รายงานโครงการวิจัย

อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย

DNA Barcoding of Pests and Natural Enemies for The Plant Protection Research in Thailand

กรมวิชาการเกษตร

หัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวยุวรินทร์ บุญทบ

Miss Yuvarin Boontop

ปี พ.ศ. 2564

รายงานโครงการวิจัย

อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย

DNA Barcoding of Pests and Natural Enemies for The Plant Protection Research in Thailand

หัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวยุวรินทร์ บุญทบ

Miss Yuvarin Boontop

ปี พ.ศ. 2564

กรมวิชาการเกษตร

คำปรารภ

ในฐานะนักวิจัยภายใต้สังกัดกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ซึ่งเป็นองค์กรที่ทำหน้าที่หลักด้านอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization; NPPO) นั้น คณะผู้วิจัยจึงเกิดความมุ่งมั่นและมีความคิดสร้างสรรค์ที่จะสร้างงานวิจัยที่จะเกิดประโยชน์สูงสุดต่อภาคการเกษตรของไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งงานวิจัยที่สามารถช่วยแก้ไขปัญหาศัตรูพืชที่สำคัญต่อการผลิตพืชในประเทศและศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดปัญหาการค้าระหว่างประเทศ

ดังนั้น **โครงการวิจัย อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย** จึงเกิดขึ้น ซึ่งเป็นงานวิจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานด้านอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ของศัตรูพืช (แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช และวัชพืช) และศัตรูธรรมชาติที่มีความสำคัญทาการเกษตร จำนวน 3 กิจกรรม (77 การทดลอง) ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงวิจัยในครั้งนี้ไม่เพียงแต่จะเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่มีคุณค่าอย่างยิ่งต่องานอารักขาพืชแล้วนั้น ผลงานที่สำเร็จลุล่วงด้วยดีนั้น ยังสามารถนำมาใช้เป็นหลักฐานอ้างอิง และเป็นข้อมูลสำคัญในภาคการเกษตรของประเทศไทยอีกด้วย

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....vi
ผู้วิจัย.....vii
บทนำ.....1
บทคัดย่อ.....3
1. กิจกรรมที่ 1 สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ.....6
1.1.1 อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Aspidiotinae (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) ในประเทศไทย.....9
1.1.2 การศึกษาอนุกรมวิธานตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera: Tephritidae) ร่วมกับการใช้เทคนิค Morphomertic ในตัวเต็มวัย.....43
1.1.3 อนุกรมวิธานเพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วง (Hemiptera: Cicadellidae) ในประเทศไทย.....73
1.1.4 อนุกรมวิธานผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo* (Lepidoptera: Crambidae, Crambinae) ในประเทศไทย.....90
1.1.5 สำรวจความหลากชนิดหอยทากบกศัตรูพืชในระบบนิเวศเกษตรและสิ่งแวดล้อม.....116
1.1.6 ศึกษาโครโมโซมและการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยศัตรูพืชวงศ์ Succineidae ในประเทศไทย.....126
1.1.7 สำรวจความหลากชนิดหอยน้ำจืดศัตรูพืชในพรรณไม้น้ำ.....134
1.1.8 ความหลากชนิดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหนูหริ่งสกุล *Mus* (Rodentia: Muridae: Murinae) ที่พบในประเทศไทย.....141
1.1.9 อนุกรมวิธานของแตนเบียนสกุล *Encarsia* (Hymenoptera:Aphelinidae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงหวี่ขาว(Hemiptera: Aleyrodidae) ในประเทศไทย.....170
1.1.10 อนุกรมวิธานของแมลงช้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ในประเทศไทย.....185
1.1.11 อนุกรมวิธานมวนตัวห้ำสกุล *Orius* (Heteroptera: Anthocoridae) ในประเทศไทย.....206
1.1.12 ชนิดของเพลี้ยอ่อน (Hemiptera: Aphididae) ในพืชผัก (วงศ์แตง กะหล่ำ พริก มะเขือ และถั่ว) ของประเทศไทย.....235
1.1.13 อนุกรมวิธานมวนสกุล *Nysius* (Hemiptera: Lygaeidae) ในประเทศไทย.....241
1.1.14 การศึกษาชนิดของตั๊กแตน (Orthoptera) ในประเทศไทย.....252
1.1.15 อนุกรมวิธานของผีเสื้อหนอนร่าน วงศ์ Limacodidae ในประเทศ.....289
1.1.16 ชนิดของแมลงหวี่ขาว (Hemiptera: Aleyrodidae)ในพืชผักสวนครัวเพื่อการส่งออกของประเทศไทย.....353

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

1.1.17 อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Diaspidinae (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) ในประเทศไทย....374
1.1.18 อนุกรมวิธานเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae (Hemiptera: Coccoidea) ในประเทศไทย....413
1.1.19 อนุกรมวิธานและความหลากชนิดของแตนเบียนไข่ของแมลงกลุ่มมวนวงศ์ Pentatomidae ศัตรูพืชสำคัญทางการเกษตรในประเทศไทย....430
1.1.20 อนุกรมวิธานของแมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae ในประเทศไทย....455
1.1.21 อนุกรมวิธานไรขาว วงศ์ Tarsonemidae ในประเทศไทย....478
1.1.22 การจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย....516
1.1.23 อนุกรมวิธาน การแพร่กระจาย พืชอาศัย ของแมลงวันหนอนชอนใบในวงศ์ Agromyzidae (Order: Diptera) ในพืชผัก....527
1.1.24 อนุกรมวิธานแมงมุมวงศ์ Oxyopidae....568
1.2.1 ศึกษาราสกุล *Phytophthora* ในเผือก....587
1.2.2 การจำแนกชนิดของราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris*....612
1.2.3 การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอม....629
1.2.4 การสำรวจ จำแนกและศึกษาอาการ Chlorotic ringspot บนกล้วยไม้ *Phalaenopsis* 644
1.2.6 การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางสัณฐานวิทยาในไม้ประดับส่งออก....652
1.2.7 การจำแนกไส้เดือนฝอยรากแผล (*Pratylenchus* spp.) ในแหล่งปลูกหอมแดงด้วยวิธีอณูชีววิทยา....664
1.2.8 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ไอโซเลตไทย....678
1.2.9 การทวนสอบแนวทางการจำแนกชนิดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองด้วยวิธีอณูชีววิทยากับไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย....684
1.2.10 การศึกษาและจำแนกโรค Leek yellow stripe virus (LYSV) ในกระเทียม....696
1.2.11 ศึกษาชนิดและเขตการแพร่กระจายของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก....704

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

1.2.13 อนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของเชื้อรา Cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช.....716
1.2.14 อนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืช.....756
1.2.15 การจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางชีวโมเลกุล.....789
1.2.16 การศึกษาและจำแนกเชื้อไวรัสสาเหตุโรคของยาสูบที่พบในประเทศไทย.....805
2. กิจกรรมที่ 2 ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ของศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติ (วงจรชีวิต การเข้าทำลายพืชอาหาร และการแพร่กระจาย).....811
2.1.1 ชีวประวัติและลักษณะทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งมะละกอ; *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink (Hemiptera: Pseudococcidae) ในประเทศไทย.....813
2.1.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อชีววิทยาและนิเวศวิทยาของแตนเบียนไข่ *Trichogramma confusum*.....829
2.1.3 ชีววิทยาและเขตการแพร่กระจายของไรแดงมันสำปะหลัง *Oligonychus biharensis* (Hirst).....837
2.1.4 ชีววิทยาและพลวัตประชากรของหอยศัตรูพืชสกุล *Succinea*.....849
2.1.5 ชีววิทยา วงจรชีวิต และการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Indoplanorbis* 857
2.1.6 ชีววิทยา การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Radix* 868
2.1.7 ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ฤดูการระบาด ของหนอนแดงในฝรั่ง และพุทรา.....897
2.1.8 ศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa* (Fabricius).....888
2.1.9 ศึกษาชนิด ชีววิทยา และการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยน้ำศัตรูพืช สกุล *Physella*.....906
2.1.10 สัณฐานวิทยาและชีววิทยาของเพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch (Hemiptera: Aphididae) ในประเทศไทย.....912
2.2.1 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phyllosticta citriasiana* 927
2.2.2 การศึกษาพืชอาศัย และเขตการแพร่กระจายของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชในประเทศไทย 956
2.2.3 ชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า.....977

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.2.4 การศึกษาสาเหตุและการถ่ายทอดอาการใบหงิกของส้มโอ.....990
2.2.5 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Curvularia eragrostidis* และ รา *C. oryzae*.....1002
2.2.6 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา Neoscytalidium *dimidiatum* Crous & Slippers and Gruyter 1029
การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาและชีวโมเลกุลของเชื้อ Pepper vein yellows virus (PeVYV) ที่เข้าทำลายพริกในประเทศไทย.....1058
2.2.8 การจำแนกชนิดเชื้อ *Crinivirus* ของพืชตระกูลแตงในประเทศไทย.....1070
2.3.1 ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของหญ้าตีนกาใหญ่ (*Acrachne racemosa* (Heyne ex Roth) Ohwi) 1080
2.3.2 ชีววิทยา และนิเวศวิทยาของลูกใต้ใบใบใหญ่ (*Phyllanthus caroliniensis* Walter).....1094
2.3.3 ชีววิทยาของวัชพืช *Asystasia gangetica* (L.) Anderson subsp. *micarantha* (Nees.) Ensermu.....1106
2.3.4 ชีววิทยา และนิเวศวิทยาของกระดุมใบใหญ่(*Borreria latifolia* (Aubl), Schum.).....1117
2.3.5 ชีววิทยาของเทียนนา (*Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Excell.).....1127
3. กิจกรรมที่ 3 การจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด.....1144
3.1 การจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* (Hendel) complex (Diptera:Tephritidae) ด้วยลักษณะทางพันธุกรรมในประเทศไทย.....1145
3.2 การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในกล้วยไม้ในเขตภาคกลางของประเทศไทย.....1163
3.3 การสำรวจโรคและจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา Cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช.....1179
3.4 การสำรวจโรคและจัดทำรหัสดีเอ็นเอบาร์โค้ดของราสนิมสาเหตุโรคพืช.....1199
3.5 การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา Alternaria สาเหตุโรคพืช.....1217
3.6 การตรวจวินิจฉัยชนิดของแตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae (Platygastridae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล.....1229
3.7 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกชนิดแมงมุมแม่หม้ายสกุล *Latrodectus* ในประเทศไทย.....1243
3.8 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจัดจำแนกเชื้อรา *Beauveria bassiana*.....1263

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.9 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา *Trichoderma asperellum T. harzianum* และ *T. viride*.....1278

3.10 การประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* spp. ที่เป็นศัตรูพืชกักกันแบบรวดเร็ว.....1312

3.11 การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนกชนิดเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera (Thysanoptera: Tubulifera) ในประเทศไทย.....1341

3.12 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา *Chaetomium cupreum* และ *C. globosum*.....1360

3.13 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกแมงมุมวงศ์ Salticidae 1387

3.14 การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Curvularia* สาเหตุโรคพืช.....1420

3.15 การศึกษาชนิดแมลงวันผลไม้เผ่า (Tribe) Dacini (Diptera: Tephritidae) ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด.....1442

3.16 การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย.....1463

บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....1481

บรรณานุกรม.....1509

ภาคผนวก.....1593

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน เริ่มดำเนินการปีงบประมาณ 2560 และ สิ้นสุด 2564 รวม 5 ปี กรมวิชาการเกษตรในฐานะองค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization; NPPO) ของประเทศไทยมีบทบาทหน้าที่ดำเนินการวิจัยและศึกษาชนิดศัตรูพืช เพื่อให้ได้ข้อมูลศัตรูพืชที่ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล สามารถนำผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยในครั้งนี้ไปใช้สนับสนุนงานด้านการอารักขาพืชและแก้ปัญหาศัตรูพืชในประเทศไทย เพิ่มความเชื่อมั่นและสร้างความน่าเชื่อถือในการเจรจาต่อรองเพื่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรของไทยไปสู่ตลาดโลก เกิดการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทยอย่างยั่งยืน

ความสำเร็จจากการดำเนินการทดลองต่าง ๆ ภายใต้โครงการวิจัยในครั้งนี้ เกิดขึ้นจากความอุตสาหะ และตั้งใจทำงานของนักวิจัยทุก ๆ ท่าน ส่งผลให้การทดลองต่าง ๆ สำเร็จ ลุล่วงด้วยดี ก่อให้เกิดประโยชน์ต่องานด้านอารักพืชเป็นอย่างยิ่ง นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้จัดสรรงบประมาณเพื่อสนับสนุนโครงการวิจัยครั้งนี้ และกรมวิชาการเกษตร ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัย ทั้งครุภัณฑ์ทางด้านวิทยาศาสตร์และสาธารณูปโภคตลอดในการดำเนินการวิจัยจนลุล่วงด้วยดี รวมทั้งคณะผู้ทรงคุณวุฒิและผู้เชี่ยวชาญทุกท่าน ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่าในการให้ข้อเสนอแนะ แนวทางปรับปรุงแก้ไข และข้อคิดเห็นที่ก่อประโยชน์จนสามารถดำเนินงานได้ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

ยุวรินทร์ บุญทบ และคณะ

มกราคม 2565

กรมวิชาการเกษตร

ผู้วิจัย

นางสาวยุวรินทร์ บุญทบ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าโครงการ
นายจารุวัตถ์ แต้กุล	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวสุนัดดา เชาวลิต	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวชมัยพร บัวมาศ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นายอิทธิพล บรรณาการ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นายอาทิตย์ รักกสิกร	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวจอมสุรางค์ ดวงธิสาร	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวพลอยชมพู กรวิภาสเรือง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาววิมลวรรณ โชติวงศ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวพัชรีวรรณ จงจิตเมตต์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวดาราพร รินทะรักษ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นายวิชาญ วรรธนะไกวัล	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นายอภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวอมรรัชฎ์ คิดใจเดียว	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวชนินทร ดวงสอาด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวธารทิพย ภาสบุตร	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวทิพวรรณ กันหาญาติ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นายสิทธิศักดิ์ แสไพศาล	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวธิติยา สารพัฒน์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นายไตรเดช ข่ายทอง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวเยาวภา ตันติวานิช	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นายภูวนารถ มณีโชติ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นายอภิรัชต์ สมฤทธิ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวนงนุช ช่างสี	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวอัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวสัญญาณี ศรีคชา	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

นางสาวกรกต ดำรักษ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นายแสนชัย คำหล้า	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางอัณศยา พรมมา	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวธัญชนก จงรักไทย	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวจรัญญา ปิ่นสุภา	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นายเมธาสิทธิ์ คนการ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	หัวหน้าการทดลอง
นายนพรัตน์ บัวหอม	สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร	หัวหน้าการทดลอง
นายพิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวศิริพร ซึงสนธิพร	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นายปราสาททอง พรหมเกิด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวชลธิชา รักใคร่	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นายสิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นายณพชรกร ธไภษัชย์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวอทิติยา แก้วประดิษฐ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นายวีระชัย สมศรี	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นางรจนา ไวยเจริญ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นางณัฏฐิณี ศิริมาจันทร์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นางประภัสสร เชยคำแหง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวหทัยภัทร เจษฎารมย์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวบูรณี พั่ววงษ์แพทย์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวรุ่งนภา ทองเครึง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวกาญจนา ศรีไม้	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นายวีรกรณ์ แสงไสย	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาววาสนา รุ่งสว่าง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นายรัชชัย ประดับวงศ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวอุณากุล จันทร์ภู่	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นายสมเกียรติ กล้าแข็ง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวณัฐฐิญา กาญจนนิธิพัฒน์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นายศุภกร วงศ์เรืองพิบูล	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย

กรมวิชาการเกษตร

นายทรงทัพ แก้วตา	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาววิไล อินทรเจริญสุข	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นายเอกรัตน์ ธนูทอง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวกาญจนา วาระวิชะนี	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวสุทธินี ลิขิตตระกูลรุ่ง	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาววิจิตรา โชคบุญ	สำนักวิจัยและพัฒนาการการเกษตรเขตที่ 6	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	ผู้ร่วมวิจัย
นางช่อทิพย์ ศัลยพงษ์	สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร	ผู้ร่วมวิจัย
นายมนตรี ธนรส	สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร	ผู้ร่วมวิจัย
นายคมสัน หงภัทรคีรี	ศูนย์ศึกษาเรียนรู้ระบบนิเวศป่าชายเลนสิรินาถราชินี	ผู้ร่วมวิจัย

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

กรมวิชาการเกษตรในฐานะที่เป็นองค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization; NPPO) ได้ดำเนินงานวิจัยด้านการจัดจำแนกชนิดและศึกษาอนุกรมวิธาน ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของศัตรูพืช (แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช และวัชพืช) และศัตรูธรรมชาติมาอย่างต่อเนื่อง เพื่อแก้ไขปัญหาศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดปัญหาจากการผลิตพืชในประเทศและปัญหาการค้าระหว่างประเทศ โดยในปีงบประมาณ 2559-2564 ได้จัดทำข้อเสนอโครงการวิจัย อนุกรมวิธาน ชีววิทยาและ การจำแนกชนิดโดย ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย ซึ่งเป็นโครงการวิจัยใหม่ โดยศัตรูพืชที่ดำเนินการทดลองในโครงการเป็นศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย นอกจากสร้างความเสียหายให้แก่พืชเศรษฐกิจหลักหลายชนิดแล้วยังมีสร้างความเสียหายในแง่การนำเข้าส่งออกสินค้าเกษตร โดยได้สรุปประเด็นปัญหาหลักที่สำคัญในการวิจัยของโครงการไว้ดังนี้

1) ปัจจุบันศัตรูพืชหลายชนิดยังไม่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์ หรือการวินิจฉัยชนิดที่ไม่ถูกต้อง จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาชนิดที่ถูกต้อง ทันสมัย เพื่อหาสาเหตุที่แน่ชัดว่าศัตรูพืชชนิดใดสร้างความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตร ข้อมูลเหล่านี้นอกจากจะมีความสำคัญอย่างยิ่งในการหาแนวทางการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพแล้วยังเป็นข้อมูลสำคัญในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช สำหรับการเปิดตลาดสินค้าเกษตรและการเจรจาการค้าระหว่างประเทศ

2) ขาดความรู้ความเข้าใจในเรื่องชีววิทยา นิเวศวิทยา ของศัตรูพืช และข้อมูลชีววิทยาหรือข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบันไม่ได้รับการปรับปรุงมาเป็นเวลานาน เป็นหนึ่งในสาเหตุที่สำคัญของการป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ไม่มีประสิทธิภาพ จำเป็นที่ต้องศึกษาชีววิทยาของศัตรูพืช เพื่อให้ได้ข้อมูล วงจรชีวิต ลักษณะการเข้าทำลาย พืชอาศัย ช่วงฤดูการระบาด หรือแม้แต่ช่วงแสงอุณหภูมิความชื้นที่เหมาะสมต่อการระบาดของศัตรูพืช ซึ่งข้อมูลดังกล่าวเป็นข้อมูลที่จำเป็นในการหาแนวทางป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพสูงสุด

3) แนวทางการวินิจฉัยชนิดของศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติในบางกลุ่มหรือบางชนิดไม่สามารถใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่ เนื่องจากศัตรูพืชหลายชนิดที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันมาก ทำให้เกิดความสับสนในการจำแนกชนิด จึงมีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลเช่น ดีเอ็นเอบาร์โค้ด มาใช้ในวินิจฉัยชนิดเพื่อให้ได้ชนิดที่ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล

ดังนั้นกรมวิชาการเกษตรซึ่งทำหน้าที่เป็นองค์กรอารักขาพืชแห่งชาติจำเป็นอย่างยิ่งต้องมีข้อมูลศัตรูพืชในประเทศไทย โดยเฉพาะข้อมูลด้านอนุกรมวิธาน ชีววิทยาของศัตรูพืชซึ่งเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เชื่อถือได้มากที่สุด เพื่อใช้ในอ้างอิงสำหรับการค้าระหว่างประเทศและสนับสนุนงานด้านกักกันพืช โดยเฉพาะการนำข้อมูลทั้งหมดไปจัดทำข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืช ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญที่ต้องส่งให้ประเทศคู่ค้าได้นำไปพิจารณาก่อนนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศไทย ในขณะเดียวกันก็ใช้เป็นข้อมูลสำคัญของประเทศ สำหรับเปรียบเทียบกับข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืชของประเทศคู่ค้าที่ส่งมา เพื่อประกอบในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ก่อนนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศคู่ค้า รวมทั้งยังเป็นประโยชน์ในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืชกักกัน เพื่อการควบคุมศัตรูพืชจากต่างประเทศไม่ให้เข้ามา

กรมวิชาการเกษตร

แพร่กระจายในประเทศและใช้เป็นประโยชน์เพื่อการเจรจาตอบโต้กับประเทศคู่ค้าที่ใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช มาเป็นเงื่อนไขในการกีดกันทางการค้า

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานให้ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน พร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่ทำการศึกษาวิจัยในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับอ้างอิงข้อมูลศัตรูพืชของประเทศไทย

2) เพื่อศึกษาชีววิทยา พืชอาศัย เขตการแพร่กระจายของศัตรูพืชและนิเวศวิทยาของศัตรูพืชของศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติ เพื่อเป็นข้อมูลในการหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม และเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญเพื่อประกอบการพิจารณาในการแก้ไขปัญหาการค้าระหว่างประเทศทั้งในด้านการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร

3) เพื่อศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ และรวบรวมเป็นระบบ สามารถสืบค้น อ้างอิงและใช้ในการตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติได้ อย่างรวดเร็วและถูกต้อง

ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 3 กิจกรรม ดังต่อไปนี้

กิจกรรมที่ 1 ชนิดและอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ โดยเป็นการศึกษาอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ โดยศึกษาลักษณะที่สำคัญของศัตรูพืช ศัตรูธรรมชาติ เพื่อนำไปใช้ในการจำแนกชนิดศัตรูพืชในระดับต่างๆ ตามระบบอนุกรมวิธาน ประกอบด้วย

กิจกรรมย่อย 1.1 ชนิดและอนุกรมวิธานของแมลง ไร สัตว์ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมย่อย 1.2 ชนิดและอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชและจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช

กิจกรรมที่ 2 ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยาของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ โดยศึกษาวิจัยในศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ทั้งนี้แต่ละการทดลองดำเนินการทดลองในเขตพื้นที่สำคัญทางการเกษตรหรือพื้นที่ใกล้เคียงระบบนิเวศเกษตรในประเทศไทย ประกอบด้วย

กิจกรรมย่อย 2.1 ชีววิทยา นิเวศวิทยาของแมลง ไร และสัตว์ศัตรูพืช

กิจกรรมย่อย 2.2 ชีววิทยา นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช

กิจกรรมย่อย 2.3 ชีววิทยา นิเวศวิทยาของวัชพืช

กิจกรรมที่ 3 การจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เป็นการศึกษาวิธีการสมัยใหม่อาศัยหลักการชีววิทยาโมเลกุลในการจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติให้ชนิดที่ถูกต้องแม่นยำโดยเฉพาะในศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่มีสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก (cryptic species) และอยู่ในกลุ่ม species complex ทำให้ไม่สามารถจัดจำแนกด้วยวิธีสัณฐานวิทยาได้

กรมวิชาการเกษตร

กรอบแนวความคิด ความเชื่อมโยงของโครงการวิจัยและการนำไปใช้ประโยชน์

โครงการ	**อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย**
ปัญหา	1) ศัตรูพืชบางชนิดยังไม่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์และข้อมูลทางชีววิทยา ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน 2) การวินิจฉัยชนิดที่ไม่ถูกต้องและการขาดความรู้ความเข้าใจในเรื่องชีววิทยา นิเวศวิทยา ของศัตรูพืชนั้นๆ เป็นสาเหตุหลักที่สำคัญของการป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ไม่มีประสิทธิภาพ 3) การวินิจฉัยชนิดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่มีลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันไม่สามารถตรวจวินิจฉัยชนิดได้โดยง่าย
เป้าหมาย	เกษตรกร เอกชน และหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง สามารถนำเทคโนโลยี ระบบการผลิตพืช ไปใช้ประโยชน์ ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืช มีความมั่นคงด้านอาหารและพลังงานอย่างยั่งยืน
กลยุทธ์	**การวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช** → **ถ่ายทอดเทคโนโลยี**
แนวทาง	-ศึกษาอนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศวิทยาของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ -จัดจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ถ่ายทอดเทคโนโลยี องค์ความรู้ ฐานข้อมูลสู่นักวิชาการ นักวิจัย เกษตรกร ชุมชน ทั้งภาครัฐและเอกชน
ผลสัมฤทธิ์	เพิ่มศักยภาพของฐานข้อมูลศัตรูพืช ศัตรูธรรมชาติในประเทศไทย ให้ถูกต้อง แม่นยำ และเป็นปัจจุบัน เพื่อนำไปใช้ในการหาแนวทางป้องกันกำจัดที่ถูกต้อง เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ รวมทั้งเป็นข้อมูลสำคัญในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช สำหรับเปิดตลาดสินค้าเกษตร และการเจรจาการค้าระหว่างประเทศ
ผลผลิต (Output)	ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน (validation) แต่ละชนิดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ได้ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (sequences) และ ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติทั้งเป็นข้อมูลเพื่ออ้างอิงและใช้ในการทดลองด้านความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมหรือ phylogeny เข้าใจลักษณะการทำลายพืชแมลงอาศัยหรือเหยื่อของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ รวมถึงอุณหภูมิและสภาพที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายของศัตรูพืช จัดทำคู่มือวินิจฉัย (key)
ผลลัพธ์ (Outcome)	1. ได้แนวทางการวินิจฉัย (Key) ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่ทำการศึกษาวิจัยในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับอ้างอิงข้อมูลศัตรูพืชของประเทศไทย 2. ได้ลชีววิทยา (พืชอาศัย เขตการแพร่กระจายของศัตรูพืชและนิเวศวิทยาของศัตรูพืช) ของศัตรูพืช (แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช วัชพืช) และศัตรูธรรมชาติ เพื่อเป็นข้อมูลในการหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม และเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญเพื่อประกอบการพิจารณาในการแก้ไขปัญหาการค้าระหว่างประเทศทั้งในด้านการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร 3. ได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ และรวบรวมเป็นระบบ สามารถสืบค้น อ้างอิงและใช้ในการตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติได้ อย่างรวดเร็วและถูกต้อง
ผลกระทบ (Impact)	ผู้ที่นำผลงานไปใช้ประโยชน์โดยนำแนวทางการวินิจฉัย (dichotomous Key) ข้อมูลชีววิทยาเบื้องต้น เขตการแพร่กระจายของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติรวบรวมเป็นข้อมูลในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพช่วยให้สามารถแก้ไขปัญหาศัตรูพืชได้ตรงประเด็น

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

ศัตรูพืช (แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช และวัชพืช) เป็นปัญหาสำคัญต่อการเกษตร ปัจจุบันพบว่ามีศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่สามารถระบุชนิดก่อให้เกิดปัญหาตามมาจำนวนมาก โครงการวิจัยนี้ ดำเนินงานระหว่างปี 2560-2564 มีวัตถุประสงค์ (1) เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานให้ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน พร้อมแนวทางการวินิจฉัย (2) เพื่อศึกษาชีววิทยา (พืชอาศัย เขตการแพร่กระจายของศัตรูพืชและนิเวศวิทยา) (3) เพื่อศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด ของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ โครงการวิจัยนี้ประกอบด้วย 3 กิจกรรม (77 การทดลอง) ได้แก่

กิจกรรมที่ 1 ชนิดและอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ประกอบด้วย 38 การทดลอง ทำให้ทราบชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน พืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย และแนวทางวินิจฉัยชนิด ศัตรูพืช ได้แก่ เพลี้ยหอยเกล็ด เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วง มวนสกุล *Nysius* ผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo* ผีเสื้อหนอนร่าน ตั๊กแตน แมลงวันผลไม้ในเผ่า Dacini แมลงวันหนอนชอนวงศ์ Agromyzidae หอยทากบกศัตรูพืช หอยน้ำจืดศัตรูพืช หนูหริ่ง ไรขาววงศ์ Tarsonemidae แมงมุมวงศ์ Oxyopidae ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ราสกุล *Phytophthora* ในเผือก รา *Curvularia* spp. และ *Bipolaris* spp. เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. สาเหตุโรคใบแห้งของหอม รา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ไวรัสสาเหตุโรค chlorotic ringspot กล้วยไม้ เชื้อไวรัส LYSV ในกระเทียม โรคไวรัสในยาสูบ ไส้เดือนฝอยสาเหตุโรคพืชสกุล *Radopholus* ไส้เดือนฝอยรากแผล ศัตรูธรรมชาติ ได้แก่ แตนเบียนสกุล *Encarsia* แตนเบียนไข่มวน มวนตัวห้ำสกุล *Orius* แมลงช้าง วงศ์ Chrysopidae, Hemerobiidae และ Coniopterygidae

กิจกรรมที่ 2 ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยาของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ จำนวน 23 การทดลอง ได้ชีววิทยา (พืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย นิเวศวิทยา) ของศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติ ได้แก่ ศัตรูพืช เพลี้ยแป้งมะละกอ *P. marginatus* เพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* หนอนแดงในฝรั่ง และพุทรา แมลงวันผลไม้ *B. umbrosa* ไรแดง *O. biharensis* หอยซัคซีเนีย หอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Indoplanorbis* และ *Physella* รา *Phyllosticta citriasiana*, *Fusarium oxysporum*, *Curvularia eragrostidis*, *C. Oryzae* และ *Neoscytalidium dimidiatum* โรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า ใบหงิกในพืชตะกูลส้ม โรคเส้นใบเหลืองจากเชื้อ PeVYV CYSDV และ CCYV หญ้าตีนกาใหญ่ ลูกใต้ใบใบใหญ่ บาหยา กระดุมใบใหญ่ และเทียนนา แมลงศัตรูธรรมชาติ แตนเบียนไข่ไตรโคแกรมมา

กิจกรรมที่ 3 การจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ จำนวน 16 การทดลอง ทำให้ได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ประกอบด้วย ศัตรูพืช แมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex แมลงวันผลไม้เผ่า Dacini เพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae, Tubulifera วงศ์ Thripidae ที่พบในหน่อไม้ฝรั่ง มอดแป้งสกุล *Tribolium* แตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae แมงมุมสกุล *Latrodectus* วงศ์ Salticidae รา cercosporoid ราสนิมสาเหตุโรคพืช ราสกุล*Trichoderma* spp. เชื้อรา *Chaetomium* spp. และเชื้อรา *Curvularia*

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยในครั้งนี้ ไปจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชและเอกสารวิชาการ คู่มือของศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติที่มีความสำคัญในประเทศไทย เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับอ้างอิงข้อมูล และใช้ในการ

กรมวิชาการเกษตร

ตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติได้ อย่างรวดเร็ว และถูกต้อง เพื่อเป็นแนวทางการป้องการกำจัดให้ถูกวิธี และเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาแก้ไขปัญหาการค้าระหว่างประเทศ ก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อภาคการเกษตรของประเทศไทยอย่างยั่งยืน

คำสำคัญ: อนุกรมวิธาน ชีววิทยา ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ศัตรูพืช

Abstarct

Pests (insects, mites, other animal pests, plant diseases and weeds) are important problems for agriculture. Currently, many pests cannot be identified and this problem cascades into other disciplines. The present research project spans the 2017-2021 period. Its objectives have been: (1) taxonomic study to obtain accurate and up-to-date scientific names of pests and natural enemies and diagnostic guidelines; (2) to study the biology (host plants, distribution and ecology) of pests; and (3) to obtain and study DNA barcodes of pests and natural enemies. This research project consisted of 3 broad activities, comprising a total of 77 individual projects ('experiments'):

Activity 1: **Species and taxonomy of pests and natural enemies.** This activity consisted of 38 experiments to identify pests and natural enemies and update their scientific names. Pests comprised diaspidid scales, aphids, whiteflies, mango leafhopper, *Nysius*, *Chilo* moths, caterpillars of various moths, locusts, Dacini fruit flies, agromyzid leaf miners, land snails, freshwater mollusks, *Mus* rats, white mites, Tarsonemidae, spiders, *Phytophthora*, *Curvularia* spp., *Bipolaris* spp., *Xanthomonas* sp., fungi causing *Anthracnose*, viruses that cause chlorotic, ringspot disease in orchids, LYSV virus in garlic, viral diseases in tobacco, and *Radopholus* nematodes and root wound nematodes. Natural enemies comprised: *Encarsia* parasitoids, *Orius*, Neuroptera in families Chrysopidae, Hemerobiidae and Coniopterygidae.

Activity 2: **Biological and ecological study of pests and natural enemies.** A total of 23 experiments obtained information on the biology (host plants and distribution) of pests and natural enemies. Pests included: papaya mealybug (*Paracoccus marginatus*), bean aphid (*Aphis craccivora*), guava and jujube worm, the fruit fly *Bactrocera umbrosa*, cassava red mite (*Oligonychus biharensis*), succulent snails, snails of the genus. *Indoplanorbis* and *Physella, Phyllosticta citriasiana*, *Fusarium oxysporum*, *Curvularia eragrostidis, Curvularia oryzae* and *Neoscytalidium dimidiatum*, Mokara leaf spot, curled leaves in citrus plants, Yellow vein disease caused by PeVYV, CYSDV and CCYV viruses,

กรมวิชาการเกษตร

and the weeds, *Acrachne racemose, Phyllanthus caroliniensis*, *Asystasia gangetica*, *Spermacoce alata* and *Ludwigia hyssopifolia.* Natural enemies: *Trichogramma*.

Activity 3: **Identification of pests and natural enemies using DNA barcodes**. A total of 16 experiments derived barcodes for pests, including Dacini fruit flies, thrips (subfamily Thripinae, Tubulifera and Thripidae), *Tribolium* weevils, spiders in the family Salticidae and the genus *Latrodectus*, cercosporoid fungi, rust fungi that cause plant diseases, *Trichoderma* spp., *Chaetomium* spp. and *Curvularia*. Natural enemies belonging to the Telenominae,The results obtained from this research project are used to prepare pest lists, academic documents, and handbooks to pests and natural enemies important in Thailand. The project provides scientific evidence on pest status, reference data and enables timely and accurate diagnostics of pests and natural enemies. The results from this research project also provide guidelines for pest control. The project supports strategic decision-making to solve international trade problems and thus creates broad, sustainable benefits for the agricultural sector of Thailand.

Key words: Taxonomy, Biology, DNA barcode, Pest

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 1 สำรวจชนิดและอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

ประกอบด้วย 2 กิจกรรมย่อย จำนวน 38 การทดลอง ดังนี้

<u>กิจกรรมย่อยที่ 1.1 สำรวจชนิดและอนุกรมวิธานของแมลง ไร สัตว์ ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ</u>

การทดลองที่ 1.1.1 อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Aspidiotinae (Hemiptera:Coccoidea: Diaspididae) ในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.2 การศึกษาอนุกรมวิธานตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera:Tephritidae) ร่วมกับการใช้เทคนิค Morphomertic ในตัวเต็มวัย

การทดลองที่ 1.1.3 อนุกรมวิธานเพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วง (Hemiptera: Cicadellidae) ในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.4 อนุกรมวิธานผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo* (Lepidoptera: Crambidae, Crambinae) ในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.5 สำรวจความหลากชนิดหอยทากบกศัตรูพืชในระบบนิเวศเกษตรและสิ่งแวดล้อม

การทดลองที่ 1.1.6 ศึกษาโครโมโซมและการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยศัตรูพืชวงศ์ Succineidae ในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.7 สำรวจความหลากชนิดหอยน้ำจืดศัตรูพืชในพรรณไม้น้ำ

การทดลองที่ 1.1.8 ความหลากชนิดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหนูหริ่งสกุล *Mus* (Rodentia: Muridae: Murinae) ที่พบในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.9 อนุกรมวิธานของแตนเบียนสกุล *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงหวี่ขาว (Hemiptera: Aleyrodidae) ในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.10 อนุกรมวิธานของแมลงช้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.11 อนุกรมวิธานมวนตัวห้ำสกุล *Orius* (Heteroptera: Anthocoridae) ในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.12 ชนิดของเพลี้ยอ่อน (Hemiptera: Aphididae) ในพืชผัก (วงศ์แตง กะหล่ำ พริก มะเขือ และถั่ว) ของประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.13 อนุกรมวิธานมวนสกุล *Nysius* (Hemiptera: Lygaeidae) ในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.14 การศึกษาชนิดของตั๊กแตน (Orthoptera) ในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.15 อนุกรมวิธานของผีเสื้อหนอนร่าน วงศ์ Limacodidae ในประเทศ

การทดลองที่ 1.1.16 ชนิดของแมลงหวี่ขาว (Hemiptera: Aleyrodidae) ในพืชผักสวนครัวเพื่อการส่งออกของประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.17 อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Diaspidinae (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae)ในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.18 อนุกรมวิธานเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae (Hemiptera: Coccoidea) ในประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.19 อนุกรมวิธานและความหลากชนิดของแตนเบียนไข่ของแมลงกลุ่มมวนวงศ์ Pentatomidae ศัตรูพืชสำคัญทางการเกษตรในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.20 อนุกรมวิธานของแมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae ในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.21 อนุกรมวิธานไรขาว วงศ์ Tarsonemidae ในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.22 การจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.23 อนุกรมวิธาน การแพร่กระจาย พืชอาศัย ของแมลงวันหนอนชอนใบในวงศ์ Agromyzidae (Order: Diptera) ในพืชผัก

การทดลองที่ 1.1.24 อนุกรมวิธานแมงมุมวงศ์ Oxyopidae

<u>กิจกรรมย่อยที่ 1.2 สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชและจุลินทรีย์ควบคุมโรค</u>

การทดลองที่ 1.2.1 ศึกษาราสกุล *Phytophthora* ในเผือก

การทดลองที่ 1.2.2 การจำแนกชนิดของราสกุล *Curvularia และ Bipolaris*

การทดลองที่ 1.2.3 การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอม

การทดลองที่ 1.2.4 การสำรวจ จำแนกและศึกษาอาการ Chlorotic ringspot บนกล้วยไม้ *Phalaenopsis*

การทดลองที่ 1.2.6 การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางสัณฐานวิทยาในไม้ประดับส่งออก

การทดลองที่ 1.2.7 การจำแนกไส้เดือนฝอยรากแผล (*Pratylenchus* spp.) ในแหล่งปลูกหอมแดงด้วยวิธีอณูชีววิทยา

การทดลองที่ 1.2.8 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ไอโซเลตไทย

การทดลองที่ 1.2.9 การทวนสอบแนวทางการจำแนกชนิดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองด้วยวิธีอณูชีววิทยากับไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.2.10 การศึกษาและจำแนกโรค *Leek yellow stripe virus* (LYSV) ในกระเทียม

การทดลองที่ 1.2.11 ศึกษาชนิดและเขตการแพร่กระจายของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

การทดลองที่ 1.2.13 อนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของเชื้อรา Cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช

การทดลองที่ 1.2.14 อนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืช

การทดลองที่ 1.2.15 การจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางชีวโมเลกุล

การทดลองที่ 1.2.16 การศึกษาและจำแนกเชื้อไวรัสสาเหตุโรคของยาสูบ ที่พบในประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.1. อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Aspidiotinae (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) ในประเทศไทย

Taxonomy of Armored Scale in the Subfamily Aspidiotinae (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) of Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ชมัยพร บัวมาศ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ยุวรินทร์ บุญทบ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Aspidiotinae ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2562 เพื่อทราบชนิด พืชอาศัย เขตการแพร่กระจายของเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Aspidiotinae ที่มีอยู่ในประเทศไทย โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในพื้นที่เขตภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช พบเพลี้ยหอยเกล็ด ในวงศ์ย่อย Aspidiotinae ทั้งสิ้น 7 สกุล รวม 12 ชนิด ได้แก่ 1) เพลี้ยหอยเกล็ดแดงแคลิฟอร์เนีย *Aonidiella aurantii* (Maskell) 2) เพลี้ยหอยเกล็ดเหลืองเทียม *Aonidiella comperei* Mckenzie 3) เพลี้ยหอยเกล็ดออเรนทัล *Aonidiella orientalis* (Newstead) 4) เพลี้ยหอยเกล็ดมะพร้าว *Aspidiotus destructor* Signoret 5) เพลี้ยหอยเกล็ดขิง *Aspidiella hartii* (Cockerell) 6) เพลี้ยหอยเกล็ดมอร์แกน *Chrysomphalus dictyospermi* (Morgan) 7) เพลี้ยหอยเกล็ด *Chrysomphalus* sp. Ferris 8) เพลี้ยหอยเกล็ดลาทิเนีย *Hemiberlesia lataniae* (Signoret) 9) เพลี้ยหอยเกล็ดปาล์ม *Hemiberlisia palmae* (Cockerell) 10) เพลี้ยหอยเกล็ดฟลอริดาน่า *Lindingaspis floridana* Ferris 11) เพลี้ยหอยเกล็ดไตรโลไบท์ *Pseudaonidia trilobitiformis* (Green) และ 12) เพลี้ยหอยเกล็ด *Pseudaonidia* sp. เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ใช้เฉพาะลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัยเพศเมียในการจำแนกชนิดเท่านั้นและบางชนิดมีจำนวนตัวอย่างน้อยทำให้ยังไม่สามารถระบุชนิดได้เนื่องจากมีความใกล้เคียงกับชนิดอื่น ๆ ที่พบในสกุลเดียวกัน เพื่อความถูกต้องและแม่นยำควรมีการศึกษาวิจัยด้านชีวโมลกุลเพื่อตรวจสอบเพิ่มเติม

คำสำคัญ: อนุกรมวิธาน เพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ย่อย Aspidiotinae ประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Taxonomic study of Aspidiotinae was conducted from October 2016 to September 2019. Survey and specimen collecting were carried out from various agricultural crops across Thailand. The descriptions of the species found, host plants, distribution as well as generic key to species are presented. The total of seven genera and twelve identified species are revealed ; 1) *Aonidiella aurantii* (Maskell) 2) *Aonidiella comperei* Mckenzie 3) *Aonidiella orientalis* (Newstead) 4) *Aspidiotus destructor* Signoret 5) *Aspidiella hartii* (Cockerell) 6) *Chrysomphalus dictyospermi* (Morgan) 7) *Chrysomphalus* sp. 8) *Hemiberlesia lataniae* (Signoret) 9) *Hemiberlisia palmae* (Cockerell) 10) *Lindingaspis floridana* Ferris 11) *Pseudaonidia trilobitiformis* (Green) and 12) *Pseudaonidia* sp. On the other hand, this study has provided a morphological identification guide for adult female only, a few sample in some species is needed further molecular analysis to clarify the distinction species.

Key words: taxonomic study, armored scale, Aspidiotinae, Thailand

คำนำ

เพลี้ยหอยเกล็ด (armored scale) วงศ์ย่อย (subfamily) Aspidiotinae จัดอยู่ในวงศ์ Diaspididae ซึ่งสามารถแบ่งได้หลายวงศ์ย่อย และมีความหลากหลายค่อนข้างสูง ทั่วโลกมีรายงานจำนวนชนิดมากถึง 2,413 ชนิด คิดเป็น 1 ใน 3 ของจำนวนชนิดเพลี้ยหอย เพลี้ยแป้งที่จัดอยู่ในวงศ์ใหญ่ (superfamily) Coccoidea อันดับ Hemiptera (Ben-Dov *et.al*, 2014) แมลงกลุ่มนี้จัดเป็นแมลงปากดูด ที่สามารถสร้างความเสียหายให้กับพืชได้หลายชนิด ทั้งพืชสวน และพืชไร่ โดยดูดน้ำเลี้ยงจากส่วนต่าง ๆ ของพืช ทำให้บริเวณที่ถูกทำลายมีลักษณะผิดปกติ เช่น จุดเหลืองตามผิวใบ ลำต้น กิ่งแห้งตาย Ben-Dov *et.al*, (2014) รายงานเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อยนี้ ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีมากกว่า 15 สกุล 100 ชนิด เช่น สกุล *Aonidiella, Pseudaonidia, Diaspidiotus Lindingaspis* และ *Aspidiotus* ซึ่งเพลี้ยหอยเกล็ดเหล่านี้ล้วนแต่เป็นศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจ ทั้งไม้ผล พืชไร่ และไม้ดอก สำหรับในประเทศไทยพบเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Aspidiotinae เป็นศัตรูที่สำคัญในพืชตระกูลส้ม และมะพร้าว เป็นต้น (บุปผา และ ชลิดา, 2543) ซึ่งมีรายงานไว้เพียง 3 ชนิดเท่านั้น และเป็นข้อมูลที่ไม่ได้มีการปรับปรุง มากกว่า 10 ปี ในขณะที่สภาพแวดล้อมปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างมาก ส่งผลทำให้แมลงศัตรูพืชหลายชนิดมีความสามารถในการปรับตัว และสร้างความเสียหายให้แก่พืชเศรษฐกิจเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้เพลี้ยหอยเกล็ดยังเป็นแมลงที่มีขนาดเล็ก สามารถติดไปกับส่วนต่างๆ ของพืชที่ใช้ในการส่งออกได้ ไม่ว่าจะเป็น ผล ใบ ส่วนต่างๆ ที่ใช้ในการขยายพันธุ์ เช่น หัว หรือเหง้า รวมทั้งส่วนที่ใช้ในการรับประทาน เป็นต้น ซึ่งจะพบว่าความเสียหายจากเพลี้ยหอยเกล็ดนั้นสามารถส่งผลกระทบทั้งด้านปริมาณและคุณภาพของผลผลิต และยังกระทบต่อมาตรการสุขอนามัยในการส่งออก

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตทางการเกษตรไปยังประเทศคู่ค้าต่างๆ ดังนั้นการศึกษาด้านอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อยนี้ทำให้ทราบชนิด พืชอาหาร เขตกระจาย จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการหาวิธีการป้องกันกำจัดที่ถูกต้องและเหมาะสมต่อไป

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช

2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ขวดดอง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ และถังรักษาความเย็น

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ (alcohol) 50-100% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10%, กรดไฮโดรคลอริค (hydrochloric acid) กรดแกลเชียลอะซิติก (glacial acetic acid) กรดคาร์บอลิค (carbolic acid) แอซิดฟุชซิน (acid fuchsin) โคล์ฟอย (clove oil) และ แคนาดาบัลซัม (Canada balsam) เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องใส่สไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร

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

5. อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา rotting และกระดาษไขเขียนแบบ

6. เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ Diaspididae

- วิธีการ

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

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

3. คัดเลือกเพลี้ยหอยเกล็ดเพศเมีย จากข้อ 2 ไปทำสไลด์ถาวรเพื่อจำแนกชนิด โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 10-20 ตัวอย่างต่อหมายเลข

4. วิธีการทำสไลด์ถาวร

กรมวิชาการเกษตร

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

4.2 นำตัวอย่างจากข้อ 4.1 ย้ายลงในน้ำกลั่น กดเบา ๆ บนลำตัวด้วยเข็มดัดปลายโค้ง เพื่อทำให้ไข่ตัวอ่อน และของเหลวที่อยู่ในลำตัวหลุดออกมาทางรอยที่เจาะไว้ ถ้ายังมีก้อนไขมันตกค้างอยู่ให้นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 2 – 3 นาที

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

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

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

5. ตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยหอยเกล็ดบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Williams and Watson (1988) และ Miller and Davidson (1990, 2005) รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างสไลด์เพลี้ยหอยเกล็ดที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร และจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Aspidiotinae โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ (Figure 1.1.1.1) ได้แก่ ขนาดความยาวของลำตัว รูปร่าง (body) ของส่วนหัวและอก ส่วนท้องปล้องที่ 4 ถึงปล้องสุดท้าย เรียกว่า pygidium ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการจำแนกชนิดของเพลี้ยหอยเกล็ด โดย pygidium ประกอบด้วย 1-barred macroduct (single bar) และ 2- barred macroduct (pararell bar) และบริเวณส่วนปลายของ pygidium ส่วนใหญ่มี lobe จำนวน 3 คู่ที่เห็นได้ชัดเจน (L1, L2, L3) รูปทรงและขนาดแตกต่างกันในแต่ละชนิด แต่บางชนิดปรากฏคู่ที่ 4 (L4) และมีขนาดค่อนข้างเล็กซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการจำแนกชนิด ระหว่าง lobe แต่ละคู่จะมีแผ่นแข็ง (plate) ที่ปลายแตกเป็นแฉกในรูปแบบต่างๆ เช่น ปลายแตกเป็นสองแฉก (bifurcate) แบบสามแฉก (trifurcate) แบบหลายแฉก (fimbriate) แบบขอบแตกเป็นแฉกทั้งสองด้าน (fringed) รวมทั้งรูปร่างและจำนวนของ paraphyses นอกจากนี้ยังต้องศึกษาลักษณะการเรียงตัวและจำนวนของ microduct ทั้งแบบสั้น แบบยาว พร้อมการเรียงตัวของ perivulvar pores ที่มีจำนวนกลุ่มแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด หลังจากนั้นจึงนำข้อมูลต่างๆที่ได้รวบรวมจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยหอยเกล็ดในวงศ์ย่อยนี้ โดยในแนวทางวินิจฉัยจะมีทั้งข้อมูลสัณฐานวิทยาที่ใช้จำแนกเพลี้ยหอยในวงศ์ย่อยนี้จนถึงระดับชนิด และยังมีข้อมูลการแพร่กระจาย พืชอาศัย และแมลงศัตรูธรรมชาติที่พบจากการสำรวจ

กรมวิชาการเกษตร

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

7. จัดเก็บตัวอย่างเพลี้ยหอยในกล่องใส่สไลด์ถาวรและนำเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล และจัดทำหมายเลขประจำตัวอย่างเพลี้ยหอยแต่ละสไลด์เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์ต่อไป

- เวลาและสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2559 ถึง เดือนกันยายน 2562

สถานที่ 1. แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่างๆ ในเขตภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคตะวันตกและภาคใต้

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตว์วิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Aspidiotinae จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ย่อย Aspidiotinae จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในพื้นที่เขตภาคกลาง ได้แก่จังหวัด สมุทสงคราม สมุทรสาคร ราชบุรี ลพบุรี สระบุรี เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่จังหวัดนครราชสีมา ขอนแก่น มหาสารคาม อุดรธานี หนองคาย มุกดาหาร สุรินทร์ ศรีสะเกษ ยโสธร และอุบลราชธานี เขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง และเพชรบรูณ์ และภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ชลบุรี ตราด ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ชมุพร นครศรีธรรมราช และระนอง นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จากการตรวจจำแนกชนิดตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดจำนวน 554 ตัวอย่าง (Table 1.1.1.1) พบทั้งสิ้น 7 สกุล รวม 12 ชนิด ได้แก่ 1) เพลี้ยหอยเกล็ดแดงแคลิฟอร์เนีย *Aonidiella aurantii* (Maskell) 2) เพลี้ยหอยเกล็ดเหลืองเทียม *Aonidiella comperei* Mckenzie 3) เพลี้ยหอยเกล็ดออเรนทัล *Aonidiella orientalis* (Newstead) 4) เพลี้ยหอยเกล็ดมะพร้าว *Aspidiotus destructor* Signoret 5) เพลี้ยหอยเกล็ดขิง *Aspidiella hartii* (Cockerell) 6) เพลี้ยหอยเกล็ดมอร์แกน *Chrysomphalus dictyospermi* (Morgan) 7) เพลี้ยหอยเกล็ด *Chrysomphalus* sp. Ferris 8) เพลี้ยหอยเกล็ดลาทิเนีย *Hemiberlesia lataniae* (Signoret) 9) เพลี้ยหอยเกล็ดปาล์ม *Hemiberlisia palmae* (Cockerell) 10) เพลี้ยหอยเกล็ดฟลอริดาน่า *Lindingaspis floridana* Ferris 11) เพลี้ยหอยเกล็ดไตรโลไบท์ *Pseudaonidia trilobitiformis* (Green) และ 12) เพลี้ยหอยเกล็ด *Pseudaonidia* sp. ซึ่งได้จัดทำแนวทางการวินิจฉัย (key) และรายละเอียดของเพลี้ยหอยเกล็ดทั้ง 12 ชนิด ดังต่อไปนี้

กรมวิชาการเกษตร

แนวทางการวินิจฉัยวงศ์ย่อยของเพลี้ยหอยเกล็ดในวงศ์ Diaspididae

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

แนวทางการวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ย่อย Aspidiotinae

1. Pygidial margin without knobbed paraphyses, Dorsal surface of pygidium with a conspicuous mosaic or areolate appearance.....2
- Pygidial margin with knobbed paraphyses, Dorsal surface of pygidium without a conspicuous mosaic or areolate appearance.....3

2. L3 and L4 lobes narrow and very elongate, as long as, or longer than the plates in between them.....***Pseudaonidia trilobitiformis*** **(Green)**
- L3 and L4 lobes as narrow and elongate, shorter than the plates in between them .....***Pseudaonidia*** **sp.**

3. Prosoma of mature female expanded posterolaterally, often nearly enclosing the pygidium, giving the body a reniform shape; Lobe 1-3 present, long fringed setae between lobes; Pygidium without paraphyses arising from lobes 4
- Prosoma variable not expanded posterolaterally, body usually oval or fusiform, not enclosing the pygidium, reniform shape pygidium with paraphyses arising from lobes 6

4. Plate lateral to the third lobe not fringed, each with long fleshy process; abdominal segment 1-3 with a submarginal row of cluster of dorsal ducts on each side; normally, perivulvar pores present 4 groups (rarely 5)..... ***Aonidiella orientalis*** **(Newstead)**
- Plate lateral to the third lobe fringed, each with long fleshy process; abdominal segment 1-3 with a submarginal row of cluster of dorsal ducts on each side; perivulvar pores present or absent..... 5

5. Perivulvar pores absent, perivulvar scleroses present.....***Aonidiella aurantii*** **(Maskell)**
- Perivulvar pores present; pygidium with 2 groups of perivulvar pores; thoracic tubercles absent or very small.....***Aonidiella comperei*** **McKenzie**

6. Paraphyses longer than L1 lobe; paraphyses present between L1 and L2 lobes.....7
- Paraphyses shorter than L1 lobe; paraphyses absent between L1 and L2 lobes 9

กรมวิชาการเกษตร

7. Pygidium with conspicuous, branched plates between L3 and L4, these exceeding the lobes in length; L4 sclerotized point.....8

- Pygidium plates very small or mere point, rounded with 3 pairs of very small lobes .....*Lindingaspis floridana* Ferris

8. Duct in second and third furrows few, in single rows.....*Chrysomphalus dictyospermi* (Morgan)

- Duct in second and third furrows few, in double rows.....*Chrysomphalus* sp.

9. With paraphyses wide, robust shape.....10

- Without paraphyses or very small on L 1 only.....11

1 0 . L2 and L3 well developed, often sclerotized; plates the lobes and anterior to L3 very long..... *Hemiberlesia palmae* (Cockerell)

- L2 and L3 lacking or merely a unsclerotized point; plates the lobes and anterior to L3 not as long.....*Hemiberlesia lataniae* (Signoret)

1 1. L1 and L2 well developed, L3 absent or indicated only by a sclerotized point.....*Aspidiella hartii* (Cockerell)

- L1, L2 and L3 well developed, L1 present lobes recessed; pygidial macroduct elongate, more than 16x as long as wide.....*Aspidiotus destructor* Signoret

กรมวิชาการเกษตร

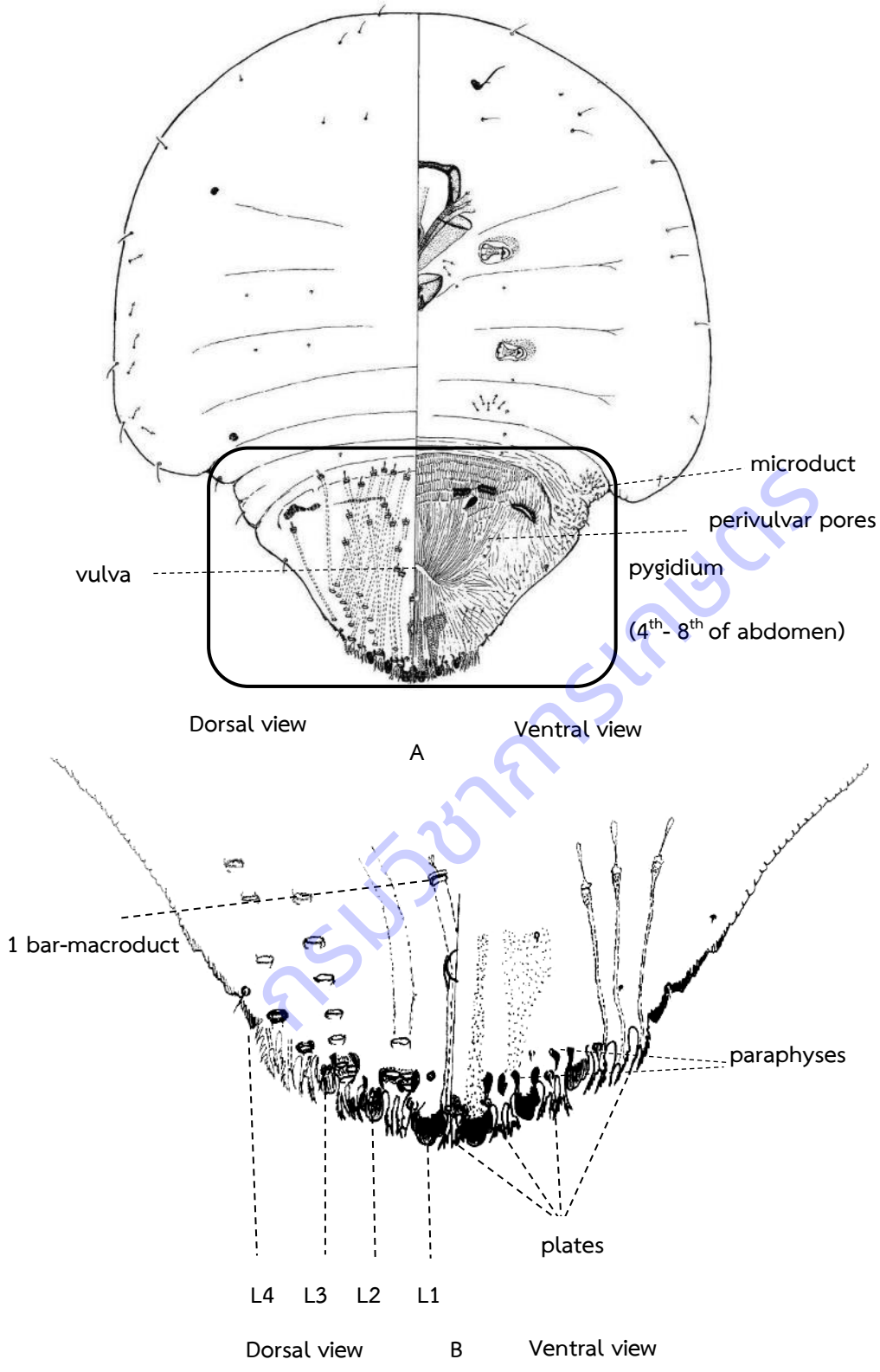


Figure 1.1.1.1 A) General morphology of slide – mounted adult female Aspidiotinae
B) Morphological characters of pygidium Aspidiotinae

กรมวิชาการเกษตร

รายละเอียดของเพลี้ยหอยเกล็ดแต่ละชนิด

1. ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Aonidiella aurantii* (Maskell, 1879) (Figure 1.1.1.2 และ 1.1.1.3)

ชื่อพ้อง : *Aspidiotus aurantii* Maskell 1879, *Aspidiotus citri* Comstock 1881

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดแดงแคลิฟอร์เนีย (California red scale)

ลักษณะในธรรมชาติ : แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างกลม ลักษณะสีเหลืองปนน้ำตาล หรือสีน้ำตาลอ่อน ไม่สามารถมองเห็นลักษณะของลำตัวได้จากภายนอก

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ส่วน pygidium ประกอบด้วย 1 - barred macroduct ซึ่ง lobe ทั้ง 3 คู่ ปรากฏชัดเจนแต่ละคู่มีความยาวใกล้เคียงกัน plate ที่อยู่ด้านข้างของ L3 แตกออกเป็นแฉกทั้ง 2 ด้านแต่ละแฉกค่อนข้างยาว ส่วนท้องปล้องที่ 1 - 3 พบกลุ่มท่อเรียงกันเป็นแถวบริเวณขอบของผนังลำตัวด้านหลัง (dorsum) ไม่ปรากฏ perivulva pores

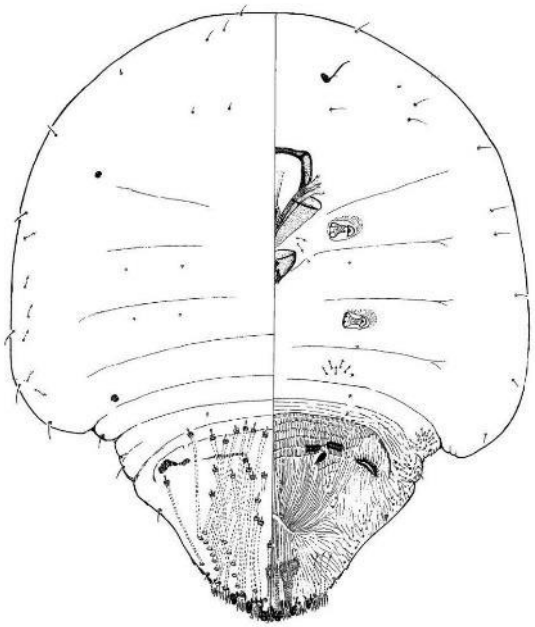
พืชอาหาร : พบลงทำลายทั้งส่วนใบและผลของ ส้มโอ และมะนาว

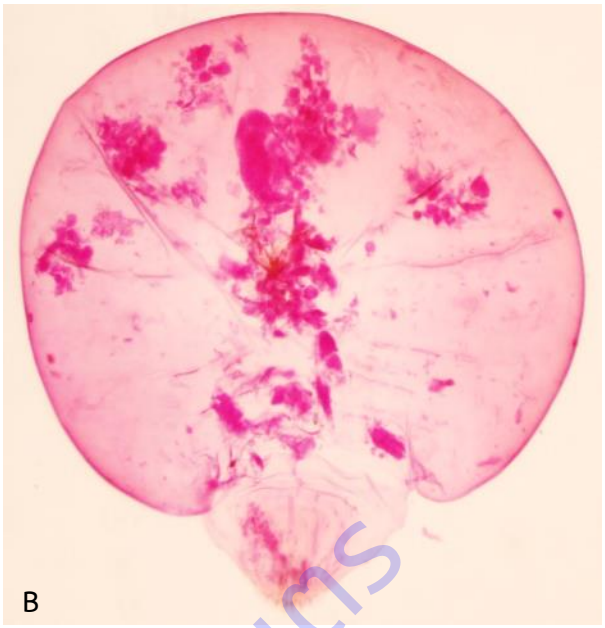
การแพร่กระจาย : ขอนแก่น ชุมพร และตราด

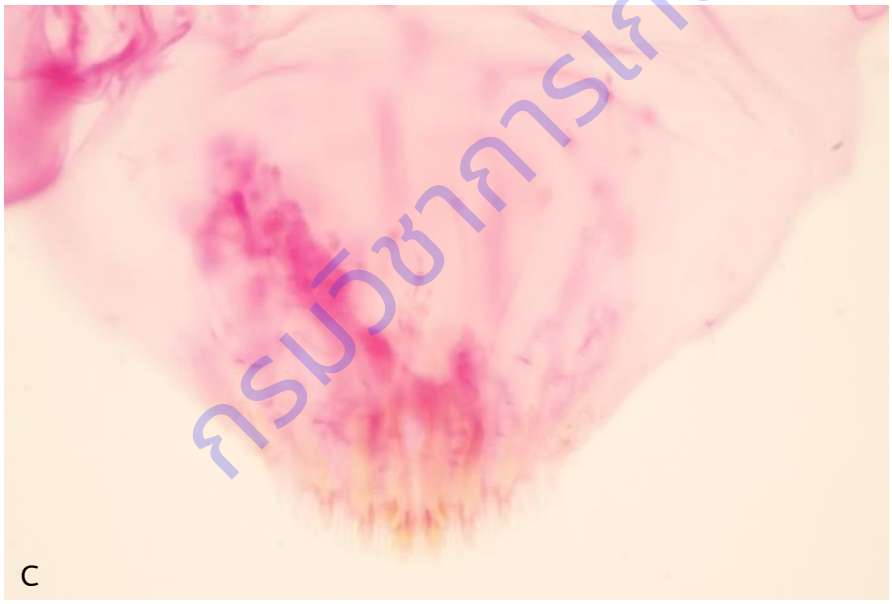
ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Thailand, 50 females (Table 1.1.1.1)

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.2 Field view of *Aonidiella aurantii* (Maskell)







กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.3 *Aonidiella aurantii* (Maskell, 1879)

A) Morphology of slide – mounted

B) Microscope view of adult female

C) Microscope view of pygidium

2. ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Aonidiella comperei* Mckenzie, 1937 (Figure 1.1.1.4 และ 1.1.1.5)

ชื่อพ้อง : *Aonidiella comperei* McKenzie 1937

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดเหลืองเทียม (false yellow scale)

ลักษณะในธรรมชาติ : แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างกลม ลักษณะสีเหลือง ไม่สามารถมองเห็นลักษณะของลำตัวได้จากภายนอก

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ส่วน pygidium ประกอบด้วย 1 - barred macroduct ซึ่ง lobe ทั้ง 3 คู่ ปรากฏชัดเจน คู่ที่ 1 ยาวกว่าคู่ที่ 2 และ 3 ลักษณะของ plate ที่อยู่ด้านข้างของ L3 แตกออกเป็นแฉกทั้ง 2 ด้านแต่ละแฉกค่อนข้างยาว ส่วนท้องปล้องที่ 1 -3 พบกลุ่มท่อเรียงกันเป็นแถวบริเวณขอบของผนังลำตัวด้านหลัง (dorsum) ปรากฏ perivulva pores เรียงกัน จำนวน 2 กลุ่ม มักไม่ปรากฏท่อบริเวณส่วนอกแต่อาจพบได้บางครั้งซึ่งมีลักษณะเล็กมาก

พืชอาหาร : กล้วย

การแพร่กระจาย : ขอนแก่น

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Thailand, 20 females (Table 1.1.1.1)

ข้อสังเกต : *A. comperei* มีลักษณะใกล้เคียงกันกับชนิด *A. eremocitri* และชนิด *A. inornata* แต่ทั้ง 2 ชนิดที่กล่าวมายังไม่มีรายงานในประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

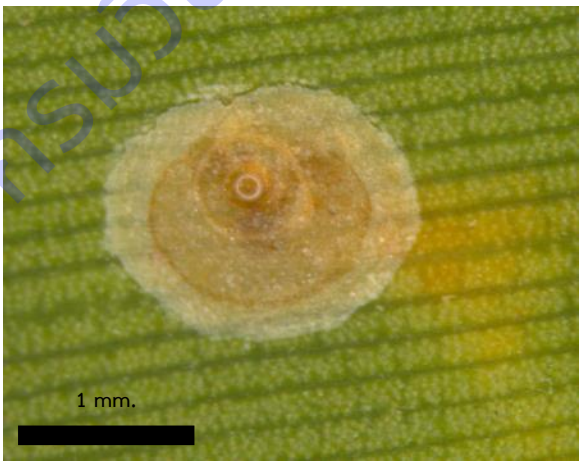


Figure 1.1.1.4 Field view of *Aonidiella comperei* Mckenzie

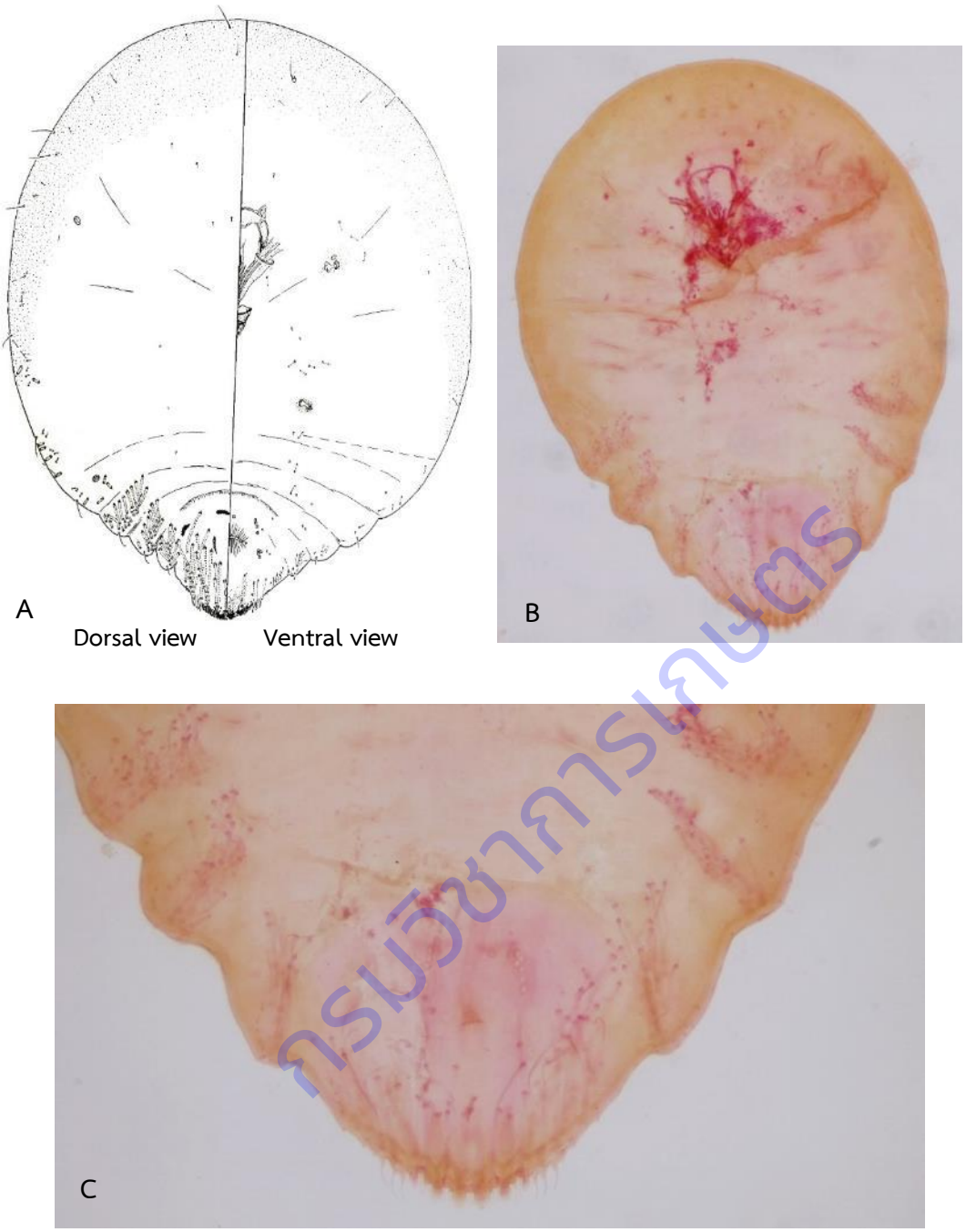


Figure 1.1.1.5 *Aonidiella comperei* Mckenzie, 1937

A) Morphology of slide – mounted

B) Microscope view of adult female

C) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

3. ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Aonidiella orientalis* (Newstead, 1894) (Figure 1.1.1.6 และ 1.1.1.7)

ชื่อพ้อง : *Aspidiotus orientalis* Newstead 1894, *Aspidiotus osbeckiae* Green, *Aspidiotus* (*Chrysomphalus*) *pedronis*, *Aspidiotus* (*Aonidiella*) *taprobanus* Green, *Aspidiotus (Aonidiella) cocotiphagus* Marlatt, *Chrysomphalus pedroniformis* Cockerell & Robinson, *Abgrallaspis narainus* Dutta & Singh 1990, *Abgrallaspis azadirachti* Ojha 2005

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดออเรนทัล (oriental scale)

ลักษณะในธรรมชาติ : แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างกลม ลักษณะสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาลเข้ม เมื่อเป็นระยะตัวอ่อนจะมีสีออกเหลืองและสีจะเข้มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อมีอายุมากขึ้น ไม่สามารถมองเห็นลักษณะของลำตัวได้จากภายนอก

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ส่วน pygidium ประกอบด้วย 1-barred macroduct ซึ่ง lobe ทั้ง 3 คู่ปรากฏชัดเจน โดยคู่ที่ 1 ยาวกว่าคู่ที่ 2 อย่างชัดเจน ส่วนปลายของ plates ตั้งแต่คู่ที่ 1 - 3 มีลักษณะเป็นแท่งยาวบริเวณขอบไม่แตกเป็นแฉก plate ที่อยู่ด้านข้างของ L3 แต่ละแท่งค่อนข้างยาว ส่วนท้องปล้องที่ 1 -3 พบกลุ่มท่อเรียงกันเป็นแถวบริเวณขอบของผนังลำตัวด้านหลัง (dorsum) ปรากฏ perivulva pores จำนวน 4 กลุ่ม บางครั้งอาจมี 5 กลุ่มแต่พบได้น้อย

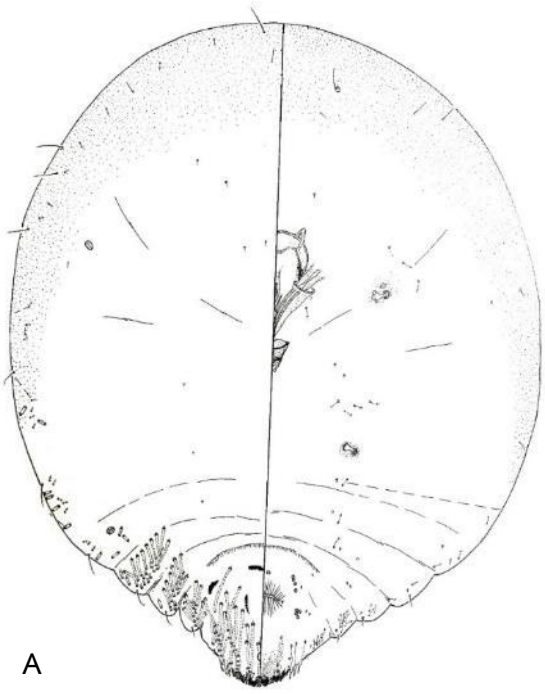
พืชอาหาร : พบลงทำลายบริเวณใบของลิ้นจี่ ส่วนใบและผลของกล้วย มะม่วง มะนาว ส้มโอ น้อยหน่า และส่วนผลของมะละกอ

การแพร่กระจาย : กรุงเทพฯ สมุทรสงคราม ราชบุรี สระบุรี นครราชสีมา มหาสารคาม ขอนแก่น อุดรธานี หนองคาย มุกดาหาร สุรินทร์ ศรีสะเกษ ยโสธร อุบลราชธานี เชียงใหม่ ลำปาง จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ตราด เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี ชุมพร นครศรีธรรมราช และระนอง

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Thailand 160 females (Table 1.1.1.1)

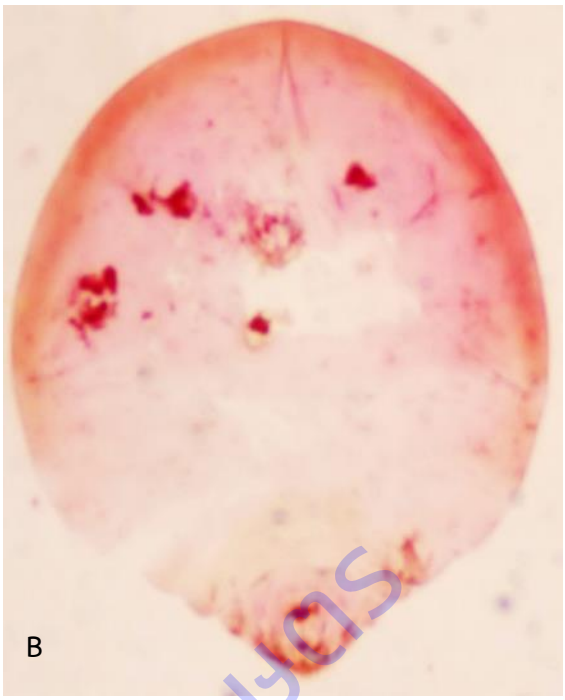
Figure 1.1.1.6 Field view of *Aonidiella orientalis* (Newstead)

กรมวิชาการเกษตร

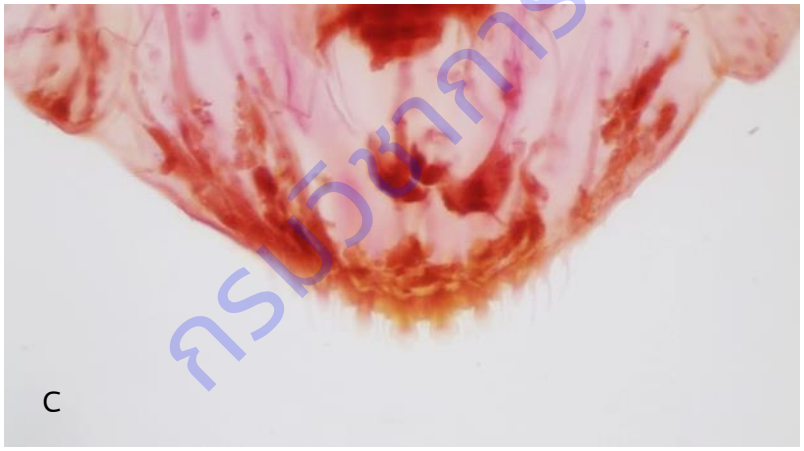


A

Dorsal view Ventral view



B



C

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.7 *Aonidiella orientalis* (Newstead, 1894)

A) Morphology of slide – mounted

B) Microscope view of adult female

C) Microscope view of pygidium

4. ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Aspidiotus destructor* Signoret, 1869 (Figure 1.1.1.8 และ 1.1.1.9)

ชื่อพ้อง : *Aspidiotus destructor* Signoret 1869, *Aspidiotus transparens* Green 1890, *Aspidiotus cocotis* Newstead, *Aspidiotus fallax* Cockerell 1893,*Aspidiotus transparens simillimus* Cockerell 1898

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดมะพร้าว (coconut scale)

ลักษณะในธรรมชาติ : แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างกลม ลักษณะสีเหลืองอ่อนค่อนข้างโปร่งใส สามารถมองเห็นส่วนของไข่ ตัวอ่อน ตัวเต็มวัย ได้จากภายนอก

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ส่วน pygidium ประกอบด้วย 1 - barred macroduct ซึ่ง lobe ทั้ง 3 คู่ปรากฏชัดเจน คู่ที่ 1 มีขนาดใหญ่กว่าคู่อื่นลักษณะหักมุม ไม่พบ paraphyses ด้านข้างของ lobe ทั้ง 3 คู่ รูปทรงของ macroduct ค่อนข้างรียาวความยาวมากกว่าความกว้างถึง 16 เท่า

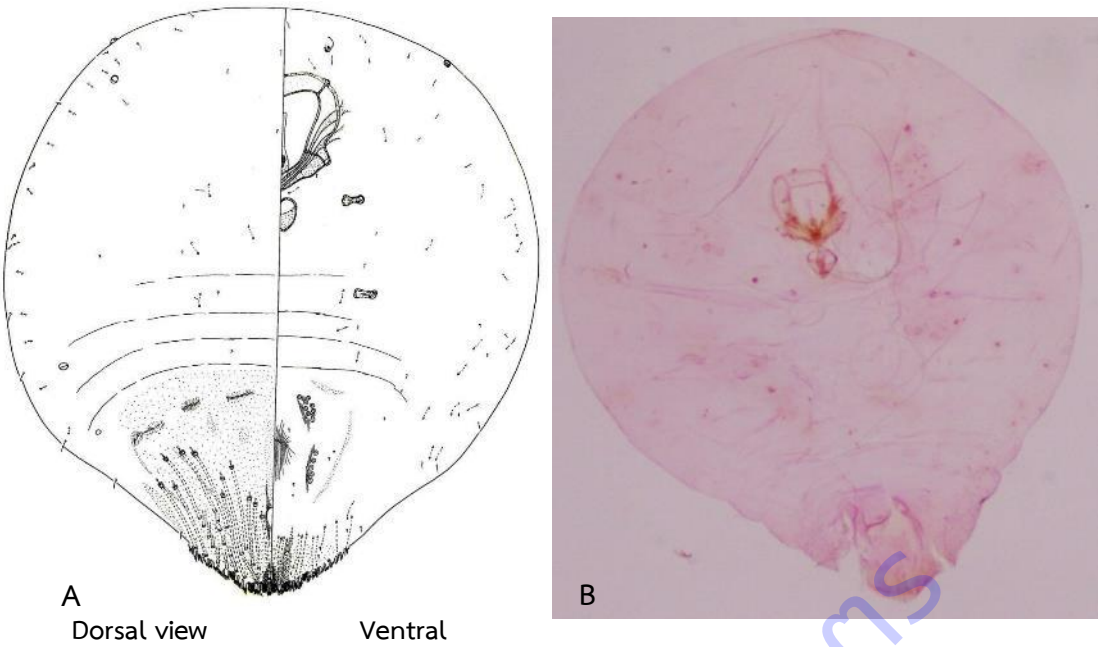
พืชอาหาร : พบลงทำลายส่วนใบของมันสำปะหลัง มะม่วง มะพร้าว ทุเรียน กล้วย และยังพบลงทำลายส่วนผลของมังคุด

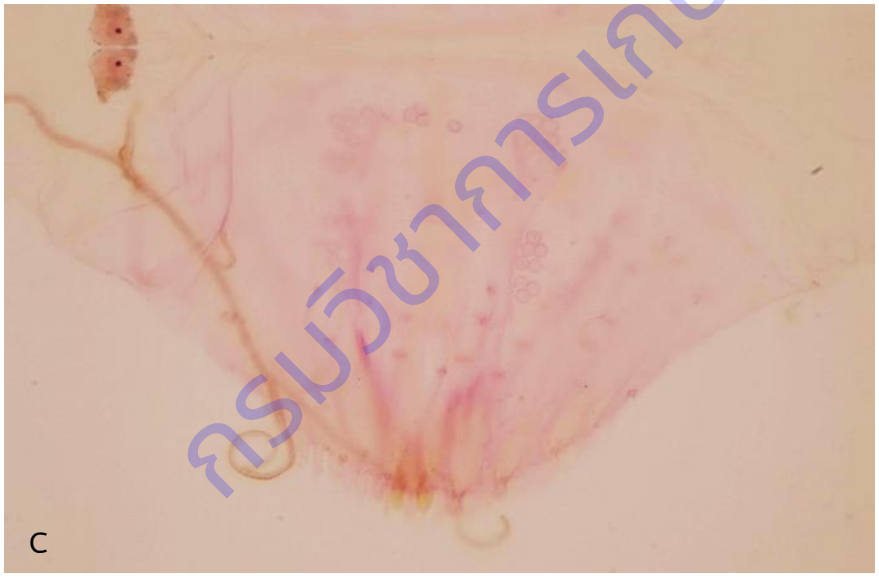
การแพร่กระจาย : กรุงเทพฯ สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ราชบุรี ลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น มหาสารคาม อุดรธานี หนองคาย มุกดาหาร สุรินทร์ ศรีสะเกษ ยโสธร อุบลราชธานี เชียงใหม่ ลำปาง จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ตราด เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี ชุมพร นครศรีธรรมราช และระนอง

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Thailand, 200 females (Table 1.1.1.1)

Figure 1.1.1.8 Field view of *Aspidiotus destructor* Signoret

กรมวิชาการเกษตร





กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.9 *Aspidiotus destructor* Signoret, 1869

A) Morphology of slide – mounted

B) Microscope view of adult female

C) Microscope view of pygidium

5. ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Aspidiella hartii* (Cockerell,1895) (Figure 1.1.1.10 และ 1.1.1.11)

ชื่อพ้อง : *Aspidiotus hartii* Cockerell 1895, *Aspidiotus hartii luntii* Hart 1896, *Aspidiotus hartii luntii* Cockerell 1896, *Aspidiotus luntii* Cockerell 1896

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดขิง (yam scale)

ลักษณะในธรรมชาติ : แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างกลม ลักษณะสีน้ำตาล หรือสีน้ำตาลเข้ม ไม่สามารถมองเห็นลักษณะของลำตัวได้จากภายนอก

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ส่วน pygidium ประกอบด้วย 1 - barred macroduct ซึ่ง paraphyses ด้านข้างของ lobe คู่ที่ 1 มีขนาดค่อนข้างสั้นและไม่พบใน lobe คู่ที่ 2 ลักษณะของ lobe คู่ที่ 1 - 2 ปรากฏชัดเจน ส่วนใหญ่คู่ที่ 3 ไม่ปรากฏหรือในบางครั้งจะพบเป็นเพียงจุดของแผ่นแข็งขนาดเล็ก

พืชอาหาร : พบทำลายในส่วนหัวของขิง

การแพร่กระจาย : เพชรบรูณ์

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Thailand, 20 females (Table 1.1.1.1)

สำนักวิทยบริการเกษตร

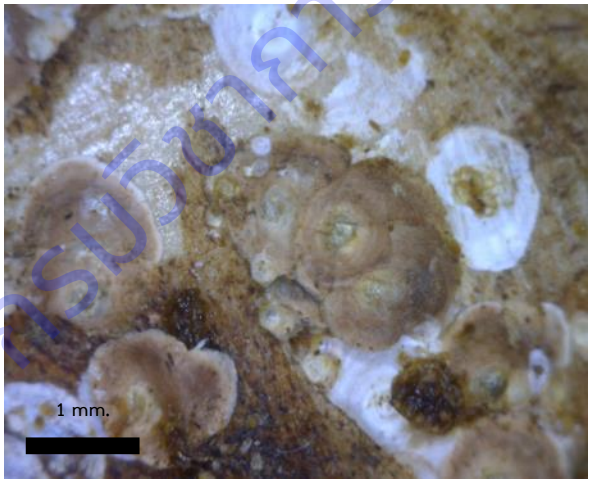
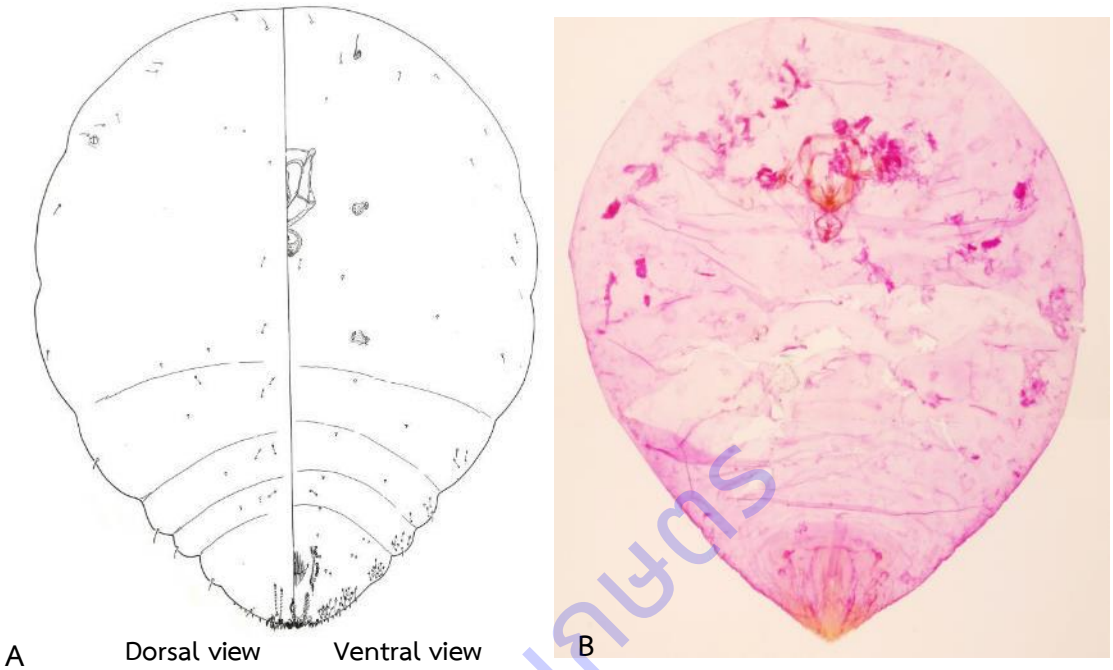
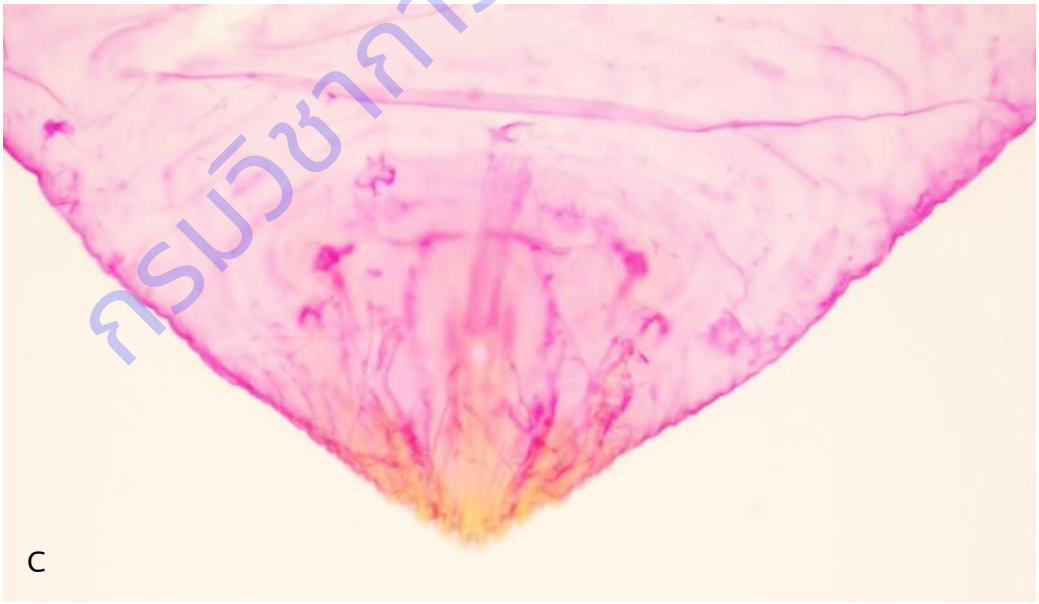


Figure 1.1.1.10 Field view of *Aspidiella hartii* (Cockerell)





กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.11 *Aspidiella hartii* (Cockerell, 1895)

A) Morphology of slide – mounted

B) Microscope view of adult female

C) Microscope view of pygidium

6. ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Chrysomphalus dictyospermi* (Morgan,1889) (Figure 1.1.1.12 และ 1.1.1.13)

ชื่อพ้อง : *Aspidiotus dictyospermi* Morgan 1889, *Aspidiotus dictyospermi arecae* Newstead 1893, *Aspidiotus mangiferae* Cockerell 1893, *Aspidiotus dictyospermi jamaicensis* Cockerell 1894, *Chrysomphalus minor* Berlese in Berlese & Leonardi 1896, *Chrysomphalus castigatus* Mamet 1936

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดมอร์แกน (Morgan's scale)

ลักษณะในธรรมชาติ : แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างกลม ลักษณะสีน้ำตาลอ่อน ตรงกลางจะมีสีเข้มกว่าด้านข้าง บางครั้งสามารถมองเห็นลักษณะของลำตัวได้จากภายนอก

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ส่วน pygidium ประกอบด้วย 1 - barred macroduct ซึ่ง lobe ทั้ง 3 คู่ ปรากฏชัดเจน และสามารถเห็นคู่ที่ 4 ได้อย่างชัดเจน ซึ่งมีลักษณะของแผ่นแข็งแยกระหว่าง L3 และ L4 ปรากฏส่วนของ duct บริเวณช่องที่อยู่ระหว่าง lobe คู่ที่ 2 และ 3 มีการเรียงตัวเป็นแถวเดียว

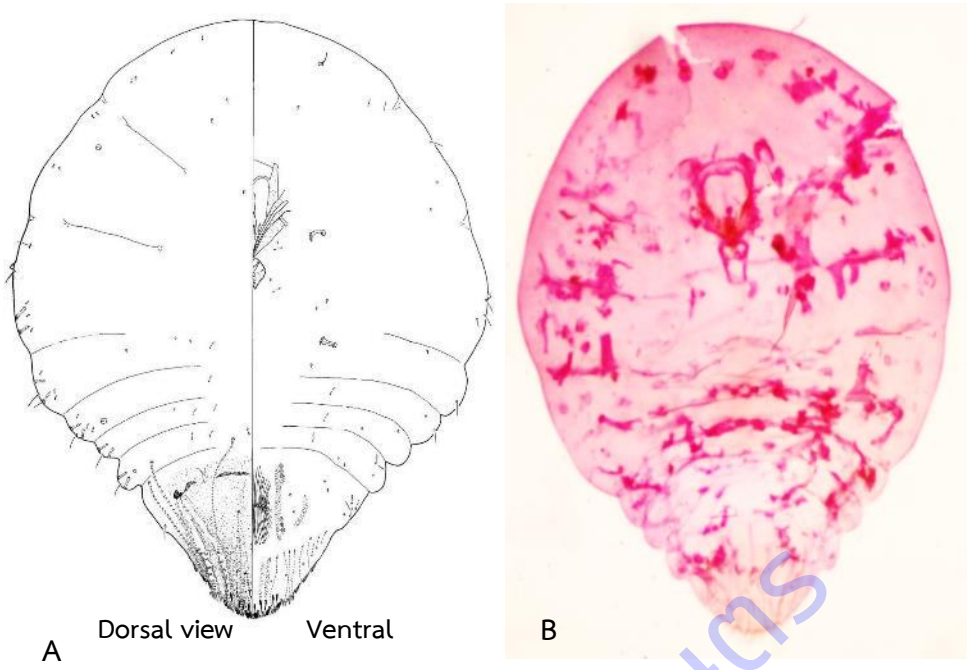
พืชอาหาร : มะนาว และฝรั่ง

การแพร่กระจาย : ชุมพร และเพชรบุรี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Thailand, 20 females (Table 1.1.1.1)

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.12 Field view of *Chrysomphalus dictyospermi* (Morgan)



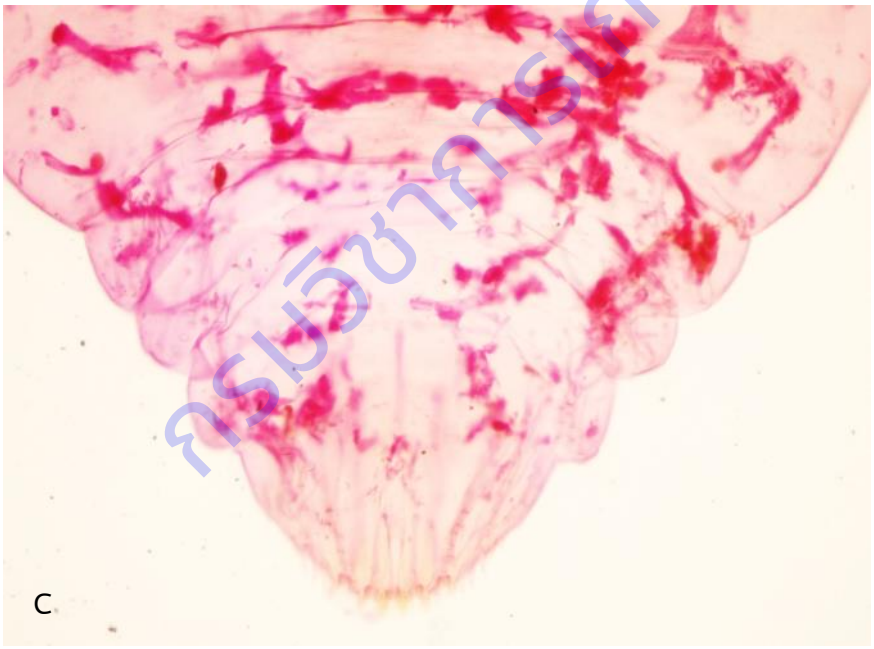


Figure 1.1.1.13 *Chrysomphalus dictyospermi* (Morgan, 1889)

A) Morphology of slide – mounted

B) Microscope view of adult female

C) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

7. ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Chrysomphalus* sp. (Figure 1.1.1.14 และ 1.1.1.15)

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ด (armored scale)

ลักษณะในธรรมชาติ : แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างกลม ลักษณะสีน้ำตาลเข้มตรงกลางมีสีเข้มกว่าด้านข้าง บางครั้งสามารถมองเห็นลักษณะของลำตัวได้จากภายนอก

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ส่วน pygidium ประกอบด้วย 1 - barred macroduct ซึ่ง lobe ทั้ง 3 คู่ ปรากฏชัดเจน และสามารถเห็นคู่ที่ 4 ได้อย่างชัดเจน ซึ่งมีลักษณะของแผ่นแข็งแยกระหว่าง L3 และ L4 ปรากฏส่วนของ duct บริเวณช่องที่อยู่ระหว่าง lobe คู่ที่ 2 และ 3 มีการเรียงตัวเป็นสองแถวซ้อนกัน

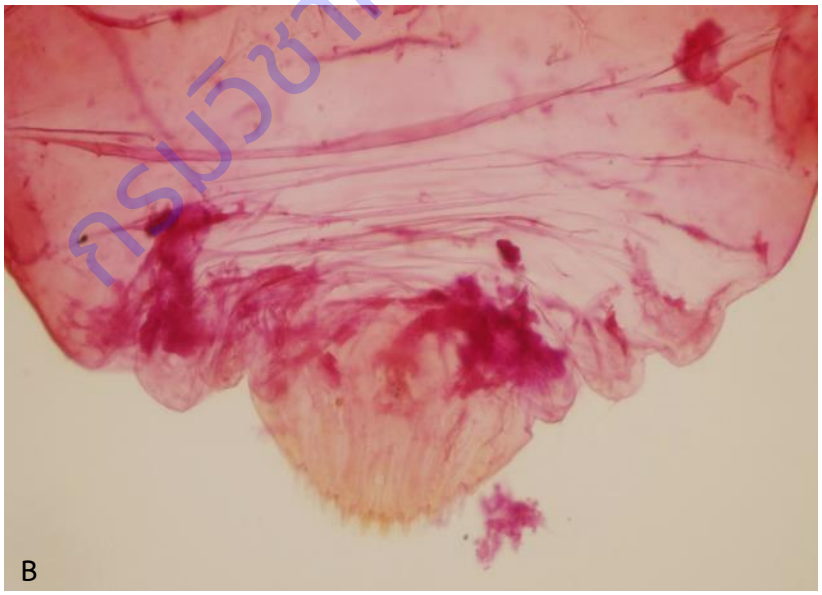
พืชอาหาร : พบลงทำลายส่วนผลมังคุด

การแพร่กระจาย : จันทบุรี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Thailand, 10 females (Table 1.1.1.1)

Figure 1.1.1.14 Field view of *Chrysomphalus* sp.

กรมวิชาการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.15 Adult female of *Chrysomphalus* sp.

A) Microscope view of adult female

B) Microscope view of pygidium

8. ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Hemiberlesia lataniae* (Signoret, 1869) (Figure 1.1.1.16 และ 1.1.1.17)

ชื่อพ้อง : *Aspidiotus lataniae* Signoret 1869, *Aspidiotus lataniae* Signoret 1869, *Aspidiotus cydoniae* Comstock 1881, *Aspidiotus punicae* Cockerell 1893, *Aspidiotus diffinis lateralis* Cockerell 1894, *Aspidiotus (Hemiberlesia) crawii* Cockerell 1897, *Aspidiotus cydoniae tecta* Maskell 1897, *Aspidiotus (Diaspidiotus) greenii* Cockerell 1897, *Aspidiotus implicatus* Maskell 1897

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดลาทิเนีย (latinia scale)

ลักษณะในธรรมชาติ : แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างกลม ลักษณะสีขาวอมเทาตรงกลางมีสีเข้ม บางครั้งสามารถมองเห็นลักษณะของลำตัวได้จากภายนอก

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ส่วน pygidium ประกอบด้วย 1 - barred macroduct ซึ่งมี เพียง lobe คู่ที่ 1 ที่ปรากฏชัดเจน ส่วนคู่ที่ 2 และ 3 ไม่ปรากฏหรือเป็นเพียงติ่งเล็กๆ เท่านั้น มี paraphyses ที่ขนาดค่อนข้างกว้างและแข็ง แผ่นแข็งที่อยู่ระหว่าง lobe มีขนาดสั้น

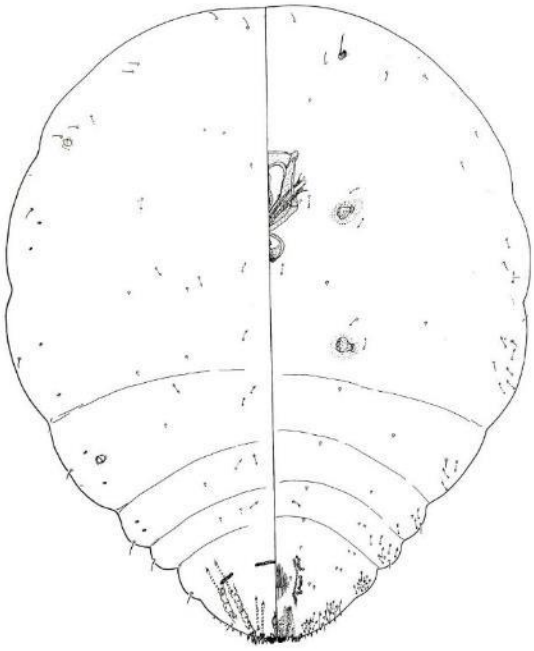
พืชอาหาร : พบลงทำลายในส่วนของใบปาล์ม

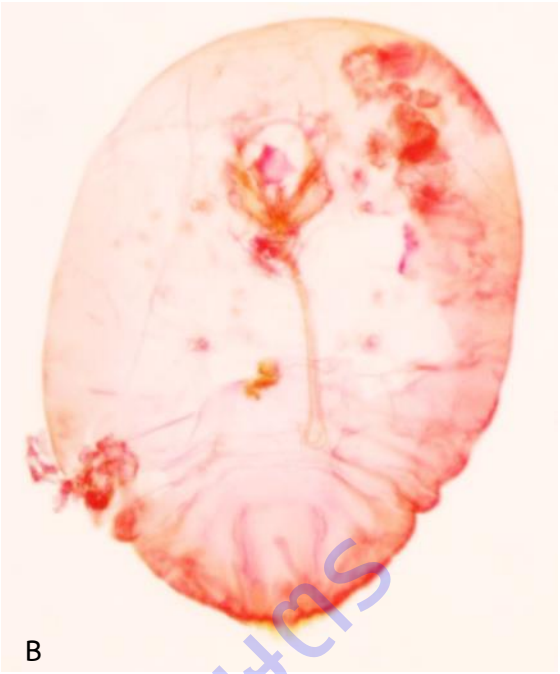
การแพร่กระจาย : นครราชสีมา

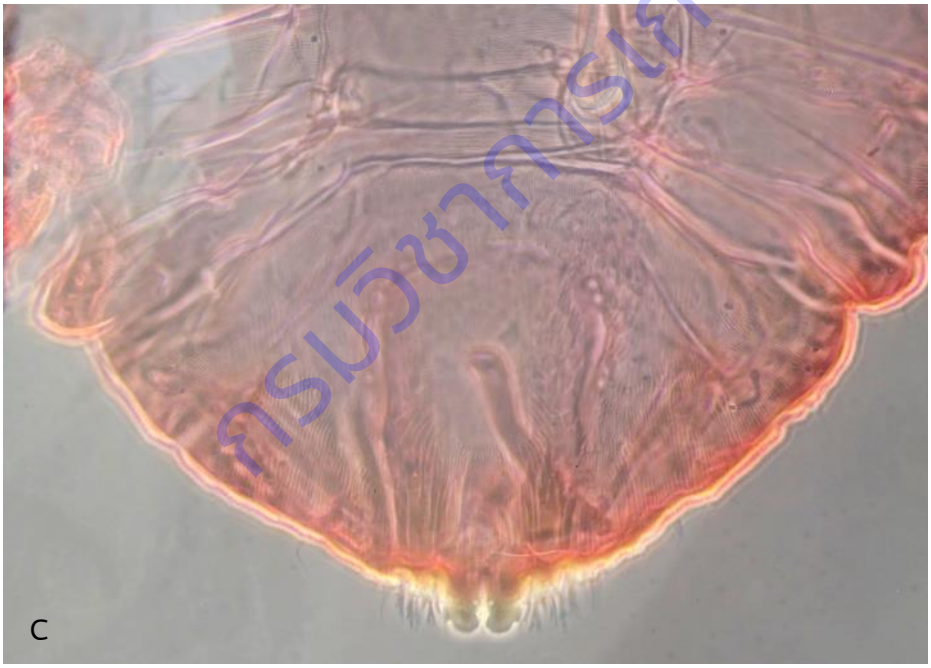
ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Thailand, 20 females (Table 1.1.1.1)

Figure 1.1.1.16 Field view of *Hemiberlesia lataniae* (Signoret)

กรมวิชาการเกษตร







กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.17 *Hemiberlesia lataniae* (Signoret, 1869)

A) Morphology of slide – mounted

B) Microscope view of adult female

C) Microscope view of pygidium

9. ชื่อวิทยาศาสตร์ : ***Hemiberlesia palmae*** **(Cockerell, 1982) (Figure 1.1.1.18 และ 1.1.1.19)**

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดปาล์ม (tropical palm scale)

ลักษณะในธรรมชาติ : แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างกลม หรือรี ลักษณะสีน้ำตาลอ่อนตรงกลางมีสีเข้มกว่าด้านข้าง บางครั้งสามารถมองเห็นลักษณะของลำตัวได้จากภายนอก

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ส่วน pygidium ประกอบด้วย 1 - barred macroduct ซึ่งมี lobe ทั้ง 3 คู่ มี paraphyses ที่ขนาดค่อนข้างกว้างและแข็ง ปรากฏชัดเจน คู่ที่ 1 มีขนาดใหญ่ ส่วนคู่ที่ 2 และ 3 มีขนาดเล็กลง แผ่นแข็งที่อยู่ระหว่าง lobe มีขนาดยาว

พืชอาหาร : พบลงทำลายในส่วนของใบปาล์ม

การแพร่กระจาย : นครราชสีมา

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Thailand, 10 females (Table 1.1.1.1)

กรมวิชาการเกษตร

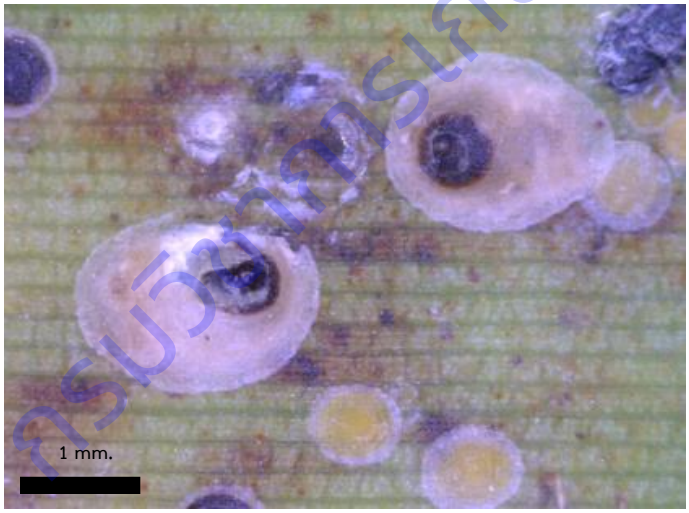
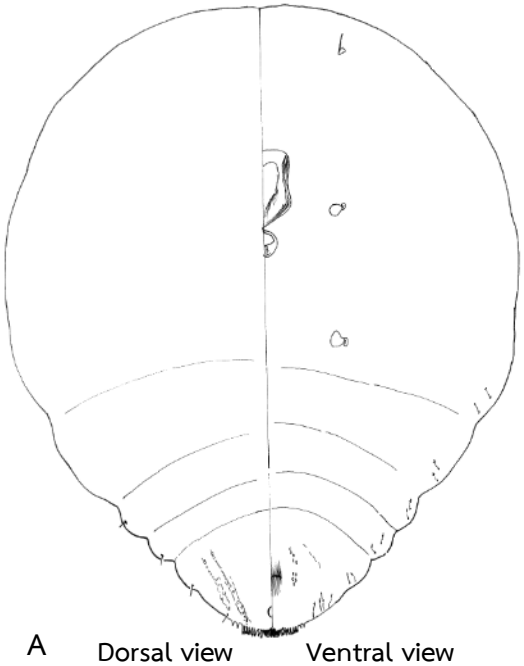
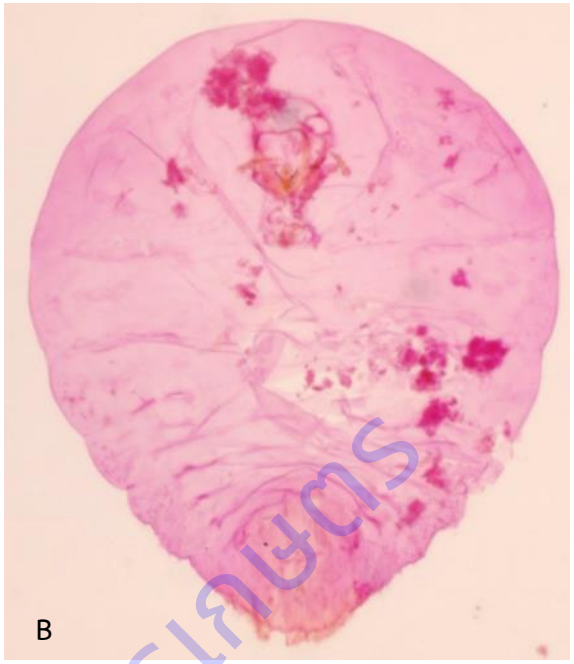
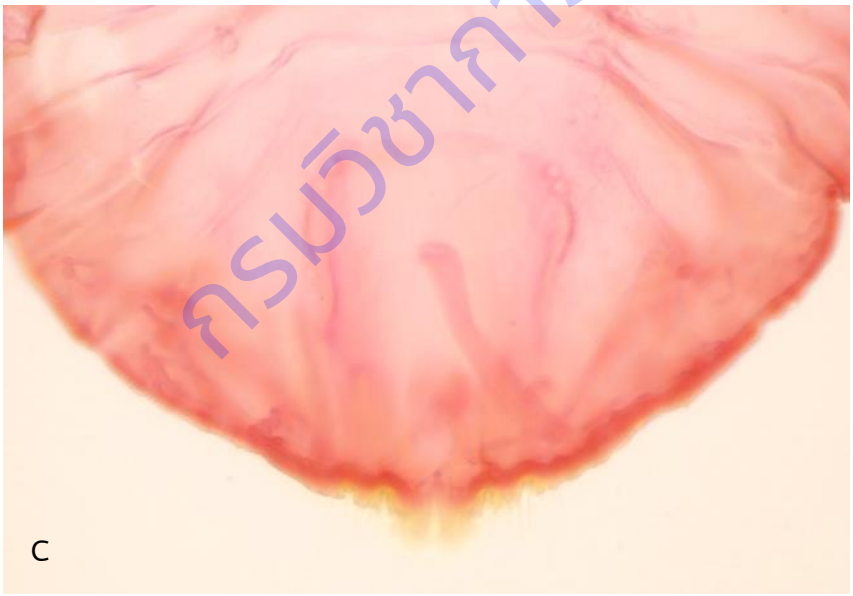


Figure 1.1.1.18 Field view of *Hemiberlesia palmae* (Cockerell)







กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.19 *Hemiberlisia palmae* (Cockerell)

A) Morphology of slide – mounted

B) Microscope view of adult female

C) Microscope view of pygidium

10. ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Lindingaspis floridana* Ferris, 1942 (Figure 1.1.1.20 และ 1.1.1.21)

ชื่อพ้อง : *Lindingaspis floridana* Ferris 1942

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดฟลอริดาน่า (floridana scale)

ลักษณะในธรรมชาติ : แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างกลม ลักษณะสีน้ำตาลอ่อน ไม่สามารถมองเห็นลักษณะของลำตัวได้จากภายนอก

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ส่วน pygidium ประกอบด้วย 1 - barred macroduct ซึ่ง lobe ทั้ง 3 คู่ ปรากฏชัดเจน lobe แต่ละคู่มีความยาวใกล้เคียงกัน ปรากฏ paraphyses ระหว่าง lobe คู่ที่ 1 และ 2 แผ่นแข็งที่อยู่ระหว่าง lobe มีขนาดเล็ก

พืชอาหาร : มะม่วง

การแพร่กระจาย : นครราชสีมา

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Thailand, 10 females (Table 1.1.1.1)

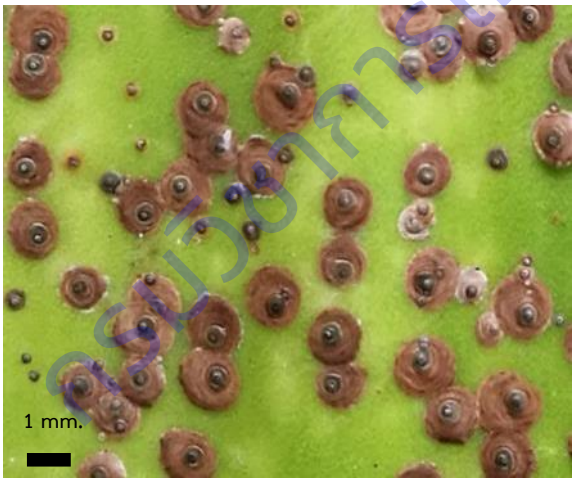
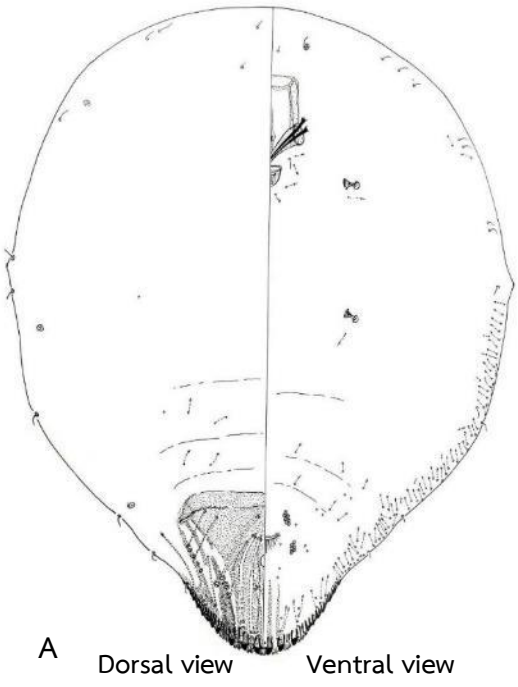
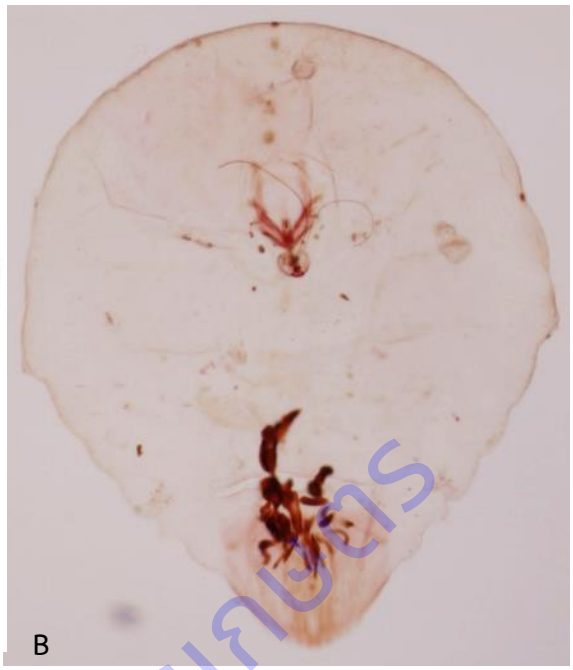


Figure 1.1.1.20 Field view of *Lindingaspis floridana* Ferris

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตร





กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.21 *Lindingaspis floridana* Ferris, 1942

A) Morphology of slide – mounted

B) Microscope view of adult female

C) Microscope view of pygidium

11. ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Pseudaonidia trilobitiformis* (Green, 1896) (Figure 1.1.1.22 และ 1.1.1.23)

ชื่อพ้อง : *Aspidiotus trilobitiformis* Green 1896, *Aspidiotus darutyi* Charmoy 1898

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดไตรโลไบท์ (trilobite scale)

ลักษณะในธรรมชาติ: แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างรี หรือบางครั้งเป็นรูปไข่ ลักษณะสีน้ำตาล ไม่สามารถมองเห็นลักษณะของลำตัวได้จากภายนอก

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ส่วน pygidium ประกอบด้วย 1 - barred macroduct และผิวของผนังลำตัวด้านหลังบริเวณ pygidium มีลักษณะเป็นช่องๆ เรียงต่อกันคล้ายภาพโมเสค ซึ่ง lobe ทั้ง 4 คู่ lobe คู่ที่ 3 และ 4 มีลักษณะแคบและยาวมากซึ่งมีขนาดความยาวเท่ากันหรือยาวกว่าแผ่นแข็งที่อยู่ระหว่างคู่ที่ 3 และ 4

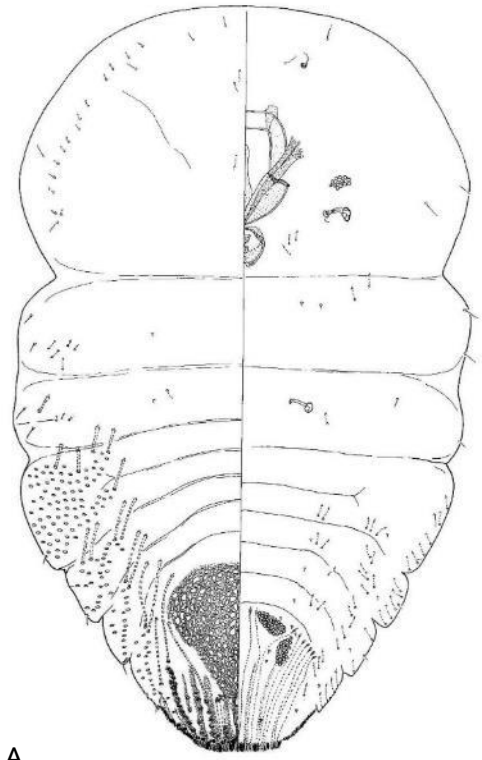
พืชอาหาร : พบลงทำลายบริเวณใบและผลของมะม่วง กล้วย ส้มโอ ลิ้นจี่ ลำไย และมังคุด

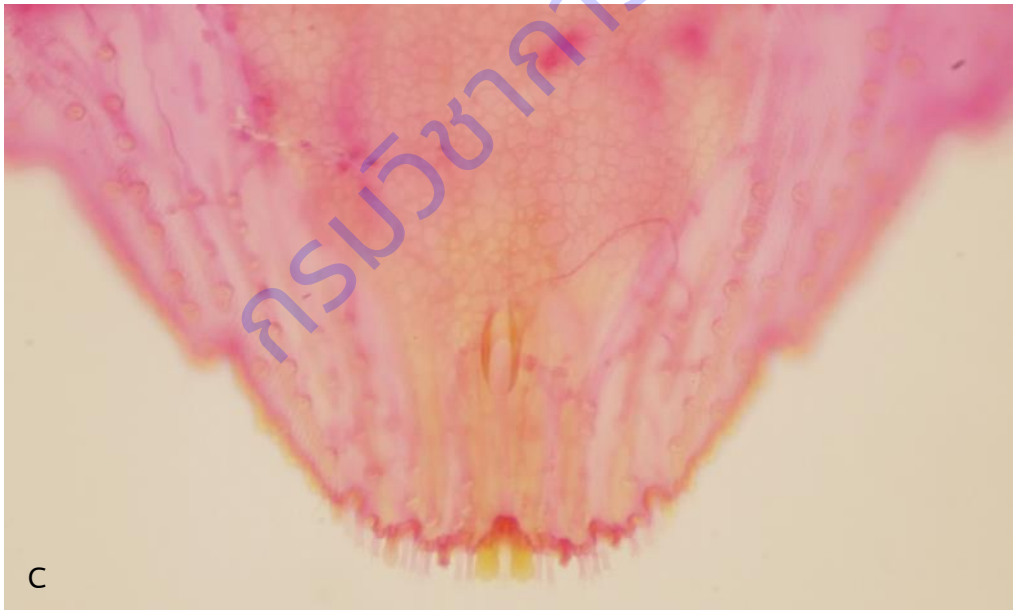
การแพร่กระจาย : หนองคาย ยโสธร สมุทรสงคราม ชุมพร ระยอง และจันทบุรี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Thailand, 29 females (Table 1.1.1.1)

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.22 Field view of *Pseudaonidia trilobitiformis* (Green)





กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.23 *Pseudaonidia trilobitiformis* (Green, 1896)

A) Morphology of slide – mounted

B) Microscope view of adult female

C) Microscope view of pygidium

12. ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Pseudaonidia* sp. (Figure 1.1.1.24 และ 1.1.1.25)

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ด (armored scale)

ลักษณะในธรรมชาติ : แผ่นปกคลุมลำตัวยาวรี หรือบางครั้งเป็นรูปไข่ ลักษณะสีน้ำตาล ไม่สามารถมองเห็นลักษณะของลำตัวได้จากภายนอก

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ส่วน pygidium ประกอบด้วย 1 - barred macroduct และผิวของผนังลำตัวด้านหลังบริเวณ pygidium มีลักษณะเป็นช่องๆ เรียงต่อกันคล้ายภาพโมเสค ซึ่ง lobe ทั้ง 4 คู่ lobe คู่ที่ 3 และ 4 มีลักษณะแคบและยาวซึ่งมีขนาดความน้อยกว่าแผ่นแข็งที่อยู่ระหว่างคู่ที่ 3 และ 4

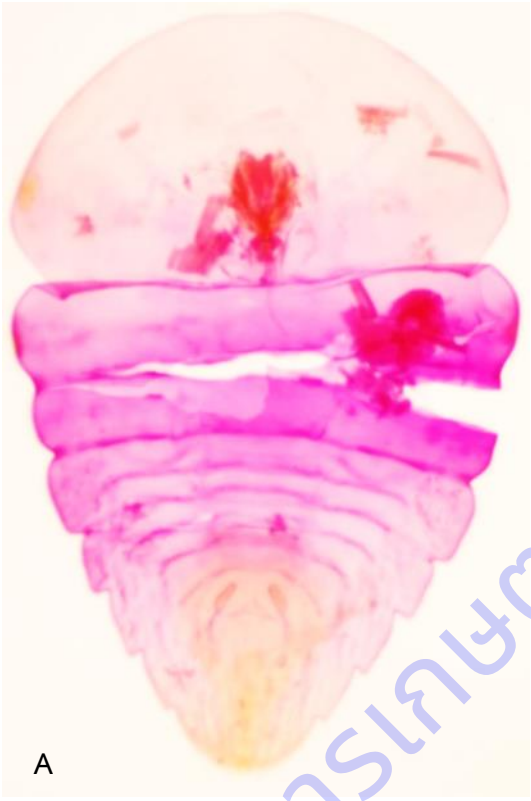
พืชอาหาร : มะม่วง

การแพร่กระจาย : เพชรบุรี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Thailand, 5 females (Table 1.1.1.1)

Figure 1.1.1.24 Field view of *Pseudaonidia* sp.

กรมวิชาการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.25 Adult female of *Pseudaonidia* sp.

A) Microscope view of adult female

B) Microscope view of pygidium

Table 1.1.1.1 Number and location of material examined in this study.

Number of sample	Location	Species
20 females	Nong Khai N 18°2'39.8" E 102°20'11.5" (C. Buamas)	*A. destructor*
20 females	Yasothon N 14°39'51.6" E 104° 15'51." (C. Buamas)	*A. destructor*
20 females	Nakhon Ratchasima N 14°23'45.0" E 101°41'22.2" (C. Buamas)	*A. destructor*
20 females	Samut Songkhram N 13°36'4.73" E 99°96'37.42" (S. Chaovalit)	*A. destructor*
20 females	Prachuap Khiri Khan N 11°5'49.6" E 99°28'47.3" (C. Buamas)	*A. destructor*
20 females	Petchaburi N 12°5'43.0" E 99°54'13.3" (C. Buamas)	*A. destructor*
20 females	Surat Thani N 9°12'33.6" E 99°28'39.2" (C. Buamas)	*A. destructor*
20 females	Chumphon N 10°20'34.9" E 99°4'45.5" (C. Buamas)	*A. destructor*
20 females	Rayong N 12°57'23.7" E 101°3'9.3" (C. Buamas)	*A. destructor*
20 females	Chiangmai N 18°60'52.0" E 98°89'21.0" (C. Buamas)	*A. destructor*
20 females	Mahasarakham N 16°4'38.7" E 103°9'24.4" (C. Buamas)	*A. orientalis*
20 females	Nakhon Ratchasima N 14°23'45.0" E 101°41'22.2" (C. Buamas)	*A. orientalis*
20 females	Samut Songkhram N 13°26'9.2" E 99°56'34.2" (C. Buamas)	*A. orientalis*
20 females	Chachoengsao N 13°46'20.0" E 101°12'17.1" (C. Buamas)	*A. orientalis*
20 females	Ratchaburi N 13°32'28.9" E 99°22'37.8" (C. Buamas)	*A. orientalis*
20 females	Surat Thani N 9°12'33.6" E 99°28'39.2" (C. Buamas)	*A. orientalis*
20 females	Chumphon N 10°20'34.9" E 99°4'45.5" (C. Buamas)	*A. orientalis*
20 females	Chiangmai N 18°60'52.0" E 98°89'21.0" (C. Buamas)	*A. orientalis*
20 females	Khon Kaen N 16°31'44.6" E 102°14'29.3" (C. Buamas)	*A. comperei*
20 females	Khon Kaen N 16°27'43.6" E 102°37'13.1" (C. Buamas)	*A. aurantii*
20 females	Chumphon N 10°20'34.9" E 99°4'45.5" (C. Buamas)	*A. aurantii*
10 females	Trat N (B. Manusmunkong)	*A. aurantii*
20 females	Phetchabun (W. Kampanich)	*A. hartii*
5 females	Nong Khai N 18°2'39.8" E 102°20'11.5" (C. Buamas)	*P. trilobitiformis*
2 females	Yasothon N 14°39'51.6" E 104° 15'51." (C. Buamas)	*P. trilobitiformis*
5 females	Nakhon Ratchasima N 14°23'45.0" E 101°41'22.2" (C. Buamas)	*P. trilobitiformis*
5 females	Samut Songkhram N 13°26'9.2" E 99°56'34.2" (C. Buamas)	*P. trilobitiformis*
2 females	Chumphon N 10°20'34.9" E 99°4'45.5" (C. Buamas)	*P. trilobitiformis*
5 females	Rayong N 12°57'23.7" E 101°3'9.3" (C. Buamas)	*Pseudaonidia sp.*
5 females	Chantaburi N 12°30'47.6" E 102°10'16.8" (C. Buamas)	*C. dictyospermi*
5 females	Petchaburi N 12°5'43.0" E 99°54'13.3" (C. Buamas)	*C. dictyospermi*
10 females	Chumphon N 10°20'34.9" E 99°4'45.5" (C. Buamas)	*C. dictyospermi*
10 females	Petchaburi N 12°5'43.0" E 99°54'13.3" (C. Buamas)	*Chrysomphalus* sp.
10 females	Chantaburi N 12°30'47.6" E 102°10'16.8" (C. Buamas)	*L. floridana*
20 females	Nakhon Ratchasima N 14°23'45.0" E 101°41'22.2" (C. Buamas)	*H. lataniae*
10 females	Nakhon Ratchasima N 14°23'45.0" E 101°41'22.2" (C. Buamas)	*H. palmae*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ย่อย Aspidiotinae จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ เช่น มันสำปะหลัง มะม่วง น้อยหน่า มะละกอ มะพร้าว ทุเรียน กล้วย มังคุด ลิ้นจี่ ลำไย ขิง และปาล์ม ในพื้นที่ 29 จังหวัด ในเขตภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาค ภาคตะวันตก และภาคใต้ นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จากการตรวจจำแนกชนิดตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดจำนวน 554 ตัวอย่าง พบทั้งสิ้น 7 สกุล รวม 12 ชนิด ได้แก่ 1) เพลี้ยหอยเกล็ดแดงแคลิฟอร์เนีย *Aonidiella aurantii* (Maskell) 2) เพลี้ยหอยเกล็ดเหลืองเทียม *Aonidiella comperei* Mckenzie 3) เพลี้ยหอยเกล็ดออเรนทัล *Aonidiella orientalis* (Newstead) 4) เพลี้ยหอยเกล็ดมะพร้าว *Aspidiotus destructor* Signoret 5) เพลี้ยหอยเกล็ดขิง *Aspidiella hartii* (Cockerell) 6) เพลี้ยหอยเกล็ดมอร์แกน *Chrysomphalus dictyospermi* (Morgan) 7) เพลี้ยหอยเกล็ด *Chrysomphalus* sp. Ferris 8) เพลี้ยหอยเกล็ดลาทิเนีย *Hemiberlesia lataniae* (Signoret) 9) เพลี้ยหอยเกล็ดปาล์ม *Hemiberlisia palmae* (Cockerell) 10) เพลี้ยหอยเกล็ดฟลอริดาน่า *Lindingaspis floridana* Ferris 11) เพลี้ยหอยเกล็ดไตรโลไบท์ *Pseudaonidia trilobitiformis* (Green) และ 12) เพลี้ยหอยเกล็ด *Pseudaonidia* sp. ซึ่งได้จัดทำแนวทางการวินิจฉัย (key) และรายละเอียดของเพลี้ยหอยเกล็ดทั้ง 12 ชนิด โดยตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชในประเทศไทย เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาอนุกรมวิธานโดยใช้เฉพาะลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวันเพศเมียเพื่อนำมาจำแนกชนิด และพบว่าในบ้างชนิดของเพลี้ยหอยเกล็ดที่ทำการศึกษายังไม่สามารถระบุชนิดเนื่องมีความใกล้เคียง กับชนิดอื่นๆ ที่พบในสกุลเดียวกัน เพื่อความถูกต้องและแม่นยำ ควรมีการศึกษาวิจัยด้านชีวโมเลกุลเพื่อตรวจสอบเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ นำไปจัดทำแนวทางการวินิจฉัย (key) และรายละเอียดของเพลี้ยหอยเกล็ดทั้ง 12 ชนิด โดยตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเฏษตร เพื่อจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชในประเทศไทย ใช้ในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูเพื่อดำเนินการด้านมาตรการสุขอนามัยในการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรไปยังประเทศคู่ค้าต่างๆ รวมถึงการหาแนวทางป้องกันกำจัดที่ถูกต้องเหมาะสมแก่เกษตรกรในอนาคตต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.2 การศึกษาอนุกรมวิธานตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera:Tephritidae) ร่วมกับการใช้เทคนิค Morphometric ในตัวเต็มวัย

Taxonomy of fruit fly larvae in Tribe Dacini (Diptera: Tephritidae) and using Morphometric Technique in adults

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ยุวรินทร์ บุญทบ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ชมัยพร บัวมาศ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	เกศสุดา สนสิริ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	จอมสุรางค์ ดวงธิสาร	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สิทธิสิโรดม แก้วสวัสดิ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

แมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ซึ่งเป็นศัตรูพืชมีความสำคัญทางเศรษฐกิจและด้านกักกันพืชที่สำคัญ ตัวอ่อนแมลงวันผลไม้สร้างความเสียหายให้กับการนำเข้าและส่งออกผัก ผลไม้ทั่วโลก และยากในการจำแนกชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก การศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ร่วม กับเทคนิคมอร์โฟเมตริกเพื่อช่วยจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ให้ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น โดยรวบรวมตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจากทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย พร้อมทั้งจัดทำแนวทางวินิจฉัยตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ในเผ่า Dacini จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *B. correcta, B. latifrons*, *B. dorsalis*, *B. umbrosa, Z. cucurbitae* และ *Z. tau* และจากการศึกษา morphometric ปีกแมลงวันผลไม้ 10 ชนิด ได้แก่ *B. carambolae, B. cilifera*, *B. correcta, B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa, B. tuberculata, B. zonata*, *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* พบว่าขนาดเซนทรอยด์มีความความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยพบว่า *B. latifrons* มีขนาดเซนทรอยด์เล็กสุด (5.533 ± 0.401) และ *B. tuberculata* มีขนาดใหญ่สุด (6.377 ± 0.306) และจากการศึกษารูปร่างของปีกด้วย Canonical variate analysis พบความแตกต่างระหว่างสกุล โดยรูปร่างปีกแมลงวันผลไม้ในสกุล *Zeugodacus* นั้นแยกออกมาจากสกุล *Bactrocera* อย่างชัดเจน และแมลงวันผลไม้ในสกุลเดียวกันจะมีรูปร่างของปีกคล้ายกันมากกว่าต่างสกุล การศึกษาครั้งนี้เป็นครั้งแรกในประเทศไทยที่ได้ทำแนวทาง การจำแนกชนิดที่ใช้ง่าย สะดวก ประหยัดเวลาในการจำแนกตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini อย่างไรก็ตามควรมีการ ศึกษาด้านชีวโมเลกุลเพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่างชนิดของตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ เพิ่มเติมในอนาคต

คำหลัก : ตัวอ่อน แมลงวันผลไม้ เซนทรอยด์ รูปร่างปีก

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Dacini fruit fly which are of prime economic and quarantine importance in the world. Larvae infested into fruit and cause serious problem about importing and exporting around the word. Species identification at larvae stages is difficult by morphological characteristics. Traditional taxonomy and morphometric technique for species identification is carried out for the precision and efficiency. The goal of this research to obtain the taxonomic character of dacine fruit flies larvae and information about wing morphometric. Collecting survey were done on many kind of fruit orchards and lure trapping all regions in Thailand. Six of dacine fruit flies larvae were re-described: *Bactrocera correcta*, *B. dorsalis*, *B latifrons*, *B. umbrosa*, *Zeugodacus cucurbitae* and *Z. tau*. A dichotomous key was prepared to enable rapid identification of larvae by using a combination of morphological features. Additionally, wing morphometrics were studied from 10 species: of *B. carambolae, B. cilifera*, *B. correcta, B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa, B. tuberculata, B. zonata*, *Z. cucurbitae* and *Z. tau*. Centroid sizes differed significantly among sampled species ($P > 0.05$). Centroid size of *B. latifrons* were smallest (5.533 ± 0.401 mm) and *B. tuberculata* were largest (6.377 ± 0.306 mm). Canonical variate analysis of the dataset based on the 10 species. Analysis revealed a clear pattern in which species of *Zeugodacus* clustered together and were clearly separated from the cluster comprising species of *Bactrocera*. This study has provided a simplified identification guide for initial morphological diagnosis of third larval stages. However, further molecular analysis is needed to clarify the distinction among other species.

Keyword: larvae, fruit fly, centroid, wing shape

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

แมลงวันผลไม้หรือแมลงวันทอง (fruit fly) เป็นแมลงศัตรูพืชที่สร้างความเสียหายกับผลไม้และผักในพื้นที่เขตร้อน (tropical) และเขตร้อนชื้น (sub-tropical) เป็นอย่างมาก ทั่วโลกพบแมลงวันผลไม้ในเผ่า Daciniมากกว่า 700 ชนิด (Krosch *et al*., 2012) สำหรับทวีปเอเชียนั้นพบว่าแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini เป็นแมลงวันผลไม้ที่มีสร้างความเสียหายจนเกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสกุล *Zeugodacus, Bactrocera* และ *Dacus* ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรอย่างสูง (Aluja and Norrbom, 2001) แมลงวันผลไม้เผ่า Dacini บางชนิดมีรูปร่างทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันมาก (Cameron *et al.,* 2010; Kitthawee and Rungsri, 2011; Hernández-Ortiz *et al.*, 2012; Schutze *et al.*, 2012; Krosch *et al*., 2013) ตัวเต็มวัยเข้าทำลายผักผลไม้โดย

การวางไข่กับผลที่มีเปลือกบางหรืออ่อนนุ่ม จากนั้นตัวอ่อนจะเจริญเติบโต กัดกินอยู่ภายในผลทำให้ผลไม้เน่าเสียก่อนการเก็บเกี่ยว และบ่อยครั้งพบว่าตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้ติดไปภายในผลพร้อมกับการส่งออกผักผลไม้

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จะเป็นการศึกษาชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ในระยะตัวอ่อนด้วยการศึกษาอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม (traditional taxonomy) และการประยุกต์ใช้การวิเคราะห์มอร์โฟเมตริกแบบจีโอเมตริก (morphometric geometrics) กับแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัย โดยข้อมูลที่ได้จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการอ้างอิงและเป็นข้อมูลสนับสนุนในการจัดจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ เผ่า Dacini รวมทั้งสามารถนำไปใช้ประยุกต์เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการป้องกันกำจัด รวมทั้งการนำเข้าส่งออกผักผลไม้ไปยังต่างประเทศต่อไป

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

- อุปกรณ์และสารเคมีในการเก็บตัวอย่างแมลง (ขวดดอง เอทิลอะซิเตท กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก)
- อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ เช่น ตะแกรง ขี้เลื่อย พลาสติกใสในกรงผ้า น้ำตาลผสมบรีเวอร์ยีสต์ในอัตรา 1:4
- กับดักแมลงวันผลไม้ชนิด กับดักถังเปียก (wet bucket trap)
- สารฟีโรโมนที่ใช้ล่อแมลงวันผลไม้ ได้แก่ Cue lure และ Methyl Eugenol
- กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope
- กล้องถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์
- อุปกรณ์ใช้ในการวาดภาพ
- สารเคมีในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ Canada balsam
- ตู้อบ /เครื่องอุ่นสไลด์
- แผ่นสไลด์แก้ว cover glass และกล่องเก็บสไลด์ถาวร
- เอกสารประกอบการจำแนกแมลงวันผลไม้

- วิธีการ

1. วิธีดำเนินการวิจัยเก็บตัวอย่างตัวอ่อนและตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้

- เก็บรวบรวมผลไม้ที่มีร่องรอยการทำลายของแมลงวันผลไม้ พร้อมพืชใส่ถุงพลาสติกหรือ กล่องพลาสติกเพื่อให้ระบายอากาศได้ดี บันทึกวันที่ เดือน ปี สถานที่เก็บ นำกลับมาเลี้ยงยังห้องปฏิบัติการ จนเป็นตัวเต็มวัย นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บตัวอย่างในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รวมทั้งเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยในแปลงเพาะปลูก และในสภาพธรรมชาติโดยใช้กับดักล่อแมลงวันผลไม้แบบ wet bucket trap ซึ่งประกอบด้วยสารล่อแมลงวันผลไม้ 2 ประเภท ได้แก่ CUE lure และ Methyl Eugenol

กรมวิชาการเกษตร

- การศึกษาครั้งนี้มีแผนการปฏิบัติการเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากพื้นที่การเกษตร และพื้นที่ป่าธรรมชาติ แต่เนื่องจากแมลงวันผลไม้แต่ละชนิดในเผ่า Dacini เข้าทำลายพืชอาหารแตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องเก็บรวบรวมตัวอ่อนแมลงวันผลไม้จากพืชให้มีความหลากหลายมากที่สุด โดยจะเก็บรวบรวมตัวอย่างจากพื้นที่ต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย (ในแต่ละปีจะออกเก็บตัวอย่าง ในทุกๆ เดือน หมุนเปลี่ยนไปในภาคต่างๆ ดังนี้ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคะวันออก ภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) ซึ่งภายในหนึ่งปีจะสามารถเก็บตัวอย่างได้ภาคละ 3 - 5 จังหวัด และในแต่ละจังหวัดเก็บสามจุดสำรวจ และใช้กับดักฟีโรโมน 2 ประเภทได้แก่ CUE lure และ Methyl Eugenol โดยติดตั้งใน พื้นที่เก็บตัวอย่างละ 5 อัน/ต่อจุดสำรวจ บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ (Global Positioning System: GPS) โดยแบ่งเป็น พื้นที่ต่างๆ ดังนี้

(1) แปลงพืชผักสวนครัว เช่น แตงกวา ฟักทอง และถั่วฝักยาว

(2) แปลงผลไม้ (ขึ้นอยู่กับพื้นที่ที่เข้าสำรวจในแต่ละจังหวัด)

(3) พื้นที่ป่าธรรมชาติ เช่น สวนพฤกษศาสตร์ และอุทยานแห่งชาติ

รายละเอียดจังหวัดที่เป็นตัวแทนพื้นที่ปลูกพืชที่ต้องการไปเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้

ปี 2560 สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจาก 3 ภาคดังนี้

(1) ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม นนทบุรี ปทุมธานี และนครนายก

(2) ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ตาก ราชบุรี และเพชรบุรี

(3) ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย น่าน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน แพร่ ลำปาง และลำพูน

ปี 2561 สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจาก 3 ภาคดังนี้

(1) ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดสระแก้ว ปราจีนบุรี ชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด

(2) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัด ขอนแก่น เลย หนองคาย หนองบัวลำภู สุรินทร์ บุรีรัมย์ และอุดรธานี

(3) ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง ตรัง สงขลา พังงา ระนอง และสตูล

- นำส่วนของพืชมายังห้องปฏิบัติการ และแยกตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ระยะ 3 ออกจากพืชอาศัย มาต้มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อทำให้ตัวหนอนคงสภาพที่สมบูรณ์และสีไม่เปลี่ยนแปลง จากนั้นดองตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ 95-100% (เพื่อใช้นำไปศึกษาอนุกรมวิธานของตัวอ่อน) นำตัวอ่อนที่เหลือใส่กล่องพลาสติกที่มีตะแกรงรองก้นซึ่งด้านล่างใส่ขี้เลื่อย นำกล่องพลาสติกใส่ในกรงผ้าเพื่อให้ตัวเต็มวัยเจริญออกมาให้อาหาร คือ น้ำตาลผสม บรีเวอร์ยีสต์ในอัตรา 1:4 เพื่อให้สืบนลำตัวพัฒนาได้ดี

- เตรียมตัวอย่างตัวเต็มวัยเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ โดยใช้ตัวอย่างตัวเต็มวัยที่อบแห้งหรือฆ่าด้วยเอทิลอะซิเตท หรือเก็บแมลงใส่หลอดแก้ว แช่ในช่องน้ำแข็ง 4 - 5 ชั่วโมง วิธีนี้จะทำให้สีไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อได้ตัวอย่างแล้วใช้เข็มขนาดเล็ก (micropin) แทงบริเวณด้านข้างของส่วนอกใต้ปีก ให้ไปทางด้านหน้าของลำตัว แล้วจึง

กรมวิชาการเกษตร

เสียบ micropin กับโฟมหรือ ค๊อกขนาดเล็กที่มีเข็มปักแมลงเสียบอยู่ โดยมีป้ายเล็ก ๆ บันทึก สถานที่ วันเดือน ปี และชื่อผู้เก็บ และมีป้ายบันทึก แยกบันทึกชื่อพืชที่เก็บมา และชื่อแมลงที่จำแนกได้อีก 1 ป้าย

2. การศึกษาอนุกรมวิธานตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ดำเนินการปี 2560-2561)

- นำตัวอย่างตัวอ่อนแมลงวันผลไม้มาศึกษาลักษณะต่างๆ โดยละเอียด ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตรวจดูลักษณะที่แตกต่างกันซึ่งเป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกชนิด

- ทำสไลด์ถาวรลักษณะบางอย่างที่มีความสำคัญในการจัดจำแนกชนิด เช่น รยางค์ปาก หรือบริเวณด้านท้ายของลำตัว เพื่อใช้ในการทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดตัวอ่อนแมลงวันผลไม้

- บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น รูปร่าง ลักษณะ ขนาด และสีเป็นต้น ตรวจสอบ ลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดของตัวอ่อนแมลงวันผลไม้

- บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยา โดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้าย บันทึกของขวดดองตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ทุกขวด ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน เดือน ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

- จัดทำแนวทางวินิจฉัย (dichotomous key) ชนิดของตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ในเผ่า Dacini ที่รวบรวม ได้พร้อมภาพประกอบ

- จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง

3. การศึกษาอนุกรมวิธานแมลงด้วยเทคนิค morphometric (ดำเนินการปี 2561)

- ทำสไลด์ปีกถาวรเพื่อใช้ในการศึกษา morphometric ของปีกโดยใช้แมลงวันผลไม้ จำนวน 20 ตัวอย่าง/ชนิด

- ตัดส่วนปีกด้านขวาของแมลงวันผลไม้ มาวางบนสไลด์ ที่หยดน้ำยา canada balsam แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 40 - 45 องศาเซลเซียส ให้แห้งรวม 2 - 6 สัปดาห์ จึงนำออกมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่มีกำลังขยายสูง

- ถ่ายภาพปีกและกำหนดจุดสังเกต (landmark) ของปีกแมลงวันผลไม้ โดยใช้โปรแกรม TPS Dig2 เป็นตัวกำหนดและสร้างไฟล์ในรูปแบบ ของ TPS.file

- ศึกษาความแตกต่างของสัณฐานวิทยา โดยใช้ โปรแกรม Morpho J เป็นตัววิเคราะห์ความแตกต่างของรูปร่างของปีกแมลงวันผลไม้ชนิดต่างๆ

กรมวิชาการเกษตร

- ศึกษาการเปลี่ยนแปลงขนาดของร่างกายที่มีผลต่อรูปร่างของปีก (allometry) โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยการทำการทดสอบแบบถดถอย (regression analysis) พร้อมทั้งศึกษาขนาดของเซนทรอยด์ (centroids size) และรูปร่างของปีก (wing shape) แมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ

- จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์โดยแบ่ง เป็น หมวดหมู่ตามระบบสากล ของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง (แมลงวันผลไม้ ทุกชนิดที่รายงาน ไว้ต้องเก็บรักษาตัวอย่างจริงไว้ เพื่อการตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง)

เวลาและสถานที่

1) แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่างๆ ของภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัย โดยการเก็บตัวหนอนจากพืชอาหาร ชนิดต่างๆ เช่น บวบ เมล่อน พริก ฝรั่ง และมะม่วง รวมทั้งติดตั้งกับดักแมลงวันผลไม้ด้วยสารล่อ ประเภท CUE lure และ Methyl eugenol เพื่อนำตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากทั่วทุกภาคของประเทศไทย (Table 1.1.2.1) ไปใช้ในการศึกษา morphometrics

ลักษณะทางอนุกรมวิธานของตัวอ่อนแมลงวันผลไม้

จากการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานของตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ที่ได้จากพืชอาหารชนิดต่าง ๆ โดยใช้ตัวอ่อนระยะที่ 3 (third instar) ซึ่งเป็นระยะที่ตัวอ่อนเจริญเติบโตเต็มที่ก่อนจะเข้าดักแด้ จัดเป็นระยะที่ตัวอ่อนมีความสมบูรณ์และเหมาะสมที่สุดในการนำมาศึกษาอนุกรมวิธาน (Figure 1.1.2.1) และจากการเลี้ยงตัวอ่อนเพื่อศึกษาอนุกรม วิธานนั้น พบว่าวงจรชีวิตแมลงวันผลไม้แต่ละชนิดมีระยะเวลาแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแมลงวันผลไม้และชนิดของพืชอาหาร รวมทั้งอุณหภูมิและสภาพแวดล้อมนั้น ๆ โดยวงจรชีวิตแมลงวันผลไม้นั้นเริ่มจากแมลงวันผลไม้เพศเมียวางไข่โดยแทงอวัยวะวางไข่ที่ตั้งอยู่บริเวณปลายสุดของส่วนท้อง ลงในเนื้อเยื่อผักหรือผลไม้ลึกประมาณ 3 มิลลิเมตร ไข่ของแมลงวันผลไม้มีสีขาว ลักษณะยาวรีประมาณ 1 มิลลิเมตร ระยะไข่ใช้เวลา 2 - 4 วัน จากนั้นจะฟักเป็นตัวอ่อนมีลักษณะเป็นตัวหนอน (maggot หรือ larvae) และกัดกินอยู่ภายในผล ตัวหนอนมีสีครีม เรียวยาวและบริเวณส่วนปลายตัดทู่ โดยพบว่าบริเวณส่วนหัวมีลักษณะเรียวแหลมและบริเวณด้านหน้าของส่วนปากจะมีลักษณะโครงกระดูกที่มีลักษณะคล้ายตะขอ (mouth hook: cephalopharyngeal) ก่อให้เกิดประโยชน์ในการฉีกกินเนื้อผักและผลไม้ ตัวหนอนมีการเจริญเติบโต 3 ระยะ (9 - 12 วัน) เมื่อเติบโตเต็มที่มีสีเหลืองอ่อน ความยาวประมาณ 9 มิลลิเมตร ขึ้นอยู่กับชนิดของแมลงวันผลไม้ และอาหาร (Table 2) จากนั้นจะพัฒนาเป็นดักแด้ ที่มีลักษณะคล้ายถัง

กรมวิชาการเกษตร

เบียร์สีน้ำตาล (obtect) และดักแด้จะแตกออกเจริญเติบโตกลายเป็นตัวเต็มวัย (8 - 10 วัน) ตัวเต็มวัยมีระยะการเจริญเติบโตของแมลงวันผลไม้ประมาณ 85 - 115 วัน

การศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานของตัวอ่อนแมลงวันผลไม้พบว่าลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดนั้นได้แก่

1. ปาก (mouth hook) คือ ส่วนของปากที่มีลักษณะเป็นโครงสร้างแข็ง (cephalopharygeal) ซึ่งประกอบด้วย (Figure 1.1.2.2)

- apical tooth : ส่วนปลายสุดของฟัน
- pre - apical tooth : ส่วนที่เป็นโครงสร้างแข็ง พบก่อนบริเวณล่างสุดของฟัน
- neck : พื้นที่ด้านหลัง ventral apodeme
- dorsal apodeme : ส่วนที่เป็นโครงสร้างแข็ง พบก่อนบริเวณด้านบนของกราม

2. รูหายใจด้านหน้า (anterior spiracle) (Figure 1.1.2.3) เป็นรูหายใจที่พบบริเวณด้านข้างของลำตัว โดยรูหายใจนี้จะติดอยู่ส่วนหน้าของลำตัว มีลักษณะเป็นเนื้อยื่นออกมาคล้ายนิ้วมือ (tubules) มีรูปร่างและจำนวนแตกต่างกันในแต่ละชนิดของแมลงวันผลไม้

3. บริเวณส่วนท้ายของลำตัว (caudal segment) และรูหายใจบริเวณท้าย (posterior spiracle) (Figure 4) เป็นส่วนปลายสุดของตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ ซึ่งประกอบด้วยส่วนสำคัญต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกชนิดตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ ได้แก่

- ส่วนของรูหายใจด้านหลังมีลักษณะและจำนวนแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดแมลงวันผลไม้
- Tubercles เป็นเนื้อเยื่อที่พบบริเวณส่วนปลายท้องของตัวอ่อน ซึ่งระยะห่างระหว่าง tubercle และพื้นที่ระหว่าง tubercle นั้นจะมีลักษณะที่แตกต่างกัน

กรมวิชาการเกษตร

<u>แนวทางวินิจฉัยตัวอ่อนแมลงวันแมลงวันผลไม้ เผ่า Dacini</u>

1. Posterior end with a short transverse line at the apex (between the tubercles) (Figure 4); posteriors spiracular slits nearly equidistant from each other and nearly parallel ..... 2 (Genus *Zeugodacus*)

- Posterior end without a transverse line at the apex (between the tubercles); posteriors spiracular slits variable..... 3 (Genus *Bactrocera*)

2. Preapical tooth present. Anterior spiracle with 16 - 23 tubules.....*Z. cucurbitae*

-Preapical tooth absent. Anterior spiracle with 14 -16 tubules.....*Z. tau*

3. Anterior spiracle with less than 14 tubules 4

- Anterior spiracle with more than 14 tubules.....5

4. Anterior spiracles with 9-11 tubules.....*B. correcta*

-Anterior spiracles with 10-12 tubules.....*B. dorsalis* complex

5. Anterior spiracle with 13-18.....*B. latifrons*

- Anterior spiracle with 18 -21 tubules; each tubercle below posterior spiracle bearing two papillae.....*B. umbrosa*

***Bactrocera* (*Bactrocera*) *correcta* (Bezzi)**

(Figure 1.1.2.5A, 1.1.2.6A and 1.1.2.7A)

Chaetodacus correctus Bezzi, 1916: 107. Syntypes in ZSI.

Bactrocera Zonata - Bezzi, 1913: 94, [Misidentification] see Bezzi, 1916: 106.

Dacus dutti Kapoor, 1971: 480; Kapoor 1993: 74 (Synonym)

Strumeta paratuberculatus Philip, 1950: 31; Norrbom *et al*., 1998: 89 (Synonym)

Dacus bangaloriensis Agarwal & Kapoor, 1983: 169; Norrbom *et al*., 1998: 89 (Synonoym)

Dacus (*Strumeta*) *correctus* - Hardy, 1973: 38.

Bactrocera (*Bactrocera*) *correcta* - Norrbom *et al*., 1998: 89; Drew & Raghu, 2002: 335; Drew *et al*., 207: 2.

ชื่อสามัญ : แมลงวันฝรั่ง (guava fruit fly)

ความยาวของลำตัว : 7.5 - 9 มิลลิเมตร **ความกว้างของลำตัว** : 1.4 – 1.5 มิลลิเมตร

ตัวอ่อนรูปร่างยาวรี หัวเรียวเล็ก ส่วนท้ายจะมีขนาดใหญ่กว่าส่วนหัว (tapering anteriorly) มีสีขาวค่อนข้างเหลือง บางส่วนของตัวอ่อนจะมีเส้นแข็งพาดขวางด้านใต้ของรูหายใจและตัวอ่อนระยะสุดท้ายสามารถดีดตัวได้

ส่วนหัว : cephalic lobes

ปาก : บริเวณส่วนปลายของฟัน (apical tooth) มีลักษณะเรียว ยาว แหลม รูปร่างคล้ายเคียว ไม่มี pre-apical tooth ส่วนของคอ (neck) มีขนาดสั้นเมื่อเทียบกับความยาวของฟัน dorsal apodeme ยื่นออกไปจากส่วนของกรามอย่างเห็นได้ชัด (Figure 1.1.2.5A)

รูหายใจด้านหน้า : รูหายใจมีลักษณะโค้งนูนบริเวณขอบ มีจำนวนตั้งแต่ 9 -11 อัน (Figure 1.1.2.6A)

กรมวิชาการเกษตร

รูหายใจด้านหลัง : อยู่บริเวณส่วนท้ายสุดของหนอน แต่ละข้างจะประกอบด้วยแท่งข้างละ 3 แท่ง รูหายใจที่ส่วนท้องไม่สามารถแยกอย่างเห็นได้ชัดจากส่วนปล้องท้องสุดท้าย รูหายใจที่ส่วนปลายท้อง (spiracular slit) มีจำนวน 3 อัน ยาวเรียวเป็น 2- 3 เท่าของความกว้าง และมีลักษณะคล้ายกันเกือบจะเท่ากัน และพื้นที่บริเวณรูหายใจแต่ละอันมีลักษณะเรียบ (Figure 1.1.2.7A)

ลักษณะการทำลาย : ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ ตัวหนอนกัดกิน และเจริญเติบโตในผลไม้หลากหลายชนิด

ส่วนของพืชที่พบตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เข้าทำลาย : ผล

พืชอาหาร : ชมพู่ ฝรั่ง กระท้อน มะละกอ กล้วย กระท้อน พุทรา ละมุด น้อยหน่า และมะม่วง

เขตการแพร่กระจาย : จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน น่าน นครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น อุดรธานี อุบลราชธานี หนองคาย มหาสารคาม กาญจนบุรี ตาก จันทบุรี ระยอง สุราษฎร์-ธานี ชุมพร ระนอง ตรัง พัทลุง สงขลา นครศรีธรรมราช กระบี่ พังงา ภูเก็ต กรุงเทพมหานคร นครปฐม สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : EMBT.L 0601 **–** EMBT.L 0620 (20 ตัวอย่าง)

Bactrocera (*Bactrocera*) *dorsalis* Hendel

(Figure 1.1.2.5B, 1.1.2.6B and 1.1.2.7B)

Musca ferruginea Fabricius, 1974: 342. Peroccupied by *Musca ferruginea* - Scopoli, 1763 (see Hardy, 1969: 396).

Dacus ferruginea Fabricius, 1805: 274.

Dacus dorsalis Hendel, 1912: 18. Lectotype female in BMNH.

Bactrocera ferruginea - Bezzi, 1913: 95.

Chetodacus ferrugineus var. *dorsalis* - Hendel, 1915: 426.

Chetodacus ferrugineus - Bezzi, 1916: 104.

Chetodacus ferrugineus dorsalis - Bezzi, 1916: 104.

Chetodacus ferrugineus var. *okinawanus* Shiraki, 1933: 62; Hardy 7 Adachi, 1956: 8; Hardy, 1969: 402 (Synonym).

Dacus (Strumeta) dorsalis - Hardy 7 Adachi, 1956: 7; Hardy, 1969: 395; 1973: 41; 1974: 29.

Strumeta dorsalis - Hering, 1956: 63.

Strumeta ferruginea - Hering, 1956: 63.

Strumeta dorsalis okinawana - Shiraki, 1968: 23.

Dacus (*Bactrocera*) *dorsalis* - Hardy, 1997: 49; Drew. 1982: 60; Drew, 1989: 63.

Dacus (*Bactrocera*) *semifemoralis* Tseng, Chen & Chu, 1992: 46. New Synonym.

กรมวิชาการเกษตร

Dacus (*Bactrocera*) *yilanensis* Tseng, Chen & Chu, 1992: 52. New Synonym.

Bactrocera (*Bactrocera*) *dorsalis* - Drew & Hancock, 1994a: 17, Lectotype designation; Norrbom *et al*., 1998: 90; Drew *et al*., 2007: 3.

Bactrocera (*Bactrocera*) *variabilis* Lin & Wang, in Lin *et al*., 2011b: 896. Holotype in HEIQ. New Synonym.

Bactrocera (*Bactrocera*) *dorsalis* - Schutze *et al.,* 2015

ชื่อสามัญ แมลงวันผลไม้ (oriental fruit fly)

ความยาวของลำตัว : 8 - 11 มิลลิเมตร **ความกว้างของลำตัว** : 1.7 -1.8 มิลลิเมตร

ตัวหนอนมีรูปร่างยาวรี หัวเรียวเล็ก ส่วนท้ายจะมีขนาดใหญ่กว่าส่วนหัว มีสีขาวค่อนข้างเหลือง บางส่วนของตัวอ่อนจะมีเส้นแข็ง พาดขวางด้านใต้ของรูหายใจและตัวอ่อนระยะสุดท้ายสามารถดีดตัวได้

ส่วนหัว : cephalic lobes พัฒนาได้ดี

ปาก : บริเวณส่วนปลายของฟันมีลักษณะ ผอม แหลม ไม่มี pre-apical tooth ส่วนของคอ มีขนาดสั้นเมื่อเทียบกับความยาวของฟัน dorsal apodeme ยื่นออกไปจากส่วนของกรามอย่างเห็นได้ชัด (Figure 1.1.2.5B)

รูหายใจด้านหน้า : รูหายใจมีลักษณะโค้งนูนบริเวณขอบ มีจำนวนตั้งแต่ 10 - 12 อัน (Figure 1.1.2.6B)

รูหายใจด้านหลัง : รูหายใจที่ส่วนท้องไม่สามารถแยกอย่างเห็นได้ชัดจากส่วนปล้องท้องสุดท้าย รูหายใจที่ส่วนปลายท้องมีจำนวน 3 อัน ยาวเป็น 2- 3 เท่าของความกว้าง และมีลักษณะคล้ายกันเกือบจะเท่ากัน และพื้นที่บริเวณรูหายใจแต่ละอันมีลักษณะเรียบ (Figure 1.1.2.7B)

พืชอาหาร : ชมพู่ ลำไย กระท้อน น้อยหน่า ขนุน มะละกอ ลิ้นจี่ กล้วย เงาะ ฝรั่ง พุทรา และมะม่วง

ส่วนของพืชที่พบตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เข้าทำลาย : ผล

ลักษณะการทำลาย : ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ และตัวหนอนกัดกิน และเจริญเติบโตผล

การแพร่กระจาย : จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน น่าน นครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น อุดรธานี อุบลราชธานี หนองคาย มหาสารคาม กาญจนบุรี ตาก จันทบุรี ระยอง สุราษฎร์ธานี ชุมพร ระนอง ตรัง พัทลุง สงขลา นครศรีธรรมราช กระบี่ พังงา ภูเก็ต กรุงเทพมหานคร นครปฐม สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : EMBT.L 0701 **–** EMBT.L 0720 (20 ตัวอย่าง)

Bactrocera (*Bactrocera*) *latifrons* (Hendel)

(Figure 1.1.2.5C, 1.1.2.6C and 1.1.2.7C)

Chaetodacus latifrons Hendel, 1915: 425. Lectotype male in BMNH.

Dacus amoyensis Froggatt, 1909: 36, nomen nudum.

Dacus parvulus Hendel, 1912: 12: 21; White & Liquido, 1995: 250 - 252 (Synonym).

กรมวิชาการเกษตร

Chaetodacus antennalis Shiraki, 1933: 56; Hardy, 1973: 49 as synonym of *D. parvulus* Hendel; White & Liquido, 1995: 250 - 252.

Bactrocera (*Bactrocera*) *laitfrons* - White & Liquido, 1995: 251, Lectotype designation; Norrbom *et al*., 1998: 91

ชื่อสามัญ : แมลงวันทองมะเขือ หรือ แมลงวันทองพริก (solanum fruit fly)

ความยาวของลำตัว : 7.5 – 8.5 มิลลิเมตร **ความกว้างของลำตัว** : 1.1 - 1.2 มิลลิเมตร

ตัวหนอนมีรูปร่างยาวรี หัวเรียวเล็ก ส่วนท้ายจะมีขนาดใหญ่กว่าส่วนหัวมีสีขาวค่อนข้างเหลือง บางส่วนของตัวอ่อนจะมีเส้นแข็งพาดขวางด้านใต้ของรูหายใจและตัวอ่อนระยะสุดท้ายสามารถดีดตัวได้

ส่วนหัว : cephalic lobes พัฒนาได้ดี

ปาก : บริเวณส่วนปลายของฟันมีลักษณะแหลม ไม่มี pre-apical tooth ส่วนของคอมีขนาดสั้นเมื่อเทียบกับความยาวของฟัน ไม่มี Dorsal apodeme (Figure 1.1.2.5C)

รูหายใจด้านหน้า : รูหายใจมีลักษณะโค้งนูนบริเวณขอบ มีจำนวนตั้งแต่ 13 -18 อัน ในบางตัวอย่างที่นำมาศึกษาพบว่า ทิศทางของ tubule นั้น ไม่ได้ตั้งอยู่ในทางเดียวกัน (Figure 1.1.2.6C)

รูหายใจด้านหลัง : รูหายใจที่ส่วนท้องไม่สามารถแยกอย่างเห็นได้ชัดจากส่วนปล้องท้องสุดท้าย รูหายใจที่ส่วนปลายท้องมีจำนวน 3 อัน ยาวเป็น 2- 3 เท่าของความกว้าง และมีลักษณะคล้ายกันเกือบจะเท่ากัน และพื้นที่บริเวณรูหายใจแต่ละอันมีลักษณะเรียบ (Figure 1.1.2.7C)

พืชอาหาร : พืชตระกูลพริก มะเขือเปราะ และมะเขือยาว

ส่วนของพืชที่พบตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เข้าทำลาย : ผล

ลักษณะการทำลาย : ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ ตัวหนอนกัดกิน และเจริญเติบโตในผล

การแพร่กระจาย : จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน น่าน นครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น อุดรธานี อุบลราชธานี หนองคาย มหาสารคาม กาญจนบุรี ตาก จันทบุรี ระยอง สุราษฎร์ธานี ชุมพร ระนอง ตรัง พัทลุง สงขลา นครศรีธรรมราช กระบี่ พังงา ภูเก็ต กรุงเทพมหานคร นครปฐม สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : EMBT.L 0901 **–** EMBT.L 0920 (20 ตัวอย่าง)

Bactrocera (*Bactrocera*) *umbrosa* (Fabricius)

(Figure 1.1.2.5D, 1.1.2.6D and 1.1.2.7D)

Dacus umbrosa Fabricius, 1805: 274. Lectotype in UZMC.

Dacus fascipennis Wiedemann, 1819: 28; Bezzi, 1913: 72 (Synonym); Hardy, 1968: 146.

Bactrocera fasciatipennis Doleschall, 1856: 412; Osten - Sacken, 1881 (fide Bezzi, 1913: 71) (Synonym).

กรมวิชาการเกษตร

Dacus conformis Walker, 1856a: 34; Osten - Sacken, 1881 (fide Bezzi, 1913: 69) (Synonym)

Dacus diffsus Walker, 1860: 153; Hardy, 1959: 169-70 (Synonym).

Dacus frenchi Froggatt, 1909: 92 - 3; Bezz, 1913: 72; Bezzi, 1919: 417 (Synonym).

Dacus (*Bactrocera*) *umbrosus* - Malloch, 1939b: 412; Drew, 1982: 75-8: Hardy, 1982: 25.

Strumeta umbrosa - Perkins, 1939: 12.

Strumeta frenchi - Perkins, 1939: 13.

Dacus (*Strumeta*) *umbrosus* - Hardy and Adachi, 1954: 184; Hardy, 1973: 52, Lectotype designation by inference of holotype; Drew, 1974a: 88 - 92.

Bactrocera (*Bactrocera*) *umbrosa* - Drew, 1989: 165; Norrbom *et al*., 1998: 96.

Bactrocera (*Bactrocera*) *lacerate* White & Evenhuis, 1999: 497. New Synonym.

ชื่อสามัญ : แมลงวันทองขนุน (bread fruit fly)

ความยาวของลำตัว : 7.5 – 10.5 มิลลิเมตร **ความกว้างของลำตัว** : 1.1 - 1.3 มิลลิเมตร

ตัวหนอนมีรูปร่างยาวรี หัวเรียวเล็ก ส่วนท้ายจะมีขนาดใหญ่กว่าส่วนหัวมีสีขาวค่อนข้างเหลือง บางส่วนของตัวอ่อน จะมีเส้นแข็ง พาดขวางด้านใต้ของรูหายใจและตัวอ่อนระยะสุดท้ายสามารถดีดตัวได้

ส่วนหัว : cephalic lobes พัฒนาได้ดี

ปาก : บริเวณส่วนปลายของฟันมีลักษณะแหลม ไม่มี pre-apical tooth ส่วนของคอมีขนาดสั้นเมื่อเทียบกับความยาวของฟัน ไม่มี dorsal apodeme (Figure 1.1.2.5D)

รูหายใจด้านหน้า : รูหายใจมีลักษณะโค้งนูนบริเวณขอบ มีจำนวนตั้งแต่ 18 -21 อัน (Figure 1.1.2.6D)

รูหายใจด้านหลัง : รูหายใจที่ส่วนท้องไม่สามารถแยกอย่างเห็นได้ชัดจากส่วนปล้องท้องสุดท้าย รูหายใจที่ส่วนปลายท้องมีจำนวน 3 อัน ยาวเป็น 2- 3 เท่าของความกว้าง และมีลักษณะคล้ายกันเกือบจะเท่ากัน และพื้นที่บริเวณรูหายใจแต่ละอันมีลักษณะเรียบ (Figure 1.1.2.7D)

พืชอาหาร : ขนุนและจำปาดะ

ส่วนของพืชที่พบตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เข้าทำลาย : ผล

ลักษณะการทำลาย : ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ ตัวหนอนกัดกิน และเจริญเติบโตในผล

การแพร่กระจาย : จังหวัดชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง และตรัง

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : EMBT.L 1301 **–** EMBT.L 1320 (20 ตัวอย่าง)

Zeugodacus (*Zeugodacus*) *cucurbitae* (Coquillett)

(Figure 1.1.2.5E, 1.1.2.6E and 1.1.2.7E)

Dacus cucurbitae Coquillet, 1899: 129: Froggatt, 1909: 84. Lectotype female and Paralectotypes (1 male and 1 female) in USNM.

กรมวิชาการเกษตร

Bactrocera cucurbitae - Bezzi, 1913: 96.

Chaetodacus cucurbitae - Bezzi, 1916: 109; Hendel, 1915: 426, 1927a: 28; Shiraki, 1933:73.

Strumeta cucurbitae - Perkins, 1938a: 127.

Dacus (*Strumeta*) *cucurbitae* - Hardy & Adachi, 1954: 164; Hardy. 1973: 38, 1974: 27.

Dacus (*Zeugodacus*) *cucurbitae* - Drew, 1973: 23; Hardy, 1977: 57, 1982: 203, 1983: 36.

Dacus aureus Tseng & Chu, 1982: 85.

Bactrocera (*Zeugodacus*) *cucurbitae* - Drew, 1989: 212, Lectotype designation.

Dacus yuiliensis Tseng & Chu, 1992: 84 (New name by May, 1951: 10). Record of original synonymy unknown, see Norrbom *et al*., 1998: 102.

Zeugodacus (*Zeugodacus*) *cucurbitae* - Virgilio *et al*., 2015: 171

ชื่อสามัญ : แมลงวันแตง (melon Fly)

ความยาวของลำตัว : 9 -11 มิลลิเมตร **ความกว้างของลำตัว** : 1.2 -1.3 มิลลิเมตร

ตัวหนอนมีรูปร่างยาวรี หัวเรียวเล็ก ส่วนท้ายจะมีขนาดใหญ่กว่าส่วนหัวมีสีขาวค่อนข้างเหลือง บางส่วนของตัวอ่อน จะมีเส้นแข็ง พาดขวางด้านใต้ของรูหายใจและตัวอ่อนระยะสุดท้ายสามารถดีดตัวได้

ส่วนหัว : cephalic lobes พัฒนาได้ดี

ปาก : บริเวณส่วนปลายของฟันมีลักษณะแหลม และมี pre-apical tooth ขนาดเล็กยื่นออกมา ส่วนของคอมีขนาดสั้นเมื่อเทียบกับความยาวของฟัน ส่วนของ dorsal apodeme ทู่แบะยื่นออกไปเล็กน้อย (Figure 1.1.2.5E)

รูหายใจด้านหน้า : มีจำนวนตั้งแต่ 16 -23 อัน (Figure 1.1.2.6E)

รูหายใจด้านหลัง : รูหายใจที่ส่วนท้องไม่สามารถแยกอย่างเห็นได้ชัดจากส่วนปล้องท้องสุดท้าย รูหายใจที่ส่วนปลายท้องมีจำนวน 3 อัน ยาวเป็น 2- 3 เท่าของความกว้าง และมีลักษณะคล้ายกันเกือบจะเท่ากัน และพื้นที่บริเวณรูหายใจแต่ละอันมีลักษณะเรียบ (Figure 1.1.2.7E)

พืชอาหาร : พืชตระกูลแตง เช่น แตงโม ฟักเขียว แตงไทย แตงกวา มะระจีน มะระขี้นก บวบ เหลี่ยม บวบงู เมล่อน และตำลึง

ส่วนของพืชที่พบตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เข้าทำลาย : ผล

ลักษณะการทำลาย : ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ ตัวหนอนกัดกิน และเจริญเติบโตในพืชผักผลไม้หลายชนิด

การแพร่กระจาย : จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน น่าน นครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น อุดรธานี อุบลราชธานี หนองคาย มหาสารคาม กาญจนบุรี ตาก จันทบุรี ระยอง สุราษฎร์ธานี ชุมพร ระนอง ตรัง พัทลุง สงขลา นครศรีธรรมราช กระบี่ พังงา ภูเก็ต กรุงเทพมหานคร นครปฐม สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : EMBT.L1601 – EMBT.L1620 (20 ตัวอย่าง)

กรมวิชาการเกษตร

Zeugodacus (*Zeugodacus*) *tau* (Walker)

(Figure 1.1.2.5F, 1.1.2.6F and 1.1.2.7F)

Dasyneura tau Walker, 1849: 1074. Syntype male in BMNH.

Dacus hagoni de Meijere, 1911: 375, type locality, Sumatra.

Dacus caudatus Var. nubilus Hendel, 1912: 16, type locality Taiwan; White & Wang, 1992: 278 (Synonym).

Dacus nubilus spp. femoralis Hendel, 1934: 11, type locality China.

Dacus (*Zeugodacus*) *tau* - Hardy, 1977: 60

Bactrocera (*Zeugodacus*) *tau* Wang, 1996: 72.

Bactrocera (*Zeugodacus*) *tau* - Norrbom *et al*., 1998: 104.

Dacus (*Zeugodacus*) *elegantis* Tseng, Chen & Chu, 1992: 61. New Synonym.

Dacus (*Zeugodacus*) *flavus* Tseng, Chen & Chu, 1992: 63. New Synonym

Zeugodacus (*Zeugodacus*) *tau* - Virgilio *et al*., 2015: 171

ชื่อสามัญ :

ความยาวของลำตัว : 7.5 - 9 มิลลิเมตร **ความกว้างของลำตัว** : 1.1 – 1.2 มิลลิเมตร

ตัวหนอนมีรูปร่างยาวรี หัวเรียวเล็ก ส่วนท้ายจะมีขนาดใหญ่กว่าส่วนหัว มีสีขาวค่อนข้างเหลือง บางส่วนของตัวอ่อน จะมีเส้นแข็ง พาดขวางด้านใต้ของรูหายใจและตัวอ่อนระยะสุดท้ายสามารถดีดตัวได้

ส่วนหัว : cephalic lobes พัฒนาได้ดี

ปาก : บริเวณส่วนปลายของฟันมีลักษณะแหลม ไม่มี pre-apical tooth ขนาดเล็กยื่นออกมา ส่วนของคอมีขนาดยาวเมื่อเทียบกับความยาวของฟัน ส่วนของ dorsal apodeme แหลมผอม ยื่นออกไปมาก (Figure 1.1.2.5F)

รูหายใจด้านหน้า : รูหายใจมีลักษณะโค้งนูนบริเวณขอบ มีจำนวนตั้งแต่ 14 -16 อัน (Figure 1.1.2.6F)

รูหายใจด้านหลัง : รูหายใจที่ส่วนท้องไม่สามารถแยกอย่างเห็นได้ชัดจากส่วนปล้องท้องสุดท้าย รูหายใจที่ส่วนปลายท้องมีจำนวน 3 อัน ยาวเป็น 2- 3 เท่าของความกว้าง และมีลักษณะคล้ายกันเกือบจะเท่ากัน และพื้นที่บริเวณรูหายใจแต่ละอันมีลักษณะเรียบ (Figure 1.1.2.7F)

พืชอาหาร : พืชตระกูลแตง เช่น แตงกวา แตงโม ฟัก มะระ และ เมล่อน

ส่วนของพืชที่พบตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เข้าทำลาย : ผล

ลักษณะการทำลาย : ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ ตัวหนอนกัดกิน และเจริญเติบโตในผล

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : EMBT.L 1901 **–** EMBT.L 1920 (20 ตัวอย่าง)

การแพร่กระจาย : จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน น่าน นครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น อุดรธานี อุบลราชธานี หนองคาย มหาสารคาม กาญจนบุรี ตาก จันทบุรี ระยอง สุราษฎร์ธานี ชุมพร ระนอง ตรัง พัทลุง สงขลา

กรมวิชาการเกษตร

นครศรีธรรมราช กระบี่ พังงา ภูเก็ต กรุงเทพมหานคร นครปฐม สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์

2. การศึกษาอนุกรมวิธานแมลงด้วยเทคนิค Morphometric

2.1 กำหนดจุดสังเกต (Landmark based data)

การกำหนดจุดสังเกตลงบนปีกซึ่งเป็นอวัยวะที่เราต้องการศึกษา โดยข้อมูลที่ได้จะเป็นข้อมูลพิกัดคาร์ทีเซียน (cartesian coordinate) ซึ่งเป็นข้อมูลที่อยู่ในระนาบสองมิติ (x,y) หรือระนาบสามมิติ (x,y,z) โดยจุดสังเกตนั้นเป็นจุดที่แสดงถึงความสัมพันธ์เชิงหน้าที่ของโครงสร้างหรืออวัยวะที่เรียกว่า “โฮโมโลจี” (homology) โดยมีลักษณะเป็นจุดคู่เหมือน (homologous point) คือเป็นจุดที่มีตำแหน่งตรงกันทั้งในระดับภายในประชากร (interspecies) และระหว่างประชากร (interspecies) (Figure 1.1.2.8 – 1.1.2.9 และ Table 1.1.2.3) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างและความแปรผันทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างปีกแมลงวันผลไม้

2.2 ขนาดเซนทรอยด์ (centroids size) จากปีกของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

จากการศึกษาขนาดของเซนทรอย์ด้วยวิธีการทาง morphometrics จากปีกของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini จำนวน 10 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยขนาดเซนทรอยด์จากแมลงวันทองฝรั่ง *B. latifrons* มีขนาดเล็กสุด (5.533 ± 0.401) และ *B. tuberculata* มีขนาดใหญ่สุด (6.377 ± 0.306) (Figure 1.1.2.10 และ Table 1.1.2.4)

2.3 Procrustes Superimposition

การศึกษา Procrustes superimposition เป็นการกำหนดค่า co-ordinate data ขึ้นมาใหม่สำหรับแมลงวันผลไม้แต่ละตัว ในการศึกษาครั้งนี้ได้กำหนดจุดสังเกตขึ้นมา 15 จุดสังเกต ในรูปแบบ 2 มิติ จะเป็นข้อมูลพิกัดคาร์ทีเซียน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันออกไปใน 2 แกน (Table 1.1.2.5) และจากค่า Procrustes superimposition ชี้ให้เห็นว่าจุดสังเกตที่ 4 นั้น มีความแปรผันมากกว่าจุดสังเกตตำแหน่งอื่น ๆ และในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบว่ามี outliers จึงสามารถนำข้อมูลนี้ไปศึกษาความแปรผันของปีกแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ต่อไปได้ (Figure 1.1.2.11)

2.4 การศึกษา allometric effect ด้วยกระบวนการ multiple regression

การกำหนดค่า allometric effect ของการทำ multiple regression จากรูปร่างของปีกแมลงวันผลไม้ ต่อขนาดของเซนทรอยด์พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยแสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของ allometric effect ($P < 0.0001$) และมีค่าของการแปรผันของรูปร่างปีก (shape variation) เท่ากับ 1.51 % ดังนั้น จึงสามารถยืนยันได้ว่า ผลกระทบจาก allometric นั้น ไม่ได้มีผลต่อรูปร่างของปีกแมลงวันผลไม้ เผ่า Dacini (Figure 1.1.2.12) ซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปศึกษารูปร่างของปีก (wing shape) ต่อไปได้

กรมวิชาการเกษตร

2.5 การวิเคราะห์รูปร่างของปีกแมลงวันผลไม้ตามหลักการ Canonical variate analysis (CVA)

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของรูปร่างปีกจากแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ทั้ง 10 ชนิดตามหลักการ Canonical variate analysis (CVA) พบความแตกต่างระหว่างระหว่างสกุลของแมลงวันผลไม้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณแกนหลักเกิดรูปแบบความแตกต่างที่ชัดเจน โดยพบว่าแมลงวันผลไม้ในสกุล *Zeugodacus* นั้นแยกออกจากแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* ซึ่งเกาะกลุ่มกันอย่างชัดเจน แสดงถึงรูปร่างปีกของแมลงวันผลไม้ในสกุล *Zeugodacus* นั้นมีมีความแตกต่างจากแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* อย่างชัดเจน และพบว่าแมลงวันผลไม้ชนิดต่างๆ ในสกุล *Bactrocera* นั้นเกาะกลุ่มกันตามแนวแกน CVA ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแสดงให้เห็นว่า แมลงวันผลไม้ทั้งหมดในสกุล *Bactrocera* นั้นมีรูปร่างของปีกคล้ายคลึงกัน และในแมลงวันผลไม้ในสกุล *Bactrocera* นั้น พบว่า *B. zonata* นั้น มีลักษณะรูปร่างปีกแตกต่างจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ ในสกุลนี้ (Figure 1.1.2.13)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจากพื้นที่ภาคใต้ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันตก และภาคเหนือ รวมทั้งเก็บตัวหนอนจากพืชอาหารชนิดต่าง ๆ เช่น บวบ เมล่อน พริก ฝรั่ง และมะม่วง และนำตัวอ่อนแมลงวันผลไม้จากพืชอาหารชนิดต่าง ๆ มาเลี้ยงจนได้ตัวหนอนในระยะที่ 3 พร้อมทั้งถ่ายภาพ วัดขนาด และทำสไลด์ถาวรส่วนที่มีลักษณะสำคัญในการศึกษาอนุกรมวิธาน เช่น ปาก รูหายใจด้านข้าง และด้านท้าย จากตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ 6 ชนิด จำนวน 120 ตัวอย่าง พร้อมทั้งวาดภาพประกอบลักษณะทางอนุกรมวิธาน และจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini นั้นพบว่ายังมีตัวอ่อนแมลงวันผลไม้อีกหลายชนิดที่ไม่สามารถจำแนกได้โดยวิธีการอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม โดยเฉพาะอย่างยิ่งแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาทางชีวโมเลกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ด้านดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA Barcode) ของตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันความถูกต้อง นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้ยังทำการศึกษา Morphometric จากปีกของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำมาประกอบการแยกชนิดของแมลงในผลไม้เผ่า Dacini ในอนาคต

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ให้ระบุผลงานที่สิ้นสุด ได้นำไปใช้ประโยชน์อย่างไร พัฒนาต่อหรือถ่ายทอด หรือเผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์กับกลุ่มเป้าหมาย (ระบุเป็นข้อๆ) เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ได้ชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ ที่ถูกต้อง รวมทั้งลักษณะทางอนุกรมวิธานตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้ในเผ่า Dacini และได้ข้อมูล Morphometric ของปีกแมลงวันผลไม้ในเผ่า Dacini และสามารถนำมาใช้ เพื่อจัดจำแนกชนิดแมลงวันในเผ่า Dacini ได้อย่างถูกต้อง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการควบคุม ป้องกันกำจัด และข้อมูลในการนำเข้าส่งออก ซึ่งเป็นแหล่งข้อมูลทางด้านกีฏวิทยาที่สำคัญของประเทศ ซึ่งหน่วยงานที่สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ หน่วยงานราชการ กระทรวงพาณิชย์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ บริษัทเอกชนผู้ส่งออก และมหาวิทยาลัย

กรมวิชาการเกษตร

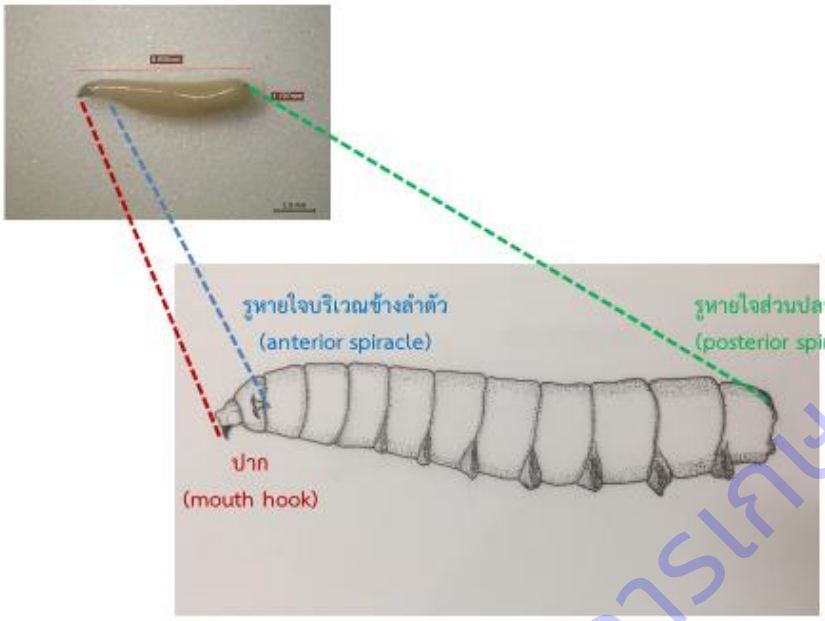


Figure 1.1.2.1 Morphological character of third instar of fruit fly larva (lateral view). The important characteristics of larvae are mouth hook, anterior spiracle and caudal segment.

กรมวิชาการเกษตร

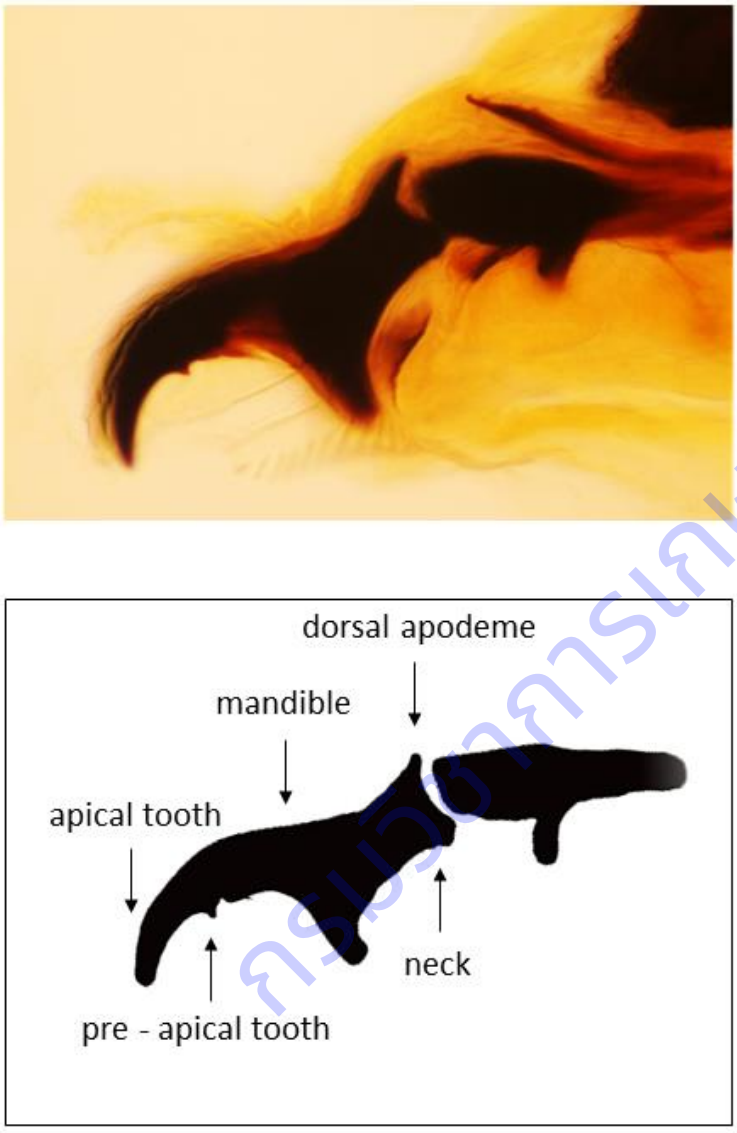


Figure 1.1.2.2 Cephalopharyngeal skeleton of third instar larva in lateral view.

กรมวิชาการเกษตร

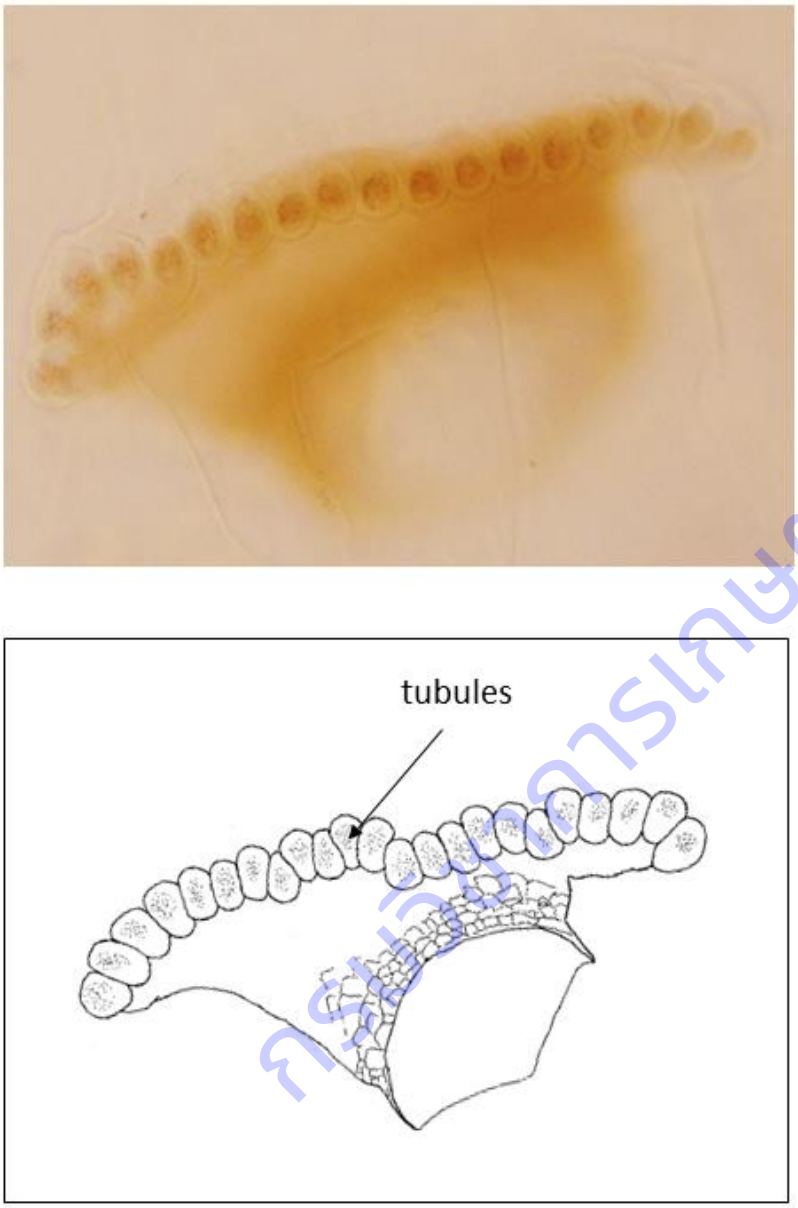
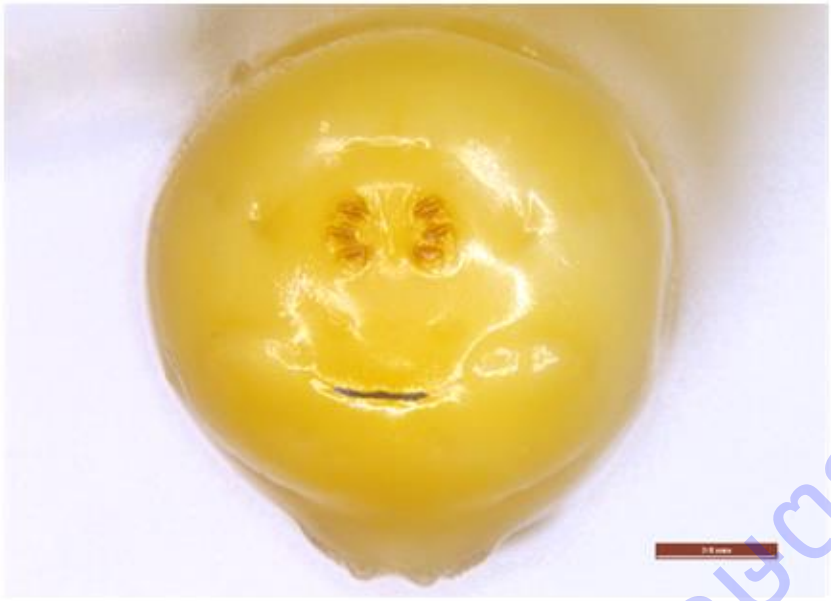
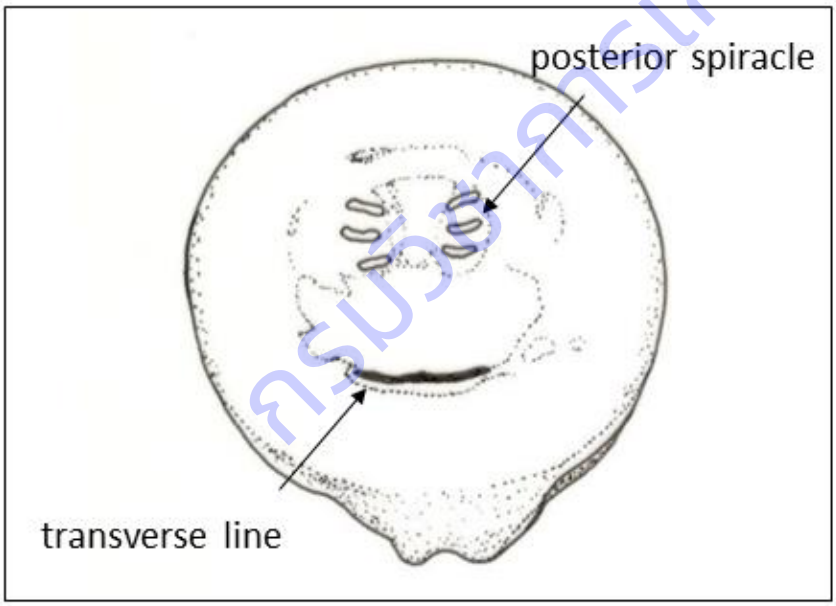


Figure 1.1.2.3 Anterior spiracle of third instar larva in lateral view.





กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.2.4 Caudal segment of third instar larva (posterior view).

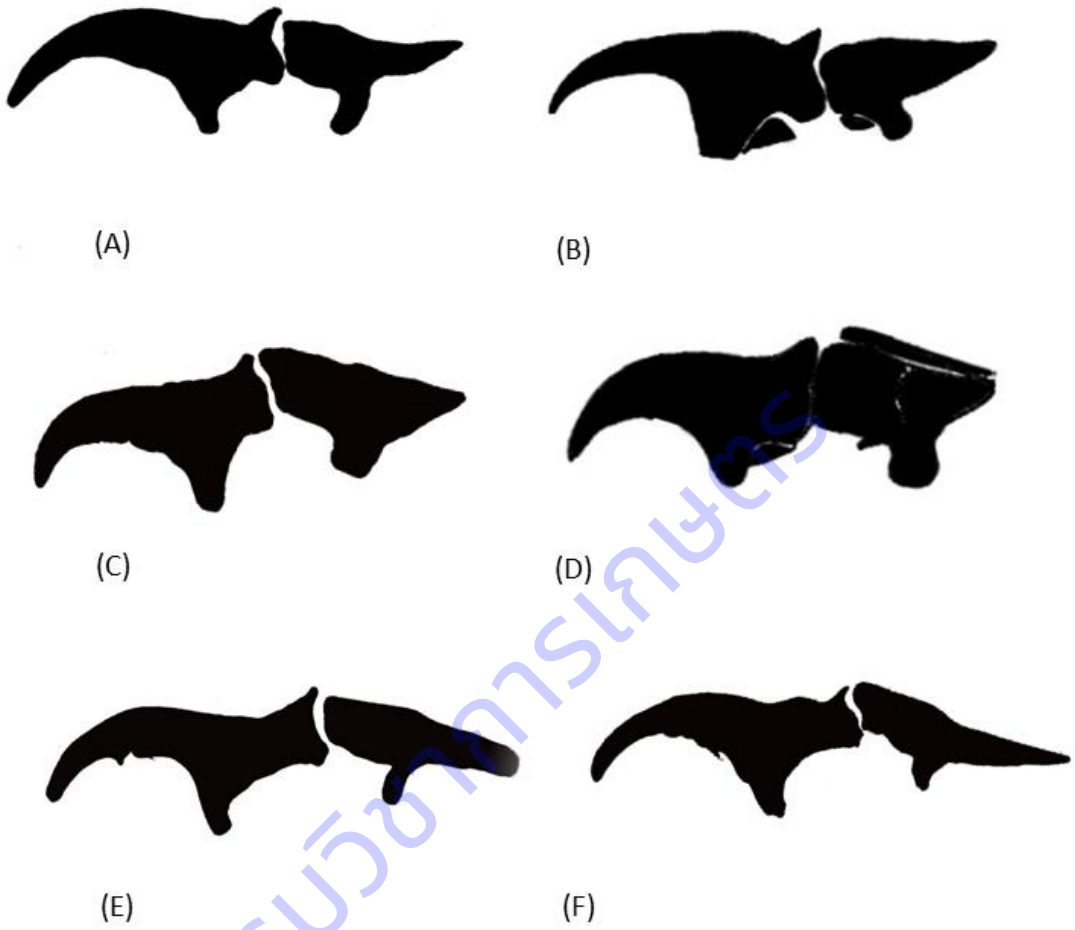


Figure 1.1.2.5 Cephalopharyngeal skeleton of third instar larva of Dacini fruit fly

(A) *B. correcta* (B) *B. dorsalis*

(C) *B. latifrons* (D) *B. umbrosa*

(E) *Z. cucurbitae* (F) *Z. tau*

กรมวิชาการเกษตร

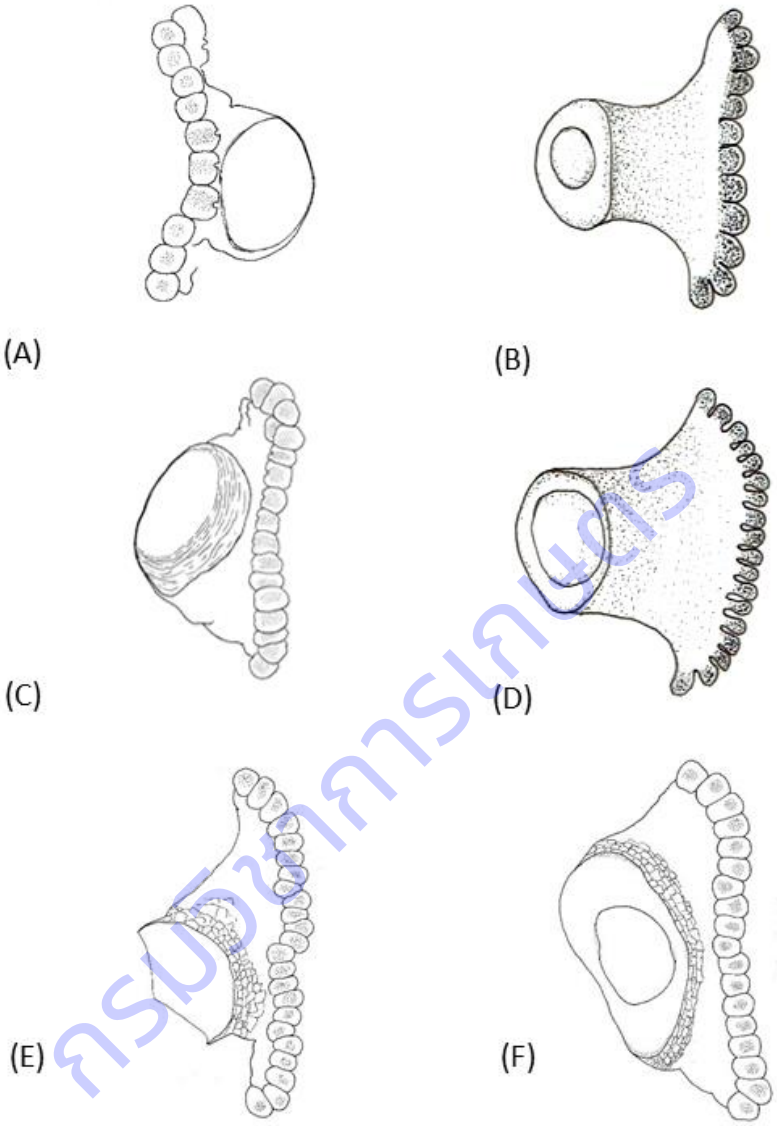


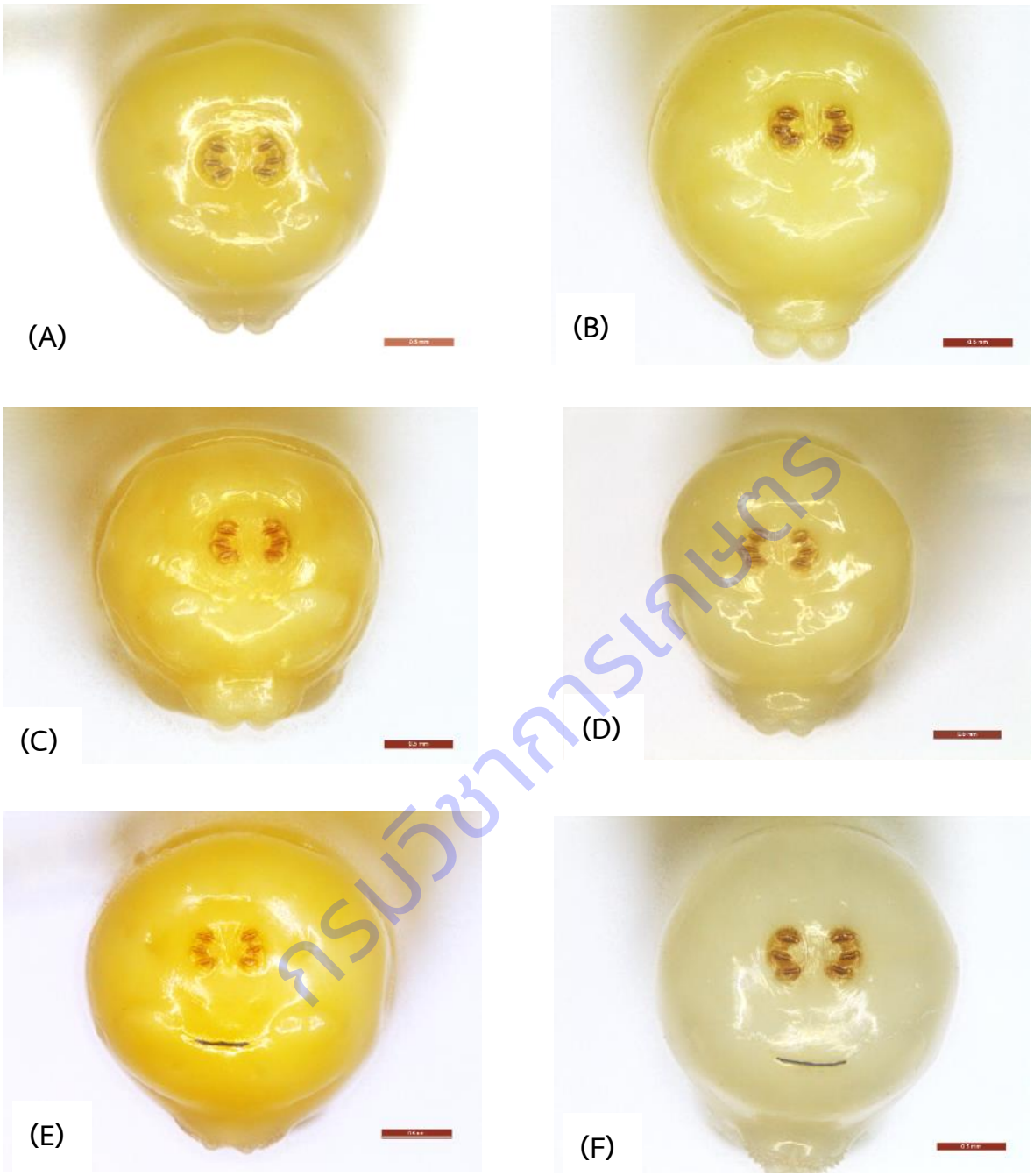
Figure 1.1.2.6 Anterior spiracle of third instar of Dacini larvae (lateral view).

(A) *B. correcta* (B) *B. dorsalis*

(C) *B. latifrons* (D) *B. umbrosa*

(E) *Z. cucurbitae* (F) *Z. tau*

กรมวิชาการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.2.7 Caudal segment of third instar of Dacini larvae (lateral view).

(A) *B. correcta* (B) *B. dorsalis*

(C) *B. latifrons* (D) *B. umbrosa*

(E) *Z. cucurbitae* (F) *Z. tau*

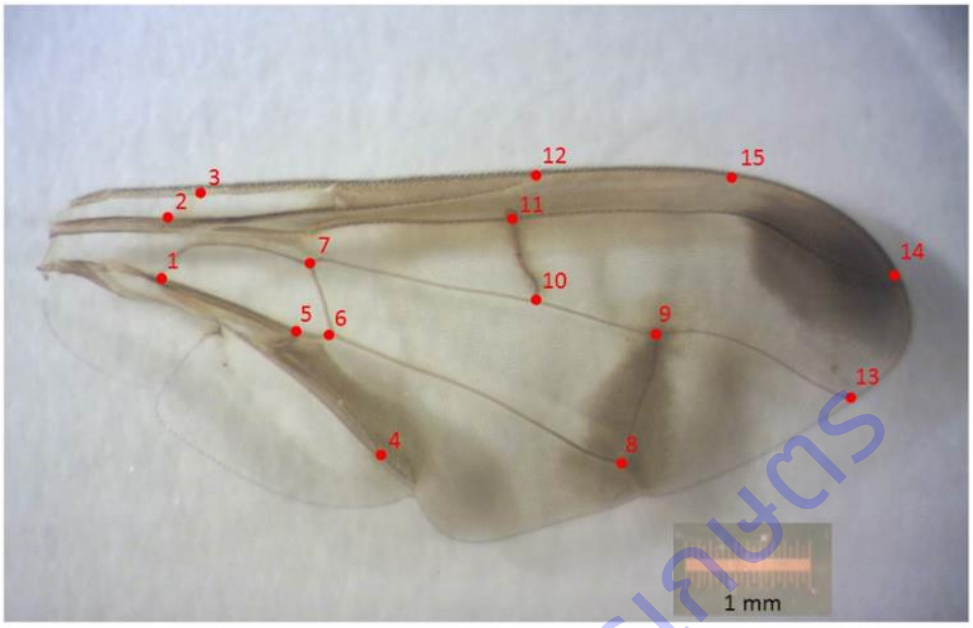


Figure 1.1.2.8 Right-hand wing of a Dacini fruit flies individual showing each of the 15 landmarks used in the geometric morphometric analysis. Wing with 15 landmarks using TPS Program. Landmark information can be found in Table 1.1.2.3

กรมวิชาการเกษตร

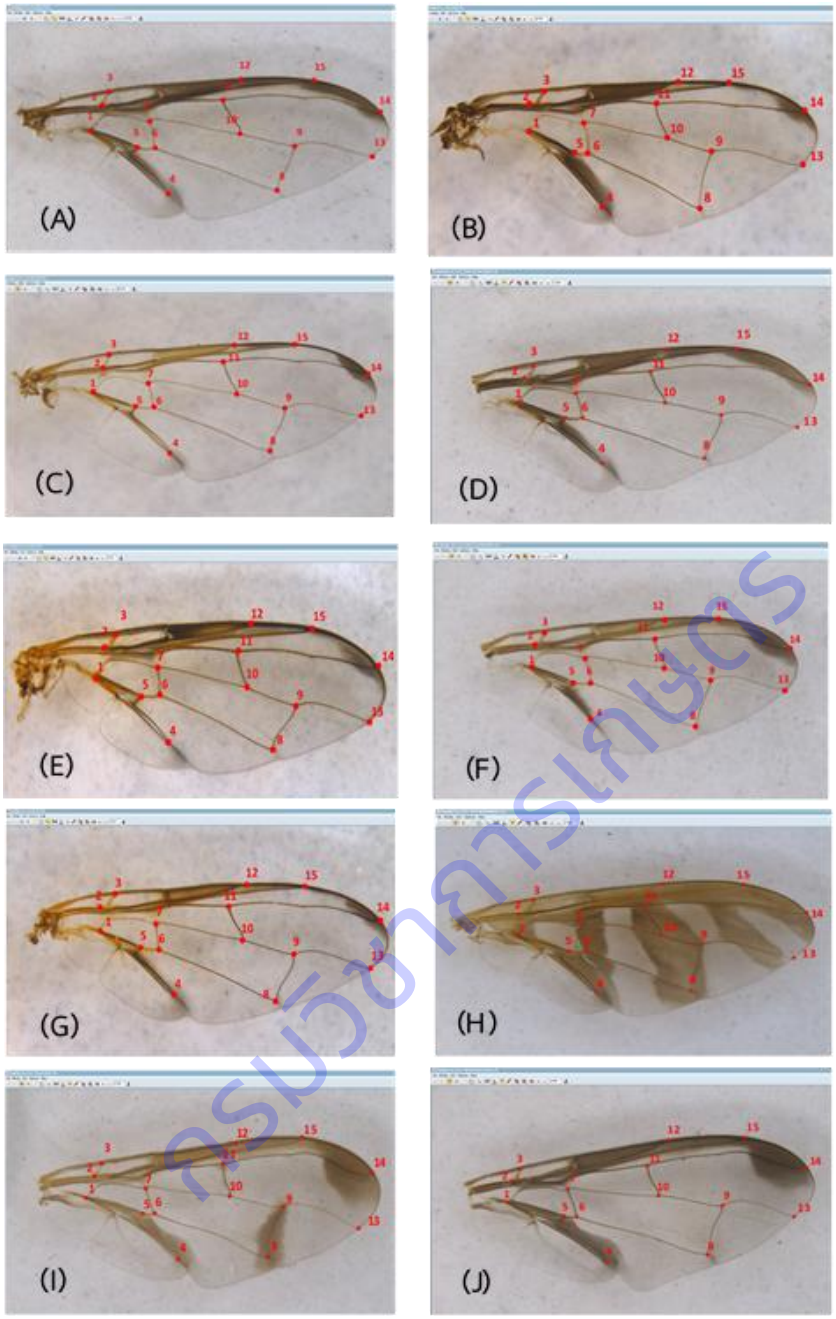


Figure 1.1.2.9 Right-hand wing of a Dacini fruit flies individual showing each of the 15 land marks used in the geometric morphometric analysis

(A) *B. carambolae* (B) *B. cilifera*

(C) *B. correcta* (D) *B. dorsalis*

(E) *B. latifrons* (F) *B. tuberculata*

(G) *B. zonata* (H) *B. umbrosa*

(I) *Z. cucurbitae* (J) *Z. tau*

กรมวิชาการเกษตร

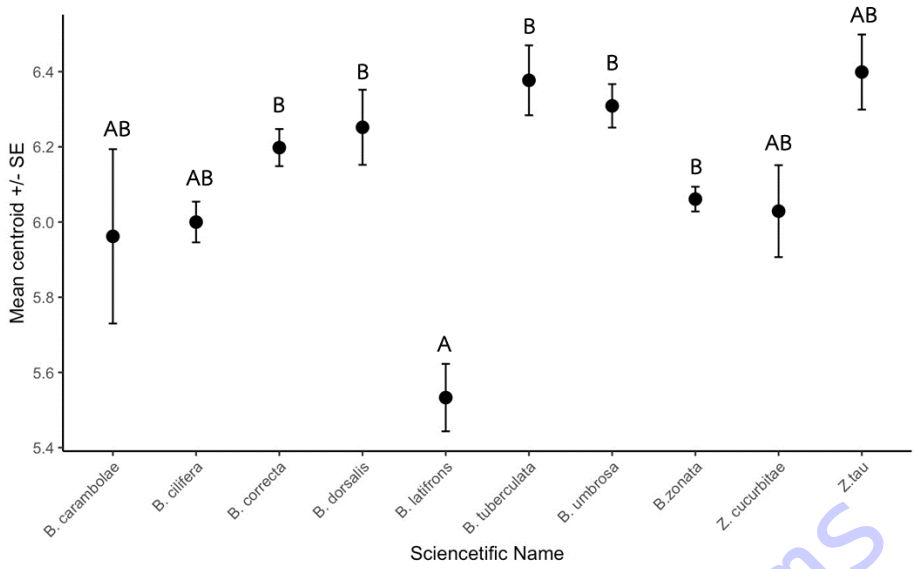


Figure 1.1.2.10 Mean (±SE) wing centroid size of Dacini fruit flies from ten species. Samples sharing the same letter are not statistically different from each other based on one-way ANOVA with a Tukey *post hoc* test ($F_{9, 190} = 6.495$; $P > 0.05$).

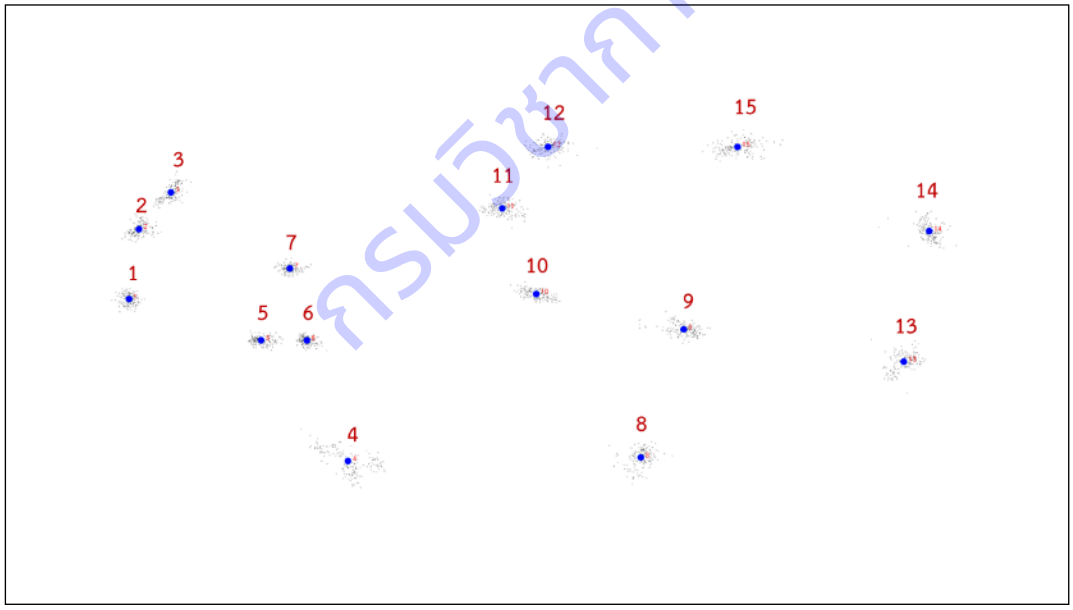


Figure 1.1.2.11 Procrustes superposition showing the variation of 15 landmarks of Dacini fruit flies wings from ten species. The figure shows the configurations of landmarks for which differences in position, scale and orientation have been removed. The position of the landmarks in relation to a real wing is shown in Figure 1.1.2.9.

กรมวิชาการเกษตร

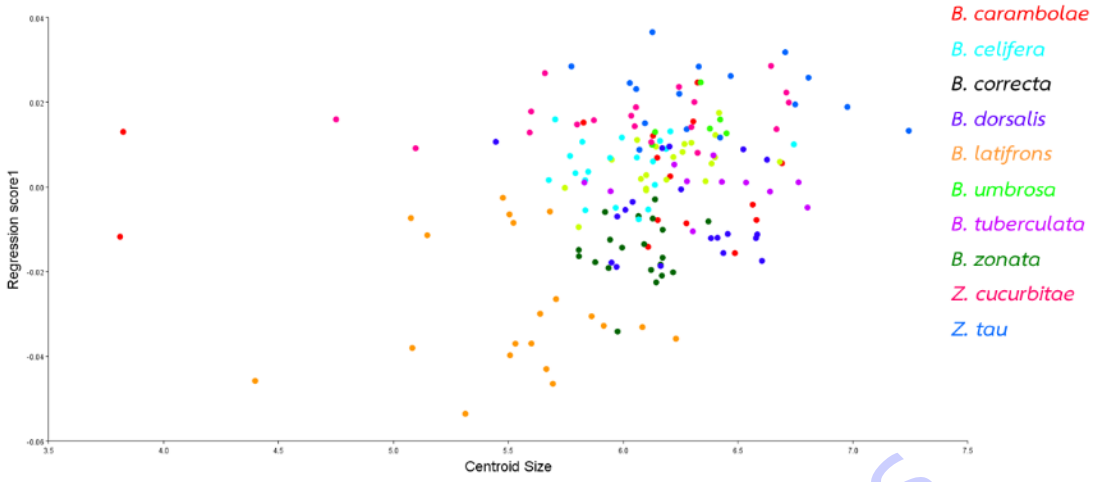


Figure 1.1.2.12 Multiple regression of wing shape (regression score one) on centroid size (a measure of wing size) from Dacini fruit flies. Each coloured dot represents the wing of a fly from one of the listed species.

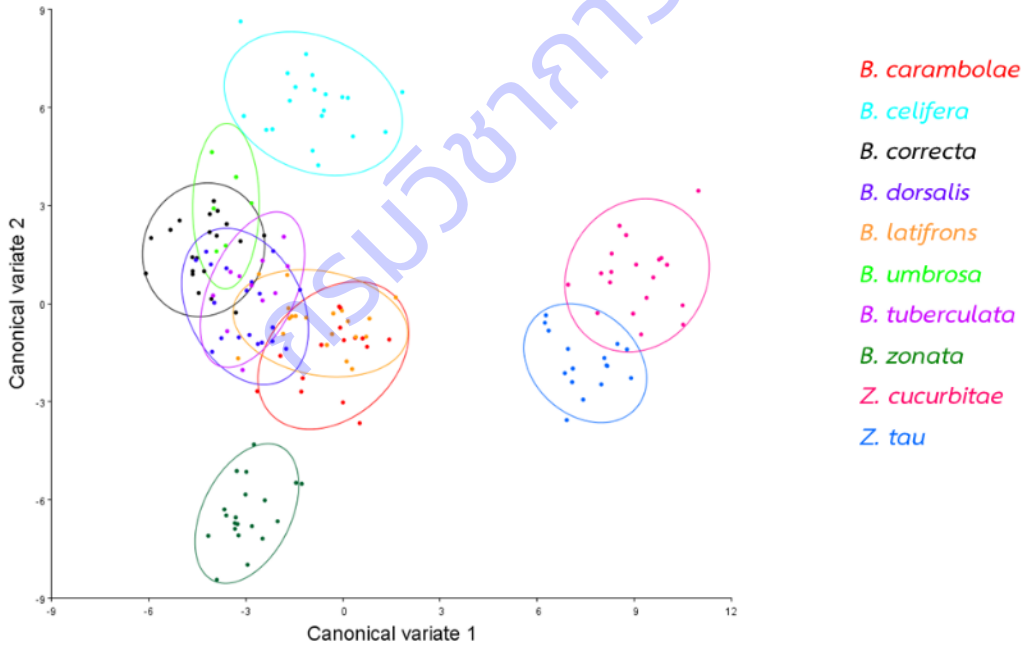


Figure 1.1.213 First two principal components resulting from CVA of wing shape data of Dacini fruit flies; 95% confidence ellipses are shown for each group. Each coloured dot represents the wing of a fly from one of the listed species.

สำนักวิทยบริการฯ

Table 1.1.2.1 Locations which collected fruit flies specimens (region and province), type of attractants and host plants.

	Regions	Provinces	Attractants	Host plants
1.	Central	Bangkok, Nakhon Pathom, Ratchaburi Pathumthani, Suphanburi, Samut Sakhon, Samut Songkhram, Phetchabun, Phetchaburi and Prachuap Khiri Khan	Methyl eugenol CUE lure	Rose apple guava cucumber winter melon bitter Gourd pumpkin
2.	West	Tak, Kanchanaburi	Methyl eugenol CUE lure	winter melon bitter Gourd rose apple
3.	Northern	Kamphaeng Phet, Lamphun, Chiang Mai, Chiang Rai, Nan	Methyl eugenol CUE lure	winter melon bitter Gourd rose apple
4	East	Chanthaburi, Rayong	Methyl eugenol CUE lure	winter melon bitter Gourd rose apple
5.	North-east	Khon Kaen, Loei Udon Thani Nakhon Ratchasima Saraburi, Buri Rum, Surin, Nongkhai, Mahasarakham Chaiyaphum, Ubon Ratchathani	Methyl eugenol CUE lure	pumpkin water melon guava mango
6.	Southern	Chumphon, Surat Thani, Nakhon Si Thammarat Ranong, Trang, Phatthalung, Songkhla, Krabi, Phang Nga Phuket	Methyl eugenol CUE lure	santon guava rose apple mango jackfruit

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.2.2 Scientific name, number of samples, length and width of fruit fly larvae.

	Scientific name	number of samples	length	width
1	*B. correcta*	20	8.619 ± 0.494	1.499 ± 0.116
2	*B. dorsalis* complex	20	10.084 ± 0.269	1.755 ± 0.068
3	*B. latifrons*	20	8.219 ± 0.410	1.199 ± 0.096
4	*B. umbrosa*	20	10.952 ± 0.810	1.795 ± 0.098
5	*Z. cucurbitae*	20	9.381 ± 0.442	1.200 ± 0.133
6	*Z. tau*	20	7.962 ± 0.610	1.114 ± 0.955

Table 1.1.2.3 Fifteen landmarks located at the junctions and terminations of wing veins chosen for this study.

Landmarks	Position on wing
1	Basal junction of veins of cell bm
2	Anterior-most point of the suture located towards the base of vein sc
3	Inner antero-distal corner of cell bc
4	Junction of veins A_1 and CuA_2
5	Junction of CuA_1 and CuA_2
6	Junction of vein CuA_1 and dm-bm cross vein
7	Junction of vein M and dm-bm cross-vein
8	Junction of vein CuA_1 and dm-cu
9	Junction of vein M and dm-cu
10	Junction of vein M and r-m cross-vein
11	Junction of vein R_{4+5} and r-m cross-vein
12	Junction of vein R_1 and costal vein
13	Termination of vein M
14	Termination of vein R_{4+5}
15	Termination of vein R_{2+3}

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.2.4 Mean (± SE) wing centroid size of Dacini fruit flies.

	Scientific name	Centroid size	S.E.
1	*B. carambolae*	5.962	0.8980
2	*B. latifrons*	5.533	0.4010
3	*B. correcta*	6.198	0.2209
4	*B. umbrosa*	6.309	0.1416
5	*B. zonata*	6.061	0.1472
6	*B. cilifera*	6.000	0.2421
7	*B. dorsalis*	6.252	0.3995
8	*B. tuberculata*	6.377	0.3062
9	*Z. cucurbitae*	6.029	0.3082
10	*Z. tau*	6.399	0.5329

Table 1.1.2.5 Average position on two axis of fifteen landmarks in two dimensions of Dacini fruit flies wings from individuals collected from ten species. The position of the landmarks in relation to a real wing is shown in Figure 8 and 9.

Landmark	Axis 1 (x)	Axis 2 (y)
1	-0.32659	-0.01122
2	-0.31717	0.05461
3	-0.28705	0.08923
4	-0.11999	-0.16387
5	-0.20198	-0.05012
6	-0.15871	-0.05026
7	-0.17483	0.01756
8	0.15642	-0.16050
9	0.19688	-0.03970
10	0.05774	-0.00656
11	0.02562	0.07422
12	0.06890	0.13209
13	0.40457	-0.07027
14	0.42857	0.05275
15	0.24765	0.13204

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.3 อนุกรมวิธานเพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วง (Hemiptera: Cicadellidae) ในประเทศไทย
Taxonomy of mango leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae) in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	เกศสุดา สนศิริ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	จารุวัตถ์ แต้กุล	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ยุวรินทร์ บุญทบ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สุนัดดา เชาวลิต	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ชมัยพร บัวมาศ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	อิทธิพล บรรณาการ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

เพลี้ยจักจั่นมะม่วง (Hemiptera: Cicadellidae) เป็นแมลงศัตรูสำคัญในมะม่วง สร้างความเสียหายโดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบ ยอดอ่อน และช่อดอก ทำให้ใบหงิก ขอบใบไหม้ ดอกแห้งและร่วง ติดผลน้อยหรือไม่ติดผล หากมีการระบาดรุนแรงจะทำให้ผลผลิตลดลง 80 - 100 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเพลี้ยจักจั่นในกลุ่มนี้มีรูปร่างลักษณะที่คล้ายคลึงกันยากแก่การจำแนกชนิด วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อทราบชนิด เขตการแพร่กระจาย พร้อมจัดทำแนวทางการวินิจฉัย เพื่อเป็นข้อมูลจัดทำรายชื่อแมลงศัตรูพืชและวิเคราะห์ความเสี่ยงแมลงศัตรูพืช ในการนำเข้าและส่งออกผลผลิตทางการเกษตรรวมทั้งเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาด้านกีฏวิทยาทุกสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึง กันยายน 2562 จากการศึกษาโดยการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วงจากแปลงปลูกที่สำคัญทั่วทุกภาคของประเทศไทย นำมาจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน และใช้แนวทางวินิจฉัยตาม Distant (1908) และ Dietrich (2005) พบเพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วงจำนวน 4 สกุล 8 ชนิด ได้แก่ *Amrasca splendens* Ghauri, *Amritodus atkinsoni* (Lethierry), *Idioscopus clypealis* (Lethierry), *Idioscopus nagpurensis* (Pruthi), *Idioscopus nitidulus* (Walker), *Idioscopus clavosignatus* Maldonado Capriles, *Idioscopus chumphoni* Hongsaprug และ *Mangganeura reticulata* Ghauri ซึ่งเพลี้ยจักจั่นสกุล *Amritodus* เป็นการรายงานครั้งแรกในประเทศไทย และชนิดที่เป็นศัตรูสำคัญของมะม่วง ได้แก่ *I. clypealis, I. nagpurensis* และ *I. nitidulus* ทั้งนี้ได้บรรยายลักษณะทางสัณฐานวิทยา เขตการแพร่กระจาย และแนวทางการวินิจฉัย (Key to species) ของเพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วงที่ได้สำรวจพบในครั้งนี้ไว้ด้วยแล้ว

คำสำคัญ เพลี้ยจักจั่น อนุกรมวิธาน Cicadellidae Hemiptera

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Mango leafhoppers are major pests in mango. Nymphs and adults of the leafhoppers puncture and suck the sap from tender shoots, inflorescences and leaves of mango trees, which cause non-setting of flowers and dropping of immature fruits. The yield loss may reach 80 – 100 percent, if severe outbreaks are found. Presented with similar shapes and characters, this pest is difficult to identify to species. The objectives of this study are to gain better insight in the identification at species level as well as the distributions of the mango leafhoppers in Thailand. The results are applied in a pest list and pest risk analysis program for the import-export agricultural products. A survey and collecting were implemented from October 2016 – September 2019 on the mango crops across the country. The insect samples were examined based on classical taxonomy and identification to the species level followed Distant (1908) และDietrich (2005). The result revealed that 4 genera 8 species were found comprising, *Amrasca splendens* Ghauri, *Amritodus atkinsoni* (Lethierry), *Idioscopus clypealis* (Lethierry), *Idioscopus nagpurensis* (Pruthi), *Idioscopus nitidulus* (Walker), *Idioscopus clavosignatus* Maldonado Capriles, *Idioscopus chumphoni* Hongsaprug and *Mangganeura reticulata* Ghauri. *Amritodus* is considered as new to the genus record in Thailand. *I. clypealis, I. nagpurensis* and *I. nitidulus* are most common and destructive species of hoppers, which cause heavy damage to mango crops. The species descriptions and the key to species are presented.

Keywords Mango leafhopper Taxonomy Cicadellidae Hemiptera

คำนำ

มะม่วง (*Mangifera indica* (Linn.)) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย นิยมปลูกเพื่อบริโภคและส่งขายทั้งในและนอกประเทศ นำรายได้เข้าประเทศปีละหลายพันล้านบาท (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2561) เพลี้ยจักจั่น (leafhopper) เป็นแมลงจัดอยู่ในวงศ์ Cicadellidae อันดับย่อย Auchenorrhyncha อันดับ Hemiptera ปัจจุบันพบเพลี้ยจักจั่นในวงศ์นี้แล้ว 22,600 ชนิด ใน 40 วงศ์ย่อย (subfamily) มากกว่า 170 สกุล (genus) มีเขตการแพร่กระจายทั้งเขตอบอุ่นและเขตร้อน (Knight, 2010; Dietrich, 2005) ในประเทศไทย วารี (2543) ได้รายงานว่าพบเพลี้ยจักจั่นจำนวน 4 สกุล 8 ชนิด ที่เป็นศัตรูสำคัญในมะม่วง โดยทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบและยอดอ่อน ทำให้ใบหงิก และขอบใบไหม้ไม่สามารถผลิตช่อดอก หากดูดกินน้ำเลี้ยงจากช่อดอก จะทำให้ดอกแห้งและร่วง ติดผลน้อยหรือไม่ติดผลเลย นอกจากนี้ในขณะที่ดูดกินน้ำเลี้ยง เพลี้ยจักจั่นจะถ่ายมูลมีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวๆคล้ายน้ำหวาน เรียกว่า Honey dew หรือมูลหวาน ติดตามช่อดอกและใบ และรอบๆทรงพุ่ม มูลน้ำหวานนี้เป็นอาหารของราดำ (sooty mold) ทำให้ราดำมีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ปกคลุมใบ ช่อดอก ซึ่งมีผลกระทบ

กรมวิชาการเกษตร

ต่อการสังเคราะห์แสงของใบ (Nene, 2001; Butani, 1979; Sen และ Chaudhari, 1961) หากขนาดประชากรที่ลงทำลายมีจำนวนมากอาจทำให้ผลผลิตลดลง 20-100 เปอร์เซ็นต์ (Verghese และ Rao, 1985) และพบระบาดทั่วไปทุกท้องที่ที่มีการปลูกมะม่วง เนื่องจากเพลี้ยจักจั่นในกลุ่มนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกคล้ายคลึงกันยากแก่การจำแนกชนิด และในประเทศไทยยังไม่มีการสำรวจชนิดทั่วทุกภูมิภาค ดังนั้นจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาเพื่อให้ทราบชนิดเขตการแพร่กระจาย พร้อมจัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิด เพื่อให้ผู้เกี่ยวข้องจำแนกชนิดได้อย่างถูกต้อง รวมถึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาด้านกีฏวิทยาทุกสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest list: PL) และการวิเคราะห์ความเสี่ยง (Pest Risk Analysis: PRA) สนับสนุนการนำเข้าและส่งออกมะม่วงของประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1) ตัวอย่างเพลี้ยจักจั่น ที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกมะม่วง และตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

2) อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง (insect net) ขวดฆ่าแมลง (killing jar) ขวดดองปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่าง ถังรักษาความเย็น และเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)

3) อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับใช้ในการทำสไลด์ถาวรอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia) ได้แก่ potassium hydroxide 10 %, alcohol 70-95 %, aetic acid gacial, clove oil และ canada balsam แผ่นสไลด์แก้วและแผ่นแก้วปิดสไลด์ ตู้อบสไลด์ถาวร

4) อุปกรณ์ที่ใช้ในการจัดรูปร่างแมลง เช่น เข็มไร้สนิม เบอร์ 0 เข็มหมุดหัวกลม ไม้จัดรูปร่างแมลง กระดาษว่าวสีใส กระดาษแข็งรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก (card point) ปากคีบ โหลชื้น ตู้อบแมลง ฯลฯ

5) กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope, compound microscope และกล้องถ่ายภาพ

6) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเพลี้ยจักจั่นในวงศ์ Cicadellidae ของ Distant (1908) และ Dietrich (2005)

-วิธีการ

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยจักจั่นในแปลงปลูกมะม่วงที่สำคัญทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย โดยการเดินสุ่มสำรวจทั่วแปลงโดยใช้สวิงจับแมลง โฉบเพื่อเก็บเพลี้ยจักจั่นจากแปลงปลูกมะม่วง ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า ซึ่งบรรจุน้ำยาเอทิลอะซิเตด หลังจากเพลี้ยจักจั่นตายแล้ว เก็บใส่ซองกระดาษสามเหลี่ยมและนำไปเก็บไว้ในกล่องเก็บตัวอย่างแมลงเพื่อป้องกันการกระทบกระเทือนซึ่งอาจทำให้ตัวอย่างเกิดความเสียหาย บันทึกข้อมูลเบื้องต้น เช่น พืชอาหาร สถานที่ วัน เดือน ปี วัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง

กรมวิชาการเกษตร

2) การเตรียมตัวอย่างเพื่อจำแนกชนิด นำตัวอย่างเพลี้ยจักจั่นที่ได้จากการสำรวจ มาจัดรูปร่างโดยนำไปติดบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง นำไปอบแห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 - 30 วัน เพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วงบางชนิดที่มีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมากจำเป็นต้องใช้ข้อแตกต่างของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia) ในการจำแนกชนิด ซึ่งจะทำตามวิธีการของ Knight (1965)

3) การตรวจจำแนกชนิด นำตัวอย่างเพลี้ยจักจั่นที่ผ่านการอบจนแห้งแล้วมาตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope ตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดของ Distant (1908) และ Dietrich (2005) ลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกชนิด ได้แก่ ลักษณะลวดลายบนส่วนหัว (head) และใบหน้า (face) ตาเดี่ยว (ocelli) แผ่นเหนือริมฝีปากบน (clypeus) สันหลังอกปล้องแรก (pronotum) แผ่นแข็งทรงสามเหลี่ยมบริเวณท้ายส่วนอกด้านสันหลัง (scutellum) ลักษณะส่วนปลายของขาคู่หลัง (hind basitarsus) และอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia) ได้แก่ aedeagus

4) ถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และแบบ compound บันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกเพลี้ยจักจั่นแต่ละตัว พร้อมทั้งใส่หมายเลขประจำตัว

5) จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุลและชนิดของเพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วง ที่รวบรวมได้

6) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาเก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง เพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2562

สถานที่ - แหล่งปลูกมะม่วงทั่วทุกภาคของประเทศไทย

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาอนุกรมวิธานเพลี้ยจักจั่นในวงศ์ Cicadellidae ที่เป็นศัตรูของมะม่วงในแหล่งปลูกที่สำคัญทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย จำนวน 9,555 ตัวอย่าง วิเคราะห์ชนิดโดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Distant (1908) และ Dietrich (2005) รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีในพิพิธภัณฑ์แมลงของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร สามารถวิเคราะห์ชนิด ได้ 8 ชนิด โดยมีรายละเอียด ดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

แนวทางการวินิจฉัยในระดับชนิด

1 ก. ส่วนปลายของขาคู่หลัง (hind basitarsus) มีลักษณะหัวตัด (ภาพที่ 1.1.3.2ก).....(2)

ข. ส่วนปลายของขาคู่หลัง (hind basitarsus) มีลักษณะแหลม (ภาพที่ 1.1.3.2ข).....(3)

2 ก. สันหลังอกปล้องแรก (pronotum) มีจุดสีดำหนึ่งคู่บนขอบส่วนหน้า, อวัยวะเพศผู้ (aedeagus) ไม่มีรยางค์.....*Amritodus atkinsoni* (Lethierry)

ข. สันหลังอกปล้องแรก (pronotum) มีจุดดำประปราย, อวัยวะเพศผู้ (aedeagus) มีรยางค์ .....(4)

3 ก. สันหลังอกปล้องแรก (pronotum), ตรงกลางส่วนหัว, แผ่นแข็งทรงสามเหลี่ยมบริเวณท้ายส่วนอกด้านสันหลัง (scutellum) และใกล้ปลายปีก มีจุดสีแดงเข้มเกือบดำ..... .....*Amrasca splendens* Ghauri

ข. สันหลังอกปล้องแรก (pronotum) มีลักษณะนูน ขอบหน้ายื่นเป็นรูปโค้ง ยาวรี ผิวของสันหลังอกปล้องแรกแตกระแหงเป็นตาข่าย ใบหน้ายาว มีแถบสีดำจากส่วนบนใบหน้ามาจดแผ่นเหนือริมฝีปาก (clypeus).....*Mangganeura reticulata* Ghauri

4 ก. สันหลังอกปล้อง (pronotum), แผ่นแข็งทรงสามเหลี่ยมบริเวณท้ายส่วนอกด้านสันหลัง (scutellum), พื้นของใบหน้า และ 2/3 ของพื้นที่ clavus ที่ชิดกับเส้นปีกมีสีเหลือง.....*Idioscopus clavosignatus* Maldonado Capriles

ข. สันหลังอกปล้องแรก (pronotum), แผ่นแข็งทรงสามเหลี่ยมบริเวณท้ายส่วนอกด้านสันหลัง (scutellum) และพื้นที่ของใบหน้า และ 2/3 ของพื้นที่ clavus ที่ชิดกับเส้นปีกไม่มีสีเหลือง.....(5)

5 ก. ส่วนหัวมีจุดสีดำขนาดใหญ่ 2 จุด มองเห็นได้ทั้งด้านบนและด้านล่าง.....(6)

ข. ส่วนหัวไม่มีจุดสีดำ.....(7)

กรมวิชาการเกษตร

6 ก. แผ่นเหนือริมฝีปากบน (clypeus) มีสีดำเต็มแผ่น อวัยวะเพศของเพศผู้ (aedeagus) มีรยางค์ 4 เส้น ยาว 2 เส้น สั้น 2 เส้น.....*Idioscopus clypealis* (Lethierry)

ข. แผ่นเหนือริมฝีปากบน (clypeus) มีสีดำครึ่งแผ่น, อวัยวะเพศของเพศผู้ มีรยางค์ 4 เส้น ค่อนข้างสั้น.....*Idioscopus nagpurensis* (Pruthi)

7 ก. ใบหน้า (face) ตรงกลางมีแถบสีน้ำตาลเข้มทอดขวางและจุดสีขาวบนใบหน้าจะอยู่ในระดับเสมอกับตาเดี่ยว (ocelli) และ aedeagus มีลักษณะทรงกระบอกส่วนปลายโค้งงอเล็กน้อย มีรยางค์ 4 เส้น ยาว 2 เส้น สั้น 2 เส้น.....*Idioscopus nitidulus* (Walker)

ข. ใบหน้ามีสีน้ำตาลอ่อน และจุดกลมเล็กๆสีขาว จะอยู่ต่ำกว่าระดับตาเดี่ยว (ocelli) และอวัยวะเพศของเพศผู้มีลักษณะค่อนข้างตรง ส่วนปลายโค้งงอมีปลายแหลม รยางค์ยาวกว่าตัว Aedeagus มาก.....*Idioscopus chumphoni* Hongsaprug

***Amrasca splendens* Ghauri, 1967** (ภาพที่ 1.1.3.3ก)

Amrasca splendens Ghauri. 1967: 161; Dworakowska, 1994: 12

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ส่วนหัวและอก (Head and Thorax) : มีมีสีเขียวสดใส ส่วนหัวค่อนข้างแหลมมน ที่ขอบหน้าผากระหว่างตารวม (compound eye) มีจุดกลมสีดำเล็กๆ 2 จุด และมีเส้นสีขาววนเป็นรูปครึ่งวงกลมล้อมจุดดำนี้ไว้ บริเวณกลางส่วนหัว สันหลังอกปล้องแรก (pronotum) แผ่นแข็งทางตอนท้ายของปล้องอก (scutellum) และใกล้ปลายปีกมีสีน้ำตาลแดง

ขนาด (Measurements) : เพศผู้ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 3.85 $\pm$ 0.36 มิลลิเมตร เพศเมียยาวเฉลี่ย 3.89 $\pm$ 0.15 มิลลิเมตร (n=20) (วัดจากปลายสุดของหัวถึงปลายสุดของท้อง)

การวินิจฉัย (Diagnosis) : ลักษณะทั่วไปคล้ายกับเพลี้ยจักจั่นฝอยทุเรียน *A. durianae* มาก แต่ *A. splendens* จะมีสีเข้มกว่า บริเวณกลางส่วนหัว, pronotum และ scutellum มีสีแดงสด และที่ขอบหน้าผากมีจุดสีดำ 2 จุด มีเส้นสีขาววนรอบ แต่ *A. durianae* มีเส้นสีเขียววนรอบ

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) : จีน อินเดีย อินโดนีเซีย ศรีลังกา ไทย เวียดนาม บังคลาเทศ

แหล่งที่สำรวจพบ (Collected locality) : สุพรรณบุรี ปทุมธานี อ่างทอง พระนครศรีอยุธยา นครนายก สุโขทัย เชียงใหม่ เชียงราย พะเยา ลำปาง ชัยภูมิ และ นครราชสีมา

กรมวิชาการเกษตร

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material examined) : จำนวน 40 ตัวอย่าง THAILAND: Pathum Thani Prov. 10♂ 10♀ (EMBT.Hem. 011332 – 011334, 001341 – 001350), Sukhothai Prov., 10♂ 10♀ (EMBT.Hem. 001618 – 001627, 001645 – 001654)

วิจารณ์ (Comments) : พบตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงยอดอ่อนของมะม่วงและมะปราง วารี (2543) ได้รายงานว่าพบเพลี้ยจักจั่นชนิดนี้เฉพาะในเขตภาคกลางของประเทศไทย แต่จากการศึกษาในครั้งนี้พบมีการแพร่กระจายในเขตภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และหลายจังหวัดในเขตภาคเหนือ

***Amritodus atkinsoni* (Lethierry, 1889)** (ภาพที่ 1.1.3.3ข)

Idiocerus atkinsoni Lethierry, 1889: 252

Idioscerus quinquepunctatus Melichar, 1930: 146

Amritodus atkinsoni Anufriev, 1970: 376

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ส่วนหัวและอก (Head and Thorax) : มีสีเหลืองเหลือบน้ำตาล ส่วนหัวมีขอบหน้าผาก (vertex) โค้งมน ตารวม (compound eye) ขนาดใหญ่สีน้ำตาลเข้มเกือบดำ ขอบด้านหน้าของใบหน้า (face) มีจุดกลมสีดำสองจุดมีขอบสีขาววนรอบ ระหว่างตาเดี่ยว (ocelli) มีแผ่นสีน้ำตาล มีเส้นสีเหลืองขนาดเล็กอยู่ตรงกลาง (ภาพที่ 1.1.3.4ข) pronotum มีจุดกลมสีดำสองจุด และบริเวณขอบด้านบนของ scutellum มีสามเหลี่ยมสีดำ 1 คู่ และมีจุดกลมสีดำเล็กๆ 2 จุดอยู่ระหว่างรูปสามเหลี่ยมหัวกลับ ขอบปีกด้านหน้าของปีกคู่หน้า มีแผ่นสีเงิน

ขนาด (Measurements) : ขนาดลำตัวเพศผู้ยาวเฉลี่ย 8.99 $\pm$ 0.2 มิลลิเมตร เพศเมียยาวเฉลี่ย 9.48 $\pm$ 0.3 มิลลิเมตร (n=20)

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (Male genitaria : aedeagus มีลักษณะเป็นรูปตัว S ไม่มีรยางค์ (processes) (ภาพที่ 1.1.3.5ก)

การวินิจฉัย (Diagnosis) : *I. atkinsoni* มีลักษณะรูปร่างใกล้เคียงและคล้ายกับ *I. nitidulus* แต่สามารถแยกจากลักษณะสัณฐานภายนอกคือ บนสันหลังอกปล้องแรกมีจุดสีดำ 2 จุด และ aedeagus มีลักษณะเป็นรูปตัว s ไม่มีรยางค์ (processes)

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) : อินเดีย บังคลาเทศ พม่า ปากีสถาน

แหล่งที่สำรวจพบ (Collected locality) : เชียงใหม่

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material examined) จำนวน 40 ตัวอย่าง THAILAND: Chang Mai Prov. 20♂ 20♀ (EMBT.Hem. 001910 – 001940)

กรมวิชาการเกษตร

วิจารณ์ (Comments) : เพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วงในสกุลนี้ยังไม่เคยมีการรายงานการพบมาก่อนในประเทศไทย ถือเป็นการรายงานครั้งแรก สำรวจพบเฉพาะที่จังหวัดเชียงใหม่เท่านั้น และเป็นเพลี้ยจักจั่นที่มีขนาดใหญ่ที่สุดที่สำรวจพบในครั้งนี้ จากรายงานของ Sohi and Sohi (1990) พบว่า *I. atkinsoni* สามารถขยายพันธุ์ได้ 6 รุ่น ต่อปี ดังนั้นควรมีการเฝ้าระวังและติดตามการแพร่กระจายไปยังภูมิภาคอื่นๆ และในอนาคตอาจเป็นศัตรูสำคัญของมะม่วงในประเทศไทย

***Idioscopus chumphoni* Hongsaprug** (ภาพที่ 1.1.3.3ค)

Idioscopus chumphoni Hongsaprug 1984: 424

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ส่วนหัวและอก (Head and Thorax) : มีสีน้ำตาล ลักษณะหัวและลำตัวเป็นรูปลิ่ม ตรงกลางใบหน้า (fronts) มีแถบสีน้ำตาลเข้มทอดขวาง และจุดกลมสีขาวบนใบหน้าจะอยู่ใต้ตาเดี่ยว (ocelli) (ภาพที่ 1.1.3.4ค) แผ่น pronotum และ scutellum เป็นสีน้ำตาลอมเทา มีจุดสีดำประปรายทั่วไป เมื่อปีกทั้งสองประกอบกันจะเห็นจุดสีขาวเรียงกันเป็นรูปตัววี(v)

ขนาด (Measurements) : เป็นเพลี้ยจักจั่นขนาดใหญ่ เพศผู้ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 7.35 $\pm$ 0.3 มิลลิเมตร เพศเมียยาวเฉลี่ย 7.45 $\pm$ 0.3 มิลลิเมตร (n = 20)

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (Male genitaria) : aedeagus ค่อนข้างตรง ส่วนปลายเว้าและแหลม รยางค์ (processes) ยาวกว่าตัว aedeagus มาก (ภาพที่ 1.1.3.5ข)

การวินิจฉัย (Diagnosis) : ขนาด รูปร่าง สีสันและลักษณะทั่วไปคล้ายเพลี้ยจักจั่น *I. nitidulus* แต่มีข้อแตกต่างคือ ใบหน้ามีสีน้ำตาลอ่อน มีจุดเล็กๆ สีขาว อยู่ระดับต่ำกว่าตาเดี่ยว (ocelli) และ aedeagus ค่อนข้างตรง รยางค์ยาวกว่าตัว aedeagus มาก

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) : เวียดนาม ลาว กัมพูชา ไทย

แหล่งที่สำรวจพบ (Collected locality) : ชุมพร พัทลุง กระบี่ นครศรีธรรมราช สงขลา ตรัง สุราษฎร์ธานี ระนอง พังงา ภูเก็ตและ ประจวบคีรีขันธ์

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material examined) : จำนวน 40 ตัวอย่าง THAILAND: Chumphon Prov. 10♂ 10♀ (EMBT.Hem. 011370 – 011380, 001390 – 001400), Phatthalung Prov. 10♂ 10♀ (EMBT.Hem. 011450 – 011460, 001480 – 001490)

วิจารณ์ (Comments) : พบตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบ ยอด และช่อดอกมะม่วง ในเขตภาคใต้ของประเทศไทย วารี(2543) ได้รายงานว่าพบที่จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี และหนองคาย แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบมีเขตการแพร่กระจายเพิ่มขึ้นในหลายจังหวัดทางภาคใต้ ได้แก่ พัทลุง กระบี่ นครศรีธรรมราช สงขลา ตรัง ระนอง

กรมวิชาการเกษตร

ประจวบคีรีขันธ์ พังงา และ ภูเก็ต ดังนั้นควรมีการเฝ้าระวังและติดตามการแพร่กระจายไปยังภูมิภาคอื่นๆของประเทศไทย

Idioscopus clavosignatus Maldonado Capriles (ภาพที่ 1.1.3.3ง)

Idioscopus clavosignatus Maldonado-Capriles, 1974: 163

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ส่วนหัวและอก (Head and Thorax) : มีสีน้ำตาล หรือ สีน้ำตาลดำ ส่วนหัวโค้งมน ขอบหน้าผาก มีสีน้ำตาล ใบหน้ามีสีน้ำตาลดำมีจุดสีน้ำตาลอ่อนกระจายทั่วไป (ภาพที่ 1.1.3.4ง) pronotum และ scutellum พื้นของใบหน้า และ 2/3 ของพื้นที่ clavus ที่ชิดกับเส้นปีกมีสีเหลือง

ขนาด (Measurements) : เพศผู้ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 7.44 $\pm$ 0.39 มิลลิเมตร เพศเมียยาวเฉลี่ย 7.73 $\pm$ 0.18 มิลลิเมตร (n=20)

การวินิจฉัย (Diagnosis) : มีลักษณะทั่วไปคล้ายเพลี้ยจักจั่น *I. nitidulus* แต่มีข้อแตกต่างคือ pronotum และ scutellum พื้นของใบหน้า และ 2/3 ของพื้นที่ clavus ที่ชิดกับเส้นปีกมีสีเหลือง

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) : มาเลเซีย ไทย

แหล่งที่สำรวจพบ (Collected locality) : ชุมพร สุราษฎร์ธานี ระนอง พังงา ภูเก็ต กระบี่

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material examined) จำนวน 20 ตัวอย่าง THAILAND: Chumphon Prv. 5♂ 5♀ (EMBT.Hem. 011510 – 011515, 001530 – 001535), Phuket Prv. 5♂ 5♀ (EMBT.Hem. 011540 – 011543, 001545 – 001550)

วิจารณ์ (Comments) : พบตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบ ยอด และช่อดอกมะม่วง ในเขตภาคใต้ของประเทศไทย วารี(2543) ได้รายงานว่าพบ *I. clavosignatus* เฉพาะที่จังหวัดชุมพร แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีเขตการแพร่กระจายเพิ่มขึ้นในหลายจังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ สุราษฎร์ธานี ระนอง พังงา ภูเก็ต และกระบี่ ดังนั้นควรมีการเฝ้าระวังและติดตามการเขตการแพร่กระจายในภูมิภาคอื่นๆ

กรมวิชาการเกษตร

***Idioscopus clypealis* (Lethierry, 1889)** (ภาพที่ 1.1.3.3จ)

Idiocerus clypealis Lethierry 1889: 252

Idiocerus nigroclypeatus Melichar 1903: 148

Idiocerus clypeatus Matsumura, 1907: 90 (Missp)

Idioscopus clypealis (Lethierry) Baker, 1915: 339

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ส่วนหัวและอก (Head and Thorax) : พื้นสีของส่วนหัว ลำตัว และปีกมีสีน้ำตาลอ่อนอมเขียว ส่วนหัวและอกกว้างกว่า pronotum ใบหน้า (face) เพศเมียมีจุดสีดำ 2 จุด ส่วนเพศผู้จะไม่มี และที่ขอบด้านหน้าของหน้าผาก (vertex) มีอีก 2 จุด scutellum มีสามเหลี่ยมสีดำ 1 คู่ แผ่น clypeus มีสีดำเต็มแผ่น(ภาพที่ 1.1.3.4จ)

ขนาด (Measurements) : ขนาดลำตัวเพศผู้ยาวเฉลี่ย 3.64 $\pm$ 0.12 มิลลิเมตร เพศเมียยาวเฉลี่ย 3.78 $\pm$ 0.17 มิลลิเมตร (n=20)

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (Male genitaria) : aedeagus มีรยางค์ทั้งหมด 4 เส้น ยาว 2 เส้น สั้น 2 เส้นกางออกจากแกนของ aedeagus (ภาพที่ 1.1.3.5ค)

การวินิจฉัย (Diagnosis) : *I. clypealis* มีลักษณะรูปร่างใกล้เคียงและคล้ายกับ *I. nagpurensis* แต่สามารถแยกจากลักษณะสัณฐานภายนอกคือแผ่น clypeus มีสีดำเต็มแผ่น และ aedeagus มีรยางค์ 4 เส้น สั้น 2 เส้น ยาว 2 เส้น ในขณะที่ *I. nagpurensis* มีรยางค์สั้นทั้ง 4 เส้น

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) : ในแถบเอเชีย (บังคลาเทศ กัมพูชา จีน อินเดีย อินโดนีเซีย อิหร่าน มาเลเซีย ศรีลังกา ไต้หวัน พม่า เวียดนาม ไทย ฯลฯ) และโอเชียเนีย (ออสเตรเลีย)

แหล่งที่สำรวจพบ (Collected locality) : ทุกจังหวัด ทุกภูมิภาคของประเทศไทย

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material examined) : จำนวน 40 ตัวอย่าง THAILAND; Chang Mai Prv. 10♂ 10♀ (EMBT.Hem. 011700 – 011720), Nakhon Ratchasima Prv. 10♂ 10♀ (EMBT.Hem. 011820 – 011840)

วิจารณ์ (Comments) : พบตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของ *I. clypealis* ลงทำลายมะม่วงในปริมาณมาก และมักลงทำลายร่วมกับเพลี้ยจักจั่นชนิด *I. nagpurensis* และ *I. nitidulus* ในทุกจังหวัด และทุกภูมิภาคของประเทศไทย นับว่าเป็นศัตรูสำคัญชนิดหนึ่งของมะม่วง

***Idioscopus nagpurensis* (Pruthi, 1930)** (ภาพที่ 1.1.3.3ฉ)

Idiocerus nagpurensis Pruthi, 1930

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

กรมวิชาการเกษตร

ส่วนหัวและอก (Head and Thorax) : ลักษณะของหัวและลำตัวเป็นรูปลิ่ม พื้นสีของหัว ลำตัว และปีกมีสีน้ำตาลอ่อนอมเขียว ลำตัวเรียวแหลมไปทางปลายปีก ตามีสีเขียวด้านข้างมีแถบสีดำ ส่วนหัวมีจุดกลมสีดำ 2 จุด แผ่น clypeus มีสีดำครึ่งแผ่น อีกครึ่งมีสีเหลือง (ภาพที่ 1.1.3.4ฉ) และแผ่นแข็งทางตอนท้ายของปล้องอก (scutellum) ส่วนฐานมีสามเหลี่ยมสีดำ 1 คู่ ระหว่างสามเหลี่ยมมีจุดสีน้ำตาลอ่อน 2 จุด สันหลังอกปล้องแรก (pronotum) มีสีเหลืองอ่อน

ขนาด (Measurements) : ขนาดลำตัวเพศผู้ยาวเฉลี่ย 3.43 ± 0.12 มิลลิเมตร เพศเมียยาวเฉลี่ย 3.44 ± 0.12 มิลลิเมตร (n=20)

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (Male genitaria) : aedeagus มีรยางค์ทั้งหมด 4 เส้น ค่อนข้างสั้น (ภาพที่ 1.1.3.5 ง)

การวินิจฉัย (Diagnosis) : ขนาด สี และรูปร่างคล้าย *I. clypealis* มาก แต่สังเกตลักษณะภายนอกได้จากแผ่น clypeus ของ *I. n*agpurensis จะเป็นสีดำเพียงครึ่งแผ่นจากด้านล่าง และ aedeagus ทั้ง 4 เส้น สั้น

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) : อินเดีย ปากีสถาน ศรีลังกา ไทย

แหล่งที่สำรวจพบ (Collected locality) : ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material examined) : จำนวน 40 ตัวอย่าง THAILAND: Phetchaburi Prv., 10♂ 10♀ (EMBT.Hem.011600 – 011610, 011620 – 001630), Nakhon Ratchasima Prv. 10♂ 10♀ (EMBT.Hem. 011650 – 011670)

วิจารณ์ (Comments) : พบ *I. n*agpurensis ทุกภูมิภาคของประเทศไทย แต่ปริมาณการพบในแต่ละภูมิภาคต่างกัน โดยพบปริมาณการเข้าทำลายมะม่วงในทุกภาคปริมาณมาก แต่ในเขตภาคใต้พบปริมาณน้อย อาจจะเนื่องมาจากความแตกต่างของสภาพภูมิอากาศและความชื้น เนื่องจากภาคใต้ของประเทศไทยมีฝนตกชุกและความชื้นสัมพัทธ์สูง มักพบลงทำลายร่วมกับ *I. clypealis* และ *I. nitidulus*

***Idioscopus nitidulus* (Walker, 1870)** (ภาพที่ 1.1.3.3ช)

Jassus nitidulus Walker 1870: 322

Idiocerus niveosparsus Lethierry, 1889: 252

Idiocerus nitidulus Distant, 1908: 136

Chunra niveosparsus Baker, 1915: 318

Idioscopus nitidulus Maldonado-Capriles, 1973: 181

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

กรมวิชาการเกษตร

ส่วนหัวและอก (Head and Thorax) : ลักษณะส่วนหัวและลำตัวเป็นรูปลิ่ม ตรงกลางใบหน้า (front) มีแถบสีน้ำตาลเข้มทอดขวาง และจุดกลมสีขาวบนใบหน้าจะอยู่ในระดับเสมอกับตาเดี่ยว(ocelli) (ภาพที่ 1.1.3.4ช) pronotum และ scutellum มีสีน้ำตาลอมเทา มีจุดสีดำประปรายทั่วไป เวลาที่ปีกทั้งสองประกอบกันจะเห็นจุดสีขาวใสเรียงกันเป็นรูปตัววี (V)

ขนาด (Measurements) : ขนาดลำตัวเพศผู้ยาวเฉลี่ย 4.45 $\pm$ 0.16 มิลลิเมตร เพศเมียยาวเฉลี่ย 4.71 $\pm$ 0.07 มิลลิเมตร (n=20)

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (Male genitaria) : aedeagus ค่อนข้างตรงทรงกระบอก ส่วนปลายโค้งงอเล็กน้อย รยางค์มี 4 เส้น สั้น 2 เส้น ยาว 2 เส้น เส้นยาวจะยาวเท่าฐาน aedeagus (ภาพที่ 1.1.3.5จ)

การวินิจฉัย (Diagnosis) : *I. nitidulus* มีลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกคล้ายกับ *I. chumphoni* มาก แต่ลักษณะของ aedeagus มีความแตกต่างอย่างชัดเจน คือ *I. nitidulus* มี aedeagus รูปทรงกระบอกส่วนปลายโค้งงอเล็กน้อย รยางค์ (process) สั้นกว่าตัว aedeagus (ภาพที่ 1.1.3.5จ)

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) : ในแถบเอเชีย (บรูไน กัมพูชา จีน อินเดีย อินโดนีเซีย ลาว มาเลเซีย พม่า ปากีสถาน ฟิลิปินส์ ศรีลังกา เวียดนาม ไทย ไต้หวัน) และโอเชียเนีย (ออสเตรเลีย)

แหล่งที่สำรวจพบ (Collected locality) : ทุกภูมิภาคของประเทศไทย

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material examined) : จำนวน 40 ตัวอย่าง THAILAND: Chiang Mai Prv. 10♂ 10♀ (EMBT.Hem. 010406 – 011415)., Nakhon Ratchsima Prv. 10♂ 10♀ (EMBT.Hem. 010181 – 010200)

วิจารณ์ (Comments) : พบลงทำลายร่วมกับ เพลี้ยจักจั่น *I. clypealis* และ *I. nagpurensis* วารี (2543) ได้รายงานว่าพบมากในภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า *I. nitidulus* มีการแพร่กระจายในทุกภูมิภาคของประเทศไทยในปริมาณมาก ซึ่งถือว่าเป็นศัตรูสำคัญของมะม่วงอีกชนิดหนึ่ง

กรมวิชาการเกษตร

***Mangganeura reticulata* Ghauri** (ภาพที่ 1.1.3.3ช)

Mangganeura reticulata Ghauri, 1967: 164

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ส่วนหัวและอก (Head and Thorax) : ส่วนหัวมีสีเหลืองนวล ขอบหน้าจะยื่นเป็นรูปโค้งยาวรี ใบหน้ายาวมีแถบสีดำจากส่วนบนของใบหน้ามาจดแผ่นแข็งเหนือริมฝีกปาก (clypellus) ตารวม (compound) มีสีดำ (ภาพที่ 1.1.3.4ช) สันหลังอกปล้องแรก (pronotum) มีลักษณะนูนมากและแตกแขนงเป็นตาข่าย ปีกมีสีฟ้าอมเทา

ขนาด (Measurements) : ขนาดลำตัวเพศผู้ยาวเฉลี่ย 6.75 $\pm$ 0.2 มิลลิเมตร เพศเมียยาวเฉลี่ย 6.85 $\pm$ 0.1 มิลลิเมตร

การวินิจฉัย (Diagnosis) : ขนาด สี และรูปร่างคล้ายเพลี้ยจักจั่นฝอยของฝ้าย *Amrasca biguttula* (Ishida) แต่สังเกตลักษณะสันอกปล้องแรก (pronotum) ของ *M. reticulata* มีสีเหลืองและแตกแขนงเป็นรูปตาข่าย

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) : ในแถบเอเชีย (อินเดีย มาเลเซีย ฯลฯ)

แหล่งที่สำรวจพบ (Collected locality) : ตาก สุโขทัย ลำปาง ชุมพร สุราษฎร์ธานี พัทลุง ระนอง ภูเก็ต ประจวบคีรีขันธ์

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material examined) : จำนวน 40 ตัวอย่าง THAILAND: TAK Prv. 10♂ 10♀ (EMBT.Hem. 011960 – 011970), Ranong Prv. 10♂ 10♀ (EMBT.Hem. 012010 – 012020),

วิจารณ์ (Comments) : วารี (2543) ได้รายงานว่าพบ *M. reticulata* ในจังหวัดชุมพร และสุราษฎร์ธานี แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบมีการแพร่กระจายเพิ่มขึ้นในหลายจังหวัดได้แก่ ตาก สุโขทัย ลำปาง พัทลุง ระนอง ภูเก็ต ประจวบคีรีขันธ์ ดังนั้นควรมีการเฝ้าระวังและติดตามเพราะในอนาคตอาจเป็นศัตรูสำคัญของมะม่วง

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาอนุกรมวิธานเพลี้ยจักจั่นวงศ์ Cicadellidae ศัตรูมะม่วง ในแหล่งปลูกมะม่วงที่สำคัญของประเทศไทย ผลการตรวจสอบจำแนกชนิด โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยตามหลักอนุกรมวิธานแมลง รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีในพิพิธภัณฑ์แมลงของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร สามารถจัดจำแนกได้ 4 สกุล 8 ชนิด จากจำนวน 9,555 ตัวอย่าง ได้แก่ *Amrasca splendens* Ghauri, *Amritodus atkinsoni* (Lethierry), *Idioscopus clypealis* (Lethierry), *Idioscopus nagpurensis* (Pruthi), *Idioscopus nitidulus* (Walker), *Idioscopus clavosignatus* Maldonado Capriles, *Idioscopus chumphoni* Hongsaprug และ *Mangganeura reticulata* Ghauri ซึ่งชนิดที่เป็นศัตรูสำคัญของมะม่วง ได้แก่ เพลี้ยจักจั่น *I. clypealis*, *I. nagpurensis* และ *I. nitidulus* พบมีการเข้าทำลายมะม่วงทั่วทุกภาคของประเทศไทย เพลี้ยจักจั่นชนิด *I. clavosignatus* และ *I. chumphoni* พบเฉพาะทางภาคใต้ของประเทศไทย *I. nitidulus, A. splendens* และ *M. reticulata* มีเขตการแพร่กระจายเพิ่มขึ้นจากที่วารี (2543) ได้รายงานไว้ และพบเพลี้ยจักจั่นสกุล *Amritodus* ซึ่งถือเป็นการรายงานครั้งแรกในประเทศไทย ตัวอย่างที่ได้จากการสำรวจเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง พร้อมจัดทำฐานข้อมูล เพื่อหาแนวทางในการป้องกันกำจัดที่เหมาะสม และนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาด้านอื่นๆ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืชเพื่อประกอบในงานสำคัญด้านการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้ข้อมูลรายละเอียดของเพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วง พืชอาศัย สำหรับจัดทำฐานข้อมูลอย่างสมบูรณ์
2. ได้ข้อมูลเบื้องต้นที่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ สามารถนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงาน

กรมวิชาการเกษตร

อนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาด้านอื่นๆ

3. มีตัวอย่างเพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วงเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง เพื่อใช้ในการอ้างอิง ตรวจสอบความถูกต้อง เพื่อประกอบในงานสำคัญด้านการส่งออก และนำเข้าสินค้าเกษตร ตลอดจนใช้ในด้านกักกันพืช ซึ่งเป็นไปตามมาตรการด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช เพื่อปกป้องสุขภาพมนุษย์ สัตว์ พืชและสิ่งแวดล้อม

ภาพที่ 1.1.3.1 อาการขอบใบไหม้และช่อดอกแห้งเนื่องจากการเข้าทำลายของเพลี้ยจักจั่น

ภาพที่ 1.1.3.2 ลักษณะส่วนปลายของขาคู่หลัง (hind basitarsus)

ก. หัวตัด ข. ปลายแหลม

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.1.3.3 ตัวเต็มวัยเพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วง

ก). *Amrasca splendens* Ghauri

ข). *Amritodus atkinsoni* (Lethierry)

ค). *Idioscopus chumphoni* Hongsaprug

ง). *Idioscopus clavosignatus* Maldonado Capriles

ง). *Idioscopus clavosignatus* Maldonado Capriles

จ). *Idioscopus clypealis* (Lethierry)

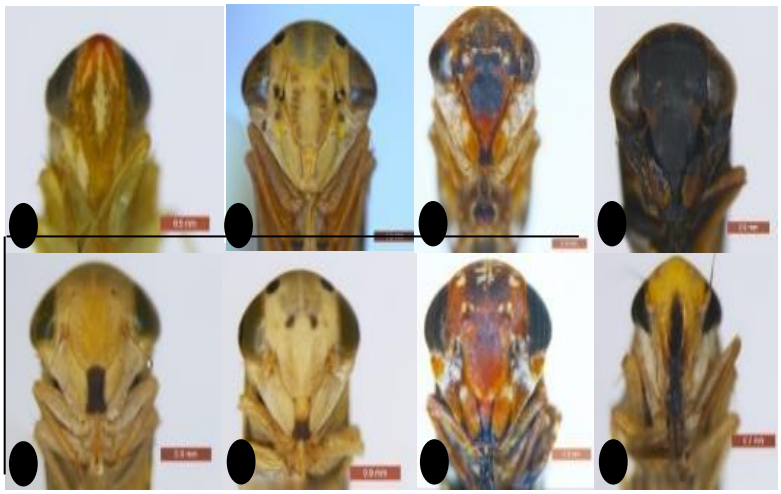
ฉ). *Idioscopus nagpurensis* (Pruthi)

ช). *Idioscopus nitidulus* (Walker)

ซ). *Mangganeura reticulata* Ghauri

ซ). *Manggneura reticulate* Ghauri

สำนักวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.1.3.4 ลักษณะใบหน้า (face) ของเพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วง

ก). *Amrasca splendens* Ghauri

ข). *Amritodus atkinsoni* (Lethierry)

ค). *Idioscopus chumphoni* Hongsaprug

ง). *Idioscopus clavosignatus* Maldonado Capriles

จ). *Idioscopus clypealis* (Lethierry)

ฉ). *Idioscopus nagpurensis* (Pruthi)

ช). *Idioscopus nitidulus* (Walker)

ซ). *Mangganeura reticulata* Ghauri

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.1.3.5 อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia) ของเพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วง

ก). *Amritodus atkinsoni* (Lethierry)

ข). *Idioscopus chumphoni* Hongsaprug

ค). *Idioscopus clypealis* (Lethierry)

ง). *Idioscopus clavosignatus* Maldonado Capriles

จ). *Idioscopus nagpurensis* (Pruthi)

ฉ). *Idioscopus nitidulus* (Walker)

ช). *Mangganeura reticulata* Ghauri

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.4 อนุกรมวิธานผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo* Zincken, 1817 (Lepidoptera: Crambidae, Crambinae) ในประเทศไทย

Taxonomy of borer moths in genus *Chilo* Zincken, 1817 (Lepidoptera: Crambidae: Crambinae) in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวสุนัดดา เชาวลิต	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นายอิทธิพล บรรณาการ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางเกศสุดา สนศิริ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นายอาทิตย์ รักสิกร	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo* Zincken, 1817 ระยะหนอนเป็นแมลงศัตรูสำคัญของพืชวงศ์ Poaceae ได้แก่ ข้าว อ้อย และวงศ์ Gramineae ได้แก่ ข้าวโพด มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางทั่วโลกโดยเฉพาะภูมิภาคเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน ตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อขนาดเล็กมีทางสัณฐานวิทยาคล้ายกันมาก การวินิจฉัยที่ถูกต้องทำให้การจัดการศัตรูพืชเป็นไปอย่างรวดเร็ว การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบชนิด พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจาย เพื่อประโยชน์ในการจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างทั่วทุกภาคของประเทศไทย ตัวเต็มวัยเก็บโดยการใช้กับดักแสงไฟ ตัวหนอนเก็บจากพืชอาหาร รวมทั้งใช้ตัวอย่างเดิมที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2562 จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกร่วมกับความแตกต่างของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย สามารถจำแนกได้ พบจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *C. auricilius* *C. infuscatellus* *C. polychrysus* *C. sacchariphagus* *C. suppressalis* *C. terrenellus* และ *C. tumidicostalis* ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร และได้จัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชของประเทศ

Abstract

The genus *Chilo* Zincken, 1817, especially in the larval stage has been considered to be important pests of Poaceae and Gramineae (rice, sugarcane and corn) *Chilo* is widely distributed throughout tropical and subtropical regions but there has been little research on the genus in Thailand. The present study documents host plants and distribution of Chilo and contributes to an ongoing program to compile a pest database of Thailand. Adults were collected using light traps and larvae were collected from plantations in all biogeographical regions of Thailand between October

กรมวิชาการเกษตร

2016 and September 2019. This material supplemented with specimens held in the Insect Museum of Thai Department of Agriculture. Specimens were identified using external morphology and male and female genitalia. Seven species *Chilo* were found. *C. auricilius C. infuscatellus C. polychrysus C. sacchariphagus C. suppressalis C. terrenellus* and *C. tumidicostalis*. All specimens were deposited in the Insect Museum, Insect Taxonomy Group, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand.

คำนำ

ผีเสื้อหนอนกอในสกุล *Chilo* เป็นแมลงศัตรูพืชสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง พบระบาดสร้างความเสียหายให้แก่ ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง อ้อย ทำลายพืชในระยะต้นกล้า ระยะแตกกอ และระยะการออกดอก การระบาดเกิดมากในภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีการระบาดสูงสุด ปี พ.ศ. 2543-2544 พบระบาดใน 21 จังหวัด คิดเป็นพื้นที่กว่า 8.5 แสนไร่ มูลค่าความเสียหายมากกว่า 2,000 ล้านบาท และในปี พ.ศ.2545 มีการระบาดของหนอนกอที่จังหวัดนครสวรรค์เป็นพื้นที่ 90,000 ไร่ (อรรถสิทธิ์, 2544; ณัฐกฤต, 2544) หนอนกอเป็นแมลงที่มีพืชอาหารหลายชนิด รวมทั้งสามารถเคลื่อนย้ายเพื่อหาแหล่งอาหารใหม่ได้หากเกิดการขาดแคลน หรือสภาพแวดล้อมบริเวณนั้นไม่เหมาะสม สภาพแวดล้อมที่มีความเหมาะสมกับการแพร่ระบาดของหนอนกอคือ อุณหภูมิสูง ความชื้นต่ำและไม่มีฝน (ณัฐกฤต, 2544; ณัฐกฤตและอนุวัฒน์ 2545) ปัจจุบันพบว่าการระบาดของหนอนกอยังเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ถึงแม้จะไม่รุนแรงเหมือนที่แล้วมา แต่ด้วยการเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศ พฤติกรรมการปลูกพืชของเกษตรกรที่เปลี่ยนไป หรือการใช้สารกำจัดศัตรูพืชในปริมาณที่ไม่เหมาะสม เหล่านี้ ล้วนเป็นเหตุผลสนับสนุนการกลับมาระบาดของแหนอนกอได้ทั้งสิ้น

จากการสืบค้นข้อมูลในประเทศไทยพบว่า ยังไม่เคยมีการศึกษาอนุกรมวิธานของผีเสื้อในสกุล *Chilo* มาก่อน ทำให้ไม่สามารถทราบข้อมูลที่แท้จริงของแมลงในสกุลนี้ได้ เนื่องจากผีเสื้แหนอนกอ เป็นแมลงที่มีความคล้ายคลึงกันของรูปร่างลักษณะภายนอกค่อนข้างมาก ทำให้ยากต่อการจำแนกชนิด การศึกษาอนุกรมวิธานจะทำให้ทราบชื่อชนิดที่ถูกต้อง และเป็นกุญแจสำคัญให้กับนักวิจัย นักวิชาการ สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อยอดสู่งานวิจัยอื่นๆ เช่น การศึกษาด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา การบริหารจัดการจนนำไปสู่กระบวนการป้องกันกำจัดให้มีประสิทธิภาพ การจัดทำรายชื่อแมลงศัตรูพืชที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งงานด้านอนุกรมวิธานมีความจำเป็นต่อการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในการนำเข้าสินค้าเกษตรจากต่างประเทศ และการเจรจาต่อรองทางการค้าระหว่างประเทศ เพื่อการส่งออกสินค้าเกษตรไทย

วิธีดำเนินการ

- **อุปกรณ์**

กรมวิชาการเกษตร

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ได้จากการเก็บตัวอย่างทั่วประเทศไทย โดยระยะหนอนเก็บจากพืชอาหาร และตัวเต็มวัยเก็บจากกับดักแสงไฟ (light trap) รวมทั้งใช้ตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรด้วย

2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง ขวดฆ่า ขวดดอง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง ถังรักษาความเย็นและเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)

3. สารเคมีต่างทีใช้ในการเก็บตัวอย่าง เช่น เอทิลอะซีเตท แอลกอฮอล์ 70-80 %

4. อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง ได้แก่ เข็มไร้สนิม เข็มหมุดหัวกลม ไม้จัดรูปร่างแมลง ปากคีบ โหลชี้น ตู้อบแมลง ฯลฯ

5. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ น้ำกลั่น alcohol 50 – 99.5 %, sodium hydroxide 10%, clove oil, euparal เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องสไลด์ถาวร และตู้อบสไลด์ถาวร

6. กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereomicroscope, compound microscope และกล้องถ่ายภาพ

7. อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ camera lucida ปากกา roting และกระดาษไขเขียนแบบ

8. เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของผีเสื้อกลางคืนในสกุล *Chilo*

- วิธีการ

1. กำหนดพื้นที่การสำรวจผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo* โดยเน้นพื้นที่เกษตรซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo* เช่น ข้าวโพด อ้อย ข้าว นอกจากนี้ยังสำรวจและเก็บตัวอย่างจากพื้นที่เกษตรและพื้นที่อีกด้วยแบ่งขอบเขตการสำรวจตามภูมิภาคของประเทศไทย ดังนี้

- ปีที่ 1 สำรวจและเก็บตัวอย่าง จากภาคกลาง และภาคเหนือของประเทศไทย
- ปีที่ 2 สำรวจและเก็บตัวอย่าง จากภาคตะวันตก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
- ปีที่ 3 สำรวจและเก็บตัวอย่าง จากภาคภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย

2. เก็บรวบรวมตัวอย่างผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo* แบ่งเป็น 3 วิธี (ภาพที่ 1) ดังนี้

2.1) การเดินสุ่มเก็บทั่วแปลงโดยใช้สวิงจับแมลง (insect net) โฉบเพื่อเก็บตัวผีเสื้อจากแปลงปลูกพืชในช่วงเวลากลางวัน ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า (killing jar) ซึ่งบรรจุน้ำยาเอททิล อะซิเตด (ethyl acetate) หลังจากผีเสื้อตายแล้ว ใช้เข็มไร้สนิม (stainless steel) เบอร์ 000, 00, 0, 1 หรือ 3 ปักกลางอกด้านบนเพื่อรักษาตัวอย่างไม่ให้เสียหาย เก็บลงกล่องใส่ตัวอย่างแมลง นำกล่องใส่ตัวอย่างใส่ไว้ในกล่องรักษาความเย็นอีกชั้นเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเน่าเสีย

กรมวิชาการเกษตร

2.2) การใช้กับดักแสงไฟ (light trap) ติดตั้งในแปลงเกษตรหรือพื้นที่ป่า เพื่อดึงดูดผีเสื้อช่วงเวลากลางคืน คัดเลือกผีเสื้อที่ต้องการศึกษา ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่าซึ่งบรรจุน้ำยาเอททิล อะซิเตด และเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 2.1

2.3) การสำรวจและเก็บตัวอย่างระยะหนอน โดยการเดินสุ่มสำรวจทั่วแปลงเก็บหนอนทุกระยะใส่กล่องพลาสติกพร้อมพืชอาหาร นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาชีวประวัติ เปลี่ยนอาหารและทำความสะอาดกล่องเลี้ยงหนอนทุกวัน บันทึกระยะเวลาการเจริญเติบโตโดยดูจากการลอกคราบของหนอนแต่ละระยะ บันทึกขนาด สี รูปร่าง หรือรายละเอียดอื่นๆที่สังเกตได้ เลี้ยงจนเป็นตัวเต็มวัยรอจนปีกและสีของตัวเต็มวัยพัฒนาเต็มที่จึง ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า นำตัวอย่างที่ได้ไปจัดรูปร่างเพื่อรอการจำแนกชนิด

2.4) การบันทึกข้อมูล ได้แก่ ค่าพิกัดภูมิศาสตร์ สถานที่ วัน/เดือน/ปี ชื่อผู้เก็บ พืชอาหาร และข้อมูลอื่นๆ ในระบบนิเวศน์ที่สามารถบันทึกได้

3. นำตัวอย่างผีเสื้อจัดรูปร่าง บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) จัดปีกให้กางออกโดยให้ขอบล่างของปีกคู่หน้าตั้งฉากกับลำตัว ขอบบนของปีกคู่หลังอยู่ใต้ขอบล่างของปีกคู่หน้า นำไปอบให้แห้งในตู้อบ (oven) ปรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15-30 วัน

4. การศึกษาครั้งนี้นอกจากตัวอย่างผีเสื้อที่ได้จากการสำรวจแล้ว ยังใช้ตัวอย่างผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo* ที่มีอยู่เดิมในพิพิธภัณฑ์ กรมวิชาการเกษตร และตัวอย่างที่ได้รับจากนักวิชาการ หรือจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิดด้วย

5. การตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาดลำตัว รูปร่าง ลักษณะ และสี ฯลฯ โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชนิด ด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิด ผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo* ประกอบกับการเปรียบเทียบตัวอย่างแมลงที่ได้จำแนกแล้วในพิพิธภัณฑ์ กรมวิชาการเกษตร สำหรับผีเสื้อหนอนกอบางชนิดซึ่งมีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมากจำเป็นต้องใช้อวัยวะสืบพันธุ์ประกอบในการจำแนก ซึ่งมีขั้นตอนการทำสไลด์อวัยวะสืบพันธุ์ดังนี้

- ตัดส่วนท้องของผีเสื้อ แช่ในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 % ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หรือต้มในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 % ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 – 20 นาที
- ดูดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ออก เติมน้ำกลั่นเพื่อล้างโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ยังหลงเหลืออยู่ออกให้หมด ทำซ้ำอีก 1-2 ครั้ง ย้อมสีด้วยเกจส์สเตน (Gage's slain) ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิตฟุซชิน 0.5 กรัม กรดเกลือ 10% 25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ นาน 2-3 นาทีหรือนานถึง 12 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์ของตัวอย่างผีเสื้อที่จะติดสีได้ง่ายหรือยาก
- ย้ายตัวอย่างลงในน้ำกลั่นเพื่อทำการผ่าเอาอวัยวะสืบพันธุ์ออกจากท้อง ถ้าเป็นเพศผู้ใช้ปากคีบปลายแหลมดึงอวัยวะสืบพันธุ์ออกจากท้องปล้องสุดท้ายได้เลย แต่ถ้าเป็นเพศเมียใช้มีดผ่าตัดผ่าผนังลำตัวด้านข้างออก

กรมวิชาการเกษตร

เพื่อป้องกันการเสียหายของอวัยวะสืบพันธุ์ ใช้ปากคีบปลายแหลมค่อยๆแยกผนังลำตัวออกจากอวัยวะสืบพันธุ์ จากนั้นใช้พู่กันเบอร์ 00 หรือเบอร์ 0 และทำความสะอาดไขมันส่วนเกินออกให้หมด

- ย้ายตัวอย่างลงแอลกอฮอล์ 30% จัดรูปร่างอวัยวะสืบพันธุ์ ให้ได้ตามลักษณะที่ต้องการ 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 บาซัม (canada balsam) แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 50 ˚C นาน 4 - 6 สัปดาห์ จึงนำออกมาศึกษา

6. บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาพร้อมทั้งถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound วาดรูปโดยใช้เครื่องมือ camera lucida บันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของผีเสื้อแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ ปีที่จำแนกชนิด ชื่อผู้จำแนกชนิด และรหัสกำกับตัวแมลง พิกัดภูมิศาสตร์ สถานที่ วัน/เดือน/ปี ชื่อผู้เก็บ พืชอาหาร และวิธีการเก็บตัวอย่าง

7. จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุลและชนิดของผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo* ที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

8. จัดเก็บตัวอย่างผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo* ทุกชนิดที่จำแนกเรียบร้อยแล้วไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง เพื่อการตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

เวลาและสถานที่ **ระยะเวลา :** เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2562

สถานที่ : แหล่งปลูกพืชทั้งพื้นที่เกษตรและพื้นที่ป่า โดยเน้นพื้นที่เกษตรซึ่งเป็นแหล่งอาหาร ที่สำคัญของผีเสื้อกลางคืนในวงศ์ย่อยนี้ ได้แก่ ข้าวโพด อ้อย ข้าว ทั่วทุกภาคของประเทศไทย และ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยาสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการจำแนกผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo* แหล่งปลูก อ้อย ข้าว และข้าวโพด จากทุกภาคของประเทศไทย พบจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *C. auricilius C. infuscatellus C. polychrysus C. sacchariphagus C. suppressalis C. terrenellus* และ *C. tumidicostalis* โดยมีรายละเอียดดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

ผีเสื้อกลางคืนสกุล *Chilo* Zincken, 1817

ชื่อพ้อง

Chilo Zincken, 1817:23; Fernald, 1896: 77; Hampson, 1896: 954 [in part]; Kapur, 1950: 394; Okano, 1950: 122; Bleszynski, 1965: 98; Bleszynski, 1965: 102; Bleszynski, 1966: 478; Bleszynski, 1969: 12. Type species: *Tinea phragmitella* Hübner, [1805] [selected by Duponchel, 1836: 9].

Diphryx Grote, 1881; Bull. U.S. Geol. Surv. 6 (2): 273; TS: *Diphryx prolatella* Grote; Hampson, 1896, Proc. zool. Soc. Lond. 1895: 954; Bleszynski, 1970, Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Ent. 25 (4): 110.

Proceras Bojer, 1856: (not paginated); Tams, 1942: 67, 410; Bleszynski, 1965: 122. Type species: *Proceras sacchariphagus* Bojer, 1856, by monotypy [syn. Bleszynski, 1966:477].

Borer Guenée in Maillard, 1862. Type species: Borer saccharallus Guenée, 1862, by monotypy [syn. Tams, 1942:67].

Nephalia Turner, 1911:113. Type species: *Nephalia crypsimetalla* Turner, 1911, by monotypy [syn. Bleszynski, 1966: 478].

Hypiesta Hampson, 1919: 538. Type species: *Hypiesta argyrogramma* Hampson, 1919, by monotypy [syn. Bleszynski, 1966: 478].

Silveria Dyar, 1925: 10. Type species: *Silveria hexhex* Dyar, 1925, by original designation [syn. Bleszynski, 1962b: 108].

Diatraenopsis Dyar & Heinrich, 1927: 39[in part].

Silveria Dyar: Dyar & Heinrich, 1927: 31.

Chilotraea Kapur, 1950: 402. Type species: *Chilo infuscatellus* Snellen, 1890, by original designation [syn. Bleszynski, 1962a: 1].

แนวทางการวินิจฉัย

Labial palpus ชี้ไปด้านหน้า Maxillary palpus สั้น สีน้ำตาลปล้องสุดท้ายขนยาวเป็นกระจุก มีลำตัวเรียวยาว ปีกคู่หน้ากว้างเป็นรูปสามเหลี่ยม ปีกคู่หลังแคบและเล็กกว่าปีกคู่หน้า ปาก (proboscis) มีเกล็ดปกคลุม ระยางค์ฟัน (maxillary palpus) เห็นได้ชัดเจน อวัยวะทำเสรียงปรากฏที่ท้องปล้องแรก ปีกคู่หน้าเส้น R3 และ R4 โคนเส้นติดกัน 1/3 หรือ 1/2 ของความยาวเส้น ปลายเส้นแยกออกจากกัน ปีกคู่หลัง เส้น Sc+R1 และ Rs ออกจาก close cell

กรมวิชาการเกษตร

1. *Chilo auricilius* Dudgeon, 1905

ภาพที่ 1.1.4.2ก-ข

ชื่อพ้อง

Chilo auricilia Dudgeon 1905: 405.

Diatraea auricilia (Dudgeon): Fletcher 1928: 58; Gupta 1940: 799.

Chilotraea auricilia (Dudgeon): Kapur 1950: 408.

Chilo popescugorji Bleszynski 1963: 179

Chilo auricilia Dudgeon: Bleszynski & Collins 1962: 239

Chilo auricilius Dudgeon; Bleszynski 1965: 113; 1969: 16

แนวทางการวินิจฉัย

C. auricilius มีลักษณะใกล้เคียงกับ *C. polychrysus* กันมาก ต่างกันที่ AML และ PML เป็นจุดสีเงินโค้งออกด้านนอก ML เป็นจุดสีน้ำตาลเข้ม

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

หน้าเรียบ (smooth) เกล็ดขนชี้ไปด้านหน้า Ocellus มีขนาดเล็กแต่เห็นได้ชัดเจน Maxillary palpus สั้น สีน้ำตาลปล้องสุดท้ายขนยาวเป็นกระจุก หนวดสีเหลืองอ่อนเรียวยาวเป็นแบบเส้นด้าย อกสีเหลืองอ่อนผสมสีน้ำตาลอ่อน ความกว้างของปีกคู่หน้า ♂ 7.7±0.6 มิลลิเมตร (n=20) ♀ 10.7±1.0 มิลลิเมตร (n=20) พื้นปีกสีเหลืองปนน้ำตาลอ่อน มีเกล็ดสีน้ำตาลกระจายทั่วไป เส้น R รวมกับเส้น Sc, antemedial spot ไม่ปรากฏ discal spot สีน้ำตาลเหลือบเงิน AML และ PML เป็นจุดสีเงินโค้งออกด้านนอก ML เป็นจุดสีน้ำตาลเข้ม ปีกคู่หลัง สีเหลืองไม่มีลวดลาย ท้องสีเหลือง (ภาพที่ 1.1.4.2ก-ข)

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

THAILAND: 1exs, Bangkok, Bangkhen, 24 I 1926, (W.R.S Ladell); 2♀ 2exs, Bangkok, Bangkhen, 23 XII 1949, (A. Lewvanich); 2♂, Bangkok, Bangkhen, 24 XII 1951, (Phichit); 1♀ 1exs, Bangkok, Bangkok noi, 14 X 1950, (A. Lewvanich); 1♂, Bang Bua Thong, Nonthaburi, 14 X 1950, (Tip); 1exs, Bangkok, Bangkhen, 27 X 1950, (Phichit); 1♂ 3, Bangkok, Bangkhen, 24 XII 1951, (Phichit); 3♂ 3♀ 25exs, Bangkok, Bangkhen, 27 X 1951, (Phichit); 1♀, Nonthaburi, 26 VIII 1951, (Sivachat);

กรมวิชาการเกษตร

5exs, Bangkok, Bangkhen, 14 IX 1952, (Phichit); 1exs, Bangkok, Bangkhen, 28 IX 1952, (Phichit); 35♂ 45♀ 25exs, Bangkok, Bangkhen, 16 XII 1953, (A. Lewvanich); 2exs, Bangkok, Bangkhen, 10 XII 1960, (P. Pholboon); 2♂ 10♀, Bangkok, Bangkhen, 13 XII 1960, (P. Pholboon); 1exs, Lampang, 22 IX 1961, (P. Pholboon); 3♂, Suphanburi, Samchuk, 30 I 1974, (A. Lewvanich); 1♀ 2, Bangkok, Bangkhen, 22 II 1984, (Vichuda)

เขตการแพร่กระจาย

ประเทศไทย (กรุงเทพมหานคร นนทบุรี ลำปาง สุพรรณบุรี) ปาปัวนิวกีนี บังคลาเทศ ศรีลังกา ภูฏาน จีน ฮ่องกง อินเดีย อินโดนีเซีย ปากีสถาน มาเลเซีย พม่า ลาว เนปาล ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน และเวียดนาม (CIE, 1972; Bleszynski 1970; Chundurwar 1989; David & Easwaramoorthy 1990; Harris 1990)

พืชอาหาร

อ้อย (*Saccharum officinarum*)
ข้าว (*Oryza sativa*)
ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*)
ข้าวโพด (*Zea mays*)
พืชวงศ์หญ้า (Poaceae)
ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*)
อ้อน้ำ

สถานะการเป็นศัตรูพืช

C. auricilius เป็นศัตรูพืชสำคัญของอ้อยในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเป็นศัตรูร้ายแรงในภาคเหนือของอินเดีย (Neupane, 1990) ระยะหนอนทำลาย ต้นกล้า ดอก และส่วนเจริญของพืช

ชีววิทยาและนิเวศวิทยา

ตัวเต็มวัยออกหากินในเวลากลางคืน การผสมพันธุ์เกิดขึ้นระหว่าง 20.00 น. – 21.00 น. หลังจากผสมพันธุ์จะเริ่มวางไข่ใต้ใบพืชในคืนถัดไป ไข่เรียงเป็นแถวประมาณ 2-5 แถว ไข่สีขาวครีมมีสารเคลือบเจลาตินปกคลุม เพศเมียหนึ่งตัววาไข่ได้ 80-330 ฟอง ระยะไข่ประมาณ 4-10 วัน หลังจากฟักจะใช้เวลาประมาณ 15 นาทีจึงเริ่มแทะผิวใบ ตัวอ่อนวัย 3 จะเข้าไปในหน่อหรือปล้องซึ่งอาจมีมากถึง 15 ตัวในหนึ่งปล้อง ตัวอ่อนใช้เวลาประมาณ 35 วันจึงพัฒนาเป็น

กรมวิชาการเกษตร

ดักแด้ ใช้เวลา 5-10 วันจงเป็นตัวเต็มวัย สามารถพบได้ 3 รุ่นในหนึ่งปี การระบาดพบได้ทุกช่วงอายุของพืช โดยเฉพาะช่วงที่มีความชื้นสูง ในเขตชลประทาน หรือแหล่งที่มีความอุดมสมบูรณ์ประชาการจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

2. *Chilo infuscatellus* Snellen, 1890

ภาพที่ 1.1.4.2ค-ง 1.1.4.3ก-ค

ชื่อพ้อง

Chilo infuscatellus Snellen 1890: 94, pl. 1, f. 5-8; Shibuya 1928b: 54; Bleszynski, 1962b: 111; 1965: 116; 1969: 15.

Argyria sticticraspis Hampson 1919: 449; Gupta 1940: 788; Isaac & Rao 1941: 799; Isaac & Venkatraman 1941: 806 [syn. Kapur 1950].

Argyria coniorata Hampson 1919: 449 [syn. Fletcher 1928].

Diatraea calamine Hampson 1919: 544 [syn. Kapur 1950].

Diatraea auricilia (Dudgeon): Fletcher & Ghosh 1920: 387.

Diatraea shariinensis Eguchi 1933: 3 [syn. Kapur 1950].

Chilo tadzhikiellus Gerasimov 1949: 704.

Proceras infuscatellus (Snellen): Kalshoven 1950: 413.

Chilotraea infuscatellus (Snellen): Kapur 1950: 404.

แนวทางการวินิจฉัย

ปีกคู่หน้าเรียวเป็นรูปสามเหลี่ยมปลายปีกไม่แหลมมาก postmedial line สีน้ำตาลเข้ม maginal line มีแถบสั้นสีดำทุกเซล อวัยวะสืบพันธ์เพศผู้ Saccus รูปสามเหลี่ยมปลายกว้าง ใน Juxta ฐานกว้างเป็นรูปสามเหลี่ยม aedeagus สั้น cornuti เป็นแข็งขนาดใหญ่ cornuti เป็นแข็งขนาดใหญ่ อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย Ostium เป็นแผ่นขนาดใหญ่ปลายเว้าเข้าด้านใน bursa copulatrix รูปไข่สั้น

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

หัวสีเหลืองอ่อนมีแถบสีน้ำตาลขนาดเล็กที่ด้านข้าง ริมปากล่าง (labial palpus) หงายขึ้น หน้าผากเรียบมนมีขนยาวรอบตารวม ตาเดี่ยวพัฒนาดีเห็นได้ชัดเจน ปีกคู่หน้าเรียวเป็นรูปสามเหลี่ยมปลายปีกไม่แหลมมาก ความกว้างของปีกคู่หน้า ♂ 10±0.3 มิลลิเมตร (n=20) ♀ 13±0.7 มิลลิเมตร (n=12) พื้นปีกสีน้ำตาลอ่อนผสมสีเหลืองอ่อน มีสีน้ำตาลเข้มกระจายอยู่บริเวณกลางและขอบนอกของปีก เส้น R1 รวมกับเส้น Sc ที่กึ่งกลางของเส้นปีก discodal

กรมวิชาการเกษตร

spot ไม่ชัดเจนลักษณะเป็นแถบสีน้ำตาลเข้มฟุ้งกระจาย postmedial line สีน้ำตาลเข้ม maginal line มีแถบสั้นสีดำทุกเซล ปีกคู่หลังสีขาวครีม ขอบด้านนอกของปีกปนด้วยสีน้ำตาลอ่อนเล็กน้อย (ภาพที่ 1.1.4.2ค-ง)

อวัยวะสืบพันธ์เพศผู้ (ภาพที่ 1.1.4.3ก – ข) Uncus สั้น ปลายเป็นแผ่นแข็งลักษณะคล้ายจงอยปากนก Saccus รูปสามเหลี่ยมปลายกว้าง Sacculus กว้างส่วนโคนมีขนเล็กน้อย Valva กว้างเป็นรูปสามเหลี่ยมปลายมน มีขนยาวกระจายไม่หนาแน่น ขอบด้านในของ valva โค้งเข้าด้านใน Juxta ฐานกว้างเป็นรูปสามเหลี่ยม โคนขยายกว้างจากกลางถึงปลายเป็นแผ่นแข็งสองแผ่นที่ด้านข้างเรียงขนานกัน aedeagus สั้น cornuti เป็นแข็งขนาดใหญ่

อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (ภาพที่ 1.1.4.3ค) Papilla analis รูปไข่ Apophysis posterior ขนาดเล็กและสั้นกว่า Apophysis anterior, Ostium เป็นแผ่นขนาดใหญ่ปลายเว้าเข้าด้านใน Antrum สั้น ทรงกระบอก Ductus bursae เรียวยาว bursa copulatrix รูปไข่สั้น

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

THAILAND: 4♂, 6♀, 5 exs, Lampang, 17 III 1958, A. Manyeekul; 11♂, 20♀, Lampang, 4 V 1961, P. Pholboon; 3♂, 6♀, Lampang, 7 IX 1961, A. manyeekul; 3♀, Lampang, 7 VII 1961, A. manyeekul; 13♂, 28♀, Lampang, 6-31 VII 1961, A. manyeekul; 1♀, Lampang, 8 IX 1961, A. manyeekul; 1♂, Lampang, 18 VIII 1961, A. manyeekul; 1♀, Udonthani, 7 I 1958, A. manyeekul; 1♂, Udonthani, 7 VII 1962, A. manyeekul; 4 exs, Udonthani, Non Sa-at, N 16°5304.3, E 102°5543.2, 18 I 2011, S. Chaovalit; 1♂, Chonburi, 10 III 1958, Thepthit; 1♂, Chonburi, 12 VI 1958, Thepthit; 7 exs, Chiayaphum, Muang, N 15°5229.5 E 102°1012.2, 18 I 2011, S. Chaovalit; 1 exs, Chiayaphum, Noen sanga, N 15° 3715.8 E 102°0116.2, 18 I 2011, S. Chaovalit; 2 exs, Chaiyaphum, Chatturat, N. 15° 25′29.3′′ E. 101° 50′05.7′′, 18 I 2011, S.Chaovalit; 2 exs, Chaiyaphum, Noen sanga, N 15°3715.8 E 102°0116.2, 18 I 2011, S.Chaovalit; 2 exs, Chiayaphum, Muang, N 15°5629.5 E 102°1012.2, 18 I 2011, S.Chaovalit; 6 exs, Khonkaen, Phon, N 15°3356.7 E 102°3920.6, 21 I 2011, S. Chaovalit; 2 exs, Khonkaen, Ubol rattana, N 16°4156.3 E 102°4147.2, 21 I 2011, S. Chaovalit; Khon Kaen, Ubol rattana , N 16°4156.3 E 102°4147.2, 21 I 2011, S.Chaovalit; 2 exs, Khonkaen, Nam Phong, N 16°4907.0 E 102°5029.3, 18 I 2011, S. Chaovalit; 2 exs, Khon Kaen, Nam Phong, N 16°4907.0, E 102°5029.3, 18 I 2011, S.Chaovalit; 2 exs, Khon Kaen, Muang, N 16°0624.4 E 102°2725.3, 18 I 2011, S.Chaovalit; 2 exs, Udonthani, Muang, N 17°1950.0, E 102°4853.4, 20 I 2011, S. Chaovalit; 1 exs, Kanchanaburi, Lao Khwan, N 17°1950.0, E 102°4853.4, 17 IX 2010, S. Chaovalit; 3 exs, Kanchanaburi, Tha Muang, N. 14° 00′20.4′′, E. 099° 37′52.8′′, 22 VI 2011, S. Chaovalit; 1 exs, Nakhon Sawan, Tak Fa, 21 III 2011, S. Chaovalit; 4 exs, Phetchabun, Si Thap, N. 15° 26′48.1′′ E. 101° 03′07.2′′, 21 III 2011, S. Chaovalit; 3 exs, Uthai Thani, Huai Khot, N. 15° 16′43.0′′, E.

กรมวิชาการเกษตร

099° 36´30.0´´, 4 VIII 2011, S. Chaovalit; 3 exs, Roi-et, Thawatchaburi, N 16˚09 43.5 E 103˚5225.1″, 6 VI 2011, S. Chaovalit; 4 exs, Roi-et, Pho Chai, N. 16° 59´28.2´´ E. 103° 59´16.0´´, 6 VI 2011, S. Chaovalit; 3 exs, Nakhon Ratchasima, Sung Noen, N. 14° 49´34.8´´ E. 101° 49´11.5´´, 5 VI 2011, S. Chaovalit; 3 exs, Buriram, Khu Muang, N. 14° 56´00.3´´ E. 103° 02´14.7´´, 6 VI 2011, S. Chaovalit; 3 exs, Maha Sarakham, Borabu, N. 16° 05´20.9´´ E. 103° 10´53.2´´, 6. VI. 2011, S.Chaovalit; 6 VI 2011, S. Chaovalit; 3 exs, Sing Buri, Muang, N. 14° 52´24.7´´ E. 100° 18´46.4´´, 5 VIII 2011, S. Chaovalit; 3xs, Suphan Buri, Song Phi Nong, N. 14° 11´51.2´´ E. 099° 55´52.4´´, 21 VI 2011, S. Chaovalit

เขตการแพร่กระจาย

ประเทศไทย (จังหวัดกาญจนบุรี ขอนแก่น ชลบุรี ชัยภูมิ นครราชสีมา นครสวรรค์ บุรีรัมย์ เพชรบูรณ์ ร้อยเอ็ด ลำปาง สิงห์บุรี สุพรรณบุรี อุดรธานี และอุทัยธานี) นอกจากนี้มีรายงานแพร่กระจายใน อัฟกานิสถาน บังคลาเทศ พม่า จีน อินเดีย อินโดนีเซีย เกาหลี มาเลเซีย เนปาล ปากีสถาน ปาปัวนิวกินี ฟิลิปปินส์ ศรีลังกา ไต้หวัน ติมอร์ เวียดนาม (Carl 1962; Bleszynski 1970; CAB 1972; Chundurwar 1989; David & Easwaramoorthy 1990; Harris 1990; Neupane 1990)

พืชอาหาร

อ้อย (*Saccharum officinarum*)
ข้าวโพด (*Zea mays*)
ข้าวโอ๊ต (*Avena sativa*)
ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum saturum*)
ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*)
ลูกเดือย (*Pennisetum glaucum*)

สถานะการเป็นศัตรูพืช

Chilo infuscatellus เป็นศัตรูสำคัญของอ้อย

ชีววิทยาและนิเวศวิทยา

C. infuscatellus มักพบทำลายยอดอ่อน หนอนวัยที่ 3 จะเจาะเข้ากัดกินในลำต้น (Easwaramoorthy & Nandagopal 1986; Harris 1990; Kuniata 1998) โดยทั่วไปพบประมาณ 5-6 รุ่นต่อปี (Harris, 1990) หลังจากฟักเป็นตัวเต็มวัยจะผสมพันธุ์ภายใน 24 ชั่วโมง ระหว่าง 20:00 - 24:00 น. เพศเมียหนึ่งตัววางไข่ประมาณ 200 - 250 ฟอง วางไข่เป็นกลุ่มใต้ใบพืช ระยะไข่ 5-9 วัน หนอนมี 5 วัย วัย 1-2 กัดกินใบ วัย 3-5 จะเจาะเข้าไปทำลายในลำต้น

กรมวิชาการเกษตร

ระยะเวลารวม 26-145 วัน ระยะดักแด้ 7 - 19 วัน อายุตัวเต็มวัยเพศผู้ 3.5- 3.6 วัน และเพศเมีย 4.0 - 4.2 วัน อัตราส่วนระหว่างเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 1: 2.28 ตลอดวงจรชีวิตใช้เวลาประมาณ 4-6 สัปดาห์ (Saikia *et al*. 1996) ช่วงเวลาที่ระบาดมากที่สุดคือ เดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม (Singh & Varma 1995)

3. *Chilo polychrysus* (Meyrick , 1932)

ภาพที่ 1.1.4.2จ-ฉ

ชื่อพ้อง

Diatraea polychrysa Meyrick 1932: 321.

Proceras polychrysa (Meyrick): Kalshoven 1950: 413.

Chilotraea polychrysa (Meyrick): Martin 1954: 120.

Chilo polychrysa (Meyrick): Bleszynski 1962: 115.

แนวทางการวินิจฉัย

C. polychrysus มีลักษณะใกล้เคียงกับ *C. auricilius* ต่างกันที่ AML และ PML เป็นจุดสีเงินโค้งออกด้านนอก ML เป็นจุดสีน้ำตาลเข้ม labial palpus มีสัดส่วนที่สั้นกว่าเล็กน้อยใน *C. polychrysus*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ความกว้างของปีกคู่หน้า ♂ 6.7±0.1 มิลลิเมตร (n=2) ♀ 7.1±0.1 มิลลิเมตร (n=2) Ocellus มีขนาดเล็กแต่เห็นได้ชัดเจน หน้าเรียบ (smooth) เกล็ดขนชี้ไปด้านหน้า Maxillary palpus สั้น สีน้ำตาลปล้องสุดท้ายขนยาวเป็นกระจุก หนวดสีเหลืองอ่อนเรียวยาวเป็นแบบเส้นด้าย labial palpus มีสัดส่วนที่สั้นกว่าเล็กน้อยใน *C. polychrysus* อกสีเหลืองอ่อนผสมสีน้ำตาลอ่อน พื้นปีกสีเหลืองปนน้ำตาลอ่อน มีเกล็ดสีน้ำตาลกระจายทั่วไป เส้น R รวมกับเส้น Sc, antemedial spot ไม่ปรากฏ discal spot สีน้ำตาลเหลือบเงินแต่มีขนาดเล็กกว่า *C. auricilius* บริเวณ subterminal สีดำ AML และ PML เป็นจุดสีเงินโค้งออกด้านนอก ML เป็นจุดสีน้ำตาลเข้ม จุดที่ปลายปีกมีขนาดเล็กและไม่เชื่อมต่อกัน ปีกคู่หลัง สีขาวครีมไม่มีลวดลาย ปลายปีกมีสีเหลืองอ่อนเล็กน้อย ท้องสีเหลือง (ภาพที่ 1.1.4.2จ-ฉ)

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

กรมวิชาการเกษตร

THAILAND: 1♂ 1♀ 1exs, Bangkok, Bangkhen, 21 XII 1951, (Pichit); 1exs, Bangkok, Bangkhen, 14 IX 1952, (Pichit); 1♂, Bangkok, Bangkhen, 1 XI 1967, (I. Hattori); 2♀, Bangkok, Bangkhen, 3 I 1968, (I. Hattori); 7exs, Bangkok, Bangkok noi, 14 XII 1932, (Srinual); 6exs, Ratchaburi, 5 XI 1937, (Prasert)

เขตการแพร่กระจาย

ประเทศไทย (กรุงเทพมหานคร และราชบุรี) บังคลาเทศ พม่า จีน อินเดีย อินโดนีเซียมาเลเซีย เวียดนาม และปาปัวนิวกินี (Hattori & Siwi 1986, Harris 1990, Li 1990)

พืชอาหาร

ข้าว (*Oryza sativa*)

ข้าวโพด (*Zea mays*)

อ้อย (*Saccharum officinarum*)

ข้าวป่า (*Oryza latifolia*)

กกสามเหลี่ยม (*Actinoscirpus grossus*)

สถานะการเป็นศัตรูพืช

C. polychrysus เป็นศัตรูพืชสำคัญของข้าว โดยเฉพาะทางเหนือของออสเตรเลีย (Li, 1970) Bleszynski (1970) ระบุว่าทั้งสองสายพันธุ์ (*C. auricilius* และ *C. polychrysus*) มีลักษณะที่คล้ายกันมากสร้างความสับสนในอินโดนีเซีย ไทย และอินเดีย ทั้งสองชนิดสามารถแยกได้โดยอวัยวะเพศของทั้งสองเพศ

ชีววิทยาและนิเวศวิทยา

ตัวเต็มวัยออกหากินในเวลากลางคืน หลังจากผสมพันธุ์จะเริ่มวางไข่ใต้ใบพืชในคืนถัดไป ไข่เรียงเป็นแถว ประมาณ 2-5 แถว ไข่สีขาวครีมมีสารเคลือบเจลาตินปกคลุม เพศเมียหนึ่งตัววางไข่ได้ 30-330 ฟอง หนอนมีสีขาวขุ่นหัวสีดำและมีแถบสีม่วงเข้มตามยาวลำตัว 5 แถบ Ragini *et al.* (2000) รายงานว่าจากการศึกษา species complex ของผีเสื้อสกุล *Chilo* ในนาข้าวในอินเดีย พบเพียง 13 % ที่เป็น *C. polychrysus* นอกจากนี้ Husain & Begum (1985) พบว่า *C. polychrysus และ C. auricilius* พบมากในช่วงเดือนมกราคม - พฤษภาคมและพฤศจิกายน - ธันวาคม นอกจากนี้ *Catling* et al. (1984) สำรวจพื้นที่ปลูกข้าวในประเทศไทยพบว่าหนอนศรัตรูในนาข้าว 90% เป็น *Scirpophaga incertulas* มีเพียง 11% ที่เป็น *C. polychrysus*

กรมวิชาการเกษตร

4. *Chilo sacchariphagus* (Bojer, 1856)

ภาพที่ 1.1.4.2 ช-ซ 1.1.4.3ง-ฉ

ชื่อพ้อง *Proceras sacchariphagus* Bojer 1856: unnumbered; Tams 1942: 67; Kapur 1950: 412; Kalshoven 1950: 411.

Borer saccharellus Guenée 1862: unnumbered [syn. Tams 1942].

Chilo mauriciellus Walker 1863: 141. [syn. Tams 1942].

Chilo venosatus Walker 1863: 144 [syn. Bleszynski 1970].

Diatraea striatalis Snellen 1890: 98; 1891: 349 [syn. Hampson 1896b]

Diatraea mauriciella (Walker): Hampson 1896b: 953.

Diatraea venosata (Walker): Hampson 1896b: 954.

Diatraea mauriciella (Walker); Vinson 1941: 39; 1942: 39.

Proceras venosatus (Walker): Kapur 1950: 413; Bleszynski 1962a: 9.

Chilo sacchariphagus (Bojer): Bleszynski 1966: 494; 1969: 18; 1970: 182.

แนวทางการวินิจฉัย

ปีกคู่หน้าเรียวเป็นรูปสามเหลี่ยมปลายปีกแหลมมาก มีแถบสีน้ำตาลเทาระหว่างเซลปีกเรียงกันหนาแน่น discodal spot สีน้ำตาลเทา เห็นได้ชัดเจนคล้ายปลายหอกชี้ออกด้านนอก อวัยวะสืบพันธ์เพศผู้ Saccus รูปสามเหลี่ยมปลายเรียวมน Juxta ฐานกว้างเป็นรูปสามเหลี่ยม ปลายเว้าเข้าด้านใน cornuti มีแผ่นแข็งลักษณะเป็นหนามแข็งเรียงกันลักษณะคล้ายหวี อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย Antrum ยาวทรงกระบอก bursa copulatrix ขยายใหญ่

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ภาพที่ 1.1.4.2จ-ฉ)

หัวสีเหลืองอ่อนมีแถบสีน้ำตาลขนาดเล็กที่ด้านข้าง ริมฝีปากล่างหงายขึ้น หน้าผากเรียบมน มีขนสั้นรอบตารวม ตาเดี่ยวขนาดเล็ก ปีกคู่หน้าเรียวเป็นรูปสามเหลี่ยมปลายปีกแหลมมาก ความกว้างของปีกคู่หน้า ♂ 12 มิลลิเมตร (n=20) ♀ 18 มิลลิเมตร (n=20) พื้นปีกสีน้ำตาลอ่อน มีสีน้ำตาลเข้มที่เส้นปีก และมีแถบสีน้ำตาลเทาระหว่างเซลค่อนข้างมากคล้ายเส้นปีกขนาดเล็กเรียงกันหนาแน่น เส้น R1 รวมกับเส้น Sc ที่กึ่งกลางของเส้นปีก discodal spot สีน้ำตาลเทา เห็นได้ชัดเจนคล้ายปลายหอกชี้ออกด้านนอก postmedial line สีขาวครีมเป็นแถบจางๆ ไม่ชัดเจน ปีกคู่หลังสีขาวครีมปนด้วยสีน้ำตาลอ่อนและสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 1.1.4.2จ-ฉ)

กรมวิชาการเกษตร

อวัยวะสืบพันธ์เพศผู้ (ภาพที่ 1.1.4.3ง - จ) Uncus สั้น ปลายเป็นแผ่นแข็งลักษณะคล้ายจงอยปากนก Saccus รูปสามเหลี่ยมปลายเรียวมน Sacculus กว้าง Valva กว้างเป็นรูปสามเหลี่ยมปลายมน มีขนยาวกระจายไม่หนาแน่น ขอบด้านในของ valva เป็นเส้นตรง Juxta ฐานกว้างเป็นรูปสามเหลี่ยม ปลายเว้าเข้าด้านใน aedeagus สั้น cornuti มีแผ่นแข็งลักษณะเป็นหนามแข็งเรียงกันลักษณะคล้ายหวีอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (ภาพที่ 1.1.4.3ฉ) Papilla analis รูปไข่ Apophysis posterior ขนาดเล็กและสั้นกว่า Apophysis anterior, Ostium เป็นแผ่นขนาดใหญ่ส่วนปลายขยายออก Antrum ยาวทรงกระบอก Ductus bursae สั้น bursa copulatrix ขยายใหญ่

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

THAILAND: 1♂, 3♀, Udonthani, 10. II. 1959, A. Manyeekul; 4♂, 11♀, Udonthani, 10. II. 1958, (P. holboon); 1♀, Udonthani, 17. VIII. 1958, P. Pholboon; 4♀, Ubon Ratchathani, 10, I, 1959, Pichai; 4♂, 4♀, Ubon Ratchathani, 13, I, 1959, A. Samruadkit; 1♀, Ubon Ratchathani, 5. I. 1958, A. Manyeekul; 1♂, Chonburi, 28, VIII, 1954, Grohs; 1♂, Lampang, 4, VII, 1961, Apirat; 1♂, Suphanburi, Nong Ya Sai, 14° 49.858 N, 99° 50.976 E, 13, I, 1959, S. Chaovalit; 1 exs., Nakhon Sawan, Tak Fa, 21. III. 2011, S. Chaovalit; 1 exs., 2 exs., Phitsanulok, Wat Bot, N. 17° 03´09.4´´ E. 100° 21´45.6´´, 24. III. 2011, S. Chaovalit

เขตการแพร่กระจาย

ประเทศไทย (ชลบุรี นครสวรรค์ พิษณุโลก ลำปาง สุพรรณบุรี และอุบลราชธานี) นอกจากนี้มีรายงานแพร่กระจายในเอเชีย ได้แก่ บังคลาเทศ (APPPC, 1987) บรูไน กัมพูชา ลาว มาเลเซีย สิงคโปร์ เวียดนาม (Waterhouse, 1993) จีน ฟิลิปปินส์ (Bleszynski, 1970) อินเดีย (David, 1986) อินโดนีเซีย ปากีสถาน ไต้หวัน (CABI/EPPO, 2012) อิหร่าน (Ghahari *et al*., 2009) ญี่ปุ่น (Uesumi, 1972) ศรีลังกา (Williams, 1983) แอฟริกาใต้ (Conlong and Goebel, 2002) และ แทนซาเนีย (Polaszek, 1998) *Chilo sacchariphagus* เป็นสายพันธุ์พื้นถิ่นของเอเชีย (Bleszynski 1970; Williams 1983) ส่วนในแอฟริกาได้รับการบันทึกว่าเป็นศัตรูในอ้อยในปี 1991 (Way 1998)

พืชอาหาร

อ้อย (*Saccharum officinarum*)

ข้าวโพด (*Zea mays*)

ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*)

อ้อยป่า (*Saccharum* spp.)

กรมวิชาการเกษตร

สถานะการเป็นศัตรูพืช

Chilo sacchariphagus เป็นศัตรูสำคัญของอ้อย เข้าทำลายตั้งแต่ระยะเริ่มเจริญเติบโตจนเก็บเกี่ยวผลผลิต นอกจากนี้ยังพบรายงานในข้าวโพดและข้าวแต่ในปริมาณเล็กน้อย (Betbeder-Matibet & Malinge 1968; Williams 1983)

ชีววิทยาและนิเวศวิทยา

เต็มวัยเพศเมียหนึ่งตัววางไข่ประมาณ 80 ฟองเป็นแถว แถวละ 7-30 ฟอง เรียงเป็นสองแถวขนานกันส่วนใหญ่ติดอยู่ที่ด้านบนของใบ ตัวอ่อนเคลื่อนที่ไวและสามารถโรยตัวด้วยเส้นใยขนาดเล็กและจากนั้นจะถูกพัดพาไปด้วยลม Kalshoven (1981) ตัวอ่อนกัดกินส่วนเจริญของพืช ตาข้าง และผิวใบ *C. sacchariphagus* เข้าทำลายพืชตั้งแต่ต้นอ่อน จนถึงระยะเก็บเกี่ยว Viswanathan *et al.* (2549) พบว่าการเข้าทำลายของ *C. sacchariphagus* มีการระบาดรุนแรง การทำลายทำให้เกิดการเหี่ยวของอ้อยในอินเดีย ซึ่งผลจากการทำลายของหนอนทำให้ผลผลิตอ้อยลดลง แต่ไม่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลในอ้อย (Anon. 1987) ในไต้หวัน Cheng *et al.* (1997a) ได้เก็บข้อมูลการระบาดของศัตรูอ้อย พบว่า 33.8% เป็น *C. infuscatellus* และ 33.8% เป็น *C. sacchariphagus* ในการสำรวจหนอนเจาะอ้อย ในประเทศอินเดียพบ *C. sacchariphagus* และ *C. auricilius* เข้าทำลายพืชในช่วงเดือนมิถุนายนถึงธันวาคม (Pandya *et al.*, 1996)

5. *Chilo suppressalis* (Walker, 1863)

ภาพที่ 1.1.4.3ก-ข 1.1.4.4ช-ฌ

ชื่อพ้อง *Crambus suppressalis* Walker 1863: 166.

Jartheza simplex Butler 1880: 690 [syn. Kapur 1950].

Chilo suppressalis (Walker): Hampson 1896: 957; Leech 1901: 398; Kapur 1950: 397; Zimmerman 1958: 342; Okano 1962: 124; Bleszynski 1965: 109; 1970: 120.

Chilo simplex (Butler): Rebel 1901: 257; Leech 1901: 397 [in part]; Shibuya, 1928a: 143; 1928b: 54; Kawada 1930: 145; Marumo 1933: 51.

Chilo boxanus Hering 1903: 111 [in part].

Chilo oryzae Fletcher 1928: 59 [syn. Kawada 1930].

Chilo orizae Fletcher: Rebel 1940: 116 [misspelling].

แนวทางการวินิจฉัย

กรมวิชาการเกษตร

ปีกคู่หน้าเรียวเป็นรูปสามเหลี่ยมปลายปีกแหลมมาก อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ Saccus รูปสี่เหลี่ยม Valva มีขนหนาแน่นที่โคน Juxta ฐานกว้างขยายใหญ่โค้งมน cornuti เป็นแผ่นแข็งสามแผ่น อวัยวะสืบพันธ์เพศเมีย Ostium เป็นแผ่นแข็งขนาดใหญ่ส่วนปลายขยายออกด้านข้าง Antrum ยาวทรงกระบอกส่วนปลายเว้าเข้าด้านใน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ภาพที่ 1.1.4.3ก-ข)

หัวสีเหลืองอ่อนมีแถบสีน้ำตาลขนาดเล็กที่ด้านข้าง labial palpus หงายขึ้น หน้าผากมีขนฟู มีขนยาวรอบตารวม ตาเดี่ยวพัฒนาดีเห็นได้ชัดเจน ปีกคู่หน้าเรียวเป็นรูปสามเหลี่ยมปลายปีกแหลมมาก ความกว้างของปีกคู่หน้า ♂ 11 มิลลิเมตร (n=20) ♀ 14 มิลลิเมตร (n=20) พื้นปีกสีเหลืองอ่อนปนขาว discodal spot เป็นจุดกลมสีดำเห็นได้ชัดเจน postmedial line ปีกคู่หลังสีขาวครีม

อวัยวะสืบพันธ์เพศผู้ (ภาพที่ 4ช – ซ) Uncus สั้น ปลายเป็นแผ่นแข็งลักษณะคล้ายจงอยปากนก Saccus รูปสี่เหลี่ยม Sacculus กว้าง Valva กว้างเป็นรูปสามเหลี่ยมปลายมน มีขนหนาแน่นที่โคน ขอบด้านบนของ valva โค้งออกด้านนอกเล็กน้อย Juxta ฐานกว้างขยายใหญ่โค้งมน aedeagus สั้น cornuti เป็นแผ่นแข็งสามแผ่น
อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (ภาพที่ 4ฌ) Papilla analis รูปสามเหลี่ยม Apophysis posterior ขนาดเล็กและสั้นกว่า Apophysis anterior, Ostium เป็นแผ่นแข็งขนาดใหญ่ส่วนปลายขยายออกด้านข้าง Antrum ยาวทรงกระบอกส่วนปลายเว้าเข้าด้านใน Ductus bursae สั้น bursa copulatrix รูปไข่ท้ายเรียวมน

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

THAILAND: 1♀, Bangkok, 10, III, 1926, W. R. S. Ladell; 1♂, 4♀, Bangkok, Bang khen, 6. VII. 1954, Pichit; 1♀, Bangkok, Bangkok Noi, 4. VII. 1954, Pichit; 25♂, 35♀, Khon kaen, XII. 1954, Chanpen; 38♂, 31♀, Khon kaen, III. 1979, X. Lig; 1 exs, Bangkok, Bangkhen, 7. VI. 1952, A. Lewvanich; 3 exs, Roi-et, Thawatchaburi, N 16°09 43.5 E 103°5225.1″, 6. VII. 2011. S. Chaovalit; 3 exs., Roi-et, Thawatchaburi, N 16°09 43.5 E 103°5225.1″, 7. VII. 2011, S. Chaovalit; 2 exs., Buri Ram, Khu Muang, N. 15° 10′12.9′′ E. 103° 11′33.1′′, 6. VII. 2011, S. Chaovalit; 1 exs., Kanchanaburi, Tha Muang, N. 14° 00′20.4′′ E. 099° 37′52.8′′, 22. VI. 2011, S. Chaovalit; 2 exs., Uthai Thani, Huai Khot, N. 15° 16′43.0′′ E. 099° 36′30.0′′, 4. VIII. 2011, S. Chaovalit; 2 exs., Suphan Buri, Song Phi Nong, N. 14° 11′51.2′′ E. 099° 55′52.4′′, 21. VI. 2011, S. Chaovalit; 1 exs., Ang Thong, Sawaengha, N. 14° 44′46.7′′ E. 100° 18′55.6′′, 5. VIII. 2011, S. Chaovalit

เขตการแพร่กระจาย

กรมวิชาการเกษตร

ประเทศไทย (กรุงเทพ กาญจนบุรี ขอนแก่น บุรีรัมย์ ร้อยเอ็ด สุพรรณบุรี อ่างทอง และอุทัยธานี) นอกจากนี้มีรายงานแพร่กระจายในบังคลาเทศ บรูไน พม่า จีน ฝรั่งเศส ฮาวาย อินเดีย อินโดนีเซีย อิรัก ญี่ปุ่น เกาหลี มาเลเซีย เนปาล ปากีสถาน ฟิลิปปินส์ รัสเซียตะวันออกไกล ศรีลังกา ไต้หวัน และเวียดนาม

พืชอาหาร

ข้าว (*Oryza sativa*)
ข้าวโพด (*Zea mays*)
กกสามเหลี่ยม (*Actinoscirpus grossus*)
หญ้าข้าวนก (*Echinochloa crus-galli*)
อ้อย (*Saccharum officinarum*)
หน่อไม้น้ำ (*Zizania latifolia*)

สถานะการเป็นศัตรูพืช

C. suppressalis เป็นศัตรูสำคัญของข้าว และมีการรายงานในข้าวโพด (Meyrick, 1932; Nair, 195; Alam *et al.* 1993) อ้อย (Easwaramoorthy, 1990) ข้าวฟ่าง (Litsinger, 1977; Harris, 1990; Ishida *et al*., 2000). หนอนกอชนิดนี้เป็นศัตรูสำคัญในเอเชียตะวันออก อินเดีย ญี่ปุ่น และอินโดนีเซีย (Hattori & Siwi 1986; Konno & Tanaka 1996; Tripathi *et al.* 1997) การทำลายของ *C. suppressalis* ทำให้เกิดอาการบอดเหี่ยวหรือที่เรียกว่าหัวขาว

ชีววิทยาและนิเวศวิทยา

C. suppressalis มักพบตัวเต็มวัยออกหากินตอนเย็น ตัวหนอนทำลายในเวลากลางคืน หลังจากฟักเป็นตัวเต็มวัยจะผสมพันธุ์ภายใน 24 ชั่วโมง เพศเมียหนึ่งตัววางไข่ประมาณ 100 - 550 ฟอง ภายในระยะเวลา 3 – 5 วัน วางไข่เป็นแถวใต้ใบหรือกาบใบพืช ตัวอ่อนที่ฟักใหม่ๆจะอาศัยรวมกันเป็นกลุ่ม หลังจากนั้นจะกระตัวและเจาะข้าต้นพืช ตลอดวงจรชีวิตใช้เวลาประมาณ 35-60 วัน ในประเทศเขตร้อนที่มีการปลูกพืชอย่างต่อเนื่องสามารถพบผีเสื้อชนิดนี้ได้ถึง 5 รุ่นต่อปี

6. *Chilo terrenellus* Pagenstecher, 1900

ภาพที่ 1.1.4.3ค

ชื่อพ้อง *Chilo terrenellus* Pagenstecher 1900: 160; Bleszynski 1962: 7; 1970: 145.
Chilotraea terrenellus (Pagenstecher): Martin 1954: 120.

กรมวิชาการเกษตร

แนวทางการวินิจฉัย

C. terrenellus มีขนาดค่อนข้างเล็กเมื่อเทียบกับชนิดอื่นในสกุลเดียวกัน ปีกคู่หน้ากลางปีกมีแถบสีน้ำตาล ตามยาว 2 แถบ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

หัวสีเหลืองอ่อนมีแถบสีน้ำตาลขนาดเล็กที่ด้านข้าง labial palpus หงายขึ้น มี 3 ปล้อง ยาวเท่ากับเส้นผ่าศูนย์กลางของตา ตาเดี่ยวพัฒนาดีเห็นได้ชัดเจน ปีกคู่หน้าเรียวเป็นรูปสามเหลี่ยมปลายปีกไม่แหลมมาก พื้นปีกสีเหลืองอ่อนปนขาว กลางปีกมีแถบสีน้ำตาล ตามยาว 2 แถบ ความกว้างของปีกคู่หน้า ♂ 12.5 มิลลิเมตร (n=1) ปีกคู่หน้าเส้น R1 รวมกับเส้น Sc ปีกคู่หลังสีขาวมีสีเทาอ่อนๆเล็กน้อยที่ขอบด้านในของปีก (ภาพที่ 1.1.4.3ค)

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

THAILAND: 1♂, Chumphon, I, 1916, E.J. Godfrey

เขตการแพร่กระจาย

ประเทศไทย (ชุมพร) นอกจากนี้มีรายงานแพร่กระจายใน ปาปัวนิวกินี (Bleszynski, 1970; Li 1985; Kuniata 2000).

พืชอาหาร

อ้อย (*Saccharum officinarum*)

สถานะการเป็นศัตรูพืช

C. terrenellus เป็นศัตรูของอ้อย แต่การระบาดและสร้างความเสียหายน้อยกว่า 10% น้อยกว่า *Sesamia grisescens* (Kuniata, 2000).

ชีววิทยาและนิเวศวิทยา

Li (1985) ศึกษาวงจรชีวิตของ *C. tumidicostalis* ในสภาพธรรมชาติ พบว่า ผีเสื้อชนิดนี้สามารถพบได้ถึง 6 รุ่นต่อปี โดยแต่ละรุ่นอาจจะทับซ่อนกัน วางไข่เป็นแถวใต้ใบหรือกาบใบพืช ตัวเต็มวัยมีชีวิตอยู่ได้ 1-6 วัน เพศเมียหนึ่งตัวสามารถวางไข่ได้ 24 ฟอง ติดต่อกัน 3 วัน

กรมวิชาการเกษตร

7. *Chilo tumidicostalis* (Hampson , 1919)

ภาพที่ 1.1.4.3ง

ชื่อพ้อง *Argyria tumidicostalis* Hampson 1919: 448.

Chilo gemininotalis Hampson 1919: 59. [syn. Fletcher 1928].

Chilo tumidicostalis (Hampson): Kapur 1950: 401; Bleszynski, 1969: 14; 1970: 134.

แนวทางการวินิจฉัย

labial palpus หงายขึ้น ยาวเท่ากับ 2.5 เท่าของตา ปีกคู่หน้า เส้น R1 ไม่รวมกับเส้น Sc กลางปีกคู่หน้ามีแถบสีน้ำตาลเทาขนาดใหญ่ ตามยาวปีก 1 แถบ ขอบปลายปีกด้านนอกสีเทาเข้ม

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

หัวสีเหลืองอ่อน labial palpus หงายขึ้น ยาวเท่ากับ 2.5 เท่าของตาหน้าผากมีขนฟู มีขนยาวรอบตารวม ตาเดี่ยวพัฒนาดีเห็นได้ชัดเจน ปีกคู่หน้าเรียวเป็นรูปสามเหลี่ยมปลายปีกแหลมมาก ความกว้างของปีกคู่หน้า ♂ 14 มิลลิเมตร (n=1) พื้นปีกสีเหลืองอ่อน เส้น R1 ไม่รวมกับเส้น Sc กลางปีกคู่หน้ามีแถบสีน้ำตาลเทาขนาดใหญ่ ตามยาวปีก 1 แถบ ขอบปลายปีกด้านนอกสีเทาเข้ม (ภาพที่ 1.1.4.3ง)

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

THAILAND: 1exs, Ubon Ratchathani, Lot 2441/8

เขตการแพร่กระจาย

ประเทศไทย (อุบลราชธานี) นอกจากนี้มีรายงานแพร่กระจายในบังคลาเทศ พม่า อินเดีย และเนปาล (Bleszynski, 1970; Miah *et al*., 1983; David & Easwaramoorthy 1990; Suasa-ard 2000)

พืชอาหาร

อ้อย (*Saccharum officinarum*)

สถานะการเป็นศัตรูพืช

C. tumidicostalis เป็นศัตรูสำคัญของอ้อย

กรมวิชาการเกษตร

ชีววิทยาและนิเวศวิทยา

จากการศึกษาวงจรชีวิตของ *C. tumidicostalis* ในประเทศไทย พบว่า ตัวเต็มวัยมีชีวิตอยู่ได้ 5-7 วัน เพศเมียหนึ่งตัวสามารถวางไข่ได้เฉลี่ย 287 ฟอง วางไข่เป็นแถวใต้ใบหรือกาบใบพืช ระยะไข่ 4.6 วัน หนอนมีสีขาวครีมมีจุดดำขนาดใหญ่ที่ด้านหลังของลำตัวและหัวสีน้ำตาลเข้ม จากนั้นจะเจาะเข้าไปในเนื้อเยื่อส่วนเจริญของพืช สร้างเป็นอุโมงค์อาศัยกัดกินอยู่ภายใน เมื่อโตขึ้นหนอนจะกระจายสู่ส่วนอื่นๆของพืช เช่นก้านใบ ลำต้น บางครั้งอาจจพบมีการรวมกลุ่มของหนอนมากกว่า 100 ตัวในก้านเดียวกัน (Suasa-ard, 2000) ระยะหนอนประมาณ 26 วัน มีการลอกคราบ 5-7 ครั้ง ระยะดักแด้ 7 วัน จึงออกเป็นตัวเต็มวัย โดยพบประชาการผีเสื้อมากในช่วงกลางเดือนกรกฎาคมจนถึงปลายเดือนกันยายน ซึ่งความชื้นสัมพัทธ์สูงเป็นปัจจัยที่สนับสนุนการเพิ่มจำนวนประชากร (Borah & Sarma, 1995)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาอนุกรมวิธานผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo* โดยใช้ตัวอย่างการสำรวจจากแหล่งปลูก อ้อย ข้าว และข้าวโพด ในพื้นที่ 38 จังหวัด ในประเทศไทย รวมทั้งตัวอย่างที่ได้มีการเก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง ของกรมวิชาการเกษตร จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกร่วมกับเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีในพิพิธภัณฑ์แมลงของกรมวิชาการเกษตร รวมทั้งจำแนกความแตกต่างของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย ผลการตรวจวิเคราะห์สามารถจำแนกได้ 7 ชนิด ได้แก่ 1) *C. auricilius* เป็นศัตรูของ อ้อย ข้าว ข้าวฟ่าง ข้าวโพด พืชวงศ์หญ้า ตะไคร้ และอ้อน้ำ พบแพร่กระจาย จังหวัดกรุงเทพมหานคร นนทบุรี ลำปาง และสุพรรณบุรี 2) *C. infuscatellus* เป็นศัตรูของอ้อย ข้าวโพด ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และลูกเดือย พบแพร่กระจายจังหวัดกาญจนบุรี ขอนแก่น ชลบุรี ชัยภูมิ นครราชสีมา นครสวรรค์ บุรีรัมย์ เพชรบูรณ์ ร้อยเอ็ด ลำปาง สิงห์บุรี สุพรรณบุรี อุดรธานี และอุทัยธานี 3) *C. polychrysus* เป็นศัตรูของข้าว ข้าวโพด อ้อย ข้าวป่า และกกสามเหลี่ยม พบแพร่กระจายจังหวัดกรุงเทพมหานครและราชบุรี 4) *C. sacchariphagus* เป็นศัตรูสำคัญของอ้อย ข้าวโพด อ้อยป่า ข้าวฟ่าง พบแพร่กระจายจังหวัดชลบุรี นครสวรรค์ พิษณุโลก ลำปาง สุพรรณบุรี และอุบลราชธานี 5) *C. suppressalis* เป็นศัตรูของข้าว ข้าวโพด กกสามเหลี่ยม หญ้าข้าวนก อ้อย และหน่อไม้น้ำ กรุงเทพ กาญจนบุรี ขอนแก่น บุรีรัมย์ ร้อยเอ็ด สุพรรณบุรี อ่างทอง และอุทัยธานี 6) *C. terrenellus* เป็นศัตรูของอ้อย พบแพร่กระจายจังหวัดชุมพร และ 7) *C. tumidicostalis* เป็นศัตรูของอ้อย พบแพร่กระจายจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อเตรียมจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชของประเทศไทย

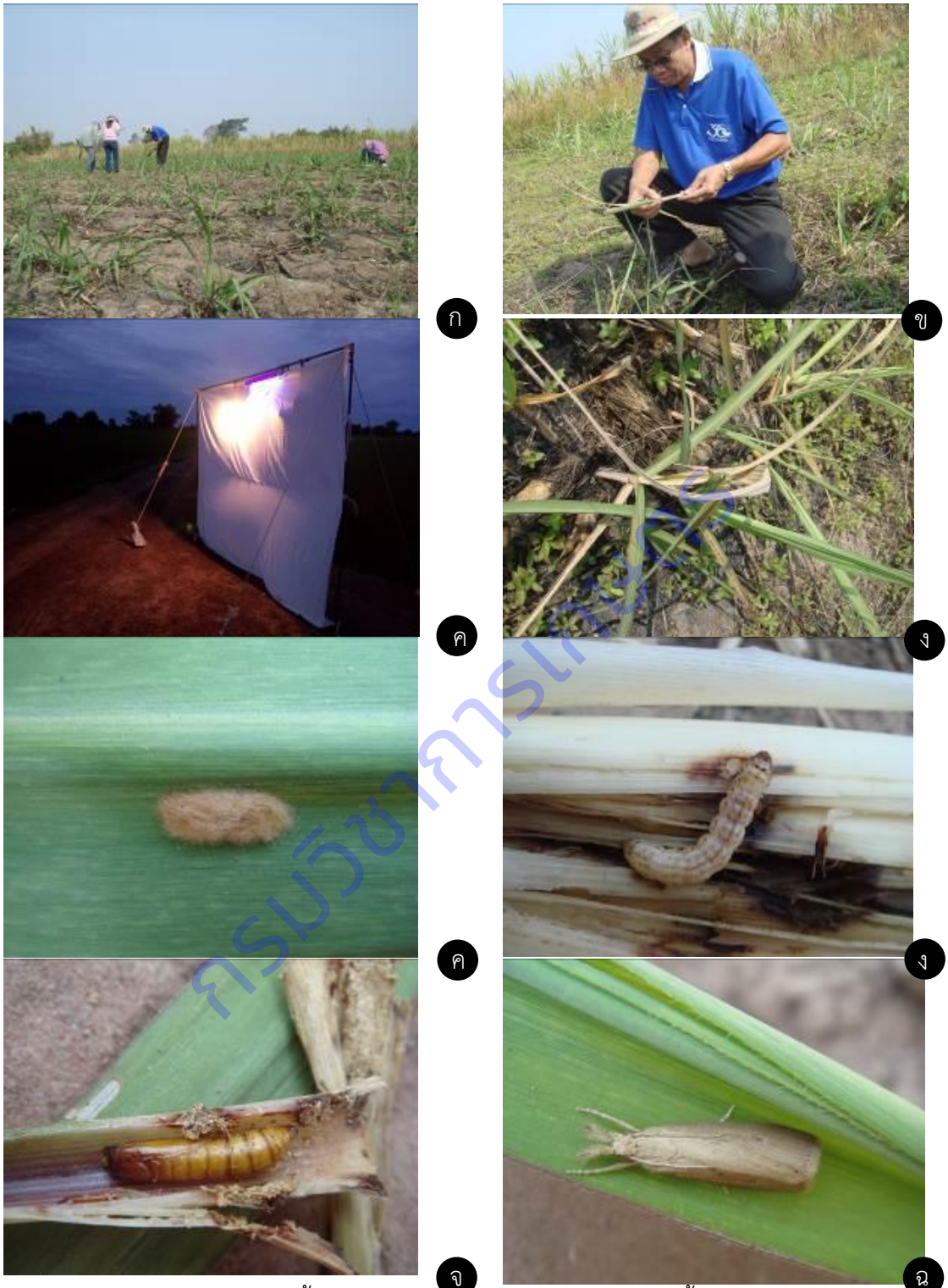
การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

กรมวิชาการเกษตรในฐานะที่เป็นองค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization; NPPO) ของประเทศไทย มีฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชในสกุล *Chilo* (Lepidoptera: Crambidae) ได้ปรับปรุงให้ที่ถูกต้องแม่นยำ และเป็นปัจจุบันมากขึ้น สามารถนำไปใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เชื่อถือต่องานวิจัย ใช้ในการอ้างอิงสำหรับการค้าระหว่างประเทศและสนับสนุนงานด้านกักกันพืช โดยเฉพาะการนำข้อมูลทั้งหมดไปจัดทำข้อมูล

กรมวิชาการเกษตร

บัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List) ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญที่ต้องส่งให้ประเทศคู่ค้าได้นำไปพิจารณาก่อน นำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศไทย ในขณะเดียวกันก็ใช้เป็นข้อมูลสำคัญของประเทศ สำหรับเปรียบเทียบกับข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืชของประเทศคู่ค้าที่ส่งมา อีกทั้งเพื่อประกอบในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis) ก่อนนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศคู่ค้า รวมทั้งเป็นประโยชน์ในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืชกักกัน (Quarantine Pest) เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมศัตรูพืชจากต่างประเทศไม่ให้เข้ามาแพร่กระจายในประเทศ รวมถึงเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับหาแนวทางการป้องกันกำจัดในอนาคตต่อไป

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.1.4.1 ก-ฉ) การเก็บตัวอย่างผีเสื้อหนอนกอสกุล *chilo* ในแปลง ก. การตั้งกับดักแสงไฟในเวลากลางคืนเพื่อเก็บตัวเต็มวัย ข. ต้นอ้อยที่ถูกหนอนกอทำลาย ค. ไข่ผีเสื้อหนอนกอ ง. ระยะหนอนกอ จ. ระยะดักแด้ ฉ. ระยะตัวเต็มวัย

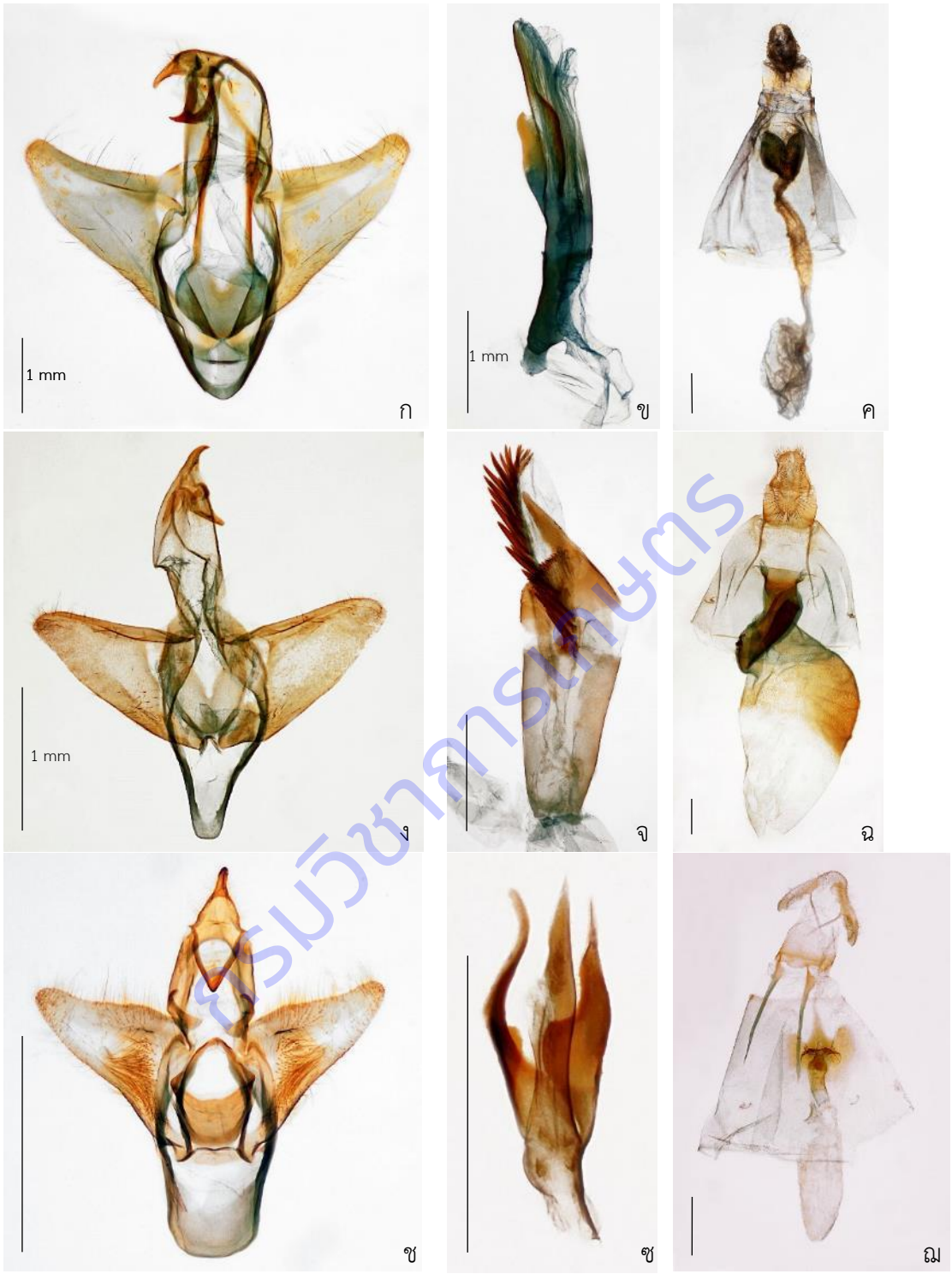
กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.1.4.2 ตัวเต็มวัยของผีเสื้อหนอนกอ *Chilo* ก-ข *C. auricilius* ค-ง *C. infuscatellus* จ-ฉ *C. polychrysus* ช-ซ *Chilo sacchariphagus*

ภาพที่ 1.1.4.3 ตัวเต็มวัยของผีเสื้อหนอนกอ *Chilo* ก-ข *Chilo suppressalis* ค *C. terrenellus* ง. *C. tumidicostalis*

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.1.4.4 อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ เพศเมียของผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo*
ก-ค *C. infuscatellus* ก อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ข aedeagus ค อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย
ง-ฉ *C. sacchariphagus* ง อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ จ aedeagus ฉ อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย
ช-ฌ *C. suppressalis* ช อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ซ aedeagus ฌ อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย

ศูนย์วิทยทรัพยากร

การทดลองที่ 1.1.5 สำรวจความหลากชนิดหอยทากบกศัตรูพืชในระบบนิเวศเกษตรและสิ่งแวดล้อม

Species Diversity of Terrestrial Pest Snails in Agricultural Ecosystem and Environment in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ดาราพร รินทะรักษ์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ณัฐฐิญา กาญจนนิธิพัฒน์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ศุภกร วงศ์เรืองพิบูล	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

สำรวจความหลากชนิดหอยทากบกศัตรูพืชในระบบนิเวศเกษตรและสิ่งแวดล้อมในประเทศไทย โดยในปี 2560 ดำเนินการในพื้นที่ภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ ในพื้นที่ป่าธรรมชาติ เขาหินปูนที่มีพื้นที่ติดต่อกับระบบนิเวศเกษตรที่มีการปลูกพืชเศรษฐกิจและบันทึกพิกัดภูมิศาสตร์พื้นที่เก็บตัวอย่าง เพื่อนำข้อมูลไปจัดทำแผนที่การกระจายพันธุ์ของหอยทากบกชนิดที่พบโดยใช้โปรแกรม Arc Gis และ ArcView และจำแนกชนิดตามระบบอนุกรมวิธานของหอย ตามเอกสารของ Abbott (1989), Hemmen and Hemmen (2001), Naggs (1989), Panha (1996) และ Vaught (1989) ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ เพชรบูรณ์ แม่ฮ่องสอน พะเยา และลำปาง ได้ตัวอย่างรวม 250 ตัวอย่าง สามารถจำแนกได้ กลุ่มหอยทากบก 10 ชนิด กลุ่มทาก 3 ชนิด โดยจัดเป็นหอยและทากชนิดที่มีรายงานเป็นศัตรูพืช 6 ชนิด คือ หอยดักดาน *Cryptozona siamensis*, หอยกระดุม *Bradybeana* sp, หอยขัดเปลือก *Macrochlamys* sp.,หอยสาลิกา *Sarika* sp., หอยทากยักษ์อัฟริกา *Achatina fulica* และ *Parmarion sp.,* ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดหนองบัวลำภู หนองคาย เลย ชัยภูมิ ขอนแก่น ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี ได้ตัวอย่างรวม 420 ตัวอย่าง จำแนกได้ กลุ่มหอยทากบก 25 ชนิด กลุ่มทาก 3 ชนิด โดยจัดเป็นหอยและทากชนิดที่มีรายงานเป็นศัตรูพืช 9 ชนิด คือ หอยดักดาน *Cryptozona siamensis, , หอยเจดีย์เล็ก Lamellaxis gracilis,* หอยเจดีย์ใหญ่ *Prosapea walkeri ,* หอยกระดุม *Bradybeana sp,* หอยอำพัน *Succinea sp.,* หอยขัดเปลือก *Macrochlamys sp.,*หอยสาลิกา *Sarika sp.,* หอยทากยักษ์อัฟริกา *Achatina fulica* และทากเล็บมือนาง *Parmarion sp.,* และพบหอยและทากชนิดที่เป็นตัวห้ำ 2 ชนิด ได้แก่ หอยนักล่าสยาม *Perrottetia siamensis* (Pfeiffer,1862) และทากนักล่าซาราซิน *Atopos sarasini* (Collinge ,1902) ขณะนี้อยู่ระหว่างการวิเคราะห์ดัชนีความหลากชนิด (species diversity index) และดัชนีความเด่น (dominance species index) ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีลักษณะทางภูมิประเทศ และภูมิอากาศที่อุดมสมบูรณ์ จึงเป็นแหล่งผลิตพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด อาทิเช่น กล้วยไม้ตัดดอก และพรรณไม้น้ำ เป็นต้น มีการผลิตและส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกเป็นอันดับ 1 ของโลก มูลค่าการส่งออกในปัจจุบันไม่ต่ำกว่า 3,000 ล้านบาท นอกจากนี้ ธุรกิจการเพาะขยายพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออก มีอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้น โดยสถิติการส่งออกพรรณไม้น้ำของไทย ในปี 2546 มีการส่งออกคิดเป็นมูลค่า 16.22 ล้านบาท ปี 2547 คิดเป็นมูลค่า 17.2 ล้านบาท ปัญหาที่พบในแหล่งผลิตพืชเศรษฐกิจ ดังกล่าว นอกจากการทำลายของแมลงและโรคแล้ว ยังพบหอยทากศัตรูพืชหลายชนิด หอยทากที่มีรายงานว่าเป็นเป็นศัตรูพืชในประเทศไทย ได้แก่ หอยทากยักษ์อัฟริกัน, *Achatina fulica*, หอยดักดาน, *Cryptozona siamensis*, หอยทากสาลิกา, *Sarika spp*., หอยเจดีย์ใหญ่, *Prosopea walkeri* , หอยเจดีย์เล็ก, *Lamellaxis gracilis* , หอยอำพันหรือหอยเล็บ, *Succinea* spp. และหอยเลขหนึ่ง, *Ovachlamys fulgens* เป็นต้น ปี 2553 มีรายงานการพบหอย *Bradybeana* spp. และหอยซัคซิเนีย, *Succinea* spp. ระบาดในแหล่งเพาะพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออก ในเขตจังหวัดนครราชสีมา ซึ่งหอยทากชนิดดังกล่าว เคยมีการพบในสวนผลไม้และไม้ดอกไม้ประดับหลายชนิด ทางภาคเหนือของประเทศไทย หอยอำพันหรือหอยซัคซีเนีย มักพบอาศัยอยู่บริเวณที่มีความชื้นสูง มีรายงานว่าพบในสวนกล้วยไม้ โดยหอยชนิดนี้มักพบอาศัยอยู่บริเวณพื้นดิน วัสดุปลูก และอาจไต่ขึ้นต้นและดอกกล้วยไม้ แล้วจะเข้าทำลายโดยการกัดกินต้นอ่อนและดอกกล้วยไม้ ทำให้ต้นและดอกกล้วยไม้ไม่ได้คุณภาพ ปัจจุบันพบว่าหอยซัคซิเนียกลายเป็นศัตรูพืชที่ทำความเสียหายและเป็นปัญหาต่อการส่งออกพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยหลายชนิด จากการเฝ้าระวังของผู้วิจัย เริ่มพบการระบาดของหอยซัคซีเนียตามแหล่งปลูกพืชผักหลายชนิด เช่น คะน้าและผักกาดหอม เป็นต้น และจากการสังเกต และเฝ้าติดตามการระบาด ทั้งในประเทศไทยและจากรายงานของประเทศเพื่อนบ้านในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สันนิษฐานว่าหอยทากสกุล *Succinea* ที่เริ่มพบระบาดในพื้นที่เศรษฐกิจของประเทศไทย มีความเป็นไปได้ว่าเป็นชนิด introduced species และอาจมีมากกว่า 2 ชนิด โดยพบว่ามนุษย์เป็นปัจจัยหลัก ที่นำพาเอาสิ่งมีชีวิตต่างถิ่นเข้ามา อาจเนื่องจากประเทศไทยมีการนำเข้าพืชจากต่างประเทศและไม่มีมาตรการป้องกันที่เข้มงวด สิ่งมีชีวิตต่างถิ่นเหล่านี้สามารถปรับตัวอยู่รอด เจริญเติบโตเพิ่มจำนวนในระบบนิเวศใหม่และขยายเขตที่อยู่หรือรุกรานไปยังแห่งอื่น รบกวนสิ่งมีชีวิตหรือทำลายแหล่งที่อยู่ดั้งเดิมในระบบนิเวศ บางครั้งก่อให้เกิดผลกระทบที่ไม่อาจคาดเดาได้ หรือแม้กระทั่งหอยทากพื้นเมือง (native species) บางชนิดกลายเป็นศัตรูพืช ดังนั้น เพื่อการเฝ้าระวัง และเพื่อการควบคุมไม่ให้หอยทากหลายชนิดดังกล่าวเกิดการระบาดรุนแรง สร้างความเสียหายแก่พืชชนิดอื่นๆ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องเร่งทำการศึกษาให้รู้ถึงข้อมูลพื้นฐานต่างๆของหอยทาก เช่น ชนิด การแพร่กระจายในสภาพพื้นที่ต่างๆ รวมไปถึงข้อมูลทางด้านชีววิทยา และนิเวศวิทยา เพื่อประโยชน์ในการเป็นฐานข้อมูล แหล่งสืบค้น เฝ้าระวังและเป็นแนวทางในการนำไปใช้วางแผนการจัดการหอยศัตรูพืชต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล่องพลาสติกขนาดต่างๆ /กระดาษเอนกประสงค์ /ไฟฉายและแบตเตอรี่
- ตลับเมตรสำหรับวัดพื้นที่สำรวจตัวอย่างหอย ทากในสภาพแปลง
- เครื่องวัดพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) และเครื่องวัดอุณหภูมิและค่า pH ของดิน
- อุปกรณ์ศึกษากายวิภาคและสัณฐานวิทยา ได้แก่ ขวดแก้วสำหรับใส่น้ำยาเคมี สไลด์แก้ว และแผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องไม้สำหรับเก็บสไลด์ ชุด Jar สำหรับย้อมสี 1 ชุด
- เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น เวอร์เนียร์ thermo-hygrometer

วิธีการ

วิธีดำเนินการวิจัย แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอน 1. สำรวจและเก็บตัวอย่าง ปฏิบัติดังนี้

ปี 2560 ดำเนินการในพื้นที่ภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ ดังนี้

ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ เพชรบูรณ์ แม่ฮ่องสอน พะเยา และลำปาง

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดหนองบัวลำภู หนองคาย เลย ชัยภูมิ ขอนแก่น ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี

ปี 2561 ดำเนินการในพื้นที่ภาคกลางและตะวันตก

ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี ชัยนาถ อุทัยธานี ปทุมธานี และนครนายก

ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ตาก ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี และราชบุรี

ปี 2562 ดำเนินการในพื้นที่ภาคตะวันออกและภาคใต้

ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ชลบุรี ตราด ระยอง และสระแก้ว

ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช ระนอง สงขลา และสุราษฎร์ธานี

1. ศึกษาแผนที่ธรณีวิทยามาตราส่วน 1:250,000 ของกรมทรัพยากรธรณี เพื่อเลือกพื้นที่ศึกษาขนาด 500 ตารางเมตร สำหรับเป็นตัวแทนของแต่ละพื้นที่ โดยสำรวจตามพื้นที่ป่าธรรมชาติ เขาหินปูน ที่มีพื้นที่ติดต่อกับระบบนิเวศเกษตรที่มีการปลูกพืชเศรษฐกิจตามภาคต่างๆของประเทศไทย ทั้งนี้ต้องเป็นบริเวณที่สามารถเข้าถึงพื้นที่ได้

2. วางแปลงสำรวจขนาด 5 x 5 เมตร จำนวน 5 แปลง โดยเลือกบริเวณพื้นที่แปลงสำรวจให้กระจายครอบคลุมทั่วทั้งพื้นที่ศึกษา 500 ตารางเมตร (ดัดแปลงจากวิธี A square kilometer, Srihata et.al (2010) และ Oke and Alohan (2006)

3. เก็บตัวอย่างหอยทากบกอย่างละเอียดในแต่ละแปลงสำรวจ โดยเก็บตัวอย่างจากบนพื้นดิน บนต้นไม้ และบริเวณที่หอยมักซ่อนตัวอยู่ เช่น ขอนไม้ผุ กองใบไม้ทับถม โดยใช้ผู้เก็บตัวอย่าง 2 คน นับจำนวนของหอยแต่ละชนิดที่พบในแต่ละแปลงสำรวจ เก็บตัวอย่างเปลือกและหอยที่มีชีวิตทุกตัวเป็นเวลา 30 นาที ต่อ 1 แปลง

กรมวิชาการเกษตร

4. บันทึกพิกัดด้วย GPS เพื่อจัดทำแผนที่การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยทากบก โดยใช้โปรแกรม ArcView หรือ ArcGis จากนั้นนำตัวอย่างมาพักในตู้กระจกขนาด 25x40x26 เซนติเมตร และอ่างซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เมตร เพื่อรอจำแนกชนิดจากลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร โดยฉีดพ่นน้ำ วันละ 1 ครั้งและให้ผักชนิดต่างๆเป็นอาหาร สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

<u>ขั้นตอน 2. ตรวจสอบชนิดและวิเคราะห์ความหลากชนิด</u>

การจำแนกชนิด (identification) นำตัวอย่างที่ได้มา โดยสังเกตรูปร่าง สี ลวดลาย บนเปลือก ลักษณะการเวียนซ้าย (sinistral) เวียนขวา (dextral) ของเปลือก และศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือก โดยการถ่ายภาพ วาดภาพ และวัดค่า shell length, shell width, last whorl height, aperture length และ aperture width ด้วยเวอร์เนีย การจัดหมวดหมู่ (classification) เรียงลำดับตามการจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธาน โดยยึดตามเอกสารของ Hemmen and Hemmen (2002) , Panha (1996), Patterson (1971) และ Vaught (1989) และตรวจสอบกับตัวอย่างต้นแบบจากพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งเปรียบเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูลของหอยศัตรูพืชในต่างประเทศ ทำแผนที่การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยทากบกที่พบในประเทศไทย ตัวอย่างเปลือกหอยจะถูกลงทะเบียนและเก็บรักษาไว้เป็นตัวอย่างอ้างอิง (reference collection) ของกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา

การวิเคราะห์ดัชนีความหลากชนิด (species diversity index) ของหอยทากบกในแต่ละแปลงสำรวจ

โดยใช้ Shannon-Wiener function

$$H = \sum_{i=1}^{s} (pi)(\ln pi)$$

เมื่อ H คือ ค่าดัชนีความหลากชนิด (species diversity index)

s คือ จำนวนชนิด (number of species)

pi คือ สัดส่วนจำนวนตัวอย่างทั้งหมดของชนิด i ต่อจำนวนตัวอย่างทั้งหมดของทุกชนิดที่พบ

(proportion of the total sample belonging to i species)

การวิเคราะห์ดัชนีความเด่น (dominance species index)

$$C = \sum (pi)2$$

เมื่อ C คือ ดัชนีความเด่น (index of dominance)

pi คือ สัดส่วนจำนวนตัวอย่างทั้งหมดของชนิด i ต่อจำนวนตัวอย่างทั้งหมดของทุกชนิดที่พบ

(proportion of the total sample belonging to I species)

กรมวิชาการเกษตร

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2562 รวม 3 ปี

สถานที่ : พื้นที่ป่าธรรมชาติ เขาหินปูน และพื้นที่เกษตรกรรม ภาคต่างๆของประเทศไทย

: ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สอพ.

ผลการทดลองและวิจารณ์:

การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

ผลการสำรวจ/ เก็บตัวอย่างหอยทากบกอย่างละเอียดในแต่ละแปลงสำรวจในพื้นที่ป่าธรรมชาติ เขาหินปูนที่มีพื้นที่ติดต่อกับระบบนิเวศเกษตรที่มีการปลูกพืชเศรษฐกิจ โดยเก็บตัวอย่างจากบนพื้นดิน บนต้นไม้ และบริเวณที่หอยมักซ่อนตัวอยู่ เช่น ขอนไม้ผุ กองใบไม้ทับถม และบันทึกพิกัดภูมิศาสตร์พื้นที่ๆเก็บตัวอย่าง เพื่อนำข้อมูลไปจัดทำแผนที่การกระจายพันธุ์ของหอยทากบกชนิดที่พบ โดยใช้โปรแกรม Arc Gis และ ArcView และจำแนกชนิดตามระบบอนุกรมวิธานของหอย ตามเอกสารของ Abbott (1989), Hemmen and Hemmen (2001), Naggs (1989), Panha (1996) และ Vaught (1989) ดังนี้

<u>ภาคเหนือ</u> ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ เพชรบูรณ์ แม่ฮ่องสอน พะเยา และลำปาง ได้ตัวอย่างรวม 250 ตัวอย่าง นำมาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ สามารถจำแนกได้ ดังนี้

กลุ่มหอยทากบก 10 ชนิด ได้แก่ หอยดักดาน *Cryptozona siamensis*, หอยกระดุม *Bradybeana* sp, หอยขัดเปลือก *Macrochlamys* sp.,หอยสาลิกา *Sarika* sp., หอยเดื่อ *Hemiplecta* sp., *Pyramidulus* sp.,หอยหางดิ้นน้อย *Durgella* sp., *Cryptaustenia* sp., หอยทากยักษ์อัฟริกา *Achatina fulica* และหอยหอม *Cyclophorus* sp.

กลุ่มทาก 3 ชนิด ได้แก่ ทากเล็บมือนาง *Parmarion* sp., ทากกล้วยตาก *Semperula siamensis* (Martens,1867) และ unknown1

โดยจัดเป็นหอยและทากชนิดที่มีรายงานเป็นศัตรูพืช 6 ชนิด คือ หอยดักดาน *Cryptozona siamensis*, หอยกระดุม *Bradybeana* sp, หอยขัดเปลือก *Macrochlamys* sp.,หอยสาลิกา *Sarika* sp., หอยทากยักษ์อัฟริกา *Achatina fulica* และ *Parmarion sp.,*

<u>ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ</u> ได้แก่ จังหวัดหนองบัวลำภู หนองคาย เลย ชัยภูมิ ขอนแก่น ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี ได้ตัวอย่างรวม 420 ตัวอย่าง นำมาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ สามารถจำแนกได้ ดังนี้

กลุ่มหอยทากบก 25 ชนิด ได้แก่ หอยดักดาน *Cryptozona siamensis*, หอยเดื่อ *Hemiplecta distincta*, หอยเจดีย์เล็ก *Lamellaxis gracilis*, หอยเจดีย์ใหญ่ *Prosapea walkeri* , หอยงวงท่อ *Rhiostroma housei*, หอยดักแด้ *Pseudobuliminus siamensis*, หอยลายตอง *Amphidromus schombergki*, หอยข้าวตอกพระร่วง *Pupina siamensis*, หอยหอม *Cyclophorus malayanus*, หอยนักล่าสยาม *Perrottetia siamensis* (Pfeiffer,1862), หอยทากยักษ์อัฟริกา *Achatina fulica*, *Leptopoma nitidum*, หอยกระดุม *Bradybeana* sp,

กรมวิชาการเกษตร

หอยหางดิ้นน้อย *Durgella* sp., *Cryptaustenia* sp.,หอยอำพัน *Succinea sp.,* หอยขัดเปลือก *Macrochlamys* sp.,หอยสาลิกา *Sarika* sp.,หอยจานบิน *Trochomorpha* sp.,หอยโดม *Landouria* sp., *Dioryx pyramidalis* , *Plectopylis* sp., *Pyramidulus* sp., *Scabrina* sp. และ *Pterocyclus* sp.

กลุ่มทาก 3 ชนิด ได้แก่ ทากนักล่าซาราซิน *Atopos sarasini* (Collinge ,1902), ทากกล้วยตาก *Semperula siamensis* (Martens,1867) และทากเล็บมือนาง *Parmarion* sp., โดยจัดเป็นหอยและทากชนิดที่มีรายงานเป็นศัตรูพืช 9 ชนิด คือ หอยดักดาน *Cryptozona siamensis, , หอยเจดีย์เล็ก Lamellaxis gracilis,* หอยเจดีย์ใหญ่ *Prosapea walkeri* , หอยกระดุม *Bradybeana sp,* หอยอำพัน *Succinea sp.,* หอยขัดเปลือก *Macrochlamys sp.,*หอยสาลิกา *Sarika sp.,* หอยทากยักษ์อัฟริกา *Achatina fulica* และทากเล็บมือนาง *Parmarion sp.,* และพบหอยและทากชนิดที่เป็นตัวห้ำ 2 ชนิด ได้แก่ หอยนักล่าสยาม *Perrottetia siamensis* (Pfeiffer,1862) และทากนักล่าซาราซิน *Atopos sarasini* (Collinge ,1902)

ภาคตะวันตก ได้แก่จังหวัดกาญจนบุรี ตาก ราชบุรี เพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ ได้แปลงทดลอง จังหวัดละ 2 แปลง และได้ตัวอย่างหอยทากบก นำมาจำแนกชนิดจากสัณฐานวิทยาของเปลือกและจัดหมวดหมู่ ในห้องปฏิบัติการ ดังนี้

- จังหวัดกาญจนบุรี ได้แปลงทดลอง 2 แปลง ได้ตัวอย่างรวม 340 ตัวอย่าง พบชนิดที่เป็นศัตรูพืช 8 ชนิด ได้แก่ หอยทากสยาม *Cryptozona siamensis* , หอยเจดีย์เล็ก *Lamellaxis gracilis*, หอยเจดีย์ใหญ่ *Prosapea walkeri* , หอยขัดเปลือก *Macrochlamys* sp.,หอยสาลิกา *Sarika* sp., หอยอำพัน *Succinea sp.,* หอยทากยักษ์อัฟริกา *Achatina fulica* และ *Parmarion sp.,*

- จังหวัดตาก ได้แปลงทดลอง 2 แปลง ได้ตัวอย่างรวม 190 ตัวอย่าง พบชนิดที่เป็นศัตรูพืช 6 ชนิด ได้แก่ หอยทากสยาม *Cryptozona siamensis* , หอยเจดีย์เล็ก *Lamellaxis gracilis*, หอยขัดเปลือก *Macrochlamys* sp.,หอยสาลิกา *Sarika* sp., หอยทากยักษ์อัฟริกา *Achatina fulica* และ *Parmarion sp.,*

- จังหวัดราชบุรี ได้แปลงทดลอง 2 แปลง ได้ตัวอย่างรวม 250 ตัวอย่าง พบชนิดที่เป็นศัตรูพืช 8 ชนิด ได้แก่ หอยทากสยาม *Cryptozona siamensis* , หอยเจดีย์เล็ก *Lamellaxis gracilis*, หอยเจดีย์ใหญ่ *Prosapea walkeri* , หอยขัดเปลือก *Macrochlamys* sp.,หอยสาลิกา *Sarika* sp., หอยอำพัน *Succinea sp.,* หอยทากยักษ์อัฟริกา *Achatina fulica* และ *Parmarion sp.*

- จังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ ได้แปลงทดลอง 2 แปลง ได้ตัวอย่างรวม 180 ตัวอย่าง พบชนิดที่เป็นศัตรูพืช 4 ชนิด ได้แก่ หอยทากสยาม *Cryptozona siamensis* , หอยขัดเปลือก *Macrochlamys* sp.,หอยสาลิกา *Sarika* sp., และหอยทากยักษ์อัฟริกา *Achatina fulica* และ *Parmarion sp.*

ภาคกลาง ได้สำรวจพื้นที่เกษตรที่มีการปลูกพืชเศรษฐกิจจังหวัดนครปฐม นครนายก และชัยนาท ได้แปลงทดลองในพื้นที่ 2 แปลง และได้ตัวอย่างหอยทากบก นำมาจำแนกชนิดจากสัณฐานวิทยาของเปลือกและจัดหมวดหมู่ในห้องปฏิบัติการ ดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

- จังหวัดนครปฐม_ได้แปลงทดลอง 2 แปลง ได้ตัวอย่างรวม 200 ตัวอย่าง พบชนิดที่เป็นศัตรูพืช 6 ชนิด ได้แก่ หอยทากสยาม *Cryptozona siamensis* , หอยเจดีย์เล็ก *Lamellaxis gracilis*, หอยเจดีย์ใหญ่ *Prosapea walkeri* , หอยอำพัน *Succinea sp.,* หอยทากยักษ์อัฟริกา *Achatina fulica* และ *Parmarion sp.*

- จังหวัดนครนายก ได้แปลงทดลอง 2 แปลง ได้ตัวอย่างรวม 120 ตัวอย่าง พบชนิดที่เป็นศัตรูพืช 4 ชนิด ได้แก่ หอยทากสยาม *Cryptozona siamensis* , หอยสาลิกา *Sarika* sp., หอยทากยักษ์อัฟริกา *Achatina fulica* และ *Parmarion sp.,*

- จังหวัดชัยนาท ได้แปลงทดลอง 2 แปลง ได้ตัวอย่างรวม 155 ตัวอย่าง พบชนิดที่เป็นศัตรูพืช 5 ชนิด ได้แก่ หอยทากสยาม *Cryptozona siamensis* , หอยเจดีย์เล็ก *Lamellaxis gracilis*, หอยเจดีย์ใหญ่ *Prosapea walkeri* , หอยทากยักษ์อัฟริกา *Achatina fulica* และ *Parmarion sp.*

การสำรวจความหลากชนิด

โดยเลือกตัวแทนพื้นที่ ภาคละ 2 จังหวัด โดยใช้เกณฑ์พิจารณาจากสภาพป่าธรรมชาติหรือเขาหินปูนที่มีพื้นที่ติดต่อกับระบบนิเวศเกษตรที่มีการปลูกพืชเศรษฐกิจ เพื่อวางแปลงสำรวจขนาด 5 x 5 เมตร จำนวน 5 แปลง โดยเลือกวางแปลงสำรวจให้กระจายครอบคลุมทั่วทั้งพื้นที่ศึกษา 500 ตารางเมตร ดังนี้

ปี 2560 ดำเนินการในพื้นที่ภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ ดังนี้

ภาคเหนือ ได้แก่ สวนส้มฝาง จ. เชียงใหม่ และ แปลงกะหล่ำปลีภูทับเบิก จ. เพชรบูรณ์

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ สวนมะม่วง จ. นครราชสีมา และสวนผลไม้ จ.ศรีสะเกษ

ปี 2561 ดำเนินการในพื้นที่ภาคกลางและตะวันตก

ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี ชัยนาถ อุทัยธานี ปทุมธานี และนครนายก

ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ตาก ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี และราชบุรี

ปี 2562 ดำเนินการในพื้นที่ภาคตะวันออกและภาคใต้

ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ชลบุรี ตราด ระยอง และสระแก้ว

ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช ระนอง สงขลา และสุราษฎร์ธานี

ข้อสังเกต :

pH ของดินในพื้นที่ๆเก็บตัวอย่าง อยู่ในช่วง 7.0 - 7.4 โดยส่วนใหญ่พบตัวอย่างหอยทากจำนวนมากในสภาพที่เป็นภูเขาหินปูน และความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 60% ขึ้นไป

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ:

การทราบข้อมูลพื้นฐาน เช่น ชื่อวิทยาศาสตร์ ชีววิทยา นิเวศวิทยาของหอยทากบกศัตรูพืช จะเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวัง และวางแผนจัดการควบคุมหอยศัตรูพืชอย่างทันท่วงที รวมทั้งยังมีตัวอย่างหอยทากบก ที่วิเคราะห์

กรมวิชาการเกษตร

ชนิดแล้ว เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นแหล่งค้นคว้าอ้างอิง ทั้งยังได้ข้อมูลเชิงวิชาการที่สามารถยืนยันว่ามีหอยทากบกชนิดต่างถิ่นในประเทศไทย นำไปประกอบการปรับปรุงรายชื่อหอยศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย จัดทำเป็นคู่มือถ่ายทอดแก่ผู้สนใจ ต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์:

การทราบข้อมูลพื้นฐาน เช่น ชื่อวิทยาศาสตร์ ชีววิทยา นิเวศวิทยาของหอยทากบกศัตรูพืช จะเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวัง และวางแผนจัดการควบคุมหอยศัตรูพืชอย่างทันท่วงที รวมทั้งยังมีตัวอย่างหอยทากบก ที่วิเคราะห์ชนิดแล้ว เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นแหล่งค้นคว้าอ้างอิง ทั้งยังได้ข้อมูลเชิงวิชาการที่สามารถยืนยันว่ามีหอยทากบกชนิดต่างถิ่นในประเทศไทย นำไปประกอบการปรับปรุงรายชื่อหอยศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย จัดทำเป็นคู่มือถ่ายทอดแก่ผู้สนใจ ต่อไป

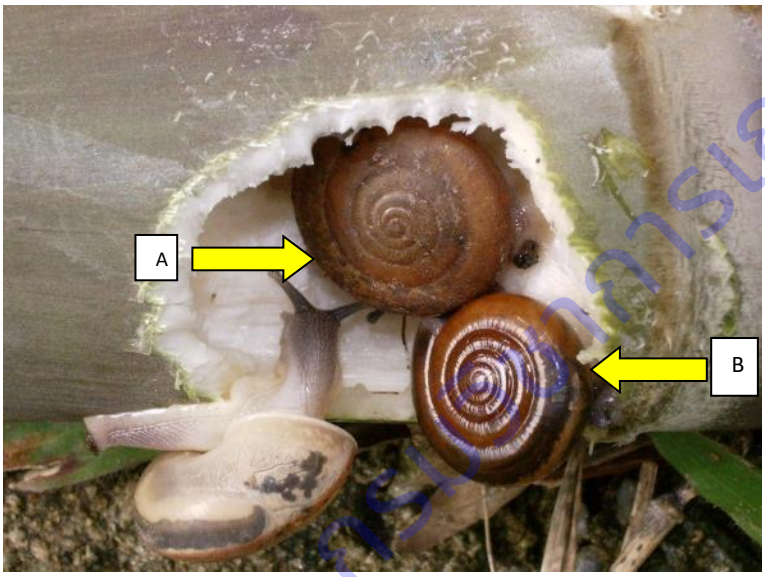


Figure 1.1.5.1 Two species of terrestrial pest snail , *Cryptozona siamensis* (A) and *Sarika* sp. (B) are feeding on bamboo plants in Chiangmai agricultural ecosystem.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.5.2 The terrestrial slug, *Pamarion martensi* is feeding on orchid buds in orchid plantation in Nakornratchasima Province

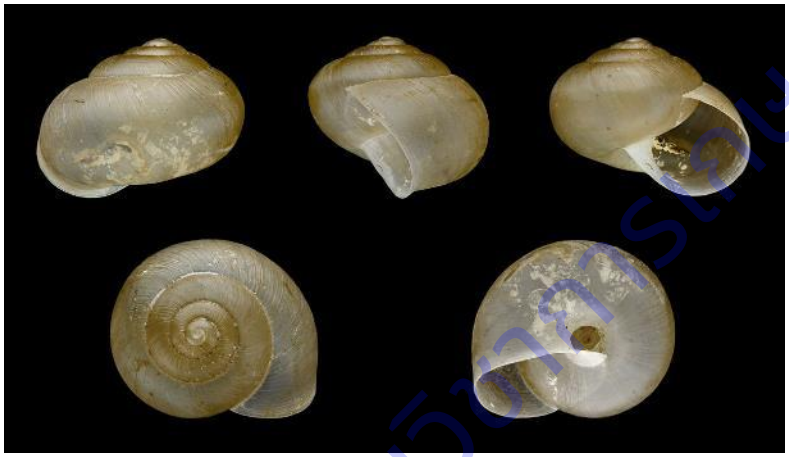


Figure 1.1.5.3 *Bradybeana similaris*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

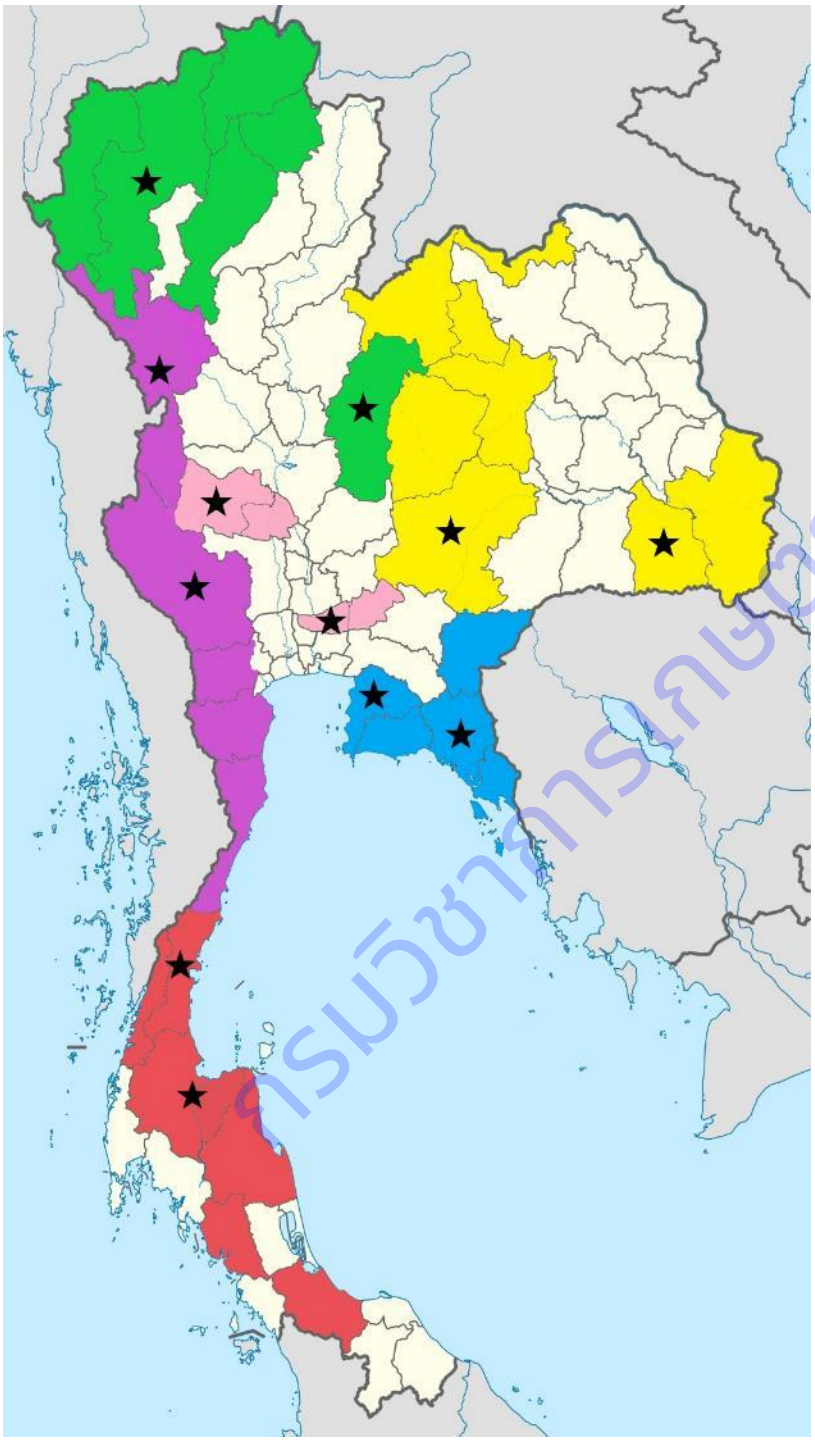


Figure 1.1.5.4 Species Diversity of Terrestrial Pest Snails in Agricultural Ecosystem and Environment in Thailand

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.6 ศึกษาโครโมโซมและการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยศัตรูพืชวงศ์ Succineidae ในประเทศไทย

Chromosomal studies and the Geographical Distribution of Pest Snails Family Succineidae in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ดาราพร รินทะรักษ์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ณัฐฐิญา กาญจนนิธิพัฒน์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ทรงทัพ แก้วตา	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ดำเนินการสำรวจพื้นที่เกษตรที่มีการปลูกพืชเศรษฐกิจจังหวัดตาก นครปฐม กาญจนบุรี และราชบุรี ได้ตัวอย่างหอยศัตรูพืชวงศ์ Succineidae จำนวน 140 ตัวอย่าง พื้นที่ภาคเหนือได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงรายและเพชรบูรณ์ จำนวน 150 ตัวอย่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดชัยภูมิและนครราชสีมา จำนวน 85 ตัวอย่าง และภาคตะวันออก ได้แก่จันทบุรีและตาก จำนวน 17 ตัวอย่าง ดำเนินการศึกษาโครโมโซมจากตัวอย่างหอยทากบกวงศ์ Succineidae จากบางพื้นที่ๆ มีลักษณะของสัณฐานวิทยาของเปลือกที่แตกต่างกันชัดเจน ได้แก่นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี จันทบุรีและตาก พบว่าจำนวนโครโมโซมมีค่าแฮพพลอยด์ (haploid, n) เท่ากับ 19-24 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่มีก่อนหน้านี้ ว่าค่าแฮพพลอยด์ของหอยทากบกวงศ์นี้เท่ากับ 5-25

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีลักษณะทางภูมิประเทศ และภูมิอากาศที่อุดมสมบูรณ์ จึงเป็นแหล่งผลิตพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด อาทิเช่น กล้วยไม้ตัดดอก และพรรณไม้น้ำ เป็นต้น มีการผลิตและส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกเป็นอันดับ 1 ของโลก มูลค่าการส่งออกในปัจจุบันไม่ต่ำกว่า 3,000 ล้านบาท นอกจากนี้ ธุรกิจการเพาะขยายพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออก มีอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้น โดยสถิติการส่งออกพรรณไม้น้ำของไทย ในปี 2546 มีการส่งออกคิดเป็นมูลค่า 16.22 ล้านบาท ปี 2547 คิดเป็นมูลค่า 17.2 ล้านบาท ปัญหาที่พบในแหล่งผลิตพืชเศรษฐกิจ ดังกล่าว นอกจากการทำลายของแมลงและโรคแล้ว ยังพบหอยทากศัตรูพืชหลายชนิด หอยทากที่มีรายงานว่าเป็นเป็นศัตรูพืชในประเทศไทย ได้แก่ หอยทากยักษ์อัฟริกัน, *Achatina fulica*, หอยดักดาน, *Cryptozona siamensis*, หอยทากสาลิกา, *Sarika* spp., หอยเจดีย์ใหญ่, *Prosopea walkeri* , หอยเจดีย์เล็ก, *Lamellaxis gracilis* , หอยอำพันหรือหอยเล็บ, *Succinea* spp. และหอยเลขหนึ่ง, *Ovachlamys fulgens* เป็นต้น ซึ่งในจำนวนนี้มีหลายชนิดที่จัดเป็นศัตรูในสวนกล้วยไม้และก่อให้เกิดปัญหาการส่งออก โดยมีการตรวจพบตัวอย่างหอย

กรมวิชาการเกษตร

ที่มีชีวิต ณ ด่านตรวจพืชเพื่อการส่งออก ได้แก่ หอยอำพันและหอยเลขหนึ่ง นอกจากนี้ในแหล่งเพาะพรรณไม้น้ำยังพบหอยศัตรูพืชหลายชนิด เช่น หอยลิมเนีย, *Lymnaea* spp., หอยเชอรี่, *Pomacea* spp. และหอย *Indoplanorbis* spp. เป็นต้น ในปี 2553 มีรายงานการพบหอย *Bradybeana* spp. และหอยซัคซิเนียระบาดในแหล่งเพาะพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออก ในเขตจังหวัดนครราชสีมา ซึ่งหอยทากชนิดดังกล่าว เคยพบในสวนผลไม้และไม้ดอกไม้ประดับหลายชนิด ทางภาคเหนือของประเทศไทย

หอยอำพัน หอยเล็บหรือหอยซัคซีเนีย, *Succinea* spp. เป็นหอยทากบกที่จัดอยู่ในวงศ์ Succineidae ในประเทศไทยมีรายงานเพียง 1 สกุล 2 ชนิด ได้แก่ *Succinea cochinchinensis* และ *Succinea tenella* (Hemmen and Hemmen, 2002) และ (Panha, 1996) หอยซัคซิเนียมักพบอาศัยอยู่บริเวณที่มีความชื้นสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีรายงานว่าพบระบาดในสวนกล้วยไม้ หอยชนิดนี้มักอาศัยอยู่บริเวณพื้นดิน วัสดุปลูก และอาจไต่ขึ้นต้นและดอกกล้วยไม้ เข้าทำลายกล้วยไม้โดยการกัดกินส่วนของต้นอ่อนและดอกกล้วยไม้ ทำให้ต้นและดอกกล้วยไม้ไม่ได้คุณภาพ ปัจจุบันพบว่าหอยซัคซิเนีย กลายเป็นศัตรูพืชที่ทำความเสียหายและเป็นปัญหาต่อการส่งออกพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยหลายชนิด จากการเฝ้าระวังของผู้วิจัย เริ่มพบการระบาดของหอยซัคซีเนียตามแหล่งปลูกพืชผักหลายชนิด เช่น คะน้าและผักกาดหอม เป็นต้น โดยหอยทากชนิดดังกล่าวที่พบระบาดในพื้นที่เกษตรกรรมของประเทศไทย สามารถระบุได้เพียงระดับสกุล ว่าเป็นหอยสกุล *Succinea* แต่ยังไม่สามารถระบุ species ที่แน่นอนได้ เนื่องจากหอยทากในวงศ์นี้มีความผันแปรของลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกค่อนข้างมาก ทำให้การจำแนกชนิดไม่สามารถใช้ลักษณะของเปลือกเพียงอย่างเดียว และจากการสังเกต ติดตามการระบาดทั้งในประเทศไทยและจากรายงานของประเทศเพื่อนบ้านในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สันนิษฐานว่าหอยทากวงศ์ Succineidae ที่พบระบาดในพื้นที่เศรษฐกิจของประเทศไทย มีความเป็นไปได้ว่าเป็นชนิด introduced species และอาจมีมากกว่า 2 ชนิด ซึ่งแต่เดิมในการจำแนกชนิดจะใช้ข้อมูลเกี่ยวกับสัณฐานวิทยาของเปลือกในการจำแนกเป็นหลัก เช่น รูปทรงเปลือก ทิศของการขดวน ขนาดเปลือก สีสัน และลวดลายของเปลือก แต่บ่อยครั้งทำให้เกิดปัญหาในการจำแนก เนื่องจากเปลือกของหอยทากแต่ละชนิดมีความผันแปรมาก ทำให้การจำแนกชนิดโดยใช้สัณฐานวิทยาของเปลือกเพียงอย่างเดียว มีความสับสนและขาดความชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งหอยทากที่มีรูปทรงและขนาดของเปลือกใกล้เคียงกัน เช่น หอยขัดเปลือก, *Macrochlamys limbata* และ *M. hepbagyra* ที่มีความคล้ายคลึงกันมากในทางสัณฐานวิทยา แต่เมื่อมีการศึกษาข้อมูลทางด้านโครโมโซมประกอบกัน พบว่าหอยทากทั้ง 2 ชนิด มีจำนวนแฮพพลอยด์ (haploid) เท่ากันคือ 10 โดยเมื่อนำมาจัดคาริโอไทป์จะเห็นความแตกต่างกันอย่างชัดเจน และสามารถจำแนกได้ว่าเป็นคนละชนิด เป็นต้น

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงมุ่งเน้นศึกษาอนุกรมวิธานในระดับโครโมโซม เพื่อสนับสนุนข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาของเปลือก และเขตการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยวงศ์ Succineidae ที่พบในประเทศไทย ซึ่งจากการศึกษาและค้นคว้างานทางด้านโครโมโซม พบว่าหอยทากแต่ละวงศ์จะมีจำนวนโครโมโซมคงที่และมีลักษณะเป็นแบบเชิงอนุรักษ์ (conservatism) กล่าวคือหอยที่อยู่ในวงศ์เดียวกันจะมีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน ซึ่งหากจะจำแนกให้ได้ถึงระดับชนิด (species) จะต้องมีการศึกษารูปแบบของการจัดเรียงโครโมโซมหรือคาริโอไทป์ และข้อมูลด้านอื่นๆ สนับสนุนกัน เพื่อให้ฐานข้อมูลทางด้านอนุกรมวิธานของหอยศัตรูพืช มีความชัดเจนและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น โดยอาศัยหลัก

กรมวิชาการเกษตร

ทางอนุกรมวิธานที่ว่า “คาริโอไทป์ (karyotype) ของสิ่งมีชีวิตเดียวกันจะเหมือนกันและจะแตกต่างกันกับคาริโอไทป์ของสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน" (Nakamura, 1985)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล่องพลาสติกขนาดต่างๆ /กระดาษเอนกประสงค์ /ไฟฉายและแบตเตอรี่ สวิงสำหรับเก็บตัวอย่างหอย และอาหารชนิดเม็ด และผักสด สำหรับเลี้ยงหอย

- เครื่องวัดพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) และเครื่องวัดอุณหภูมิและค่า pH ของดิน

- อุปกรณ์ศึกษากายวิภาคและโครโมโซม ได้แก่ ขวดแก้วสำหรับใส่น้ำยาเคมี สไลด์แก้ว และแผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องไม้สำหรับเก็บสไลด์ ชุด Jar สำหรับย้อมสี 1 ชุด

- สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมโครโมโซม ได้แก่ 0.01 % Colchicin , Giemsa Solution และ Carnoy Fixative Solution stock Giemsa’s Solution

- ภาพถ่ายโครโมโซมขนาด 4”x 6 สำหรับศึกษาคาริโอไทป์

- เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น เวอร์เนียร์ thermo-hygrometer

วิธีการ

วิธีดำเนินการวิจัย แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. สำรวจ/ เก็บตัวอย่าง และจัดทำแผนที่การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์

โดยสำรวจทุกๆ 2 เดือน ตามพื้นที่ป่า เขาหินปูน และพื้นที่ปลูกพืชเศรษฐกิจตามภาคต่างๆของประเทศไทย ดังนี้

ภาคเหนือ : พื้นที่จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน น่าน และลำปาง

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ : พื้นที่จังหวัดหนองคาย เลย ชัยภูมิ ขอนแก่น ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี

ภาคกลาง : พื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี ชัยนาถ ปทุมธานี และนครนายก

ภาคตะวันตก : พื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี ตาก ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี และราชบุรี

ภาคตะวันออก : พื้นที่จังหวัดจันทบุรี ชลบุรี ตราด ระยอง และสระแก้ว

ภาคใต้ : พื้นที่จังหวัดชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช ระนอง สงขลา และสุราษฎร์ธานี

เก็บตัวอย่างพื้นที่ละ 30 ตัว และบันทึกพิกัดด้วย GPS เพื่อจัดทำแผนที่การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยทากวงศ์ Succineidae ด้วยโปรแกรม ArcView หรือ ArcGis จากนั้นนำตัวอย่างมาพักในตู้กระจกขนาด 25x40x26 เซนติเมตร และอ่างซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เมตร เพื่อรอจำแนกชนิดจากลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร โดยฉีดพ่นน้ำ วันละ 1 ครั้งและให้ผักชนิดต่างๆเป็นอาหาร สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

2. ตรวจสอบและวิเคราะห์ชนิด

กรมวิชาการเกษตร

นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือก โดยการถ่ายภาพ วาดภาพและวัดค่า shell length, shell width, last whorl height, aperture length และ aperture width ด้วยเวอร์เนีย นำไปวิเคราะห์ชื่อตามระบบอนุกรมวิธาน เปรียบเทียบกับเอกสารหอยทากทั้งในและต่างประเทศ ยึดตามเอกสารของ Abbott (1989), Hemmen and Hemmen (2002) , Laws (1973), Panha (1996), Patterson (1971) และ Vaught (1989) จากนั้นนำข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยทากที่วิเคราะห์แล้ว มาเปรียบเทียบเพื่อคัดเลือกเฉพาะตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันไปศึกษาจำนวนโครโมโซมและการจัดเรียงคาริโอไทป์ต่อไป

3. ขั้นตอนการศึกษาคาริโอไทป์ โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อ ovotestis ดังนี้

3.1 Pre-treatment โดยการฉีด 0.01 - 0.02 % colchicines จำนวน 1 - 2 มิลลิลิตร เข้าไปในลำตัวหอยทาก เป็นเวลา 3 - 4 ชั่วโมง เพื่อยับยั้งการทำงานของ spindle fiber ในโครโมโซม

3.2 Hypotonic treatment โดยการนำเนื้อเยื่อ ovotestis ของหอยทากมาแช่ใน hypotonic solution (สารละลาย KCl) ประมาณ 30 - 45 นาที เพื่อให้เซลล์บวม (swelling)

3.3 Fixation โดยการนำเซลล์ไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วใช้หลอดดูดส่วนที่เป็น supernatant ออกให้หมด แล้วเติมสาร fixative (Carnoy solution) 3 - 4 ครั้ง

3.4 Air dried slide ดูดตัวอย่าเซลล์ที่ผ่านขั้นตอน fixation ลงบนสไลด์ จากนั้นทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.5 Staining ย้อมสไลด์ที่แห้งแล้วด้วย 20% Giemsa ที่มีส่วนผสมของ stock Giemsa's Solution เป็นเวลา 30 นาที จึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นและทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง รอนำไปศึกษาต่อไป

3.6 Analyzation นำสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 100 X ยี่ห้อ Olympus Model Bx 40F เลนส์แบบ pancromatic วิเคราะห์โครโมโซมโดยเลือกจากระยะเมทาเฟส (metaphase) ซึ่งมีการกระจายดี ไม่ซ้อนทับกัน นับจำนวนโครโมโซม จับคู่โครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome) มาจัดเรียงคาริโอไทป์ตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ ถ่ายภาพเซลล์ที่เลือกไว้ จากนั้นใช้ภาพถ่ายมาวิเคราะห์และคำนวณหาค่า relative length (RL) และค่า centromeric index (CI) เพื่อจัดชนิดโครโมโซม ต่อไป

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561 รวม 2 ปี

สถานที่ : พื้นที่ป่าธรรมชาติ เขาหินปูน และพื้นที่เกษตรกรรม ภาคต่างๆของประเทศไทย

: ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สอพ.

ผลการทดลองและวิจารณ์

ได้ดำเนินการสำรวจพื้นที่เกษตรที่มีการปลูกพืชเศรษฐกิจจังหวัดตาก นครปฐม กาญจนบุรี และราชบุรี ได้ตัวอย่างหอยศัตรูพืชวงศ์ Succineidae จำนวน 140 ตัวอย่าง พื้นที่ภาคเหนือได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงรายและเพชรบูรณ์ จำนวน 150 ตัวอย่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดชัยภูมิและนครราชสีมา จำนวน 85 ตัวอย่าง และภาคตะวันออก ได้แก่จันทบุรีและตาก จำนวน 17 ตัวอย่าง อยู่ระว่างยืนยันชนิดและนำมาปรับสภาพใน

กรมวิชาการเกษตร

ห้องปฏิบัติการ ดำเนินการศึกษาโครโมโซมจากตัวอย่างหอยทากบกวงศ์ Succineidae จากบางพื้นที่ๆ มีลักษณะของสัณฐานวิทยาของเปลือกที่แตกต่างกันชัดเจน ได้แก่นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี จันทบุรีและตาก พบว่าจำนวนโครโมโซมมีค่าแฮพพลอยด์ (haploid, n) เท่ากับ 19-24 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่มีก่อนหน้านี้ ว่าค่าแฮพพลอยด์ของหอยทากบกวงศ์นี้เท่ากับ 5-25

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การทราบจำนวนและ รูปแบบการจัดเรียงโครโมโซม จะเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ ที่ช่วยสนับสนุนงานทางด้านการจำแนกชนิดและระบุชื่อวิทยาศาสตร์ได้แม่นยำยิ่งขึ้น ทั้งนี้เพื่อเป็นฐานข้อมูลทางอนุกรมวิธานหอยทากศัตรูพืช รวมไปถึงการสำรวจการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของทากบกที่จัดอยู่ในวงศ์ Succineidae ที่พบในประเทศไทย สามารถนำข้อมูลไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆ เช่น การป้องกันกำจัด ซึ่งหอยดังกล่าวเป็นศัตรูสำคัญในพืชหลายชนิด รวมทั้งยังมีตัวอย่างหอยทากวงศ์ Succineidae ที่วิเคราะห์ชนิดแล้ว เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นแหล่งค้นคว้าอ้างอิง และสามารถจัดทำเป็นเอกสารถ่ายทอดแก่เกษตรกรและผู้สนใจ ต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์:

การทราบข้อมูลพื้นฐาน เช่น ชื่อวิทยาศาสตร์ ชีววิทยา นิเวศวิทยาของหอยทากบกศัตรูพืช จะเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวัง และวางแผนจัดการควบคุมหอยศัตรูพืชอย่างทันท่วงที รวมทั้งยังมีตัวอย่างหอยทากบก ที่วิเคราะห์ชนิดแล้ว เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นแหล่งค้นคว้าอ้างอิง ทั้งยังได้ข้อมูลเชิงวิชาการที่สามารถยืนยันว่ามีหอยทากบกชนิดต่างถิ่นในประเทศไทย นำไปประกอบการปรับปรุงรายชื่อหอยศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย จัดทำเป็นคู่มือถ่ายทอดแก่ผู้สนใจ ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.6.1 The amber snails, *Succinea* spp. are feeding on orchid leaf and stem in orchid plantation in Kanchanaburi province

Figure 1.1.6.2 The pest snails, genus *Succinea* from eastern region of Thailand

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.6.3 Shell morphology of pest snail, Succineidae from western region of Thailand (orchid plantation in Kanchanaburi, Nakornpathom and Ratchaburi)

กรมวิชาการเกษตร

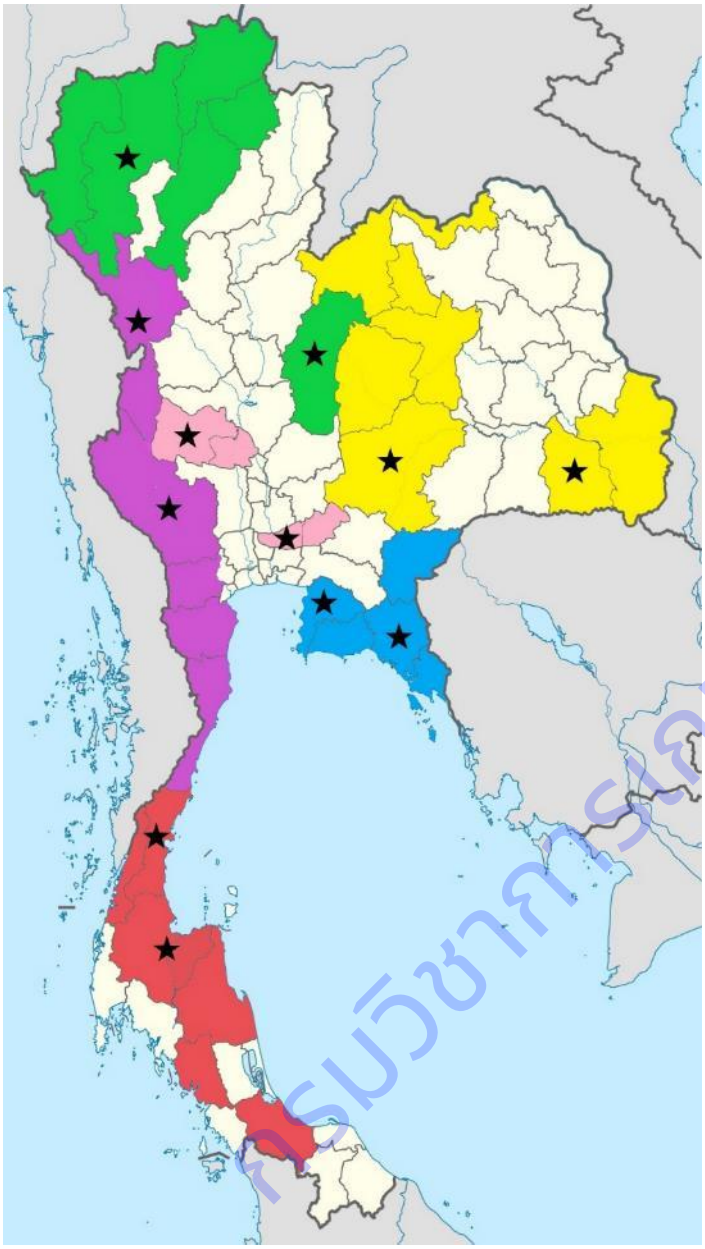


Figure 1.1.6.4 Species Diversity of Terrestrial Pest Snails in Agricultural Ecosystem and Environment in Thailand

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.7 สำรวจความหลากชนิดหอยน้ำจืดศัตรูพืชในพรรณไม้น้ำ

Survey of aquatic pest snail in aquarium plants

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ดาราพร รินทะรักษ์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ณัฐฐิญา กาญจนนิธิพัฒน์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ปราสาททอง พรหมเกิด	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ดำเนินการเก็บตัวอย่างหอยน้ำศัตรูพืชตามภาคต่างๆ ของประเทศไทย ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2561 ได้ตัวอย่างหอยน้ำศัตรูพืชจากจังหวัดนครราชสีมา 10 ตัวอย่าง จังหวัดตาก 10 ตัวอย่าง จังหวัดอุบลราชธานี 10 ตัวอย่าง จังหวัดกาญจนบุรี 46 ตัวอย่าง จังหวัดยโสธร 5 ตัวอย่าง จังหวัดสุพรรณบุรี 2 ตัวอย่าง จังหวัดศรีสะเกษ 10 ตัวอย่าง จังหวัดนครปฐม 42 ตัวอย่าง จังหวัดชลบุรี 3 ตัวอย่าง พบว่าเป็นหอยน้ำจืดศัตรูพืช *Radix* และ *Indoplanorbis* และพบหอย *Physella* sp. 1 ซึ่งเป็นหอยศัตรูพืชต่างถิ่นในบริเวณเขื่อนลำพระเพลิง จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดนครปฐม และหอยศัตรูพืชต่างถิ่น *Physella* sp. 2 ในจังหวัดนครปฐม ทั้งนี้มีความต้องทำการวิจัยเกี่ยวกับชีววิทยา การแพร่กระจาย และความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการเฝ้าระวัง *Physella* ต่อไป

Aquatic pest snails were collected throughout Thailand from October 2016 to September 2018. Totally 137 samples were obtained: 10 samples from Nakhon Ratchasima province, 10 samples from Tak province, 10 samples from Ubon Ratchathani province, 46 samples from Kanchanaburi province, 5 samples from Yasothon province, 2 samples from Suphanburi province, 10 samples from Sisaket province, 42 samples from Nakhon Pathom province, 3 samples from Chonburi province. There species were identified as aquarium pest snails: *Radix*, *Indoplanorbis* and *Physella*. One alien species (*Physella* sp. 1) is found *ex-situ* in Nakhon Ratchasima, Kanchanaburi and Nakhon Pathom provinces. Furthermore, additional invasive species, *Physella* sp. 2, is also found in Nakhon Pathom. Thus, its biology, distribution and genetic diversity researches of *Physella* are required to get insight for surveillance in near future.

คำนำ

ประเทศไทยมีระบบนิเวศที่หลากหลาย เป็นที่อยู่ของสิ่งมีชีวิตนานาชนิด อีกทั้งมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกษตรกรรมเนื่องมาจากทรัพยากรทางธรรมชาติที่อุดมสมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม ความสมบูรณ์ของระบบนิเวศและ

กรมวิชาการเกษตร

สิ่งแวดล้อมได้เปลี่ยนไปจากเดิมเนื่องจากหลายปัจจัย หนึ่งในปัจจัยนั้นคือการรุกรานของสิ่งมีชีวิตต่างถิ่น (invasion of alien species)

สิ่งมีชีวิตต่างถิ่น (alien species) หมายถึง สิ่งมีชีวิตอาศัยอยู่ในระบบนิเวศหนึ่งโดยดั้งเดิมไม่ได้อาศัยอยู่ ณ บริเวณนั้น ปัจจัยที่นำพาเอาสิ่งมีชีวิตต่างถิ่นเข้ามานอกจากปรากฏการณ์ทางธรรมชาติแล้ว มนุษย์เป็นตัวการที่สำคัญในการนำเข้ามา สิ่งมีชีวิตต่างถิ่นสามารถปรับตัว อยู่รอด เจริญเติบโตเพิ่มจำนวนในระบบนิเวศใหม่และขยายเขตที่อยู่หรือรุกรานไปยังแห่งอื่น รบกวนสิ่งมีชีวิตหรือทำลายแหล่งที่อยู่ดั้งเดิมในระบบนิเวศ บางครั้งก่อให้เกิดผลกระทบที่ไม่อาจคาดเดาได้ บางชนิดกลายเป็นศัตรูพืช ยกตัวอย่างเช่น หอยเชอรี่ *Pomacea* ที่ดั้งเดิมนั้นถูกนำเข้ามาเป็นสัตว์น้ำสวยงาม เจริญเติบได้ดีจนมีปริมาณมากเกินความต้องการ จึงถูกนำไปปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ สร้างความเสียหายแก่นาข้าวและพืชน้ำเป็นวงกว้างทั่วประเทศ เป็นต้น นอกจากนี้หอยเชอรี่ยังเป็นตัวกลางของพยาธิ *Angiostrongylus cantonensis* ซึ่งก่อให้เกิดโรคปวดหัวในมนุษย์

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับหอยหลายชนิดที่เป็นสิ่งมีชีวิตต่างถิ่นรุกรานดังนี้ จากฐานข้อมูลของ Global invasive species database โดยคณะผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านสิ่งมีชีวิตต่างถิ่นรุกรานของ IUCN รายงานว่ามีหอยที่ถือเป็นสิ่งมีชีวิตต่างถิ่นรุกรานติดอยู่ใน 100 อันดับแรกที่ก่อให้เกิดผลเสียและอันตรายมากที่สุดดังนี้ ได้แก่ หอยทากยักษ์แอฟริกัน *Achatina fulica* หอยกาบน้ำจืด *Corbula amurensis* หอยแมลงภู่น้ำจืด zebra mussel *Dreissena polymorpha* หอยนักล่า *Euglandina rosea* หอยแมลงภู่เมดิเตอร์เรเนียน *Mytilus galloprovincialis* และหอยเชอรี่ *Pomacea canaliculata* นอกจากนี้ยังมีหอยน้ำจืดที่มีความสามารถในการรุกรานไปยังพื้นที่อื่นๆ และทำความเสียหายให้กับระบบนิเวศ สุขภาพหรือการเกษตร แต่ไม่ได้ถูกจัดอยู่ในรายชื่อ เช่น New Zealand mud snail *Potamopyrgus antipodarum* (Levri et al., 2014) หอย*เจดีย์ Melanoides tuberculata* (Ladd and Rogowski, 2012) หอยเจดีย์ *Tarebia granifera* (López-López et al., 2009) หอย *Physella acuta* (Van Leeuwen et al., 2013) หอยกาบ *Corbicula fluminea* (López-López et al., 2009) Chinese mystery snail *Bellamya chinensis* (Soes et al., 2011) หอยแมลงภู่น้ำจืด Quagga Mussel *Dreissena rostriformis bugensis* (Nelson and Nibling, 2013) หอย *Pseudosuccinea columella* (Grabner et al., 2014) เป็นต้น

หอยน้ำจืดที่ไม่พบในประเทศไทย จัดเป็นสิ่งมีชีวิตต่างถิ่นรุกรานและสามารถทำความเสียหายแก่ระบบนิเวศ มีรายงานดังนี้ เช่น หอยแมลงภู่น้ำจืด *Dreissena polymorpha* มีเขตการแพร่กระจายเดิมอยู่ในรัสเซีย ปัจจุบันแพร่ระบาดไปยังทวีปอเมริกาและยุโรป ทำความเสียหายแก่ระบบนิเวศโดยที่หอยชนิดนี้หาอาหารโดยการกรองน้ำและดักจับแพลงก์ตอน ทำให้ห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศเปลี่ยนไป เบียดบังแย่งถิ่นที่อยู่และทรัพยากรจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น หอยชนิดนี้จะลงเกาะบนหอยชนิดอื่นๆ ทำให้ไม่สามารถหาอาหารได้และตายในที่สุด อีกทั้งยังสามารถไปเกาะกับสิ่งปลูกสร้าง ท่อน้ำ ใบพัดเรือ อวน ทำให้เกิดความเสียหายแก่พื้นผิวนั้นได้ (biofouler) (Birnbaum, 2011) หอย New Zealand mud snail *Potamopyrgus antipodarum* เขตการแพร่กระจายเดิมอยู่ในประเทศนิวซีแลนด์ ปัจจุบันแพร่ระบาดไปยังทวีปอเมริกาและยุโรป ทำความเสียหายให้กับระบบนิเวศโดยเข้าไปแย่งที่อยู่อาศัยของหอยพื้นถิ่น

กรมวิชาการเกษตร

เจริญเติบโตจนอาจมีจำนวนมากถึง 300,000 ตัวต่อตารางเมตร (Levri et al., 2007) อาจเข้าไปกับเกาะกับพื้นผิวของวัสดุ เช่น ท่อ เรือ เป็นต้น และทำให้เกิดความเสียหายแก่พื้นผิวนั้นได้ (Benson et al., 2014)

หอยน้ำจืดที่จัดเป็นศัตรูพืชที่สำคัญทางเกษตรกรรมหรือทางการแพทย์ในต่างประเทศนั้น จำเป็นต้องมีมาตรการการกักกันพืชและสัตว์ที่เข้มงวดเพื่อป้องกันการรุกรานและเข้ามาระบาดในประเทศไทย เช่นหอย *Pseudosuccinea columella* มีเขตการแพร่กระจายเดิมอยู่ในอเมริกาเหนือ *Physella acuta* มีเขตการแพร่กระจายเดิมอยู่ในยุโรป หอยทั้งสองชนิดไม่มีรายงานการพบในประเทศไทย จัดเป็นศัตรูของพรรณไม้น้ำประดับที่สำคัญ (Tian, 2008) อีกทั้งมีรายงานอีกว่า *Pseudosuccinea columella* เป็นพาหะของพยาธิใบไม้ในตับ *Fasciola gigantica* (Grabner et al., 2014) หอย *Lymnaea acuminata* มีเขตการแพร่กระจายเดิมอยู่ในอินเดีย เนปาล *Radix natalensis* มีเขตการแพร่กระจายเดิมอยู่ในแอฟริกา ทั้ง *L. acuminata* และ *R. natalensis* ไม่มีรายงานการพบในประเทศไทย เป็นศัตรูของแหนแดง (*Azolla*) ซึ่งเป็นพืชน้ำที่ช่วยเพิ่มธาตุไนโตรเจนในการปลูกข้าว (Stevens, 2002)

ระบบนิเวศน้ำจืดมีความเสี่ยงต่อการที่หอยน้ำจืดต่างถิ่นจะรุกรานเข้ามา เนื่องจากประเทศไทยมีการนำเข้าสัตว์น้ำจากต่างประเทศและไม่มีมาตรการป้องกันที่เข้มงวด หอยน้ำจืดต่างถิ่นที่มีความสามารถในการรุกราน เช่น *Physella* และ *Pseudosuccinea* สามารถติดมากับพรรณไม้น้ำจากต่างประเทศและถือเป็นศัตรูพรรณไม้น้ำที่สำคัญ หอยน้ำต่างถิ่นบางชนิด เช่น หอยแมลงภู่น้ำจืด (*Dreissena polymorpha*) มีความสามารถในการอยู่รอดและรุกรานสูง พบระบาดแล้วหลายทวีปทั่วโลก ทำให้เกิดความเสียหายต่อระบบนิเวศและสิ่งปลูกสร้าง อีกทั้งข้อมูลทางด้านการกักกันพืชยังขาดข้อมูลทางด้านหอยน้ำศัตรูพืชต่างถิ่น จึงมีความจำเป็นต้องทำการสำรวจ เฝ้าระวังการระบาดของหอยน้ำจืดต่างถิ่นในระบบนิเวศเกษตรและสิ่งแวดล้อมทั่วประเทศ เพื่อเตรียมพร้อมและป้องกันการรุกรานของหอยน้ำจืดต่างถิ่นมายังประเทศไทย

วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

1. กล่องพลาสติกขนาดต่างๆ กระดาษอเนกประสงค์
2. เวอร์เนีย (เครื่องมือวัดขนาดเปลือกหอย)
3. เครื่องบอกพิกัด (GPS)
4. กล้องถ่ายรูปดิจิตอล
5. ตู้ปลา
6. อาหารเม็ด
7. ผักสด
8. ไม้น้ำ
9. สารเคมีเก็บรักษาเปลือกหอย ได้แก่ แอลกอฮอล์ บัฟเฟอร์

กรมวิชาการเกษตร

10. เครื่องแก้วสำหรับบรรจุตัวอย่าง

- วิธีการ

1) เก็บตัวอย่างหอยน้ำจืด

สุ่มเก็บตัวอย่างหอยน้ำจืดจากแหล่งน้ำจืดธรรมชาติ เช่น คลอง บึง แม่น้ำ น้ำตก คลองชลประทาน อ่างเก็บน้ำ และเขื่อน เป็นต้น รวมถึงพื้นที่เกษตรกรรม เช่น แปลงปลูกไม้น้ำ นาบัว ในพื้นที่ศึกษาต่อไปนี้ ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดลพบุรี และสุพรรณบุรี ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี และตาก ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี และฉะเชิงเทรา ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา และอุบลราชธานี ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครสวรรค์ และเชียงใหม่ ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดและสุราษฎร์ธานี กระบี่ บันทึกลักษณะของระบบนิเวศและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่พบ วัดอุณหภูมิ ค่าการนำไฟฟ้า ความเป็นกรดด่างของน้ำ และบันทึกข้อสังเกตอื่นๆ เช่น การกินพืชน้ำของหอย เป็นต้น บันทึกพิกัดของจุดที่เก็บตัวอย่างด้วยโปรแกรม Google earth

2) การเลี้ยงหอยในห้องปฏิบัติการ

นำหอยน้ำจืดกลับมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยนำหอยไปเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 25x40x26 เซนติเมตร รองพื้นตู้ด้วยทราย ใส่น้ำลงไป 3 ลิตร และให้ออกซิเจน นำไปเลี้ยงในบริเวณที่มีแสงส่องถึง ให้อาหารปลาชนิดเม็ดหรือผักสดทุก 3 วัน ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำพร้อมกับให้แคลเซียมผงสัปดาห์ละ 2 ครั้งเพื่อทำให้หอยมีสุขภาพแข็งแรง

3) การจำแนกชนิดและวิเคราะห์ข้อมูล

นำหอยไปจำแนกเพื่อระบุชนิดโดยใช้ลักษณะเปลือก เริ่มจากทำการสังเกตรูปร่าง สี ลวดลาย บนเปลือก ฝาปิด (ถ้ามี) และลำตัวของหอย ตรวจดูรายละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วัดความกว้างความสูงของเปลือก (shell height – SH และ shell width - SH) ความกว้างและความสูงของปากเปิด (aperture height – AH และ aperture width – AW) จำนวนวงรอบเปลือก (whorls) ความยาวของตีนด้วยเวอร์เนียร์ ลักษณะการเวียนซ้าย (sinistral) เวียนขวา (dextral) ของเปลือก ชั่งน้ำหนักหอย บันทึกลักษณะและค่าที่วัดได้ โดยใช้คู่มือของ Brandt (1974) Nabhitabhata (2009) Burch (1989) และ Anderson (2008)

บันทึกข้อมูลของหอยน้ำจืดที่พบในการศึกษานี้ นำมาเปรียบเทียบกับ checklist of mullusca in Thailand หอยชนิดใดที่พบว่าเป็นหอยต่างถิ่นให้เปรียบเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูลและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับหอยน้ำจืดที่เป็น invasive species เช่น Institute for the Study of Invasive Species (USA), National Invasive Species Information Center (NISIC, USA) และ Global invasive species database เป็นต้น รวมทั้งเปรียบเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูลของหอยศัตรูพืชในต่างประเทศ ทำแผนที่การแพร่กระจายของหอยน้ำจืดในประเทศไทย และสรุปผล

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

ลักษณะของระบบนิเวศและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่พบ วัดอุณหภูมิ ค่าการนำไฟฟ้า ความเป็นกรดด่างของน้ำ และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ สถานที่ พิกัด ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง บันทึกข้อสังเกตอื่นๆ เช่น การกินพืชน้ำของหอย เป็นต้น บันทึกพิกัดของจุดที่เก็บตัวอย่าง ความกว้างความสูงของเปลือก (shell height – SH และ shell width - SH) ความกว้างและความ

กรมวิชาการเกษตร

สูงของปากเปิด (aperture height – AH และ aperture width – AW) จำนวนวงรอบเปลือก (whorls) ความยาวของตีนด้วยเวอร์เนียร์ ลักษณะการเวียนซ้าย (sinistral) เวียนขวา (dextral) ของเปลือก

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561 โดยเก็บตัวอย่างหอยน้ำจืดระบบนิเวศน้ำจืดตามธรรมชาติและพื้นที่เกษตรกรรม และนำกลับมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ณ กลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บตัวอย่างหอยน้ำจืดศัตรูพืชจากจังหวัดนครราชสีมาได้ 10 ตัวอย่าง จังหวัดตาก 10 ตัวอย่าง จังหวัดอุบลราชธานี 10 ตัวอย่าง จังหวัดกาญจนบุรี 46 ตัวอย่าง จังหวัดยโสธร 5 ตัวอย่าง จังหวัดสุพรรณบุรี 2 ตัวอย่าง จังหวัดศรีสะเกษ 10 ตัวอย่าง จังหวัดนครปฐม 42 ตัวอย่าง จังหวัดชลบุรี 3 ตัวอย่าง พบว่าเป็นหอยน้ำจืดศัตรูพืช *Radix* และ *Indoplanorbis* และพบหอย *Physella* sp. 1 ซึ่งเป็นหอยศัตรูพืชต่างถิ่นในบริเวณเขื่อนลำพระเพลิง จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดกาญจนบุรี (Figure 1.1.7.1) และจังหวัดนครปฐม ทั้งนี้ มีรายงานการค้นพบ *Physella* sp. 2 ในแหล่งน้ำที่จังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งมีลักษณะเปลือกแตกต่างจาก *Physella* sp. 1 ตรงที่ *Physella* sp. 2 มีลักษณะ apex แบน และเปลือกมีลักษณะเป็นเหลี่ยม ขณะที่ *Physella* sp. 1 มีลักษณะ apex ที่กลมและเปลือกมีลักษณะรี โดยสามารถเก็บตัวอย่าง *Physella* sp. 2 จากจังหวัดกาญจนบุรีได้ 3 ตัวอย่าง (Figure 1.1.7.2)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้ สรุปได้ว่า จากการเก็บตัวอย่างหอยน้ำศัตรูพืชจากแปลงปลูกไม้น้ำและแหล่งน้ำธรรมชาติทั้งหมด 137 ตัวอย่าง 5 ชนิด เป็นหอยในสกุล *Radix* 90 ตัวอย่าง 2 ชนิด ได้แก่ *Radix rubiginosa* และ *Radix swinhoei* สกุล *Indoplanorbis* 4 ตัวอย่าง สกุล *Physella* จำนวน 44 ตัวอย่าง 2 ชนิด คือ *Physella* sp. 1 และ *Physella* sp. 2 โดยหอยในสกุล *Physella* ถือเป็นหอยศัตรูพืชต่างถิ่นที่มีศักยภาพในการรุกรานสูง จำเป็นต้องมีการวิจัยด้านชีววิทยา ความหลากหลายทางพันธุกรรม และการแพร่กระจายเพื่อทำการเฝ้าระวังต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

พัฒนาต่อ สามารถนำไปใช้ประโยชน์กับกลุ่มเป้าหมาย ได้แก่ เกษตรกรผู้ปลูกไม้น้ำ หน่วยงานของรัฐผู้มีหน้าที่รับผิดชอบ เช่น กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร มหาวิทยาลัย นักวิชาการ และผู้สนใจ

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.7.1 หอยน้ำจืดศัตรูพืช *Physella* (ซ้าย) และ *Radix* (ขวา)

Figure 1.1.7.2 หอย *Physella* sp. 2

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.7.1 ชนิดและจำนวนหอยน้ำจืดศัตรูพืชที่สำรวจพบในแหล่งน้ำจืดในจังหวัดต่างๆ

จังหวัด	**สกุล**		
	Radix	*Indoplanorbis*	*Physella* (ต่างถิ่น)
ภาคเหนือ			
ตาก	10		
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ			
ยโสธร	5		
อุบลราชธานี	10		
ศรีสะเกษ	10		
นครราชสีมา	9		1
ภาคกลาง			
สุพรรณบุรี	1	1	
นครปฐม	20		22
ภาคตะวันตก			
กาญจนบุรี	25		21
ภาคตะวันออก			
ชลบุรี		3	

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.8 ความหลากชนิดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหนูหริ่งสกุล *Mus* (Rodentia: Muridae) ที่พบในประเทศไทย

Diversity and genetic relationships of mice group in the genus *Mus* (Rodentia: Muridae: Murinae) in Thailand.

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	วิชาญ วรรธนะไกวัล	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ปราสาททอง พรหมเกิด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สมเกียรติ กล้าแข็ง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ทรงทัพ แก้วตา	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากชนิดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหนูหริ่งสกุล *Mus* (Rodentia: Muridae: Murinae) ที่พบในประเทศไทย ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2562 ได้ดำเนินการดักหนูหริ่งศัตรูพืชจำนวน 110 ตัวอย่าง จากพื้นที่ทำการเกษตร 11 แหล่ง (10 จังหวัด) 4 ภูมิภาคของประเทศไทย ผลการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา โดยการวัดลักษณะขนาดรูปร่างภายนอก และการวัดลักษณะกะโหลก ร่วมกับการศึกษาทางชีวโมเลกุล บริเวณยีนไซโทโครม บี โดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม การเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบส การวิเคราะห์ร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบส การวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรม และการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน สามารถจำแนกชนิดหนูหริ่งศัตรูพืช ได้ 4 สปีชีส์ ได้แก่ หนูหริ่งนาหางสั้น (Fawn-colored mouse; *Mus cervicolor*) 50 ตัวอย่าง, หนูหริ่งใหญ่ (Cook's mouse; *Mus cookii*) 12 ตัวอย่าง, หนูหริ่งนาหางยาว (Ryukyu mouse; *Mus caroli*) 42 ตัวอย่าง และหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน (Shortridge's shrewmouse; *Mus pahari*) 6 ตัวอย่าง ค่าเฉลี่ยของลักษณะขนาด รูปร่างภายนอก 5 ลักษณะ และค่าเฉลี่ยของลักษณะกะโหลก 21 ลักษณะ ในแต่ละสปีชีส์นั้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อแยกเปรียบเทียบกันในแต่ละลักษณะ ส่วนผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม ได้แก่ ความหลากหลายของ haplotypes ความหลากหลายของลำดับเบส และ ผลการทดสอบสมดุลประชากร ทั้ง 4 พารามิเตอร์ ได้แก่ Tajima's D, Fu's Fs, Fu and Li's *D* และ Fu and Li's *F* บ่งชี้ว่าหนูหริ่งมีความหลากหลาย ทางพันธุกรรมสายแม่ที่สูง และกลุ่มประชากรหนูหริ่งนั้นมีจำนวนประชากรเพิ่มขึ้น

Abstract

The study of diversity and genetic relationships of mice group in the genus *Mus* (Rodentia: Muridae: Murinae) in Thailand was conducted during October 2016 to September 2019. We collected 110 of *Mus* spp. samples in 11 agricultural areas (10 provinces) obtain from 4 regions of Thailand.

กรมวิชาการเกษตร

The morphological identification based on the external characters and cranial character measurements combined with molecular characteristics using cytochrome *b* region by phylogenetic analysis, nucleotide differentiation, nucleotde identity, genetic distance and amino acid translation can divided into 4 species such as Fawn-colored mouse (*Mus cervicolor*) 50 samples, Cook's mouse (*Mus cookii*) 12 samples, Ryukyu mouse (*Mus caroli*) 42 samples and Shortridge's shrewmouse (*Mus pahari*) 6 samples. The measurements of the average number of 5 external characters and 21 cranial characters in each species, no statistical differences when separated in each characters. The result of genetic diversity test (haplotype diversity and nucleotide diversity) and the neutrality test such as Tajima's D, Fu's Fs, Fu and Li's *D* and Fu and Li's *F* indicated that haplotype and nucleotide diversity were very high and possible population expansion in the *Mus* species in this study.

คำนำ

หนูเป็นศัตรูสำคัญในกระบวนการผลิตพืช-สัตว์และทางการแพทย์ในประเทศไทย หนูสร้างความเสียหายให้กับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ตั้งแต่ระยะปลูก ตลอดจนหลังการเก็บเกี่ยวแล้ว เช่น ข้าว ข้าวโพด อ้อย ถั่วเหลือง โกโก้ ปาล์มน้ำมัน เป็นต้น ความเสียหายที่เกิดขึ้นคิดเป็นมูลค่าหลายพันล้านบาทต่อปี นอกจากการทำลายพืชทางการเกษตรแล้ว หนูยังเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญที่ถ่ายทอดสู่มนุษย์ และสัตว์เลี้ยง เช่น กาฬโรค โรคเลปโตสไปโรซีสหรือโรคไข้ฉี่หนู เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยา นิเวศวิทยาและอนุกรมวิธานของหนูเพื่อศึกษาเรียนรู้พฤติกรรมของมันเพื่อนำไปสู่การป้องกันและกำจัด โดยทั่วไปสัตว์ในวงศ์ Muridae จะมีรูปร่างแบบหนู คือ รูปร่างทรงกระบอกและด้านหัว มีทรงแหลม มีสี่ขา หางยาว สูตรของฟันโดยทั่วไป คือ 1/1, 0/0, 0/0, 3/3 = 16 สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในวงศ์นี้ มีจำนวนชนิดที่มากที่สุด ในโลกดิดเป็นร้อยละ 65 ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในอันดับสัตว์ ฟันแทะทั้งหมด สำหรับในประเทศไทยหนูในวงศ์ Muridae จัดแบ่งตาม Lekagul and Jeffery (1997) ลักษณะที่ใช้จำแนกชนิดของหนูที่ใช้กันทั่วๆไป คือ ลักษณะภายนอก (external characters) เช่น ขนาด น้ำหนัก ลักษณะของขน สี จำนวนเต้านม (เพศเมีย) และอื่นๆ ซึ่งลักษณะเหล่านี้ต้องดูจากหนูที่โตเต็มวัยแล้ว เมื่อนำเอาลักษณะต่างๆมาประกอบกันทำให้สามารถจำแนกจำแนกหนูได้ถึงระดับสกุล (genus) หรือชนิด (species) ส่วนการจำแนกชนิดของหนูที่มีลักษณะใกล้เคียงกันในสกุลเดียวกัน สามารถทำได้ยาก เช่น หนูในสกุล *Rattus* ต้องอาศัยลักษณะอื่นๆประกอบ เช่น สัณฐานวิทยาของกะโหลกศรีษะ ลักษณะและขนาดของฟันแทะและฟันกราม เป็นต้น (กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร, 2544)

หนูหริ่งสกุล *Mus* เป็นหนูที่มีขนาดเล็กที่สุด น้ำหนักตัวอยู่ระหว่าง 8-20 กรัม ลักษณะเด่นที่สุดของหนูสกุลนี้ คือ ความยาวฟันกรามซี่แรกด้านบน M1 ยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของฟันกรามทั้งแถว (molar row) ในประเทศไทยพบเป็นศัตรูสำคัญของข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ถั่วเขียว ถั่วเหลืองและข้าวโพด เป็นศัตรูสำคัญของการผลิตธัญพืชต่างๆ หนูสกุลนี้ขนลำตัวด้านหลังสีเทา ด้านท้องสีขาว หางมี 2 สี ขุดรูอาศัยตามคันนาหรือในแปลงปลูกพืชที่แห้งและมีหญ้า

กรมวิชาการเกษตร

รก ในหน้าแล้งจะอาศัยอยู่ตามรอยแยกแตกระแหงของดิน เพศเมียมีเต้านม 3 คู่ที่อก และ 2 คู่ที่ท้อง ในประเทศไทยมี 2 ชนิด คือ

1. **หนูหริ่งนาหางยาว (Ryukyu mouse : *Mus caroli* Bonhote, 1902)** พบในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลางและภาคตะวันออก ฟันแทะคู่บนจะตั้งฉากกับ palate สีผิวด้านหน้าของฟันแทะคู่บนมีสีแทนหรือน้ำตาลเข้มมากกว่าหนูหริ่งชนิดอื่นๆ ส่วนฟันแทะคู่ล่างมีสีขาว จมูกสั้น จึงทำให้ส่วนหน้าทู่ หางยาวกว่าความยาวหัวและลำตัวรวมกันและมี 2 สีชัดเจน คือด้านบนของหางมีสีดำ ด้านล่างมีสีขาว ตีนหลังใหญ่และมีสีเทา ปีนป่ายดีกว่าหนูหริ่งนาหางสั้น (กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร, 2544)
2. **หนูหริ่งนาหางสั้น (Fawn-colored mouse : *Mus cervicolor* Hodgson, 1845)** เขตแพร่กระจายลักษณะต่างๆ คล้ายกับหนูหริ่งนาหางยาว ตัวมีขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย ฟันแทะคู่บนจะโค้งงอเข้าด้านในและไม่ตั้งฉากกับ palate สีผิวด้านหน้าของฟันแทะคล้ายหนูหริ่งนาหางยาวแต่สีอ่อนกว่ามาก จมูกยาวกว่าทำให้ส่วนหน้าดูแหลม ตีนหลังขาว หางมี 2 สี แต่อ่อนกว่าของหนูหริ่งนาหางยาวและหางสั้นกว่าความยาวหัวและลำตัวรวมกัน (กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร, 2544)

เนื่องจากมียังมีความเข้าใจที่ไม่ตรงกันว่า ในประเทศไทยนั้นพบหนูหริ่งบ้าน (*M. musculas*) หรือไม่ ซึ่งบางแหล่งข้อมูลรายงานว่าพบในประเทศไทย แต่บางแหล่งข้อมูลรวมถึงทางกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตรฯ ไม่เคยพบว่ามีในประเทศไทย อีกทั้งในปัจจุบันสภาพแหล่งทีอยู่อาศัยของหนูหริ่งศัตรูพืชตามธรรมชาติหรือในแหล่งทำการเกษตรอาทิเช่น ไร่ข้าวโพด, แปลงถั่วเหลืองและโรงเก็บธัญพืช นั้นมีการเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้เกิดการเคลื่อนย้ายของกลุ่มประชากรไม่ว่าจะเป็นการเคลื่อนย้ายแหล่งที่อยู่ของหนูหริ่งเองตามธรรมชาติ หรือเคลื่อนย้ายโดยติดไปกับผลิตผลทางการเกษตรอาทิเช่น เรือบรรทุกสินค้าหรือรถบรรทุกสินค้าเป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เป็นปัจจัยที่ทำให้หนูหริ่งสามารถเคลื่อนย้ายไปยังแหล่งที่อยู่อาศัยใหม่ ทำให้ข้อมูลเกี่ยวกับแหล่งที่พบหนูหริ่งศัตรูพืช ตามธรรมชาตินั้นต้องเปลี่ยนแปลงตามสภาพในปัจจุบันด้วยเพื่อนำไปสู่การป้องกันและกำจัดที่เหมาะสมต่อไป ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องทำการศึกษาการแพร่กระจายของหนูหริ่งศัตรูพืชในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย โดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรม (molecular characteristic) ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (molecular technique) ควบคู่ไปกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology characteristic) เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาความหลากชนิด ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหนูหริ่งที่พบในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย ทำให้ทราบถึงชนิดของหนูหริ่งศัตรูพืชที่พบในประเทศไทย เพื่อเป็นแหล่งข้อมูลพื้นฐานด้านอนุกรมวิธานของหนูหริ่งศัตรูพืช อันจะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการป้องกันกำจัดหนูหริ่งที่สร้างความเสียหายให้แก่ผลิตภัณฑ์ธัญพืชต่างๆรวมถึงนาข้าวและพืชผลทางการเกษตรอื่นๆได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งเพื่อเป็นการพัฒนาฐานข้อมูลด้านอนุกรมวิธานสำหรับงานวิจัยต่อยอดในด้านอื่นๆต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- สารเคมี; ethyl alcohol, ether, ชุด kit สกัดดีเอ็นเอ, hot start taq DNA polymerase, ชุด kit purification gel electrophoresis, TAE/TBE buffer, agarose gel, สีย้อม nucleic acid (gel star)

- สัตว์ทดลอง; หนูหริ่งศัตรูพืชจากธรรมชาติ

- วัสดุและอุปกรณ์; เวอร์เนีย คาลิปเปอร์ (vernier caliper), slides + coverglass, เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge), หลอดปั่นขนาด 1.5, 15 และ 50 มิลลิลิตร, ตู้เย็น, กรรไกรและชุดเครื่องมือผ่าตัด, เครื่องชั่งสาร, beaker, pipette, sterile tips, eppendorf tube (1.5 ml), gel electrophoresis, ชุดถ่ายรูป gel document, กรงดักหนู ขนาด 13 x 22 x 13 ซม. และกรงเลี้ยงหนูสแตนเลส ขนาด 40 x 26 x 15 ซม.

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง (sampling)

ดักจับหนูหริ่งในธรรมชาติ ด้วยการใช้กรงดักชนิดจับเป็น จากภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย เพื่อเป็นตัวแทนของหนูหริ่งศัตรูพืชที่พบในประเทศไทย

2. การวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics)

นำตัวอย่างหนูหริ่งที่ดักได้จากธรรมชาติ มาวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้

2.1 การวัดขนาด รูปร่างภายนอก (external characters)

ทำการบันทึกลักษณะของขน สีขน ชั่งน้ำหนัก หน่วยเป็นกรัม (grams) และวัดลักษณะภายนอกของตัวอย่างหนูหริ่งที่ดักได้ หน่วยเป็นมิลลิเมตร (millimeter) ตามวิธีการของ Aplin *et al*. (2003) ดังนี้

2.1.1 ความยาวของหัวและลำตัว (head and body length; HB) โดยวัดจากปลายจมูกถึงรูทวาร

2.1.2 ความยาวของหาง (tail length; T) โดยวัดจากรูทวารถึงปลายหาง

2.1.3 ความยาวของตีนหลัง (hind foot length; HF) โดยวัดจากปลายนิ้วที่ยาวที่สุดจนถึงส้นของตีนหลัง

2.1.4 ความยาวของหู (ear length; E) โดยทำการวัด จากโคนหูจนถึงปลายของใบหู

2.2 การวัดลักษณะกะโหลก (cranial measurements)

ตัดส่วนหัวของหนูหริ่ง ลอกส่วนหนังและเนื้อออก หลังจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดจนได้ชิ้นกะโหลกที่ไม่มีส่วนของเนื้อติดอยู่ หลังจากนั้นทำการวัดลักษณะของกะโหลก 21 ลักษณะ โดยใช้เวอร์เนีย คาลิปเปอร์ (vernier caliper) ตามวิธีการของ Musser, (1979) และ Harrison & Bates, (1991) โดยมีหน่วยวัดเป็นมิลลิเมตร ดังนี้ Greatest skull length (GSL), Occipital nasal length (ONL), Condylobasal length (CBL), Zygomatic breadth (ZB), Interorbital breadth (IB), Length of rostrum (LB), Breadth of rostrum (BR), Breadth of braincase (BB), Height of braincase (HBC), Breadth of zygomatic plate (BZB), Length of nasals (LN), Length of diastema

กรมวิชาการเกษตร

(LD), Length of incisive foramina (LIF), Palatal length (PL), Post palatal length (PPL), Breadth of bony palate at first molars (BBPM^1), Breadth of bony palate at third molars (BBPM^3), Length of bullae (LB), Length of maxillary toothrow (ALM^1-M^3), Length of mandible (LM) และ Length of mandible toothrow (ALM$_1$-M$_3$)

3. การวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล (molecular characteristics)

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างชิ้นเนื้อหรืออวัยวะต่างๆ เช่น หัวใจ ปอด ไต และตับ เป็นต้น โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Germany) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer 30 ไมโครลิตร (ul) หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกริยาพีซีอาร์

3.2 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR)

ใช้ไพรเมอร์ (primers) จำนวน 1 คู่ บริเวณยีนไซโตโครมบี ในไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ(cytochrome *b* gene) คือ Mus cytb F seq; 5'- CCA TGA GGA CAA ATA TCA TTC TGA GG-3' และ Mus cytb R; 5'- GGT TGG CCT CCG ATT CAG GTT A-3' เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวม 20 ul ประกอบด้วยดีเอ็นเอหนูหริ่ง 2 ul ผสมกับ 10x PCR buffer, 10mM dNTPs, เอนไซม์ hot start taq DNA polymerase 1 ยูนิต และไพรเมอร์ชนิดละ 10 mM แล้วเติมน้ำกลั่น จนครบปริมาตร 20 ul ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) ภายใต้อุณหภูมิ pre denature 98 °C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบของการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ denature 98 °C เป็นเวลา 30 วินาที, annealing 60 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ extension 72 °C เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 40 รอบ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน final extension 72 °C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วย 1.5 % อะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟริซีส (agarose gel electrophoresis)

3.3 การหาลำดับเบส (DNA sequencing)

ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ 1.5% อะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟริซีส และตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ที่มีขนาดของแถบดีเอ็นเอขนาดตรงกับที่คำนวณไว้ หลังจากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ gel elution kit (GeneMark, Taiwan) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต และส่งดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ First BASE laboratories ประเทศมาเลเซีย

3.4 การวิเคราะห์ผล (data analysis)

ตรวจสอบความถูกต้อง และตัดลำดับเบสที่ไม่ชัดเจนหรือมีสัญญาณรบกวนออก จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) ใช้โปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) จัดเรียง วิเคราะห์ และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0 (Hall, 1999) รวบรวมแต่ละ contig เป็นสายเดียว

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.4.1 การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree)

วิเคราะห์ความหลากหลายและสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 3 วิธี ได้แก่ neighbor-joining (NJ), maximum parsimony (MP) และ maximum likelihood (ML) โดยใช้หนูสกุลท้องขาว (*Rattus*) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม (outgroup) การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิธี neighbor-joining (NJ; Saitou and Nei, 1987) นั้นถูกสร้างจากการวิเคราะห์ข้อมูลคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างลำดับเบสของหนูแต่ละคู่ ด้วยแบบจำลอง kimura 2-parameter distance models (Kimura, 1980) วิธี Maximum parsimony (MP; Fitch, 1971) ทำ brance swapping โดยใช้ subtree-pruning-regrafting (SPR) method (Hein *et al*, 1996) ในขณะที่วิธี Maximum likelihood (ML; Felsenstein, 1981) หา best fit model และวิเคราะห์ด้วยสมการแบบ TN93+G+I (Tamura - Nei model; GTR, Gamma distributed และ Invariant site (G+I)) ซึ่งทั้ง 3 แผนภูมิดังกล่าวนั้น วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม MEGA 7 software (Kumar *et al*., 2016) ทำการวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ (bootstrap) จำนวน 1,000 รอบ โดยค่าทางสถิติที่ได้จะถูกนำมาแสดงเพื่อเพิ่มระดับความเชื่อมั่นของแผนภูมิ

3.4.2 การเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบส

นำลำดับเบสที่ได้มาหลังจากทำการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบส โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0

3.4.3 การวิเคราะห์ร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบสและระยะห่างทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ค่าร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบส (nucleotide identity) โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0 และวิเคราะห์หาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) โดยการวิเคราะห์แบบ pairwise distance โดยที่ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม คือ ค่าที่คำนวณความแตกต่างกันระหว่างลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตตัวอย่างที่นำมาศึกษา โดยใช้ข้อมูลการแทนที่เบสที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่นำมาศึกษา โดยกระทำภายใต้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสม ซึ่งแบบจำลองที่นำมาใช้นั้น เพื่อป้องกันการประเมินจำนวนการแทนที่เบสน้อยกว่าความเป็นจริง (Nei and Kumur, 2000) โดยใช้โปรแกรม MEGA 7 software

3.4.4 การวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity)

โดยการวิเคราะห์ค่าความหลากหลายของลำดับเบส (nucleotide diversity, *Pi*) (Tajima, 1983) และค่าความหลากหลายของ haplotypes (haplotypes diversity, *Hd*) (Nei, 1987) ด้วยโปรแกรม DnaSP v.5 (Librado and Rozas, 2009)

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Nucleotide diversity (*Pi*) คือ ค่าเฉลี่ยความแตกต่างของลำดับเบส เป็นค่าที่สามารถบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรได้ คำนวณได้จากสูตร

$$Pi = \left[\frac{n}{n-1}\right]\left[\sum_{l=1}^{k}\sum p_i\, p_j\, d_{ij}\right]$$

เมื่อ n = จำนวนตัวอย่าง k = จำนวน haplotype

p_i = ความถี่ haplotype I p_j = ความถี่ haplotype j

dij = ค่าที่คำนวณได้จากความแตกต่างระหว่าง haplotype i และ haplotype j

Haplotype diversity (*Hd*) คือ ความน่าจะเป็นที่ตัวอย่างของ haplotype ใดๆ มีความแตกต่างกันในกลุ่มประชากร คำนวณได้จากสูตร

$$Hd = \left[\frac{n}{n-1}\right]\left[1-\sum_{l=1}^{k} p_i^{2}\right]$$

เมื่อ n = จำนวนตัวอย่าง

k = จำนวน haplotype

p_i = ความถี่ของแต่ละ haplotype

3.4.5 การแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน

นำลำดับเบสบริเวณไซโตโครม บี ที่ได้มาหลังจากทำการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0

3.4.6 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ mitochondrial cyt *b* haplotypes

วิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ mitochondrial haplotypes โดยการสร้างเครือข่ายพันธุกรรม (haplotypes network) จากการประเมินความแตกต่างของลำดับเบส ในแต่ละ haplotype และจากการประเมินความสัมพันธ์ของแต่ละตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม Network 4.6.1.3 program (Bandelt *et al*., 1999)

3.4.7 การวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากร และการทดสอบสมดุลประชากร

วิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากร (population history) และการทดสอบสมดุลประชากร (neutrality test) โดยใช้ การทดสอบ 4 วิธี ได้แก่ Tajima D (Tajima, 1989), Fu's Fs (Fu, 1997), Fu and Li's *D* (Fu and Li 1993) และ Fu and Li's *F* (Fu and Li 1993) ทดสอบค่าทางสถิติด้วย permutation 1,000 ซ้ำ คำนวณและหาค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้โปรแกรม DnaSP v.5

กรมวิชาการเกษตร

เวลา และสถานที่

ทดลองและเก็บรวบรวมข้อมูลระหว่างเดือนตุลาคม 2559 - กันยายน 2562 ภายในกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร และพื้นที่ทำการเกษตร 11 แหล่ง (10 จังหวัด) 4 ภูมิภาคของประเทศไทย ได้แก่ ภาคเหนือ 3 จังหวัด (น่าน, เชียงใหม่ และเชียงราย) ภาคกลาง 3 จังหวัด (นครสวรรค์, เพชรบูรณ์ และนครนายก) ภาคตะวันตก 2 จังหวัด (เพชรบุรี และกาญจนบุรี) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2 จังหวัด (บุรีรัมย์ และนครราชสีมา)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1 การเก็บตัวอย่าง

หนูหริ่งศัตรูพืชที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ทั้งหมด 110 ตัวอย่าง จากพื้นที่ทำการเกษตร 11 แหล่ง (10 จังหวัด) 4 ภูมิภาคของประเทศไทย (table 1.1.8.1)

2 การวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2.1 การวัดขนาด รูปร่างภายนอก

ผลการวัดลักษณะภายนอกของตัวอย่างหนูหริ่งศัตรูพืช ทั้ง 5 ลักษณะ (figure 1.1.8.1) ได้แก่ ความยาวของหัวและลำตัว (HB) ความยาวของหาง (T) ความยาวของตีนหลัง (HF) ความยาวของหู (E) และทำการชั่งน้ำหนัก (weight) พบว่าตัวอย่างหนูหริ่งศัตรูพืชที่ดักมาได้ทั้งหมด 110 ตัวอย่าง นั้น สามารถจำแนกชนิดหนูหริ่งศัตรูพืช ได้ 4 สปีชีส์ ได้แก่ หนูหริ่งนาหางสั้น (Fawn-colored mouse; *M. cervicolor*) จำนวน 50 ตัวอย่าง, หนูหริ่งใหญ่ (Cook's mouse; *M. cookii*) จำนวน 12 ตัวอย่าง, หนูหริ่งนาหางยาว (Ryukyu mouse; *M. caroli*) จำนวน 42 ตัวอย่าง และหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน (Shortridge's shrewmouse; *M. pahari*) จำนวน 6 ตัวอย่าง โดยที่หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน มีขนาดลำตัวใหญ่และมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวมากที่สุด รองลงมาคือ หนูหริ่งใหญ่ และ หนูหริ่งนาหางสั้น ในขณะที่หนูหริ่งนาหางยาวมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวน้อยที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวอยู่ที่ 27, 19.61, 16.83 และ 12.24 กรัม ตามลำดับ ซึ่งหนูหริ่งศัตรูพืชทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน หนูหริ่งใหญ่ และหนูหริ่งนาหางสั้น นั้นมีความยาวของส่วนหัวและลำตัวสั้นกว่าความยาวของหาง โดยมีหนูหริ่งนาหางยาวเพียงสปีชีส์เดียวเท่านั้น ที่มีความยาวหางมากกว่าความยาวของส่วนหัวและลำตัว ซึ่งมีค่าร้อยละของความยาวหางต่อหัวและลำตัว (Tail/HB %) เท่ากับ 86.40%, 84.31%, 76.85% และ 107.47% ตามลำดับ ขณะเดียวกันพบว่า หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน มีค่าเฉลี่ยความยาวของหูมากที่สุด รองลงมาคือ หนูหริ่งใหญ่ และ หนูหริ่งนาหางสั้น ในขณะที่หนูหริ่งนาหางยาวมีค่าเฉลี่ยความยาวหูน้อยที่สุด เช่นเดียวกับค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว โดยมีค่าเฉลี่ยความยาวหู เท่ากับ 16.8, 13.64, 13.14 และ 12.67 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในส่วนค่าเฉลี่ยความยาวของตีนหลังนั้น พบว่า หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน มีค่าเฉลี่ยความยาวของตีนหลังมากที่สุด รองลงมาคือ หนูหริ่งใหญ่ หนูหริ่งนาหางยาว และหนูหริ่งนาหางสั้น โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 20.8, 16.64, 16.18 และ 15.63 มิลลิเมตร ตามลำดับ (table 1.1.8.2) และเมื่อนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกทุกลักษณะที่นำมาใช้วิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้ ไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) ด้วยโปรแกรม

กรมวิชาการเกษตร

SPSS version 17.0 ผลที่ได้พบว่า ค่าเฉลี่ยของลักษณะภายนอกของหนูหริ่งศัตรูพืช ทั้ง 5 ลักษณะ ในแต่ละสปีชีส์นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อแยกเปรียบเทียบกันในแต่ละลักษณะ ดังนั้นการจำแนกชนิดของหนูหริ่งศัตรูพืชทั้ง 4 สปีชีส์ในการศึกษาครั้งนี้ จากลักษณะภายนอกนั้น จำเป็นต้องอาศัยลักษณะต่างๆ ร่วมกันเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดดังนี้

- หนูหริ่งนาหางสั้น; หางสั้นกว่าความยาวหัวและลำตัวรวมกัน หางมี 2 สี ด้านบนสีดำ ในขณะที่ด้านล่างมีสีขาว แต่ไม่ชัดเจนเท่าหนูหริ่งนาหางยาว ฟันแทะคู่บนจะโค้งงอเข้าด้านในและไม่ตั้งฉากกับเพดานปาก (palate) ส่วนหน้าแหลม ตีนหลังขาว (กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร, 2544)

- หนูหริ่งใหญ่; หางสั้นกว่าความยาวหัวและลำตัวรวมกัน หางมี 2 สี ด้านบนสีน้ำตาล ในขณะที่ด้านล่างมีสีน้ำตาลที่อ่อนกว่า ขนด้านหลังเป็นสีเทาเข้ม ส่วนด้านท้องเป็นสีเทาอ่อน และมีขนแข็งที่หลัง (stiff fur) (Bibi *et al*., 2019)

- หนูหริ่งนาหางยาว; หางยาวกว่าความยาวหัวและลำตัวรวมกัน หางมี 2 สีชัดเจน ด้านบนสีดำ ในขณะที่ด้านล่างมีสีขาว ฟันแทะคู่บนมีสีน้ำตาลเข้มกว่าหนูหริ่งชนิดอื่นๆ ฟันแทะคู่ล่างมีสีขาว จมูกสั้นจึงทำให้ส่วนหน้าทู่ ตีนหลังใหญ่และมีสีเทา (กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร, 2544)

- หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน; หางสั้นกว่าความยาวหัวและลำตัวรวมกัน ส่วนลำตัว หู และตีนหลัง มีขนาดใหญ่กว่าหนูหริ่งชนิดอื่นๆ ขนด้านหลังเป็นสีดำ ส่วนด้านท้องเป็นสีเทา

2.2 การวัดลักษณะกะโหลก

ผลการวัดลักษณะกะโหลก จำนวน 21 ลักษณะ (figure 1.1.8.2) ตามวิธีการของ Musser (1979) และ Harrison & Bates (1991) กับตัวอย่างหนูหริ่งศัตรูพืชที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 110 ตัวอย่าง พบว่าหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน มีค่าเฉลี่ยของลักษณะกะโหลก ที่มีค่ามากที่สุดในหนูหริ่งศัตรูพืชทั้ง 4 สปีชีส์ ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ จำนวน 15 ลักษณะ (GSL, ONL, CBL, ZB, IB, LR, BR, BB, BZP, LN, LD, PL, PPL, $BBPM^3$ และ ML) ในขณะที่ หนูหริ่งใหญ่ มีค่าเฉลี่ยของ HBC และหนูหริ่งนาหางสั้น มีค่าเฉลี่ยของ LIF, $BBPM^1$, LB, ALM^1-M^3 และ ALM_1-M_3 มากที่สุดในหนูหริ่งศัตรูพืชทั้ง 4 สปีชีส์ ในการศึกษาครั้งนี้ ขณะเดียวกันหนูหริ่งนาหางหางยาว มีค่าเฉลี่ยของลักษณะกะโหลก ที่มีค่าน้อยที่สุดในหนูหริ่งศัตรูพืชทั้ง 4 สปีชีส์ ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ จำนวน 18 ลักษณะ (GSL, ONL, IB, LR, BR, BB, HBC, BZP, LN, LD, LIF, PL, PPL, $BBPM^1$, $BBPM^3$, ALM^1-M^3, ML และ ALM_1-M_3) โดยที่ หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน มีค่าเฉลี่ยของ LB และหนูหริ่งนาหางสั้น มีค่าเฉลี่ยของ CBL และ ZB น้อยที่สุดในหนูหริ่งศัตรูพืชทั้ง 4 สปีชีส์ (table 1.1.8.3) และเมื่อนำลักษณะกะโหลกทุกลักษณะที่นำมาใช้วิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้ ไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS version 17.0 ผลที่ได้พบว่า ค่าเฉลี่ยของกะโหลกทุกลักษณะ ในแต่ละสปีชีส์นั้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อแยกเปรียบเทียบกันในแต่ละลักษณะ เช่นเดียวกับผลการวัดขนาดรูปร่างภายนอก

3 **การวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล**

การศึกษาครั้งนี้ เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของหนูหริ่งศัตรูพืชด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบในบริเวณยีนไซโตโครมบี จำนวน 1 คู่ (Mus cytb F seq / Mus cytb R) จากผลการทดลองพบว่า หนูหริ่งศัตรูพืช

กรมวิชาการเกษตร

จะให้แถบดีเอ็น ขนาดประมาณ 800 คู่เบส (bp) ซึ่งผลที่ได้นั้นเป็นไปตามที่คาดการณ์ไว้ในขั้นตอนออกแบบไพรเมอร์ (figure 1.1.8.3) หลังจากนั้นเตรียมตัวอย่างเพื่อหาลำดับเบสตามขั้นตอนในข้อ 3.2 -3.3 และนำผลลำดับเบสที่ได้ไปวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล ดังนี้

3.1 **การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม**

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน ไซโตโครมบี ความยาว 500 คู่เบส ของ สกุลหนูหริ่ง 130 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างหนูหริ่งศัตรูพืชในประเทศไทยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 110 ตัวอย่าง เป็นลำดับเบสจากฐานข้อมูล GenBank 20 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับลำดับเบสของสกุลหนูท้องขาว (*Rattus*) ในฐานข้อมูล GenBank 5 ตัวอย่าง เป็นสัตว์นอกกลุ่ม (out group) รวมลำดับเบสที่ใช้ในการวิเคราะห์ครั้งนี้ จำนวน 135 ตัวอย่าง โดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 3 วิธี ได้แก่ NJ/MP/ML พบว่า ทั้งสามวิธีให้ผลการวิเคราะห์ในรูปแบบเดียวกัน และสามารถแบ่งกลุ่มหนูหริ่ง ได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ (clades) ประกอบด้วย Clade A (หนูหริ่งนาหางสั้น; *M. cervicolor*, หนูหริ่งใหญ่; *M. cookie* และ หนูหริ่งนาหางยาว; *M. caroli*) Clade B (หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน; *M. pahari*) และ Clade C (หนูหริ่งบ้าน; *M. musculus*, Macedonian mouse; *M. macedonicus* และ Steppe mouse; *M. spicilegus*) (figure 1.1.8.4)

Clade A สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย (sub clade) ได้แก่ AI และ AII ซึ่งหนูหริ่งในกลุ่มนี้เป็น monophyletic ทั้ง 2 กลุ่มย่อย สามารถแยกออกออกจากกันอย่างชัดเจน ไม่มีสมาชิกของหนูหริ่งในสปีชีส์อื่นเข้ามาปะปนและ interior branch ระหว่างสปีชีส์ให้ค่าผลการทดสอบ bootstrap ที่มีค่าสูง โดยกลุ่มย่อย AI ประกอบไปด้วยสมาชิก 2 กลุ่ม คือ AI/I; กลุ่มหนูหริ่งนาหางสั้น มีจำนวนสมาชิกมากที่สุด 50 ตัวอย่าง จากแปลงปลูกตะไคร้ จ. กาญจนบุรี (15 ตัว) นาข้าว จ. นครนายก และเพชรบูรณ์ (1 และ 5 ตัว) แปลงอ้อย จ. บุรีรัมย์ (8 ตัว) แปลงถั่วลิสง จ. เพชรบุรี (9 ตัว) แปลงถั่วเหลือง จ. นครสวรรค์ (12 ตัว) คิดเป็นร้อยละ 46 ของตัวอย่างทั้งหมด สามารถแบ่งได้เป็น 27 haplotypes (Hap 1-27) และ AI/II; กลุ่มหนูหริ่งใหญ่ มีจำนวนสมาชิก 12 ตัวอย่าง จากนาข้าว จ. น่าน และเพชรบูรณ์ (2 และ 1 ตัว) และแปลงมะคาเดเมีย จ. เพชรบูรณ์ (9 ตัว) คิดเป็นร้อยละ 11 ของตัวอย่างทั้งหมด สามารถแบ่งได้เป็น 6 haplotypes (Hap 28-33) ส่วนกลุ่มย่อย AII นั้น มีสมาชิกเพียงสปีชีส์เดียว คือกลุ่มหนูหริ่งนาหางยาว จำนวน 42 ตัวอย่าง จากนาข้าว จ.เชียงราย, นครนายก, เพชรบูรณ์ และนครราชสีมา (4, 6, 2 และ 10 ตัว ตามลำดับ) แปลงอ้อย จ. บุรีรัมย์ (5 ตัว) แปลงถั่วเหลือง จ. นครสวรรค์ (13 ตัว) และแปลงมะคาเดเมีย จ. เพชรบูรณ์ (2 ตัว) คิดเป็นร้อยละ 38 ของตัวอย่างทั้งหมด สามารถแบ่งได้เป็น 22 haplotypes (Hap 34-55)

ขณะที่ Clade B เป็นกลุ่มของหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน มีจำนวนสมาชิก 6 ตัวอย่าง จาก แปลงมะคาเดเมีย จ. เพชรบูรณ์ ทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ 5 ของตัวอย่างทั้งหมด สามารถแบ่งได้เป็น 6 haplotypes (Hap 56-61) จากผลการศึกษาเป็นที่น่าสังเกตว่าหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน มีที่อยู่อาศัยที่ค่อนข้างจำกัด และ ไม่แพร่กระจายไปตามภูมิภาคต่างๆ ในประเทศไทย โดยสามารถพบได้เฉพาะในแปลงปลูกมะคาเดเมีย ที่ อ. เขาค้อ จ. เพชรบูรณ์ เท่านั้น ต่างกับหนูหริ่งศัตรูพืชอีก 3 สปีชีส์ ที่พบว่าสามารถพบได้ตามภูมิภาคต่างๆ ยกเว้นทางภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสำรวจและดักหนูหริ่งในนาข้าวที่ จ. สงขลา และ จ. พัทลุง รวมถึงสวนปาล์มน้ำมันที่ อ.ปะทิว

กรมวิชาการเกษตร

และ อ.สวี จ. ชุมพร ผลปรากฏว่าไม่พบหนูหริ่งศัตรูพืชในพื้นที่เกษตรและสภาพตามธรรมชาติของทั้ง 3 จังหวัด ดังกล่าว

ส่วน Clade C นั้น เป็นกลุ่มหนูหริ่งบ้าน, Macedonian mouse และ Steppe mouse จากฐานข้อมูล GenBank ซึ่งหนูทั้ง 3 กลุ่มนี้ไม่พบในประเทศไทยจากการศึกษาในครั้งนี้ โดยในกลุ่มของ Macedonian mouse และ Steppe mouse นั้นสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Krystufek & Vohralik (2016) และ Coroiu *et al*. (2016) ที่ได้รายงานไว้ว่า Macedonian mouse พบได้ในประเทศตุรกี อิรัก อิหร่าน และจอร์แดน ส่วน Steppe mouse นั้น พบได้ในทวีปยุโรปแถบประเทศ ยูเครน โรมาเนีย และฮังการี เป็นต้น ในขณะที่การศึกษาในครั้งนี้ไม่พบหนูหริ่งบ้านตามพื้นที่เกษตรและสภาพตามธรรมชาติในประเทศไทย ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานที่ผ่านมาของกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร (2544) แต่ขัดแย้งกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Musser & Carleton (2005) ที่ได้รายงานไว้ว่าสามารถพบแพร่กระจายได้ตามทวีปต่างๆทั่วโลก

3.2 การเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบส

จากความยาวของลำดับเบสที่ทำการศึกษา 500 คู่เบส เปรียบเทียบตำแหน่งกับลำดับเบสของหนูหริ่งนาหางสั้น Acession number; AY057811 *M. cervicolor cytb* gene, complete cds ตรงกับตำแหน่งที่ 450 - 950 bp พบความแตกต่างของลำดับเบส 79 ตำแหน่ง สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างหนูหริ่งศัตรูพืชที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มหนูหริ่งนาหางสั้น หนูหริ่งใหญ่ หนูหริ่งนาหางยาว และหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน และสามารถแบ่งได้เป็น 61 haplotypes โดยพบว่า ลำดับเบส 3 ตำแหน่ง ได้แก่ตำแหน่งที่ 481 (T; thymine), 511 (C; cytosine) และ 523 (T; thymine) สามารถแยกหนูหริ่งใหญ่ออกจากหนูหริ่งชนิดอื่นได้ ขณะเดียวกันลำดับเบสในตำแหน่งที่ 456 (A; adenine), 475 (T; thymine), 478 (T; thymine), 514 (T; thymine) และ 569 (A; adenine) นั้นสามารถแยกหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน ออกจากหนูหริ่งชนิดอื่นได้ ส่วนหนูหริ่งนาหางสั้นและหนูหริ่งนาหางยาวนั้น ลำดับเบสในตำแหน่งที่ 463 (C; cytosine) และ 472 (T; thymine) สามารถแยกความแตกต่างของหนูหริ่งทั้ง 2 ชนิดนี้ ออกจากหนูหริ่งชนิดอื่นได้ ตามลำดับ

3.3 การวิเคราะห์ร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบสและระยะห่างทางพันธุกรรม

ผลการวิเคราะห์ร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบส (nucleotide identity) และระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) จากลำดับเบสบริเวณยีนไซโตโครมบี ความยาว 500 คู่เบส พบความแตกต่างของลำดับเบส 79 ตำแหน่ง และมีทั้งหมด 61 haplotypes พบว่าหนูหริ่งนาหางสั้น (50 ตัวอย่าง) มี 27 haplotypes (Hap 1-27) มีค่าร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบส อยู่ที่ร้อยละ 96-99 และระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.002 – 0.04 (table 1.1.8.4A) หนูหริ่งนาหางยาว (42 ตัวอย่าง) มี 22 haplotypes (Hap 34-55) มีค่าร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบส อยู่ที่ร้อยละ 95-99 และระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.002 – 0.05 (table 1.1.8.4B) ส่วนหนูหริ่งใหญ่ (12 ตัวอย่าง) มี 6 haplotypes (Hap 28-33) มีค่าร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบส อยู่ที่ ร้อยละ 98-99 และระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.002 – 0.01 (table 1.1.8.4C) ในขณะที่หนูหริ่งป่าเล็กขน

ศูนย์วิทยาศาสตร์การเกษตร

เสี้ยน (6 ตัวอย่าง) มี 6 haplotypes (Hap 56-61) มีร้อยละความเหมือนกันของลำดับเบส อยู่ที่ร้อยละ 93-99 และระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.002 – 0.06 (table 4D)

3.4 การวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ในการศึกษาครั้งนี้หนูหริ่งทั้ง 4 สปีชีส์ มีค่าความหลากหลายของ haplotypes เท่ากับ 1 ทุกสปีชีส์ ในขณะที่ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.007 – 0.025 (table 1.1.8.5) แสดงให้เห็นว่าหนูหริ่งทั้ง 4 สปีชีส์ ในการศึกษาครั้งนี้มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่สูงเช่นเดียวกันทั้ง 2 การวิเคราะห์ สอดคล้องกับจำนวน haplotypes เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนตัวอย่างที่พบในแต่ละสปีชีส์ โดยเฉพาะในกลุ่มหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน ที่มีจำนวน ตัวอย่างน้อย (8 ตัวอย่าง; ในการศึกษาครั้งนี้ 6 ตัวอย่าง และจากฐานข้อมูล GenBank 2 ตัวอย่าง) แต่สามารถพบได้ 6 haplotypes ซึ่งค่าความหลากหลายของ haplotypes นั้นขึ้นกับจำนวนตัวอย่าง ถ้าจำนวนตัวอย่างมากจะทำให้มีโอกาสตรวจพบ haplotypes เพิ่มขึ้นอีก

3.5 การแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน

เมื่อนำลำดับเบสของหนูหริ่งทั้ง 4 สปีชีส์ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มาแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน พบว่ากรดอะมิโนทั้ง 138 ตำแหน่ง มีลำดับของกรดอะมิโนที่เหมือนกัน 124 ลำดับ แตกต่างกัน 14 ลำดับ โดยกรดอะมิโนลำดับที่ 84 (L; leucine) และ 85 (S; serine) สามารถแยกความแตกต่างของหนูหริ่งนาหางสั้นจากหนูหริ่งชนิดอื่นๆ ทีมีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน F (phynylalanine) และ L (leucine) ตามลำดับ ในขณะที่หนูหริ่งใหญ่ กรดอะมิโนลำดับที่ 81 (I; isoleucine) และ 88 (M; methionine) สามารถแยกความแตกต่างออกจากหนูหริ่งชนิดอื่นๆ ที่มีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน L (leucine) และ I (isoleucine) ตามลำดับ ส่วนหนูนานาหางสั้นนั้น กรดอะมิโนลำดับที่ 41 (A; alanine) สามารถแยกความแตกต่างออกจากหนูหริ่งชนิดอื่นๆ ทีมีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน V (valine) ได้ และหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน กรดอะมิโนลำดับที่ 89 (A; alanine และ I; isoleucine) สามารถแยกความแตกต่างหนูหริ่งชนิดอื่นๆ ทีมีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน T (threonine) ได้ (figure 1.1.8.5)

3.6 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ mitochondrial cyt *b* haplotypes

ผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ mitochondrial cyt *b* haplotypes ของหนูหริ่งทั้ง 4 สปีชีส์ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มาสร้างเป็นเครือข่ายทางพันธุกรรม (haplotypes net work) พบว่าเป็นแบบ complicated MSN ไม่สามารถสามารถแบ่งแยกกลุ่มประชากรหนูหริ่งตามสภาพภูมิศาสตร์ได้ แต่สามารถจัดกลุ่มหนูหริ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มหนูหริ่งนาหางสั้น มีรูปแบบเป็น star – like network มี haplotype 8, 15, 16, 17 และ 21 เป็น common haplotype ในขณะที่กลุ่มที่ 2-4 เป็นกลุ่มของหนูหริ่งใหญ่ หนูหริ่งนาหางยาว และหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน ซึ่งแต่ละกลุ่มนั้นมีการเชื่อมต่อกันด้วยการกลายพันธุ์ 20-35 mutation step โดยกลุ่มที่ 2 (กลุ่มหนูหริ่งใหญ่) มี haplotype 29-32 เป็น common haplotype ขณะที่กลุ่มที่ 3 (กลุ่มหนูหริ่งนาหางยาว) มีลักษณะเป็นแบบ long genealogy และมี haplotype 50 และ 53 เป็น common

haplotype ส่วนกลุ่มที่ 4 (กลุ่มหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน) มี common haplotype คือ haplotype 57-59 ซึ่งในกลุ่มนี้สมาชิกในกลุ่มทั้งหมด 6 ตัวอย่าง มาจากแปลงมะคาเดเมีย ที่ อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่ ทั้งหมด (figure 1.1.8.6)

จากการที่ผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ haplotypes ในครั้งนี้ไม่สามารถสามารถแบ่งแยกกลุ่มประชากรหนูหริ่งตามสภาพภูมิศาสตร์ได้นั้น สอดคล้องกับลักษณะการหากินตามธรรมชาติของหนูที่จะมีการอพยพเคลื่อนย้ายไปยังแหล่งที่อยู่ใหม่ได้ ซึ่งขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่ แหล่งอาหารตามธรรมชาติ สภาพนิเวศที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ จำนวนความหนาแน่นของประชากรหนูในแต่ละพื้นที่ และสัตว์ผู้ล่าตามธรรมชาติ เป็นต้น จะมีเพียงกลุ่มหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยนเท่านั้น ที่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีแหล่งอาศัยในแปลงมะคาเดเมีย ที่ จ. เชียงใหม่ เท่านั้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแปลงมะคาเดเมียดังกล่าว ตั้งอยู่บนภูเขาความสูงอยู่เหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง 1,300 เมตร มีอากาศหนาวเย็นทั้งปี ทำให้มีผลมะคาเดเมียตลอดทั้งปี จึงทำให้ประชากรหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยนกลุ่มนี้มีแหล่งอาหารตลอดทั้งปี จึงไม่มีการอพยพเคลื่อนย้ายไปยังแหล่งอื่น อีกทั้งสภาพภูมิประเทศที่เป็นภูเขาสูงอาจเป็นกำแพงตามธรรมชาติ (natural barrier) ทำให้ประชากรหนูกลุ่มนี้ไม่มีการอพยพเคลื่อนย้ายไปยังแหล่งอื่น แต่เนื่องจากจำนวนหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยนในการศึกษาครั้งนี้ มีเพียง 6 ตัวอย่างเท่านั้น จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อทำให้ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

3.7 การวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรและการทดสอบสมดุลประชากร

วิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากรของหนูหริ่งทั้ง 4 สปีชีส์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยทำการทดสอบสมดุลประชากร 4 วิธี ได้แก่ Tajima's D, Fu's Fs, Fu and Li's *D* และ Fu and Li's *F* ด้วยการทดสอบการเบี่ยงเบนไปจาก neutral population พบว่าค่า Tajima's D มีค่าเบี่ยงเบนไปจาก neutral state โดยมีค่าติดลบในกลุ่มหนูหริ่งทั้ง 4 สปีชีส์ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าประชากรหนูหริ่งนั้นมีจำนวนประชากรเพิ่มขึ้น (population expansion) อาจเกิดการขยายขนาดประชากรมาก่อน อีกทั้งค่า Fu's Fs, Fu and Li's *D* และ Fu and Li's *F* มีค่าติดลบทุกพารามิเตอร์ ในหนูหริ่งทั้ง 4 สปีชีส์ จึงเป็นการยืนยันว่าประชากรหนูหริ่งเคยมีการขยายขนาดประชากรมาก่อน โดยเฉพาะในหนูหริ่งใหญ่ ที่ค่า Tajima D นั้น มีค่าเป็นลบที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากค่าศูนย์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (table 1.1.8.5) ซึ่งสอดคล้องกับจำนวน haplotypes ที่พบ และสอดคล้องกับผลการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ผลการวิเคราะห์ ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม รวมถึงการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ mitochondrial cyt *b* haplotypes ซึ่งแต่ละผลการวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่าหนูหริ่งทั้ง 4 สปีชีส์ ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ นั้นมีความหลายหลายทางพันธุกรรมทางสายแม่ที่สูง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าการขยายขนาดประชากรของหนูหริ่งในประเทศไทย ส่งผลให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่ที่สูง อีกทั้ง ผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ยังสอดคล้องกับสภาพหนูหริ่งที่พบในธรรมชาติ เนื่องจากสามารถพบหนูหริ่งได้ทุกภูมิภาคของประเทศ (ยกเว้นทางภาคใต้) อันเป็นผลมาจากการที่หนูเป็นสัตว์ที่มีการเรียนรู้ และมีการปรับตัวให้สามารถเข้ากับปัจจัยสภาพแวดล้อมที่อาศัยได้ ดังนั้นผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาต่อยอดด้านอนุกรมวิธาน นิเวศวิทยา และทาง ชีวโมเลกุลของหนูหริ่งศัตรูพืชได้ อีกทั้งสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการป้องกันกำจัดหนูหริ่งศัตรูพืช ทำให้การป้องกันกำจัดนั้นมีประสิทธิภาพ อันจะนำไปสู่

กรมวิชาการเกษตร

การเกษตรที่ดี มีคุณภาพและเหมาะสมอีกทั้งสามารถนำข้อมูลต่างๆ ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

หนูหริ่งที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ จำนวน 110 ตัวอย่าง จากพื้นที่ทำการเกษตร 11 แหล่ง (10 จังหวัด) 4 ภูมิภาคของประเทศไทย สามารถจำแนกชนิดหนูหริ่งศัตรูพืช ได้ 4 สปีชีส์ ได้แก่ หนูหริ่งนาหางสั้น (Fawn-colored mouse; *M. cervicolor*) 50 ตัวอย่าง, หนูหริ่งใหญ่ (Cook's mouse; *M. cookii*) 12 ตัวอย่าง, หนูหริ่งนาหางยาว (Ryukyu mouse; *M. caroli*) 42 ตัวอย่าง และหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน (Shortridge's shrewmouse; *M. pahari*) 6 ตัวอย่าง

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำนวน 5 ลักษณะ ได้แก่ การชั่งน้ำหนัก การวัดขนาดความยาวของหัวและลำตัว (HB) ความยาวของหาง (T) ความยาวของตีนหลัง (HF) ความยาวของหู (E) หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยนมีขนาดลำตัวใหญ่และมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวมากที่สุด รองลงมาคือ หนูหริ่งใหญ่ หนูหริ่งนาหางสั้น และหนูหริ่งนาหางยาว ตามลำดับ หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน หนูหริ่งใหญ่ และ หนูหริ่งนาหางสั้น มีความยาวของส่วนหัวและลำตัวสั้นกว่า ความยาวของหางโดยมีหนูหริ่งนาหางยาวเพียงสปีชีส์เดียว ที่มีความยาวหางมากกว่าความยาวของส่วนหัวและลำตัว หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน มีค่าเฉลี่ยความยาวของหู ตีนหลัง และน้ำหนักตัว มากที่สุด ค่าเฉลี่ยของลักษณะภายนอกขนาด รูปร่างภายนอกทุกลักษณะ ในแต่ละสปีชีส์นั้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อแยกเปรียบเทียบกันในแต่ละลักษณะ ดังนั้นการจำแนกชนิดของหนูหริ่งศัตรูพืชทั้ง 4 สปีชีส์ จากลักษณะภายนอกนั้น ต้องอาศัยลักษณะภายนอกต่างๆ ได้แก่ ขนาดลำตัว ความยาวหางเปรียบเทียบกับความยาวหัวและลำตัว ลักษณะและสีขนด้านหลังและด้านท้อง สีของหาง ลักษณะและสีของฟันแทะคู่บน ลักษณะของส่วนหน้า รวมถึงลักษณะและสีของตีนหลังร่วมกันจึงจะสามารถจำแนกชนิดได้

2. ผลการวัดลักษณะกะโหลก จำนวน 21 ลักษณะ หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน มีค่าเฉลี่ยที่มีค่ามากที่สุด 15 ลักษณะ (GSL, ONL, CBL, ZB, IB, LR, BR, BB, BZP, LN, LD, PL, PPL, $BBPM^3$ และ ML) หนูหริ่งใหญ่มีค่าเฉลี่ยของ HBC มากที่สุด หนูหริ่งนาหางสั้น มีค่าเฉลี่ยของ LIF, $BBPM^1$, LB, ALM^1-M^3 และ ALM_1-M_3 มากที่สุด ในขณะที่หนูหริ่งนาหางหางยาว มีค่าเฉลี่ยที่มีค่าน้อยที่สุด 18 ลักษณะ (GSL, ONL, IB, LR, BR, BB, HBC, BZP, LN, LD, LIF, PL, PPL, $BBPM^1$, $BBPM^3$, ALM^1-M^3, ML และ ALM_1-M_3) หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน มีค่าเฉลี่ยของ LB น้อยที่สุด และหนูหริ่งนาหางสั้น มีค่าเฉลี่ยของ CBL และ ZB น้อยที่สุด ค่าเฉลี่ยของลักษณะกะโหลกทุกลักษณะในแต่ละสปีชีส์นั้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อแยกเปรียบเทียบกันในแต่ละลักษณะ

3. การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมบริเวณยีน ไซโตโครมบี ความยาว 500 คู่เบส ของสกุลหนูหริ่ง (*Mus*) 130 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างหนูหริ่งศัตรูพืชที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 110 ตัวอย่าง เป็นลำดับเบสจากฐานข้อมูล GenBank 20 ตัวอย่าง ผลการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม สามารถแบ่งกลุ่มหนูหริ่ง ได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ (clades) ได้แก่ Clade A (หนูหริ่งนาหางสั้น, หนูหริ่งใหญ่ และ หนูหริ่งนาหางยาว) Clade B (หนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน) และ Clade C (หนูหริ่งบ้าน, Macedonian mouse และ Steppe mouse) พบความแตกต่างของลำดับเบส 79 ตำแหน่ง สามารถ

กรมวิชาการเกษตร

แบ่งได้เป็น 61 haplotypes และสามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างหนูหริ่งศัตรูพืช ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ได้เป็น 4 สปีชีส์ ได้แก่ กลุ่มหนูหริ่งนาหางสั้น หนูหริ่งใหญ่ หนูหริ่งนาหางยาว และหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน สอดคล้องกับผลการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา และการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม ความหลากหลายของ haplotypes และ ผลการทดสอบสมดุลประชากร ทั้ง 4 พารามิเตอร์ ได้แก่ Tajima's D, Fu's Fs, Fu and Li's *D* และ Fu and Li's *F* บ่งชี้ว่าหนูหริ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่ที่สูง และกลุ่มประชากรหนูหริ่งนั้นมีจำนวนประชากรเพิ่มขึ้น

4. การศึกษาในครั้งนี้ไม่พบหนูหริ่งบ้านตามพื้นที่เกษตรและสภาพตามธรรมชาติในประเทศไทย ซึ่งสอดคล้องกับสมมุติฐานเดิมก่อนที่จะดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการศึกษาด้านอนุกรมวิธานการจัดจำแนกชนิดหนูหริ่งศัตรูพืช

2. เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลการกระจายตัวตามธรรมชาติของหนูหริ่งศัตรูพืชและเป็นต้นแบบในหนูศัตรูพืชชนิดอื่น อันนำไปสู่การป้องกันและกำจัดต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.8.1 Summary of the species identification and mitochondrial (Cyt *b* gene) sequences of *Mus* spp. include in this study.

Region	Sampling location	Locality coordinating	N	Species (n)	Voucher number	Mitochondrial (Cyt *b* gene)	
						Clade	Haplotypes
Northern Thailand	MaeChaem, ChiangMai ; MJ (macademia plantation)	18.647320, 98.476502	6	*M. pahari* (6)	MJ1-6	B	Hap 58-61
	Thoeng, ChiangRai; T (rice field)	19.683735, 100.191085	4	*M. caroli* (4)	T1-4	AIII	Hap 34-37
	BoKluea, Nan; BK (rice field)	19.104218, 101.191022	2	*M. cookii* (2)	BK1/ BK2	AII	Hap 29/ Hap 33
Central Thailand	BanphotPhisai, NakhonSawan; NKW (soybean field)	15.967748, 99.897299	25	*M. cervicolor* (12)	NKW8/ NKW19, 24/ NKW5, 29/ NKW20/ NKW13, 25, 27, 28/ NKW11, 18	AI	Hap 8/Hap 9/ Hap 15/ Hap 16/ Hap 17/ Hap 19
				M. caroli (13)	NKW23, 26/ NKW6, 12/ NKW1, 2/ NKW14, 17/ NKW16/ NKW7, 15, 21, 22	AIII	Hap 41/ Hap 44/ Hap 46 Hap 49/ Hap 50/ Hap 53
	LomKao, Phetchabun; LK (rice field)	16.850098, 101.200224	8	*M. cervicolor* (5)	LK2/ LK1, 4, 24, 26	AI	Hap 13/ Hap 14
				M. cookii (1)	LK25	AII	Hap 31
				M. caroli (2)	LK3, 5	AIII	Hap 45
	KhaoKho, Phetchabun; KK (macademia plantation)	16.588535, 100.960216	11	*M. cookii* (9)	KK3-4/ KK5, 7/ KK1, 2, 6, 9, 11	AII	Hap28/ Hap 30/ Hap 31
				M. caroli (2)	KK8/ KK10	AIII	Hap 47/ Hap 48
	Mueang, NakhonNayok; NYK (rice field)	14.159897, 101.134773	7	*M. cervicolor* (1)	NKY6	AI	Hap 15
				M. caroli (6)	NKY1, 2/ NKY3/ NKY4, 9, 10	AIII	Hap 49/ Hap 50/ Hap 51

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.8.1 Summary of the species identification and mitochondrial (Cyt *b* gene) sequences of *Mus* spp. include in this study (continue).

Region	Sampling location	Locality coordinating	N	Species (n)	Voucher number	Mitochondrial (Cyt *b* gene)	
						Clade	Haplotypes
Western Thailand	BanLat, Phetchaburi; P (peanut field)	13.072184, 99.887626	9	*M. cervicolor* (9)	P3/ P4, 7/ P10/ P8/ P6/ P9/ P1, 5	AI	Hap4/ Hap5/ Hap7/ Hap17/ Hap21/ Hap24/ Hap26
	Mueang, Kanchanaburi; K (lemon grass field)	14.111819, 99.4964177	15	*M. cervicolor* (15)	K18, 20/ K25/ K2/ K11/ K4, 8/ K7/ K1, 10, 22, 23/ K15/ K19/ K14	AI	Hap 6/ Hap 7/ Hap 10/ Hap 18 Hap19/ Hap 20/ Hap 22/ Hap 23/ Hap 25/ Hap 27
Northeast Thailand	Sikhio, NakhonRatchasima; SK (rice field)	14.872284, 101.650930	10	*M. caroli* (10)	SK13/ SK28/ SK16, 27/ SK20, 21/ SK3, 4, 15/ SK22	AIII	Hap 40/ Hap 43/ Hap 52/ Hap 53 Hap 54/ Hap 55
	NaPho, BuriRam; NP (sugarcane field)	15.625610, 102.947091	13	*M. cervicolor* (8)	NP11/ NP1, 6, 7, 12/ NP2, 13/ NP9	AI	Hap 1/ Hap 2/ Hap 3/ Hap 11
				M. caroli (5)	NP4/ NP8, 10/ NP3, 5	AIII	Hap 39/ Hap 40/ Hap 55
		Total	110				

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.8.2 The body length measurements (mean ± SD) of *Mus* spp. in this study.

Species	N	Weight ± SD (g) (min-max)	Body length (mm)				
			HB ± SD (min-max)	Tail ± SD (min-max)	(Tail/HB)%	E ± SD (min-max)	HF ± SD (min-max)
M. cervicolor	50	16.83 ± 4.09 (8.8 - 30.1)	81.47 ± 8.33 (59 - 100)	62.61 ± 6.63 (50 - 84)	76.85%	13.14 ± 1.22 (10 - 15)	15.63 ± 1.58 (11 - 19)
M. cookii	12	19.61 ± 8.76 (11.5 - 31.5)	82.81 ± 13.72 (62 - 105)	69.82 ± 4.83 (66 - 84)	84.31%	13.64 ± 1.86 (11 - 16)	16.64 ± 2.69 (11 - 20)
M. caroli	42	12.24 ± 2.88 (7.6 - 19)	73.08 ± 7.34 (58 - 88)	78.54 ± 6.83 (65 - 95)	107.47%	12.67 ± 1.47 (8 - 15)	16.18 ± 1.76 (11 - 19)
M. pahari	6	27 ± 4.31 (22 - 31.5)	114 ± 25.2 (93 - 150)	98.5 ± 0.71 (98-99)	86.40%	16.8 ± 1.1 (16 - 18)	20.8 ± 1.3 (20 - 23)
Total	110						

กรมวิทยาศาสตร์

Table 1.1.8.3 The cranial and dental character measurements (mean ± SD; millimeters) of *Mus* spp. in this study.

Species	N	Cranial and dental length (mm)										
		GSL ± SD (min-max)	ONL ± SD (min-max)	CBL ± SD (min-max)	ZB ± SD (min-max)	IB ± SD (min-max)	LR ± SD (min-max)	BR ± SD (min-max)	BB ± SD (min-max)	HBC ± SD (min-max)	BZP ± SD (min-max)	LN ± SD (min-max)
M. cervicolor	50	22.42 ± 4.99 (20.74 - 25.81)	22.82 ± 4.85 (20 - 25.54)	20.39 ± 4.34 (19.66 - 25.03)	9.85 ± 1.47 (7.87 - 11.04)	3.84 ± 0.31 (3.41 - 4.15)	7.07 ± 0.92 (5.6 - 8.79)	3.42 ± 0.84 (2.84 - 3.86)	9.36 ± 0.46 (8.02 - 10.19)	7.35 ± 0.60 (6.11 - 7.98)	3.07 ± 1.57 (2.29 - 3.82)	9.12 ± 1.2 (7.26 - 12.98)
M. cookii	12	25.14 ± 2.22 (22.75 - 28.59	25.32 ± 2.82 (20.34 - 29.57)	23.06 ± 1.62 (20.13 - 25.66)	10.71 ± 1.09 (9.58 - 12.28)	3.98 ± 0.24 (3.7 - 4.52)	7.95 ± 1.41 (6.47 - 10.97)	3.31 ±0.36 (2.54 - 3.81)	10.16 ± 0.37 (9.62 - 10.86)	7.95 ± 1.41 (7.49 - 8.57)	3.06 ± 0.38 (2.59 - 4)	9.69 ± 1.52 (7.49 - 11.34)
M. caroli	42	21.73 ±3.81 (19.87 - 25.32)	22.24 ± 3.66 (21.01 - 25.04)	20.75 ± 3.25 (19 - 23.97)	9.9 ± 1.18 (9 - 10.69)	3.76 ± 0.36 (2.66 - 4.24)	5.89 ± 0.87 (4 - 7.95)	3.3 ± 0.7 (2 - 3.9)	9.07 ± 0.42 (8.21 - 10.07)	7.31 ± 0.57 (6.22 - 8.78)	2.6 ± 1.54 (1.82 - 2.69)	8 ± 1.01 (6.69 - 9.95)
M. pahari	6	26.41 ± 2.42 (23.91 - 30.72)	27.95 ± 1.70 (25.64 - 30.76)	22.93 ± 1.40 (21.02 - 25.27)	11.11 ± 0.58 (10.2 - 11.75)	4.78 ± 0.17 (4.55 - 5.04)	8.31 ± 0.90 (7.44 - 9.27)	3.51 ± 0.29 (3.11 - 3.8)	10.55 ± 0.33 (10.06 - 11.01)	7.68 ± 0.53 (7.02 - 8.31)	3.35 ± 0.45 (2.57 - 3.88)	10.70 ± 1.13 (9.28 - 12.35)

Species	N	Cranial and dental length (mm)									
		LD ± SD (min-max)	LIF ± SD (min-max)	PL ± SD (min-max)	PPL ± SD (min-max)	BBPM1 ± SD (min-max)	BBPM3 ± SD (min-max)	LB ± SD (min-max)	ALM1-M3U ± SD (min-max)	ML ± SD (min-max)	ALM1-M3L ± SD (min-max)
M. cervicolor	50	7.83 ± 1.08 (6.64 - 9.54)	5.21 ± 1.87 (4.13 - 7.27)	11.30 ± 0.73 (9.89 - 11.8)	7.61 ± 1.89 (4.93 - 9.18)	3.33 ± 2.81 (2.06 - 3.24)	3.21 ± 3.06 (2.11 - 3.04)	3.19 ± 3.37 (1.63 - 2.99)	4.26 ± 3.26 (2.93 - 3.82)	12.60 ± 1.75 (10.66 - 13.18)	3.88 ± 3.79 (2.5 - 3.91)
M. cookii	12	7.93 ± 0.97 (7.02 - 9.27)	5.05 ± 1.34 (3.66 - 5.45)	11.87 ± 3.65 (10.46 - 12.89)	7.50 ± 1.22 (4.52 - 9.28)	2.91 ± 0.32 (2.48 - 3.44)	2.97 ± 0.21 (2.69 - 3.29)	2.12 ± 0.44 (1.48 - 2.84)	3.95 ± 0.25 (3.43 - 4.12)	12.93 ± 1.04 (11.69 - 14.78)	3.71 ± 0.3 (3.25 - 4.37)
M. caroli	42	7.27 ±1.02 (5 - 8.42)	4.39 ± 1.53 (3.42 - 5.01)	10.75 ± 0.73 (9.34 - 11.72)	7.26 ± 1.57 (5.86 - 9.3)	2.77 ± 2.27 (1.78 - 2.68)	2.69 ± 2.44 (1.82 - 2.71)	2.81 ± 2.62 (1.6 - 3.3)	3.74 ± 2.59 (3 - 4)	11.83 ± 1.63 (9.63 - 13.2)	3.62 ± 2.95 (2.48 - 3.82)
M. pahari	6	8.33 ± 0.67 (7.48 - 9.22)	5.10 ± 0.42 (4.37 - 5.63)	12 ± 0.46 (11.27 - 12.51)	9.44 ± 1.34 (7.61 - 10.1)	3.17 ± 0.36 (2.72 - 3.68)	3.32 ± 0.09 (3.2 - 3.46)	2.02 ± 0.46 (1.53 - 2.77)	3.98 ± 0.07 (3.89 - 4.05)	13.66 ± 0.65 (12.7 - 14.73	3.72 ± 0.20 (3.49 - 4.1)
Total	110										

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

Table 1.1.8.4A Pairwise comparison of nucleotide sequences divergence with Kimura's two-parameter distance using the MEGA 7 program (lower half) and percentage values of sequence identity using the BioEdit program (upper half) among the mitochondrial cyt*b* sequences (500 bp) from *M. cervicolor* 27 haplotypes.

Haplotypes no.	Voucher name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	KJ530559 *M.cervicolor*, NP11	ID	0.993	0.991	0.969	0.969	0.967	0.965	0.969	0.965	0.967	0.967	0.965	0.963	0.959	0.967	0.969	0.971	0.965	0.969	0.965	0.973	0.969	0.971	0.965	0.967	0.967	0.965
2	NP1, NP6, NP7, NP12	0.006	ID	0.997	0.975	0.971	0.973	0.971	0.975	0.971	0.973	0.973	0.971	0.969	0.965	0.973	0.975	0.977	0.971	0.975	0.971	0.979	0.975	0.973	0.971	0.969	0.969	0.967
3	NP2, NP13	0.008	0.002	ID	0.973	0.969	0.971	0.969	0.973	0.969	0.971	0.971	0.969	0.967	0.963	0.971	0.973	0.975	0.969	0.973	0.969	0.977	0.973	0.971	0.969	0.967	0.967	0.965
4	P3	0.031	0.024	0.027	ID	0.995	0.997	0.991	0.991	0.987	0.989	0.989	0.987	0.981	0.981	0.989	0.991	0.993	0.987	0.991	0.987	0.991	0.991	0.989	0.987	0.985	0.985	0.975
5	P4, P7	0.031	0.029	0.031	0.004	ID	0.993	0.987	0.987	0.983	0.985	0.985	0.983	0.977	0.977	0.985	0.987	0.989	0.983	0.987	0.983	0.987	0.987	0.985	0.983	0.981	0.981	0.971
6	K18, K20	0.033	0.027	0.029	0.002	0.006	ID	0.989	0.993	0.989	0.987	0.987	0.985	0.979	0.979	0.987	0.989	0.991	0.985	0.989	0.985	0.989	0.989	0.987	0.985	0.983	0.983	0.973
7	P10, K25	0.035	0.029	0.031	0.008	0.012	0.01	ID	0.991	0.987	0.989	0.989	0.987	0.977	0.981	0.989	0.991	0.993	0.987	0.991	0.987	0.991	0.991	0.989	0.987	0.985	0.985	0.975
8	AY057811 *M. cervicolor*, NKW8	0.031	0.024	0.027	0.008	0.012	0.006	0.008	ID	0.995	0.993	0.993	0.991	0.981	0.985	0.993	0.995	0.997	0.991	0.995	0.991	0.995	0.995	0.993	0.991	0.989	0.989	0.979
9	NKW19, NKW24	0.035	0.029	0.031	0.012	0.016	0.01	0.012	0.004	ID	0.989	0.989	0.987	0.977	0.981	0.989	0.991	0.993	0.987	0.991	0.987	0.991	0.991	0.989	0.987	0.985	0.985	0.975
10	K2	0.033	0.027	0.029	0.01	0.014	0.012	0.01	0.006	0.01	ID	0.995	0.993	0.979	0.983	0.991	0.993	0.995	0.989	0.993	0.989	0.993	0.993	0.991	0.989	0.987	0.987	0.977
11	JQ685755 *M. cervicolor*, NP9	0.033	0.027	0.029	0.01	0.014	0.012	0.01	0.006	0.01	0.004	ID	0.997	0.983	0.987	0.991	0.993	0.995	0.989	0.993	0.989	0.993	0.993	0.991	0.989	0.987	0.987	0.977
12	KJ530560 *M. cervicolor*	0.035	0.029	0.031	0.012	0.0165	0.014	0.012	0.008	0.012	0.006	0.002	ID	0.985	0.989	0.989	0.991	0.993	0.987	0.991	0.987	0.991	0.991	0.989	0.987	0.985	0.985	0.975
13	LK2	0.037	0.031	0.033	0.018	0.022	0.02	0.022	0.018	0.022	0.02	0.016	0.014	ID	0.995	0.979	0.981	0.983	0.977	0.981	0.977	0.981	0.981	0.979	0.977	0.975	0.975	0.969
14	LK1, LK4, LK24, LK26	0.041	0.035	0.037	0.018	0.022	0.02	0.018	0.014	0.018	0.016	0.012	0.01	0.004	ID	0.983	0.985	0.987	0.981	0.985	0.981	0.985	0.985	0.983	0.981	0.979	0.979	0.969
15	NKW5, NKW29, NKY6	0.033	0.027	0.029	0.01	0.014	0.012	0.01	0.006	0.01	0.008	0.008	0.01	0.02	0.015	ID	0.993	0.995	0.989	0.993	0.989	0.993	0.993	0.991	0.989	0.987	0.987	0.977
16	NKW20	0.031	0.024	0.027	0.008	0.012	0.01	0.008	0.004	0.008	0.006	0.006	0.008	0.018	0.014	0.006	ID	0.997	0.991	0.995	0.991	0.995	0.995	0.993	0.991	0.989	0.989	0.979
17	NKW13, NKW25, NKW27, NKW28, P8	0.029	0.022	0.024	0.006	0.01	0.008	0.006	0.002	0.006	0.004	0.004	0.006	0.016	0.012	0.004	0.002	ID	0.993	0.997	0.993	0.997	0.997	0.995	0.993	0.991	0.991	0.981
18	K11	0.035	0.029	0.031	0.012	0.015	0.014	0.012	0.008	0.012	0.01	0.01	0.012	0.022	0.018	0.01	0.008	0.006	ID	0.995	0.991	0.991	0.991	0.989	0.987	0.985	0.985	0.975
19	K4, K8, NKW11, NKW18	0.031	0.024	0.027	0.008	0.012	0.01	0.008	0.004	0.008	0.006	0.006	0.008	0.018	0.014	0.006	0.004	0.002	0.004	ID	0.995	0.995	0.995	0.993	0.991	0.989	0.989	0.979
20	K7	0.035	0.029	0.031	0.012	0.016	0.014	0.012	0.008	0.012	0.01	0.01	0.012	0.022	0.018	0.01	0.008	0.006	0.008	0.004	ID	0.991	0.991	0.989	0.987	0.985	0.985	0.975
21	P6	0.027	0.02	0.022	0.008	0.012	0.01	0.008	0.004	0.008	0.006	0.006	0.008	0.018	0.014	0.006	0.004	0.002	0.008	0.004	0.008	ID	0.995	0.993	0.991	0.989	0.989	0.979
22	K1, K10, K22, K23	0.031	0.024	0.027	0.008	0.012	0.01	0.008	0.004	0.006	0.006	0.006	0.008	0.018	0.014	0.006	0.004	0.002	0.008	0.004	0.008	0.004	ID	0.993	0.991	0.989	0.989	0.983
23	K15	0.029	0.027	0.029	0.01	0.014	0.012	0.01	0.006	0.01	0.008	0.008	0.01	0.02	0.016	0.008	0.006	0.004	0.01	0.006	0.01	0.006	0.006	ID	0.993	0.995	0.991	0.981
24	P9	0.035	0.029	0.031	0.012	0.016	0.014	0.012	0.008	0.012	0.01	0.01	0.012	0.022	0.018	0.01	0.008	0.006	0.012	0.008	0.012	0.008	0.008	0.006	ID	0.993	0.985	0.975
25	K19	0.033	0.031	0.033	0.014	0.018	0.016	0.014	0.01	0.014	0.012	0.012	0.014	0.024	0.02	0.012	0.01	0.008	0.014	0.01	0.014	0.01	0.01	0.004	0.006	ID	0.987	0.977
26	P1, P5	0.033	0.031	0.033	0.014	0.018	0.016	0.014	0.01	0.014	0.012	0.012	0.014	0.024	0.02	0.012	0.01	0.008	0.014	0.01	0.014	0.01	0.01	0.008	0.014	0.012	ID	0.981
27	K14	0.035	0.033	0.035	0.024	0.029	0.027	0.024	0.02	0.024	0.022	0.022	0.024	0.031	0.031	0.022	0.02	0.018	0.024	0.02	0.024	0.02	0.016	0.018	0.024	0.022	0.018	ID

Table 1.1.8.4B Pairwise comparison of nucleotide sequences divergence with Kimura's two-parameter distance using the MEGA 7 program (lower half) and percentage values of sequence identity using the BioEdit program (upper half) among the mitochondrial cyt*b* sequences (500 bp) from *M. caroli* 22 haplotypes.

Haplotypes no.	Voucher name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
34	AB213499 *M. caroli*, T4	ID	0.997	0.995	0.993	0.963	0.967	0.969	0.955	0.959	0.961	0.963	0.959	0.957	0.959	0.959	0.959	0.961	0.957	0.957	0.959	0.953	0.955
35	T3	0.002	ID	0.997	0.991	0.965	0.969	0.971	0.957	0.957	0.959	0.961	0.957	0.955	0.957	0.957	0.957	0.959	0.955	0.955	0.957	0.951	0.953
36	T1	0.004	0.002	ID	0.989	0.963	0.967	0.969	0.955	0.955	0.957	0.959	0.955	0.953	0.955	0.955	0.955	0.957	0.953	0.953	0.955	0.949	0.951
37	T2	0.006	0.008	0.01	ID	0.961	0.965	0.967	0.957	0.957	0.959	0.961	0.957	0.955	0.957	0.957	0.957	0.959	0.955	0.955	0.957	0.951	0.953
38	AB213510 *M. caroli*	0.037	0.035	0.037	0.039	ID	0.993	0.993	0.967	0.967	0.969	0.975	0.971	0.973	0.975	0.975	0.975	0.977	0.973	0.973	0.975	0.969	0.971
39	NP4	0.033	0.031	0.033	0.035	0.006	ID	0.997	0.969	0.969	0.971	0.977	0.969	0.971	0.973	0.973	0.973	0.975	0.971	0.971	0.973	0.967	0.969
40	NP8, NP10, SK13	0.031	0.029	0.031	0.033	0.006	0.002	ID	0.969	0.969	0.971	0.977	0.969	0.971	0.973	0.973	0.973	0.975	0.971	0.971	0.973	0.967	0.969
41	AB033698 *M. caroli*, NKW23,NKW26	0.045	0.043	0.045	0.043	0.033	0.031	0.031	ID	0.987	0.981	0.979	0.975	0.977	0.979	0.979	0.979	0.977	0.973	0.973	0.975	0.971	0.973
42	AB213502 *M. caroli*	0.041	0.043	0.045	0.043	0.033	0.031	0.031	0.012	ID	0.981	0.987	0.975	0.977	0.979	0.979	0.979	0.977	0.973	0.973	0.975	0.971	0.973
43	SK28	0.039	0.041	0.043	0.041	0.031	0.029	0.029	0.018	0.018	ID	0.985	0.981	0.983	0.985	0.985	0.985	0.983	0.979	0.979	0.981	0.975	0.977
44	NKW6, NKW12	0.037	0.039	0.041	0.039	0.024	0.022	0.022	0.02	0.012	0.014	ID	0.987	0.989	0.987	0.989	0.991	0.985	0.981	0.981	0.983	0.977	0.979
45	LK3, LK5	0.041	0.043	0.045	0.043	0.029	0.031	0.031	0.024	0.024	0.018	0.012	ID	0.993	0.991	0.993	0.995	0.989	0.985	0.985	0.987	0.981	0.983
46	NKW1, NKW2	0.043	0.045	0.048	0.045	0.027	0.029	0.029	0.022	0.022	0.016	0.01	0.006	ID	0.995	0.995	0.997	0.991	0.987	0.987	0.989	0.983	0.985
47	KK8	0.041	0.043	0.045	0.043	0.024	0.027	0.027	0.02	0.02	0.014	0.012	0.008	0.004	ID	0.995	0.995	0.993	0.989	0.989	0.991	0.985	0.987
48	KK10	0.041	0.043	0.045	0.043	0.024	0.027	0.027	0.02	0.02	0.014	0.01	0.006	0.004	0.004	ID	0.997	0.993	0.989	0.989	0.991	0.985	0.987
49	NKW14, NKW17, NKY1, NKY2	0.041	0.043	0.045	0.043	0.024	0.027	0.027	0.02	0.02	0.014	0.008	0.004	0.002	0.004	0.002	ID	0.993	0.989	0.989	0.991	0.985	0.987
50	NKY3, NKW16	0.039	0.041	0.043	0.041	0.022	0.024	0.024	0.022	0.022	0.016	0.014	0.01	0.008	0.006	0.006	0.006	ID	0.995	0.995	0.997	0.991	0.993
51	NKY4, NKY9, NKY10	0.043	0.045	0.048	0.045	0.027	0.029	0.029	0.027	0.027	0.02	0.018	0.014	0.012	0.01	0.01	0.01	0.004	ID	0.991	0.993	0.987	0.989
52	SK16, SK27	0.043	0.045	0.048	0.045	0.027	0.029	0.029	0.027	0.027	0.02	0.018	0.014	0.012	0.01	0.01	0.01	0.004	0.008	ID	0.997	0.991	0.993
53	AY057812 *M. caroli*, SK20, SK21, NKW7, NKW15, NKW21, NKW22	0.041	0.043	0.045	0.043	0.024	0.027	0.027	0.024	0.024	0.018	0.016	0.012	0.01	0.008	0.008	0.008	0.002	0.006	0.002	ID	0.993	0.995
54	SK3, SK4, SK15	0.048	0.05	0.052	0.05	0.031	0.033	0.033	0.029	0.029	0.024	0.022	0.018	0.016	0.014	0.014	0.014	0.008	0.012	0.008	0.006	ID	0.997
55	SK22, NP3, NP5	0.045	0.048	0.05	0.048	0.029	0.031	0.031	0.027	0.027	0.022	0.02	0.016	0.014	0.012	0.012	0.012	0.006	0.01	0.006	0.004	0.002	ID

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Table 1.1.8.4C Pairwise comparison of nucleotide sequences divergence with Kimura's two-parameter distance using the MEGA 7 program (lower half) and percentage values of sequence identity using the BioEdit program (upper half) among the mitochondrial cyt*b* sequences (500 bp) from *M. cookii* 6 haplotypes.

Haplotypes no.	Voucher name	1	2	3	4	5	6
28	KK3, KK4	ID	0.983	0.985	0.987	0.985	0.985
29	BK1	0.016	ID	0.993	0.995	0.993	0.993
30	KK5, KK7	0.014	0.006	ID	0.997	0.995	0.995
31	AY057813 *M. cookii*, KK1, KK2, KK6, KK9, KK11, LK25	0.012	0.004	0.002	ID	0.997	0.997
32	AB125768 *M. cookii*	0.014	0.006	0.004	0.002	ID	0.995
33	BK2	0.014	0.006	0.004	0.002	0.004	ID

Table 1.1.8.4D Pairwise comparison of nucleotide sequences divergence with Kimura's two-parameter distance using the MEGA 7 program (lower half) and percentage values of sequence identity using the BioEdit program (upper half) among the mitochondrial cyt*b* sequences (500 bp) from *M. pahari* 6 haplotypes.

Haplotypes no.	Voucher name	1	2	3	4	5	6
56	AB096839 *M. pahari*	ID	0.939	0.941	0.941	0.939	0.939
57	KY038052 *M. pahari*	0.063	ID	0.997	0.995	0.993	0.993
58	MJ5	0.061	0.002	ID	0.997	0.995	0.995
59	MJ2, MJ4	0.061	0.004	0.002	ID	0.997	0.997
60	MJ1, MJ3	0.063	0.006	0.004	0.002	ID	0.995
61	MJ6	0.063	0.006	0.004	0.002	0.004	ID

กรมวิทยาศาสตร์

Table 1.1.8.5 Summary statistics of the genetic diversity indicies and neutrality test of Cytb sequence (500 bp) of *Mus* spp. in this study.

Populations (species)	N	Haplotypes (n)	S	Hd ± SD	Pi ± SD	Tajima's D	Fu's Fs	Fu and Li 's D	Fu and Li 's F
M. cervicolor	50	27	51	1 ± 0.01	0.015 ± 0.002	-1.622	-24.709	-1.214	-1.583
M. cookii	12	6	11	1 ± 0.096	0.007 ± 0.002	-1.445	-2.814	-1.481	-1.593
M. caroli	42	22	46	1 ± 0.014	0.025 ± 0.003	-0.424	-12.702	-0.319	-0.411
M. pahari	6	6	32	1 ± 0.096	0.022 ± 0.012	-1.488*	-0.804	-1.458	-1.602

Remark: N = numbers of samples, S = number of polymorphic (segregation), Hd = haplotype diversity, Pi = nucleotide diversity, SD = standard deviation.

(Estimates of Tajima's D, Fu's Fs, Fu and Li 's D and Fu and Li 's F are follow by 95% confidence and statistical significance derived from 1000 coalescent simulation).

* $P < 0.05$: significant

กรมวิชาการเกษตร

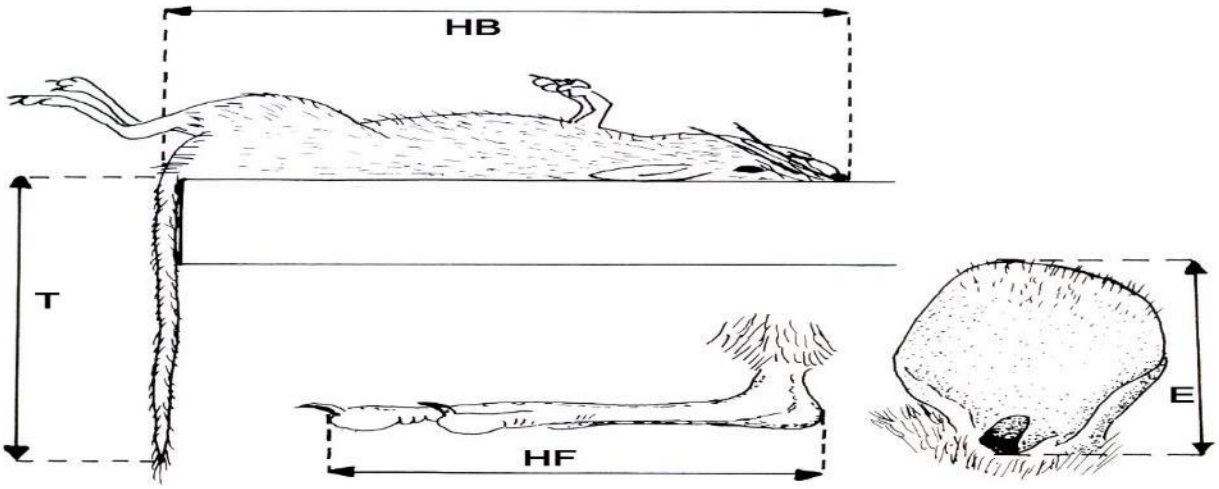


Figure 1.1.8.1 External characters of adult rodent, as referred to in this study; (HB): head and body length, (T): tail length, (HF): hind foot length and (E); ear length (กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร, 2544)

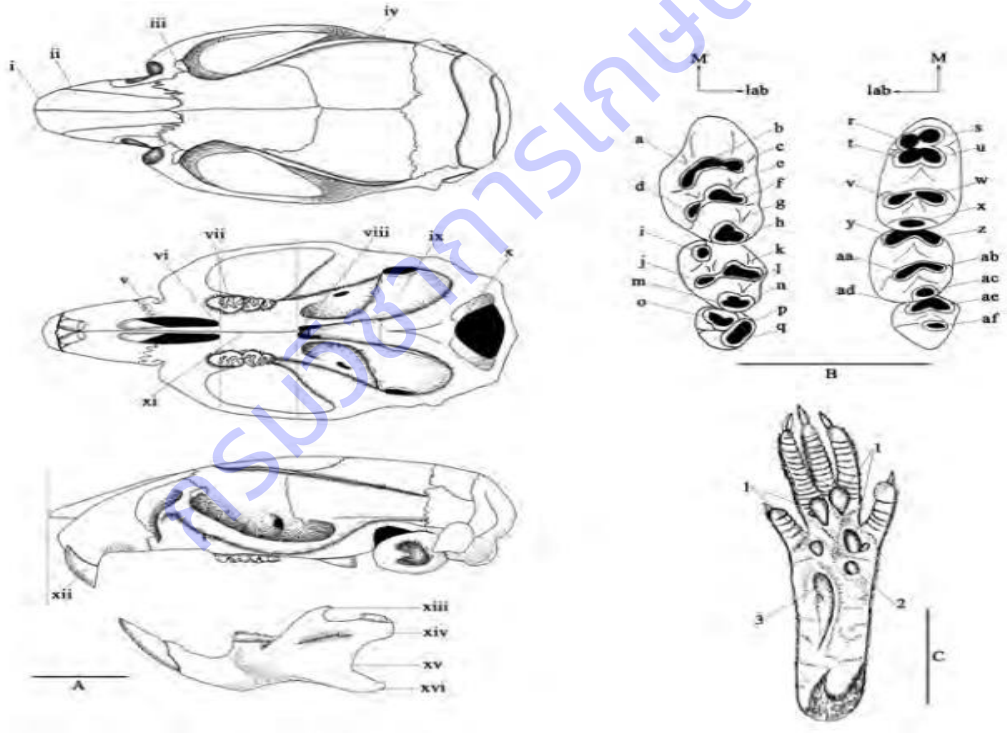


Figure 1.1.8.2 Skull and dentition of *Mus musculus* (JTM6912). (A): dorsal, ventral and lateral view of skull and mandible (Scale = 5 mm); (B): occlusal view of upper (left) and lower (right) left molars (Scale = 2 mm); (C): left hind foot of *M. musculus* (HZM457.18657), Beesham, Pakistan (Scale = 5 mm). Indicative numbers (i–xvi) and (1–3) and letters (a–af) are explained in the text 'Description' for *Mus.* M: mouth; lab: labial. (Pimsai *et al*., 2014)

กรมวิชาการเกษตร

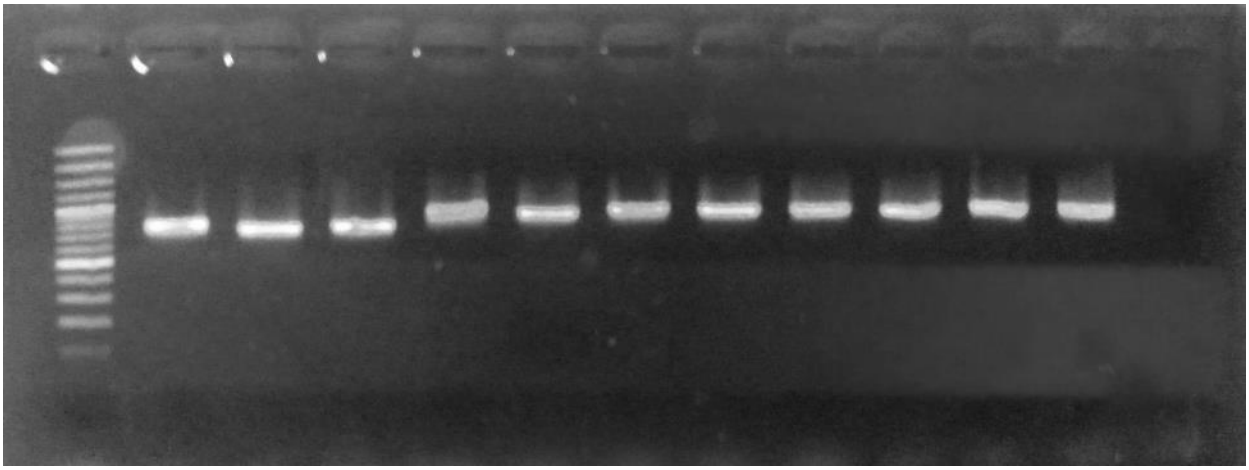
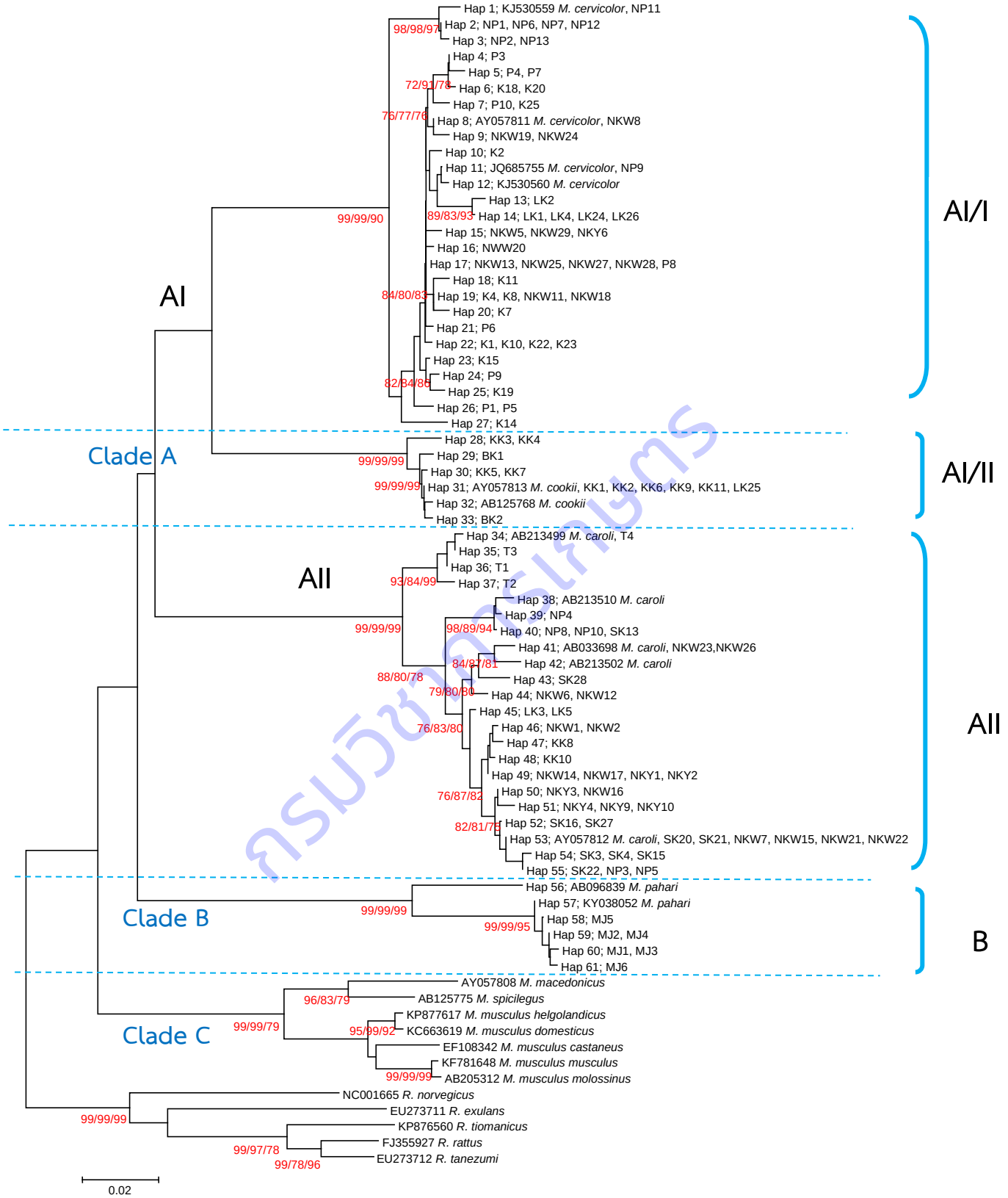


Figure 1.1.8.3 PCR product with the use of primer Mus cyt*b* F seq / Mus cyt*b* R (cytochrome *b* region) of *Mus* spp. generated 800 bp (estimate) detect by 1.5% agarose gel electrophoresis, (left to right) lane 1 contains DNA markers (100 bp), and lane 2-12 are samples *Mus* spp. (NP1-11), lane 13 is negative control.

กรมวิชาการเกษตร



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Figure 1.1.8.4 Phylogenetic tree of cyt*b* sequences (500 bp) of *Mus* spp. and depicting the genetic relatedness of the *Rattus* species. Bootstrap support 1,000 replicated are given above or below the branchs and reconstructed following 3 different methods NJ/MP/ML respectively. The tree has been rooted using *Rattus* spp.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.8.5 The amino acid based on KJ530559 *M. cervicolor*, cyt*b* gene (500 bp). Dots indicate amino acid identical to the haplotype of *Mus* spp. in this study.

กรมวิทยาศาสตร์

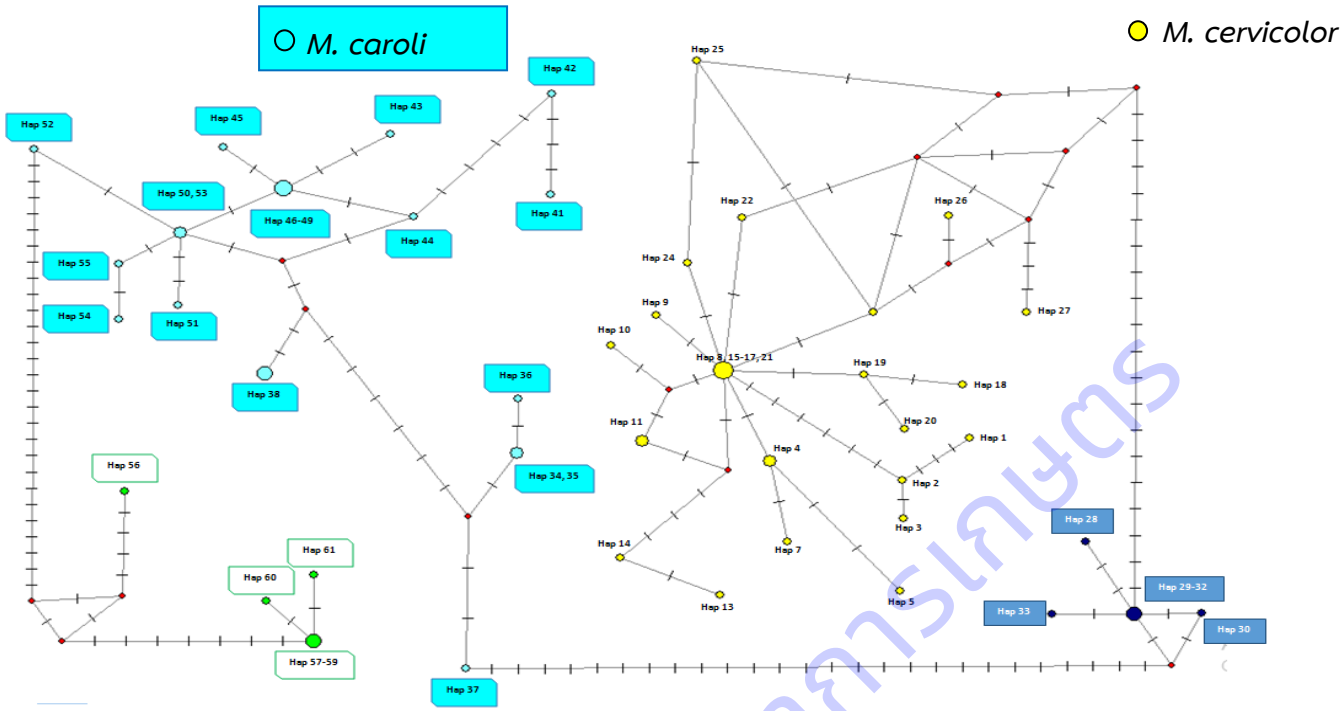


Figure 1.1.8.6 Haplotype network based on partial cytochrome *b* sequences (500 bp) reconstructed by Median-joining analysis (NETWORK 4.6.1.3 program). All haplotypes were plotted on to their sampling areas and haplotypes were represented by circles with diameter proportional to their population size.

M. pahari

M. cookii

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.9 อนุกรมวิธานของแตนเบียนสกุล *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงหวี่ขาว (Hemiptera: Aleyrodidae)ในประเทศไทย

Taxonomic study of the genus *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoids wasps attacking whiteflies in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง จารุวัตถ์ แต้กุล กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน ยุวรินทร์ บุญทบ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

สุนัดดา เชาวลิต กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

ชมัยพร บัวมาศ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

อิทธิพล บรรณาการ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

เกศสุดา สนศิริ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

อาทิตย์ รักกสิกร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

จอมสุรางค์ ดวงธิสาร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์ กลุ่มกีฏและสัตววิทยาสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

แมลงหวี่ขาวยาสูบจัดเป็นศัตรูพืชที่สำคัญของประเทศไทย นอกจากทำลายพืชโดยตรงแล้วยังเป็นแมลงพาหะนำโรคที่สำคัญ เมื่อแมลงหวี่ขาวเกิดการระบาด การป้องกันกำจัดมักไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากแมลงชนิดนี้สามารถหลบหนีจากสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช ไปซ่อนตัวในวัชพืชอาศัยบริเวณใกล้เคียงแปลงปลูกพืชหลักได้ การใช้ศัตรูธรรมชาติโดยเฉพาะแตนเบียนแมลงหวี่ขาวถือเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ แต่ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับชนิดของแตนเบียนศัตรูธรรมชาติที่สำคัญของแมลงหวี่ขาวสกุลนี้ในประเทศไทย ซึ่งการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์คือ เพื่อทราบชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ ชีววิทยาและเขตการแพร่กระจาย ของแตนเบียนสกุล *Encarsia* ศัตรูธรรมชาติของแมลงหวี่ขาวในประเทศไทย ดำเนินการตั้งแต่เดือนตุลาคม 2560 ถึง เดือนกันยายน 2562 เก็บตัวอย่างจากแปลงปลูกพืชเศรษฐกิจที่มีแมลงหวี่ขาวเป็นศัตรูสำคัญ การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานและการสร้างแนวทางการวินิจฉัยดำเนินการ ณ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ผลการทดลองพบแตนเบียนแมลงหวี่ขาวสกุล Encarsia ทั้งสิ้น 3 ชนิด ได้แก่ *Encarsia strenua* Polaszek 1992, *Encarsia dispersa* Polaszek 2004 และ *Encarsia bimaculata* Heraty & Polaszek 2000. นอกจากนี้ยังพบแตนเบียนสกุลอื่นอีก 2 สกุลได้แก่ *Eretmocerus* sp. Haldeman, 1850 และ *Metaphycus* sp. Mercet, 1917 ผลการทดลองสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาการใช้แตนเบียนควบคุมแมลงหวี่ขาวโดยชีววิธีต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) — one of the potential pests in Thailand currently post a significant impact on agricultural system especially field crops. They have not only caused damage to growing plants directly but carried plant diseases as insect vector. The insect control program has not yet been successful since whiteflies can escape to the weeds around field crop area. The parasitoids in the genus *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae) are acknowledged as one of the promising biological control strategies. Despite its importance, little information regarding species richness is reported. The objectives of this study are to examine species richness as well as generate key to species of parasitoids, the genus *Encarsia.* This research was carried out from October 2017 to September 2019. Filed collecting was achieved around economically important field crops; taxonomic study was implemented at the taxonomy research group, Department of Agriculture. The results revealed three species of the genus were found including *Encarsia strenua* Polaszek 1992, *Encarsia dispersa* Polaszek 2004, and *Encarsia bimaculata* Heraty & Polaszek 2000. Two genera in the Aphelinid family were found: *Eretmocerus* sp. Haldeman, 1850 and *Metaphycus* sp. Mercet, 1917. The results will make a significant contribution to biological control study so as to utilize local parasitoids into biological control of whiteflies program.

คำสำคัญ แตนเบียนแมลงหวี่ขาว การควบคุมโดยชีววิธี สกุล *Encarsia* แตนเบียนแมลงปากดูด แมลงหวี่ขาว ศัตรูธรรมชาติ

Keywords: whiteflies parasitoids, Chalcidoidea, Aphelinidae, *Trichogramma, Encarsia*

คำนำ

แมลงในกลุ่ม ผึ้ง ต่อ และแตน (Hymenoptera) จัดว่าเป็นแมลงกลุ่มที่มีความสำคัญมากที่สุดในกลุ่มแมลงที่มีประโยชน์ ความหลากชนิดของแมลงในกลุ่มนี้มีมากกว่า 115,000 ชนิด (LaSalle and Gauld, 1993) จากการศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic position) พบว่า Hymenoptera มีวิวัฒนาการความสัมพันธ์ไกล้เคียงมากที่สุด (sister group) ต่อกลุ่มแมลงที่มีการเจริญเติบโตแบบครบวงจรหรือ Holometabola (Sharkey, 2007; Savard *et al*., 2006) โดยทั่วไปแล้วแมลงในกลุ่มผึ้ง ต่อ แตน แบ่งเป็น 2 กลุ่มหลักได้แก่ กลุ่มกินพืช paraphyletic Symphyta (sawflies, woodwasps) และแมลงผสมเกสร มด และแตน monophyletic Apocrita ซึ่งประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย monophyletic Aculeata และ polyphyletic Parasitica กลุ่มย่อย Aculeata และ Parasitica เป็นแมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในแง่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มแตนเบียน (parasitoids wasps) พบว่าการนำเข้าแตนเบียนเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช (classical biological control) ประสบความสำเร็จสูงถึง 87% จากการนำเข้าแมลงศัตรูธรรมชาติทั้งหมด(Greathead, 1986; Lasalle and Gauld, 1993)แมลงในกลุ่มแตนเบียนมีความน่าสนใจมาก

กรมวิชาการเกษตร

ที่สุดในกลุ่มแมลงศัตรูธรรมชาติในแง่ของชีววิทยา แมลงในกลุ่มนี้สามารถอาศัยบริโภคอาหารทั้งในตัวเหยื่อ (endoparasitoids) และบนตัวเหยื่อ (ectoparasitoids) แตนเบียนแตกต่างจาก ตัวห้ำและตัวเบียนกล่าวคือ ตัวห้ำ (predator) เข้าทำลายและฆ่าเหยื่อโดยทางตรงและครั้งละหลายตัว ตัวเบียน (parasite) สร้างความรำคาญหรือบาดเจ็บให้กับเหยื่อแต่จะไม่ฆ่าเหยื่อ ในทางกลับกันแตนเบียน (parasitoids) เข้าทำลายเหยื่อครั้งละ 1 ตัว ตัวอ่อนกัดกินอวัยวะภายในเหยื่อและทำให้เหยื่อตายในที่สุด จำนวนของแตนเบียนภายในเหยื่ออาจแตกต่างกัน มีเพียงแค่ 1 ตัว (solitary) หรือหลายตัว (gregarious)

ความสำคัญของแตนเบียนประกอบไปด้วย 1) ช่วยรักษาสมดุลของระบบนิเวศ แตนเบียนเข้าทำลายเหยื่อจัดเป็นการรักษาระดับการระบาดของแมลง 2) สามารถใช้ในการวัดระดับการแพร่กระจายของแมลง พบว่าหากมีแตนเบียนชนิดใดอยู่เป็นจำนวนมาก อาจมีผลมาจากความอุดมสมบูรณ์ของเหยื่อ 3) การใช้แตนเบียนควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี พบว่าเป็นวิธีการที่ประสบความสำเร็จทั้งแมลงศัตรูทางการเกษตร ป่าไม้ และทางการแพทย์ และยังช่วยลดระดับการใช้สารเคมีควบคุมแมลงศัตรูพืช 4) แมลงศัตรูพืชลดระดับความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลง และในที่สุดแล้ว 5) ช่วยส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม

Wang *et al*. (2016) ได้รายงานการระบาดของโรคใบด่างมันสำปะหลัง ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส Sri Lankan cassava mosaic virus ระบาดในแปลงปลูกมันสำปะหลังในจังหวัดรัตนะคีรี บริเวณภาคตะวันออกของประเทศกัมพูชา ซึ่งอยู่ห่างจากชายแดนประเทศไทยประมาณ 430 กิโลเมตร เชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถสร้างความเสียหายต่อผลผลิต 80 – 100 เปอร์เซ็น ซึ่งเป็นการรายงานการตรวจพบครั้งแรกในประเทศกัมพูชาและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการระบาดของโรคไวรัสชนิดนี้ในประเทศไทย โรคไวรัสดังกล่าวจัดเป็นศัตรูพืชกักกันที่สำคัญของประเทศในปัจจุบัน สาเหตุหลักของการระบาดของโรคชนิดนี้คือ แมลงพาหะนำโรคได้แก่ แมลงหวี่ขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius) ซึ่งหากมีการระบาดเกิดขึ้นในประเทศไทย จะเกิดปัญหาและอุปสรรคในการป้องกันกำจัดเนื่องจาก แมลงชนิดนี้มีพืชอาศัยหลายชนิด แมลงหวี่ขาวสามารถหลบหนีจากสารเคมีป้องกันกำจัด ไปซ่อนตัวในวัชพืชอาศัยบริเวณใกล้เคียงแปลงปลูกพืชหลักได้ การใช้ศัตรูธรรมชาติโดยเฉพาะแตนเบียนแมลงหวี่ขาวถือเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ แต่ในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับชนิดของแตนเบียนศัตรูธรรมชาติที่สำคัญของแมลงหวี่ขาวชนิดนี้

แมลงหวี่ขาวจัดอยู่ในวงศ์ Aleyrodidae นับเป็นศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางการเกษตร สามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิด (polyphagous pests) ทั้งยังมีความสามารถเข้าทำลายพืชได้ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยโดยแมลงหวี่ขาวอาศัยดูดกินน้ำเลี้ยงอยู่บริเวณใต้ใบพืชทำให้มีความยุ่งยากและเป็นอุปสรรคในการป้องกันกำจัด แมลงหวี่ขาวยังเป็นพาหะนำโรคมาสู่พืชโดยเฉพาะเชื้อไวรัส มีรายงานว่าสามารถเป็นพาหะนำโรคไวรัสได้สูงถึง 114 ชนิด โดยเฉพาะแมลงหวี่ขาวชนิด *Bemisia tabaci* สามารถนำโรคไวรัสได้สูงถึง 111 ชนิด (Jone, 2003; Plant Health Australia, 2010) ในปัจจุบันประเทศไทยต้องประสบปัญหาในการส่งออกสินค้าเกษตร เนื่องจากตามข้อตกลงว่าด้วยสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (sanitary and phytosanitary agreement) หรือ SPS สินค้าส่วนใหญ่ไม่สามารถส่งออกได้เนื่องจากมีการปนเปื้อนของแมลงหวี่ขาวทั้งในระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัย หรือเกิดการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสโรคพืช ซึ่งเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศคู่ค้า สิ่งเหล่านี้นำความเสียหายทางเศษฐกิจมาสู่ประเทศไทยมูลค่ามหาศาล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การใช้ศัตรูธรรมชาติควบคุมแมลงหวี่ขาวนับเป็นวิธีการหนึ่งที่สำคัญและมีประสิทธิภาพ นอกจากมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้และผู้บริโภคแล้ว ยังช่วยลดปัญหาการสร้างความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลง และการเกิดพิษตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร แตนเบียนศัตรูธรรมชาติของแมลงหวี่ขาวที่มีประสิทธิภาพในการเบียนเข้าทำลายแมลงหวี่ขาวอยู่ในสกุล *Encarsia* Förster, 1878 (Hymenoptera: Aphelinidae) ซึ่งเป็นแตนเบียนที่พบเป็นปกติในแปลงปลูกพืชที่มีการระบาดของแมลงหวี่ขาว (Schauff *et al.*, 1996) แตนเบียนสกุลนี้นอกเหนือจากเบียนแมลงหวี่ขาวแล้วยังมีความสามารถในการเบียนแมลงกลุ่มเพลี้ยหอย (Coccoidea) และเพลี้ยอ่อนอีกด้วย ปัจจุบันแตนเบียนกลุ่มนี้มีการรายงานว่าพบมากกว่า 280 ชนิด (Hayat, 1989) อย่างไรก็ตามในประเทศไทยมีแตนเบียนหลายชนิดในวงศ์นี้ ที่มีศักยภาพในการเบียนแมลงหวี่ขาว แต่ยังไม่มีรายงานถึงระดับชนิดในสกุล *Encarsia* นักชีววิทยาโดยเฉพาะอย่างยิ่งนักวิจัยที่ทำงานทางด้านการเพาะขยายแตนเบียนเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชทางชีวภาพ ประสบปัญหาในการหาข้อมูลทางวิชาการเนื่องจากไม่ทราบชนิดที่ถูกต้องของแตนเบียนในกลุ่มนี้ การพัฒนาเลี้ยงขยายแตนเบียนจะไม่สามารถเกิดขึ้นได้หากไม่ทราบถึงชนิดของแมลงที่ต้องการเลี้ยงขยาย การทราบถึงระดับชนิดของแตนเบียนสามารถช่วยในการสืบค้นข้อมูล ทั้งในแง่ความสามารถในการเบียน รวมถึงความหลากชนิดของศัตรูพืช หรือเทคโนโลยีการผลิตขยายเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช การทดลองนี้มุ่งเน้นสำรวจและหาแนวทางวินิจฉัยระดับชนิดของแตนเบียนแมลงหวี่ขาวสกุล *Encarsia* ในประเทศไทยเพื่อเป็นฐานข้อมูลในการใช้ควบคุมแมลงหวี่ขาวศัตรูพืชโดยชีววิธีในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้คือ เพื่อทราบชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ ลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา และได้แนวทางการวินิจฉัย ของแตนเบียนสกุล *Encarsia* ศัตรูธรรมชาติของแมลงหวี่ขาวศัตรูพืชสำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. กับดักแมลงประกอบไปด้วย Yellow pan trap, Malaise trap และสวิงจับแมลง
2. ethanol ความเข้มข้น 95% เพื่อใช้ในการจัดเก็บตัวอย่างสดของแมลง
3. กระดาษคุณภาพสูง (acid free) เพื่อการเก็บรักษาตัวอย่างแห้งในระยะยาว
4. อุปกรณ์บันทึกเขตการแพร่กระจายในระดับละเอียด (GPS)
5. Forceps ขนาดเล็ก
6. ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับตัวอย่างสด
7. เพลตแก้วสำหรับเลี้ยงแมลงหวี่ขาวและแตนเบียน
8. กล่องพลาสติกเจาะรูระบายอากาศติดตาข่ายความละเอียดสูง
9. กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope กำลังขยายมากกว่า 50 เท่าขึ้นไป
10. สารเคมีในการทำแห้งตัวอย่างแมลง
11. พัดลมดูดอากาศ (Laminar Flow Clean Air Bench)
12. โรงเรือนทดลองกรณีเลี้ยงแมลงหวี่ขาว

กรมวิชาการเกษตร

13. กล้องจุลทรรศน์สเตริโอแบบกำลังขยายสูงสำหรับงานทางอนุกรมวิธานแมลง Leica M205 C พร้อมเลนซ์ Planapo Objective 1.0X สำหรับการถ่ายภาพเพื่อตีพิมพ์ในเอกสารวิชาการ

- **วิธีการ**

<u>การเก็บและรักษาตัวอย่างแตนเบียนสกุล *Encarsia* (Acquisition of research material)</u>

ดำเนินการเก็บตัวอย่างแตนเบียนแมลงหวี่ขาว 2 วิธี ได้แก่ 1) การเก็บตัวอย่างจากสภาพแวดล้อมโดยตรงทั้งจากแปลงเกษตรกรและพื้นที่ใกล้เคียงและ 2) จากการเลี้ยงขยายแมลงหวี่ขาวที่เก็บจากแปลง

1) การเก็บตัวอย่างจากสภาพแวดล้อมโดยตรง ใช้วิธีการวางกับดักเพื่อเก็บตัวอย่างแตนเบียน ประกอบด้วย กับดักถ้วยสีเหลือง Yellow Pan Traps (YPT) กับดักผ้ามุ้งได้แก่ Malaise trap และ Slam trap การใช้ YPT จะทำการเก็บแมลงทุกวันโดยทิ้งระยะเวลา 24 ชั่วโมงโดยวางกับดักเวลา 08:00 นาฬิกา และทำการเก็บแมลงในช่วงเช้าวันถัดไประหว่างเวลา 09:00 – 10:00 นาฬิกา และวางกับดัก Malaise trap และ Slam trap สามารถเว้นระยะเวลา 5-10 วัน นำแมลงออกจากกับดักโดยใช้ ตาข่ายความละเอียดพิเศษ (fine-mesh aquarium net) เก็บใน 95% ethanol หลังจากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รอเพื่อเตรียมตัวอย่างแห้ง หรือรอไว้เพื่องานวิจัยทางด้านสกัด ดี เอ็น เอ ต่อไป

2) เก็บแตนเบียนจากการเลี้ยงขยายแมลงหวี่ขาว ดำเนินการเก็บตัวอย่างแมลงหวี่ขาวบนพืชอาศัย ทั้งระยะตัวเต็มวัยและดักแด้ โดยตัดส่วนของพืชอาศัยที่พบดักแด้ของแมลงหวี่ขาวขนาดประมาณ 4 ตารางเซนติเมตร ใส่ในเพลทพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร สูง 1 เซนติเมตร เลี้ยงแมลงหวี่ขาวที่อุณหภูมิ 24.5$\pm$4 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70$\pm$5 เปอร์เซ็น ประมาณ 2 – 3 วันจนกระทั่งแตนเบียนออกจากดักแด้แมลงหวี่ขาว

<u>การจัดจำแนกโดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา</u>

ดำเนินการจัดจำแนกแตนเบียนแมลงหวี่ขาวในระดับอันดับ (order) โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Goulet & Huber (1993) นับจำนวนของแมลงในแต่ละอันดับในแต่ละครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่าง ทั้งนี้เพื่อศึกษาถึงศักยภาพของกับดัก วิธีการเก็บแมลง แมลงในกลุ่มเป้าหมาย Hymenoptera จะถูกแยกกลุ่มในระดับ Superfamily การจัดแบ่งในหมวด วงศ์และสกุล (Family และ genus) โดยใช้เอกสารวิชาการหลักที่ใช้ในการจัดจำแนกได้แก่ “Hymenoptera of the world: an identification guide to families” (Gibson, 1993) และความร่วมมือจากนักวิจัยจากประเทศแคนนาดา (CNCI:Canadian National Collection of Insects) การศึกษาภายใต้กล้อง stereo microscope ใช้โปรแกรมการถ่ายภาพ AutoMontage หรือ Cartograph extended-focus โดยใช้ JVC KY-F75U digital camera, Leica Z16 APOA

<u>ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการทดลอง</u>

ลักษณะและคำศัพท์ทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ ใช้ในการทดลองได้แก่ลักษณะจำนวนปล้องหนวด รูปร่างของปล้องหนวดเพศเมีย ระยะห่างระหว่างตาเดี่ยวหรือ POL (posterior ocellar line) ระยะที่สั้นที่สุดระหว่างขอบตารวมด้านใน (inner orbit) และตาเดี่ยวแต่ละข้าง (lateral ocellus) ซึ่งเรียกระยะนี้ว่า OOL (ocular

กรมวิชาการเกษตร

ocellar line) (Masner, 1980) ปล้องท้องแต่ละปล้องเรียกว่า T1, T2, . T7 (metasomal tergite) นอกจากนี้ใช้ภาพและลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อการวินิจฉัยอ้างอิงจาก Polaszek *et al*. (1999) (Figure 1.1.9.1-1.1.9.2)

- **เวลาและสถานที่**

ทำการเก็บตัวอย่าง ณ พื้นที่เกษตรกรรมที่มีการระบาดหรือเคยมีการระบาดของแมลงหวี่ขาว ทั้งในฤดูและนอกฤดูเกษตรกรรม นอกจากนี้เก็บแตนเบียนในสภาพพื้นที่ธรรมชาตินอกเหนือพื้นที่เพาะปลูก โดยดำเนินการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ที่มีการปลูกพืชเศรษฐกิจที่มีแมลงหวี่ขาวเป็นศัตรูพืชสำคัญเช่น มันสำปะหลัง อ้อย ข้าวโพด มะเขือ ฝรั่ง เป็นต้น ในบริเวณภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การตรวจวินิจฉัย จัดอันดับแตนเบียนสกุล *Encarsia* ดำเนินการ ณ พิพิธภัณฑ์แมลงและห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

- **การบันทึกข้อมูล**

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

-การลงทะเบียนและระบบฐานข้อมูลแตนเบียนในประเทศไทย หากมีการค้นพบชื่อวิทยาศาสตร์ชนิดใหม่ ดำเนินการตีพิมพ์และขึ้นทะเบียนกับ IZCN-Zoobank (Polaszek *et al.* 2005)

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

-เก็บรักษาตัวอย่างแมลงทั้งตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง ณ พิพิธภัณฑ์แมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

แตนเบียนไข่แมลงหวี่ขาวสกุล *Encarsia* Förster, 1878

Genus *Encarsia* Förster, 1878

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

Encarsia Förster 1878: p. 65–66. Type species: *Encarsia* tricolor Förster by monotypy. = *Aspidiotiphagus* Howard 1894a: p. 229, *Prospalta* Howard 1894b: p. 6, Prospaltella Ashmead 1904: p. 126, *Encarsiella* Hayat 1983: p. 85. For a full list of generic synonyms see Schmidt and Polaszek (2007a; p. 85–86).

Synonyms: *Aspidiotiphagus, Aleurodiphilus, Prospalta, Encarsiella*

การวินิจฉัย (Diagnosis)

เมื่อเปรียบเทียบกับแตนเบียนในวงศ์ใหญ่ Chacidoidea แล้วแตนเบียนในวงศ์ Aphelinidae มีเส้นปีกที่แตกต่างจากวงศ์อื่นคือไม่มี post marginal vein (Figure 1.1.9.2) การวินิจฉัยระดับสกุลจากสีของลำตัว โดยทั่วไปมีสีเหลืออ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ตัวผู้มีสีลำตัวที่เข้มกว่าตัวเมีย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

กรมวิชาการเกษตร

ส่วนหัวเมื่อมองจากด้านบนมีลักษณะแคบ (dorsum transverse) มีความกว้างสองเท่าหรือมากกว่าความยาวของส่วนหัว มีแถบเส้นบางเรียกว่า postocellar bar อยู่ตอนล่างของตาเดี่ยว กรามมี 3 ซี่ หรือบางครั้งพบ 2 ซี่ รยางค์ฟัน (maxillary palp) พบ 1-2 ชิ้น รยางค์แก้ม (labial palps) 1 ชิ้น หนวดมี 8 ปล้องไม่รวมปล้องฐานหรือ radical เพศผู้ส่วนใหญ่มีหนวดแค่ 7 ปล้อง ความยาวของหนวดปล้องที่ 2 หรือ pedicel และหนวดปล้องอื่น ๆ มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด หนวดส่วน funicle มี 2-4 ปล้อง ส่วนกระบองหรือ clava มี 2-4 ปล้องหรือเห็นได้ไม่ชัดเจน (Figure 1.1.9.2)

อกปล้องที่ 1 (pronotum) ส่วนกลางอกมองจากด้านบนมีลักษณะเป็นแผ่นใส อกปล้องกลางมีขนขึ้นประมาณ 20 เส้น จัดเรียงตัวเป็นแนวขนานกันบนสันอก บริเวณด้านข้างอกปล้องกลางแยกออกมาเป็นส่วนเรียกว่า side lobe แต่ละข้างมีขนขึ้น 1 – 5 เส้น ส่วนของแผ่นแข็งใกล้ฐานปีกบนอกปล้องกลาง (axilla) มีขนาดความกว้างน้อยกว่าระยะห่างของทั้งสองแผ่นบนอกแต่ละข้างมีขน 1 เส้น เมื่อเปรียบเทียบกับแตนเบียนในสกุลอื่น ส่วนของแผ่นแข็ง scutellum มีความกว้างมากกว่าความยาวเห็นได้อย่างชัดเจนและพบเส้นขน 2 คู่ ตุ่มขน (placoid sensilla) อีก 1 คู่ เส้นขนคู่แรกสั้นกว่าเส้นขนคู่ที่สอง ลักษณะผิวผนังของส่วน scutellum ขรุขระเป็นเส้นตามยาวและคล้ายตาข่ายอยู่ส่วนกลาง (Figure 1) ปีกคู่หน้า ความกว้างที่มากที่สุดของปีกเรียกว่า marginal fringe แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด เส้นปีก submarginal สั้นกว่าเส้นปีก marginal มีขนขึ้นบนเส้นปีก 2 เส้น บริเวณส่วนฐานของปีกมีขนขึ้นน้อยกว่า 10 เส้น แต่มีในบางชนิดอาจมีมากกว่า เส้นปีกซึ่งต่อกับ marginal เรียกว่า postmarginal vein ไม่พบในแตนเบียนสกุลนี้ซึ่งถือเป็นลักษณะเฉพาะของสกุลที่สำคัญอย่างหนึ่ง ปีกคู่หลังเรียวแคบ ส่วนขาหลังมี tarsal formula คือ 5-5-5 หรือบางครั้ง 5-4-5 (Figure 1.1.9.2)

ส่วนท้องมี 7 ปล้อง (T1 – T7) ส่วนของปล้องท้องปล้องสุดท้าย T7 มีสัดส่วนของความยาวและความกว้างแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด ส่วนปลายของท้องปล้องสุดท้ายมีลักษณะเป็นแผ่นใส ท้องปล้องที่ 1 ไม่มีขน ท้องปล้องที่ 2 – 4 มีขนขึ้นด้านข้างประมาณ 1 – 5 เส้น ท้องปล้องที่ 5 และ 6 พบขนปล้องละ 2 เส้น ส่วนท้องปล้องที่ 7 พบขน 4 เส้นมีในบางชนิดที่พบ 6 เส้น อวัยวะวางไข่เรียกว่า ovipositor ในแตนเบียนกลุ่มนี้เรียกว่า 2nd valvifer และ 3rd valvula มีสัดส่วนความยาวที่แตกต่างกันตามชนิด อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้มีแผ่นแข็งเรียกว่า phallobase มีความยาวมากกว่าความกว้าง ส่วนของ aedeagus มีความยาวมากกว่า phallobase

***Encarsia bimaculata* Heraty & Polaszek, 2000**

Figure 1.1.9.3

Original description: Heraty J.M. and A. D. Polaszek. 2000 Type: *Encarsia bimaculata* original designation.

Synonyms: *Encarsia strenua*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ตัวเมียมีหนวด 6 ปล้อง ส่วนปลายหนวดมีลักษณะเป็นกระบองเรียกว่า clava มี 3 ปล้อง หนวดปล้องที่ 1 (F1) มีความยาวเป็นสองเท่าของความกว้างและมีขนาดใกล้เคียงกับหนวดปล้องที่ 3 (F3) ฐานหนวดมีสีเหลืองซีดและค่อยๆเข้มขึ้นจนถึงปลายหนวด หัวมีลักษณะมนมีความกว้างมากกว่าความยาว ตาเดี่ยวมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมและมีพื้นผิวขรุขระ ส่วนหลังของหัวมีลักษณะเป็นแถบสีน้ำตาล มีขนขึ้นด้านหลังเล็กน้อย มีรยางค์ฟัน (maxillary palp) 1 ปล้อง กรามมีฟัน 3 ซี่ ส่วนปลายแหลมคม อกส่วนกลางมีสีเหลือง และส่วนประกอบเหล่านี้มีสีน้ำตาลได้แก่ อกส่วนหน้า (pronotum) ส่วนกลางของ mesoscutum และส่วนกลางของ tegula axilla และ propodeum ส่วนท้องมีลักษณะเป็นรอยแกะรูปห้าเหลี่ยมอยู่ทางด้านบน ส่วนกลางหรือ mid lobe พบขนทั้งสิ้น 4 คู่ ขนมีลักษณะนิ่มและมีขนาดค่อนข้างเท่ากัน ส่วนของ scutellum มีขน 2 คู่ ส่วนของช่องตรงกลางหรือ median groove แคบและและเป็นร่องลึกเห็นได้อย่างชัดเจน tarsal formula 5-5-5 ปีกคู่หน้ามีความยาว 2-3 เท่าของความกว้าง ส่วนของ disc มีขนขึ้นอย่างสม่ำเสมอ ส่วนของ costal cell บนปีกมีขนขึ้นเป็นแถวประมาณ 9 – 10 เส้น และบริเวณส่วนปลายมีขนยาวขึ้น 1 เส้น เส้นปีก submarginal vein พบขนเส้นใหญ่ขึ้น 2 เส้น ส่วนฐานปีกพบขน 5 – 6 เส้น บริเวณตอนท้ายใกล้กับ submarginal vein ปีกมีสีขาวขุ่น มีรอยพับบางบริเวณฐานของ frenal fold ส่วนท้องมีสีเหลืองอ่อน ยกเว้นปล้องที่ 1 และ 2 มีสีน้ำตาลบางครั้งพบจุดสีน้ำตาลเข้มบริเวณท้องปล้องที่ 5 และ 6 ส่วนด้านข้างท้องมีพื้นผิวขรุขระเล็กน้อย อวัยวะสืบพันธุ์มีขนาดใกล้เคียงกับ mid tibia

เพศผู้มีสีลำตัวใกล้เคียงกับเพศเมีย แต่มีสีน้ำตาลเข้มกว่าบริเวณท้อง ส่วนหัวตอนท้ายมีแถบสีน้ำตาลบริเวณท้ายทอยของส่วนหัว ปีกมีลักษณะขุ่นถึงน้ำตาลอ่อนบริเวณกลางปีก หนวดมี 6 ปล้อง

การวินิจฉัย (Diagnosis) แตนเบียนแมลงหวี่ขาวชนิดนี้มีขนาดเล็กและใกล้เคียงกับชนิดอื่นๆ แต่สามารถจำแนกชนิดได้ชัดเจนจากสีลำตัวที่มีสีน้ำตาลและสีเหลือง บางครั้งพบสีน้ำตาลเข้ม พบชัดเจนบริเวณอกปล้องที่ 2 และบริเวณท้องปล้องกลาง

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) พบแพร่กระจายในเขตโลกเก่า (old world) ได้แก่ เขตทวีปเอเชีย ได้แก่ประเทศ อินเดีย ฟิลิปปินส์ ไทย ซูดาน อิสราเอล (Heraty & Polaszek, 2000)

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) สุพรรณบุรี ราชบุรี สมุทรสงคราม

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0001423 – 0001433, 0001440, 0001445, 0001468 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร)

ข้อสังเกต (Comments) แตนเบียนแมลงหวี่ขาวชนิดนี้แยกมากจากกลุ่ม *Encarsia strenua* complex ซึ่งเป็นกลุ่มสำคัญในการเข้าทำลายแมลงหวี่ขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* ซึ่งเป็นกลุ่มที่ควรนำมาศึกษาทดสอบประสิทธิภาพเปรียบเทียบกับชนิดอื่นเพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงหวี่ขาวศัตรูพืช

Encarsia dispersa Polaszek, 2004

Figure 1.1.9.4 – 1.1.9.5

ศรีวิชาการเกษตร

Original description: Polaszek A.D., M. Shahab Donald L. J. QuickeType: *Encarsia dispersa* original designation.

Synonyms: -

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ลำตัวมีสีเหลือถึงสีส้มอ่อนเห็นได้อย่างชัดเจน พบเส้นที่พาดผ่านระหว่าง mesoscutum และ scutellum มีสีเหลืองเข้มถึงสีน้ำตาลดำ หนวดมีสีเหลืองอ่อนถึงเหลืองซีดขาว ส่วนของฐานหนวด pedicel มีสีเหลือง ปล้องหนวดมีสีเหลือง ปล้องหนวดปล้องที่ 6 (F6) มีสีเข้มกว่าปล้องอื่นๆ ปีกมีสีขาวขุ่น ตาเดี่ยวมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมและมีพื้นผิวขรุขระ ส่วนหลังของหัวมีลักษณะเป็นแถบสีเหลืองเข้ม มีขนขึ้นด้านหลังเล็กน้อย มีรยางค์ฟัน (maxillary palp) 2 ปล้อง กรามมีฟัน 3 ซี่ ส่วนปลายแหลมคม อกส่วนกลางมีสีเหลืองได้แก่ อกส่วนหน้า (pronotum) ส่วนกลางของ mesoscutum และส่วนกลางของ tegula axilla และ propodeum ส่วนกลางหรือ mid lobe พบขนทั้งสิ้น 4 คู่ ขนมีลักษณะนิ่มและมีขนาดค่อนข้างเท่ากัน ส่วนของ scutellum มีขน 2 คู่ ส่วนของช่องตรงกลางหรือ median groove แคบและและเป็นร่องลึกเห็นได้อย่างชัดเจน tarsal formula 5-5-5 บางตัวอย่างพบ 5-4-5 ปีกคู่หน้ามีความยาว 2-3 เท่าของความกว้าง ส่วนของ disc มีขนขึ้นอย่างสม่ำเสมอ ส่วนของ costal cell บนปีกมีขนขึ้นเป็นแถวประมาณ 9 – 10 เส้น และบริเวณส่วนปลายมีขนยาวขึ้น 1 เส้น เส้นปีก submarginal vein พบขนเส้นใหญ่ขึ้น 2 เส้น ส่วนฐานปีกพบขน 4 – 6 เส้น บริเวณตอนท้ายใกล้กับ submarginal vein ปีกมีสีขาวขุ่น มีรอยพับบางบริเวณฐานของ frenal fold ส่วนท้องมีสีเหลืองอ่อน

การวินิจฉัย (Diagnosis) แตนเบียนแมลงหวี่ขาวชนิดนี้มีขนาดเล็กและใกล้เคียงกับชนิดอื่นๆ แต่สามารถจำแนกชนิดได้ชัดเจนจากสีลำตัวที่มีสีเหลืองส้ม มีเส้นสีน้ำตาลดำบางพาดผ่านระหว่างส่วน mesoscutum และ mesoscutellum ส่วนปลายหนวดมีสีเข้มกว่าปล้องอื่น

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) แตนเบียนชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดในเขตโลกใหม่ (Neotropical) และได้มีการนำเข้ามาใช้เพื่อควบคุมแมลงหวี่ขาวไยเกลียวในประเทศแถบเอเชีย ได้แก่ ได้แก่ประเทศ อินเดีย ปากีสถาน บังคลาเทศ (Heraty & Polaszek, 2000)

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) สุพรรณบุรี ปราจีนบุรี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0001333 – 0001335, 0001428, 0001440 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร)

ข้อสังเกต (Comments) แตนเบียน *Encarsia dispersa* เป็นแตนเบียนที่เข้าทำลายแมลงหวี่ขาวใยเกลียว *Aleurodicus dispersus* Russell ซึ่งเป็นศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจกลุ่มหนึ่งในประเทศไทย นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานว่าแตนเบียนชนิดนี้ยังเข้าทำลายแมลงหวี่ขาวได้อีกหลายชนิดได้แก่ *A. maritimus* Hempel, *A. pulvinatus* (Maskell), *Aleurothrixus floccosus* (Maskell), *Paraleyrodes urichii* Quaintance และ *Tetraleurodes acaciae* (Quaintance) (Polaszek *et al*., 2004) แมลงหวี่ขาวกลุ่มนี้จึงมีแนวโน้มทีจะนำมา

กรมวิชาการเกษตร

พัฒนาเพื่อทดสอบประสิทธิภาพคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพ ผลิตขยายเป็นชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมแมลงหวี่ขาวศัตรูพืชต่อไป

***Encarsia strenua* (Silvestri, 1927)**

Figure 1.1.9.6

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

Prospaltella strenua Silvestri 1927, p. 34. Holotype R, China: Macao, ex *Bemisia giffardii* (Kotinsky) on Citrus sp. (DEZA, examined). *Prospaltella strenua* Silvestri: Wu 1941, p. 103; Thompson 1953, p. 26. *Encarsia strenua* (Silvestri): Viggiani and Mazzone 1979, p. 46; Hayat 1989, p. 11, 23; Polaszek et al. 1992, p. 388 [part misidentification of *E. citri* (Ishii) and *E. protransvena* Viggiani]; Schauff et al. 1996, p. 29 (misidentification of *E. protransvena*); Viggiani and Ren 1993, p. 226; Huang and Polaszek 1998, p. 1951–1953; Heraty and Polaszek 2000:166–167.

Synonyms: *Prospaltella strenua*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

หัวมีสีซีด หนวดมีสีเหลืองถึงสีน้ำตาลเหลือง ส่วนหัวมีขนาดใหญ่โดยมีลักษณะผนังพื้นผิวขรุขระเป็นลวดลาย Antennal formula 1-1-3-3 ส่วนของฐานหนวดหรือ pedicel มีขนาดสั้นกว่าปล้องที่ 1 เล็กน้อย หนวดปล้องที่ 1 (F1) มีขนาดเท่ากับหรือใกล้เคียงกับหนวดปล้องที่ 2 นอกจากนี้หนวดปล้องที่ 1 ถึงกล้องที่ 3 รวมกันมีขนาดยาวกว่าหนวดปล้องที่เหลือรวมกันทุกปล้อง

ลักษณะส่วนอกหรือ Mesosoma มีสีเหลืองถึงสีเทา ปีกคู่หน้าใสมีสีเทาขุ่นขาว ส่วนด้านข้างของ อกมีเส้นขน 4 เส้น โดย 2 เส้นเรียงกันในแต่ละข้างของส่วนอก บนส่วนอกด้านบนเรียกว่า scutellum มีตุ่มขนเรียกว่า placoid sensilla อยู่ชิดติดกันเห็นได้อย่างชัดเจน กลุ่มขนที่อยู่บน scutellum อยู่กันเป็นคู่ คู่หน้ามีระยะห่างจากคู่หลังไม่มากนัก ความความกว้างของปีกตั้งฉากกับลำตัวมีระยะ 2 – 4 เท่าของความกว้างวัดจากขอบปีกบนลงล่าง เส้นปีกที่เรียกว่า submarginal vein มีขนขึ้น 2 เส้น

ส่วนท้อง Metasoma มีสีเหลืองถึงเหลืองซีด 3rd valvulae มีสีซีด ท้องปล้องที่ 2 ถึงปล้องที่ 7 มีขนเป็นคู่ ปล้องที่ 2 ถึงปล้องที่ 4 มีขนข้างละ 1 เส้น ปล้องที่ 5 ข้างละ 2 เส้น ปล้องที่ 6 มีขนข้างละ 3 เส้น ส่วนปล้องที่ 7 มีขน 4 เส้น อวัยวะวางไข่มีความยาวยาวกว่าครึ่งหนึ่งของ middle tibia รวมกันนอกจากมีแล้วอวัยวะวังไข่มีความยาว 1-1.5 เท่าของความยาวของ tibia

การวินิจฉัย (Diagnosis) แตนเบียนแมลงหวี่ขาวชนิดนี้มีขนาดเล็กและใกล้เคียงกับชนิดอื่นๆ แต่สามารถจำแนกชนิดได้ชัดเจนจากเส้นขนหลังตาเดี่ยวมีจำนวน 6 เส้น ลำตัวมีสีเหลืองถึงซีดจาง ท้องปล้องที่ 6 มีขน 6 เส้น ปีกคู่หน้ามีขนยาวสม่ำเสมอ อวัยวะวางไข่ยาว ยาวกว่าครึ่งของส่วนท้องและอกรวมกัน

ศรีษะเกษตร

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) จีน เปอโตริโก สเปน สหรัฐอเมริกา (Heraty &Polaszek, 2000)

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) ราชบุรี นครสวรรค์ สุพรรณบุรี ปราจีนบุรี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0001123, 0001213 - 0001215, 0001225 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร)

ข้อสังเกต (Comments) แตนเบียนแมลงหวี่ขาวในกลุ่มนี้ถือว่าเป็นกลุ่มใหญ่มีความซับซ้อนในการวินิจฉัยชนิด เข้าทำลายแมลงหวี่ขาวส้ม *Dialeurodes citri* (Aleyrodidae) เป็นหลักนอกจากนี้ยังเข้าทำลายแมลงหวี่ขาวยาสูบและแมลงหวี่ขาวที่เป็นศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด ได้แก่ *Bemisia tabaci* (Kotinsky), *D. citrifolii* (Morgan), *D. kirkaldyi*, *Trialeurodes packardi* (Morrill) เพราะฉะนั้น *Encarsia strenua* จึงเป็นแตนเบียนอีกชนิดหนึ่งที่ควรนำมาศึกษาทดสอบประสิทธิภาพเพื่อศึกษาต่อยอด และผลิตขยายควบคุมแมลงหวี่ขาวศัตรูพืชต่อไป

Eretmocerus sp. Haldeman, 1850

Figure 1.1.9.7

เป็นแตนเบียนแมลงหวี่ขาวอีกกลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญในวงศ์ Aphelinidae ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไป หนวดปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 สั้น ส่วนของ clava ไม่ได้แยกออกเป็นปล้องอย่างชัดเจน ในส่วนของเพศผู้ปล้องหนวดไม่มี funicle นอกจากนี้ clava ที่มีลักษณะค่อนข้างยาว อย่างน้อยที่สุดแปดเท่าของความกว้าง

Metaphycus sp. Mercet, 1917

Figure 1.1.9.8

เป็นแตนเบียนแมลงหวี่ขาวอีกหนึ่งสกุลพบได้จากการทดลอง ลักษณะเฉพาะของแตนเบียนกลุ่มนี้คือ อกปล้องที่ 1 หรือ pronotum ไม่ได้แยกออกจาก mesoscutum อย่างชัดเจน และทุกตัวอย่างมี notauli ซึ่งเป็นหลุมร่องยาวตั้งอยู่บน mesoscutum ซึ่งมีความยาวไปจนถึงขอบส่วนหลัง ส่วนหัวและส่วนท้องมีสีเหลือง ส้มถึงน้ำตาล ส่วนท้องและส่วนอกไม่มันวาว ในปล้องหนวดบางปล้องมีสีขาว ถึงแม้แตนเบียนชนิดนี้เข้าทำลายแมลงหวี่ขาวแต่ไม่มีรายงานว่าใช้แตนเบียนชนิดนี้ใช้ในการควบคุมแมลงหวี่ขาว

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

แตนเบียนสกุล *Encarsia* ศัตรูธรรมชาติของแมลงหวี่ขาว เป็นแตนเบียนที่มีความสำคัญใช้แก้ปัญหาการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชในประเทศไทยในปัจจุบัน เนื่องจากเมื่อแมลงหวี่ขาวเกิดการระบาด การป้องกันกำจัดมักไม่ประสบผลสำเร็จ แมลงหวี่ขาวสามารถหลบหนีจากสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช ไปซ่อนตัวในวัชพืชอาศัยบริเวณใกล้เคียงแปลงปลูกพืชหลักได้ การใช้ศัตรูธรรมชาติโดยเฉพาะแตนเบียนถือเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสามารถแก้ปัญหาดังกล่าว ผลการทดลองพบแตนเบียนแมลงหวี่ขาวสกุล *Encarsia* ทั้งสิ้น 3 ชนิด ได้แก่ *Encarsia strenua* Polaszek 1992, *Encarsia dispersa* Polaszek 2004 และ *Encarsia bimaculata*

ศรีวิชาการเกษตร

Heraty & Polaszek 2000. นอกจากนี้ยังพบแตนเบียนสกุลอื่นอีก 2 สกุลได้แก่ *Eretmocerus* sp. Haldeman, 1850 และ *Metaphycus* sp. Mercet, 1917 โดยแต่ละชนิดที่พบมีความสัมพันธ์กับแมลงอาศัยที่ค่อนข้างแตกต่างกัน เห็นได้จาก *E. dispersa* เข้าทำลายแมลงหวี่ขาวใยเกลียวเป็นหลักแต่ยังสามารถเข้าทำลายแมลงหวี่ขาวยาสูบได้ *E. bimaculate* เข้าทำลายแมลงหวี่ขาวยาสูบ และ *E. strenua* นอกจากเข้าทำลายแมลงหวี่ขาวส้มแล้วยังเข้าทำลายแมลงหวี่ขาวยาสูบด้วย การศึกษาหาแตนเบียนที่มีศักยภาพเพื่อควบคุมแมลงหวี่ขาว ต้องทราบถึงชนิดของศัตรูพืช คือ เมื่อต้องการทดสอบประสิทธิภาพของแตนเบียนแมลงหวี่ขาวยาสูบ ควรนำแตนเบียนทั้ง 3 ชนิด มาดำเนินการทดลองเพื่อให้เห็นทั้งประสิทธิภาพการเบียนและศักยภาพในการผลิตขยายและเพิ่มปริมาณ นอกจากนี้แล้วยังมีแตนเบียนอีกหลายชนิดซึ่งเป็นแตนเบียนท้องถิ่นในประเทศที่ยังไม่มีการศึกษาความหลากชนิดและนำมาใช้ประโยชน์อย่างจริงจัง จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ควรมีการศึกษาถึงความหลายทางชีวภาพของศัตรูธรรมชาติและคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่มีศักยภาพผลิตขายเป็น ชีวภัณฑ์ชนิดใหม่ต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลการทดทองการวินิจฉัยชนิดของแตนเบียนแมลงหวี่ขาวในประเทศไทย สามารถสนับสนุนและเป็นแนวทางให้นักวิชาการทางด้านการวิจัยพัฒนาการผลิตขยายชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชได้นำไปใช้ประโยชน์ในการเข้าถึงข้อมูลวิชาการที่ถูกต้องเพื่อหาแนวทางศึกษาคัดเลือกสายพันธ์ ทดสอบผลกระทบจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช วิจัยพัฒนาการผลิตขยายที่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลสำหรับเกษตรกร ส่งเสริมให้มีการรับรู้และเข้าใจถึงประโยชน์ของศัตรูธรรมชาติ เพื่อการอนุรักษ์ไม่ใช้สารเคมีที่ไม่จำเป็น ก่อให้เกิดระบบการผลิตพืชที่ปลอดภัย และเกิดความสมดุลในสภาพแวดล้อมต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

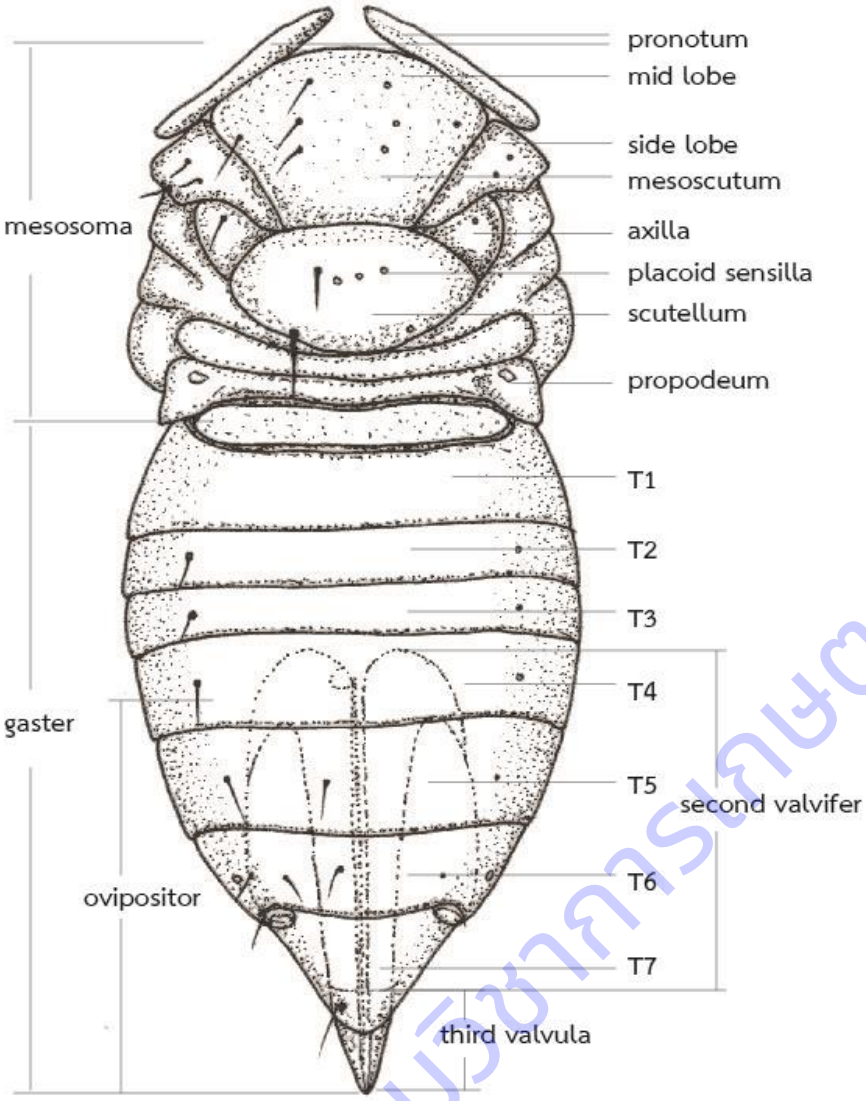
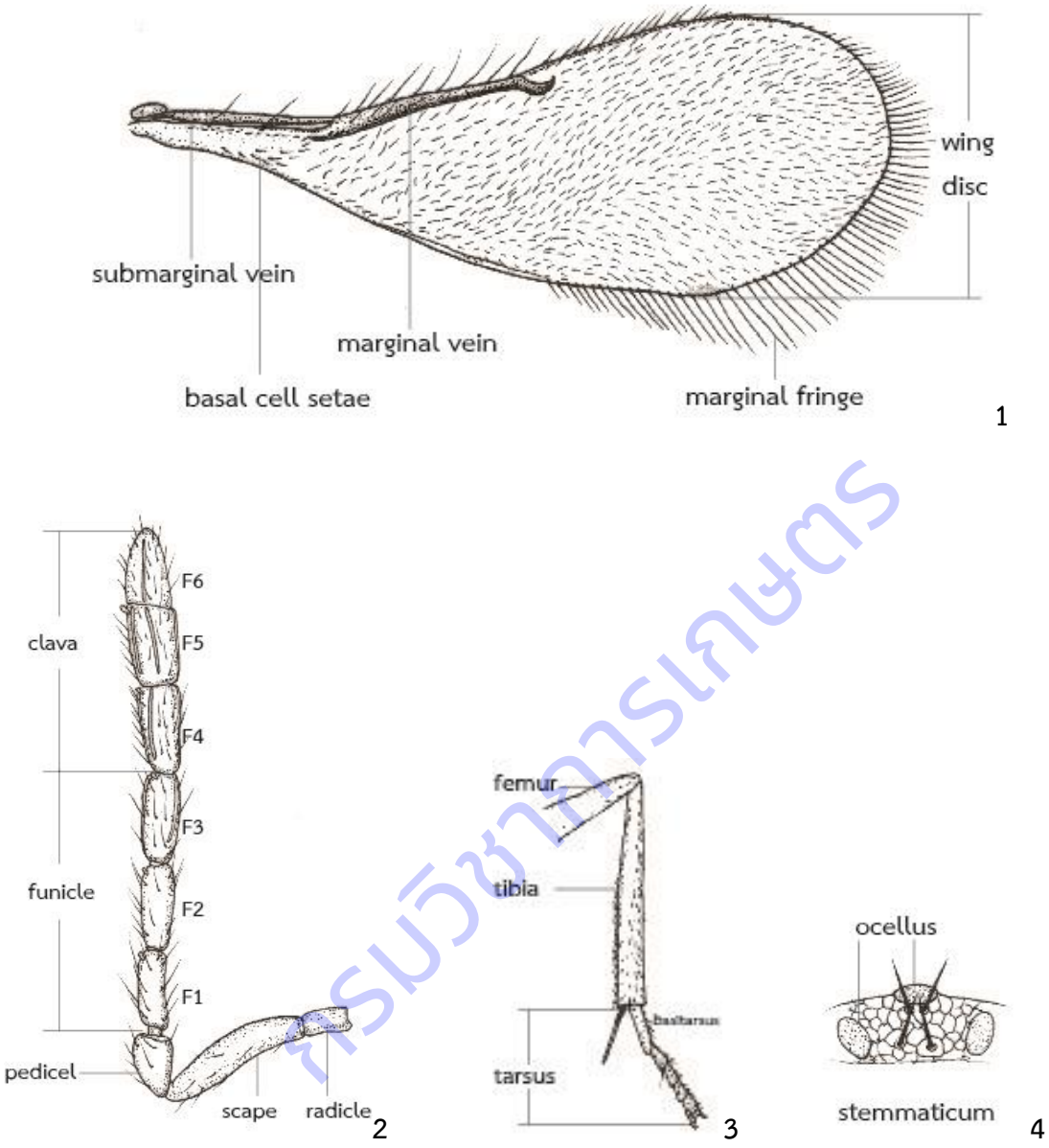


Figure 1.1.9.1. *Encarsia* general morphology; Mesosoma and Gaster (female). Image modified from Polaszek *et al.* (1999)

กรมวิชาการเกษตร



ศรีวิชาการเกษตร

Figure 1.1.9.2. *Encarsia* general morphology; 1.fore wing, 2. female antenna, 3. mid leg, and 4. stemmaticum. Image modified from Polaszek *et al*. (1999)

Figure 1.1.9.3. *Encarsia bimaculata* Heraty & Polaszek (Hymenoptera: Aphelinidae)

Figure 1.1.9.4. *Encarsia dispersa* Polaszek (Hymeoptera: Aphelinidae)

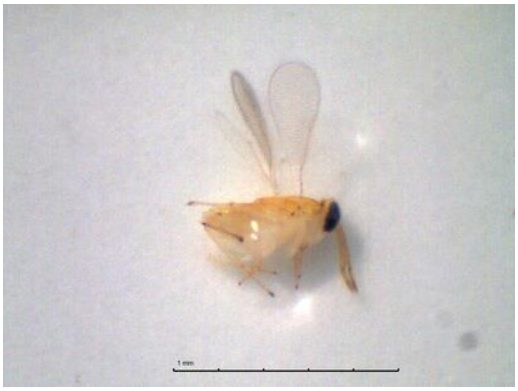


Figure 1.1.9.5. *Encarsia dispersa* Polaszek (Hymeoptera: Aphelinidae)

Figure 1.1.9.6. *Encarsia strenua* species group , (Hymenoptera: Aphilinidae)

Figure 1.1.9.7. *Eretmocerus sp.* (Hymenoptera: Aphelinidae)

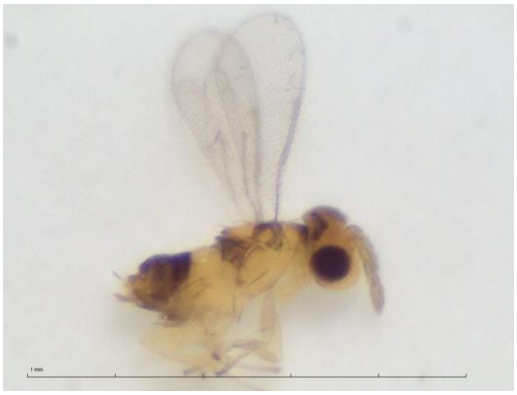


Figure 1.1.9.8. *Coccophagus* sp. (Hymenoptera: Aphilinidae), scale insect

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.10 อนุกรมวิธานของแมลงช้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ในประเทศไทย

Taxonomy of Green Lacewings (Family Chrysopidae) in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นายอาทิตย์ รักกสิกร	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นายจารุวัตถ์ แต้กุล	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวพลอยชมพู กรวิภาสเรือง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวชมัยพร บัวมาศ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นายอิทธิพล บรรณาการ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางประภัสสร เชยคำแหง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นายสิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงช้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae โดยการสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างในแปลงพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2562 และจากตัวอย่างแมลงช้างปีกใส ที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร พบว่าสามารถวินิจฉัยได้จำนวน 8 ชนิด ใน 2 วงศ์ย่อย และ 4 เผ่า คือ *Nobilinus albardae* (MacLachlan, 1875) *Ankylopteryx octopunctata* (Fabricius, 1793) *Ankylopteryx anomala* Brauer, 1 8 6 4 *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

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: *Nobilinus 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

กรมวิชาการเกษตร

be used in biological pest control, especially to control pests with sucking-mouthparts nowadays.

คำนำ

แมลงช้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae เป็นแมลงขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ลำตัวเรียวยาวและบอบบาง หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) มีตารวม 1 คู่ มักมีสีเหลืองทอง ไม่มีตาเดี่ยว ปากกัดกินแบบ orthognathous ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมักมีสีเขียวอ่อน ขาเป็นแบบขาเดิน (walking leg) มีจำนวน 3 คู่ ปีกมี 2 คู่ แบบเยื่อบาง (membranous) (ศานิต, 2550; ไสว, 2544) แมลงช้างวงศ์ Chrysopidae มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดและมีจำนวนชนิดมากที่สุดในอันดับ Neuroptera โดยมีสมาชิกในวงศ์นี้ทั่วโลกประมาณ 1,250 ชนิด ซึ่งในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบประมาณ 105 ชนิด (Brooks & Barnard, 1990; New, 2003)

แมลงช้างปีกใสหลายชนิดเป็นศัตรูธรรมชาติของศัตรูพืชที่มีความสำคัญ โดยตัวอ่อนเป็นแมลงตัวห้ำของแมลงศัตรูพืช โดยเฉพาะแมลงปากดูด ได้แก่ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยแป้ง และแมลงหวี่ขาว เป็นต้น ในปัจจุบันมีการนำแมลงช้างปีกใสบางชนิดมาใช้ควบคุมการระบาดของแมลงศัตรูพืชปากดูดที่ทำความเสียหายพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ได้ผลการป้องกันกำจัดที่ดี โดยเฉพาะในสวนไม้ผล รวมถึงพืชไร่หลายชนิด (พิมลพร และคณะ, 2544; พิมลพร, 2545; รัตนา, 2544; รัตนา และประภัสสร, 2554)

เนื่องจากงานการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี มีความสำคัญมากในการอารักขาพืชผลทางการเกษตร โดยเฉพาะในประเทศไทย ดังนั้น การศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงช้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ในประเทศไทยนี้จึงมีความสำคัญที่ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐาน และทราบชนิดของแมลงช้างปีกใสที่อาศัยในระบบนิเวศเกษตรของประเทศไทย เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี หรือคัดเลือกชนิดแมลงช้างปีกใสชนิดใหม่ๆ จากธรรมชาติของประเทศไทย มาใช้ควบคุมการระบาดของแมลงศัตรูพืชได้ดียิ่งขึ้น ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1) ตัวอย่างแมลงช้างปีกใส 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 โหลชื้น ตู้อบแมลง ฯลฯ

5) อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น Ethyl alcohol 50 - 100%, sodium hydroxide 10%, clove oil และ canabalsam เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องสไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร

กรมวิชาการเกษตร

6) กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo microscope, Compound microscope และกล้องถ่ายภาพ

7) อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ Camera lucida ปากกา roting และกระดาษไขเขียนแบบ

8) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของแมลงช้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ได้แก่ Brooks & Barnard (1990), New (1980: 2003) และ Winterton (1995)

วิธีการ

1) เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงช้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae โดยสำรวจจากแหล่งปลูกพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ มันสำปะหลัง ข้าวโพด ส้มโอ ส้มเขียวหวาน มะนาว เงาะ ลำไย ลิ้นจี่ และพืชผักต่างๆ เป็นต้น

2) การเก็บตัวอย่างแมลงช้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae แบ่งเป็น 3 วิธี ดังนี้

- การเดินสุ่มสำรวจทั่วแปลงโดยใช้สวิงจับแมลง (insect net) โฉบเพื่อเก็บตัวแมลงช้างปีกใสจากแปลงปลูกพืชในช่วงเวลากลางวัน ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า (killing jar)ซึ่งบรรจุน้ำยาเอททิล อะซิเตด (Ethyl acetate) หลังจากแมลงช้างปีกใสตายแล้ว เก็บลงในซองกระดาษสามเหลี่ยมแยกใส่ไว้ในกล่องใส่ตัวอย่างแมลง นำกล่องใส่ตัวอย่างใส่ไว้ในกล่องรักษาความเย็นอีกชั้นเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเน่าเสีย

- การใช้กับดักแสงไฟ (light trap) ติดตั้งในแปลงเกษตร เพื่อดึงดูดแมลงช้างในช่วงเวลากลางคืน คัดเลือกแมลงช้างปีกใสที่ต้องการศึกษา ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่าซึ่งบรรจุน้ำยาเอททิล อะซิเตด และเก็บตัวอย่างโดยใช้ซองกระดาษสามเหลี่ยมเช่นเดียวกัน

- การสำรวจและเก็บตัวอย่างระยะตัวอ่อนแมลงช้างปีกใส โดยการเดินสุ่มสำรวจทั่วแปลงเก็บตัวอ่อนแมลงช้างปีกใสทุกระยะใส่กล่องพลาสติกพร้อมเหยื่อศัตรูพืชที่พบ และส่วนของพืชที่พบ นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการทั้งตัวอ่อนแมลงช้างและศัตรูพืชที่เป็นเหยื่อ เพื่อศึกษาชีวประวัติ เปลี่ยนเหยื่ออาหารและทำความสะอาดกล่องเลี้ยงตัวอ่อนแมลงช้างเมื่อกล่องเลี้ยงเริ่มสกปรก 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) นำตัวอย่างแมลงช้างปีกใสจัดรูปร่าง 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 โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชนิดแมลงช้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ด้วยการใช้เอกสารแนวทางการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วินิจฉัยชนิด ประกอบกับการเปรียบเทียบตัวอย่างแมลงที่ได้จำแนกแล้วในพิพิธภัณฑ์ กรมวิชาการเกษตร สำหรับแมลงช้างปีกใสบางชนิดซึ่งมีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมากจำเป็นต้องใช้อวัยวะสืบพันธุ์ประกอบในการจำแนก ซึ่งมีขั้นตอนการทำสไลด์อวัยวะสืบพันธุ์ดังนี้

- ตัดส่วนท้องของแมลงช้างปีกใสแช่ในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10% ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หรือต้มในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10% ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 – 20 นาที

- ดูดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ออก เติมน้ำกลั่นเพื่อล้างโพแทสเซียมไฮ ดรอกไซด์ที่ยังหลงเหลืออยู่ออกให้หมด ทำซ้ำอีก 1-2 ครั้ง ย้อมสีด้วยเกจส์สเตน (Gage's slain) ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิตฟุชซิน 0.5 กรัม กรดเกลือ 10% 25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้นาน 2 - 3 นาที หรือนานถึง 12 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์ของตัวอย่างแมลงช้างปีกใสที่จะติดสีได้ง่ายหรือยาก

- ย้ายตัวอย่างลงในน้ำกลั่นเพื่อทำการผ่าเอาอวัยวะสืบพันธุ์ออกจากท้อง ถ้าเป็นเพศผู้ใช้ปากคีบปลายแหลมดึงอวัยวะสืบพันธุ์ออกจากท้องปล้องสุดท้ายได้เลย แต่ถ้าเป็นเพศเมียใช้มีดผ่าตัดผ่าผนังลำตัวด้านข้างออกเพื่อป้องกันการเสียหายของอวัยวะสืบพันธุ์ใช้ปากคีบปลายแหลมค่อยๆแยกผนังลำตัวออกจากอวัยวะสืบพันธุ์ จากนั้นใช้พู่กันเบอร์ 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 บันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของแมลงช้างปีกใสแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ ปีที่จำแนกชนิด ชื่อผู้จำแนกชนิด และรหัสกำกับตัวแมลง พิกัดภูมิศาสตร์ สถานที่ วัน/เดือน/ปี ชื่อผู้เก็บพืชที่พบ ศัตรูพืชที่เป็นเหยื่อ และวิธีการเก็บตัวอย่าง

7) จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุลและชนิดของแมลงช้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

8) จัดเก็บตัวอย่างแมลงช้างปีกใส 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

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากตัวอย่างแมลงช้างปีกใส ที่เก็บรวบรวมได้จากการสำรวจในแปลงพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2562 และตัวอย่างแมลงช้างปีกใส 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 1.1.10.2) ในแต่ละปล้องหนวด มีกลุ่มของเส้นขนเรียงตัวเป็นวงรอบปล้องหนวด จำนวน 5 ชุด..... (Subfamily Apochrysinae).....***Nobilinus albardae*** **(MacLachlan, 1875)**

1'. ที่ฐานปีกคู่หน้าพบเส้นขวางปีก basal subcostal crossvein (bsx) ปรากฏอยู่ (Figure 1.1.10.1) 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 1.1.10.3,1.1.10.4) .....(Tribe Ankylopterygini).....3

2'. ที่บริเวณปลายปีกคู่หน้าพบเส้นขวางปีก ระหว่างเส้นปีก subcosta (Sc) และ radial vein ที่ 1 (R1) จำนวนมากกว่า 2 เส้น (Figure 1.1.10.1) ส่วนฐานของ costal area มักจะไม่ขยายกว้างออก.....4

3. ที่ฐานปีกพบ intramedian cell (im-cell) ปรากฏอยู่ (Figure 1.1.10.3)..... ..... ***Ankylopteryx octopunctata*** **(Fabricius, 1793)**

3'. ที่ฐานปีกไม่พบ intramedian cell (im-cell) ปรากฏอยู่ (Figure 1.1.10.4)..... .....*Ankylopteryx anomala* Brauer, 1864

4. im-cell รูปสี่เหลี่ยม (Figure 1.1.10.5,1.1.10.6) ..... (Tribe Belonopterygini).....5

4'. im-cell รูปสามเหลี่ยม (Figure 1.1.10.1,1.1.10.7,1.1.10.8).....(Tribe Chrysopini)..... ...7

5. im-cell มีความยาวสั้นกว่า 2nd median cell (m2-cell) (Figure 1.1.10.5)..... ***Evanochrysa evanescens*** **(MacLachlan, 1869)**

5'. im-cell มีความยาวใกล้เคียงกับ 2nd median cell (m2-cell) (Figure 1.1.10.6)..... 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 1.1.10.7) ตัวแมลงช้างมีขนาดค่อนข้างเล็ก ..... ***Mallada basalis*** **(Walker, 1853)**

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

7’. ไม่มีแถบสีเหลืองพาดตามความยาวลำตัว เส้นขวางปีก gradate crossveins จำนวน 2 ชุด (og และ ig) และมีความยาวไม่เท่ากัน โดย inner gradate crossveins (ig) สั้นกว่า outer gradate crossveins (og) (Figure 1.1.10.8) ตัวแมลงช้างมีขนาดค่อนข้างใหญ่ ... ***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 1.1.10.9.)**

Subfamily Chrysopinae Schneider, 1851

Tribe Ankylopterygini Navás, 1910

Genus *Ankylopteryx* Brauer, 1864

Subgenus *Ankylopteryx* Brauer, 1864

Ankylopteryx* (*Ankylopteryx*) *octopunctata **(Fabricius, 1793) (Figure 1.1.10.10.)**

Subgenus *Sencera* Navás, 1925

Ankylopteryx* (*Sencera*) *anomala **Brauer, 1864 (Figure 1.1.10.11.)**

Tribe Belonopterygini Navás, 1913

Genus *Evanochrysa* Brooks & Barnard, 1990

Evanochrysa evanescens **(MacLachlan, 1869) (Figure 1.1.10.12.)**

Genus *Italochrysa* Principi, 1946

Italochrysa aequalis **(Walker, 1853) (Figure 1.1.10.13.)**

Italochrysa japonica **(MacLachlan, 1875) (Figure 1.1.10.14.)**

Tribe Chrysopini Schneider, 1851

Genus *Mallada* Navás, [1925]

Mallada basalis **(Walker, 1853) (Figure 1.1.10.15.)**

Genus *Plesiochrysa* Adams, 1982

Plesiochrysa ramburi **(Schneider, 1851) (Figure 1.1.10.16.)**

1. ***Nobilinus albardae*** **(MacLachlan, 1875) (Figure 1.1.10.9.)**

Apochrysa albardae MacLachlan, 1875: *Tijdschrift voor Entomologie* 18: 3.

ศรีนครินทรวิโรฒ

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

แมลงช้างขนาดใหญ่ ความยาวลำตัว ประมาณ 18 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีน้ำตาลอ่อนยาวประมาณ 20 มิลลิเมตร ในแต่ละปล้องหนวด มีกลุ่มของเส้นขนเรียงตัวเป็นวงรอบปล้องหนวดจำนวน 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 ปรากฏอยู่ ที่บริเวณปลายปีกพบเส้นขวางปีก 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 1.1.10.10.)**

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.

กรมวิชาการเกษตร

Ankylopteryx octopunctata Ghosh, 1980: Rec. Zool. Serv. India, 77: 251.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงช้างขนาดเล็กถึงขนาดกลาง 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 ปรากฏอยู่ ที่บริเวณปลายปีกไม่พบเส้นขวางปีก 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 พบว่าเหยื่อของแมลงช้างปีกใสชนิดนี้ ได้แก่ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยแป้ง แมลงหวี่ขาว (New, 2003) รวมถึงไข่และหนอนวัยอ่อนของหนอนหัวดำศัตรูมะพร้าว (Wei, C.S. *et al*., 1985)

3. ***Ankylopteryx anomala* Brauer, 1864 (Figure 1.1.10.11.)**

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];

กรมวิชาการเกษตร

Yang *et al*. 2005: 56.

Ankylopteryx exquisita (Nakahara): Tsukaguchi 1995: 131.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงช้างขนาดเล็ก ความยาวลำตัว ประมาณ 10 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีขาว ยาวประมาณ 12 มิลลิเมตร ตารวม 1 คู่ สีเหลืองทอง ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง รวมทั้งขา มีสีเขียวอ่อน ทางด้านหลังของปล้องอกมีแถบสีดำขนาดใหญ่พาดจรดฐานปีก ความยาวของปีกหน้า ประมาณ 10 มิลลิเมตร ปีกคู่หน้ามีขนาดใหญ่กว่าคู่หลังเล็กน้อย โดยเฉพาะส่วนฐานของ costal area จะขยายกว้างออก ที่ฐานปีกไม่พบ im-cell ปรากฏอยู่ ที่บริเวณปลายปีกพบเส้นขวางปีก ระหว่างเส้นปีก subcosta และ radial vein ที่ 1 จำนวน 1 เส้น ที่บริเวณปีก พบจุดสีดำในปีกคู่หน้าแต่ละข้าง 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: ตัวอย่างที่ได้รวบรวมจากกับดักแมลงวันผลไม้ จากการสืบค้นเอกสาร พบว่าแมลงช้างชนิดนี้เพศผู้ตอบสนองต่อสาร methyl eugenol จึงมักพบแมลงช้างชนิดนี้ในกับดักแมลงวันผลไม้ที่ใช้สารนี้เป็นสารดึงดูดแมลงวันผลไม้ และในดอกไม้บางชนิดที่สร้างสารชนิดนี้ (Breitkreuz *et al*., 2015)

4. ***Evanochrysa evanescens*** **(MacLachlan, 1869) (Figure 1.1.10.12.)**

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

แมลงช้างขนาดใหญ่ 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 ที่บริเวณ

กรมวิชาการเกษตร

ปลายปีกพบเส้นขวางปีก gradate crossveins จำนวน 2 ชุด (og และ ig) ปีกคู่หลังมี pterostigma ไม่มีลวดลายบนปีกทั้ง 2 คู่

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: มาเลเซีย และอินโดนีเซีย (New, 2003)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเพชรบุรี

ฤดูกาลที่พบ: เดือนเมษายน

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ศึกษา ได้จากกับดักแสงไฟ

5. ***Italochrysa aequalis*** **(Walker, 1853) (Figure 1.1.10.13.)**

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

แมลงช้างขนาดกลาง 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 1.1.10.14.)**

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

กรมวิชาการเกษตร

แมลงช้างขนาดกลาง ความยาวลำตัว ประมาณ 13 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีน้ำตาลเข้มยาวประมาณ 15 มิลลิเมตร ตารวม 1 คู่ สีเหลืองทองอมเขียว ส่วนหัวและส่วนอกปล้องแรก มีสีขาวและมีแถบสีแดงพาดทางด้านหลัง 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 1.1.10.15.)

Chrysopa basalis Walker, 1853: List of the specimens of neuropterous insects in the collection of the British Museum. Part II.: 239.

Chrysopa microphya 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.

กรมวิทยาศาสตร์

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

แมลงช้างขนาดค่อนข้างเล็ก ความยาวลำตัว ประมาณ 10 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีน้ำตาลอ่อนยาวประมาณ 15 มิลลิเมตร ตารวม 1 คู่ สีเหลืองทองอมเขียว ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง รวมถึงขา มีสีเขียวอ่อน มีแถบสีเหลืองพาดตามความยาวลำตัว จากอกปล้องแรกถึงปลายส่วนท้อง ปีกทั้ง 2 คู่มี pterostigma สังเกตได้ชัดในเพศผู้ และจางลงในเพศเมีย ความยาวของปีกหน้า ประมาณ 10 มิลลิเมตร ที่ฐานปีกพบ im-cell รูปทรงสามเหลี่ยมปรากฏอยู่ ที่บริเวณปลายปีกพบเส้นขวางปีก 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 และกรุงเทพมหานครฯ

ฤดูกาลที่พบ: พบได้ตลอดทั้งปี

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ศึกษา ได้ตัวเต็มวัยจากกับดักแสงไฟ และตัวอ่อนจากแปลงปลูกพืชเศรษฐกิจ โดยส่วนมากมักพบในแปลงไม้ผลที่มีความร่มเงาและความชื้นสูง ได้แก่ ส้ม เงาะ ลำไย และมะม่วง โดยพบว่าเหยื่อของแมลงช้างปีกใสชนิดนี้ ได้แก่ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยหอย เพลี้ยแป้ง และแมลงหวี่ขาว

8. ***Plesiochrysa ramburi* (Schneider, 1851) (Figure 1.1.10.16.)**

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 deutera 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.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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

แมลงช้างขนาดกลางถึงค่อนข้างใหญ่ ความยาวลำตัว ประมาณ 12 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีน้ำตาลอ่อนยาวประมาณ 15 มิลลิเมตร ตารวม 1 คู่ สีเหลืองทองอมเขียว ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง รวมถึงขา มีสีเขียว ปีกทั้ง 2 คู่มี pterostigma ความยาวของปีกหน้า ประมาณ 15 มิลลิเมตร ที่ฐานปีกพบ im-cell รูปทรงสามเหลี่ยมปรากฏอยู่ ที่บริเวณปลายปีกพบเส้นขวางปีก gradate crossveins จำนวน 2 ชุด (og และ ig) และมีความยาวไม่เท่ากัน โดย inner gradate crossveins (ig) สั้นกว่า outer gradate crossveins (og) ไม่มีลวดลายบนปีกทั้ง 2 คู่

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: พบเขตการแพร่กระจายกว้างทางภูมิภาคตะวันตกของมหาสมุทรแปซิฟิก 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 ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา ระยอง จันทบุรี นครปฐม กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และกรุงเทพมหานครฯ

ฤดูกาลที่พบ: พบได้ตลอดทั้งปี

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ศึกษา ได้ตัวเต็มวัยจากกับดักแสงไฟ และตัวอ่อนจากแปลงปลูกพืชเศรษฐกิจ โดยส่วนมากมักพบในแปลงพืชไร่และพืชผัก ที่มีแสงแดดจัด ได้แก่ มันสำปะหลัง มะเขือ และกระเจี๊ยบมอญ โดยพบว่าเหยื่อของแมลงช้างปีกใสชนิดนี้ ได้แก่ เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยหอย เพลี้ยแป้ง และแมลงหวี่ขาว

จากการสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงช้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ในแปลงพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย สามารถพบแมลงช้างปีกใสจำนวน 8 ชนิด ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะในสภาพแปลงเกษตร มักมีการปลูกพืชเศรษฐกิจเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง ไม่มีความหลากหลายของพืชและแมลงเหยื่อ อีกทั้งมีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช อาจเป็นเหตุให้พบจำนวนชนิดแมลงช้างปีกใสไม่มากนัก

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงช้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae โดยการสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างในแปลงพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2562 และจากตัวอย่างแมลงช้างปีกใส ที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร พบว่าสามารถวินิจฉัยได้จำนวน 8 ชนิด ใน 2 วงศ์ย่อย และ 4 เผ่า คือ *N. albardae A. octopunctata A. anomala E. evanescens I. aequalis I. japonica M. basalis* และ *P. ramburi* โดยชนิดเด่นที่สามารถพบได้ทุกภูมิภาคของประเทศไทย และพบได้เกือบตลอดทั้งปี

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

มีจำนวน 3 ชนิด คือ *A. anomala M. basalis* และ *P. ramburi* ทั้งนี้ชนิด *M. basalis* และ *P. ramburi* เป็นแมลงตัวห้ำที่มีความสำคัญทางการเกษตร โดยมีการนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี โดยเฉพาะกลุ่มแมลงปากดูด เช่น เพลี้ยอ่อน เพลี้ยหอย เพลี้ยแป้ง และแมลงหวี่ขาว ได้ในปัจจุบัน นอกจากนี้หากมีการสำรวจแมลงช้างปีกใส ในพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากกว่าในพื้นที่เกษตรกรรมซึ่งมักพบความหลากหลายทางชีวภาพน้อย อีกทั้งการศึกษาชีววิทยาของแมลงช้างปีกใสชนิดนั้นๆ ควบคู่กันกับการสำรวจ อาจทำให้สามารถค้นหาชนิดใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธีได้ในอนาคต

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

งานวิจัยนี้ เป็นงานวิจัยพื้นฐาน เพื่อรวบรวมข้อมูลทางอนุกรมวิธาน เขตการแพร่กระจาย และฤดูกาลที่พบ ของแมลงช้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ในประเทศไทย ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัยชนิดของแมลงช้างปีกใสที่พบในแปลงเกษตร และนำไปใช้ตัดสินใจคัดเลือกชนิดแมลงช้างชนิดที่เป็นชนิดพื้นถิ่นของประเทศไทย เพื่อคัดเลือกชนิดใหม่ๆ นำมาใช้ในงานวิจัยด้านการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธีได้

กรมวิชาการเกษตร

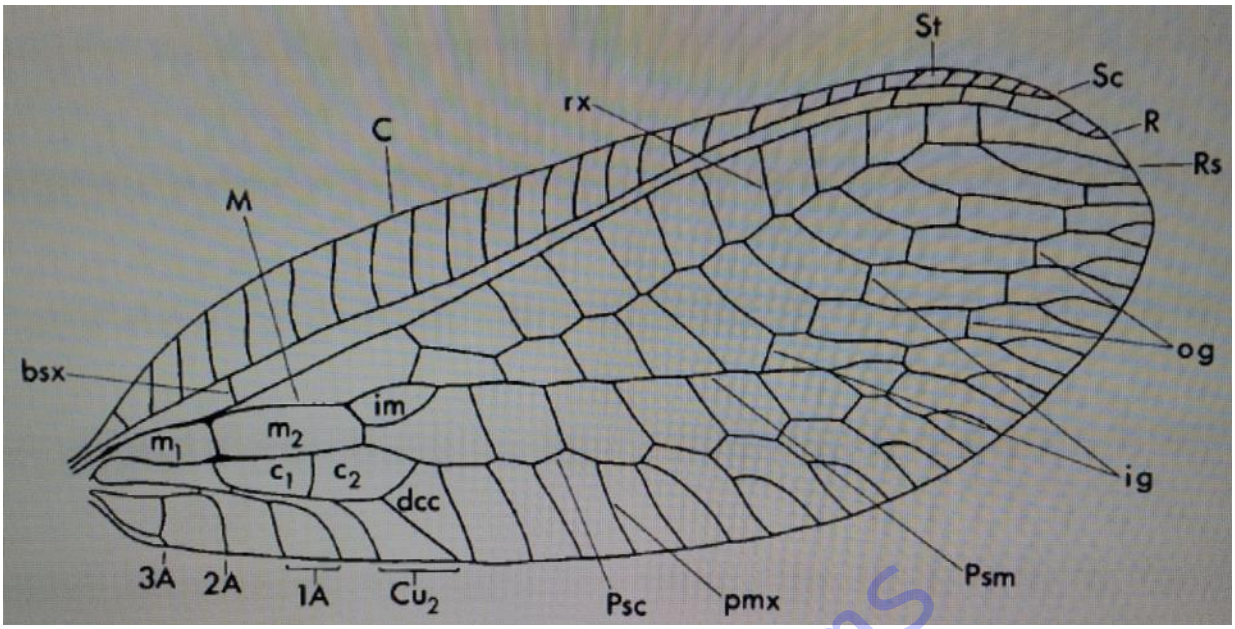


Figure 1.1.10.1. Wing venetion pattern in fore wing of the green lacewings (Tribe Chrysopini). bsx; basal subcostal crossvein, ig; inner gradate crossveins, im; intramedian cell, m_1 and m_2; 1st and 2nd median cell, og; outer gradate crossveins, R; radius, Rs; radial sector, Sc; subcosta, St; pterostigma. (From: Brooks & Barnard, 1990)

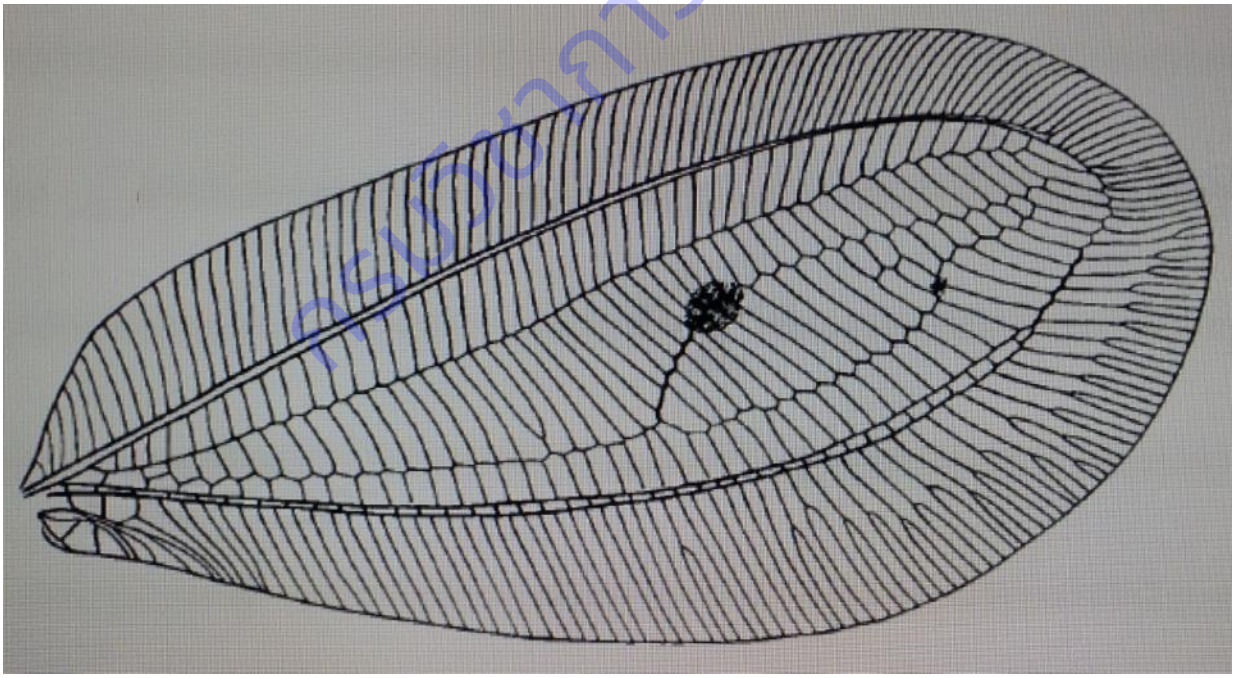


Figure 1.1.10.2. Wing venetion pattern in fore wing of the green lacewings; genus *Nobilinus*. (From: Brooks & Barnard, 1990)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

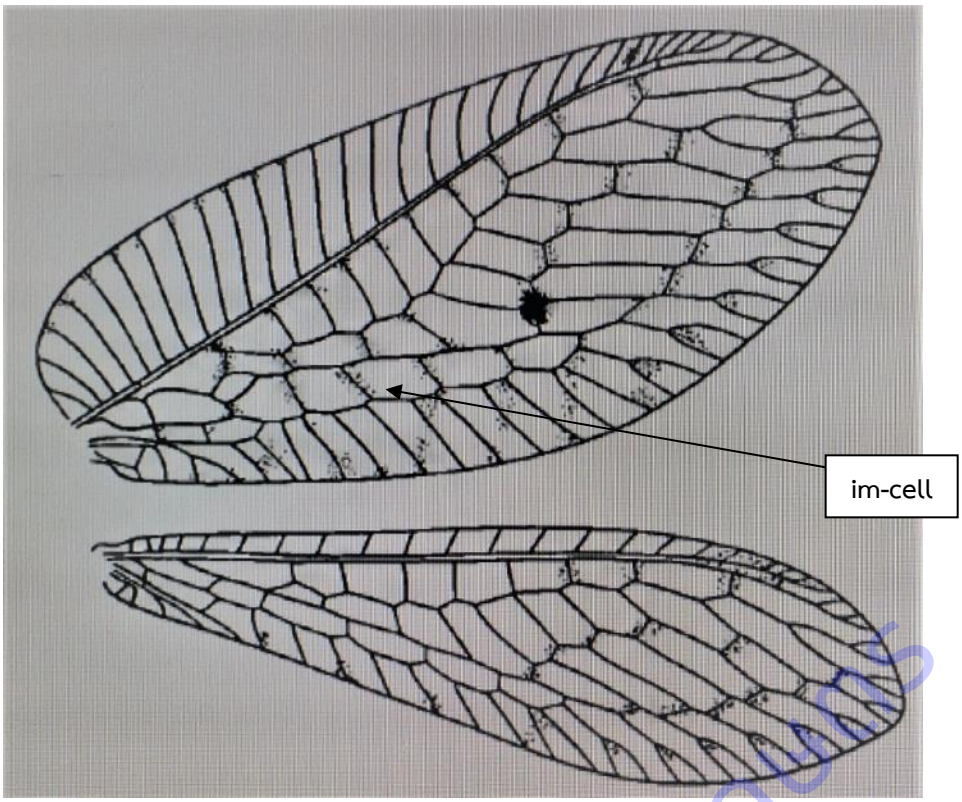


Figure 1.1.10.3. Wing venetion pattern in fore wing of the green lacewings; genus *Ankylopteryx*, subgenus *Ankylopteryx*. (From: Brooks & Barnard, 1990)

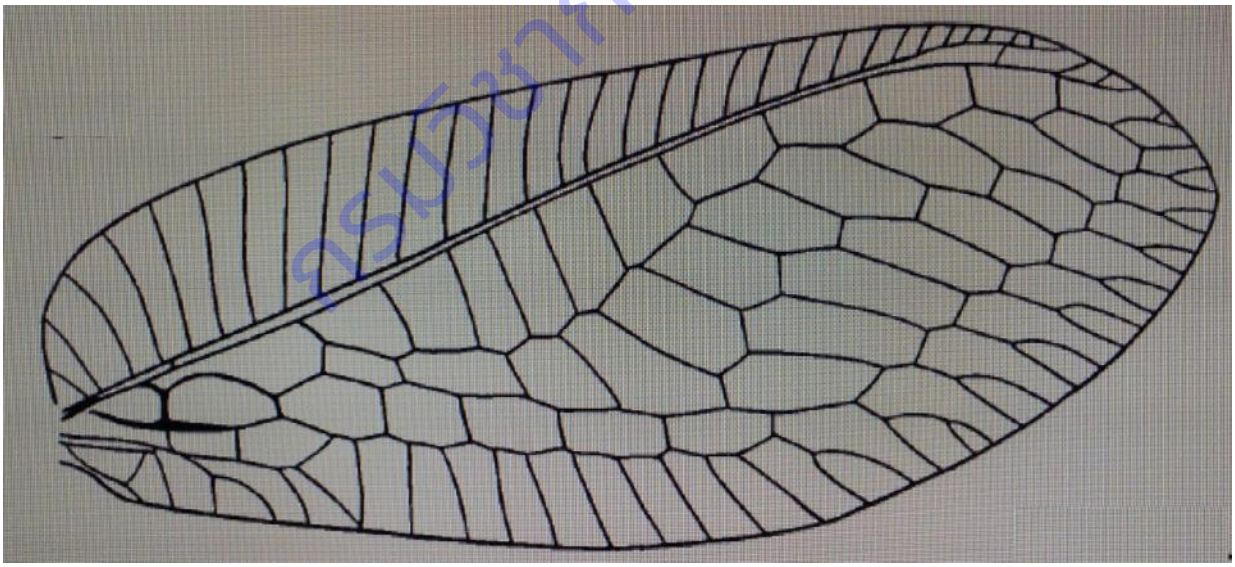


Figure 1.1.10.4. Wing venetion pattern in fore wing of the green lacewings; genus *Ankylopteryx*, subgenus *Sencera*. (From: Brooks & Barnard, 1990)

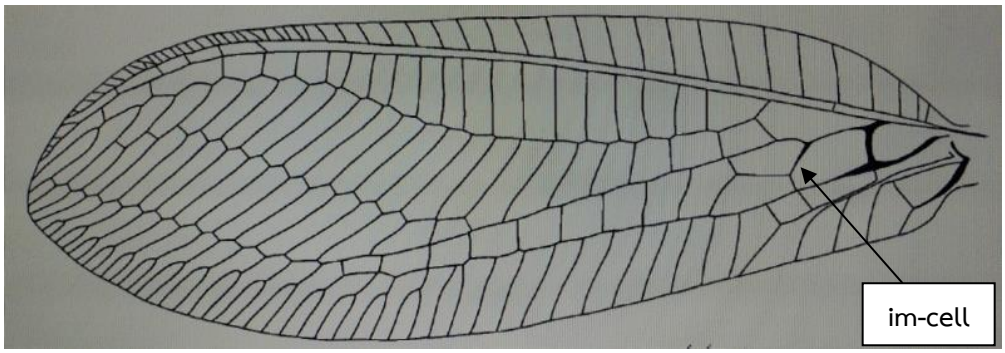


Figure 1.1.10.5. Wing venetion pattern in fore wing of the green lacewings; genus *Evanochrysa*.

(From: Brooks & Barnard, 1990)

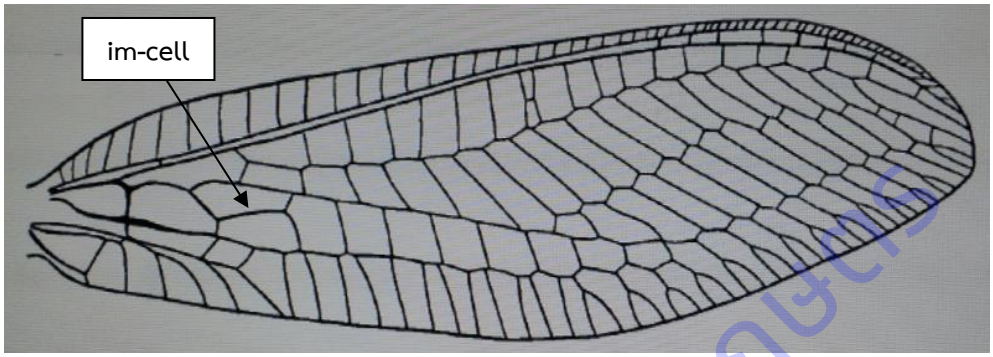


Figure 1.1.10.6. Wing venetion pattern in fore wing of the green lacewings; genus *Italochrysa*.

(From: Brooks & Barnard, 1990)

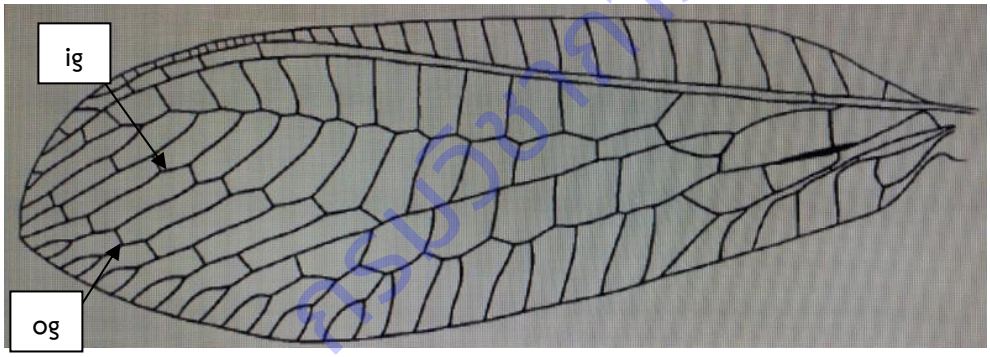


Figure 1.1.10.7. Wing venetion pattern in fore wing of the green lacewings; genus *Mallada*.

(From: Brooks & Barnard, 1990)

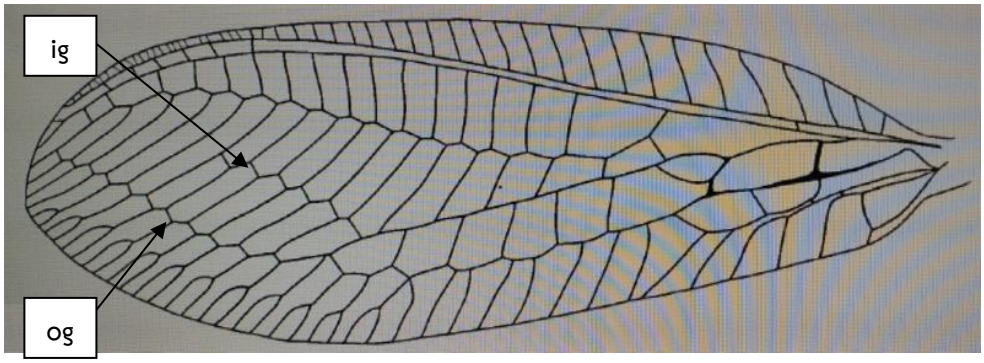


Figure 1.1.10.8. Wing venetion pattern in fore wing of the green lacewings; genus *Plesiochrysa*.

(From: Brooks & Barnard, 1990)

Figure 1.1.10.9. *Nobilinus albardae* (MacLachlan, 1875) male.

Figure 1.1.10.10. *Ankylopteryx* (*Ankylopteryx*) *octopunctata* (Fabricius, 1793) male.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.10.11. *Ankylopteryx* (*Sencera*) *anomala* Brauer, 1864 male.

Figure 1.1.10.12. *Evanochrysa evanescens* (MacLachlan, 1869) male (left) female (right).

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.10.13. *Italochrysa aequalis* (Walker, 1853) male (left) female (right).

Figure 1.1.10.14. *Italochrysa japonica* (MacLachlan, 1875) male.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.10.15. *Mallada basalis* (Walker, 1853) male (left) female (right).

Figure 1.1.10.16. *Plesiochrysa ramburi* (Schneider, 1851) male (left) female (right).

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.11 อนุกรมวิธานมวนตัวห้ำสกุล *Orius* (Heteroptera: Anthocoridae) ในประเทศไทย
Taxonomy of the genus *Orius* (Hemiptera: Anthocoridae) in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	จอมสุรางค์ ดวงธิสาร	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	จารุวัตถ์ แต้กุล	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ยุวรินทร์ บุญทบ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ชมัยพร บัวมาศ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	อิทธิพล บรรณาการ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	เกศสุดา สนศิริ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

มวนในสกุล *Orius* Wolff (Hemiptera: Heteroptera: Anthocoridae) จัดเป็นมวนตัวห้ำที่มีขนาดเล็กและเป็นศัตรูธรรมชาติที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง มีศักยภาพในการกินศัตรูพืชได้หลายชนิด การศึกษาอนุกรมวิธานของมวนตัวห้ำสกุลนี้ มีการศึกษาโดยนักอนุกรมวิธานในหลายประเทศ โดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่น มีการสำรวจและวินิจฉัยมวนสกุลนี้แล้ว 7 ชนิด สำหรับในประเทศไทยข้อมูลของมวนตัวห้ำในสกุล *Orius* ยังมีอยู่น้อยมาก วัตถุประสงค์ของการศึกษาคือ เพื่อทราบชนิด ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เขตการแพร่กระจาย ศัตรูพืชที่เป็นเหยื่อของมวนตัวห้ำ พืชอาศัยของศัตรูพืช เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นด้านกีฏวิทยา จากการศึกษาอนุกรมวิธานมวนตัวห้ำสกุล *Orius* ในประเทศไทยระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – เดือนกันยายน 2562 โดยการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างมวนตัวห้ำสกุลนี้จากแปลงปลูกพืชทางการเกษตร ในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งได้ทำการศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอก ผ่าศึกษาอวัยวะสืบพันธุ์ และวิเคราะห์ชนิด ผลการศึกษาสามารถจำแนกมวนตัวห้ำสกุลนี้ได้ 4 ชนิด ได้แก่ *Orius dravidiensis* Muraleedharan, *Orius tantillus* (Motschulsky), *Orius maxidentex* Ghauri และ *Orius minutus* (Linnaeus) ทั้ง 4 ชนิดพบดูดกินเพลี้ยไฟ แมลงหวี่ขาว ไร เป็นต้น ซึ่งผลการศึกษาสามารถใช้คัดเลือกชนิดมวนตัวห้ำในสกุลนี้มาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ อนุกรมวิธาน มวนสกุล *Orius* มวนตัวห้ำ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Abstract

The genus *Orius* Wolff (Hemiptera: Heteroptera: Anthocoridae) is a small true bug, one of the most important natural enemies. As the insect predators, they can consume several pests. Taxonomic records of this predator have been reported as in several countries, especially in Japan in which 7 species were described. In Thailand, nonetheless, the taxonomic study of the genus has not yet been profoundly carried out. The goals of this research are to explore the species richness of the genus as well as its distribution and biology, to help strengthening the knowledgebase of Entomology. This taxonomic study was implemented from October 2016 to September 2019; the survey and collecting were executed on agricultural crops in Central, North, Northeast, East, West and South of Thailand. The species validation is mainly done via morphological characters, specifically on genitalia dissections. The results reveal that the genus is comprised of 4 known species: *Orius dravidiensis* Muraleedharan, *Orius tantillus* (Motschulsky), *Orius maxidentex* Ghauri, and *Orius minutus* (Linnaeus). These 4 species feed on thrips whiteflies and mites. This results can use for select important species of genus *orius* to efficient biological control.

Keyword Taxonomy, Genus *Orius*, True bug predator

คำนำ

มวนในสกุล *Orius* จัดอยู่ในวงศ์ Anthocoridae อันดับ Hemiptera จัดเป็นมวนที่มีขนาดเล็กและเป็นมวนตัวห้ำที่สามารถกินเหยื่อ (ศัตรูพืช) ที่พบในแปลงปลูกพืชทางการเกษตรได้หลายชนิด เช่น เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ แมลงหวี่ขาว และไร เป็นต้น ลักษณะเด่นของมวนสกุล *Orius* ที่ทำให้เป็นมวนตัวห้ำที่มีประสิทธิภาพคือ สามารถกินเหยื่อได้หลายชนิด อาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกันกับเหยื่อ และสามารถขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณในธรรมชาติได้ค่อนข้างง่าย มวนตัวห้ำในสกุลนี้หลายชนิดเป็นแมลงศัตรูธรรมชาติที่มีศักยภาพสำหรับใช้ควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี และมีการนำมาใช้ในการควบคุมศัตรูพืชอย่างแพร่หลายในประเทศต่างๆ เช่น ในทวีปอเมริกาเหนือ พบว่า มวนตัวห้ำ *Orius insidiosus* (Say) สามารถนำมาใช้ควบคุมเพลี้ยไฟได้ดี (Yasunaga, 1977a; Hernández and Stonedahl, 1999) เช่นเดียวกับในประเทศเกาหลี พบว่า มวนตัวห้ำ *Orius strigicollis* (Poppius) และ *Orius laevigatus* (Fieber) สามารถนำมาใช้ควบคุมเพลี้ยไฟในโรงเรือนกระจกได้ (Kim *et al*. 2008) ปัจจุบันมีการผลิตมวนตัวห้ำสกุลนี้เป็นการค้าอย่างแพร่หลาย เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชแบบผสมผสาน (IPM Program) (Pericart, 1972) ในการศึกษาอนุกรมวิธานของมวนตัวห้ำสกุลนี้ มีการศึกษาโดยนักอนุกรมวิธานในหลายประเทศ เช่น ในประเทศญี่ปุ่น มีการสำรวจและจัดจำแนกมวนสกุลนี้แล้ว 7 ชนิด ได้แก่ *Orius miyamotoi* Yasunaga, *Orius atratus* Yasunaga, *O. minutus* (Linnaeus), *O. strigicollis*, *Orius sauteri* (Poppius), *Orius nagaii* Yasunaga และ *O. tantillus* (Motschlsky) (Yasunaga, 1997a,b,c) สำหรับในประเทศไทยข้อมูล

กรมวิชาการเกษตร

ของมวนตัวห้ำในสกุล *Orius* ยังมีอยู่น้อยมาก และยังไม่เคยมีการศึกษาอนุกรมวิธานของมวนตัวห้ำในสกุลนี้มาก่อน

ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานมวนตัวห้ำสกุล *Orius* เพื่อทราบชื่อชนิดที่ถูกต้อง ลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา เขตการแพร่กระจายของมวนตัวห้ำ ศัตรูพืชที่เป็นเหยื่อของมวนตัวห้ำ และพืชอาศัยของศัตรูพืช เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นด้านกีฏวิทยา และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อยอดสู่งานวิจัยอื่นๆ เช่น ข้อมูลทางด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา การอนุรักษ์และพัฒนาบทบาทของมวนตัวห้ำเหล่านี้ให้มีศักยภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1) ตัวอย่างมวนตัวห้ำสกุล *Orius* ที่รวบรวมได้จากแหล่งปลูกพืชผัก ไม้ดอก และข้าวโพด

2) อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงโฉบแมลง ถุงพลาสติก ขวดฆ่าแมลง ขวดดองแมลง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถังรักษาความเย็นและเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)

3) สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง เช่น เอทิลอะซีเตท แอลกอฮอล์ 80%

4) อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง ได้แก่ เข็มไร้สนิมเบอร์ 3 เข็มหมุดหัวกลม ไม้จัดรูปร่างแมลง ปากคีบ (forcep) ตู้อบแมลง ฯลฯ

5) อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น alcohol 80% Potassium hydroxide 10% และ canabalsam เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องสไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร

6) กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope compound microscope และกล้องถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์

7) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของมวนตัวห้ำสกุล *Orius*

- วิธีการ

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างมวนตัวห้ำสกุล *Orius* จากแหล่งปลูกพืชทางการเกษตร เช่น ข้าวโพด พริก โหระพาฯลฯ ที่พบแมลงศัตรูพืช ซึ่งเป็นอาหารของมวนตัวห้ำ เช่น เพลี้ยไฟ แมลงหวี่ขาว เพลี้ยอ่อน และไร เป็นต้น ในเขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย น่าน พะเยา เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน แพร่ ลำปาง ลำพูน อุตรดิตถ์ พิษณุโลก สุโขทัย เพชรบูรณ์ พิจิตร กำแพงเพชร และนครสวรรค์ เป็นต้น เขตภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดลพบุรี ชัยนาท อุทัยธานี สิงห์บุรี อ่างทอง สระบุรี พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี และนครปฐม เป็นต้น เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดกาฬสินธุ์ ขอนแก่น มหาสารคาม หนองคาย นครพนม อุดรธานี และร้อยเอ็ด เป็นต้น เขตภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดปราจีนบุรี จันทบุรี และสระแก้ว เป็นต้น เขตภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี เป็นต้น และเขตภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร พัทลุง กระบี่ นครศรีธรรมราช และตรัง เป็นต้น

กรมวิชาการเกษตร

2) ทำการใช้สวิงโฉบต้นพืช ที่พบตัวเต็มวัยมวนตัวห้ำเกาะอยู่ นำตัวอย่างมวนตัวห้ำที่เก็บรวบรวมพร้อมพืชอาศัยใส่ถุงพลาสติก และทำการเก็บรักษาตัวอย่างมวนตัวห้ำเพื่อนำไปจัดรูปร่าง โดยนำพู่กันเขี่ยมวนตัวห้ำจากพืชอาศัยโดยใส่ลงในขวดแอลกอฮอล์ 80 เปอร์เซ็นต์

3) การบันทึกข้อมูล ได้แก่ ชื่อพืชอาศัยของแมลงศัตรูพืช และชนิดศัตรูพืชที่เป็นอาหารของมวนตัวห้ำ สถานที่ที่พบ วัน/เดือน/ปี พิกัดภูมิศาสตร์ ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ลักษณะการเป็นตัวห้ำ และข้อมูลอื่นๆ ในระบบนิเวศน์ที่สามารถบันทึกได้

4) นำตัวอย่างมวนตัวห้ำที่เก็บรวบรวมได้จากแปลงปลูกพืชของเกษตรกรมาจัดรูปร่าง จากนั้นนำไปอบให้แห้งในตู้อบ (oven) ปรับอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 5-7 วัน พร้อมทั้งบันทึกข้อมูลหมายเลข (Lot number) ตัวอย่างในแต่ละครั้งที่ทำการสำรวจอย่างละเอียด

5) นำตัวอย่างมวนตัวห้ำบางส่วนมาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยา เช่น ขนาดลำตัว รูปร่าง สี ลักษณะของส่วนหัว อก ท้อง และผ่าดูลักษณะรูปร่างของอวัยวะสืบพันธุ์ (genitalia) ใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope เพื่อนำไปเปรียบเทียบกันแต่ละชนิด โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยของ Carayon (1972), Pericart (1972) และ Yasunaga (1997a, 1997b) มวนตัวห้ำสกุล *Orius* นี้ มีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมากจึงต้องใช้อวัยวะสืบพันธุ์ (genitalia) ในการจำแนกชนิด ซึ่งมีขั้นตอนการทำสไลด์ ดังนี้

- นำมวนตัวห้ำมาต้มในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 % ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 นาที เนื่องจากแมลงตัวเล็กจึงไม่ควรใช้เวลาในการต้มตัวอย่างนานมาก เพราะจะทำให้ตัวอย่างเปื่อยได้ง่าย
- นำตัวอย่างที่ต้มมาพักไว้จนเย็น ย้ายลงใน petridish และเติมแอลกอฮอล์ 80 เปอร์เซ็นต์ลงไป จากนั้นส่องดูตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์ stereo microscope จะพบส่วนของ genitalia อยู่ภายในบริเวณปลายส่วนท้อง
- ทำการตัดบริเวณปลายส่วนท้องของแมลง แยกส่วนท้องและส่วนลำตัวออกจากกัน โดยส่วนลำตัวจะเก็บไว้จัดรูปร่างตัวอย่างแห้ง และส่วนท้องจะนำไปแยกส่วนของ genitalia ต่อไป (บันทึกหมายเลขส่วนของลำตัวและส่วนท้องของแมลงในแต่ละตัวที่ทำการแยกชิ้นส่วน เพื่อให้ทราบว่าชิ้นส่วนที่ทำการแยกเป็นของแมลงตัวเดียวกัน)
- นำส่วนท้องที่ได้มาแยกส่วนเนื้อเยื่อต่างๆ ของแมลงออกด้วยปากคีบ (forcep) ขนาดเล็ก จนเหลือเฉพาะส่วนของ genitalia (ขั้นตอนนี้ทำภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope)
- ทำการล้าง genitalia ของมวนตัวห้ำด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด จากนั้นนำ genitalia ที่ได้มาทำสไลด์แก้ว โดยวางบนสไลด์ที่หยดน้ำยา canada balsam ทำการจัดรูปร่าง genitalia แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 4 - 6 สัปดาห์ จึงนำออกมาศึกษา

6) ถ่ายภาพลักษณะต่างๆ ที่พบภายนอก ส่วนหัว อก ท้อง และอวัยวะสืบพันธุ์ (genitalia) ของมวนตัวห้ำสกุล *Orius* ที่ได้จากการศึกษา

กรมวิชาการเกษตร

7) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง (มวนตัวห้ำสกุล *Orius* ทุกชนิดที่รายงานไว้ต้องเก็บรักษาตัวอย่างจริงไว้เพื่อการตรวจสอบ สืบค้นและอ้างอิงในภายหลัง)

- เวลาและสถานที่ : เดือนตุลาคม 2560 ถึง เดือนกันยายน 2562

1. แปลงปลูกพืชผัก ไม้ดอก และข้าวโพด ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย
2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง
   กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาอนุกรมวิธานมวนตัวห้ำสกุล *Orius* จากแหล่งปลูกพืชทางการเกษตร เช่น พืชผักและไม้ดอก (ข้าวโพด โหระพา แมงลัก พริก ดาวเรือง) ในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ของประเทศไทย โดยทำการวิเคราะห์ชนิดโดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Carayon (1972), Pericart (1972) และ Yasunaga (1997a, 1997b) สามารถจำแนกชนิดได้ 4 ชนิด ได้แก่ *O. dravidiensis*, *O. tantillus, O. maxidentex* และ *O. minutus* โดยมีรายละเอียดดังนี้

Genus *Orius* Wolff, 1811

Orius Wolff, 1811 : iv. Type species by monotype: *Salda nigra* Wolff, 1811; Zimmerman 1948: 170 (key, note); Wagner 1952: 23 (redescription); Yasunaga 1997a: 358 (diagnosis, discussion); Bu and Zheng 2001: 185 (redescription); Yasunaga 2001: 287 (note); Ghahari *et al*. 2009: 50 (list); Jung *et al*. 2011: 65 (diagnosis); Jung *et al*. 2013: 424 (catalogue)

Triphleps Fieber, 1860: 266. Type species by subsequent designation (Kirkaldy 1906: 120): *Salda nigra* Wolff (Syn. Schumacher 1922: 338); Reuter 1884: 643 (redescription); Distant 1906: 8 (diagnosis); Champion 1900: 326 (note)

ลำตัวมีขนาดเล็ก แบนเป็นวงรี ยาวประมาณ 1.5-3.0 มิลลิเมตร มีสีน้ำตาลจนถึงดำ ส่วนหัวด้านบนมีความยาวมากกว่าความกว้าง (วัดรวมตารวม) หนวดมี 4 ปล้อง หนวดของเพศผู้มีความหนากว่าเพศเมีย อกปล้องแรกมีแผ่นโค้งนูน (callus) กว้างเห็นชัดเจน ปีกคู่หน้าคลุมมิดส่วนท้อง ปีกส่วนกึ่งแข็งกึ่งอ่อน (hemelytra) มีเส้นปีก (vein) 3 เส้น ปีกส่วนเยื่อบาง (membrane) ไม่มีเส้นปีก อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (paramere) มีลักษณะกลมส่วนมากจะพบแผ่นแข็งเล็กๆ อยู่ติดกับส่วนบนของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (denticule) และส่วนที่ยื่นออกมาคล้ายหาง (flagellum) เห็นได้ชัดเจน อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย มีท่ออวัยวะสืบพันธุ์ (copulatory tube) อยู่ฐานของอวัยวะวางไข่ (ovipositor) ซึ่งอยู่ระหว่างท้องปล้องที่ 7 และ 8 (figure 1.1.11W-Z2)

กรมวิชาการเกษตร

แนวทางการวินิจฉัยในระดับชนิด

1. อกปล้องแรก (pronotum) ไม่มีขน แผ่นโค้งนูน (callus) มีลักษณะโค้ง.....2
- อกปล้องแรก (pronotum) ไม่มีขน แผ่นโค้งนูน (callus) มีลักษณะแบนยาว.....3
2. แผ่นโค้งนูน (callus) ไม่มีจุดเป็นมันเงา.....*O. minutus*
3. หัว (head) สั้น มีสีดำ ส่วนที่ยื่นออกมาตรงกลางระหว่างหัว (tinged) มีสีเหลืองซีดตรงส่วนปลายยอดท่อปาก (labium) มีสีเหลืองอ่อน และส่วนปลายมีสีดำ ปีกคู่หน้าส่วนกึ่งแข็งกึ่งอ่อน (hemelytra) มีสีเหลืองน้ำตาล แผ่นสามเหลี่ยมตั้งอยู่บนส่วนที่เป็นแผ่นหนังของปีกคู่แรก (cuneus) มีสีดำ ..... *O. dravidensis*
- หัว (head) สั้น มีสีดำ ส่วนที่ยื่นออกมาตรงกลางระหว่างหัว (tinged) มีสีส้มอมน้ำตาลตรงส่วนปลายยอดท่อปาก (labium) มีน้ำตาลดำ ปีกคู่หน้าส่วนกึ่งแข็งกึ่งอ่อน (hemelytra) มีสีเหลืองซีด กึ่งโปร่งใสสม่ำเสมอกัน ปลายแผ่นสามเหลี่ยมตั้งอยู่บนส่วนที่เป็นแผ่นหนังของปีกคู่แรก (cuneus) มีสีดำ 4
4. อกปล้องแรก (pronotum): ไม่มีขนยาว มีแผ่นโค้งนูน (callus) แบนยาวและมีจุดสีดำพาดขวางเป็นเส้นผ่าน callus 2 เส้น เห็นได้ชัดเจน..... *O. maxidentex*
- อกปล้องแรก (pronotum): ไม่มีขนยาว มีแผ่นโค้งนูน (callus) แบนยาวและมีจุดสีดำพาดขวางเป็นเส้นผ่าน callus 1 เส้น เห็นได้ชัดเจน..... *O. tantillus*

แนวทางการวินิจฉัยในระดับชนิด (อวัยวะสืบพันธุ์ (genitalia) เพศผู้และเพศเมีย)

1. มีแผ่นแข็งเล็กๆ อยู่ติดกับส่วนบนของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (denticule).....2
- ไม่มีแผ่นแข็งเล็กๆ อยู่ติดกับส่วนบนของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (denticule).....3
2. อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (paramere) มีรูปร่างกลม ส่วนปลายอวัยวะสืบพันธุ์ (cone) มีลักษณะกลมแข็ง ส่วนปลายยอดมนไม่แหลม แผ่นแข็งเล็กๆ อยู่ติดกับส่วนบนของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้(denticule) อยู่ติดกับฐานส่วนที่ยื่นออกมาคล้ายหาง (flagellum)..... *O. minutus*
3. อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (paramere) มีรูปร่างกลม ส่วนปลายอวัยวะสืบพันธุ์ (cone) มีลักษณะมนตรงส่วนปลาย มีแผ่นลักษณะยาวแบน (lamelliform) ปรากฏอยู่ ท่ออวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (copulatory tube) ตั้งอยู่ติดกับฐานของอวัยวะวางไข่ (ovipositor)..... ..... *O. maxidentex*
- อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (paramere) มีรูปร่างกลม ส่วนปลายอวัยวะสืบพันธุ์ (cone) มีลักษณะแหลมตรงส่วนปลาย ไม่มีแผ่นลักษณะยาวแบน (lamelliform) อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (copulatory tube) อยู่ไกลจากฐานของอวัยวะวางไข่ (ovipositor)..... 4
4. อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (paramere) ส่วนที่ยื่นออกมาคล้ายหาง (flagellum) แบ่งออกเป็นสามส่วนท่ออวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (copulatory tube) เชื่อมกันอยู่ตรงกลางของเยื่อหุ้มระหว่างปล้อง อยู่ระหว่างท้องปล้องที่ 7 และ 8..... *O. tantillus*

ศรีบัวการเกษตร

- อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (paramere) ส่วนที่ยื่นออกมาคล้ายหาง (flagellum) เป็นเส้นเดี่ยวๆ ท่ออวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (copulatory tube) เชื่อมกันอยู่ทางด้านซ้ายของเยื่อหุ้มระหว่างปล้อง อยู่ระหว่างท้องปล้องที่ 7 และ 8..... *O. dravidensis*

***Orius dravidiensis* Muraleedharan, 1977 (Figure 1.1.11A-F)**

Orius (Heterorius) dravidiensis Muraleedharan, 1977: 234

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (description)

ลำตัว (body): ลำตัวมีขนาดเล็ก มีสีดำ ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 2.52±0.39 มิลลิเมตร กว้างเฉลี่ย 0.91±0.07 มิลลิเมตร (n=20)

หัว (head): สั้น มีสีดำ มีหลุมเล็กๆ (punture) กระจายทั่วไป ตารวมใหญ่สีแดง มีตาเดี่ยว 2 ตา สีแดง ส่วนที่ยื่นออกมาตรงกลางระหว่างหัว (tinged) มีสีเหลืองซีดตรงส่วนปลายยอด ท่อปาก (labium) มีสีเหลืองอ่อนและส่วนปลายมีสีดำ หัวมีความยาวเฉลี่ย 0.42±0.02 มิลลิเมตร หัวมีความกว้างเฉลี่ย 0.52±0.01 มิลลิเมตร (n=20)

หนวด (antennae): หนวดมีลักษณะเรียวยาว มีขนเล็กๆ ขึ้นปกคลุม มี 4 ปล้อง ปล้องที่ 1 และ 2 มีสีเหลืองอ่อน ปล้องที่ 3 มีสีน้ำตาลเข้ม ปล้องที่ 4 บริเวณส่วนโคนมีสีน้ำตาลและส่วนปลายมีสีเหลืองอ่อน หนวดมีความยาวเฉลี่ย 0.78±0.08 มิลลิเมตร (n=20)

อกปล้องแรก (pronotum): ไม่มีขนยาว มีแผ่นโค้งนูน (callus) แบนยาวและมีจุดสีดำพาดขวางเป็นเส้นผ่าน callus 2 เส้น อกปล้องแรกมีความกว้างเฉลี่ย 0.95±0.04 มิลลิเมตร (n=20)

ปีก (hemelytra): ปีกคู่หน้าส่วนกึ่งแข็งกึ่งอ่อน (hemelytra) มีสีเหลืองน้ำตาล แผ่นสามเหลี่ยมตั้งอยู่บนส่วนที่เป็นแผ่นหนังของปีกคู่แรก (cuneus) มีสีดำ ปีกมีความยาวเฉลี่ย 1.82±0.09 มิลลิเมตร (n=20)

ขา (leg): มีลักษณะเรียวยาว ขาคู่ที่ 1 และขาคู่ที่ 2 มีสีเหลืองอ่อน ขาคู่ที่ 3 ปลายของโคนขา (femur) มีสีน้ำตาลอ่อน

อวัยวะสืบพันธุ์ (genitalia):

เพศผู้: อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (paramere) มีรูปร่างกลม ส่วนปลายอวัยวะสืบพันธุ์ (cone) มีลักษณะแหลมตรงส่วนปลาย ไม่มีแผ่นลักษณะยาวแบน (lamelliform) ส่วนที่ยื่นออกมาคล้ายหาง (flagellum) เป็นเส้นเดี่ยวๆ

เพศเมีย: ท่ออวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (copulatory tube) อยู่ไกลจากฐานของอวัยวะวางไข่ (ovipositor) เชื่อมกันอยู่ทางด้านซ้ายของเยื่อหุ้มระหว่างปล้อง อยู่ระหว่างท้องปล้องที่ 7 และ 8

การตรวจวินิจฉัย (diagnosis)

O. dravidiensis มีความคล้ายคลึงกับ *O. minutus* แต่สามารถจำแนกได้จากลักษณะเด่นคือ อกปล้องแรก (pronotum) มีแผ่นโค้งนูน (callus) แบนยาวและมีจุดสีดำพาดขวางเป็นเส้นผ่าน callus 2 เส้น รวมทั้งยังมีความแตกต่างของรูปร่างอวัยวะสืบพันธุ์ (genitalia) อีกด้วย

กรมวิชาการเกษตร

แหล่งที่สำรวจพบ (distribution): จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ฉะเชิงเทรา สระแก้ว ปราจีน เลย หนองคาย และกาฬสินธุ์

ความสำคัญและพืชอาศัย: ตัวอ่อนและตัวเต็มวัย พบในไหมข้าวโพด ดอกโหระพา แมงลัก ข้าวฟ่าง และเกาลัดจีน โดยดูดกินเพลี้ยไฟ เป็นอาหาร

ตัวอย่างที่ใช้ในศึกษา (material examined)

Lamphun: 2 males, 3 females, EMBT.HEM. 200001-200005. Chachoengsao: 2 males, 3 females, EMBT.HEM. 200261-200265. Kalasin: 2 males, 3 females, EMBT.HEM. 200247-200251.

***Orius tantillus* (Motschulsky, 1863) (Figure 1.1.11G-L)**

Anthocoris tantillus Motschulsky, 1863: 89. Neotype (Ghauri 1972: 414); Ghauri 1972: 411 (*Orius*, redescription, neotype designation, figures); Muraleedharan and Ananthakrishnan 1974: 38 (*Orius*, diagnosis, key, figures); Yasunaga 1977c: 387 (*Orius* (*Paraorius*), record, diagnosis, key, figures); Yasunaga 2001: 291 (*Orius* (*Dimorphella*), note, key, figures); Ghahari *et al*. 2009: 50 (*Orius* (*Dimorphella*), record, note)

Triphleps australis China, 1962: 361 (syn. Woodward and Postle 1986: 247); Gross 1954: 136 (*Orius*, diagnosis)

Orius Niobe Herring, 1967: 399 (syn. Ghauri 1972: 411)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (description)

ลำตัว (body): ลำตัวมีขนาดเล็ก มีสีดำ ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 2.46±0.24 มิลลิเมตร กว้างเฉลี่ย 0.88±0.10 มิลลิเมตร (n=20)

หัว (head): สั้น มีสีดำ มีหลุมเล็กๆ (punture) กระจายทั่วไป ตารวมใหญ่สีแดง มีตาเดี่ยว 2 ตา สีแดง ส่วนที่ยื่นออกมาตรงกลางระหว่างหัว (tinged) มีสีน้ำตาลส้มตรงส่วนปลายยอด ท่อปาก (labium) ส่วนโคนมีสีดำตรงกลางสีเหลือง และส่วนปลายมีสีดำ หัวมีความยาวเฉลี่ย 0.39±0.04 มิลลิเมตร หัวมีความกว้างเฉลี่ย 0.48±0.02 มิลลิเมตร (n=20)

หนวด (antennae): หนวดมีลักษณะเรียวยาว มีขนเล็กๆ ขึ้นปกคลุม มี 4 ปล้อง ปล้องที่ 1 และ 2 มีสีเหลือง ปล้องที่ 3 มีสีน้ำตาล ปล้องที่ 4 บริเวณส่วนโคนมีสีดำและส่วนปลายมีสีแดง หนวดมีความยาวเฉลี่ย 0.84±0.06 มิลลิเมตร (n=20)

อกปล้องแรก (pronotum): ไม่มีขนยาว มีแผ่นโค้งนูน (callus) แบนยาวและมีจุดสีดำพาดขวางเป็นเส้นผ่าน callus 1 เส้น เห็นได้ชัดเจน อกปล้องแรกมีความกว้างเฉลี่ย 0.88±0.04 มิลลิเมตร (n=20)

ปีก (hemelytra): ปีกคู่หน้ามีสีเหลืองซีดกึ่งโปร่งใส ปลายแผ่นสามเหลี่ยมตั้งอยู่บนส่วนที่เป็นแผ่นหนังของปีกคู่แรก (cuneus) มีสีดำ ปีกมีความยาวเฉลี่ย 1.79±0.10 มิลลิเมตร (n=20)

ขา (leg): มีลักษณะเรียวยาว ขาทั้ง 3 คู่ มีสีเหลืองอ่อน

สำนักวิชาการเกษตร

อวัยวะสืบพันธุ์ (genitalia):

เพศผู้: อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (paramere) มีรูปร่างกลม ส่วนปลายอวัยวะสืบพันธุ์ (cone) มีลักษณะแหลมตรงส่วนปลาย ไม่มีแผ่นลักษณะยาวแบน (lamelliform) ส่วนที่ยื่นออกมาคล้ายหาง (flagellum) แบ่งออกเป็นสามส่วน

เพศเมีย: ท่ออวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (copulatory tube) สั้นมาก อยู่ไกลจากฐานของอวัยวะวางไข่ (ovipositor) เชื่อมกันอยู่ตรงกลางของเยื่อหุ้มระหว่างปล้อง อยู่ระหว่างท้องปล้องที่ 7 และ 8

การตรวจวินิจฉัย (diagnosis)

O. tantillus มีความคล้ายคลึงกับ *O. maxidentex* แต่สามารถจำแนกได้จากลักษณะเด่นคือ อกปล้องแรก (pronotum) มีแผ่นโค้งนูน (callus) แบนยาวและมีจุดสีดำพาดขวางเป็นเส้นผ่าน callus 1 เส้น เห็นได้ชัดเจน รวมทั้งยังมีความแตกต่างของรูปร่างอวัยวะสืบพันธุ์ (genitalia) อีกด้วย

แหล่งที่สำรวจพบ (distribution): จังหวัดอุทัยธานี ชัยนาท สิงห์บุรี นครปฐม เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน แพร่ น่าน อุตรดิตถ์ พิษณุโลก เพชรบูรณ์ ฉะเชิงเทรา สระแก้ว ปราจีน นครนายก นครราชสีมา อุดรธานี หนองคาย อุบลราชธานี อำนาจเจริญ ชัยภูมิ กาญจนบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และพังงา

ความสำคัญและพืชอาศัย: ตัวอ่อนและตัวเต็มวัย พบในไหมข้าวโพด ใบพริก ดอกโหระพา แมงลัก ข้างฟ่าง ดอกทานตะวัน และดอกดาวเรือง โดยดูดกินเพลี้ยไฟ ไร เป็นอาหาร

ตัวอย่างที่ใช้ในศึกษา (material examined)

Nakhon Pathom: 2 males, 3 females, EMBT.HEM. 200151-20000155. Phitsanulok: 2 males, 3 females, EMBT.HEM. 200120-20000124. Phangnga: 2 males, 3 females, EMBT.HEM. 200675-200679.

***Orius maxidentex* Ghauri, 1972 (Figure 1.1.11M-R)**

Orius (*Dimorphella*) *maxidentex* Ghauri, 1972: 44; Muraleedharan 1977: 234 (diagnosis, key);

Erfan *et al*. 2010: 341 (record, note, figure)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (description)

ลำตัว (body): ลำตัวมีขนาดเล็ก มีสีดำ ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 2.58±0.07 มิลลิเมตร กว้างเฉลี่ย 2.92±0.05 มิลลิเมตร (n=20)

หัว (head): สั้น มีสีดำ มีหลุมเล็กๆ (punture) กระจายทั่วไป ตารวมใหญ่สีแดง มีตาเดี่ยว 2 ตา สีขาวเหลือง ส่วนที่ยื่นออกมาตรงกลางระหว่างหัว (tinged) มีสีน้ำตาลส้มตรงส่วนปลายยอด ท่อปาก (labium) มีน้ำตาลค่อนข้างดำ หัวมีความยาวเฉลี่ย 0.40±0.03 มิลลิเมตร หัวมีความกว้างเฉลี่ย 0.51±0.01 มิลลิเมตร (n=20)

ศูนย์วิทยาการเกษตร

หนวด (antennae): หนวดมีลักษณะเรียวยาว มีขนเล็กๆ ขึ้นปกคลุม มี 4 ปล้อง ปล้องที่ 1 และ 3 มีสีเหลืองอ่อน ปล้องที่ 2 ส่วนโคนสีเหลืองอ่อน ส่วนปลายสีน้ำตาลดำ ปล้องที่ 4 บริเวณส่วนปลายมีสีแดงอมส้ม หนวดมีความยาวเฉลี่ย 0.78±0.07 มิลลิเมตร (n=20)

อกปล้องแรก (pronotum): ไม่มีขนยาว มีแผ่นโค้งนูน (callus) แบนยาวและมีจุดสีดำพาดขวางเป็นเส้นผ่าน callus 2 เส้น อกปล้องแรกมีความกว้างเฉลี่ย 0.94±0.03 มิลลิเมตร (n=20)

ปีก (hemelytra): ปีกคู่หน้ามีสีเหลืองซีดกึ่งโปร่งใส แผ่นสามเหลี่ยมตั้งอยู่บนส่วนที่เป็นแผ่นหนังของปีกคู่แรก (cuneus) มีสีดำ ปีกมีความกว้างเฉลี่ย 1.76±0.06 มิลลิเมตร (n=20)

ขา (leg): มีลักษณะเรียวยาว ขาทั้ง 3 คู่ มีสีเหลืองอ่อน

อวัยวะสืบพันธุ์ (genitalia)

เพศผู้: อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (paramere) มีรูปร่างกลม ส่วนปลายอวัยวะสืบพันธุ์ (cone) มีลักษณะมนตรงส่วนปลาย มีแผ่นลักษณะยาวแบน (lamelliform) ปรากฏอยู่

เพศเมีย: ท่ออวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (copulatory tube) ตั้งอยู่ติดกับฐานของอวัยวะวางไข่ (ovipositor)

การตรวจวินิจฉัย (diagnosis)

O. maxidentex มีความคล้ายคลึงกับ *O. tantillus* แต่สามารถจำแนกได้จากลักษณะเด่นคือ อกปล้องแรก (pronotum) มีแผ่นโค้งนูน (callus) แบนยาวและมีจุดสีดำพาดขวางเป็นเส้นผ่าน callus 2 เส้น รวมทั้งยังมีความแตกต่างของรูปร่างอวัยวะสืบพันธุ์ (genitalia) อีกด้วย

แหล่งที่สำรวจพบ (distribution): จังหวัดอ่างทอง ชัยนาท นครปฐม สุพรรณบุรี แม่ฮ่องสอน ลำพูน แพร่ พิษณุโลก กำแพงเพชร ฉะเชิงเทรา กาญจนบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น อุดรธานี ชัยภูมิ เลย และชุมพร

ความสำคัญและพืชอาศัย: ตัวอ่อนและตัวเต็มวัย พบในไหมข้าวโพด ดอกโหระพา แมงลัก เกาลัดจีน และดาวเรือง โดยดูดกินเพลี้ยไฟ ไร เป็นอาหาร

ตัวอย่างที่ใช้ในศึกษา (material examined)

Kanchanaburi: 2 males, 3 females, EMBT.HEM. 200587-200591. อุดรธานี: 2 males, 3 females, EMBT.HEM. 200210-200214. Chumphon: 2 males, 3 females, EMBT.HEM. 200650-200654.

***Orius minutus* (Linnaeus, 1758) (Figure 1.1.11S-V)**

Cimex minutus Linnaeus, 1758: 446. Neotype (Péricart 1970: 742)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (description)

ลำตัว (body): ลำตัวมีขนาดเล็ก มีสีดำ ขนาดลำตัวยาว 2.02 มิลลิเมตร กว้าง 0.83 มิลลิเมตร (n=1)

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

หัว (head): สั้น มีสีน้ำตาล มีหลุมเล็กๆ (punture) กระจายทั่วไป ตารวมใหญ่สีแดง มีตาเดี่ยว 2 ตา สีเหลือง ท่อปาก (labium) มีเหลืองอ่อน ส่วนปลายมีสีดำ หัวมีความยาวเฉลี่ย 0.47 มิลลิเมตร หัวมีความกว้างเฉลี่ย 0.55 มิลลิเมตร (n=1)

หนวด (antennae): หนวดมีลักษณะเรียวยาว มีขนเล็กๆ ขึ้นปกคลุม มี 4 ปล้อง ปล้องที่ 1 และ 2 มีสีเหลืองอ่อน ปล้องที่ 3 สีน้ำตาลดำ ปล้องที่ 4 บริเวณส่วนโคนมีสีน้ำตาลอ่อน และส่วนปลายมีสีเหลืองอ่อน หนวดมีความยาว 1.04 มิลลิเมตร (n=1)

อกปล้องแรก (pronotum): ไม่มีขน แผ่นโค้งนูน (callus) มีลักษณะโค้ง ไม่มีจุดเป็นมันเงา อกปล้องแรกมีความกว้างเฉลี่ย 1.076 มิลลิเมตร (n=1)

ปีก (hemelytra): ปีกคู่หน้าส่วนกึ่งแข็งกึ่งอ่อน (hemelytra) มีสีเหลืองน้ำตาล แผ่นสามเหลี่ยมตั้งอยู่บนส่วนที่เป็นแผ่นหนังของปีกคู่แรก (cuneus) มีสีดำ ปีกมีความกว้าง 1.42 มิลลิเมตร (n=1)

ขา (leg): มีลักษณะเรียวยาว ขาทั้ง 3 คู่ มีสีเหลืองอ่อน

อวัยวะสืบพันธุ์ (genitalia)

เพศผู้: อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (paramere) มีรูปร่างกลม ส่วนปลายอวัยวะสืบพันธุ์ (cone) มีลักษณะกลมแข็ง ส่วนปลายยอดมนไม่แหลม แผ่นแข็งเล็กๆ อยู่ติดกับส่วนบนของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (denticule) อยู่ติดกับฐานส่วนที่ยื่นออกมาคล้ายหาง (flagellum)

เพศเมีย: ยังสำรวจไม่พบ

การตรวจวินิจฉัย (diagnosis)

O. minutus มีความคล้ายคลึงกับ *O. dravidensis* แต่สามารถจำแนกได้จากลักษณะเด่นคือ อกปล้องแรก (pronotum) แผ่นโค้งนูน (callus) มีลักษณะโค้ง ไม่มีจุดเป็นมันเงา รวมทั้งยังมีความแตกต่างของรูปร่างอวัยวะสืบพันธุ์ (genitalia) อีกด้วย

แหล่งที่สำรวจพบ (distribution): จังหวัดชัยนาท

ความสำคัญและพืชอาศัย: ตัวอ่อนและตัวเต็มวัย พบในไหมข้าวโพด ดูดกินเพลี้ยไฟ เป็นอาหาร

ตัวอย่างที่ใช้ในศึกษา (material examined) Chainat: 1 males, EMBT.HEM. 200161

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาอนุกรมวิธานมวนตัวห้ำสกุล *Orius* ในประเทศไทยระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – เดือนกันยายน 2562 ได้ทำการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจากแปลงปลูกพืชผักและไม้ดอก (ข้าวโพด โหระพา แมงลัก พริก ดาวเรือง) ในเขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย น่าน พะเยา เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน แพร่ ลำปาง ลำพูน อุตรดิตถ์ พิษณุโลก สุโขทัย เพชรบูรณ์ พิจิตร กำแพงเพชร และนครสวรรค์ เป็นต้น เขตภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดลพบุรี ชัยนาท อุทัยธานี สิงห์บุรี อ่างทอง สระบุรี พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี และนครปฐม เป็นต้น เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดกาฬสินธุ์ ขอนแก่น มหาสารคาม หนองคาย นครพนม อุดรธานี และร้อยเอ็ด เป็นต้น เขตภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดปราจีนบุรี จันทบุรี และสระแก้ว เป็นต้น เขตภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี เป็นต้น และเขตภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร พัทลุง กระบี่

กรมวิชาการเกษตร

นครศรีธรรมราช และตรัง เป็นต้น ผลการตรวจสอบจำแนกชนิด สามารถวิเคราะห์ชนิดได้ 4 ชนิด ได้แก่ *O. dravidiensis, O. tantillus*, *O. maxidentex* และ *O. minutus* ทั้ง 4 ชนิด พบดูดกินเพลี้ยไฟ แมลงหวี่ขาว และไร เป็นต้น ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาทั้งหมดนำไปเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลงเพื่อใช้อ้างอิงทางด้านอนุกรมวิธาน และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาพัฒนาบทบาทมวนตัวห้ำเหล่านี้ให้มีศักยภาพนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำผลการศึกษาชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องของมวนตัวห้ำในสกุล *Orius* พร้อมทั้งลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา ศัตรูพืชที่เป็นอาหารของมวนตัวห้ำ พืชอาศัยของศัตรูพืชและเขตการแพร่กระจายในแหล่งปลูกพืชภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญมาใช้ในการคัดเลือกชนิดมวนตัวห้ำในสกุลนี้เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

2. นำข้อมูลมวนตัวห้ำในสกุล *Orius* ที่ได้จากการศึกษา จัดทำฐานข้อมูลแมลง และเก็บรักษาตัวอย่างแมลงไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลงของกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ซึ่งเป็นแหล่งข้อมูลทางด้านกีฏและสัตววิทยาที่สำคัญของประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

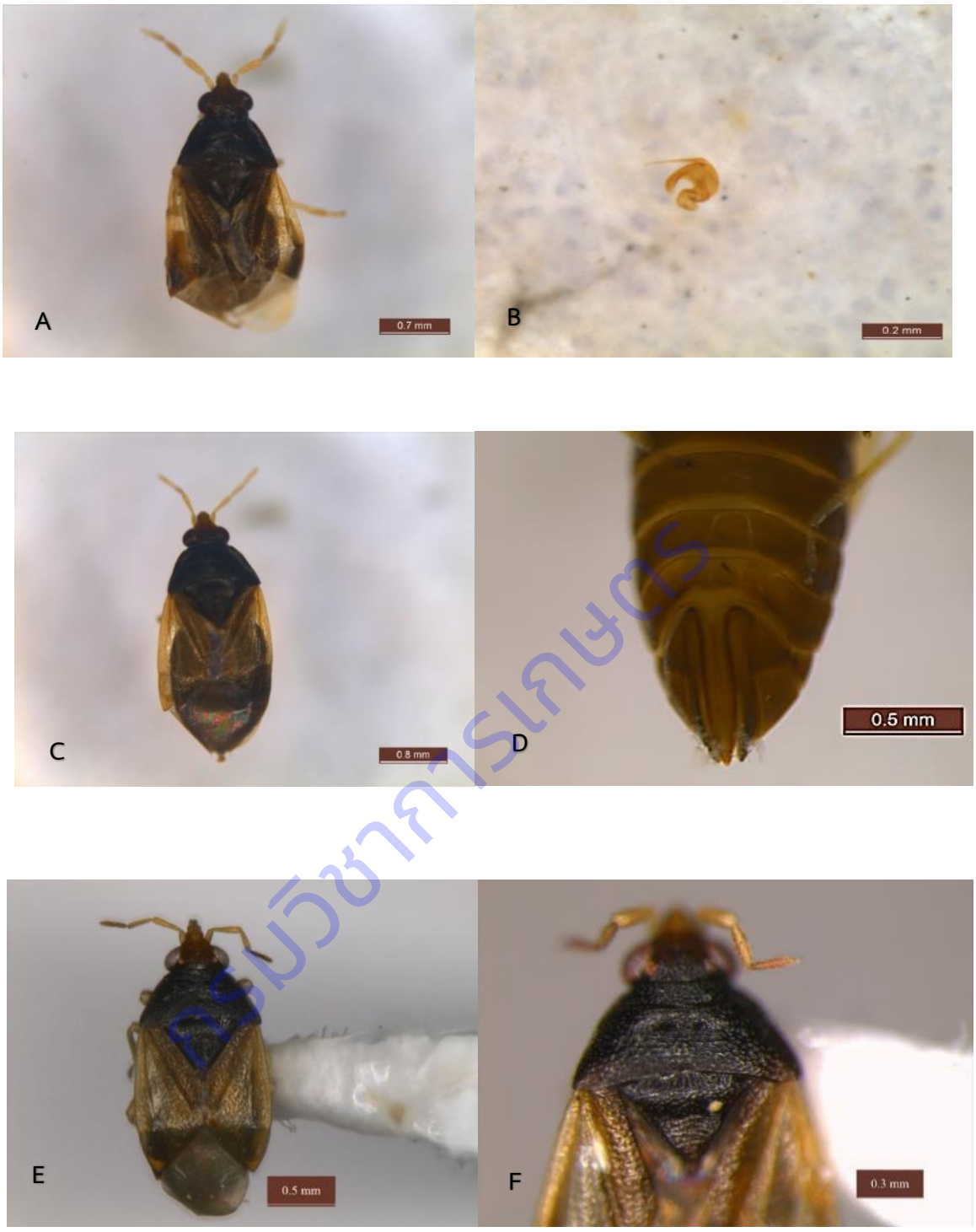


Figure 1.1.11A-F) *O. dravidiensis* A) male B) male genitalia (male paramere) C) female D) female genitalia E) body adult F) pronotum

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.11G-L) *O. tantillus* G) male H) male genitalia (male paramere) I) female J) female genitalia J) body adult J) pronotum

กองวิชาการเกษตร

Figure 1.1.11M-R) *O. maxidentex* M) male N) male genitalia (male paramere) O) female P) female genitalia Q) body adult R) pronotum

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.11S-V) *O. minutus* S) male T) male genitalia (male paramere) U) body adult V) pronotum

กรมวิชาการเกษตร

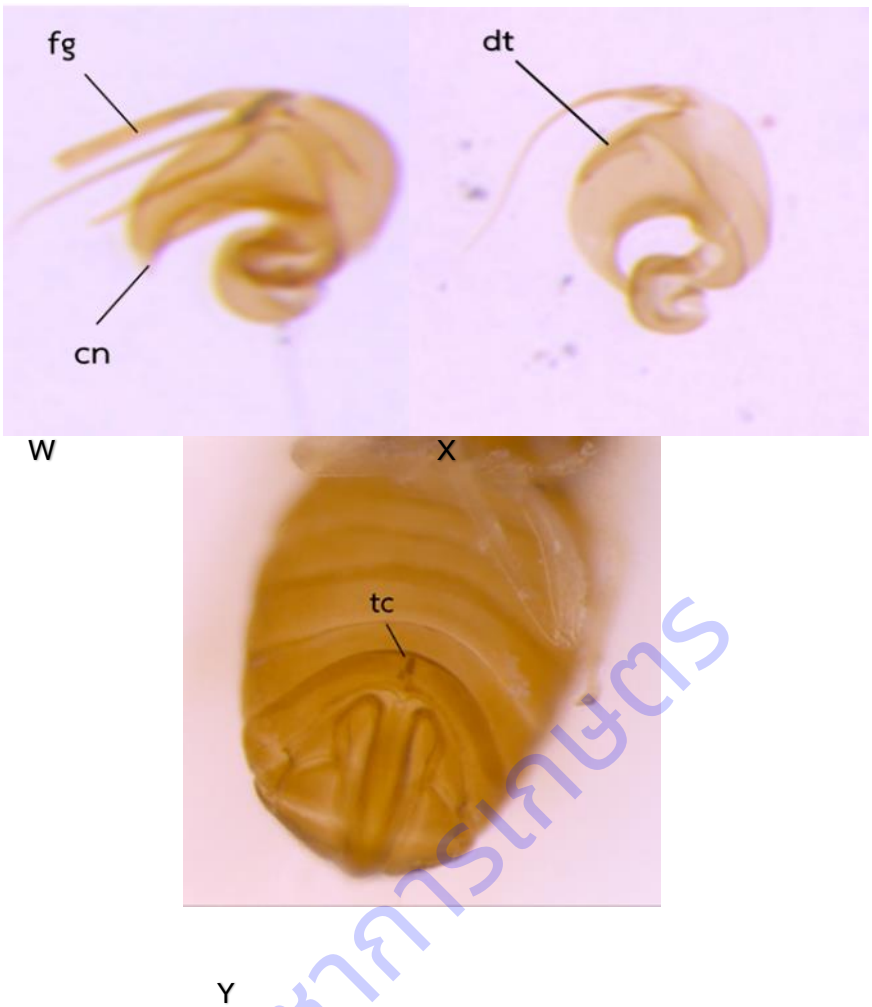


Figure 1.1.11W-Y) genitalia W,X) male paramere; fg: flagellum, cn: cone, dt: denticule
Y) female genitalia; tc: copulatory tube

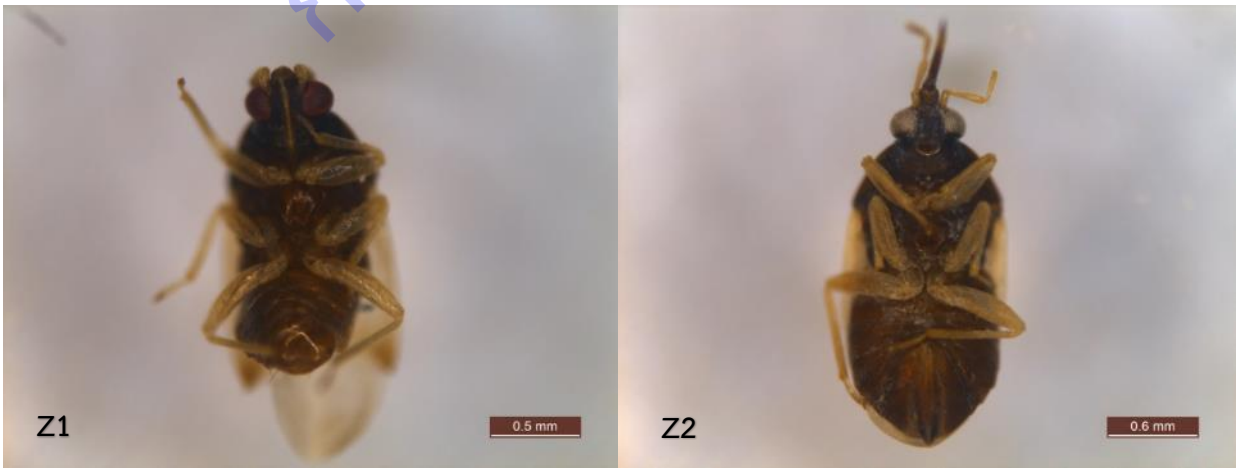


Figure 1.1.11Z1-Z2) adult Z1) male Z2) female

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.12 ชนิดของเพลี้ยอ่อน (Hemiptera: Aphididae) ในพืชผัก (วงศ์แตง กะหล่ำ พริก มะเขือ และถั่ว) ของประเทศไทย

Species of Aphids (Hemiptera: Aphididae) on Vegetable (Family Cucurbitaceae, Brassicaceae, Solanaceae and Leguminose) in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	เกศสุดา สนศิริ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	จารุวัตถ์ แต้กุล	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ยุวรินทร์ บุญทบ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สุนัดดา เชาวลิต	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ชมัยพร บัวมาศ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	อิทธิพล บรรณาการ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	จอมสุรางค์ ดวงธิสาร	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

เพลี้ยอ่อน (Hemiptera: Aphididae) เป็นแมลงศัตรูสำคัญในพืชผักวงศ์แตง (Cucerbitaceae) กะหล่ำ (Cruciferae) พริก มะเขือ (Solanaceae) และถั่ว (Leguminosae) สร้างความเสียหายโดยตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงจาก ใบ ลำต้น ตา ดอก และผล ทำให้เซลล์พืชบริเวณที่ถูกทำลายมีลักษณะผิดปกติ เกิดอาการใบเหลือง ใบย่น ผลบิดเบี้ยว ใบและผลที่ถูกทำลายจะแห้งและร่วงไปในที่สุด เนื่องจากเพลี้ยอ่อนมีการระบาดทำลายอย่างรวดเร็วและรุนแรง นอกจากนี้เพลี้ยอ่อนในกลุ่มนี้มีรูปร่างลักษณะที่คล้ายคลึงกันยากแก่การจำแนกชนิด ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อทราบชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจาย ของเพลี้ยอ่อนที่พบในพืชผัก วงศ์แตง กะหล่ำ พริก มะเขือ และถั่ว พร้อมทั้งจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิด จากการศึกษาโดยการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนจากแปลงปลูกทั่วภูมิภาคของประเทศไทย ระหว่างเดือน ตุลาคม 2560 ถึง กันยายน 2563 ได้ตัวอย่างเพลี้ยอ่อน จำนวน 915 ตัวอย่าง จำแนกชนิดโดยใช้แนวทางวินิจฉัยตาม Blackman and Eastop, 2000) สามารถจำแนกได้ 4 สกุล 6 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยอ่อนฝ้าย *Aphis gossypii* Glover เพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch เพลี้ยอ่อนถั่วเหลือง *Aphis glycines* Matsumura เพลี้ยอ่อนกะหล่ำ *Brevicorync brassicae* (Linnaeus) เพลี้ยอ่อนผัก *Lipaphis erysimi* Kaltenbach และเพลี้ยอ่อนยาสูบ *Myzus persicae* (Sulzer) ตัวอย่างทั้งหมดนำไปจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร โดยจัดเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล เพื่อสืบค้น อ้างอิงในภายหลัง

คำสำคัญ อนุกรมวิธาน เพลี้ยอ่อน Aphididae Hemiptera Vegetable

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Aphids are major pests in vegetable (Family Cucurbitaceae, Brassicaceae, Solanaceae and Leguminose). Nymphs and adults feed on plant juices, attacking leaves, stems, buds, flowers, and fruit, depending on the species. However, heavy infestations will cause leaves to curl, wilt or yellow and stunted plant growth. Presented with similar shapes and characters, this pest is difficult to identify to species. The objectives of this study are to gain better insight in the identification at species level as well as the distributions of the aphids in Thailand. The results are applied in a pest list and pest risk analysis program for the import-export agricultural products. A survey and collecting were implemented from October 2017 – September 2020 on the vegetable crops across the country. The insect samples were examined based on classical taxonomy and identification to the species level followed Blackman and Eastop (2000). The result revealed that 4 genera 6 species were found comprising, *Aphis gossypii* Glover, *Aphis craccivora* Koch, *Aphis glycines* Matsumura, *Brevicorync brassicae* (Linnaeus), *Lipaphis erysimi* Kaltenbach and *Myzus persicae* (Sulzer). The species descriptions and the key to species are presented.

Keywords Aphididae Hemiptera Taxonomy Cucurbitaceae Brassicaceae Solanaceae Leguminose

คำนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งปลูกผักที่มีความหลากหลายชนิดและพันธุ์ โดยมีพื้นที่ปลูกมากถึง 3 ล้านไร่ต่อปี หรือ 2.5% ของพื้นที่ภาคการเกษตร มีผลผลิตรวมประมาณ 5.0-5.5 ล้านตันผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้แก่ ผักในวงศ์แตง (Cucerbitaceae) วงศ์กะหล่ำ (Cruciferae) วงศ์พริก มะเขือ (Solanaceae) และวงศ์ถั่ว (Leguminosae) (กรมวิชาการเกษตร, 2556) การผลิตพืชผักเพื่อให้ได้คุณภาพที่ดีตามความต้องการของตลาด มักจะประสบปัญหาศัตรูพืช โดยเฉพาะแมลงศัตรูพืช จัดเป็นปัญหาที่สำคัญ เนื่องจากมีการระบาดทำลายอย่างรวดเร็วและรุนแรง ทำให้ผลผลิตได้รับความเสียหาย เพลี้ยอ่อน (Aphid) เป็นแมลงศัตรูสำคัญของผักหลายชนิด เพลี้ยอ่อนจัดอยู่ในวงศ์ (family) Aphididae อันดับ (Order) Hemiptera ทั่วโลกมีเพลี้ยอ่อน 4,000 ชนิด ซึ่งมีประมาณ 250 ชนิด ที่เป็นศัตรูสำคัญของพืช (Blackman and Estop, 2000) ในประเทศไทยรายงานว่ามีเพลี้ยอ่อนทั้งหมด 182 ชนิด (Sirikajornjaru, 2002) เพลี้ยอ่อนเป็นแมลงปากดูดขนาดเล็กเข้าทำลายพืชโดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชบริเวณใต้ใบ หรือส่วนอ่อนๆของพืช เช่น ยอดอ่อน ตาอ่อน ใบ ดอก และผล ทำให้เซลล์พืชบริเวณที่ถูกทำลายมีลักษณะผิดปกติ เกิดอาการใบเหลือง ใบย่น ผลบิดเบี้ยว ใบและผลที่ถูกทำลายจะแห้งและร่วงไปในที่สุด บางชนิดทำให้เกิดปม ถ้าพืชถูกทำลายรุนแรงจะทำให้ชะงักการเจริญเติบโต หรือบางครั้งทำให้ต้นตายได้ นอกจากนี้เพลี้ยอ่อนยังปล่อยของเหลวซึ่งเป็นน้ำตาลที่เหลือใช้ ผสมกับของเสียและปล่อยออกมาทางช่องขับถ่าย เรียกว่า มูลน้ำหวาน (honeydew) ซึ่งเป็นอาหารของมดและราดำ (sooty mold) ทำให้ราดำเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนปกคลุมใบและผล ใบจึงไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้อย่างเต็มที่ ส่วนผลจะสกปรกเนื่องจากมูลน้ำหวาน

กรมวิชาการเกษตร

และราดำเช่นกัน ทำให้ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด (ลักขณา และชฎาภรณ์, 2554) นอกจากนี้เพลี้ยอ่อนบางชนิดยังเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช เช่น เพลี้ยอ่อนฝ้าย *Aphis gossypii* Glover เป็นพาหะนำเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างของพืชตระกูลแตง เพลี้ยอ่อนถั่วเหลือง *Aphis glycines* Matsumura เป็นพาหะนำเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างและต้นเตี้ยแคระของถั่วเหลือง (เครือพันธุ์ และ วันเพ็ญ, 2545) ดังนั้นการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน ชีววิทยา ลักษณะความแตกต่าง พืชอาหาร เขตการแพร่กระจายและศัตรูธรรมชาติ จึงมีความสำคัญอย่างมากเพื่อเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาแนวทางการป้องกันกำจัด และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นหลักฐานสืบค้นอ้างอิงทางวิชาการต่อไป

วิธีดำเนินการ

- **อุปกรณ์**

1) ตัวอย่างเพลี้ยอ่อน ที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกผักในวงศ์แตง (Cucerbitaceae) วงศ์กะหล่ำ (Cruciferae) วงศ์พริก มะเขือ (Solanaceae) และวงศ์ถั่ว (Leguminosae) และตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

2) อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ขวดดอง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่าง ถังรักษาความเย็น และเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)

3) อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับใช้ในการทำสไลด์ถาวรได้แก่ potassium hydroxide 10 %, Alcohol 70-95 %, acetic acid gacial, clove oil และ canada balsam แผ่นสไลด์แก้วและแผ่นแก้วปิดสไลด์ ตู้อบสไลด์ถาวร

4) กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope, compound microscope และกล้องถ่ายภาพ

5) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดเพลี้ยอ่อน Aphididae ของ Blackman and Eastop (2000)

- **วิธีการ**

1) สืบค้นข้อมูลเพลี้ยอ่อนในวงศ์ Aphididae ที่เป็นศัตรูของพืชผักในวงศ์ แตง (Cucerbitaceae) กะหล่ำ (Cruciferae) พริก มะเขือ (Solanaceae) และถั่ว (Leguminosae) จากเอกสารต่าง ๆ ที่มีการรายงานไว้ในประเทศไทยและต่างประเทศ หรือจากข้อมูลอิเลคโทรนิค

2) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนในแปลงปลูกผักวงศ์ แตง (Cucerbitaceae) กะหล่ำ (Cruciferae) พริก มะเขือ (Solanaceae) และถั่ว (Leguminosae) ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ดังนี้

ปีที่ 1 <u>ภาคกลาง</u> ได้แก่ จังหวัดนครปฐม พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี ลพบุรี สระบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี ชัยนาท นครสวรรค์ กำแพงเพชร พิจิตร พิษณุโลก เพชรบูรณ์

<u>ภาคเหนือ</u> ได้แก่ อุตรดิตถ์ ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน เชียงราย แพร่ และน่าน

ปีที่ 2 <u>ภาคตะวันออก</u> ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี สระแก้ว ระยอง จันทบุรี ตราด และ ชลบุรี เป็นต้น

<u>ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ</u> ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา สุรินทร์ ชัยภูมิ กาฬสินธุ์

กรมวิชาการเกษตร

ร้อยเอ็ด ขอนแก่น เลย ยโสธร มุกดาหาร มหาสารคาม สกลนคร ศรีษะเกษ หนองคาย อุดรธานี อุบลราชธานี

ปีที่ 3 ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์

ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ ภูเก็ต พัทลุง ตรัง และสงขลา

3) การเก็บตัวอย่างเพลี้ยอ่อน

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนจากแหล่งเพาะปลูกพืชผักชนิดต่างๆ โดยตัดส่วนของพืชที่มีตัวอ่อน หรือตัวเต็มวัยที่มีเพลี้ยอ่อนเกาะอยู่ด้วยกรรไกรตัดกิ่ง นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่เก็บรวบรวมพร้อมพืชอาศัยห่อกระดาษแล้วนำใส่ถุงพลาสติก หรือกล่องพลาสติก และนำเพลี้ยอ่อนอีกส่วนหนึ่งดองในน้ำยาสำหรับดองเพลี้ยอ่อน (แอลกอฮอล์ 80% 2 ส่วน กรดแลคติก 1 ส่วน) บันทึกข้อมูลเบื้องต้น เช่น พืชอาหาร ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย สถานที่ วัน เดือน ปี พิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) ซึ่งประกอบด้วยค่าละติจูด (Latitude) ค่าลองจิจูด (Longitude) ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (Altitude) และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง นอกจากตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่ได้จากสภาพธรรมชาติแล้ว มีตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่มีอยู่เดิมในพิพิธภัณฑ์ กรมวิชาการเกษตร ตัวอย่างที่ได้จากนักวิชาการ และตัวอย่างจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

2) นำตัวอย่างตัวเต็มวัยของเพลี้ยอ่อนที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาด รูปร่าง ลักษณะ สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพเพลี้ยอ่อนแต่ละระยะ

3) นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่เก็บโดยการดองในแอลกอฮอล์มาทำสไลด์ถาวร ตามวิธีการของ Blackman and Eastop (2000) ดังนี้

- นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนจากขวดดอง ใช้เข็มเจาะบริเวณส่วนกลางอกด้านบนของเพลี้ยอ่อน และรีดเอาของเหลวและตัวอ่อนที่อยู่ภายในตัวออก ระวังอย่าให้ปากเสียหาย นำเพลี้ยอ่อนที่เจาะแล้วใส่ในหลอดแก้วที่มีแอลกอฮอล์ 95% ไปต้มโดยวิธีวอเตอร์บาท (water bath) นาน 1-2 นาที
- ดูดแอลกอฮอล์ออก เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide: KOH) 10% แช่ทิ้งไว้ 3-5 นาที
- ดูดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ออก เติมน้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำกลั่น 5-6 ครั้ง แล้วแช่ทิ้งไว้ในน้ำกลั่นอีก 5-6 นาที
- ดูดน้ำกลั่นออก เติมกรดแกลเชียลอะซิติก แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง
- ดูดกรดแกลเชียลอะซิติกออก เติมโคลฟออย แช่ทิ้งไว้ 10-20 นาที หรือจนกว่าตัวอย่างเพลี้ยอ่อนใส

การเม้าท์สไลด์

หยดแคนนาดาบัลซัมเพียงเล็กน้อยลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ เขี่ยเพลี้ยอ่อนลงในหยดแคนนาดาบัลซัม ให้เพลี้ยอ่อนหงายท้องขึ้น จัดหนวด ขา ไซฟังคูไล และหางให้อยู่ในตำแหน่งสวยงาม จากนั้นหยดไซลีนลงบนกึ่งกลาง

กรมวิชาการเกษตร

แผ่นสไลด์ที่สะอาด ค่อยๆคว่ำแผ่นสไลด์ลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ช้าๆ รีบพลิกแผ่นสไลด์ให้ด้านแผ่นแก้วปิดสไลด์อยู่ด้านบน นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7-15 วัน การเมาท์สไลด์ด้วยวิธีการนี้สามารถเก็บสไลด์ได้คงทนนานนับปี

4) นำสไลด์ที่ผ่านการอบจนแห้งมาตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบลักษณะสำคัญต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกชนิดกับเอกสารแนวทางการวินิจฉัยเพลี้ยอ่อนของ Blackman and Eastop (2000) ลักษณะสำคัญของเพลี้ยอ่อนที่ใช้ในการจำแนกชนิด ได้แก่ ส่วนหัว; ร่องหนวดและร่องบริเวณหน้าผาก ความสั้นยาวของหนวด จำนวนปล้องและความยาวส่วนปลายของปล้องสุดท้าย ความยาวของปาก ส่วนอก; ความยาวของปลายขาคู่หลังและหนามบนน่องขา ส่วนท้อง; จะมีตุ่มขนาดเล็กปรากฏบริเวณปล้องท้องปล้องที่ 1 และ 7 โดยเฉพาะปล้องที่ 7 ตำแหน่งของตุ่มขนาดเล็กที่ปรากฏอยู่ด้านบนหรือด้านล่างรูหายใจใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกระดับสกุล แต่ในเพลี้ยอ่อนบางชนิดไม่ปรากฏตุ่มดังกล่าว วาดรูปแสดงลักษณะต่างๆที่สำคัญ

5) บันทึกรายละเอียดต่างๆ ของเพลี้ยอ่อนที่สำรวจพบ เช่น ลักษณะ รูปร่าง ขนาด สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพเพลี้ยอ่อนในแต่ละระยะ รวมถึงบันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายที่ต้องติดไว้กับสไลด์เพลี้ยอ่อนแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่จับ และ วัน/เดือน/ปีที่ทำสไลด์ถาวร ชื่อน้ำยาที่ใช้เมาท์ (mount) สไลด์

6) จัดทำแนวทางการวินิจฉัยเพลี้ยอ่อนและวาดภาพลักษณะสำคัญประกอบ

7) เก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษา เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล เพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

การบันทึกข้อมูล

บันทึกรายละเอียด ชื่อพืช พันธุ์พืช สถานที่เก็บตัวอย่าง วัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) ซึ่งประกอบด้วยค่าละจิจูด (Latitude) ค่าลองจิจูด (Longitude) ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (Altitude) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างและชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ นอกจากตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่ได้จากสภาพธรรมชาติแล้ว มีตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่มีอยู่เดิมในพิพิธภัณฑ์ กรมวิชาการเกษตร ตัวอย่างที่ได้จากนักวิชาการ และตัวอย่างจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

- **เวลาและสถานที่**

เวลา ตุลาคม 2560 - กันยายน 2563

สถานที่ - แหล่งปลูกพืชผักที่สำคัญของประเทศไทย

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาอนุกรมวิธานเพลี้ยอ่อน (Hemiptera: Aphididae) ในพืชผัก (วงศ์แตง กะหล่ำ พริก มะเขือ และถั่ว) ของประเทศไทย จำนวน 915 ตัวอย่าง วิเคราะห์ชนิดโดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Blackman and Eastop (2000) รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีในพิพิธภัณฑ์แมลงของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร สามารถวิเคราะห์ชนิด ได้ 6 ชนิด โดยมีรายละเอียด ดังนี้

แนวทางการวินิจฉัยในระดับชนิด

1) ก. ส่วนหาง (cauda) มีลักษณะเป็นปุ่ม ไซฟังคูไล หรือ cornicles สั้น และไม่ยาวมากกว่าความกว้างของส่วนฐาน บริเวณส่วนท้องมีตุ่ม (tubercle) ที่มีขน

.....Sub family Calaphidinae.....

ข. ส่วนหาง (cauda) มีลักษณะยาวหรือทรงสามเหลี่ยม ไซฟังคูไล หรือ cornicles ยาวกว่าความกว้างของส่วนฐาน ส่วนท้องไม่มีตุ่ม (tubercle)

.....Sub family Aphidinae..... (2)

2) ก. ร่องหนวด (antennal tubercles) มีการพัฒนาดี ด้านบนของส่วนท้องมักมีจุดหรือแถบสี ดำ

.....Tribe Macrosiphinidini..... (3)

ข. ร่องหนวด (antennal tubercles) ไม่พัฒนาหรือมีการพัฒนาน้อย ด้านหลังของส่วนท้องมักมีสีเสมอกันไม่มีแถบหรือจุดสีเข้ม

.....Tribe Aphidini..... (5)

3) ก. ร่องบริเวณหน้าผาก (frontal tubercles) มีการพัฒนา และขยายไปยังส่วนของ vertex หนวดมีความยาวมากว่าลำตัว ไซฟังคูไลยาว

.....*Myzus persicae* (Sulzer).....

ข. ร่องบริเวณหน้าผาก (frontal tubercles) ไม่มีการพัฒนา หนวดสั้นกว่าลำตัว ไซฟังคูไลสั้น

.....(4).....

4) ก. ด้านบนของส่วนท้องมีจุดหรือแถบสีดำ ส่วนหางสั้นรูปทรงสามเหลี่ยม ไซฟังคูไลสั้นกว่าส่วนหาง

.....*Brevicorync brassicae* (Linnaeus)....

ข. ด้านบนของส่วนท้องไม่มีจุดหรือแถบสีดำ ไซฟังคูไลและส่วนหางมีสีอ่อน ส่วนหางมีลักษณะคล้ายลิ้น (tongue shaped) ไซฟังคูไลยาวกว่าส่วนหาง

.....*Lipaphis erysimi* (Kaltenbach).....

5) ก. บริเวณท้องด้านบนมีแถบสีดำ ส่วนหาง (cauda) และ ไซฟังคูไล มีสีดำ ส่วนของปาก

กรมวิชาการเกษตร

(rostral) ปล้องที่ 4 และ 5 สั้นกว่า

.....*Aphis craccivora* Koch.....

ข. บริเวณท้องด้านบนไม่มีแถบสีดำ ส่วนหาง (cauda) มีสีซีดจางกว่าไซฟังคูไล

.....(6).....

6) ก. ส่วนหาง (cauda) มีขน 8 - 10 เส้น สีจาง

.....*Aphis glycines* Matsumura.....

ข. ส่วนหาง (cauda) มีขน 4 - 7 เส้น สีเข้ม

.....*Aphis gossypii* Glover.....

***Aphis gossypii* Glover** (Figure 1.1.12.2)

Aphis bauhiniae Theobald, 1918; *Aphis citri* Ashmead of Essig, 1909; *Aphis citrulli* Ashmead, 1882; *Aphis cucumeris* Forbes, 1883; *Aphis cucurbiti* Buckton, 1879; *Aphis minuta* Wilson, 1911; *Aphis monardae* Oestlund, 188; *Cerosypha gossypii* Glover, 1877; *Doralis frangulae* Kaltenbach; *Toxoptera aurantii* var. limonii del Guercio, 1917

ลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธาน

เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดเล็ก ลำตัวยาว 1.30-1.58 มิลลิเมตร ตัวอ่อนที่ออกมาใหม่ๆ มีขนาดเล็กมาก สีเหลืองจางจบเกือบขาว เมื่อโตขึ้นมีสีเขียวอมเหลือง จนถึงสีเขียวเข้ม ขามีสีเหลือง ส่วนหัว หนวดปล้องที่ 1, 2 และส่วนปลายของหนวดปล้องสุดท้ายมีสีน้ำตาลอ่อน หนวดมีจำนวน 6 ปล้อง ยาวน้อยกว่าลำตัว ปากยาวถึงโคนขาคู่หลัง ไซฟังคูไลสีดำเข้มยาวกว่าส่วนหาง ส่วนหางมีรูปร่างลักษณะคล้ายลิ้น สีอ่อนกว่าไซฟังคูไล มีขนจำนวน 4-7 เส้น

พืชอาหาร พืชตระกูลแตง เช่น แตงกวา แตงแคนตาลูป แตงไทย แตงโม แตงล้าน บวบ และฟักทอง พืชตระกูลมะเขือ เช่น มะเขือเทศ มะเขือเปราะ มะเขือพวง มะเขือยาว พริก ถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังพบเพลี้ยอ่อนชนิดนี้ในพืชอื่น เช่น กะเพรา โหระพา กระเจี๊ยบ แก้วมังกร ฝ้าย ปอ ไม้ดอกไม้ประดับ ฯลฯ

แหล่งที่สำรวจพบ : นครปฐม พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี ลพบุรี สระบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี ชัยนาท นครสวรรค์ กำแพงเพชร พิจิตร พิษณุโลก เพชรบูรณ์ อุตรดิตถ์ ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน เชียงราย แพร่ น่าน ฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี สระแก้ว ระยอง จันทบุรี ตราด ชลบุรี ราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ ภูเก็ต พัทลุง ตรัง สงขลา

การตรวจวินิจฉัย (Diagnosis) **:** ไซฟังคูไลมีสีดำเข้มมีความยาวกว่าส่วนหาง ส่วนหางมีรูปร่างลักษณะคล้ายลิ้น มีสีอ่อนกว่า มีขน 4-7 เส้น เพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii* มีรูปร่างลักษณะคล้ายเพลี้ยอ่อนถั่วเหลือง *A. glycine* แตกต่างกันที่

เขตการแพร่กระจาย : มีเขตแพร่กระจายทั่วโลก

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material examined) specimens. 5 Slide, ChongKhaep, PhopPhra, Tak, 16°30'03"N, 98°43'50"E, 27.III.2018, K. Sonsiri; 12 Slide, SanamChai, BangSai, Ayutthaya, 14°13'13"N,

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

100°30'00"E, 22.VI.2018, K. Sonsiri. 10 Slide SamChuk, Samchuk, SuphanBuri, 16°30'03"N, 98°43'50"E, 27.III.2018, K. Sonsiri; 10 Slide Bangphueng, Ban Mi, Lop Buri, K. Sonsiri.

***Aphis craccivora* Koch** (Figure 1.1.12.3)

Aphis craccivora C.L.Koch, 1854; *Aphis atronitens* Cockerell, 1903; *Aphis beccarii* del Guercio, 1917; *Aphis cistiella* Theobald, 1923; *Aphis citricola* del Guercio, 1917; *Aphis dolichi* Montrouzier, 1861; *Aphis isabellina* del Guercio, 1917; *Aphis kyberi* Hottes, 1930; *Aphis laburni* Theobald; *Aphis leguminosae* Theobald, 1915; *Aphis loti Kaltenbach*, 1862; *Aphis mimosae* Ferrari, 1872; *Aphis oxalina* Theobald, 1925; *Aphis papilionacearum* van der Goot, 1918; *Aphis robiniae* Macchiati, 1885; *Doralida loti* (Kaltenbach); *Doralina craccivora* (Koch); *Doralina salsolae* Börner, 1940; *Doralis meliloti* Börner, 1939;

ลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธาน

เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดกลาง ลำตัวยาว 1.90 – 2.31 มิลลิเมตร ตัวอ่อนที่ออกมาใหม่ๆ มีขนาดเล็กมากสีเหลืองอ่อน เมื่อโตขึ้นมีสีเทาดำถึงสีดำเป็นมันเงา หัวและหนวดปล้องสุดท้ายสีน้ำตาล หนวดสั้นกว่าลำตัว ไซฟังคูไลและส่วนหางสีน้ำตาลหรือสีดำ ส่วนปากยาวถึงโคนขาคู่กลาง ไซฟังคูไลยาวกว่าส่วนหาง ส่วนหางมีรูปร่างคล้ายลิ้น มีขน 4-7 เส้น บริเวณส่วนท้องด้านบนมีแถบสีดำ

พืชอาหาร พืชตระกูลถั่ว (เช่น ถั่วฝักยาว ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วพู ถั่วแปป) พริก นอกจากนี้ยังพบในพืชอื่น เช่น มันสำปะหลัง ละหุ่ง ผักโขม ส้ม ขี้เหล็ก กระเจี๊ยบ ชบา มะเขือและแตงกวา เป็นต้น

แหล่งที่สำรวจพบ : นครปฐม พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี ลพบุรี สระบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี ชัยนาท นครสวรรค์ กำแพงเพชร พิจิตร พิษณุโลก เพชรบูรณ์ อุตรดิตถ์ ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน เชียงราย แพร่ น่าน ฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี สระแก้ว ระยอง จันทบุรี ตราด ชลบุรี ราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ ภูเก็ต พัทลุง ตรัง สงขลา

การตรวจวินิจฉัย (Diagnosis) **:** ส่วนหาง (caudal) มีรูปร่างคล้ายนิ้ว (tongue-shaped) ลักษณะเรียวยาว ร่องหนวด (antennal tubercles) มีการพัฒนาเล็กน้อย บริเวณส่วนท้องด้านบนมีแผ่นแข็งสีดำ ส่วนหางมีสีดำ

เขตการแพร่กระจาย : มีเขตการแพร่กระจายทั่วโลก

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material examined) specimens. 15 Slide, Sindhanat, LatBuaLuang,, Phranakhonsiayutthaya, 14°90'60"N, 100°23'30"E, 24.XI.2017, K. Sonsiri; 10 Slide, MaeFaekMai, Sansai, ChiangMai, 18°58'23.4"N, 98°58'31.9"E, 31.I.2018, K. Sonsiri; 12 Slide, ThakhianPom, ThungHuaChang, Lumphon, 18°07'34.4"N, 99°00'45.6"E, 30 I. 2018, K. Sonsiri; 10 Slide, Wiang Duk, Mueang, Nong Khai, 17°48'7"N, 102°41'36"E, 6.II.2019, K. Sonsiri.

กรมวิชาการเกษตร

***Aphis glycine* Matsumura** (Figure 1.1.12.4)

Aphis justiceae Shinji, 1922

ลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธาน

เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดเล็ก สีเหลือง สีเหลืองอ่อน หรือเหลืองอมเขียว ลำตัวยาว 1.2 – 1.5 มิลลิเมตร หนวดยาวกว่าลำตัวสีอ่อนใส ยกเว้นหนวดปล้องสุดท้ายสีน้ำตาล หนวดมีทั้งหมด 6 ปล้อง ร่องหนวด (frontal tubercle) มีการพัฒนาเล็กน้อย ส่วนปากยาวถึงโคนขาคู่หลัง ไซฟังคูไลและส่วนหางสีอ่อน ส่วนหางรูปร่างคล้ายลิ้น มีขน 8 – 10 เส้น

พืชอาหาร ถั่วเหลือง

แหล่งที่สำรวจพบ : แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ลำปาง

การตรวจวินิจฉัย (Diagnosis) **:** เพลี้ยอ่อนถั่วเหลือง *A. glycine* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับเพลี้ยอ่อน *A. gossypii* แต่ เพลี้ยอ่อน *A. gossypii* บริเวณส่วนหาง (cauda) มีขนจำนวน 4 – 7 เส้น เพลี้ยอ่อน *A. glycine* มีพืชอาหารคือถั่วเหลืองเพียงชนิดเดียว ส่วนเพลี้ยอ่อน *A. gossypii* มีพืชอาหารหลากหลายชนิด

เขตการแพร่กระจาย : ทวีปเอเชีย (จีน กัมพูชา ฮ่องกง อินโดยนีเซีย ญี่ปุ่น มาเลเซีย ฟิลิปินส์ เกาหลีใต้ ไต้หวัน ไทย และเวียดนาม) อเมริกาเหนือ (แคนนาดา อเมริกา) โอซีเนีย (ออสเตรเลีย)

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material examined) 15 Slide, Thung Yao, Pai, Mae Hong Son, 17°48'7"N, 102°41'36"E, 6.II.2019, K. Sonsiri.

***Brevicoryne brassicae* (Linnaeus)** (Figure 5)

Aphis brassicae 1758, *Brevicoryne raphanin* Schrank, 1801 (Aphis); *Brevicoryne isatidis* Boyer Fonscolombe, 1841 (Aphis); *Brevicoryne floris-rapae* Curtis, 1842 (Aphis); *Brevicoryne dusmeti* Gomez-Menor, 1950 partim.

ลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธาน

เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดกลาง ลำตัวยาว 2.00 – 2.16 มิลลิเมตร สีเขียวอมเทา มีไขสีเทาอ่อนเคลือบอยู่ทั่วตัว หนวดสั้นกว่าลำตัว มี 6 ปล้อง ปากยาวถึงโคนขาคู่กลาง ไซฟังคูไลมีลักษณะเรียวและจมลงไป ส่วนหางสั้นมีลักษณะเป็นรูปทรงสามเหลี่ยมมีขนจำนวน 5-7 เส้น

พืชอาหาร พืชตระกูลกะหล่ำ ได้แก่ ผักกาดกวางตุ้ง กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก ผักคะน้า ผักกาดเขียวปลี

แหล่งที่สำรวจพบ : เพชรบูรณ์ พิจิตร พิษณุโลก ลำพูน ลำปาง เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน แพร่ น่าน ลำราชบุรี อุทัยธานี ชัยนาท กาญจนบุรี

การตรวจวินิจฉัย (Diagnosis) **:** ตัวเต็มวัยเพลี้ยอ่อน *B. brassicae* มีลักษณะรูปร่างคล้ายใกล้เคียงกับเพลี้ยอ่อน *Lipaphis erysimi* คือ ลำตัวมีสีเขียวอมเทาปกคลุมด้วยไขหรือผงแป้งสีขาว ไซฟังคูไลสั้น และมีลักษณะแตกต่างกันคือ *B. brassicae* ลักษณะส่วนหางมีรูปทรงสามเหลี่ยม ส่วนเพลี้ยอ่อน *L. erysimi* ลักษณะส่วนหางคล้ายรูปลิ้น

เขตการแพร่กระจาย : มีเขตการแพร่กระจายในเขตอบอุ่น

ศรีวิชาการเกษตร

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material examined) 15 Slide, Sado Phong, KhaoKho, Phetchabun, 16°32'23"N, 100°59'26"E, 23.VII.2019, K. Sonsiri; 10 Slide, MaePhaek, SanSai, ChiangMai, 18°58'23.4"N, 98°58'31.9"E, 31.I.2019, K. Sonsiri. 10 Slide, SuanPhueng, SuanPhueng, Ratchaburi, 13°40'20"N, 98°27'26"E, 18.I.2019, K. Sonsiri; 10 Slide, ThungHuachang, ThungHuachang, Lamphun, 30.I.2018, K. Sonsiri.

***Lipaphis erysimi* Kaltenbach** (Figure 1.1.12.6)

Aphis pseudobrassicae Davis, 1914 *Aphis contermina* F.Walker, 1849; *Aphis erysimi* Kaltenbach, 1843; *Aphis mathiolellae* Theobald & F.V., 1917; *Hyadaphis erysimi* (Kaltenbach, 1843); *Rhopalosiphum papaveri* R.Takahashi, 1921; *Siphocoryne indobrassicae* Das & B.C., 1918

ลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธาน

เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดเล็ก ลำตัวยาว 1.66 – 1.92 มิลลิเมตร สีเหลือง สีเหลืองแกมเขียวหรือสีเขียว มีไขสีขาวตามปล้องของลำตัว ส่วนของหนวดค่อนข้างยาว หนวดปล้องที่ 1 และ 2 มีสีอ่อน ปล้องที่ 3 - 6 สีน้ำตาล ปากสั้น ปลายของส่วนปากอยู่ที่โคนขาคู่หน้า ไซฟังคูไลและส่วนหางมีสีอ่อน ส่วนหางมีรูปร่างคล้ายลิ้น

พืชอาหาร พืชตระกูลกะหล่ำ เช่น ผักกาดกวางตุ้ง กะหล่ำหัว กะหล่ำดอก คะน้า

แหล่งที่สำรวจพบ : นครปฐม อยุธยา สุพรรณบุรี ลพบุรี สระบุรี พิจิตร พิษณุโลก เพชรบูรณ์ อุตรดิตถ์ เชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง กาญจนบุรี ราชบุรี นครปฐม สระบุรี สุพรรณบุรี ลำพูน ลำปาง แม่ฮ่องสอน แพร่ น่าน ปราจีนบุรี สระแก้ว ฉะเชิงเทรา

การตรวจวินิจฉัย (Diagnosis) : ร่องหนวดมีการพัฒนาเล็กน้อย terminal process ยาวสองเท่าของส่วนฐานของหนวดปล้องสุดท้าย ส่วนหางมีรูปร่างคล้ายลิ้น หนวดปล้องที่ 3 ยาว 1.2-1.7 เท่าของไซฟังคูไล เพลี้ยอ่อน *L. erysimi* มีความคล้ายคลึงกับเพลี้ยอ่อนกะหล่ำ *B. brassicae* สามารถจำแนกได้จากลักษณะของส่วนหาง (cauda) *L. erysimi* ลักษณะส่วนหางคล้ายรูปลิ้น ส่วน *B. brassicae* ลักษณะของส่วนหางเป็นรูปสามเหลี่ยม ลักษณะส่วนหางมีรูปทรงสามเหลี่ยม ส่วนเพลี้ยอ่อน *L. erysimi* ลักษณะส่วนหางคล้ายรูปลิ้น

เขตการแพร่กระจาย : มีเขตการแพร่กระจายทั่วโลก

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material examineduj) specimens. 15 Slide, MaeFaek, Sansai, ChiangMai, 19°04'21.3"N, 98°56'44.8"E, 31.I.2018, K. Sonsiri; 10 Slide, SamoengNuea, Samoeng, ChiangMai, 18°58'39.38"N, 98°42'39.6"E, 31.I.2018, K. Sonsiri; 15 Slide, ChongKhaep, PhopPhra, Tak, 16°30'03"N, 98°43'50"E, 27.III.2018, K. Sonsiri; 10 Slide, SuanPhueng, SuanPhueng, Ratchaburi, 13°40'20"N, 99°27'26"E, 18.I.2018, K. Sonsiri.

กรมวิชาการเกษตร

***Myzus persicae* (Sulzer)** (Figure 1.1.12.7)

Aphis cynoglossi Walker, 1848, *Aphis derelicta* Walker, 1849, *Aphis rapae* Curtis, 1842, *Aphis redundans* Walker, 1849 sec. Laing, 1925, *Aphis suffragans* Walker, 1848, *Aphis vulgaris* Kyber, 1815 (sec. Walker), *Myzodes persicae* (Sulzer), *Myzodes tabaci* Mordvilko,1914, *Myzus dianthi* (Schrank), *Myzus malvae* Oestl., 1886 (sec. Theob.), *Phorodon cynoglossi* Williams, 1891 sec. Davis, 1911, *Rhopalosiphum betae* Theobald, 1913, *Rhopalosiphum calthae* Koch, 1854, *Rhopalosiphum lactucellum* Theobald, 1915, *Rhopalosiphum solani* Theobald, 1912 nonKalt, 1843, *Rhopalosiphum tuberosellae* Theobald, 1922, *Rhopalosiphum tulipae* Thos., 1879 sec. Davis, 1911, *Siphonophora achyrantes* Mon., 1879, *Siphonophora nasturtii* Koch, 1855

ลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธาน

เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดเล็ก ลำตัวยาว 1.68 – 1.84 มิลลิเมตร ตัวอ่อนที่ออกมาใหม่ๆ มีขนาดเล็กมากสีชมพูอ่อนปนเหลือง เมื่อโตขึ้นสีเหลืองอ่อน สีเหลืองอมเขียว หัวและหนวดมีสีเหลืองอ่อน หนวดมี 6 ปล้อง ความยาวเท่ากับลำตัว ปากยาวถึงโคนขาคู่กลาง ไซฟังคูไลยาว ส่วนหางยาวรูปร่างคล้ายนิ้ว ไซฟังคูไลและส่วนหาง สีจางใส

พืชอาหาร พริก ยาสูบ มะเขือเทศ นอกจากนี้ยังพบในพืชอื่น เช่น ผักกาด กะหล่ำดอก คะน้า ข้าว งา ถั่วต่างๆ มันฝรั่ง

แหล่งที่สำรวจพบ : นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี ลพบุรี สระบุรี นครสวรรค์ พิษณุโลก พิจิตร ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย แพร่ น่าน ร้อยเอ็ด นครพนม หนองคาย เพชรบูรณ์

การตรวจวินิจฉัย (Diagnosis) **:** ตัวเต็มวัย *M. persicae* สีน้ำตาลเข้มคล้ายเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* แต่เพลี้ยอ่อน *M. persicae* บริเวณส่วนท้องด้านบนไม่มีแถบสีดำ ไซฟังคูไล ส่วนขา หนวด ลำตัวมีสีใส ในขณะที่เพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* บริเวณส่วนท้องด้านบนมีแถบสีดำ ไซฟังคูไล ส่วนขา หนวด มีสีเข้ม

เขตการแพร่กระจาย : มีเขตการแพร่กระจายทั่วโลก

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material examined) 20 Slide, PhonSa, ThaBo, NongKhai, 17°49'32"N, 102°36'51"E, 6.II.2019, K. Sonsiri; 15 Slide, ThungThong, ThaMuang, Kanchanaburi, 13°59'87"N, 99°39'46"E, 22.IX.2020, K. Sonsiri; 15 Slide, KhonKaen, Mueang, RoiEt, 16°00'48"N, 103°35'8"E, 27.II.2018, K. Sonsiri.

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาอนุกรมวิธานเพลี้ยอ่อนวงศ์ Aphididae ศัตรูผักในวงศ์แตง (Cucerbitaceae) กะหล่ำ (Cruciferae) พริก มะเขือ (Solanaceae) และถั่ว (Leguminosae) ในแหล่งปลูกที่สำคัญของประเทศไทย ผลการตรวจสอบจำแนกชนิด โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยตามหลักอนุกรมวิธานแมลง รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีในพิพิธภัณฑ์แมลงของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร สามารถจัดจำแนกได้ 4 สกุล 6 ชนิด จากจำนวน 915 ตัวอย่าง ได้แก่ เพลี้ยอ่อนฝ้าย *Aphis gossypii* Glover เพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch เพลี้ยอ่อนถั่วเหลือง *Aphis glycines* Matsumura เพลี้ยอ่อนกะหล่ำ *Brevicorync brassicae* (Linnaeus) เพลี้ยอ่อนผัก *Lipaphis erysimi* Kaltenbach และเพลี้ยอ่อนยาสูบ *Myzus persicae* (Sulzer) ชนิดที่มี

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ความสำคัญได้แก่ เพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii* และเพลี้ยอ่อนยาสูบ *M. persicae* สามารถเข้าทำลายพืชได้หลากหลายวงศ์ เช่นวงศ์แตง (Cucerbitaceae) พริก มะเขือ (Solanaceae) และถั่ว (Leguminosae) สำรวจพบทุกจังหวัดและทุกภาคของประเทศไทย เพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* พบเข้าทำลายเฉพาะในพืชตระกูลถั่ว เพลี้ยอ่อนกะหล่ำ *B. brassicae* และเพลี้ยอ่อนผัก *L. erysimi* พบเข้าทำลายในพืชตระกูลกะหล่ำ และเพลี้ยอ่อนถั่วเหลือง *A. glycines* พบลงทำลายเพียงเฉพาะถั่วเหลืองพืชเดียวเท่านั้น ตัวอย่างที่ได้จากการสำรวจเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง พร้อมจัดทำฐานข้อมูล เพื่อหาแนวทางในการป้องกันกำจัดที่เหมาะสม และนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาด้านอื่นๆ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืชเพื่อประกอบในงานสำคัญด้านการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.ได้ข้อมูลรายละเอียดของเพลี้ยอ่อนศัตรูผักในวงศ์ พืชอาศัย สำหรับจัดทำฐานข้อมูลอย่างสมบูรณ์

2.ได้ข้อมูลเบื้องต้นที่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ สามารถนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาด้านอื่นๆ

3. มีตัวอย่างเพลี้ยอ่อนศัตรูผักในวงศ์แตง (Cucerbitaceae) กะหล่ำ (Cruciferae) พริก มะเขือ (Solanaceae) และถั่ว (Leguminosae) เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง เพื่อใช้ในการอ้างอิง ตรวจสอบความถูกต้อง เพื่อประกอบในงานสำคัญด้านการส่งออก และนำเข้าสินค้าเกษตร ตลอดจนใช้ในด้านกักกันพืช ซึ่งเป็นไปตามมาตรการด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช เพื่อปกป้องสุขภาพมนุษย์ สัตว์ พืชและสิ่งแวดล้อม

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.12.1 Aphids collected from various vegetable (Family Cucurbitae, Brassicaceae, Solanaceae and Leguminose) growing areas.

กรมวิชาการเกษตร

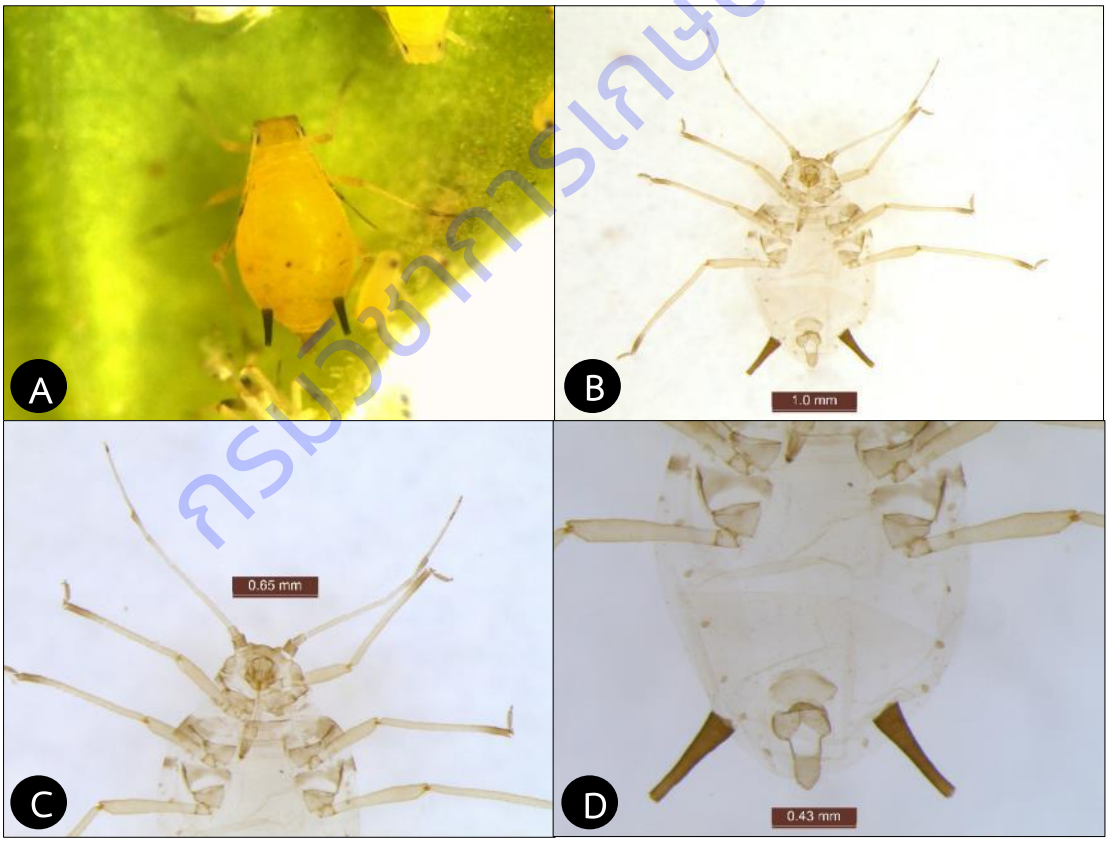


Figure 1.1.12.2 *Aphis gossypii* Glover**;** A. dorsal view of the body, B. dorsal view of the body on slide C. head, D. caudal and siphunculi on slide.

Figure 1.1.12.3 *Aphis craccivora* Koch; A. dorsal view of the body, B. dorsal view of the body on slide C. head, D. caudal and siphunculi on slide.

กรมวิชาการเกษตร

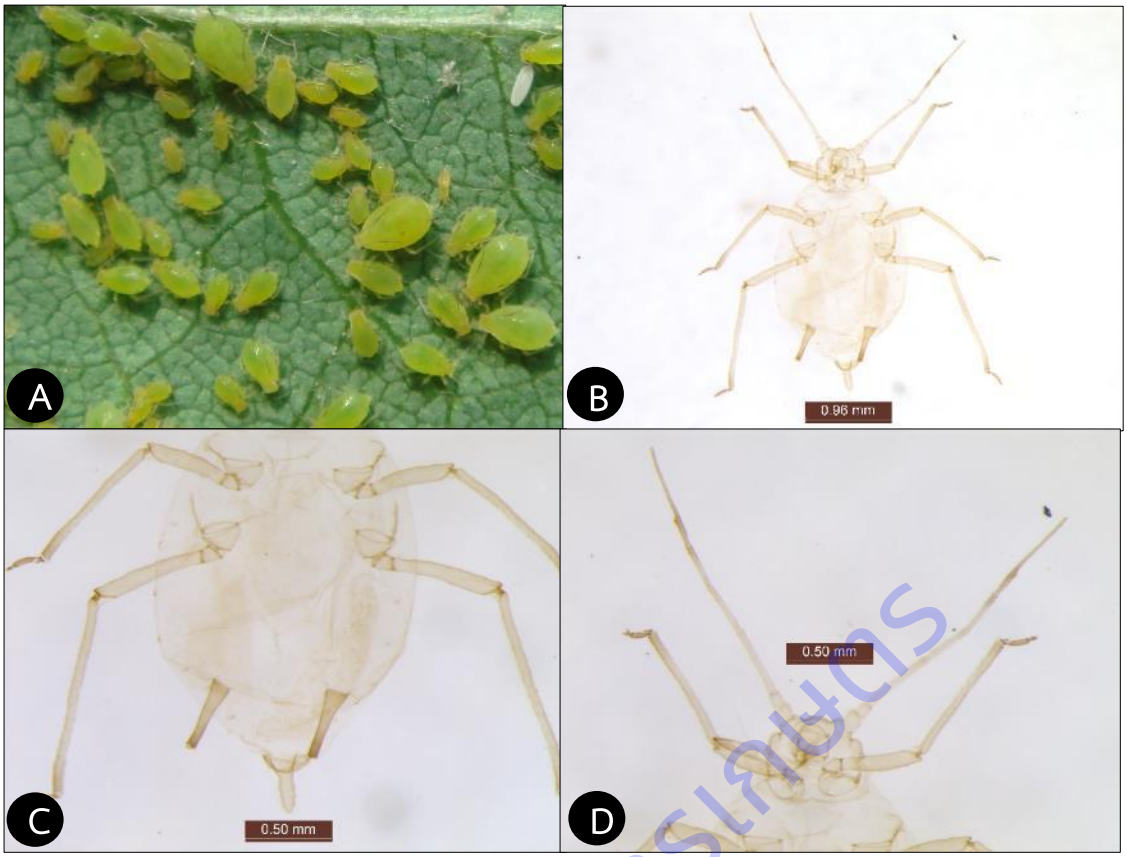


Figure 1.1.12.4 *Aphis glycine* Matsumura; A. dorsal view of the body, B. dorsal view of the body on Slide C. caudal and siphunculi on slide D. head

กรมวิชาการเกษตร

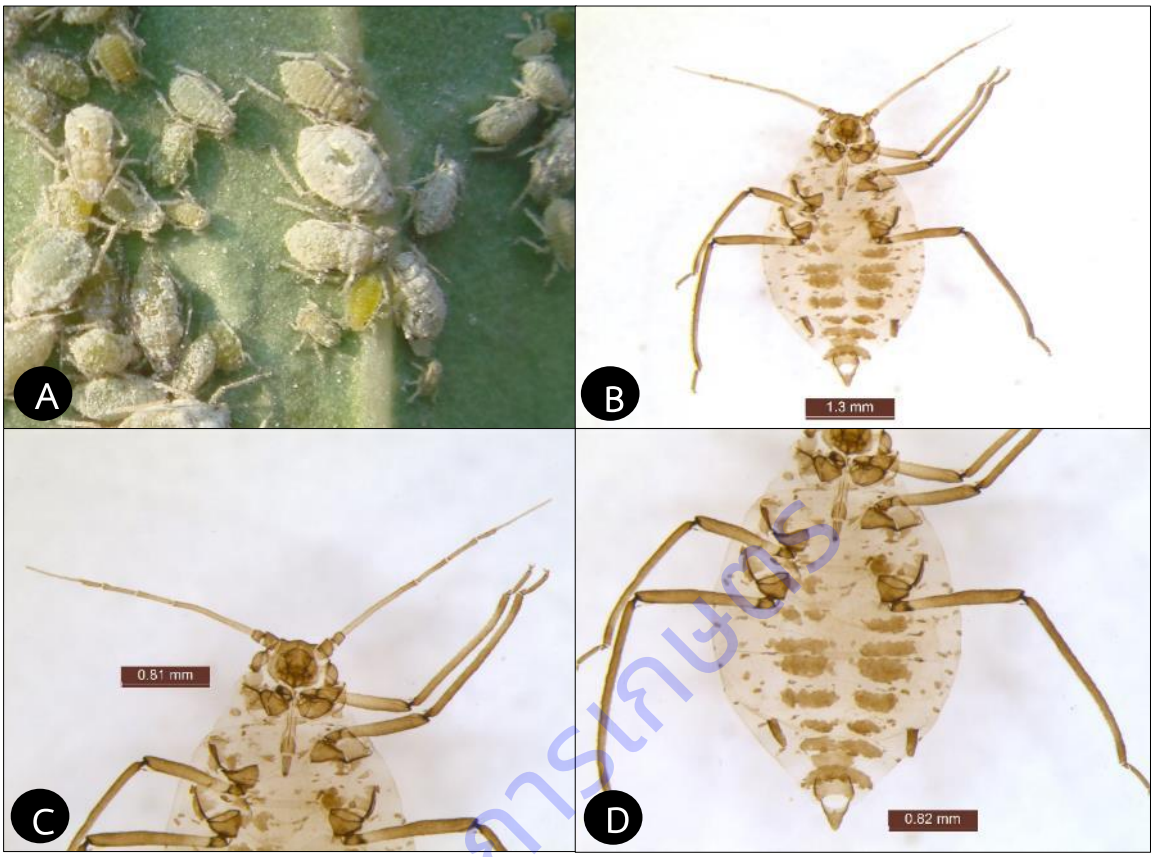


Figure 1.1.12.5 *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus)**;** A. dorsal view of the body, B. dorsal view of the body on slide C. head, D. caudal and siphunculi on slide.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.12.6 *Lipaphis erysimi* Kaltenbach**;** A. dorsal view of the body, B. dorsal view of the body on Slide C. head, D. caudal and siphunculi on slide.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.12.7 *Myzus persicae* (Sulzer)**;** A. dorsal view of the body, B. dorsal view of the body on Slide C. head, D. caudal and siphunculi on slide.

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.13 อนุกรมวิธานมวนสกุล *Nysius* (Hemiptera: Lygaeidae) ในประเทศไทย

Taxonomy of the genus *Nysius* (Hemiptera: Lygaeidae) in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	จอมสุรางค์ ดวงธิสาร	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	จารุวัตถ์ แต้กุล	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	เกศสุดา สนศิริ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

มวนสกุล *Nysius* Dallas (Hemiptera: Heteroptera: Lygaeidae) เป็นสกุลหนึ่งในวงศ์ Lygaeidae ที่พบได้ทั่วไป มีมากกว่า 100 ชนิด ทั่วโลก (Ashlock, 1967) มวนกลุ่มนี้พบทำลายพืชในกลุ่มพืชผักและดอกไม้ (Evan, 1936) สำหรับในประเทศไทยข้อมูลของมวนสกุลนี้ยังมีอยู่น้อยมาก วัตถุประสงค์ของการศึกษาคือ เพื่อทราบชนิด ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เขตการแพร่กระจาย พืชอาหาร เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นด้านกีฏวิทยา จากการศึกษาอนุกรมวิธานมวนสกุล *Nysius* ในประเทศไทยระหว่างเดือนตุลาคม 2561 – เดือนกันยายน 2563 โดยการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจากแปลงปลูกพืชทางการเกษตรในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคตะวันตกของประเทศไทย ซึ่งได้ทำการศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกและวิเคราะห์ชนิด ผลการศึกษาสามารถจำแนกมวนสกุลนี้ได้ 3 ชนิด คือ *Nysius dissimillis* (Izzard), *Nysius ceylanicus* (Motsch) และ*Nysius minor* (Distant) ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินของเหลวในเมล็ด ดอก ใบ หน่อ ของหน่อไม้ฝรั่ง แตงโม กะเพรา และดอกเบญจมาศ ทำให้ผลผลิตลดลง ซึ่งข้อมูลจากการศึกษาสามารถใช้ต่อยอดการศึกษาด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา และการใช้ประโยชน์ในการบริหารการจัดการศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสานได้อย่างเหมาะสมต่อไป

คำสำคัญ อนุกรมวิธาน มวนสกุล *Nysius*

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

The genus *Nysius* Dallas (Hemiptera: Heteroptera: Lygaeidae) is a genus in the family Lygaeidae that has seen in a generation. There are at least 100 described species of *Nysius* in the world (Ashlock, 1967). The bug populations damage vegetables and flowers (Evan, 1936). In Thailand, nonetheless, the taxonomic study of the genus has not yet been profoundly carried out. The goals of this research are to explore the species richness of the genus as well as its morphology distribution and host plant, to help strengthening the knowledgebase of Entomology. This taxonomic study was implemented from October 2018 to September 2020; the survey and collecting were executed on agricultural crops in Central, North, Northeast, East, West and South of Thailand. The species validation is mainly done via morphological characters. The results reveal that the genus is comprised of 3 known species: *Nysius dissimillis* (Izzard), *Nysius ceylanicus* (Motsch) and *Nysius minor* (Distant). Nymphs and adults suck fluid from seed, flower, leaf, sapling of asparagus, watermelon, basil and chrysanthemum which reduce the crops. These Knowledge that can apply for study the biology ecology of the pest and utilize suitable integrated pest management measures.

Keyword Taxonomy, Genus *Nysius*

ศรีวิชาการเกษตร

6. คำนำ

มวนในสกุล *Nysius* จัดอยู่ในวงศ์ Lygaeidae อันดับ Hemiptera เป็นมวนศัตรูพืชที่มีขนาดเล็ก พบทำลายพืชได้หลายชนิด เช่น หน่อไม้ฝรั่ง แตงโม แตงกวา แตงเมล่อน กะเพรา มะเขือ รวมถึงไม้ดอกไม้ประดับ เช่น ดาวเรือง เบญจมาศ เป็นต้น และพบระบาดอย่างรุนแรงในแปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่งเป็นพื้นที่มากกว่า 10 ไร่ ในตำบลหนองงูเหลือม อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม โดยมวนสกุลนี้จะดูดกินน้ำเลี้ยงหน่อไม้ฝรั่ง สร้างความเสียหายให้กับผู้ปลูกหน่อไม้ฝรั่งเป็นอย่างมาก เนื่องจากพืชชนิดนี้ถือเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยชนิดหนึ่งที่มีการผลิตเพื่อการส่งออกทั้งในรูปบริโภคสดและแปรรูปทางอุตสาหกรรม มวนสกุลชนิดนี้จะทำลายพืชโดยการดูดกินน้ำเลี้ยงทั้งจากส่วนของดอก ใบ และลำต้น ส่งผลให้พืชแสดงอาการใบและลำต้นเป็นสีเหลือง ต้นพืชได้รับความเสียหาย ชะงักการเจริญเติบโต หากมีการระบาดเป็นปริมาณมาก ต้นพืชจะแห้งตายได้ และในปัจจุบันพบว่ามีแนวโน้มแพร่ระบาดมากขึ้น นับว่าเป็นปัญหาที่สำคัญของเกษตรกร

ในต่างประเทศ เช่น ประเทศญี่ปุ่นได้มีการสำรวจและจัดจำแนกชนิดของมวนในสกุล *Nysius* พบมวนสกุลนี้ 4 ชนิด ได้แก่ *Nysius expressus* Distant, *Nysius plebeius* Distant, *Nysius caledoniae* Distant และ *Nysius graminicola* (Kolenati) (Nakatani, 2015) แต่สำหรับในประเทศไทยข้อมูลของมวนในสกุล *Nysius* ยังมีอยู่น้อยมาก และยังไม่เคยมีการศึกษาอนุกรมวิธานของมวนในสกุลนี้มาก่อน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานมวนในสกุล *Nysius* เพื่อได้ทราบชื่อชนิดที่ถูกต้อง ลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา พืชอาศัย และเขตการแพร่กระจาย เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นด้านกีฏวิทยาสามารถใช้ในการศึกษาต่อยอดสู่

งานวิจัยอื่นๆ เช่น การศึกษาด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา และการใช้ประโยชน์ในการบริหารการจัดการศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสานได้อย่างเหมาะสมต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1) ตัวอย่างมวนสกุล *Nysius* ที่รวบรวมได้จากแหล่งปลูกพืชของเกษตรกร

2) อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงโฉบแมลง ขวดดองแมลง ปากคีบ (forcep) พู่กัน ถุงพลาสติก กล่องพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง ถังรักษาความเย็น และเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)

3) สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง เช่น เอทิลอะซีเตท แอลกอฮอล์ 80%

4) อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง ได้แก่ เข็มไร้สนิม เบอร์ 3 เข็มหมุดหัวกลม กระดาษสามเหลี่ยม ไม้จัดรูปร่างแมลง ปากคีบ ตู้อบแมลง ฯลฯ

5) กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope, compound microscope และกล้องถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์

6) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของมวนสกุล *Nysius*

- วิธีการ

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างมวนสกุล *Nysius* จากแหล่งปลูกพืชของเกษตรกร เช่น แปลงหน่อไม้ฝรั่ง แตงโม กะเพรา เบญจมาศ เป็นต้น ในเขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย น่าน พะเยา เชียงใหม่ แพร่ พิษณุโลก พิจิตร และกำแพงเพชร เป็นต้น เขตภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดชัยนาท สิงห์บุรี อ่างทอง สระบุรี พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี และนครปฐม เป็นต้น เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดกาฬสินธุ์ ขอนแก่น มหาสารคาม หนองคาย นครพนม อุดรธานี และร้อยเอ็ด เป็นต้น ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดปราจีนบุรี และฉะเชิงเทรา เป็นต้น เขตภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ เป็นต้น (Figure A-B)

2) ใช้สวิงโฉบต้นพืชที่พบตัวเต็มวัยมวนสกุล *Nysius* เกาะอยู่ นำตัวอย่างมวนตัวเต็มวัยที่เก็บรวบรวมได้พร้อมพืชอาศัยใส่ถุงพลาสติก และทำการเก็บรักษาตัวอย่างมวนเพื่อนำไปจัดรูปร่าง โดยนำมวนใส่ลงในขวดน็อคแมลง ซึ่งมีสารเอทิลอะซีเตทอยู่ภายในขวด เมื่อมวนตายสนิทนำมวนใส่ลงในซองสามเหลี่ยมที่เตรียมไว้ พับเก็บให้เรียบร้อยและนำเก็บลงในกล่องพลาสติกที่เตรียมไว้สำหรับเก็บซองสามเหลี่ยม พร้อมทั้งบันทึกข้อมูลเบื้องต้น เช่น พืชอาหาร สถานที่ พิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) วัน เดือน ปี และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่าง

3) นำตัวอย่างมวนมาจัดรูปร่าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบ (oven) ปรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 5-7 วัน ขึ้นกับขนาดตัวอย่าง รวมถึงบันทึกข้อมูลหมายเลข (Lot number) ตัวอย่างในแต่ละครั้งที่ทำการสำรวจอย่างละเอียดโดยจะแยกเป็นชนิด พืชอาศัย และสถานที่

4) นำตัวอย่างมวนที่รวบรวมได้มาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยา เช่น ขนาดลำตัว รูปร่าง สี ลักษณะของส่วนหัว อก

กรมวิชาการเกษตร

ท้อง เพื่อนำไปเปรียบเทียบกันแต่ละชนิด โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยของ Blanford (1904) ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์

5) ถ่ายภาพลักษณะต่างๆ ของมวนที่ได้จากการศึกษา และบันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของมวนแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ วัน/เดือน/ปี สถานที่พบตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

6) จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) ชนิดของมวนสกุล *Nysius* ที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง ของมวนสกุลนี้

7) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง (มวนสกุล *Nysius* ทุกชนิดที่รายงานไว้ต้องเก็บรักษาตัวอย่างจริงไว้เพื่อการตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง)

- เวลาและสถานที่ : เดือนตุลาคม 2561 ถึง เดือนกันยายน 2563

1. แปลงปลูกพืชผัก ไม้ดอก ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย
2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง
   กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาอนุกรมวิธานมวนสกุล *Nysius* จากแหล่งปลูกพืชของเกษตรกร อาทิเช่น แปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่ง แตงโม กะเพรา เบญจมาศ เป็นต้น ในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคตะวันตกของประเทศไทย ทำการวิเคราะห์ชนิดโดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Blanford (1904) สามารถจำแนกชนิดได้ 3 ชนิด คือ *N. dissimillis*, *N. ceylanicus* และ *N. minor* โดยมีรายละเอียด ดังนี้

Genus *Nysius* Dallas, 1852

Nysius Dallas, 1852, List Hemipt. Brit. Mus. 2 : 511.-Usinger. 1942; B. P. Bishop Mus., Bull. 173 : 84.

ส่วนหัวมีรูปร่างคล้ายสามเหลี่ยมค่อนข้างกว้าง ส่วนของตายื่นออกมาเห็นเด่นชัดเจน ฐานของข้อต่อของหนวดสั้นเล็กน้อยกว่าส่วนหัว โดยทั่วไปหนวดปล้องที่ 2 จะยาวกว่าหนวดปล้องที่ 3 ลำตัวมีลักษณะเป็นรูปกลมรีหรือรูปไข่ ปีกส่วนอ่อนบางใส (membrane) มีเส้นปีก 5 เส้น ส่วนบริเวณต้นขาด้านหน้าไม่มีหนาม พบแพร่กระจายอยู่เกือบทั่วโลก **(Figure 1.1.13C-E)**

แนวทางการวินิจฉัยในระดับชนิด

1. อกปล้องแรก (pronotum) มีความกว้างมากกว่าความยาว บริเวณส่วนบนมีจุดเล็กๆ สีน้ำตาลดำ มีลักษณะคล้ายแถบพาดขวางอกปล้องแรก บริเวณขอบมุมอกมีกลุ่มจุดเล็กๆ สีดำ ตรงกลางอกมีสีน้ำตาลอ่อนซีดกว่าบริเวณส่วนบนของอก.....2

กรมวิชาการเกษตร

- มีความกว้างมากกว่าความยาว บริเวณส่วนบนมีจุดเล็กๆ สีค่อนข้างดำ มีลักษณะคล้ายแถบพาดขวางอกปล้องแรก บริเวณขอบมุมอกมีกลุ่มจุดเล็กๆ สีดำ ตรงกลางอกมีสีจุดเล็กๆ สีดำ ลักษณะคล้ายแถบเล็กๆ สองแถบ.....3

2. หนวดปล้องที่ 2 มีความยาวมากกว่าหนวดปล้องที่ 3..... *N. dissimillis*
3. หนวดปล้องที่ 2 มีความยาวมากกว่าหนวดปล้องที่ 3..... *N. ceylanicus*

- หนวดปล้องที่ 2 มีความยาวใกล้เคียงหรือเท่ากับหนวดปล้องที่ 3..... *N. minor*

***Nysius dissimillis* Izzard, 1936 (Figure 1.1.13F-G)**

Nysius dissimillis Izzard, 1936, R.J. (1963). *Ann. Mag. Nat. Hist. (10)* 17:577-600 [581].

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (description)

หัว (head): มีสีดำ มีความกว้างมากกว่าความยาว พบแถบสีน้ำตาลอยู่บนส่วนหัว มีแผ่นแข็ง (buccula) ลักษณะยาวรี อยู่ใต้ขอบตรงฐานของส่วนหัว อยู่ติดกับปล้องปากปล้องที่ 1

หนวด (antennae): หนวดมีลักษณะเรียวยาว มีสีเหลืองอมน้ำตาล หนวดปล้องที่ 2 มีความยาวมากกว่าหนวดปล้องที่ 3 หนวดปล้องที่ 2 มีความยาวเฉลี่ย 0.36±0.29 มิลลิเมตร หนวดปล้องที่ 3 มีความยาวเฉลี่ย 2.31±0.25 มิลลิเมตร (n=13)

อกปล้องแรก (pronotum): มีความกว้างมากกว่าความยาว บริเวณส่วนบนมีจุดเล็กๆ สีน้ำตาลดำ มีลักษณะคล้ายแถบพาดขวางอกปล้องแรก บริเวณขอบมุมอกมีกลุ่มจุดเล็กๆ สีดำ ตรงกลางอกมีสีน้ำตาลอ่อนซีดกว่าบริเวณส่วนบนของอก

ปีก (hemelytra): ไม่มีสี ปลายขอบปีก (hemelytra) ส่วนกึ่งแข็ง มีจุดรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าสีน้ำตาลดำ 3 อัน 1 อัน ตรงโคนเห็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าไม่ชัดเจน ส่วน 2 อัน ตรงกลางและตรงปลายเห็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าชัดเจน ปีกส่วน membrane ซีด ใส ไม่มีสี

ขา (leg): ขาส่วนต้นขา femur มีจุดสีน้ำตาลอมดำจำนวนมาก

ลำตัว (body): ลำตัวมีความยาวเฉลี่ย 2.13±1.67 มิลลิเมตร มีความกว้างเฉลี่ย 0.64±0.51 มิลลิเมตร (n=13)

การตรวจวินิจฉัย (diagnosis)

N. dissimillis หนวดปล้องที่ 2 มีความยาวมากกว่าหนวดปล้องที่ 3 ชัดเจน คล้ายกันกับ *N. ceylanicus* แต่มีความแตกต่างกันคือ *N. dissimillis* อกปล้องแรก (pronotum) บริเวณขอบมุมอกมีกลุ่มจุดเล็กๆ สีดำ ตรงกลางอกมีสีน้ำตาลอ่อนซีดกว่าบริเวณส่วนบนของอก

แหล่งที่สำรวจพบ (distribution): จังหวัดเชียงใหม่ พะเยา น่าน แพร่ พิจิตร นครสวรรค์ สุพรรณบุรี ฉะเชิงเทรา และกาญจนบุรี

ความสำคัญและพืชอาศัย: ตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ดูดกินใบ ดอก ยอดอ่อน หน่ออ่อน ของพืชผักและไม้ดอก เช่น หน่อไม้ฝรั่ง แตงโม กะเพรา โหรพา และดอกเบญจมาศ เป็นต้น

ตัวอย่างที่ใช้ในศึกษา (material examined)

สำนักวิทยบริการเกษตร

Chiang Mai: 2, EMBT. HEM. 200801-200802. Phayao: 4, EMBT. HEM. 200848-200851. Nan: 2, EMBT. HEM. 200880-200881. Nakhon Sawan: 1, EMBT. HEM. 200923. Phichit: 1, EMBT. HEM. 201994. Suphan Buri: 1, EMBT. HEM. 201050. Chachoengsao: 1, EMBT. HEM. 201187. Kanchanaburi: 1, EMBT. HEM. 201234.

***Nysius ceylanicus* (Motschulsky, 1863) (Figure 1.1.13H-I)**

Heterogaster ceylanicus Motschulsky. *Bull. Soc. Nat. Moscu.*, 36 : 78.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (description)

หัว (head): มีสีค่อนข้างดำ มีความกว้างมากกว่าความยาว พบแถบสีน้ำตาลอยู่บนส่วนหัว มีแผ่นแข็ง (buccula) ลักษณะยาวรี อยู่ใต้ขอบตรงฐานของส่วนหัว อยู่ติดกับปล้องปากปล้องที่ 1

หนวด (antennae): หนวดมีลักษณะเรียวยาว มีสีน้ำตาลดำ ข้อต่อปล้องหนวดทั้งหมดมีสีค่อนข้างดำ หนวดปล้องที่ 2 มีความยาวมากกว่าหนวดปล้องที่ 3 ชัดเจน หนวดปล้องที่ 2 มีความยาวเฉลี่ย 0.65±0.08 มิลลิเมตร หนวดปล้องที่ 3 มีความยาวเฉลี่ย 0.60±0.11 มิลลิเมตร (n=20)

อกปล้องแรก (pronotum): มีความกว้างมากกว่าความยาว บริเวณส่วนบนมีจุดเล็กๆ สีค่อนข้างดำ มีลักษณะคล้ายแถบพาดขวางอกปล้องแรก บริเวณขอบมุมอกมีกลุ่มจุดเล็กๆ สีดำ ตรงกลางอกมีสีจุดเล็กๆ สีดำ ลักษณะคล้ายแถบเล็กๆ สองแถบ

ปีก (hemelytra): ปีกส่วน corium มีสีน้ำตาลอ่อนซีด ปีกส่วน veins มีจุดสีน้ำตาลอ่อนเล็กๆ กระจายอยู่ ปลายขอบปีก (hemelytra) ส่วนกึ่งแข็ง มีจุดรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าสีน้ำตาลดำ 3 อัน ชัดเจน ปีกส่วน membrane ซีด ใส ไม่มีสี

ขา (leg): ขามีสีน้ำตาลอ่อน ส่วนต้นขา femur มีจุดสีน้ำตาลเทา ส่วนปลายขา tibia และ tarsi มีสีน้ำตาลเทาเช่นกัน

ลำตัว (body): ลำตัวมีความยาวเฉลี่ย 3.55±0.44 มิลลิเมตร มีความกว้างเฉลี่ย 1.05±0.13 มิลลิเมตร (n=20)

การตรวจวินิจฉัย (diagnosis)

N. ceylanicus มีความคล้ายคลึงกับ *N. minor* แต่มีความแตกต่างกันคือ *N. ceylanicus* หนวดปล้องที่ 2 มีความยาวมากกว่าหนวดปล้องที่ 3 ชัดเจน

แหล่งที่สำรวจพบ (distribution): จังหวัดเชียงใหม่ พะเยา พิษณุโลก สุโขทัย ราชบุรี อุดรธานี ขอนแก่น ศรีษะเกษ นครราชสีมา ฉะเชิงเทรา และกาญจนบุรี

ความสำคัญและพืชอาศัย: ตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ดูดกินใบ ดอก ยอดอ่อน หน่ออ่อน ของพืชผักและไม้ดอก เช่น แตงโม แตงกวา กะเพรา แมงลัก ถั่วลิสง และดอกเบญจมาศ เป็นต้น

ตัวอย่างที่ใช้ในศึกษา (material examined)

Chiang Mai: 1, EMBT.HEM. 200811. Phayao:2, EMBT. HEM. 200865-200866. Phitsanulok: 1, EMBT. HEM. 200921. Sukhothai: 2, EMBT. HEM. 201980-201981. Udon Thani: 1, EMBT. HEM.

กรมวิชาการเกษตร

201093. Khon Kaen: 1, EMBT. HEM. 201120. Sisaket: 1, EMBT. HEM. 201152. Nakhon Ratchasima: 1, EMBT. HEM. 201164. Chachoengsao: 5, EMBT. HEM. 201190-201194. Ratchaburi: 1, EMBT. HEM. 201290. Kanchanaburi: 4, EMBT. HEM. 201250-201253.

***Nysius minor* Distant, 1909 (Figure 1.1.13J-K)**

Nysius minor Distant, *Ann. Mag. Nat. Hist*., (8) 3 : 321; *A. M. N. H.* (8) iii, p. 32.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (description)

หัว (head): มีสีค่อนข้างดำ มีความกว้างมากกว่าความยาว พบแถบสีน้ำตาลอยู่บนส่วนหัว มีแผ่นแข็ง (buccula) ลักษณะยาวรี อยู่ใต้ขอบตรงฐานของส่วนหัว อยู่ติดกับปล้องปากปล้องที่ 1

หนวด (antennae): หนวดมีลักษณะเรียวยาว หนวดปล้องที่ 2 และ 3 มีสีน้ำตาล หนวดปล้องที่ 1 และ 4 มีสีดำ หนวดปล้องที่ 2 มีความยาวเท่าๆ กับหนวดปล้องที่ 3 หนวดปล้องที่ 2 มีความยาวเฉลี่ย 0.58±0.10 มิลลิเมตร หนวดปล้องที่ 3 มีความยาวเฉลี่ย 0.58±0.10 มิลลิเมตร (n=20)

อกปล้องแรก (pronotum): มีความกว้างมากกว่าความยาว บริเวณส่วนบนมีจุดเล็กๆ สีค่อนข้างดำ มีลักษณะคล้ายแถบพาดขวางอกปล้องแรก บริเวณขอบมุมอกมีกลุ่มจุดเล็กๆ สีดำ ตรงกลางอกมีสีจุดเล็กๆ สีดำ ลักษณะคล้ายแถบเล็กๆ สองแถบ

ปีก (hemelytra): ปีกส่วน corium มีสีน้ำตาลอ่อนซีด ปีกส่วน veins มีจุดสีน้ำตาลอ่อนเล็กๆ กระจายอยู่ ปลายขอบปีก (hemelytra) ส่วนกึ่งแข็ง มีจุดรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าสีน้ำตาลดำ 3 อัน ชัดเจน ปีกส่วน membrane ซีด ใส ไม่มีสี

ขา (leg): ขามีสีน้ำตาลอ่อน ส่วนต้นขา femur มีจุดสีน้ำตาลเทา ส่วนปลายขา tibia และ tarsi มีสีน้ำตาลเทาเช่นกัน

ลำตัว (body): ลำตัวมีความยาวเฉลี่ย 3.61±0.59 มิลลิเมตร มีความกว้างเฉลี่ย 1.06±0.16 มิลลิเมตร (n=20)

การตรวจวินิจฉัย (diagnosis)

N. minor มีความคล้ายคลึงกับ *N. ceylanicus* แต่มีความแตกต่างกันคือ *N. minor* หนวดปล้องที่ 2 มีความยาวเท่าๆ กับหนวดปล้องที่ 3

แหล่งที่สำรวจพบ (distribution): จังหวัดเชียงใหม่ พะเยา ตาก กำแพงเพชร ลพบุรี อยุธยา สุพรรณบุรี อุบลราชธานี ขอนแก่น ศรีษะเกษ ฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี และกาญจนบุรี

ความสำคัญและพืชอาศัย: ตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ดูดกินใบ ดอก ยอดอ่อน หน่ออ่อน ของพืชผักและไม้ดอก เช่น หน่อไม้ฝรั่ง แตงโม กะเพรา แมงลัก และดอกเบญจมาศ เป็นต้น

ตัวอย่างที่ใช้ในศึกษา (material examined)

Chiang Mai: 1, EMBT. HEM. 200840. Phayao: 3, EMBT. HEM. 200869-200871. Tak: 1, EMBT. HEM. 200896. Kamphaeng Phet: 1, EMBT. HEM. 200950. Lopburi: 1, EMBT. HEM. 201017. Phra Nakhon Si Ayutthaya: 1, EMBT. HEM. 201030. Suphan Buri: 1, EMBT. HEM. 201059. Ubon

กรมวิชาการเกษตร

Ratchathani: 1, EMBT. HEM. 201070. Khon Kaen: 1, EMBT. HEM. 201132. Sisaket: 2, EMBT. HEM. 201159-201160. Chachoengsao: 3, EMBT. HEM. 201200-201202. Prachinburi: 1, EMBT. HEM. 201230. Kanchanaburi: 3, EMBT. HEM. 201260-201262.

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาอนุกรมวิธานมวนสกุล *Nysius* ในระหว่างเดือนตุลาคม 2561 – เดือนกันยายน 2563 ได้ทำการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจากแปลงปลูกพืชผักและไม้ดอกของเกษตรกร เช่น หน่อไม้ฝรั่งแตงโม กะเพรา เบญจมาศ เป็นต้น ในเขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย น่าน พะเยา เชียงใหม่ แพร่ พิษณุโลก พิจิตร และกำแพงเพชร เป็นต้น เขตภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดชัยนาท สิงห์บุรี อ่างทอง สระบุรี พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี และนครปฐม เป็นต้น เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดกาฬสินธุ์ ขอนแก่น มหาสารคาม หนองคาย นครพนม อุดรธานี และร้อยเอ็ด เป็นต้น ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดปราจีนบุรี และฉะเชิงเทรา เป็นต้น เขตภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ เป็นต้น ผลการตรวจสอบจำแนกชนิด สามารถวิเคราะห์ชนิด 3 ชนิด คือ *Nysius dissimillis* (Izzard), *Nysius ceylanicus* (Motsch) และ *Nysius minor* (Distant) ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินของเหลวในเมล็ด ดอก ใบ หน่อ ของหน่อไม้ฝรั่ง แตงโม กะเพรา และดอกเบญจมาศ ทำให้ผลผลิตลดลง ซึ่งข้อมูลจากการศึกษาสามารถใช้ต่อยอดการศึกษาด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา และการใช้ประโยชน์ในการบริหารการจัดการศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสานได้อย่างเหมาะสมต่อไป การศึกษาครั้งนี้ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัยในการจำแนกชนิดและเพื่อความถูกต้องแม่นยำมากขึ้นควรมีการศึกษาด้านชีวโมเลกุลเพื่อเป็นข้อมูลเพิ่มเติมในอนาคต

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำผลการศึกษาชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องของมวนในสกุล *Nysius* พร้อมทั้งลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา พืชอาศัย และเขตการแพร่กระจาย เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นด้านกีฏวิทยาสามารถใช้ในการศึกษาต่อยอดสู่งานวิจัยอื่นๆ เช่น การศึกษาด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา และการใช้ประโยชน์ในการบริหารการจัดการศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสานได้อย่างเหมาะสมต่อไป

2. นำข้อมูลมวนในสกุล *Nysius* ที่ได้จากการศึกษา จัดทำฐานข้อมูลแมลง และเก็บรักษาตัวอย่างแมลงไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลงของกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ซึ่งเป็นแหล่งข้อมูลทางด้านกีฏและสัตววิทยาที่สำคัญของประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.13A-B) collecting *Nysius* sp.

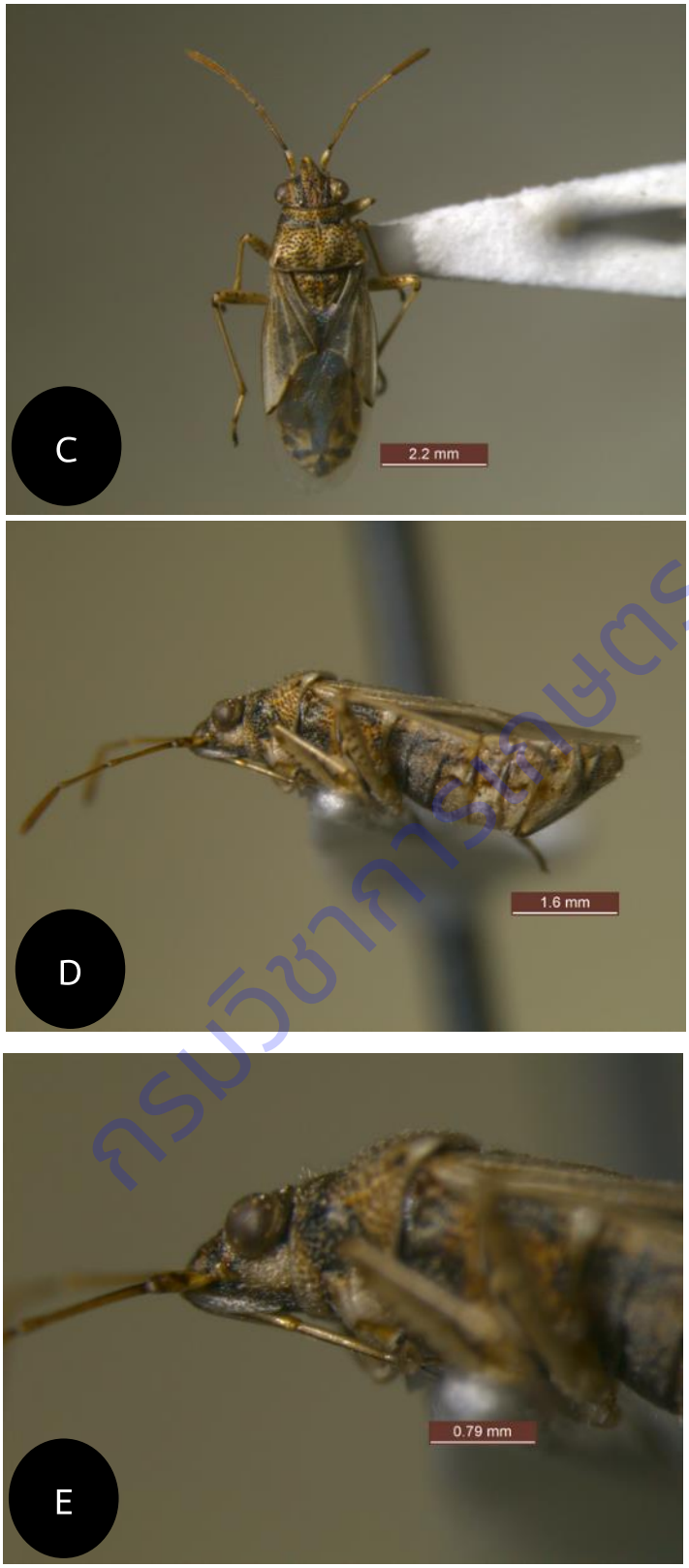


Figure 1.1.13C-E) *Nysius* sp. C) dorsal habitus; D) lateral habitus; E) head and pronotum habitus.

กรมวิชาการเกษตร

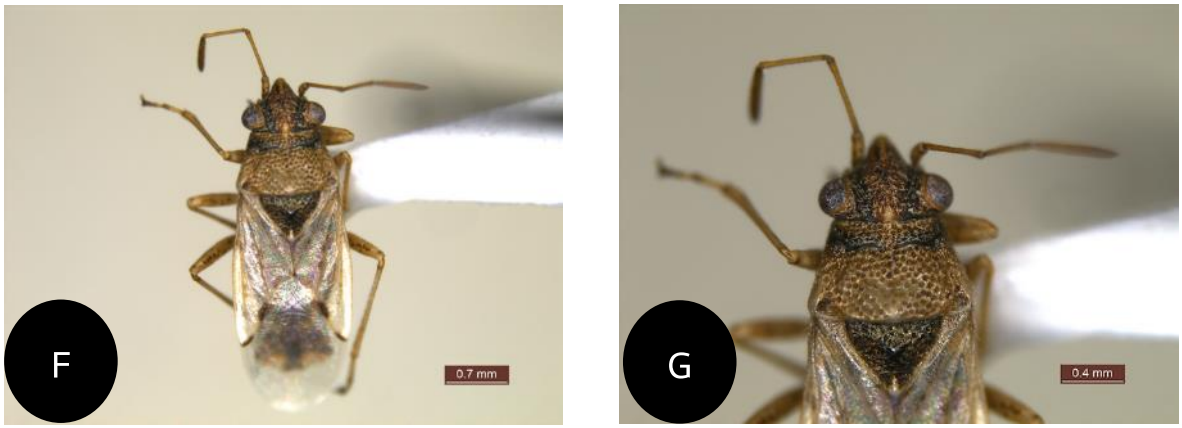


Figure 1.1.13F-G) adult *N. dissimillis*

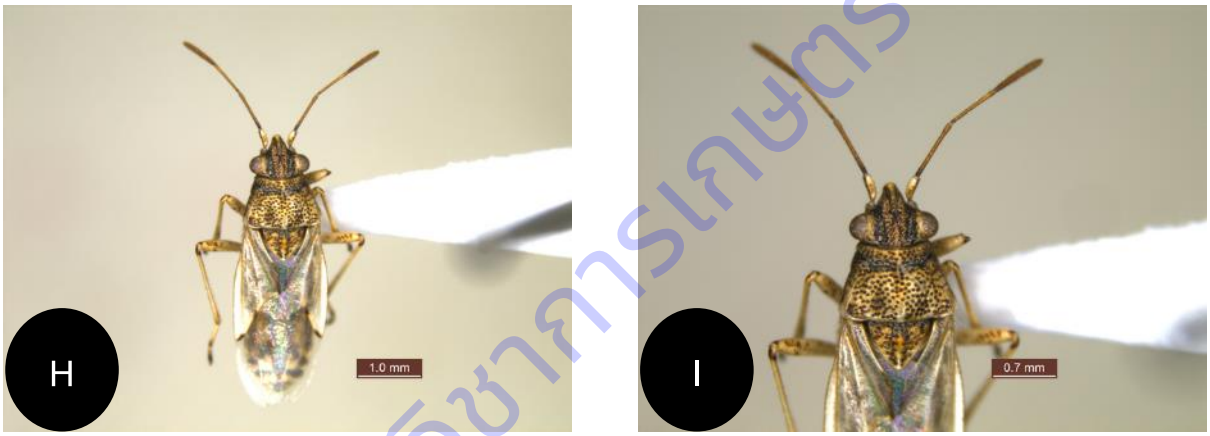


Figure 1.1.13H-I) adult *N. Ceylanicus*

Figure 1.1.13J-K) adult *N. minor*

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.14 อนุกรมวิธานและการศึกษาชนิดของตั๊กแตน (Orthoptera) ในพืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย

Taxonomic study and species richness of grasshoppers (Orthoptera) on economically important field crops in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง จารุวัตถ์ แต้กุล กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน ยุวรินทร์ บุญทบ สุนัดดา เชาวลิต ชมัยพร บัวมาศ อิทธิพล บรรณาการ เกศสุดา สนศิริ อาทิตย์ รักกสิกร จอมสุรางค์ ดวงธิสาร สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ปัจจุบันตั๊กแตนจัดเป็นแมลงศัตรูพืชเฝ้าระวังที่สำคัญของประเทศชนิดหนึ่ง เนื่องจากเกิดการระบาดในหลายประเทศ เช่น ตั๊กแตนไผ่ และตั๊กแตนทะเลทราย รวมถึงเป็นศัตรูพืชที่กลับมาระบาดอีกครั้งซึ่งได้แก่ตั๊กแตนข้าว อย่างไรก็ตามการศึกษาด้านอนุกรมวิธานและชนิดของตั๊กแตนในประเทศไทยไม่ได้ดำเนินการมาเป็นระยะเวลากว่า 30 ปี จึงจำเป็นอย่างยิ่งต้องศึกษาสถานภาพความเป็นปัจจุบันของศัตรูพืชชนิดนี้ วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้คือเพื่อทราบชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ ลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา และได้แนวทางการวินิจฉัยชนิดของตั๊กแตนในพืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ดำเนินการศึกษาตั้งแต่ กันยายน 2561 – ตุลาคม 2563 โดยสำรวจและเก็บตัวอย่างตั๊กแตนในพื้นที่แปลงปลูกพืชไร่เศรษฐกิจ ได้แก่ อ้อย ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และแปลงวัชพืชและในเขตป่าใกล้เคียง ผลการศึกษาพบตั๊กแตนทั้งสิ้น 3 วงศ์ 8 วงศ์ย่อย 23 ชนิด ได้แก่ Acrididae: *Acrida willemsei* Dirsh 1954, *Gonista bicolor* (De Haan 1842), *Trilophidia annulata* (Thunberg 1815), *Phlaeoba infumata* Brunner 1893, *Phlaeoba antennata* Brunner 1893, *Calephorus vitalisi* I. Bolivar 1914, *Oedaleus abruptus* (Thunberg 1815), *Aiolopus thalassinus* (Fabricius 1781), *Gesonula mundata* (Walker 1870), *Oxya japonica* (Thunberg 1824), *Oxya hyla* Serville 1831, *Pseudoxya diminuta* (Walker 1871), *Apalacris varicornis* Walker 1870, *Hieroglyphus banian* (Fabricius 1798), *Spathosternum prasiniferum* (Walker 1871), *Choroedocus violaceipes* Miller 1934, *Atractomorpha psittacina* (De Haan 1842), *Atractomorpha crenulata* (Fabricius 1793), *Pyrgocorypha subulate* (Thunberg 1815), *Conocephalus longipennis* (Haan 1842), *Holochlora nigrothympana* Ingrisch 1990, *Orthelimaea leeuwenii* (Karny 1926) และ *Hexacentrus unicolor* Serville 1831 ดำเนินการจัดทำแนวทางการวินิจฉัยตั๊กแตนหนวดสั้นซึ่งเป็นตั๊กแตนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ บรรยายประวัติทางอนุกรมวิธาน รหัส LSID ซึ่งสามารถเชื่อมต่อกับฐานข้อมูลตั๊กแตนโลก ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เขตการแพร่กระจายรวมถึงตัวอย่างอ้างอิง (voucher specimens) ผลการทดลองครั้งนี้ส่งผลกระทบต่องานวิจัยด้านการป้องกันกำจัดตั๊กแตนศัตรูพืช การศึกษาสถานภาพและเฝ้าระวังศัตรูพืชต่างถิ่นรุกราน รวมถึง

กรมวิชาการเกษตร

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของตั๊กแตนเพื่อใช้ประโยชน์อนุรักษ์ เพิ่มมูลค่าของทรัพยากรชีวภาพ สนับสนุนยุทธศาสตร์ชาติว่าด้วย เศรษฐกิจชีวภาพ เศรษฐกิจหมุนเวียนและเศรษฐกิจสีเขียว (BCG: Bio-Circular-Green Economy)

Abstract

Grasshoppers currently are considered one of the most important pest surveillance of Thailand. Although this pest causes outbreak in several countries as well as eastern part of Thailand, taxonomic study and species richness of this insect have not yet been reviewed for more than 30 years. Taxonomic status of grasshoppers especially on field crops, therefore, need to be validated. The objectives of this study are to evaluate species richness as well as generate key to species of grasshoppers on the important field crop of Thailand. The research was implemented from September 2018 – October 2020. Field collecting and survey were carried out on field crops, i.e., sugarcane, corn, maize, millet as well as on weeds and surrounding area. The results revealed that 3 families, 8 subfamilies and 23 species of grasshoppers were found. They contained Acrididae: *Acrida willemsei* Dirsh 1954, *Gonista bicolor* (De Haan 1842), *Trilophidia annulata* (Thunberg 1815), *Phlaeoba infumata* Brunner 1893, *Phlaeoba antennata* Brunner 1893, *Calephorus vitalisi* I. Bolivar 1914, *Oedaleus abruptus* (Thunberg 1815), *Aiolopus thalassinus* (Fabricius 1781), *Gesonula mundata* (Walker 1870), *Oxya japonica* (Thunberg 1824), *Oxya hyla* Serville 1831, *Pseudoxya diminuta* (Walker 1871), *Apalacris varicornis* Walker 1870, *Hieroglyphus banian* (Fabricius 1798), *Spathosternum prasiniferum* (Walker 1871), *Choroedocus violaceipes* Miller 1934, *Atractomorpha psittacina* (De Haan 1842), *Atractomorpha crenulata* (Fabricius 1793), *Pyrgocorypha subulate* (Thunberg 1815), *Conocephalus longipennis* (Haan 1842), *Holochlora nigrothympana* Ingrisch 1990, *Orthelimaea leeuwenii* (Karny 1926) and *Hexacentrus unicolor* Serville 1831. The key to species of short horn grasshoppers on field crops in Thailand were generated. The species descriptions included taxonomic history, LSID number which can link to World grasshopper database, general morphology, distribution, collected locality as well as voucher specimens. The results of this research pose an impact on pest control research and pest surveillance. The result also supports the research on valued-added biodiversity assessments of national policy (BCG: Bio Circular and Green Economy).

คำสำคัญ ตั๊กแตน ตั๊กแตนหนวดสั้น ตั๊กแตนหนวดยาว Acrididae Tettigoniiidae Orthoptera ความหลากหลายทางชีวภาพ การวินิจฉัยชนิด อนุกรมวิธาน

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Keywords: Locust, Grasshopper, Acrididae, Tettigoniiidae, Orthoptera, Biological Diversity, Species richness, Taxonomy, Identificatoin

คำนำ

ตั๊กแตนจัดอยู่ในอันดับ (Order) Orthoptera แบ่งออกเป็น 2 อันดับย่อย(Suborder) ตั๊กแตนหนวดสั้นและตั๊กแตนแคระจัดอยู่ในอันดับย่อย Caelifera ส่วนตั๊กแตนหนวดยาวอยู่ในอันดับย่อย Ensifera ในอันดับย่อยนี้ได้รวมจิ้งหรีด จิ้งโกร่งและแมลงกะชอน เข้าไว้ด้วย อย่างไรก็ตามตั๊กแตนในอันดับย่อย Caelifera จัดว่าเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 infraorder ได้แก่ Tridactylidea และ Acrididea สำหรับ infraorder Tridactyleidea มีวงศ์ใหญ่ (superfamily) เพียงวงศ์ใหญ่เดียวได้แก่ Tridactyloidea ซึ่งประกอบด้วย 3 วงศ์ได้แก่ Cylindrachetidae, Ripipterygidae และ Tridactylidae ใน infraorder Acrididea ประกอบด้วย 7 วงศ์ใหญ่ได้แก่ Acridoidea, Eumastacoidea, Pneumoroidea, Pyrgomirphoidea, Tanaoceroidea, Trigonopterygoidea และ Tetrigoidea ตั๊กแตนใน 6 วงศ์ใหญ่แรกจัดว่ามีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นตั๊กแตนหนวดสั้นที่พบเห็นโดยทั่วไป และมีความสำพันธ์ในระบบอนุกรมวิธานเป็นแบบ monophyletic group คือวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษเดียวกัน ได้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มวงศ์ใหญ่ Acridomorpha ส่วนวงศ์ใหญ่ Tetrigoidea มีเพียงวงศ์เดียวได้แก่ Tetrigidae หรือตั๊กแตนแคระ วงศ์ใหญ่ที่มีความสำคัญและมีความหลากชนิดสูงที่สุดในอันดับ Orthoptera ได้แก่ Acridoidea ซึ่งประกอบด้วย 11 วงศ์ 7,680 ชนิด (Song, 2010) ซึ่งตั๊กแตนวงศ์ที่มีความสำคัญและระบาดเป็นศัตรูพืช ทำให้เกิดปัญหาทางเศรษฐกิจในปัจจุบันได้แก่วงศ์ Acrididae ได้มีรายงานการระบาดของตั๊กแตนไผ่ (Yellow-spined bamboo locust): *Ceracris kiangsu* Tsai ในสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ซึ่งทาง สปป.ลาว ได้รายงานในที่ประชุมคณะกรรมาธิการอารักขาพืชระหว่างประเทศแห่งภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิก ครั้งที่ 29 เมื่อปี 2558 (The Asia and Pacific Plant Protection Commission: APPPC) ว่าเกิดการระบาดอย่างรุนแรงของตั๊กแตนไผ่ ทำลายพืชเศรษฐกิจ เช่น ข้าวไร่ ข้าวโพด และลูกเดือย การระบาดเกิดขึ้นในพื้นที่แขวงหัวพัน ซึ่งเป็นเขตติดต่อกับประเทศสาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม มีรายงานพบตั๊กแตนชนิดนี้ครั้งแรกในปี 2472 ที่สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนจีน ในพื้นที่มณฑล เสฉวน หูเป่ย เกียงสู หูหนาน เกียงสี ฝูเจียน และกวางตุ้ง ซึ่งสร้างความเสียหายอย่างรุนแรงหลายครั้ง ในช่วงปี 2478 – 2489 โดยพบทำความเสียหายอย่างรุนแรงในพืชไผ่ ข้าวโพด และข้าว (Centre for overseas pest research, 1982) อย่างไรก็ตาม ไม่มีรายงานการระบาดของตั๊กแตนชนิดนี้ในประเทศไทย แต่มีรายงานว่าเคยพบที่จังหวัดเชียงใหม่และสุพรรณบุรี (Roffey, 1979) รวมทั้งมีตัวอย่างอ้างอิงในพิพิธภัณฑ์แมลงของกรมวิชาการเกษตร ซึ่งเก็บได้จากไผ่และธัญพืช ที่จังหวัดสุพรรณบุรี (ปี 2506) เชียงใหม่ (ปี 2518) และสุรินทร์ (ปี 2518) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะอากาศที่ร้อนของประเทศไทยไม่เหมาะสมกับแมลงชนิดนี้ ในปี 2558 มีรายงานการระบาดของตั๊กแตนไผ่เพิ่มในแขวงพงสาลีซึ่งเป็นเขตติดต่อกับสาธารณรัฐประชาชนจีนและปัจจุบันพบการระบาดในแขวงหลวงพระบางซึ่งอยู่ห่างจากประเทศไทยเพียง 114 กิโลเมตร การระบาดมีความรุนแรงจนไม่สามารถควบคุมการระบาดได้ ดังนั้นสปป.ลาว จึงได้ขอความช่วยเหลือไปยังองค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) ให้เข้ามาช่วยควบคุมการระบาดของตั๊กแตนไผ่ปัจจุบันยังไม่สามารถควบคุมได้เนื่องจากพื้นที่ที่มีการระบาดของ

ตั๊กแตนไผ่มีสภาพภูมิประเทศเป็นป่าและภูเขาสูงชัน ทำให้ไม่สามารถดำเนินการป้องกันกำจัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตั๊กแตนชนิดนี้ พบแพร่กระจายอย่างกว้างขวางบริเวณพื้นที่ป่าไผ่ ทางตอนใต้ของประเทศจีน ด้านตะวันออกเฉียงใต้ของมณฑลแจงสี บริเวณทางลาดเชิงเขา มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 300 – 400 เมตร บางครั้งพบในพื้นที่มีความสูงกว่าระดับน้ำทะเลถึง 780 เมตร มีรายงานว่าพบแมลงชนิดนี้วางไข่จำนวนมากใต้ผิวดินไข่ของตั๊กแตนชนิดนี้จะฟักในบริเวณที่มีแสงแดดส่องถึง โดยมีอุณหภูมิสูงกว่า 32 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามตัวเต็มวัยชอบอาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีอากาศค่อนข้างเย็น ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยมีการแพร่กระจายเป็นกลุ่ม ตัวอ่อนในระยะสุดท้ายเริ่มมีการอพยพเคลื่อนย้ายเป็นกลุ่มใหญ่ซึ่งเป็นระยะที่เริ่มสร้างความเสียหายให้กับพืชได้ ระยะตัวเต็มวัยจะสร้างความเสียหายได้กว้างขวางและรุนแรงที่สุดนอกจากพืชกลุ่มไผ่แล้วแมลงชนิดนี้ยังเป็นศัตรูพืชที่สำคัญของพืชในตระกูลหญ้า (graminivorous) และยังพบว่าสามารถเข้าทำลายพืชตระกูลปาล์มและพืชล้มลุกบางชนิด ถึงแม้ขณะนี้ยังไม่มีรายงานการระบาดสร้างความเสียหายภายในประเทศไทย แต่อย่างไรก็ตามตั๊กแตนชนิดนี้อาจจะมีโอกาสเข้ามาแพร่ระบาดสร้างความเสียหายในประเทศไทยได้

ตั๊กแตนไฮโดรไกลฟัสหรือตั๊กแตนข้าว เป็นศัตรูสำคัญอันดับสองรองมาจากตั๊กแตนปาทังกา มีพื้นที่การระบาดน้อยกว่าตั๊กแตนปาทังกา ในประเทศไทยพบตั๊กแตนสกุล *Hieroglyphus* 4 ชนิดได้แก่ *H. banian* Fabricius, *H. annmulicornis* Shiraki, *H. concolor* Walker และ *H. tonknensis* Boliver ตั๊กแตนชนิดนี้เป็นศัตรูที่สำคัญของข้าว เคยระบาดอย่างรุนแรงที่ประเทศอินเดีย ในอดีตจากการสำรวจในประเทศไทย พบการระบาดในป่าหญ้าคา แฝก ต่อมาเมื่อมีการปลูกอ้อยและข้าวโพดในพื้นที่ดังกล่าว ตั๊กแตนก็ระบาดในพื้นที่ที่ปลูกพืชนั้น และมีการระบาดเรื้อรังเรื่อยมา ตั๊กแตนไม่วางไข่และฟักเป็นตัวอ่อนในแปลงปลูกพืช แต่จะวางไข่และฟักเป็นตัวอ่อนที่หัวไร่หรือปลายนาแล้วเข้ามาระบาดในแปลงปลูกพืช โดยทั่วไปแล้วลักษณะการระบาดของตั๊กแตนข้าวจะคล้ายกับตั๊กแตนปาทังกา คือจะกัดกินเนื้อใบอ้อยเหลือทิ้งไว้แค่ก้านใบอ้อย ไร่อ้อยที่ถูกทำลายอย่างหนักจะเห็นแต่ก้านใบทั้งแปลง ปัจจุบันมีรายงานการระบาดอย่างเร่งด่วนของตั๊กแตนข้าว *Hieroglyphus banian* Fabricius เข้าทำลายอ้อยในแปลงเกษตรกร อำเภอโพธาราม และอำเภอบ้านบึง จังหวัดราชบุรี มีเนื้อที่ประมาณ 500 ไร่ ตั๊กแตนชนิดนี้เคยมีรายงานพบการระบาดในประเทศไทย โดยพบการระบาดในข้าวที่จังหวัด กาฬสินธุ์ (ปี 2492) สกลนคร (ปี 2499) และมีการระบาดในอ้อย ที่จังหวัดอุตรดิตถ์ (ปี 2504) และมีรายงานการระบาดเรื่อยมาในพื้นที่เขตภาคกลางตอนบน ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยระบาดร่วมกับตั๊กแตนปาทังกาจนถึงปี 2522 และหลังจากนั้นไม่มีรายงานการระบาดที่รุนแรง (ณัฐกฤติ 2547) จากสถานการณ์ดังกล่าว เห็นได้ว่าตั๊กแตนศัตรูพืชมีแนวโน้มที่จะกลับมาระบาดอีกครั้ง วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้คือเพื่อทราบชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ ลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา และได้แนวทางการวินิจฉัยชนิดของตั๊กแตนในพืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. กับดักแมลงประกอบไปด้วย กับดักแสงไฟ (Light trap) กับดักถ้วยสีเหลือง (Yellow pan trap) กับดักมุ้ง (Malaise trap และ Slam trap) รวมทั้งสวิงจับแมลง

กรมวิชาการเกษตร

2. ขวดฆ่าแมลง (killing jar) ซึ่งบรรจุน้ำยาเอททิล อะซิเตด (ethyl acetate)

3. อุปกรณ์สำหรับจัดรูปร่างแมลงเช่น เข็มสแตนเลส กระดาษลอกลาย setting board

4. ethanol ความเข้มข้น 95% เพื่อใช้ในการจัดเก็บตัวอย่างสดของแมลง

5. กระดาษคุณภาพสูง (acid free paper) เพื่อการเก็บรักษาตัวอย่างแห้งในระยะยาว

6. อุปกรณ์บันทึกเขตการแพร่กระจายในระดับละเอียด (GPS)

7. Forceps ขนาดเล็ก

8. ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับตัวอย่างสด

9. กล้องจุลทรรศน์สเตริโอกำลังขยายมากกว่า 50 เท่าขึ้นไป

10. สารเคมีในการทำแห้งตัวอย่างแมลง

11. โรงเรือนทดลองกรณีจำเป็นต้องเลี้ยงตั๊กแตน

12. กล้องจุลทรรศน์สเตริโอแบบกำลังขยายสูงสำหรับงานทางอนุกรมวิธานแมลง Leica M205 C พร้อมเลนซ์ Planapo Objective 1.0x สำหรับการถ่ายภาพเพื่อตีพิมพ์ในเอกสารวิชาการ

- **วิธีการ**

<u>การเก็บและรักษาตัวอย่างตั๊กแตน (Acquisition of research material)</u>

ดำเนินการเก็บตัวอย่างตั๊กแตนในพื้นที่ปลูกพืชของเกษตรกร ทั้งในฤดูและนอกฤดูเกษตรกรรม รวมทั้งพื้นที่ป่าหรือสภาพแวดล้อมธรรมชาติ ในปี 2561 ดำเนินการเก็บตัวอย่าง พื้นที่ภาคกลางและภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัด กรุงเทพมหานคร นครปฐม นนทบุรี ปทุมธานี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ชัยนาท สิงห์บุรี อยุธยา อ่างทอง นครสวรรค์ อุตรดิตถ์ แพร่ น่าน เชียงใหม่ เชียงรายและแม่ฮ่องสอน เป็นต้น ดำเนินการเก็บตัวอย่างตั๊กแตนด้วยวิธีการหลัก 2 วิธี ได้แก่ การเดินสำรวจใช้สวิงจับแมลงและใช้มือเก็บตัวอย่าง และ การวางกับดักแมลง โดยกับดักที่ใช้ได้แก่ กับดักแสงไฟ (Light trap) กับดักถ้วยสีเหลือง (Yellow pan trap) กับดักมุ้ง (Malaise trap และ Slam trap) หลังจากได้ตัวอย่างตั๊กแตนแล้ว ดำเนินการฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า (killing jar) ซึ่งบรรจุน้ำยาเอททิล อะซิเตด (ethyl acetate) หลังจากนั้นห่อตัวอย่างตั๊กแตนที่ตายแล้วด้วยกระดาษลอกลาย บิดหัวท้ายลักษณะคล้ายท็อฟฟี่ เก็บตัวอย่างลงกล่องพลาสติกใส่แมลง นำกล่องใส่ตัวอย่างใส่ไว้ในกล่องรักษาความเย็นอีกชั้นเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเน่าเสียหาย หลังจากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รอเพื่อจัดรูปร่างและทำตัวอย่างแห้งต่อไป

การจัดรูปร่างตั๊กแตนเพื่อศึกษาด้านอนุกรมวิธานแมลง นำตัวอย่างตั๊กแตนจัดรูปร่าง บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) โดยจัดให้มีรูปร่างเหมือนลักษณะในธรรมชาติ การจัดวางขาและหนวดอยู่ในลักษณะสมมาตรเหมือนกันทั้งสองข้าง หลังจากนั้นนำไปอบให้แห้งในตู้อบ (oven) ปรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15-30 วัน ขึ้นกับขนาดตัวอย่าง การศึกษาครั้งนี้นอกจากตัวอย่างตั๊กแตนที่ได้จากการสำรวจแล้ว ยังใช้ตัวอย่างที่มีอยู่เดิมในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตรด้วย รวมถึงตัวอย่างที่ได้รับจากนักวิชาการ หรือจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิดจากหน่วยต่างๆ ภายในกรมวิชาการเกษตร

<u>การจัดจำแนกโดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา</u>

กรมวิชาการเกษตร

การตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo microscope แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ ลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญเช่น สี ขนาดลำตัว ลักษณะและตำแหน่งของหนามแหลมบนลำตัว โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิด ประกอบกับการเปรียบเทียบตัวอย่างแมลงที่ได้จำแนกแล้วในพิพิธภัณฑ์ ดำเนินการจัดจำแนกในระดับอันดับ (order) และวงศ์ (family) โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Triplehorn & Johnson (2005) นับจำนวนของแมลงในแต่ละอันดับในแต่ละครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่าง ทั้งนี้เพื่อศึกษาถึงศักยภาพของกับดัก วิธีการเก็บแมลง แมลงในกลุ่มเป้าหมาย Orthoptera การจัดหมวดหมู่ในระดับ สกุลและชนิดใช้แนวทางการวินิจฉัยประกอบจาก Roffey (1979) และ Centre for overseas pest research (1982) ทั้งนี้ได้รับความร่วมมือจากนักวิจัยด้านตั๊กแตนจากประเทศสหรัฐอเมริกา ช่วยในการตรวจวินิจฉัยชนิด หลังจากนั้นดำเนินการถ่ายภาพใต้กล้อง stereo microscope ใช้โปรแกรมการถ่ายภาพ AutoMontage หรือ Cartograph extended-focus โดยใช้ JVC KY-F75U digital camera, Leica Z16 APOA

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

- บันทึกข้อมูลรายละเอียดแต่ละตัวอย่างที่เก็บได้ ประกอบด้วย แหล่งที่เก็บ พิกัดทางภูมิศาสตร์ พืชอาศัย วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง เทคนิคการเก็บตัวอย่าง ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง เป็นต้น
- การลงทะเบียนในระบบฐานข้อมูลตั๊กแตนในประเทศไทยโดย ตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมีรายละเอียดแยกกันอย่างชัดเจน (specimen barcode) หากมีการค้นพบชื่อวิทยาศาสตร์ชนิดใหม่ ดำเนินการตีพิมพ์และขึ้นทะเบียนกับ IZCN-Zoobank (Polaszek *et al.* 2005)
- รูปแบบการเขียนตีพิมพ์ผลงานวิจัย (taxonomic description) ดำเนินการตามแบบมาตรฐานของ Pyle *et al*. (2008)
- เก็บรักษาตัวอย่างแมลง ณ พิพิธภัณฑ์แมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
- **เวลาและสถานที่**

ดำเนินการสำรวจและเก็บตัวอย่างตั๊กแตนในพื้นที่เกษตรกรรมโดยเฉพาะในพืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญเช่น อ้อย ข้าวโพด ข้าวฟ่าง เป็นต้น ทั้งในฤดูและนอกฤดูเกษตรกรรม รวมทั้งพื้นที่ป่าหรือสภาพแวดล้อมธรรมชาติ โดยมีแผนการดำเนินการดังนี้

ปี 2561 ดำเนินการเก็บตัวอย่าง พื้นที่ภาคกลางและภาคเหนือ ได้แก่จังหวัด กรุงเทพฯ อยุธยานนทบุรี ปทุมธานี อ่างทอง นครสวรรค์ อุตรดิตถ์ แพร่ น่าน เชียงราย เป็นต้น

ปี 2562 ดำเนินการเก็บตัวอย่าง พื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่จังหวัดการพสินธุ์ มหาสารคาม ระยอง จันทบุรี ตราด ขอนแก่น ชัยภูมิ เป็นต้น

ปี 2563 ดำเนินการเก็บตัวอย่าง พื้นที่ภาคตะวันตก ได้แก่ ราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี เป็นต้น การตรวจวินิจฉัยจัดหมวดหมู่ของตั๊กแตน ดำเนินการ ณ พิพิธภัณฑ์แมลงและห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

<u>หมายเหตุ: ทุกขั้นตอนในการดำเนินการ วิธีการทำการทดลองเหมือนกันในแต่ละปี</u>

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

อันดับ Orthoptera

แมลงในอันดับนี้ได้แก่ ตั๊กแตน จิ้งหรีด และแมลงกระชอน แมลงในกลุ่มนี้มีวิวัฒนาการค่อนข้างช้าหรืออยู่ทางตอนล่างของสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับกลุ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบไม่สมบูรณ์เช่น แมลงสาบ โครงสร้างทางสัณฐานวิทยาลดรูปน้อยจึงนิยมนำมาศึกษาด้านสรีรวิทยาของแมลงเบื้องต้น แมลงกลุ่มนี้มี 4 ปีก ปีกคู่หน้าส่วนใหญ่ขยายยาว มีเส้นปีกมากและหนาหรือที่เรียกว่า tegmina ส่วนปีกคู่หลังกว้างมีเนื้อปีกใสหรือ membranous ลำตัวยาว รยางค์รอบลำตัวพัฒนาอย่างสมบูรณ์ อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียหลายชนิดยาว เพื่อใช้วางไข่ในดินที่ลึกประมาณ 5 – 10 เซนติเมตร ส่วนของรยางค์บริเวณปลายขาหรือ tarsi มีประมาณ 3 – 4 ปล้อง

ตั๊กแตนแบ่งออกหลักๆ ได้ 2 กลุ่มคือตั๊กแตนหนวดสั้นและตั๊กแตนหนวดยาว ตั๊กแตนหนวดสั้นอยู่ในอันดับย่อย Caelifera จัดอยู่ในกลุ่มที่กระโดดค่อนข้างไกลหรือที่เรียกว่า jumping orthoptera ส่วนของกล้ามขาหลัง (hind femur) ใหญ่และแข็งแรง หนวดสั้น รยางค์ขา (tarsi) มี 3 ปล้องหรือน้อยกว่า อวัยวะทำเสียง (tympana) ส่วนใหญ่ตั้งอยู่บริเวณด้านข้างของท้องปล้องที่ 1 อวัยวะสืบพันธุ์ของแมลงกลุ่มนี้สั้นทั้งเพศผู้และเพศเมีย ตั๊กแตนกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากเป็นกลุ่มที่ระบาดเข้าทำลายผลผลิตทางการเกษตร เมื่อมีการระบาดมากมีการอพยพเป็นกลุ่ม (swamp) มักเรียกว่า Locust ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในวงศ์ Acrididae ในการทดลองนี้ดำเนินการศึกษาแนวทางการวินิจฉัยชนิด และศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเฉพาะตั๊กแตนหนวดสั้นเท่านั้น ส่วนตั๊กแตนหนวดยาวจัดอยู่ในอันดับย่อย Ensifera ซึ่งจะรวมแมลงในกลุ่มจิ้งหรีดเข้าไปด้วย หนวดของแมลงกลุ่มนี้ยาว ยาวคล้ายกับเส้นผม รยางค์ของขา (tarsi) มีประมาณ 3 – 4 ปล้อง อวัยวะทำเสียง (tympana) ตั้งอยู่บริเวณปลายขาคู่หน้า (front tibia) อวัยวะสืบพันธุ์ยาว โดยเฉพาะเพศเมียมีลักษณะยาวคล้ายดาบหรือหอก สำหรับในการทดลองนี้แสดงเฉพาะชื่อชนิด แหล่งที่เก็บตัวอย่างและตัวอย่างอ้างอิงของตั๊กแตนหนวดยาวเท่านั้น

แนวทางการวินิจฉัยชนิดของตั๊กแตนในพืชไร่ที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย

Key to species of grasshoppers on economic important field crops in Thailand

1) Hind tarsi with 3-segmented, front and middle tarsi 2 – 3 segmented; ovipositor short; antennae usually short, rarely more than half as long as body; auditory organs (tympana) on sides of first abdominal segment ..... Pyrgomorphidae Acrididae 2

– Usually all tarsi, 4-segmented as least middle tarsi; ovipositor long sword-shaped; antennae long, usually as long as body or longer; auditory organs (tympana), if present, at base of front tibiae ..... Tettigoniidae

2) Lower basal lobe of hind femur relatively longer than upper; deep thin furrow along mid-line of fastigial furrow (Figure 1.1.14.2, 1.1.14.3, 1.1.14.7, 1.1.14.8) Pyrgomorphidae 3

กรมวิชาการเกษตร

– Lower basal lobe of hind femur shorter than or as long as upper; no deep furrow along mid-line of fastigium (Figure. 1.1.14.2, 1.1.14.3, 1.1.14.5,1.1.14.6)
Acrididae 4

3) Medium length, slender; head conical, face very strong oblique; fastigium of vertex well develop but shorter than the length of the compound eye (Figure 1.1.14.7, 1.1.14.25)
***Atractomorpha crenulata* (Fabricius 1793)**

– Exceptional slender; head lanceolate, face very strongly oblique; fastigium of vertex very long, greater than length of compound eye (Figure 1.1.14.8)
***Atractomorpha psittacina* (De Haan 1842)**

4) Prosternal process or peg absent (Figure 1.1.14.18) Acridinae 5

– Prosternal process or peg present (Figure 1.1.14.17) Hemiacridinae Oxyninae Coptacridinae 12

5) Antennae widened and flattened at base, sword-like (Figure 1.1.14.23 – 1.1.14.26) 6

– Antennae filiform (Figs. 1, 4, 27, 28 – 31) 10

6) Body elongate, straw-like; head present in front of eyes for longer than distance between eyes (Figure 1.1.14.23, 1.1.14.24) 7

– Body normal, not elongate; head only produced in front of eyes for a distance equal to distance between eyes (Figure 1.1.14.26, 1.1.14.27, 1.1.14.37) 8

7) Lobes of hind knee elongate, pointed (Figure 1.1.14.19, 1.1.14.23) ***Acrida willemsei* Dirsh 1954**

– Lobes of hind knee not elongate, rounded (Figure 1.1.14.20, 1.1.14.24) ***Gonista bicolor* (De Haan 1842)**

8) Hind margin of pronotum acute; hind wing with crescent-shaped brown marking in middle of basal half (Figure 1.1.14.1, 1.1.14.11) ***Calephorus vitalisi* I. Bolivar 1914**

– Hind margin of pronotum obtuse; hind wing with brown coloration at apex and sometimes around posterior margin (Figure 1.1.14.1, 1.1.14.9, 1.1.14.10) 9

9) Antenna flattened basally, pale or white-tripped; Pronotum with distinct lateral carinae, medial carina not distinctly interrupted by main transverse sulcus (Figure 1.1.14.9)
***Phlaeoba antennata* Brunner 1893**

– Antenna flattened basally, unicolorous or dark apically, not pale or white-tripped; Pronotum with medial carina distinctly interrupted by transverse sulcus (Figure 1.1.14.10)
***Phlaeoba infumata* Brunner 1893**

ศูนย์วิทยทรัพยากร

10) Pronotum with two tooth-like projections on medial carina in front of posterior transverse furrow (Figure 1.1.14.12)..... ***Trilophidia annulata* (Thunberg 1815)**

– Pronotum in profile arched or straight in front of posterior transverse furrow 11

11) Hind wing with crescent-shaped black-brown band across middle; smaller species about 25 mm long; hind tibia without bluish or red (Figure 1.1.14.22, 1.1.14.30)

..... ***Oedaleus abruptus* (Thunberg 1815)**

– Hind wing without black coloration across middle; smaller species about 35 mm long; hind tibia with bluish or red (Figure 1.1.14.21, 1.1.14.27)..... ***Aiolopus thalassinus* (Fabricius 1781)**

12) Lower external lobe of hind femur not extended into spine-like apex (Figure 1.1.14.4) Oxyinae 13

– Lower external lobe of hind femur extended into spine-like apex (Figure 1.1.14.4)

..... Hemiacridinae Coptacridinae Eyprepocnemidinae 16

13) Tegmina with series of regular, parallel transverse stridulatory veinlets on radical area; female ovipositor valves short (Figure 1.1.14.35)..... ***Gesonula mundata* (Walker 1870)**

– Tegmina without series of regular, parallel transverse stridulatory veinlets on radical area; female ovipositor valves long and slender (Figure 1.1.14.32 – 1.1.14.34)..... 14

14) Head shorter than pronotum; face in profile oblique; vertex convex from above, fastigium rounded; Elytra and wings short extending beyond the middle of hind femur (Figure 1.1.114.14, 1.1.14.33)..... ***Pseudoxya diminuta* (Walker 1871)**

– Head longer than pronotum; frontal ridge sulcate; fastigium of vertex short, without mid longitudinal carina; Elytra and wings developed extending longer than the middle of hind femur (Figure 1.1.14.13, 1.1.14.34)..... 15

15) Supra-anal plate in male appear weakly trilobate; ovipositor valves in female with long teeth, the apical ones curved (Figure 1.1.14.13, 1.1.14.34)..... ***Oxya hyla* Serville 1831**

– Supra-anal plate in male with basal folds, size variable; ovipositor valves in female with short teeth, lateral longitudinal ridges on subgenital plate with spines apically (Figure 1.1.14.32)

..... ***Oxya japonica* (Thunberg 1824)**

16) Mesosternal lobes rectangular or acute (Figure 1.1.14.4, 1.1.14.15, 1.1.14.16) Hemiacridinae 17

– Mesosternal lobes rounded or obtuse (Figure 1.1.14.4)..... Coptacridinae Eyprepocnemidinae 18

ศูนย์วิทยทรัพยากร

17) Robust species, medium to large, body length 28 – 65 mm; dorsal pronotum cylendrical without lateral carina (Figure 1.1.1.14.15, 1.1.14.28)..... ***Hieroglyphus banian* (Fabricius 1798)**

– Small to medium size, body length 12 – 23 mm; dorsal pronotum flat, lateral carina present (Figure 1.1.14.16)..... ***Spathosternum prasiniferum* (Walker 1871)**

18) Subgenital plate with transverse fold; supra anal plate with attenuate or trilobate apex; pronotum without distinct lateral carina (Figure 1.1.14.29)..... ***Apalacris varicornis* Walker 1870**

– Subgenital plate without transverse fold; supra-anal plate varialbe; pronotum with distinct lateral carina (Figure 1.1.14.4)..... ***Choroedocus violaceipes* Miller 1934**

Family Acrididae

Subfamily Acridinae

***Acrida willemsei* Dirsh 1954**

Figures 1.1.14.19, 1.1.14.23

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:52451

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1111413

Synonyms: -

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) มีขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ โดยมีขนาดเฉลี่ย 36 – 40 เซนติเมตรโดยประมาณ รูปร่างเรียวยาวหนวดมีลักษณะสั้น ฐานของหนวดแบนและเรียวยาวคล้ายดาบ ส่วนหัวเรียวยาว ส่วนหน้าโค้งมน มีลักษณะเรียวแหลมโดยเฉพาะในตัวเมีย ส่วนอกมีเส้นนูนตามขวาง (lateral carina) 1 เส้น ปีกคู่หน้าและปีกคู่หลังพัฒนาอย่างสมบูรณ์ ส่วนของปีกคู่หน้าแผ่ขยายจนถึงข้อเข่า (hind knee) ของขาคู่หลัง ปีกคู่หลังค่อนข้างสั้นกว่าปีกคู่หน้า ขาคู่หลังในส่วนของ femur เรียวยาวส่วนขอบมีความแข็งและนูนออกมาเล็กน้อย ตั๊กแตนกลุ่มนี้โดยทั่วไปแล้วมีสีเขียวจนถึงสีน้ำตาล ปีกคู่หลังมีสีเหลืองอ่อนจนถึงสีเขียวส่วนขอบปีกเป็นสีน้ำตาล.

การวินิจฉัย (Diagnosis) ตั๊กแตนชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับตั๊กแตน Gonista bicolor แต่สามารถแยกความแตกต่างได้จาก ข้อเข่า (hind knee) ของขาคู่หลังซึ่งมีลักษณะเป็นหนามแหลมเห็นได้อย่างชัดเจน

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) พม่า จีน (ยูนาน กวางตุ้ง ฝูเจี้ยน ซีเกียง และไหหนาน) ไต้หวัน เวียดนาม มาเลเซีย หมู่เกาะสุมาตราและจาวาของอินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) อ้อย ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ในจังหวัด ชัยภูมิ มหาสารคาม นครปฐม อุดรธานี หนองบัวลำภู บุรีรัมย์ ราชบุรี กาญจนบุรี ตาก นครราชสีมา.สุพรรณบุรี

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0003682, 0003689, 0003782, 0000468, 0003863 – 0003865, 0003943 – 0003944, 0003941, 0003970, 0003725, 0003723, 0001618 – 0001619, 0003964 – 0003966, 0001620 – 0001644, 0000885, 0003826, 0003967, 0003959 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

Gonista bicolor **(De Haan 1842)**

Figures 1.1.14.20, 1.1.14.24

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:60542

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1106806

Synonyms:

antennata Bolívar, 1898

esox (Burr, 1902)

gracilis (Fritze, 1900)

lucius (Burr, 1902)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) แมลงกลุ่มนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับ Acrida มีขนาดกลาง ลำตัวเรียวยาวส่วนหัวสั้นกว่าส่วนอก ส่วนของหน้าผาก (Fastigium vertex) ยื่นออกไปข้างหน้าตรงๆ ส่วนของหน้าโค้งเล็กน้อย ฐานของนวดมีลักษณะแบนเชื่อมต่อกันเป็นรูปดาบ ส่วนของตาอยู่ตรงกลางของหัว มีระยะห่างจากส่วนของตารวมถึง fastigium เท่ากับหรือมากกว่าความกว้างของหน้าผาก vertex และขนาดของตารวมรวมกัน ส่วนของอก (prozona และ metazona) มีลักษณะแบนข้างๆเห็นในส่วนของเส้นนูน(keels) ตรงกลางและข้างๆอย่างชัดเจน พบส่วนของร่องลึก (sulcus) 3 ร่องบนส่วนอก แต่มีเพียงร่องเดียวเท่านั้นที่ตรงขอบที่ลึกและชัดเจน ปีกคู่หน้าและปีกคู่หลังเรียวยาวปลายแหลม ส่วนขาหลังส่วนของ femur เรียวยาวๆ ข้อเข่าด้านหลังกลมมน สีของตั๊กแตนชนิดนี้มีสีเหลืองถึงน้ำตาลบางกลุ่มมีสีเขียวแต่พบน้อยมาก ตารวมมีสีน้ำตาลแดงและมีขอบสีเข้ม ขอบของหน้าผากและโหนกหัวมีสีน้ำตาลแดงส่วนของอกมีสีน้ำตาลอยู่ด้านบน

การวินิจฉัย (Diagnosis)) ตั๊กแตนชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับตั๊กแตน Acrida แต่สามารถแยกความแตกต่างได้จาก ข้อเข่า (hind knee) ของขาคู่หลังซึ่งมีลักษณะมนไม่เป็นหนามแหลมเหมือน Acrida

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) เกาหลี ญี่ปุ่น ประเทศจีนทางตอนกลางและตอนใต้ ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ เวียดนาม มาเลเซีย หมู่เกาะสุมาตรา และประเทศไทย

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) พบในอ้อย จังหวัดอุดรธานี มหาสารคาม ชัยภูมิ ขอนแก่น

กรมวิชาการเกษตร

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0001645 – 0001649, 0003882 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

***Trilophidia annulata* (Thunberg 1815)**

Figure 1.1.14.12

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:64660

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1104507

Synonyms:

aspera (Walker, 1870)

bidens (Thunberg, 1815)

ceylonica Saussure, 1884

cristella (Stål, 1861)

japonica Saussure, 1888

mongolica Saussure, 1888

nigricans (Walker, 1870)

vulneratum (Haan, 1842)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) ตั๊กแตนชนิดนี้มีขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ผนังลำตัวค่อนข้างขรุขระ และมีขนบริเวณผนังลำตัว หนวดมีลักษณะเป็นลูกปัด(rod-like) หนวดมีความยาวเท่ากับหรือยาวกว่าส่วนหัวและส่วนอกรวมกัน หัวมีลักษณะกลมมนเป็นรูปกรวย หน้าผาก (fastigium vertex) ทำมุมกันเห็นได้ชัดเจน ส่วนของหน้าค่อนข้างมนตรง ส่วนของอกส่วนหน้าหรือ pronotum ส่วนบนมีลักษณะแคบ อกร่องสุดท้ายมีลักษณะคมมีสันนูนขึ้นมาสันคมเห็นชัดเจน อกปล้องสุดท้าย (metazoan) ยาวกว่าอกปล้องแรก (prozona) ส่วนขอบของอกมนไม่แหลมโค้ง ปีกคู่หน้าและปีกคู่หลังพัฒนาอย่างสมบูรณ์ ขาหลังมีขนาดใหญ่โดยเฉพาะส่วน femur สีของตั๊กแตนชนิดนี้มีสีน้ำตาลถึงสีเทาเข้มและมีจุดสีดำเห็นชัดเจน ปีกคู่หน้าพบแถบสีน้ำตาลเข้มถึงดำ 2-3 แถบ ขาหลังส่วน femur สีน้ำตาลถึงสีเทาเข้ม ส่วนบนจะเป็นสีดำและส่วนด้านในพบสีดำสีเทาเป็นแถบ ปีกคู่หลังมีสีเหลือง เหลืองเขียวหรือบางครั้งพบเป็นสีใสทางตอนต้นของปีก

การวินิจฉัย (Diagnosis) ตั๊กแตนชนิดนี้คล้างคลึงกันกับ Phlaeoba แต่สามารถแยกออกมาได้จากลักษณะหนวดเป็นลูกปัด นอกจากนี้ยังมีลักษณะเด่นบริเวณอกปล้องแรก (prozona) คือพบแกนแข็งเหมือนฟัน 2 ซี่ยื่นออกมาเห็นได้อย่างชัดเจน

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) อัฟกานิสถาน ปากีสถาน แคชเมียร์ อินเดีย ศรีลังกา บังคลาเทศ พม่า เวียดนาม จีน เกาหลี ญี่ปุ่น ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ หมู่เกาะสุมาตรา เกาะจาวา บอร์เนียว และประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) พบในอ้อยเป็นส่วนใหญ่ และพบส่วนน้อยในข้าวโพด จังหวัด.นครราชสีมา ราชบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม กำแพงเพชร นครสวรรค์ สุโขทัย กาญจนบุรี สุรินทร์ บุรีรัมย์ ชัยภูมิ ขอนแก่น กาฬสินธุ์ หนองบัวลำภู อุดรธานี มหาสารคาม

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0000287 – 0000290, 0000300 – 0000302, 0000464, 0000478 – 0000487, 0000490 – 0000492, 0000495, 0000499, 0000500, 0000842 – 0000849, 0000021, 0000035, 0000038, 0000046, 0000051, 0000062, 0000066 – 0000068, 0000070, 0000075, 0000084 – 0000083, 0000109, 0000120 – 0000121, 0000123, 0001686, 0001691 – 0001700 – 0001701, 0000166, 0000013, 0000015, 0000096, 0000087 – 0000086, 0001706 - 0001710, 0000017, 0000094, 0003973 – 0003977, 0008014 – 0008016, 0001747 – 0001748, 0008018 – 0008020, 0008011 – 0008012, 0008005 – 0008008, 0003953,0003948 – 0003951, 0003945 – 0003946, 0003929 – 0003930, 0003927, 0003923 – 0003925, 0003704, 0003734, 0003736 – 0003737, 0003740 – 0003741, 0003620, 0003744 – 0003745, 0008148 – 0008155, 0008065 - 0008066, 0003636, 0003800, 0003803 – 0 003805, 0003747, 0003798 – 0003799, 0003610, 0003899, 0001752 – 0001769, 0008072, 0008061, 0008058 – 0008059, 0008076, 0008070, 0008055, 0008052 - 0008053, 0008079, 0003691 – 0003694, 0003696 – 0003690, 0003981, 0003794, 0008063, 0003791 – 0003792, 0003842 – 0003843, 0003992, 0003994, 0003995, 0003919, 0003916, 0001770 – 0001783 – 0001785, 0001787 – 0001788 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

Phlaeoba infumata Brunner 1893

Figure 1.1.14.10

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:52252

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1111516

Synonyms: -

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) มีลักษณะคล้ายกับ *Phlaeoba antennata* แตกต่างกันที่หนวดจะมีสีเดียวและเป็นสีเข้มทางตอนปลายหนวดไม่พบสีเทาหรือสีขาวทางตอนปลาย ส่วนของอก (prozona) จะพบเส้นนูนอยู่ตรงกลางอกด้านบนซึ่งจะมีร่อง (sulcus) พาดตามขวางเห็นอย่างชัดเจน ปีกคู่หลังมีลักษณะใสขุ่น ส่วนปลายจะมีลักษณะใสส่วนฐานปีกไม่มีลักษณะเป็นสีเข้มถึงน้ำเงิน ตัวผู้แผ่นที่ปิดอวัยวะสืบพันธุ์แหลม อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้เรียวยาวโดยมีความยาว 4 ถึง 5 เท่าของฐาน

การวินิจฉัย (Diagnosis) มีลักษณะคล้ายกับ *Phlaeoba antennata* แต่ปลายหนวดไม่เป็นสีขาวซีด

กรมวิชาการเกษตร

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) ประเทศจีน (กวางตุ้ง กวางสี หูเป่ย ยูนาน ไหหนาน) ไต้หวัน กัมพูชาอินเดีย บังคลาเทศ พม่า มาเลเซีย และประเทศไทย

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) อ้อย ข้าวไร่บางชนิด ข้าวฝ่าง จังหวัด หนองบัวลำภู สุพรรณบุรี นครสวรรค์ นครปฐม กำแพงเพชร สุโขทัย นครราชสีมา กาฬสินธุ์ ราชบุรี อุดรธานี บุรีรัมย์ อุทัยธานี ชัยภูมิ มหาสารคาม ขอนแก่น,

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0003990, 0003972, 0000880, 0000882, 0000496 – 0 000497, 0000886 – 0000887, 0003921, 0000868, 0001711 – 0001712, 0000508, 0008073 – 0008074, 0000869, 0001713 – 0001732, 0000867, 0000871 – 0000872, 0000874 – 0000876, 0001733 – 0001744, 0000879, 0000884, 0001745, 0003906 – 0003907, 0003684, 0003903 - 0003904, 0000873, 0000877, 0000504, 0003909 - 0003912, 0003904, 0003685, 0000890 – 0000896, 0000881, 0000888 – 0000889, 0001789, 0003633, 0003638, 0000860 – 0000866, 0008050, 0008048, 0008082 – 0008089, 0000471 – 0000474, 000855 – 0000859
(เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

Phlaeoba antennata Brunner 1893

Figure 1.1.14.9

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:52218

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1111536

Synonyms: -

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) ตั๊กแตนชนิดนี้มีขนาดกลาง ส่วนหัวมีขนาดสั้นกว่าส่วนอก ส่วนของหน้ามีลักษณะค่อนข้างมน หน้าผาก (fastigium vertex) ยาว ส่วนของฐานหนวดแบน ความยาวหนวดยาวไปจนถึงส่วนท้ายของอกปล้องสุดท้ายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเพศผู้ ส่วนของอก (prozona, metazoan) เห็นเส้นนูนด้านข้างอย่างชัดเจน ไม่มีร่องพาดตามขวาง เส้นนูนด้านบนอก ส่วนขอบของอกด้านหลังมีลักษณะมนไม่แหลม ปีกคู่หน้าและปีกคู่หลังยาวไปจนถึงส่วนของเข่า (hind knee) ของขาคู่หลัง แผ่นปิดอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้สั้นส่วนปลายป้านไม่แหลม ตั๊กแตนชนิดนี้มีสีค่อนข้างแดงจนถึงสีเขียวเข้มถึงน้ำตาล พบแถบสีซีดจากส่วนของหน้าผากพาดไปจนถึงส่วนปีกคู่หน้าและสีจะจางลงในเพศผู้มากกว่าเพศเมีย ส่วนหนวดมีสีน้ำตาลเข้มที่ฐาน ส่วนปลายของหนวดพบสีขาวหรือสีขาวอ่อนจนซีด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเพศผู้ ปีกคู่หลังมีสีน้ำเงินเข้มถึงดำที่ส่วนฐานปีก

การวินิจฉัย (Diagnosis) ตั๊กแตนชนิดนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับ Phlaeoba infumata แตกต่างกันตรงที่ปลาบหนวดมีสีขาวหรือสีซีดเห็นได้ชัดเจน

กรมวิชาการเกษตร

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) อินเดีย บังคลาเทศ พม่า จีน (ไหหนาน กวางสี กวางตุ้ง) ฮ่องกง เวียดนาม มาเลเซีย สิงคโปร์ เกาะสุมาตราหมู่เกาะบอร์เนียว และประเทศไทย

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) พบในแปลงปลูกอ้อยจังหวัด จ.ขอนแก่น, จ.อุดรธานี, จ.หนองบัวลำภู, จ.มหาสารคาม

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0001790, 0003895, 0003822, 0003837, 0003731, 0003840, 0003740, 0003763 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

Calephorus vitalisi **I. Bolivar 1914**

Figure 1.1.14.11

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:52369

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1111457

Synonyms: -

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) .ลำตัวมีขนาดเล็ก รูปร่างเพรียว ผนังลำตัวค่อนข้างหยาบขรุขระ จนถึงเรียบ ลักษณะของหนวดแบนและกว้างมีขนาดสั้นกว่าส่วนหัวและส่วนอกรวมกัน ส่วนหัวมีรูปกรวยยาวกว่าส่วนตา ความยาวของส่วนหัวเท่ากับระยะความยาวของตารวม ส่วนหน้ามีลักษณะบ้านและค่อนข้างมน ส่วนอกมีลักษณะคล้ายบ้านหน้าจั่วห้าเหลี่ยม สันนูนทางตอนบนแหลมคมสันธานตอนข้างแข็งหนาอกส่วนท้ายมีลักษณะยาวกว่าอกส่วนหน้า อกส่วนหลังตรงขอบมีลักษณะแหลมคมเห็นชัดเจน ปีกคู่หน้าและปีกคู่หลังพัฒนาสมบูรณ์ ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลตอนกลางจนถึงฐานปีก สีของลำตัวมีสีเขียวถึงสีเหลืองเข้ม ส่วนท้องตอนต้นมีสีแดง ส่วนอื่นๆค่อนข้างเป็นสีใสหรือสีหม่น

การวินิจฉัย (Diagnosis) ตั๊กแตนชนิดนี้วินิจฉัยจากขอบของอกปล้องสุดท้าย (metasoma) แหลมและคมอย่างชัดเจน

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) ประเทศในคาบสมุทรอินโดจีน โดยเฉพาะเวียดนามและไทย

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) แปลงปลูกอ้อยจังหวัดมหาสารคาม และสุโขทัย

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0003754, 0003765, 0003767, 0003820, 0003825, 0003814, 0003819, 0003789, 0000900 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4m

Oedaleus abruptus **(Thunberg 1815)**

Figures 1.1.14.22, 1.1.14.30

กรมวิชาการเกษตร

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:68045

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1103191

Synonyms: -

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) ตั๊กแตนชนิดนี้มีขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ผนังลำตัวพบรอยหลุมของขนละเอียดไม่ลึกมาก หนวดมีลักษณะเป็นลูกปัด มีขนาดยาวกว่าส่วนหัวและส่วนอกรวมกันเล็กน้อย ส่วนหน้าค่อนข้างตรง ส่วนของหน้าผาก (fastigium of vertex) ทำมุมกับส่วนหน้าอย่างชัดเจน ส่วนของอกค่อนข้างสั้นด้านข้างขนานกันและขยายไปถึงอกปล้องสุดท้าย ส่วนขอบอกทางตอนบนค่อนข้างเป็นเส้นตรงตากต่างกันกับส่วนขอบทางตอนท้ายและทำมุมเห็นได้อย่างชัดเจน พบร่องขวาง (sulcus) ตัดผ่านเส้นนูนทางด้านกลาง (medial carina) ของอกปีกคู่หน้าและปีกคู่หลังพัฒนาสมบูรณ์ขยายยาวไปถึงส่วนเข่าหลัง (hind knee) ปีกคู่หลังพบแถบสีเขียวเข้มถึงเหลืองแพร่ขยายกว้างในส่วนฐาน ในส่วนของ femur ขาคู่หลังนั้นเรียวยาว ตั๊กแตนชนิดนี้มีสีค่อนข้างหลากหลายทั้งสีเขียวและสีน้ำตาลบางครั้งพบสีเขียวและสีน้ำตาลอยู่ในตัวเดียวกัน ด้านบนของหัวเป็นสีเทาเข้มและบางครั้งพบสีเทาตามแนวยาวเป็นแถบในแต่ละข้างของส่วนอก ส่วนของ hind tibia ไม่พบสีแดงทางตอนปลายของขา

การวินิจฉัย (Diagnosis) ตั๊กแตนชนิดนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกันกับ *Aiolopus thalassinus* แตกต่างกันที่ปลาย Tibia ของขาคู่หลังที่ไม่พบสีแดงทางตอนปลายของขอ

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) ปากีสถาน อินเดีย ศรีลังกา บังคลาเทศ พม่า จีน

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) แปลงปลูกอ้อยและข้าวโพด จังหวัดกาฬสินธุ์ มหาสารคาม หนองบัวลำภู ขอนแก่น อุดรธานี ชัยภูมิ กำแพงเพชร กาฬสินธุ์ ราชบุรี กาญจนบุรี สุโขทัย บุรีรัมย์ อุทัยธานี นครราชสีมา

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0008120 – 0008121, 0008124 – 0008129, 0003751, 0003753, 0003755, 0003758, 0003781, 0003784, 0003787, 0003916, 0003701 – 0003702, 0003705, 0003850 – 0003852, 0003858, 0003790, 0008130 – 0008141, 0003680, 0003649, 0003900, 0003902, 0003801, 0003806 – 0003807, 0003809, 0003861 – 0003862, 0003832 – 0003835, 0003652, 0003760, 0003764, 0003770, – 0003773, 0003810, 0003812, 0003816, 0003957, 0000331, 0003721, 0008118 – 0008119, 0000327, 0000898 – 0000899, 0008022, 0003937, 0000262, 0000122, 0000901, 0003748, 0000164, 0003893, 0003841, 0003847 – 0003849, 0003823, 0003827, 0003739, 0001791, 0008078 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

Aiolopus thalassinus **(Fabricius 1781)**

Figures 1.1.14.21, 1.1.14.27

กรมวิชาการเกษตร

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:67700

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1103315

Synonyms: -

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) ลำตัวมีขนาดกลาง ผนังลำตัวเป็นจุดละเอียด หนวดมีลักษณะเป็นเส้นด้าย (filiform) ความยาวหนวดเท่ากับส่วนหัวและส่วนอกรวมกัน ส่วนของหน้าผาก (fatigium vertex) เป็นรูปห้าเหลี่ยมมีความยาว ยาวกว่าความกว้างเล็กน้อย ส่วนของหน้ามนแคบขยายไปถึงทางด้านล่าง ส่วนอกมีลักษณะคล้ายบ้านหน้าจั่วรูปห้าเหลี่ยม อกตอนต้น (prosoma) มีลักษณะแคบ เส้นนูนตอนกลางของอกเป็นเส้นตรงโดยมีร่องลึก (sulcus) พาดผ่านขวางตอนต้นเท่านั้น อกปล้องสุดท้ายยาวกว่าอกปล้องแรก ส่วนขอบของอกมีลักษณะมนทำมุมอย่างชัดเจน ปีกคู่หน้าและปีกคู่หลังพัฒนาอย่างสมบูรณ์ Femur ของขาหลังมีลักษณะเรียวยาว ตั๊กแตนชนิดนี้มีสีที่หลากหลายแต่โดยส่วนใหญ่แล้วพบสีน้ำตาลถึงสีน้ำตาลเข้ม บางครั้งก็จะพบว่ามีสีเขียวเกือบทั้งตัว

การวินิจฉัย (Diagnosis) ปีกคู่หลังไม่มีแถบสีดำพาดผ่านพื้นที่ปีก มีขนาดกลางถึงขนาดเล็กประมาณ 3.5 เซนติเมตร ส่วนปลายของขาหลังบริเวณ Tibia มีสีแดงหรือสีน้ำเงินเข้ม

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) อินเดีย ศรีลังกา บังคลาเทศ หมู่เกาะแถบทะเลอันดามัน พม่า จีน ฮ่องกง ไต้หวัน เกาหลี ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย สิงคโปร์ หมู่เกาะสุมาตรา หมู่เกาะบอร์เนียว หมู่เกาะปาปัว นิวกินีออสเตรเลียทางฝั่งตะวันออก และประเทศไทย

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) แปลงปลูกอ้อยจังหวัดมหาสารคาม หนองบัวลำภู อุดรธานี ขอนแก่นและจังหวัดกาฬสินธุ์

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0003785 – 0003786, 0003730, 0003711 – 0003712, 0003717, 0003719, 0003750, 0003722, 0003778, 0003971, 0003749, 0003821, 0001792 – 0001799, 0008071, 0004000, 0008067 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

Subfamily Oxyinae

***Gesonula mundata* (Walker 1870)**

Figure 1.1.14.35

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:47262

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1114238

Synonyms: -

กรมวิชาการเกษตร

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) .ตั๊กแตนชนิดนี้มีขนาดเล็กถึงขนาดกลาง รูปร่างเพรียว ผนังลำตัวมีลักษณะขรุขระและเป็นปุ่มเล็กน้อย ผนังมีลักษณะคล้ายตาข่ายร่างแหบางๆ หนวดมีลักษณะเป็นเส้นด้าย (filiform) มีความยาวมากกว่าหัวและอกรวมกัน ลักษณะของหน้ากลมมนมาทางด้านล่าง ส่วนอกมีความยาวเป็นรูปกรวยขยายมาทางตอนล่างเล็กน้อย พบเส้นพาดผ่านบริเวณสันหลังอกไปจนถึงอกปล้องสุดท้าย มีร่อง (sulcus) 3 ร่องพาดผ่านทางตอนกลางเส้นที่ 3 เด่นชัดที่สุด ส่วนของแผ่นแข็งด้านข้างของอก มีลักษณะเป็นร่องลึกใกล้ๆกับขอบส่วนหน้า prosternal tubicle สั้นมีลักษณะรูปกรวยเอนไปทางด้านหลัง ปีกคู่หน้าและปีกคู่หลังพัฒนาอย่างสมบูรณ์มีความยาวไปจนถึงเข่าของขาคู่หลัง (hind knee) ส่วนของ tibia บริเวณขาหลังมีหนามแหลม 7-9 หนาม ลักษณะสีโดยทั่วไปมีทั้งสีเหลืองเขียวและน้ำตาล พบแถบสีน้ำตาลเข้มแผ่ขยายส่วนด้านข้างของหน้าผากหลังตา รวมพาดผ่านส่วนบนของแผ่นแข็งบริเวณอกและรวมถึงส่วนหน้าของปีกคู่หน้า ปีกคู่หลังมีลักษณะเป็นสีใสขุ่น ขาหลังส่วน femur มีสีเหลืองน้ำตาลจนสีเขียวเข้ม ขาหลังมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงเหลืองเข้ม

การวินิจฉัย (Diagnosis) อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียสั้น ปีกคู่หน้าพบกลุ่มเส้นปีกขนานกันในส่วน radical

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) พม่า หมู่เกาะสุมาตรา ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ หมู่เกาะบอร์เนียว หมู่เกาะจาวา และประเทศไทย

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) แปลงปลูกอ้อยจังหวัดหนองบัวลำภู อุดรธานี ชัยภูมิ

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0003978 – 0003979, 0001800, 0003980, 0008049, 0008156, 0008157 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

***Oxya japonica* (Thunberg 1824)**

Figure 1.1.14.32

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:47046

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1114334

Synonyms: *Prospaltella strenua*

asinensis Willemse, 1925

rufostriata Willemse, 1925

simplex (Walker, 1870)

sinense (Walker, 1870)

straminea (Walker, 1870)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) มีลักษณะคล้าย *Oxy hyla* แต่จะมีขนาดใหญ่กว่า ความยาวของปีกคู่หน้าและลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ที่แตกต่างกัน เพศผู้มีลักษณะที่แตกต่างจากชนิดอื่นโดยสังเกตได้จากบริเวณฐานของแผ่นปิดอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้มีลักษณะพับเป็นครีบ ส่วนในเพศเมียนั้นไม่สามารถเห็นฟันที่ยาว

กรมวิชาการเกษตร

ออกมาจากอวัยวะสืบพันธุ์ บริเวณฐานของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียเป็นหนามที่ใหญ่ตั้งอยู่บริเวณด้านใน นอกจากนี้แล้วส่วนแคบของด้านข้างของแผ่นที่ปิดอวัยวะสืบพันธุ์ไม่มีหนามแหลมไม่เหมือนกับชนิดอื่นๆ ในสกุลนี้

การวินิจฉัย (Diagnosis) อวัยวะสืบพันธุ์

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) ศรีลังกา อินเดีย บังคลาเทศ พม่า จีน ญี่ปุ่น เวียดนาม มาเลเซีย สิงคโปร์ หมู่เกาะสุมาตรา หมู่เกาะบาหลี ฟิลิปปินส์ และประเทศไทย

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) แปลงปลูกอ้อยจังหวัดหนองบัวลำภู

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0003942 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

***Oxya hyla* Serville 1831**

Figures 1.1.14.13, 1.1.14.34

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:47135

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1114307

Synonyms:

acuminata Willemse, 1925

ebneri Willemse, 1925

multidentata Willemse, 1925

viridivitta (Walker, 1870)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) ลำตัวมีขนาดเล็กถึงขนาดกลาง รูปร่างค่อนข้างปราดเปรียว ผนังลำตัวมีลักษณะเป็นจุดประปรายแต่ไม่ลึกมาก หน้าผากสั้นเห็นค่อนข้างชัดเจน และส่วนปลายมีลักษณะเป็นวงรีหนวดมีลักษณะเป็นเส้นด้าย (filiform) หนวดมีความยาวมากกว่าส่วนหัวและส่วนอกรวมกันพบส่วนมากในเพศผู้ เพศเมียหนวดมีความยาวสั้นกว่าส่วนหัวและอกรวมกัน ส่วนของหน้ามนเล็กน้อย ตามีขนาดใหญ่ส่วนของอกมีลักษณะเป็นครึ่งวงรี พบเส้นนูนตรงกลางอก (medial carina) ส่วนบนมองเห็นไม่ชัดเจน ส่วนของเส้นนูนข้างๆไม่ปรากฏ ส่วนบนของอกพาดผ่านด้วยร่อง (sulcus) 3 ร่อง อยู่ทางด้านขอบของส่วนอก ส่วนของ prosternal process หรือ PEG ใหญ่ มีลักษณะเป็นรูปกรวยส่วนปลายมนและชี้ออก ปีกคู่หน้าสมบูรณ์ ส่วนของ tibia ในขาคู่สุดท้าย ส่วนปลายพบหนามแหลมคม ส่วนของแผ่นแข็งที่ปิดอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้มีลักษณะเป็นกรวยเรียวแหลม ส่วนในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียเห็นเป็นฟันยาวยื่นออกมาส่วนปลายโค้งเล็กน้อย สีส่วนใหญ่ของตั๊กแตนชนิดนี้ประกอบด้วย 2 สีได้แก่สีเขียวอ่อนและสีน้ำตาลอ่อนนอกจากนี้แล้วยังพบสีเขียวเหลืองเป็นแถบพาดผ่านตรงกลางด้านบนของหัวและของปีกคู่หน้า

การวินิจฉัย (Diagnosis) ส่วนฐานของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้มีลักษณะเป็นครีบละเอียด ในเพศเมียพบฟันยาวยื่นออกมาจากอวัยวะสืบพันธุ์

กรมวิชาการเกษตร

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) พม่า จีน ฮ่องกง ไต้หวัน เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซีย สิงคโปร์ หมู่เกาะสุมาตรา หมู่เกาะจาวา ฟิลิปปินส์ และไทย

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) แปลงปลูกอ้อยและข้าวไร่จังหวัดหนองบัวลำภู กาฬสินธุ์ อุดรธานี ขอนแก่น ชัยภูมิ

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0003955, 0008017, 0008001, 0008003, 0003896 – 0003898, 0008159, 0008160 – 0008161 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

Pseudoxya diminuta **(Walker 1871)**

Figures 1.1.14.14, 1.1.14.33

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:46981

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1114397

Synonyms:

rufipes (Brunner von Wattenwyl, 1893)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) ตั๊กแตนชนิดนี้มีขนาดเล็ก ส่วนหัวมีขนาดสั้นกว่าส่วนอก หนวดมีลักษณะเป็นเส้นด้าย ส่วนของหน้ามีลักษณะโค้งมน ส่วนของหน้าผากจากด้านบนมีลักษณะโค้ง ส่วนร่องด้านข้าง (sulcus) ไม่ปรากฏ ส่วนตรงกลางหน้าเห็นเป็นร่องและมีเส้นนูนข้างๆขนานกัน ตารวมเป็นรูปถ้วย ส่วนอกมีลักษณะเป็นรูปกรวยและแบนทางตอนท้าย อกปล้องสุดท้ายมีลักษณะโค้งนูนออกมามองเห็นเส้นนูนตรงกลาง อกไม่มีเส้นนูน (lateral carina) ด้านข้าง prostenal process หรือ PEG มีลักษณะเป็นรูปกรวยและมนบริเวณตอนปลาย แผ่นแข็งบริเวณด้านข้างของอกมีความกว้างมากกว่าความยาว ปีกคู่หน้าและปีกคู่หลังสมบูรณ์

การวินิจฉัย (Diagnosis) เป็นตั๊กแตนที่มีขนาดเล็กและมีลักษณะเหมือนกับ *Oxya hyla* และ *japonica* แตกต่างกันตรงที่ปีกคู่หน้ามีความยาวแค่เพียงส่วนกลางของท้อง

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) อินโดนีเซีย เวียดนาม ฟิลิปปินส์และไทย

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) อ้อย ข้าวโพด จังหวัดอุดรธานี นครปฐม สุพรรณบุรี หนองบัวลำภู สุโขทัย นครราชสีมา ขอนแก่น ราชบุรี กำแพงเพชร กาฬสินธุ์ ชัยภูมิ บุรีรัมย์ อุตรดิตถ์

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0003884, 0000498, 0000501, 0008075, 0008077, 0008062, 0008069, 0000534 – 0000539, 0000319, 0008090 – 0008099, 0000291, 0000295, 0000297, 0000299, 0008004, 0008009, 0000185 – 0000186, 0000042, 0000323, 0000834 – 0000839, 0008032, 0008037 – 0008040, 0008045, 0003936, 0008100 – 0008109, 0003695, 0008010, 0008110 – 0008114, 0008116 – 0008117, 0000091 – 0000095, 0000540, 008080, 0000121, 0000177, 0000214 – 0000218, 0000304 – 0000305,

กรมวิชาการเกษตร

0000224, 0000272 – 0000273, 0008051, 0000840 – 0000841, 0000475 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

Apalacris varicornis Walker 1870

Figure 1.1.14.29

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:57685

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1108624

Synonyms: -

hyalina Willemse, 1957

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) ตัวเต็มวัยมีขนาดกลาง ค่อนข้างปราดเปรียว ผนังลำตัวขรุขระส่วนหัวมีลักษณะโค้งลง ส่วนสันหน้ามีลักษณะแบนราบ ส่วนหน้าผากแคบ ความกว้างระหว่างตารวมเกือบเท่ากับความกว้างของสันหน้า (frontal ridge) ระหว่างหนวด หนวดของตัวผู้มีสีดำเรียวยาว มีความยาวประมาณ 3 เท่าของความยาวหัวและอกรวมกัน มีสีซีดบริเวณปลายหนวด ตารวมมีลักษณะเป็นรูปไข่เห็นได้อย่างชัดเจน หน้าอกมีลักษณะเป็นรูปกรวยอกส่วนท้าย (metasoma) มีขนาดกว้างขึ้นจนถึงขอบ เส้นนูนตรงกลางอก (medial carina) เห็นชัดเจนและมีร่อง (sulcus) 3 รองตัดผ่าน ร่องแรกเห็นได้อย่างชัดเจน ส่วนอีก 2 ร่องจะตื้นและบาง ปีกคู่หน้าและคู่หลังสมบูรณ์ยาวจนถึงส่วนกลางของขาในส่วน femur ปีกคู่หน้าทั้งด้านบนและด้านล่างค่อนข้างขนานกันปลายปีกมีลักษณะโค้งมน สีของลำตัวส่วนใหญ่เป็นสีเขียวมะกอก ส่วนท้องมีลักษณะเป็นสีซีดกว่าเล็กน้อย ขาส่วน femur มีลักษณะเป็นสีเขียวเข้ม ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้ม ปีกคู่หลังมีลักษณะเป็นสีน้ำเงินอ่อนโดยที่ปลายปีกและส่วนของขอบปีกมีลักษณะสีเข้มขึ้น

การวินิจฉัย (Diagnosis) ตั๊กแตนชนิดนี้มีลักษณะคล้ายกับชนิด Choroedocus violaceipes แต่แตกต่างกันที่ลักษณะอก โดยที่ด้านข้างของอกไม่มีเส้นนูน (lateral carina) ให้เห็นชัดเจน

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) อินเดีย บังคลาเทศ พม่า จีน ฮ่องกง ญี่ปุ่น เวียดนาม มาเลเซีย หมู่เกาะสุมาตรา หมู่เกาะจาวา บอร์เนียว และประเทศไทย

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) ข้าวโพดจังหวัดเชียงใหม่

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0000041 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

Sumfamily Hemiacridinae

Hieroglyphus banian **(Fabricius 1798)**

Figures 1.1.14.15, 1.1.14.28

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:49415

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1113004

Synonyms:

elongata Uvarov, 1922

furcifer (Serville, 1838)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) ตั๊กแตนชนิดนี้ลำตัวมีขนาดกลาง ผนังลำตัวมีลักษณะขรุขระเล็กน้อยและมีจุดที่ตื้นๆ หนวดมีลักษณะเป็นเส้นด้ายมีขนาดยาวกว่าส่วนหัวและส่วนอกรวมกัน หน้าผาก (fatigium vertex) ของตั๊กแตนชนิดนี้มีความยาวและส่วนกลางหน้าผากมีรอยบุ๋มอยู่ตรงกลาง ส่วนอกจะมีลักษณะเป็นรูปกรวยเส้นนูนบางๆ ตรงกลางส่วนอก และมีหลุมสีดำ (sulcus) เป็นร่องพาดผ่านส่วนอกประมาณ 3-4 ร่อง เห็นได้อย่างชัดเจน ร่องที่ 1 อยู่ด้านหน้า ส่วนร่องที่ 2 – 3 เห็นไม่ชัดเจนมากนัก อกปล้องสุดท้าย (metasoma) มีลักษณะเหมือนบ้านหน้าจั่วรูปห้าเหลี่ยม ส่วนของ prostenal process หรือ PEG มีลักษณะเป็นกรวย ปีกคู่หน้าและปีกคู่หลังยาวไปจนสุดของส่วนท้อง femur บนขาคู่สุดท้ายมีลักษณะเรียวยาว

การวินิจฉัย (Diagnosis) *Hieroglyphus banian* มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Spathosternum prasiniferum* แต่สามารถแยกออกมาได้โดยลักษณะของเส้นนูนด้านข้าง (lateral carina) บนส่วนอก ไม่พบในตั๊กแตนชนิดนี้

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) ปากีสถาน อัฟกานิสถาน อินเดีย เนปาล ภูฏาน ศรีลังกา พม่า เวียดนาม จีน และประเทศไทย

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) ในแปลงปลูกอ้อยจังหวัดอุดรธานี หนองบัวลำภู

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0003870, 0001685, 0003997 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

***Spathosternum prasiniferum* (Walker 1871)**

Figure 1.1.14.16

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:48364

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1113638

Synonyms:

caliginosus (Walker, 1871)

rectus (Walker, 1871)

simplex (Walker, 1871)

strigulatus (Walker, 1871)

กรมวิชาการเกษตร

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) ตั๊กแตนชนิดนี้มีขนาดกลางถึงขนาดเล็ก ผนังลำตัวค่อนข้างเรียบ หนวดมีลักษณะเป็นเส้นด้าย สั้นกว่าส่วนหัวและส่วนอกรวมกัน ตารวมมีขนาดใหญ่ หน้าผากสั้น หน้ามีลักษณะแคบป้าน อกทางด้านบนแบนเรียบและมีร่องลึก (sulcus) 3 ร่องพาดผ่าน มีเส้นนูนทางด้านข้างของอกอย่างละ 1 เส้นอกปล้องสุดท้าย (metazoma) สั้นกว่าอกปล้องแรก (prosoma) ลักษณะ prostenal process หรือ PEG มีขนาดใหญ่ ปีกคู่หน้าและปีกคู่หลังพัฒนาอย่างสมบูรณ์หรือในบางชนิดจะสั้น ขาคู่หลังในส่วนของ femur ไม่ได้แบนมีขนาดใหญ่ tibia คู่หลังไม่ได้กว้างแผ่ออก ตั๊กแตนชนิดนี้มีหลายสีส่วนใหญ่แล้วจะมีสีเขียวและสีน้ำตาล ส่วนใบหน้าจะมีสีเขียวซีดและมีแถบสีเขียวเข้มพาดผ่านจากใต้ตารวมไปจนถึงขาคู่กลาง ปีกคู่หน้ามีสีเขียวเข้มถึงน้ำตาลเข้ม ทางด้านกลางปีกคู่หลังมีสีใส femur ในขาคู่หลังมีสีดำหรือสีเขียวเข้มพาดผ่านทางส่วนนอก

การวินิจฉัย (Diagnosis) *Spathosternum prasiniferum* มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Hieroglyphus banian* แต่สามารถแยกออกมาได้โดยลักษณะของเส้นนูนด้านข้าง (lateral carina) ของส่วนอกเห็นได้ชัดเจน

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) ปากีสถาน อินเดีย ศรีลังกา เนปาล บังคลาเทศ พม่า จีน เวียดนามมาเลเซีย

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) แปลงปลูกอ้อยจังหวัดหนองบัวลำภู อุดรธานี ชัยภูมิ มหาสารคาม

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0003923, 0003926, 0003928, 0008158, 0003931, 0008041, 0008030, 0008023, 0008029, 0003793, 0003795 – 0003797, 0003982, 0003892, 0003996 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

Subfamily Eyprepocnemidinae

Choroedocus violaceipes Miller 1934

Figure 1.1.14.4

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:57144

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1108950

Synonyms: -

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) มีขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ผิวบริเวณด้านข้างลำตัวมีลักษณะขรุขระเล็กน้อย และมีจุดบางๆประปราย หนวดมีลักษณะเป็นเส้นด้าย (filiform) ในเพศผู้ความยาวหนวดยาวถึงด้านหลังของอกปล้องสุดท้าย ในเพศเมียยาวไม่น้อยกว่าอกปล้องสุดท้าย ส่วนหัวแคบ ส่วนของหน้าผากไม่ได้ขยายไปจนถึงฐานหนวด หน้าผากมีลักษณะกลมมน ส่วนของอกด้านข้างมีลักษณะพบเส้นนูน (lateral carina) เห็นชัดเจน มีร่อง 3 ร่องพาดผ่าน แต่มองเห็นเฉพาะส่วนบนเท่านั้น ส่วนของปีกคู่หน้าไม่มีแถบสีดำ บริเวณส่วน tibia ของขาหลังเป็นสีชีดและต่อมาเป็นสีน้ำตาลตรงส่วนฐาน ส่วนหนามแหลมมีลักษณะเป็นสีขาวและมีแถบสีดำเห็นได้อย่างชัดเจน

กรมวิชาการเกษตร

การวินิจฉัย (Diagnosis) *Choroedocus violaceipes* มีลักษณะคล้ายคลึงกันกับ *Apalacris varicornis* แต่สามารถแยกออกมาได้จากลักษณะที่เห็นชัดเจนของ lateral carina บริเวณด้านข้างของอก

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) ศรีลังกา อินเดีย พม่า เวียดนาม กัมพูชา

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) แปลงปลูกอ้อยจังหวัดหนองบัวลำภู อุดรธานี ชัยภูมิ มหาสารคาม

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0003922 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

Familiy Pyrgomorphidae

Subfamily Pyrgomorphinae

***Atractomorpha psittacina* (De Haan 1842)**

Figure 1.1.14.8

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:38793

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1120410

Synonyms:

contracta (Walker, 1870)

dohrni Bolívar, 1905

parabolica (Walker, 1870)

hilippina Bolívar, 1905

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) เป็นตั๊กแตนขนาดกลาง มีรูปร่างปราดเปรียว ความยาวลำตัวในเพศผู้ 2.1 – 2.4 เซนติเมตร ส่วนในเพศเมีย 3 – 3.6 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับตั๊กแตน *Atractomorpha crenulata* แล้วมีลักษณะลำตัวเรียวยาวกว่ามาก ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปกรวยเห็นได้อย่างชัดเจน ส่วนหน้ามีลักษณะยาวปลายมน โดยทั่วไปแล้วตั๊กแตนชนิดนี้มีสีเขียวถึงสีน้ำตาลทั้งสองเพศ ปีกคู่หลังจะมีลักษณะเป็นสีชมพูหรือชมพูอ่อนส่วนในส่วนฐานปีก พบเป็นสีชีดหรือบางครั้งเป็นสีใสถึงขุ่นในส่วนปลายปีก.

การวินิจฉัย (Diagnosis) ตั๊กแตนชนิดนี้มีลักษณะคล้าย *Atractomorpha crenulate* มากแต่สามารถแยกได้โดยลักษณะลำตัวเรียวยาวคล้ายกระสวย

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) บังคลาเทศ อินเดีย พม่า ประเทศจีนทางตอนใต้ คาบสมุทรอินโดจีน มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย และประเทศไทย

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) แปลงปลูกอ้อยจังหวัดราชบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น กาฬสินธุ์ ตาก กาญจนบุรี สุพรรณบุรี บุรีรัมย์

กรมวิชาการเกษตร

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0001664 – 0001668, 0003952, 0003631, 0001669 – 0001684 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

Atractomorpha crenulata **(Fabricius 1793)**

Figures 1.1.14.7, 1.1.14.25

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:38740

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1120429

Synonyms:

consobrina Saussure, 1862

obscura Bolívar, 1917

porrecta (Walker, 1859)

scaber (Thunberg, 1815)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) เป็นตั๊กแตนขนาดกลาง รูปร่างเพรียว หัวมีลักษณะเป็นกรวย หน้ามีลักษณะมนส่วนปลายโค้ง หน้าผากลักษณะสมบูรณ์แต่จะสั้นกว่าความยาวของตารวม ส่วนอกขยายไปถึงทางตอนล่าง ส่วนของเส้นนูนบริเวณกลางอก (medial carina) มองจากด้านบนชัดเจน เส้นนูนด้านข้าง (lateral carina)ชัดเจนน้อยกว่า และมีเส้นพาดขวางถึง 2 เส้น ปีกคู่หน้ายาวแต่โดยส่วนใหญ่แล้วไม่ได้ยาวไปจนถึงขาหลัง หรือมีความยาวมากกว่า 1 ใน 3 ของลำตัว ปีกคู่หลังสมบูรณ์ ส่วนของ femur บนขาคู่หลังมีลักษณะยาวเรียวและข้อเข่า (hind knee) มี 2 lobes โดยทั่วไปตั๊กแตนชนิดนี้มีสีเขียวหรือสีเขียวเข้มจนถึงสีน้ำตาลในทั้งสองเพศ สีเขียวมีอยู่ทั่วไปในประเทศอินเดียและประเทศไทย ลักษณะของตารวมเป็นสีเขียวอ่อน ฐานของปีกคู่หลังเป็นสีชมพูอ่อนจนถึงสีม่วงอ่อนหรือไม่ก็เป็นสีชมพูอ่อนจนถึงสีชมพูชัด

การวินิจฉัย (Diagnosis) ตั๊กแตนชนิดนี้มีลักษณะคล้าย Atractomorpha psittacina มากแต่สามารถแยกได้โดยลักษณะลำตัวหนากว่า ไม่เรียวเป็นกระสวยมากนัก

เขตการแพร่กระจาย (Distribution) ปากีสถาน อินเดีย บังคลาเทศ ศรีลังกา หมู่เกาะบริเวณทะเลอันดามัน พม่า กัมพูชา เวียดนาม มาเลเซีย ตอนเหนือและตะวันตกของหมู่เกาะสุมาตรา และประเทศไทย

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) แปลงปลูกอ้อยจังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี บุรีรัมย์ ตาก อุดรธานี นครราชสีมา ขอนแก่น มหาสารคาม อุดรธานี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0001651, 0001653 – 0001663, 0001687 – 0001690, 0003706 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

กรมวิชาการเกษตร

Pyrgocorypha subulate (Thunberg 1815)

Tettigoniidae, Conocephalinae

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:15384

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1134262

Synonyms:

dorsalis (Walker, 1869)

javanicus Bolívar, 1884

spatulatus (Walker, 1869)

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0008162 – 0008167, 0000351, 0000353 – 0000354 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

Conocephalus longipennis (Haan 1842)

Tettigoniidae, Conocephalinae

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:17464

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1133384

Synonyms:

carolinensis Willemse, 1942

longicornis (Redtenbacher, 1891)

macroptera Willemse, 1942

spinipes (Stål, 1877)

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0008176 – 0008179, 0008180 – 0008189, 0003670 – 0003675, 0008190 – 0008200, 0000941 – 0000976, 0000340 – 0000343, 0000345 – 0000347, 0000349, 0000034, 0000360 – 0000366, 0000368, 0000369, 0000268, 0000330, 0000332, 0000335 – 0000339, 0000350, 0000359, 0000370 – 0000373, 0000322, 0000328, 0000329, 0000204, 0000209, 0000223,0000318 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

Holochlora nigrothympana Ingrisch 1990

Tettigoniidae, Phaneropterinae

กรมวิชาการเกษตร

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:9027

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1138901

Synonyms:

semirotunda Xia & Liu, 1990

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0008168 – 0008169, 0008170 – 0008175, 0003869, 0000352, 0000356, 0000334, 0000344, 0000977 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

***Orthelimaea leeuwenii* (Karny 1926)**

Tettigoniidae, Phaneropterinae

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:9303

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1138680

Synonyms: -

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0000232 – 0000233, 0000178, 0000182, 0000169, 0000127, 0000333, 0000357 – 0000358, 0000159, 0000111, 0000348, 0000979, 0000980 – 0000982, 0000374 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

***Hexacentrus unicolor* Serville 1831**

Tettigoniidae, Hexacentrinae

ประวัติทางอนุกรมวิธาน

urn:lsid:Orthoptera.speciesfile.org:TaxonName:520

http://orthoptera.speciesfile.org/Common/basic/Taxa.aspx?TaxonNameID=1143357

Synonyms:

***plantaris* Burmeister, 1838**

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0000355, 0000375 (เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) http://bit.ly/3kex4mE

ข้อสังเกตและวิจารณ์ผลการทดลอง (Comments and Discussions)

กรมวิชาการเกษตร

จากการสำรวจความหลากชนิดและศึกษาอนุกรมวิธานของตั๊กแตนในพืชไร่ที่สำคัญทางเศรษฐกิจในครั้งนี้ ไม่พบศัตรูพืชเฝ้าระวังที่สำคัญ ได้แก่ ตั๊กแตนไผ่ (Yellow-spined bamboo locust): *Ceracris kiangsu* Tsai ที่ระบาดในสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ซึ่งเป็นประเทศเพื่อนบ้านอยู่ติดชายแดนของประเทศไทย ตั๊กแตนไผ่เข้าทำลายพืชไร่เศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ข้าวไร่ ข้าวโพด และลูกเดือย อย่างไรก็ตาม ควรมีงานวิจัยเพื่อศึกษาสถานภาพของตั๊กแตนชนิดนี้อย่างจริงจัง โดยดำเนินการสำรวจและเก็บตัวอย่างอย่างเป็นระบบตามมาตรฐานสากลหรือ ISPM (International Standards for Phytosanitary Measures) นอกจากนี้จากการสำรวจยังไม่พบตั๊กแตนทะเลทราย *Schistocerca gregaria* (Forskal, 1775) (Orthoptera: Acrididae) ซึ่งถือว่าเป็นเป็นศัตรูพืชเฝ้าระวังที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง มีความร้ายแรงในระดับโลก FAO เตือนภัยตั๊กแตนทะเลทรายระบาดร้ายแรงที่สุดในรอบ 25 ปี ซึ่งการระบาดเกิดขึ้นในทวีปแอฟริกา ตะวันออกกลางและทางตะวันตกและตอนใต้ของประเทศอินเดีย และยังมีตั๊กแตนที่เป็นศัตรูพืชไร่ที่สำคัญในอดีตแต่ไม่พบในการทดลองครั้งนี้ ได้แก่ ตั๊กแตนปาทังก้าสีน้ำตาล *Patanga succincta* (Johannson, 1763), ตั๊กแตนโลกัสตา *Locusta migratoria migratoria* (Linnaeus, 1758), ตั๊กแตนผี *Aularches miliaris miliaris* (Linnaeus, 1758), ตั๊กแตนไซตาแคนตาคริส *Cyrtacanthacris tatarica tatarica* (Linnaeus, 1758), ตั๊กแตนคอนดราคริส *Chondracris rosea brunneri* Uvarov, 1924, และตั๊กแตนหัวแหลม *Chlorizeina unicolor unicolor* Brunner von Wattenwyl, 1893 (สมุทร 2524) จากการทดลองในครั้งนี้พบเฉพาะตั๊กแตนข้าว *Hieroglyphus banian* (Fabricius 1798) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหลายปัจจัย เช่น การศึกษาสำรวจไม่ตรงกับฤดูการระบาดของตั๊กแตนแต่ละชนิด อุณหภูมิและสภาพแวดล้อมยังไม่เหมาะแก่การขยายพันธุ์

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้คือเพื่อทราบชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ ลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา และได้แนวทางการวินิจฉัยชนิดของตั๊กแตนในพืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ดำเนินการศึกษาตั้งแต่กันยายน 2561 – ตุลาคม 2563 โดยสำรวจและเก็บตัวอย่างตั๊กแตนในพื้นที่แปลงปลูกพืชไร่เศรษฐกิจ ได้แก่ อ้อย ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และแปลงวัชพืชและในเขตป่าใกล้เคียง ผลการศึกษาพบตั๊กแตนทั้งสิ้น 3 วงศ์ 8 วงศ์ย่อย 23 ชนิด ประกอบด้วย วงศ์ Acrididae วงศ์ย่อย Acridinae พบ 8 ชนิด ได้แก่ *Acrida willemsei* Dirsh 1954, *Gonista bicolor* (De Haan 1842), *Trilophidia annulata* (Thunberg 1815), *Phlaeoba infumata* Brunner 1893, *Phlaeoba antennata* Brunner 1893, *Calephorus vitalisi* I. Bolivar 1914, *Oedaleus abruptus* (Thunberg 1815), *Aiolopus thalassinus* (Fabricius 1781) วงศ์ย่อย Oxynae พบตั๊กแตน 5 ชนิด ได้แก่ *Gesonula mundata* (Walker 1870), *Oxya japonica* (Thunberg 1824), *Oxya hyla* Serville 1831, *Pseudoxya diminuta* (Walker 1871), *Apalacris varicornis* Walker 1870 วงศ์ย่อย Hemiacridinae พบ 2 ชนิดได้แก่ *Hieroglyphus banian* (Fabricius 1798), *Spathosternum prasiniferum* (Walker 1871) และวงศ์ย่อย Eyprepocnemidinae พบ 1 ชนิด *Choroedocus violaceipes* Miller 1934 วงศ์ Pyrgomorphidae พบ 1 วงศ์ย่อย Pyrgomorphinae 2 ชนิด *Atractomorpha psittacina* (De Haan 1842), *Atractomorpha crenulata* (Fabricius 1793) ตั๊กแตนหนวดยาว พบ 1 วงศ์ได้แก่ Tettigoniidae ซึ่งมี 5 ชนิดได้แก่

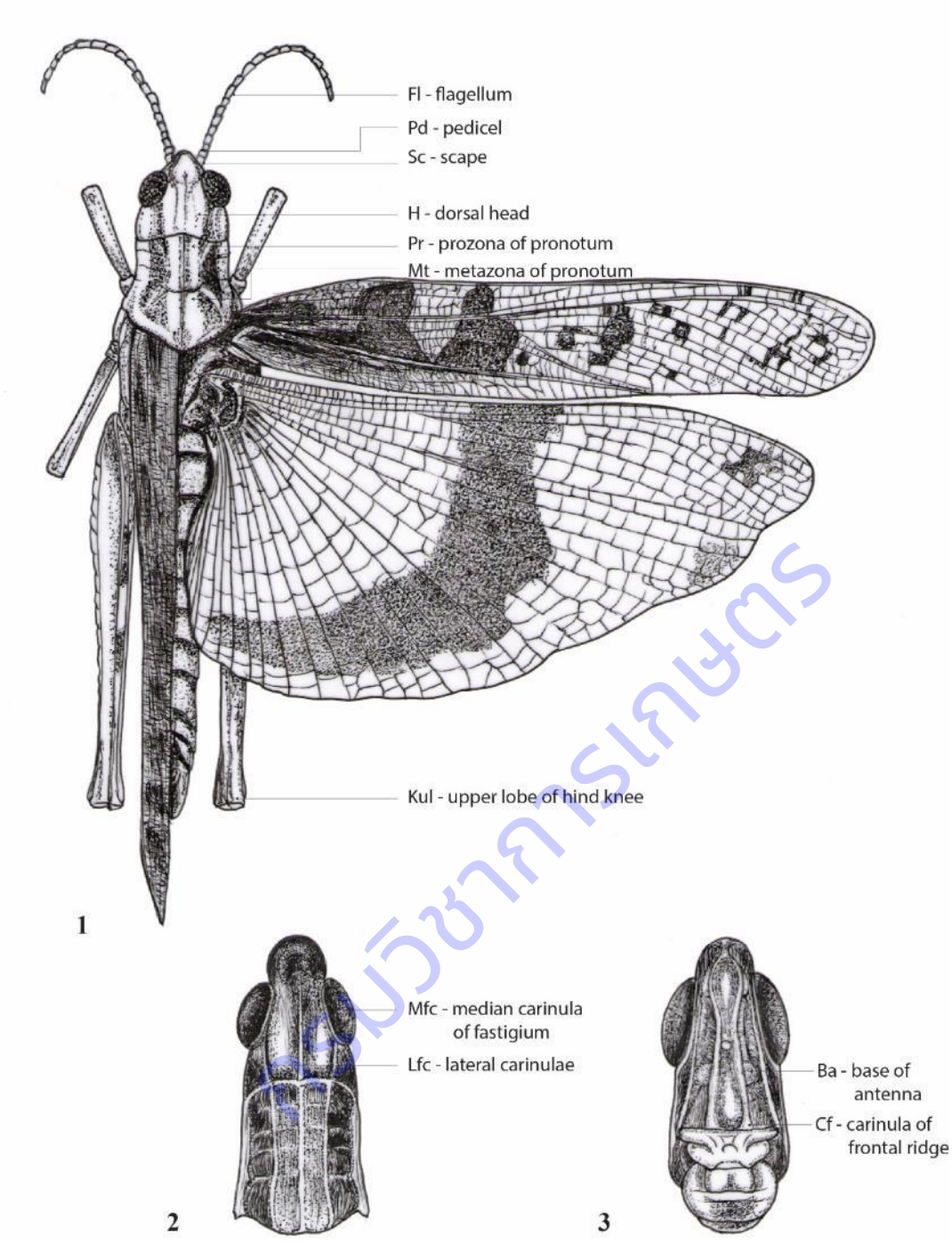
ศรีวิชาการเกษตร

Pyrgocorypha subulate (Thunberg 1815), *Conocephalus longipennis* (Haan 1842), *Holochlora nigrothympana* Ingrisch 1990, *Orthelimaea leeuwenii* (Karny 1926) และ *Hexacentrus unicolor* Serville 1831 ดำเนินการจัดทำแนวทางการวินิจฉัยตั๊กแตนหนวดสั้นซึ่งเป็นตั๊กแตนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ บรรยายประวัติทางอนุกรมวิธาน รหัส LSID ซึ่งสามารถเชื่อมต่อกับฐานข้อมูลตั๊กแตนโลก บรรยายลักษณะทางสัณฐานวิทยา เขตการแพร่กระจายรวมถึงตัวอย่างอ้างอิง (voucher specimens) และสามารถเข้าถึงระบบฐานข้อมูลแหล่งที่สำรวจและเก็บตัวอย่างได้ ผลการทดลองครั้งนี้ส่งผลกระทบต่องานวิจัยด้านการป้องกันกำจัดตั๊กแตนศัตรูพืช การศึกษาสถานภาพและเฝ้าระวังศัตรูพืชต่างถิ่นรุกราน รวมถึงการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของตั๊กแตนเพื่อใช้ประโยชน์อนุรักษ์ เพิ่มมูลค่าของทรัพยากรชีวภาพ สนับสนุนยุทธศาสตร์ชาติว่าด้วยเศรษฐกิจชีวภาพ เศรษฐกิจหมุนเวียนและเศรษฐกิจสีเขียว (BCG: Bio-Circular-Green Economy)

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลการทดลองสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาสำรวจสถานภาพตั๊กแตนศัตรูพืชเฝ้าระวังที่สำคัญของประเทศไทย เป็นข้อมูลวิชาการสนับสนุนการเจรจาการค้าระหว่างประเทศ แนวทางการวินิจฉัยชนิดสามารถช่วยให้นักวิชาการจำแนกชนิดของตั๊กแตนได้อย่างถูกต้องและข้อมูลเหล่านี้เพื่อป้องกันกำจัดตั๊กแตนศัตรูพืชได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังสนับสนุนงานวิจัยด้านการเพิ่มมูลค่าจากความหลากหลายทางชีวภาพเช่น การศึกษาชนิดของตั๊กแตนที่มีคุณค่าทางโภชนาการเพื่องานวิจัยด้านแมลงกินได้ โปรตีนทางเลือก รวมถึงการผลิตขยายในระดับอุตสาหกรรม

กรมวิชาการเกษตร



Figures 1.1.14.1 – 1.1.14.3. Grasshopper morphology; dorsal habitus of body and head, for wing venation see Dirsh (1965) in terminological lists. Image modified from Dirsh (1965)

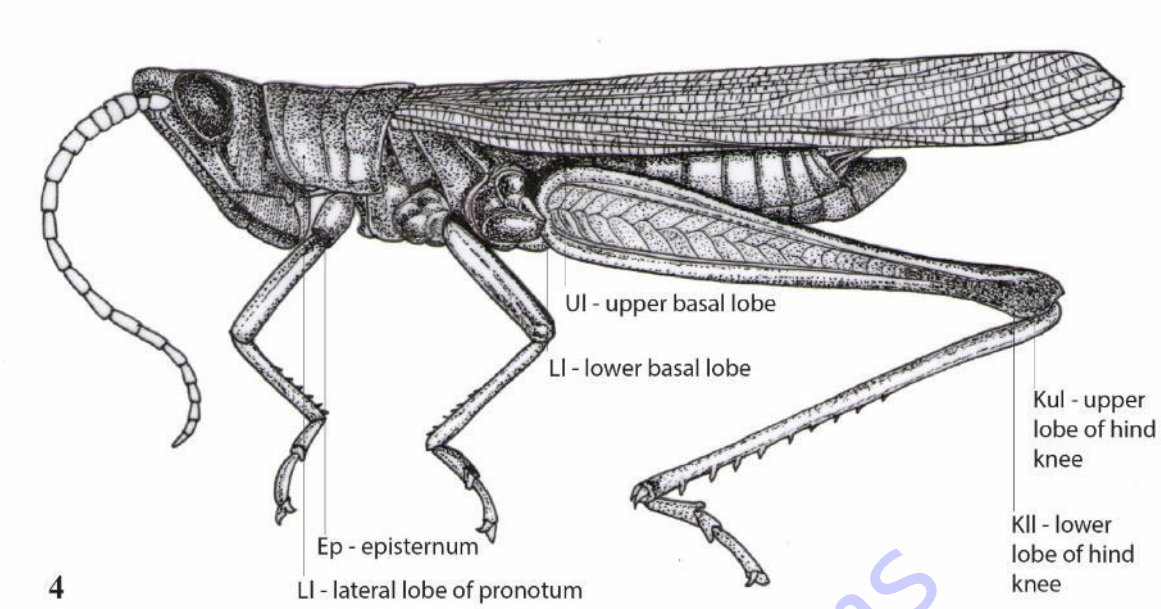
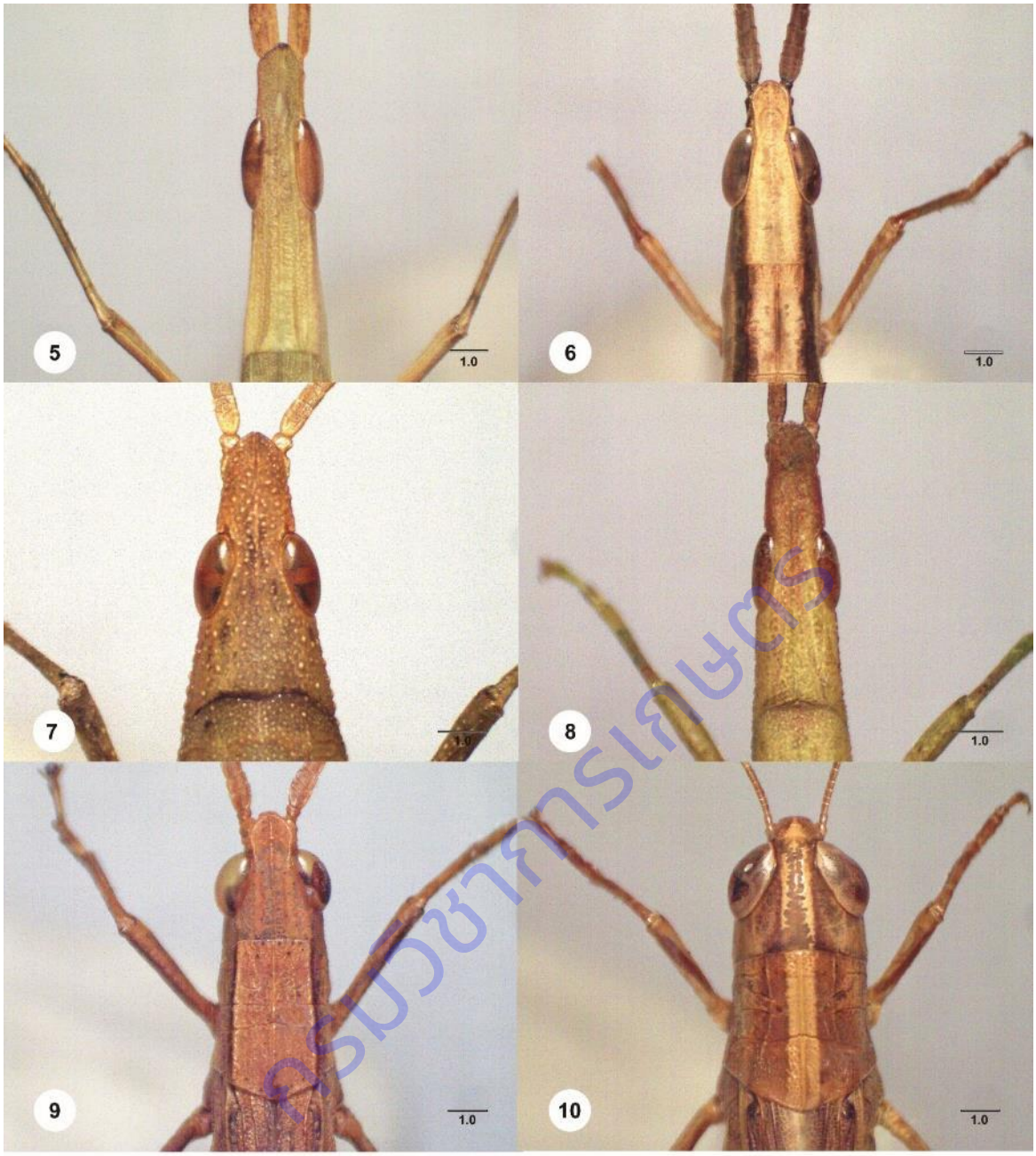


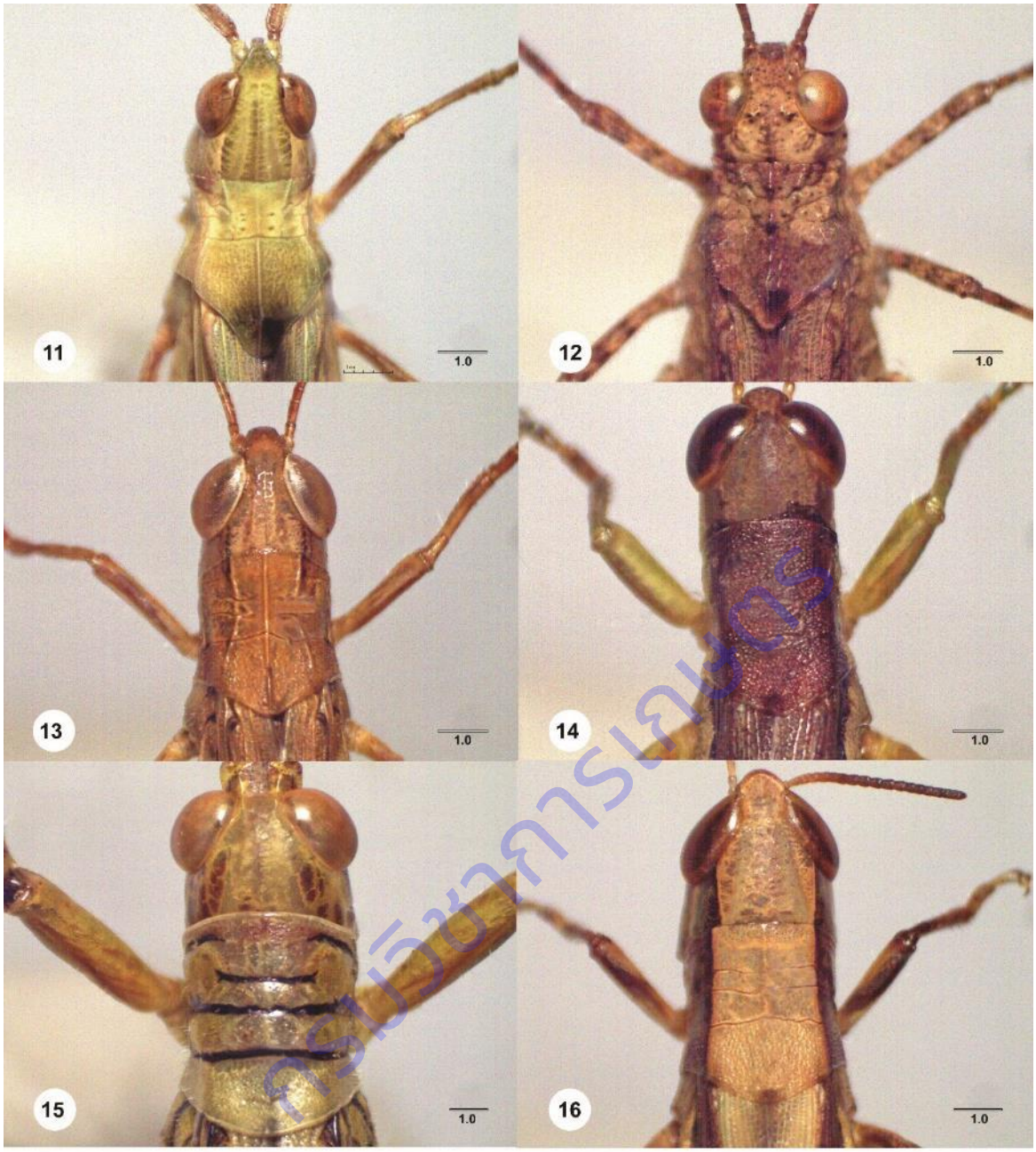
Figure 1.1.14.4. Grasshopper morphology; lateral habitus of body, Image modified from Dirsh (1965)

กรมวิชาการเกษตร



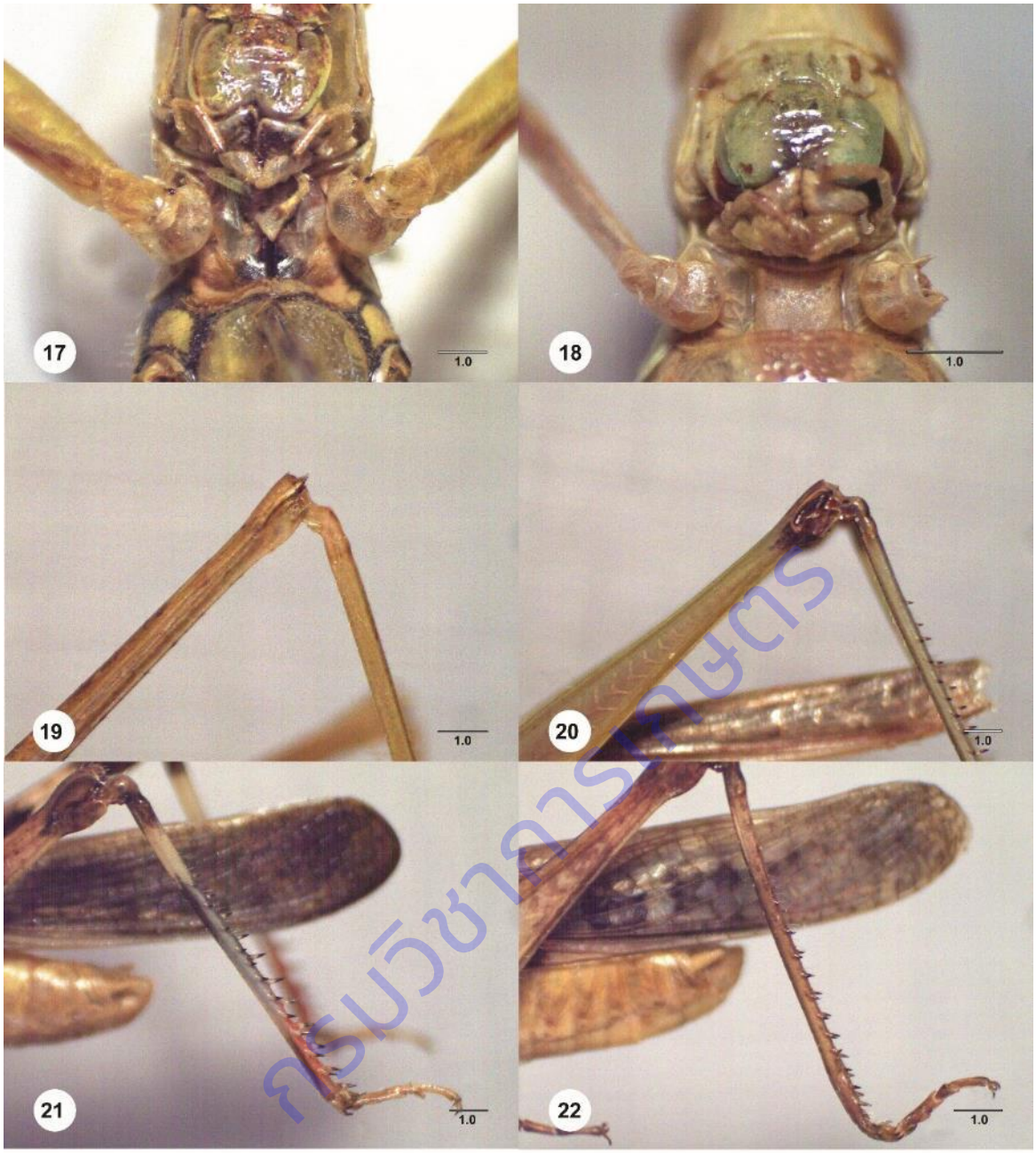
Figures 1.1.14.5 – 1.1.14.10. Head, dorsal view. 5, *Acrida willemsei* Dirsh; 6, *Gonista bicolor* (De Haan); 7, *Atractomorpha crenulata* (Fabricius); 8, *Atractomorpha psittacina* (De Haan); 9, *Phlaeoba antennata* Brunner; 10, *Phlaeoba infumata* Brunner. Scale bar in millimeters.

กรมวิชาการเกษตร



Figures 1.1.14.11 – 1.1.14.16. Head dorsal view. 11, *Calephorus vitalisi* I. Bolivar; 12, *Trilophidia annulata* (Thunberg); 13, *Oxya hyla* Serville; 14, *Pseudoxya diminuta* (Walker); 15, *Hieroglyphus banian* (Fabricius); 16, *Spathosternum prasiniferum* (Walker). Scale bar in millimeters.

กรมวิชาการเกษตร



Figures 1.1.14.17 – 1.1.14.22. Prosternal process or PEG 17, *Hieroglyphus banian* (Fabricius); 18, *Calephorus vitalisi* I. Bolivar; Hind knee, lateral view 19, *Acrida willemsei* Dirsh; 20, *Gonista bicolor* (De Haan); Hind tibia 21, *Aiolopus thalassinus* (Fabricius); 22, *Oedaleus abruptus* (Thunberg). Scale bar in millimeters.

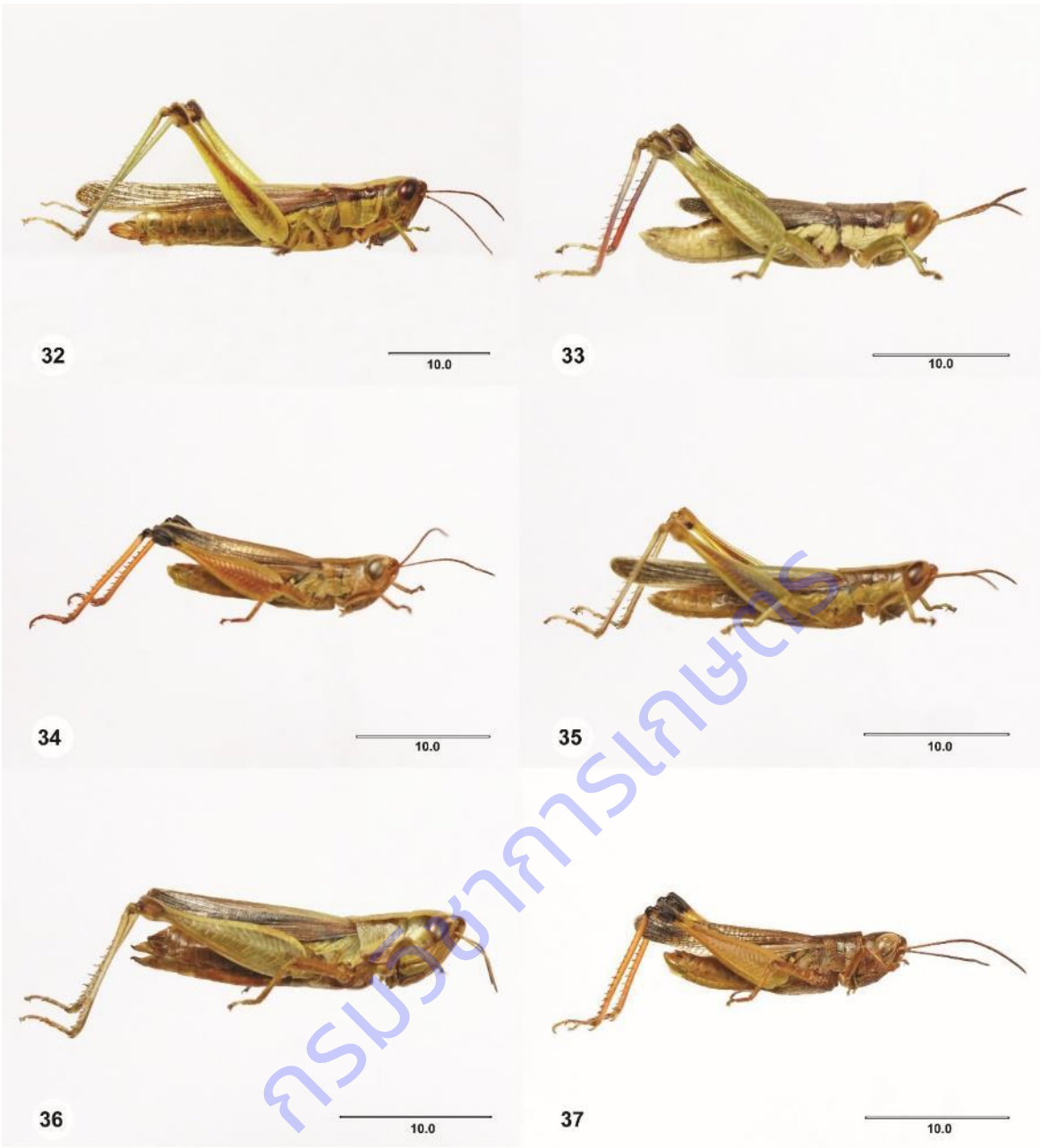
กรมวิชาการเกษตร

Figures 1.1.14.23 – 1.1.14.27. Dorsal habitus 23, *Acrida willemsei* Dirsh; 24, *Gonista bicolor* (De Haan); 25, *Atractomorpha crenulata* (Fabricius); 26, *Phlaeoba infumata* Brunner; 27, *Aiolopus thalassinus* (Fabricius). Scale bar in millimeters.

กรมวิชาการเกษตร

Figures 1.1.14.28 – 1.1.14.31. Dorsal habitus 28, *Hieroglyphus banian* (Fabricius); 29, *Apalacris varicornis* Walker; Lateral habitus 30, *Oedaleus abruptus* (Thunberg); 31, *Trilophidia annulata* (Thunberg). Scale bar in millimeters.

กรมวิชาการเกษตร



Figures 1.1.14.32 – 1.1.14.37. Lateral habitus 32, *Oxya japonica* (Thunberg); 33, *Pseudoxya diminuta* (Walker); 34, *Oxya hyla* Serville; 35, *Gesonula mundata* (Walker); 36, *Spathosternum prasiniferum* (Walker); 37, *Phlaeoba antennata* Brunner. Scale bar in millimeters.

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.15 อนุกรมวิธานของผีเสื้อหนอนร่าน วงศ์ Limacodidae ในประเทศไทย.
Taxonomy of Nettle Caterpillar Moths, Family Limacodidae, in Thailand.

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นายอาทิตย์ รักกสิกร	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นางสาวสุนัดดา เชาวลิต	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ผีเสื้อหนอนร่าน (Lepidoptera: Limacodidae) เป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็กถึงขนาดกลาง หนอนผีเสื้อในวงศ์นี้ มีรายงานการเข้าทำลายโดยการกัดกินใบในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด การศึกษาอนุกรมวิธานของผีเสื้อหนอนร่าน วงศ์ Limacodidae ในประเทศไทย จึงมีความสำคัญที่ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐาน เพื่อประโยชน์ในการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี การบริหารจัดการโดยวิธีผสมผสาน หรือควบคุมการระบาดของผีเสื้อหนอนร่านต่อไป ซึ่งจากการศึกษาตัวอย่างที่สำรวจเก็บจากแหล่งปลูกพืชทั่วทุกภาคของประเทศไทย และตัวอย่างที่ได้เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร จำนวน 1,371 ตัวอย่าง ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2563 พบผีเสื้อหนอนร่าน มีจำนวน 60 ชนิด ใน 26 สกุล คือ สกุล *Altha* 2 ชนิด สกุล *Atosia* 1 ชนิด สกุล *Birthamoides* 1 ชนิด สกุล *Birthosea* 1 ชนิด สกุล *Cania* 3 ชนิด สกุล *Chalcocelis* 1 ชนิด สกุล *Cleromettia* 1 ชนิด สกุล *Darna* 6 ชนิด สกุล *Hampsonella* 1 ชนิด สกุล *Hyphorma* 1 ชนิด สกุล *Hyphormides* 1 ชนิด สกุล *Idonauton* 1 ชนิด สกุล *Miresa* 2 ชนิด สกุล *Narosoideus* 1 ชนิด สกุล *Nirmides* 1 ชนิด สกุล *Oxyplax* 1 ชนิด สกุล *Parasa* 17 ชนิด สกุล *Phlossa* 1 ชนิด สกุล *Phocoderma* 1 ชนิด สกุล *Praesetora* 1 ชนิด สกุล *Pseudonirmides* 1 ชนิด สกุล *Quasithosia* 1 ชนิด สกุล *Scopelodes* 5 ชนิด สกุล *Setora* 2 ชนิด สกุล *Susica* 1 ชนิด และสกุล *Thosea* 5 ชนิด ซึ่งสกุลและชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีจำนวน 6 สกุล 10 ชนิด คือ สกุล *Cania* ได้แก่ชนิด *C. siamensis* สกุล *Darna* ได้แก่ชนิด *D. furva D. diducta D. pallivitta D. sordid* สกุล *Parasa* ได้แก่ชนิด *P. corbetti P. lepida* สกุล *Quasithosia* ได้แก่ชนิด *Q. sythoffi* สกุล *Setora* ได้แก่ชนิด *S. fletcheri* และสกุล *Thosea* ได้แก่ชนิด *T. siamica* โดยทั้ง 10 ชนิดนี้ พบได้ทุกฤดูกาล ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย และพบบนพืชอาศัยหลายชนิด โดยในจำนวนนี้มีพืชเศรษฐกิจสำคัญ ได้แก่ มะพร้าว ปาล์มน้ำมัน ลำไย เงาะ มะม่วง และชมพู่ เป็นต้น โดยเฉพาะมะพร้าวและปาล์มน้ำมัน ที่มักพบการระบาดของหนอนร่านอยู่บ่อยครั้ง และเมื่อพบการระบาดรุนแรงมักสร้างความเสียหายแก่ผลผลิตของมะพร้าวและปาล์มน้ำมัน

คำหลัก : ผีเสื้อหนอนร่าน ผีเสื้อหนอนหอย Limacodidae อนุกรมวิธาน

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

The nettle caterpillar moths (Lepidoptera: Limacodidae) are small to medium size moths. The caterpillars have been reported as leaf-feeding pests of many economic plants. The study on taxonomy of nettle caterpillar moths in Thailand should be of importance for basic biology of nettle caterpillar moths for use in biological control, integrated pest management and control of nettle caterpillar epidemics. The results of studying specimens collected from plantation areas in all parts of Thailand, and specimens in the Insect Museum, Department of Agriculture, between October 2017 and September 2020, totaled 1,371 specimens. The nettle caterpillar moths in Thailand are composed of 60 species in 26 genera: *Altha* (2 spp.), *Atosia* (1 sp.), *Birthamoides* (1 sp.), *Birthosea* (1 sp.), *Cania* (3 spp.), *Chalcocelis* (1 sp.), *Cleromettia* (1 sp.), *Darna* (6 spp.), *Hampsonella* (1 sp.), *Hyphorma* (1 sp.), *Hyphormides* (1 sp.), *Idonauton* (1 sp.), *Miresa* (2 spp.), *Narosoideus* (1 sp.), *Nirmides* (1 sp.), *Oxyplax* (1 sp.), *Parasa* (17 spp.), *Phlossa* (1 sp.), *Phocoderma* (1 sp.), *Praesetora* (1 sp.), *Pseudonirmides* (1 sp.), *Quasithosia* (1 sp.), *Scopelodes* (5 spp.), *Setora* (2 spp.), *Susica* (1 sp.) and *Thosea* (5 spp.). Ten species in 6 genera are of economic importance, these are genus *Cania* such as *C. siamensis*, genus *Darna* such as *D. furva, D. diducta, D. pallivitta, D. sordid*, genus *Parasa* such as *P. corbetti, P. lepida*, genus *Quasithosia* such as *Q. sythoffi*, genus *Setora* such as *S. fletcheri* and genus *Thosea* such as *T. siamica*. These ten species are seasonally abundant throughout the year in all parts of Thailand and are found on many kinds of host plants, some of which are economic plants such as coconut, oil palm, longan, rambutan, mango and rose apple. Epidemics are especially often found in coconut and oil palm. Severe epidemics of high concentration will cause economic loss to coconut and oil palm yields.

Keywords : nettle caterpillar moths, slug caterpillar moths, Limacodidae, taxonomy

คำนำ

ผีเสื้อหนอนร่าน วงศ์ Limacodidae เป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ลำตัวอ้วนป้อม มีขนปกคลุมมาก ปีกมักมีสีน้ำตาลอ่อนและมีจุดสีเขียว สีเงิน หรือสีอื่นๆ ที่มีขนาดใหญ่ปรากฏบนปีก ไม่มีตาเดี่ยว เพศผู้มีหนวดแบบ bipectinate เพศเมียเป็นแบบ filiform มี proboscis และ maxillary palps ขนาดเล็กหรือไม่มีในบางชนิด หนอนของผีเสื้อในวงศ์นี้บางครั้งเรียกว่า หนอนหอย หรือ slug caterpillars เนื่องจากลำตัวอ้วนสั้นคล้ายทาก ขาจริงมีขนาดเล็ก ขาเทียมไม่มี ส่วนหัวซ่อนอยู่ในอกปล้องแรก ตัวหนอนมักมีรูปร่างแปลกๆ และมักมีขนหรือหนามพิษปกคลุมตัวหนอน หากถูกหนามพิษเหล่านี้ทิ่มแทง จะทำให้เกิดการระคายเคืองแสบร้อนอย่างรุนแรงได้ จึงมักเรียกหนอนของผีเสื้อในวงศ์นี้ว่า หนอนร่าน (ศานิต, 2550; ไสว, 2544) ผีเสื้อหนอนร่านหลายชนิด

กรมวิชาการเกษตร

เป็นศัตรูพืชที่มีความสำคัญ มีรายงานการระบาดทำความเสียหายพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ปาล์มน้ำมัน มะพร้าว ลิ้นจี่ ลำไย เงาะ ส้มโอ อ้อย ชา โกโก้ กาแฟ รวมทั้งไม้ดอกและไม้ประดับด้วย (ทวีศักดิ์, 2544; องุ่น, 2544; Hill, 2008; Kuroko and Lewvanich, 1993) ตัวหนอนมักจะทำลายพืชด้วยการกัดกินใบหรือดอก โดยตัวหนอนวัยอ่อนมักจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มกัดกินใบพืช หากมีการระบาดของผีเสื้อหนอนร่านรุนแรงในพื้นที่เกษตรกรรม จะทำให้ผลผลิตลดลงและพืชเศรษฐกิจนั้นๆ ชะงักงันในการเจริญเติบโต และต้นพืชนั้นอาจตายในที่สุด

การศึกษาอนุกรมวิธานของผีเสื้อหนอนร่าน วงศ์ Limacodidae ในประเทศไทยนี้ จึงมีความสำคัญที่ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐาน และทราบชนิดของผีเสื้อหนอนร่านบนพืชอาศัยที่เป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย เช่น ปาล์มน้ำมัน มะพร้าว ชา และกาแฟ เป็นต้น เพื่อประโยชน์ในการป้องกันกำจัด หรือควบคุมการระบาดของผีเสื้อหนอนร่านได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1) ตัวอย่างผีเสื้อหนอนร่าน วงศ์ Limacodidae ที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืชเศรษฐกิจ และตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

2) อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง (insect net) ขวดฆ่า ขวดดอง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง ถังรักษาความเย็น เครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) และชุดอุปกรณ์กับดักแสงไฟ

3) สารเคมีต่างที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง เช่น เอทิลอะซีเตท (ethyl acetate) แอลกอฮอล์ 80%

4) อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง ได้แก่ เข็มไร้สนิม (stainless steel) เข็มหมุดหัวกลม ไม้จัดรูปร่างแมลง (setting board) ปากคีบ โหลชื้น ตู้อบแมลง ฯลฯ

5) กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope, compound microscope และกล้องถ่ายภาพ

6) อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ camera lucida ปากกา roting และกระดาษไขเขียนแบบ

7) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของผีเสื้อหนอนร่าน วงศ์ Limacodidae ได้แก่ Holloway (1986; 1987), Cock *et al.* (1987), Solovyev & Witt (2009) และ Solovyev & Giusti (2017)

วิธีการ

1) เก็บรวบรวมตัวอย่างผีเสื้อหนอนร่าน โดยสำรวจจากแหล่งปลูกพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ ปาล์มน้ำมัน มะพร้าวมันสำปะหลัง ละหุ่ง ส้มเขียวหวาน ส้มโอ มะนาว มะม่วง เงาะ ลำไย ลิ้นจี่ ชา กาแฟ และพืชผักต่างๆ เป็นต้น ตามภูมิภาคต่างๆ ดังต่อไปนี้

ปีที่ 1 ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดพิษณุโลก สุโขทัย เพชรบูรณ์ พิจิตร กำแพงเพชร นครสวรรค์ ลพบุรี ชัยนาท สระบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี และกรุงเทพมหานคร

สารวิชาการเกษตร

ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย น่าน พะเยา เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน แพร่ ลำปาง ลำพูน และอุตรดิตถ์

ปีที่ 2 ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดสระแก้ว ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น ชัยภูมิ นครพนม มหาสารคาม มุกดาหาร เลย สกลนคร สุรินทร์ ศรีสะเกษ หนองคาย อุดรธานี และอุบลราชธานี

ปีที่ 3 ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์

ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ พังงา ภูเก็ต พัทลุง ตรัง สงขลา และสตูล

2) การเก็บตัวอย่างผีเสื้อหนอนร่าน แบ่งเป็น 3 วิธี ดังนี้

- การเดินสุ่มสำรวจทั่วแปลงโดยใช้สวิงจับแมลง โฉบเพื่อเก็บตัวอย่างผีเสื้อหนอนร่านจากแปลงปลูกพืชในช่วงเวลากลางวัน ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า (killing jar) ซึ่งบรรจุน้ำยาเอททิล อะซิเตด หลังจากผีเสื้อหนอนร่านตายแล้วเก็บลงในซองกระดาษสามเหลี่ยมแยกใส่ไว้ในกล่องใส่ตัวอย่างแมลง นำกล่องใส่ตัวอย่างใส่ไว้ในกล่องรักษาความเย็นอีกชั้นเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเน่าเสีย

- การใช้กับดักแสงไฟ (light trap) ติดตั้งในแปลงเกษตร เพื่อดึงดูดผีเสื้อหนอนร่านในช่วงเวลากลางคืน คัดเลือกผีเสื้อหนอนร่านที่ต้องการศึกษา ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า และเก็บตัวอย่างโดยใช้ซองกระดาษสามเหลี่ยมเช่นเดียวกัน

- การสำรวจและเก็บตัวอย่างระยะตัวหนอนของผีเสื้อหนอนร่าน โดยการเดินสุ่มสำรวจทั่วแปลงเก็บตัวหนอนร่านทุกระยะใส่กล่องพลาสติกพร้อมส่วนของพืชที่พบ นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการทั้งตัวหนอนร่านและพืชอาหาร เพื่อศึกษาชีวประวัติ เปลี่ยนพืชอาหารและทำความสะอาดกล่องเลี้ยงตัวหนอนร่านเมื่อกล่องเลี้ยงเริ่มสกปรก บันทึกระยะเวลาการเจริญเติบโตโดยดูจากการลอกคราบของตัวหนอนแต่ละระยะ บันทึกขนาด สี รูปร่าง หรือรายละเอียดอื่นๆที่สังเกตได้ เลี้ยงจนเป็นตัวเต็มวัยรอจนปีกและสีของตัวเต็มวัยพัฒนาเต็มที่จึง ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า นำตัวอย่างที่ได้ไปจัดรูปร่างเพื่อรอการจำแนกชนิด

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

4) นำตัวอย่างผีเสื้อหนอนร่านจัดรูปร่าง บนไม้จัดรูปร่าง โดยใช้เข็มไร้สนิม เบอร์ 000, 00, 0, 1 หรือ 3 ปักกลางอกด้านบน จัดปีกให้กางออกโดยให้ขอบล่างของปีกคู่หน้าตั้งฉากกับลำตัว นำไปอบให้แห้งในตู้อบ ปรับอุณหภูมิ 50 ˚C ใช้เวลา 15 - 30 วัน

5) การตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Holloway (1986), Cock *et al.* (1987) และ Solovyev & Witt (2009) เป็นต้น ดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาดลำตัว รูปร่าง ลักษณะ และสี ฯลฯ โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชนิดผีเสื้อหนอนร่าน ด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิด ประกอบกับการเปรียบเทียบตัวอย่างแมลงที่ได้จำแนกแล้วในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

6) บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาพร้อมทั้งถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound วาดรูปโดยใช้เครื่องมือ camera lucida บันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของผีเสื้อหนอนร่านแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ ปีที่จำแนกชนิด ชื่อผู้จำแนกชนิด และรหัสกำกับตัวแมลง พิกัดภูมิศาสตร์ สถานที่ วัน/เดือน/ปี ชื่อผู้เก็บ พืชที่พบ และวิธีการเก็บตัวอย่าง

7) จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) ชนิดของผีเสื้อหนอนร่าน ที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

8) จัดเก็บตัวอย่างผีเสื้อหนอนร่าน วงศ์ Limacodidae ทุกชนิดที่จำแนกเรียบร้อยแล้วไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง เพื่อการตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

เวลาและสถานที่ : เดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2563

1) แหล่งปลูกพืชทั่วทุกภาคของประเทศไทย
2) พิพิธภัณฑ์แมลง และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากตัวอย่างผีเสื้อหนอนร่าน ที่เก็บรวบรวมได้จากการสำรวจในแปลงพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2563 และตัวอย่างผีเสื้อหนอนร่าน วงศ์ Limacodidae ที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร พบว่าสามารถวินิจฉัยได้จำนวน 60 ชนิด ใน 26 สกุล

ทั้งนี้สามารถวินิจฉัยชนิด โดยใช้รูปวิธาน (key) ที่ปรับปรุงจากแนวทางการวินิจฉัยของ Dyar (1898) Holloway (1986) Cock *et al.* (1987) และ Solovyev & Witt (2009) ดังนี้

(1.) – labial pulp เจริญดี มีขนาดใหญ่.....(2.)

– labial pulp มีขนาดเล็ก เห็นได้ไม่ชัดเจน.....(8.)

(2.) – labial pulp มีสีเดียวกันกับลำตัว ส่วนท้องผีเสื้อมีสีน้ำตาล หรือสีดำ.....(3.)

– labial pulp มีสีต่างจากลำตัว ส่วนท้องผีเสื้อมีสีเหลืองและมีแถบสีดำพาดขวางตามแนวปล้องท้อง .....(4.)

(3.) – ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลดำ ที่กึ่งกลางขอบปีกด้าน hind margin ใกล้ฐานปีกมีจุดสีเงิน จำนวน 2 จุด ปรากฏอยู่.....

Hyphormides argentipunctata **Hering, 1931**

– ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้ม ไม่มีจุดสีเงินปรากฏอยู่บนพื้นปีก.....

Hyphorma minax **Walker, 1865**

(4.) – ปีกคู่หลังสีน้ำตาลเข้ม บริเวณ anal area สีเหลือง.....(5.)

– ปีกคู่หลังสีเหลือง.....(7.)

(5.) – basal area ของปีกคู่หน้ามีสีน้ำตาลเข้ม และจางลงทางปลายปีก.....(6.)

กรมวิชาการเกษตร

– basal area ของปีกคู่หน้ามีสีน้ำตาลอ่อน.....

Scopelodes pallivittata **Snellen, 1886**

(6.) - ปลาย labial pulp มีสีขาวถึงส่วนปลายสุด.....

Scopelodes kwangtungensis **Hering, 1931**

- ปลาย labial pulp มีสีขาว แต่ส่วนปลายสุดมีสีดำ.....

Scopelodes venosa **Walker, 1855 ssp. *bicolor* Wu & Fang, 2009**

(7.) - ปลาย labial pulp มีสีส้มที่ส่วนปลาย.....

Scopelodes unicolor **Westwood, 1841**

- ปลาย labial pulp มีสีขาว แต่ส่วนปลายสุดมีสีดำ.....

Scopelodes testacea **Butler, 1886**

(8.) - ปีกคู่หน้ามีสีเขียว หรือสีเขียวและสีน้ำตาลบนพื้นที่ปีก.....(9.)

- ปีกคู่หน้าไม่ได้มีสีเขียว.....(25.)

(9.) - ปีกคู่หน้ามีสีเขียวทั้งหมด หรือขอบปีกทั้งสามด้านมีสีเขียว.....(10.)

- ขอบปีกคู่หน้าอย่างน้อย 1 ด้าน มีสีน้ำตาลเข้ม หรือสีเหลืองอมน้ำตาล.....(13.)

(10.) – basal area ของปีกคู่หน้ามีสีน้ำตาลเข้ม.....

Parasa ostia **Swinhoe, 1902**

- basal area ของปีกคู่หน้าไม่มีสีน้ำตาลเข้ม.....(11.)

(11.) - ปีกคู่หลังสีน้ำตาลเข้ม ปีกคู่หน้ามีจุดสีน้ำตาลแดงขนาดเล็กปรากฏบนพื้นปีก.....

Parasa bicolor **(Walker, 1855)**

- ปีกคู่หลังสีเหลือง.....(12.)

(12.) - ที่กึ่งกลางใกล้ขอบปีกด้าน hind margin ของปีกคู่หน้า มีจุดสีเงินจำนวน 1 จุด ปลายปีกหน้ามน

Parasa jade **Solovyev & Witt, 2009**

- ปีกคู่หน้า ไม่มีจุดสีเงินปรากฏอยู่ ปลายปีกหน้าค่อนข้างแหลม.....

Parasa prasina **Alpheraky, 1895**

(13.) - ขอบปีกหน้าทั้งสามด้านมีแถบสีน้ำตาลล้อมรอบพื้นที่สีเขียวทางด้านใน.....(14.)

- ขอบปีกหน้า 1-2 ด้าน มีแถบสีน้ำตาลเข้ม หรือสีเหลืองอมน้ำตาล.....(15.)

(14.) - แถบสีน้ำตาลล้อมรอบพื้นที่สีเขียวทางด้านใน มีลักษณะเป็นแถบกว้างและสีน้ำตาลเข้ม.....

Parasa darma **Moore, 1859**

- แถบสีน้ำตาลล้อมรอบพื้นที่สีเขียวทางด้านใน มีลักษณะบาง และมีจุดสีเงินจำนวน 2 จุด ใกล้กึ่งกลางของขอบปีกหน้า ด้าน hind margin และ outer margin.....

Parasa albipuncta **Hampson, 1893**

(15.) - ขอบปีกหน้าตลอดแนว ด้าน hind margin และ outer margin มีแถบสีน้ำตาลเข้ม.....(16.)

- ขอบปีกหน้าเฉพาะด้าน outer margin มีแถบสีน้ำตาลเข้ม หรือสีเหลืองอมน้ำตาล.....(17.)

กรมวิชาการเกษตร

(16.) - ปีกคู่หลังสีน้ำตาลเข้ม.....

Parasa campagnei DeJoannis, 1928

- ปีกคู่หลังสีเหลืองขอบปีกสีน้ำตาล.....

Parasa pseudorepanda Hering, 1933

(17.) - ขอบปีกหน้าด้าน outer margin มีแถบสีเหลืองอมน้ำตาล.....

Parasa pastoralis Butler, 1885

- ขอบปีกหน้าด้าน outer margin มีแถบสีน้ำตาลเข้ม.....(18.)

(18.) - แถบสีน้ำตาลเข้ม ด้าน outer margin มีลักษณะกว้างมากกว่าหรือเท่ากับครึ่งหนึ่งของพื้นที่ปีกหน้า.....(19.)

- แถบสีน้ำตาลเข้ม ด้าน outer margin มีลักษณะกว้างน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของพื้นที่ปีกหน้า..(22.)

(19.) - ปีกคู่หลังสีน้ำตาลเข้ม.....(20.)

- ปีกคู่หลังสีเหลืองขอบปีกสีน้ำตาล.....

Parasa chlorozonata Hampson, 1896

(20.) – basal area ของปีกคู่หน้ามีสีเขียว.....

Parasa balitkae Holloway, 1987

– basal area ของปีกคู่หน้ามีสีน้ำตาลเข้ม.....(21.)

(21.) - ผีเสื้อมีขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีกน้อยกว่า 20 มิลลิเมตร.....

Parasa canangae Hering, 1931

- ผีเสื้อมีขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีกมากกว่า 30 มิลลิเมตร.....

Parasa bana (Cai, 1983)

(22.) - ผีเสื้อมีลักษณะลำตัวเรียวยาว.....(23.)

- ผีเสื้อมีลักษณะลำตัวอ้วนป้อม.....(24.)

(23.) - เส้นลายปีกระหว่างพื้นที่สีเขียวและสีน้ำตาล โค้งออกทางด้าน outer margin ของปีกหน้า.....

Parasa himalepida Holloway, 1987

- เส้นลายปีกระหว่างพื้นที่สีเขียวและสีน้ำตาล โค้งเข้าทางด้าน basal area ของปีกหน้า.....

Parasa sundalepida Holloway, 1986

(24.) - ปีกคู่หลังมีพื้นที่สีน้ำตาลกว้างมากกว่าครึ่งของพื้นที่ปีกหลัง.....

Parasa corbetti Holloway, 1987

- ปีกคู่หลังมีพื้นที่สีน้ำตาลกว้างน้อยกว่าครึ่งของพื้นที่ปีกหลัง.....

Parasa lepida (Cramer, 1779)

(25.) - ปีกคู่หน้ามีเส้นลายปีกลักษณะเป็นเส้นชัดเจนอย่างน้อย 1 เส้น.....(26.)

- ปีกคู่หน้าไม่มีเส้นลายปีกลักษณะเป็นเส้นชัดเจน หรือลายปีกมีลักษณะเป็นแถบ.....(48.)

ศรีวิชาการเกษตร

(26.) - ปีกคู่หน้ามีเส้นลายปีกลักษณะเป็นเส้นชัดเจนจำนวน 3 เส้น ตัวผีเสื้อมีขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีกน้อยกว่า 25 มิลลิเมตร.....(27.)

- ปีกคู่หน้ามีเส้นลายปีกลักษณะเป็นเส้นชัดเจนจำนวน 1-2 เส้น.....(28.)

(27.) - พื้นที่ระหว่าง postmedian line และ marginal line ในปีกคู่หน้า มีแถบสีขาวพาด.....

***Darna furva* (Wileman, 1911)**

- พื้นที่ระหว่าง postmedian line และ marginal line ในปีกคู่หน้า ไม่มีแถบสีขาวพาด.....

***Darna mindanensis* Holloway, 1987**

(28.) - ปีกคู่หน้ามีเส้นลายปีกลักษณะเป็นเส้นชัดเจน จำนวน 2 เส้น.....(29.)

- ปีกคู่หน้ามีเส้นลายปีกลักษณะเป็นเส้นชัดเจน จำนวน 1 เส้น.....(37.)

(29.) - ปีกคู่หน้า มี discal spot.....(30.)

- ปีกคู่หน้า ไม่มี discal spot.....(32.)

(30.) - postmedian line ในปีกหน้า มีลักษณะโค้ง มีพื้นที่รูปพระจันทร์เสี้ยว (cressent) ปรากฏบนพื้นที่ของปีกคู่หน้า.....(31.)

- postmedian line ในปีกหน้า มีลักษณะเป็นเส้นตรง ข้างเส้น postmedian line ด้าน outer margin มีพื้นที่รูปสามเหลี่ยมสีส้ม จำนวน 2 อัน.....

***Phlossa conjuncta* (Walker, 1855)**

(31.) - basal area ในปีกหน้า สีน้ำตาลอ่อน พื้นที่รูปพระจันทร์เสี้ยวมีขนาดใหญ่ใกล้ปลายปีก marginal line มีลักษณะเป็นเส้นประสีขาวดำ.....

***Hampsonella dentata* (Hampson, 1893)**

- basal area ในปีกหน้า สีน้ำตาลเข้ม พื้นที่รูปพระจันทร์เสี้ยวมีขนาดเล็กอยู่กลางพื้นที่ปีกหน้า ที่ปลายปีก มี apical spot.....

***Atosia doenia* (Moore, 1859)**

(32.) - basal area ในปีกหน้า สีน้ำตาลเข้ม ขนาดประมาณครึ่งหนึ่งของพื้นที่ปีกหน้า.....

- basal area ในปีกหน้า ไม่มีสีน้ำตาลเข้ม.....(33.)

(33.) - เส้นลายปีกทั้ง 2 เส้น มีลักษณะโค้งขนานกัน.....(34.)

- เส้นลายปีกทั้ง 2 เส้น ไม่มีลักษณะเป็นเส้นโค้งขนานกัน.....(35.)

(34.) - ปีกคู่หลังสีน้ำตาลอ่อน.....

***Cania robusta* Hering, 1931**

- ปีกคู่หลังสีเหลืองขอบปีกสีน้ำตาล.....

***Cania bandura* Moore, 1859** (เพศเมีย)

(35.) - ข้างเส้น postmedian line ด้าน outer margin ในปีกคู่หน้าไม่มีลวดลาย.....

***Praesetora divergens* (Moore, 1879)**

- ข้างเส้น postmedian line ด้าน outer margin ในปีกคู่หน้ามีลวดลาย.....(36.)

กรมวิชาการเกษตร

(36.) - ข้างเส้น postmedian line ด้าน outer margin ในปีกคู่หน้า มีลวดลายเป็นแถบสีส้มอมน้ำตาล .....

Setora fletcheri **Holloway, 1987**

- ข้างเส้น postmedian line ด้าน outer margin ในปีกคู่หน้า มีลวดลายรูปสามเหลี่ยมสีดำ ที่บริเวณ tornus.....

Setora postornata **(Hampson, 1900)**

(37.) - ปีกคู่หน้า ไม่มี discal spot.....(38.)

- ปีกคู่หน้า มี discal spot.....(40.)

(38.) - เส้นลายปีกในปีกหน้า มีลักษณะเป็นเส้นตรงพาดจากใกล้ปลายปีกมาจรดที่บริเวณกึ่งกลางของขอบปีกด้าน hind margin สีของพื้นที่ปีกระหว่าง 2 ข้าง ของเส้นลายปีกนี้ไม่แตกต่างกัน.....

Quasithosea sythoffi **(Snellen, 1900)**

- เส้นลายปีกในปีกหน้า ไม่มีลักษณะพาดเป็นเส้นตรงพาดจากใกล้ปลายปีกมาจรดที่บริเวณ กึ่งกลางของขอบปีกด้าน hind margin หรือหากมีลักษณะดังกล่าว สีของพื้นที่ปีกระหว่าง 2 ข้าง ของเส้นลายปีกนี้แตกต่างกัน.....(39.)

(39.) - เส้นลายปีกในปีกหน้า มีลักษณะเป็นเส้นโค้งพาดจากใกล้ปลายปีกมาจรดที่บริเวณใกล้ tornus พื้นที่จากเส้นลายปีกนี้ ถึงขอบปีกด้าน outer margin มีสีน้ำตาลแดง.....

Idonauton apicalis **(Walker, 1855)**

- เส้นลายปีกในปีกหน้า มีลักษณะเป็นเส้นโค้งพาดจากใกล้ปลายปีกมาจรดที่บริเวณใกล้ basal area พื้นที่จากเส้นลายปีกนี้ ถึงขอบปีกด้าน costal margin มีสีน้ำตาลเข้ม และที่บริเวณเส้นลายปีกจรด costal margin มีจุดสีดำขนาดใหญ่ปรากฏอยู่.....

Phocoderma velutina **(Kollar, 1844)**

(40.) - discal spot อยู่ข้างเส้นลายปีกทางด้าน outer margin.....

Susica sinensis **(Walker, 1856)**

- discal spot อยู่ข้างเส้นลายปีกทางด้าน basal area.....(41.)

(41.) - เส้นลายปีกในปีกหน้า มีลักษณะเป็นเส้นโค้งพาดจากใกล้ปลายปีกมาจรดที่บริเวณใกล้ tornus.....(42.)

- เส้นลายปีกในปีกหน้า มีลักษณะเป็นเส้นตรงพาดจากใกล้ปลายปีกมาจรดที่บริเวณกึ่งกลางของขอบปีกด้าน hind margin.....(43.)

(42.) - ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้ม ปีกคู่หลังสีน้ำตาลอ่อน.....

Darna sordida **(Snellen, 1900)**

- ปีกคู่หน้าและปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้ม.....

Darna diducta **(Snellen, 1900)**

กรมวิชาการเกษตร

(43.) - ปีกคู่หน้ามีรูปร่างคล้ายสามเหลี่ยม ปลายปีกแหลม ตัวผีเสื้อมีขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีกน้อยกว่า 25 มิลลิเมตร.....(44.)

- ปีกคู่หน้ามีรูปร่างค่อนข้างรูปไข่ ปลายปีกมน ตัวผีเสื้อมีขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีกมากกว่า 30 มิลลิเมตร.....(45.)

(44.) - ปีกคู่หลังสีน้ำตาลเข้ม ปีกคู่หน้าพื้นที่ด้านในสีเหลือง ด้านนอกสีน้ำตาลอมเทา.....

***Oxyplax ochracea* (Moore, 1883)**

- ปีกคู่หลังสีเหลือง ปีกคู่หน้าพื้นที่ด้านในสีส้มอมเหลือง ด้านนอกสีน้ำตาลเข้ม.....

***Darna pallivitta* (Moore, 1877)**

(45.) - ปีกคู่หน้าพื้นที่ด้านในสีน้ำตาลอ่อน ด้านนอกสีน้ำตาลเข้ม.....(46.)

- ปีกคู่หน้าพื้นที่ด้านในและด้านนอกเส้นลายปีก มีสีน้ำตาลเข้ม.....(47.)

(46.) - ปีกคู่หลังสีน้ำตาลเข้ม.....

***Thosea bipartita* Hering, 1933**

- ปีกคู่หลังสีน้ำตาลอ่อน แต่ด้านขอบปีกสีน้ำตาลเข้ม.....

***Thosea unifascia* Walker, 1855**

(47.) - ข้างเส้นลายปีกด้านใน มีเส้นสีขาวลักษณะเด่นชัดพาดตามแนวเส้นลายปีก.....

***Thosea rara* Swinhoe, 1889**

- ข้างเส้นลายปีกด้านใน มีแถบสีขาวลักษณะไม่เด่นชัดพาดตามแนวเส้นลายปีก.....

***Thosea siamica* Holloway, 1987**

(48.) - ปีกคู่หน้า ไม่มี discal spot.....(49.)

- ปีกคู่หน้า มี discal spot.....(56.)

(49.) - ปีกคู่หลังรูปร่างลักษณะคล้ายสามเหลี่ยม สั้นกว่าครึ่งของความยาวปีกคู่หน้า ขอบปีกด้าน outer margin ลักษณะเว้าเข้าด้านใน.....

***Cheromettia sumatrensis* (Heylaerts, 1884)** (เพศผู้)

- ปีกคู่หลังรูปร่างลักษณะไม่คล้ายสามเหลี่ยม ยาวกว่าครึ่งของความยาวปีกคู่หน้า.....(50.)

(50.) - ปลายปีกคู่หน้ามีจุดสีดำขนาดใหญ่.....

***Cheromettia sumatrensis* (Heylaerts, 1884)** (เพศเมีย)

- ปลายปีกคู่หน้าไม่มีจุดสีดำขนาดใหญ่.....(51.)

(51.) - ปีกคู่หน้ามีพื้นที่บริเวณขอบปีกสีขาว พื้นที่ด้านในมีสีน้ำตาล.....(52.)

- ปีกคู่หน้ามีสีน้ำตาลอมแดง หรือสีน้ำตาลอมเหลือง ไม่มีพื้นที่บริเวณขอบปีกสีขาว.....(53.)

(52.) - พื้นที่บริเวณขอบปีกคู่หน้า มีสีขาวล้อมรอบขอบปีกทุกด้าน พื้นที่ด้านในมีสีน้ำตาลเข้ม.....

***Cania bandura* Moore, 1859** (เพศผู้)

กรมวิชาการเกษตร

- พื้นที่บริเวณขอบปีกคู่หน้า มีสีขาวล้อมรอบขอบปีกด้าน outer และ hind margin พื้นที่ด้านใน มีสีน้ำตาลอ่อน มีจุดกลมสีแดงขนาดใหญ่ที่บริเวณ basal area.....

Cania siamensis **Tams, 1924** (เพศผู้)

(53.) - ปีกคู่หน้ามีสีน้ำตาลอมเหลือง มีจุดกลมสีแดงขนาดใหญ่ที่บริเวณ basal area.....

Cania siamensis **Tams, 1924** (เพศเมีย)

- ปีกคู่หน้ามีสีน้ำตาลอมแดง ไม่มีจุดกลมสีแดงขนาดใหญ่ที่บริเวณ basal area.....(54.)

(54.) - มีจุดรูปสามเหลี่ยมสีเงินบริเวณกลางปีกคู่หน้า.....

Miresa bracteata **Butler, 1880**

- ไม่มีจุดรูปสามเหลี่ยมสีเงินบริเวณกลางปีกคู่หน้า.....(55.)

(55.) - ปีกคู่หลังสีน้ำตาลอ่อน.....

Miresa kwangtungensis **Hering, 1931**

- ปีกคู่หลังสีเหลือง.....

Narosoideus vulpina **(Wileman, 1911)**

(56.) - basal area ของปีกคู่หน้ามีสีขาว.....(57.)

- basal area ของปีกคู่หน้าไม่มีสีขาว.....(58.)

(57.) - ปีกคู่หลังสีน้ำตาลอ่อน.....

Nirmides basalis **(Walker, 1862)**

- ปีกคู่หลังสีขาว.....

Darna metaleuca **Walker, 1862**

(58.) - ปีกทั้งสองคู่มีสีขาว ปีกคู่หน้ามีลวดลาย.....(59.)

- ปีกทั้งสองคู่มีสีน้ำตาล ปีกคู่หน้ามีลวดลาย.....(61.)

(59.) - มีจุดกลมสีแดงขนาดใหญ่ จำนวน 1 จุด ที่บริเวณ basal area ของปีกคู่หน้า.....

Chalcocelis albiguttatus **(Snellen, 1879)** (เพศเมีย)

- มีจุดกลมสีดำขนาดใหญ่ จำนวน 4 จุด ที่บริเวณ basal area ของปีกคู่หน้า.....(60.)

(60.) - ที่ขอบปีกคู่หลัง มีจุดสีน้ำตาลขนาดเล็ก ไม่เด่นชัด จำนวน 1-2 จุด.....

Altha adala **Moore, 1859**

- ที่ขอบปีกคู่หลัง มีจุดสีดำขนาดเล็ก เด่นชัด จำนวน 2-3 จุด.....

Altha lacteola **(Swinhoe, 1890)**

(61.) - ผีเสื้อมีสีน้ำตาลอ่อน ที่บริเวณ hind margin ใกล้ basal area มีแถบสีดำ ลักษณะสั้นไม่เด่นชัด..

Thosea lutea **Heylaerts, 1890**

- ผีเสื้อมีสีน้ำตาลเข้ม ทั้งปีกคู่หน้า และปีกคู่หลัง.....(62.)

(62.) - มีจุดกลมสีน้ำตาลดำขนาดใหญ่ จำนวน 1 จุด ที่บริเวณ basal area ของปีกคู่หน้า.....

Chalcocelis albiguttatus **(Snellen, 1879)** (เพศผู้)

กรมวิชาการเกษตร

- ไม่มีจุดกลมสีน้ำตาลดำขนาดใหญ่ จำนวน 1 จุด ที่บริเวณ basal area ของปีกคู่หน้า.....(63.)

(63.) - marginal line มีลักษณะเป็นเส้นประ ลายขาวดำ ที่ basal area มีจุดสีดำขนาดเล็ก จำนวน 5 จุด

.....

***Birthosea bisura* (Moore, 1859)**

- marginal line ไม่มีลักษณะเป็นเส้นประ ลายขาวดำ ที่ basal area ไม่มีจุดสีดำปรากฏอยู่.....

***Pseudonirmides cyanopasta* (Hampson, 1910)**

***Birthosea bisura* (Moore, 1859)**

- marginal line ไม่มีลักษณะเป็นเส้นประ ลายขาวดำ ที่ basal area ไม่มีจุดสีดำปรากฏอยู่.....

***Pseudonirmides cyanopasta* (Hampson, 1910)**

โดยมีรายละเอียดของชนิดที่วินิจฉัยได้ ดังนี้

Order Lepidoptera

Suborder Glossata

Superfamily Zygaenoidea Latreille, 1809

Family Limacodidae Duponchel, 1845

Subfamily Limacodinae Duponchel, 1845

Tribe Limacodini Duponchel, 1845

1. Genus *Altha* Walker, 1862

Altha Walker, 1862: *J. Proc. Linn. Soc*. 6: 173.

Type species: *Altha nivea* Walker, 1862

ผีเสื้อหนอนร่านสกุล *Altha* เป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ลำตัวอ้วนป้อม มีขนปกคลุมมาก ปีกทั้งสองคู่มีสีขาว มีลวดลายในปีกคู่หน้า ไม่มีตาเดี่ยว เพศผู้มีหนวดแบบ bipectinate เพศเมียเป็นแบบ filiform มี proboscis และ maxillary palps ขนาดเล็ก ผีเสื้อเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะแตกต่างกันเล็กน้อย โดยผีเสื้อเพศเมียมักมีขนาดใหญ่กว่าในเพศผู้

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 2 ชนิด ในประเทศไทย โดยมีรายละเอียดในแต่ละชนิดดังนี้

1) *Altha adala* Moore, 1859 (Figure 1.1.15.1.)

Altha adala Moore, 1859: *in* Horsfield & Moore, 1859: *Cat. Lep. Ins. Mus. Nat. East India House* 2: 418.

Altha adala Moore; Hering, 1931: *in* Seitz, *Gross-Schmett. Erde, Suppl* 10: 680.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 25-30 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีขาวปกคลุม ปีกคู่หน้าสีขาว มีลวดลายเป็นเส้นสีเหลืองอมส้ม พาดตามขวางของปีก ทั่วทั้ง

กรมวิชาการเกษตร

ปีกหน้า ที่บริเวณ discal cell มีจุดสีน้ำตาลแดงขนาดใหญ่ จำนวน 4 จุด discal spot สีน้ำตาลเข้มขนาดเล็ก จำนวน 1 จุด และที่ outer margin จำนวน 1-2 จุด ในปีกแต่ละข้างปรากฏอยู่ ปีกคู่หลังมีสีขาว ไม่มีลวดลาย ที่ด้าน outer margin มีจุดสีน้ำตาลเข้ม 1-2 จุด ไม่เด่นชัด

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=38) EMBT-Lep-Limc 000893-000910, 000914-000918, 000942, 000947 และ 000951-000963

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: เมียนมาร์ ไทย มาเลเซียตะวันตก เกาะสุลาเวสี เกาะบอร์เนียว เกาะสุมาตรา และเกาะชวา อินโดนีเซีย (Holloway, 1986)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดชัยนาท สระบุรี จันทบุรี และกรุงเทพมหานคร

ฤดูกาลที่พบ: เดือนมิถุนายน ถึงเดือนธันวาคม

พืชอาหาร: ชมพู่น้ำดอกไม้ กุหลาบ จิกนา เข็ม กล้วยป่า เยอบีร่า ส้มโอ และขันทองพยาบาท นอกจากนี้ยังมีรายงานใน น้อนหน่า และมะม่วง (Holloway, 1986)

2) *Altha lacteola* (Swinhoe, 1890) (Figure 1.1.15.2.)

Narosa lacteola Swinhoe, 1890: *Trans. ent. Soc. Lond.* 1890: 193.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 25-30 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีขาวปกคลุม ปีกคู่หน้าสีขาว มีลวดลายเป็นเส้นสีเหลืองอมส้ม พาดตามขวางของปีก บริเวณใกล้ outer margin ของปีกหน้า ที่บริเวณ discal cell มีจุดสีน้ำตาลแดงขนาดใหญ่ จำนวน 4 จุด discal spot สีน้ำตาลเข้มขนาดเล็ก จำนวน 1 จุด และที่ outer margin จำนวน 1-2 จุด ในปีกแต่ละข้างปรากฏอยู่ ปีกคู่หลังมีสีขาว ไม่มีลวดลาย ที่ด้าน outer margin มีจุดสีน้ำตาลเข้ม 2-3 จุด เด่นชัด

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=33) EMBT-Lep-Limc 000911-000913, 000919-000941, 000943-000946 และ 000948-000950

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: เมียนมาร์ (Holloway, 1986)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ กาญจนบุรี นครสวรรค์ ฉะเชิงเทรา ชลบุรี และนครราชสีมา

ฤดูกาลที่พบ: เดือนมกราคม กุมภาพันธ์ กรกฎาคม ตุลาคม และพฤศจิกายน

2. Genus *Atosia* Snellen, 1900

Atosia Snellen, 1900: *Tijdschr. Ent.* 43: 50 (key), 92.

Type species: *Parasa doenia* Moore, 1859

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด ในประเทศไทย คือ *Atosia doenia* (Moore, 1859)

***Atosia doenia* (Moore, 1859) (Figure 1.1.15.3.)**

Parasa doenia Moore, 1859: *Cat. Lep.Mus. E.I.C.* 2: 416, t.11a, Figure 10.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

กรมวิชาการเกษตร

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 15 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลปกคลุม ส่วนขนที่ปกคลุมทางด้านล่างของลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้ม พบลายปีก antemedian line และ postmedian line สีขาวจาง ไม่ชัดเจน ในพื้นที่ระหว่างเส้นลายปีกทั้งสองเส้นตามแนวลายปีก มีแถบโค้งสีน้ำตาลเข้ม ที่ด้านในของแถบโค้งนี้ ที่กลางปีก มีจุดสีขาวรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว จำนวน 1 จุด และที่ใกล้ปลายปีก มีจุดสีดำจำนวน 1 จุด ในปีกแต่ละข้างปรากฏอยู่ ปีกคู่หลังมีสีขาว ไม่มีลวดลาย

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=9) EMBT-Lep-Limc 001142-001144, 001146, 001147, 001149, 001150, 001151 และ 001157

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ภูฏาน ตอนใต้ของเมียนมาร์ เกาะบอร์เนียว เกาะสุมาตรา และเกาะชวา อินโดนีเซีย (Irungbam *et al*., 2017)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ ฉะเชิงเทรา และสระบุรี

ฤดูกาลที่พบ: เดือนพฤษภาคม ถึงเดือนกรกฎาคม

พืชอาหาร: ละหุ่ง

3. Genus *Birthamoides* Hering, 1931

Birthamoides Hering, 1931: *in* SEITZ, Gross-Schmett. Erde 10: 671 (key), 703.

Type species: *Hyblaea junctura* Walker, 1865

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด ในประเทศไทย คือ *Birthamoides junctura* (Walker, 1865)

***Birthamoides junctura* (Walker, 1865) (Figure 1.1.15.4.)**

Hyblaea junctura Walker, 1865: *List Specimens lepid. Insects Colln. Br. Mus*. 33: 857.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 30-40 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาล ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลปกคลุม ส่วนขนที่ปกคลุมทางด้านล่างของลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าสีน้ำตาล ที่บริเวณจาก median line จนถึงฐานปีกมีสีน้ำตาลเข้ม พื้นที่ประมาณครึ่งปีกหน้า และที่บริเวณ postmedian line มีแถบสีน้ำตาลเข้มคู่กับแถบสีขาวจาง ไม่ชัดเจน พาดจากขอบปีกด้าน costal margin จนถึง hind margin ระหว่าง median line และแถบสีน้ำตาลเข้มที่ postmedian line มีลายสีน้ำตาลเข้ม ลักษณะคล้ายตัวอักษร “V” กลับหัว โดยมุมแหลมของลายนี้อยู่ที่บริเวณกึ่งกลางปีก ปลายแขนของตัวอักษรพาดมาจรดที่ hind margin ของปีกหน้า ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อน ไม่มีลวดลาย

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=7) EMBT-Lep-Limc 001050 และ 001053-001058

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: อินเดีย หมู่เกาะอันดามัน เมียนมาร์ กัมพูชา ไทย ภาคเหนือและภาคกลางของเวียดนาม เกาะบอร์เนียว เกาะสุมาตรา เกาะชวา และเกาะบาหลี อินโดนีเซีย (Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ เลย นครนายก จันทบุรี และกรุงเทพมหานคร

กรมวิชาการเกษตร

ฤดูกาลที่พบ: เดือนสิงหาคม พฤศจิกายน และธันวาคม

พืชอาหาร: มะม่วง (Solovyev & Witt, 2009)

4. Genus *Birthosea* Holloway, 1986

Birthosea Holloway, 1986: The Moths of Borneo Part 1. The Malayan Nature Journal 40: 116. pl 8, Figure 202, 203.

Type species: *Birthosea bisura* (Moore, 1859)

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด ในประเทศไทย คือ *Birthosea bisura* (Moore, 1859)

***Birthosea bisura* (Moore, 1859) (Figure 1.1.15.5.)**

Parasa bisura Moore, 1859: in Horsfield & Moore, *Cat. Lep. Ins. Mus. Nat. East India House* 2: 415.

Miresa orthosioides Walker, 1862: *J. Linn. Soc. Lond.* (*Zool.*) 6: 143, **syn. n.**

Contheyla brunnea Swinhoe, 1904: Trans. Ent. Soc. Lond., 1904: 153 **syn. n.**

Thosea bisura Moore; Hering, 1931 *in* Seitz, *Gross-Schmett. Erde, Suppl* 10: 714.

ชื่อสามัญ: หนอนหอยหลังจุดส้ม (ทวีศักดิ์, 2544)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 30 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ส่วนขนที่ปกคลุมทางด้านล่างของลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้ม พบลายปีก antemedian line และ postmedian line สีขาวจาง ไม่ชัดเจน ในพื้นที่ระหว่างเส้นลายปีกทั้งสองเส้น มีจุดสีดำจำนวน 5 จุด ในปีกแต่ละข้างปรากฏอยู่ ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อน ลายปีก marginal line บริเวณขอบปีกด้านนอกของปีกทั้งสองคู่ มีลักษณะเป็นเส้นประสีขาวสลับดำตลอดด้าน outer margin

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=2) EMBT-Lep-Limc 000873 และ 000874

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ไทย มาเลเซียตะวันตก เกาะบอร์เนียว เกาะสุมาตรา เกาะชวา อินโดนีเซีย และเกาะปาลาวัน ฟิลิปปินส์ (ทวีศักดิ์, 2544; Cock *et al.*, 1987; Holloway, 1986)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่

ฤดูกาลที่พบ: เดือนสิงหาคม

พืชอาหาร: ชาน้ำมัน นอกจากนี้ มีรายงานพืชอาหารอื่น ได้แก่ ปาล์มน้ำมัน สาคู ละหุ่ง เงาะ ตะแบก ขิง และกาแฟ (ทวีศักดิ์, 2544; Cock *et al.*, 1987; Holloway, 1987)

ศัตรูธรรมชาติ: Holloway (1987) ได้รายงานพบศัตรูธรรมชาติหนอนร่าน B. bisura จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ กลุ่มแมลงเบียน เช่น แมลงวันก้นขนชนิด *Chaetexorista javana* Brauer & Bergenstamm, 1895 (Diptera: Tachinidae) *Fornicia* sp. (Hymenoptera: Braconidae) *Euplectrus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae) *Buysmania oxymora* (Tosquinet, 1903) และ *Chlorocryptus purpuratus* (Smith, 1852)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

(Hymenoptera: Ichneumonidae) กลุ่มแมลงห้ำ เช่น มวนพิฆาต ชนิด *Cantheconidea furcellata* Wolff, 1801 (Hemiptera: Pentatomidae) และมวนเพชฌฆาต ชนิด *Sycanus dichotomus* Stål, 1866 (Hemiptera: Reduviidae)

5. Genus *Cania* Walker, 1855

Cania Walker, 1855: *List Specimens lepid. Insects Colln Br. Mus*. 5: 1159 (key), 1177.

Type species: *Cania sericea* Walker, 1855

ผีเสื้อหนอนร่านสกุล *Cania* เป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ลำตัวอ้วนป้อม มีขนปกคลุมมาก ปีกทั้งสองคู่มักมีสีน้ำตาล ไม่มีตาเดี่ยว เพศผู้มีหนวดแบบ bipectinate เพศเมียเป็นแบบ filiform มี proboscis และ maxillary palps ขนาดเล็ก ผีเสื้อเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะที่แตกต่างกัน และผีเสื้อเพศเมียมักมีขนาดใหญ่กว่าและมีสีจางกว่าในเพศผู้

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 3 ชนิด ในประเทศไทย โดยมีรายละเอียดในแต่ละชนิด ดังนี้

1) ***Cania bandura* Moore, 1859 (Figure 1.1.15.6.)**

Parasa bandura Moore, 1859: *Cat, Keo, Nys, E,I.C*.1: 417.

Nyssia malaccana Walker, 1865: *List Specimens lepid. Insects Colln Br. Mus.* 32: 481.

ชื่อสามัญ: หนอนหอยเขียวกำมะหยี่ (ทวีศักดิ์, 2544)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 25-40 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ในเพศผู้จะเห็นลักษณะหนวดแบบฟันหวีได้ชัดเจน ส่วนหัวและส่วนอกมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม ในส่วนท้องมีขนสีเหลืองเข้มปกคลุม โดยทางด้านบนมีสีเข้มกว่าด้านล่าง เพศผู้และเพศเมียมีขนาดตัวและลวดลายบนปีกแตกต่างกัน ในเพศผู้ขอบปีกทั้งสามด้าน รวมทั้งบริเวณฐานปีก มีสีขาว ล้อมรอบพื้นที่สีน้ำตาลเข้มทางด้านใน ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อน ขอบปีกหลังมีสีขาว ไม่มีลวดลาย ในเพศเมีย ปีกคู่หน้ามีสีน้ำตาลอ่อน มีลายปีก median line และ postmedian line พาดจากขอบปีกด้าน costal margin จรดขอบปีกด้าน hind margin โดยลายปีกทั้งสองเส้นนี้ สอบเข้าใกล้กันบริเวณ costal margin ส่วนปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อนทางด้านนอกและจางลงเป็นสีเหลืองที่ฐานปีกคู่หลัง ไม่มีลวดลาย

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=4) EMBT-Lep-Limc 001059-001062

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ด้านตะวันออกของเทือกเขาหิมาลัย เมียนมาร์ ภาคใต้ของไทย มาเลเซีย ตะวันตก เกาะบอร์เนียว เกาะสุมาตรา เกาะชวา และเกาะบาหลี อินโดนีเซีย (Holloway, 1987)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดยะลา และตรัง

ฤดูกาลที่พบ: เดือนกุมภาพันธ์ เมษายน และตุลาคม

พืชอาหาร: Holloway (1987) ได้รายงานพืชอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ มะพร้าว และปาล์มน้ำมัน

ศรีวิชาการเกษตร

ศัตรูธรรมชาติ: Holloway (1987) ได้รายงานแตนเบียนหนอนของ *C. bandura* จำนวน 2 ชนิด คือ *Apanteles* sp. และ *Apanteles caniae* Wilkinson, 1928 (Hymenoptera: Braconidae)

2) *Cania robusta* Hering, 1931 (Figure 1.1.15.7.)

Cania bilinea robusta Hering, 1931: *in* Seitz, *Gross-Schmett. Erde, Suppl* 10: 679.

Cania bilinea pallida Hering, 1931: *in* Seitz, *Gross-Schmett. Erde, Suppl* 10: 679.

Cania robusta Hering; Holloway, 1986: 78.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 30-40 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ในเพศผู้จะเห็นลักษณะหนวดแบบฟันหวีได้ชัดเจน ส่วนหัวและส่วนอกมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม ในส่วนท้องมีขนสีเหลืองเข้มปกคลุม โดยทางด้านบนมีสีเข้มกว่าด้านล่าง เพศผู้และเพศเมียมีขนาดตัวและลวดลายบนปีกใกล้เคียงกัน ปีกคู่หน้ามีสีน้ำตาลอ่อน มีลายปีก median line และ postmedian line พาดจากขอบปีกด้าน costal margin จรดขอบปีกด้าน hind margin โดยลายปีกทั้งสองเส้นนี้ ค่อนข้างขนานกัน และขนานไปกับขอบปีกด้าน outer margin ของปีกคู่หน้า ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อนทั่วทั้งปีก ไม่มีลวดลาย

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=16) EMBT-Lep-Limc 001064-001066, 001068-001070, 001085-001087 และ 001091-001097

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: จีนตอนใต้ เมียนมาร์ ไทย และมาเลเซียตะวันตก

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พิษณุโลก เลย พระนครศรีอยุธยา จันทบุรี และชุมพร

ฤดูกาลที่พบ: พบได้ทุกฤดูกาล

พืชอาหาร: Holloway (1987) ได้รายงานพืชอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ มะพร้าว ปาล์มน้ำมัน กล้วย ชมพู่ และชา

3) *Cania siamensis* Tams, 1924 (Figure 1.1.15.8.)

Cania siamensis Tams, 1924: J. *Nat. Hist. Soc. Siam* 6: 280.

ชื่อสามัญ: หนอนหอยหลังจุดขาว (ทวีศักดิ์, 2544)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 30-40 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ในเพศผู้จะเห็นลักษณะหนวดแบบฟันหวีได้ชัดเจน ส่วนหัวและส่วนอกมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม ในส่วนท้องมีขนสีเหลืองเข้มปกคลุม โดยทางด้านบนมีสีเข้มกว่าด้านล่าง เพศผู้และเพศเมียมีขนาดตัวและลวดลายบนปีกแตกต่างกัน ในเพศผู้ขอบปีกด้าน outer margin และ hind margin มีสีขาว submarginal line มีสีน้ำตาลเข้ม พื้นที่ด้านในของปีกคู่หน้าเป็นสีน้ำตาลอ่อน บริเวณ discal cell มีสีน้ำตาลเข้ม โดยทางด้านใต้พื้นที่สีน้ำตาลเข้มนี้จรดขอบปีกด้าน hind margin ใกล้ฐานปีก มีจุดสีแดงรูปทรงไม่สมมาตรปรากฏอยู่ ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อน ไม่มีลวดลาย ในเพศเมีย ปีกคู่หน้ามีสีน้ำตาลอมเหลือง ที่บริเวณใต้ discal cell จรดขอบปีกด้าน hind margin ใกล้ฐานปีก มีจุดสีแดงรูปทรงไม่สมมาตรปรากฏอยู่ ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอมเหลือง ไม่มีลวดลาย

กรมวิชาการเกษตร

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=33) EMBT-Lep-Limc 001067, 001071-001084, 001088-001090, 001098 และ 001100-001113

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ไทย (Holloway, 1987)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ นครราชสีมา ชลบุรี ระยอง จันทบุรี และประจวบคีรีขันธ์

ฤดูกาลที่พบ: เดือนธันวาคม ถึงกุมภาพันธ์ พฤษภาคม มิถุนายน และสิงหาคม

พืชอาหาร: Holloway (1987) ได้รายงานพืชอาหาร ได้แก่ มะพร้าว

ศัตรูธรรมชาติ: Solovyev & Witt (2009) ได้รายงานแตนเบียนหนอนของ *C. siamensis* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Buysmania oxymora* (Tosquinet, 1903) (Hymenoptera: Ichneumonidae) และ *Platyplectrus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae) เช่นเดียวกันกับ ทวีศักดิ์ (2544) ได้รายงานแตนเบียนหนอน จำนวน 1 ชนิด คือ *Euplectromorpha chlorocephala* (Nees, 1834) (Hymenoptera: Eulophidae) แตนเบียนดักแด้ จำนวน 2 ชนิด คือ *Chlorocryptus* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae) และ *Chrysis shanghaiensis* Smith, 1874 (Hymeoptera: Chrysidae)

6. Genus *Chalcocelis* Hampson, 1893

Chalcocelis Hampson, 1893: *Fauna Br. India (Moths)* 1: 372 (key), 392.

Type species: *Miresa fumifera* Swinhoe, 1890

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด ในประเทศไทย คือ *Chalcocelis albiguttatua* (Snellen, 1879)

Chalcocelis albiguttatus (Snellen, 1879) (Figure 1.1.15.9.)

Limacodes albiguttatus Snellen, 1879: *Tijdschr. Ent.* 22: 118.

Miresa fumifera Swinhoe, 1890: *Trans. ent. Soc. Lond*. 1890: 195.

Miresa nigriplaga Heylaerts, 1890: *Comp. rend. Soc. ent. Belg*. 34: 28.

Miresa sanguineomaculata Heylaerts, 1890: *Ibid.* 34: 28.

Altha pulchrimacula Hulstaert, 1924: *Ann. Mag. Nat. Hist.* (9) 13: 139.

Chalcocelis albiguttatua Snellen; Hering, 1931: 686.

ชื่อสามัญ: หนอนวุ้น (ทวีศักดิ์, 2544)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 25-40 มิลลิเมตร เพศผู้และเพศเมียมีขนาดตัวและลวดลายบนปีกแตกต่างกัน ในเพศผู้ หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ปีกคู่หน้าและคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้ม มี discal spot ขนาดเล็กสีดำบริเวณกลางปีกคู่หน้า บริเวณพื้นที่ใต้ discal cell มีจุดขนาดใหญ่ค่อนข้างกลมสีน้ำตาลเข้มอมดำ ใกล้กึ่งกลางขอบปีกด้าน hind margin ปีกคู่หลัง ไม่มีลวดลาย ในเพศเมีย หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง มีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม ปีกคู่หน้ามีสีน้ำตาลอมเหลือง มี discal spot ขนาดเล็กสีดำบริเวณกลางปีกคู่หน้า ลาย postmedian line มีสีน้ำตาลอ่อน ไม่ชัดเจน

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

บริเวณ discal cell มีแถบสีส้ม และที่บริเวณใต้ discal cell ใกล้จุดกึ่งกลางขอบปีกด้าน hind margin มีจุดสีแดงรูปทรงค่อนข้างกลมปรากฏอยู่ ปีกคู่หลังมีสีเหลือง ไม่มีลวดลาย

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=5) EMBT-Lep-Limc 001114-001118

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ภาคใต้ของไทย มาเลเซียตะวันตก เกาะบอร์เนียว เกาะสุมาตรา เกาะชวา หมู่เกาะโมลุกกะ เกาะสุลาเวสี เกาะนิวกินี อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และรัฐควีนแลนด์ ออสเตรเลีย

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดชลบุรี จันทบุรี และกรุงเทพมหานคร

ฤดูกาลที่พบ: เดือนพฤษภาคม ตุลาคม และธันวาคม

พืชอาหาร: มะพร้าว และรัก สอดคล้องกับรายงานของ Holloway (1986) ซึ่งพบหนอนร่านชนิดนี้บน มะพร้าว กาแฟ ทองหลาง ชมพู่ ฝรั่ง ยูคาลิปตัส เงาะ กระเบา พุดซ้อน และกระถินณรงค์

ศัตรูธรรมชาติ: Holloway (1987) ได้รายงานพบแมลงเบียนหนอนร่าน *C. albiguttatus* จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *Systropus roepkei* deMeijere, 1914 (Diptera: Bombyliidae) *Boettchertsca peregrina* (Robineau-Desvoidy, 1830) *Sarcorohdendorfia antilope* (Böttcher, 1913) *Seniorwhitea krameri* (Boettcher, 1912) (Diptera: Sacophagidae) แตนเบียนชนิด *Fornicia chalcoscelidis* Wilkinson, 1936 (Hymenoptera: Braconidae) *Brachymeria lasus* (Walker, 1841) (Hymenoptera: Chalcididae) *Goryphus* sp. และ *Buysmania oxymora* (Tosquinet, 1903) (Hymenoptera: Ichneumonidae)

7. **Genus *Cleromettia* Moore, 1883**

Cheromettia Moore, 1883: *Lepid. Ceylon* 2: 133.

Type species: *Belippa ferruginea* Moore, 1877

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด ในประเทศไทย คือ *Cheromettia sumatrensis* (Heylaerts, 1884)

***Cheromettia sumatrensis* (Heylaerts, 1884) (Figure 1.1.15.10.)**

Nemeta sumatrensis Heylaerts, 1884: *Comp. rend. Soc. ent. Belg*. 28: 42.

Cheromettia sumatrensis Heylaerts; Hering, 1931: 674.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 25-40 มิลลิเมตร เพศผู้และเพศเมียมีขนาดตัวและลวดลายบนปีกแตกต่างกัน ในเพศผู้ หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ปีกคู่หน้าแคบและยาวมีสีน้ำตาล มี apical spot ขนาดใหญ่สีดำบริเวณปลายปีกคู่หน้า มี antemedial line สีดำไม่เด่นชัด ปีกคู่หลังรูปสามเหลี่ยม มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของปีกคู่หน้า ขอบปีกด้าน outer margin เว้าเข้าด้านในปีก มีสีน้ำตาลเข้มที่บริเวณขอบปีกด้าน costal margin และ anal margin ไม่มีลวดลาย บริเวณกลางปีกคู่หลังจรดขอบปีกด้าน outer margin มีลักษณะใส ไม่มีเกล็ดปกคลุม ในเพศเมีย หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง มีขนสีส้มอมเหลืองปกคลุม ปีกคู่หน้ามีสีเหลือง มี apical spot ขนาดใหญ่สีดำบริเวณปลายปีกคู่

กรมวิชาการเกษตร

หน้า ที่ฐานปีกตลอดแนวขอบปีกด้าน costal margin มีสีส้มอมเหลือง ปีกคู่หลังมีสีเหลือง ไม่มีลวดลาย ที่กึ่งกลางขอบปีกด้าน outer margin มีจุดสีดำขนาดเล็กอยู่ข้างละ 1 จุด

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=7) EMBT-Lep-Limc 000133-000136, 000853, 000854 และ 000863

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: มาเลเซียตะวันตก เกาะบอร์เนียว เกาะสุมาตรา เกาะชวา และเกาะบาหลี อินโดนีเซีย

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ ตาก ขอนแก่น นครราชสีมา และระนอง

ฤดูกาลที่พบ: เดือนพฤษภาคม สิงหาคม และกันยายน

พืชอาหาร: กุหลาบ และ Holloway (1987) ได้รายงานพบหนอนร่านชนิดนี้บน กล้วย พุทธรักษา นุ่น ชิงโคนา โกโก้ มะพร้าว กาแฟ โล่ติ้น มะม่วง ทองหลาง ปาล์มน้ำมัน ถั่วเขียว เงาะ ละหุ่ง และชา

ศัตรูธรรมชาติ: Holloway (1987) ได้รายงานพบแมลงเบียนหนอนร่าน *C. sumatrensis* จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Systropus roepkei* deMeijere, 1914 (Diptera: Bombyliidae) แตนเบียนชนิด *Apanteles aluella* Nixon, 1967 และชนิด *Apanteles belippae* Rohwer, 1918 (Hymenoptera: Braconidae)

8. Genus *Darna* Walker, 1862

Darna Walker, 1862: *J. Proc. Linn. Soc. (Zool.)* 6: 174.

Type species: *Darna plana* Walker, 1862

ผีเสื้อหนอนร่านสกุล *Darna* เป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ลำตัวอ้วนป้อม มีขนปกคลุมมาก ปีกทั้งสองคู่มักมีสีน้ำตาล หรือสีส้มอมเหลือง ไม่มีตาเดี่ยว เพศผู้มีหนวดแบบ bipectinate เพศเมียเป็นแบบ filiform มี proboscis และ maxillary palps ขนาดเล็ก ผีเสื้อเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะที่แตกต่างกันเล็กน้อย และผีเสื้อเพศเมียมักมีขนาดใหญ่กว่าและมีสีจางกว่าในเพศผู้

จากการศึกษา ตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 2 ชนิด คือ *D. metaleuca* และ *D. mindanensis* แต่เนื่องจากมีรายงานโดย ทวีศักดิ์ (2544) ที่ได้รายงานผีเสื้อหนอนร่านสกุลนี้ในประเทศไทย ที่เป็นศัตรูพืชสำคัญในมะพร้าวและปาล์มน้ำมัน อีกจำนวน 4 ชนิด คือ *D. diducta D. furva D. pallivitta* และ *D. sordida* ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงรายงานชนิดผีเสื้อหนอนร่านสกุลนี้ในประเทศไทยรวมกับการตรวจเอกสารที่ได้มีผู้รายงานไว้แล้ว โดยมีรายละเอียดในแต่ละชนิด ดังนี้

1) *Darna diducta* (Snellen, 1900)

Ploneta diducta Snellen: *in* Piepers & Snellen 1900: 105.

ชื่อสามัญ: หนอนร่านสีน้ำตาล (ทวีศักดิ์, 2544)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 22-27 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ในเพศผู้จะเห็นลักษณะหนวดแบบฟันหวีได้ชัดเจน ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม เพศผู้และเพศเมียมีขนาดตัวและลวดลายบนปีกแตกต่างกัน ในเพศผู้ ปีกคู่หน้าบริเวณฐานปีกจนถึง postmedian line มีสีน้ำตาลดำ postmedian line สีขาวเด่นชัด พาดจากปลายปีกมาจรดบริเวณกึ่งกลางของขอบปีกด้าน hind margin พื้นที่

กรมวิชาการเกษตร

บริเวณ postmedian line จรด outer margin มีสีน้ำตาล ที่กึ่งกลางปีกคู่หน้า มี discal spot สีดำ ข้างละ 1 จุด ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้ม ในเพศเมีย ปีกคู่หน้ามีสีน้ำตาลอ่อน มีลายปีก postmedian line สีน้ำตาล ไม่ชัดเจน พาดจากขอบปีกด้าน costal margin จรดขอบปีกด้าน hind margin ที่กึ่งกลางปีกคู่หน้า มี discal spot สีดำ ข้างละ 1 จุด ไม่เด่นชัด ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้มกว่าปีกคู่หน้า ไม่มีลวดลาย

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: -

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ภาคใต้ของไทย มาเลเซียตะวันตก เกาะบอร์เนียว เกาะสุมาตรา เกาะชวา อินโดนีเซีย และเกาะลูซอน ฟิลิปปินส์ (Holloway, 1987)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดชุมพร และกระบี่ (ทวีศักดิ์, 2544)

ฤดูกาลที่พบ: ฤดูแล้ง (ทวีศักดิ์, 2544)

พืชอาหาร: มะพร้าว ปาล์มน้ำมัน สาคู ทุเรียนเทศ ลูกชิด มะละกอ นุ่น โกโก้ ตะคร้อ กล้วย ชมพู่ เงาะ และจำปา (ทวีศักดิ์, 2544; Holloway, 1987)

ทวีศักดิ์ (2544) และ (Holloway, 1987) ได้รายงานแมลงศัตรูธรรมชาติของ *D. diducta* จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ แตนเบียนหนอน สกุล *Apanteles* (Hymenoptera: Braconidae) *Buysmania oxymora* (Tosquinet, 1903) (Hymenoptera: Ichneumonidae) แมลงวันก้นขน ชนิด *Chaetexorista javana* Brauer & Bergenstamm, 1895 (Diptera: Tachinidae)) มวนพิฆาต ชนิด *Eocanthecona furcellata* (Wolff, 1811) (Hemiptera: Pentatomidae) และมวนเพชฌฆาต ชนิด *Sycanus collaris* (Fabricius, 1785) (Hemiptera: Reduviidae)

2) *Darna furva* (Wileman, 1911)

Natada furva Wileman 1911: *Entomologist* 44: 205.

Thoseoides fasciata Shiraki 1913: *Spec. Rep. Formosa Agric. Expt. Sta*. 8: 391.

ชื่อสามัญ: หนอนหน้าแมว (ทวีศักดิ์, 2544)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 15-21 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้ม มีลายปีก antemedian line median line postmedian line และ submarginal line สีดำชัดเจน median line เห็นได้ในพื้นที่ใต้ discal cell จรดขอบปีกด้าน hind margin ของปีกคู่หน้า marginal line มีลักษณะเป็นเส้นประสีดำตลอดด้าน outer margin พื้นที่ระหว่าง postmedian line และ submarginal line มีลักษณะเป็นแถบสีขาว ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาล มีลายปีกตามยาวของปีกจากฐานปีกจรดขอบปีก

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: -

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: จีนตอนใต้ เกาะไต้หวัน ด้านตะวันออกเฉียงใต้ของเทือกเขาหิมาลัย และไทย (Holloway, 1987)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี และกระบี่ (ทวีศักดิ์, 2544)

ฤดูกาลที่พบ: เดือนตุลาคม ถึงเดือนเมษายน (ทวีศักดิ์, 2544)

กรมวิชาการเกษตร

พืชอาหาร: มะพร้าว ปาล์มน้ำมัน ปาล์มขวด หมาก ระกำ สละ พุดซ้อน การะเวก กระถินณรงค์ และมะเม่า (ทวีศักดิ์, 2544; Holloway, 1987)

ศัตรูธรรมชาติ: ทวีศักดิ์ (2544) ได้รายงานแมลงศัตรูธรรมชาติของ *D. furva* จำนวน 12 ชนิด ได้แก่ แตนเบียนไข่ *Trichogramma* sp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) แตนเบียนหนอน สกุล *Aroplectrus* สกุล *Euderastichus* สกุล *Euplectromorpha* สกุล *Platyplectrus* (Hymenoptera: Eulophidae) สกุล *Apanteles* สกุล *Microgaster* (Hymenoptera:Braconidae) แตนเบียนดักแด้ *Paraphylax varius* (Walker, 1860) (Hymenoptera: Ichneumonidae) แมลงวันก้นขน (Diptera: Tachinidae) ด้วงเสือเล็ก *Callimerus* sp. (Coleoptera: Cleidae) มวนพิฆาต ชนิด *Eocanthecona furcellata* (Wolff, 1811) (Hemiptera: Pentatomidae) และมวนเพชฌฆาต ชนิด *Sycanus collaris* (Fabricius, 1785) (Hemiptera: Reduviidae)

3) *Darna metaleuca* Walker, 1862 (Figure 1.1.15.11.)

Artaxa metaleuca Walker, 1862: *J. Linn. Soc. Lond. (Zool.)* 6: 126.

Darna plana Walker, 1862: *Ibid*. 6: 126.

Darna metaleuca Walker; Hering: 1931: 718.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็กมาก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 12-15 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัวส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีขาวปกคลุม ปีกคู่หน้าสีส้มอมชมพูจาง ทางด้านบนของปีกคู่หน้า และมีแถบสีดำขนาดเล็กที่ขอบปีกด้าน costal margin ใกล้ปลายปีก พื้นที่บริเวณส่วนที่เหลือของปีกคู่หน้ามีสีขาว ไม่มีลวดลายบนปีก ปีกคู่หลังมีสีเหลืองอ่อน

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=1) EMBT-Lep-Limc 001119

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: มาเลเซียตะวันตก เกาะบอร์เนียว เกาะสุมาตรา เกาะชวา และเกาะบาหลี อินโดนีเซีย (Holloway, 1986)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดตรัง

ฤดูกาลที่พบ: เดือนตุลาคม

พืชอาหาร: พืชสกุลงิ้ว *Bombax* (Holloway, 1986)

4) *Darna mindanensis* Holloway, 1987 (Figure 1.1.15.12.)

Darna mindanensis Holloway, 1987: Slug and Nettle Caterpillars: 105, pls 16, 22, 30.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็กมาก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 11-15 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัวส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้ม มีลายปีก antemedian line median line postmedian line และ submarginal line สีดำชัดเจน median line เห็นได้ในพื้นที่ใต้ discal cell จรดขอบปีกด้าน hind margin ของปีกคู่หน้า marginal line มีลักษณะเป็นเส้นประสีดำตลอดด้าน outer margin ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาล ไม่มีลายปีก

กรมวิชาการเกษตร

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=1) EMBT-Lep-Limc 001120

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: เกาะมินดาเนา ฟิลิปปินส์ (Holloway, 1987)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดจันทบุรี

ฤดูกาลที่พบ: เดือนธันวาคม

พืชอาหาร: มะพร้าว ปาล์มน้ำมัน โกโก้ และน้อยหน่า (Holloway, 1987)

5) *Darna pallivitta* (Moore, 1877)

Miresa pallivitta Moore 1877: *Ann. Mag. Iwt. Hist*. (4): 20, 93.

ชื่อสามัญ: หนอนร่านหลังดำขาว (ทวีศักดิ์, 2544)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 18-23 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม ปีกคู่หน้าบริเวณฐานปีกจนถึง postmedian line มีสีเหลืองส้ม postmedian line สีขาวเด่นชัด พาดจากปลายปีกมาจรดบริเวณกึ่งกลางของขอบปีกด้าน hind margin พื้นที่บริเวณ postmedian line จรด outer margin มีสีน้ำตาล ที่กึ่งกลางปีกคู่หน้า มี discal spot สีดำ ข้างละ 1 จุด ปีกคู่หลังมีสีเหลือง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: -

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: จีนตอนใต้ เกาะไต้หวัน ไทย มาเลเซียตะวันตก เกาะบอร์เนียว และเกาะชวา อินโดนีเซีย (Holloway, 1987)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดชุมพร (ทวีศักดิ์, 2544)

พืชอาหาร: มะพร้าว ปาล์มน้ำมัน ปาล์มขวด หมากนวล ข้าวโพด และไทร (ทวีศักดิ์, 2544; Holloway, 1987)

6) *Darna sordida* (Snellen, 1900)

Orthocraspeda sordida Snellen: *in* Piepers & Snellen 1900: 99.

Orthocraspeda luticrista Tarns 1924: *J. nat. Hist. Soc. Siam* 6: 280.

ชื่อสามัญ: หนอนเขากระทิง (ทวีศักดิ์, 2544)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 18-23 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้ม postmedian line สีน้ำตาลเข้มทางด้านบนของปีกด้าน costal margin และจางลงเมื่อใกล้ hind margin ที่บริเวณ postmedian line จรด costal margin มีจุดสีดำ จำนวน 1 จุด พื้นที่ระหว่าง postmedian line และ marginal line มีลักษณะเป็นแถบสีขาวจาง ไม่ชัดเจน ที่กึ่งกลางปีกคู่หน้า มี discal spot สีดำ ข้างละ 1 จุด ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้ม

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: -

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ไทย มาเลเซียตะวันตก เกาะสุมาตรา และเกาะชวา อินโดนีเซีย (Holloway, 1987)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดชุมพร (ทวีศักดิ์, 2544)

กรมวิชาการเกษตร

ฤดูกาลที่พบ: เดือนสิงหาคม ถึงเดือนตุลาคม (ทวีศักดิ์, 2544)

พืชอาหาร: มะพร้าว ปาล์มน้ำมัน พุทรา มะม่วง ตำลึง มะเขือ เข็ม ขี้เหล็ก ผักแครด มะเฟือง ขนุน นุ่น ทองหลาง กาแฟ ชบา ประดู่ มะกอกป่า และข่าด่าง (ทวีศักดิ์, 2544; Holloway, 1987)

ศัตรูธรรมชาติ: ทวีศักดิ์ (2544) ได้รายงานแมลงศัตรูธรรมชาติของ *D. sordida* จำนวน 8 ชนิด แตนเบียนหนอน สกุล *Aroplectrus Euplectromorpha bicarinata* (Ferriere, 1940) *Euplectromorpha maculata* Ferriere, 1940 *Platyplectrus orthocraspedae* Ferriere, 1941 (Hymenoptera: Eulophidae) สกุล *Apanteles* (Hymenoptera:Braconidae) ด้วงเสือเล็ก *Callimerus* sp. (Coleoptera: Cleidae) มวนพิฆาต ชนิด *Eocanthecona furcellata* (Wolff, 1811) (Hemiptera: Pentatomidae) และมวนเพชฌฆาต ชนิด *Sycanus collaris* (Fabricius, 1785) (Hemiptera: Reduviidae)

9. Genus *Hampsonella* Dyar, 1898

Hampsonella Dyar, 1898: *Psyche, Camb*. 8: 274.

Type species: *Parasa dentata* Hampson, 1893

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด ในประเทศไทย คือ *Hampsonella dentata* (Hampson, 1893)

***Hampsonella dentata* (Hampson, 1893) (Figure 1.1.15.13.)**

Parasa dentata Hampson, 1893: *Fauna Br. India (Moths)* 1: 391.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 30 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้ม บริเวณฐานปีกมีสีเหลืองอมน้ำตาล antemedian line สีดำเด่นชัดและโค้งออกด้านนอกปีก postmedian line สีขาวจาง ไม่ชัดเจน โค้งออกด้านนอกของปีก marginal line มีสีดำใกล้ปลายปีก และมีลักษณะเป็นเส้นประสีขาวสลับดำตลอดด้าน outer margin ในพื้นที่ระหว่างเส้นลายปีก postmedian line และ marginal line ทั้งสองเส้น มีแถบรูปพระจันทร์เสี้ยวสีขาวขนาดใหญ่ โค้งออกด้านนอกของปีก ที่กลางปีกมีแถบสีน้ำตาลอมเทาพาดลงมาจรดบริเวณใกล้มุมขอบปีกด้าน hind margin ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อน ลายปีก marginal line บริเวณขอบปีกด้านนอก มีลักษณะเป็นเส้นประสีขาวสลับดำตลอดด้าน outer margin

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=1) EMBT-Lep-Limc 001121

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: อินเดีย (Dyar, 1898)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดลำปาง

ฤดูกาลที่พบ: เดือนตุลาคม

10. Genus *Hyphorma* Walker, 1865

Hyphorma Walker, 1865: *List Specimens lepid. Insects Colln. Br. Mus*. 32: 493.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Type species: *Hyphorma minax* Walker, 1865

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด ในประเทศไทย คือ *Hyphorma minax* Walker, 1865

***Hyphorma minax* Walker, 1865 (Figure 1.1.15.14.)**

Hyphorma minax Walker: 1865, *List Specimens lepid. Insects Colln. Br. Mus*. 32: 493.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 25-40 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอมแดงเข้ม labial pulp เจริญดีและมีขนาดใหญ่ สีน้ำตาลแดง ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ส่วนขนที่ปกคลุมทางด้านล่างของลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้ม พบลายปีก postmedian line สีขาวจางไม่ชัดเจน บริเวณใกล้ปลายปีก ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อน ขอบปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้ม

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=38) EMBT-Lep-Limc 000507-000544

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: จีน เวียดนาม กัมพูชา (Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดชัยภูมิ และสระบุรี

ฤดูกาลที่พบ: เดือนเมษายน กรกฎาคม สิงหาคม และกันยายน

พืชอาหาร: มะค่าโมง มะกอกน้ำ หูกวาง สมอพิเภก นอกจากนี้ยังมีรายงานพืชอาหารอื่น คือ *Aleurites moluccana* (L.) Willd. วงศ์ Euphorbiaceae (Solovyev & Witt, 2009)

11. Genus *Hyphormides* Hering, 1931

Hyphormides Hering, 1931: *in* Seitz. Gross-Schmett. Erde. 10 : 668 [key], 691.

Type species: *Hyphormides argentipunctata* Hering, 1931

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด ในประเทศไทย คือ *Hyphormides argentipunctata* Hering, 1931

***Hyphormides argentipunctata* Hering, 1931 (Figure 1.1.15.15.)**

Hyphormides argentipunctata Hering, 1931: *In* Seitz, Gross-Schmett. Erde. 10: 691, pl.90, row f.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 25-40 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม labial pulp เจริญดีและมีขนาดใหญ่ สีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ส่วนขนที่ปกคลุมทางด้านล่างของลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้มอมดำ บริเวณใกล้กึ่งกลางของขอบปีกด้าน hind margin มีจุดสีเงินขนาดเล็กข้างละ 1 จุด และกลางปีกใกล้ฐานปีก มีจุดสีขาวขนาดเล็กข้างละ 1 จุด ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อน

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=3) EMBT-Lep-Limc 000545-000547

ศูนย์วิทยทรัพยากร

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: มาเลเซียตะวันตก เกาะบอร์เนียว และเกาะสุมาตรา อินโดนีเซีย (Holloway, 1986)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดตรัง

ฤดูกาลที่พบ: เดือนตุลาคม

12. Genus *Idonauton* Swinhoe, 1892

Idonauton Swinhoe, 1892: *Cat. east. and Aust. Lepid. Heterocera Colln Oxf.* (1): 238.

Type species: *Limacodes apicalis* Walker, 1855

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด ในประเทศไทย คือ *Idonauton apicalis* (Walker, 1855)

***Idonauton apicalis* (Walker, 1855) (Figure 1.1.15.16.)**

Limacodes apicalis Walker, 1855: *List Specimens.lepid. Insects Colln. Br. Mus*. 5: 1150.

Miresa curvifera Walker, 1859: *J. Linn. Soc. Lond. (Zool.)* 3: 188.

Nyssia rubriplaga Walker, 1862: *J. Linn. Soc. Lond. (Zool.)* 6: 144.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 25-30 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม ปีกทั้งสองคู่สีน้ำตาลอ่อน ในปีกคู่หน้าพบลายปีก postmedian line สีขาว ลักษณะชัดเจน เว้าเข้าด้านในของปีก ในพื้นที่นอกเส้นลายปีก postmedian line จรดขอบปีกด้าน outer margin มีสีน้ำตาลแดง ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อนไม่มีลายบนปีก

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=23) EMBT-Lep-Limc 000099, 001122-001141, 001145 และ 001148

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ทางตะวันออกเฉียงเหนือของเทือกเขาหิมาลัย ไทย มาเลเซียตะวันตก เกาะบอร์เนียว และเกาะสุมาตรา อินโดนีเซีย (Holloway, 1987)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดลำพูน ลำปาง และตรัง

ฤดูกาลที่พบ: เดือนกุมภาพันธ์ และมิถุนายน

พืชอาหาร: ลำไย และลิ้นจี่ นอกจากนี้ Holloway (1987) ได้รายงานพืชอาหารชนิดอื่น ได้แก่ มะพร้าว และปาล์มน้ำมัน

13. Genus *Miresa* Walker, 1855

Miresa Walker, 1855: *List Specimens.lepid. Insects Colln. Br. Mus*. 5: 1103, 1123.

Type species: *Nyssia albipuncta* Herrich-Schäffer, [1854]

ผีเสื้อหนอนร่านสกุล *Miresa* เป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ลำตัวอ้วนป้อม มีขนปกคลุมมาก ปีกคู่หน้าสีแดงอมน้ำตาล มักมีลวดลายในปีกคู่หน้า ปีกคู่หลังสีน้ำตาลอ่อน ไม่มีตาเดี่ยว เพศผู้มีหนวดแบบ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

bipectinate เพศเมียเป็นแบบ filiform มี proboscis และ maxillary palps ขนาดเล็ก ผีเสื้อเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะแตกต่างกันเล็กน้อย โดยผีเสื้อเพศเมียมักมีขนาดใหญ่กว่าในเพศผู้

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 2 ชนิด ในประเทศไทย โดยมีรายละเอียดในแต่ละชนิด ดังนี้

1) *Miresa bracteata* Butler, 1880 (Figure 1.1.15.17.)

Miresa bracteata Butler, 1880: *Annals and Magazine of Natural History* (5) 6: 64.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 30 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาล ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีเหลืองอมน้ำตาลปกคลุม ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้ม พบลายปีก postmedian line สีขาวจาง ไม่ชัดเจน บริเวณกึ่งกลางปีก มีจุดรูปสามเหลี่ยมสีเงิน จำนวน 1 จุด ในปีกแต่ละข้างปรากฏอยู่ ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อน บริเวณขอบปีกด้านนอกของปีกมีสีน้ำตาลเข้ม

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=77) EMBT-Lep-Limc 000866, 000867, 001184-001186, 001189, 001191-001238, 001243-001245 และ 001250-001262

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: อินเดีย เนปาล ภูฏาน ตอนใต้ของจีน ไทย มาเลเซีย เกาะบอร์เนียว เกาะสุมาตรา และเกาะชวา อินโดนีเซีย (Wu & Solovyev, 2011)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ กาญจนบุรี สระบุรี ฉะเชิงเทรา เลย ชัยภูมิ กาฬสินธุ์ นครราชสีมา และกรุงเทพมหานคร

ฤดูกาลที่พบ: เดือนเมษายน ถึงเดือนพฤศจิกายน

พืชอาหาร: กาแฟ พุทรา ทองหลาง กุหลาบ มะกอก และลำไย นอกจากนี้มีรายงานใน โกโก้ หว้า ละมุด หูกวาง และซิงโคนา (Wu & Solovyev, 2011)

2) *Miresa kwangtungensis* Hering, 1931 (Figure 1.1.15.18.)

Miresa argentifera kwangtungensis Hering, 1931: *in* Seitz, Gross-Schmett. Erde 10: 683.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 40 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีเหลืองอมน้ำตาลปกคลุม ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้มอมแดง พบลายปีก postmedian line สีดำจาง ไม่ชัดเจน ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อน

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=19) EMBT-Lep-Limc 001263-001281

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ตอนใต้ของจีน ภาคเหนือและภาคกลางของเวียดนาม (Wu & Solovyev, 2011)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ แพร่ เลย นครราชสีมา และอุบลราชธานี

ฤดูกาลที่พบ: เดือนมิถุนายน ถึงเดือนกันยายน

กรมวิชาการเกษตร

14. Genus *Narosoideus* Matsumura, 1911

Narosoideus Matsumura, 1911: *Thousand Insects Japan (Suppl.)* 3: 75.

Type species: *Narosoideus formosanus* Matsumura, 1911

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด ในประเทศไทย คือ *Narosoideus vulpina* (Wileman, 1911)

***Narosoideus vulpina* (Wileman, 1911) (Figure 1.1.15.19.)**

Miresa vulpina Wileman: 1911, *Entomologist*: 206.

Narosoideus formosanus Matsumura: 1911, *Thous. Ins. Japan (Suppl.)* 3: 75, pl. XXXVI, f. 1.

Narosoideus apicipennis Matsumura: 1931, *Ins. mats*. 5: 101, pl. II, Figure 16, **syn. n.**

Narosoideus vulpinus ab. *aurisoma* Matsumura: 1927, *J. Coll. Agric. Hokkaido imp. Univ*. 19: 86, pl. V, Figure 28, **syn. n.**

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 40 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัว ส่วนอกและส่วนท้องมีขนสีเหลืองอมน้ำตาลปกคลุม ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลอมแดง พบลายปีก postmedian line และ marginal line ลักษณะเป็นแถบกว้างสีขาวจาง ไม่ชัดเจน ปีกคู่หลังมีสีเหลืองอมน้ำตาล ไม่มีลวดลาย

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=3) EMBT-Lep-Limc 001158-001160

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ตอนใต้ของจีน ไต้หวัน ไทย ภาคเหนือและภาคกลางของเวียดนาม (Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดนครราชสีมา และตรัง

ฤดูกาลที่พบ: เดือนกรกฎาคม สิงหาคม และธันวาคม

15. Genus *Nirmides* Hering, 1931

Nirmides Hering, 1931: *in* SEITZ, Gross-Schmett. Erde 10: 670 (key), 702.

Type species: *Susica basalis* Walker, 1862

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด ในประเทศไทย คือ *Nirmides basalis* (Walker, 1862)

***Nirmides basalis* (Walker, 1862) (Figure 1.1.15.20.)**

Susica basalis Walker, 1862: *J. Linn. Soc. Lond. (Zool.)* 6: 172.

Nirma micron vanEecke, 1929: *Zool. Meded. Leiden* 12: 118.

Nirmides basalis Walker; Hering: 1931: 702; *Barlow* 1982: 40.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

กรมวิชาการเกษตร

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็กมาก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 15 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้ม ขอบปีกด้าน costal margin มีสีดำ บริเวณฐานปีกมีสีขาวอมน้ำตาล พบลายปีก postmedian line ลักษณะเป็นแถบสีขาวจาง ไม่ชัดเจน ในพื้นที่ด้านนอกเส้นลายปีก postmedian line จรดขอบปีกด้าน outer margin มีสีส้ม discal spot สีดำขนาดใหญ่ ปรากฏอยู่ในปีกแต่ละข้าง ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อน บริเวณขอบปีกด้านนอกสีขาว

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=1) EMBT-Lep-Limc 000548

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: มาเลเซียตะวันตก เกาะบอร์เนียว และเกาะสุมาตรา อินโดนีเซีย (Holloway, 1986)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดระนอง

ฤดูกาลที่พบ: เดือนตุลาคม

16. Genus *Oxyplax* Hampson, 1893

Oxyplax Hampson, 1893: *Fauna Br. India (Moths)* 1: 372 (key), 376.

Type species: *Aphendala ochracea* Moore, 1883

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด ในประเทศไทย คือ *Oxyplax ochracea* (Moore, 1883)

Oxyplax ochracea (Moore, 1883) (Figure 1.1.15.21.)

Aphendala ochracea Moore, 1883: *Lep. Ceyl.* 2: 129, pl. 129, Figure 3, 3a.

Oxyplax weixiensis Cai, 1984: *Entomotaxonomia* 6 (2-3): 172, **syn. n.**

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 25 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีเหลืองอมน้ำตาลปกคลุม ปีกคู่หน้าสีเหลือง พบลายปีก postmedian line สีขาว เห็นได้ชัดเจน พาดจากบริเวณใกล้กึ่งกลางขอบปีกด้าน hind margin ไปจรดขอบปีกด้าน costal margin ใกล้ปลายปีก พื้นที่ด้านนอกเส้นลายปีก postmedian line จรดขอบปีกด้าน outer margin มีสีน้ำตาลอมเทา ที่กลางปีกมี discal spot สีน้ำตาลเข้มจำนวน 1 จุด ในปีกแต่ละข้างปรากฏอยู่ ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้ม **ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา:** (n=6) EMBT-Lep-Limc 001161, 001164, 001165, 001170, 000597 และ 000598

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: อินเดีย จีนตอนใต้ ภาคเหนือของไทย ภาคเหนือของเวียดนาม และลาว (Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย กรุงเทพมหานคร และฉะเชิงเทรา

ฤดูกาลที่พบ: เดือนกุมภาพันธ์ พฤษภาคม มิถุนายน และพฤศจิกายน

พืชอาหาร: ขนุน และหญ้ามาเลเซีย นอกจากนี้ Solovyev & Witt (2009) รายงานพืชอาหารของหนอนร่านชนิดนี้ไว้ ได้แก่ แอปเปิ้ล ชา และทองหลาง

กรมวิชาการเกษตร

17. Genus *Parasa* Moore, 1859

Latoia Guérin-Méneville, 1844: *Icon. Règne anim. Cuvier* 3: 512.

Neaera Herrich-Schäffer, 1854: *Lep. Exot. Spec. Nov. ser*. I. *f*. 176, 177.

Parasa Moore, 1859: in Horsfield & Moore, *Cat. Lep. Ins. Mus. Nat. East India House* 2: 413.

Callochlora Packard, 1864: *Proc. Ent. Soc. Phil*. iii: 339.

Pantoctenia Felder, 1875: *Reise öst. Fregatte Novara* (Zool.) 2(Abt.2): pl.82, Figure16.

Neaerasa Staudinger, 1892: in Romanoff, *Mém. Lépid*. 6: 298.

Pacasa Wichgraf, 1908: 107.

Type species: *Parasa chloris* (Herrich-Schäffer, 1854)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อหนอนร่านสกุล *Parasa* เป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ลำตัวอ้วนป้อม มีขนปกคลุมมาก ปีกคู่หน้ามักมีสีเขียวและสีน้ำตาลเข้ม ปีกคู่หลังมักมีสีเหลืองและสีน้ำตาลอ่อน ไม่มีตาเดี่ยว เพศผู้มีหนวดแบบ bipectinate เพศเมียเป็นแบบ filiform มี proboscis และ maxillary palps ขนาดเล็ก ผีเสื้อเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะคล้ายกัน แต่ผีเสื้อเพศเมียมักมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้เล็กน้อย

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 17 ชนิด ในประเทศไทย โดยมีรายละเอียดในแต่ละชนิด ดังนี้

1) *Parasa albipuncta* Hampson, 1893 (Figure 1.1.15.22.)

Parasa albipuncta Hampson, 1893: *Fauna Br. India* (Moths) 1: 390.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 20 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัวและส่วนอกมีขนสีเขียวอ่อนปกคลุมตลอด ในส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุมทางด้านบน ส่วนขนที่ปกคลุมในส่วนปลายท้องมีสีน้ำตาลเข้ม ปีกคู่หน้าบริเวณขอบปีกทั้งสามด้าน (costal margin, outer margin และ hind margin) มีสีน้ำตาลอ่อนล้อมรอบปีกคู่หน้า ที่กึ่งกลางด้าน outer margin และ hind margin มีส่วนของพื้นที่สีน้ำตาลเว้าเข้ามาด้านในปีกเล็กน้อย และมีจุดสีเงินขนาดเล็กปรากฏอยู่ ในพื้นที่ส่วนที่เหลือของปีกคู่หน้าบริเวณกลางปีกมีสีเขียวอ่อน ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อนบริเวณขอบปีกด้านนอก ส่วนพื้นที่ด้านในมีสีเหลืองอ่อน

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=3) EMBT-Lep-Limc 000030, 000587 และ 000589

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: อินเดีย เมียนมาร์ ไทย ลาว เวียดนาม มาเลเซียตะวันตก และเกาะสุมาตรา อินโดนีเซีย (Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเพชรบูรณ์ และเลย

ฤดูกาลที่พบ: เดือนเมษายน และกันยายน

2) *Parasa balitkae* Holloway, 1987 (Figure 1.1.15.23.)

Parasa balitkae Holloway, 1987: Slug and Nettle Caterpillars: 37, pls 4, 5, 19.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก (wing span) ประมาณ 35 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัวและส่วนอกมีขนสีเขียวอ่อนปกคลุม ในส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม ปีกคู่หน้าบริเวณพื้นที่จากกึ่งกลางปีก (median) จนถึงพื้นที่ขอบปีกด้านนอก (distal portion) มีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนพื้นที่ของปีกคู่หน้าด้านใน (proximal portion) มีสีเขียวอ่อน ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้ม

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=2) EMBT-Lep-Limc 000314 และ 000315

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ตอนเหนือของเกาะสุลาเวสี อินโดนีเซีย (Holloway, 1987)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดนครนายก

ฤดูกาลที่พบ: เดือนมิถุนายน และพฤศจิกายน

พืชอาหาร: มะพร้าว (Cock *et al.*, 1987)

ศัตรูธรรมชาติ: Cock *et al.* (1987) ได้รายงานศัตรูธรรมชาติของ *P. balitkae* จากเกาะสุลาเวสี คือแมลงวันก้นขนชนิด *Chaetexorista javana* Brauer & Bergenstamm, 1895 (Diptera: Tachinidae) โดยเป็นแมลงเบียนเข้าทำลายดักแด้ของ *P. balitkae*

3) *Parasa bana* (Cai, 1983) (Figure 1.1.15.24.)

Latoia bana Cai, 1983: *Acta ent.sinica* 26 (4): 449, Figure 8.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก (wing span) ประมาณ 35 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัวและส่วนอกมีขนสีเขียวอ่อนปกคลุม ที่กลางอกด้านหลังตลอดจนส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ปีกคู่หน้าบริเวณพื้นที่จากกึ่งกลางปีก (median) จนถึงพื้นที่ขอบปีกด้านนอก (distal portion) มีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนพื้นที่ของปีกคู่หน้าด้านใน (proximal portion) จนถึงบริเวณเส้น antemedian line มีสีเขียวอ่อน ที่ฐานปีกคู่หน้าบริเวณ basal area มีสีน้ำตาลเข้ม ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้ม

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=6) EMBT-Lep-Limc 000233, 000234, 000303, 000312, 000313 และ 000869

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: จีนตอนใต้ และภาคเหนือของเวียดนาม (Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเลย

ฤดูกาลที่พบ: เดือนเมษายน

4) *Parasa bicolor* (Walker, 1855) (Figure 1.1.15.25.)

Neaera bicolor Walker, 1855: *List. Lep. Ins. Br. Mus*. 5: 1142.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดค่อนข้างเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 25 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัวและส่วนอกมีขนสีเขียวอ่อนปกคลุม ในส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม ปีกคู่หน้ามีสีเขียวอ่อน บริเวณขอบปีกด้านนอก (outer margin) จนถึงมุมปีก (tornus) มีแถบขนสีน้ำตาลเข้ม และมีจุดสีน้ำตาลแดงขนาดเล็กประมาณ 2 จุด กระจายอยู่ในบริเวณพื้นที่ขอบปีกด้านนอกในปีกแต่ละข้าง ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้ม

กรมวิชาการเกษตร

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=28) EMBT-Lep-Limc 000012, 000014, 000015, 000235, 000549-000571 และ 000865

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ปากีสถาน อินเดีย เนปาล เมียนมาร์ ไทย เวียดนาม จีนตอนใต้ ไต้หวัน มาเลเซีย ตะวันตก และเกาะชวา อินโดนีเซีย (Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ ตาก กาญจนบุรี อุทัยธานี ชลบุรี จันทบุรี เพชรบูรณ์ ขอนแก่น มหาสารคาม ยะลา และสุราษฎร์ธานี

ฤดูกาลที่พบ: เดือนพฤษภาคม มิถุนายน กรกฎาคม สิงหาคม กันยายน และพฤศจิกายน

พืชอาหาร: Solovyev & Witt (2009) ได้รายงานพืชอาหารของ *P. bicolor* ได้แก่ ข้าว และอ้อย ในอินเดีย และไผ่ตง ในไทย

ศัตรูธรรมชาติ: Solovyev & Witt (2009) ได้รายงานศัตรูธรรมชาติของ *P. bicolor* จากอินเดีย เป็นแตนเบียน จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Brachymeria euploeae* (Westwood, 1873) (Hymenoptera: Chalcididae) *Goryphus basilaris* (Holmgren, 1868) (Hymenoptera: Ichneumonidae) *Eupteromalus parnarae* Gahan, 1919 (Hymenoptera: Pteromalidae) *Aroplectrus dimerus* L., 1963 (Hymenoptera: Eulophidae) และ *Platyplectrus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae)

5) *Parasa campagnei* DeJoannis, 1928 (Figure 1.1.15.26.)

Parasa campagnei DeJoannis, 1928: *Annls Soc. ent. Fr.* 98: 576, pl. 3.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 35-45 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัวมีขนสีเขียวปกคลุม ส่วนอกมีขนสีเขียวอ่อนปกคลุมด้านข้างอกส่วนกึ่งกลางอกมีขนสีน้ำตาลเข้มพาดตามยาว ในส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม โดยทางด้านบนมีสีเข้มกว่าด้านล่าง ปีกคู่หน้าบริเวณปลายปีก ขอบปีกด้านนอก มุมปีก ขอบปีกด้านท้าย ตลอดจนบริเวณฐานปีกและขอบปีกด้านบนของฐานปีก มีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนพื้นที่ของปีกคู่หน้าส่วนที่เหลือมีสีเขียวอ่อน ระหว่างพื้นที่สีน้ำตาลและสีเขียวในส่วนขอบปีก (outer margin และ hind margin) นี้มีเส้นสีขาวพาดตลอดแนวขอบปีก ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้มทั่วปีก

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=1) EMBT-Lep-Limc 000011

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: จีนตอนใต้ และทางเหนือของเวียดนาม (Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเพชรบูรณ์

ฤดูกาลที่พบ: เดือนกันยายน

6) *Parasa canangae* Hering, 1931 (Figure 1.1.15.27.)

*Parasa canang*ae Hering, 1931: in Seitz, *Gross-Schmett. Erde, Suppl* 10: 665 – 728.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 15 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัวมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ส่วนอกมีขนสีเขียวอ่อนปกคลุมด้านข้างส่วนกึ่งกลางอกมีขนสีน้ำตาลเข้มพาดตามยาว ในส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ปีกคู่หน้าบริเวณพื้นที่จากกึ่งกลางปีกจนถึงพื้นที่ขอบปีกด้านนอก ตลอดจนขอบปีก

กรมวิชาการเกษตร

ด้านท้าย (hind margin) และฐานปีก (basal angle) มีสีน้ำตาลเข้ม ในพื้นที่ส่วนที่เหลือของปีกคู่หน้ามีสีเขียวอ่อน ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้ม

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=1) EMBT-Lep-Limc 000048

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: มาเลเซียตะวันตก ด้านตะวันออกของเทือกเขาหิมาลัย (Holloway, 1986)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดสระบุรี

ฤดูกาลที่พบ: เดือนกันยายน

พืชอาหาร: กระดังงา และละหุ่ง (Holloway, 1986; Solovyev & Witt, 2009)

7) *Parasa chlorozonata* Hampson, 1896 (Figure 1.1.15.28.)

Parasa chlorozonata Hampson, 1896: *Fauna Br. India* (Moths) 4: xxiii+588.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก (wing span) ประมาณ 27 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัวและส่วนอกมีขนสีเขียวอ่อนปกคลุม ที่กลางอกด้านหลังตลอดจนส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ปีกคู่หน้าบริเวณพื้นที่จากกึ่งกลางปีก (median) จนถึงพื้นที่ขอบปีกด้านนอก (distal portion) มีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนพื้นที่ของปีกคู่หน้าด้านใน (proximal portion) จนถึงบริเวณเส้น antemedian line มีสีเขียวอ่อนลักษณะแคบพาดตามความกว้างของปีกหน้า ที่ฐานปีกคู่หน้าบริเวณ basal area มีสีน้ำตาลเข้ม ปีกคู่หลังมีสีเหลืองที่ฐานของปีก แต่ในส่วนกลางปีกจนถึงขอบปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้ม

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=3) EMBT-Lep-Limc 000585, 000586 และ 000588

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: อินเดีย (Dyar, 1898)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดจันทบุรี และสุโขทัย

ฤดูกาลที่พบ: เดือนกรกฎาคม กันยายน และตุลาคม

8) *Parasa corbetti* Holloway, 1987 (Figure 1.1.15.29.)

Parasa corbetti Holloway, 1987: Slug and Nettle Caterpillars: 31, pls 4, 5, 19.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 20 - 45 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัวมีขนสีเขียวและมีแถบขนพาดตามแนวกึ่งกลางสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ลำตัวค่อนข้างอ้วนป้อม ส่วนอกมีขนสีเขียวอ่อนปกคลุมด้านข้างอกส่วนกึ่งกลางอกมีขนสีน้ำตาลเข้มพาดตามยาว ในส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม โดยทางด้านบนมีสีเข้มกว่าด้านล่าง ปีกคู่หน้าพื้นที่ขอบปีกด้านนอก 1 ใน 3 ของพื้นที่ปีก ตลอดจนบริเวณฐานปีกและขอบปีกด้านบน (costal margin) ของฐานปีก มีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนพื้นที่ของปีกคู่หน้าด้านในส่วนที่เหลือมีสีเขียวอ่อน ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้ม มากกว่าครึ่งของพื้นที่ปีกคู่หลังที่บริเวณขอบปีกด้านนอก และจางลงเป็นสีเหลืองในส่วนพื้นที่ด้านใน

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=171) EMBT-Lep-Limc 000032, 000033, 000035, 000036, 000039-000041, 000043-000046, 000159, 000239-000244, 000316-000328, 000332-000338, 000389-000415, 000435-000425, 000462-000476, 000478-000480, 000599-000602, 000612, 000615,

กรมวิชาการเกษตร

000623-000646, 000648-000657, 000681-000701, 000733-000748, 000796-000807, 000862 และ 000870-000872

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: มาเลเซียตะวันตก (Holloway, 1987)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ ฉะเชิงเทรา ชลบุรี จันทบุรี กรุงเทพมหานคร อุทัยธานี สระบุรี ลพบุรี ชัยภูมิ นครปฐม กาญจนบุรี และชุมพร

ฤดูกาลที่พบ: พบได้ทุกฤดูกาล

พืชอาหาร: ละหุ่ง หมากเหลือง มะพร้าว เงาะ บานบุรี มะขามเทศ ชงโค จิกนา ชมพู่ ธรรมรักษา ตะโกดัด สะแก นา ราชพฤกษ์ มะม่วงหิมพานต์ ส้มป่อย แคฝรั่ง และบัวหลวง เช่นเดียวกับ Holloway (1987) ที่ได้รายงานพืชอาหารของ *P. corbetti* ไว้ ได้แก่ มะพร้าว และจาก

9) *Parasa darma* Moore, 1859 (Figure 1.1.15.30.)

Parasa darma Moore, 1859: in Horsfield & Moore, *Cat. Lep. Ins. Mus. Nat. East India House* 2: 414.

ชื่อสามัญ: หนอนร่านหน้าขาว (ทวีศักดิ์, 2544)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 20 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัวมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ส่วนอกมีขนสีเขียวอ่อนปกคลุมด้านข้างอกเล็กน้อยส่วนกึ่งกลางอกมีขนสีน้ำตาลเข้มพาดตามยาว ในส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุมทางด้านบน ส่วนขนที่ปกคลุมในส่วนท้องด้านล่างมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าบริเวณขอบปีกทั้งสามด้าน (costal margin, outer margin และ hind margin) ตลอดจนฐานปีกมีสีน้ำตาลเข้ม ในพื้นที่ส่วนที่เหลือของปีกคู่หน้าบริเวณกลางปีกมีสีเขียวอ่อน ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้มบริเวณขอบปีกด้านนอก ส่วนพื้นที่ด้านในมีสีเหลืองอ่อน

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: เมียนมาร์ ไทย เวียดนามตอนกลางและใต้ มาเลเซียตะวันตก เกาะบอร์เนียว เกาะสุมาตรา เกาะชวา อินโดนีเซีย เกาะปาลาวัน ฟิลิปปินส์ (Cock *et al.*, 1987; Solovyev & Witt, 2009)

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=26) EMBT-Lep-Limc 000016, 000017, 000018, 000243, 001162, 001163, 001166-001169, 001171-001183, 001187, 001188 และ 001190

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน อุตรดิตถ์ กำแพงเพชร เลย เพชรบูรณ์ สุโขทัย นครนายก นครราชสีมา ราชบุรี กาญจนบุรี กรุงเทพมหานคร จันทบุรี และกระบี่

ฤดูกาลที่พบ: พบได้ทุกฤดูกาล

พืชอาหาร: มะพร้าว ปาล์มน้ำมัน พริกไทย โกโก้ และกาแฟ (ทวีศักดิ์, 2544; Cock *et al.*, 1987; Solovyev & Witt, 2009)

10) *Parasa himalepida* Holloway, 1987 (Figure 1.1.15.31.)

Parasa himalepida Holloway, 1987: Slug and Nettle Caterpillars: 31, pls 4, 5, 19.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 30-40 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัวมีขนสีเขียวและมีแถบขนพาดตามแนวกึ่งกลางสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ลำตัวค่อนข้างเรียวยาว ส่วนอกมีขนสีเขียวอ่อนปกคลุมด้านข้างอกส่วนกึ่งกลางอกมีขนสีน้ำตาลเข้มพาดตามยาว ในส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม โดยทางด้านบนมีสีเข้มกว่าด้านล่าง ปีกคู่หน้าพื้นที่ขอบปีกด้านนอก 1 ใน 3 ของพื้นที่ปีก ตลอดจนบริเวณฐานปีกและขอบปีกด้านบน (costal margin) ของฐานปีก มีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนพื้นที่ของปีกคู่หน้าด้านในส่วนที่เหลือ มีสีเขียวอ่อน เส้น postmedian line ที่กั้นอยู่ระหว่างพื้นที่สีน้ำตาลเข้มและสีเขียว มีลักษณะโค้งออกด้านนอกพื้นที่สีน้ำตาลของปีกคู่หน้า ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อนบริเวณขอบปีกด้านนอก และจางลงเป็นสีเหลืองอ่อนในส่วนพื้นที่ด้านใน

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=17) EMBT-Lep-Limc 000025, 000241, 000257, 000259, 000260, 000261, 000266, 000268, 000270, 000272, 000278, 000280, 000283, 000859, 000860, 000861 และ 000890

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย และทางเหนือของเมียนมาร์ (Holloway, 1987)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดน่าน และเลย

ฤดูกาลที่พบ: เดือนกุมภาพันธ์ มีนาคม เมษายน มิถุนายน กรกฎาคม และกันยายน

11) *Parasa jade* Solovyev & Witt, 2009 (Figure 1.1.15.32.)

Parasa jade Solovyev & Witt, 2009: The Limacodidae of Vietnam. Entomofauna Supplement 16: 127.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 25 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัวและส่วนอกมีขนสีเขียวอ่อนปกคลุมตลอด ในส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม ปีกคู่หน้ามีสีเขียวอ่อน ที่กึ่งกลางด้าน outer margin ใกล้ขอบปีก มีจุดสีเงินข้างละ 1 จุด และ hind margin มีส่วนของพื้นที่สีน้ำตาลเว้าเข้ามาด้านในปีกเล็กน้อย และมีจุดสีเงินและสีน้ำตาลขนาดเล็กปรากฏอยู่ ปีกคู่หลังมีสีเหลืองอ่อน และมีเส้นสีน้ำตาลอ่อนบริเวณขอบปีกด้านนอก

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=5) EMBT-Lep-Limc 000572-000576

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ภาคใต้ของไทย และเวียดนามตอนกลางและใต้ (Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดนครนายก และระนอง

ฤดูกาลที่พบ: เดือนพฤษภาคม สิงหาคม และกันยายน

12) *Parasa lepida* (Cramer, 1779) (Figure 1.1.15.33.)

Noctua lepida Cramer, 1779: *Pap. Exot*. 2: 130E.

Limacodes graciosa Westwood, 1848: *Cabinet Orient. Ent.* 50.

Nyssia latifascia Walker, 1855: *List. Lep. Ins. Br. Mus*. 5: 1136.

Neaera media Walker, 1855: *Ibid*. 5: 1140.

Parasa lepida lepidula Hering, 1933: in Seitz, *Gross-Schmett. Erde, Suppl* 2: 206.

ชื่อสามัญ: หนอนหอยมะพร้าว (ทวีศักดิ์, 2544)

กรมวิชาการเกษตร

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 20-45 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัวมีขนสีเขียวและมีแถบขนพาดตามแนวกึ่งกลางสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ลำตัวค่อนข้างอ้วนป้อม ส่วนอกมีขนสีเขียวอ่อนปกคลุมด้านข้างอกส่วนกึ่งกลางอกมีขนสีน้ำตาลเข้มพาดตามยาว ในส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม โดยทางด้านบนมีสีเข้มกว่าด้านล่าง ปีกคู่หน้าพื้นที่ขอบปีกด้านนอก 1 ใน 3 ของพื้นที่ปีก ตลอดจนบริเวณฐานปีกและขอบปีกด้านบน (costal margin) ของฐานปีก มีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนพื้นที่ของปีกคู่หน้าด้านในส่วนที่เหลือ มีสีเขียวอ่อน ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อนบริเวณขอบปีกด้านนอก บริเวณสีน้ำตาลนี้น้อยกว่าครึ่งหนึ่งของพื้นที่ปีก และจางลงเป็นสีเหลืองอ่อนในส่วนพื้นที่ด้านใน

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=239) EMBT-Lep-Limc 000037, 000038, 000042, 00200, 000238, 000240, 000245, 000256, 000329-000331, 000339-000360, 000363, 000364, 000366-000386, 000416-000434, 000453-000463, 000477, 000481-000506, 000603-000611, 000613, 000614, 000616-000622, 000647, 000658-000680, 000703-000712, 000722-000732, 000734-000747, 000749-000790 และ 000791-000795

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: พบทั่วไปในเอเชียเขตร้อน และบางส่วนของเอเชียตะวันออก โดย Cock *et al.* (1987) ได้รายงานเขตการแพร่กระจายของ *P. lepida* ดังนี้ ในบริเวณอนุทวีปอินเดียและพื้นที่รอบข้าง เป็นชนิดย่อย *P. lepida lepida* ในบริเวณเอเชียตะวันออก เช่น จีน และญี่ปุ่น เป็นชนิดย่อย *P. lepida lepidula* และบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ภาคพื้นทวีป รวมถึง เกาะสุมาตรา ชวา และบาหลี เป็นชนิดย่อย *P. lepida media*

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ น่าน อุตรดิตถ์ เพชรบูรณ์ เลย ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ระยอง จันทบุรี กรุงเทพมหานคร สระบุรี กาญจนบุรี นครปฐม กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร ระนอง และสุราษฎร์ธานี

ฤดูกาลที่พบ: พบทุกฤดูกาล

พืชอาหาร: มะพร้าว ปาล์มน้ำมัน หมากเหลือง ไผ่ตง ธรรมรัษา บัวหลวง กุหลาบ ขนุน เงาะ ชมพู่ ลำไย ท้อ มะม่วง มะม่วงหิมพานต์ พุทรา ทับทิม กระทุ่มนา จิกนา หม่อน ละหุ่ง นุ่น จิ้วป่า เข็ม บานบุรี ตะโกดัด ลัดดาวัลย์ ถั่วพู ทองหลาง มะขามเทศ ชงโค ส้มป่อย ราชพฤกษ์ แคฝรั่ง หางไหลแดง โดยพบการเข้าทำลายในมะพร้าวมากที่สุด นอกจากนี้ Cock *et al.* (1987) ได้รายงานพืชอาหารของ *P. lepida* อื่นๆ ได้แก่ กล้วย โกโก้ ชา กาแฟ ส้ม กันเกรา ชบา พริกไทย กะหล่ำดอก จาก ตาลโตนด มะขวิด หว้า ข้าวฟ่าง และฝ้าย

ศัตรูธรรมชาติ: จากการตรวจสอบตัวอย่างศัตรูธรรมชาติของ *P. lepida* ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร พบศัตรูธรรมชาติกลุ่มแมลงเบียนดักแด้ของ *P. lepida* จำนวน 3 ชนิด คือ ต่อกาเหว่าชนิด *Chrysis shanghaiensis* Smith, 1874 (Hymeoptera: Chrysidae) แมลงวันก้นขนชนิด *Chaetexorista javana* Brauer & Bergenstamm, 1895 (Diptera: Tachinidae) และแมลงวันหลังลายชนิด *Sarcophaga antilope* Böttcher, 1913 (Diptera: Sarcophagidae) สอดคล้องกับรายงานของ ทวีศักดิ์ (2544) ซึ่งได้รายงานแมลงเบียนดักแด้ของ *P. lepida* ทั้ง 3 ชนิดนี้ รวมถึงได้รายงานแตนเบียนหนอนของ *P. lepida* อีกจำนวน 2 ชนิด คือ

กรมวิชาการเกษตร

Apanteles parasae (Rohwer, 1922) (Hymenoptera: Braconidae) และ *Euderastichus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae)

13) *Parasa ostia* Swinhoe, 1902 (Figure 1.1.15.34.)

Parasa ostia Swinhoe, 1902: *Ann. Mag. Nat. Hist*. (7) 10: 48.

Latoia pseudostia Cai, 1983: *Acta ent. sinica.* 26(4): 450, Figure 13.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลางหรือค่อนข้างใหญ่ ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 60 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัวและส่วนอกมีขนสีเขียวอ่อนปกคลุมและมีแถบแคบสีน้ำตาลอ่อนพาดตามแนวกึ่งกลาง ในส่วนท้องมีขนสีเหลืองน้ำตาลปกคลุม โดยทางด้านบนมีสีเข้มกว่าด้านล่าง ปีกคู่หน้ามีสีเขียวอ่อน บริเวณพื้นที่ขอบปีกด้านนอกจนถึงมุมปีก มีสีเหลืองอมน้ำตาล บริเวณฐานปีกมีสีน้ำตาลเข้ม ปีกคู่หลังมีสีเหลืองอมเขียว

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=38) EMBT-Lep-Limc 000020, 000022-000024, 000201-000210, 000213-000220, 000242, 000250, 000856, 000857, 000875, 000876 และ 000881-000889

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: อินเดีย เมียนมาร์ จีนตอนใต้ เวียดนามเหนือ ลาว และไทย (Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ น่าน และเลย

ฤดูกาลที่พบ: เดือนมีนาคม เมษายน และกรกฎาคม

พืชอาหาร: Solovyev & Witt (2009) ได้รายงานพืชอาหารของ *P. ostia* ได้แก่ *Salix* sp. และ *Populus* sp. (Salicaceae) ในจีนตอนใต้

14) *Parasa pastoralis* Butler, 1885 (Figure 1.1.15.35.)

Parasa pastoralis Butler, 1885: *Ann. Mag. Nat. Hist*. (5) 6: 63.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 40 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัวและส่วนอกมีขนสีเขียวอ่อนปกคลุม และมีแถบแคบสีน้ำตาลอ่อนพาดตามแนวกึ่งกลางของส่วนอก ในส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม ปีกคู่หน้ามีสีเขียวอ่อน บริเวณขอบปีกด้านนอกตั้งแต่พื้นที่บริเวณปลายปีก (apex) จนถึงบริเวณมุมปีก (tornal area) มีสีน้ำตาลอมเหลือง บริเวณฐานปีกมีสีน้ำตาลอ่อน และบริเวณขอบปีกด้านนอกจนถึงมุมปีกมีแถบขนสีน้ำตาลเข้ม ปีกคู่หลังมีสีเหลืองอ่อน บริเวณขอบปีกด้านนอกมีแถบขนสีน้ำตาลเข้ม

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=10) EMBT-Lep-Limc 000019 และ 000799-000807

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ปากีสถาน อินเดีย เนปาล ภูฏาน เมียนมาร์ ไทย เวียดนาม จีนตอนใต้ ไต้หวัน เกาะสุมาตรา เกาะบาหลี และเกาะชวา อินโดนีเซีย (Holloway, 1986; Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ เพชรบูรณ์ ชัยภูมิ และนครราชสีมา

ฤดูกาลที่พบ: เดือนกุมภาพันธ์ พฤษภาคม มิถุนายน กรกฎาคม และสิงหาคม

พืชอาหาร: Solovyev & Witt (2009) ได้รายงานพืชอาหารของ *P. pastoralis* ได้แก่ กล้วย สัก และชา ในอินเดีย

กรมวิชาการเกษตร

ศัตรูธรรมชาติ: Solovyev & Witt (2009) ได้รายงานศัตรูธรรมชาติของ *P. pastoralis* เป็นมวนตัวห้ำ ชนิด *Cantheconidea furcellata* Wolff, 1801 (Hemiptera: Pentatomidae)

15) *Parasa prasina* Alpheraky, 1895 (Figure 1.1.15.36.)

Parasa prasina Alpheraky, 1895: *D. ent. Zts. Iris* 8: 186.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลางหรือค่อนข้างใหญ่ ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 40 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัวและส่วนอกมีขนสีเขียวอ่อนปกคลุม ในส่วนท้องมีขนสีเหลืองน้ำตาลปกคลุม โดยทางด้านบนมีสีเข้มกว่าด้านล่าง ปีกคู่หน้ามีสีเขียวอ่อน บริเวณพื้นที่ขอบปีกด้านนอกจนถึงมุมปีก มีสีเหลืองจาง ปลายปีกคู่หน้าค่อนข้างแหลม ปีกคู่หลังมีสีเหลือง

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: จีนตอนใต้ เมียนมาร์ และภาคเหนือของเวียดนาม (Solovyev & Witt, 2009)

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=8) EMBT-Lep-Limc 000577-000584

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ฤดูกาลที่พบ: เดือนกรกฎาคม

พืชอาหาร: ไผ่ไม่ทราบชนิดใน สกุล *Bambusa*

หมายเหตุ: ตัวอย่างทั้งหมดในการศึกษา เป็นตัวอย่างที่เก็บหนอนมาเพาะเลี้ยง ในเดือนกรกฎาคม ปี ค.ศ. 1961

16) *Parasa pseudorepanda* Hering, 1933 (Figure 1.1.15.37.)

Neaera pseudorepanda Hering, 1933: in Seitz, *Gross-Schmett. Erde, Suppl* 2: 207.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 35-45 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัวมีขนสีเขียวปกคลุม ส่วนอกมีขนสีเขียวอ่อนปกคลุมด้านข้างอกส่วนกึ่งกลางอกมีขนสีน้ำตาลเข้มพาดตามยาว ในส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม โดยทางด้านบนมีสีเข้มกว่าด้านล่าง ปีกคู่หน้าบริเวณปลายปีก ขอบปีกด้านนอก มุมปีก ขอบปีกด้านท้าย ตลอดจนบริเวณฐานปีกและขอบปีกด้านบนของฐานปีก มีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนพื้นที่ของปีกคู่หน้าส่วนที่เหลือมีสีเขียวอ่อน ระหว่างพื้นที่สีน้ำตาลและสีเขียวในส่วนขอบปีก (outer margin และ hind margin) นี้มีเส้นสีขาวพาดตลอดแนวขอบปีก ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อนบริเวณขอบปีกด้านนอก และจางลงเป็นสีเหลืองอ่อนในส่วนพื้นที่ด้านใน

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=43) EMBT-Lep-Limc 000001-000010, 000227, 000249, 000282, 000808-000834, 000858, 000879 และ 000880

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: เมียนมาร์ จีนตอนใต้ ไทย เวียดนาม (Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ แพร่ ตาก เพชรบูรณ์ เลย ชัยภูมิ ศรีสะเกษ นครนายก สระแก้ว และนครราชสีมา

ฤดูกาลที่พบ: เดือนกุมภาพันธ์ เมษายน พฤษภาคม สิงหาคม กันยายน และตุลาคม

17) *Parasa sundalepida* Holloway, 1986 (Figure 1.1.15.38.)

กรมวิชาการเกษตร

Parasa sundalepida Holloway, 1986: The Moths of Borneo Part 1. The Malayan Nature Journal 40: 91. pl 6, Figure 150, 155.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 30-40 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัวมีขนสีเขียวและมีแถบขนพาดตามแนวกึ่งกลางสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ลำตัวค่อนข้างเรียวยาว ส่วนอกมีขนสีเขียวอ่อนปกคลุมด้านข้างอกส่วนกึ่งกลางอกมีขนสีน้ำตาลเข้มพาดตามยาว ในส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม โดยทางด้านบนมีสีเข้มกว่าด้านล่าง ปีกคู่หน้าพื้นที่ขอบปีกด้านนอก 1 ใน 3 ของพื้นที่ปีก ตลอดจนบริเวณฐานปีกและขอบปีกด้านบน (costal margin) ของฐานปีก มีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนพื้นที่ของปีกคู่หน้าด้านในส่วนที่เหลือ มีสีเขียวอ่อน เส้น postmedian line ที่กั้นอยู่ระหว่างพื้นที่สีน้ำตาลเข้มและสีเขียว มีลักษณะเว้าเข้าด้านในพื้นที่สีเขียวของปีกคู่หน้า ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อนบริเวณขอบปีกด้านนอก และจางลงเป็นสีเหลืองอ่อนในส่วนพื้นที่ด้านใน

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=1) EMBT-Lep-Limc 000031

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: มาเลเซียตะวันตก เกาะบอร์เนียว เกาะสุมาตรา อินโดนีเซีย (Holloway, 1986; 1987)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดระนอง

ฤดูกาลที่พบ: เดือนตุลาคม

พืชอาหาร: Holloway (1986, 1987) ได้รายงานพืชอาหารของ *P. sundalepida* ได้แก่ พืชสกุลกระถินณรงค์ อบเชย มะพร้าว กาแฟ เงาะ และหมากเหลือง

18. Genus *Phlossa* Walker, 1858

Phlossa Walker, 1858: *List Specimens lepid. Insects Colln Br. Mus*. 15: 1673.

Type species: *Phlossa fimbriares* Walker, 1858

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด ในประเทศไทย คือ *Phlossa conjucta* (Walker, 1855)

***Phlossa conjuncta* (Walker, 1855) (Figure 1.1.15.39.)**

Limacodes ? conjuncta Walker, 1855: *List Specimens lepid. Insects Colln Br. Mus*. 5: 1150.

Phlossa fimbriares Walker, 1858: *List Specimens lepid. Insects Colln Br. Mus*. 15: 1673.

Iragoides conjuncta, (Walker): Hering, 1931: *in* Seitz, Gross-Schmett. Erde 10: 709, Figure 88i.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 25-30 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ส่วนขนที่ปกคลุมทางด้านล่างของลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าสี

ศรีวิชาการเกษตร

น้ำตาล บริเวณ basal area มีสีน้ำตาลเข้ม ด้านข้างของ postmedian line ทาง outer margin พบลวดลายรูปสามเหลี่ยมสีส้มอมน้ำตาล จำนวน 2 อัน และ discal spot สีดำ ในปีกแต่ละข้างปรากฏอยู่ ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อน ลายปีก marginal line บริเวณขอบปีกด้านนอกของปีกคู่หลัง มีสีน้ำตาลเข้มตลอดด้าน outer margin

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=30) EMBT-Lep-Limc 000590-000594, 001353 และ 001355-001378

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: อินเดีย จีน เกาหลี ญี่ปุ่น ไต้หวัน เวียดนาม ลาว และภาคเหนือของไทย (Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย เลย อุตรดิตถ์ สุโขทัย อุทัยธานี นครราชสีมา ชัยภูมิ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี และชุมพร

ฤดูกาลที่พบ: เดือนเมษายน ถึงเดือนธันวาคม

พืชอาหาร: ละหุ่ง นอกจากนี้ในต่างประเทศมีรายงานพืชอาหาร คือ *Triadica sebifera* (L.) Smal ในวงศ์ Euphorbiaceae (Solovyev & Witt, 2009)

19. Genus *Phocoderma* Butler, 1886

Phocoderma Butler, 1886: *Illust. Lepid. Heterocera Br. Mus*. 6: 4.

Type species: *Gastropacha velutina* Kollar, 1844

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด ในประเทศไทย คือ *Phocoderma velutina* (Kollar, 1844)

***Phocoderma velutina* (Kollar, 1844) (Figure 1.1.15.40.)**

Gastropacha velutina Kollar, 1844: *in* HÜGEL, Kaschmir und das Reich der Siek, 4 (part 2), Aufzählung und Beschreibung der von Freiherrn Carl v. HÜGEL auf seiner Reise durch Kaschmir und das Himaleyagebirge gesammelten Insecten: 473.

Natada rugosa Walker, 1855: *List Spec. lepid. Insects Colln Br. Mus*. 5: 1109.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลางถึงขนาดค่อนข้างใหญ่ ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 45-60 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ส่วนขนที่ปกคลุมทางด้านล่างของลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าสีน้ำตาล พบลายปีก median line พาดจากขอบปีกด้าน costal margin บริเวณใกล้ปลายปีก ลงมาจรดที่ hind margin บริเวณใกล้ฐานปีก พื้นที่บริเวณ basal area จนถึง median line มีสีน้ำตาลเข้ม และบริเวณใกล้ median line และขอบปีกด้าน costal margin มีจุดสีดำขนาดใหญ่ปรากฏอยู่ postmedian line ขนานกับขอบปีกด้าน outer margin สีน้ำตาลเข้มจากด้าน costal margin และจางลงเมื่อใกล้ hind margin ในปีกแต่ละข้าง ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อน ลายปีก marginal line บริเวณขอบปีกด้านนอกของปีกคู่หลัง สีน้ำตาลเข้มตลอดด้าน outer margin

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=34) EMBT-Lep-Limc 000379-000413

กรมวิชาการเกษตร

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: อินเดีย เนปาล เมียนมาร์ ไทย ภาคเหนือและภาคกลางของเวียดนาม มาเลเซียตะวันตก เกาะสุมาตรา และเกาะบอร์เนียว อินโดนีเซีย (Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ อุตรดิตถ์ แพร่ น่าน ตาก อุทัยธานี เลยสระบุรี ลพบุรี นครราชสีมา ราชบุรี และกรุงเทพมหานคร

ฤดูกาลที่พบ: เดือนเมษายน ถึงเดือนพฤศจิกายน

พืชอาหาร: มีรายงานพืชอาหารของหนอนร่านชนิดนี้ หลายชนิดในหลายวงศ์ ได้แก่ สกุลมะม่วง วงศ์ Anacardiaceae สกุลหูกวาง วงศ์ Combretaceae สกุลงิ้ว วงศ์ Bombacaceae ทองกวาว วงศ์ Fabaceae เงาะ วงศ์ Sapindaceae และชา วงศ์ Theaceae เป็นต้น (Solovyev & Witt, 2009)

20. Genus *Praesetora* Hering, 1931

Praesetora Hering, 1931: *in* SEITZ, *Gross-Schmett. Erde* 10: 672 (key), 711.

Type species: *Setora divergens* Moore, 1879

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด ในประเทศไทย คือ *Praesetora divergens* (Moore, 1879)

***Praesetora divergens* (Moore, 1879) (Figure 1.1.15.41.)**

Setora divergens Moore, 1879: *Lep. Atkins*.: 75, t. 3, f. 23.

Aphendala divaricata Moore, 1884: *Trans. Ent. Soc. Lond*.: 376.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 30-45 มิลลิเมตร เพศผู้และเพศเมียมีสีและขนาดที่ต่างกัน หนวดสีน้ำตาลอ่อน ในเพศผู้ ส่วนหัว ส่วนอก ปีกทั้งสองคู่ และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลอมแดงเข้มปกคลุม ส่วนในเพศเมียมีสีเหลือง ในปีกคู่หน้า พบลายปีก median line และ postmedian line ชัดเจน โดย median line เริ่มต้นใกล้บริเวณที่ postmedian line จรดขอบปีกด้าน costal margin และพาดลงมาจรดขอบปีกด้าน hind margin ใกล้ฐานปีก postmedian line พาดจากขอบปีกด้าน costal margin ขนานกับ outer margin ลงมาจรดกับขอบปีกด้าน hind margin บริเวณพื้นที่ปีกด้าน outer margin จาก postmedian line มีสีจางกว่าพื้นที่ทางด้านในของปีกเล็กน้อย ปีกคู่หลังมีสีเข้มบริเวณด้าน outer margin

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=15) EMBT-Lep-Limc 000835-000848 และ 001285

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย ภูฏาน เนปาล ภาคเหนือของไทย เกาะฮ่องกง และภาคกลางของเวียดนาม (Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ เพชรบูรณ์ เลย อุดรธานี ชัยภูมิ นครราชสีมา และนครนายก

ฤดูกาลที่พบ: เดือนเมษายน ถึงเดือนตุลาคม

พืชอาหาร: ชา และกาแฟ (Solovyev & Witt, 2009)

21. Genus *Pseudonirmides* Holloway, 1986

กรมวิชาการเกษตร

Pseudonirmides Holloway, 1986: Moths of Borneo 1: 131.

Type species: *Miresa sola* Swinhoe, 1901

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด ในประเทศไทย คือ *Pseudonirmides cyanopasta* (Hampson, 1910)

***Pseudonirmides cyanopasta* (Hampson, 1910) (Figure 1.1.15.42.)**

Belippa cyanopasta Hampson, 1910: *J. Bombay nat. Hist. Soc*. 20: 110.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 20-30 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ส่วนขนที่ปกคลุมทางด้านล่างของลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้ม พบลายปีก median line สีขาวจาง ไม่ชัดเจน พาดผ่าน discal spot สีดำขนาดเล็ก postmedian line มีลักษณะเป็นจุดสีดำ เรียงตัวแบบไม่ต่อเนื่อง และแต่ละจุดมีขนาดไม่เท่ากัน ในพื้นที่ระหว่างเส้นลายปีกทั้งสองเส้นใกล้ขอบปีกด้าน costal margin มีจุดสีน้ำตาลเข้ม ในปีกแต่ละข้างปรากฏอยู่ ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาล ไม่มีลวดลาย

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=88) EMBT-Lep-Limc 001010-001052 และ 000964-001009

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ด้านตะวันออกของเมียนมาร์ ทางเหนือของเวียดนาม และไทย (Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดจันทบุรี

ฤดูกาลที่พบ: เดือนมีนาคม

พืชอาหาร: เงาะ และลำไย สอดคล้องกับรายงานของ Solovyev & Witt (2009) ที่รายงานพืชอาหาร ได้แก่ เงาะ ลำไย และลิ้นจี่

22. Genus *Quasithosea* Holloway, 1987

Quasithosea Holloway, 1987: Slug and nettle caterpillars: 66.

Type species: *Thosea sythoffi* Snellen, 1900

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด ในประเทศไทย คือ *Quasithosea sythoffi* (Snellen, 1900)

***Quasithosea sythoffi* (Snellen, 1900) (Figure 1.1.15.43.)**

Thosea sythoffi Snellen, 1900: *Tijdschr. Ent.* 43, 70.

Iragoides pseudocurvistriga Hering, 1933: *Stylops* 2, 110. **syn. n.**

ชื่อสามัญ: หนอนร่านหลังลายม่วง (ทวีศักดิ์, 2544)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 30 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ส่วนขนที่ปกคลุมทางด้านล่างของลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าสีน้ำตาล

กรมวิชาการเกษตร

ไม่มี discal spot พบลายปีก median line สีขาวจาง ไม่ชัดเจน ด้านข้างเส้น median line ในพื้นที่ด้าน outer margin มีแถบสีน้ำตาลเข้มพาดตามแนวเส้น median line โดยตลอด ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อน

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=3) EMBT-Lep-Limc 001584-001586

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ด้านตะวันออกของเทือกเขาหิมาลัย เมียนมาร์ มาเลเซียตะวันตก และเกาะชวา อินโดนีเซีย (Holloway, 1987)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน และ ทวีศักดิ์ (2544) รายงานพบการระบาด ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี

ฤดูกาลที่พบ: เดือนเมษายน พฤษภาคม และตุลาคม

พืชอาหาร: ทวีศักดิ์ (2544) รายงานพืชอาหาร ได้แก่ ปาล์มน้ำมัน และพืชวงศ์ปาล์มอื่นๆ สอดคล้องกับรายงานของ Holloway (1987) ที่พบหนอนร่านชนิดนี้เข้าทำลายใน ปาล์มน้ำมัน อ้อย และพืชวงศ์หญ้าบางชนิด

ศัตรูธรรมชาติ: ทวีศักดิ์ (2544) ได้รายงานแมลงเบียนของ *Q. sythoffi* จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ แตนเบียนไข่ *Trichogramma* sp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) แตนเบียนดักแด้ ชนิด *Eugalta longipes* (Cameron, 1906) (Hymenoptera: Ichneumonidae) แตนเบียนดักแด้ *Phanerotoma* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae) แตนเบียนดักแด้ไม่ทราบชนิด (Hymenoptera: Ichneumonidae) แมลงวันก้นขน (Diptera: Tachinidae) ด้วงเสือเล็ก *Callimerus* sp. (Coleoptera: Cleidae) มวนพิฆาต ชนิด *Eocanthecona furcellata* (Wolff, 1811) (Hemiptera: Pentatomidae) และมวนเพชฌฆาต ชนิด *Sycanus collaris* (Fabricius, 1785) (Hemiptera: Reduviidae)

23. Genus *Scopelodes* Westwood, 1841

Scopelodes Westwood, 1841: in Jardine, *Naturalist's Libr.* (Ed. 1) 33: 222.

Type species: *Scopelodes unicolor* Westwood, 1841

ชื่อสามัญ: หนอนร่านวงเหลือง (ทวีศักดิ์, 2544)

ผีเสื้อหนอนร่านสกุล *Scopelodes* เป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดกลางถึงขนาดค่อนข้างใหญ่ ลำตัวอ้วนป้อม มีขนปกคลุมมาก ส่วนท้องมักมีสีเหลืองและมีลายสีดำคาดตามขวางแนวสันหลังของปล้องท้อง ปีกคู่หน้ามักมีสีเหลือง สีน้ำตาลอมเทา หรือสีน้ำตาลเข้ม ปีกคู่หลังมักมีสีเหลืองและสีน้ำตาลอ่อน ไม่มีตาเดี่ยว เพศผู้มีหนวดแบบ bipectinate เพศเมียเป็นแบบ filiform มี proboscis และ maxillary palps เจริญดี ส่วน labial palps มีขนาดใหญ่ ผีเสื้อเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะแตกต่างกันเล็กน้อย และผีเสื้อเพศเมียมักมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 5 ชนิด ในประเทศไทย โดยมีรายละเอียดในแต่ละชนิด ดังนี้

1) *Scopelodes kwangtungensis* Hering, 1931 (Figure 1.1.15.44.)

Scopelodes venosa kwangtungensis Hering, 1931: in Seitz, *Gross-Schmett. Erde* 10: 689, Figure 87e.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

กรมวิชาการเกษตร

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลางถึงค่อนข้างใหญ่ ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 45-60 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม labial pulp เจริญดีและมีขนาดใหญ่ ที่ส่วนฐานมีสีน้ำตาลแดง ที่ส่วนปลายมีสีขาวจรดปลายสุดของ labial pulp ส่วนหัว และส่วนอกมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ในส่วนท้องมีขนสีเหลืองปกคลุม โดยทางด้านบนมีลายสีดำพาดตามแนวขวางปล้องท้อง ที่ปลายสุดของส่วนท้องมีขนสีดำปกคลุม ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้มบริเวณฐานปีกและจางลงบริเวณปลายปีก ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้มและมีสีเหลืองบริเวณฐานปีกจนถึงขอบปีกด้าน anal margin

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=22) EMBT-Lep-Limc 000055, 000063, 000212, 000264, 000281, 000282, 000284-000294 และ 000296-000300

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ภาคเหนือของอินเดีย เนปาล บังกลาเทศ เมียนมาร์ จีนตอนใต้ ภาคเหนือของไทย ลาว และเวียดนาม (Solovyev & Giusti, 2017)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ เลย และชัยภูมิ

ฤดูกาลที่พบ: เดือนเมษายน ถึงเดือนกรกฎาคม

2) *Scopelodes pallivittata* Snellen, 1886 (Figure 1.1.15.45.)

Scopelodes pallivittata Snellen, 1886: *Notes Leyd. Mus*. 8: 9.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 40-50 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม labial pulp เจริญดีและมีขนาดใหญ่ ที่ส่วนฐานมีสีน้ำตาลอ่อน ที่ส่วนปลายมีสีขาวและมีสีดำที่ปลายสุดของ labial pulp ส่วนหัว และส่วนอกมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม ในส่วนท้องมีขนสีเหลืองปกคลุม โดยทางด้านบนมีลายสีดำพาดตามแนวขวางปล้องท้อง ที่ปลายสุดของส่วนท้องมีขนสีดำปกคลุม ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลอมเหลือง ลายปีก median line และ postmedian line สีน้ำตาลเข้ม ลักษณะไม่เด่นชัด บริเวณพื้นที่ระหว่างลายปีกทั้งสองเส้นนี้มีสีขาวจาง ปีกคู่หลังมีสีเหลืองอ่อนและมีสีเหลืองเข้มขึ้นบริเวณขอบปีกด้าน anal margin

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=1) EMBT-Lep-Limc 000053

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ไทย มาเลเซียตะวันตก เกาะบอร์เนียว เกาะสุมาตรา เกาะชวา อินโดนีเซีย (Solovyev & Giusti, 2017)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดชุมพร

ฤดูกาลที่พบ: เดือนพฤษภาคม

พืชอาหาร: Solovyev & Giusti (2017) ได้รายงานพืชอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ กล้วย เงาะ และโกโก้

3) *Scopelodes testacea* Butler, 1886 (Figure 1.1.15.46.)

Scopelodes testacea Butler, 1886: *Ill. Typ. Brit. Mus. Specimens Colln. Br. Mus*. 6:

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลางถึงค่อนข้างใหญ่ ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 45-60 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม labial pulp เจริญดีและมีขนาดใหญ่ ที่ส่วนฐานมีสีน้ำตาล ที่ส่วนปลายมีสีขาวและมีสีดำที่ปลายสุดของ labial pulp ส่วนหัว และส่วนอกมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ในส่วนท้องมีขนสีเหลืองปกคลุม โดยทางด้านบนมีลาย

กรมวิชาการเกษตร

สีดำพาดตามแนวขวางปล้องท้อง ที่ปลายสุดของส่วนท้องมีขนสีดำปกคลุม ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้ม ที่กลางปีกมีแถบสีขาวจางไม่เด่นชัดพาดกลางปีก ลักษณะแถบโค้งเข้าทางด้านฐานปีก ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้มและมีสีเหลืองบริเวณฐานปีกจนถึงขอบปีกด้าน anal margin

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=68) EMBT-Lep-Limc 000047, 000054, 000058, 000060, 000061, 001286-001323, 001327-001344 และ 001347-001352

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: อินเดีย ศรีลังกา เนปาล บังกลาเทศ เมียนมาร์ จีนตอนใต้ ลาว กัมพูชา เวียดนาม ไทย มาเลเซียตะวันตก สิงคโปร์ เกาะสุมาตรา เกาะชวา อินโดนีเซีย (Solovyev & Giusti, 2017)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง น่าน เพชรบูรณ์ หนองคาย สระบุรี นครนายก จันทบุรี ระนอง นครราชสีมา นครศรีธรรมราช ตรัง และกรุงเทพมหานคร

ฤดูกาลที่พบ: พบได้ทุกฤดูกาล

พืชอาหาร: ตะคร้อ ตะโก อินทรชิต ลำไย และกล้วย นอกจากนี้ Solovyev & Giusti (2017) ได้รายงานพืชอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ ตะโกนา ตะแบก มะม่วง กล้วย เงาะ และตะคร้อ

4) ***Scopelodes unicolor* Westwood, 1841 (Figure 1.1.15.47.)**

Scopelodes unicolor Westwood, 1841: in Jardine, *Naturalist's Libr.* (Ed. 1) 33: 222.

Scopelodes palpalis Walker, 1855: *List SpecimensLepid.Insects Colln Br. Mus*. 5: 1, 105.

Dalcera palpigera Herrich-Schäffer, 1856: *Samml. Aussereur. Schmett.* 1: Figure 509.

Bethura minax Walker, 1862: *J. Linn. Soc. Lond. (Zool.)* 6: 207.

Nyssia micacea Walker, 1865: *List Specimens.lepid. Insects Colln Br. Mus.* 32: 481.

Scopelodes lutea Hering, 1931: in Seitz, *GrossSchmett. Erde* 10: 690.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 40-50 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม labial pulp เจริญดีและมีขนาดใหญ่ ที่ส่วนฐานมีสีน้ำตาลอ่อน ที่ส่วนปลายมีสีขาวและมีสีส้มที่ปลายสุดของ labial pulp ส่วนหัว และส่วนอกมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม ในส่วนท้องมีขนสีเหลืองปกคลุม โดยทางด้านบนมีลายสีดำพาดตามแนวขวางปล้องท้อง ที่ปลายสุดของส่วนท้องมีขนสีดำปกคลุม ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลอมส้ม ปีกคู่หลังมีสีเหลืองอ่อนและมีสีเหลืองเข้มขึ้นบริเวณขอบปีกด้าน anal margin

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=4) EMBT-Lep-Limc 000057, 000067, 000067 และ 000345

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: อินเดีย ภูฏาน เมียนมาร์ จีนตอนใต้ ไทย มาเลเซียตะวันตก เกาะบอร์เนียว เกาะสุมาตรา เกาะชวา อินโดนีเซีย (Solovyev & Giusti, 2017)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดตาก ขอนแก่น สุราษฎร์ธานี และยะลา

พืชอาหาร: Solovyev & Giusti (2017) ได้รายงานพืชอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ นุ่น กาแฟ ชมพู่ เงาะ โกโก้ และละหุ่ง

กรมวิชาการเกษตร

ฤดูกาลที่พบ: เดือนมกราคม เมษายน พฤษภาคม และกันยายน

5) *Scopelodes venosa* Walker, 1855 ssp. *bicolor* Wu & Fang, 2009 (Figure 1.1.15.48.)

Scopelodes venosa Walker, 1855: *List Lep.Het.Br. Mus*. 5:1, 105.

Scopelodes aurogrisea Moore: *Lep.Ceyl*. 2: 126, pl. 128, figs 1a-b.

Scopelodes ursina Butler, 1886: *Ill. Het.Colln.Br. Mus.* 6: 3, pl. 101, figs 7,8.

Scopelodes bicolor Wu & Fang, 2009, *Acta Entomologica Sinica* 52 (6): 687, figs 4, 5, 13, 20.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลางถึงค่อนข้างใหญ่ ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 45-60 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม labial pulp เจริญดีและมีขนาดใหญ่ ที่ส่วนฐานมีสีน้ำตาลแดง ที่ส่วนปลายมีสีขาวและมีสีดำที่ปลายสุดของ labial pulp ส่วนหัว และส่วนอกมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ในส่วนท้องมีขนสีเหลืองปกคลุม โดยทางด้านบนมีลายสีดำพาดตามแนวขวางปล้องท้อง ที่ปลายสุดของส่วนท้องมีขนสีดำปกคลุม ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้มบริเวณฐานปีก บริเวณปลายปีกมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้มและมีสีเหลืองบริเวณฐานปีกจนถึงขอบปีกด้าน anal margin

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=11) EMBT-Lep-Limc 000049-000052, 000056, 000062, 000064-000066, 000237 และ 000**878**

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: เมียนมาร์ จีนตอนใต้ ภาคเหนือของไทย ลาว และเวียดนาม (Solovyev & Giusti, 2017)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ ตาก กาญจนบุรี ชัยภูมิ ศรีสะเกษ จันทบุรี และระนอง

ฤดูกาลที่พบ: เดือนเมษายน พฤษภาคม มิถุนายน สิงหาคม และกันยายน

พืชอาหาร: Solovyev & Giusti (2017) ได้รายงานพืชอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ ชา กาแฟ กุหลาบ และพลับ

24. Genus *Setora* Walker, 1855

Setora Walker, 1855: List *Specimens lepid. Insects Colln Br. Mus*. 5: 978 (key), 1069.

Type species: *Setora nitens* Walker, 1855

ผีเสื้อหนอนร่านสกุล *Setora* เป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ลำตัวอ้วนป้อม มีขนปกคลุมมาก ปีกทั้งสองคู่มักมีสีน้ำตาล ไม่มีตาเดี่ยว เพศผู้มีหนวดแบบ bipectinate เพศเมียเป็นแบบ filiform มี proboscis และ maxillary palps ขนาดเล็ก ผีเสื้อเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะแตกต่างกันเล็กน้อย โดยผีเสื้อเพศเมียมักมีขนาดใหญ่กว่าและมีสีเข้มกว่าในเพศผู้

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 2 ชนิด ในประเทศไทย โดยมีรายละเอียดในแต่ละชนิด ดังนี้

1) *Setora fletcheri* Holloway, 1987 (Figure 1.1.15.49.)

กรมวิชาการเกษตร

Setora fletcheri Holloway, 1987: Slug and Nettle Caterpillars: 82, pl. 21, 13.

ชื่อสามัญ: หนอนร่านสี่เขา (ทวีศักดิ์, 2544)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 20-35 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัวส่วนอก มีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ส่วนขนที่ปกคลุมทางด้านล่างของลำตัวรวมถึงส่วนท้องมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลอมเทา พบลายปีก median line และ postmedian line สีน้ำตาลอ่อน ลายปีกทั้งสองเส้นนี้ จรดกันที่ขอบปีกด้าน costal margin แบ่งพื้นที่ของปีกคู่หน้าเป็นสามส่วน พื้นที่ส่วนฐานปีกและขอบปีกด้านนอกมีสีน้ำตางเข้ม ส่วนพื้นที่ระหว่างเส้นลายปีกทั้งสองเส้นมีสีน้ำตาลอ่อน ที่บริเวณพื้นที่ส่วนขอบปีกด้านนอกตามแนวเส้น postmedian line ในปีกแต่ละข้าง มีแถบสีแดงส้มปรากฏอยู่ตลอดแนว ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อนกว่าปีกคู่หน้า

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=31) EMBT-Lep-Limc 000026-000028, 000247, 000248, 000263, 000265, 000308, 001354, 000427-000433, 000457-000459 และ **000852**

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: รัฐอัสสัม อินเดีย ภูฏาน บังกลาเทศ เมียนมาร์ จีนตอนใต้ ไทย ภาคกลางและใต้ของเวียดนาม (Holloway, 1987; Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ น่าน ตาก เพชรบูรณ์ เลย ชัยภูมิ นครนายก จันทบุรี ชุมพร ยะลา และนราธิวาส

ฤดูกาลที่พบ: พบทุกฤดูกาล

พืชอาหาร: มะพร้าว เงาะ อะโวกาโด นอกจากนี้ ทวีศักดิ์ (2544) ได้รายงานพืชอาหารของหนอนร่านชนิดนี้ โดยพบเข้าทำลายมะพร้าว และปาล์มน้ำมัน บ่อยครั้ง

ศัตรูธรรมชาติ: ทวีศักดิ์ (2544) ซึ่งได้รายงานแมลงเบียนของ *S. fletcheri* ได้แก่ แมลงวันหลังลายชนิด *Sarcophaga antilope* Böttcher, 1913 (Diptera: Sarcophagidae) แมลงวันก้นขนชนิด *Chaetexorista javana* Brauer & Bergenstamm, 1895 (Diptera: Tachinidae) แตนเบียนหนอนของ *S. fletcheri* อีกจำนวน 2 ชนิด คือ *Platybracon* sp. (Hymenoptera: Braconidae) และ *Brachymeria* sp. (Hymenoptera: Chalcididae) นอกจากนี้ Holloway (1987) ได้รายงานแตนเบียนหนอนของ *S. fletcheri* อีกชนิด คือ *Spinaria spinator* (Guérin-Méneville, 1830) (Hymenoptera: Braconidae)

2) *Setora postornata* (Hampson, 1900) (Figure 1.1.15.50.)

Setora sinensis Moore, 1877: *Ann. Mag. nat. Hist*. (4) 20: 93.

Thosea postornata Hampson, 1900: *J. Bombay nat. Hist. Soc.* 13: 231.

Thosea postornata ab. *Hampsoni* Strand, 1916: *Arch. Naturg.* 82 A, 2: 89.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 35 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัว ส่วนอกมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ส่วนขนที่ปกคลุมทางด้านล่างของลำตัวรวมถึงส่วนท้องมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลอมเทา พบลายปีก median line และ postmedian line สีน้ำตาลอ่อน ลายปีกทั้งสองเส้นนี้ จรดกันที่ขอบปีกด้าน costal margin แบ่งพื้นที่ของปีกคู่หน้าเป็นสามส่วน พื้นที่ส่วนฐานปีกและขอบปีกด้านนอกมีสีน้ำตางเข้ม

กรมวิชาการเกษตร

ส่วนพื้นที่ระหว่างเส้นลายปีกทั้งสองเส้นมีสีน้ำตาลอ่อน ที่บริเวณ tornal area ในปีกแต่ละข้าง มีลวดลายรูปสามเหลี่ยมสีดำปรากฏอยู่ ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้ม

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=1) EMBT-Lep-Limc 000445

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: อินเดีย เนปาล จีนตอนใต้ เกาะไต้หวัน และเวียดนาม (Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเพชรบูรณ์

ฤดูกาลที่พบ: เดือนกรกฎาคม

พืชอาหาร: Solovyev & Giusti (2017) ได้รายงานพืชอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ *Platanus acerifolia* (Ait.) Willd. *P. orientalis* L. และ *P. occidentalis* L. ในวงศ์ Platanaceae และ ก่อ ชนิด *Castanea sativa* Miller ในวงศ์ Fagaceae

25. Genus *Susica* Walker, 1855

Susica Walker, 1855: *List Specimens lepid. Insects Colln Br. Mus*. 5: 1103 (key), 1113.

Type species: *Susica pallida* Walker, 1855

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด ในประเทศไทย คือ *Susica sinensis* (Walker, 1856)

***Susica sinensis* (Walker, 1856) (Figure 1.1.15.51.)**

Tadema sinensis Walker, 1856: *List Specimens lepid. Insects Colln. Br. Mus*. 7: 1759.

Susica formosana Wileman, 1911: *Entomologist* 44: 151, **syn. n.**

Susica fusca Matsumura, 1911: *Thous. Ins. Japan Suppl*. 3: 80, **syn. n.**

ชื่อสามัญ: หนอนร่านหลังลายขาว (ทวีศักดิ์, 2544)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 35-40 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลเข้ม ในเพศผู้จะเห็นลักษณะหนวดแบบฟันหวีได้ชัดเจน เนื่องจากมีแขนงหนวดที่ยาว ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ส่วนขนที่ปกคลุมทางด้านล่างของลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าสีน้ำตาล พบลายปีก median line สีน้ำตาลเข้มชัดเจน ส่วนเส้นปีก postmedian line ไม่ชัดเจน เห็นได้ในบริเวณที่ใกล้ปลายปีก ด้านข้างเส้น median line ในพื้นที่ด้าน outer margin มี discal spot ใกล้กึ่งกลางเส้น median line ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อน

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=14) EMBT-Lep-Limc 000446-000456 และ 000460-000462

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: จีนตอนใต้ เกาะไต้หวัน ภาคเหนือของไทย กัมพูชา และเวียดนาม (Solovyev & Witt, 2009)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ แพร่ น่าน กาญจนบุรี ขอนแก่น กาฬสินธุ์ และนครราชสีมา

กรมวิชาการเกษตร

ฤดูกาลที่พบ: เดือนพฤษภาคม ถึงเดือนตุลาคม

26. Genus *Thosea* Walker, 1855

Thosea Walker, 1855: *List Specimens lepid. Insects Colln Br. Mus*. 5: 979 (key), 1068.

Autocopa Meyrick, 1889: *Trans. Ent. Soc. Lond*.: 457.

Anzabe Walker, 1855: *List Specimens lepid. Insects Colln Br. Mus*. 5: 1093.

Dasycomota Lower, 1902: *Trans. Proc. R. Soc. Aust*. 26: 220.

Type species: *Thosea unifascia* Walker, 1855.

ผีเสื้อหนอนร่านสกุล *Thosea* เป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ลำตัวอ้วนป้อม มีขนปกคลุมมาก ปีกคู่หน้ามักมีสีเหลือง สีน้ำตาลอมเทา หรือสีน้ำตาลเข้ม ปลายปีกค่อนข้างแหลม ปีกคู่หลังมักมีสีเหลืองหรือสีน้ำตาลอ่อน ไม่มีตาเดี่ยว เพศผู้มีหนวดแบบ bipectinate เพศเมียเป็นแบบ filiform มี proboscis และ maxillary palps เจริญดี ส่วน labial palps มีขนาดใหญ่ ผีเสื้อเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะแตกต่างกันเล็กน้อย และผีเสื้อเพศเมียมักมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้

จากการศึกษา พบผีเสื้อหนอนร่านในสกุลนี้จำนวน 5 ชนิด ในประเทศไทย โดยมีรายละเอียดในแต่ละชนิด ดังนี้

1) *Thosea bipartita* Hering, 1933 (Figure 1.1.15.52.)

Thosea bipartita Hering, 1933: *Stylops* 2: 214.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 35-40 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลปกคลุม ส่วนขนที่ปกคลุมทางด้านล่างของลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าสีน้ำตาล พบลายปีก postmedian line สีน้ำตาลเข้มชัดเจน ด้านข้างลายปีก postmedian line นี้มีแถบสีขาวจางไม่ชัดเจนพาดตามแนวลายปีกทางด้านในของปีก ด้านข้างเส้น postmedian line ในพื้นที่ด้านในของปีก มี discal spot ใกล้กึ่งกลางเส้น postmedian line ส่วนพื้นที่ด้าน outer margin มีสีน้ำตาลเข้มกว่าพื้นที่ด้านในของปีกคู่หน้า ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้ม

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=22) EMBT-Lep-Limc 001505-001527

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย บังกลาเทศ เมียนมาร์ ตอนใต้ของเวียดนาม และไทย (Holloway, 1987)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ฤดูกาลที่พบ: เดือนเมษายน

พืชอาหาร: ละหุ่ง

2) *Thosea lutea* Heylaerts, 1890 (Figure 1.1.15.53.)

Thosea lutea Heylaerts, 1890: *Comp. Rend. Soc. ent. Belg*.: 28.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Limacodes nubeculosa Snellen, 1892: *Veth. Midden Sumatra, Lepidoptera* 4 (8): 30.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 30-40 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลปกคลุม ส่วนขนที่ปกคลุมทางด้านล่างของลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าสีน้ำตาล บริเวณฐานปีกมีสีเข้มกว่าบริเวณอื่นเล็กน้อย พบลายปีก antemedian line สีน้ำตาลจางไม่ชัดเจน แต่เห็นได้ชัดขึ้นในบริเวณใกล้กับขอบปีกด้าน hind margin เส้น postmedian line สีน้ำตาลไม่ชัดเจน ด้านข้างเส้น postmedian line ในพื้นที่ด้านในของปีก มี discal spot ใกล้กึ่งกลางเส้น postmedian line ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลอ่อน

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=2) EMBT-Lep-Limc 001466-001467

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: มาเลเซียตะวันตก เกาะบอร์เนียว เกาะสุมาตรา เกาะชวา และเกาะบังกา อินโดนีเซีย (Holloway, 1987)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดสระบุรี

ฤดูกาลที่พบ: เดือนมกราคม

พืชอาหาร: ตะแบก นอกจากนี้ Holloway (1987) ได้รายงานพืชอาหารอื่น ได้แก่ มะพร้าว ปาล์มน้ำมัน ชา กาแฟ และพริกไทย

ศัตรูธรรมชาติ: Holloway (1987) ได้รายงานแมลงเบียนของ *T. lutea* จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ แตนเบียนไข่ *Brachymeria* sp. (Hymenoptera: Chalcididae) แตนเบียนดักแด้ *Eurytoma* sp. (Hymenoptera: Eurytomidae) แตนเบียนดักแด้ *Chlorocryptus purpuratus* (Smith, 1852) แตนเบียนดักแด้ไม่ทราบชนิด *Stictipisthus* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae) แตนเบียนดักแด้ *Apanteles* sp. (Hymenoptera: Braconidae) ต่อกาเหว่าชนิด *Chrysis shanghaiensis* Smith, 1874 (Hymeoptera: Chrysidae) แมลงวันก้นขนไม่ทราบชนิด (Diptera: Tachinidae) มวนพิฆาต ชนิด *Cantheconidea gaugleri* Schneider, 1940 (Hemiptera: Pentatomidae) และมวนเพชฌฆาต *Sycanus* sp. (Hemiptera: Reduviidae)

3) *Thosea rara* Swinhoe, 1889 (Figure 1.1.15.54.)

Thosea rara Swinhoe, 1889: *Proc. zool. Soc. Lond.* 1889: 408.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 30-35 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลปกคลุม ส่วนขนที่ปกคลุมทางด้านล่างของลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าสีน้ำตาล พบลายปีก postmedian line สีน้ำตาลเข้มชัดเจน ด้านข้างลายปีก postmedian line นี้มีแถบสีขาวเด่นชัดพาดตามแนวลายปีกทางด้านในของปีก ด้านข้างเส้น postmedian line ในพื้นที่ด้านในของปีก มี discal spot ใกล้กึ่งกลางเส้น postmedian line ส่วนพื้นที่ด้าน outer margin มีสีน้ำตาลเช่นเดียวกันกับพื้นที่ด้านในของปีกคู่หน้า ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้ม

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=5) EMBT-Lep-Limc 001468-001470 และ 001566-001567

กรมวิชาการเกษตร

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: เมียนมาร์ (Holloway, 1987)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดปทุมธานี และกรุงเทพมหานคร

ฤดูกาลที่พบ: เดือนมกราคม และกุมภาพันธ์

พืชอาหาร: Holloway (1987) ได้รายงานพืชอาหาร ได้แก่ ถั่วลิสง ทองหลาง กล้วย และพืชสกุลชมพู่

4) *Thosea siamica* Holloway, 1987 (Figure 1.1.15.55.)

Thosea siamica Holloway, 1987: Slug and Nettle Caterpillars: 48, pl. 6, 20.

ชื่อสามัญ: หนอนหอยหลังเต่า (ทวีศักดิ์, 2544)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 35-40 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลเข้มปกคลุม ส่วนขนที่ปกคลุมทางด้านล่างของลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าสีน้ำตาล พบลายปีก postmedian line สีน้ำตาลเข้ม ด้านข้างลายปีก postmedian line นี้มีแถบสีขาวจางไม่ชัดเจนพาดตามแนวลายปีกทางด้านในของปีก ด้านข้างเส้น postmedian line ในพื้นที่ด้านในของปีก มี discal spot ใกล้กึ่งกลางเส้น postmedian line ส่วนพื้นที่ด้าน outer margin มีสีน้ำตาลเข้มเช่นเดียวกันกับพื้นที่ด้านในของปีกคู่หน้า ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้ม

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=88) EMBT-Lep-Limc 001471-001504, 001528-001565, 001568-001583 และ 001587

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: ไทย (Holloway, 1987)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ หนองคาย อุทัยธานี ลพบุรี ฉะเชิงเทรา ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร นครศรีธรรมราช ตรัง และกรุงเทพมหานคร

ฤดูกาลที่พบ: พบได้ทุกฤดูกาล

พืชอาหาร: ข้าว มะพร้าว กุหลาบ ขนุน ละหุ่ง มะขามเทศ พุทรา ทองหลาง กระเจี๊ยบแดง ยาสูบ หมาก พุทธรักษา กระถินณรงค์ ถั่วลิสง นอกจากนี้มีรายงานพบการระบาดทำความเสียหายในปาล์มน้ำมัน (ทวีศักดิ์, 2544; Holloway, 1987)

ศัตรูธรรมชาติ: ทวีศักดิ์ (2544) และ Holloway (1987) ได้รายงานศัตรูธรรมชาติ ของ *T. siamica* ไว้ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ แตนเบียนไข่ *Trichogramma* sp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) *Brachymeria* sp. (Hymenoptera: Chalcididae) และมวนเพชฌฆาต ชนิด *Sycanus collaris* (Fabricius, 1785) (Hemiptera: Reduviidae)

5) *Thosea unifascia* Walker, 1855 (Figure 1.1.15.56.)

Thosea unifascia Walker, 1855: List Specimens lepid. Insects Colln Br. Mus. 5: 1068.

Parasa loesa Moore, 1859: *Cat. Lep. Mus. Eaet-India Company* 1: 417.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 35-40 มิลลิเมตร หนวดสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีขนสีน้ำตาลปกคลุม ส่วนขนที่ปกคลุมทางด้านล่างของลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าสีน้ำตาล พบลายปีก postmedian line สีน้ำตาลเข้มชัดเจน ด้านข้างลายปีก postmedian line นี้มีแถบสีขาวจางกว้างพาดตามแนวลายปีกทางด้านในของปีก ด้านข้างเส้น postmedian line ในพื้นที่ด้านในของปีก มี discal spot ใกล้กึ่งกลางเส้น postmedian line ส่วนพื้นที่ด้าน outer margin มีสีน้ำตาลเข้มกว่าพื้นที่ด้านในของปีกคู่หน้า ปีกคู่หลังมีสีน้ำตาลเข้มทางด้านนอกและสีจางลงบริเวณฐานปีก

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา: (n=3) EMBT-Lep-Limc 001463-001465

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: เกาะชวา และเกาะบาหลี อินโดนีเซีย (Holloway, 1987)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ฤดูกาลที่พบ: เดือนมกราคม

พืชอาหาร: มะพร้าว กาแฟ และขนุน นอกจากนี้ Holloway (1987) ได้รายงานพืชอาหารอื่น ได้แก่ ซิงโคนา ทองหลาง มะม่วงป่า ถั่วเขียว ฝรั่ง ชา ทับทิม ส้ม และอินทผลัม

จากการศึกษาชนิดของผีเสื้อหนอนร่านในประเทศไทย พบว่า สกุล *Parasa* เป็นสกุลที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุด จำนวน 17 ชนิด โดย ชนิด *P. lepida* เป็นชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ที่พบมากที่สุด ในทุกภูมิภาคของประเทศไทยโดยพบได้ตลอดทั้งปี บนพืชอาศัยจำนวน 49 ชนิด โดยในจำนวนนี้มีพืชเศรษฐกิจสำคัญหลายชนิด ได้แก่ มะพร้าว ปาล์มน้ำมัน ลำไย เงาะ มะม่วง มะม่วงหิมพานต์ กล้วย โกโก้ ชา กาแฟ ส้ม หม่อน พริกไทย กุหลาบ และชมพู่ เป็นต้น สอดคล้องกับรายงานของ ทวีศักดิ์ (2544) สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร (2559) องุ่น (2544) และ Kuroko and Lewvanich (1993) โดยพบการทำลายของ *P. lepida* ในมะพร้าวมากที่สุด และเป็นศัตรูพืชที่มีความสำคัญของมะพร้าว นอกจากนี้ในการศึกษาและการตรวจเอกสารยังพบว่า ในอดีตที่ผ่านมา ในหลายภูมิภาคของประเทศไทยที่เคยพบการระบาดอย่างรุนแรงของผีเสื้อหนอนร่านหลายชนิด เช่น *C. siamensis D. diducta D. furva D. pallivitta D. sordida Q. sythoffi* และ *T. siamica* โดยเฉพาะในพื้นที่ปลูกมะพร้าวและปาล์มน้ำมัน เมื่อมีการป้องกันกำจัดโดยใช้ชีววิธี วิธีผสมผสาน และชีวภัณฑ์ต่างๆ จนประสบความสำเร็จ ส่งผลให้การระบาดลดลงจนไม่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจ ในการศึกษานี้จึงสำรวจไม่พบตัวอย่างในบางชนิด เช่นผีเสื้อหนอนร่านในสกุล *Darna* สอดคล้องกับรายงานของทวีศักดิ์ (2544) ที่รายงานว่า ผีเสื้อหนอนร่านบางชนิด เช่น *Q. sythoffi* มีจำนวนลดลง จนไม่พบการระบาดอีก ในปัจจุบัน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการศึกษาตัวอย่างผีเสื้อหนอนร่านที่สำรวจเก็บตัวอย่างจากแหล่งปลูกพืชทั่วทุกภาคของประเทศไทย และตัวอย่างที่ได้เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร จำนวน 1,371 ตัวอย่าง ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2563 รวมทั้งการตรวจเอกสารอ้างอิง พบผีเสื้อหนอนร่าน มีจำนวน 60 ชนิด ใน 26 สกุล คือ สกุล *Altha* 2 ชนิด คือ *A. adala* และ *A. lacteola* สกุล *Atosia* 1 ชนิด คือ *A. doenia* สกุล *Birthamoides*

กรมวิชาการเกษตร

1 ชนิด คือ *B. junctura* สกุล *Birthosea* 1 ชนิด คือ *B. bisura* สกุล *Cania* 3 ชนิด คือ *C. bandura C. robusta* และ *C. siamensis* สกุล *Chalcocelis* 1 ชนิด คือ *C. albiguttatus* สกุล *Cleromettia* 1 ชนิด คือ *C. sumatrensis* สกุล *Darna* 6 ชนิด คือ *D. diducta D. furva D. metaleuca D. mindanensis D. pallivitta* และ *D. sordida* สกุล *Hampsonella* 1 ชนิด คือ *H. dentata* สกุล *Hyphorma* 1 ชนิด คือ *H. minax* สกุล *Hyphormides* 1 ชนิด คือ *H. argentipunctata* สกุล *Idonauton* 1 ชนิด คือ *I. apicalis* สกุล *Miresa* 2 ชนิด คือ *M. bracteata* และ *M. kwangtungensis* สกุล *Narosoideus* 1 ชนิด คือ *N. vulpina* สกุล *Nirmides* 1 ชนิด คือ *N. basalis* สกุล *Oxyplax* 1 ชนิด คือ *O. ochracea* สกุล *Parasa* 17 ชนิด คือ *P. albipuncta P. balitkae P. bana P. bicolor P. campagnei P. canangae P. chlorozonata P. corbetti P. darma P. himalepida P. jade P. lepida P. ostia P. pastoralis P. prasina P. pseudorepanda* และ *P. sundalepida* สกุล *Phlossa* 1 ชนิด คือ *P. conjuncta* สกุล *Phocoderma* 1 ชนิด คือ *P. velutina* สกุล *Praesetora* 1 ชนิด คือ *P. divergens* สกุล *Pseudonirmides* 1 ชนิด คือ *P. cyanopasta* สกุล *Quasithosia* 1 ชนิด คือ *Q. sythoffi* สกุล *Scopelodes* 5 ชนิด คือ *S. kwangtungensis S. pallivittata S. testacea S. unicolor* และ *S. venosa* สกุล *Setora* 2 ชนิด คือ *S. fletcheri* และ *S. postornata* สกุล *Susica* 1 ชนิด *S. sinensis* คือ และสกุล *Thosea* 5 ชนิด คือ *T. bipartita T. lutea T. rara T. siamica* และ *T. unifascia* ส่วนชนิดที่มีจำนวนตัวอย่างมากที่สุดในการศึกษา ได้แก่ *P. lepida* จำนวน 239 ตัวอย่าง รองลงมาคือ *P. corbetti* จำนวน 171 ตัวอย่าง *T. siamica* จำนวน 88 ตัวอย่าง *P. cyanopasta* จำนวน 88 ตัวอย่าง และ *M. bracteata* จำนวน 77 ตัวอย่าง ตามลำดับ

และจากข้อมูลพืชอาหารที่สำรวจร่วมกับการตรวจเอกสาร พบว่าสกุลและชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีจำนวน 6 สกุล 10 ชนิด คือ สกุล *Cania* ได้แก่ชนิด *C. siamensis* สกุล *Darna* ได้แก่ชนิด *D. diducta D. furva D. pallivitta D. sordida* สกุล *Parasa* ได้แก่ชนิด *P. corbetti P. lepida* สกุล *Quasithosia* ได้แก่ชนิด *Q. sythoffi* สกุล *Setora* ได้แก่ชนิด *S. fletcheri* และสกุล *Thosea* ได้แก่ชนิด *T. siamica* โดยทั้ง 10 ชนิดนี้ พบได้ทุกฤดูกาล ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย และพบบนพืชอาศัยจำนวนหลายชนิด โดยในจำนวนนี้มีพืชเศรษฐกิจสำคัญ ได้แก่ มะพร้าว ปาล์มน้ำมัน ลำไย เงาะ มะม่วง และชมพู่ เป็นต้น โดยเฉพาะมะพร้าวและปาล์มน้ำมัน ที่มักพบการระบาดของหนอนร่านอยู่บ่อยครั้ง และเมื่อพบการระบาดรุนแรงมักสร้างความเสียหายแก่ผลผลิตของมะพร้าวและปาล์มน้ำมัน

นอกจากนี้ ในการศึกษาชนิดของศัตรูธรรมชาติทั้งจากการตรวจเอกสาร และในพิพิธภัณฑ์แมลง พบว่าชนิดของศัตรูธรรมชาติที่พบได้บ่อย และเข้าทำลายผีเสื้อหนอนร่านในระยะต่างๆ ได้แก่ แมลงเบียน เช่น แมลงวันก้นขนชนิด *C. javana* พบเข้าทำลาย *B. bisura P. lepida* และ *S. fletcheri* แมลงวันหลังลายชนิด *S. antelope* พบเข้าทำลาย *C. albiguttatus P. lepida* และ *S. fletcheri* ต่อกาเหว่าชนิด *C. shanghaiensis* พบเข้าทำลาย *C. siamensis P. lepida* และ *T. lutea* แตนเบียนไข่ สกุล *Trichogramma* พบเข้าทำลาย *D. furva Q. sythoffi* และ *T. siamica* แตนเบียนหนอน สกุล *Apanteles* พบเข้าทำลาย *C. bandura C. sumatrensis D. diducta D. furva D. sordida P. lepida* และ *T. lutea* แตนเบียน สกุล *Brachymeria* พบเข้าทำลาย *C. albiguttatus P. bicolor S. fletcheri T. lutea* และ *T. siamica* แตนเบียนหนอน ชนิด *B. oxymora* พบเข้า

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ทำลาย *B. bisura C. siamensis* และ *C. albiguttatus* แตนเบียนหนอน ชนิด *C. purpuratus* พบเข้าทำลาย *B. bisura C. siamensis* และ *T. lutea* แมลงห้ำ เช่น มวนพิฆาต ชนิด *E. furcellata* พบเข้าทำลาย *B. bisura D. diducta D. furva D. sordida P. pastoralis Q. sythoffi* และ *T. lutea* มวนเพชฌฆาต สกุล *Sycanus* พบเข้าทำลาย *B. bisura D. diducta D. furva D. sordida Q. sythoffi T. lutea* และ *T. siamica* ซึ่งข้อมูลศัตรูธรรมชาติที่ได้นี้ จะสามารถนำไปป้องกันกำจัดการระบาดของผีเสื้อหนอนร่านที่พบเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจต่างๆ ได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ด้านวิชาการ : ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยไปตีพิมพ์ในรายงานผลงานวิชาการประจำปี วารสารตลอดจนเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการต่าง ๆ สำหรับกรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยและสถานศึกษาที่เกี่ยวข้อง เพื่อนำผลงานวิจัยที่ได้ไปต่อยอดหรือพัฒนาการป้องกันกำจัดหนอนร่านในประเทศไทย

ด้านนโยบาย : เป็นฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชในประเทศไทย คำแนะนำการเลือกชนิดของศัตรูธรรมชาติเพื่อใช้ป้องกันกำจัดหนอนร่านศัตรูพืชเศรษฐกิจ ตัวอย่างเช่น มะพร้าว และปาล์มน้ำมัน หรือเผยแพร่สู่เกษตรกรทั่วไป กรมส่งเสริมการเกษตร ภาคธุรกิจต่างๆ

กรมวิชาการเกษตร

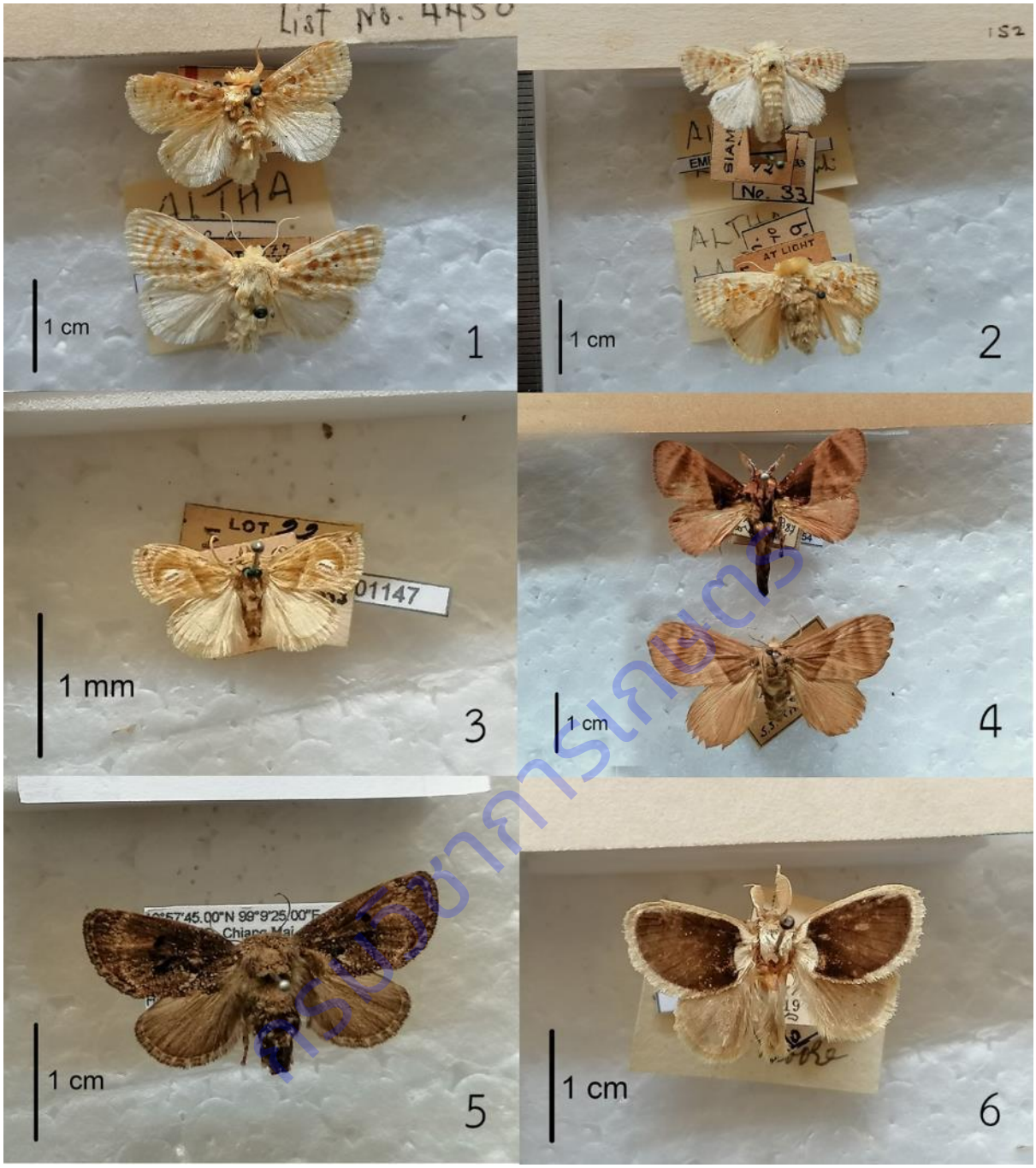


Figure 1.1.15.1. *Altha adala* (male & female) **1.1.15.2**. *Altha lacteola* (male & female)

1.1.15.3. *Atosia doenia* (male) **1.1.15.4**. *Birthamoides junctura* (male & female)

1.1.15.5. *Birthosea bisura* (female) **1.1.15.6**. *Cania bandura* (male)

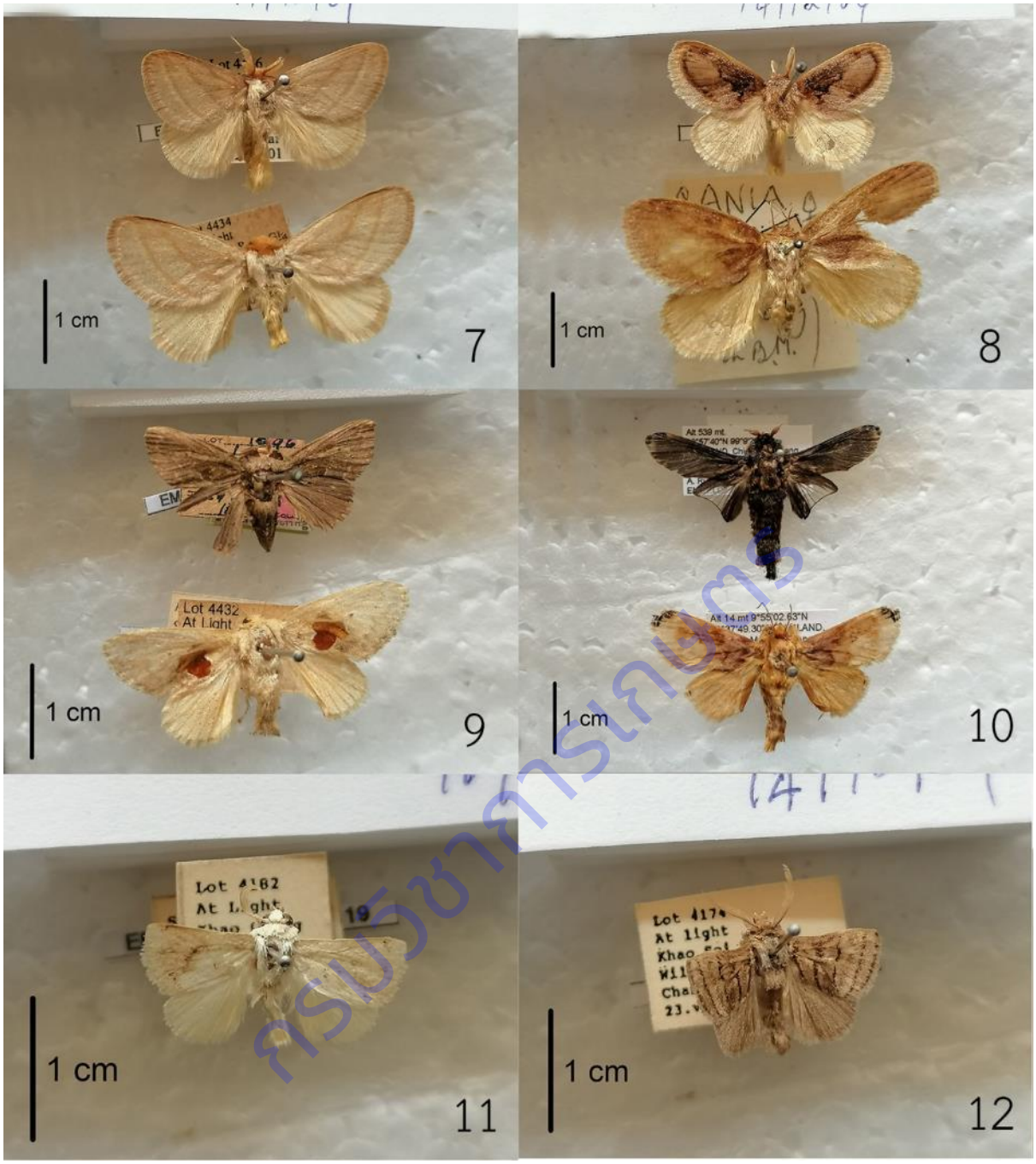


Figure 1.1.15.7. *Cania robusta* (male & female) **1.1.15.8**. *Cania siamensis* (male & female)

1.1.15.9. *Chalcocelis albiguttatua* (male & female) **1.1.15.10.** *Cheromettia sumatrensis* (male & female)

1.1.15.11. *Darna metaleuca* (male) **1.1.15.12**. *Darna mindanensis* (male)

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.15.**13**. *Hampsonella dentata* (male) **1.1.15.14**. *Hyphorma minax* (male & female) **1.1.15.15**. *Hyphormides argentipunctata* (2 males) **1.1.15.16**. *Idonauton apicalis* (male & female)

1.1.15.17. *Miresa bracteata* (male & female) **1.1.15.18**. *Miresa kwangtungensis* (2 males)

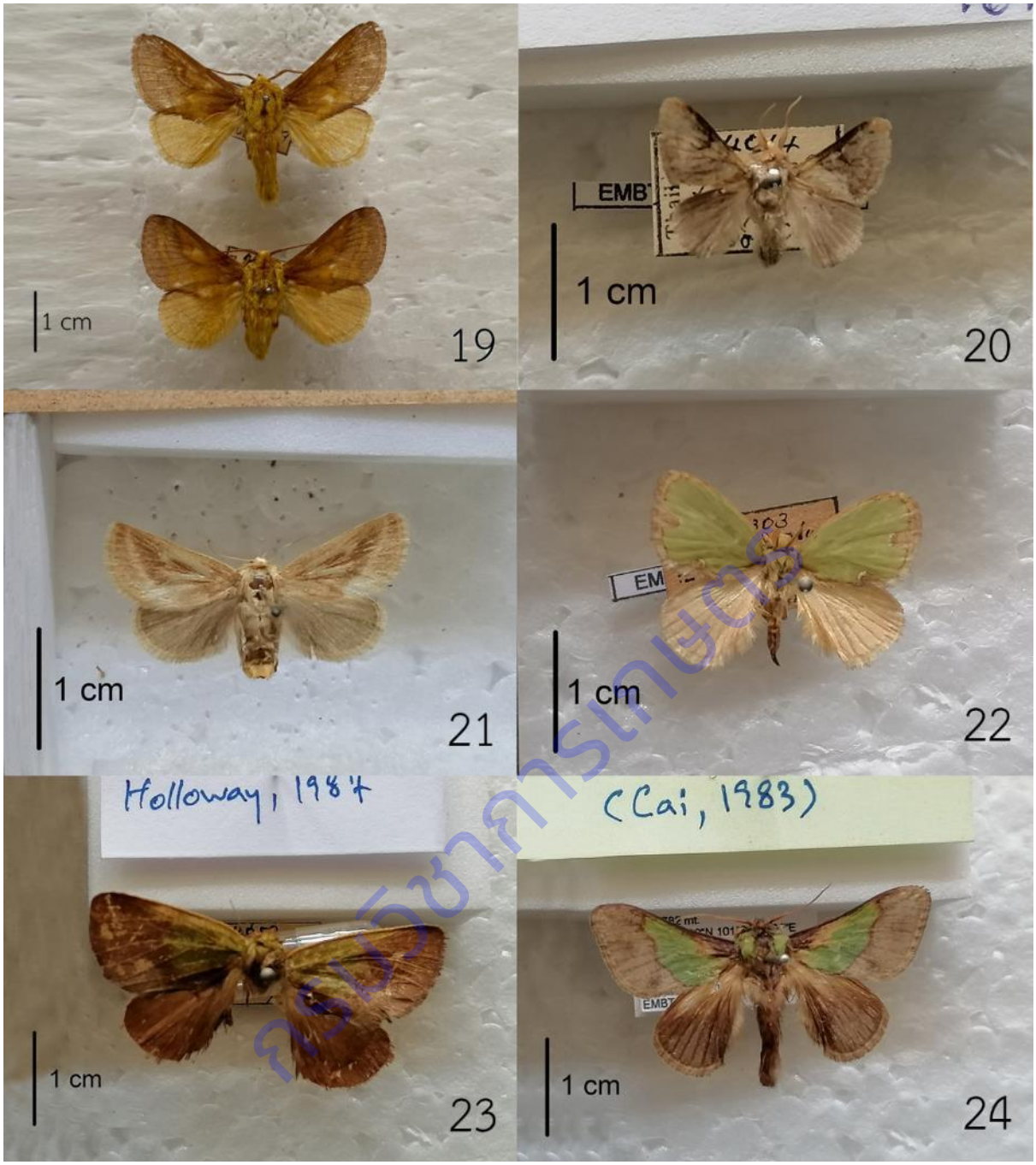


Figure 1.1.15.19. *Narosoideus vulpina* (2 males) **1.1.15.20**. *Nirmides basalis* (male)

1.1.15.21. *Oxyplax ochracea* (male) **1.1.15.22**. *Parasa albipuncta* (male)

1.1.15.23. *Parasa balitkae* (male) **1.1.15.24**. *Parasa bana* (male)

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.15.25. *Parasa bicolor* (male)

1.1.15.26. *Parasa campagnei* (male)

1.1.15.27. *Parasa canang*ae (male)

1.1.15. 28. *Parasa chlorozonata* (male)

1.1.15.29. *Parasa corbetti* (male & female)

1.1.15.30. *Parasa darma* (male)

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.15.31. *Parasa himalepida* (male)
1.1.15.32. *Parasa jade* (male)
1.1.15.33. *Parasa lepida* (male & female)
1.1.15.34. *Parasa ostia* (male)
1.1.15.35. *Parasa pastoralis* (male)
1.1.15.36. *Parasa prasina* (male)

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.15.37. *Parasa pseudorepanda* (male) **1.1.15.38**. *Parasa sundalepida* (male) **1.1.15.39**. *Phlossa conjuncta* (male & female) **1.1.15.40**. *Phocoderma velutina* (male & female) **1.1.15.41**. *Praesetora divergens* (male & female) **1.1.15.42**. *Pseudonirmides cyanopasta* (male & female)

Figure 1.1.15.43. *Quasithosea sythoffi* (male) **1.1.15.44**. *Scopelodes kwangtungensis* (male)
1.1.15.45. *Scopelodes pallivittata* (male) **1.1.15.46**. *Scopelodes testacea* (male & female)
1.1.15.47. *Scopelodes unicolor* (male & female) **1.1.15.48**. *Scopelodes venosa* (male)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Figure 1.1.15.49. *Setora fletcheri* (male & female) **1.1.15.50**. *Setora postornata* (male) **1.1.15.51**. *Susica sinensis* (male & female) **1.1.15.52**. *Thosea bipartita* (male & female) **1.1.15.53**. *Thosea lutea* (female) **1.1.15.54**. *Thosea rara* (male)

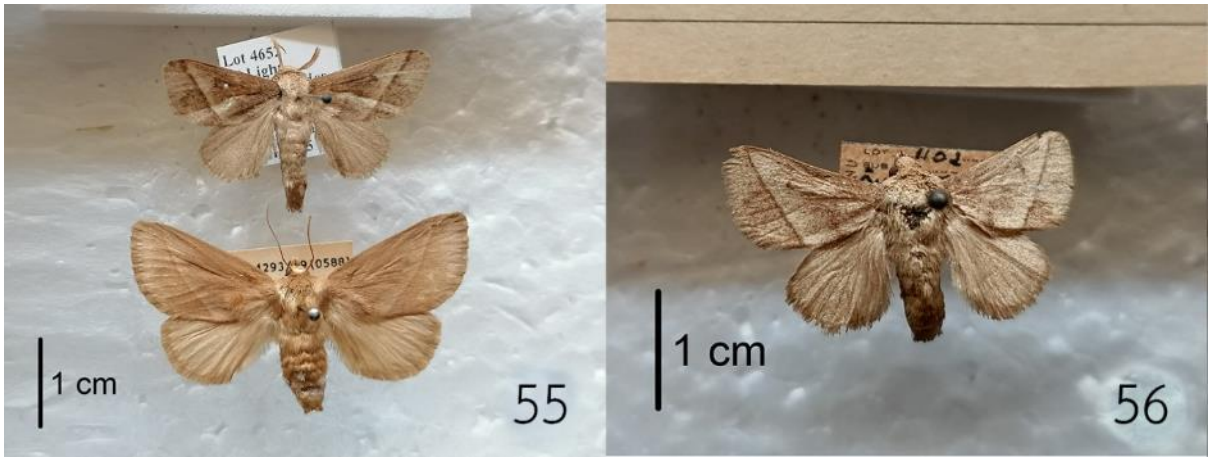


Figure1.1.15. 55. *Thosea siamica* (male & female) **1.1.15.56**. *Thosea unifascia* (male)

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.16 ชนิดของแมลงหวี่ขาว (Hemiptera: Aleyrodidae) ในพืชผักสวนครัวเพื่อการส่งออกของประเทศไทย

Species of Whitefly in backyard garden for export in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวสุนัดดา เชาวลิต	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นายอิทธิพล บรรณาการ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวเกศสุดา สนศิริ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นายสิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

แมลงหวี่ขาวเป็นแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง มีการระบาดรุนแรงไปทั่วโลก อาศัยอยู่กับพืชมากมายหลายชนิด ประเทศไทยรับการแจ้งเตือนจากสหภาพยุโรปว่ามีแมลงหวี่ขาวติดไปกับพืชผักสวนครัวที่ส่งไปยังสหภาพยุโรปบ่อยครั้ง สร้างความเสียหายให้ประเทศไทยและเกษตรกรและผู้ส่งออกเป็นอย่างมาก การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบชนิด พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจายของแมลงหวี่ขาว เพื่อประโยชน์ในการจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืช แก้ไขปัญหาการส่งออกพืชชผักสวนครัวของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างแมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัวจาก 51 จังหวัด ของประเทศไทย รวมทั้งใช้ตัวอย่างเดิมที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2564 จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาระยะดักแด้แมลงหวี่ขาวจำนวน 1,605 ตัวอย่าง สามารถจำแนกได้ 3 ชนิด ได้แก่ 1) แมลงหวี่ขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) 2) แมลงหวี่ขาวใยเกลียว *Aleurodicus dispersus* Russell และ 3) แมลงหวี่ขาวในโรงเรือน *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856) ในสัดส่วนร้อยละ 66.85, 33.40 และ 0.75 ตามลำดับ ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อเตรียมจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชของประเทศไทย

Abstract

The whitefly is one of the most important insect pests. There are severe outbreak all over the world. Thailand has received alerts from the European Union that whitefly is frequently attached to the vegetable gardens exported to the EU causing a lot of damage to Thailand and farmers and exporters. The aim of this research is to identify, host plants and distribution of species of Whitefly in backyard garden for export and contributes to an ongoing program to compile a pest database of Thailand. Leaves bearing puparia collected on backyard garden plantation was carried out during October 2019 – September 2021 in 51 provinces around Thailand, and 1,605 samples were collected and identified. This material supplemented with

กรมวิชาการเกษตร

specimens held in the Insect Museum of Thai Department of Agriculture. Specimens were identified using external morphology on slide. Three species Aleyrodinae were found. 1) Tobacco whitefly; *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) 2) Spiralling Whitefly; *Aleurodicus dispersus* Russell and 3) Greenhouse Whitefly; *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856). Voucher specimens were deposited in the Insect Museum, Insect Taxonomy Group, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand.

คำนำ

แมลงหวี่ขาว (whitefly) เป็นแมลงศัตรูพืชขนาดเล็กที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในอันดับ Hemiptera อันดับย่อย Sternorrhyncha วงศ์ Aleyrodidae ทั่วโลกมีแมลงหวี่ขาวที่จำแนกไว้แล้ว 166 สกุล จำนวน 1,556 ชนิด (Martin, 2007) แมลงหวี่ขาวมีเขตการแพร่กระจายได้ทั่วโลกและพบมากในประเทศเขตร้อนและกึ่งร้อน สำหรับประเทศไทย Mound and Halsey (1978) ได้รายงานชนิดแมลงหวี่ขาวที่เป็นศัตรูพืชมีไม่น้อยกว่า 50 ชนิด Hutacharern *et al*. (2007) รวบรวมรายชื่อแมลงหวี่ขาวที่พบในประเทศไทยมีจำนวน 93 ชนิด สมชัย (2550) รายงานชนิดแมลงหวี่ขาวศัตรูพืชในประเทศไทยไว้ 9 ชนิด โดยทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจะดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพืชแล้วถ่ายมูลเหนียวที่เป็นน้ำหวานออกมาตามส่วนต่าง ๆ ของพืชที่อาศัย ซึ่งมูลเหนียวนี้เป็นอาหารของเชื้อรา หากมีการถ่ายมูลหวานในปริมาณมากใบพืชจะถูกปกคลุมไปด้วยเชื้อราดำจนพืชไม่สามสามารถสังเคราะห์แสงได้ ทำให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตลดลง แมลงหวี่ขาวชนิดที่เป็นศัตรูพืชสำคัญได้แก่ แมลงหวี่ขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius) มีการระบาดรุนแรงและแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปทั่วโลก (De Barro, 1995) อาศัยอยู่กับพืชได้หลายชนิด (polyphagous) เช่น พืชวงศ์มะเขือ พืชวงศ์ถั่ว พืชวงศ์แตง กระเพรา โหระพา แมงลัก ผักชีฝรั่ง ฝ้าย มันสำปะหลัง และพืชสวนประดับอีกจำนวนมาก (Byrne *et al*., 1990; กรรณิการ์และคณะ, 2554; สุนัดดาและคณะ, 2556) แมลงหวี่ขาวใยเกลียว *Aleurodicus disperses* Russell พบมีพืชอาหารมากกว่า 43 ชนิด และได้รายงานในพืชผักสวนครัว ได้แก่ พืชวงศ์แตง วงศ์ถั่ว กระเจี๊ยบ ชะพลู ตำลึง แตงกวาถั่วฝักยาว ถั่วพู พริก มะเขือ มะเขือม่วง CPC (2007) รายงาน ว่าแมลงหวี่ขาวใยเกลียว เป็นศัตรูสำคัญของ กระเจี๊ยบ ถั่วลิสง พืชตระกูลกะหล่ำ ถั่วมะแฮะ พริกหยวก พืชวงศ์แตง พืชตระกูลถั่ว และพืชวงศ์ แม้ยามอาหารขาดแคลนแมลงหวี่ขาวยังสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ แมลงหวี่ขาวยาสูบ มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในทวีปแอฟริกา ยุโรป และอเมริกา ซึ่งคาดว่าเกิดจากการติดไปกับสินค้าเกษตร (Cock, 1986) แมลงหวี่ขาวสามารถขยายพันธุ์ได้ 11-15 รุ่นต่อปีภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (Avidov, 1956) และเพศเมียหนึ่งตัวสามารถวางไข่ได้ 100-300 ฟอง ตลอดวงจรชีวิตจะอยู่ได้ประมาณ 3-6 สัปดาห์ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้แมลงหวี่ขาวสามารถเพิ่มปริมาณและแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว (Azab *et al*., 1971; Bethke *et al*., 1991) ปัญหาการระบาดของแมลงหวี่ขาวยาสูบจึงมีรายงานอย่างต่อเนื่อง

แมลงหวี่ขาวนอกจากเป็นแมลงศัตรูพืชแล้วยังเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *Begomovirus Geminivirus Carlavirus Nepovirus Potyvirus* และ *Closterovirus* (Byrne *et al*., 1990) แมลงหวี่ขาวยาสูบนี้มีความซับซ้อนทางพันธุกรรมสูง (species complex) ดังจะเห็นได้จากในยุคแรกมีการจำแนก

แมลงหวี่ขาวยาสูบ ออกเป็น 18 ชนิดด้วยกัน โดยใช้ความเพียงแตกต่างของรูปร่างลักษณะของดักแด้ที่สำรวจได้จากพืชอาหารต่างชนิดกัน ซึ่งการจำแนกในลักษณะดังกล่าวมีข้อจำกัดอยู่มากเนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับการปรับตัวของแมลงหวี่ขาวให้มีความเฉพาะเจาะจงกับพืชอาหารหรือสภาพแวดล้อม (Gill, 1992; Mound and Halsey, 1978; Russel, 1958; De Barro *et al*., 2005; Perring, 2001) แต่ในภายหลังได้มีการศึกษาโครงสร้างอย่างละเอียดจึงได้ยุบรวมเป็นชนิดเดียว คือ *B. tabaci* (Costa *et al*., 1993; Brown, 1994) แสดงให้เห็นว่าแมลงหวี่ขาวชนิดนี้ยากที่จะใช้เพียง ลักษณะสัณฐานภายนอกมาเป็นตัวจัดจำแนกในระดับ species และ biotype ซึ่งความผันแปรทางพันธุกรรมของแมลงหวี่ขาวมีผลต่อความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสได้ต่างกันด้วย (Bedford *et al*., 1992, 1994) ตัวอย่างเช่น พบว่าแมลงหวี่ขาวยาสูบเป็นพาหะของเชื้อไวรัสใบหด (tabacco leaf curl virus) ซึ่งเป็นโรคสำคัญของยาสูบเป็นศัตรูพืชของแมลงหวี่ขาว (สิริวัฒน์, 2526; Ohno, 1992; ปิยรัตน์และคณะ, 2542; สมศักดิ์และคณะ, 2554)

การศึกษาอนุกรมวิธานและชีววิทยาของแมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัวเพื่อการส่งออก จะทำให้ประเทศไทยมีฐานข้อมูลแมลงหวี่ขาวศัตรูพืชผักสวนครัว ซึ่งเป็นข้อมูลประกอบในการปรับปรุงกระบวนการผลิตสินค้าให้ได้คุณภาพตามมาตรฐานปราศจากการปนเปื้อนของแมลงศัตรูพืช เป็นที่ยอมรับของสหภาพยุโรปและประเทศคู่ค้าอื่นๆ นอกจากนี้ยังเป็นการเตรียมความพร้อมในการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืชของประเทศไทย เพื่อนำมาใช้เป็นมาตรฐานในการนำเข้าและส่งออกผลผลิตทางการเกษตร รองรับการเปิดเสรีทางการค้าระหว่างประเทศสมาชิกประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน (AEC) ที่จะเกิดขึ้นในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1) ตัวอย่างแมลงหวี่ขาวที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืชผักสวนครัวทั่วประเทไทย

2) อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ขวดดองแมลงซึ่งบรรจุแอลกอฮอล์ 80% ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง ถังรักษาความเย็น และเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)

3) อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ potassium hydroxide 10 %, alcohol 70-95 %, aetic acid gacial, Chloral-phenol, ammonia solution, hydrogen peroxide, acid fuchsin strain, clove oil และ canada balsam บีคเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร แผ่นสไลด์แก้วและแผ่นแก้วปิดสไลด์ ตู้อบสไลด์ถาวร

4) กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereomicroscope ,compound microscope และกล้องถ่ายภาพ

5) อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา roting และกระดาษไขเขียนแบบ

6) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของแมลงหวี่ขาววิธีปฏิบัติการทดลอง

วิธีการ

1) กำหนดพื้นที่การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงหวี่ขาวจากแหล่งปลูกพืชผักสวนครัว (5 กลุ่ม 16 ชนิด ได้แก่ กะเพรา โหระพา แมงลัก ยี่หร่า พริกหยวก พริกชี้ฟ้า พริกขี้หนู มะเขือเปราะ มะเขือยาว มะเขือม่วง มะเขือ

สำนักวิชาการเกษตร

เหลือง มะเขือขาว มะเขือขื่น มะระจีน มะระขี้นก และผักชีฝรั่ง) รวมถึงพืชผักสวนครัวชนิดอื่นที่มีศักยภาพในการส่งออก ทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยแบ่งขอบเขตการสำรวจตามภูมิภาคของประเทศไทย ดังนี้

ปีที่ 1 เก็บรวบรวมตัวอย่าง จากภาคเหนือและภาคกลาง

ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ น่าน พะเยา แพร่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง ลำพูน อุตรดิตถ์

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

ปีที่ 2 เก็บรวบรวมตัวอย่าง จากภาคตะวันออกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ตราด ปราจีนบุรี ระยอง สระแก้ว

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัด ขอนแก่น นครพนม นครราชสีมา สกลนคร สุรินทร์ ศรีสะเกส หนองคาย อุดรธานี อุบลราชธานี

ปีที่ 3 เก็บรวบรวมตัวอย่าง จากภาคใต้และภาคตะตก

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

ภาคตะตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ตาก ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี ราชบุรี

2) เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงหวี่ขาว ระยะตัวอ่อน ดักแด้ หรือตัวเต็มวัยจากใบพืช นำตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้พร้อมพืชอาศัยห่อกระดาษแล้วนำใส่ถุงพลาสติก กล่องพลาสติก หรือถุงสีน้ำตาลเพื่อรักษาความชื้นของพืช หากตัวอย่างแมลงหวี่ขาวที่รวบรวมได้อยู่ในระยะตัวอ่อน ต้องนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนเป็นดักแด้ บันทึกข้อมูลเบื้องต้น เช่น พืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่ พิกัดภูมิศาสตร์ และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง

3) นำตัวอย่างดักแด้และตัวเต็มวัยแมลงหวี่ขาวที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาด รูปร่าง ลักษณะ สี ฯลฯ และทำสไลด์ถาวร ตามวิธีการของ Martin (1985)

4) จำแนกชนิดใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound ตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดของแมลงหวี่ขาวตามแนวทางการวินิจฉัยของ Martin (1985) Martin และคณะ (2007) Mound และคณะ (1978) ลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกชนิดได้แก่ ขนและหนาม (setae & spine) ขอบลำตัว (margin) อวัยวะที่ใช้ในการขับไข เช่น ช่องเปิดชนิดต่างๆ (pores) vesiform orifice lingula และ operculum เป็นต้น

5) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษา โดยนำตัวอย่างแมลงหวี่ขาวพร้อมตัวอย่างพืชที่มีดักแด้เกาะอยู่และสไลด์ถาวรที่ทำเสร็จแล้ว เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล เพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

- การบันทึกข้อมูล

1. ข้อมูลชนิดของแมลงหวี่ขาว ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิด
2. ข้อมูลพืชอาหาร
3. ข้อมูลเขตการแพร่กระจาย

กรมวิชาการเกษตร

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2564

สถาณที่ แหล่งปลูกพืชทั้งพื้นที่เกษตรและพื้นที่ป่า โดยเน้นพื้นที่ปลูกพืชผักสวนครัว และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตวิทยาสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการสำรวจชนิดของแมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัวเพื่อการส่งออกของประเทศไทย จำนวน 16 ชนิดพืช ได้แก่ กะเพรา โหระพา แมงลัก ยี่หร่า พริกหยวก พริกชี้ฟ้า พริกขี้หนู มะเขือเปราะ มะเขือยาว มะเขือม่วง มะเขือเหลือง มะเขือขาว มะเขือขื่น มะระจีน มะระขี้นก และผักชีฝรั่ง ใน 51 จังหวัด ได้แก่ กระบี่ กาญจนบุรี ขอนแก่น จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ชัยนาท ชุมพร เชียงรายเชียงใหม่ ตรัง ตราดตาก นครปฐม นครพนม นครราชสีมา นครศรีธรรมราช นนทบุรี น่าน ประจวบคีรีขันธ์ปราจีนบุรี พระนครศรีอยุธยา พะเยา พังงา พัทลุง พิจิตร เพชรบุรี เพชรบูรณ์ แพร่ ภูเก็ต แม่ฮ่องสอน ระนอง ระยอง ราชบุรี ลำปาง ลำพูน ศรีสะเกส สกลนคร สงขลา สระแก้วสิงห์บุรี สุโขทัย สุพรรณบุรี สุราษฎร์ธานีสุรินทร์ หนองคาย อ่างทอง อุดรธานี อุตรดิตถ์ อุทัยธานี และอุบลราชธานี จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดักแด้ จำนวน 1,605 ตัวอย่าง ได้ 3 ชนิด ได้แก่ *Bemisia tabaci* จำนวน 1,057 ตัวอย่าง *Aleurodicus disperses* จำนวน 106 ตัวอย่าง และ *Trialeurodes vaporariorum* จำนวน 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 66.85, 33.40 และ 0.75 ตามลำดับ โดยมีรายละเอียดดังนี้

แนวทางการวินิจฉัยชนิดแมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัว

1 - ไม่พบช่องเปิดขนาดใหญ่บนลำตัว (compound pores) แต่อาจมีช่องเปิดแบบ simple pores ขนาดใหญ่กระจายทั่วตัว lingual มีหลายขนาด มักอยู่ด้านใน vasiform orifice (ภาพที่ 1,3) 2

- มีช่องเปิดขนาดใหญ่บนลำตัว (compound pores) บริเวณอก 1 คู่ และที่ปล้องท้อง 4 คู่ ตั้งอยู่ที่ท้องปล้องที่ 3 ถึง 6 แต่ละช่องเปิดมีขนาดใกล้เคียงกัน vasiform orifice มีขนาดใหญ่รูปร่างคล้ายหัวใจ โดยส่วนปลายลิ้นมีขนแข็ง 4 เส้น (ภาพที่ 2) ..... *Aleurodicus disperse*

2 - ช่องเปิดแบบขนาดใหญ่ (simple pore) 4 คู่ โดยพบที่ส่วนหัว 1 คู่ อกปล้องแรก 1 คู่ และที่ส่วนท้องระหว่างปล้องท้อง 2 คู่ ลำตัวกลมมน ขอบลำตัวมีตุ่มขนาดเล็กมีรูปร่างคล้ายกรวย (papillae) เรียงรอบลำตัว ปลายของ lingual ขยายใหญ่และหยัก ..... *Trialeurodes vaporariorum*

- ลำตัวส่วนหัวโค้งมน ท้ายเรียว lingual ยาวกว่า vesiform รอยย่นที่ท้ายลำตัวมีขนาดเล็ก มีขนหนึ่งคู่ที่ท้ายลำตัว ..... *Bemisia tabaci*

ศรีวิชาการเกษตร

แมลงหวี่ขาวยาสูบ

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

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889)

ชื่อพ้อง -

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Bemisia tuberculata Bondar, 1923: 123. Brazil

กรมวิชาการเกษตร

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะที่พบในธรรมชาติ (ภาพที่ 1.1.16.1 ก-ง)

วางไข่ด้านล่างของใบไม้เป็นฟองเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มไม่แน่นอน ไข่มีรูปร่างยาวเรียว มีขนาดเล็กกว่า 0.2 มิลลิเมตร และมีก้านสั้นๆ ยึดไข่ให้ติดกับผิวใบ หลังจากนั้นไข่จะเริ่มเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีน้ำตาล ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนภายใน 6-7 วัน ตัวอ่อนระยะนี้เรียกว่า “Crawler”เมื่อฟักออกมาจะเคลื่อนไหวเพียงเล็กน้อยเพื่อหาบริเวณที่เป็นแหล่งอาหาร และเมื่อหยุดนิ่งจะใช้ปากที่มีลักษณะคล้ายเข็ม (needle-like form) ดูดน้ำเลี้ยงจากพืช จากนั้นตัวอ่อนจะลอกคราบครั้งแรกเข้าสู่ระยะที่ 2 ขายังพัฒนาไม่เต็มที่ ลอกคราบครั้งที่ 2 เพื่อเข้าสู่ระยะที่ 3 ตัวอ่อนจะมีขนาด 0.4-0.8 มิลลิเมตร ลอกคราบครั้งที่ 3 ตัวอ่อนจะมีลักษณะแบนราบติดกับผิวใบ สีเหลืองอมเขียวใส สามารถมองเห็นส่วนต่างๆ ที่อยู่ภายในได้ รวมระยะเป็นตัวอ่อนประมาณ 9 วัน หลังจากลอกคราบครั้งที่ 4 ตัวอ่อนจะมีลักษณะตัวนูนสีเหลืองเข้มขึ้น เรียกว่าระยะก่อนเข้าดักแด้ สังเกตความแตกต่างของระยะก่อนเข้าดักแด้กับระยะเข้าดักแด้โดยระยะเข้าดักแด้จะมีตารวมสีแดง เรียกว่า “red-eyed nymph” ปรากฏให้เห็นชัดเจนและตัวจะนูนมากขึ้น ระยะตัวเต็มวัย ตัวยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร ปีกปกคลุมด้วยผงสีขาว เพศเมียสามารถวางไข่ได้มากกว่า 100 ฟองและมีอายุเฉลี่ย 6.11 วัน ส่วนเพศผู้มีอายุเฉลี่ย 3.35 วัน

ลักษณะดักแด้บนแผ่นสไลด์ (ภาพที่ 1.1.16.3)

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

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา : ตารางที่ 1.1.16.1

ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย : พบอาศัยดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณใต้ใบพืช

พืชอาหารจากการศึกษาครั้งนี้ : กะเพรา โหระพา แมงลัก ยี่หร่า พริกหยวก พริกชี้ฟ้า พริกขี้หนู มะเขือเปราะ มะเขือยาว มะเขือม่วง มะเขือเหลือง มะเขือขาว มะเขือขื่น มะระจีน มะระขี้นก และผักชีฝรั่ง (ตารางที่ 2)

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

เขตการแพร่กระจาย ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ น่าน พะเยา แพร่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง ลำพูน อุตรดิตถ์ นครปฐม นนทบุรี พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี สิงห์บุรี ชัยนาท พิจิตร เพชรบูรณ์ สุโขทัย อ่างทอง อุทัยธานี

กรมวิชาการเกษตร

จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ตราด ปราจีนบุรี ระยอง สระแก้ว ขอนแก่น นครพนม นครราชสีมา สกลนคร สุรินทร์ ศรีสะเกส หนองคาย อุดรธานี อุบลราชธานี กระบี่ ชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช พังงา พัทลุง ภูเก็ต ระนอง สงขลา สุราษฎร์ธานี กาญจนบุรี ตาก ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี และราชบุรี และจากรายงานของ Mound & Halsey (1978) พบว่า แมลงหวี่ขาวชนิดนี้มีการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในหลายประเทศ เช่น แถบภูมิภาคพาเลอาคติก –อังกฤษ สเปน โมร็อกโค อียิปต์ ไซปรัส อิสราเอล จอร์แดน ซาอุดิอาราเบีย อิหร่าน รัสเซีย และญี่ปุ่น แถบภูมิภาคเอธิโอเปีย – แกมเบีย ไอเวอรี่ กานา คาเมรูน ซูดาน เอเดน คองโก เคนยา แทนซาเนีย ยูกานดา และแองโกลา แถบภูมิภาคมาดากัสแคน- มาดากัสการ์ เมอร์ริเชียส แถบภูมิภาคโอเรียนตอล – ปากีสถาน อินเดีย จีน ไต้หวัน พม่า ศรีลังกา และไทย แถบภูมิภาคออสโต-โอเรียนตอล –มาเลเซีย สิงคโปร์ เกาะสุมาตรา อินโดนีเซีย นิวกีนี และฟิลิปปินส์ แถบภูมิภาคออสเตรลาเซียน – ออสเตรเลีย แถบภูมิภาคแปซิฟิก- ฟิจิ แถบภูมิภาคนีอาร์กติก – สหรัฐอเมริกา แถบภูมิภาคนีโอโทรปิคอล–จาไมก้า บาบาโดส เปอโตริโก้ บราซิล และอาเจนตินา

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

แมลงหวี่ขาวใยเกลียว
(Spiralling Whitefly)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Aleurodicus dispersus* Russell

ชื่อพ้อง -

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะที่พบในธรรมชาติ (ภาพที่ 1.1.16.1 จ-ฉ)

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

ลักษณะบนแผ่นสไลด์ (ภาพที่ 1.1.16.2)

กรมวิชาการเกษตร

ดักแด้ลักษณะโค้งมนเป็นรูปไข่ พบรูประกอบจำนวน 5 คู่ มีขนาดใกล้เคียงกัน โดยพบที่ส่วนหัว 1 คู่ และส่วนท้องระหว่างปล้องท้องที่ 3 ถึงปล้องท้องที่ 6 จำนวน 4 คู่ และพบรูธรรมดาหลายๆขนาดกระจายอยู่ทั่วลำตัว บริเวณขอบลำตัวพบขนแข็งขนาดเล็กรอบลำตัว 12 คู่ รูเปิดที่ vasiform orifice มีรูปร่างคล้ายหัวใจโดยมีลิ้นขนาดใหญ่มองเห็นได้ชัดเจน ที่ส่วนปลายลิ้นพบขนแข็ง 4 เส้น ที่ฝาปิด จะมีขนขนาดเล็ก 2 เส้น

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ตารางที่ 1.1.16.1

ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย : พบอาศัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะบริเวณ ใต้ใบพืช

พืชอาหารจากการศึกษาครั้งนี้ : กะเพรา โหระพา แมงลัก ยี่หร่า พริกหยวก พริกชี้ฟ้า พริกขี้หนู มะเขือเปราะ มะเขือยาว มะเขือม่วง มะเขือเหลือง มะเขือขาว มะเขือขื่น มะระจีน มะระขี้นก และผักชีฝรั่ง (ตารางที่ 2)

พืชอาหารอื่น : โกโก้ กล้วย กระเจี๊ยบ กระท้อน กระดังงา ขี้เหล็ก คริสมาสขาว คริสมาส ชะพลู ชมพู่น้ำดอกไม้ ตดหมูตดหมา ตำลึง ถั่วฝักยาว ถั่วพู น้ำนมราชสีห์ น้อยหน่า บัว ปาล์ม ผักแพรว ฝรั่ง พุดตาน พุทรา มะขามเทศ มันสำปะหลัง มะละกอ มะลิ เมเปิ้ล ยางพารา ลีลาวดี ละหุ่ง วัชพืช สตรังค์ หูปลาช่อน องุ่น แอปเปิ้ล อะโวคาโด และอ้อย

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

แมลงหวี่ขาวในโรงเรือน (Greenhouse Whitefly)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856)

ชื่อพ้อง

Aleurodes vaporariorum Westwood, 1856, p852

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

กรมวิชาการเกษตร

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะที่พบในธรรมชาติ (ภาพที่ 1.1.16.1 ช-ฌ)

ตัวอ่อนระยะแรกมีสีเหลืองอ่อน รูปร่างแบน ลำตัวค่อนข้างเรียวยาว มีเส้นแป้งขนาดเล็กและสั้นรอบลำตัว เมื่อเข้าสู่ระยะดักแด้จะมีสีเข้มขึ้นและมีเส้นแป้งรอบลำตัวเช่นกัน ขนาดดักแด้ยาว 0.98 มิลลิเมตร กว้าง 0.60 มิลลิเมตร

ลักษณะดักแด้บนแผ่นสไลด์ (ภาพที่ 1.1.16.4)

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

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา : ตารางที่ 1.1.16.1

ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย : พบอาศัยดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณใต้ใบพืช

พืชอาหารจากการศึกษาครั้งนี้ : ผักชีฝรั่ง โหระพา พริกขี้หนู มะเขือยาว และมะเขือม่วง (ตารางที่ 2)

พืชอาหารอื่น : เมเปิล ขาเขียด ยี่โถ บอนสี เผือก สาบแร้งสาบกา หูปลาช่อน ปืนนกไส้ แอสเตอร์ เบญจมาศ ดอกกระดุม รักเร่ สาบหมา เยอบีร่า ทานตะวัน ผักกาดหอม ผักสลัด สร้อยทอง ผักกาดหอม ดาวเรือง แดนดิไลออน

กรมวิชาการเกษตร

ผักกระชับ บานชื่น แสม เทียน แคป่า หญ้างวงช้าง บัลลูนฟลาวเวอร์ กัญชา สายน้ำผึ้ง มันเทศ มอร์นิ่งกลอรี่ ผักกาด ขี้กาเทศ ฟักทอง แคนตาลูป ฟักทองน้ำเต้า แตงกวา ฟักแม้ว สกุลมะพลับ กุหลาบพันปี หญ้ายาง ละหุ่ง ถั่วเหลือง ถั่วอัลฟัลฟ่า ถั่วแขก โสน ถั่วปากอ้า โอ๊ก พรมกำมะหยี่ ไฮเดรนเจีย แกลดิโอลัส ฤาษีผสม ลาเวนเดอร์ สะระแหน่ ซัลเวีย อาโวคาโด แมกโนเลีย ฮอลลี่ฮ็อค ฝ้าย สกุลชบา พุดตาน ยูคาลิปตัส ฝรั่ง หว้า มะลิ มะกอกโคมญี่ปุ่น ผีเสื้อราตรี สกุลกะทกรก พริกไทย มะเดื่อ พวงแก้วกุดั่น สตรอเบอร์รี่ พรุน แพร์ กุหลาบ ผกากรอง พุดน้ำบุษย์ สกุลส้ม ตุ่มเงินตุ่มทอง ตำเสาหนู มังกร ถุงมือจิ้งจอก ข้าวเย็น พุดสามสี พุดสีดา ลำโพง สกุลมะเขือเทศ ยาสูบเล็ก ยาสูบ มันฝรั่ง พุฒตาล ผกากรอง เวอร์บีน่า และปรง

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

สถานะศัตรูพืช

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

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการสำรวจชนิดของแมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัวเพื่อการส่งออกของประเทศไทย จำนวน 16 ชนิดพืช ได้แก่ กะเพรา โหระพา แมงลัก ยี่หร่า พริกหยวก พริกชี้ฟ้า พริกขี้หนู มะเขือเปราะ มะเขือยาว มะเขือม่วง มะเขือเหลือง มะเขือขาว มะเขือขื่น มะระจีน มะระขี้นก และผักชีฝรั่ง ใน 51 จังหวัด ได้แก่ กระบี่ กาญจนบุรี ขอนแก่น จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ชัยนาท ชุมพร เชียงรายเชียงใหม่ ตรัง ตราดตาก นครปฐม นครพนม นครราชสีมา นครศรีธรรมราช นนทบุรี น่าน ประจวบคีรีขันธ์ปราจีนบุรี พระนครศรีอยุธยา พะเยา พังงา พัทลุง พิจิตร เพชรบุรี เพชรบูรณ์ แพร่ ภูเก็ต แม่ฮ่องสอน ระนอง ระยอง ราชบุรี ลำปาง ลำพูน ศรีสะเกส สกลนคร สงขลา สระแก้วสิงห์บุรี สุโขทัย สุพรรณบุรี สุราษฎร์ธานีสุรินทร์ หนองคาย อ่างทอง อุดรธานี อุตรดิตถ์ อุทัยธานี และอุบลราชธานี จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดักแด้ จำนวน 1,605 ตัวอย่าง ได้ 3 ชนิด ได้แก่ *Bemisia tabaci* จำนวน 1,057 ตัวอย่าง *Aleurodicus disperses* จำนวน 106 ตัวอย่าง และ *Trialeurodes*

กรมวิชาการเกษตร

vaporariorum จำนวน 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 66.85, 33.40 และ 0.75 ตามลำดับ ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อเตรียมจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชของประเทศไทย

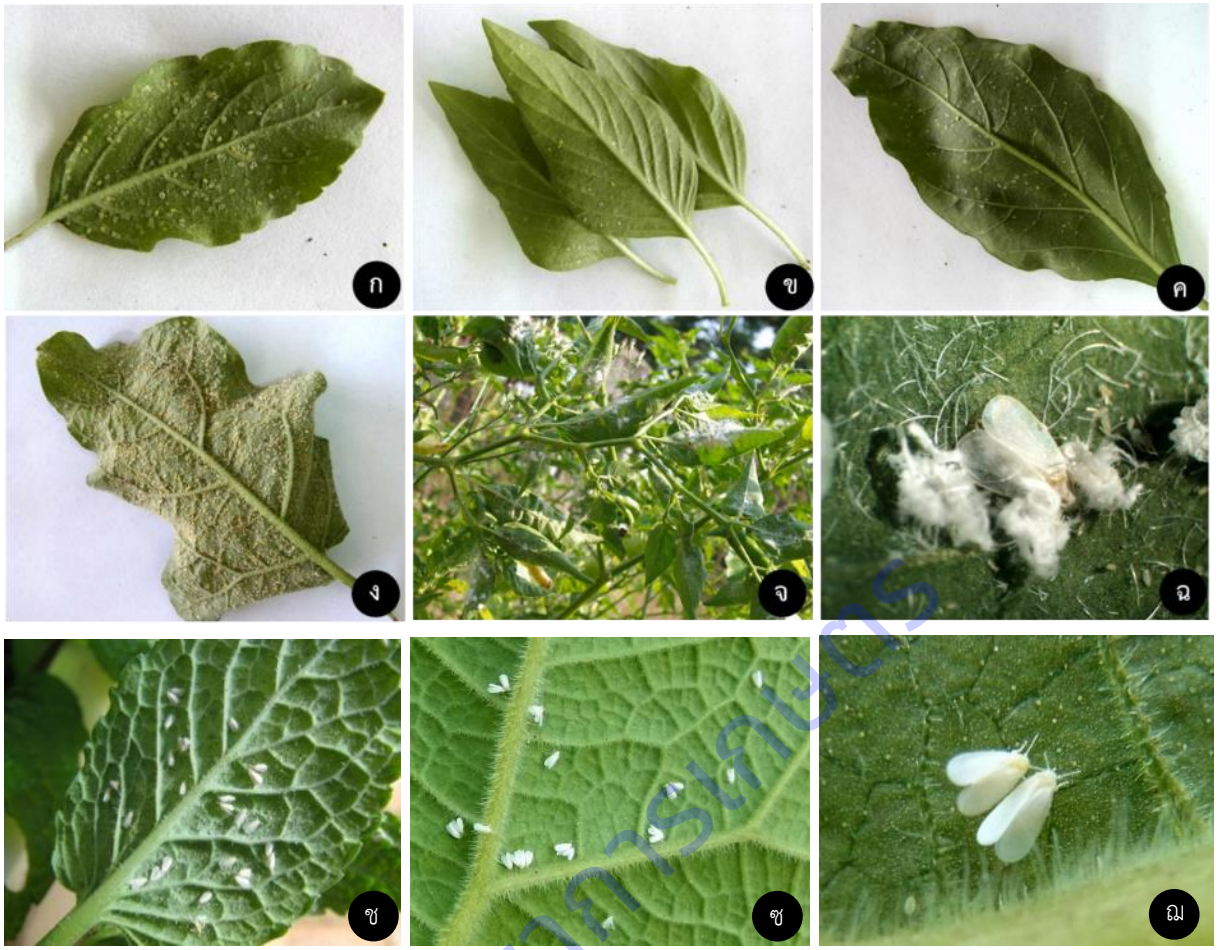
การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1) ตัวอย่างและข้อมูลแมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัว ทั้งหมดที่ได้ศึกษาแล้วนำจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เพื่อเป็นแหล่งสืบค้น อ้างอิง สำหรับนักวิชาการ นักวิจัย นิสิต นักศึกษา เกษตรกร ฯลฯ

2) จัดทำเอกสารรายงานผลการวิจัยซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการกำหนดวิธีการป้องกันกำจัดได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม รวมทั้งข้อมูลสำคัญในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในการเจรจาการค้านำเข้า-ส่งออกของผลผลิตการเกษตร เพื่อเผยแพร่แก่หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

3) นำผลงานที่วิจัยได้รวมกับผลงานด้านอนุกรมวิธานแมลงอื่นๆ เพื่อจัดทำเอกสารด้านอนุกรมวิธานแมลงเพื่อใช้ในการฝึกอบรม และให้ความรู้แก่นักวิชาการจากหน่วยงานต่าง ๆ ทั้งภาครัฐและเอกชน ตลอดจนเกษตรกรและนิสิต นักศึกษา

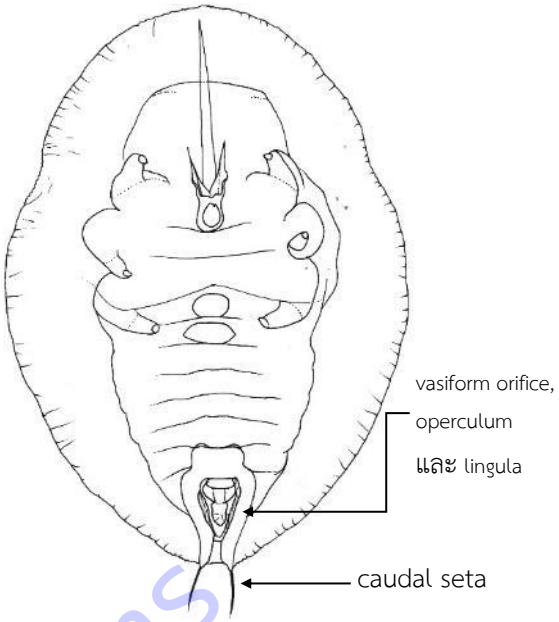
กรมวิชาการเกษตร



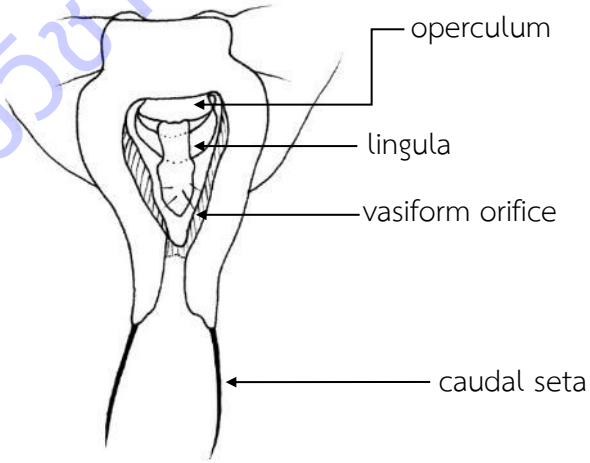
ภาพที่ 1.1.16.1 แมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัว ก-ง) แมลงหวี่ขาว *Bemisia tabaci* จ-ฉ) แมลงหวี่ขาว *Aleurodicus dispersus* ช-ฌ) แมลงหวี่ขาว *Trialeurodes vaporariorum*

กรมวิชาการเกษตร

ก



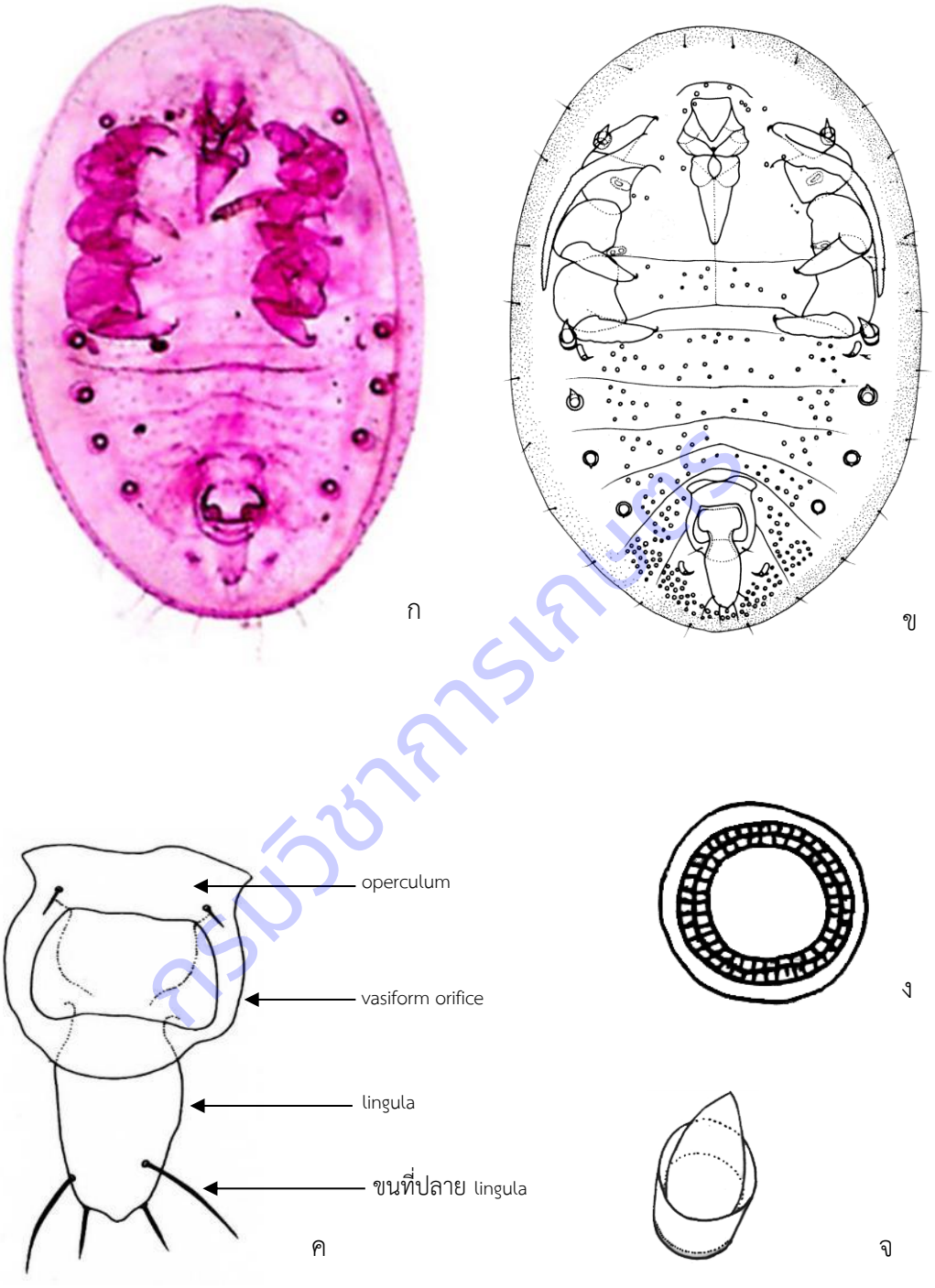
ข



ค

กรมวิชาการเกษตร

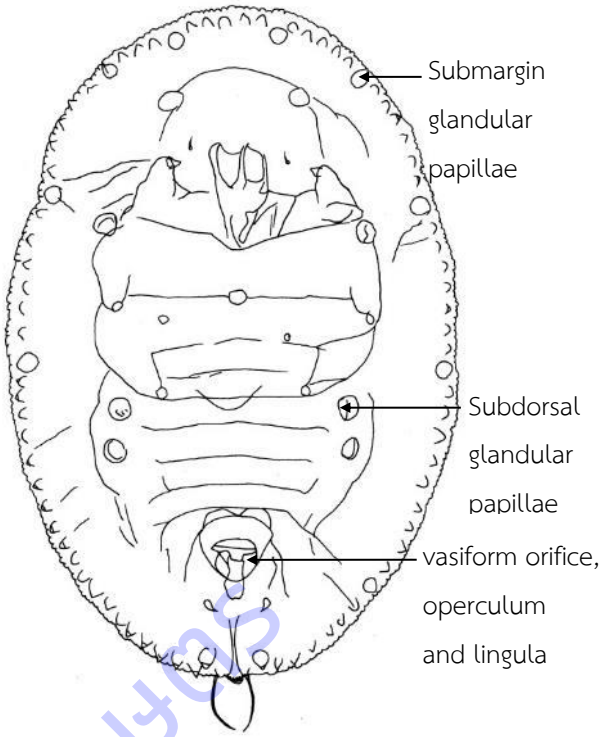
ภาพที่ 1.1.16.2 ลักษณะดักแด้ของแมลงหวี่ขาวยาสูบ; *Bemisia tabaci* (Gennadius)
ก) ลักษณะดักแด้บนสไลด์ ข) ลักษณะลายเส้นของดักแด้ ค) vasiform orifice, operculum



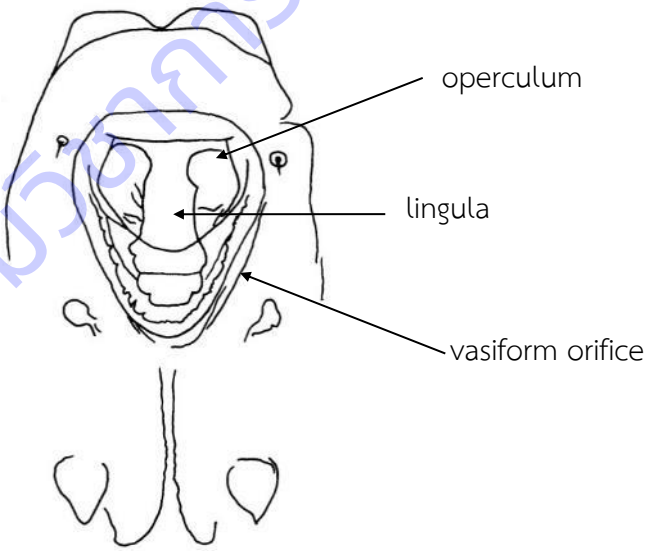
ภาพที่ 1.1.16.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงหวี่ขาวใยเกลียว; *Aleurodicus disperses* Russell, 1965 ก) ลักษณะดักแด้บนสไลด์ ข) ลักษณะลายเส้นของดักแด้ ค) vasiform orifice, operculum และ lingual ง) ลักษณะของ compound pore จ) ลักษณะด้านในของ compound pore

สงวนวิชาการเกษตร

ก



ข



ค

ภาพที่ 1.1.16.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาดักแด้ของ *Trialeurodes vaporariorum* Westwood
ก) ลักษณะดักแด้บนสไลด์ ข) ลักษณะลายเส้นของดักแด้ ค). vasiform orifice, operculum

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.1.16.1 แสดงเขตการแพร่กระจายของแมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัวในประเทศไทย

จังหวัด	อำเภอ	Lat	Long	*B. tabaci*	*A. disperses*	*T. vaporariorum*
เชียงราย	เชียงแสน	20.408557	99.998144	/	/	-
	เมือง	19.632623	98.965825	/	/	-
	แม่จัน	20.161134	99.868607	/	/	-
เชียงใหม่	สันทราย	18.917546	99.072851	/	/	-
	แม่ริม	18.898965	98.860518	/	/	-
	เชียงดาว	19.417649	98.979993	/	/	-
น่าน	เมือง	18.694500	100.741990	/	/	-
	เวียงสา	18.544338	100.694311	/	/	-
	เมือง	18.803530	100.703155	/	/	-
พะเยา	เมือง	19.031023	99.950381	/	/	-
	ดอกคำใต้	19.015773	100.072082	/	/	-
	ปง	19.354712	100.475310	/	/	-
แพร่	เด่นชัย	18.240295	99.592571	/	/	-
	สอง	18.407163	100.207805	/	/	-
	สอง	18.415855	100.108833	/	/	-
แม่ฮ่องสอน	เมือง	19.578607	97.999687	/	/	-
	ปาย	19.296539	98.464105	/	/	-
	สบเมย	18.048182	97.917545	/	/	-
ลำปาง	เมือง	18.317324	99.472996	/	/	-
	แม่เมาะ	18.252443	99.640344	/	/	-
	แม่พริก	17.561960	99.004393	/	/	-
ลำพูน	เมือง	18.628437	99.037378	/	/	-
	เมือง	18.589291	99.079357	/	/	-
	เมือง	18.626317	99.045488	/	/	-
อุตรดิตถ์	เมือง	17.550053	100.089750	/	/	-
	ลับแล	17.720093	99.986752	/	/	-
	ท่าปลา	17.801833	100.380200	/	/	-
นครปฐม	เมือง	13.885197	99.933288	/	/	-
	นครชัยศรี	13.828169	100.210385	/	/	-
	กำแพงแสน	13.956149	99.959073	/	/	-
นนทบุรี	บางบัวทอง	13.910058	100.389636	/	/	-
	เมือง	13.872398	100.467227	/	/	-
	บางบัวทอง	13.883730	100.436672	/	/	-
พระนครศรีอยุธยา	ผักไห่	14.489443	100.311912	/	/	-
	บางบาน	14.444232	100.494560	/	/	-

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.1.16.1 (ต่อ)

จังหวัด	อำเภอ	Lat	Long	*B. tabaci*	*A. disperses*	*T. vaporariorum*
	บางปะหัน	14.480396	100.508058	/	/	-
สุพรรณบุรี	หนองหญ้าไซ	14.813721	99.892470	/	/	-
	ศรีประจันต์	14.634087	100.084729	/	/	-
	อู่ทอง	14.444997	99.892467	/	/	-
สิงห์บุรี	เมือง	14.938610	100.410990	/	/	-
	เมือง	14.889510	100.360178	/	/	-
	อินทร์บุรี	14.944451	100.361260	/	/	-
ชัยนาท	หันคา	15.094859	100.051389	/	/	-
	เนินขาม	**15.041153**	**99.793210**	/	/	-
	สรรคบุรี	15.067013	100.100827	/	/	-
พิจิตร	โพธิ์ประทับช้าง	16.311928	100.293669	/	/	-
	วชิรบารมี	16.518746	100.040984	/	/	-
	ตะพานหิน	16.252241	100.420010	/	/	-
เพชรบูรณ์	ชนแดน	16.059098	100.947436	/	/	-
	วิเชียรบุรี	15.694529	101.235827	/	/	-
	ศรีเทพ	15.366133	101.196216	/	/	-
สุโขทัย	เมือง	17.115377	99.701269	/	/	-
	ศรีสำโรง	17.133751	99.934729	/	/	-
	สวรรคโลก	17.446904	99.931976	/	/	-
อ่างทอง	วิเศษชัยชาญ	14.494761	100.307792	/	/	-
	โพธิ์ทอง	14.678167	100.370964	/	/	-
	สามโก้	14°38'59.8	100.274832	/	/	-
อุทัยธานี	หนองฉาง	15.375029	99.826748	/	/	-
	แม่เปิน	15.584138	99.457333	/	/	-
	บ้านไร่	15.088819	99.495785	/	/	-
จันทบุรี	นายายอาม	12.777987	101.866951	/	/	-
	แก่งหางแมว	13.117541	101.850635	/	/	-
	นายายอาม	12.685852	101.939941	/	/	-
ฉะเชิงเทรา	พนมสารคาม	13.791774	101.424747	/	/	-
	พนมสารคาม	13.791305	101.425240	/	/	-
	เมือง	13.723418	101.066737	/	/	-
ชลบุรี	พนัสนิคม	13.515350	101.301706	/	/	-
	บางละมุง	12.951081	100.961914	/	/	-

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.1.16.1 (ต่อ)

จังหวัด	อำเภอ	Lat	Long	*B. tabaci*	*A. disperses*	*T. vaporariorum*
	บางละมุง	12.950245	100.962043	/	/	-
ตราด	เมือง	12.378237	102.520809	/	/	-
	ตราด	12.167012	102.535933	/	/	-
	เขาสมิง	12.285216	102.400799	/	/	-
ปราจีนบุรี	เมือง	14.174092	101.435803	/	/	-
	นาดี	14.118162	101.820324	/	/	-
	เมือง	14.162108	101.445416	/	/	-
ระยอง	แกลง	12.840590	101.676750	/	/	-
	เขาชะเมา	12.856657	101.731682	/	/	-
	ปลวกแดง	12.932280	101.198821	/	/	-
สระแก้ว	อรัญประเทศ	13.756847	102.585073	/	/	-
	เขาฉกรรจ์	13.669811	102.090687	/	/	-
	วังน้ำเย็น	13.501618	102.002796	/	/	-
ขอนแก่น	กระนวน	16.657884	103.063882	/	/	-
	เมือง	16.427468	102.813897	/	/	-
	หนองเรือ	16.470445	102.542366	/	/	-
นครพนม	วังยาง	17.080143	104.456251	/	/	-
	เมือง	17.263834	104.763868	/	/	-
	วังยาง	17.052246	104.474221	/	/	-
นครราชสีมา	พระทองคำ	15.352109	102.013253	/	/	-
	ปากช่อง	14.763307	101.447457	/	/	-
	บัวใหญ่	15.653827	102.348336	/	/	-
สกลนคร	เมือง	17.149173	104.037207	/	/	-
	วานรนิวาส	17.700794	103.737829	/	/	-
	อากาศอำนวย	17.575156	104.019354	/	/	-
สุรินทร์	เมือง	14.833728	103.353466	/	/	-
	เมือง	15.019160	103.510020	/	/	-
	โนนนารายณ์	15.237900	103.872569	/	/	-
ศรีสะเกส	ศิลาลาด	15.516358	104.090266	/	/	-
	เบญจลักษ์	14.785983	104.793391	/	/	-
	กันทรลักษ์	14.517515	104.542643	/	/	-
หนองคาย	เมือง	17.730746	102.698009	/	/	-
	เมือง	17.730818	102.697998	/	/	-
	โพนพิสัย	18.107340	103.080918	/	/	-

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.1.16.1 (ต่อ)

จังหวัด	อำเภอ	Lat	Long	*B. tabaci*	*A. disperses*	*T. vaporariorum*
อุดรธานี	เมือง	17.517261	102.710117	/	/	-
	บ้านผือ	17.755452	102.405247	/	/	-
	เพ็ญ	17.655760	102.790743	/	/	-
อุบลราชธานี	เมือง	15.213877	104.809456	/	/	-
	เมือง	15.325161	104.787483	/	/	-
	สิรินธร	15.642788	104.998970	/	/	-
ราชบุรี	ดำเนินสะดวก	14.355778	100.549936	/	/	/
	บางแพ	13.720177	99.905301	/	/	-
	บ้านโป่ง	13.851321	99.81679	/	/	-
	เมือง	13.544948	99.636306	/	/	/
	จอมบึง	13.640232	99.445288	/	/	-
	ท่ายาง	12.827274	99.746484	/	/	-
เพชรบุรี	เมือง	13.084577	99.943735	/	/	-
	บ้านลาด	13.020019	99.867373	/	/	-
	แก่งกระจาน	12.902311	99.65528	/	/	-
	หนองหญ้าปล้อง	13.180495	99.606006	/	/	-
ประจวบคีรีขันธ์	หัวหิน	12.548976	99.902588	/	/	-
	สามร้อยยอด	12.290886	99.977492	/	/	-
	กุยบุรี	12.150977	99.836119	/	/	-
	เมือง	11.972246	99.822807	/	/	-
	บางสะพาน	11.193858	99.363274	/	/	-
	บางสะพานน้อย	11.053871	99.439395	/	/	-
สุราษฎร์ธานี	พนม	8.885676	98.677551	/	/	-
	กาญจนดิษฐ์	9.121728	99.43465	/	/	-
	บ้านนาสาร	8.883959	99.382752	/	/	-
	ท่าชนะ	9.674516	99.111519	/	/	-
	ไชยา	8.584883	99.223688	/	/	-
นครศรีธรรมราช	ปากพนัง	8.291952	100.231997	/	/	-
	พรหมคีรี	8.509863	99.836845	/	/	-
	ลานสกา	8.243443	99.57791	/	/	-
	นาบอน	9.230387	99.854267	/	/	-
	ท่าศาลา	8.67511	99.861092	/	/	-

สำนักวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.1.16.1 (ต่อ)

จังหวัด	อำเภอ	Lat	Long	*B. tabaci*	*A. disperses*	*T. vaporariorum*
พัทลุง	เมือง	7.605892	99.999358	/	/	-
	ป่าพะยอม	7.835705	99.860131	/	/	-
	ควนขนุน	7.739884	100.066234	/	/	-
	ศรีนครินทร์	7.572423	99.947681	/	/	-
	เขาชัยสน	7.396766	100.029921	/	/	-

ตารางที่ 1.1.16.2 แสดงชนิดพืชอาหารของแมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัวในประเทศไทย

พืช	*B.tabaci*	*A. disperses*	*T. vaporariorum*
กะเพรา	/	/	-
ผักชีฝรั่ง	/	/	/
พริกขี้หนู	/	/	/
พริกชี้ฟ้า	/	/	-
พริกหยวก	/	/	-
มะเขือขาว	/	/	-
มะเขือขื่น	/	/	-
มะเขือเปราะ	/	/	-
มะเขือม่วง	/	/	/
มะเขือยาว	/	/	/
มะเขือเหลือง	/	/	-
มะระขี้นก	/	/	-
มะระจีน	/	/	-
แมงลัก	/	/	-
ยี่หร่า	/	/	
โหระพา	/	/	/

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.17 อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ย่อย Diaspidinae (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) ในประเทศไทย

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

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ชมัยพร บัวมาศ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ยุวรินทร์ บุญทบ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	จารุวัตถ์ แต้กุล	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สุนัดดา เชาวลิต	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	อาทิตย์ รักกสิกร	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Diaspidinae ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2564 เพื่อทราบชนิด พืชอาศัย เขตการแพร่กระจายของเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Diaspidinae ที่มีอยู่ในประเทศไทย เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ทั่วทุกภูมิภาคในประเทศ นำตัวอย่างที่รวบรวมได้ทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน จากการตรวจจำแนกชนิดตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ด พบทั้งสิ้น 8 สกุล 14 ชนิด ได้แก่ 1) เพลี้ยหอยเกล็ดขาวมันสำปะหลัง *Aonidomytilus albus* (Cockerell) 2) เพลี้ยหอยเกล็ดกุหลาบ *Aulacaspis rosae* (Bouche') 3)เพลี้ยหอยเกล็ดขาวมะม่วง *Aulacaspis tubercularis* (Newstead) 4) เพลี้ยหอยเกล็ดขาวทุเรียน *Aulacaspis vitis* (Green) 5) เพลี้ยหอยเกล็ดขาว *Aulacaspis* sp. 6) เพลี้ยหอยเกล็ดสับปะรด *Diaspis bromeliae* (Kerner) 7) เพลี้ยหอยเกล็ดยาวส้ม *Lepidosaphes gloverii* (Packard) 8) เพลี้ยหอยเกล็ดยาว *Lepidosaphes* sp. 9) เพลี้ยหอยเกล็ดกลมส้ม *Parlatoria pergandii* (Comstock) 10) เพลี้ยหอยเกล็ดดำมะนาว *Parlatoria ziziphi* (Locau) 11) เพลี้ยหอยเกล็ดเฟิร์น *Pinnaspis aspidiatrae* (Signorest) 12) เพลี้ยหอยเกล็ดขาวฝ้าย *Pinnaspis strachani* (Cooley) 13) เพลี้ยหอยเกล็ดยี่โถ *Pseudaulacaspis* cockerelli (Cooley) 14) เพลี้ยหอยเกล็ดหิมะส้ม *Unaspis citri* (Comstock) ซึ่งได้จัดทำแนวทางการวินิจฉัย พร้อมรายละเอียดของเพลี้ยหอยเกล็ดพร้อมพืชอาหาร โดยตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชในประเทศไทยต่อไป

คำสำคัญ: เพลี้ยหอยเกล็ด อนุกรมวิธาน วงศ์ย่อย Diaspidinae

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

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

Key words: taxonomy, armored scale, Diaspidinae

คำนำ

เพลี้ยหอยเกล็ด (armored scale) จัดอยู่ในวงศ์ Diaspididae สามารถแบ่งออกได้หลายวงศ์ย่อย รวมทั้งวงศ์ย่อย Diaspidinae ทั่วโลกมีรายงานจำนวนชนิดมากถึง 2,413 ชนิด คิดเป็น 1 ใน 3 ของจำนวนชนิดแมลงในวงศ์ใหญ่ Coccoidea (Ben-Dov *et.al*, 2014) ซึ่งแมลงกลุ่มนี้จัดเป็นแมลงปากดูดที่สามารถสร้างความเสียหายให้กับพืชได้หลายชนิด ทั้งพืชสวน และพืชไร่ โดยดูดกินน้ำเลี้ยงจากส่วนต่าง ๆ ของพืช ทำให้บริเวณที่ถูกทำลายมีลักษณะผิดปกติ เช่น ใบเหลือง หงิกงอ ลำต้นคดงอ และบางชนิดเป็นพาหะ (vector) นำโรคมาสู่พืชอาศัยที่แมลงเหล่านี้เข้าทำลายอีกด้วย เพลี้ยหอยเกล็ดในวงศ์ย่อย Diaspidinae มีรายงานในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มากกว่า 17 สกุล 170 ชนิด (Ben-Dov et.al, 2014) เช่น สกุล *Aulacaspis, Unaspis, Pseudaulacaspis, Parlatoria* และ *Pinnaspis* ซึ่งล้วนแต่เป็นศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจ ทั้งไม้ผล พืชไร่ และไม้ดอก สำหรับในประเทศไทยพบเพลี้ยหอยวงศ์ย่อย Diaspidinae เป็นศัตรูที่สำคัญในมะม่วง และพืชตระกูลส้ม (บุปผา และ ชลิดา, 2543) และรายงานไว้เพียง 3 ชนิด ซึ่งเป็นข้อมูลที่ไม่ได้มีการปรับปรุงมากว่า 10 ปี และในปัจจุบันสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปทำให้แมลงศัตรูพืชหลายชนิดมีความสามารถในการปรับตัว และสร้างความเสียหายให้แก่พืชเศรษฐกิจเป็นจำนวนมาก ส่งผลทำให้แมลงศัตรูพืชหลายชนิดมีความสามารถในการปรับตัว และสร้างความเสียหายให้แก่พืชเศรษฐกิจเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้เพลี้ยหอยเกล็ดยังเป็นแมลงที่มีขนาดเล็ก สามารถติดไปกับส่วนต่างๆ ของพืชที่ใช้ในการส่งออกได้ ไม่ว่าจะเป็น ผล ใบ ส่วนต่างๆ ที่ใช้ในการขยายพันธุ์ เช่น หัว หรือเหง้า รวมทั้งส่วนที่ใช้ในการรับประทาน เป็นต้น ซึ่งจะพบว่าความเสียหายจากเพลี้ยหอยเกล็ดนั้นสามารถส่งผลกระทบทั้งด้านปริมาณและคุณภาพของผลผลิต และยังกระทบต่อมาตรการสุขอนามัยในการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรไปยังประเทศคู่ค้าต่างๆ ดังนั้นการศึกษาด้านอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อยนี้ทำให้ทราบชนิด พืชอาหาร เขตกระจาย จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการหาวิธีการป้องกันกำจัดที่ถูกต้องและเหมาะสมต่อไป

สำนักวิชาการเกษตร

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช

2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ขวดดอง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง และถังรักษาความเย็น

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ (alcohol) 50-100% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% กรดไฮโดรคลอริค (hydrochloric acid) กรดแกลเซียลอะซิติก (glacial acetic acid) กรดคาร์บอลิค (carbolic acid) แอซิดฟุชซิน (acid fuchsin) โคล์ฟออย (clove oil) และแคนาดาบัลซัม (Canada balsam) เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องใส่สไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร

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

5. อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา rotting และกระดาษไขเขียนแบบ

6. เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ Diaspididae

- วิธีการ

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

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

3. คัดเลือกเพลี้ยหอยเกล็ดเพศเมีย จากข้อ 2 ไปทำสไลด์ถาวรเพื่อจำแนกชนิด โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 10-20 ตัวอย่างต่อหมายเลข

4. วิธีการทำสไลด์ถาวร

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

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

ศรีวิชัยการเกษตร

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

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

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

5. ตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยหอยเกล็ดบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง สูง โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Williams and Watson (1988) และ Miller and Davidson (1990, 2005) รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างสไลด์เพลี้ยหอยเกล็ดที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร และจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Diaspidinae โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ (Figure 1) ได้แก่ รูปทรงของลำตัว (body) ส่วนท้องตั้งแต่ปล้องที่ 4 ถึงปล้องสุดท้าย (pygidium) บริเวณ pygidium ประกอบด้วยท่อขนาดใหญ่ โดยส่วนด้านบนของท่อมีแถบ 2 ชั้นปิดอยู่ (2-barred macroduct/ pararell bar) และบริเวณส่วนปลายของ pygidium ส่วนใหญ่มีลอนปลายส่วนท้อง (lobe) จำนวน 4 คู่แต่บางครั้งอาจจะเห็นเพียง 3 คู่ (L1 , L2, L3, L4) โดยลอนคู่ที่ 1 หรือคู่กลาง (L1/median lobe) จะมีขนาดใหญ่ที่สุด ซึ่งจะมีขนาดลดหลั่นลงมาตามลำดับจนถึงคู่ที่ 4 ระหว่าง lobe การเชื่อมกันระหว่างฐานของลอนคู่ที่ 1 (median lobe yoked) เส้นขนที่อยู่ระหว่างลอนคู่ที่ 1 (setae) ตำแหน่งการเรียงตัวของ macroduct รูปทรงของต่อมหนาม (gland spine) ที่แตกต่างกันไปในแต่ละชนิด

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

7. จัดเก็บตัวอย่างเพลี้ยหอยในกล่องใส่สไลด์ถาวรและนำเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล และจัดทำหมายเลขประจำตัวอย่างเพลี้ยหอยแต่ละสไลด์เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์ต่อไป

- เวลาและสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2561 ถึง เดือนกันยายน 2564

สถานที่ 1. แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่างๆ ในเขตภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคตะวันตกและภาคใต้

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตว์วิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Diaspidinae การเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในพื้นที่ภาคกลาง ได้แก่จังหวัด กรุงเทพฯ นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สมุทสงคราม ลพบุรี สิงห์บุรี ชัยนาท พิจิตร นครสวรรค์ อุทัยธานี กำแพงเพชร สระบุรี ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่จังหวัด นครราชสีมา ขอนแก่น มหาสารคาม อุดรธานี หนองคาย มุกดาหาร บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ ยโสธร และอุบลราชธานี ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พิษณุโลก อุตรดิตถ์ และเพชรบรูณ์ ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ชลบุรี และฉะเชิงเทรา ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี ตาก เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ชมุพร และนครศรีธรรมราช นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จากการตรวจจำแนกชนิดตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ด พบทั้งสิ้น 8 สกุล 14 ชนิด ได้แก่ 1) เพลี้ยหอยเกล็ดขาวมันสำปะหลัง *Aonidomytilus albus* (Cockerell) 2) เพลี้ยหอยเกล็ดกุหลาบ *Aulacaspis rosae* (Bouche') 3)เพลี้ยหอยเกล็ดขาวมะม่วง *Aulacaspis tubercularis* (Newstead) 4) เพลี้ยหอยเกล็ดขาวทุเรียน *Aulacaspis vitis* (Green) 5) เพลี้ยหอยเกล็ดขาว *Aulacaspis* sp. 6) เพลี้ยหอยเกล็ดสับปะรด *Diaspis bromeliae* (Kerner) 7) เพลี้ยหอยเกล็ดยาวส้ม *Lepidosaphes gloverii* (Packard) 8) เพลี้ยหอยเกล็ดยาว *Lepidosaphes* sp. 9) เพลี้ยหอยเกล็ดกลมส้ม *Parlatoria pergandii* (Comstock) 10) เพลี้ยหอยเกล็ดดำมะนาว *Parlatoria ziziphi* (Locau) 11) เพลี้ยหอยเกล็ดเฟิร์น *Pinnaspis aspidiatrae* (Signorest) 12) เพลี้ยหอยเกล็ดขาวฝ้าย *Pinnaspis strachani* (Cooley) 13) เพลี้ยหอยเกล็ดยี่โถ *Pseudaulacaspis* cockerelli (Cooley) 14) เพลี้ยหอยเกล็ดหิมะส้ม *Unaspis citri* (Comstock) ซึ่งได้จัดทำแนวทางการวินิจฉัย (key) และรายละเอียดของเพลี้ยหอยเกล็ดทั้ง 14 ชนิด ดังต่อไปนี้

แนวทางการวินิจฉัยวงศ์ย่อยของเพลี้ยหอยเกล็ดในวงศ์ Diaspididae

- Macroducts one - barred; plates present; gland tubercles rarely or never present.....**Aspidiotinae (Figure 1.1.17.1)**
- Macroducts two - barred; plates rarely or never present; gland spines normally present..... **Diaspidinae (Figure 1.1.17.2)**

กรมวิชาการเกษตร

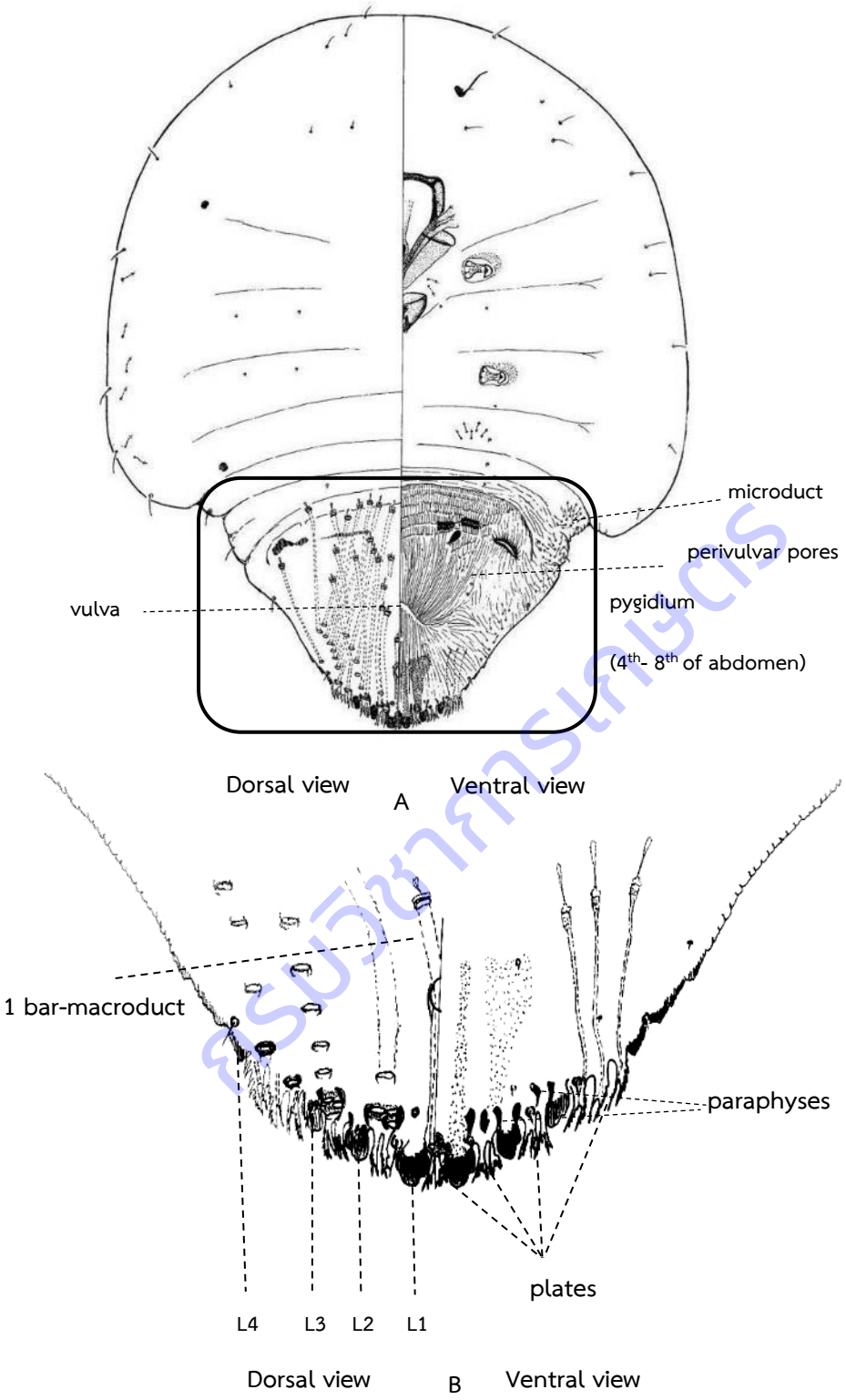


Figure 1.1.17.1 A) General morphology of slide – mounted adult female Aspidiotinae
B) Morphological characters of pygidium Aspidiotinae

ศูนย์วิทยทรัพยากร

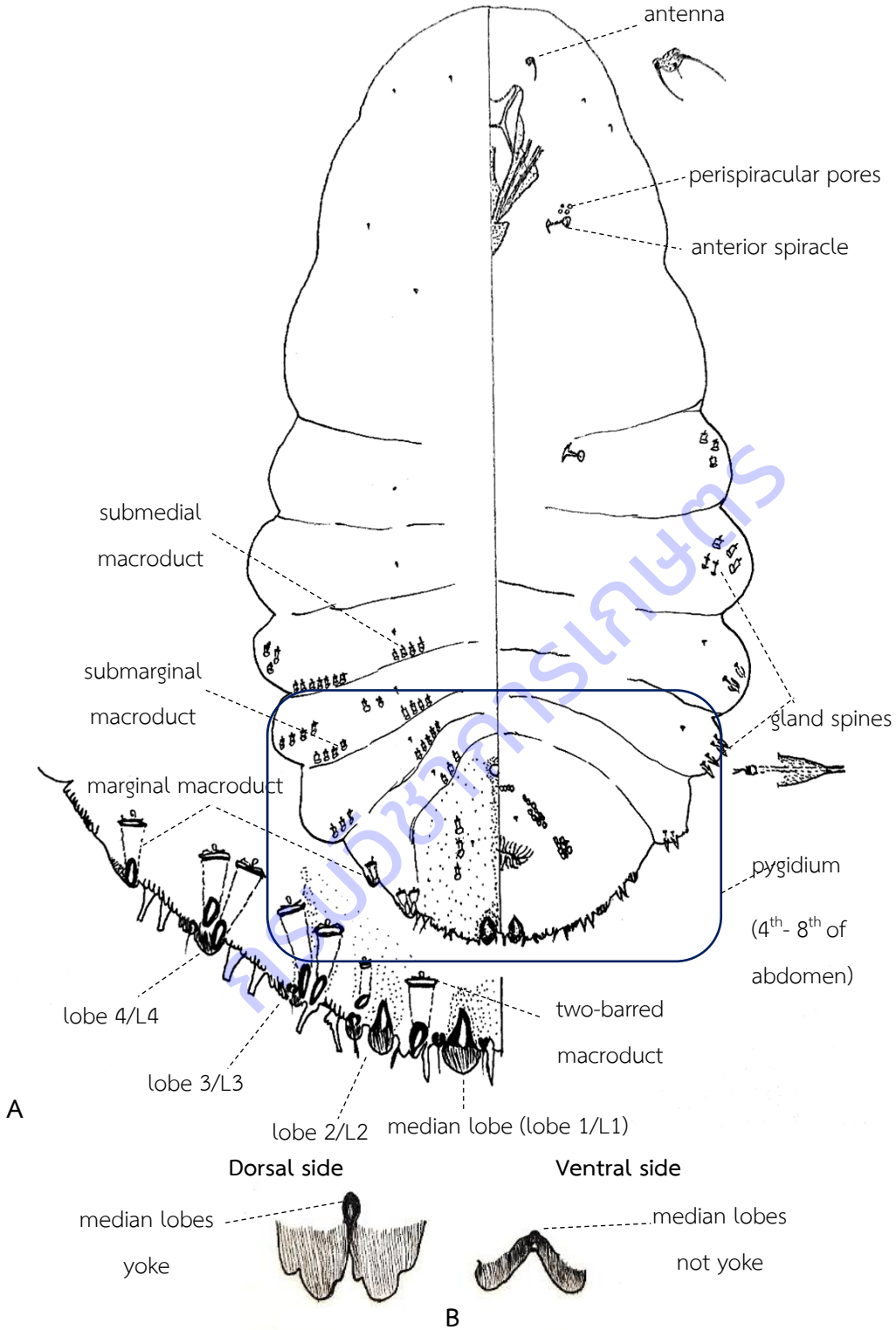


Figure 1.1.17.2 A) General morphology of slide – mounted adult female Diaspidinae
B) Characters of median lobes basally

ตัวอย่างเอกสาร

แนวทางการวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ย่อย Diaspidinae

1. Median lobes yoked basally, body shape almost alwayselongate.....2

- Median lobes not yoked basally, body shapevariable.....8

2. With a pair of setae between the median lobes.....***Pseudaulacaspis cockerelli*** **(Cooley)**

- Without a pair of setae between the medianlobes.....3

3. Prosoma swollen, more of less quadrate, wider than abdomen; pygidial lobes forming a distinct notch at apex; gland spines and macroducts absent anterior to the first abdomen.....4

- Prosoma not swollen, body tubinate or fusiform elongate quadrate, wider than abdomen; pygidial lobes forming a distinct notch at apex; gland spines and macroducts present anterior to the first abdomen.....7

4. Enlarged prosoma rounded, not angular or quadrate; submedian macroducts on segment 6 of pygidium may number up 7 on each side.....***Aulacaspis*** **sp.**

- Enlarged prosoma angular or quadrate or irregular; submedian macroducts on segment 6 of pygidium numbering not more than 4 on each side.....5

5. Pygidial segment 6 with 4 rows of submedian macroducts..... ***Aulacaspis rosae*** **(Bouché)**

- Pygidial segment 6 with 1 or 2 rows of submedian macroducts.....6

6. Enlarge prosoma angular quadrate; widest at lateral tubercles, almost level with anterior spiracles; posterior spiracles usually associated with spiracular pores.....***Aulacaspis tubercularis*** **Newstead**

- Enlarge prosoma variable or irregular in shape, widest at mesothorax; prominent lateral tubercles sometimes present; posterior spiracles usually not associated with spiracular pores .....***Aulacaspis vitis*** **(Green)**

7. Dorsal preanal scleroses present; second lobes (L2) small, usually shorter than median lobes (L1).....***Pinnaspis aspidiatrae*** **(Signoret)**

- Dorsal preanal scleroses absent; second lobes (L2) usually as long as median lobes (L1).....***Pinnaspis strachani*** **(Cooley)**

8. Marginal pygidial macroducts with the axis of their orifices set transversely, with each orifice surrounded by a transversely oval sclerotized rim.....10

- Marginal pygidial macroducts with the axis of their orifices set longitudinally or diagonally, with each orifice surrounded by a sclerotized rim at similar angle.....11

10. Marginal of prosoma bearing a conspicuous, membranous ear-like projection on either side.....***Parlatoria ziziphi*** **(Lucas)**

กรมวิชาการเกษตร

- Marginal of prosoma without conspicuous, membranous ear-like projection on either side..... ***Parlatoria pergandii*** **Comstock**

11. Gland spine absent between median lobe.....12

- Gland spine present between median lobe.....13

12. Body turbinate, common species with ears-likes protuberance on head.....***Diaspis bromeliae*** **(Kerner)**

- Body long and slender; head without ears-likes protuberance on head..... ***Unaspis citri*** **(Comstock)**

13. Perivulvar pores absent.....***Aonidomytilus albus*** **(Cockerell)**

- Perivulvar pores present.....14

14. Bosses present on dorsum..... ***Lepidosaphes*** **sp.**

- Bosses absent from dorsum.....***Lepidosaphes gloverii*** **(Packard)**

รายละเอียดของเพลี้ยหอยเกล็ดระดับสกุลและชนิด

Genus *Aonidomytilus*, Leonardi, 1903

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

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ: ส่วน pygidium ประกอบด้วย 2 - barred macroduct ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 เชื่อมติดกัน ลอนบริเวณส่วนท้องด้านบนของ pygidium เจริญดี มีต่อมหนามขนาดใหญ่ มีต่อมหนามระหว่างลอนปลายส่วนท้องคู่ที่ 1 ท่อขนาดใหญ่ (macroducts) บริเวณปลายของ pygidium ไม่ปรากฏ perivulvar pores

Aonidomytilus albus **(Cockerell, 1893)**

(Figure 1.1.17.3 and 1.1.17.17A)

ชื่อพ้อง *Mytilaspis albus* Cockerell 1893j: 256. nomen nudum (discovered by Cocker1893p, 156). Illustr.

Mytilaspis albus Cockerell 1893p: 156-157. Type data: JAMAICA: Kingston, East Street, on Malvaceae, by T.D.A. Cockerell. Syntypes, female, Type depository: London: The Natural History Museum, England, UK;

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดขาวมันสำปะหลัง (topioca scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : มีลักษณะของแผ่นปกคลุมสีขาวรูปทรงเรียวยาวมีคราบเก่าอยู่บริเวณส่วนบนมีสีน้ำตาลเข้ม

กรมวิชาการเกษตร

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 เชื่อมติดกัน ท่อขนาดใหญ่ (macroducts) บริเวณปลายของ pygidium ไม่ปรากฏ perivulvar pores บริเวณขอบของ pygidium ปรากฏต่อมหนาม (gland spine) 2 -3 กลุ่ม และยังพบท่อขนาดใหญ่ (macroduct) กระจัดกระจาย 6 - 7 ท่อ

พืชอาหาร : พบลงทำลายลำต้นมันสำปะหลัง

การแพร่กระจาย : กรุงเทพฯ นครสวรรค์ อุทัยธานี กำแพงเพชร สระบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น มหาสารคาม อุดรธานี หนองคาย มุกดาหาร บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ ยโสธร อุบลราชธานี เชียงราย พิษณุโลก ฉะเชิงเทรา ระยอง ชลบุรี ราชบุรี กาญจนบรี ตาก เพชรบุรี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1.1.17.1

Genus *Aulacaspis* Cockerell 1893

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

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ: ส่วน pygidium ประกอบด้วย 2 - barred macroduct ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 ไม่เชื่อมติดกัน มีรูปร่างยาวรี ส่วนบน (prosoma) มีขนาดใหญ่ที่เห็นได้ชัดเจนจนถึงอกปล้องสุดท้าย หนวดมีขนค่อนข้างยาว รูหายใจด้านบน (anterior spiracles) มีรูเล็กๆ รอบล้อมจำนวนมาก

Aulacaspis rosae (Bouché, 1833)

(Figure 1.1.17.4 and 1.1.17.17B)

ชื่อพ้อง : *Coccus rosae* Virey 1821: 211. *nomen nudum* Notes: Virey (1821) described a scale insect on roses in France named *Coccus rosae*.

Aspidiotus rosae Bouché 1833: 53. Type data: GERMANY: Berlin.

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดกุหลาบ (rose scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : เป็นเพลี้ยหอยเกล็ดที่มีลักษณะของแผ่นปกคลุมค่อนข้างกลม เป็นสีน้ำตาลอ่อน มีคราบเก่าอยู่บริเวณด้านบนขอบกึ่งกลางของแผ่นปกคลุมมีสีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 ไม่เชื่อมติดกัน ส่วนบน (prosoma) คล้ายสี่เหลี่ยม ปรากฏท่อขนาดใหญ่ (macroducts) ใกล้บริเวณกึ่งกลางของทั้งสองฝั่งของ pygidium ในปล้องที่ 6 มีจำนวนไม่เกิน 4 ท่อ

พืชอาหาร : พบลงทำลายลำต้นและกิ่งกุหลาบ ผักหวานบ้าน

การแพร่กระจาย : สระบุรี ขอนแก่น

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1.1.17.1

กรมวิชาการเกษตร

Aulacaspis tubercularis Newstead, 1906

(Figure 1.1.17.5 and 1.1.17.17C)

ชื่อพ้อง : *Aulacaspis (Diaspis) tubercularis* Newstead 1906a: 73. Type data: INDONESIA: Java, on *Cinnamomum zeylanicum*.

Aulacaspis cinnamomi Newstead 1908b: 34-35. Type data: INDONESIA: Java, on *Cinamomum zeylanicum*

Diaspis (Aulacaspis) cinnamomi mangiferae Newstead 1911: 86. Type data: SRI LANKA: Helwan

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดขาวมะม่วง (white mango scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : ลักษณะของแผ่นปกคลุมค่อนข้างกลม สีขาวขุ่น มีคราบเก่าอยู่บริเวณด้านบนขอบกึ่งกลางของแผ่นปกคลุมมีสีดำหรือสีน้ำตาล

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 ไม่เชื่อมติดกัน ส่วนบน (prosoma) คล้ายสี่เหลี่ยมเห็นเป็นมุมฉากชัดเจน มีลักษณะเป็นแท่งความกว้างมากที่สุด ปรากฏท่อขนาดใหญ่ (macroducts) ใกล้บริเวณกึ่งกลางของทั้งสองฝั่งของ pygidium ในปล้องที่ 6 มีจำนวน 1 หรือ 2 แถว รูหายใจด้านบนและด้านล่างจะปรากฏรูพรุน (spiracular pores)

พืชอาหาร : พบลงทำลายส่วนใบของมะม่วง ทุเรียน ลองกอง และยังพบลงทำลายในส่วนของกิ่งและลำต้นมะม่วงเมื่อมีการระบาดอย่างรุนแรงจนทำให้แห้งตายได้

การแพร่กระจาย : กรุงเทพฯ นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สมุทสงคราม ลพบุรี สิงห์บุรี ชัยนาท พิจิตร นครสวรรค์ อุทัยธานี กำแพงเพชร สระบุรีนครราชสีมา ขอนแก่น มหาสารคาม อุดรธานี หนองคาย มุกดาหาร บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ ยโสธร อุบลราชธานี เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พิษณุโลก อุตรดิตถ์ ฉะเชิงเทรา จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ราชบุรี กาญจนบรี ตาก เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์
สุราษฎร์ธานี ชมุพร นครศรีธรรมราช

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1.1.17.1

Aulacaspis vitis (Green, 1896)

(Figure 1.1.17.6 and 1.1.17.17D)

ชื่อพ้อง : *Chionaspis vitis* Green 1896: 3. Type data: SRI LANKA: Punduloya, on *Vitis*.

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดขาวทุเรียน (white scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : ลักษณะของแผ่นปกคลุมค่อนข้างกลม เป็นสีขาวขุ่น มีคราบเก่าอยู่บริเวณด้านบนขอบกึ่งกลางของแผ่นปกคลุมมีสีดำหรือสีน้ำตาล

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 ไม่เชื่อมติดกัน ส่วนบน (prosoma) มีรูปทรงไม่แน่นอน อกปล้องกลาง (mesothorax) เป็นส่วนที่กว้างที่สุด ปรากฏท่อขนาดใหญ่ (macroducts) ใกล้บริเวณกึ่งกลางของทั้งสองฝั่งของ pygidium ในปล้องที่ 6 มีจำนวน 1 หรือ 2 แถว บางครั้งพบตุ่มด้านข้าง รูหายใจด้านบนและด้านล่างจะไม่ปรากฏรูพรุน (spiracular pores)

กรมวิชาการเกษตร

พืชอาหาร : พบลงทำลายส่วนใบและบริเวณกิ่งของทุเรียน

การแพร่กระจาย : จันทบุรี ระยอง ประจวบครีรีขันธ์ ชุมพร

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1.1.17.1

Aulacaspis sp.

(Figure 1.1.17.7 and 1.1.17.17E)

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดขาว (white scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : เป็นเพลี้ยหอยเกล็ดที่มีลักษณะของแผ่นปกคลุมค่อนข้างกลม เป็นสีขาวขุ่น มีคราบเก่าอยู่บริเวณด้านบนขอบกึ่งกลางของแผ่นปกคลุมมีน้ำตาลเข้ม

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 ไม่เชื่อมติดกัน ส่วนบน (prosoma) บวมป่องลักษณะค่อนข้างกลมมน ปรากฏท่อขนาดใหญ่ (macroducts) ใกล้บริเวณกึ่งกลางของทั้งสองฝั่งของ pygidium ในปล้องที่ 6 มีจำนวนมากกว่า 7 ท่อ

พืชอาหาร : พบลงทำลายส่วนใบของต้นอะโวกาโด

การแพร่กระจาย : เพชรบูรณ์ ตาก

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1.1.17.1

Genus *Diaspis* Costa, 1828

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

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ: ส่วน pygidium ประกอบด้วย 2 - barred macroduct ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 เชื่อมติดกัน มี รูปร่างสั้นป้อมยกเว้นส่วนของ pygidium ไม่ปรากฏต่อมหนามระหว่างลอนปลายส่วนท้องคู่ที่ 1 ลอนปลายส่วนท้องคู่ที่ 2 และ 3 เจริญดี แต่ละคู่เห็นเป็นลอนขนาดเล็ก 2 อันติดกัน

Diaspis bromeliae (Kerner, 1778)

(Figure 1.1.17.8 and 1.1.17.17F)

ชื่อพ้อง : C*occus bromeliae* Kerner 1778: 1-56. Type data: BRAZIL: Sao Paulo; EUROPE; NORTH AMERICA; MEXICO; on *Bromelia pinguin*, *Hibiscus* sp., *Canna* sp., *Billbergia zebrina*, *Olea fragrans*.

Aspidiotes Bromeliae Bouché 1844: 295. Type data: WEST INDIES: on *Ananas sativus*.

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดสับปะรด (pineapple scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : ลักษณะของแผ่นปกคลุมค่อนข้างกลม สีขาวขุ่น มีคราบเก่าอยู่บริเวณกิ่งกลางของแผ่นปกคลุมมีสีน้ำตาล

กรมวิชาการเกษตร

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 เชื่อมติดกัน ไม่พบต่อมหนาม (gland spine) ระหว่างลอนปลายส่วนท้องคู่ที่ 1 ลำตัวค่อนข้างสั้นป้อม ความกว้างและความยาวของลำตัวใกล้เคียงกัน ส่วนหัวมีขนาดใหญ่กว่าส่วนท้ายเกิน 5 เท่า ขอบของผนังลำตัวส่วนหัวมีตุ่มที่เห็นได้ชัดเจนยื่นของไปทั้ง 2 ข้างคล้ายลักษณะของหู (ear-like)

พืชอาหาร : พบลงทำลายส่วนใบสับปะรด

การแพร่กระจาย : ระยอง ชลบุรี จันทบุรี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1.1.17.1

Genus *Lepidosaphes*, Shimer 1868

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

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ: ส่วน pygidium ประกอบด้วย 2 - barred macroduct ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 เชื่อมติดกัน ลอนบริเวณส่วนท้องด้านบนของ pygidium เจริญดี มีต่อมหนามขนาดใหญ่ (gland spine) มีต่อมหนามระหว่างลอนปลายส่วนท้องคู่ที่ 1 ท่อขนาดใหญ่ (macroducts) บริเวณปลายของ pygidium ปรากฏ perivulvar pores

Lepidosaphes gloverii (Packard, 1869)

(Figure 1.1.17.9 and 1.1.17.18A)

ชื่อพ้อง *Aspidiotus gloverii* Packard 1869: 527. Type data: UNITED STATES: Florida, on *Citrus* sp. *Mytiella sexspina* Hoke 1921: 341-342. Type data: UNITED STATES: Mississippi, Logtown, on *Citrus* sp., 22/08/1916, by E.C. Lindsey; Florida, Fort Pierce, on "Satsuma oranges

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดยาวส้ม (citrus long scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : มีลักษณะของแผ่นปกคลุมสีน้ำตาลอ่อนรูปทรงเรียวยาว มีคราบเก่าอยู่บริเวณส่วนบนมีสีน้ำตาลเข้ม

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 เชื่อมติดกัน ท่อขนาดใหญ่ (macroducts) บริเวณปลายของ pygidium มีสันนูนตามแนวยาวและล้อมรอบด้วยขอบแข็งรูปวงรีในตำแหน่งเดียวกัน ปรากฏต่อมหนาม (gland spine) ระหว่างลอนคู่ที่ 1 ผนังลำตัวด้านหลัง (dorsum) ไม่ปรากกฏก้อนแข็ง

พืชอาหาร : พบลงทำลายส่วนใบของโกงกาง กล้วย ลีลาวดี มะม่วง

การแพร่กระจาย : จันทบุรี เพชรบุรี ตาก

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1.1.17.1

Lepidosaphes sp.

(Figure 1.1.17.10 and 1.1.17.18B)

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดยาว (long scale)

กรมวิชาการเกษตร

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : มีลักษณะของแผ่นปกคลุมสีเหลืองหรือน้ำตาลอ่อนรูปทรงเรียวยาว มีคราบเก่าอยู่บริเวณส่วนบนมีสีน้ำตาลเข้ม

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 เชื่อมติดกัน ท่อขนาดใหญ่ (macroducts) บริเวณปลายของ pygidium มีสันนูนตามแนวยาวและล้อมรอบด้วยขอบแข็งรูปวงรีในตำแหน่งเดียวกัน ตำแหน่งเดียวกันปรากฏต่อมหนาม (gland spine) ระหว่างลอนคู่ที่ 1 ผนังลำตัวด้านหลัง (dorsum) ปรากกฏก้อนแข็ง

พืชอาหาร : พบลงทำลายส่วนใบของหมาก กล้วย

การแพร่กระจาย : ชุมพร ราชบุรี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1.1.17.1

Genus *Parlatoria* Targioni Tozzetti 1868

ชื่อพ้อง : *Parlatoria* Targioni Tozzetti 1868: 735. Type species: *Parlatoria orbicularis* Targioni Tozzetti by subsequent designation Leonar1899a:208

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ: : ส่วน pygidium ประกอบด้วย 2 - barred macroduct ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 เชื่อมติดกัน รูปร่างทรงกลมหรือรี บริเวณปลายของ pygidium มีแผ่นแข็ง มีลอนปลายส่วนท้อง 3 คู่แต่ละคู่มีรอยบาก ปรากฏท่อขนาดใหญ่ (macroducts) บริเวณขอบของผนังลำตัวรวมทั้งบริเวณลอนปลายส่วนท้องคู่ที่ 1 ด้วย หนวดมีขน 1 เส้น

Parlatoria pergandii Comstock, 1881

(Figure 1.1.17.11 and 1.1.17.18C)

ชื่อพ้อง : *Parlatoria pergandii* Comstock 1881a: 327-328. Type data: UNITED STATES: Florida, on *Citrus* sp.

Parlatoria sinensis Maskell 1897a: 241. Type data: CHINA: Hong Kong, on *Citrus* sp.

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดกลมส้ม (chaff scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : ลักษณะของแผ่นปกคลุมสีน้ำตาลเข้มรูปทรงคล้ายวงกลมหรือบางครั้งเป็นวงรี มีคราบเก่าอยู่บริเวณส่วนบนมีสีน้ำตาลเข้ม

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 เชื่อมติดกัน ส่วนบน (prosoma) มีตุ่มยื่นออกจากผนังลำตัวด้านข้าง คล้ายหู (ear-like) ท่อขนาดใหญ่ (macroducts) บริเวณปลายของ pygidium มีสันนูน ตามแนวขวางจะล้อมรอบด้วยขอบแข็งรูปวงรีตามแนวขวาง

พืชอาหาร : พบลงทำลายส่วนกิ่งและใบมะนาว ใบมะม่วง ผลส้มโอ

การแพร่กระจาย : กรุงเทพฯ ราชบุรี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1.1.17.1

Parlatoria ziziphi (Lucas, 1853)

(Figure 1.1.17.12 and 1.1.17.18D)

กรมวิชาการเกษตร

ชื่อพ้อง : *Coccus ziziphi* Lucas 1853: xxix. Type data: FRANCE: on *Ziziphus pinnachristi*. Syntypes, female, accepted valid name Notes: Types presumed lost.

Chermes aurantii Boisduval 1867: 338-339. Type data: ALGERIA: Blidah, on *Citrus* sp.

Parlatoria Lucassi Targioni Tozzetti 1868: 735. *nomen nudum* (discovered by Ferris1937, SI-84).

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดดำมะนาว (black parlatoria scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : ลักษณะของแผ่นปกคลุมสีดำเข้มรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า มีคราบเก่าอยู่บริเวณส่วนบนมีสีดำ

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 เชื่อมติดกัน ส่วนบน (prosoma) มีตุ่มยื่นออกจากผนังลำตัวด้านข้าง คล้ายหู (ear-like) ท่อขนาดใหญ่ (macroducts) บริเวณปลายของ pygidium มีสันนูนตามแนวขวาง ล้อมรอบด้วยขอบแข็งรูปวงรีตามแนวขวาง

พืชอาหาร : พบลงทำลายส่วนใบและผลของมะนาว มะกรูด ส้มโอ

การแพร่กระจาย : กรุงเทพฯ นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สมุทสงคราม ลพบุรี สิงห์บุรี ชัยนาท พิจิตร นครสวรรค์ อุทัยธานี กำแพงเพชร สระบุรีนครราชสีมา ขอนแก่น มหาสารคาม อุดรธานี หนองคาย มุกดาหาร บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ ยโสธร อุบลราชธานี เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พิษณุโลก อุตรดิตถ์ ฉะเชิงเทรา จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ราชบุรี กาญจนบรี ตาก เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี ชุมพร นครศรีธรรมราช

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1.1.17.1

Genus *Pinnaspis* Cockerell 1892

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

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ: ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 เชื่อมติดกัน รูปร่างยาวรี ส่วนของลำตัวมีความกว้างของท้อง มีลักษณะเด่นของลอนปลายส่วนท้องที่บริเวณส่วนปลายจะมีคล้ายรอยบาก มีต่อมหนาม (gland spines) และท่อขนาดใหญ่ (macroducts) โดยเฉพาะบริเวณขอบขแงผนังลำตัวมีขนาดค่อนข้างใหญ่

Pinnaspis aspidiatrae (Signoret, 1869)

(Figure 1.1.17.13 and 1.1.17.18E)

ชื่อพ้อง : *Chionaspis aspidistrae* Signoret 1869d: 443. Type data: FRANCE: Paris, on *Aspidistra* sp.

Chionaspis brasiliensis Signoret 1869d: 444-445. Type data: BRAZIL: Bahia.

Chionaspis latus Cockerell 1896h: 21. Type data: JAPAN: Tokyo, on *Citrus* sp.,

Pinnaspis ophiopogonis Takahashi 1952a: 11-12. Type data: JAPAN: Honshu, Tokyo, on *Ophiopogon japonica*,

Pinnaspis caricis Ferris 1957: 212. Type data: HAWAII: Honolulu, on *Carex japonicum*,

Pinnaspis aspidistrae yunnanensis Chen 1983: 20. Type data: CHINA: Yunnan, on unknown plant

กรมวิชาการเกษตร

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดเฟิร์น (fern scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : ลักษณะของแผ่นปกคลุมสีน้ำตาลรูปทรงคล้ายวงรีท้ายกว้างกว่าส่วนหัวซึ่งมีคราบเก่าอยู่บริเวณด้านบนและมีสีดำหรือน้ำตาลเข้ม

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 เชื่อมติดกัน รูปร่างยาวรี ส่วนของลำตัวมีความกว้างของท้อง มีลักษณะเด่นของลอนปลายส่วนท้องที่บริเวณส่วนปลายจะมีคล้ายรอยบาก ลอนคู่ที่ 1 มีความยาวมากกว่าลอนคู่ที่ 2 พบต่อมหนาม (gland spines) และท่อขนาดใหญ่ (macroducts) ตั้งแต่ส่วนบนถึงท้องปล้องที่ 1 ปรากฏเส้นแข็งบริเวณผนังลำตัวด้านหลัง (dorsal preanal scleroses)

พืชอาหาร : พบลงใบและลำต้นบานไม่รู้โรย ลีลาวดี กล้วย

การแพร่กระจาย : กรุงเทพฯ ปทุมธานี นครสวรรค์ อุทัยธานี ขอนแก่น

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1.1.17.1

***Pinnaspis strachani* (Cooley, 1899)**

(Figure 1.1.17.14 and 1.1.17.18F)

ชื่อพ้อง : *Hemichionaspis minor strachani* Cooley 1899: 54-55. Type data: NIGERIA: Abeokuta, on unknown host, by H. Strachan.

Hemichionaspis Marchali Cockerell 1902b: 81-83. Type data: GUINEA: Konakry, on *Elaeis guineensis*, by Dr. Marchal. Syntypes

Hemichionaspis townsendi Cockerell 1905f: 135. Type data: PHILIPPINES: Luzon, Tayabas (=Quezon), on *Gossypium* sp.,

Chionaspis (Hemichionaspis) aspidistrae gossypii Newstead 1906a: 74. *nomen nudum* (discovered by Lindin1935, 143).

Chionaspis (Hemichionaspis) aspidistrae gossypii Newstead 1908b: 37. Type data: TOGO: Kpeme, on *Gossypium hirsutum*,

Hemichionaspis proxima Leonardi 1914: 193-195. Type data: SENEGAL: Dakar, on *Calotropis procera*, Thiès, on Mango; GUINEA: Conakry, on *Annona* sp.; NIGERIA: Lagos; BENIN: Cotonou; ANGOLA; SOUTH AFRICA: Pretoria

Pinnaspis temporaria Ferris 1942: SIV-407. Type data: PANAMA: Armuelles, on *Mangifera indica*, by G.F. Ferris.

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดขาวฝ้าย (cotton white scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : ลักษณะของแผ่นปกคลุมสีขาวรูปทรงคล้ายวงรีท้ายกว้างกว่าส่วนหัวซึ่งมีคราบเก่าอยู่บริเวณด้านบนและมีสีน้ำตาล

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ส่วน pygidium ประกอบด้วย 2 - barred macroduct ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 ไม่เชื่อมติดกัน รูปร่างยาวรี ส่วนของลำตัวมีความกว้างของท้อง มีลักษณะเด่นของลอนปลายส่วนท้องที่บริเวณส่วนปลายจะมีคล้ายรอยบาก ลอนคู่ที่ 1 มีสั้นกว่าลอนคู่ที่ 2 พบต่อมหนาม (gland spines) และท่อขนาดใหญ่

กรมวิชาการเกษตร

(macroducts) ตั้งแต่ส่วนบนถึงท้องปล้องที่ 1 ไม่ปรากฏเส้นแข็งบริเวณผนังลำตัวด้านหลัง (dorsal preanal scleroses)

พืชอาหาร : พบลงทำลายลำต้นของมันสำปะหลัง ส่วนใบของต้นลีลาวดี ลำต้นและใบของต้นบานชื่น บานไม่รู้โรย ใบลิ้นมังกรแคระ

การแพร่กระจาย : กรุงเทพฯ ปทุมธานี นครสวรรค์ อุทัยธานี กำแพงเพชร สระบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น มหาสารคาม หนองคาย ฉะเชิงเทรา ระยอง ชลบุรี ราชบุรี กาญจนบรี ตาก

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1.1.17.1

Genus *Pseudaulacaspis* MacGillivray, 1921

ชื่อพ้อง : *Pseudaulacaspis* MacGillivray 1921: 305. Type species: *Diaspis pentagona* Targioni Tozzetti

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ส่วน pygidium ประกอบด้วย 2 - barred macroduct ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 ไม่เชื่อมติดกัน มีขนแข็งจำนวน 1 คู่ระหว่างลอนคู่ที่ 1 (median lobes) รูปร่างยาวรี

Pseudaulacaspis cockerelli (Cooley, 1897)

(Figure 1.1.17.15 and 1.1.17.18G)

ชื่อพ้อง : *Chionaspis cockerelli* Cooley 1897: 278-279. Type data: CHINA: from quarantine at United States, San Francisco, on unidentified Palmae,

Chionaspis aucubae Cooley 1897: 279-280. Type data: JAPAN: taken at quarantine in San Francisco, on *Aucuba* sp.,

Chionaspis dilatata Green 1899a: 148. Type data: SRI LANKA: Peradeniya

Phenacaspis natalensis Cockerell 1902a: 25. Type data: SOUTH AFRICA: Natal, Durban, on *Mangifera* sp.

Chionaspis candida Banks 1906: 232-233. Type data: PHILIPPINES: Manila, on upper surface of leaves of *Cocos nucifera*.

Phenacaspis eugeniae sandwicensis Fullaway 1932: 103-104. Type data: UNITED STATES: Hawaii.

Chionaspis syringae Borchsenius 1938: 140-141. Type data: RUSSIA: Primorsky Kray, Vladivostok, city garden, on *Syringa amurensis*,

Chionaspis hattorii Kanda 1941b: 185-186. Type data: SOUTH KOREA: Suigen, on *Deutzia scabra* var.*crenata*,

Chionaspis akebiae Takahashi 1952a: 8-10. Type data: JAPAN: Honshu, Mt. Takao and Hikawa, near Tokyo, on *Akebia lobata*,

กรมวิชาการเกษตร

Phenacaspis ferrisi Mamet 1959a: 459-461. Type data: MADAGASCAR: Ambilobe, on undetermined plant

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดยี่โถ (oleander scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : ลักษณะของแผ่นปกคลุมรียาว สีขาวขุ่น ด้านท้ายกว้างกว่าด้านหัวชัดเจน ความกว้างประมาณ 1 ใน 3 ของความยาว มีคราบเก่าอยู่บริเวณด้านหัวของแผ่นปกคลุมมีสีเหลืองหรือสีน้ำตาล

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 ไม่เชื่อมติดกัน มีขนแข็ง จำนวน 1 คู่ระหว่างลอนคู่ที่ 1 ส่วนใหญ่ลำตัวค่อนเรียวยาว ลอนคู่ที่ 1 และ 2 เห็นได้ชัดเจน ไม่ปรากฏลอนคู่ที่ 3

พืชอาหาร : พบลงทำลายส่วนใบของหมาก มะเดื่อฝรั่ง ยี่โถ

การแพร่กระจาย : ปทุมธานี ชุมพร อุทัยธานี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1.1.17.1

Genus *Unaspis* MacGillivray, 1921

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

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ: ส่วน pygidium ประกอบด้วย 2 - barred macroduct ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 เชื่อมติดกัน ไม่พบต่อมหนามระหว่างลอนปลายส่วนท้องคู่ที่ 1 มีเส้นนูนตามยาวบริเวณกึ่งกลาง มีลอนปลายส่วนท้องจำนวน 3 คู่

Unaspis citri (Comstock, 1883)

(Figure 1.1.17.16 and 1.1.17.18H)

ชื่อพ้อง : *Chionaspis citri* Comstock 1883: 100-102. Type data: UNITED STATES: Louisiana, on *Citrus* sp.

Dinaspis annae Malenotti 1916b: 188-192. Type data: BARBADOS: on *Citrus medica acida*, *Dinaspis veitchi* Green & Laing 1923: 123. Type data: FIJI: Rarawai, on unknown host, by R. Veitch.

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดหิมะส้ม (citrus snow scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : มีลักษณะของแผ่นปกคลุมสีน้ำตาลอ่อนรูปทรงคล้ายวงรียาวเรียว

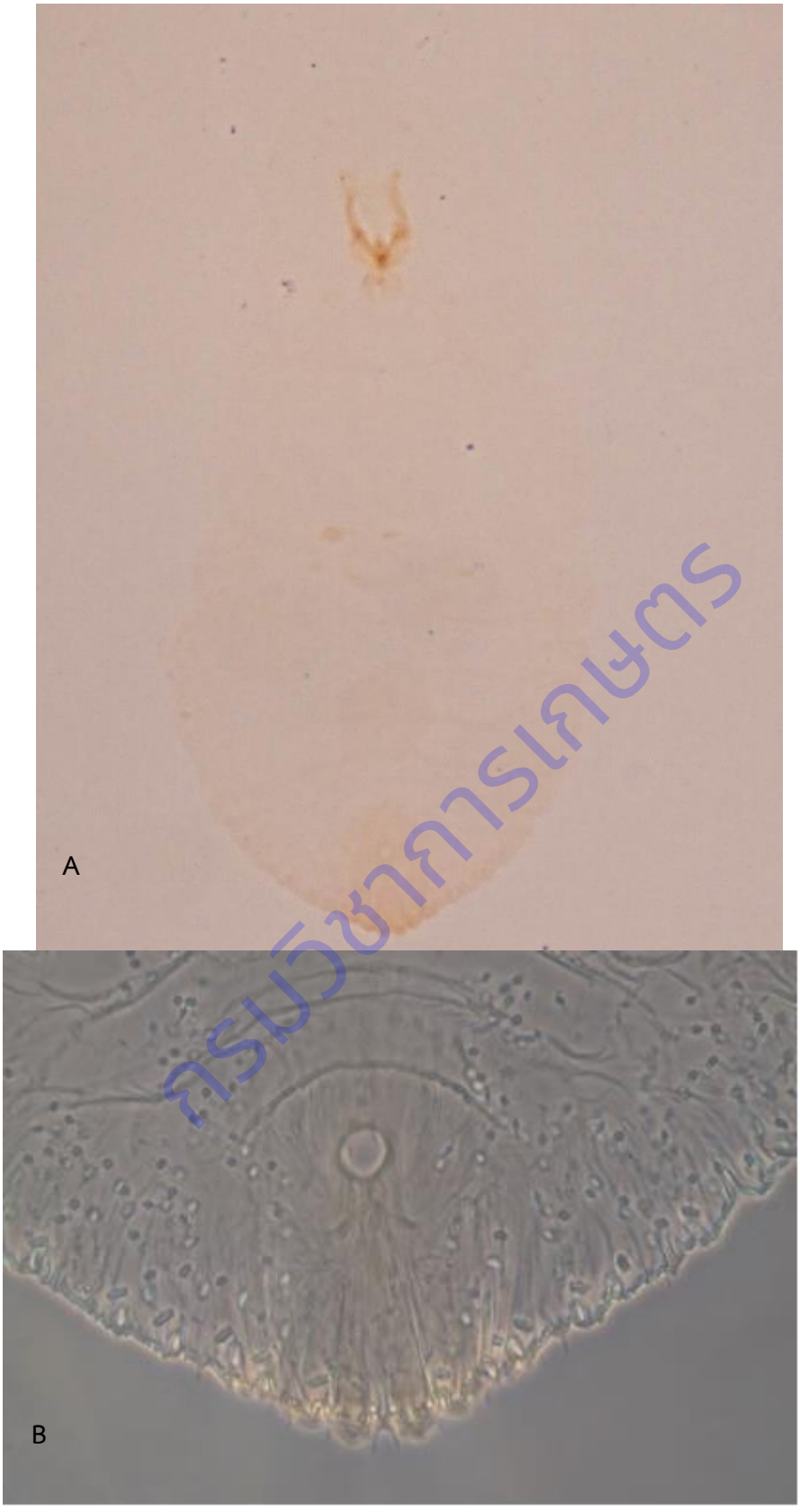
ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ฐานระหว่างลอนคู่ที่ 1 เชื่อมติดกัน ไม่พบต่อมหนามระหว่างลอนปลายส่วนท้องคู่ที่ 1 ท่อขนาดใหญ่ (macroducts) บริเวณปลายของ pygidium มีสันนูนตามแนวยาวล้อมรอบด้วยขอบแข็งรูปวงรีในตำแหน่งเดียวกัน ไม่ปรากฏต่อมหนาม (gland spine) ระหว่างลอนคู่ที่ 1

พืชอาหาร : พบลงทำลายลำต้น ใบและผลของมะนาว ใบของมังคุด ผลส้มโอ

การแพร่กระจาย : กรุงเทพฯ นครศรีธรรมราช

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1.1.17.1

กรมวิชาการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.17.3 *Aonidomytilus albus* (Cockerell, 1893); A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium**.**

Figure 1.1.17.4 *Aulacaspis rosae* (Bouché, 1833); A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium.

กรมวิชาการเกษตร

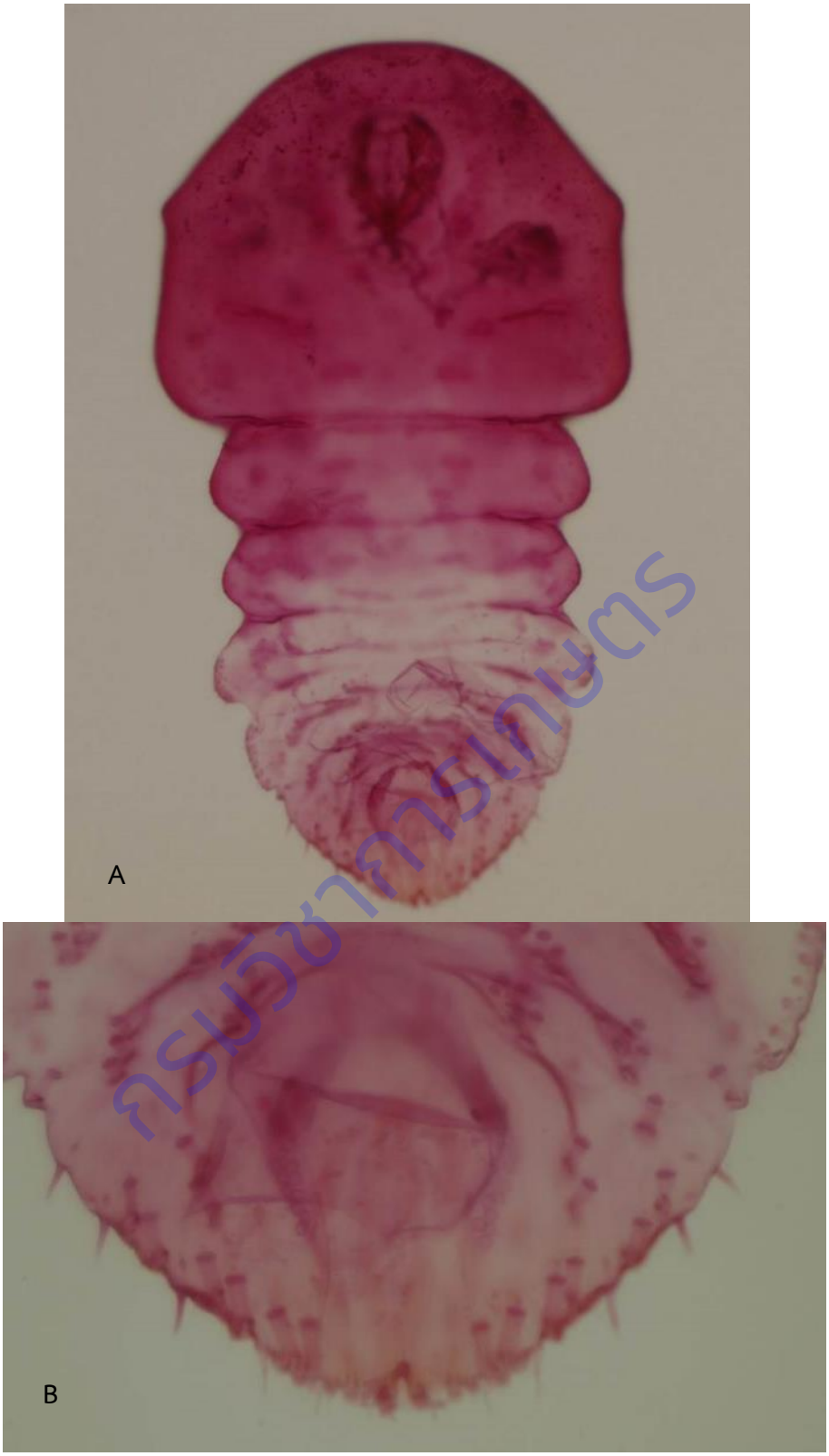


Figure 1.1.17.5 A*ulacaspis tubercularis* Newstead, 1906; A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.17.6 *Aulacaspis vitis* (Green, 1896); A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium

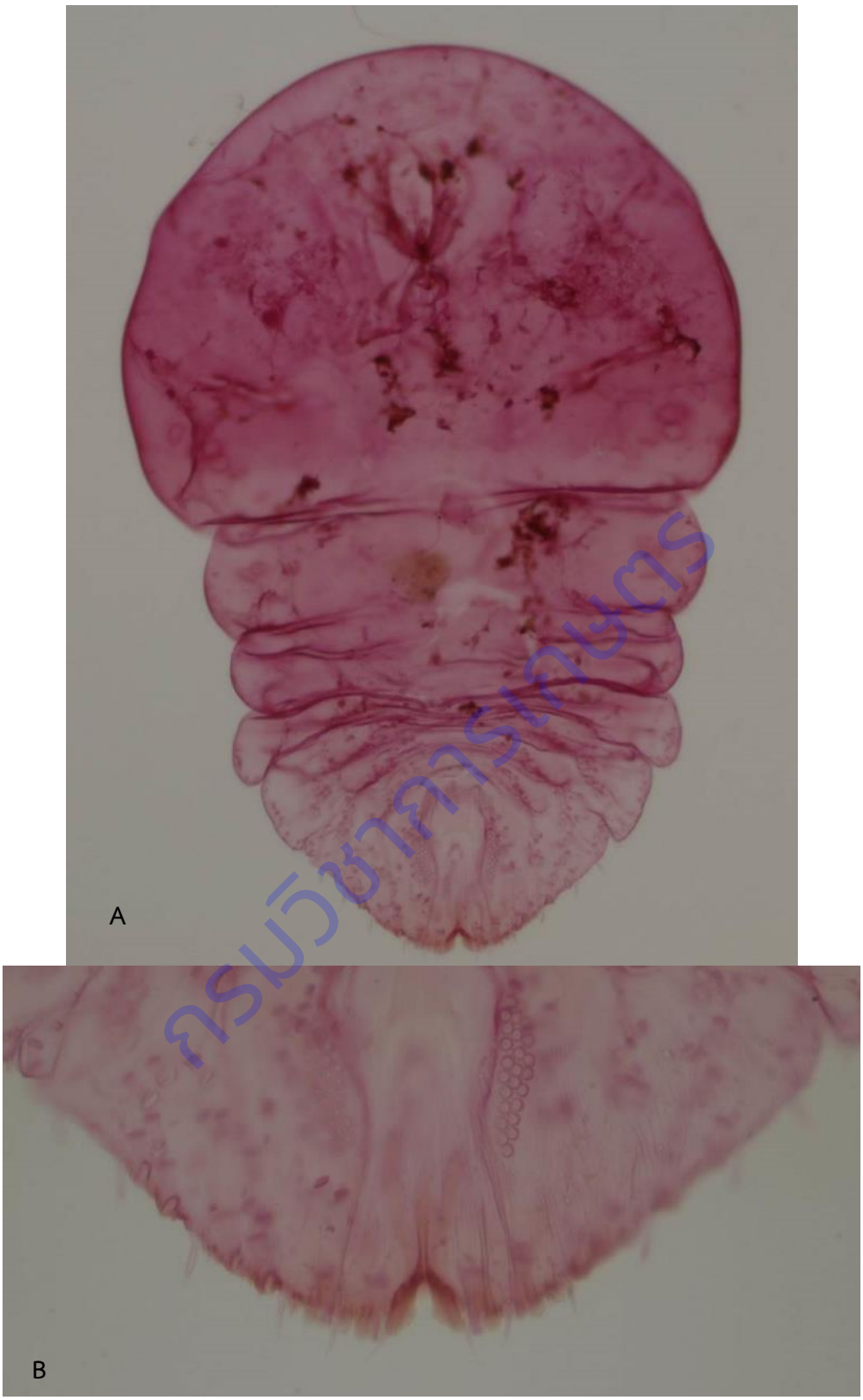


Figure 1.1.17.7 *Aulacaspis* sp.; A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium.

กรมวิชาการเกษตร

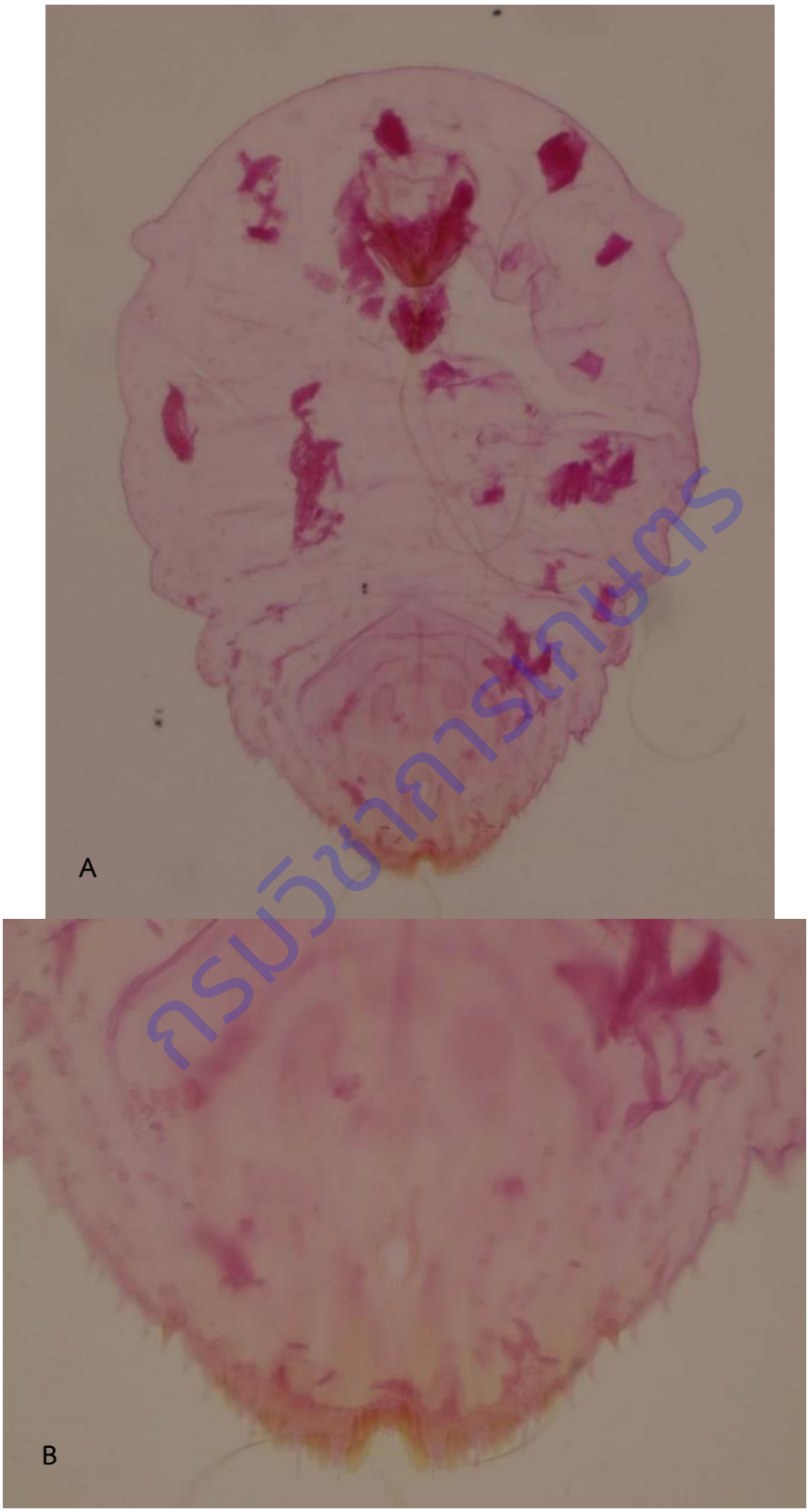
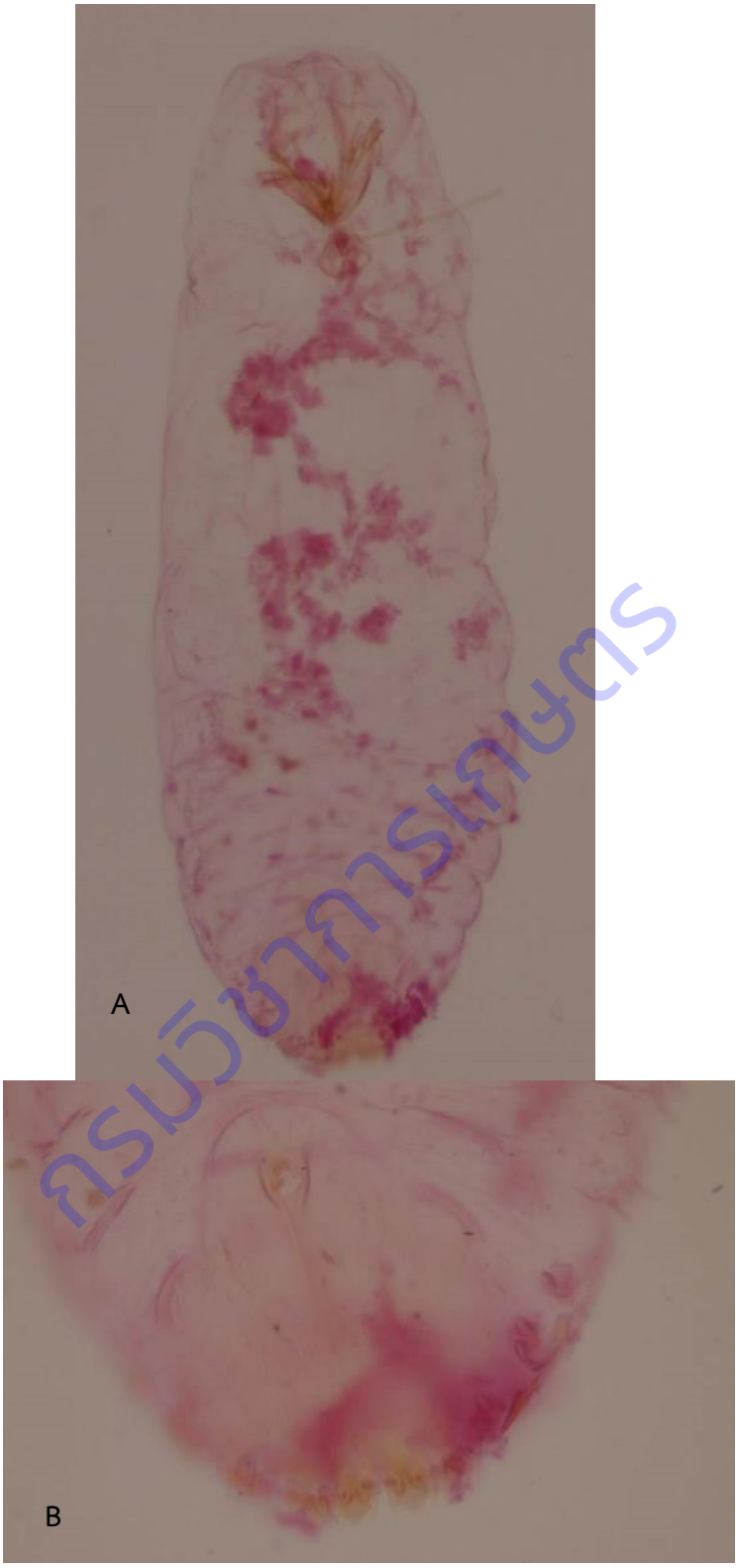


Figure 1.1.17.8 *Diaspis bromeliae* (Kerner, 1778); A)Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

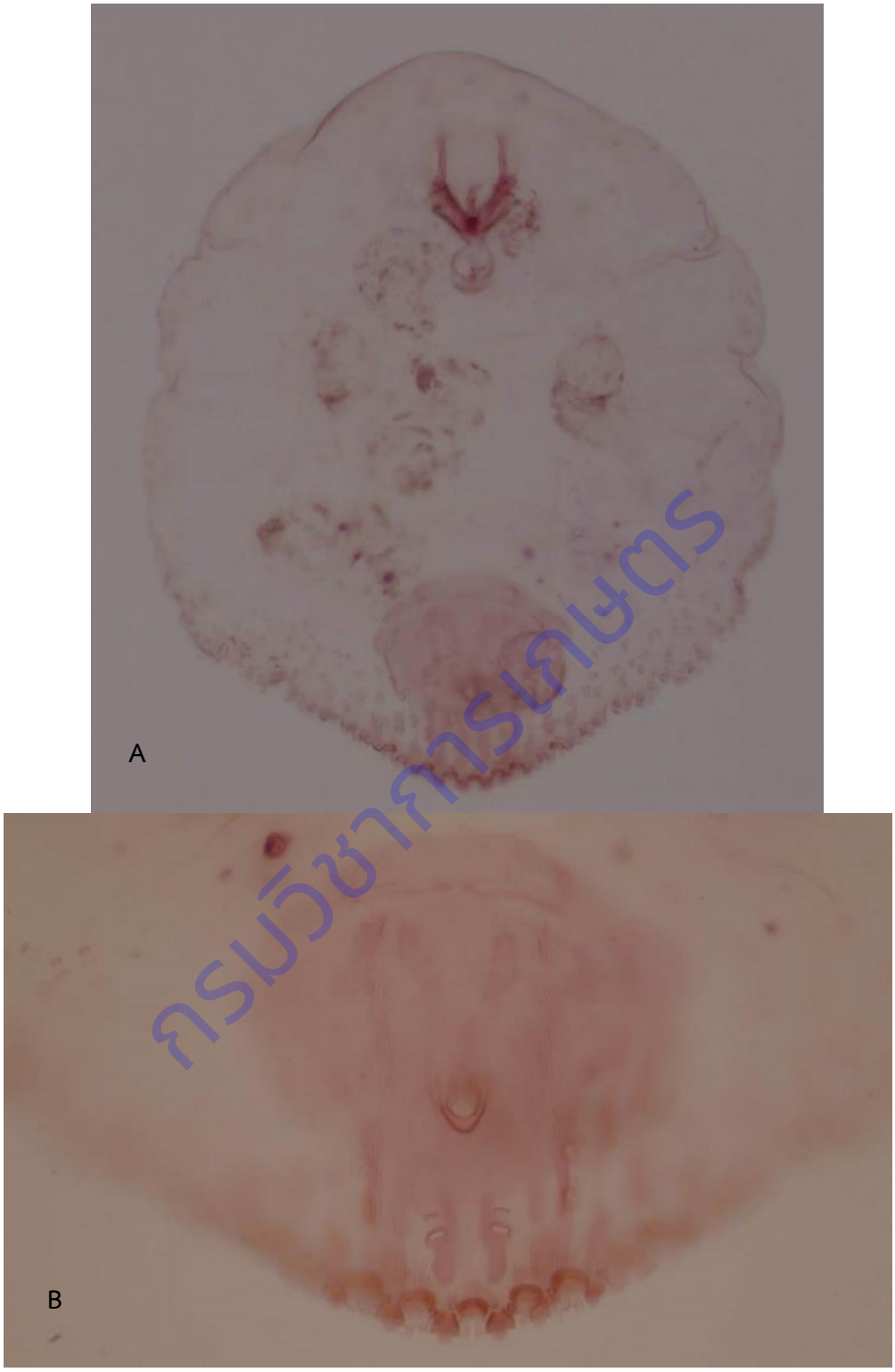
กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.17.9 *Lepidosaphes gloverii* (Packard, 1869); A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium



กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.17.10 *Lepidosaphes* sp.; A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium



กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.17.11 *Parlatoria pergandii* Comstock, 1881; A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium

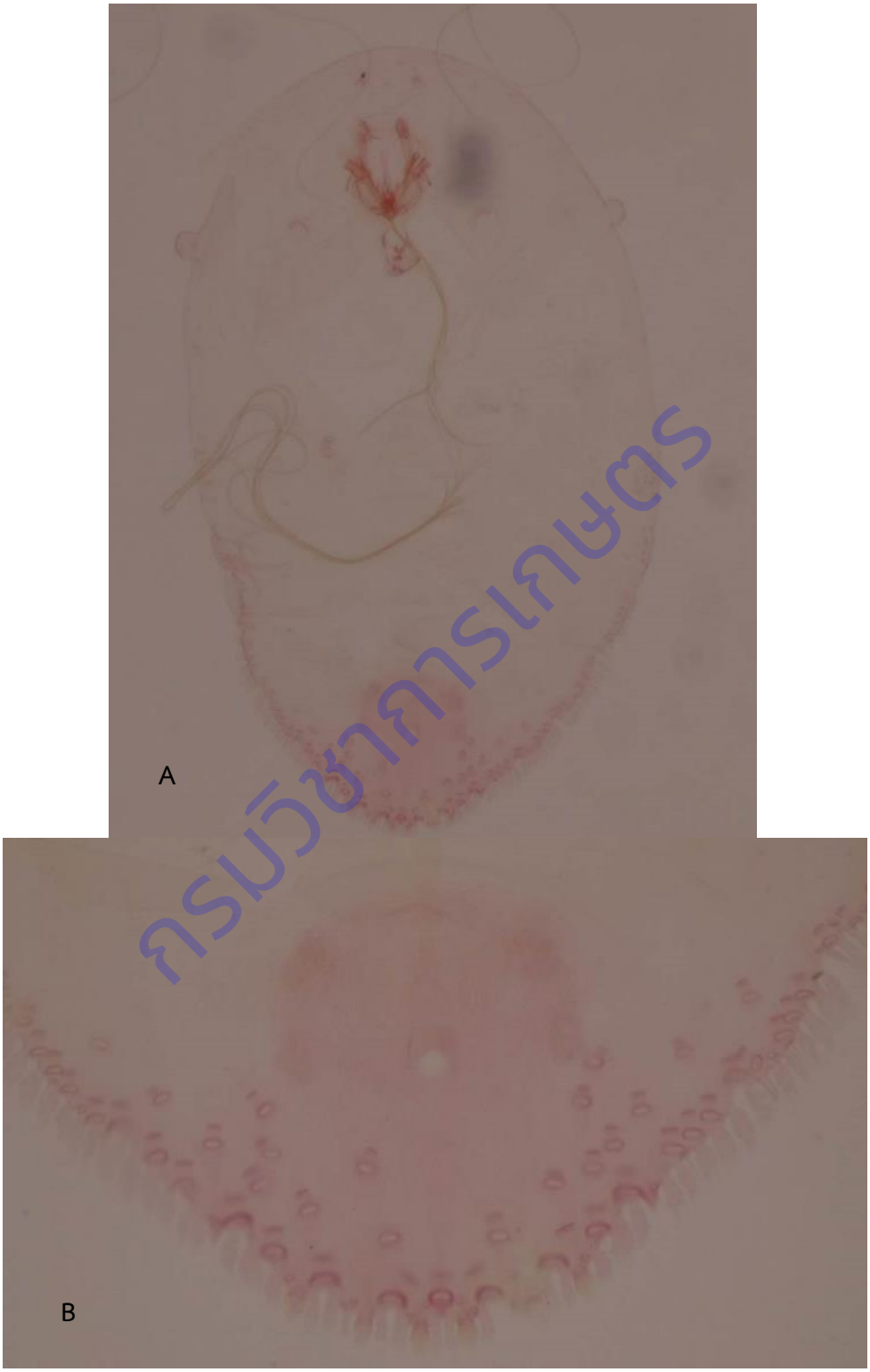


Figure 1.1.17.12 *Parlatoria ziziphi* (Lucas, 1853); A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium.

กรมวิชาการเกษตร

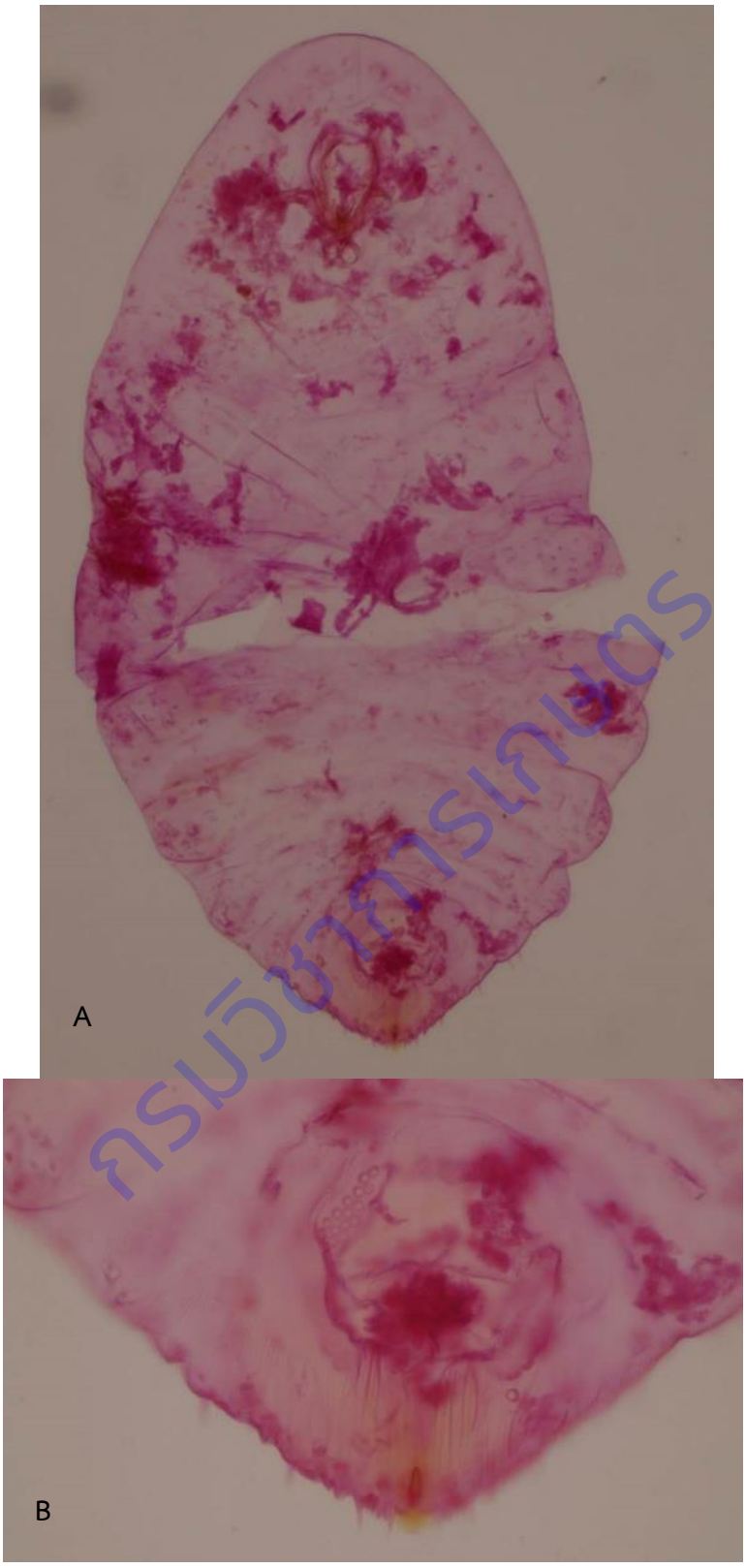


Figure 1.1.17.13 *Pinnaspis aspidiatrae* (Signoret, 1869); A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

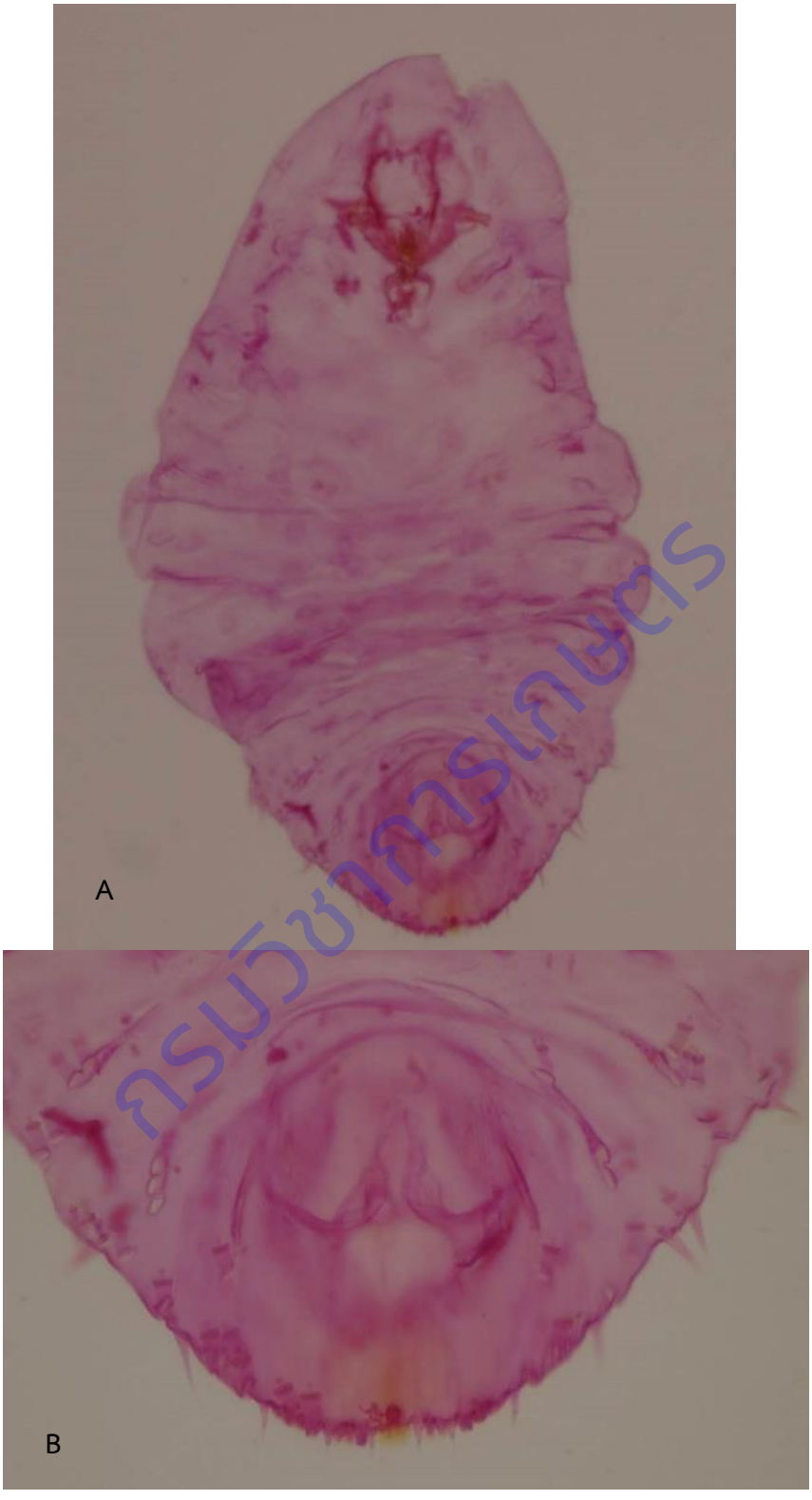


Figure 1.1.17.14 *Pinnaspis strachani* (Cooley, 1899); A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium.

กรมวิชาการเกษตร

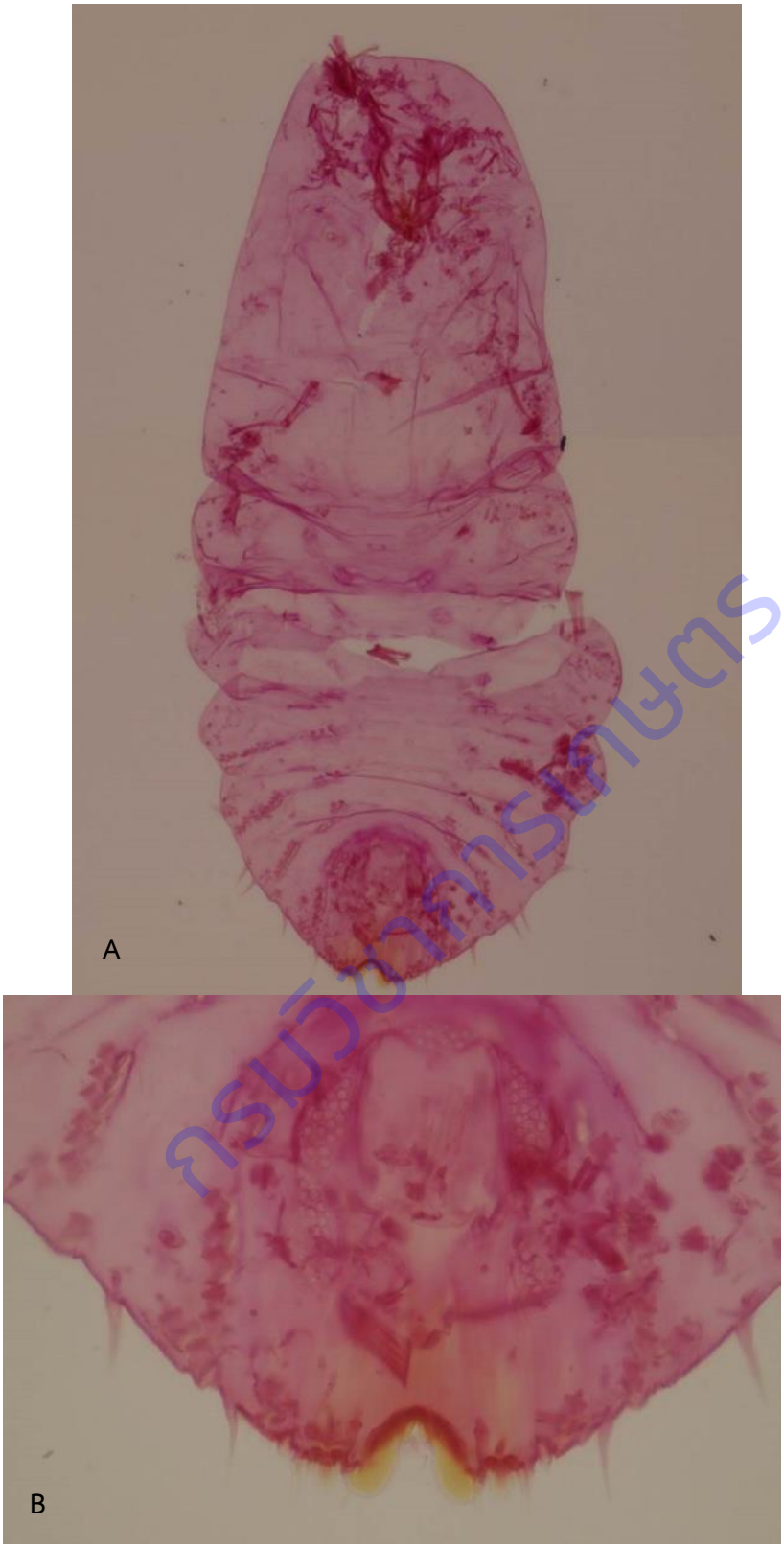
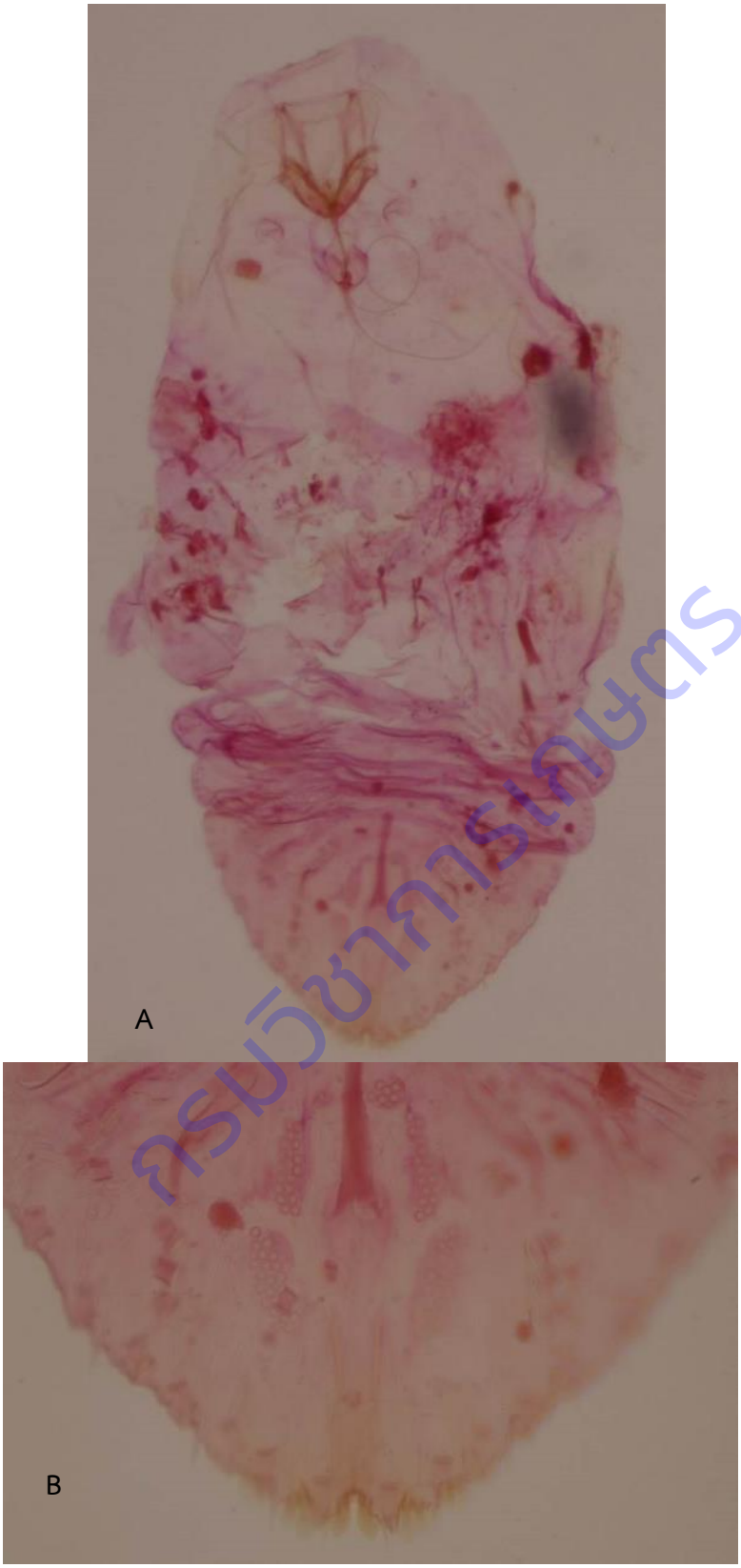


Figure 1.1.17.15 *Pseudaulacaspis cockerelli* (Cooley, 1897); A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium.



กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.17.16 *Unaspis citri* (Comstock, 1883); A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium.

Figure 1.1.17.17 Field view of Diaspidinae; A) *Aonidomytilus albus* (Cockerell), B) *Aulacaspis rosae* (Bouche'), C) *A. tubercularis* (Newstead) D), *A. vitis* (Green), E) *Aulacaspis* sp., F) *Parlatoria ziziphi* (Locau)

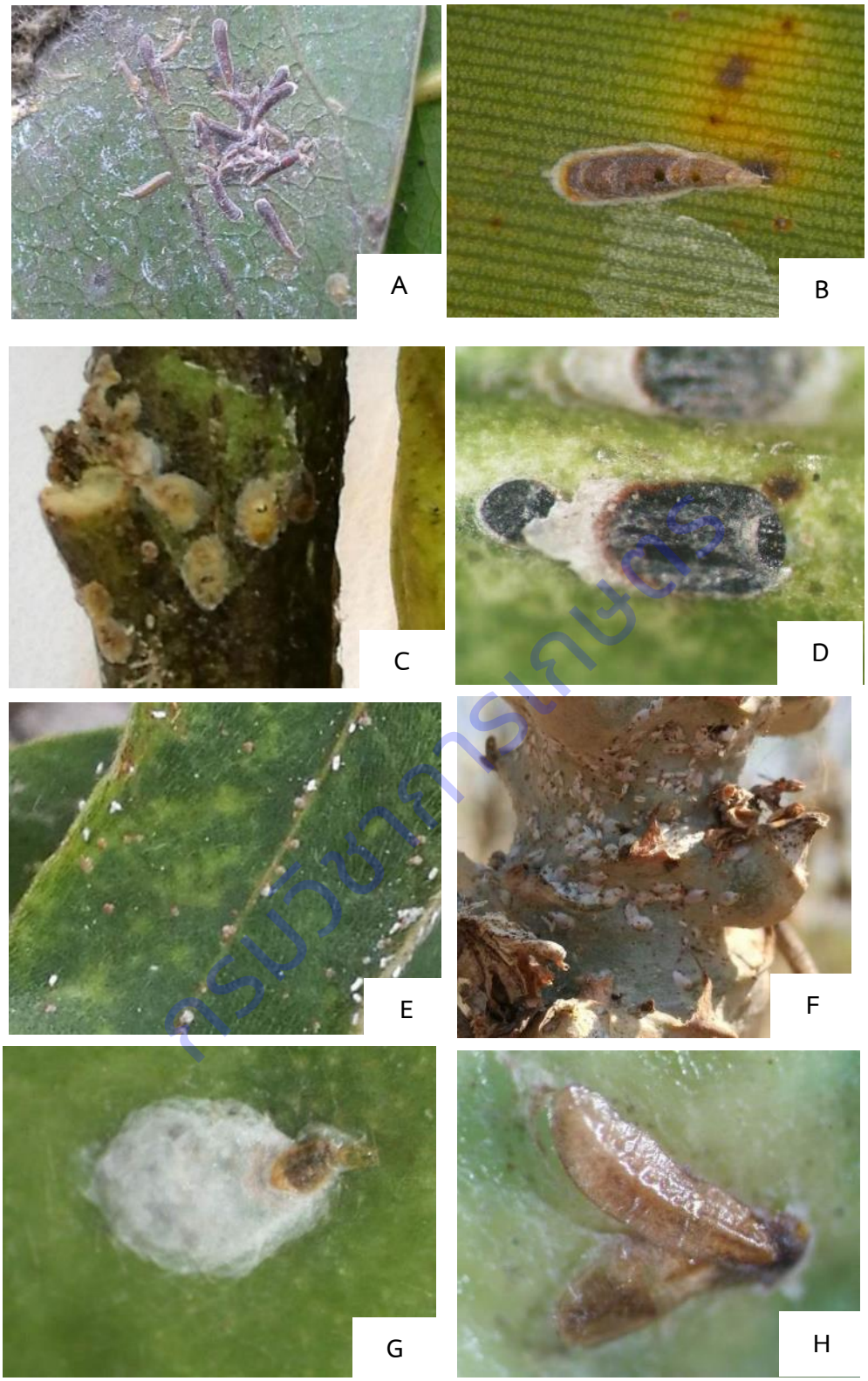


Figure 1.1.17.18 Field view of Diaspidinae; A) *Lepidosaphes gloverii* (Packard), B) *Lepidosaphes* sp., C) *Parlatoria pergandii* (Comstock), D) *P. ziziphi* (Locau), E) *Pinnaspis aspidiatrae* (Signorest), F) *P. strachani* (Cooley), G) *Pseudaulacaspis* cockerelli (Cooley), H) *Unaspis citri* (Comstock).

Table 1.1.17.1 Host plant and location of samples in this study.

Host Plants	Locations	Species
Cassava	Bangkok N 13°85'9.7" E 100°57'47.2" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Nakhon Sawan N 15°52'20.1" E 99°30'4.8" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Uthai Thani N 15°28'48.1" E 99°52'42.3" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Kamphaeng Phet N 16°8'29.1" E 99°34'48.0" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Saraburi N 14°52'56.5" E 101°7'9.1" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Nakhon Ratchasima N 14°23'45.0" E 101°41'22.2" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Khonkhen N 16°35'18.1" E 101°59'28.2" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Mahasarakham N 16°04'38.7" E 103°09'24.4" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Udonthani N 17°41'9.5" E 102°35'6.7" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Nong Khai N 18°2'39.8" E 102°20'11.5" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Mukdahan N 16°22'47.4" E 100°51'45.2" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Buriram N 14°41'50.2" E 102°29'50.7" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Si Sa Ket N 14°46'14.0" E 104°44'53.2" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Yasothon N 14°39'51.6" E 104° 15'51." (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Ubonratchathani N 14°58'28.7" E 104°58'35.5" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Chiangrai N 19°53'08.6" E 99°52'24.4" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Phitsanulok N 17°44'12.0" E 99°02'13.0" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Chachoengsao N 13°37'58.6" E 101°18'16.9" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Rayong N 12°57'23.7" E 101°3'9.3" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Chonburi N 12°57'23.2" E 101°13'9.3" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Ratchaburi N 13°32'28.9" E 99°22'37.8" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Kanchanaburi N 14°31'56.0" E 99°32'13.0" (C. Buamas)	*A. albus*
Cassava	Tak N 17°2'54.9" E 99°4'3.5" (C. Buamas)	*A. albus*
Star gooseberry	Khon Kaen N 16°27'43.6" E 102°37'13.1" (C. Buamas)	*A. rosae*
Rose	Saraburi N 16°27'43.6" E 102°37'13.1" (C. Buamas)	*A. rosae*
Mango	Bangkok N 13°85'9.7" E 100°57'47.2" (C. Buamas)	*A. tuberculatis*
Mango	Nonthaburi N 13°80'9.2" E 100°47'34.2" (C. Buamas)	*A. tuberculatis*
Mango	Pathum Thani N 14°08'9.2" E 100°53'34.2" (C. Buamas)	*A. tuberculatis*
Mango	Nakhon Pathom N 14°23'9.2" E 99°97'34.2" (C. Buamas)	*A. tuberculatis*
Mango	Samut Songkhram N 13°26'9.2" E 99°56'34.2" (C. Buamas)	*A. tuberculatis*
Mango	Lopburi N 14°50'55.5" E 100°56'21.5" (C. Buamas)	*A. tuberculatis*
Mango	Singburi N 14°50'34.5" E 100°25'25.2" (C. Buamas)	*A. tuberculatis*
Mango	Chainat N 15°8'48.4" E 100°14'26.3" (C. Buamas)	*A. tuberculatis*
Mango	Phichit N 16°25'7.5" E 100°8'34.6" (C. Buamas)	*A. tuberculatis*
Mango	Nakhon Sawan N 15°52'20.1" E 99°30'4.8" (C. Buamas)	*A. tuberculatis*
Mango	Kamphaeng Phet N 16°8'29.1" E 99°34'48.0" (C. Buamas)	*A. tuberculatis*
Mango	Saraburi N 14°52'56.5" E 101°7'9.1" (C. Buamas)	*A. tuberculatis*
Mango	Uthai Thani N 15°28'48.1" E 99°52'42.3" (C. Buamas)	*A. tuberculatis*
Mango	Nakhon Ratchasima N 14°23'45.0" E 101°41'22.2" (C. Buamas)	*A. tuberculatis*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

Table 1.1.17.1 Continue

Host Plants	Locations	Species
Mango	Khonkhen N 16°35'18.1" E 101°59'28.2" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Mahasarakham N 16°04'38.7" E 103°09'24.4" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Udonthani N 17°41'9.5" E 102°35'6.7" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Nong Khai N 18°2'39.8" E 102°20'11.5" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Mukdahan N 16°22'47.4" E 100°51'45.2" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Buriram N 14°41'50.2" E 102°29'50.7" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Si Sa Ket N 14°46'14.0" E 104°44'53.2" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Yasothon N 14°39'51.6" E 104° 15'51." (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Ubonratchathani N 14°58'28.7" E 104°58'35.5" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Chiangmai N 18°60'52.0" E 98°89'21.0" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Chiangrai N 19°53'08.6" E 99°52'24.4" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Lamphun N 18°33'44.0" E 98°59'27.0" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Lampang N 17°44'12.0" E 99°02'13.0" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Phitsanulok N 17°44'12.0" E 99°02'13.0" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Uttaradit N 17°14'22.0" E 100°14'42.3" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Chachoengsao N 13°37'58.6" E 101°18'16.9" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Chantaburi N 12°30'47.6" E 102°10'16.8" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Durian	Chantaburi N 12°29'31.8" E 102°13'53.3" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Chonburi N 12°57'23.2" E 101°13'9.3" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Rayong N 12°57'23.7" E 101°3'9.3" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Durian	Rayong N 12°39'7.5" E 101°27'3.3" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Ratchaburi N 13°32'28.9" E 99°22'37.8" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Kanchanaburi N 14°31'56.0" E 99°32'13.0" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Tak N 17°2'54.9" E 99°4'3.5" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Petchaburi N 12°5'43.0" E 99°54'13.3" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Prachuap Khiri Khan N 11°5'49.6" E 99°28'47.3" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Surat Thani N 9°8'31.7" E 99°37'55.5" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Chumphon N 10°20'34.9" E 99°4'45.5" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Langsat	Chumphon N 10°15'25.6" E 98°54'52.5" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Mango	Nakhon Si Thammarat N 8°18'27.4" E 99°46'25.4" (C. Buamas)	*A. tuberculoris*
Durian	Chantaburi N 12°30'47.6" E 102°10'16.8" (C. Buamas)	*A. vitis*
Durian	Rayong N 12°57'23.7" E 101°3'9.3" (C. Buamas)	*A. vitis*
Durian	Prachuap Khiri Khan N 11°3'15.0" E 99°26'0.7" (C. Buamas)	*A. vitis*
Mango	Chumphon N 10°15'30.9" E 98°55'39.6" (C. Buamas)	*A. vitis*
Avacado	Phetchabun N 16°35'11.1" E 100°57'23.14" (A. Rukkasikorn)	*Aulacaspis* sp.
Avacado	Tak N 16°75'15.9" E 98°93'55.3" (C. Buamas)	*Aulacaspis* sp.
Pineapple	Rayong N 12°55'33.3" E 101°14'43.2" (C. Buamas)	*D. bromeliae*
Pineapple	Chonburi; N 12°53'49.0" E 101°53'17.5" (C. Buamas)	*D. bromeliae*
Pineapple	Chanthaburi N 12°44'23.4" E 101°08'21.4" (C. Buamas)	*D. bromeliae*
Rhizophora sp.	Chanthaburi N 12°34'27.4" E 101°54'11.7" (C. Buamas)	*L. gloverii*
Banana	Petchaburi N 12°5'43.0" E 99°54'13.3" (C. Buamas)	*L. gloverii*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

Table 1.1.17.1 Continue

Host Plants	Locations	Species
Frangipani	Tak N 17°2'54.9" E 99°4'3.5" (C. Buamas)	*L. gloverii*
Mango	Petchaburi N 12°5'43.0" E 99°54'13.3" (C. Buamas)	*L. gloverii*
Nut palm	Chumphon N 10°15'30.9" E 98°55'39.6" (C. Buamas)	*Lepidosaphes* sp.
Banana	Ratchaburi N 13°32'28.9" E 99°22'37.8" (C. Buamas)	*Lepidosaphes* sp.
Lime	Bangkok N 13°85'9.7" E 100°57'47.2" (C. Buamas)	*P. pergandii*
Pomelo	Bangkok N 13°85'9.7" E 100°57'47.2" (C. Buamas)	*P. pergandii*
Mango	Ratchaburi N 13°32'28.9" E 99°22'37.8" (C. Buamas)	*P. pergandii*
Lime	Bangkok N 13°85'9.7" E 100°57'47.2" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Nonthaburi N 13°80'9.2" E 100°47'34.2" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Pathum Thani N 14°08'9.2" E 100°53'34.2" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Nakhon Pathom N 14°23'9.2" E 99°97'34.2" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Samut Songkhram N 13°26'9.2" E 99°56'34.2" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Lopburi N 14°50'55.5" E 100°56'21.5" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Singburi N 14°50'34.5" E 100°25'25.2" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Chainat N 15°8'48.4" E 100°14'26.3" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Phichit N 16°25'7.5" E 100°8'34.6" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Nakhon Sawan N 15°52'20.1" E 99°30'4.8" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Kamphaeng Phet N 16°8'29.1" E 99°34'48.0" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Saraburi N 14°52'56.5" E 101°7'9.1" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Uthai Thani N 15°28'48.1" E 99°52'42.3" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Nakhon Ratchasima N 14°23'45.0" E 101°41'22.2" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Khonkhen N 16°35'18.1" E 101°59'28.2" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Mahasarakham N 16°04'38.7" E 103°09'24.4" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Udonthani N 17°41'9.5" E 102°35'6.7" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Nong Khai N 18°2'39.8" E 102°20'11.5" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Mukdahan N 16°22'47.4" E 100°51'45.2" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Buriram N 14°41'50.2" E 102°29'50.7" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Si Sa Ket N 14°46'14.0" E 104°44'53.2" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Yasothon N 14°39'51.6" E 104° 15'51." (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Ubonratchathani N 14°58'28.7" E 104°58'35.5" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Chiangmai N 18°60'52.0" E 98°89'21.0" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Chiangrai N 19°53'08.6" E 99°52'24.4" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Pomelo	Chiangrai N 19°53'08.6" E 99°52'24.4" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Lamphun N 18°33'44.0" E 98°59'27.0" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Lampang N 17°44'12.0" E 99°02'13.0" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Phitsanulok N 17°44'12.0" E 99°02'13.0" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Uttaradit N 17°14'22.0" E 100°14'42.3" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Chachoengsao N 13°37'58.6" E 101°18'16.9" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Chantaburi N 12°30'47.6" E 102°10'16.8" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Chonburi N 12°57'23.2" E 101°13'9.3" (C. Buamas)	*P. ziziphi*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Table 1.1.17.1 Continue

Host Plants	Locations	Species
Lime	Rayong N 12°57'23.7" E 101°3'9.3" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Rayong N 12°39'7.5" E 101°27'3.3" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Ratchaburi N 13°32'28.9" E 99°22'37.8" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Kanchanaburi N 14°31'56.0" E 99°32'13.0" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Tak N 17°2'54.9" E 99°4'3.5" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Petchaburi N 12°5'43.0" E 99°54'13.3" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Prachuap Khiri Khan N 11°5'49.6" E 99°28'47.3" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Surat Thani N 9°8'31.7" E 99°37'55.5" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Pomelo	Chumphon N 10°20'34.9" E 99°4'45.5" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Chumphon N 10°15'25.6" E 98°54'52.5" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Lime	Nakhon Si Thammarat N 8°18'27.4" E 99°46'25.4" (C. Buamas)	*P. ziziphi*
Banana	Bangkok N 13°85'9.7" E 100°57'47.2" (C. Buamas)	*P. aspidiatrae*
Gomphrena globosa	Pathum Thani N 14°08'9.2" E 100°53'34.2" (S.Sukkul)	*P. aspidiatrae*
Banana	Nakhon Sawan N 15°52'20.1" E 99°30'4.8" (C. Buamas)	*P. aspidiatrae*
Banana	Uthai Thani N 15°28'48.1" E 99°52'42.3" (C. Buamas)	*P. aspidiatrae*
Frangipani	Khonkhen N 16°35'18.1" E 101°59'28.2" (C. Buamas)	*P. aspidiatrae*
Gomphrena globosa	Bangkok N 13°85'9.7" E 100°57'47.2" (C. Buamas)	*P. strachani*
Zinnia violacea	Pathum Thani N 14°08'9.2" E 100°53'34.2" (S.Sukkul)	*P. strachani*
Cassava	Nakhon Sawan N 15°52'20.1" E 99°30'4.8" (C. Buamas)	*P. strachani*
Cassava	Uthai Thani N 15°28'48.1" E 99°52'42.3" (C. Buamas)	*P. strachani*
Cassava	Kamphaeng Phet N 16°8'29.1" E 99°34'48.0" (C. Buamas)	*P. strachani*
Cassava	Saraburi N 14°52'56.5" E 101°7'9.1" (C. Buamas)	*P. strachani*
Cassava	Nakhon Ratchasima N 14°23'45.0" E 101°41'22.2" (C. Buamas)	*P. strachani*
Cassava	Khonkhen N 16°35'18.1" E 101°59'28.2" (C. Buamas)	*P. strachani*
Snake plant	Mahasarakham N 16°04'38.7" E 103°09'24.4" (C. Buamas)	*P. strachani*
Cassava	Nong Khai N 18°2'39.8" E 102°20'11.5" (C. Buamas)	*P. strachani*
Cassava	Chachoengsao N 13°37'58.6" E 101°18'16.9" (C. Buamas)	*P. strachani*
Cassava	Rayong N 12°57'23.7" E 101°3'9.3" (C. Buamas)	*P. strachani*
Cassava	Chonburi N 12°57'23.2" E 101°13'9.3" (C. Buamas)	*P. strachani*
Cassava	Ratchaburi N 13°32'28.9" E 99°22'37.8" (C. Buamas)	*P. strachani*
Cassava	Kanchanaburi N 14°31'56.0" E 99°32'13.0" (C. Buamas)	*P. strachani*
Frangipani	Tak N 17°2'54.9" E 99°4'3.5" (C. Buamas)	*P. strachani*
Fig	Pathum Thani N 14°08'9.2" E 100°53'34.2" (S. Sukkul)	*P. cockerlli*
Oleander	Uthai Thani N 15°28'48.1" E 99°52'42.3" (C. Buamas)	*P. cockerlli*
Lime	Bangkok N 13°85'9.7" E 100°57'47.2" (S. Sukkul)	*U. citri*
Pomelo	Bangkok N 13°85'9.7" E 100°57'47.2" (S. Sukkul)	*U. citri*
Mangosteen	Nakhon Si Thammarat N 8°18'27.4" E 99°46'25.4" (C. Buamas)	*U. citri*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

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

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ นำไปจัดทำแนวทางการวินิจฉัย (key) และรายละเอียดของเพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ย่อย Diaspidinae ทั้ง 14 ชนิด โดยตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชโดยเฉพาะเพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ Diaspididae ในประเทศไทย ซึ่งยังมีข้อมูลอยู่น้อยและไม่เป็นปัจจุบันเพื่อให้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูเพื่อดำเนินการด้านมาตรการสุขอนามัยในการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรยังประเทศคู่ค้าต่างๆ รวมถึงการหาแนวทางป้องกันกำจัดที่ถูกต้องเหมาะสมแก่เกษตรกรในอนาคตต่อไป

สำนักวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.18 อนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae (Hemiptera: Coccoidea) ในประเทศไทย

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

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ชมัยพร บัวมาศ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ยุวรินทร์ บุญทบ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	จารุวัตถ์ แต้กุล	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สุนัดดา เชาวลิต	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2564 เพื่อทราบชนิด พืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย ที่มีอยู่ในประเทศไทย เก็บรวบรวมตัวอย่างจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ทั่วทุกภูมิภาคในประเทศ นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จากการตรวจจำแนกชนิดตัวอย่างเพลี้ยแป้งในราก จำนวน 95 ตัวอย่าง พบเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae จำนวน 3 สกุล 3 ชนิด ได้แก่ 1) *Geococcus coffeae* Green 2) *Rhizoecus americanus* (Hambleton) 3) *Ripersiella saintpauliae* (Williams) และได้จัดทำแนวทางการวินิจฉัยพร้อมรายละเอียดโดยตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชในประเทศไทย นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการตรวจสอบการนำเข้าพืชชนิดต่างๆ ที่มีการนำเข้าพร้อมวัสดุปลูกเพื่อป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นและความพร้อมในการหาแนวทางป้องกันกำจัดที่ถูกต้องเหมาะสมในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ: เพลี้ยแป้งในราก เพลี้ยแป้งในดิน เพลี้ยแป้งใต้ดิน วงศ์ Rhizoecidae

Abstract

Taxonomic study of Rhizoecidae was conducted from October 2018 to September 2021. Survey and specimen collecting were carried out from various agricultural crops across Thailand. The descriptions of the species found, host plants, distribution as well as generic key to species are presented. The total of three genera and three identified species are revealed: 1) *Geococcus coffeae* Green 2) *Rhizoecus americanus* (Hambleton) 3) *Ripersiella saintpauliae* (Williams) and has provided key. All specimens from this research collect at Insect Museum, Department of Agriculture to improve a database of insect pests in Thailand. In addition, can be used as a key

กรมวิชาการเกษตร

for inspection of various plants that are imported with planting material. In order to prevent alien pest species and prepare the most suitable method to management in the future.

Key words: root mealybug, ground mealybug, subteranian mealybug, Rhizoecidae

คำนำ

เพลี้ยแป้งหลายชนิดจัดเป็นเพลี้ยแป้งที่อาศัยอยู่ในดิน (subterranean mealybug) มักพบอาศัยอยู่บริเวณส่วนรากของพืช ซึ่งมีอยู่หลายวงศ์ด้วยกัน ไม่ว่าจะเป็น วงศ์ Pseudococcidae และ Potuidae แต่วงศ์ที่พบมากที่สุดได้แก่ Rhizoecidae (root mealybug หรือ ground mealybug) ทั่วโลกมีรายงานไว้จำนวน 18 สกุล 244 ชนิด ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบจำนวน 6 สกุล 41 ชนิด (Ben-Dov., *et. al*.,2014) ซึ่งพบว่ามีเพลี้ยแป้งในรากวงศ์นี้อาศัยอยู่ในดินเท่านั้น โดยดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณรากของพืชอาศัย และมีพืชอาศัยหลายชนิด โดยเฉพาะกลุ่มพืชเศรษฐกิจ ทั้งไม้ผล ไม้ยืนต้น และไม้ดอกไม้ประดับ (Hambleton, 1976) นอกจากนี้ในบางชนิดอาศัยอยู่ร่วมกันกับมด ซึ่งสามารถสร้างความเสียหายให้แก่รากของพืชได้ หากพบประชากรของเพลี้ยแป้งเพิ่มปริมาณมากจนคลุมทั้งบริเวณของรากซึ่งทำให้รากไม่สามารถหาอาหารได้ พืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่ หรือชะงักการเจริญเติบโตโดยไม่ทราบสาเหตุ และทำให้มีลักษณะผิดปกติต่าง ๆ เช่น ใบเหลือง ยอดแห้ง และยืนต้นตาย สำหรับเพลี้ยแป้งในรากวงศ์ในประเทศไทยมีข้อมูลน้อยมากโดยเฉพาะข้อมูลในพืชเศรษฐกิจ

เนื่องจากเพลี้ยแป้งในรากวงศ์นี้มีขนาดค่อนข้างเล็กเมื่อเทียบกับเพลี้ยแป้งในรากวงศ์อื่นๆ ซึ่งอาจติดไปกับส่วนรากของพืชที่ใช้ในการขยายพันธุ์และสามารถส่งผลกระทบทั้งด้านปริมาณและคุณภาพของพืชโดยที่เกษตรไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริง และยังกระทบต่อมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชในการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรไปยังประเทศคู่ค้าต่างๆ โดยเฉพาะการส่งหัวพันธุ์ และไม้ดอกไม้ประดับที่มีส่วนของรากติดไปโดยเฉพาะกลุ่มที่ส่งไปพร้อมวัสดุปลูก ดังนั้นการศึกษาด้านอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งในรากนี้ทำให้สามารถจัดทำแนวทางการวินิจฉัยเพื่อทราบชนิด รวมทั้งพืชอาหารและเขตการแพร่กระจาย เพื่อสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืชที่พบในประเทศ การจัดทำแนวทางในการจำแนกชนิด รวมทั้งการหาวิธีการป้องกันกำจัดที่ถูกต้องและเหมาะสมเพื่อเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกร และนักวิชาการเกี่ยวข้องต่อไปสามารถนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเพลี้ยแป้งในรากที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช

2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ขวดดอง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง และถังรักษาความเย็น

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ (alcohol) 50-100% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% กรดแกลเซียลอะซิติก (glacial acetic acid) แอซิดฟุชซิน (acid fuchsin) กรดเกลือ (hydrochloric acid) โคล์ฟออย (clove oil) และ แคนาดาบัลซัม (Canada balsam) เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องใส่สไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร

กรมวิชาการเกษตร

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

5. อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา rotting และกระดาษไขเขียนแบบ

6. เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae

- วิธีการ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งในราก โดยสำรวจแหล่งปลูกพืชที่สำคัญตามภูมิภาคต่างๆ ทั่วประเทศไทย เมื่อพบตัวอย่างเพลี้ยแป้งในราก ตัดชิ้นส่วนของรากที่มีเพลี้ยแป้งอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วใส่ในถุงพลาสติก และใช้วิธีการสังเกตอาการต่างๆ เช่น ใบร่วง ยอดแห้ง ยืนต้นตายโดยไม่ทราบสาเหตุ และทำการขุดบริเวณราก นอกจากนี้จะใช้วิธีการขุดดินบริเวณรอบๆ รากของต้นพืช นำไปแยกแมลงโดยใช้ Berlese funnel เพื่อช่วยในการแยกแมลง บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์(GPS) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ สำหรับการเก็บตัวอย่างในแต่ละจุด จะเก็บให้ได้ตัวอย่างมากที่สุด เพื่อนำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการและจัดทำสไลด์ถาวรในการจำแนกชนิดต่อไป

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

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

4. วิธีการทำสไลด์ถาวร

4.1 ใช้เข็มเขี่ยเจาะบริเวณกลางส่วนท้องของตัวอย่างเพลี้ยแป้งในราก

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

4.3 นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งในรากย้ายลงในน้ำกลั่น กดเบา ๆ บนลำตัวด้วยเข็มดัดปลายโค้ง เพื่อทำให้ไข่ ตัวอ่อน และของเหลวที่อยู่ในลำตัวหลุดออกมาทางรอยที่เจาะไว้ ถ้ายังมีก้อนไขมันตกค้างอยู่ให้นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 2 – 3 นาที

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

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

4.6 ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95% แช่ทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อกำจัดสีส่วนเกิน

4.7 ย้ายลงในโคล์ฟออย (clove oil) แช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

กรมวิชาการเกษตร

4.8 นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งในรากวางบนแผ่นสไลด์แก้ว ใช้กระดาษกรองซับโคล์ฟอยส่วนที่เกินออก หยดแคนาดาบัลซัม (Canada balsam) 1 หยดบนตัวอย่างแมลงจัดรูปร่าง ให้สวยงามไม่บิดเบี้ยวหรือทับซ้อนกัน ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

4.9นำไปอบให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาอย่างน้อย 3 เดือน ขึ้นอยู่กับตัวอย่าง

5. ตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยแป้งในรากบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Williams (2004) Hodgson (2012) Jansen (2003) Jansen and Westenberg (2015) และ Tanaka (2016) รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างสไลด์เพลี้ยแป้งในรากที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรและวาดรูปแสดงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกเพลี้ยแป้งในรากแต่ละชนิด และจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae ซึ่งจะนำตัวอย่างสไลด์ที่ได้ มาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ของลำตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง ตรวจดูลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก ได้แก่ รูปทรงของลำตัว จำนวนปล้องหนวด (antennae) ไม่เกิน 6 ปล้อง ความยาวของหนวดปล้องสุดท้าย ลักษณะของท่อที่มี 3 ช่องประกบกันหรือพันเป็นเกลียว (tritubular duct) มีเพียง 2 ช่องประกบกันหรือพันเป็นเกลียว (bitubular duct) ลักษณะของท่อที่มี 3 ช่องยื่นยาวมาจากผนังลำตัว (tritubular cerores) ท่อที่มี 2 ช่องยื่นยาวมาจากผนังลำตัว (bitubular cerores) ช่องเปิดที่มีลักษณะคล้ายรอยแตกตามขวางของลำตัว (ostioles) ช่องเปิด (pores) รูปแบบต่างๆ ได้แก่ ช่องเปิดรูปวงกลม (multilocular disc pore) ช่องเปิดรูปสามเหลี่ยม (trilocular disc pore) รูวงกลม (curculi) การปรากฏของส่วนต่างๆ บนผนังลำตัวด้านหลัง (dorsum) หรือ ผนังลำตัวด้านท้อง (venter) และ ลักษณะของลอนปลายส่วนท้อง (anal lobe) แผ่นแข็งบริเวณลอนปลายส่วนท้อง (sclerotized anal lobes) วงแหวนปลายส่วนท้อง (anal ring) จำนวนเส้นขนบนวงแหวนปลายส่วนท้อง (anal ring setae) นำลักษณะที่สำคัญเหล่านี้มาเพื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละชนิด หลังจากนั้นจึงนำข้อมูลต่างๆ ที่ได้รวบรวมจัดทำแนวทางวินิจฉัยระดับสกุลและระดับชนิดของเพลี้ยแป้งในรากวงศ์นี้ และยังมีข้อมูลการแพร่กระจายพร้อมพืชอาศัย

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

7. จัดเก็บตัวอย่างเพลี้ยแป้งในรากในกล่องใส่สไลด์ถาวรและนำเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์ต่อไป

- เวลาและสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2561 ถึง เดือนกันยายน 2564

สถานที่ 1. แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่างๆ ในเขตภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคตะวันตกและภาคใต้

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตวิวทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งในราก จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในพื้นที่เขตภาคกลางได้แก่จังหวัด สมุทสงคราม สมุทรสาคร ราชบุรี ลพบุรี สระบุรี ปทุมธานี นนทบุรี กรุงเทพฯ เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่จังหวัดนครราชสีมา มหาสารคาม ขอนแก่น อุดรธานี หนองคาย มุกดาหาร สุรินทร์ ศรีสะเกษ ยโสธร และอุบลราชธานี เขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ และลำปาง และภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ชลบุรี ตราด ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ชมุพร นครศรีธรรมราช และระนอง จากแปลงปลูกพืชต่าง ๆ ได้แก่ ทุเรียน มังคุด มะม่วง น้อยหน่า ขิง ข่า โป๊ยเซียน ปทุมมา ชวนชม ลิ้นมังกร ว่านงาช้าง และวัชพืช นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จากการตรวจจำแนกชนิดตัวอย่างเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae จำนวน 95 ตัวอย่าง พบทั้งสิ้น 3 สกุล 3 ชนิด ได้แก่ 1) *Geococcus coffeae* Green 2) *Rhizoecus americanus* (Hambleton) 3) *Ripersiella saintpauliae* (Williams) ซึ่งได้จัดทำแนวทางการวินิจฉัย (key) และรายละเอียดของเพลี้ยแป้งในรากทั้ง 3 ชนิด ดังต่อไปนี้

แนวทางการวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae

1. มีแผ่นแข็งที่หนามากบริเวณปลายส่วนท้อง ท่อที่มี 3 ท่อประกบกันเป็นรูปทรงสามเหลี่ยม มีขนแข็งจำนวน 1 คู่บริเวณระหว่างลอนปลายส่วนท้องทั้ง 2 อันและมีอีก 1 คู่บริเวณขอบของส่วนหัวตรงข้ามกับหนวดพบบนผนังลำตัวด้านหลังเท่านั้น ..... ***Geococcus coffeae*** **Green**

- ไม่มีแผ่นแข็งบริเวณปลายส่วนท้องหรืออาจจะมีเพียงบางๆ มีท่อที่มี 3 ท่อพันเป็นเกลียวและท่อที่มี 2 ท่อพันเป็นเกลียว 2

2. พบท่อที่มี 3 ท่อยื่นยาวมาจากผนังลำตัวด้านหลังมีขนาดใหญ่ที่สุด ท่อที่มี 3 ท่อยื่นยาวมาจากผนังลำตัวด้านท้องมี 2 ขนาดแต่มีขนาดเล็กกว่าที่พบบนผนังลำตัวด้านหลังอย่างชัดเจน ..... ***Rhizoecus americanus*** **(Hambleton)**

- พบท่อที่มี 2 ท่อยื่นยาวมาจากผนังลำตัวด้านหลังมีลักษณะอ้วน ท่อที่มี 2 ท่อยื่นยาวมาจากผนังลำตัวด้านท้องมีขนาดที่เล็กกว่าที่พบบนผนังลำตัวด้านหลังมาก.....***Ripersiella saintapauliae*** **(Williams)**

รายละเอียดของเพลี้ยแป้งในรากในระดับสกุลและชนิด

1. Genus *Geococcus* Green, 1902

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

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปทรงยาวรี หรือรูปไข่กว้าง ลอนปลายส่วนท้องเห็นได้ชัดเจน มีแผ่นแข็งขนาดใหญ่และหนาล้อมรอบ หนวดค่อนข้างสั้น มีจำนวน 6 ปล้อง หนวดปล้องสุดท้ายมีความ

กรมวิชาการเกษตร

ยาวมากกว่าปล้องอื่นๆ ไม่มีตา รูวงกลม มี 3 จุด ได้แก่ จุดกึ่งกลางของอกปล้องที่ 3 (metathorax) ท้องปล้องที่ 2 และ 3 มีขนแข็งบนส่วนหัวของผนังลำตัวด้านหลังตรงข้ามกับหนวดและระหว่างลอนปลายส่วนท้อง มีท่อที่มี 3 ท่อ ประกบกันเป็นลักษณะรูปทรงสามเหลี่ยม โดยไม่มีลักษณะของท่อที่ยื่นยาวออกมากจากผนังลำตัว

Geococcus coffeae Green, 1933

(Figure 1.1.18.1 และ 1.1.18.2)

ชื่อพ้อง : *Geococcus coffeae* Green, 1933: 54. Type depository: London: The Natural History Museum, England, UK

ชื่อสามัญ : เพลี้ยแป้งรากกาแฟ (coffee root mealybug)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ : บริเวณของลอนปลายส่วนท้องมีแผ่นแข็งค่อนข้างหนาและมีขนาดใหญ่ล้อมรอบ ปลายของลอนมีลักษณะเป็นหนามแข็งยาว ส่วนฐานค่อนข้างอ้วนและมีปลายยาวแหลม มีขนแข็ง 1 บริเวณระหว่างลอนปลายส่วนท้องทั้ง 2 อันและมีอีก 1 คู่บริเวณขอบของส่วนหัวตรงข้ามกับหนวด ส่วนผนังลำตัวด้านท้องปรากฏท่อที่มี 3 ท่อประกบกันเป็นลักษณะรูปทรงสามเหลี่ยมโดยไม่มีลักษณะของท่อที่ยื่นยาวออกมากจากผนังลำตัว และมีขนาดใหญ่กว่าขนาดที่พบบนผนังลำตัวด้านท้องอย่างชัดเจน

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา : Thailand, 5 females; Mahasarakham N 16°04′38.7″ E 103°09′24.4″ (C. Buamas), 7 females; Chiang Mai N 18°2′39.8″ E 102°20′11.5″ (C. Buamas), 3 females; Prachuap Khiri Khan N 11°54′13.1″ E 099°46′46.7″ (C. Buamas)

พืชอาหาร พบอาศัยอยู่บริเวณรากของต้นไมยราบยักษ์ หญ้าขัดใบมอน

การแพร่กระจาย จังหวัดเชียงใหม่ ประจวบคีรีขันธ์ มหาสารคาม

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

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

Rhizoecus (Pararhizoecus) Goux 1941b: 197. Type species: *Rhizoecus petiti* Goux

Pararhizoecus Goux, 1941; Goux 1943: 41. change in status (level)

Neorhizoecus Hambleton 1946: 40. Type species: *Rhizoecus coffeae* Laing

Radicoccus Hambleton 1946: 47. Type species: *Rhizoecus globosus* James

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปทรงยาวรี หรือรูปไข่กว้าง หนวด มีจำนวน 5 - 6 ปล้อง ขาเจริญเติบโตดี ปรากฏท่อที่มี 3 ท่อพันเป็นเกลียวและยื่นยาวมาจากผนังลำตัวด้านหลัง และผนังลำตัวด้านท้องลอนปลายส่วนท้องเห็นได้ชัดเจน วงแหวนปลายส่วนท้องมีขนยาว จำนวน 6 เส้น ไม่มีแผ่นแข็งบริเวณลอนปลายส่วนท้อง

กรมวิชาการเกษตร

Rhizoecus americanus **(Hambleton, 1946)**

(Figure 1.1.18.3 และ 1.1.18.4)

ชื่อพ้อง : *Morrisonella americana* Hambleton, 1946: 18. Type data: COLOMBIA: Villavicencio, on *Eragrostis maypurensis.* Holotype, female, Type depository: Washington: United States National Entomological Collection, U.S. National Museum of Natural History, District of Columbia, *Rhizoecus americanus* (Hambleton, 1946); Ferris 1953a: 428.change of combination

ชื่อสามัญ : เพลี้ยแป้งในราก (root mealybug)

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

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา : Thailand, 10 females; Bangkok N 13°51′14.7″ E 100°34′32.4″ (C. Buamas), 10 females; Pathum Thani (S. Sukkul), 5 females; Nakhon Pathom N 14°00′39.7″ E 99°58′51.″ (C. Buamas), 5 females; Ratchaburi N 13°30′55.2″ E 99°23′19.3″ (C. Buamas), 15 females; Mahasarakham N 16°04′38.7″ E 103°09′24.4″ (C. Buamas), 5 females; Chiang Mai N 18°60′52.0″ E 98°89′21.0″ (C. Buamas), 10 females; Chiang Rai, N 19°54′02.6″ E 99°58′46.8″ (C. Buamas), 10 females; Chumphon N 10°20′34.9″ E 99°4′45.5″ (C. Buamas)

พืชอาหาร พบอาศัยอยู่บริเวณรากของต้นโป๊ยเซียน ลิ้นมังกรแคระ ว่านงาช้าง ว่านเงินไหลมา ตะไคร้ บริเวณหัวของต้นปทุมมา

การแพร่กระจาย กรุงเทพฯ ปทุมธานี นครปฐม ราชบุรี มหาสารคาม เชียงใหม่ เชียงราย ชุมพร

กรมวิชาการเกษตร

3. Genus *Ripersiella* Tinsley, 1899

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

Rhizoecus (Pararhizoecus) Goux *1941b: 197.* Type species*: Rhizoecus petiti* Goux by monotypy and original designation. junior synonym (discovered by MorrisMo1966: 147) Notes: A subjective synonym of *Rhipersiella.*

Pararhizoecus Goux, 1941; Goux 1943: 41. change in status (level)

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

Ripersiella saintapauliae **(Williams, 1985)**

(Figure 1.1.18.5 และ 1.1.18.6)

ชื่อพ้อง : *Rhizoecus saintpauliae* Williams, 1985i: 622. Type data: THAILAND: Bangkok, on *Saintpaulia ionantha*. Holotype, female, Type depository: London: The Natural History Museum, England

ชื่อสามัญ : เพลี้ยแป้งในราก (root mealybug)

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

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

พืชอาหาร พบอาศัยอยู่บริเวณรากของต้นชวนชม ต้นหญ้าคา บริเวณหัวของต้นปทุมมา

การแพร่กระจาย กรุงเทพฯ นนทบุรี มหาสารคาม ประจวบคีรีขันธ์

กรมวิชาการเกษตร

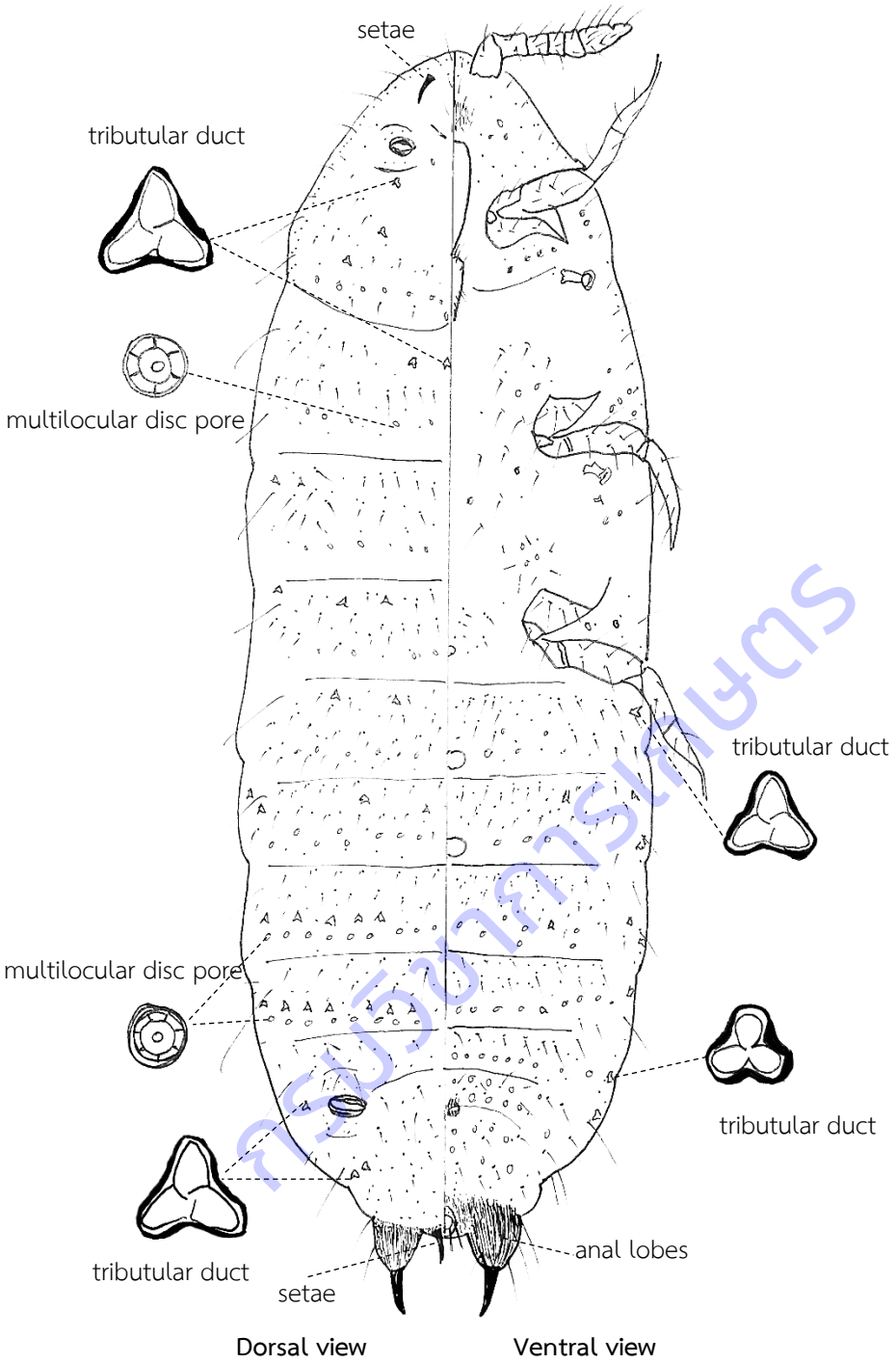
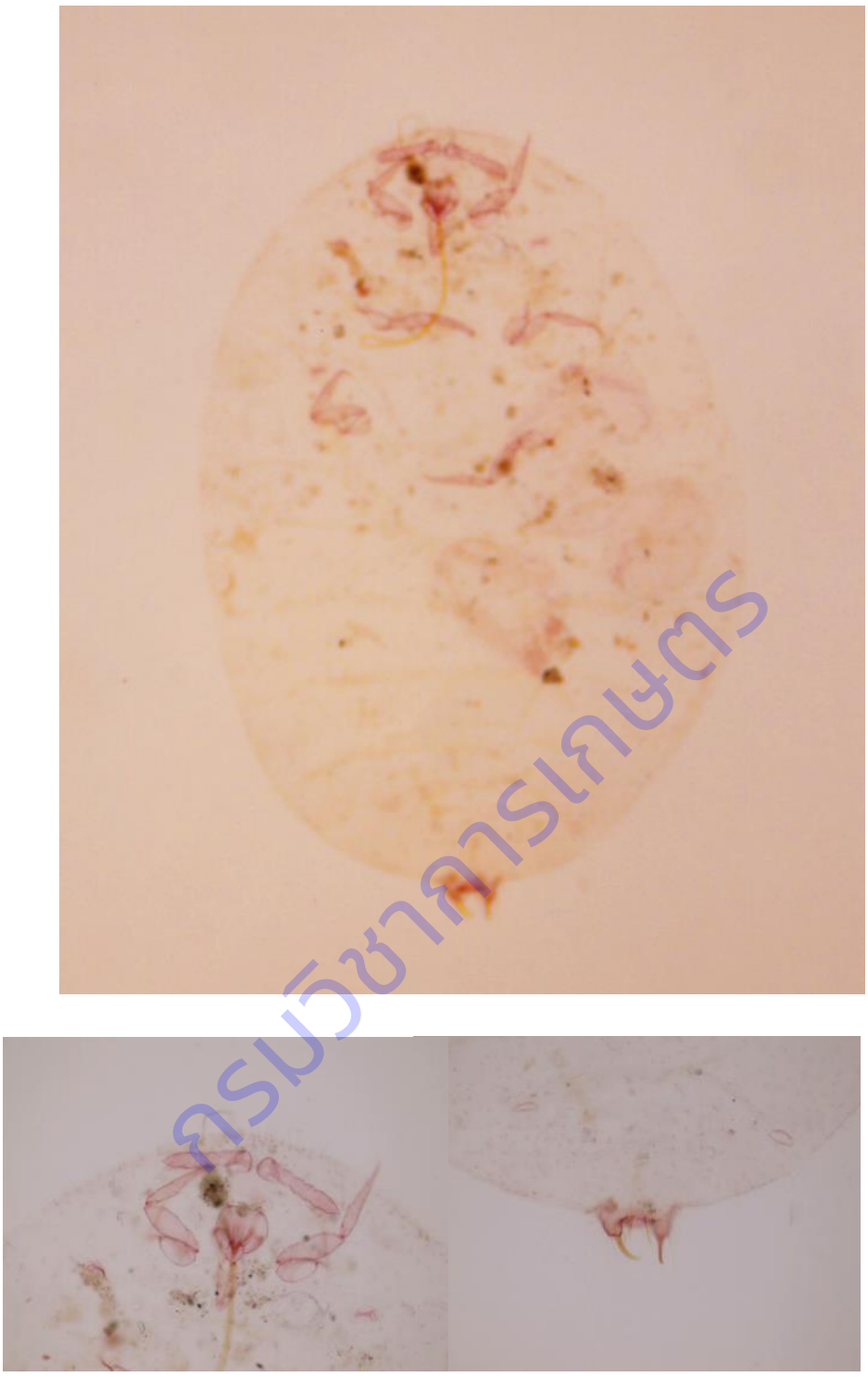


Figure 1.1.18.1 Morphology of slide-mounted adult female of *Geococcus coffeae* Green, 1933



กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.18.2 Microscope view of *Geococcus coffeae* Green, 1933

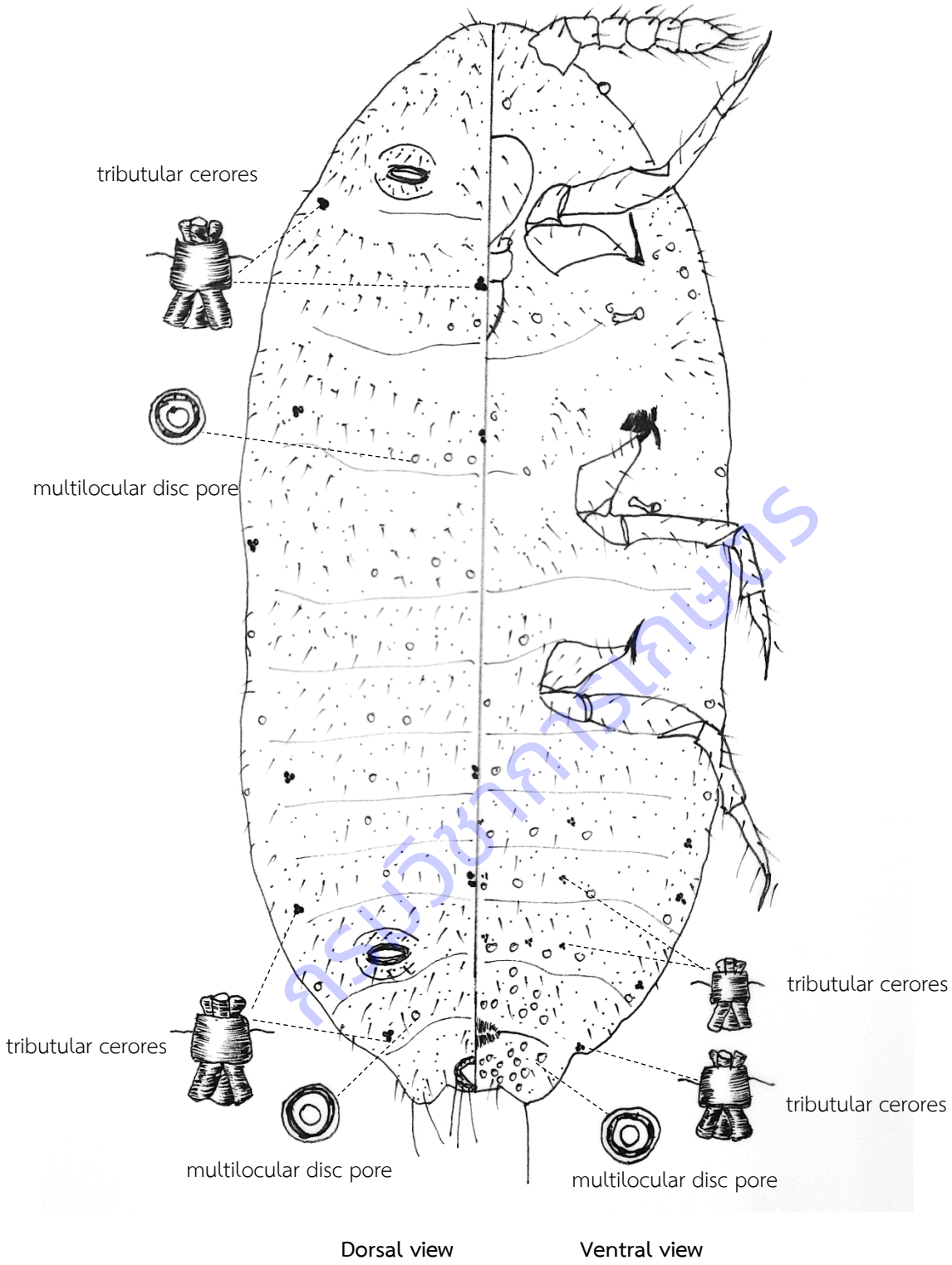


Figure 1.1.18.3 Morphology of slide-mounted adult female of *Rhizoecus americanus* (Hambleton, 1946)

Figure 1.1.18.4 Microscope view of *Rhizoecus americanus* (Hambleton, 1946)

กรมวิชาการเกษตร

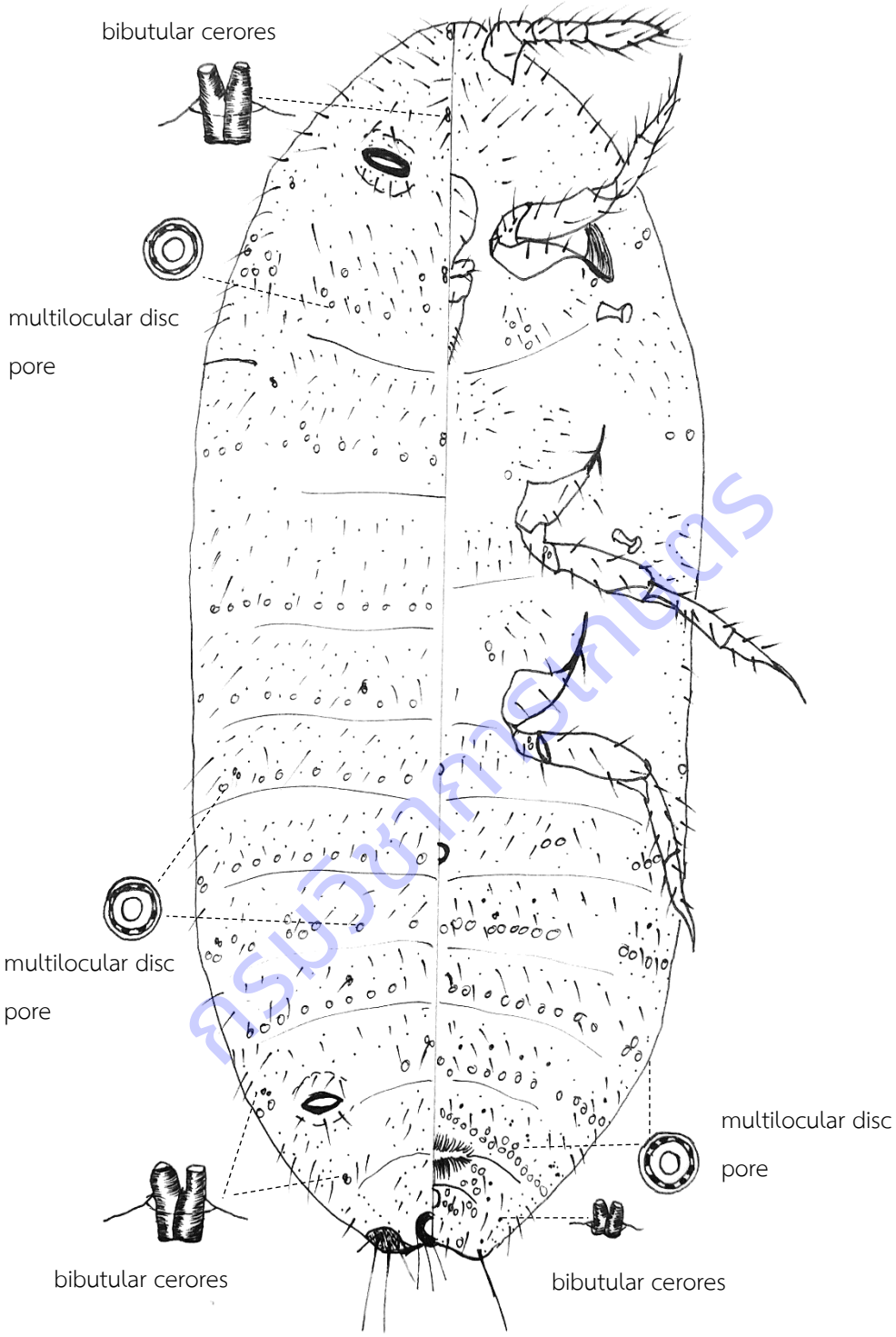


Figure 1.1.18.5 Morphology of slide-mounted adult female of *Ripersiella saintapauliae* (Williams, 1985)

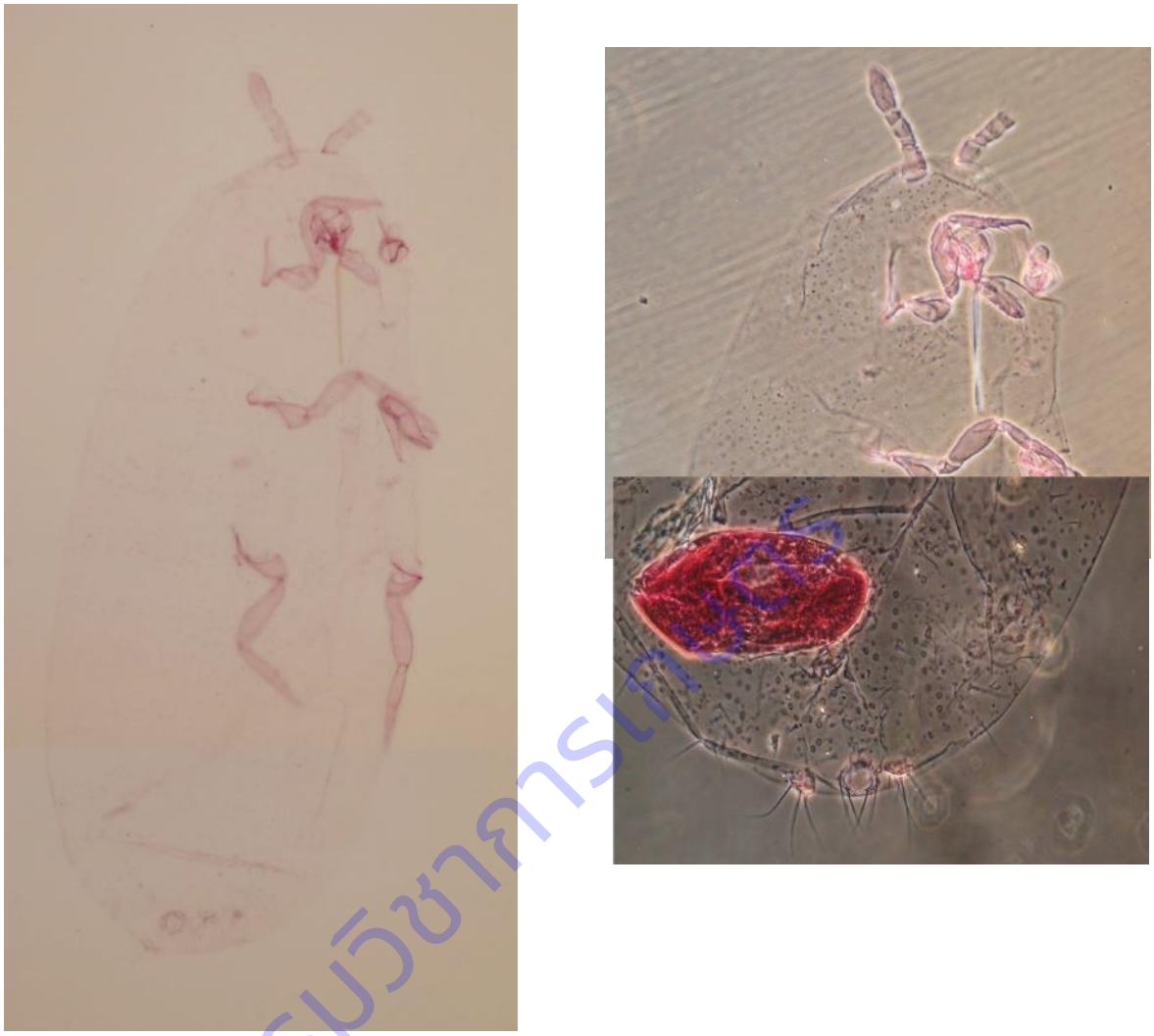


Figure 1.1.18.6 Microscope view of *Rhizoecus americanus* (Hambleton, 1946)

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในครั้งนี้นอกจากตัวอย่างเพลี้ยแป้งในรากวงศ์ Rhizoecidae แล้ว ยังพบเพลี้ยแป้งในวงศ์ Pseudococcidae ที่สามารถสามารถอยู่บริเวณรากของพืชชนิดต่างๆ ได้ เช่น เพลี้ยแป้งสับปะรดสีชมพู *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) พบในรากของต้นผักบุ้ง จ. มหาสารคาม มีรายงานพบในส่วนต่างๆของต้นสับปะรดทั้งในส่วนของราก ลำต้น กาบใบ หรือในส่วนของผลสับปะรด และเพลี้ยแป้ง *Formicococcus* sp. ที่พบในรากต้นมะม่วง จ. เชียงใหม่ ซึ่งเพลี้ยแป้งชนิดนี้เป็นเพลี้ยแป้งที่อาศัยอยู่เฉพาะในบริเวณรากของต้นพืชเท่านั้น จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างจะเห็นได้ว่าเพลี้ยแป้งในรากวงศ์ Rhizoecidae ที่พบเป็นเพลี้ยแป้งในรากที่มีขนาดเล็กมาก เมื่อเทียบกับเพลี้ยแป้งที่พบในรากวงศ์ Pseudococcidae ปริมาณตัวอย่างที่พบมีจำนวนค่อนข้างน้อยในแต่ละจุดที่ และการเก็บตัวอย่างเป็นไปได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากส่วนใหญ่พืชที่มีเพลี้ยแป้งในรากอาศัยอยู่หากมีปริมาณไม่มากจะไม่มีลักษณะอาการบ่งชี้ถึงความผิดปกติ จนกว่าจะมีการระบาดที่

กรมวิชาการเกษตร

หนาแน่นจนทำให้สังเกตอาการได้ และพบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นกลุ่มพืชที่เป็นพืชผัก หรือไม้ดอกไม้ประดับที่มีการปลูกในกระถาง ซึ่งสามารถเก็บตัวอย่างได้ง่ายโดยการสุ่มถอนพืชผักขึ้นมาทั้งต้นและราก หรือการถอนออกมาจากกระถางซึ่งลักษณะแป้งสีขาว คล้ายเส้นใย หรือเชื้อรา แต่เมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วจะพบว่าเป็นเพลี้ยแป้งในรากนั้นเอง

Figure 1.1.18.7 Field view of Rhizoecidae: A) - C) *Rhizoecus americanus* (Williams) D) *Ripersiella saintpauliae* (Williams)

Figure 1.1.18.8 Field view of Pseudococcidae: A) – B) *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) on roots of *Ipomcea aquatica* Forsk , C) -D) *Formicococcus* sp. on roots of *Mangifera indica* Linn.

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

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

กรมวิชาการเกษตร

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ นำไปจัดทำแนวทางการวินิจฉัย (key) และรายละเอียดของเพลี้ยแป้งในรากจำนวน 3 ชนิด โดยตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชในประเทศไทย ใช้ในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูเพื่อดำเนินการด้านมาตรการสุขอนามัยในการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรไปยังประเทศคู่ค้าต่างๆ และเป็นแนวทางในการตรวจสอบการนำเข้าพืชชนิดต่างๆ เช่น ไม้ดอกไม้ประดับที่นำเข้ามาทั้งวัสดุปลูกรวมถึงการหาแนวทางป้องกันกำจัดที่ถูกต้องเหมาะสมแก่เกษตรกรในอนาคตต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.19 อนุกรมวิธานและความหลากชนิดของแตนเบียนไข่ของแมลงกลุ่มมวนวงศ์ Pentatomidae ศัตรูพืชสำคัญทางการเกษตรในประเทศไทย

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

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง จารุวัตถ์ แต้กุล กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน ยุวรินทร์ บุญทบ สุนัดดา เชาวลิต ชมัยพร บัวมาศ อิทธิพล บรรณาการ เกศสุดา สนศิริ อาทิตย์ รักกสิกร จอมสุรางค์ ดวงธิสาร สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

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

Abstract

True bugs or stink bugs (Hemiptera: Heteroptera, Pentatomidae) are considered one of the important economic pests. One of the potential species, Brown Marmorated Stink Bug (BMSB), *Halyomorpha halys* (Stål) has been reported as potential invasive alien species in certain countries in North and South America as well as Europe. There is no evidence of egg parasitoids, the important natural enemies to control this pest in Thailand. The objectives of this research are

กรมวิชาการเกษตร

to understand the species richness, valid scientific names, morphological differences of egg parasitoids attaching the stink bugs (Pentatomidae) and obtain the voucher specimens to curate at the insect museum. The experiment was carried out from October 2019 – September 2021. The Survey and Collecting were implemented on the agricultural field where stink bugs were or used to be the key pests. The results revealed that one parasitoid family were found, Platygastridae. The genus *Trissolcus* sp. which is the important natural enemy contains 7 species including *Trissolcus basalis* (Wollaston), *T. japonicus* (Ashmead), *T. thyantae* Ashmead, *T. latisulcus* Crawford, *T. comperei* Ashmead, *T. mitsukurii* Ashmead, *T. vindicius* (Nixon). Besides *Trissolcus* other genera attacking the eggs of stink bug were discovered: *Gryon* sp., *Telenomus* sp., *Idris* sp., *Calliscelio* sp., *Scelio* sp., *Psix* sp., *Phanuromyia* sp., *Trichoteleia* sp. and *Macroteleia* sp. The genus *Trissolus* is deemed to have an effective quality for biological control agents to control pentatomid bugs because there are a number of successful cases in certain countries.

คำสำคัญ แตนเบียนไข่มวน, วงศ์ Platygastridae, สกุล *Trissolcus*, การควบคุมโดยชีววิธี, ความหลากหลายทางชีวภาพ

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

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

แมลงศัตรูพืชในกลุ่มมวน (Pentatomidae) เป็นแมลงกลุ่มหนึ่งที่คนส่วนใหญ่มองข้ามถึงแม้ว่ามีความสำคัญทางการเกษตรและเคยมีการระบาดทำความเสียหายในพืชเศษฐกิจหลายชนิด อาทิการระบาดของแมงแกงหรือมวนลำไยในเขตภาคเหนือ ซึ่งในทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัย มีความสามารถเข้าทำลายได้ทั้งลำไยและลิ้นจี่ การระบาดพบประจำทุกปีในช่วงที่ลำไยและลิ้นจี่ออกดอกติดผล (กองกีฏและสัตววิทยา, 2542) การระบาดของมวนเขียวข้าวซึ่งนอกจากข้าวแล้วยังเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญของถั่วเหลืองและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอีกหลายชนิด ในถั่วเหลืองทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากทุกส่วนของพืช ทำให้ลำต้นเป็นจุดสีดำฝักอ่อนที่ถูกทำลายลีบและร่วงหล่นส่วนฝักแก่ที่ยังไม่แห้งเมล็ดจะเป็นจุดสีดำ เมล็ดไม่เจริญเติบโตและฝักลีบ นอกจากนี้แล้วความเสี่ยงหรือโอกาสการเข้ามาระบาดของแมลงในกลุ่มนี้ชนิดต่างถิ่น ปัจจุบันมีการระบาดอย่างรุนแรงของมวนกลุ่มนี้ในแถบอเมริกาเหนือและอเมริกาใต้รวมถึงยุโรป ถึงแม้ว่ายังไม่พบการระบาดในประเทศไทยซึ่งอาจเนื่องมาจากเป็นศัตรูพืชต่างถิ่นหรือมีการควบคุมในระบบนิเวศเดิม ซึ่งการศึกษาในแง่ศัตรูธรรมชาติของมวนศัตรูพืชสำคัญทางการเกษตรในประเทศไทย มีรายงานอยู่น้อยหรือแทบจะไม่มีเลย

มวนชนิดหนึ่งเป็นที่รู้จักกันดีในประเทศสหรัฐอเมริกา แคนาดา และบางประเทศแถบยุโรป ในชื่อสามัญว่า BMSB หรือ Brown Marmorated Stink Bug มวนชนิดนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Halyomorpha halys* (Stål) มีถิ่นกำเนิดมาจากแถบประเทศ จีน ญี่ปุ่น เกาหลีและไต้หวัน แมลงชนิดนี้มีความสามารถเข้าทำลายพืชได้มากกว่า 100 ชนิด (polyphagous) ส่วนใหญ่เป็นพวกไม้ผล ไม้ดอกไม้ประดับและพืชผักบางชนิด ตัวอ่อนและตัวเต็มวัย

ของ BMSB เข้าดูดกินน้ำเลี้ยงจากส่วนใบ ผล ของพืชเหล่านี้ พบว่าสร้างความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรระดับวิกฤติในหลายพืชในประเทศญี่ปุ่น (Hoebeke & Carter 2003) เอกสารทางวิชาการในประเทศแถบเอเชียอ้างอิงเกี่ยวกับแมลงชนิดนี้ตามลักษณะสีของลำตัวว่าเป็นมวนเหลืองน้ำตาล (yellow-brown stink bug) และรายงานว่าเป็น *H. picus* หรือ *H. mista* ในประเทศสหรัฐอเมริกามวนชนิดนี้ถูกสำรวจพบครั้งแรกประมาณ กลางทศวรรษ 1990 ในรัฐเพนซีเวเนีย ในปัจจุบัน BMSB ระบาดอย่างรุนแรงในประเทศอเมริกา พบว่าระบาดหนักถึง 38 รัฐและรวมถึงกรุงวอชิงตัน ดี ซี (Leskey et al., 2012) และยังพบว่าเป็นศัตรูต่างถิ่นรุกรานในประเทศสหพันธรัฐสวิส (Wermelinger et al., 2008) และแคนาดา (Fogain & Graff 2011) แมลงชนิดนี้เข้าทำลายผลิตผลทางการเกษตรได้ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ตัวเมียวางไข่ได้ประมาณ 28 ฟองต่อกลุ่มไข่โดยวางไข่อยู่ใต้ใบพืช ทั้งนี้ปริมาณการวางไข่ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ไข่ใช้เวลาฟัก 3 – 4 วัน ตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัยมีทั้งสิ้น 5 ระยะ ในเขตร้อนชื้นแถบทวีปเอเชียมวน BMSB มี 1 ชั่วอายุขัยในช่วงระยะเวลา 1 ปี อย่างไรก็ตามในเขตร้อน (sub-tropical) มวนชนิดนี้สามารถขยายพันธ์ได้ถึง 2 ชั่วอายุ (Fujiie, 1985) และยังมีรายงานว่าสามารถขยายพันธ์ได้สูงถึง 5 – 6 ชั่วอายุทางตอนใต้ของประเทศจีน (Hoffmann, 1931) ศัตรูธรรมชาติของ BMSB มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด

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

Hymenoptera เป็นอันดับของแมลงในกลุ่ม ผึ้ง ต่อ แตน และ มด จัดว่าเป็นแมลงกลุ่มที่มีความสำคัญมากที่สุดในแง่แมลงที่มีประโยชน์ ความหลากชนิดของแมลงในกลุ่มนี้มีมากกว่า 115,000 ชนิด (LaSalle & Gauld, 1993) จากการศึกษาถึงสายวิวัฒนาการ (phylogenetic position) พบว่า Hymenoptera มีความสัมพันธ์มากที่สุด กับกลุ่มแมลงที่มีการเจริญเติบโตแบบสมบูรณ์ complete methamorphosis หรือ holometabola (Sharkey, 2007; Savard et al., 2006) อันดับ Hymenoptera แบ่งเป็น 2 กลุ่มหลักได้แก่ กลุ่มกินพืช หรือที่เรียกว่ากลุ่มparaphyletic Symphyta (sawflies, woodwasps) และแมลงผสมเกสร มด และแตน หรือกลุ่ม monophyletic Apocrita ซึ่งประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย monophyletic Aculeata และ polyphyletic Parasitica กลุ่มย่อย Aculeata และ Parasitica เป็นแมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในแง่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มแตนเบียนไข่ (parasitoids wasps) พบว่าการนำเข้าแตนเบียนไข่เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช (classical biological control) ประสบความสำเร็จสูงถึง 87% จากกรรมวิธีนำเข้าแมลงศัตรูธรรมชาติทั้งหมด(Greathead, 1986; Lasalle and Ga uld, 1993) แมลงในกลุ่มแตนเบียนไข่มีความน่าสนใจมากที่สุดในกลุ่มแมลงศัตรูธรรมชาติในแง่ของชีววิทยา แมลงในกลุ่มนี้สามารถอาศัยบริโภคอาหารทั้งในตัวเหยื่อ (endoparasitoids) และบนตัวเหยื่อ (ectoparasitoids) แตนเบียนแตกต่างจาก ตัวห้ำและตัวเบียนกล่าวคือ ตัวห้ำ (predator) เข้าทำลายและฆ่าเหยื่อโดยทางตรงและครั้งละหลายตัว ตัวเบียน (parasite)

กรมวิชาการเกษตร

สร้างความรำคาญหรือบาดเจ็บให้กับเหยื่อแต่จะไม่ฆ่าเหยื่อ ในทางกลับกันแตนเบียน (parasitoids) เข้าทำลายเหยื่อครั้งละ 1 ตัว ตัวอ่อนกัดกินอวัยวะภายในเหยื่อและทำให้เหยื่อตายในที่สุด จำนวนของแตนเบียนภายในเหยื่ออาจแตกต่างกัน มีเพียงแค่ 1 ตัว (solitary) หรือหลายตัว (gregarious)

แตนแบนไข่ คือแตนเบียนที่เข้าทำลายไข่ของเหยื่อ พบว่ามีการใช้แตนเบียนไข่ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีถึง 7 วงศ์ และมี 1 ชนิด ผลิตเพื่อเป็นการค้าและประสบความสำเร็จในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ได้แก่ Trichogramma (Mills, 2010) ทั้งนี้จากแตนเบียนไข่ที่ถูกค้นพบ แต่ยังมีแตนเบียนไข่อีกหลายชนิดที่อยู่ในธรรมชาติที่ยังไม่มีการค้นพบและศึกษา จากรายงานพบว่าแตนเบียนไข่วงศ์ใหญ่ Platygastroidea จัดเป็นแตนเบียนไข่ที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง มีการจัดจำแนกสายบรรพบุรุษในกลุ่มเดียวกันกับวงศ์ใหญ่ Prototrupoidea และ Cynipoidea สร้างเครือข่ายความสัมพันธ์ชนิด monophyly (Sharkey, 2007) ระดับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน มีการรวบรวมข้อมูลปัจจุบันใน Hymenoptera On-line database โดย Johnson (2014) มีเพียง 1 วงศ์ได้แก่ Platygastridae ประกอบด้วย 5 วงศ์ย่อยและมีความหลากชนิดดังต่อไปนี้ Platygastrinae (45 genera, 1,745 species), Sceliotrachelinae (28 genera, 142 species), Scelioninae (155 genera, 2,571 species), Teleasinae (13 genera, 509 species), และ Telenominae (20 genera, 907 species) มีเขตการแพร่กระจายครอบคลุมทั่วโลก การศึกษาแมลงในกลุ่มนี้ เขตร้อนชื้นเป็นเขตที่ได้มีการศึกษาน้อยที่สุด (Austin et al., 2005)

แตนเบียนไข่หลายสกุลในวงศ์ Platygastridae ที่มีประสิทธิภาพในการเบียนไข่แมลงในกลุ่มมวน ในทวีปเอเชียมีแตนเบียนไข่หลายชนิด ในสกุล *Trissolcus* ที่มีศักยภาพสูงในการเบียนไข่ของมวน BMSB นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานถึงแมลงวันก้นขนซึ่งมีประสิทธิภาพในการเบียนทั้งไข่และตัวเต็มวัยของมวนชนิดนี้ (Yang et al., 2009) ทั้งนี้ *Telenomus podisi* ซึ่งเป็นแตนเบียนไข่สกุลหนึ่งที่สำคัญในวงศ์ย่อย Telenominae (Platygastridae) ที่สามารถเบียนและเข้าทำลายไข่ของแมลงกลุ่มมวน BMSB นอกจากนี้แล้ว Leskey et al. (2012) ได้ให้ข้อสังเกตที่สำคัญกล่าวคือแตนเบียนไข่ที่สำรวจได้จากแหล่งปลูกพืชหรือแหล่งเกษตรกรรมมีศักยภาพในการเบียนไข่สูงกว่าแตนเบียนไข่ในสภาพธรรมชาติหรือพื้นที่ที่ไม่มีการเพาะปลูก วัตถุประสงค์ของการทดลองเพื่อทราบชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ ลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา ของแตนเบียนไข่ของแมลงกลุ่มมวน (Pentatomidae) ศัตรูพืชสำคัญทางการเกษตรในประเทศไทย ได้ตัวอย่างแตนเบียนไข่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. กับดักแมลง Yellow pan trap, Malaise trap, Slam trap รวมทั้งสวิงจับแมลง
2. ethanol ความเข้มข้น 95% เพื่อใช้ในการจัดเก็บตัวอย่างสดของแมลง
3. กระดาษคุณภาพสูง (acid free) เพื่อการเก็บรักษาตัวอย่างแห้งในระยะยาว
4. อุปกรณ์บันทึกเขตการแพร่กระจายในระดับละเอียด (GPS)
5. Forceps ขนาดเล็ก

กรมวิชาการเกษตร

6. ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับตัวอย่างสด

7. กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope กำลังขยายมากกว่า 50 เท่าขึ้นไป

8. สารเคมีในการทำแห้งตัวอย่างแมลง

9. พัดลมดูดอากาศ (Laminar Flow Clean Air Bench)

11. โรงเรือนทดลองกรณีเลี้ยงมวนเพื่อให้ได้ไข่ในการเลี้ยงแตนเบียนไข่

12.กล้องจุลทรรศน์สเตริโอแบบกำลังขยายสูงสำหรับงานทางอนุกรมวิธานแมลง Leica M205 C พร้อมเลนซ์ Planapo Objective 1.0x สำหรับการถ่ายภาพเพื่อตีพิมพ์ในเอกสารวิชาการ

- **วิธีการ**

<u>การเก็บรวบรวมและรักษาตัวอย่างแตนเบียนไข่ (Acquisition of research material)</u>

เก็บรวบรวมตัวอย่างแตนเบียนไข่ของมวนวงศ์ Pentatomidae ในพื้นที่ที่มีการระบาดหรือเคยมีการระบาดของมวนกลุ่มนี้ รวมถึงพื้นที่ป่าหรือพื้นที่ใกล้เคียงแหล่งเกษตรกรรมได้แก่

- ภาคเหนือ จังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง แพร่ น่าน จำนวน 15 แปลง ในไม้ผลเศษฐกิจ เช่น ลำไย ลิ้นจี่ มะม่วง เป็นต้น
- ภาคตะวันออกและภาคกลางได้แก่จังหวัดจันทบุรี ระยอง ตราด ลพบุรี นครสวรรค์ อุทัยธานี สิงห์บุรี อยุธยา ชัยนาท สุพรรณบุรี ในพืชสวนเศษฐกิจอื่นๆ เช่นเงาะ ลองกอง ทุเรียน รวมถึงไม้ดอกไม้ประดับ และพืชผัก จำนวน 15 แปลง
- ภาคใต้ได้แก่จังหวัด ชุมพร ระนอง พังงา สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ ตรัง สงขลา จำนวน 10 แปลงในไม้ผล เช่น มังคุด ทุเรียน ลองกอง มะพร้าว
- ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่จังหวัด นครราชสีมา อุดรธานี สกลนคร กาฬสินธ์ ขอนแก่น หนองบัวลำภู ยโสธร อำนาจเจริญ สุรินทร์ อุบลราชธานี ไปแปลงปลูกไม้ยืนต้นเช่น ยางพารา ไม้สัก ก้ามปู เป็นต้น

ดำเนินการเก็บตัวอย่างแตนเบียนไข่ของมวนในวงศ์ Pentatomidae ด้วย 2 กรรมวิธีประกอบไปด้วย 1) การเก็บตัวอย่างแห้ง ซึ่งจะเก็บในห้องที่มีความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิต่ำ และ 2) การเก็บตัวอย่างสดเพื่องานวิจัยทางชีวโมเลกุล ทั้งนี้ใช้ 4 วิธีพื้นฐานทางกีฏวิทยาในการเก็บตัวอย่างได้แก่ สวิงโฉบแมลง Yellow Pan Traps (YPT), Malaise trap และ Slam trap. การใช้ YPT จะทำการเก็บแมลงทุกวันโดยทิ้งระยะเวลา 24 ชั่วโมงโดยวางกับดักเวลา 08:00 นาฬิกา และทำการเก็บแมลงในช่วงเช้าวันถัดไประหว่างเวลา 09:00 – 10:00 นาฬิกา และวางกับดัก Malaise trap และ Slam trap สามารถเว้นระยะเวลา 5-10 วัน นำแมลงออกจากกับดักโดยใช้ ตาข่ายความละเอียดพิเศษ (fine-mesh aquarium net) สำหรับการเก็บตัวอย่างในแต่ละจุดทำการบันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์(GPS) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง ชื่อผู้เก็บตลอดถึงเทคนิคที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง รวมถึงบันทึกลักษณะทางชีววิทยา นิเวศวิทยาเบื้องต้นของมวนศัตรูพืชที่แตนเบียนไข่เข้าทำลาย ตัวอย่างจะถูกเก็บในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% หลังจากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รอเพื่อเตรียมทำตัวอย่างแห้ง หรือรอไว้เพื่องานวิจัยทางด้านสกัด ดี เอ็น เอ ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

การจัดจำแนกโดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา

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

ลักษณะทางสันฐานวิทยาที่ใช้ในการทดลอง

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

การลงทะเบียนและระบบฐานข้อมูลแตนเบียนไข่ในประเทศไทย

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

การบันทึกข้อมูล

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

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

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

กรมวิชาการเกษตร

เก็บรักษาตัวอย่างแมลงทั้งตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง ณ พิพิธภัณฑ์แมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

สถานที่ดำเนินการทดลอง

เก็บรวบรวมตัวอย่างแตนเบียนไข่ของมวนวงศ์ Pentatomidae ในพื้นที่ที่มีการระบาดหรือเคยมีการระบาดของมวนกลุ่มนี้ รวมถึงพื้นที่ป่าหรือพื้นที่ใกล้เคียงแหล่งเกษตรกรรม โดยมีแผนการดำเนินการดังนี้

- ปี 2562 ดำเนินการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ภาคเหนือ จังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง แพร่ น่าน เป็นต้น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่จังหวัด นครราชสีมา อุดรธานี สกลนคร กาฬสินธ์ ขอนแก่น หนองบัวลำภู ยโสธร อำนาจเจริญ สุรินทร์ อุบลราชธานี เป็นต้น
- ปี 2563 ภาคตะวันออกและภาคกลางได้แก่จังหวัดจันทบุรี ระยอง ตราด ลพบุรี นครสวรรค์ อุทัยธานี สิงห์บุรี อยุธยา ชัยนาท สุพรรณบุรี เป็นต้น
- ปี 2564 ภาคใต้ได้แก่จังหวัด ชุมพร ระนอง พังงา สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ ตรัง สงขลา เป็นต้น

การตรวจวินิจฉัยจัดหมวดหมู่ของแตนเบียนไข่ของมวนวงศ์ Pentatomidae ดำเนินการ ณ พิพิธภัณฑ์แมลงและห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

หมายเหตุ: ทุกขั้นตอนในการดำเนินการ วิธีการทำการทดลองเหมือนกันในแต่ละปี

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

วงศ์ Platygastridae

แนวทางการวินิจฉัยระดับสกุลในวงศ์ย่อย Telenominae

Key to genera of Telenominae

1) T2 at most slightly longer or as long as T3 , always distinctly shorter than subsequent terga combined; fore wing with stigmal vein and usually postmarginal vein present, the veins rarely indistinct or absent; antennae usually with 11-12 segments, very rarely with 10 or fewer segments; male flagellomere 3 modified, Metasoma with wide laterotergites loosely attached to sternites ..... **Telenominae** 2

– T2 several times longer than T3, usually as long as or longer than subsequent terga combined;fore wing without stigmal and postmarginal veins, usually veinless; Antennae usually with 10 segments,rarely with fewer segments; male flagellomere 2 or rarely 1 modified, Metasoma with narrow laterotergites closely attached to sternites to form an impressed submarginal ridge ..... **Scelioninae, Teleasinae, Platygastrinae, Sceliotrachelinae**

2) Central keel on frons present; clypeus and labrum fused; lateral ocelli far from inner orbits; genal striae present, at least at base of mandible 3

– Central keel on frons absent; clypeus and labrum not fused; lateral ocelli very close almost touching to inner orbits; genal striae entirely absent 4

3) Central keel structure on frons bifurcation passing outside antennal insertions, fading at medial occelus; head shape in dorsal view transverse; frontal sculpture with dense microsculpture surrounding central keel and orbital carina; 1st and 2nd coxa close together; lateral mesosoma sculpture filled with sulcus ..... ***Psix*** **Kozlov & Lê**

– Central keel structure on frons bifurcation passing outside antennal insertions, forming Y-shape on medial occelus;head shape in dorsal view weakly transverse; frontal sculpture mostly smooth throughout; 1st and 2nd coxa distance to each other; lateral mesosoma sculpture smooth, reduced sulcus ..... ***Paratelenomus*** Dodd

กรมวิชาการเกษตร

4) Orientation of malar sulcus attached relatively behind compound eyes; the presence of episternal foveae next to 1st coxa; occipital carina sculpture punctate; hyperoccipital carina present.....5

– Orientation of malar sulcus attached below compund eyes; the absence of episternal foveae next to 1st coxa; occipital carina sculpture microsculptured; hyperoccipital carina absent.....***Phanuromyia*** **Dodd**

5) Frontal sculpture coarsely punctate throughout or sometimes reticulate punctate microsculpture; setations on compound eyes short, sparse or almost absent; number of calvomeres in female antenna always 6 segments .....***Trissolcus Ashmead***

– Frontal sculpture mostly smooth throughout if sculpture on frons setations on compound eyes long and dense; number of calvomeres in female antenna always 3, 4 or 5 segments .....***Telenomus*** **Haliday**

สกุล *Trissolcus* Ashmead

Type Species: *Telenomus brochymenae* Ashmead

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

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

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) ขนาดลำตัวเพศเมียยาว 0.94 – 1.98 มิลลิเมตร (n=20) ขนาดลำตัวเพศผู้ยาว 0.89 – 1.69 มิลลิเมตร หัว (Head) ส่วนหัวมีขนาดเล็กกว่าส่วนอก (mesosoma) รูปร่างของส่วนหัวเมื่อมองจากด้านบน (dorsal view) มีลักษณะค่อนข้างแคบตามแนวขวาง (weakly transverse) ไม่มีสันแข็งบริเวณหน้า (frontal depression) ร่องลึกบนโหนกแก้ม (malar sulcus) เริ่มจากบริเวณด้านหลังของตารวม ไม่มีเส้นนูนพาดผ่านกลางใบหน้า แผ่นเหนือริมฝีปากบนและริมฝีปากบนไม่เชื่อมต่อกันเป็นเนื้อเดียว ไม่มีเส้นนูนรอบตารวม (orbital carina) ไม่มีรอยกดหรือสัน (frontal depression) บนใบหน้า ลักษณะผนังลำตัวส่วนหน้าบริเวณใต้ตาเหนือส่วนปาก (frontal sculpture) มีลักษณะเม็ดขนาดเล็ก (microsculpture) หรือมีลักษณะเป็นผนังขรุขระหรือเป็นรอยตาข่ายปกคลุมทั่วใบหน้า. ไม่มีเส้นนูนพาดตามขวาง (frontal transverse carinae) ไม่มีขนในตารวม ส่วนปลายของกราม (mandibles) มี 2 แฉก (bidentate) ผนังลำตัวบริเวณพื้นที่ด้านหลังของหัวกะโหลก (occiput) มีลักษณะเป็นหลุมเล็กๆ (punctate) กระจายตัวสม่ำเสมอ มีเส้นนูนแข็งด้านหลังของหัวกะโหลก (hyperoccipital carina) หัวกะโหลกมีลักษณะโค้งมนเว้าตามแนว mesosoma ตาเดี่ยวด้านข้างทั้ง 2

กรมวิชาการเกษตร

ข้าง (lateral ocelli) ตั้งอยู่ใกล้หรือเกือบติดกับขอบด้านในของตารวม ไม่มีแถบลายเส้นด้านข้างแก้มรูปใบพัด (fan-like striae) ติดกับส่วนฐานของกราม ไม่มีกลุ่มขนหรือพบอยู่อย่างกระจัดกระจายบริเวณด้านข้างของหัวกะโหลกเหนือกราม

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

การวินิจฉัย (Diagnosis) แตนเบียนไข่สกุล *Trissolcus* มีลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับสกุล *Telenomus* แต่สามารถแยกออกมาได้จากลักษณะของผนังใบหน้า (frontal sculpture) มีลักษณะเป็นเม็ดนูนขนาดเล็ก (microsculpture) หรือมีลักษณะเป็นผนังขรุขระหรือเป็นรอยตาข่ายปกคลุมทั่วใบหน้า ไม่มีขนขึ้นในตารวมหรือบางครั้งมีอยู่อย่างกระจัดกระจาย และขนสั้น มีจำนวนปล้องหนวดจำนวน 6 ปล้องเท่านั้นที่รวมตัวกันแน่นเป็นรูปกระบอง (clavomeres)

แนวทางการวินิจฉัยแตนเบียนไข่สกุล *Trissolcus* Ashmead
ที่เข้าทำลายมวนศัตรูพืชวงศ์ Pentatomidae

1) Metapleuron without paracoxal sulcus visible in ventral half; frons without facial striae 2

กรมวิชาการเกษตร

– Metapleuron with paracoxal sulcus visible in ventral half; frons with facial striae extending as rugulae from anterior mandibular articulation toward compound eye..... ..... ***Trissolcus latisulcus*** **Crawford**

2) T2 reticulate punctate or variable ; metapostnotum invaginated distance from propodeal spiracle.....3

– T2 smooth or with faintly impressed striation posterior to antecostal sulcus; metapostnotum invaginated near propodeal spiracle, not separating propodeum from metanotum near metascutellum..... ***Trissolcus comperei*** **Ashmead**

3) Inner margin of eye without orbital furrow; mesoscutellum variable.....4

– Inner margin of eye with orbital furrow constricted ventrally; mesoscutellum rugose, at least laterally and usually throughout; first laterotergite usually with setae; mesoscutum often with median mesoscutal sulcus..... ***Trissolcus mitsukurii*** **Ashmead**

4) Clypeus with setation; orbital furrow absent.....5

– Clypeus smooth without setae; orbital furrow present.....6

5) Clypeus with 4 setae; mesopleuron with episternal foveae well-defined and deep, forming a continuous line of cells from postacetabular sulcus to mesopleural pit; mesoscutum without median mesoscutal carina..... ***Trissolcus japonicus*** **(Ashmead)**

– Presence of 2 clypeal setae; a well-defined and ventrally expanded orbital furrow; episternal foveae extend from the postacetabular sulcus to the mesopleural pit; and a mesoscutum without a median mesoscutal carina..... ***Trissolcus vindicius*** **(Nixon)**

6) Mesoscutellum entirely smooth, without microsculpture; Gena in lateral view narrow; Mesopleural carina absent ventrally..... ***Trissolucs. thyantae*** **Ashmead**

– Mesoscutellum with distinct coriaceous microsculpture and setal bases usually pustulate; mesopleuron with episternal foveae shallowly impressed and distinctly separated from mesopleural pit ; netrion sulcus incomplete..... ***Trissolcus basalis*** **(Wollaston)**

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Trissolcus basalis (Wollaston)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

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

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

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

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

กรมวิชาการเกษตร

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

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) สุพรรณบุรี กาญจนบุรี ชัยนาท สมุทรสาคร สมุทรสงคราม

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

Trissolcus japonicus **(Ashmead)**

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

หัว (Head) ส่วนหัวมีขนาดใกล้เคียงส่วนอก (mesosoma) รูปร่างของส่วนหัวเมื่อมองจากด้านบน (dorsal view) มีลักษณะค่อนข้างแคบตามแนวขวาง (weakly transverse) ไม่มีสันแข็งบริเวณหน้า (frontal depression) ร่องลึกบนโหนกแก้ม (malar sulcus) เริ่มจากบริเวณใต้ตารวม ไม่มีเส้นนูนพาดผ่านกลางใบหน้า แผ่นเหนือริมฝีปากบนและริมฝีปากบนไม่เชื่อมต่อกันเป็นเนื้อเดียว ไม่มีเส้นนูนรอบตารวม (orbital carina) ลักษณะผนังลำตัวส่วนหน้าบริเวณใต้ตาเหนือส่วนปาก (frontal sculpture) มีลักษณะเป็นรอยขีดสานเป็นร่างแห และมีเม็ดขนาดเล็กแทรกอยู่ ไม่มีเส้นนูนพาดตามขวาง (frontal transverse carinae) ไม่มีขนในตารวม ส่วนปลายของกราม (mandibles) มี 2 แฉก (bidentate) ผนังลำตัวบริเวณพื้นที่ด้านหลังของหัวกะโหลก (occiput) มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ (microsculpture) หนาแน่นและกระจายตัวสม่ำเสมอ ไม่มีเส้นนูนแข็งด้านหลังของหัวกะโหลก (hyperoccipital carina) หัวกะโหลกมีลักษณะโค้งมนเว้าตามแนว mesosoma ตาเดี่ยวด้านข้างทั้ง 2 ข้าง (lateral ocelli) ตั้งอยู่ใกล้หรือเกือบติดกับขอบด้านในของตารวม ไม่มีแถบลายเส้นด้านข้างแก้มรูปใบพัด (fan-like striae) ติดกับส่วนฐานของกราม ไม่มีกลุ่มขนหรือพบอยู่อย่างกระจัดกระจายบริเวณด้านข้างของหัวกะโหลกเหนือกราม หนวด (Antennae) เพศเมียมีหนวดจำนวน 5 ปล้องที่รวมตัวกันแน่นมีรูปร่างเป็นกระบอง (clavomere) การจัดเรียงของต่อมรับรู้กลิ่นหรือฮอร์โมนที่พืชปลดปล่อยในเพศเมีย (claval formula) มีดังนี้ A11-A9/1-2-2 เพศผู้มีปล้องหนวด 12 ปล้อง

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

กรมวิชาการเกษตร

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

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

การวินิจฉัย (Diagnosis) บริเวนปากส่วนล่าง (clypeus) มีขนจำนวน 4 เส้น ด้านข้างของอกพบแผ่นแข็งเรียกว่า mesopleuron และมีรอยพับอยู่บนพื้นผิวแผ่นแข็งนี้ (episternal foveae) เกิดเป็นเส้นต่อเนื่องกันเป็นช่องๆ จาก postacetabular sulcus ไปยังหลุมด้านข้าง mesopleural pit อกปล้องกลางไม่มีเส้นนูนด้านข้างเกิดขึ้น (mesoscutal carina)

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

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

Trissolucs. thyantae Ashmead

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

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

กรมวิชาการเกษตร

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

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

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

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

การวินิจฉัย (Diagnosis) พื้นผิวของอกปล้องที่ 2 ลักษณะเรียบและมัน ไม่พบลักษณะขรุขระหรือร่างแหส่วนของแก้มเมื่อมองจากด้านข้างแคบและยาว พบแผ่นแข็งทางด้านข้างหรือ mesopluron และค่อยๆ จางหายไปทางส่วนล่างของอก

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) เพชรบุรี ตราด นครราชสีมา อุบลราชธานี

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

Trissolcus latisulcus Crawford

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

หัว (Head) ส่วนหัวมีขนาดเล็กกว่าส่วนอก (mesosoma) รูปร่างของส่วนหัวเมื่อมองจากด้านบน (dorsal view) มีลักษณะแคบตามแนวขวาง (transverse) ไม่มีสันแข็งบริเวณหน้า (frontal depression) มีร่องลึกบนโหนกแก้ม (malar sulcus) เริ่มจากบริเวณด้านหลังของตารวม มีเส้นนูน (central keel) 2 เส้นล้อมรอบฐานหนวด (antennal insertion) มาบรรจบกันและพาดผ่านกลางใบหน้า และค่อยๆหายไปบริเวณด้านหน้าตาเดี่ยวที่อยู่ตรงกลาง (medial occelus) แผ่นเหนือริมฝีปากบนและริมฝีปากบนเชื่อมต่อกันเป็นเนื้อเดียว มีเส้นนูนรอบตารวม (orbital carina) ลักษณะผนังลำตัวส่วนหน้าบริเวณใต้ตาเหนือส่วนปาก (frontal sculpture) มีลักษณะเม็ดขนาดเล็ก (microsculpture) แทรกอยู่อย่างหนาแน่นบริเวณเส้นนูนกลางใบหน้าและรอบตารวม มีเส้นนูนพาด

กรมวิชาการเกษตร

ตามขวาง (frontal transverse carinae) ซึ่งเกิดขึ้นมาจากฐานของเส้นนูนกลางใบหน้า ไม่มีขนในตารวม ส่วนปลายของกรามมี 3 แฉก (tridentate) มีเส้นนูนแข็งด้านหลังของหัวกะโหลก (hyperoccipital carina) ไม่มีตุ่มใส (blister plate) อยู่ด้านล่างของตารวม หัวกะโหลกมีลักษณะโค้งมนเว้าตามแนวอกด้านบน ตาเดี่ยวด้านข้างทั้ง 2 ข้าง (lateral ocelli) ตั้งอยู่ห่างจากขอบด้านในของตารวม มีแถบลายเส้นด้านข้างแก้มรูปใบพัด (fan-like striae) ติดกับส่วนฐานของกราม ไม่มีกลุ่มขนหรือพบอยู่อย่างกระจัดกระจายบริเวณด้านข้างของหัวกะโหลกเหนือกราม หนวด (Antennae) เพศเมียมีหนวดจำนวน 5 ปล้อง รวมตัวกันแน่นรูปร่างเป็นกระบอง (clavomere) เพศผู้มีปล้องหนวด 12 ปล้อง

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

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

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

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

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) ราชบุรี สมุทรสาคร นครปฐม

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0008976, 0003465, 0009875, 0003452 – 0003457, 0003564 – 0003568

Trissolcus comperei Ashmead

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

กรมวิชาการเกษตร

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

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

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

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

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

สำนักวิทยบริการฯ

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

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) สุพรรณบุรี

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

Trissolcus mitsukurii Ashmead

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

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

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

ปีก (Wings) บนปีกคู่หน้าไม่มีเส้นปีก basal vein (Rs+M) เส้นปีก M เส้นปีก Rs และไม่มีปื้นสีดำหรือสีเทา (pseudostigma) บริเวนเส้นปีก marginal vein (R) เส้นปีก marginal vein (R) บนปีกคู่หน้าค่อนข้างสั้น

กรมวิชาการเกษตร

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

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

การวินิจฉัย (Diagnosis) ขอบด้านในของตารวมเห็นเป็นร่องลึกโดยรอบและค่อยๆลึกลงเรื่อยๆทางตอนล่าง ปล้องกลางของอกมีลักษณะเป็นหลุมลึกอย่างน้อยที่สุดทางด้านข้างและส่วนใหญ่เห็นเป็นร่องลึกโดยตลอด (rugose) ด้านข้างของปล้องท้องส่วนใหญ่มีขนปกคลุม บ่อยครั้งจะพบเป็นแผ่นแข็งๆที่มีหลุมอยู่ทางด้านข้าง (median mesoscutal sulcus)

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) นครสวรรค์ สุพรรณบุรี ตาก กำแพงเพชร ประจวบคีรีขันธ์

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

Trissolcus vindicius (Nixon)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

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

อก (Mesosoma) รูปร่างโดยทั่วไปของส่วนอก มีลักษณะนูนทั้งด้านบนและด้านข้าง ไม่มีแผ่นแข็งลักษณะเป็นมันวาว (skaphion) อยู่ทางตอนบนของปล้องอก ส่วนปลายของอกปล้องที่ 3 (metascutellum) ไม่มีหนามแหลมยื่นออกมา ขอบด้านหลังของอกปล้องที่ 3 มีลักษณะโค้งมน ไม่มีหลุมที่เรียงตัวกันเป็นแถว (episternal foveae) บนผนังลำตัวเหนือฐานของขาปล้องที่ 1 ฐานของขาปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 อยู่ชิดติดกัน

กรมวิชาการเกษตร

มีลวดลายของหลุม (mesosoma sulcus) หนาแน่นบริเวณด้านข้างของผนังลำตัวส่วนอก ไม่มีเส้นขอบด้านข้าง (parapsidal line) บริเวณอกปล้องที่สองด้านบน (dorsal mesoscutum) ไม่มีพื้นที่บนส่วนผนังลำตัวรูปร่างคล้ายกระสวยทอผ้า (netrion) บริเวณด้านข้างของอก (lateral mesosoma) มีร่องบริเวณขอบด้านบนของอกปล้องที่ 2 (notaulus) ไม่มีสันนูนทางด้านข้างของอกปล้องที่ 1 (vertical epomial carina)

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

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

การวินิจฉัย (Diagnosis) ริมฝีปากล่างพบขน 2 เส้น (clypeal setae) ซึ่งจะเห็นได้อย่างชัดเจน ด้านล่างของริมฝีปากล่างจะขยายออกเห็นเป็นร่องลึก ผนังลำตัวมีลักษณะเป็นหลุมทางด้านล่างติดต่อไปยังแผ่นแข็งด้านกลางของอก (postacetabular – mesopleural) อกทางด้านข้างส่วนกลาง (mesoscutum) ไม่เห็นแผ่นนูน (median mesoscutal carina)

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) เพรชบูรณ์

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0007843, 0006743

กรมวิชาการเกษตร

ข้อสังเกตและวิจารณ์ผลการทดลอง (Comments and Discussions)

มีหลายประเทศประสบความสำเร็จในการใช้แตนเบียนไข่วงศ์ Platygastridae ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช Orr (1988) ได้รายงานถึงความสำเร็จในการใช้แตนเบียนไข่ ในการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี พบว่ามีการนำเข้าแตนเบียนไข่ในวงศ์นี้ในประเทศต่างๆ สูงถึง 30 ชนิด (classical biological control) นอกจากนี้แล้วสามารถใช้แตนเบียนไข่ชนิดนี้ในทุกวิธีการของการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีซึ่งประกอบไปด้วย การนำเข้า (classical control) การดูแลรักษาสมดุล (conservation) และการปล่อยอย่างท่วมท้น (augmentation) แตนเบียนที่ประสบความสำเร็จโดยการนำเข้า (classical biological control) ได้แก่ *Trissolcus basalis*, *Telenomus remus, Trissolcus semistriatus, Trissolcus nigribasalis, Trissolcus mitsukurii, Telenomus chloropus, Telenomus cyrus, Psix lacunatus, Telenomus proditor, Telenomus applanatus, Telenomus alsophilae* และแตนเบียนที่ประสบความสำเร็จในการผลิตขยายให้ได้ปริมาณมากและปล่อยควบคุมศัตรูพืช (augmentative biological control) ได้แก่ *Gryon muscaeforme, Trissolcus flavipes, Telenomus gifuensis, Trissolcus basalis, Trissolcus grandis, Trissolcus semistriatus, Trissolcus remus, Telenomus olsenni* แตนเบียนไข่ในสกุล *Trissolcus* เป็นสกุลที่มีศักยภาพในการนำมาใช้พัฒนาผลิตขยายเพื่อควบคุมมวนศัตรูพืชโดยชีววิธี ซึ่งจากการทดลองนอกจากพบแตนเบียนในสกุล *Trissolcus* แล้วยังพบแตนเบียนในสกุลอื่นอีก 9 สกุล ได้แก่ *Gryon* sp., *Telenomus* sp., *Idris* sp. *Calliscelio* sp., *Scelio* sp., *Psix* sp., *Phanuromyia* sp., *Trichoteleia* sp. และ *Macroteleia* sp. อย่างไรก็ตามเนื่องจากแตนเบียนไข่ในสกุล *Trissolus* จัดว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพและมีการนำมาใช้ในการพัฒนาผลิตขยายเพื่อควบคุมมวนศัตรูพืชจึงได้ดำเนินการวินิจฉัยจนถึงระดับชนิด ทั้งนี้แตนเบียนในสกุลอื่นยังมีแนวโน้มในการนำมาพัฒนาเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชได้เช่นกัน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

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

กรมวิชาการเกษตร

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากการทดลองเมื่อได้ชนิดของแตนเบียนไข่ที่เข้าทำลายแมลงในกลุ่มมวนวงศ์ Pentatomidae ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะถูกเก็บเป็นฐานข้อมูลเพื่อใช้เป็นประโยชน์ในอนาคต เช่นการศึกษาประสิทธิภาพการเข้าทำลายเหยื่อ ผลิตขยายเป็นชีวภัณฑ์นใหม่ ได้ตัวอย่างแตนเบียนไข่ในพิพิธภัณฑ์แมลงทั้งตัวอย่างสดและตัวอย่าง แห้ง ซึ่งนอกจากใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงสำหรับการเทียบหาชื่อวิทยาศาสตร์ ทั้งนี้ตัวอย่างสดที่ได้สามารถใช้ประกอบในการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแตนเบียนไข่ โดยใช้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลในอนาคต ตัวอย่างแตนเบียนไข่ในสกุลที่ยังไม่วินิจฉัยจำแนกชนิด จะถูกเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง เพื่อนักอนุกรมวิธานทั่วทุกมุมโลก ที่วิจัยในสกุลนั้นๆ ยืมตัวอย่างเพื่อการศึกษาวิจัยในอนาคต ในกรณีที่มีการระบาดของมวนศัตรูพืช โดยเฉพาะการรองรับการระบาดของมวนศัตรูพืชต่างถิ่นที่สำคัญ ได้แก่ BMSB ข้อมูลเหล่านี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี ทั้งการพัฒนาแตนเบียนไข่สายพันธุ์ท้องถิ่นหรือการนำเข้าจากต่างประเทศ ได้ฐานข้อมูลสากลที่สมบูรณ์ ทั้งนี้อาจได้แมลงศัตรูธรรมชาติชนิดใหม่ที่เข้าทำลายมวนในวงศ์ Pentatomidae ถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้สู่นักชีววิทยา งานทางด้านการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีสามารถนำฐานข้อมูลดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต

กรมวิชาการเกษตร

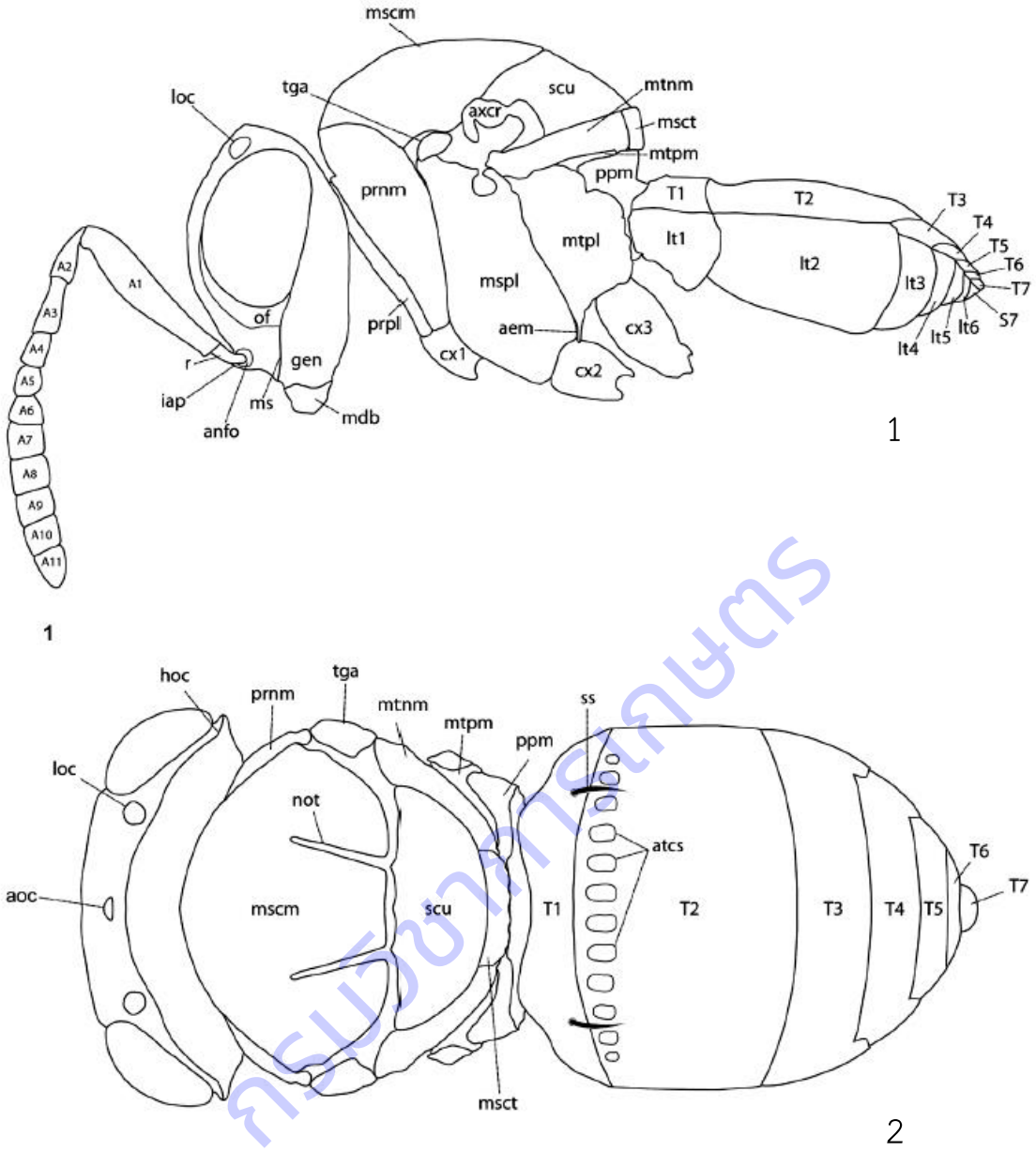


Figure 1.1.19.1-1.1.19.2. Morphological characters of *Trissolcus* sp.; 1, Dorsal habitus; 2, Lateral habitus

Characters annotations; A1–12 - antennomeres 1–12, ac - acetabular carina; aem - anteroventral extension of metapleuron; anfo - antennal foramen; aoc - anterior ocellus; as - antennal scrobe, atcs - antecostal sulcus; ats - postacetabular sulcus; axcr - axillar crescent; bs - basiconic sensilla ; cs - clypeal setae; ctk - central keel; cx1 - procoxa; cx2- mesocoxa; cx3 – metacoxal; eps - episternal foveae; fs - facial striae; gc - genal carina; gen - gena; hoc - hyperoccipital carina; iap - interantennal process; loc - lateral ocellus; lt(s) - laterotergite(s); mc - mesopleural carina; mdb - mandible; mmc - median mesoscutal carina; mms - median

mesoscutal sulcus; mpp - mesopleural pit; ms - malar sulcus; mscm - mesoscutum; msct - metascutellum; mshs - mesoscutal humeral sulcus; mspl - mesopleuron; mtnm - metanotum; mtpl - metapleuron; mtpm - metapostnotum ; nes - netrion sulcus ; not - notaulus; of - orbital furrow; pcxs - paracoxal sulcus; ppm - propodeum; prnm - pronotum; prpl - propleuron; pvm - posteroventral portion of metapleuron; r - radicle; scu - mesoscutellum; ss - sublateral seta; T1–6 - mediotergite; tga – tegula

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.19.3 – 1.1.19.8. Identification process to genera level; 3, *Psix* sp. dorsal view; 4, *Psix* sp. lateral view; 5, *Trissolcus* sp. lateral view; 6, *Trissolcus* sp. lateral mesosoma; 7, *Gryon* sp. lataral view; 8*, Telenomus* lateral view.

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.20 อนุกรมวิธานของแมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae ในประเทศไทย

Taxonomy of Brown Lacewings (Family Hemerobiidae) and Dusty-wings (Family Coniopterygidae) in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นายอาทิตย์ รักกสิกร	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นายจารุวัตถ์ แต้กุล	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวพลอยชมพู กรวิภาสเรือง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวชมัยพร บัวมาศ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นายอิทธิพล บรรณาการ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางประภัสสร เชยคำแหง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นายสิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

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

Abstract

This study on taxonomy of brown lacewings (Family Hemerobiidae) and dusty-wings (Family Coniopterygidae) is based on collections from plantation areas in all parts of Thailand between October 2018 – September 2021, and examination of specimens in the Insect Museum, Department of Agriculture. As a result, 2 brown lacewing taxa were identified to species and one only to genus, belonging to 3 subfamilies and 3 tribes: *Psectra siamica* Nakahara & Kuwayama, 1961, *Micromus timidus* Hagen, 1853 and *Drepanacra* sp.; while 1 dusty-wings taxon was identified

กรมวิชาการเกษตร

to species and 1 only to genus, belonging to 1 subfamily and 2 tribes: *Semidalis aleyrodiformis* (Stephens, 1836) and *Coniopteryx* sp.. Two species, *M. timidus* and *S. aleyrodiformis*, can be found in all parts of Thailand. The larvae of both species are often found as predators of many sucking-mouthpart pests, such as aphids and whiteflies. Thus they could be agriculturally important species which can be used in biological pest control, especially to control pests with sucking-mouthparts in future.

คำนำ

แมลงช้างอยู่ในอันดับ Neuroptera เป็นแมลงที่มีการเจริญเติบโตแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) แมลงช้างเป็นแมลงตัวห้ำ กินแมลงและสัตว์ขนาดเล็กอื่นๆ เป็นอาหาร โดยเฉพาะในระยะตัวอ่อน แมลงช้างหลายชนิดเป็นศัตรูธรรมชาติของศัตรูพืชที่มีความสำคัญ โดยเป็นแมลงตัวห้ำของแมลงศัตรูพืช โดยเฉพาะแมลงปากดูด ซึ่งแมลงช้างในวงศ์ที่มีตวามสำคัญทางการเกษตร ได้แก่ แมลงช้างปีกใสสีเขียว วงศ์ Chrysopidae เป็นแมลงตัวห้ำของศัตรูพืช ได้แก่ เพลี้ยแป้ง เพลี้ยหอย เพลี้ยอ่อน ไรแดง และไข่ขนาดเล็กของแมลงอื่นๆ แมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae เป็นแมลงตัวห้ำของศัตรูพืช ได้แก่ เพลี้ยแป้ง เพลี้ยหอย เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว ไรแดง และไข่ขนาดเล็กของแมลงอื่นๆ แมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae เป็นแมลงตัวห้ำของศัตรูพืช ได้แก่ เพลี้ยแป้ง เพลี้ยหอย เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยไก่แจ้ ไรแดง และไข่ขนาดเล็กของแมลงอื่นๆ (ศานิต, 2550; ไสว, 2544; Brooks & Barnard, 1990; Cranshaw, 2004)

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

เนื่องจากงานการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี มีความสำคัญมากในการอารักขาพืชผลทางการเกษตร โดยเฉพาะในประเทศไทย แต่ฐานข้อมูลเกี่ยวกับแมลงช้างสีน้ำตาลและแมลงช้างปีกแป้งนั้นมีอยู่ไม่มากนัก ดังนั้น การศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae ในประเทศไทยนี้ จึงมีความสำคัญที่ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐาน และทราบชนิดของแมลงช้างสีน้ำตาลและแมลงช้างปีกแป้งที่อาศัยในระบบนิเวศเกษตรของประเทศไทย เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี หรือคัดเลือกชนิดแมลงช้างชนิดใหม่ๆ จากธรรมชาติของประเทศไทย ที่มีศักยภาพมาใช้ควบคุมการระบาดของแมลงศัตรูพืชได้ดียิ่งขึ้น ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1) ตัวอย่างแมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae ที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืชเศรษฐกิจ และตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

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 โหลชี้น ตู้อบแมลง ฯลฯ

5) อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น Ethyl alcohol 50-100%, sodium hydroxide 10%, clove oil และ Canada balsam เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องสไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร

6) กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope, compound microscope และกล้องถ่ายภาพ

7) อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ camera lucida ปากกา roting และกระดาษไขเขียนแบบ

8) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของแมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae ได้แก่ New (2003) และ Sziráki (2011)

วิธีการ

1) เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae โดยสำรวจจากแหล่งปลูกพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ มันสำปะหลัง ข้าวโพด ส้มโอ ส้มเขียวหวาน มะนาว เงาะ ลำไย ลิ้นจี่ และพืชผักต่างๆ เป็นต้น

2) การเก็บตัวอย่างแมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae แบ่งเป็น 3 วิธี ดังนี้

- การเดินสุ่มสำรวจทั่วแปลงโดยใช้สวิงจับแมลง (insect net) โฉบเพื่อเก็บตัวแมลงช้างปีกใสจากแปลงปลูกพืชในช่วงเวลากลางวัน ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า (killing jar) ซึ่งบรรจุน้ำยาเอททิล อะซิเตด (ethyl acetate) หลังจากแมลงช้างตายแล้ว เก็บลงในซองกระดาษสามเหลี่ยมแยกใส่ไว้ในกล่องใส่ตัวอย่างแมลง นำกล่องใส่ตัวอย่างใส่ไว้ในกล่องรักษาความเย็นอีกชั้นเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเน่าเสีย

- การใช้กับดักแสงไฟ (light trap) ติดตั้งในแปลงเกษตร เพื่อดึงดูดแมลงช้างในช่วงเวลากลางคืน คัดเลือกแมลงช้างที่ต้องการศึกษา ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่าซึ่งบรรจุน้ำยาเอททิล อะซิเตด และเก็บตัวอย่างโดยใช้ซองกระดาษสามเหลี่ยมเช่นเดียวกัน

- การสำรวจและเก็บตัวอย่างระยะตัวอ่อนแมลงช้าง โดยการเดินสุ่มสำรวจทั่วแปลงเก็บตัวอ่อนแมลงช้างทุกระยะใส่กล่องพลาสติกพร้อมเหยื่อศัตรูพืชที่พบ และส่วนของพืชที่พบ นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการทั้งตัวอ่อนแมลงช้างและศัตรูพืชที่เป็นเหยื่อ เพื่อศึกษาชีวประวัติ เปลี่ยนเหยื่ออาหารและทำความสะอาดกล่องเลี้ยงตัวอ่อนแมลงช้างเมื่อกล่องเลี้ยงเริ่มสกปรก บันทึกระยะเวลาการเจริญเติบโตโดยดูจากการลอกคราบของตัวอ่อนแต่ละระยะ บันทึกขนาด สี รูปร่าง หรือรายละเอียดอื่นๆที่สังเกตได้ เลี้ยงจนเป็นตัวเต็มวัยรอจนปีกและสีของตัวเต็มวัยพัฒนาเต็มที่จึง ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า นำตัวอย่างที่ได้ไปจัดรูปร่างเพื่อรอการจำแนกชนิด

ศรีวิชาการเกษตร

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

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

5) การตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ New (2003) และ Sziráki (2011) ดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาดลำตัว รูปร่าง ลักษณะ และสี ฯลฯ โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชนิดแมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae ด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิด ประกอบกับการเปรียบเทียบตัวอย่างแมลงที่ได้จำแนกแล้วในพิพิธภัณฑ์ กรมวิชาการเกษตร สำหรับแมลงช้างบางชนิดซึ่งมีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมากจำเป็นต้องใช้อวัยวะสืบพันธุ์ประกอบในการจำแนก ซึ่งมีขั้นตอนการทำสไลด์อวัยวะสืบพันธุ์ดังนี้

- ตัดส่วนท้องของแมลงช้างแช่ในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 % ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หรือต้มในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 % ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 – 20 นาที

- ดูดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ออก เติมน้ำกลั่นเพื่อล้างโพแทสเซียมไฮ ดรอกไซด์ที่ยังหลงเหลืออยู่ออกให้หมด ทำซ้ำอีก 1-2 ครั้ง ย้อมสีด้วยเกจส์สเตน (Gage's slain) ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิตฟุชซิน 0.5 กรัม กรดเกลือ 10% 25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ นาน 2-3 นาทีหรือนานถึง 12 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์ของตัวอย่างแมลงช้างที่จะติดสีได้ง่ายหรือยาก

- ย้ายตัวอย่างลงในน้ำกลั่นเพื่อทำการผ่าเอาอวัยวะสืบพันธุ์ออกจากท้อง ถ้าเป็นเพศผู้ใช้ปากคีบปลายแหลมดึงอวัยวะสืบพันธุ์ออกจากท้องปล้องสุดท้าย แต่ถ้าเป็นเพศเมียใช้มีดผ่าตัดผ่าผนังลำตัวด้านข้างออกเพื่อป้องกันการเสียหายของอวัยวะสืบพันธุ์ใช้ปากคีบปลายแหลมค่อยๆ แยกผนังลำตัวออกจากอวัยวะสืบพันธุ์ จากนั้นใช้พู่กันเบอร์ 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 บันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของแมลงช้างปีกใสแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อ

กรมวิชาการเกษตร

วิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ ปีที่จำแนกชนิด ชื่อผู้จำแนกชนิด และรหัสกำกับตัวแมลง พิกัดภูมิศาสตร์ สถานที่ วัน/เดือน/ปี ชื่อผู้เก็บพืชที่พบ ศัตรูพืชที่เป็นเหยื่อ และวิธีการเก็บตัวอย่าง

7) จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุลและชนิดของแมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae ที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

8) จัดเก็บตัวอย่างแมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae ทุกชนิดที่จำแนกเรียบร้อยแล้วไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง เพื่อการตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

เวลาและสถานที่

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

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากตัวอย่างแมลงช้างสีน้ำตาล และแมลงช้างปีกแป้ง ที่เก็บรวบรวมได้จากการสำรวจในแปลงพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2564 และตัวอย่างแมลงช้างที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร พบว่าสามารถวินิจฉัยแมลงช้างสีน้ำตาล ในระดับชนิดได้จำนวน 2 ชนิด และในระดับสกุลได้จำนวน 1 ชนิด ใน 3 วงศ์ย่อย และ 3 เผ่า และสามารถวินิจฉัยแมลงช้างปีกแป้ง ในระดับชนิดได้จำนวน 1 ชนิด และในระดับสกุลได้จำนวน 1 ชนิด ใน 1 วงศ์ย่อย และ 2 เผ่า

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

1. แมลงช้างมีขนาดเล็กมาก มีความยาวของปีกคู่หน้าแต่ละปีก น้อยกว่า 5 มิลลิเมตร ทั้งปีกคู่หน้าและปีกคู่หลัง มีเส้นปีกจำนวนน้อย (Figure 8 & 9)..... Family Coniopterygidae

1’. แมลงช้างมีขนาดเล็กถึงขนาดกลาง มีความยาวของปีกคู่หน้าแต่ละปีก มากกว่า 5 มิลลิเมตร ทั้งปีกคู่หน้าและปีกคู่หลัง มีเส้นปีกจำนวนมาก (Figure 1, 2, 5, 6 & 7).....2

2. ปีกคู่หน้า มักมีเส้นปีก radial sector (Rs) เส้นเดียว ที่บริเวณขอบปีกคู่หน้าพบเส้นขวางปีก costal cross veins ลักษณะไม่แตกแขนง (Figure 1.1.20.1) ขณะแมลงมีชีวิต มักมีสีเขียวหรือสีเหลือง ..... Family Chrysopidae

2’.ปีกคู่หน้า มักมีเส้นปีก radial sector (Rs) มากกว่า 2 เส้น ที่บริเวณขอบปีกคู่หน้าพบเส้นขวางปีก costal cross veins ลักษณะแตกแขนง (Figure 1.1.20.2) ขณะแมลงมีชีวิต มักมีสีน้ำตาลหรือสีเขียว ..... Family Hemerobiidae

กรมวิชาการเกษตร

วงศ์แมลงช้างสีน้ำตาล (Family Hemerobiidae) ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถวินิจฉัยในระดับชนิด โดยใช้รูปวิธาน (key) ที่ปรับปรุงจากแนวทางการวินิจฉัยของ Garzon-Orduna *et al*. (2016) Ghosh (2000) Makarkin (1993) New (2003) และ Oswald (1993) ดังนี้

1. ปลายปีกคู่หน้ามีลักษณะโค้งงอ คล้ายตะขอ (falcate) (Figure 1.1.20.5)..... ..... *Drepanacra* sp.

1'. ปลายปีกคู่หน้าไม่มีลักษณะโค้งงอ หรือไม่คล้ายตะขอ (falcate).....2

2. ที่บริเวณฐานของขอบปีกคู่หน้า พบเส้น recurrent humeral vein ปรากฏอยู่ (Figure 1.1.20.3 & 1.1.20.6) ..... *Psectra siamica* Nakahara & Kuwayama, 1961

2'. ที่บริเวณฐานของขอบปีกคู่หน้า ไม่พบเส้น recurrent humeral vein ปรากฏอยู่ (Figure 1.1.20.4 & 1.1.20.7) ..... *Micromus timidus* Hagen, 1853

วงศ์แมลงช้างปีกแป้ง (Family Coniopterygidae) ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถวินิจฉัยในระดับชนิด โดยใช้รูปวิธาน (key) ที่ปรับปรุงจากแนวทางการวินิจฉัยของ Meinander (1972) New (2003) และ Sziráki (2011) ดังนี้

1. ที่ปีกคู่หน้า ที่บริเวณจุดแยกของเส้นปีก M_{1+2} และ M_{4+5} ไม่พบเส้นขวางปีก M-Cu ปรากฏอยู่ในแนวเฉียงในปีกคู่หลังเส้นปีก media vein (M) ไม่แตกแขนงออกเป็น 2 แฉก (Figure 1.1.20.8)..... ..... *Coniopteryx* sp.

1'. ที่ปีกคู่หน้า ที่บริเวณจุดแยกของเส้นปีก M_{1+2} และ M_{4+5} จะพบเส้นขวางปีก M-Cu ปรากฏอยู่ในแนวเฉียงในปีกคู่หลังเส้นปีก media vein (M) แตกแขนงออกเป็น 2 แฉก (Figure 1.1.20.9)..... ..... *Semidalis aleyrodiformis* (Stephens, 1836)

ทั้งนี้ สามารถจำแนกระดับขั้นทางอนุกรมวิธาน (taxonomic category) ของชนิดที่วินิจฉัยชื่อได้จากการศึกษาครั้งนี้ ตามแนวทางการศึกษาของ Garzon-Orduna *et al*. (2016) Ghosh (2000) Meinander (1972) New (2003) และ Oswald (1993) ได้ ดังนี้

Order Neuroptera

Suborder Hemerobiiformia

Superfamily Hemerobioidea Latreille, 1802

Family Hemerobiidae Latreille, 1802

Subfamily Drepanacrinae Oswald, 1993

Tribe Drepanacrini Oswald, 1993

Genus *Drepanacra* Tillyard, 1916

***Drepanacra* sp.**

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

กรมวิชาการเกษตร

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

Genus *Psectra* Hagen, 1866

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

Subfamily Microminae Krüger, 1822

Tribe Micromini Krüger, 1822

Genus *Micromus* Rambur, 1842

***Micromus timidus* Hagen, 1853**

Superfamily Coniopterygoidea Burmeister, 1839

Family Coniopterygidae Burmeister, 1839

Subfamily Coniopteryginae Burmeister, 1839

Tribe Coniopterygini Burmeister, 1839

Genus *Coniopteryx* Curtis, 1834

***Coniopteryx* sp.**

Tribe Conwenziini Enderlein, 1905

Genus *Semidalis* Enderlein, 1905

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

Genus *Drepanacra* Tillyard, 1916

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

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

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

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

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

1. *Drepanacra* sp. (Figure 1.1.20.10.)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงช้างขนาดเล็ก ความยาวลำตัว ประมาณ 8 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีน้ำตาลอ่อน ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร มีตารวม 1 คู่ ไม่มีตาเดี่ยว ปากกัดกินแบบ orthognathous เมื่อเกาะพักมักซ่อนส่วนหัวไว้ใต้ส่วนอกและขอบปีก ที่บริเวณลำตัว รวมทั้งแผ่นปีก มีขนขนาดเล็กและสั้นปกคลุม ขาเป็นแบบขาเดิน (walking leg) มีจำนวน 3 คู่ ปีกมี 2 คู่ แบบเยื่อบาง (membranous) มีจำนวนเส้นปีกมาก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 15 มิลลิเมตร ปีกคู่หน้ามีขนาดใหญ่กว่าคู่หลังเล็กน้อย ปลายปีกคู่หน้ามีลักษณะโค้งงอ คล้ายตะขอ (falcate) ที่บริเวณฐานของขอบปีกคู่หน้า พบเส้น recurrent humeral vein ปรากฏอยู่ ที่บริเวณกลางปีกมีชุดเส้นขวางปีก gradate crossveins จำนวน 2 ชุด

กรมวิชาการเกษตร

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

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่

ฤดูกาลที่พบ: พบในเดือนพฤษภาคม

หมายเหตุ: แมลงช้างชนิดนี้ จากการสำรวจ สามารถดักจับได้เพียงตัวอย่างเดียว โดยพบบินเล่นแสงไฟในเวลากลางคืน บนพื้นที่ระดับสูงของจังหวัดเชียงใหม่

Genus *Psectra* Hagen, 1866

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

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

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

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

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

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

2. *Psectra siamica* Nakahara & Kuwayama, 1961 (Figure 1.1.20.11.)

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

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

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

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: พบในประเทศไทย จีน และสิงคโปร์ (New, 2003)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดน่าน ขอนแก่น และชัยนาท

ฤดูกาลที่พบ: พบในเดือนมีนาคม และกันยายน

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ได้ทั้งหมด จับได้โดยกับดักแสงไฟ

กรมวิชาการเกษตร

Genus *Micromus* Rambur, 1842

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. *Micromus timidus* Hagen, 1853 (Figure 1.1.20.12, 1.1.2.13, 1.1.20.14 & 1.1.20.15.)

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

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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

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

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

ฤดูกาลที่พบ: พบได้เกือบตลอดปี แต่มักจะพบมากในช่วงเดือน เดือนธันวาคม มกราคม กุมภาพันธ์ มีนาคม และเมษายน

หมายเหตุ: พบตัวอ่อนบนต้นพืชที่มีเหยื่ออาศัยอยู่ ได้แก่ ชาทอง และขี้เหล็กเทศ โดยพบว่าเหยื่อของตัวอ่อนแมลงช้างสีน้ำตาลชนิดนี้ ได้แก่ แมลงหวี่ขาว และเพลี้ยอ่อน

Genus *Coniopteryx* Curtis, 1834

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

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

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

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

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

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

Type species: *Coniopteryx tineiformis* Curtis, 1834

4. *Coniopteryx* sp. (Figure 1.1.20.16.)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงช้างขนาดเล็กมาก ความยาวลำตัว ประมาณ 3 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีดำยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร มีตารวม 1 คู่ ไม่มีตาเดี่ยว ปากกัดกินแบบ orthognathous ตลอดลำตัว รวมทั้งขาและแผ่นปีก มีผงสีขาวปกคลุม ขาเป็นแบบขาเดิน (walking leg) มีจำนวน 3 คู่ ปีกมี 2 คู่ แบบเยื่อบาง (membranous) มีจำนวนเส้นปีกน้อย ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 4 มิลลิเมตร ปีกคู่หน้ามีขนาดใหญ่กว่าคู่หลังเล็กน้อย ที่บริเวณจุดแยกของเส้นปีก M1+2 และ M4+5 w,jพบเส้นขวางปีก M-Cu ปรากฏอยู่ในแนวเฉียง ในปีกคู่หลังเส้นปีก media vein (M) ไม่แตกแขนงออกเป็น 2 แฉก

กรมวิชาการเกษตร

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

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่

ฤดูกาลที่พบ: เดือนพฤษภาคม

หมายเหตุ: แมลงช้างชนิดนี้ จากการสำรวจ สามารถดักจับได้เพียงตัวอย่างเดียว โดยพบติดใยแมงมุมในเวลากลางวัน บนพื้นที่ระดับสูงของจังหวัดเชียงใหม่ แต่สอดคล้องกับรายงานการสำรวจของ Sziráki (2002) ที่รายงานแมลงช้างชนิดนี้จากจังหวัดเชียงใหม่

Genus *Semidalis* Enderlein, 1905

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5. ***Semidalis aleyrodiformis* (Stephens, 1836) (Figure 1.1.20.17, 1.1.20.18, 1.1.20.19, 1.1.20.20 & 1.1.20.21.)**

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

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

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

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงช้างขนาดเล็กมาก ความยาวลำตัว ประมาณ 2 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีดำยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร มีตารวม 1 คู่ ไม่มีตาเดี่ยว ปากกัดกินแบบ orthognathous ตลอดลำตัว รวมทั้งขาและแผ่นปีก มีผงสีขาวปกคลุม ขาเป็นแบบขาเดิน (walking leg) มีจำนวน 3 คู่ ปีกมี 2 คู่ แบบเยื่อบาง (membranous) มีจำนวนเส้นปีกน้อย ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 3 มิลลิเมตร ปีกคู่หน้ามีขนาดใหญ่กว่าคู่หลัง

กรมวิชาการเกษตร

เล็กน้อย ที่บริเวณจุดแยกของเส้นปีก M_{1+2} และ M_{4+5} จะพบเส้นขวางปีก M-Cu ปรากฏอยู่ในแนวเฉียง ในปีกคู่หลังเส้นปีก media vein (M) แตกแขนงออกเป็น 2 แฉก

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: เขตอบอุ่นและกึ่งร้อนของทวีปยุโรปและเอเชีย รวมทั้งมาเลเซีย และไทย (New, 2003)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย จันทบุรี และกรุงเทพมหานครฯ

ฤดูกาลที่พบ: เดือนมกราคม กุมภาพันธ์ มีนาคม และเมษายน

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ได้ส่วนมาก รวบรวมจากตัวเต็มวัยที่พบบนต้นพืชที่มีเหยื่ออาศัยอยู่ ได้แก่ มะม่วง ขี้เหล็กเทศ ทรงบาดาล มันสำปะหลัง มะยม ชมพู่ และชาฮกเกี้ยน นอกจากนี้พบว่าเหยื่อของแมลงช้างปีกใสชนิดนี้ ได้แก่ แมลงหวี่ขาว และไร หลายชนิด

การศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae ในประเทศไทยนั้น การสำรวจและเก็บตัวอย่างแมลงช้าง โดยใช้กับดักแสงไฟ รวมถึงการสำรวจเก็บตัวอย่างด้วยสวิงโฉบในแปลงพืช ในจำนวนนี้เป็นการเก็บตัวอย่างด้วยสวิงโฉบในแปลงปลูกกาแฟ ในจังหวัดเชียงราย ซึ่งก็ได้ทั้งตัวอย่างแมลงช้างสีน้ำตาลและแมลงช้างปีกแป้ง ซึ่งสามารถบ่งชี้ว่าแมลงช้างทั้ง 2 วงศ์นี้ เป็นศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูกาแฟได้ อีกทั้งมักพบตัวอ่อนแมลงช้างชนิด *M. timidus* และ *S. aleyrodiformis* กัดกินแมลงปากดูด ได้แก่ เพลี้ยอ่อน และแมลงหวี่ขาว อยู่บ่อยครั้ง ในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น มะม่วง ชมพู่ มะยม มันสำปะหลัง และกาแฟ เป็นต้น จึงจัดว่าเป็นแมลงตัวห้ำที่น่าจะมีความสำคัญทางการเกษตร นำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี โดยเฉพาะกลุ่มแมลงปากดูดชนิดต่างๆ

แต่การสำรวจพบจำนวนชนิดของแมลงช้างทั้ง 2 วงศ์นี้ เพียงแค่ 5 ชนิดนั้น ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะในสภาพแปลงเกษตร มักมีการปลูกพืชเศรษฐกิจเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง ไม่มีความหลากหลายของพืชและแมลงเหยื่อ อีกทั้งมีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช อาจเป็นเหตุให้พบจำนวนชนิดแมลงช้างไม่มากนัก นอกจากนี้หากมีการสำรวจแมลงช้างกลุ่มนี้ ในพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากกว่าในพื้นที่เกษตรกรรมซึ่งมักพบความหลากหลายทางชีวภาพน้อย อีกทั้งการศึกษาชีววิทยาของแมลงช้างชนิดนั้นๆ ควบคู่กันกับการสำรวจ อาจทำให้สามารถค้นหาชนิดใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธีได้ในอนาคต

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae โดยการสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างในแปลงพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2564 และจากตัวอย่างแมลงช้าง ที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร พบว่าสามารถวินิจฉัยแมลงช้างสีน้ำตาล ในระดับชนิดได้จำนวน 2 ชนิด และในระดับสกุลได้จำนวน 1 ชนิด ใน 3 วงศ์ย่อย และ 3 เผ่า คือ *Psectra siamica* Nakahara & Kuwayama, 1961 *Micromus timidus* Hagen, 1853 และ *Drepanacra* sp. และสามารถวินิจฉัยแมลงช้างปีกแป้ง ในระดับชนิดได้จำนวน 1 ชนิด และในระดับสกุลได้จำนวน 1 ชนิด ใน 1 วงศ์ย่อย และ 2 เผ่า คือ *Semidalis aleyrodiformis* (Stephens, 1836)

และ *Coniopteryx* sp. โดยแมลงช้างทั้ง 2 วงศ์นี้ ชนิดที่สามารถพบได้ทุกภูมิภาคของประเทศไทย มีจำนวน 2 ชนิด คือ *M. timidus* และ *S. aleyrodiformis* ซึ่งแมลงช้างทั้งสองชนิดนี้ มักพบตัวอ่อนกัดกินแมลงปากดูด ได้แก่ เพลี้ยอ่อน และแมลงหวี่ขาว อยู่บ่อยครั้ง ในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น มะม่วง ชมพู่ มะยม มันสำปะหลัง และกาแฟ เป็นต้น จึงจัดว่าเป็นแมลงตัวห้ำที่น่าจะมีความสำคัญทางการเกษตร นำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี โดยเฉพาะกลุ่มแมลงปากดูดชนิดต่างๆ

นอกจากนี้หากมีการสำรวจแมลงช้างกลุ่มนี้ ในพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากกว่าในพื้นที่เกษตรกรรม ซึ่งมักพบความหลากหลายทางชีวภาพน้อย อีกทั้งการศึกษาชีววิทยาของแมลงช้างชนิดนั้นๆ ควบคู่กันกับการสำรวจ อาจทำให้สามารถค้นหาชนิดใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธีได้ในอนาคต

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

งานวิจัยนี้ เป็นงานวิจัยพื้นฐาน เพื่อรวบรวมข้อมูลทางอนุกรมวิธาน เขตการแพร่กระจาย และฤดูกาลที่พบ ของแมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae ในประเทศไทย ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัยชนิดของแมลงช้างที่พบในแปลงเกษตร และนำไปใช้ตัดสินใจคัดเลือกชนิดแมลงช้างชนิดที่เป็นชนิดพื้นถิ่นของประเทศไทย เพื่อคัดเลือกชนิดใหม่ๆ นำมาใช้ในงานวิจัยด้านการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธีได้

ศูนย์วิชาการเกษตร

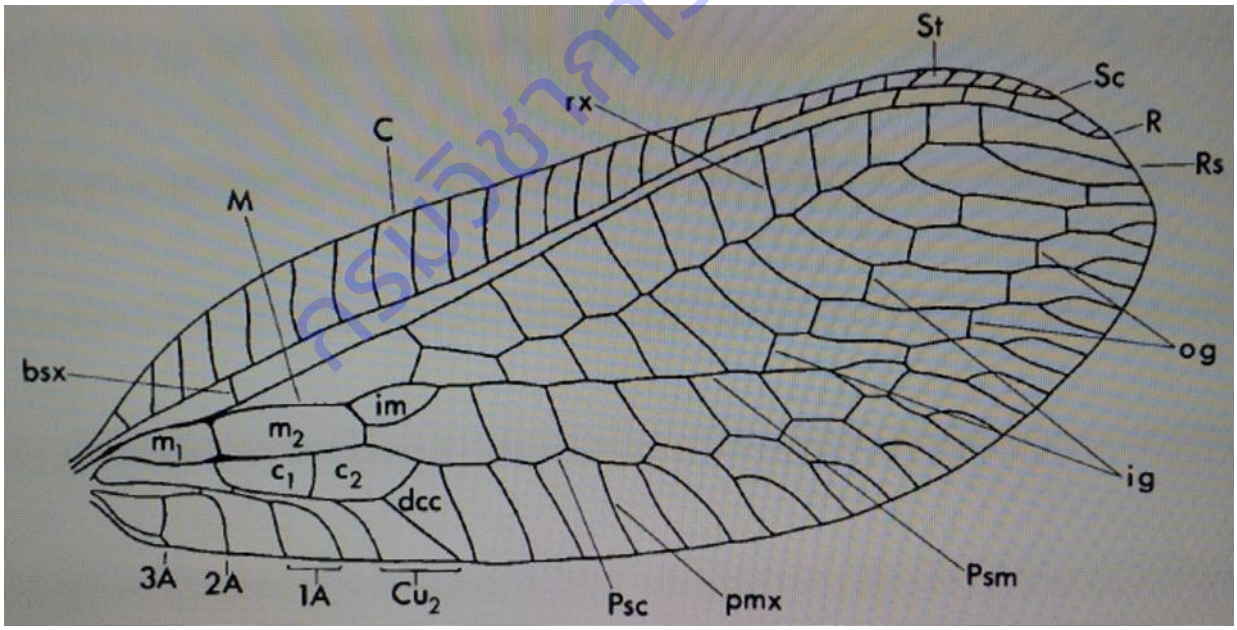


Figure 1.1.20.1. Wing venation pattern in fore wing of the green lacewings (Family Chrysopidae). bsx; basal subcostal crossvein, ig; inner gradate crossveins, im; intramedian cell, m_1 and m_2; 1st and 2nd median cell, og; outer gradate crossveins, R; radius, Rs; radial sector, Sc; subcosta, St; pterostigma. (From: Brooks & Barnard, 1990)

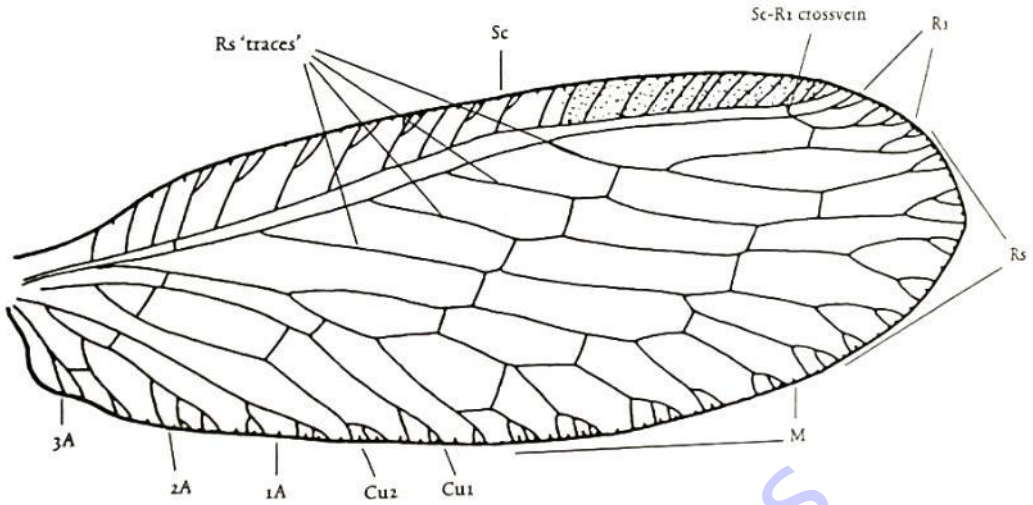


Figure 1.1.20.2. Wing venation pattern in fore wing of the brown lacewings (Family Hemerobiidae). 1A 2A and 3A; 1st 2nd and 3rd Anal vein, Cu1 and Cu2; 1st and 2nd Cubitus, M; Media, Rs; radial sector, Sc; subcosta. (From: New, 2003)

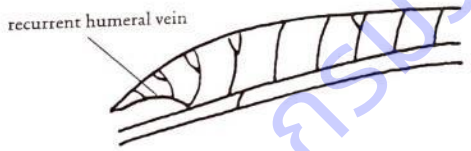


Figure 1.1.20.3. Wing venation pattern at costal area base in fore wing of the brown lacewings; Recurrent humeral vein present. (From: New, 2003)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

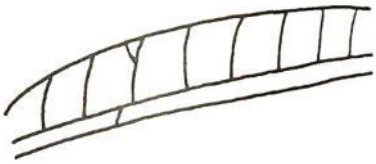


Figure 1.1.20.4. Wing venation pattern at costal area base in fore wing of the brown lacewings; Recurrent humeral vein absent. (From: New, 2003)

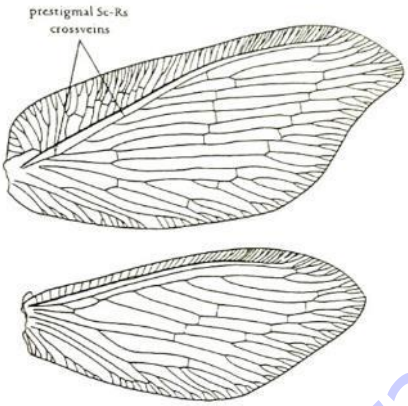


Figure 1.1.20.5. Wing venation pattern in both wings of the brown lacewings; genus *Drepanacra*. (From: New, 2003)

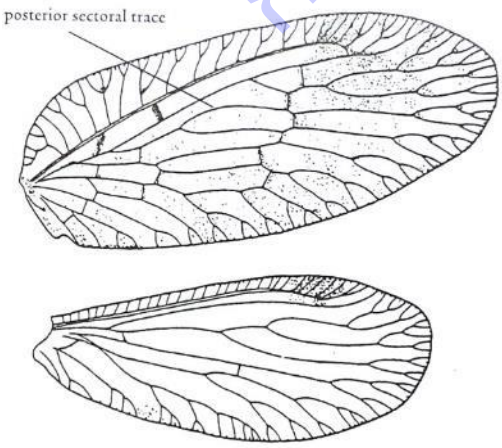


Figure 1.1.20.6. Wing venation pattern in both wings of the brown lacewings; genus *Psectra*. (From: New, 2003)

กรมวิชาการเกษตร

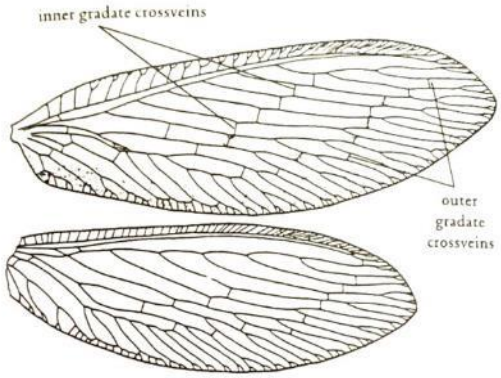


Figure 1.1.20.7. Wing venation pattern in both wings of the brown lacewings; genus *Micromus*. (From: New, 2003)

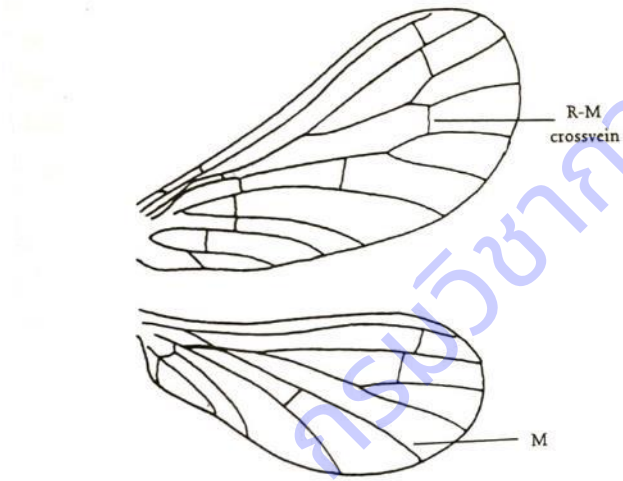


Figure 1.1.20.8. Wing venation pattern in both wings of the dusty-wings; genus *Coniopteryx*. (From: New, 2003)

กรมวิชาการเกษตร

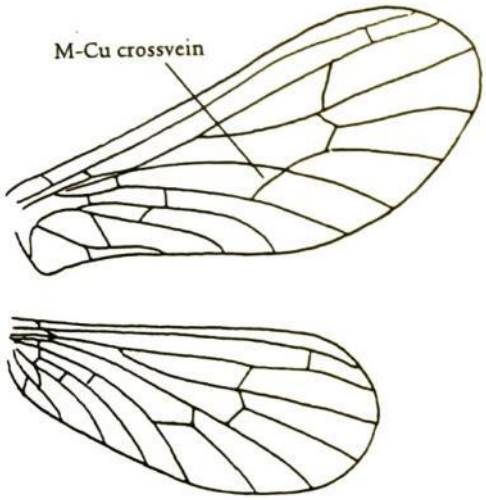


Figure 1.1.20.9. Wing venation pattern in both wings of the dusty-wings; genus *Semidalis*. (From: New, 2003)

กรมวิชาการเกษตร

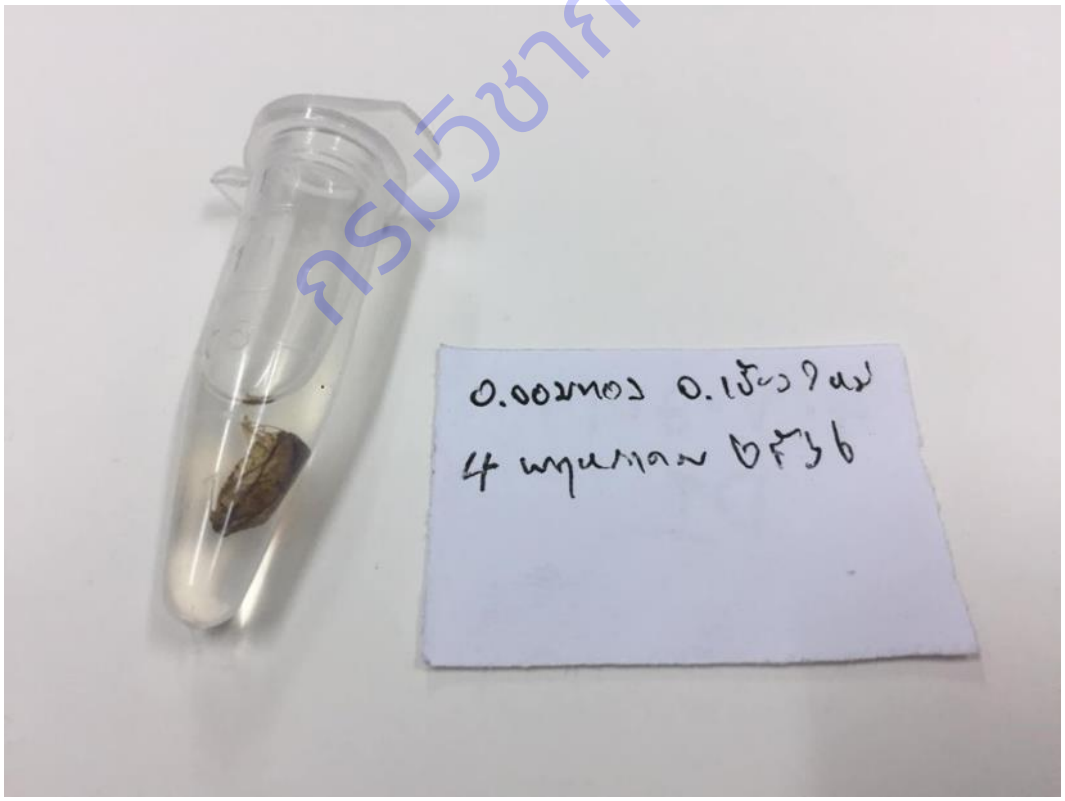


Figure 1.1.20.10. Preserved *Drepanacra* Tillyard, 1916 in 70% ethyl alcohol.

Figure 1.1.20.11. *Psectra siamica* Nakahara & Kuwayama, 1961.

Figure 1.1.20.12. *Micromus timidus* Hagen, 1853

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.20.13. A final instar larva of *M. timidus*

Figure 1.1.20.14. *M. timidus* larva feeding on whitefly larvae.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.20.15. *M. timidus* larva feeding on aphids.

Figure 1.1.20.16. *Coniopteryx* Curtis, 1834

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.20.17. *Semidalis aleyrodiformis* (Stephens, 1836)

Figure 1.1.20.18. A living *S. aleyrodiformis*

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.20.19. *S. aleyrodiformis* larva feeding on whitefly larvae.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.20.20. Cocoon of *S. aleyrodiformis*

Figure 1.1.20.21. *S. aleyrodiformis* pupa in the cocoon.

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.21 อนุกรมวิธานไรขาว วงศ์ Tarsonemidae ในประเทศไทย

Taxonomic Study of Mite Family Tarsonemidae in Thailand.

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง พลอยชมพู กรวิภาสเรือง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน วิมลวรรณ โชติวงศ์ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ณพชรกร ธไภษัชย์ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

อทิติยา แก้วประดิษฐ์ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

วีระชัย สมศรี สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ไรขาวในวงศ์ Tarsonemidae เป็นไรศัตรูที่มีความสำคัญเข้าทำลายผลอ่อน ช่อดอก และยอดอ่อนของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ลักษณะตัวมีขนาดเล็กมองเห็นได้ยากด้วยตาเปล่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งไรขาวเป็นศัตรูพืชในวงศ์เดียวของประเทศที่ยังไม่มีรายชื่อเป็นศัตรูพืชกักกันในประเทศ ดังนั้นการสำรวจในครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์ในการเพิ่มข้อมูลศัตรูพืชกักกันให้สมบูรณ์ครบถ้วยยิ่งขึ้น โดยการสำรวจไรขาวในพืชเศรษฐกิจนพื้นที่ 48 จังหวัด ระหว่างเดือนตุลาคม 2561-เดือนธันวาคม 2564 พบไรทั้งหมด 2 วงศ์ 15 ชนิด เป็นไรศัตรูพืช 8 ชนิด ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นศัตรูพืชหรืออาจจะเป็นไรที่กินเชื้อราอีก 6 ชนิดและ ไรตัวห้ำ 1 ชนิด ไรขาวศัตรูพืชที่พบได้แก่ *Polyphagotarsonemus latus* (Banks), *Polyphagotarsonemus* sp., *Nasuitarsonemus onami* Lofego, Hountondji, Al-Shanfari&Moraes, *Nasutitarsonemus* sp., *Steneotarsonemus furcatus* De Leon, *Steneotarsonemus* sp., *Steneotarsonemus spinki* Smiley และอีกชนิดไม่สามารถจำแนกชนิดได้ สำหรับไรขาวอีก 5 ชนิดได้แก่ *Fungitarsonemus setillus* Sousa, Lofego & Gondim, *Fungitarsonemus* sp. *Neotrsonemoides* sp., *Tarsonemus bilobatus* Suski *Tarsonemus* sp. และ *Steneotarsonemus* sp. ไม่พบอาการเข้าทำลายอย่างชัดเจน คาดว่าน่าจะเป็นไรขาวที่กินเชื้อราเป็นอาหาร นอกจากนี้พบไรตัวห้ำพบ 1 ชนิดคือ *Amblyseius largoensis* (Muma) จากการสำรวจพบว่าไรขาวชนิดที่มีความสำคัญมี 3 ชนิดคือ *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) เป็นไรขาวที่เข้าทำลายพืชได้หลากหลายชนิด ทำให้ใบพืชม้วนหงิกงอ *Steneotarsonemus furcatus* De Leon เป็นไรขาวศัตรูสำคัญบนผลมะพร้าวทำให้มะพร้าวเป็นแผลแข็งสีน้ำตาล ผลไม่ได้ขนาด หากเข้าทำลายรุนแรงผลจะบิดเบี้ย และ *Steneotarsonemus spinki* Smiley เป็นไรขาวที่พบบนใบข้าว ระบาดเป็นครั้งคราวแต่หากระบาดทำให้ผลผลิตข้าวลดลง

คำนำ

ไรขาวในวงศ์ Tarsonemidae อยู่ในวงศ์ Tarsonemidae มีถิ่นอาศัยอยู่กว้างขวาง เช่นกินเชื้อรา กินสาหร่าย กินพืช เป็นตัวห้ำของไรชนิดอื่น เป็นตัวเบียนในแมลง แบบพึ่งพาอาศัยกันกับแมลง และเป็นศัตรูที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ไรขาวเป็นไรที่มีขนาดเล็กรองลงมาจากไรสี่ขา มีสีขาวใส แผ่นหลังนูน รูปรี กลม หรือลำตัวยาว

กรมวิชาการเกษตร

ขึ้นอยู่กับชนิดของไร โดยมากแล้วตัวผู้จะมีขนาดเล็กกว่าตัวเมีย อย่างเห็นได้ชัด ไรขาวมีรายงานทั่วโลก 529 ชนิด 40 สกุล (Lin and Zhang, 2002) ชนิดที่มีความสำคัญเข้าทำลายพืชไปทั่วโลกเช่น *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) เป็นไรพบเข้าทำลายพืชทั้งในสภาพโรงเรือนและสภาพไร่ มีรายงานแพร่กระจายทั่วโลกถึง 124 ประเทศ บนพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมากถึง 34 ชนิด เช่นส้ม มะนาว มะม่วง องุ่น กาแฟ พริก ถั่ว ถั่วเหลือง ถั่วลันเตา มะเขือเทศ แตงกวา และพืชอื่นๆ อีกมากมาย ในหลายๆ ประเทศเช่น ประเทศบราซิล ออสเตรเลีย อินเดีย ญี่ปุ่น เกาหลี (Lin and Zhang, 2002; Venzon *et al*, 2008, CABI, 2018) แต่สำหรับประเทศไทย ไรชนิดนี้พบดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณใบอ่อน หรือยอดที่แตกใหม่ และทำให้ใบหงิก ขอบใบม้วนลง ยอดอ่อนแตกเป็นฝอย ก้านใบยืดออก ใบเรียวเล็ก ทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโต และมีรายงานเข้าทำลายพืชปลูกได้หลายชนิดเช่น ส้มโอ ชา พริก ฝ้าย ปอกระเจา บวบ ถั่วเขียว โหระพา มันฝรั่ง มะม่วง และ ไม้ดอกหลายชนิด เช่น เยอบีร่า เบญจมาศ ไซคลาเมน (วัฒนา และคณะ, 2543) ไรขาว *Steneotarsonumus spinki* Smiley เป็นศัตรูที่สำคัญในข้าว *Tarsonemus myceliophagus* เป็นไรขาวที่พบเข้าทำลายเห็ดหลายชนิด (Cho, 2013) *Phytonemus pallidus* เป็นศัตรูที่สำคัญในสตรอเบอรี่ และไม้ดอกหลายชนิดในโรงเรือน (Zhang, 2003), *Tarsonemus setifer* Ewing เป็นไรขาวที่มีเขตการแพร่กระจายไปในหลาย ๆ ทวีปเช่นในทวีปยุโรป อเมริกาเหนือ บนพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเช่น ทับทิม สตรอเบอรี่ ท้อ องุ่น กุหลาบ ไผ่ blackberry dewberry raspberry และ พืชอื่นอีกหลายชนิด *Tarsonemus smithi* Ewing มีรายงานพบใน แอปเปิล ส้ม ท้อ พลัม มะเขือเทศ และไม้ดอกพวกเบญจมาศ โดยมีรายงานพบในประเทศโปรตุเกส เวอจิเนีย และ สหรัฐอเมริกา (Jepson *et al*, 1975) *Phytonemus pallidus* (Zimmerman) เป็นไรศัตรูที่สำคัญในสตรอเบอรี่ในยุโรปและอเมริกาเหนือ (Fountain *et al*, 2010), *Steneotarsonemus concavuscutum* Lofego and Gondim เป็นไรขาวที่รายงานการเข้าทำลายในขั้วผลมะพร้าวขนาดเล็กที่ประเทศบราซิล (Lofego and Gondim, 2006) ในประเทศจีนมีรายงานการพบไรขาวทั้งหมด 93 ชนิด 15 สกุล (Lin and Zhang, 1999) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการพบไรขาวอยู่ 7 ชนิด 4 สกุล ได้แก่ *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Baker, 1975), *Steneotarsonemus spinki* Smiley และ *Steneotarsonemus oryzae* พบในนาข้าว (พิเชฐ และคณะ, 2548; Wongsiri, 1991; Charanasri *et al*., 1977; Kongchuensin *et al*., 2005), *Tarsonemus cryptocephaus* (Ewing) พบในกล้วยไม้ (วัฒนา และคณะ 2526), *Tarsonemus weitei* Banks พบในองุ่น ส่วนอีก 2 ชนิดคือ *Hemitarsonemus* sp. และ *Tarsonemus* sp. พบในลิ้นจี่ และองุ่น ตามลำดับ (วัฒนา และมานิตา, 2533; วัฒนาและคณะ, 2535; พิเชฐ และคณะ, 2548) ไรขาวจึงนับเป็นไรที่มีความสำคัญสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจให้กับผลิตผลทางการเกษตร แต่ในประเทศไทยข้อมูลของไรขาวยังมีไม่มาก มีรายงานพบไรขาวในประเทศเพียง 7 ชนิด ในขณะที่ทั่วโลกมีรายงานการพบมากถึง 529 ชนิด (Lin and Zhang, 2002) เนื่องจากไรขาวเป็นไรที่มีขนาดเล็กมากการใช้กล้องจุลทรรศน์ในการจำแนกชนิด ในอดีตเทคโนโลยีของกล้องยังไม่ทันสมัย ไม่สามารถที่จะส่องดูลักษณะที่สำคัญของไรขาวได้ เนื่องจากข้อจำกัดของกล้องและคู่มือการจำแนกชนิดของไรขาวไม่สมบูรณ์และละเอียดมากพอ ปัจจุบันด้วยเทคโนโลยีอันทันสมัยของกล้องจุลทรรศน์ ทำให้มีคู่มือการจำแนกชนิดไรขาวนี้ได้อย่างละเอียด และซับซ้อนมากกว่าคู่มือเดิม ใช้ตรวจสอบและจำแนกชนิดของไรขาวจากต่างประเทศที่ติดมากับส้มแมนดาริน ประเทศอเมริกา ทางด่านตรวจศัตรูพืชแหลมฉบังพบมีชื่อว่า *Dendroptus* sp. ยังไม่สามารถจำแนกได้ถึงระดับชนิด เนื่องจากไม่พบไรตัวผู้ใน

กรมวิชาการเกษตร

ตัวอย่างที่ส่งมาจำแนก แต่ไรขาวนี้เป็นสกุลที่ไม่มีรายงานการพบในประเทศไทยมาก่อน ดังนั้นไรขาวชนิดนี้จึงอาจเป็นไรศัตรูพืชชนิดใหม่ก็ได้ จากข้อมูลตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. ๒๕๐๗ (ฉบับที่ ๓) พ.ศ. ๒๕๕๐ พบว่ามีไรศัตรูพืชกักกันที่เป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติอยู่ทั้ง หมด 32 ชนิด เป็นไรแดงวงศ์ Tetranychidae ทั้งหมด 25 ชนิด ไรสี่ขาวงศ์ Eriophyidae 3 ชนิด ไรศัตรูในโรงเก็บวงศ์ Acaridae 4 ชนิด โดยไม่มีไรขาวที่เป็นศัตรูพืชที่สำคัญ ประกาศในพระราชบัญญัตินี้เลย ดังนั้นการสำรวจไรขาวในครั้งนี้ จะได้ข้อมูลที่ถูกต้องและทันสมัย เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานแจ้งให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทราบ ใช้ประกาศเพิ่มเติมถึงชนิดของไรขาวที่เป็นศัตรูที่สำคัญที่ยังไม่มีรายงานพบในประเทศ เพื่อประโยชน์ในการต่อรองเจรจาทางการค้าและเป็นการป้องกันไม่ให้มีไรขาวชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจจากต่าง ประเทศ ติดเข้ามาทำความเสียหายให้กับประเทศได้

วิธีดำเนินการ

- สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1). อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างไร: ได้แก่ ถุงพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ กล่องพลาสติก พู่กันเบอร์ 0, ขวดดองตัวอย่างไร ขนาด 1 แดรม บรรจุแอลกอฮอล์ 70% กล่องพลาสติกรักษาความเย็นขนาด 68 ควอทซ์ แว่นขยาย (กำลังขยาย 20x)

2). อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างไร เพื่อการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน: ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ (stereo microscope) โคมไฟ พู่กันเบอร์ 0 เข็มเขี่ยปลายแหลม แผ่นกระจกปิดสไลด์ สไลด์ สำลี แผ่นพลาสติกเจาะรู จานแก้ว กล่องใส่สไลด์ แป้นหมุนสำหรับผนึกขอบสไลด์ น้ำยาผนึกขอบสไลด์ สารเคมีสำหรับใช้เตรียมน้ำยาเมาท์ ตู้อบ/เครื่องอุ่นสไลด์ ตั้งอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส

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

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

-วิธีปฏิบัติการทดลอง

1 . การเก็บและรักษาตัวอย่างไรขาว

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

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

กรมวิชาการเกษตร

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

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน

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

สถานที่

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

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการสำรวจไรขาวในวงศ์ Tarsonemidae ในพื้นที่ 48 จังหวัด ได้แก่จังหวัด จังหวัดปทุมธานี นครนายก กรุงเทพ ลพบุรี ชัยนาท นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี กำแพงเพชร นครสวรรค์ อุตรดิตถ์ น่าน พิจิตร เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี ชุมพร พัทลุง ระนอง ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี พังงา สตูล ภูเก็ต สงขลา ปัตานี ชัยภูมิ เพชรบูรณ์ กาฬสินธุ์ นครราชสีมา สุรินทร์ ขอนแก่น อำนาจเจริญ สกลนคร ศรีสะเกษ มุกดาหาร หนองคาย อุดรธานี อุบลราชธานี ตราด ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา และจันทบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม 2561-เดือนธันวาคม 2564 พบไรทั้งหมด 2 วงศ์ 15 ชนิด เป็นไรศัตรูพืช 8 ชนิด ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นศัตรูพืชหรืออาจจะเป็นไรที่กินเชื้อราอีก 6 ชนิดและ ไรตัวห้ำ 1 ชนิด ไรขาวที่พบทั้งที่เป็นศัตรูพืชและไม่ใช่ศัตรูพืชได้แก่ *Polyphagotarsonemus latus* (Banks), *Polyphagotarsonemus* sp., *Nasuitarsonemus onami* Lofego, Hountondji, Al-Shanfari&Moraes, *Nasutitarsonemus* sp. , *Steneotarsonemus furcatus* De Leon, *Steneotarsonemus* sp.,

กรมวิชาการเกษตร

Steneotarsonemus spinki Smiley, *Fungitarsonemus setillus* Sousa, Lofego & Gondim, *Fungitarsonemus* sp. *Neotrsonemoides* sp., *Tarsonemus bilobatus* Suski *Tarsonemus* sp. และ *Steneotarsonemus* sp. (Table 1.1.21.1) สำหรับไรตัวห้ำพบ 1 ชนิดคือ *Amblyseius largoensis* (Muma) โดยพบภายในขั้วผลมะพร้าวพบร่วมด้วยกับไร *S. furcatus* (Table 1.1.21.2)

จากการสำรวจพบว่าไรขาวชนิดที่มีความสำคัญเป็นศัตรูพืชเศรษฐกิจมี 3 ชนิด คือ *Polyphagotarsonemus latus* (Banks), *Steneotarsonemus furcatus* De Leon และ *Steneotarsonemus spinki* Smiley ไรขาวพริก *P. latus* เป็นไรขาวที่เข้าทำลายพืชได้หลากหลายชนิด ทำให้ยอดใบพริกหงิกม้วนงอ ลำตัวของไรมีสีขาวใส ตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่า ตัวผู้ผอมเล็กกว่าดูแข็งแรง (Figure 1.1.21.8) ไรขาวที่พบบนผลมะพร้าวพบ 3 ชนิดได้แก่ *Steneotarsonemus furcatus* De Leon, *Steneotarsonemus* sp. และ *Nasutitarsonemus* sp. ชนิดที่สำคัญคือ *Steneotarsonemus furcatus* De พบมากกว่าไรขาวชนิดอื่นที่พบบนในขั้วผลมะพร้าว โดยตัวอ่อนไรจะมีสีขาว (Figure 1.1.21.9b) ตัวแก่มีสีขาวอมน้ำตาล (Figure 1.1.21.9c) ตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ ตัวผู้มีขนาดเล็ก เคลื่อนไหวว่องไว ทำให้เกิดแผลนูนแข็งสีน้ำตาล ปลายแผลเรียบเป็นเส้นตรง บางลูกอาจแสดงอาการผลบิดเบี้ยว (Figure 1.1.21.9A) ซึ่งแตกต่างกว่าอาการที่พบบนผลมะพร้าวที่เกิดจากอาการเข้าทำลายของไรสี่ขามะพร้าว ที่ปลายแผลจะมีลักษณะปลายแผลแหลม ผลเล็กลีบ และ *Steneotarsonemus spinki* Smiley เป็นไรขาวที่พบบนใบข้าว ระบาดเป็นครั้งคราวแต่หากระบาดทำให้ผลผลิตข้าวลดลง ลำตัวมีสีขาวใสหรือสีน้ำตาล ระยะเริ่มแรกใบจะมีสีขาวซีด ต่อมาบริเวณแผลจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

Key to Genera of Tarsonemidae

1. Adult, female and male: metapodosomal venter with 3 or usually 4 pairs of setae, leg I with membranous part of ambulacrum reduced or absent, and with large, nearly sessile claw or absent.....2

- Adult, female and male: metapodosomal venter with 2 pairs of setae, leg I with membranous ambulacrum bearing usually moderately small or reduced claw 3

2. Lava and adult: legs II and III with symmertrically vestigial claws or without claw, leg IV of female with 2 setae on tibiotarsus, legs IV of male with pointed, triangulara flange distally on posterolateral surface of femorogenu, and with reduced, buttonlike claw terminally.....***Polyphagotarsonemus***

One single genus and species known in Thailand: ***Polyphagotarosnemus latus*** **(Banks).**

- Lava and adult: legs II and III with claws well develop or asymmetrically reduce, the posterior member usually vestigial or absent on leg III, and sometimes on leg II, of adult female and leg IV with 3 setae on tibiotarsus , structure legs IV of male unknow.....***Nasuitarsonemus***

กรมวิชาการเกษตร

3. Lava and adult: scapular setae very long, near stigmata and anterior to trichobothria; on anterior half of propodosoma, leg I-III with tarsi realtively long, such tat legII with tarsus usually exceeding combined length of tibia and genu.....***Fungitarsonemus***

- Lava and adult: scapular setae posterior to trichobothria; on posterior half of propodosoma, leg I-III with tarsi of moderated length or short, such that leg II with tarsus equal to or shorter than combined length o ftibia and genu.....4

4. Female adult: tegula triangular, its length about 1-1.5 time its basal width.....
.....***Neotarsonemoides***

-Female adult: tegula short to moderately long, broadly rounded apically.....5

5. Female adult: setae *v1* close stigmata, apodeme 4 not extending to base of trochanter IV
.....***Steneotarsonemus***

- Female adult: setae *v1* not close stigmata, apodeme 4 not extending posterolaterad of base of setae *3b*.....***Tarsonemus***

กรมวิชาการเกษตร

Subfamily Pseudotarsonemoidinae Lindquist, 1986

Tribe Pseudotarsonemoidini Lindquist, 1986

Genus *Polyphagotarsonemus* Beer and Nucifora, 1965

Polyphagotarsonemus (*Tarsonemus*) *latus* Banks, 1904, p.56, Figure3.

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

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

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

ความยาวและความกว้างของส่วนหัวมีขนาดใกล้เคียงกัน ไม่พบขนที่ plapcoxal, ขนบนส่วนปาก gnathosoma ด้านหลังเรียบ, ส่วนของปาก chelicerae เป็นแท่งเข็มยาวปานกลาง, ขนส่วนด้านสันหลัง idiosoma แตกเป็นแฉกเล็กน้อย, ส่วนของแผ่นแข็งด้านสันหลังส่วนบน (prodosal shield) ปกติ ไม่ปกคลุมเลยไปถึงส่วนของปาก gnathosoma, รูเปิดหายใจ stigmata ไม่สูงเกินกว่าขอบของแผ่นด้านสันหลังส่วนบน (prodorsal shield) โดยตำแหน่งจะอยู่ด้านข้างใกล้เคียงกับขน *v1,* หลุมขน *v2* เฉียงเป็นแนวตรงกับขน *v1* และ *sc2* โดยตำแหน่งที่ตั้งของขน *v2* จะอยู่ระหว่างขนทั้งคู่, ปรากฏขน *sc1* เป็นขนกระบอง Bothridia, แผ่นแข็ง EF มีขน *e* และ *f* ตั้งอยู่ในแนวขวาง, ด้านล่าง ventral shield มีร่อง apodmes ลักษณะเป็นรูปตัว Y, apodeme III จะเชื่อมต่อด้านข้างกับ trochanter 3, apodeme IV ลากยาวไปด้านข้างของขน *3b* จนถึงฐานของ

trochanter IV, บริเวณด้านล่างของ metapodosomal พบขน 4 คู่ ประกอบด้วยขน *3a, 3b 3c* และ *4b*, แผ่น teula ที่อยู่ระหว่างขาคู่ที่ 4 ในเพศเมียกว้างโค้งมน

Polyphagotarsonemus latus **(Banks)**

(Figure 1.1.21.2)

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

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เพศเมียลำตัวเป็นรูปไข่ สีขาวเหลือง, ขนด้านสันหลังและบนแผ่นแข็งมีขนาดสั้น, มีขน Bothridia เป็นรูปกระบองอยู่ด้านหลังของขน *v1* โดยจะอยู่เหนือขน *sc2,* ความกว้างและความยาวของส่วนหัวมีขนาดใกล้เคียงกัน ระยางค์ปากมีขนาดเล็ก, บริเวณ ด้านล่างของ metapodosomal พบขน 4 คู่, ปลายขา tarsus ของขาคู่ที่ 1 มีเล็บขนาดใหญ่เห็นชัดเจน, ปลายขา tarsus ของขาคู่ที่ 2 และ 3 ไม่ปรากฏเล็บ ปลายขาคู่ที่ 4 มีขนยาว 2 เส้น เช่นเดียวกับไรขาวเพศเมียชนิดอื่นๆ เพศผู้มีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย ลำตัวเรียวผอม ดูแข็งแรง เคลื่อนไหวว่องไว ส่วนของปลายขาในเพศผู้มีลักษณะเป็นกระเปราะ บริเวณส่วนปลายของ femur มีลักษณะเป็นแผ่นยื่นยาวออกเห็นชัดเจน

ความสัมพันธ์กับพืชอาศัย (Relation to host)

เข้าทำลายยอดอ่อนของพืชผัก ไม้ดอกหลายชนิด โดยจะทำให้ยอดอ่อนม้วนหงิกงอ โดยม้วนลงด้านล่างอย่างชัดเจน

กรมวิชาการเกษตร

Genus *Nasuitarsonemus* Nucifora, 1964

Nasuitarsonemus Nucifora, 1964, p 12; nomen nudum.

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

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

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

ความยาวของส่วนหัวยาวมากกว่าความกว้างของส่วนหัว ส่วนปากยืดยาวไปด้านหน้า ไม่พบขนที่ plapcoxal, ขนบนส่วนปาก gnathosoma ด้านหลังยาว เรียบ, ส่วนของปาก chelicerae เป็นแท่งเข็ม ยาวตรง, ส่วนของ pharynx ยาว เรียว ปานกลาง ผนังแข็ง, ขนส่วนด้านสันหลัง (idiosoma) แตกเป็นแฉก, ขน *sc2* มีขนาดใกล้เคียงกับความยาวของขนบนแผ่นแข็งอื่นๆ ส่วนของแผ่นแข็งด้านสันหลังส่วนบน (prodosal shield) ยืดยาวแคบ หรือปกคลุมส่วนของปาก gnathosoma และรูหายใจ stigmata, รูเปิดหายใจ stigmata ตั้งอยู่ด้านข้างหลังขน *v1,* หลุมขน *v2* เฉียงเป็นแนวยาวตรงกับขน *v1* และ *sc2* โดยตำแหน่งที่ตั้งของขน *v2* จะอยู่หนึ่งในสามระหว่างขนทั้งคู่, ปรากฏขนกระบอง Bothridia, ขน *sc2* ตั้งอยู่ส่วนท้ายของแผ่นแข็งด้านสันหลังหลังรู

หายใจ โดยตำแหน่งที่ตั้งกว้างกว่าขนอื่น ๆ แผ่นแข็ง EF มีขน *e* และ *f* ตั้งอยู่ในแนวขวาง, ขน *f* ตั้งอยู่ระยะห่างกว่าขนอื่น ๆ บนแผ่นแข็ง D ด้านล่าง (ventral shield) มีร่อง apodmes แคบ ๆ ไม่ค่อยชัดเจนและไม่รวมกับ prosternal apodeme, apodeme II ชัดเจนเชื่อมต่อกับ prosternal apodeme, apodeme III ยืดออกไปทางด้านข้างของ trochanter III ยาวเลยขน *3a* บางครั้งก็ไม่ชัดเจน, apodeme IV ยาวเลยไปกว่าขน *3b* แต่ไม่ถึงฐานของ trochanter IV

Nasuitarsonemus onami Lofego, Hountondji, Al-Shanfari & Moraes
(Figure 1.1.21.3)

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

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ส่วนปาก gnathosma ยืดยาวออก, ร่องด้านสันหลังชัดเจน, ไม่ขนพบ *pp,* ระยางค์ปาก palp ยาว, ส่วนของ pharynx ความกว้างปากนกลาง ส่วนของแผ่นแข็งด้านสันหลังเรียบ ปกคลุมส่วนของ gnathosoma, ส่วนของ stigmata ตำแหน่งใกล้เคียงกับขน *sc1* โดยอยู่เหนือขน *sc1,* ขนด้านสันหลังเป็นแบบเรียบยาว setiform, ขน *1a* ใกล้กับร่อง apodeme I, apodeme II สั้น ไม่รวมกับ proternal apodeme, apodeme IV ยืดยาวเฉียงไปส่วนท้ายของขน *3b*, ไม่พบ poststernal apodeme, coxisternal plates เรียบ, terula พัฒนาดีส่วนท้ายโค้งมน, ขน *ps* แตกเป็นแฉก ขน solenidion ของขา tarsus I เป็นรูปกระบอง ปลายมน ส่วนของเล็บพัฒนาดี ในเพศผู้ พบขน 4 คู่ตรงตำแหน่ง metapodosomal, ปลายขา tarsus ของขาคู่ที่ 1 มีเล็บขนาดไม่ใหญ่มาก ขาคู่ที่ 2 และ 3 มีเล็บเป็น 2 แฉก และของปลายขาคู่ที่ 4 ปรากฏเป็นเล็บขนาดใหญ่ชัดเจน ส่วนของ femur พบขน 3 เส้น โดยขยายใหญ่ป่องออกพบขน 1 เส้นตรงบริเวณที่ขยายป่องออก อีกเส้นหนึ่งสั้น ๆ และอีกเส้นมีความยาวตั้งอยู่ตรงปลายของ femur

ความสัมพันธ์กับพืชอาศัย (Relation to host)

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

Subfamily Tarsoeminae Canestrini and Fanzago, 1977
Tribe Steneotarsonemini Linndquist, 1986
Genus *Steneotarsonemus* Beer, 1954

Steneotarsonemus Beer, 1954, p. 1229.

กรมวิชาการเกษตร

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

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

ความยาวและความกว้างของส่วนหัวมีขนาดใกล้เคียงกัน ส่วนใหญ่จะเป็นรูปทรงครึ่งวงกลม หรือกึ่งสี่เหลี่ยม ส่วนปากไม่ยืดยาวไปด้านหน้า พบขนที่ plapcoxal ด้านข้างในตัวเต็มวัย,ขนบนส่วนปาก gnathosoma ด้านหลังปกติก เรียบ แตกเป็นแฉกเล็กน้อย, ส่วนของปาก chelicerae เป็นแท่งเข็มชัดเจน ส่วนฐานแข็งโค้งวางขวางตามความกว้างส่วนใหญ่หรือทั้งหมดของแคปซูล, ส่วนของ pharynx สั้นจนถึงยาวปานกลาง, ลำตัวเป็นรูปไข่ ขนส่วนด้านสันหลัง idiosoma เรียบแตกเป็นแฉกเล็กน้อย, ขนบนแผ่นแข็งสั้นโดยปกติสั้นกว่าขน *sc2*, ด้านหน้าของแผ่นแข็งด้านสันหลังนูนเล็กน้อย หรือเรียบ ไม่ยืดยาวออกปกคลุมส่วนของ gnathosoma, หลุมขน *v2* เฉียงเป็นแนวตรงกับขน *v1* และ *sc2* โดยตำแหน่งที่ตั้งของขน *v2* จะอยู่ระหว่างหนึ่งในสามหรือหนึ่งในสี่ของขน *v1* และ sc2, ตำแหน่งที่ตั้งของขน *sc2* อยู่ห่างกว่าระยะการตั้งของขนอื่น ๆ ขนยาวกว่าขน *v1* และตั้งอยู่หลัง stigmata, ปรากฏขนกระบอง Bothridia บนแผ่นแข็งด้านสันหลัง, แผ่นแข็ง EF มีขน *e* และ *f* ตั่งอยู่ในแนวขวาง, ขน *f* ตั้งอยู่ระยะแคบกว่าขนอื่น ๆ บนแผ่นแข็ง D, ร่อง apodmes ลักษณะเป็นรูปตัว Y เชื่อมต่อกับ prosternal apodeme, apodeme II ชัดเจน หรือไม่ชัดเจน หรือไม่เชื่อมต่อกับ prosternal apodeme และไม่เชื่อมต่อกัน sejugal apodeme, apodeme III ไม่ยืดยาวออกไปทางด้านข้างของ trochanter III ตรงกลางไม่ชัดเจน, apodeme IV เชื่อมต่อกับ poststeral apodeme ไม่เลยเกินตำแหน่งของขน *3b* บางครั้งยาวเลยถึงฐานของ trochanter III, บริเวณ ด้านล่างของ metapodosomal พบขน 2 คู่, แผ่น teula สั้นโค้งมน

***Steneotarsonemus furcatus* De Leon**

(Figure 1.1.21.4)

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

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

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

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เพศเมียมีลำตัวเป็นรูปไข่โดยมีขนาดความยาวของส่วนหัวและความกว้างใกล้เคียงกัน ขนด้านสันหลังและบนแผ่นแข็งมีขนาดสั้น, รูหายใจอยู่ใกล้เคียงกับส่วนท้ายของขน *v1,* บริเวณ ด้านล่างของ metapodosomal พบขน 2 คู่, แผ่น teula สั้นโค้งมนกว้าง, ปลายขา tarsus ของขาคู่ที่ 1 มีเล็บแตกเป็น 2 แฉก ปลายขา tarsus ของขาคู่ที่ 2 มีเล็บ 1 อันขนาดปานกลางและปลายขาคู่ที่ 3 ไม่ปรากฏเล็บ ปลายขาคู่ที่ 4 มีขนยาว 2 เส้นเช่นเดียวกับไรขาวเพศเมียชนิดอื่นๆ ในเพศผู้มีขน 4 คู่บนแผ่นแข็งด้านสันหลังส่วนบน prodorsal shield โดยขนทั้ง 4 คู่มีขนาดความยาวใกล้เคียงกันยกเว้นขน *v2* ที่มีขนาดสั้นกว่าขนคู่อื่น ๆ อย่างชัดเจน, ปลายขา tarsus ของขาคู่ที่ 1 มีเล็บเดี่ยว ๆ, ปลายขา tarsus ของขาคู่ที่ 2 และ 3 มีลักษณะเป็นเล็บ 2 อันขนาดปานกลาง และ ปลายขาคู่ที่ 4

กรมวิชาการเกษตร

มีเล็บขนาดใหญ่ โดยส่วนของ femur ขยายใหญ่ มีขน 3 คู่ ขนคู่ที่อยู่บริเวณส่วนขยายของ femur มีลักษณะขนแตกเป็น 2 แฉกชัดเจน

ความสัมพันธ์กับพืชอาศัย (Relation to host)

ลักษณะผลมะพร้าวที่ถูกไรขาว *S. furcatus* ทำลายพบว่ามีลักษณะปลายแผลที่เกิดจะตัดเป็นเส้นตรงเป็นแผลแข็งนูน ไรจะเข้าทำลายภายในขั้วผลมะพร้าว ผลอ่อนขนาดเล็ก เมื่อผลโตขึ้นแผลจะขยายใหญ่มากขึ้น หากไรเข้าทำลายรุนแรง ผลจะบิดเบี้ยว

Steneotarsonemus spinki Smiley

(Figure 1.1.21.5)

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

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

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

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เพศเมีย ลำตัวค่อนข้างยาว ความยาวของส่วนหัวมีความยาวมากกว่าความกว้างเล็กน้อย รูหายใจ stigmata ตั้งอยู่ตำแหน่งใกล้เคียงกับขน *v1,* ขน *sc1* เป็นรูปกระบองเรียวยาว อยู่เหนือขน *sc2* ไปทางด้านข้างเล็กน้อย, ขน *sc2* มีความยาวมากกว่าขนด้านสันหลังบนแผ่นแข็งอื่น ๆ บริเวณด้านล่างของ metapodosomal พบขน 2 คู่, โดยขน *3c* มีความยาวมากกว่าขน *3b* สองถึงสามเท่า แผ่น teula สั้นโค้งมน ปลายขา tarsus เพศเมียมีเล็บ 1 เล็บขนาดไม่ชัดเจน ปลายขาคู่ 2 และ 3 เป็นเล็บแตกเป็น 2 แฉก ปลายขาคู่ที่ 4 มีขนยาว 2 เส้น เช่นเดียวกับไรขาวเพศเมียชนิดอื่นๆ เพศผู้มีขนด้านสันหลังตอนบน (prodorsal shield) 4 คู่, ขน *v2* มีขนาดสั้นกว่าขนอื่นๆ ขน *sc2* ตั้งอยู่ในตำแหน่งที่ห่างกว่าขนอื่นๆ พบขนบริเวณ metapodosomal 2 คู่, ปลายขา tarsus ในเพศผู้มีเล็บ 1 เล็บขนาดไม่ชัดเจน ปลายขาคู่ 2 และ 3 เป็นเล็บแตกเป็น 2 แฉก, ปลายขาคู่ที่ 4 เป็นเล็บขนาดใหญ่ มี femur ป่องออกขยายใหญ่ชัดเจน

ความสัมพันธ์กับพืชอาศัย (Relation to host)

ไรเข้าทำลายช่อดอก เมล็ดข้าวและใบข้าว มีผลต่อการเจริญเติบโตข้องต้นข้าว ช่อดอกและเนื้อเยื่อแห้งเป็นสีน้ำตาล จำนวนช่อดอกลดลอง เมล็ดข้าวเป็นจุดสีน้ำตาล สูญเสียคุณภาพของเมล็ดข้าว ถ้าเข้าทำลายใบ ใบจะห่อม้วนในแนวยาว ใบเป็นสีน้ำตาลโดยเฉพาะบริเวณกาบใบข้าว ไรจะอาศัยหลบซ่อนอยู่ภายในกาบใบข้าว ระบาดรุนแรงใบจะแห้งเป็นสีน้ำตาล

Subfamily Acarpinae Schaarschmidt, 1959

Tribe Tarsonemini Canestrini and Fanzago, 1877

Genus *Fungitarsonemus* Beer, 1954

สำนักวิชาการเกษตร

Fungitarsonemus Cromroy, 1985, p. 113.

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

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

ความยาวและความกว้างของส่วนหัวมีขนาดใกล้เคียงกัน พบขนที่ plapcoxal ตั้งอยู่ด้านข้าง ยาวและเห็นชัดเจนในตัวเต็มวัย, ขนบนด้านหลัง gnathosoma เรียบ, ส่วนของปาก chelicerae เป็นแท่งเข็มสั้น, ส่วนของ pharynx ยาว เรียวเล็ก ผนังแข็ง ด้านสันหลังมีขนเรียบเรียวเล็ก และแตกเป็นแฉกเล็กน้อย, ขนที่แผ่นแข็ง *c, d, f* มีขนาดสั้นลง หรือไม่สั้นลง, ขน *sc2* มีขนาดยาวกว่าขนที่แผ่นแข็ง ส่วนของแผ่นแข็งด้านสันหลังส่วนบน (prodosal shield) ยืดออกปกคลุมเลยไปถึงส่วนของปาก gnathosoma คล้ายหมวก, รูเปิดหายใจ stigmata ไม่ตั้งอยู่ด้านข้างของขอบบนแข็ง (prodorsal shield) โดยตำแหน่งจะอยู่ชิดกับขน *sc2,* หลุมขน *v2* หลังขน *sc2* โดยตำแหน่งที่ตั้งจะอยู่ส่วนท้ายของแผ่นแข็งด้านสันหลัง, ตำแหน่งของขน *sc2* ตั้งอยู่ระยะห่างกว่าตำแหน่งของขน *v1* โดยจะตั้งอยู่ด้านบนประมาณครึ่งหนึ่งของแผ่นแข็ง หรือประมาณหนึ่งในสามของแผ่นแข็งด้านสันหลังและอยู่ชิดกับรูหายใจ, ปรากฏขนกระบอง Bothridia บนแผ่นแข็งด้านสันหลัง, แผ่นแข็ง D มีขนาดใหญ่กว้างเชื่อมต่อกับแผ่นแข็ง EF, แผ่นแข็ง EF มีขน *e* และ *f* ตั่งอยู่ในแนวขวาง, ด้านล่าง ventral shield มีร่อง apodmes ลักษณะเป็นรูปตัว Y เชื่อมต่อกับ prosternal apodeme, apodeme II เชื่อมต่อกับ prosternal apodeme และเชื่อมต่อกัน sejugal apodeme, apodeme III ยืดออกไปทางด้านข้างของ trochanter III และไม่เชื่อมต่อกัน ตรงกลางไม่ชัดเจน, apodeme IV เชื่อมต่อกับ poststeral apodeme บริเวณตรงกลาง ไม่เลยเกินตำแหน่งของขน *3b*, บริเวณ ด้านล่างของ metapodosomal พบขน 2 คู่ ประกอบด้วยขน *3a* อยู่ด้นบนของ apodeme III, ปรากฏพบขน *3c* หรือ *4a* หรือไม่พบขนดักล่าว ถ้าพบจะอยู่ระหว่างขาคู่ที่ 4, แผ่น teula สั้นโค้งมน

Fungitarsonemus setillus Sousa, Lofego & Gondim

(Figure 1.1.21.6)

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

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ความยาวและความกว้างของส่วนหัวมีขนาดใกล้เคียงกัน ลำตัวค่อข้างกลม ลำตัวสีขาวใส ส่วนของแผ่นแข็งด้านสันหลังส่วนบน (prodosal shield) ยืดออกปกคลุมเลยไปถึงส่วนของปาก gnathosoma คล้ายหมวก, ขน *v1* ยาวแต่สั้นกว่าขน *sc2* ขน *sc2* อยู่ตรงกลางระหว่างขน *v1* กับขน *sc1* โดยขน *sc 1* เป็นรูปกระบองจะอยู่ส่วนท้ายสุด เยื่องไปด้านข้างบริเวณขอบของแผ่นแข็ง มีรูหายใจ sitgma อยู่อยู่เหนือโดยใกล้หรือชิดกับขน *sc2,* ขน *sc2* มีความยาวมากกว่าขนด้านสันหลังบนแผ่นแข็งอื่น ๆ, ขน *h* มีขนาดสั้นและเล็ก, บริเวณ ด้านล่างของ metapodosomal พบขน 2 คู่, tegula โค้งมน, ปลายขา tarsus เพศเมียมีเล็บ 1 เล็บขนาดไม่ชัดเจน ปลายขาคู่

กรมวิชาการเกษตร

2 และ 3 เป็นเล็บขนาดเล็กแตกเป็น 2 แฉกบริเวณด้านข้าง, ปลายขาคู่ที่ 4 มีขนยาว 2 เส้นเช่นเดียวกับไรขาวเพศเมียชนิดอื่นๆ ในเพศผู้มีขน 4 คู่บนแผ่นแข็งด้านสันหลังส่วนบน prodorsal shield โดยขนทั้ง 4 คู่มีขนาดความยาวแตกต่างกัน, ขน *v2* ที่มีขนาดสั้นกว่าขนคู่อื่น ๆ อย่างชัดเจน, ขน *sc1* มีขนาดยาวกว่าขนอื่นๆ ขน *v1* และ *sc1* มีความยาวใกล้เคียงกัน, ปลายขา tarsus ของขาคู่ที่ 1 และ 2 ไม่ปรากฏเล็บ, ปลายขา tarsus ของขาคู่ 3 มีลักษณะเป็นเล็บ 2 อันขนาดเล็ก, ปลายขาคู่ที่ 4 เรียวยาวคล้ายเล็บปลายมน โดยส่วนของ femur ไม่ขยายใหญ่เรียวยาว มีขน 3 คู่ ขนคู่ที่อยู่บริเวณส่วนปลายของ femure มี 2 เส้น เส้นที่อยู่ปลายสุดมีขนาดสั้น และอีกเส้นมีความยาวชัดเจน

ความสัมพันธ์กับพืชอาศัย (Relation to host)

พบบนใบอ่อนของขนุน ไม่ชัดเจนว่าเป็นศัตรูพืชของขนุน คาดว่าจะเป็นไรขาวที่กินเชื้อราเป็นอาหาร

Genus *Neotarsonemoides* Kaliszewski, 1984

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

ตัวอย่างต้นแบบ (Type species): *Neotarsonemoides adae* Kaliszewski, 1984b; by original designation and monotype. Genus based on adult female only.

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

ความยาวของส่วนหัวยาวมากว่าความกว้างเล็กน้อย เป็นรูปไข่ ปากไม่ยื่นยาวไปด้านหน้า ขนที่ plapcoxal ไม่สามารถเห็นได้, ขนบนด้านหลังของ gnathosoma ปกติ เรียบ, ระยางค์ปาก palp ยื่นไปข้างหน้าสั้นและมีขนาดเล็ก, ส่วนของปาก chelicerae เป็นแท่งเข็มสั้น, ส่วนของ pharynx ยาว เรียวปานกลาง, แผ่นแข็งด้านสันหลังเรียบ หรือเป็นริ้วเล็กน้อย, ขนด้านสันหลังสั้นหรือแตกเป็นแฉกเล็กน้อย, ขน *sc2* มีความยาวใกล้เคียงกับขนบนแผ่นแข็ง, แผ่นแข็งด้านสันหลังปกคลุมคล้ายหมวก โดยคลุมอย่างน้อยครึ่งหนึ่งของฐานส่วนปาก gnathosoma, รูหายใจตั้งอยู่ส่วนท้ายด้านข้างของขน *v1,* หลุมขน *v2* เฉียงตรงด้านข้างกับขน *v1* และ *sc2* โดยตำแหน่งจะอยู่กึ่งกลางระหว่างขนทั้งสอง, ระยะห่างของขน *sc2* กว้างกว่าระยะห่างของขนคู่อื่น ๆ เล็กน้อย โดยความยาวไม่มากกว่าขน *v1* และตั้งอยู่ส่วนท้ายของแผ่นแข็งด้านสันหลัง โดยแบ่งแผ่นแข็งเป็นสามส่วน ขนจะตั้งอยู่ในส่วนที่สามจากท้ายหลังรูหายใจ, ปรากฏขนกระบอง Bothridia บนแผ่นแข็งด้านสันหลัง, แผ่นแข็ง EF มีขน *e* และ *f* ตั้งอยู่ในแนวขวาง, apodeme I ไม่ชัดเจน apodeme II ไม่เชื่อมต่อกับ prosternal apodeme, apodeme IV เป็นร่องแคบ ๆ เชื่อมต่อกับ poststeral apodeme ไม่เลยเกินตำแหน่งของขน *3b*, บริเวณด้านล่างของ metapodosomal พบขน 2 คู่ แผ่น teula เห็นเป็นรูปสามเหลี่ยมชัดเจน

Genus *Tarsonemus* Canestrini and Fanzago, 1877

ศรีวิชาการเกษตร

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

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

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

ลำตัวเป็นรูปไข่ ความยาวของส่วนหัวยาวมากกว่าความกว้างของส่วนหัว ส่วนปากไม่ยืดยาว, พบขนที่ plapcoxal ด้านข้างในตัวเต็มวัยหรือไม่พบ, ขนบนด้านหลังส่วนปาก gnathosoma ปกติ เรียบ, ขนระยางค์ปาก palp ยื่นไปด้านหน้ายาวปานกลางพบขนเล็ก ๆ สองเส้น, ส่วนของปาก chelicerae เป็นแท่งเข็ม สวนน้อยที่จะยาวปานกลาง, ส่วนของ pharynx มีหลากหลายแบบ, แผ่นแข็งด้านสันหลังเรียบ หรือเป็นริ้วเล็กน้อยพบขนด้านสันหลังเรียวเรียบหรือแตกเป็นแฉกเล็กน้อย, ขนบนแผ่นแข็ง tergite สั้นปานกลาง บางครั้งยาว โดยจะมีขนหนึ่งหรือสองคู่ที่ยาวกว่าขนอื่น ๆ, ขน *sc2* ยาวเกินขนบนแผ่นแข็ง tergite อื่น ๆ, ส่วนของแผ่นแข็งด้านสันหลังส่วนบน (prodosal shield) มีหลากหลายรูปแบบ ไม่ขยายออก ขยายออก หรือ ปกคลุมส่วนของปาก gnathosoma และรูหายใจ stigmata, รูเปิดหายใจ stigmata ตั้งอยู่ด้านข้างหลังขน *v1,* หลุมขน *v2* เฉียงเป็นแนวยาวตรงกับขน *v1* และ *sc2* โดยตำแหน่งที่ตั้งของขน *v2* จะอยู่กึ่งกลางระหว่างขนทั้งคู่, ปรากฏขน Bothridia เป็นรูปกระบองหรือเป็นขนเรียวแหลม และอาจจะถูกปกคลุมหรือไม่ถูกปกคลุมด้วยแผ่นแข็งด้านสันหลัง prodorsal shield, แผ่นแข็ง EF มีขน *e* และ *f* ตั้งอยู่ในแนวขวาง, ขน *f* ตั้งอยู่ระยะห่างกว่าขนอื่น ๆ บนแผ่นแข็ง D, ด้านล่าง ventral shield มีร่อง apodmes ลักษณะเป็นรูปตัว Y เชื่อมต่อกับ prosternal apodeme, apodeme II ชัดเจน หรือไม่ชัดเจน แต่โดยปกติไม่รวมกับ sejugal apodeme, apodeme III ยืดออกไปทางด้านข้างของ trochanter III และไม่เชื่อมต่อกัน โดยปกติไม่ยืดออกจนถึงตรงกลางของขน *3a,* apodeme IV เชื่อมต่อกับ poststeral apodeme บริเวณตรงกลาง หรือไม่เชื่อมต่อแต่จะ ไม่เลยเกินตำแหน่งของขน *3b*, บริเวณ ด้านล่างของ metapodosomal พบขน 2 คู่, แผ่น teula สั้นโค้งมน

Tarsonemus bilobatus Suski

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

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

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

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เพศเมียลำตัวเป็นรูปไข่ ความยาวของส่วนหัวยาวมากกว่าความกว้างของส่วนหัว, ขน *sc1* เป็นรูปกระบองอยู่ระหว่างขน *v1* และขน *sc2* โดยตำแหน่งอยู่ค่อนมาทางส่วนท้ายของแผ่นแข็ง ใกล้กับขน *sc2*, ขน sc2 ยาวกว่า

กรมวิชาการเกษตร

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

ความสัมพันธ์กับพืชอาศัย (Relation to host)

พบอยู่ภายในกาบใบสับปะรด โดยเฉพาะกาบใบที่ติดอยู่กับดิน ไม่ชัดเจนว่าเป็นศัตรูพืช

กรมวิชาการเกษตร

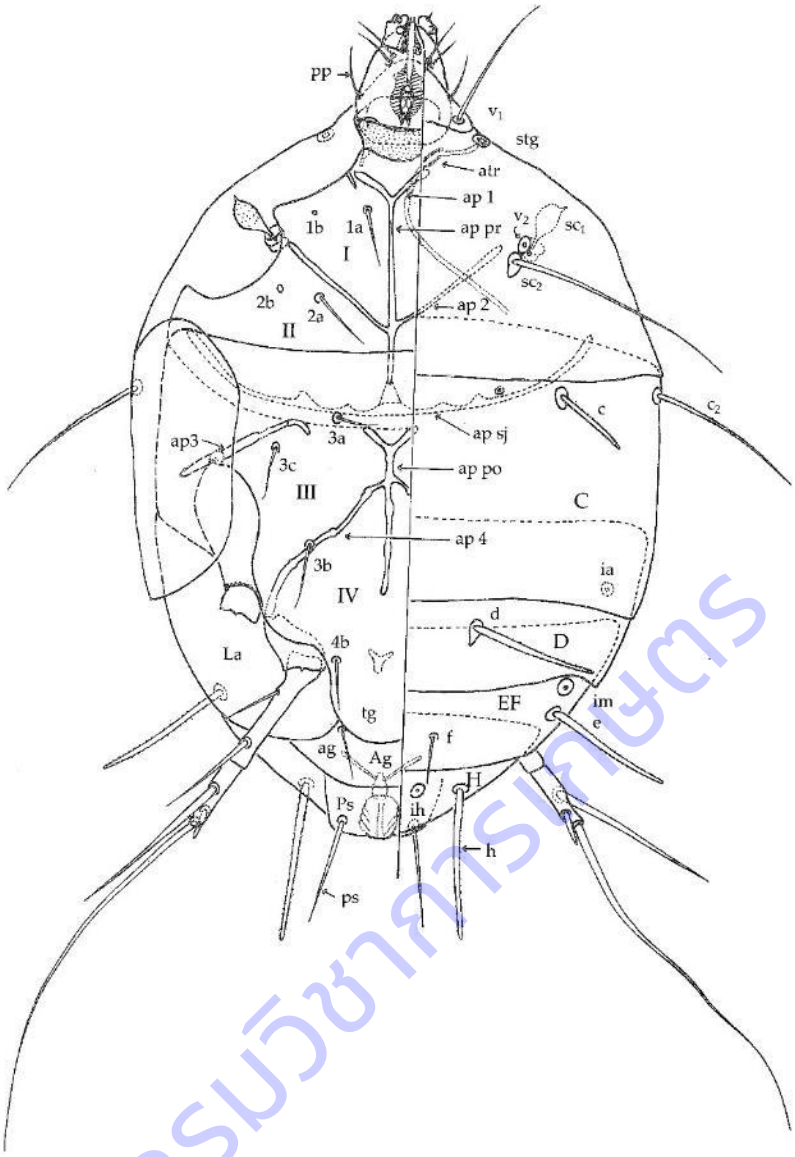


Figure 1.1.21.1. Ununguiarsonemus beameri (Beer), ตัวเต็มวัยเพศเมีย, ด้านซ้ายภาพส่วนด้านล่าง ด้านขวาภาพส่วนด้านบน; ap 1-4, ร่อง apodeme; ap po, poststernal apodeme; ap pr, prosternal apodeme; ap aj, sejugal apodeme; atr, atrium; pp, plapcoxal seta; stg stigmata; tg, tegula (Lindquist, 1986)

กรมวิชาการเกษตร

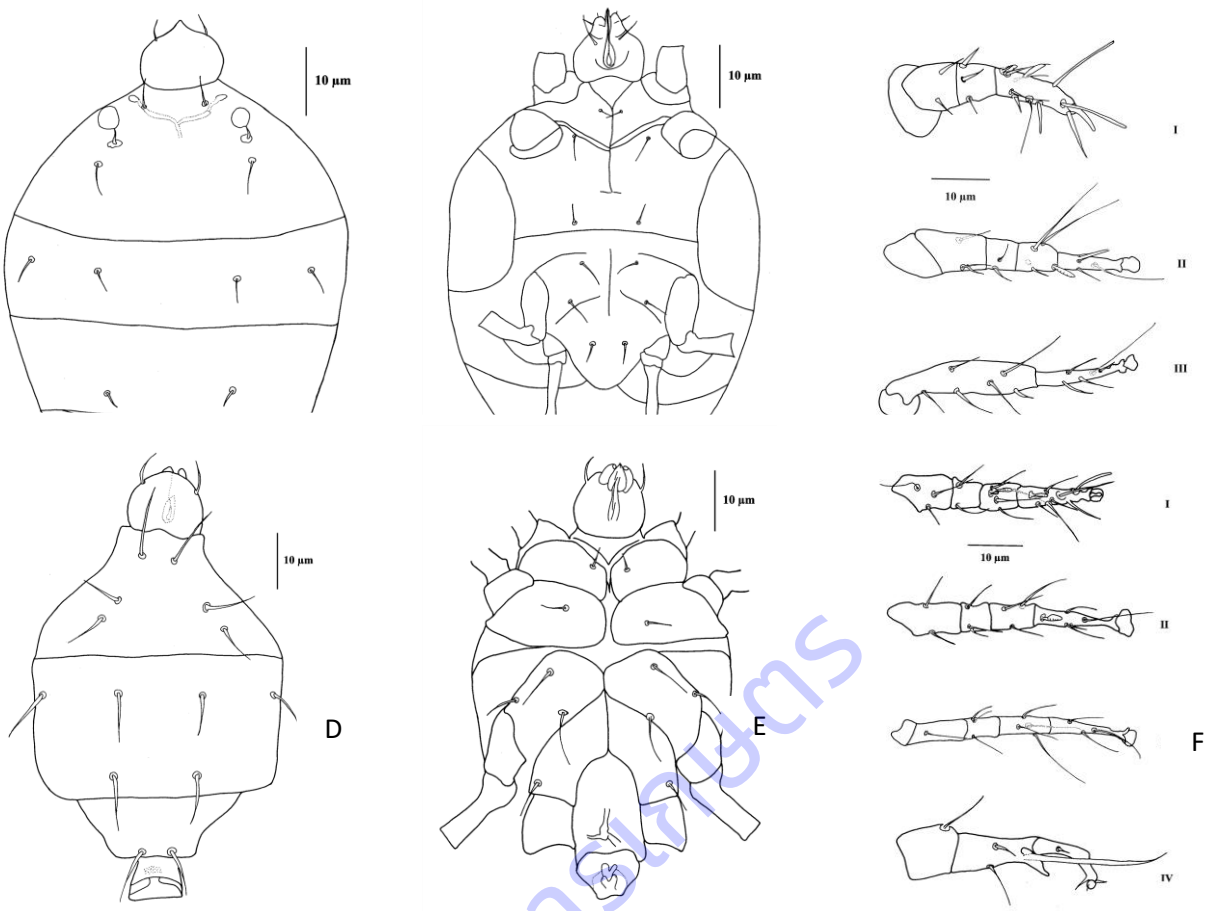


Figure 1.1.21.2. *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) เพศเมีย; A. ด้านสันหลัง, B ด้านล่าง, C. ขา I-IV, เพศผู้; D, ด้านสันหลัง, E. ด้านล่าง, F. ขา I-IV.

กรมวิชาการเกษตร

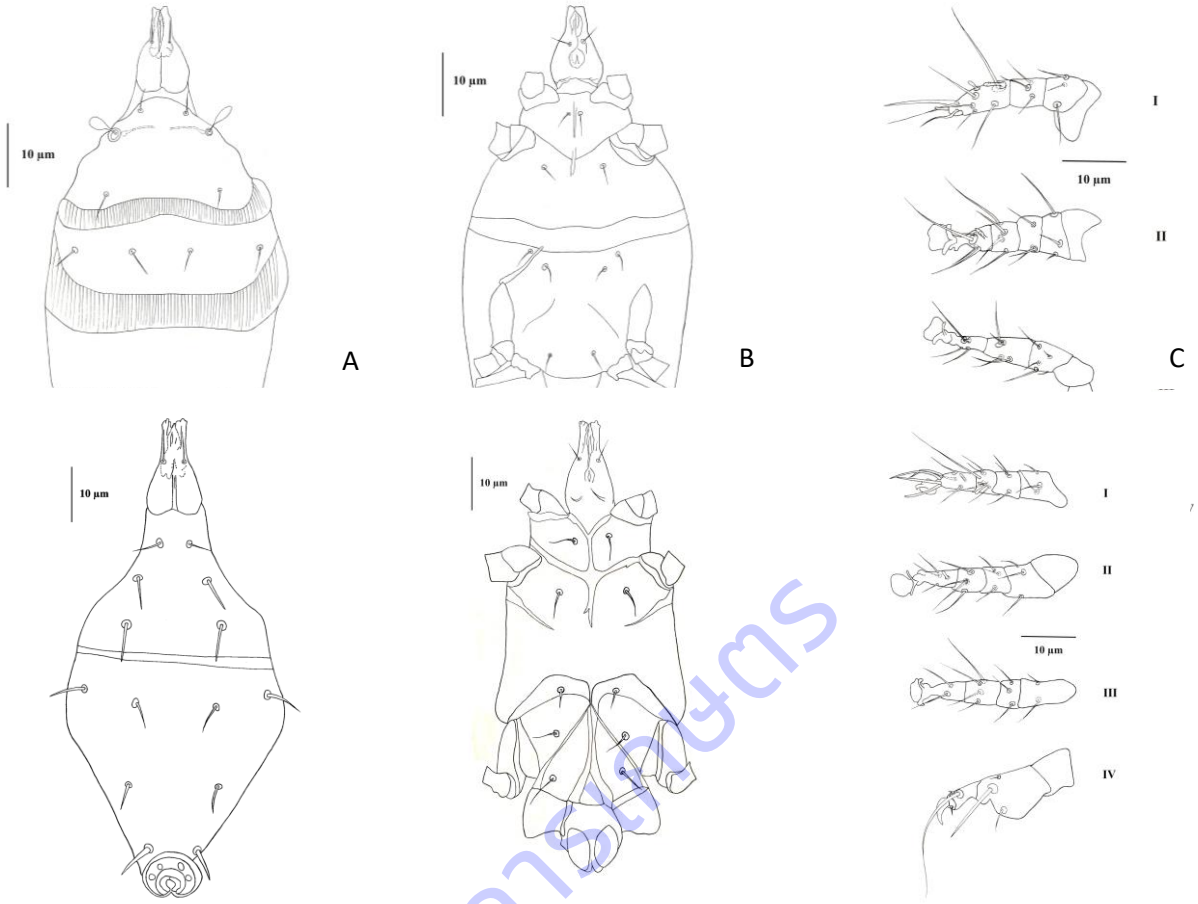
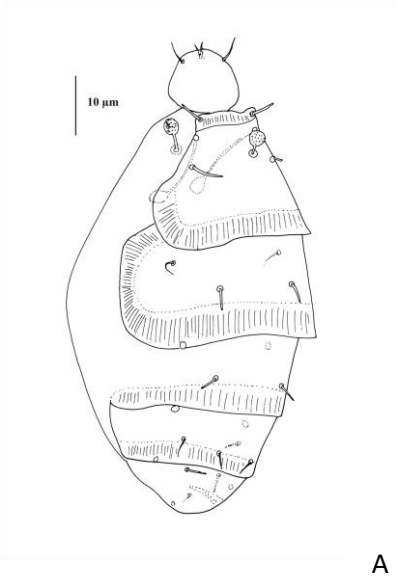
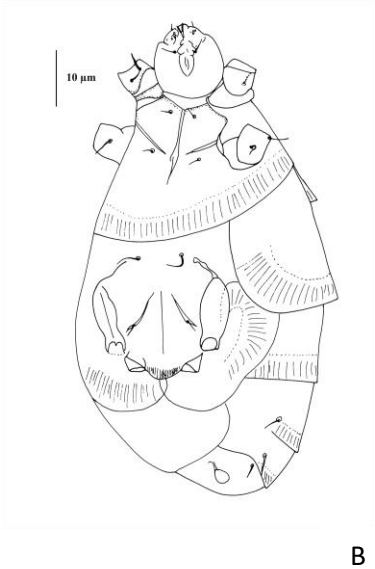


Figure 1.1.21.3. *Nasuitarsonemus onami* Lofego, Hountondji, Al-Shanfari & Moraes เพศเมีย; A. ด้านสันหลัง, B ด้านล่าง, C. ขา I-IV, เพศผู้; D, ด้านสันหลัง, E. ด้านล่าง, F. ขา I-IV.

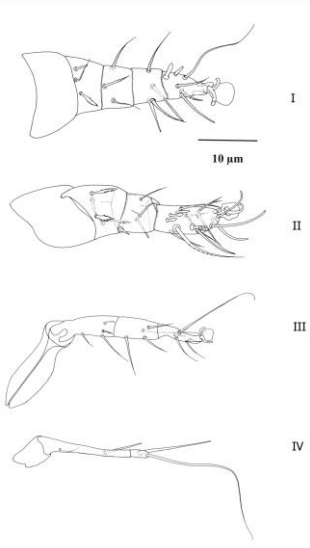
กรมวิชาการเกษตร



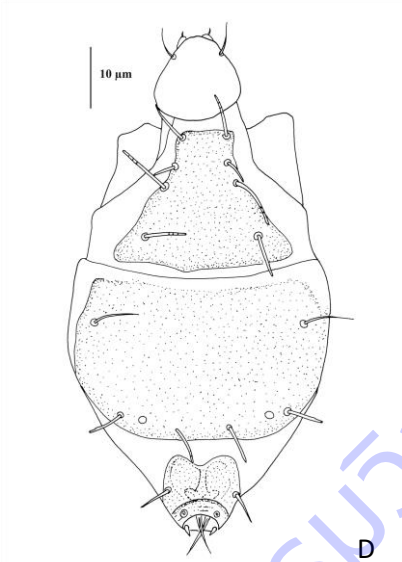
A



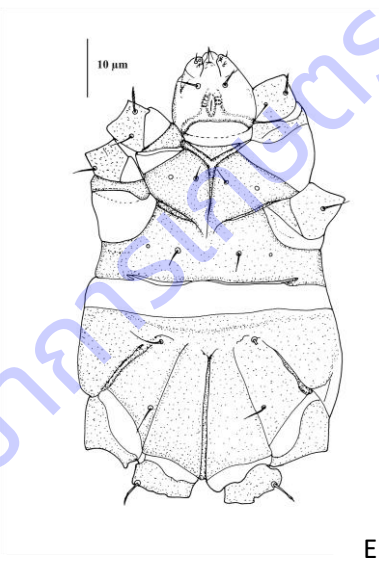
B



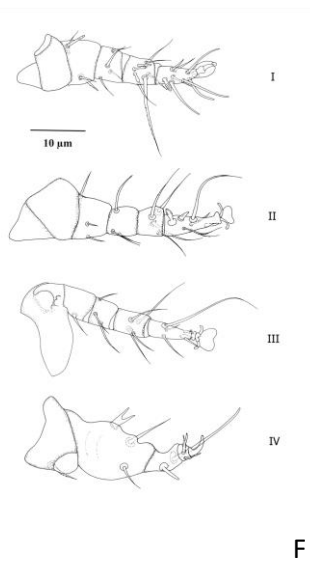
C



D



E



F

กรมวิชาการเกษตร

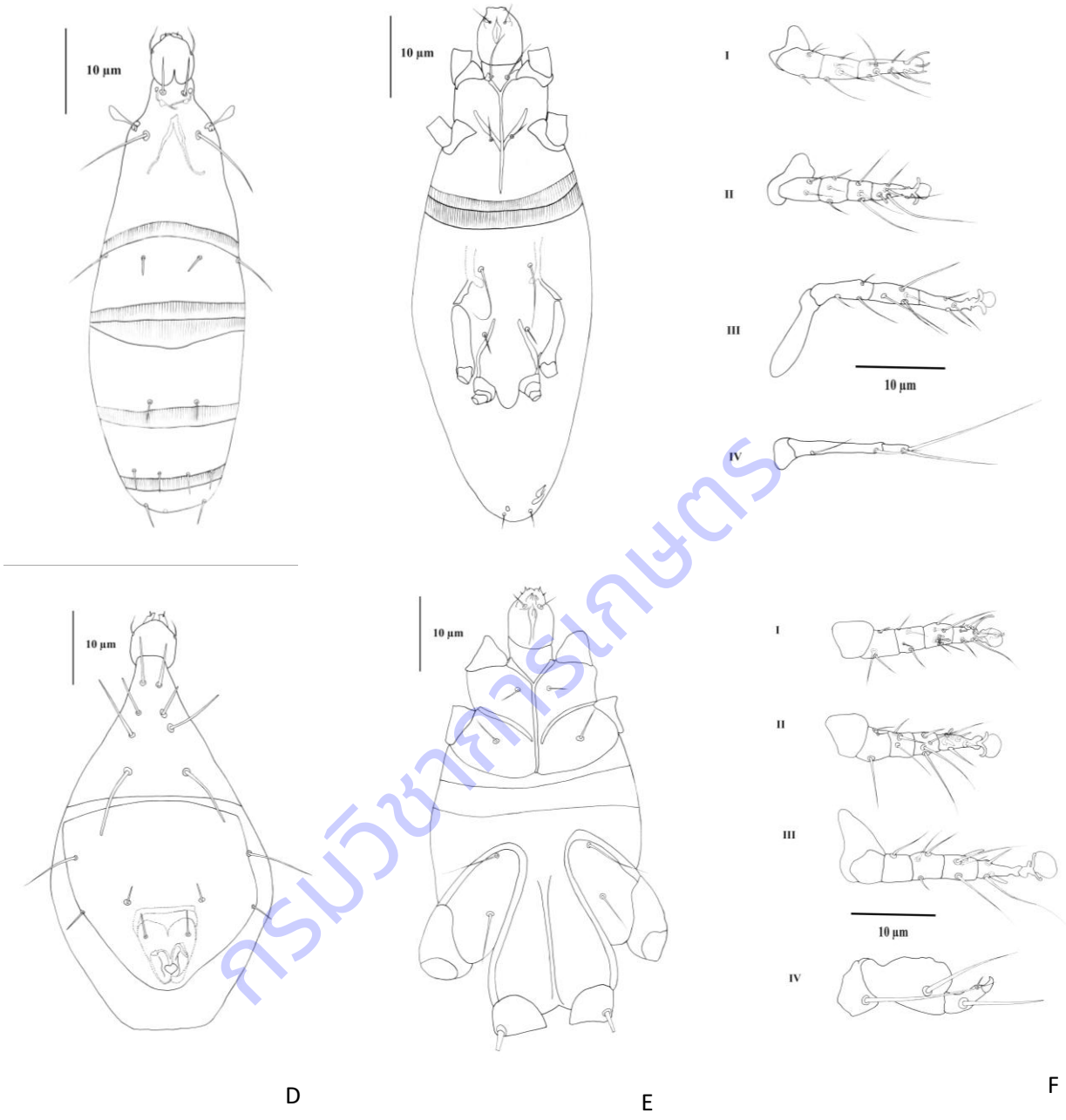
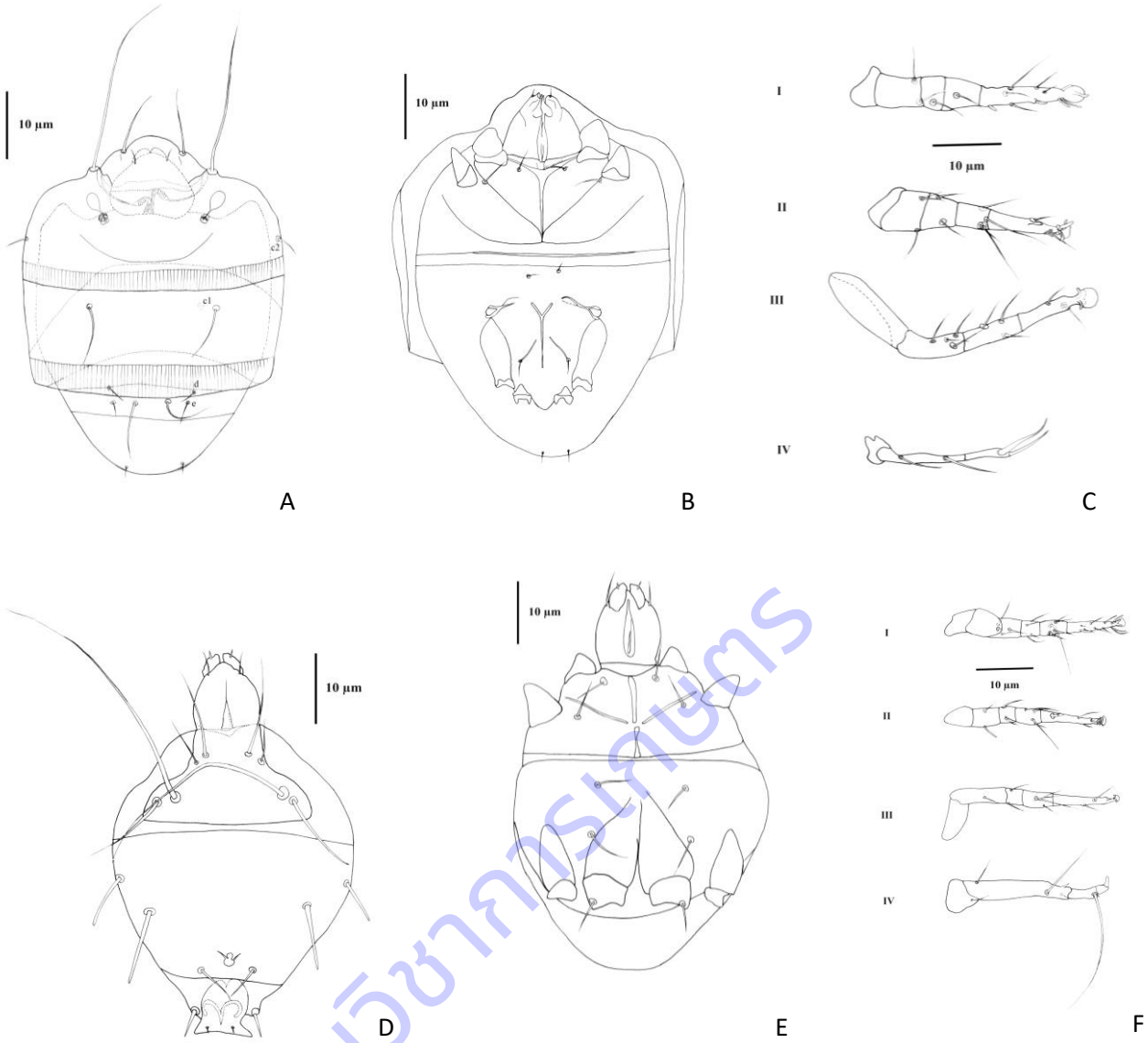


Figure 1.1.21.5. *Steneotarsonemus spinki* Smiley เพศเมีย; A. ด้านสันหลัง, B ด้านล่าง, C. ขา I-IV, เพศผู้; D, ด้านสันหลัง, E. ด้านล่าง, F. ขา I-IV.

กรมวิชาการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.21.6. *Fungitarsonemus setillus* Sousa, Lofego & Gondim เพศเมีย; A. ด้านสันหลัง, B ด้านล่าง, C. ขา I-IV, เพศผู้; D, ด้านสันหลัง, E. ด้านล่าง, F. ขา I-IV.

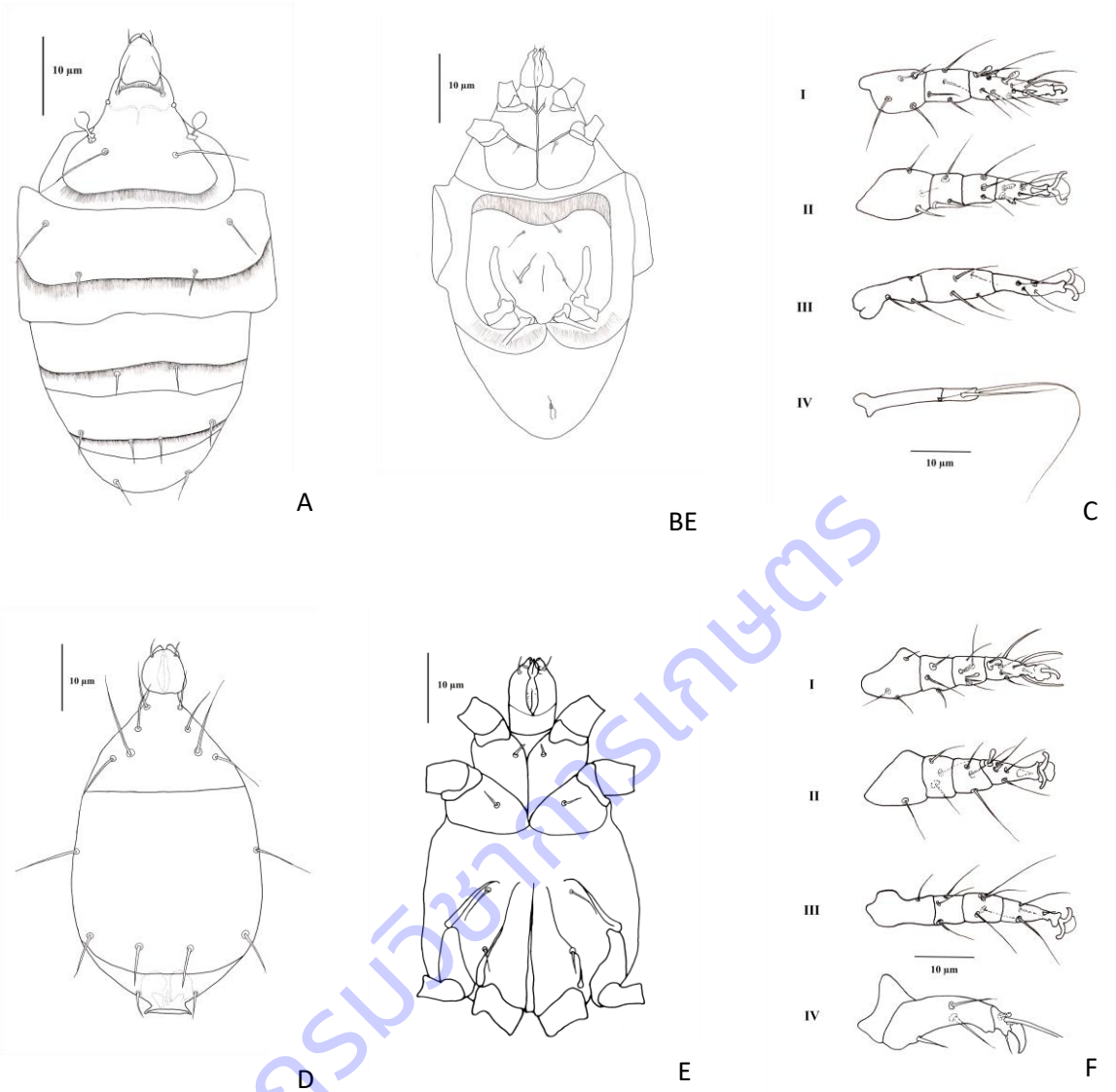


Figure 1.1.21.7. *Tarsonemus bilobatus* Suski เพศเมีย; A. ด้านสันหลัง, B ด้านล่าง, C. ขา I-IV, เพศผู้; D, ด้านสันหลัง, E. ด้านล่าง, F. ขา I-IV.

กรมวิชาการเกษตร

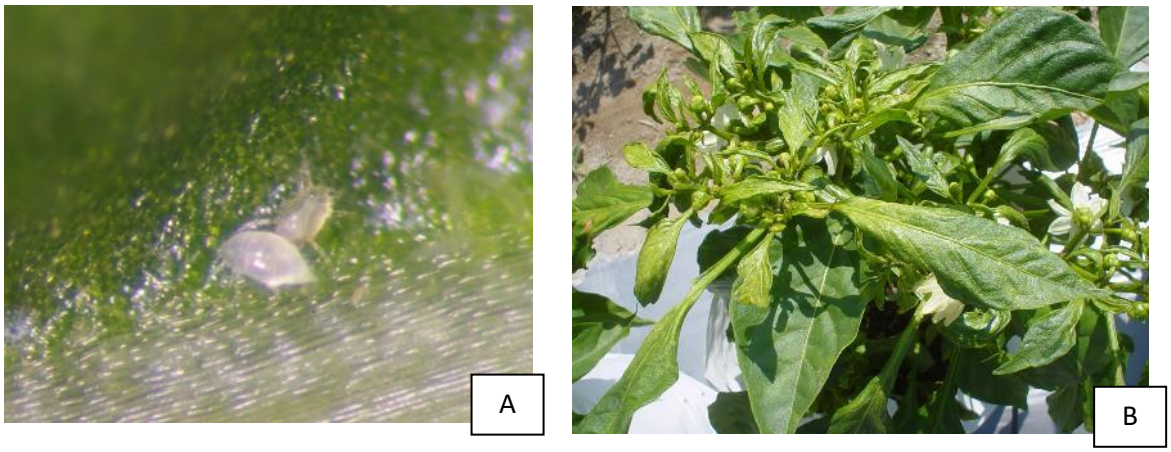


Figure 1.1.21.8. A. ไรขาวพริก เพศผู้ด้านบน และเพศเมีย *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) B. อาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของไรในพริก

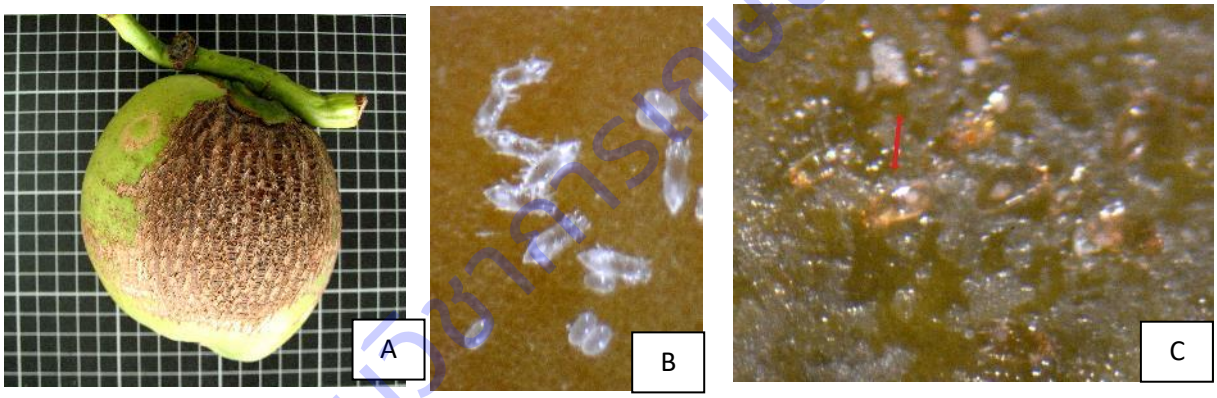


Figure 1.1.21.9. *Steneotarsonemus furcatus* De Leon; A. ลักษณะอาการเข้าทำลายบนผล, B, ตัวอ่อน, C, ตัวเต็มวัยขณะมีชีวิต

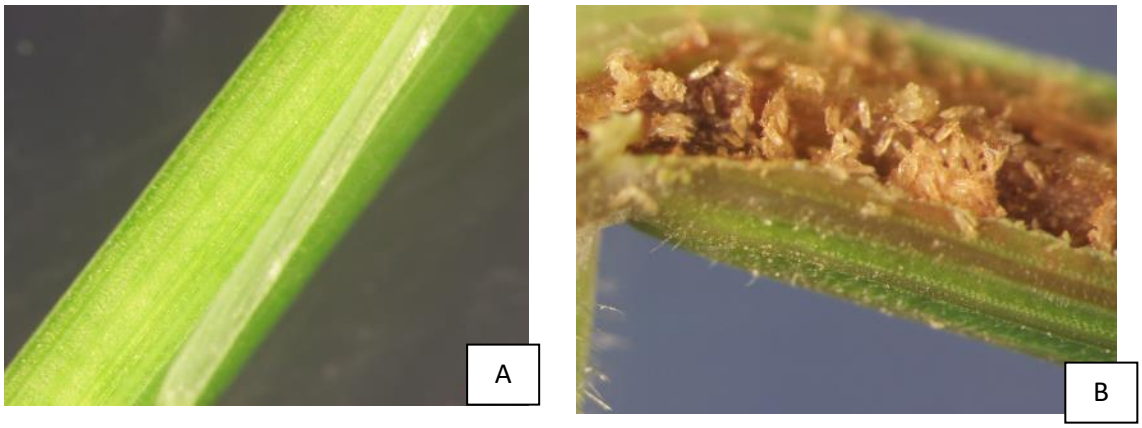


Figure 1.1.21.10. *Steneotarsonemus spinki* Smiley A. ลักษณะอาการเข้าทำลายบนใบข้าว, B, ตัวอ่อนและเต็มวัยขณะมีชีวิต

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.21.1. Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand.

Specific name of mite	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
				Lat (N)	Long (E)
Fungitarsonemus setillus Sousa, Lofego & Gondim	*Artocarpus heterophyllus* Lam	Tha Khun Ram Sub-district, Mueang District, Kamphaeng Phet Province	-	16°26.169'	099°27.649'
Fungitarsonemus sp.	*Artocarpus heterophyllus* Lam	Wang Wa Sub-district, Kleang District, Rayong Province	-	12°44.895'	101°37.442'
		Phu Ngoen Sub-district, Kantharalak District, Sisaket Province	-	14°44.732'	104°31.589'
Nasuitarsonemus sp.	*Cocos nucifera* L.	Ban Phaeo Sub-district, Ban Phaeo District, Samut Sakhon Province	-	13°28.20'	100°4.50'
Nasuitarsonemus onami Lofego, Hountondji, Al-Shanfari & Moraes	*Cocos nucifera* L.	Huai Sakae Sub-district, Mueang District, Phetchabun Province	-	16°09.801'	101°04.666'
				16°10.770'	101°05.519'
		Nong Sam Wang Sub-district, Nong Suea District, Pathum Thani Province		14°13.800'	101°85.9434'
Neotarsonemoides sp.	*Ananas comosus* (L.) Merr.	Khao Kaew Sub-district, Tha Mai District, Chanthaburi Province	-	12°51.097'	101°57.329'
		Wiang Sub-district, Chiang Saen District, Chiang Rai Province	-	20°16.473'	100°43.883'

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.21.1. Continued

Specific name of mite	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
				Lat (N)	Long (E)
Polyphagotarsonemus latus (Banks)	*Capsicum annuum* L.	Tha Chang Sub-district, Mueang District, Nakhon Nayok Province	Leaf curl	14°11.130'	101°09.875'
		Na Kham Sub-district, Ban Dung District, Udon Thani Province		17°38.588'	103°06.464'
		Hai Yong Sub-district, Phang Khon District, Sakon Nakhon Province		17°25.213'	103°43.703'
		Jumpon Sub-district, Phon Phisai District, Nong Khai Province		18°03.442'	103°06.276'
		Bong tai Sub-district, Sawang Daen Din District, Sakon Nakhon Province		17°24.632'	103°22.318'
		Rattaphum Sub-district, Khuan Niang District, Songkhla Province		07°09.584'	100°20.076'
		Tanotduan Sub-district, Khuan Khanun District, Phatthalung Province		07°44.047'	100°01.403'
		Bang Riang Sub-district, Khuan Niang District, Songkhla Province		07°07.930'	100°25.461'

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.21.1. Continued

Specific name of mite	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
				Lat (N)	Long (E)
Polyphagotarsonemus latus (Banks)	*Capsicum annuum* L.	Bang Kaeo Sub-district, La-un District, Ranong Province	Leaf curl	10°11.750'	098°43.794'
		Rong Chang Sub-district, Mueang District, Phichit Province		16°26.117'	100°17.101
		Chakthong Building, Ladyao Sub-district, Chatuchak District, Bangkok Province		13°50.837'	100°34.388'
		Bang Non Sub-district, Mueang District, Ranong Province		10°00.760'	098°38.679'
				10°25.881'	098°47.872'
		Chum Kho Sub-district, Pathio District, Chumphon Province		10°42.913'	099°22.807'
		Huai Rai Sub-district, Mueang District, Amnat Charoen Province		15°82.622'	104°67.498'
		Dunsat Sub-district, Kranuan District, Khon Kaen Province		-	-

กรมวิทยาศาสตร์

Table 1.1.21.1. Continued

Specific name of mite	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
				Lat (N)	Long (E)
Polyphagotarsonemus latus (Banks)	*Capsicum annuum* L.	Huai Mek District, Kalasin Province	Leaf curl	16°19.8'	103°11.61'
		Tha Luang Sub-district, Tha Luang District, Lopburi Province		15°03.665'	101°09.708'
	Solanum virginianum L.	Lam Hoei Sub-district, Don Tum District, Nakhon Phathom Province	Leaf curl	13°57.467'	100°02.754'
	Solanum virginianum L.	Tha Luang Sub-district, Tha Luang District, Lopburi Province		15°04.809'	101°06.523'
	Solanum tuberosum L.	Ban Luang Sub-district, Chom Thong District, Chiang Mai Province	-	18°44.463'	98°55.022'
	Diplotaxis tenuifolia (L.) DC.	Ladprao Road, Khlong Chan Sub-district, Bang Kapi District, Bangkok Province	-	-	-
	Weed	Mae Faek Sub-district, San Sai District, Chiang Mai Province	-	-	-
	Jasminum abyssinicum Hochs	Khao Saming District, Trat Province		-	-
	Cannabis sativa L.	Department of Agriculture Bangkok		13°51.07.289'	100°34.31.662'

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.21.1. Continued

Specific name of mite	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
				Lat (N)	Long (E)
Polyphagotarsonemus sp.	*Cucumis sativus* L.	Khao Yai Sub-district, Cha-am District, Phetchaburi Province	-	12°45.108'	099°55.083'
	Morus alba L.	Chakthong Building, Bangkok Province		-	-
Steneotarsonemus furcatus De Leon	*Cocos nucifera* L.	Ban Phaeo Sub-district, Ban Phaeo District, Samut Sakhon Province	Scanty squarely brown patches of damaged tissue on the fruit surface	13°61.1874 '	100° 12.2446'
		Nong Sam Wang Sub-district, Nong Suea District, Pathum Thani Province		13°62.4772 '	100°11.2743 '
				14°13.800'	100°85.9434'
		Lumpum Sub-district, Mueang District, Phatthalung Province		07°41.739'	100°08.634'
		Chumpon Sub-district, Sathing Phra District, Songkhla Province		07°36.007'	100°24.096'
		Ban Phaeo Sub-district, Ban Phaeo		13°28.20'	100°4.50'
		District, Samut Sakhon Province		13°37.100'	100°07.452'
		Takian Tia Sub-district,Bang Lamung		13°00.681'	100°58.512'
		District, Chon Buri Province			
		Lak Song Sub-district, Ban Phaeo		13°38.298'	100°07.138'
		District, Samut Sakhon Province			

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.21.1. Continued

Specific name of mite	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
				Lat (N)	Long (E)
Steneotarsonemus furcatus De Leon	*Cocos nucifera* L.	Ban Phaeo Sub-district, Ban Phaeo District, Samut Sakhon Province	Scanty squarely brown patches of damaged tissue on the fruit surfac	13°36.645'	100°05.850'
		Wang Nam Khiao Sub-district, Kamphaeng Saen District, Nakhon Pathom Province		13°50.874'	100°01.328'
		Don Khoi Sub-district, Kamphaeng Saen District, Nakhon Pathom Province		14°00.259'	100°02.624'
		Bang Talat Sub-district, Khlong Khuean District, Chachoengsao Province		13°43.160'	101°10.567'
		Jom Pluak Sub-district, Bang Khonthi District, Samut Songkhram Province		13°28.50'	99°58.28'
		Klong Khon Sub-district, Mueang District, Samut Songkhram Province		13°21.316'	099°56.704'
		Wat Keaw Sub-district, Bang Phae District, Ratchaburi Province		13°38.621'	099°55.164'
				13°38.589'	099°55.238'

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.21.1. Continued

Specific name of mite	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
				Lat (N)	Long (E)
Steneotarsonemus furcatus De Leon	*Cocos nucifera* L.	Khok Mo Sub-district, Mueang District, Ratchaburi Province	Scanty squarely brown patches of damaged tissue on the fruit surface	13°33.693'	099°50.520'
				12°16.582'	102°18.333'
		Ta Som Sub-district, *Khao Saming District, Trat* Province			
		Chong Kham Sub-district, Mueang District, Mae Hong Son Province		19°29.7268'	97°97.1424'
		Non Sung Sub-district, *Non Sung District, Nakhon Ratchasima* Province		15°11.892'	102°15.249'
		Nai Mueang Sub-district, *Phi mai District, Nakhon Ratchasima* Province		15°15.044'	102°29.003'
		Chak Don Sub-district, *Klaeng* District, Rayong Province		12°41.898'	101°38.068'
		Bang Luang Sub-district, Sapphaya District, Chai Nat Province		15°15.371'	100°18.397'
		Ta Wang Sub-district, Buachet District, Surin Province		14°38.569'	104°00.741'

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.21.1. Continued

Specific name of mite	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
				Lat (N)	Long (E)
Steneotarsonemus furcatus De Leon	*Cocos nucifera* L.	*Thung Kha* Sub-district, Mueang District, Chumphon Province	Scanty squarely brown patches of damaged tissue on the fruit surface	10°25.651'	99°09.258'
		Mai Khao Sub-district, Thalang District, Phuket Province		08°04.303'	098°20.590'
		La-Ngu Sub-district, *La-Ngu District, Satun* Province		06°48.858'	099°48.333'
				06°46.964'	099°49.611'
		Khon Klan Sub-district, Thung Wa District, Satun Province		06°59.548'	099°40.584'
				06°58.892'	099°40.770'
		Thung Bulang Sub-district, Thung Wa District, Satun Province		07°01.831'	099°40.477'
				07°01.864'	099°40.467'
		Pak Nam Sub-district, La-ngu District, Satun Province		06°52.760'	099°41.501'
				06°52.774'	099°41.527'
		Laem Son Sub-district, La-ngu District, Satun Province		06°54.705'	099°41.678'
				06°54.707'	099°41.706'
		Bang Talat Sub-district, Khlong Khuean District, Chachoengsao Province		13°43.160'	101°10.561'

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.21.1. Continued

Specific name of mite	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
				Lat (N)	Long (E)
Steneotarsonemus furcatus De Leon	*Cocos nucifera* L.	Ko Pa-ngan Sub-district, Ko Pha-ngan District, Surat Thani Province	Scanty squarely brown patches of damaged tissue on the fruit surface	09°43.250'	099°59.291'
				09°42.966'	099°59.641'
				09°43.811'	099°59.119'
				09°43.089'	100°00.443'
				09°44.390'	100°00.223'
		Bang Bor Sub-district, *Ta Kua Pa* District, Phang-Nga Province		08°46.611'	098°15.884'
		Kui Nuea Sub-district, Kui Buri District, Pachaup Khiri Khan		12°00.165'	099°54.435'
		Chum Pon Sub-district, Sathing Phra District, Songkhla Province		07°36.159'	100°23.789'
				07°36.071'	100°22.881'
		Rueso Sub-district, Mae Lan District, Pattani Province		06°33.249'	101°09.637'
Steneotarsonemus sp.	*Ananas comosus* (L.) Merr.	Huai Yang Thon Sub-district, Pak Tho District, Ratchaburi Province	-	13°18.621'	099°39.713'
		Wang Chan Sub-district, Kaeng Krachan District, Phetchaburi Province	-	12°57.526'	99°44.606'

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.21.1. Continued

Specific name of mite	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
				Lat (N)	Long (E)
Steneotarsonemus sp.	*Ananas comosus* (L.) Merr.	Bo Ploy Sub-district, Bo Rai District, Trat Province	-	12°32.954'	102°32.851'
	Solanum virginianum L.	Ainalai Sub-district, Wiang Sa District, Nan Province	-	18°36.223'	100°31.469'
	Solanum tuberosum L.	Nong Kwai Sub-district, Hang Dong District, Chiang Mai Province	-	18°'74.620'	98°91.672'
	Cocos nucifera L.	Wa Ta Baek Sub-district, Thep Sathit District, Chaiyaphum Province	Scanty squarely brown patches of	15°23.106'	101°25.886'
		Chum pon Sub-district, Sathing Phra District, Songkhla Province	damaged tissue on the fruit surface	07°36.159'	100°23.789'
				07°36.071'	100°22.881'
				07°36.007'	100°24.096'
		Ban Phaeo Sub-district, Ban Phaeo District, Samut Sakhon Province		13°62.4772 ' 13°28.20'	100° 11.2743' 100°4.50'
		Phi Kul Thong Sub-district, Mueang District, Ratchaburi Province		13°35.216'	099°53.065'
		Jompluak Sub-district, Bang Khonthi District, Samut Songkhram Province		13°28.50'	099°58.28'

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.21.1. Continued

Specific name of mite	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
				Lat (N)	Long (E)
Steneotarsonemus sp.	*Cocos nucifera* L.	Sapphaya Sub-district, Sapphaya District, Chainat Province	Scanty squarely brown patches of damaged tissue on the fruit surface	15°07.353'	120°14.245'
		Phu Nam Yod Sub-district, Wichian Buri District, Phetchabun Province		15°30.798'	100°59.946'
		Huai Sakae Sub-district Mueang District, Petchabun Province		16°10.603'	101°05.831'
		Non Sung Sub-district, Nonsung District, Nakhon Ratchasima Province		15°11.836'	102°15.324'
		Klong Noi Sub-district, Pak Phanang District, Nakhon Si thammarat Province		08°22.384'	100°06.146'
		Thung Kha Sub-district, Muang District, Chumphon Province		10°25.165'	099°09.254'
		Khuk Khak Sub-district, Ta Kua Pa Distric, Phang-nga Province		08°43.761'	098°14.386'
		Huai Yang Sub-district, Thap Sakae District, Prachuap khiri khan Province		11°37.051'	099°38.335'

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.21.1. Continued

Specific name of mite	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
				Lat (N)	Long (E)
Steneotarsonemus sp.	*Musa acuminata* Colla	Nam Chuet Noi Subdistrict, Kraburi District, Ranong Province	-	10°25.884'	098°47.856'
Steneotarsonemus spinki Smiley	*Oryza sativa* L.	Nong Khon Sub-district, Mueang District, Ubon Ratchathani Province	The surface of leaf sheath browning and decaying	13°49.297'	100°36.049'
Tarsonemus bilobatus Suski	*Ananas comosus* (L.) Merr.	Huai Yang Thon Sub-district, Pak Tho District, Ratchaburi Province	-	13°18.621'	099°39.713'
		Khao Yai Sub-district, Cha-am District, Phetchaburi Province	-	12°47.555'	099°55.603'
		Bowin Sub-district, Si Racha District, Chonburi Province	-	13°01.383'	101°04.170'
		Thung Bencha Sub-district, Tha Mai District, Chanthaburi Province	-	12°46.141'	101°57.868'
		Rahaeng Sub-district, Lat Lum Kaeo District, Pathum Thani Province	-	-	-
		Aow Noi Sub-district, Mueang District, Prachuap Khiri Khan Province	-	11°55.487'	99°48.428'

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.21.1. Continued

Specific name of mite	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
				Lat (N)	Long (E)
Tarsonemus bilobatus Suski Tarsonemidae	*Ananas comosus* (L.) Merr. *Cocos nucifera* L.	Nong Krang Sub-district, Bo Ploy District, Kanchanaburi Province	-	14°31.412'	99°31.596'
		Pho Pitak Sub-district, Sapphaya District, Chai Nat Province	Scanty squarely brown patches of damaged tissue on the fruit surface	15°04.451'	100°17.286'
		Mueang District, Phitsanulok Province		16°749.9513'	100°306.4575'
		Huai Sakae Sub-district, Mueang District, Phetchabun Province		16°09.801'	101°05.666'
				16°10.603'	101°05.831'
		Ta Chan Sub-district, Khong District, Nkhon Ratchasima Province		15°19.175'	102°26.641'
		Thung Kha Sub-district, Mueang District, Chumphon Province		10°25.651'	99°09.258'
		Rueso Sub-district, Mae Lan District, Pattani Province		06°33.249'	101°09.637'
		Bang Pra Sub-district, Si Racha District, Chon buri Province		13°14.352'	100°52.292'
		Ta Khian Tia Sub-district, Bang Lamung District, Chon buri Province		13°00.190'	100°59.575'
				13°00.681'	100°58.512'

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.21.1. Continued

Specific name of mite	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
				Lat (N)	Long (E)
Tarsonemidae	*Cocos nucifera* L.	Khan Thuli Sub-district, Tha Chana District, Surat Thani Province	Scanty squarely brown patches of damaged tissue on the fruit surface	09°40.235'	099°05.100'
		Chom Pluak Sub-district, Bang Khonthi District, Samut Songkhram Province		13°28.050'	99°58.28'
		Chumphon Sub-district, Sathing Phra District, Songkhla Province		07°36.007'	100°24.096'
Tarsonemus sp.	*Pithecellobium dulce* (Roxb.)	Samrongchai Sub-district, Paisali District, Nakhon Sawan Province	-	-	-
	Allium sativum L.	Nampat District, Uttaradit Province	-	17°44.597'	100°42.304'
	Allium ascalonicum L.	Wang Hin District, Sisaket Province	-	14°55.914'	104°16.177'
	Lagerstroemias peciosa (L.) Pers.	Muang District, Kamphaeng Phet Province	-	-	-

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.21.1. Continued

Specific name of mite	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
				Lat (N)	Long (E)
Tarsonemus sp.	*Azima sarmentosa* (Blume)	Kamphaeng Saen District, Nakhon Pathom Province	-	14°00.746'	99°97.162'
				13°59.268'	099°51.864'
		Huai Mon Thong Sub-district, Kamphaeng Saen District, Nakhon Pathom Province		13°57.264'	99°52.534'
	Ruellia tuberosa L.	Chakthong Building, Department of Agriculture Bangkok	-	-	-
	Ficus carica L.	Pathum Thani Province	-	-	-
	Artocarpus heterophyllus Lam	Nam Thiang Sub-district, Kham Cha-i District, Mukdahan Province	-	16°34.736'	104°25.118'

Table 1.1.21.2. Predatory mite associated with mite on Tarsonemid mites in Thailand.

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

สำนักวิทยบริการฯ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการสำรวจไรขาวในพื้นที่ 48 จังหวัด ได้แก่จังหวัด จังหวัดปทุมธานี นครนายก กรุงเทพ ลพบุรี ชัยนาท นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี กำแพงเพชร นครสวรรค์ อุตรดิตถ์ น่าน พิจิตร เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี ชุมพร พัทลุง ระนอง ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี พังงา สตูล ภูเก็ต สงขลา ปัตานี ชัยภูมิ เพชรบูรณ์ กาฬสินธุ์ นครราชสีมา สุรินทร์ ขอนแก่น อำนาจเจริญ สกลนคร ศรีสะเกษ มุกดาหาร หนองคาย อุดรธานี อุบลราชธานี ตราด ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา และจันทบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม 2561-เดือนธันวาคม 2564 พบไรทั้งหมด 2 วงศ์ 15 ชนิด เป็นไรศัตรูพืช 8 ชนิด ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นศัตรูพืชหรืออาจจะเป็นไรที่กินเชื้อราอีก 6 ชนิดและ ไรตัวห้ำ 1 ชนิด ไรขาวศัตรูพืชที่พบได้แก่ *Polyphagotarsonemus latus* (Banks), *Polyphagotarsonemus* sp., *Nasuitarsonemus onami* Lofego, Hountondji, Al-Shanfari&Moraes, *Nasutitarsonemus* sp., *Steneotarsonemus furcatus* De Leon, *Steneotarsonemus* sp., *Steneotarsonemus spinki* Smiley และอีกชนิดไม่สามารถจำแนกชนิดได้ ไรขาวที่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นศัตรูพืชพบ 5 ชนิดได้แก่ *Fungitarsonemus setillus* Sousa, Lofego & Gondim, *Fungitarsonemus* sp. *Neotrsonemoides* sp., *Tarsonemus bilobatus* Suski *Tarsonemus* sp. และ *Steneotarsonemus* sp. สำหรับไรตัวห้ำพบ 1 ชนิดคือ *Amblyseius largoensis* (Muma) จากการสำรวจพบว่าไรขาวชนิดที่มีความสำคัญมี 3 ชนิดคือ *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) เป็นไรขาวที่เข้าทำลายพืชได้หลากหลายชนิด ทำให้ใบพืชม้วนหงิกงอ *Steneotarsonemus furcatus* De Leon เป็นไรขาวศัตรูสำคัญบนผลมะพร้าวทำให้มะพร้าวผิวผลเสียหาย ผลไม่ได้ขนาด และ *Steneotarsonemus spinki* Smiley เป็นไรขาวที่พบบนใบข้าว ระบาดเป็นครั้งคราวแต่หากระบาดทำให้ผลผลิตข้าวลดลง

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้ชื่อวิทยาศาสต์นำไปใช้เป็นฐานข้อมูลงานวิจัยในการสืบค้นอ้างอิงทางหลักวิชาการ

2. สามารถนำข้อมูลวิชาการที่ได้ไปใช้ประโยชน์ เพื่อนำไปจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชในวงศ์นี้เพิ่มเติม จากที่ประเทศไทยยังไม่มีรายชื่อไรขาวเป็นศัตรูพืชกักกันในประเทศ ดังนั้นการสำรวจในครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์ในการเพิ่มข้อมูลศัตรูพืชกักกันให้สมบูรณ์ครบถ้วยยิ่งขึ้น

3. ได้ความสัมพันธ์อันดีระหว่างผู้เชี่ยวชาญต่างประเทศในการช่วยยืนยันต์ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.22 การจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย
Identification of Entomopathogenic Nematodes in Eastern Thailand.

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวพัชรีวรรณ จงจิตเมตต์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นายอภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นายรัชชัย ประดับวงศ์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวอุณากุล จันทร์ภู่	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การจำแนกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย ดำเนินการเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา ระยอง จันทบุรี ตราด ปราจีนบุรี และสระแก้ว ทำการสุ่มเลือกสภาพพื้นที่ดินในป่าที่ยังไม่เคยมีการบุกรุก จากนั้นขุดดินลึกประมาณ 15 - 20 เซนติเมตร เก็บดินจำนวน 2 กิโลกรัม ได้ตัวอย่างดินรวมจำนวน 76 ตัวอย่าง นำกลับมาคัดแยกและจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ได้ ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2564 ผลการคัดแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยหนอนกินรังผึ้ง ตรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินในพื้นที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดิน 3 ตัวอย่าง โดยในพื้นที่ตำบลบ้านฉาง อำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง พบจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ PC52 และ PC53 และในพื้นที่ตำบลบ้านแหลมกลัด อำเภอเมืองตราด จังหวัดตราด พบจำนวน 1 ตัวอย่าง คือ PC64 เมื่อนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมาจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่า ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง PC52 เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน และ PC64 เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ ทั้ง 2 ตัวอย่างจัดอยู่ในสกุล *Steinernema* สำหรับ PC53 จัดอยู่ในสกุล *Heterorhabditis* เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง และลักษณะโครงสร้างของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* คือ PC52 และ PC64 มีขนาดลำตัวสั้นความยาวประมาณ 500 ไมครอน ส่วน PC53 ขนาดความยาวลำตัวจะยาวประมาณ 700 ไมครอน เมื่อนำไปวิเคราะห์จัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล พบว่าผลการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่สำรวจพบยังไม่สมบูรณ์ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอได้ จำเป็นต้องทำเพิ่มเติมเพื่อความสมบูรณ์ของตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์

คำสำคัญ: ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ภาคตะวันออก หนอนกินรังผึ้ง

Abstract

Identification of entomopathogenic nematodes (EPN) in the Eastern Thailand. Soil samples were collected in 7 provinces; Chon Buri, Chachoengsao, Rayong, Chanthaburi, Trat, Prachin Buri and Sa Kaeo. Collected the soil sample to a depth of about 15 - 20 cm. for 2 kilograms of soil, the total of 76 soil samples were obtained and brought them back for

กรมวิชาการเกษตร

classification of EPN at the laboratory, Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research and Development Office. During October 2018 to September 2021. The entomopathogenic nematodes were isolated by wax worms. EPNs were found from 3 soil samples. Two samples of EPNs, PC52 and PC53 were collected from soil in Ban Chang sub-district, Ban Chang district, Rayong province, and a sample, PC64 was recovered in Ban Laem Klat sub-district, Muang Trat district, Trat province. Two EPNs were described as *Steinernema*, PC52 and PC 64, when PC52 infect to wax worms showed that the worms turned pale yellow, and PC64 showed the worms turned brownish-black color. As for PC53, it is belong to genus *Heterorhabditis*, it can be recognized by red color of cadavers. The infective juvenile of PC52 and PC64, both of them had a body length about 500 microns, as for PC53 had about 700 microns in body length. The analyzed and classified entomopathogenic nematodes by molecular technic. It was found that the nucleotide analysis results of the observed EPNs were incomplete and the DNA sequencing could not be analyzed. Further work is required to ensure the integrity of the samples prior to analysis.
Keywords: Entomopathogenic Nematodes, Eastern Thailand, Wax moth

คำนำ

การควบคุมกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี เป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมี โดยเน้นความปลอดภัยของเกษตรกร ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อม ซึ่งเป็นสิ่งที่ทุกคนตระหนักถึงอยู่ตลอดเวลา และงานวิจัยเกี่ยวกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง เป็นงานอีกด้านหนึ่งที่มีการศึกษาและพัฒนาศักยภาพ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในทางการเกษตร ซึ่งเป็นที่ยอมรับและนำไปใช้กันอย่างกว้างขวางในประเทศต่างๆ ทั่วโลก ลักษณะเด่นที่สำคัญในการเลือกใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงคือการมีชีวิตอยู่รอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสภาพแวดล้อมเพื่อรอเข้าทำลายแมลง และความเฉพาะเจาะจงในการเลือกทำลายแมลงศัตรูพืชเป็นลักษณะที่บ่งชี้ได้ว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมีความสามารถแตกต่างจากการใช้จุลินทรีย์และศัตรูธรรมชาติอื่นๆ ดังนั้นการสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดใหม่ๆ เพื่อนำมาพัฒนาศักยภาพและนำไปใช้ประโยชน์ จึงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

สำหรับการใช้ประโยชน์จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในต่างประเทศประสบความสำเร็จและมีการศึกษาค้นคว้าตั้งแต่ ปี ค.ศ. 1923 และพัฒนากันมาอย่างต่อเนื่องโดยนักวิจัยประเทศต่างๆ ทั่วโลก ตั้งแต่การค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดใหม่ๆ จนถึงการผลิตขยายและนำไส้เดือนฝอยไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ การใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในต่างประเทศเป็นที่ยอมรับจากเกษตรกรเป็นอย่างมาก มีบริษัทเอกชนหลายบริษัทที่ผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและจัดจำหน่ายในรูปชีวภัณฑ์ เช่น บริษัท Andermatt Biocontrol AG, สวิสเซอร์แลนด์; CropKing Inc, สหรัฐอเมริกา; Natural Insect Control, แคนาดา; E-nema, เยอรมันนี; Ecowin Co. Ltd., เกาหลีใต้ สำหรับในประเทศไทยเคยมีบริษัทเอกชนได้แก่ บริษัทแอพลายเค็ม และบริษัท

ศรีวิชาการเกษตร

ยูนิซีดส์ ผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและจำหน่ายแก่เกษตรกรในช่วงปี 2539-2550 แต่ปัจจุบันทั้งสองบริษัทได้เลิกผลิตแล้ว เนื่องจากขาดการส่งเสริมและเผยแพร่สู่เกษตรกรอย่างต่อเนื่อง

สำหรับพืชเศรษฐกิจหลายชนิดที่ประสบปัญหาจากแมลงศัตรูพืช จนทำให้ผลผลิตเสียหาย สามารถควบคุมและกำจัดได้โดยการใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* เช่น เห็ด (Jess *et al*., 2005) พวกผักต่างๆ เช่น แครอท กะหล่ำปลี มันฝรั่ง แตงกวา (Belair *et al*., 2005) รวมทั้งธัญพืชชนิดต่างๆ และพืชน้ำมัน (Cabanillas *et al*., 2005) ในประเทศไทยการนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไปใช้ควบคุมแมลงยังไม่แพร่หลายนัก เนื่องจากงานวิจัยเกี่ยวกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ยังมีข้อมูลและรายงานไม่มากนัก งานทดลองส่วนใหญ่จะเน้นไปกับการใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงควบคุมหนอนผีเสื้อศัตรูพืช เช่น หนอนกินใต้ผิวเปลือกไม้สกุลลางสาด หนอนกระทู้หอมในดาวเรือง หนอนกระทู้ผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย (วัชรี และคณะ, 2529; 2537) และทดสอบกับด้วงหมัดผัก ด้วงงวงมันเทศ (วัชรี และคณะ, 2534ก; ข)

เมื่อมองในแง่ของการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพแล้ว ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก โดยมีจำนวนสิ่งมีชีวิตอยู่ประมาณร้อยละ 7 เมื่อเทียบสัดส่วนกับจำนวนประชากรสิ่งมีชีวิตในโลกซึ่งมีประมาณ 5 ล้านชนิด ทั้งนี้เนื่องด้วยประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น สภาพทางภูมิศาสตร์ที่มีความหลากหลายในแต่ละพื้นที่ล้วนเป็นปัจจัยที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของสิ่งมีชีวิต ประเทศไทยมีภูมิประเทศเป็นที่ราบลุ่มแม่น้ำ ที่ราบลอนคลื่น มีแถบชายฝั่งทะเล และมีภูเขาที่มีความสูงหลากหลายตั้งแต่เนินเขา จนถึงภูเขาที่สูงชันถึง 2,400 เมตรจากระดับน้ำทะเล ทำให้ที่ผ่านมาสามารถสำรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้จากพื้นที่ต่างๆ ได้แก่ *Steinernema siamkayai* Stock, Somsook and Reid พบที่สวนมะขาม อำเภอหล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์ และ *Steinernema minutum* Maneesakorn, Grewal and Chandrapatya พบในป่าที่อำเภอเมือง จังหวัดชุมพร และ *Heterorhabditis somsookae*, Maneesakorn, An, Grewal and Chandrapatya (Stock *et al*., 1998; Maneesakorn *et al*., 2010; Maneesakorn *et al*., 2015) โดยทั้ง 3 ชนิดนี้พบเป็นครั้งแรกในประเทศไทย และมีรายงานว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* สำรวจพบได้ที่จังหวัดกาญจนบุรีด้วย นอกจากนี้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* สำรวจพบได้อีกตามพื้นที่ต่างๆ ทั่วประเทศ ได้แก่ *Heterorhabditis indica* พบที่จังหวัดขอนแก่น กระบี่ กาญจนบุรี สุราษฎร์ธานี และยังมีไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอีกหลาย isolate จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ซึ่งอาจเป็นชนิดเดียวกับที่ทราบชนิดแล้ว หรืออาจเป็นชนิดใหม่ที่ค้นพบได้ครั้งแรกในประเทศไทย แต่ยังไม่ได้ทำการจัดจำแนกชนิด ทั้งนี้ทางภาคตะวันออกของประเทศไทยมีความหลากหลายทางสภาพภูมิศาสตร์คือมีทั้งภูเขาสูงและมีชายฝั่งทะเล สันนิษฐานว่าอาจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้ วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย เพื่อจำแนกชนิดโดยลักษณะทางพันธุกรรมและสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ที่สำรวจพบได้ในภาคตะวันออกของประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

วิธีการ

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> การสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และการคัดแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์การวิจัย

ทำการสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย 7 จังหวัด ประกอบด้วย จังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา ระยอง จันทบุรี ตราด ปราจีนบุรี และสระแก้ว กำหนดการเก็บตัวอย่างจังหวัดละอย่างน้อย 3 จุดพื้นที่ แต่ละจุดห่างกันอย่างน้อย 5 กิโลเมตร ทำการจับพิกัดตำแหน่งพื้นที่ของตัวอย่างดินด้วยเครื่องมือ GPS บันทึกลักษณะดิน ความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิดิน แต่ละจุดที่เก็บตัวอย่างดิน

วิธีปฏิบัติการทดลอง

เก็บตัวอย่างดินในแต่ละจุดโดยใช้พลั่วมือขุดดินลึกลงไป 15 - 20 เซนติเมตร จากผิวหน้าดิน ในแต่ละพื้นที่เก็บดิน 5 จุด โดยให้แต่ละจุดห่างกัน 1 เมตรจากจุดกลาง จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างดินจุดละ 400 กรัม รวมเป็นปริมาณ 2 กิโลกรัม ใส่ลงถุงพลาสติก มัดปากถุงเพื่อรักษาความชื้น และเก็บรักษาดินตัวอย่างในที่เย็น 15 - 20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปคัดแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากดินตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ

นำดินจำนวน 2 กิโลกรัมที่ได้จากแต่ละจุดเก็บตัวอย่างมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน และแบ่งใส่กล่องพลาสติกขนาด 5x7x9 เซนติเมตร กล่องละ 150 กรัม จากนั้นปล่อยหนอนกินรังผึ้งวัย 5 ลงไปกล่องละ 20 ตัว ปิดฝากล่องให้สนิท นำกล่องทดสอบเก็บที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนดจึงนำกล่องออกมาตรวจผลการทดสอบ เมื่อพบหนอนกินรังผึ้งตาย ทำการเก็บรวบรวมหนอนที่ตายออกจากดิน และทำความสะอาดผิวลำตัวภายนอกของหนอนด้วยสารละลาย 0.1% ฟอร์มาลีน อย่างน้อย 3 ครั้ง จากนั้นทำการดักล่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงตามวิธีการของ White (1927) โดยนำหนอนที่ตายและทำความสะอาดแล้ววางบนผ้ากรองที่ปูบนจานแก้วในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิดมิดชิด เติมน้ำลงในกล่องจำนวน 20 มิลลิลิตร ก่อนจะนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 - 12 วัน เมื่อครบกำหนดจึงทำการตรวจหาไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง ซึ่งจะเคลื่อนตัวออกจากซากหนอนลงมาอยู่ในน้ำ ทำการเก็บไส้เดือนฝอยโดยเทออกจากกล่องแล้วล้างเศษซากหนอนออก จากนั้นเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในชิ้นฟองน้ำหรือบรรจุในขวดพลาสติกเก็บรักษาต้นเชื้อ (culture flask) ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกพิกัดตำแหน่ง GPS พื้นที่จุดที่เก็บตัวอย่าง
- บันทึกลักษณะของดินตัวอย่าง ค่าความเป็นกรดด่างของดิน อุณหภูมิ และความชื้นของดินตัวอย่าง

<u>ขั้นตอนที่ 2 การวิเคราะห์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล</u>

ทำการเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่คัดแยกได้จากดินตัวอย่างในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย ให้ได้เป็นปริมาณมากเพื่อนำมาใช้ทดสอบในขั้นตอนนี้

<u>การสกัด DNA ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง</u>

เตรียมไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (IJ) จำนวน 200 ตัวผสมน้ำ 10 มิลลิลิตร ใช้ auto pipette ดูดไส้เดือนฝอยหยดลงบนกระดาษกรองซึ่งวางในจานทดลองเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร

กรมวิชาการเกษตร

ปล่อยหนอนกินรังผึ้งลงไปในจาน จานละ 10 ตัว จากนั้นหยดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* ไว้ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ *Heterorhabditis* เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

คัดเลือกหนอนที่ถูกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเข้าทำลายแล้ว โดยใช้เข็มเขี่ยตัวหนอนให้แตกแล้วแยกเอาไส้เดือนฝอยเพศเมียออกมา โดยใช้ไม้ปลายแหลมเขี่ยไส้เดือนฝอยเพศเมียลงใน eppendorf ที่มี buffer ATL 180 ไมโครลิตร และ proteinase K 20 ไมโครลิตร นำไปเข้าเครื่องบ่มที่ 56 องศาเซลเซียส ปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที และที่ 700 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติม buffer AL 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 56 องศาเซลเซียส ปั่นเหวี่ยงที่ 1,800 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม Abs. ethanol 200 ไมโครลิตร แล้วดูดสารละลายทั้งหมดที่ได้ใส่ใน spin column นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายส่วนล่างของ spin column ทิ้ง แล้วนำสารละลายส่วนบนไปใส่ใน spin column ใหม่ จากนั้นเติม buffer AW1 500 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนล่างของ spin column ทิ้ง แล้วนำสารละลายส่วนบนไปใส่ใน spin column ใหม่ แล้วเติม buffer AW2 500 ไมโครลิตร เข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนล่างของ spin column ทิ้ง แล้วนำสารละลายส่วนบนไปใส่ใน spin column ใหม่ แล้วเติม buffer AE 100 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 2 รอบ จะได้ตัวอย่างดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง นำเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

<u>การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยกระบวนการ PCR</u>

เตรียม greentaq จำนวน 62.5 ไมโครลิตร ใส่หลอด eppendorf จากนั้นหยด Primer D2F: 5′-CCT TAG TAA CGG CGA GTG AAA-3′ (forward) และ 536 : 5′-CAG CTA TCC TGA GGA AAC-3′ (reverse) อย่างละ 5 ไมโครลิตร และน้ำ 37.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารใส่หลอด PCR หลอดละ 22 ไมโครลิตร โดยมีหลอด positive (+) เติม DNA template และหลอด nagative (-) เติมน้ำกลั่น จากนั้นผสมสารให้เข้ากันในแต่ละหลอดด้วยเครื่อง vortex จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตะกอนตกสู่ด้านล่างหลอด PCR จากนั้นนำเข้าเครื่อง thermocycler โดยกำหนดให้เครื่องทำงาน 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และรอบ 40 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป หรือนำดีเอ็นเอที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

<u>การทดสอบเจลอิเล็กโตรฟอเรซีส</u>

เตรียมสารละลาย 0.5X TBE 1 ลิตร จาก 10X TBE 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร สำหรับเตรียม 1.5% agarose gel โดยใช้ agarose 1.5 กรัม และ 0.5X TBE 100 มิลลิลิตร ผสมให้สารละลายเข้ากันเป็นเนื้อเดียวแล้วนำใส่เครื่องไมโครเวฟตั้งอุณหภูมิ 360 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูด agarose gel มาใช้ครั้งละ 20 มิลลิลิตร ใส่สีย้อมเรืองแสง 1 มิลลิลิตร ลงไป เขย่าให้ผสมกัน จากนั้นจึงนำไปเทลงในถาดเจล รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 10 - 15 นาที นำเจลออกจากถาดไปวางบนเครื่อง เทสารละลาย 0.5X TBE buffer ลงใน

ศูนย์วิทยทรัพยากร

เครื่องจนท่วมแผ่นเจล พยายามไม่ให้เกิดฟอง นำ marker หยดลงในหลุมแรก 3 ไมโครลิตร จากนั้นหยดตัวอย่างดีเอ็นเอตัวอย่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่เตรียมได้ลงหลุมละ 8 ไมโครลิตร และหลุมสุดท้ายหยด marker 3 ไมโครลิตร เปิดเครื่อง Electrophoresis ที่แรงดันไฟฟ้า 100 โวลต์, ความจุไฟฟ้า 100 มิลิแอมแปร์, กำลังไฟฟ้า 10 วัตต์ เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นนำเจลไปส่องในเครื่อง Biorad Chemidoc Touch Imaging System

การทำ Purification

นำตัวอย่างดีเอ็นเอไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงใน spin column เติม buffer BP จำนวน 85 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง 30 - 60 วินาที ล้างด้วย buffer PE จำนวน 150 ไมโครลิตร แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 30 - 60 วินาที จากนั้นจึงย้าย column วางลงใน eppendorf แล้วเติม buffer EB จำนวน 50 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เวลาและสถานที่:

ระยะเวลาดำเนินการ: ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2561 ถึง กันยายน 2564

สถานที่ดำเนินการ: - ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

- พื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา ระยอง จันทบุรี ตราด ปราจีนบุรี และสระแก้ว

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการสำรวจเก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย จากพื้นที่ 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา ระยอง จันทบุรี ตราด ปราจีนบุรี และสระแก้ว โดยเก็บตัวอย่างดินได้ 11 3 12 16 9 13 และ 12 ตัวอย่าง ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 76 ตัวอย่าง (Figure 1-2) จะเห็นได้ว่าบางจังหวัดเก็บตัวอย่างได้เพียง 3 หรือ 9 ตัวอย่างเท่านั้น เนื่องจากช่วงที่เดินทางไปเก็บตัวอย่างยังอยู่ในช่วงฤดูแล้ง พื้นที่ที่คาดว่าจะพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมีน้อยมาก เพราะพื้นดินยังมีความแห้ง ความชื้นน้อย โอกาสที่จะพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินที่ไม่มีความชื้นหรือแห้งจึงเป็นไปได้ยาก ทำให้เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ป่าของจังหวัดฉะเชิงเทราได้น้อย หลังจากนั้นปริมาณฝนเริ่มมากขึ้น ดินมีความชุ่มชื้นมากขึ้น ดินในบริเวณผืนป่ามีความร่วนซุยมีโอกาสที่จะพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามบางครั้งสามารถพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้จากดินที่มีลักษณะเป็นดินทราย หรือดินที่อยู่แถบชายฝั่งทะเลได้เช่นกัน (Hominick *et al*., 1996; Hominick, 2002) ผลการคัดแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินตัวอย่างด้วยหนอนกินรังผึ้ง ตรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดิน 3 ตัวอย่าง ในพื้นที่ตำบลบ้านฉาง อำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดิน PC52 ตำแหน่งพิกัดที่ x,y : 12.7520240, 101.0836820 ดินมีลักษณะนิ่ม ร่วน สีดำ อุณหภูมิดิน 28 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 4.69 ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (EC (ds m^{-1})) 0.08 ค่าอินทรียวัตถุในดิน (OM

ศูนย์วิชาการเกษตร

(%)) 0.91 และตัวอย่างดิน PC53 ตำแหน่งพิกัดที่ x,y : 12.7519270, 101.0836850 ดินมีลักษณะนิ่ม ร่วน สีดำ อุณหภูมิดิน 28 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 4.89 ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (EC (ds m^{-1})) 0.06 ค่าอินทรียวัตถุในดิน (OM (%)) 0.94 และในพื้นที่ตำบลบ้านแหลมกลัด อำเภอเมืองตราด จังหวัดตราด จำนวน 1 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดิน PC64 ตำแหน่งพิกัดที่ x,y : 12.1139200, 102.7034070 ดินมีลักษณะนิ่ม ร่วน สีดำ อุณหภูมิดิน 27 องศาเซลเซียส โดยดินตัวอย่างนี้มีไม่เพียงพอจึงไม่สามารถวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าการนำไฟฟ้าของดิน และค่าอินทรียวัตถุในดินได้ จากการคัดแยกดินตัวอย่างด้วยหนอนกินรังผึ้งในภาชนะ ที่ปล่อยให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเข้าทำลายและเจริญเติบโตขยายเพิ่มปริมาณในนั้น เมื่ออาหารในตัวหนอนหมดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะออกจากซากหนอนมาอยู่ในดินทำให้เห็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวนมากเกาะที่ดินข้างภาชนะ (Figure 3) จากนั้นทำการเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงให้ได้เป็นปริมาณมากด้วยหนอนกินรังผึ้งเดือนละ 1 ครั้งเพื่อเพิ่มปริมาณ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่พบในประเทศไทย (Maneesakorn *et al*., 2010) เมื่อนำตัวอย่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมาจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่า ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง PC52 และ PC64 จัดอยู่ในสกุล *Steinernema* สำหรับ PC53 จัดอยู่ในสกุล *Heterorhabditis* ตามลำดับ โดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง PC 52 เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน แต่สำหรับ PC64 เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ ส่วน PC53 เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง (Figure 4) เมื่อนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไปตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ จะพบลักษณะโครงสร้างของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* คือ PC52 และ PC64 มีขนาดลำตัวสั้นความยาวประมาณ 500 ไมครอน และปลายหางไม่ยาวแหลม ส่วน PC53 ขนาดความยาวลำตัวจะยาวกว่าประมาณ 700 ไมครอน และปลายหางแหลมเรียวยาว ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะอย่างหนึ่งของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* (Nguyen and Hunt, 2007) (Figure 5) จากนั้นได้นำไปวิเคราะห์จัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทางชีวโมเลกุล ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่สำรวจพบยังไม่สมบูรณ์ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอได้ เนื่องจากยังพบความบกพร่องอย่างต่อเนื่องในขั้นตอนการจัดเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำเป็นต้องทำเพิ่มเติมเพื่อความสมบูรณ์ของตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการสำรวจเก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา ระยอง จันทบุรี ตราด ปราจีนบุรี และสระแก้ว ตรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดิน 3 ตัวอย่าง โดยในพื้นที่ตำบลบ้านฉาง อำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง พบจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดิน PC52 และ PC53 และในพื้นที่ตำบลบ้านแหลมกลัด อำเภอเมืองตราด จังหวัดตราด พบจำนวน 1 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดิน PC64 โดยทั้ง 3 ตัวอย่างดินมีลักษณะนิ่ม ร่วน สีดำ เมื่อนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมาจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่า ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง PC52 เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน และ PC64 เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ ทั้ง 2 ตัวอย่างจัดอยู่ในสกุล *Steinernema* สำหรับ PC53 จัดอยู่ในสกุล *Heterorhabditis* เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีส้ม

กรมวิชาการเกษตร

แดง และลักษณะโครงสร้างของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* คือ PC52 และ PC64 มีขนาดลำตัวสั้นความยาวประมาณ 500 ไมครอน และปลายหางไม่ยาวแหลม ส่วน PC53 ขนาดความยาวลำตัวจะยาวกว่าประมาณ 700 ไมครอน และปลายหางแหลมเรียวยาว ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะอย่างหนึ่งของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* เมื่อนำไปวิเคราะห์จัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยเทคนิควิธีทางชีวโมเลกุล พบว่าผลการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่สำรวจพบยังไม่สมบูรณ์ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอได้ จำเป็นต้องทำเพิ่มเติมเพื่อความสมบูรณ์ของตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

สำหรับงานวิจัยนี้สามารถบ่งชี้จำแนกสกุลของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่คัดแยกได้จากดินตัวอย่าง ดังนั้นจำเป็นต้องทำการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมและลักษณะทางโครงสร้างของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแต่ละตัวอย่างที่ได้ และเมื่อได้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่อาจพบเป็นชนิดใหม่ (new species) สามารถดำเนินการตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการนานาชาติ และนำไปพัฒนาศักยภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง พัฒนาต่อยอดสู่ขบวนการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณผลิตในรูปของชีวภัณฑ์ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้

กรมวิชาการเกษตร

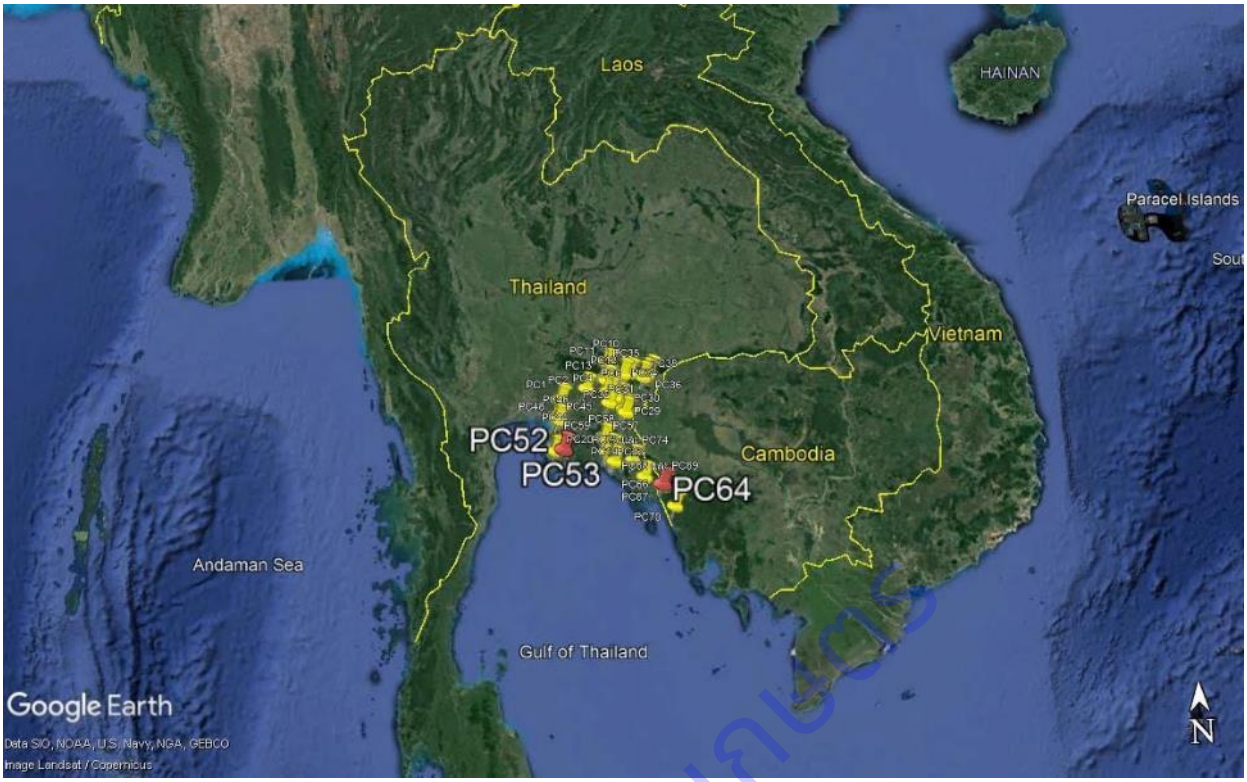


Figure 1.1.22.1. The sampling sites of collected 76 soil samples in Thailand.

Figure 1.1.22.2. The sampling sites of collected 76 soil samples in Eastern Thailand.

Figure 1.1.22.3. The entomopathogenic nematodes were found in soil samples.

Figure 1.1.22.4. The cadavers of wax moth after infected by different entomopathogenic nematodes.

กรมวิชาการเกษตร

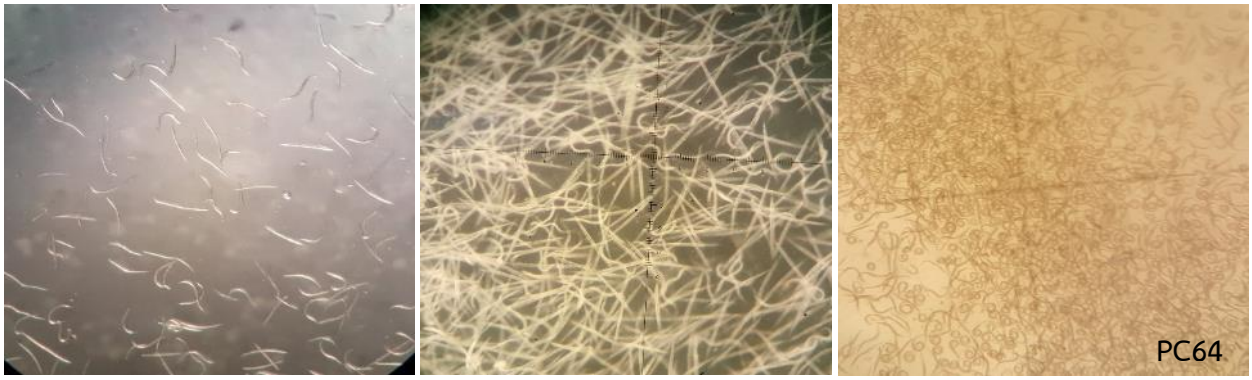


Figure 1.1.22.5. The characteristic of three different entomopathogenic nematodes.

PC52 : *Steiernema* sp.

PC53 : *Heterorhabditis* sp.

PC64 : *Steiernema* sp.

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.23 อนุกรมวิธาน การแพร่กระจาย พืชอาศัยของแมลงวันหนอนชอนใบในวงศ์ Agromyzidae (Order : Diptera) ในพืชผัก

Taxonomy, Distribution and Host Plants of Leafminer Flies in Family Agromyzidae (Order: Diptera) in vegetable crops

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ยุวรินทร์ บุญทบ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	สุนัดดา เชาวลิต	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ชมัยพร บัวมาศ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

แมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae เป็นศัตรูพืชที่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและปัญหาด้านการกักกันพืชเป็นอย่างยิ่ง การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะทสงสัณฐานวิทยาเพื่อช่วยในการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae ที่เป็นศัตรูพืชผักที่สำคัญในประเทศไทย โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาดั้งเดิม เช่น อัตราส่วนของเส้นปีก รูปแบบสีท้อง และอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ โดยสำรวจพบแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Liriomyza brassicae* (Riley, 1884), *L. chinensis* (Kato, 1949), *L. huidobrensis* (Blanchard, 1926), *L. sativae* Blanchard, 1938 และ *L. trifolii* (Burgess 1880) การศึกษาครั้งนี้พบว่าลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้เป็นสิ่งสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิด และได้จัดทำแนวทางวินิจฉัยแมลงวันหนอนชอนใบทั้ง 5 ชนิด นอกจากนี้ได้ทำการรวบรวมข้อมูลการกระจายตัวและพืชอาหารของแมลงวันหนอนชอนใบแต่ละชนิด พบแมลงวันหนอนชอนใบ *L. brassicae, L. chinensis, L. sativae* และ *L. trifolii* แพร่กระจายในทุกภูมิภาค แต่พบ *L. huidobrensis* เฉพาะที่ราบสูงในภาคเหนือของประเทศไทย และพบ *L. sativae* เข้าทำลายพืชผักหลากหลายที่สุด โดยพบทำลายพืชผัก 21 ชนิด ในอนาคตมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อยืนยันชี้แจงความแตกต่างระหว่างชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae ในประเทศไทยและประเทศใกล้เคียง

คำสำคัญ: อนุกรมวิธาน การแพร่กระจาย พืชอาศัย แมลงวันหนอนชอนใบ

Abstract

Agromyzid leafminers comprise a pest group that causes both considerable economic losses and serious quarantine problems. In this study, morphological studies were performed to assist in species identification of pest species of Agromyzidae leafminers in vegetable crops in Thailand. The discriminative ability of some traditional morphological characters, such as wing ratio, abdominal color patterns and male genitalia, was evaluated. Five *Liriomyza* spp. were

found: *Liriomyza brassicae* (Riley, 1884), *L. chinensis* (Kato, 1949), *L. huidobrensis* (Blanchard, 1926), *L. sativae* Blanchard, 1938. and *L. trifolii* (Burgess 1880). Morphological characters of male genitalia should be examined to prevent misidentifications. A key for the discrimination of these five species is provided. Distribution and host plant data were compiled for each species. Four species of leaf miner: *L. brassicae, L. chinensis, L. sativae* and *L. trifolii* are widespread in lowland, except *L. huidobrensis* which can be found only the highlands in the northern part of Thailand. *Liriomyza sativae* has the most diverse range of host plants, being recorded from 21 vegetable crops in Thailand. Further DNA barcode and phylogenetic analysis are needed to clarify the distinction among other species of Agromyzidae present in Thailand and nearby countries.

Keyword: Taxonomy, Distribution and Host Plants of Leafminer Flies

คำนำ

แมลงวันหนอนชอนใบในอดีตจัดเป็นแมลงศัตรูพืชชนิดรอง (minor pests) แต่ปัจจุบันพบว่าแมลงวันหนอนชอนใบได้เข้าทำลายพืชได้มากมายหลากหลายชนิด และสามารถเพิ่มจำนวนประชากรอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังเกิดความต้านทานยาฆ่าแมลงในการเพาะปลูกพืชผัก และไม้ดอกไม้ประดับหลายชนิด (Parrella *et al*., 1985) และพบว่าในปัจจุบันแมลงวันหนอนชอนใบเริ่มเป็นแมลงศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดปัญหาทางการเกษตรขึ้นทั่วโลก จากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบว่ามนุษย์เป็นตัวกลางสำคัญที่ก่อให้เกิดการแพร่กระจายของแมลงวันหนอนชอนใบจากพื้นที่หนึ่งไปยังอีกพื้นที่หนึ่ง (Minkenberg, 1988) และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันมีการค้าขายผลผลิตทางการเกษตรกันอย่างเสรีทั่วโลก และในประเทศไทยนั้นมีการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรของไทยไปสู่ประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในพืชผัก จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าแมลงวันหนอนชอนใบนั้นก่อให้เกิดการกีดกันทางการค้า และเป็นปัญหาสำคัญต่อการส่งออกผลิตผลทางการเกษตร เนื่องจากแมลงวันหนอนชอนใบสามารถเข้าทำลายและก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากให้กับพืชผักหลากหลายชนิด แต่มักพบเข้าทำลายพืชในวงศ์ (Family) Cucurbitaceae ได้แก่ พืชตระกูลแตงชนิดต่าง ๆ (Spencer, 1973) พืชตระกูลถั่ว ในวงศ์ (Family) Leguminosae เช่น ถั่วชนิดต่าง ๆ ในวงศ์ Solanaceae เช่น พืชตระกูลมะเขือ และในวงศ์ Cruciferaceae เช่น กะหล่ำปลี ผักกวางตุ้ง (Stegmaier, 1966) และจากการแพร่กระจายตัวอย่างรวดเร็วของแมลงวันหนอนชอนใบรวมทั้งความหลากหลายของพืชอาหารนั้น ทำให้แมลงวันหนอนชอนใบสามารถสร้างความเสียหาย ส่งผลให้ผลผลิตลดลงและพืชอาจตายได้ในที่สุด ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเร่งทำการศึกษาอนุกรมวิธาน การแพร่กระจายของแมลงวันหนอนชอนใบที่เข้าทำลายพืชผักสวนครัว โดยเฉพาะพืชผักที่มีความสำคัญต่อการส่งออก เพราะข้อมูลชนิด การแพร่กระจาย รวมทั้งพืชอาหารของแมลงวันหนอนชอนใบนั้นสามารถนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่สนับสนุนการศึกษาค้นคว้าวิจัยด้านอื่น ๆ เช่นการพยากรณ์การแพร่ระบาด และการแปรผันของรูปร่างแมลงวันหนอนชอนใบ ซึ่งความรู้ด้านต่าง ๆ เหล่านี้จะเป็นฐานข้อมูลในการวางยุทธศาสตร์ในการบริหารจัดการแมลงวันหนอนชอนใบอย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

ศรีสะเกษนคร

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

- อุปกรณ์และสารเคมีในการเก็บตัวอย่างแมลง เช่น ขวดดอง เอทิลอาซีเตด กล่องพลาสติก และถุงพลาสติก
- อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงแมลงวันหนอนชอนใบ เช่น ทิชชู สำลี และพลาสติกใส่ในกรงผ้า
- กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope
- กล้องถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์
- อุปกรณ์ใช้ในการวาดภาพ
- สารเคมีในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ Canada balsam
- ตู้อบ / เครื่องอุ่นสไลด์
- แผ่นสไลด์แก้ว cover glass และกล่องเก็บสไลด์ถาวร

- วิธีดำเนินการ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae

ทำการสำรวจแปลงเพาะปลูกพืชผักต่าง ๆ ทั่วประเทศ ที่พบลักษณะแมลงวันหนอนชอนใบเข้าทำลาย เก็บรวบรวมตัวอย่างจากพื้นที่ต่าง ๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้) โดยเลือกจังหวัดที่เป็นตัวแทนของพื้นที่ทำการเกษตรของภูมิภาคนั้น ๆ ดังนี้

- ภาคกลาง: จังหวัดกรุงเทพมหานคร นครปฐม สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ราชบุรี และ เพชรบุรี
- ภาคตะวันตก: จังหวัดกาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และตาก
- ภาคเหนือ: จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน และน่าน
- ภาคตะวันออก: จังหวัดจันทบุรี และระยอง
- ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ: จังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น อุดรธานี อุบลราชธานี หนองคาย และมหาสารคาม
- ภาคใต้: จังหวัดสุราษฎร์ธานี ชุมพร ระนอง ตรัง พัทลุง สงขลา นครศรีธรรมราช กระบี่ พังงา และภูเก็ต

โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างจากแปลงพืชผักสวนครัว เช่น แตงกวา ฟักทอง ถั่วฝักยาว บวบ ฟักและอื่น ๆ จากนั้นใส่ถุงหรือกล่องพลาสติก เพื่อให้ระบายอากาศได้ดี บันทึก วันที่ เดือน ปี และสถานที่เก็บ นำกลับมาเลี้ยงยังห้องปฏิบัติการจนเป็นตัวเต็มวัย เก็บรักษาไว้ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีป้ายเล็ก ๆ บอก สถานที่ วันเดือนปี ผู้เก็บ ชื่อพืชที่เก็บ

2. ศึกษาอนุกรมวิธานแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae

2.1 ศึกษาอนุกรมวิธานจากลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก

กรมวิชาการเกษตร

- นำตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบมาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิดจากลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) Leica รุ่น M 165C (Leica Microsystems Ltd, Switzerland) โดยใช้ตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบแต่ละชนิดที่นำมาศึกษาจำนวน 20 ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนในการศึกษาการศึกษาอนุกรมวิธานจากลักษณะสัณฐานภายนอกโดยศึกษาลักษณะสำคัญ เช่น ขนาดความยาว ความกว้างของปีก และอัตราส่วนของเซลล์ปีก และรูปแบบของส่วนท้อง (tergite pattern) โดยการใช้เอกสารประกอบเป็นแนวทางการวินิจฉัยการจำแนกชนิด: New records of *Liriomyza* Mik (Agromyzidae: Diptera) leafminers from Indonesia (Malipatil, *et al*., 2004) และ Workshop on leafminers of vegetables in Southeast Asia (Lim *et al*., 1999) ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

- บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาโดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของแมลงวันหนอนชอนใบแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่พบตัวอย่าง พืชอาหาร และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

- จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) ชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae ที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

2.2 การศึกษาอนุกรมวิธานจากอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia)

แมลงวันหนอนชอนใบบางชนิดที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกคล้ายคลึงกันมาก และยากในการตรวจวินิจฉัยชนิดนั้น ต้องมีการศึกษาอวัยวะเพศผู้ โดยมีวิธีการทำสไลด์ถาวรของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา รูปร่าง และขนาด ด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

- ตัดส่วนท้องของแมลงวันหนอนชอนใบแช่ในน้ำยาโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ผนังส่วนท้องและไขมันที่ไม่ต้องการย่อยสลาย

- นำชิ้นส่วนออกจากน้ำยา แช่ในน้ำกลั่น เขี่ยเอาไขมันและส่วนที่ไม่ใช่อวัยวะเพศออก โดยใช้เข็มแหลมเขี่ยเอาเฉพาะอวัยวะเพศออกมาจากส่วนของท้อง และแช่ในแอลกอฮอล์ (alcohol) 75% และ 95% ตามลำดับนานครั้งละ 5 นาที เพื่อดึงน้ำที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อให้ออกไปจนหมด เนื่องจากหากดึงน้ำออกไม่หมดจะทำให้อวัยวะเพศที่อยู่ในสไลด์หดตัวเมื่อนำไปอบภายใต้อุณหภูมิสูง 40 - 45°C เกิดความเสียหาย ไม่สามารถเก็บรักษาสไลด์ไว้ได้เป็นเวลานาน

- นำส่วนของอวัยวะเพศแช่ในกรดซิทริค (citric acid) ประมาณ 3 นาที

- เขี่ยอวัยวะเพศมาวางบนสไลด์ที่หยดน้ำยา Canada balsam แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์

- นำไปอบให้แห้งเป็นระยะเวลา 2 - 3 สัปดาห์ ในตู้อบอุณหภูมิ 40 - 45°C จึงนำออกมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

- บันทึกรายละเอียดของแผ่นสไลด์ เช่น ชื่อวิทยาศาสตร์แมลงวันหนอนชอนใบ วัน/เดือน/ปี ที่ทำสไลด์ และชื่อผู้ทำสไลด์

2.3 จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของแมลงวันหนอนชอนใบที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

กรมวิชาการเกษตร

2.4 จัดเก็บตัวอย่างที่ได้จากศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง (แมลงวันหนอนชอนใบทุกชนิดที่รายงานไว้ต้องเก็บรักษาตัวอย่างจริงไว้เพื่อการตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง)

3. ศึกษาการแพร่กระจายตัวของแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae

4. ศึกษาพืชอาศัยของแมลงวันหนอนชอนใบแต่ละชนิดวงศ์ Agromyzidae

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : ตุลาคม 2561 - กันยายน 2564

สถานที่ : 1) แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่าง ๆ ในภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคะวันออก ภาคตะวันออก เฉียงเหนือและภาคใต้

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการ-อารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae

จากการสำรวจแมลงวันหนอนชอนใบจากพื้นที่การปลูกผักในภูมิภาคต่าง ๆ ในประเทศไทย (Figure 1.1.23.1) (Table 1.1.23.1) และนำใบพืชผักที่มีลักษณะการเข้าทำลายของแมลงวันหนอนชอนใบมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (Figure 1.1.23.2) เพื่อให้ได้ตัวเต็มวัยมาใช้ในการจำแนกชนิด โดยทำการสำรวจในพืชผักต่าง ๆ จำนวน 34 ชนิด ได้แก่ กวางตุ้ง กวางตุ้งฮ่องเต้ คะน้า ผักกาดขาว ผักกาดเขียว มะเขือเปราะ กระเทียม กุยช่าย หอมแดง หอมใหญ่ มันฝรั่ง กระเจี๊ยบเขียว กะหล่ำดอก จิงจูฉ่าย แตงกวา แตงโม แตงไทย ตำลึง ถั่วฝักยาว ถั่วหวาน ถั่วเหลือง บวบ บวบหอม บวบเหลี่ยม ผักชีฝรั่ง ฟักทอง ฟักทองญี่ปุ่น ฟักทองบัตเตอร์นัท มะเขือม่วง มะเขือเทศ มะเขือเทศสีดา ขึ้นฉ่าย และโหระพา

2. การศึกษาอนุกรมวิธานแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae

2.1 การศึกษาอนุกรมวิธานจากลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก

จากการนำตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบมาตรวจจำแนกชนิดด้วยจากลักษณะสัณฐานภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบลักษณะแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae (Figure 1.1.23.3) มีลักณะดังนี้

ความยาวของลำตัว : ระยะตัวเต็มวัยเป็นแมลงวันขนาดเล็กมีขนาดลำตัวยาว 1-3 มิลลิเมตร

ความกว้างของลำตัว : 1.4 – 1.5 มิลลิเมตร

ส่วนหัว : มีตาเดี่ยว (ocellus) ขนาดเล็ก 3 ตา เรียงเป็นรูปสามเหลี่ยม (ocellar triangle) ที่บริเวณกลางหน้าผาก (vertex) มีขนที่บริเวณด้านหลังของตาเดี่ยว (postvertical bristle) ที่มุมฐานของรูปสามเหลี่ยม 1 คู่

กรมวิชาการเกษตร

โดยปลายขนแยกห่างจากกัน และอีก 1 คู่ ที่บริเวณยอดของรูปสามเหลี่ยม (ocellar bristle) บริเวณหน้า (fron) มีเส้นตะเข็บส่วนหน้า (frontal suture) เป็นรูปตัวยูหัวกลับ มีขนแข็งสั้นที่ด้านข้างของปีก (oval vibrissae) 1 คู่ หนวดมี 3 ปล้อง ปล้องที่ 3 มีขนแข็ง (arista) 1 เส้น

ส่วนอก: แผ่นสามเหลี่ยมสันหลังอก (scutellum) ที่บริเวณส่วนปลายมีขน(apical bristle) 2 เส้น และมีอีก 2 เส้นที่บริเวณด้านข้างของส่วนฐาน (lateral bristle) มีขนจำนวนมากบนส่วนหัวและลำตัว ส่วนท้องมี 6 ปล้อง ปีกมีเส้นใต้ขอบปีก (sub costa หรือ Sc) ไม่สมบูรณ์โดยปลายเส้นไม่รวมกับฐาน ของเส้นรัศมี (radius) แต่อยู่ติดกับเส้นรัศมี เส้นขอบปีก (costa) ขาดที่บริเวณใกล้กับส่วนปลายของ เส้นรัศมี 1 (R1) เส้นกลางปีก1+2 (M1+2) ยาวไปสิ้นสุดที่ส่วนปลายสุดของปีก

แนวทางวินิจฉัย (key) ชนิดแมลงวันหนอนชอนใบตัวเต็มวัยวงศ์ Agromyzidae

(Morphological identification of adult leaf miner flies Key)

1. Scutellum largely black, sometimes brownish or greyish, never yellow. First antennal flagellomere angulate dorsoapically; mesoscutum grayish-black; head largely yellow (host plant: *Allium* spp.).....(*L. chinensis*)

- Scutellum distinctly yellow, at least centrally. First antennal flagellomere round; mesoscutum partly and scutellum largely (bright yellow).....2

2. Mesonotum (presctum and scutum) shiny. Femora yellow, without dark striations 3

- Mesonotum (presctum and scutum) not shiny. Femora yellow, with dark striations 4

3. Fron and vertex of head yellow brown .under inner and outer vertical bristles standing on black ground; shining black mesonotum]. Anepisternum predominantly yellow, with dark area along ventral margin in variable length..... *.L. sativae*

- Fron and vertex of head yellow brown under inner and outer vertical bristles standing on yellow ground. Anepisternum with dark area filling ventral third .....*L. brassicae*

4. Vertex of head yellow under outer vertical bristles. Inner setae standing on yellow ground; presctum and scutum black with grey bloom.....*L. trifolii*

- Vertex of head black under outer vertical bristles. Inner setae standing usually standing on dark ground (yellow mixed with black); presctum and scutum shiny black ..... *L. huidobrensis*

กรมวิชาการเกษตร

1. *Liriomyza brassicae* (Riley,1884)

(Figure 1.1.23.4 และ 1.1.23.5)

ชื่ออื่น (synonym) *Oscinis brassicae* Riley,1884

Oscinis brassicae Riley 1885

Liriomyza cruciferarum Hering 1927

Phytomyza mitis Curran 1931

Liriomyza hawaiiensis Frick 1952

Liriomyza bulnesiae Spencer 1963

Liriomyza ornephila Garg 1971

ชื่อสามัญ (common name): cabbage leaf miner, cabbage serpentine leaf miner, serpentine leaf miner และ north American cabbage leaf miner

ความยาวปีก (wing length): 1.25 - 1.7 mm

รูปร่างลักษณะ

ส่วนหัว: หน้ามีสีเหลืองอมน้ำตาลและมีสีดำบริเวณมุม บริเวณหลังตารวมมีสีดำ กระหม่อมบริเวณด้านข้างมีสีเหลืองอมน้ำตาล มีขนบนกระหม่อมอยู่ติดกับด้านข้างของตารวมที่ตาซ้าย 1 คู่และตาขวา 1 คู่ โดยขนบนกระหม่อมแต่ละคู่จะตั้งอยู่ทางด้านนอก 1 เส้นและอยู่ทางด้าน ใน 1 เส้น ซึ่งขนบนกระหม่อมเส้นนอก และขนบนกระหม่อมเส้นในอยู่บนพื้นสีเหลืองอมน้ำตาล หนวดปล้องที่ 3 มีขนาดเล็กสีเหลือง ส่วนยอดของปล้องมีลักษณะกลม

ส่วนอก: สันหลังอกปล้องที่สอง (mesonotum) มีสีดำมันวาว และมีขนสั้นเรียงเป็นแถวที่กลางปล้องระหว่างแถวของขนด้านสันหลัง แผ่นสามเหลี่ยมสันหลังอกมีสีเหลืองใส ปล้องฐานขา (coxa) และต้นขา (femur) มีสีเหลืองออกน้ำตาลอ่อน ส่วนหน้าแข้ง (tibia) และฝ่าเท้า (tarsi) มีสีน้ำตาลดำ ปีกมี discal cell เล็ก มี anal cell เส้นขอบปีกสิ้นสุดที่ปลายของเส้นกลางปีก1+2

ส่วนท้อง: มี 6 ปล้อง แผ่นแข็งที่ด้านหลังของปล้องท้องมีสีดำมันวาว โดยปล้องท้องแต่ละปล้องมีสีเหลืองบริเวณขอบ ยกเว้นปล้องท้องที่ 2 ที่มีร่องสีเหลืองตรงกลางปล้อง

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา: EMBT.LM 0101 – EMBT.LM 0120 (20 ตัวอย่าง)

*แมลงวันหนอนชอนใบชนิดนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *L. sativae* และ *L. bryoniae* (Spencer, 1981) แต่รูปร่างของ Distiphallus นั้นมีความแตกต่างจากแมลงวันหนอนชอนใบชนิดอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด

2. *Liriomyza chinensis* (Kato, 1949)

(Figure 1.1.23.6 และ 1.1.23.7)

ชื่ออื่น (synonym) *Liriomyza chinensis* (Kato 1949)

Dizygomyza cepae ssp. *chinensis* Kato 1949

Liriomyza chinensis (Kato 1949) *comb.* and *stat. nov.* Spencer (1973)

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ชื่อสามัญ (common name): onion leaf miner และ stone leek leafminer

ความยาวปีก (wing length): 1.3 - 2.0 mm

รูปร่างลักษณะ

ส่วนหัว: หน้ามีสีเหลือง บริเวณหลังตารวมมีสีเหลือง กระหม่อมบริเวณด้านข้างมีสีเหลือง มีขนบนกระหม่อมอยู่ติดกับด้านข้างของตารวมที่ตาซ้าย 1 คู่ และตาขวา 1 คู่ โดยขนบนกระหม่อม แต่ละคู่จะตั้งอยู่ทางด้าน นอก 1 เส้นและอยู่ทางด้าน ใน 1 เส้น ซึ่งขนบนกระหม่อมเส้นนอกตั้งอยู่ บนพื้นสีดำขนาดเล็ก และขนบนกระหม่อมเส้นในตั้งอยู่บนพื้นสีเหลือง หนวดปล้องที่ 3 มีขนาดเล็กสีเหลืองส่วนยอดของปล้องมีลักษณะเป็นมุม (angulate) เส้นขน arista มีสีน้ำตาล

ส่วนอก: สันหลังอกปล้องที่สอง (mesonotum) มีสีเทาดำไม่มันวาว และมีขนสั้นเรียงเป็นแถวที่กลางปล้องระหว่างแถวของขนด้านสันหลัง แผ่นสามเหลี่ยมสันหลังอก (scutellum) มีสีเทาดำ ขาส่วนของปล้องฐานขา (coxa) และต้นขา (femur) มีสีเหลืองใส หน้าแข้ง (tibia) และฝ่าเท้า (tarsi) มีสีน้ำตาลดำ ปีกมี discal cell ขนาดเล็ก มี anal cell เส้น ขอบปีกสิ้นสุดที่ปลายของเส้นกลางปีก 1+2

ส่วนท้อง: มี 6 ปล้อง มีสีเทาดำ และมีสีเหลืองบริเวณมุมส่วนท้อง

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา: EMBT.LM 0201 – EMBT.LM 0220 (20 ตัวอย่าง)

3. *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard, 1926)

(Figure 1.1.23.8 และ 1.1.23.9)

ชื่ออื่น (synonym) *Liriomyza orbona* Meigen 1830

Agromyza huidobrensis Blanchard 1926

Liriomyza cucumifoliae Blanchard 1938

Liriomyza langei Frick 1951

Liriomyza decora Blanchard 1954

Liriomyza dianthi Frick 1958

ชื่อสามัญ (common name): serpentine leafminer, pea leafminer, South American leafminer และ potato leafminer fly

ความยาวปีก (wing length): 1.7 - 2.3 mm

รูปร่างลักษณะ ตัวสีเทาดำ และมีรูปร่างอ้วนป้อม

ส่วนหัว: หน้ามีสีเหลืองส้ม บริเวณหลังตารวมมีสีดำ กระหม่อมบริเวณด้านข้างมีสีเหลือง มีขนบนกระหม่อมอยู่ติดกับด้านข้างของตารวมที่ตาซ้าย 1 คู่และตาขวา 1 คู่ โดยขนบนกระหม่อม แต่ละคู่จะตั้งอยู่ทางด้านนอก 1 เส้นและอยู่ทางด้าน ใน 1 เส้น ซึ่งขนบนกระหม่อมเส้นนอกและขนบนกระหม่อมเส้นในตั้งอยู่บนพื้นสีดำ หนวดปล้องที่ 3 ขยายใหญ่ และบริเวณปลายหนวดปล้องที่สามมีสีเข้มมากบางครั้งเกือบเป็นสีดำ

สำนักวิชาการเกษตร

ส่วนอก: สันหลังอกปล้องที่สอง (mesonotum) มีสีดำด้าน ไม่มันวาว และมีขนสั้นเรียงเป็นแถวที่กลางปล้อง scutellum สีเหลืองสดใส Anepisternum มีสีเหลือง ขาหลัง บริเวณ femur มีสีเหลือง หรือเหลืองเข้ม และมีเส้นสีดำพาด

แถวของขนด้านสันหลังแผ่นสามเหลี่ยมสันหลังอกมีสีเหลืองใสที่บริเวณด้านข้างทั้งสองข้างมีแถบใหญ่สีดำ ปล้องฐานขามีสีดำอมสีเหลือง ต้นขามีสีเหลืองและมีแถบลายสีน้ำตาลดำ หน้าแข้งและ ฝ่าเท้ามีสีดำ ปีกมี discal cell ขนาดใหญ่ มี anal cell เส้นขอบปีกสิ้นสุดที่ปลายของเส้นกลางปีก 1+2

ส่วนท้อง: มี 6 ปล้อง แผ่นแข็งที่ด้านหลังของปล้องท้องมีสีน้ำตาลอมดำ Tergite ปล้องที่ 2 แยกออกจากกัน

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา: EMBT.LM 0301 – EMBT.LM 0320 (20 ตัวอย่าง)

4. *Liriomyza sativae* Blanchard, 1938

(Figure 1.1.23.10 และ 1.1.23.11)

ชื่ออื่น (synonym) *Liriomyza sativae* Blanchard 1938

Agromyza subpusilla Frost 1943

Liriomyza verbenicola Hering 1951

Liriomyza pullata Frick 1952

Liriomyza canomarginis Frick 1952

Liriomyza minutiseta Frick 1952

Liriomyza propepusilla Frost 1954

Liriomyza munda Frick 1957

Liriomyza guytona Freeman 1958

Lemurimyza lycopersicae Pla & de la Cruz 1981

ชื่อสามัญ (common name) vegetable leafminer, American leafminer, chrysanthemum leafminer, serpentine vegetable leafminer และ melon leafminer

ความยาวปีก (wing length): 1.25) - 1.9 mm

รูปร่างลักษณะ

ส่วนหัว: หน้ามีสีเหลือง orbit สีเหลืองและมีริ้วสีน้ำตาลเล็กน้อย บริเวณด้านหลังตารวมเป็นสีดำ กระหม่อมบริเวณด้านข้างมีสีเหลือง มีขนบนกระหม่อมอยู่ติดกับด้านข้างของตารวมที่ตาซ้าย 1 คู่ และตาขวา 1 คู่ โดยขนบนกระหม่อมเส้นนอก (outer vertical bristle) ตั้งอยู่บนพื้นสีดำ และขนบนกระหม่อมเส้นใน (inner vertical bristle) อยู่บนพื้นสีเหลือง หนวดปล้องที่ 3 มีขนาดเล็กสีเหลืองใส ส่วนปลายปล้องมีลักษณะกลม

ส่วนอก: สันหลังอกปล้องที่สอง (mesonotum) มีสีดำ ลักษณะเป็นมันวาว และมีขนสั้นเรียงเป็นแถวที่ กลางปล้องระหว่าง แถวของขนด้านสันหลัง แผ่นสามเหลี่ยมสันหลังอกมีสีเหลืองใสยกเว้นด้านข้าง บริเวณส่วนฐานมีจุดสีน้ำตาลข้างละจุด Anepisternum มีสีเหลืองและมีบางส่วนเป็นสีทึบซึ่งมีแถบเล็ก ๆ บริเวณขอบด้านล่าง

สำนักวิชาการเกษตร

ขามีสีเหลืองใส ส่วนหน้าแข้งและฝ่าเท้ามีสีน้ำตาล ปีก มี discal cell เล็ก มี anal cell เส้นขอบปีกสิ้นสุดที่ปลายของเส้นกลางปีก 1+2 (M 1+2)

ส่วนท้อง: มี 6 ปล้อง แผ่นแข็งด้านบนของปล้องท้องมีสีดำ Tergite ปล้องที่ 2 แยกออกจากกัน

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา: EMBT.LM 0401 – EMBT.LM 0420 (20 ตัวอย่าง)

5. *Liriomyza trifolii* (Burgess 1880)

(Figure 1.1.23.12 และ 1.1.23.13)

Oscinis trifolii Burgess 1880

Agromyza phaseolunulata Frost 1943

Liriomyza alliovora Frick 1955

ชื่อสามัญ (Common name): American serpentine leafminer, serpentine leafminer, broad bean leafminer, Californian leafminer, celery leafminer และ chrysanthemum leaf miner

ความยาวปีก (wing length): 1.2 - 1.8 mm

รูปร่างลักษณะ

ส่วนหัว: หน้ามีสีเหลือง บริเวณมุมด้านหลังตารวมเป็นสีเหลืองอ่อนและมีแถบสีน้ำตาลเป็นริ้ว และตรงกลางมีสีเข้มขึ้น กระหม่อมบริเวณด้านข้างมีสีเหลือง มีขนบนกระหม่อมอยู่ติดกับด้านข้างของตารวมที่ตาซ้าย 1 คู่ และตาขวา 1 คู่ โดยขนบนกระหม่อม แต่ละคู่จะตั้งอยู่ทางด้าน นอก 1 เส้น และอยู่ทางด้านใน 1 เส้น ซึ่งขนบนกระหม่อมเส้นนอก (outer vertical bristle) และขนบนกระหม่อมเส้นใน (inner vertical bristle) อยู่บนพื้นสีเหลือง หนวดปล้องที่ 3 มีขนาดเล็กสีเหลืองอมน้ำตาล ส่วนยอดของปล้องมีลักษณะกลม

ส่วนอก: สันหลังอกปล้องที่สอง (mesonotum) มีสีดำด้านและเทาเข้ม และมีขนสั้นเรียงเป็นแถวที่ กลางปล้องระหว่าง แถวของขนด้านสันหลัง แผ่นสามเหลี่ยมสันหลังอกมีสีเหลืองใสยกเว้นด้านข้าง บริเวณส่วนฐานมีจุดสีน้ำตาลข้างละจุด ขามีสีเหลืองใส โดย coxa มีสีเหลือง femora ส่วนใหญ่มีสีเหลือง แต่บางตัวอย่างมีแถบสีน้ำตาลเล็กน้อย tibia และ tarsi จะมีสีน้ำตาลเข้ม ปีก มี discal cell เล็ก มี anal cell เส้นขอบปีกสิ้นสุดที่ปลายของเส้นกลางปีก 1+2 (M 1+2) Anepisternum มีสีเหลืองมีจุดสีดำบริเวณขอบด้านล่าง

ส่วนท้อง: มี 6 ปล้อง แผ่นแข็งที่ด้านหลังของปล้องท้องมีสีดำ

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา: EMBT.LM 0501 – EMBT.LM 0520 (20 ตัวอย่าง)

*สัณฐานภายนอกคล้ายกับ *L. katoi* และ *L. yasumatsui* จำเป็นต้องมีการศึกษาอวัยวะเพศของเพศผู้ (Malipatil *et al*., 2004 และ Shiao, 2004)

ถึงแม้ Sasakawa (2013) นั้นสำรวจแมลงวันหนอนชอนใบในป่าไม้ในประเทศไทย พบแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae จำนวน 10 สกุล 28 ชนิด แต่จากการศึกษาครั้งนี้ทำการสำรวจพบแมลงวันหนอนชอนใบที่เข้าทำลายพืชผักที่มีความสำคัญทางการเกษตรนั้นพบเฉพาะสกุล *Liriomyza* จำนวน 5 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับ Shiao (2004) ที่รายงานว่าแมลงวันหนอนชอนใบสกุล *Liriomyza* ที่มีความสำคัญต่องานด้านกักกันพืชในประเทศ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ไต้หวันนั้น มีจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Liriomyza brassicae*, *L. bryoniae, L. chinensis, L. huidobrensis, L. sativae* และ *L. trifolii* แต่ Sasakawa (2013) รายงานว่า สำรวจพบแมลงวันหนอนชอนใบสกุล *Liriomyza* ในประเทศไทย 5 ชนิด ได้แก่ *Liriomyza brassicae L. chinensis, L. sativae, L. compositella* และ *L. subpusilla* แต่ *L. compositella* และ *L. subpusilla* นั้น เข้าทำลายพืชในตระกูล Asteraceae ซึ่งเป็นกลุ่มไม้ดอกและไม้ประดับ

อัตราส่วนของเส้นปีกแมลงวันหนอนชอนใบที่ใช้ประกอบการจำแนกชนิด

การจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบพบว่า ความยาวและความกว้างของปีก ในแมลงวันหนอนชอนใบมีความใกล้เคียงกัน ดังนี้ *L. brassicae, L. sativae* และ *L. triflolii* มีความยาวปีก 1.45, 1.42 และ 1.44 มิลลิเมตร และ มี ความกว้างปีก 0.62, 0.60 และ 0.60 (Figure 1.1.23.15) (Table 1.1.23.2) และศึกษาอัตราส่วนของเส้นปีกบริเวณ Last section of vein CuA1 (A) ต่อ Penultimate section of vein (B) ของปีก (Figure 1.1.23.16) โดยพบว่าอัตราส่วนรูปแบบปีกคำนวณจากความยาว (A) หารด้วยส่วน penultimate section (B) พบว่ามีความแตกต่างกัน (Figure 1.1.23.16 และ Table 1.1.23.2) ดังนี้

L. brassicae นั้น a เป็น 2.99 เท่า ของ b (Figure 1.1.23.16A)

L. chinensis นั้น a เป็น 3.13 เท่า ของ b (Figure 1.1.23.16B)

L. huidobrensis นั้น a เป็น 2.31 เท่า ของ b (Figure 1.1.23.16C)

L. sativae นั้น a เป็น 3.32 เท่า ของ b (Figure 1.1.23.16D)

L. triflolii นั้น a เป็น 3.23 เท่า ของ b (Figure 1.1.23.16E)

การศึกษาอัตราส่วนของเส้นปีกบริเวณส่วน Last section of vein CuA1 (A) ต่อ Penultimate section of vein (B) ของปีก พบว่าอัตราส่วนของเส้นปีก *L. huidobrensis* นั้น แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับแมลงวันหนอนชอนใบชนิดอื่น ๆ นอกจากนั้นพบว่ามีตัวอย่าง *L. trifolii* หลาย ๆ ตัวอย่างนั้น เส้น dm-cu cross veins นั้นหายไป

ลักษณะรูปแบบของส่วนท้อง (abdomen pattern)

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษารูปแบบปล้องท้องด้านบน (tergites) ของแมลงวันหนอนชอนใบ จากลักษณะของรูปแบบของแถบสีเหลืองตรงกลางด้านบนของท้องปล้องที่ 5 (Tergite 5) (Figure 1.1.23.17 – 1.1.23.18) ใช้เป็นส่วนประกอบในการจำแนกชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบทั้ง 5 ชนิด โดยพบว่ารูปแบบของปล้องท้องด้านบน สามารถแบ่งออกได้ดังนี้

1. กลุ่มแมลงวันหนอนชอนใบที่พบร่องสีเหลืองตรงกลางบริเวณด้านบนของปล้องท้องปล้องที่ 2 ซึ่งได้แก่ *L. brassicae, L. huidobrensis,* และ *L. sativae* (Figure 1.1.23.17A, C และ E, 1.1.23.18A, C และ E)
2. กลุ่มแมลงวันหนอนชอนใบที่พบร่องสีเหลืองตรงกลางบริเวณปล้องท้องด้านบนปล้องที่ 2 และยาวลงมา ได้แก่ *L. trifolii* (Figure 1.1.23.17E และ 1.1.23.18E)

กรมวิชาการเกษตร

3. กลุ่มแมลงวันหนอนชอนใบที่พบร่องสีเหลืองตรงกลางบริเวณปล้องท้อง ได้แก่ *L. chinensis* (Figure 1.1.23.17B และ 1.1.23.18B)

การศึกษาครั้งนี้สามารถใช้รูปแบบของด้านบนของปล้องท้องปล้องที่ 5 ประกอบการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบ ซึ่งสอดกล้องกับ Sasakawa (1960, 1961) ที่ได้ศึกษารูปแบบของสีบริเวณส่วนท้องของแมลงวันหนอนชอนใบ และการบรรยายลักษณะจากบริเวณด้านข้างและส่วนปลายท้อง แต่ไม่มีการวาดภาพหรือบรรยายลักษณะสัณฐานโดยละเอียด ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นครั้งแรกที่ใช้การถ่ายภาพ และวาดภาพรูปแบบด้านบนของปล้องท้องปล้องที่ 5 ซึ่งพบว่าแมลงวันหนอนชอนใบทั้ง 5 ชนิด นั้นมีรูปแบบของปล้องท้องด้านบนที่แตกต่างกันออกไป แต่ *L. trifolii* นั้นมีลักษณะแปลกแตกต่างจากแมลงวันหนอนชอนใบชนิดอื่น ๆ ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับ Shiao (2004) ที่ได้ทำการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบในปะเทศไต้หวันจากการศึกษาลักษณะรูปแบบของส่วนท้อง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ารูปแบบของส่วนท้องนี้เป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถนำมาใช้ประกอบการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบได้

2.2 การศึกษาอนุกรมวิธานจากอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia)

ปัจจุบันการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบในสกุล *Liriomyza* spp. พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกนั้นมีข้อจำกัดมากมาย จึงได้มีการนำเอาลักษณะทางสัณฐานของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia) มาช่วยในการจำแนกชนิด ซึ่งประกอบด้วย epandrium, aedeagal apodeme, aedeagal และ distiphallus มาใช้ในการจำแนกชนิด (Figure 19) และส่วนของ distiphallus (aedeagus) นั้นเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบได้ดีที่สุด สามารถจัดทำแนวทางวินิจฉัยการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบด้วยอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ดังนี้

แนวทางวินิจฉัยการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบด้วยอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้

(Diagnostic key for identification of *Liriomyza* spp. using the male distiphallus)

1. With one distal bulb 2

- With a pair of distal bulbs, the distiphallus is paired and sac-shaped as seen from the ventral side. ..... *L. huidobrensis*

2. The distiphallus is stronger pigmented..... 3

- The distiphallus is pale pigmented..... 4

3. The distiphallus seems constricted at the midlength (barrel shaped) .....*L. brassicae*

- Aedeagus with distiphallus enlarged.....*L. chinensis*

ศูนย์วิทยทรัพยากร

4. With marked constriction between the apical and basal parts of the bulb: basal section strongly curved. The distiphallus is distinctly constricted apically, the neck behind adjoining and relatively long, a little shorter than the distiphallus proper.....*L. trifolii*

- With slight constriction only between the apical and basal parts of the bulb: basal section not strongly curved. The distiphallus with slight constriction between lower and upper halves .....*L. sativae*

ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของแมลงวันหนอนชอนใบชนิดต่าง ๆ

การศึกษาครั้งนี้ใช้อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ โดยเฉพาะรูปร่างและลักษณะของ distipallus ในการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบ ซึ่งพบลักษณะแตกต่างกันดังนี้

- แมลงวันหนอนชอนใบ *L. brassicae* ลักษณะของ distiphallus มี distal bulb 1 อัน และมีลักษณะคล้ายถังรูปทรงกระบอกมีสีเข้ม มีลักษณะคอดตรงกลาง (Figure 1.1.23.20)

- แมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* ลักษณะของ distiphallus มี distal bulb 1 อัน มีขนาดใหญ่สีเข้ม ลักษณะเหมือนกลีบดอกไม้ซ้อนกัน แตกต่างจากแมลงวันหนอนชอนใบชนิดอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด (Figure 1.1.23.21)

- แมลงวันหนอนชอนใบ *L. huidobrensis* ลักษณะของ distiphallus มี distal bulb 2 อัน แตกต่างแมลงวันหนอนชอนใบชนิดอื่น ๆ ที่มีเพียงหนึ่งอัน และ distiphallus มีลักษณะคล้ายถุงน้ำ (Figure 1.1.23.22)

- แมลงวันหนอนชอนใบ *L. sativae* ลักษณะของ distiphallus มี distal bulb หนึ่งอัน มีการหดตัวเล็กน้อยระหว่างส่วนปลายและส่วนฐานของกระเปาะ (Figure 1.1.23.23)

- แมลงวันหนอนชอนใบ *L. trifolii* ลักษณะของ distiphallus มี distal bulb หนึ่งอัน มีลักษณะโค้งมนและตีบคอดอย่างชัดเจน (Figure 1.1.23.24)

การศึกษาครั้งนี้สามารถใช้อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ โดยเฉพาะจำนวน และลักษณะรูปร่างของ distipallus มาประกอบการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบ เช่นเดียวกับ Spencer (1973); Shiao, (2004) ที่ใช้ลักษณะของ distipallus ในการตรวจวินิจฉัยชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบสกุล *Liriomyza* โดยพบว่าแมลงวันหนอนชอนใบ 2 ชนิด คือ *L. trifolii* และ *L. sativae* มีลักษณะรูปร่างของของ distipallus ที่คล้ายคลึงกันมาก แต่พบว่า *L. sativae* มี distipallus ที่มีขนาดใหญ่กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ *L. trifolii* ซึ่งมีขนาดเล็ก และบริเวณแผ่นแข็ง (sclerotization) ของ distipallus มีความแตกต่างกัน โดย phallus ของ *L. sativae* นั้นมีลักษณะคอดเว้าเข้ามา (Figure 1.1.23.23) ในขณะที่ *L. trifolii* นั้นโค้งมน (Figure 24)

กรมวิชาการเกษตร

3. ศึกษาการแพร่กระจายของแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae

จากการศึกษาเขตการแพร่กระจายของแมลงวันหนอนชอนใบทั้ง 5 ชนิด (Figure 1.1.23.25 – 1.1.23.26) พบแมลงวันหนอนชอนใบแพร่กระจายในพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย ดังนี้

- แมลงวันหนอนชอนใบ *L. brassicae* เข้าทำลายพืชผักในพื้นที่ กรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี ชลบุรี เชียงใหม่ นนทบุรี พระนครศรีอยุธยา เพชรบุรี ยโสธร ศรีสะเกษ และอ่างทอง
- แมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* เข้าทำลายพืชในพื้นที่ กาญจนบุรี เชียงใหม่ นครปฐม เพชรบูรณ์ ยโสธร และศรีสะเกษ
- แมลงวันหนอนชอนใบ *L. huidobrensis* เข้าทำลายพืชในพื้นที่ เชียงใหม่
- แมลงวันหนอนชอนใบ *L. sativae* เข้าทำลายพืชในพื้นที่ กรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี ขอนแก่น จันทบุรี ชุมพร เชียงใหม่ ตาก นครปฐม นครศรีธรรมราช ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี แพร่ ราชบุรี ลำพูน สระแก้ว สุพรรณบุรี สุรินทร์ ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี
- แมลงวันหนอนชอนใบ *L. trifolii* เข้าทำลายพืชในพื้นที่ เชียงใหม่ และนครปฐม

จากการศึกษาการแพร่กระจายตัวของแมลงวันหนอนชอนใบทั้ง 5 ชนิด พบว่า แมลงวันหนอนชอนใบ *L. brassicae*, *L. chinensis, L. sativae* และ *L. trifolii* นั้น พบกระจายทั่วไปในพื้นที่ราบ ในภูมิภาคต่าง ๆ ของไทย แต่พบว่า *L. huidobrensis* เป็นศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการทำการเกษตรในพื้นที่สูงทางภาคเหนือเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับ Rauf *et al*., (2000) ที่รายงานว่า *L. huidobrensis* นั้น เป็นศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับการทำการเกษตรในพื้นที่สูงในประเทศอินโดนีเซีย

4. ศึกษาพืชอาศัยของแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae

จากการสำรวจแมลงวันหนอนชอนใบที่เข้าทำลายพืชผัก พบแมลงวันหนอนชอนใบเข้าทำลายพืชมากมายหลากหลายชนิด (Table 1.1.23.2) ดังนี้

- แมลงวันหนอนชอน *L. brassicae* เข้าทำลายพืชผักได้ 6 ชนิด ได้แก่ กวางตุ้ง กวางตุ้งฮ่องเต้ คะน้า ผักกาดขาว ผักกาดเขียว และมะเขือเปราะ
- แมลงวันหนอนชอน *L. chinensis* เข้าทำลายพืชผักได้ 4 ชนิด ได้แก่ กระเทียม กุยช่าย หอมแดง และหอมใหญ่
- แมลงวันหนอนชอน *L. huidobrensis* เข้าทำลายพืชผักได้ 1 ชนิด ได้แก่ มันฝรั่ง
- แมลงวันหนอนชอน *L. sativae* เข้าทำลายพืชผักได้ 21 ได้แก่ กระเจี๊ยบเขียว กะหล่ำดอก จิงจูฉ่าย แตงกวา แตงโม แตงไทย ตำลึง ถั่วฝักยาว ถั่วหวาน ถั่วเหลือง บวบ บวบหอม บวบเหลี่ยม ผักชีฝรั่ง ฟักทอง ฟักทองญี่ปุ่น ฟักทองบัตเตอร์นัท มะเขือม่วง มะเขือเทศ มะเขือเทศสีดา และโหระพา
- แมลงวันหนอนชอน *L. trifolii* เข้าทำลายพืชได้ 3 ชนิด ได้แก่ ขึ้นฉ่าย มะเขือเทศ และโหระพา

กรมวิชาการเกษตร

การศึกษาครั้งนี้พบแมลงวันหนอนชอนใบ 5 ชนิด เข้าทำลายพืชผักมากมายหลายชนิด ซึ่งสอดคล้องกับ Spencer (1973) ที่รายงานว่า *L. huidobrensis*, *L. sativae* และ *L. trifolii* นั้น เข้าทำลายพืชได้มากมายหลากหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชผักและไม้ดอก และสอดคล้องกับกอบเกียรติและอัมพร (2544) ที่รายงานว่าแมลงวันหนอนชอนใบสกุล *Liriomyza* จัดเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เป็นปัญหาทั้งในพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับมาตั้งแต่ปี 2529 พบการระบาดเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจ จำพวกพืชผักและไม้ดอกได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย พบทำลายพืชเศรษฐกิจมากมาย เช่น พืชผัก ตระกูลแตง ตระกูลกะหล่ำ พืชตระกูลถั่ว ไม้ดอก เช่น เยอบีร่า แอสเตอร์ กุหลาบ ดาวเรือง เบญจมาศ เป็นต้น ซึ่งพืชในกลุ่มนี้เป็นพืชผักที่มีระยะการเพาะปลูกสั้น และสามารถปลูกได้ทั้งปี ดังนั้นแมลงวันหนอนชอนใบจึงเป็นศัตรูพืชที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างยิ่ง และการศึกษาครั้งนี้พบว่าแมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* มีความเจาะจงกับพืชอาหาร (host specific) โดยพบว่า เข้าทำลายเฉพาะพืชในสกุล *Allium* spp. ซึ่งได้แก่ หอมและกระเทียม สอดคล้องกับ Sasakawa (2013) ที่ทำการสำรวจพบ *L. chinensis* จากพืชสกุล *Allium* spp. เท่านั้น และ *L. brassicae* นั้นเข้าทำลายพืชผักในวงศ์ Brassicae, Capparidaceae แต่พบว่า *L. sativae* เข้าทำลายพืชผักสวนครัวหลากหลายมากที่สุด เช่นเดียวกับ Bhuiya *et al*., (2010) พบว่า *L. sativae* ในประเทศบังคลาเทศ พบทำลายพืชผักมากกว่า 45 ชนิด

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการสำรวจแมลงวันหนอนชอนใบจากพื้นที่การปลูกผักจากภูมิภาคต่าง ๆ ในประเทศไทย และศึกษาด้านอนุกรมวิธานแมลง อัตราส่วนของเส้นปีก ลักษณะรูปแบบของส่วนท้อง และอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ โดยเฉพาะส่วนของ distiphallus (หรือ aedeagus) นั้นเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบได้ดีที่สุดและสามารถจัดทำแนวทางวินิจฉัยการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบที่ทำลายพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Liriomyza brassicae*, *L. chinensis, L. huidobrensis, L. sativae* และ *L. trifolii* นอกจากนี้การเตรียมสไลด์อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้นั้นทำได้ยากต้องอาศัยความชำนาญ และในการศึกษาความแตกต่างของ distiphallus ของแมลงวันหนอนชอนใบแต่ละชนิดมีความละเอียดอ่อน ต้องใช้ประสบการณ์ และความชำนาญอย่างยิ่งในการตรวจสอบอย่างรอบคอบ ดังนั้นลักษณะของ distiphallus ที่แตกต่างกันควรนำมาประกอบการวินิจฉัยร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกอื่น ๆ เพื่อให้แน่ใจว่าการจำแนกชนิดนั้นถูกต้อง และจากการศึกษาเขตการแพร่กระจายและพืชอาหารของแมลงวันหนอนชอนใบทั้ง 5 ชนิด พบว่า *Liriomyza brassicae*, *L. chinensis, L. sativae* และ *L. trifolii* นั้นเข้าทำลายพืชผักในภูมิภาคต่าง ๆ ของไทย แต่ *L. huidobrensis* ก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชผักในพื้นที่สูงทางภาคเหนือเท่านั้น แต่การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาชนิดแมลงวันหนอนชอนใบที่เข้าทำลายพืชผักเศรษฐกิจเพียงเท่านั้น ดังนั้นจึงควรมีการสำรวจเพิ่มเติมชนิดแมลงวันหนอนชอนใบที่เข้าทำลายสร้างความเสียหายให้กับไม้ดอกและไม้ประดับในอนาคตอีกด้วย

ศรีวิชาการเกษตร

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. แก้ไขปัญหาการขาดแคลนบุคลากรที่มีความชำนาญหรือประสบการณ์ในการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบ เนื่องจากแนวทางวินิจฉัย คำบรรยายและภาพประกอบนั้นสามารถใช้ง่าย

2. ก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งในงานด้านการกักกันพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำเข้าและส่งออกผักผลไม้ของประเทศไทย

3. สามรถเพิ่มความเชื่อมั่นและสร้างความน่าเชื่อถือในการเจรจาต่อรองเพื่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรของไทยไปสู่ตลาดโลก เกิดการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทย ส่งผลในองค์รวมต่อความเป็นอยู่ที่ดีขึ้นของประชาชนชาวไทย

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.23.1 Samples of Agromyzid leafminer collected from host plants in Thailand.

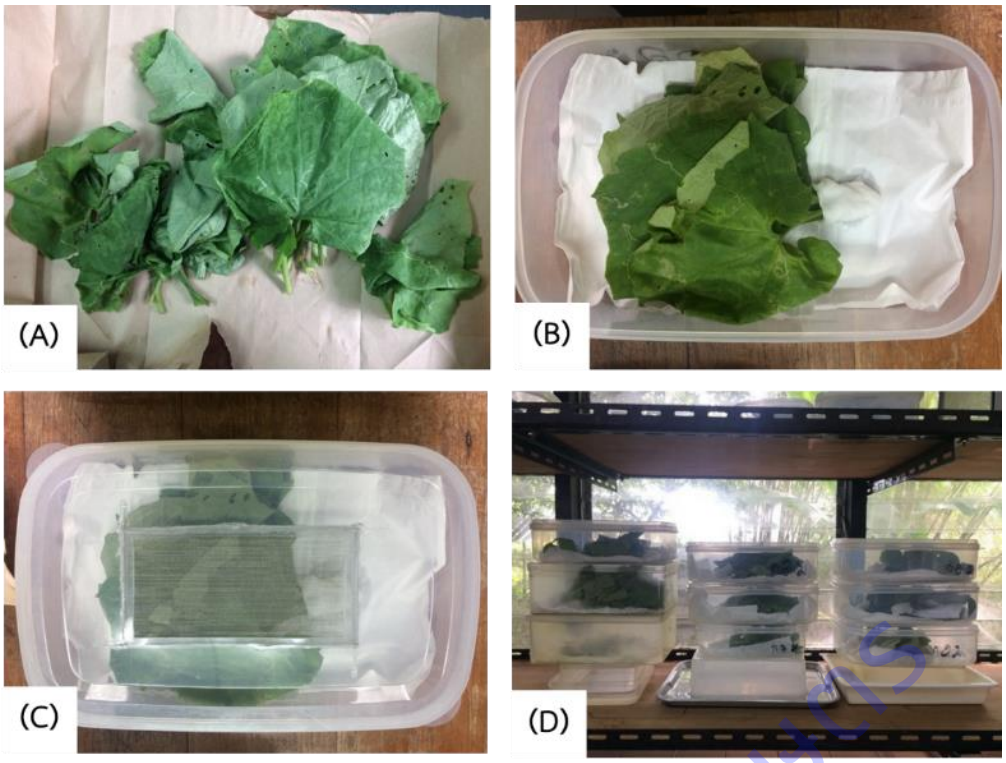


Figure 1.1.23.2 Agromyzid leafminer larvae reared on vegetable leaflets: (A) leaflets collected from vegetable farms, leaflets with mines containing agromyzid larvae; (B-D) larval rearing containers with leaflets on moisturized paper towels.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.23.3 Abdomen in adult of Agromyzid leafminer

(A) Female of leafminer

(B) Male of leafminer

กรมวิชาการเกษตร

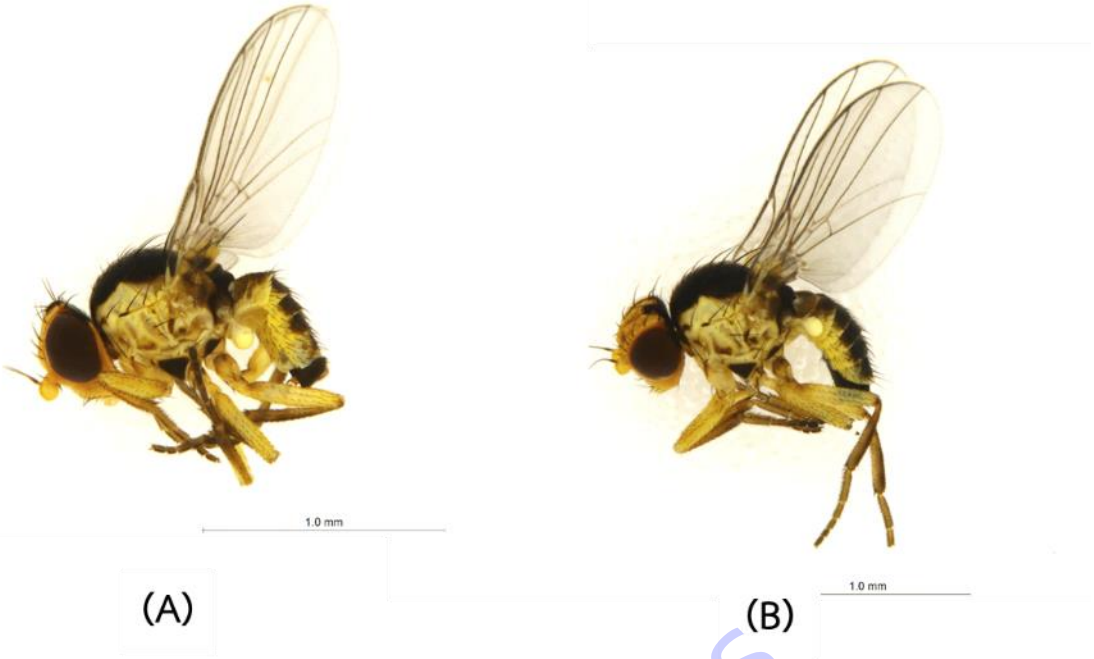


Figure 1.1.23.4 Adult of *Liriomyza brassicae* (Riley) (side view of typical)

(A) Male (B) Female

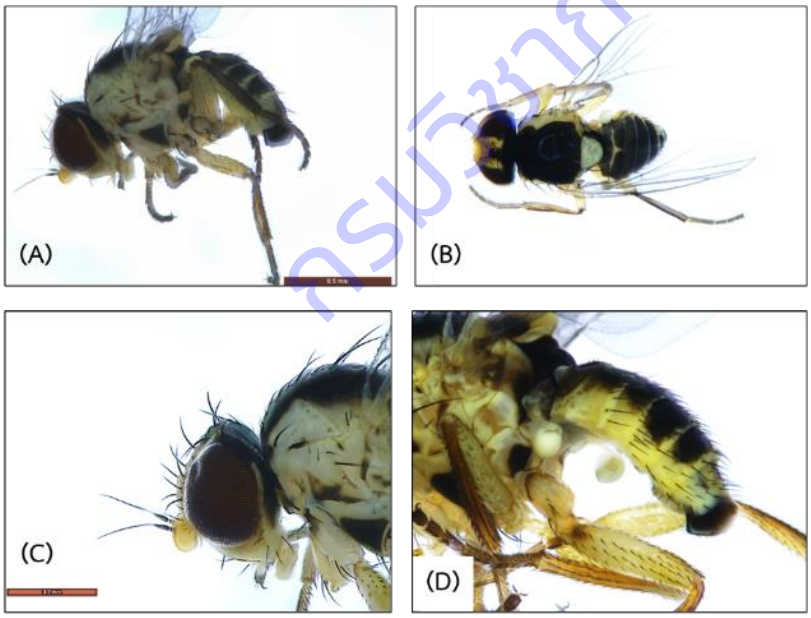


Figure 1.1.23.5 Adult of *Liriomyza brassicae* (Riley)

(A) head (B) thorax

(C) pronotum (D) abdomen

กรมวิชาการเกษตร

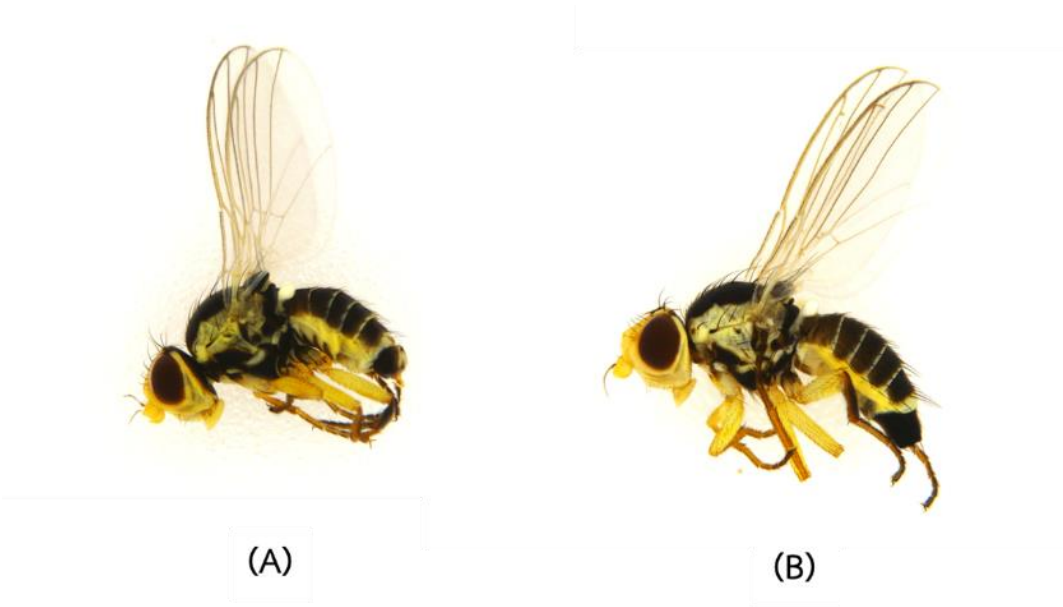


Figure 1.1.23.6 Adult of *Liriomyza chinensis* (side view of typical)

(B) Male (B) Female

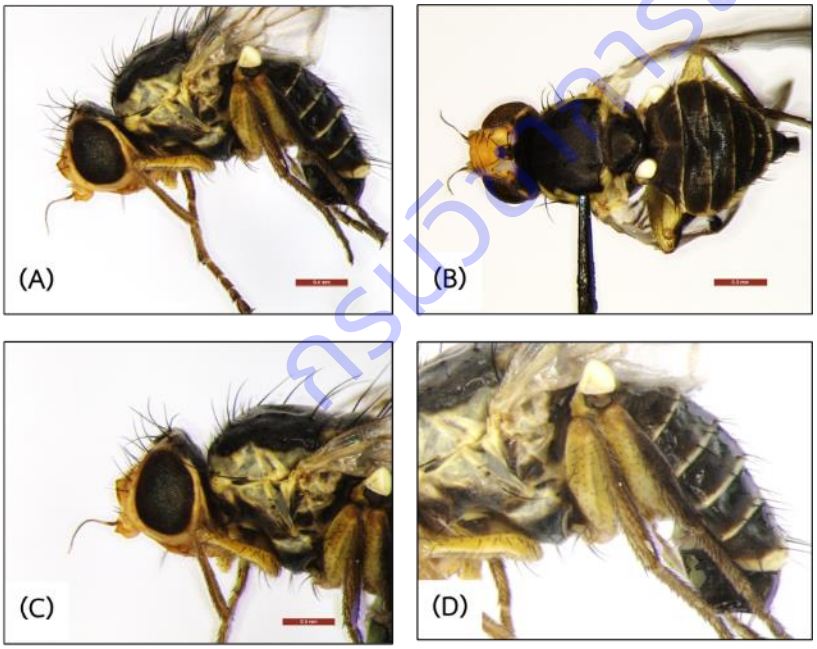


Figure 1.1.23.7 Adult of *Liriomyza chinensis*

(A) head (B) thorax

(C) pronotum (D) abdomen

กรมวิชาการเกษตร

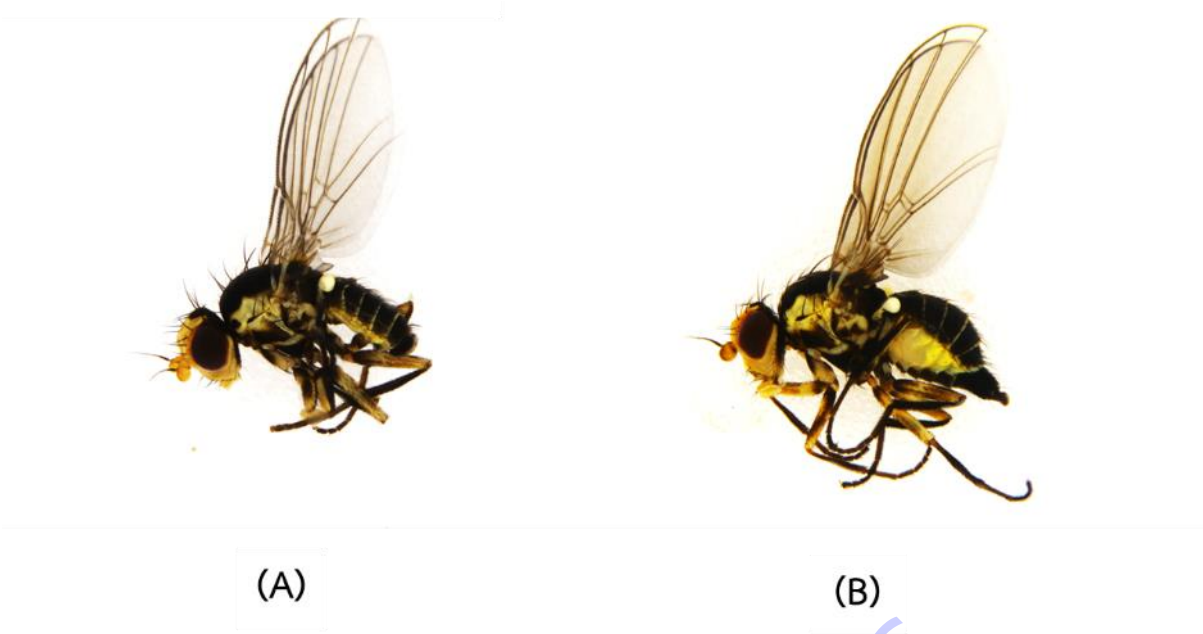


Figure 1.1.23.8 Adult of *Liriomyza huidrobrensis* (side view of typical)

(A) Male (B) Female

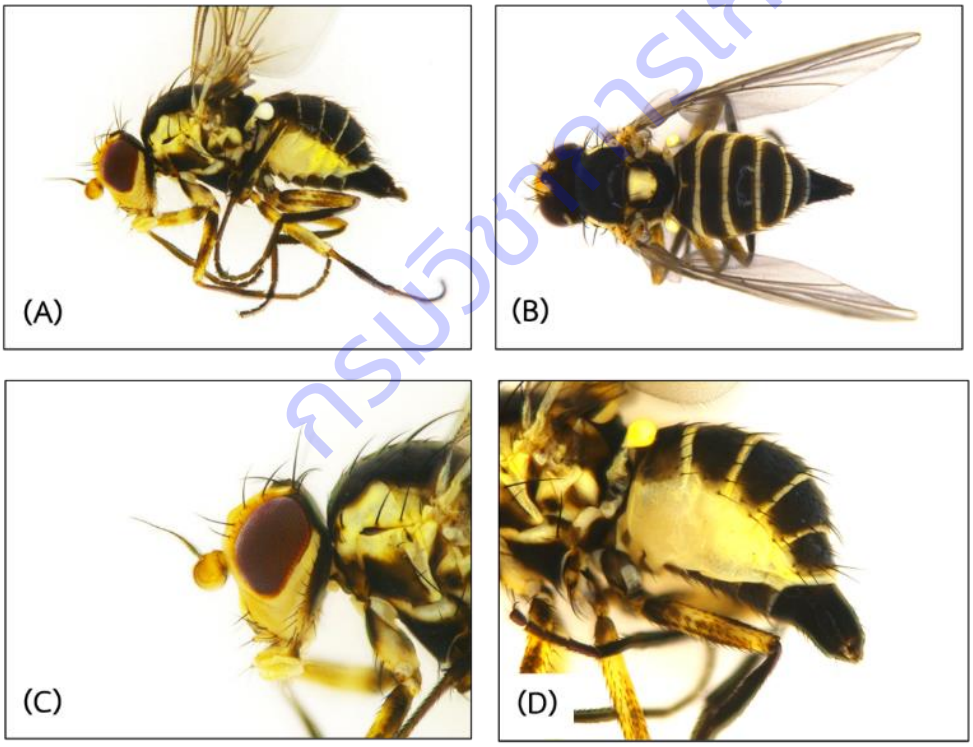


Figure 1.1.23.9 Adult of *Liriomyza huidrobrensis*

(A) head (B) thorax

(C) pronotum (D) abdomen

กรมวิชาการเกษตร

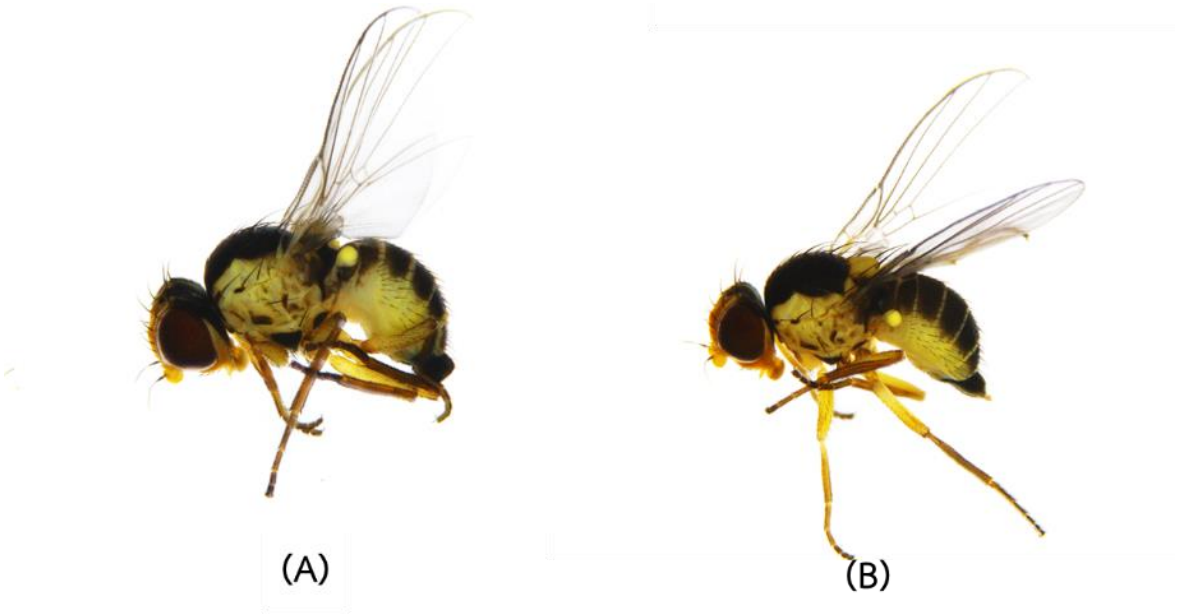


Figure 1.1.23.10 Adult of *Liriomyza sativae* (side view of typical)

(C) Male (B) Female

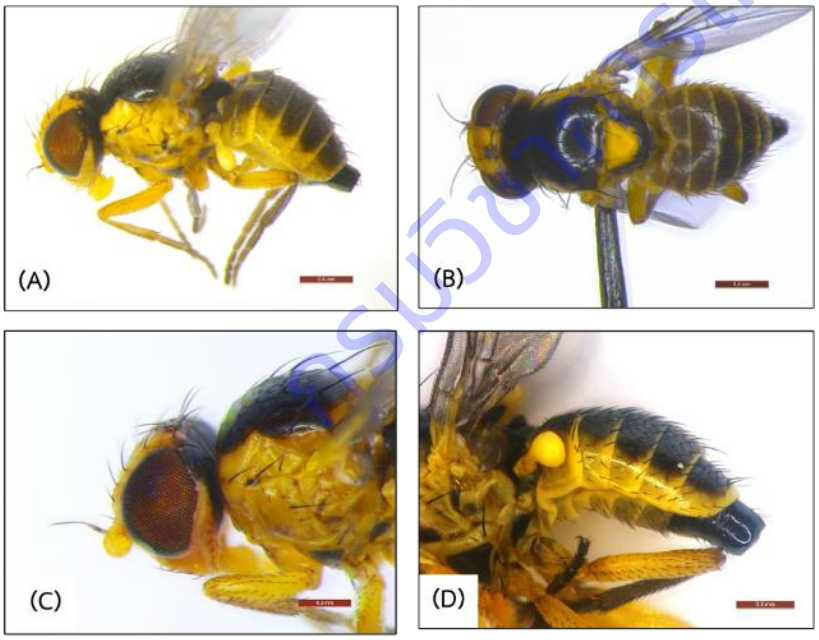


Figure 1.1.23.11 Adult of *Liriomyza sativae*

(A) head (B) thorax

(C) pronotum (D) abdomen

Figure 1.1.23.12 Adult of *Liriomyza trifolii* (Burgess, 1880) (side view of typical)

(A) Male (B) Female

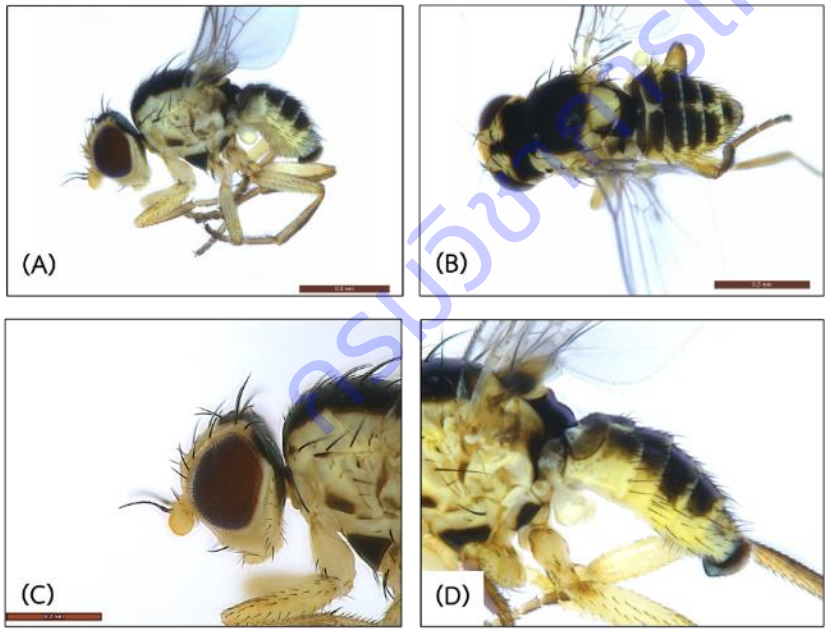
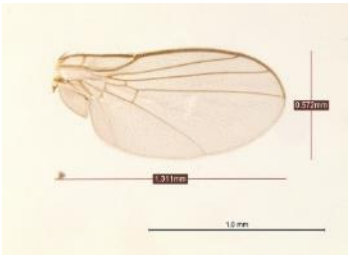


Figure 1.1.23.13 Adult of *Liriomyza trifolii* (Burgess, 1880)

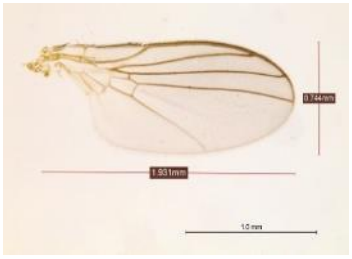
(A) head (B) thorax

(C) pronotum (D) abdomen

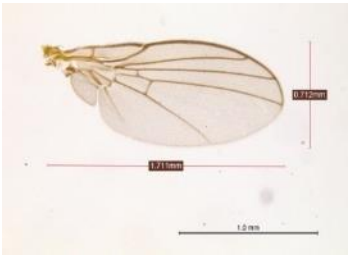
กรมวิชาการเกษตร



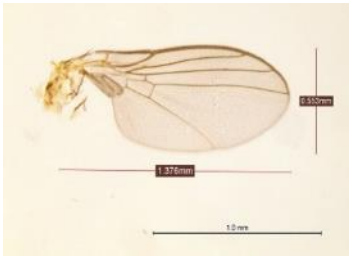
L. brassicae



L. chinensis



L. huidobrensis



L. trifolii

L. sativae

Figure 1.1.23.14 Wing length and width of five *Liriomyza* species.

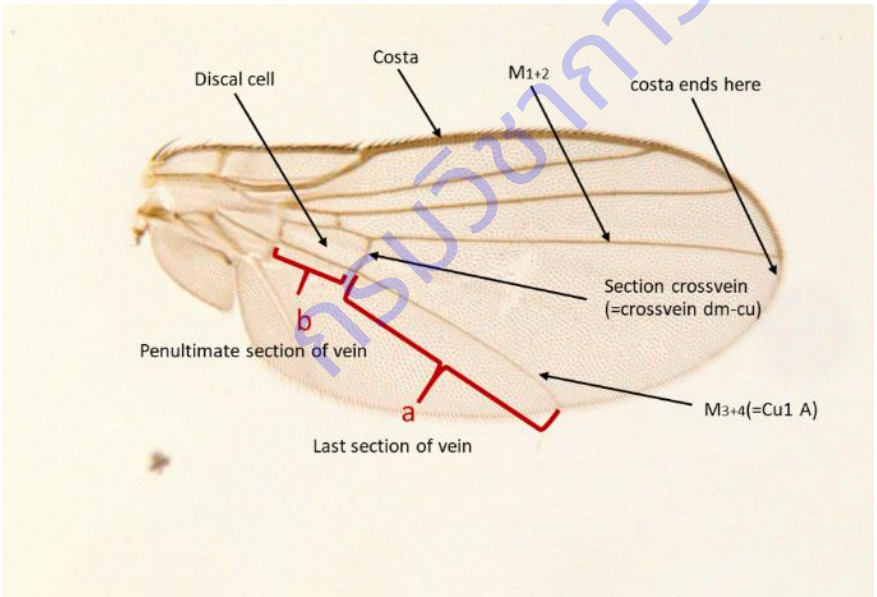
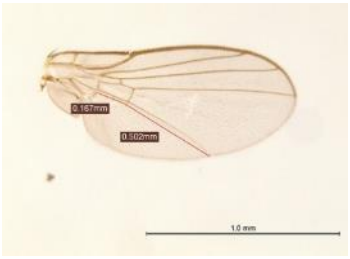
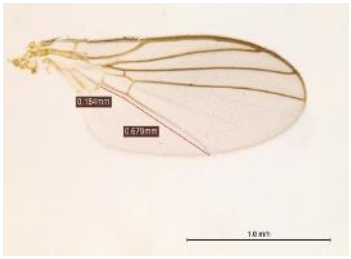


Figure 1.1.23.15 Wing venation of leafminer. Comparison of the wing patterns of*Liriomyza* species. The length of ultimate section of vein CuA_1 divided by penultimate section (a and b sections).

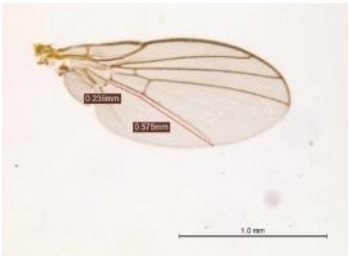
กรมวิชาการเกษตร



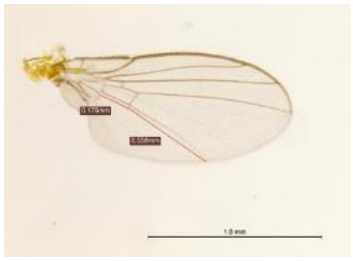
L. brassicae



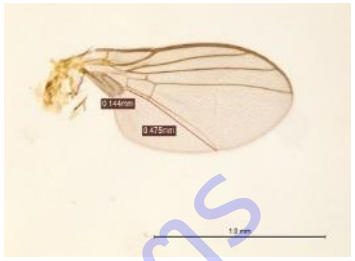
L. chinensis



L. huidobrensis



L. sativae



L. trifolii

Figure 1.1.23.16 Comparison of the wing patterns of five *Liriomyza* species. The length of ultimate section of vein CuA_1 divided by penultimate section (a and b sections). Scale bar= 1 mm.

กรมวิชาการเกษตร

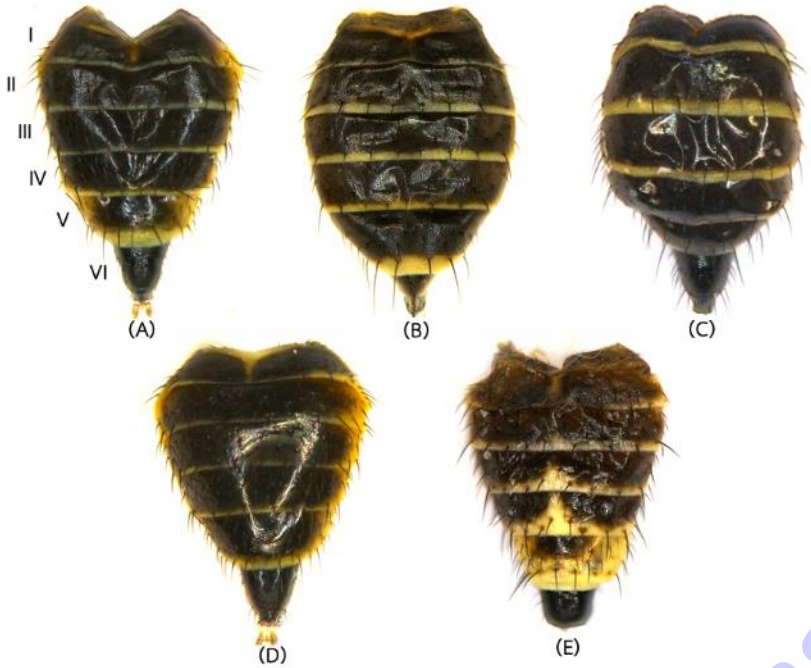


Figure 1.1.23.17 Diagrams of abdominal color patterns of five *Liriomyza* species. I to VI indicate the first to sixth visible abdominal tergites

A) *L. brassicae* B) *L. chinensis* C) *L. huidobrensis*

D) *L. sativae* E) *L. trifolii*

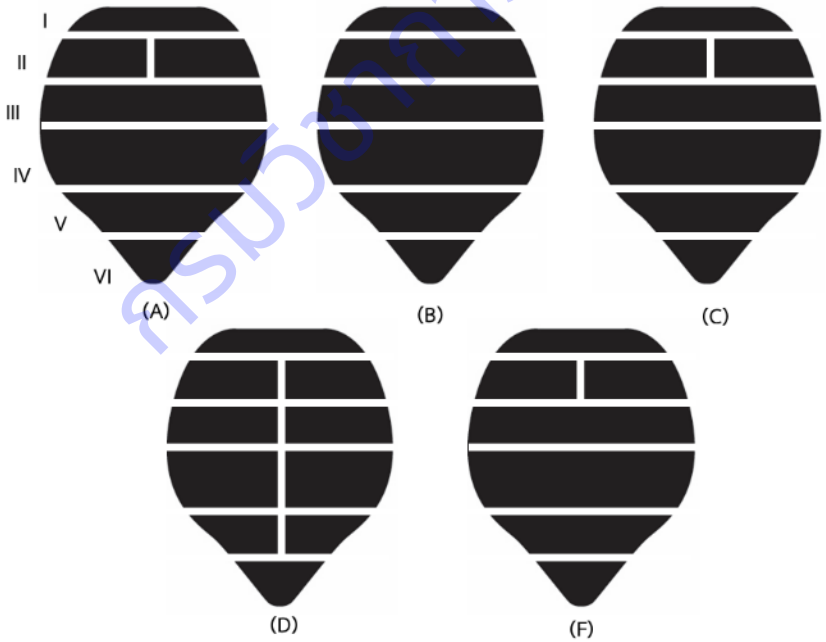
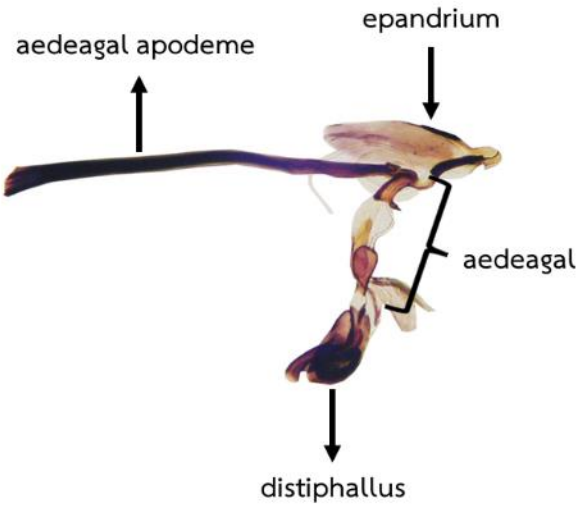


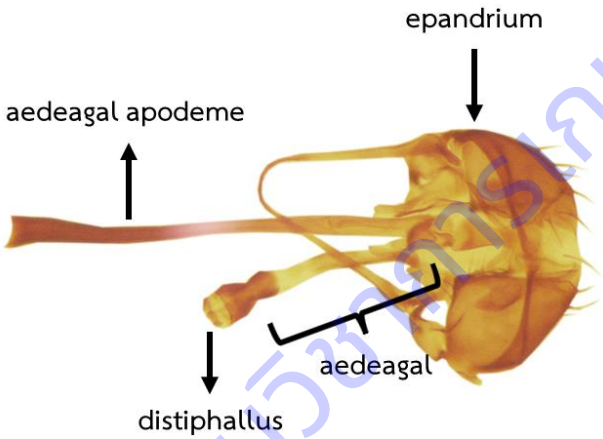
Figure 1.1.23.18 Diagrams of abdominal color patterns of five *Liriomyza* species. I to VI indicate the first to sixth visible abdominal tergites

B) *L. brassicae* B) *L. chinensis* C) *L. huidobrensis*

D) *L. trifolii* E) *L. sativae*

กรมวิชาการเกษตร





กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.23.19 Male genitalia of leafminer

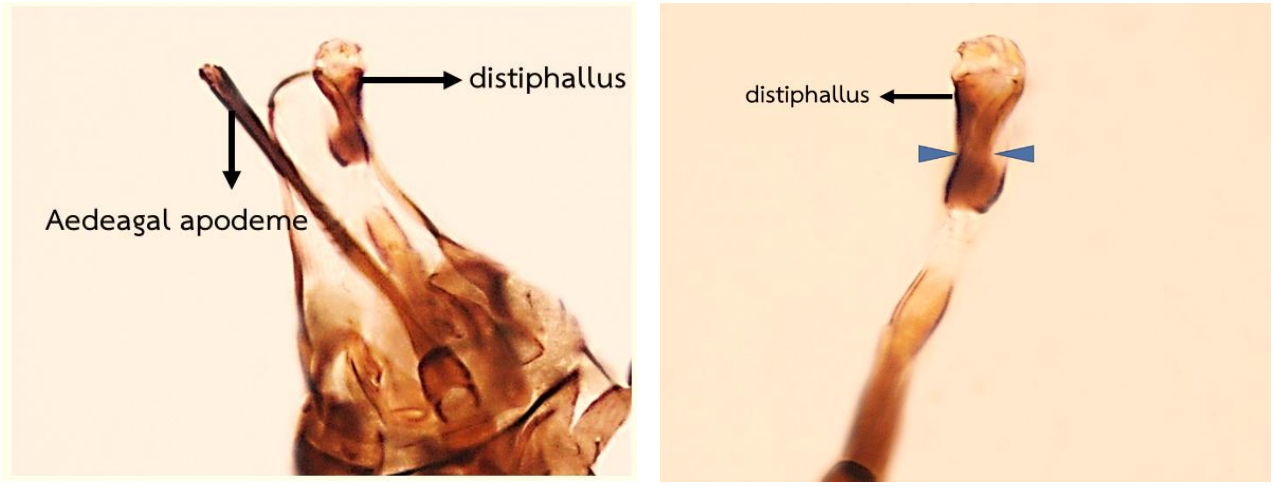


Figure 1.1.23.20 Male genitalia and phalluses of *Liriomyza brassicae* (Riley) (lateral view). Arrows indicate the distiphallus

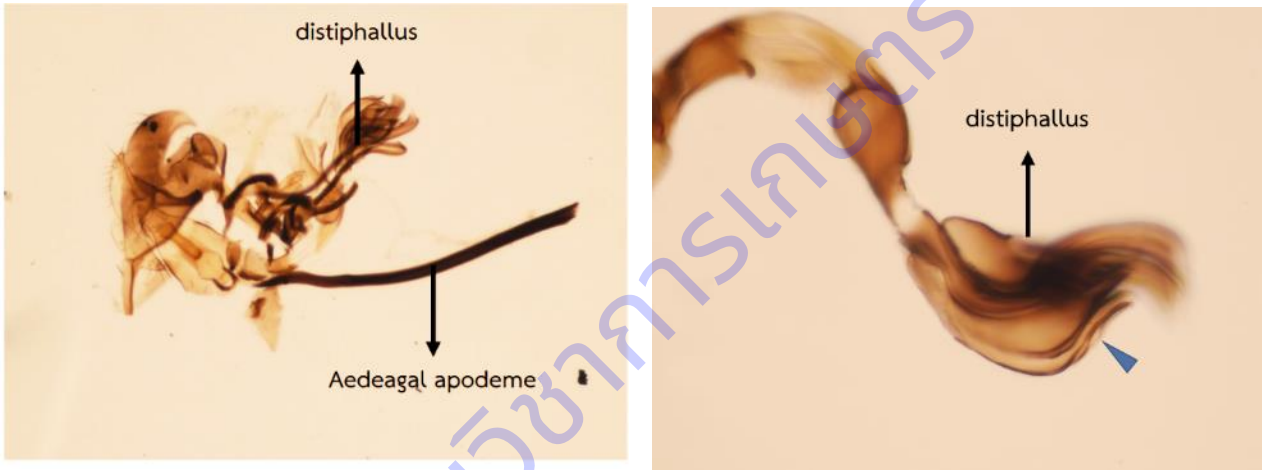


Figure 1.1.23.21 Male genitalia and phalluses of *Liriomyza chinensis* (lateral view). Arrows indicate the distiphallus.

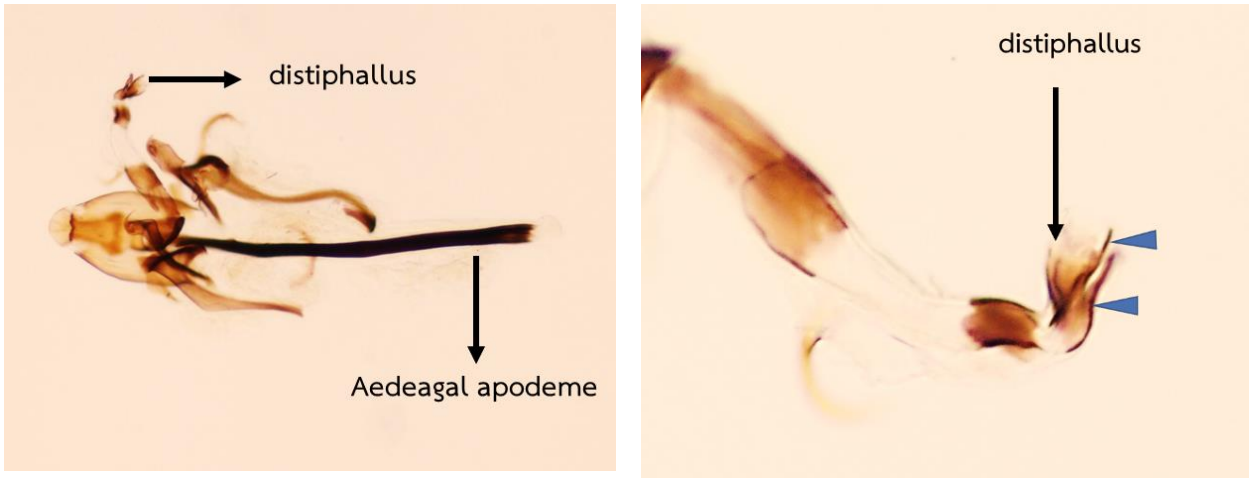
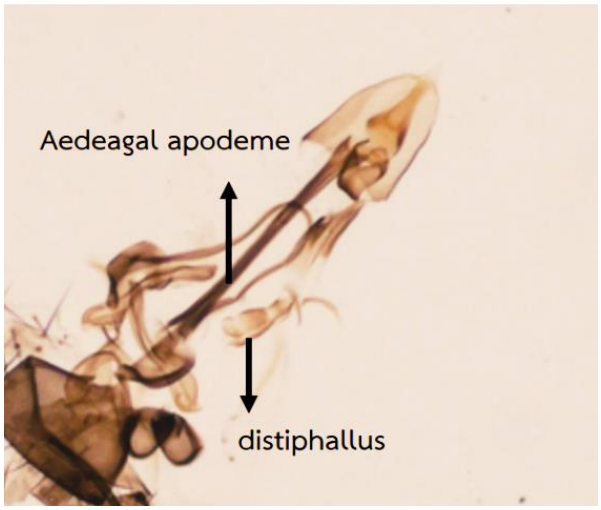


Figure 1.1.23.22 Male genitalia and phalluses of *Liriomyza huidrobrensis* (lateral view). Arrows indicate the distiphallus.

กรมวิชาการเกษตร



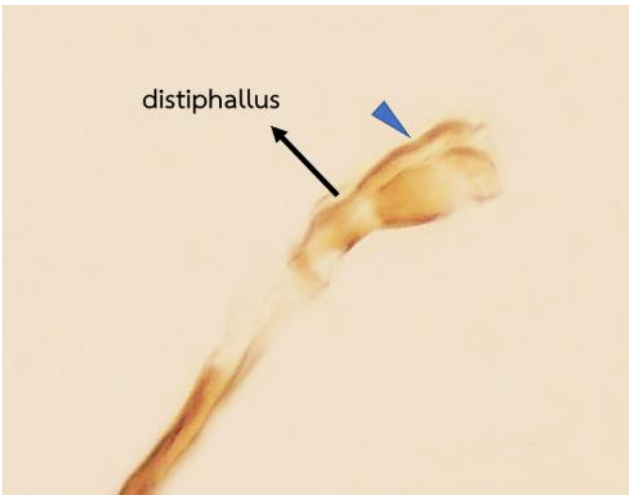
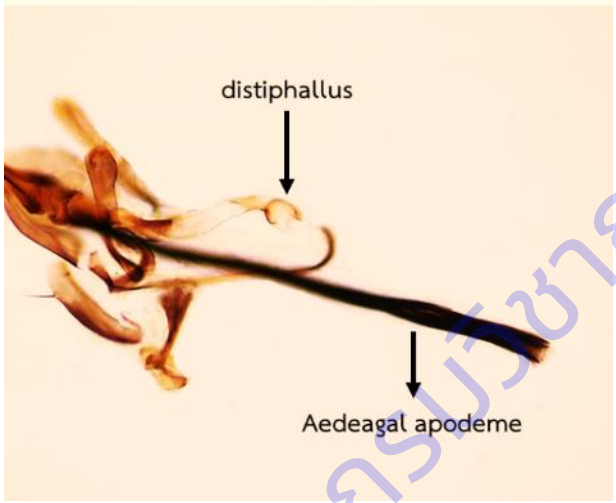
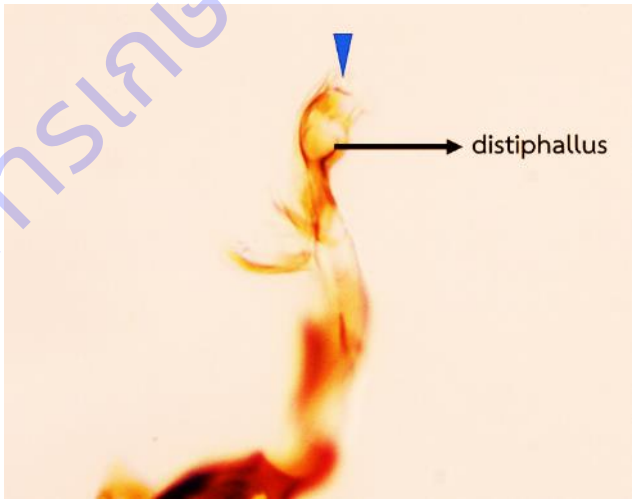


Figure 1.1.23.23 Male genitalia and phalluses of *Liriomyza sativae* (lateral view). Arrows indicate the distiphallus.





กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.23.24 Male genitalia and phalluses of *Liriomyza trifolii* (lateral view). Arrows indicate the distiphallus.

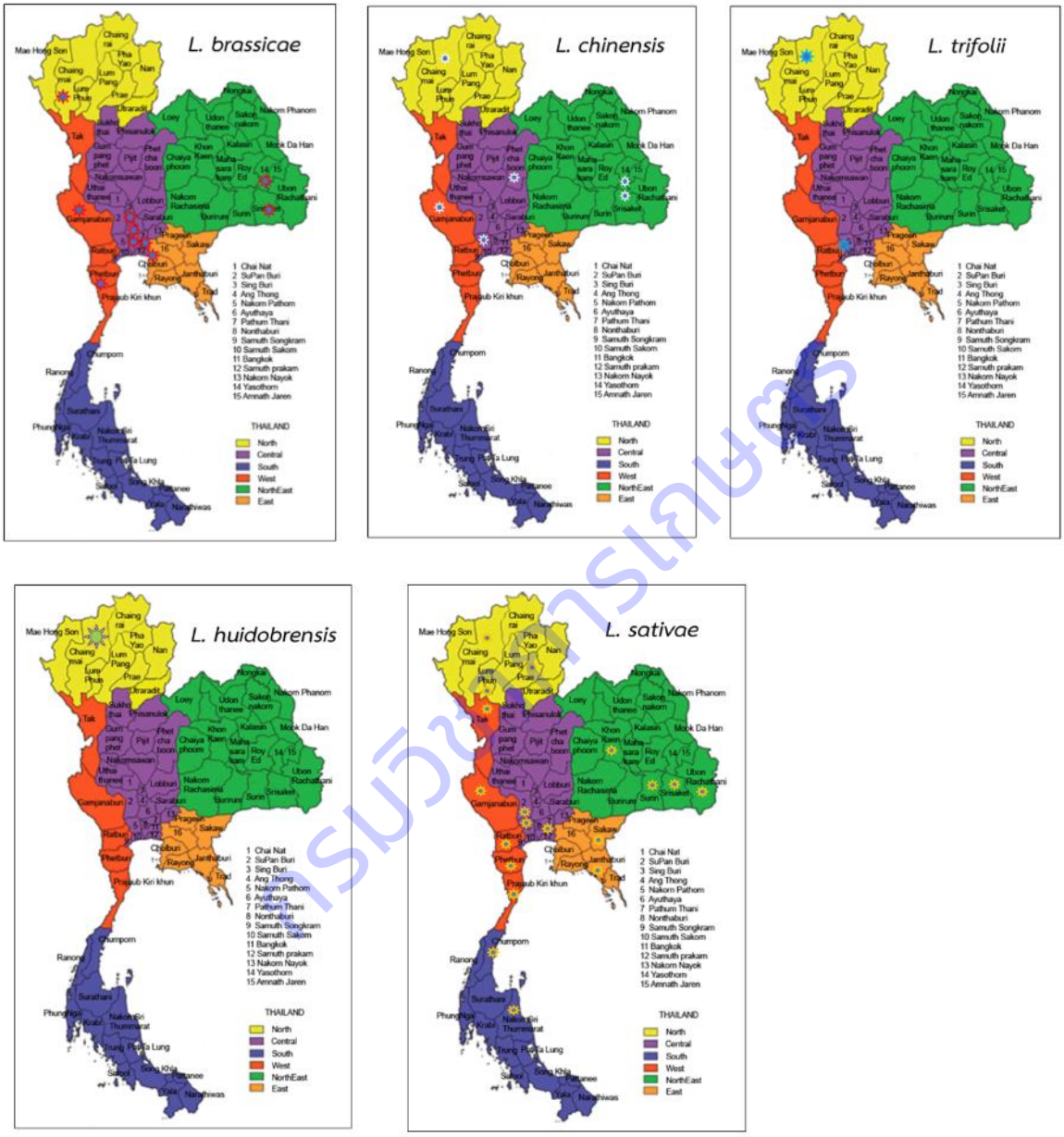


Figure 1.1.23.25 The distribution of leafminers in Thailand

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

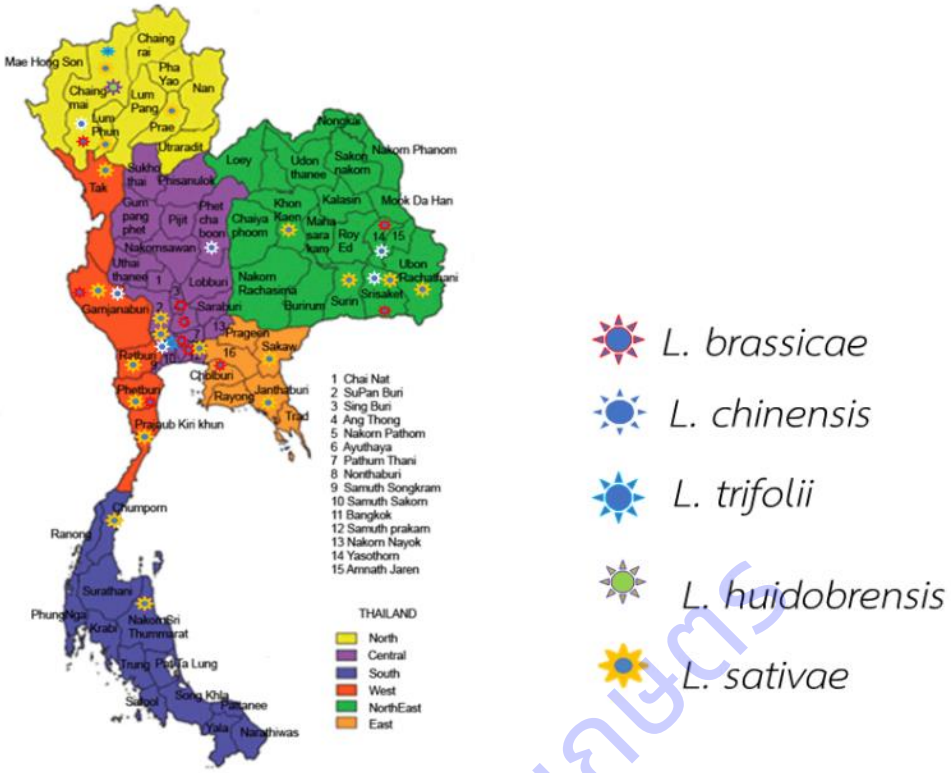


Figure 1.1.23.26 The distribution of leafminers in Thailand

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.23.1 Collecting date, latitude, longitude, comon name, scientific name of host plant, Family location and number of Agromyzid leafminer

No.	Date	Latitude	Longitude	Common Name	Scientific Name	Family	Location	Quantity			leafminer
								Male	Female	Total	
1	21.03.2018	13°57'49"	99°38'27"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Tha Muang, Tha Muang, Kanchanaburi	10	33	43	*L. chinensis*
2	21.03.2018	13°58'32"	99°37'25"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata*	Fabaceae	Tha Muang, Tha Muang, Kanchanaburi	8	12	20	*L. sativae*
3	08.05.2018	13°52'3"	100°10'53"	Sweet Basil	*Ocimum basilicum* L.	Labiatae	Si Maha Pho, Nakhon Chai Si, Nakhon Path	16	16	32	*L. trifolii*
4	23.05.2018	13°59'56"	99°39'56"	Cucumber	*Sucumis sativus* L.	Cucurbitaceae	Thung Thongi, Tha Muang, Kanchanaburi	15	6	21	*L. sativae*
5	19.06.2018	14°18'27"	99°51'37"	Pumpkin	*Cucurbita moschata* Decne.	Cucurbitaceae	Chorakhe Sam Phan, U Thong, Suphan Buri	1	5	6	*L. sativae*
6	25.07.2018	14°00'32"	99°43'26"	Cucumber	*Sucumis sativus* L.	Cucurbitaceae	Takhram En, Tha Maka, Kanchanaburi	25	90	115	*L. sativae*
7	13.09.2018	13°58'23"	99°47'40"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Don Cha-em, Tha Maka, Kanchanaburi	16	0	16	*L. sativae*
8	13.09.2018	13°59'48"	99°43'44"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Takhram En, Tha Maka, Kanchanaburi	12	17	29	*L. sativae*
9	21.09.2018	13°59'40"	99°43'33"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Takhram En, Tha Maka, Kanchanaburi	72	89	161	*L. sativae*
10	28.09.2018	13°59'30"	99°38'47"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Thung Thongi, Tha Muang, Kanchanaburi	38	98	136	*L. sativae*
11	03.10.2018	18°08'47.9"	98°20'47.1"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Bo Luang, Hot, Chiang Mai (1)	1	5	6	*L. sativae*
12	03.10.2018	18°09'08.9"	98°20'38.6"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Bo Luang, Hot, Chiang Mai (2)	14	16	30	*L. sativae*
13	03.10.2018	18°09'22.3"	98°20'35.8"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Bo Luang, Hot, Chiang Mai (3)	2	3	5	*L. sativae*
14	03.10.2018	18°09'00.1"	98°14'49.7"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Bo Sali, Hot, Chiang Mai (4)	1	1	2	*L. sativae*
15	03.10.2018	18°08'58.1"	98°15'04.3"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Bo Sali, Hot, Chiang Mai (5)	4	1	5	*L. sativae*
16	03.10.2018	18°08'34.1"	98°15'16.9"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Bo Sali, Hot, Chiang Mai (6)	13	6	19	*L. sativae*
17	03.10.2018	18°08'44.4"	98°15'12.3"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Bo Sali, Hot, Chiang Mai (7)	14	0	14	*L. sativae*
18	09.10.2018	12°56'21.9"	100°54'18.0"	Flowering cabbage	*Brassica Chinensis* L.	Brassicaceae	Nong Prue,Bang Lamung, Chon Buri	5	0	5	*L. brassicae*
19	06.12.2018	14°18'27"	99°51'37"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Chorakhe Sam Phan, U Thong, Suphan Buri	2	3	5	*L. sativae*
20	06.12.2018	14°18'27"	99°51'37"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Chorakhe Sam Phan, U Thong, Suphan Buri	1	1	2	*L. sativae*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Table 1.1.23.1 continue

No.	Date	Latitude	Longitude	Common Name	Scientific Name	Family	Location	Quantity			leafminer
								Male	Female	Total	
22	06.01.2019	12°56'23.0"	102°16'20.9"	Cucumber	*Sucumis sativus* L.	Cucurbitaceae	Thap Sai, Pong Nam Ron, Chanthaburi	20	32	52	*L. sativae*
23	07.01.2019	14°25'59"	100°57'47"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Lad yao, Chatuchak, Bangkok	7	2	9	*L. sativae*
24	31.01.2019	14°48'18.2"	103°20'39.5"	Cucumber	*Sucumis sativus* L.	Cucurbitaceae	Sawai, Mueang Surin, Surin	53	60	113	*L. sativae*
25	31.01.2019	14°48'18.2"	103°20'39.5"	Angled Loofah	*Luffa acutangula* (L.) Roxb.	Cucurbitaceae	Sawai, Mueang Surin, Surin	209	200	409	*L. sativae*
26	22.01.2019	13°51'18.9"	100°07'08.9"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Sam Khwai Phueak, Mueang, Nakhon Patho	38	38	76	*L. sativae*
27	22.01.2019	13°51'18.9"	100°07'08.9"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Sam Khwai Phueak, Mueang, Nakhon Patho	44	54	98	*L. sativae*
28	22.01.2019	13°46'10.9"	99°34'07.2"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Nong Tak Ya, Tha Muang, Kanchanaburi	14	19	33	*L. sativae*
29	28.01.2019	13°50'50"	100°34'23"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	DOA, Lad yao, Chatuchak, Bangkok	12	13	25	*L. sativae*
30	28.01.2019	13°50'50"	100°34'23"	Chinese cabbage	*Brassica Chinensis* L.	Brassicaceae	DOA, Lad yao, Chatuchak, Bangkok	1	0	1	*L. brassicae*
31	12.02.2019	14°25'59"	100°57'47"	Chinese cabbage	*Brassica Chinensis* L.	Brassicaceae	Lad yao, Chatuchak, Bangkok	17	19	36	*L. brassicae*
32	13.02.2019	13°23'40.15"	102°7'26.57"	Pumpkin	*Cucurbita moschata* Decne.	Cucurbitaceae	Wang Thong, Wang Sombun, Sa Kaeo	30	13	43	*L. sativae*
33	14.02.2019	14°25'59"	100°57'47"	Leaf mustard	*Brassica juncea* (L.) Czern.	Brassicaceae	Lad yao, Chatuchak, Bangkok	1	2	3	*L. brassicae*
34	14.02.2019	13°50'50"	100°34'23"	Chinese broccoli	*Brassica oleracea* L.	Brassicaceae	Lad yao, Chatuchak, Bangkok	15	12	27	*L. brassicae*
35	14.03.2019	13°50'58"	100°34'23"	Smooth loofah	*Luffa cylindrica* (L.) M.Roem.	Cucurbitaceae	Rice Department, Lad yao, Chatuchak, Ban	39	133	172	*L. sativae*
36	20.03.2019	10°40'29"	99°10'14"	Cucumber	*Sucumis sativus* L.	Cucurbitaceae	Tha Sae, Tha Sae, Chumphon	3	2	5	*L. sativae*
37	10.04.2019	14°1'53"	99°58'16"	White mugwort	*Artemisia lactiflora* Wall.	Asteraceae	Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom	7	5	12	*L. sativae*
38	18.04.2019	14°34'09.7"	100°28'53.2"	Chinese cabbage	*Brassica Chinensis* L.	Brassicaceae	Mueang Ang Thong, Ang Thong	7	3	10	*L. brassicae*
39	18.04.2019	14°34'09.7"	100°28'53.2"	Chinese cabbage	*Brassica Chinensis* L.	Brassicaceae	Tha To, Maha Rat, Phra Nakhon Si Ayutthay	8	5	13	*L. brassicae*
40	19.04.2019	13°55'3"	99°56'47"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Nong Ngu Lueam, Mueang, Nakhon Pathom	362	405	767	*L. sativae*

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.23.1 continue

No.	Date	Latitude	Longitude	Common Name	Scientific Name	Family	Location	Quantity			leafminer
								Male	Female	Total	
22	06.01.2019	12°56'23.0"	102°16'20.9"	Cucumber	*Sucumis sativus* L.	Cucurbitaceae	Thap Sai, Pong Nam Ron, Chanthaburi	20	32	52	*L. sativae*
23	07.01.2019	14°25'59"	100°57'47"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Lad yao, Chatuchak, Bangkok	7	2	9	*L. sativae*
24	31.01.2019	14°48'18.2"	103°20'39.5"	Cucumber	*Sucumis sativus* L.	Cucurbitaceae	Sawai, Mueang Surin, Surin	53	60	113	*L. sativae*
25	31.01.2019	14°48'18.2"	103°20'39.5"	Angled Loofah	*Luffa acutangula* (L.) Roxb.	Cucurbitaceae	Sawai, Mueang Surin, Surin	209	200	409	*L. sativae*
26	22.01.2019	13°51'18.9"	100°07'08.9"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Sam Khwai Phueak, Mueang, Nakhon Patho	38	38	76	*L. sativae*
27	22.01.2019	13°51'18.9"	100°07'08.9"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Sam Khwai Phueak, Mueang, Nakhon Patho	44	54	98	*L. sativae*
28	22.01.2019	13°46'10.9"	99°34'07.2"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Nong Tak Ya, Tha Muang, Kanchanaburi	14	19	33	*L. sativae*
29	28.01.2019	13°50'50"	100°34'23"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	DOA, Lad yao, Chatuchak, Bangkok	12	13	25	*L. sativae*
30	28.01.2019	13°50'50"	100°34'23"	Chinese cabbage	*Brassica Chinensis* L.	Brassicaceae	DOA, Lad yao, Chatuchak, Bangkok	1	0	1	*L. brassicae*
31	12.02.2019	14°25'59"	100°57'47"	Chinese cabbage	*Brassica Chinensis* L.	Brassicaceae	Lad yao, Chatuchak, Bangkok	17	19	36	*L. brassicae*
32	13.02.2019	13°23'40.15"	102°7'26.57"	Pumpkin	*Cucurbita moschata* Decne.	Cucurbitaceae	Wang Thong, Wang Sombun, Sa Kaeo	30	13	43	*L. sativae*
33	14.02.2019	14°25'59"	100°57'47"	Leaf mustard	*Brassica juncea* (L.) Czern.	Brassicaceae	Lad yao, Chatuchak, Bangkok	1	2	3	*L. brassicae*
34	14.02.2019	13°50'50"	100°34'23"	Chinese broccoli	*Brassica oleracea* L.	Brassicaceae	Lad yao, Chatuchak, Bangkok	15	12	27	*L. brassicae*
35	14.03.2019	13°50'58"	100°34'23"	Smooth loofah	*Luffa cylindrica* (L.) M.Roem.	Cucurbitaceae	Rice Department, Lad yao, Chatuchak, Ban	39	133	172	*L. sativae*
36	20.03.2019	10°40'29"	99°10'14"	Cucumber	*Sucumis sativus* L.	Cucurbitaceae	Tha Sae, Tha Sae, Chumphon	3	2	5	*L. sativae*
37	10.04.2019	14°1'53"	99°58'16"	White mugwort	*Artemisia lactiflora* Wall.	Asteraceae	Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom	7	5	12	*L. sativae*
38	18.04.2019	14°34'09.7"	100°28'53.2"	Chinese cabbage	*Brassica Chinensis* L.	Brassicaceae	Mueang Ang Thong, Ang Thong	7	3	10	*L. brassicae*
39	18.04.2019	14°34'09.7"	100°28'53.2"	Chinese cabbage	*Brassica Chinensis* L.	Brassicaceae	Tha To, Maha Rat, Phra Nakhon Si Ayutthay	8	5	13	*L. brassicae*
40	19.04.2019	13°55'3"	99°56'47"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Nong Ngu Lueam, Mueang, Nakhon Pathor	362	405	767	*L. sativae*

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.23.1 continue

No.	Date	Latitude	Longjitude	Common Name	Scientific Name	Family	Location	Quantity			leafminer
								Male	Female	Total	
41	22.05.2019	8° 18'47.9"	99° 45'42.4"	No.E49	*Luffa acutangula* (L.) Roxb.	Cucurbitaceae	Lan Saka, Lan Saka, Nakhon Si Thammarat	7	10	17	*L. sativae*
42	25.05.2019	12° 44'51.1"	99° 42'27.1"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Khao Krapuk, Tha Yang, Phetchaburi	28	41	69	*L. sativae*
43	25.05.2019	12° 44'51.1"	99° 42'27.1"	Chinese cabbage	*Brassica Chinensis* L.	Brassicaceae	Khao Krapuk, Tha Yang, Phetchaburi	2	3	5	*L. brassicae*
44	25.05.2019	12° 44'51.1"	99° 42'27.1"	Smooth Loofah	*Luffa acutangula* (L.) Roxb.	Cucurbitaceae	Khao Krapuk, Tha Yang, Phetchaburi	9	23	32	*L. sativae*
45	25.05.2019	12° 43'26.1"	99° 53'35.2"	Smooth Loofah	*Luffa acutangula* (L.) Roxb.	Cucurbitaceae	Sam Phraya, Cha-am, Phetchaburi	123	124	247	*L. sativae*
46	25.05.2019	12° 43'26.1"	99° 53'35.2"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Sam Phraya, Cha-am, Phetchaburi	47	35	82	*L. sativae*
47	31.05.2019	13° 32'38.8"	99° 56'30.8"	Cucumber	*Sucumis sativus* L.	Cucurbitaceae	Tha Nat, Damnoen Saduak, Ratchaburi	1	1	2	*L. sativae*
48	31.05.2019	13° 50'14.0"	100° 07'37.6"	Smooth Loofah	uf+A47u.fa acutangula (L.) Roxb.	Cucurbitaceae	Sam Khwai Phueak, Mueang, Nakhon Patho	9	16	25	*L. sativae*
49	05.06.2019	14° 07'04.66"	100° 01'06.49"	Celery	*Aqium graveolens* L.	Apiaceae	Sam Khwai Phueak, Mueang, Nakhon Patho	1	2	3	*L. trifolii*
50	11.06.2019	18° 32'41.5"	98° 58'14.0"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Ton Thong, Mueang, Lamphun	12	0	12	*L. sativae*
51	18.06.2019	18° 22'46.32	100° 9'47.53"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Daen Chumphon, Song, Phrae	8	8	16	*L. sativae*
52	24.06.2019	13° 57'00.0"	99° 56'52.9"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Thung Khwang, Kamphaeng Saen, Nakhon	2	6	8	*L. sativae*
53	23.11.2019	14° 32'51.4"	100° 11'07.6"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Don Masang, Mueang, Suphan Buri	9	13	22	*L. sativae*
54	02.12.2019	14° 58'03.6"	104° 12'29.1"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Bu Sung, Wang Hin, Si Sa Ket	8	8	16	*L. chinensis*
55	02.12.2019	14° 58'03.6"	104° 12'29.1"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Bu Sung, Wang Hin, Si Sa Ket	2	3	5	*L. chinensis*
56	03.12.2019	15° 14'05.5"	104° 31'10.0"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	I Pat, Kanthararom, Si Sa Ket	5	11	16	*L. chinensis*
57	03.12.2019	15° 12'25.4"	104° 08'47.9"	Muskmelon	*Cucumis melo*	Cucurbitaceae	Khaem, Uthumphon Phisai, Si Sa Ket	3	9	12	*L. sativae*
58	03.12.2019	15° 14'30.6"	104° 24'01.8"	Chinese broccoli	*Brassica oleracea* L.	Brassicaceae	Yang Chum Noi, Yang Chum Noi, Si Sa Ket	13	24	37	*L. brassicae*
59	03.12.2019	15° 09'00.1"	104° 13'00.0"	Garlic	*Allium sativum* L.	Alliaceae	Ta Ket, Uthumphon Phisai, Si Sa Ket	5	9	14	*L. chinensis*
60	03.12.2019	15° 13'13.4"	104° 31'58.5"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Mueang Noi, Kanthararom, Si Sa Ket	0	1	1	*L. chinensis*
61	03.12.2019	15° 13'50.1"	104° 24'44.5"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Bueng Bon, Yang Chum Noi, Si Sa Ket	8	12	20	*L. chinensis*
62	03.12.2019	15° 14'13.2"	104° 24'53.3"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Bueng Bon, Yang Chum Noi, Si Sa Ket	6	13	19	*L. chinensis*
63	03.12.2019	15° 09'00.1"	104° 13'00.0"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Ta Ket, Uthumphon Phisai, Si Sa Ket	4	1	5	*L. chinensis*
64	03.12.2019	15° 09'47.6"	104° 35'05.2"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Lathai, Kanthararom, Si Sa Ket	2	3	5	*L. chinensis*
65	03.12.2019	15° 15'12.9"	104° 25'29.0"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Bueng Bon, Yang Chum Noi, Si Sa Ket	0	2	2	*L. chinensis*
66	03.12.2019	15° 14'30.6"	104° 24'01.8"	Thai Eggplant	*Solanum virginianum* L.	Solanaceae	Yang Chum Noi, Yang Chum Noi, Si Sa Ket	1	4	5	*L. brassicae*
67	03.12.2019	15° 14'30.6"	104° 24'01.8"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Yang Chum Noi, Yang Chum Noi, Si Sa Ket	1	4	5	*L. sativae*
68	03.12.2019	14° 51'55.0"	104° 11'12.4"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Samrong Ta Chen, Khukhan, Si Sa Ket	12	21	33	*L. sativae*
69	03.12.2019	15° 06'26.4"	104° 19'54.6"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Mueang Tai, Mueang, Si Sa Ket	21	23	44	*L. sativae*
70	03.12.2019	15° 05'58.5"	104° 27'28.7"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Nong Kaeo, Mueang, Si Sa Ket	4	1	5	*L. sativae*

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.23.1 continue

No.	Date	Latitude	Longjitude	Common Name	Scientific Name	Family	Location	Quantity			leafminer
								Male	Female	Total	
71	03.12.2019	15°15'12.9"	104°25'29.0"	Pumpkin	*Cucurbita moschata* Decne.	Cucurbitaceae	Bueng Bon, Yang Chum Noi, Si Sa Ket	2	2	4	*L. sativae*
72	03.12.2019	15°13'13.4"	104°31'58.5"	Chinese cabbage	*Brassica Chinensi* s L.	Brassicaceae	Mueang Noi, Kanthararom, Si Sa Ket	10	5	15	*L. brassicae*
73	03.12.2019	15°21'40.6"	104°23'07.8"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Fa Huan, Kho Wang, Yasothon	2	5	6	*L. chinensis*
74	04.12.2019	16°16'23.3"	104°30'53.0"	Garlic	*Allium sativum* L.	Alliaceae	Kut Hae, Loeng Nok Tha, Yasothon	1	5	6	*L. chinensis*
75	04.12.2019	16°16'23.3"	104°30'53.0"	Chinese cabbage	*Brassica Chinensis* L.	Cruciferae	Kut Hae, Loeng Nok Tha, Yasothon	4	1	5	*L. brassicae*
76	04.12.2019	16°16'23.3"	104°30'53.0"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Kut Hae, Loeng Nok Tha, Yasothon	2	3	5	*L. chinensis*
77	15.12.2019	13°58'57"	99°39'0"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Tha Muang, Kanchanaburi	8	11	19	*L. chinensis*
78	18.12.2019	12°43'27.5"	99°53'35.6"	Chinese kale	*Brassica oleracea* L.	Brassicaceae	Mueang, Nonthaburi	1	1	2	*L. brassicae*
79	18.12.2019	12°43'27.5"	99°53'35.6"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Sam Phraya, Cha-am, Phetchaburi	3	7		*L. sativae*
80	18.12.2019	12°43'27.5"	99°53'35.6"	Cucumber	*Sucumis sativus* L.	Cucurbitaceae	Sam Phraya, Cha-am, Phetchaburi	2	0	2	*L. sativae*
81	23.12.2019	13°44'19.60"	100°21'40.45"	Butternut squash	*Cucurbita moschata*	Cucurbitaceae	Bangkok	9	9	18	*L. sativae*
82	03.01.2020	16°3'56"	105°21'40.45"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Khemarat, Khemarat, Ubon Ratchathani	2	3	5	*L. sativae*
83	03.01.2020	16°3'56"	105°21'40.45"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Khemarat, Khemarat, Ubon Ratchathani	4	3	7	*L. sativae*
84	06.01.2020	16°38'29"	102°54'42"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Nam Phong, Khon Kaen	11	6	17	*L. sativae*
85	07.01.2020	18°19'37.85"	98°21'42.90"	Potato	*Solanum tuberosum* L.	Solanaceae	Kong Khaek, Mae Chaem, Chiang Mai	17	6	23	*L. huidobrensis*
86	08.01.2020	18°33'35.15"	98°19'56.10"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Mae Suek, Mae Chaem, Chiang Mai	9	7	16	*L. sativae*
87	08.01.2020	18°33'37.6"	98°31'26.77"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Ban Luang, Chom Thong, Chiang Mai	13	10	23	*L. sativae*
88	09.01.2020	18°37'31.83"	98°31'47.14"	Chinese Cabbage	*Brassica rapa* L.	Brassicaceae	Mae Win, Mae Wang, Chiang Mai	2	2	4	*L. brassicae*
89	10.01.2020	18°47'0.31"	98°57'26.3"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Suthep, Mueang, Chiang Mai	1	4	5	*L. sativae*
90	13.01.2020	16°8'35"	101°3'20"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Nong Phai, Phetchabun	6	9	15	*L. chinensis*

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Table 1.1.23.1 continue

No.	Date	Latitude	Longitude	Common Name	Scientific Name	Family	Location	Quantity			leafminer
								Male	Female	Total	
91	13.01.2020	16° 23'13"	101° 7'36"	Garlic	*Allium sativum* L.	Alliaceae	Mueang, Phetchabun	0	1	1	*L. chinensis*
92	27.01.2020	14° 1'33"	99° 52'22"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom	33	9	42	*L. sativae*
93	27.01.2020	14° 0'42"	99° 38'40"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Tha Muang, Kanchanaburi	0	3	3	*L. chinensis*
94	29.01.2020	18° 58'5"	98° 59'1"	Potato	*Solanum tuberosum* L.	Solanaceae	San Sai, Chiang Mai	1	1	2	*L. Huidobrensis*
95	29.01.2020	19° 5'30"	99° 10'26"	Potato	*Solanum tuberosum* L.	Solanaceae	Phrao, Chiang Mai	2	7	9	*L. huidobrensis*
96	12.02.2020	18° 37'20.81"	98° 31'17.60"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom	13	24	37	*L. sativae*
97	14.02.2020	16° 35'52"	102° 6'48"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Tha Muang, Kanchanaburi	4	10	14	*L. sativae*
98	14.02.2020	16° 36'53"	101° 9'34"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	San Sai, Chiang Mai	6	9	15	*L. chinensis*
99	21.02.2020	14° 0'34"	99° 38'32"	Onion	*Allium cepa* L.	Amaryllidaceae	Phrao, Chiang Mai	11	11	22	*L. chinensis*
100	26.02.2020	19° 5'30"	99° 10'57"	Soybean	*Glycine max* (L.) Merr.	Fabaceae	Phrao, Chiang Mai	10	15	25	*L. sativae*
101	26.02.2020	19° 2'45"	98° 57'56"	Garlic	*Allium sativum* L.	Alliaceae	San Sai, Chiang Mai	4	10	14	*L. chinensis*
102	02.03.2020	14° 2'46"	99° 42'55"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Phanom Thuan, Kanchanaburi	5	5	10	*L. chinensis*
103	02.03.2020	14° 4'47"	99° 44'46"	Cucumber	*Sucumis sativus* L.	Cucurbitaceae	Phanom Thuan, Kanchanaburi	3	21	24	*L. sativae*
104	09.03.2020	13° 26'53"	102° 8'8"	Cucumber	*Sucumis sativus* L.	Cucurbitaceae	Wang Nam Yen, Sa Kaeo	0	3	3	*L. sativae*
105	09.03.2020	13° 29'29"	102° 10'51"	Culantro	*Eryngium foetidum* L.	Apiaceae	Wang Nam Yen, Sa Kaeo	0	2	2	*L. sativae*
106	17.03.2020	13° 55'34"	99° 57'9"	Sweet Basil	*Ocimum basilicum* L.	Labiatae	Mueang, Nakhon Pathom	3	11	14	*L. sativae*
107	17.03.2020	13° 57'45"	99° 56'53"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom	0	2	2	*L. chinensis*
108	17.03.2020	13° 54'24"	99° 58'5"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Mueang, Nakhon Pathom	2	6	8	*L. sativae*
109	17.03.2020	13° 55'50"	99° 57'20"	Chinese Chives	*Allium tuberosum* Rottl. ex Spreng	Amaryllidaceae	Mueang, Nakhon Pathom	0	5	5	*L. chinensis*
110	24.03.2020	14° 0'43"	99° 39'51"	Chinese broccoli	*Brassica oleracea* L.	Brassicaceae	Tha Muang, Kanchanaburi	0	1	1	*L. brassicae*

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.23.1 continue

No.	Date	Latitude	Longitude	Common Name	Scientific Name	Family	Location	Quantity			leafminer
								Male	Female	Total	
111	24.03.2020	14°1'55"	99°49'55"	Okra	*Abelmochus esculentus* L.	Malvaceae	Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom	3	5	8	*L. sativae*
112	24.03.2020	14°4'25"	99°49'19"	Onion	*Allium cepa* L.	Amaryllidaceae	Phanom Thuan, Kanchanaburi	10	3	13	*L. chinensis*
113	24.03.2020	14°14'37"	99°49'25"	Angled Loofah	*Luffa acutangula* (L.) Roxb.	Cucurbitaceae	Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom	1	0	1	*L. sativae*
114	24.03.2020	14°14'37"	99°49'25"	Cucumber	*Sucumis sativus* L.	Cucurbitaceae	Phanom Thuan, Kanchanaburi	2	5	7	*L. sativae*
115	24.03.2020	14°0'7"	99°37'52"	Cucumber	*Sucumis sativus* L.	Cucurbitaceae	Tha Muang, Kanchanaburi	4	2	6	*L. sativae*
116	02.12.2020	18°19'29.8"	98°22'10.4"	Potato	*Solanum tuberosum* L.	Solanaceae	Kong Khaek, Mae Chaem, Chiang Mai	3	2	5	*L. huidobrensis*
117	30.12.2020	14°47'33"	98°21'40.2"	Watermelon	*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & N	Cucurbitaceae	Nong Ya Sai, Suphan Buri	1	9	10	*L. sativae*
118	31.12.2020	14°14'51"	99°49'17"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	U Thong, Suphan Buri	16	5	21	*L. sativae*
119	14.01.2021	16°46'03"	98°34'15"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Mae Sot, Tak	1	11	12	*L. sativae*
120	02.02.2021	18°29'18.4"	98°13'29.14"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Pang Hin Fon, Mae Chaem, Chiang Mai	0	18	18	*L. trifolii*
121	19.02.2021	14°39'15"	99°57'4"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Si Prachan, Suphan Buri	1	3	4	*L. sativae*
122	19.03.2021	14°00'28"	99°39'30"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Thung Thong, Tha Muang, Kanchanaburi	3	5	8	*L. chinensis*
123	23.03.2021	18°51'55"	99°21'2"	Ivy gourd	*Coccinia grandis* L.	Cucurbitaceae	Huai Kaeo, Mae On, Chiang Mai	5	5	10	*L. sativae*
124	23.03.2021	18°52'3"	99°19'20.1"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Huai Kaeo, Mae On, Chiang Mai	6	5	11	*L. sativae*
125	24.03.2021	18°52'2"	99°16'13"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Huai Kaeo, Mae On, Chiang Mai	13	8	21	*L. sativae*
126	24.03.2021	18°32'30"	98°31'19"	Potato	*Solanum tuberosum* L.	Solanaceae	Ban Luang, Chom Thong, Chiang Mai	13	70	83	*L. huidobrensis*
127	24.03.2021	18°32'29"	98°32'57"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Ban Luang, Chom Thong, Chiang Mai	47	51	98	*L. sativae*
128	24.03.2021	18°52'2"	99°16'13"	Cucumber	*Sucumis sativus* L.	Cucurbitaceae	Huai Kaeo, Mae On, Chiang Mai	0	1	1	*L. sativae*
129	25.03.2021	18°19'27"	98°21'45"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Mae Chaem, Chiang Mai	0	2	2	*L. chinensis*
130	25.03.2021	18°30°4"	98°21'25"	Shallot	*Allium ascalonicum* L.	Amaryllidaceae	Chang Khoeng, Mae Chaem, Chiang Mai	3	8	11	*L. chinensis*

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.23.1 continue

No.	Date	Latitude	Longitude	Common Name	Scientific Name	Family	Location	Quantity			leafminer
								Male	Female	Total	
131	25.03.2021	18°29'43"	98°22'23"	Chinese broccoli	*Brassica oleracea* L.	Brassicaceae	Chang Khoeng, Mae Chaem, Chiang Mai	1	0	1	*L. brassicae*
132	25.03.2021	18°30'11"	98°21'40"	Ivy gourd	*Coccinia grandis* L.	Cucurbitaceae	Chang Khoeng, Mae Chaem, Chiang Mai	0	1	1	*L. sativae*
133	25.03.2021	18°29'43"	98°22'23"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata*	Fabaceae	Chang Khoeng, Mae Chaem, Chiang Mai	12	10	22	*L. sativae*
134	25.03.2021	18°32'20"	98°20'54"	Japanese Pumpkin	*Cucurbita moschata*	Cucurbitaceae	Chang Khoeng, Mae Chaem, Chiang Mai	5	7	12	*L. sativae*
135	25.03.2021	18°19'27"	98°22'23"	Sugar snap pea	*Pisum sativum* L.	Fabaceae	Kong Khaek, Mae Chaem, Chiang Mai	2	3	5	*L. sativae*
136	29.03.2021	13°0'11.01"	99°51'39.25"	Cucumber	*Sucumis sativus* L.	Cucurbitaceae	Tha Laeng, Tha Yang, Phetchaburi	12	22	34	*L. sativae*
137	29.03.2021	11°46'8.51"	99°46'12.89"	Tomato	*Lycopersicon esculentum* Mill.	Solanaceae	Khlong Wan, Mueang, Prachuap Khiri Khan	10	12	22	*L. sativae*
138	29.03.2021	12°57'25.04"	99°54'0.31"	Cauliflower	*Brassica oleracea* L.	Brassicaceae	Tha Yang, Tha Yang, Phetchaburi	13	8	21	*L. sativae*
139	29.03.2021	12°57'25.04"	99°54'25.04"	Chinese broccoli	*Brassica oleracea* L.	Brassicaceae	Tha Yang, Tha Yang, Phetchaburi	11	20	31	*L. brassicae*
140	30.03.2021	12°31'48.63"	99°32'40.9"	Eggplant	*Solanum melongena* L.	Solanaceae	Huai Sat Yai, Hua Hin, Prachuap Khiri Khan	1	0	1	*L. sativae*
141	30.03.2021	12°2'43.91"	99°51'42.90"	Yardlong bean	*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedali*	Fabaceae	Kui Buri, Kui Buri, Prachuap Khiri Khan	2	0	2	*L. sativae*

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.23.2 The data of wing length and width of Agromyzid leafminer

	Scientific name	Number of samples	Wing length (mm)	Wing width (mm)
1.	*L. brassicae*	20	1.45 ± 0.03	0.62 ± 0.01
2.	*L. chinensis*	20	1.82 ± 0.02	0712± 0.01
3.	*L. huidobrensis*	20	1.95 ± 0.03	0.82 ± 0.01
4.	*L. sativae*	20	1.42 ± 0.01	0.60 ± 0.04
5.	*L. triflolii*	20	1.44 ± 0.02	0.60 ± 0.01

Table 1.1.23.3 The ration of Agromyzid venation (Penultimate section of vein (b) and Last section of vein (a).

	Scientific name	Number of samples	Vein Cu 1A		a -times length of b
			a(mm)	b(mm)	
1.	*L. brassicae*	20	0.520 ± 0.010	0.176 ± 0.013	2.990 (3-4 times)
2.	*L. chinensis*	20	0.607± 0.009	0.195 ± 0.004	3.129 (3-4 times)
3.	*L. huidobrensis*	20	0.679 ± 0.015	0.293 ± 0.007	2.309 (2-2.5 times)
4.	*L. sativae*	20	0.530 ± 0.005	0.159 ± 0.003	3.316 (3-4 times)
5.	*L. triflolii*	20	0.505 ± 0.009	0.158 ± 0.004	3.231 (3-4 times)

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.24 อนุกรมวิธานแมงมุมวงศ์ Oxyopidae

Taxonomic study of Spider Fauna in Family Oxyopidae

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	วิมลวรรณ โชติวงศ์	สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	พลอยชมพู กรวิภาสเรือง	สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
	อทิติยา แก้วประดิษฐ์	สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
	ณพชรกร ธไภษัชย์	สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
	วีระชัย สมศรี	สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมในวงศ์ Oxyopidae ของประเทศไทยตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2564 บนพื้นที่ 10 จังหวัด เพื่อนำมาศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานและจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ โดยการใช้ลักษณะที่สำคัญในการจำแนกชนิด เช่น ลักษณะการจัดเรียงของตา ลักษณะของ endite ลักษณะการจัดเรียงของฟันและจำนวนฟันบน chelicerae การจัดเรียงของเส้นขนบนขา ความยาวของขา ลักษณะรูปร่างและลวดลายบนส่วนหลัง ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ฯลฯ ผลจากการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานพบแมงมุมในวงศ์ Oxyopidae ทั้งหมด 4 สกุล 6 ชนิดได้แก่ *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch, 1847) *Oxyopes javanus* Thorell, 1887 *Oxyopes shweta* Tikader, 1970 *Peucetia viridans* (Hentz, 1832) *Hamataliwa* sp. และ *Hamadruas* sp.

Abstact

Survey of spider in Family Tetragnthidae from 10 provinces in Thailand from October, 2019 to September, 2021 was conducted. The results of identification revealed that there were 4 genera 6 species of including *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch, 1847) *Oxyopes javanus* Thorell, 1887 *Oxyopes shweta* Tikader, 1970 *Peucetia viridans* (Hentz, 1832) *Hamataliwa* sp. and *Hamadruas* sp. The taxonomic character are used for identification such as eyes arrangement , tooth arrangement and number of tooth on chelicerae, hair arrangement, length legs, shape, pattern and marking on abdomen, the shape of palpus and epigyne etc.

คำนำ

แมงมุมตาหกเหลี่ยม (lynx spider) เป็นแมงมุมที่อยู่ในวงศ์ Oxyopidae พบครั้งแรกโดย Thorell ในปี 1870 ลักษณะเด่นของแมงมุมวงศ์นี้คือมีลักษณะการจัดเรียงตาเป็นรูป 6 เหลี่ยมโดยตากลางคู่หน้ามีขนาดเล็กอยู่ด้านหน้า และ6 ตาที่เหลือจะเรียงเป็นรูป 6 เหลี่ยม ขายาว ผอม มีหนามยาวทั่วไป หากินกลางวันและกลางคืน

กรมวิชาการเกษตร

เป็นแมงมุมที่มีสายตาดีมาก เคลื่อนไหวได้ว่องไว สามารถตะครุบจับเหยื่อได้รวดเร็ว และกระโดดได้ไกลถึง 2 – 3 เซนติเมตร หรือมากกว่าเพื่อจับแมลงที่บิน ปัจจุบันจำแนกได้ 9 สกุล 456 ชนิด ซึ่ง 3 สกุลที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุดประกอบด้วย *Oxyopes* Latreille, 1804 *Hamataliwa* Keyserling, 1887 และ *Peucetia* Thorell, 1869 ตามลำดับ (NMBE, 2021) และพบในประเทศไทยเพียง 3 ชนิด (Platnick, 2013) การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้แมงมุมตาหกเหลี่ยมได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย เช่น ทางตะวันออกของเท็กซัสได้ศึกษาประสิทธิภาพของแมงมุมตาหกเหลี่ยม *Peucetia viridans* (Hentz) ในฝ้ายและ woolly croton พบว่าสามารถควบคุม *Heliothis zea* (Boddie), *Alabama argillacea* (Hübner) และ cotton fleahopper, *Pseudatomoscelis seriatus* (Reuter) (Nyffeler *et al.,* 1987) สำหรับในประเทศไทย *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch, 1847) เป็นตัวห้ำที่มีความสำคัญและมีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงวันผลไม้ ในสวนมะม่วงและพบมากบนวัชพืชริมท้องร่อง (วิภาดา และคณะ, 2551) นอกจากนี้ยังพบอาศัยหากินตามพืชเศรษฐกิจต่าง ๆ เช่น นาข้าวและบริเวณคันนา พืชไร่ พืชสวน ไม้ดอกไม้ประดับต่าง ๆ บริเวณที่พบมากที่สุดคือ วัชพืชใต้ร่มเงาไม้ผล โดยเฉพาะหญ้าขน หญ้าไทร (วิภาดา และอัมพร, 2544) วิมลวรรณ และคณะ 2556 ได้ศึกษาอัตราการกินแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis*) (Hendel) ของแมงมุมตาหกเหลี่ยม: *O. lineatipes* (C. L. Koch, 1847) ในห้องปฏิบัติการและพบว่าแมงมุมตัวอ่อน ตัวเต็มวัยเพศเมียและตัวเต็มวัยเพศผู้มีอัตราการกินสูงสุดเฉลี่ย 7.78 7.67 และ 6.53 ตัวต่อวันที่ระดับความหนาแน่นของแมลงวันผลไม้ 17 16 และ 16 ตัวต่อแมงมุม 1 ตัว ตามลำดับ ดังนั้นการศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมวงศ์ Oxyopidae จึงนับว่ามีความสำคัญที่ควรจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงจำนวนชนิดที่พบในประเทศไทย ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นพื้นฐานของการบริหารศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีจุดมุ่งหมายในการลดใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อความปลอดภัย ประหยัด และไม่เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ประกอบกับปัจจุบันไม่มีผู้ที่ศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของแมงมุมทางการเกษตรในประเทศไทย และการศึกษาอนุกรมวิธานของแมงมุมในวงศ์ Oxyopidae ในประเทศไทยยังทำน้อยมาก สมควรศึกษาอนุกรมวิธานของแมงมุมวงศ์นี้เพื่อทราบจำนวนชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ เขตการแพร่กระจาย พืชอาศัย เป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อเป็นแหล่งสืบค้นและเปรียบเทียบตัวอย่างต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง หลอดแก้วทดลอง ขวดดองตัวอย่างแมงมุมขนาดต่างๆ กัน กล่องพลาสติกใสขนาดต่างๆ กัน กระดาษทิชชู่ ปากคีบ พู่กัน ถุงพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ กัน

- อุปกรณ์ในการจำแนกชนิด ได้แก่ จานแก้ว petridish silica-gelสำหรับcolumn chromatography กล้องจุลทรรศน์ (stereomicroscope) tube ขนาดเล็ก ดินสอ ปากกา rotring เบอร์ 1, 2, 3 เอกสารด้านอนุกรมวิธานแมงมุมที่เกี่ยวข้อง สารเคมี ได้แก่ alcohol 95%, proteinase K, 10% KOH, chloroform, ethyl acetate

- อุปกรณ์ในการเขียนผลงานวิจัยและเผยแพร่ ได้แก่ อุปกรณ์ในการถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์ ติดตั้งด้วยกล้องถ่ายภาพ อุปกรณ์คอมพิวเตอร์ วัสดุสำนักงาน

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง (ดำเนินการปี 2562-2564)

วิธีดำเนินการวิจัยในการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนและตัวเต็มวัยแมงมุมตาหกเหลี่ยมเพื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- การศึกษาครั้งนี้มีแผนการปฏิบัติการเก็บตัวอย่างแมงมุมตาหกเหลี่ยมจากพื้นที่แปลงมันสำปะหลัง สวนชมพู่ แปลงเกษตรกร และป่า ในประเทศไทย โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างหลายวิธีการดังนี้

- การมองหาและจับโดยตรง (visual search) วิธีนี้เหมาะสำหรับจับแมงมุมทุกเวลาและสถานที่ จับแมงมุมโดยใช้หลอดทดลอง ฆ่าแมงมุมโดยใส่ก้อนสำลีในกล่องพลาสติกที่เลี้ยงแมงมุมหยด เอทิลอะซิเตต 2-3 หยด ลงบนก้อนสำลีเพื่อทำให้แมงมุมสลบ ดองแมงมุมในขวดที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75% เพื่อเก็บรักษาตัวอย่างและนำไปจำแนกชนิดต่อไป

- การใช้ Beating tray โดยเขย่ากิ่งไม้ที่มีขนาดเล็กลงบนตัวถาดสำหรับรองรับแมงมุมจากนั้นแมงมุมจะตกลงในถาด โดยถาดที่ใช้ทำมาจากผ้าดิบสีขาว รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 80x80 ซม. โดยนำไม้ไผ่ หรือท่ออลูมิเนียม ทำเป็นโครงรูปกากบาท นอกจากผ้าดิบที่นำมาทำถาดแล้วอาจจะใช้ร่มแทน ฆ่าและรักษาตัวอย่างแมงมุมดังข้อ 1

- การใช้สวิงโฉบ (Sweep net) ใช้สวิงจับแมลงโฉบแมงมุมที่อาศัยตามวัชพืช แมงมุมจะติดในสวิง จากนั้นเทแมงมุมบนกระดาษขาวที่ปูบนพื้นดิน ใช้หลอดแก้วค่อยๆ จับแมงมุมใส่ในหลอดแก้วที่เตรียมไว้ ฆ่าและเก็บตัวอย่างแมงมุมเพื่อนำไปรักษาตัวอย่างดังข้อ 1

นำตัวอย่างที่ได้มาฆ่าด้วยขวดน็อคแมลงที่บรรจุด้วยสารเอทิลอะซิเตต จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมในหลอดแก้วที่บรรจุแอลกอฮอล์ 95% เพื่อนำไปศึกษาดีเอ็นเอ สำหรับตัวอย่างที่ต้องการเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ให้เก็บรักษาในหลอดแก้วที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75%

บันทึกชื่อแมงมุม วันที่จับ สถานที่จับ ชื่อผู้เก็บ ลงในป้ายกระดาษขาวแผ่นเล็กๆ แล้วใส่ลงในหลอดแก้วที่ดองแมงมุม

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน (ดำเนินการปี 2562-2564)

- วิธีการเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างออกจากขวดจากนั้นโดยใช้พู่กัน forceps และ needles ยืดขาแมงมุมให้กางออกให้ตรง จากนั้นนำตัวอย่างมาวางไว้ในจาน petridish ที่มีทรายวิทยาศาสตร์สีขาวที่ถูกแช่ด้วยแอลกอฮอล์ให้เต็ม นำไปตั้งไว้ใต้กล้อง Olympus SZH-ILLD stereomicroscope สำหรับ epigynum (อวัยวะเพศเมีย) จะใช้ needles เจาะรอบๆ epigynum จากนั้นจึงดึงออกมาแล้วแล้วนำไปแช่ใน proteinase K ประมาณ 2-3 ชั่วโมง เพื่อกำจัดเนื้อเยื่อส่วนที่ไม่ต้องการออกไป แล้วจึงนำไปล้างในน้ำสะอาด เมื่อจำแนกชนิดเสร็จแล้วจึงนำไปใส่ในสไลด์หลุมแล้วปิดด้วย cover slip แล้วนำไปแช่ในขวดตัวอย่างเดิม ส่วน pedipalps (อวัยวะเพศผู้) จะถูกดึงออกทางด้านซ้าย จากนั้นจึงแล้วนำไปต้มด้วย 10% KOH ที่อุณหภูมิ 60oC ประมาณ 5-10 นาที จนกระทั่ง pedipalp ขยายออก จึงนำไปศึกษาดูรายละเอียดใต้กล้อง stereomicroscope เมื่อจำแนกชนิดเสร็จแล้วจะนำ pedipalps (อวัยวะเพศผู้) ใส่ใน tube ขนาดเล็กแล้วนำไปแช่ในขวดตัวอย่างเดิม

- การจำแนกชนิด

กรมวิชาการเกษตร

นำตัวอย่างแมงมุม epigynum (อวัยวะเพศเมีย) และ pedipalps (อวัยวะเพศผู้) มาเปรียบเทียบจากตำราต่างๆ โดยเฉพาะจากเอกสารเกี่ยวกับการศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในแถบทวีปเอเชีย ได้แก่ The Spiders of China (Song *et al.* 1999) และ Description of the lynx spiders of a canopy fogging project in northern Borneo (Araneae: Oxyopidae), with description of a new genus and six new species of Hamataliwa (Deeleman 2009) จากนั้นบรรยายลักษณะทางอนุกรมวิธาน วัดความยาวของทั้งลำตัว ความยาวและความกว้างของ carapace (ส่วนหัวรวมกับส่วนอก) ความยาวและความกว้างของ abdomen (ส่วนท้อง) ความยาวของขาทั้งหมด femur, patella, tibia, metatarsus, tarsus ถ่ายรูปและบรรยายลักษณะทางอนุกรมวิธาน จากนั้นทำคู่มือการจัดจำแนกชนิด (key) เพื่อใช้เป็นแนวทางในการจำแนก เก็บและรักษาตัวอย่างแมงมุมไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม สำนักวิจัยและพัฒนาอารักขาพืช

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564

สถานที่ : 1) พื้นที่ 10 จังหวัด ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา ขอนแก่น ชัยภูมิ และอุดรธานี ภาคตะวันตกได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี เพชรบุรี ราชบุรี ภาคใต้ได้แก่ สุราษฎร์ธานี และตรัง

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมตาหกเหลี่ยม

ผลจากการสำรวจชนิดแมงมุมตาหกเหลี่ยมในประเทศไทยตามพื้นที่การเกษตร ได้แก่ สวนชมพู่ สวนมะม่วงสวนยางพารา พื้นที่ป่าธรรมชาติ เช่น ป่าข้างทาง ขอบชายป่า วัชพืช และน้ำตก (table 1.1.24.1) ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2564 ในพื้นที่ 10 จังหวัด พบแมงมุมตาหกเหลี่ยมในประเทศไทย 4 สกุล 6 ชนิด ได้แก่ สกุล *Oxyopes* จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *O. lineatipes O. javanus* และ *O. shweta* สกุล *Hamataliwa* จำนวน 1 ชนิด คือ *Hamataliwa* sp. สกุล *Hamadruas* จำนวน 1 ชนิด คือ *Hamadruas* sp. แมงมุมวงศ์ Oxyopidae หากินในเวลากลางวัน ส่วนมากมีพฤติกรรมซุ่มรอดักเหยื่อ ซึ่งแมงมุมตาหกเหลี่ยมส่วนใหญ่ชอบอาศัยในบริเวณที่มีแหล่งหญ้าสูง ไม้พุ่มเตี้ย และพืชล้มลุก แต่สกุล *Hamataliwa* บางชนิดอาศัยอยู่กับต้นไม้และบางครั้งก็พบวิ่งตามพื้นดิน

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน

จากการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานของแมงมุมกระโดดในประเทศไทยเพื่อจำแนกชนิดตัวอย่างแมงมุมทั้งหมดที่เก็บได้ในห้องปฏิบัติการโดยการใช้ลักษณะที่สำคัญในการจำแนกชนิด เช่น ลักษณะการจัดเรียงของตา ลักษณะของ endite ลักษณะของ fovea ระยะห่างระหว่างตา ลักษณะ sternum labium maxillae ความยาวของขา ลักษณะรูปร่างและลวดลายบนด้านหลังของส่วนท้อง ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย และแหล่งที่อยู่อาศัย พบแมงมุมในวงศ์ Oxyopidae ทั้งหมด 4 สกุล 6 ชนิด สามารถจำแนกชนิดได้ 6 ชนิด ได้แก่ *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch, 1847) *Oxyopes javanus* Thorell, 1887 *Oxyopes*

กรมวิชาการเกษตร

shweta Tikader, 1970 *Peucetia viridans* (Hentz, 1832) *Hamataliwa* sp. และ *Hamadruas* sp. ซึ่งแมงมุมสกุล *Oxyopes* ชนิด *O. shweta* และสกุล *Hamadruas* นับว่าเป็นสกุลที่ยังไม่มีตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์มาก่อน สำหรับคู่มือการวินิจฉัยชนิดที่ใช้ในการจำแนกและลักษณะอนุกรมวิธานของแมงมุมตาหกเหลี่ยมในวงศ์ Oxyopidae แต่ละวงศ์มีดังนี้

1. Posterior row of eyes slightly procurved. Posterior lateral eyes further from the anterior lateral than from the posterior medians. The row of anterior lateral eyes wider than the row of posterior medians. Retromargin of cheliceral fang furrow without teeth. (Body bright green in life) ..... *Peucetia*

- Posterior row of eyes strongly procurved; posterior lateral eyes about as far from the anterior laterals as from the posterior medians. The row of anterior lateral eyes subequal in length to the row of posterior medians or else narrower. Retromargin of cheliceral fang furrow with one tooth. (Body in life not green)..... 2

2 . AME more than d apart or less apart; clypeus and femora usually lined with black .....*Oxyopes*

- PER procurve; clypeus more than distance between ALE; no irrdescent setae are present, only appressed flattened setae in white, black and red; Leg IV < leg III.....3

3. Carapace dorsally straight in lateral view rectangular, front face shorter than rear face, rear face vertical or receding; abdomen not more than 20% longer than carapace or shorter, spider length 3-9 mm, abdomen rarely with geometric color pattern.....*Hamataliwa*

- carapace dorsally with saddle; rear face of carapace sloping, abdomen 50-100% longer than caraopace, narrow distally; spider length 7-15 mm, abdomen dorsally often with geometric color pattern..... *Hamadruas*

วงศ์ Oxyopidae Thorell, 1869 (แมงมุมตาหกเหลี่ยม, lynx spiders)

แมงมุมวงศ์ Oxyopidae มาจากภาษากรีกแปลว่ามีสายตาที่เฉียบคม พบครั้งแรกโดย Thorell ในปี 1869 โดยเขาได้จำแนกออกเป็น 2 สกุล ได้แก่ สกุล *Peucetia* และ สกุล *Oxyopes* ต่อมาปี 1894 Urquhart ย้ายไปอยู่ในสกุล *Laestrygones* วงศ์ Toxopidae แมงมุมวงศ์นี้มีการจัดเรียงตาที่เป็นเอกลักษณ์ที่มีลักษณะโดดเด่นไม่เหมือนกับแมงมุมวงศ์อื่น โดยมีการจัดเรียงเป็น 4 แถว (2-2-2-2) เป็นรูปหกเหลี่ยมโดยตากลางคู่หน้ามีขนาดเล็กที่สุดอยู่ด้านหน้า และอีก6 ตาที่เหลือจะเรียงเป็นรูป 6 เหลี่ยม clypeus มีความกว้างมากกว่าระยะห่างของตากลางคู่หน้าเป็นอย่างมากจึงทำให้เห็นว่าพื้นที่ส่วน clypeus มีความสูง chelicerae มี boss และ scopula ไม่มีฟันหรือมีฟันจำนวน 1 ซี่ labium ยาวและเคลื่อนไหวได้ maxillae ขนานกันและมี scopulae ไม่มี cribellum calamistrum และ colulus มีspinneret มีจำนวน 6 อัน นอกจากการจัดเรียงตาที่เป็นเอกลักษณ์ของวงศ์นี้แล้วการมีขนแข็งลักษณะเกือบตั้งตรงที่บริเวณขาจำนวนมากเป็นลักษณะเด่นอีกประการของวงศ์นี้ ขามี

กรมวิชาการเกษตร

หนามยาวกระจายทั่วทุกขา ลักษณะยาว ผอม และมีเกล็ดขนลักษณะแบน มี claw จำนวน 3 เล็บ tibia metatarsi และ tarsi มี trichobotria จำนาน 2 แถว tracheal spiracle ตั้งอยู่ใกล้กับspinneret ปลายท้องเรียวแหลม แมงมุมวงศ์นี้มีสายตาดีมากและมีนิสัยว่องไว Gajbe (2008) รายงานว่าแมงมุมวงศ์นี้มีขาหลังแข็งแรงมีการพัฒนามาอย่างดีจึงทำให้สามารถกระโดดได้ไกลและเคลื่อนไหวรวดเร็ว แมงมุมตาหกเหลี่ยมหากินโดยการกระโดดตะครุบเหยื่อและไม่สร้างเส้นใยดักเหยื่อ มีนิสัยออกหากินเวลากลางวัน ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ตามหญ้าและพุ่มไม้ สามารถพบได้ทั่วไป โดยทั่วไปมีลำตัวขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ (5-23 มิลลิเมตร) เพศผู้และเพศเมียมีขนาดลำตัวใกล้เคียงกัน แมงมุมมักวางไข่บริเวณกิ่งไม้และถักเส้นใยสีขาวคลุมกลุ่มไข่ แม่แมงมุมจะเฝ้ากลุ่มไข่จนกว่าไข่จะฟักออกมาเป็นตัวอ่อน ปัจจุบัน World Spider Catalog (2021) รายงานว่าเป็นวงศ์ที่ประกอบด้วยสมาชิกที่ถูกจำแนกชนิดเรียบร้อยแล้วจำนวน 9 สกุล 442 ชนิด

สกุล *Hamadruas* Deeleman-Reinhold, 2009

Type: *Oxyopes hieroglyphicus* Thorell, 1887เพศเมีย

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

แมงมุมสกุลนี้มีลำตัวขนาดใหญ่ โดยทั่วไปเพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ แมงมุมสกุลนี้แตกต่างจากสกุล *Hamataliwa* โดยcehalothorax มีลักษณะลาดชันหรือมีลักษณะคล้ายอานม้า เมื่อก่อนเคยจัดจำแนกอยู่ในสกุล *Oxyopes* หรือ *Tapponia* มาก่อน ขายาวกว่า สกุล *Hamataliwa* มีความยาวของขาเรียงตามลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 1234 และมีรูปร่างส่วนท้องแตกต่างจากสกุล *Hamataliwa* ปัจจุบันมีสมาชิกที่ถูกจำแนกชนิดเรียบร้อยแล้วทั้งหมด 9 ชนิด

Hamadruas sp. (Figure 1.1.24.1)

ชื่อสามัญ: Lynx spider

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศเมีย 15 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศเมีย; สีน้ำตาลเข้ม ลักษณะนูน มีความยาวมากกว่าความกว้างเล็กน้อย พื้นที่ส่วนหัวยกสูงขึ้นและถูกปกคลุมด้วยขนสั้นๆ สีน้ำตาลออกดำและสีน้ำตาล ตา 8 ตา (รูป 1B) สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes ตากลางคู่หน้ามีขนาดเล็กที่สุด มีการจัดเรียงตา 2 แถว ตาแถวด้านหน้าเรียงตัวเป็นรูป recurved เล็กน้อย ตาแถวด้านหลังเรียงตัวเป็นรูป procurvedเล็กน้อย ตาแต่ละข้างจะมีระยะห่างระหว่างตาเท่ากัน clypeus ยาวและกว้าง มีลักษณะคล้ายเส้นขนสีดำ 2 เส้นลากจากตากลางคู่หน้าจนถึงฐานของ fang Sternum เป็นรูปหัวใจและถูกปกคลุมไปด้วยขนและมีหนามขนาดเล็กบ้างเล็กน้อย chelicerae มีฟันแถวหน้าจำนวน 1 ซี่ แถวหลังจำนวน 1 ซี่ ขาลักษณะยาวแข็งแรงมีสีน้ำตาลเข้มถูกปกคลุมไปด้วยขนและหนามขนาดยาวเห็นอย่างเด่นชัดกระจายอยู่ทั่วทุกขา มีความยาวของขาเรียงตามลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 1234

ท้อง (Abdomen): เพศเมีย; สีน้ำตาลเข้มออกดำ และมีลวดลายด้านบนของส่วนท้อง มีความยาวมากกว่าความกว้างและแคบลงไปทางด้านปลายของส่วนท้องและถูกปกคลุมไปด้วยเส้นขนสีน้ำตาลเข้มออกดำ ดังรูป Epigynum และ vulva ดังรูป 1 D

ศูนย์วิทยทรัพยากร

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): ในประเทศไทยสามารถพบได้ที่ สระบุรี

สกุล *Hamataliwa* Keyserling, 1887

Type: *Hamataliwa grisea* Keyserling, 1887 เพศเมีย

ชื่อพ้อง :

ถูกจำแนกชนิดและพิจารณาให้เป็น senior synonym ของสกุล *Oxyopeidon* โดย Bryant ในปี1948 และ Simon ในปี 1898 และเคยถูกเปลี่ยนเป็นสกุล *Megullia* โดย Thorell ในปี1897 และมีสมาชิกในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด คือ *Hamataliwa sikkimensis* (Tikader, 1970) ได้ถูกย้ายไปอยู่ในสกุล *Hamadruas* ปัจจุบันมีสมาชิกที่ถูกจำแนกชนิดเรียบร้อยแล้วทั้งหมด 83 ชนิด

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

โดยทั่วไปแมงมุมสกุลนี้มีลำตัวขนาดเล็กกว่าสกุล *Hamadruas* และ *Oxyopes* ลักษณะยกสูงและนูนถ้ามองด้านข้างจะเห็นลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส carapace ถูกปกคลุมไปด้วยขนยาวสีน้ำตาลเข้มและมีขนปุยฟูที่บริเวณพื้นที่ตาโดยอยู่ระหว่างตาข้างคู่หน้าและตาข้างคู่หลัง ตามีสีดำ ตากลางคู่หน้ามีขนาดเล็กที่สุดและอยู่ใกล้กันมากกว่าสกุล *Oxyopes* ตากลางคู่หลังและตาข้างคู่หลังมีขนาดเกือบเท่ากันและมีขนาดใหญ่กว่าตากลางคู่หน้า แถวของตาข้างคู่หน้ามีความกว้างมากกว่าแถวของตากลางคู่หลัง แถวของตาข้างคู่หลังมีความกว้างมากที่สุด maxillae มีขนาดยาวกว่า labium มีเส้นสีดำตรงด้านด้านหลังของขาปล้องที่สาม ขาปล้องที่สี่ห้าและหกถูกปกคลุมด้วยขนยาวจำนวนมากและมีขนตั้งตรงบริเวณด้านหลังและด้านข้าง ความยาวชองขาเรียงตามลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 1234 โดยขาคู่ที่หนึ่งมีลักษณะยาวและแข็งแรง ขาคู่ที่สามมีขนาดเกือบเท่ากับหรือใหญ่กว่าขาคู่ที่สี่ ส่วนใหญ่มีขนยาวที่บริเวณด้านข้างของขาแต่ละข้าง ส่วนท้องมีลักษณะเป็นรูปไข่ มากกว่าสกุล *Oxyopes* และ *Peucetia* บางครั้งด้านหน้ามีขนาดกว้างและเป็นลักษณะปลายตัดบริเวณด้านปลายของส่วนท้องและมีขนยาวบริเวณด้านข้างของส่วนท้อง

Hamataliwa sp. (Figure 1.1.24.2)

ชื่อสามัญ: Lynx spider

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศเมีย 8 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศผู้; สีดำ ส่วนหัวมีแต้มขนสีขาว 3 จุด ที่ตรงกลาง ด้านซ้ายและด้านขวา มีเส้นขอบสีขาวที่ด้านท้ายของหัวและอกส่วนอก ส่วนหัวและอกมีความยาวมากกว่าความกว้างเล็กน้อย ตา 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 2-4-4 โดยตาแถวแรกมีขนาดตาที่เล็กที่สุดจำนวน 1 คู่ แถวที่ 2 และ 3 เรียงเป็นรูปหกเหลี่ยม มีเส้นสีดำลากจากตากลางคู่หน้าจนถึง chelicerae chelicerae ไม่มีฟัน ขาสีน้ำตาล มีจุดสีดำ และมีหนามขนาดยาวกระจายอยู่ทั่วทุกขา เพศเมีย; สีน้ำตาลเขียว มีความยาวมากกว่าความกว้าง carapace นูน

กรมวิชาการเกษตร

ท้อง (Abdomen): เพศผู้; มีแถบยาวสีเหลืองขุ่นที่ด้านข้างของส่วนท้องทั้ง 2 ด้าน และมีแถบสีน้ำตาลเข้ม 1 แถบอยู่ตรงกลาง spinnerets มีสีเหลืองขุ่น เพศเมีย; สีเขียวเหลือง มีความยาวมากกว่าความกว้าง ปลายท้องแหลม มีลายสีเนื้อด้านบนของส่วนท้อง Epigynum และ vulva ดังรูป 1.1.24.2 F

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): อเมริกากลางและอเมริกาเหนือ แคริบเบียน และ เวเนซุเอล่า ในประเทศไทยสามารถพบได้ที่ ภาคเหนือ ได้แก่ สุโขทัย ลำปาง น่าน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ ภาคกลาง ได้แก่ กรุงเทพมหานคร นครปฐม พิษณุโลก ภาคตะวันออก ได้แก่ ระยอง ฉะเชิงเทรา ภาคตะวันตก ได้แก่ กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี ภาคใต้ ได้แก่ เพชรบุรี

สกุล *Oxyopes* Latreille, 1804

Type: *Aranea heterophthalma* Latreille, 1804 เพศผู้

ชื่อพ้อง :

เดิมถูกตั้งชื่อเป็น *Oxyopes* โดย Latreille ในปี 1804 สมาชิกจำนวน 14 ชนิดได้ถูกย้ายไปอยู่ในวงศ์ *Hamataliwa* และ มีเพียง 2 ชนิดที่ถูกย้ายไปอยู่ในวงศ์ *Hamadruas* เช่น *Oxyopes banksi* Mello-Leitão, 1928 ได้ถูกย้ายไปเป็น *Hamataliwa banksi*, *Oxyopes clypeatus* F. O. Pickard-Cambridge, 1902 ได้ถูกย้ายไปเป็น *Hamataliwa tricuspidate*, *Oxyopes pupulus* Thorell, 1890 ได้ถูกย้ายไปเป็น *Hamadruas pupulus*, *Oxyopes sikkimensis* Tikader, 1970 1890 ได้ถูกย้ายไปเป็น *Hamadruas sikkimensis* และมีสมาชิกที่ถูกจำแนกชนิดเรียบร้อยแล้วทั้งหมด 291 ชนิด

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

Cephalothorax ยกสูงและนูน พื้นที่ส่วนหัวยกสูงขึ้นเล็กน้อยและลาดลงไปทางพื้นที่ส่วนอก ตามีสีดำ ตากลางคู่หน้าและตาข้างคู่หลังมีขนาดเกือบเท่ากันโดยตาข้างคู่หน้ามีขนาดใหญ่ที่สุด โดยตาแถวแรกมีขนาดตาที่เล็กที่สุดจำนวน 1 คู่ แถวที่ 2 และ 3 เรียงเป็นรูปหกเหลี่ยม clypeus ยาวและมีเส้นสีดำ 2 เส้นลากจากตากลางคู่หน้าจนถึงฐานของ fang chelicerae ยาวมากและเรียวเล็กไปที่ส่วนปลาย fangs (เขี้ยว) สั้น chelicerae มีฟันที่ขอบด้านหน้า 1 ซี่ ด้านหลัง 1 ซี่ Labium ยาวมากกว่ากว้าง Maxillae ยาวมากกว่าlabium ส่วนท้องมีขนาดยาวและเรียวเล็กไปทางส่วนปลาย ขายาวและมีหนามขนาดสั้นกระจายทั่วทุกขา

***Oxyopes javanus* Thorell, 1887 (Figure 1.1.24. 3)**

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Thorell ในปี 1887 โดยจำแนกชนิดเป็น *Salticus plataleoides* ต่อมา Simon (1901) ได้เปลี่ยนเป็นสกุล *Myrmarachne plataleoides* Prószyński (2016) ได้พยายามแยกออกไปเป็นสกุลใหม่คือสกุล *Myrmaplata* โดยใช้ลักษณะของ Spermatheca ที่มีลักษณะแตกต่างกันในการจำแนก กระนั้นก็ตาม Caleb (2016) ได้นำกลับมาอยู่สกุลเดิมคือ *Myrmarachne* เนื่องจาก *M. plataleoides* ส่วนใหญ่มีลำตัวสีดำแต่ตัวอย่างที่สำรวจพบจากเมืองเจนไน ประเทศอินเดีย เป็นตัวอ่อนและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย แต่อย่างไรก็ตาม Caleb (2020) ได้ยอมรับและใช้เป็นสกุล *Myrmaplata* ตาม Prószyński เนื่องจากงานที่เขาตีพิมพ์ในปี 2016 พบว่า *Myrmarachne megachelae* มีรูปร่างลักษณะเหมือนกับ *Myrmaplata*

ศรีนครินทร์

plataleoides ในรูปแบบสีของลำตัวที่เป็นสีดำ จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และจำนวนฟันบน chelicerae พบว่าเป็นชนิดเดียวกัน ดังนั้น *M. megachelae* จึงเป็น junior synonym ของ *M. plataleoides*

ชื่อพ้อง :

Oxyopes lineatipes Simon, 1885

Oxyopes javanus Thorell, 1887

Oxyopes javanus Nentwig *et al.,* 2019

ชื่อสามัญ: Lynx spider

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศเมีย 7-8 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศเมีย; สีเหลืองแกมเขียว มีความยาวมากกว่าความกว้าง พื้นที่ของส่วนหัวยกขึ้นเล็กน้อยโดยไม่มีเส้น fovea ตา 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes ตาแถวด้านหน้าเรียงตัวเป็นรูป recurved ตาแถวด้านหลังเรียงตัวเป็นรูป procurved มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 2-4-4 โดยตาแถวแรกมีขนาดตาที่เล็กที่สุดจำนวน 1 คู่ แถวที่ 2 และ 3 เรียงเป็นรูปหกเหลี่ยม clypeus ยาวและมีเส้นสีดำ 2 เส้นลากจากตากลางคู่หน้าจนถึงฐานของ fang มีเส้นขนสีน้ำตาลแดง 2 เส้นลากจากตาข้างคู่หลังไปจนถึงขอบด้านหลังของ cephalothorax มีเส้นรอยริ้วสีน้ำตาลเข้มที่ด้านข้างของ cephalothoraxทั้ง 2 ด้าน chelicerae สีน้ำตาล มีฟันแถวหน้าจำนวน 1 ซี่ แถวหลังจำนวน 1 ซี่ Maxillae สีน้ำตาลอ่อนมีความยาวมากกว่าความกว้าง Labium สีน้ำตาลอ่อน Sternum มีความยาวมากกว่าความกว้างและมีรูปร่างคล้ายรูปหัวใจ ขาสีเหลืองทอง มีหนามแข็งแรงสีดำกระจายอยู่ทั่วทุกขา โดยเรียงลำดับความยาวจากมากที่สุดไปน้อยที่สุดดังนี้ 1423

ท้อง (Abdomen): เพศเมีย; รูปร่างคล้ายทรงกระบอก สีเหลืองแกมเขียว มีความยาวมากกว่าความกว้าง ด้านหลังมีสัญลักษณ์คล้ายปลายหอกบริเวณด้านหน้าของส่วนท้องจนถึงกึ่งกลางของส่วนท้อง มีริ้วสีน้ำตาลเข้มที่ด้านข้างของส่วนท้อง Epigynum และ vulva ดังรูป 1.1.24.3 D

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): อินเดีย บังคลาเทศ อินโดนีเซีย (จาวา) ฟิลิปปินส์ จีน และ ไทย ในประเทศไทยสามารถพบทั่วทุกภาค ภาคเหนือ ได้แก่ ลำปาง น่าน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ ภาคกลาง ได้แก่ กรุงเทพมหานคร นครปฐม พิษณุโลก ภาคตะวันออก ได้แก่ ระยอง ฉะเชิงเทรา ภาคตะวันตก ได้แก่ กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี ภาคใต้ ได้แก่ เพชรบุรี

***Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch, 1847) (Figure 1.1.24.4)**

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Carl Ludwig Koch ในปี 1846 โดยจำแนกชนิดเป็น *Plexippus versicolor* ในปี 1846 ได้จำแนกชนิดผิดเป็น *Maevia picta* ต่อมาปี 1894 Workman and Workman ใช้ตัวอย่างจาก C. L. Koch ที่จำแนกไว้แล้วได้แก่ *Plexippus versicolor* (1846) และ *Maevia picta* (1848) มาอธิบายบรรยายลักษณะสัณฐานวิทยาใหม่และเปลี่ยนเป็นชื่อ *Chrysilla versicolor ในปี* 1906 *Bösenberg & Strand* ได้ทำการสำรวจและจำแนกชนิดผิดคิดว่าเป็นแมงมุมชนิดใหม่จึงตั้งชื่อใหม่เป็น *Jotus munitus* ต่อมาจึงมีคนตั้งชื่อผิดตาม ได้แก่ Strand ในปี1907, Yaginuma ในปี1955, Lee ในปี 1966, Yin & Wang ในปี 1979 และHu ในปี 1984

หลังจากปี 1985 จนกระทั่งถึงปี 2018 ได้มีการสำรวจแมงมุมกระโดดในประเทศญี่ปุ่น เกาหลี จีน และจำแนกชนิดเป็น *Phintella versicolor* แต่ในปี 2019 Kanesharatnam & Benjamin ได้แก้ไขการจัดกลุ่มสมาชิกแมงมุมกระโดดในทวีปเอเชียใต้สกุล *Chrysilla* และ *Phintella* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมและสัณฐานวิทยา ผลจากการวิเคราะห์พบว่าทั้ง 2 สกุลมีสายวิวัฒนาการที่ต่างกันดังนั้นเขาจึงกำหนดสกุลใหม่ขึ้นว่าชื่อว่า *Phintelloides*

ชื่อพ้อง :

Sphasus lineatipes C. L. Koch, 1847

Oxyopes lineatipes Simon, 1864

Argiope viabilior Chamberlin, 1924

Oxyopes lineatipes Yin *et al.,* 2012

ชื่อสามัญ: Lynx spider

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศผู้ 7-8 มิลลิเมตร เพศเมีย 8-9 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศผู้; สีดำ ส่วนหัวมีแต้มขนสีขาว 3 จุด ที่ตรงกลาง ด้านซ้ายและด้านขวา มีเส้นขอบสีขาวที่ด้านท้ายของหัวและอกส่วนอก ส่วนหัวและอกมีความยาวมากกว่าความกว้างเล็กน้อย ตา 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 2-4-4 โดยตาแถวแรกมีขนาดตาที่เล็กที่สุดจำนวน 1 คู่ แถวที่ 2 และ 3 เรียงเป็นรูปหกเหลี่ยม clypeus ยาวและมีเส้นสีดำ 2 เส้นลากจากตากลางคู่หน้าจนถึงฐานของ fang chelicerae มีฟันแถวหน้าจำนวน 1 ซี่ แถวหลังจำนวน 1 ซี่ ขาสีเหลืองทอง มีหนามขนาดยาวกระจายอยู่ทั่วทุกขา เพศเมีย; สีทองสะท้อนแสง มีความยาวมากกว่าความกว้าง carapace นูน มีร่องลึกตามยาว มีแผงขนสีขาวสั้นๆตามความยาวของ carapace

ท้อง (Abdomen): เพศผู้; มีแถบยาวสีเหลืองขุ่นที่ด้านข้างของส่วนท้องทั้ง 2 ด้าน และมีแถบสีน้ำตาลเข้ม 1 แถบอยู่ตรงกลาง spinnerets มีสีเหลืองขุ่น เพศเมีย; สีเทาสลับสีเงิน มีความยาวมากกว่าความกว้าง ปลายท้องแหลม มีลายตามยาวด้านข้างของส่วนท้อง Epigynum และ vulva ดังรูป 1.1.24.4 D

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): จีน ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย (สุมาตจรา จาวา) และ ไทย ในประเทศไทยสามารถพบทั่วทุกภาค ภาคเหนือ ได้แก่ ลำปาง น่าน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ ภาคกลาง ได้แก่ กรุงเทพมหานคร นครปฐม พิษณุโลก ภาคตะวันออก ได้แก่ ระยอง ฉะเชิงเทรา ภาคตะวันตก ได้แก่ กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี ภาคใต้ ได้แก่ เพชรบุรี

Oxyopes shweta **Tikader, 1970 (Figure 1.1.24.5)**

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกในประเทศอินเดียโดย Tikader, B.K. ในปี 1970 โดยจำแนกชนิดเป็น *Oxyopes shweta* และใช้ชื่อนี้ต่อเนื่องจนกระทั่งถึงปัจจุบัน

ชื่อสามัญ: White lynx spider

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ศรีวิชัยการเกษตร

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศเมีย 12 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศเมีย; ลักษณะนูน มีความยาวมากกว่าความกว้าง มีแถบสีขาวปกคลุมตั้งแต่ตาข้างด้านหน้าไปจนกระทั่งถึงด้านปลายของcarapace และมีขอบสีเหลืองส้มออกสีน้ำตาลล้อมรอบ พื้นที่ส่วนหัวยกสูงขึ้นและถูกปกคลุมด้วยขนละเอียด foveaเด่นชัด ตา 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes ตาข้างคู่หน้ามีขนาดใหญ่ที่สุดและตากลางคู่หน้ามีขนาดเล็กที่สุด มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 2-4-4 ตาแถวด้านหน้าเรียงตัวเป็นรูป recurved ตาแถวด้านหลังเรียงตัวเป็นรูป procurved และมีระยะห่างเท่ากัน โดยตาแถวแรกมีขนาดตาที่เล็กที่สุดจำนวน 1 คู่ แถวที่ 2 และ 3 เรียงเป็นรูปหกเหลี่ยม clypeus ยาวและมีเส้นสีดำ 2 เส้นลากจากตากลางคู่หน้าจนถึงฐานของ fang Sternum เป็นรูปไข่และถูกปกคลุมไปด้วยขนละเอียด chelicerae มีฟันแถวหน้าจำนวน 1 ซี่ แถวหลังจำนวน 1 ซี่ ขาลักษณะยาวแข็งแรงมีสีน้ำตาลออ่อนออกเขียว ปกคลุมไปด้วยขนละเอียดและหนามขนาดยาวเห็นอย่างเด่นชัดกระจายอยู่ทั่วทุกขา ด้านท้องของขาปล้องที่สามของทุกขามีเส้นสีดำลากยาวลงมาตั้งแต่ด้านบนของปล้องจนถึงด้านล่างของปล้อง

ท้อง (Abdomen): เพศเมีย; ลักษณะยาว มีแถบสีขาวปกคลุมด้านหลังตั้งแต่ด้านหน้าของส่วนท้องจนกระทั่งถึงด้านปลายของส่วนท้อง ทางด้านข้างของส่วนท้องมีเส้นสีออกดำลากยาวจากด้านบนไปจนถึงด้านล่างของปลายท้อง Epigynum และ vulva ดังรูป 1.1.24.5 F

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): ปากีสถาน อินเดีย จีน และ ไทย ในประเทศไทยสามารถพบ ภาคเหนือ ได้แก่ ลำปาง น่าน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ ภาคกลาง ได้แก่ กรุงเทพมหานคร นครปฐม พิษณุโลก ภาคตะวันออก ได้แก่ ระยอง ฉะเชิงเทรา ภาคตะวันตก ได้แก่ กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี ภาคใต้ ได้แก่ เพชรบุรี

สกุล *Peucetia* Thorell, 1869

Type: *Pasithea viridis* Blackwall, 1858 เพศเมีย

ชื่อพ้อง :

เดิมถูกตั้งชื่อเป็น *Pasithea viridis* โดย Blackwall ในปี 1858 และเคยถูกย้ายไปอยู่ในสกุล *Tapinillus* ซึ่งชนิดที่ถูกย้ายคือ *Peucetia caldensis* Garcia-Neto, 1989 ปัจจุบันมีสมาชิกที่ถูกจำแนกชนิดเรียบร้อยแล้วทั้งหมด 47 ชนิด

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

แมงมุมสกุลนี้มีลำตัวขนาดใหญ่ยาวและแคบเรียวลงไปทางด้านปลายspinneret โดยทั่วไปสีเขียวสว่าง spinnerets มีจำนวน 3 คู่ มีcolulusขนาดเล็ก มีเล้บจำนวน 3 เล็บ cephalothorax มีความยาวมากกว่าความกว้าง ลักษณะยกสูงและนูนบริเวณส่วนหน้าและแคบลงไปทางส่วนท้าย พื้นที่ส่วนหัวแคบ พื้นที่ส่วนอกกว้างกว่าพื้นที่ส่วนหัวและโค้งมนทางด้านข้าง fovea มักจะมีรอยสีน้ำตาลเข้มทั้งสองข้าง ตามีสีดำ ตาข้างคู่หน้ากว้างกว่าตากลางคู่หลังอย่างชัดเจน ตากลางคู่หน้ามีขนาดเล็กที่สุด ตาข้างคู่หน้ามีขนาดใหญ่ที่สุด ตากลางคู่หลังมีขนาดเท่ากับตาข้างคู่หลัง แถวของตาข้างคู่หลังมีความกว้างมากกว่าแถวของตากลางคู่หน้า โดยตาแถวด้านหน้าเรียงตัวเป็นรูป recurved อย่างชัดเจน ตาแถวด้านหลังเรียงตัวเป็นรูป procurved เล็กน้อย ตาแถวแรกมีขนาดตาที่เล็กที่สุดจำนวน 1 คู่ แถวที่ 2 และ 3 เรียงเป็นรูปหกเหลี่ยม มีเส้นสีดำ น้ำตาลดำ หรือน้ำตาลจำนวน 2 เส้นหรือ 4 เส้น

กรมวิชาการเกษตร

ลากจากตากลางคู่หน้าจนถึงฐานของ fang chelicerae มีลักษณะยาวและเป็นรูปกรวย และไม่พบฟันบน chelicerae sternum มีรูปร่างคล้ายโล่ห์ maxillae มีขนาดยาวกว่า labium

***Peucetia viridans* (Hentz, 1832) (Figure 1.1.24.6)**

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Hentz, N. M. ในปี 1832 โดยจำแนกชนิดเป็น *Sphasus viridans* ต่อมา Walckenaer (1837) ได้จำแนกชนิดผิดและเปลี่ยนชื่อเป็น *Clastes abbot* ในปี 1841 Walckenaer จำแนกชนิดผิดและเปลี่ยนเป็นชนิดใหม่ชื่อ *Clastes viridis* และ *Clastes roseus* ต่อมาในปี Hentz (1845) ได้ย้ายไปอยู่ในสกุล *Oxyopes* โดยตั้งชื่อว่า *Oxyopes viridans* จนกระทั่ง Emerton (1902) ได้ย้ายไปอยู่ในสกุล *Peucetia* โดยตั้งชื่อว่า *Peucetia viridans* และยังคงใช้สกุลนี้ต่อมาตั้งแต่ปี 1902 แต่เปลี่ยนชื่อชนิดไปตั้งแต่ปี 1902 จนกระทั่ง Santos & Brescovit (2003) นำกลับมาใช้ชื่อ *Peucetia viridans* ซึ่งเป็นชื่อที่ถูกต้อง

ชื่อสามัญ: green lynx spider

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศเมีย 17 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศเมีย; สีเขียวสว่าง มีความยาวมากกว่าความกว้าง carapace นูน ตา 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 2 แถว โดยตาแถวแรกมีขนาดตาที่เล็กที่สุด จำนวน 1 คู่ แถวที่ 2 และ 3 เรียงเป็นรูปหกเหลี่ยม carapace ไม่มีเส้นขนแต่มีขนสีขาวที่ติดแนบไปกับพื้นผิวที่บริเวณพื้นที่ตา มีเส้นสีดำลากจากตากลางคู่หน้าจนถึงฐานของ fang chelicerae ไม่มีฟัน Labium endites และ sternum สีเขียว ขาสีเขียวออกเหลือง มีแถบสีแดงที่บริเวณด้านหน้าของขาคู่ที่หนึ่งของขาปล้องที่สาม นอกจากนี้ขาปล้องที่สามมีจุดสีดำขนาดใหญ่กระจายทั่วทั้งปล้องและบางครั้งพบจุดสีดำที่ฐานของหนามบนขาปล้องที่ห้า และมีหนามขนาดยาวกระจายอยู่ทั่วทุกขา

ท้อง (Abdomen): เพศเมีย; สีเขียวสว่าง มีเส้นสีขาว2 เส้น ลากขนานกันตั้งแต่ด้านบนของส่วนท้องจนกระทั่งถึงด้านปลายของส่วนท้อง มีความยาวมากกว่าความกว้าง ปลายท้องแหลม ด้านล่างของส่วนท้องมีแถบสีแดงตั้งแต่ด้านบนของส่วนท้องจนกระทั่งถึงด้านปลายของส่วนท้อง Epigynum และ vulva ดังรูป 1.1.24.6 E

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): อเมริกากลางและอเมริกาเหนือ แคริบเบียน และ เวเนซุเอล่า ในประเทศไทยสามารถพบได้ที่ ภาคเหนือ ได้แก่ สุโขทัย ราชบุรี เพชรบุรี และสระบุรี

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.24.1 Spider Fauna in Family Salticidae found in Thailand between 2017 until 2020

Scientific name	Habitus	Location	GPS	Reference
Oxyopes lineatipes (C. L. Koch, 1847);	dry evergreen forest	Nakron Rachasima	14^{0}40.065",101^{0}26.630"'	W. Chotwong
	mango	Khon Kaen	16^{0}33"13.2474", 102^{0}56'53.4438"'	W. Chotwong
	Restaurant	Sisaket	14^{0}27'39.7188", 104^{0}43'4.3458"	J. Bangtha
	along forest	Bangkok	13^{0}50'50", 100^{0}34'24"	J. Bangtha
	along forest	Pathum thani		J. Bangtha
	Cassava field	Kamphaeng Phet	16^{0}28"9.4146", 99^{0}31'38.8050"'	J. Bangtha
	tree near restaurant	Phitsanulok	16^{0}51"11.5668", 100^{0}36'41.3676"'	W. Chotwong
	Rose apple orchard	Phetchaburi	12^{0}53'45.0", 99^{0}50'57.8"	W. Chotwong
	forest	Kanchanaburi	14° 2' 21.4614",99°30'44.6466"	W. Chotwong
	forest	Prachuap Khiri Khan	12° 23' 39.3468",99°58'51.6684"	W. Chotwong
	along forest	ChiangMai	12^{0}53'45.0", 99^{0}50'57.8"	W. Chotwong
	Rose apple orchard	Rachaburi	13^{0}33'40.8990", 100^{0}3'33.3498"	J. Bangtha
	forest	Surat Thani	07° 28.618" , 099° 21.'393"	J. Bangtha
	forest	Nan	18° 37'31.67" , 100° 44.'17.50"	J. Bangtha
	mango	Chachoengsao	13^{0}42'54.6510", 101^{0}13'2.4708"	W. Chotwong

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.24.1 Spider Fauna in Family Salticidae found in Thailand between 2017 until 2020 (continue)

Scientific name	Habitus	Location	GPS	Reference
	mango	Chachoengsao	13^{0}42'54.6510", 101^{0}13'2.4708"	W. Chotwong
	Rose apple orchard	Samut Sakhon	13° 33'41" , 100° 3.'33"	W. Chotwong
	Restaurant	Sisaket	14^{0}27'39.7188", 104^{0}43'4.3458"	J. Bangtha
	Rose apple orchard	Phetchaburi	13^{0}8'8", 99^{0}56'56"	W. Chotwong
	forest around paddy field	Chainat	15° 17'17.6994" , 100° 1'56.7480"	J. Bangtha
	along forest	ChiangMai	19^{0}57'57.5496", 99^{0}9'17.4060"	J. Bangtha
	Waterfall	ChiangMai	18^{0}32'48.7", 98^{0}30'56.4"	J. Bangtha
	forest	Nan	18° 45'15.4908" , 100° 47'24.7194"	W. Chotwong
Oxyopes javanus Thorell, 1887	forest	Kanchanaburi	14° 50' 0.9", 98° 39' 51.4"	W. Chotwong
	forest	Prachuap Khiri Khan	12° 23' 39.3468",99°58'51.6684"	W. Chotwong
	house	Phitsanulok	16° 51'11.5668" , 100° 36'41.3676"	W. Chotwong
	market	Surat Thani	09° 1'46.0158" , 98° 56'46.0890"	W. Chotwong
	house	Phrae	17° 56'31.5666" , 100° 3'47.3220"	W. Chotwong
	forest	Nan	18° 45'15.4908" , 100° 47'24.7194"	W. Chotwong
	forest	ChiangMai	19^{0}57'57.5496", 99^{0}9'17.4060"	J. Bangtha
	along forest	Bangkok	13^{0}50'50", 100^{0}34'24"	J. Bangtha
	house	Buriram	14^{0}36'25.7508", 103^{0}7'41.3502"	J. Bangtha
	cassava	Rayong	14^{0}30'26.6580",101^{0}55'39.3312"	W. Chotwong
	Rose apple orchard	Phetchaburi	12^{0}53'45.0", 99^{0}50'57.8"	W. Chotwong
	Palm plantation	Chumphon	10^{0}51'46.3500", 99^{0}25'35.7492"	W. Chotwong
	corn	Nakron Pathom	14^{0}1'28.8300", 99^{0}52'38.5566"	W. Chotwong
	forest	Trat	12^{0}3'45.8382",102^{0}18'38.2134"	J. Bangtha

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.1.24.1 Spider Fauna in Family Salticidae found in Thailand between 2017 until 2020 (continue)

Scientific name	Habitus	Location	GPS	Reference
Oxyopes shweta Tikader, 1970	mango	Rayong	14^{0}30'26.6580",101^{0}55'39.3312"	W. Chotwong
	Rose apple orchard	Phetchaburi	12^{0}53'45.0", 99^{0}50'57.8"	J. Bangtha
	corn	Kanchanaburi	13^{0}57'42.7386", 99^{0}38'57.5766"	J. Bangtha
	forest	Prachuap Khiri Khan	12° 23' 39.3468",99°58'51.6684"	W. Chotwong
	corn	Nakron Pathom	14^{0}1'28.8300", 99^{0}52'38.5566"	W. Chotwong
	along forest	Bangkok	13^{0}50'50", 100^{0}34'24"	J. Bangtha
	forest	Surat Thani	09° 44'18.2724" , 100° 0'5.5476"	J. Bangtha
	tree near restaurant	Phitsanulok	16^{0}51"11.5668", 100^{0}36'41.3676"'	W. Chotwong
	mango	Phrae	17° 56'31.5666" , 100° 3'47.3220"	J. Bangtha
	forest	Nan	18° 45'15.4908" , 100° 47'24.7194"	W. Chotwong
	mango	Chachoengsao	13^{0}42'54.6510", 101^{0}13'2.4708"	W. Chotwong
	forest	Rachaburi	13^{0}35'12.5442", 99^{0}23'33.7992"	J. Bangtha
	dry evergreen forest	Nakron Rachasima	14^{0}40.065",101^{0}26.630"'	W. Chotwong
	mango	Khon Kaen	16^{0}33"13.2474", 102^{0}56'53.4438"'	W. Chotwong
	tree near house	Buriram	14^{0}36'25.7508", 103^{0}7'41.3502"	J. Bangtha
	tree near Restaurant	Sisaket	14^{0}27'39.7188", 104^{0}43'4.3458"	J. Bangtha
Peucetia viridans (Hentz, 1832);	Gas Station	Nakhon Ratchasima	14^{0}400.65", 101^{0}26.630'	W. Chotwong
	corn	Kanchanaburi	13^{0}57'42.7386", 99^{0}38'57.5766"	W. Chotwong
	tree	Phetchaburi	13^{0}8'25.8900", 99^{0}56'52.8930"	W. Chotwong
	along forest	Pathum thani		J. Bangtha
***Hamadruas* sp.**	forest	ChiangMai	12^{0}53'45.0", 99^{0}50'57.8"	W. Chotwong
	forest	Phetchaburi	12^{0}53'45.0", 99^{0}50'57.8"	J. Bangtha
***Hamataliwa* sp.**	grass	Rachaburi	13^{0}35'12.5442", 99^{0}23'33.7992"	J. Bangtha
	grass	Kanchanaburi	14^{0}10'31.7892", 99^{0}7'42.4200"	J. Bangtha

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Figure 1.1.24.1 ***Hamadruas sp.***; female abdomen dorsal view (A), Eye arrangement (B), trichobotria (C), epigyne; ventral view (D), sternum (E), spinneret (F)

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.24.2. ***Hamataliwa* sp.;** female abdomen dorsal view (A), female abdomen ventral view (B), labium and sternum (C), claws (D), epigyne; ventral view (E), eye arrangement and tuft hairs

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.24.3 ***Oxyopes javanus*** **Thorell, 1887;** female abdomen dorsal view (A), eye arrangement and carapace (B), face (C), epigyne; ventral view (D)

Figure 1.1.24.4 ***Oxyopes lineatipes*** **(C. L. Koch, 1847);** female abdomen dorsal view (A), habitat (B), epigyne; ventral view (C), epigyne; ventral view (D)

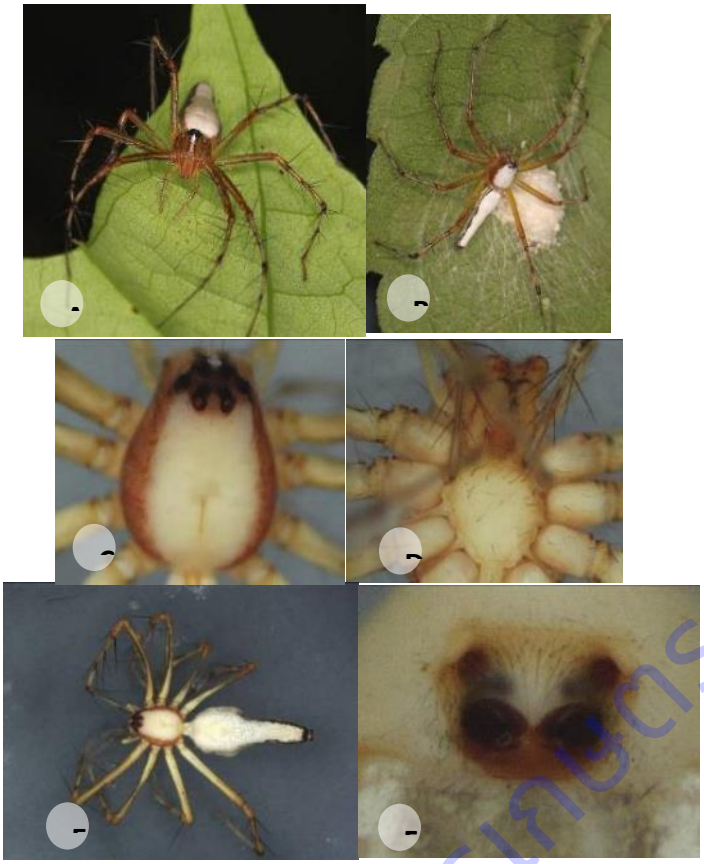


Figure 1.1.24.5 *Oxyopes shweta* Tikader, 1970; female habitat (A), female abdomen dorsal view (B), eye arrangement and carapace (C), labium and sternum (D), in alcohol (E), epigyne; ventral view (F)

Figure 1.1.24.6 *Peucetia viridans* (Hentz, 1832); female abdomen dorsal view (A), female abdomen ventral view (B), labium and sternum (C), spinneret (D), epigyne; ventral view (E)

การทดลองที่ 1.2.1 ศึกษาราสกุล *Phytophthora* ในเผือก

Study on *Phytophthora* species of Taro

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ ชนินทร ดวงสอาด มะโนรัตน์ สุดสงวน

พรพิมล อธิปัญญาคม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

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 พบว่าคือ *P. colocasiae* รา เจริญได้ดีบนอาหาร 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) 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

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.

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

เผือก (*Colocasia esculenta* (L.) Schott.) ประชากรของประเทศในเขตร้อนเกือบทั่วโลกรู้จักเผือกเป็นอย่างดี 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) โรคใบไหม้ (โรคใบจุดตาเสือ; Taro leaf blight) สาเหตุเกิดจากรา *Phythopthera colocasiae* Rac. อาการเริ่มแรกบนใบ เป็นจุดขี้แมลงวันเล็กๆ สีน้ำตาลเข้มหรือจุดสีน้ำตาลอ่อน ปรากฏเห็นชัดบนผิวใบ (Brooks, F.E. 2005) แผลขยายใหญ่ขึ้นเป็นวงๆ ต่อกัน ลักษณะพิเศษ คือ บริเวณขอบแผลมีหยดสีเหลืองข้น ซึ่งต่อมาแห้งเป็นเม็ดๆ เกาะอยู่เป็นวงๆ เมื่อบีบจะแตกเป็นผงละเอียด สีสนิม ในระยะที่รุนแรงแผลขยายติดต่อกัน และทำให้ใบม้วนพับเข้าและแห้งเหี่ยว หรืออาจเน่าเละถ้าอากาศชื้นมีฝนพรำ อาการบนก้านใบ จะเกิดแผลฉ่ำน้ำยาวรี สีน้ำตาลอ่อน แผลขยายใหญ่ขึ้นเป็นวงๆ เช่นกัน ต่อมาจะเน่า แห้ง เป็นสีน้ำตาล มีหยดสีเหลืองข้นด้วย ทำให้ก้านต้านทานน้ำหนักใบไม่ได้จึงหักพับ มีผลทำให้ใบแห้ง พบมากในระยะโรครุนแรง และมีลมพัด อาการเป็นระยะนี้ทำให้ผลผลิตลดลง และเชื้อนี้อาจเข้าทำลายหัวเผือกด้วยทำให้หัวเผือกเน่าเสียหายได้ โรคนี้เป็นโรคที่รุนแรงที่สุดของเผือกที่พบในประเทศไทยและในต่างประเทศ โรคนี้เริ่มระบาดเมื่อมีฝนตกและอากาศชุ่มชื้น ถ้ามีฝนตกหนักและติดต่อกันหลายๆ วัน โรคจะระบาดอย่างรวดเร็ว ในแปลงที่เป็นรุนแรง เผือกจะมีใบเหลืองประมาณต้นละ 3-4 ใบ เท่านั้น เผือกที่เป็นโรคนี้ถ้ายังไม่เริ่มลงหัว หรือลงหัวไม่โตนักจะเสียหายหมด หัวที่ลงจะไม่ขยายเพิ่มขนาดขึ้น ในช่วงที่หมอกลงจัดเผือกจะเป็นโรคนี้ได้ง่ายเช่นเดียวกัน (อมรรัตน์, 2552; กลุ่มวิจัยโรคพืช, 2555) *P. colocasiae* จัดอยู่ใน class Oomycetes family Pythiaceae ลักษณะของรานี้ เป็นราน้ำ เส้นใยสีขาว ไม่มีผนังกั้น แตกกิ่งก้าน 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) โรคแพร่กระจายอย่างรวดเร็วในสภาพที่มีเมฆมากและฝนตกไม่สม่ำเสมอ อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส และจะเกิดการระบาด เมื่อเวลากลางคืนมีอุณหภูมิต่ำต่อเนื่องกัน ประมาณ 20 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90-100 เปอร์เซนต์ (Nath, *et al*., 2013) *P. colocasiae* มีพืชอาศัยส่วนมากเป็นพืชพวก aroids (Araceae) รวมทั้ง พืชตระกูลเผือก [*Colocasia esculenta* (taro, kalo, dasheen) และ *Alocasia macrorrhiza* (giant taro)] (Brooks, F.E. 2005) มีรายงานในประเทศอินเดีย ว่า *P. colocasiae* ทำให้เกิดโรคใบไหม้และหัวเน่าที่ร้ายแรงที่สุดของเผือก (Raj *et al*., 2011) พบได้ทุกพื้นที่ที่มีการปลูกเผือกในฮาวายและยังพบได้ในพื้นที่อื่นอีก ได้แก่ ปาปัวนิวกินี, เกาะโซโลมอน, ฟิลิปปินส์, เกาะกวม,ซามัวตะวันตก, อินเดีย

กรมวิชาการเกษตร

, ไต้หวัน และทรินิแดด เป็นต้น (Anonymous, n.p.) ทำให้ผลผลิตลดลง 25-50% (Gollifer and Brown, 1974; Jackson *et al*., 1980) อมรรัตน์ (2552; 2556) รายงานว่ารา *P. colocasiae* ทำให้เกิดโรคใบแห้ง ใบไหม้ ใบจุดตาเสือกับ เผือก บอนน้ำ บอนเขียว และคูณในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์เผือกให้ต้านทานโรคใบจุดตาเสือของบางประเทศ มีการนำวิธีการ Isozyme analysis and DNA markers (RAPD) มาระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *P. colocasiae* ไอโซเลทต่างๆ ทั้งภายในและนอกประเทศ ซึ่งเผือกจากการปรับปรุงพันธุ์ควรมีการทดสอบการต่อต้านเชื้อนี้ ก่อนที่จะออกเป็นพันธุ์ใหม่ต่อไป (Brooks, F.E. 2005)
Mei-ju Lin and Wen-Hsiung Ko (2008) ทำการสำรวจและเก็บใบเผือกที่แสดงอาการโรคมาแยกเชื้อได้ 7 ไอโซเลท จากนั้นนำมาวินิจฉัยว่าเป็น *P. colocasiae* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลำดับของ ITS (Internal Transcribed Spacer) และความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนเผือก

ในประเทศไทย มีรายงานเกี่ยวกับรา *Phythopthora* หลายสปีชี ที่ทำให้เกิดโรคกับพืชต่างๆ หลายชนิด จึงควรมีการศึกษาข้อมูลต่างๆ ของรา *Phythopthora* สาเหตุโรคใบจุดตาเสือของเผือก เพื่อให้ได้ทราบชนิด และลักษณะประจำพันธุ์ ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาวิธีการป้องกันกำจัดโรค เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับนำมาใช้กำหนดแผนการป้องกำจัดได้รวดเร็วทันเหตุการณ์ และยังเป็นข้อมูลอ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้า และเพื่อเก็บในศูนย์รวบรวมราสาเหตุโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช และตัวอย่างแห้งโรคพืชเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างและอุปกรณ์จัดเก็บตัวอย่างแห้ง ได้แก่ ปากกาเคมี, ดินสอ, กระดาษหนังสือพิมพ์, ถุงพลาสติก, กรรไกรตัดแต่งกิ่ง, ไม้ทับตัวอย่าง, 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 บิกเกอร์, ขวดดูแรน, กระบอกตวง, 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)

กรมวิชาการเกษตร

- วิธีการ

1. การเก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Phytophthora*

เก็บและรวบรวม และเก็บตัวอย่างโรคใบจุดตาเสือของเผือก จากแหล่งปลูก ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ นครสวรรค์ พิษณุโลก สิงห์บุรี นครราชสีมา สุรินทร์ สระบุรี ปราจีนบุรี อยุธยา นครปฐม ราชบุรี สุพรรณบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี โดยเลือกเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรค ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างในสภาพที่แห้ง เพื่อให้ส่วนของแผลอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์และหลีกเลี่ยงที่เชื้อราชนิดอื่นจะขึ้นปกคลุม เนื่องจากความชื้น บันทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่ พิกัด สถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำมาจำแนกชนิดและทำการสกัดดีเอ็นเอ ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การจำแนกชนิดของราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- การแยกรา และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

แยกราโดยวิธี Tissue transplanting โดยตัดบริเวณรอยต่อเนื้อเยื่อที่เป็นโรคกับเนื้อเยื่อปกติเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร แช่ในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar ผสม BRNAP (PDA+BRNAP) (Masago *et al*., 1972) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25+2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ตัดขอบโคโลนีของเส้นใยราที่เจริญจากชิ้นตัวอย่างพืช มาเลี้ยงบนอาหาร PDA+BRNAP อีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25+2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ตัดขอบโคโลนีของเส้นใยราที่เจริญจากชิ้นวุ้น มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นแครอท (อมรรัตน์ และคณะ, 2556) แล้วทำให้เป็นราบริสุทธิ์จากสปอร์เดี่ยว โดยนำราที่เจริญบนอาหารวุ้นแครอท ไปเก็บไว้ในที่มืด 72 ชั่วโมง แล้วนำออกไปไว้ใต้แสงนีออน ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-48 ชั่วโมง ใช้เข็มเขี่ยที่ฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ มาแตะกลุ่มสปอร์ แล้วนำไปเขี่ยให้สปอร์กระจายบนอาหารวุ้น (water agar: WA) แล้วตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อแยกสปอร์เดี่ยว นำไปวางบนอาหาร PDA ทิ้งไว้ 72 ชั่วโมง ให้สปอร์เจริญสร้างกลุ่มสปอร์ แล้วตัดขอบโคโลนี ไปเลี้ยงในหลอดอาหาร PDA (อมรรัตน์, 2556) ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

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

- ศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย (ลักษณะโคโลนี) ของเชื้อเลี้ยงรา *Phytophthora* บนอาหารวุ้นมันฝรั่ง หรืออาหารวุ้นแครอท เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย ใช้เครื่องเจาะรู (Cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อซึ่งเลี้ยงบนอาหาร นาน 5 วัน วางให้ด้านที่มีเส้นใยของเชื้อคว่ำลงบนอาหารบริเวณกลางจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มในตู้บ่มมืดอุณหภูมิห้อง จนเชื้อเจริญเติบโตเต็มจานเลี้ยงเชื้อ บันทึกลักษณะการเจริญที่ผิวหน้าอาหารและความหนาแน่นของเส้นใย

- ศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดสปอร์ของรา

นำรา *Phytophthora* ในจานเลี้ยงเชื้อ ที่มีอาหารวุ้นแครอท จานวน 15 มิลลิเมตร ที่บ่มในตู้บ่มมืดนาน 72 ชั่วโมง นำไปไว้ใต้แสงนีออน (White cool) 40 วัตต์ 2 หลอดระยะ 30 เซนติเมตรที่ให้แสง 200 แรงเทียน

(Foot candle ftc) ที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยไว้ใต้แสงนาน 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสร้าง สปอร์แรงเจีย (Sporangia) ศึกษาและบันทึกลักษณะการแตกแขนงของก้านสปอร์ (Sporangiophores) วัดความยาว (Length) และความกว้าง (Breadth) ของ สปอร์แรงเจีย เพื่อหาอัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง วัดความยาวของก้านสปอร์ (Pedicel หรือ Stalk) ความยาวของ ปาปิลา (Papilla) และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ คลาไมโดสปอร์ (Chlamydospore)

- จัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืช

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

3. การจำแนกชนิดของรา *Phytophthora* โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรมสกัดดีเอ็น

โดยเลี้ยงรา *Phytophthora* ที่ต้องการศึกษาในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง (25-27 องศาเซลเซียส) ให้มีอายุประมาณ 7 วัน จากนั้นเขี่ยเส้นใยของรายย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป ปฏิบัติตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต โดยก่อนสกัด จะเติมเอ็นไซม์ Proteinase K เพื่อช่วยในการย่อยผนังเซลล์ ใช้ที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร หลังจากสกัดได้ดีเอ็นเอต้นแบบ (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) ด้วยคู่ไพร์เมอร์ ELONGF1/ELONGR1 (Kroon *et al*., 2004) β-tubulin ด้วยคู่ไพร์เมอร์ 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 สำหรับไพร์เมอร์ของยีนทั้ง 3 ตำแหน่ง

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (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

การวิเคราะห์และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

ศรีวิชาการเกษตร

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ดีเอ็นเอของรา *Phytophthora* มาทำการวิเคราะห์ โดยนำเส้นดีเอ็นเอสองเส้นที่ได้จาก forward และ reverse primer มาเทียบกัน โดยใช้โปรแกรมที่ Genious version 8.1.9 (http://www.geneious.com, Kearse *et al*., 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอ และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป และดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

จำแนกชนิดของ *Phytophthora* โดยวิเคราะห์เบื้องต้นจากตำแหน่ง 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 บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

การบันทึกข้อมูล

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยราบนอาหารแต่ละชนิด เมื่อเส้นใยที่เจริญบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะสีของเส้นใย และการสร้างสปอร์ เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของราบนอาหารสูตรต่างๆ

5. ศึกษาการเก็บรักษารา *P. colocasiae*

กรมวิชาการเกษตร

นำรา *P. colocasiae* บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ในหลอดทดลอง จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มนำไปเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17 ^{O}C) และ ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27 ^{O}C) เมื่อได้ระยะเวลาตามแผนนำหลอดเชื้อมาแยกเชื้อเพื่อดูการมีชีวิตของเชื้อ

การบันทึกข้อมูล

การเจริญและการสร้างสปอร์ หลังการเก็บรักษา 2 4 6 8 และ10 เดือน

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

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

วิธีการทดลอง

นำรา *P. colocasiae* บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร CA ที่ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง (ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ ไฮโดรคลอริคแอซิค) ในจานเลี้ยงเชื้อ จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

การบันทึกข้อมูล

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยรา ลักษณะสีของเส้นใย และการสร้างสปอร์

- เวลาและสถานที่ - ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชและแปลงเผือกของเกษตรกร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Phytophthora*

เก็บตัวอย่างเผือกที่เป็นโรคใบจุดตาเสือจากแหล่งปลูกเผือก (Table 1.2.11) รวม 110 ตัวอย่าง แยกราสาเหตุโรคจากส่วนก้านใบและใบเผือกที่แสดงอาการ (Figure 1.2.11 and 1.2.12) เก็บเป็นราบริสุทธิ์ เพื่อใช้ศึกษา 117 ไอโซเลท

2. การจำแนกชนิดของรา *Phytophthora* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- ศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย (ลักษณะโคโลนี) ของเชื้อการเจริญเติบโตของรา *Phytophthora* ในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ บนอาหารแข็ง 2 ชนิด คืออาหารวุ้นมันฝรั่ง (PDA) และอาหารวุ้นแครอท (CA) บ่มไว้ที่มืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Figure 1.2.1.3) พบว่าการสร้างเส้นใยบนอาหารแข็ง มีลักษณะการเจริญเป็นเส้นตรง แตกกิ่งก้านออกไปสม่ำเสมอ เส้นใยใสไม่มีสี ไม่มีผนังกั้นเส้นใย ผิวผนังเส้นใยเรียบ (Smoot) ไม่มีการโป่งพอง การเจริญบนอาหารวุ้นมันฝรั่ง เต็มจานเลี้ยงเชื้อใช้เวลา 9 วัน แต่บนอาหารวุ้นแครอท เชื้อเจริญเติบโตช้ากว่า เต็มจานเลี้ยงเชื้อใช้เวลา 11 วัน นอกจากนี้ บนอาหารวุ้นมันฝรั่ง ราสร้างเส้นใยหนาแน่นกว่า แต่บนอาหารวุ้นแครอทสร้างสปอร์แรนเจีย (Sporangia) มากกว่าบนอาหารวุ้นมันฝรั่ง

- ศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดสปอร์ของรา (Figure 1.2.1.4 and 1.2.1.5)

ศรีวิชาการเกษตร

รา *Phytophthora* สร้างสปอร์แรนเจียจำนวนมาก มีรูปร่างหลายแบบตั้งแต่ รูปไข่ หรือรูปค่อนข้างยาว หรือรูปไข่ ขนาดสปอร์แรนเจีย 98.71-179.40 x 87.78-144.40 μm อัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง เท่ากับ 1.40:1 ด้านบนของสปอร์แรนเจียมีส่วนเปิดเป็นทางออกของสปอร์ที่มีหางและว่ายน้ำได้ เด่นชัด

3. การจำแนกชนิดของรา *Phytophthora* โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม

การจำแนกชนิดของรา *Phytophthora* ที่แยกได้จากตัวอย่างเผือกที่แสดงอาการโรคใบจุดตาเสือ จากแหล่งปลูกเผือก 110 ตัวอย่าง 117 ไอโซเลท จากข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็น *P. colocasiae* ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละแหล่งปลูก เมื่อพิจารณาจากพิกัดภูมิศาสตร์และวิธีการปลูก สามารถแบ่งได้ 5 กลุ่ม เลือกมากลุ่มละ 2 ไอโซเลท รวม 10 ไอโซเลท (Figure 1.2.1.6) เพื่อเปรียบเทียบและจำแนกเบื้องต้นด้วยข้อมูลพันธุกรรมของยีนตำแหน่ง ITS พบว่า รา *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 1.2.1.2) เมื่อวิเคราะห์ phylogenetic reconstruction พบว่ารา *Phytophthora* ทั้ง 10 ไอโซเลท สามารถจำแนกได้เป็น *P. colocasiae* (Figure 1.2.1.7) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาใน clade ของ *P. colocasiae* จะพบว่าราที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ทั้ง 10 ไอโซเลท มีความหลากหลาย โดยความหลากหลายนี้อาจมีความสอดคล้องตามชนิดของพืชอาศัยที่แตกต่าง เช่น ไอโซเลท M0193 ที่แยกได้จากใบบอนพบว่ามีความแตกต่างอย่างชัดเจนกับไอโซเลทอื่น ๆ ใน clade เดียวกัน (Figure 1.2.1.7) รวมถึงความหลากหลายที่อาจเกิดจากความแตกต่างของพื้นที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งเมื่อพิจารณาภายใน clade ของรา *P. colocasiae* จะพบว่ามีแนวโน้มของความหลากหลายอย่างน้อย 5 กลุ่ม

4. ศึกษาชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของรา *P. colocasiae*

ชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. colocasiae* ที่ 7 วัน พบว่า รา *P. colocasiae* เจริญบนอาหาร CMA ได้เร็วที่สุดโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใย 78.0 มม. รองมา ได้แก่ V8, CA, OMA และ PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใย 69.30, 64.30, 58.70 และ 52.20 มม. ตามลำดับ (Table 1.2.1.3, Figure 1.2.1.8) ที่ 14 วัน พบว่า บนอาหาร PDA รา *P. colocasiae* มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใย 85.10 มม. ส่วนบนอาหารชนิดอื่น รา *P. colocasiae* เจริญเต็มจานอาหารแล้ว โดย บนอาหาร CMA เจริญเต็มจานอาหารที่ 8 วัน แต่ให้เส้นใยที่น้อยและบางติดอาหาร ส่วนอาหาร V8, CA และ OMA เจริญเต็มจานอาหารที่ 10 วัน แต่ถึงแม้การเจริญของ รา *P. colocasiae* บนอาหาร PDA จะเจริญได้ช้ากว่า แต่เส้นใยหนาแน่นกว่าอาหารชนิดอื่น ส่วนบนอาหาร OMA ถึงจะมีการเจริญของเส้นใยดีและราสามารถสร้างสปอร์แรงเจียมได้ แต่ยากต่อการสังเกตุเนื่องจากสีของอาหารมีสีขาวขุ่น

ลักษณะเส้นใยบนอาหารต่างๆ ดังนี้

- PDA เส้นใยสีขาว แน่น ค่อนข้างหยิก เจริญเป็นวงถี่ๆ เห็นชัดเจน เส้นใยชูขึ้นบนผิวอาหารเล็กน้อย
- CA เส้นใยสีขาว หยิก เจริญเป็นวง เส้นใยชูขึ้นบนผิวอาหาร
- V8 เส้นใยสีขาว หยิก เจริญเป็นวงเห็นชัดเจน เส้นใยชูขึ้นบนผิวอาหารมาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร

- OMA เส้นใยสีขาว หยาบ หยิกเล็กน้อย 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 1.2.1.4, Figure 1.2.1.9) ซึ่งสอดคล้องกับ Jeffers (2006) ที่ใช้อาหาร CA และ V8A ในการศึกษาการระบุชนิดของรา *Phytophthora*

5. ศึกษาการเก็บรักษารา *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) การเจริญของราไม่แตกต่างจากการเก็บที่ 4 เดือน ส่วนที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27°C) การเจริญของลดลง ส่วนการสร้างสปอร์ค่อนข้างน้อย และเริ่มพบการปนเปื้อน

หลังการเก็บรักษา 8 เดือน พบว่า การเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17 ^{O}C) และที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27 ^{O}C) มีการเจริญของลดลง ส่วนการสร้างสปอร์ค่อนข้างน้อย และมีการปนเปื้อน

หลังการเก็บรักษา 10 เดือน พบว่า การเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17 OC) และที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27 OC) มีการเจริญของลดลง ส่วนการสร้างสปอร์ค่อนข้างน้อย และมีการปนเปื้อนเพิ่มขึ้น

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

ผลของความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) และอุณหภูมิ (T) ต่อการเจริญของรา *P. colocasiae* ที่ pH 10 ไม่มีการเจริญของรา ที่อุณหภูมิ 35°C ส่วนที่อุณหภูมิ 30°C และอุณหภูมิ 25 ^{O}C มีการเจริญเป็นปกติ pH 5, 6, 7, 8 และ 9 มีการเจริญช้า ที่อุณหภูมิ 35°C ส่วนที่อุณหภูมิ 30°C และอุณหภูมิ 25 ^{O}C มีการเจริญเป็นปกติ ซึ่งสอดคล้องกับ Tsopmbeng *et al*. (2014) ที่รายงานว่า ที่ pH 10 การเจริญของรา *P. colocasiae* ต่ำกว่าที่ pH อื่นๆ ในทุกอุณหภูมิ และเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิ 27 ^{O}C, 30 ^{O}C, 24 ^{O}C, 21 ^{O}C และ 18 ^{O}C ตามลำดับ และ ที่ pH 6.5 เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของรา *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 ^{O}C สร้างสปอร์ได้ปกติ สำหรับ pH 5, 6, 7 และ 8 มีการสร้างสปอร์ที่อุณหภูมิ 30°C ได้ แต่น้อยกว่า ที่อุณหภูมิ 25°C ซึ่งสามารถสร้างสปอร์ได้ดีเป็นปกติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการรวบรวมและเก็บตัวอย่างเผือกที่แสดงอาการโรคใบจุดตาเสือ 110 ตัวอย่าง ในจังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม เพชรบูรณ์ สระบุรี นครราชสีมา สุโขทัย และจังหวัดเชียงใหม่ 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) 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 สำหรับที่ pH 10 การเจริญและการสร้างสปอร์ ลดลงเมื่อมีอุณหภูมิสูงขึ้น ทำการจัดเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์ของเชื้อไว้ใน culture collection

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- ได้อาหารที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยและการสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค และการเก็บรักษาราสาเหตุโรค เพื่อใช้ในการศึกษาในระยะยาว
- ได้ข้อมูลเบื้องต้นของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของราสาเหตุโรคใบจุดตาเสือของเผือก เพื่อการคาดการณ์การเพิ่มหรือลดของเชื้อสาเหตุ หรือการเลือกพื้นที่ปลูก
- เผยแพร่แก่ นักวิจัย จากหน่วยงานต่างๆ ทั้งภาครัฐและเอกชนเพื่อไปพัฒนางานต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.1.1 Sampling location of Taro leaf blight.

No.	Sampling location			
1	สายหนึ่ง	ท่าคอย	ท่ายาง	เพชรบุรี
2			ท่ายาง	เพชรบุรี
3	ม.7 บ้านประชาสุขสาร	ทุ่งสมอ	เขาค้อ	เพชรบูรณ์
4	ม.7 บ้านประชาสุขสาร	ทุ่งสมอ	เขาค้อ	เพชรบูรณ์
5		วังโบสถ์	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
6		วังโบสถ์	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 (บ้านวังกะโห้)	โคกใหญ่	บ้านหมอ	สระบุรี
25	ม.5 (บ้านวังกะโห้)	โคกใหญ่	บ้านหมอ	สระบุรี
26	ม.5 (บ้านวังกะโห้)	โคกใหญ่	บ้านหมอ	สระบุรี
27	ม.5 (บ้านวังกะโห้)	โคกใหญ่	บ้านหมอ	สระบุรี
28	ม.1 บ้านท่ายาง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
29	ม.7 บ้านหนองบ้วย	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
30	ม.7 บ้านหนองบ้วย	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 บ้านไสค้าน	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
36	หนองขานาง	ท่าคอย	ท่ายาง	เพชรบุรี

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.1.1 Sampling location of Taro leaf blight. (cont.)

No.	Sampling location			
37	หนองขานาง	ท่าคอย	ท่ายาง	เพชรบุรี
38	หนองขานาง	ท่าคอย	ท่ายาง	เพชรบุรี
39	ม.8 บ้านหนองแขม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
40	ม.8 บ้านหนองแขม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
41	ม.8 บ้านหนองแขม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
42	ม.8 บ้านหนองแขม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
43	ม.8 บ้านหนองแขม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
44	บ้านหัวทุ่ง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
45	บ้านหัวทุ่ง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
46	ม.2 บ้านทุ่งแฝก	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
47		หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
48	ม.4 บ้านโป่งกะสัง	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
49	ม.11 บ้านเขาตกน้ำ	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
50	ม.11 บ้านเขาตกน้ำ	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
51	ซ. พัชรี 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 ซ.12 บ้านกร่างทอง	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
61	ม.1 ซ.13 บ้านกร่างทอง	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
62	วัดสันติคีรีศรีบรมธาตุ ม.5	ท่าล้อ	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
63	ม.2 บ้านสำนักคร้อ	ตะคร้ำเอน	ท่ามะกา	กาญจนบุรี
64	ม.1 บ้านท่ากระบือ	เกาะสำโรง	เมือง	กาญจนบุรี
65	ม.7 หนองยายทรัพย์	สระยายโสม	อู่ทอง	สุพรรณบุรี
66	ม.4 บ้านโข่ง	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

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.1.1 Sampling location of Taro leaf blight. (cont.)

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	วังหว้า	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
78	ม.7 บ้านคลองชะโด	วังหว้า	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
79	ม.7 บ้านคลองชะโด	วังหว้า	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
80	ม.7 บ้านคลองชะโด	วังหว้า	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 บ้านตาลพร้า	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 บ้านหนองตูม	สุขไพบูลย์	เสิงสาง	นครราชสีมา

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.1.1 Sampling location of Taro leaf blight. (cont.)

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

Figure 1.2.1.1 Symptoms of taro leaf blight on leaf and petiole.

Figure 1.2.1.2 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)

กรมวิชาการเกษตร

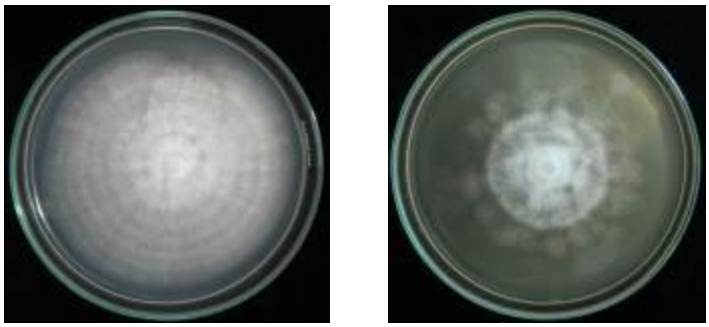


Figure 1.2.1.3 Colony types of *Phytophthora* isolated from taro on Potato dextrose agar (PDA) after 9 days incubation (left) and on Carrot agar (CA) after 11 days incubation. (right)

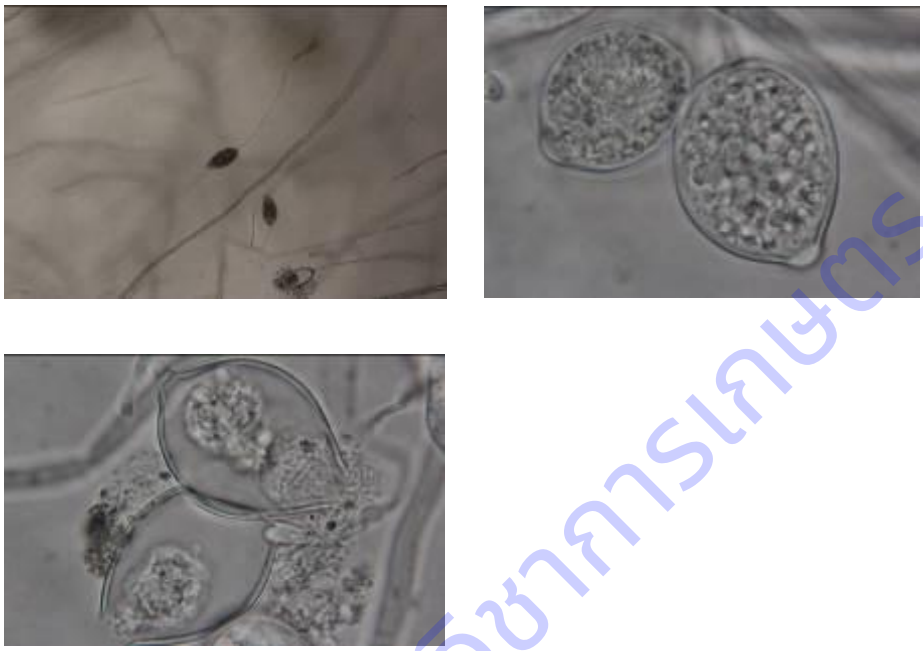


Figure 1.2.1.4 Microscopic view of mycelium and sporangium of *Phytophthora* on Potato dextrose agar (PDA)

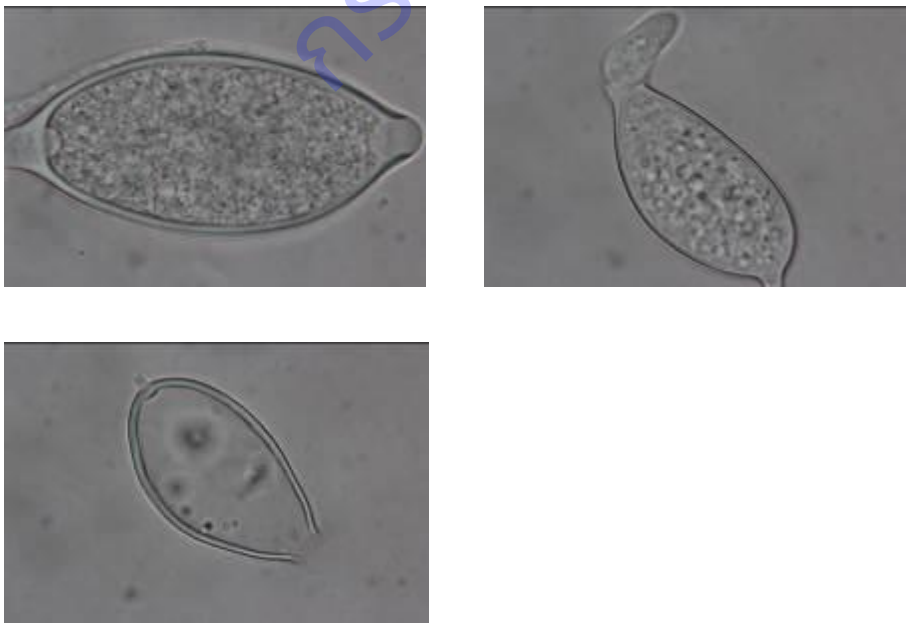


Figure 1.2.1.5 Microscopic view of sporangium of *Phytophthora* on Carrot agar (CA)

กรมวิชาการเกษตร

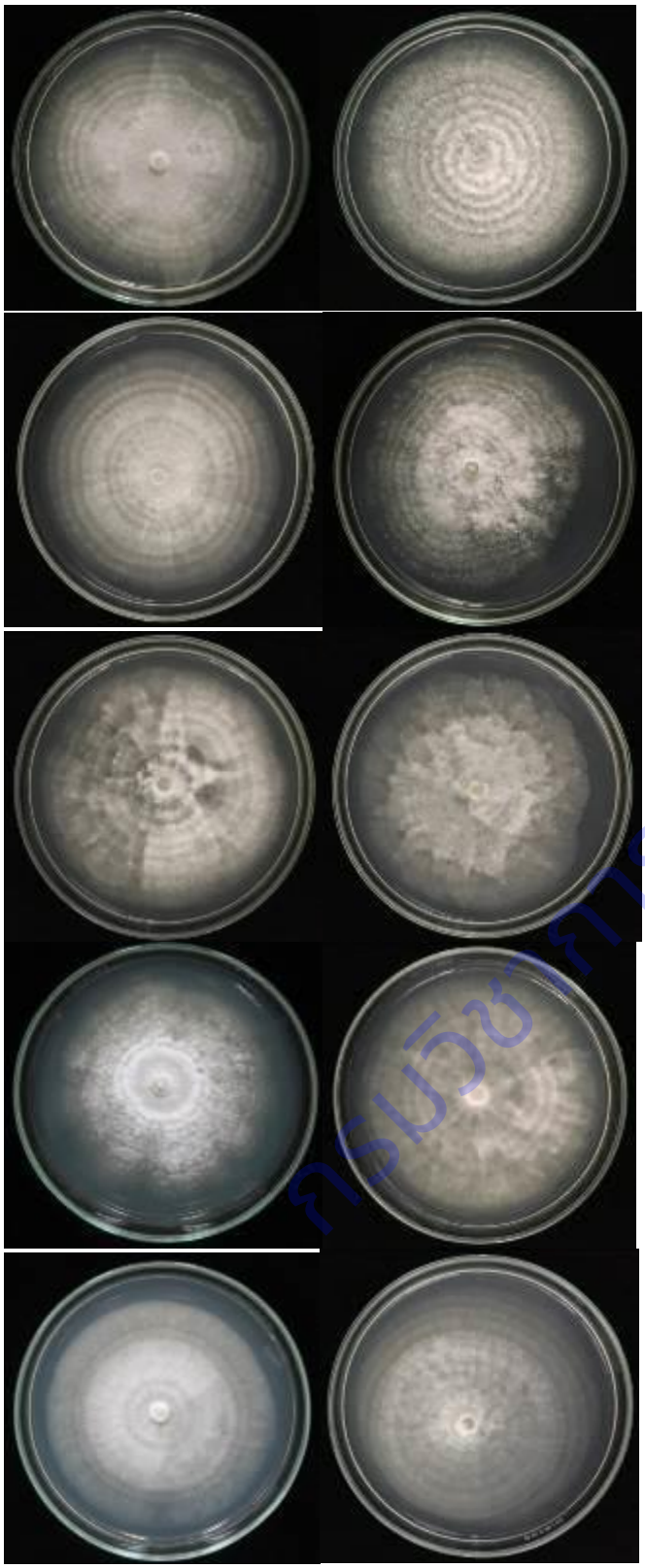


Figure 1.2.1.6 *Phytophthora colocasiae* isolates used for genetic characteristics.

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.1.2 The list of taxa used in the phylogenetic identification.

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

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.1.2 The list of taxa used in the phylogenetic identification. (cont.)

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

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.1.2 The list of taxa used in the phylogenetic identification. (cont.)

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

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.1.2 The list of taxa used in the phylogenetic identification. (cont.)

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

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.1.2 The list of taxa used in the phylogenetic identification. (cont.)

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

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

กรมวิชาการเกษตร

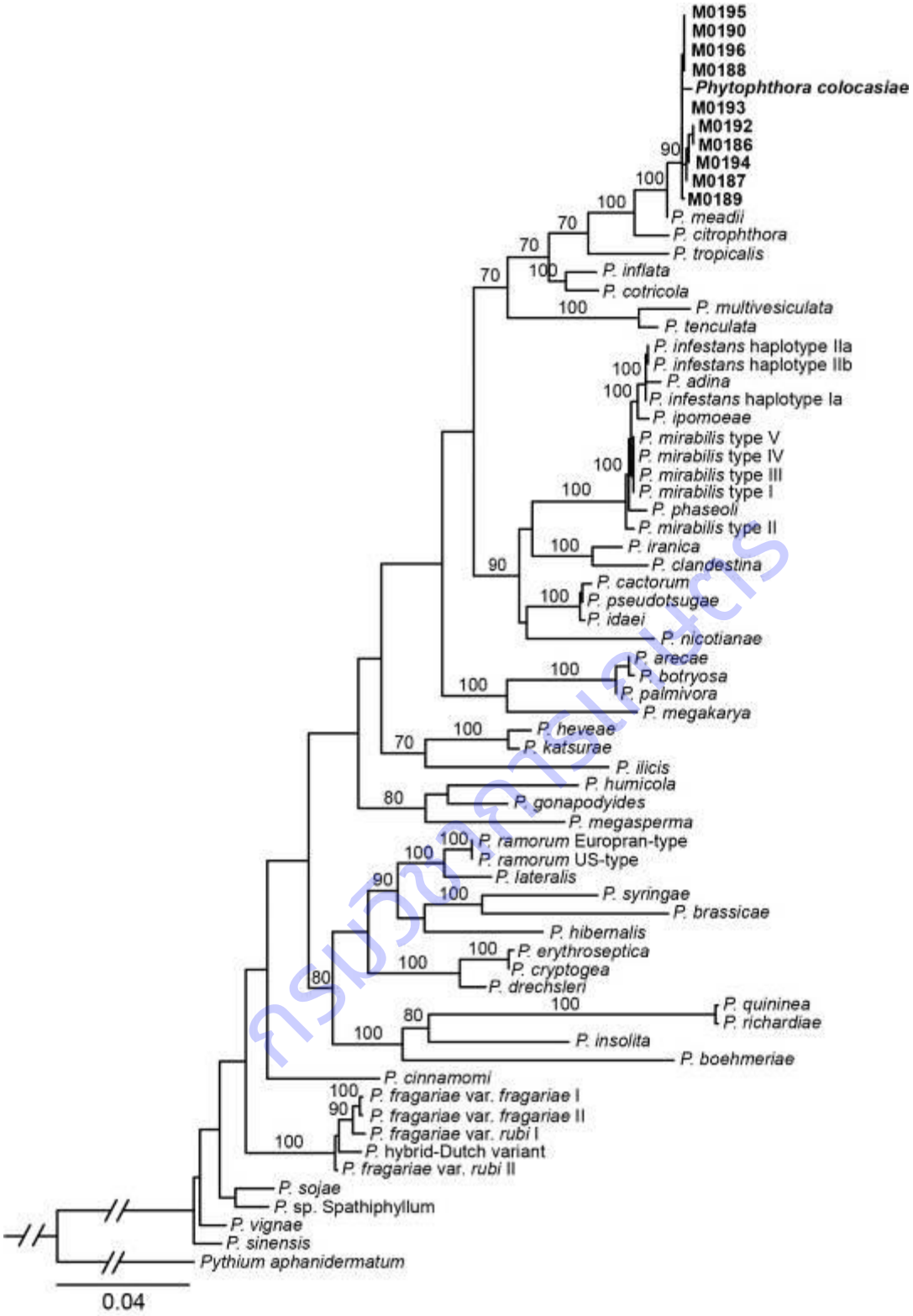


Figure 1.2.1.7 Phylogram obtained in a maximum likelihood search in RAxML of concatenated β-tubulin2 and TEF1 gene regions. Bootstrap support values (≥70%) from 1,000 replicates above nodes.

Table 1.2.1.3 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 1.2.1.4 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.

กรมวิชาการเกษตร

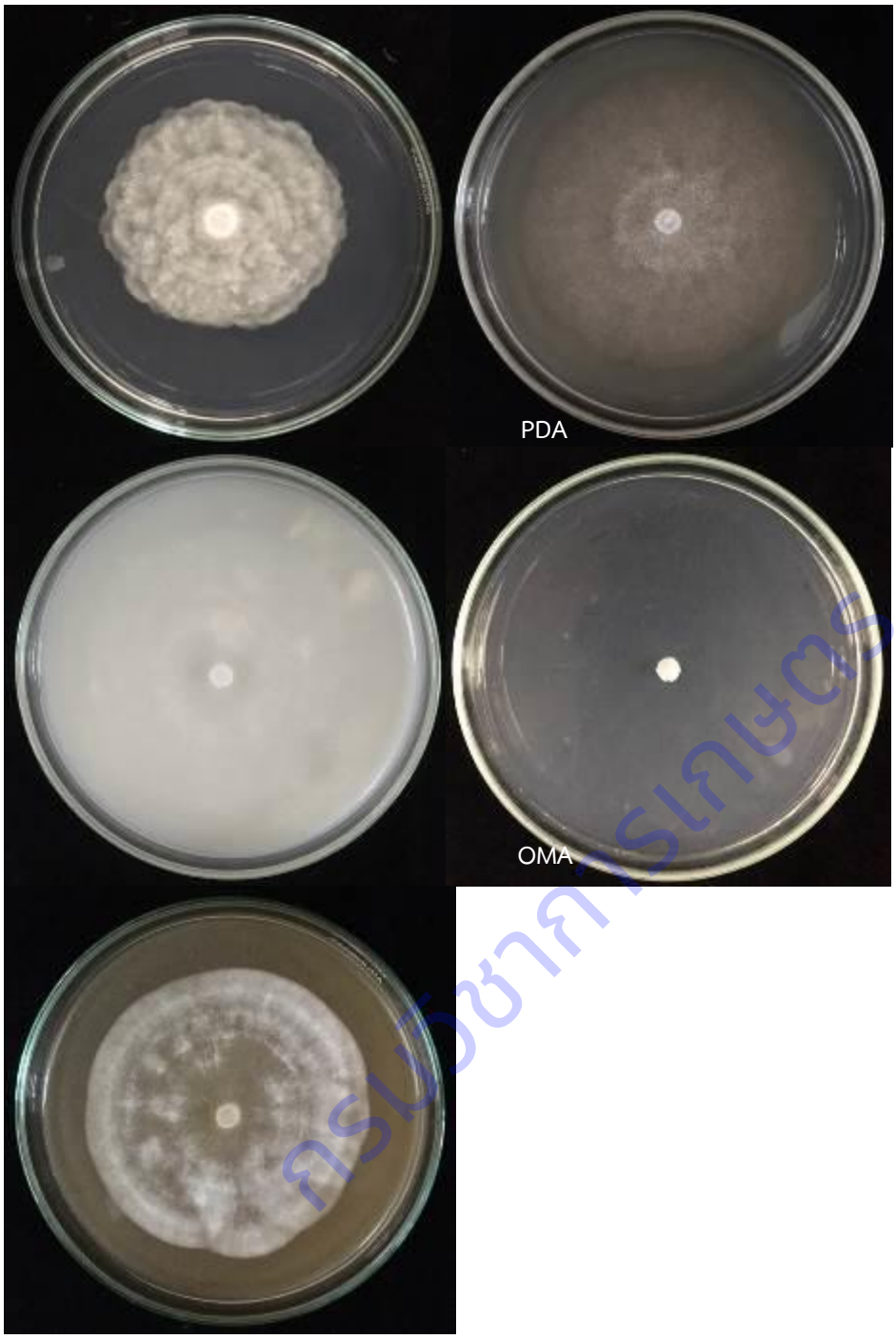


Figure 1.2.1.8 Colony growths of *Phytophthora colocasiae* on 5 selective media at 7 day.

กรมวิชาการเกษตร

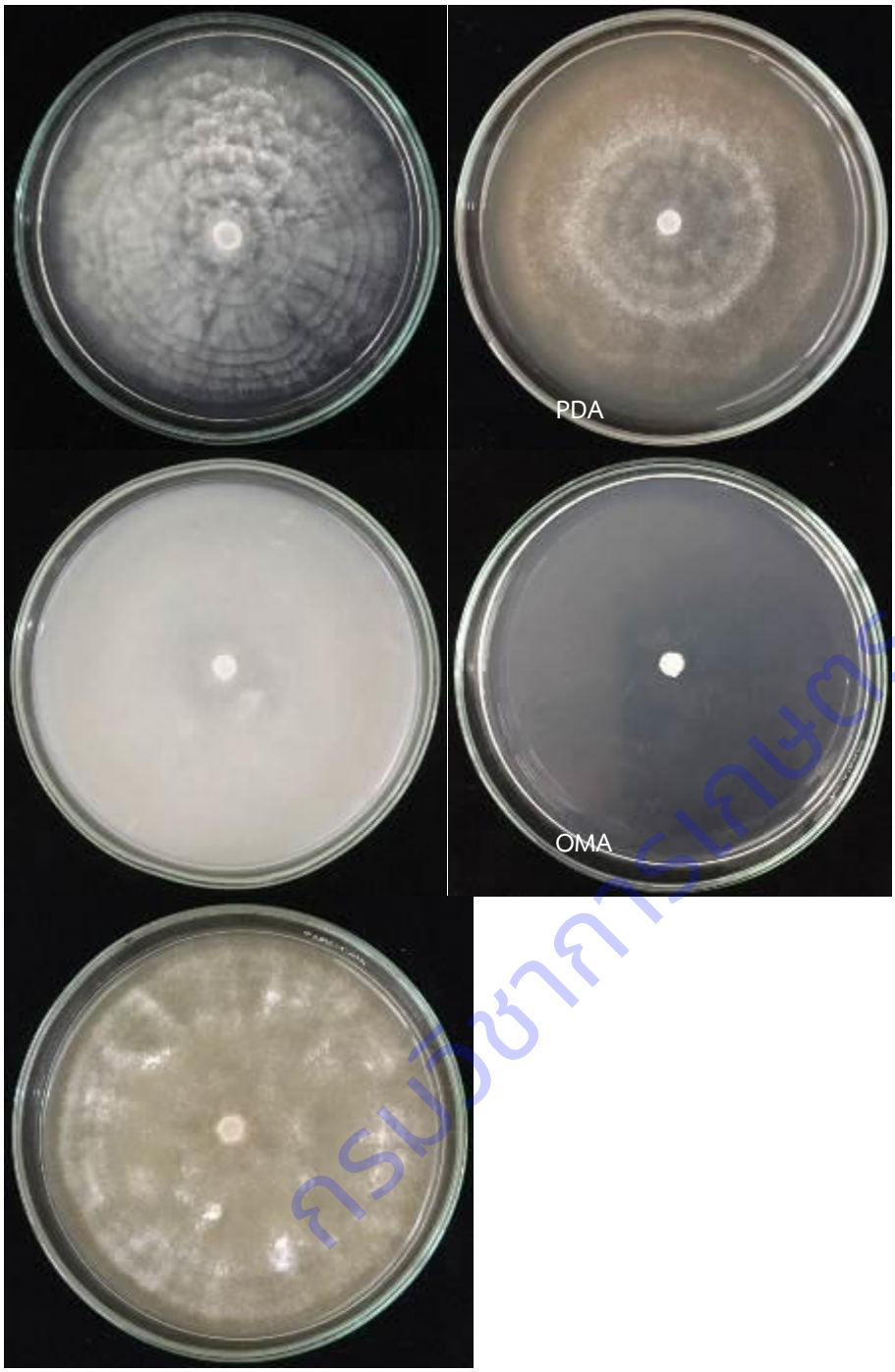


Figure 1.2.1.9 Colony growths of *Phytophthora colocasiae* on 5 selective media at 14 day.

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.2.2. การจำแนกชนิดของราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris*

Identification of *Curvularia* and *Bipolaris*

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวชนินทร ดวงสอาด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวอมรรัชฎ์ คิดใจเดียว	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ศึกษาชนิดของราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris* โดยเก็บตัวอย่างโรคพืชที่แสดงอาการใบจุดและใบไหม้ ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 - กันยายน 2562 จำนวน 107 ตัวอย่างจากแปลงปลูกพืช ข้าวโพด ข้าว ปาล์มน้ำมัน กล้วยไม้ แก้วมังกร และหญ้าสนามกอล์ฟจากจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ พะเยา ลำพูน อุตรดิตถ์ กรุงเทพมหานคร นครนายก นครปฐม พิษณุโลก เพชรบูรณ์ ลพบุรี สุโขทัย นครราชสีมา สุรินทร์ กาญจนบุรี ตาก ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี จันทบุรี ฉะเชิงเทรา สระแก้ว กระบี่ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี แยกราจากตัวอย่างโรคพืชด้วยวิธี 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*

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,

สำนักวิจัยการเกษตร

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*

คำนำ

ราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris* (Teleomorph: *Cochiobolus* Drechsler) จัดอยู่ในDivision Ascomycota Class Dothideomycetes Order Pleosporales Family Pleosporales มีรายงานพบ 183 records (*Curvularia*) และ 132 records (*Bipolaris*) (Indexfungorum, 2019) เชื้อราทั้ง 2 สกุลนี้สามารถพบได้ทั่วไปและเป็นสาเหตุของโรคพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เช่น ใบจุดปาล์มน้ำมัน ใบจุดสีน้ำตาลของข้าว โรคเมล็ดด่างข้าว โรคใบจุดข้าวสาลี โรคใบไหม้ข้าวโพด และ โรคที่สำคัญในข้าวบาร์เลย์และข้าวสาลี 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* เป็นเชื้อราสาเหตุของโรค นอกจากนี้พบเป็นเชื้อราสาเหตุของโรคใบไหม้ของข้าวโพดในประเทศสหรัฐอเมริกาและอังกฤษก่อให้เกิดการสูญเสียผลผลิตเป็นจำนวนมาก (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 พีระวรรณ และคณะ ทำการสำรวจ รวบรวม และจำแนกเชื้อราสกุล *Curvularia* โดยเก็บตัวอย่างพืชที่มีลักษณะอาการไหม้และใบจุด มาทำการแยกเชื้อสาเหตุโรค พบว่าสามารถแยกได้เชื้อ *Curvularia* ทั้งหมด 45 ไอโซเลท โดยแยกเชื้อสาเหตุได้จากพืชที่เป็นโรคต่างๆ ดังนี้ โรคใบจุดข้าวโพด โรคเมล็ดด่างข้าว โรคใบจุด โรคใบไหม้เยอบีร่า โรคเมล็ดเน่าดำข้าวฟ่าง โรคใบไหม้สบู่ดำ โรคใบไหม้วัชพืชหญ้ายาง โรคใบไหม้ปาล์มน้ำมัน โรคดอกสนิมหรือโรคจุดสนิมบนดอกไม้สกุลหวาย โรคจุดบนกล้วยไม้สกุลออยเดียม โรคใบแกลดดิโอลัส 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

ศรีวิชาการเกษตร

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 และสามารถลดการสูญเสียของผลผลิตทำให้เกษตรมีผลผลิตที่สามารถเก็บเกี่ยวได้มากขึ้นและเพื่อเพิ่มผลผลิตที่มีคุณภาพและสามารถส่งออกได้มากยิ่งขึ้นส่งผลดีต่อเศรษฐกิจทั้งในประเทศและต่างประเทศ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ มีด กรรไกร กรรไกรตัดกิ่ง ถุงพลาสติก กระดาษบันทึก ปากกาเคมี เครื่องระบุพิกัด
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อ
3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวดดูแรน บีกเกอร์ สไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์ กระบอกตวง 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 และกล้วยไม้เป็นต้น จากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย เช่น จังหวัดนครราชสีมา สุรินทร์ เพชรบูรณ์ ลพบุรี สระบุรี พิษณุโลก สุโขทัย เชียงใหม่ เชียงราย กระบี่ และสุราษฎร์ธานี เป็นต้น ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ ข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์ และแบ่งตัวอย่างโรคพืชมาอัดทับตัวอย่างแห้ง จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

ศรีวิชาการเกษตร

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- แยกเชื้อราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ 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 นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปร์คลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำชิ้นพืชไปวางบนอาหาร ½PDA PDA หรือ WA บ่มที่อุณหภูมิ 28$\pm$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 โดยการใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยโครงสร้างของรานำมาวางบนแผ่นสไลด์และหยดด้วยน้ำ 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 ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างโรคพืชจากแหล่งปลูกพืชต่าง ๆ

เก็บรวมรวมตัวอย่างโรคพืชที่มีลักษณะอาการจุดหรือไหม้ของพืชต่าง ๆ จำนวน 107 ตัวอย่างจากจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ พะเยา ลำพูน อุตรดิตถ์ กรุงเทพมหานคร นครนายก นครปฐม พิษณุโลก เพชรบูรณ์ ลพบุรี สุโขทัย นครราชสีมา สุรินทร์ กาญจนบุรี ตาก ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี จันทบุรี ฉะเชิงเทรา สระแก้ว กระบี่ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี (ตารางที่ 1.2.2.1 และ ภาพที่ 1.2.2.1) ตัวอย่างแห้งโรคพืชที่ได้จากการศึกษา จำนวน 107 ตัวอย่าง นำไปเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จำกรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

การแยกและจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

แยกเชื้อราสาเหตุของโรคจากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคใบจุดและใบไหม้และศึกษาลักษณะของทางสัณฐานของเชื้อราที่แยกได้ โดยศึกษาลักษณะของโคโลนี ขนาด และสี ลักษณะของเส้นใย ลักษณะของก้านชูสปอร์ และลักษณะของโคนิเดีย โดยเปรียบเทียบกับเอกสารการจำแนกเชื้อรา Dematiaceous hyphomycetes และ more Dematiaceous hyphomycetes ของ Ellis M.B. (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. pallescens* ราสกุล *Bipolaris* spp. จำนวน 37 ไอโซเลท 4 ชนิด ได้แก่ *B. bicolor B. cactivora B. maydis* และ *B. oryzae* (ภาพที่ 1.2.2.2 และ 1.2.2.3)

Scientific Classification

Kingdom:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Class:	Dothideomycetes
Subclass:	Pleosporomycetidae
Order:	Pleosporales
Family:	Pleosporaceae
Genus:	*Curvularia, Bipolaris*

***Curvularia akii* (Tsuda & Ueyama)**

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีเทา ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส สร้างก้านชูสปอร์ (conidiophore) แบบเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม มีสีน้ำตาล โคนิเดีย (conidia) มีลักษณะทรงกระบองตรงหรือโค้งเล็กน้อย ผนังเรียบ มีผนังกั้น (septate) 3 เส้น มีสีน้ำตาล เซลล์บริเวณกลางมีสีเข้มกว่าบริเวณหัวท้าย เซลล์ที่ 3 จากฐานจะมีลักษณะโป่งพองและมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์อื่น สามารถแยกได้จากโรคใบไหม้ข้าวโพดเช่นเดียวกับการศึกษาของกัญญา (2545) ที่ทำการแยกราชนิดนี้จากข้าวโพดที่มีอาการใบไหม้

***Curvularia clavata* Jain**

กรมวิชาการเกษตร

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีน้ำตาลดำ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่ออายุ 14 องศาเซลเซียส สร้างก้านชูสปอร์ลักษณะตรงหรือโค้งงอ ผนังเรียบ สีน้ำตาล โคนิเดียมี ลักษณะเป็นรูปกลมรีคล้ายไข่ (elilipsoid) ผนังเรียบ มีสีน้ำตาลเข้ม มีผนังกั้น 3 เส้น มี 4 เซลล์ โดยเซลล์ส่วนกลางมีสีเข้มกว่าเซลล์บริเวณหัวท้าย แยกได้จากใบจุดและใบไหม้ข้าวโพดเช่นเดียวกับการศึกษาของกัญญา (2545) แยกราชนิดนี้โดยแยกจากข้าวโพดที่มีอาการใบไหม้ และหญ้าพะดอเงียวที่มีอาการใบจุด

***Curvularia eragrostidis* (P. Henn.) J. A. Meyer** (ภาพที่ 1.2.2.4)

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีเทาเข้มจนถึงดำ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่ออายุ 14 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ก้านชูสปอร์มีสีน้ำตาล ผนังเรียบ โคนิเดียมีรูปร่างคล้ายถังเบียร์ (barrel shaped) เซลล์ที่อยู่ตรงกลางโป่งออก ผนังเรียบ มี 4 เซลล์ มีสีน้ำตาลเซลล์บริเวณปลายทั้ง 2 ข้างของ conidia มีสีอ่อนกว่าเซลล์ที่อยู่บริเวณตรงกลาง และผนังกั้นที่อยู่กึ่งกลางของโคนิเดียมีสีเข้าจนถึงดำมองเห็นชัดเจนซึ่งเป็นลักษณะเด่นของเชื้อราชนิดนี้โคนิเดียเกิดเป็นกลุ่มบริเวณปลายก้านชูสปอร์ แยกได้จากโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้เช่นเดียวกับงานวิจัยของพีระวรรณ และคณะ (2553) มีรายงานพบเชื้อราชนิดนี้ได้ทั้งในดินและพืชหลายชนิด เช่น อ้อย ข้าวโพด ข้าวฟ่าง เป็นต้น (นิยม, 2542; Domsch *et al*., 1993) นอกจากนี้พบมีรายงานการเกิดโรคผลเน่าของสับปะรดสาเหตุจากเชื้อรา *C. eragrostidis* เป็นครั้งแรกในประเทศบราซิล (Ferreira *et al*., 2014)

***Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn** (ภาพที่ 1.2.2.5)

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีตาลเข้มจนถึงดำ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่ออายุ 9 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ก้านชูสปอร์ เกิดแบบเดี่ยว ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล โคนีเดียมีลักษณะโค้งเล็กน้อย ผนังเรียบ มีผนังกั้น 3 เส้น และมี 4 เซลล์ บริเวณกลางเซลล์มีสีน้ำตาลเข้มกว่าเซลล์หัวท้าย แยกจากใบจุดข้าวโพด เมล็ดด่างข้าว และหญ้าสนามกอล์ฟ เช่นเดียวกับรายงานของ พีระวรรณ และคณะ (2553) แยกราชนิดนี้ได้จากโรคใบจุดข้าวโพด โรคเมล็ดด่างข้าว โรคเมล็ดเน่าดำข้าวฟ่าง โรคใบไหม้สบู่ดำ โรคใบจุดหน้าวัว โรคใบไหม้เยอรบีร่า โรคใบไหม้หญ้ายาง นอกจากนี้พบเชื้อราชนิดนี้ในดินปลูกอ้อย ปอ และมันสำปะหลัง สถานีทดลองพืชไร่สกลนคร จังหวัดสกลนคร และพบเป็นราเอนโดไฟลท์ในใบ *Globba* sp. จากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา (นิยม, 2542; Kokaew, 2011)

***Curvularia oryzae* Bugnicourt** (ภาพที่ 1.2.2.6)

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีเทาเข้ม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่ออายุ 14 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โคนีเดียมีลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย ผนังเรียบ มีผนังกั้น 3 เส้น และมี 4 เซลล์ มีสีน้ำตาลจนถึงน้ำตาลปนดำ บริเวณกลางเซลล์มีสีน้ำตาลเข้มกว่าเซลล์หัวท้าย แยกได้จากใบจุดและใบไหม้ของปาล์มน้ำมันเช่นเดียวกับการวิจัยของ Sunpapoa and Kittimorakul (2014) รายงานรา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดของปาล์มน้ำมัน

***Curvularia pallescens* Boedijn**

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีดำปนเขียว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ก้านชูสปอร์ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล โคนีเดียมีลักษณะเป็นทรงรี ปลายเซลล์งอเล็กน้อย หัวท้ายมน ผนังเรียบ มีผนังกั้น 3 เส้น และมี 4 เซลล์ บริเวณกลางเซลล์มีสีน้ำตาลอ่อนแต่เข้มกว่าเซลล์หัวท้าย แยกได้จาก

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ข้าวโพด มีรายงานพบในกล้วยไม้ดินพันธุ์เหลืองพิสมร จังหวัดตรัง ข้าวโพด หญ้าขน จังหวัดนครราชสีมา หญ้าตีนกา หญ้าปากควาย จังหวัดนนทบุรี หญ้าพะดอเงียว และหญ้ามาเลเซีย จังหวัดกรุงเทพฯ (กัญญา, 2545; คนึงนิจ, 2545)

***Bipolaris bicolor* (Mitra) Shoemaker** (ภาพที่ 1.2.2.7)

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 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ก้านชูสปอร์ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล โคนีเดียมีลักษณะทรงกระบอกปลายมน มีสีน้ำตาลทอง ผนังกั้นแบบ pseudoseptate มี 7-8 เซลล์ บริเวณเซลล์หัวท้ายมีผนังกั้นสีเข้มและเซลล์สีอ่อนกว่าบริเวณอื่น มี hilum อยู่ที่ฐานของโคนีเดีย เมื่อให้ความชื้น 24 ชั่วโมง เส้นใยจะงอกออกมาบริเวณหัวและท้ายเซลล์

***Bipolaris cactivora* (Petr.) Alcorn** (ภาพที่ 1.2.2.8)

Synonymy:

Helminthosporium cactivora Pertr., 1931, Gartenbauwissenenschaft 5: 226.

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

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส มีสีเทาเข้ม ก้านชูสปอร์มีสีน้ำตาล ผนังเรียบ โคนีเดียมีลักษณะทรงกระบอกแหลมปลายมน มีสีน้ำตาล ผนังกั้นแบบ 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.

โคโลนีบนอาหาร PDA มีสีเทาอมน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ก้านชูสปอร์มีผนังเรียบ สีน้ำตาลจนถึงน้ำตาลเข้ม โคนีเดียมีลักษณะโค้งงอ ผนังเรียบ มีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลทองเข้ม มี 5-11 เซลล์ และมี hilum อยู่บริเวณส่วนฐาน แยกได้จากโรคใบไหม้ข้าวโพด เช่นเดียวกับรายงานของ กัญญา (2545) แยกเชื้อชนิดนี้จากใบข้าวโพดที่เป็นโรคใบไหม้

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

Synonym:

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

กรมวิชาการเกษตร

Drechslera oryzae (Brede de Haan) Subram. & B.L. Jain, 1966, Current Sxience 35(14): 354.

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

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

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีเทาจนถึงเทาดำ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ก้านชูสปอร์มีลักษณะตรงหรือโค้งงอ ผนังเรียบ สีน้ำตาลจนถึงน้ำตาลเข้ม โคนีเดียมีลักษณะโค้งงอ แบบ fusoid หรือ obclavate ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล มี 6-14 เซลล์ แยกได้จากได้จากโรคเมล็ดด่างข้าวเช่นเดียวกับรายงานของ กัญญา (2545) แยกเชื้อชนิดนี้จากใบและเมล็ดข้าว

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

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 ตัวอย่างและแยกราจากตัวอย่างโรคพืชได้ 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

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ข้อมูลและรายละเอียดการจัดจำแนกชนิดของรา *Curvularia* และ *Bipolaris* สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงประกอบการศึกษา งานวิจัย ในสถาบันการศึกษา หน่วยงานรัฐ และหน่วยงานเอกชน

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.2.2.1 ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการใบจุดและใบไหม้ที่มีสาเหตุเกิดจากราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris* ที่ทำการเก็บจากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ระหว่าง เดือนตุลาคม 2559-เดือนกันยายน 2562

พืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	สถานที่	จำนวนตัวอย่าง
กล้วยไม้หวาย	*Dendrobium* spp.	ต.นราภิรมย์ อ.บางเลน จ.นครปฐม	4
		ต.คลองนกกระทุง อ.บางเลน จ.นครปฐม	3
		ต.คลองใหญ่ อ.องครักษ์ จ.นครนายก	4
		ต.หนองลาน อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี	1
แก้วมังกร	*Hylocereus undatus*	แขวงสีกัน เขตดอนเมือง กรุงเทพฯ	1
ข้าว	*Oryza sativa*	ต.เขาค้อ อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์	1
		ต.บุฤๅษี อ.เมือง จ.สุรินทร์	2
		ต.เขาแก้วศรีสมบูรณ์ อ.ทุ่งเสลี่ยม จ.สุโขทัย	1
ข้าวโพด	*Zea mays*	ต.ชัยนารายณ์ อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	2
		ต.นางั่ว อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์	1
		ต.เขาค้อ อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์	1
		ต.ทุ่งสมอ อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์	1
		ต.สระ อ.เชียงม่วน จ.พะเยา	2
		ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก	1
		ต.ท่าตอน อ.แม่อาย จ.เชียงใหม่	2
		อ.ไชยปราการ จ.เชียงใหม่	2
		ต.ทุ่งสะโตก อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่	3
		ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่	3
		ต.แม่ข้าวต้ม อ.เมือง จ.เชียงราย	4
		ต.แม่สรวย อ.แม่สรวย จ.เชียงราย	3
		ต.โป่งแพร่ อ.แม่ลาว จ.เชียงราย	1
		ต.ป่าตึง อ.แม่จัน จ.เชียงราย	2
		อ.ลี้ จ.ลำพูน	2
		ต.ท่าสัก อ.พิชัย จ.อุตรดิษถ์	3
		ต.ปากแคว อ.เมือง จ.พิษณุโลก	4
		ต.วังไม้ขอน อ.สวรรคโลก จ.สุโขทัย	5
		ต.บ้านป่า อ.เมือง จ.พิษณุโลก	2
		ต.ปลักแรด อ.บางระกำ จ.พิษณุโลก	1
		ต.มะต้อง อ.พรหมพิราม จ.พิษณุโลก	3
		ต.ท่าช้าง อ.พรหมพิราม จ.พิษณุโลก	3
		ต.ทับยายเชียง อ.พรหมพิราม จ.พิษณุโลก	4

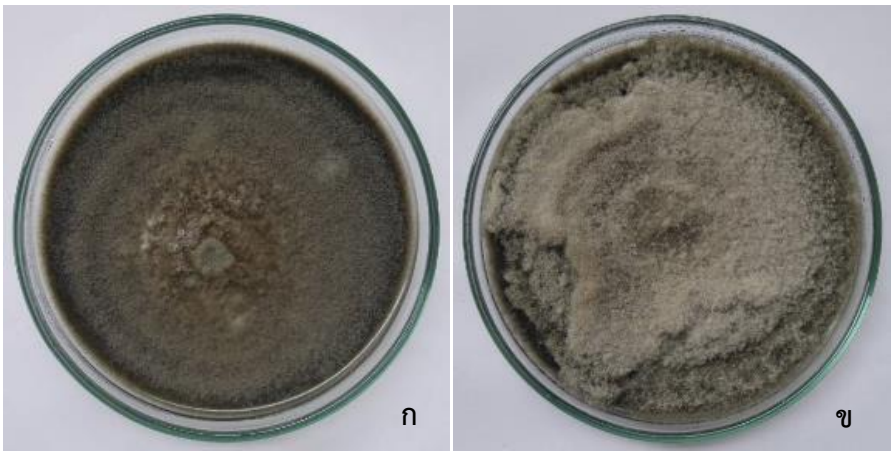
กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.2.2.1(ต่อ)

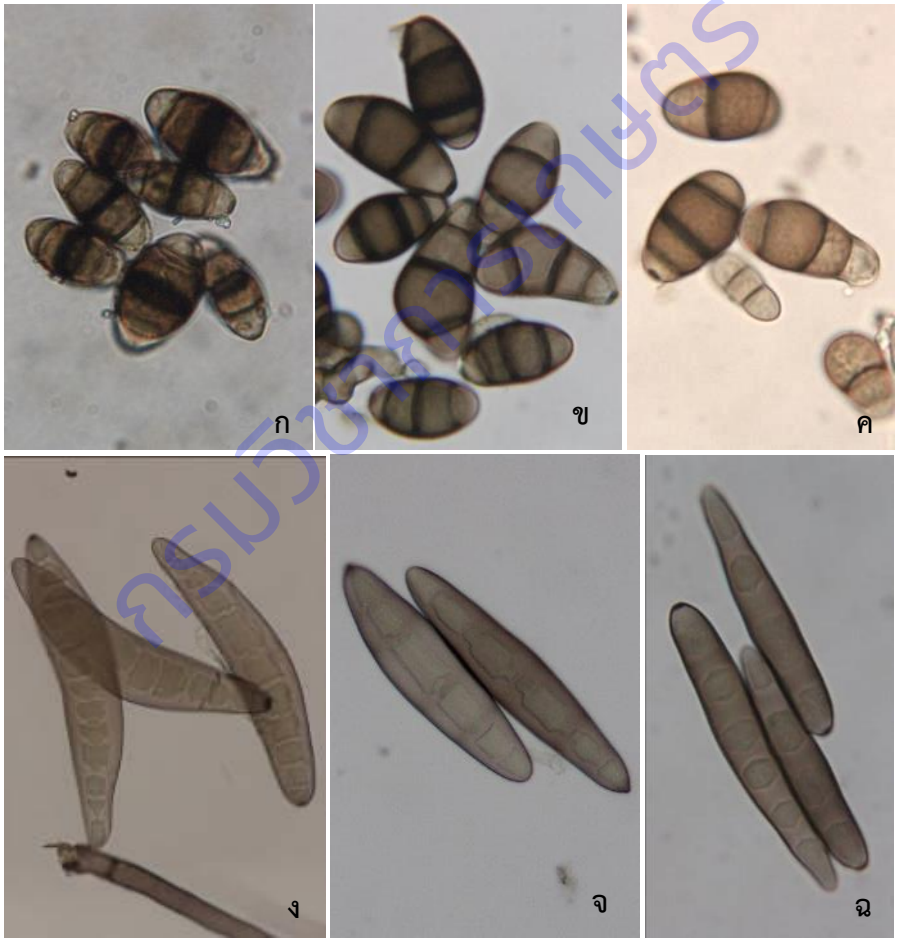
พืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	สถานที่	จำนวนตัวอย่าง
ข้าวโพด	*Zea mays*	อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	1
		อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา	1
		ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	2
		ต.ทุ่งบัว อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	1
		ต.พระแท่น อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี	2
		ต.วังขนาย อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี	2
		ต.ทับพริก อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว	2
		จ.จันทบุรี	1
		ต.กุยบุรี อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์	1
ปาล์มน้ำมัน	*Elaeis guineensis*	ต.ท่าอุแท อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี	2
		ต.คลองน้อย อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี	2
		ต.ท่าชนะ อ.คันธุลี จ.สุราษฎร์ธานี	3
		ต.เขาคราม อ.เมือง จ.กระบี่	2
		ต.ปกาสัย อ.เหนือคลอง จ.กระบี่	1
		ต.คลองท่อม อ.คลองท่อม จ.กระบี่	2
		อ.ละแม จ.ชุมพร	1
มะพร้าว	*Cocos nucifera*	ต.วังเย็น อ.บางแพ จ.ราชบุรี	1
		ต.ท่าอุแท อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี	2
		ต.คันธุลี อ.ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี	2
		อ.สวี จ.ชุมพร	1
หญ้านวนน้อย	*Zoysia* sp.	จ.ฉะเชิงเทรา	2
Tifdwarf grass	-	จ.ชลบุรี	1
		รวม	**107**

กรมวิทยาศาสตร์

ภาพที่ 1.2.2.1 ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคใบจุดและโรคใบไหม้ที่เกิดจากราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris* ที่เก็บจากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย



ภาพที่ 1.2.2.2 ลักษณะโคโลนีของรา ก) *Curvularia* sp. และ ข) *Bipolaris* sp.



กรมวิชาการเกษตร

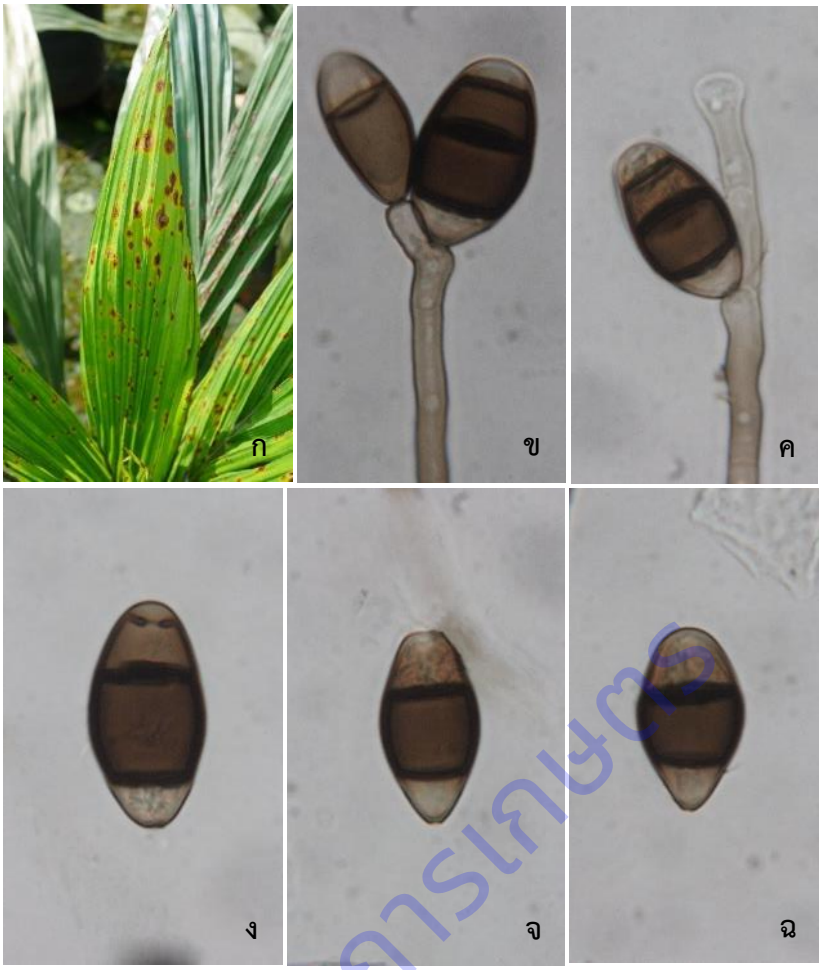
ภาพที่ 1.2.2.3 ลักษณะโคนิเดียของรา ก-ค) *Curvularia* และ ง-ฉ) *Bipolaris*

ภาพที่ 1.2.2.4 *Curvularia eragrostidis* : ก) ลักษณะอาการดอกจุดสนิมของกล้วยไม้
ข - ง) ก้านชูสปอร์และโคนิเดีย
จ - ซ) โคนิเดีย

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.2.2.5 *Curvularia lunata* : ก) ลักษณะอาการเมล็ดด่างข้าว
ข - ค) ก้านชูสปอร์และโคนิเดีย
จ - ฌ) โคนิเดีย

กรมวิชาการเกษตร

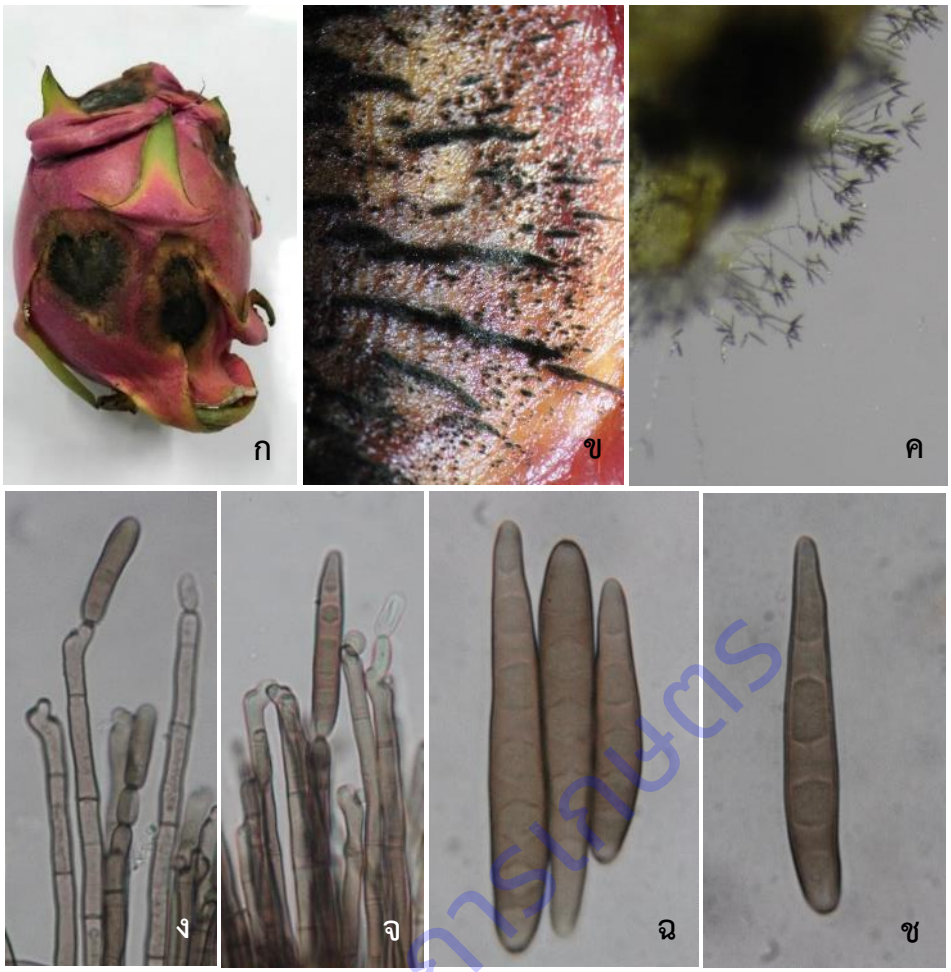


ภาพที่ 1.2.2.6 *Curvularia oryzae* : ก) ลักษณะอาการใบจุดปาล์มน้ำมัน
ข - ค) ก้านชูสปอร์และโคนิเดีย
ง - ฉ) โคนิเดีย

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.2.2.7 *Bipolaris bicolor* : ก - ข) ลักษณะอาการใบไหม้ของข้าวโพด
ค - ซ) โคนิเดีย

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.2.2.8 *Bipolaris cactivora* : ก) ลักษณะอาการผลเน่าแก้วมังกร
ข และ ค) ลักษณะของราบนแก้วมังกร
ง และ จ) ก้านชูสปอร์และโคนิเดีย
ฉ และ ช) โคนิเดีย

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.2.3. การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอม

Identification of the bacteria causes leaf blight disease on onion

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง ทิพวรรณ กันหาญาติ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล

บูรณี พั่ววงษ์แพทย์

รุ่งนภา ทองเคร็ง

กาญจนา ศรีไม้

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ดำเนินการเก็บตัวอย่างโรคใบแห้งของหอมจากแหล่งปลูกหอมและฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. สาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืชเพื่อจำแนกชนิด ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2561 พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคมีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ผิวมัน สีเหลือง การพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch สามารถทำให้เกิดอาการของโรคบนหอมแดง หอมแบ่ง และหอมหัวใหญ่ได้ ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญในสภาพที่มีอากาศ เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ 4% สามารถผลิตเอนไซม์ catalase และ pectinase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ oxidase, nitrate reductase, arginine dihydrolase และ urease เชื้อสามารถย่อย gelatin, casein, esculin, cellulose, Tween 80 และแป้งได้ สามารถสร้าง H_2S และเจริญบนอาหาร YPGA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สร้างกรดจาก cellobiose lactose และ glycerol ได้ แต่เชื้อไม่สร้าง indole และไม่สร้างเม็ดสีเรืองแสง (fluorescent pigment) บนอาหาร King's B การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อ *Xanthomonas* spp. การจำแนกชนิดของเชื้อด้วยวิธี Multilocus sequence analysis (MLSA) จากยีน *dna*K, *fyu*A, *gyr*B และ *rpo*D รวมทั้งข้อมูลคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *allii*

Abstract

The experiment was conducted to isolate and identify the causal agent of leaf blight on onion during October 2016 – September 2018. A yellow bacterium was consistently isolated from the affected leaves. Pathogenicity test revealed that the bacterium was able to cause leaf blight symptom on shallot, multiplied onion and onion, and allowed reisolation of the inoculated bacterium from the infected leaves. For the physiological and biochemical properties, bacteria

กรมวิชาการเกษตร

were gram-negative, rod-shaped, motile, aerobic, tolerate 4% NaCl concentration, positive for catalase and pectinolytic activity. Does not produce oxidase, nitrate reductase, arginine dihydrolase and urease. Hydrolyses gelatin, casein, esculin, starch, cellulose and Tween 80, produces H_2S from cysteine, grow on YPGA at 35°C but not at 40°C and produce acid from cellobiose, lactose and glycerol while negative for indole production and fluorescent pigments are not observed on King's B medium. Phylogenetic analysis based on partial 16S rDNA sequences, the BBO isolates were grouped into *Xanthomonas* spp. Further investigation based on multilocus sequence analysis (MLSA) by using concatenated phylogenies produced from multiple loci of house–keeping genes, dnaK, fyuA, gyrB and rpoD all BBO isolates were resemble of *X. axonopodis* pv. *allii*.

คำนำ

โรคใบแห้ง (bacterial leaf blight หรือ bacterial blight of onion: BBO) ของหอมในประเทศไทยเคยพบมีการระบาดเมื่อปี 2526 ในหอมหัวใหญ่ที่ตำบลทุ่งทอง อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี (นิตยา และคณะ, 2530) ต่อมาพบแพร่ระบาดในหอมแบ่งและหอมแดงที่จังหวัดราชบุรีและนครปฐม (นิตยาและคณะ, 2532) โดยวนิดาและคณะ (2529) ทำการศึกษาเชื้อสาเหตุตามลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี จำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคได้เป็น *Xanthomonas* sp. ดังนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่พบระบาดในประเทศไทยเป็นปัจจุบัน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่เก็บรักษาไว้ในศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ (culture collection) ของกลุ่มวิจัยโรคพืชและจากการเก็บตัวอย่างโรคจากแหล่งปลูกที่มีการระบาดของโรคใบแห้ง โดยศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และจำแนกชนิดด้วยวิธี multilocus sequence analysis (MLSA) เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงแก่นักวิชาการในการทำวิจัยและเป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช (pest list)

กรมวิชาการเกษตร

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
3. หม้อนึ่งความดันไอ
4. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ
5. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
6. ตู้อบ
7. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
8. เครื่องชั่ง

9. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

10. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สกัดดีเอ็นเอ และทำปฏิกิริยา PCR

- วิธีการ

1. ฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. จากแหล่งเก็บจุลินทรีย์

นำเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. ที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ (culture collection) ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาฟื้นฟู โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Luria Bertani (LB) เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร Potato semi-synthetic agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรค

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคใบแห้งของหอมจากแหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ สุรินทร์ กาญจนบุรี ราชบุรี ตาก ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน สุโขทัย พะเยา อุตรดิตถ์ และเพชรบูรณ์ บันทึกข้อมูลลักษณะอาการของโรค ถ่ายภาพ วันที่เก็บ และแหล่งที่พบ จากนั้นนำตัวอย่างกลับมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ โดยตัดส่วนของพืชบริเวณรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคเป็นชิ้นเล็กๆ แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วนำมาบดในน้ำกลั่น และแยกเชื้อบนอาหาร PSA หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกเก็บเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลมนูน ขอบเรียบ ผิวเป็นมันวาวสีเหลือง และทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ กลีเซอรอล 15% และ 50% ไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

3. ทดสอบการเกิดโรค (Pathogenicity test)

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่างและที่เก็บรักษาไว้ในศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาทดสอบการเกิดโรคกับหอมแดง หอมแบ่ง หอมหัวใหญ่ และกุยช่าย โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml พ่นเชื้อแบคทีเรียบนพืชทดสอบแล้วใช้ถุงพลาสติกคลุมไว้ให้มีความชื้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงเปิดถุงออก และสังเกตอาการต้นพืชเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* และน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ และพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch's postulation)

4. ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ

ทำการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียบางประการที่เหมาะสมและจำเป็นต่อการจำแนกเชื้อ โดยศึกษาตามวิธีการของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition และ Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria Third Edition (Schaad *et al.*, 2001) ได้แก่ การย้อมสีแบบแกรม, motility test, oxidative/fermentation test, salt tolerance, catalase test, oxidase test, nitrate reduction, arginine dihydrolase test, urease test, indole production, esculin hydrolysis, gelatin hydrolysis, starch hydrolysis, casein hydrolysis,

กรมวิชาการเกษตร

cellulose hydrolysis, tween 80 hydrolysis, H_2S production, pectinolytic activity, fluorescent pigment production และ acid production

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene

แยกสกัดดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยนำเชื้อแบคทีเรีย 1 ลูป 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

เพิ่มปริมาณ 16S rDNA gene ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 27F (5′-AGAGTTTGATCMTGG CTCAG-3′) และ 1492R (5′-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3′) โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 100 ng/µl, One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.5 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, 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 ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK) ส่งผลผลิต PCR ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA gene ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank และจัดลำดับความสัมพันธ์ของแบคทีเรียด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MEGA X (Kumar *et al*., 2018)

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี multilocus sequence analysis (MLSA)

นำดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณ housekeeping gene จำนวน 4 ยีน ได้แก่ ยีน *dna*K, *fyu*A, *gyr*B และ *rpo*D ตามรายงานของ Young *et al*. (2008) โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 100 ng/µl, One

PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.5 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, 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 ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK) และส่งผลผลิต PCR ที่มีขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่งวิเคราะห์กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank และจัดลำดับความสัมพันธ์ของแบคทีเรียด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MEGA X (Kumar *et al*., 2018)

- เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 59 – กันยายน 61

สถานที่ ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และแปลงเกษตรกร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. จากแหล่งเก็บจุลินทรีย์

นำเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. ที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืชมาฟื้นฟูโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. ลักษณะโคโลนีกลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาวสีเหลือง ได้จำนวน 6 ไอโซเลท เป็นเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากหอมแดง 4 ไอโซเลท และหอมหัวใหญ่ 2 ไอโซเลท (Table 1.2.3.1)

2. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรค

เก็บตัวอย่างหอมที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคใบแห้งของหอมจากจังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ สุรินทร์ กาญจนบุรี ราชบุรี ตาก ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน สุโขทัย พะเยา อุตรดิตถ์ และเพชรบูรณ์ นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการแยกเชื้อสาเหตุจากลักษณะอาการใบจุดรูปร่างคล้ายเลนส์ตรงกลางแผลบางสีขาวซีด ขอบแผลฉ่ำน้ำและใบแห้งของหอม พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลมนูน ขอบเรียบ ผิวมันวาวสีเหลือง คล้าย *Xanthomonas* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท จากตัวอย่างหอมแบ่งที่เก็บจากอำเภอพบพระ จังหวัดตาก (Figure

กรมวิชาการเกษตร

1.2.3.1) ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์เก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บรักษาในกลีเซอรอล 15% และ 50% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

3. ทดสอบการเกิดโรค (Pathogenicity test)

นำเชื้อที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่าง จำนวน 1 ไอโซเลท และที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืช จำนวน 6 ไอโซเลท รวม 7 ไอโซเลท มาทดสอบการเกิดโรคกับหอมแดง หอมแบ่ง หอมหัวใหญ่ และกุยช่าย โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml พ่นเชื้อบนพืชทดสอบเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* และน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้หอมแดง หอมแบ่ง และหอมหัวใหญ่เกิดโรคได้ แต่ไม่ก่อให้เกิดโรคในกุยช่ายโดยพืชทดสอบเริ่มแสดงอาการจุดฉ่ำน้ำหัวท้ายแหลมคล้ายวงรีหรือรูปเลนส์หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 4 วัน บริเวณแผลใบจะยุบตัวหรือบางลง เมื่อแผลขยายใหญ่ขึ้นอาจทำให้ใบหักพับและปลายใบแห้งได้ โดยที่ต้นที่ปลูกเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* และกรรมวิธีควบคุมลบ (negative control) คือน้ำนึ่งฆ่าเชื้อไม่ทำให้พืชทดสอบปรากฏอาการโรค (Table 1) ผลทดสอบการเกิดโรคสอดคล้องกับรายงานของ Kadota *et al*. (2000) ซึ่งพบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้เกิดโรคใน Welsh onion (*A. fistulosum* L.) และหอมหัวใหญ่ (*A. cepa* L.) แต่ไม่ทำให้เกิดโรคใน chive (*A. schoenoprasum* L.) กุยช่าย (*A. tuberosum* Rottler) และ hyacinth (*Hyacinthus orientalis* L.) และจากข้อมูลการศึกษาความสามาถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity test) ของ Roumagnac *et al*. (2004) พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้เกิดโรคบนหอมหัวใหญ่ (*A. cepa* L. cv. Red Creole) กระเทียม (*A. sativum* L. cv. Vacoa) กระเทียมต้น (*A. porrum* L. cv. Gros long d'e ´te ´) และหอมแดง (*A. cepa* var. *ascalonicum* Backer cv. Ambition) แต่ไม่ทำให้เกิดโรคบน chive (*A. schoenoprasum* L. cv. Civette) และ hyacinth (*H. orientalis* L. cv. Carnegie) การพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch สามารถแยกได้เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลมนูน ขอบเรียบ ผิวมันวาวสีเหลือง จากแผลที่ทำการปลูกเชื้อ

4. ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ

ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญในสภาพที่มีอากาศ เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ 4% สามารถผลิตเอนไซม์ catalase และ pectinase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ oxidase, nitrate reductase, arginine dihydrolase และ urease เชื้อสามารถย่อย gelatin, casein, esculin, cellulose, Tween 80 และแป้งได้ สามารถสร้าง H_2S และเจริญบนอาหาร YPGA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สร้างกรดจาก cellobiose lactose และ glycerol ได้ แต่เชื้อไม่สร้าง indole และไม่สร้างเม็ดสีเรืองแสง (fluorescent pigment) บนอาหาร King's B (Table 1.2.3.2)

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene

ทำการเพิ่มปริมาณ 16S rDNA gene ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 27F และ 1492R แล้วส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene ของ type

กรมวิชาการเกษตร

strain ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Xanthomonads มากกว่า 99% โดยเชื้อ *X. euvesicatoria* DSM19128 (accession NR104773.1) ค่า identity เท่ากับ 99.66% เชื้อ *X. perforans* XV938 (accession NR104792.1) ค่า identity เท่ากับ 99.60% เชื้อ *X. fuscans* LMG 826 (accession NR104958.1) ค่า identity เท่ากับ 99.66% และเชื้อ *X. campestris* ATCC 33913 (accession NR074936.1) ค่า identity เท่ากับ 99.46% นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดประมาณ 1.4 kb ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมสร้างแผนภูมิต้นไม้เพื่อดูความสัมพันธ์กับเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ที่มีรายงานเป็นสาเหตุโรคในพืชผักและหอม โดยใช้โปรแกรม MEGA X (Kumar *et al*., 2018) ด้วยวิธี Maximum Likelihood ประเมินความเชื่อมั่นของแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมในไทย จัดกลุ่มรวมกับเชื้อ *X. euvesicatoria* และ *X. perforans* สาเหตุโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศ เชื้อ *X. fuscans* สาเหตุโรคใบจุดในถั่ว และเชื้อ *X. axopnopodis* pv. *allii* สาเหตุโรคใบแห้งของหอม แยกกลุ่มชัดเจนออกจากเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* สาเหตุโรคเน่าดำ (black rot) ของพืชผักตระกูลกะหล่ำ และแบคทีเรีย *Pantoea allii* สาเหตุ center rot ของหอมหัวใหญ่ (Figure 1.2.3.2)

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่มีความใกล้เคียงกันมากกับเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ไม่เพียงพอต่อการจำแนกชนิดแบคทีเรียสอดคล้องกับการศึกษาของ Hauben *et al*. (1997) ซึ่งทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ของเชื้อสกุล Xanthomonas พบว่ามีความใกล้เคียงกันมากและให้ผลไม่สอดคล้องกับข้อมูลของ DNA-DNA hybridization ที่มีการศึกษาไว้ ทำให้ไม่สามารถนำข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene มาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย Xanthomonas ในระดับสปีชีส์ได้

6. การวิเคราะห์ multilocus sequence analysis (MLSA)

นำดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณ housekeeping gene จำนวน 4 ยีน ได้แก่ ยีน *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* และ *rpoD* แล้วส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 940 bp, 698 bp, 865 bp และ 873 bp ตามลำดับ นำมาเรียงต่อกันรวมความยาวทั้งหมด 3,376 bp สร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้เพื่อดูความสัมพันธ์กับเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pathovars และ *Xanthomonas* spp. ที่เป็น type strain และ pathotype strain ของเชื้อแบคทีเรียและมีข้อมูลของทั้ง 4 ยีนในฐานข้อมูล Genbank (Table 1.2.3.3) โดยใช้โปรแกรม MEGA X (Kumar *et al*., 2018) ด้วยวิธี Maximum Likelihood ประเมินความเชื่อมั่นของแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมใกล้เคียงกับของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *allii* สายพันธุ์ LMG 21894 (CFBP 6369) ซึ่งเป็น pathotype strain ตามรายงานของ Roumagnac *et al*. (2004) (Figure 1.2.3.3) โดยแยกกลุ่มชัดเจนออกจากเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* สายพันธุ์ ICMP13 (type strain) และ ICMP6541 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคในกลุ่มพืชผักเช่นเดียวกัน

โรคใบแห้งของหอม (Bacterial leaf blight) มีรายงานการพบโรคครั้งแรกที่ฮาวายในปี 1975 และจำแนกเชื้อสาเหตุครั้งแรกเป็นเชื้อ *Xanthomonas* sp. อาการของโรคเริ่มแรกใบเป็นจุดฉ่ำน้ำ แล้วขยายเป็นรูป

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

วงรีแหลมหัวท้าย และขยายใหญ่ไปตามความยาวใบ จากนั้นแผลเริ่มแห้งแตกตรงกลางแผลและใบหักพับลง หากอาการรุนแรงใบจะแห้งตายมีผลทำให้หัวมีขนาดเล็กหรือฝ่อ (Alvarez *et al*., 1978) ต่อมา Paulraj and O'Garro (1993) ทำการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่ระบาดในแหล่งปลูกหอมที่สำคัญใน Barbados โดยศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อ และทำ fatty acid analysis พบว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* และ Kadota *et al*. (2000) ทำการศึกษา pathovar ของเชื้อ *X. campestris* สาเหตุโรคไหม้ของ Welsh onion (Bacterial blight of Welsh onion) ซึ่งพบระบาดที่เมืองโอกินาวา ประเทศญี่ปุ่นในปี 1998 พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้เกิดโรคใน Welsh onion และหอมหัวใหญ่ แต่ไม่ทำให้เกิดโรคใน chive, กุยช่าย (Chinese chive) และ hyacinth จึงเสนอเป็น pathovar ใหม่ และจำแนกเชื้อสาเหตุเป็น *X. campestris* pv. *allii* pv. nov. อย่างไรก็ตาม การศึกษาของ Kadota *et al*. (2000) ใช้เพียงคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาและความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัย ต่อมา Roumagnac *et al*. (2004) ได้ทำการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบแห้งของหอมใหม่โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rRNA, วิธี DNA–DNA hybridization, ทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน (carbon source utilization), การวิเคราะห์องค์ประกอบไขมันของเซลล์แบคทีเรีย และเทคนิค fluorescent amplified fragment length polymorphisms (FAFLPs) จำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคได้เป็น *X. axonopodis* pv. *allii*

สำหรับประเทศไทยพบโรคใบแห้งของหอมระบาดในปี 2526 ในหอมหัวใหญ่ที่ ตำบลทุ่งทอง อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี (นิตยา และคณะ, 2530) ต่อมาพบแพร่ระบาดในหอมแบ่งและหอมแดงที่จังหวัดราชบุรีและนครปฐม (นิตยา และคณะ, 2532) การศึกษาเชื้อสาเหตุตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีโดยวนิดา และคณะ (2529) จำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเป็น *Xanthomonas* sp. และยังไม่พบรายงานการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้ของหอมในประเทศไทยในระดับสปีชีส์ แต่เนื่องจากการขาดแคลนเชื้อสายพันธุ์ต้นแบบ (type strain) สำหรับใช้จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี DNA–DNA hybridization เพื่อดูความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียทำให้นักวิจัยพยายามหาวิธีการเพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าว เทคนิค multilocus sequence analysis (MLSA) เป็นการวิเคราะห์กลุ่มยีนที่เป็น housekeeping gene ซึ่งมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียจำนวน 4-7 ยีน เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank มีความนิยมใช้จำแนกชนิดแบคทีเรียมากขึ้นเนื่องจากสามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้สอดคล้องกับการศึกษา DNA–DNA hybridization โดย Young *et al*. (2008) ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. จำนวน 119 สายพันธุ์ โดยใช้ multilocus sequence analysis ของ 4 ยีน ได้แก่ *dna*K, *fyu*A, *gyr*B และ *rpo*D พบว่าสามารถแยก *Xanthomonas* spp. ออกเป็น 2 กลุ่ม สอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยเปรียบเทียบกับวิธี DNA-DNA hybridization การนำเทคนิค MLSA มาใช้จำแนกชนิดเชื้อในกลุ่มของ Xanthomonas spp. โดย Lang *et al*. (2017) วิเคราะห์กลุ่มยีน *atp*D, *dna*K, *gyr*B, *fus*A, *lep*A และ *rpo*D เพื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุอาการใบขีด (bacterial leaf streak) ของข้าวโพดที่พบในสหรัฐอเมริกาพบว่าเกิดจากเชื้อ *X. vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov. และการศึกษาของRoach *et al.* (2018) ใช้การวิเคราะห์กลุ่มยีน *atp*D, *dna*K, *efp* และ *gyr*B จำแนกชนิดเชื้อ Xanthomonas spp. สาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศและพริกในออสเตรเลีย จำนวน 64 ไอโซเลท พบว่าสามารถจำแนกเชื้อได้เป็น *X. euvesicatoria*, *X. perforans* และ *X. vesicatoria* นอกจากนี้

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ยังมีการศึกษาของ 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* โดยใช้เชื้ออ้างอิง (reference strain) จาก 7 สปีชีส์ที่จำแนกเป็นเชื้อ Pantoea แล้ว เชื้อสาเหตุโรคคนซึ่งยากต่อการจำแนกเป็น *P. agglomerans* หรือ *P. ananatis* และเชื้อสาเหตุโรคพืชซึ่งแยกได้จากยูคาลิปตัส ข้าวโพด และหอม 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 โดยต้องพิจารณาคัดเลือกยีนพื้นฐานที่ทำหน้าที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียและแบคทีเรียจำเป็นต้องรักษาคุณสมบัตินั้นไว้ให้คงที่โดยหลีกเลี่ยงการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ต่อยีนนั้นน้อยที่สุด

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เก็บตัวอย่างโรคใบแห้งของหอมจากแหล่งปลูกหอมและฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. สาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืชเพื่อจำแนกชนิด พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคมีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ผิวมัน สีเหลือง การพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch สามารถทำให้เกิดอาการของโรคบนหอมแดง หอมหัวใหญ่ และหอมแบ่งได้ ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญในสภาพที่มีอากาศ เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ 4% สามารถผลิตเอนไซม์ catalase และ pectinase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ oxidase, nitrate reductase, arginine dihydrolase และ urease เชื้อสามารถย่อย gelatin, casein, esculin, cellulose, Tween 80 และแป้งได้ สามารถสร้าง H_2S และเจริญบนอาหาร YPGA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สร้างกรดจาก cellobiose lactose และ glycerol ได้ แต่เชื้อไม่สร้าง indole และไม่สร้างเม็ดสีเรืองแสง (fluorescent pigment) บนอาหาร King's B การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA และจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Multilocus sequence analysis (MLSA) จากยีน *dna*K, *fyu*A, *gyr*B และ *rpo*D รวมทั้งข้อมูลคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่ระบาดในประเทศไทยมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเชื้อ *X. axonopodis* pv. *allii*

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ทราบชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอม เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงแก่นักวิชาการในการทำวิจัย เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช และใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงหนังสือของกลุ่มวิจัยโรคพืช

ศรีเวียงการเกษตร

Figure 1.2.3.1 Bacterial blight on field grown multiplied onion (*A. cepa* var. *aggregatum*)

กรมวิชาการเกษตร

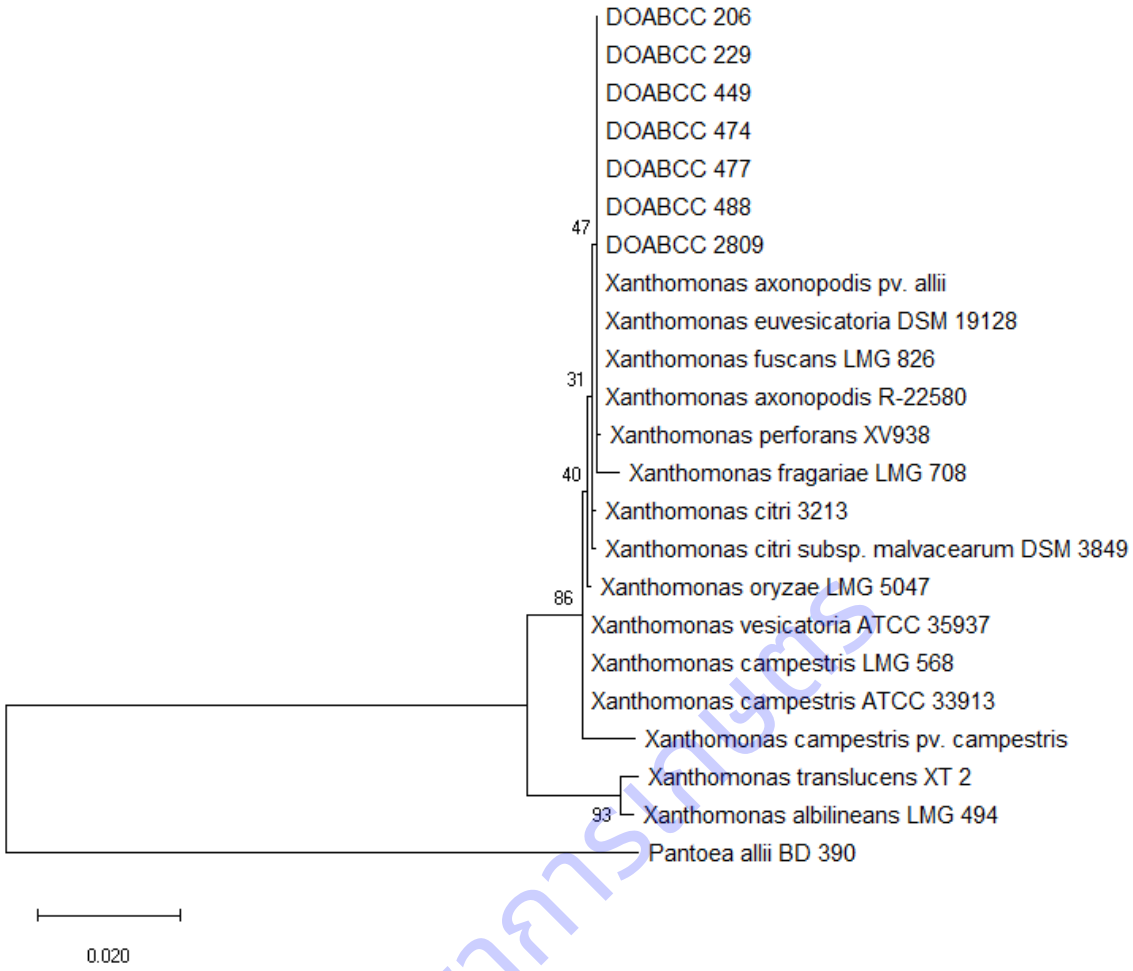


Figure 1.2.3.2 Maximum-likelihood tree based on partial 16S rDNA gene sequences showing the relationships of 7 BBO isolates (DOABCC 206, DOABCC 229, DOABCC 449, DOABCC 474, DOABCC 477, DOABCC 488 and DOABCC 2809) and type strains of species. Bootstrap values based on 1,000 replicates are shown at branch nodes

กรมวิชาการเกษตร

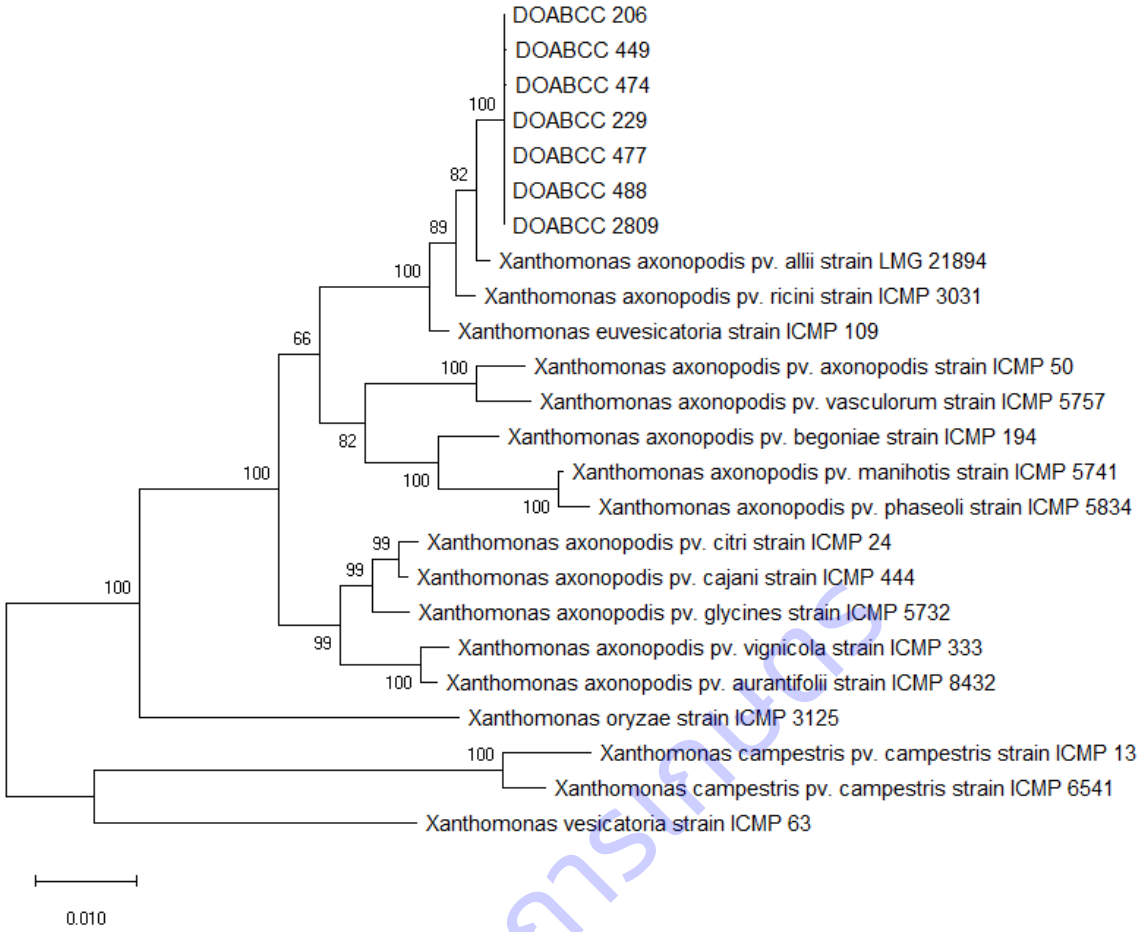


Figure 1.2.3.3 Maximum-likelihood tree based on the concatenated *dna*K, *fyu*A, *gyr*B and rpoD nucleotide sequences showing the relationships of 7 BBO isolates (DOABCC 206, DOABCC 229, DOABCC 449, DOABCC 474, DOABCC 477, DOABCC 488 and DOABCC 2809) and type strains of species. Bootstrap values based on 1,000 replicates are shown at branch nodes

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.3.1 Bacterial strains used in this study and their pathogenicity for *Allium* spp.

Strain		Host		Location	Year	Pathogenicity Test			
						Shallot	Onion	Multiplied onion	Chinese chive
DOABCC 206		Shallot	*A. cepa* var. *ascalonicum*	Ratchaburi	1984	+	+	+	-
	DOABCC 229	Onion	*A. cepa*	Kanchanaburi	1984	+	+	+	-
DOABCC 449		Shallot	*A. cepa* var. *ascalonicum*	Kanchanaburi	1985	+	+	+	-
DOABCC 474		Onion	*A. cepa*	Kanchanaburi	1985	+	+	+	-
DOABCC 477		Shallot	*A. cepa* var. *ascalonicum*	Kanchanaburi	1985	+	+	+	-
DOABCC 488		Onion	*A. cepa*	Kanchanaburi	1985	+	+	+	-
DOABCC 2809		Multiplied onion	*A. cepa* var. *aggregatum*	Tak	2018	+	+	+	-
X. campestris pv. campestris	DOABCC 493	Cauliflower	*Brassica oleracea* var. *botrytis*	Prathum Thani	1985	-	-	-	-

+ means positive; - means negative

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.3.2 Comparison of physiological and biochemical characteristics of bacterial strains isolated from *Allium* spp.

Character	DOABCC								*Xaa*[1/]
	206	229	449	474	477	488	2809	493	
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aerobic metabolism of glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anaerobic metabolism of	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase test	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease test	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Casein hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellulose hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80 hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H_2S production	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pectinolytic activity	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Tolerance to 3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fluorescent pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 35°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from:									
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+

[1/] Kadota *et al*. (2000), Roumagnac *et al*. (2000), Xaa: *X. axonopodis* pv. *allii*

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.3.3 Xanthomonas strains used in multilocus sequence analysis

No.	Species name	Strain	Accession Number			
			dnaK	fyuA	gyrB	rpoD
1	*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*	ICMP 13^{T}	EU498747.1	EU498849.1	EU498948.1	EU499067.1
2	*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*	ICMP 24^{P}	EU498749.1	EU498851.1	EU498950.1	EU499069.1
3	*Xanthomonas axonopodis* pv. *axonopodis*	ICMP 50^{T}	EU498751.1	EU498853.1	EU498952.1	EU499071.1
4	*Xanthomonas vesicatoria*	ICMP 63^{T}	EU498753.1	EU498855.1	EU498954.1	EU499073.1
5	*Xanthomonas euvesicatoria*	ICMP 109^{T}	EU498754.1	EU498856.1	EU498955.1	EU499074.1
6	*Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*	ICMP 194^{P}	EU498757.1	EU498859.1	EU498962.1	EU499081.1
7	*Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*	ICMP 333^{P}	EU498764.1	EU498866.1	EU498970.1	EU499089.1
8	*Xanthomonas axonopodis* pv. *cajani*	ICMP 444^{P}	EU498767.1	EU498869.1	EU498973.1	EU499092.1
9	*Xanthomonas axonopodis* pv. *ricini*	ICMP 3031	EU498782.1	EU498884.1	EU498991.1	EU499110.1
10	*Xanthomonas oryzae*	ICMP 3125^{T}	EU498784.1	EU498886.1	EU498993.1	EU499112.1
11	*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*	ICMP 5732^{P}	EU498794.1	EU498896.1	EU499003.1	EU499122.1
12	*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*	ICMP 5741^{P}	EU498796.1	EU498898.1	EU499006.1	EU499125.1
13	*Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*	ICMP 5757^{P}	EU498798.1	EU498900.1	EU499011.1	EU499130.1
14	*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*	ICMP 5834^{P}	EU498802.1	EU498904.1	EU499015.1	EU499134.1
15	*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*	ICMP 6541	EU498805.1	EU498907.1	EU499018.1	EU499137.1
16	*Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*	ICMP 8432	EU498811.1	EU498913.1	EU499027.1	EU499146.1
17	*Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*	LMG 21894^{P}	KJ491213.1	HQ591016.1	CM002866.1	KJ491663.1

ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants

LMG: BCCM/LMG Bacteria Collection,Laboratory for Microbiology NCPPB- National Collection of Plant Pathogenic Bacteria

^{T} Type strain of species

^{P} Pathotype strain

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.2.4 การสำรวจ จำแนกและศึกษาอาการ chlorotic ringspot บนกล้วยไม้ *Phalaenopsis*
Survey, Identification and characterization of chlorotic ringspot on *Phalaenopsis* orchid

คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[1]

บทคัดย่อ

การตรวจวินิจฉัยลักษณะอาการ chlorotic ringspot บนกล้วยไม้ *Phalaenopsis* ที่พบอาการด่างเหลืองใบซีด (chlorosis) เป็นวงแหวน (ring spot) ขยายใหญ่บนใบกล้วยไม้และมีอาการใบจุด (local lesion) ตรงกลางแผล เมื่อตรวจสอบด้วย primer CaCV.NPF 5'TTA CAC TTC TAT AGA AGT ACT A 3' และ CaCV.NPR 5'ATG TCT AAC GTT AGG CAA CTT A 3' ด้วยเทคนิค reverse transcription PCR (RT-PCR) พบแถบดีเอ็นเอและได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเหมือนกับเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) percent identity เท่ากับ 92.62 เปอร์เซ็นต์ และทำการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อและลักษณะอาการบนพืชทดสอบ 4 ชนิด คือ *Nicotiana benthamiana*, *Lycopersicon esculentum*, *Vigna sinensis* และ *Chenopodium quinoa* ด้วยวิธี mechanical ในโรงเรือนควบคุมอุณหภูมิ 25-28 °C พบอาการจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบที่ปลูกเชื้อและต่อมาเนื้อเยื่อเป็นจุดเหลืองตายบน *N. Benthamiana* และ *C. quinoa* ส่วน *L. esculentum* และ *V. sinensis* ไม่แสดงอาการบนใบหลังปลูกเชื้อ จากการศึกษาทำให้พบว่าลักษณะอาการ chlorotic ringspot บนใบกล้วยไม้สกุลฟาเลนอพซิส (Phalaenopsis) ที่พบในประเทศไทยมีความเหมือนกับเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) ที่มีรายงานในไต้หวัน

คำหลัก: กล้วยไม้, ฟาเลนอพซิส, จุดแผลสีเหลือง

Abstract

The diagnosis of the chlorotic ringspot's characteristics on *Phalaenopsis* orchid leaves which the yellow mosaic, the ring spot chlorosis expanding on leaves, and the local lesions are found. Furthermore, when testing with primer CaCV.NPF 5'TTA CAC TTC TAT AGA AGT ACT A 3' and CaCV.NPR 5'ATG TCT AAC GTT AGG CAA CTT A 3' with the technique of reverse transcription PCR (RT-PCR), the DNA bar is found as well as when analysing the nucleotides' order, it is found that there are 92.62% of identity similarity with the *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph). Additionally, the virus transfer and the characteristic of plants' symptoms are studied in 4 types of plant named as *Nicotiana Benthamiana*, *Lycopersicon Esculentum*, *Vigna Sinensis*, and *Chenopodium Quinoa* with the mechanical method in the greenhouse which the temperature is

กรมวิชาการเกษตร

controlled around 25 to 28 °C; as a result, the chlorotic yellow lesion spot is found on the leaves which were inoculated; later, it become to yellow necrotic spot and dead in *N. Benthamiana* and *C. Quinoa* differentiating form *L. Esculentum* and *V. Sinensis* which the symptoms are not shown after inoculation. According to the study, it could be found that the chlorotic ringspot's symptom characteristics on the Phalaenopsis orchid which is found in Thailand resembling with *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) reported in Taiwan.

Keywords: Orchid, Phalaenopsis, chlorotic ring spot

คำนำ

ประเทศไทยมีการส่งออกและนำเข้าต้นกล้วยไม้เพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อย ๆ สำหรับประเทศที่นำเข้าต้นกล้วยไม้จากไทยส่วนใหญ่นำไปประดับ มีส่วนน้อยที่นำไปเป็นต้นพันธุ์ แต่การนำเข้าของผู้ปลูกเลี้ยงในประเทศไทยจะนำพันธุ์ที่แปลกใหม่มาเป็นต้นพันธุ์ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การนำต้นที่ติดเชื้อไวรัสเข้ามาโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อไวรัสที่ไม่เคยมีมาก่อนในประเทศไทยย่อมมีผลกระทบโดยตรงต่อการเพิ่มและแพร่ กระจายโรคไวรัสที่ติดมากับต้นพันธุ์ ส่วนที่นำต้นพันธุ์เข้ามาเพื่อผสมพันธุ์แม้เชื้อจะไม่ถ่ายทอดทางเมล็ดแต่เป็นการนำต้นกล้วยไม้ที่มีเชื้อไวรัสมาปะปนอยู่ในแหล่งปลูก จากการสำรวจตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545-2550 ตรวจพบโรคไวรัสที่เกิดจากเชื้อไวรัส CyMV ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย (Dendrobium), สกุลแวนด้า (Vanda), สกุลสาวน้อยเต้นระบำ (Oncidium), แกรมมาโตไฟลั่ม (Grammatophyllum) และสกุลฟาแลนอพซีส (Phalaenopsis) ในอัตราตั้งแต่ 30-100 เปอร์เซ็นต์ในทุกพันธุ์ ORSV ถูกตรวจพบในกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ ในอัตราที่น้อยกว่า CyMV พบเฉลี่ยประมาณ 20-50 เปอร์เซ็นต์ แต่มีผลกระทบรุนแรงมากกว่าต่อปริมาณผลผลิตของดอกและคุณภาพของช่อดอกทำให้สกุล Vanda มีอาการเนื้อเยื่อตายเป็นแผลรูปวงแหวนแล้วเปลี่ยนเป็นแผลสีดำบนใบทั้งต้น สกุล Oncidium เป็นพันธุ์ที่ตรวจพบเชื้อ ORSV ในอัตราสูงกว่ากล้วยไม้สกุลอื่น ๆ มีอาการรุนแรงใบเรียวเล็กเหลือแต่เส้นกลางใบและมีใบด่างร่วมด้วย (สุรภี, 2536) และปัจจุบันได้มีการตรวจพบอาการด่างเหลืองเป็นวง (chlorotic ringspot) บนใบของกล้วยไม้สกุล Phalaenopsis ในบางแหล่งปลูกของประเทศซึ่งจากรายงานของ Zheng *et. al* (2008) พบว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) และมีการระบาดในประเทศไต้หวัน นอกจากนั้น You-Xiu Zheng *et al.* (2008) พบว่าอาการ chlorotic ringspot บนกล้วยไม้สกุล Phalaenopsis มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) และจัดอยู่ในกลุ่ม Tospovirus มีการระบาดในประเทศไต้หวัน ซึ่งเป็นแหล่งนำเข้ากล้วยไม้ของประเทศไทย สำหรับประเทศไทยยังไม่มีรายงานเชื้อไวรัสชนิดนี้ในกล้วยไม้สกุล Phalaenopsis ดังนั้นจึงควรทำการสำรวจ จำแนกและศึกษาลักษณะอาการดังกล่าวบนกล้วยไม้ เพื่อจัดทำเป็นข้อมูลปัจจุบัน ทำให้ได้ข้อมูลของการเกิดโรคและผลกระทบต่อต้นกล้วยไม้ เพื่อวางแนวทางในการควบคุมโรคหรือลักษณะอาการดังกล่าวกับกล้วยไม้ รวมทั้งทำให้ทราบชนิดเชื้อสาเหตุ ทั้งยังเป็นการเฝ้าระวังการเกิดโรคและการแพร่ระบาดในประเทศไทย ดังนั้นเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาจำแนกเชื้อไวรัสสาเหตุของอาการ chlorotic ringspot บนกล้วยไม้ Phalaenopsis โดยทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนดูอนุภาค ศึกษาการถ่ายทอดเชื้อด้วยวิธีปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นจากพืชเป็นโรคกับพืชทดสอบ และตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยา ด้วยวิธี ELISA

ศรีนครินทรวิโรฒ

และใช้วิธี RT-PCR เป็นวิธีตรวจสอบในกรณีเชื้อไวรัสมีปริมาณน้อย และยังใช้เป็นวิธีช่วยทวนสอบให้ชัดเจนมากขึ้น โดยออกแบบ primers ที่เฉพาะเจาะจง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
- primer
- PCR
- พืชทดสอบและพืชอาศัย

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างกล้วยไม้และตรวจสอบอาการ chlorotic ringspot บน *Phalaenopsis*

สำรวจและเก็บตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่แสดงลักษณะอาการ chlorotic ringspot บนใบ ที่มีอาการด่างเหลืองหรือใบซีด (chlorosis) เป็นวงแหวน (ring spot) และใบจุด (local lesion) ในแปลงปลูกของเกษตรกรในพื้นที่ จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดลำพูน และจังหวัดราชบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม-สิงหาคม 2560 และนำกลับมายังห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาเชื้อสาเหตุและเพื่อนำไปทดสอบลักษณะอาการบนพืชทดสอบต่อไป

2. การตรวจวินิจฉัยหาเชื้อสาเหตุ chlorotic ringspot บน Phalaenopsis

2.1 การสกัดและตรวจสอบด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

การตรวจหาเชื้อไวรัส โดยทำการสกัดอาร์เอ็นเอและนำอาร์เอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการแยกสกัดมาทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ชุด One Step RT-PCR Kit (biotechrabbit) เพิ่มปริมาณของชิ้น cDNA สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการ chlorotic โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (RNeasy Kit ของ QIAGEN) มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งใบกล้วยไม้ที่มีอาการของโรค ประมาณ 0.1 กรัม บดในโกร่งที่เย็นโดยการเติมไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด ใช้ช้อนพลาสติกที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ตักผงละเอียดที่บดไว้ใส่หลอด micro centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. เติม buffer RLT ที่เติม beta mercaptoethanol (10 ไมโครลิตร/1 มิลลิลิตร RLT) 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยและนำหลอดไปแช่ที่ 56 ºC นาน 1-3 นาทีจากนั้นดูด ส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน QIAshredder spin column (สีม่วง) นำ column ซ้อนบนหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 2 นาที น้ำใสจะผ่าน column ลงในหลอดที่รองรับขนาด 2 มิลลิลิตร ส่วนเศษชิ้นส่วนพืชติดอยู่ด้านบนcolumn

3. เติม absolute ethanol ในหลอดที่รองรับน้ำใส ปริมาตร 0.5 เท่า (225 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ micropipette ดูดขึ้นลง

4. ดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน RNeasy mini column (สีชมพู) และวางซ้อนบนหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร และนำไปหมุนเหวี่ยงตะกอนที่ 12,000 รอบ/นาทีนาน 15 วินาที

ศรีวิชัยการเกษตร

5. เททิ้งส่วนที่ผ่าน column แล้วเติมสารละลาย RW1 ลงใน column ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที 15 วินาที

6. เททิ้งส่วนที่ผ่าน column แล้วล้าง column ด้วย RPE 500 ไมโครลิตร โดยการหมุนเหวี่ยง 12,000 รอบ/นาที 15 วินาที

7. ย้าย column ซ้อนบนหลอด micro centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ (RNase-free water) 50 ไมโครลิตร ใน column เพื่อชะล้าง RNAจาก column รอประมาณ 1 นาที ก่อนไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาทีนาน 1 นาที อาร์เอ็นเอที่ได้ละลายในน้ำผ่าน column และถูกเก็บไว้ในหลอดรองรับ จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -80ºC

ตรวจสอบลักษณะอาการ chlorotic ringspot ในกล้วยไม้ Phalaenopsis โดยใช้คู่โดยใช้คู่ไพรเมอร์ตามวิธีของ Jones R.A.C. and M. Sharman, (2005) CaCV.NPF 5'TTA CAC TTC TAT AGA AGT ACT A 3' และ CaCV.NPR 5'ATG TCT AAC GTT AGG CAA CTT A 3' สังเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิค reverse transcription PCR (RT-PCR)

2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ท ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที

2.3 การทำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR บริสุทธิ์ (Purification PCR product)

โดยนำชิ้นส่วนเจลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR บน 0.7% agarose gel มาทำให้บริสุทธิ์โดยปฏิบัติตามคำแนะนำและวิธีใช้ของชุด PCR clean up และ Gel extraction (NucleoSpin® Extract II)

2.4 หาลำดับเบสและตรวจสอบความเหมือนของลำดับเบส

นำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR (จากการทดลองข้อ 2.4) ส่งไปหาลำดับเบสที่บริษัทกิบไทย เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูล (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

3. การปลูกเชื้อบนพืชอาศัย

นำใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการ chlorotic ringspot มาปลูกเชื้อ โดยบดใบพืชให้ละเอียดผสมกับ 0.5M phosphate buffer pH 7.0 และผสมผงซีไลท์ (celite) ก่อนนำน้ำคั้นทาลงบนใบพืชทดสอบ ได้แก่ ยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*) และคีโนโปเดียม (*Chenopodium quinoa*) แล้วล้างใบพืชด้วยน้ำสะอาด นำพืชทดสอบไปไว้ในโรงเรือนปลูกพืชทดสอบควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน โดยหมั่นสังเกตลักษณะอาการของพืชทดสอบหลังปลูกเชื้อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2560 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2561

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างกล้วยไม้และตรวจสอบตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบกล้วยไม้สกุล ฟาเลนอพซิส (*Phalaenopsis*) ที่แสดงลักษณะอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ที่มีอาการด่างเหลืองหรือใบชีด (chlorosis) เป็นวงแหวน (ring spot) และใบจุด (local lesion) จากแปลงปลูกกล้วยไม้ของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ราชบุรี และในโรงเรือนกล้วยไม้มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ ในระหว่างเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน 2560 (Figure 1.2.4.1) ซึ่งลักษณะอาการดังกล่าวที่ปรากฏนั้นสอดคล้องกับรายงานของ You-Xiu Zheng *et al*., (2008) ที่พบอาการ centric necrosis และพบลักษณะอาการเป็น chlorotic ringspot ขนาดใหญ่บนใบกล้วยไม้สกุลฟาเลนอพซิส (Phalaenopsis) ในประเทศไต้หวัน ส่งผลทำให้เกิดความเสียหายร้ายแรงต่อการผลิตกล้วยไม้ในไต้หวัน จากรายงานดังกล่าวของ You-Xiu Zheng *et al*., (2008) และ You-Xiu Zheng *et al*., (2011) ได้จำแนกสาเหตุลักษณะอาการ chlorotic ringspots บนใบกล้วยไม้ Phalaenopsis ในประเทศไต้หวัน พบว่าเป็นเชื้อไวรัส *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) จัดอยู่ในกลุ่ม Tospovirus

2. การตรวจวินิจฉัยหาเชื้อสาเหตุ chlorotic ringspot บน Phalaenopsis

2.1 การสกัดและตรวจสอบด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

ตามรายงานรายงานของ You-Xiu Zheng *et al*., (2008) ที่พบอาการ centric necrosis และพบลักษณะอาการเป็น chlorotic ringspot ขนาดใหญ่บนใบกล้วยไม้สกุลฟาเลนอพซิส (Phalaenopsis) ในประเทศไต้หวันและสอดคล้องกับอาการที่พบบนกล้วยไม้ Phalaenopsis ในประเทศไทย จึงได้ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการ chlorotic ringspot ด้วยชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (RNeasy Kit ของ QIAGEN) และนำอาร์เอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการแยกสกัดมาทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ชุด One Step RT-PCR Kit (biotechrabbit) เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) ตามวิธีของ You-Xiu Zheng *et al*., (2011) ด้วยเทคนิค reverse transcription PCR (RT-PCR) โดยใช้คู่โดยใช้คู่ไพรเมอร์ตามวิธีของ You-Xiu Zheng *et al*., (2008) CaCV.NPF 5’ TTA CAC TTC TAT AGA AGT ACT A 3’ และ CaCV.NPR 5’ ATG TCT AAC GTT AGG CAA CTT A 3’ ซึ่งจากผลการตรวจ พบว่า primers สามารถจับและสังเคราะห์ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 828 นิวคลีโอไทด์ (Figure 1.2.4.2)

2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

จากการศึกษาลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอใน Figure 2 นำ DNA product ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (ส่งวิเคราะห์บริษัท กิบไทย จำกัด) เพื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่ตรวจพบที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) พบว่ามีขนาด 828 นิวคลีโอไทด์ (Figure 1.2.4.3) และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัส *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) ในกล้วยไม้ Phalaenopsis ตามที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank พบว่ามี percent identity ถึง 92.62% และสอดคล้องกับรายงานของ You-Xiu Zheng *et al*., (2011) แสดงว่าลักษณะอาการ chlorotic ringspot บนใบกล้วยไม้สกุลฟาเลนอพซิส (Phalaenopsis) ที่พบในประเทศไทยมีความเหมือนกับเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) ที่มีรายงานในไต้หวัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร

3. การปลูกเชื้อบนพืชอาศัย

นำใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการมาบดใบให้ละเอียดกับ 0.5M phosphate buffer pH 7.0 ที่ผสม 2-mercaptoethanol อัตรา 0.2% ผสมผงซีไลท์ (celite) นำน้ำคั้นทาลงบนใบพืชทดสอบ ได้แก่ ยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*), มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*), ถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) และคีโนโปเดียม (*Chenopodium quinoa*) แล้วล้างใบพืชด้วยน้ำสะอาด นำพืชทดสอบไปไว้ในโรงเรือนปลูกพืชทดสอบควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือน ซึ่งพืชทดสอบหลังปลูกเชื้อแล้วเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ โดยลักษณะอาการที่พบเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานของ Zheng *et al*., (2008) ปรากฏอาการแรกเริ่มจะเป็นจุดบนใบและขยายออกซึ่งพบว่า ทั้งยาสูบใบใหญ่ (*Nicotiana benthamiana*) และคีโนโปเดียม (*Chenopodium quinoa*) เกิดอาการจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบที่ปลูกเชื้อและต่อมาเนื้อเยื่อตายเป็นจุดหลังปลูกเชื้อแล้ว 10-15 วัน ส่วนมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) และถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) ไม่แสดงอาการบนใบหลังปลูกเชื้อ (Figure 1.2.4.3)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การสำรวจและเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ที่แสดงลักษณะอาการ chlorotic ringspot บนกล้วยไม้ *Phalaenopsis* นั้น พบลักษณะอาการด่างเหลือง ใบซีด (chlorosis) เป็นวงแหวน (ring spot) ขยายใหญ่บนใบกล้วยไม้และมีอาการใบจุด (local lesion) ตรงกลางแผล เมื่อตรวจด้วย primer ตามวิธีของ You-Xiu Zheng *et al*., (2008) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) ที่มีรายงานในไต้หวัน และหลังปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบด้วยวิธี mechanical บนต้นยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*), มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*), ถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) และคีโนโปเดียม (*Chenopodium quinoa*) พบว่าในยาสูบและคีโนโปเดียม เกิดลักษณะอาการจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบที่ปลูกเชื้อและต่อมาเนื้อเยื่อเป็นจุดเหลืองและตาย ส่วนมะเขือเทศ (Lycopersicon esculentum) และถั่วพุ่ม (Vigna sinensis) ไม่แสดงอาการบนใบหลังปลูกเชื้อ ซึ่งจากการศึกษาทำให้พบว่าลักษณะอาการ chlorotic ringspot บนใบกล้วยไม้สกุลฟาเลนอพซิส (*Phalaenopsis*) ที่พบในประเทศไทยมีความเหมือนกับเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) ที่มีรายงานในไต้หวัน

ศรีนครินทร์

Figure 1.2.4.1 Symptoms chlorotic ringspot on orchids *Phalaenopsis*

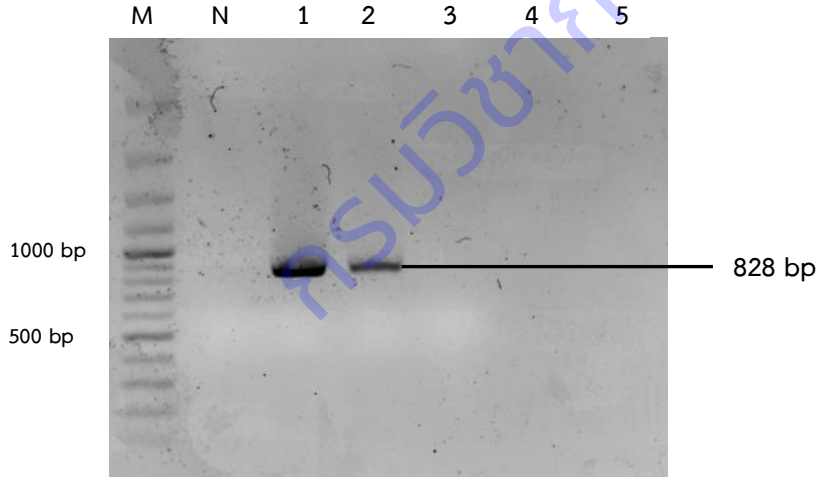


Figure 1.2.4.2 Detection of CaCV infecting plant samples by RT-PCR specific primer for gene of CaCV (828 bp) M: 100 bp Plus DNA ladder (Thermo), N: dH_2O as negative control, Lane 1: Pepper positive control, Lane 2: Orchid 1, Lane 3: Orchid 2, Lane 4: Orchid 3 and Lane 5: Orchid 4

กรมวิชาการเกษตร

1 TTAGCACTAA AAGCTTTGTC CATGTACTTG ACTTGCTCAT CATATTTCTT
AATCGTGATT TTCGAAACAG GTACATGAAC TGAACGAGTA GTATAAAGAA

51 AAGTGAGATA GAACTAGCAG TACCAGGATT GCTTTCACTG AGCAATTTGA
TTCACTCTAT CTTGATCGTC ATGGTCCTAA CGAAAGTGAC TCGTTAAACT

101 CAGCTTGTTT GAACAATGTG TTCAGATCCT CCTTAAACTC TATTTGAGAA
GTCGAACAAA CTTGTTACAC AAGTCTAGGA GGAATTTGAG ATAAACTCTT

151 GCAGAAAGAA CTTTAGCCAC TTTGCAAACC TGTTCATAGG TAGAGAAATT
CGTCTTTCTT GAAATCGGTG AAACGTTTGG ACAAGTATCC ATCTCTTTAA

201 CTTAATGCCC AGTTTCTCCT TTTTAACATT TTGATAATAA GCTAATGGGA
GAATTACGGG TCAAAGAGGA AAAATTGTAA AACTATTATT CGATTACCCT

251 AAATAATTGG TGCAAGGCCT TTAATGCTGG ATAAGAGTGG TAAGGGACCA
TTTATTAACC ACGTTCCGGA AATTACGACC TATTCTCACC ATTCCCTGGT

301 CCAATACATA GCATCATCCT AAGAGCACAT GAATCAAACT GAGCAGGTAT
GGTTATGTAT CGTAGTAGGA TTCTCGTGTA CTTAGTTTGA CTCGTCCATA

351 GTTCAATCCA TAAGCTGCAA CTAATGGCAA TTCCATCACC TTTGCATACA
CAAGTTAGGT ATTCGACGTT GATTACCGTT AAGGTAGTGG AAACGTATGT

401 TCTCTTGTTT AGCAACTTCA TTCTTGCTCT TTTCTACCAT GTTGATCATC
AGAGAACAAA TCGTTGAAGT AAGAACGAGA AAAGATGGTA CAACTAGTAG

451 TTAACTCTTA TCAAAGCTTC TGTTCTCTTA AAAGTCCAGT CCTCTGGACC
AATTGAGAAT AGTTTCGAAG ACAAGAGAAT TTTCAGGTCA GGAGACCTGG

501 AACATTAGCA TCTGTAGAAA CAATAGTTTT CTCACAGAAC TTATACTTTC
TTGTAATCGT AGACATCTTT GTTATCAAAA GAGTGTCTTG AATATGAAAG

551 CACTTTTGCA AGCGGCAAAA ATCTGCTTTC TACACTTCAG AATATTAAGA
GTGAAAACGT TCGCCGTTTT TAGACGAAAG ATGTGAAGTC TTATAATTCT

601 CAGTTTGTGA AAGTCATTTC AACGCTTTTG TTGTTCTCAT AGAATGTCTT
GTCAAACACT TTCAGTAAAG TTGCGAAAAC AACAAGAGTA TCTTACAGAA

651 GAAACTGAAT CCAGGAGTTG AATCTTCGGT TTCAATTTCA ACATCTGCAG
CTTTGACTTA GGTCCTCAAC TTAGAAGCCA AAGTTAAAGT TGTAGACGTC

701 TTCCACCAGC CAAGAGTCTC TATAATTTTC TTCTCGGTAA GTTGCTAGTC
AAGGTGGTCG GTTCTCAGAG ATATTAAAAG AAGAGCCATT CAACGATCAG

751 TATAAGAAT
ATATTCTTA

Figure 1.2.4.**3** The order of chlorotic ringspot nucleotides on Phalaenopsis orchid leaves which contain the percent of identity as same as *Capsicum chlorosis virus*

กรมวิทยาศาสตร์

การทดลองที่ 1.2.6 การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางสัณฐานวิทยาในไม้ประดับส่งออก

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง นางสาวธิติยา สารพัฒน์ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน นายไตรเดช ข่ายทอง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ที่ตรวจพบในไม้ประดับส่งออกโดยเฉพาะพรรณไม้น้ำ และกวักมรกต ซึ่งคณะวิจัยได้เริ่มดำเนินการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชตั้งแต่ กันยายน 2560 ถึง ตุลาคม 2562 ซึ่ง รวมทั้งสิ้นจำนวน 2,583 ตัวอย่าง พบไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จำนวน 26 กลุ่มประชากร คิดเป็นร้อยละ 1.0 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด และนำไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* เพศเมีย 28 ตัวอย่าง มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับการวินิจฉัยของ EPPO PM 7/88 (1) จัดจำแนกชนิดได้เป็น *Radopholus similis*

Abstract

The genus *Radopholus* found in exported ornamental plants, especially Aquatic plants and Zanzibar gem, the research team began to diagnose plant-parasitic nematodes from September 2017 to October 2019, a total of 2,583 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). Species is *Radopholus similis*

คำนำ

ไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* 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 ซึ่งเป็นพืชในตระกูลส้มอีกชนิดหนึ่ง ผลผลิตลดลง 50 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ เหตุการณ์ในครั้งนี้ ได้มีการใช้โปรแกรมการป้องกันกำจัดที่เรียกว่า ‘Push and Treat’ และ ‘Buffer’ในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคซึ่งใช้เวลาต่อเนื่องยาวนานหลายปี มีผู้คำนวณค่าใช้จ่ายของโปรแกรมดังกล่าวนี้พบว่ามีค่าใช้จ่ายสูงประมาณ 20,000 เหรียญสหรัฐต่อเฮกตาร์ แม้ค่าใช้จ่ายสูงแต่ก็ทำให้ไส้เดือนฝอยชนิดนี้ลดลงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามในปี 1983 โปรแกรมนี้ต้องยุติลง เพราะมีการปนเปื้อนของสารป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยในแหล่งน้ำดื่ม จากนั้นได้มีการใช้ methyl bromide และการตัดรากของพืชออก แต่มียังค่าใช้จ่ายสูง ต่อมาได้มีการหลีกเลี่ยงการแพร่ระบาดของโรคต้นโทรมของส้มซึ่งเกิดจากไส้เดือน

กรมวิชาการเกษตร

ฝอย *R. similis* ของบริเวณแหล่งปลูกส้มบนสันเขาของรัฐฟลอริดาซึ่งได้คำนึงถึงการจัดการในระดับสูงเป็นสำคัญ เช่น การผลิตต้นกล้าต้องได้รับใบรับรองว่าปลอดศัตรูพืช โรงเรือนเพาะกล้าต้องได้รับการเก็บตัวอย่าง และการตรวจสอบอย่างสม่ำเสมอ เพื่อที่จะได้มีสิทธิ์ได้รับใบรับรอง การเคลื่อนย้ายดินเข้าไปในขอบเขตที่กำหนด และเกี่ยวข้องกับการปลูกส้มต้องมีใบรับรองว่าดินนั้นมาจากแหล่งปลอดศัตรูพืชชนิดนี้ ซึ่งการวิเคราะห์ต้นทุนต่อผลตอบแทนของโปรแกรมการออกใบรับรองที่สามารถเป็นไปได้ในการลดความสูญเสียที่เกิดจากไส้เดือนฝอย *R. similis* (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 หมู่เกาะในทะเลแคริเบียน ซึ่งทำให้เกิดโรคที่เรียกว่า "blackhead banana disease" หรือ "banana toppling disease" ทำให้เกิดการโค่นล้มของกล้วยในขณะออกเครือเพราะหัวกล้วยและระบบรากได้ถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลาย ทำให้ไม่สามารถรับน้ำหนักของเครือกล้วยได้จึงโค่นล้มก่อนที่จะเก็บผลผลิตและด้วยเหตุของการแพร่กระจายเชื้อไปกับหัวกล้วยและหน่อกล้วยทำให้แทบทุกภูมิภาคมีไส้เดือนฝอยชนิดนี้ อีกทั้งไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* มีพืชอาศัยมากกว่า 250 ชนิด ยกตัวอย่างเช่น กล้วย ส้ม ขิง ปาล์ม กาแฟ พริกไทย อ้อย ชา ไม้ดอกไม้ประดับ เช่น หน้าวัว ฟิโลเดนดรอน เป็นต้นในปี 1953 มีการระบาดครั้งใหญ่ของโรคเหลืองพริกไทย (yellow disease of *Piper nigrum*) ซึ่งเกิดจาก *R. similis* ในการปลูกพริกไทยของประเทศอินโดนีเซีย โดยเกิดความเสียหายเกือบ 90 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตทั้งประเทศซึ่งความเสียหายครั้งนี้ได้สูญเสียต้นพริกไทยกว่า 22 ล้านต้น และมีการรายงานว่าแพร่กระจายไปในแหล่งปลูกพริกไทยอื่นได้แก่ อินเดีย พบว่า *R. similis* เป็นสาเหตุของโรค slow wilt ที่ทำให้ผลผลิตของพริกไทยลดลง (Ramana *et.al,* 1987; Roland,N.P and Maurice, M., 2006; Haegman *et. al.,* 2010)

แม้ประเทศไทยไม่มีรายงานความเสียหายของพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* แต่พบว่าได้เกิดปัญหาการส่งออกพืชไปยังสหภาพยุโรป ถูกปฏิเสธการนำเข้าเนื่องจากมีการตรวจพบ *R. similis* ในพรรณไม้น้ำ *Anubias* spp. ในระหว่างปี พ.ศ 2550 ถึง 2551 ไม้น้ำจากประเทศไทยถูกเผาทำลายไป 11 ครั้ง ทำให้มีผลกระทบต่อผู้ส่งออกพรรณไม้น้ำของไทยเป็นอย่างมาก (นุชนารถ, 2551) ในการขอใบรับรองสุขอนามัยพืชเพื่อส่งออก ของผู้ประสงค์ส่งออกพืชหลายชนิด อาทิ พืชตระกูล Citrus, Araceae, Marantaceae, Musaceae เป็นต้น ต้องได้รับการรับรองว่าปราศจากไส้เดือนฝอย *R. similis* และ *R. citrophilus* และการส่งออกพืชที่เป็น ต้น พันธุ์ กิ่งพันธุ์ และพืชเพื่อปลูก (plant intend for planting) เช่น พรรณไม้น้ำส่งออก ไม้ประดับ ไปยังหลายประเทศ ต้องได้รับการรับรองว่าปราศจากไส้เดือนฝอยดังกล่าวด้วยเช่นกัน ในการขอใบรับรองสุขอนามัยพืชนั้นต้องมีใบรายงานผลการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชดังกล่าว ซึ่งออกให้โดยกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ดังนั้นวัตถุประสงค์และเป้าหมายของการวิจัยนี้ เพื่อจัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางสัณฐานวิทยาในไม้ประดับส่งออก ให้ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน พร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ซึ่งผลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้จะทำให้เกิดข้อมูลที่สำคัญสำหรับผู้เกี่ยวข้องกับการส่งออกพืช และผู้ตรวจรับรองการปราศจากศัตรูพืชกักกันโดยเฉพาะไส้เดือนฝอยศัตรูพืช และสำคัญที่สุดคือเป็นฐานข้อมูลอ้างอิงของศัตรูพืชของประเทศไทยและเป็นมาตรฐานที่สามารถสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ประเทศผู้นำเข้าได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1.ไม้ประดับส่งออก (พรรณไม้น้ำส่งออก และ กวักมรกต)

2.อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย

วิธีการ

การเก็บตัวอย่างไม้ประดับส่งออกจะได้รับการสุ่มและเก็บตัวอย่างจากฟาร์มโดยกลุ่มงานศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช แล้วจึงส่งตัวอย่างพืชมาตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืช ที่กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยเฉพาะพรรณไม้น้ำซึ่งเป็นไม้ประดับส่งออกเพื่อเลี้ยงในตู้ปลา และไม้ประดับอื่น เช่น กวักมรกต มีขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยดังนี้

1. <u>การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชจากรากพืช</u>โดยการใช้เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงอัลตร้าโซนิค (Ultrasonic Sonicator) ซึ่งประยุกต์จากการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชด้วยการใช้คลื่นเสียง โดยนำตัวอย่างพืชที่ได้รับล้างให้สะอาดบรรจุในภาชนะแก้วแล้วเติมน้ำให้ท่วมระบบราก จากนั้นนำไปวางในอ่างของเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงอัลตร้าโซนิค ปรับระดับของน้ำในอ่าง และภาชนะแก้วที่บรรจุพรรณไม้น้ำให้อยู่ในระดับเดียวกัน โดยคำนึงถึงเหมาะสมกับของการเกิดคลื่นเสียงฯ เปิดคลื่นเสียงฯเป็นเวลา 20 นาที (นุชนารถ, 2555) เมื่อครบกำหนดเวลาดังกล่าว นำน้ำในภาชนะแก้วที่บรรจุพรรณไม้น้ำแต่ละตัวอย่าง กรองผ่านตะแกรงโลหะ Cobb sieving ขนาด 20 mesh 150 mesh และ ขนาด 400 mesh ตามลำดับ จากนั้นเก็บน้ำที่อยู่บนตะแกรงโลหะ ขนาด 400 mesh ใส่ในภาชนะแก้ว นำน้ำในภาชนะแก้ว ที่ได้ ของแต่ละตัวอย่าง ตั้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมงเป็นอย่างน้อย เพื่อให้ไส้เดือนฝอยตกลงด้านล่างของภาชนะ จากนั้นดูดน้ำส่วนบนทิ้งอย่างแผ่วเบา เพื่อไม่ให้เกิดการฟุ้งกระจายของตะกอน คงเหลือน้ำในภาชนะแก้วประมาณ 10 -15 มิลลิลิตร หรือปริมาณที่เหมาะกับถ้วยนับตัวอย่าง ในกรณีน้ำ ที่ได้จาก มีความขุ่น ซึ่งจะทำให้ไม่สามารถมองเห็นไส้เดือนฝอยได้อย่างชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฯ ต้องนำน้ำของตัวอย่างดังกล่าวกรองผ่านกรวยโดยวิธี Baermann funnel method หรือ เพื่อความสะดวกใช้ Oostenbrink dish แทนกรวยก็ได้ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บน้ำที่ผ่านการกรองใส่ในภาชนะแก้ว

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

กรมวิชาการเกษตร

3.การทำสไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอยศัตรู

เมื่อพบว่าเป็นไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จึงนำไปทำสไลด์ถาวร ตามวิธีการของ De Grisse,1969 โดยย่อดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เขี่ยตัวไส้เดือนฝอยลงใน straining block เติมน้ำ 400 µl 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 ลงบนสไลด์แก้วเขี่ยไส้เดือนฝอยที่เตรียมไว้จัดเรียงเป็นแถวโดยใช้ไม้เขี่ยกดให้ทุกตัวติดกับผิวสไลด์อย่าให้ตัวลอยจัดเรียงให้สวยงามง่ายแก่การดูรายละเอียดต่างๆ ภายใต้กล้อง ก่อนปิด cover slip ยาแนวขอบด้วยยาทาเล็บให้สนิท แล้วเก็บในกล่องสไลด์

4.การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus*

โดยเปรียบเทียบกับเอกสารการจัดจำแนกชนิดของ EPPO PM 7/88 (1): *Radopholus similis* และเอกสารอื่นที่เกี่ยวข้อง โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง differential interference contrast (DIC) พร้อมคอมพิวเตอร์และอุปกรณ์ถ่ายภาพ และโปรแกรมการวัดขนาด โดยมีลักษณะสำคัญที่ต้องบันทึก อาทิ ความยาวของลำตัว ลักษณะริมฝีปาก ความยาวของ stylet ลักษณะหาง เส้นผ่านศูนย์กลางลำตัว ความยาวของ oesophagus ค่า De Man's ratios เช่น ค่า a (อัตราส่วนของความยาวลำตัวต่อส่วนที่กว้างที่สุดของลำตัว) ค่า b (อัตราส่วนของความยาวลำตัวต่อความยาวของ oesophagus) ค่า c (อัตราส่วนของความยาวลำตัวต่อความยาวของหาง) เป็นต้น

ผลการทดลองและวิจารณ์

1.การเก็บตัวอย่างไม้ประดับส่งออกโดยเฉพาะพรรณไม้น้ำซึ่งเป็นไม้ประดับส่งออกเพื่อเลี้ยงในตู้ปลา และไม้ประดับอื่น เช่น กวักมรกต ผลการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในพรรณไม้น้ำและกวักมรกต คณะวิจัยได้เริ่มดำเนินการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชตั้งแต่ กันยายน 2560 ถึง ตุลาคม 2562 ซึ่ง โดยนำเฉพาะข้อมูลผลการตรวจของสถานประกอบการ 4 แห่ง ซึ่งส่งตัวอย่างเข้ามาตรวจอย่างสม่ำเสมอในช่วงเวลาดังกล่าว รวมทั้งสิ้นจำนวน 2,583 ตัวอย่าง โดยจำนวนต้นของตัวอย่างแต่ละครั้งขึ้นกับจำนวนต้นพืชที่ต้องการส่งออก ซึ่งพบไส้เดือนฝอย *Radopholus* จำนวน 26 กลุ่มประชากร คิดเป็นร้อยละ1.0 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด ส่วนจำนวนตัวของไส้เดือนฝอย *Radopholus* ที่พบส่วนใหญ่ 1 ตัวต่อตัวอย่าง แต่โดยเฉลี่ยพบ จำนวน 6 ตัวต่อกลุ่มประชากร

2. การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชเบื้องต้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ (Inverted Microscope) ก่อนที่จำนำไปทำสไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอย *Radopholus* ต้องจัดจำแนกเป็นไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ตาม คู่มือการจำแนกสกุลของไส้เดือนฝอย Plant-parasitic nematodes ; A pictorial

กรมวิชาการเกษตร

key to genera (Mai *et.al.,* 1996) ดังนี้ พบว่าเป็น ไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* โดยมีลักษณะสัณฐานวิทยาดังนี้ เป็นไส้เดือนฝอยมี stylet มองเห็นได้ชัดเจน แข็งแรง และมี stylet basal knobs บริเวณส่วนหัวค่อนข้างกลมและมีโครงสร้างแข็งแรง ทำให้มองเห็นอย่างชัดเจนภายใต้กล้อง ส่วนหัวไม่มี setae ตัวเต็มวัยเพศเมียมีรูปร่างเรียวยาว (vermiform) ส่วนหลอดอาหาร (esophagus) แบ่งออกเป็น 3 ส่วน มีการซ้อนทับลำไส้ไปด้านท้อง ตำแหน่งของ vulva อยู่ใกล้กึ่งกลางลำตัว ประมาณ 50-69 เปอร์เซ็นต์ มี ovaries 2 ด้านของ vulva มีเพศเมียและเพศผู้ที่มีลกษณะแตกต่างกัน (sexual dimorphism)

3.การทำสไลด์ถาวร และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง differential interference contrast (DIC) พร้อมคอมพิวเตอร์และอุปกรณ์ถ่ายภาพ และโปรแกรมการวัดขนาด โดยเปรียบเทียบกับเอกสารการจัดจำแนกชนิดของ EPPO PM 7/88 (1): *Radopholus similis* เป็นสำคัญ และเอกสารอื่นที่เกี่ยวข้อง เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 28 ตัว กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *R. similis* ตาม คำนิยามชนิดและรูปภาพของ *R. similis* ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบเพศผู้ของไส้เดือนฝอยชนิดนี้ จึงเปรียบเทียบเฉพาะลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเพศเมีย และหน่วยวัดทั้งหมดของการศึกษาในครั้งนี้เป็น ไมครอน (µm) ตามเอกสารอ้างอิงของ EPPO ผลการวิจัยนี้

จัดจำแนกชนิดเป็น *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949

ซึ่งมีชื่อพ้องดังนี้:

Tylenchus similis Cobb,

Tylenchus granulosus Cobb, 1893

Tylenchus acutocaudatus Zimmerman, 1898

Tylenchus biformis Cobb, 1909

Anguillulina similis (Cobb, 1893) Goodey, 1932

Rotylenchus similis (Cobb, 1893) Filipjev, 1936

Radopholus citrophilus Huettel, Dickson & Kaplan, 1984

และยังมีชื่อพ้องอื่น (Siddiqi, 2000)

ลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* เมื่อเปรียบเทียบกับคู่มือของ A.Y. Ryss (Ryss,2003) และ คู่มือของ Nickle (Nickle,1991) เป็นไส้เดือนฝอยที่มีขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร เพศเมียส่วนหัวค่อนข้างกลม และมีโครงสร้างแข็งแรง และยกสูงแยกจากลำตัวเพียงเล็กน้อยลักษณะคล้ายโดม ส่วนบริเวณ lib region มี 6 annules ส่วนของ Stylet ชัดเจน และพัฒนาดี และมี Stylet knobs ค่อนข้างกลม และค่อนข้างเท่ากัน ส่วนของ oesophagus ค่อนข้างยาว และลำไส้ซ้อนทับลำตัวด้านท้อง มีเส้นข้างลำตัว 4 เส้นมีความข้างกว้างค่อนข้างเท่ากัน ตำแหน่ง Vulva อยู่กึ่งกลางของลำตัว มีมดลูกทั้ง 2 ข้าง ส่วนของรังไข่ ลักษณะเป็นแท่งยาว และความยาวของมดลูกทั้งส่วนหน้าและส่วนหลังค่อนข่างใกล้เคียงกัน มี spermatheca ลักษณะกลม และมี

กรมวิชาการเกษตร

sperm cells ใน spermatheca เป็นแท่งเล็ก(rod-like) ผิวของลำตัวค่อนข้างเรียบ ส่วนของหางมีลักษณะ elongate-conoid ลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* แสดงในภาพที่ 1.2.6.1-1.2.6.4

การวัดลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* เปรียบเทียบกับเอกสารการจัดจำแนกชนิดของ EPPO PM 7/88 (1) พบว่าความยาวของลำตัว (Body length) อยู่ในช่วงของตัวอย่างของเดียวกันกับของ EPPO 510–820 (655) และการศึกษานี้ 534-663 (592±33.3) ส่วนความยาว Stylet อยู่ในช่วงใกล้เคียงกันมากของ EPPO 16–23 (18.5) และการศึกษานี้ 16-18 (17±0.42) ส่วนของมดลูกส่วนหน้า (Female gonad anterior branch) และมดลูกส่วนหลัง (Female gonad posterior branch) ความยาวค่อนข้างใกล้เคียงกัน แม้ว่าส่วนหน้าจะยาวกว่าเล็กน้อย ความยาวของมดลูกส่วนหน้าของ EPPO 112–297 (174) และมดลูกส่วนหน้าของไส้เดือนฝอยในการศึกษานี้ความยาวอยู่ที่ 108-138 (126±7.18) ความยาวของมดลูกส่วนหลังของ EPPO 103–269 (165) และการศึกษานี้ 103-132 (117±7.44) เส้นผ่านของร่างกายบริเวณทวาร (Body diameter at the anus) 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 50–67 (57) และ 50-61 (57±1.91) เปอร์เซ็นต์ 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) จึงจัดจำแนกชนิดได้เป็น *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949 ซึ่งค่าการวัดลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* เปรียบเทียบกับเอกสารการจัดจำแนกชนิดของ EPPO PM 7/88 (1) ดังตารางที่ 1.2.6.1-1.2.6.3

ไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* มีความหลากหลายของชนิดมากปัจจุบันพบว่ามี 30 ชนิด ซึ่งประเทศออสเตรเลียมีความหลากหลายมากถึง 25 ชนิด (Luc, 1987) จากการศึกษาของ Quénéhervé (2009) และTan *et. al.,* (2010) คาดว่าความหลากหลายของไส้เดือนฝอย *Radopholus* ในออสเตรเลียมีสาเหตุเนื่องจากมีการแลกเปลี่ยนและเคลื่อนย้ายพืชที่ติดเชื้อมาจากภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเป็นที่น่าสังเกตว่าในช่วงทศวรรษ ที่ผ่านมาได้มีรายงานในการพบชนิดใหม่ของไส้เดือนฝอยสกุลนี้หลายชนิด โดยพบว่า มีการพบชนิดใหม่ในเวียดนาม 3 ชนิด นิวซีแลนด์ 1 ชนิด ออสเตรเลีย 2 ชนิด และอินโดนีเซีย 1 ชนิด (Volcy, 2010) ในส่วนประเทศไทยปี พ.ศ.2508 (1965) พบไส้เดือนฝอย *R. similis* ครั้งแรกในกล้วยและฝรั่ง ที่ เกษตรกลางบางเขน (Timm,1965 และ สืบศักดิ์, 2538) การอนุกรมวิธานของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ประเทศไทย พบเพียงชนิดเดียว *R. similis* (Pliansinchai and Boonduang, 1986 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 ได้รายงานว่าพบไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ชนิดใหม่ในทุเรียน คือ *R. duriophilus* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกับ *R. similis*

กรมวิชาการเกษตร

เป็นอย่างมากแต่แตกต่างในรายละเอียดทางสัณฐานวิทยา เช่นตำแหน่งของ excretory pore ลักษณะของ phasmid ลักษณะของ bursa เป็นต้น และมีความแตกต่างอย่างชัดเจนทางชีวโมเลกุล และเป็นที่น่าสังเกตว่าเวียดนามเป็นประเทศเพื่อนบ้านของไทย แต่ไม่เคยมีรายงานว่าพบ *R. similis* อย่างไรก็ตามแม้จะเป็นการยืนยันว่าในไม้ประดับส่งออก (พรรณไม้น้ำส่งออก และ กวักมรกต) มีเพียง *R. similis* ชนิดเดียว ไม่พบชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ต่างถิ่น (alien species)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การเก็บตัวอย่างไม้ประดับส่งออกโดยเฉพาะพรรณไม้น้ำซึ่งเป็นไม้ประดับส่งออกเพื่อเลี้ยงในตู้ปลา และไม้ประดับอื่น เช่น กวักมรกต ผลการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออกนี้ คณะวิจัยได้เริ่มดำเนินการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชตั้งแต่ กันยายน 2560 ถึง ตุลาคม 2562 ซึ่ง รวมทั้งสิ้นจำนวน 2,583 ตัวอย่าง ตัวอย่าง โดยจำนวนต้นของตัวอย่างแต่ละครั้งขึ้นกับจำนวนต้นพืชที่ต้องการส่งออก ซึ่งพบไส้เดือนฝอย *Radopholus* จำนวน 26 กลุ่มประชากร คิดเป็นร้อยละ1.0 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด และนำมาการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* เพศเมีย 28 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับการวินิจฉัยของ EPPO PM 7/88 (1) พบว่าเป็น ไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* และไม่พบชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ต่างถิ่น (alien species) ซึ่งจะนำมาซึ่งปัญหาอื่นตามมา

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.2.6.1 เปรียบเทียบ Morphometric characteristics ของตัวอย่างไส้เดือนฝอยกับ *Radopholus similis* ตามเอกสารอ้างอิงของ EPPO (µm) ของตัวอย่างที่ S2, S3, S4, S5, S6, S7, S17, S18, S19 และ S20

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

ศูนย์วิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.2.6.2 เปรียบเทียบ Morphometric characteristics ของตัวอย่างไส้เดือนฝอยกับ *Radopholus similis* ตามเอกสารอ้างอิงของ EPPO (µm) ของตัวอย่างที่ S21, S22, S23, S24, S25, S27, S28, S29, S30 และ S31

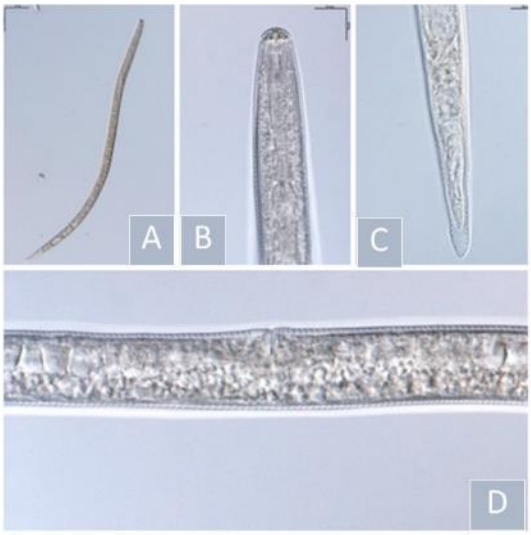
Character Female	EPPO	This study	S21	S22	S23	S24	S25	S27	S28	S29	S30	S31
Body length	510–820 (655)	534-663 (592±33.3)	580	596	542	655	581	613	561	605	605	621
Stylet length	16–23 (18.5)	16-18 (17±0.42)	17	17	17	17	17	16	17	17	16	17
Female gonad anterior branch	112–297 (174)	108-138 (126±7.18)	126	121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

ศูนย์วิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.2.6.3 เปรียบเทียบ Morphometric characteristics ของตัวอย่างไส้เดือนฝอยกับ *Radopholus similis* ตามเอกสารอ้างอิงของ EPPO (µm) ของตัวอย่างที่ S32, S42, S43, S44, S45, S46, S47 และ S48

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

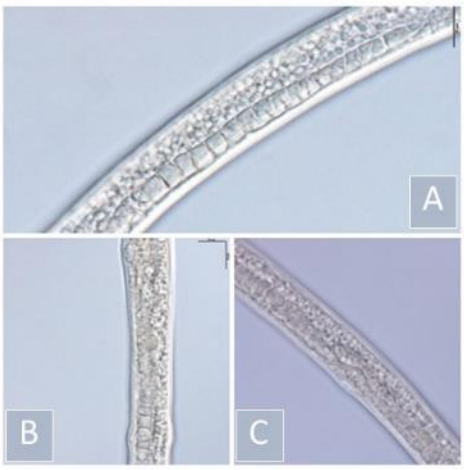
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.2.6.1 แสดงภาพไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* โดย A- ไส้เดือนฝอยทั้งตัว B ไส้เดือนฝอยส่วนบนของร่างการ C- ส่วนหาง D- อวัยวะเพศเมียและระบบสืบพันธุ์ทั้งสองด้าน

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.2.6.2 แสดงภาพร่างกายส่วนบนของไส้เดือนฝอย *Radopholus similis*



ภาพที่ 1.2.6.3 แสดงภาพไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* โดย A-รังไข่ส่วนหน้า B- อวัยวะเพศระบบสืบพันธุ์ส่วนหลัง C- อวัยวะเพศเมียและระบบสืบพันธุ์ทั้งสองด้าน

ภาพที่ 1.2.6.4 แสดงภาพส่วนหางของไส้เดือนฝอย *Radopholus similis*

กรมวิชาการเกษตร

ชื่อการทดลองที่ 1.2.7 การจำแนกไส้เดือนฝอยรากแผล (*Pratylenchus* spp.) ในแหล่งปลูกหอมแดงด้วยวิธีอณูชีววิทยา

Molecular identification of lesion nematode (*Pratylenchus* spp.) in shallot fields

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง ไตรเดช ข่ายทอง กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ.

ผู้ร่วมงาน ธิติยา สารพัฒน์ กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ.

วีรกรณ์ แสงไสย กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ.

รุ่งนภา ทองเครื่ง กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ.

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกหอม ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนมีนาคม 2561 ในจังหวัดศรีสะเกษ ยโสธร อุบลราชธานี บุรีรัมย์ นครราชสีมา แม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน อุตรดิตถ์ ตาก ราชบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และนครปฐม รวม 128 ตัวอย่าง แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและตรวจหาไส้เดือนฝอยรากแผล พบไส้เดือนฝอยรากแผลในตัวอย่างดิน 12 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากแผลโดยการปลูกข้าวโพดลงในตัวอย่างดินที่ตรวจพบ และเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากแผลโดยเริ่มจากตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัว ในรากข้าวโพดในสภาวะปลอดเชื้อ เพื่อให้ได้ประชากรที่บริสุทธิ์ ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลโดยวิธีทางอณูชีววิทยา โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA gene กับฐานข้อมูล พบว่าคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ชอง *Pratylenchus dellatrei* 11 ตัวอย่างและ *P. brachyurus* 1 ตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา การเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกหอมครั้งนี้ พบไส้เดือนฝอยรากแผลในพื้นที่ จ. กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และราชบุรี ยังไม่มีข้อมูลการเข้าทำลาย และความเสียหายที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากแผลทั้ง 2 ชนิดต่อหอม ซึ่งควรศึกษาในลำดับต่อไป

Soil samples were collected from onion fields in Si Sa Ket, Yasothon, Ubon Ratchathani, Buri Ram, Nakhon Ratchasima, Mae Hong Son, Chiang Rai, Chiang Mai, Lamphun, Uttaradit, Tak, Ratchaburi, Kanchanaburi, Suphan Buri and Nakhon Pathom provinces during October 2016 to March 2018. Nematodes were extracted from 128 soil sample to determine the presence of lesion nematodes. *Pratylenchus* spp. was detected in 12 samples and subsequently corn was grown in each soil sample to increase nematode number. Monoxenic culture of single *Pratylenchus* female was carried out using corn root tissue culture. *Pratylenchus* species were identified by comparing the D2D3 expansion region of 28S large subunit ribosomal RNA gene with database in the GenBank in combination with morphology study. *Pratylenchus dellatrei* were identified from 11 samples and *P. brachyurus* was identified from 1 sample. In this study lesion nematodes were found in

กรมวิชาการเกษตร

onion fields in Kanchanaburi, Suphan Buri and Ratchaburi, provinces. However, the pathogenicity and damage potential to onion of both species is unknown and should be determined.

คำนำ

ไส้เดือนฝอยรากแผล (Lesion nematodes: *Pratylenchus* spp.) เป็นไส้เดือนฝอยอีกสกุลหนึ่งที่มีความสำคัญ และทำความเสียหายแก่พืชหลายชนิด นอกจากจะทำความเสียหายโดยตรงต่อผลผลิตทางการเกษตรแล้ว ไส้เดือนฝอยรากแผลบางชนิดยังเป็นศัตรูพืชกักกัน และมีความสำคัญด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ไส้เดือนฝอยรากแผลทำลายพืชโดยการเข้าทำลายรากโดยเฉพาะเนื้อเยื่อส่วน cortex parenchyma การเคลื่อนที่และดูดกินอาหารภายในราก ทำให้รากถูกทำลายเกิดแผลและเน่าตาย การเข้าทำลายรากนอกจากทำให้เกิดแผลแล้วยังส่งเสริมการเข้าทำลายรากของเชื้อราโรคพืชบางชนิดอีกด้วย ไส้เดือนฝอยรากแผลเป็นศัตรูของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น กล้วย ธัญพืชต่างๆ กาแฟ ข้าวโพด พืชตระกูลถั่ว มันฝรั่ง พืชผัก และไม้ผลต่างๆ ปัจจุบันมีการจำแนกไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* มากกว่า 60 ชนิด (Castillo and Vovlas, 2007) ในประเทศไทยมีรายงานการพบไส้เดือนฝอยรากแผล *P. alleni, P. brachyurus, P. breviobesus, P. coffeae, P. delattrei*, *P. neglectus, P. nongkiensis*, *P. penetrans, P. scribneri, P. sudanensis*, *P. tenuis*, *P. thilandicus, P. thornei, P. vulnus, P. zeae* และ *Pratylenchus* sp. ที่ยังไม่สามารถระบุชนิดชนิด (สืบศักดิ์, 2538) การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากแผลได้มีการปรับปรุง ซึ่งปัจจุบันไม่มี *P. breviobesus, P. nongkiensis* และ *P. thailandicus* อยู่ในรายชื่อไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* แล้ว

หอมแดง (*Allium ascalonicum* L.) เป็นพืชที่มีการบริโภคสูงทั้งในประเทศและต่างประเทศ ในปี 2560 มีเนื้อที่เพาะปลูกประมาณ 57,800 ไร่ ผลผลิต128,879 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2560) เป็นพืชส่งออกอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญ ในปี พ.ศ. 2554 ประเทศไทยส่งออกหอมแดงไปต่างประเทศ ถึง 54,233.47 ตัน มูลค่า 585.01 ล้านบาท โดยมีตลาดส่งออกที่สำคัญคืออินโดนีเซียและมาเลเซีย อุปสรรคของการส่งออกหอมแดงประการหนึ่งคือกฎระเบียบการนำเข้าของประเทศคู่ค้า เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของศัตรูพืชที่อาจติดไปกับหอมแดง ข้อมูลการสำรวจศัตรูพืชมีความสำคัญต่อการเจรจาการส่งออกหอมแดง ทำให้ประเทศคู่ค้ามีความมั่นใจว่าสินค้าจะไม่มีการปนเปื้อนจากศัตรูพืชกักกัน อินโดนีเซียได้ประกาศการยอมรับเขตพื้นที่ปลอดศัตรูพืชสำหรับหอมแดงที่ผลิตในประเทศไทย (Pest Free Area; PFA) โดยประกาศให้หอมแดงจาก จ. ศรีสะเกษ เป็นแหล่งปลอดศัตรูพืชกักกันของอินโดนีเซีย 2 ชนิด คือ ไส้เดือนฝอย *Ditylenchus destructor* และเชื้อรา *Urocystis cepulae* ตั้งแต่วันที่ 16 กันยายน 2558 (กรมวิชาการเกษตร, 2558) ซึ่งเป็นผลจากข้อมูลการสำรวจพื้นที่ปลูกหอมแดงของประเทศไทย อย่างไรก็ตามประเทศอินโดนีเซียได้แจ้งเตือนการตรวจพบไส้เดือนฝอย *P. penetrans* ในหอมแดงจากประเทศไทย ทำให้ต้องมีการสุ่มตรวจตัวอย่างหอมแดงก่อนส่งออกไปยังอินโดนีเซีย ซึ่งเป็นการเพิ่มขั้นตอนและต้นทุนต่อการส่งออกหอมแดงของไทย จากการสุ่มตรวจหอมแดงส่งออกที่ผ่านมา ยังไม่เคยมีรายงานการตรวจพบไส้เดือนฝอยรากแผล *P. penetrans*

ไส้เดือนฝอยรากแผลชนิดที่มีรายงานการพบในพื้นที่ปลูกหอมในประเทศต่างๆ ได้แก่ *P. brachyurus P. coffeae P. neglectus P. penetrans P. scribneri P. thornei* และ *P. zeae* (Hodda *et al*., 2012) รายงาน

เกี่ยวกับความเสียหายของหอมหรือหอมแดงที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากแผลมีค่อนข้างน้อย *P. penetrans* เป็นไส้เดือนฝอยรากแผลชนิดที่สำคัญมีพืชอาศัยกว้าง มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับไส้เดือนฝอยรากแผลชนิดนี้ค่อนข้างมาก *P. penetrans* สามารถเข้าทำลายและทำความเสียหายแก่หอม (*Allium cepa*) โดยทำให้หอมมีการเจริญเติบโต ขนาดและน้ำหนักหัวลดลง (Pang *et al*., 2009) ในประเทศไทยมีรายงานการพบ *P. penetrans* ในตัวอย่างดินจากแปลงองุ่นพันธ์ไวท์มะละกา จ. สมุทรสาคร (สืบศักดิ์, 2538) ถึงแม้ว่าหอมแดงอาจไม่ใช่พืชอาศัยหลักของไส้เดือนฝอยรากแผลชนิดต่างๆ แต่ก็มีความสำคัญเนื่องจากไส้เดือนฝอยสกุลนี้สามารถติดไปกับหัวหอมและอาจไปแพร่ระบาดทำความเสียหายต่อพืชในพื้นที่ต่างๆ ได้ ข้อมูลการแพร่กระจายของชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลในพื้นที่ปลูกหอมจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้ทราบถึงสถานการณ์ปัจจุบัน เพื่อใช้ประโยชน์ในการบริหารจัดการและสร้างความเชื่อมั่นต่อประเทศคู่ค้าในการส่งออกสินค้าเกษตร

การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลทางสัณฐานวิทยาค่อนข้างยาก จำเป็นต้องใช้นักไส้เดือนฝอยที่มีความชำนาญ ไส้เดือนฝอยรากแผลมีลักษณะทางสัณฐานน้อยประการ ที่สามารถนำไปใช้ในการจำแนกชนิด อีกทั้งยังมีความแปรปรวนของลักษณะภายในประชากร (Intraspecific variation) ด้วย การนำเทคนิคด้านอณูชีววิทยามาประกอบกับสัณฐานวิทยา สามารถเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการตรวจวินิจฉัย สำหรับไส้เดือนฝอยรากแผลสกุล *Pratylenchus* นั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA gene สามารถนำมาใช้ประกอบการจำแนกชนิดได้ และมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนนี้ในฐานข้อมูลค่อนข้างมาก Al-Banna *et al*. (1997) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA genes ศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของ *Pratylenchus* Carta *et al*. (2001) และ De Luca *et al*. (2004) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA genes ศึกษาความแตกต่างของไส้เดือนฝอยรากแผลชนิดอื่นๆ เพิ่มเติม พบว่าไส้เดือนฝอยรากแผลชนิดที่มีลักษณะทางสัณฐานคล้ายคลึงกัน อาจมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน Al-Banna *et al*. (2004) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D3 expansion region ในการออกแบบคู่ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากแผล 6 ชนิด ต่อมามีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2 เพิ่มเข้ามาในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* เพื่อเพิ่มความชัดเจนในการศึกษา เนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D3 อาจไม่เพียงพอในการการศึกษาความสัมพันธ์ในระดับชนิด (species) จึงทำให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2D3 expansion region ของไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* ในฐานข้อมูลค่อนข้างมาก และในการรายงานการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากแผลชนิดใหม่ๆ จึงมักจะมีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนนี้ร่วมอยู่ด้วย การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนนี้ร่วมกับการศึกษาทางสัณฐานวิทยาจะทำให้การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลในพื้นที่ปลูกหอมมีความถูกต้องแม่นยำเพิ่มขึ้น

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยรากแผลในพื้นที่ปลูกหอมของประเทศไทย โดยการนำเทคนิคด้านอณูชีววิทยามาใช้ในการจำแนกเพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นปัจจุบัน สำหรับใช้ประโยชน์ในการบริหารจัดการและเป็นข้อมูลประกอบการส่งออกหอมแดงต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างดิน อุปกรณ์สำหรับแยกไส้เดือนฝอยออกจากดินและส่วนของพืช อุปกรณ์สำหรับปลูกพืช กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ คอมพิวเตอร์และอุปกรณ์ถ่ายภาพ เครื่องปั่นเหวี่ยง สไลด์ กระจกปิดสไลด์ ถ้วยนับตัวอย่าง เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เครื่องอิเล็กโตโฟรีสีส microcentrifuge tube, pcr tube, pipette tip, ชุด kit สำหรับสกัดดีเอ็นเอ, agarose gel, gel star, pcr buffer, pcr mix

- วิธีการ

<u>การเก็บตัวอย่างดินและแยกไส้เดือนฝอย</u>

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงหอมและกระเทียม ในพื้นที่ จ. ศรีสะเกษ จ. ยโสธร จ. อุบลราชธานี จ. บุรีรัมย์ จ. นครราชสีมา จ. แม่ฮ่องสอน จ. เชียงราย จ. เชียงใหม่ จ. ลำพูน จ. อุตรดิตถ์ จ. ตาก จ. ราชบุรี จ. กาญจนบุรี จ. สุพรรณบุรี และ จ. นครปฐม โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินที่ความลึก 15 – 20 เซนติเมตร สุ่มเก็บให้ทั่วแปลง หรือพื้นที่อย่างน้อย 1,600 ตารางเมตร ให้ได้ตัวอย่างดินประมาณ 4 กิโลกรัม คลุกเคล้าตัวอย่างดินเข้าด้วยกัน แบ่งบรรจุลงในถุงพลาสติก ประมาณ 1 กิโลกรัม บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินหนัก 250 กรัม โดยวิธี Decanting and sieving with Baermann trays โดยกวนตัวอย่างดินในน้ำ 2 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที กรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร ที่วางอยู่บนตะแกรงโลหะ ขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างที่ติดอยู่บนตะแกรงอันล่างใส่ลงบนกระดาษทิชชูที่วางอยู่บนตะแกรงไนล่อน ในถาดพลาสติกกลมที่มีน้ำสะอาด ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอยในน้ำไปตรวจหาไส้เดือนฝอยรากแผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ

<u>การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากแผล</u>

เพาะเมล็ดข้าวโพดลงในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากแผล เมื่อครบ 60 วันนำรากข้าวโพดมาล้างให้สะอาด แยกไส้เดือนฝอยรากแผลจากรากข้าวโพดโดยการนำรากข้าวโพดมาล้างให้สะอาด ตัดเป็นท่อนสั้นๆ ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร แช่ในน้ำสะอาด เลี้ยงไส้เดือนฝอยรากแผลในรากข้าวโพดในสภาพปลอดเชื้อ โดยเริ่มจากตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัว เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ สำหรับนำไปจำแนกชนิด โดยเตรียมรากข้าวโพดในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช Gamborg's B5 ในจานเลี้ยงเชื้อ ฆ่าเชื้อที่ผิวไส้เดือนฝอยรากแผลโดยโดยการตักตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากแผลใส่ลงในสาร streptomycin sulfate ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยที่ฆ่าเชื้อแล้วตักไส้เดือนฝอยใส่ลงบนรากข้าวโพดที่เตรียมไว้ จำนวน 1 ตัวต่อจานเลี้ยงเชื้อ เมื่อได้ประชากรไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงจากตัวเต็มวัย 1 ตัวแล้วนำไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

<u>การตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผล</u>

ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลโดยใช้วิธีทางอณูชีววิทยาและสัณฐานวิทยา ตรวจสอบทางอณูชีววิทยาโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA gene กับฐานข้อมูล สกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอย 1 ตัวด้วย GeneReleaser® (BioVentures)

กรมวิชาการเกษตร

ตามคำแนะนำที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ ร่วมกับวิธีการตาม Schizas *et al*. (1997) ใช้เข็มเขี่ยตักตัวไส้เดือนฝอยรากแผลใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 500 ไมโครลิตร บดใน PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ด้วยส่วนปลายของ pipette tip นำหลอดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 70°C บ่มนาน 10 นาที เติม proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดและบ่มที่ 55°C ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมินานประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดใส่ใน heating block ที่อุณหภูมิ 100°C นาน 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของ proteinase K ใส่ GeneReleaser® 20 ไมโครลิตรลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟชนิด 1000 วัตต์ นาน 6 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีนาน 1 นาที เก็บดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนใสใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่ -20°C ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ forward primer D2A (5- ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG -3) และ reverse primer D3B (5- TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3) (Baldwin *et al.,* 1997) โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR ที่เริ่มจาก hot start 94°C นาน 7 นาที amplification cycle 35 รอบ ประกอบด้วย denature ที่ 94°C นาน 1 นาที annealing ที่ 50°C นาน 1 นาที และ extension ที่ 72°C นาน 1 นาที เมื่อจบ amplification cycle แล้ว ตามด้วย final extension ที่ 72°C นาน 10 นาที โดย มีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR (ชุด Gotaq Flexi DNA Polymerase) ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ได้แก่ 5x buffer 1.5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (25 mM) 1.5 ไมโครลิตร dNTP (10 mM) 1.2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (10 pmol/µL) อย่างละ 0.3 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (0.1 unit/µL) 0.3 ไมโครลิตร nuclease free water 7.1 ไมโครลิตรและดีเอ็นเอต้นแบบ 3 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยนำหลอดใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมรุ่น T-Advanced (Biometra)

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR ที่สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเจลอีเอ็กโตรโฟรีซีส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 10 ไมโครลิตรผสมกับ 6x loading dye 2 ไมโครลิตร ใช้ 100 bp DNA Ladder 1 ไมโครลิตร เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบ นำ agarose gel ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์นาน 30 นาที แล้วนำแผ่น agarose gel มาย้อมด้วย ethidium bromide นาน 10 นาที และแช่น้ำเปล่าอีก 5 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) และบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation ทำปฏิกิริยา PCR อีกครั้งในปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แบบdirect sequencing ทั้ง 2 ทิศทางโดยใช้ทั้ง forward และ reverse primers นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ จัดเรียงในโปรแกรม ClustalW เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank สร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA4 โดยวิธี neighbor-joining หลังจากเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว หากพบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากแผลชนิดที่มีคู่ไพรเมอร์จำเพาะในการตรวจสอบ จะตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยนั้นๆ ด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะอีกครั้งหนึ่ง เพื่อเป็นการยืนยัน

ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง โดยตรวจสอบลักษณะของไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างสด และตัวอย่างที่ทำการคงสภาพและทำสไลด์ถาวรตามวิธีของ Ryss (2003) จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลโดยใช้คู่มือการจัดจำแนกของ Castillo and Vovlas (2007) บันทึกภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างดินและตรวจหาไส้เดือนฝอยรากแผล

จากการเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกหอมจังหวัดศรีสะเกษ ยโสธร อุบลราชธานี บุรีรัมย์ นครราชสีมา แม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน อุตรดิตถ์ ตาก ราชบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และนครปฐม ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนมีนาคม 2561 รวม 128 ตัวอย่าง เมื่อแยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดินตรวจหาไส้เดือนฝอยรากแผล พบไส้เดือนฝอยรากแผลในตัวอย่างดิน 12 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณโดยปลูกข้าวโพดลงในตัวอย่างดินและเลี้ยงบนรากข้าวโพดในสภาวะปลอดเชื้อ ได้ครบทุกตัวอย่าง สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุลอื่นที่ตรวจพบในตัวอย่างดิน ได้แก่ *Meloidogyne Rotylenchulus Tylenchorhynchus Hirschmanniella Helicotylenchus Aphelenchoides* และ *Hoplolaimus*

การตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

การตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยาโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA gene เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยคู่ไพรเมอร์ D2A/D3B ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 760 คู่เบส (ภาพที่ 1.2.7.1) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับไส้เดือนฝอยรากแผล *P. dellatrei* จำนวน 11 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างที่แยกได้จากตัวอย่างดิน อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี 7 ตัวอย่าง อ. เลาขวัญ จ. กาญจนบุรี 1 ตัวอย่าง อ. อู่ทอง จ. สุพรรณบุรี 1 ตัวอย่าง อ. จอมบึง จ. ราชบุรี 1 ตัวอย่าง และ อ. บ้านคา จ. ราชบุรี 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ และคล้ายกับ *P. brachyurus* จำนวน 1 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่แยกได้จากตัวอย่างดินจาก อ. ท่ามะกา จ. กาญจนบุรี ตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากแผล *P. brachyurus* ด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะ forward primer 18S (5- TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT -3) และ reverse primer ACM7R (5- GCW CCA TCC AAA CAA YGA G -3) โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR เริ่มจาก hot start ที่ 94°C นาน 2 นาที 45 วินาที amplification cycle จำนวน 40 รอบ ประกอบด้วย denature ที่ 94°C นาน 1 นาที annealing ที่ 57°C นาน 45 วินาที และ extension ที่ 72°C นาน 2 นาที เมื่อจบ amplification cycle แล้ว ตามด้วย final extension ที่ 72°C นาน 10 นาที ผลการตรวจได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 267 คู่เบส (ภาพที่ 1.2.7.2)

การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา

P. dellatrei

สามารถจำแนกด้วยลักษณะดังนี้ จำนวนรอยย่นบริเวณโครงหัว (Lip annuli) 3 วง เส้นข้างลำตัว 4 เส้น หางของตัวเต็มวัยเพศเมียมีลักษณะ subcylindrical ปลายหางมนมีผิวเรียบ ไม่พบตัวเต็มวัยเพศผู้ matrix code สำหรับ tabular key คือ A2, B1, C3, D1, E2, F3, G3, H1, I1, J1, K1 (ตารางที่ 1.2.7.2)

ศรีวิชัยการเกษตร

ลักษณะโดยทั่วไปของตัวเต็มวัยเพศเมีย *P. dellatrei* ส่วนโครงหัวเชื่อมต่อเนื่องกับลำตัวมีลักษณะ off set เล็กน้อย มีรอยย่น (annuli) 3 วง stylet แข็งแรง stylet knob มีลักษณะแบนทางด้านบน ขนาดประมาณ 1.6 x 4.0 ไมโครเมตร ส่วน dorsal oesophageal gland orifice อยู่ห่างจากฐานของ stylet ประมาณ 1.6-2.4 ไมโครเมตร oesophageal gland ซ้อนทับลำไส้ด้าน ventral ส่วน median bulb กลมหรือรี มีระบบวาล์วเห็นชัดเจน ส่วน nerve ring อยู่เหนือ excretory pore ตำแหน่งของ excretory pore ห่างจากส่วนปลายหัว 66.4-76.8 ไมโครเมตร ส่วน hemizonid อยู่เหนือ excretory pore ขนาดประมาณ 3 annuli มี lateral field ขนาดประมาณ 1/3 ของความกว้างลำตัว มีเส้นข้างลำตัว (lateral line) 4 เส้น ovary แบบเดี่ยว prodelphic เหยียดตรงไปทางด้านหัว oocyte เรียงเป็นแถวเดี่ยว spermatheca กลม ไม่มี sperm ส่วน post-vulval uterine sac ยาวกว่าความกว้างลำตัวช่วง vulva หางมีลักษณะ subcylindrical ปลายมนผิวเรียบ ไส้เดือนฝอยรากแผล *P. dellatrei* ไม่พบตัวเต็มวัยเพศผู้

P. brachyurus

สามารถจำแนกด้วยลักษณะดังนี้ จำนวนรอยย่นบริเวณโครงหัว (Lip annuli) 2 วง วงบนสุดมีลักษณะเป็นมุมแหลม ส่วน stylet แข็งแรง basal knob กลม vulva 82-89% ของความยาวลำตัว ส่วน post-vulval uterine sac สั้นกว่าความกว้างลำตัว ส่วน spermatheca ไม่เด่นชัด และใช้งานไม่ได้ หางมีลักษณะกว้างรูปโคน (broadly conoid) ปลายหางเรียบ มีลักษณะกลม (rounded) ปลายตัด (truncated) หรือ คล้ายใบพาย (spatulated) พบตัวเต็มวัยเพศผู้ แต่ค่อนข้างพบได้น้อย matrix code สำหรับ tabular key คือ A1, B2, C4, D1, E4, F3, G3, H1, I4, J2-3, K1 (ตารางที่ 1.2.7.2)

ลักษณะโดยทั่วไปของ *P. brachyurus* ตัวเต็มวัยเพศเมียมีส่วนโครงหัว off set จากส่วนลำตัว มีรอยย่น (annuli) 2 วง โดยวงด้านบนมีลักษณะเป็นมุมแหลม โครงหัวแข็งแรง ส่วน lateral field มี lateral line 4 เส้น บริเวณกลางลำตัว และอาจแบ่งเป็น 5-6 เส้นบริเวณ vulva และสองเส้น บริเวณปลายหาง ส่วน stylet แข็งแรง basal knob กลม excretory pore อยู่หลัง hemizonid และห่างจากปลายหัวประมาณ 57-108 ไมโครเมตร oesophageal gland ซ้อนทับลำไส้ด้าน ventral และ lateral ovary มีลักษณะเหยียดตรง หรือบางครั้งมีลักษณะพับงอ หรือบางครั้งอาจเหยียดยาวจนถึง pharyngeal lobe ซึ่งพบค่อนข้างน้อย oocyte อาจเป็นแถวเดี่ยวหรือบางครั้งอาจเป็นแถวคู่ ตำแหน่ง vulva 82-89% ของความยาวลำตัว post-vulval uterine sac สั้นกว่าความกว้างลำตัวบริเวณ vulva ส่วน spermatheca ไม่ชัดเจน และไม่ทำงาน หางมีลักษณะเป็นรูปโคน ผิวเรียบ ปลายหางมีลักษณะ กลมมน (round) truncate หรือ spatulate มี ventral annuli 13-24 วง phasmid อยู่กึ่งกลางหาง

การศึกษาการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยรากแผลในพื้นที่ปลูกหอมครั้งนี้ พบไส้เดือนฝอยรากแผล 2 ชนิด คือ *P. dellatrei* และ *P. brachyurus* ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 ชนิดมีรายงานการพบในประเทศไทย ข้อมูลเกี่ยวกับ *P. delattrei* มีไม่มากนัก มีรายงานว่าพบในตัวอย่างดินจาก ถั่วลิสง ส้มแมนดาริน ฝ้าย มันเทศ หม่อน มะเขือเทศ แตงกวา และ อ้อย (สืบศักดิ์, 2538) ส่วน *P. brachyurus* มีรายงานการพบในตัวอย่างดิน สับปะรด ตะไคร้ ทุเรียน ยูคาลิปตัส ฝ้าย มันสำปะหลัง มะละกอ มะม่วง อ้อย หม่อน ข้าวฟ่าง ข้าวโพด ถั่วเหลือง ถั่วลิสง พริก พริกไทย ยาสูบ มะเขือเทศ (สืบศักดิ์, 2538) และ กล้วย (ไตรเดช และคณะ, 2558) จากการตรวจสอบข้อมูล

กรมวิชาการเกษตร

ไม่พบข้อมูลการเข้าทำลายหอมของ *P. dellatrei* แต่สำหรับ *P. brachyurus* มีรายงานการพบในพื้นที่ปลูกหอมและสามารถเข้าทำลายหอมได้ อย่างไรก็ตามหอมอาจไม่ใช่พืชอาศัยหลักของ *P. brachyurus* Machado and Inomoto (2001) ทดสอบความเป็นพืชอาศัยของพืชผัก 18 ชนิดต่อ *P. brachyurus* พบว่า onion cv. Baia Periforme (*Allium cepa* L.) และ green onion cv. Todo ano (*Allium fistulosum* L.) เป็นพืชอาศัยที่ไม่ดี (poor host) ของ *P. brachyurus* พืชอาศัยที่มีการศึกษาความสามารถในการเข้าทำลายและระดับความเสียหายที่เกิดจากไส้เดือนฝอย *P. brachyurus* ได้แก่ ถั่วเหลือง และกาแฟ ส่วน พืชอาศัยที่มีการศึกษาการเข้าทำลายและระดับความเสียหายที่เกิดจากไส้เดือนฝอย *P. dellatrei* ได้แก่ *Crossandra undulaefolia* (Castillo and Vovlas, 2007) การสำรวจเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกหอมครั้งนี้ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล *P. penetrans* อย่างไรก็ตามควรมีการสำรวจเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกหอมอย่างต่อเนื่อง ครอบคลุมทุกพื้นที่ และช่วงเวลาและฤดูต่างๆ รวมทั้งการเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืชชนิดอื่นที่อยู่ใกล้เคียงแปลงปลูกหอม เพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มขึ้น และควรศึกษาความสามารถในการเข้าทำลายหอมของไส้เดือนฝอยรากแผล *P. dellatrei* และ *P. brachyurus* เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อไป

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกหอม ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนมีนาคม 2561 ในจังหวัดศรีสะเกษ ยโสธร อุบลราชธานี บุรีรัมย์ นครราชสีมา แม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน อุตรดิตถ์ ตาก ราชบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และนครปฐม รวม 128 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากแผลในตัวอย่างดิน จ. กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และราชบุรี รวม 12 ตัวอย่าง จำแนกชนิดด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาและสัณฐานวิทยาได้เป็น *Pratylenchus dellatrei* 11 ตัวอย่าง และ *P. brachyurus* 1 ตัวอย่าง

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- ได้ข้อมูลชนิดและการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยรากแผลที่เป็นปัจจุบัน มีความถูกต้องแม่นยำ ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีประโยชน์ต่อการส่งออกหอมแดง และการเจรจานำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตรอื่นๆ
- ได้สไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอยเพื่อใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงและประกอบการสอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Table 1.2.7.1 Location and numbers of soil samples collected from onion and shallot fields during October 2016 - June 2018 showing number of soil samples which lesion nematodes were detected and species identified.

Province	District	Sub-district	Number of Soil Samples	Number of positive samples	Type of Lesion Nematode
Chiang Rai	Wiang Pa Pao	Mae Chedi	3	0	
	Mae Suai	Mae Phrik	1	0	
	Phan	Pa Hung	2	0	
Chiang Mai	Chiang Dao	Mae Na	1	0	
	Chai Prakan	Si Dong Yen	7	0	
		Nong Bua	2	0	
		Pong Tam	1	0	
	Fang	Mae Ngon	1	0	
		Mae Sun	1	0	
		Pong Nam Ron	1	0	
		Mon Pin	1	0	
		San Sai	2	0	
		Mae Kha	2	0	
	San Sai	Mae Faek	1	0	
	Hot	Bo Sali	2	0	
Mae Hong Son	Pai	Mae Na Toeng	2	0	
	Pang Mapha	Tham Lot	1	0	
		Pang Mapha	1	0	
	Mueang	Huai Pong	3	0	
	Khun Yuam	Mueang Pon	3	0	
	Mae La Noi	Mae La Luang	1	0	
		Mae La Noi	1	0	
Lamphun	Pa Sang	Muang Noi	1	0	
		Mae Raeng	2	0	
		Ban Ruean	1	0	
	Thung Hua Chang	Thung Hua Chang	1	0	
		Takhian Pom	1	0	
	Ban Hong	Lao Yao	2	0	
		Pa Phlu	1	0	
Uttaradit	Laplae	Chai Chumphon	2	0	
		Fai Luang	1	0	
Tak	Phop Phra	Phop Phra	1	0	
		Chong Khaep	2	0	
		Ruam Thai Phatthana	1	0	

กรมวิชาการเกษตร

Province	District	Sub-district	Number of Soil Samples	Number of positive samples	Type of Lesion Nematode
Kanchanaburi	Tha Muang	Tha Muang	7	6	*P. delattrei*
		Wang Sala	1	0	
		Wang Khanai	1	1	*P. delattrei*
	Tha Maka	Tha Ruea	1	1	*P. brachyurus*
	Bo Phloi	Lum Rang	1	0	
		Nong Krang	1	0	
	Lao Khwan	Nong Nok Kaeo	2	1	*P. delattrei*
Suphan Buri	U Thong	Chorakhe Sam Phan	1	1	*P. delattrei*
Nakhon Pathom	Mueang	Nong Ngu Luam	1	0	
Ratchaburi	Chom Bueng	Kaem On	3	0	
		Dan Thap Tako	1	1	*P. delattrei*
	Ban Kha	Ban Kha	1	1	*P. delattrei*
		Nong Pan Chan	1	0	
Nakhon Ratchasima	Mueang	Si Mum	1	0	
		Phon Krung	1	0	
Yasothon	Kho Wang	Fa Huan	4	0	
Buri Ram	Mueang	Thalung Lek	1	0	
		Phra Khru	1	0	
	Nong Hong	Thai Samakkhi	2	0	
		Sa Kaeo	1	0	
Si Sa Ket	Yang Chum Noi	Yang Chum Noi	6	0	
		Non Khun	1	0	
		Khon Kam	2	0	
	Mueang	Mueang Tai	1	0	
		Mak Khiap	2	0	
	Kanthararom	Mueang Noi	1	0	
		Lathai	1	0	
	Wang Hin	Bu Sung	2	0	
		Duan Yai	1	0	
	Rasi Salai	Mueang Khong	1	0	
		Mueang Khaen	1	0	
		Som Poi	4	0	
		Nong Mi	12	0	
		Sang Pi	2	0	
Ubon Ratchathani	Khueang Nai	Sang Tho	1	0	
		That Noi	1	0	
Total			128	12	

กรมวิชาการเกษตร

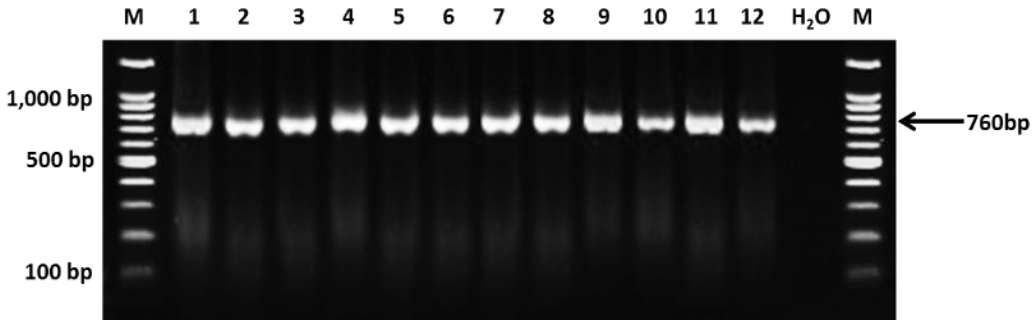


Figure 1.2.7.1. Amplicons of D2D3 expansion segments of 12 *Pratylenchus* amplified with the universal primer D2A/D3B yielded approximately 760 bp products.

Figure 1.2.7.2. Detection of *P. brachyurus* using specific primers 18S/ACM7R, approximately 267 bp DNA fragment was obtained.

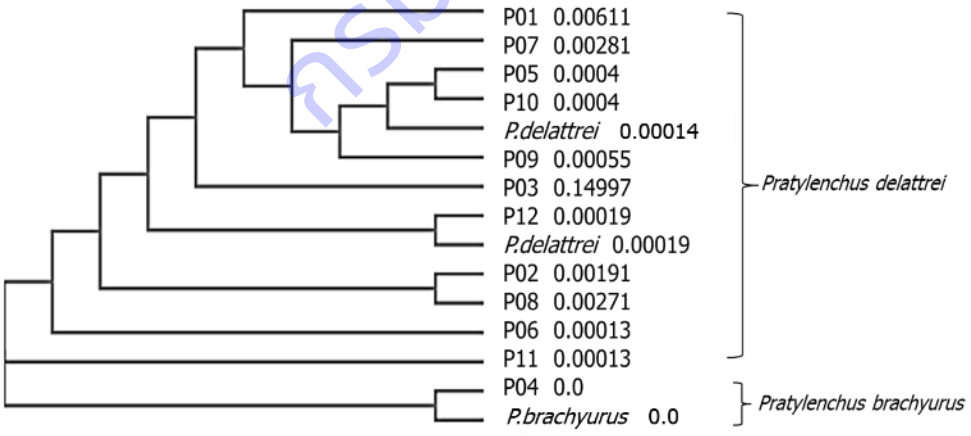


Figure 1.2.7.3. Phylogenetic tree of the *Pratylenchus* species constructed using D2D3 expansion segments of the 28S rDNA.

ภาควิชากีฏวิทยา

Table 1.2.7.2 Morphological characteristics used for *Pratylenchus* identification with Tabular key (Castillo and Vovlas, 2007)

A. จำนวนรอยย่นบริเวณโครงหัว (Lip annuli)	E. ตำแหน่งและอัตราส่วนของ vulva (Valva position, ratio V)	I. ความยาวของการซ้อนทับของ pharynge กับลำไส้ (Pharyngeal overlapping length)
กลุ่มที่ 1: 2 วง กลุ่มที่ 2: 3 วง กลุ่มที่ 3: 4 วง	กลุ่มที่ 1: < 75% กลุ่มที่ 2: 75 - 79.9% กลุ่มที่ 3: 80 - 85% กลุ่มที่ 4: > 85%	กลุ่มที่ 1: < 30 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 2: 30 - 39.9 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 3: 40 - 50 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 4: > 50 ไมโครเมตร
B. การปรากฏของตัวเต็มวัยเพศผู้ (Male)	F. ความยาวของ Post-vulval uterine sac (PUS)	J. จำนวนเส้นข้างลำตัวบริเวณตำแหน่งvulva (Lateral field lines at vulval region)
กลุ่มที่ 1: ไม่พบ กลุ่มที่ 2: พบ	กลุ่มที่ 1: < 16 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 2: 16 - 19.9 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 3: 20 - 24.9 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 4: 25 - 29.9 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 5: 30 - 35 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 6: > 35 ไมโครเมตร	กลุ่มที่ 1: 4 เส้น กลุ่มที่ 2: 5 เส้น กลุ่มที่ 3: 6 - 8 เส้น
C. ความยาว Stylet (Stylet Length)	G. ลักษณะหางของตัวเต็มวัยเพศเมีย (Female tail shape)	K. ลักษณะของ Lateral field บริเวณตำแหน่งvulva (Lateral field structure at vulval region)
กลุ่มที่ 1: < 13 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 2: 13 - 15.9 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 3: 16 - 17.9 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 4: 18 - 20 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 5: > 20 ไมโครเมตร	กลุ่มที่ 1: cylindrical กลุ่มที่ 2: subcylindrical กลุ่มที่ 3: conoid	กลุ่มที่ 1: smooth bands กลุ่มที่ 2: partially or completely areolated bands
D. ลักษณะของ Spermatheca (Shape of spermatheca)	H. ลักษณะปลายหางของตัวเต็มวัยเพศเมีย (Female tail tip)	
กลุ่มที่ 1: absent or reduced กลุ่มที่ 2: rounded to spherical กลุ่มที่ 3: oval กลุ่มที่ 4: rectangular	กลุ่มที่ 1: smooth กลุ่มที่ 2: striated กลุ่มที่ 3: pointed กลุ่มที่ 4: with ventral projection	

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.2.7.4. *P. dellatrei* is characterised by three lip annuli, stylet 16-17.9 µm, spermatheca absent or reduced, vulva position 75-79.9%, post-vulval uterine sac 20-24.9 µm, female tail shape conoid, female tail tip smooth, pharyngeal overlapping length <30 µm, lateral field

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.2.7.5. *P. brachyurus* is characterised by two lip annuli, stylet 18-20 µm, spermatheca absent or reduced, vulva position > 85%, post-vulval uterine sac 20-24.9 µm, female tail shape conoid, female tail tip smooth, pharyngeal overlapping length >50 µm, lateral field smooth with 5-8 lines.

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.2.8 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ไอโซเลตไทย

Phylogenetic analysis of the Thai Isolates of *Pasteuria penetrans*

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง ไตรเดช ข่ายทอง สังกัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ.

ผู้ร่วมงาน ธิติยา สารพัฒน์ สังกัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ.

วีรกรณ์ แสงไสย์ สังกัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ.

รุ่งนภา ทองเครื่ง สังกัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ.

บทคัดย่อ

เลี้ยงแบคทีเรีย *P. penetrans* แบคทีเรียปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งเป็นไอโซเลตที่รวบรวมได้จากพื้นที่ปลูกพืชในประเทศไทย ได้แก่ มันฝรั่ง จ. ตาก 2 ไอโซเลต พริก จ. ขอนแก่น 1 ไอโซเลต มันขี้หนู จ. สุราษฎร์ธานี 7 ไอโซเลต พริกไทย จ. จันทบุรี 2 ไอโซเลต และ โหระพา จ. สกลนคร 1 ไอโซเลต รวม 13 ไอโซเลต โดยนำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง แช่ในเซลล์แขวนลอยของสปอร์แบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ เพื่อให้แบคทีเรียเกาะผนังลำตัว จากนั้นนำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมที่มีสปอร์ไปเลี้ยงในรากมะเขือเทศ เพื่อให้ไส้เดือนฝอยรากปมเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยที่มีสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* อยู่ภายในแยกไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศเมียออกจากรากมะเขือเทศ นำไปแยกสปอร์ของแบคทีเรียออกจากตัวไส้เดือนฝอย และสกัดดีเอ็นเอ ทำปฏิกิริยา PCR ในส่วน 16S rDNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ 27f/440r และ 440f/1492r ได้แถบดีเอ็นขนาด 448 และ 1,063 bp คู่เบส ตามลำดับ รวม 11 ไอโซเลต วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรวจแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์และอยู่ระหว่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรม

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

Pasteuria spp. เป็นแบคทีเรียปรสิต ที่สร้างเอ็นโดสปอร์ ติดสีแกรมบวก เป็นปรสิตที่ต้องเจริญเติบโตในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เพื่อการครบวงชีวิต (obligate parasite) มีรายงานการพบแบคทีเรียสกุล *Pasteuria* ในไส้เดือนฝอย 323 ชนิด อยู่ใน 116 สกุล (Chen and Dickson, 1998; Ciancio *et al.,* 1994; Sayre and Starr, 1988; Sturhan, 1988) การจำแนกชนิดของ *Pasteuria* spp. ปัจจุบันยังไม่ชัดเจนแต่มีการแบ่งออกอย่างคร่าวๆ ออกเป็น 6 สปีชีส์ คือ *P. ramosa* เป็นปรสิตของ water flea (*Daphnia magna*) *P. thornei* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากแผล *Pratylenchus penetrans P. nishizawae* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Heterodera* และ *Globodera* spp. *P. usage* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Belonolaimus longicaudatus P. hartismeri* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากปม *M. ardensis* สำหรับ *P. penetrans* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. (Gowen *et al.,* 2008) Chen and Dickson (1998) ได้รวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับ *P. penetrans* ทั้งประวัติของแบคทีเรียชนิดนี้ รวมทั้งชีววิทยา นิเวศวิทยา และการใช้แบคทีเรียชนิดนี้ในการควบคุม

ไส้เดือนฝอยรากปมแบบชีววิธี *P. penetrans* เข้าทำลายไส้เดือนฝอยโดยสปอร์ที่อยู่ในดินจะเกาะติดกับผนังลำตัวของตัวอ่อนระยะที่สอง เมื่อไส้เดือนฝอยเข้าทำลายรากพืชและเริ่มชักนำเซลพืชเพื่อสร้างแหล่งอาหาร (feeding site) สปอร์ของ *P. penetrans* จะสร้าง germ tube แทงผ่านผนังลำตัวและพัฒนาเป็น dichotomous septate mycelium ในช่องว่างภายในลำตัวของไส้เดือนฝอย ต่อมา mycelium จะเข้าสู่ระยะ sporogenesis และสุดท้ายจะพัฒนาเป็น single sporangia ที่มี endospore อยู่ภายใน การสร้างสปอร์ของ *P. penetrans* ภายในตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอย จะทำลายการสร้างไข่ ทำให้ไส้เดือนฝอยไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ ในระยะยาวจะทำให้ประชากรของไส้เดือนฝอยในดินลดลง ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมเมื่อถูกสปอร์ของ *P. penetrans* เกาะอยู่ที่ผนังลำตัวจำนวนมาก จะทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่และการเข้าทำลายรากพืชลดลง (Sano and Gaspard, 1995; Adiko and Gowen, 1999) มีรายงานถึงประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมของ *P. penetrans* ในพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ พริก ยาสูบ กระเจี๊ยบ องุ่น และข้าวสาลี เป็นต้น (Chen and Dickson, 1998) เอ็นโดสปอร์ของ *P. penetrans* สายพันธุ์ P20 จำนวน 10,000 สปอร์ต่อดิน 1 กรัม สามารถควบคุมไส้เดือนฝอย *M. arenaria* race1 ในถั่วลิสงได้ (Chen *et al.,* 1996) สปอร์จำนวนน้อยของ *P. penetrans* ในดิน สามารถเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนถึงระดับที่สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ (Chen *et al.,* 1996; Oostendrop *et al.,* 1991) ในการทดลองในกระถางพบว่า *P. penetrans* สามารถเพิ่มปริมาณได้มากกว่า 100 เท่า ภายใน 2-3 รอบของการปลูกพืช (Ali *et al.,* 2005) ในแปลงปลูกยาสูบที่มีการระบาดอย่างหนักของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* race1 และ *M. javanica* และต่อมาพบว่าการระบาดลดลง เมื่อนำดินจากแปลงที่มีการระบาดลดลง (suppressive soil) มาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการพบว่าสาเหตุที่ทำให้การระบาดของไส้เดือนฝอยลดลงนั้นเกิดจาก *P. penetrans* (Weibelzahl-Fulton *et al.,* 1996)

แบคทีเรียชนิดนี้มีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เพื่อใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (Brown and Kerry, 1987; Dickson *et al.,*1994; Oostendorp *et al.,* 1990; Sayre and Starr, 1988; Stirling, 1991) แต่มีข้อจำกัดคือความเป็น obligate parasite ซึ่งต้องการไส้เดือนฝอยอาศัยในการควบวงชีวิตทำให้การผลิตในปริมาณมากทำได้ยาก ปัจจุบันมีผู้รายงานการเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้บนอาหารเทียมได้สำเร็จ และได้มีการผลิตแบคทีเรีย *Pasteuria* หลายชนิดเพื่อใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิดต่างๆ ในเชิงพาณิชย์ กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้รวบรวมและคัดเลือกแบคทีเรียชนิดนี้เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากปมของพืชหลายชนิด ปัจจุบันได้รวบรวมแบคทีเรียชนิดนี้จากพื้นที่ต่างๆของประเทศไทยได้หลายไอโซเลต (Khaithong *et al.,* 2012) และพบว่าบางไอโซเลตสามารถลดการสร้างกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้ (ไตรเดช และคณะ, 2558)
การจำแนกชนิดแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างสปอร์ มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา แบคทีเรีย *Pasteuria* ถูกค้นพบว่าเป็น endoparasite ของไส้เดือนฝอยในปี ค.ศ. 1975 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Mankau, 1975a) และได้ตั้งชื่อเป็น *Bacillus penetrans* (Thorne, 1940) Mankau, 1975 (Mankau 1975b) ต่อมา Sayre and Starr (1988) พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้คล้ายกับแบคทีเรีย *P. ramosa* (Metchnikoff, 1888) ซึ่งเป็น endoparasite ของไรน้ำ (water fleas) จึงได้จัดเข้าอยู่ในสกุล *Pasteuria* แบคทีเรียสกุล *Pasteuria* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก dichotomous branching เป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ และมี septate mycelium (William *et al.,* 1994)

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

แบคทีเรียสกุลนี้มีลักษณะที่แตกต่างกับแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์เช่นเดียวกันแต่ไม่ได้เป็นปรสิต แบคทีเรีย *P. penetrans* จัดจำแนกโดยการใช้ลักษณะของสปอร์และชนิดของไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลาย ต่อมามีการนำเทคนิคด้านอณูชีววิทยามาใช้ศึกษามากขึ้น เช่นการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วน 16S rRNA Anderson *et al.* (1999) รายงานศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *P. penetrans* โดยใช้ยีน 16S rRNA ในไอโซเลต P-20 ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากปม *M. arenaria* race 1 และไอโซเลต P-100 ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *M. incognita* และ *M. javanica* พบว่าแบคทีเรีย *P. penetrans* อยู่ใน clade เดียวกับ *Alicyclobacillus acidocaldarius A. cycloheptanicus Sulfobacillus* sp. *B. tusciae B. schlegelii* และ *P. ramosa* ซึ่ง *P. ramosa* เป็นแบคทีเรีย *Pasteuria* ที่เป็นปรสิตของไรน้ำ (water fleas: *Daphnia* spp.) Atibalentja *et al.* (2000) รายงานศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Pasteuria* ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยซีสต์ถั่วเหลือง (soybean cyst nematode: *Heterodera glycines*) โดยใช้ยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้เป็น sister species ของ *P. ramosa* อยู่ในกลุ่ม *Alicyclobacillus* ภายในวงศ์ *Bacillaceae* Charles *et al.* (2005) ศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *P. penetrans* กับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดยใช้ยีนหลายตำแหน่งพบว่า *P. penetrans* เป็น low-G+C-content eubacteria ติดสีแกรมบวก และอยู่ใน class เดียวกับ *Bacillus* และจากการวิเคราะห์พบว่า *P. penetrans* เป็นบรรพบุรุษของ *Bacillus* spp. และมีความใกล้ชิดกับกลุ่ม saprophytic extremophile เช่น *B. haladurans* และ *B. subtilis* มากกว่าชนิดที่ก่อโรค คือ *B. anthracis* และ *B. cereus* งานวิจัยนี้นี้เป็นการศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตไทย เปรียบเทียบกับ *P. penetrans* จากแหล่งอื่นๆ และแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ชนิดอื่นๆ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยขั้นต่อไป

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

อุปกรณ์สำหรับแยกไส้เดือนฝอยออกจากดินและส่วนของพืช อุปกรณ์สำหรับปลูกพืช กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ คอมพิวเตอร์และอุปกรณ์ถ่ายภาพ เครื่องปั่นเหวี่ยง สไลด์ กระจกปิดสไลด์ ถ้วยนับตัวอย่าง เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เครื่องอิเล็กโตโฟรีสีส microcentrifuge tube, pcr tube, pipette tip, ชุด kit สำหรับสกัดดีเอ็นเอ, plasmid, agarose gel, gel star, pcr buffer, pcr mix

- วิธีการ

การเตรียม Inoculum ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

เลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในรากมะเขือเทศในกระถาง เมื่อต้นมะเขือเทศอายุประมาณ 60 วัน แยกไข่ไส้เดือนฝอยจากรากโดยการตัดรากปมเป็นชิ้นขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร และเขย่าใน 0.52 % Sodium Hypochlorite (คลอร็อก 10%) และเก็บไข่ไส้เดือนฝอยโดยการล้างผ่านตะแกรงที่มีขนาดช่อง 25 ไมโครเมตร ด้วยน้ำสะอาด (Hussey and Barker, 1973) นำไข่ไส้เดือนฝอยใส่ลงบนตะแกรงไนลอนขนาดเล็กที่มี

ศรีวิชาการเกษตร

ขนาดช่องประมาณ 25 ไมโครเมตร ซึ่งวางในจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บตัวอ่อนระยะที่สอง ซึ่งฟักออกมาจากไข่และอยู่ในน้ำในจานเลี้ยงเชื้อไปใช้

การเตรียมสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* เพื่อใช้ในการทดลอง

นำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองที่มีสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ติดอยู่ที่ผนังลำตัวโดยวิธีปั่นเหวี่ยง (Hewlett and Dickson, 1993) ไปเลี้ยงในต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 45 – 60 วันที่ปลูกในดินอบฆ่าเชื้อ เก็บรากมะเขือเทศ 60 วันหลังใส่เชื้อ ล้างน้ำให้สะอาด เขี่ยไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศเมียที่ถูกเข้าทำลายด้วยแบคทีเรีย *P. penetrans* ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 ตัว ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 100 ไมโครลิตร บดด้วยแท่งบดตัวอย่าง ตรวจสอบสปอร์ของแบคที่เรีย *P. penetrans* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ รวมตัวอย่างจากแต่ละหลอดเข้าด้วยกันแล้วปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ 10^6 สปอร์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรและเก็บที่ 4°C เพื่อใช้เป็น stock

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี plain glass bead-beating (Atibalentja *et al.*, 2004) ดูดสปอร์จากหลอด stock 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge แบบฝาเกลียวขนาด 2 มิลลิลิตร ใส่ acid-washed glass beads (Sigma) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.150-0.212 มิลลิเมตร ปริมาตรเท่ากันลงในหลอด ใส่ลงในเครื่อง Mini-BeadBeater ที่ 5,000 รอบต่อนาทีนาน 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด (ประมาณ 16,000g) นาน 5 นาที ดูดของเหลวส่วนบนใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่เก็บที่ -20°C

การทำ PCR การโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำ PCR ส่วนของ *Pasteuria* 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชุดๆ แรก คือ universal forward 27f: 5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (Lane, 1991) และ reverse primer 440r: 5'-CATTTCTTCTTCCCGATG-3' ชุดที่สองคือ forward primer 440f: 5' -CATCGGGAAGAAGAAATG-3' และ universal reverse primer 1492r: 5' -TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3' (Lane, 1991) ทำปฏิกิริยา PCR 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอ 20 ไมโครลิตร, 5 ไมโครลิตร 10x PCR buffer (Tris-HCl 200mM, pH 8.4, KCl 500 mM), $MgCl_2$ 1.5 mM, ไพรเมอร์แต่ละชนิด 0.2 µM, dNTP แต่ละชนิด 0.2 mM และ 2.5 units Taq DNA Polymerase ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Thermal Cycler โดยมีสภาวะดังนี้ 94 °C นาน 10 นาที; 94 °C 1 นาที, 52 °C 1 นาที และ 72 °C 2 นาที ทั้งหมด 45 รอบ, final extension ที่ 72 °C 10 นาทีและ incubation ที่ 4 °C ทำ electrophoresis PCR products ที่ได้ใน 2% agarose gel, ตรวจด้วยการแช่ ethidium bromide (0.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และตรวจภายใต้แสง UV ตัดเจลส่วนที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการไป purify ด้วย QIAEX® II gel extraction kit (Qiagen) ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาแก้ไข จัดเรียง วิเคราะห์ด้วยวิธี maximum parsimony maximum likelihood และ Bayesian สร้าง phylogenetic tree โดยใช้ฐานข้อมูลใน GenBank ในการเปรียบเทียบ

กรมวิชาการเกษตร

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

เลี้ยงแบคทีเรีย *P. penetrans* แบคทีเรียปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งเป็นไอโซเลตที่รวบรวมได้จากพื้นที่ปลูกพืชในประเทศไทย ได้แก่ มันฝรั่ง จ. ตาก 2 ไอโซเลต พริก จ. ขอนแก่น 1 ไอโซเลต มันขี้หนู จ. สุราษฎร์ธานี 7 ไอโซเลต พริกไทย จ. จันทบุรี 2 ไอโซเลต และ โหระพา จ. สกลนคร 1 ไอโซเลต รวม 13 ไอโซเลต โดยนำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง แช่ในเซลล์แขวนลอยของสปอร์แบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ เพื่อให้แบคทีเรียเกาะผนังลำตัว จากนั้นนำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมที่มีสปอร์ไปเลี้ยงในรากมะเขือเทศ เพื่อให้ไส้เดือนฝอยรากปมเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยที่มีสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* อยู่ภายในแยกไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศเมียออกจากรากมะเขือเทศ นำไปแยกสปอร์ของแบคทีเรียออกจากตัวไส้เดือนฝอย และสกัดดีเอ็นเอ ทำปฏิกิริยา PCR ในส่วน 16S rDNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ 27f/440r และ 440f/1492r ได้แถบดีเอ็นขนาด 448 และ 1,063 bp คู่เบส ตามลำดับ รวม 11 ไอโซเลต วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรวจแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์และอยู่ระหว่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรม

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เลี้ยงเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *P. penetrans* และสกัดดีเอ็นเอได้ รวม 13 ไอโซเลต ทำปฏิกิริยา PCR ในส่วน 16S rDNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ 27f/440r และ 440f/1492r ได้แถบดีเอ็นขนาด 448 และ 1,063 bp คู่เบส ตามลำดับ รวม 11 ไอโซเลต วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรวจแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์และอยู่ระหว่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรม

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ทราบข้อมูลความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตไทย เปรียบเทียบกับ *P. penetrans* จากแหล่งอื่นๆ และแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ชนิดอื่นๆ เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยและพัฒนาแบคทีเรียกลุ่มนี้เพื่อใช้ประโยชน์ในการใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมแบบชีววิธีต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

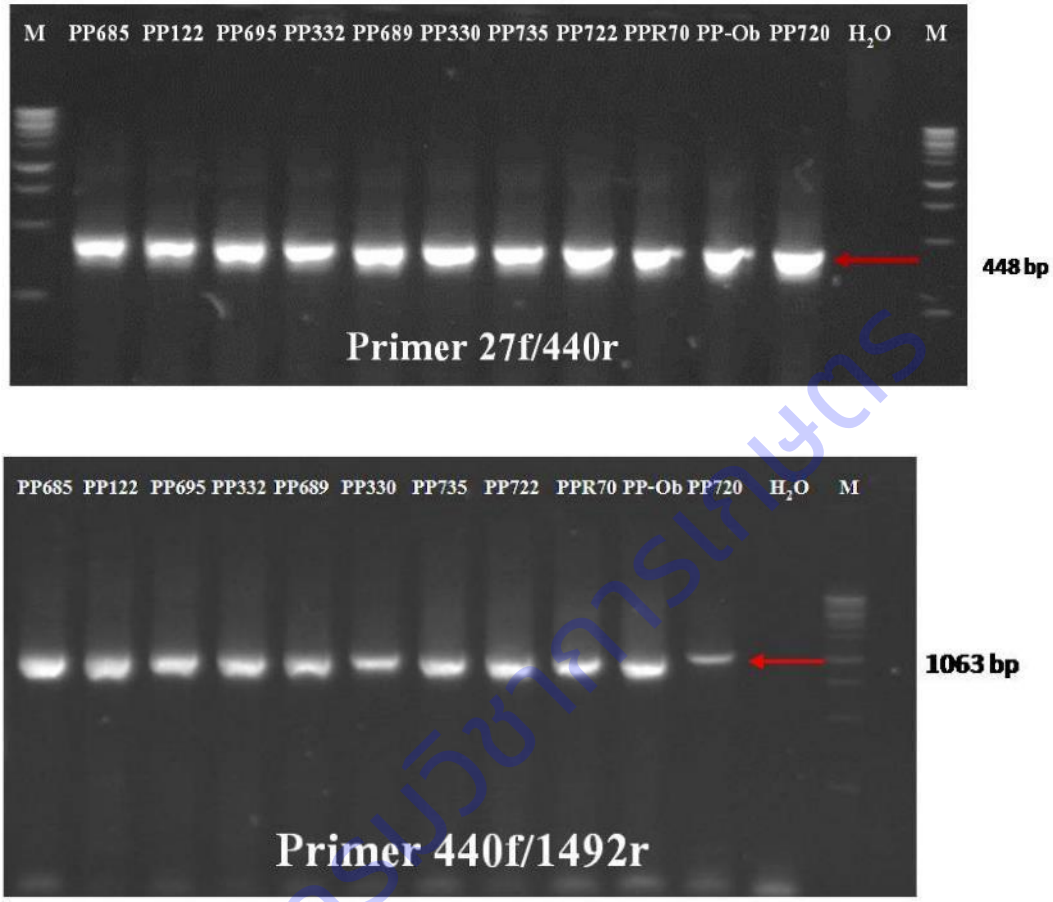


Figure 1.2.8.1 Amplification of *P. penetrans* 16S rRNA gene using 27f/440r and 440f/1492r primers yielded 448 bp and 1063 bp respectively

การทดลองที่ 1.2.9 การทวนสอบแนวทางการจำแนกชนิดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองด้วยวิธีอณูชีววิทยากับไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย

Validation of Molecular Diagnostic Key with Second Stage Juveniles of Root-Knot Nematodes in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง ไตรเดช ข่ายทอง สังกัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ

ผู้ร่วมงาน ธิติยา สารพัฒน์ สังกัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ

วีรกรณ์ แสงไสย์ สังกัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ

รุ่งนภา ทองเครื่ง สังกัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ

บทคัดย่อ

การทวนสอบแนวทางการจำแนกชนิดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อยืนยันความใช้ได้ของ Molecular Diagnostic Key ที่รายงานโดย Adam *et al.* (2007) กับประชากรไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย เพื่อนำไปใช้จำแนกชนิดของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม ลดขั้นตอนและความยุ่งยากในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้สัณฐานวิทยา ซึ่งต้องใช้ตัวเต็มวัยในการจำแนก และต้องใช้นักวิชาการด้านไส้เดือนฝอยที่มีความเชี่ยวชาญ ดำเนินงานระหว่างปี พ.ศ. 2560-2561 โดยเริ่มจากการทดสอบคู่ไพรเมอร์ 194/195 ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม และคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้แก่ MI-F/MI-R, Inc-K14-F/Inc-K14-R, Finc/Rinc และ F/R พบว่าทุกคู่ไพรเมอร์ให้ผลผลิตปฏิกิริยา PCR ตรงตามรายงานต้นฉบับ ยกเว้นคู่ไพรเมอร์ F/R ที่ให้ผลผลิตปฏิกิริยาขนาดเล็กกว่าในรายงานต้นฉบับ และพบว่าคู่ไพรเมอร์ Inc-K14-F/Inc-K14-R เหมาะสมในการใช้ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* มากที่สุดเนื่องจากมีความไวสูงที่สุด ในปี พ.ศ. 2560 ตรวจตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปม 23 ประชากร จากตัวอย่างดิน จ. เพชรบูรณ์ จ. ฉะเชิงเทรา จ. ตาก จ. ราชบุรี จ. กาญจนบุรี จ.อุตรดิตถ์ จ. แม่ฮ่องสอน จ. เชียงใหม่ จ. ลำพูน จ. เชียงราย จ.นครศรีธรรมราช จ. ชุมพร จ. พังงา จ. สกลนคร จ. อุดรธานี จ.หนองคาย พบว่าทุกประชากรเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* โดยเปรียบเทียบกับลักษณะสัณฐานของริ้วรอยย่นส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมียพบว่าให้ผลตรงกัน ในปี พ.ศ. 2561 เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกพืชต่างๆ ใน จ. เชียงราย แม่ฮ่องสอน พะเยา เชียงใหม่ และน่าน รวม 107 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 13 ตัวอย่าง เมื่อเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมให้ได้ประชากรที่บริสุทธิ์โดยการเริ่มเลี้ยงจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม และตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง 13 ประชากร พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* 11 ตัวอย่างและ *M. javanica* 2 ตัวอย่าง การทดลองนี้ยืนยันความใช้ได้ของ Molecular Diagnostic Key ที่รายงานโดย Adam *et al.* (2007) ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ประชากรในประเทศไทยได้

ศรีมหาสารคาม

คำนำ

ไส้เดือนฝอยรากปมเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่มีความสำคัญ และทำความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรของประเทศไทยเป็นอย่างมากทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ ไส้เดือนฝอยรากปมมีหลายชนิด ชนิดที่สำคัญคือ *Meloidogyne incognita* และ *M. javanica* ปัจจุบันมีไส้เดือนฝอยรากปมที่ได้รับการจัดจำแนกแล้วมากกว่า 80 ชนิด (Karssen, 2002) การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมทำได้ยาก ในอดีตการจัดจำแนกจะใช้ลักษณะทางสัณฐาน เช่น ลักษณะของริ้วรอยย่นบริเวณส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเต็มวัยเพศเมีย ลักษณะของตัวอ่อนระยะที่สอง และตัวเต็มวัยเพศผู้ รวมทั้งข้อมูลของพืชอาศัยช่วยในการจัดจำแนก อย่างไรก็ตามลักษณะต่างๆ เหล่านี้มีความแปรปรวนสูงทำให้เกิดปัญหาในการจัดจำแนก ซึ่งปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคด้านอณูชีววิทยามาช่วยในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมได้ถูกต้องมีความสำคัญในการวางแผนการจัดการไส้เดือนฝอย เช่น การปลูกพืชหมุนเวียน การพัฒนาพันธุ์พืชต้านทาน และงานด้านการกักกันศัตรูพืช

นอกจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานแล้ว ได้มีการใช้ isozyme analysis ในการจำแนกไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมและสะดวกรวดเร็ว วิธีนี้ต้องใช้ตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัวในการทำ ไม่สามารถใช้ตัวอ่อนระยะที่สองหรือตัวเต็มวัยเพศผู้ในการทำได้ (Esbenshade and Triantaphyllou, 1990) เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนไม่เพียงพอ ซึ่งตัวเต็มวัยเพศเมียไม่สามารถแยกได้จากตัวอย่างดิน แต่ต้องแยกจากราก หรือส่วนของพืชเท่านั้น บางครั้งต้องเลี้ยงไส้เดือนฝอยในรากมะเขือเทศเพื่อให้ได้ตัวเต็มวัยเพศเมีย การใช้ตัวอ่อนระยะที่สองซึ่งสามารถแยกได้จากตัวอย่างดินโดยตรงในการจำแนกชนิดจะสะดวกรวดเร็วกว่ามาก ซึ่งมีประโยชน์ต่อการตัดสินใจในการจัดการไส้เดือนฝอยรากปมก่อนทำการปลูกพืช (Powers & Harris, 1993) Harris *et al.* (1990) ใช้เทคนิค PCR ในการจำแนกตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมเป็นครั้งแรกโดยการ amplify ส่วนของ mitochondrial DNA ต่อมา Powers & Harris (1993) ออกแบบไพรเมอร์ที่ amplify ดีเอ็นเอส่วนระหว่างยีน cytochrome oxidase II และ 16S rRNA และ digest ด้วย restriction enzymes สามารถจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมชนิดที่สำคัญ 5 ชนิดออกจากกันคือ *M. incognita M. javanica M. arenaria M. hapla* และ *M. chitwoodi* Williamson *et al.* (1977) จำแนก *M. hapla* และ *M. chitwoodi* โดยใช้ SCAR primers กับดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่สองเพียง 1 ตัว ซึ่งใช้ proteinase K ร่วมในการสกัดตัวอย่าง นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ดีเอ็นเอจากตัวอ่อนระยะที่สองเพียง 1 ตัวในการตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปม ด้วยวิธีต่างๆ Zijlstra *et al.* (2000) ใช้ nested PCR ในการจำแนก *M. hapla M. chitwoodi* และ *M. fallax* โดยใช้ SCAR primers Randig *et al.* (2001) ประสบความสำเร็จในการใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัวทำปฏิกิริยา PCR ได้ 4 ครั้ง Meng *et al.* (2004) ออกแบบ SCAR ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจง สำหรับจำแนก *M. incognita M. javanica* และ *M. areneria* โดยสามารถจำแนกได้จากตัวอ่อนระยะที่สอง 1 ตัว สามารถทำปฏิกิริยา PCR ได้ 3 ครั้ง Adam *et al.* (2007) ได้จัดทำแนวทางการจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม 7 ชนิดที่สำคัญทางเศรษฐกิจคือ *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. mayaguensis*, *M. hapla*, *M. chitwoodi* และ *M. fallax* โดยใช้เทคนิค SCAR (sequence characterized amplified region) และ RAPD (random amplified polymorphic DNA) ธนากรและ วราภรณ์ (2553) ใช้วิธี PCR ในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย 10 ไอโซเลต โดยใช้คู่ไพร

ศรีวิชัยการเกษตร

เมอร์จำเพาะต่อชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม พบว่าได้ผลตรงกับการจำแนกชนิดโดยการใช้รูปแบบริ้วรอยย่นส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมีย

งานวิจัยนี้เป็นการทวนสอบแนวทางการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมด้วยวิธีอณูชีววิทยา (Molecular Diagnostic Key) กับประชากรไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย โดยเปรียบเทียบกับวิธีการทางสัณฐานวิทยา เพื่อยืนยันความใช้ได้ของ Molecular Diagnostic Key ในการนำไปใช้จำแนกชนิดของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองชนิดที่สำคัญในประเทศไทย ได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

อุปกรณ์เก็บตัวอย่างดิน อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เครื่อง electrophoresis

- วิธีการ

การเก็บตัวอย่างดิน และรากพืช

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืชที่มีรายงานว่าเป็นพืชอาศัยของไส้เดือนฝอยรากปม โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 20 จุดต่อแปลง ความลึก ประมาณ 15-20 เซนติเมตรโดยใช้ท่อเก็บตัวอย่างดิน เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว คลุกเคล้าเข้าด้วยกันให้ได้ตัวอย่างดินอย่างน้อยแปลงละ 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติก บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์และชนิดพืชปลูก รวมทั้งเก็บตัวอย่างราก หรือส่วนของพืชที่แสดงอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมหากพบในพื้นที่

การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและพืช

แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดิน 250 กรัมโดยวิธีการล้างตัวอย่างดิน และกรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร วางบนตะแกรงที่มีขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างดินที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่างและนำตัวอย่างใส่ลงบนกระดาษกรอง ที่วางอยู่บนตะแกรงไนลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) ตรวจไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แยกไส้เดือนฝอยรากปมจากพืชโดยการคีบกลุ่มไข่จากรากหรือส่วนของพืชโดยตรง

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

นำต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนปลูกในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปมในกระถาง หลังจากนั้น 45 วัน ล้างรากมะเขือเทศด้วยน้ำสะอาด เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม โดยเริ่มเลี้ยงจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยใช้ปากคีบๆ กลุ่มไข่ 1 กลุ่มแช่ในน้ำสะอาดในถ้วยนับตัวอย่าง ตรวจดูการฟักของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ นำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยและไข่ใส่ลงในกระถางที่ปลูกต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือน เลี้ยงไว้ประมาณ 60 วัน เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยรากปมชนิดเดียวกันที่บริสุทธิ์ หากเป็นตัวอย่างรากที่มีกลุ่มไข่ จะเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยคีบกลุ่มไข่มาแช่ในน้ำกลั่น ตรวจดูการฟักของตัวอ่อนระยะที่สอง แล้วนำไปเทใส่ในต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนที่ปลูกในกระถางในดินอบ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ฆ่าเชื้อ เตรียมตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ โดยคีบกลุ่มไข่วางลงบนตะแกรงไนล่อนที่แช่อยู่ในน้ำสะอาดในจานเลี้ยงเชื้อ ได้ตัวอ่อนระยะที่สองในน้ำสะอาดสำหรับนำไปสกัดดีเอ็นเอ

การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน

จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานโดยเปรียบเทียบลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมีย (perineal patterns) เปรียบเทียบลักษณะ ความกว้างยาวและสัดส่วนของอวัยวะต่างๆ ของไส้เดือนฝอยรากปมเพศผู้ และตัวอ่อนระยะที่สองประกอบในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้นในการจำแนกได้ โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลจากตำราและรายงานตีพิมพ์

จำแนกตัวอ่อนระยะที่สองด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา

จำแนกตัวอ่อนระยะที่สองด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา โดยใช้ Molecular Diagnostic Key ที่จัดทำขึ้นโดย Adam *et al.,* 2007 การสกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอยใช้วิธีการตาม Schizas *et al.,* 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) ตามเอกสารที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ เขี่ยไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงบนหยด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 20 ไมโครลิตรบนสไลด์แก้ว ตัดตัวไส้เดือนฝอยออกเป็น 2-3 ท่อน โดยใช่ส่วนปลายของ 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 นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟชนิด 700 วัตต์ นาน 6 นาที นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยา PCR

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

ทดสอบคู่ไพรเมอร์ 194/195 ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม และทดสอบคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้แก่ MI-F/MI-R, Inc-K14-F/Inc-K14-R, Finc/Rinc และ F/R ในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อทดสอบประสิทธิภาพความสามารถในการทำปฏิกิริยา เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานไว้ พบว่าไพรเมอร์ MI-F/MI-R, Inc-K14-F/Inc-K14-R และ Finc/Rinc สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ได้ขนาดประมาณ 999, 400 และ 670 คู่เบสตามลำดับตรงตามขนาดที่มีรายงานไว้ ส่วนคู่ไพรเมอร์ F/R เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 500 คู่เบส ไม่ตรงตามที่มีรายงานไว้ที่ขนาด 1,350 คู่เบส (ภาพที่ 1.2.8.2) คู่ไพรเมอร์ Inc-K14-F/Inc-K14-R มีความไวในการตรวจมากที่สุด สามารถตรวจได้ที่ความเข้มข้นของจีโนมิคดีเอ็นเอต่ำสุด 10 นาโนกรัม ส่วนคู่ไพรเมอร์อื่น สามารถตรวจสอบได้ที่ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ 30 นาโนกรัม (ตารางที่ 1.2.8.2) เมื่อทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* กับตัวอย่างดีเอ็นเอของไส้เดือน

กรมวิชาการเกษตร

ฝอยรากปม *M. javanica* พบว่าทุกคู่ไพรเมอร์มีความจำเพาะเจาะจง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยรากปม *M. javanica* ได้ (ภาพที่ 1.2.8.2)

การเก็บตัวอย่างดินจาก จ. เพชรบูรณ์ จ. ฉะเชิงเทรา จ. ตาก จ. ราชบุรี จ. กาญจนบุรี จ.อุตรดิตถ์ จ. แม่ฮ่องสอน จ. เชียงใหม่ จ. ลำพูน จ. เชียงราย จ. นครศรีธรรมราช จ. ชุมพร จ. พังงา จ. สกลนคร จ. อุดรธานี จ. หนองคาย นำมาแยกไส้เดือนฝอยรากปม และเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมที่แยกได้ให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ โดยสุ่มกลุ่มไข่จากรากมะเขือเทศจากแต่ละตัวอย่าง จำนวน 10 กลุ่มไข่มาเลี้ยงขยาย ตรวจสอบลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมีย และตรวจตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ทั้ง 23 ประชากร (ตารางที่ 1.2.8.1) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 194/195 และคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง 4 คู่ พบว่าคู่ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่มีความจำเพาะเจาะจงกับไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* อย่างไรก็ตามการใช้คู่ไพรเมอร์ Inc-K14-F/Inc-K14-R ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* มีความเหมาะสมที่สุดนอกจากมีความจำเพาะเจาะจง แล้วยังมีความไวของการตรวจสูงกว่าคู่ไพรเมอร์คู่อื่นๆ ดังนั้นจึงใช้ไพรเมอร์คู่นี้ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* แทนคู่ไพรเมอร์ MI-F/MI-R ตามรายงานของ Adam *et al*., 2007

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยรากปม โดยใช้ลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมีย พบว่าไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง 23 ประชากรคือ *M. incognita* โดยลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมียของ *M. incognita* จะมีลักษณะรูปไข่ หรือกลม ส่วน dorsal arch สูงมีลักษณะเป็นเหลี่ยม เส้น striae มีลักษณะเป็นเส้นสั้นๆ ขยุกขยิก ไม่มี lateral field หรือมีเป็นลักษณะการสานกันของเส้น striae อย่างไรก็ตามการใช้ลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้นในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมทำได้ยาก เนื่องจากมีความแปรปรวนค่อนข้างสูง (ภาพที่ 1.2.8.1) ในปี พ.ศ. 2561เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกพืชต่างๆ ใน จ. เชียงราย แม่ฮ่องสอน พะเยา เชียงใหม่ และน่าน รวม 107 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 13 ตัวอย่าง เมื่อเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมให้ได้ประชากรที่บริสุทธิ์โดยการเริ่มเลี้ยงจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม และตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง 13 ประชากร โดยใช้ Molecular Diagnostic Key ตามรายงานของ Adam *et al*., 2007 พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* 11 ตัวอย่างและ *M. javanica* 2 ตัวอย่าง (ภาพที่ 1.2.8.3)

การทดลองนี้พบไส้เดือนฝอยรากปมเพียง 2 ชนิดคือ *M. incognita* และ *M. javanica* ซึ่งจากการใช้ Molecular Diagnostic Key ตามรายงานของ Adam et al., 2007 ในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* มีความถูกต้องแม่นยำน่าเชื่อถือ ไส้เดือนฝอยรากปม *M. javanica* ในการทดลองนี้มีเพียง 2 ประชากรอาจไม่เพียงพอสำหรับการสรุปความถูกต้องแม่นยำ การนำ Molecular Diagnostic Key ตามรายงานของ Adam *et al*., 2007 ไปใช้ในการจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่นๆ ในประเทศไทยก็ควรมีการทวนสอบด้วยเช่นเดียวกัน

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ประชากรในประเทศไทยโดยใช้ Molecular Diagnostic Key ตามรายงานของ Adams *et al*., 2007 ให้ผลถูกต้อง มีความน่าเชื่อถือสามารถนำมาใช้ตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในประเทศไทยได้ สำหรับการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม

M. javanica มีตัวอย่างเพียง 2 ตัวอย่าง จำเป็นต้องมีจำนวนตัวอย่างเพิ่มขึ้น เพื่อเพิ่มความมั่นใจในการนำคู่ไพรเมอร์ Fjav/Rjav ไปใช้ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *M. javanica* ต่อไป การนำไปใช้ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่นๆ ก็ควรมีการทวนสอบถึงความถูกต้องเช่นเดียวกัน

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ข้อมูลการใช้ Molecular Diagnostic Key ในการจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมชนิดที่สำคัญในประเทศไทย ทำให้เกิดความเชื่อมั่นในการนำไปใช้ การใช้วิธีทางอณูชีววิทยาในการจำแนกตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว และจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการจัดการ การคัดพันธุ์ต้านทาน และงานด้านการกักกันศัตรูพืช

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.8.1 List of 23 *M. incognita* population, crops and locations

No.	Crop	Location
1	*Solanum tuberosum*	Mae Ramat, Tak
2	*Solanum tuberosum*	Phop Phra, Tak
3	*Solanum tuberosum*	Phop Phra, Tak
4	*Solanum tuberosum*	Phop Phra, Tak
5	*Solanum tuberosum*	Phop Phra, Tak
6	*Solanum tuberosum*	Phop Phra, Tak
7	*Solanum tuberosum*	Phop Phra, Tak
8	*Solanum tuberosum*	Phop Phra, Tak
9	*Solanum tuberosum*	Phop Phra, Tak
10	*Solanum tuberosum*	Fang, Chiangmai
11	*Curcuma longa*	Thap Put, Phangnga
12	*Curcuma longa*	Takua Pa, Phangnga
13	*Curcuma longa*	Lang Suan, Chumphon
14	*Curcuma longa*	Lamae, Chumphon
15	*Curcuma longa*	Thung Tako, Chumphon
16	*Curcuma longa*	Cha-uat, Nakhon Si Thammarat
17	*Manihot esculenta*	Kumphawapi, Udon Thani
18	*Vigna unguiculata*	Phon Phisai, Nong Khai
19	*Musa* spp.	Phon Phisai, Nong Khai
20	*Capsicum annuum*	Sangkhom, Nong Khai
21	*Musa* spp.	Sangkhom, Nong Khai
22	*Manihot esculenta*	Nam Som, Udon Thani
23	*Solanum lycopersicum*	Phu Phan, Sakon Nakhon

กรมวิทยาศาสตร

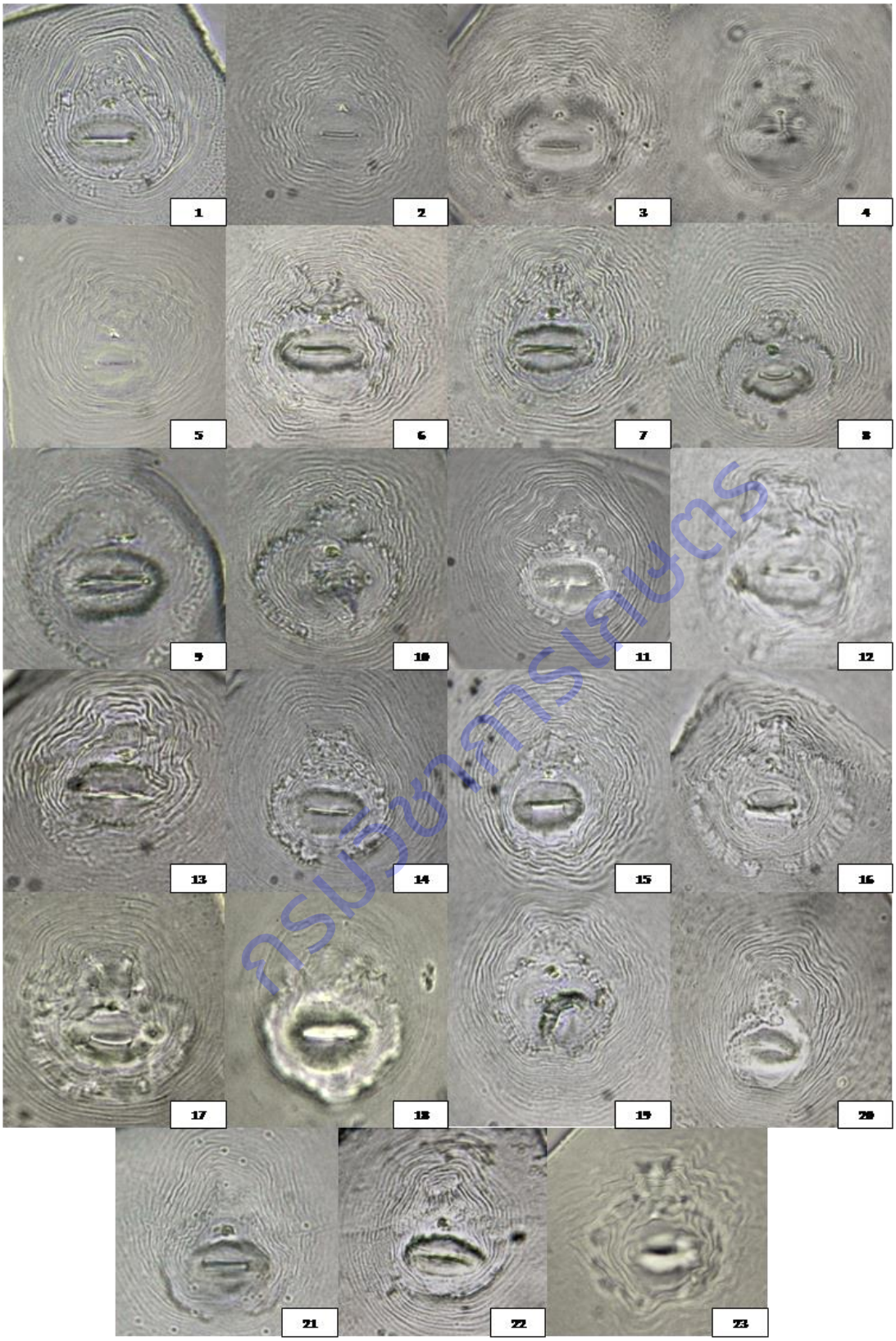
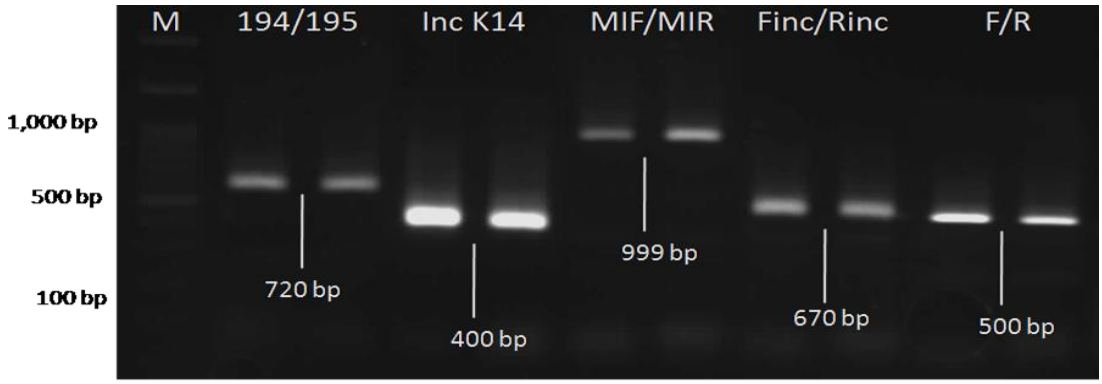
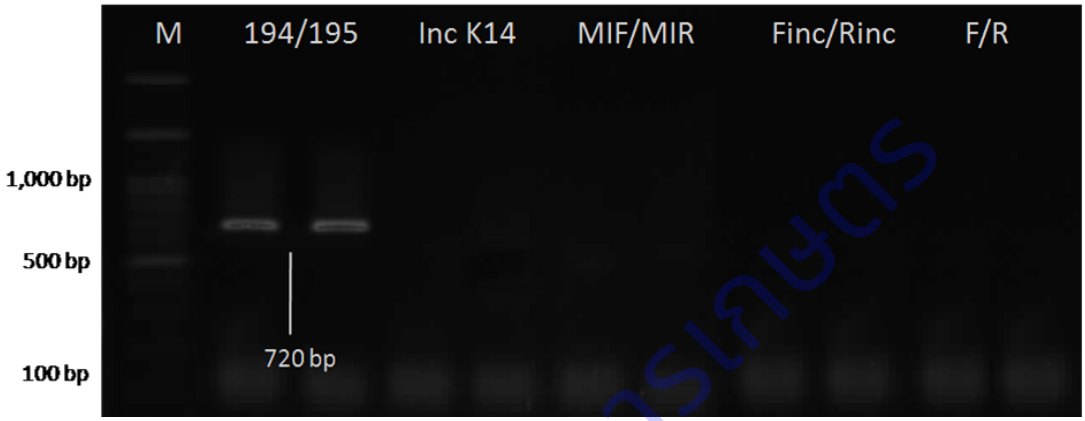


Figure 1.2.8.1 Perineal patterns of 23 *M. incognita* populations.



M. incognita



M. javanica

Figure 1.2.8.2 Test of 194/195 primer for root-knot nematode identification and 4 specific primers (MI-F/MI-R, Inc-K14-F/Inc-K14-R, Finc/Rinc and F/R) for *M. incognita* identification. *M. incognita* (above) *M. javanica* (below)

Table 1.2.8.2 Sensitivity of each primers sets on the detection of *M. incognita* DNA.

Primers	*M. incognita* DNA concentration		
	30 ng	20 ng	10 ng
IncK-14-F/Inck-14-R	√	√	√
MI-F/MI-R	√	-	-
194/195	√	-	-
Finc/Rinc	√	-	-
F/R	√	-	-

กรมวิชาการเกษตร

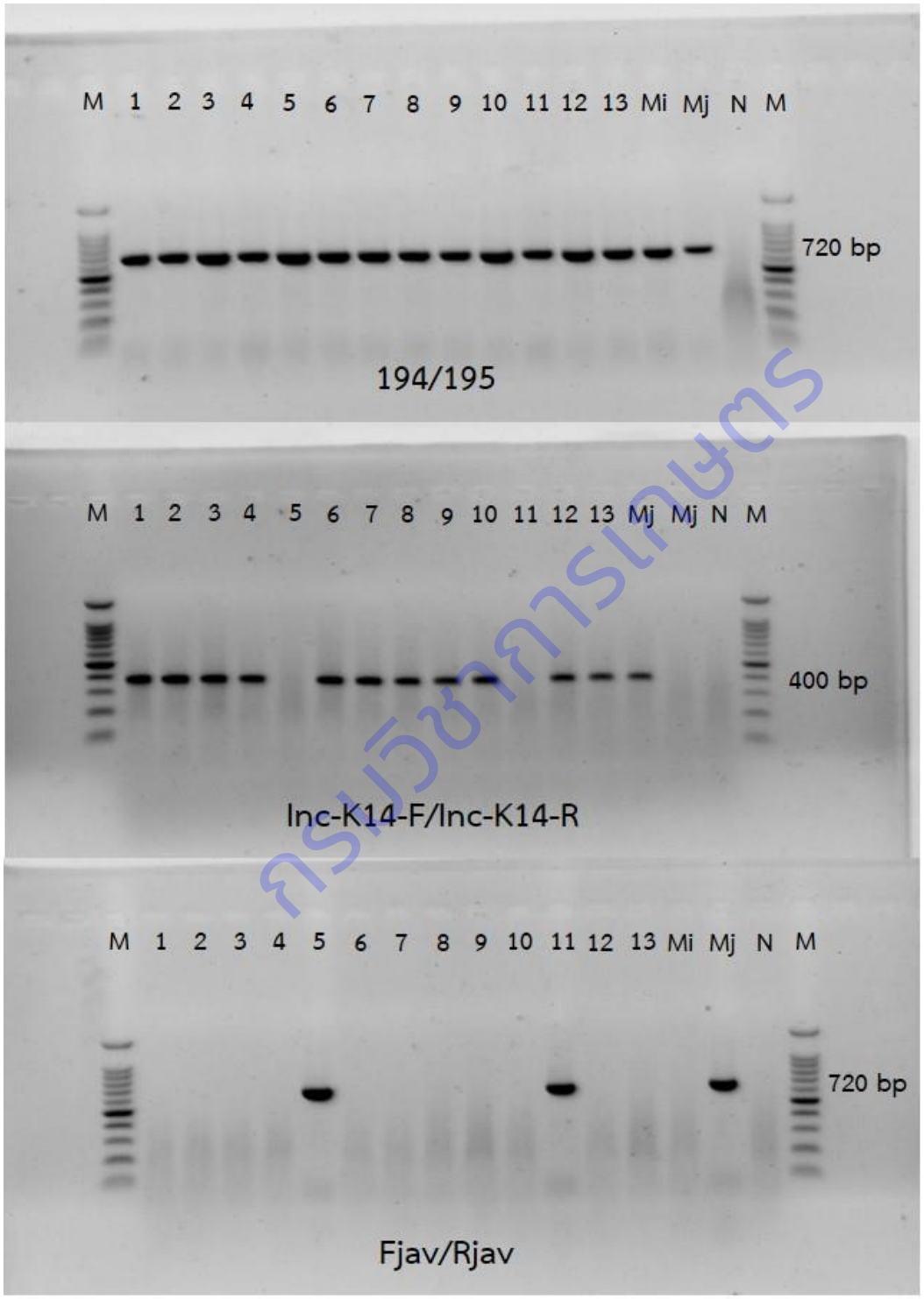


Figure 1.2.8.3 Identification of *M. incognita* and *M. javanica* using 194/195, Inc-K14-F/Inc-K14-R and Fjav/Rjav primers.

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.8.3 Root-knot nematodes molecular diagnostic key (Adam *et al*., 2007)

1. Amplify the amplifly the IGS between 5S and 18S ribosomal genes using 194/195 primers			
	a) 720-bp product	Tropical species.....	go to (2)
	b) 780-bp product	*M. mayaguensis* (now *M. enterolobii*)	
	c) 700-bp product	*M. hapla*.....	go to (3)
	d) 1,700- to 1,800-bp products	*M. fallax and M. chitwoodi*.....	go to (3)
	e) Other size, clone and sequence		
2. Tropical RKN specific SCAR primers			
	2.1 Fjav and Rjav primers		
	a) 720-bp product	*M. javanica*	
	b) No product.....		go to (2.2)
	2.2 MI-F and MI-R primers		
	a) 999-bp product	*M. incognita*	
	b) No product.....		go to (2.3)
	2.3 Far and Rar primers		
	a) 420-bp product	*M. arenaria*	
3. JMV primers			
	a) 540-bp product	*M. chitwoodi*	
	b) 670-bp product	*M. fallax*	
	c) 440-bp product	*M. hapla*	

Table 1.2.8.4 Primer sequences, specificity and sources.

Primer code	Primer sequence 5′-3′	Specificity and source
194	TTAACTTGCCAGATCGGACG	5S-18S rDNA
195	TCTAATGAGCCGTACGC	Blok et al. (1997)
MI-F	GTGAGGATTCAGCTCCCCAG	*M. incognita* SCAR
MI-R	ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC	Meng et al. (2004)
Inc-K14-F	GGGATGTGTAAATGCTCCTG	*M. incognita* SCAR
Inc-K14-R	CCCGCTACACCCTCA ACT TC	Randig et al. (2002)
Finc	CTCTGCCCAATGAGCTGTCC	*M. incognita* SCAR
Rinc	CTCTGCCCTCACATTAGG	Zijlstra et al. (2000)
F	CTCTGCCCTCACATTAGG	*M. incognita* SCAR
R	CAGATATCTCTGCATTGGTGC	Dong et al. (2001)

กรมวิชาการเกษตร

Tabel 1.2.8.5 PCR amplification profiles for different primers.

		45 cycles			
		50 °C (194/195)			
		62 °C (MI-F/ MI-R)			
		64 °C (Inc-k14-F/ Inc-k14-R)			
94 °C	94°C	54 °C (Finc/Rinc)	72°C	72°C	4°C
5 min	1 min	50°C (F/R)	90 secs (194/195)	7min	∞
		1 min	1min		

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.2.10 การศึกษาและจำแนกโรค *Leek yellow stripe virus* (LYSV) ในกระเทียม

Study and Identification of *Leek yellow stripe virus* (LYSV) disease on garlic

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[2]

บทคัดย่อ

การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) ในกระเทียม เกิดจากเชื้อไวรัสกลุ่ม Potyvirus เก็บตัวอย่างใบกระเทียมที่แสดงลักษณะอาการเป็นแถบสีเหลืองอ่อนที่ส่วนปลายใบและเป็นขีดๆ บนใบ ตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ในแปลงปลูกด้วยชุดตรวจสอบ Pocy kit ก่อนนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยใช้เทคนิค Brandes' dip พบอนุภาคไวรัสชนิดท่อนยาวคด (flexuous rod) มีขนาดความยาว 550-650 นาโนเมตร และ 800-820 นาโนเมตร ปะปนอยู่ด้วยกัน ได้ตรวจจำแนกเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primer LYSV_1F 5'ACAAGTAAGAAACAGAAGGACAGC3' LYSV_2R 5'GAGGTTCCATTTT CAATGCACCAC3' พบแถบอาร์เอ็นเอ LYSV ขนาดประมาณ 409 คู่เบส ตัวอย่างที่ 1, 2 และ 4 จึงทำการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัส บนพืชทดสอบทั้ง 3 ชนิด คือ *Nicotiana benthamiana*, *Chenopodium quinoa* และ *Vigna Sinensis* ในโรงเรือนควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-28 ℃ ตรวจพบอาการอาการจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) หลังปลูกเชื้อได้ 12-14 วัน บน *C. Quinoa* ส่วน *N. benthamiana* และ *V. sinensis* ไม่แสดงอาการปรากฏให้เห็น

คำหลัก: กระเทียม, *Leek yellow stripe virus* (LYSV)

Abstract

The diagnosis of *Leek Yellow Stripe Virus* (LYSV) in garlic happened from a group of Potyvirus. To begin with, the garlic leaves which show the symptoms of chlorotic yellow stripe at the tip and a small streak on the leaves are collected in order to search for a Potyvirus group in the field with the examination kit, named Pocy kit. After that, they would be studied through the electron microscopy with the technique of Brandes' dip and the flexuous rod virus which has 550 to 650 nanometres and 800 to 820 of length is found jointly. Moreover, the virus is classified examined by the technique of RT-PCR by using primer LYSV_1F5'ACAAGTAAGAAA CAGAAGGACAGC3' LYSV_2R 5' GAGGTTCCATTTTCAATGCACCAC3' which can be found around the side of RNA LYSV containing 409 base pairs approximately as in the 1st, 2nd and 4th examples.

กรมวิชาการเกษตร

To be in the next step, the virus transfer would be studied in the differential host plants including *Nicotiana Benthamiana*, *Chenopodium Quinoa*, and *Vigna Sinensis* in the greenhouse with the controlled temperature around 25 to 28 °C. From the symptom examination, the chlorotic yellow spot is found in *C. Quinoa* after 12 to 14 days of virus inoculation; however, the symptom is not shown in *N. Benthamiana* and *V. Sinensis*.

Keywords: garlic, *Leek yellow stripe virus* (LYSV)

คำนำ

ปัจจุบันมีการปลูกกระเทียมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งต้องประสบปัญหาการระบาดของแมลงและโรคที่มีเชื้อสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไส้เดือนฝอย รวมทั้งไวรัส ส่งผลกระทบต่อผลผลิตและคุณภาพของกระเทียม ซึ่งโรคไวรัสที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Leek yellow stripe virus* (LYSV) เป็นเชื้อในกลุ่ม Potyviruses เมื่อติดเชื้อ LYSV ในแปลงสามารถเข้าทำลายต้นหอมได้ถึง 100% (Bos, 1983) ส่วนการสูญเสียผลผลิตในกระเทียมสูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ และมากถึง 84 เปอร์เซ็นต์ เมื่อติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นในกลุ่ม potyvirus ร่วมด้วย อัตราการงอกในกระเทียมได้รับผลกระทบและลดลงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ (Lot *et al*., 1998) ซึ่งโรคนี้มีเพลี้ยอ่อน *Myzus persicae* และ *Aphis fabae* เป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ ทำให้เกิดการแพร่ระบาดในแปลงปลูกและเป็นแมลงปากดูดที่มีความสำคัญต่อการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส (Lunello *et al*., 2002) พืชสกุลกระเทียม (*Allium* spp.) อยู่ในวงศ์ Alliaceae เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ต่างจากพืชผักในสกุลอื่นๆ ซึ่งส่วนมากเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ มีแหล่งปลูกทั่วโลก พืชสกุลหอมกระเทียมได้แก่ หอมหัวใหญ่ (Onion, *A. cepa* L.) Potato Onion (*A. cepa* var. aggregatum G. Don) หอมแดงและหอมแบ่ง (Shallot, *A. ascalonicum* L.) กระเทียม (Garlic, *A. sativum* L.) เป็นต้น ในประเทศไทยพืชสกุลหอมกระเทียมที่ปลูกมากและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่ หอมหัวใหญ่ หอมแดง กระเทียม เป็นพืชที่เกี่ยวข้องกับชีวิตประจำวันของไทยแทบทุกครัวเรือน ใช้ปรุงเป็นอาหาร ทำยา และเครื่องสำอาง นอกจากปลูกเพื่อบริโภคภายในประเทศแล้ว ยังส่งออกขายในต่างประเทศทำรายได้ให้เกษตรกรอย่างมาก กระเทียมมีพื้นที่ปลูกทางภาคเหนือ คือ จังหวัดเชียงราย พะเยา ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ตาก แพร่ น่าน อุตรดิตถ์ เพชรบูรณ์ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ จังหวัดนครพนม ศรีสะเกษ ชัยภูมิ และนครราชสีมา ในปี พ.ศ. 2551 มีพื้นที่ปลูกรวม 87,411 ไร่ ได้ผลผลิต 85,648 ตัน ส่งออกจำนวน 199.2 ตัน มีมูลค่าการส่งออก 8.2 ล้านบาท (กลุ่มวิจัยโรคพืช, 2545) เชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) เป็นเชื้อในกลุ่ม Potyviruses ซึ่งเมื่อเชื้อ LYSV เข้าทำลายในกระเทียม จะทำให้เกิดแถบสีเหลืองอ่อนที่ส่วนปลายใบ และเป็นขีดๆ มีขนาดเล็กสีเหลืองและทำให้เกิดแถบสีเหลืองผิดปกติบนใบ ส่งผลต่อการสูญเสียผลผลิตพืช Allium โดยเฉพาะอย่างยิ่งใกล้ฐานแต่ไม่ได้จำกัดอยู่ในพื้นที่นี้ ในบางกรณีใบทั้งหมดสามารถเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (Bos *et al*., 1978)

ศรีษะเกษ

ดังนั้นเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาจำแนกเชื้อไวรัส LYS) ในกระเทียม โดยทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนดูอนุภาค ศึกษาการถ่ายทอดโรคกับพืชทดสอบ และตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยา ด้วยวิธี ELISA หรือใช้วิธี RT-PCR และยังใช้เป็นวิธีช่วยทวนสอบให้ชัดเจนมากขึ้น โดยออกแบบ primers ที่เฉพาะเจาะจง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
- Ultra-centrifuge
- Spectrophotometer
- ตู้แช่แข็ง 4 และ -20 0C
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการปลูกเชื้อไวรัส
- พืชทดสอบและพืชอาศัย

วิธีการ

1. ตรวจเก็บตัวอย่างใบกระเทียม

ทำการเก็บตัวอย่างใบที่แสดงลักษณะอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) ในแปลงปลูกของเกษตรกรในพื้นที่ จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดลำพูน ระหว่างเดือนตุลาคม 2559-สิงหาคม 2560 มาศึกษาลักษณะอาการและตรวจหาเชื้อ LYSV

2. การตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV)

2.1 ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นำตัวอย่างกล้วยไม้จากรังกล้วยไม้ ในแต่ละแหล่งปลูกที่เก็บรวบรวมในข้อ 1 มาตรวจสอบหาเชื้อไวรัสโดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนด้วยเทคนิค Brandes' dip โดยบดตัวอย่างใบพืชใน 0.05 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 บนแผ่นไสลด์ ใช้คีมคีบกริด (grid) ขนาด 300 mesh (มีช่องสี่เหลี่ยม 300 ช่องต่อตารางนิ้ว) ที่เคลือบด้วย colloidion เพื่อเป็นเยื่อรองรับบนกริดและเคลือบทับด้วยคาร์บอน (carbon) ฟิล์มบนผิวด้านหน้า มาคว่ำแตะลงบนน้ำคั้นพืช แล้วซับส่วนที่เป็นของเหลวรอบกริดให้แห้งด้วยกระดาษกรอง แล้วจึงนำไปเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น ก่อนนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope) HITACHI H-7700

2.2 การตรวจสอบด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบกระเทียมที่เป็นโรคโดยนำตัวอย่างใบกระเทียมที่เป็นโรค น้ำหนัก 100-200 มิลลิกรัม บดในไนโตรเจนเหลวจนละเอียด ย้ายตัวอย่างลงในหลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร เติม extraction buffer (0.1 M NaCl, 2% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 9.0) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วเติม β-mercaptoethanol ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย vortex และบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เติม Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสใส่เหลอดใหม่ แล้ว

ศูนย์วิทยทรัพยากร

เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) หนึ่งเท่าของปริมาตรส่วนใส ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อ นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่แล้ว เติม Isopropanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ 5M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ที่แช่เย็นปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C เป็นเวลา 2 นาทีเทส่วนใสทิ้ง แล้วตากตะกอนประมาณ 20 นาที และเติม diethylpyrocarbonate (DEPC)–dH2O ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C

ทำการออกแบบหรือสืบค้นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนใน ribosome ของไวรัสตรงยีนในส่วนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein gene) ของ LYSV เพื่อนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณ cDNA และตรวจสอบโรค LYSV

3. ศึกษาการถ่ายทอดเชื้อบนพืชทดสอบ

นำตัวอย่างใบกระเทียมที่แสดงลักษณะอาการของโรคและที่ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแล้วพบเชื้อ LYSV มาปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ โดยบดใบพืชที่เป็นให้ละเอียดผสมกับ sodium phosphate buffer pH 7.5 ผสมผงซีไลท์ (celite) นำน้ำคั้นทาลงบนใบพืชทดสอบ ได้แก่ ยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*), ถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) และคีโนโปเดียม (*Chenopodium quinoa*) แล้วล้างใบพืชด้วยน้ำสะอาด นำพืชทดสอบไปไว้ในโรงเรือนปลูกพืชทดสอบควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน หลังจากนั้นทำการตรวจสอบอาการของพืชทดสอบเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2560 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2561

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ตรวจเก็บตัวอย่างใบกระเทียม และนำไปทดสอบหาเชื้อในพืชทดสอบไวรัส

ได้ทำการเก็บตัวอย่างใบกระเทียมที่มีอาการเป็นแถบสีเหลืองอ่อนและเป็นขีด ๆ บนใบมีขนาดเล็กและทำให้เกิดแถบสีเหลืองผิดปกติบนใบ เป็นลักษณะอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) จากแปลงปลูกกระเทียมของเกษตรกรในพื้นที่ อ.ไชยปราการ อ.ฝาง จังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำพูน จำนวน 21 ตัวอย่าง ในระหว่างเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน 2560 ในเบื้องต้นได้ใช้ชุดตรวจสอบ POCY kit ของกล้วยไม้ ตรวจตัวอย่างใบกระเทียมที่มีลักษณะอาการดังกล่าวเนื่องจากเชื้อไวรัส LYSV เป็นเชื้อไวรัสที่จัดอยู่ในกลุ่ม Potyvirus ซึ่งผลการตรวจสอบพบเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus กับตัวอย่างใบกระเทียม (Figure 1.2.10.1)

2. การตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV)

ศรีวิชาการเกษตร

2.1 ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ทำการตรวจหาเชื้อไวรัส LYSV โดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนด้วยเทคนิค Brandes' dip นำตัวอย่างใบกระเทียมมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า การตรวจดูด้วยกล้องนั้น พบอนุภาคไวรัส 2 กลุ่ม รวมปะปนอยู่ด้วยกัน (Figure 1.2.10.2) ดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นอนุภาคไวรัสชนิดท่อนยาวคด (flexuous rod) มีขนาดความยาวประมาณ 550-650 นาโนเมตร

กลุ่มที่ 2 เป็นอนุภาคไวรัสชนิดท่อนยาวคด (flexuous rod) มีขนาดความยาวประมาณ 800-820 นาโนเมตร

และไม่พบอนุภาคไวรัสในตัวอย่างใบกระเทียมปกติ ซึ่งอนุภาคที่ตรวจพบจัดอยู่ในกลุ่ม Potyvirus สอดคล้องกับรายงานของ Fajardo *et al*., (2001)

2.2 การตรวจสอบด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

ผล PCR ตัวอย่างกระเทียม ทำการตรวจสอบใบกระเทียม ที่มีลักษณะอาการใบเป็นแถบสีเหลืองอ่อนที่ส่วนปลายใบและเป็นขีด ๆ บนใบมีขนาดเล็กและทำให้เกิดแถบสีเหลืองผิดปกติบนใบ (Figure 1.2.10.1) และเมื่อได้เก็บตัวอย่างใบกระเทียมที่มีลักษณะอาการดังกล่าว มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอ ด้วยชุดสกัด 4 ตัวอย่าง และนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primer LYSV_1F 5' ACAAGTAAGAAACAGAAGGACAGC 3' LYSV_2R 5' GAGGTTCCATTTTCAAT GCACCAC 3' (Fajardo *et al*., 2001) หลังตรวจสอบด้วย 1.2% อะกาโรสเจล พบว่ามีปฏิกิริยาเป็นบวก สามารถเกิดแถบอาร์เอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 409 คู่เบส (Figure 1.2.10.3)

3. การตรวจสอบและศึกษาการถ่ายทอดเชื้อโดยใช้พืชทดสอบ

หลังนำน้ำคั้นใบกระเทียมที่แสดงลักษณะอาการของโรคและได้ตรวจสอบแล้วว่าพบเชื้อ LYSV ที่ผสมผงซีไลท์ (celite) มาทาลงบนบนพืชทดสอบและนำพืชทดสอบไปไว้ในโรงเรือนควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส พร้อมสังเกตอาการและตรวจสอบอาการต้นพืชทดสอบในเรือนทดลอง หลังจากปลูกเชื้อแล้วเป็นระยะเวลา 2 เดือน ซึ่งจากผลการทดลองหลังปลูกเชื้อแล้ว 12-14 วัน ตรวจไม่พบอาการ systemic บนพืชทดสอบ และหลังปลูกเชื้อครบ 2 เดือน พบว่า ต้นพืชทดสอบยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*) และถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) ไม่แสดงอาการปรากฏให้เห็น มีเพียงคีโนโปเดียม (*Chenopodium quinoa*) ที่แสดงอาการอาการจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบที่ปลูกเชื้อ หลังปลูกเชื้อได้ 12-14 วัน (Figure 4) และในพืชทดสอบทั้ง 3 ชนิด ไม่พบอาการที่เกิดจากเชื้อในกลุ่ม Potyvirus ซึ่งจะแสดงลักษณะอาการด่างเป็น systemic symptom ให้เห็น สอดคล้องกับรายงานของ สุวรรณาและคณะ, 2536 ที่พบว่าการใช้น้ำคั้นใบกระเทียมที่เป็นโรคปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบด้วยวิธีกลนั้น พบแผลจุด local lesion หลังปลูกเชื้อได้ 7 วัน ในขณะที่พืชทดสอบอื่นไม่แสดงอาการ ซึ่งการปลูกเชื้อลงพืชทดสอบนั้นทำได้ยาก ต้องปลูกเชื้อซ้ำ 2-3 ครั้ง และต้องเลี้ยงพืชในสภาพที่อุณหภูมิต่ำ 13-17 องศาเซลเซียส พืชจึงแสดงอาการของโรคปรากฏให้เห็น (Bos *et al*., 1978)

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ตัวอย่างใบกระเทียมที่แสดงลักษณะอาการเป็นแถบสีเหลืองอ่อนที่ส่วนปลายใบและเป็นขีด ๆ บนใบมีขนาดเล็กและทำให้เกิดแถบสีเหลืองผิดปกติบนใบ จากแปลงปลูกกระเทียมของเกษตรกรในพื้นที่ อ.ฝาง อ.ไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำพูน จำนวน 21 ตัวอย่าง โดยได้ตรวจในเบื้องต้นด้วยชุดตรวจสอบ POCY kit เนื่องจากเชื้อไวรัส LYSV เป็นเชื้อไวรัสที่จัดอยู่ในกลุ่ม Potyvirus จากผลการตรวจสอบกับตัวอย่างใบกระเทียม ถ้าพบว่ามีเชื้อในกลุ่ม Potyvirus จะนำตัวอย่างใบกระเทียมดังกล่าวมาศึกษาลักษณะอาการของโรคและลักษณะของอนุภาค ซึ่งจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบขนาดอนุภาคไวรัส 2 ขนาด คืออนุภาคไวรัสเป็นชนิดท่อนยาวคด (flexuous rod) มีขนาดความยาวประมาณ 800-820 นาโนเมตร ซึ่งอนุภาคที่ตรวจพบจัดอยู่ในกลุ่ม Potyvirus สอดคล้องกับรายงานของ Fajardo *et al*., (2001) และยังพบขนาด 550-650 นาโนเมตร เป็นอนุภาคที่สั้นกว่าปะปนอยู่ด้วยและเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ด้วย primer LYSV_1F และ LYSV_2R พบเชื้อ LYSV ขนาดประมาณ 409 คู่เบส และเมื่อศึกษาบนพืชทดสอบได้แก่ ยาสูบ (*N. benthamiana*), chenopodium (*C. quinoa*) และถั่วพุ่ม (*V. sinensis*) ในโรงเรือนควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส พบว่าต้นพืชทดสอบยาสูบ (*N. benthamiana*) และถั่วพุ่ม (*V. sinensis*) ไม่แสดงอาการปรากฏให้เห็น มีเพียงคีโนโปเดียม (*C. quinoa*) ที่แสดงอาการอาการจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบที่ปลูกเชื้อ หลังปลูกเชื้อได้ 12-14 วัน และต้องมีการปลูกเชื้อซ้ำหลายรอบ

Figure 1.2.10.1 presenting the characteristics of *Leek Yellow Stripe Virus* (LYSV) in garlic leaves.

กรมวิชาการเกษตร

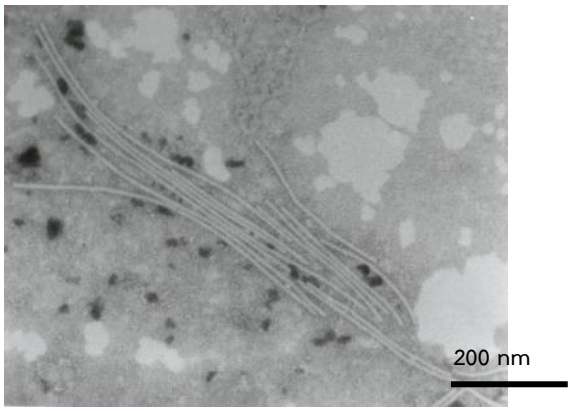


Figure 1.2.10.2 presenting the particle of *Leek Yellow Stripe Virus* in the garlic leaves showing the symptoms of chlorotic yellow stripe and a small streak on the leaves which is dipped with the negative Brandes method and is examined under the HITACHI H-7700 transmission electron microscopy in the magnification of 70,000 times (80 kv) and in the approximate particle size of 800 to 820 nanometres.

กรมวิชาการเกษตร

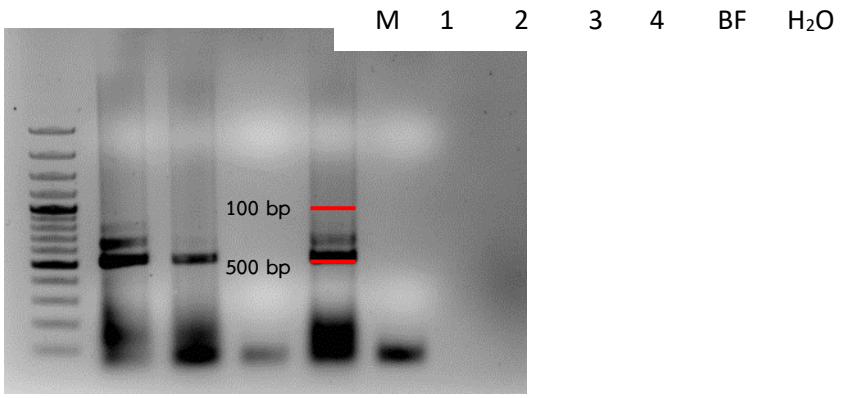


Figure 1.2.10.3 analysing the RT-PCR result of *Leek Yellow Stripe Virus* with primer (LYSV_1F and LYSV_2R) in the size of 409 base pairs which M is DNA Ladder 1kb DNA marker (Thermo ®) 1 to 4 are the examples of the garlic leaves which show the symptoms of chlorotic yellow stripe and a small streak on the leaves resembling the virus in the cultivated plant at Chai Prakan and Fang districts in Chiang Mai and Lamphun provinces which 3 examples are found. 5 is Buffer and 6 is H_2O

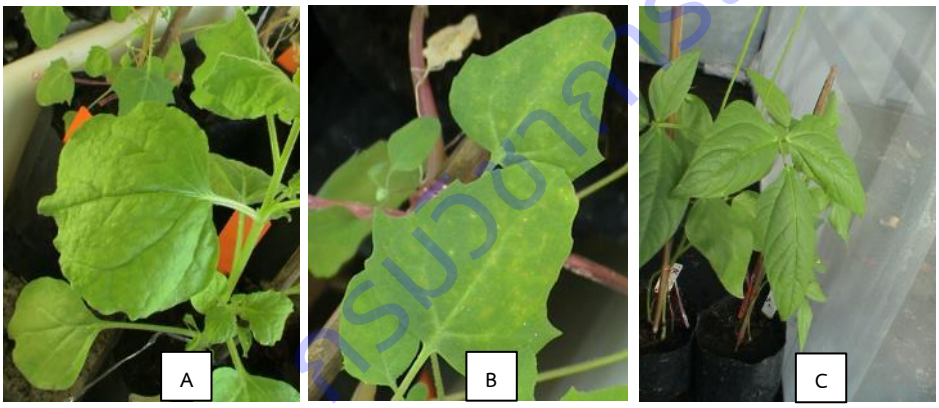


Figure 1.2.10.4 The characteristics of the plants symptoms after inoculating the *Leek Yellow Stripe Virus*

A) *Nicotiana Benthamiana* does not show the symptom

B) *Chenopodium Quinoa* contains the chlorotic yellow spot in 12 to 14 days after inoculating the virus; however, if this symptom is from Potyvirus, it will be spotted as systemic symptom.

C) *Vigna Sinensis* does not show the symptom.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

การทดลองที่ 1.2.11 ศึกษาชนิดและเขตการแพร่กระจายของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

Species and Distribution of *Colletotrichum* spp. Causing Chilli Anthracnose Disease.

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง ธารทิพย ภาสบุตร สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน นายอภิรัชต์ สมฤทธิ์

นางสาวอมรรัชฎ์ คิดใจเดียว

นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน

สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาชนิดและเขตการแพร่กระจายของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก โดยการเก็บตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสจากพื้นที่ปลูกพริกทุกภาคของประเทศไทย ระหว่างเดือน ตุลาคม 2560 ถึง เดือนกันยายน 2562 นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อจำแนกชนิดรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรค ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของรา *Colletotrichum* spp. แบ่งกลุ่มตามลักษณะรูปร่างของโคนิเดียเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มโคนิเดียรูปร่างทรงกระบอกหรือรูปกระสวยตรงและกลุ่มโคนิเดียรูปร่างโค้งคล้ายพระจันทร์เสี้ยว ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA พบว่าแต่ละไอโซเลตลักษณะโคโลนีมีความหลากหลาย การเจริญของเส้นใยมีความเร็วในการเจริญและสีที่แตกต่างกัน ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในครั้งนี้ จำแนกรา *Colletotrichum* spp. ที่เป็นสาเหตุหลักของโรคแอนแทรคโนสพริกได้ 3 ชนิด คือ *Colletotrichum acutatum* ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากที่สุด รองลงมาได้แก่รา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum capsici* ตามลำดับ จากการศึกษาความสัมพันธ์ของ clear zone และชนิดของรา *Colletotrichum* spp. โดยเลี้ยงรา *Colletotrichum* spp. ที่จัดกลุ่มไว้บนอาหาร Casein hydrolysis medium (CHM) พบว่ารา *Colletotrichum acutatum* สร้าง clear zone ได้ชัดเจนที่สุด มีความกว้างของ clear zone กว้างที่สุด รองลงมาได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum capsici* ตามลำดับ บนอาหาร CBM พบ *Colletotrichum acutatum* และ *Colletotrichum gloeosporioides* สร้าง clear zone ได้ชัดเจนและกว้างกว่า *Colletotrichum capsici* ที่สร้าง clear zone แคบที่สุดและบางไอโซเลตไม่สร้าง clear zone

คำหลัก: *Colletotrichum* spp., โรคแอนแทรคโนสพริก

กรมวิชาการเกษตร

Abstract:

Chili fruit showing symptoms of anthracnose were collected from chili cultivation area of Thailand during October 2017 to March 2019. The samples were studied to identify species based on morphology characteristics. Divide *Colletotrichum* spp. into two groups according to the shape of conidia, the cylindrical or fusiform conidia and the curved crescent-shaped of conidia. The mycelium characteristics on potato dextrose agar showed variation of each species e.g. color of mycelium and growth rate. In this study Microscopic studies was made and most isolate were identified as *Colletotrichum acutatum Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici*, respectively. All isolates were grown on casein hydrolysis medium (CHM) then clear zone was assessed. *C. acutatum* displayed the greatest clear zone and the widest, followed by *C. gloeosporioides* and *C. capsici*, respectively. On casein from bovine milk medium (CBM), *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* were found to create a clearer and wider clear zone but *C. capsici* that create the narrowest clear zone and some isolates do not create clear zone.

Keywords: *Colletotrichum* spp., Chilli Anthracnose Disease

คำนำ

พริก (*Capsicum* spp. ; Chilli) เปนพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ที่นิยมปลูกได้แก่ พริกขี้หนูผลใหญ่ พริกชี้ฟ้า พริกขี้หนูสวน พริกหยวก พริกเหลือง พริกหนุ่ม พริกกะเหรี่ยง และ พริกหวาน เป็นต้น เมื่อนำพริกแต่ละชนิดมาจัดกลุ่ม จัดได้ 3 กลุ่มคือ 1.กลุ่มพริกใหญ่ (*Capsicum annuum* L.) พริกกลุ่มนี้จะมีขนาดผลกว้างประมาณ 1-3 เซนติเมตร ยาว 8-20 เซนติเมตร มีความเผ็ดในระดับน้อยถึงเผ็ดปานกลาง พริกที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มพริกใหญ่ ได้แก่ พริกบางช้าง พริกมัน พริกหนุ่ม พริกเหลือง พริกซอส และพริกหวาน 2.กลุ่มพริกขี้หนูใหญ่ (*Capsicum annuum* L.) ขนาดของผลโดยประมาณกว้าง 0.3-1 เซนติเมตร ผลยาว 3-8 เซนติเมตร มีรสเผ็ด พริกที่จัดอยู่ในกลุ่มพริกขี้หนูใหญ่ ได้แก่ พริกจินดา พริกหัวเรือ พริกห้วยสีทน พริกยอดสนและพริกช่อ 3. กลุ่มพริกขี้หนูเล็ก (*Capsicum frutescens* L.) ขนาดผลโดยประมาณยาวน้อยกว่า 3 เซนติเมตร พริกขี้หนูผลเล็กเป็นพริกที่มีรสเผ็ดจัด ตัวอย่างพริกขี้หนูเล็ก ได้แก่ พริกขี้หนูหอม พริกขี้นกและพริกกะเหรี่ยง (วิลาวัณย์, 2557) ในระบบการปลูกพริกโรคที่สำคัญที่สุดโรคหนึ่งคือ โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) หรือ โรคกุ้งแห้งของพริก ซึ่งจะพบระบาดทำความเสียหายต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิตพริกในแปลงปลูกพริกของเกษตรกรในทุกแหล่งปลูก (นิรนาม, 2552) มีรายงานว่าเกิดจากราสกุล *Colletotrichum* มากกว่าหนึ่งชนิด (species) ได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler & Bisby *Colletotrichum acutatum* Simmonds และ *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes (สุดารัตน์และเพชรรัตน์, 2552; Than *et.al*., 2008) การแพร่ระบาดของโรคนี้เกิดจากโคนิเดียของเชื้อราบนผลพริกที่เป็นโรคแพร่ไปกับลม น้ำฝน และแมลง เชื้อราอยู่ข้ามฤดูปลูกโดยเส้นใย ราที่อาศัยอยู่ในเมล็ดจะเข้าทำลายต้นกล้าในระยะพืชงอกเป็นต้นกล้าเกิดอาการกล้าเน่าตายและเข้าทำลายพืชต่อเนื่องในระยะติดผลกระทั่งผลเริ่มสุกแก่ (Chandra

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

et al., 2009; Than *et.al*., 2008) ลักษณะอาการส่วนใหญ่มักพบบนผลพริกในระยะเริ่มสุกก่อนที่จะเปลี่ยนสี อาการในระยะแรกจะปรากฏเป็นจุดฉ่ำน้ำเล็กๆ แผลบุ๋มลึกลงไปเล็กน้อย ต่อมาแผลขยายขนาดออกไปในลักษณะวงรี หรือวงกลม เกิดเป็นวงดำซ้อนกันเป็นชั้นๆ บางครั้งจะพบเมือกเยิ้มสีส้มอ่อนที่บริเวณแผล ผลพริกที่เป็นโรคจะเหี่ยวแฟบ สีเหลืองซีด ผลโค้งงอ ในสภาพแวดล้อมเหมาะสม และหรือพริกเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค โรคจะขยายลุกลามสู่ต้นอื่นๆอย่างรวดเร็ว ทำความเสียหายต่อผลพริกจนบางแปลงอาจเก็บเกี่ยวผลผลิตไม่ได้เลย ซึ่งโรคแอนแทรคโนสในพริกมักพบระบาดรุนแรงมากในสภาพอากาศร้อนชื้น อุณหภูมิประมาณ 27 องศาเซลเซียส และความชื้นสูง (ความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์) (Robert et. al., 2001; Chandra et al., 2009; Than et.al., 2008)

ปัจจุบันระบบนิเวศน์เกษตรมีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ ทั้งสภาพอากาศและชนิดของพันธุ์พืชที่ปลูก จึงอาจมีแนวโน้มทำให้ราสาเหตุโรคมีความผันแปรในหลายๆด้านรวมทั้งความสามารถในการทำให้เกิดโรค ซึ่งพบว่าปัจจุบันพบการเข้าทำลายผลพริกได้ทุกระยะ ดังนั้นการศึกษาชนิดและเขตการแพร่กระจายของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก 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

เก็บรวมรวมตัวอย่างพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส

เก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการเป็นโรคแอนแทรคโนสจากแหล่งปลูกพริกที่สำคัญโดยกำหนดพื้นที่หรือแหล่งปลูกดังนี้

ภาคกลาง เช่น จังหวัดสุโขทัย สุพรรณบุรี เพชรบูรณ์ พิษณุโลก พิจิตร นครสวรรค์ นครปฐม ลพบุรี

ภาคเหนือ เช่น จังหวัดเชียงราย แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง แพร่ น่าน พะเยา อุตรดิตถ์

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดอุบลราชธานี นครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น ร้อยเอ็ด นครพนม ศรีสะเกษ เลย

ภาคตะวันออกเช่น จังหวัดปราจีนบุรี สระแก้ว ระยอง ชลบุรี จันทบุรี ตราด ฉะเชิงเทรา

กรมวิชาการเกษตร

ภาคตะวันตก เช่น จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์

ภาคใต้ เช่น จังหวัดกระบี่ ชุมพร นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา

เก็บตัวอย่างในพื้นที่ปลูก โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างโรค 5 แถวต่อแปลง กำหนดการสุ่มแบบแถวเว้นแถว นำตัวอย่างโรคที่ได้ห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก เจาะระบายความชื้น นำตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นแยกที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช แล้วทำการแยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากผลพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนสเพื่อเก็บรักษาสายพันธุ์ราไว้ในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของรา *Colletotrichum* spp. เพื่อจำแนกชนิด

ศึกษาจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง (Direct observation) ศึกษาลักษณะโคนิเดียของรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope และ กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope โดยใช้เข็มปลายแหลมย้ายโคนิเดียหรือโครงสร้างที่สร้างส่วนขยายพันธุ์ของรามาวางบนสไลด์ ถ้าไม่พบโคนิเดียของราบนชิ้นส่วนพืช นำชิ้นส่วนพืชมาวางในกล่องที่ทำให้ชื้น (moist chamber) วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 วัน ตรวจดูชิ้นส่วนพืชเมื่อพบการสร้างกลุ่มโคนิเดีย ใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยย้ายกลุ่มโคนิเดียที่เจริญอยู่บนชิ้นส่วนพืชมาตรวจดูอีกครั้ง บันทึกลักษณะต่าง ๆ วัดขนาดส่วนต่าง ๆ ของราและถ่ายภาพ จากนั้นทำการแยกเชื้อแบบ single conidia โดยนำกลุ่มโคนิเดีย มาเจือจางในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไป streak บนอาหาร WA แล้วตัดปลายเส้นใยที่งอกมาจาก single conidia มาเลี้ยงบนอาหาร PDA นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลา 5-7 วัน ศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหาร

ศึกษาเชื้อสาเหตุโดยวิธีแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค (Tissue transplanting) ตัดตัวอย่างพืชที่เป็นโรคบริเวณที่เป็นรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติ ฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนพืชโดยแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3-5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้งสนิท นำชิ้นส่วนพืชมาวางบนอาหาร half strength Potato Dextrose Agar (1/2 PDA) บ่มไว้ที่ อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจดูเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo ตัดปลายเส้นใย (hyphal tip) ของราที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนพืช วางลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ จนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้ทั้งหมดทุกไอโซเลตมาจำแนกระบุชื่อชนิด (species) โดยนำลักษณะโคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ เช่น ลักษณะการเจริญ สีของโคโลนี ลักษณะรูปร่าง สีและขนาดของโคนิเดีย ลักษณะรูปร่าง สีและขนาดของแอพเพรสซอเรีย (appressoria) ที่ได้โดยวิธีการเลี้ยงราบนสไลด์ (slide culture) มาเปรียบเทียบตามแนววิธีการจัดจำแนกชนิดของ Sutton (1980) Bailey and Jeger (1992) วิรัชและคณะ (2528) รัติยาและคณะ (2553) และ วรานันท์ (2554)

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

การสร้าง clear zone ของรา *Colletotrichum* spp. บนอาหาร Casein hydrolysis medium (CHM) เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เมื่อมีอายุ 5 วัน ย้ายเชื้อมาทดสอบบนอาหาร CHM ที่มีความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้แสง black light เป็นเวลา 12 ชั่วโมงสลับกับความมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

กรมวิชาการเกษตร

4 วัน บันทึกผลโดยวัดขนาดของ clear zone ศึกษาความสัมพันธ์ของ clear zone และชนิดของรา *Colletotrichum* spp. แต่ละไอโซเลต

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

นำเชื้อรา *Colletotrichum* 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 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน บันทึกผลโดยวัดขนาดของ clear zone ศึกษาความสัมพันธ์ของ clear zone และชนิดของรา *Colletotrichum* spp. แต่ละไอโซเลต

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

บันทึกรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจเช่น ชื่อที่อยู่ที่ตั้งของแปลง วัน เดือน ปีที่เก็บตัวอย่าง พันธุ์พริก เป็นต้น

บันทึกลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราเช่น ลักษณะการเจริญและสีของโคโลนี ลักษณะรูปร่าง ขนาดและสีของโคนิเดีย รูปร่างและขนาดของแอพเพรสซอเรีย

บันทึกขนาดของ clear zone บนอาหาร CHM และ CBM

- เวลาและสถานที่ เริ่มต้น เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2560 สิ้นสุด เดือน กันยายน พ.ศ. 2563
  สถานที่ทำการทดลอง แปลงปลูกพริกของเกษตรกร
  ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
  กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บรวมรวมตัวอย่างพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส

เก็บตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสจากแหล่งปลูกพริกทุกภาคของประเทศไทย เดือนตุลาคม 2560 ถึง เดือนกันยายน 2562 ได้ตัวอย่างพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส ซึ่งเป็นพริกในกลุ่ม *Capsicum annuum* ได้แก่ พริกขี้หนูผลใหญ่พันธุ์จินดา ฮอตเตอร์ ซุปเปอร์ฮอต หัวเรือ ห้วยสีทน ยอดสน พริกในกลุ่ม *Capsicum frutescens* หรือพริกขี้หนูผลเล็กได้แก่ พริกกะเหรี่ยง พริกขี้หนู พริกขาวชัยบุรี (พริกขาวซี) และพริกในกลุ่ม *Capsicum chinense* หรือพริกผลใหญ่ได้แก่ พริกหนุ่มเขียว พริกยำ พริกหยวก เป็นต้น (ตารางที่ 1.2.11.1)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของรา *Colletotrichum* spp. เพื่อจำแนกชนิด

จากนำตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสมาศึกษาลักษณะอาการของโรค ลักษณะทางสัณฐานของราที่เจริญอยู่บนผิวพืช และทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาลักษณะโคโลนี ลักษณะทางสัณฐานของราตามเอกสารและวิธีการของ Sutton (1980) Bailey and Jeger (1992) วิรัชและคณะ (2528) รัติยาและ

กรมวิชาการเกษตร

คณะ (2553) และ วรานันท์ (2554) ผลการศึกษา จัดกลุ่ม *Colletotrichum* spp. ตามลักษณะรูปร่างของโคนิเดีย เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มโคนิเดียรูปร่างทรงกระบอกหรือกระสวยตรง และ กลุ่มโคนิเดียรูปร่างโค้ง จำแนกชนิดรา *Colletotrichum* spp. โดยใช้ลักษณะโคโลนี colony ขนาดรูปร่างของโคนิเดียและแอพเพรสซอเรียได้ราสาเหตุหลักของโรคแอนแทรคโนสพริก 3 ชนิด ดังนี้

***Colletotrichum acutatum* Simmonds**

ลักษณะอาการของโรค แผลเริ่มแรกมีรูปร่างค่อนข้างกลมลักษณะฉ่ำน้ำสีเข้ม ยุบตัวลงเป็นแอ่งลึกจากผิวผล เมื่อขยายขนาด ส่วนใหญ่จะขยายตามความยาวของผล เปนรูปวงรีหรือรูปร่างไม่แน่นอน ส่วนใหญ่ผิวพืช (epidermis) บริเวณแผล มีลักษณะแตกหรือปริแตกเป็นริ้ว บนรอยแตกพบกลุ่ม โคนิเดีย ลักษณะเป็นเมือกสีส้ม (orange , blight orange) อยู่ใน acervulus ที่เกิดกระจายเป็นจำนวนมาก ไมพบ setae บริเวณแผล

ส่วนใหญ่พบการเกิดโรคกับผลพริกทั้งที่ยังอ่อนมีสีเขียว ผลพริกที่แก่จัดเริ่มเปลี่ยนสี และผลพริกที่สุกแดง ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA กลุ่มที่ 1 เส้นใยคล้ายกำมะหยี่ สีขาวเทา เจริญฟูเหนืออาหารเล็กน้อย ด้านหลังของโคโลนีขอบสีขาวเทา กลางโคโลนีสีส้มอมชมพูหรือเทาอมชมพู สร้างกลุ่มโคนิเดียเจริญซ้อนกันเป็นวง กลุ่มโคนิเดียสีส้ม (orange, blight orange) กลุ่มที่ 2 เส้นใยสีขาวอมส้ม เจริญฟูเหนืออาหารเล็กน้อย ด้านหลังของโคโลนีขอบสีขาวเทา กลางโคโลนีสีส้มอมชมพู กลุ่มโคนิเดียสีส้ม (orange, blight orange) เจริญซ้อนกันเป็นวงไม่ชัดเจน กลุ่มที่ 3 เส้นใยฟู สีขาวเทา ด้านหลังของโคโลนีขอบขาว กลางโคโลนีสีเทาอมชมพูถึงเทาเข้ม พบกลุ่มโคนิเดียเจริญฝังอยู่ใต้โคโลนี กลุ่มที่ 4 เส้นใยเจริญฟูและหนาแน่น ด้านหลังของโคโลนีขอบมีสีชมพูอมส้ม กลางโคโลนีมีสีเขียวเข้มจนถึงเทา กลุ่มโคนิเดียค่อนข้างน้อยสีอ่อน (peal salmon ถึง salmon orange) ทุกไอโซเลตของ *C. acutatum* การเจริญของเส้นใยเจริญช้ากว่า *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* ไม่พบการสร้าง setae บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

รูปร่างลักษณะของโคนิเดีย เมื่อดูด้วยกลองจุลทรรศน์ โคนิเดียเซลล์เดียว ใส ไม่มีสี (hyaline) ผนังเรียบ รูปร่างหลายแบบมีทั้งรูปกระสวย รูปรีปลายเรียวแหลมด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้าน รูปทรงกระบอกตรง รูปร่างคล้ายกระบอง บางโคนิเดียพบรอยคอดกลางโคนิเดีย ขนาดโคนิเดียอยู่ในช่วง 1.75-4.3x5.18-18.37 ไมครอน ลักษณะของแอพเพรสซอเรีย (appressoria) สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม มีทั้งที่เจริญเดี่ยวและเจริญต่อกันเป็นลูกโซ่ รูปร่างมีหลายลักษณะทั้งเป็น lobe, clavate, long clavate, circular, cylindrical และ irregular

***Colletotrichum capsici* (Syd.) Butl. and Bisby**

ลักษณะอาการของโรค แผลมีลักษณะค่อนข้างกลม หรือรูปรี หรือรูปไข่ ขอบเรียบ แผลยุบตัวลึกลงจากผิวผล บางแผลตรงกลางมีสีเข้มขอบมีสีอ่อน มีจุดสีดำซึ่งเปนกลุมของ acervulus และ setae จำนวนมากเรียงเป็นวงซ้อนกัน มองเห็นได้ชัดเจน พบกลุ่มโคนิเดีย สีครีม สีชมพูอมส้ม หรือสีส้มอ่อนบน acervulus ลักษณะ setae สีดำยาวสูงกวากลุ่มโคนิเดีย ทุกไอโซเลตของ *C. capsici* การเจริญของเส้นใยเจริญเร็วกว่า *C. acutatum* แต่เจริญช้ากว่า *C. gloeosporioides* ส่วนใหญ่พบการเกิดโรคบนผลพริกที่แก่จัดหรือผลพริกที่สุกแดง
ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA กลุ่ม 1 โคโลนีตรงกลางสีเทาถึงสีเทาดำ ขอบเทาขาว เส้นใยแน่น เจริญฟูเหนืออาหารเล็กน้อย พบกลุ่มโคนิเดียเจริญซ้อนกันเป็นวงแบบ concentric ring ชัดเจน สี buff, pale peach, peach,

ศูนย์วิทยทรัพยากร

pale salmon, salmon, salmon orange กลุ่ม 2 โคโลนีขอบเทาขาว ตรงกลางสีเทา เส้นใยหยาบ เจริญบางๆ บนอาหาร กลุ่มโคนิเดียเจริญซ้อนกันเป็นวงแบบ concentric ring ชัดเจน ลักษณะกลุ่มโคนิเดียเป็นเมือกสี pale peach, pale salmon salmon, salmon orange

รูปร่างลักษณะของโคนิเดีย เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โคนิเดีย ใส ไม่มีสี เซลล์เดียว ผนังเรียบ รูปร่างโค้งคล้ายเคียวหรือพระจันทร์เสี้ยว (falcate จนถึง fusiform) ปลายเรียวแหลมทั้งสองด้าน ขนาดโคนิเดียอยู่ในช่วง 1.76-3.82x20.04-26.94 ไมครอน ลักษณะของแอพเพรสซอเรีย (appressoria) สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม มีทั้งที่เจริญแบบเดี่ยวและเจริญต่อกันเป็นลูกโซ่ รูปร่างมีหลายลักษณะทั้งเป็น lobe, clavate, long clavate, circular, cylindrical, irregular และ ovoid บางครั้งพบการสร้าง setae บนอาหารเลี้ยงเชื้อ รูปร่างของ setae มีทั้งรูปร่างเรียวยาวปลายมน เรียวยาวปลายแหลม และโคนแคบปลายมน สีน้ำตาลเข้ม

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

ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก เริ่มแรกแผลมีลักษณะฉ่ำน้ำสีเข้มยุบตัวลึกลงเป็นแอ่งลึกจากผิวผล รูปร่างคอนข้างกลมถึงยาวรี แผลขยายขนาดตามความยาวของผล บริเวณแผลส่วนใหญ่พบจุดสีดำขนาดเล็ก ซึ่งเป็นกลุม acervulus จำนวนมากเรียงซ้อนกันเป็นวง ฝังอยู่ที่ผิวพืช ส่วนใหญ่ไม่พบผิวพืชที่มีลักษณะแตกหรือปริแตกเป็นริ้ว มีกลุ่มโคนิเดียลักษณะเป็นเมือกเยิ้มสีส้ม (orange , blight orange) บน acervulus ไม่พบการสร้าง setae ส่วนใหญ่พบการเกิดโรคบนผลพริกที่แก่จัดเริ่มเปลี่ยนสีและผลที่สุกแดง

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA กลุ่มที่ 1 โคโลนีสีขาวเทา กลางโคโลนีสีเทาถึงเทาเข้ม เส้นใยสีขาวเทาเจริญฟูเหนืออาหาร พบกลุ่มโคนิเดียเจริญซ้อนกันเป็นวง ลักษณะเป็นเมือกสี pale salmon , salmon, orange , blight orange กลุ่มที่ 2 โคโลนีสีขาวเทา กลางโคโลนีสีเขียวถึงเทา เส้นใยเจริญฟูแน่นบนผิวหน้าอาหาร กลุ่มโคนิเดียสี pale salmon, salmon orange , blight orange เจริญใต้โคโลนี กลุ่มที่ 3 โคโลนีขอบขาว กลางโคโลนีสีเขียวมะกอกหรือเทาเข้ม เส้นใยเจริญฟูแน่นบนผิวหน้าอาหาร พบกลุ่มโคนิเดียเจริญแบบ concentric ring ลักษณะเป็นเมือกสี pale peach, pale salmon กลุ่มที่ 4 โคโลนีสีขาวเทา กลางโคโลนีสีเขียวถึงเทา เส้นใยหยาบสีขาวเทาเจริญฟูเหนืออาหาร พบกลุ่มโคนิเดียค่อนข้างน้อยสี pale salmon, salmon orange ทุกไอโซเลตของ *C. gloeosporioides* การเจริญของเส้นใยเร็วกว่า *C. capsici* และ *C. acutatum*

รูปร่างลักษณะของโคนิเดีย เมื่อดูด้วยกล่องจุลทรรศน์ โคนิเดียเซลล์เดียว ผนังเรียบ ใส ไม่มีสี ส่วนใหญ่รูปร่างทรงกระบอกตรง ปลายมน ฐานตัด ขนาดโคนิเดียอยู่ในช่วง 2.44-4.45x8.35-19.41 ไมครอน ลักษณะของแอพเพรสซอเรีย (appressoria) สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม มีทั้งที่เจริญแบบเดี่ยวและเจริญต่อกันเป็นลูกโซ่ รูปร่างมีหลายลักษณะทั้งเป็น lobe, clavate, long clavate, circular, cylindrical และ irregular

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

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าให้ผลสอดคล้องกับการสำรวจของรัติยาและคณะ (2553) ที่พบรา *Colletotrichum* 3 ชนิดที่เป็นสาเหตุหลักของโรคแอนแทรคโนสพริก คือ *C. gloeosporioides*, *C. capsici* และ *C. acutatum* แต่แตกต่างจากการสำรวจของ ฉัตรนัททรีและคณะ (2550) และ Than et al. (2008) ที่พบเชื้อ *Colletotrichum* 4 ชนิด คือ *C. gloeosporioides*, *C. capsici*, *C. acutatum* และ *C. coccodes* ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการสำรวจเก็บตัวอย่างโรคแอนแทรคโนสพริกในครั้งนี้ไม่ได้เป็นไปอย่างต่อเนื่องและครอบคลุมทุกพื้นที่ที่มรายงานการพบรา *C. coccodes* นอกจากนี้ยังพบว่าราในสกุล *Colletotrichum* มีความผันแปรสูง ปัจจุบันการศึกษาทางสัณฐานของราอย่างเดียวเพื่อการจำแนกชนิดนั้นย่อมไม่เพียงพอ จำเป็นต้องใช้ทางอณูชีวโมเลกุลมาช่วยในการจำแนก ดังนั้นงานวิจัยต่อไปในอนาคตเพื่อให้มีความชัดเจนขึ้นจะได้นำวิธีการทางอณูชีวโมเลกุลมาช่วยในการยืนยันการจัดจำแนกระบุชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกต่อไป

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาชนิดและเขตการแพร่กระจายของรา *Colletotrichum spp.* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกระหว่างเดือน ตุลาคม 2560 ถึง เดือนกันยายน 2562 โดยการเก็บตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสจากพื้นที่ปลูกพริกทุกภาคของประเทศไทย มาศึกษาและจำแนกชนิดรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานของรา ผลการศึกษาในครั้งนี้ จำแนกรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุหลักของโรคได้ 3 ชนิด คือ *Colletotrichum acutatum* ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากที่สุด และกระจายอยู่ในทุกภาคของประเทศไทย ซึ่งจากเดิมพบไม่มากนัก รองลงมาได้แก่รา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum capsici* ตามลำดับ จากการศึกษาความสัมพันธ์ของ clear zone และชนิดของรา *Colletotrichum* spp. โดยเลี้ยงรา *Colletotrichum* spp. ที่จัดจำแนกไว้บนอาหาร Casein hydrolysis medium (CHM) พบว่ารา *Colletotrichum acutatum* สร้าง clear zone ได้ชัดเจนที่สุด มีความกว้างของ clear zone มากที่สุด รองลงมาได้แก่ *Colletotrichum* และ *Colletotrichum capsici* ตามลำดับ ส่วนบนอาหาร CBM พบ *Colletotrichum acutatum* และ *Colletotrichum gloeosporioides* สร้าง clear zone ได้ชัดเจนที่สุด ส่วน *Colletotrichum capsici* สร้าง clear zone แคบที่สุดและบางไอโซเลตไม่สร้าง clear zone แต่อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองที่พบว่าเมื่อนำรา *Colletotrichum* spp. มาเลี้ยงบนอาหาร CHM ราแต่ละกลุ่มชนิดสามารถสร้าง clear zone ให้เห็นความแตกต่างได้ค่อนข้างชัดเจน ซึ่งข้อมูลดังกล่าวเมื่อนำมาประกอบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถนำมาสนับสนุนการจัดจำแนกกลุ่มรา *Colletotrichum* spp. ทั้ง 3 กลุ่มชนิด ในเบื้องต้นได้ทางหนึ่ง

กรมวิชาการเกษตร

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เป็นข้อมูลอ้างอิงในการทำวิจัยและเป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช (pest list) เป็นข้อมูลในเพื่อนำไปสู่การวางแผนในการป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสพริกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 1.2.11.1 พื้นที่ที่เก็บตัวอย่างโรคแอนแทรคโนสพริก

ลำดับที่	ชนิดพริก	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด	Lat. (N)	Long. (E)
1	*Capsicum annuum*	วังน้ำซับ	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี	14° 36' 46"	100° 04' 49"
2	*Capsicum annuum*	วังน้ำซับ	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี	14° 39' 37"	100° 08' 36"
3	*Capsicum annuum*	ดอนมดแดง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี	14° 36' 43"	100° 04' 50"
4	*Capsicum annuum*	บางงาม	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี	14° 36' 46"	100° 04' 49"
5	*Capsicum chinense*	พลับพลาไชย	อู่ทอง	สุพรรณบุรี	14° 30' 23"	99° 54' 23"
6	*Capsicum annuum*	ทุ่งคอก	สองพี่น้อง	สุพรรณบุรี	14° 11' 17"	99° 55' 52"
7	*Capsicum chinense*	โตนด	คีรีมาศ	สุโขทัย	16° 49' 31"	99° 48' 11"
8	*Capsicum chinense*	กกแรด	กงไกรลาศ	สุโขทัย	16° 59' 35"	100° 02' 09"
9	*Capsicum chinense*	สนามคลี	บางกระทุ่ม	พิษณุโลก	16° 32' 28"	100° 15' 35"
10	*Capsicum chinense*	สนามคลี	บางกระทุ่ม	พิษณุโลก	16° 32' 18"	100° 16' 00"
11	*Capsicum chinense*	สนามคลี	บางกระทุ่ม	พิษณุโลก	16° 32' 26"	100° 16' 01"
12	*Capsicum annuum*	ปลายนา	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี	14° 36' 48"	100° 06' 00"
13	*Capsicum chinense*	ปลายนา	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี	14° 36' 07"	100° 05' 47"
14	*Capsicum annuum*	แม่หอพระ	แม่แตง	เชียงใหม่	19° 6' 29"	99° 1' 48"
15	*Capsicum annuum*	อินทขิล	แม่แตง	เชียงใหม่	19° 9' 20"	98° 59' 01"
16	*Capsicum annuum*	อินทขิล	แม่แตง	เชียงใหม่	19° 9' 51"	98° 59' 99"
17	*Capsicum annuum*	อินทขิล	แม่แตง	เชียงใหม่	19° 9' 15"	98° 59' 83"
18	*Capsicum annuum*	อินทขิล	แม่แตง	เชียงใหม่	19° 9' 01"	98° 59' 59"
19	*Capsicum annuum*	ช่อแล	แม่แตง	เชียงใหม่	19° 6' 17"	99° 0' 84"
20	*Capsicum annuum*	ช่อแล	แม่แตง	เชียงใหม่	19° 6' 06"	99° 0' 42"
ลำดับที่	ชนิดพริก	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด	Lat. (N)	Long. (E)
21	*Capsicum annuum*	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่	18° 54' 54 "	99° 01' 45"
22	*Capsicum annuum*	บวกค้าง	สันกำแพง	เชียงใหม่	18° 41' 59"	99° 05' 35 "
23	*Capsicum annuum*	บวกค้าง	สันกำแพง	เชียงใหม่	18° 41' 47"	99° 05' 01 "
24	*Capsicum annuum*	โหล่งขอด	พร้าว	เชียงใหม่	19° 06' 18"	99° 10' 20"
25	*Capsicum annuum*	โหล่งขอด	พร้าว	เชียงใหม่	19° 06' 18"	99° 10' 19"
26	*Capsicum chinense*	แม่แฝกใหม่	สันทราย	เชียงใหม่	19° 8' 22"	99° 1' 28"
27	*Capsicum chinense*	ห้วยยาบ	บ้านธิ	ลำพูน	19° 9' 01"	99° 4' 00"
28	*Capsicum chinense*	ห้วยยาบ	บ้านธิ	ลำพูน	19° 9' 01"	99° 0' 04"
29	*Capsicum chinense*	หนองม่วงไข่	หนองม่วงไข่	แพร่	19° 8' 42"	100° 09' 10"
30	*Capsicum chinense*	แม่ทราย	ร้องกวาง	แพร่	18° 23' 17"	100° 18' 45"
31	*Capsicum annuum*	ช่อแล	แม่แตง	เชียงใหม่	19° 7' 24"	99° 0' 8.78"
32	*Capsicum annuum*	แคมป์สน	เขาค้อ	เพชรบูรณ์	16° 45' 40"	101° 01' 59"
33	*Capsicum annuum*	แคมป์สน	เขาค้อ	เพชรบูรณ์	16° 45' 35"	101° 01' 51"
34	*Capsicum annuum*	แคมป์สน	เขาค้อ	เพชรบูรณ์	16° 45' 26"	101° 01' 54"

กรมวิชาการเกษตร

35	*Capsicum annuum*	หนองแม่นา	เขาค้อ	เพชรบูรณ์	16° 45' 22"	101° 01' 11"
36	*Capsicum chinense*	หนองย่างเสือ	มวกเหล็ก	สระบุรี	14° 49' 38"	110° 20' 21"
37	*Capsicum annuum*	หนองย่างเสือ	มวกเหล็ก	สระบุรี	14° 48' 35"	101° 20' 50"
38	*Capsicum annuum*	หนองงูเหลือม	เมือง	นครปฐม	13° 55' 00"	99° 56' 23"
39	*Capsicum annuum*	ทุ่งกระพังโหม	กำแพงแสน	นครปฐม	13° 59' 45"	99° 58' 48"
40	*Capsicum annuum*	ทุ่งขวาง	กำแพงแสน	นครปฐม	13° 59' 09"	99° 58' 25"
41	*Capsicum frutescens*	ปลาดุก	หล่มสัก	เพชรบูรณ์	16° 42' 57"	101° 14' 57"
42	*Capsicum frutescens*	หนองไขว่	หล่มสัก	เพชรบูรณ์	16° 45' 03"	101° 14' 48"
43	*Capsicum frutescens*	หล่มสัก	หล่มสัก	เพชรบูรณ์	16° 45' 50"	101° 15' 2"
44	*Capsicum frutescens*	เขาค้อ	เขาค้อ	เพชรบูรณ์	16° 40' 13"	101° 00' 48"
45	*Capsicum frutescens*	เขาค้อ	เขาค้อ	เพชรบูรณ์	16° 40' 17"	101° 00' 36"
46	*Capsicum annuum*	หนองกลับ	สวรรคโลก	สุโขทัย	17° 14' 10"	99° 46' 29"
47	*Capsicum annuum*	โนนหญ้าคา	ขามสะแกแสง	นครราชสีมา	15° 23' 07"	102° 09' 24"
48	*Capsicum annuum*	ขามเฒ่า	เมือง	นครพนม	17° 16' 23"	104° 46' 08"
49	*Capsicum annuum*	ขามเฒ่า	เมือง	นครพนม	17° 16' 37"	104° 46' 10"
50	*Capsicum annuum*	ขามเฒ่า	เมือง	นครพนม	17° 16' 35"	104° 45' 58"
51	*Capsicum annuum*	ขามเฒ่า	เมือง	นครพนม	17° 16' 27"	104° 46' 17"
52	*Capsicum annuum*	โนนอุดม	ชุมแพ	ขอนแก่น	16° 30' 19"	102° 13' 51"
53	*Capsicum annuum*	หนองบัวใหญ่	จัตุรัส	ชัยภูมิ	15° 34' 16"	101° 52' 10"
54	*Capsicum annuum*	ทุ่งพระ	คอนสาร	ชัยภูมิ	16° 39' 11"	101° 45' 19"
55	*Capsicum annuum*	โพนสา	ท่าบ่อ	หนองคาย	17° 49' 15"	102° 37' 50"
56	*Capsicum annuum*	โพนสา	ท่าบ่อ	หนองคาย	17° 48' 39"	102° 38' 48"
ลำดับที่	ชนิดพริก	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด	Lat. (N)	Long. (E)
57	*Capsicum annuum*	โนนอุดม	ชุมแพ	ขอนแก่น	16° 31' 13"	102° 12' 40"
58	*Capsicum annuum*	ห้วยโมง	ท่าบ่อ	หนองคาย	17° 50' 04"	102° 35' 20"
59	*Capsicum annuum*	ทุ่งพระ	ดอนสาร	ชัยภูมิ	16° 38' 28"	101° 49' 019"
60	*Capsicum annuum*	กองนาง	ท่าบ่อ	หนองคาย	17° 52' 25"	102° 35' 07"
61	*Capsicum annuum*	หนองเหล่า	ม่วงสามสิบ	อุบลราชธานี	15° 27' 03"	104° 40' 35"
62	*Capsicum annuum*	โพนสา	ท่าบ่อ	หนองคาย	17° 49' 37"	102° 37' 00"
63	*Capsicum annuum*	โพนสา	ท่าบ่อ	หนองคาย	17° 49' 32"	102° 37' 17"
64	*Capsicum annuum*	โพนสา	ท่าบ่อ	หนองคาย	17° 49' 37"	102° 37' 14"
65	*Capsicum annuum*	ดงบัง	บึงโขงหลง	บึงกาฬ	18° 03' 06"	104° 09' 26"
66	*Capsicum annuum*	ดงบัง	บึงโขงหลง	บึงกาฬ	18°03' 02"	104° 09' 29"
67	*Capsicum chinense*	ขี้เหล็ก	เมือง	อุบลราชธานี	15° 21' 47"	104° 47' 39"
68	*Capsicum chinense*	ขี้เหล็ก	เมือง	อุบลราชธานี	15° 21' 48"	104° 47' 41"
69	*Capsicum annuum*	บ้านยาง	เกษตรสมบูรณ์	ชัยภูมิ	16° 18' 11"	101° 58' 28"
70	*Capsicum annuum*	หนองตาคง	โป่งน้ำร้อน	จันทบุรี	13° 04' 17"	102° 23' 37"
71	*Capsicum annuum*	หนองตาคง	โป่งน้ำร้อน	จันทบุรี	13° 04' 14"	102° 23' 41"
72	*Capsicum frutescens*	คอหงส์	หาดใหญ่	สงขลา	6° 58' 37"	100° 27' 42"
73	*Capsicum frutescens*	คอหงส์	หาดใหญ่	สงขลา	6° 58' 45"	100° 28' 03"
74	*Capsicum frutescens*	รวมไทยพัฒนา	พบพระ	ตาก	16° 26' 17"	98° 49' 22"
75	*Capsicum annuum*	คีรีราษฎร์	พบพระ	ตาก	16° 28' 49"	98° 49' 40"
76	*Capsicum annuum*	คีรีราษฎร์	พบพระ	ตาก	16° 28' 42"	98° 49' 46"

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

77	*Capsicum annuum*	วังกระแจะ	ไทรโยค	กาญจนบุรี	14° 11' 43"	99° 3' 29"
78	*Capsicum annuum*	วังกระแจะ	ไทรโยค	กาญจนบุรี	14° 11' 58"	99° 3' 24"
79	*Capsicum annuum*	วังกระแจะ	ไทรโยค	กาญจนบุรี	14° 11' 54"	99° 3' 36"
80	*Capsicum frutescens*	รวมไทยพัฒนา	พบพระ	ตาก	16° 26' 15"	98° 49' 30"
81	*Capsicum annuum*	หนองเป็ด	ศรีสวัสดิ์	กาญจนบุรี	14° 35' 57"	99° 6' 50"
82	*Capsicum annuum*	หนองเป็ด	ศรีสวัสดิ์	กาญจนบุรี	14° 35' 28"	99° 6' 60"
83	*Capsicum annuum*	หนองเป็ด	ศรีสวัสดิ์	กาญจนบุรี	14° 35' 39"	99° 6' 50"
84	*Capsicum annuum*	หนองเป็ด	ศรีสวัสดิ์	กาญจนบุรี	14° 35' 14"	99° 6' 58"
85	*Capsicum frutescens*	หนองเป็ด	ศรีสวัสดิ์	กาญจนบุรี	14° 35' 57"	99° 6' 62"
86	*Capsicum frutescens*	นาสวน	ศรีสวัสดิ์	กาญจนบุรี	14° 35' 47"	99° 6' 39"
87	*Capsicum frutescens*	คีรีราษฎร์	พบพระ	ตาก	16° 30' 30"	98° 51' 13"
88	*Capsicum frutescens*	คีรีราษฎร์	พบพระ	ตาก	16° 29' 21"	98° 50' 13"
89	*Capsicum annuum*	คีรีราษฎร์	พบพระ	ตาก	16° 29' 8"	98° 45' 46"
90	*Capsicum chinense*	คีรีราษฎร์	พบพระ	ตาก	16° 28' 33"	98° 50' 4"
91	*Capsicum annuum*	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี	14° 00' 32"	99° 39' 44"
92	*Capsicum annuum*	บ้านใหม่	ท่าม่วง	กาญจนบุรี	13° 51' 44"	99° 34' 46"
ลำดับที่	ชนิดพริก	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด	Lat. (N)	Long. (E)
93	*Capsicum annuum*	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี	14° 00' 26"	99° 39' 48"
94	*Capsicum annuum*	ตะคร้ำเอน	ท่ามะกา	กาญจนบุรี	13° 56' 48"	99° 45' 41"
95	*Capsicum annuum*	วังกระแจะ	ไทรโยค	กาญจนบุรี	14° 11' 43"	99° 3' 36"
96	*Capsicum annuum*	วังกระแจะ	ไทรโยค	กาญจนบุรี	14° 11' 43"	99° 3' 36"
97	*Capsicum annuum*	ท่ากระบุง	ศรีสวัสดิ์	กาญจนบุรี	14° 27' 41"	99° 2' 14"
98	*Capsicum annuum*	ท่ากระดาน	ศรีสวัสดิ์	กาญจนบุรี	14° 27' 35"	99° 07' 57"
99	*Capsicum annuum*	ท่ากระดาน	ศรีสวัสดิ์	กาญจนบุรี	14° 26' 58"	99° 07' 26"
100	*Capsicum annuum*	ท่ากระดาน	ศรีสวัสดิ์	กาญจนบุรี	14° 27' 16"	99° 07' 59"
101	*Capsicum annuum*	บ้านใหม่	ท่าม่วง	กาญจนบุรี	13° 51' 39"	99° 34' 39"
102	*Capsicum annuum*	บ้านใหม่	ท่าม่วง	กาญจนบุรี	13° 51' 44"	99° 34' 35"
103	*Capsicum annuum*	ท่าพริก	เมือง	ตราด	12° 15' 00"	102° 34' 21"
104	*Capsicum annuum*	เขาน้อย	ท่าม่วง	กาญจนบุรี	13° 51' 55"	99° 34' 06"
105	*Capsicum annuum*	เขาน้อย	ท่าม่วง	กาญจนบุรี	13° 51' 44"	99° 34' 15"
106	*Capsicum annuum*	เขาน้อย	ท่าม่วง	กาญจนบุรี	13° 51' 57"	99° 34' 22"
107	*Capsicum annuum*	ท่าพริก	เมือง	ตราด	12° 15' 00"	102° 34' 12"
108	*Capsicum annuum*	บ้านใหม่	ท่าม่วง	กาญจนบุรี	13° 51' 39"	99° 34' 39"
109	*Capsicum annuum*	บ้านใหม่	ท่าม่วง	กาญจนบุรี	13° 51' 40"	99° 34' 51"
110	*Capsicum annuum*	ท่าพริก	เมือง	ตราด	12° 14' 56"	102° 35' 43"
111	*Capsicum annuum*	ด่านทับตะโก	จอมบึง	ราชบุรี	13° 39' 18"	99° 26' 48"
112	*Capsicum annuum*	ด่านทับตะโก	จอมบึง	ราชบุรี	13° 39' 18"	99° 27' 05"
113	*Capsicum annuum*	ด่านทับตะโก	จอมบึง	ราชบุรี	13° 39' 08"	99° 27' 18"

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

Figure 1.2.11.1 Anthracnose symptoms on chilli fruits

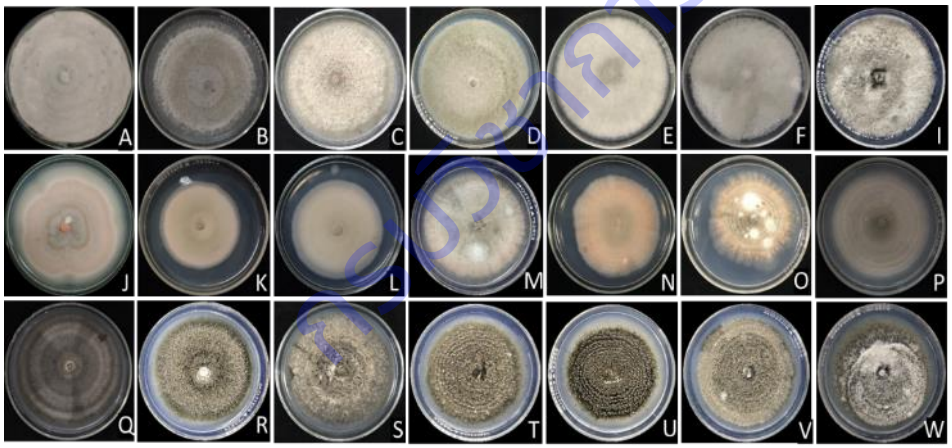


Figure 1.2.11.2 Colony of *Colletotrichum* spp.

A-I = *Colletotrichum gloeosporioides*

J-P = *Colletotrichum acutatum*

Q-W = *Colletotrichum capsici*

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.2.13 อนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของเชื้อรา Cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช
Taxonomy and phylogeny of Cercosporoid fungi in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวชนินทร	ดวงสอาด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นางสาวพรพิมล	อธิปัญญาคม	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวสุณีรัตน์	สีมะเดื่อ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวมะโนรัตน์	สุดสงวน	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวสุทธินี	ลิขิตตระกูลรุ่ง	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

5. บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่มีลักษณะพ้องกับอาการจุดที่เกิดจากเชื้อรา cercosporoid จากแปลงปลูกพืชในประเทศไทย ระหว่าง ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564 เพื่อจำแนกชนิด พิจารณาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและพืชอาศัย เพื่อเป็นแนวทางในการพิจารณาขอบเขตของพืชอาศัย ได้เชื้อราในกลุ่ม cercosporoid ได้แก่ *Cercospora apii*, *Cer. beticola*, *Cer. citrulina*, *Cer. arachidicola* (syn. *Passalora arachidicola*), *Cercospora* sp.1, *Cercospora* sp.2, *Corynespora torulosa*, *Cory. cassiicola*, *Pseudocercospora dendrobii*, *Pseu. Abelmoschi* และ *Mycosphaerella* sp.1 จากความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่าเชื้อรา *Cercospora* และ *Corynespora* หลายชนิดเป็นกลุ่ม complex จึงมีความจำเป็นที่การจำแนกชนิดต้องอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมที่เพียงพอ และเมื่อพิจารณาข้อมูลของพืชอาศัยประกอบ พบว่ามีแนวโน้มที่สามารถพิจารณาของเขตของพืชอาศัยของเชื้อรา cercosporoid บางชนิด หากมีศึกษาที่มีกำหนดเป้าหมายของชนิดเชื้อราต่อพืชตระกูลเป้าหมาย จะเป็นจุดเริ่มต้นที่สามารถใช้เป็นข้อมูลในการคาดการณ์การเกิดโรคได้ และได้รวบรวมข้อมูลการจัดจำแนกเชื้อรา cercosporoid ที่มีรายงานพบในประเทศไทย

คำหลัก: cercosporoid ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

Leaf spot disease samples caused by cercosporoid fungi were collected from various plantations located in Thailand during October 2019 – September 2021 in order to study the relationships of cercosporoid fungi with the host plant data. The cercosporoid fungi collected from this study namely, *Cercospora apii*, *Cer. beticola*, *Cer. citrulina*, *Cer. arachidicola* (syn. *Passalora arachidicola*), *Cercospora* sp.1, *Cercospora* sp.2, *Corynespora torulosa*, *Cory. cassiicola*, *Pseudocercospora dendrobii*, *Pseu. Abelmoschi* และ *Mycosphaerella* sp.1. The phylogenetic reconstruction showed that *Cercospora* and *Corynespora* contained complex species for which genealogical concordance was required for resolving the complex. The phylogeny of some *Cercospora* and *Corynespora* was considered with the host plant data. It

กรมวิชาการเกษตร

was found that the host range of some cercosporoid fungi could be considered. Further studies targeting the fungal species on their host plant could provide information for predicting disease progression. Data on the classification of cercosporoid fungi reported in Thailand were also gathered.

Key word: cercosporoid, phylogeny

คำนำ

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

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

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การจำแนกราในกลุ่ม cercosporoid โดยเฉพาะ *Pseudocercospora* และ *Cercospora* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ค่อนข้างใกล้เคียงกันประกอบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ เช่น ลักษณะสีของ conidia ทำให้การจำแนกชนิดค่อนข้างมีความสับสน อีกทั้งข้อจำกัดของเครื่องมือที่ใช้ในการวินิจฉัยเช่น ความคมชัด ความเข้มแสง กล้องจุลทรรศน์ ยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งในการพิจารณาลักษณะความหนาของ scar ในระดับที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีความพยามยามที่จะศึกษาลักษณะความหนาของ scar ในแต่ละ genus เพื่อให้ได้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แม่นยำเพื่อการวินิจฉัย แต่ยังพบว่ารา *Cercospora* ในบางสปีชีส์ ถูกจัดเป็นกลุ่มสปีชีส์ที่อาจประกอบด้วยสมาชิกมากกว่า 1 สปีชีส์ แต่เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยายังไม่เพียงพอต่อการจำแนกความแตกต่าง รากลุ่มนี้จึงยังถูกจัดอยู่ใน สปีชีส์เดียวกันและจัดเป็น complex species เช่น *Cercospora apii* เป็นราที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงกับอุตสาหกรรมการผลิตพริกของบราซิล พบว่ามีราที่ถูกจำแนกเป็น *C. apii* มากกว่า 280 ไอโซเลท โดยทุกไอโซเลทมีความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่ลักษณะความแตกต่างดังกล่าวไม่เพียงพอในการจำแนกราไอโซเลทนั้น ๆ ออกจาก *C. apii* (Crous and Braun, 2003;

กรมวิชาการเกษตร

Nicoli *et al*, 2011) ลักษณะที่เกิดขึ้นนี้ อาจเกิดจากการที่ราและพืชอาศัยมีวิวัฒนาการร่วมกัน ทำให้ราเกิดมีวิวัฒนาการ หรือลักษณะทางของราที่สามารถวัดค่าหรือนำมาใช้ในการจำแนกยังไม่เพียงพอ จึงยังคงจัดอยู่ใน complex species

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

ในประเทศไทยมีการศึกษาราในกลุ่ม cercosporoid มาแล้วในระดับหนึ่ง แต่การจัดจำแนกชนิดส่วนใหญ่ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ถึงแม้ว่า การจัดจำแนกรา *Cercospora* จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ค่อนข้างเด่นชัด แต่ก็ยังพบว่ายังมีราในกลุ่มนี้ที่มีรายงานว่าเป็น complex species ที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ไม่เพียงพอต่อการจัดจำแนก หรือบางครั้งราไม่สร้างโครงสร้างที่เพียงพอต่อการจัดจำแนก อีกทั้งด้วยเทคโนโลยีที่พัฒนาและนำมาช่วยในการศึกษาและและเพื่อการจัดจำแนก ทำให้พบว่า การจำแนกชนิดของราโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางพันธุกรรม สามารถจำแนกชนิดของราหลายชนิดที่มีปัญหาในการวินิจฉัย ซึ่งรวมถึงราในกลุ่ม cercosporoid ด้วย

ถึงแม้รา cercosporoid ส่วนใหญ่จะทำให้เกิดความเสียหายแก่พืช แต่ก็มีเชื้อราบางชนิดในกลุ่มของ cercosporoid ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ดังนั้นนอกจากนี้การศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อราควบคู่กับพืชอาศัย ทำให้สามารถเข้าใจวิวัฒนาการระหว่างราและพืชอาศัย (phylogenetic relationship) ซึ่งสามารถนำไปสู่การคาดหมายหรือการทำนายการเกิดโรคในพืช (pattern of pathogenicity) อีกทั้งรา cercosporoid เป็นรากลุ่มใหญ่ที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิดในประเทศไทย รวมถึงทั่วโลก ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของรา cercosporoid จึงมีความสำคัญ โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษานอกจากจะทำให้เข้าใจวิวัฒนาการรา cercosporoid แล้ว ยังสามารถประเมินการเข้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ทำลายพืชอาศัยหรือโอกาสการเกิดโรคข้ามพืชอาศัย (host jump) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นที่สามารถใช้เป็นข้อมูลในการคาดการณ์การเกิดโรคได้อีกทางหนึ่ง นอกจากนี้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลยังสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลในการจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชอีกทางหนึ่ง ซึ่งสามารถสนับสนุนการการค้าระหว่างประเทศในการนำเข้าและส่งออกสินค้าทางการเกษตร ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของรากลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืช

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทับตัวอย่าง 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 บิกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate
5. สารเคมี ได้แก่
   - Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™)
   - Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (Glucanex®)
   - Lithium Borate buffer (LB)
   - PureDireX Genomic DNA Isolation Kit
   - QIAquick Gel Extraction Kit
   - SERVA HiSens Stain G
   - Nuclease-Free Water

ศูนย์วิทยาการเกษตร

- ไพร์เมอร์ ได้แก่

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990)

the translation elongation factor 1-alpha (EF1-α)

EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG (Carbone and Kohn, 1999)

EF-2: GGARGTACCAGTSATCATGTT (O'Donnell et al., 1998)

the Large Subunit (LSU, 28S)

LROR: ACCCGCTGAACTTAAGC (Vilgalys and Hester, 1990)

LR6: CGCCAGTTTCTGCTTACC (Vilgalys and Hester, 1990)

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

- วิธีการ

1. เก็บ และรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid จากพืชต่างๆ ที่แสดงอาการใบจุด โดยเก็บตัวอย่างโรคพืชจากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย โดยจะเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรคและเก็บใบของพืชที่ปกติ ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างในสภาพที่แห้ง เพื่อให้ส่วนของแผลอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์และหลีกเลี่ยงที่เชื้อราชนิดอื่นจะขึ้นปกคลุมเนื่องจากความชื้น บันทึกข้อมูลรายละเอียดของการเก็บตัวอย่าง วันที่ พิกัดสถานที่ ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้ตัวอย่างโรคที่ใช้ในการศึกษา จะรวมถึงตัวอย่างแห้งของโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid ที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของรากลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะอาการของโรค และเชื้อสาเหตุโรคโดยตรงจากพืช

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

แยกรา และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

- แยกราโดยวิธี Tissue transplant โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหาร Potato

กรมวิชาการเกษตร

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 ที่หยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 1 มิลลิลิตร ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ เอียงจานเลี้ยงเชื้อโดยวนเป็นลักษณะวงกลมนานประมาณ 1-3 นาที จากนั้นเทของเหลวที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ ลงบน PDA จานใหม่ หากผิวหน้าอาหาร PDA เริ่มแห้ง ให้เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อประมาณอีกประมาณ 0.5-1 มิลลิลิตร ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำซ้ำแบบเดิมอีก จนได้จานเลี้ยงเชื้ออย่างน้อย 3 จาน บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน หากพบราเจริญขึ้นก่อนเวลา 10 วัน ให้ทำการคัดทิ้ง เนื่องจากราในกลุ่ม cercosporoid เจริญช้า ซึ่งจะใช้ระยะเวลานานกว่า 10 วัน จึงจะพบ colony

จำแนกชนิดรา cercosporoid สาเหตุโรคพืช

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

3. จำแนกชนิดของรากลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืชโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สกัดดีเอ็น

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

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White et al., 1990)

the translation elongation factor 1-alpha (EF1-**α**)

EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG (Carbone and Kohn, 1999)

EF-2: GGARGTACCAGTSATCATGTT (O'Donnell et al., 1998)

the Large Subunit (LSU, 28S)

LROR: ACCCGCTGAACTTAAGC (Vilgalys and Hester, 1990)

LR6: CGCCAGTTTCTGCTTACC (Vilgalys and Hester, 1990)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของตำแหน่ง ITS EF1-**α** และ LSU ด้วย Green Hot Start PCR Master Mix

ลิขสิทธิ์การเกษตร

(biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนด annealing temperature ที่ 56 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ที่ได้จากการทดลองมาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious version 8.1.9 (http://www.geneious.com, Kearse *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consencus sequence ที่บันทึกไว้ในรูปแบบ fasta ไฟล์) ที่ได้จากการทดลองและจากการรวบรวมข้อมูล มาจัดเรียง (align) ด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Katoh and Toh, 2008) จากนั้นตรวจสอบการจัดเรียง (alignment) โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 (Kumar et al., 2016) จากนั้นใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) ทำการรวมชุดข้อมูลของดีเอ็นเอเป็น combined dataset บันทึกชุด alignment ในรูปแบบไฟล์ nexus หรือ nex โดยใช้โปรแกรม Mesquite

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

จำแนกชนิดโดยวิเคราะห์จาก combined dataset วิเคราะห์ด้วย phylogenetic criteria 2 แบบคือ

1. Maximum Likelihood (ML) โดยเตรียมไฟล์ phy และวิเคราะห์โดยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ซึ่งจำเพาะต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command –f a) เริ่มจาก random starting tree และ กำหนด maximum likelihood bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง

2. Bayesian inference (BI) เตรียมไฟล์ nexus วิเคราะห์โดยโปรแกรม MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) โดยใช้วิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ค่าตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้ กำหนด 4 runs แต่ละ run ประกอบด้วย 4 chains วิเคราะห์จำนวน 10 ล้าน generations ตั้งค่า cold chain ที่ temperature 0.25 สุ่มตัวอย่าง substitution model parameters และบันทึก trees ทุก 500 generations ตรวจสอบความเชื่อมั่นของ topology ด้วย cumulative and compare functions ด้วย AWTY (Nylander *et al*., 2008)

ศรีนครินทรวิโรฒ

4. บันทึกข้อมูลเชื้อรา cercosporoid ที่รายงานพบในประเทศไทย

รวบรวมข้อมูลการจัดจำแนกรา cercosporoid ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและที่มีการจัดจำแนกด้วยข้อมูลชีวโมเลกุลของรา cercosporoid ที่มีรายงานพบในประเทศไทย เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาประเมินความเชื่อมั่นในการจัดจำแนกชนิด เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับ การตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชเพื่อการวินิจฉัยที่ถูกต้อง

5. การเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราและเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ

ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2562 – พฤษภาคม 2564

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. เก็บ และรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรากลุ่ม cercosporoid

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่มีลักษณะพ้องกับอาการจุดที่เกิดจากเชื้อรา cercosporoid จากพืช 22 ชนิด ได้แก่ กระเจี๊ยบเขียว กล้วย กล้วยไม้ กวางตุ้ง กัญชา ขึ้นฉ่าย ตำลึง แตงโม ถั่วเขียว ถั่วแปบ ถั่วฝักยาว ถั่วลิสง บัว บานชื่น บานไม่รู้โรย บีทรูท ผักคอส พริก มะระขี้นก มะละกอ มันสำปะหลัง และ ยาสูบ จากพื้นที่ปลูกพืชในประเทศไทย (Table 1.2.13.1) ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.13.1: Leaf spot specimens caused by cercosporoid fungi collected from this study (2019-2021)

Host	Locations
Abelmoschus esculentus	Mueang district, Surat Thani province
Musa sp.	Tha Muang district, Chataburi province
Dendrobium sp.	Nabirom sub-district, Bang lan district, Nakhon Pathom province
Brassica chinensis	Ban Kham, Chatturat district, Chaiyaphum province
Cannabis sativa	Don Khwang, Mueang district, Uthai Thani
Apium graveolens	Wang Kanai, Tha Maka district, Kanchanaburi province
Coccinia grandis	Doi Lan, Mueang district, Chiangrai province;
	Na Nai, Phon Sawan district, Nakhon Phanom province
Citrullus lanatus	Sa Yai Som, U Thong district, Suphan Buri province
Vigna radiata	Lam Phayon, Tak Fa district, Nakhon Sawan province
Lablab purpureus	Doi Lan, Mueang district, Chiangrai province
Vigna unguiculata	Sai Nung, Tha Koy, Tha Yang district, Phetchaburi province;
	Kaeng Krachan District Phetchaburi province
Arachis hypogaea	Huay Sai Nuea sub-district, Cha-am district, Phetchaburi
Nelumbo nucifera	Nhong Han, San Sai district, Chiangmai province
Zinnia violacea	Thung Song district, Nakhon Si Thammarat province
Gomphrena globosa	Thung Song district, Nakhon Si Thammarat province
Beta vulgaris	Pak Khwae, Mueang district, Sukhothai province
Romaine lettuce	Phu Thap Buek, Phetchabun province
Capsicum furtescens	Cherng Doi, Doi Saket district, Chiangmai province; Pak Phanang district,
	Nakhon Si Thammarat province; Dune Sart, Kranuan district,
	Khon Kaen province; Tha Chana district, Surat Thai province
Momordica charantia	Ban Na Makhua, Pla Pak district, Nakhon Phanom province
Carica papaya	Ban Bang Por, Klong Noi district, Nakhon Si Thammarat; Kaeng Krachan
	District Phetchaburi province; Doi Lan, Mueang district, Chiangrai province;
	Ban Na Makhua, Pla Pak district, Nakhon Phanom province
Manihot esculenta	Fhahoun sub-district, Ko Wang district, Yasothon province
Nicotiana tabacum	Bang Shong, Pak Khwae, Mueang district, Sukhothai province

กรมวิชาการเกษตร

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของรากลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ได้จำนวน 65 ไอโซเลท จำแนกชนิดเบื้องต้นด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา พบเชื้อราที่มีลักษณะพ้องกับเชื้อราในกลุ่ม cercosporoid และ helminthosporoid (Figure 1.1.13.1-1.1.13.18)

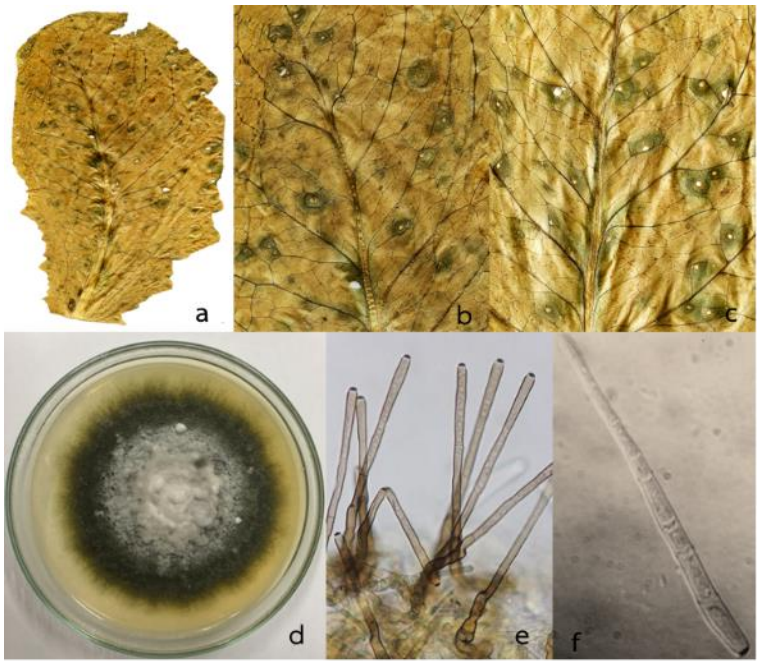


Figure 1.2.13.1: Leaf spot on *Romaine lettuce* (M0351) caused by *Cercospora* sp.1
a-c: spot symptoms leaves; d: colony of fungi on PDA;
e: conidiophores; f: conidia

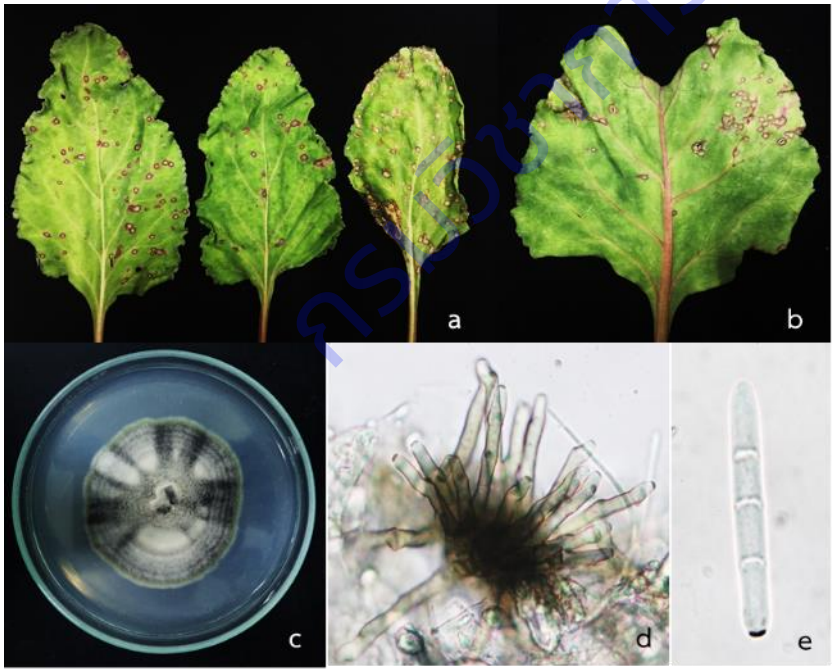


Figure 1.2.13.2: Leaf spot on leaves of *Beta vulgaris* (M0879) caused by *Cer. beticola*
a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;
d: conidiophores; e: conidia

กรมวิชาการเกษตร

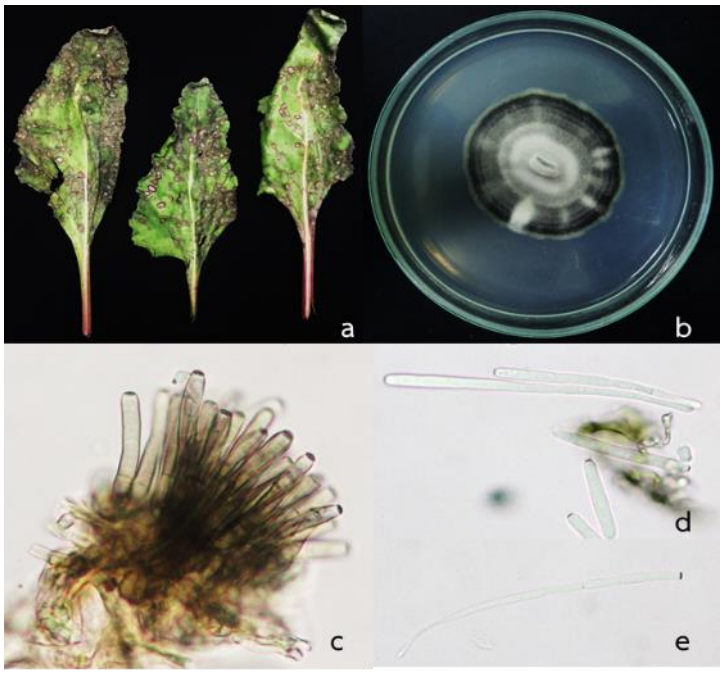


Figure 1.2.13.3: Leaf spot on leaves of *Beta vulgaris* (M0878) caused by *Cercospora beticola*

a: spot symptoms leaves; b: colony of fungi on PDA;

c: conidiophores; d-e: conidia

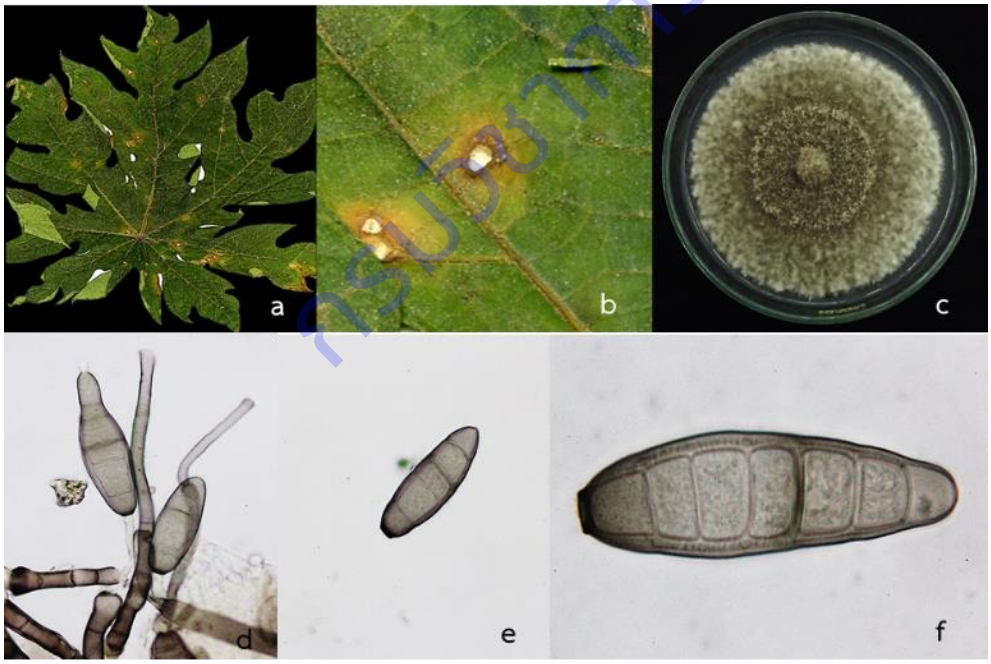


Figure 1.2.13.4: Leaf spot on leaves of *Carica papaya* (M0987) caused by *Corynespora cassiicola*

a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;

d-f: conidia

กรมวิชาการเกษตร

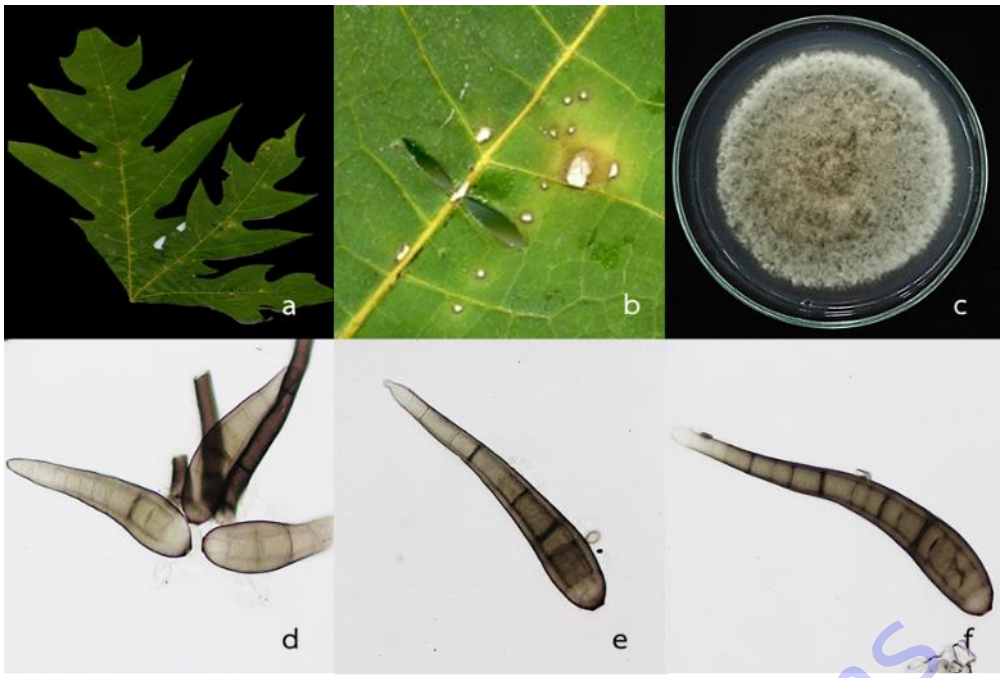


Figure 1.2.13.5: Leaf spot on leaves of *Carica papaya* (M0990) caused by *Corynespora cassiicola*

a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;

d-f: conidia

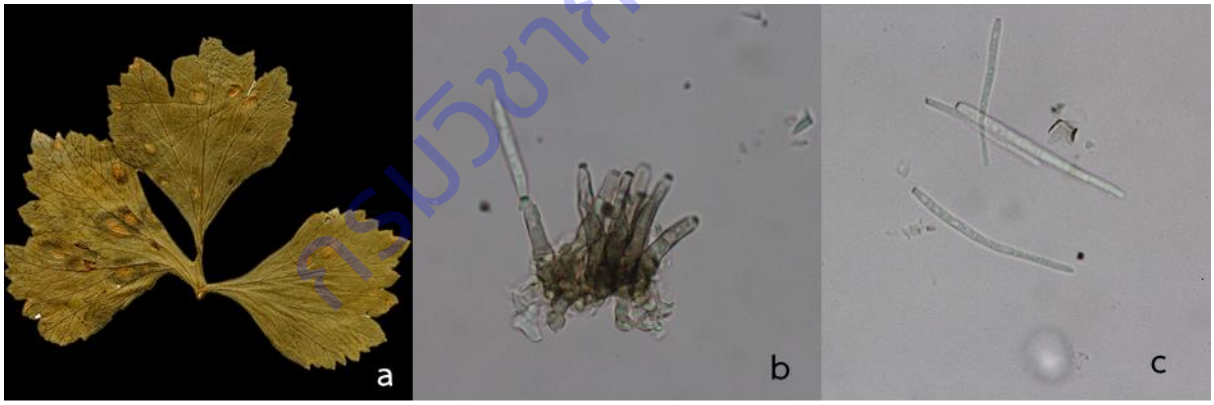


Figure 1.2.13.6: Leaf spot on leaves of *Apium graveolens* (M1095) caused by *Cercospora apii*

a: spot symptoms leaves; b: conidiophore; c: conidia

กรมวิชาการเกษตร

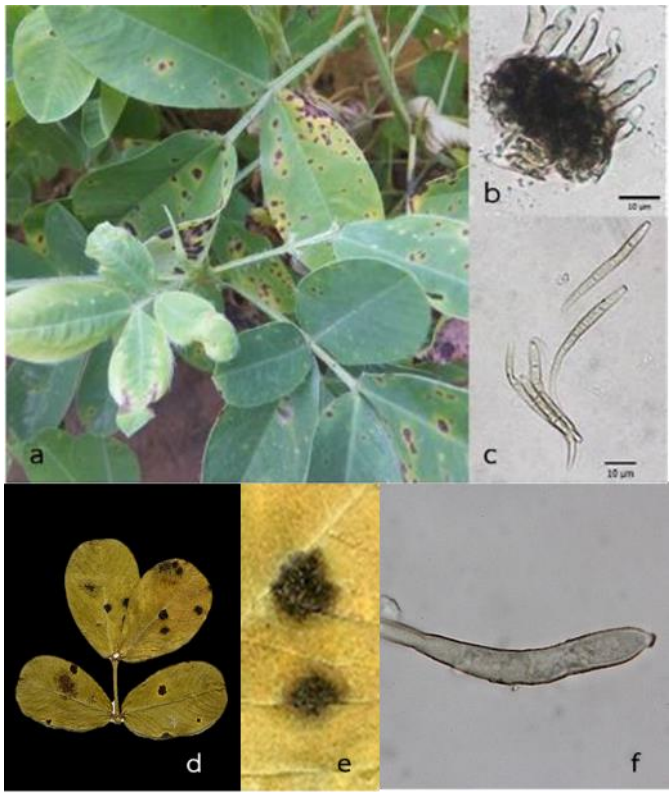


Figure 1.2.13.7: Leaf spot on leaves of *Arachis hypogaea* (C-23) caused by *Cercospora arachidicola* (syn. *Passalora arachidicola*)

a, d-e: spot symptoms leaves; b: conidiophore; c, f: conidia

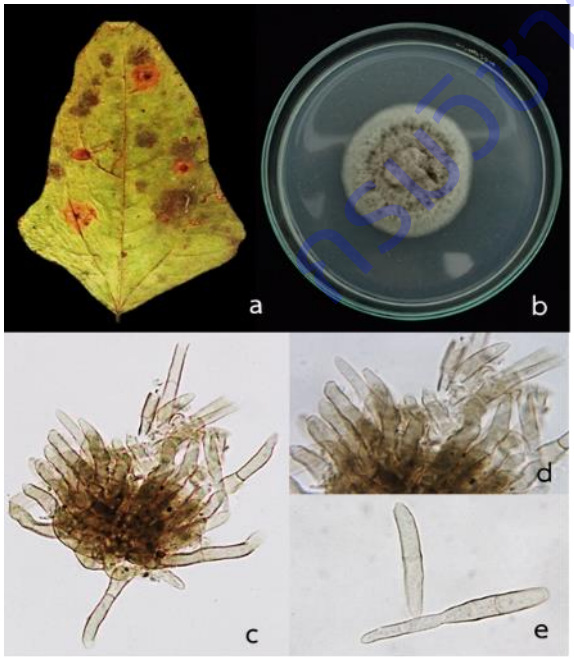


Figure 1.2.13.8: Leaf spot on leaves of *Vigna unguiculata* (M0521) caused by *Corynespora cassiicola*

a: spot symptoms leaf; b: colony of fungi on PDA;

c-d: conidiophoresd; e: conidia

กรมวิชาการเกษตร

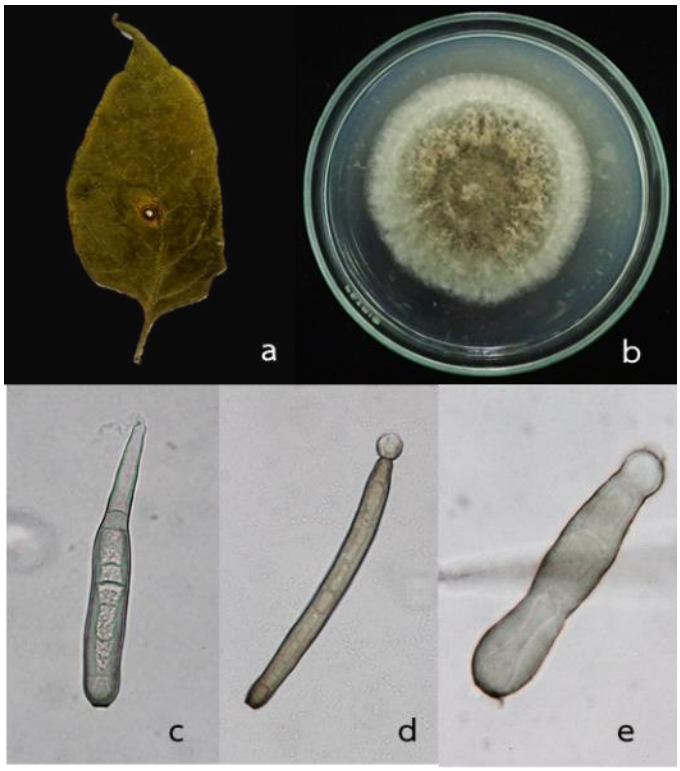


Figure 1.2.13.9: Leaf spot on leaves of *Capsicum furtescens* (M0529) caused by *Corynespora cassiicola*

a: spot symptoms leaf; b: colony of fungi on PDA; c-e: conidia

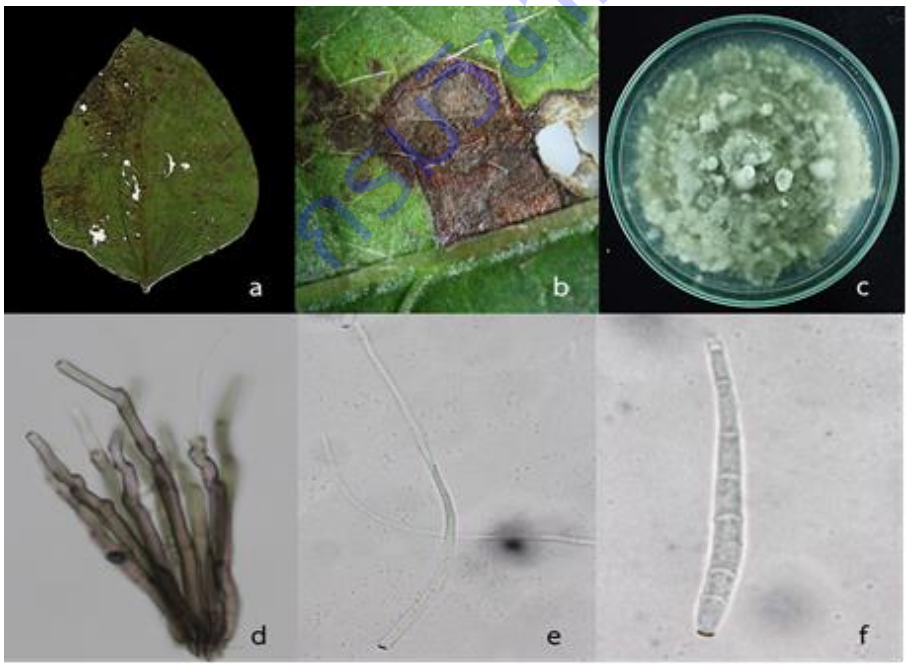


Figure 1.2.13.10: Leaf spot on *Romaine lettuce* (M0967) caused by *Cercospora* sp.2

a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;

d: conidiophores; e-f: conidia

ศูนย์วิทยทรัพยากร

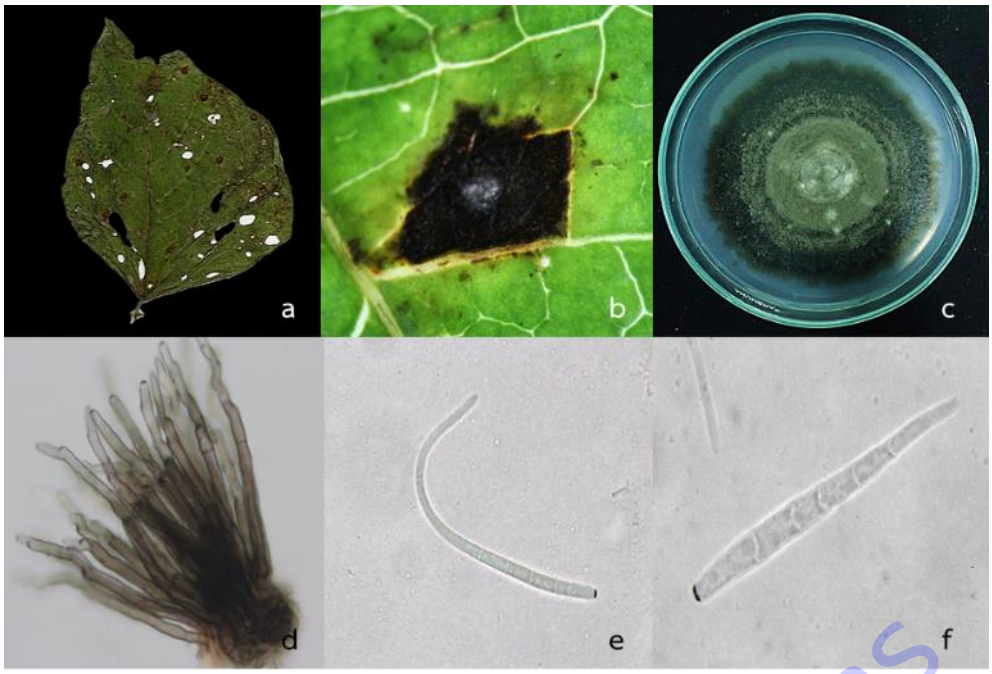


Figure 1.2.13.11: Leaf spot on *Romaine lettuce* (M0967) caused by *Cercospora* sp.2
a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;
d: conidiophores; e-f: conidia

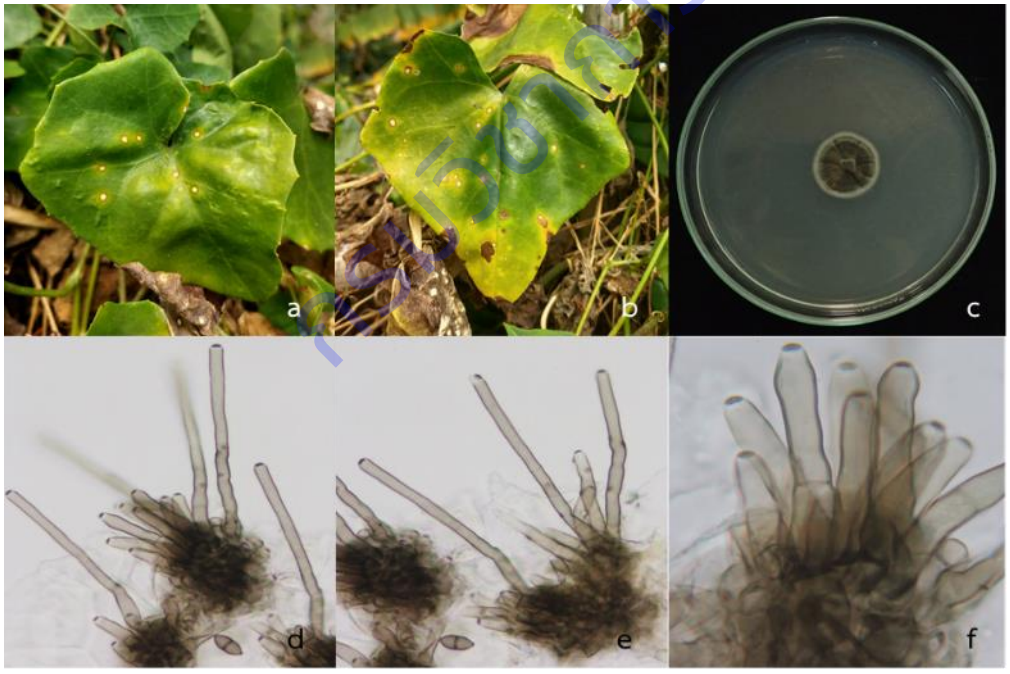


Figure 1.2.13.12: Leaf spot on *Coccinia grandis* (M0983) caused by *Cercospora citrulina*
a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;
d-f: conidiophores

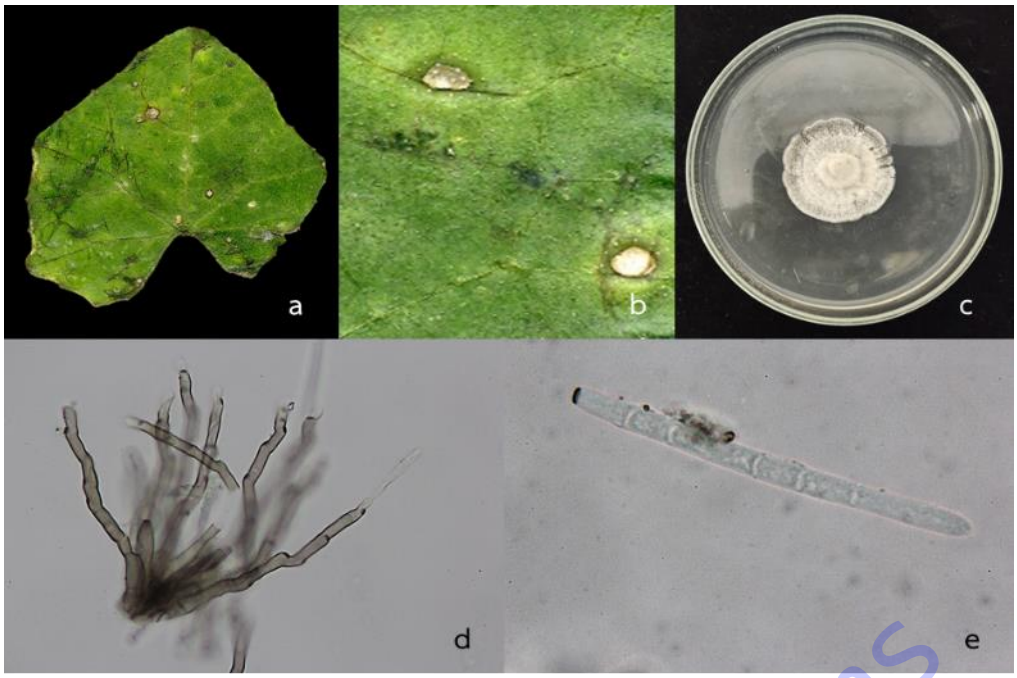


Figure 1.2.13.13: Leaf spot on *Coccinia grandis* (M1008) caused by *Cercospora citrulina*
a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;
d: conidiophores; e: conidia

Figure 1.2.13.14: Leaf spot on *Dendrobium sp.* caused by *Pseudocercospora dendrobii*
a-b: spot symptoms leaves; b: conidia

กรมวิชาการเกษตร

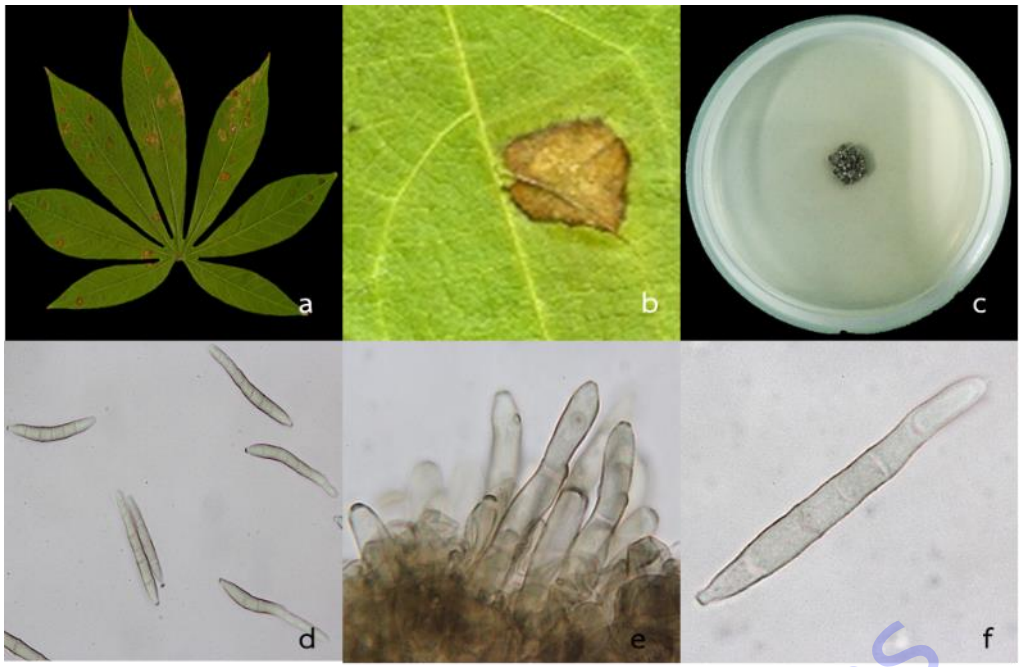


Figure 1.2.13.15: Leaf spot on *Manihot esculenta* (M0993) caused by *Mycosphaerellaceae*

a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;

e: conidiophores; d, f: conidia

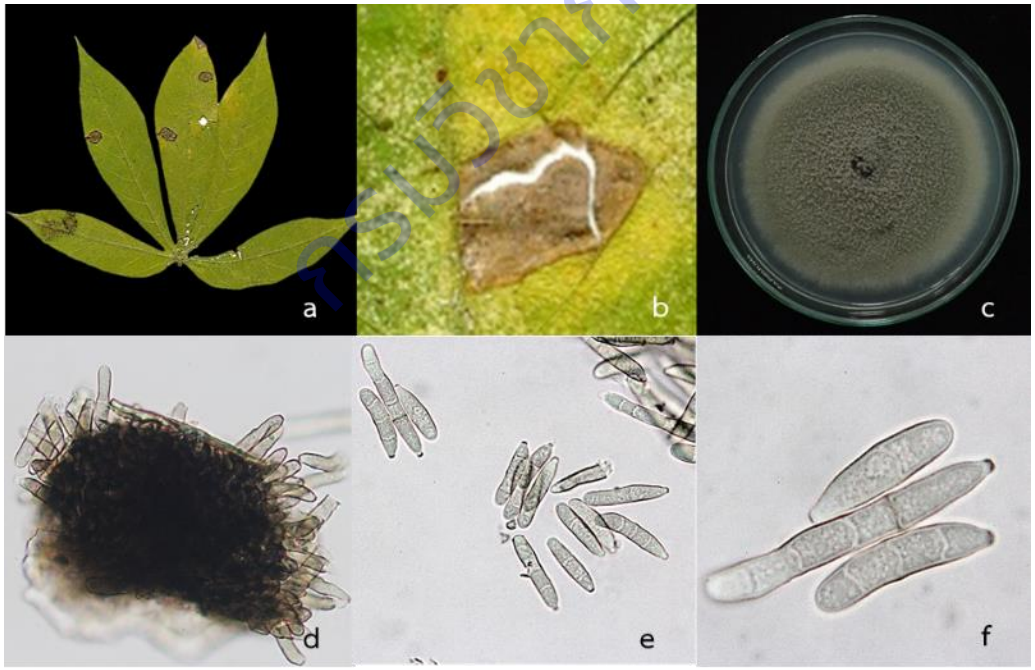


Figure 1.2.13.16: Leaf spot on *Manihot esculenta* (M0988) caused by *Mycosphaerellaceae*

a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;

d: conidiophores; e-f: conidia

กรมวิชาการเกษตร

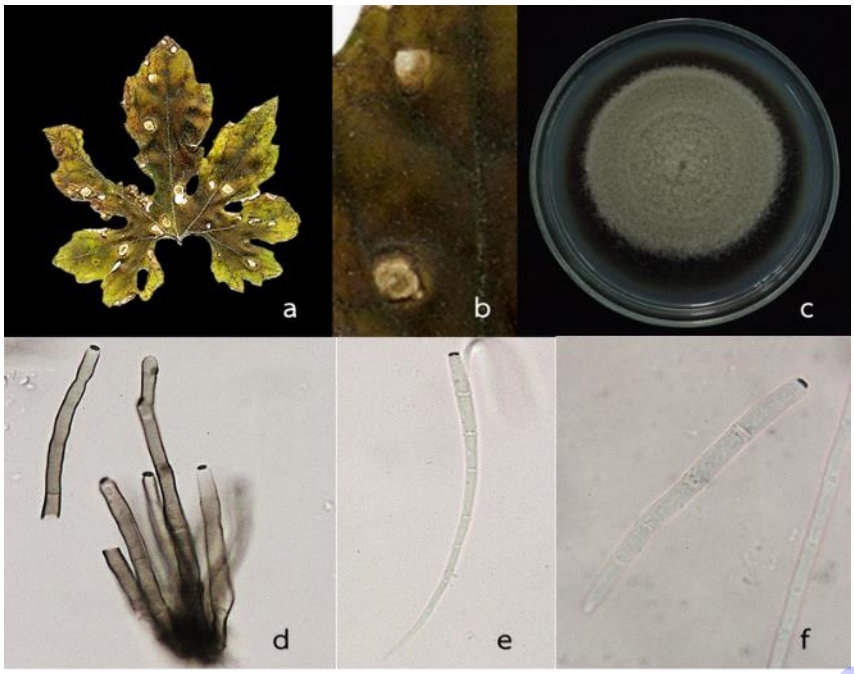


Figure 1.2.13.17: Leaf spot on *Momordica charantia* (M0985) caused by *Cercospora citrulina*

a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;

d: conidiophores; e-f: conidia

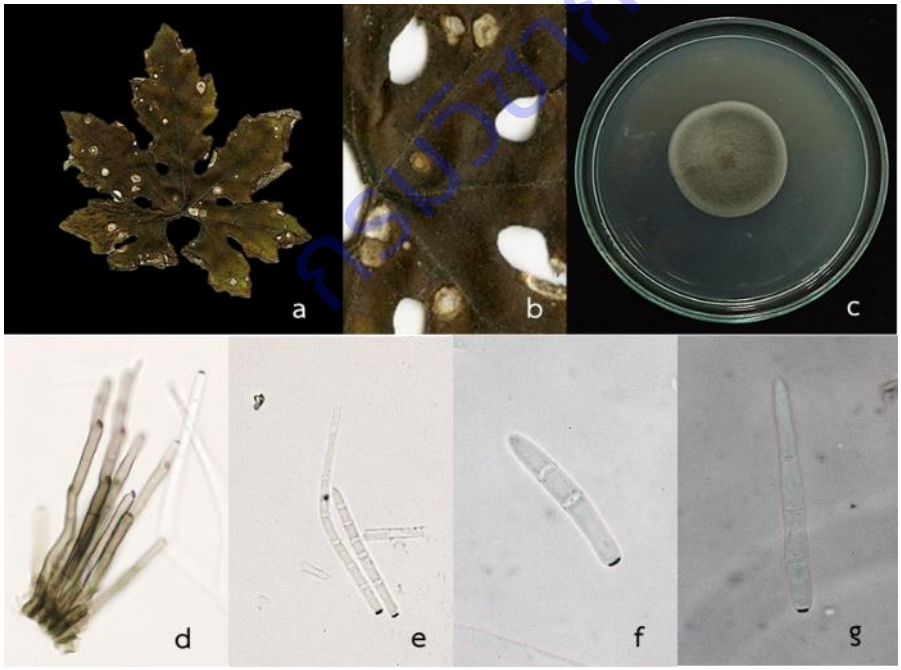


Figure 1.2.13.18: Leaf spot on *Momordica charantia* (M0986) caused by *Cercospora citrulina*

a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;

d: conidiophores; e-f: conidia

กรมวิชาการเกษตร

3. จำแนกชนิดของรากลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืชโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

ทำการคัดเลือกตัวแทนเชื้อราที่จำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานชนิดเดียวกัน จำนวน 40 ไอโซเลท มาสกัดดีเอ็นเอและทำ PCR ตำแหน่ง ITS เพื่อวิเคราะห์ชนิดเบื้องต้น พบว่าเป็นเชื้อราในกลุ่ม cercosporoid จำนวน 28 ไอโซเลท ใน 4 genera ได้แก่ *Cercospora*, *Pseudocercospora*, *Corynespora* และ *Mycosphaerella* จากนั้นจำแนกชนิดด้วยวิธี multi-locus phylogenetic reconstruction โดยเปรียบเทียบกับ type sequences (Table 1.2.13.2) สามารถจำแนกได้ ดังนี้

***Cercospora*:** *Cer. apii* (ขึ้นฉ่าย), *Cer. beticola* (บีทรูท), *Cer. citrulina* (แตงโม มะระขี้นก ตำลึง), *Cer. arachidicola* (syn. *Passalora arachidicola*) (ถั่วลิสง), *Cercospora* sp.1 (คะหน้า ผักคอส หรือ ผักกาดหวาน), *Cercospora* sp.2 (ถั่วเขียว)

Corynespora: *Cory. torulosa* (กล้วย) และ *Cory. cassiicola* (มะละกอ กวางตุ้ง ถั่วฝักยาว พริก กล้วย และกัญชา)

***Pseudocercospora*:** *Pseu. dendrobii* (กล้วยไม้) และ *Pseu. abelmoschi* (กระเจี๊ยบเขียว)

***Mycosphaerellaceae*:** *Mycosphaerella* sp.1 (มันสำปะหลัง)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Cercospora* จะพบว่า เชื้อราในกลุ่มนี้มีความหลากหลายและเป็นกลุ่ม complex เมื่อพิจารณาเพื่อการจำแนกในกลุ่มหรือ clade ที่มีความซับซ้อน อาจต้องเพิ่มตำแหน่งของยีนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป (Figure 1.2.13.19) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาพบว่า มีเชื้อรา *Cercospora* ที่ไม่ตรงกับชนิดใดที่เคยมีรายงาน โดยเฉพาะ *Cercospora* sp.1 ที่พบในตัวอย่างของผักคอสและผักคะน้า ซึ่งพืชอาศัยทั้งสองอยู่ในพืชตระกูลกะหล่ำ ซึ่งคล้ายกับกรณีของเชื้อรา *Cer. citrulina* ที่พบในตัวอย่างจากพืชตระกูลแตง เช่นแตงโม มะระขี้นก ตำลึง

จากการพิจารณาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Corynespora* จะพบว่าเชื้อราในกลุ่มนี้มีความ complex น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราใน genus *Cercospora* ซึ่งจากการศึกษานี้พบ *Cory. torulosa* และ *Cory. cassiicola* บนพืชอาศัยตามที่เคยมีรายงานในประเทศไทย อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาใน clade หรือกลุ่มของเชื้อรา *Cory. cassiicola* (Figure 1.2.13.20) จะพบว่ามีความหลากหลายในเชื้อรากลุ่มนี้ ซึ่งมีแนวโน้มว่า เชื้อราที่พบบนกัญชา จะเป็นเชื้อรา *Corynespora* ที่แตกต่างจาก *Cory. cassiicola* หรือเชื้อรา *Corynespora* อื่นๆ ที่มีรายงานในปัจจุบัน ซึ่งต้องศึกษาและเพิ่มตำแหน่งของยีนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

4. บันทึกข้อมูลเชื้อรา cercosporoid ที่รายงานพบในประเทศไทย

รวบรวมข้อมูลการจัดจำแนกรา cercosporoid ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและที่มีการจัดจำแนกด้วยข้อมูลชีวโมเลกุลของรา cercosporoid ที่มีรายงานพบในประเทศไทย เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาประเมินความเชื่อมั่นในการจัดจำแนกชนิด เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับ การตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชเพื่อการวินิจฉัยที่ถูกต้อง (Table 1.2.13.3)

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.13.2: List of *Cercospora* and *Corynespora* included in this study

Taxa	Accession No.	Host	GenBank Acession No.	
			ITS	tef1
Cercospora agavicola	CPC 117292	*Agave tequilana*	NR111175	AY966897
Cer. althaeina	CBS 248.67	*Althaea rosea*	NR111770	JX143284
Cer. apii	CBS 116455	*Glebionis coronaria*	NR119525	AY840486
	M1095	*Apium graveolens*	this study	this study
Cer. apiicola	CBS 116457	*Apinum* sp.	NR119526	AY840503
Cer. armoraciae	CBS 250.67	*Armoracia rusticana*	JX143545	JX143299
Cer. beticola	CBS 116456	*Beta vulgaris*	NR121315	AY840494
	M0878	*Beta vulgaris*	this study	this study
	M0879	*Beta vulgaris*	this study	this study
Cer. celosiae	CBS 132600	*Celosia cristata*	JX143570	JX143326
Cer. citrulina	ICMP 21757	*Citrullus lanatus*	MK210537	MK210420
	M1008	*Coccinia grandis*	this study	this study
	M1028	*Citrullus lanatus*	this study	this study
Cer. coniogrammes	CBS 132634	*Coniogramme japonica*	NR147260	JX143341
Cer. cyperina	CPC 23919	*Cyperus alternifolius*	NR147292	-
Cer. euphorbiae-sieboldianae	CBS 113306	*Euphorbia sieboldiana*	NR147262	JX143351
Cer. flagellaris	CBS 113127	*Eichhornia crassipes*	DQ835075	DQ835101
Cer. glycinicola	CPC 23911	*Glycine max*	KT193670	-
	CPC 23912	*Glycine max*	NR147293	-
Cer. gomphrenigena	CBS 144613	*Gomphrena globosa*	MK442573	MK442690
Cer. helianthicola	LIPIMC 0775	*Helianthus tuberosus*	KC776156	-
Cer. ipomoeae	CEO16	*Ipomoea aquatica*	JN662322	-
Cer. lactucae-sativae	CPC 23819	*Lactuca sativa*	KT193675	-
Cer. malloti	CPC 24828	*Musa sapientum*	KT193691	-
Cer. mercurialis	CBS 550.71	*Mercurialis perennis*	NR111772	JX143387
Cer. mikaniicola	CPC 22030	*Mikania cordata*	KT193694	-
Cer. musigena	CPC 24809	*Musa* sp.	NR147294	-
	CPC 24831	*Musa* sp.	KT193699	-
Cer. nicotianae	CPC 22006	*Nicotiana tabacum*	KT193702	-
Cer. physalidis	CBS 765.79	*Solanum tuberosum*	JX143633	JX143392
Cer. pileicola	CBS 132607	*Pilea pumila*	NR147264	JX143393
Cer. polygonacea	CBS 132614	*Persicaria longiseta*	JX143637	JX143396
Cer. punctiformis	CBS 132626	*Cynanchum wilfordii*	JX143638	JX143397
Cer. rumicis	CPC 5439	*Rumex sanguineus*	JX143648	JX143407
Cer. samambaiae	CPC 24673	*Thelypteris dentata*	NR147287	KT037474
Cer. senecionis-walkeri	CBS 132636	*Senecio walkeri*	JX143649	JX143408
Cer. sojina	CBS 132615	*Glycine soja*	JX143659	JX143419

กรมวิทยาศาสตร์

Table 1.2.13.2: Continued

Taxa	Accession No.	Host	GenBank Acession No.	
			ITS	tef1
Cercospora sp.1	M0308	*Brassica chinensis*	this study	this study
	M0351	*Romaine lettuce*	this study	this study
Cercospora sp.2	M0967	*Vigna radiata*	this study	this study
Cer. vignigena	CBS 132611	*Vigna unguiculata*	NR147266	JX143493
Cer. violae	CBS 251.67	*Viola tricolor*	NR111774	JX143496
Cer. zinniae	CPC 22027	*Zinnia elegans*	KT193706	-
	CPC 22041	*Zinnia elegans*	KT193708	-
Corynespora cassiicola	DX-2a	*Syringa oblata*	MH596853	MT787295
	CBS 161.60	*Syringa oblata*	MH857942	-
	ST1	*Ligustrum ×vicaryi*	KC138855	KX429666
	ZM160181	*Fragaria ×ananassa*	KY082696	KY112719
	M 0327	*Carica papaya*	this study	this study
	M 0379	*Brassica chinensis*	this study	this study
	M 0445	*Carica papaya*	this study	this study
	M 0521	*Vigna unguiculata*	this study	this study
	M 0522	*Carica papaya*	this study	this study
	M 0529	*Capsicum furtescens*	this study	this study
	M 0798	*Musa* sp.	this study	this study
	M 0984	*Vigna unguiculata*	this study	this study
	M 0987	*Carica papaya*	this study	this study
	M 0990	*Carica papaya*	this study	this study
	M 1117	*Cannabis sativa*	this study	this study
	M 1119	*Cannabis sativa*	this study	this study
	M 1122	*Cannabis sativa*	this study	this study
	M 1124	*Cannabis sativa*	this study	this study
	M 1125	*Cannabis sativa*	this study	this study
	M 1127	*Cannabis sativa*	this study	this study
Cory. citricola	CABI211585	*Poncirus trifoliatus*	FJ852593	-
	CBS 169.77	*Poncirus trifoliatus*	FJ852594	-
Cory. encephalarti	CBS 145555	*Encephalartos* sp.	NR165556	-
Cory. pseudocassiicola	CPC 31708	*Byrsonima* sp.	NR159833	MH327877
Cory. smithii	CABI 5649b	*Fagus sylvatica*	FJ852597	GU349018
	L120	*Hippocrepis emerus*	KY984297	KY984435
	L130	*Fagus sylvatica*	KY984298	KY984436
Cory. submersa	HKAS 92703	Submerged wood	NR170017	-
Cory. thailandica	CBS 145089	Wood in forest	NR161145	MK047567
Cory. torulosa	CPC 15989	*Musa acuminata*	NR145181	-
	M 0796	*Musa* sp.	this study	this study
	M 0799	*Musa* sp.	this study	this study
Cyclothyriella rubronotata	TR	*Acer pseudoplatanus*	KX650541	KX650516
Septoria provencialis	CPC 12226	*Eucalyptus* sp.	DQ303096	JX143522

กรมวิชาการเกษตร

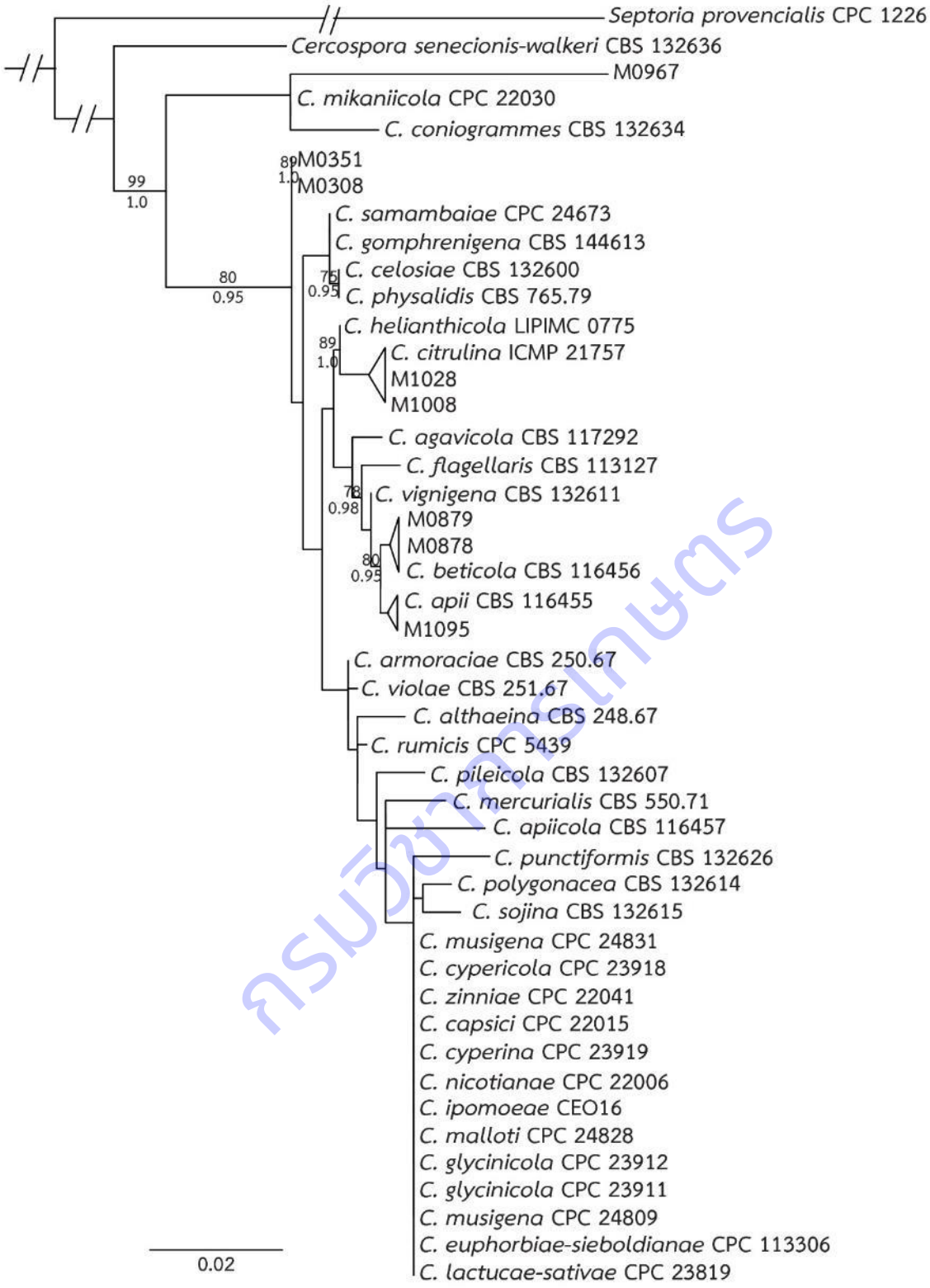


Figure 1.2.13.19: Phylogram of *Cercospora* obtained in a maximum likelihood search in RAxML of concatenated dataset of ITS and TEF1 gene regions. Bootstrap support values (≥70%) from 1,000 replicates above nodes. Posterior probabilities (≥0.95) summarized from 10,000 converged trees obtained in a Bayesian search are shown below nodes.

กรมวิชาการเกษตร

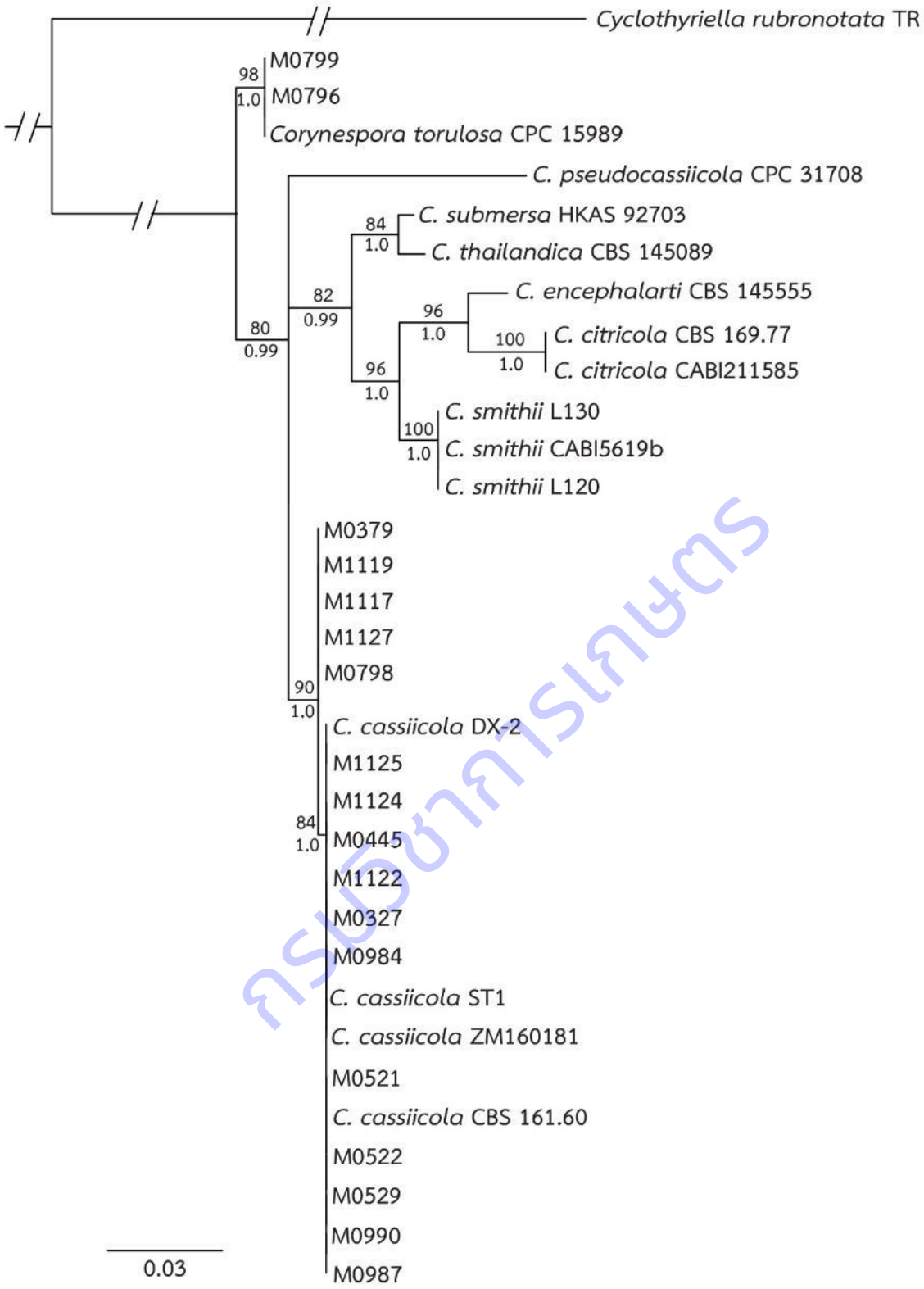


Figure 1.2.13.20: Phylogram of *Corynespora* obtained in a maximum likelihood search in RAxML of concatenated dataset of ITS and TEF1 gene regions. Bootstrap support values (≥70%) from 1,000 replicates above nodes. Posterior probabilities (≥0.95) summarized from 10,000 converged trees obtained in a Bayesian search are shown below nodes.

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.13.3: The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand.

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Pseudocercospora dendrobii	*Cercospora dendrobii*	กล้วยไม้	ปื้นเหลือง	ใบ	2561	ชนินทร และคณะ, 2561
Pseudocercospora abelmoschi	*Cercospora abelmoschi*	กระเจี๊ยบเขียว	จุด	ใบ	2561	ชนินทร และคณะ, 2561
	Cercospora hibisci					
	Cercospora hibisci-manihotis					
Cercospora zinniae	*Cercospora atrocincta*	บานชื่น	จุด	ใบ	2561	ชนินทร และคณะ, 2561
	Cercospora atricincta			กลีบดอก		
	Cercosporina zinniae					
Cercospora apii	*Cercospora penicillata var. apii*	ขึ้นฉ่าย	จุด ไหม้	ใบ	2549	ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2549
	Cercospora penicillata f. apii					
	Cercosporina apii					
	Cercospora apii f. dauci-carotae					
	Cercospora levistici					
	Cercospora apii f. clerodendri					
Passalora arachidicola	*Passalora arachidicola*	ถั่วลิสง	จุด	ใบ	2513	เฉลิมชัย และคณะ, 2513
	Cercospora arachidis var. macrospora					
Cercospora asparagi	*Cercospora caulicola*	หน่อไม้ฝรั่ง	ไหม้	กิ่ง ก้าน ใบ	2554	พรพิมล และคณะ, 2554
	Cercosporina asparagicola					
Pseudocercospora timorensis	*Cercospora batatae*	มันเทศ	จุด	ใบ	2509	Puckdeedindan, 1966
	Ramularia batatae					
	Cercospora timorensis					
	Cercospora ipomoeae-purpureae					

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.13.3: Continued

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Cercospora beticola	*Cercosporina beticola*	สวิสชาร์ด	จุด	ใบ	2554	พรพิมล และคณะ, 2554
	Cercospora flagilliformis					
	Cercospora longissima	ผักกาดหอม ผักสลัด	จุด	ใบ	2520	พัฒนา และคณะ, 2520
	Cercospora flagelliformis					
	Cercospora anthelmintica					
	Cercospora spinaciae					
	Cercospora chenopodiicola					
	Cercosporina spinacicola					
	Cercospora beticola var. poonensis					
Cercospora brassicicola	*Cercospora brassicae-campestris*	ผักกาดเขียวปลี	จุด	ใบ	2509	Puckdeedindan, 1966
	Cercospora brassicae-junceae					
Cercospora canescens	*Cercosporiopsis canescens*	ถั่วหรั่ง	จุด ไหม้	ใบ	2536	ชุติมันต์ และคณะ, 2536
	Cercospora vignicaulis	ถั่วแขก	จุด	ใบ	2528	ประไพศรี และคณะ, 2528
		ถั่วลิสง	จุด	ใบ	2513	เฉลิมชัย และคณะ, 2513
		ถั่วฝักยาว	จุด	ใบ	2527	ประไพศรี และคณะ, 2527
		ถั่วเขียว	จุด	ใบ	2523	Sontirat *et al.*, 1980
Phaeoramularia capsicicola	*Cercospora capsicicola*	พริก	จุดตากบ	ใบ	2554	พรพิมล และคณะ, 2554
	Cladosporium capsici	พริกชี้ฟ้า	จุด	ใบ	2554	อภิรัชต์ และคณะ, 2554
	Phaeoramularia capsicicola	พริก	จุดตากบ	ใบ	2516	อารีย์, 2516
	Passalora capsicicola					
	Cercospora capsici					

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.13.3: Continued

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Clarohilum henningsii	*Cercospora henningsii*	มันสำปะหลัง	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
	Cercospora manihotis					
	Septogloeum manihotis					
	Helminthosporium manihotis					
	Cercospora cearae					
Zasmidium citri-griseum	*Stenella citri-grisea*	ส้มเขียวหวาน	กริสซิมีลาโนส	ใบ	2550	วุฒิศักดิ์ และคณะ, 2550
	Zasmidium citri-griseum	ส้มจุก	จุดน้ำหมาก			
		ส้มจีน				
		ส้มโชกุน				
Cercospora citrullina	*Cercospora cucurbitae*	มะระ, มะระจีน	เน่า	ยอด ใบ ผล	2528	ปราณีต และคณะ, 2528
	Cercospora sechii	ตำลึง	จุด	ใบ	2554	พรพิมล และคณะ, 2554
	Cercospora momordicae	แตงโม	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
	Cercospora trichosanthis					
	Cercospora chardoniana					
	Cercospora momordicae	มะระ, มะระจีน	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
	Cercospora momordicae					
	Cercospora luffae					
Cercospora coffeicola	*Cercospora herrerana*	กาแฟ	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
	Ramularia goeldiana	กาแฟ	จุด	ใบ	2554	พรพิมล และคณะ, 2554
Cercospora daizu miura	*Passalora sojina Syn Cer. daiza miura*	จุดตากบ	จุด	ใบ	2514	ประพันธ์ และประวิทย์, 2514

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.13.3: Continued

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Cercospora duddiae	*Passalora sojina Syn Cer. daiza miura*	กระเทียม	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
		หอมใหญ่	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
		หอม, หอมแดง, หอมเล็ก	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
		หอมเล็ก, หอมแบ่ง			2545	นิตยา, 2545
Cercospora gerberae		เยอบีร่า	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
Cercospora gossypina		ฝ้าย	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
					2523	พัฒนา และคณะ, 2523
Cercospora helianthicola		ทานตะวัน	จุด	ใบ	2523	วสันณ์ และมานะ, 2523
Cercospora hydrangea	*Cercosporina hydrangeicola*	ไฮเดรนเยีย	จุด	ใบ	2554	พรพิมล และคณะ, 2554
	Cercospora hydrangeana					
	Cercospora arborescentis					
Cercospora kikuchii	*Mycosphaerella phaseoli*	ถั่วเหลือง	จุด	ใบ	2522	พัฒนา และคณะ, 2522
Cercospora lactucae-sativae	*Cercospora longispora*	กะหล่ำปลี	จุด	ใบ	2552	พรพิมล, 2552
	Cercospora longissima	ผักกาดหอม ผักสลัด	จุด	ใบ	2552	พรพิมล, 2552; 2554
	Cercospora lactucae				2554	
	Cercospora ixeridis-chinensis					
	Cercospora lactucae-indicae					
Cercospora lactucae-indicae	*Cercospora longispora*	กระเจี๊ยบมอญ, กระเจี๊ยบเขียว	จุด	ใบ	2509	Puckdeedindan, 1966
	Cercospora longissima	ผักกาดหอม ผักสลัด	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
	Cercospora lactucae					

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.13.3: Continued

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Cercospora lactucae-indicae	*Cercospora ixeridis-chinensis*	ผักกาดหอม ผักสลัด	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
	Cercospora lactucae-indicae					
Cercospora longipes		อ้อย	จุดสีน้ำตาล	ใบ	2516	อุดม, 2516ก
Cercospora moricola		หม่อน	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
Cercospora physalidis	*Cercospora nicotianae*	ยาสูบ	จุดตากบ	ใบ	2502	ทองพูน, 2502
	Cercospora solanicola				2508	มานพ, 2508
	Cercospora physalicola				2550	ศรีสุรางค์ และคณะ, 2550
	Cercospora raciborskii					
	Cercosporina daturicola					
	Cercospora capsici					
	Cercospora abchasica					
	Cercospora melongenae					
	Cercosporina petuniae					
Cercospora janseana	*Cercospora oryzae*	ข้าว	ขีดสีน้ำตาล	ใบ เมล็ด	2501	วิจิตร, 2501
	Napicladium janseanum		เมล็ดด่าง		2524	สมคิด, 2524
	Passalora janseana				2549	ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2549
	Sphaerulina oryzina				2554	วิชชุดา, และคณะ, 2554
Cercospora personata	*Phaeoisariopsis personata*	ถั่วลิสง	tikka	ใบ	2528	โสภณ, 2528
	Syn. Cercosporidium personatum				2529	ธรรมศักดิ์ และ Beute, 2529
	Syn. Cercospora personata				2513	เฉลิมชัย และคณะ, 2513
					2501	นิรานาม, 2501

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.13.3: Continued

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Cercospora pisa-sativae	*Cercospora pisa-sativae*	ถั่วลันเตา	จุด	ใบ	2534	พัฒนา และคณะ, 2534
Cercospora ricinella	*Cercospora albidomaculans*	ละหุ่ง	จุด	ใบ	2501	นิรานาม, 2501
	Cercospora ricini					
Cercospora sesami		งา	จุด, เมล็ดเน่า	ใบ เมล็ด	2522	พัฒนา และคณะ, 2522
Cercospora sorghi		ข้าวฟ่าง	จุดสีเทา	ใบ	2509	Puckdeedindan, 1966
Cercospora tectonae		สัก	จุด	ใบ	2522	พัฒนา และคณะ, 2522
Cercospora theae	*Cercospora theae*	ชา	จุด	ใบ	2529	วิรัช และคณะ, 2529
	Pseudocercospora ocellata	ชา	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017
Cercospora viticola		องุ่น	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
					2508	ทะนง, 2508
Cercospora zinniae	*Cercospora atricincta*	บานชื่น	จุด	ใบ	2549	ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2549
	Cercospora atrocincta			กลีบดอก	2550	ศรีสุรางค์ และคณะ, 2550
	Cercosporina zinniae				2561	ชนินทร และคณะ, 2561
Clarohilum henningsii	*Cercosporidium henningsii*	มันสำปะหลัง	จุด	ใบ	2520	โสภณ, 2520
	Passalora henningsii				2508	นิรานาม, 2508
	Cercospora manihotis	มันสำปะหลัง	จุด	ใบ	2554	พรพิมล และคณะ, 2554
	Cercospora cearae					
	Septogloeum manihotis					
	Helminthosporium manihotis					
Corynespora cassiicola	*Cercospora melonis*	ถั่วหรั่ง	จุด, ไหม้	ใบ	2536	ชุติมันต์ และคณะ, 2536
	Helminthosporium cassiaecola	ถั่วเขียว, ถั่วเขียวผิวมัน	จุด	ใบ	2534	พัฒนา และคณะ, 2534

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.13.3: Continued

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Corynespora cassiicola	*Cercospora melonis*	แตงฝรั่ง, แตงเทศ	จุด	ใบ	2509	Puckdeedindan, 1966
	Corynespora mazei	ฝ้าย	จุด	ใบ	2524	ชุติมันต์ และคณะ, 2524
	Helminthosporium warpuriae	มะเขือแปราะ	จุด	ใบ	2534	พัฒนา และคณะ, 2534
	Helminthosporium papayae	ถั่วแขก, ถั่วพุ่ม	จุด	ใบ	2526	ชุติมันต์ และคณะ, 2526
	Cercospora vignicola	เยอบีร่า	จุด	ใบ	2553	ธารทิพย, 2553
	Helminthosporium vignae	กะเพรา	จุด	ใบ	2534	พัฒนา และคณะ, 2534
		มะละกอ	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
					2530	กรรณิการ์ และคณะ, 2530
					2555	พรพิมล และคณะ, 2555
		ยางพารา	จุดก้างปลา	ใบ	2530	พงษ์เทพ และกาจนสินธุ์, 2530
		ทับทิม	จุด	ใบ	2534	พัฒนา และคณะ, 2534
		ส้มโอ	จุด	ใบ	2534	พัฒนา และคณะ, 2534
		งา	จุดเป้ากระสุน, เมล็ดเน่า	ใบ	2529	นิวัฒ และพิศาล, 2529
		ถั่วเหลือง	จุด	ใบ	2534	พัฒนา และคณะ, 2534
		ทานตะวัน	ไหม้	ใบ	2537	นลินี และคณะ, 2537
		มะขาม	จุด	ใบ	2534	พัฒนา และคณะ, 2534
		ยาสูบ	จุด	ใบ	2535	พัฒนา และคณะ, 2535
		มะเขือเทศ	จุด	ใบ	2522	สมชัย และคณะ, 2522
		ผักบุ้ง, ผักบุ้งไทย	จุด	ใบ	2534	พัฒนา และคณะ, 2534
		ฟัก, ฟักเขียว, แฟง	จุด	ใบ	2534	พัฒนา และคณะ, 2534

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.13.3: Continued

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Corynespora cassiicola		แตงฝรั่ง, แตงเทศ	จุด	ใบ	2509	Puckdeedindan, 1966
Didymella bryoniae	*Mycosphaerella citrullina*	แตงโม	ยางไหล	ลำต้น	2509	Puckdeedindan, 1966
	Sphaeria bryoniae					
	Didymella melonis					
	Phyllosticta citrullina					
	Sphaerella bryoniae					
	Sphaerella melonis					
Paracercospora egenula	*Cercospora egenula*	มะเขือยาว	จุด	ใบ	2523	พัฒนา และคณะ, 2523
	Cercoseptoria egenula	มะเขือยาว	จุด	ใบ	2532	วสันณ์ และมานะ, 2532
	Pseudocercospora egenula	มะเขือขื่น	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al.*, 2017
	Cercospora solani-melongenae					
Phaeoramularia capsicicola	*Cercospora unamunoi*	พริก	จุด	ใบ	2516	อารีย์, 2516
	Cercospora capsicicola					
	Passalora capsicicola					
	Cercospora capsici					
	Cercospora angolensis	ส้มแมนดาริน	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al.*, 2017
	Phaeoramularia angolensis					
	Pseudophaeoramularia angolensis					
Pseudocercospora abelmoschi	*Cercospora abelmoschi*	กระเจี๊ยบเขียว	จุด	ใบ	2531	นิยมรัฐ และคณะ, 2531
	Cercospora hibisci				2554	พรพิมล และคณะ, 2554
	Cercospora hibisci-manihotis				2561	ชนินทร และคณะ, 2561

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.13.3: Continued

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Pseudocercospora abelmoschi	*Cercospora hibisci-manihotis*	กระเจี๊ยบมอญ,	จุด	ใบ	2531	นิยมรัฐ และคณะ, 2531
		กระเจี๊ยบเขียว			2554	พรพิมล และคณะ, 2554
Pseudocercospora atromarginalis	*Pseudocercospora fuiligena*	มะเขือเทศ	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
	Cercospora atromarginalis				2519	Pachinburavan, 2519
	Cercospora rigospora				2523	พัฒนา และคณะ, 2523
	Cercospora tosensis				2549	ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2549
	Cercospora nigri					
	Cercospora solani-biflori					
	Cercospora solani-nigri					
	Pseudocercospora solani-melongenicola					
Pseudocercospora biophyti	*Cercospora biophyti*	ออกซาลิส เดบิลิส	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017
Pseudocercospora dendrobii	*Cercospora dendrobii*	กล้วยไม้	ปื้นเหลือง	ใบ	2561	ชนินทร และคณะ, 2561
						ทัศนาพร และคณะ, 2553
						พรพิมล และคณะ, 2554
						กุลฉวี, 2526
Pseudocercospora centrosematicola	*Cercospora centrosematicola*	อัญชัน	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017
Pseudocercospora cosmicola	*Cercospora cosmicola*	คอสมอส	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017
Pseudocercospora cruenta	*Cercospora cruenta*	ถั่วฝักยาว	จุด	ใบ	2527	ประไพรศรี และคณะ, 2527
	Cercospora phaseolorum				2505	Chandrasrikul, 1962
	Cercospora vignae	ถั่วฝักยาว	จุด	ใบ	2549	ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2549
	Cercospora dolichi	กวาวเครือขาว	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.13.3: Continued

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Pseudocercospora cruenta	*Cercospora raciborskii*					
	Cercospora vignae-sinensis					
	Cercospora neovignae					
Pseudoperonospora cubensis	*Peronospora cubensis*	บวบเหลี่ยม	ราน้ำค้าง	ใบ	2550	ศรีสุรางค์ และคณะ, 2550
	Peronospora cubensis	มะระ, มะระจีน, มะระยาว	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
	Peronoplasmopara cubensis	แตงฝรั่ง, แตงเทศ	ราน้ำค้าง	ใบ	2501	นิรนาม, 2501
					2526	ประไพรศรี และคณะ, 2526
					2552, 2554	ชนินทร และคณะ, 2552; 2554
		แตงกวา, แตงร้าน	ราน้ำค้าง	ใบ	2525	ประไพรศรี และคณะ, 2525;
					2552, 2554	ชนินทร และคณะ, 2552; 2554
					2550	อมรรัตน์ และคณะ, 2550
		แตงโม	ราน้ำค้าง	ใบ	2509	Puckdeedindan, 1966
		แตงไทย	ราน้ำค้าง	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
					2509	ขวัญไทย, 2509
Pseudocercospora daturina	*Cercospora daturina*	ลำโพงกาสลัก	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017
Pseudocercospora dovyalidis	*Cercospora dovyalidis*	ตะขบควาย	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017
	Pseudocercosporella dovyalidis					
Pseudocercospora euphorbie-pubescentis		โป๊ยเซียน	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017
Pseudocercospora heveae	*Cercospora heveae*	ยางพารา	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
	Cercosporina heveae	ยางพารา	จุด	ใบ	2532	พัฒนา และคณะ, 2532

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.13.3: Continued

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Pseudocercospora jatrophae	*Cercospora jatrophae*	สบู่ดำ	จุด	ใบ	2554	พรพิมล และคณะ, 2554
	Cercoseptoria egenula	มะเขือขื่น	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017
Pseudocercospora eragrostidis		กล้วยไม้	ปื้นเหลือง	ใบ	2553	ทัศนาพร และคณะ, 2553
					2554	พรพิมล และคณะ, 2554
		กล้วยไม้	จุดสนิม	ดอก	2548	ทัศนาพร และคณะ, 2548
Pseudocercospora gardeniae	*Cercospora gardeniae*	พุดซ้อน	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017
Pseudocercospora jujubae	*Cercospora jujubae*	พุทรา, พุทราอินเดีย	จุด	ใบ	2553	พรพิมล และคณะ, 2553
	Cladosporium zizyphi	พุทรา	จุด	ใบ	2553	พรพิมล และคณะ, 2553
		พุทรา	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
Pseudocercospora jatrophae	*Cercospora jatrophae*	สบู่ดำ	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017
Pseudocercospora justiciae	*Cercospora justiciae*	หางกระรอก	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017
Pseudocercospora kaki	*Cercospora kaki*	พลับ	จุด	ใบ	2554	พรพิมล และคณะ, 2554
Pseudocercospora kopsii		พุดชมพู	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017
Pseudocercospora kurimensis	*Cercospora nerii-indici*	ยี่โถ	จุด	ใบ	2532	วสันณ์ และมานะ, 2532
Pseudocercospora liquadambaricola		เมเปิ้ล	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017
Pseudocercospora mali	*Cercospora mali*	สาลี่	จุด	ใบ	2534	พัฒนา และคณะ, 2534
	Cercospora minima					
Pseudocercospora marsdeniae	*Cercospora marsdeniae*	กระทุงหมาบ้า	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017
Pseudocercospora mori	*Cercospora mori*	หม่อน	จุด	ใบ	2552	พัฒนา และคณะ, 2552
		หม่อน	จุด	ใบ	2522	พัฒนา และคณะ, 2522
Pseudocercospora mitracarpi		หญ้าจุกขาว	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.13.3: Continued

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Pseudocercospora musae	*Cercospora musae*	กล้วย	จุด	ใบ	2525	ประไพรศรี และคณะ, 2525;
	Mycosphaerella musicola				2554	พรพิมล และคณะ, 2554
		กล้วย	ใบจุด	ใบ	2511	Chandrasrikul, 1968
					2549	พรพิมล และศรีสุรางค์, 2549
Cercospora nymphaeacea	*Cercospora nymphaeacea*	บัว	จุด	ใบ	2549	ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2549
	Cercoseptoria nymphaeacea				2550	ศรีสุรางค์ และคณะ, 2550
	Cercospora exotica					
	Cercospora nelumbii					
	Cercospora nelumbinis					
		ชา	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017
Pseudocercospora pericampylii		สลิดหม่มคา, เถาเขม่า	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017
Pseudocercospora prunicola	*Cercospora prunicola*	ท้อ	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017
	Cercoseptoria prunicola					
	Cercospora pruni-yedoensis					
	Pseudocercospora pruni-yedoensis					
	Cercoseptoria pruni-perciae					
Pseudocercospora psophocarpi	*Cercospora psophocarpi*	ถั่วเหลือง	จุด	ใบ	2525	อุดม และคณะ, 2525
	Cercospora aranetae	ถั่วพู	จุด	ใบ	2525	วีระศักดิ์ และอุดม, 2525
Pseudocercospora puderi	*Cercospora puderi*	กุหลาบ	จุด	ใบ	2532	วสันณ์ และมานะ, 2532
	Cercospora puderii					
Pseudocercospora punicae	*Cercospora punicae*	ทับทิม	จุด	ใบ	2509	Puckdeedindan, 1966

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.13.3: Continued

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Pseudocercospora repens	*Cercospora repens*	ยี่โถ	จุด	ใบ	2560	Nguanhom *et al*., 2017
Pseudocercospora sp.		สาลี่	จุด	ใบ	2534	พัฒนา และคณะ, 2534
Pseudocercospora timorensis	*Cercospora timorensis*	มันเทศ	จุด	ใบ	2534	พัฒนา, 2534
	Ramularia batatae	มันเทศ	จุด	ใบ	2532	วสันณ์ และมานะ, 2532
	Cercospora batatas					
	Cercospora ipomoeae-purpureae					
Pseudocercospora sawadae	*Cercospora sawadae*	ฝรั่ง	จุด	ใบ	2522	ขจรศักดิ์ และคณะ, 2522
	Cercospora psidii Sawada					ศรีสุรางค์ และคณะ, 2550
Pseudocercospora sesami	*Cercospora sesamicola*	งา	จุดสามเหลี่ยม	ใบ	2529	นิวัฒ และพิศาล, 2529
	Cylindrosporium sesami					
	Cercoseptoria sesami					
Pseudocercospora stizolobii	*Cercospora stizolobii*	ถั่วพร้า	จุด	ใบ	2509	Puckdeedindan, 1966
	Cercospora lussoniensis					
	Cercospora mucunae-capitatae					
Pseudocercospora subsessilis	*Cercospora subsessilis*	สะเดา	จุด	ใบ	2554	พรพิมล และคณะ, 2554
	Cercosporina subsessilis					
	Cercoseptoria domingensis					
	Pseudocercosporella meliae					
	Pseudocercosporella indica					
Passalora arachidicola	*Cercospora arachidicola*	ถั่วลิสง	จุด	ใบ	2554	พรพิมล และคณะ, 2554
	Cercospora arachidis var. macrospora					

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.13.3: Continued

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Passalora bougainvillea	*Cercospora bougainvilleae*	เฟื่องฟ้า	จุด	ใบ	2554	พรพิมล และคณะ, 2554
	Cercosporidium bougainvilleae					
Passalora koepkei	*Cercospora koepkei*	อ้อย	จุดเหลือง	ใบ	2516	อุดม, 2516
	Mycovellosiella koepke					วันทนีย์ และคณะ, 2537
	Pseudocercospora miscanthi	อ้อย	จุดเหลือง	ใบ	2516	อุดม, 2516
					2537	วันทนีย์ และคณะ, 2537
Passalora vaginae	*Cercospora vaginae*	อ้อย	จุด, กาบใบจุดสีแดง	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
	Mycovellosiella vaginae					
Passalora sojina	*Syn Cercospora daizu miura*	ถั่วเหลือง	จุดตากบ	ใบ	2514	ประพันธ์ และประวิทย์, 2514
Passalora rubrotincta	*Cercospora rubrotincta*	ท้อ	จุด	ใบ	2509	Puckdeedindan, 1966
	Cercospora consobrina					
	Cercospora guliana					
	Cercospora amygdali					
	Cercosporina amygdali					
Nothopassalora personata	*Cercosporidium personatum*	ถั่วลิสง	tikka	ใบ	2528	โสภณ, 2528
	Cladosporium personatum				2529	ธรรมศักดิ์ และ Beute, 2529
	Cercospora personata				2513	เฉลิมชัย และคณะ, 2513
	Passalora personata				2501	นิรานาม, 2501
	Phaeoisariopsis personata	ถั่วลิสง	จุด	ใบ	2554	พรพิมล และคณะ, 2554
	Mycosphaerella berkeleyi					
	Cercosporidium personatum					

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.13.3: Continued

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Passalora bougainvillea	*Septogloeum arachidis*	ถั่วลิสง	จุด	ใบ	2554	พรพิมล และคณะ, 2554
	Cercospora arachidis					
Rosisphaerella rosicola	*Cercospora rosicola*	กุหลาบ	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
	Passalora rosicola	กุหลาบ	จุดสีน้ำตาล	ใบ	2515	อนงค์, 2515
	Mycosphaerella rosicola					
	Cercospora rosigena					
	Cercospora rosae					
	Mycological Society					
	Cercospora rosae-indianensis					
Scolecostigmina mangiferae	*Cercospora mangiferae*	มะม่วง	จุด	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
	Stigmina mangiferae					
	Sciniatosporium mangiferae					
Sphaerella caricae	*Mycosphaerella caricae*	มะละกอ	จุด	ใบ	2529	กรรณิการ์ และคณะ, 2529

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทำให้เกิดข้อจำกัดในการจำแนกชนิดให้ชัดเจน อันเนื่องจากจากความคล้ายคลึงกันของลักษณะบางอย่าง เช่น สี รูปร่าง และขนาดของ conidia เมื่อจำแนกชนิดเบื้องต้นว่าเป็นเชื้อราในกลุ่ม cercosporoid เมื่อจำแนกชนิดเพิ่มเติมด้วยข้อมูลพันธุกรรมเบื้องต้นด้วย กลับพบว่าประกอบไปด้วยเชื้อราในกลุ่ม cercosporoid และ helminthosporoid ดังนั้นเพื่อให้เกิดความชัดเจนในการจำแนกชนิด ควรพิจารณาการจำแนกชนิดด้วยข้อมูลพันธุกรรมประกอบการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และจากการศึกษาข้อมูลวิวัฒนาการของเชื้อ *Cercospora* และ *Corynespora* จะพบว่ามีความซับซ้อนหรือประกอบไปด้วยกลุ่ม complex ต่างๆ ในแต่ละ genus ซึ่งต้องมีการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบในเชิงลึกมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะเมื่อจำแนกเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเชื้อราที่มีการจำแนกในปัจจุบันจะพบว่ามีการแยกกลุ่มหรือจัดตั้งรายงานเป็นชนิดใหม่ขึ้นมา ทำให้ข้อมูลเดิมที่เคยใช้ในการจำแนกไม่เพียงพอดังที่พบในตัวอย่างเชื้อรา *Mycosphaerella* บนใบมันสำปะหลังที่พบในการศึกษานี้ รวมถึงพบว่าเชื้อราบางไอโซเลท เช่น *Cercospora* sp. 1 และ *Cercospora* sp. 2 ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เนื่องจากมีความแตกต่างจากชนิดที่เคยมีรายงานในปัจจุบัน

ทั้งนี้เมื่อสามารถจำแนกชนิดได้อย่างละเอียด และนำมาพิจารณาข้อมูลพืชอาศัยประกอบ จะสามารถวิเคราะห์ขอบเขตของพืชอาศัยได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เช่น การศึกษาครั้งนี้เชื้อราไอโซเลท ที่สามารถจำแนกได้เป็น *Cer. citrulina* พบได้ในพืชตระกูลแตง ขอบเขตพืชอาศัยของเชื้อรา *Cer. citrulina* อาจจำเพาะต่อพืชในตระกูลแตง หรือ บางชนิดในตระกูลแตงเท่านั้น เพื่อยืนยันสมมติฐาน ต้องมีการศึกษาที่มีกำหนดเป้าหมายของชนิดเชื้อราต่อพืชตระกูลเป้าหมาย เพื่อให้เกิดความชัดเจนมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ ยังพบว่า เชื้อรา *Cer. cassiicola* พบบนพืชอาศัยที่หลากหลาย แต่เมื่อพิจารณาจากข้อมูลวิวัฒนาการกลับพบว่า มีความหลากหลายของชนิดแฝงอยู่ ซึ่งหากศึกษาเพิ่มจะสามารถจำแนกและแยกชนิดที่มีความแตกต่างออกมาได้ ชนิดที่สามารถระบุความแตกต่างออกมาได้นี้ จะบ่งบอกถึงขอบเขตของพืชอาศัยได้ด้วย ดังนั้น เชื้อรา *Cer. cassiicola* อาจไม่ได้มีพืชอาศัยที่มีขอบเขตกว้างอย่างที่มีรายงานในปัจจุบัน ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการจึงมีความสำคัญ โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษานอกจากจะทำให้เข้าใจวิวัฒนาการของเชื้อราแล้ว ยังสามารถประเมินการเข้าทำลายพืชอาศัยหรือโอกาสการเกิดโรคข้ามพืชอาศัยหรืออาจเกิดจากข้อจำกัดของการจำแนกชนิด ทำให้ไม่สามารถบ่งบอกชนิดในเชิงลึกส่งผลให้การรายงานการพบบนพืชอาศัยที่กว้าง การศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการที่สามารถช่วยกำหนดขอบเขตของพืชอาศัย เป็นจุดเริ่มต้นที่สามารถใช้เป็นข้อมูลในการคาดการณ์การเกิดโรคได้ นอกจากนี้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลยังสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลในการจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืช ซึ่งสามารถสนับสนุนการการค้าระหว่างประเทศในการนำเข้าและส่งออกสินค้าทางการเกษตร

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้ฐานข้อมูลการจัดจำแนกชนิดของรา cercosporoid ที่มีรายงานพบในประเทศไทย ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อสนับสนุนมาตราการการค้าระหว่างประเทศ

กรมวิชาการเกษตร

2. สามารถเผยแพร่ผลงานวิจัยในรายงานประจำปีของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รวมถึงงานประชุมวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.2.14 อนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืช
Taxonomy and phylogeny of Pucciniaceae in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวชนินทร	ดวงสอาด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นางสาวพรพิมล	อธิปัญญาคม	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวสุณีรัตน์	สีมะเดื่อ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวมะโนรัตน์	สุดสงวน	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวสุทธินี	ลิขิตตระกูลรุ่ง	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่มีลักษณะอาการของราสนิม จากแปลงปลูกพืชในพื้นที่ 20 จังหวัด ระหว่าง ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564 เพื่อจำแนกชนิด พิจารณาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและพืชอาศัย เพื่อเป็นแนวทางในการพิจารณาขอบเขตของพืชอาศัย ได้ราสนิมจำนวน 138 ตัวอย่างจากพืชอาศัย 58 ชนิด เมื่อจำแนกชนิดเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าได้ตัวอย่างราสนิมจาก 8 family ได้แก่ Albuginaceae, Coleosporiaceae, Crossopsoraceae, Phakopsoraceae, Pucciniaceae, Pucciniastraceae, Raveneliaceae และ Zaghouaniaceae นำราสนิม Pucciniaceae มาจำแนกชนิดพบราสนิมจำนวน 22 ชนิด เมื่อจำแนกชนิดด้วยข้อมูลพันธุกรรมพบว่าข้อมูลที่สามารถใช้อ้างอิงตามมาตรฐานสากลยังมีจำกัด จึงพิจารณาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในตัวอย่างราสนิมบางชนิด พบว่าราสนิมมีพืชอาศัยที่แคบ และราสนิมบางชนิดมีแนวโน้มที่มีความจำเพาะต่อพืชอาศัยในระดับสายพันธุ์ของพืช ซึ่งต้องมีการพัฒนาวิธีการศึกษาต่อไป เพื่อสามารถใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ รวมไปถึงการคาดการณ์การเกิดโรคได้ และได้รวบรวมข้อมูลการจัดจำแนกราสนิม Pucciniaceae ที่มีรายงานพบในประเทศไทย

คำหลัก: Pucciniaceae ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

Rust disease samples caused by fungi in family Pucciniaceae were collected from various plantations located in 22 provinces of Thailand during October 2019 - September 2021 in order to study the relationships of Pucciniaceae fungi with the host plant data. Based on the morphological characteristics combined with the host plant data, 138 rust disease specimens of 58 host plants were identified as the rust fungi in 8 families, namely, Albuginaceae, Coleosporiaceae, Crossopsoraceae, Phakopsoraceae, Pucciniaceae, Pucciniastraceae, Raveneliaceae, and Zaghouaniaceae. The identification using molecular data was difficult for rust fungi due to the limitation of standard (type) molecular data. The phylogeny of some Pucciniaceae fungi was considered with the host plant data. It was found that some Pucciniaceae

กรมวิชาการเกษตร

had the narrow host range or more specificity to the host plant than others. Further studies targeting the fungal species on their host plants could provide information for predicting disease progression. In addition, information on the classification of Pucciniaceae fungi reported in Thailand was gathered.

Key word: Pucciniaceae, phylogeny

คำนำ

ราสนิม (Rust fungi) วงศ์ Pucciniaceae เป็นราสนิมสาเหตุโรคพืชกลุ่มใหญ่ ที่ทำความเสียหายให้แก่พืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น เบญจมาศ ทานตะวัน ข้าวโพด ข้าวสาลี พืชตระกูลถั่วหน่อไม้ฝรั่ง และพืชที่สำคัญอีกหลายชนิด โดยราสนิมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสกุล Pucciniaceae มีจำนวน 20 สกุล โดยมี 2 สกุล คือ *Puccinia* และ *Uromyces* เป็นสมาชิกกลุ่มใหญ่ โดยราสนิมสองสกุลนี้ มีรายงานว่าพบการเข้าทำลายบนพืชอาศัยที่มีความใกล้เคียงกัน (host jump) ซึ่งสันนิษฐานว่าอาจเนื่องมาจากวิวัฒนาการของราสนิมทั้งสองสกุล เนื่องจากราสนิมมีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย ดังนั้น ในการจำแนกชนิดของราสนิมแต่เดิม จึงอาศัยข้อมูลของพืชอาศัย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะวงจรชีวิตของราสนิมมาใช้ในการจัดจำแนกชนิด โดยลักษณะดังกล่าวข้างต้นในบางกรณีไม่เพียงพอต่อการจำแนก ทำให้พบว่าราสนิมหลายชนิดถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่มีความซับซ้อน (complex species) โดยลักษณะนี้ยังพบว่าสามารถเกิดกับเชื้อราชนิดอื่นๆ ไม่เพียงแต่ราสนิมเท่านั้น แต่เนื่องจากวิวัฒนาการของราสนิมเอง ร่วมกับความสัมพันธ์ที่พัฒนาร่วมกับพืชอาศัย (co-evolution) ทำให้ปัจจุบันมีรายงานการพบราสนิมบนพืชที่มีความใกล้ชิดกับพืชอาศัยดั้งเดิม ทำให้เกิดความสับสนและผิดพลาดในการจำแนกชนิดของราสนิมด้วยเพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพืชอาศัย เพื่อให้เข้าใจวิวัฒนาการระหว่างราสนิมและพืชอาศัย ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาช่วยบ่งชี้ หรือ แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์และวิวัฒนาการ (phylogeny) ของราสนิมในหลายสกุลที่มีความใกล้เคียงกัน บนพืชอาศัยต่างๆกัน หรือพืชอาศัยที่มีความใกล้เคียงกัน โดยนำข้อมูลจากหลายๆด้านเช่น ข้อมูลชีวโมเลกุลจากหลายตำแหน่ง ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พืชอาศัย ลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่เก็บตัวอย่างหรือพบราสนิม มาวิเคราะห์รวมกันอย่างเป็นระบบ (systematics study)

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

กรมวิชาการเกษตร

ชีวโมเลกุลยังสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลในการจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชอีกทางหนึ่ง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืช

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทับตัวอย่าง 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 บิกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate
5. สารเคมี ได้แก่
   - Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™)
   - Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (Glucanex®)
   - Lithium Borate buffer (LB)
   - PureDireX Genomic DNA Isolation Kit
   - QIAquick Gel Extraction Kit
   - SERVA HiSens Stain G
   - Nuclease-Free Water

   - ไพร์เมอร์ ได้แก่

     the Internal Transcribed Spacer (ITS)

สำนักวิชาการเกษตร

V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990)

the Large Subunit (LSU, 28S)

LROR: ACCCGCTGAACTTAAGC (Vilgalys and Hester, 1990)

LR6: CGCCAGTTTCTGCTTACC (Vilgalys and Hester, 1990)

the Small Subunit (SSU, 16S)

NS1F: GTAGTCATATGCTTGTCTC (White *et al.*, 1990)

Rust18SR: ACCTTGTTACGACTTTTACTTC (Aime, 2006)

Cytochrome c oxidase subunit 3 (CO3)

CO3F1: TCAGTATGTTATTTTAACGATGTAG (Vialle et al., 2009)

CO3R1: TCCTCATCAGTAAACACTAATA (Vialle et al., 2009)

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

- วิธีการ

1. เก็บ และรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราสนิมวงศ์ Pucciniaceae

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากโรคราสนิมวงศ์ Pucciniaceae จากพืชต่างๆ ได้แก่ พืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วเหลือง ถั่วฝักยาว ถั่วลิสง กาแฟ สัก ลีลาวดี ตะไคร้ เบญจมาศ โมก มะเดื่อฝรั่ง รวมถึงราสนิมที่พบบนหญ้า เป็นต้น โดยเก็บตัวอย่างโรคพืชจากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย โดยเลือกเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรค ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างในสภาพที่แห้ง เพื่อให้ส่วนของแผลที่เกิดจากราสนิมอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ และหลีกเลี่ยงที่เชื้อราชนิดอื่นจะขึ้นปกคลุมสืบเนื่องจากความชื้น บันทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่ พิกัดสถานที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำมาจำแนกชนิดและทำการสกัดดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้ตัวอย่างโรคที่ใช้ในการศึกษา จะรวมถึงตัวอย่างแห้งของโรคพืชที่เกิดจากราสนิมที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

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

3. จำแนกชนิดของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืชโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

ศูนย์วิทยทรัพยากร

สกัดดีเอ็น

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

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990)

the Large Subunit (LSU, 28S)

LROR: ACCCGCTGAACTTAAGC (Vilgalys and Hester, 1990)

LR6: CGCCAGTTTCTGCTTACC (Vilgalys and Hester, 1990)

the Small Subunit (SSU, 16S)

NS1F: GTAGTCATATGCTTGTCTC (White *et al.*, 1990)

Rust18SR: ACCTTGTTACGACTTTTACTTC (Aime, 2006)

Cytochrome c oxidase subunit 3 (CO3)

CO3F1: TCAGTATGTTATTTTAACGATGTAG (Vialle et al., 2009)

CO3R1: TCCTCATCAGTAAACACTAATA (Vialle et al., 2009)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่ง LSU SSU ITS และ CO3 ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนดใช้ค่า annealing temperature ของแต่ละตำแหน่ง LSU SSU ITS และ CO3 ที่ 62 60 60 และ 58 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ที่ได้จากการทดลองมาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious version 8.1.9 (http://www.geneious.com, Kearse *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consencus sequence ที่บันทึกไว้ในรูปแบบ fasta ไฟล์) ที่ได้จากการทดลองและจากการรวบรวมข้อมูล มาจัดเรียง (align) ด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Katoh and Toh, 2008) จากนั้นตรวจสอบการจัดเรียง (alignment) โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 (Kumar et al., 2016) จากนั้นใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) ทำการรวมชุดข้อมูลของดีเอ็นเอเป็น combined dataset บันทึกชุด alignment ในรูปแบบไฟล์ nexus หรือ nex โดยใช้โปรแกรม Mesquite

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

จำแนกชนิดโดยวิเคราะห์จาก combined dataset วิเคราะห์ด้วย phylogenetic criteria 2 แบบคือ

1. Maximum Likelihood (ML) โดยเตรียมไฟล์ phy และวิเคราะห์โดยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ซึ่งจำเพาะต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command –f a) เริ่มจาก random starting tree และ กำหนด maximum likelihood bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง

2. Bayesian inference (BI) เตรียมไฟล์ nexus วิเคราะห์โดยโปรแกรม MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) โดยใช้วิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ค่าตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้ กำหนด 4 runs แต่ละ run ประกอบด้วย 4 chains วิเคราะห์จำนวน 10 ล้าน generations ตั้งค่า cold chain ที่ temperature 0.25 สุ่มตัวอย่าง substitution model parameters และบันทึก trees ทุก 500 generations ตรวจสอบความเชื่อมั่นของ topology ด้วย cumulative and compare functions ด้วย AWTY (Nylander *et al*., 2008)

4. บันทึกข้อมูลราสนิมวงศ์ Pucciniaceae ที่รายงานพบในประเทศไทย

รวบรวมข้อมูลการจัดจำแนกราสนิม Pucciniaceae ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและที่มีการจัดจำแนกด้วยข้อมูลชีวโมเลกุลของสนิม Pucciniaceae ที่มีรายงานพบในประเทศไทย เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาประเมินความเชื่อมั่นในการจัดจำแนกชนิด เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชเพื่อการวินิจฉัยที่ถูกต้อง

5. การเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราและเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ

ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2562 – กันยายน 2564

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. เก็บ และรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราสนิมวงศ์ Pucciniaceae

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่มีลักษณะอาการของราสนิม จากแปลงปลูกพืชในพื้นที่ 20 จังหวัด จากพืช 58 ชนิด จำนวน 138 ตัวอย่าง ระหว่าง ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564 (Table 1.2.14.1, Figure 1.2.14.1) ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.2.14.1: Rust disease specimens collected from this study (2019-2021)

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.14.1: Rust specimens collected from this study (2019-2021)

Family	Taxa	TPPH No.	Lab No.	Host common name	Scientific name	Location
Albuginaceae	*Albugo* sp.1	005209	M 0965	Amaranth	*Amaranthus viridis*	Saraburi
Coleosporiaceae	*Coleosporium* sp.	004336	M 0065	Goldenrod	*Solidago canadensis*	Saraburi
	Coleosporium ipomoeae	004611	M 0066	Water Morning Glory	*Ipomoea aquatica*	Saraburi
		005085	M 0954	Frangipani	*Plumeria* sp.	Chiangrai
		005408	-	Water Morning Glory	*Ipomoea aquatica*	Chiangmai
		005635	M 1043	Water Morning Glory	*Ipomoea aquatica*	Suphan Buri
Crossopsoraceae	*Dasturella* sp.1	-	M 0007	Bamboo	*Bambusa* sp.	Ubon Ratchathani
		005093	M 0005	Bamboo	*Bambusa* sp.	Ubon Ratchathani
		005093	M 0955	Bamboo	*Bambusa* sp.	Ubon Ratchathani
		005271	-	Bamboo	*Bambusa vulgaris*	Lampang
		005309	-	Rough Giant Bamboo	*Dendrocalamus asper*	Chiangrai
		005326	-	Bamboo	*Bambusa vulgaris*	Chiangrai
	Phakopsora sp.1	005340	M 0051	Purging nut	Jatropha curcas	Chiangmai
	Phakopsora sp.2	004273	M 0062	Grape	*Vitis* sp.	Nakhon Ratchasima
Phakopsoraceae	*Phakopsora* sp.3	-	M 0064	Sugar Apple	*Annona squamosa*	Saraburi
		005466	M 0063	Sugar Apple	*Annona squamosa*	Saraburi
	Phakopsora sp.4	005275	-	Kyasuma grass	*Pennisetum pedicellatum*	Lampang
	Phakopsora phyllanthi	004946	M 0057	Star Gooseberry	*Phyllanthus acidus*	Nakhon Ratchasima
		004946	M 0945	Star Gooseberry	*Phyllanthus acidus*	Nakhon Sawan
	Cerotelium fici	005084	M 0953	Fig	*Ficus carica*	Chiangmai
		005157a	M 0045	Fig var. BNR	*Ficus carica* (BNR)	Chiangmai
		005157b	M 0958	Fig	*Ficus carica*	Chiangmai
		005158	M 0046	Fig var. MR	*Ficus carica* (MR)	Chiangmai
		005159	M 0047	Fig var. Jolly Tiger	*Ficus carica* (Jolly Tiger)	Chiangmai

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.14.1: Continued

Family	Taxa	TPPH No.	Lab No.	Host common name	Scientific name	Location
Phakopsoraceae	*Cerotelium fici*	005160	M 0048	Fig var. Black Genoa	*Ficus carica* (Black Genoa)	Chiangmai
		005161	M 0049	Fig var. Panaehee	*Ficus carica* (Panaehee)	Chiangmai
		005568	M 0058	White Mulberry	*Morus alba*	Nakhon Ratchasima
	Phakopsora pachyrhizi	005378	-	Soybean	*Glycine max*	Chiangmai
		005627	M 1035	Soybean สจ.5	*Glycine max*	Chiangmai
		005628	M 1036	Soybean สจ.5	*Glycine max*	Chiangmai
		005633	M 1041	Soybean ชม.60	*Glycine max*	Chiangmai
		005634	M 1042	Soybean	*Glycine max*	Chiangmai
		005637	-	Soybean	*Glycine max*	Chiangmai
		005638	-	Soybean สจ.5	*Glycine max*	Chiangmai
		005639	-	Soybean	*Glycine max*	Chiangmai
		005640	-	Soybean สจ.5	*Glycine max*	Chiangmai
		005641	-	Soybean สจ.5	*Glycine max*	Chiangmai
		005642	-	Soybean ชม.60	*Glycine max*	Chiangmai
		005647	-	Soybean ชม.60	*Glycine max*	Chiangmai
		005648	-	Soybean	*Glycine max*	Chiangmai
		005649	-	Soybean	*Glycine max*	Phitsanulok
Pucciniaceae	*Puccinia arachnidis*	-	M 0006	Peanut	*Arachis hypogaea*	Surin
		-	M 0056	Peanut	*Arachis hypogaea*	Nakhon Ratchasima
		005075	M 0952	Peanut	*Arachis hypogaea*	Surin
		005139	M 0956	Peanut	*Arachis hypogaea*	Ratchaburi
		005263	-	Peanut	*Arachis hypogaea*	Lopburi
		005330	-	Peanut	*Arachis hypogaea*	Chiangrai
	Puccinia cynodontis	005273	-	Bermuda grass	*Cynodon dactylon*	Phrae

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.14.1: Continued

Family	Taxa	TPPH No.	Lab No.	Host common name	Scientific name	Location
Pucciniaceae	*Puccinia cynodontis*	005285	-	Bermuda grass	*Cynodon dactylon*	Nakhoratchasima
		005288	-	Bermuda grass	*Cynodon dactylon*	Uttaradit
		005299	-	Bermuda grass	*Cynodon dactylon*	Uttaradit
		005300	-	Bermuda grass	*Cynodon dactylon*	Uttaradit
		005301	-	Grass	*Cynodon dactylon*	Uttaradit
		005303	-	Grass	*Cynodon dactylon*	Uttaradit
		005306	-	Weed	*Cynodon dactylon*	Uttaradit
		005310	-	Grass	*Cynodon dactylon*	Phrae
		005311	-	Weed	*Cynodon dactylon*	Phrae
		005316	-	Grass	*Cynodon dactylon*	Phitsanulok
		005317	-	Grass	*Cynodon dactylon*	Phitsanulok
		005318	-	Grass	*Cynodon dactylon*	Chiangrai
		005323	-	Unknown	*Cynodon dactylon*	Chiangrai
		005324	-	Grass	*Cynodon dactylon*	Chiangrai
		005325	-	Grass	*Cynodon dactylon*	Chiangrai
		005328	-	Grass	*Cynodon dactylon*	Chiangrai
		005331	-	Grass	*Cynodon dactylon*	Chiangrai
		005380	-	Unknown	*Cynodon dactylon*	Chiangmai
		005398	-	Grass	*Cynodon dactylon*	Chiangmai
		005399	-	Unknown	*Cynodon dactylon*	Chiangmai
		005403	-	Grass	*Cynodon dactylon*	Chiangmai
		005407	-	Grass	*Cynodon dactylon*	Chiangmai
		005414	-	Unknown	*Cynodon dactylon*	Chiangmai
		005435	-		*Cynodon dactylon*	Chiangrai

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.14.1: Continued

Family	Taxa	TPPH No.	Lab No.	Host common name	Scientific name	Location
Pucciniaceae	*Puccinia cynodontis*	005445	-		*Cynodon dactylon*	Chiangrai
	Puccinia horiana	005501	M 0003	Chrysanthemum	*Chrysanthemum* sp.	Chiangmai
	Puccinia melanocephala	003731	M 0060	Sugar cane	*Saccharum officinarum*	Nakhon Ratchasima
		003732	M 0061	Sugar cane	*Saccharum officinarum*	Nakhon Ratchasima
	Puccinia nakanishikii	004960	M 0949	Lemon Grass	*Cymbopogon citratus*	Phayao
		005322	M 0053	Lemon Grass	*Cymbopogon citratus*	Nakhon Ratchasima
		005322	-	Lemon Grass	*Cymbopogon citratus*	Chiangrai
		005374	-	Lemon Grass	*Cymbopogon citratus*	Chiangmai
	Puccinia polysora	-	M 0059	Maize	*Zea mays*	Nakhon Ratchasima
		005168	M 0959	Maize	*Zea mays*	Phitsanulok
		005211	M 0966	Maize	*Zea mays*	Saraburi
		005420	M 0055	Sweet corn	*Zea mays* var. *rugosa*	Nakhon Ratchasima
	Puccinia sorghi	005147	M 0957	Maize	*Zea mays*	Kanchanaburi
		005188	M 0962	Maize	*Zea mays*	Khon Kaen
		005190	M 0963	Waxy corn	*Zea mays* var. *ceratina*	Khon Kaen
		005256	-	Sorghum	*Sorghum bicolor*	Nakhoratchasima
		005291	-	Maize	*Zea mays*	Uttaradit
		005304	-	Sorghum	*Sorghum bicolor*	Nakhoratchasima
		005320	-	Maize	*Zea mays*	Chiangmai
		005626	M 1034	Sweet corn	*Zea mays* var. *rugosa*	Sukhothai
		005629	M 1037	Sweet corn	*Zea mays* var. *rugosa*	Chiangmai
		005630	M 1038	Maize	*Zea mays*	Chiangmai
		005632	M 1040	Sweet corn	*Zea mays* var. *rugosa*	Chiangmai
		005636	-	Sweet corn	*Zea mays* var. *rugosa*	Chiangmai

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.14.1: Continued

Family	Taxa	TPPH No.	Lab No.	Host common name	Scientific name	Location
Pucciniaceae	*Puccinia sorghi*	005643	-	Sweet corn	*Zea mays* var. *rugosa*	Chiangmai
		005644	-	Maize	*Zea mays*	Chiangmai
		005646	M 0137	Sweet corn	*Zea mays* var. *rugosa*	Sukhothai
	Puccinia sp.1	004961	M 0950	Spanish Needles	*Bidens biternata*	Phayao
		005327	-	Spanish needles	*Bidens biternata*	Chiangrai
		005388	-	Spanish needles	*Bidens biternata*	Chiangmai
		005397	-	Spanish needles	*Bidens biternata*	Chiangmai
	Puccinia sp.2	-	M 0054	Cyperus	*Cyperus* sp.	Nakhon Ratchasima
	Puccinia sp.3	005187	M 0961	Umbrella sedge	*Cyperus* sp.	Khon Kaen
		005203	M 0964	Umbrella sedge	*Cyperus* sp.	Khon Kaen
	Puccinia sp.4	004959	M 0948	Vetiver	*Chrysopogon zizanioides*	Phayao
	Puccinia sp.5	005298	-	Grass	*Apluda sp.*	Uttaradit
	Puccinia sp.6	005284	-	Guinea grass	*Megathyrsus maximus*	Nakhoratchasima
	Puccinia sp.7	005332	-	Bornyard grass	*Echinochloa crusgalli*	Chiangmai
	Puccinia sp.8	005315	-	Wild sugarcane	*Saccharum spontaneum*	Phitsanulok
	Puccinia sp.9	005297	-	Blady grass	*Imperata cylindrica*	Chiangrai
		005321	-	Blady grass	*Imperata cylindrica*	Chiangrai
	Puccinia sp.10	005308	-	Globe amaranth	*Gomphrena globosa*	Phayao
		005319	-	Globe amaranth	*Gomphrena globosa*	Chiangmai
		005413	-	Globe Amaranth	*Gomphrena globosa*	Chiangmai
		005415	-	Globe Amaranth	*Gomphrena globosa*	Chiangmai
	Puccinia thaliae	004981	M 0951	Canna Lily	*Canna indica*	Phetchabun
	Uromyces appendiculatus	-	M 0002	Yardlong bean	*Vigna unguiculata*	Chiangmai
		-	M 0052	Yardlong bean	*Vigna unguiculata*	Nakhon Ratchasima

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.14.1: Continued

Family	Taxa	TPPH No.	Lab No.	Host common name	Scientific name	Location
Pucciniaceae	*Uromyces appendiculatus*	-	M 0067	Green Bean	*Phaseolus vulgaris*	Saraburi
		005180	M 0960	Yardlong bean	*Vigna unguiculata*	Nakhon Ratchasima
		005264	-	Bean	*Phaseolus vulgaris*	Lopburi
		005274	-	Bean	*Phaseolus vulgaris*	Lampang
		005313	-	Yard long bean	*Vigna unguiculata*	Lampang
		005631	M 1039	Yardlong bean	*Vigna unguiculata*	Chiangmai
		005645	-	Yardlong bean	*Vigna unguiculata*	Chiangmai
	Uromyces commelinae	-	M 0068	Benghal Dayflower	*Commelina benghalensis*	Saraburi
		005292	-	Benghal Dayflower	*Commelina benghalensis*	Chiangmai
	Uromyces sp.1	005266	-	Mucuna	*Mucuna pruriens*	Uttaradit
	Uromyces stariae-italicae	004951	M 0947	Mauritius Grass	*Brachiaria mutica*	Phayao
		005314	-	Panicum grass	*Brachiaria mutica*	Lampang
Pucciniastraceae	*Pucciniastrum* sp.1	005387	-	Fuchsia	*Fuchsia hybrida*	Chiangmai
Raveneliaceae	*Olivea tectonae*	004950	M 0946	Teak	*Tectona grandis*	Phayao
		005272	-	Teak	*Tectona grandis*	Phrae
	Ravenelia sp.1	005302	-	Golden shower	*Cassia fistula*	Phichit
	Olivea tectonae	005307	-	Teak	*Tectona grandis*	Nakhoratchasima
Zaghouaniaceae	*Hemileia vastatrix*	005295	-	Coffee	*Coffea robusta*	Chiangrai

กรมวิชาการเกษตร

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จำแนกชนิดราสนิมที่ทำการเก็บตัวอย่างด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็นราสนิมจาก 8 family ได้แก่ Albuginaceae, Coleosporiaceae, Crossopsoraceae, Phakopsoraceae, Pucciniaceae, Pucciniastraceae, Raveneliaceae และ Zaghouaniaceae นำราสนิม Pucciniaceae และจำแนกชนิดโดยใช้ข้อมูลพืชอาศัยประกอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบราสนิมจำนวน 22 ชนิด (Table 1.2.14.1, Figure 1.2.14.2-1.2.14.26)

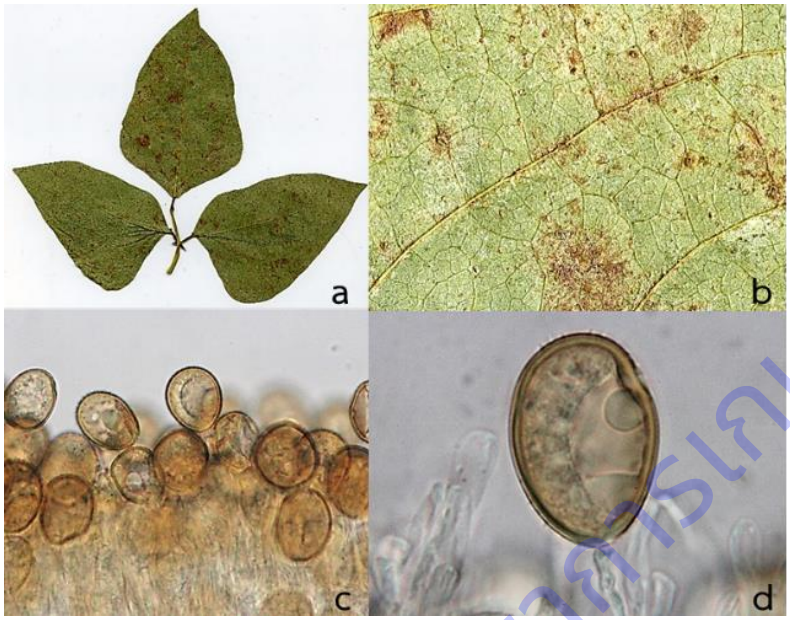


Figure1.2.14. 2: *Uromyces appendiculatus* on *Vigna unguiculata* (M0960)

a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf; c-d: urediospores

Figure 1.2.14.3: *Olivea tectonae* on *Tectona grandis* (M0946)

a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf; c: urediospores

กรมวิชาการเกษตร

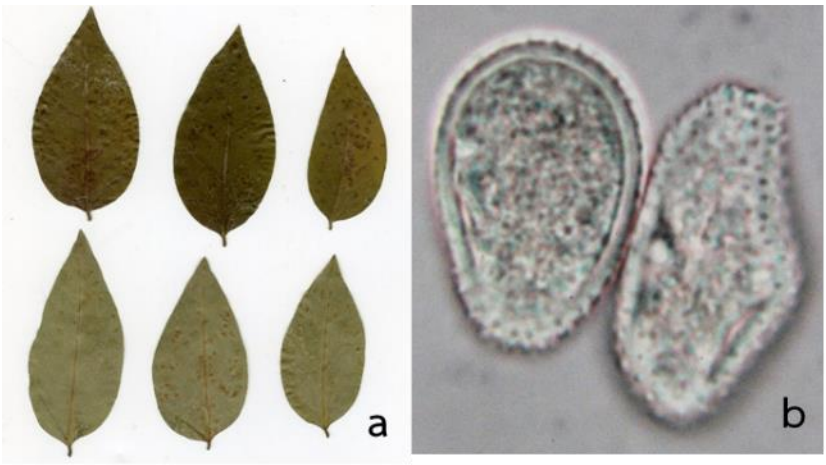
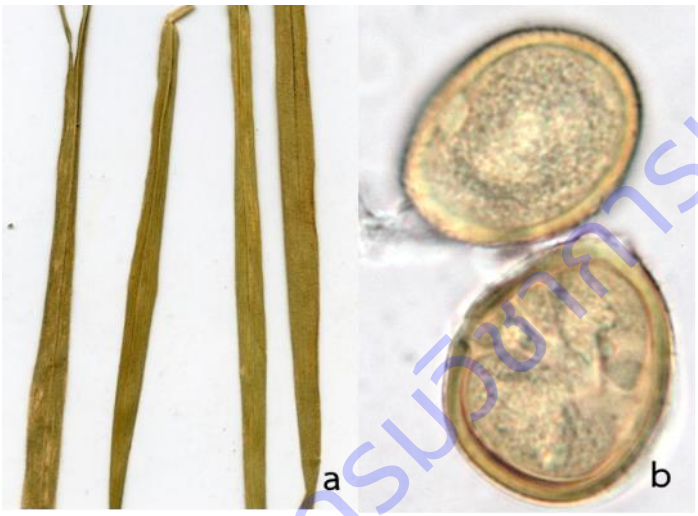


Figure 1.2.14.4: *Phakopsora phyllanthi* on *Phyllanthus acidus* (M0945)

a: symptom on leaves; b: urediospores



สำนักวิทยบริการเกษตร

Figure 1.2.14.5: *Uromyces stariae-italicae* on *Brachiaria mutica* (M0947)

a: symptom on leaves; b: urediospores

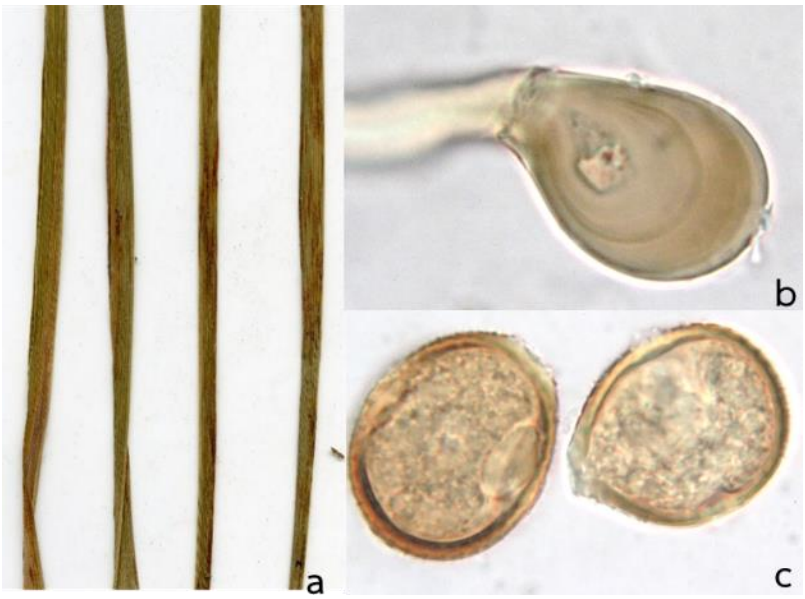


Figure 1.2.14.6: *Puccinia nakanishikii* on *Cymbopogon citratus* (M0949)

a: symptom on leaves; b-c: urediospores

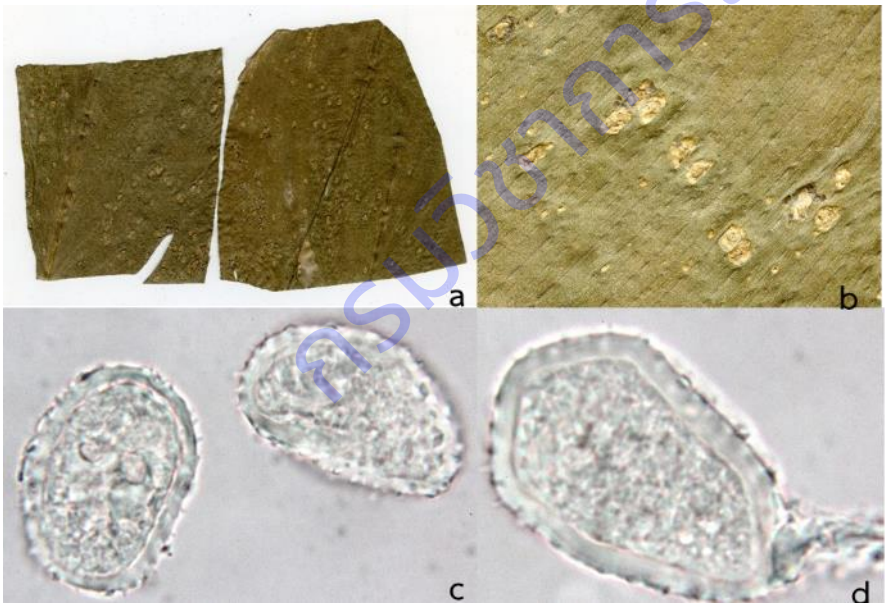


Figure 1.2.14.7: *Puccinia thaliae* on *Canna indica* (M0951)

a: symptom on leaves; b: sori c-d: urediospores

กรมวิชาการเกษตร

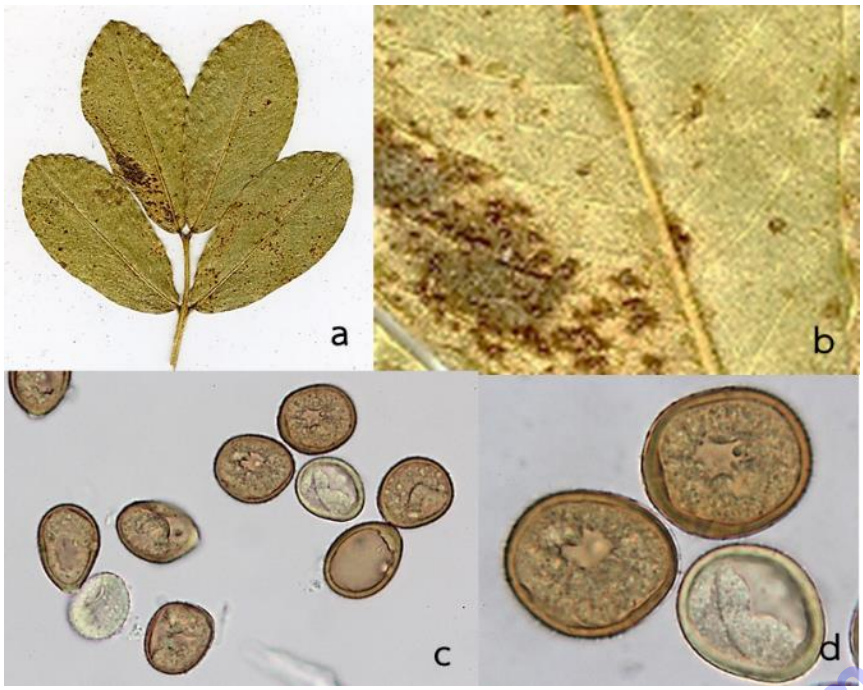


Figure 1.2.14.8: *Puccinia arachnidis* on *Arachis hypogaea* (M0956)

a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf c-d: urediospores

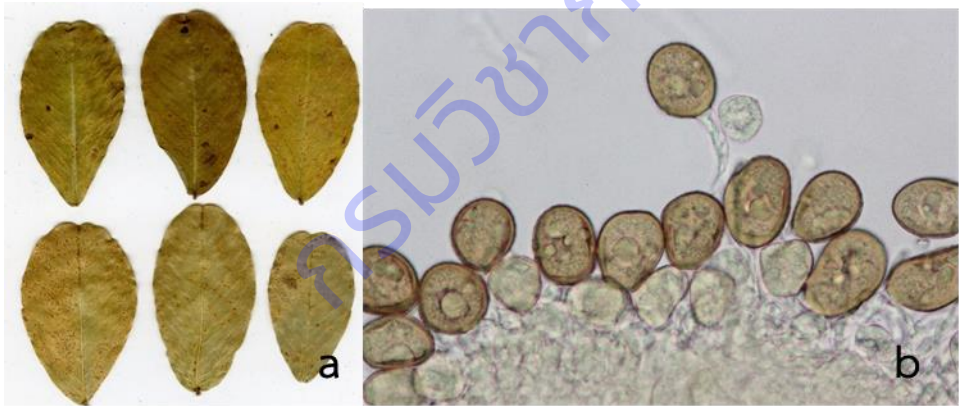


Figure 1.2.14.9: *Puccinia arachnidis* on *Arachis hypogaea* (M0952)

a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf c-d: urediospores

กรมวิชาการเกษตร

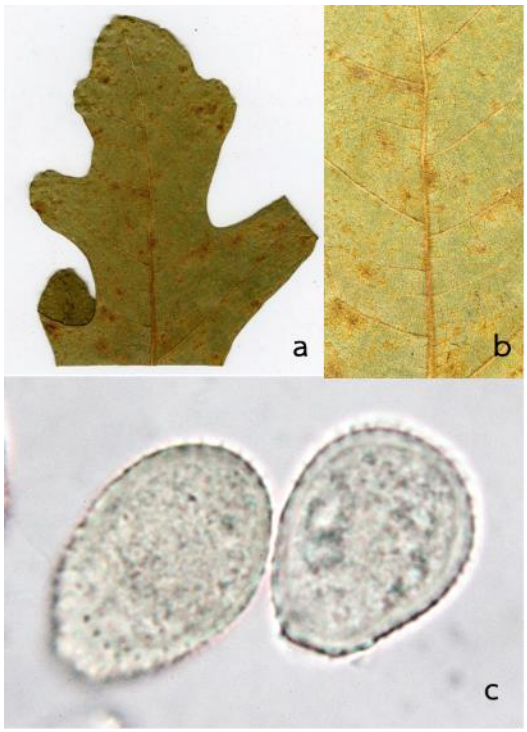


Figure 1.2.14.9: *Cerotelium fici* on *Ficus carica* (M0953)

a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf c: urediospores

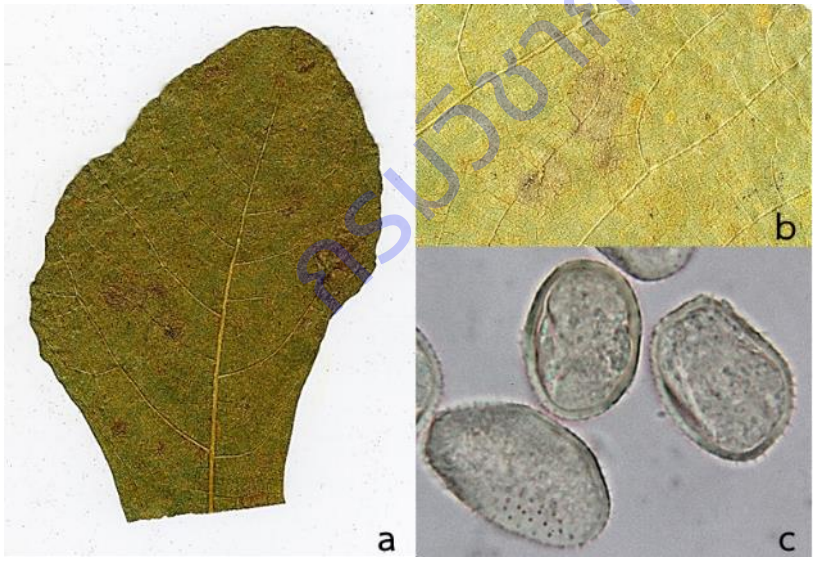


Figure 1.2.14.10: *Cerotelium fici* on *Ficus carica* (M0958)

a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf c: urediospores

ศูนย์วิทยทรัพยากร

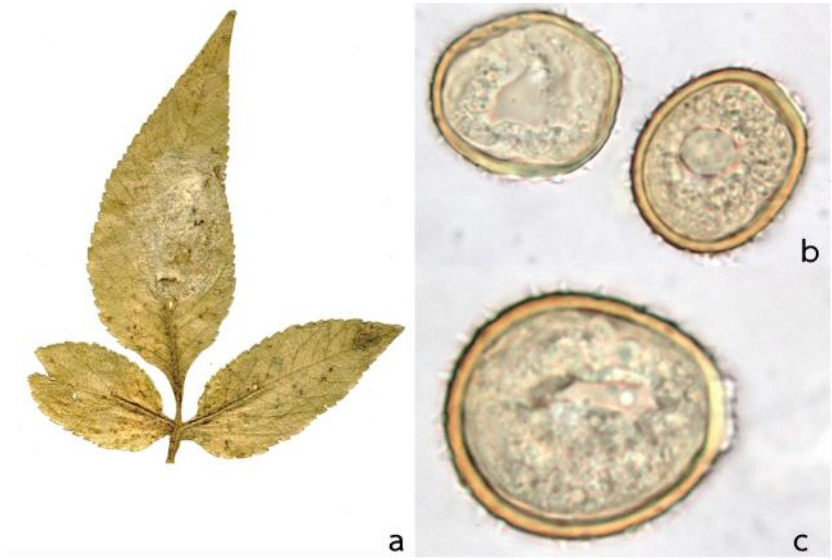


Figure 1.2.14.11: *Puccinia* sp.1 on *Bidens biternata* (M0950)

a: symptom on leaves; b-c: urediospores

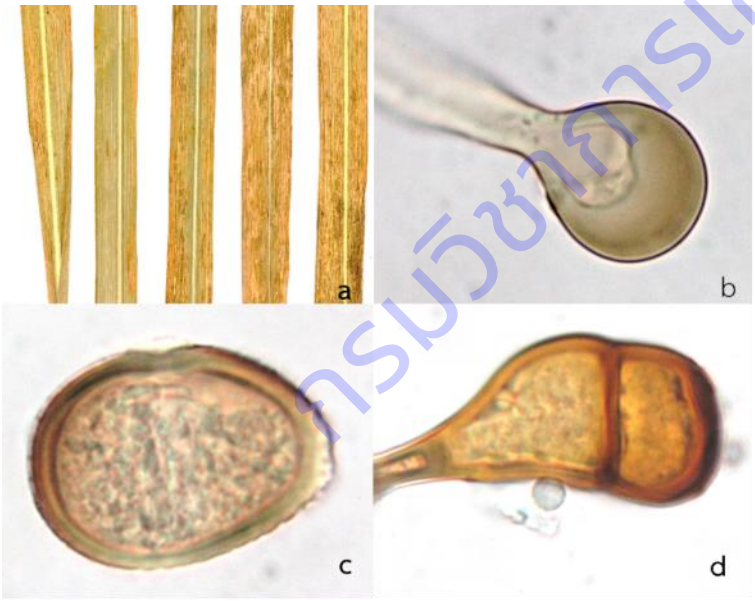


Figure 1.2.14.12: *Puccinia* sp.4 on *Chrysopogon zizanioides* (M0948)

a: symptom on leaves; b-c: urediospores; d: teliospore

กรมวิชาการเกษตร

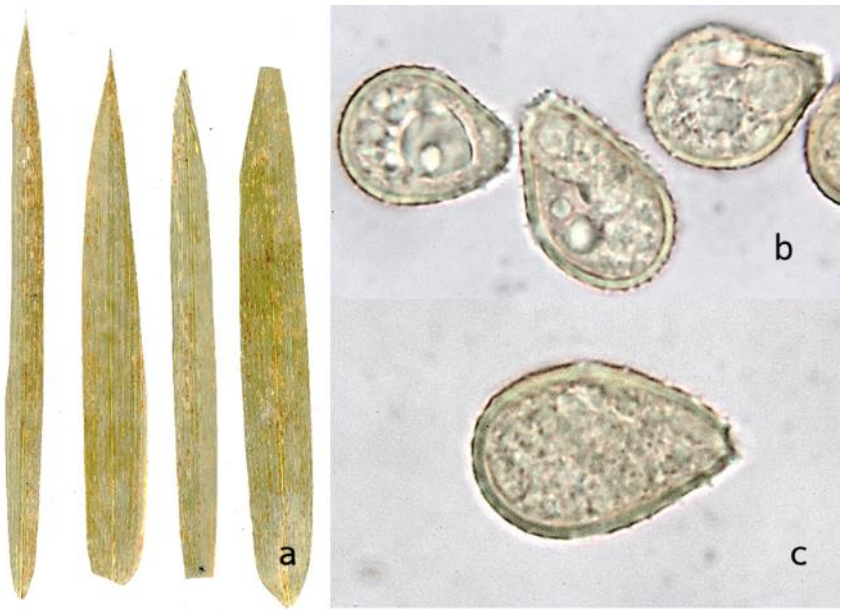


Figure 1.2.14.13: *Dasturella* sp.1 on *Bambusa* sp. (M0955)

a: symptom on leaves; b-c: urediospores

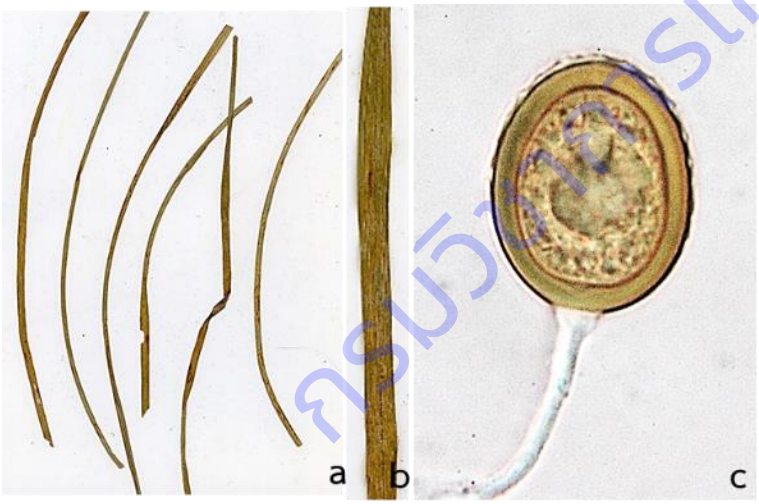


Figure 1.2.14.14: *Puccinia* sp.3 on *Cyperus* sp. (M0961)

a-b: symptom on leaves; c: urediospore on pedicel

กรมวิชาการเกษตร

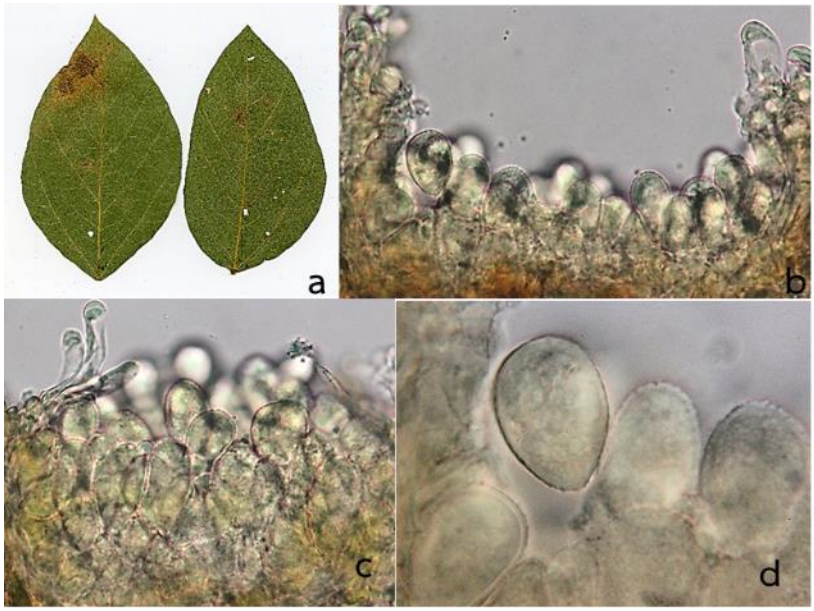


Figure 1.2.14.15: *Phakopsora pachyrhizi* on *Glycine max* (สจ.5) (M1035)

a: symptom on leaves; b-d: urediospores embedded in sori

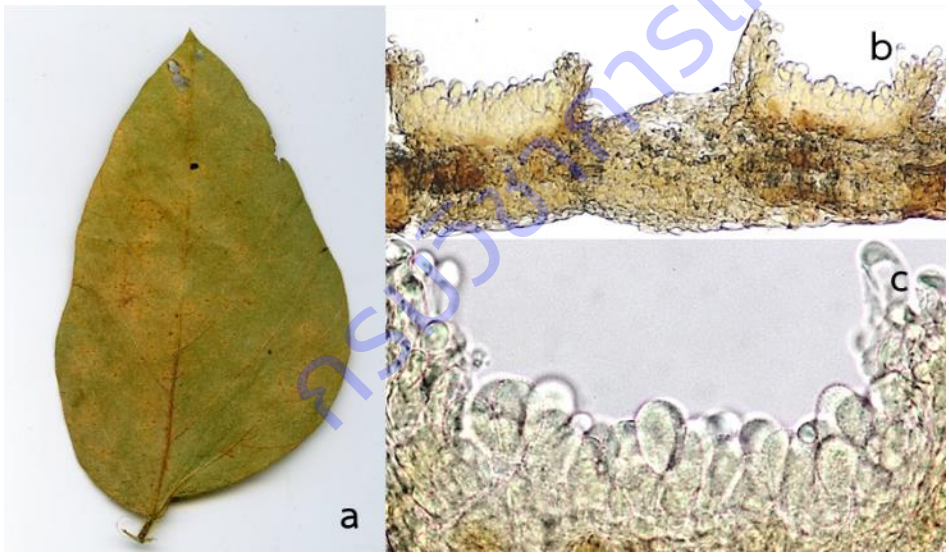


Figure 1.2.14.16: *Phakopsora pachyrhizi* on *Glycine max* (สจ.5) (M1036)

a: symptom on leaf; b: cross section of sori; c: urediospores

กรมวิชาการเกษตร

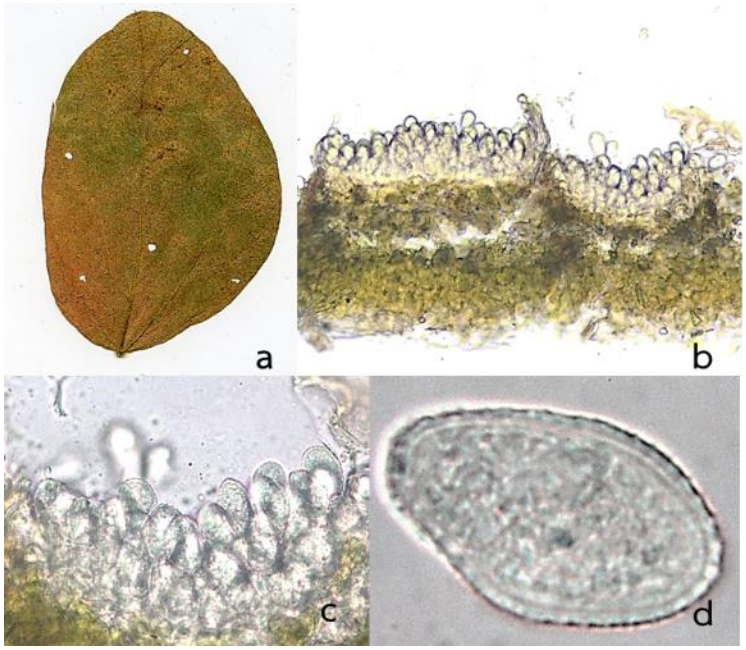


Figure 1.2.14.17: *Phakopsora pachyrhizi* on *Glycine max* (ชม.60) (M1041)

a: symptom on leaf; b: cross section of sori; c-d: urediospores

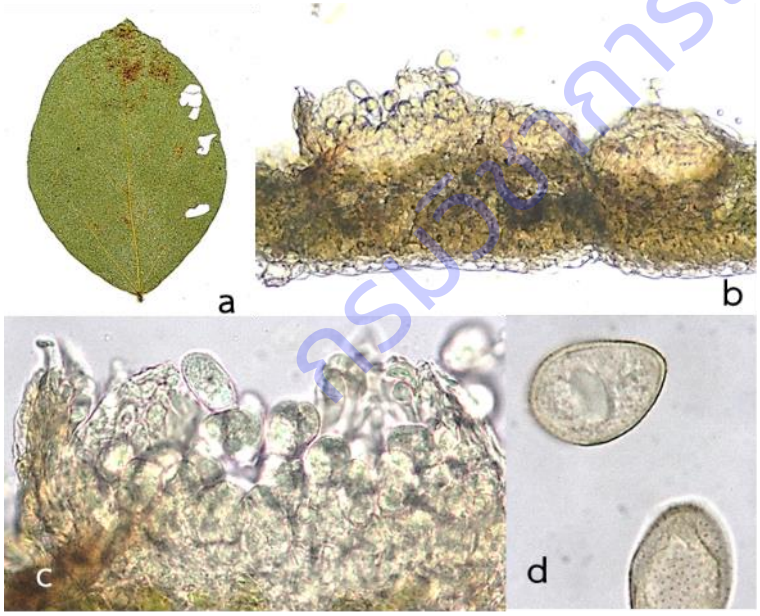


Figure 1.2.14.18: *Phakopsora pachyrhizi* on *Glycine max* (ชม.60) (TPPH 005378)

a: symptom on leaf; b: cross section of sori; c-d: urediospores

กรมวิชาการเกษตร

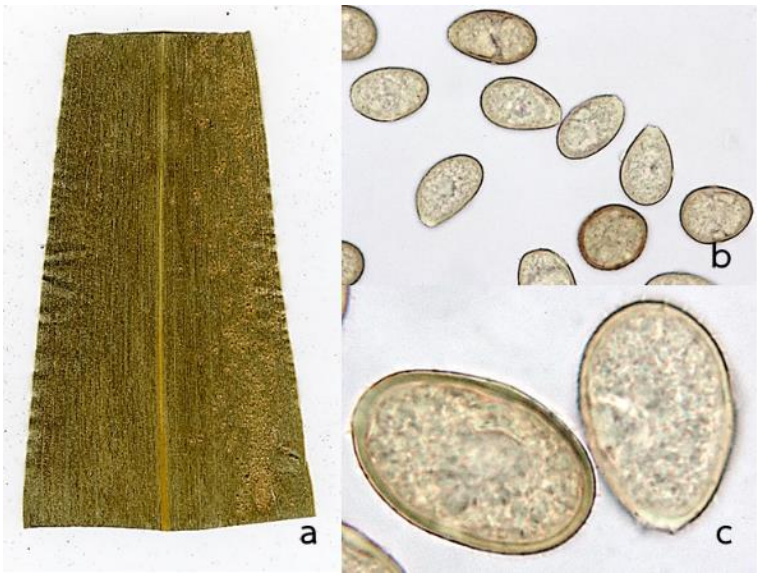


Figure 1.2.14.19: *Puccinia sorghi* on *Zea mays* (M0957)

a: symptom on leaf; b-c: urediospores

Figure 1.2.14.20: *Puccinia sorghi* on *Zea mays* (M0962)

a-b: symptom on leaves; c-d: urediospores

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.2.14.21: *Puccinia sorghi* on *Zea mays* (TPPH 005291)

a-b: symptom on leaf; c-d: urediospores

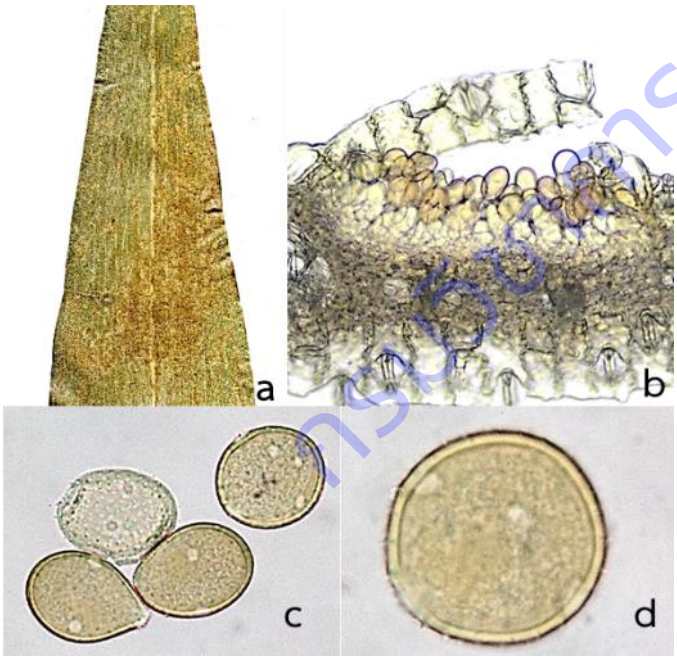


Figure 1.2.14.22: *Puccinia polysora* on *Zea mays* var. *rugosa* (M0055)

a: symptom on leaf; b: sorus, c-d: urediospores

Figure 1.2.14.23: *Puccinia polysora* on *Zea mays* (M0966)

a: symptom on leaf; b-d: urediospores

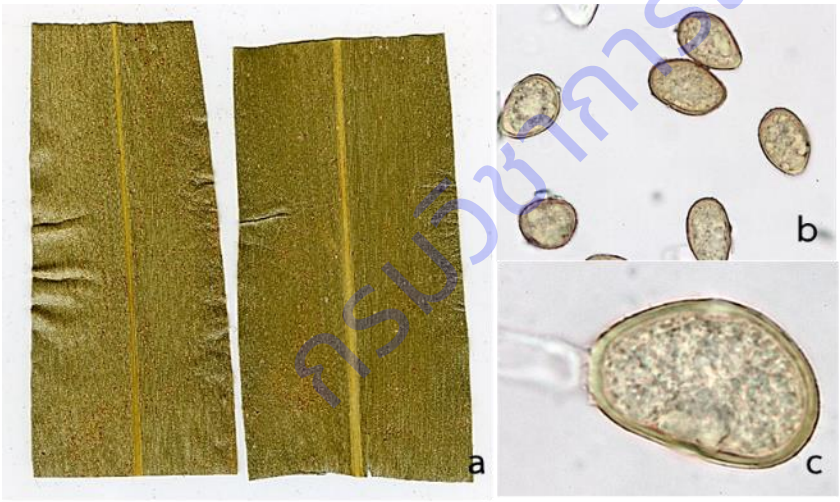


Figure 1.2.14.24: *Puccinia polysora* on *Zea mays* (M0959)

a: symptom on leaves; b-c: urediospores

กรมวิชาการเกษตร

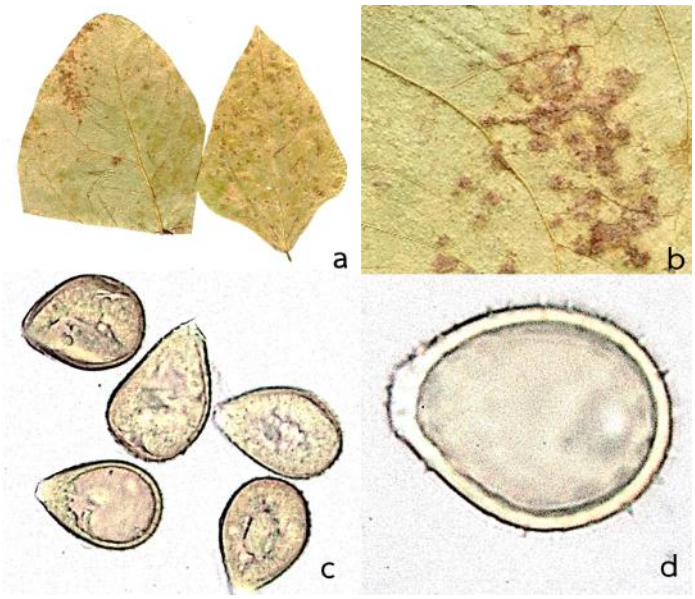


Figure 1.2.14.25: *Uromyces appendiculatus* on *Phaseolus vulgaris* (M0960)
a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf; c-d: urediospores

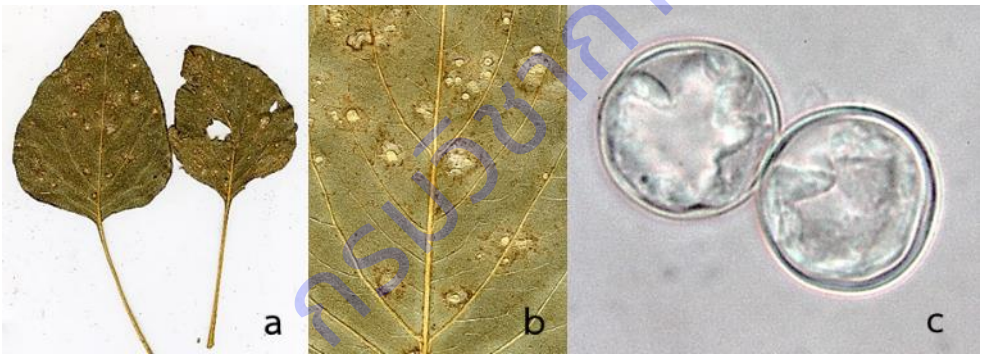


Figure 1.2.14.26: *Albugo* sp.1 on *Amaranthus viridis* (M0965)
a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf; c-d: teliospores

กรมวิชาการเกษตร

3. จำแนกชนิดของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืชโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

ราสนิมเป็นเชื้อราที่ไม่สามารถเลี้ยงให้บริสุทธิ์ได้ และมีปริมาณน้อย ทำให้การสกัดดีเอ็นเอจากสปอร์ค่อนข้างมีข้อจำกัด ทำให้ส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ พบว่าสามารถสกัดได้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณและคุณภาพ 20 ตัวอย่าง และจากดีเอ็นเอดังกล่าว เมื่อทำปฏิกริยา PCR พบว่าบางตำแหน่ง เช่น the Large Subunit (LSU) the Internal Transcribed Spacer (ITS) มีคุณภาพของ PCR product ค่อนข้างต่ำ เมื่อจัดทำ sequencing ข้อมูลที่ได้ต่อนข้างมีความแปรปรวนสูง ดังนั้นจึงคัดเลือกราสนิมไอโซเลทที่มีข้อมูลที่สมบูรณ์มาทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Figure 1.2.14.27)

การจำแนกชนิดด้วยข้อมูลพันธุกรรมของราสนิมวงศ์ Puccinianeae พบว่าข้อมูลที่สามารถใช้อ้างอิงตามมาตรฐานสากลยังมีจำกัด อย่างไรก็ตามการจำแนกชนิดของราสนิม ต้องใช้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา พืชอาศัย ประกอบกับข้อมูลพันธุกรรม (systematics identification) จากการศึกษาครั้งนี้สามารถจำแนกราสนิม Pucciniaceae ได้ 23 ชนิด ได้แก่ *Puccinia arachnidis, Puc. Cynodontis, Puc. Horiana, Puc. Melanocephala, Puc. Nakanishikii, Puc. Polysora, Puc. Sorghi, Puccinia* sp.1, *Puccinia* sp.2, *Puccinia* sp.3, *Puccinia* sp.4, *Puccinia* sp.5, *Puccinia* sp.6, *Puccinia* sp.7, *Puccinia* sp.8, *Puccinia* sp.9, *Puccinia* sp.10, *Puc. thaliae*, *Uromyces appendiculatus*, *U. commelinae, Uromyces* sp.1 และ *Uromyces stariae-italicae*

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในตัวอย่างราสนิมบางชนิด พบว่าราสนิมมีพืชอาศัยที่แคบ เช่น เชื้อรา *U. appendiculatus* และมีแนวโน้มที่มีความจำเพาะต่อพืชอาศัยในระดับสายพันธุ์ของพืช เมื่อพิจารณาจาก phylogeny จะเห็นได้ว่า ใน clade ของเชื้อรา *U. appendiculatus* แสดงให้เห็นถึงความหลากหลาย และแยกกลุ่มย่อยภายในตามชนิดของพืชอาศัย เช่น ระหว่างราสนิมถั่วฝักยาว (M0052) และราสนิมถั่วเขียว (M0067) และยังมีข้อสังเกตจากตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราสนิมที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้คือ เชื้อรา *Puccinia* ซึ่งเป็นเชื้อราในวงศ์ Pucciniaceae ซึ่งมักพบบนพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และเชื้อรา *Phakopsora* ซึ่งเป็นเชื้อราในวงศ์ Phakopsoraceae มักพบบนพืชใบเลี้ยงคู่

4. บันทึกข้อมูลราสนิมวงศ์ Pucciniaceae ที่รายงานพบในประเทศไทย

รวบรวมข้อมูลการจัดจำแนกรา cercosporoid ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและที่มีการจัดจำแนกด้วยข้อมูลชีวโมเลกุลของรา cercosporoid ที่มีรายงานพบในประเทศไทย เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาประเมินความเชื่อมั่นในการจัดจำแนกชนิด เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับ การตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชเพื่อการวินิจฉัยที่ถูกต้อง (Table 1.2.14.2)

กรมวิชาการเกษตร

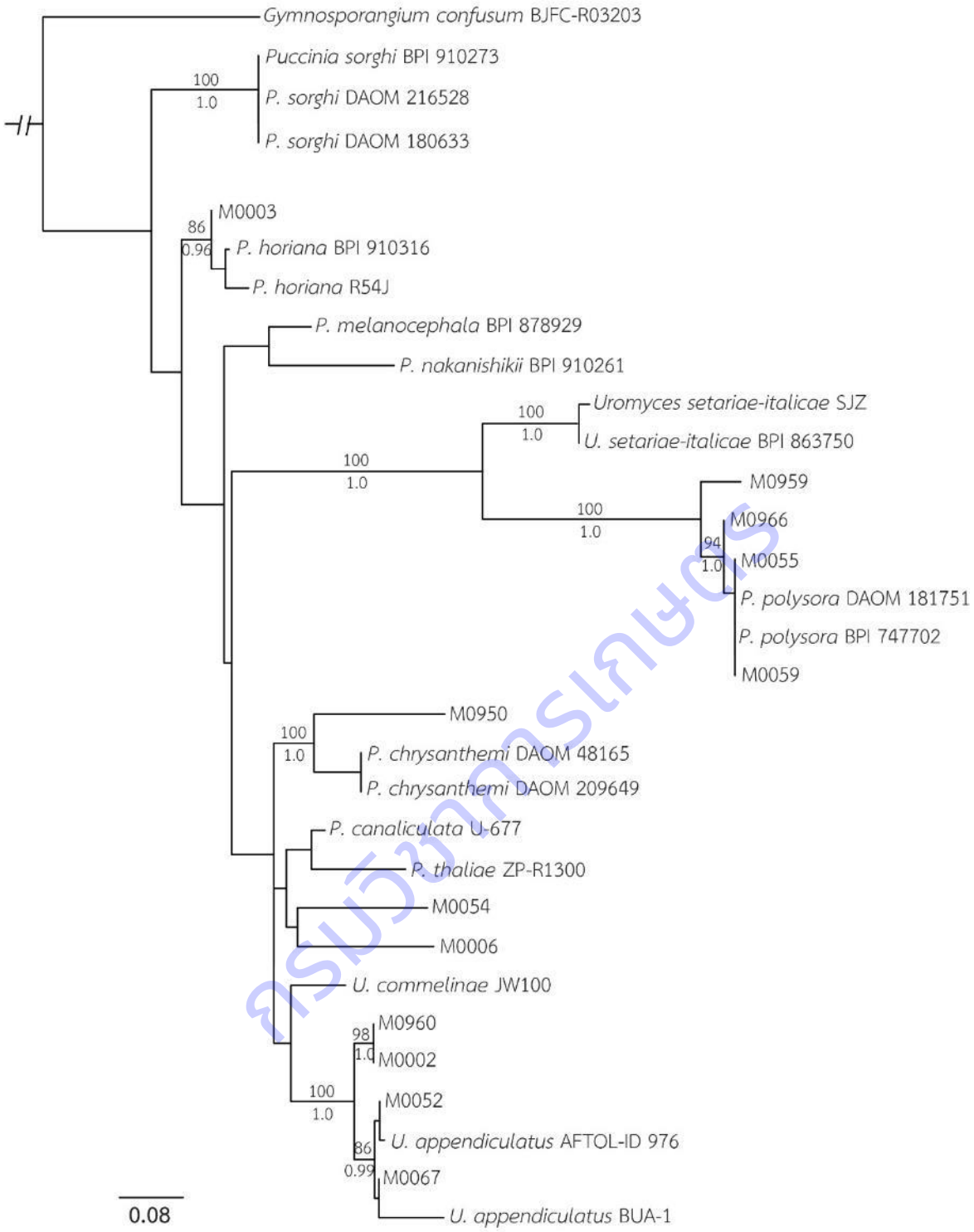


Figure 1.2.14.27: Phylogram of *Pucciniaceae* obtained in a maximum likelihood search in RAxML of the ITS dataset. Bootstrap support values (≥70%) from 1,000 replicates above nodes. Posterior probabilities (≥0.95) summarized from 10,000 converged trees obtained in a Bayesian search are shown below nodes.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Table 1.2.14.2: The list of rust diseases caused by Pucciniaceae had been reported in Thailand

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Coleosporium plumeriae		ลั่นทม	สนิม	ใบ	2563	Chaijuckam *et al*.,2020
Endophyllum kaernbachii	*Aecidium kaernbachii*	ผักบุ้ง	สนิม	ใบ	2529	พงษ์วิภา, 2529
Macabuna ziziphi	*Uredo zizyphi*	พุทรา	สนิม	ใบ	2508	นิรนาม, 2508
Puccinia hemerocallidis	*Dicaeoma hemerocallidis*	ดอกไม้จีน	สนิม	ใบ	2549	ธารทิพย และคณะ, 2549
Puccinia allii	*Xyloma allii*	กุยช่าย	สนิม	ใบ ก้านดอก	2552	สุณีรัตน์ และคณะ, 2550
	Dicaeoma allii	หอมใหญ่			2549	ธารทิพย และคณะ, 2549
	Puccinia alliorum					
Puccinia arachidis	*Dicaeoma arachidis*	ถั่วลิสง	สนิม	ใบ	2550	สุณีรัตน์ และคณะ, 2550
	Bullaria arachidis					
Puccinia asparagi	*Puc. discoidearum* var. *asparagi*	หน่อไฝรั่ง	สนิม	ใบ ลำต้น	2529	อุดมลักษณ์, 2529
	Dicaeoma asparagi					
	Persooniella asparagi					
Puccinia cynodontis		graminicolous	สนิม		2535	Lohsomboon *et al*.,1992
Puccinia chrysanthemi		เบญจมาศ, เก๊กฮวย	สนิม	ใบ	2526	ฉายแสง และคณะ, 2526;
					2531	ผ่องศรี, 2531
Puccinia erianthi		อ้อย	สนิม	ใบ	2519	อนุสรณ์ และคณะ, 2519;
					2557	พรพิมล และคณะ, 2557
Puccinia striiformis	*Dicaeoma glumarum*	ข้าวสาลี	สนิม	ใบ	2509	Puckdeedindan, 1966
	Puccinia striiformis					
	Puccinia lineatula					
Puccinia horiana		เบญจมาศ, เก๊กฮวย	สนิมขาว	ใบ	2558	พงศ์วิภา และคณะ, 2558;
					2553	สุณีรัตน์ และคณะ, 2553;
					2550	ยุทธศักดิ์ และคณะ 2550;

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.14.2: Continued

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Puccinia kuehnii	*Uromyces kuehnii*	อ้อย	สนิม	ใบ	2526	ธนาคร และคณะ, 2526
	Caeomurus kuehnii					
	Coeomurus kuehnii					
	Puccinia kuhnii					
Puccinia melanocephala		อ้อย	สนิม	ใบ	2519	อนุสรณ์ และคณะ, 2519
					2557	พรพิมล และคณะ, 2557
Puccinia nakanishikii	*Dicaeoma nakanishikii*	ตะไคร้	สนิม	ใบ	2550	ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2550
					2549	ธารทิพย์ และคณะ, 2549
Puccinia philippinensis		กกสามเหลี่ยม	สนิม	ใบ	2550	ธารทิพย์ และคณะ, 2550
		แห้วหมู	สนิม	ใบ	2550	ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2550
					2550	ธารทิพย์ และคณะ, 2550
					2550	สุณีรัตน์ และคณะ, 2550
		กกทราย, กกขนาก	สนิม	ใบ	2550	ธารทิพย์ และคณะ, 2550
					2550	สุณีรัตน์ และคณะ, 2550
Puccinia polysora	*Dicaeoma polysorum*	ข้าวโพด	สนิม	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
					2510	อุดม และเมธา, 2510
					2552	พีระวรรณ, 2552
					2550	ศรีสุรางค์ และคณะ, 2550
Tranzschelia pruni-spinosae	*Puccinia prunorum*	ท้อ	สนิม	ใบ	2511	Chandrasrikul, 1968
	Lecythea pruni-spinosae					
	Dicaeoma pruni-spinosae					
	Tranzschelia pruni-spinosae					
	Puccinia pruni					

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.14.2: Continued

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Puccinia purpurea	*Dicaeoma purpureum*	ข้าวฟ่าง	สนิม	ใบ ลำต้น	2511	Chandrasrikul, 1968
					2549	ธารทิพย์ และคณะ, 2549
					2557	พรพิมล และคณะ, 2557
Puccinia recondita	*Puccinia dispersa*	ข้าวสาลี	สนิม	ใบ	2524	เฉลิมลาภ และคณะ, 2524
Puccinia recondita f.sp. tritici		ข้าวสาลี	สนิม	ใบ	2520	ประพาส และคณะ, 2520
Puccinia rubigo-vera f.sp. tritici		ข้าวสาลี	สนิม	ใบ	2509	Puckdeedindan, 1966
Puccinia rufipes	*Dicaeoma rufipes*	หญ้าคา	สนิม	ใบ	2553	ธารทิพย์ และคณะ, 2553
Puccinia sojae		ข้าวโพด	สนิม	ใบ		CABI
Puccinia thaliae		พุทธรักษา	สนิม	ใบ	2550	ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2550
					2549	ธารทิพย์ และคณะ, 2549
Puccinia thwaitesii	*Dicaeoma thwaitesi*	ขาไก่ดำ	สนิม	ใบ	2550	ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2550
Phakopsora pachyrhizi	*Uromyces sojae*	ถั่วเหลือง	สนิม	ใบ	2505	นิรนาม, 2505
	Uredo sojae				2514	ประพันธ์ และประวิทย์, 2514
	Phakopsora sojae					
Physopella vitis	*Uredo vitis*	องุ่น	สนิม	ใบ	2508	ทะนง, 2508
Uromyces fabae	*Capitularia fabae*	ถั่วลันเตา	สนิม	ใบ	2501	นิรนาม, 2501
	Caeomurus fabae				2550	ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2550
Uromyces appendiculatus	*Uredo appendiculata*	ถั่วแขก, ถั่วพุ่ม	สนิม	ใบ	2509	Puckdeedindan, 1966
	Caeoma appendiculatum	ถั่วฝักยาว	สนิม	ใบ	2552	สุณีรัตน์, 2552
	Nigredo appendiculata				2550	ศรีสุรางค์, 2550
	Caeomurus appendiculatus	ถั่วฝักยาว	สนิม	ใบ	2549	ธารทิพย และคณะ, 2549
	Uromyces phaseolorum					
	Uredo phaseoli					
	Uromyces fatouae					

กรมวิชาการเกษตร

Table 1.2.14.2: Continued

Current name	Taxon synonyms	Host	Symptom	Plant part	Reported	References
Uromyces appendiculatus	*Uromyces aberrans*	ถั่วฝักยาว	สนิม	ใบ	2549	ธารทิพย และคณะ, 2549
	Uredo appendiculata					
	Puccinia phaseolorum					
	Uromyces phaseoli					
Uromyces appendiculus		ถั่วพุ่ม	สนิม	ใบ	2526	พิศาล และนิวัฒน์, 2526
Uromyces caryophyllinus	*Lycoperdon caryophyllinum*	คาร์เนชั่น	สนิม	ใบ	2520	อนงค์, 2520
	Uredo dianthi	คาร์เนชั่น	สนิม	ใบ	2548	พรพิมล และสุรภี, 2548
	Caeoma dianthi				2549	ธารทิพย และคณะ, 2549
	Nigredo caryophyllina					
	Caeomurus caryophyllinus					
	Uromyces dianthi					
Uromyces commelinae	*Caeomurus commelinae*	*Aneilema sinicum*	สนิม	ใบ	2548	Engkhaninun *et al*., 2005
Uromyces phaseoli var. phaseoli		ถั่วแขก, ถั่วพุ่ม	สนิม	ใบ	2528	ณรงค์, 2528
Uromyces phaseoli var. typical		ถั่วแขก, ถั่วพุ่ม	สนิม	ใบ	2525	ฉายแสง และคณะ, 2525
Uromyces phaseoli-vignae		ถั่วฝักยาว	สนิม	ใบ	2526	ฉายแสง และคณะ, 2526
Uromyces stariae-italicae		graminicolous	สนิม		2535	Lohsomboon *et al*., 1992
Uromyces vignae	*Uromyces phaseoli var. vignae*	ถั่วฝักยาว	สนิม	ใบ	2505	Chandrasrikul, 1962
	Nigredo vignae				2527	ประไพศรี และคณะ, 2527
		ถั่วเขียวผิวดำ, ถั่วเขียวเมล็ดดำ	สนิม	ลำต้น	2530	สุรพล และคณะ, 2530
		ถั่วเขียว, ถั่วเขียวผิวมัน	สนิม	ใบ	2530	สุรพล และคณะ, 2530

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การจำแนกชนิดของราสนิมด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ทำให้เกิดข้อจำกัด เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ต้องใช้ในการพิจารณามีไม่เพียงพอ เช่น ลักษณะของสปอร์ไม่ระยะการเจริญ มีข้อมูลไม่ครบทุกระยะ แต่หากได้รับคำปรึกษาหรือจำแนกโดยผู้มีความเชี่ยวชาญและมีประสบการณ์ในการจำแนกราสนิม ทำให้ลดอุปสรรคในการจำแนกชนิดลงไป ในปัจจุบันด้วยความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยี ทำให้การจำแนกราสนิมในปัจจุบัน ได้รับการยอมรับในการจำแนกด้วยการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พืชอาศัย และข้อมูลทางชีวโมเลกุล โดยมีการวิเคราะห์เป็นเชิงระบบ (systematics classification) ทำให้การจำแนกชนิดเป็นไปอย่างแม่นยำ แม้จะมีข้อมูลของระยะการเจริญของราสนิมไม่ครบ ทำให้สามารถลดปัญหาด้านการจำแนกชนิด อย่างไรก็ข้อมูลทางพันธุกรรมของราสนิมยังไม่หลากหลาย หรือสามารถเข้าถึงได้เหมือนเชื้อราชนิดอื่นๆ เนื่องจากขั้นตอนในการสกัดดีเอ็นเอ การทำปฏิกิริยา PCR ค่อนข้างท้าทาย เนื่องจากราสนิมเป็นเชื้อราที่ไม่สามารถเลี้ยงให้บริสุทธิ์ได้ ทำให้มักพบการปนเปื้อนดีเอ็นเอเชื้อราชนิดอื่น อีกทั้งมีปริมาณน้อย ทำให้การสกัดดีเอ็นเอจากสปอร์ค่อนข้างมีข้อจำกัด ทำให้ส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ นอกจากนี้การจำแนกราสนิมด้วยข้อมูลพันธุกรรม ต้องทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลมาตรฐาน (type sequences) แต่ตัวอย่างของราสนิมส่วนใหญ่จะมีอายุที่ค่อนข้างมาก เนื่องจากมีการค้นพบเป็นเวลานาน ทำให้เกิดอุปสรรคต่อการนำข้อมูลพันธุกรรมมาใช้ จึงต้องมีการศึกษาในการเสนอตัวอย่างมาตรฐานขึ้นมาทดแทนหรือเปรียบเทียบตามวิธีการสากลซึ่งต้องอาศัยระยะเวลาในการศึกษา

อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้แม้ไม่สามารถพิจารณาข้อมูลเชิงวัฒนาการของวงศ์ Pucciniaceae แต่ก็ยังสามารถพิจารณาข้อมูลของราสนิมหลายชนิด จากข้อมูลที่บ่งชี้ว่าราสนิมบางชนิดมีพืชอาศัยที่แคบ และมีแนวโน้มที่มีความจำเพาะต่อพืชอาศัยในระดับสายพันธุ์ของพืช การศึกษาชนิดของราสนิมโดยวิเคราะห์ร่วมกับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และพืชอาศัย สามารถใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ รวมไปถึงการคาดการณ์การเกิดโรคได้ นอกจากนี้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลยังสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลในการจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืช ซึ่งสามารถสนับสนุนการการค้าระหว่างประเทศในการนำเข้าและส่งออกสินค้าทางการเกษตร

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้ฐานข้อมูลการจัดจำแนกชนิดของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae ที่มีรายงานพบในประเทศไทย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อสนับสนุนมาตราการการค้าระหว่างประเทศ

2. สามารถเผยแพร่ผลงานวิจัยในรายงานประจำปีของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รวมถึงงานประชุมวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.2.15 การจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล Radopholus ทางชีวโมเลกุล
The Identification of the Genus Radopholus with the Molecular Technique.

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ธิติยา ชยาภัคพัฒนา	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ทิพวรรณ กันหาญาติ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ไตรเดช ข่ายทอง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	อังคณา พวงเงินมาก	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุล *Radopholus* ที่พบในไม้ประดับ เช่น คล้า หน้าวัว เป็นต้น ยังไม่สามามารถจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ได้ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเพื่อจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุลนี้ โดยใช้แนวทางการจัดจำแนกของ EPPO PM 7/88 (1) : *Radopholus similis* ซึ่งใช้การจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางชีวโมเลกุล ดำเนินการระหว่าง ตุลาคม 2562 ถึง กันยายน 2564 ได้เก็บตรวจตัวอย่างพืชรวมทั้งสิ้นจำนวน 1,210 ตัวอย่าง จากการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูพืชด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาผลการจำแนกภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิด Differential interference contrast (DIC) ของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* เพศเมีย จำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่าเป็น *Radopholus similis*

การศึกษาการจำแนกชนิดโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลซึ่งดำเนินการ 3 เทคนิค 1)การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในส่วน D2-D3 expansion region ของ 28s ribosomal RNA gene (rDNA) โดยใช้ forward primer D2A (5' - ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG -3') และ reverse primer D3B (5' - TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3') ซึ่งได้ตัวอย่าง PCR product ที่ดี จำนวน 70 ตัวอย่าง ส่งวิเคราะห์ลำดับเบสจำนวน 10 แล้วนำไปเทียบเคียงความเหมือนกันของลำดับเบสที่ได้กับที่มีอยู่ในกับฐานข้อมูล BLASTN จากการประมวลผลพบว่าเป็น *R.similis* ทุกตัวอย่าง และ2)การทดสอบตัวอย่าง PCR product 10 ตัวอย่าง ด้วยการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region โดยใช้ Real-Time PCR ไพรเมอร์ forward primer RAD-F: AGACTTGA TGAGCGCAGA และ reverse primer RAD-R: CGTGCCAGAGGAAGTGA ที่ออกแบบให้จำเพาะเจาะจงกับส่วน ITS ของ *R. similis* ขนาด 227 bp พบว่าทั้ง 10 ตัวอย่างเป็น *R. similis* และ3) การตรวจตัวอย่าง PCR product 10 ตัวอย่าง ด้วยการใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* คือ ไพรเมอร์ forward primer RsimF 5’-GATTCCGTCCTTTGGTGGGCA-3’ และ reverse primer RsimR 5’- GAACCAGGCGTGCCAGAGG-3’ ขนาด 398 bp พบว่าทั้ง 10 ตัวอย่างเป็น *R. similis* และ ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิง

กรมวิชาการเกษตร

พันธุกรรมของยีนส่วน ITS ของไส้เดือนฝอย *R. similis* ประชากรจากประเทศไทยกับตัวอย่างในฐานข้อมูล ด้วยวิธี maximum likelihood พบว่าเป็น *R. similis*

คำหลัก : ไส้เดือนฝอย Radopholus ไม้ประดับ เทคนิคทางชีวโมเลกุล

Radopholus, plant parasitic nematodes found in ornamental plants such as *Calathea* spp., *Anthurium* spp., etc. The species of Radopholus nematodes has not yet been identified. Therefore, studies have been conducted to identify this genus of nematodes. Using the classification guidelines of EPPO PM 788 (1): Radopholus similis, which used morphological classification and the biomolecular classification of nematodes of the genus *Radopholus*. Conducted between October 2019 and September 2021, a total of 1,210 plant samples were examined. Morphologically identification of plant parasitic nematodes was identified under differential interference contrast (DIC) magnification microscopy. Fifty female Genus *Radopholus*, identified as *Radopholus similis*.

The experiment was studied using 3 biomolecular techniques. The first DNA enrichment by polymerase chain reaction in the D2-D3 expansion region of the 28s ribosomal RNA genes. (RDNA) using forward primer D2A (5' - ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG -3') and reverse primer D3B (5' - TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3'), which yielded good 70 PCR product samples. The samples were sent for analysis of 10 by base sequencing and were compared with those of the existing sequences in the BLASTN database. The showed the result, all of them were *R.similis*. The second experimentation, The10 PCR product samples were applied by DNA content in the sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region using Real-Time PCR primer forward primer RAD-F: AGACTTGA TGAGCGCAGA and reverse primer RAD-R: CGTGCCAGAGGAAGTGA, which designed specifically for the ITS portion of *R. similis* with a size of 227 bp, displayed total were identified as *R. similis.* And, the third experiment of 10 PCR product samples was also used for assays using species specific primers of *R. similis*. by forward primer RsimF 5'- GATTCCGTCCTTTGGTGGGGGCA-3' and reverse primer RsimR 5'- GAACCAGGCGTGCCAGAGG-3', size 398 bp, completely 10 samples were *R. similis*. The genus *Radopholus* populations of Thailand in the database using maximum likelihood method. The result was found to be absolutely *R. similis.*

ศรีมหาสารคาม

Keywords: Radopholus, burrowing nematode, ornamental plants, Molecular technique

คำนำ

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

ดังนั้นไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จึงบทบาทสำคัญทางเศรษฐกิจ และด้วยเหตุที่ว่าการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับไส้เดือนฝอยสกุลนี้ยังมีน้อย จึงจำเป็นต้องศึกษาวิจัยการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางชีวโมเลกุล ต่อยอดมาจากการศึกษาการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางสัณฐานวิทยา ซึ่งผลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้จะทำให้เกิดข้อมูลที่สำคัญสำหรับผู้เกี่ยวข้องกับการส่งออกพืช และผู้ตรวจรับรองการปลอดภัยจากศัตรูพืชโดยเฉพาะไส้เดือนฝอยศัตรูพืช และสำคัญที่สุดคือเป็นฐานข้อมูลอ้างอิงของประเทศไทย และเป็นมาตรฐานที่สามารถสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ประเทศผู้นำเข้าได้ และการจัดจำแนกชนิดทางชีวโมเลกุลนี้เป็นการเตรียมความพร้อมเพื่อรับมือกับมาตรฐานที่มีแนวโน้มที่จะต้องใช้เทคโนโลยีที่สูงขึ้นในการตรวจรับรองศัตรูพืช

กรมวิชาการเกษตร

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1.ตัวอย่างดิน วัสดุปลูกและต้นพืช

2.อุปกรณ์การเก็บตัวอย่างในแปลง

3.ไส้เดือนฝอยสกุล Radopholus

4.กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และกำลังขยายสูง และอุปกรณ์ถ่ายภาพ

5.อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย ยกตัวอย่างเช่น กรวยและตะแกรงแยกเชื้อ ถุงมือสไลด์ เครื่องอัลตร้าโซนิก อุปกรณ์เขี่ยเชื้อ น้ำยาดอง หลอดเก็บตัวอย่าง ตู้ปลอดเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ ตู้เย็นเก็บตัวอย่างพืช อุปกรณ์เลี้ยงพืชอาศัยเชื้อ เป็นต้น

6.อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ยกตัวอย่างเช่น ถุงมือ เสื้อคลุม หมวก หลอด PCR ชั้นวางหลอด ไมโครปิเปต ไมโครปิเปตต์ทิปอ่างควบคุมอุณหภูมิ เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องเขย่า

ผสมสารละลาย เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ตู้ดูดควันและสารพิษ เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เครื่อง Gel electrophoresis เครื่องกำเนิดพลังงาน เครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator ตู้แช่แข็ง เป็นต้น และสารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอเช่น ชุดสกัดสารดีเอ็นเอ, TBE Buffer (10 mMTris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 , อะกาโรส และสีย้อมดีเอ็นเอ เป็นต้น

- วิธีการ

1.เก็บตัวอย่างพืชอาศัยของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จากพืชวงศ์บอน (*Araceae*) พืชวงศ์คล้า (*Marantaceae*) พืชวงศ์กล้วย(*Musaceae*) พืชวงศ์กล้วยพัด (*Strelitziaceae*) กวักมรกรต และพรรณไม้น้ำ เป็นต้น เก็บตัวอย่างจากพืช อย่างน้อย 100 ตัวอย่าง แต่ละพืชจำนวนตัวอย่างแล้วความเหมาะสมและโอกาสอำนวย โดยตัวอย่างต้นพืชเก็บใส่ถุงพลาสติกรัดปากถุงให้แน่นนำกลับมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างดินปลูก หรือวัดสดุปลูกเก็บบริเวณทรงพุ่มความลึกอยู่ในช่วงประมาณ 0-25 เซนติเมตร จำนวน 10 จุดต่อต้นคลุกเคล้ารวมกันแล้วเก็บตัวอย่าง 250 กรัมนำใส่ถุงพลาสติกรัดปากถุงให้แน่นนำกลับมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการ

2.การแยกเชื้อไส้เดือนฝอย

2.1 ตัวอย่างต้นพืชใช้ Ultrasonicator แล้วนำมากรองด้วยวิธีของ Baerman funnel method หรือ Oostenbrink dish

2.2 ตัวอย่างดินและตัวอย่างวัสดุปลูกใช้วิธี Cobb sieving แล้วนำมากรองด้วยวิธีของ Baerman funnel method หรือ Oostenbrink dish

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

4.เพาะเลี้ยงเพิ่มเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในพืชอาศัยเดิมเพื่อสำรองเลี้ยงไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus*

5.การทำสไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอยศัตรูเมื่อพบว่าเป็นไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จึงนำไปทำสไลด์ถาวร ตามวิธีการของ De Grisse,1969 และ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus*โดยเปรียบเทียบกับเอกสารการจัดจำแนกชนิดของ EPPO PM 7/88 (1): *Radopholus similis* และเอกสารอื่นที่เกี่ยวข้อง โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง differential interference contrast (DIC) พร้อมคอมพิวเตอร์และอุปกรณ์ถ่ายภาพ และโปรแกรมการวัดขนาด โดยมีลักษณะสำคัญที่ต้องบันทึก อาทิ ความยาวของลำตัว ลักษณะริมฝีปาก ความยาวของ stylet ลักษณะหาง เส้นผ่านศูนย์กลางลำตัว ความยาวของ oesophagus ค่า De Man’s ratios เช่น ค่า a (อัตราส่วนของความยาวลำตัวต่อส่วนที่กว้างที่สุดของ

กรมวิชาการเกษตร

ลำตัว) ค่า b (อัตราส่วนของความยาวลำตัวต่อความยาวของ oesophagus) ค่า c (อัตราส่วนของความยาวลำตัวต่อความยาวของหาง) เป็นต้น

6.ศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus*

6.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ใช้วิธีการตามร่วมกับคำแนะนำของ เขี่ยไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงบนหยด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 20 ไมโครลิตร บนสไลด์แก้ว ตัดตัวไส้เดือนฝอยออกเป็น 2-3 ท่อน โดยใช่ส่วนปลายของ 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 นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟเป็นเวลา 6 นาที ถ้าเตาไมโครเวฟเป็นชนิด 750 วัตต์ (สามารถปรับเวลาตามกำลังไฟของเตาไมโครเวฟให้ได้ 4,500 วัตต์-นาที ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสม)

6.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในส่วน D2-D3 expansion region ของ 28s ribosomal RNA gene (rDNA) โดยใช้ forward primer D2A (5' - ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG -3') และ reverse primer D3B (5' - TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3') และ เพิ่มปริมาณ DNA (Kaplan *et al*., 2000 ; Subbotin *et al*., 2006) โดยสารที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1.0 U AmpliTaq® DNA Polymerase, 10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 50 mM KCL, 2.5 mM $MgCl_2$, 200 uM dNTPs ,0.2 µM primers และ 1.0 µl DNA template เมื่อเตรียม master mix ใส่ หลอด PCR แล้วเติม DNA template ในหลอด PCR นำหลอด ดังกล่าวใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุ์กรรม (Thermocycle) จากนั้นตั้งอุณหภูมิและเวลาของขั้นตอนปฏิกิริยา PCR ดังนี้ ปฏิกิริยา Initial denaturation อุณหภูมิ °C 94 เวลา1 นาทีปฏิกิริยา Denaturation อุณหภูมิ °C 94 เวลา1 นาที ปฏิกิริยา Annealing อุณหภูมิ °C 55 เวลา1 นาที ปฏิกิริยา Extension อุณหภูมิ °C 72 เวลา1 นาที ปฏิกิริยา Final extension อุณหภูมิ °C 72 เวลา 5 นาที จำนวน 35 รอบ

6.3 การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ด้วยการทำอิเลกโทรโฟรีซีสแบบอะกาโรสเตรียม 1.5% ของอะกาโรส โดยชั่งอะกาโรส 1.5 กรัม ผสมกับ สารละลายบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้สารละลายใส ตั้งไว้ให้เย็น แล้วเทอะกาโรสลงในชุด gel box ที่ปรับสมดุล และวางหวีไว้แล้ว เมื่อเจลแข็งตัว จึงดึงหวีออก แล้วนำเจลที่ได้ไปวางในแชมเบอร์ จากนั้นเทสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ให้ท่วมแผ่นเจล นำ DNA ที่ได้ผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอ ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 จากนั้นหยอดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรลงในหลุมของเจลอะกาโรสในแชมเบอร์ เรียบร้อยแล้วจึงต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ นานประมาณ 40-50 นาที แล้วเจลอะกาโรสไปย้อมสี DNA

กรมวิชาการเกษตร

แล้วนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่อง UV-transilluminator แล้วถ่ายภาพ เลือกตัวอย่างได้ PCR product ที่ดี ส่งวิเคราะห์ลำดับเบส แล้วนำไปจะถูกนำไปเทียบเคียงความเหมือนกันของลำดับเบสที่ได้กับที่มีอยู่ในกับฐานข้อมูล BLASTN

6.4 การทดสอบตัวอย่าง PCR product 10 ตัวอย่าง ด้วยการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region โดยใช้ Real-Time PCR ไพรเมอร์ forward primer RAD-F: AGACTTGA TGAGCGCAGA และ reverse primer RAD-R: CGTGCCAGAGGAAGTGA ที่ออกแบบให้จำเพาะเจาะจงกับส่วน ITS ของ *R. similis* ที่ขนาด 227 bp

6.5 การทดสอบตัวอย่าง PCR product 10 ตัวอย่าง ด้วยการใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* คือ ไพรเมอร์ forward primer RsimF 5'- GATTCCGTCCTTTGGTGGGCA-3' และ reverse primer RsimR 5'- GAACCAGGCGTGCCAGAGG-3' ขนาด 398 bp และ วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของยีนส่วน ITS ของไส้เดือนฝอย *R. similis* ประชากรจากประเทศไทยกับตัวอย่างในฐานข้อมูล ด้วยวิธี maximum likelihood

- เวลาและสถานที่

ระหว่าง ตุลาคม 2562 ถึง กันยายน 2563

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

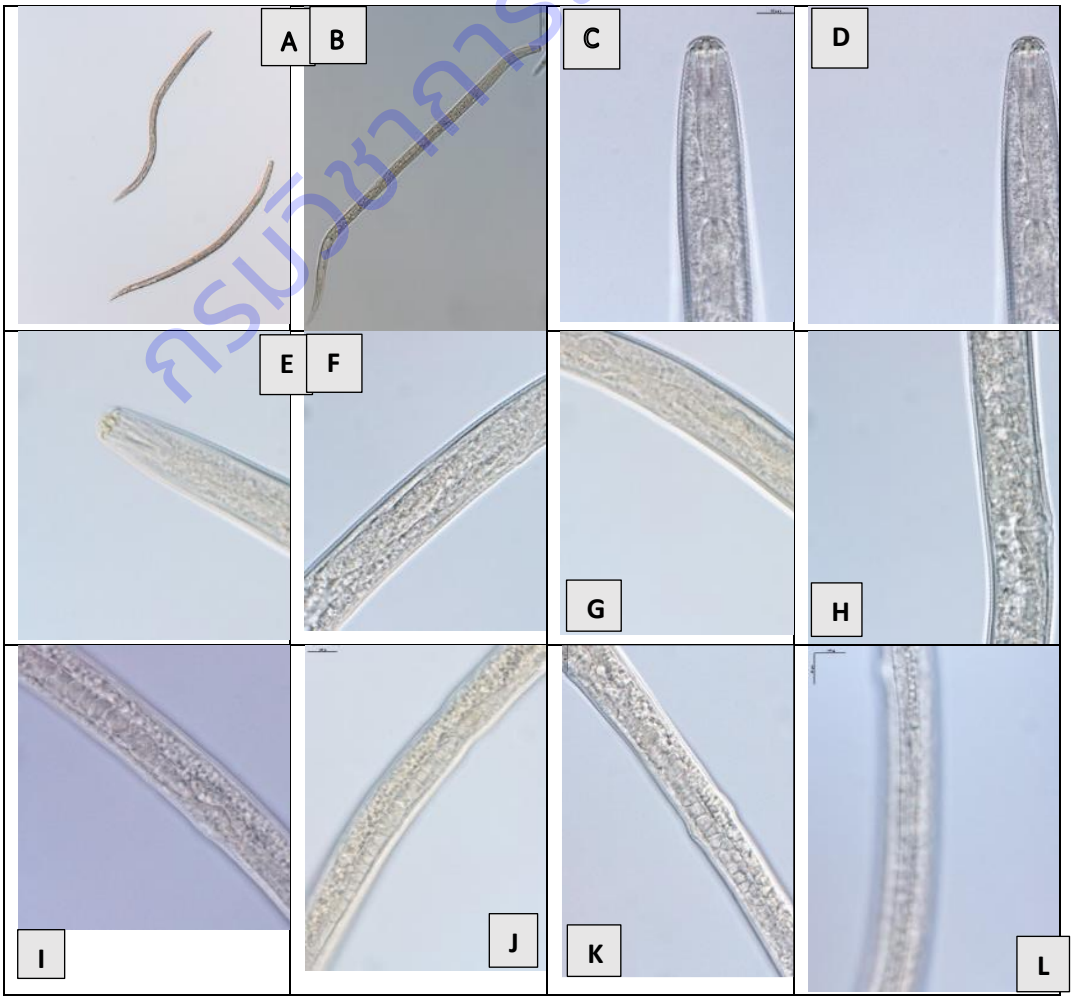
ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* โดยการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphometric measurements) เปรียบเทียบกับเอกสารการจัดจำแนกชนิดของ EPPO PM 7/88 (1): *Radopholus similis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง differential interference contrast (DIC) ซึ่งพบว่าทุกลักษณะที่สำคัญในการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ของการศึกษาครั้งนี้มีความใกล้เคียงกับผลการวัดลักษณะสัณฐานวิทยาของ EPPO จึงกล่าวได้ว่าไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ที่ศึกษานี้ เป็นไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* ดังที่แสดงใน **ตารางที่ 1.2.15.1**

ตารางที่ 1.2.15.1 ผลการวัดลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* เพศเมีย ปริมาณ 50 ตัวพร้อมทั้งค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปรียบเทียบกับผลการวัดลักษณะสัณฐานวิทยาของ PM 7/88 (1): *Radopholus similis* of EPPO Bulletin (หน่วยวัดคือไมครอน)

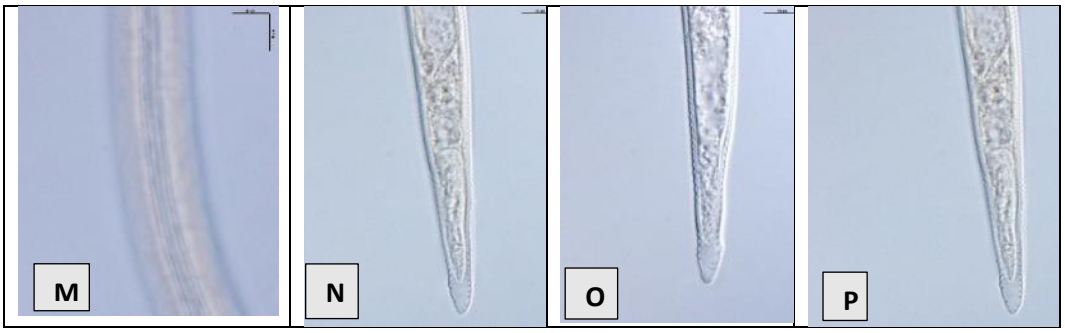
ลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *R. similis* เพศเมีย	EPPO		การศึกษานี้	
Body length	510–820	(655)	525-788	(640±105.04)
Stylet length	16–23	(18.5)	16-21	(19±2.84)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Female gonad anterior branch	112–297	(174)	113-270	(160±50.86)
Female gonad posterior branch	103–269	(165)	106-264	(147±40.67)
Body diameter at the anus	13–24	(17.7)	13-21	(16±3.24)
Distance from Excretory pore to head tip	59–115	(88)	60-106	(86±16.59)
ลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *R. similis* เพศเมีย	EPPO		การศึกษานี้	
Vulva %	50–67	(57)	51-63	(56±8.29)
a	20–34	(27)	24-40	(30±5.65)
b	6–10	(7.9)	8-10	(9±0.46)
c	7–13	(9.4)	6-12	(10±0.73)
hyaline region length			9-17	(11±1.24)



กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.2.15.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ที่ทำสไลด์ถาวรแล้วตรวจวินิจฉัยภายใต้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง differential interference contrast (DIC) ของลักษณะไส้เดือนฝอยรากโพรง *R. similis* (A-B) ลักษณะไส้เดือนฝอยเพศเมียซึ่งโครงสร้างส่วนหัว (labial framework) และ หลอดดูดอาหาร (stylet) พัฒนาดี และ ปากช่องคลอด (vulva) อยู่ค่อนขางกึ่งกลางลำตัว (C-E) ส่วนหัวมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลม (Head hemispherical) ยกสูงเพียงเล็กน้อย ในส่วนของหลอดอาหารมีพัฒนาการดีและมี stylet knobs ซึ่งมีรูปร่างกลมและขนาดเท่ากัน (F-G) ส่วนหน้ารวมทั้งหลอดอาหาร(oesophagus) และต่อมน้ำลาย(oesophageal glands) ซึ่งได้ขยายตัวเป็นกลีบยาวซ้อนทับลำไส้ไปด้านหลัง และหลอดอาหารส่วนกลาง (Metacorpus) มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือทรงรี มีพัฒนาการดี มีวาล์วเปิด-ปิดอย่างชัดเจน (H-k) มีระบบสืบพันธุ์เพศเมียแยกออกเป็นสองแขนงจากบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียโดยตรงข้ามกันระหว่างส่วนหน้า และส่วนท้ายของลำตัว (Didelphic) และระบบสืบพันธุ์ทั้งสองด้านมีหน้าที่พัฒนารังไข่ได้ดี และมีขนาดและความยาวใกล้เคียงกัน (ง) ระบบสืบพันธุ์เพศเมียทั้งส่วนหน้าและส่วนท้ายของลำตัวมี spermatheca รูปร่างกลม (spheroid) ภายในบรรจุอสุจิลักษณะคล้ายแท่งขนาดเล็ก (rod-like sperm) และริมขอบช่องคลอดนูนออกมาเล็กน้อย (L-M) บริเวณกลางลำตัว lateral fields มี 4 รอยบาก (N-P) ส่วนของหางมีลักษณะรูปทรงโคนค่อนข้างยาว

ผลการวัดลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ใน**ตารางที่ 1.2.15.1** มีผลต่อการจำแนกชนิด โดยสามารถอธิบายร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาใน**ภาพที่ 1** ได้ดังนี้ การตรวจวินิจฉัยสกุลของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ (Inverted Microscope) พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* โดยมีลักษณะสัณฐานวิทยาดังนี้ เป็นไส้เดือนฝอยโครงสร้างส่วนหัว (labial framework) และ หลอดดูดอาหาร (stylet) พัฒนาดี สามารถมองเห็นได้ชัดเจนและมีโครงสร้างแข็งแรง ทำให้มองเห็นอย่างชัดเจนภายใต้กล้อง ส่วนหัวไม่มี setae ตัวเต็มวัยเพศเมียมีรูปร่าง เรียวยาว (vermiform) ส่วนหลอดอาหาร (esophagus) แบ่งออกเป็น 3 ส่วน มีการซ้อนทับลำไส้ไปด้านหลัง ตำแหน่งของ vulva อยู่ใกล้กึ่งกลางลำตัว ประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ มีแขนงของระบบสืบพันธุ์สองแขนงตรงข้ามกันด้านหน้าและด้านหลัง (Didelphic) ของอวัยวะเพศเมีย และลำไส้ค่อนข้างสีเข้มมองเห็นได้ชัดเจน เพศผู้ที่มีลักษณะรูปร่างแตกต่างกับเพศเมีย (sexual dimorphism) ซึ่งมีลักษณะของหัวยกสูงอย่างชัดเจนมี stylet ขนาดเล็กและบาง (Mai et.al.,

กรมวิชาการเกษตร

1996) กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ (Inverted Microscope) สามารถจำแนกได้เพียงในส่วนนี้ ดังนั้นลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ที่ทำสไลด์ถาวรแล้วตรวจวินิจฉัยภายใต้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง differential interference contrast (DIC) ของลักษณะไส้เดือนฝอยรากโพรง *R. similis* จึงมีความสำคัญในการจำแนกชนิด โดยเมื่อกล่าวว่าผลการวัดลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ใน **ตารางที่ 1.2.15.1** มีผลต่อการจำแนกชนิดพร้อมอธิบายร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาใน **ภาพที่ 1.2.15.1** โดยการใช้ไดโคโตมัสคีย์อนุกรมวิธาน วิวัฒนาการ และลำดับสกุลของ *Radopholus* (ชนิดที่มีระบบสืบพันธุ์เพศเมียแบบมีแขนงของระบบสืบพันธุ์อยู่ตรงข้ามกันระหว่างด้านหน้า และด้านหลังของอวัยวะเพศเมีย) ตามข้อมูลทางสัณฐานวิทยาซึ่งเป็นกุญแจสำคัญในการจำแนกชนิดของ (Nematoda: Tylenchida) (ธิติยา, 2562)

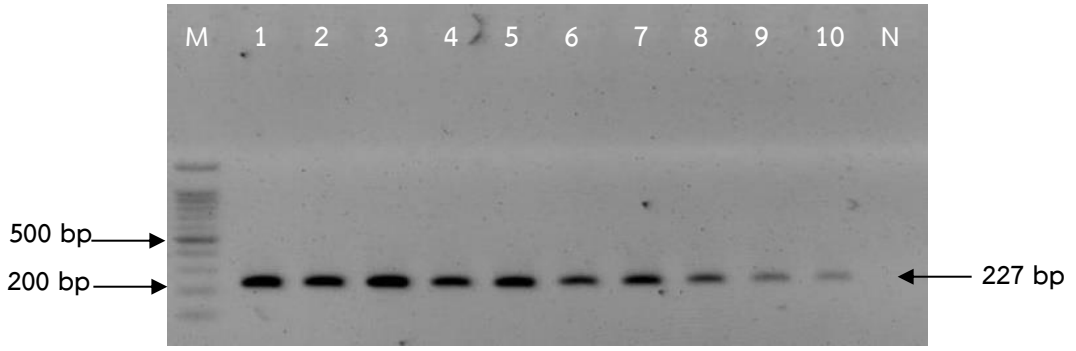
ลำตัวของไส้เดือนฝอยมีลักษณะเรียวยาวความยาวที่เคยมีการบันทึกไว้ไม่เกิน 820 ในส่วนตัวที่สั้น 510 ไมครอน ลักษณะไส้เดือนฝอยเพศเมียซึ่งโครงสร้างส่วนหัว (labial framework) ยกสูงจากลำตัวเพียงเล็กน้อยมีเพียง 3-6 annuli ส่วนหัวมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลม (Head hemispherical) ในส่วนของหลอดอาหารมีพัฒนาการดีและมี stylet knobs ซึ่งมีรูปร่างกลมและขนาดเท่ากัน ความยาวของหลอดอาหารถึง stylet knobs ส่วนใหญ่ประมาณ 17 ไมครอน ใน *R.similis* แต่พบตัวที่สั้นกว่าและยาวกว่าในช่วง 16–23 ไมครอน ในส่วนหน้ารวมทั้งหลอดอาหาร(oesophagus) ค่อนข้างยาว ไม่ว่าจะเป็น หลอดอาหารส่วนหน้า (procorpus) อาหารส่วนกลาง (Metacorpus) และต่อมน้ำลาย (oesophageal glands) ซึ่งได้ขยายตัวเป็นกลีบยาวซ้อนทับลำไส้ไปด้านหลัง และอาหารส่วนกลาง (Metacorpus) มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือทรงรี มีพัฒนาการดี มีวาล์วเปิด-ปิดอย่างชัดเจน ส่วนปากช่องคลอด (vulva) อยู่ค่อนขางกึ่งกลางลำตัวเมื่อวัดโดยละเอียดอยู่ในช่วงร้อยละ 50–67 ของความยาวลำตัวและริมขอบช่องคลอดนูนออกมาเล็กน้อย ไส้เดือนฝอยรากโพรง *R. similis* มีระบบสืบพันธุ์เพศเมียแยกออกเป็นสองแขนงจากบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียโดยตรงข้ามกันระหว่างส่วนหน้า และส่วนท้ายของลำตัว (Didelphic) และระบบสืบพันธุ์ทั้งสองด้านมีหน้าที่พัฒนารังไข่ได้ดี และมีขนาดและความยาวใกล้เคียงกัน ระบบสืบพันธุ์เพศเมียทั้งส่วนหน้าและส่วนท้ายของลำตัวมี spermatheca รูปร่างกลม (spheroid) ภายในบรรจุอสุจิลักษณะคล้ายแท่งขนาดเล็ก (rod-like sperm) ในบริเวณกลางลำตัว lateral fields มี 4 รอยบากตามแนวยาว (incisures) ส่วนของหางมีลักษณะรูปทรงโคนค่อนข้างยาว และ hyaline region length ยาวมากกว่า 9 ไมครอน ในส่วนของ ratios เมื่อเปรียบเทียบค่า a (อัตราส่วนของความยาวของลำตัวต่อส่วนที่กว้างที่สุดของลำตัว) 20–34 ไมครอน การศึกษานี้ 24-40 ไมครอน แม้จะมีค่ามากกว่าเนื่องมากจากไส้เดือนฝอยหลายตัวมีไข่แก่ทำให้ส่วนกลางลำตัวขยายใหญ่ขึ้นมาก ค่า b (อัตราส่วนของความยาวของลำตัวต่อความยาวของ oesophagus) 6-10 และ 8-10 ไมครอน ถือว่าอยู่ในช่วงเดียวกัน เช่นกันกับ c (อัตราส่วนของความยาวของลำตัวต่อความยาวหาง) 7-13 และ 6-12 ไมครอน จากผลการวัดลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* เพศเมียปริมาณ 50 ตัวพร้อมทั้งค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปรียบเทียบกับผลการวัดลักษณะ

กรมวิชาการเกษตร

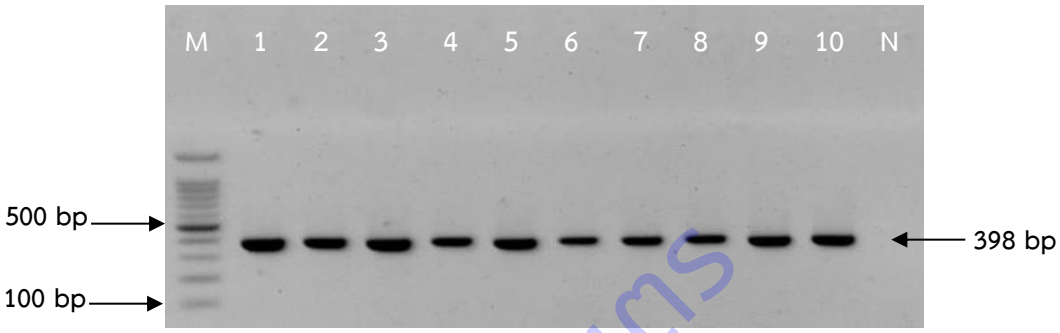
สัณฐานวิทยาของ PM 7/88 (1): *Radopholus similis* of EPPO Bulletin และรูปภาพของลักษณะสัณฐานวิทยา และไดโคโตมัสคีย์ สามารถจัดจำแนกชนิดได้เป็นไส้เดือนฝอย *Radopholus similis*

ในส่วนการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในส่วน D2-D3 expansion region ของ 28s ribosomal RNA gene (rDNA) โดยใช้ forward primer D2A (5' - ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG -3') และ reverse primer D3B (5' - TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA - 3') แล้วเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) จากตัวอย่าง 50 ตัวอย่าง ผลที่ได้การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ด้วยการทำอิเลกโทรโฟรีซีสแบบอะกาโรสแล้วนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่อง UV-transilluminator แล้วถ่ายภาพ ซึ่งได้เลือก ตัวอย่างได้ PCR product ที่ดี 10 ตัวอย่าง ส่งวิเคราะห์ลำดับเบส แล้วนำไปจะถูกนำไปเทียบเคียงความเหมือนกันของลำดับเบสที่ได้กับที่มีอยู่ในกับฐานข้อมูล BLASTN จากการประมวลผลพบว่าเป็น *R.similis* ทุกตัวอย่าง (Zheng, et al.,2000) และผลจากการทดลองที่ 2 การทดสอบตัวอย่าง PCR product 10 ตัวอย่าง ด้วยการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region โดยใช้ Real-Time PCR ไพรเมอร์ forward primer RAD-F: AGACTTGA TGAGCGCAGA และ reverse primer RAD-R: CGTGCCAGAGGAAGTGA ที่ออกแบบให้จำเพาะเจาะจงกับส่วน ITS ของ *R. similis* ขนาด 227 bp พบว่าทั้ง 10 ตัวอย่างเป็น *R. similis* ดังที่แสดงไว้ใน**ภาพที่ 1.2.15.2** ผลจากการทดลองที่ 3 การตรวจสอบตัวอย่าง PCR product 10 ตัวอย่าง ด้วยการใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* คือ ไพรเมอร์ forward primer RsimF 5'-GATTCCGTCCTTTGGTGGGCA-3' และ reverse primer RsimR 5'- GAACCAGGCGTGCCAGAGG-3' ขนาด 398 bp พบว่าทั้ง 10 ตัวอย่างเป็น *R. similis* ดังที่แสดงไว้ใน **ภาพที่ 1.2.15.3** และ ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของยีนส่วน ITS ของไส้เดือนฝอย *R. similis* ประชากรจากประเทศไทยกับตัวอย่างในฐานข้อมูล ด้วยวิธี maximum likelihood พบว่าเป็น *R. similis*ดังที่แสดงไว้ใน**ภาพที่ 1.2.15.4**

กรมวิชาการเกษตร

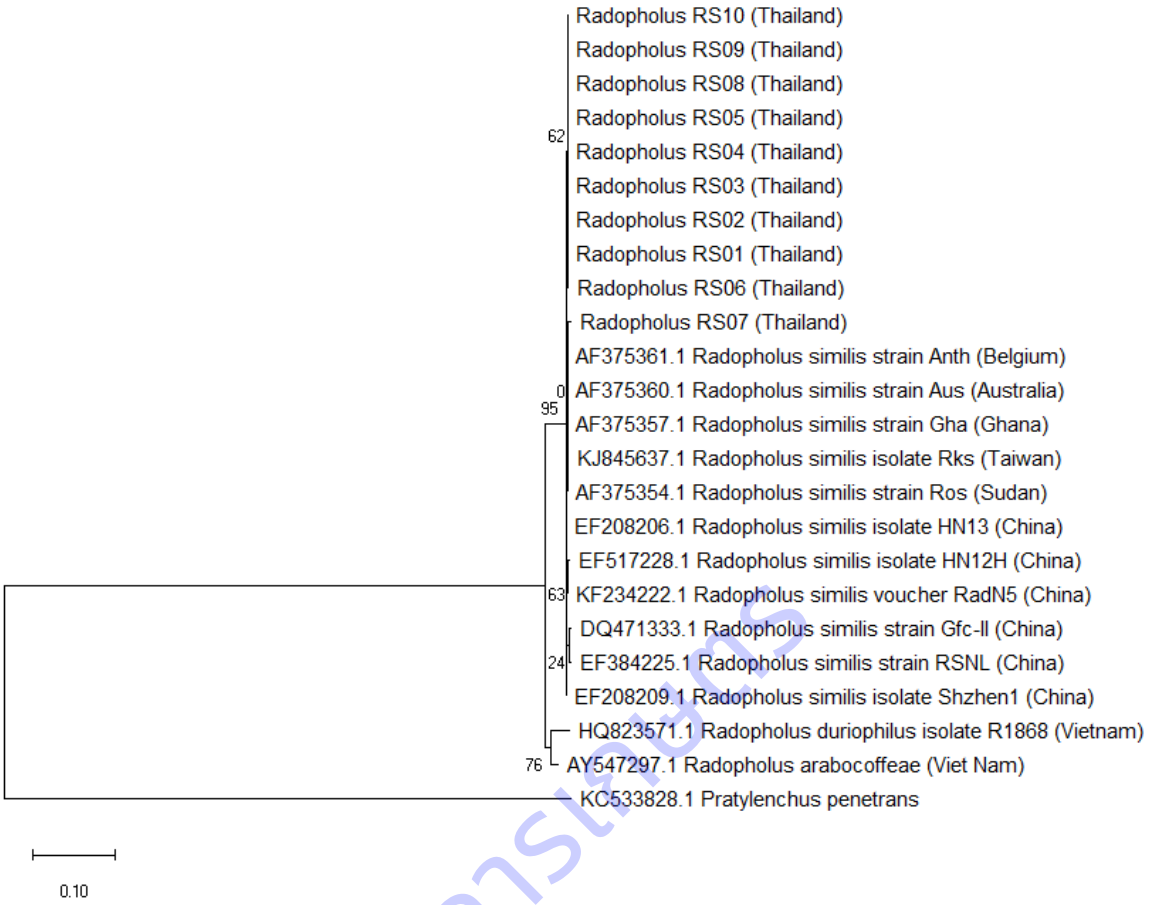


ภาพที่ 1.2.15.2 ผลการวิเคราะห์ไพรเมอร์ RAD-F: AGACTTGA TGAGCGCAGA และ RAD-R: CGTGCCAGAGGAAGTGA ที่ออกแบบให้จำเพาะเจาะจงกับส่วน ITS ของ *R. similis* (Krisna and Eapen, 2019) ขนาด 227 bp



ภาพที่ 1.2.15.3 ผลการวิเคราะห์ไพรเมอร์ คู่ไพรเมอร์จำเพาะ RsimF/RsimR (Ravindran *et al*. 2011) RsimF 5'- GATTCCGTCCTTTGGTGGGCA-3' และ RsimR 5'-GAACCAGGCGTGCCAGAGG-3' ขนาด 398 bp

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.2.15.4 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของยีนส่วน ITS ของไส้เดือนฝอย *R. similis* ประชากรจากประเทศไทยกับตัวอย่างในฐานข้อมูล ด้วยวิธี maximum likelihood

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.2.15.2. ไดโคโตมัสคีย์ อนุกรมวิธาน วิวัฒนาการ และลำดับสกุลของ *Radopholus* (ชนิดที่มีระบบสืบพันธุ์เพศเมียแบบมีแขนงของระบบสืบพันธุ์อยู่ตรงข้ามกันระหว่างด้านหน้า และด้านหลังของอวัยวะเพศเมีย) ตามข้อมูลทางสัณฐานวิทยาซึ่งเป็นกุญแจสำคัญในการจำแนกชนิดของ (Nematoda: Tylenchida) (ธิติยา, 2562)

1. Spermatheca ที่ว่างเปล่า 2

– Spermatheca ที่มีการบรรจุอยู่ของอสุจิ. 3

2. โครงสร้างส่วนหัวมีลักษณะคล้ายโดม . . . . . ***R. nativus***

– โครงสร้างส่วนหัวมีลักษณะแบน. . . . . .***R. vertexplanus***

3. Spermatheca มีการบรรจุอยู่ของอสุจิที่มีรูปทรงกลม. 4

– Spermatheca มีการบรรจุอยู่ของอสุจิที่มีลักษณะคล้ายแท่งขนาดเล็ก. 12

4. ปลายหางมีลักษณะเป็นวงแหวน. 5

– ปลายหางมีลักษณะเรียบ. 10

5. stylet knob มีหนึ่งอันที่ใหญ่กว่าอันอื่นอย่างมาก . . . . . ***R. citri***

–stylet knobs ทั้งหมดขนาดเท่ากัน. 6

6. บริเวณ Lateral field มีรอยบาก 5 ถึง 6 รอยบาก . . . . . ***R. rotundisemenus***

– บริเวณ Lateral field มีรอยบาก 4 รอยบาก 7

7. ปลายหางมีลักษณะปลายกว้างกลมมน. . . . . ***R. rectus***

– . ปลายหางมีลักษณะแคบลงจนแหลม. 8

8. อวัยวเพศผู้ (Male spicule) ยาว 20 μm หรือ ยาวกว่า . . . . . .***R. kahikatea***

– อวัยวเพศผู้ ยาว16 μm หรือ สั้นกว่า 9

9. 75 μm หรือ ยาวกว่า. . . . . ***R. colbrani***

– หางยาว 45 μm หรือ สั้นกว่า. . . . . ***R. serratus***

10. spermatheca ส่วนหน้าใหญ่กว่า spermatheca ของส่วนหลังมาก

. . . .***R.intermedius***

–spermathecae ทั้งส่วนหน้าและส่วนหลังขนาดเท่ากัน 11

11. โครงสร้างส่วนหัว มี 2 annuli; บริเวณ lateral field ระหว่าง

phasmid และปลายหาง มี 3 รอยบาก. . . . . .***R. vacuus***

– โครงสร้างส่วนหัว มี 3 annuli; บริเวณ lateral field ระหว่าง

phasmid และปลายหาง มี 4 รอยบาก. . . . . .***R. inanis***

12. spermatheca ส่วนหน้าใหญ่กว่า spermatheca ของส่วนหลังมาก

. . . . . ***R. magniglans***

– spermathecae ทั้งส่วนหน้าและส่วนหลังขนาดเท่ากัน 13

13. stylet knob มีหนึ่งอันที่ใหญ่กว่าอันอื่นอย่างมาก. 14

กรมวิชาการเกษตร

– stylet knobs ทั้งหมดขนาดเท่ากัน.. 15

14. บริเวณ lateral field ระหว่าง phasmid และปลายหาง มี 4 รอยบาก; มี postrectal sac . . . . . ***R. inaequalis***

– บริเวณ lateral field ระหว่าง phasmid และปลายหาง มี 3 รอยบาก; ไม่มี postrectal sac . . . . . ***R. citri***

15. ปลายหางมีลักษณะ เรียบ 16

– ปลายหางมีลักษณะเป็นวงแหวน.. 19

16. บริเวณเส้นบริเวณ lateral field เส้นคู่ในแคบกว่าเส้นคู่นอก 17

– ทุกเส้นในบริเวณ lateral field มีขนาดความกว้างเท่ากัน 18

17.ปลายหางกลม; ความยาวหาง 31 μm หรือ น้อยกว่า (ความยาวของ stylet 1.5 μm หรือน้อยกว่า), index *b* 5.2 หรือน้อยกว่า. . . . . ***R. Brevicaudatus***

– ปลายหางกลมมีลักษณะทรงโคนแคบลงปลายหางมีเดือย; ความยาวของหาง 57 μm หรือยาวกว่า (ความยาวของ stylet 3.7 μm หรือมากกว่า), index *b* 6.9 หรือมากกว่า. . . . . ***R. musicola***

18. ความยาวของร่างกายทั้งหมด 500 μm หรือยาวกว่า; ความยาวของ stylet 17 μm หรือยาวกว่า ; *c´* = 3.0 หรือมากกว่า; ลักษณะของตัวเมียที่ออกไข่คล้ายหนอนตัวกลมเรียวยาว (female wormlike)

. . . .***R. similis***

– ความยาวของร่างกายทั้งหมด 450 μm หรือสั้นกว่า; ความยาวของ stylet 16 μm หรือสั้นกว่า; *c´* = 2.7 หรือน้อยกว่า; เมื่ออยู่ในระยะวางไข่ตัวเต็มวัยเพศเมียขยายร่างการพองตัวขึ้น . . . . . ***Achlysiella williamsi***

19.บริเวณ Lateral field มี 3 บาก . . . . . ***R. trilineatus***

– บริเวณ Lateral field มี 4 บาก หรือมากกว่า. 20

20. บริเวณเส้นบริเวณ lateral field เส้นคู่ในแคบกว่าเส้นคู่นอก 21

– ทุกเส้นในบริเวณ lateral field มีขนาดความกว้างเท่ากัน. 22

21. ปลายหางมีลักษณะปลายกว้างกลมมน; โครงสร้างส่วนหัวเรียบ, ไม่มี annuli . . ***R. megadorus***

– ปลายหางมีลักษณะแคบ,รูปทรงโคน ; โครงสร้างส่วนหัว มี 3-4 annuli . . .. ***R. bridgei***

22. โครงสร้างส่วนหัวเรียบ . . . .***R. crenatus***

– โครงสร้างส่วนหัวมีวงแหวน 23

23. โครงสร้างส่วนหัว มี 2 annuli . . . . . ***R. capitatus***

– โครงสร้างส่วนหัว มี 3 annuli หรือมากกว่า 24

24. โครงสร้างส่วนหัวแบนราบ. . . . . ***R. neosimilis***

– โครงสร้างส่วนหัว คล้ายรูปทรงโดม (dome-shaped). 25

25.หางลักษณะกว้าง, รูปทรงกระบอก 26

กรมวิชาการเกษตร

– หางลักษณะรูปทรงโคน. 28

26. บริเวณ lateral field ระหว่าง phasmid และปลายหาง มี 3 รอยบาก . . . . . ***R. nativus***

– บริเวณ lateral field ระหว่าง phasmid และปลายหาง มี 4 รอยบาก 27

27. อัตราส่วนของความยาวหางต่อความกว้างของร่างกายบริเวณทวารหนัก 2.7 หรือ มากกว่า; ลักษณะของตัวเมียที่ออกไข่เรียวยาว. . . . . ***R. clarus***

– อัตราส่วนของความยาวหางต่อความกว้างของร่างกายบริเวณทวารหนัก 2.7 หรือ มากกว่า; เมื่ออยู่ในระยะวางไข่ตัวเต็มวัยเพศเมียขยายร่างกาย หนาขึ้นและพองตัวขึ้นล็กน้อย. . .. . ***R. nelsoni***

28. บริเวณ lateral field ระหว่าง phasmid และปลายหาง มี 4 รอยบาก . . . . . ***R. vangundyi***

– บริเวณ lateral field ระหว่าง phasmid และปลายหาง มี 3 รอยบาก . . . . ***R. similis***

ตารางที่ 1.2.15.3 รายชื่อพืช และสถานที่ จำนวนต้นและจำนวนตัวการตรวจพบไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus*

ลำดับที่	พืช	จำนวนต้นพืช		จำนวนตัวการตรวจพบไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus*	
		2563	2564	2563	2564
1	คล้าชุนแผน ที่ตลาดบางใหญ่	25	25	150	40
2	คล้าชุนแผนเรียกเงิน ที่ตลาดบางใหญ่	25	25	30	70
3	คล้าถุงเงิน ที่ตลาดบางใหญ่	25	25	–	–
4	คล้าเสน่ห์นางพิมพ์ ที่ตลาดบางใหญ่	25	25	22	80
5	คล้าใบละร้อย ที่ตลาดบางใหญ่	25	25	–	–
6	คล้ากาเหว่าลาย ที่ตลาดบางใหญ่	25	25	–	–
7	ดินจากสวนลีลาวดี ที่คลอง 15	10	10	50	35
8	หน้าวัวตัดดอก ทรอปิคอล ที่บางกรวย	50	50	230	150
9	หน้าวัวตัดดอก พันธุ์พิสตาเช่ ที่บางกรวย	50	50	119	85
10	หน้าวัวตัดดอก พันธุ์โซเน็ต ที่บางกรวย	25	25	139	95
11	หน้าวัวตัดดอก พันธุ์แองเจิ้ล ที่บางกรวย	25	25	165	160
12	4/1 หน้าวัวแคระ ที่คลอง 15	25	25	12	20
13	4/2 คล้าคละพันธุ์ ที่ คลอง 15	50	50	115	130
14	วัสดุปลูกตาลฉัตร คลอง 15	50	50	–	–
15	ดินปลูกชวนชม คลอง 15	25	25	–	–
16	ดินปลูกหมากเหลือง	50	50	–	–
17	อะโกลนีมา	25	25	30	–
18	มอนเตอร่า	10	10	13	6
19	ฟิโลเด็นดรอน	10	10	12	5
20	กวนอิม	25	25	10	2
21	หน้าวัวใบ	25	25	5	13
	รวม	605	605	1102	891

สงวนลิขสิทธิ์

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* โดยใช้แนวทางการจัดจำแนกของ EPPO PM 7/88 (1) : *Radopholus similis* ซึ่งใช้การจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางชีวโมเลกุล เพื่อนำไปเป็นแนวทางเทคนิค องค์ความรู้ และฐานข้อมูลอ้างอิงของประเทศ เพื่ออำนวยความสะดวกในการการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชก่อนการส่งออก

ไส้เดือนฝอยรากโพรง(burrowing nematode) หรือไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus similis* เป็นไส้เดือนฝอยที่มีความสำคัญเพราะเป็นศัตรูพืชกักกันในหลายประเทศ และเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่มีความรุนแรงในการระบาดทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณซึ่ง ในอดีตได้ทำความเสียหายทางเศรษฐกิจ เช่น ประเทศอินโดนีเซีย รัฐฟลอริดา ในสหรัฐอเมริกา ประเทศในแถบอเมริกาใต้ เป็นต้น แต่เป็นความท้าทายของผู้ที่ต้องการส่งออกไม้ประดับที่จะต้องจัดการกับสถานประกอบการเพื่อให้ปลอดจากไส้เดือนฝอยรากโพรง และโอกาสของประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความสามารถในการสร้างสายพันธุ์ที่แปลกใหม่ของไม้ประดับจนเป็นที่ยอมรับของทั่วโลก และไม่ใช่ว่าไส้เดือนฝอยรากโพรงจะเข้าทำลายพืชทุกชนิด การมีไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* แม้จะเป็นเรื่องยากในการจัดการแต่ก็มีหลายสถานประกอบการที่มีความสามารถจัดการจนสามารถส่งออกได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

หลังเสร็จสิ้นการทดลอง จะเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หรือลงตีพิมพ์เผยแพร่ในเอกสารวิชาการถ่ายทอดความรู้ให้เจ้าหน้าที่กรมวิชาการเกษตร และกรมส่งเสริมการเกษตร เพื่อเผยแพร่สู่ผู้ประกอบการส่งออก เกษตรกร และผู้สนใจ เผยแพร่ข้อมูลทางเว็บไซต์ของกรมวิชาการเกษตร จัดทำเอกสารเผยแพร่ เอกสารวิชาการ และจัดนิทรรศการ

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.2.16 การศึกษาและจำแนกเชื้อไวรัสสาเหตุโรคของยาสูบที่พบในประเทศไทย
The study and classification of tobacco virus diseases in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง นางสาวเยาวภา ตันติวานิช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน นายภูวนารถ มณีโชติ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การสำรวจโรคของไวรัสในยาสูบในแหล่งปลูกชองประเทศไทย ในช่วงเดือนตุลาคม 2562 ถึงเดือนกันยายน 2564 พบยาสูบที่มีอาการผิดปกติคล้ายที่เกิดจากเชื้อไวรัสและเก็บตัวอย่างมาทั้งสิ้นจำนวน 180 ตัวอย่าง ในแหล่งปลูกจำนวน 15 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ แพร่ น่าน ตาก สุโขทัย ร้อยเอ็ด นครพนม หนองคาย ชัยภูมิ มหาสารคาม บึงกาฬ กาฬสินธุ์ สกลนคร ศรีสะเกษและมุกดาหาร เมื่อนำมาตรวจด้วยวิธี ELISA สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัส 6 ชนิด คือ TLCV TMV TSV CMV TSWV และ PVY พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวก กับเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือ TLCV และ TMV จำนวนทั้งหมด 60 ตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวก มาตรวจสอบด้วย PCR พบว่า พบตัวอย่างยาสูบที่ให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อไวรัส TLCV จำนวน 24 ตัวอย่าง และ TMV จำนวน 22 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด จำนวน 46 ตัวอย่าง

Survey of viral diseases in tobacco in plantations in Thailand. During October 2019 to September 2021, There were 180 tobacco-like disorders detected in 15 provinces, including Chiang Mai, Phrae, Nan, Tak, Sukhothai, Roi Et, Nakhon Phanom, Nong Khai, Chaiyaphum, Maha Sarakham, Bueng Kan, Kalasin, Sakon Nakhon, Sisaket and Mukdahan on detection of six types of viruses by ELISA. TLCV and TMV were found to be present in 60 of the samples. For PCR analysis, 24 samples of tobacco were positive for TLCV and 22 were positive for TMV, for a total of 46 samples.

คำนำ

ยาสูบจัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับพริก มะเขือ มะเขือเทศ และมันฝรั่ง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nicotiana tabacum* L. เป็นพืชไร่ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายกว่า 120 ประเทศทั่วโลก เนื่องจากเป็นพืชที่สามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาพอากาศและสภาพดินที่หลากหลาย สายพันธุ์ที่นิยมปลูกมากที่สุด คือ เบอร์เลย์ เตอร์กิซหรือโอเรียนทอล และเวอร์จิเนีย ปลูกกันมากภาคเหนือ เช่น แม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่ แพร่ น่าน พะเยา และลำปาง ยาสูบเบอร์เลย์ นิยมปลูกมากในภาคกลางตอนบน เช่น สุโขทัย เพชรบูรณ์ อุตรดิตถ์ สุดท้ายพันธุ์เตอร์กิซหรือโอเรียนทอลนิยมปลูกกันมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น ชัยภูมิ ขอนแก่น กาฬสินธุ์

ศรีวิชาการเกษตร

สกลนคร มหาสารคาม ร้อยเอ็ด และยโสธร ใบยามีขนาดเล็ก กลิ่นหอมแรง สำหรับประเทศไทยมีเกษตรกรที่ปลูกใบยาทั้ง 3 สายพันธุ์ กระจายอยู่ในหลายพื้นที่กว่า 1 แสนราย และในปี 2553/2554 สามารถเก็บใบยาส่งออกได้สูงถึงกว่า 60 ล้านกิโลกรัมโดย เป็นสายพันธุ์เวอร์จิเนียมียอดการเก็บสูงถึง 17,500,000 กิโลกรัม ตามมาด้วยพันธุ์เบอร์เลย์ จำนวน 35,000,000 กิโลกรัม สุดท้ายจะเป็นเตอร์กิซหรือโอเรียนทอล ที่จัดเก็บได้เพียง 8,000,000 กิโลกรัมโดยมีมูลค่าการส่งออกสูงถึง 2,523 ล้านบาทในปี 2553 คุณภาพของใบยาสูบไทยนั้นได้รับการยอมรับจากตลาดโลกและเป็นหนึ่งในสินค้าส่งออกที่สำคัญ

สำหรับปัญหาโรคของยาสูบนั้น พบโรคที่เกิดจากทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไส้เดือนฝอย โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ซึ่งในช่วงปี 2507 โรคที่พบส่วนใหญ่ คือ โรคใบหด (*Tobacco leaf curl virus*) โรคใบด่าง (*Tobacco mosaic virus*) และแผลละเอียด (*Tobacco streak virus*) จนกระทั่งช่วงปี 2550 ความเสียหายของยาสูบที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอื่นเพิ่มมากขึ้น ได้แก่ *Cucumber mosaic virus Tomato spotted wilt* และ *Potato virus* Y เป็นต้น ซึ่งในต่างประเทศมีรายงานการพบเชื้อไวรัสในยาสูบมากกว่า 10 ชนิด

ในปี 2527 มานพ ได้รายงานโรคไวรัสของยาสูบพันธุ์เวอร์จิเนียที่ปลูกในแถบภาคเหนือของไทยนั้น คือ โรคใบหด (*Tobacco leaf curl virus*) โรคใบด่าง (*Tobacco mosaic virus*) และแผลละเอียด (*Tobacco streak virus*) ต่อมาในปี 2537 พัฒนา และคณะ ได้รายงานโรคไวรัสของยาสูบไว้ในดรรชนีโรคพืชในประเทศ ได้แก่ *Cucumber mosaic virus Tobacco streak virus Tobacco mosaic virus Tobacco mosaic virus-Orchid strain Tobacco etch virus Tobacco vein banding virus Tobacco leaf curl virus* และ *Groundnut bud necrosis virus* และในปี 2556 ปรียพรรณ และคณะ ได้ศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์ยาสูบนำเข้าจากบราซิล พบว่าศัตรูพืชที่มีโอกาสติดมากับเมล็ดพันธุ์ยาสูบและไม่มีรายงานพบในประเทศไทยมีทั้งหมด 5 ชนิด ซึ่งรวมถึง เชื้อไวรัส *Tobacco ringspot virus* ด้วย

ในปัจจุบันการศึกษาวิจัยเชื้อไวรัสสาเหตุโรคของยาสูบในประเทศไทยมีค่อนข้างน้อย ประกอบกับในต่างประเทศมีรายงานการพบเชื้อไวรัสในยาสูบมากกว่า 10 ชนิด และมีหลายชนิดที่มีการถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดได้ จึงควรมีการศึกษาวิจัย และการจัดจำแนกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุโรคของยาสูบในประเทศ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคของยาสูบต่อไป

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์
  1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการไวรัส
  2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติค มาร์กเกอร์ มีดคัตเตอร์ กรรไกร กล่องเก็บความเย็น
  3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการไวรัส
  4. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA และ วิธี PCR

กรมวิชาการเกษตร

- วิธีการ

การสำรวจโรคไวรัสในยาสูบ

สำรวจและเก็บตัวอย่างยาสูบที่มีลักษณะผิดปกติคล้ายเกิดจากโรคไวรัส ได้แก่ อาการใบม้วนงอหนาแข็ง ใบย่น ใบด่าง สีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน แผลละเอียดเล็กๆ สีขาวและสีน้ำตาล และใบเหลือง ในแหล่งปลูกยาสูบในประเทศไทย แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบโดยเดินตามเส้นทแยงมุม ทุกๆ 10 ก้าว ตรวจโรคจุดละ 10 ต้น จำนวน 10 จุดต่อแปลง หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แปลง เก็บตัวอย่างในถุงพลาสติกและแช่ในกล่องเก็บความเย็นตลอดเวลา จนกระทั่งนำไปเก็บในตู้เย็นในห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการตรวจหาไวรัสในตัวอย่างด้วยวิธี ELISA และวิธี PCR

การตรวจโรคด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ตรวจตัวอย่างใบยาสูบที่เก็บมาโดยใช้ ELISA Reagent สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัส 6 ชนิด คือ *Tobacco leaf curl virus* (TLCV) *Tobacco mosaic virus* (TMV) *Tobacco streak virus* (TSV) *Cucumber mosaic virus* (CMV) *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) และ *Potato virus* Y (PVY) โดยทำตามวิธีการตามขั้นตอนของบริษัท (Agdia, Co Ltd, USA)

ตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

สกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างยาสูบโดยใช้ชุดสกัด DNeasy Plant Mini Kit และ RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Taiwan) ตามลำดับ ในส่วนของอาร์เอ็นเอได้นำส่วนของ total RNA ที่ได้ไปเตรียม cDNA library ด้วย SuperscriptTM III One–Step RT–PCR System with Platinum (Invitrogen, USA) เพื่อนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ต่อไป ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัส ในใบยาสูบมีดังนี้

ไพรเมอร์	**ลำดับนิวคลีโอไทด์**
TLCV	pAL1v 1978 (5’GCATCTGCAGGCCCACATYGTCTTYCCNGT3’) pAR1c 715 (5’GATTTCTGCAGTTDATRTTYTCRTCCAT CCA3’) (Rojas *et al.* 1993).
TMV	TMV-CPF (5’ ATGTCTTACAGTATCACTACTCC 3’) TMV-CPR (5’ TCAAGTTGCAGGACCAGAGGT-3’) (Choi *et al*. 2009).
TSV	TSV CP RNA3 express1 (5’ AGGTAGCAGGAGATATAACAATGAATACTTTGATCCAAGG 3’) TSV CP RNA3 express2 (5’ TCGACTCTAGAAACTAGTCTTGATTCACCAGAAAATCTTC 3’)
CMV	CMV-CPF (5’ TTG AGT CGA GTC ATG GAC AAA TC 3’) CMV-CPR (5’ AAC ACG GAA TCA GAC TGG GAG 3’)
PVY	PVY-P1 (5’ CAACTCCAGATGGAACAATTG 3’) PVY-P2 (5’ CCATTCATCACAGTTGGC 3’)
TSWV	TSWV-NPF (5'ATGTCTAAGGTTAAGCTC-3') TSWV-NPR (5'TTAAGCAAGTTCTGTGAG-3') TSWV-LF (5'AATTGCCTTGCAACCAATTC-3') TSWV-LR (5'ATCAGTCGAAATGGTCGGCA-3')

กรมวิชาการเกษตร

- เวลาและสถานที่ - 1 ตุลาคม 2562 วันที่สิ้นสุด 30 กันยายน 2564

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การสำรวจโรคไวรัสในยาสูบ

สำรวจเก็บตัวอย่างยาสูบที่แสดงอาการผิดปกติคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส โดยเก็บตัวอย่างยาสูบที่มีลักษณะอาการผิดปกติ คือ อาการใบด่างเหลือง ใบหงิกม้วนงอ ใบหดย่น เส้นใบหงิกย่น และอาการด่างเหลืองเส้นใบเขียว ลำต้นแคระแกร็น ในพื้นที่ปลูกยาสูบ จำนวน 15 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ แพร่ น่าน ตาก สุโขทัย ร้อยเอ็ด นครพนม หนองคาย ชัยภูมิ มหาสารคาม บึงกาฬ กาฬสินธุ์ สกลนคร ศรีสะเกษและมุกดาหาร และเก็บตัวอย่างมาทั้งหมด 180 ตัวอย่าง

การตรวจโรคด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ตรวจตัวอย่างใบยาสูบที่เก็บมาโดยใช้ ELISA Reagent สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัส 6 ชนิด คือ *Tobacco leaf curl virus* (TLCV) *Tobacco mosaic virus* (TMV) *Tobacco streak virus* (TSV) *Cucumber mosaic virus* (CMV) *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) และ *Potato virus* Y (PVY) พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวก กับเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือ TLCV และ TMV จำนวนทั้งหมด 60 ตัวอย่าง

ตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี ELISA มาสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ และทำการตรวจสอบไวรัสด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะต่อเชื้อไวรัส TLCV และ TMV
ปฏิกิริยาสำหรับเพิ่มปริมาณ ชิ้นยีนมีดังนี้

TLCV: ดีเอ็นเอตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (@ThermoFisherScientific) ปริมาตรของปฏิกิริยารวม 25 ไมโครลิตร โดยอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน PCR คือ Denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing 55 องศาเซลเซียส 2 นาที Extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 30 รอบ ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis ใน Tris–borate buffer (TBE) และนำไปย้อมแถบ DNA ด้วย Ethidium bromide ตรวจแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบ เทียบขนาดของ DNA กับ 100 bp Plus markers (Fermentas, USA)

TMV: นำส่วนของ total RNA ที่ได้ไปเตรียม cDNA library ด้วย SuperscriptTM III One–Step RT–PCR System with Platinum (Invitrogen, USA) และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน TMV-CP โดยวิธี PCR โดยใช้ cDNA 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (@ThermoFisherScientific) ปริมาตรของปฏิกิริยารวม 25 ไมโครลิตร โดยอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน PCR คือ Denaturation 94 องศาเซลเซียส 3 นาที; Denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที; Annealing 66 องศาเซลเซียส 30 วินาที Extension 72

กรมวิชาการเกษตร

องศาเซลเซียส 40 วินาที เริ่มกระบวนการที่ 2–5 ซ้ำอีก 31 รอบ และ Final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ลดอุณหภูมิลงมาที่ 16 องศาเซลเซียส ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ 1.5% agarose gel electrophoresis ใน Tris–borate buffer (TBE) และนำไปย้อมแถบ DNA ด้วย Ethidium bromide ตรวจแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตเปรียบ เทียบขนาดของ DNA กับ 100 bp Plus markers (Fermentas, USA)

ผลการตรวจสอบด้วย PCR พบว่า มีตัวอย่างยาสูบที่ให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อไวรัส TLCV จำนวน 24 ตัวอย่าง และ TMV จำนวน 22 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด จำนวน 46 ตัวอย่าง ดังนี้

สถานที่	TMV	TLCV
อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่	-	1
อำเภอพบพระ จังหวัดตาก	-	2
อำเภอท่าวังผา จังหวัดน่าน	2	1
อำเภอปัว จังหวัดน่าน	2	2
อำเภอท่าเชียงกลาง จังหวัดน่าน	3	1
อำเภอร้องกวาง จังหวัดแพร่	2	2
อำเภอสอง จังหวัดแพร่	1	2
อำเภอหนองม่วงไข่ จังหวัดแพร่	2	1
อำเภอเมือง จังหวัดสุโขทัย	1	1
อำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัย	2	1
อำเภอศรีสำโรง จังหวัดสุโขทัย	1	1
อำเภอเกษตรสมบูรณ์ จังหวัดศรีสะเกษ	1	2
อำเภอเมือง จังหวัดหนองคาย	2	2
อำเภอท่าบ่อ จังหวัดหนองคาย	2	1
อำเภอบึงโขงโหลง จังหวัดบึงกาฬ	1	1
อำเภอบ้านแพง จังหวัดนครพนม	1	-
อำเภอเมือง จังหวัดร้อยเอ็ด	-	1
อำเภอศรีสมเด็จ จังหวัดร้อยเอ็ด	1	-

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการสำรวจโรคของไวรัสในยาสูบในแหล่งปลูกชองประเทศไทย ในช่วงเดือนตุลาคม 2562 ถึง เดือนกันยายน 2564 พบยาสูบที่มีอาการผิดปกติคล้ายที่เกิดจากเชื้อไวรัสและเก็บตัวอย่างมาทั้งสิ้น จำนวน 180 ตัวอย่าง ในแหล่งปลูกจำนวน 15 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ แพร่ น่าน ตาก สุโขทัย

กรมวิชาการเกษตร

ร้อยเอ็ด นครพนม หนองคาย ชัยภูมิ มหาสารคาม บึงกาฬ กาฬสินธุ์ สกลนคร ศรีสะเกษและมุกดาหาร เมื่อนำมาตรวจด้วยวิธี ELISA สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัส 6 ชนิด คือ TLCV TMV TSV CMV TSWV และ PVY พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวก กับเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือ TLCV และ TMV จำนวนทั้งหมด 60 ตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวก มาตรวจสอบด้วย PCR พบว่า พบตัวย่างยาสูบที่ให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อไวรัส TLCV จำนวน 24 ตัวอย่าง และ TMV จำนวน 22 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด จำนวน 46 ตัวอย่าง

เชื้อไวรัส *Tobacco Leaf Curl Virus* (TLCV) ที่เป็นสาเหตุโรคใบหด มีแมลงหวี่ขาวเป็นพาหะ ยาสูบทุกพันธุ์อ่อนแอต่อโรคนี้ สามารถเกิดโรคได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต และมีพืชอาศัยหลายชนิด ได้แก่ สาบแร้งสาบกา มะละกอ สาบเสือ น้ำนมราชสีห์ หญ้าขัด มะแว้งนก หญ้าละออง พืชตระกูลมะเขือ พริก

เชื้อไวรัส *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคใบด่างยาสูบ เข้าทำลายได้ทุกส่วนของยาสูบ ทำให้เกิดอาการแคระแกร็น ใบม้วนงอบิดเบี้ยว ใบด่าง สามารถระบาดไปได้ง่ายโดยการสัมผัส ทาบกิ่ง ติดตา ถึงแม้จะไม่สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด หรือแมลงพาหะ แต่ก็สามารถติดไปกับเครื่องมือทางการเกษตร มือของเกษตรกร หรือวัสดุอื่นๆ ได้

การดูแลต้นกล้าในแปลงเพาะกล้ายาสูบ ให้ปลอดจากโรค เพื่อป้องกันการติดเชื้อตั้งแต่ระยะกล้า หากพบต้นกล้าที่เป็นโรคควรถอนทิ้งทันที การป้องการระบาดของแมลงพาหะรวมทั้งการกำจัดวัชพืชหรือพืชอาศัยในบริเวณรอบแปลงปลูกเพื่อเป็นการลดแหล่งสะสมเชื้อไวรัสได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ สามารถแยกเชื้อ จัดจำแนก และทราบชนิดเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคของยาสูบที่ระบาดอยู่ในแปลงปลูกที่สำคัญของประเทศไทยได้

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 2 ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ของศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติ (วงจรชีวิต การเข้าทำลาย พืชอาหาร และการแพร่กระจาย) ประกอบด้วย 3 กิจกรรมย่อย จำนวน 23 การทดลอง ดังนี้

กิจกรรมย่อยที่ 2.1 ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ของแมลง ไร สัตว์ ศัตรูพืช

การทดลองที่ 2.1.1 ชีวประวัติและลักษณะทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งมะละกอ; *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink (Hemiptera: Pseudococcidae) ในประเทศไทย

การทดลองที่ 2.1.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อชีววิทยาและนิเวศวิทยาของแตนเบียนไข่ *Trichogramma confusum*

การทดลองที่ 2.1.3 ชีววิทยาและเขตการแพร่กระจายของไรแดงมันสำปะหลัง *Oligonychus biharensis* (Hirst)

การทดลองที่ 2.1.4 ชีววิทยาและพลวัตประชากรของหอยศัตรูพืชสกุล *Succinea*

การทดลองที่ 2.1.5 ชีววิทยา วงจรชีวิต และการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Indoplanorbis*

การทดลองที่ 2.1.6 ชีววิทยา การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Radix*

การทดลองที่ 2.1.7 ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ฤดูการระบาด ของหนอนแดงในฝรั่ง และพุทรา

การทดลองที่ 2.1.8 ศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa* (Fabricius)

การทดลองที่ 2.1.9 ศึกษาชนิด ชีววิทยา และการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Physella*

การทดลองที่ 2.1.10 สัณฐานวิทยาและชีววิทยาของเพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch (Hemiptera: Aphididae) ในประเทศไทย

กิจกรรมย่อยที่ 2.2 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของโรคพืช

การทดลองที่ 2.2.1 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phyllosticta citriasiana*

การทดลองที่ 2.2.2 การศึกษาพืชอาศัย และเขตการแพร่กระจายของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชในประเทศไทย

การทดลองที่ 2.2.3 ชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า

การทดลองที่ 2.2.4 การศึกษาสาเหตุและการถ่ายทอดอาการใบหงิกของส้มโอ

การทดลองที่ 2.2.5 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Curvularia eragrostidis* และรา *C. oryzae*

การทดลองที่ 2.2.6 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Neoscytalidium dimidiatum* Crous & Slippers and Gruyter

ศรีวิชัยการเกษตร

การทดลองที่ 2.2.7 การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาและชีวโมเลกุลของเชื้อ *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) ที่เข้าทำลายพริกในประเทศไทย

การทดลองที่ 2.2.8 การจำแนกชนิดเชื้อ *Crinivirus* ของพืชตระกูลแตงในประเทศไทย

กิจกรรมย่อยที่ 2.3 ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของวัชพืช

การทดลองที่ 2.3.1 ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของหญ้าตีนกาใหญ่ (*Acrachne racemosa* (Heyne ex Roth) Ohwi)

การทดลองที่ 2.3.2 ชีววิทยา และนิเวศวิทยาของลูกใต้ใบใบใหญ่ (*Phyllanthus caroliniensis* Walter)

การทดลองที่ 2.3.3 ชีววิทยาของวัชพืช *Asystasia gangetica* (L.) Anderson subsp. *micarantha* (Nees.) Ensermu

การทดลองที่ 2.3.4 ชีววิทยา และนิเวศวิทยาของกระดุมใบใหญ่ (*Borreria latifolia* (Aubl), Schum.)

การทดลองที่ 2.3.5 ชีววิทยาของเทียนนา (*Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Excell.)

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.1.1 ชีวประวัติและลักษณะทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งมะละกอ *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink (Hemiptera: Pseudococcidae) ในประเทศไทย

Life History and Taxonomic Characteristics of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink (Hemiptera: Pseudococcidae) in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ชมัยพร บัวมาศ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ยุวรินทร์ บุญทบ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาชีวประวัติและอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งมะละกอ (papaya mealybug) *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink โดยนำมาเลี้ยงบนพืชอาหารจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ มะละกอ มันสำปะหลัง ลีลาวดี และชบา ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยทำการศึกษาตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 ถึง กันยายน 2561 พบว่า ตัวเต็มวัยของเพลี้ยแป้งมะละกอ (*P. marginatus*) ที่เลี้ยงในมะละกอมีช่วงอายุเฉลี่ยยาวนานที่สุด รองลงมาได้แก่ ลีลาวดี มันสำปะหลัง และชบา ตามลำดับ สำหรับวงจรชีวิต พบว่า เมื่อเลี้ยงในมะละกอมีวงจรชีวิตเฉลี่ยนานที่สุด คือ 39.8 วัน รองลงมา คือ ลีลาวดี 38.9 วัน เมื่อเลี้ยงในมันสำปะหลัง มีวงจรชีวิตเพียง 34.3 วัน และ 33.2 วันในชบา เพลี้ยแป้งมะละกอ (*P. marginatus*) สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ วางไข่อยู่ภายในถุงไข่ ซึ่งแต่ละถุงไข่เมื่อทำการตรวจนับจำนวนไข่มีความแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด พบว่า จำนวนไข่เฉลี่ยที่เลี้ยงด้วยมะละกอมีจำนวนสูงสุดและในชบาน้อยที่สุด ตัวอย่างของเพลี้ยแป้งแต่ละระยะได้นำมาทำสไลด์ถาวรเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลเปรียบเทียบ จัดทำเป็นคู่มือในการจำแนกเพลี้ยแป้งมะละกอ (*P. marginatus*) แต่ละระยะการเจริญเติบโตพร้อมจัดเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง

Abstract

Life history and taxonomic characteristic of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink were conducted between October 2016 and September 2018. Rearing *P. marginatus* was on four host plants including papaya, cassava, frangipani and Chinese rose in the laboratory of Insect Taxonomy Section, Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research and Development office. The adult female longevity of *P. marginatus* on four host plants varied in the order, papaya > frangipani > cassava >

กรมวิชาการเกษตร

Chinese rose. The life cycle of *P. marginatus* was observed on papaya, frangipani, cassava and Chinese rose; total life span is 39.8, 38.9, 34.3 and 33.2 days respectively. The total number of eggs from each ovisac recorded the highest and lowest on papaya and Chinese rose respectively. Slide-mounted of *P. marginatus* in each stage were collected at insect museum (DoA) and did the key for identification of all stages of *P. marginatus*.

คำนำ

เพลี้ยแป้งมะละกอ (papaya mealybug) *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink จัดเป็นเพลี้ยแป้งไม่ประจำถิ่นของประเทศไทยและแถบเอเชีย ซึ่ง Miller *et al*. (1999) เชื่อว่าน่าจะเป็นเพลี้ยแป้งประจำถิ่นในประเทศเม็กซิโก หรือในแถบอเมริกากลาง และได้ระบาดไปยังประเทศต่างๆ ทั่วทุกภูมิภาคของโลกอย่างรวดเร็ว ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบเพลี้ยแป้งมะละกอครั้งแรก เมื่อปี 1998 และ ปี 2000 พบมีการระบาดในแถบอเมริกากลาง (Matile-Ferrero *et al*., 2000) และเริ่มมีการรายงานการระบาดจากภูมิภาคต่างๆ เพิ่มมากขึ้น เช่น ปี 2008 มีรายงานการพบเพลี้ยแป้งมะละกอลงทำลายพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ได้แก่ ลีลาวดี และมะละกอ ในประเทศศรีลังกา (Galanihe *et al*., 2010) และในปีเดียวกันนี้ ยังพบรายงานเพลี้ยแป้งมะละกอในประเทศอินโดนีเซียและอินเดียอีกด้วย (Muniappan *et. al*., 2008) ซึ่งเพลี้ยแป้งชนิดนี้ถือเป็นเพลี้ยแป้งต่างถิ่นรุกราน (alien invasive species) สามารถสร้างความเสียหายให้แก่พืชเศรษฐกิจจำนวนมาก และยังมีพืชอาหารที่หลากหลายถึง 22 วงศ์ (Ben-Dov, 1994)

สำหรับในประเทศไทยได้มีการพบเพลี้ยแป้งมะละกอลงระบาดในมันสำปะหลังเมื่อปี 2553 และพบว่าเพลี้ยแป้งมะละกอมีความสามารถในการทำลายมันสำปะหลังได้ค่อนข้างสูงโดยเฉพาะช่วงที่ไม่มีเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูระบาด และยังพบลงทำลายในพืชเศรษฐกิจอื่นๆ ได้แก่ ลีลาวดี ชบา สบู่ดำ มะเขือ พริก ปอ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย (ชมัยพร และคณะ 2557) เนื่องจากเพลี้ยแป้งมะละกอเป็นเพลี้ยแป้งที่มีพืชอาหารหลากหลายและมีการสำรวจพืชอาศัยของเพลี้ยแป้งชนิดนี้ในประเทศไทย พบว่า มีพืชอาศัยถึง 10 ชนิด ได้แก่ มะละกอ ลีลาวดีดอกแดง ลีลาวดีดอกขาว หญ้าก้นจ้ำขาว 2 ชนิด ปัตตาเวีย มันสำปะหลัง ชบา พุดสามสี และมะเขือพวง (Saengyot and Burikam, 2011) ในปัจจุบันมีแนวโน้มที่เพลี้ยแป้งชนิดนี้จะลงทำลายพืชอื่นๆ และเพิ่มความรุนแรงมากขึ้น แต่ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลด้านชีวประวัติซึ่งเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญในการหาแนวทางป้องกันกำจัดที่ถูกต้องและเหมาะสมจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาชีวประวัติของเพลี้ยแป้งชนิดนี้เพื่อนำไปใช้ในการหาแนวทางในการป้องกันกำจัดต่อไป

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเพลี้ยแป้งมะละกอ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างเพลี้ยแป้ง ได้แก่ แอลกอฮอล์ 70 – 80% หรือน้ำยา AGA ขวดดองตัวอย่างแมลง คัตเตอร์ กรรไกรตัดกิ่ง กล่องพลาสติก ถุงกระดาษและถุงพลาสติก

3. อุปกรณ์และพืชอาหารสำหรับเลี้ยงแมลง ได้แก่ กล่องพลาสติก พู่กัน และพืชอาหารที่ใช้เลี้ยง ได้แก่ มันสำปะหลัง มะละกอ ลีลาวดี และชบา

4. อุปกรณ์บันทึกข้อมูล ได้แก่ กระดาษ ดินสอ เวอร์เนียร์คาลิเปอร์ เป็นต้น

5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวรเพลี้ยแป้ง ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น alcohol 70 %, potassium hydroxide 10%, hydrochloric acid, glacial acetic acid, xylene, carbolic acid, acid fuchsin, N-butyl alcohol, clove oil และ Canada balsam เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องใส่สไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร

6. กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope, compound microscope กล้องถ่ายภาพและเครื่องระบุพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS)

7. อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา rotting และกระดาษไขเขียนแบบ

8. เอกสารประกอบการจำแนกชนิดเพลี้ยแป้ง

- วิธีการ

1. เตรียมพืชอาหารสำหรับการเลี้ยงเพลี้ยแป้งมะละกอ โดยใช้พืชอาหารทั้งสิ้น 4 ชนิด ได้แก่ มันสำปะหลัง มะละกอ ชบา และ ลีลาวดี

2. เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากแหล่งปลูกมันสำปะหลัง มะละกอ ชบา และลีลาวดี ใน จังหวัดสระบุรี นครราชสีมา ราชบุรี กาญจนบุรี เพื่อนำเพลี้ยแป้งมะละกอที่ได้มาทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการ โดยตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยแป้งอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษแล้วใส่ในถุงพลาสติก บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง ชนิดพืชอาศัย ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ

3. นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งมะละกอที่รวบรวมได้จากการเก็บรวบรวม มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการ โดยใช้พู่กันเขี่ยตัวอ่อน ตัวเต็มวัย และถุงไข่ ลงบนฟักทอง รอจนเพลี้ยแป้งสามารถเจริญเติบโตได้ดีและเพิ่มปริมาณมากเพียงพอสำหรับนำไปดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

4. คัดเลือกเพลี้ยแป้งที่มีถุงไข่ บริเวณปลายส่วนท้อง โดยนำพู่กัน เขี่ยเพลี้ยแป้งที่มีถุงไข่ ใส่ในฟักทองอีกลูก จำนวน 10-15 ตัว รอจนไข่เริ่มฝักออกมาเป็นตัวอ่อนวัยที่ 1

5. หลังจากนั้นให้ ใช้พู่กันเขี่ยตัวอ่อนเพลี้ยแป้งวัยที่ 1 ลงในพืชอาหารที่เตรียมไว้ซึ่งวางไว้ในกล่องพลาสติก จำนวน 1 ตัวต่อ 1 กล่อง จำนวน 20 กล่อง เปลี่ยนพืชอาหารเมื่อจำเป็น บันทึกการเจริญเติบโต รูปร่างลักษณะ สี ขนาด ทุกระยะการเจริญเติบโต รวมทั้งพฤติกรรมต่างๆ ตลอดการทดลอง พร้อมกับถ่ายภาพประกอบ

6. นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งบางส่วนจากที่เลี้ยงไว้บนพืชอาหาร มาตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพ บันทึกรายละเอียด เช่น ขนาด รูปร่างลักษณะ สี และระยะการเจริญเติบโตของเพลี้ยแป้งก่อนดองในแอลกอฮอล์ 70%

กรมวิชาการเกษตร

7. นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากขวดดองตัวอย่างในข้อ 6 มาทำสไลด์ถาวร โดยดัดแปลงวิธีการของ Williams and Watson (1988) มีขั้นตอนดังนี้

7.1 ใช้เข็มเขี่ยเจาะบริเวณกลางส่วนอกด้านบนของตัวอย่างเพลี้ยแป้ง นำไปใส่ในถาดแก้วที่บรรจุด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% แช่ทิ้งไว้ 12 - 24 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับขนาดตัวอย่าง และระยะการเจริญเติบโตของเพลี้ยแป้ง

7.2 นำตัวอย่าง ที่ได้จากข้อ 7.1 มากดเบา ๆ บนลำตัวด้วยเข็มดัดปลายโค้ง เพื่อทำของเหลวที่อยู่ในลำตัวหลุดออกมาทางรอยที่เจาะไว้ ถ้ายังมีก้อนไขมันตกค้างอยู่ให้นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 2 – 3 นาที

7.3 ย้ายลงในกรดแอลกอฮอล์ (acid alcohol) แช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

7.4 ย้อมสีตัวอย่างโดยแช่ในน้ำยาย้อมสี ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิดฟุชซิน (acid fuchsin) กรดเกลือ (hydrochloric acid) และน้ำกลั่น แช่ทิ้งไว้นาน 5-10 นาที

7.5 ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95% แช่ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที เพื่อกำจัดสีส่วนเกิน

7.6 แช่แอลกอฮอล์ 95% ทิ้งไว้ 10 นาที

7.7 ย้ายลงในโคล์ฟออย (clove oil) แช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

7.8 นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากข้อ 7.8 วางบนแผ่นสไลด์แก้ว ใช้กระดาษกรองซับโคล์ฟออยส่วนที่เกินออก หยดแคนาดาบัลซัม (canada balsam) 1 หยดบนตัวอย่างแมลงจัดรูปร่าง ให้สวยงามไม่บิดเบี้ยวหรือทับซ้อนกัน ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

7.9 นำไปอบให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 1-2 เดือน

8. ตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยแป้งบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Williams and Granara de Willink (1992) ตรวจดูลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก ได้แก่ หนวด (antennae) ขน (setae) รู (pores) ท่อ (tubular ducts) กลุ่มอวัยวะที่ผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว (cerarii) ช่องเปิดที่มีลักษณะคล้ายรอยแตกตามขวางของลำตัว (ostioles) และวงแหวนที่ล้อมรอบช่องเปิดของอวัยวะขับถ่าย (anal ring)

9. วาดรูปแสดงลักษณะทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งแต่ละระยะโดยวาดลงบนกระดาษกราฟและลอกลงบนกระดาษไขเขียนแบบและจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพลี้ยแป้งมะละกอในแต่ละระยะ

10. การบันทึกรายละเอียดบนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้วโดยวางแผ่นสไลด์หันด้านหัวของเพลี้ยแป้งเข้าหาตัว ด้านขวาเขียนรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ด้านซ้ายมือเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ เพศ วันเดือนปี ที่ทำสไลด์และชื่อผู้จำแนก ควรลงรายละเอียดดังกล่าวเป็นภาษาอังกฤษ

11. จัดเก็บตัวอย่างเพลี้ยแป้งในกล่องใส่สไลด์ถาวรและนำเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล

- เวลาและสถานที่

ศูนย์วิทยทรัพยากร

เริ่มต้น เดือนตุลาคม 2559 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2561

สถานที่ 1. แหล่งปลูกพืชต่างๆ

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ 1) ศึกษาด้านชีววิทยาของเพลี้ยแป้งมะละกอ โดยนำเพลี้ยแป้งมะละกอมาเลี้ยงบนพืชอาหารจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ มะละกอ มันสำปะหลัง ชบา และลีลาวดี 2) ศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งแต่ละระยะการเจริญเติบโต โดยนำตัวอย่างเพลี้ยแป้งแต่ละระยะการเจริญเติบโตที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการในพืชแต่ละชนิด มาทำสไลด์ถาวร เพื่อจัดทำคู่มือวินิจฉัยเพลี้ยแป้งมะละกอแต่ละระยะการเจริญเติบโต ดำเนินการทดลองทั้ง 2 ส่วน ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

1) การศึกษาชีววิทยาของเพลี้ยแป้งมะละกอ (papaya mealybug) *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

โดยนำเพลี้ยแป้งมะละกอมาเลี้ยงบนพืชอาหารจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ มะละกอ มันสำปะหลัง ลีลาวดีและชบา ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช พบว่า เพลี้ยแป้งมะละกอ (papaya mealybug) *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink เป็นเพลี้ยแป้งที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ตัวเต็มวัยเมื่อได้รับการผสมพันธุ์จากตัวผู้จะออกลูกเป็นไข่ (oviparity) มีถุงไข่ (ovisac) ตัวเมีย 1 ตัวสามารถสร้างถุงไข่ได้ 1 ถุง โดยถุงไข่จะหุ้มไข่ไว้อยู่บริเวณปลายส่วนท้องของตัวเต็มวัยเพศเมีย ไข่มีลักษณะทรงรี สีของไข่จะค่อยๆ เข้มขึ้นเมื่อใกล้ฟัก ไข่มีอายุประมาณ 2-7 วัน จากนั้นจะฟักออกเป็นตัวอ่อนวัยที่ 1 (crawler) และคลานออกมาภายนอกถุงไข่ ผนังลำตัวค่อนข้างใสหรือเหลืองใส ส่วนขาและหนวดมีการเจริญเติบโตดี เห็นได้ชัดเจน ขนาดค่อนข้างเล็กความยาว ประมาณ 0.7 - 1.7 มิลลิเมตร ตัวอ่อนเพศเมียจะมีการลอกคราบจำนวน 3 ครั้ง ตัวเต็มวัยเพศเมียจะมีผนังลำตัวสีเหลือง มีแป้งสีขาวปกคลุมลำตัว ขนาดตัวเต็มวัยด้านกว้าง ประมาณ 1.7 – 3.5 มิลลิเมตร ด้านยาว ประมาณ 3.0 – 4.1 มิลลิเมตร

วงจรชีวิต

ตัวเต็มวัยเพศเมีย (adult female) จะมีการลอกคราบจำนวน 3 ครั้งหลังจากฟักออกจากไข่ ได้แก่ ตัวอ่อนวัยที่ 1 (crawler/1st instar) ตัวอ่อนวัยที่ 2 (2nd instar) และตัวอ่อนวัยที่ 3 (3rd instar) หลังจากนั้นจะเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งใช้เวลาตลอดอายุขัยประมาณ 31-42 วัน ส่วนตัวผู้เมื่อผ่านระยะตัวอ่อนวัยที่ 2 จะมีขนาดตัวเรียวยาวขึ้น (pre pupa) และมีการสร้างเส้นไยปกคลุมลำตัวคล้ายดักแด้ (pupa) โดยตัวอ่อนภายในดักแด้จะมีการพัฒนาส่วนของหนวดและขาและปีก ซึ่งส่งผลให้

กรมวิชาการเกษตร

ตัวเต็มวัยเพศผู้ (adult male) ของเพลี้ยแป้งมีลักษณะไม่เหมือนกับตัวเต็มวัยเพศเมียและสามารถที่จะบินได้

เพลี้ยแป้งมะละกอ *P. marginatus* เมื่อเลี้ยงในพืชอาหารทั้ง 4 ชนิด พบว่าวงจรชีวิตของเพลี้ยแป้งในแต่ละพืชอาหารมีความแตกต่างกัน (Table 2.1.1.1) รายละเอียดดังนี้

วงจรชีวิตจากตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัยเมื่อเลี้ยงบนใบมะละกอภายในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส มีอายุเฉลี่ย 39.8 วัน โดยตัวอ่อนวัยที่ 1 (crawler) อายุเฉลี่ย 4.5 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 2 อายุเฉลี่ย 4.7 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 3 อายุเฉลี่ย 5.0 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมีย อายุเฉลี่ย 25.5 วัน สามารถวางไข่เฉลี่ย 101.6 ฟองต่อตัว

วงจรชีวิตจากตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัยเมื่อเลี้ยงบนใบลีลาวดีภายในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส มีอายุเฉลี่ย 38.9 วัน โดยตัวอ่อนวัยที่ 1 (crawler) อายุเฉลี่ย 4.8 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 2 อายุเฉลี่ย 4.6 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 3 อายุเฉลี่ย 5.0 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมีย อายุเฉลี่ย 24.5 วัน สามารถวางไข่เฉลี่ย 92.0 ฟองต่อตัว

วงจรชีวิตจากตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัยเมื่อเลี้ยงบนใบมันสำปะหลังภายในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส มีอายุเฉลี่ย 34.3 วัน โดยตัวอ่อนวัยที่ 1 (crawler) อายุเฉลี่ย 4.6 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 2 อายุเฉลี่ย 4.4 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 3 อายุเฉลี่ย 4.8 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมีย อายุเฉลี่ย 20.5 วัน สามารถวางไข่เฉลี่ย 71.1 ฟองต่อตัว

วงจรชีวิตจากตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัยเมื่อเลี้ยงบนใบชบสภายในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส มีอายุเฉลี่ย 33.2 วัน โดยตัวอ่อนวัยที่ 1 (crawler) อายุเฉลี่ย 4.5 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 2 อายุเฉลี่ย 4.1 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 3 อายุเฉลี่ย 4.8 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมีย อายุเฉลี่ย 19.8 วัน สามารถวางไข่เฉลี่ย 67.5 ฟองต่อตัว

Table 2.1.1.1 Total life cycle of mealybug on 4 host plant in laboratory; crawler, second, third instar, adult durations and number of eggs per ovisac.

host plant	Duration (Days)						number of eggs/ovisac
	crawler	2nd instar	3rd instar	total life of immature stages	adult	total life cycle	
papaya	4.5	4.7	5.0	14.2	25.5	39.8	101.6
frangipani	4.8	4.6	5.0	14.5	24.5	38.9	92.0
cassava	4.6	4.4	4.8	13.8	20.5	34.3	71.1
Chinese rose	4.5	4.1	4.8	13.4	19.8	33.2	67.5

ศรีนวินทรวิโรฒ

ลักษณะในธรรมชาติของเพลี้ยแป้งมะละกอ *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

ไข่ (egg) (Figure 2.1.1.1A) รูปร่างทรงรี เป็นฟองเดี่ยวๆ อยู่ภายในถุงไข่ของตัวแม่ เมื่อวางไข่ระยะแรก ไข่จะมีสีขาวใส และเข้มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อใกล้ฟัก ขนาดไข่ยาว 0.31-0.35 มิลลิเมตร กว้าง 0.12-0.15 มิลลิเมตร

ตัวอ่อน (nymph)

ตัวอ่อนวัยที่ 1 (crawler) (Figure 2.1.1.1B) รูปร่างรูปไข่ ลำตัวยาว 0.4-0.5 มิลลิเมตร กว้าง 0.2-0.3 มิลลิเมตร เคลื่อนไหวรวดเร็ว ขายาวชัดเจนเมื่อเทียบกับขนาดตัว ผนังลำตัวใสหรือเป็นสีเหลืองใส ไม่มีไขแป้งปกคลุม หรือมีน้อยมาก ยังไม่ปรากฏเส้นแป้งด้านข้างลำตัวและด้านท้าย เริ่มดูดกินน้ำเลี้ยงจากส่วนต่างๆ ของพืช

ตัวอ่อนวัยที่ 2 (2nd instar) (Figure 2.1.1.1C) รูปร่างรูปไข่ ลำตัวยาว 0.5-0.7 มิลลิเมตร กว้าง 0.3-0.5 มิลลิเมตร เคลื่อนไหวรวดเร็ว ขนาดตัวเริ่มขยายขึ้นเมื่อเทียบกับส่วนขาซึ่งเห็นขาสั้นลง ผนังลำตัวเริ่มเป็นสีเหลืองอ่อน เริ่มมีเส้นแป้งด้านข้างแต่ไม่ยาวนัก แต่เห็นเส้นแป้งด้านท้ายยาวกว่าด้านข้างชัดเจน มีไขแป้งปกคลุมเห็นได้อย่างชัดเจน

ตัวอ่อนวัยที่ 3 (3rd instar) (Figure 2.1.1.1D) รูปร่างรูปไข่ ลำตัวยาว 0.7-1.8 มิลลิเมตร กว้าง 0.5-0.9มิลลิเมตร เคลื่อนไหวช้าและมักไม่ค่อยเคลื่อนไหว ยกเว้นหาแหล่งอาหาร ผนังลำตัวสีเหลือง มีเส้นแป้งด้านข้างยาวชัดเจน เส้นแป้งด้านท้ายมีขนาดยาวกว่าเส้นแป้งด้านข้างเล็กน้อย มีไขแป้งปกคลุมชัดเจน

ตัวเต็มวัย (adult)

เพศเมีย (female) (Figure 2.1.1.2A,B) รูปร่างรูปไข่ ลำตัวยาว 1.5-2.3 มิลลิเมตร กว้าง 0.9-1.7 มิลลิเมตร เคลื่อนไหวช้า และมักไม่ค่อยเคลื่อนไหว ผนังลำตัวสีเหลือ ปกคลุมด้วยไขแป้งสีขาว ผนังลำตัวด้านข้างมีเส้นแป้งสั้นล้อมรอบ เส้นแป้งด้านท้ายลำตัวยาวกว่าเส้นแป้งด้านข้างเล็กน้อย มีเส้นแป้งทั้งหมด 34 เส้น

เพศผู้ (male) (Figure 2.1.1.2C,D) ลำตัวเรียวยาว มีหนวด 10 ปล้อง ปีก 1 คู่ บริเวณปากไม่พัฒนา หนวดยาว หลังออกจากดักแด้ สามารถดำรงชีวิตได้ในระยะสั้นๆ เนื่องจากไม่สามารถกินอาหารได้

กรมวิชาการเกษตร

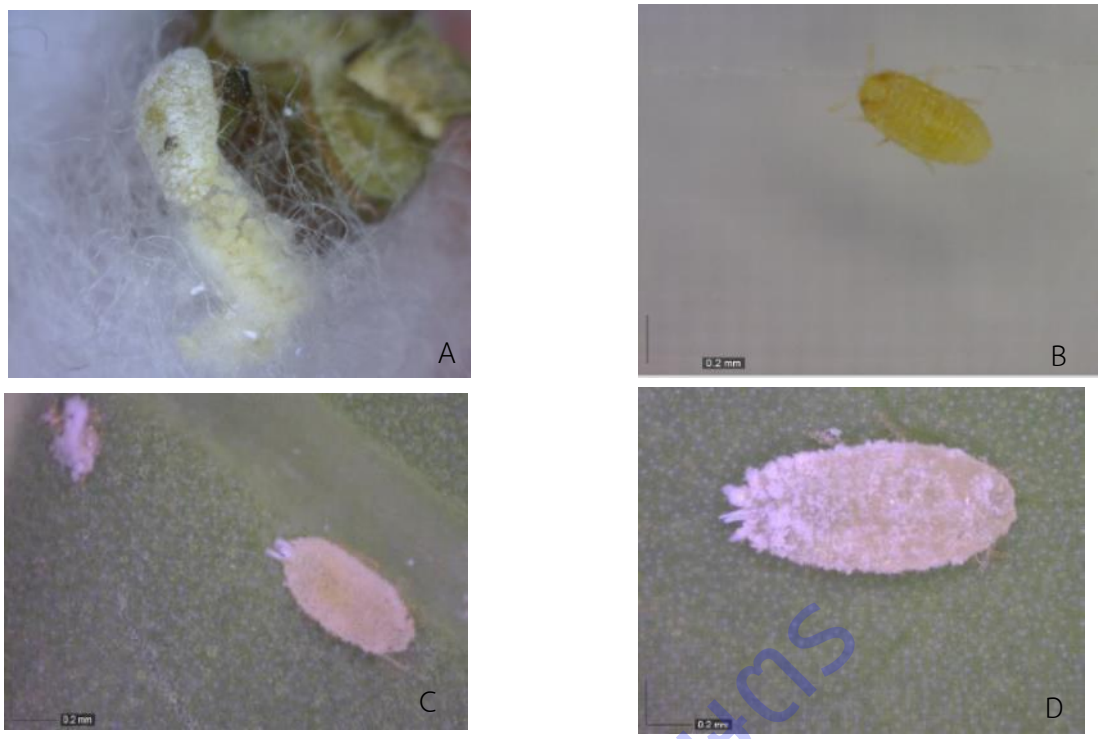


Figure 2.1.1.1 Immature stages of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink (A) Crawler stage (first stage), (B) Mounting to second stage, (C) Second stage, (D) Third stage.

Figure 2.1.1.2 Adult female and male of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink (A) Mounting to adult stage, (B) Adult female, (C) Male pupa with cocoon, (D) Adult male.

กรมวิชาการเกษตร

2) การจำแนกเพลี้ยแป้งมะละกอในแต่ละระยะการเจริญเติบโต

***Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink**

1. – Without wings or wing buds on thorax.....2
   – With wings or wing buds on thorax.....third-instar or adult male
2. – Antennae 6-segmented.....3
   – Antennae with 7 or 8 segmented 6
3. – Without tubular ducts or with less than 5 ducts 4
   – With more than 5 tubular ducts particularly on dorsal abdomen.....
   ..... second-instar male
4. – Third antennal segment with more than 4 setae; anal-lobe cerarius with at least 1 auxiliary seta.....5
   – Third antennal segment with more than 4 setae; anal-lobe cerarius without auxiliary seta.....first instar
5. – Third antennal segment with 5 setae .....second-instar female
   – Third antennal segment with 9 setae ..... third-instar female
6. – Antenna 7-segmented;with less than 5multilocular pores; without vulva
   .....third-instar female
   – Antenna 8-segmented;with more than 5 multilocular pores; without vulva
   ..... adult female

ลักษณะบนแผ่นสไลด์แก้ว

ตัวอ่อนวัยที่ 1 (Figure 2.1.1.3) รูปร่างรูปไข่ หนวดมี 6-7 ปล้อง ความยาว 0.3-0.5 มิลลิเมตร กว้าง 0.2-0.3 มิลลิเมตร กลุ่มอวัยวะผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว มีจำนวน 7-10 คู่ แต่ละคู่ประกอบด้วยขนปลายแหลมรูปกรวย จำนวน 2 เส้น รู อวัยวะผลิตเส้นแป้งคู่สุดท้ายบริเวณปลายส่วนท้องจะประกอบด้วยขนปลายแหลมรูปกรวย จำนวน 2 เส้น มีรูรูปสามเหลี่ยม 1 รู

ศรีวิชาการเกษตร

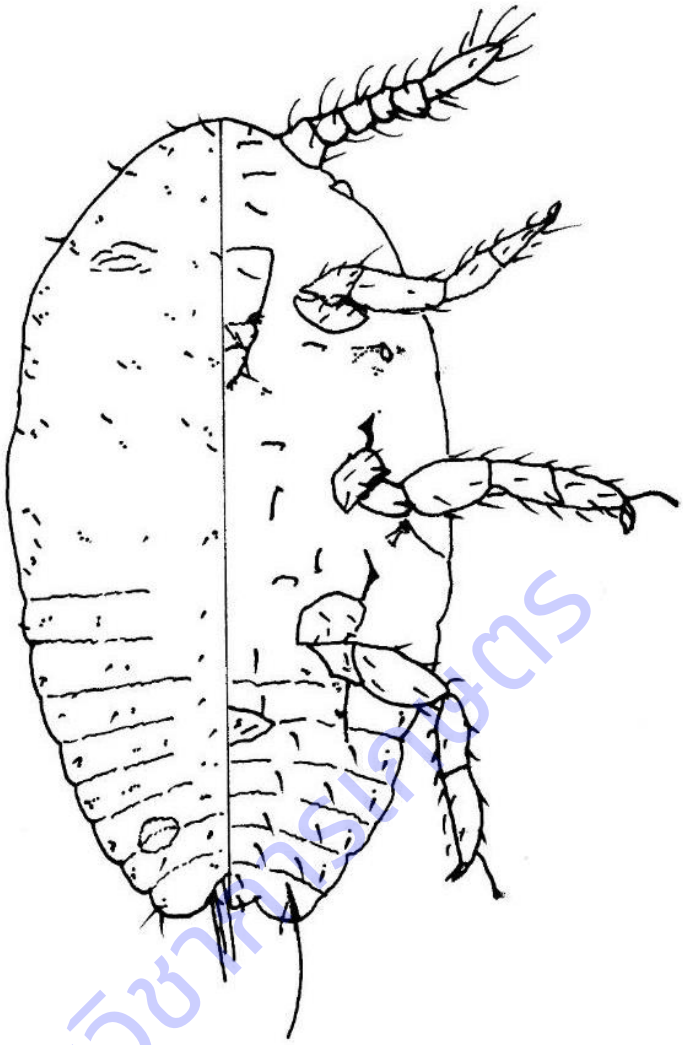


Figure 2.1.1.3 First instar of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

ตัวอ่อนวัยที่ 2 (Figure2.1.1.4) รูปร่างรูปไข่ หนวดมี 6-7 ปล้อง ความยาว 0.5-0.8 มิลลิเมตร กว้าง 0.3-0.5 มิลลิเมตร กลุ่มอวัยวะผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว มีจำนวน 4-11 คู่ แต่ละคู่ประกอบด้วยขนปลายแหลมรูปกรวย จำนวน 2 เส้นและมีรูรูปสามเหลี่ยม 1 รู อวัยวะผลิตเส้นแป้งคู่สุดท้ายบริเวณปลายส่วนท้องจะประกอบด้วยขนปลายแหลมรูปกรวย จำนวน 2 เส้น ขนขนาดเล็ก 1 เส้น

กรมวิชาการเกษตร

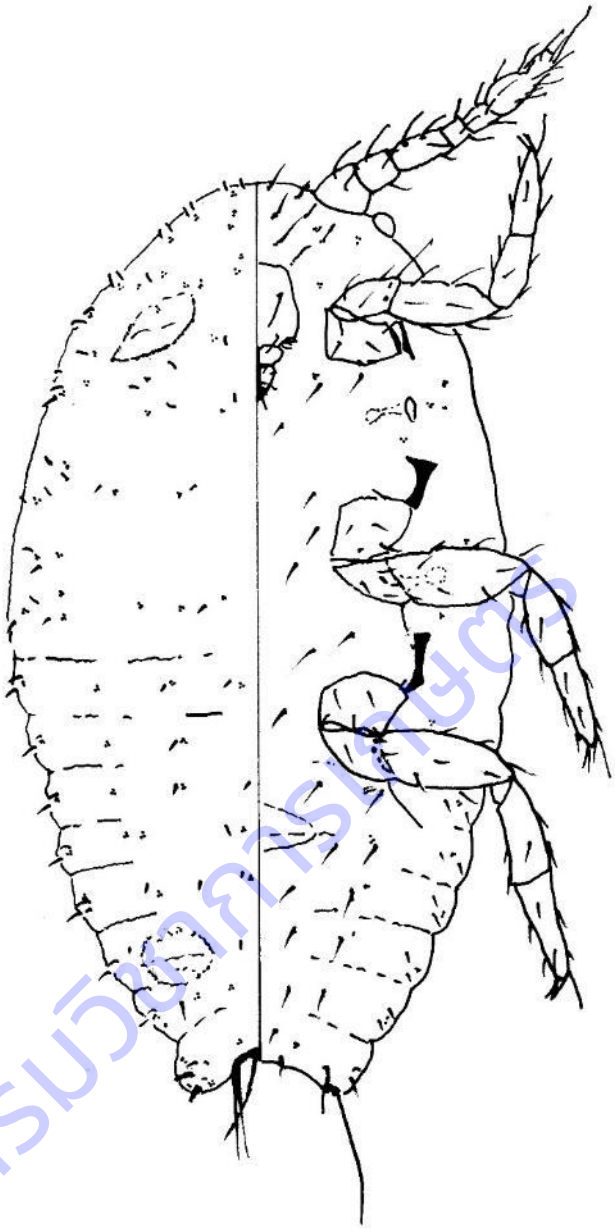


Figure 2.1.1.4 Second instar of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

ตัวอ่อนวัยที่ 3 (Figure 2.1.1.5) รูปร่างรูปไข่ หนวดมี 6-7 ปล้อง ความยาว 0.7-1.8 มิลลิเมตร กว้าง 0.3-1.1 มิลลิเมตร กลุ่มอวัยวะผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว มีจำนวน 1-10 คู่ แต่ละคู่ประกอบด้วยขนปลายแหลมรูปกรวย จำนวน 2 เส้นและมีรูรูปสามเหลี่ยม 1 รู ขนขนาดเล็ก 1 เส้นอวัยวะผลิตเส้นแป้งคู่สุดท้ายบริเวณปลายส่วนท้องจะประกอบด้วยขนปลายแหลมรูปกรวย จำนวน 2 เส้น ขนขนาดเล็ก 1 เส้น รูรูปสามเหลี่ยม จำนวน 5 รู

กรมวิชาการเกษตร

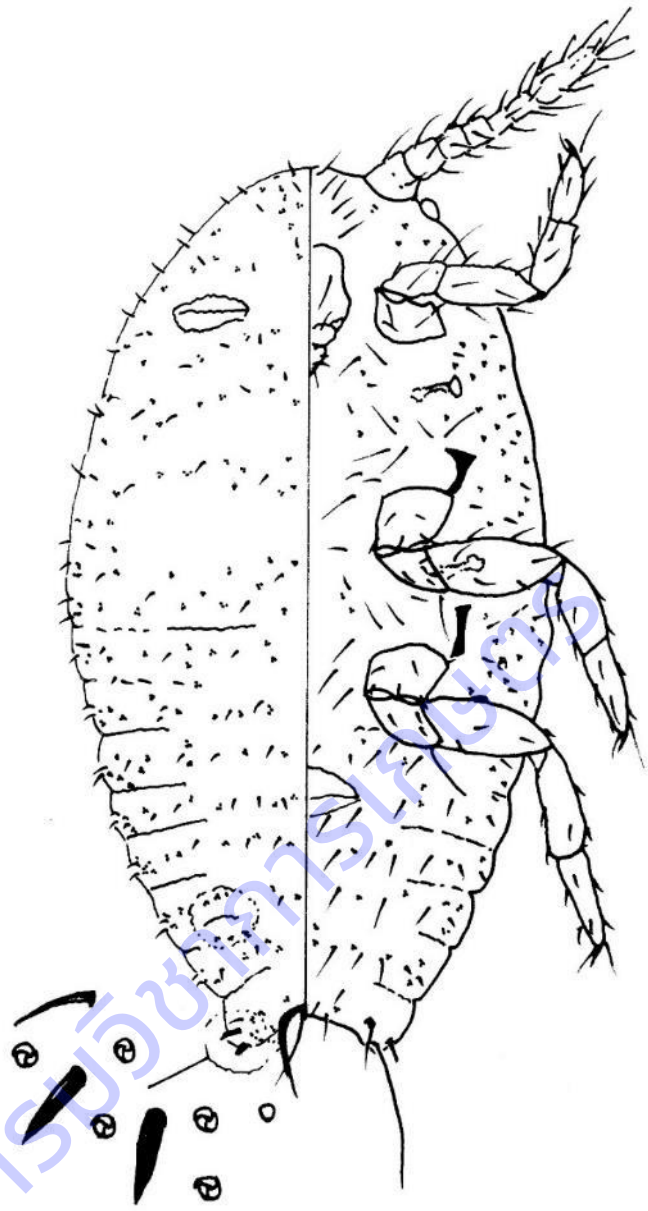


Figure 2.1.1.5 Third instar of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

ตัวเต็มวัยเพศเมีย (Figure 2.1.1.6) รูปร่างรูปไข่ หนวดมี 8 ปล้อง ความยาว 1.5-2.7 มิลลิเมตร กว้าง 0.9-1.7 มิลลิเมตร มีรูโปร่งแสงบนต้นขา (femur) ของขาคู่หลัง มีกลุ่มของรูเปิดรูปวงกลม อยู่บริเวณกึ่งกลางของส่วนท้องปล้องที่ 6-8 ปรากฏกระจายตัวอยู่เป็นจำนวนมากบริเวณท้องปล้องที่ 7 ระหว่างขอบด้านบนและด้านล่าง กลุ่มอวัยวะผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว มีจำนวน 17 คู่ คู่สุดท้ายบริเวณปลายส่วนท้องจะประกอบด้วยขนปลายแหลมรูปกรวย จำนวน 2 เส้น

กรมวิชาการเกษตร

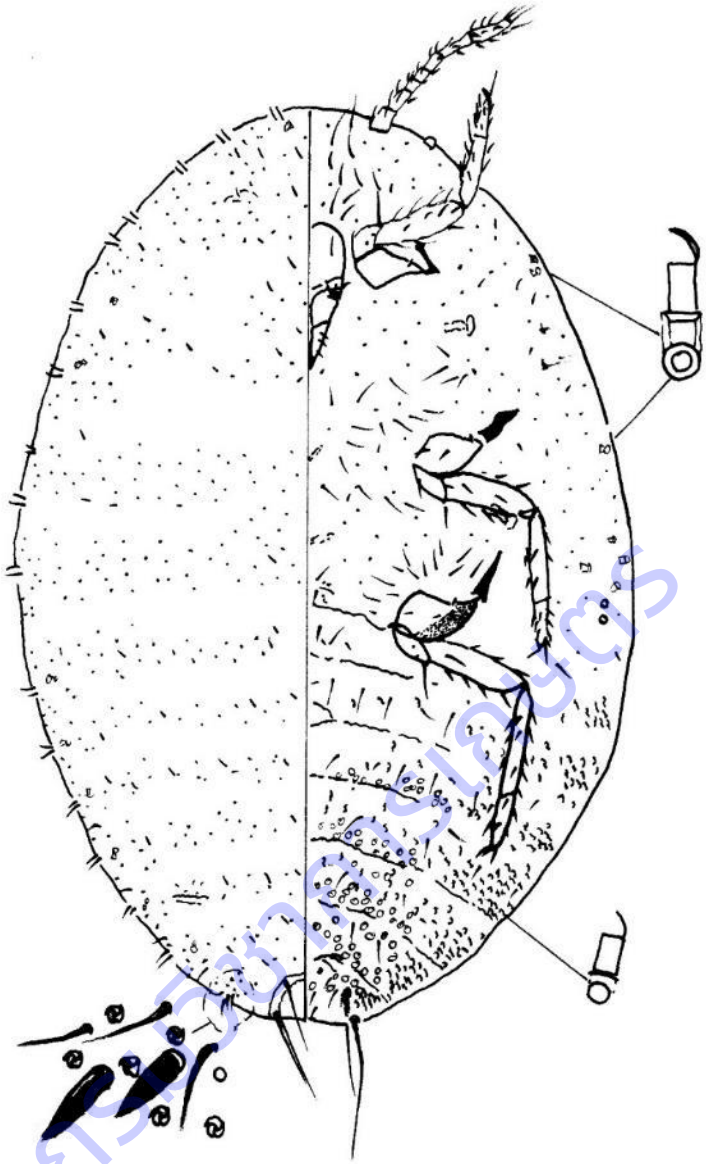


Figure 2.1.1.6 Adult female of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

ตัวอ่อนเพศผู้วัยที่ 2 (Figure 2.1.1.7) รูปร่างยาว ความยาว 1.45-1.57 มิลลิเมตร กว้าง 0.42-0.53 มิลลิเมตร ส่วนของปากไม่มีการเจริญเติบโต หนวดมี 10 ปล้องซึ่งยาวประมาณ 2/3 ส่วนของความยาวลำตัว ขาเจริญเติบโตดี ด้านขอบของผนังลำตัวส่วนท้องมีขนขนาดยาว ปีกแบบบางใส จำนวน 1 คู่

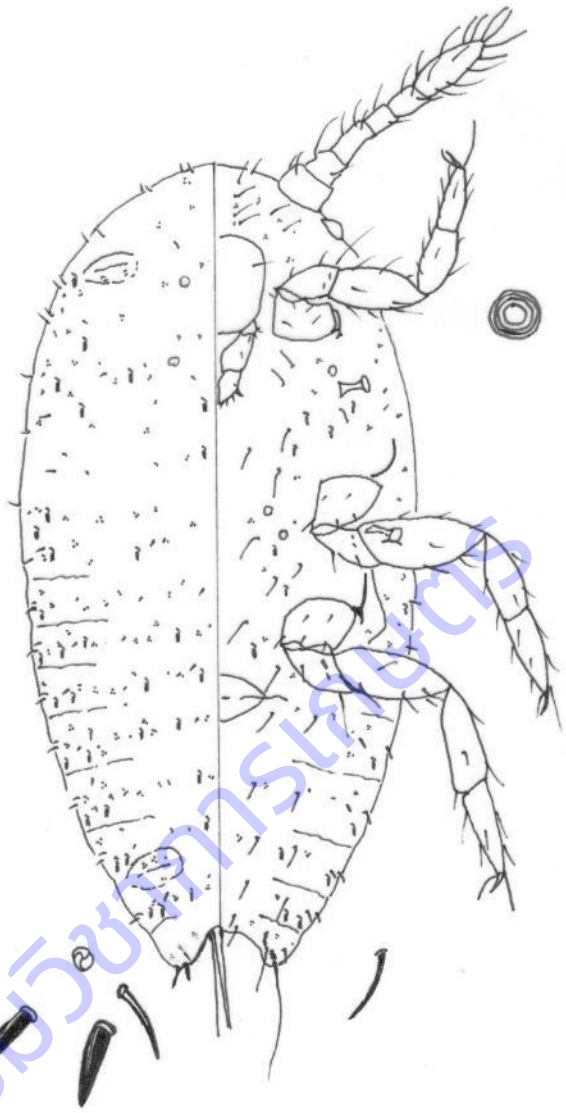


Figure 2.1.1.7 Second instar male of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

ตัวอ่อนเพศผู้วัยที่ 3 (Figure 2.1.1.8) รูปร่างยาว ความยาว 1.45-1.57 มิลลิเมตร กว้าง 0.42-0.53 มิลลิเมตร ส่วนของปากไม่มีการเจริญเติบโต หนวดมี 10 ปล้องซึ่งยาวประมาณ 2/3 ส่วนของความยาวลำตัว ขาเจริญเติบโตดี ด้านขอบของผนังลำตัวส่วนท้องมีขนขนาดยาว ปีกแบบบางใส จำนวน 1 คู่

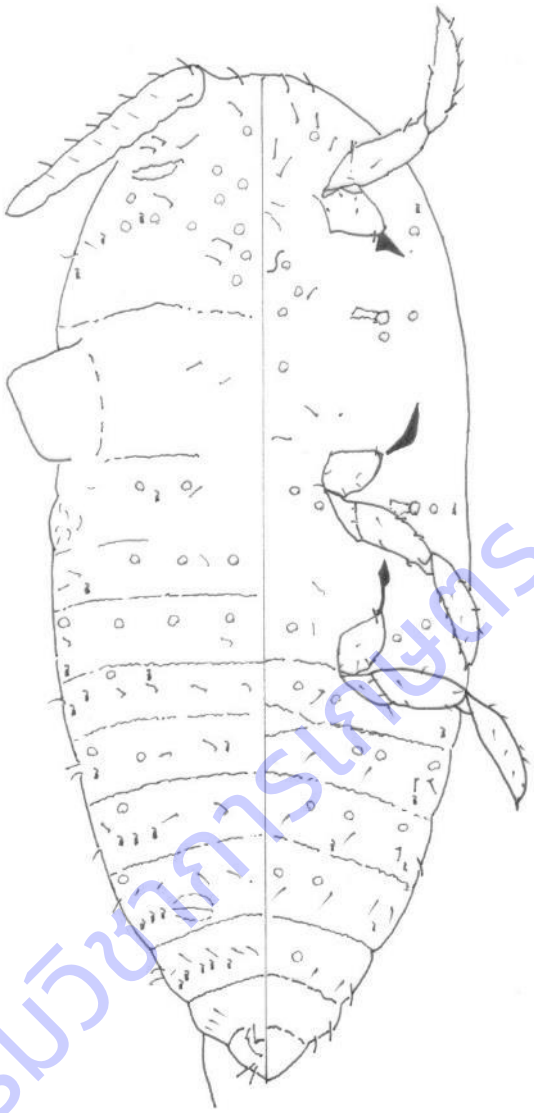


Figure 2.1.1.8 Third instar male of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาชีวประวัติและอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งมะละกอ (papaya mealybug) *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink โดยนำมาเลี้ยงบนพืชอาหารจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ มะละกอ มันสำปะหลัง ลีลาวดี และชบา ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยทำการศึกษาตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 ถึง กันยายน 2561 พบว่า ตัวเต็มวัยของเพลี้ยแป้งมะละกอ (*P. marginatus*) ที่เลี้ยงในมะละกอมีช่วงอายุเฉลี่ยยาวนานที่สุด รองลงมาได้แก่ ลีลาวดี มันสำปะหลัง และชบา ตามลำดับ สำหรับวงจรชีวิต พบว่า

เมื่อเลี้ยงในมะละกอมีวงจรชีวิตเฉลี่ยนานที่สุด คือ 39.8 วัน รองลงมา คือ ลีลาวดี 38.9 วัน เมื่อเลี้ยงในมันสำปะหลัง มีวงจรชีวิตเพียง 34.3 วัน และ 33.2 วันในชบา เพลี้ยแป้งมะละกอ (*P. marginatus*) สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ วางไข่อยู่ภายในถุงไข่ ซึ่งแต่ละถุงไข่เมื่อทำการตรวจนับจำนวนไข่มีความแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด พบว่า จำนวนไข่เฉลี่ยที่เลี้ยงด้วยมะละกอมีจำนวนสูงสุดและในชบาน้อยที่สุด แม้ว่าการเลี้ยงเพื่อศึกษาชีววิทยาของเพลี้ยแป้งชนิดนี้ ในพืชอาหารที่แตกต่างกันทั้ง 4 ชนิดจะมีความแตกต่างกันไม่มาก แต่ก็ได้เห็นข้อมูลที่มีความแตกต่างกันของพืชอาหารแต่ละชนิดที่สามารถส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเพลี้ยแป้ง ตัวอย่างของเพลี้ยแป้งแต่ละระยะได้นำมาทำสไลด์ถาวรเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลเปรียบเทียบ จัดทำเป็นคู่มือในการจำแนกเพลี้ยแป้งมะละกอ (*P. marginatus*) แต่ละระยะการเจริญเติบโตพร้อมจัดเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง ซึ่งจัดเป็นข้อมูลที่สำคัญที่นำมาใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์เพื่อยืนยันชนิดและพัฒนางานด้านอนุกรมวิธานในด้านต่างๆต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้มีการจัดทำคู่มือวินิจฉัย และถ่ายทอดข้อมูลรายละเอียดเหล่านี้แก่นักวิชาการเกษตรที่ปฏิบัติงานในพื้นที่ เช่น ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตร เจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช ที่ได้เข้าร่วมอบรมในหลักสูตร แมลงปากดูดที่สำคัญในประเทศไทย ปี 2562

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.1.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อชีววิทยาและนิเวศวิทยาของแตนเบียนไข่ *Trichogramma confusum*

Study the effect of temperature on biology and ecology of *Trichogramma confusum*

นงนุช ช่างสี รจนา ไวยเจริญ ณัฏฐิณี ศิริมาจันทร์ พัชรีวรรณ จงจิตเมตต์
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักพืช

Abstract

The life cycle of *Trichogramma confusum* is the shortest at 35˚C with a life cycle of 6-7 days. And averaged at 6.47-6.73 days, which was raised at 35˚C for 2 days and then fed at room temperature (The temperature is between 24.4˚C-36.13˚C, average 30.80˚C) with the shortest life cycle. And at 25˚C will have the longest life cycle for 6-9 days and have an average of 6.85-7.00 days when fed at different periods and raising at 37˚C and 39˚C for 1-3 days can develop into an adult But a life cycle that is longer than not control the temperature. that show when the embryo needs to grow in high temperature conditions for several consecutive days. Will affect the growth of the embryo more by causing unusual development It takes a long time to develop into an adult. And at a temperature of 30˚C, there is a 95% breeder rate. And the first generation of parasites, the rate of 93%, and the rate of reduction in the parasite that has an increased age in various temperatures And at the temperature 37˚C and 39˚C, the first egg parasite did not find the parasitic rate due to the development of an adult And the age of the first egg parasite in the first day of the first two days of the egg parasitoid at the temperature of 30 degrees Celsius and the age of the adult egg parasite Out of the next generation of the Hornetian adults

Keywords : egg parasitoids, *Trichogramma confusum*

บทคัดย่อ

วงจรชีวิตของแตนเบียนไข่ไตรโคแกรมมาจะสั้นมากที่สุดที่ 35 องศาเซลเซียส โดยมีวงจรชีวิต 6-7 วัน และมีค่าเฉลี่ยที่ 6.47-6.73 วัน ซึ่งการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมาเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 24.4-36.13 องศาเซลเซียส เฉลี่ย 30.80 องศาเซลเซียส) มีวงจรชีวิตที่สั้นที่สุด และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะมีวงจรชีวิตยาวที่สุด เป็นเวลา 6-9 วัน และมีค่าเฉลี่ยที่ 6.85-7.00 วัน เมื่อเลี้ยงที่ระยะเวลาต่างกัน และการเลี้ยงที่อุณหภูมิ

กรมวิชาการเกษตร

37 และ 39 องศาเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน สามารถพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยได้ แต่มีวงจรชีวิตที่ยืดยาวออกไปมากกว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องปกติที่ไม่ได้ควบคุมอุณหภูมิ แสดงให้เห็นว่าเมื่อตัวอ่อนต้องเจริญเติบโตในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงติดต่อกันหลายวัน จะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนมากขึ้น โดยทำให้มีพัฒนาการที่ไม่ปกติ ต้องใช้ระยะเวลาในการพัฒนาการจนออกเป็นตัวเต็มวัยนานมากขึ้น และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีอัตราการเบียนของพ่อแม่พันธุ์ 95% และแตนเบียนรุ่นที่ 1 อัตราการเบียน 93% และมีอัตราการเบียนลดลงในแตนเบียนที่มีอายุวันที่เพิ่มขึ้นในอุณภูมิต่าง ๆ และที่อุณหภูมิ 37 และ 39 องศาเซลเซียส แตนเบียนไข่รุ่นที่ 1 ไม่พบอัตราการเบียนเนื่องจากไม่พบการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย และพบอัตราการออกเป็นตัวเต็มวัยในแตนเบียนเบียนไข่รุ่นที่ 1 จากพ่อแม่พันธุ์แตนเบียนไข่อายุ 2 วัน มากที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอายุแตนเบียนไข่ตัวเต็มวัยมีผลต่อประสิทธิภาพการเบียนและการออกเป็นตัวเต็มวัยของแตนเบียนรุ่นถัดไป

คำหลัก : แตนเบียนไข่, *Trichogramma confusum*

คำนำ

แตนเบียนไข่ *Trichogramma* spp. เป็นแตนเบียนที่มีความสำคัญ สามารถเข้าทำลายไข่ของแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกผีเสื้อและมวน เช่น หนอนกออ้อย หนอนกอข้าว หนอนเจาะลำต้นข้าวโพด และมวนเขียวข้าว เป็นต้น มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดสูง 70-90% ซึ่งสามารถลดค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับสารฆ่าแมลงได้มาก อีกทั้งไม่เป็นอันตรายต่อสภาพแวดล้อมและตัวเกษตรกร แมลงศัตรูพืชไม่สามารถสร้างความต้านทาน สามารถนำไปใช้คล้ายกับสารฆ่าแมลงคือ ปลดปล่อยเพื่อควบคุมในช่วงที่มีการระบาดของศัตรูพืช อุณหภูมิเป็นปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่สำคัญ ที่ส่งผลกระทบต่อชีวิตแมลงซึ่งเป็นสัตว์เลือดเย็นในหลายด้าน อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นสูงมากสามารถทำลายคุณลักษณะที่เหมาะสมบางอย่างของแมลงได้ ยกตัวอย่างเช่น วงจรชีวิต และอัตราการเจริญเติบโตของแมลงแต่ละชนิด จะขึ้นกับพันธุกรรมและสรีรวิทยา อีกทั้งยังขึ้นกับสภาพแวดล้อม ซึ่งอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด (Rinehart et al., 2000; Nagahara et al., 2000) ในปัจจุบันจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเปลี่ยนแปลงอันเนื่องมาจากอุณหภูมิโลก ซึ่งน่าจะเป็นปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่สำคัญที่สุด ที่จะมีผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของแมลง ทั้งนี้ศัตรูพืชและแมลงศัตรูธรรมชาติชนิดต่าง ๆ อาจได้รับผลกระทบต่อชีววิทยาและนิเวศวิทยา ซึ่งอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อพฤติกรรม วงจรชีวิต การแพร่กระจาย ความมีชีวิตรอดและการขยายพันธุ์ (Petzoldt and Seaman, online) รวมถึงการเปลี่ยนแปลงประชากรของแมลง ซึ่งหากเกิดกับศัตรูพืชหรือแมลงศัตรูธรรมชาติ จะนำไปสู่การระบาดของแมลงที่รุนแรงกว่าเดิมหรือน้อยกว่าเดิม และไปมีผลต่อการควบคุมแมลงศัตรูพืชตามธรรมชาติหรือการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี เช่น การปล่อยแตนเบียนไข่ *Trichogramma confusum* เพื่อป้องกันกำจัดหนอนกออ้อยในอ้อย

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ซึ่งจะต้องปรับวิธีการและระยะเวลาให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ให้สอดคล้องกันระหว่างศัตรูพืชกับแมลงศัตรูธรรมชาติ ซึ่งข้อมูลชีววิทยาและนิเวศวิทยาเบื้องต้นของแมลงศัตรูธรรมชาติที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิที่สูงขึ้น เป็นข้อมูลที่จำเป็น และมีประโยชน์ในการผลิตขยายแตนเบียนไข่ *T. confusum* เพื่อใช้ในโปรแกรมการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี และพยากรณ์การขยายพันธุ์ในธรรมชาติ ซึ่งจะสามารถนำไปปรับใช้กับแนวทางควบคุมศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1) แตนเบียนไข่ *Trichogramm confusum*
2) วัสดุเลี้ยงผีเสื้อข้าวสาร เช่น รำข้าว น้ำตาลทราย และปลายข้าวสาร
3) อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงผีเสื้อข้าวสาร เช่น กล่องพลาสติก แปรงทาสี
4) วัสดุอุปกรณ์เลี้ยงแตนเบียนไข่ เช่น กระดาษ กาวน้ำ แปรงทาสี น้ำผึ้ง
5) เครื่องวัดอุณหภูมิ-ความชื้น (Thermo hygrometer)
6) ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
7) อุปกรณ์ใช้สำหรับทดสอบ เช่น กล่องพลาสติก ปากคีบ หลอดทดลอง ยางรัด ผ้าขาวบาง

วิธีการ

1. ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ระยะเวลาต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของตัวเต็มวัยแตนเบียนไข่

ทำการทดลองที่อุณหภูมิต่าง ๆ 5 ระดับ ได้แก่ 25, 30, 35, 37 และ 39°C วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ จำนวน 6 กรรมวิธี จำนวน 2 หลอดต่อหน่วยทดลอง ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ระยะเวลา 0 วัน (เลี้ยงปกติที่อุณหภูมิห้อง)

กรรมวิธีที่ 2 ระยะเวลา 1 วัน

กรรมวิธีที่ 3 ระยะเวลา 2 วัน

กรรมวิธีที่ 4 ระยะเวลา 3 วัน

กรรมวิธีที่ 5 ระยะเวลา 4 วัน

กรรมวิธีที่ 6 ระยะเวลา 5 วัน

วิธีปฏิบัติการทดลอง

เลี้ยงแตนเบียนไข่ *T. confusum* และผีเสื้อข้าวสารในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ไข่ของผีเสื้อข้าวสาร *Corcyra cephalonica* (Stainton) เป็นแมลงอาศัยของแตนเบียนไข่

เตรียมแผ่นไข่ผีเสื้อข้าวสาร โดยนำกระดาษมาขีดตารางเป็นช่องขนาด 4x18 มิลลิเมตร ทากาวน้ำให้ทั่ว จากนั้นนำไข่ของผีเสื้อข้าวสารใส่ในตะแกรงโรยลงบนกระดาษให้ทั่วและสม่ำเสมอ (1 ช่อง จะมีไข่ประมาณ 100 ฟอง) นำไปผ่านแสง ultraviolet นานประมาณ 15 นาที เพื่อไม่ให้ไข่สามารถฟักเป็นตัวหนอนได้ ตัดแยกแต่ละช่องออกเป็นแผ่น

ศรีวิชัยการเกษตร

เตรียมแตนเบียนไข่ *T. confusum* ให้ออกเป็นเป็นตัวเต็มวัยใส่ในหลอดทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร สูง 20 เซนติเมตร จำนวน 48 หลอด ใส่สำลีชุบน้ำผึ้ง 20% ไว้เพื่อเป็นอาหารของตัวเต็มวัยแตนเบียนไข่ โดยใช้พ่อแม่พันธุ์แตนเบียนไข่ ต่อ ไข่หนอนผีเสื้อข้าวสาร ในอัตรา 1 ต่อ 5 ใส่แผ่นไข่ผีเสื้อข้าวสารที่เตรียมไว้หลอดละ 1 แผ่น ปิดด้วยผ้าขาวบาง จำนวนทั้งหมด 48 หลอด นำไปใส่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้ละ 10 หลอด ตามระยะเวลาที่กำหนด คือ เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิที่กำหนดเป็นเวลานาน 1 2 3 4 และ 5 วัน เมื่อครบกำหนดเอาออกจากตู้ควบคุมอุณหภูมิ มาไว้ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 2 หลอดต่อหน่วยทดลอง ย้ายแผ่นไข่ผีเสื้อข้าวสารไปใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ ตรวจดูการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของไข่ผีเสื้อข้าวสารทุกวัน หากถูกเบียนและมีแตนเบียนไข่เจริญเติบโตอยู่ภายในไข่จะเปลี่ยนเป็นสีดำ จนกว่าแตนเบียนไข่ *T. confusum* จะออกเป็นตัวเต็มวัย ใส่แผ่นไข่ผีเสื้อข้าวสารแผ่นใหม่เข้าไป เพื่อให้แตนเบียนที่ออกมาวางไข่ ตรวจนับ จำนวนแตนเบียนไข่ที่ได้ จำนวนตัวตาย อัตราการเบียน อัตราการออกเป็นตัวเต็มวัยของรุ่นต่อไป และจำแนกเพศ นำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลและทำแผนภูมิอัตราการเจริญเติบโต

การบันทึกข้อมูล: ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของไข่ผีเสื้อข้าวสาร, วงจรชีวิต อายุขัย, จำนวนไข่ทั้งหมด, จำนวนไข่ที่ถูกเบียนของแต่ละรุ่น, จำนวนแตนเบียนไข่ที่ออกเป็นตัวเต็มวัย, จำนวนตัวแต่ละเพศของแต่ละรุ่น

2. ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อตัวอ่อนแตนเบียนไข่ในอายุต่าง ๆ

โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิต่างๆ 5 ระดับ ได้แก่ 25, 30, 35, 37 และ 39°C วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ จำนวน 7 กรรมวิธี จำนวน 2 หลอดต่อหน่วยทดลอง ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แตนเบียนไข่อายุ 0 วัน (เลี้ยงปกติที่อุณหภูมิห้อง)
กรรมวิธีที่ 2 แตนเบียนไข่อายุ 1 วัน
กรรมวิธีที่ 3 แตนเบียนไข่อายุ 2 วัน
กรรมวิธีที่ 4 แตนเบียนไข่อายุ 3 วัน
กรรมวิธีที่ 5 แตนเบียนไข่อายุ 4 วัน
กรรมวิธีที่ 6 แตนเบียนไข่อายุ 5 วัน
กรรมวิธีที่ 7 แตนเบียนไข่อายุ 6 วัน

วิธีปฏิบัติการทดลอง

เลี้ยงแตนเบียนไข่ *T. confusum* และผีเสื้อข้าวสารในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ไข่ของผีเสื้อข้าวสาร *Corcyra cephalonica* (Stainton) เป็นแมลงอาศัยของแตนเบียนไข่

เลี้ยงแตนเบียนไข่ *T. confusum* ให้ได้แตนเบียนไข่อายุ 1-6 วัน นับหลังจากเริ่มให้พ่อแม่พันธุ์วางไข่บนผีเสื้อข้าวสารพร้อมกันในวันที่เริ่มทดลอง โดยนำกระดาษมาขีดตารางเป็นช่องขนาด 4x18 มิลลิเมตร ทากาวน้ำให้ทั่ว จากนั้นนำไข่ของผีเสื้อข้าวสารใส่ในตะแกรงโรยลงบนกระดาษให้ทั่วและสม่ำเสมอ (1 ช่อง จะมีไข่ประมาณ 100 ฟอง) นำไปผ่านแสง ultraviolet นานประมาณ 15 นาที เพื่อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ไม่ให้ไข่สามารถฟักเป็นตัวหนอนได้ ตัดแยกแต่ละช่องออกเป็นแผ่น ใส่ในหลอดทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร สูง 20 เซนติเมตร แต่ละหลอด ให้ *T. confusum* เบียนแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ได้อายุตามที่กำหนด แล้วแยกแต่ละอายุใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 แผ่น อายุละ 8หลอด จำนวน 2 หลอด ต่อหน่วยทดลอง ใส่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เลี้ยงจนกระทั่งออกเป็นตัวเต็มวัย แล้วใส่ไข่ผีเสื้อข้าวสารเพื่อให้แตนเบียนวางไข่ ตรวจนับ จำนวนแตนเบียนไข่ที่ได้ จำนวนตัวตาย อัตราการเบียน อัตราการออกเป็นตัวเต็มวัยของรุ่นต่อไป และจำแนกเพศ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การบันทึกข้อมูล: อายุแตนเบียนไข่, ระยะเวลาที่ออกเป็นแตนเบียน, จำนวนแตนเบียนไข่ที่ออกเป็นตัวเต็มวัย, จำนวนไข่ทั้งหมด, จำนวนไข่ที่ถูกเบียน, จำนวนตัวแต่ละเพศ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินงาน: ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561

สถานที่ดำเนินงาน: ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลของอุณหภูมิที่ระยะเวลาต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของตัวเต็มวัยแตนเบียนไข่

จากผลการทดลอง พบว่า เมื่อเลี้ยงแตนเบียนไข่ไตรโคแกรมมาที่อุณหภูมิต่าง ๆ จะมีผลต่อวงจรชีวิตของแตนเบียนไข่ไตรโคแกรมมา วงจรชีวิตจะสั้นมากที่สุดที่ 35 องศาเซลเซียส โดยมีวงจรชีวิต 6-7 วัน และมีค่าเฉลี่ยที่ 6.47-6.73 วัน เมื่อเลี้ยงที่ระยะเวลาต่างกัน ซึ่งการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมาเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 24.4-36.13 องศาเซลเซียส เฉลี่ย 30.80 องศาเซลเซียส) มีวงจรชีวิตที่สั้นที่สุด และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะมีวงจรชีวิตยาวที่สุด เป็นเวลา 6-9 วัน และมีค่าเฉลี่ยที่ 6.85-7.00 วัน เมื่อเลี้ยงที่ระยะเวลาต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37 และ 39 องศาเซลเซียส แตนเบียนทั้งหมดเกือบไม่สามารถมีพัฒนาการเจริญเติบโตจนเป็นตัวเต็มวัย จากกรรมวิธีที่ 1, 2 และ 3 ที่สามารถมีพัฒนาการจนกระทั่งออกเป็นตัวเต็มวัยได้ แต่มีวงจรชีวิตที่ยืดยาวออกไปมากกว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องปกติที่ไม่ได้ควบคุมอุณหภูมิ แสดงให้เห็นว่า เมื่อตัวอ่อนต้องเจริญเติบโตในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงติดต่อกันหลายวัน จะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนมากขึ้น โดยทำให้มีพัฒนาการที่ไม่ปกติ ต้องใช้ระยะเวลาในการพัฒนาการจนออกเป็นตัวเต็มวัยนานมากขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ตารางที่ 2.1.2.1 วงจรชีวิตของแตนเบียนไข่ในแต่ละอุณภูมิ

กรรมวิธี อุณหภูมิ (°C)	วงจรชีวิต (วัน)									
	ต่ำสุด -สูงสุด					ค่าเฉลี่ย				
	25	30	35	37	39	25	30	35	37	39
1. เลี้ยงที่อุณหภูมิที่กำหนด 1 วัน	6-7	6-7	6-7	9-10	6-9	6.85	6.52	6.71	9.05	7.53
2. เลี้ยงที่อุณหภูมิที่กำหนด 2 วัน	6-7	6-7	6-7	8-9	7-10	7.00	6.59	6.47	8.12	8.22
3. เลี้ยงที่อุณหภูมิที่กำหนด 3 วัน	7	6-7	6-7	7-8	-	7.00	6.62	6.54	7.07	-
4. เลี้ยงที่อุณหภูมิที่กำหนด 4 วัน	7	6-7	6-7	-	-	7.00	6.84	6.51	-	-
5. เลี้ยงที่อุณหภูมิที่กำหนด 5 วัน	6-9	6-7	6-7	-	-	7.00	6.88	6.73	-	-
6. เลี้ยงปกติที่อุณหภูมิห้อง	7	7	7	7	7	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00

ผลของอุณหภูมิที่มีต่อตัวอ่อนแตนเบียนไข่ในอายุต่าง ๆ

จากผลการทดลอง พบว่า มีอัตรการเบียนสูงที่สุดในแตนเบียนไข่อายุ 2 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีอัตราการเบียนของพ่อแม่พันธุ์ 95% และแตนเบียนรุ่นที่ 1 อัตราการเบียน 93% และมีอัตราการเบียนลดลงในแตนเบียนที่มีอายุวันที่เพิ่มขึ้นในอุณภูมิต่างๆ และที่อุณหภูมิ 37 และ 39 องศาเซลเซียส แตนเบียนไข่รุ่นที่ 1 ไม่พบอัตราการเบียนเนื่องจากไม่พบการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย ดังตารางที่ 2 และพบอัตราการออกเป็นตัวเต็มวัยในแตนเบียนเบียนไข่รุ่นที่ 1 จากพ่อแม่พันธุ์แตนเบียนไข่อายุ 2 วัน มากที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 37 และ 39 องศาเซลเซียส ไม่พบอัตราการเบียนเนื่องจากไม่พบการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย ดังตารางที่ 2.1.2.3

ตารางที่ 2.1.2.2 อัตราการเบียนของแตนเบียนไข่แต่ละอุณหภูมิที่มีต่อตัวอ่อนแตนเบียนไข่ในอายุต่าง ๆ

กรรมวิธี อุณหภูมิ (°C)	**อัตราการเบียนของแตนเบียนไข่ (%)**									
	พ่อแม่พันธุ์					**รุ่น F1**				
	25	**30**	**35**	**37**	**39**	**25**	**30**	**35**	**37**	**39**
1. แตนเบียนไข่อายุ 0 วัน	74	79	81	75	69	81	72	16	0	0
2. แตนเบียนไข่อายุ 1 วัน	82	62	74	59	83	83	61	24	0	0
3. แตนเบียนไข่อายุ 2 วัน	91	95	89	78	41	89	93	39	0	0
4. แตนเบียนไข่อายุ 3 วัน	83	81	72	52	22	72	81	44	0	0
5. แตนเบียนไข่อายุ 4 วัน	51	55	41	37	17	74	78	33	0	0
6. แตนเบียนไข่อายุ 5 วัน	55	61	38	31	22	69	71	29	0	0
6. แตนเบียนไข่อายุ 6 วัน	43	52	41	33	17	75	78	36	0	0

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2.1.2.3 อัตราการออกเป็นตัวเต็มวัยของแตนเบียนรุ่นที่ 1 ในแต่ละอุณหภูมิ

กรรมวิธี / อุณหภูมิ (°C)	อัตราการออกเป็นตัวเต็มวัยของแตนเบียนรุ่นที่ 1 (%)				
	25	30	35	37	39
1. แตนเบียนไข่อายุ 0 วัน	72	81	88	0	0
2. แตนเบียนไข่อายุ 1 วัน	74	78	82	0	0
3. แตนเบียนไข่อายุ 2 วัน	83	87	84	0	0
4. แตนเบียนไข่อายุ 3 วัน	69	71	59	0	0
5. แตนเบียนไข่อายุ 4 วัน	62	78	44	0	0
6. แตนเบียนไข่อายุ 5 วัน	63	70	48	0	0
6. แตนเบียนไข่อายุ 6 วัน	52	54	33	0	0

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

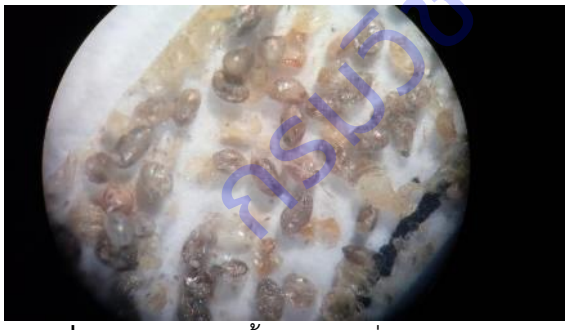
จากการทดลองผลของอุณหภูมิที่ระยะเวลาต่าง ๆ ต่อชีววิทยาและนิเวศวิทยาของตัวเต็มวัยแตนเบียนไข่ ทำการทดลองที่อุณหภูมิต่าง ๆ 5 ระดับ ได้แก่ 25, 30, 35, 37 และ 39 องศาเซลเซียส จากการตรวจผลและบันทึกผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า ที่อุณหภูมิที่ 37 และ 39 องศาเซลเซียส แตนเบียนทั้งหมดเกือบไม่สามารถมีพัฒนาการเจริญเติบโตจนเป็นตัวเต็มวัย มีเพียงแตนเบียนไข่ไตรโคแกรมมาที่เลี้ยงในกรรมวิธีที่ 1 และ 2 เท่านั้นที่สามารถมีพัฒนาการจนกระทั่งออกเป็นตัวเต็มวัยได้ในอัตราที่ต่ำ แต่มีวงจรชีวิตที่ยืดยาวออกไปมากกว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องปกติที่ไม่ได้ควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เมื่อตัวอ่อนต้องเจริญเติบโตในสภาพที่ยิ่งมีอุณหภูมิสูงติดต่อกันหลายวัน จะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนมากขึ้น โดยทำให้มีพัฒนาการที่ไม่ปกติ ต้องใช้ระยะเวลาในการพัฒนาการจนออกเป็นตัวเต็มวัยนานมากขึ้น และอายุแตนเบียนไข่ตัวเต็มวัยมีผลต่อประสิทธิภาพการเบียนและการออกเป็นตัวเต็มวัยของแตนเบียนรุ่นถัดไป

กรมวิชาการเกษตร

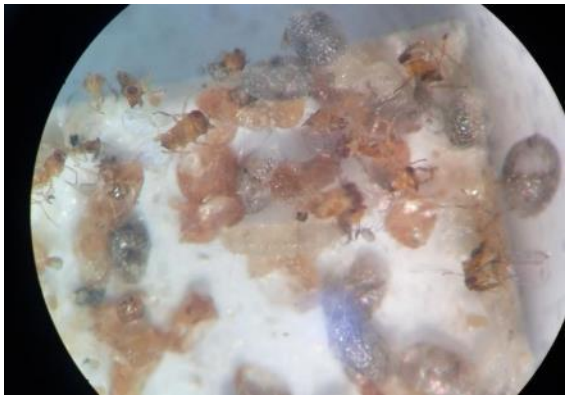
ภาพที่ 2.1.2.1 ลักษณะแตนเบียนไข่ที่ทำการทดลองในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

ภาพที่ 2.1.2.2 ลักษณะแตนเบียนไข่ที่ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้องปกติ

ภาพที่ 2.1.2.3 การวางเปรียบเทียบเพื่อตรวจนับจำนวนไข่ที่ถูกเบียนที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 2.1.2.3 ไข่ผีเสื้อข้าวสารที่ถูกเบียนและออกเป็นตัวเต็มวัยที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2.1.2.4 ตัวเต็มวัยแตนเบียนไข่ที่ตายในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.1.3 ชีววิทยาของไรแดงมันสำปะหลัง (cassava red mite); *Oligonychus biharensis* (Hirst)

Biology of Cassava Red Mite; *Oligonychus biharensis* (Hirst)

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล

ผู้ร่วมงาน: พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์ พลอยชมพู กรวิภาสเรือง อทิติยา แก้วประดิษฐ์

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

บทคัดย่อ

ไรแดงมันสำปะหลัง *Oligonychus biharensis* (Hirst) เป็นศัตรูสำคัญในมันสำปะหลัง ซึ่งยังไม่มีข้อมูลชีววิทยาของไรชนิดนี้ในประเทศไทย การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวงจรชีวิตของไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis* บนใบพืชอาศัย 2 ชนิด ได้แก่ มันสำปะหลัง และชมพู่ ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2561 ในห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิ 26.49 ± 0.07 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60.04 ± 0.86 %RH และให้ได้รับแสงวันละ 10 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า ระยะเวลาในการเจริญเติบโตตั้งแต่ไข่จนเป็นตัวเต็มวัยของไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis* บนมันสำปะหลังและชมพู่ เฉลี่ยนาน 7.16 ± 0.04 และ 9.78 ± 0.06 วัน ตามลำดับ ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุยืนยาวเฉลี่ย 13.19 ± 0.76 และ 7.34 ± 0.44 วัน ตามลำดับ ตัวเต็มวัยเพศเมียระยะก่อนวางไข่เฉลี่ย 1.16 ± 0.06 และ 2.04 ± 0.02 วัน ระยะวางไข่เฉลี่ย 12.21 ± 0.76 และ 4.65 ± 0.39 วัน และระยะหลังวางไข่เฉลี่ยนาน 0.49 ± 0.11 และ 0.65 ± 0.12 วัน ตามลำดับ ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ได้ทั้งหมดประมาณ 92.95 ± 5.19 และ 44.58 ± 4.03 ฟองต่อตัว เฉลี่ยวันละ 7.10 ± 0.30 และ 4.94 ± 0.34 ฟองต่อวัน ตามลำดับ อัตราการขยายพันธุ์สุทธิในชั่วอายุขัย (R_0) ชั่วอายุขัยของกลุ่ม (G) ผลิตลูกได้สุทธิต่อวัน (λ) และอัตราส่วนเพศของไรแดงมันสำปะหลังบนมันสำปะหลังมีค่ามากกว่าบนชมพู่ อัตราการเพิ่มประชากร (r_m) ของไรแมงมุมบนมันสำปะหลัง และชมพู่นั้นใกล้เคียงกัน 0.26 และ 0.22 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ประชากรของไรแดงมันสำปะหลังที่ลงทำลายบนมันสำปะหลัง สามารถเพิ่มประชากรได้ดี และระบาดอย่างรวดเร็วกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับประชากรที่ลงทำลายบนชมพู่ เนื่องจากมีวงจรชีวิตสั้น ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุยืนยาว ระยะวางไข่ยาว และตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถ วางไข่เฉลี่ยต่อวันได้ปริมาณมาก ซึ่งผลการทดลองนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการป้องกันกำจัดไรแดงชนิดนี้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังเป็นข้อมูลสนับสนุนในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช Pest Risk Analysis (PRA) เพื่อประโยชน์ในการเจรจาการค้าระหว่างประเทศในอนาคต

คำหลัก: ไรแดงชมพู่ ไรแดงมันสำปะหลัง วงจรชีวิต มันสำปะหลัง ชมพู่

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ABSTRACT

The cassava red mite, *Oligonychus biharensis* (Hirst) is considered one of the most important pests of cassava in Thailand. Despite its importance, the biological information of this pest has not yet been studied. The objective of this experiment is to study the life cycle of *O. biharensis* on two economic host plants: cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and rose apple (*Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L. M. Perry). This study was carried out from October 2016 to September 2018 in the laboratory at 26.49 ± 0.07 ºC, 60.04±0.86 % RH and 10 : 14 (L : D). The results revealed that the development times from egg to adult stage of *O. biharensis* were 7.16 ± 0.04 and 9.78 ± 0.06 days, when feeding on cassava and rose apple, respectively. The female longevities were 13.19 ± 0.76 and 7.34 ± 0.44 days, respectively. The pre - oviposition periods were 1.16 ± 0.06 and 2.04 ± 0.02 days; the oviposition periods were 12.21 ± 0.76 and 4.65 ± 0.39 days; the post - oviposition periods were 0.49 ± 0.11 and 0.65 ± 0.12 days, respectively. The totals of eggs per female were 92.95 ± 5.19 and 44.58 ± 4.03; the number of eggs per day were 7.10 ± 0.30 and 4.94 ± 0.34, respectively. The net reproductive rate (R_0), generation time (G) and Sex ratio of *O. biharensis* on cassava were higher than rose apple. The intrinsic rate of increase (r_m) on cassava and rose apple are similar 0.26 day^{-1} and 0.22 day^{-1}, respectively. The results indicated that in comparison with rose apples the population of *O. biharensis* infested on cassava could rapidly increase generating an outbreak, because of the short life cycle, the long female longevity, the long oviposition period, and the high number of eggs per day. These can be used as fundamental knowledge to effectively control this mite and to support the implementation of Pest Risk Analysis (PRA) for trade negociation in the long run.

Keywords: *Oligonychus biharensis* (Hirst), Life Cycle, Biology, Cassava, Rose Apple

คำนำ

ไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis* มีพืชอาศัยหลากหลาย ประมาณ 53 ชนิด และมีการแพร่กระจายอยู่ใน 24 ประเทศทั่วโลก (Bolland *et al.*, 1998) ส่วนในประเทศไทย ไรชนิดนี้เดิม วัฒนาและคณะ (2544) จำแนกชนิดไว้ภายใต้ชื่อสามัญ ไรแดงชมพู่ (Rose apple red mite) พบระบาดเป็นครั้งคราว ไม่เกิดความเสียหายรุนแรง เช่น มันสำปะหลัง พุทรา มะขาม ชมพู่ ฝรั่ง ทุเรียน ลิ้นจี่ ลำไย กล้วยไม้ และกุหลาบ เป็นต้น กระจายอยู่ทั่วประเทศ เช่น จ. กรุงเทพมหานคร ชัยนาท เชียงใหม่ ชลบุรี ราชบุรี กาญจนบุรี สุราษฎร์ธานี นครราชสีมา และขอนแก่น เป็นต้น (พลอยชมพู,

2553) ต่อมาพบการระบาดมากขึ้นในมันสำปะหลัง โดยเฉพาะเมื่อมีปัญหาภัยแล้งยาวนาน และมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดต่าง ๆอย่างมาก ทำให้ศัตรูธรรมชาติถูกทำลาย โดยพบการระบาดมากในภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ กลุ่มพยากรณ์และเตือนการระบาดศัตรูพืช กองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย (2558) รายงานว่า สถานการณ์ศัตรูมันสำปะหลังของสำนักงานเกษตรจังหวัด 53 จังหวัด พบการระบาดของไรแดงมันสำปะหลังในมันสำปะหลัง พื้นที่ระบาดรวม 3,094 ไร่ ในพื้นที่ จ. อุตรดิตถ์ ได้แก่ อ. ทองแสงขัน และ อ. ตรอน ทั้งหมดพบในมันสำปะหลังอายุ 1-4 เดือน ดังนั้น เพื่อไม่ให้เกิดความสับสนและสอดคล้องกับต่างประเทศจึงขอใช้ชื่อสามัญ ไรแดงมันสำปะหลัง (Cassava red mite); *O. biharensis* (CSIRO, 2004 และ Vacante, 2015) โดยไรชนิดนี้จะดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณหน้าใบส่วนยอด แล้วขยายปริมาณลงสู่ส่วนล่างของต้น ถ้าระบาดมาก ใบจะเหลืองซีด ม้วนงอ ส่วนยอดงองุ้ม ถ้ามันสำปะหลังมีขนาดเล็กอาจตายได้ (มานิตา, 2553) อีกทั้งปัจจุบันประเทศไทยได้มีการเปิดตลาดการค้าเสรีกับหลายประเทศ จึงมีมาตรการด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช ซึ่งเป็นมาตรการในการใช้ปกป้อง สุขภาพมนุษย์ สัตว์ และพืช และยังเป็นมาตรการที่ใช้ในการกีดกันทางการค้าได้อีกด้วย จึงทำให้ทุกประเทศ ต้องมีการศึกษาข้อมูลศัตรูพืชของประเทศคู่ค้า เพื่อไม่ให้เสียเปรียบทางการค้า ซึ่งพืชเศรษฐกิจที่ประเทศไทยมีการค้าขายกับต่างประเทศ เช่น เวียดนาม จะต้องมีการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เช่น กล้วย แคนตาลูป มะพร้าว ทุเรียน ฝรั่ง ชมพู่ ขนุน ลำไย ลิ้นจี่ มะม่วง และมะขาม เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพืชอาศัยของไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis* ด้วย ซึ่งขณะนี้ยังไม่มีข้อมูลทางชีววิทยาของไรชนิดนี้ในประเทศไทย ดังนั้น การศึกษาชีววิทยาของไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis* ในประเทศไทย จึงมีความสำคัญที่ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐาน เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest risk analysis) และทราบศักยภาพการเข้าทำลายพืชอาศัยที่เป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย เช่น มันสำปะหลัง และชมพู่ เพื่อประโยชน์ในการป้องกันกำจัดต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis*
2. ใบพืชอาศัย ได้แก่ มันสำปะหลัง และชมพู่
3. ชั้นเลี้ยงไรติดตั้งไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 40 lux
4. พู่กัน คีมคีบ (forceps) สำลี กระดาษทิชชู่
5. น้ำกลั่น
6. ถาดพลาสติกเลี้ยงไร ขนาด 27x45x3 ซม.
7. กล่องพลาสติกที่แบ่งเป็นช่องย่อย 14 ช่อง
8. ถ้วยพลาสติก กล่องพลาสติกขนาดต่าง ๆ

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1. การเลี้ยงขยายไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis*

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไรแดงมันสำปะหลัง ในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวอย่างไรที่เก็บได้บนพืชอาศัย ได้แก่ มันสำปะหลัง และชมพู่ มาเลี้ยงบนใบพืชอาศัย และวางอยู่บนสำลีชุ่มน้ำในถาดพลาสติกหล่อน้ำถาดเลี้ยงตลอดเวลา และวางบนชั้นใต้แสงไฟฟลูออเรสเซ็นต์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องปฏิบัติการอุณหภูมิ 26.49 ± 0.07 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60.04 ± 0.86 % RH. เพื่อให้ไรเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆจนมากเพียงพอ

ขั้นตอนที่ 2. ศึกษาวงจรชีวิตของไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis*

การศึกษาวงจรชีวิตของไรแดงมันสำปะหลังบนใบมันสำปะหลัง และชมพู่ โดยนำตัวเต็มวัยเพศเมียของไรที่เลี้ยงไว้จำนวน 40-50 ตัวลงบนใบพืชอาศัย ทิ้งไว้ให้วางไข่ 3-4 ชั่วโมง นำไข่ที่ได้มาแยกเลี้ยงเดี่ยวๆบนใบพืชอาศัย ที่ตัดเป็นแผ่นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.7 เซนติเมตร วางบนแผ่นสำลีชุ่มน้ำในกล่องพลาสติก ทำการทดลอง 100 ตัว ในแต่ละพืชอาศัย บันทึกระยะเวลาการเจริญเติบโตทุกๆ 6 ชั่วโมง เมื่อเป็นตัวเต็มวัยเขี่ยไรตัวผู้ที่เตรียมไว้ใส่ลงไปในช่องที่เป็นเพศเมียเพื่อผสมพันธุ์กับไรตัวเมีย บันทึกจำนวนไข่และการตายของตัวเมียที่เกิดขึ้นทุก 24 ชั่วโมง

การบันทึกข้อมูล

บันทึกวงจรชีวิต ระยะเวลาในการเจริญเติบโตตั้งแต่ไข่จนเป็นตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย ความสามารถในการผลิตไข่ตลอดอายุขัย ในแต่ละพืชอาศัย ได้แก่ มันสำปะหลัง และชมพู่

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรุงเทพฯ

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis* ในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวอย่างไรที่เก็บได้บนมันสำปะหลัง และชมพู่ มาเลี้ยงบนใบพืชชนิดนั้นๆ และวางอยู่บนสำลีชุ่มน้ำในถาดพลาสติกหล่อน้ำถาดเลี้ยงตลอดเวลา และวางบนชั้นใต้แสงไฟฟลูออเรสเซ็นต์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน (Figure 2.1.3.1A) เพื่อให้ไรเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ จนมากเพียงพอ

การศึกษาวงจรชีวิตของไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis* ในใบพืชอาศัย ได้แก่ มันสำปะหลัง และชมพู่ โดยนำตัวเต็มวัยเพศเมียของไรที่เลี้ยงไว้จำนวน 40-50 ตัวลงบนใบพืชอาศัย ทิ้งไว้ให้วางไข่ 3-4 ชั่วโมง นำไข่ที่ได้มาแยกเลี้ยงเดี่ยว ๆ บนใบพืชอาศัย ที่ตัดเป็นแผ่นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.7 เซนติเมตร วางบนแผ่นสำลีชุ่มน้ำในกล่องพลาสติก ในห้องปฏิบัติการอุณหภูมิ 26.49±0.07 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60.04±0.86% RH. ทำการทดลอง 100 ตัว ในแต่ละพืชอาศัย (Figure 2.1.3.1B) บันทึกระยะเวลาการเจริญเติบโตทุกๆ 6 ชั่วโมง (Figure 2.1.3. 1C) บันทึกวงจรชีวิตระยะเวลาในการเจริญเติบโตตั้งแต่ไข่จนเป็นตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย ในแต่ละพืชอาศัย ผลการทดลอง พบว่า ไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis* มีระยะการเจริญเติบโต 5 ระยะ ได้แก่ ระยะไข่

ศรีวิชาการเกษตร

(egg) ตัวอ่อนวัย 1 (larva) ตัวอ่อนวัย 2 (protonymph) ตัวอ่อนวัย 3 (deutonymph) และตัวเต็มวัย (adult) (Figure 2.1.3.2) โดยมีระยะพักตัว 3 ระยะ ได้แก่ ระยะพักตัวครั้งที่ 1 (protochrysalis) ระยะพักตัวครั้งที่ 2 (deutochrysalis) และระยะพักตัวครั้งที่ 3 (teliochrysalis) ไข่มีลักษณะกลมด้านบนค่อนข้างแบน มีสีขาว ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ไข่เมื่อใกล้ฟักมีสีส้มอมแดง ตัวอ่อนเมื่อฟักออกจากไข่มีสีเหลือง มีขาเพียง 3 คู่ ตัวอ่อนเจริญเติบโตโดยมีการลอกคราบ 3 ครั้ง ก่อนการลอกคราบแต่ละครั้งตัวอ่อนจะหยุดกินอาหาร ไม่เคลื่อนไหว หลังการลอกคราบครั้งที่ 1 ตัวอ่อนมีขาเพิ่มขึ้นเป็น 4 คู่ และมีสีแดง หรือแดงอมม่วง หลังการลอกคราบครั้งที่ 3 สีจะเข้มขึ้น

ไข่ของไรแดงมันสำปะหลังเพศผู้ที่เลี้ยงบนใบมันสำปะหลังมีขนาดเฉลี่ย 198.00 ไมครอน ตัวอ่อนระยะที่ 1, 2, 3 และตัวเต็มวัยมีขนาดกว้าง×ยาวเฉลี่ย 132.00 × 181.50, 148.50 × 231.00, 165.00 × 231.00 และ 198.00 × 330.00 ไมครอน ตามลำดับ (Table 2.1.3.1)

ไรแดงมันสำปะหลังเพศผู้ที่เลี้ยงบนใบมันสำปะหลัง ใช้เวลาในการเจริญเติบโตจากไข่จนเป็นตัวเต็มวัยเฉลี่ยนาน 6.94 ± 0.28 วัน โดยมีระยะไข่เฉลี่ย 3.00 ± 0.00 วัน ระยะการเจริญเติบโตของตัวอ่อนระยะที่ 1, 2 และ 3 เฉลี่ย 0.50 ± 0.00, 0.56 ± 0.11 และ 1.06 ± 0.20 วัน ตามลำดับ ตัวเต็มวัยเพศผู้มีอายุยืนยาวเฉลี่ย 14.22 ± 1.85 วัน การเจริญเติบโตในระยะต่าง ๆ แสดงตาม ตารางที่ 2.1.3.2 ไข่ของไรแดงมันสำปะหลังเพศเมียที่เลี้ยงบนใบมันสำปะหลังมีขนาดเฉลี่ย 198 ไมครอน ตัวอ่อนระยะที่ 1, 2, 3 และตัวเต็มวัยมีขนาดกว้าง×ยาวเฉลี่ย 165.87 × 218.84, 197.08 × 251.17, 221.76 × 320.10 และ 297 × 458.33 ไมครอน ตามลำดับ (Table 2.1.3.1)

ไรแดงมันสำปะหลังเพศเมียที่เลี้ยงบนใบมันสำปะหลัง ใช้เวลาในการเจริญเติบโตจากไข่จนเป็นตัวเต็มวัยเฉลี่ยนาน 7.16 ± 0.04 วัน (Figure 2.1.3.3) โดยมีระยะไข่เฉลี่ย 3.00 ± 0.00 วัน ระยะการเจริญเติบโตของตัวอ่อนระยะที่ 1, 2 และ 3 เฉลี่ย 0.52 ± 0.01, 0.53 ± 0.01 และ 1.09 ± 0.02 วัน ตามลำดับ ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุยืนยาวเฉลี่ย 13.19 ± 0.76 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมียระยะก่อนวางไข่เฉลี่ย 1.16 ± 0.06 วัน ระยะวางไข่เฉลี่ย 12.21 ± 0.76 วัน และระยะหลังวางไข่เฉลี่ยนาน 0.49 ± 0.11 วัน การเจริญเติบโตในระยะต่าง ๆ แสดงตาม Table 2.1.3.2 ตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถวางไข่เฉลี่ยวันละ 7.10 ± 0.30 ฟอง และสามารถวางไข่ได้ตลอดชั่วอายุขัยเฉลี่ย 92.95 ± 5.19 ฟอง (Table 2.1.3.3)

ไข่ของไรแดงมันสำปะหลังเพศผู้ที่เลี้ยงบนใบชมพู่มีขนาดเฉลี่ย 198.00 ไมครอน ตัวอ่อนระยะที่ 1, 2, 3 และตัวเต็มวัยมีขนาดกว้าง×ยาวเฉลี่ย 132.00 × 181.50, 165.00 × 214.50, 165.00 × 247.50 และ 198.00 × 330.00 ไมครอน ตามลำดับ (Table 2.1.3.1)

ไรแดงมันสำปะหลังเพศผู้ที่เลี้ยงบนใบชมพู่ ใช้เวลาในการเจริญเติบโตจากไข่จนเป็นตัวเต็มวัยเฉลี่ยนาน 9.27 ± 0.47 วัน โดยมีระยะไข่เฉลี่ย 3.00 ± 0.00 วัน ระยะการเจริญเติบโตของตัวอ่อนระยะที่ 1, 2 และ 3 เฉลี่ย 0.80 ± 0.11, 1.07 ± 0.19 และ 1.12 ± 0.33 วัน ตามลำดับ ตัวเต็มวัยเพศผู้มีอายุยืนยาวเฉลี่ย 6.17 ± 0.77 วัน การเจริญเติบโตในระยะต่างๆ แสดงตาม Table 2.1.3.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ไข่ของไรแดงมันสำปะหลังเพศเมียที่เลี้ยงบนใบชมพู่มีขนาดเฉลี่ย 198 ไมครอน ตัวอ่อนระยะที่ 1, 2, 3 และตัวเต็มวัยมีขนาดกว้าง×ยาวเฉลี่ย 158.92 × 208.42, 190.67 × 238.33, 219.39 × 311.06 และ 297.00 × 454.67 ไมครอน ตามลำดับ (Table 2.1.3.1)

ไรแดงมันสำปะหลังเพศเมียที่เลี้ยงบนใบชมพู่ ใช้เวลาในการเจริญเติบโตจากไข่จนเป็นตัวเต็มวัยเฉลี่ยนาน 9.78 ± 0.06 วัน (Figure 2.1.3.4) โดยมีระยะไข่เฉลี่ย 3.00 ± 0.00 วัน ระยะการเจริญเติบโตของตัวอ่อนระยะที่ 1, 2 และ 3 เฉลี่ย 0.85 ± 0.02, 1.10 ± 0.02 และ 1.09 ± 0.04 วัน ตามลำดับ ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุยืนยาวเฉลี่ย 7.34 ± 0.44 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมียระยะก่อนวางไข่เฉลี่ย 2.04 ± 0.02 วัน ระยะวางไข่เฉลี่ย 4.65 ± 0.39 วัน และระยะหลังวางไข่เฉลี่ยนาน 0.65 ± 0.12 วัน การเจริญเติบโตในระยะต่างๆ แสดงตาม Table 2 ตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถวางไข่เฉลี่ยวันละ 4.94 ± 0.34 ฟอง และสามารถวางไข่ได้ตลอดชั่วอายุขัยเฉลี่ย 44.58 ± 4.03 ฟอง (Table 2.1.3.3)

การศึกษาตารางชีวิต (life table) ของไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis* ในพืชอาศัย ได้แก่ มันสำปะหลัง และชมพู่ พบว่า ไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis* ที่เลี้ยงบนใบมันสำปะหลังมีอัตราการขยายพันธุ์สุทธิในชั่วอายุขัย (R_0) มีค่า 70.63 อัตราการเพิ่มประชากร (r_m) มีค่า 0.26 และผลิตลูกได้สุทธิ (λ) 1.81 ตัวต่อวัน ชั่วอายุขัยของกลุ่ม (G) 16.55 วัน ไข่ที่วางได้ทั้งหมดของตัวเมียแต่ละตัวมีสัดส่วนของลูกที่ฟักเป็นเพศเมียเท่ากับ 0.69 (Table 4) ตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถวางไข่เฉลี่ยวันละ 7.10 ± 0.30 ฟอง และสามารถวางไข่ได้ตลอดชั่วอายุขัยเฉลี่ย 92.95 ± 5.19 ฟอง (Table 2.1.3.2)

ไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis* ที่เลี้ยงบนใบชมพู่มีอัตราการขยายพันธุ์สุทธิในชั่วอายุขัย (R_0) มีค่า 34.35 อัตราการเพิ่มประชากร (r_m) มีค่า 0.22 และผลิตลูกได้สุทธิ (λ) 1.64 ตัวต่อวัน ชั่วอายุขัยของกลุ่ม (G) 16.45 วัน ไข่ที่วางได้ทั้งหมดของตัวเมียแต่ละตัวมีสัดส่วนของลูกที่ฟักเป็นเพศเมียเท่ากับ 0.75 (Table 2.1.3.4) ตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถวางไข่เฉลี่ยวันละ 4.94 ± 0.34 ฟอง และสามารถวางไข่ได้ตลอดชั่วอายุขัยเฉลี่ย 44.58 ± 4.03 ฟอง (Table 2.1.3.2)

จะเห็นได้ว่า อัตราการเพิ่มประชากร (r_m) ของไรแดงมันสำปะหลังที่เลี้ยงบนใบมันสำปะหลังและชมพู่ใกล้เคียงกัน แต่อัตราการขยายพันธุ์สุทธิในชั่วอายุขัย (R_0) ในไรแดงมันสำปะหลังที่เลี้ยงบนใบมันสำปะหลังมากกว่าในชมพู่ถึง 36.28 (Table 2.1.3.4) เนื่องจากตัวเต็มวัยเพศเมียที่เลี้ยงบนใบมันสำปะหลังมีช่วงเวลาการวางไข่ยาวนานกว่าในชมพู่ 7.56 วัน จำนวนไข่ที่ตัวเต็มวัยเพศเมียวางได้เฉลี่ยต่อวันมากกว่า 2.16 ฟองต่อวัน และจำนวนไข่ที่ตัวเต็มวัยเพศเมียวางได้เฉลี่ยต่อตัวมากกว่า 48.37 ฟองต่อตัว (Table 2.1.3.2) จะเห็นได้ว่า อัตราการเพิ่มประชากร (r_m) มีปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้อง 2 ปัจจัยด้วยกันคือ ระยะเวลาในการเจริญเติบโต และอัตราการวางไข่ (Snell, 1978; Wrensch, 1985)

เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Zhang *et al*. (2007) และ Wanmei *et al*. (2005) ซึ่งพบว่าไรแดงมันสำปะหลังเพศเมียที่เลี้ยงบนลำไย มะม่วง และลิ้นจี่ ใช้เวลาในการเจริญเติบโตจากไข่จนเป็นตัวเต็มวัย 14.57, 20.71 และ 16.97 วัน ตามลำดับ และอัตราการวางไข่ตลอดชั่วอายุขัย 46.63, 7.32 และ 34.00 ฟอง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ประชากรของไรแดงมันสำปะหลังที่ลงทำลายบนมันสำปะหลังสามารถเพิ่มประชากรได้ดีกว่า เมื่อลงทำลายบนชมพู่ เนื่องจากอัตราการเพิ่มประชากร (intrinsic rate

ศูนย์วิทยทรัพยากร

of increase, r_m) มีปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้อง 2 ปัจจัยด้วยกัน คือ ระยะเวลาในการเจริญเติบโต และอัตราการวางไข่ (Snell, 1978; Wrensch, 1985) สำหรับอัตราการเพิ่มประชากรของไรแมงมุมนั้น การเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการเจริญเติบโตมีความสำคัญมากกว่าการเปลี่ยนแปลงอัตราการวางไข่ (Sabelis, 1985) ซึ่งหนึ่งในปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต คือ พืชอาหาร ชนิดของพืชอาหารมีผลต่อการเจริญเติบโต อัตราการวางไข่ อายุขัย และการกินอาหารของไรแมงมุม เนื่องจากโครงสร้างของพืช ธาตุอาหาร สรีรวิทยาของพืช และสารเคมีในพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน โครงสร้างของใบพืช เช่น ผิวใบ ความหนาของใบ องค์ประกอบเหล่านี้ล้วนทำให้ไรโตและขยายพันธุ์ต่างกัน (อังศุมาลย์, 2550) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบประชากรของไรแดงมันสำปะหลังที่ลงทำลายบนชมพู่ ลำไย มะม่วง และลิ้นจี่ พบว่าประชากรของไรแดงมันสำปะหลังที่ลงทำลายบนมันสำปะหลัง มีวงจรชีวิตสั้นกว่า 2.62, 7.41, 13.55 และ 9.81 วัน ตามลำดับ ตัวเต็มวัยเพศเมียของไรแดงมันสำปะหลังที่ลงทำลายบนมันสำปะหลังสามารถวางไข่ได้เฉลี่ยต่อตัวมากกว่า 48.37, 46.32, 85.63 และ 58.95 ฟองต่อตัว ตามลำดับ (Zhang *et al*., 2007; Wanmei *et al*., 2005) อายุตัวเต็มวัยเพศเมียและช่วงเวลาการวางไข่ของไรแดงมันสำปะหลังที่ลงทำลายบนมันสำปะหลังยาวกว่าชมพู่ 5.85 วัน และ 7.56 วัน ตามลำดับ และจำนวนไข่ที่ตัวเต็มวัยเพศเมียวางได้เฉลี่ยต่อวันมากกว่า 2.16 ฟองต่อวัน แสดงให้เห็นว่า ไรแดงมันสำปะหลังเมื่อลงทำลายบนมันสำปะหลัง จะระบาดอย่างรวดเร็ว เนื่องจากลักษณะทางชีววิทยา และสภาพแวดล้อมในแปลงที่เหมาะสม โดยเฉพาะสภาพอากาศร้อน แล้ง ฝนทิ้งช่วง ทำให้การระบาดรุนแรงมากขึ้น จึงควรเฝ้าระวังไรแดงชนิดนี้ เพื่อป้องกันกำจัดได้อย่างรวดเร็ว

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis* มีระยะการเจริญเติบโต 5 ระยะ คือ ระยะไข่ (egg) ตัวอ่อนวัย 1 (larva) ตัวอ่อนวัย 2 (protonymph) ตัวอ่อนวัย 3 (deutonymph) และตัวเต็มวัย (adult) ไรแดงมันสำปะหลังที่ลงทำลายบนมันสำปะหลังใช้เวลาในการเจริญเติบโตจากไข่จนเป็นตัวเต็มวัยเฉลี่ย 7.16 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุยืนยาวเฉลี่ย 13.19 วัน ระยะเวลาในการวางไข่เฉลี่ย 12.21 วัน สามารถวางไข่ได้โดยเฉลี่ยตลอดชีวิต 92.95 ฟอง เฉลี่ยวันละ 7.10 ฟอง เนื่องจากในมันสำปะหลังมีระยะเวลาการเจริญเติบโตสั้นกว่าในชมพู่ 2.62 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมียมีช่วงเวลาการวางไข่ยาวนานกว่า 7.56 วัน จำนวนไข่ที่ตัวเต็มวัยเพศเมียวางได้เฉลี่ยต่อตัวมากกว่า 48.37 ฟอง และเฉลี่ยต่อวันมากกว่า 2.16 ฟอง อัตราการขยายพันธุ์สุทธิในชั่วอายุขัย (R_0) ชั่วอายุขัยของกลุ่ม (G) ผลิตลูกได้สุทธิต่อวัน (λ) และอัตราส่วนเพศมีค่ามากกว่า 36.28, 0.1,0.17 และ 0.98 ตามลำดับ อัตราการเพิ่มประชากร (r_m) ของไรแมงมุมในมันสำปะหลัง และชมพู่นั้นใกล้เคียงกัน 0.26 และ 0.22 ตามลำดับ เนื่องจากในมันสำปะหลังมีระยะเวลาการเจริญเติบโตสั้นกว่าในชมพู่ 2.62 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมียมีช่วงเวลาการวางไข่ยาวนานกว่าในชมพู่ 7.56 วัน และจำนวนไข่ที่ตัวเต็มวัยเพศเมียวางได้เฉลี่ยต่อตัวมากกว่าในชมพู่ 48.37 ฟองต่อตัว ไรแมงมุมชนิดนี้จึงสามารถเพิ่มประชากรได้ดีเมื่อมีมันสำปะหลังเป็นพืชอาศัย และเป็นสาเหตุ

กรมวิชาการเกษตร

หนึ่งที่ทำให้เกิดการระบาดอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะสภาพอากาศร้อน แล้ง ฝนทิ้งช่วง การระบาดจะรุนแรงมาก จึงควรป้องกันกำจัดอย่างรวดเร็ว

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ทราบข้อมูลพื้นฐาน เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest risk analysis) และทราบศักยภาพการเข้าทำลายพืชอาศัยที่เป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย เช่น มันสำปะหลัง และชมพู่ เพื่อประโยชน์ในการป้องกันกำจัดต่อไป

Table 2.1.3.1 Effects of host plant on the body size of *O. biharensis* at 26.49 ± 0.07 °c and 60.04 ± 0.86 %RH.

stage	Body Size (Width x length, µm) (Mean±S.E.)			
	On Cassava		On Rose Apple	
	Male	Female	Male	Female
Egg	198.00	198.00	198.00	198.00
Larva	132.00 × 181.50	165.87 × 218.84	132.00 × 181.50	158.92 × 208.42
Protonymph	148.50 × 231.00	197.08 × 251.17	165.00 × 214.50	190.67 × 238.33
Deutonymph	165.00 × 231.00	221.76 × 320.10	165.00 × 247.50	219.39 × 311.06
Adult	198.00 × 330.00	297.00 × 458.33	198.00 × 330.00	297.00 × 454.67

Table 2.1.3.2 Effects of host plant on the duration of immature and adult development of *O. biharensis* at 26.49 ± 0.07 °c and 60.04 ± 0.86 %RH.

stage	Development duration in days (Mean±S.E.)			
	On Cassava		On Rose Apple	
	Male	Female	Male	Female
Egg	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00
Larva	0.50 ± 0.00	0.52 ± 0.01	0.80 ± 0.11	0.85 ± 0.02
Protochrysalis	0.64 ± 0.13	0.62 ± 0.01	1.13 ± 0.22	1.11 ± 0.03
Protonymph	0.56 ± 0.11	0.53 ± 0.01	1.07 ± 0.19	1.10 ± 0.02
Deutochrysalis	0.58 ± 0.15	0.61 ± 0.02	0.90 ± 0.18	0.91 ± 0.02
Deutonymph	1.06 ± 0.20	1.09 ± 0.02	1.12 ± 0.33	1.09 ± 0.04
teliochrysalis	0.64 ± 0.13	0.81 ± 0.03	1.25 ± 0.38	1.72 ± 0.06
Total (egg-adult)	6.94 ± 0.28	7.16 ± 0.04	9.27 ± 0.47	9.78 ± 0.06
Pre- oviposition	-	1.16 ± 0.06	-	2.04 ± 0.02
Oviposition	-	12.21 ± 0.76	-	4.65 ± 0.39
Post- oviposition	-	0.49 ± 0.11	-	0.65 ± 0.12
Female longevity	-	13.19 ± 0.76	-	7.34 ± 0.44
Male longevity	14.22 ± 1.85	-	6.17 ± 0.77	-

กรมวิชาการเกษตร

Table 2.1.3.3 Comparison of egg production and egg hatchability on Cassava and Rose Apple.

Host plant	Average number of eggs per female per day	Average total of eggs per female
Cassava	7.10 ± 0.30	92.95 ± 5.19
Rose Apple	4.94 ± 0.34	44.58 ± 4.03

Table **2.1.3.4** Effects of host plant on the life table parameters of *O. biharensis*

Parameters	Host plant	
	Cassava	Rose Apple
Net reproduction rate, R_0 per generation	70.63	34.35
Intrinsic rate of increase, r_m per day	0.26	0.22
generation time, G (days)	16.55	16.45
finite rate of increase, λ per day	1.81	1.64
Sex ratio	1: 4.33	1: 3.35
Proportion of female (♀ / ♀ + ♂) of F_1	0.69	0.75

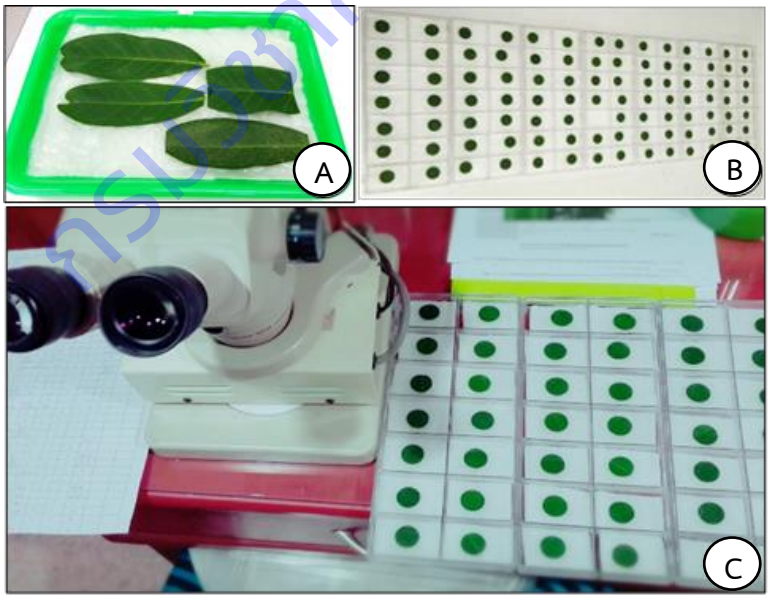
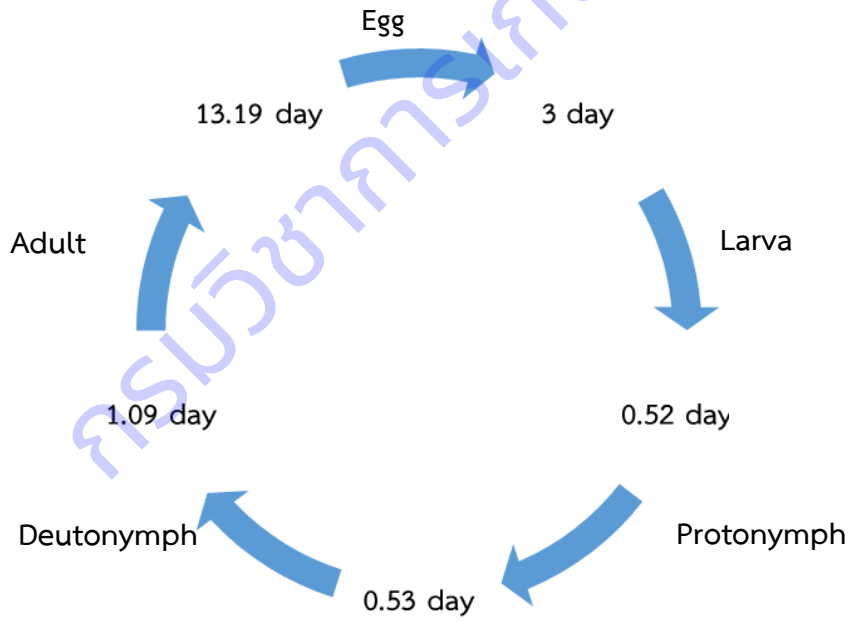


Figure 2.1.3.1 *O. biharensis* were reared on each host plant leaves in laboratory. (A) Only one egg was left on each leaflet. (B) The duration for each developmental stage was recorded every 6 hours. (C)

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Figure 2.1.3.2 The duration developmental was 5 stages including Egg (A) Larva (B) Protonymph (C) Deutonymph (D) Adult Male (E) and Adult Female. (F)



กรมวิชาการเกษตร

Figure 2.1.3.3 Life cycle of *O. biharensis* when feeding on cassava.

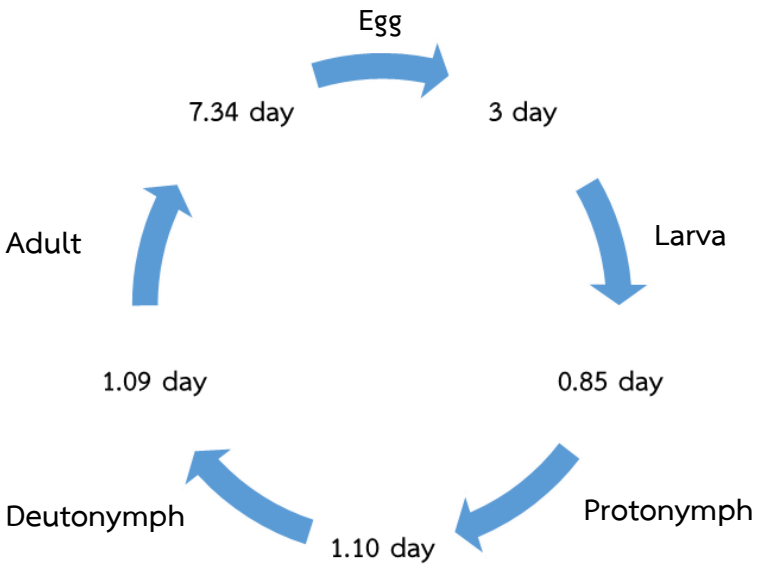


Figure 2.1.3.4 Life cycle of *O. biharensis* when feeding on rose apple.

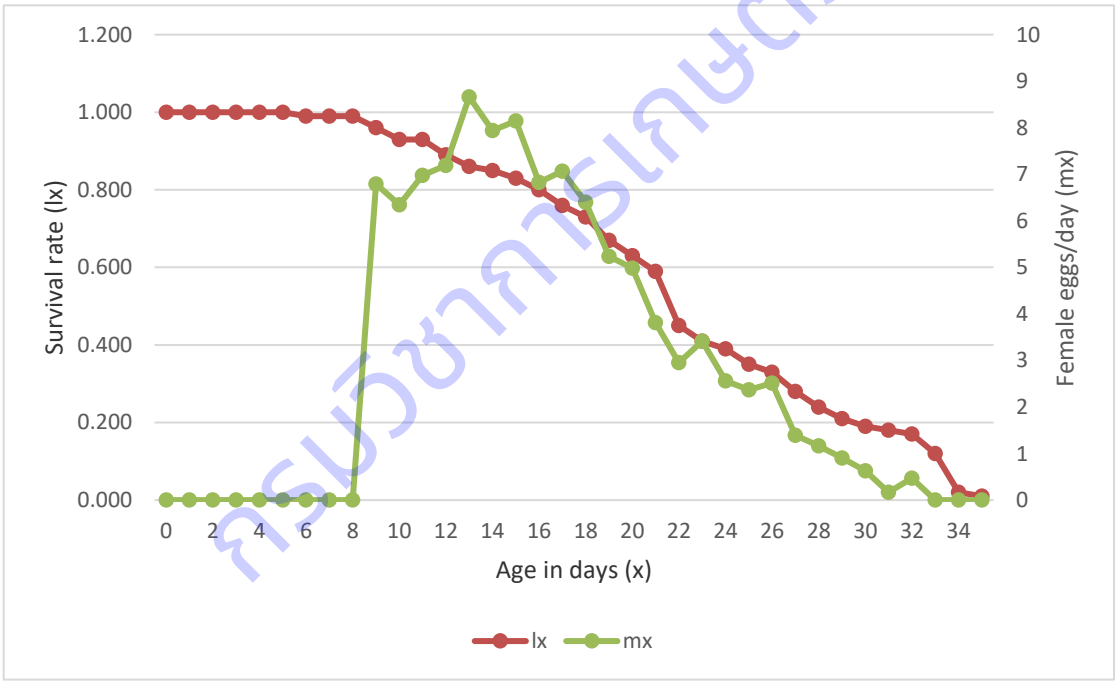


Figure 2.1.3.5 Age-specific survival rate and age-specific fecundity rate of *O. biharensis* when feeding on cassava.

กรมวิชาการเกษตร

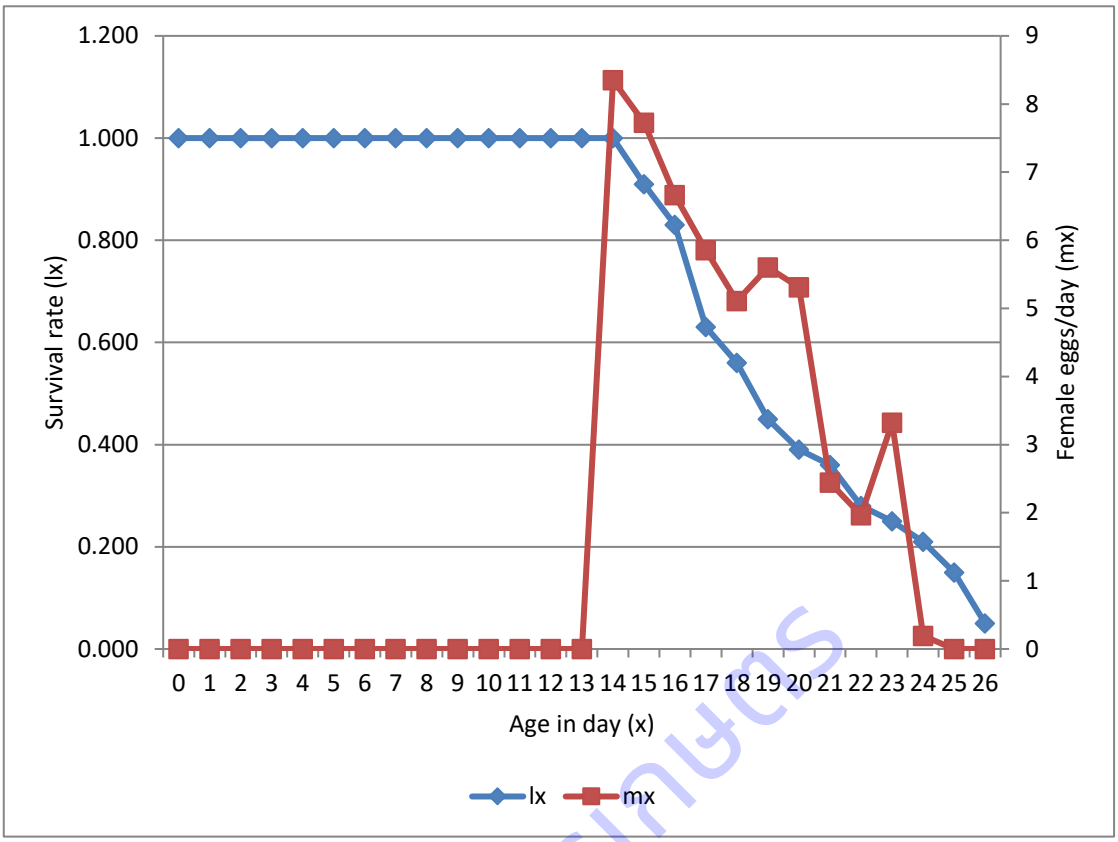


Figure 2.1.3.6 Age-specific survival rate and age-specific fecundity rate of *O. biharensis* when feeding on rose apple.

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.1.4 ชีววิทยาและพลวัตประชากรของหอยศัตรูพืชสกุล *Succinea*

Biology and population dynamics of pest snail *Succinea*

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ดาราพร รินทะรักษ์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ณัฐฐิญา กาญจนนิธิพัฒน์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ปราสาททอง พรหมเกิด	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ดำเนินการศึกษาชีววิทยาและพลวัตประชากรของหอยชัคซีเนียในแปลงปลูกกล้วยไม้จังหวัดนครปฐมตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2561 เก็บตัวอย่างจากจังหวัดนครปฐมและกาญจนบุรีได้ทั้งหมด 195 ตัวอย่าง เพื่อนำไปศึกษาชีววิทยาต่อในห้องปฏิบัติการ ค่าพลวัตประชากรในจังหวัดกาญจนบุรีมีค่าต่ำสุดในเดือนเดือนมิถุนายน 2560 (4.60 ตัวต่อตารางเมตร) และมีค่าสูงสุดในเดือนสิงหาคม 2560 (เท่ากับ 63.6 ตัวต่อตารางเมตร) ขณะที่ในจังหวัดนครปฐมมีค่าต่ำสุดในเดือนเดือนมิถุนายน 2560 (6.37 ตัวต่อตารางเมตร) และมีค่าสูงสุดในเดือนพฤศจิกายน 2559 (60.31 ตัวต่อตารางเมตร) ปริมาณน้ำฝนและฤดูกาลไม่สัมพันธ์กับพลวัตประชากรของหอยชัคซีเนีย หอยชัคซีเนียมีอายุขัยตั้งแต่ 90 ถึง 145 วัน และสามารถเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนครบวงจรชีวิตได้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Biology and population dynamics of *Succinea* in orchid plantations were investigated from October 2016 to September 2018. Totally, 1 95 samples were collected from Nakhon Pathom and Kanchanaburi province for rearing in the laboratory. Lowest abundance of *Succinea* in Kanchanaburi (4.60 individuals per m^2) was in June 2016 while highest value (63.6 individuals per m^2) was in August 2017. Additionally, lowest abundance of *Succinea* in Nakhon Pathom (6.37 individuals per m^2) was in June 2016 while highest value (60.31 individuals per m^2) was in November 2016. The precipitation and season do not relate to *Succinea* abundance. Life span of *Succinea* in laboratory ranges from 90 to 145 days. The laboratory rearing of this snail can only be completed with equal or less than 25°C.

คำนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตและส่งออกกล้วยไม้นานาชนิดติดอันดับต้นๆของโลก สามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศนับพันล้านบาท อย่างไรก็ตามอุปสรรคที่สำคัญของการผลิตและการส่งออกคือ

กรมวิชาการเกษตร

ปัญหาการเข้าทำลายจากหอยทากบกศัตรูซึ่งสร้างความเสียหายแก่กล้วยไม้ กรมวิชาการเกษตรได้ทำการวิจัยและพัฒนาความรู้พื้นฐานและเทคโนโลยีสำหรับการป้องกันกำจัดหอยทากศัตรูกล้วยไม้ พบว่าหนึ่งในศัตรูกล้วยไม้ที่มีความสำคัญคือหอยซัคซีเนีย *Succinea*

หอยซัคซีเนีย *Succinea* จัดเป็นหอยทากบก มักพบอาศัยอยู่บริเวณที่มีความชื้นสูง มีรายงานว่าพบในสวนกล้วยไม้ หอยชนิดนี้มักพบอาศัยอยู่บริเวณพื้นดิน วัสดุปลูก ต้นและดอกกล้วยไม้ หอยจะเข้าทำลายโดยการกัดกินต้นอ่อนและดอกกล้วยไม้ ทำให้ต้นและดอกกล้วยไม้ไม่ได้คุณภาพ อีกทั้งถ้าการพบเห็นตัวและไข่หอยติดไปกับต้นหรือดอกกล้วยไม้จะถูกเผาทำลาย ยังผลให้ภาพพจน์การส่งออกกล้วยไม้ของประเทศไทยเสื่อมเสียอีกด้วย ไม่เพียงเท่านั้น ในปัจจุบันเริ่มมีการพบเห็นการระบาดของหอยซัคซีเนียศัตรูพืชไปยังแปลงปลูกผัก เช่น คะน้าและผักกาดหอม เป็นต้น

หอยสกุล *Succinea* จัดอยู่ในวงศ์ Succineidae เป็นหอยทากบกไม่มีฝาปิด สามารถพบได้ในทวีปอเมริกาและยุโรป ทั้งนี้มีรายงานว่าหอยสกุลนี้เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศสหรัฐอเมริกา (Cowie et al., 2009 ;Villalobos et al., 1995) *Succinea costaricana* เข้ากัดกินและก่อให้เกิดความเสียหายแก่ไม้ประดับ *Dracaena marginata* ทางกรมวิชาการเกษตรได้รายงานว่าหอยสกุล *Succinea* นี้เป็นหอยศัตรูกล้วยไม้ที่สำคัญ (ชมพูนุทและปิยาณี, 2545; ปราสาททองและคณะ 2555) นอกจากนี้มีรายงานการพบในแปลงปลูกผักคะน้าอีกด้วย (ปราสาททองและคณะ, 2554)

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยาของหอย *Succinea* ดังนี้ Ðatkauskienë (2005) รายงานว่า *Succinea putris* มีช่วงชีวิตยาวนาน 13 ถึง 17 เดือน ช่วงเวลาผสมพันธุ์ในธรรมชาติเริ่มตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงเดือนตุลาคม ขณะที่ในห้องปฏิบัติการผสมพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี จำนวนไข่ต่อกลุ่มในธรรมชาติโดยเฉลี่ยเท่ากับ 48 ± 12 ฟองและในห้องปฏิบัติการเท่ากับ12.7 ± 6.8 ฟอง ต่อมาในปี 2009 Dillen et al. ได้ทำการศึกษา S. putris ในห้องปฏิบัติการพบว่าหอยที่ได้รับการผสมพันธุ์แล้วจะสามารถผลิตไข่ได้เกือบหมดทุกตัว ขณะที่หอยยังไม่ได้รับการผสมพันธุ์สามารถผลิตไข่ได้ไม่ถึง 50% ของหอยทั้งหมด อีกทั้งหอยที่ได้รับการผสมพันธุ์แล้วมีระยะเวลาวางไข่ และจำนวนไข่มากกว่าหอยที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ หลังจากนั้น Kuznik-Kowalska et al. (2013) ทำการศึกษาพลวัตประชากรและชีววิทยาของ S. putris พบว่ามีช่วงชีวิตตั้งแต่ 210 ถึง 420 วัน หอยที่สามารถวางไข่ได้มีวงรอบเปลือกประมาณ 3 ถึง 4 วง ไข่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.7 ถึง 2.0 มิลลิเมตร จำนวนไข่ต่อกลุ่มตั้งแต่ 5 ถึง 64 ฟอง

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับพลวัตประชากรของหอยทากบกหลายชนิด เช่น *S. costaricana* มีความหนาแน่นประชากรในสวนไม้ประดับของประเทศคอสตาริกา มีมากกว่า 200,000 ตัวต่อเฮกตาร์ และการเปลี่ยนแปลงของขนาดประชากรไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณฝนและอุณหภูมิ (Villalobos et al., 1995) หอย *Ovachlamys fulgens* พบได้บริเวณที่มีการเพาะปลูกในประเทศคอสตาริกา การแพร่กระจายของหอยชนิดนี้ถูกจำกัดโดยอุณหภูมิและปริมาณน้ำฝน ความชุกชุมของหอยชนิดนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของเศษซากใบไม้ ความชื้นในดิน ความชื้นสัมพัทธ์ และอุณหภูมิในตอนเช้า (Barrientos, 2000) และหอย *Helicodonta obvoluta* มีการเจริญเติบโตในธรรมชาติคล้ายกับในห้องปฏิบัติการ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศเป็นสำคัญ แต่ละปี มีลูกหอยเกิดขึ้นใหม่ในฤดูไม้ไม้ผลิและฤดูใบไม้ร่วง ทั้งในธรรมชาติและห้องปฏิบัติการ หอยชนิดนี้มีชีวิตอยู่ได้มากกว่า 3 ปี (Maltz, 2005) เป็นต้น

กรมวิชาการเกษตรได้ทำการวิจัยเพื่อการป้องกันและกำจัดหอยทากบกศัตรูกล้วยไม้อย่างต่อเนื่องจนได้ชนิดของสารเคมีและสารสกัดจากพืชที่มีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม ยังขาดข้อมูลพื้นฐานในด้านของชีววิทยาดังเช่น วงจรชีวิต การสืบพันธุ์ และพลวัตประชากร เป็นต้น การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ และความหลากหลายทางพันธุกรรม ทั้งนี้ข้อมูลทางด้านชีววิทยา การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ และพลวัตประชากรจะทำให้เข้าใจถึงธรรมชาติและพฤติกรรมของหอยศัตรูพืชชนิดนี้ได้ดียิ่งขึ้น และสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการอ้างอิงเชิงวิชาการ เพื่อการป้องกันกำจัดและมีความจำเป็นต่อการวางแผนเพื่อการจัดการหอยศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพ (pest management) ต่อไปได้

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. กล่องพลาสติกขนาดต่างๆ
2. กระดาษอเนกประสงค์
3. พู่กัน
4. เวอร์เนีย (เครื่องมือวัดขนาดเปลือกหอย)
5. อาหารปลาชนิดเม็ด
6. ผักสด
7. กล้องถ่ายรูปดิจิตอล
8. เชือกและไม้หลักสำหรับตีวงสุ่มตัวอย่าง
9. เครื่องวัดอุณหภูมิความชื้น (Data logger)

- วิธีการ

1. ศึกษาชีววิทยาของหอยศัตรูพืชสกุล *Succinea* โดยดำเนินการดังนี้

- การเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างหอยซัคซีเนียศัตรูพืชสกุล *Succinea* จากแปลงปลูกกล้วยไม้ และแปลงปลูกผักในแหล่งปลูกภาคตะวันตก ได้แก่จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี ภาคกลาง ได้แก่ นครปฐม นนทบุรี สมุทรสาคร ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา เป็นต้น บันทึกลักษณะของระบบนิเวศที่เป็นที่อยู่อาศัยของหอย พืชอาหาร วัดค่าความเป็นกรดด่าง ความชื้น อุณหภูมิ แสง และปัจจัยอื่นๆ เช่น สภาพแวดล้อมในแปลงปลูก ศัตรูธรรมชาติ เป็นต้น

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำหอยที่เก็บตัวอย่างมาได้มาวัดความสูงของเปลือก (จาก apex จนถึงด้านล่างสุดของ aperture) ความยาวของเปลือก ความกว้างของรูเปิด (aperture) จำนวนวง (whorl) ลักษณะของเปลือก

กรมวิชาการเกษตร

- การศึกษาวงจรชีวิต

นำหอย *Succinea* จากการสำรวจมาเลี้ยง เพื่อศึกษาวงจรชีวิตในกล่องพลาสติกขนาด 13 x 13 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร ภายในบรรจุดินหนา 5-10 เซนติเมตร ให้อาหารปลาชนิดเม็ด ผักกาดหอม หรือแตงกวาเป็นอาหารทุก 3 วัน เปลี่ยนดินและให้แคลเซียมทุก 7 วัน วัด ความยาวของเปลือก น้ำหนัก จนกระทั่งหอยผสมพันธุ์และวางไข่ ให้นำกลุ่มไข่ที่ได้จากการเลี้ยงเพิ่มปริมาณ มาเลี้ยงในกล่องพลาสติกบรรจุดินกล่อง กลุ่มไข่ละกล่อง ทำการศึกษา 5 กลุ่มไข่ต่อชนิดหอย เมื่อไข่ฟักเป็นลูกหอยรุ่นที่ 1 ให้อาหารปลาชนิดเม็ด ผักกาดหอม หรือแตงกวาเป็นอาหารทุก 3 วัน เปลี่ยนดินและให้แคลเซียมทุก 7 วัน สังเกตระยะเวลาการเจริญเติบโต พฤติกรรม เช่น การกินอาหาร การเคลื่อนที่ การผสมพันธุ์ ชั่งน้ำหนักและวัดขนาดลูกหอยทุกสัปดาห์ และดำเนินการเช่นเดียวกันกับลูกหอยรุ่นที่ 2

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

- ระยะเวลาการเจริญเติบโต
- พฤติกรรม เช่น การกินอาหาร การเคลื่อนที่ การผสมพันธุ์
- ลักษณะของระบบนิเวศที่เป็นที่อยู่อาศัยของหอย เช่น พืชอาหาร วัดค่าความเป็นกรดด่าง ความชื้น อุณหภูมิ แสง
- ลักษณะของเปลือก เช่น ความสูงของเปลือก (จาก apex จนถึงด้านล่างสุดของ aperture) ความยาวของเปลือก ความกว้างของรูเปิด (aperture) จำนวนวง (whorl)

- เวลาและสถานที่

ดำเนินการทดลองตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2561 โดยเก็บตัวอย่างหอยซัคซีเนียและศึกษาพลวัตประชากรในแปลงปลูกกล้วยไม้ในจังหวัดกาญจนบุรีและนครปฐม และนำกลับมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ณ กลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บตัวอย่างหอยซัคซีเนียจากแปลงปลูกในจังหวัดนครปฐม 100 ตัวอย่าง จังหวัดกาญจนบุรี 95 ตัวอย่าง เพื่อนำมาศึกษาชีววิทยาการวางไข่ในห้องปฏิบัติการ พบว่าหอยซัคซีเนียวางไข่ครั้งละ 1 ถึง 5 ฟองต่อกลุ่ม ใช้เวลาประมาณ 3 ถึง 7 วันกว่าไข่จะฟักเป็นตัว ไข่มีลักษณะเป็นวุ้นขนาดประมาณ 1 ถึง 2 มิลลิเมตร กำลังศึกษาการเติบโตของลูกรุ่นแรก จำนวนหอยซัคซีเนียในแปลงปลูกนั้นแสดงอยู่ในตารางที่ 2.1.4.2 ดังเช่น จากจังหวัดกาญจนบุรีได้เฉลี่ย 20.43 ตัวต่อตารางเมตรในเดือนพฤศจิกายน 2559 20 ตัวต่อตารางเมตรในเดือนกุมภาพันธ์ 2560 4.6 ตัวต่อตารางเมตรในเดือนมิถุนายน 2560 และจังหวัดนครปฐมในเดือนกุมภาพันธ์ 2560 เท่ากับ 7 ตัวต่อตารางเมตร 6.4 ตัวต่อตารางเมตรในเดือนมิถุนายน 2560 พลวัตในจังหวัดนครปฐมเท่ากับ 23.8 ตัวต่อตารางเมตร และจังหวัดกาญจนบุรีเท่ากับ 63.6 ตัวต่อตารางเมตรในเดือนสิงหาคม 2560 ในเดือนตุลาคม 2560 จังหวัดนครปฐมเท่ากับ 29.8 ตัวต่อตารางเมตร และจังหวัดกาญจนบุรีเท่ากับ 49.4 ตัวต่อตารางเมตร และเดือนธันวาคม 2560

กรมวิชาการเกษตร

ในจังหวัดนครปฐมเท่ากับ 8.89 ตัวต่อตารางเมตร และจังหวัดกาญจนบุรีเท่ากับ 13.25 ตัวต่อตารางเมตร ในเดือนมกราคม 2561 ในจังหวัดนครปฐมเท่ากับ 13.83 ตัวต่อตารางเมตร และจังหวัดกาญจนบุรีเท่ากับ 10.58 ตัวต่อตารางเมตร และในเดือนพฤษภาคม 2561 ในจังหวัดนครปฐมเท่ากับ 32.93 ตัวต่อตารางเมตร และจังหวัดกาญจนบุรีเท่ากับ 12.41 ตัวต่อตารางเมตร (ภาพที่ 2.1.4.1 และตารางที่ 2.1.4.1)

จากการศึกษาชีววิทยาการวางไข่ของหอยซัคซีเนีย 30 ตัวอย่าง พบว่า หอยซัคซีเนียวางไข่เฉลี่ยประมาณ 2.00 ± 1.05 ฟอง/ตัว ใช้เวลาเฉลี่ย 3.76 ± 1.33 วันกว่าจะฟักเป็นตัว หอยสามารถดำรงชีพได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 ถึง 33 องศาเซลเซียส หอยแรกเกิดมีขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ใช้เวลาประมาณ 90-145 วันจะเริ่มเจริญเติบโตจนมีขนาดเปลือกประมาณ 4 ถึง 6 มิลลิเมตร ก็จะเริ่มผสมพันธุ์และวางไข่อีกครั้ง (n = 30 ตัว) หอยสามารถกินพืชได้หลายชนิด ดังเช่น กล้วยไม้ ผักกาดหอม แตงกวา แต่การเลี้ยงด้วยกระดาษชำระพรมน้ำให้ชุ่ม พร้อมกับให้ผักกาดหอม และแคลเซียมผง ที่อุณหภูมิไม่เกิน 25 องศาเซลเซียส จะมีอัตราการรอดสูงและสามารถเลี้ยงได้ยาวนานจนกระทั่งครบวงจรชีวิต

เมื่อนำพลวัตของหอยซัตซีเนียไปเปรียบเทียบกับอุณหภูมิและความชื้น (ภาพที่ 2.1.4.2 และภาพที่ 2.1.4.3) พบว่า จำนวนของหอยซัคซีเนียในสวนกล้วยไม้ไม่สัมพันธ์กับอุณหภูมิและความชื้นเลย แต่มีแนวโน้มว่าจะเพิ่มขึ้นหรือลดลงตามฤดูกาลในจังหวัดกาญจนบุรี เริ่มจากเดือนมิถุนายน (ต้นฤดูฝน) หอยจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงสุดในเดือนสิงหาคม และเริ่มลดลงจนต่ำสุดในเดือนมกราคม (ฤดูหนาว) แต่ในจังหวัดนครปฐมกลับมีความผันผวน ขึ้น ๆ ลง ๆ ของพลวัตประชากรหอยซัคซีเนีย เป็นไปได้ว่าอาจต้องพิจารณาปัจจัยอื่น ๆ เช่น การฉีดพ่นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ค่าทางกายภาพของดินประการอื่น และปัจจัยทางนิเวศวิทยาอื่น ๆ เช่น ผู้ล่าร่วมด้วย ซึ่งอาจมีผลให้จำนวนประชากรหอยแปรปรวนเช่นนี้

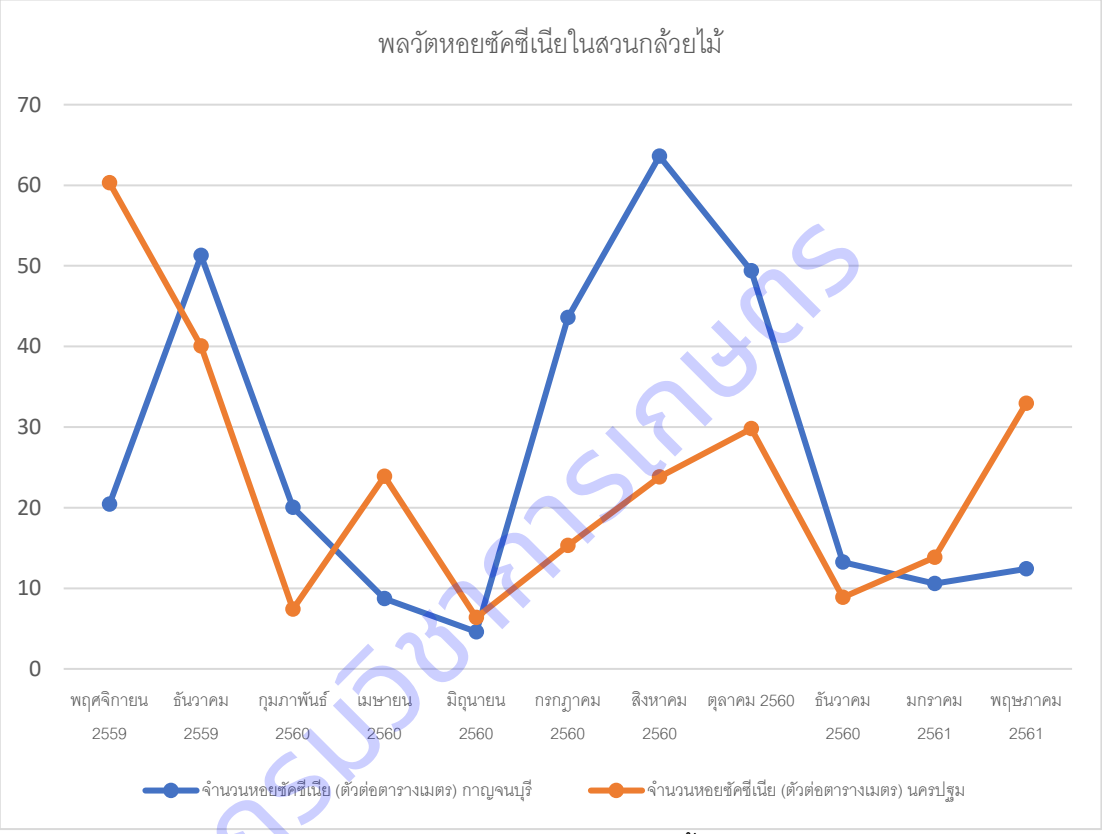
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้ได้ข้อมูลโดยรวมเกี่ยวกับชีววิทยา และพลวัตของหอยซัคซีเนียในสวนกล้วยไม้ เมื่อเก็บตัวอย่างหอยซัคซีเนียจากจังหวัดนครปฐมและกาญจนบุรีได้ทั้งหมด 195 ตัวอย่าง ดำเนินการเก็บข้อมูลพลวัตประชากรตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2561 ได้ค่าพลวัตประชากรตั้งแต่ 4.6 ตัวต่อตารางเมตร ถึง 63.6 ตัวต่อตารางเมตร พบว่าสามารถเลี้ยงหอยซัคซีเนียได้จนครบวงจรชีวิต อายุขัยของหอยยาวนานประมาณ 90 ถึง 145 วัน และพลวัตของหอยซัคซีเนียไม่สัมพันธ์กับความชื้นและอุณหภูมิแต่อย่างใด หอยจะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเมื่อเข้าสู่ฤดูฝน ช่วงเดือนมิถุนายน และจะเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดราวเดือนสิงหาคม และจะมีค่าลดลงต่ำที่สุดราวเดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์ มีความจำเป็นต้องทำการวิจัยพลวัตประชากรต่อไปอีกสักสองปีและศึกษาปัจจัยอื่น ค่าทางกายภาพของดินและปัจจัยทางนิเวศวิทยา เพื่อให้สามารถเข้าใจการเปลี่ยนแปลงนี้มากขึ้น รวมทั้งควรมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยซัคซีเนีย เพื่อให้เข้าใจถึงพฤติกรรม นิเวศวิทยาอันเป็นข้อมูลสำคัญต่อการวางแผนป้องกันกำจัดได้ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร

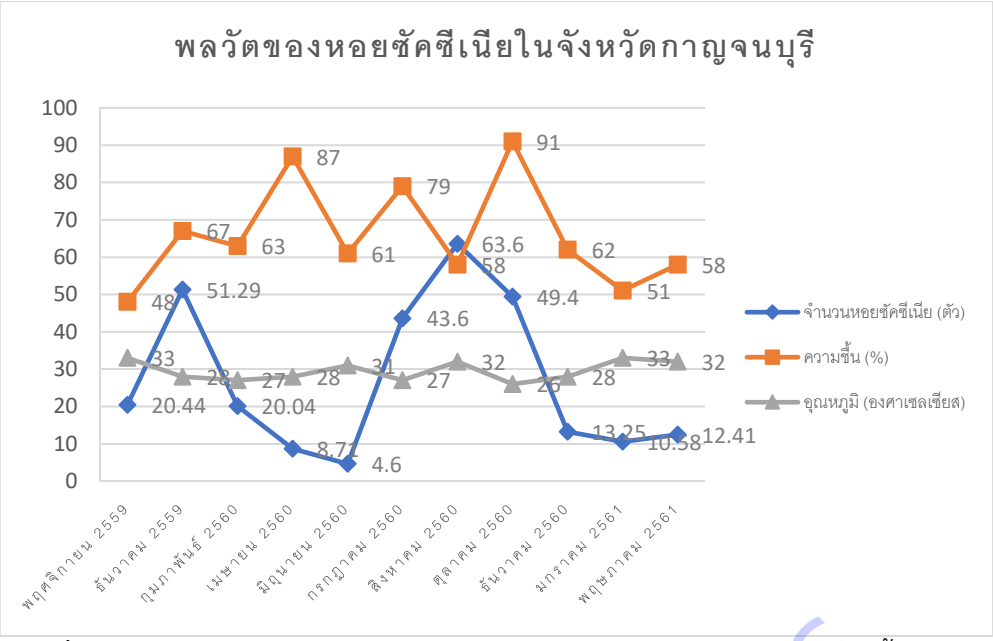
การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

พัฒนาต่อ สามารถนำไปใช้ประโยชน์กับกลุ่มเป้าหมาย ได้แก่ เกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้ หน่วยงานของรัฐผู้มีหน้าที่รับผิดชอบ เช่น กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร มหาวิทยาลัย นักวิชาการ และผู้สนใจ

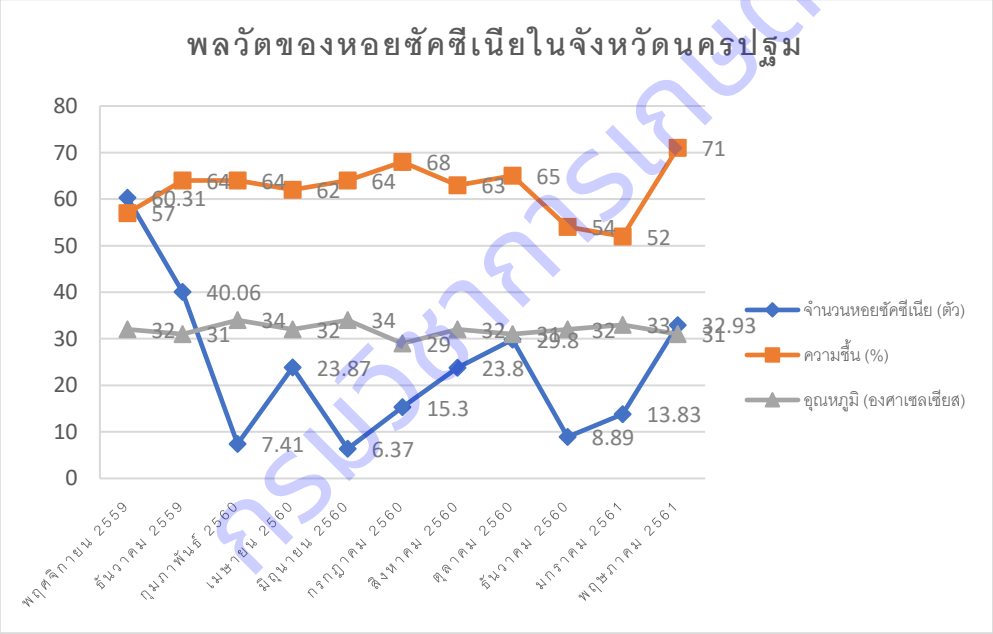


ภาพที่ 2.1.4.1 กราฟแสดงพลวัตหอยซัคซีเนียในสวนกล้วยไม้ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2559 ถึง พฤษภาคม 2561

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2.1.4.2 พลวัตของหอยซัคซีเนียในกาญจนบุรีเทียบกับอุณหภูมิและความชื้น



ภาพที่ 2.1.4.3 พลวัตของหอยซัคซีเนียในนครปฐมเทียบกับอุณหภูมิและความชื้น

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2.1.4.1 พลวัตประชากรหอยซัคซีเนียในสวนกล้วยไม้ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2559 ถึงพฤษภาคม 2561

เดือน	**จำนวนหอยซัคซีเนีย (ตัวต่อตารางเมตร)**	
	กาญจนบุรี	**นครปฐม**
พฤศจิกายน 2559	20.44	60.31
ธันวาคม 2559	51.29	40.06
กุมภาพันธ์ 2560	20.04	7.41
เมษายน 2560	8.71	23.87
มิถุนายน 2560	4.60	6.37
กรกฎาคม 2560	43.6	15.3
สิงหาคม 2560	63.6	23.8
ตุลาคม 2560	49.4	29.8
ธันวาคม 2560	13.25	8.89
มกราคม 2561	10.58	13.83
พฤษภาคม 2561	12.41	32.93

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.1.5 ชีววิทยา วงจรชีวิต และการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Indoplanorbis*

Geographical distribution and some biological aspects of freshwater pest snail *Indoplanorbis* sp.

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ดาราพร รินทะรักษ์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ณัฐฐิญา กาญจนนิธิพัฒน์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ปราสาททอง พรหมเกิด	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การสำรวจการแพร่กระจายของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Indoplanorbis* ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2561 ได้ตัวอย่าง 651 ตัว โดยแพร่กระจายตามแหล่งน้ำจืดทุกภาคในประเทศไทย จำแนกชนิดได้ 1 ชนิด คือ *Indoplanorbis exustus* (Deshayes, 1834) ศึกษาศักยภาพการกินโดยเปรียบเทียบอัตราการกินพืชอาหาร 8 ชนิด ได้แก่ ใบพาย *Cryptocoryne* sp. อเมซอน *Echinodorus* sp. หญ้าเทเนลูส *Echinodorus tenellus* สาหร่าย *Cabomba* sp. สาหร่าย *Egeria* sp. อนูเบียส *Anubias* sp. ชบาน้ำ *Aponogeton* sp. และบัวประดับ *Nymphaea* sp. พบว่าอัตราการกินพืชอาหารทุกชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หอยชนิดนี้ออกไข่เป็นกลุ่มมีเมือกล้อมรอบ มีวงชีวิตประมาณ 115 วัน สามารถสืบพันธุ์ให้ลูกมากกว่า 10 ครอกต่อวงชีวิต

Geographical distribution of *Indoplanorbis* was investigated during October 2016 to September 2018. 651 samples were collected and only one species *Indoplanorbis exustus* (Deshayes, 1834) was found. The study of snail grazing on various aquarium plants (*Cryptocoryne* sp., *Echinodorus* sp., *Echinodorus tenellus*, *Cabomba* sp., *Egeria* sp., *Anubias* sp., *Aponogeton* sp. and *Nymphaea* sp.) was conduct. It is revealed that the grazing rates among these aquarium plants were not significantly different at 95% confidential level. The egg clusters of this species were coated with mucus. Its life cycle prolongs around 115 days and should give birth to at least ten litters per se.

คำนำ

ปัจจุบันธุรกิจการเพาะขยายพรรณไม้น้ำมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่มีภูมิอากาศและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม สถิติการส่งออกพรรณไม้น้ำของไทยโดย

เฉพาะที่มีใบรับรองปลอดศัตรูพืชจากกรมวิชาการเกษตร พบว่าในปี 2546 มีการส่งออกจำนวน 9,462 กิโลกรัม 9,884,470 ต้น คิดเป็นมูลค่า 16.22 ล้านบาท ในปี 2547 มีการส่งออกจำนวน 164,187 กิโลกรัม 8,085,068 ต้น คิดเป็นมูลค่า 17.2 ล้านบาท ปัญหาที่พบในแหล่งที่มีการเพาะขยายพรรณไม้น้ำ คือสัตว์ศัตรูพรรณไม้น้ำ โดยการกัดกินหรือดูดกินน้ำเลี้ยงที่ใบ ลำต้นอ่อน และส่วนต่างๆ ของพืช ศัตรูที่พบเช่น แมลงหวี่ขาว, *Bemisia tabaci* (Gennadius) แมลงวันหนอนชอนใบ, *Liriomyza* sp. เพลี้ยไฟฝ้าย, *Thripspalmi* (Karni) รวมทั้งหอยน้ำที่สำคัญและระบาดในประเทศไทย เช่น หอยลิมเนีย, *Lymnaea* sp. หอยเชอรี่, *Pomacea* sp. และหอย *Indoplanorbis exustus* เป็นต้น

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพของหอยน้ำจืดสูง การศึกษาหอยน้ำจืดในปัจจุบันส่วนใหญ่มีการสำรวจความหลากชนิด การแพร่กระจายของหอยน้ำจืด และมีการศึกษาเกี่ยวกับโรคที่เกิดจากปรสิต เนื่องจากหอยบางชนิดเป็นโฮสต์ของปรสิต (สุชาติ และคณะ, 2538) ข้อมูลด้านการเป็นสัตว์ศัตรูพืชมีค่อนข้างน้อย ซึ่งจากรายงานทางวิชาการพบว่าหอยสกุล *Indoplanorbis* เป็นสัตว์ศัตรูพรรณไม้น้ำอีกชนิดหนึ่งที่สร้างความเสียหายแก่บ่อหรือแปลงเพาะปลูกพรรณไม้ประดับ

การศึกษาหอยน้ำจืดในประเทศไทยพบว่าในช่วงเริ่มแรกจะเน้นการวิจัยที่เกี่ยวปรสิตและการเกิดโรค เนื่องจากมีหอยน้ำจืดบางชนิดเป็นโฮสต์ตัวกลางให้ปรสิตอาศัย (สุชาติ และคณะ, 2538) เช่น หอย *Bitthynia* spp.,หอย *Lymnaea* spp.และหอย *Melanoides* sp. ที่เป็นโฮสต์ตัวกลางของพยาธิใบไม้ที่สามารถติดต่อมาถึงมนุษย์ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งหอยในวงศ์ Thiaridae ซึ่งสามารถเป็นโฮสต์ตัวกลางของพยาธิใบไม้ได้ถึง 8 ชนิดพันธุ์ (ดวงเดือน และคณะ, 2552) และการศึกษาเกี่ยวกับหอย *Indoplanorbis exustus* ส่วนใหญ่เน้นด้านการแพร่กระจายและการก่อโรค เนื่องจากหอยชนิดนี้เป็นโฮสต์ตัวกลางของตัวอ่อนพยาธิที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของพยาธิใบไม้ในโคและกระบือ (พินิจ, 2542; Vaidya *et al.*, 1980; Singh and Agarwal, 1981; Agarwal and Singh, 1988; Tiwari, 2013)

จากการศึกษาในแง่ของการเป็นสัตว์ศัตรูพืชของ *Indoplanorbis* sp. โดยการสำรวจความหลากชนิดของหอยศัตรูพรรณไม้ประดับพบการระบาดของหอยน้ำ 3 ชนิด ได้แก่ *Radix* sp. *Indoplanorbis exustus* และ *Physella* sp. ซึ่งสร้างความเสียหายแก่แปลงเพาะปลูกพรรณไม้ประดับซึ่งเกษตรกรยังไม่สามารถกำจัดออกจากแปลงได้หมดทำให้สูญเสียรายได้จากการกัดกินและทำลายส่วนต่างๆ ของต้น

จากการสำรวจความหลากชนิด ปริมาณและการแพร่กระจายของหอยน้ำจืดในแม่น้ำบางปะกงและแม่น้ำปราจีนบุรีพบว่าหอยที่พบในวงศ์ Bulinidae มีเพียงชนิดเดียวคือ *Indoplanorbis exustus* ซึ่งหอยในวงศ์นี้เปลือกมีลักษณะแบนขดวนเป็นวงในระนาบเดียวกันและพบได้ทั่วไปในน้ำจืด (สุชาติ และประสิทธิ์, 2555) และจากบัญชีรายชื่อหอยน้ำจืดในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยพบหอยวงศ์ Bulinidae เพียงชนิดเดียวคือ *Indoplanorbis exustus* เช่นกัน (สิทธิ, 2554)

จากรายงานทางวิชาการได้บรรยายลักษณะภายนอกของ *Indoplanorbis exustus* พบว่าลักษณะเปลือกรูปร่างกลมแบน (planiform) ด้านล่างและด้านบนเว้า ไม่มีปิดเปลือก เปลือกขดเป็น

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วนเวียนซ้าย (sinistral) มี 4 วง เปลือกมีสีน้ำตาลอ่อนเกือบดำ ปากยื่น มีหนวด 2 เส้น ตาอยู่ใต้ผิวหนังบริเวณหัวไม่มีก้านตา (eye stalk) อาศัยอยู่ทั่วไปตามแหล่งน้ำจืดในคลอง คูน้ำ บ่อน้ำ อ่างเก็บน้ำ นาข้าว และสามารถอยู่ในน้ำที่ระดับออกซิเจนมากหรือในน้ำที่มีออกซิเจนน้อยมาก (Grzimek, 1972; Brandt, 1974)

การศึกษาด้านชีววิทยาของ *Indoplanorbis exustus* ในอินเดียพบว่าเมื่ออายุ 6-8 สัปดาห์ หอยจะเริ่มวางไข่ มีจำนวนไข่ 20-60 ฟองต่อครั้ง และไข่จะฟักออกเป็นลูกหอยประมาณ 6-8 วัน (Kathuria*et al*.,1956) สำหรับในประเทศไทย มงคล และคณะ (2511) รายงานว่า อุณหภูมิของน้ำมีผลต่อการวางไข่และฟักไข่ของหอย *Indoplanorbis exustus* โดยที่อุณหภูมิสูงประมาณ 29 องศาเซลเซียส หอยจะวางไข่มาก และไข่จะฟักเป็นลูกหอยเร็ว และที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส หอยจะวางไข่น้อยและฟักเป็นลูกหอยช้า ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Goel and Parshar (1979) ที่พบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *Indoplanorbis exustus* ในขณะที่ดวงขวัญ (2520) ทำการศึกษาชีววิทยาบางประการของ *Indoplanorbis exustus* พบว่าหอยชนิดนี้มีการผสมพันธุ์ 2 แบบ คือ แบบผสมในตัวเดียวกันและผสมข้ามตัว

หอย *Indoplanorbis* sp. จัดเป็นหอยศัตรูพืชที่พบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำในลำคลอง แหล่งน้ำนิ่ง อ่างเก็บน้ำ พบได้ทั้งในสมีปริมาณออกซิเจนต่ำและสูง อาศัยเกาะอยู่ตามวัตถุต่างๆ ในน้ำ รวมทั้งพรรณไม้น้ำชนิดต่างๆ (ดวงขวัญ, 2520; Grzimek, 1972) โดยกัดกินใบและส่วนต่างๆ ของพรรณไม้น้ำเป็นอาหาร ทำให้พรรณไม้น้ำไม่สมบูรณ์เป็นปัญหาแก่เกษตรกรผู้เพาะขยายพรรณไม้น้ำ ทำให้ไม่สามารถจำหน่ายได้หรือจำหน่ายได้ในราคาต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าเป็นปัญหาด้านการส่งออก เนื่องจากไข่หอยมีลักษณะเป็นวุ้นใสและมีขนาดเล็ก หากติดไปกับส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชส่งออกและมีการตรวจพบจะถูกทำลายทิ้งส่งผลต่อเกษตรกรผู้ส่งออกโดยตรงประกอบกับข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับหอย *Indoplanorbis* sp. ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในแง่ของการเป็นโฮสต์ของปรสิต ยังขาดข้อมูลด้านการเป็นสัตว์ศัตรูพืช ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาด้านการแพร่กระจาย รวมถึงวงชีวิตของหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปวิจัยเพื่อการป้องกันกำจัดและควบคุมหอยน้ำศัตรูพรรณไม้น้ำต่อไป

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. เครื่องระบุพิกัด GPS

2. อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างและเพาะเลี้ยงหอยน้ำ ได้แก่ กล่องพลาสติกขนาด 10x10x5.5, 15.5x22x7 เซนติเมตร จำนวน 80 กล่อง ตู้เลี้ยงขนาด 25x40x26 เซนติเมตร (พร้อมฝาปิด) จำนวน 20 ตู้

3. พรรณไม้น้ำ ได้แก่ ใบพาย *Cryptocoryne* sp. อเมซอน *Echinodorus* sp. หญ้าเทเนลูส *Echinodorus tenellus* สาหร่าย *Cabomba* sp. สาหร่าย *Egeria* sp. อนูเบียส *Anubias* sp. ชบาน้ำ *Aponogeton* sp. บัวประดับ *Nymphaea* sp. และสาหร่ายพุงชะโด

4. อาหารปลาชนิดเม็ดสำหรับเลี้ยงหอยน้ำ

5. สารเคมี ได้แก่ แอลกอฮอล์

6. อุปกรณ์วัดขนาดตัวอย่าง ได้แก่ เวอร์เนีย สายวัด ไม้บรรทัด

7. อุปกรณ์ประกอบการถ่ายภาพ ได้แก่ กล้องถ่ายภาพดิจิทัล กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

8. อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ จานแก้ว เทอร์โมมิเตอร์ สไลด์ กระจกปิดสไลด์ แว่นขยาย พู่กัน กระชอน ถุงมือแพทย์

- วิธีการ

<u>1. สำรวจ เก็บตัวอย่าง จำแนกชนิด และเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ</u> (ดำเนินการในปี 2560)

1.1 สำรวจและเก็บตัวอย่างหอยสกุล *Indoplanorbis* ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ บ่อไม้ประดับ และแปลงเพาะขยายพรรณไม้น้ำของเกษตรกรในพื้นที่ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ของประเทศไทย

1.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง ดำเนินการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ที่กำหนด โดยแบ่งเก็บพื้นที่ละ 5 จุด ตามขอบตลิ่ง พื้นดินขอบบ่อ และพันธุ์พืชน้ำ

<u>การบันทึกข้อมูล</u> :

- บันทึกพิกัดการกระจายของหอยสกุล *Indoplanorbis* โดยเครื่อง GPS และนำมาทำแผนที่การกระจายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม Arch view

- บันทึกชนิดพันธุ์ไม้น้ำที่พบในบริเวณแหล่งน้ำที่หอยสกุล *Indoplanorbis* อาศัยอยู่ บันทึกลักษณะทางภูมิศาสตร์ของพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง

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

1.3 การเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เพื่อนำตัวอย่างมาจำแนกชนิด โดยเลี้ยงในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร เตรียมตู้กระจกขนาด 25x40x26 เซนติเมตร ใส่น้ำสะอาดสูง 15 เซนติเมตร จำนวน 100 ตัว/ตู้ ใส่สาหร่ายพุงชะโดลงไปเพื่อเป็นที่เกาะอาศัยของหอย เลี้ยงหอยด้วยอาหารปลาชนิดเม็ด

1.4 จำแนกชนิดของหอยสกุล *Indoplanorbis* โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกการจำแนกชนิดยึดตามเอกสารของ Brandt (1974) และ Nabhitabhata (2009)

<u>บันทึกข้อมูล</u> :

- บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก เช่น ลักษณะรูปร่าง สี และลวดลายบนเปลือก ตรวจดูรายละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

กรมวิชาการเกษตร

- บันทึกความกว้างและความสูงของเปลือก ความกว้างของวงรอบเปลือกความกว้างขนาดของปากเปิดเปลือก

2. ศึกษาชีววิทยาบางประการของหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* (ดำเนินการในปี 2560-2561)

2.1 ศึกษาศักยภาพการกินของหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* (ดำเนินการปี 2560)

(2.1.1) คัดเลือกพรรณไม้น้ำเพื่อใช้เป็นพืชอาหารในแต่ละกรรมวิธี โดยเก็บตัวอย่างพรรณไม้น้ำที่เกษตรกรนิยมปลูกเพื่อการค้าและการส่งออกที่สำคัญ 8 ชนิด ได้แก่ ใบพาย *Cryptocoryne* sp. อเมซอน *Echinodorus* sp. หญ้าเทเนลูส *Echinodorus tenellus* สาหร่าย *Cabomba* sp. สาหร่าย *Egeria* sp. อนูเบียส *Anubias* sp. ชบาน้ำ *Aponogeton* sp. และบัวประดับ *Nymphaea* sp.

(2.1.2) ศึกษาศักยภาพการกิน โดยเปรียบเทียบอัตราการกินของหอยชนิดเดียวกันต่อพืชอาหารแต่ละชนิด วางแผนการทดลองแบบ RCB 5 ซ้ำๆ 8 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 อนูบีส *Anubias* sp. น้ำหนัก 5 กรัม ต่อหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* 5 ตัว

กรรมวิธีที่ 2 สาหร่าย *Cabomba* sp. น้ำหนัก 5 กรัม ต่อหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* 5 ตัว

กรรมวิธีที่ 3 สาหร่าย *Egeria*sp. น้ำหนัก 5 กรัม ต่อหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* 5 ตัว

กรรมวิธีที่ 4 ใบพาย *Cryptocoryne* sp. น้ำหนัก 5 กรัม ต่อหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* 5ตัว

กรรมวิธีที่ 5 บัวประดับ *Nymphaea* sp. น้ำหนัก 5 กรัม ต่อหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* 5 ตัว

กรรมวิธีที่ 6 อเมซอน *Echinodorus* sp. น้ำหนัก 5 กรัม ต่อหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* 5 ตัว

กรรมวิธีที่ 7 หญ้าเทเนลูส *Echinodorus tenellus* น้ำหนัก 5 กรัม ต่อหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* 5ตัว

กรรมวิธีที่ 8 ชบาน้ำ *Aponogeton* sp. น้ำหนัก 5 กรัม ต่อหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* 5 ตัว

(2.1.3) วิธีปฏิบัติการทดลอง เตรียมกล่องพลาสติกขนาด 15.5 x 22 x 7 เซนติเมตร เติมน้ำสะอาดให้สูงจากพื้นกล่อง 5 เซนติเมตร คัดเลือกหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* จำนวน 5 ตัว/กล่อง ขนาดใกล้เคียงกัน นำพืชอาหารที่เตรียมไว้มาตัดส่วนใบที่ติดกับลำต้น นำมาทดลองตามกรรมวิธี ทำการเปลี่ยนอาหารทุกวัน นำอาหารที่เหลือแต่ละวันชั่งน้ำหนัก สังเกตการกินทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบอัตราการกินพืชอาหารแต่ละชนิดของหอย วิเคราะห์ค่าความสามารถในการกินพืชโดยวิธีทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99%

กรมวิชาการเกษตร

การวิเคราะห์ข้อมูล : นำข้อมูลมาคำนวณค่าความสามารถในการกินพืชอาหารคำนวณค่าความสามารถในการกินพืชของหอยโดยดัดแปลงจาก Wong *et al*., (2010) ดังนี้

(1) ค่าความสามารถในการกินพืช

น้ำหนักพืชอาหารในวันแรก – น้ำหนักพืชอาหารหลังเวลาผ่านไป

จำนวนวัน

(2) อัตราการกินพืชต่อตัว

น้ำหนักของพืชอาหารก่อนการทดลอง - น้ำหนักของพืชอาหารหลังทดลอง

จำนวนหอย (ตัว)

การบันทึกข้อมูล :

- บันทึกพฤติกรรมการกินพืชอาหารแต่ละชนิด
- บันทึกน้ำหนักพืชอาหารหลังจากให้หอยกินในแต่ละวัน

2.2 ศึกษาวงชีวิต การผสมพันธุ์ และวางไข่ (ดัดแปลงจาก ดวงขวัญ (2520)) (ดำเนินการปี 2561) โดยนำหอยที่ได้การเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ มาดำเนินการศึกษา

(2.2.1) ศึกษาวงชีวิตหอยสกุล *Indoplanorbis* ดังนี้

- แยกไข่รุ่นที่ 1 แต่ละกลุ่มมาเลี้ยงในจานแก้ว (petri-dish) ใส่น้ำประมาณ 50 มิลลิเมตร เปลี่ยนน้ำทุกวัน จนกระทั่งไข่เริ่มฟักเป็นลูกหอย บันทึกวันที่ไข่เริ่มฟัก จนกระทั่งฟักเป็นลูกหอยทั้งหมด
- ย้ายลูกหอยมาเลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาด 10x10x 5.5 เซนติเมตร ใส่สาหร่ายพุงชะโด และเติมน้ำให้สูงจากพื้นกล่อง 3.5 เซนติเมตร
- เมื่ออายุครบ 2 สัปดาห์ แยกเลี้ยงในกล่องพลาสติก ขนาด 15.5x22x7 เซนติเมตร จำนวน 5 ตัว/กล่อง เติมน้ำสะอาดให้สูงจากพื้นกล่อง 5 เซนติเมตร ใส่สาหร่ายพุงชะโด จนกระทั่งหอยวางไข่และฟักเป็นลูกหอย ทดลองซ้ำดังกล่าวข้างต้นจนถึงรุ่นที่ 3
- ระยะเวลาการเจริญเติบโตในแต่ละช่วงอายุ
- ลักษณะภายนอกของไข่และลูกหอย

(2.2.2) ศึกษาการผสมพันธุ์ของหอยสกุล *Indoplanorbis*

- แยกไข่รุ่นที่ 1 มาเลี้ยงในจานแก้วใส่น้ำประมาณ 50 มิลลิลิตร เปลี่ยนน้ำทุกวัน จนกระทั่งไข่เริ่มฟักเป็นลูกหอย แยกลูกหอยไปเลี้ยงเพื่อศึกษาการผสมพันธุ์ภายในตัวเองและผสมข้ามตัว
- ศึกษาการผสมพันธุ์ภายในตัวเอง (self-fertilization) โดยแยกลูกหอยอายุ 3 วันมาเลี้ยงเดี่ยว ตามวิธีการข้อ (2.2.1) เมื่อหอยเริ่มวางไข่ บันทึกจำนวนครั้งและจำนวนไข่ที่วางแต่ละครั้ง และอัตราการรอดของไข่ที่ฟักจนหอยมีอายุ 14 สัปดาห์

กรมวิชาการเกษตร

- ศึกษาการผสมพันธุ์ข้ามตัว (cross-fertilization) แยกลูกหอยอายุ 3 วันมาเลี้ยงเป็นคู่ โดยศึกษาและบันทึกผลเช่นเดียวกับการผสมพันธุ์ภายในตัว

2.3 ศึกษาการเจริญเติบโต (ดำเนินการปี 2561)

นำตัวอย่างหอยที่ฟักตัวจากข้อ (2.2.1) มาวัดขนาดและบันทึกลักษณะต่างๆ ดังนี้ ความกว้างของลำตัว (body width) ความสูง (height) ความกว้างของปาก จำนวนวง และชั่งน้ำหนัก โดยศึกษาสัปดาห์ละ 1 ครั้ง นำมาสร้างกราฟวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโต

- เวลาและสถานที่

ดำเนินการทดลองตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2561 โดยเก็บตัวอย่างและรวบรวมข้อมูลการแพร่กระจายของหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* จากแหล่งน้ำจืดตามธรรมชาติและบ่อเลี้ยงพรรณไม้น้ำจากทุกภาคในประเทศไทย นำมาเพาะเลี้ยง วิเคราะห์ชนิด ศึกษาชีววิทยา และวงจรชีวิต ณ ห้องปฏิบัติการและโรงเรือน กลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

-การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis*

ได้ดำเนินการสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ แหล่งน้ำที่มนุษย์สร้างขึ้นเพื่อการเกษตร และบ่อเลี้ยงพรรณไม้น้ำจากทุกภาคในประเทศไทย นำมาศึกษาลักษณะและจำแนกชนิดตามระบบอนุกรมวิธานของหอยตามเอกสารของ Brandt (1974) และ Nabhitabhata (2009) พบหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* จำนวน 1 ชนิด ดังนี้

Phylum Mollusca

Class Gastropoda (Cuvier, 1804)

Subclass Euthyneura (Sperael, 1881)

Order Neogastropoda (Wenz, 1941)

Superfamily Ancylacea (Brown, 1844)

Family Bulinidae (Baker, 1821)

Genus *Indoplanorbis* (Annadale and Prashad, 1920)

Specific epithet *exustus*

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Indoplanorbis exustus* (Deshayes, 1834)

ชื่อพ้อง : *Planorbis exustus* (Deshayes, 1834)

ชื่อท้องถิ่น : หอยเลขหนึ่งจิ๋ว หอยคัน

ชื่อสามัญ : Freshwater ramhorn, Ram's horn snail

ลักษณะสำคัญ

กรมวิชาการเกษตร

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของเปลือกหอยน้ำ *Indoplanorbis exustus* (Deshayes, 1834) พบว่า เปลือกมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ลักษณะเปลือกมีรูปร่างกลมและแบนคล้ายเหรียญ (discoidal shell, planiform) ด้านล่างและด้านบนเว้า มีรอยบุ๋มตรงกลางทั้งสองด้าน ความกว้างเปลือก (Shell width; SW) เฉลี่ย 6.21 มิลลิเมตร ความสูง เปลือก (Shell height; SH) เฉลี่ย 12.01 มิลลิเมตร เปลือกขดวนเป็นวงในระนาบเดียวกัน เปลือกเวียนซ้าย (sinistral) เป็นเกลียว 3 – 4 ชั้น ปากเปิดเปลือก (apeture) บานออกเล็กน้อย และไม่มีฝาปิด (non operculum) (Figure 2.1.5.1) เป็นที่ยื่นออกมาของหัวและเท้า (head and foot) มีหนวดเรียวยาว 2 เส้น มีตา 1 คู่บริเวณหัว ไม่มีก้านตา (eye stalk)

ถิ่นที่อยู่อาศัย

หอยน้ำ *Indoplanorbis exustus* (Deshayes, 1834) อาศัยอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำจืดในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย ได้แก่ คลอง บึง นาข้าว อ่างเก็บน้ำทางการเกษตรกรรม ร่องน้ำในสวนกล้วยไม้ของเกษตรกร และอ่างเลี้ยงไม้น้ำประดับ โดยพบเกาะอยู่ตามพืชน้ำ ได้แก่ ผักตบชวา สาหร่าย รวมถึงพืชน้ำชนิดอื่นๆ และยังพบอาศัยอยู่ที่พื้นดินในน้ำริมตลิ่ง

การแพร่กระจาย

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2561 ได้ตัวอย่างหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* จำนวน 651 ตัว (Table 2.1.5.1) พบในกระจายในแหล่งน้ำจืดทั่วทุกภาคของประเทศไทย ดังนี้

1. ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดปทุมธานี ลพบุรี สุพรรณบุรี และเพชรบูรณ์
2. ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พะเยา
3. ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดราชบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และกาญจนบุรี
4. ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา ศรีสะเกษ อุบลราชธานี มหาสารคาม เลย และชัยภูมิ
5. ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดสระแก้ว ระยอง และชลบุรี
6. ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี

-การศึกษาศักยภาพการกินของหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis*

นำหอยน้ำ *Indoplanorbis exustus* (Deshayes, 1834) มาศึกษาศักยภาพการกินไม้น้ำประดับ 8 ชนิด โดยพบว่า *Indoplanorbis exustus* (Deshayes, 1834) 1 ตัว มีอัตราการกินดังนี้ คือ อนูบีส *Anubias* sp. 0.029 กรัม/วัน สาหร่าย *Cabomba* sp. 0.137 กรัม/วัน สาหร่าย *Egeria* sp. 0.423 กรัม/วัน ใบพาย *Cryptocoryne* sp. 0.423 กรัม/วัน บัวประดับ *Nymphaea* sp. 0.129 กรัม/วัน อเมซอน *Echinodorus* sp. 0.011 กรัม/วัน หญ้าเทเนลูส *Echinodorus tenellus* 0.02 กรัม/วัน และชบาน้ำ *Aponogeton* sp. 0.282 กรัม/วัน ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ศูนย์วิทยทรัพยากร

-วงชีวิตของหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* ในห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาการวางไข่ของหอยในห้องปฏิบัติการ พบว่าหอยสกุลนี้ออกไข่เป็นกลุ่ม แต่ละกลุ่มมีจำนวนไข่ตั้งแต่ 10 ถึง 25 ฟอง มีเมือกหุ้มรอบ กลุ่มไข่มีสีน้ำตาลออกแดง (Figure 2.1.5.2) ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มไข่ของ *Radix* ที่มีลักษณะใสมากกว่า หอยจะเจริญและเริ่มสามารถวางไข่ได้อีกครั้งหลังผ่านไปประมาณ 25-50 วัน ช่วงชีวิตเฉลี่ยมีค่าเท่ากับประมาณ 115 วัน แต่ละตัวสามารถออกไข่ได้มากกว่า 10 ครั้งตลอดช่วงอายุของมัน เมื่อเติบโตเต็มที่เปลือกจะมีความกว้าง 8 ถึง 21 มิลลิเมตร ความกว้าง 6 ถึง 11 มิลลิเมตร

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

หอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* เป็นหอยน้ำจืดฝาเดียว อาศัยอยู่ทั่วไปตามแหล่งน้ำจืด คลอง หนองน้ำ บึง นาข้าว อ่างเก็บน้ำ แปลงปลูกไม้น้ำ และแหล่งน้ำนิ่งทั่วไปในประเทศไทย จากการสำรวจการแพร่กระจายตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2561 ได้ตัวอย่างหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* จำนวน 651 ตัว จาก 18 จังหวัด จำแนกชนิดได้ 1 ชนิด คือ *Indoplanorbis exustus* (Deshayes, 1834) นำมาศึกษาศักยภาพการกินโดยเปรียบเทียบอัตราการกินพืชอาหาร 8 ชนิด ได้แก่ ใบพาย *Cryptocoryne* sp. อเมซอน *Echinodorus* sp. หญ้าเทเนลูส *Echinodorus tenellus* สาหร่าย *Cabomba* sp. สาหร่าย *Egeria* sp. อนูเบียส *Anubias* sp. ชบาน้ำ *Aponogeton* sp. และบัวประดับ *Nymphaea* sp. พบว่าอัตราการกินพืชอาหารทุกชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หอยชนิดนี้ออกไข่เป็นกลุ่มมีเมือกล้อมรอบ มีวงชีวิตประมาณ 115 วัน สามารถสืบพันธุ์ให้ลูกมากกว่า 10 ครอกต่อวงชีวิต

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

พัฒนาต่อ สามารถนำไปใช้ประโยชน์กับกลุ่มเป้าหมาย ได้แก่ เกษตรกรผู้ปลูกไม้น้ำ หน่วยงานของรัฐผู้มีหน้าที่รับผิดชอบ เช่น กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร มหาวิทยาลัย นักวิชาการ และผู้สนใจ

กรมวิชาการเกษตร

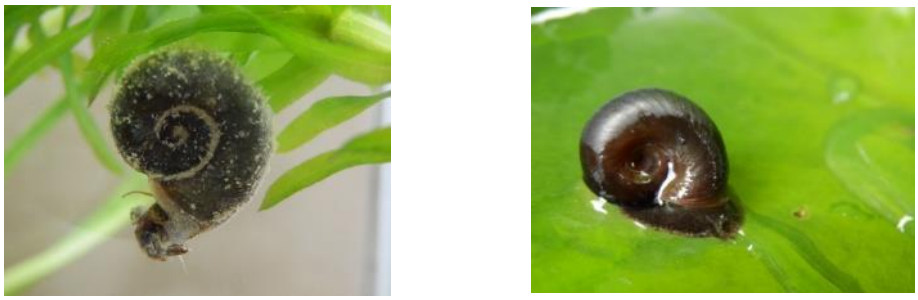
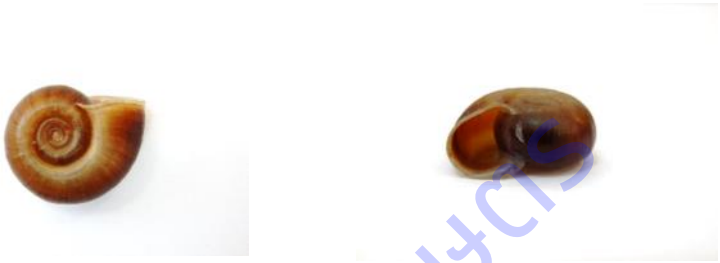


Figure 2.1.5.1 แสดงหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* ขณะลอยตัวอยู่ในน้ำ (1) และเกาะอยู่บนใบบัว (2)



(1) (2)

Figure 2.1.5.2 เปลือกของ *Indoplanorbis* sp. มีรูปร่างคล้ายเหรียญกลม (discoidal shell) (1) และปากเปิดเปลือก (an apertural view of a shell) (2)

Figure 2.1.5.3 ลักษณะไข่ของหอย *Indoplanorbis* sp.

กรมวิชาการเกษตร

Table 2.1.5.1 การแพร่กระจายของ *Indoplanorbis* ในประเทศ

ชนิด	เขตการแพร่กระจาย	จำนวนตัวอย่าง	แหล่งเก็บตัวอย่าง
Indoplanorbis sp.	กาญจนบุรี	18	ร่องน้ำแปลงปลูกกล้วยไม้
	ราชบุรี	19	อ่างเก็บน้ำ
	เพชรบุรี	50	สระบัว บึง อ่างเก็บน้ำ
	ปทุมธานี	25	กระถางไม้น้ำประดับ
	นครราชสีมา	22	อ่างเก็บน้ำ กระถางไม้น้ำประดับ
	สุพรรณบุรี	19	อ่างเก็บน้ำ นาข้าว
	สระแก้ว	58	อ่างเก็บน้ำ กระถางไม้น้ำประดับ
	ปราจีนบุรี	31	กระถางไม้น้ำประดับ นาข้าว
	นครนายก	1	นาข้าว
	ระยอง	43	อ่างเก็บน้ำ
	สกลนคร	35	กระถางไม้น้ำประดับ สระบัว
	นครพนม	28	กระถางไม้น้ำประดับ
	เลย	63	อ่างเก็บน้ำ กระถางไม้น้ำประดับ
	มหาสารคาม	15	อ่างเก็บน้ำ บึง
	อุบลราชธานี	42	แม่น้ำ บึง กระถางไม้น้ำประดับ
	เชียงราย	29	กระถางไม้น้ำประดับ สระบัว
	ตาก	23	นาข้าว กระถางไม้น้ำประดับ บึง
	เพชรบูรณ์	18	อ่างเก็บน้ำ
	ชุมพร	35	กระถางไม้น้ำประดับ
	ประจวบคีรีขันธ์	23	กระถางไม้น้ำประดับ
	ชัยภูมิ	12	อ่างเก็บน้ำ บึง
	กรุงเทพมหานคร	42	กระถางไม้น้ำประดับ

กรมอำการเกษตร

การทดลองที่ 2.1.6 ชีววิทยา การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Radix*

Biology, geographical distribution and genetic diversity of aquatic pest snail *Radix*

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ดาราพร รินทะรักษ์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ณัฐฐิญา กาญจนนิธิพัฒน์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ปราสาททอง พรหมเกิด	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ไตรเดช ข่ายทอง	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ดำเนินการศึกษาชีววิทยา การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Radix* ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2561 ได้ตัวอย่างหอย *Radix* ทั้งหมด 80 ตัวอย่างจาก 8 จังหวัด (ตาก ยโสธร อุบลราชธานี ศรีสะเกษ นครราชสีมา สุพรรณบุรี นครปฐม และกาญจนบุรี) พบว่า 71 ตัวอย่างคือ *R. rubiginosa* และอีก 9 ตัวอย่างคือ *R. swinhoei* ผลจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมสอดคล้องกับการระบุชนิดหอย *Radix* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี NJ ML และ BI อย่างไรก็ตามมีความจำเป็นต้องศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของหอยชนิดนี้เพื่อให้เข้าใจถึงพฤติกรรมเชิงนิเวศวิทยาซึ่งมีความจำเป็นต่อการวางแผนจัดการและการกำจัด

Biology, geographical distribution and genetic diversity of aquatic pest snail *Radix* were elucidated from October 2016 to September 2017. Totally 80 specimens of *Radix* were collected from 8 provinces (Tak, Yasothon, Ubon Ratchathani, Sisaket, Nakhon Ratchasima, Suphanburi, Nakhon Pathom, and Kanchanaburi). 7 1 samples were morphologically identified as *Radix rubiginosa* while 9 samples were *R. swinhoei*. Molecular investigation using *cox*I also confirmed the morphological identification of *Radix* samples. There are two major clades of *Radix* found with more than 50% bootstrapping support (NJ and ML) and more than 0.5 of posterior probability value (BI).

กรมวิชาการเกษตร

Further population genetic research for *Radix* is needed to get ecological insights which is crucial for management and control for this species.

คำนำ

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง เป็นแหล่งที่อยู่ของพันธุ์พืชน้ำหลายชนิดที่มีความสวยงาม สามารถนำมาใช้ประดับตกแต่งตู้ปลา และจัดสวน พรรณไม้น้ำเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ต่างประเทศต้องการและให้ราคาสูง ไม้น้ำประดับสร้างรายได้ให้กับประเทศนับร้อยล้านบาทและมีแนวโน้มที่จะเติบโตต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามอุปสรรคสำคัญของการผลิตไม้น้ำและการส่งออกคือปัญหาการเข้าทำลายจากหอยน้ำศัตรูพืชซึ่งสร้างความเสียหายแก่พรรณไม้น้ำ นอกจากนี้ตัวและไข่หอยยังติดไปกับต้นไม้ ทำให้เสียเวลาในการล้างทำความสะอาดก่อนนำส่งออก ถ้าหากมีการพบเห็นตัวและไข่หอยติดไปกับพรรณไม้น้ำส่งออกจะถูกเผาทำลาย ทำให้ภาพพจน์การส่งออกไม้น้ำของประเทศไทยเสื่อมเสียอีกด้วย

กรมวิชาการเกษตรกำลังทำการวิจัยหอยศัตรูพรรณไม้น้ำ พบว่าหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Radix* (วงศ์ Lymnaeidae) เป็นหนึ่งในชนิดที่มีความสำคัญเนื่องจากสามารถทำความเสียหายแก่พรรณไม้น้ำประดับเป็นอย่างมาก มักพบหอยสกุลนี้ติดไปกับไม้น้ำ และเข้าทำลายโดยการกัดกินใบจนเสียหาย เช่น บัว เป็นต้น และมีถิ่นอาศัยอยู่ในประเทศไทย มักพบตามแหล่งน้ำจืด เช่น หนอง คลอง บึง แม่น้ำ เป็นต้น อีกทั้งมีรายงานว่าเป็นศัตรูเข้าทำลายข้าวในประเทศอินเดีย

หอยสกุล *Radix* จัดอยู่ในวงศ์ Lymnaeidae เป็นหอยน้ำจืดไม่มีฝาปิด สามารถพบได้ทั่วโลก (Hunova *et al*., 2012; Correa *et al*., 2010) ในประเทศไทยพบรายงาน 3 ชนิด ได้แก่ *Radix rubiginosa*, *R. swinhoei* และ *R. luteola* ทุกชนิดสามารถเป็นตัวกลางของพยาธิที่ก่อให้เกิดโรคในคน ดังเช่น *R. swinhoei* เป็นตัวกลางของพยาธิใบไม้ในตับ ทั้ง *I. exustus* และ *Radix* รวมเรียกว่าหอยคัน เนื่องมาจากหอยเหล่านี้เป็นโฮสต์ตัวกลางของพยาธิใบไม้ในเลือดของสัตว์ ซึ่งตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียของพยาธิเหล่านี้สามารถชอนไชผ่านผิวหนังเข้าสู่ร่างกาย แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ทำให้มีผิวหนังอักเสบและมีอาการคัน (วิวิชชุตา, 2549) มีรายงานว่า *R. swinhoei* เข้ากัดกินและก่อให้เกิดความเสียหายแก่บัวหลวง (Tian, 2008) ทางกรมวิชาการเกษตรกำลังดำเนินการศึกษาหอยศัตรูพรรณไม้น้ำและพบว่าหอยสกุล *Radix* นี้เป็นหอยศัตรูพรรณไม้น้ำประดับ (อภินันท์และคณะ, 2557)

มีรายงานการศึกษาการกินพืชน้ำในหอยเชอรี่ *Pomacea canaliculata* โดยศึกษากับพืชน้ำ 21 ชนิดพบว่าอัตราการกินมีค่าตั้งแต่ 1.1 ถึง 22% ของน้ำหนักตัวและมีความแตกต่างกันในพืชน้ำแต่ละชนิด หอยจะชอบกินพืชที่มีไนโตรเจนสูง และหลีกเลี่ยงพืชที่มี ส่วนประกอบแห้ง (dry matter content) สูง และพืชบางชนิดที่มีสารเคมีที่หอยไม่ชอบเช่น สารประกอบฟีนอลิก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในหอยชนิดอื่น เช่น *P. insularum* และ *Lymnaea stagnalis* (Wong *et al*., 2010; Elger and Barrat-Segretain, 2002)

กรมวิชาการเกษตร

มีการศึกษาการกินพืชน้ำในหอย *Radix swinhoei* พบว่า หอยชนิดนี้สามารถกินพรรณไม้น้ำสกุล *Myriophyllum Monochoria Eichhornia Brasenia Cabomba Alternanthera Hydrilla Elodea Ottelia Vallisneria Hydrocharis Potamogeton Egeria Monochoria Utricularia* และสามารถกิน *Pomatogeton malaianus* ได้มากที่สุด (Li *et al*., 2009; Xiong *et al*., 2008)

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยาของหอยน้ำสกุล *Radix* ดังนี้ Gaten (1986) รายงานว่า *Radix peregra* มีอัตราการเจริญของความยาวเปลือกอยู่ระหว่าง 2.41 ถึง 2.86 มิลลิเมตร ต่อระยะเวลา 4 สัปดาห์ วางไข่ตั้งแต่ 11 ถึง 99 ฟองต่อกลุ่ม สืบพันธุ์เพียง 1 รอบต่อปี ต่อมา Bryne et al. (1989) ได้รายงานว่า *R. peregra* มีช่วงชีวิตตั้งแต่ 140 ถึง 728 วัน วางไข่ในช่วงฤดูไม่ใบไม้ผลิและต้นฤดูร้อน หลังจากฟักออกมาจากไข่มีความยาวเปลือก 0.9 ถึง 1.1 มิลลิเมตร ในประเทศไทย กัญญา (2520) ศึกษาชีววิทยาบางประการของ *Radix rubiginosa* พบว่าหอยชนิดนี้กินแพลงก์ตอนพืช แพลงก์ตอนสัตว์ ไดอะตอม พืชดังเช่น สาหร่ายพุงชะโด ผักตบชวา บัวประดับ ผักบุ้ง จอก แหน เป็นต้น มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเป็นตัวเต็มวัยประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนไข่เฉลี่ย 11 ถึง 28 ฟอง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของศัตรูพืชทำให้เข้าใจชีววิทยา นิเวศวิทยา และกระบวนการวิวัฒนาการ (evolution) ในการระบาดบุกรุก (invasion) ของศัตรูพืช การแพร่กระจาย (dispersal) การเปลี่ยนแปลงประชากร (demography) และการปรับตัว (adaptation) ของศัตรูพืชให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ข้อมูลเหล่านี้มีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการจัดการศัตรูพืช (applied pest management) ข้อมูลเชิงพันธุกรรมสามารถใช้เพื่อการระบุชนิดศัตรูพืช (identification of pest species) ใช้ประเมินประสิทธิผล (efficacy) ของการจัดการศัตรูพืชที่เป็นเป้าหมาย (target invasive pest) ดังเช่นการเกิดปรากฏการณ์คอขวด (bottleneck effect) หลังจากการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ทำให้สัดส่วนของศัตรูพืชที่ต้านทานมีมากขึ้น เป็นต้น ใช้ในการอธิบายเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นกับประชากรศัตรูพืช (pest demographic history) และคาดคะเนเส้นทางการบุกรุก (reconstruction of pest invasion route) (Kirk *et al*., 2013)

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมและอณูชีววิทยาของหอยน้ำจืดดังนี้ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อระบุชนิดของหอยในวงศ์ Lymnaeidae ในประเทศไทย (Kaset et al., 2010) หอยในวงศ์ Lymnaeidae จากหลายทวีป (Correa *et al*., 2010) และในประเทศเวียดนาม (Dung *et al*., 2013) หอยในวงศ์ Bithyniidae (Kulsantiwong *et al*., 2013) มีการใช้เทคนิค real-time PCR ในการแยกชนิดหอยในวงศ์ Lymnaeidae ในประเทศอาร์เจนตินา (Duffy *et al*., 2009) นอกจากนี้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยน้ำ *Physella acuta* เพื่อตอบคำถามว่ามีพาหะใดบ้างที่นำพาหอยชนิดนี้ไปแพร่กระจายไปยังสถานที่อื่น (Van Leeuwen et al., 2013) จากการศึกษาหอย *Radix balthica* พบว่าหลายปัจจัยเช่นการเกิด local drift และภูมิอากาศมีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม (Pfenninger *et al*., 2011) ต่อมา Haun *et al*. (2012) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *R. bathica* และพบว่าการเข้าไปตั้งถิ่นฐาน (colonization) และความแปรปรวนของประชากรย่อย (metapopulation dynamics) มีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม

ศูนย์วิทยทรัพยากร

นอกจากหอย *Radix* จัดเป็นศัตรูพรรณไม้น้ำที่สำคัญแล้ว มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับหอยสกุลนี้ในแง่ของความสำคัญด้านการแพทย์ เนื่องจากหอยชนิดนี้เป็นพาหะของพยาธิหลายชนิด อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลพื้นฐานในด้านของชีววิทยาดังเช่น อนุกรมวิธาน วงจรชีวิต การสืบพันธุ์ แหล่งที่อยู่อาศัยและอาหาร เป็นต้น การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ และความหลากหลายทางพันธุกรรม ทั้งนี้ข้อมูลทางด้าน ชีววิทยา การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยจะทำให้เข้าใจถึงธรรมชาติและพฤติกรรมของหอยน้ำศัตรูพืชชนิดนี้ได้ดียิ่งขึ้น และสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการอ้างอิงเชิงวิชาการ เพื่อการป้องกันกำจัดและมีความจำเป็นต่อการวางแผนเพื่อการจัดการหอยน้ำศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพ (pest management) ต่อไปได้

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

  - กล่องพลาสติกขนาดต่างๆ กระดาษอเนกประสงค์
  - เวอร์เนีย (เครื่องมือวัดขนาดเปลือกหอย)
  - อาหารปลาชนิดเม็ด
  - กล้องถ่ายรูปดิจิตอล
  - สาหร่าย และไม้น้ำ
  - ผักสด
  - เครื่อง UV transilluminator
  - เครื่อง autoclave
  - เครื่อง PCR
  - เครื่องอบความร้อน

- วิธีการ

1) เก็บตัวอย่าง เลี้ยงหอยและศึกษาการแพร่กระจาย

สุ่มเก็บตัวอย่างหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Radix* จากแปลงปลูกและแหล่งน้ำธรรมชาติ บันทึกลักษณะของระบบนิเวศที่เป็นที่อยู่อาศัยของหอย พืชอาหาร วัดค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณออกซิเจน ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ บันทึกข้อมูลการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ โดยการจดบันทึกพิกัดภูมิศาสตร์ อำเภอ จังหวัด สถานที่ สิ่งแวดล้อมและลักษณะถิ่นที่อยู่ของหอย ทำการบันทึกข้อมูลด้วยโปรแกรม Google Earth

2) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและน้ำหนัก

นำหอยที่เก็บตัวอย่างมาได้มาวัดความสูงของเปลือก (จาก apex จนถึงด้านล่างสุดของ aperture) ความยาวของเปลือก ความกว้างของรูเปิด (aperture) จำนวนวง (whorl) ลักษณะ

กรมวิชาการเกษตร

ของเปลือก ชั่งน้ำหนักหอย นำมาสร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างความยาว ความสูงของเปลือกและน้ำหนัก ด้วยวิธี correlation analysis

3) ศึกษาวงจรชีวิต

3.1 นำหอยที่ได้จากในข้อ 13.1 นำหอยมาเลี้ยงเพื่อศึกษาวงจรชีวิตในกล่องพลาสติกขนาด 13 x 13 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร ที่ภายในบรรจุน้ำประมาณ 3 ลิตร พร้อมสาหร่ายหางกระรอก นำไปเลี้ยงในบริเวณที่มีแสง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้อาหารปลาชนิดเม็ดและผักกาดหอมทุก 3 วัน และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำและให้แคลเซียมผงทุก 7 วัน วัดความสูงความยาวของเปลือก น้ำหนัก วัดค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิ

3.2 เมื่อหอยเกิดการผสมพันธุ์และวางไข่ บันทึกจำนวนไข่ต่อกลุ่ม ให้นำไข่มาเลี้ยงในกล่องพลาสติกบรรจุน้ำและสาหร่ายหางกระรอกกล่องใหม่ เมื่อลูกหอยรุ่นที่ 1 ฟักออกมาจากไข่แล้ว นับจำนวน ชั่งน้ำหนักและวัดขนาดลูกหอยที่เกิดขึ้นใหม่ทุกสัปดาห์

3.3 เลี้ยงลูกหอยรุ่นที่ 1 จนกระทั่งเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยและสามารถผสมพันธุ์ได้ ให้ดำเนินการตามข้อที่ 13.3.1 และ 13.3.2 จนกระทั่งเกิดลูกหอยรุ่นที่ 2

4) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเนื้อเยื่อของหอยมาสกัดดีเอ็นเอโดยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ตรวจวัดคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟริซิส โดยเตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% และนำไปใส่ในกล่องที่บรรจุทีบีอีบัฟเฟอร์ ผสมดีเอ็นเอกับสีย้อมในอัตราส่วน 1:5 และนำไปหยอดลงในหลุมของอะกาโรสเจล เปิดให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที นำอะกาโรสเจลมาย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.2 การเพิ่มปริมาณยีน coxI ด้วยพีซีอาร์

ทำการเพิ่มปริมาณยีน coxI ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ของ Folmer et al. (1994) แต่ละไพร์เมอร์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ LCO1490 (5’-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3’) และ HCO2198 (5’-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3’) ปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 50 µl ประกอบด้วยสารเคมีต่อไปนี้

10x buffer	5	µl
10 mM dNTP mix	1	µl
10 µM LCO1490 primer	1.5	µl
10 µM HCO2198 primer	1.5	µl
2 U/µl Taq polymerase	0.5	µl
template DNA (ดีเอ็นเอของหอย)	1	µl

กรมวิชาการเกษตร

น้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ 39.5 µl

นำสารทั้งหมดใส่ในหลอดพีซีอาร์และผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง thermocycler ภายใต้อุณหภูมิดังนี้

- ช่วงเริ่มต้น

95°C เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ

- ช่วงเพิ่มปริมาณ

a) 95°C เป็นเวลา 1 นาที

b) 50°C เป็นเวลา 1 นาที

c) 72°C เป็นเวลา 1 นาที

ทำซ้ำเรียงตามลำดับจาก a) ถึง c) 35 รอบ

- ช่วงสุดท้าย

72°C เป็นเวลา 10 นาที 1 รอบ

หลังจากนั้นนำสารผสมดีเอ็นเอที่ผ่านการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ไปตรวจสอบว่ามีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการเกิดขึ้นหรือไม่ โดยเตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.8% และนำไปใส่ในกล่องที่บรรจุทีบีอีบัฟเฟอร์ ผสมสารผสมดีเอ็นเอกับสีย้อมในอัตราส่วน 1:5 และนำไปหยอดลงในหลุมของอะกาโรสเจล เปิดให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำอะกาโรสเจลมาย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ ถ้ามีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการขนาดประมาณ 600 คู่เบสเกิดขึ้นให้นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสรอการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

4.3 การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated sequencer ที่มีให้บริการโดยบริษัทเอกชนที่รับจ้างอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำไปวิเคราะห์และสร้างสร้างแผนภูมิต้นไม้ต่อไป

4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างแผนภูมิต้นไม้

นำไฟล์ที่ได้จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated sequencer มาวิเคราะห์ และตัดบริเวณสัญญาณรบกวนออก เพื่อให้ได้ไฟล์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน coxI ทุกตัวอย่าง หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงด้วยโปรแกรม MAFFT version 7 (Katoh and Standley, 2013) หลังจากนั้นนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธีการ 3 วิธี ดังนี้

4.4.1 วิธี neighbor-joining

ศูนย์วิทยทรัพยากร

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปสร้างแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 5.1 (Tamura et al., 2011) โดยใช้โมเดล Kimura-2 parameter และทดสอบความเชื่อมั่นของกิ่งด้วยวิธีบูทสแทร็ป 1,000 ซ้ำ

4.4.2 วิธี maximum likelihood

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปทดสอบหาโมเดลที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม jModeltest version 2 (Darriba et al., 2012) และนำไปสร้างแผนภูมิต้นไม้ตามโมเดลที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม PhyML version 3 (Guindon et al., 2010) และทดสอบความเชื่อมั่นของกิ่งด้วยวิธีบูทสแทร็ป 1,000 ซ้ำ

4.4.3 วิธี Bayesian inference

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปสร้างแผนภูมิต้นไม้ตามโมเดลที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม MrBayes version 3.2.1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) โดยตั้งค่า MCMC chain เท่ากับ 10,000,000 รอบ และตัด burn-in ออก 25% ก่อนสร้างแผนภูมิ

นำแผนภูมิที่ได้จากทั้ง 3 วิธีมารวมให้เป็นแผนภูมิเดียว เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Lymnaea* sp. เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม

- การบันทึกข้อมูล

ความสูงของเปลือก (จาก apex จนถึงด้านล่างสุดของ aperture) ความยาวของเปลือก ความกว้างของรูเปิด (aperture) จำนวนวง (whorl) ลักษณะของเปลือก น้ำหนักหอย ลักษณะของระบบนิเวศที่เป็นที่อยู่อาศัยของหอย พืชอาหาร วัดค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณออกซิเจน ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ บันทึกข้อมูลการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ โดยการจดบันทึกพิกัดภูมิศาสตร์ อำเภอ จังหวัด สถานที่ สิ่งแวดล้อมและลักษณะถิ่นที่อยู่ของหอย

- เวลาและสถานที่

ดำเนินการทดลองตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2561 โดยเก็บตัวอย่างหอยสกุล *Radix* ตามธรรมชาติและแปลงปลูกทั่วประเทศไทย นำมาศึกษาชีววิทยา สกัดดีเอ็นเอและทำพีซีอาร์ ณ กลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา และกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ได้ตัวอย่างหอยน้ำศัตรูพืช *Radix* ทั้งหมด 80 ตัวอย่าง จากจังหวัดจังหวัดนครราชสีมาได้ 9 ตัวอย่าง จังหวัดตาก 10 ตัวอย่าง จังหวัดอุบลราชธานี 10 ตัวอย่าง จังหวัดกาญจนบุรี 25 ตัวอย่าง จังหวัดยโสธร 5 ตัวอย่าง จังหวัดสุพรรณบุรี 1 ตัวอย่าง จังหวัดศรีสะเกษ 10 ตัวอย่าง จังหวัดนครปฐม 10 ตัวอย่าง พบว่าหอยที่เก็บได้จากจังหวัดกาญจนบุรีและนครปฐมเป็นหอยชนิด *Radix rubiginosa* และ *R. swinhoei* จังหวัดอื่น ๆ เป็นหอยชนิด *R. rubiginosa* (ภาพที่ 2.1.6.1) พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ (71 จาก 80 ตัวอย่าง คิดเป็น 88.8%) เป็นหอยชนิด *R. rubiginosa* มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้น (9

ศรีวิชัยการเกษตร

จาก 80 ตัวอย่าง คิดเป็น 11.2%) เป็นหอยชนิด *R. swinhoei* หอยชนิด *R. rubiginosa* พบในทุกพื้นที่ที่ทำการศึกษา ขณะที่ *R. swinhoei* พบเพียง 2 จังหวัดจาก 8 จังหวัดที่ทำการศึกษา (ตารางที่ 2.1.6.1)

จากการศึกษาลักษณะกลุ่มไข่ของ *R. rubiginosa* พบว่า กลุ่มไข่ของ *Radix* มีเมือกหุ้มกลุ่มไข่ ไข่มีจำนวนตั้งแต่ 10-40 ฟองต่อกลุ่ม ไข่จะฟักเป็นตัวภายใน 3-6 วัน จากนั้น หอยจะเจริญเติบโตจนสามารถวางไข่ได้ใช้เวลาประมาณ 25-45 วัน เมื่อโตเต็มที่จะมีความยาวเปลือกประมาณ 9 ถึง 35 มิลลิเมตร และมีความกว้างเปลือกประมาณ 6 ถึง 8 มิลลิเมตร

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างหอย 20 ตัวอย่าง และตอนนี้กำลังดำเนินการหาสภาวะที่ดีที่สุดในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน *cox*I พบว่าสภาวะที่ดีที่สุดในการทำพีซีอาร์คือการใช้วงรอบพีซีอาร์ตามอุณหภูมิและช่วงเวลาต่อไปนี้

1) 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
2) 40 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
3) 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 30 วินาที

ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (ภาพที่ 2.1.6.2) แต่ยังมี non-specific product เกิดขึ้นที่ขนาดประมาณ 500 คู่เบสในบางตัวอย่าง จึงต้องมีการปรับสภาวะพีซีอาร์ดังกล่าว ในขั้นตอนที่ 2 (annealing) เพิ่มขึ้นเป็น 45 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที แถบดังกล่าวจึงหายไป

จากการสกัดดีเอ็นเอและทำพีซีอาร์ของยีน *cox*I จากตัวอย่างหอยจำนวน 30 ตัวอย่าง ได้แก่ กาญจนบุรี 6 ตัวอย่าง นครปฐม 6 ตัวอย่าง นครราชสีมา 5 ตัวอย่าง ตาก 5 ตัวอย่าง อุบลราชธานี 5 ตัวอย่าง และศรีสะเกษ 5 ตัวอย่าง พบว่าโมเดลที่เหมาะสมที่สุดสำหรับสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการคือ HKY+G+I จากการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงให้เห็นว่าพบ *Radix* 2 ชนิด ได้แก่ *Radix rubiginosa* (กลุ่ม A) และ *Radix swinhoei* (กลุ่ม B) ซึ่งลักษณะโครงสร้างของแผนภูมิจากการสร้างแผนภูมิด้วยวิธีการ neighbor joining, maximum likelihood และ Bayesian inference พบว่ามีความสอดคล้องกันกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ภาพที่ 2.1.6.3)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

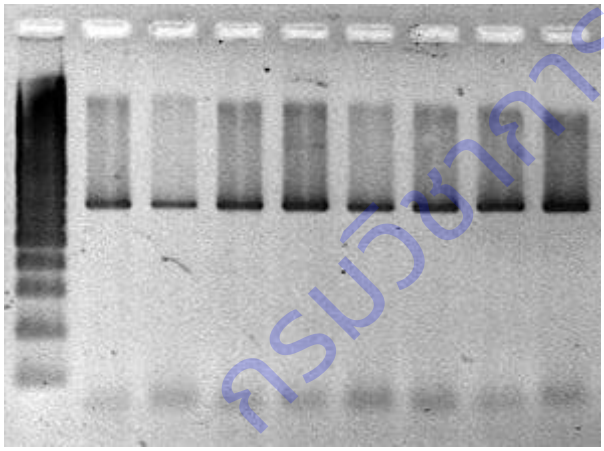
จากการเก็บตัวอย่างหอยสกุล *Radix* ทั้งหมด 80 ตัวอย่าง จาก 8 จังหวัด พบว่าเป็น *Radix rubiginosa* 71 ตัวอย่าง และ *Radix swinhoei* 9 ตัวอย่าง การจำแนกทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกับการใช้ยีน *cox*I ในการสร้างแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการทั้งสามวิธี ทั้งนี้ ควรทำการศึกษาในระดับพันธุศาสตร์ประชากร เพื่อที่จะเข้าใจถึงนิเวศวิทยาเชิงโมเลกุล พฤติกรรม และการแพร่กระจายได้ดียิ่งขึ้น อันจะนำไปสู่การวางแผนการจัดการหอยน้ำศัตรูพืชต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

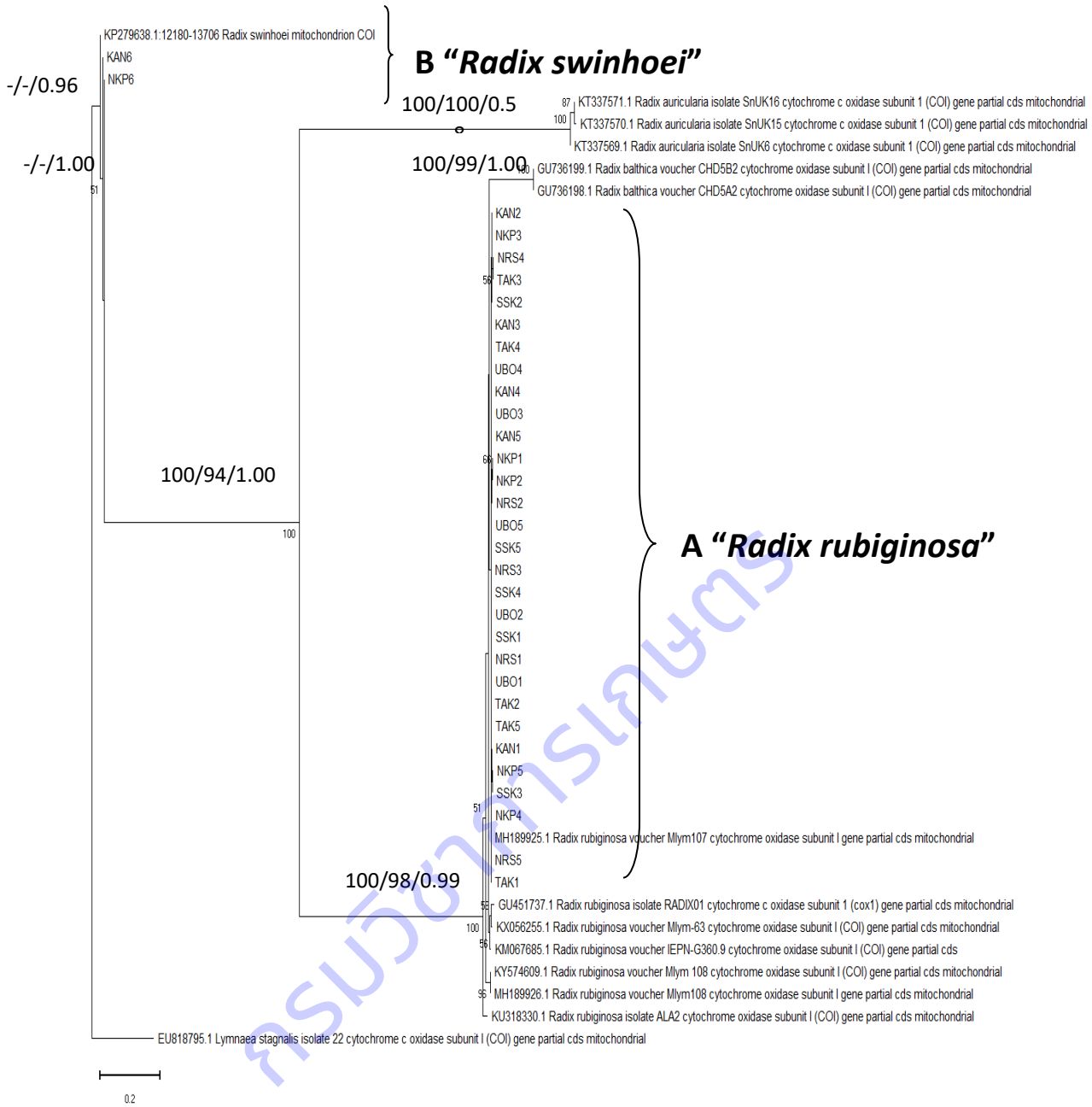
พัฒนาต่อ สามารถนำไปใช้ประโยชน์กับกลุ่มเป้าหมาย ได้แก่ เกษตรกรผู้ปลูกไม้น้ำ หน่วยงานของรัฐผู้มีหน้าที่รับผิดชอบ เช่น กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร มหาวิทยาลัย นักวิชาการ และผู้สนใจ

ภาพที่ 2.1.6.1 หอยศัตรูพืช *Radix rubiginosa*



ภาพที่ 2.1.6.2 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ยีน COI จากตัวอย่างหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Radix* จำนวน 8 ตัวอย่าง (จากซ้ายไปขวา) ตัวอย่าง KAN1-KAN5 และ NKP1-NKP3

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2.1.6 .3 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้ยีน COI ตัวอักษรย่อแทนชื่อตัวอย่างจากแต่ละจังหวัดดังนี้ KAN = กาญจนบุรี, NKP = นครปฐม, TAK = ตาก, NRS = นครราชสีมา , UBO= อุบลราชธานี และ SSK = ศรีสะเกษ ตัวเลขเอียงตัวแรกแทนค่า bootstrap ประจำกิ่ง ด้วยวิธี neighbor joining จำนวน 1,000 รอบ ตัวเลขเอียงตัวกลางแสดงค่า bootstrap ประจำกิ่ง ด้วยวิธี maximum likelihood จำนวน 1,000 รอบ และตัวเลขเอียงท้ายสุดแสดงค่า posterior probablility ประจำกิ่ง ด้วยวิธี bayesian inference

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2.1.6.1 ชนิดและจำนวนหอยน้ำจืดศัตรูพืชสกุล *Radix* ที่สำรวจพบในแหล่งน้ำจืดในจังหวัดต่าง ๆ

จังหวัด	***Radix***	
	R. rubiginosa	***R. swinhoei***
ภาคเหนือ		
ตาก	10	
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ		
ยโสธร	5	
อุบลราชธานี	10	
ศรีสะเกษ	10	
นครราชสีมา	9	
ภาคกลาง		
สุพรรณบุรี	1	
นครปฐม	6	4
ภาคตะวันตก		
กาญจนบุรี	20	5

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.1.7 ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ฤดูการระบาด ของหนอนแดงในฝรั่ง และพุทรา

สัญญาณี ศรีคชา[1/] กรกต ดำรักษ์[1] สุนัดดา เชาวลิต[2/]
[1/]กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ฤดูการระบาด ของหนอนแดงในฝรั่ง และพุทรา ทำการเก็บรวมรวมผลชมพู่ ฝรั่ง และพุทราจากจังหวัดนครปฐม ราชบุรี และสมุทรสาครที่ถูกหนอนแดงเข้าทำลายมาเลี้ยงต่อในห้องปฏิบัติการ การศึกษาวงจรชีวิตของหนอนแดงในฝรั่ง และพุทรา ดำเนินการศึกษาในระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2559 ถึง เดือนมีนาคม 2560 ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรุงเทพมหานคร โดยมีอุณหภูมิเฉลี่ย 25.50±1.23 ^{0}C และความชื้นสัมพันธ์เฉลี่ย 85.04±0.91 % RH พบว่าตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็กสีน้ำตาล อายุ 5-8 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ บนผลฝรั่ง ผลพุทรา ดอกและผลชมพู่ ผลละ 1-2 ฟอง ไข่สีขาวใส ผิวเป็นมันสะท้อนแสง รูปร่างกลมรี มีขนาดค่อนข้างเล็ก ขนาดกว้าง 0.1 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 0.15 มิลลิเมตร ระยะไข่ 2-3 วัน เฉลี่ย 2.49±0.44 วัน หนอนระยะแรกสีขาวแล้วค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีแดง ระยะหนอน 9-12 วัน เฉลี่ย 11.78±0.56วัน หนอนที่โตเต็มที่จะเจาะออกจากผลและเข้าดักแด้ในดิน โดยนำดินมาทำเป็นรังเพื่อห่อหุ้มตัว ดักแด้อาศัยอยู่ในดินลึกประมาณ 2.0 เซนติเมตร หรืออยู่ได้ใต้ใบไม้ที่ร่วงหล่นอยู่รอบๆ โคนต้น ระยะดักแด้ 8-9 วัน เฉลี่ย 8.46±0.84วัน

การศึกษาระยะการเข้าทำลายของหนอนแดงในชมพู่ ฝรั่ง และพุทรา ดำเนินการศึกษาในปี พ.ศ. 2561 ในชมพู่พันธุ์ทับทิมจันทร์ อายุ 6 ปี ที่ตำบลคลองจินดา อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม พบหนอนแดงเข้าทำลายชมพู่ที่ผลอายุ 21, 28, 35 และ 42 วัน โดยพบการทำลายของหนอนแดง 50, 80, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนฝรั่งพันธุ์แป้นสีทอง อายุ 4 ปี ที่ตำบลคลองจินดา อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม พบหนอนแดงเข้าทำลายฝรั่งที่ผลอายุ 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91 และ 98 วัน โดยพบการทำลายของหนอนแดง 55, 60, 70, 85, 90, 90, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพุทรา ที่ตำบลบ้านเกาะ อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร พบหนอนแดงเข้าทำลายพุทราที่ผลอายุ 70, 77, 84, 91, 98, 105 และ 112 วัน โดยพบการทำลายของหนอนแดง 10, 45, 50, 75, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

คำหลัก: ชีววิทยา นิเวศวิทยา ฤดูการระบาด หนอนแดง

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

หนอนแดง (Fruit boring caterpillar; *Meridarchis scyrodes* Meyrich) จัดอยู่ในอันดับ Lepidoptera วงศ์ Carposinidae ตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก มีสีน้ำตาลอมเทา ผีเสื้อวางไข่บนดอกและผลชมพู่ ไข่มีสีขาวใส ผิวเป็นมันสะท้อนแสง รูปร่างกลมรี มีขนาดค่อนข้างเล็ก ขนาดกว้าง 0.1 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 0.15 มิลลิเมตร จากนั้นหนอนเจาะกินดอกและผล ทำให้ดอกร่วงก่อนที่จะติดผล และถ้าทำลายในระยะผล ทำให้ผลร่วงก่อนที่เก็บเกี่ยวได้ หนอนกัดกินเนื้อภายในดอกและผลแล้วขับถ่ายไว้เป็นเม็ดกลมๆ เล็กๆ ทำให้สกปรกและดอกร่วง ผลเน่าได้ ตัวหนอนมีสีขาวและค่อยๆมีสีชมพูแดง สีเข้มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อหนอนโตเต็มที่ มีสีแดงอมชมพูเล็กน้อย ระยะหนอนเป็นระยะเดียวที่ทำลายชมพู่ ดักแด้มีรูปร่างยาวรี สีน้ำตาล ลำตัวส่วนท้องเป็นปล้องๆ ตามแนวขวางสีน้ำตาลอ่อนและสีเข้มขึ้นเรื่อยๆ จนออกเป็นตัวเต็มวัย ระยะดักแด้ไม่เคลื่อนไหว อาศัยอยู่ในดินลึกประมาณ 2 เซนติเมตร หรืออยู่ใต้ใบไม้ที่ร่วงหล่นอยู่โคนต้นชมพู่ รอบๆ ต้นนั้นๆ การทำลายอาจรุนแรง 80-100% แมลงชนิดนี้สามารถเข้าทำลายตั้งแต่ชมพู่ยังเป็นดอกตูม พืชอาหาร ชมพู่ พุทรา และฝรั่ง ยังสำรวจไม่พบศัตรูธรรมชาติ การป้องกันกำจัดหนอนแดงในชมพู่ใช้สารฆ่าแมลง diflubenzuron 25% WP อัตรา 30 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร หรือ triazophos 40% EC อัตรา 30 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นช่วงเริ่มแทงดอก 1 ครั้งและช่วงดอกตูม 1 ครั้ง และพ่นหลังติดผล 2-3 ครั้ง จนห่อผลหมด (กองกีฏและสัตววิทยา, 2542) ส่วนในพุทราใช้สารฆ่าแมลง diflubenzuron 25% WP อัตรา 30 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร หรือ triazophos 40% EC อัตรา 30 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นเมื่อผลมีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 1 เซนติเมตร (กลุ่มกีฏและสัตววิทยา, 2553)

หนอนแดง (Fruit boring caterpillar) เป็นศัตรูสำคัญของไม้ผลหลายชนิด เช่น ชมพู่ ฝรั่ง และพุทรา ซึ่งไม้ผลดังกล่าวมีการส่งออกจำหน่ายยังต่างประเทศโดยเฉพาะกลุ่มสหภาพยุโรป และจีน จากข้อมูลการแจ้งเตือนเรื่องศัตรูพืชติดไปกับสินค้าเกษตร พบว่ามีการแจ้งเตือนถึงการติดไปของแมลงชนิดนี้กับทั้งชมพู่ ฝรั่ง และพุทราที่ส่งออก เนื่องจากเรายังขาดข้อมูลพื้นฐาน เช่น ข้อมูลวงจรชีวิต ลักษณะการเข้าทำลาย และช่วงฤดูการระบาด ทำให้การป้องกันกำจัดแมลงชนิดนี้ไม่ค่อยได้ผลเท่าที่ควร ส่งผลให้มีการติดไปกับสินค้าเกษตรที่ส่งออก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาข้อมูลพื้นฐานเช่น วงจรชีวิต ลักษณะการเข้าทำลาย และช่วงฤดูการระบาดของหนอนแดงในพืชต่างๆ เพื่อหาวิธีการป้องกันกำจัดที่เหมาะสมในแต่ละพืช ลดปัญหาการติดไปกับสินค้าเกษตร ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพและปลอดภัย

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. กรงเลี้ยงแมลงขนาด 35x35x35 เซนติเมตร
2. กล่องพลาสติกเลี้ยงแมลงขนาด 22x29x10 เซนติเมตร
3. ผลและดอกของฝรั่ง และพุธรา
4. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบทศนิยมสองตำแหน่ง

กรมวิชาการเกษตร

5. จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
6. เชือกสำหรับผูกดอก/ผล ถุงพลาสติก แผ่นป้าย

วิธีการ

1. การศึกษาวงจรชีวิตของหนอนแดงในฝรั่ง และพุทรา

1. ทำการเก็บรวบรวมผลฝรั่ง และพุทรา ที่ถูกหนอนแดงเข้าทำลายจากแปลงเกษตรกรในจังหวัดราชบุรี นครปฐม และสมุทรสาคร บันทึกจำนวนผล น้ำหนัก สถานที่ และวันเดือนปีที่เก็บ

2. นำผลที่เก็บได้มาเลี้ยงต่อในห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการศึกษาหาอายุของตัวเต็มวัย ระยะเวลาการอยู่รอดของตัวเต็มวัยในแต่ละเพศ ปริมาณการวางไข่ของของตัวเต็มวัยเพศเมีย ลักษณะการว่างไข่ ลักษณะของไข่ ขนาดและอายุของไข่ ลักษณะหนอนแต่ละวัย ขนาดและอายุของหนอน ลักษณะดักแด้ ขนาดและอายุดักแด้ โดยทำการศึกษาข้อมูลแยกในแต่ละพืช

2. การศึกษาระยะการเข้าทำลายของหนอนแดงในชมพู่ ฝรั่ง และพุทรา

1. ทำการผูกดอกชมพู่ ฝรั่ง และพุทรา ในแปลงเกษตรกรตั้งแต่เริ่มแทงดอกจำนวน 2,000 ดอกต่อพืช

2. เก็บผลที่ผูกไว้ออกทุก 7 วัน จำนวน 20 ผล ต่อครั้งในแต่ละพืช จากนั้นนำผลที่เก็บออกไปไว้ในห้องปฏิบัติการ 7 วัน จึงทำการผ่าผล เพื่อดูการเข้าทำลายของหนอนแดง บันทึกขนาดและน้ำหนักของผล จำนวนหนอนที่พบ

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561

ห้องปฏิบัติการกลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

แปลงชมพู่เกษตรกร ตำบลคลองจินดา อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม

แปลงฝรั่งเกษตรกร ตำบลคลองจินดา อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม

แปลงพุทราเกษตรกร ตำบลบ้านเกาะ อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาวงจรชีวิตของหนอนแดงในฝรั่ง และพุทรา ดำเนินการศึกษาในระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2559 ถึง เดือนมีนาคม 2560 ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรุงเทพมหานคร โดยมีอุณหภูมิเฉลี่ย 25.50$\pm$1.23 ^{0}C และความชื้นสัมพันธ์เฉลี่ย 85.04$\pm$0.91 % RH จากการเก็บรวมรวมผลชมพู่ ฝรั่ง และพุทรา ที่ถูกหนอนแดงเข้าทำลายจากจังหวัดนครปฐม ราชบุรี และสมุทรสาคร มาศึกษาชีววิทยาของหนอนแดง (Fruit boring caterpillar; *Meridarchis scyrodes* Meyrich) บนผลชมพู่ ฝรั่ง และพุทรา พบว่าการเจริญเติบโตของแมลงชนิดนี้แบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ

กรมวิชาการเกษตร

ระยะไข่ ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ บนผลฝรั่ง ผลพุทรา ดอกและผลชมพู่ ผลละ 1-2 ฟอง ไข่สีขาวใส ผิวเป็นมันสะท้อนแสง รูปร่างกลมรี มีขนาดค่อนข้างเล็ก ขนาดกว้าง 0.1 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 0.15 มิลลิเมตร ระยะไข่ 2-3 วัน เฉลี่ย 2.49±0.44 วัน (Table 2.1.7.1)

ระยะหนอน หนอนที่พึ่งฟักออกจากไข่ใหม่มีสีขาวและค่อยมีสีชมพูแดง สีของตัวหนอนจะเข้มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อโตเต็มที่หนอนมีสีแดงอมชมพูเล็กน้อย ระยะหนอนเป็นระยะที่ทำลายดอกและผลชมพู่ ผลของฝรั่งและพุทรา ระยะหนอน 9-12 วัน เฉลี่ย 11.78±0.56วัน (Table 2.1.7.1 และ Figure 2.1.7.2)

ระยะดักแด้ ดักแด้อยู่ในดินโดยหนอนที่โตเต็มที่จะเจาะออกจากผลและเข้าดักแด้ในดิน โดยนำดินมาทำเป็นรังเพื่อห่อหุ้มตัว ดักแด้อาศัยอยู่ในดินลึกประมาณ 2.0 เซนติเมตร หรืออยู่ได้ใต้ใบไม้ที่ร่วงหล่นอยู่รอบๆ โคนต้น ดักแด้มีขนาดกว้าง 3.0 มิลลิเมตร ยาว 15.0 มิลลิเมตร ระยะดักแด้ 8-9 วัน เฉลี่ย 8.46±0.84วัน (Table 2.1.7.1 และ Figure 2.1.7.3)

ระยะตัวเต็มวัย ตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็กสีน้ำตาล ตัวเต็มวัยอายุ 5-8 วัน เมื่อกางปีกมีขนาดกว้างเฉลี่ย 1.12±0.04 ซม. ลำตัวยาวเฉลี่ย 0.4±0.08 ซม. ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุ 6-8 วัน เฉลี่ย 7.46±0.64วัน ตัวเต็มวัยเพศผู้เมื่อกางปีกมีขนาดกว้างเฉลี่ย 1.45±0.06 ซม. ลำตัวยาวเฉลี่ย 0.65±0.05 ซม. ตัวเต็มวัยเพศผู้มีอายุ 5-8 วัน เฉลี่ย 6.86±1.06วัน (Table 2.1.7.1 และ Figure 2.1.7.1)

2. การศึกษาระยะการเข้าทำลายของหนอนแดงในชมพู่ ฝรั่ง และพุทรา

ในชมพู่ดำเนินการศึกษาในปี พ.ศ. 2561 ในชมพู่พันธุ์ทับทิมจันทร์ อายุ 6 ปี ที่ตำบลคลองจินดา อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม โดยทำการเก็บผลชมพู่ที่อายุ 7, 14, 21, 28, 35, และ 42 วัน มาทำการผ่าเพื่อตรวจดูการเข้าทำลายของหนอนแดงครั้งละ 20 ผล พบว่าผลชมพู่ที่อายุ 7-14 วัน ไม่พบการเข้าทำลายของหนอนแดง ส่วนผลชมพู่ที่อายุ 21, 28, 35 และ 42 วัน พบการทำลายของหนอนแดง 50, 80, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 2.1.7.2) ส่วนฝรั่งดำเนินการศึกษาในปี พ.ศ. 2561 ในฝรั่งพันธุ์แป้นสีทอง อายุ 4 ปี ที่ตำบลคลองจินดา อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม โดยทำการเก็บผลฝรั่งที่อายุ 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91 และ 98 วัน มาทำการผ่าเพื่อตรวจดูการเข้าทำลายของหนอนแดงครั้งละ 20 ผล พบว่าผลฝรั่งที่อายุ 7-42 วัน ไม่พบการเข้าทำลายของหนอนแดง ส่วนผลฝรั่งที่อายุ 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91 และ 98 วัน พบการทำลายของหนอนแดง 55, 60, 70, 85, 90, 90, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 2.1.7.2) และพุทราดำเนินการศึกษาในปี พ.ศ. 2561 ตำบลบ้านเกาะ อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร โดยทำการเก็บผลพุทราที่อายุ 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 98, 105 และ 112 วัน มาทำการผ่าเพื่อตรวจดูการเข้าทำลายของหนอนแดงครั้งละ 20 ผล พบว่าผลพุทราที่อายุ 7-63 วัน ไม่พบการเข้าทำลายของหนอนแดง ส่วนผลพุทราที่อายุ 70, 77, 84, 91, 98, 105 และ 112 วัน พบการทำลายของหนอนแดง 10, 45, 50, 75, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 2.1.7.2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาวงจรชีวิตของหนอนแดงในฝรั่ง และพุทรา พบว่าตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็กสีน้ำตาล เมื่อกางปีกมีขนาดกว้างเฉลี่ย 1.12±0.04 ซม. ลำตัวยาวเฉลี่ย 0.4±0.08 ซม. ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุ 6-8 วัน เฉลี่ย 7.46±0.64วัน ส่วนตัวเต็มวัยเพศผู้เมื่อกางปีกมีขนาดกว้างเฉลี่ย 1.45±0.06 ซม. ลำตัวยาวเฉลี่ย 0.65±0.05 ซม. ตัวเต็มวัยเพศผู้มีอายุ 5-8 วัน เฉลี่ย 6.86±1.06วันตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ บนผลฝรั่ง ผลพุทรา ดอกและผลชมพู่ ผลละ 1-2 ฟอง ไข่สีขาวใส ผิวเป็นมันสะท้อนแสง รูปร่างกลมรี มีขนาดค่อนข้างเล็ก ขนาดกว้าง 0.1 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 0.15 มิลลิเมตร ระยะไข่ 2-3 วัน เฉลี่ย 2.49±0.44 วัน หนอนที่พึ่งฟักออกจากไข่ใหม่ๆ มีสีขาวและค่อยมีสีชมพูแดง สีของตัวหนอนจะเข้มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อโตเต็มที่หนอนมีสีแดงอมชมพูเล็กน้อย ระยะหนอนเป็นระยะที่ทำลายดอกและผลชมพู่ ผลของฝรั่งและพุทรา ระยะหนอน 9-12 วัน เฉลี่ย 11.78±0.56วัน หนอนที่โตเต็มที่จะเจาะออกจากผลและเข้าดักแด้ในดิน โดยนำดินมาทำเป็นรังเพื่อห่อหุ้มตัว ดักแด้อาศัยอยู่ในดินลึกประมาณ 2.0 เซนติเมตร หรือยู่ได้ใต้ใบไม้ที่ร่วงหล่นอยู่รอบๆ โคนต้น ดักแด้มีขนาดกว้าง 3.0 มิลลิเมตร ยาว 15.0 มิลลิเมตร ระยะดักแด้ 8-9 วัน เฉลี่ย 8.46±0.84วัน

การศึกษาระยะการเข้าทำลายของหนอนแดงในชมพู่ ฝรั่ง และพุทรา ในชมพู่ดำเนินการศึกษาในแปลงชมพู่เกษตร ที่ตำบลคลองจินดา อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม พบว่าผลชมพู่ที่อายุ 7-14 วัน ไม่พบการเข้าทำลายของหนอนแดง ส่วนผลชมพู่ที่อายุ 21, 28, 35 และ 42 วัน พบการทำลายของหนอนแดง 50, 80, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนฝรั่งดำเนินการศึกษาในแปลงฝรั่งเกษตรกร ที่ตำบลคลองจินดา อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม พบว่าผลฝรั่งที่อายุ 7-42 วัน ไม่พบการเข้าทำลายของหนอนแดง ส่วนผลฝรั่งที่อายุ 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91 และ 98 วัน พบการทำลายของหนอนแดง 55, 60, 70, 85, 90, 90, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพุทราดำเนินการศึกษาในแปลงพุทราเกษตรกร ที่ตำบลบ้านเกาะ อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร พบว่าผลพุทราที่อายุ 7-63 วัน ไม่พบการเข้าทำลายของหนอนแดง ส่วนผลพุทราที่อายุ 70, 77, 84, 91, 98, 105 และ 112 วัน พบการทำลายของหนอนแดง 10, 45, 50, 75, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

กรมวิชาการเกษตร

Table 2.1.7.1 Developmental stages of fruit boring caterpillar, *Meridarchis scyrodes* Meyrich under laboratory condition (25.50±1.23 ^{0}C and 85.04±0.91 % RH)

Stages of *M. scyrodes*	n [1/]	Range(days)	Mean ± SD (days)
Egg incubation	50	2-3	2.49 ± 0.44
Larva period	30	9-12	11.78 ± 0.56
Pupal period	15	8-9	8.46 ± 0.84
Adult longevity			
Female	5	6-8	7.46 ± 0.64
Male	5	5-8	6.86 ± 1.06
Total development period			
From egg to adult (day)		18-24	22.86 ± 1.94

[1/] = number of observations

กรมวิชาการเกษตร

Table 2.1.7.2 Compares the percentage of damage of fruit boring caterpillar, *Meridarchis scyrodes* Meyrich in rose apple, guava and jujube fruits at various ages.

Age (days)	Rose apple				Guava			Jujube			
	Wide (cm)	Lengthy (cm)	Weight (g)	Percent damage of fruit *M. scyrodes*	Diameter (cm)	Weight (g)	Percent damage of fruit *M. scyrodes*	Wide (cm)	Lengthy (cm)	Weight (g)	Percent damage of fruit *M. scyrodes*
7	1.27±0.14	2.02±0.09	1.79±0.31	0	0.82±0.12	0.81±0.18	0	0.69±0.43	0.84±0.17	0.34±0.16	0
14	1.77±0.19	2.67±0.31	3.75±1.22	0	1.55±0.12	2.91±0.67	0	0.75±0.02	0.98±0.14	0.37±0.12	0
21	2.92±0.28	4.82±0.42	17.66±4.09	50	1.99±0.09	3.48±0.17	0	0.87±0.10	1.12±0.12	0.42±0.07	0
28	3.65±0.48	5.81±0.40	32.36±8.18	80	2.49±0.26	9.02±2.28	0	0.97±0.10	1.20±0.05	0.52±0.05	0
35	4.33±0.48	7.09±0.36	59.44±14.63	80	2.83±0.16	16.69±2.51	0	1.16±0.14	1.38±0.13	0.85±0.23	0
42	4.50±0.34	7.87±0.52	69.83±19.44	100	3.42±0.43	20.00±0.82	0	1.12±0.10	1.51±0.10	1.46±0.27	0
49	-	-	-	-	3.77±0.53	26.92±8.53	55	1.41±0.12	1.84±0.09	2.59±0.47	0
56	-	-	-	-	3.94±0.45	34.80±7.06	60	1.94±0.16	2.38±0.19	5.20±1.19	0

กรมวิชาการเกษตร

63	-	-	-	-	4.05±0.41	38.61±10.72	70	2.19±0.14	2.46±0.15	6.88±0.74	0
70	-	-	-	-	4.52±0.52	46.74±14.12	85	2.44±0.15	2.78±0.12	9.77±1.22	10
77	-	-	-	-	5.59±0.33	59.34±12.18	90	2.26±0.25	2.91±0.19	11.63±2.67	45
84	-	-	-	-	6.23±0.23	65.12±8.22	90	2.80±0.29	3.12±0.27	13.92±3.77	50
91	-	-	-	-	6.89±0.75	69.31±6.64	95	2.93±0.33	3.04±0.35	15.65±5.35	75
98	-	-	-	-	7.62±0.22	75.9±13.60	100	3.57±0.60	3.60±0.39	27.14±10.33	80
105	-	-	-	-	-	-	-	4.03±0.53	4.02±0.60	37.34±13.85	90
112	-	-	-	-	-	-	-	4.38±0.40	4.36±0.33	43.37±8.47	100

กรมวิชาการเกษตร

Figure 2.1.7.1 Adult male and female characteristics of fruit boring caterpillar, *Meridarchis scyrodes* Meyrich

Figure 2.1.7.2 Larva characteristics of fruit boring caterpillar, *Meridarchis scyrodes* Meyrich

Figure 2.1.7.3 Pupal characteristics of fruit boring caterpillar, *Meridarchis scyrodes* Meyrich

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.1.8 ศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa* (Fabricius)
The Biology of Breadfruit Fruit Fly (*Bactrocera umbrosa* (Fabricius))

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	กรกต ดำรักษ์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	สัญญาณี ศรีคชา	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	หทัยภัทร เจษฎารมย์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ยุวรินทร์ บุญทบ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

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

คำหลัก : ชีววิทยา แมลงวันผลไม้ *Bactrocera umbrosa* (Fabricius)

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

The study of breadfruit fruit fly (*Bactrocera umbrosa*) biology was conducted between 2018 and 2020 with a combination of field studies and insectary-based experimental work. During November 2018 - October 2019, surveys and field collections were made across Thailand in 16 provinces including Nakhon Pathom, Suphanburi, Kanchanaburi, Samut Sakhon, Ratchaburi, Rayong, Trat, Chanthaburi, Phetchaburi, Prachuap Khiri Khan, Chumphon, Surat Thani, Nakhon Si Thammarat, Phatthalung, Songkhla and Satun. Breadfruit fruit fly were collected on various damaged fruits including jackfruits, chempedaks, breadfruits, guavas and horse mangoes. Collection sites included natural areas and farmers' orchards. The result showed that *B. umbrosa* were found on jackfruits, chempedaks and guavas that collected at Chumphon, Surat Thani, Nakhon Si Thammarat, Songkhla and Satun provinces. The life cycle of *B. umbrosa* was studied under laboratory condition (26.80±1.16°C and 88.49±1.33 %RH) during November 2019 - July 2020. It was observed that adult females laid eggs singly or in groups after her pre-oviposition period of 15 days. One adult female could lay 110-422 eggs, averaging 175.50±89.77 eggs. Percentage of eggs hatched was 85% and egg stage lasted for 84-96 hours, averaging 84.21±1.45 hours. Larval developmental period was 8-10 days, averaging 8.85± 0.74 days, and the survival rate of this period was 47.06%. Pupal stage averaged 11.50± 0.66 days with a range of 11-13 days, and it showed 60% of the survival rate. The longevity of adult females and males were 87-119 and 80-106 days, which were 100.30±11.03 and 89.90±6.87 days in average, respectively. Total developmental period in laboratory from eggs to adults was 23.72± 0.83 days. The life table study on jackfruit pieces revealed that the mortality of the larval instar was remarkably high at 52.94%, whereas the survival rate decreased as stage and age were increased. The survival rate of adults from eggs was 24%.

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

คำนำ

แมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa* (Fabricius) จัดอยู่ในอันดับ Diptera วงศ์ Tephritidae เป็นหนึ่งในแมลงวันผลไม้ที่สำคัญในประเทศไทยที่มีจำนวนกว่า 10 ชนิด มีเขตแพร่กระจายทั่วไปในประเทศไทย มีพืชอาศัยจำพวกขนุน และจำปาดะ (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 สิงค์โปร์ ฟิลิปปินส์ เปรู อินโดนีเซีย นิวเฮบริดีส์ นิวแคลิโดเนีย ปาปัวนิวกีนี 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* ในประเทศไทยจากภาคใต้จนถึงบริเวณเพนนินซูล่า ประเทศมาเลเซีย จึงถือว่าแมลงวันผลไม้ชนิดนี้เป็นชนิดที่พบได้ทั่วไปในภาคใต้ (Clarke *et al*., 2001) เช่นเดียวกันกับ Danjuma (2013) ที่ได้ทำการศึกษาถึงความหลายของชนิดแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* ในสวนฝรั่งทางภาคใต้ของประเทศไทย ด้วยการใช้กับดักสารล่อตัวเต็มวัย Methyl eugenal และ Torula yeast ในจังหวัดนราธิวาส สงขลา ตรัง และสุราษฎร์ธานี พบแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* ทั้งหมด 31 ชนิด โดยพบ *B. umbrosa* ซึ่งเป็นหนึ่งใน 8 ชนิดของแมลงวันผลไม้ที่พบได้จากกับดักสารล่อตัวเต็มวัยในทุกสถานีการทดลอง นอกจากนี้ ยุวรินทร์ และคณะ (2554); ยุวรินทร์ 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 ชมพู่ 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 อก scutum สีดำ mesonotum มีแถบข้างอกทั้งสอง 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 จังหวัดกรุงเทพ 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

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างผลไม้ ขนุน จำปาดะ 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. ขี้เลื่อย
7. ตะแกรงร่อนเบอร์ 20
8. Brewer's yeast และน้ำตาลไอซ์ซิ่ง
9. จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
10. กล้อง Stereo microscope
11. อุปกรณ์สำหรับบันทึกข้อมูล และบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์

- วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa*

โดยการเก็บรวบรวมผลไม้ ขนุน จำปาดะ 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 และรองก้นด้วยขี้เลื่อยสูงประมาณ 1 นิ้ว เมื่อหนอนแมลงวันผลไม้เข้าสู่ระยะที่ 3 จะออกจากผลไม้มาเข้าดักแด้ในขี้เลื่อย คอยตรวจดูดักแด้ในขี้เลื่อยทุก 2 วัน เมื่อดักแด้เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม จึงร่อนขี้เลื่อยด้วยตะแกรงร่อน เพื่อแยกดักแด้ออกมานำไปใส่กล่องพลาสติกและคลุมทับด้วยขี้เลื่อยสูงประมาณ 0.5 นิ้ว นำไปไว้ในกรงเลี้ยงแมลง ที่ภายในมีน้ำและอาหารสำหรับตัวเต็มวัย (Brewer's yeast และน้ำตาลไอซ์ซิ่ง อัตราส่วน 3:7) เมื่อตัวเต็มวัยฟักออกมาและมีอายุประมาณ 7-10 วัน จะเป็นช่วงที่ตัวเต็มวัยมีการพัฒนาเจริญเติบโตมีสีสันเต็มที่แล้ว จึงทำการฆ่าตัวเต็มวัยโดยนำไปใส่ในหลอดแก้วแช่ในช่องทำน้ำแข็ง (freezer) นาน 4-5 ชั่วโมง แล้วนำไปจำแนกชนิดและตรวจนับจำนวน

ศรีวิชาการเกษตร

การบันทึกข้อมูล

บันทึกชนิดผลไม้ บันทึกข้อมูลสถานที่ วัน/เดือน/ปี และพิกัดทางภูมิศาสตร์ที่เก็บผลไม้

2. การศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa*

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

2.1 วงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* โดยดำเนินการศึกษาวงจรชีวิตในระยะต่างๆ

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

ระยะหนอน ศึกษาอายุและลักษณะของหนอนวัยต่าง ๆ โดยเลี้ยงหนอนในเนื้อผลขนุน บันทึกขนาด ลักษณะ และการตายของหนอนวัยต่าง ๆ โดยศึกษาจากหนอน 85 ตัว

ระยะดักแด้ ศึกษาอายุและลักษณะของดักแด้ โดยทำการบันทึกขนาด และลักษณะของดักแด้ โดยศึกษาจากดักแด้ 40 ดักแด้

ระยะตัวเต็มวัย ศึกษาอายุขัย การผสมพันธุ์ การวางไข่ และลักษณะของตัวเต็มวัย โดยเลี้ยงแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* 1 คู่ ในกล่องพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 6.5 เซนติเมตร ที่ภายในมีน้ำ อาหาร และกระบอกพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร สูง 4.5 เซนติเมตร เจาะรูขนาดเล็กจำนวน 20 รู ภายในใส่เนื้อผลขนุน เพื่อล่อให้แมลงวางไข่ บันทึกปริมาณไข่ทุกวันจนตัวเต็มวัยเพศเมียตาย นอกจากนี้ทำการบันทึกลักษณะตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย ลักษณะการจับคู่ผสมพันธุ์ และการตายของตัวเต็มวัย โดยศึกษาจากแมลงวันผลไม้จำนวน 10 คู่

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

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกข้อมูลอายุและลักษณะของไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ในการศึกษาวงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa*

- บันทึกข้อมูลจำนวนไข่ที่ฟัก หนอนวัยต่างๆ ดักแด้ และตัวเต็มวัย ในการคำนวณตารางชีวิตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa*

- เวลาและสถานที่

- เริ่มต้น ตุลาคม 2561 - สิ้นสุด กันยายน 2563
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

แหล่งปลูกผลไม้ ขนุน จำปาดะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด ในพื้นที่ธรรมชาติหรือในพื้นที่แปลงปลูกของเกษตรกรที่ถูกแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* เข้าทำลาย ในเขตภาคกลาง เช่น จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร

ศรีวิชัยการเกษตร

และสุพรรณบุรี หรือภาคตะวันออก เช่น จังหวัดจันทบุรี ตราด และระยอง หรือภาคตะวันตก เช่น จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ หรือภาคใต้ เช่น จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา และสตูล

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa*

จากการสำรวจเก็บรวบรวมผลไม้ ขนุน จำปาดะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด ที่ถูกแมลงวันผลไม้เข้าทำลาย (Figure 2.1.8.1) ในธรรมชาติและในพื้นที่แปลงปลูกของเกษตรกร ในเขตพื้นที่ 16 จังหวัด คือ เขตพื้นที่ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร และสุพรรณบุรี เขตพื้นที่ภาคตะวันออก ได้แก่ ระยอง ตราด และจันทบุรี เขตพื้นที่ภาคตะวันตก ได้แก่ กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ เขตพื้นที่ภาคใต้ ได้แก่ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา และสตูล ในเดือนพฤศจิกายน 2561 - ตุลาคม 2562 และนำผลไม้มายังห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาต่อโดยการเลี้ยงหนอนที่พบในผลไม้จนเข้าดักแด้และฟักเป็นตัวเต็มวัย พบชนิดแมลงวันผลไม้ที่ฟักออกเป็นตัวเต็มวัย มี 4 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera dorsalis, Bactrocera correcta Bactrocera carambolae* และ *Bactrocera umbrosa* (Table 2.1.8.1) โดยพบ *B. dorsalis* จำนวนมากที่สุด 6,166 ตัว จากผลขนุน จำปาดะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี กาญจนบุรี สมุทรสาคร ราชบุรี ระยอง ตราด จันทบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา และสตูล พบ *B. correcta* จำนวน 935 ตัว จากผลขนุน สาเก ฝรั่ง ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี กาญจนบุรี สมุทรสาคร ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ พบ *B. carambolae* จำนวน 382 ตัว จากผลขนุน จำปาดะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี กาญจนบุรี สมุทรสาคร ราชบุรี ระยอง ตราด จันทบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา และพบ *B. umbrosa* จำนวน 1,030 ตัว จากผลขนุน จำปาดะ ฝรั่ง ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา และสตูล

2. การศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa*

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

2.1 วงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa*

พบการเจริญเติบโตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* 4 ระยะ (Figure 2.1.8.3) ดังนี้

ระยะไข่ ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่เป็นฟองเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม ๆ บางครั้งพบถึง 78 ฟองต่อกลุ่ม ไข่มีขนาดเล็กคล้ายเมล็ดข้าวสารแต่มีรูปร่างโค้งคล้ายผลกล้วย มีสีขาวผิวเป็นมันเงาสะท้อนแสง (Figure

กรมวิชาการเกษตร

2.1.8.2A.) มีขนาดกว้างเฉลี่ย 0.23±0.03 มิลลิเมตร ยาวเฉลี่ย 1.12±0.10 มิลลิเมตร ระยะไข่ 84-96 ชั่วโมง (Table 2.1.8.2) และไข่มีเปอร์เซ็นต์การฟัก 85% (Table 2.1.8.3)

ระยะหนอน หนอนมีลักษณะหัวแหลมท้ายป้าน ไม่มีขา ส่วนหัวมีลักษณะเป็นตะขอสีดำ เมื่อหนอนฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ ลำตัวจะใส ขนาดลำตัวใกล้เคียงกับขนาดของไข่ (Figure 2.1.8.2B.) หนอนเคลื่อนที่โดยการยืดหดลำตัว โดยเมื่อโตเต็มที่สามารถดีดตัวได้ไกลประมาณ 30 เซนติเมตร และมีขนาดลำตัวกว้างเฉลี่ย 1.79±0.21 มิลลิเมตร ยาวเฉลี่ย 8.05±0.63 มิลลิเมตร (Figure 2.1.8.2C.) ระยะหนอน 8-10 วัน (Table 2.1.8.2) โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอด 47.06% (Table 2.1.8.3)

ระยะดักแด้ ดักแด้มีลักษณะกลมรีคล้ายถังเบียร์ ผิวภายนอกแบ่งปล้องชัดเจนตามแนวขวาง ในระยะแรกดักแด้มีสีเหลืองอ่อนและค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน จากนั้นสีจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อใกล้ฟัก (Figure 2.1.8.2D.) ในระยะดักแด้ไม่มีการเคลื่อนที่ มีขนาดกว้างเฉลี่ย 2.05±0.11 มิลลิเมตร ยาวเฉลี่ย 5.22±0.33 มิลลิเมตร ระยะดักแด้ 11-13 วัน (Table 2.1.8.2) โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอด 60.00% (Table 2.1.8.3)

ระยะตัวเต็มวัย ตัวเต็มวัยเป็นแมลงวันสีน้ำตาลและมีแถบสีเหลืองที่ส่วนอก หัวสีเหลือง มีปากแบบซับดูด มีจุดสีดำขนาดกลางใต้หนวด 2 จุด ขาสีเหลือง ปีกบางใส 1 คู่ มีแถบขวางปีกสีน้ำตาล 3 แถบ ชัดเจนและเป็นลักษณะเด่น (Figure 2.1.8.2E.) ตัวเต็มวัยหลังออกจากดักแด้ 15 วัน จะเริ่มจับคู่ผสมพันธุ์และวางไข่ (Figure 2.1.8.2F.) โดยจะจับคู่ผสมพันธุ์ในช่วงเวลาเย็น ตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถวางไข่ตลอดอายุขัยได้ 110-422 ฟอง เฉลี่ย 175.50±89.77 ฟอง วางไข่ได้สูงสุด 78 ฟอง/วัน โดยมีอัตราส่วนเพศเมียต่อเพศผู้เท่ากับ 1:1.18 ตัวเต็มวัยเพศเมียเมื่อกางปีกมีขนาดกว้างเฉลี่ย 1.50±0.07 เซนติเมตร ลำตัวยาวเฉลี่ย 0.90±0.04 เซนติเมตร ตัวเต็มวัยเพศเมียหลังออกจากดักแด้มีอายุ 87-119 วัน เฉลี่ย 100.30±11.03 วัน ตัวเต็มวัยเพศผู้เมื่อกางปีกมีขนาดกว้างเฉลี่ย 1.38±0.05 เซนติเมตร ลำตัวยาวเฉลี่ย 0.82±0.06 เซนติเมตร ตัวเต็มวัยเพศผู้หลังออกจากดักแด้มีอายุ 80-106 วัน เฉลี่ย 89.90±6.87 วัน (Table 2.1.8.2)

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

ทำการศึกษาบนชิ้นเนื้อขนุน โดยนำไข่ของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* วางในกระดาษสีดำขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร วางบนชิ้นเนื้อขนุน 20 ฟองต่อชิ้น จำนวน 5 ชิ้น จากนั้นใช้กระดาษทิชชูคลุมปิดไว้ บันทึกจำนวนไข่ที่ฟัก หนอนวัยต่าง ๆ ดักแด้ และตัวเต็มวัย แล้วนำมาคำนวณตามวิธีของ Southwood (1966) ซึ่งมีขั้นตอนการคำนวณ ดังนี้

L_x คือ จำนวนตัวเฉลี่ยที่มีชีวิตรอดได้ในแต่ละระยะ คำนวณได้จากสูตร
$l_x + l_{x+1}$ โดย x คือ ระยะการเจริญเติบโต
l_x คือ จำนวนตัวที่มีชีวิตอยู่รอดในระยะ x

q_x คือ อัตราการตายในแต่ละระยะ คำนวณได้จากสูตร
$q_x = d_x/l_x$ โดย d_x คือ จำนวนตัวที่ตายในระยะ x

S_x คือ อัตราการรอดในแต่ละระยะ คำนวณได้จากสูตร
$S_x = 100\text{-}100q_x$ โดย $100q_x = 100 \times q_x$

e_x คือ ค่าที่คาดว่าจะมีชีวิตอยู่ในแต่ละระยะ คำนวณได้จากสูตร

$e_x = T_x/l_x$ โดย $T_x = L_x+L_{x+1}+...+L_{x+n}$

จากการทดลองพบว่า ระยะหนอน มีอัตราการตายสูงที่สุด คือ 52.94% รองลงมาเป็นระยะดักแด้ และระยะไข่ คือ 40.00% และ 15.00% ตามลำดับ (Table 2.1.8.3)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการเก็บรวบรวมผลไม้ ขนุน จำปาดะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด ที่ถูกแมลงวันผลไม้เข้าทำลายในธรรมชาติและในพื้นที่แปลงปลูกของเกษตรกร ในเขตพื้นที่ 16 จังหวัด คือ เขตพื้นที่ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร และสุพรรณบุรี เขตพื้นที่ภาคตะวันออก ได้แก่ ระยอง ตราด และจันทบุรี เขตพื้นที่ภาคตะวันตก ได้แก่ กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ เขตพื้นที่ภาคใต้ ได้แก่ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา และสตูล ในเดือนพฤศจิกายน 2561 ถึง เดือนตุลาคม 2562 พบแมลงวันผลไม้ที่เข้าทำลายขนุน จำปาดะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด 4 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera dorsalis, Bactrocera correcta Bactrocera carambolae* และ *Bactrocera umbrosa* โดยพบแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* จากผลขนุน จำปาดะ ฝรั่ง ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา และสตูล และจากการศึกษาวงจรชีวิตแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* ในห้องปฏิบัติการโดยมีอุณหภูมิเฉลี่ย 26.80±1.16 °C และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 88.49±1.33 %RH ในเดือนตุลาคม 2562 ถึง เดือนกรกฎาคม 2563 พบว่า ตัวเต็มวัยเริ่มจับคู่ผสมพันธุ์หลังออกจากดักแด้ 15 วัน โดยวางไข่เป็นฟองเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม ๆ ตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัว สามารถวางไข่ได้ 110-422 ฟอง เฉลี่ย 175.50±89.77 ฟอง ไข่มีเปอร์เซ็นต์การฟัก 85% ระยะไข่ 84-96 ชั่วโมง เฉลี่ย 84.21±1.45 ชั่วโมง ระยะหนอน 8-10 วัน เฉลี่ย 8.85±0.74 วัน มีเปอร์เซ็นต์การรอด 47.06% ระยะดักแด้ 11-13 วัน เฉลี่ย 11.50±0.66 วัน มีเปอร์เซ็นต์การรอด 60.00% ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุ 87-119 วัน เฉลี่ย 100.30±11.03 วัน ตัวเต็มวัยเพศผู้มีอายุ 80-106 วัน เฉลี่ย 89.90±6.87 วัน โดยสรุปวงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* ในห้องปฏิบัติการ จากไข่ถึงตัวเต็มวัยใช้เวลา 23.72±0.83 วัน สำหรับการศึกษาตารางชีวิต (Life table) ของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* บนชิ้นเนื้อขนุน ในห้องปฏิบัติการ พบว่า ระยะหนอนมีอัตราการตายสูงที่สุด คือ 52.94% รองลงมาเป็นระยะดักแด้ และระยะไข่ คือ 40.00% และ 15.00% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการรอดชีวิตในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของแมลงวันผลไม้จะลดลงตามระยะและอายุที่มากขึ้น จากไข่มีโอกาสรอดเป็นตัวเต็มวัยเพียง 24%

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะนำไปใช้ประโยชน์ ในด้านวิชาการ ได้แก่ ข้อมูลชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* (Fabricius) โดยมีกลุ่มเป้าหมายคือ กลุ่มเกษตรกรและผู้สนใจ กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร และหลังเสร็จสิ้นงานวิจัยจะถ่ายทอดผลการวิจัยโดยเผยแพร่ผลงานวิจัยในรายงานประจำปี หรือนำเสนอผลงานในเอกสารวิชาการ หรือการประชุมวิชาการ ถ่ายทอดความรู้ให้เจ้าหน้าที่จากกรมวิชาการเกษตรและกรมส่งเสริมการเกษตร เพื่อเผยแพร่สู่เกษตรกร และผู้สนใจ

สำนักวิชาการเกษตร

Table 2.1.8.1 Species and number of individuals of fruit flies reared from fruits (i.e. jackfruit, breadfruit, chempedak, guava and horse mango) in 16 provinces, November 2018 – October 2019

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
20/11/2018	Nakhon Pathom	13°59'23.2"N 99°58'16.3"E	guava	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera correcta* *Bactrocera carambolae*	490 162 74
20/11/2018	Nakhon Pathom	13°59'23.0"N 99°58'18.3"E	jackfruit	*Bactrocera dorsalis*	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	*Bactrocera dorsalis*	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	*Bactrocera dorsalis*	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	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera correcta* *Bactrocera carambolae*	89 3 2
04/12/2018	Suphanburi	14°10'16.4"N 99°56'50.5"E	breadfruit	-	-
04/12/2018	Suphanburi	14°18'16.0"N 99°51'46.1"E	breadfruit	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera correcta* *Bactrocera carambolae*	56 1 7
22/01/2019	Kanchanaburi	14°44'14.1"N 99°26'44.4"E	guava	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera correcta* *Bactrocera carambolae*	23 1 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	*Bactrocera dorsalis*	17
22/01/2019	Kanchanaburi	14°43'47.0"N 99°24'03.9"E	jackfruit	-	-

กรมวิทยาศาสตร์

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
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	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	168 9
22/01/2019	Kanchanaburi	14°36'48.5"N 99°30'24.1"E	guava	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera correcta* *Bactrocera carambolae*	64 12 8
22/01/2019	Kanchanaburi	14°33'02.8"N 99°27'35.0"E	breadfruit	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera correcta*	17 5
22/01/2019	Kanchanaburi	14°39'33.5"N 99°25'34.0"E	guava	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera correcta*	210 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	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera correcta*	9 6
22/02/2019	Samut Sakhon	13°35'47.4"N 100°13'12.9"E	guava	*Bactrocera dorsalis*	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	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera correcta* *Bactrocera carambolae*	57 28 2
20/03/2019	Samut Sakhon	13°33'38.2"N 100°12'28.7"E	guava	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera correcta* *Bactrocera carambolae*	108 126 2
20/03/2019	Samut Sakhon	13°33'37.9"N 100°12'10.2"E	jackfruit	-	

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
20/03/2019	Samut Sakhon	13°33'37.9"N 100°12'10.2"E	guava	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera correcta* *Bactrocera carambolae*	132 79 2
20/03/2019	Samut Sakhon	13°33'52.6"N 100°12'22.5"E	guava	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera correcta* *Bactrocera carambolae*	1,193 229 12
20/03/2019	Samut Sakhon	13°33'53.9"N 100°12'19.3"E	guava	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera correcta*	154 47
20/03/2019	Samut Sakhon	13°33'43.3"N 100°12'16.4"E	guava	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera correcta* *Bactrocera carambolae*	178 78 1
29/03/2019	Nakhon Pathom	13°46'49.2"N 100°03'13.9"E	guava	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera correcta* *Bactrocera carambolae*	225 138 4
01/04/2019	Rayong	12°54'09.3"N 101°31'59.0"E	jackfruit	*Bactrocera dorsalis*	76
01/04/2019	Rayong	12°53'55.9"N 101°31'37.1"E	breadfruit	-	
01/04/2019	Rayong	12°53'54.3"N 101°31'37.2"E	jackfruit	-	
01/04/2019	Rayong	12°54'25.1"N 101°32'06.0"E	jackfruit	-	
01/04/2019	Rayong	12°54'24.2"N 101°32'07.5"E	guava	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	82 6
02/04/2019	Rayong	12°52'31.3"N 101°36'23.1"E	jackfruit	-	
02/04/2019	Rayong	12°52'34.4"N 101°36'24.4"E	jackfruit	*Bactrocera dorsalis*	2
02/04/2019	Rayong	12°52'29.2"N 101°36'31.1"E	jackfruit	-	
02/04/2019	Rayong	12°52'23.3"N 101°36'22.2"E	jackfruit	-	
03/04/2019	Trat	12°18'15.6"N 102°27'36.1"E	jackfruit	-	
03/04/2019	Trat	12°17'24.2"N 102°23'39.3"E	jackfruit	-	
03/04/2019	Trat	12°18'59.5"N 102°27'06.6"E	jackfruit	-	
03/04/2019	Trat	12°18'48.2"N 102°27'00.7"E	guava	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	85 3
03/04/2019	Trat	12°15'42.7"N 102°30'13.3"E	breadfruit	-	
03/04/2019	Trat	12°07'09.2"N 102°41'39.6"E	guava	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	165 4

กรมวิชาการเกษตร

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
03/04/2019	Trat	12°23'08.1"N 102°22'19.1"E	breadfruit	-	
03/04/2019	Chanthaburi	12°31'06.3"N 102°09'53.6"E	breadfruit	-	
03/04/2019	Chanthaburi	12°32'14.4"N 102°07'31.4"E	breadfruit	-	
03/04/2019	Chanthaburi	12°33'10.0"N 102°06'57.5"E	breadfruit	-	
04/04/2019	Chanthaburi	12°30'45.8"N 102°10'21.5"E	jackfruit	*Bactrocera dorsalis*	1
04/04/2019	Chanthaburi	12°34'24.8"N 102°09'43.6"E	breadfruit	-	
04/04/2019	Chanthaburi	12°35'20.9"N 102°09'14.0"E	breadfruit	-	
04/04/2019	Chanthaburi	12°36'49.9"N 102°08'18.4"E	breadfruit	-	
04/04/2019	Chanthaburi	12°38'54.4"N 102°04'24.0"E	breadfruit	-	
04/04/2019	Chanthaburi	12°41'15.2"N 102°03'01.6"E	guava	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	140 7
04/04/2019	Chanthaburi	12°41'17.6"N 102°03'00.5"E	jackfruit	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	241 18
04/04/2019	Chanthaburi	12°45'27.9"N 102°00'22.2"E	chempedak	-	
04/04/2019	Chanthaburi	12°45'44.0"N 102°00'15.8"E	jackfruit	-	
04/04/2019	Chanthaburi	12°45'48.3"N 102°00'18.6"E	jackfruit	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	29 1
04/06/2019	Phetchaburi	12°50'01.4"N 99°43'60.0"E	jackfruit	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	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	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera correcta* *Bactrocera carambolae*	88 8 13
26/07/2019	Chumphon	10°49'57.1"N 99°13'07.8"E	jackfruit	*Bactrocera umbrosa* *Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	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	chempedak	*Bactrocera umbrosa*	28
26/07/2019	Chumphon	10°48'21.4"N 99°14'22.8"E	horse mango	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	236 8

กรมวิทยาศาสตร์

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
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	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	250 6
26/07/2019	Surat Thani	9°39'55.3"N 99°06'23.3"E	horse mango	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	52 4
26/07/2019	Surat Thani	9°39'47.0"N 99°06'13.2"E	chempedak	-	0
27/07/2019	Nakhon Si Thammarat	8°25'09.4"N 99°51'15.0"E	horse mango	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	57 12
27/07/2019	Nakhon Si Thammarat	8°25'27.2"N 99°51'20.6"E	jackfruit	*Bactrocera dorsalis*	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	chempedak	-	0
27/07/2019	Nakhon Si Thammarat	8°26'07.7"N 99°46'44.4"E	guava	*Bactrocera umbrosa* *Bactrocera dorsalis*	9 19
27/07/2019	Nakhon Si Thammarat	8°25'57.5"N 99°46'33.4"E	guava	*Bactrocera dorsalis*	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	chempedak	*Bactrocera umbrosa* *Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	42 100 17
19/08/2019	Songkhla	7°09'10.4"N 100°32'43.9"E	chempedak	*Bactrocera umbrosa* *Bactrocera dorsalis*	4 15
19/08/2019	Songkhla	7°09'10.4"N 100°32'41.5"E	chempedak	*Bactrocera dorsalis*	8
20/08/2019	Songkhla	6°53'41.3"N 100°21'19.3"E	chempedak	*Bactrocera umbrosa* *Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	18 386 86
20/08/2019	Songkhla	6°53'23.3"N 100°21'02.1"E	chempedak	*Bactrocera umbrosa*	13
20/08/2019	Songkhla	6°53'19.5"N 100°24'20.6"E	guava	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	182 6
20/08/2019	Songkhla	6°53'06.6"N 100°23'41.5"E	jackfruit	*Bactrocera umbrosa* *Bactrocera dorsalis*	117 19
20/08/2019	Songkhla	6°58'08.1"N 100°26'07.5"E	chempedak	*Bactrocera umbrosa* *Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	89 33 7
20/08/2019	Songkhla	7°00'24.7"N 100°18'13.8"E	jackfruit	*Bactrocera umbrosa* *Bactrocera dorsalis*	134 13

กรมวิชาการเกษตร

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
20/08/2019	Songkhla	7°00'24.8"N 100°18'13.8"E	chempedak	-	0
20/08/2019	Songkhla	7°00'27.5"N 100°18'06.8"E	chempedak	*Bactrocera umbrosa*	3
24/08/2019	Chumphon	10°49'56.9"N 99°13'07.9"E	jackfruit	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	3 1
24/08/2019	Chumphon	10°49'44.6"N 99°13'09.4"E	jackfruit	*Bactrocera dorsalis*	10
24/08/2019	Surat Thani	9°39'46.7"N 99°06'12.8"E	chempedak	-	0
26/08/2019	Songkhla	6°58'09.0"N 100°34'07.1"E	chempedak	*Bactrocera dorsalis*	91
26/08/2019	Satun	6°46'12.9"N 100°08'35.0"E	chempedak	*Bactrocera umbrosa*	24
26/08/2019	Satun	6°45'54.5"N 100°08'37.5"E	chempedak	*Bactrocera umbrosa*	33
26/08/2019	Satun	6°45'44.1"N 100°03'54.0"E	chempedak	*Bactrocera umbrosa*	71
26/08/2019	Satun	6°47'32.5"N 100°04'59.9"E	guava	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	238 38
26/08/2019	Songkhla	6°57'00.5"N 100°08'03.3"E	chempedak	*Bactrocera dorsalis*	32
27/08/2019	Phatthalung	7°33'52.4"N 100°07'26.5"E	jackfruit	*Bactrocera dorsalis* *Bactrocera carambolae*	63 6
20/10/2019	Surat Thani	9°39'47.1"N 99°06'13.0"E	chempedak	*Bactrocera umbrosa*	44
21/10/2019	Songkhla	7°00'27.5"N 100°18'06.8"E	jackfruit	*Bactrocera umbrosa* *Bactrocera dorsalis*	32 75
21/10/2019	Songkhla	6°53'18.5"N 100°23'37.1"E	jackfruit	*Bactrocera umbrosa* *Bactrocera dorsalis*	54 19
22/10/2019	Surat Thani	9°40'23.7"N 99°05'06.1"E	jackfruit	*Bactrocera umbrosa* *Bactrocera dorsalis*	262 24
22/10/2019	Surat Thani	9°40'30.0"N 99°05'15.9"E	jackfruit	-	0

กรมวิทยาศาสตร์

Table 2.1.8.2 Development stages of *Bactrocera umbrosa* (Fabricius) under laboratory condition (26.80±1.16°C and 88.49±1.33 %RH)

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

[1]= number of observations

Table 2.1.8.3 Life table of *Bactrocera umbrosa* (Fabricius) in jackfruit, *Artocarpus heterophyllus*

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

x = Developmental stage

l_x = Number entering stage

L_x = Number alive in each age interval

d_x = Number dead during stage x

$100q_x$ = Percent apparent mortality

S_x = Survival rate within stage

e_x = life expectancy

กรมวิชาการเกษตร

Figure 2.1.8.1 Fruit samples

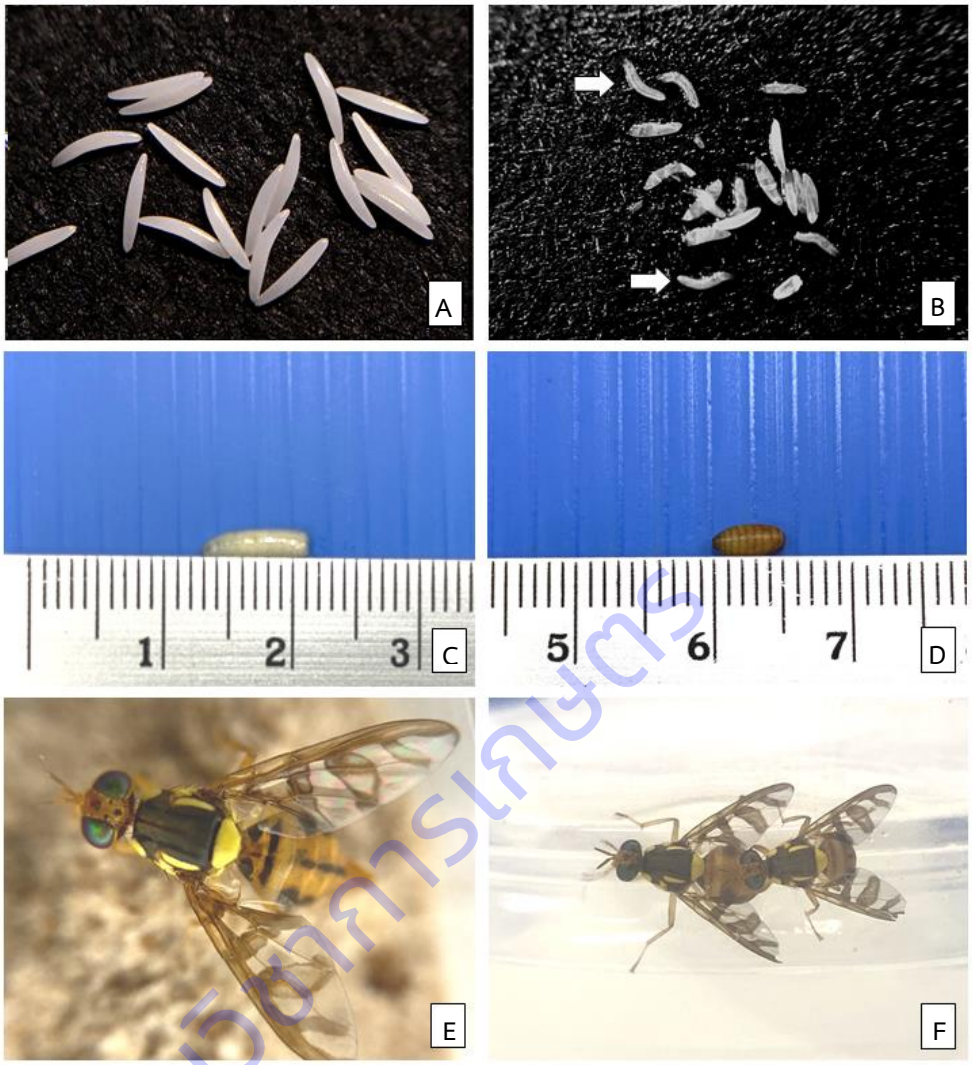


Figure 2.1.8.2 *Bactrocera umbrosa* (Fabricius)

A. Eggs

B. Newly hatched larvae

C. Final stage of larva

D. Pupa

E. Female adult

F. Mating

กรมวิชาการเกษตร

Adults

Male: 80-106

Pupae 11-13

Eggs 84-96

Larvae 8-10

กรมวิชาการเกษตร

Figure 2.1.8.3 Life cycle of *Bactrocera umbrosa* (Fabricius)

การทดลองที่ 2.1.9 ศึกษาชนิด ชีววิทยา และการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Physella*

Species, biology, and geographical distribution of aquatic pest snail *Physella*

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ดาราพร รินทะรักษ์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ศุภกร วงษ์เรืองพิบูล	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

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

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

คำนำ

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพของพันธุ์พืชน้ำหลายชนิดที่มีความสวยงาม มีศักยภาพสูงในการเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ต่างประเทศต้องการและให้ราคาสูง ไม้น้ำประดับสร้างรายได้ให้กับประเทศนับร้อยล้านบาทและมีแนวโน้มที่จะเติบโตต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามอุปสรรคสำคัญของการผลิตไม้น้ำและการส่งออกคือปัญหาการเข้าทำลายจากหอยน้ำศัตรูพืชซึ่งสร้างความเสียหายแก่พรรณไม้น้ำ นอกจากนี้ตัวและไข่หอยยังติดไปกับต้นไม้ ทำให้เสียเวลาในการล้างทำความสะอาดก่อนนำส่งออก ถ้าหากมีการ

กรมวิชาการเกษตร

พบเห็นตัวและไข่หอยติดไปกับพรรณไม้น้ำส่งออกจะถูกเผาทำลาย ทำให้ภาพพจน์การส่งออกไม้น้ำของประเทศไทยเสื่อมเสียอีกด้วย

กรมวิชาการเกษตรกำลังทำการวิจัยหอยศัตรูพรรณไม้น้ำและสำรวจความหลากชนิดของหอยน้ำในระบบนิเวศเกษตร พบว่าหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Physella* (วงศ์ Physidae) เป็นหนึ่งในชนิดที่มีความสำคัญ เนื่องจากสามารถทำความเสียหายแก่พรรณไม้น้ำประดับเป็นอย่างมาก มักพบหอยและไข่หอยสกุลนี้ติดไปกับไม้น้ำ และเข้าทำลายโดยการกัดกินใบจนเสียหาย ทั้งนี้หอยชนิดนี้ไม่ได้มีถิ่นอาศัยดั้งเดิมอยู่ในประเทศไทย มีศักยภาพในการรุกรานสูง จากการสำรวจเบื้องต้นมีรายงานการพบในแหล่งน้ำในประเทศไทยดังเช่นเขื่อนลำพระเพลิง ณ จังหวัดนครราชสีมา

อย่างไรก็ตาม ยังขาดข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับหอย *Physella* ในด้านของชีววิทยาดังเช่น อนุกรมวิธาน วงจรชีวิต การสืบพันธุ์ แหล่งที่อยู่อาศัย และอาหาร เป็นต้น การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ ทั้งนี้ข้อมูลทางด้านชีววิทยา การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ จะทำให้เข้าใจถึงธรรมชาติและพฤติกรรมของหอยน้ำศัตรูพืชชนิดนี้ได้ดียิ่งขึ้น และสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการอ้างอิงเชิงวิชาการ เพื่อการป้องกันกำจัดและมีความจำเป็นต่อการวางแผนเพื่อการจัดการหอยน้ำศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพ (pest management) ต่อไปได้

วิธีดำเนินการ

<u>อุปกรณ์</u>

- กล่องพลาสติกขนาดต่าง ๆ
- กระดาษอเนกประสงค์
- เวอร์เนีย (เครื่องมือวัดขนาดเปลือกหอย)
- อาหารปลาชนิดเม็ด
- กล้องถ่ายรูปดิจิตอล
- สาหร่าย และไม้น้ำ
- ผักสด
- ตู้ปลา
- เครื่องกำเนิดออกซิเจน
- GPS

<u>วิธีการ</u>

1) เก็บตัวอย่างหอยและศึกษาการแพร่กระจาย

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

กรมวิชาการเกษตร

1.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง ดำเนินการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ที่กำหนด โดยแบ่งเก็บพื้นที่ละ 5 จุด ตามขอบตลิ่ง 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 ลักษณะรูปทรงของเปลือก (shell shape) รูเปิด (aperture) จำนวนวง (whorl) ลักษณะตีน (foot) ตามวิธีการในคู่มือของ Brown (1994)

3) ศึกษาวงจรชีวิต

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

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

<u>เวลาและสถานที่</u>

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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

ผลการทดลองและวิจารณ์

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

จากการศึกษาลักษณะการวางไข่ในห้องปฏิบัติการ พบว่ามีลักษณะของไข่คล้ายกับไข่ของหอยศัตรูพืช Radix กล่าวคือ มีลักษณะเป็นเมือกเหนียวห่อหุ้มกลุ่มไข่อีกชั้นหนึ่ง จำนวนไข่ต่อคลัสเตอร์ประมาณ 11-43 ฟอง ไข่จะฟักเป็นลูกหอยภายใน 2-5 วัน และเริ่มวางไข่ครั้งแรกได้เมื่อลูกหอยอายุ 30-35 วัน (5-6 สัปดาห์) จากการศึกษาน้ำหนักของลูกหอยเกิดใหม่ทุกสัปดาห์จนครบ 8 สัปดาห์ สามารถสร้างกราฟได้ดังใน Figure 2.1.9.3 แสดงให้เห็นว่าน้ำหนักหอยในสัปดาห์ที่ 8 (0.035 กรัม) เพิ่มขึ้นคิดเป็น 17 เท่าของสัปดาห์ที่ 2 (0.002 กรัม) และจากการศึกษาความยาวเปลือก สามารถสร้างกราฟได้ดังใน Figure 2.1.9.4 แสดงให้เห็นว่าความยาวเปลือกในสัปดาห์ที่ 8 (6.97 มิลลิเมตร) เพิ่มขึ้นคิดเป็นประมาณ 5 เท่าของสัปดาห์ที่ 2 (1.37 มิลลิเมตร)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

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

กรมวิชาการเกษตร

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

พัฒนาต่อ สามารถนำไปใช้ประโยชน์กับกลุ่มเป้าหมาย ได้แก่ เกษตรกรผู้ปลูกไม้น้ำ หน่วยงานของรัฐผู้มีหน้าที่รับผิดชอบ เช่น กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร มหาวิทยาลัย นักวิชาการ และผู้สนใจ

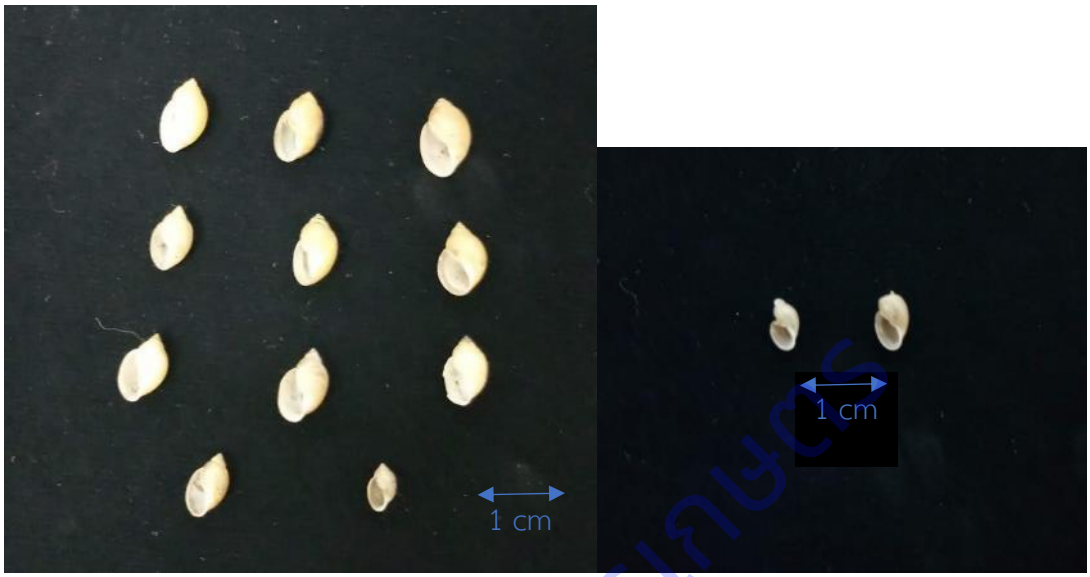


Figure 2.1.9.1: *Physella acuta* (left) and *Physella bonushenricus* (right)

Table 2.1.9.1: All *Physella* samples collected throughout Thailand.

Province	Species	
	Physella acuta	*Physella bonushenricus*
Bangkok	66	23
Kanchanaburi	39	-
Nakhon Pathom	38	-
Total	**143**	**23**

กรมวิชาการเกษตร

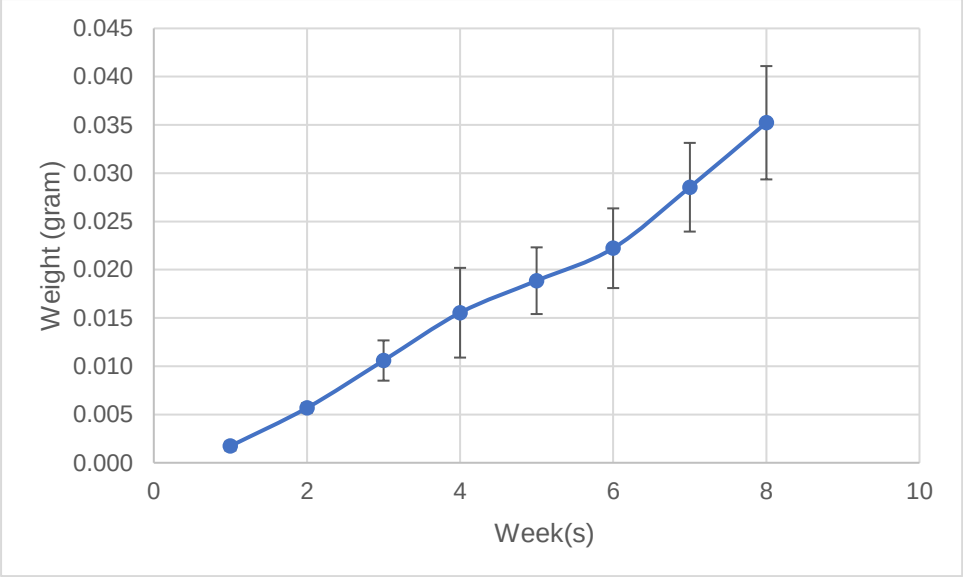


Figure 2.1.9.2: Average weight of *Physella acuta* individuals from first week to eighth week after hatching.

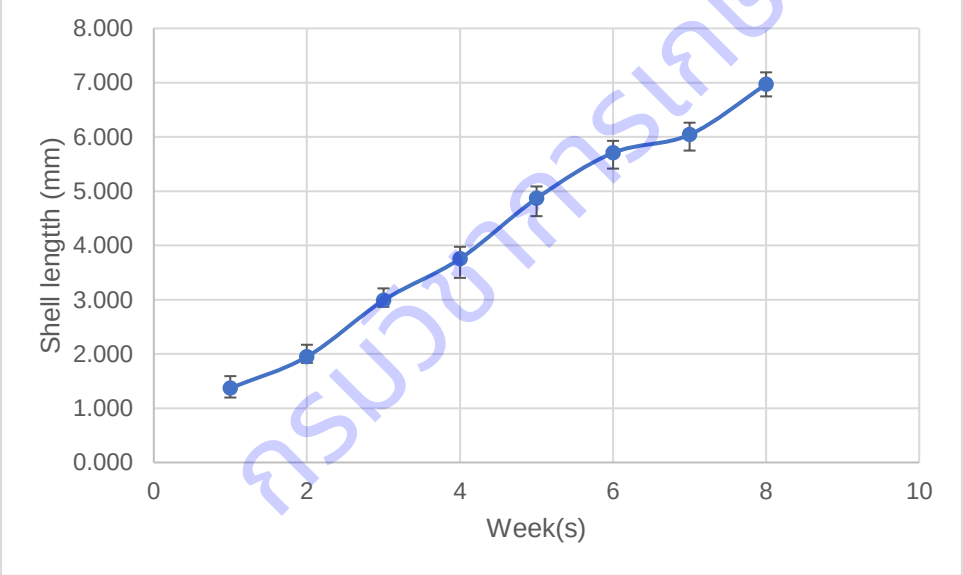


Figure 2.1.9.2: Average shell length of *Physella acuta* individuals from first week to eighth week after hatching.

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.1.10 สัณฐานวิทยาและชีววิทยาของเพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch (Hemiptera: Aphididae) ในประเทศไทย

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

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	เกศสุดา สนศิริ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	จารุวัตถ์ แต้กุล	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ยุวรินทร์ บุญทบ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สุนัดดา เชาวลิต	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	อิทธิพล บรรณาการ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	จอมสุรางค์ ดวงธิสาร	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

เพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch เป็นแมลงปากดูดศัตรูสำคัญของพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย เนื่องจากสามารถเข้าทำลายพืชได้มากกว่า 80 วงศ์ และยังสามารถเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชแก่พืชถึง 30 ชนิด หากเพลี้ยอ่อนลงทำลายจำนวนมากจะทำให้ผลผลิตเสียหายและลดลง ดังนั้นวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชีววิทยา พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจายของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2562 ถึง กันยายน 2564 ผลการศึกษาพบว่า เพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดกลาง ลำตัวยาวเฉลี่ย 2.18 $\pm$ 0.38 มิลลิเมตร มีสีเทาดำ ถึงสีดำเป็นมันเงามีผงแป้งปกคลุมที่ส่วนท้อง หนวดมี 6 ปล้อง ปาก (rostrum) ยาวถึงโคนขาคู่กลาง ไซฟังคูไล (siphunculi) เรียวและยาวกว่าส่วนหาง (cauda) ส่วนหางมีรูปร่างคล้ายลิ้น (tongue-shape) มีขน 4 – 7 เส้น ตุ่มด้านข้างลำตัว (lateral tubercles) บนปล้องท้องที่ 1 และ 7 อยู่ข้างใต้ด้านหลังรูหายใจ (spiracles) บริเวณส่วนท้องด้านสันหลังมีแถบสีดำ วงจรชีวิตมีการลอกคราบทั้งหมด 4 ครั้ง ระยะตัวอ่อนมี 4 วัย ระยะตัวอ่อน 4 - 6 วัน ระยะตัวเต็มวัย 6 – 14 วัน ตัวเต็มวัยมีทั้งพวกมีปีกและไม่มีปีก ผลการวิเคราะห์ค่าคุณลักษณะทางชีววิทยาจากตารางชีวิตแบบ biological life table ของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* ที่เลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว มีอัตราการขยายพันธุ์สุทธิ (R_0) เท่ากับ 67.1600 เท่า ค่าสัมประสิทธิ์การเพิ่มทางกรรมพันธุ์ (r_c) เท่ากับ 0.2832 ค่าสัมประสิทธิ์ของการขยายพันธุ์ (λ) มีค่าเท่ากับ 1.9100 เท่า และชั่วอายุขัยของกลุ่ม (T_c) เท่ากับ 14.854 วัน ตัวเต็มวัยสามารถออกลูกได้ในชั่วโมง 6 หลังจากเป็นตัวเต็มวัย และออกลูกได้มากที่สุดในวันที่ 3 การศึกษาตารางชีวิตแบบ Partial ecological life table ของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* เมื่อเลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว ในสภาพห้องปฏิบัติการ ระยะตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 มีอัตราการตายสูงที่สุด และระยะตัวอ่อนวัยที่ 3 มีอัตราการตายต่ำสุด

คำหลัก : อนุกรมวิธาน เพลี้ยอ่อน Aphididae

สำนักวิจัยการเกษตร

Abstrac

The cowpea aphid, *Aphis craccivora* Koch (Hemiptera: Aphididae), is one of the most destructive insect pest of legume plants. Crop losses caused by *A. craccivora* are due to direct feeding damage and to indirect damage, chiefly via the transmission of plant viruses. The objectives of this study are to the biology, host plants and distribution of *A. craccivora*. This study was conduct during October 2019 – September 2021 at Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture. The adult of *A. craccivora* was distinctly shiny brown to black body. Body length 2.18 $\pm$ 0.38 mm. Antennae six-segmented. Rostrum reaching to middle coxae; Siphunculi tapering and imbricate. Cauda tongue-shape, with 5-7 setae. Lateral tubercles on first and seventh abdominal segment posteroventrally to the spiracles. The biology life tables of *A. craccivora* fed on *Vigna sesquipedalis* Koern revealed that the net reproductive rate of increase (R_o) was 67.16, the capacity for increase (r_c) was 0.2832, the cohort generation time (T_c) was 14.854 days and the finite rate of increase (λ) was 1.9100. Most of the adult females gave birth to living young or nymphs after the last molt at 6 hr. with the highest peak of birth at 3 day. The partial ecological life table showed that the highest mortality of *A. craccivora* was found in the first and second instar larva.

คำนำ

เพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Aphididae อันดับ (Order) Hemiptera เพลี้ยอ่อนชนิดนี้เป็นศัตรูที่สำคัญชนิดหนึ่ง เนื่องจากสามารถเข้าทำลายพืชได้มากกว่า 80 วงศ์ (Favret and Miller, 2012) เช่น พืชตระกูลถั่ว (ถั่วฝักยาว ถั่วลิสง ถั่วเขียว) พืชตระกูลกะหล่ำ พืชตระกูลแตง ส้ม กระวาน มันสำปะหลัง กระเจี๊ยบ มะเขือ ขี้เหล็ก และชบา เป็นต้น โดยทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเข้าทำลายพืชโดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชบริเวณใต้ใบ หรือส่วนอ่อนๆของพืช เช่น ยอดอ่อน ตาอ่อน ใบ ดอกและผล ทำให้พืชมีลักษณะผิดปกติ ใบเหลือง ใบย่น ดอกร่วง ผลบิดเบี้ยว และเมล็ดลีบ ผลและใบที่ถูกทำลายจะแห้งและร่วงไปในที่สุด ทำให้ผลผลิตเสียหายและลดลงมากกว่า 30% และที่สำคัญเพลี้ยอ่อนยังขับมูลน้ำหวาน (honeydew) ซึ่งเป็นอาหารของมดและราดำ(sooty mold) ทำให้ราดำเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วจนปกคลุมใบและผล ใบจึงไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้อย่างเต็มที่ ส่วนผลจะสกปรกไม่เป็นที่ต้องการของตลาด นอกจากจะดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชแล้วเพลี้ยอ่อน *A. craccivora* ยังเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชแก่พืชถึง 30 ชนิด เช่น ในพืชตระกูลถั่ว ได้แก่ ถั่วฝักยาว ถั่วเหลือง ถั่วแขก ถั่วลิสง ถั่วลันเตา พืชตระกูลแตง และพืชตระกูลกะหล่ำ (Blackman and Eastop, 2000) ซึ่งโรคเหล่านี้มีผลทำให้ต้นถั่วแคระแกรน และผลผลิตลดลง 20% (วิเชียรและคณะ, 2543) ดังนั้นวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชีววิทยา พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจายของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* พร้อมทั้งจัดทำแนวทางวินิจฉัย และได้ตัวอย่างเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลงใน

กรมวิชาการเกษตร

รูปแบบสไลด์ถาวร รวมถึงจัดทำฐานข้อมูลสำหรับเป็นแหล่งสืบค้นข้อมูลศัตรูพืช นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังใช้เป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาแนวทางการป้องกันกำจัดและเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในพิพิธภัณฑ์ รวมทั้งจัดทำฐานข้อมูลตัวอย่างทั้งหมด เพื่อสามารถใช้เป็นแหล่งสืบค้น อ้างอิง ประกอบการค้นคว้า ได้อย่างมีระบบมาตรฐานสากล

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

4) ตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืชผักวงศ์แตง ตระกูลถั่ว พืชตระกูลแตง ตระกูลกะหล่ำ ส้ม มันสำปะหลัง มะเขือ และพริก และตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ใน พิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

5) อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ขวดดอง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่าง ถังรักษาความเย็น และเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)

6) อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับใช้ในการทำสไลด์ถาวรอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia) ได้แก่ potassium hydroxide 10 %, alcohol 70-95 %, acetic acid gacial, clove oil และ canada balsam แผ่นสไลด์แก้วและแผ่นแก้วปิดสไลด์ ตู้อบสไลด์ถาวร

4) กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope, compound microscope และกล้องถ่ายภาพ

5) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเพลี้ยอ่อนในวงศ์ Aphididae ของ Blackman and Eastop (2000)

- วิธีการ

1) สืบค้นข้อมูลเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* ที่จากเอกสารต่าง ๆ ที่มีการรายงานไว้ในประเทศไทย และ ต่างประเทศ หรือจากข้อมูลอิเลคโทรนิค

2) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่าง

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

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* ในแปลงปลูกทั่วทุกภาคของประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

ดังนี้

ปีที่ 1 (2563)

ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี ลพบุรี นครสวรรค์ พิษณุโลก และเพชรบูรณ์

ภาคเหนือ ได้แก่ ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน เชียงราย แพร่ และน่าน

ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี สระแก้ว ระยอง จันทบุรี ตราด และชลบุรี

ปีที่ 2 (2564)

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ ร้อยเอ็ด ขอนแก่น เลย ยโสธร สกลนคร ศรีษะเกษ หนองคาย อุดรธานี อุบลราชธานี

ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์

ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ ภูเก็ต พัทลุง ตรัง และสงขลา

3) การศึกษาทางด้านชีววิทยา

นำเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* ที่เก็บรวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยจะทำการศึกษาชีววิทยาของเพลี้ยอ่อนถั่วในพืชอาหารอย่างน้อย 2 ชนิด (จะทำการศึกษาในพืชอาหารที่เพลี้ยอ่อนถั่วลงทำลายมากเป็นอันดับ 1 และ 2 จากการสำรวจ) วิธีการโดยนำตัวเต็มวัยของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* จำนวน 200 ตัว มาเพาะเลี้ยงรวมกันในกล่องพลาสติกขนาด 14 x 23 x 7 เซนติเมตร ให้ใบถั่วฝักยาวเป็นอาหารโดยใช้สำลีชุบน้ำพันรอบก้านใบเพื่อรักษาความสด เมื่อตัวเต็มวัยออกลูกทำการแยกตัวอ่อนโดยใช้พู่กันเบอร์ 0 เขี่ยเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* แต่ละตัวไปเพาะเลี้ยงใน petri dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 2 เซนติเมตร รองด้วยกระดาษกรองที่มีความชื้น petri dish ละ 1 ตัว และใส่ใบถั่วฝักยาวขนาด 3 x 3 เซนติเมตร เพื่อเป็นอาหาร ทำการเปลี่ยนใบถั่วทุก 2 วัน สังเกตุการเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิต บันทึกข้อมูลจำนวนเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* ที่รอดชีวิตทุกๆวันจนกระทั่งเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* เป็นตัวเต็มวัย และนับจำนวนตัวอ่อนที่ตัวเต็มวัยออกลูกทุกวัน จนกระทั่งตัวเต็มวัยตาย นำข้อมูลที่ได้ไปสร้างตารางชีวิตแบบ biological life table โดยใช้เทคนิคของ Napompeth (1973) และอินทวัฒน์ (2548)

4) การศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน

นำตัวอย่างตัวเต็มวัยของเพลี้ยอ่อนที่เก็บรวบรวมได้จากแปลงปลูกพืชมาตรวจลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาด รูปร่าง ลักษณะ สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพเพลี้ยอ่อนแต่ละระยะ

การทำสไลด์ถาวร

ศรีวิชัยเกษตร

- นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่เก็บโดยการดองในแอลกอฮอล์มาทำสไลด์ถาวร ตามวิธีการของ Blackman and Eastop (2000) ดังนี้

- นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนจากขวดดอง ใช้เข็มเจาะบริเวณส่วนกลางอกด้านบนของ เพลี้ยอ่อน และรีดเอาของเหลวและตัวอ่อนที่อยู่ภายในตัวออก ระวังอย่าให้ปากเสียหาย นำเพลี้ยอ่อนที่เจาะแล้วใส่ในหลอดแก้วที่มีแอลกอฮอล์ 95% ไปต้มโดยวิธีวอเตอร์บาท (water bath) นาน 1-2 นาที

- ดูดแอลกอฮอล์ออก เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide: KOH) 10% แช่ทิ้งไว้ 3-5 นาที

- ดูดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ออก เติมน้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำกลั่น 5-6 ครั้ง แล้วแช่ทิ้งไว้ในน้ำกลั่นอีก 5-6 นาที

- ดูดน้ำกลั่นออก เติมกรดแกลเชียลอะซิติก แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

- ดูดกรดแกลเชียลอะซิติกออก เติมโคลฟอออย แช่ทิ้งไว้ 10-20 นาที หรือจนกว่าตัวอย่างเพลี้ยอ่อนใส

<u>การเม้าท์สไลด์</u>

หยดแคนนาดาบัลซัมเพียงเล็กน้อยลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ เขี่ยเพลี้ยอ่อนลงในหยดแคนนาดาบัลซัม ให้เพลี้ยอ่อนหงายท้องขึ้น จัดหนวด ขา ไซฟังคูไล และหางให้อยู่ในตำแหน่งสวยงาม จากนั้นหยดไซลีนลงบนกึ่งกลางแผ่นสไลด์ที่สะอาด ค่อยๆคว่ำแผ่นสไลด์ลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ช้าๆ รีบพลิกแผ่นสไลด์ให้ด้านแผ่นแก้วปิดสไลด์อยู่ด้านบน นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7-15 วัน การเมาท์สไลด์ด้วยวิธีการนี้สามารถเก็บสไลด์ได้คงทนนานนับปี

<u>การวินิจฉัยชนิด</u>

- นำสไลด์ที่ผ่านการอบจนแห้งมาตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตรวจสอบลักษณะสำคัญต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกชนิดกับเอกสารแนวทางการวินิจฉัยเพลี้ยอ่อน ลักษณะสำคัญของเพลี้ยอ่อนที่ใช้ในการจำแนกชนิด ได้แก่ ส่วนหัว; ร่องหนวดและร่องบริเวณหน้าผาก ความสั้นยาวของหนวด จำนวนปล้องและความยาวส่วนปลายของปล้องสุดท้าย ความยาวของปาก ส่วนอก; ความยาวของปลายขาคู่หลังและหนามบนน่องขา ส่วนท้อง; จะมีตุ่มขนาดเล็กปรากฏบริเวณปล้องท้องปล้องที่ 1 และ 7 โดยเฉพาะปล้องที่ 7 ตำแหน่งของตุ่มขนาดเล็กที่ปรากฏอยู่ด้านบนหรือด้านล่างรูหายใจใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกระดับสกุล แต่ในเพลี้ยอ่อนบางชนิดไม่ปรากฏตุ่มดังกล่าว วาดรูปแสดงลักษณะต่างๆที่สำคัญ

- บันทึกรายละเอียดต่างๆ ของเพลี้ยอ่อนที่สำรวจพบ เช่น ลักษณะ รูปร่าง ขนาด สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพเพลี้ยอ่อนในแต่ละระยะ รวมถึงบันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายที่ต้องติดไว้กับสไลด์เพลี้ยอ่อนแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่จับ และ วัน/เดือน/ปีที่ทำสไลด์ถาวร ชื่อน้ำยาที่ใช้เมาท์ (mount) สไลด์

- จัดทำแนวทางการวินิจฉัยเพลี้ยอ่อนและวาดภาพลักษณะสำคัญประกอบ

- เก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษา เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล เพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

กรมวิชาการเกษตร

การบันทึกข้อมูล

บันทึกรายละเอียด ชื่อพืช พันธุ์พืช สถานที่เก็บตัวอย่าง วัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) ซึ่งประกอบด้วยค่าละติจูด (Latitude) ค่าลองติจูด (Longitude) ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (Altitude) วัน เดือน ปี ที่ เก็บตัวอย่างและชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ นอกจากตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่ได้จากสภาพธรรมชาติแล้ว มีตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่มีอยู่เดิมในพิพิธภัณฑ์ กรมวิชาการเกษตร ตัวอย่างที่ได้จากนักวิชาการ และตัวอย่างจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564

สถานที่ - แหล่งปลูกพืชผักที่สำคัญของประเทศไทย

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาสัณฐานวิทยาและชีววิทยาของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* โดยทำการสืบค้นข้อมูลพืชอาหารที่มีรายงานในประเทศไทยและต่างประเทศ รวมถึงข้อมูลอิเล็คโทรนิค ทำการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* จำนวน 500 ตัวอย่าง ในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา นครปฐม สุพรรณบุรี กรุงเทพฯ ปทุมธานี นครนายก พิษณุโลก เพชรบูรณ์ ลพบุรี สุพรรณบุรี ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน แพร่ น่าน ฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี สระแก้ว ระยอง จันทบุรี ตราด และชลบุรีนำมาจัดทำสไลด์ถาวร และนำไปอบแห้งในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 – 60 วัน และนำไปจัดจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ตรวจสอบลักษณะสำคัญต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกชนิดโดยใช้แนวทางการวินิจฉัยเพลี้ยอ่อนของ Blackman and Eastop (2000) รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีในพิพิธภัณฑ์แมลงของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การศึกษาพืชอาหาร และเขตการแพร่กระจาย

จากการสำรวจและเก็บรรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนถั่วในพืชต่างๆ พบว่า เพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* มีพืชอาหาร ได้แก่ พืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis* Koern) ถั่วพู (*Psophocarpus tetragonolobous* D.C.) ถั่วแปป (*Dolichos lablab* L.) ถั่วลิสง ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.)) ถั่วเขียว (*Phaseolus aureus* Roxb) เป็นต้น พืชตระกูลกะหล่ำ พืชตระกูลแตง (วงศ์ Cucurbitae) ; (แตงกวา (*Cucumis Sativus* Linn.) บวบ (*Luffa cylindrica*) น้ำเต้า (*Lagenaria siceraria*) ส้ม (*Citus reticulata*) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* (L.) พริก (*Capsicum* spp.) มะเขือ (*Solanum melongeana* var. serpentinum L.) แคบ้าน (*Sesbania grandiflora* Disy) ผักโขม (*Solanum melongeana* var. serpentinum L.) ชบา (*Hibiscus rosa-sinensis*) กระเจี๊ยบ (*Hibiscus sabdariffa* L.) ขี้เหล็ก (*Senna siamea* Lam H.S.Irwin & Barneby) โดยพบทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเข้าทำลายพืชโดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร

เซลล์พืชบริเวณใต้ใบ หรือส่วนอ่อนๆของพืช เช่น ยอดอ่อน ตาอ่อน ใบ ดอกและผล พบทุกจังหวัดที่ทำการสำรวจ

ภาพที่ 2.1.10.1 เพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch ที่สำรวจพบในพืชอาหารต่างๆ

การศึกษาชีววิทยาของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora*

การศึกษาชีววิทยาของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* ได้ดำเนินการในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 60 - 80 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษารูปร่างลักษณะ และวงจรชีวิตของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* โดยทำการเลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว พบว่า เพลี้ยอ่อนถั่วมีการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ ตัวเต็มวัยสามารถออกลูกได้โดยไม่ต้องผสมพันธุ์ ไข่จะเจริญเป็นตัวอ่อนอยู่ในท้องของตัวเต็มวัยและออกลูกเป็นเพศเมียทั้งหมด วงจรชีวิตของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* มีการลอกคราบทั้งหมด 4 ครั้ง ระยะตัวอ่อนมี 4 วัย ตัวอ่อนระยะที่ 1 ที่ออกมาใหม่ๆ มีขนาดเล็กมากมีสีเหลืองอ่อน ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 0.71 $\pm$ 0.09 มิลลิเมตร (n = 20) ตัวอ่อนระยะที่ 2 ลำตัวยาวเฉลี่ย 0.93 $\pm$ 0.08 มิลลิเมตร (n = 20) ตัวอ่อนระยะที่ 3 ลำตัวยาวเฉลี่ย 1.26 $\pm$ 0.09 มิลลิเมตร (n = 20) ตัวอ่อนระยะที่ 4 ลำตัวยาวเฉลี่ย 1.54 $\pm$ 0.10 มิลลิเมตร (n = 20) ระยะตัวอ่อนใช้ระยะเวลา 4 - 6 วัน ในการลอกคราบของตัวอ่อนแต่ละระยะ ลำตัวจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและสีของลำตัวและไซฟังคูไลจะเข้มมากขึ้น ตัวเต็มวัยลำตัวยาวเฉลี่ย 2.18 $\pm$ 0.38 มิลลิเมตร (n = 20) ลำตัวมีสีเทาดำถึงดำเป็นมันเงา มีผงแป้งปกคลุมที่ส่วนท้อง บริเวณส่วนท้องมีแถบสีดำ ระยะตัวเต็มวัยเฉลี่ย 16.75 $\pm$ 1.16 เพลี้ย

อ่อนสามารถออกลูกได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย เฉลี่ย 8.6 $\pm$ 1.87 ชั่วโมง ตัวแม่หนึ่งตัวสามารถออกลูกได้เฉลี่ย 81.8 $\pm$ 2.40 ตัว (ตารางที่ 2.1.10.1) ตัวเต็มวัยมีทั้งพวกมีปีกและไม่มีปีก

ผลการวิเคราะห์ค่าคุณลักษณะทางชีววิทยาจากตารางชีวิตแบบ biological life table ของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* ที่เลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว พบว่า เพลี้ยอ่อนถั่วมีอัตราการขยายพันธุ์สุทธิ (R_0) เท่ากับ 67.1600 เท่า ค่าสัมประสิทธิ์การเพิ่มทางกรรมพันธุ์ (r_c) เท่ากับ 0.2832 ค่าสัมประสิทธิ์ของการขยายพันธุ์ (λ) มีค่าเท่ากับ 1.9100 เท่า และชั่วอายุขัยของกลุ่ม (T_c) เท่ากับ 14.854 วัน (ตารางที่ 2.1.10.2) แสดงให้เห็นว่าเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* สามาถขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณได้ 67.1600 เท่า ต่อชั่วอายุขัย เพลี้ยอ่อนถั่วหนึ่งตัวสามารถเพิ่มปริมาณได้ 1.9100 เท่า โดยตัวเต็มวัยสามารถออกลูกได้ในชั่วโมง 6 หลังจากเป็นตัวเต็มวัย และออกลูกได้มากที่สุดในวันที่ 3

ผลการศึกษาตารางชีวิตแบบ Partial ecological life table ของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* เมื่อเลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว ในสภาพห้องปฏิบัติการพบว่า มีการตายต่อชั่วอายุในแต่ละระยะของการเจริญเติบโต คือ ระยะตัวอ่อนวัยที่ 1 – 4 เท่ากับร้อยละ 15, 15, 9 และ 6 ตามลำดับ (ตารางที่ 2.1.10.3) โดยระยะตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 มีอัตราการตายสูงที่สุด และระยะตัวอ่อนวัยที่ 3 มีอัตราการตายต่ำสุด ซึ่งการศึกษาตารางชีวิตแบบนี้เป็นการศึกษาในสภาพห้องปฏิบัติการที่มีปัจจัยต่างๆ ที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของแมลง ดังนั้นการตายของแมลงในระยะต่างๆ ของการเจริญเติบโตเป็นการตายเนื่องมาจากศักยภาพของแมลง การตายดังกล่าวจึงเกิดขึ้นน้อยกว่าที่ควรจะเป็น เมื่อเปรียบเทียบกับการดำรงชีพในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ ซึ่งมีปัจจัยที่มีชีวิตและปัจจัยไม่มีชีวิตมากมายที่เป็นสาเหตุทำให้แมลงตายได้มากกว่า (Jalalipour *et, al*., 2017) (ณัฏฐาวรีย์, 2552)

ตารางที่ 2.1.10.1 ระยะเวลาการเจริญโตของเพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 25 + 2 องศาเซลเซียส ความชื้น สัมพัทธ์เฉลี่ย 60 – 80 เปอร์เซ็นต์

ระยะการเจริญเติบโต		จำนวน	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (วัน)	พิสัย (วัน)
ตัวอ่อน (Nymph) :	วัยที่ 1	20	1.14 $\pm$ 0.11	1 - 2
	วัยที่ 2	20	1.21 $\pm$ 0.21	1 - 2
	วัยที่ 3	20	1.17 $\pm$ 0.12	1 - 2
	วัยที่ 4	20	1.15 $\pm$ 0.09	1 - 2
ระยะตัวอ่อน (Nymphal period)		20	4.51 $\pm$ 0.11	4 - 6
ระยะตัวเต็มวัย (Adult period)		20	16.75 $\pm$ 1.16	6 - 14
อายุขัย (Life span)		20	14.10 $\pm$ 1.48	7 - 16

ตารางที่ 2.1.10.2 คุณลักษณะทางชีววิทยาของเพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch

ศรีวิชาการเกษตร

คุณลักษณะทางชีววิทยา	สูตร	ค่าที่ได้
อัตราการขยายพันธุ์สุทธิ (R_o) (Net Reproductive Rate of Increase)	$\sum l_x m_x$	67.1600
อัตราการขยายพันธุ์ทางกรรมพันธุ์ (r_c) (Capacity for Increase)	$\frac{\log_e R_o}{T_c}$	0.2832
ชั่วอายุขัยของกลุ่ม (T_c) (Cohort Generation time)	$\frac{\sum l_x m_x . X}{\sum l_x m_x}$	14.8540
ค่าสัมประสิทธ์ของการขยายพันธุ์ที่แท้จริง (λ) (Finite Rate of Increase)	$\text{antilog}_e r_c$	1.9100

ตารางที่ 2.1.10.3 ตารางชีวิตแบบ Partial ecological life table ของเพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Kochในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 25 + 2 องศาเซลเซียส ความชื้น สัมพัทธ์เฉลี่ย 60 – 80 เปอร์เซ็นต์

ระยะการเจริญเติบโต	จำนวนที่รอดชีวิต	จำนวนที่ตาย	เปอร์เซ็นต์การตาย	เปอร์เซ็นต์การตายในชั่วอายุขัย
(X)	(lx)	(dx)	(100qx)	(100dx/n)
ตัวอ่อนระยะที่ 1	100	15	15	15
ตัวอ่อนระยะที่ 2	85	15	17.65	15
ตัวอ่อนระยะที่ 3	70	9	12.86	9
ตัวอ่อนระยะที่ 4	61	6	9.84	6
ตัวเต็มวัย	55	-	-	-

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.1.10.2 ทำการเตรียมพืชอาหารสำหรับใช้ศึกษาชีววิทยาในห้องปฏิบัติการ

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.1.10.3 เพลี้ยอ่อนถั่วในแต่ละระยะการเจริญเติบโต

ก. ระยะตัวเต็มวัย

ข. ระยะตัวอ่อนวัยที่ 1

ค. ระยะตัวอ่อนวัยที่ 2

ง. ระยะตัวอ่อนวัยที่ 3

จ. ระยะตัวอ่อนวัยที่ 4

กรมวิชาการเกษตร

การศึกษาด้านอนุกรมวิธาน

ชื่อสามัญ	เพลี้ยอ่อนถั่ว (cowpea aphid)
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Aphis craccivora* Koch
ชื่อพ้อง	*Aphis laburni* of extra-European authors nec Kaltenbach, 1843;

Aphis salvia Walker, 1852

Aphis craccivora C.L.Koch, 1854

Aphis loti Kaltenbach, 1862

Aphis onobrychidis Goureau, 1863

Aphis mimosa Ferrari, 1872

Aphis robiniae Cockrell, 1885

Aphis atronitensf Cockrell, 1903

Aphis atronitens Cockrell, 1903

Aphis hordi del Guercio, 1913

Aphis Leguminosae Theobald, 1915

Aphis beccarii del Guercio, 1917

Aphis citricola del Guercio, 1917

Aphis isabelline del Guercio, 1917

Aphis papilioncaerum van der Goot, 1918

Aphis cistiella Theobald, 1923

Aphis oxalina Theobald, 1925

Aphis kyberi Hottes, 1930

Aphis meliloti Borner, 1939

Aphis salsolae Borner, 1940

Aphis loti sub sp. Gollmicki Borner, 1952

กรมวิชาการเกษตร

อันดับ : วงศ์ : วงศ์ย่อย Hemiptera : Aphididae : Aphidinae

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดกลาง ลำตัวยาว 2.18 $\pm$ 0.38 มิลลิเมตร (n = 20) ตัวอ่อนที่ออกมาใหม่ๆ มีขนาดเล็กมากสีเหลืองอ่อน เมื่อโตขึ้นมีสีเทาดำถึงสีดำเป็นมันเงามีผงแป้งปกคลุมที่ส่วนท้อง หนวดมี 6 ปล้อง ปาก (rostrum) ยาวถึงฐานขาคู่กลาง ไซฟังคูไล (siphunculi) เรียว ส่วนหาง (cauda) มีรูปร่างคล้ายลิ้น มีขน 4 – 7 เส้น ตุ่มด้านข้างลำตัว (lateral tubercles) บนปล้องท้องที่ 1 และ 7 อยู่ข้างใต้ด้านหลังรูหายใจ (spiracles)

ลักษณะบนแผ่นสไลด์แก้ว หัว (head) และหนวด (antennae) ปล้องสุดท้ายสีน้ำตาล หนวดปล้องที่ 3, 4 และฐานปล้องที่ 5 มีสีซีด หนวดสั้นกว่าลำตัว ไซฟังคูไล (siphunculi) และส่วนหาง (cauda) สีน้ำตาลหรือสีดำ ส่วนปาก (rostrum) ยาวถึงโคนขาคู่กลาง ไซฟังคูไล (siphunculi) ยาวกว่าส่วนหาง (cauda) ส่วนหางมีรูปร่างคล้ายลิ้น (tongue-shape) มีขน 4 – 7 เส้น บริเวณส่วนท้องด้านสันหลังมีแถบสีดำ (4)

พืชอาหาร

ถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis* Koern)

ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.))

ถั่วเขียว (*Phaseolus aureus* Roxb)

ถั่วพู (Psophocarpus tetragonolobous D.C.)

ถั่วแปป (*Dolichos lablab* L.)

พริก (*Capsicum* spp.)

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* (L.)

ละหุ่ง (*Ricinus communis* L.)

ผักโขม (*Amaranthus sp.*)

ส้ม (*Citus reticulata*)

ขี้เหล็ก (*Senna siamea* (Lam.) H.S.Irwin & Barneby)

กระเจี๊ยบ (*Hibiscus sabdariffa* L.)

ชบา (*Hibiscus rosa-sinensis*)

แตงกวา (*Cucumis Sativus* Linn.)

มะเขือ (*Solanum melongeana* var. serpentinum L.)

แค (*Sesbania grandiflora* Disy)

การวินิจฉัย

เพลี้ยอ่อน *A. craccivora* มีรูปร่างลักษณะและสีของลำตัวคล้ายคลึงกับเพลี้ยอ่อนดำส้ม *Toxoptera citricidus* แตกต่างจาก *T. citricidus* คือบริเวณส่วนท้องมีแถบสีดำ มีรายงานว่าเพลี้ยอ่อน *A. craccivora* เป็นพาหะนำเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชถึง 32 โรค เช่น โรคไวรัสใบด่าง (bean common mosaic) โรคด่างใบเหลือง (bean yellow mosaic) เป็นต้น (Kennedy, 1962)

เขตการแพร่กระจาย

มีเขตการแพร่กระจายทั่วโลก

ประเทศไทยสำรวจพบทั่วทุกภูมิภาค

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.1.10.4 **เพลี้ยอ่อนถั่ว** *Aphis craccivora* Koch

ก. ตัวเต็มวัย

ข. ลักษณะตัวเต็มวัยเมื่อนำไปทำสไลด์ถาวรเพื่อจัดจำแนกชนิด

ค. ลักษณะของส่วนหัว หนวด ปาก ขา

ง. ลักษณะส่วนท้อง ไซฟังคูไล และส่วนหาง

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดกลาง ลำตัวยาวเฉลี่ย 2.18 $\pm$ 0.38 มิลลิเมตร มีสีเทาดำถึงสีดำเป็นมันเงามีผงแป้งปกคลุมที่ส่วนท้อง หนวดมี 6 ปล้อง ปาก (rostrum) ยาวถึงโคนขาคู่กลาง ไซฟังคูไล (siphunculi) เรียวและยาวกว่าส่วนหาง (cauda) ส่วนหางมีรูปร่างคล้ายลิ้น (tongue-shape) มีขน 4 – 7 เส้น ตุ่มด้านข้างลำตัว (lateral tubercles) บนปล้องท้องที่ 1 และ 7 อยู่ข้างใต้ด้านหลังรูหายใจ (spiracles) บริเวณส่วนท้องด้านสันหลังมีแถบสีดำ

วงจรชีวิตของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* โดยทำการเลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว ในสภาพห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60 – 80 เปอร์เซ็นต์ มีการลอกคราบทั้งหมด 4 ครั้ง ระยะตัวอ่อนมี 4 วัย ตัวอ่อนระยะที่ 1 ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 0.71 $\pm$ 0.09 มิลลิเมตร (n = 20) ตัวอ่อนระยะที่ 2 ลำตัวยาวเฉลี่ย 0.93 $\pm$ 0.08 มิลลิเมตร (n = 20) ตัวอ่อนระยะที่ 3 ลำตัวยาวเฉลี่ย 1.26 $\pm$ 0.09 มิลลิเมตร (n = 20) ตัวอ่อนระยะที่ 4 ลำตัวยาวเฉลี่ย 1.54 $\pm$ 0.10 มิลลิเมตร (n = 20) ระยะตัวอ่อน 4 - 6 วัน ตัวเต็มวัย

ลำตัวยาวเฉลี่ย 2.18 $\pm$ 0.38 มิลลิเมตร (n = 20) ระยะตัวเต็มวัย 6 – 14 วัน เพลี้ยอ่อนสามารถออกลูกได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย เฉลี่ย 8.6 $\pm$ 1.87 ชั่วโมง พิสัย 6 – 11 ชั่วโมง ตัวแม่หนึ่งตัวสามารถออกลูกได้เฉลี่ย 81.8 $\pm$ 2.40 ตัว ตัวเต็มวัยมีทั้งพวกมีปีกและไม่มีปีก

ผลการวิเคราะห์ค่าคุณลักษณะทางชีววิทยาจากตารางชีวิตแบบ biological life table ของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* ที่เลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว มีอัตราการขยายพันธุ์สุทธิ (R_0) เท่ากับ 67.1600 เท่า ค่าสัมประสิทธิ์การเพิ่มทางกรรมพันธุ์ (r_c) เท่ากับ 0.2832 ค่าสัมประสิทธิ์ของการขยายพันธุ์ (λ) มีค่าเท่ากับ 1.9100 เท่า และชั่วอายุขัยของกลุ่ม (T_c) เท่ากับ 14.854 วัน ตัวเต็มวัยสามารถออกลูกได้ในชั่วโมง 6 หลังจากเป็นตัวเต็มวัย และออกลูกได้มากที่สุดในวันที่ 3

การศึกษาตารางชีวิตแบบ Partial ecological life table ของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* เมื่อเลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว ในสภาพห้องปฏิบัติการ ระยะตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 มีอัตราการตายสูงที่สุด และระยะตัวอ่อนวัยที่ 3 มีอัตราการตายต่ำสุด

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

4. ได้ข้อมูลรายละเอียดของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* พืชอาศัย สำหรับจัดทำฐานข้อมูลอย่างสมบูรณ์
5. ได้ข้อมูลเบื้องต้นที่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ สามารถนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาด้านอื่นๆ
6. มีตัวอย่างเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง เพื่อใช้ในการอ้างอิง ตรวจสอบความถูกต้อง เพื่อประกอบในงานสำคัญด้านการส่งออก และนำเข้าสินค้าเกษตร ตลอดจนใช้ในด้านกักกันพืช ซึ่งเป็นไปตามมาตรการด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช เพื่อปกป้องสุขภาพมนุษย์ สัตว์ พืชและสิ่งแวดล้อม

กรมวิชาการเกษตร

ชื่อการทดลองที่ 2.2.1 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phyllosticta citriasiana*

Study on Biology and Ecology of *Phyllosticta citriasiana*

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นางสาวชนินทร ดวงสอาด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ศึกษาอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *Phyllosticta citriasiana* ไอโซเลต DOA 009 (ส้มโอ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย) DOA 040 (ส้มโอ อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม) DOA 088 (ส้มโอ อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่) และ DOA 090 (ส้มโอ อำเภอเกษตรสมบูรณ์ จังหวัดชัยภูมิ) จาก culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยศึกษาการเจริญของเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) malt extract agar (MEA) oat meal agar (OMA) V-8 juice agar (V-8 A) และ cherry decoction agar ผลการทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* พบว่า รา *P. citriasiana* ทุกไอโซเลตมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA ยกเว้นราไอโซเลต DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร MEA และผลการทดสอบอุณหภูมิที่ 25 30 35 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการพบว่ารา *P. citriasiana* เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ยกเว้นราไอโซเลต DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาพืชอาศัยพบว่า ส้มโอเป็นพืชอาศัยของราชนิดนี้ พบการเกิดโรคที่ใบและผลเท่านั้น ไม่เกิดโรคที่ลำต้น สำหรับการเข้าทำลายของรา *P. citriasiana* บนผลส้มโอพบราสร้าง สปอร์ 2 ชนิด ได้แก่ โคนิเดีย (conidia) และสเปอร์มาเทีย (spermatia) เข้าทำลายที่ใบบนต้นและสร้างสปอร์สะสมอยู่บนใบที่ร่วงลงดินด้วยซึ่งเป็นที่อาศัยของเชื้อราในการแพร่ระบาดในฤดูต่อไป และมักพบรา Phyllosticta capa และมักพบรา *Phyllosticta capitalensis* (Teleomorph state*: Guignardia mangiferae*) เป็นราเอ็นโดไฟท์เจริญอยู่บนใบและผลส้มโอด้วยแต่ไม่ทำให้เกิดโรคซึ่งเป็นลักษณะของ Non-pathogenic fungi และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ารา *P. citriasiana* ไม่สร้างระยะสืบพันธุ์แบบมีเพศ

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

To study the optimum temperature and suitable media for the growth of *Phyllosticta citriasiana*, the causal agent was isolated from tan spot on *Citrus maxima* collected from various locations, then confirmed the species using molecular data. Four accessions of *P. citriasiana*, namely DOAM0086 (Chiang Dao, Chiangmai), DOAM0089 (Wiang Kaen district, Chiangrai), DOAM0412 (Nakhon Chai Si district, Nakhon Pathom) and DOAM0623 (Kaset Sombun district, Chaiyaphum), had been tested on potato dextrose agar (PDA) malt extract agar (MEA) oat meal agar (OMA) V-8 juice agar (V-8 A) and cherry decoction agar at different temperature. It was found that most of *P. citriasiana* isolates presented the best growth rate on OMA and the optimum temperature was at 25 degree Celsius. There was one exemption for DOAM0412, which present the best results on MEA and at 30 degree Celsius. The biological study confirmed that *C. maxima* was the host of *P. citriasiana*. The symptom was found on leave and fruits, but not stem, branches or branchlets. Conidia and spermatia could be observed on foliage and fruits as well as the dried leave, which fallen and embedded in soil. This had become the source of inoculum for further spreading in the next season. In addition, the endophytic as *P. capitalensis* (Teleomorph state*: Guignardia mangiferae*), which was non-pathogen, also presented while isolated fungi from specimens. Based on this study, the sexual stage of *P. citriasiana* had not been found.

คำนำ

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) เช่นเดียวกับโรคใบจุดสีน้ำตาล (Tan spot) ของส้มโอ สาเหตุเกิดจากรา *Phyllosticta citriasiana* 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

เนื่องจากรา *Phyllosticta citriasiana* เป็นสาเหตุโรค Tan spot ของส้มโอ มีรายงานพบในประเทศไทย ในปี 2550 (Wulandari et al., 2009) และมีรายงานแพร่ระบาดในส้มประเทศจีน (Seaver, 2012)

กรมวิชาการเกษตร

เวียดนาม ด้วยเหมือนกัน ราเข้าทำลายผลส้มโอระยะใกล้สุกและเข้าทำลายใบ สำหรับพืชอาศัยของราชนิดนี้ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับพืชอาศัยเลย (Wang et al., 2012; Wikee et al., 2011; Wulandari et al., 2009) จากการศึกษาของ Walandari และคณะ (2009) รายงานว่ารานี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลใกล้ชิดกับรา *Guignardia citricarpa* มาก ซึ่งรา *G. citricarpa* เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศในสหภาพยุโรป และสหรัฐอเมริกา สำหรับในประเทศไทย พรพิมลและคณะ (2550) ศึกษาสาเหตุโรคจุดดำของส้มโอในอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย จำแนกชนิดสาเหตุโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุเป็นรา *Phyllosticta citricarpa* แต่ไม่พบระยะสืบพันธุ์ของราคือ *Guignardia citricarpa* ในแปลงปลูกส้มโออำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย ในปี 2552 Walandari และคณะ (2009) ศึกษาพบโรคใหม่ของส้มโอและตั้งชื่อว่า โรค tan spot สาเหตุเกิดจาก *Phyllosticta citriasiana* โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล ซึ่งลักษณะของราชนิดนี้มีลักษณะใกล้ชิดกับรา *Guignardia citricarpa* และ *Guignardia mangiferae* มาก ทำให้เกิดการสับสนในการจำแนกชนิดของราทั้งสามชนิดนี้ เนื่องจากรา *P. citriasiana* พบแพร่กระจายในประเทศเอเชีย เช่น จีน เวียดนาม และไทย และเป็นราที่พบในปี 2552 โดยยังไม่ค่อยมีกี่ศึกษารายละเอียดของเชื้อมากนัก ประกอบด้วยพบการระบาดในประเทศแถบเอเชียเท่านั้น และเนื่องจากส้มโอเป็นพืชที่มีศักยภาพในการส่งออกไปในประเทศในสหภาพยุโรปได้ ซึ่งจะต้องมีปัญหากับการส่งออกส้มโอไปประเทศยุโรป หรือสหรัฐอเมริกา เพราะฉะนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาลักษณะทางชีววิทยา นิเวศวิทยาของราชนิดนี้เพื่อเป็นข้อมูลของเชื้อเพื่อในการศึกษาหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมตลอดจนสามารถนำข้อมูลนี้ไปวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชได้

ส้มโอ เป็นไม้ผลที่นิยมของผู้บริโภคภายในและต่างประเทศ และมีศักยภาพมากในการส่งออก แต่เนื่องจากประสบปัญหาเรื่องโรค ทำให้เกิดอุปสรรคต่อการส่งออกส้มโอไปยังตลาดสำคัญของโลก โดยโรคพืชที่สำคัญต่อการส่งออกส้มโอคือ โรคแคงเคอร์ (Canker) สาเหตุจากแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* และโรคจุดดำ (Black spot) สาเหตุเกิดจากรา *Phyllosticta citricarpa* (syn. *Guignardia citricarpa*) โดยเชื้อสาเหตุทั้งสองชนิดเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศในสหภาพยุโรป ในปี 2549 ประเทศไทยส่งออกส้มโอไปประเทศเนเธอร์แลนด์ และด่านตรวจพืชของประเทศเนเธอร์แลนด์ ตรวจพบโรคลักษณะคล้ายโรคจุดดำบนผลส้มโอจากประเทศไทย และได้สั่งเผาทำลายทั้ง container จากเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นทำให้ประเทศไทยเป็นที่จับตามองว่าเป็นประเทศที่มีโรคจุดดำระบาด ในปี พ.ศ. 2550-2551 ได้มีการศึกษาสาเหตุของโรคและจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเป็น รา *P. citricarpa* พร้อมทั้งศึกษาเทคโนโลยีในการป้องกันกำจัด

ราสกุล *Phyllosticta* เป็นสาเหตุโรคพืชแล้วยังเป็นราเอ็นโดไฟท์ซึ่งเป็นสกุลเด่นที่พบเจริญอยู่ในพืชแทบทุกชนิด โดยเฉพาะโรค Black spot ของพืชส้ม ซึ่งมีสาเหตุเกิดจาก *P. citricarpa* (Teleomorph state: *G. 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* .ในขณะเดียวกันก็พบรา P. capitalensis เจริญอยู่ด้วยและเมื่อทำการแยกเชื้อก็มักพบราทั้งสองชนิดนี้ รา *P. citriasiana* เป็นราที่พบในประเทศจีน เวียดนาม และไทย จากรายงาน ไม่พบราชนิดนี้ในสหภาพยุโรปและสหรัฐอเมริกา (Wang et al., 2012; Wikee et al., 2011;

Wulandari *et al*., 2009) แต่ในขณะเดียวกันมีรายงานพบรา *P. citribrazilliensis* C. Glienke & Crous ที่แยกได้จากแผล necrotic spots บนผลส้มโอในประเทศบราซิล ดังนั้นการส่งออกส้มโอไปประเทศเหล่านี้และการนำเข้าส้มมาจากประเทศบราซิลจะต้องมีมาตรการในการควบคุมการระบาดของโรค

เนื่องจากรา *P. citriasiana* เป็นสาเหตุโรค Tan spot ของส้มโอ มีรายงานพบในประเทศไทย ในปี 2550 (Wulandari et al., 2009) และมีรายงานแพร่ระบาดในส้มประเทศจีน เวียดนาม ด้วยเหมือนกัน ราเข้าทำลายผลส้มโอระยะใกล้สุกและเข้าทำลายใบ สำหรับพืชอาศัยของราชนิดนี้ ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับพืชอาศัยเลย (Wang et al., 2012; Wikee et al., 2011; Wulandari et al., 2009) จากการศึกษาของ Walandari และคณะ (2009) รายงานว่ารานี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลใกล้ชิดกับรา P. citricarpa มาก ซึ่งเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศในสหภาพยุโรป และสหรัฐอเมริกา ต่อมาพบว่าด้วยข้อจำกัดของลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำให้เชื้อสาเหตุในกลุ่ม *Phyllosticta* ที่เข้าทำลายพืชกระกูลส้มถูกวินิจฉัยว่าเป็นรา P. citricarpa และความแตกต่างนี้สามารถจำแนกได้ด้วยความแตกต่างของข้อมูลพันธุกรรมเท่านั้น เนื่องการตรวจสอบรา *P. citriasiana* และโรคพืช อาจจะได้ราหลายชนิดในสกุล Phyllosticta ที่อยู่ในกลุ่มของเอ็นโดไฟท์เช่น *P. capitalensis* ซึ่งจะพบมากในเขตร้อนร้อนและกึ่งร้อนชื้นในพืชพื้นเมืองและพืชอื่น ๆ รา *P. capitalensis* สามารถเข้าไปเจริญในแผลได้

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1 อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ กระดาษ ถุงพลาสติค ปากกาเคมี ดินสอ กรรไกรตัดกิ่ง และ GPS

2. อุปกรณ์จัดเก็บตัวอย่างแห้ง ได้แก่ แผ่นไม้อัดทับตัวอย่าง กระดาษ

3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ slide cover slip ปากคีบ เข็มเขี่ยปลายแหลม ตะเกียง ยาทาเล็บ

4. สารเคมีสำหรับ mount slide ได้แก่ lactophenol , lactic acid, shear's sulution

5. สารเคมีได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ: สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75%

6 อาหารวุ้นสังเคราะห์ corn meal agar (CMA), potato dextrose agar (PDA)

7. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดดูแรน บีกเกอร์ เป็นต้น

8. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว เป็นต้น

9. กล้องจุลทรรศน์ compound microscope และ stereo microscope พร้อมกล้องถ่ายรูปและ camera lucida สำหรับวาดภาพราจากกล้องจุลทรรศน์

- วิธีการ

1. ศึกษาชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

ศรีวิชัยการเกษตร

1.1 การทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* บนอาหารสังเคราะห์

ในห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำ 6 กรรมวิธี โดยให้อาหารแต่ละชนิดเป็นกรรมวิธี ดังนี้

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 Cherry decoction agar

วิธีการทดลอง

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

การบันทึกผลการทดลอง

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยเชื้อราบนอาหารแต่ละชนิด เมื่อเส้นใยที่เจริญบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำผลมาวิเคราะห์สถิติ

1.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* บนอาหารสังเคราะห์

ในห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน10 ซ้ำ 9 กรรมวิธี โดยให้อาหารแต่ละชนิดเป็นกรรมวิธี ดังนี้

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

กรมวิชาการเกษตร

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยเชื้อราบนอาหารแต่ละชนิด เมื่อเส้นใยที่เจริญบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำผลมาวิเคราะห์สถิติ

2. ศึกษาพืชอาศัยของรา *P. citriasiana* ในต้นกล้าของพืชตระกูลส้ม

2.1 <u>เตรียมพืชทดสอบในต้นกล้า</u>

ปลูกพืชทดสอบชนิดต่างๆ ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ส้มโอ และ มะนาว เป็นต้น ในโรงเรือนปลูกพืช

ทดลอง เตรียมผลของพืชทดสอบชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ส้มโอ และ มะนาว เป็นต้น

2.2 <u>เตรียมรา conidial suspension ของรา *P. citriasiana*</u>

เตรียม conidial suspension ของรา *P. citriasiana* โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 14-21 วัน จากนั้น ล้างสปอร์บนผิวหน้าอาหารด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 100 ครั้งต่อนาที นาน 30 นาที เพื่อให้ conidia กระจายออกจากกันโดยสม่ำเสมอ แล้วตรวจนับจำนวน conidia ด้วย haemacytometer เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^5 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

2.3 <u>เตรียมรา *P. citriasiana* บนอาหารสังเคราะห์</u>

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

2.4 <u>ทดสอบพืชอาศัยในต้นกล้า</u>

เตรียมต้นกล้าของพืชตระกูลส้มให้สมบูรณ์ และพ่น conidial suspension ของรา *P. citriasiana* ที่เตรียมไว้ มีปริมาณเชื้อ 10^5 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร บนพืชทดสอบต่างๆ โดยการทำแผลที่ใบพืช และมีกรรมวิธีพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ รดน้ำตามปกติ และ ตรวจบันทึกการเกิดโรคทุกวัน เมื่อพืชเป็นโรคนำส่วนที่แสดงอาการโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ตรวจดู เพื่อยืนยันการเกิดโรค

2.5 <u>ทดสอบพืชอาศัยบนผลส้ม</u>

เตรียมผลส้มชนิดต่าง ๆ และนำราที่เตรียมไว้บนอาหารสังเคราะห์ ทำแผลบนผลส้ม และนำส่วนของเชื้อที่เตรียมไว้ที่เจาะโดย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร มาวางไว้บนส่วนที่ทำแผลไว้บนผลส้ม และสำหรับกรรมวิธีควบคุม นำส่วนของวุ้นปกติวางบนผลส้ม

3. ศึกษาวงจรของโรค Tan spot ของส้มโอ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

3.1 <u>กำหนดแปลงทดลอง</u>

ติดต่อเกษตรกรแปลงส้มโอ บ้านหล่ายงาว ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย วัดพิกัดภูมิศาสตร์ กำหนดแปลงทดลอง

3.2 <u>เก็บตัวอย่างพืชมาตรวจหาสปอร์ ของรา *P. citriasiana* บนส่วนต่างของพืช</u>

เก็บส้มโอระยะต่าง ๆ โดย**ระยะที่ 1** เก็บใบส้มโอหลังจากตัดแต่งกิ่งแล้วทั้งที่เป็นโรค ใบพืชปกติ และ

ใบที่ร่วงลงบนพื้นดินใต้ต้นส้มโอ มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ **ระยะที่ 2** เก็บใบอ่อนของส้มโอทั้งที่เป็นโรค ใบพืชปกติและใบที่ร่วงลงบนพื้นดินใต้ต้นส้มโอ มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ **ระยะที่ 3** เก็บดอก ใบอ่อนของส้มโอทั้งที่เป็นโรค ใบพืชปกติและใบที่ร่วงลงบนพื้นดินใต้ต้นส้มโอ มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ **ระยะที่ 4** เก็บผลอ่อน ใบเป็นโรค ใบพืชปกติและใบที่ร่วงลงบนพื้นดินใต้ต้นส้มโอ มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ **ระยะที่ 5** เก็บผลแก่ ใบเป็นโรค ใบพืชปกติและใบที่ร่วงลงบนพื้นดินใต้ต้นส้มโอ มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ห่อตัวอย่างพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก เพื่อนำมาทำศึกษาชนิดและแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างที่เก็บมาตรวจหาสปอร์

3.3 <u>การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช</u>

ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช

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

แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplanting นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ ห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

3.4 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 บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscope)

3.5 บันทึกข้อมูลสิ่งแวดล้อม

บันทึกข้อมูลสภาพสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิสูงสุด อุณหภูมิต่ำสุด ความชื้นสัมพัทธ์ ปริมาณน้ำฝน ของอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

ศูนย์วิทยทรัพยากร

4. เก็บรักษาตัวอย่างแห้งโรคพืช

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

5. เก็บรักษาสายพันธุ์รา

- การเก็บรักษาสายพันธุ์ราบน slant PDA ที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 15-17 องศาเซลเซียส ในขวด vial
- การเก็บรักษาสายพันธุ์ราใน 10% glycerol และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- การเก็บรักษาราในกระดาษกรอง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์ แปลงส้มโอ บ้านหล่ายงาว ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย
- อัตราการเจริญของโคโลนีเชื้อราบนอาหารและอุณหภูมิต่างๆ
- พืชอาศัยของรา

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

แปลงส้มโอ บ้านหล่ายงาว ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

1.1 การทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ DOA 088 (อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่) DOA 009 (อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย) DOA 040 (อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม) และ DOA 090 (อำเภอเกษตรสมบูรณ์ จังหวัดชัยภูมิ) บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบกับอาหาร 8 ชนิด ได้แก่ potato dextrose agar (PDA) czapek's agar (CzA) V-8 juice agar (V-8 A) malt extract agar (MEA) Oat meal agar (OMA) cherry decoction agar (ChA) และ Water agar (WA) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการเป็นนานเวลา 14 วัน พบว่า รา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 088 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ

กรมวิชาการเกษตร

8.25 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อาหาร ChA V-8 A มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 7.65 และ 6.52 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งการเจริญของราไอโซเลต DOA 088 บนอาหาร ChA และ V-8 A ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหาร OMA (Table 2.2.1.1) (Figure 2.2.1.1)

รา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 009 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 8.24 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อาหาร ChA V-8 A MEA CzA มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 7.80 7.80 7.25 7.04 เซนติเมตร ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกัน แต่มีการเจริญแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญบนอาหาร PDA และ WA ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 3.02 และ 1.88 เซนติเมตร ตามลำดับ (Table 2.2.1.1) (Figure 2.2.1.2)

รา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร MEA มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 8.27 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อาหาร OMA CzA ChA และ V-8 A มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 7.50 7.54 6.98 และ 6.83 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งการเจริญของราไอโซเลต DOA 040 บนอาหาร MEA และ OMA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหาร CzA ChA และ V-8 A (Table 2.2.1.1) (Figure 2.2.1.3)

รา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 090 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 5.62 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อาหาร V-8 A MEA CzA และ PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 5.44 3.74 3.55 และ 3.19 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งการเจริญของราไอโซเลต DOA 090 บนอาหาร OMA และ V-8 A ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อาหาร OMA และ V-8 A แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหาร MEA CzA และ PDA (Table 2.2.1.1) (Figure 2.2.1.4)

สรุปว่ารา *P. citriasiana* มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA ยกเว้นราไอโซเลต DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร MEA

กรมวิทยาศาสตร์

Table 2.2.1.1: Colony growth of 4 isolates of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 088, 009, 040, 090) after 14 days on various media.

Media	Colony growth of 4 isolates of *Phyllosticta* after 14 days			
	DOA 088	DOA 009	DOA 040	DOA 090
PDA	3.14 bc	3.02 c	3.71 c	3.19 b
CzA	6.52 bc	7.04 b	7.54b	3.55 b
V-8 A	7.11 b	7.80 ab	6.84 b	5.44 a
MEA	5.07 bc	7.25 b	8.27 a	3.74 b
OMA	8.25 a	8.24 a	7.50 ab	5.62 a
ChA	7.65 b	7.80 ab	6.96 b	1.58 c
WA	1.36 c	1.88 d	2.55 d	1.36 c
CV	100.46	41.59	41.96	49.4

Remarks: D0A 088 isolated from from tan spot of pummelo in Chiang Dao district, Chiang Mai.

DOA 009 isolated from tan spot of pummelo in Wiang Kaen district, Chaing Rai.

DOA 040 isolated from tan spot of pummelo in Nakhon Chaisi district, Nakhon Pathom.

DOA 090 isolated from tan spot of pummelo in Kaset Sombun district, Chaiyaphum.

กรมวิชาการเกษตร

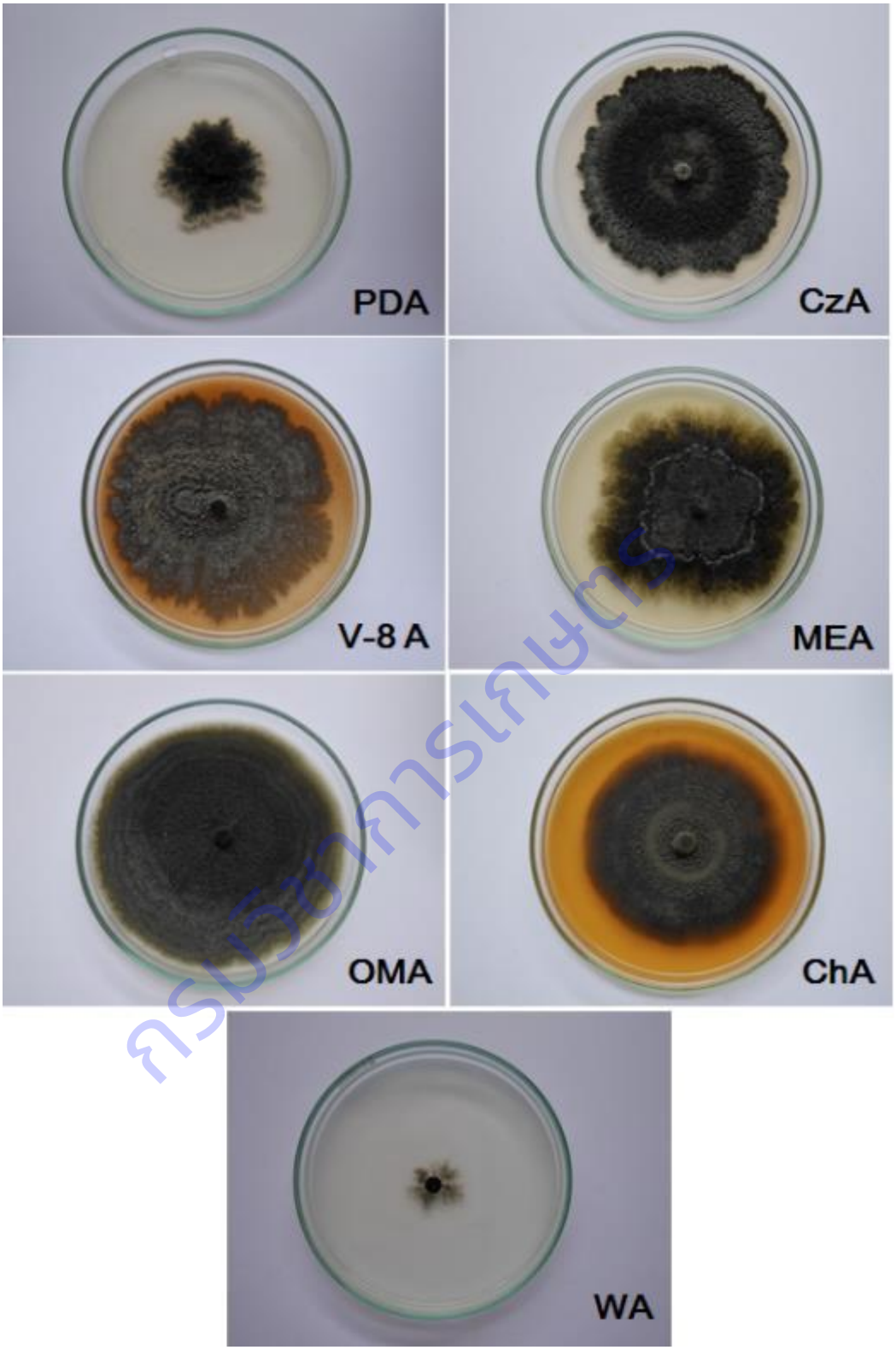


Figure 2.2.1.1: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 088) collected from tan spot of pummelo in Chiang Dao district, Chiang Mai province after 14 days on various media.

กรมวิชาการเกษตร

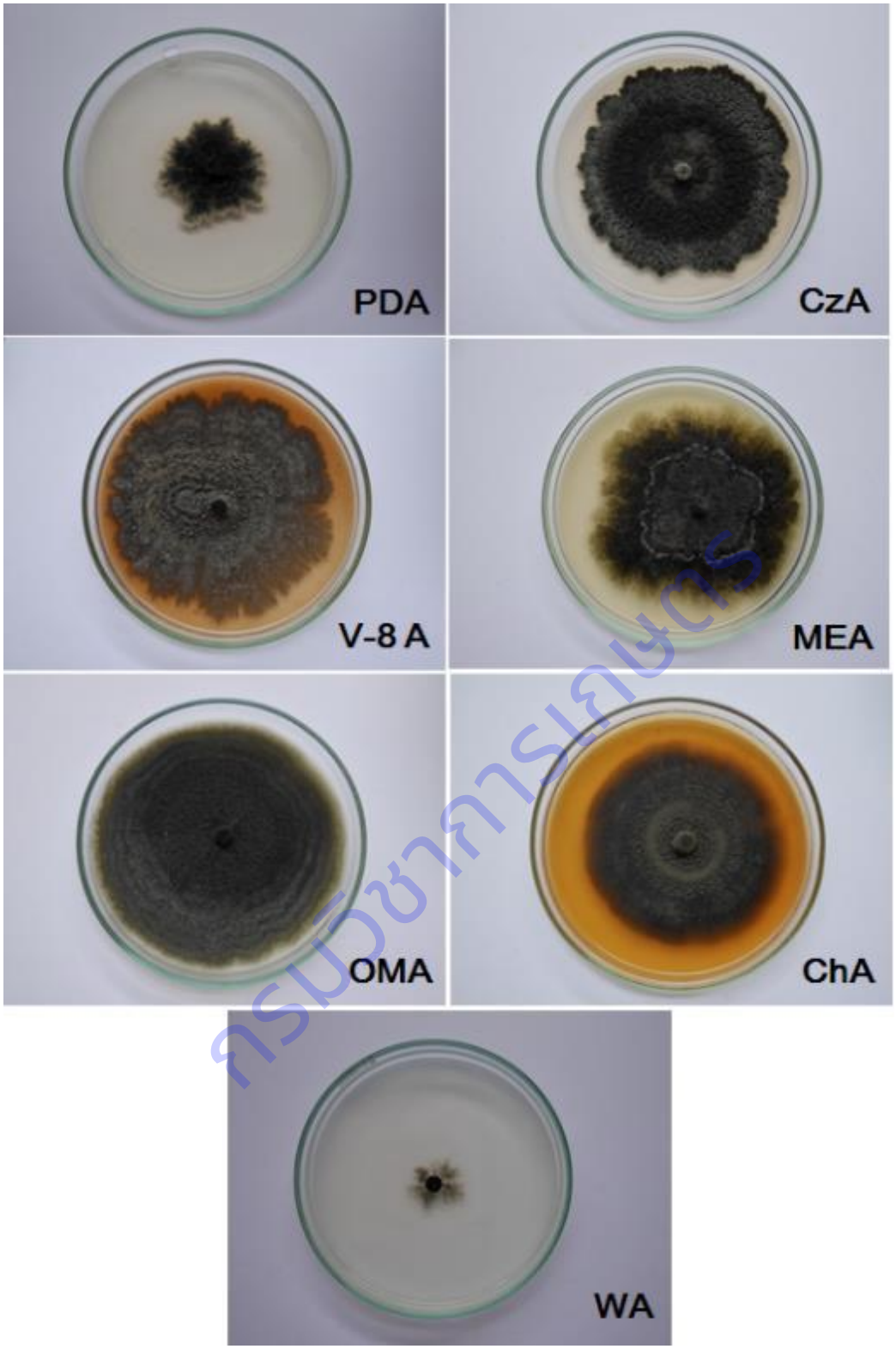


Figure 2.2.1.2: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 009) collected from tan spot of pummelo in Wiang Kaen district, Chaing Rai province after 14 days on various media.

กรมวิชาการเกษตร

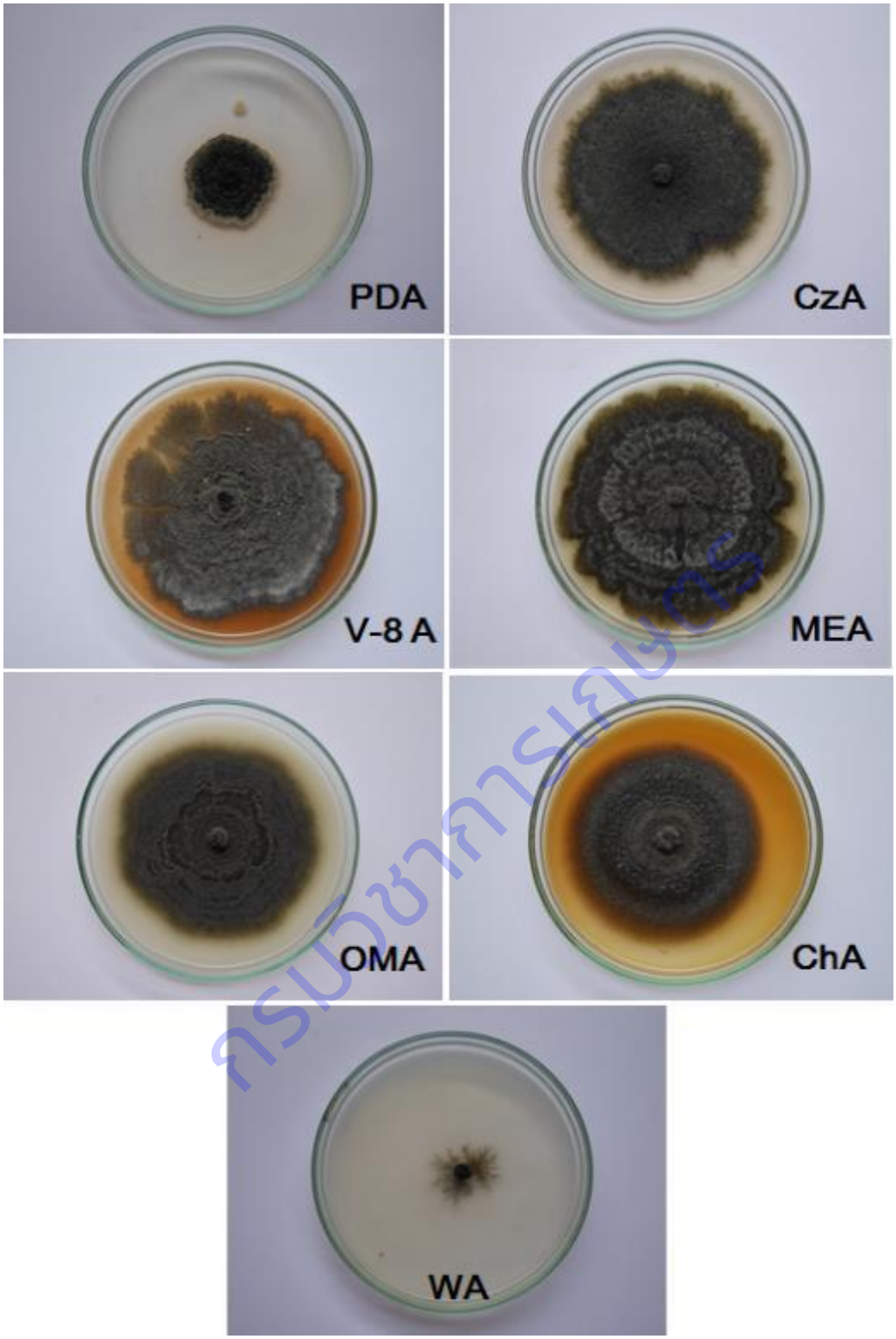


Figure 2.2.1.3: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 040) collected from tan spot of pummelo in Nakhon Chaisi district, Nakhon Pathom province after 14 days on various media.

กรมวิชาการเกษตร

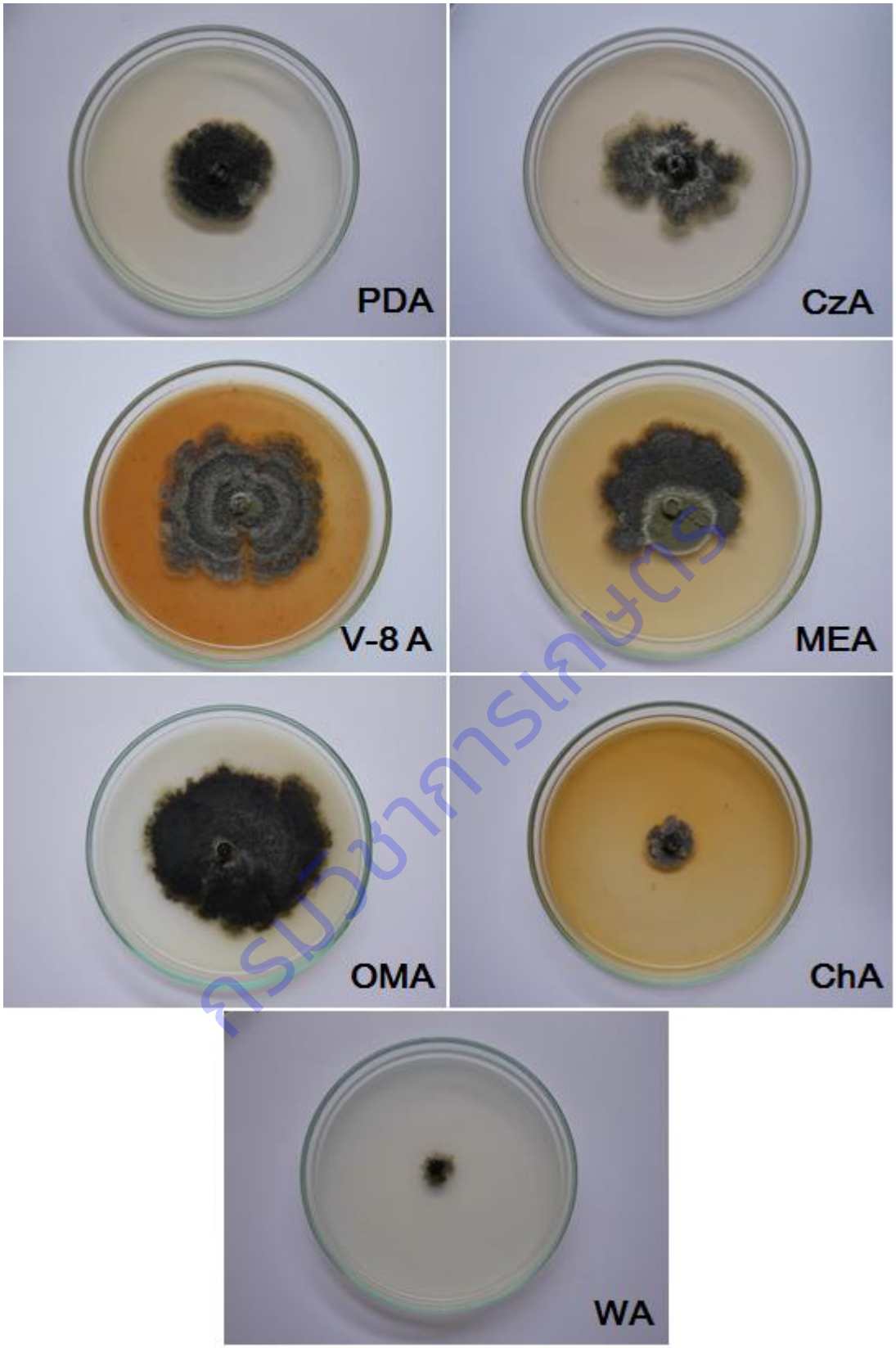


Figure 2.2.1.4: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 090) collected from tan spot of pummelo in Kaset Sombun district, Chaiyaphum province after 14 days on various media.

1.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาชนิดของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ DOA 009 DOA 040 D0A 088 และ DOA 090 ที่อุณหภูมิ 25 30 35 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ทิ้งไว้นาน 14 วัน พบว่า รา *P. citriasiana* ทุกไอโซเลตเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Table 2.2.1.2)

รา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 088 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 5.16 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 5.04 4.11 และ 0.60 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการเจริญของราไอโซเลต DOA 088 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (Table 2.2.1.2) (Figure 2.2.1.5)

รา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 009 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 6.83 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 4.37 4.23 และ 1.05 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการเจริญของราไอโซเลต DOA 009 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเจริญที่อุณหภูมิอื่นๆ (Table 2.2.1.2) (Figure 2.2.1.6)

สำหรับรา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 040 ผลของการเจริญที่ดีที่สุดในอุณหภูมิต่างจากไอโซเลตอื่นๆ คือเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 3.05 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 2.89 เซนติเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเจริญเท่ากันที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 0.73 เซนติเมตร แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการเจริญของราไอโซเลต DOA 009 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Table 2) (Figure 2.2.1.7)

รา *P. citriasiana* ไอโซเลตที่ DOA 090 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 6.63 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของราเท่ากับ 5.23 4.29 และ 1.55 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการเจริญของราไอโซเลต DOA 090 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเจริญที่อุณหภูมิอื่นๆ (Table 2.2.1.2) (Figure 2.2.1.8)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปว่ารา *P. citriasiana* มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

Table 2.2.1.2: Colony characteristics after 14 days growth on various temperature of 4 isolates of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 088, 009, 040, 090).

Temperature	Colony growth of 4 isolates of *Phyllosticta* after 14 days			
	DOA 088	DOA 009	DOA 040	DOA 090
Room temperature	4.11 a	4.23 b	0.73 b	5.23 b
25°C	5.16 a	6.83 a	2.89 a	6.63 a
30°C	5.04 a	4.37 b	3.05 a	4.29 b
35°C	0.60 b	1.05 c	0.73 b	1.55 c
40°C	0.00 b	0.00 c	0.00 b	0.00 d
CV				

Remarks: D0A 088 isolated from from tan spot of pummelo in Chiang Dao district, Chiang Mai.
DOA 009 isolated from tan spot of pummelo in Wiang Kaen district, Chaing Rai.
DOA 040 isolated from tan spot of pummelo in Nakhon Chaisi district, Nakhon Pathom.
DOA 090 isolated from tan spot of pummelo in Kaset Sombun district, Chaiyaphum.

กรมวิชาการเกษตร

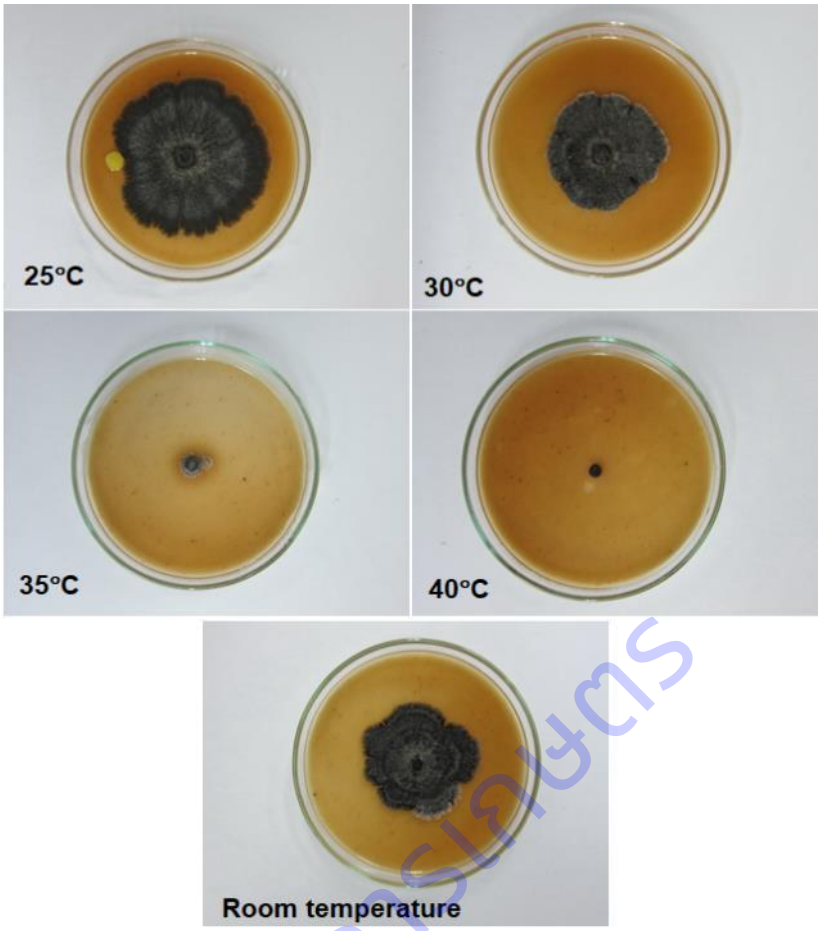


Figure 2.2.1.5: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 088) after 14 days on various temperature.

กรมวิชาการเกษตร

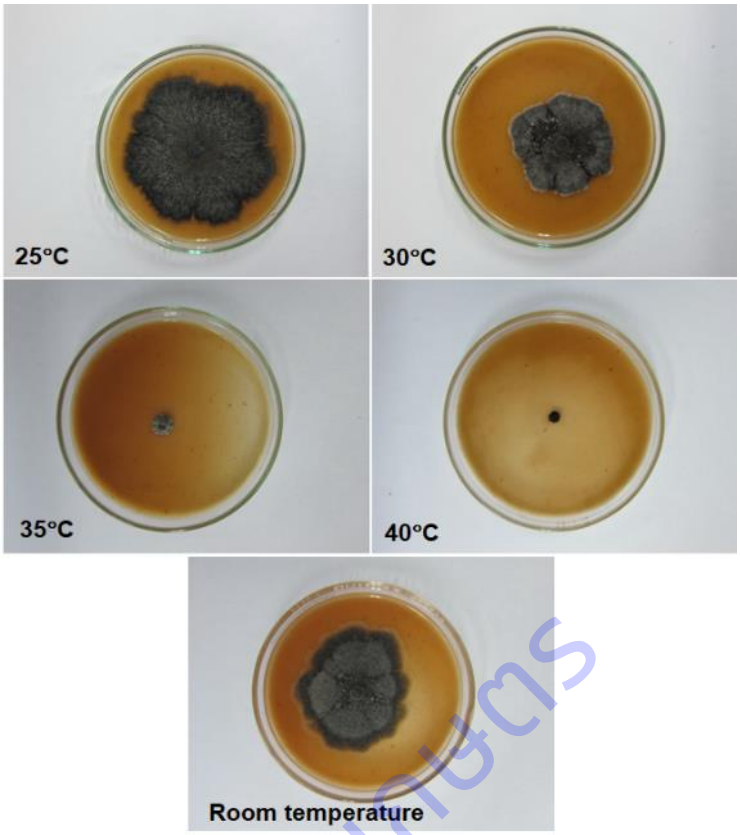


Figure 2.2.1.6: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 009) after 14 days on various temperature.

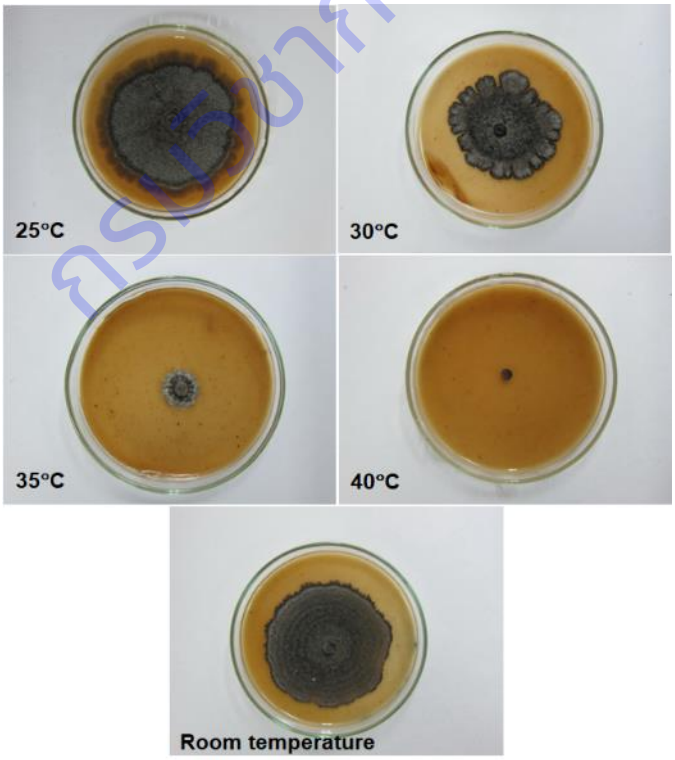


Figure 2.2.1.7: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 040) after 14 days on various temperature.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

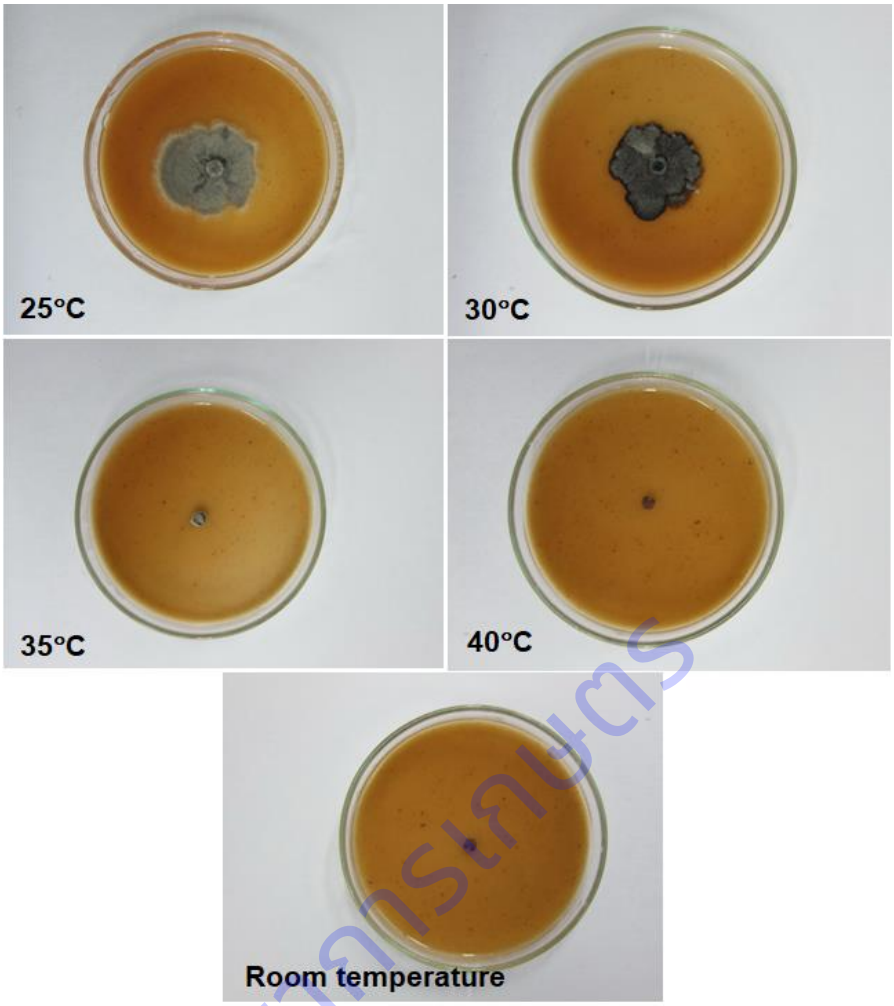


Figure 2.2.1.8: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 090) after 14 days on various temperature.

2. ศึกษาพืชอาศัยของรา *P. citriasiana* ในต้นกล้าของพืชตระกูลส้ม

การทดสอบการเกิดโรคที่ใบ

ผลการทดสอบการเกิดโรคที่ใบของรา *P. citriasiana* พบว่ารา *P. citriasiana* ไม่ทำให้เกิดโรคจุดน้ำตาลที่ใบในส้มเขียวหวาน และมะนาว แต่ทำให้เกิดโรคที่ใบของส้มโอหลังจากปลูกเชื้อ 2 อาทิตย์ (Figure 2.1.1.9)

การทดสอบการเกิดโรคที่ลำต้น

ผลการทดสอบการเกิดโรคที่ลำต้นของรา *P. citriasiana* พบว่ารา *P. citriasiana* ไม่ทำให้เกิดโรคจุดน้ำตาลที่ลำต้นในส้มเขียวหวาน มะนาว และส้มโอ

การทดสอบการเกิดโรคที่ผล

ปลูกเชื้อรา *P. citriasiana* บนผลส้มเขียวหวาน มะนาว ส้มโอ เพื่อศึกษาการเกิดโรค พบว่าหลังปลูกเชื้อ 2 สัปดาห์ พบว่ารา *P. citriasiana* ทำให้ผลส้มโอเกิดโรค ในขณะที่ส้มเขียวหวาน และมะนาว ไม่เป็นโรค

ศูนย์วิทยทรัพยากร

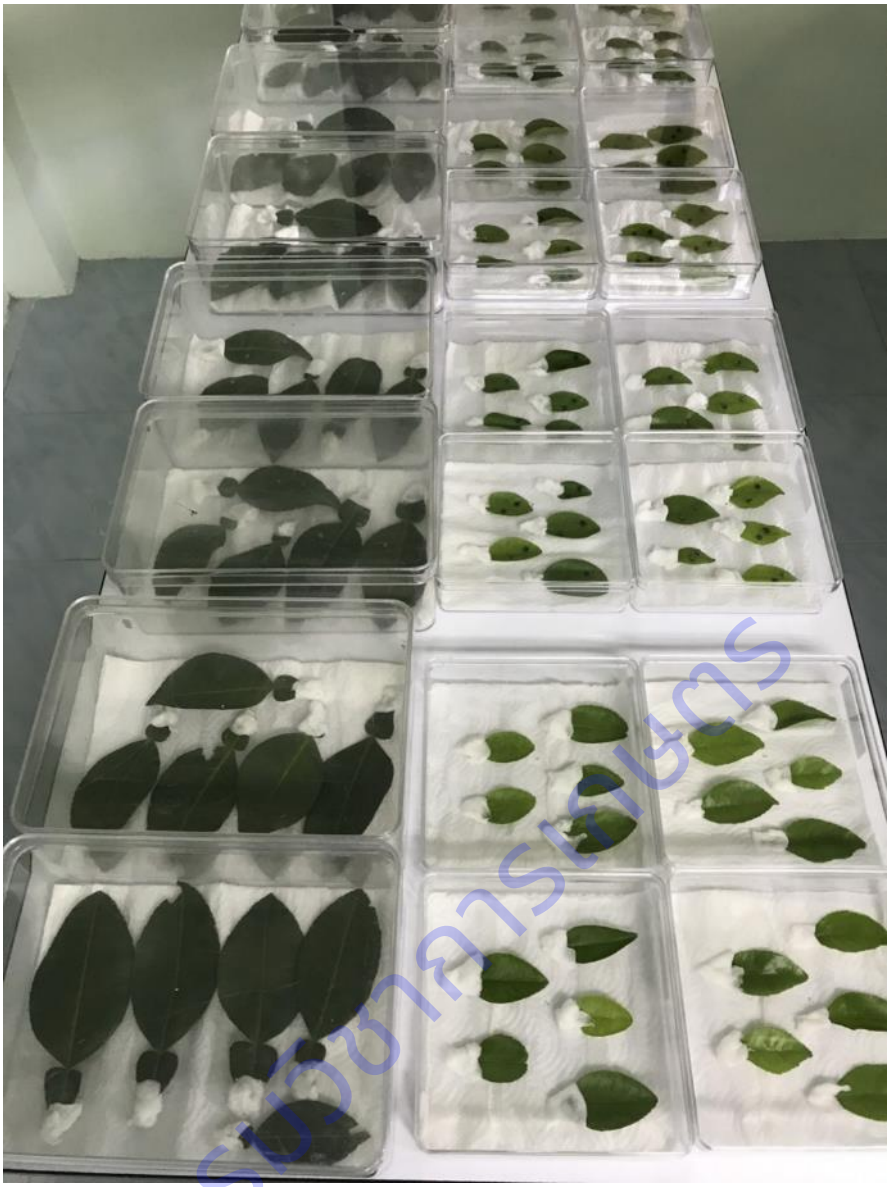


Figure 2.2.1.9: Pathogenicity of *Phyllosticta citriasiana* on *Citrus maxima*, *C. reticulata* and *C. aurantiifolia*

3. ศึกษาวงจรของโรค Tan spot ของส้มโอ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

3.1 กำหนดแปลงทดลอง

สวนส้มโอ บ้านหล่ายงาว ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย มีพิกัดภูมิศาสตร์ละติจูด 20 องศา 5 ลิปดา 34 พิลิปดา เหนือ 100 องศา 30 ลิปดา 13 พิลิปดา (20° 05' 34" N 100° 30' 13" E) ระดับความสูงเท่ากับ 366 เมตร (Figure 2.1.1.10)

Figure 2.2.1.10: Global Positioning System (GPS) of pummelo plantation in Lai Ngao Sub-district, Wiang Kaen District, Chiang Rai province.

3.2 การศึกษาวงจรชีวิตของรา *Phyllosticta citriasiana*

เก็บตัวอย่างพืชมาตรวจหาสปอร์ ของรา *P. citriasiana* บนส่วนต่างของพืชในช่วงเดือนตุลาคม 2561 - เดือนมีนาคม 2562 ที่สวนส้มโอ บ้านหล่ายงาว ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย มีพิกัดภูมิศาสตร์ ละติจูด 20 องศา 5 ลิปดา 34 พิลิปดา เหนือ 100 องศา 30 ลิปดา 13 พิลิปดา (20° 05' 34" N 100° 30' 13" E) ระดับความสูงเท่ากับ 366 เมตร (Figure 2.2.1.10) **โดยเก็บใบแก่แสดงอาการโรคใบจุดในระยะที่ 1** :ซึ่งพบราสร้างสวนขยายพันธุ์ของเชื้อสีน้ำตาลเข้มอยู่ในแผลใบจุดพบรา *P. citriasiana* เจริญอยู่ในส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อสีน้ำตาลเข้ม สร้างสปอร์อยู่ในส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อของเชื้อที่เรียกว่า pycnidia **เก็บใบแก่ปกติมาแยกเชื้อ** พบรา *Guignardia mangiferae* ซึ่งเป็นราเอ็นโดไฟท์ที่เจริญอยู่บนใบ **โดยเก็บใบในระยะที่ 2 ใบอ่อนปกติ** พบรา *G. mangiferae* ซึ่งเป็นราเอ็นโดไฟท์ที่เจริญอยู่บนใบส้มโอปกติ และไม่พบใบอ่อนเป็นโรค **โดยเก็บตัวอย่างดอกในระยะที่ 3** มาทำการแยกเชื้อ ไม่พบเชื้อรา และ**เก็บตัวอย่างผลอ่อนปกติ.ในระยะที่ 4** มาทำการแยกเชื้อ ผลการแยกเชื้อไม่พบเชื้อรา แต่พบเชื้อราสาเหตุโรคพืชบนผลส้มโอที่แสดงอาการโรค (Table 2.2.1.3)

การศึกษาวงจรชีวิตของรา *P. citriasiana* ที่ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย พบว่าระยะการเก็บเกี่ยวผลผลิตแล้วพบโรคจุดน้ำตาลที่ใบและผลที่แสดงอาการโรค ระยะเตรียมต้นก่อนออกดอกจนถึงระยะแตกใบอ่อนและระยะออกดอกนั้นจากการตรวจเชื้อไม่พบโรคจุดน้ำตาลพบแต่รา *Guignardia*

mangiferae บนใบและดอกปกติ ซึ่งราชนิดนี้มีลักษณะเป็นเอ็นโดไฟท์ ในระยะติดผลอ่อนพบโรคจุดน้ำตาลที่ใบและในระยะติดผลจนถึงระยะเก็บเกี่ยวพบโรคจุดน้ำตาลทั้งที่ใบและที่ผล

สำหรับการเข้าทำลายของรา *P. citriasiana* บนผลส้มโอพบราสร้าง สปอร์ 2 ชนิด ได้แก่ โคนิเดีย (conidia) และสเปอร์มาเทีย (spermatia) เข้าทำลายที่ใบบนต้นและสร้างสปอร์สะสมอยู่บนใบที่ร่วงลงดินด้วย ซึ่งเป็นที่อาศัยของเชื้อราในการแพร่ระบาดในฤดูต่อไป และมักพบรา *Phyllosticta capitalensis* (Telomorphic State: *Guignardia mangiferae*) เป็นราเอ็นโดไฟท์เจริญอยู่บนใบและผลส้มโอด้วยแต่ไม่ทำให้เกิดโรคซึ่งเป็นลักษณะของ Non-pathogenic fungi และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ารา *P. citriasiana* ไม่สร้างระยะสืบพันธุ์แบบมีเพศ

Table 2.2.1.3: *Phyllosticta* species isolated from various part of pummelo.

Fungi isolation	stage 1		stage 2	stage 3	stage 4	stage 5	Time collection
	Mature leaves (healthy)	Mature leaves (disease)	Young leaves (healthy)	Flowers (healthy)	Young fruits (healthy)	Mature fruits (disease)	
Guignardia mangiferae	√	-	-	-	-		October 2018
Phyllosticta citriasiana		√	-	-	-		October 2018
ไม่พบเชื้อ	-	-	√	-	-		November 2018
Guignardia mangiferae	√	-	-	-	-		November 2018
ไม่พบเชื้อ	-	-	√	-	-		December 2018
ไม่พบเชื้อ	-	-	-	√	√		January 2019
Guignardia mangiferae	√	-	-	-	-		February 2019
Phyllosticta citriasiana		√	-	-	-		February 2019
ไม่พบเชื้อ	-	-	-	√	√		February 2019
Guignardia mangiferae	√	-	-	-	-		March 2019
Phyllosticta citriasiana	-	√	-	-	-		March 2019
ไม่พบเชื้อ	-	-	-	-	√		March 2019
Phyllosticta citriasiana		√					April 2019
ไม่พบเชื้อ			√				April 2019
Phyllosticta citriasiana		√				√	May 2019
ไม่พบเชื้อ	√				√		May 2019
Phyllosticta citriasiana		√				√	June 2019
ไม่พบเชื้อ	√				√		June 2019

กรมวิชาการเกษตร

3.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

จากการศึกษาวงจรชีวิตของรา *Phyllosticta citriasiana* ส่วนของพืชที่เป็นโรคแยกได้รา *P. citriasiana* ส่วนของพืชที่ปกติแยกได้รา *Guignardia mangiferae* (Amamorphic State: *Phyllosticta capitalensis*) (Table 2.2.1.3)

3.3 การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืชด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อรา และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound จัดเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืชที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

***Phyllosticta citriasiana* Wulandari, Crous & Gruyter**

Teleomorph state: -

โรค: ใบจุดน้ำตาล (tan spot)

พืช: ส้มโอ (*Citrus maxima*)

สถานที่: ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

ลักษณะอาการ

อาการของโรคพบทั้งบนใบ (Figure 2.2.1.11A) และผลส้มโอ (Figure 2.2.1.11B) ลักษณะอาการของแผลบนผลจะพบได้ตั้งแต่ในระยะที่ผลส้มโอยังมีสีเขียว และอาการจะรุนแรงมากขึ้นเมื่อผลส้มโอเจริญเติบโตเต็มที่ อาการเริ่มแรกมีลักษณะเป็นจุดเล็ก ๆ สีน้ำตาล พบในผลส้มโอที่มีสีเขียว (Figure 2.2.1.12A) ต่อมาแผลขยายใหญ่ขึ้นเป็นจุดกลม แผลยุบตัวแต่ไม่ลึก ตรงกลางแผลมีสีเทาหรือสีแทน ขอบแผลมีสีน้ำตาลเข้ม แผลมีขนาด 2-10 มิลลิเมตร สีน้ำตาลและมีสีเหลืองล้อมรอบ และเมื่อผลส้มโอใกล้สุก แผลตรงกลางยุบตัวลงเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือสีเทา บางครั้งพบราสร้างส่วนขยายพันธุ์ (pycnidia) สีดำ ตรงกลางแผล (Figure 2.2.1.12B) แต่ไม่สร้างส่วนขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ (ascocarp) บนแผล ลักษณะอาการแบบนี้เรียกว่า Hard spot lesions (Figure 2.2.1.12B) มักพบอาการลักษณะนี้ในระยะก่อนเก็บเกี่ยว หรือระยะเก็บเกี่ยวช่วงแรก เมื่อส้มโอเริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองพบว่ามีจุดแผลเพิ่มมากขึ้น และแต่ละแผลอาจรวมตัวกันขยายใหญ่ขึ้น ส่วนใหญ่ราสร้าง pycnidia สีดำ ตรงกลางแผล อาการลักษณะนี้เรียกว่า Freckle spot (Figure 2.2.1.12C) ผลส้มโอที่แก่เต็มที่ และผลส้มโอที่เก็บไว้หลังการเก็บเกี่ยวในที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น อาการของโรครุนแรงขึ้น มักพบแผลยุบตัว เกิดจุดแผลเป็นจำนวนมาก มีสีน้ำตาล ถึง น้ำตาลแดง และราสร้าง pycndia เป็นจำนวนมาก เรียกอาการลักษณะแผลนี้ว่า Virulent spot (Figure 2.2.1.12D) จากการศึกษาอาการในระยะเริ่มแรกค่อนข้างสับสนเพราะเกิดแผลจุดสีน้ำตาลเล็ก ๆ ค่อนข้างวินิจฉัยยากว่าเป็นโรคหรือไม่ แต่เมื่อเก็บส้มโอที่เป็นโรคไว้ประมาณ 2-3 สัปดาห์ ในอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ พบว่าแผลขยายใหญ่ขึ้น และพบว่าราสร้าง Pycnidia เป็นกลุ่มสีดำบนกลางแผล เมื่อนำมาตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo พบ pycnidia เป็นกลุ่ม (Figure 2.2.1.13A)

กรมวิชาการเกษตร

และทำการตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ ตรวจใต้กล้อง compound พบว่าราสร้าง conidia ภายใน pycnidia (Figure 2.2.1.13B) ฝังอยู่บนเนื้อเยื่อของผลส้มโอ

ลักษณะอาการบนใบ พบจุดแผลบนใบมีลักษณะของแผลคล้ายกับแผลที่เกิดบนผลส้มโอคือเกิดจุดแผลเล็ก ๆ สีน้ำตาล แผลตรงกลางยุบตัวลงเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือสีเทา บางครั้งพบราสร้าง pycnidia สีดำ ตรงกลางแผล (Figure 2.2.1.13A) ส่วนใหญ่จะพบบนใบแก่ ซึ่งใบที่เป็นโรคเหล่านี้จะหลุดร่วงลงดินในที่สุด ถ้าไม่มีการเก็บเศษซากใบเหล่านี้ออกจากแปลงปลูกก็จะเป็นแหล่งของเชื้อสาเหตุในการเข้าทำลายในเวลาที่เหมาะสมต่อไป ลักษณะอาการแผลบนใบจะพบไม่มากนักบนต้นเมื่อเปรียบเทียบกับอาการบนผลส้มโอ

Figure 2.2.1.11: Tan spot symptoms caused by *Phyllosticta citriasiana*:

(A) Typical hard and virulent spot on pummelo fruit;

(B) Hard spot lesion on pummelo leaf

กรมวิชาการเกษตร

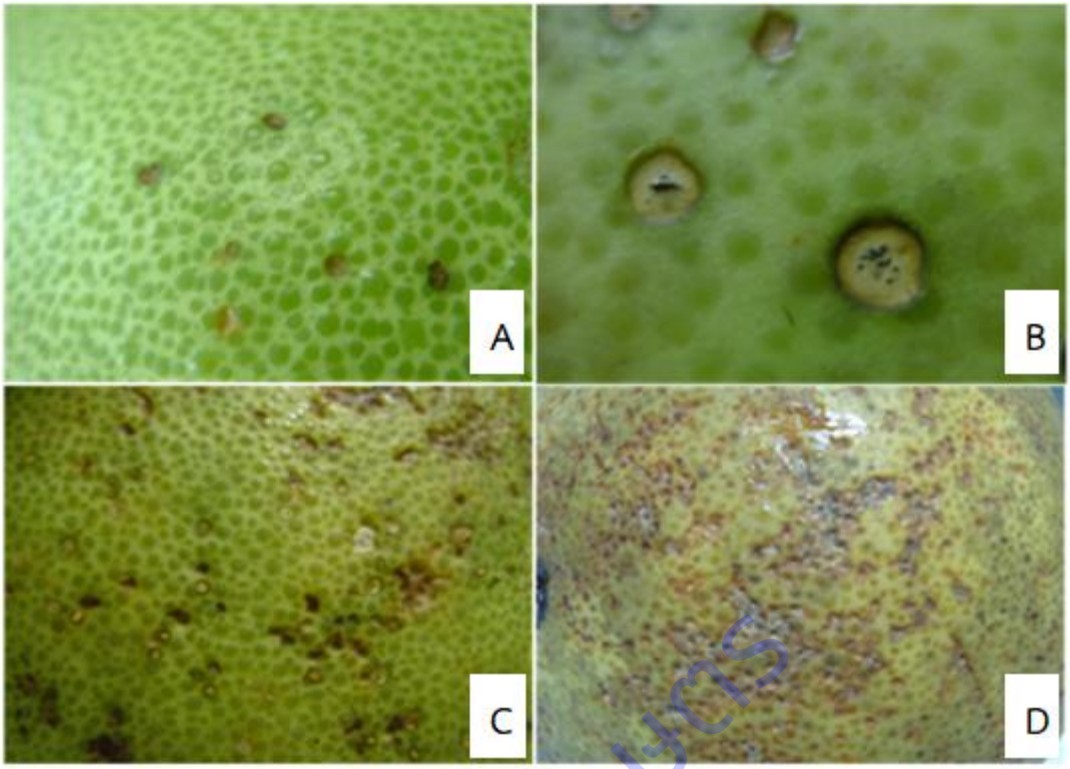


Figure 2.2.1.12: Typical symptoms of tan spot disease on Pummelo:
(A) Lesion on green fruit; (B) Hard spot lesions with pycnidia in the center of the necrotic tissue; (C) Freckle spots;
(D) Virulent spots spread during storage.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกเชื้อและศึกษาลักษณะต่าง ๆ จากแผลที่มีจุดน้ำตาลอยู่ตรงกลาง เมื่อตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound พบว่าจุดที่อยู่ตรงกลางแผล เป็น fruiting body ของราที่เรียกว่า pycnidia ซึ่งมี conidia เกิดอยู่ภายใน ผลการศึกษาการแยกเชื้อสาเหตุโรคจุดดำ โดยนำส่วนของผลส้มโอที่แสดงอาการโรคมาทำการแยกเชื้อบนอาหารสังเคราะห์ PDA จำนวนอย่างละ 40 ชิ้น พบว่าการแยกเชื้อสาเหตุโรคจากผลเบื้องต้นบนอาหาร PDA พบราที่มีโคโลนีสีเทาดำ เท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือพบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เนื่องจากอาจเป็นเพราะการซับชิ้นส่วนพืชไม่แห้ง หรือเกิดการปนเปื้อนจากเครื่องมือหรือเทคนิคการปฏิบัติงาน ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของราเพื่อการจำแนกชนิดมีดังนี้

ลักษณะโคโลนีของราบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 25 มิลลิเมตร (Figure 2.2.1.13G) ที่อุณหภูมิ 30 ± 5 องศาเซลเซียส โคโลนีของราเจริญเติบโตช้ามาก โคโลนีสีเทาดำ ด้านใต้วุ้นมีสีเทาดำ ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็น lobe (Figure 2.2.1.13H) ราจะสร้าง pycnidia เมื่ออายุ 8-10 วัน

ลักษณะ pycnidia ที่พบบริเวณกลางแผลบนผลส้มโอมีรูปร่างกลม สีดำ เกิดเดี่ยว ๆ หรือบางครั้งพบรวมกันเป็นกลุ่ม (Figure 2.2.1.13A) pycnidia เจริญฝังตัวอยู่ใต้เนื้อเยื่อพืช สีน้ำตาลดำ ขนาด 90-320 ไมครอน มี papillate ขนาด 10-13 ไมครอน (Figure 2.2.1.13B)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ลักษณะ pycnidia ที่พบบริเวณกลางแผลบนผลส้มโอมีรูปร่างกลม สีดำ เกิดเดี่ยว ๆ หรือบางครั้งพบรวมกันเป็นกลุ่ม (Figure 13A) pycnidia เจริญฝังตัวอยู่ใต้เนื้อเยื่อพืช สีน้ำตาลดำ ขนาด 90-320 ไมครอน มี papillate ขนาด 10-13 ไมครอน (Figure 2.2.1.13A)

ลักษณะ conidiogenous cells รูปทรงกระบอก (cylindrical) มีขนาด 3.5-8.0 x 2.0-3.0 ไมครอน conidia เกิดอยู่ที่ปลาย conidiogenous cells

ลักษณะ conidia ใส ไม่มีสี เซลล์เดียว ไม่มีผนังกั้น รูปร่าง obovate –elliptical ขนาด 8 x 12 – 6 x 8 ไมครอน conidia มีเยื่อหุ้มเซลล์ล้อมรอบ มี oil drop ภายในสปอร์ ปลาย conidia มีลักษณะ truncate base (Figure 2.2.1.13C) มี apical appendage ยาวประมาณ 6-18 ไมครอน (Figure 2.2.1.13D)

ลักษณะ spermatia ใส ไม่มีสี เซลล์เดียว ไม่มีผนังกั้น รูปร่าง dumb-bell ขนาด 5 – 8 x 1-1.5 ไมครอน มี oil drop อยู่ภายในเซลล์ (Figure 2.2.1.13E, 2.2.1.13F)

จากการศึกษานี้ไม่พบ perithecia และ ascospores บนใบหรือผลที่เป็นโรค และไม่พบบนอาหารสังเคราะห์เช่นกัน ได้สอดคล้องกับรายงานของ Wulandari et al. (2009) ที่รายงานว่าเชื้อราชนิดนี้ไม่สร้างระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศ perithecia และ ascospores บนอาหารสังเคราะห์ ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อ เพราะราสกุลนี้บางชนิดสามารถชักนำให้ราสร้าง perithecia และ ascospores บนอาหารสังเคราะห์ได้ Baayen et al. (2002) ศึกษารา *Guignardia mangifera* (anamorphic state: *Phyllosticta capitalensis*) ที่แยกได้จากส้มและเป็น nonpathogenic isolate พบว่าสามารถชักนำให้ราสร้าง perithecia และ ascospores บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งราดังกล่าวนี้สามารถแยกได้จากส้มเช่นกัน แต่ความแตกต่างในการสร้าง perithecia และ ascospores บนอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเป็นลักษณะหนึ่งที่ใช้สำหรับการแยกระหว่าง *G. mangifera* และ *G. citricarpa* แต่ไม่ได้เป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก อย่างไรก็ตามควรจะต้องมีการศึกษาจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุในระดับโมเลกุลเพื่อเป็นการยืนยันชนิดของเชื้อสาเหตุต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

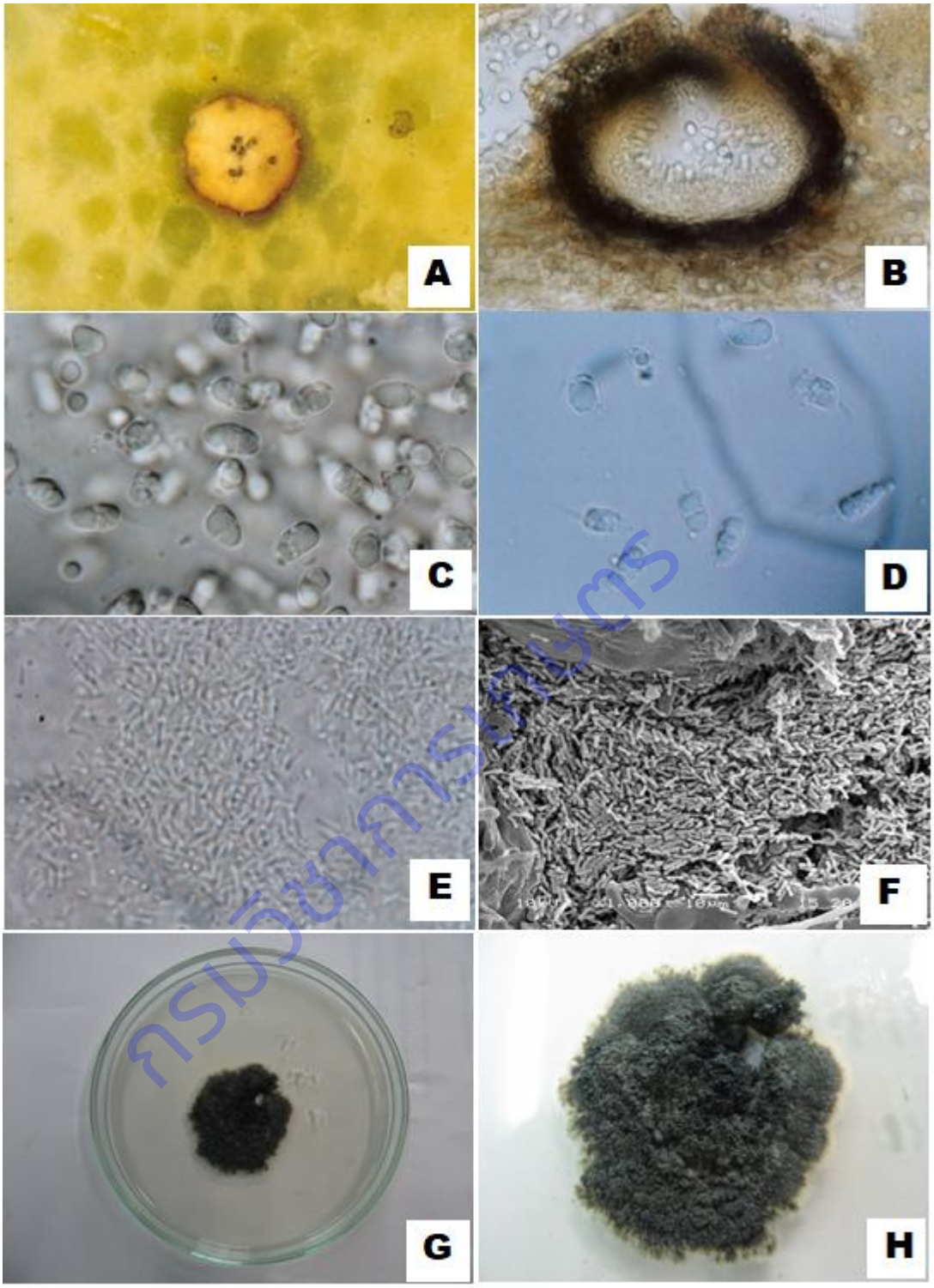


Figure 2.2.1.13: *Phyllosticta citriasiana* isolated from tan spot of Pummelo

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 appendage (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 loab margin

กรมวิชาการเกษตร

Phyllosticta capitalensis Henn

Teleomorph state: *Guignardia mangiferae* A.J. Roy

เอ็นโดไฟท์: ส้มโอ (*Citrus maxima*)

สถานที่: ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

ลักษณะโคโลนี ของราบนอาหาร Potato Dextrose Agar เส้นใยฟู เริ่มแรกโคโลนีสีขาว สร้างเส้นใยเป็นจำนวนมาก ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเขียวถึงสีเขียวเข้มภายใน 2-3 วัน เส้นใยสีขาว ขอบโคโลนีมีรอยหยัก ต่อมาเส้นใยเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มถึงสีดำ ใต้จานอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำ โคโลนีเจริญเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน

ลักษณะ pycnidia ลักษณะกลม สีน้ำตาลถึงสีดำ สูง 120-125 ไมครอน กว้าง 135-149 ไมครอน ผนังหนา 12-15 ไมครอน (Figure 2.2.1.14)

ลักษณะ conidiogenous cells รูปทรงกระบอก (cylindrical) สีใส ขนาด 2.2x2.2-3.0 ไมครอน conidia เกิดอยู่ที่ปลาย conidiogenous cells

ลักษณะ conidia รูปร่างรีตรงกลางกว้าง ใส ไม่มีสี เซลล์เดียว ผนังเรียบ ขนาด 8–11× 5– 6 ไมครอน โคนิเดียมีเหยื่อหุ้ม มี appendage 1 เส้น ยาว 5-8 ไมครอน

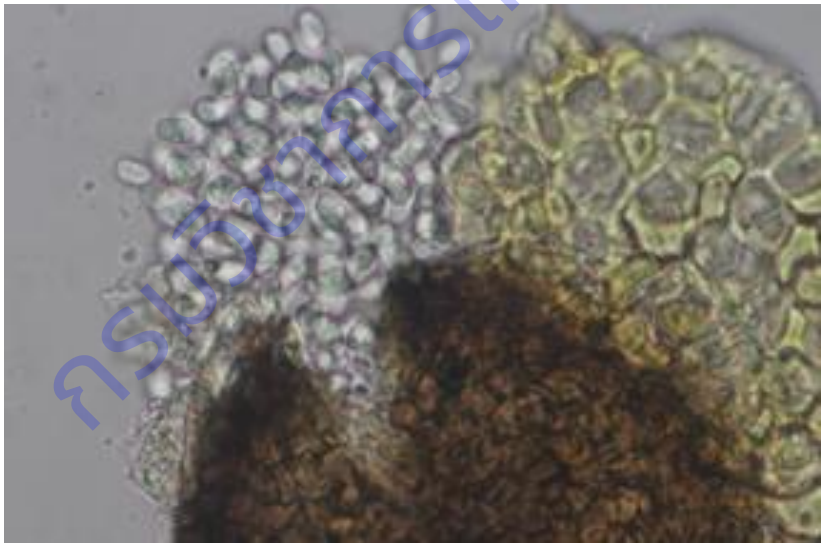


Figure 2.2.1.14: *Phyllosticta capitalensis* isolated from young fruit disease.

กรมวิชาการเกษตร

1.4 เก็บรักษาสายพันธุ์ราและตัวอย่างแห้ง

เก็บรักษาราที่แยกได้จากตัวอย่างแห้งโรคพืชและราเอ็นดาไฟท์ ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ไว้ใน Culture Collection เพื่อนำไปศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ศึกษาอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *Phyllosticta citriasiana* ผลการทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* พบว่า รา *P. citriasiana* ทุกไอโซเลตมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA ยกเว้นราไอโซเลต DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร MEA และผลการทดสอบอุณหภูมิพบว่ารา *P. citriasiana* เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ยกเว้นราไอโซเลต DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาพืชอาศัยพบว่า ส้มโอเป็นพืชอาศัยของราชนิดนี้ พบการเกิดโรคที่ใบและผลเท่านั้น ไม่เกิดโรคที่ลำต้น สำหรับการเข้าทำลายของรา *P. citriasiana* บนผลส้มโอ พบราสร้าง สปอร์ 2 ชนิด ได้แก่ โคนิเดีย (conidia) และสเปอร์มาเทีย (spermatia) เข้าทำลายที่ใบบนต้นและสร้างสปอร์สะสมอยู่บนใบที่ร่วงลงดินด้วยซึ่งเป็นที่อาศัยของเชื้อราในการแพร่ระบาดในฤดูต่อไป และมักพบรา Phyllosticta capa และมักพบรา *Phyllosticta capitalensis* (Teleomorph state*: Guignardia mangiferae*) เป็นราเอ็นโดไฟท์เจริญอยู่บนใบและผลส้มโอด้วยแต่ไม่ทำให้เกิดโรคซึ่งเป็นลักษณะของ Non-pathogenic fungi และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ารา *P. citriasiana* ไม่สร้างระยะสืบพันธุ์แบบมีเพศ

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ข้อมูลชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phyllosticta citriasiana* เพื่อเป็นข้อมูลในการหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสมของโรค Tan spot ของส้มโอ และเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญเพื่อประกอบการพิจารณาในการแก้ไขปัญหาการค้าระหว่างประเทศทั้งในด้านการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร

สามารถเผยแพร่งานวิจัยในรายงานประจำปีของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รวมถึงงานประชุมวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.2.2 การศึกษาพืชอาศัย และเขตการแพร่กระจายของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชในประเทศไทย

Hosts and Distribution areas of Pathogenic *Fusarium oxysporum* causing Wilt Disease of Crops in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง อภิรัชต์ สมฤทธิ์ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน ธารทิพย ภาสบุตร อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การรวบรวมและเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคเหี่ยวที่คาดว่ามีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ในพื้นที่เพาะปลูกพืชตามภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2562 เมื่อนำตัวอย่างพืชเป็นโรคมาแยกเชื้อราบนอาหาร 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 โรคเหี่ยวของถั่วลันเตา และโรคเหี่ยวของผักหวานบ้าน จาก 17 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี, จันทบุรี, เชียงใหม่, เชียงราย, นครพนม, นครราชสีมา, บึงกาฬ, พิษณุโลก, มุกดาหาร, ลำพูน, เลย, หนองคาย, สุโขทัย, สุพรรณบุรี, สงขลา, อุดรธานี และ อุบลราชธานี เมื่อประเมินการเกิดโรคในพื้นที่ที่พบโรคตายพราย (Panama disease) พบว่า โดยเฉลี่ยจำนวนต้นที่พบโรคคือ 5-10 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคตายพราย (panams disease) ของกล้วยไข่ พบว่า มีต้นกล้วยไข่เป็นโรคประมาณ 30 – 40 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคเหี่ยวของถั่วลันเตา 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 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรจ และโรคเหี่ยวของโหระพา พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ

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 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.

คำนำ

เชื้อราสาเหตุโรคพืชในสกุล *Fusarium* ที่รู้จักกันดีว่าเป็นสาเหตุของโรคพืชที่ทำความเสียต่อพืชที่ปลูกอย่างรุนแรง คือเชื้อรา *F. oxysporum* (เชื้อราชนิด (species) นี้ส่วนใหญ่ทำให้เกิดโรคกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่นพืชไร่, พืชหัว, ผัก, ไม้ประดับและไม้ผล ทั้งในระยะเวลาก่อนเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยว ปัญหาโรคที่เกิดขึ้นนี้ทำให้เกษตรกรเกิดการสูญเสียมูลค่าและกำไรของผลผลิตที่พวกเขาคาดว่าจะได้รับ เชื้อรา *F. oxysporum* เริ่มต้นบุกรุกเข้าทำลายพืชจากดินที่ปนเปื้อนหรือเป็นที่อาศัยอยู่ของเชื้อราสาเหตุ ผ่านทางช่องเปิดของรากเข้าไปยังระบบลำเลียงของพืช หรือผ่านทางบาดแผล เชื้อราเข้าไปเจริญทางเส้นใยและขยายพันธุ์อยู่

กรมวิชาการเกษตร

ในระบบลำเลียงน้ำและอาหารของพืชได้แล้ว ทำให้ระบบท่อลำเลียงอุดตัน ส่งผลให้ของสารอาหารและน้ำผ่านไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืชที่อยู่เหนือพื้นดินได้ ดังนั้นอาการเหี่ยวหรือสีเหลืองเหี่ยวจึงปรากฏให้เห็นกับต้นพืช ในขณะเดียวกันพืชที่เป็นโรคก็จะแสดงอาการเน่าของเนื้อเยื่อท่อลำเลียง เนื้อเยื่อบริเวณติดกัน บริเวณหัวหรือเหง้า โคนต้น รวมถึงราก โดยทั่วไป เชื้อรา *F. oxysporum* เป็นที่รู้จักกันดีในประเทศไทย ว่าเป็นเชื้อราโรคพืชที่ทำให้เกิดโรคอย่างรุนแรงกับพืชบ่อย ๆ ทั้งพืชที่ปลูก ถึงแม้ว่าอาการของโรคที่เกิดขึ้นกับพืชจะสังเกตเห็นหรือจดจำได้ง่ายว่าแสดงอาการเหี่ยวของต้นพืช แต่อาการที่แสดงออกดังกล่าวนี้ เป็นลักษณะของต้นพืชที่ติดเชื้อหรือเชื้อราเข้าไปทำลายจนไม่สามารถแก้ไขหรือเยียวยาไปแล้ว การขยายพื้นที่ปลูกพืชไปยังพื้นที่ใหม่ที่มีเชื้อราโรคพืชชนิดนี้อยู่แล้ว หรือการนำส่วนขยายพันธุ์ของพืชที่ติดเชื้อไปขยายปลูกในพื้นที่ใหม่ เป็นสาเหตุทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคต่อไปได้เรื่อย ๆ บางสถานการณ์ ถึงแม้เกษตรกร จะไม่ได้ขยายพื้นที่ปลูก แต่ได้ปลูกพืชชนิดเดียวกันอย่างต่อเนื่องกันในพื้นที่เดียวกัน 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 การศึกษาระบบนิเวศน์และระดับประชากรของเชื้อในพื้นที่เพาะปลูกพืช การศึกษาความหลากหลายของเชื้อราในระดับท้องถิ่นหรือในระดับประเทศ การศึกษาในระดับโมเลกุลเพื่อให้จัดจำแนกชนิดของเชื้อราอย่างถูกต้อง การศึกษาการจัดชั้นที่ถูกต้องของเชื้อราในระดับ formae specials รวมถึงการศึกษาวิธีการตรวจหาเชื้อราที่อาจจะติดไปกับพืชส่งออกที่สำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากประเทศไทยมีพื้นที่ตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นของโลก อีกทั้งสถานการณ์การเปลี่ยนแปลงของโลกที่ร้อนขึ้นในทุกวันนี้ ซึ่งคาดว่าทำให้สภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราโรคพืชชนิดนี้ รวมถึงความสามารถที่จำเพาะเจาะจงในการก่อให้โรคกับพืชอย่างจำเพาะเจาะจง จึงทำให้การศึกษาที่ดำเนินไปพร้อมการสำรวจหาเชื้อราและสำรวจการเกิดโรค จะเป็นแนวทางที่สำคัญอย่างยิ่งสำหรับการพยากรณ์การระบาดของโรค และการเตรียมพร้อมในการป้องกันการเกิดโรคอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

วิธีดำเนินการ

<u>อุปกรณ์</u>

1. พืชที่เป็นโรคเที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ WA (Water Agar), PDA (Potato Dextrose Agar) และ CLA (Corn Leaf Agar)
3. กล้องถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
4. อุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ
5. วัสดุอุปกรณ์สำหรับปลูกต้นไม้ในโรงเรือนทดลอง เช่น กระถางปลูกต้นไม้ขนาดความจุ 10 ลิตร ดิน พลั่ว บัวรดน้ำ ฯลฯ
6. เมล็ดพันธุ์ หรือต้นกล้าพืช สำหรับทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค (pathogenicity)

วิธีการ

กรรมวิธีและวิธีการทดลอง :

1. การเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรค

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชที่แสดงอาการเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อราที่พบในแหล่งปลูกพืชต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย บันทึกข้อมูลในแปลงปลูก บันทึกและถ่ายภาพลักษณะอาการของโรค

2. การแยกเชื้อ *F.oxysporum* จากพืชที่เป็นโรค

2.1 วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (tissue transplanting method) โดยตัดชิ้นส่วนพืชระหว่างส่วนเป็นโรคและส่วนปกติ หรือบริเวณท่อน้ำท่ออาหารของลำต้นและส่วนโคนของพืชที่แสดงอาการโรคเหี่ยว หรือ บริเวณผลที่มีอาการเน่า ให้มีขนาดประมาณ 5 x 5 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อบริเวณผิวของชิ้นส่วนพืชด้วยคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ (chlorox 10%) นาน 3-4 นาที แล้วแต่ขนาดของชิ้นส่วนพืช ย้ายลงวางบนอาหาร WA บ่มเชื้อ 24-36 ชั่วโมง ที่ 28 °ซ. เมื่อเส้นใยเจริญออกมา จึงแยกเส้นใยเชื้อลงเลี้ยงบนอาหาร PDA

3. การศึกษาและการจำแนกชนิด

3.1 ทำเชื้อบริสุทธิ์โดยการใช้ single–spore technique

เขี่ยกลุ่มสปอร์ลงใน vial ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทำสปอร์แขวนลอยให้มีปริมาณสปอร์ประมาณ 10 สปอร์ ต่อ 1 ลูป (loop; ห่วงลวด) ภายใต้เลนส์ objective กำลังขยายต่ำ ใช้ลูปที่ปลอดเชื้อแตะสปอร์แขวนลอย แล้วขีด (streak) ลงบนผิวหน้าของอาหาร WA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยตักสปอร์เดี่ยวที่งอกมาเลี้ยงบนอาหาร PDA

3.2 การจำแนกชนิด : ทำการศึกษาลักษณะของสัณฐานวิทยา ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อและจำแนกตามวิธีการของ 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

กรมวิชาการเกษตร

บันทึกข้อมูลในแปลงปลูก ระดับความเสียหายของโรค บันทึกและถ่ายภาพลักษณะอาการของโรค 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* ที่แยกได้จากพืชเป็นโรคเหี่ยว บนอาหาร PDA ประมาณ 7 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเมล็ดข้าวฟ่างที่นึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว บ่มเชื้อเป็นเวลา 14 วัน จากนั้น ชั่งเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อราเจริญอยู่จำนวน 30 กรัม แบ่งเป็น 3 ส่วน ๆ ละ 10 กรัม ฝังไว้ที่โคนต้นพืชที่ต้องการทดสอบ ตรวจสอบการเกิดโรคและลักษณะอาการที่เกิดขึ้น หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 1 สัปดาห์เป็นต้นไป

3. ดำเนินการตามวิธีการ Koch's postulate: นำเนื้อเยื่อพืชที่พบโรค มาแยกเชื้อ และจำแนกชนิดตามวิธีการที่ได้ดำเนินการมาในหัวข้อ การศึกษาและการจำแนกชนิด เมื่อได้เชื้อรา *F. oxysporum* ชนิดเดียวกับที่ใช้ปลูกเชื้อแล้ว ก็นำมาปลูกเชื้อซ้ำอีกครั้งในพืชชนิดเดิม ตรวจสอบและบันทึกผลการเกิดโรคและลักษณะอาการที่เกิดขึ้น

5. การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคเหี่ยวกับพืชที่อยู่ในวงศ์ (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* ที่แยกได้จากพืชเป็นโรคเหี่ยว บนอาหาร PDA ประมาณ 7 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเมล็ดข้าวฟ่างที่นึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว บ่มเชื้อเป็นเวลา 14 วัน จากนั้น ชั่งเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อราเจริญอยู่จำนวน 30 กรัม แบ่งเป็น 3 ส่วน ๆ ละ 10 กรัม ฝังไว้ที่โคนต้นพืชที่ต้องการทดสอบ 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

กรมวิชาการเกษตร

สถานที่ : กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
แปลงปลูกพืชของเกษตรกร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชที่แสดงอาการเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อราที่พบในแหล่งปลูกพืชต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ในช่วงเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2562 รวมระยะเวลา 3 ปีแล้วนำมาแยกหาเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหาร PDA และ เลี้ยงเชื้อราให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์ นำมาจำแนกชนิดของเชื้อราโดยตรวจดูลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยา พบว่า ได้เชื้อราบริสุทธิ์ที่เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวพืช จำนวน 60 ไอโซเลท (isolates) จากพืช 9 ชนิด ได้แก่ กล้วย (โรคตายพรายของกล้วยน้ำว้า และกล้วยไข่) โหระพา ผักชี พริก มะเขือเทศ เบญจมาศ ยาสูบ ถั่วลันเตา และ ผักหวานบ้าน จาก 17 จังหวัดพื้นที่ที่พบโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้า ได้แก่ จ.กาญจนบุรี (อ.ไทรโยค 3 ไอโซเลท), จ.เชียงใหม่ (อ.เชียงดาว 1 ไอโซเลท, อ.เมือง 1 ไอโซเลท, อ.แม่ริม 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 ไอโซเลท), จ.บึงกาฬ (อ.บึงโขงหลง 1 ไอโซเลท), จ.ลำพูน (อ.เมือง 1 ไอโซเลท), จ.สุพรรณบุรี (อ.ศรีประจันต์ 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.นายูง 3 ไอโซเลท) สำหรับเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้าในพื้นที่เก็บตัวอย่างโรคนั้น เมื่อประเมินการเกิดโรคจากการนับคร่าว ๆ ของจำนวนต้นที่ปลูกทั้งหมดในพื้นที่นั้น ๆ พื้นที่ที่พบโรคตายพราย (Panama disease) พบว่า พื้นที่ปลูกกล้วยน้ำว้าส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ว่างของสวนผลไม้ ปลายไร่ หรือปลายนา มีจำนวนต้นประมาณ 50 – 100 ต้น พบว่า โดยเฉลี่ยจำนวนต้นที่พบโรคคือ 5-10 เปอร์เซ็นต์ บางแห่งเป็นพื้นที่ปลูกริมแม่น้ำ หรือชายเขาหรือมีจำนวนต้นที่ปลูกส่วนใหญ่ จำนวน 200 – 400 ต้น มีจำนวนต้นที่พบโรคเฉลี่ย 10 - 20 เปอร์เซ็นต์เช่น ที่ จ.พิษณุโลก และ จ.เลย และ สำหรับการสำรวจโรคตายพรายที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* ในกล้วยอื่น ได้พบ โรคตายพราย (panams disease) ของกล้วยไข่ (Kluai Khai; lady finger, AA) ที่ อ.ขลุง จ.จันทบุรี (อ.ขลุง 3 ไอโซเลท) เมื่อประเมินการเกิดโรคจากจำนวนต้นที่ปลูกทั้งหมดในพื้นที่นั้น ๆ พบว่า มีต้นกล้วยไข่เป็นโรคประมาณ 30 – 40 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) โรคตายพรายของกล้วยไข่ พบครั้งแรกที่ อ.ขลุง จ.จันทบุรี และแพร่กระจายไปสู่แหล่งปลูกกล้วยไข่เป็นการค้าและส่งออกในอำเภออื่น ๆ แต่ยังไม่มีการรายงานความเสียหายอย่างชัดเจน จากการสำรวจ ได้พบ โรคเหี่ยวของถั่วลันเตาที่ จ.เชียงใหม่ (อ.สันทราย 1 ไอโซเลท) ในพื้นที่ปลูกประมาณ 200 ตารางวา หรือ 2 งานเมื่อประเมินการเกิดโรคจากจำนวนต้นที่ปลูกทั้งหมดในพื้นที่ พบว่า เป็นโรคประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ โรคเหี่ยวของเบญจมาศ ที่ จ.เชียงใหม่ (อ.จอมทอง 1 ไอโซเลท) ในพื้นที่ปลูกประมาณ 800 ตารางวา หรือ 2 ไร่ เมื่อประเมินการเกิดโรคจากจำนวนต้นที่ปลูกทั้งหมดในพื้นที่ พบว่า เป็นโรคประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ โรคเหี่ยวของผักชี ที่ จ.นครราชสีมา (อ.ปากช่อง 1 ไอโซเลท) ในพื้นที่ปลูกประมาณ 100 ตารางวา หรือ 1 งาน เมื่อประเมินการเกิดโรคจากจำนวนต้นที่ปลูกทั้งหมดในพื้นที่ พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์

สำนักวิชาการเกษตร

โรคเหี่ยวของผักหวานบ้าน 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 ไอโซเลท) และ จ.หนองคาย (จ.ศรีเชียงใหม่ 1 ไอโซเลท) ในพื้นที่ปลูกแต่ละแห่งประมาณ 400 ตารางวา หรือ 1 ไร่ เมื่อประเมินการเกิดโรคจากจำนวนต้นที่ปลูกทั้งหมดในพื้นที่ พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ ที่ จ.สุพรรณบุรี (อ.อู่ทอง 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 2.2.2.1)

เชื้อราทั้ง 60 ไอโซเลทเป็นเชื้อรา *F. oxysporum* ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการเข้าทำลายพืชอาศัย หรือ Formae speciales (f. sp.) ที่แตกต่างกัน จำนวน 9 Formae speciales (f. sp.) อย่างไรก็ตามเชื้อราทุกไอโซเลทมีลักษณะการเจริญบนอาหาร และลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกัน ดังนี้

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA : เชื้อราสร้างเส้นใยฟู ละเอียด สีขาว สีขาวแซมม่วง สีชมพูม่วง สีม่วงอ่อน จนถึงสีม่วงเข้ม เจริญอย่างรวดเร็ว สร้าง sporodochium สีส้มจำนวนมาก โคโลนีด้านใต้ผิวอาหารมีสีม่วงอ่อน ม่วงเข้ม หรือน้ำเงินเข้ม และสร้างเม็ด sclerotium สีน้ำเงิน (Figure 2.2.2.1)

ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร CLA : เชื้อราสร้าง microconidium จำนวนมากเกาะเป็นกลุ่มแบบ false head บน monophialide ซึ่งเกิดจากด้านข้างของเส้นใย phialide รูปร่างคล้ายขวดหรือพินโบว์ลิ่ง 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) เซลล์ที่ปลายเรียวแหลม 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 2.2.2.1)

ลักษณะอาการทั่วไป : ต้นพืชมีลักษณะเหลือง แคระแกรน หรือเหี่ยวเฉา คล้ายขาดน้ำ เมื่อตัดโคนต้นตามขวาง พบจุดสีน้ำตาลอ่อน น้ำตาลเข้ม จนถึงสีน้ำตาลดำ บริเวณท่อน้ำท่ออาหาร หรือผ่าตามยาว พบบริเวณท่อน้ำท่ออาหารมีสีน้ำตาลอ่อนสลับกับน้ำตาลดำเป็นทางยาว

การศึกษาข้อมูลของเชื้อชนิดนี้ พบว่าเชื้อราทำให้เกิดโรคเหี่ยว (vascular wilt) กับพืชหลายชนิด เป็นราที่มีพืชอาศัยกว้างมาก ทำความเสียหายกับพืชมากที่สุด และมีความสามารถทำให้เกิดโรคเฉพาะกับพืช โดยลักษณะของสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน ดังนั้น นักอนุกรมวิธานราที่ได้ศึกษา และจัดระบบการจำแนก จึงได้ให้

ชื่อเป็น 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 ลักษณะของต้นกล้วยที่เป็นโรคจะมีอาการหักพับของก้านใบที่อยู่ด้านนอกของลำต้นเทียม (pseudostem) จากนั้นก้านใบเริ่มหักพับหลายใบมากขึ้น ใบกล้วยที่หักพับเริ่มเหลือง แล้วเหี่ยวแห้งเป็นสีเหลืองน้ำตาล บางครั้งใบกล้วยที่ยังอ่อนอาจไม่หักพับแต่จะแสดงอาการเหลือง เมื่อเชื้อราเข้าสู่ต้นกล้วยแล้ว ก็จะกระจายไปตามท่อน้ำท่ออาหารของต้น เจริญและเพิ่มจำนวนจนอุดตันท่อลำเลียง ทำให้การไหลของน้ำและอาหารไม่เป็นไปตามปกติ เมื่อผ่าดูภายในลำต้นด้านขนานท่อน้ำท่ออาการ พบว่าเนื้อเยื่อเน่าเป็นสีน้ำตาลจนถึงดำกระจายไปตามความยาวของท่อน้ำท่ออาหาร เมื่ออาการเน่ากระจายทั่วทั้งต้น หรือเข้าสู่เหง้าก็จะทำให้ต้นกล้วยเหี่ยว และแห้งตายไปในที่สุด ในต้นกล้วยที่ยังอายุน้อย จะพบอาการใบเหลือง เหี่ยวแห้ง ยืนต้นตายในที่สุด แต่โดยทั่วไปแล้ว ความอาการที่รุนแรงของโรคมักแสดงออกมาอย่างชัดเจนหลังจากที่ต้นกล้วยมีอายุ 4 เดือนเป็นต้นไป ในระยะการออกดอกหรือแทงปลีกล้วย อาการเหี่ยวของโรคจะแสดงออกอย่างชัดเจนและบางครั้งเกิดอย่างรุนแรงและตายไป ก่อนที่กล้วยจะผลิตผลของกล้วย

จากการสำรวจได้พบโรคตายพรายเกิดกับทั้งกล้วยน้ำว้า และกล้วยไข่ ซึ่งอาการโรคที่เห็นภายนอกของกล้วยไข่นั้น ใบที่เหี่ยวเหลือง มักจะไม่หักพับ เหมือนโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้า ส่วนอาการโรคภายในลำต้นเทียมของกล้วยไข่นั้น มีลักษณะคล้ายกับที่เกิดกับลำต้นเทียมของกล้วยน้ำว้า (Figure 2.2.2.2 and 2.2.2.3)

โรคตายพรายของกล้วยน้ำว้า แพร่ระบาดได้ดีในช่วงฤดูฝน โดยส่วนใหญ่เชื้อสาเหตุโรคติดไปกับหน่อพันธุ์ที่ใช้ขยายพันธุ์ จากต้นหรือแปลงปลูกที่มีการเกิดโรคมาก่อน

จากการสำรวจได้พบโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้าเกิดกระจายทั่วไปแทบทุกพื้นที่ในการปลูกกล้วยน้ำว้า ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความเสียหายที่พบนั้น มีมากหรือน้อยแตกต่างกันไป ตั้งแต่ 5-10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโรคตายพรายของกล้วยไข่ พบที่ อ.ขลุง จ.จันทบุรี พบทำความเสียหายเป็นจำนวนมาก ในพื้นที่ปลูกกล้วยไข่ เพื่อการค้า (Figure 2.2.2.4) ระดับความเสียหาย มีตั้งแต่ 30-40 เปอร์เซ็นต์ (Table 2.2.2.1)

2. โรคเหี่ยวของโหระพา (Basil, *Ocimum basilicum* L.)

เชื้อราสาเหตุ : *F. oxysporum*

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ลักษณะอาการ: อาการของโรคเริ่มต้นจาก ส่วนยอดของต้นเริ่มแสดงอาการ แล้วใบเหลือง จากนั้นก็จะเหี่ยวเป็นสีน้ำตาล อาการเหี่ยวเริ่มจากส่วนยอดของต้นลงมา จากนั้นอาการเนื้อเยื่อท่อลำเลียงเน่าเป็นสีน้ำตาลเริ่มพบเห็นชัดเจนบริเวณส่วนโคนต้น และรากเน่าเสียหายเป็นสีน้ำตาลดำ อาการโรคเหี่ยวที่รุนแรงทำให้ต้นพืชแสดงอาการเหี่ยวแห้ง และยืนต้นตายไปในที่สุด สภาพแวดล้อมที่ อุณหภูมิและความชื้นสัมพันธ์สูง เป็นสิ่งส่งเสริมให้การพัฒนาของอาการโรคเกิดมากอย่างชัดเจน (figure 2.2.2.5) โรคเหี่ยวของต้นโหระพาที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* พบจำนวน 1 ไอโซเลท (ตัวอย่าง) จาก อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี เปอร์เซ็นต์ความเสียหายที่พบในแปลงปลูกประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (Table 2.2.2.1)

โรคเหี่ยวของโหระพา มีรายงานการพบโรคนี้ครั้งแรกที่ สหรัฐอเมริกา ในปี 1991 จากนั้นได้มีการพบโรคนี้กับพืชตระกูลกระเพราโหระพา ได้ทั่วไปใน แคนาดา และสหรัฐอเมริกา คาดว่าโรคนี้ได้แพร่ไปทั่วอเมริกาเหนือเนื่องจากติดมากับเมล็ดพันธุ์ที่นำมาจากประเทศอิตาลี เชื้อราฟิวซาเรียมที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยว และตายของพืชตระกูลกระเพราโหระพา คือเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilicum* เชื้อราแพร่กระจายโดยผ่านทางเมล็ดที่ติดเชื้อ และเชื้อที่อยู่อาศัยในดินมาหลายปี เชื้อราเข้าทำลายท่อลำเลียงน้ำในลำต้นพืช แล้วขวางกั้นการดูน้ำขึ้นสู่ต้นพืช ทำให้ใบพืชเหี่ยวอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการขาดน้ำ ลักษณะอาการที่พบโดยทั่วไป คือ 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 จากนั้นอาการเนื้อเยื่อท่อลำเลียงเน่าเป็นสีน้ำตาลเริ่มพบเห็นชัดเจนบริเวณส่วนโคนต้น และรากเน่าเสียหายเป็นสีน้ำตาลดำ อาการโรคเหี่ยวที่รุนแรงทำให้ต้นพืชแสดงอาการเหี่ยวแห้ง และยืนต้นตายไปในที่สุด สภาพแวดล้อมที่ อุณหภูมิและความชื้นสัมพันธ์สูง เป็นสิ่งส่งเสริมให้การพัฒนาของอาการโรคเกิดมากอย่างชัดเจน (figure 2.2.2.6) 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 (เขตซานต้าบาร์บาร่า) ทุ่งผักชีเชิงพาณิชย์แสดงอาการของโรคเหี่ยว มีผลกระทบทำให้เจริญเติบโตช้า และมีลักษณะแคระแกรน ใบที่อยู่ด้านล่างของต้นกลายเป็นสีเหลืองถึงน้ำตาลแดง และใบพืชเหี่ยวเฉามากในช่วงกลางวันที่ร้อนจัด โคนลำต้นจนถึงส่วนปลายราก แสดงอาการท่อลำเลียงเน่าเป็นสีน้ำตาลอ่อน ถึงน้ำตาลแดง เมื่ออาการโรคเกิดรุนแรงมากขึ้น พืชก็ตายในที่สุด (Koike, S.T., 2005)

4. โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ (Tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill.)

กรมวิชาการเกษตร

เชื้อราสาเหตุ : *F. oxysporum* (could be *F. oxysporum* f. sp. *lycpersici* (Fol)). การจัดกลุ่มในระดับ race ของเชื้อรากลุ่ม formae specials นี้ ในประเทศไทย ผู้วิจัยได้เริ่มวางแผนเพื่อดำเนินการศึกษาแล้ว เนื่องจากยังขาดความกระจ่างชัดเจนของกลุ่ม race ของเชื้อรา *Fusarium* สาเหตุโรคเหี่ยวในประเทศไทย

ลักษณะอาการ: ส่วนใหญ่อาการของโรคมักจะพบในระยะที่ต้นมะเขือเทศเจริญเต็มที่ ช่วงหลังออกดอกและเริ่มสร้างผล อาการเริ่มแรกของโรคคือใบที่อยู่ด้านล่างของลำต้นเริ่มเหลือง และยอดเริ่มฟุบเหี่ยว อาการเหลืองของใบจะเริ่มที่เนื้อเยื่อบางส่วนของใบ ต่อมาเมื่ออาการลุกลามอาการเหลืองเหี่ยวจะเกิดขึ้นทั่วทั้งพื้นที่ใบ การพัฒนาของอาการโรคจะเริ่มจากบางส่วนของต้นพืชก่อน จากนั้นอาการเหี่ยวเหลืองกระจายไปทั่วทั้งต้น ต้นมะเขือเทศมักยืนต้นตายก่อนที่จะสร้างดอกและสร้างผลอย่างสมบูรณ์ ความเสียหายของโรคเหี่ยวนี้พบได้ทั่วในพื้นที่ปลูกมะเขือเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นที่ปลูกมะเขือเทศขนาดใหญ่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งพื้นที่ดังกล่าวเป็นพื้นปลูกมะเขือเทศเพื่อจำหน่ายผลสด และผลิตเมล็ดพันธุ์ของมะเขือเทศเพื่อจำหน่ายเป็นการค้าไปยังแหล่งปลูกมะเขือเทศพื้นที่อื่น ๆ ของประเทศ จาก อ.อู่ทอง จ.สุพรรณบุรี และ อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี แยกเชื้อบริสุทธิ์ (figure 2.2.2.7)

5. โรคเหี่ยวของถั่วลันเตา (Green pea, *Pisum sativum* L.)

เชื้อราสาเหตุ : *F. oxysporum*

ลักษณะอาการ: อาการของโรคเริ่มต้นจากสีเขียวของใบจางกว่าใบของต้นปกติ และเหี่ยวจากส่วนยอดของต้น จากนั้นอาการเนื้อเยื่อท่อลำเลียงเน่าเป็นสีน้ำตาลจะเริ่มพบเห็นชัดเจนบริเวณส่วนโคนต้น อาการโรคเหี่ยวที่รุนแรงทำให้ต้นพืชแสดงอาการเหลือง จากนั้นเหี่ยวแห้ง และยืนต้นตายไปในที่สุด สภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิและความชื้นสัมพันธ์สูง เป็นสิ่งส่งเสริมให้การพัฒนาของอาการโรคเกิดมากอย่างชัดเจน อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ แยกเชื้อบริสุทธิ์ ได้ (figure 2.2.2.8)

6. โรคเหี่ยวของพริก (Chilli and Pepper; *Capsicum annuum* L.)

เชื้อราสาเหตุ : *F. oxysporum*

ลักษณะอาการ: อาการของโรคเริ่มต้นจากสีเขียวของใบจางกว่าใบของต้นปกติ และเหี่ยวจากส่วนยอดของต้น จากนั้นอาการเนื้อเยื่อท่อลำเลียงเน่าเป็นสีน้ำตาลจะเริ่มพบเห็นชัดเจนบริเวณส่วนโคนต้น อาการโรคเหี่ยวที่รุนแรงทำให้ต้นพืชแสดงอาการเหลือง จากนั้นเหี่ยวแห้ง และยืนต้นตายไปในที่สุด สภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิและความชื้นสัมพันธ์สูง เป็นสิ่งส่งเสริมให้การพัฒนาของอาการโรคเกิดมากอย่างชัดเจน ที่ อ.เมือง จ.สุโขทัย อ.เชียงแสน จ.เชียงราย และ อ.ศรีเชียงใหม่ จ.หนองคาย แยกเชื้อราได้เชื้อรา *F. oxysporum* 3 ไอโซเลท (figure 2.2.2.9)

7.โรคเหี่ยวของยาสูบ (Tobacco, *Nicotiana tabacum*)

เชื้อราสาเหตุ: *F. oxysporum*.

ลักษณะอาการ: เชื้อราเมื่อเข้าสู่พืชจะทำให้พืชเกิดอาการใบส่วนที่อยู่ด้านล่างของลำต้นเหลืองและเหี่ยวแห้งตาย ลักษณะอาการที่เด่นชัดของโรคเหี่ยวยาสูบคือ มักพบอาการต้นเหี่ยวด้านใดด้านหนึ่งของต้นก่อน บางครั้งใบของต้นที่เป็นโรคอาจยังไม่เหี่ยว แต่ก็มักแสดงอาการแกรนอย่างชัดเจน เมื่ออาการเหี่ยวพัฒนาขึ้นยอดจะเหี่ยวและโน้มงอลง ใบยอดเหลืองและเหี่ยวในที่สุด ท่อลำเลียงในลำต้นด้านที่แสดงอาการเหี่ยวมักเน่า

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

เป็นสีน้ำตาลตลอดทางยาวของระบบท่อลำเลียง อาการท่อลำเลียงเน่าตายนี้สามารถพบได้บนเส้นใบและรากของต้นที่เป็นโรคด้วย (figure 2.2.2.10)

8. โรคเหี่ยวของเบญจมาศ (Chrysanthemum, *Chrysanthemum morifolium*)

เชื้อราสาเหตุ: *F. oxysporum*.

ลักษณะอาการ: อาการเริ่มแรกพบใบเหลืองเหี่ยว หรือบางครั้งอาจจะเหี่ยวโดยที่ยังเขียวอยู่ ต้นแกรนและส่วนของต้นด้านใดด้านหนึ่งเหี่ยวและลำต้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ บางครั้งอาการเหี่ยวเกิดขึ้นคล้ายต้นพืชขาดน้ำ แต่ในที่สุดก็เหี่ยวไม่ฟื้น และต้นแห้งตายในที่สุด เนื้อเยื่อภายในท่อลำเลียงของต้นที่เป็นโรคมักเน่าเป็นสีน้ำตาลตลอดแนวยาวของท่อ โดยปกติเชื้อราสามารถแพร่กระจายได้โดยติดไปกับดิน และยอดที่นำไปขยายพันธุ์ เชื้อสาเหตุของโรคเจริญและแพร่กระจายได้ดีในสภาวะอบอุ่น มีความชื้นในอากาศสูง การให้น้ำมากหรือต้นแช่น้ำในแปลงปลูกที่ระบบการระบายน้ำไม่ดี การเตรียมหรืออบไอร้อนฆ่าเชื้อในวัสดุปลูกเป็นสิ่งที่ช่วยไม่ให้การเกิดโรคหรือแพร่กระจายของโรคได้ดีวิธีหนึ่ง (figure 2.2.2.11)

9. โรคเหี่ยวของผักหวานบ้าน (Pak Wan Ban, Sweet leaf *; Sauropus androgynus*)

เชื้อราสาเหตุ : *F. oxysporum* จากการศึกษาความสามารถในการก่อให้เกิดโรค พบความชัดเจนว่าเชื้อราชนิดนี้เป็นสาเหตุที่แท้จริงของโรคเหี่ยวที่เกิดกับผักหวานบ้าน และขณะนี้อยู่ระหว่างการศึกษาการแพร่กระจายและความรุนแรงของเชื้อราที่ทำให้เกิดอาการของโรคกับต้นผักหวานบ้านในจังหวัดอุบลราชธานี

ลักษณะอาการ: อาการของโรคมักพบในระยะที่ต้นผักหวานบ้านเป็นต้นกล้าตั้งแต่ต้นเล็กที่เกิดจากการปักชำ อาการเริ่มแรกของโรคคือใบที่อยู่ด้านล่างของลำต้นเริ่มเหลือง ที่เนื้อเยื่อบางส่วนของใบ ต่อมาเมื่ออาการลุกลามอาการเหลืองเหี่ยวจะเกิดขึ้นทั่วทั้งพื้นที่ใบ และร่วงหล่น การพัฒนาของอาการโรคจะเริ่มจากบางส่วนของต้นพืชก่อน จากนั้นอาการเหี่ยวเหลืองกระจายไปทั่วทั้งต้น ต้นผักหวานบ้านเมื่อใบร่วงเกือบหมด มักเหี่ยวแล้วยืนต้นตาย ความเสียหายของโรคเหี่ยวนี้พบได้ทั่วในพื้นที่ปลูกผักหวานบ้าน โดยเฉพาะแปลงเพาะชำต้นผักหวานบ้าน เมื่ออาการของโรครุนแรงมาก ส่วนโคนต้นจะปริแตก เนื้อเยื่อท่อลำเลียงเน่าเป็นสีน้ำตาลตามความยาวของท่อ จากโคนต้นด้านล่างสุดขึ้นไปสู่ส่วนที่อยู่ยอดเรื่อย ๆ (figure 2.2.2.12)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การรวบรวมและเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคเหี่ยวที่คาดว่ามีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ในพื้นที่เพาะปลูกพืชตามภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2562 เมื่อนำตัวอย่างพืชเป็นโรคมาแยกเชื้อราบนอาหาร 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 โรคเหี่ยวของถั่วลันเตา และ

ศรีวิชัยการเกษตร

โรคเหี่ยวของผักหวานบ้าน จาก 17 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี, จันทบุรี, เชียงใหม่, เชียงราย, นครพนม, นครราชสีมา, บึงกาฬ, พิษณุโลก, มุกดาหาร, ลำพูน, เลย, หนองคาย, สุโขทัย, สุพรรณบุรี, สงขลา, อุดรธานี และ อุบลราชธานี เมื่อประเมินการเกิดโรคในพื้นที่ที่พบโรคตายพราย (Panama disease) พบว่า โดยเฉลี่ยจำนวนต้นที่พบโรคคือ 5-10 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคตายพราย (panams disease) ของกล้วยไข่ พบว่า มีต้นกล้วยไข่เป็นโรคประมาณ 30 – 40 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคเหี่ยวของถั่วลันเตา 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 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรจ และโรคเหี่ยวของโหระพา พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ

แม้ในงานวิจัยนี้ ได้สำรวจพบโรคเหี่ยวของพืช ที่เกิดจากเชื้อรา F. oxysporum ในประเทศไทยเพียงไม่กี่ชนิดของฟอร์มสปีชีส์ (formae speciales; f. sp.) แต่ในปัจจุบัน จากการค้นเอกสารข้อมูลเกี่ยวกับ *F. oxysporum* พบว่าได้มีรายงานในต่างประเทศทั่วโลกว่าพบโรคเหี่ยวของพืชต่าง ๆ ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา F. oxysporum ที่แตกต่างชนิดของฟอร์มสปีชีส์ (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 (narciscus) 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. a*pii* โรคเหี่ยวของคื่นฉ่าย (celery), *F. oxysporum* f. sp. n*iveum* 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. *cepae* โรคเหี่ยว

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ของหอม (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. *coffeae* โรคเหี่ยวของกาแฟ (coffee), *F. oxysporum* f. sp. *cumini* โรคเหี่ยวของยี่หร่า (cumin), *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis* โรคเหี่ยวของปาล์มน้ำมัน (oil palm), *F. oxysporum* f. sp. *fabae* โรคเหี่ยวของถั่วปากอ้า (broad bean; faba), *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* โรคเหี่ยวของสตรอเบอรี่ (strawberry), *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* โรคเหี่ยวของแกลดิโอลัส (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; *Orobanche spp.*) , *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* โรคเหี่ยวหรือโรคโคนเน่าของแพสชั่นฟรุท (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. *tuberose* โรคเหี่ยวของซ่อนกลิ่นไทย (tuberose), *F. oxysporum* f. sp. *udum* โรคเหี่ยวของถั่วมะแฮะ (pigeon pea), *F. oxysporum* f. sp. *vanilae* โรคเหี่ยวของวานิลา (vanilla) และ *F. oxysporum* f. sp. *zingiberi* โรคเหี่ยวของขิง (ginger) (http://www.pestnet.org/fact_sheets/ginger_fusarium_yellows_292.htm) หรืออาจจะมากกว่านี้ หากมีรายงานการพบใหม่เรื่อย ๆ

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นำไปใช้ในหาแนวทางการป้องกันกำจัดโรคตายพรายที่เกิดจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *Cubense*

กรมวิชาการเกษตร

Table 2.2.2.1 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	*F. oxysporum* f. sp. *cubense*	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Kanchanaburi/ Sai Yok (3 isolates)	5 -10
4-8	*F. oxysporum* f. sp. *cubense*	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Chiang Mai/ Chiang Dao (1 isolate), Muang (1 isolate), Mae Rim (2 isolates), Samoeng (1 isolate)	5 -10
9-13	*F. oxysporum* f. sp. *cubense*	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Chiang Rai/ Chiang Khong (1 isolate), Chiang Saen (1 isolate), Mae Sai (2 isolates), Phaya Mengrai (1 isolate)	10-15
14-16	*F. oxysporum* f. sp. *cubense*	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Nakorn Phanom/ Tha Uthen (3 isolates)	5 -10
17	*F. oxysporum* f. sp. *cubense*	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Nakorn Rachasima/ Pak Chong (1 isolates)	10
18	*F. oxysporum* f. sp. *cubense*	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Bueng Kan/ Bueng Khong Long (1 isolate)	10
19	*F. oxysporum* f. sp. *cubense*	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Lam Phun/ Muang (1 isolate)	10

Table 2.2.2.1 (cont.)

No. of Isolate	Species (and formae speciales; f. sp.)	Host	Disease/ Symptom	Collected Location (Province/ District)	Severity percentage in average (%)

กรมวิชาการเกษตร

20-21	*F. oxysporum* f. sp. *cubense*	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Suphan Buri/ Si Prachan (2 isolates)	5 -10
22-23	*F. oxysporum* f. sp. *cubense*	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	SongKhla/ Had Yai (2 isolates)	5 -10
24-28	*F. oxysporum* f. sp. *cubense*	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Phitsanulok/ Bang Krathum (5 isolates)	10- 20
29-31	*F. oxysporum* f. sp. *cubense*	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Sukhothai/ Si Samrong (3 isolates)	5 -10
32	*F. oxysporum* f. sp. *cubense*	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Mukdahan/ Muang (1 isolate)	5 -10
33-42	*F. oxysporum* f. sp. *cubense*	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Loei/ Chaing Khan (4 isoltes), Dan Sai (3 isoltes), Phu Ruea (3 isolates)	10-20
43-45	*F. oxysporum* f. sp. *cubense*	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Udon Thani/ Na Yung (3 isoltes)	10-20
46-48	*F. oxysporum* f. sp. *cubense*	Kluai Khai (Lady Finger; AA)	Panama disease/ wilt	Chanthaburi/ Khlung (3 isoltes)	30-40
49	*F. oxysporum*	Green pea	Wilt	Chiang Mai/ San Sai (1 isolate)	20

กรมวิชาการเกษตร

Table 2.2.2.1 (cont.)

No. of Isolate	*Species (and formae speciales; f. sp.)*	Host	Disease/ Symptom	Collected Location (Province/ District)	Severity percentage in average (%)
50	*F. oxysporum*	Chrysanthemum	Wilt	Chiang Mai/ Chom Thong (1 isolate)	10
51	*F. oxysporum*	Coriander	Wilt	Nakorn Rachasima/ Muang (1 isolate)	5
52-53	*F. oxysporum*	Pak Wan Ban, Sweet leaf	Wilt	Ubon Rachathani/ Sawang Wirawong (2 isolates)	10-15
54	*F. oxysporum*	Chilli	Wilt	Sukhothai/ Si Samrong (1 isolate)	5
55	*F. oxysporum*	Chilli	Wilt	Chiang Rai/ Chiang Saen (1 isolate)	5
56	*F. oxysporum*	Chilli	wilt	Nong Khai/ Sri Chiang Mai (1 isolate)	5
57	*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*	Tomato	Wilt	Suphan Buri/ U Thong (1 isolate)	5
58	*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*	Tomato	wilt	Kanchanaburi/ Sai Yok (1 isolate)	5
59	*F. oxysporum*	Tobacco	Wilt	Chaiang Mai/ Mae Tang (1 isolate)	5
60	*F. oxysporum*	Basil	Wilt	Kanchanaburi/ Tha Muang (1 isolate)	5
	Totals			60 isolates	

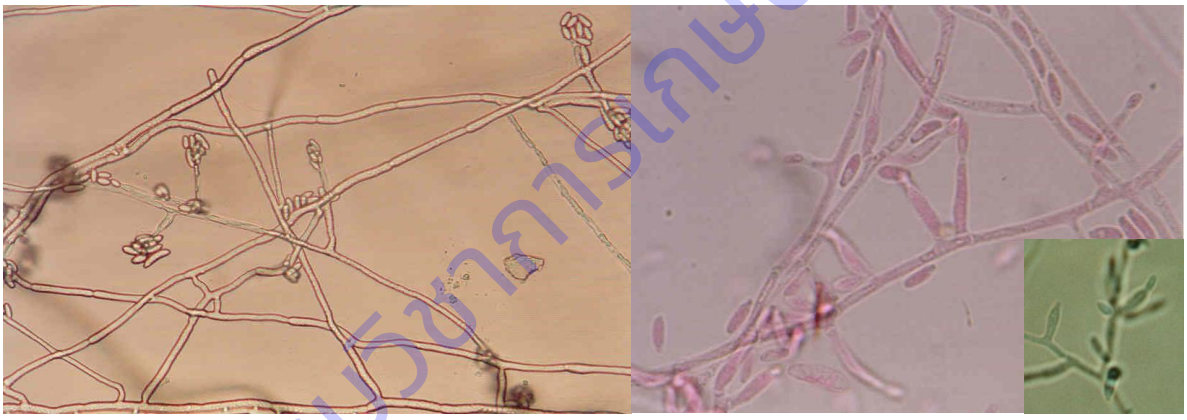
กรมวิชาการเกษตร

โคโลนีบน PDA เชื้อรา *F. oxysoporum* สาเหตุโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้า

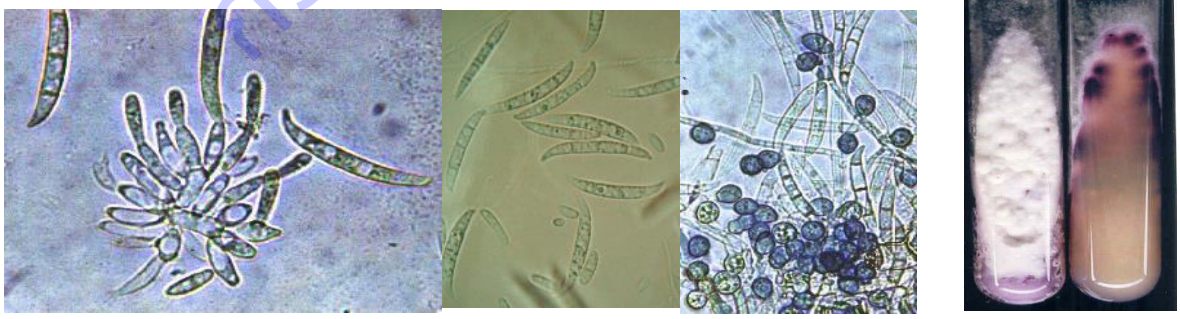
โคโลนีบน PDA เชื้อรา *F. oxysoporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของโหระหา

โคโลนีบน PDA เชื้อรา *F. oxysoporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของผักชี

Figure 2.2.2.1 Colony Characteristic of *F. oxysporum* isolates on PDA



Monophialides สร้าง microconidia เป็นกลุ่มแบบ false heads.



Monophialides สร้าง macroconidia

Chlamydospores

Culture บนอาหาร PDA

Figure 2.2.2.2 Morphology of *F. oxysporum* Schlecht ex Fries, emend. Snyder & Hansen

กรมวิชาการเกษตร

Figure 2.2.2.3 Symptom of Panama disease in Kluai Nam Wa (ABB) caused by *F. oxysporum* f.sp. *cubense*

Figure 2.2.2.4 Symptom of Panama disease in Kluai Khai (lady finger; AA) caused by *F. oxysporum* f.sp. *cubense*

Figure 2.2.2.5 Symptom of Wilt disease in basil caused by *F. oxysporum*

Figure 2.2.2.6 Symptom of Wilt disease in coriander caused by *F. oxysporum*

Figure 2.2.2.7 Symptom of Wilt disease in tomato caused by *F. oxysporum* (*F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*)

Figure 2.2.2.8 Symptom of Wilt disease in green pea caused by *F. oxysporum*

Figure 2.2.2.9 Symptom of Wilt disease in chilli caused by *F. oxysporum*

Figure 2.2.2.10 Symptom of Wilt disease in tobacco caused by *F. oxysporum*

Figure 2.2.2.11 Symptom of Wilt disease in chrysanthemum caused by *F. oxysporum*

Figure 2.2.2.12 Symptom of Wilt disease in Pak Wan Ban (Sweet leaf; *Sauropus androgynous*) caused by *F. oxysporum*

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.2.3 ชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า

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

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง ทิพวรรณ กันหาญาติ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล

บูรณี พั่ววงษ์แพทย์

รุ่งนภา ทองเครั่ง

กาญจนา ศรีไม้

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ศึกษาชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2562 พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส เชื้อไม่เจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะสเตร็ปโตมัยซินความเข้มข้นมากกว่า 5 ppm และทองแดงความเข้มข้นมากกว่า 9,000 ppm สามารถทำให้เกิดโรคได้บนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสายพันธุ์บางขุนเทียน คาลิปโซ จิตติ กล้วยไม้สกุลแวนดา (ลูกผสมฟ้ามุ่ย) และกล้วยไม้สกุลช้าง (ช้างแดง) แต่ไม่ทำให้เกิดโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย (บอม) และแคทลียา การปลูกเชื้อโดยฉีดเชื้อสาเหตุเข้าสู่หัวหอมใหญ่ทำให้กาบของหัว (bulb scale) เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วนการปลูกเชื้อสาเหตุในข้าวโพดโดยการพ่นไม่ทำให้เกิดอาการโรคจุดสีขาว เก็บข้อมูลการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียในเศษซากพืชอาศัย พบว่าใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการของโรคและร่วงจากต้นสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียหลังจากร่วงแล้วจนถึง 60 วัน เมื่อตรวจสอบเบื้องต้นโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* พบว่าให้ผลของปฏิกิริยาเป็นบวก การจำแนกชนิดของเชื้อเพื่อยืนยันผลการตรวจสอบโดยใช้การประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) จากยีน *gyr*B, *rpo*B, *atp*D และ *inf*B ทำให้สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าที่พบระบาดในประเทศไทยใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* LMG 2632^{T}

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}.

คำนำ

ในปี 2554 เกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าในเขตจังหวัดสมุทรสาครและนครปฐม ประสบกับปัญหาการระบาดของโรคใบจุดของกล้วยไม้ โดยมีลักษณะอาการเป็นจุดกลมสีน้ำตาลดำ รอบแผลเห็นวงสีเหลืองชัดเจน ในแปลงที่มีการระบาดของโรครุนแรงทำให้ใบร่วง กลีบดอกไหม้ และช่อดอกหักพับไม่ได้คุณภาพไม่สามารถส่งขายได้ จากการศึกษาเชื้อสาเหตุ พบว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรียโคโลนีสีเหลือง ผลการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกับการสืบค้นข้อมูล ไม่พบรายงานเชื้อแบคทีเรียสาเหตุที่เป็น Facultative anaerobe โคโลนีสีเหลืองที่ทำให้เกิดโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศมาก่อน (นิยมรัฐ, 2544; ปิยรัตน์และคณะ, 2552; Chuenchitt *et al*., 1983) ดังนั้น เพื่อให้การป้องกันกำจัดโรคนี้ได้ผลและมีประสิทธิภาพจึงจำเป็นต้องทราบชนิดที่ถูกต้องตลอดจนข้อมูลทางด้านชีววิทยาอื่นๆ มากขึ้น การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุล ม็อคคาร่า เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงแก่นักวิชาการในการทำวิจัยและแนะนำเกษตรกรในการป้องกันกำจัด รวมถึงเป็นข้อมูลสำหรับในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช (pest list)

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
3. หม้อนึ่งความดันไอ
4. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ
5. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
6. ตู้อบ
7. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
8. เครื่องชั่ง

9. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

10. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สกัดดีเอ็นเอ และทำปฏิกิริยา PCR

11. กล้วยไม้สกุลต่างๆ

- วิธีการ

1. ฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืชมาฟื้นฟู 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 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ทำการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ ดังนี้

2.1 กล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสายพันธุ์ต่างๆ เช่น บางขุนเทียน คาลิปโซ่ จิตติ

2.2 กล้วยไม้สกุลอื่น เช่น แวนด้า หวาย ช้าง แคทลียา

2.3 พืชที่มีรายงานการก่อให้เกิดโรคจากเชื้อแบคทีเรียสกุล *Pantoea* เช่น ข้าวโพด หอม

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

3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

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 μg/ml และอาหาร streptomycin (MGYSm) 50, 75, 100 และ 500 μg/ml เปรียบเทียบกับเลี้ยงบนอาหาร MGY บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหาร

5. การอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียบนพืชอาศัย

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

การแยกเชื้อจากผิวพืชอาศัย แช่ใบพืชอาศัยในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที นำมาทำให้เจือจางโดย วิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-6} จากนั้นนำสารแขวนลอยที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงบนอาหารกึ่งจำเพาะ PA20 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของเชื้อสาเหตุบนอาหาร

การแยกเชื้อจากพืชอาศัยหรือเศษซากพืชอาศัย ตัดใบพืชอาศัยเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง บดใบพืชในน้ำกลั่น และเลี้ยงบนอาหาร PSA และอาหารกึ่งจำเพาะ PA20 หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของเชื้อสาเหตุบนอาหาร

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/µl, One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK)

7. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย multilocus sequence analysis (MLSA)

ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยนำเชื้อแบคทีเรีย 1 ลูป 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 เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า จำนวน 4 ยีน ได้แก่ ยีน *gyrB*, *rpoB*, *atpD* และ *infB* โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 100 ng/µl, One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taipei, Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.5 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Goettingen, Germany) กำหนด

ศูนย์วิทยทรัพยากร

อุณหภูมิและเวลาให้เริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (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 ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., Cambridge, UK)

ส่งผลผลิต PCR วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 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 2562
สถานที่	ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาฟื้นฟู โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรียได้ จำนวน 10 ไอโซเลท

2. ทดสอบชนิดพืชอาศัยของเชื้อ

ทดสอบชนิดกล้วยไม้ที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ทำการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ โดยใช้เข็มฉีดยาแทงบริเวณผิวใบเพื่อทำแผลบนพืชทดสอบแล้วหยดเชื้อลงบนแผล 2 ไมโครลิตร พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้เกิดโรคได้บนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสายพันธุ์บางขุนเทียน คาลิปโซ่ จิตติ กล้วยไม้

กรมวิชาการเกษตร

สกุลแวนด้าและสกุลช้าง แต่ไม่ทำให้เกิดโรคบนกล้วยไม้สกุลหวายและแคทลียา (Figure 2.2.3.1) การทดสอบในพืชที่มีรายงานการก่อให้เกิดโรคจากเชื้อสาเหตุสกุล *Pantoea* พบว่าหอมหัวใหญ่ที่ทำการปลูกเชื้อโดยวิธีการฉีดเชื้อสาเหตุเข้าสู่หัวหอมใหญ่ หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน เมื่อผ่าดูด้านในกาบของหัว (bulb scale) เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล อาการคล้ายคลึงกับรายงานของ Carr *et al*. (2013) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *P. ananatis* และรายงานของ Stumpf *et al*. (2018) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* การปลูกเชื้อสาเหตุในข้าวโพดด้วยวิธีการทาผงคาร์โบแรนดัมบนใบข้าวโพดก่อนแล้วพ่นเชื้อสาเหตุ พบว่าข้าวโพดแสดงอาการใบช้ำเป็นสีเขียวเข้มไม่สอดคล้องกับรายงานของ Krawczyk *et al*. (2010) ซึ่งรายงานอาการของโรคบนใบข้าวโพดมีลักษณะเป็นจุดสีขาวเกิดจากเชื้อ *P. ananatis*

3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

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

4. การเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะและทองแดง

ทดสอบการเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะและทองแดงของเชื้อสาเหตุ พบว่าเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะสเตร็ปโตมัยซินความเข้มข้น 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 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ทำการปลูกเชื้อบนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า โดยใช้เข็มฉีดยาแทงบริเวณผิวใบเพื่อทำแผลบนพืชทดสอบแล้วพ่นเชื้อลงบนใบกล้วยไม้ คลุมให้ความชื้นด้วยถุงพลาสติก ทำการแยกเชื้อจากพืชอาศัย เศษซากพืชอาศัย และวัสดุปลูกทุก 1 เดือน ผลการแยกเชื้อบนกล้วยไม้พบแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชบนใบที่แสดงอาการของโรคในทุกเดือนที่ตรวจถึงแม้แผลบนใบจะแห้งแล้วก็ตาม โดยใบที่แสดงอาการของโรคและร่วงจากต้นสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียจนถึง 60 วัน สอดคล้องกับรายงานของ Sauer *et al*. (2015) ที่ทำการศึกษาความสามารถในการมีชีวิตรอดบนเศษซากพืชอาศัยของเชื้อ *Pantoea ananatis* สาเหตุโรคจุดสีขาวของข้าวโพด โดยพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียบนเศษซากของข้าวโพดหลังจากเก็บเกี่ยวแล้ว 60 วัน และยังตรวจพบเชื้อแบคทีเรียได้บนใบข้าวโพดที่ยังไม่แสดงอาการของโรคและบนพืช *Digitaria horizontalis* ซึ่งไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อ แสดงให้เห็นแหล่งที่เชื้อแบคทีเรียอาศัยและมีชีวิตรอดโดยอาศัยอยู่ในรูปแบบ epiphyte สำหรับการแยกเชื้อจากวัสดุปลูกหรือดินปลูกไม่ได้ดำเนินการเนื่องจากกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าไม่ได้ใช้วัสดุปลูกและไม่มีพืชอาศัยอื่นที่ใช้วัสดุปลูกหรือดินในการเพาะปลูก

จากข้อมูลเชื้อแบคทีเรียสามารถอยู่อาศัยบนเศษซากพืชได้นาน 60 วัน จึงสามารถเป็นแหล่งในการแพร่กระจายเชื้อไปยังแหล่งอื่นได้ ดังนั้น คำแนะนำในการป้องกันกำจัดโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าจึง

กรมวิชาการเกษตร

ควรเก็บเศษซากพืชที่เป็นโรคออกจากแปลงและเผาทำลายทิ้ง ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดแหล่งในการแพร่กระจายของเชื้อภายในแปลงปลูกและแหล่งอื่นๆ ที่มีการเคลื่อนย้ายไปทิ้ง

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 2.2.3.2)

7. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย multilocus sequence analysis (MLSA)

ทำการเพิ่มปริมาณยีน *gyrB*, *rpoB*, *atpD* และ *infB* เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าด้วยเทคนิค PCR จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้ พบว่ายีน *gyrB*, *rpoB*, *infB* มีขนาดประมาณ 1,000 bp และยีน *atp*D มีขนาดประมาณ 800 bp จัดเรียงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gyrB*, *rpoB*, *atpD* และ *infB* เพื่อวิเคราะห์แบบ multilocus sequence analysis เปรียบเทียบกับ *Pantoea* spp. ที่เป็น type strain และมีข้อมูลของทั้ง 4 ยีนในฐานข้อมูล Genbank สร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้เพื่อจัดจำแนกเชื้อโดยใช้การประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) ประเมินความเชื่อมั่นของแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยมีเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia* spp. เป็น outgroup พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าจัดกลุ่มร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *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. cypripedii* LMG 2657^{T} ซึ่งแยกได้จากกล้วยไม้ cypripedium (cypripedium orchids) ของสหรัฐอเมริกา (Figure 2.2.3.3)

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* ในพืชชนิดใหม่นอกเหนือจากพืชในกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยว และเป็นรายงานครั้งแรกของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* ที่พบทำให้เกิดโรคใบจุดในกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าและยังไม่เคยมีรายงานการระบาดของเชื้อชนิดนี้ในกล้วยไม้ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศมาก่อน โดยมีข้อสันนิษฐานการระบาดของโรคในครั้งนี้เกิดจากการปรับตัวของเชื้อที่เดิมอาศัยอยู่ในรูปแบบ epiphyte ทำให้เกิดโรคได้แต่ไม่รุนแรงเพราะจากการสอบถามข้อมูลจากเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้ พบว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เกษตรกรเคยเห็นลักษณะอาการของโรคมาก่อนแต่ไม่รุนแรง และข้อสันนิษฐานอีกประการหนึ่งคือการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ทำให้อ่อนแอต่อเชื้อเนื่องจากกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าเป็นกล้วยไม้ลูกผสม 3 สกุล (Arachnis x Ascocentrum x Vanda) และจากการสำรวจเบื้องต้นพบการระบาดของโรคในกล้วยไม้สกุลแวนด้าและสกุลเข็ม (Ascocentrum) แล้ว แต่ไม่รุนแรงเหมือนม็อคคาร่าแต่ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกล้วยไม้สกุลแวนด้าส่วนใหญ่ส่งออกต่างประเทศจึงมีการดูแลแปลงอย่างดีเมื่อมีอาการของโรค กล้วยไม้จะถูกแยกออกจากแปลงจึงพบการระบาดของโรคค่อนข้างน้อย ทั้งนี้เชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* เป็นเชื้อแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่ต้องเฝ้าระวังและติดตามสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อในกล้วยไม้สกุลอื่นๆ เพื่อไม่ให้ส่งผลกระทบต่อการปลูกและการส่งออกกล้วยไม้ไปต่างประเทศ โดยมีข้อสังเกตจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเชื้อสามารถทำให้เกิดโรคเฉพาะในกลุ่มกล้วยไม้ที่เจริญทางยอด (monopodium) ได้แก่ ม็อคคาร่า แวนด้า และช้าง แต่ไม่ทำให้เกิดโรคในกล้วยไม้กลุ่มที่มีการเจริญเติบโตด้วยการแตกหน่อ (sympodium) ได้แก่ หวายและแคทลียา ทั้งนี้ยังเหลือกล้วยไม้อีกหลายสกุลที่ต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันข้อสังเกตดังกล่าวโดยกล้วยไม้ที่เจริญทางยอดได้แก่ กล้วยไม้สกุลเข็ม (Ascocentrum) สกุลฟาแลนอปซิส (Phalaenopsis) สกุลอะแรคนิส (Arachnis) กล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตด้วยการแตกหน่อ ได้แก่ รองเท้านารี ออนซิเดียม

การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าโดย ทิพวรรณ และคณะ (2562) เบื้องต้น พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โคโลนีสีเหลือง สามารถเจริญได้ทั้งในสมีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) และเชื้อสามารถสร้าง indole (indole production) ได้ โดยคุณสมบัติดังกล่าวคล้ายคลึงกับเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea* spp. จากข้อมูลการจัดลำดับความสัมพันธ์ของเชื้อบริเวณ 16S rDNA ร่วมกับรายงานพืชอาศัยและคุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญที่ใช้พิจารณาในการจำแนกเชื้อ *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* มีรายงานทำให้เกิดโรคในพืชอาศัยหลายชนิด 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) จากรายงานพืชอาศัยของเชื้อ *P. ananatis* ที่ค่อนข้างกว้างสามารถเข้าทำลายพืชได้หลายวงศ์รวมทั้งรายงานของณัฏฐิมาและวนิดา (2539) ซึ่งพบเชื้อ *P. ananatis* เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคเนื้อแกนของสับปะรดในประเทศไทย จึงทำให้สรุปในเบื้องต้นว่า เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *P. ananatis* แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบเชื้อเพิ่มเติม พบว่าให้ผลตรวจสอบเป็นบวกเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* และให้ผล

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ตรวจสอบเป็นลบเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. ananatis* จากนั้นยืนยันผลการตรวจสอบโดยใช้ multilocus sequence analysis (MLSA) ในการจำแนกชนิดของเชื้อ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene เพียงตำแหน่งเดียวไม่สามารถใช้จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่มีความใกล้ชิดกันสูงได้ดีเหมือนวิธี 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 ทำให้นิยมใช้จำแนกชนิดแบคทีเรียมากขึ้นเนื่องจากสะดวกและสามารถลดข้อจำกัดเรื่องไม่มี 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 โดยต้องพิจารณาคัดเลือกยีนพื้นฐานที่ทำหน้าที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียและแบคทีเรียจำเป็นต้องรักษาคุณสมบัตินั้นไว้ให้คงที่ โดยหลีกเลี่ยงการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ต่อยีนนั้นน้อยที่สุด

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส ไม่เจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะสเตร็ปโตมัยซินความเข้มข้นมากกว่า 5 ppm และทองแดงความเข้มข้นมากกว่า 9,000 ppm สามารถทำให้เกิดโรคได้บนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสายพันธุ์บางขุนเทียน คาลิปโซ จิตติ กล้วยไม้สกุลแวนดา (ลูกผสมฟ้ามุ่ย) และกล้วยไม้สกุลช้าง (ช้างแดง) แต่ไม่ทำให้เกิดโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย (บอม) และ แคทลียา การปลูกเชื้อโดยฉีดเชื้อสาเหตุเข้าสู่หัวหอมใหญ่ทำให้กาบของหัว (bulb scale) เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วนการปลูกเชื้อสาเหตุในข้าวโพดโดยการพ่น ไม่ทำให้เกิดอาการโรคจุดสีขาว เชื้อแบคทีเรียสามารถอยู่รอดในใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการของโรคและร่วงจากต้นแล้วจนถึง 60 วัน ดังนั้น คำแนะนำในการป้องกันกำจัดโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าจึงควรเก็บเศษซากพืชที่เป็นโรคออกจากแปลงและเผาทำลาย

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ทิ้ง ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดแหล่งในการแพร่กระจายของเชื้อภายในแปลงปลูกและแหล่งอื่นๆ ที่มีการเคลื่อนย้ายไปทิ้ง เชื้อสามารถทำให้เกิดโรคเฉพาะในกลุ่มกล้วยไม้ที่เจริญทางยอด (monopodium) ได้แก่ ม็อคคาร่า แวนด้า และช้าง แต่ไม่ทำให้เกิดโรคในกล้วยไม้กลุ่มที่มีการเจริญเติบโตด้วยการแตกหน่อ (sympodium) ได้แก่ หวาย และแคทลียา ยังเหลือกล้วยไม้อีกหลายสกุลที่ต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อสนับสนุนผลการศึกษาดังกล่าว โดยกล้วยไม้ที่เจริญทางยอด ได้แก่ กล้วยไม้สกุลเข็ม (Ascocentrum) สกุลฟาแลนอปซิส (Phalaenopsis) สกุลอะแรคนิส (Arachnis) กล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตด้วยการแตกหน่อ ได้แก่ รองเท้านารี ออนซิเดียม ตรวจสอบเชื้อเบื้องต้นโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* พบว่าให้ผลของปฏิกิริยาเป็นบวก การจำแนกชนิดของเชื้อเพื่อยืนยันผลการตรวจสอบโดยใช้การประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) จากยีน *gyr*B, *rpo*B, *atp*D และ *inf*B ทำให้สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าที่พบระบาดในประเทศไทยใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* LMG 2632^{T} และเป็นรายงานครั้งแรกของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* ที่พบทำให้เกิดโรคใบจุดในกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ทราบชนิดเชื้อแบคทีเรียใบจุดในกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าเพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงแก่นักวิชาการในการทำวิจัยและเป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช

กรมวิชาการเกษตร

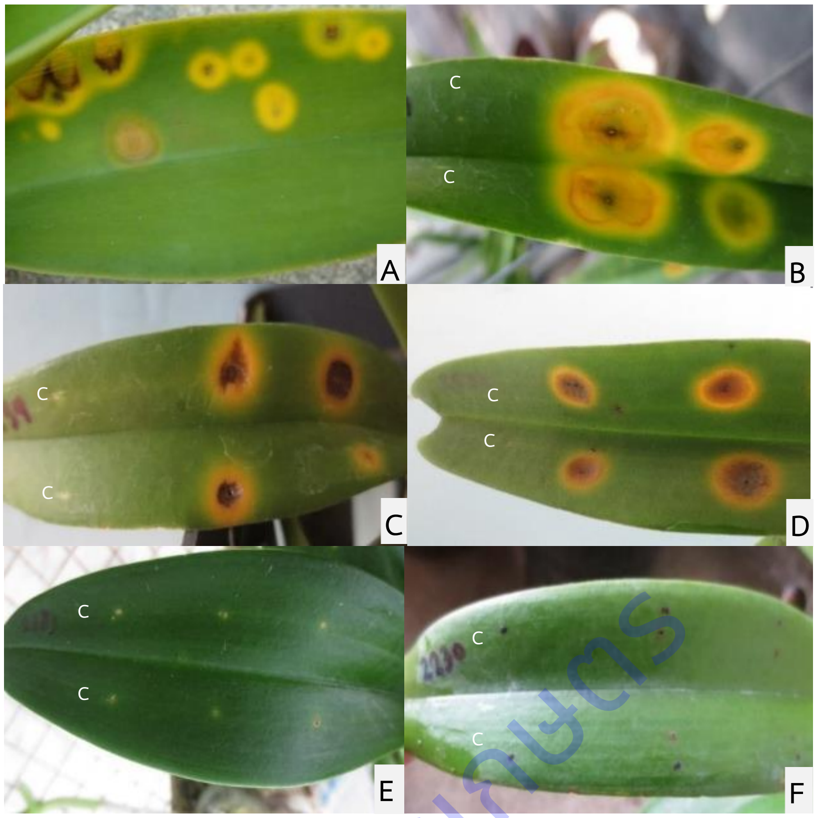


Figure 2.2.3.1 Leaf spot disease of Mokara orchid and pathogenicity test

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

กรมวิชาการเกษตร

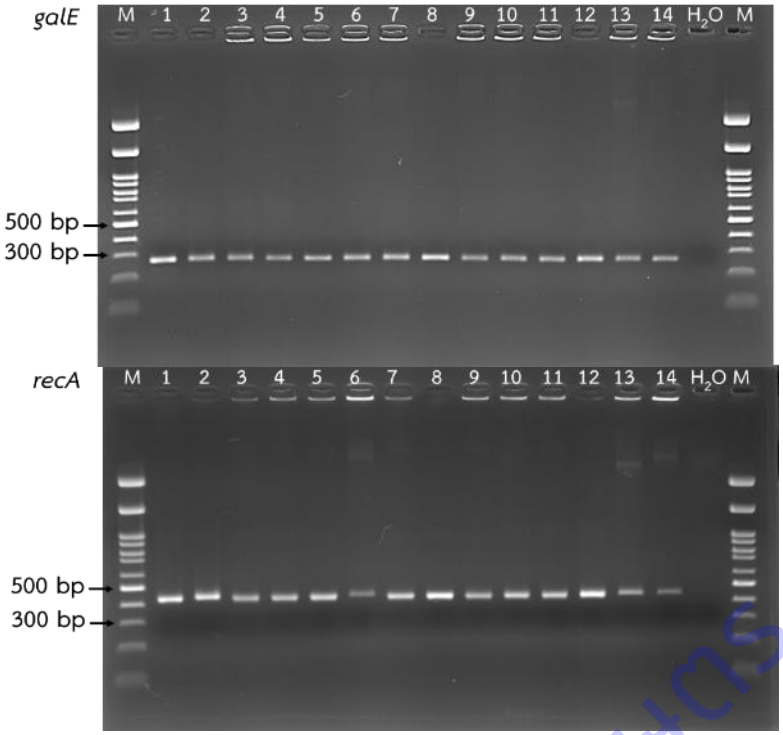


Figure 2.2.3.2 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified for detection *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* using *galE* and *recA* primers, M: onemark 100, lane 1–14: bacterial isolated from leaf spot disease of mokara orchid

กรมวิชาการเกษตร

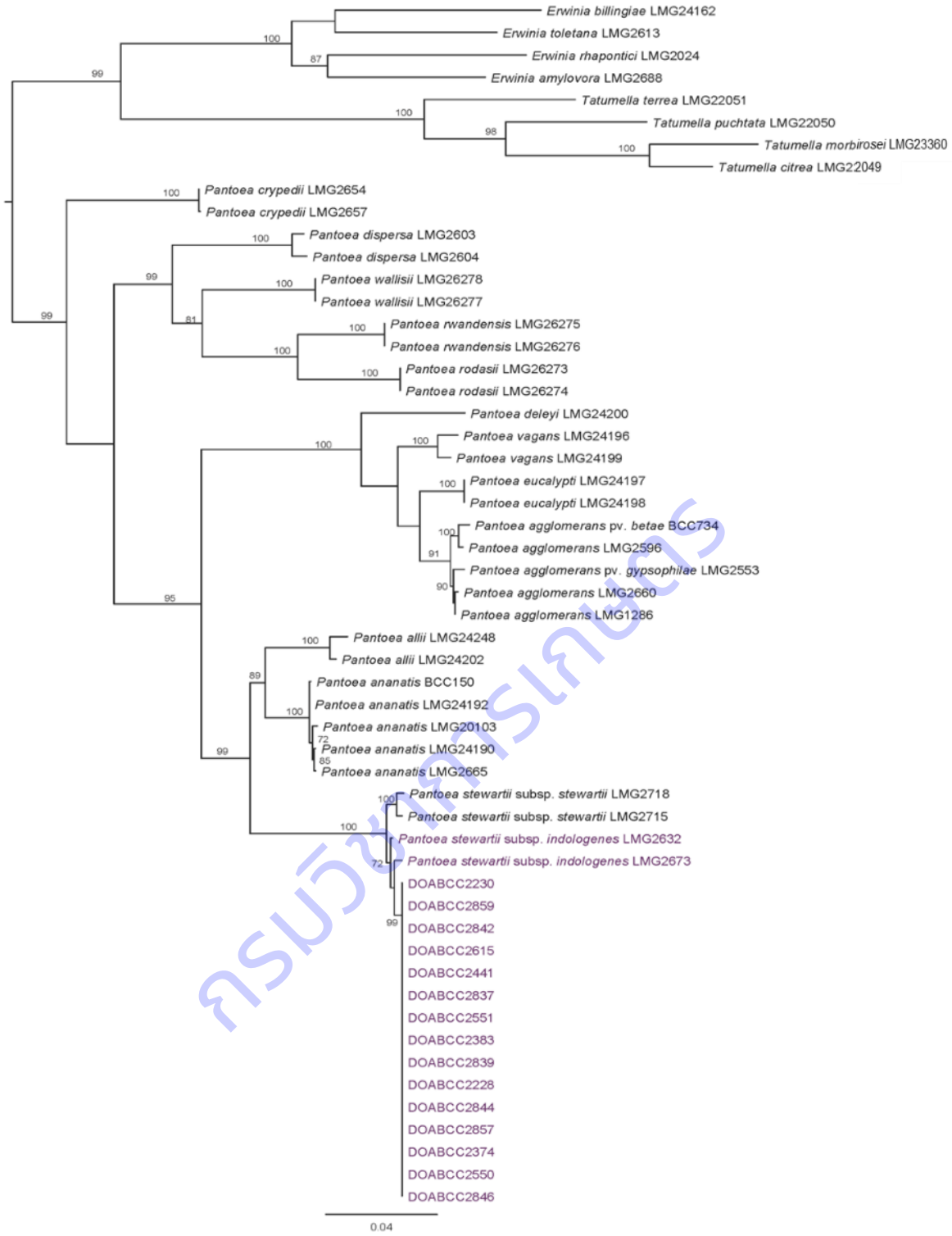


Figure 2.2.3.3 Maximum-likelihood tree based on on the concatenated *gyrB*, *rpoB*, *atpD* and *infB* nucleotide sequences showing the relationships of Mokara orchid isolates and type strains of species. Bootstrap values based on 1,000 replicates are shown at branch nodes.

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.2.4 การศึกษาสาเหตุและการถ่ายทอดอาการใบหงิกของส้มโอ

Causal agent and transmission of Pummelo crinkly leaf symptom

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง แสนชัย คำหล้า สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน กาญจนา วาระวิชะนี สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากผลการศึกษาอาการใบหงิกในพืชตะกูลส้มที่ปลูกในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยพบว่าตัวอย่างส้มโอและมะนาวที่แสดงอาการลักษณะใบหงิกงอ บิด ด่างเป็นจุดจ้ำตามด้านหลังตามแนวเส้นใบและมีลักษณะเป็นรอยบาก (notch) เว้าเข้ามาด้านใดด้านหนึ่งของใบ ซึ่งอาการจะเห็นได้ชัดเจนในช่วงแตกใบอ่อน เกิดจากเชื้อไวรัส Citrus chlorotic dwarf associated virus (CCDav) จัดอยู่ในวงศ์ Gemiviridae ปัจจุบันมีรายงานในประเทศตุรกี (2012) และประเทศจีน (2015) เชื้อไวรัส CCDaV แพร่ระบาดจากการใช้ส่วนขยายพันธุ์ เช่น ตา, กิ่ง, การตอนกิ่ง ไม่พบการถ่ายทอดโรคทางเมล็ดพันธุ์และการถ่ายทอดโรคจากการกรีดสร้างบาดแผล พบระบาดใสสวนส้มโอและมะนาวในแหล่งปลูกสำคัญของประเทศไทย

คำสำคัญ : ส้มโอ, อาการใบหงิก, อาการยอดหงิก, ไวรัสพืช

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.

Key words : Pummelo, pomelo, Crinkly leaves,CCDav, Citrus chlorotic dwarf association virus, Gemminivirus

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

จากผลการศึกษาและสำรวจโรคกรีนนิ่งของส้มโอ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงรายปี 2555 ในโครงการศึกษาการจัดการปุ๋ยและการระบาดของโรคกรีนนิ่งของส้มโอในแหล่งปลูกพื้นที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงรายนอกจากจะพบความเสียหายที่เกิดจากโรคกรีนนิ่งซึ่งมีผลกระทบทำให้ผลส้มโอร่วงก่อนอายุการเก็บเกี่ยวและผลผลิตไม่มีคุณภาพ สร้างปัญหาอย่างให้กับเกษตรกรชาวสวนส้มในพื้นที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงรายแล้ว ยังพบโรคของส้มโออีกโรคหนึ่งคือโรคใบหงิก (crinkly leaf disease) และเกษตรกรชาวสวนส้มได้กล่าวว่าเมื่อ 2 – 3 ปี ที่ผ่านมาพบโรคระบาดเพียงเล็กน้อยประมาณ 5 – 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ปัจจุบันโรคระบาดมากถึง 70 – 80 เปอร์เซ็นต์และนับวันยิ่งจะเพิ่มมากขึ้นทุก ๆ ปี บางสวนพบโรคเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ผลผลิตลดลงและต้นที่แสดงอาการใบหงิกรุนแรง ผลส้มโอจะเกิดอาการแข็งด้าน ไม่มีคุณภาพและไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ทางกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ได้ทำการพิสูจน์เบื้องต้น ตามกรรมวิธีทางไวรัสวิทยา พบเพียงบางตัวอย่างประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่เป็นโรคไวรัสทริสเทซ่า แสดงว่าอาการใบหงิกของส้มโอไม่ได้มีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสทริสเทซ่า แต่อาจเกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอื่น แม้ว่าไมตรีและคณะ (2529) ได้รายงานว่าอาการใบหงิกที่เกิดบนมะนาวเป็นอาการชนิดหนึ่ง(strain) ของโรคทริสเทซ่า อาจจะเป็นเพราะมะนาวเป็นพืชตระกูลส้มที่อ่อนแอ (susceptible) ต่อไวรัสทริสเทซ่าโดยการนำโรคของแมลงพาหะเพลี้ยอ่อน จึงตรวจพบเชื้อไวรัสเทริสเทซ่าทุกครั้ง 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) บิดเบี้ยวและด่าง (Chlorotic mottle) ผลผลิตลดลงและไม่มีคุณภาพ สำหรับประเทศไทยโรคนี้ยังไม่มีรายงานมาก่อน นอกจากจะพบเป็นกับส้มโอในพื้นที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงรายแล้ว ยังพบเกิดกับส้มโอในจังหวัดนครปฐม ราชบุรี พิจิตร สุโขทัย นครนายกและปราจีนบุรี และคงจะแพร่ระบาดไปยังจังหวัดอื่น ๆ อีก โดยนำกิ่งพันธุ์เป็นโรคขยายปลูก ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการศึกษาและพิสูจน์ว่าอาการใบหงิกที่เกิดบนส้มโอโดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์ทองดีว่ามีสาเหตุจากเชื้ออะไรและสามารถถ่ายทอดแพร่ระบาดได้อย่างไร เพื่อจะได้หาแนวทางอย่างมีประสิทธิภาพในการป้องกันและควบคุมโรคต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรค และตัวอย่างพืชปกติ

- ส้มโอ ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน และมะนาว ที่มีอาการใหงิกหรือบิดเบี้ยวและต้นกล้าส้มโอพันธ์ทองดี ส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม ส้มเขียวหวาน มะนาว และมะกรูด

- ดินปลูกพืช ถุงเพาะชำ ปุ๋ยเคมี 16-16-16 สารป้องกันกำจัดแมลง

- มีดติดตา, กรรไกรตัดกิ่ง, เทปพันกิ่ง

2. อุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ ได้แก่

- เครื่องชั่งละเอียด (precision balance) 2 ตำแหน่ง

- ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (freezer)

- ตู้ดูดควัน / ตู้ดูดไอสารเคมี (Fume Hood)

- อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water bath shaker)

- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000TM Thermal Cycler, BIO-RAD)

- เครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)

- เครื่องวิเคราะห์เจลและบันทึกภาพ (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)

3. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่

- หลอดไมโครทิวป์ (Microtube) ขนาด 0.5, 1.5 และ 2 มิลลิลิตร

- ไมโครปิเปตต์ทิป (Micropipette tip) ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร

4. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่

- ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GeneJET Plant DNA Purification Mini Kit

- GoTaq® Green Master mix (Promega, USA)

- ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 1kb /100 bp DNA Ladder (Fermentas®)

- Agarose gel (SeaKem®)

- ชุดไพรเมอร์ (Primer set)

- พลาสมิดพาหะ pGEM-T easy vector (Promega)

- วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างใบและกิ่งส้มโอ

เก็บตัวอย่างในแหล่งปลูกส้มโอที่มีอาการใบหงิกหรือบิดเบี้ยวคล้ายอาการจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายจากแหล่งปลูกในภาคเหนือ กลาง อีสาน และ ภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงราย พิจิตร ชัยนาท ชัยภูมิ ปทุมธานี นนทบุรี นครปฐมชัยภูมิ สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ภูเก็ต นำตัวอย่างกิ่งพันธุ์ที่เก็บมาทำการเสียบยอดหรือติดตาไว้บนต้นกล้าส้มโอทองดีที่ใช้เป็นต้นตออายุประมาณ 6 – 8 เดือน ซึ่งเพาะจากเมล็ดส้มโอทองดีซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ทำการเพาะเมล็ดโดยใช้วัสดุปลูกสูตรไทย-เยอรมัน เพื่อ

กรมวิชาการเกษตร

ป้องกันปัญหาโรครากเน่าโคนเน่าเมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 2 - 3 เดือน ทำการย้ายต้นกล้าใส่ในถุงพลาสติก ขนาด 6 x 12 นิ้ว แล้วเก็บรักษาไว้ในโรงเรือนกันแมลงของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช ให้น้ำและปุ๋ยอย่างสม่ำเสมอ และตัวอย่างใบไปสกัดสารพันธุกรรมเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุอาการใบหงิกและระบุชนิดเชื้อไวรัสต่อไป

2. การตรวจสอบและระบุเชื้อไวรัสสาเหตุอาการใบหงิกในส้มโอ

2.1 ทำการสกัดสารพันธุกรรม

นำตัวอย่างใบส้มโอที่เก็บมาทำการสกัดดีเอ็นเอโดยชั่งตัวอย่างใบส้มโอ 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 การตรวจสอบสาเหตุโรคไวรัสโดยใช้เทคนิค PCR

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดไว้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพร์เมอร์ 3202fw/6rev (Loconsole *et al*., 2012) เป็นตัวเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย จากปฏิกิริยา PCR จะแสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 444 เบส

ลำดับเบสคู่ไพรเมอร์ 3202fw และ 6rev ดังนี้

3202fw : 5’-GTTCTGTGTTTCGACCCGTT-3’

6rev : 5’-GGGATTCGCATGGATAGCTCATCCAA-3’

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ได้แก่

-	น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH_2O)	7.0	ไมโครลิตร
-	ไพรเมอร์ forward (3202fw) (10 pmol)	1.0	ไมโครลิตร
-	ไพรเมอร์ 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

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

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 โดยเปรียบเทียบขนาดกับ 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 2.2.4.1) 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 ต้องทำในกระติกน้ำแข็ง หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่อง thermal cycle โดยตั้งโปรแกรมคงที่ 4 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง การส่งถ่าย recombinant plasmid เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ทำการเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ ปริมาตร10 µl ใส่ลงในหลอด ขนาด 1.5 มล. จากนั้นจึงเติม competent cell ปริมาตร 50 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตกวนเบาๆ 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, ใส, 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)

กรมวิชาการเกษตร

3. การถ่ายทอดเชื้อไวรัส *Citrus chlorotic dwarf associated virus*

3.1 การถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยวิธีกรีดแผลบนต้นกล้า

นำตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าส้มโอทองดีที่ได้รับการตรวจยืนยันว่าเป็นโรคใบหงิกแล้วด้วยเทคนิคพีซีอาร์และแสดงอาการใบหงิก บิดงอ และด้านหลังใบมีอาการจุดช้ำตามแนวเส้นใบมาบดให้ละเอียดใน Phosphate buffer pH 7.2 และแช่สารละลายไว้ในกระติกน้ำแข็ง หลังจากนั้นใช้มีดติดตาจุ่มในสารละลายแล้วนำไปกรีดบนต้นกล้าส้ม 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 2.2.4.7) ทำการย้ายต้นกล้าจำนวน 200 ต้น หลังจากเพาะเมล็ด 60 วัน แล้วเก็บไว้ในโรงเรือนกันแมลง เพื่อสังเกตอาการโรคและนำตัวอย่างใบไปสกัดดีเอ็นตามวิธีการในข้อ 2.1สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค PCR เพื่อยืนยันการเกิดโรคใบหงิกในต้นกล้าส้มโอทองดี จำนวน 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 เมื่อต้นกล้าส้มโอทองดีอายุ 6 เดือน และ ครั้งที่ 2 เมื่อต้นกล้าส้มโอทองดี 12 เดือน ตามลำดับ

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา	ตุลาคม 2560-กันยายน 2562
สถานที่	กลุ่มงานไวรัสวิทยา และ สวนส้มโอเกษตรกร ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. เก็บตัวอย่างใบและกิ่งส้มโอที่มีอาการใหงิก

เก็บตัวอย่างพืชตระกูลส้มที่มีอาการใบหงิก บิดเบี้ยว ม้วนงอ รูปร่างผิดปกติคล้ายกับอาการที่เกิดจากการถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายในแปลงปลูกส้มโอ, มะนาวและส้มเขียวหวาน (Figure 2.2.4.2) 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 2.2.4.1) นำตัวอย่างกิ่งพันธุ์ที่เก็บมาทำการเสียบยอดไว้บนต้นกล้าส้มส้มโอ (Figure 2.2.4.3) และตัวอย่างในนำไปสกัดสารพันธุกรรมเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุอาการใบหงิก

2. การตรวจสอบและระบุเชื้อไวรัสสาเหตุอาการใบหงิกในส้มโอ

2.1 การเชื้อสาเหตุโรคใบหงิกในส้มโอและมะนาว

ตัวอย่างส้มโอทองดี ส้มโอขาวแตงกวา ส้มโอทับทิมสยาม มะนาวแป้น และ มะนาวตาฮิติ ที่เก็บมาจากแปลงเกษตรกร (Table 2.2.4.1) รวม จำนวน 35 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอและทำการเพิ่มปริมาณสาร

กรมวิชาการเกษตร

พันธุกรรมเชื้อไวรัสด้วยไพรเมอร์ 3202fw/6rev (Loconsole *et al*., 2012) ด้วยเทคนิค PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 444 bp (Figure 2.2.4.4)

2.2 การระบุสาเหตุสาเหตุโรคใบหงิกในส้มโอ

สกัดดีเอ็นเอจากต้นส้มโอที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อโรคใบหงิก (Figure 2.2.4.3) ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GenUP™ Plant DNA kit ด้วย Lysis buffer จะได้สารละลายดีเอ็นเอของโรคใบหงิกไว้สำหรับตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาการตรวจสอบอาการใบหงิกในส้มโอด้วยเทคนิค PCR โดยคู่ใช้ไพร์เมอร์ 3202fw/6rev (Loconsole *et al*., 2012) และตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Gel electrophoresis พบว่า ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 444 bp (Figure 4) ทำการโคลนยีนนำชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 444 bp มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป QIAquickGel Extraction Kit (Qiagen, Germany) และนำมาเชื่อมเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega) (Figure 2.2.4.1) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase และทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่คาดว่ามีพลาสมิดลูกผสมสอดแทรกด้วยเทคนิค colony PCR แล้วทำการสกัดพลาสมิดลูกผสมด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Plasmid Mini Kit QIAGEN (QIAGEN, Germany) และตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Gel electrophoresis พบว่า แสดงแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดสายผสมของชิ้นดีเอ็นจากคู่ไพรเมอร์3202fw/6rev มีขนาดประมาณ 400 bp (Figure 2.2.4.4) แล้วนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 2 โคลน ด้วยเครื่องวิเคระห์ automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ซึ่งมีความความยาว 444 เบส (Figure 2.2.4.5) 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 จำนวนชนิดละ 3 ต้น ที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อไวรัส Citrus chlorotic dwarf associated virus สาเหตุของโรคใบหงิกส้มโอ โดยวิธีกลด้วยการกรีดสร้างแผลบนต้นกล้า (Figure 2.2.4.6) พบว่าหลังการถ่ายทอดเชื้อไวรัสนาน 3 เดือน และ 6 เดือน ไม่พบต้นกล้าส้มทั้ง 7 ชนิดแสดงอาการของโรคใบหงิกส้มโอและเมื่อนำตัวอย่างใบมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกในทุกตัวอย่าง

3.2 การถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์

ต้นกล้าส้มโอทองดีจำนวน 200 ต้น ซึ่งเพาะเมล็ดจากผลส้มโอของต้นส้มโอทองดีที่เป็นโรคใบหงิก ที่เก็บไว้ในโรงเรือนกันแมลง พบต้นกล้าส้มโอแสดงอาการใบบิดเล็กน้อยในบางตัวอย่าง ลักษณะคล้ายอาการรอยบาก(notch) ซึ่งเป็นอาการอย่างหนึ่งที่พบในต้นส้มโอหรือมะนาวที่เป็นโรคใบหงิก แต่เมื่อนำมาตรวจยืนยันด้วย

เทคนิคพีซีอาร์ 2 ครั้ง เมื่อกล้าส้มโอ อายุ 6 เดือน และ 12 เดือน ไม่พบแถบดีเอ็นเป้าหมายของเชื้อไวรัส Citrus chlorotic dwarf associated virus สาเหตุของโรคใบหงิกส้มโอ (Figure 2.2.4.8)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

อาการใบหงิกในพืชตะกูลส้มที่ปลูกในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยพบว่าตัวอย่างส้มโอและมะนาวที่แสดงอาการลักษณะใบหงิกงอ บิด ด่างเป็นจุดจ้ำตามด้านหลังตามแนวเส้นใบและมีลักษณะเป็นรอยบาก (notch) เว้าเข้ามาด้านใดด้านหนึ่งของใบ ซึ่งอาการจะเห็นได้ชัดเจนในช่วงแตกใบอ่อน ส่วนในใบที่โตเต็มที่แล้วไปจนถึงใบแก่สังเกตเห็นอาการโรคได้ยาก เกิดจากเชื้อไวรัส Citrus chlorotic dwarf associated virus (CCDaV) ปัจจุบันมีรายงานในประเทศตุรกี (2012) และประเทศจีน (2015) เชื้อไวรัส CCDaV สันนิษฐานว่ามีแมลงหวีขาว 2 ชนิด คือ ในประเทศตุรกี Parabemisia myricae Kuwana (Bayberry whitefly) ส่วนในประเทศจีนตรวจพบเชื้อไวรัสในแมลงหวี่ขาว 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 ไม่พบแถบดีเอ็นเป้าหมายของเชื้อไวรัส CCDaV สาเหตุของโรคใบหงิกส้มโอ และไม่พบการเกิดโรคใบหงิกส้มโอ จากต้นกล้าส้มโอทองดี ส้มโอขาวแตงกวา ส้มโอทับทิมสยาม ส้มโชกุน ส้มเขียวหวาน มะนาว มะกรูด ที่ได้รับการถ่ายทอดโรคโดยการกรีดสร้างบาดแผล ดังนั้นเกษตรกรที่จะทำการสร้างสวนใหม่หรือนำกิ่งพันธ์ส้มโอและมะนาวไปปลูกในพื้นที่ใหม่ควรจะต้องทำการเลือกกิ่งพันธุ์จากต้นแม่พันธุ์ที่ไม่มีอาการใบหงิก ใบด่าง ข้อหดสั้น ของเชื้อไวรัส CCDaV โดยการเดินสังเกตอาการรอบ ๆ ต้นแม่พันธุ์ในช่วงที่มีการแตกยอดอ่อนจะเห็นอาการได้ชัดเจน และเมื่อนำไปปลูกแล้วให้หมั่นตรวจสอบเมื่อต้นกล้าส้มโอหรือมะนาวมีการแตกยอดใหม่ หากพบอาการอาการใบหงิก ใบด่างให้ทำการกำจัดทิ้งทันทีโดยการถอนแล้วฝังกลบและเนื่องจากเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสจึงไม่มีสารเคมีในการป้องกันกำจัดในปัจจุบัน

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- สามารถใช้เป็นคำแนะนำในการเลือกต้นกล้าส้ม กิ่งตอน หรือ ตาพันธุ์ส้มชนิดต่าง ๆ เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส

- เป็นประโยชน์กับเกษตรกรผู้ปลูกพืชตระกลูส้มทุกชนิด เช่น ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ มะนาว มะกรูด หากเกษตรกรมีต้นกล้าส้ม กิ่ง ตา พันธุ์ที่สะอาดเพื่อนำไปปลูกจะเป็นการลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับผลผลิต และเป็นการลดแหล่งสะสมของโรคและแมลงพาหะ

สถาบันวิจัยพืชสวน

Table 2.2.4.1 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

กรมวิทยาศาสตร์

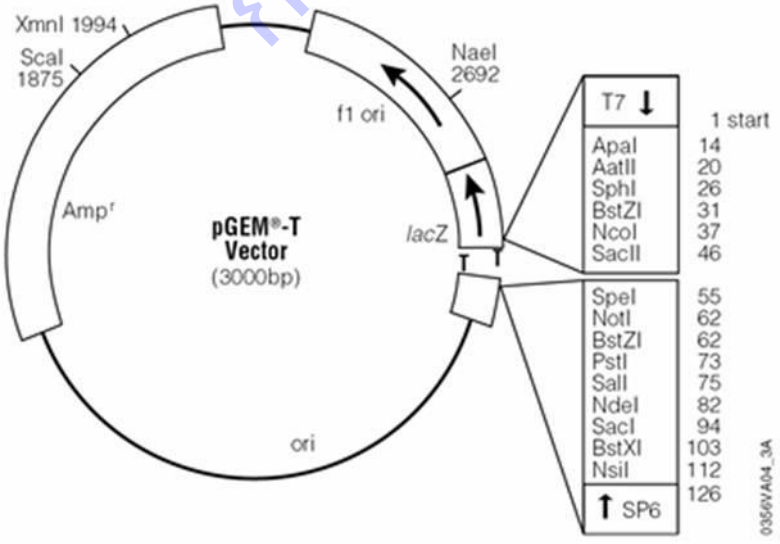


Figure 2.2.4.1 pGEM® - T easy vector map

Figure 2.2.4.2 Crinkly leaf disease symptoms on pummelo and lime orchards (A-B) symptoms on lime form Chainat and Nakhon Si Thammarat provinces, (C-D) Symptoms on Pummelo (Thab Tim Saim cultivar) and Pummelo (Thong Dee cultivar) from Nakhon Si Thammarat and Chaiyaphum provinces.

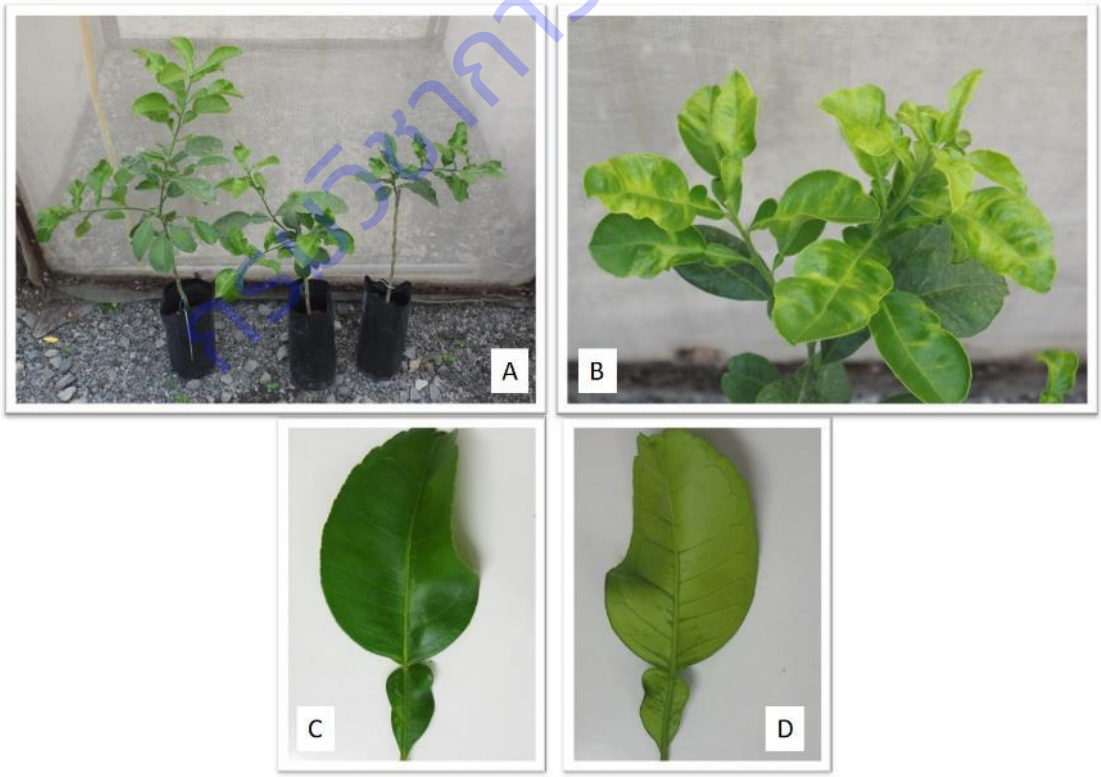


Figure 2.2.4.3 Pummelo seedlings show crinkly disease symptoms (A), Symptoms on young leaves is noticeable (B), Concave into one side of the leaf (C), Blotchy symptoms along midrib on lower surface of the leaf

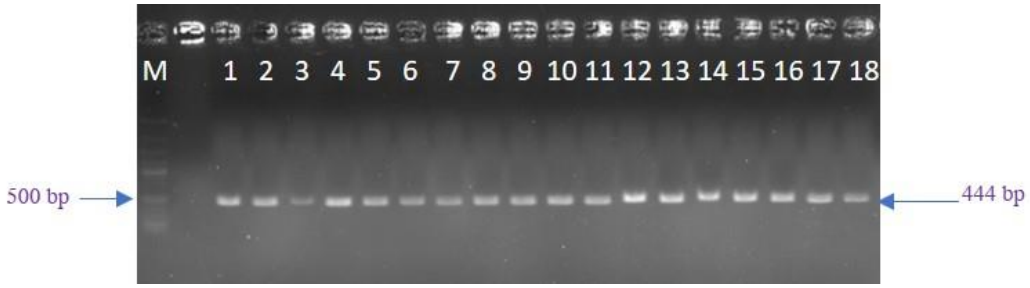


Figure 2.2.4.4 Gel electrophoresis of crinkly leaf samples show PCR product about 444 bp Electrophoresis is on 1.5% agarose gel of DNA amplified using 3202fw/6rev primers

GTGCTGTGTTTCGACCCGTTTCTTGCACTGGATCATGGCATGAAGGTGTGGGTCTCCGGATTCGTG
GAGTTCCTCACACACGCACATGTAAGTGATTGTGAATCGTGCGAGTGTTAGTCGAAGGAAAGCTT
GGAGGTGTTCCTTGGTGCATGGGCACTTGGGGTATGTAAGGAAAATATTTTTGGCTGAGAATCGG
AAGCTAGAGGAAGTGGAAGCCATGTTGTACGGATTGGTGGAGGAAAGATTAGCCCCCTTATGGTA
GTGGGAGTGGGAGTGCCAATTTTATATAATATTACAGGCACTCCCACTGTGACACGTGGCAGTTTA
GCAGCCACAAACAGAGATATGATGGAGAGATGCTCTACGTGGAATAACCTGAGGCCGTTAGATTT
GTGTTTCTCACTTTAAATAATAACCATTGGATGAGCTATCCATGCGAATCCC

Figure 2.2.4.5 Nucleotide sequence (444 bp) of crinkly leaf pummelo from Chinat province is most similar to *Citrus chlorotic dwarf associated virus* from China

Figure 2.2.4.6 The incision wound on the seedlings to transmit the crinkly leaf disease (A) Seedlings keep in the greenhouse to observe symptoms and transmission.

Figure 2.2.4.7 Pummelo (Thong Dee cultivar) seeds and seedlings from infected tree (A) Vigor seeds (left), abortion seed (right); (B) Pummelo seedlings

Figure 2.2.4.8 Pummelo seedings (Thong Dee cultivar) from infected trees uninfected with crinkly leaf disease

การทดลองที่ 2.2.5 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Curvularia eragrostidis* และ *C. oryzae*

Study on biology and ecology of *Curvularia eragrostidis* and *C. Oryzae*

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวชนินทร ดวงสอาด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวอมรรัชฎ์ คิดใจเดียว	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Curvularia eragrostidis* และรา *C. oryzae* โดยเก็บตัวอย่างโรคใบจุดและใบไหม้ปาล์มน้ำมันจากจังหวัดตรัง สุราษฎร์ธานี กระบี่ และนครศรีธรรมราช และเก็บตัวอย่างโรคดอกจุดสนิมจากจังหวัดนครปฐมและนครนายก แยกราจากตัวอย่างโรคพืชด้วยวิธี 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 และนำรา *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 วันหลังปลูกเชื้อ รา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดปาล์มน้ำมันแสดงอาการของโรคบนใบปาล์มน้ำมันเป็นเวลา 7 วันหลังปลูกเชื้อ

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

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. oryzae, C. ragrostidis*

คำนำ

รา *Curvularia eragrostidis* และ *C.oryzae* เป็นระยะสืบพันธุ์ของรา *Cochiobolus* Drechsler พบแพร่กระจายทั่วไปและเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคกับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เช่น ปาล์มน้ำมัน กล้วยไม้ และข้าว เป็นต้น (จิตรา และคณะ, 2557; วรรณิภา 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 และนำไปตรวจสอบอีกครั้งโดยวิธีทางอนูชีวโมเลกุล จากการศึกษาพบว่าเชื้อรา *C. oryzae* เป็นเชื้อราสาเหตุที่เข้าทำลายต้นปาล์มในระยะต้นกล้า

นอกจากนี้ อารีรัตน์ (2550) รายงานรา *C. eragrostidis* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคดอกจุดสนิมในดอกกล้วยไม้เชื้อราดังกล่าวเจริญได้ดีในเนื้อเยื่อของดอกกล้วยไม้ในสภาวะที่มีความชื้นสูงของโรงเรือนอาการของโรคส่วนใหญ่จะสังเกตเห็นได้ชัดในระหว่างการขนส่ง พีระวรรณ และคณะ (2553) สำรวจ รวบรวม และจำแนกเชื้อราสกุล *Curvularia* โดยเก็บตัวอย่างพืชที่มีลักษณะอาการไหม้และจุด มาทำการแยกเชื้อสาเหตุโรค พบว่าสามารถแยก *C. eragrostidis* ได้แก่ โรคใบไหม้ปาล์มน้ำมัน และโรคดอกสนิมหรือโรคจุดสนิมบนดอกไม้สกุล จากที่กล่าวมาในข้างต้นเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิดนี้สร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้เพาะปลูกปาล์มน้ำมันและกล้วยไม้เป็นอย่างมาก ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่ต้องทำการสำรวจ เก็บรวบรวม และทำการศึกษาชีววิทยา

กรมวิชาการเกษตร

นิเวศวิทยา และการระบาดของเชื้อรา *C. eragrostidis* และ *C. oryzae* เพื่อหาแนวทางในการป้องกันกำจัดและลดปัญหาการเกิดโรคจากเชื้อสาเหตุทั้ง 2 ชนิดนี้ และสามารถลดการสูญเสียของผลผลิตทำให้เกษตรมีผลผลิตที่สามารถเก็บเกี่ยวได้มากขึ้นและหากมีการจัดการและการบำรุงรักษาพืชที่ดีควบคู่ไปด้วยนอกจากช่วยลดการสูญเสียแล้วสามารถช่วยให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพมากยิ่งขึ้นส่งผลดีต่อเศรษฐกิจทั้งในประเทศและต่างประเทศ

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ มีด กรรไกร กรรไกรตัดกิ่ง ถุงพลาสติก กระดาษบันทึก ปากกาเคมี เครื่องระบุพิกัด

2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อ

3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวดดูแรน บีกเกอร์ สไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์ กระบอกตวง 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), 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 เอธิลแอลกอฮอล์ 75%

8. อุปกรณ์ทำตัวอย่างแห้ง ได้แก่ กระดาษหนังสือพิมพ์ ไม้อัดตัวอย่าง กระดาษฟาง และซองกระดาษสำหรับใส่ตัวอย่าง

- วิธีการ

การศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *C. eragrostidis* และรา *C. oryzae* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

เก็บตัวอย่างโรคพืช สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพืชจากแหล่งปลูกปาล์มน้ำมันและแหล่งปลูกกล้วยไม้ในประเทศไทย ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ ข้อมูลพิกัด ภูมิศาสตร์ และแบ่งตัวอย่างโรคพืชมาอัดทับตัวอย่างแห้ง จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 3-7 วัน เมื่อพบราสร้างเส้นใยหรือ conidia ตรวจดู ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้

กรมวิชาการเกษตร

บาง ๆ และ ตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปลักษณะเชื้อและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

- แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplant นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็น โรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปร์คลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบน กระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar หรือ water agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 3-7 วัน แยกเชื้อราให้ บริสุทธิ์ 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 และอุณหภูมิห้อง

กรมวิชาการเกษตร

ปฏิบัติการ 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 ใช้แผ่นสไลด์ขูดสปอร์บนผิวหน้าอาหารเบาๆ เทสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ลงในบีกเกอร์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 100 ครั้งต่อนาที นาน 30 นาที เพื่อให้สปอร์กระจายออกจากกันโดยสม่ำเสมอ ตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วย haemacytometer เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

3. ทดสอบการเกิดโรคบนพืชอาศัย

- ทดสอบการเกิดโรคเบื้องต้นบนใบปาล์มน้ำมันและดอกกล้วยไม้ โดยทำแผลบนใบปาล์มน้ำมัน จากนั้นพ่นสารแขวนลอยสปอร์ของรา *C. oryzae* และทำแผลบนดอกกล้วยไม้ พ่นสารแขวนลอยสปอร์ของรา *C. eragrostidis* ที่เตรียมไว้ปริมาณเชื้อ 10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร สำหรับกรรมวิธีควบคุมพ่นด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียวเพื่อเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7-14 วัน ตรวจบันทึกการเกิดโรคทุกวัน เมื่อพืชเป็นโรคนำส่วนที่แสดงอาการโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ตรวจดู เพื่อยืนยันการเกิดโรค

- ทดสอบการเกิดโรคบนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน เตรียมต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่อายุประมาณ 3-4 เดือน โดยทำแผลบนใบพืชและพ่นสารแขวนลอยสปอร์ *C. oryzae* ที่เตรียมไว้ปริมาณเชื้อ 10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตรและตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อวางบนแผล และทำแผลบนดอกกล้วยไม้พ่นสารแขวนลอยสปอร์รา *C. eragrostidis* และตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อวางบนแผล สำหรับกรรมวิธีควบคุมพ่นด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียวเพื่อเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ รดน้ำตามปกติ และ ตรวจบันทึกการเกิดโรคทุกวัน เมื่อพืชเป็นโรคนำส่วนที่แสดงอาการของโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ตรวจดู เพื่อยืนยันการเกิดโรค

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราสาเหตุโรค

เก็บตัวอย่างโรคใบจุดและใบไหม้ปาล์มน้ำมันจากแปลงปลูกปาล์มน้ำมันในจังหวัดสุราษฎร์ธานี ตรัง กระบี่ และนครศรีธรรมราช จำนวน 29 ตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างโรคดอกจุดสนิมจากแปลงปลูกกล้วยไม้ในจังหวัดนครปฐมและนครนายก จำนวน 13 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2.2.5.1 และ ภาพที่ 2.2.5.1) แยกเชื้อราจากตัวอย่างโรคพืชได้ราสกุล *Curvularia* จำนวน 25 ไอโซเลท จำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นรา *C.*

กรมวิชาการเกษตร

oryzae จำนวน 15 โอโซเลท 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 (ภาพที่ 2.2.5.2) มาทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 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 9.0000 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ CZA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 8.9050 เซนติเมตร การเจริญของโคโลนีบนอาหารทั้ง 2 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหาร OMA PDA V8 และ MEA โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.6200 8.4600 8.085 และ 6.9600 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2.2.5.2 และ ภาพที่ 2.2.5.4)

C. eragrostidis ไอโซเลท F028-6 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA CMA CZA MEA และ PDA ซึ่งมีอัตราการเจริญเท่ากัน คือ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 9.0000 เซนติเมตร เซนติเมตร ซึ่งการเจริญของโคโลนีบนอาหารทั้ง 5 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหาร V8 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.8000 เซนติเมตร (ตารางที่ 2.2.5.2 และ ภาพที่ 2.2.5.5)

C. eragrostidis ไอโซเลท F029-4 สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหาร CMA CZA PDA OMA V-8A และ MEA ซึ่งมีอัตราการเจริญ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.0000 9.0000 8.9500 8.8900 8.8800 และ 8.8450 เซนติเมตร ตามลำดับ การเจริญของโคโลนีบนอาหารทั้ง 6 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2.2.5.2 และ ภาพที่ 2.2.5.6)

จากการนำรา *C. oryzae* จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ P001 P002 และ P003 ที่แยกได้จากปาล์มน้ำมัน (ภาพที่ 2.2.5.3) มาทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ PDA MEA CZA CMA OMA และ V-8A เป็นเวลา 14 วัน พบว่า *C. oryzae* ไอโซเลท P001 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร CMA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.8950 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ CZA และ OMA ซึ่งมีอัตราการเจริญเท่ากัน คือ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 8.8600 เซนติเมตร ซึ่งการเจริญของโคโลนีบนอาหารทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหาร V8 และ PDA โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.3400 และ 7.1700 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2.2.5.3 และ ภาพที่ 2.2.5.7)

C. oryzae ไอโซเลท P002 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร CMA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.8800 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ CZA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.8650 เซนติเมตร MEA PDA และ V8 ซึ่งมีอัตราการเจริญเท่ากัน คือ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 8.8600 เซนติเมตร และ OMA ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 8.8250

กรมวิชาการเกษตร

เซนติเมตร ซึ่งการเจริญของโคโลนีบนอาหารทั้ง 6 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2.2.5.3 และ ภาพที่ 2.2.5.8)

C. oryzae ไอโซเลท P003 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร CZA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.6250 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ CMA OMA MEA PDA และ V8 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.8750 7.1350 7.1300 6.6500 และ 5.6200 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งการเจริญของโคโลนีบนอาหารทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ OMA MEA PDA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหาร CZA CMA และ V8 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.6250 7.8750 และ 5.6200 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2.2.5.3 และ ภาพที่ 2.2.5.9)

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

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *C. eragrostidis* จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ F028-5 F028-6 และ F029-4 ที่อุณภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 25 30 35 40 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 14 วัน พบว่ารา *C. eragrostidis* ไอโซเลท F028-5 มีการเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.0000 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.0250 และ 6.0100 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส การเจริญของโคโลนีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 2.2.5.4 และ ภาพที่ 2.2.5.10)

C. eragrostidis ไอโซเลท F028-6 มีการเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.0000 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.5000 และ 8.2800 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการเจริญของโคโลนีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 2.2.5.4 และ ภาพที่ 2.2.5.11)

C. eragrostidis ไอโซเลท F029-4 การเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.0000 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.6750 และ 8.2500 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการเจริญของโคโลนีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 2.2.5.4 และ ภาพที่ 2.2.5.12)

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *C. oryzae* จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ P001 P002 และ P003 ที่อุณภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 25 30 35 40 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 14 วัน พบว่ารา รา *C. oryzae* ไอโซเลท P001 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีขนาดเส้นผ่าน

กรมวิชาการเกษตร

ศูนย์กลาง 9.0000 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.1227 7.3950 และ 6.6450 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งรา *C. oryzae* ไอโซเลท P001 มีการเจริญของโคโลนีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส แต่การเจริญของโคโลนีที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 2.2.5.5 และ ภาพที่ 2.2.5.13)

C. oryzae ไอโซเลท P002 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.7100 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.6050 4.6636 และ 4.2250 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งรา *C. oryzae* ไอโซเลท P001 การเจริญของโคโลนีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพบว่าการเจริญของโคโลนีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 2.2.5.5 และ ภาพที่ 2.2.5.14)

C. oryzae ไอโซเลท P003 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.9650 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ อุณหภูมิ 25 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6200 4.2250 และ 4.0773 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งรา *C. oryzae* ไอโซเลท P003 การเจริญของโคโลนีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอุณหภูมิ 25 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ แต่อุณหภูมิ 25 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2.2.5.5 และ ภาพที่ 2.2.5.15)

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 (ภาพที่ 2.2.5.16) ทดสอบพืชอาศัยโดยการพ่นสปอร์ของเชื้อและวางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อลงบนพืชที่ทำแผลไว้ พบว่าดอกกล้วยไม้แสดงอาการของโรคภายในเวลา 3 วันหลังปลูกเชื้อ และเมื่อทำการบ่มเชื้อต่อไปอาการของโรครุนแรงมากขึ้นและกระจายทั่วทั้งดอกภายในเวลา 7 วันหลังปลูกเชื้อ (ภาพที่ 2.2.5.17) ใบปาล์มน้ำมันแสดงอาการของโรคภายในเวลา 7 วันหลังปลูกเชื้อ และหากทำการบ่มเชื้อต่อไปแผลมีขนาดใหญ่ขึ้นบนใบปาล์มน้ำมันเริ่มแสดงอาการไหม้ (ภาพที่ 2.2.5.18) เมื่อนำดอกล้วยไม้และใบปาล์มน้ำมันที่แสดงอาการของโรคมาทำการแยกเชื้อ พบว่าสามารถแยกได้เชื้อชนิดเดียวกับเชื้อที่ได้ทำการปลูกทดสอบ

การทดสอบดอกกล้วยไม้และใบปาล์มน้ำมันในเรือนทดลองพบว่าดอกกล้วยไม้แสดงอาการของโรคเพียงเล็กน้อย ใช้เวลานานจึงพบอาการของโรค อาการของโรคจะชะงักและไม่พบการกระจายของโรคเมื่อเทียบ

กรมวิชาการเกษตร

กับการทดสอบเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ ส่วนใบปาล์มน้ำมันแสดงอาการของโรคชัดเจนและมีการกระจายของโรคไปยังบริเวณใบที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อโดยพบอาการของโรคที่ใบอ่อนที่บริเวณยอดที่กำลังแตกใหม่ ส่วนใบแก่พบอาการของโรคบ้างเล็กน้อย เมื่อนำดอกกกล้วยไม้และใบปาล์มน้ำมันที่แสดงอาการของโรคมาทำการแยกเชื้อพบว่าสามารถแยกได้เชื้อชนิดเดียวกับเชื้อที่ได้ทำการปลูกทดสอบ แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสามารถก่อโรคกับพืชอาศัยได้ และเป็นเชื้อราสาเหตุของโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้และโรคใบจุดปาล์มน้ำมัน แต่เนื่องจาก การทดสอบในเรือนทดลองพืชแสดงอาการของโรคน้อยมาก และใช้ระยะเวลานานกว่าการทดสอบในห้องปฏิบัติการจึงแสดงอาการของโรค อาจเนื่องจากสภาพแวดล้อมในโรงเรือนไม่เหมาะสมต่อการก่อโรคของเชื้อสาเหตุจึงทำให้ลักษณะอาการของโรคไม่ชัดเจนและไม่รุนแรงเท่ากับทดสอบเบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการ

นอกจากนี้ ได้สำรวจการเกิดโรคในสภาพแปลงปลูกพืชของเกษตรกร พบว่าในแปลงปลูกดอกกล้วยไม้พบมีการระบาดของโรคในช่วงฤดูฝนและช่วงหลังฤดูการเก็บเกี่ยวข้าวนาปรังในแถบอำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐมและมักพบโรคดอกจุดสนิมในแปลงที่กำลังจะรื้อถอนเพื่อปลูกต้นใหม่ เกษตรจะปล่อยแปลงและไม่บำรุงรักษา ในแปลงปลูกดอกกล้วยไม้โดยทั่วไปเกษตรกรมักไม่ปล่อยให้กล้วยไม้เกิดโรคนี้ เนื่องจากหากเกิดการระบาดจะส่งผลกระทบต่อการจำหน่ายดอก เกษตรกรจึงทำการฉีดพ่นสารเคมีกำจัดโรคพืชอย่างสม่ำเสมอ และทำการดูแลรักษาต้นกล้วยไม้เป็นอย่างดีจึงไม่พบการระบาดของโรคดอกจุดสนิมในแปลงเกษตร ส่วนโรคใบจุดและใบไหม้ของปาล์มน้ำมันพบทั้งปาล์มระยะต้นกล้าและต้นที่เริ่มให้ผลผลิต แต่พบมากในปาล์มระยะต้นกล้า เนื่องจากสภาพแวดล้อมในโรงเรือนเพาะชำต้นกล้ามีความชื้นสูงและมีการจัดวางต้นกล้าในลักษณะที่ชิดกันและอัดแน่นจึงส่งผลต่อการแพร่กระจายของเชื้อรวมทั้งการให้น้ำมีผลต่อการกระจายของเชื้อจากต้นที่เป็นโรคไปสู่ต้นที่ปกติได้ส่วนในปาล์มต้นโตการปลูกจะมีระยะห่างและในแปลงปลูกความชื้นต่ำกว่าแปลงเพาะและเนื่องจากการเกิดโรคไม่รุนแรงจึงไม่ส่งผลกระทบต่อการต่อการให้ผลผลิต

จากการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับการทำแผลและวางเชื้อโดยตรงกับการพ่นด้วยสปอร์ของเชื้อพบว่าการวางเชื้อบนแผลพืชแสดงอาการชัดเจนกว่าการพ่นด้วนสปอร์ของเชื้อซึ่งอาจเกิดจากความชื้นจากอาหารวุ้นช่วยให้เชื้อสามารถเจริญได้การพ่นสปอร์ความชื้นจากสภาพแวดล้อมอาจไม่เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์จึงส่งผลให้เชื้อมีปริมาณลดจึงทำให้เชื้อก่อโรคได้น้อยกว่าการทำแผลและตัดชิ้นวุ้นอาหารพร้อมเชื้อสาเหตุลงไปวางบนแผล นอกจากนี้พบว่าใบพืชที่ไม่ทำแผลไม่พบอาการของโรคหรือหากพบมีเพียงเล็กน้อยจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน ทั้งนี้ในช่วงที่ทำการทดลองเป็นช่วงที่อากาศค่อนข้างร้อน และแห้ง และเป็นโรงเรือนแบบเปิด ไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิ ความชื้นได้ ทำให้สภาพอากาศไม่เหมาะสมต่อการเกิดโรค ซึ่งในการศึกษาในครั้งต่อไปอาจต้องมีการปรับปรุงในเรื่องของวิธีการปลูกเชื้อ จำนวนพืชที่ใช้ในการทดลอง และสถานที่ทำการทดลองให้มีความเหมาะสมมากกว่านี้

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เก็บตัวอย่างโรคใบจุดและใบไหม้ปาล์มน้ำมันจากแปลงปลูกปาล์มน้ำมัน จำนวน 29 ตัวอย่าง จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ตรัง กระบี่ และนครศรีธรรมราช และเก็บตัวอย่างโรคดอกจุดสนิมจากแปลงปลูกกล้วยไม้จำนวน 13 ตัวอย่าง จากจังหวัดนครปฐมและนครนายก แยกเชื้อราจากตัวอย่างโรคพืชได้ราสกุล *Curvularia*

จำนวน 25 ไอโซเลท จำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นรา *C. oryzae* จำนวน 15 โอโซเลท 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 ไอโซเลท มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 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 และการดูแลรักษามีผลต่อการเกิดโรคโดยสังเกตได้จากการทดสอบเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการและการทดสอบพืชอาศัยในสภาพโรงเรือน โดยพบว่าในห้องปฏิบัติการกล้วยไม้เริ่มแสดงอาการของโรคในเวลา 3 วันหลังปลูกเชื้อ และเมื่อทำการบ่มเชื้อต่อไปพบการกระจายของเชื้อทั่วดอกในเวลา 7 วันหลังปลูกเชื้อ ปาล์มน้ำมันเริ่มแสดงอาการของโรคในเวลา 7 วันหลังปลูกเชื้อและเมื่อทำการบ่มต่อไปพบขนาดของแผลบนใบปาล์มน้ำมันขยายขนาดใหญ่กว้างขึ้นและเมื่อนำดอกกล้วยไม้และใบปาล์มน้ำมันที่แสดงอาการของโรคมาทำการแยกเชื้อกลับพบว่าสามารถแยกได้เชื้อชนิดเดียวกับเชื้อที่ทำการปลูกทดสอบในเรือนทดลองอาการของโรคดอกจุดสนิมบนกล้วยไม้แสดงอาการหลังปลูกไม่ชัดเจนมีการชะงักการเจริญของเชื้อโดยบริเวณแผลพบสีเขียวล้อมรอบและไม่พบการกระจายของเชื้อบนดอกกล้วยไม้และพืชแสดงอาการของโรคน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อทดสอบเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ ใบปาล์มน้ำมันแสดงอาการของโรคชัดเจนและมีการกระจายของโรคไปยังบริเวณใบที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อโดยพบอาการของโรคที่ใบอ่อนที่บริเวณยอดที่กำลังแตกใหม่ ส่วนใบแก่พบอาการของโรคบ้างเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากสภาพแวดล้อมในโรงเรือนเป็นสภาพแวดล้อมแบบเปิด ซึ่งมีสแตกต่างจากแปลงปลูกพืชของเกษตรกร จึงส่งผลต่อการทดลองทำให้การเกิดโรคไม่ชัดเจนและอาการของโรคไม่รุนแรงเท่าสภาพแปลงปลูกพืชของเกษตรกร ดังนั้นการศึกษาในครั้งต่อไปอาจต้องมีการปรับปรุงเรื่องสภาพแวดล้อม อายุพืช วิธีการปลูกเชื้อ จำนวนพืชทดสอบ ระยะเวลา และสถานที่ในการทด เพื่อผลการทดลองที่แม่นยำมากยิ่งขึ้น

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ข้อมูลชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *C. eragrostidis* และ *C. oryzae* สาเหตุโรคพืชเพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับอ้างอิงใช้ประกอบการวางแผนป้องกันกำจัดอย่างถูกวิธี

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2.2.5.1 ตัวอย่างโรคใบจุดปาล์มน้ำมันและโรคจุดสนิมดอกกล้วยไม้ที่เก็บจากแหล่งปลูกปาล์มน้ำมันและกล้วยไม้ในประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2559-กันยายน 2561

พืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	สถานที่	จำนวนตัวอย่าง
ปาล์มน้ำมัน	*Elaeis guineensis*	ต.คลองน้อย อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี	2
		ต.ท่าอุแท อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี	3
		ต.ตะเคียนทอง อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี	2
		ต.ท่าชนะ อ.คันธุลี จ.สุราษฎร์ธานี	3
		ต.บ้านเสร็จ อ.เคียนซา จ.สุราษฎร์ธานี	2
		ต.พ่วงพรมคร อ.เคียนซา จ.สุราษฎร์ธานี	1
		ต.ทุ่งเต่าใหม่ อ.นาสาร จ.สุราษฎร์ธานี	1
		ต.คลองไทร อ.ท่าฉาง จ.สุราษฎร์ธานี	1
		ต.กะลาเส อ.สิเกา จ.ตรัง	2
		อ.ห้วยยอด จ.ตรัง	2
		ต.เขาคราม อ.เมือง จ.กระบี่	2
		ต.ปกาสัย อ.เหนือคลอง จ.กระบี่	1
		ต.กระบี่น้อย อ.เมือง จ.กระบี่	2
		ต.คลองท่อม อ.คลองท่อม จ.กระบี่	2
		ต.คลองน้อย อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช	2
		อ.ละแม จ.ชุมพร	1
กล้วยไม้หวาย	*Dendrobium* spp.	ต.นราภิรมย์ อ.บางเลน จ.นครปฐม	5
		ต.คลองนกกระทุง อ.บางเลน จ.นครปฐม	3
		ต.คลองใหญ่ อ.องครักษ์ จ.นครนายก	5
รวม			42

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2.2.5.2 การเจริญของโคโลนีของรา *C. eragrostidis* 3 ไอโซเลท บนอาหาร 6 ชนิด เป็นเวลา 7 และ 14 วัน

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

ตารางที่ 2.2.5.3 การเจริญของโคโลนีของรา *C. oryzae* 3 ไอโซเลท บนอาหาร 6 ชนิด เป็นเวลา 7 และ 14 วัน

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

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2.2.5.4 การเจริญของโคโลนีของรา *C. eragrostidis* จำนวน 3 ไอโซเลท บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 7 และ 14 วัน

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

ตารางที่ 2.2.5.5 การเจริญของโคโลนีของรา *C. oryzae* จำนวน 3 ไอโซเลท บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 7 และ 14 วัน

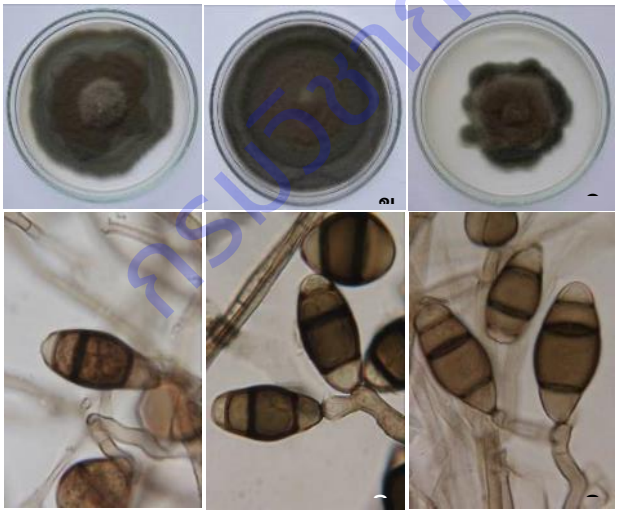
Temperature	P001		P002		P003	
	7 Days	14 Days	7 Days	14 Days	7 Days	14 Days
Control (Room Temp.)	7.4545a	8.1227ab	3.2000bc	4.6636bc	3.1318b	4.0773b
25°C	5.5650b	7.3950bc	3.5400ab	5.6050b	3.3450b	4.6200b
30°C	7.3750a	9.0000a	4.0300a	6.7100a	5.0185a	6.9650a
35°C	4.4800b	6.6450c	2.8600c	4.2250c	2.9750b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

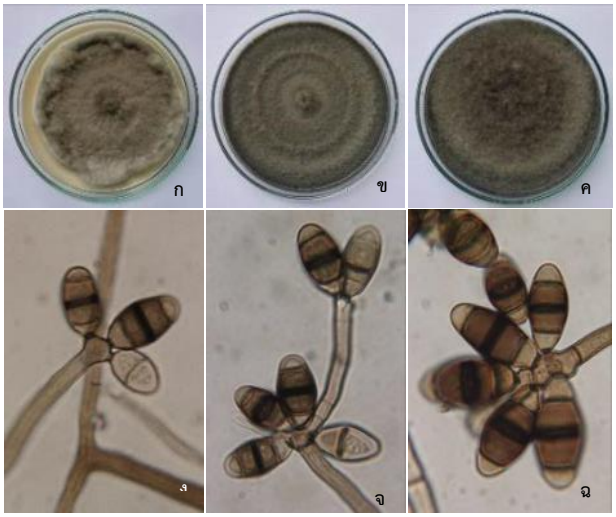
กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.2.5.1 ตัวอย่างโรคใบไหม้ปาล์มน้ำมัน (ภาพบน) และดอกจุดสนิมกล้วยไม้ (ภาพล่าง)

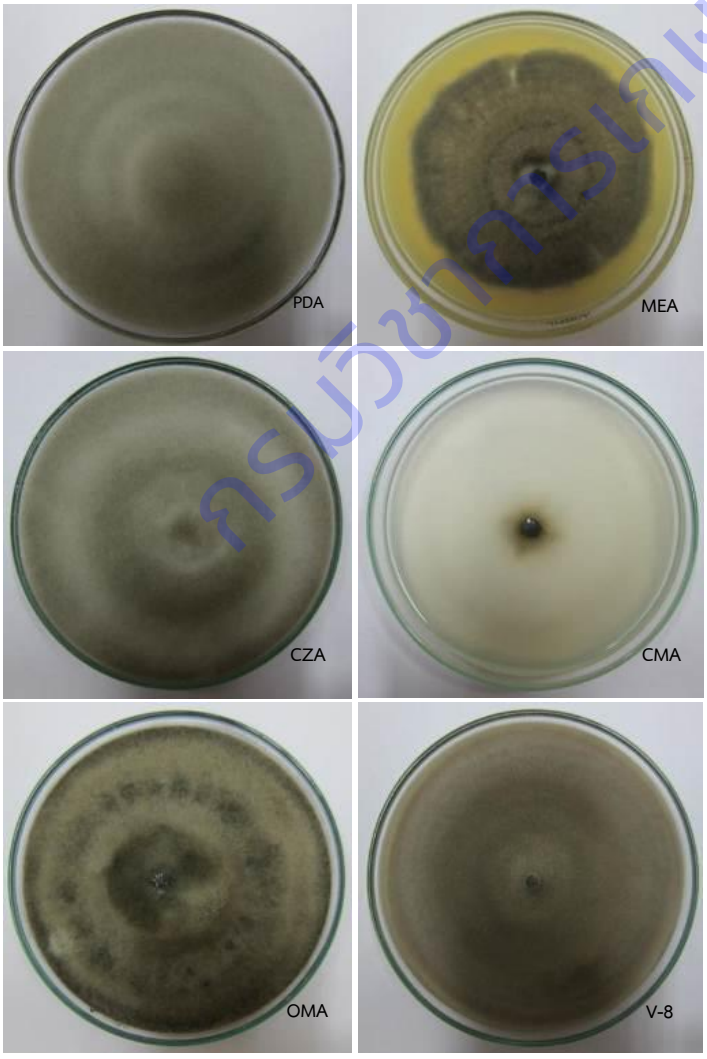


ภาพที่ 2.2.5.2 ลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของรา *c. oryzae* จากปาล์มน้ำมัน : ก และ ง) P001, ข และ จ) P002, ค และ ฉ) P003

กรมวิชาการเกษตร

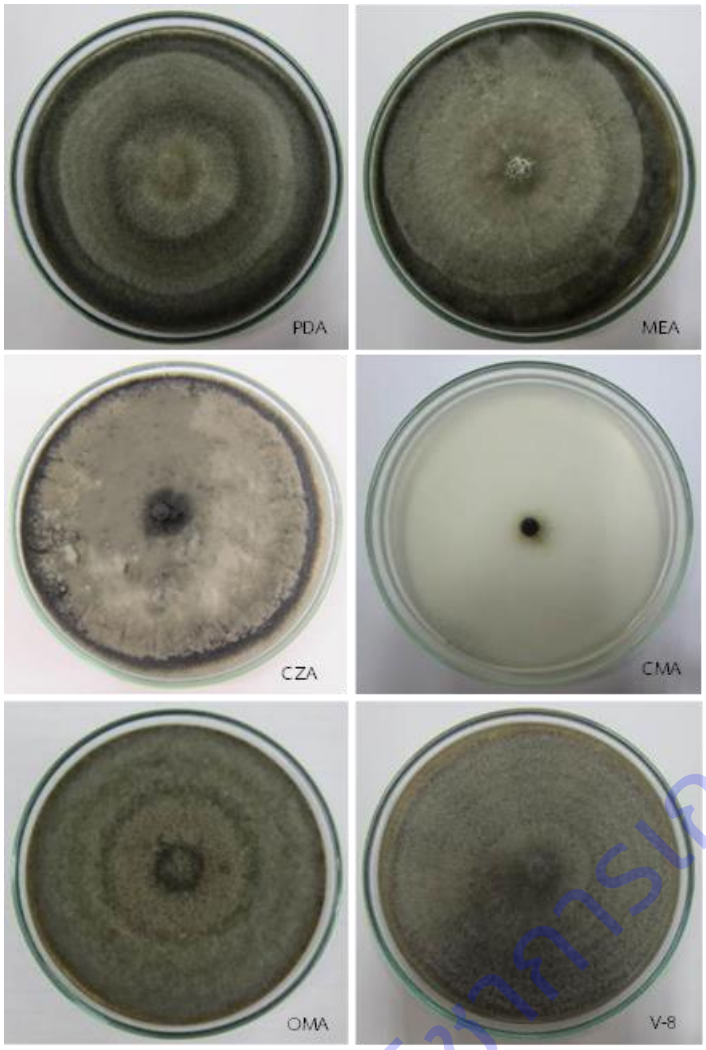


ภาพที่ 2.2.5.3 ลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของรา *C. eragrostidis* จากกล้วยไม้ : ก และ ง) P001, ข และ จ) P002, ค และ ฉ) P003



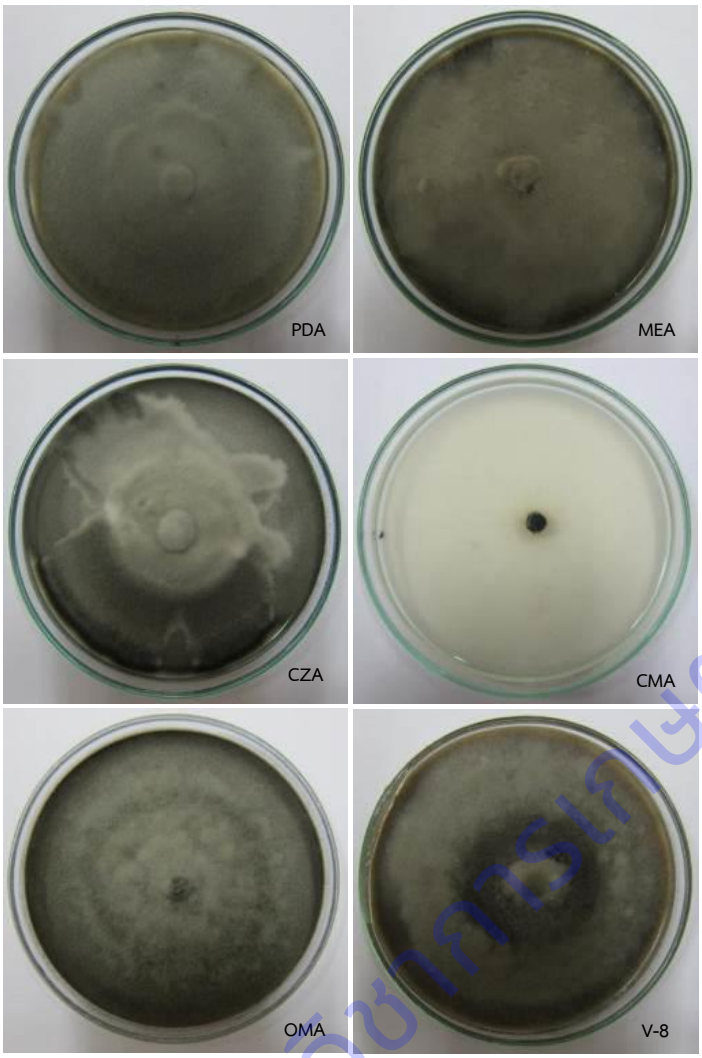
กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.2.5. 4 การเจริญของโคโลนีของ *C. eragrostidis* (F028-5) บนอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน



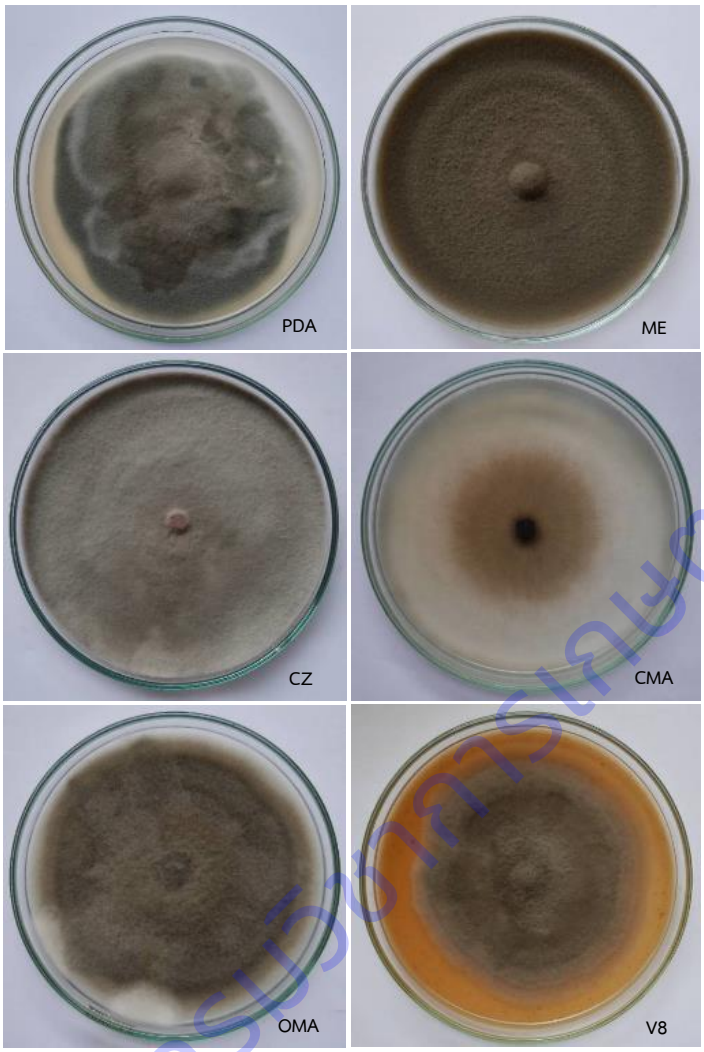
ภาพที่ 2.2.5.5 การเจริญของโคโลนีของ *C. eragrostidis* (F028-6) บนอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

กรมวิชาการเกษตร



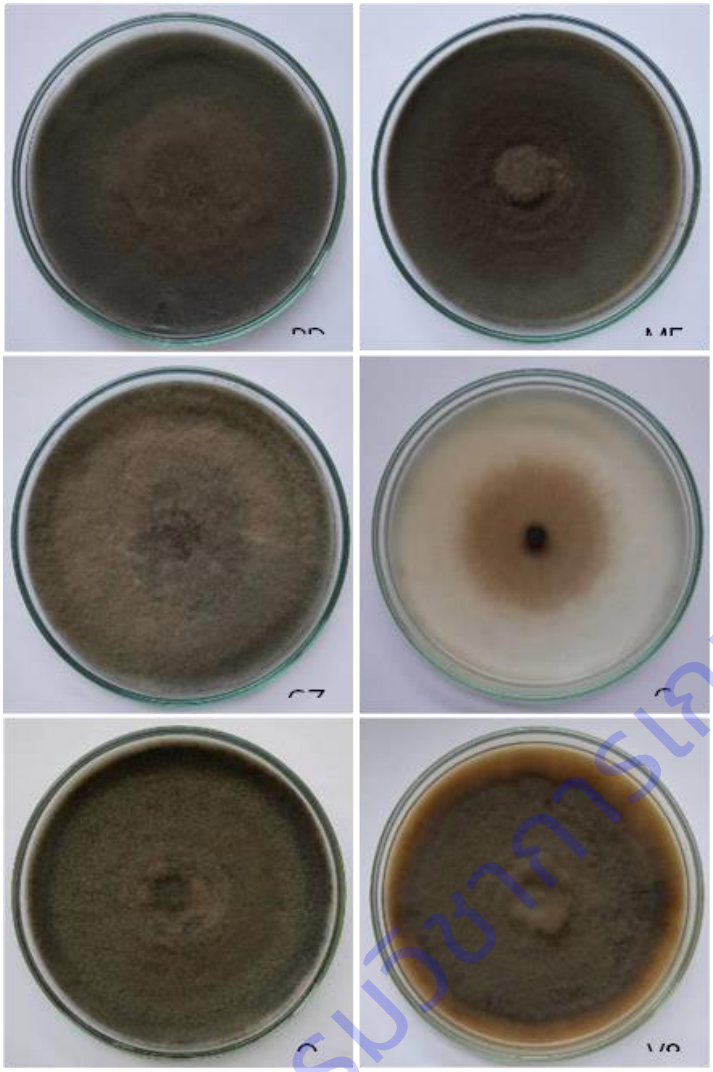
ภาพที่ 2.2.5.6 การเจริญของโคโลนีของ *C. eragrostidis* (F029-4) บนอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

กรมวิชาการเกษตร



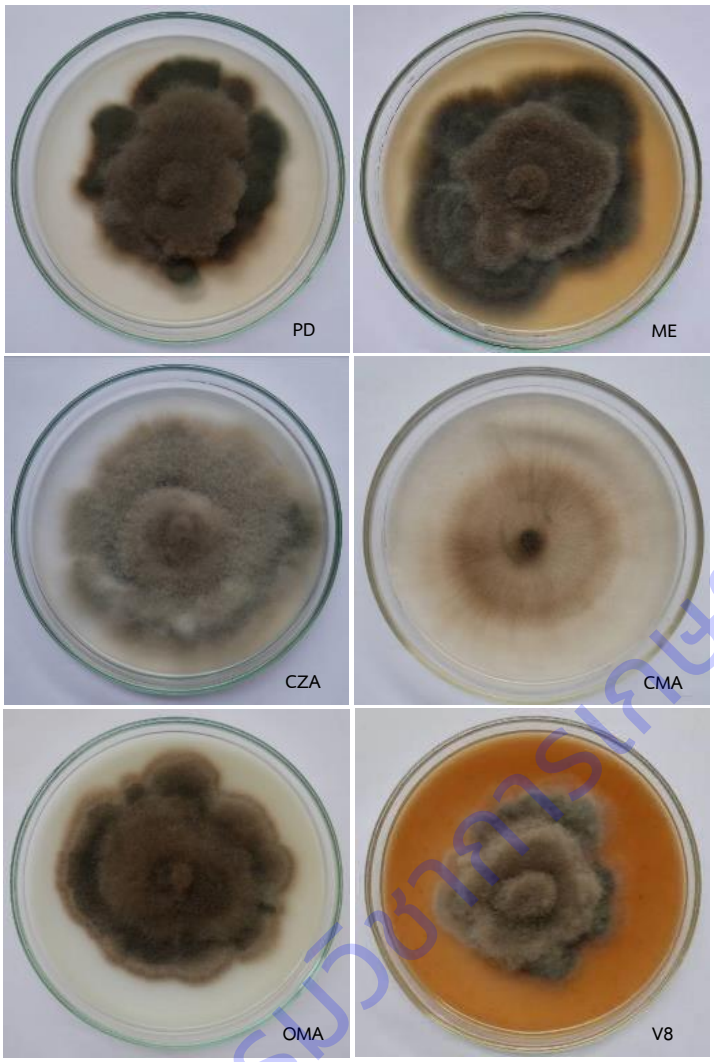
ภาพที่ 2.2.5.7 การเจริญของโคโลนีของ *C. oryzae* (P001) บนอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร



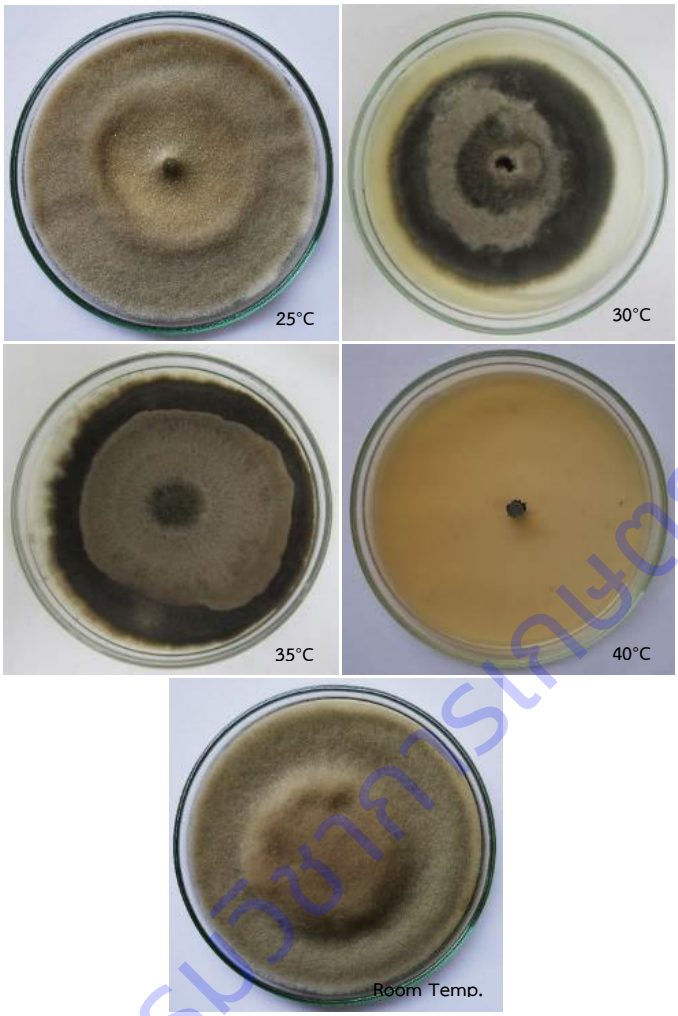
ภาพที่ 2.2.5.8 การเจริญของโคโลนีของ *C. oryzae* (P002) บนอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

กรมวิชาการเกษตร



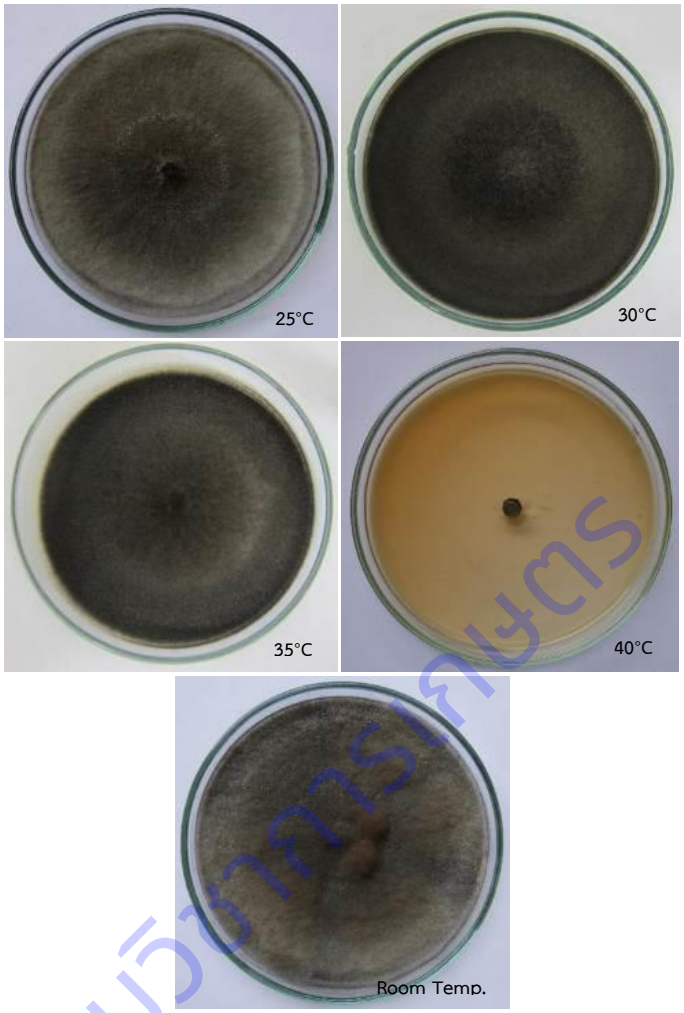
ภาพที่ 2.2.5.9 การเจริญของโคโลนีของ *C. oryzae* (P003) บนอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

กรมวิชาการเกษตร



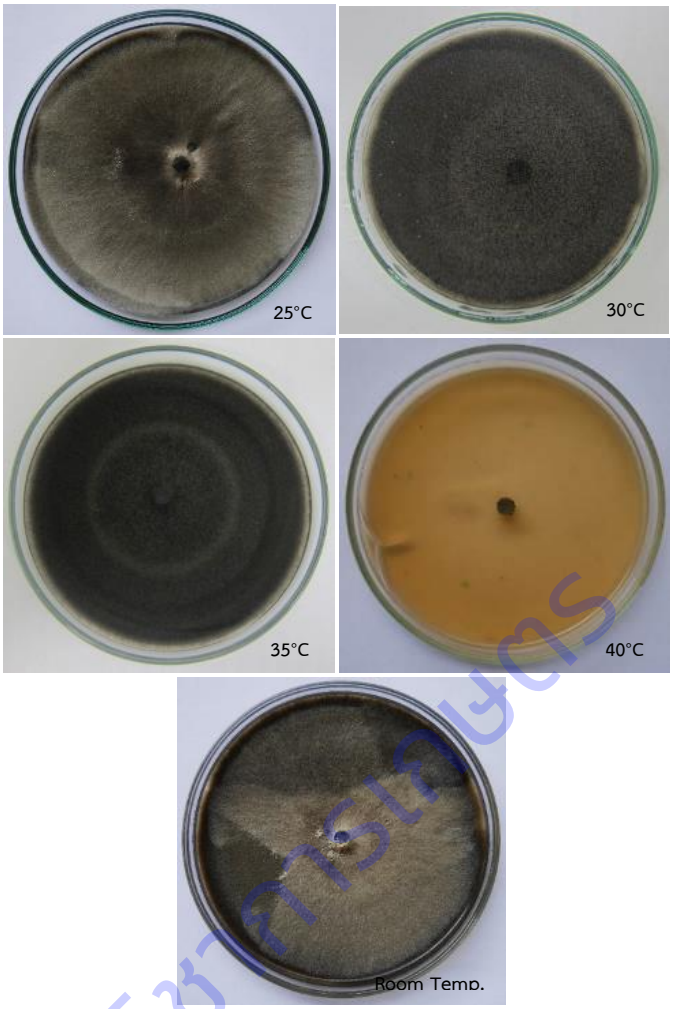
กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.2.5.10 การเจริญของโคโลนีของ *C. eragrostidis* (F028-5) ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน



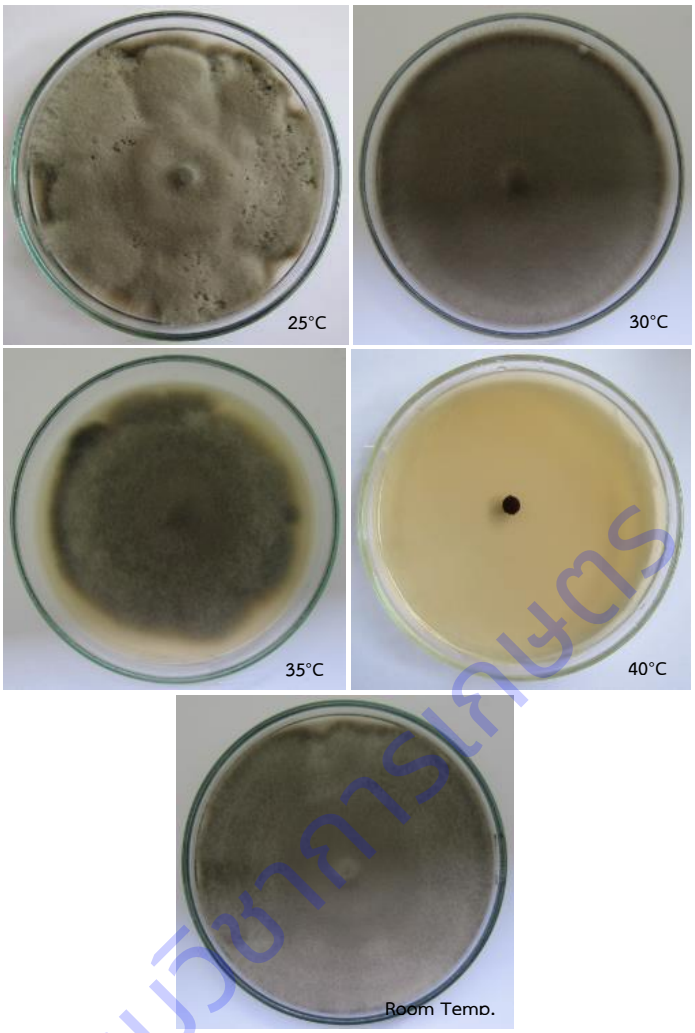
ภาพที่ 2.2.5.11 การเจริญของโคโลนีของ *C. eragrostidis* (F028-6) ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

กรมวิชาการเกษตร



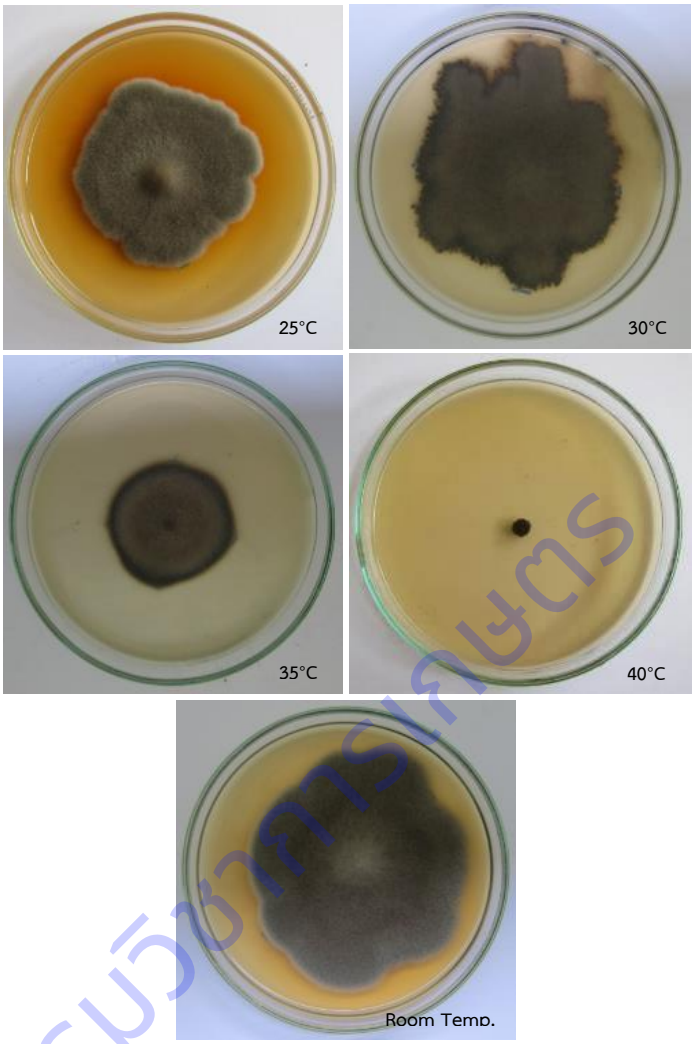
ภาพที่ 2.2.5.12 การเจริญของโคโลนีของ *C. eragrostidis* (F029-4) ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

กรมวิชาการเกษตร



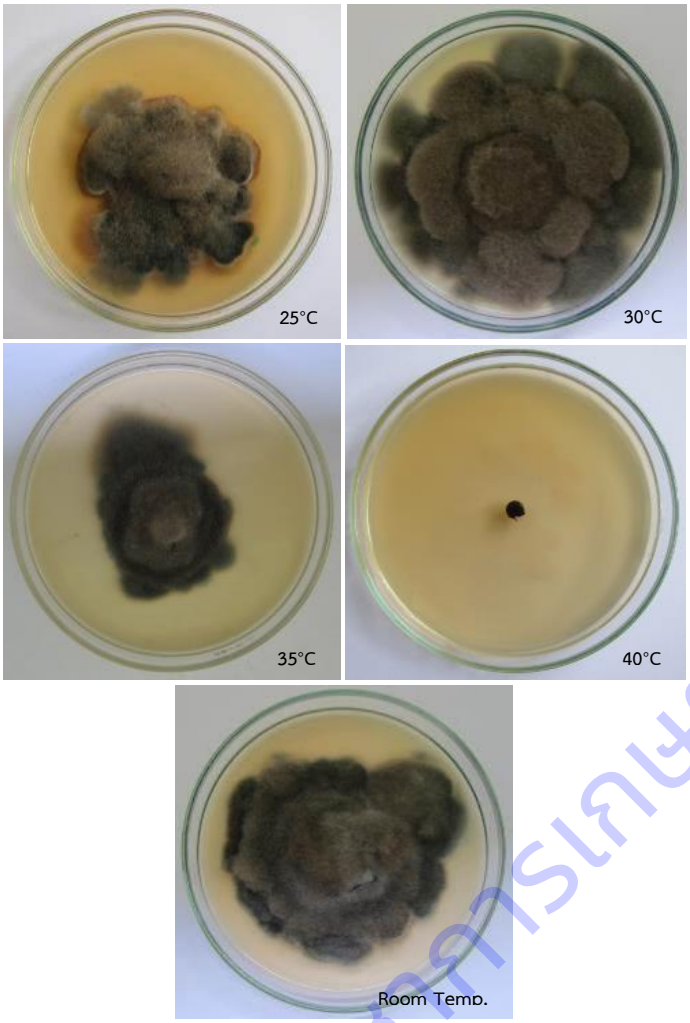
ภาพที่ 2.2.5.13 การเจริญของโคโลนีของ *C. oryzae* (P001) อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

กรมวิชาการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.2.5.14 การเจริญของโคโลนีของ *C. oryzae* (P002) อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

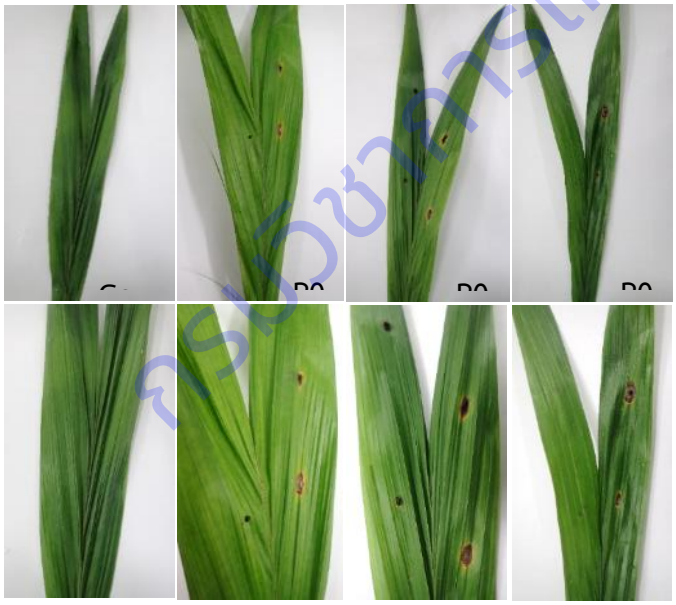


ภาพที่ 2.2.5.15 การเจริญของโคโลนีของ *C. oryzae* (P003) อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

ภาพที่ 2.2.5.16 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันและกล้วยไม้สำหรับทดสอบพืชอาศัย

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.2.5.17 การทดสอบการเกิดโรคเบื้องต้นบนพืชอาศัย: อาการของโรคเป็นเวลา 7 วันหลังปลูกเชื้อ



ภาพที่ 2.2.5.18 การทดสอบการเกิดโรคเบื้องต้นบนพืชอาศัย: อาการของโรคเป็นเวลา 14 วันหลังปลูกเชื้อ

ศรีวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.2.6 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Neoscytalidium dimidiatum* Crous & Slippers and Gruyter

Study on biology and ecology of *Neoscytalidium dimidiatum* Crous & Slippers and Gruyter

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นางสาวชนินทร ดวงสอาด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

โรคที่สำคัญของแก้วมังกรคือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ (Brown spot or stem canker) สาเหตุเกิดจากรา *Neoscytalidium dimidiatum* ราเข้าทำลายทั้งที่ดอก ลำต้นและผล ทำให้เกิดความเสียหายกับเกษตรกรเป็นจำนวนมาก สำหรับประเทศไทยนั้นยังมีข้อมูลยังไม่มีการศึกษารายละเอียดของชีววิทยาและนิเวศของรา *N. dimidiatum* เพราะฉะนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาลักษณะทางชีววิทยานิเวศวิทยาของราชนิดนี้เพื่อเป็นข้อมูลของเชื้อเพื่อในการศึกษาหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม ผลการศึกษาโดยเก็บตัวอย่างอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จำนวน 32 ตัวอย่าง จากจันทบุรี เชียงราย เชียงใหม่ นครปฐม นครราชสีมา ปทุมธานี ระยอง ราชบุรี สกลนคร สมุทรปราการ สมุทรสาคร และอุทัยธานี พบอาการโรค 2 ชนิด คือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลเกิดร่วมกับโรคแอนแทรคโนสที่ลำต้น แยกเชื้อสาเหตุได้ราทั้งหมดจำนวน 44 ไอโซเลต จำแนกชนิดได้รา 2 ชนิด คือ *Neoscytalidium dimidiatum* จำนวน 32 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และ *Colletotrichum gloeosporioides* จำนวน 12 ไอโซเลต แยกได้จากอาการโรคแอนแทรคโนส และศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum* ที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา โดยเก็บกิ่งของแก้วมังกรปกติมาทำการแยกเชื้อ ไม่พบรา *N. dimidiatum* และเก็บส่วนที่เป็นโรคมา 6 ระยะ **ระยะที่ 1** ลักษณะอาการระยะเริ่มแรกแสดงอาการจุดเล็กๆ สีขาว มักจะพบแผลสเก็ดสีแดงตรงกลางจุดแผล **ระยะที่ 2** ลักษณะจุดกลางแผลเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีเทา จากการตรวจเชื้อระยะที่ 1 และ 2 ไม่พบเชื้อสาเหตุ **ระยะที่ 3** แผลขยายใหญ่ขึ้นตรงกลางเป็นสเก็ดสีน้ำตาล แข็ง ตรงกลางแผลเชื้อสร้างส่วนขยายพันธุ์เรียกว่า pycnidia ฝังอยู่ภายในแผล **ระยะที่ 4** แผลสีเหลืองเป็นวงเกิดล้อมรอบจุดแผลสเก็ดสีน้ำตาลหรือเกิดแผลด้านข้างด้านใดด้านหนึ่งของกิ่ง **ระยะที่ 5** แผลขยายตัวใหญ่ขึ้น มีลักษณะคล้ายสเก็ด สีเทา เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน **ระยะที่ 6** เมื่ออาการรุนแรงแผลหลุดออกกลายเป็นรูขนาดใหญ่บนกิ่ง พบเชื้อรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์แบบ pycnidiospore ในส่วนขยายพันธุ์ที่เรียกว่า pycnidia ในระยะที่ 3-6 และยังพบเชื้อสาเหตุสร้างสร้างสปอร์ที่เรียกว่า arthroconidia ในส่วนของเนื่อเยื่อที่ตายระยะที่ 6 เมื่อทำการแยกเชื้อสาเหตุบนอาหารสังเคราะห์ PDA ในระยะที่ 3-6 พบรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์ที่เรียกว่า arthroconidia เช่นกัน และไม่พบสปอร์แบบ pycnidiospore บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

กรมวิชาการเกษตร

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 เซ็นติเมตร นาน 3 วัน การศึกษาชนิดของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* จำนวน 4 ไอโซเลตพบว่าเชื้อรา *N. dimidiatum* ทุกไอโซเลตเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 30 35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ และเจริญได้น้อยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

Abstract

Brown spot or stem canker is an important disease of dragon fruit. The causal fungus infected caused by mold. *Neoscytalidium dimidiatum*, the causal agent of the disease could infect flowers, stems and fruits, which causing the great damage to the production of dragon fruit. In Thailand, the informative data of brown spot disease was not available. This study was conducted to determine the biology and ecology of *N. dimidiatum*, which could apply for further study on the brown spot disease management. The dragon fruit plantation located in Chanthaburi, Chiang Rai, Chiang Mai, Nakhon Pathom, Nakhon Ratchasima, Pathum Thani, Rayong, Ratchaburi, Sakon Nakhon, Samut Prakan, Samut Sakhon and Uthai Thani province had been observed and 32 of brown spot disease samples were collected from these planting areas. The disease samples could be divided into 2 groups based on the presented symptoms. The first group showed brown spot symptom on stems, whereas the second group showed the brown spot symptom together with the anthracnose on stems. The total number of 44 isolates could be obtained from collected samples. The 32 out of 44 isolates, which obtained from the brown spot symptoms on stems, could be identified as *Neoscytalidium dimidiatum*. The 12 fungal isolates obtained from the anthracnose symptoms could be identified as *Colletotrichum gloeosporioides*. Based on the specimens collected from this study, the brown spot symptoms comprised of six stages. The first stage of brown spot symptom presented the white spot with the red minute dot in the middle. The second stage, the color spot symptom turned to red or grey color. It is most likely rare to isolate the fungal from the disease tissue of these both stages. The third stage, the spot extended and later turned into raised brown scabs with pycnidia inside. The fourth stage, the yellow halo around the scab lesions on stems. The fifth stage, the lesions enlarged and formed a grey stacked circle. The final stage, presented the severe symptoms. The lesions came off then become the large hole on stems. The pycnidiospores of *Neoscytalidium dimidiatum* embedded in pycnidia and could be found in disease stage 3-6. The arthroconidia could be found only on the dead tissue in the last stage.

กรมวิทยาศาสตร์

The growth study on various media found that arthroconidia of *N. dimidiatum* could form on PDA, but pycnidiospores could found on any isolates on various media.

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

คำนำ

แก้วมังกรเป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมสูง เพราะมีสมญานามว่าเป็น ‘ผลไม้สุขภาพ” ของผู้สูงอายุ ผู้ป่วยโรคเบาหวาน คนอ้วนที่ต้องการลดน้ำหนัก และสามารถป้องกันโรคมะเร็งได้ ออเนื่องจากในเมล็ดมีสารแอนติออกซิเดนซ์สูง ดังนั้นผู้บริโภคจึงนิยมบริโภคแก้วมังกรกันมากขึ้นและยังเป็นที่นิยมของผู้บริโภคในต่างประเทศด้วย จึงมีการขยายไปสู่ตลาดต่างประเทศ และในปัจจุบันแก้วมังกรยังเป็นพืชที่นิยมปลูกเป็นการค้าในอีกหลายประเทศ ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย บนาซิลลัมเบีย คอสตาริก้า อียิปต์ อิสราเอล ญี่ปุ่น มัวริเทียส เม็กซิโก นิการากัว ไต้หวัน อเมริกา และเวียดนาม อย่างไรก็ตามการส่งออกแก้วมังกรยังจำกัดอยู่กับเฉพาะบางประเทศเท่านั้น

ในปี 2562 มีปริมาณการส่งออกแก้วมังกร จำนวน 580,731 กิโลกรัม มีมูลค่าเท่ากับ 55,018,068 บาท และในปี 2563 มีปริมาณการส่งออกแก้วมังกร จำนวน 771,658 กิโลกรัม มีมูลค่าเท่ากับ 38,487,113 บาท มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นแต่มูลค่าการส่งออกลดลง อย่างไรก็ตามประเทศไทยก็มีความพยายามต้องการขยายตลาดไปยังประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งจะทำให้การผลิตแก้วมังกรมีความสำคัญมากขึ้น ถ้าเกษตรกรสามารถผลิตแก้วมังกรที่มีคุณภาพดีก็สามารถเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกร แต่ในปัจจุบันปัญหาที่สำคัญต่อการผลิตแก้วมังกรที่สำคัญอย่างหนึ่งคือปัญหาด้านศัตรูพืช โดยเฉพาะปัญหาโรคพืชเป็นปัญหาที่สำคัญมาก มีผลทำให้เกษตรกรเลิกปลูกกันมาก เช่นพื้นที่ปลูกในจังหวัดจันทบุรี พื้นที่ปลูกแก้วมังกรในจังหวัดจันทบุรีและสมุทรสาครลดลง ซึ่งแต่เดิมเมื่อเริ่มปลูกแก้วมังกรในปี 2540 เกษตรกรได้รับผลผลิตมากมาย ไม่พบปัญหาการระบาดของศัตรูพืช เนื่องมาจากเป็นพืชใหม่ การสะสมของศัตรูพืชยังไม่มาก แต่ในปัจจุบันนี้พบการระบาดของโรคมาก เกษตรกรไม่สามารถควบคุมและป้องกันกำจัดโรคได้ โรคระบาดทั้งที่ลำต้นและผล ทำให้ผลผลิตลดลงอย่างมาก มีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชกันมาก และใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชไม่ถูกต้อง ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง บางสวนต้องรื้อแปลงปลูกทิ้งเลย การป้องกันกำจัดโรคของแก้วมังกรที่สำคัญที่เกษตรกรจะต้องปฏิบัติคือการกำจัดส่วนที่เป็นโรคทิ้ง แต่เกษตรกรไม่สามารถปฏิบัติได้ ส่วนใหญ่จะทิ้งเศษซากส่วนที่เป็นโรคไว้ในแปลง จึงมีการสะสมของเชื้อโรคมาก เมื่อมีการปลูกในฤดูต่อไปก็จะเกิดการระบาดของโรคง่ายและรวดเร็ว และประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

อยู่ในประเทศเขตร้อน การปลูกแก้วมังกรซึ่งเป็นพืชวงศ์กระบองเพชรนั้น ถ้าปลูกในพื้นที่ๆ มีอากาศร้อนและมีฝนตก ทำให้เชื้อสามารถแพร่กระจายและระบาดได้อย่างรวดเร็ว

สำหรับในประเทศไทยนั้นพบโรคระบาดเข้าทำลายทั้งที่ดอก ลำต้น และผล พรพิมล และคณะ (2550) รายงานการสำรวจโรคแก้วมังกรจากแหล่งปลูกแก้วมังกรในจังหวัด เชียงราย พะเยา ระยอง ราชบุรี และสมุทรสาคร พบโรคของแก้วมังกร 5 ชนิด ได้แก่ โรคเน่าเปียกที่ดอก เกิดจากเชื้อรา *Choanephora* โรคผลเน่าเกิดจากเชื้อรา *Drechsiera cactivora* โรคแอนแทรคโนสที่ผล เกิดจากเชื้อรา *Collectotrichum* sp. โรค stem canker เกิดจากเชื้อรา *Dothiorella* sp. และโรคแอนแทรคโนสบนลำต้น เกิดจากเชื้อรา *Collectotrichum gloeosporioides* โดยโรคแก้วมังกรส่วนใหญ่พบในแหล่งปลูกแก้วมังกรในภาคกลางและภาคตะวันออก โรคที่สำคัญคือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ (Brown spot or stem cancer) สาเหตุเกิดจากรา *Neoscytalidium dimidiatum* ราเข้าทำลายทั้งที่ดอก ลำต้นและผล (Athipunyakom *et al*., 2015) โรคแอนแทรคโนสเข้าทำลายทั้งลำต้นและผล มีสาเหตุเกิดจากรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. truncatum* (พรพิมล และคณะ, 2550; Athipunyakom and Likhitekaraj, 2010; Athipunyakom *et al*., 2012; Athipunyakom *et al*., 2015) โรคผลเน่าที่เกิดจากรา *Bipolaris cactivora* (พรพิมล และคณะ, 2550; Athipunyakom *et al*., 2015) อย่างไรก็ตามโรคที่สำคัญของแก้วมังกรและทำความเสียหายแก่เกษตรกรมากคือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ (Brown spot or stem cancer) สาเหตุเกิดจากรา *Neoscytalidium dimidiatum* ราเข้าทำลายทั้งที่ดอก ลำต้นและผล (Athipunyakom *et al*., 2015) ซึ่งในปัจจุบันพบการระบาดของโรคนี้ในหลายประเทศในเขตประเทศเอเชียนั้น ได้แก่ ประเทศไต้หวัน (Chuang *et al.* 2012; Lin *et al*., 2015) จีน (Lan *et al*., 2012; Yi *et al*., 2013; 2015; Xu *et al*., 2018) มาเลเซีย (Masratul *et al.,* 2013; 2015) และ เวียดนาม (Hieu *et al.,* 2015) นอกจากนั้นมีการระบาดของโรคนี้ในประเทศอิสราเอล (Ezra *et al*. 2013) รัฐฟลอริดา สหรัฐอเมริกา (Sanahuja *et al*., 2016) ในปี 2558 องค์กรทางการเกษตรระดับนานาชาติ Food and Fertilizer Technology Center หรือ FFTC ในประเทศไต้หวัน ได้จัดการประชุมเชิงปฏิบัติการเกี่ยวกับแก้วมังกร Workshop on Improving Pitaya Production and Marketing ระหว่างวันที่ 7-9 กันยายน 2558 โดยมีนักวิชาการร่วมประชุมและเสนอผลงานจากประเทศไต้หวัน ไทย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย เมียนมาร์ เวียดนาม อิสราเอล และอินโดนีเซีย จากการประชุมครั้งนี้พบว่าปัญหาโรคที่สำคัญที่สุดที่ระบาดในหลายประเทศในเขตเอเชีย คือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ มีการระบาดของโรคอย่างรวดเร็ว และการป้องกันกำจัดค่อนข้างยาก ซึ่งแต่ละประเทศกำลังเร่งดำเนินงานวิจัยศึกษาอยู่ สำหรับประเทศไทยนั้นยังมีข้อมูลยังไม่มีการศึกษารายละเอียดของชีววิทยาและนิเวศของรา *N. dimidiatum* เพราะฉะนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาลักษณะทางชีววิทยานิเวศวิทยาของราชนิดนี้เพื่อเป็นข้อมูลของเชื้อเพื่อในการศึกษาหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมตลอดจนสามารถนำข้อมูลนี้ไปวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชได้

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1 อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ กระดาษ ถุงพลาสติค ปากกาเคมี ดินสอ กรรไกรตัดกิ่ง และ GPS

2. อุปกรณ์จัดเก็บตัวอย่างแห้ง ได้แก่ แผ่นไม้อัดทับตัวอย่าง กระดาษ

3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ slide cover slip ปากคีบ เข็มเขี่ยปลายแหลม ตะเกียง ยาทาเล็บ

4. สารเคมีสำหรับ mount slide ได้แก่ lactophenol , lactic acid, shear's sulution

5. สารเคมีได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ: สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75%

6 อาหารวุ้นสังเคราะห์ corn meal agar (CMA), potato dextrose agar (PDA)

7. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดดูแรน บีกเกอร์ เป็นต้น

8. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว เป็นต้น

9. กล้องจุลทรรศน์ compound microscope และ stereo microscope พร้อมกล้องถ่ายรูปและ camera lucida สำหรับวาดภาพราจากกล้องจุลทรรศน์

- วิธีการ

1. ศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum*

1.1 เก็บตัวอย่างอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร

ส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง เก็บตัวอย่างอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้ว ห่อตัวอย่างพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก เพื่อนำมาทำศึกษาชนิดและแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างที่เก็บมาตรวจหาสปอร์

1.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

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

1.3 การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

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

1.4 เก็บรักษาตัวอย่างแห้งโรคพืช

เก็บตัวอย่างโรคพืชและมาจัดทำตัวอย่างแห้ง โดยนำส่วนของพืชที่แสดงอาการโรค วางบนกระดาษฟาง พร้อมแนบกระดาษบันทึกข้อมูลพืช แล้วปิดทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ อัดทับด้วยแผงไม้อัดตัวอย่างโรคพืช เปลี่ยนกระดาษทุกวัน จนกระทั่งตัวอย่างพืชแห้ง แล้วนำตัวอย่างแห้งโรคพืชมาเก็บในถุงกระดาษ พร้อมลงรายละเอียดข้อมูล ได้แก่ ชื่อพืช ลักษณะอาการโรค สถานที่เก็บ ชนิดของราสาเหตุโรคพืช

สำนักวิชาการเกษตร

วันที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ และชื่อผู้จัดจำแนกชนิดรา เป็นต้น แล้วส่งเก็บในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

1.5 การศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum*

เก็บแก้วมังกรแสดงอาการระยะต่าง ๆ มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ห่อตัวอย่างพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก เพื่อนำมาทำศึกษาชนิดและแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ

2. ศึกษาชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

นำรา *N. dimidiatum* ที่แยกได้จากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จากศูนย์เก็บเชื้อสาเหตุโรคพืช กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ M 0328 แยกจากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดสกลนคร M 0331 แยกจากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดอุทัยธานี M 0354 แยกจากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดจันทบุรี และM 0355 แยกจากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดนครราชสีมา โดยนำรา *N. dimidiatum* ทั้ง 4 ไอโซเลต มาศึกษาชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อ

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

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยเชื้อราบนอาหารแต่ละชนิดเมื่อเส้นใยที่เจริญบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำผลมาวิเคราะห์สถิติ

2.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 10 ซ้ำ 9 กรรมวิธี โดยให้อาหารแต่ละชนิดเป็นกรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

กรมวิชาการเกษตร

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

วิธีการทดลอง

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

การบันทึกผลการทดลอง

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยเชื้อราบนอาหารแต่ละชนิด เมื่อเส้นใยที่เจริญบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำผลมาวิเคราะห์สถิติ

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2560 – กันยายน 2563

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

แปลงแก้วมังกร อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดอื่นๆ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum*

1.1 เก็บตัวอย่างอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร

เก็บตัวอย่างอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จำนวน 32 ตัวอย่าง จากจันทบุรี (10 ตัวอย่าง) เชียงราย (1 ตัวอย่าง) เชียงใหม่ (1 ตัวอย่าง) นครปฐม (3 ตัวอย่าง) นครราชสีมา (4 ตัวอย่าง) ปทุมธานี (1 ตัวอย่าง) ระยอง (1 ตัวอย่าง) ราชบุรี (2 ตัวอย่าง) สกลนคร (5 ตัวอย่าง) สมุทรปราการ (1 ตัวอย่าง) สมุทรสาคร (1 ตัวอย่าง) และอุทัยธานี (2 ตัวอย่าง) (ตารางที่ 2.2.6.1) พบอาการโรค 2 ชนิด คือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล (ภาพที่ 2.2.6.1ก) และโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลเกิดร่วมกับโรคแอนแทรคโนสที่ลำต้น มักจะพบอาการในกิ่งเดียวกัน (ภาพที่ 2.2.6.1ข) จากการศึกษาครั้งนี้พบอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลมากกว่าโรคแอนแทรคโนส โดยเฉพาะแปลงที่ไม่มีการจัดการในการเก็บส่วนที่เป็นโรคทิ้งจะพบการระบาดของโรคนี้มากและเป็นปัญหาที่สำคัญในการผลิตแก้วมังกร ซึ่งพบการระบาดของโรคนี้ในหลายประเทศในเขตประเทศเอเชียนั้น ได้แก่ ประเทศไต้หวัน (Chuang *et al.* 2012; Lin *et al*., 2015) จีน (Lan *et al*., 2012; Yi *et al*., 2013; 2015; Xu *et al*., 2018) มาเลเซีย (Masratul *et al.,* 2013; 2015) และ เวียดนาม (Hieu *et al.,* 2015) Masyahit *et al*. (2009) สำหรับโรคแอนแทรคโนสสาเหตุเกิดจากรา *Colletotrichum gloeosporioides* มีรายงานครั้งแรกที่ประเทศมาเลเซีย โดยทำการสำรวจโรคของแก้วมังกร ระหว่างเดือนธันวาคม 2550 ถึง เดือนสิงหาคม 2551 เก็บตัวอย่างส่วนที่เป็นโรคที่ลำต้นและผลมาศึกษาสาเหตุของโรคในห้องปฏิบัติการ และพบโรคนี้ระบาดรุนแรงมากที่สุดที่มะละกา ในขณะที่พบการระบาดของโรคนี้น้อยที่สุดที่รัฐกาลันตัง

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ตารางที่ 2.2.6.1: โรคลำต้นจุดสีน้ำตาลและโรคแอนแทรคโนสของแก้วมังกรจากตัวอย่างโรคที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ

ตัวอย่างที่	อาการโรคที่พบ	แหล่งเก็บตัวอย่าง
1	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และอาการโรคแอนแทรคโนส	อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี
2	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และอาการโรคแอนแทรคโนส	อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี
3	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี
4	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี
5	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี
6	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี
7	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และอาการโรคแอนแทรคโนส	อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี
8	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี
9	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และอาการโรคแอนแทรคโนส	อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี
10	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และอาการโรคแอนแทรคโนส	อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี
11	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอพาน จังหวัดเชียงราย
12	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่
13	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ
14	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี
15	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี
16	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอแกลง จังหวัดระยอง
17	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และอาการโรคแอนแทรคโนส	อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม
18	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และอาการโรคแอนแทรคโนส	อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม
19	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม
20	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และอาการโรคแอนแทรคโนส	อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี
21	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอโพหัก จังหวัดราชบุรี
22	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และอาการโรคแอนแทรคโนส	อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร
23	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และอาการโรคแอนแทรคโนส	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
24	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และอาการโรคแอนแทรคโนส	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
25	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
26	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
27	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี
28	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอสว่างแดนดิน จังหวัดสกลนคร
29	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และอาการโรคแอนแทรคโนส	อำเภอสว่างแดนดิน จังหวัดสกลนคร
30	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร
31	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร
32	อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล	อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร

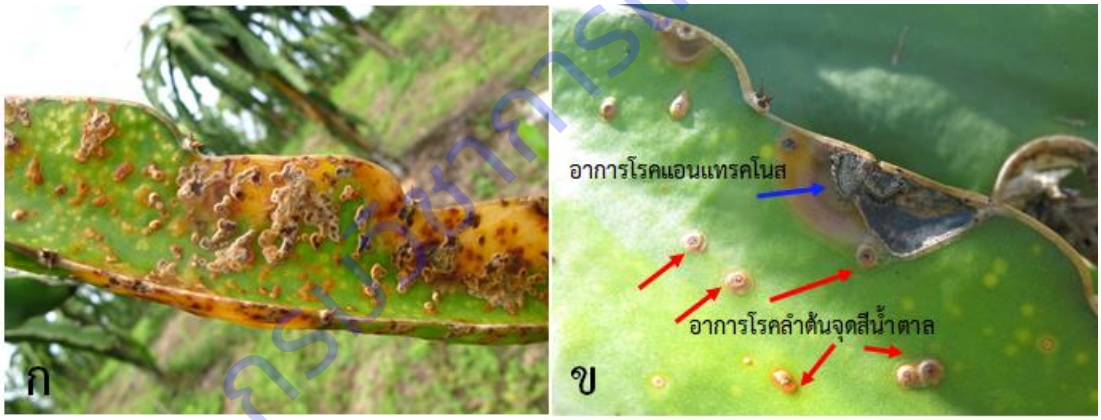
ลิขสิทธิ์การเกษตร

1.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

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

1.3 การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

จากการแยกเชื้อสาเหตุได้ทั้งหมด 44 ไอโซเลต ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อจำแนก ได้รา 2 ชนิด คือ *Neoscytalidium dimidiatum* จำนวน 32 ไอโซเลต (ภาพที่ 2.2.6.2 ก และตารางที่ 2.2.6.2) แยกได้จากอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และ *Colletotrichum gloeosporioides* จำนวน 12 ไอโซเลต (ภาพที่ 2.2.6.2 ข และตารางที่ 2.2.6.2) แยกได้จากอาการโรคแอนแทรคโนส จากนั้นแยกเชื้อบริสุทธ์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 และ -20 องศาเซลเซียส และนำรา *N. dimidiatum* จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ M 0328 M 0331 M 0354 และM 0355 ศึกษาชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อ ที่เลือก 4 ไอโซเลตนี้มาทำการศึกษาเพราะว่าทำให้เกิดโรครุนแรงในพื้นที่ปลูกเก้วมังกรที่เก็บตัวอย่างมา



ภาพที่ **2.2.6.1:** อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลและอาการโรคแอนแทรคโนสของแก้วมังกรที่อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี

ก) อาการโรคลำต้นจุดแก้วมังกร

ข) โรคลำต้นจุดสีน้ำตาลเกิดร่วมกับโรคแอนแทรคโนสที่ลำต้น

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.2.6.2: เชื้อราที่แยกได้จากโรคของแก้วมังกร ที่เก็บจากแปลงแก้วมังกร อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

ก) อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล ข) อาการโรคแอนแทรคโนส

ค) รา *Neocystalidium dimidiatum* แยกจากอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล

ง) รา *Colletotrichum gloeosporioides* แยกจากอาการโรคแอนแทรคโนส

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2.2.6.2: ชนิดของราสาเหตุโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลและโรคแอนแทรคโนสของแก้วมังกร ไอโซเลตต่างๆ ที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ

ชนิดของรา	ไอโซเลต	เลขที่ตัวอย่าง	สถานที่
Neocystalidium dimidiatum	M 0340	1	อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี
Colletotrichum gloeosporioides	M 0200	1	อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี
Neocystalidium dimidiatum	**M 0354**	**2**	**อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี**
Colletotrichum gloeosporioides	M 0201	2	อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี
Neocystalidium dimidiatum	M 0341	3	อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี
Neocystalidium dimidiatum	M 0342	4	อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี
Neocystalidium dimidiatum	M 0343	5	อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี
Neocystalidium dimidiatum	M 0344	6	อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี
Neocystalidium dimidiatum	M 0345	7	อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี
Colletotrichum gloeosporioides	M 0202	7	อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี
Neocystalidium dimidiatum	M 0346	8	อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี
Neocystalidium dimidiatum	M 0347	9	อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี
Colletotrichum gloeosporioides	M 0203	9	อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี
Neocystalidium dimidiatum	M 0348	10	อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี
Colletotrichum gloeosporioides	M 0204	10	อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี
Neocystalidium dimidiatum	M 0349	11	อำเภอพาน จังหวัดเชียงราย
Neocystalidium dimidiatum	M 0350	12	อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่
Neocystalidium dimidiatum	M 0351	13	อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ
Neocystalidium dimidiatum	**M 0331**	**14**	**อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี**
Neocystalidium dimidiatum	M 0352	15	อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี
Neocystalidium dimidiatum	M 0353	16	อำเภอแกลง จังหวัดระยอง
Neocystalidium dimidiatum	M 0356	17	อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม
Colletotrichum gloeosporioides	M 0205	17	อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม
Neocystalidium dimidiatum	M 0357	18	อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม
Colletotrichum gloeosporioides	M 0206	18	อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม
Neocystalidium dimidiatum	M 0358	19	อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม
Neocystalidium dimidiatum	M 0359	20	อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี
Colletotrichum gloeosporioides	M 0207	20	อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี
Neocystalidium dimidiatum	M 0360	21	อำเภอโพหัก จังหวัดราชบุรี
Neocystalidium dimidiatum	M 0361	22	อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร
Colletotrichum gloeosporioides	M 0208	22	อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร
Neocystalidium dimidiatum	M 0362	23	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
Colletotrichum gloeosporioides	M 0209	23	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
Neocystalidium dimidiatum	M 0363	24	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
Colletotrichum gloeosporioides	M 0210	24	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
Neocystalidium dimidiatum	**M 0355**	**25**	**อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา**
Neocystalidium dimidiatum	M 0364	26	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
Neocystalidium dimidiatum	M 0365	27	อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี
Neocystalidium dimidiatum	M 0366	28	อำเภอสว่างแดนดิน จังหวัดสกลนคร
Neocystalidium dimidiatum	M 0367	29	อำเภอสว่างแดนดิน จังหวัดสกลนคร
Colletotrichum gloeosporioides	M 0211	29	อำเภอสว่างแดนดิน จังหวัดสกลนคร
Neocystalidium dimidiatum	M 0368	30	อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร
Neocystalidium dimidiatum	M 0369	31	อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร
Neocystalidium dimidiatum	**M 0328**	**32**	**อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร**

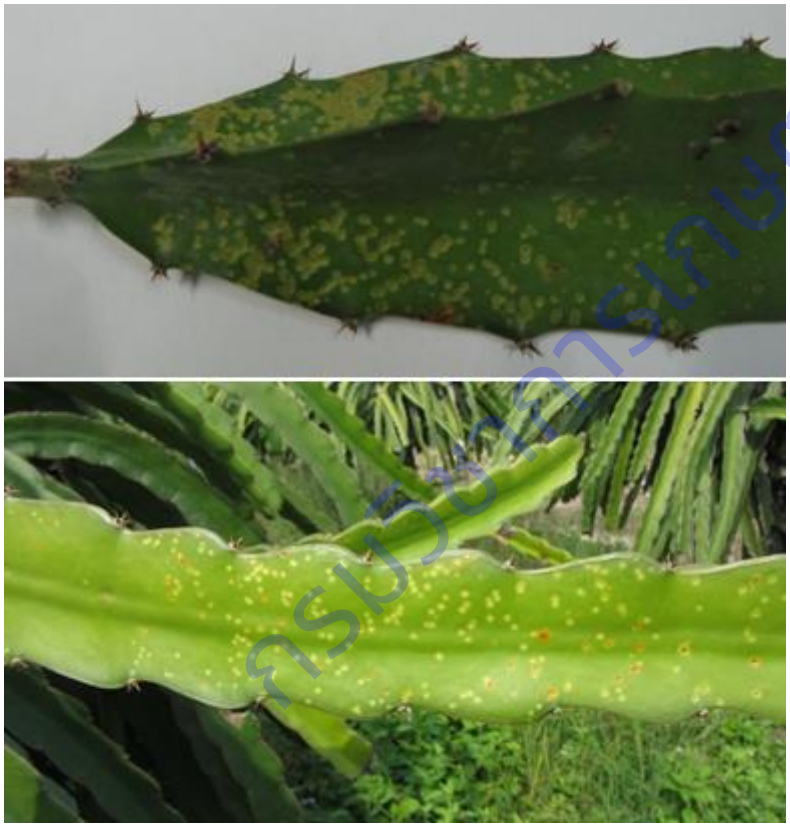
หมายเหตุ: รา *Neocystalidium dimidiatum* จำนวน 4 ไอโซเลต ที่แสดงตัวหนา หมายถึงไอโซเลตที่นำมาศึกษาชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Neoscytalidium dimidiatum Crous & Slippers and Gruyter

ลักษณะอาการของเชื้อ

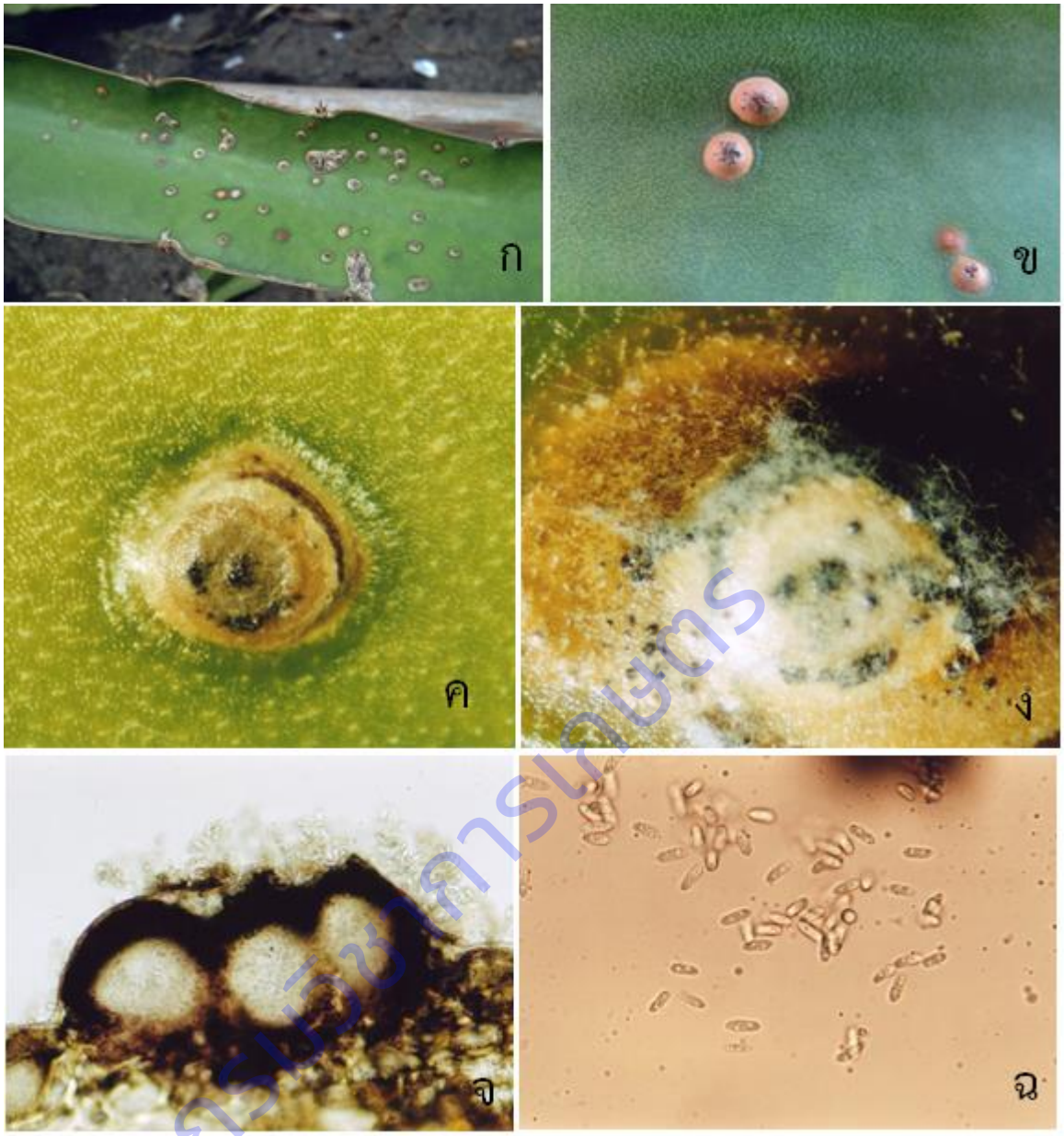
ลักษณะอาการระยะเริ่มแรกแสดงอาการจุดเล็กๆ สีขาว มักจะพบแผลสเก็ดสีแดงตรงกลางจุดแผล (ภาพที่ 2.2.6.3) ต่อมาลักษณะแผลจากจุดขาวเปลี่ยนเป็นแดงหรือน้ำตาลและต่อมาเปลี่ยนเป็นสเก็ดสีน้ำตาลนูนขึ้น (ภาพที่ 2.2.6.4) ถ้าอาการรุนแรงแผล ขยายใหญ่ขึ้น มีส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราสีดำอยู่ตรงกลาง (ภาพที่ 2.2.6.5ก-ภาพที่ 2.2.6.5ง) พบเชื้อรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์แบบ pycnidiospore ซึ่งจะพบสปอร์ชนิดนี้บนพืชที่แสดงอาการของโรคเท่านั้น ไม่พบบนอาหารสังเคราะห์ (ภาพที่ 2.2.6.5ฉ) อยู่ในส่วนขยายพันธ์ของเชื้อรา เรียกว่า pycnidia (ภาพที่ 2.2.6.5จ) และเก็บส่วนของดอกมาศึกษาเชื้อสาเหตุ จากการตรวจแยกเชื้อบนอาหาร PDA ไม่พบเชื้อสาเหตุ



ภาพที่ 2.2.6.3: อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร แสดงอาการจุดขาว

ภาพที่ 2.2.6.4: ลักษณะแผลจากจุดขาวเปลี่ยนเป็นแดงหรือน้ำตาลและต่อมาเปลี่ยนเป็นสเก็ดสีน้ำตาลนูนขึ้น

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2.2.6.5: อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร เป็นแผลจากระยะที่ 2 ขยายใหญ่ขึ้น มีส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราสีดำอยู่ตรงกลางพบเชื้อรา *Neoscytalidium dimidiatum* สร้างสปอร์แบบ pycnidiospore อยู่ในส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อรา เรียกว่า pycnidia

ก-ง) ระยะที่ 3 แผลจากระยะที่ 2 ขยายใหญ่ขึ้น มีส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราสีดำอยู่ตรงกลาง

จ) ส่วนขยายพันธ์ของรา เรียกว่า pycnidia

ฉ) สร้างสปอร์ เรียกว่า pycnidiospore

กรมวิชาการเกษตร

1.4 เก็บรักษาตัวอย่างแห้งโรคพืช

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

1.5 การศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum*

ศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum* ที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา โดยเก็บกิ่งของแก้วมังกรปกติมาทำการแยกเชื้อ ไม่พบรา *N. dimidiatum* และเก็บส่วนที่เป็นโรคมา 6 ระยะ **ระยะที่ 1** ลักษณะอาการระยะเริ่มแรกแสดงอาการจุดเล็กๆ สีขาว มักจะพบแผลสเก็ดสีแดงตรงกลางจุดแผล จากการตรวจเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในห้องปฏิบัติการไม่พบราสาเหตุโรคพืชบนลำต้นแก้วมังกรที่แสดงอาการจุดเล็กๆ สีขาว และเมื่อนำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting บนอาหารสังเคราะห์ PDA ก็ไม่พบเชื้อเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 2.2.6.6ก) **ระยะที่ 2** ลักษณะจุดกลางแผลเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีเทา (ภาพที่ 2.2.6.6ข) จากการตรวจเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในห้องปฏิบัติการไม่พบราสาเหตุโรคพืชบนลำต้นแก้วมังกรที่แสดงอาการในระยะที่ 2 และเมื่อนำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting บนอาหารสังเคราะห์ PDA ก็ไม่พบเชื้อเช่นเดียวกัน **ระยะที่ 3** แผลขยายใหญ่ขึ้นตรงกลางเป็นสเก็ดสีน้ำตาล แข็ง ตรงกลางแผลเชื้อสร้างส่วนขยายพันธุ์เรียกว่า pycnidia ฝังอยู่ภายในแผล (ภาพที่ 2.2.6.6ค) จากการตรวจเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในห้องปฏิบัติการพบเชื้อรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์แบบ pycnidiospore ในส่วนขยายพันธุ์ที่เรียกว่า pycnidia ซึ่งจะพบสปอร์ชนิดนี้บนพืชที่แสดงอาการของโรคเท่านั้น ไม่พบบนอาหารสังเคราะห์ PDA **ระยะที่ 4** ต่อมาแผลสีเหลืองเป็นวงเกิดล้อมรอบจุดแผลสเก็ดสีน้ำตาลหรือเกิดแผลด้านข้างด้านใดด้านหนึ่งของกิ่ง (ภาพที่ 2.2.6.6ง) **ระยะที่ 5** แผลขยายตัวใหญ่ขึ้น มีลักษณะคล้ายสเก็ด สีเทา เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน (ภาพที่ 2.2.6.6จ) **ระยะที่ 6** เมื่ออาการรุนแรงแผลหลุดออกกลายเป็นรูขนาดใหญ่บนกิ่ง (ภาพที่ 2.2.6.6ฉ) **ระยะที่ 4 - ระยะที่ 6** พบเชื้อรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์แบบ pycnidiospore ในส่วนขยายพันธุ์ที่เรียกว่า pycnidia เช่นกัน จากการศึกษาครั้งนี้ลักษณะอาการระยะที่ 1 มีลักษณะอาการจุดขาว มีจุดแดงตรงกลาง และในระยะที่ 6 ในส่วนของเนื่อเยื่อที่ตายแล้วอาจพบรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์ที่เรียกว่า arthroconidia (ภาพที่ 2.2.6.7ค และ ภาพที่ 2.2.6.7ง)

จากการศึกษาในอาการระยะที่ 1 แสดงอาการจุดเล็กๆ สีขาว มักจะพบแผลสเก็ดสีแดงตรงกลางจุดแผล ไม่พบเชื้อสาเหตุบนลำต้น แต่ พรพิมลและคณะ (2563) ศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจสอบรา *N. dimidiatum* โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อการวินิจฉัยโรคที่รวดเร็ว แม่นยำ พบว่าเมื่อนำเนื้อเยื่อลักษณะอาการระยะที่ 1 และ 2 มาศึกษาเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อรา *N. dimidiatum* จำนวน 2 คู่ ได้แก่ NdDOA-8F/NdDOA-6R และ NdDOA-7F/ITS4 ผลการศึกษาพบรา *N. dimidiatum* ในเนื้อเยื่อพืชในขณะที่ไม่พบเชื้อสาเหตุจากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อบรขนเนื้อเยื่อพืชและบนอาหารสังเคราะห์ การศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจสอบรา *N. dimidiatum* โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล สามารถยืนยันได้ว่า รา *N. dimidiatum*เข้าทำลายพืชตั้งแต่ระยะที่ 1 เชื้อเจริญเข้าไปในลำต้นแล้ว เพราะฉะนั้นถ้าเกษตรกรพบอาการลักษณะในระยะที่ 1 เกษตรกรจะต้องพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชทันทีเพื่อที่จะ

กรมวิชาการเกษตร

ยับยั้งไม่ให้อาการเจริญไปถึงระยะที่ 2 ซึ่งระยะ 2 เป็นแผลจากจุดขาวเปลี่ยนเป็นแดงหรือน้ำตาลและต่อมาเปลี่ยนเป็นสเก็ดสีน้ำตาลนูนขึ้น แต่ก็ยังไม่พบเชื้อสาเหตุ แต่ถ้าทิ้งไว้จนถึงระยะที่ 3 - ระยะที่ 6 นั้นราสร้างส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราสีดำอยู่ตรงกลาง และสร้างสปอร์แบบ pycnidiospore เชื้อจะแพร่กระจายอย่างรวดเร็วและการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราจะไม่สามารถกำจัดโรคได้ การศึกษาวงจรชีวิตของเชื้อนี้จะมีประโยชน์ในการป้องกันกำจัดโรคให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เมื่อทำการแยกเชื้อสาเหตุจากอาการระยะที่ 3 - ระยะที่ 6 บนอาหารสังเคราะห์ PDA พบรา *N. dimidiatum* สร้างโคโลนีบนอาหาร PDA เจริญเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่ออายุ 3 วัน โคโลนีเจริญเติบโตเร็ว เส้นใยฟูเจริญบนอาหาร โคโลนีสีเขียวมะกอกจนถึงสีเทาดำ สร้าง pigment สีเทาดำบนอาหารสังเคราะห์ PDA (ภาพที่ 2.2.6.7ก) ในขณะที่โคโลนีมีสีขาวจนถึงสีเขียวมะกอกบนอาหารสังเคราะห์ MEA (ภาพที่ 2.2.6.7ข) เส้นใยรวมกันเป็นก้อน เส้นใยเริ่มแรกมีสีอ่อนและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำและเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่ออายุมากขึ้น ราสร้างสปอร์เรียกว่า arthroconidia บนอาหารสังเคราะห์ PDA สีน้ำตาลดำ ปลายตัด ผนังหนา ขนาด 9.1 x 5.5 ไมครอน เส้นใยสีน้ำตาลแตกกิ่ง (ภาพที่ 2.2.6.7ค และ ภาพที่ 2.2.6.7ง) หรือสร้าง arthroconidia บนแผลเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว มีลักษณะคล้ายสเก็ด สีเทา เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน (6จ) หรือพบบนแผลหลุดออกกลายเป็นรูขนาดใหญ่บนกิ่ง (ภาพที่ 2.2.6.6ฉ)

การจำแนกชนิดราสาเหตุสอดคล้องกับ Chuang *et al*. (2012) และ Lin *et al*. (2015) ที่ศึกษารา *N. dimidiatum* ประเทศไต้หวัน Lan *et al*. (2012) Yi *et al*. (2013; 2015) Xu *et al*. (2018) ศึกษาราชนิดนี้ในประเทศจีน Masratul *et al*. (2013; 2015) ศึกษาราชนิดนี้ในประเทศมาเลเซีย และ Hieu *et al*. (2015) ศึกษาราชนิดนี้ในประเทศเวียดนาม รวมทั้ง Ezra *et al*. (2013) ศึกษาราชนิดนี้ในประเทศอิสราเอล (Ezra *et al*. 2013) และ Sanahuja *et al*. (2016) ศึกษาราชนิดนี้รัฐฟลอริดา สหรัฐอเมริกา

ภาพที่ 2.2.6.6: ลักษณะอาการโรคจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร เกิดจากรา *Neoscytalidium dimidiatum*
ก) ระยะที่ 1 อาการเริ่มแรก จุดเล็กๆ สีขาว
ข) ระยะที่ 2 จุดกลางแผลเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีเทา

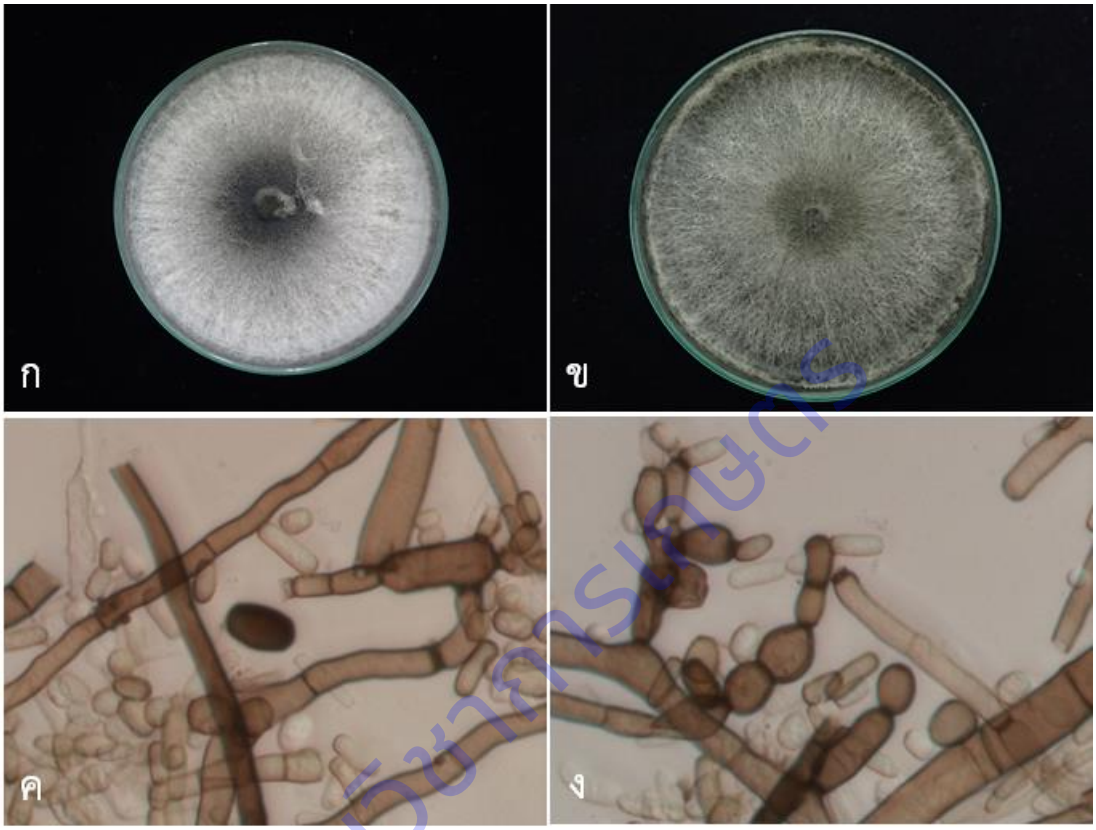
กรมวิชาการเกษตร

ค) ระยะที่ 3 แผลสเก็ดสีน้ำตาล แข็ง เชื้อสร้างส่วนขยายพันธุ์เรียกว่า pycnidia ฝังอยู่ภายในแผล

ง) ระยะที่ 4 แผลสีเหลืองเป็นวงเกิดล้อมรอบจุดแผลสเก็ดสีน้ำตาล

จ) ระยะที่ 5 แผลคล้ายสเก็ด สีเทา เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน

ฉ) ระยะที่ 6 แผลหลุดออกกลายเป็นรูขนาดใหญ่บนกิ่ง



ภาพที่ 2.2.6.7: รา *Neoscytalidium dimidiatum* บนอาหารสังเคราะห์อายุ 3 วัน

ก) โคโลนีบนอาหาร PDA ข) โคโลนีบนอาหาร MEA

ค-ง) ราสร้างสปอร์เรียกว่า arthroconidia บนอาหารสังเคราะห์ PDA

2. ศึกษาชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

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

2.1 การทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

กรมวิชาการเกษตร

ผลการศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* ไอโซเลต M 0328 (จากจังหวัดสกลนคร) ในห้องปฏิบัติการ พบว่า ราไอโซเลตนี้เจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA โดยเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซ็นติเมตร นาน 3 วัน รองลงมาได้แก่อาหาร CZA และ V-8 A โคโลนีของเชื้อมีเส้นผ่านศูนย์เท่ากับ 8.93 และ 8.92 เซ็นติเมตร ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2.2.6.3 และ ภาพที่ 2.2.6.8)

ผลการศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* ไอโซเลต M 0331 (จากจังหวัดอุทัยธานี) ในห้องปฏิบัติการ พบว่า ราไอโซเลตนี้เจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA MEA OMA และ CZA โดยเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 9 เซ็นติเมตร นาน 3 วัน รองลงมาได้แก่อาหาร V-8 A โดยมีเส้นผ่านศูนย์เท่ากับ 8.97 ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2.2.6.3 และ ภาพที่ 2.2.6.9)

ผลการศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* ไอโซเลต M 0354 (จากจังหวัดจันทบุรี) ในห้องปฏิบัติการ พบว่าราไอโซเลตนี้เจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA OMA V-8 A และ CZA โดยเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 9 เซ็นติเมตร นาน 3 วัน (ตารางที่ 2.2.6.3 และ ภาพที่ 2.2.6.10)

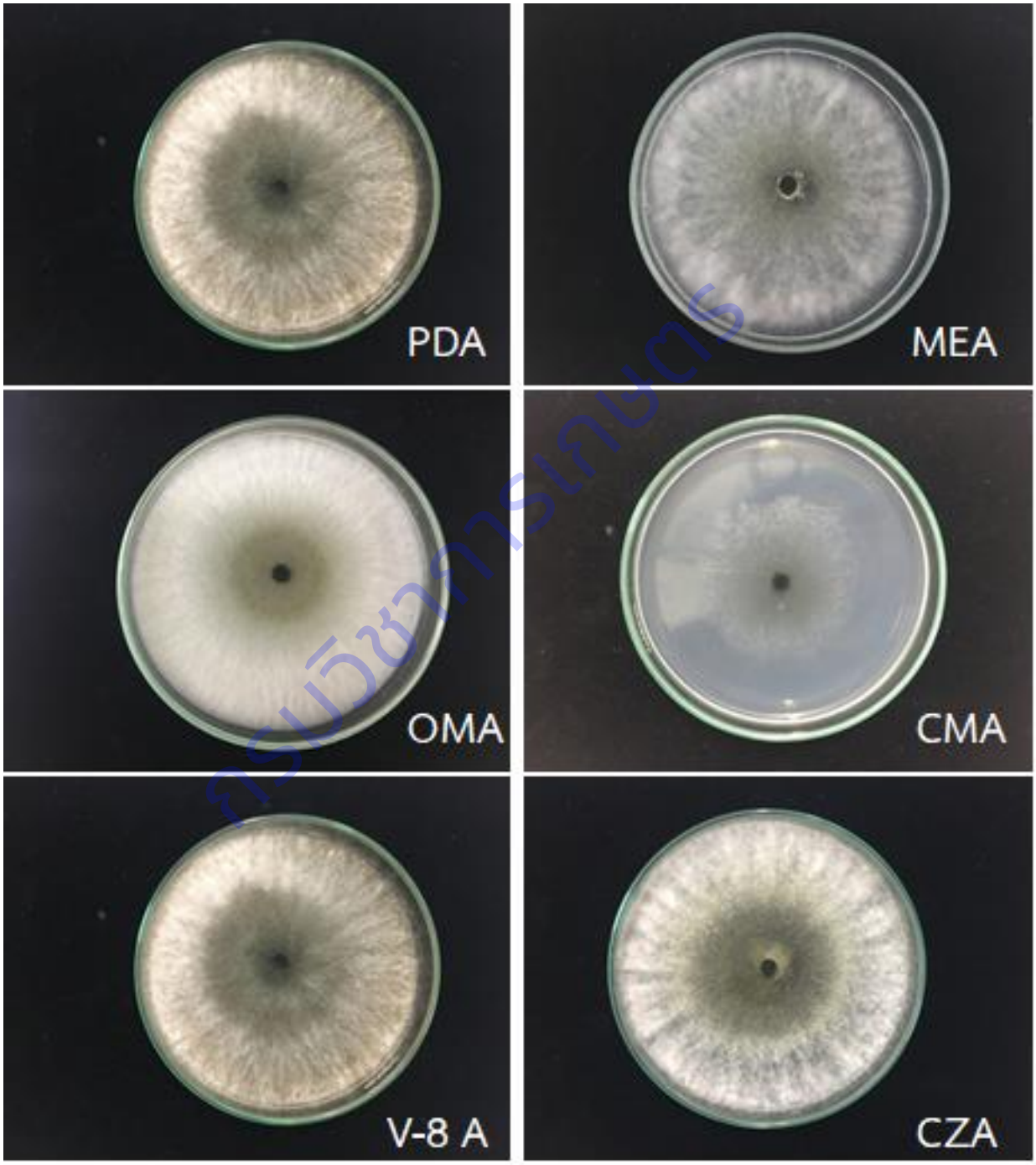
ผลการศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* ไอโซเลต M 0355 (จากจังหวัดนครราชสีมา) ในห้องปฏิบัติการ พบว่า ราไอโซเลตนี้เจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA โดยเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซ็นติเมตร นาน 3 วัน รองลงมาได้แก่อาหาร V-8 A OMA และ CZA โคโลนีของเชื้อมีเส้นผ่านศูนย์เท่ากับ 8.97 8.85 และ 8.80 เซ็นติเมตร ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2.2.6.3 และ ภาพที่ 2.2.6.11)

ตารางที่ 2.2.6.3: การเจริญเติบโตของโคโลนีของรา *Neoscytalidium dimidiatum* จำนวน 4 ไอโซเลต บนอาหาร 6 ชนิด นาน 3 วัน

อาหารเลี้ยงเชื้อรา	การเจริญเติบโตของโคโลนีของเชื้อรา *Neoscytalidium dimidiatum* บนอาหาร 6 ชนิด (เซ็นติเมตร)			
	M0328	M0331	M0354	M 0355
PDA	9.00 a	9.00 a	9.00 a	9.00 a
MEA	7.38 b	9.00 a	6.91 b	6.10 b
OMA	7.64 b	9.00 a	9.00 a	8.85 a
CMA	5.26 c	4.23 b	3.57 c	4.20 c
V-8 A	8.92 a	8.97 a	9.00 a	8.97 a
CZA	8.93 a	9.00 a	9.00 a	8.80 a
CV	17.99	21.88	26.49	25.24

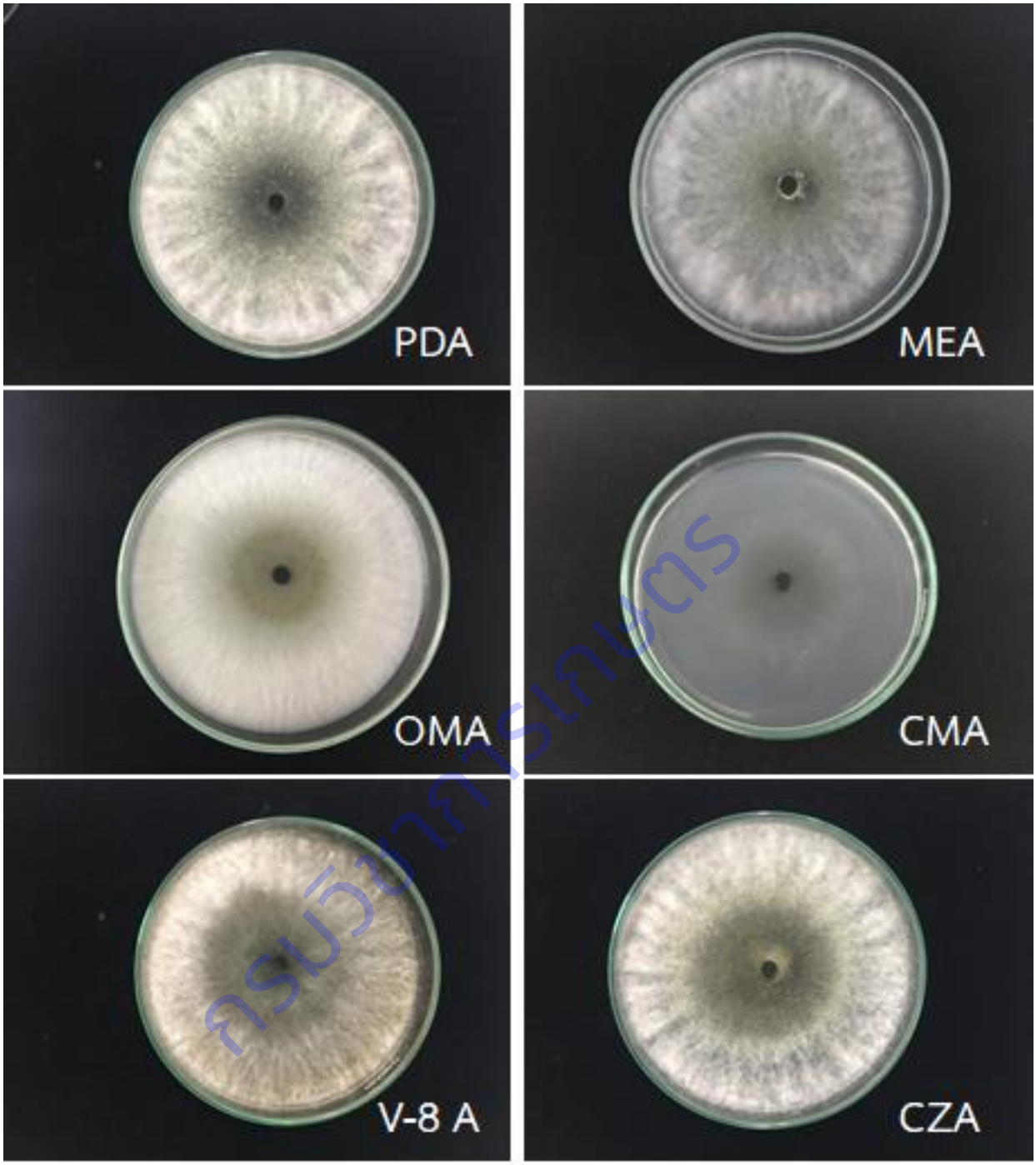
กรมวิชาการเกษตร

หมายเหตุ M 0328 แยกเชื้อรา *N. dimidiatum* จากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดสกลนคร
M 0331 แยกเชื้อรา *N. dimidiatum* จากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดอุทัยธานี
M 0354 แยกเชื้อรา *N. dimidiatum* จากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดจันทบุรี
M 0355 แยกเชื้อรา *N. dimidiatum* จากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดนครราชสีมา



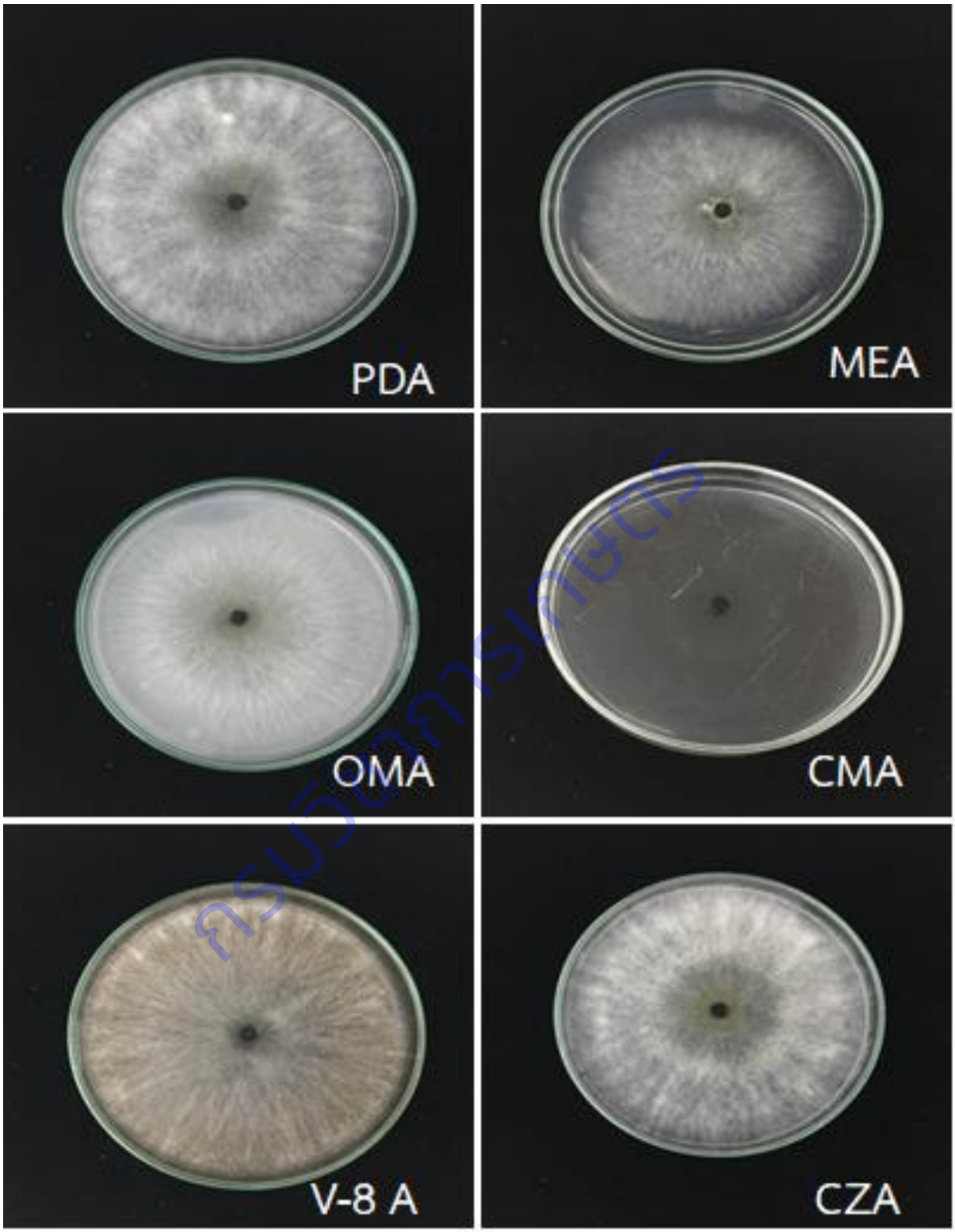
กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.2.6.8: การเจริญของโคโลนีของรา *Neoscytalidium dimidiatum* ไอโซเลต M 0328 แยกจากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จังหวัดสกลนคร บนอาหารชนิดต่างๆ นาน 3 วัน



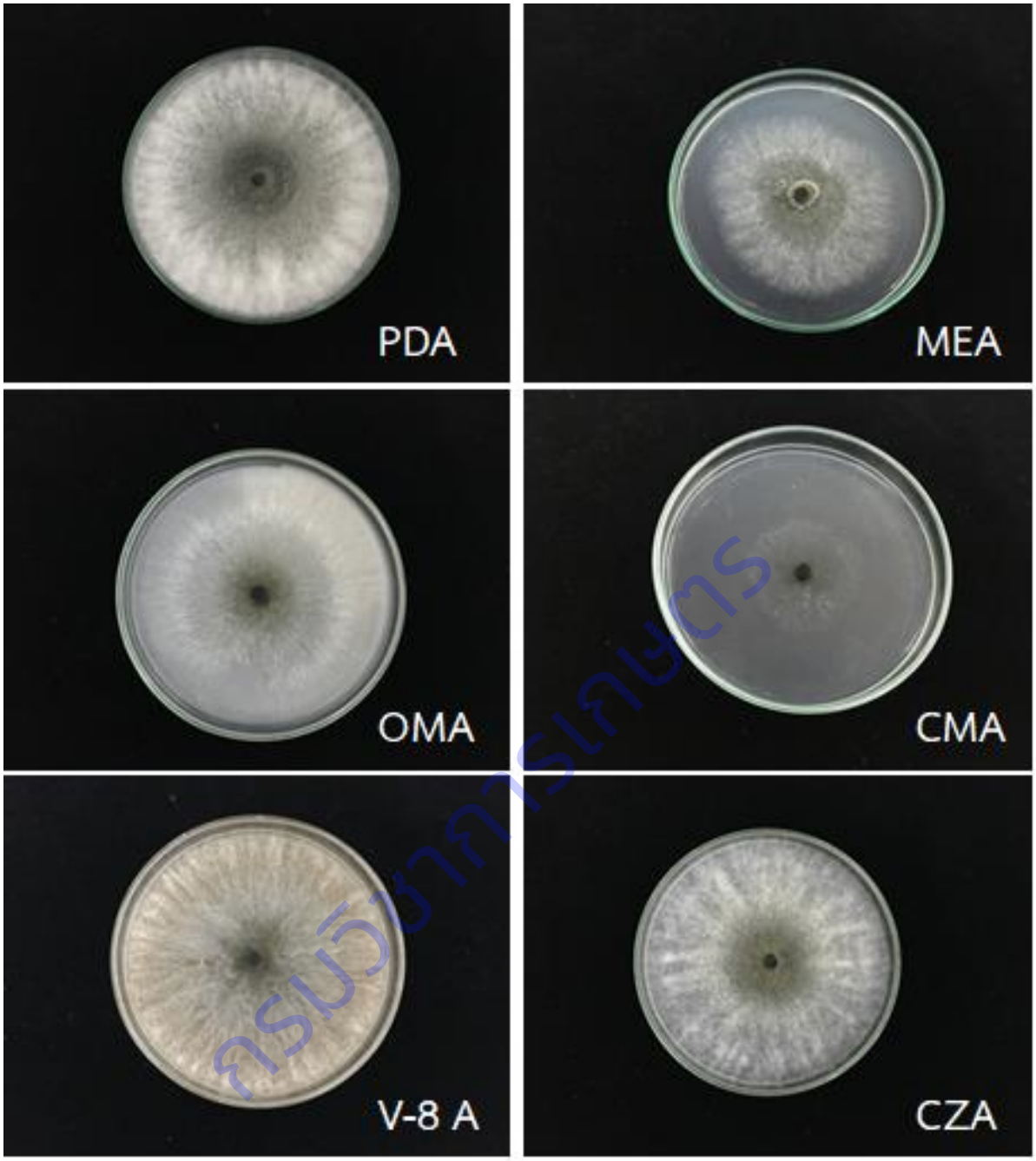
ภาพที่ 2.2.6.9: การเจริญของโคโลนีของรา *Neoscytalidium dimidiatum* ไอโซเลต M 0331 แยกจากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จากจังหวัดอุทัยธานี บนอาหารชนิดต่างๆ นาน 3 วัน

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2.2.6.10: การเจริญของโคโลนีของรา *Neoscytalidium dimidiatum* ไอโซเลต M 0354 แยกจากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จากจังหวัดจันทบุรี บนอาหารชนิดต่างๆ นาน 3 วัน

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2.2.6.11: การเจริญของโคโลนีของรา *Neoscytalidium dimidiatum* ไอโซเลต M 0355 แยกจากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จากจังหวัดจันทบุรี บนอาหารชนิดต่างๆ นาน 3 วัน

กรมวิชาการเกษตร

2.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

ศึกษาชนิดอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ M 0328 (จังหวัดสกลนคร) M 0331 (จังหวัดอุทัยธานี) M0354 (จังหวัดจันทบุรี) และ M 0355 (จังหวัดนครราชสีมา) บนอาหารสังเคราะห์ พบว่าเชื้อรา *N. dimidiatum* ไอโซเลต M 0328 เจริญได้ดีสุดที่อุณหภูมิ 25 30 35 องศาเซลเซียส เมื่ออายุ 5 วัน โคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.00 เซ็นติเมตร ทั้ง 3 อุณหภูมิ การเจริญของเชื้อราชนิดนี้เจริญในอุณหภูมิรองลงมาได้แก่ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ โคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.26 เซ็นติเมตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับการเจริญของเชื้อรา *N. dimidiatum* อุณหภูมิ 25 30 35 องศาเซลเซียส และเชื้อราเจริญได้น้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.08 เซ็นติเมตร และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกอุณหภูมิที่ทำการทดลอง (ตารางที่ 2.2.6.4 และ ภาพที่ 2.2.6.12)

รา *N. dimidiatum* ไอโซเลต M 0331 เจริญได้ดีสุดที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส โคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.00 เซ็นติเมตร ทั้ง 4 อุณหภูมิ เมื่ออายุ 3 วัน และเชื้อราเจริญได้น้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.03 เซ็นติเมตร และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกอุณหภูมิที่ทำการทดลอง (ตารางที่ 2.2.6.4 และ ภาพที่ 2.2.6.13)

รา *N. dimidiatum* ไอโซเลต M 0354 เจริญได้ดีสุดที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส โคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.00 เซ็นติเมตร ทั้ง 4 อุณหภูมิ เมื่ออายุ 3 วัน และเชื้อราเจริญได้น้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.03 เซ็นติเมตร และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกอุณหภูมิที่ทำการทดลอง (ตารางที่ 2.2.6.4 และ ภาพที่ 2.2.6.14)

รา *N. dimidiatum* ไอโซเลต M 0355 เจริญได้ดีสุดที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส โคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.00 เซ็นติเมตร ทั้ง 4 อุณหภูมิ เมื่ออายุ 3 วัน และเชื้อราเจริญได้น้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.22 เซ็นติเมตร และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกอุณหภูมิที่ทำการทดลอง (ตารางที่ 2.2.6.4 และ ภาพที่ 2.2.6.15)

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

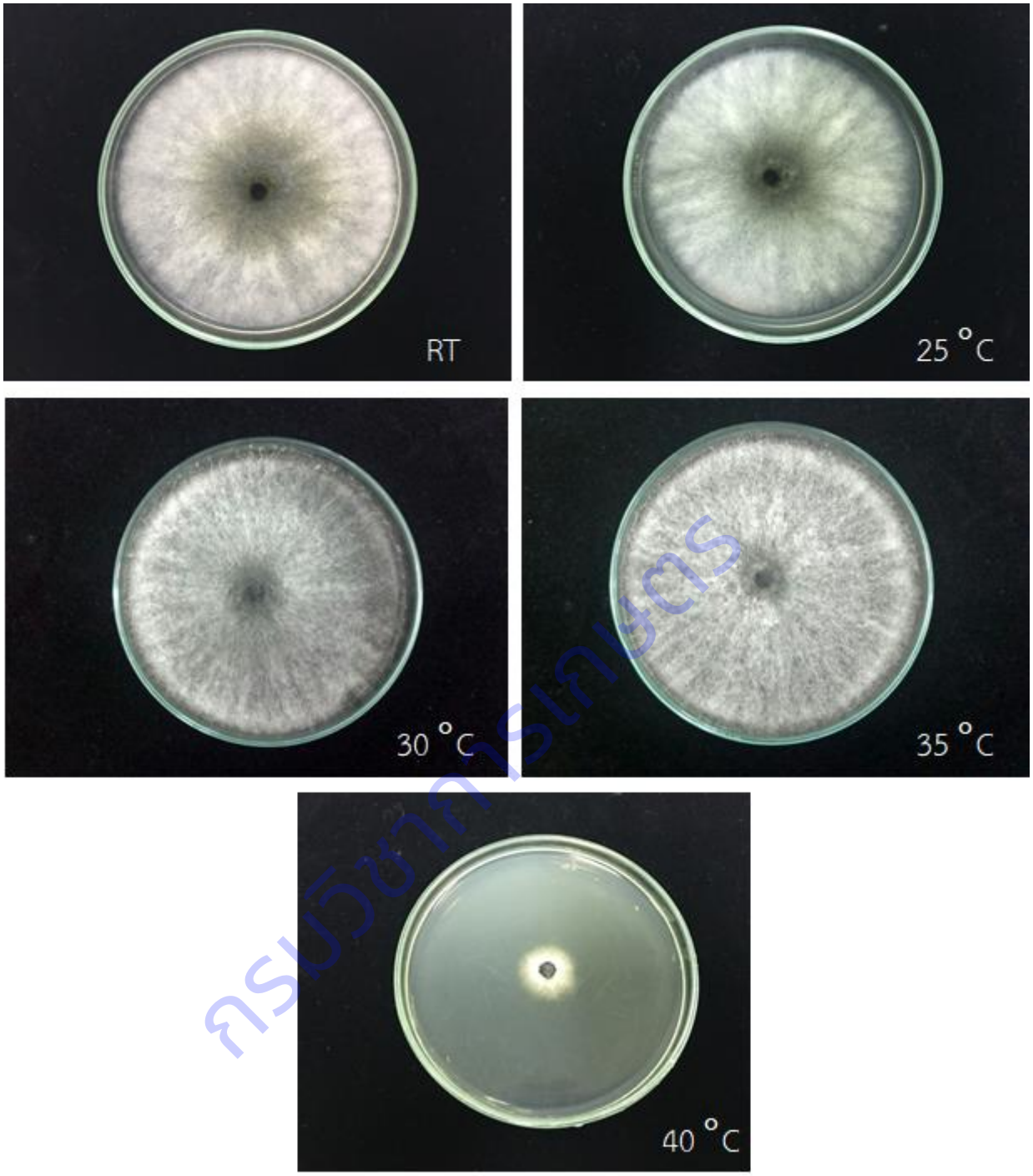
ศรีวิชัยการเกษตร

ตารางที่ 2.2.6.4 การเจริญเติบโตของโคโลนีของเชื้อรา *Neoscytalidium dimidiatum*. จำนวน 4 ไอโซเลต ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 3 วัน

อุณหภูมิ องศาเซลเซียส	**การเจริญเติบโตของโคโลนีของเชื้อรา *Neoscytalidium dimidiatum* บนอาหาร PDA (เซ็นติเมตร)**			
	M0328	**M0331**	**M0354**	**M 0355**
ห้องปฏิบัติการ	7.26 b	9.00 a	9.00 a	9.00 a
25	9.00 a	9.00 a	9.00 a	9.00 a
30	9.00 a	9.00 a	9.00 a	9.00 a
35	9.00 a	9.00 a	9.00 a	9.00 a
40	3.08 c	6.03 b	3.03 b	5.22 b
CV	32.85	14.60	30.84	19.58

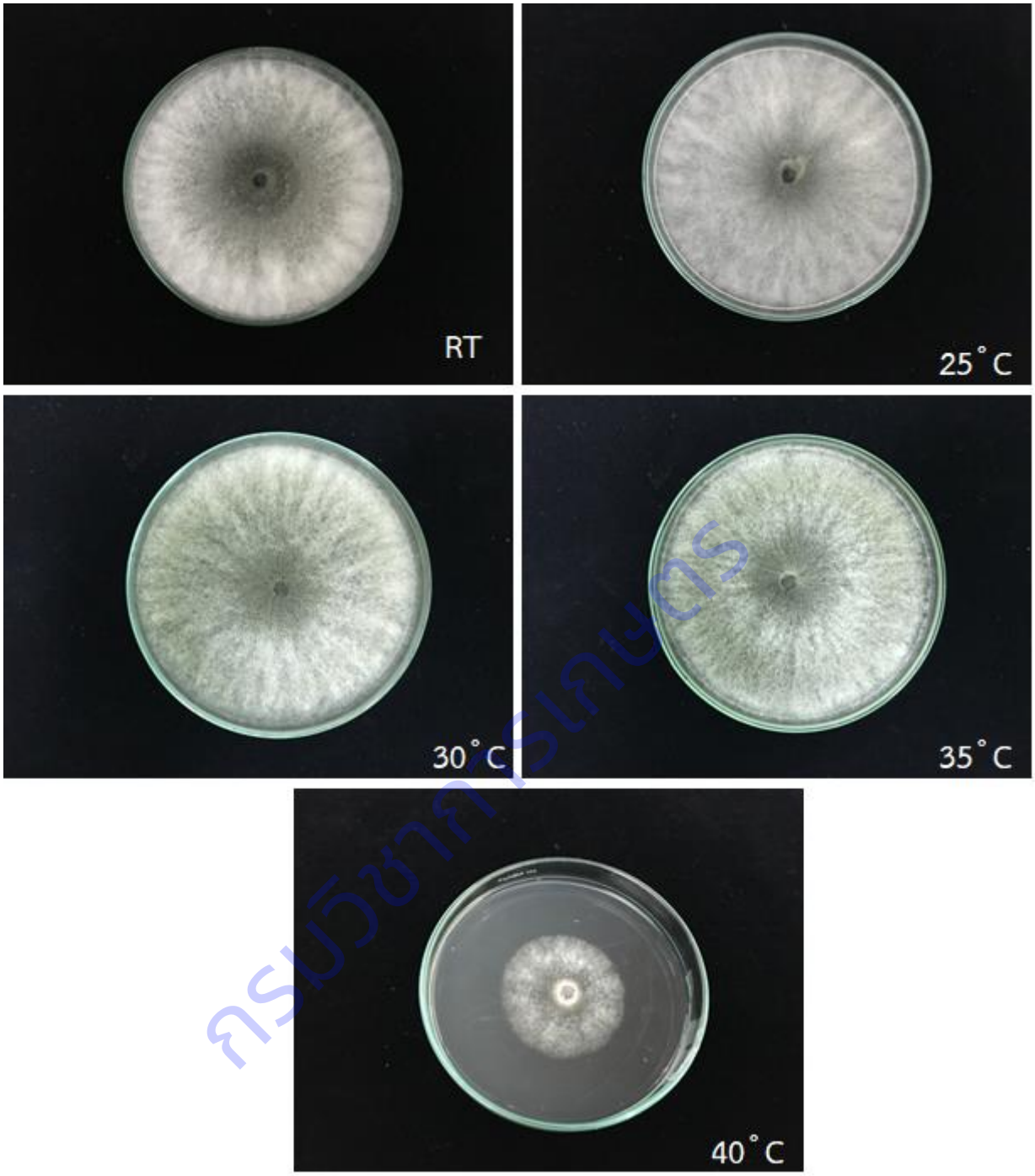
หมายเหตุ M 0328 แยกเชื้อรา *N. dimidiatum* จากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดสกลนคร
M 0331 แยกเชื้อรา *N. dimidiatum* จากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดอุทัยธานี
M 0354 แยกเชื้อรา *N. dimidiatum* จากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดจันทบุรี
M 0355 แยกเชื้อรา *N. dimidiatum* จากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดนครราชสีมา

กรมวิชาการเกษตร



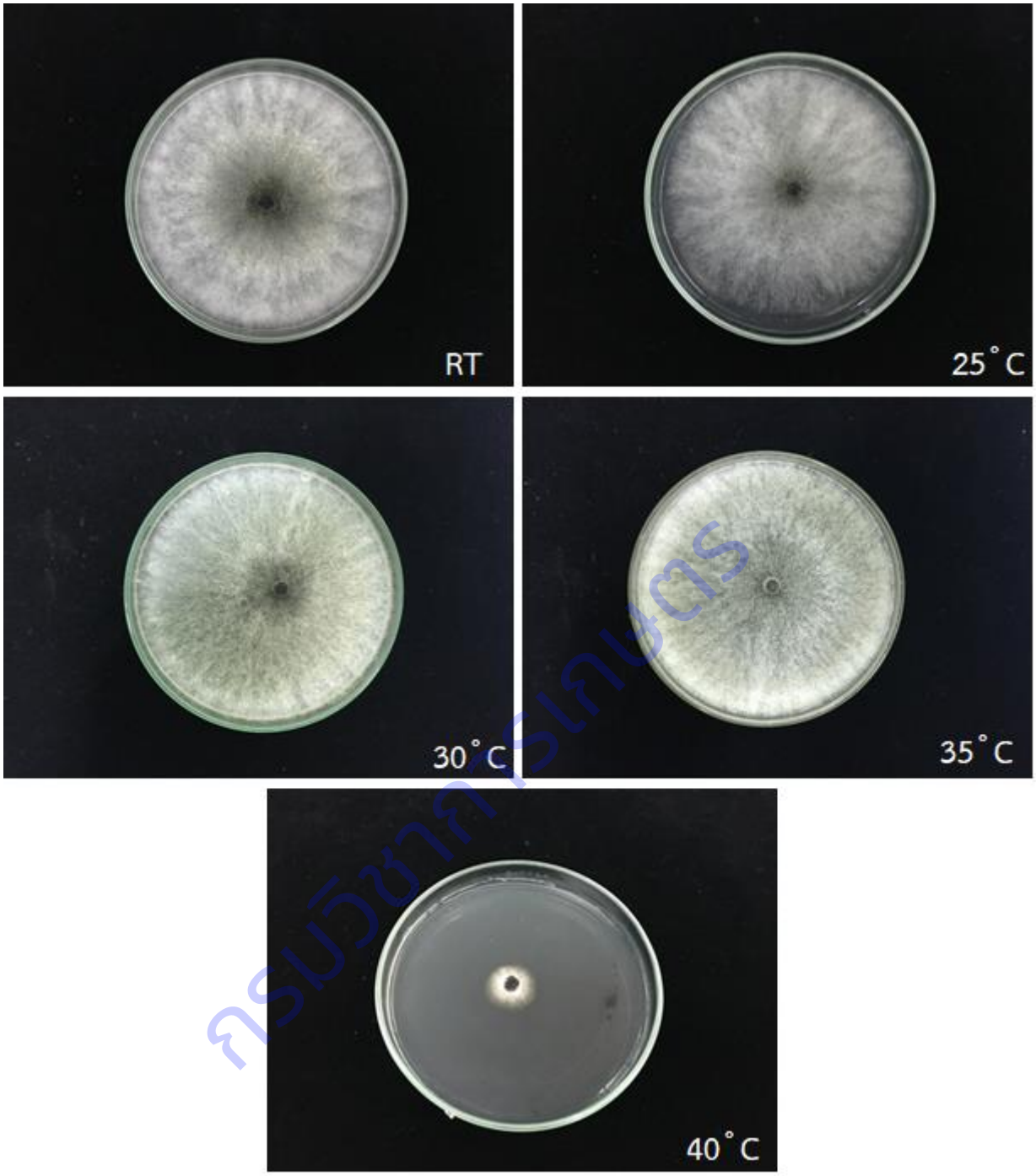
กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.2.6.12: การเจริญของโคโลนีของรา *Neoscytalidium dimidiatum* ไอโซเลต M 0328 แยกจากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จังหวัดสกลนคร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 3 วัน



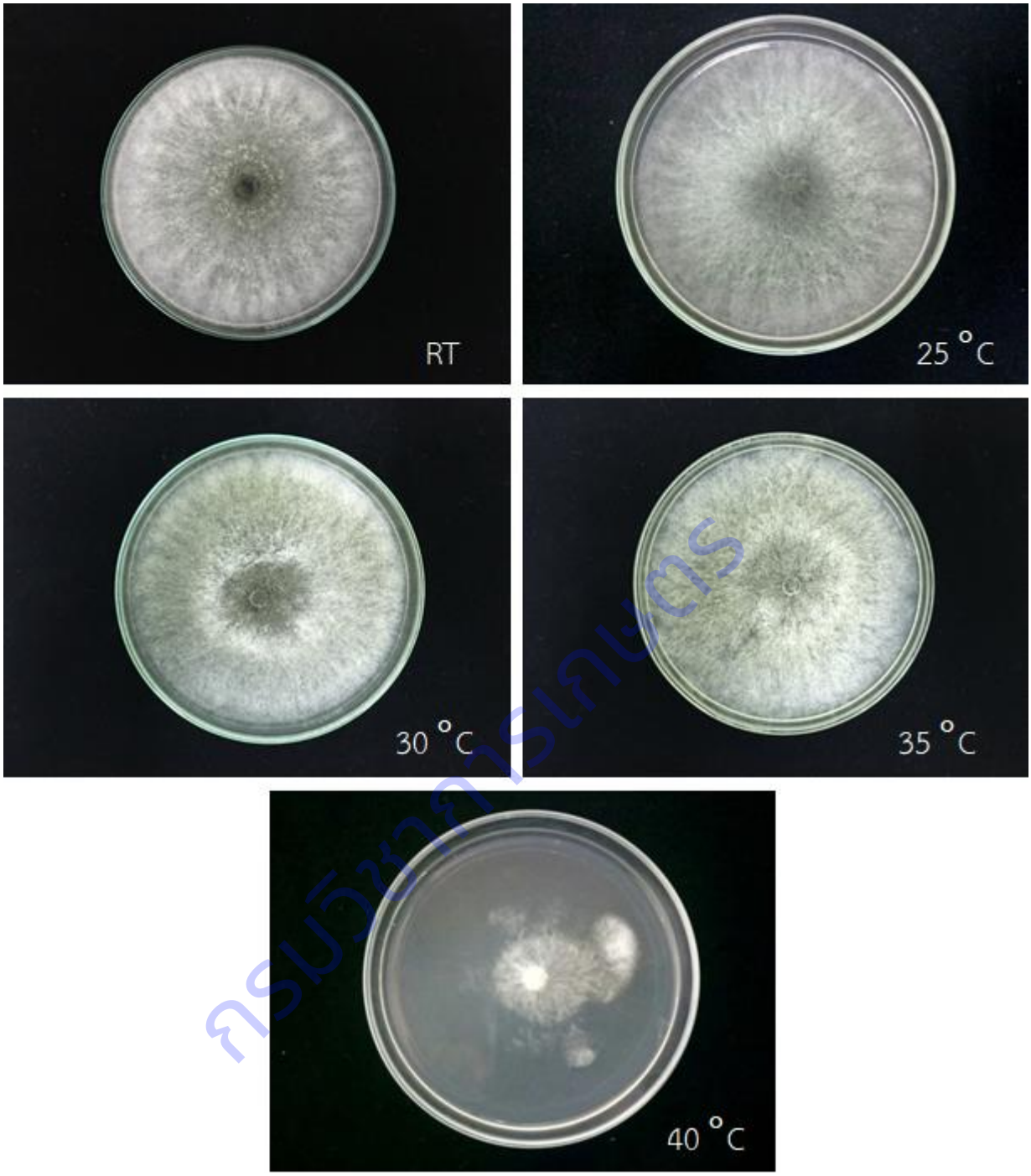
ภาพที่ 2.2.6.13: การเจริญของโคโลนีของเชื้อรา *Neoscytalidium dimidiatum* ไอโซเลต M0331 แยกจากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จังหวัดอุทัยธานี บ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 3 วัน

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2.2.6.14: การเจริญของโคโลนีของเชื้อรา *Neoscytalidium dimidiatum* ไอโซเลต M0354 แยกจากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จังหวัดจันทบุรี บ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 3 วัน

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2.2.6.15: การเจริญของโคโลนีของเชื้อรา *Neoscytalidium dimidiatum* ไอโซเลต M0355 แยกจากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จังหวัดนครราชสีมา บ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 3 วัน

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

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

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ข้อมูลชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Neoscytalidium dimidiatum* เพื่อเป็นข้อมูลในการหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสมของโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกรและเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญเพื่อประกอบการพิจารณาในการแก้ไขปัญหาการค้าระหว่างประเทศทั้งในด้านการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร

สามารถเผยแพร่งานวิจัยในรายงานประจำปีของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รวมถึงงานประชุมวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.2.7 การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาและชีวโมเลกุลของเชื้อ *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) ที่เข้าทำลายพริกในประเทศไทย

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

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นายภูวนารถ มณีโชติ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นางเกสศสุดา สนศิริ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาววาสนา รุ่งสว่าง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาววิจิตรา โชคบุญ	สำนักวิจัยและพัฒนาการการเกษตรเขตที่ 6

บทคัดย่อ

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

Abstract :

Pepper (*Capsicum annum*) is an important crop in Thailand. Pepper yellows disease caused by *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) is one of the most important plant viruses infecting pepper crop worldwide. The aims of this research are 1) biological characterization of PeVYV based on host responses against virus infection and 2) molecular characterization of *CP gene*. The 42 samples showing upward leaf curling, internodal shortening and interveinal yellowing were collected from fields in Bangkok, Kanchanaburi, Suphan Buri, Ayutthaya and Srisaket

กรมวิชาการเกษตร

Province. Seven samples were positive for PeVYV infected by RT-PCR. Symptoms on pepper induced by isolate BKK displayed upward leaf curling and interveinal yellowing at 20 days posted inoculation. By the complete of *CP gene* of three isolates namely, isolate BKK (Bangkok), SBR (Suphan Buri) and KBR (Kanchanaburi) were identified as *Pepper vein yellows virus*. The *CP gene* were 621 nucleotides which encoded 206 amino acid residues, shared 99.2% - 99.8% and 99% - 99.5% sequence identities, respectively. Neighbor joining phylogenetic tree of nucleotide and amino acid sequences clustered Thai isolates of PeVYV together and separate them from PeVYV isolates found in other countries.

คำนำ

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

เชื้อ PeVYV จัดอยู่ในแฟมิลี่ *Luteoviridae* จีนัส *Polerovirus* มีรายงานการพบในหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น (Yohana *et al.*, 1995) อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน ไทย (Knierim *et al.*, 2013) สหรัฐอเมริกา (Villanueva *et al.*, 2013: Alabi *et al.*, 2015) ซูดาน (Alfaro-Fernández *et al.*, 2014) จีน (Tan *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015) และออสเตรเลีย (Maina *et al.*, 2016) ต้นพริกที่ติดเชื้อ PeVYV ซึ่งอาการที่ปรากฏบนพริกจะมีความแตกต่างกันออกไป เช่น ลำต้นแคระแกรน ใบด่าง ใบเหลือง เส้นในใส เส้นใบเหลือง ใบหงิก ข้อปล้องสั้น และใบม้วนขึ้นคล้ายกับขาดธาตุแมกนีเซียม

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

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาคุณสมบัติด้านชีววิทยาในการตอบสนองของพริกต่อเชื้อไวรัส รวมทั้งด้านชีวโมเลกุลของเชื้อ PeVYV เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับเป็นองค์ความรู้เพื่อเผยแพร่สู่เกษตรกร และการจัดการโรคไวรัสในพริก

กรมวิชาการเกษตร

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพริกที่แสดงอาการโรคเส้นใบเหลือง

2. สารเคมี

- ชุดไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์สารพันธุกรรมเชื้อไวรัส
- ไนโตรเจนเหลว
- ชุดสกัด FavorPrep Plant Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen, Taiwan)
- One Step RT-PCR kit (Biotechrabbit, Germany)
- 100 bp DNA Ladder with 6X Loading Dye (Biotechrabbit, Germany)
- Agarose gel (SeaKem, USA)
- RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)
- 1X TAE Buffer

3. เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

- โกร่งบดตัวอย่างพืช
- เครื่องปั่นตกตะกอน Mini Spin (Eppendorf, USA)
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ Pipetman Kit (Gilson, France)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ Thermo cycler
- เครื่องแยกสารพันธุกรรม Wide Mini-Sub Cell GT Basic System (Biorad, USA)
- เครื่อง ChemiDoc Gel Imaging System (BioRad, USA)
- เครื่องผสมสาร Vortex mixer (Fisher Scientific, USA)
- หลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร
- หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มล. และ 2 มล.

- วิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการของโรค

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

2. การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากพืช

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

กรมวิชาการเกษตร

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

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

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

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

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

3. ไพรเมอร์และการสังเคราะห์ยีน *CP* บางส่วน (3′ end of *CP* gene) และยีน *CP*

1. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *CP* บางส่วนของไวรัส โดยใช้ไพรเมอร์ที่รายงานโดย Sharman *et al*. (2015) ซึ่งจะได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 370 คู่เบส

Forward primer Pol3870F : 5'- ATCACBTTCGGGCCGWSTYTWTCAGA -3'

Reverse primer AS3 : 5'- CACGCGTCIACCTATTTIGGRTTITG -3'

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *CP* โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PeVYV ของประเทศญี่ปุ่นในฐานข้อมูล GenBank (accession no. AB594828) ซึ่งจะได้ขนาด
ชิ้นดีเอ็นเอ 621 คู่เบส

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

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

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

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

กรมวิชาการเกษตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดังนี้

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

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

4. การโคลนยีน

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

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์และกรดอะมิโนโปรตีน CP

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

6. การศึกษาการตอบสนองของพืชอาศัยต่อเชื้อไวรัส

ศึกษาการตอบสนองและลักษณะอาการของเชื้อไวรัสในพริกขี้หนูสวน โดยนำเพลี้ยอ่อนที่ปราศจากเชื้อ PeVYV มาทำให้อดอาหารในจานเลี้ยงเชื้อสะอาดประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำเพลี้ยอ่อนที่อดอาหารมา

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ปล่อยลงบนต้นมันพริกที่มีเชื้อ PeVYV เพื่อให้ดูดกินน้ำเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเพลี้ยอ่อนมาปล่อยลงบนต้นพริกปกติที่ปราศจากเชื้อ PeVYV จำนวน 10 ตัวต่อต้น นาน 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการกำจัดเพลี้ยอ่อนโดยการพ่นสารเคมีกำจัดเพลี้ยอ่อน แล้วนำต้นพริกมาเก็บไว้ในกรงกันแมลง แล้วบันทึกผลโดยบันทึกระยะเวลาที่ต้นพืชทดสอบแสดงแสดงอาการของโรค บันทึกลักษณะอาการที่ปรากฏบนพืช และบันทึกภาพอาการที่ปรากฏ จากนั้นนำพืชทดสอบมาตรวจหาเชื้อ PeVYV ในต้นพริกด้วยเทคนิค One Step RT-PCR ตามวิธีการข้อ 3

เวลาที่ทำการทดลอง - ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง 1. แปลงปลูกพริกในจังหวัดกรุงเทพมหานคร สุพรรณบุรี กาญจนบุรี ศรีสะเกษ และพระนครศรีอยุธยา

2. ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

3. โรงเรือนพืชทดลอง กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

4. โรงเรือนเลี้ยงแมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ตัวอย่างพริกเป็นโรคเส้นใบเหลือง

ตัวอย่างพริกที่แสดงอาการอาการเนื้อใบเหลืองคล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร เส้นใบเขียว และใบเสียรูปทรง จากแปลงปลูกพริกในจังหวัดศรีสะเกษ จำนวน 30 ตัวอย่าง กาญจนบุรี จำนวน 3 ตัวอย่าง สุพรรณบุรี 2 ตัวอย่าง กรุงเทพมหานคร จำนวน 3 ตัวอย่าง และพระนครศรีอยุธยา จำนวน 4 ตัวอย่าง (ภาพที่ 2.2.7.1) รวมทั้งสิ้น 42 ตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค One Step RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *CP* บางส่วน (3' end of CP gene) ของเชื้อไวรัสในกลุ่ม *Polerovirus* ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสขนาด 370 คู่เบส (Sharman *et al.,* 2015) จากจังหวัดกาญจนบุรี 1 ตัวอย่าง สุพรรณบุรี 2 ตัวอย่าง และกรุงเทพมหานคร 3 ตัวอย่าง (ภาพที่ 2.2.7.2) ส่วนตัวอย่างพริกจากจังหวัดศรีสะเกษและพระนครศรีอยุธยาปรากฏว่าไม่พบตัวอย่างที่เป็นโรคเส้นใบเหลือง

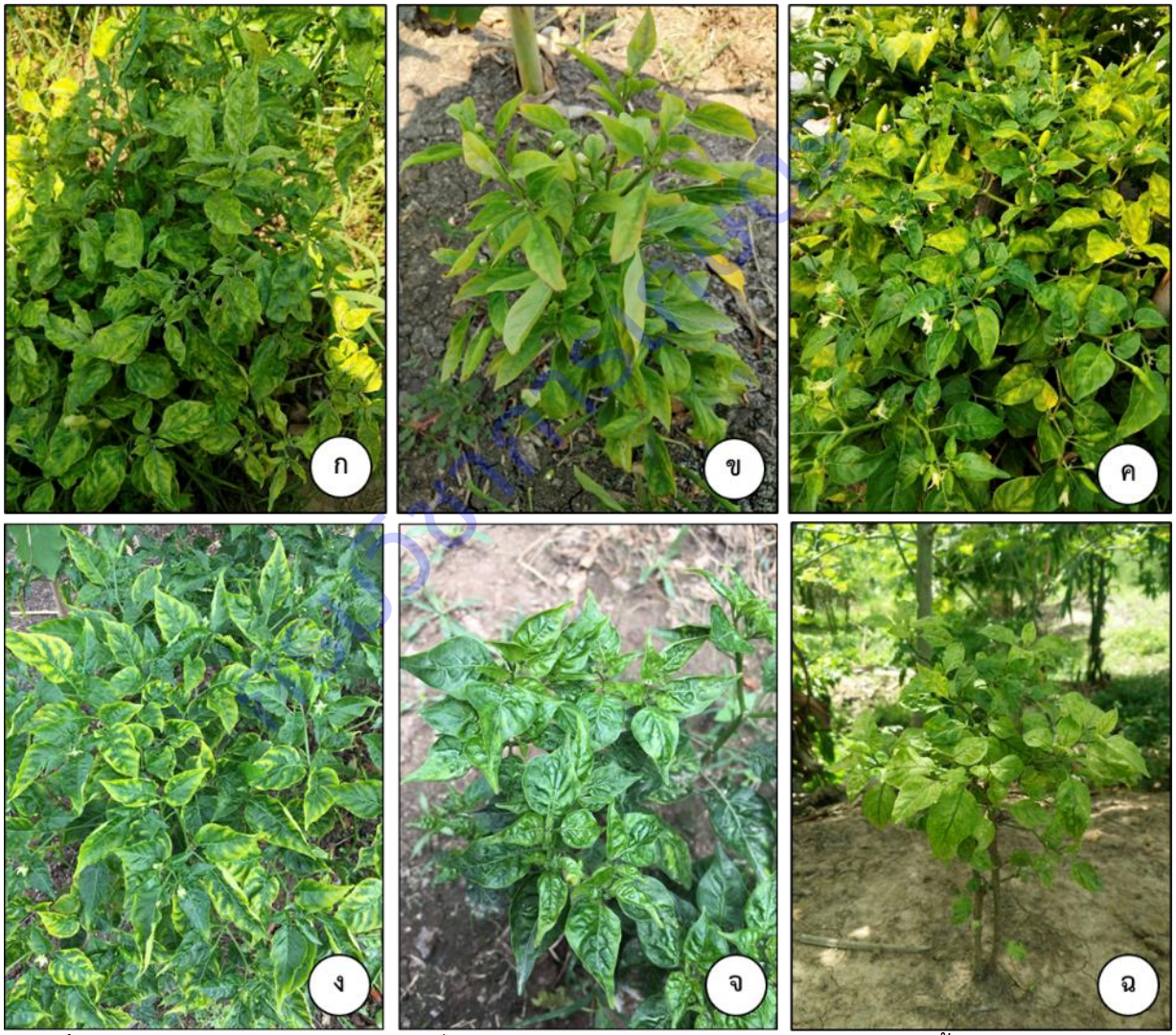
ลักษณะอาการของพริกที่ตรวจพบเชื้อ PeVYV ครั้งนี้พบว่ามีอาการเหมือนกับที่รายงานในต่างประเทศ เช่น อินเดีย อินโดนีเซี ฟิลิปปินส์ และไต้หวัน (Knierim *et al*., 2013) ถึงแม้ตัวอย่างพริกที่พบในจังหวัดพระนครศรีอยุธยาและศรีสะเกษจะมีอาการเหมือนกันแต่ไม่พบว่าเป็นโรคเส้นใบเหลือง เนื่องจากนี้ลักษณะอาการใบเหลืองพริกอาจเกิดจากการขาดธาตุอาหารหรือสามารถเกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอื่น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

2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *CP*

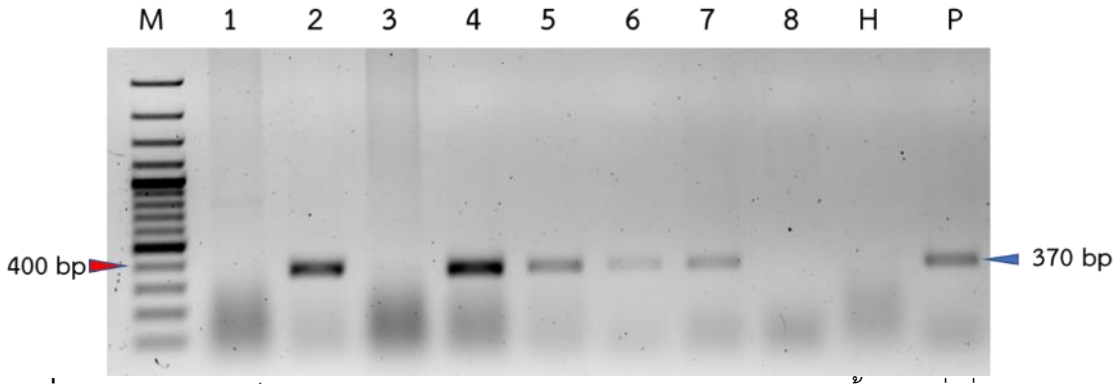
จากการทำวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *CP* (P3 ORF) ของเชื้อ PeVYVทั้ง 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร (BKK) ไอโซเลตกาญจนบุรี (KBR) และไอโซเลตสุพรรณบุรี (SBR) พบว่า ยีน *CP* ของทั้ง 3 ไอโซเลต มีขนาด 621 นิวคลิโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 206 เรซิดิวส์ คำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 22.94 - 22.97 กิโลดาลตัน

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

จากการทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลิโอไทด์ (ภาพที่ 2.2.7.3) และกรดอะมิโนของโปรตีน CP (ภาพที่ 2.2.7.4) พบว่าเชื้อ PeVYV ทั้ง 3 ไอโซเลตของไทยมีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 99.2% - 99.8% และ 99% - 99.5% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเชื้อ PeVYV ที่พบในต่างประเทศ เช่น ญี่ปุ่น อิสราเอล จีน ออสเตรเลีย สเปน มาเลเซีย และอินโดนีเซีย พบว่ามีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ระดับ 92.9% - 98.9% และกรดอะมิโนที่ระดับ 95.1% - 100% (ตารางผนวกที่ 2.2.7.1) และการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน *CP* พบว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตของไทยจับกลุ่มใกล้ชิดกันและแยกออกจากเชื้อไอโซเลตอื่นที่พบในต่างประเทศ (ภาพที่ 2.2.7.5) และยังพบว่าทั้ง 3 ไอโซเลตของไทยยังจับกลุ่มอยู่ร่วมกับไอโซเลตอื่น ๆ ที่พบในเอเชีย (Asian population) เช่นกับเดียวรายงานของ Liu *et al*. (2015)



ภาพที่ 2.2.7.1 ลักษณะอาการของพริกที่แสดงอาการใบเหลือง ใบเสียรูปทรง ใบม้วนงอขึ้น พบในแปลงปลูกพริก ก : กาญจนบุรี, ข : สุพรรณบุรี, ค : กรุงเทพมหานคร, ง-จ : พระนครศรีอยุธยา และ ฉ : ศรีสะเกษ



ภาพที่ 2.2.7.2 แถบดีเอ็นเอของยีน *CP* บางส่วน มีขนาด 370 คู่เบส (ลูกศรสีน้ำเงิน) ที่เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค One Step RT-PCR

M : 100 bp DNA ladder (Biotechrabbit, Germany)

1-3 : ตัวอย่างพริกในแปลงจังหวัดกาญจนบุรี

4 และ 8 : ตัวอย่างพริกในแปลงจังหวัดสุพรรณบุรี

5-7 : ตัวอย่างพริกที่พบในกรุงเทพมหานคร

H : พริกปกติ (Negative control)

P : ตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control)

กรมวิชาการเกษตร

```
KBR-CP      ATGAATACGGGAGGGGTTAGGAGAAATAATAATGGAAATGGTGGATCACGTAACACCCGC    60
PKR-P3      ATGAATACGGGAGGGGTTAGGAGAAATAATAATGGAAATGGTGGATCACGTAACACCCGC    60
SBR-CP      ATGAATACGGGAGGGGTTAGGAGAAATAATAATGGAAATGGTGGATCACGTAACACCCGC    60
            ************************************************************

KBR-CP      CGTCGTAGACGCCCACGACAGGTTCGCCCTGTCGTTGTGGTCGCACCCCCTGGGCGCACA   120
BKK-CP      CGTCGTAGACGCCCACGACAGGTTCGCCCTGTCGTTGTGGTCGCACCCCCTGGGCGCACA   120
SBR-CP      CGTCGTAGACGCCCACGACAGGTTCGCCCTGTCGTTGTGGTCGCACCCCCTGGGCGCACA   120
            ************************************************************

KBR-CP      CGGCGAGGAAATCGAAGACGACGAAATGGAGGCAGGAACCGAAGAAGCCGAAATAGAGTT   180
BKK-CP      CGGCGAGGAAATCGAAGACGACGAAATGGAGGCAGGAACCGAAGAAGCCGAAATAGAGTT   180
SBR-CP      CGGCGAGGAAATCGAAGACGACGAAATGGAGGCAGGAACCGAAGAAGCCGAAATAGAGTT   180
            ************************************************************

KBR-CP      GGAGGAAGGTCGAGCAACAGCGAAACTTTCATCTTCAACAAGGACTCAATCAAGGATAGT   240
BKK-CP      GGAGGAAGGTCGAGCAACAGCGAAACTTTCATCTTCAACAAGGACTCAATCAAGGATAGT   240
SBR-CP      GGAGGAAGGTCGAGCAACAGCGAAACTTTCATCTTCAACAAGGACTCAATCAAGGATAGT   240
            ************************************************************

KBR-CP      TCCTCAGGATCTGTCACCTTCGGGCCGAGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA   300
BKK-CP      TCCTCAGGATCTGTCACCTTCGGGCCGTGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA   300
SBR-CP      TCCTCAGGATCTGTCACCTTCGGGCCGAGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA   300
            *************************** ********************************

KBR-CP      GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGCTTCGTCAGTGAA   360
BKK-CP      GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGCTTCGTCAGTGAA   360
SBR-CP      GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGCTTCGTCAGTGAA   360
            ************************************************************

KBR-CP      TCCTCTTCCACAGCGGAGGGCTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCCACTGCAAGCTTACT   420
BKK-CP      TCCTCTTCCACAGCGGAGGGCTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCCACTGCAAGCTTACT   420
SBR-CP      TCCTCTTCCACAGCGGAGGGCTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCCACTGCAAGCTTACT   420
            ************************************************************

KBR-CP      AGTCTCCAATCCACCCTGCGCAAGTTCCCCGTCACCAAAGGCGGGCAAGCGACTTTTCGG   480
BKK-CP      AGTCTCCAATCCACCCTGCGCAAGTTCCCCGTCACCAAAGGCGGGCAAGCGACTTTTCGG   480
SBR-CP      AGTCTCCAATCCACCCTGCGCAAGTTCCCCGTCACCAAAGGCGGGCAAGCGACTTTTCGG   480
            ************************************************************

KBR-CP      GCTTCGCAGATTAACGGGGTAGAGTGGCATGATACATCCGAAGATCAATTTAGGCTGCTC   540
BKK-CP      GCTTCGCAGATTAACGGGGTAGAGTGGCATGATACATCCGAAGATCAATTTAGGCTGCTC   540
SBR-CP      GCTTCGCAGATTAACGGGGTAGAGTGGCATGATACATCCGAAGATCAATTTAGGCTGCTC   540
            ************************************************************

KBR-CP      TACAGAGGCAACGGGACAAAGAACGTTGCTGCCGGTTTCTTTCAGATCCGGTTTACTGTG   600
BKK-CP      TACAAAGGCAACGGGACGAAGAACGTTGCCGCCGGTTTCTTTCAGATCCGGTTTtACTGTG   600
SBR-CP      TACAAAGGCAACGGGACGAAGAACGTTGCCGCCGGTTTtCTTTtCAGATCCGGTTTtACTGTG   600
            **** ************ *********** ******************************

KBR-CP      CAACTGCACAACCCCAAATGA   621
BKK-CP      CAaTTGCACAACCCCAAATGA   621
SBR-CP      CAATTGCACAACCCCAAATGA   621
            *** *****************
```

ภาพที่ 2.2.7.3 การวิเคราะห์ แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP ของเชื้อ PeVYV ของทั้ง 3 ไอโซเลต

KBR: ไอโซเลตกาญจนบุรี

BKK: ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร

SBR: ไอโซเลตสระบุรี

(*) ระบุนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร

```
KBR-CP      MNTGGVRRNNNGNGGSRNTRRRRRPRQVRPVVVVAPPGRTRRGNRRRRNGGRNRRSRNRV    60
BKK-CP      MNTGGVRRNNNGNGGSRNTRRRRRPRQVRPVVVVAPPGRTRRGNRRRRNGGRNRRSRNRV    60
SBR-CP      MNTGGVRRNNNGNGGSRNTRRRRRPRQVRPVVVVAPPGRTRRGNRRRRNGGRNRRSRNRV    60
            ************************************************************

KBR-CP      GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFGPCLSESVALSGGVLKAYHEYKITMVNIRFVSE   120
BKK-CP      GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFGPSLSESVALSGGVLKAYHEYKITMVNIRFVSE   120
SBR-CP      GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFGPSLSESVALSGGVLKAYHEYKITMVNIRFVSE   120
            ***************************** ******************************

KBR-CP      SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTSEDQFRLL   180
BKK-CP      SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTSEDQFRLL   180
SBR-CP      SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTSEDQFRLL   180
            ************************************************************

KBR-CP      YKGNGTKNVAAGFFQIRFTVQLHNPK   206
BKK-CP      YRGNGTKNVAAGFFQIRFTVQLHNPK   206
SBR-CP      YKGNGTKNVAAGFFQIRFTVQLHNPK   206
            * ************************
```

ภาพที่ 2.2.7.4 การวิเคราะห์ แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ด้วยลำดับกรดอะมิโนของยีน CP ของเชื้อ PeVYV ของทั้ง 3 ไอโซเลต

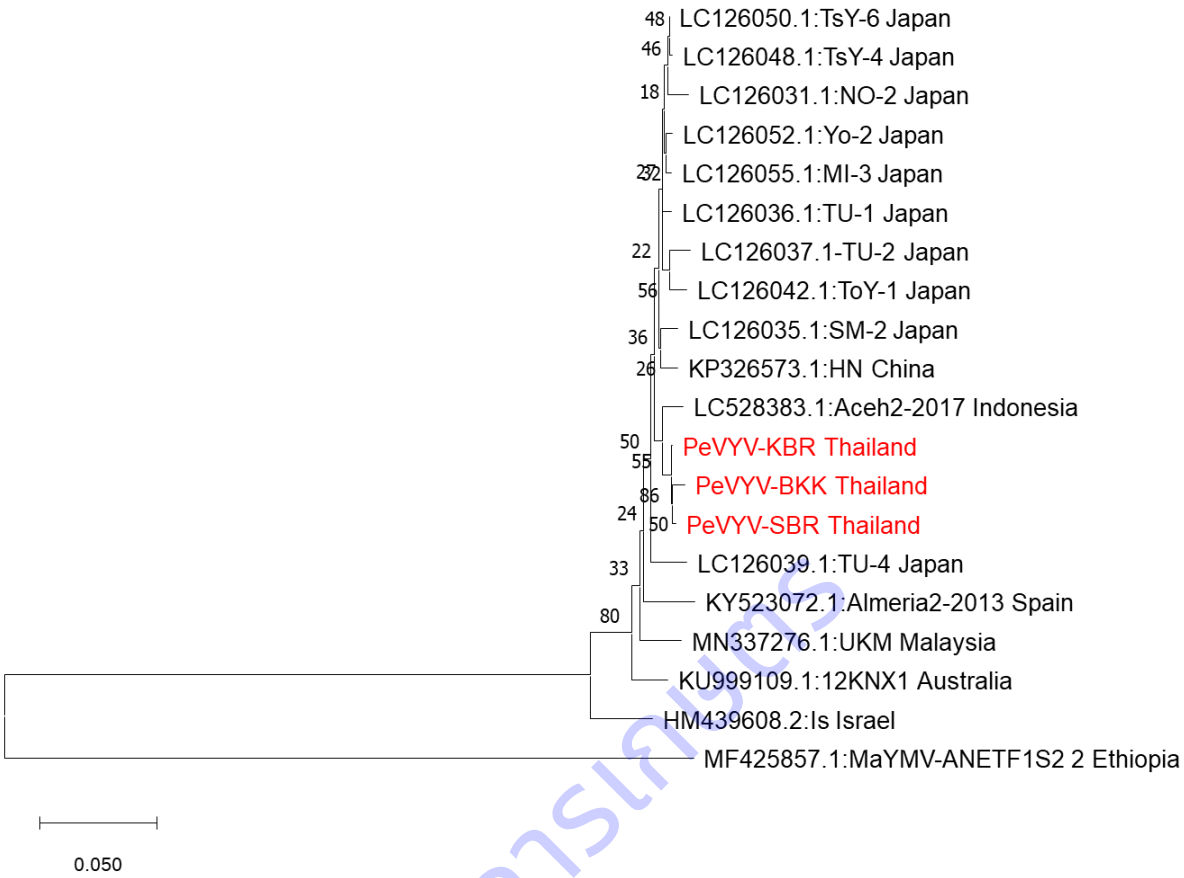
KBR: ไอโซเลตกาญจนบุรี

BKK: ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร

SBR: ไอโซเลตสระบุรี

(*) ระบุนิวคลิโอไทด์ที่เหมือนกัน

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2.2.7 .5 Neighbor-joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน *CP* แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Pepper vein yellows virus* ที่แยกได้จากพริกในประเทศไทย (อักษรสีแดง) กับไอโซเลตอื่น ๆ ในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA X และใช้ค่า bootstrap จาก 1,000 replications และใช้ข้อมูลของเชื้อ *Maize yellow mosaic virus* (MaYMV) ไอโซเลต ANETF1S2_2 ของประเทศเอธิโอเปียเป็น outgroup

กรมวิชาการเกษตร

3. การตอบสนองของพริกต่อเชื้อ PeVYV

การตอบสนองของพริกขี้หนูสวน (*Capsicum annuum*) ต่อเชื้อ PeVYV โดยนำเพลี้ยอ่อนที่ปลอดเชื้อไวรัสไปปล่อยบนต้นพริกที่เป็นโรคนาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 48 ชั่วโมงแล้ว จึงนำมาปล่อยบนต้นพริกปกติ นาน 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วสังเกตอาการบนพืชทดสอบ พบว่าต้นพริกเริ่มแสดงอาการเหลืองหลังจากที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อแล้ว 14 วัน และพัฒนาอาการของโรคจนเห็นอาการใบเหลืองชัดเจนหลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อแล้ว 20 วัน (ภาพที่ 2.2.7.6)

ภาพที่ 2.2.7.6 ต้นพริกที่ได้รับการปลูกเชื้อโดยเพลี้ยอ่อนที่ 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ต้นพริกแสดงอาการใบเหลืองในส่วนของเนื้อใบอย่างชัดเจนหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 20 วัน

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

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

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำข้อมูลของโรคที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปเผยแพร่แก่เกษตรกรในแง่ของคำแนะนำการป้องกันกำจัดโรคและแมลงพาหะ

2. สามารถถ่ายทอดเป็นองค์ความรู้เกี่ยวกับโรค เชื้อสาเหตุ และแมลงพาหะให้แก่ผู้ที่สนใจ เช่น นักวิจัย นิสิต นักศึกษา และบริษัทเอกชนผู้ผลิตพริก

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.2.8 การจำแนกชนิดเชื้อ *Crinivirus* ของพืชตระกูลแตงในประเทศไทย

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

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นายภูวนารถ มณีโชติ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นางสุนัดดา เชาวลิต	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาววาสนา รุ่งสว่าง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาววิจิตรา โชคบุญ	สำนักวิจัยและพัฒนาการการเกษตรเขตที่ 6

บทคัดย่อ

พืชตระกูลแตงเป็นพืชที่นิยมชนิดหนึ่งของประเทศไทยเพื่อใช้บริโภคและผลิตเมล็ดพันธุ์ โรคเส้นใบเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) และ *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) ไวรัสในสกุล *Crinivirus* เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ก่อความเสียหายต่อผลผลิตพริกในหลายประเทศ การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อ *Crinivirus* ที่เข้าติดเชื้อในพืชตระกูลแตง ในช่วงเดือนตุลาคม 2561 - กันยายน 2563 ได้เก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตง ได้แก่ แตงกวา ฟักทอง มะระจีน และตำลึง ที่แสดงอาการเนื้อใบเหลือง ใบด่างและลำต้นแคระแกร็นในจังหวัดกรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม เชียงราย เชียงใหม่ จันทบุรี สระแก้ว และศรีสะเกษ จำนวน 110 ตัวอย่าง มาตรวจสอบหาเชื้อ *Crinivirus* ด้วยเทคนิค One step RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณอนุรักษ์ของยีน RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ของไวรัสในกลุ่ม *Crinivirus* ผลการตรวจด้วย เทคนิค One step RT-PCR ปรากฏว่าตรวจไม่เชื้อ *Crinivirus* จากตัวอย่างพืชตระกูลแตงทั้งหมดที่เก็บมาตรวจครั้งนี้

Abstract

cucurbit plants are the most important vegetable crop in Thailand for domestic consumption and seed production. The criniviruses including *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) and *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) are the plant virus that caused yellowing symptoms and caused in high yield losses for cucurbit production. The aim of this research is to be identification of the criniviruses infected cucurbits based on biological and molecular characterization. During October 2019 – September 2020, the 137 samples of cucurbit plants including cucumber, pumpkin, Field pumpkin, bitter gourd, luffa and ivy gourd showing severe yellowing, chlorotic mottling, interveinal yellowing symptoms and stunting were collected from fields in Bangkok, Kanchanaburi, Suphan Buri, Nakhon Pathom, Chiang Rai, Chiang Mai, Chanthaburi, Sakaeo and Srisaket Province. Total RNAs of all samples were extracted and tested for *Crinivirus* infection by One step RT-PCR using universal primers which

กรมวิชาการเกษตร

specific to conserved region on RNA-dependent RNA polymerase gene (RdRp) of criniviruses. By the RT-PCR result, criniviruses were not detected in all samples.

คำนำ

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

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชตระกูลแตงที่แสดงอาการโรคไวรัส
2. สารเคมี

- ชุดไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์สารพันธุกรรมเชื้อไวรัส
- ไนโตรเจนเหลว
- ชุดสกัด FavorPrep Plant Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen, Taiwan)
- One Step RT-PCR kit (Biotechrabbit, Germany)
- 100 bp DNA Ladder with 6X Loading Dye (Biotechrabbit, Germany)
- Agarose gel (SeaKem, USA)
- RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)

กรมวิชาการเกษตร

- 1X TAE Buffer

3. เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

- โกร่งบดตัวอย่างพืช
- เครื่องปั่นตกตะกอน Mini Spin (Eppendorf, USA)
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ Pipetman Kit (Gilson, France)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ Thermo cycler
- เครื่องแยกสารพันธุกรรม Wide Mini-Sub Cell GT Basic System (Biorad, USA)
- เครื่อง ChemiDoc Gel Imaging System (BioRad, USA)
- เครื่องผสมสาร Vortex mixer (Fisher Scientific, USA)
- หลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร
- หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มล. และ 2 มล.

- วิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตงที่แสดงอาการของโรค

สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตงที่มีลักษณะอาการใบด่าง ใบเหลือง เส้นใบใส และเสียรูป จากแหล่งปลูกต่างๆ ได้แก่ จังหวัดกรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม เชียงราย เชียงใหม่ จันทบุรี สระแก้ว และศรีสะเกษ โดยการสำรวจ ในพื้นที่ประมาณ 2 ไร่ ทำการสำรวจทุกแถวปลูก ในกรณีที่พื้นที่สำรวจมีพื้นที่มากกว่า 2 ไร่ขึ้นไป จะทำการสุ่มสำรวจโดยสำรวจแถวเว้นแถว พร้อมทั้งถ่ายภาพในแปลงปลูก ลักษณะอาการที่พบในแปลงปลูกและบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์

2. การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากพืช

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

1. 1. ชั่งใบพืชตระกูลแตงแต่ละตัวอย่างให้มีปริมาณ 100 มิลลิกรัม แล้วบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วย้ายมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมบัพเฟอร์ FARB ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และเติม Mercaptoethanol ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

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

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

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

ศรีวิชัยการเกษตร

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

3. ไพรเมอร์และการสังเคราะห์ยีน *CP* บางส่วน (3′ end of *CP* gene) และยีน *CP*

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

Forward primer	CriniRdRp251F	5'- TNGGNAARGGNGARAG -3'
Reverse primer	CriniRdRp995R	5'- GTRTTNGAYAACCAHGTRTTHG -3'

เมื่อมีตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับ universal primers ก็จะนำมาตรวจหาชนิดของไวรัสด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ CYSDV หรือ CCYV โดยจะเพิ่มปริมาณส่วนของยีน Hsp70h บน RNA2 ดังนี้

<u>เชื้อ CYSDV ได้ขนาดดีเอ็นเอ 749 คู่เบส (Abrahamian *et al*., 2013)</u>

Forward primer	CY-HSPF	5'- AATCAGTTTGTGACAGTCTAGG -3'
Feverse primer	CY-HSPR	5'- GGTTTCTTCTCGCACTCCA -3'

<u>เชื้อ CCYV ได้ขนาดดีเอ็นเอ 462 คู่เบส (Okuda *et al*., 2010)</u>

Forward primer	CY-HSPF	5'- AATCAGTTTGTGACAGTCTAGG -3'
Reverse primer	CY-HSPR	5'- GGTTTCTTCTCGCACTCCA -3'

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

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

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดังนี้

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

กรมวิชาการเกษตร

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

4. การโคลนยีน

แยกดีเอ็นเอผลผลิตออกจากเจลโดยใช้ชุดสำเร็จรูป FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit (Favorgen, Taiwan) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต ตรวจสอบขนาดและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis เชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับ พลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega, USA) โดยเติมดีเอ็นเอ 150 นาโนกรัม, T4 DNA ligase buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, pGEM-T easy vector 50 นาโนกรัม และ T4 DNA ligase 3 Units รวมปริมาตรสาร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C นานข้ามคืน นำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ JM109ด้วยวิธี heat shock transformation คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอไวรัส ด้วยวิธี blue-white selection แล้วตรวจสอบโคลนของพลาสมิดสายผสมที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยนำเซลล์แบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีขาวจำนวน 10 โคโลนีและสีฟ้า 1 โคโลนี มาผสมน้ำปริมาตร 8 ไมโครลิตรใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบแล้วตรวจสอบยีนที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Crinivirus*

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์และกรดอะมิโนโปรตีน CP

วิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR มาจำแนกยีนด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (http://www.ncbi. nlm.nih.gov/Blast) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลิโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อ *Crinivirus* ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมจากข้อมูลยีนโปรตีนด้วยโปรแกรม Clustal Omega จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของ *Crinivirus* ไอโซเลตต่าง ๆ จากการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA X (Kumar *et al*., 2018)

6. การศึกษาการตอบสนองของพืชอาศัยต่อเชื้อไวรัส

ศึกษาลักษณะอาการของเชื้อไวรัสบนพืชอาศัยต่าง ๆ ได้แก่ แตงกวา แตงโม เมลอน ซุกินี่ และฟักทอง เป็นต้น โดยนำแมลงหวี่ขาวที่ปราศจากเชื้อไวรัสมาปล่อยลงบนต้นพืชที่มีเชื้อ *Crinivirus* เพื่อให้ดูดกินน้ำเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายแมลงหวี่ขาวมาปล่อยลงบนต้นพืชปกติที่ปราศจากเชื้อไวรัส จำนวน 10 ตัวต่อต้น นาน 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการกำจัดแมลงหวี่ขาวโดยการพ่นสารเคมีกำจัดแมลงหวี่ขาวแล้วนำต้นพืชมาเก็บไว้ในกรงกันแมลง

การบันทึกผลโดยบันทึกระยะเวลาที่ต้นพืชทดสอบแสดงแสดงอาการของโรค บันทึกลักษณะอาการที่ปรากฏบนพืช และบันทึกภาพอาการที่ปรากฏ จากนั้นนำพืชทอดสอบมาตรวจหาเชื้อ *Crinivirus* ในต้นพืชด้วยเทคนิค One Step RT-PCR ตามวิธีการข้อ 3

เวลาที่ทำการทดลอง - ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง 1. แปลงปลูกแตงกวาและพืชตระกูลแตงในจังหวัดกรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี สุพรรณบุรี เชียงราย เชียงใหม่ สระแก้ว และศรีสะเกษ

2. ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

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

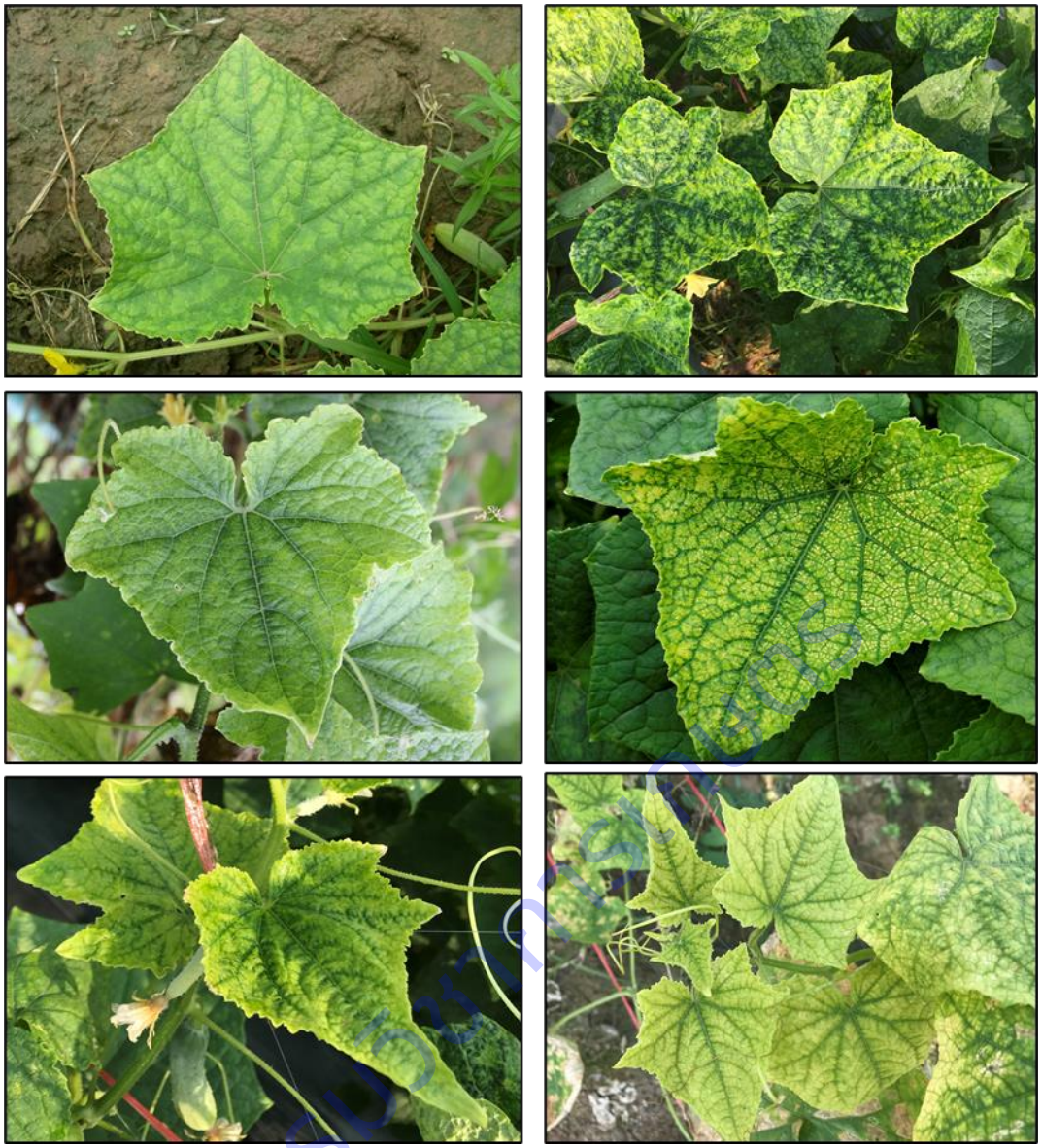
เก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตง ได้แก่ แตงกวา (ภาพที่ 2.2.8.1) มะระ (ภาพที่ 2.2.8.2 ก-ข) บวบ (ภาพที่ 2.2.8.2 ค-ง) ฟักทอง (ภาพที่ 2.2.8.2จ) ฟักแฟง (ภาพที่ 2.2.8.2ฉ) และ ตำลึง (ภาพที่ 2.2.8.2 ช-ณ) ที่แสดงอาการเส้นใบใส ใบด่าง ใบเหลืองและเสียรูปทรงในจังหวัดกรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี เชียงราย เชียงใหม่ สระแก้ว และศรีสะเกษ รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 178 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2.2.8.1) มาตรวจสอบด้วยเทคนิค One Step RT-PCR ด้วย universal primers ของเชื้อไวรัสในกลุ่ม เชื้อ *Crinivirus* ผลปรากฏว่าไม่พบแถบดีเอ็นเอเชื้อไวรัสในทุกตัวอย่าง

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

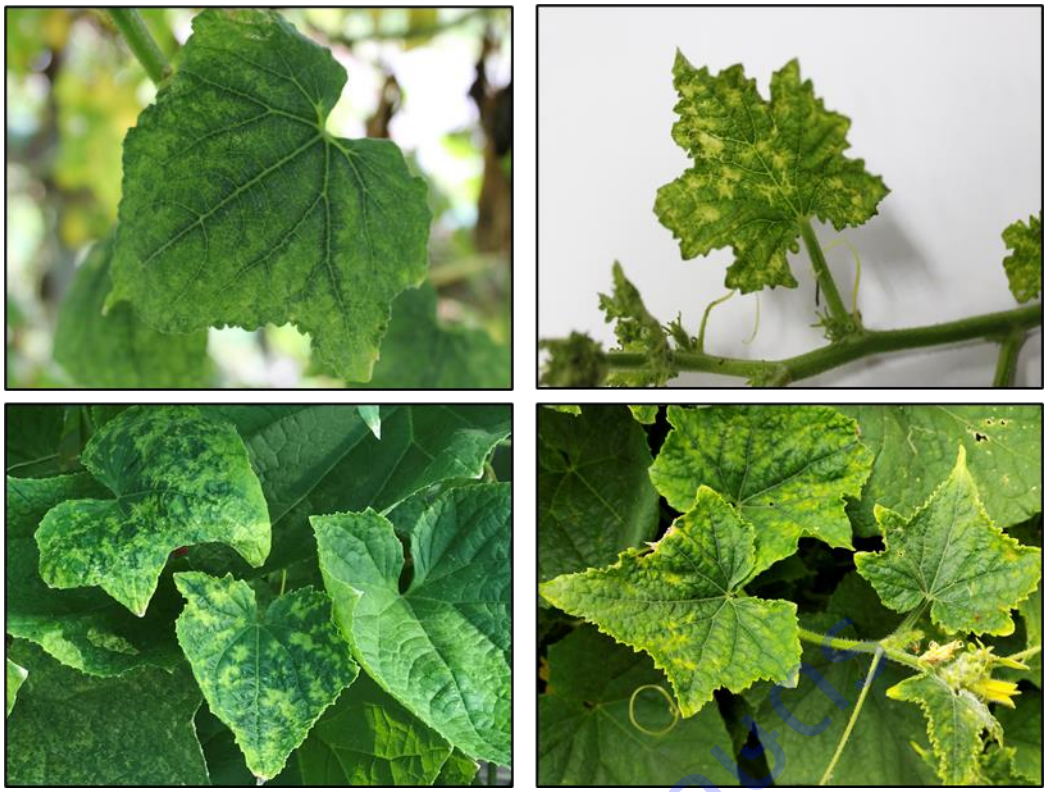
ตารางที่ 2.2.8.1 ผลตรวจหาเชื้อ *Crinivirus* ด้วยเทคนิค One Step RT-PCR ในตัวอย่างพืชตระกูลแตงที่เก็บจากแปลงปลูกใน 9 จังหวัด

จังหวัด	**จำนวนตัวอย่าง**	**ผลการตรวจวิเคราะห์**
กรุงเทพมหานคร	25	ไม่พบเชื้อ *Crinivirus*
กาญจนบุรี	25	ไม่พบเชื้อ *Crinivirus*
สุพรรณบุรี	18	ไม่พบเชื้อ *Crinivirus*
นครปฐม	15	ไม่พบเชื้อ *Crinivirus*
เชียงราย	30	ไม่พบเชื้อ *Crinivirus*
เชียงใหม่	20	ไม่พบเชื้อ *Crinivirus*
จันทบุรี	15	ไม่พบเชื้อ *Crinivirus*
สระแก้ว	36	ไม่พบเชื้อ *Crinivirus*
ศรีสะเกษ	27	ไม่พบเชื้อ *Crinivirus*
รวมทั้งสิ้น	**178**	

กรมวิชาการเกษตร

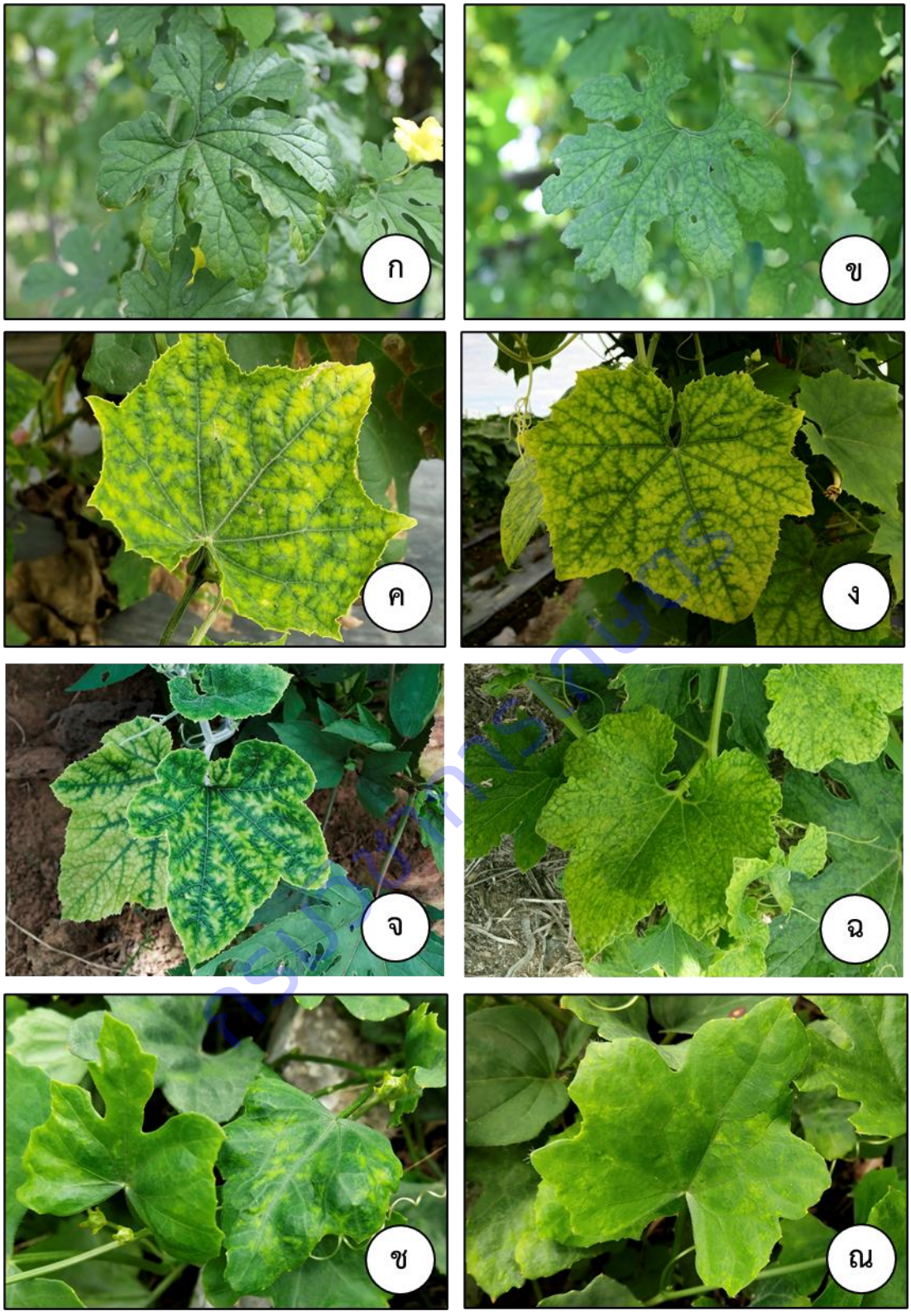


ภาพที่ 2.2.8.1 แตงกวาที่แสดงอาการใบด่าง ใบด่างประ เส้นใบใส เนื้อใบเหลือง คล้ายอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Crinivirus* ที่พบในแปลงปลูก



ภาพที่ 2.2.8.1 (ต่อ)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2.2.8.2 พืชตระกูลแตงที่แสดงอาการใบด่าง ใบด่างประ เส้นใบใส เนื้อใบเหลือง คล้ายอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Crinivirus* ที่พบในแปลงปลูก ได้แก่ (ก-ข): มะระ, (ค-ง): บวบเหลี่ยม, (จ): ฟักทอง, (ฉ): ฟักแฟง และ (ช-ณ): ตำลึง

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

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

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เป็นข้อมูลยืนยันสถานภาพกมารไม่ปรากฏของเชื้อ Crinivirus ในพืชตระกูลแตงใชช่วงระหว่างที่มีการศึกษาวิจัย ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2562-กันยายน 2563

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.3.1 ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของหญ้าตีนกาใหญ่ (*Acrachne racemosa (Heyne* ex Roth) Ohwi)

Biology and Ecology of *Acrachne racemosa* (Heyne ex Roth) Ohwi

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางอัณศยา พรมมา	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นางสาวศิริพร ซึงสนธิพร	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวธัญชนก จงรักไทย	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นายเอกรัตน์ ธนูทอง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของหญ้าตีนกาใหญ่ ทำการทดลองระหว่าง ตุลาคม 2559 - กันยายน 2561 สำรวจพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ทั้งหมด 98 แหล่ง ในพื้นที่ 43 จังหวัด พบหญ้าตีนกาใหญ่ 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ นครสวรรค์ สระบุรี กาญจนบุรี ตาก และนครพนม เมล็ดหญ้าตีนกาใหญ่มีรูปทรงกระบอก สีน้ำตาล-แดง ผิวเมล็ดมีลักษณะเป็นคลื่นขรุขระ เมล็ดมีความกว้างอยู่ระหว่าง 0.55 - 0.59 มิลลิเมตร และมีความยาวอยู่ระหว่าง 0.86 - 1.00 มิลลิเมตร การศึกษาเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด พบว่า มีความสูง แขนงย่อย จำนวนช่อดอก และจำนวนเมล็ด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แขนงหลัก พบว่า กรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 1 ต้น/กระบะ มีแขนงหลักมากที่สุด คือ 27 แขนง/ต้น แตกต่างจากกรรมวิธีอื่น น้ำหนักสด พบว่า กรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 1 ต้น/กระบะ มีน้ำหนักสดมากสุด คือ 174.27 กรัม/ต้น แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีปลูกต้นหญ้าตีนกาใหญ่ทั้งหมดที่งอก แต่ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 3 และ 5 ต้น/กระบะ ที่มีน้ำหนักสด 102.09 และ 124.50 กรัม/ต้น ตามลำดับ และน้ำหนักแห้ง พบว่า กรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 1 ต้น/กระบะ มีน้ำหนักแห้งมากสุด คือ 72.17 กรัม/ต้น แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 3 ต้น/กระบะ และกรรมวิธีปลูกต้นหญ้าตีนกาใหญ่ทั้งหมดที่งอก แต่ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 5 ต้น/กระบะ ที่มีน้ำหนักแห้ง 48.90 กรัม/ต้น และมีวงจรชีวิต 58 วัน หญ้าตีนกาใหญ่ไม่สามารถขยายพันธุ์ด้วยการปักชำแขนง แต่สามารถขยายพันธุ์ด้วยการแบ่งกอได้ และเมล็ดงอกได้บนผิวดินเท่านั้น โดยมีความงอก 67.20 เปอร์เซ็นต์

คำหลัก : ชีววิทยาและนิเวศวิทยา หญ้าตีนกาใหญ่ วัชพืช เมล็ดวัชพืช

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Study Biology and ecology of Goosegrass (*Acrachne racemosa*) was conducted during October 2016 – September 2018. Survey in agricultural areas and other ecosystem in 43 provinces found Goosegrass in Chiang Mai, Nakhon Sawan, Saraburi, Kanchanaburi, Tak and Nakhon Phanom. Seeds are reddish-brown, oblong, surface rugose, about width 0.55 - 0.59 mm, length 0.86 - 1.00 mm. Study growth, seed set and life cycle. The result shown that the height, Sub-branch, number of inflorescence and the number of seeds were not significant. It had a main- branch, fresh and dry weight were significantly different. Planting 1 plant/plot had the highest number of main- branch, 27 branch/plant. Planting 1 plant/plot had the highest fresh weight, 174.27 g/plant, not significant Planting 3 and 5 plants/plot. Planting 1 plant/plot had the highest dry weight, 72.17 g/plant, not significant Planting 5 plants/plot. It had the life cycle 58 days, not propagated by stem cutting, increasing number of shoots by dividing parts, had seed germination only on the soil surface, 67.20%.

Keywords : Biology and ecology, Goosegrass, Weed, Weed seeds

คำนำ

หญ้าตีนกาใหญ่ (*Acrachne racemosa* (Heyne ex Roth) Ohwi) จัดอยู่ในวงศ์หญ้า (family Poaceae) เป็นวัชพืชที่สำคัญในแปลงปลูกพืชไร่ และพืชผัก ในเขตภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ศิริพรและคณะ (2554) สำรวจและรวบรวมวัชพืชในพืชผัก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง จำนวนทั้งสิ้น 194 แปลง ของผัก 43 ชนิด พบหญ้าตีนกาใหญ่เป็นวัชพืชหลัก ในพื้นที่ปลูกผักคะน้า หน่อไม้ฝรั่ง และข้าวโพดฝักอ่อน ในจังหวัดกาญจนบุรี และจากการสำรวจเบื้องต้นพบระบาดรุนแรงในแปลงทานตะวัน และข้าวโพด นอกจากนี้ยังพบหญ้าตีนกาใหญ่ในจังหวัดอื่นๆ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา ลพบุรี สระบุรี นครปฐม แม่ฮ่องสอน และเชียงราย ทั้งนี้ยังพบมีการแพร่กระจายของหญ้าตีนกาใหญ่ในหลายประเทศ ได้แก่ แอฟริกา จีน อินเดีย ออสเตรเลีย และอเมริกาใต้ (Clayton *et al*., 2014) ซึ่งวัชพืชร้ายแรงหลายชนิดสามารถสร้างเมล็ดได้จำนวนมาก เมล็ดมีการพักตัวเมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม หรือมีอายุยาว นอกจากนี้หลายชนิดยังมีขนาดเล็ก ยากต่อการตรวจสอบ หรือมีขนาดใกล้เคียงกับเมล็ดพืชปลูก ทำให้แยกออกจากเมล็ดพันธุ์พืชปลูกได้ยาก (Muenscher, 1980) เมื่อเมล็ดแก่จะหลุดร่วง มีบางส่วนงอก แต่บางส่วนสะสมอยู่ในดิน ซึ่ง Juraimi *et al.* (2012) รายงานว่าจากการสุ่มเก็บตัวอย่างดินในช่วงเดือนมีนาคม-พฤษภาคม ปี 2004 พบว่ามีเมล็ดวัชพืชอยู่ในดินระหว่าง 121,115-200,201 เมล็ดต่อตารางเมตร และพบว่า *Leptochloa chinensis* มีเมล็ดสูงถึง 20,647 ต่อตารางเมตร ซึ่งเมล็ดที่สะสมในดินเมื่องอกจะกลายเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างมาก ต้องหาวิธีในการกำจัด และหากกำจัดไม่ทัน หรือไม่กำจัดเลยจะทำให้ผลผลิตลดลงได้ เช่น Tolman *et al*. (2004) รายงานว่าการไม่กำจัดวัชพืชในมะเขือเทศ และกะหล่ำปลี ทำให้สูญเสียผลผลิตสูงถึง 80 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ Lubigan

ศรีวิชัยการเกษตร

and Mercado (1974) รายงานว่า การปลูก *Scirpus maritimus* L. 24 ต้นต่อตารางเมตรในนาข้าวหลังปักดำ 7 วัน สามารถเพิ่มจำนวนเป็น 334-642 ต้น ในเวลา 45 วัน และทำให้ผลผลิตข้าวลดลง 79-100 เปอร์เซ็นต์

การแพร่กระจายของวัชพืชนั้น เมล็ดเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากเมล็ดมีลักษณะสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายได้ดี คือ มีน้ำหนักเบา มีหนาม หรือขนเกาะติดได้ง่าย มีการแตก หรือดีดได้ง่ายเมื่อฝักหรือผลแก่ มีการพักตัวที่เหมาะสม มีอายุยาวนาน และมีความคงทนต่อสภาพแวดล้อม และเนื่องจากเมล็ดหญ้าตีนกาใหญ่มีขนาดเล็ก สามารถติดไปกับผลผลิต ถูกเคลื่อนย้ายได้ง่ายโดยมนุษย์ และสัตว์ โดยเฉพาะปัจจุบันที่มีการใช้เครื่องจักรกลทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่จะทำให้หญ้าตีนกาใหญ่แพร่กระจายไปได้เร็วขึ้น ดังนั้นการศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของหญ้าตีนกาใหญ่จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานสนับสนุนการแจ้งเตือนเกษตรกร และเป็นข้อมูลประกอบการวางแผนป้องกันและกำจัดที่เหมาะสมต่อไป

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

- กล้องถ่ายรูปแบบดิจิตอล
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
- เลนส์ขยาย 10 เท่า สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นในภาคสนาม
- กรรไกร มีด เสียม หรือพลั่ว สำหรับตัด/ขุด ตัวอย่างพืช
- ดินและกระถาง สำหรับปลูกพืชทดสอบในเรือนทดลอง
- แผงอัดตัวอย่างพรรณไม้พร้อมกระดาษฟูก ฟองน้ำและหนังสือพิมพ์ พร้อมเชือกไส้ตะเกียงและป้ายชื่อสำหรับผูกตัวอย่างพืช
- กระดาษติดตัวอย่างพืช พร้อมแฟ้มปก
- ขวดแก้ว และน้ำยาสำหรับดองตัวอย่างพืช (หากจำเป็น)
- น้ำยาชุบตัวอย่างวัชพืช ประกอบด้วย ฟีนอล เมอคิวริคคลอไรด์ เอทธิลอัลกอฮอล์
- การบูร
- เครื่องรับสัญญาณดาวเทียม เพื่อระบุพิกัด
- อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น เช่น ถุงพลาสติกขนาดต่างๆ กระถางพลาสติก กระบะปูน และป้ายแสดงกรรมวิธี
- สมุดบันทึก

- วิธีการ

1. ศึกษานิเวศวิทยา

1) สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดหญ้าตีนกาใหญ่ ใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ บันทึก สถานที่หรือพิกัดที่เก็บตัวอย่าง สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูกหลัก ลักษณะ

กรมวิชาการเกษตร

พืชเป้าหมาย การถูกทำลายโดยศัตรูธรรมชาติ วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ แมลง และศัตรูธรรมชาติ ที่พบในพื้นที่ที่สำรวจ

2) การจัดทำตัวอย่างแห้ง นำตัวอย่างต้นหญ้าตีนกาใหญ่มาอัดในแผงพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 X 30 เซนติเมตร เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์กรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

3) เมล็ด นำเมล็ดที่เก็บได้ไปทำความสะอาด ผึ่งในที่ร่มให้แห้ง แบ่งเป็นสองส่วน คือ ส่วนที่ 1 นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ ส่วนที่ 2 เก็บใส่กล่องพลาสติก พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

2. ลักษณะเมล็ด

นำเมล็ดที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน แล้วสุ่มเมล็ดมาใช้จำนวน 100 เมล็ด วัดขนาด และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกข้อมูล ความกว้าง ความยาว รูปร่าง ลักษณะ และสีของเมล็ด องค์ประกอบของเมล็ด เช่น หาง ปีก หรือหนาม ที่เป็นปัจจัยในการแพร่กระจาย

3. การเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด

วางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCB) จำนวน 5 ซ้ำๆ ละ 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ต้นหญ้าตีนกาใหญ่ จำนวน 1 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 2 ต้นหญ้าตีนกาใหญ่ จำนวน 3 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 3 ต้นหญ้าตีนกาใหญ่ จำนวน 5 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 4 ต้นหญ้าตีนกาใหญ่ทั้งหมดที่งอก

หว่านเมล็ดหญ้าตีนกาใหญ่ จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1.5 ตารางเมตร เมื่อเมล็ดหญ้าตีนกาใหญ่งอก 1 สัปดาห์ ถอนให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง จำนวนต้นตามกรรมวิธีต่างๆ ที่กำหนด สังเกตการเจริญเติบโต และบันทึกข้อมูลวันที่หว่าน วันที่งอก ความสูง และจำนวนแขนง ทุก 7 วัน วันที่ออกดอก และวันที่ติดเมล็ด (นับจากวันที่ต้นหญ้าตีนกาใหญ่งอก) เมื่อต้นหญ้าตีนกาใหญ่มีใบยอดเหลือง (พืชเริ่มตาย) ถอน ล้างทำความสะอาด บันทึกน้ำหนักสด จำนวนช่อดอก แขนงย่อย จำนวนเมล็ด และนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักแห้ง นำข้อมูลที่ได้คำนวณหาค่าเฉลี่ยระยะเวลาการงอก การเจริญเติบโต การออกดอก การแก่ของเมล็ด เพื่อหาระยะเวลาที่พืชเริ่มงอกจนถึงสร้างเมล็ดแก่ ที่จะใช้ขยายพันธุ์ต่อไป (ครบวงจรชีวิต 1 รอบ)

4. ความสามารถในการขยายพันธุ์ด้วยแขนง

ทำการหว่านเมล็ดหญ้าตีนกาใหญ่ จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1.5 ตารางเมตร หลังจากหญ้าตีนกาใหญ่งอก 1 สัปดาห์ ถอนออก ให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง เมื่อต้นตีนกาใหญ่เจริญเติบโตและมีอายุ 1 เดือน ถอนออกจากแปลง ทำการตัดแขนงบริเวณโคนต้นดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

- ตัดแขนงต้นที่ยังไม่ออกดอก

- ตัดแขนงต้นที่ออกดอก

โดยให้แต่ละแขนงมีข้อจำนวน 2 ข้อ นำไปปักชำ (วางแนวนอน แล้วกลบด้วยดิน) ในกระถางขนาด 12 นิ้ว จำนวน 10 กระถางๆ ละ 10 แขนง ทำการบันทึกข้อมูลทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน

5. ความสามารถในการขยายพันธุ์ด้วยการแบ่งกอ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) จำนวน 5 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ไม่แบ่งกอ

กรรมวิธีที่ 2 แบ่งกอเป็น 2 ส่วน เท่าๆ กัน

กรรมวิธีที่ 3 แบ่งกอเป็น 4 ส่วน เท่าๆ กัน

กรรมวิธีที่ 4 แบ่งกอเป็น 8 ส่วน เท่าๆ กัน

หว่านเมล็ดหญ้าตีนกาใหญ่ จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1.5 ตารางเมตร เมื่อต้นหญ้าตีนกาใหญ่เจริญเติบโตและมีอายุ 1 เดือน เลือกต้นที่มีขนาดเท่ากัน ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง ถอนออกจากแปลง นำมาแบ่งกอตามกรรมวิธีข้างต้น (กรรมวิธีละ 5 ต้น) นำไปปลูกในกระถางขนาด 12 นิ้ว บันทึกจำนวนแขนงใหม่ที่เกิดขึ้น ทุกสัปดาห์

6. การงอกของเมล็ดที่ความลึกของดินระดับต่างๆ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) จำนวน 5 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 วางเมล็ดบนผิวดิน

กรรมวิธีที่ 2 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 3 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 10 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 4 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 5 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 20 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 6 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 25 เซนติเมตร

บรรจุดินใส่กระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร ให้ผิวดินห่างจากขอบบนของกระถาง 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 เซนติเมตร นำเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด หว่านให้ทั่วกระถาง แล้วเติมดินจนถึงขอบบนของกระถาง รดน้ำเช้า และเย็น เพื่อให้มีความชื้น บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน เป็นเวลา 2 เดือน และบันทึกจำนวนเมล็ดที่งอก นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอกโดยใช้สูตรดังนี้

ความงอก (%) = (จำนวนเมล็ดที่งอก/จำนวนเมล็ดทั้งหมดที่หว่าน) x 100

- เวลาและสถานที่

ทำการทดลอง ระหว่าง ตุลาคม 2559 - กันยายน 2561 (ระยะเวลา 2 ปี) ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ และพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ศึกษานิเวศวิทยา

สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดหญ้าตีนกาใหญ่ โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ทั้งหมด 98 แหล่ง ในพื้นที่ 43 จังหวัด ดังนี้

ภาคเหนือ 8 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง น่าน อุตรดิตถ์ แพร่ และลำพูน ภาคกลาง 14 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดนครสวรรค์ พิจิตร สุโขทัย พิษณุโลก เพชรบุรี เพชรบูรณ์ สมุทรปราการ สมุทรสงคราม นครปฐม ลพบุรี สระบุรี สุพรรณบุรี นครนายก และอยุธยา ภาคตะวันออก 5 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ชลบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา และระยอง ภาคตะวันตก 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ตาก และราชบุรี ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 10 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา นครพนม บึงกาฬ บุรีรัมย์ มหาสารคาม ร้อยเอ็ด สกลนคร หนองคาย อุบลราชธานี และอุดรธานี และภาคใต้ 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดชุมพร นครศรีธรรมราช และประจวบคีรีขันธ์ พบหญ้าตีนกาใหญ่ 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ พบในแปลงฟักทอง และข้างทาง จังหวัดนครสวรรค์ พบในแปลงมันสำปะหลัง จังหวัดสระบุรี พบในแปลงมันสำปะหลัง จังหวัดกาญจนบุรี พบในแปลงข้าวโพด กล้วย และอ้อย จังหวัดตาก พบข้างทาง และจังหวัดนครพนม พบในพื้นที่ว่างเปล่า (Table 2.3.1.1 และ Figure 2.3.1.1)

ลักษณะเมล็ด

นำเมล็ดหญ้าตีนกาใหญ่ไปถ่ายรูปภายใต้กล้องสเตอริโอ พบว่าเมล็ดรูปทรงกระบอก สีน้ำตาล-แดง ผิวเมล็ดมีลักษณะเป็นคลื่นขรุขระ (Figure 2.3.1.2) เมื่อสุ่มเมล็ดจาก 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี เชียงใหม่ และนครพนม จังหวัดละ 100 เมล็ด วัดความกว้างและความยาว พบว่า มีความกว้าง 0.58, 0.59 และ 0.55 มิลลิเมตร และมีความยาว 0.92, 1.00 และ 0.86 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Table 2.3.1.2) ซึ่งทั้ง 3 จังหวัด เมล็ดมีขนาดใกล้เคียงกัน

การเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด

บันทึกข้อมูลจนกระทั่งใบและดอกต้นหญ้าตีนกาใหญ่เริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง พบว่า มีความสูง แขนงย่อย จำนวนช่อดอก และจำนวนเมล็ด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความสูงอยู่ระหว่าง 73.5 - 91.1 เซนติเมตร แขนงย่อยอยู่ระหว่าง 35 – 72 แขนง/ต้น ช่อดอกอยู่ระหว่าง 44 – 93 ช่อ/ต้น และจำนวนเมล็ดอยู่ระหว่าง 245,287 - 519,889 เมล็ด/ต้น แขนงหลัก พบว่า กรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 1 ต้น/กระบะ มีแขนงหลักมากที่สุด คือ 27 แขนง/ต้น แตกต่างจากกรรมวิธีอื่น น้ำหนักสด พบว่า กรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 1 ต้น/กระบะ มีน้ำหนักสดมากสุด คือ 174.27 กรัม/ต้น แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีปลูกต้นหญ้าตีนกาใหญ่ทั้งหมดที่งอก แต่ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 3 และ 5 ต้น/กระบะ ที่มีน้ำหนักสด 102.09 และ 124.50 กรัม/ต้น ตามลำดับ และน้ำหนักแห้ง พบว่า กรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 1 ต้น/กระบะ มีน้ำหนักแห้งมากสุด คือ 72.17 กรัม/ต้น แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 3 ต้น/กระบะ และกรรมวิธีปลูกต้นหญ้าตีนกาใหญ่ทั้งหมดที่งอก แต่ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 5 ต้น/กระบะ ที่มีน้ำหนักแห้ง 48.90 กรัม/ต้น (Table 2.3.1.3 และ Figure 2.3.1.3 และ 2.3.1.4)

กรมวิชาการเกษตร

การศึกษาวงจรชีวิต พบว่า เมล็ดหญ้าตีนกาใหญ่เริ่มงอก ที่ระยะ 11 วันหลังหว่านเมล็ด ส่วนการแตกแขนง ออกดอก ช่อดอกเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (เมล็ดเริ่มแก่) ที่ระยะ 17, 25 และ 58 วันหลังงอก และช่อดอกเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งหมด ที่ระยะ 72 วันหลังงอก รวมมีวงจรชีวิต 58 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ที่ระยะ 58 วันหลังงอก เมล็ดหญ้าตีนกาใหญ่จะเริ่มแก่ โดยเมล็ดจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งสามารถขยายพันธุ์ต่อได้ ดังนั้น การกำจัดหญ้าตีนกาใหญ่ควรกำจัดก่อนที่จะออกดอก หรือก่อนเมล็ดแก่

ความสามารถในการขยายพันธุ์ด้วยแขนง

การศึกษาความสามารถในการขยายพันธุ์ด้วยแขนง ทำการตัดแขนงบริเวณโคนต้น ดังนี้

- ตัดแขนงต้นที่ยังไม่ออกดอก
- ตัดแขนงต้นที่ออกดอก

บันทึกข้อมูลทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน ไม่พบการแตกหน่อจากแขนงที่ปักชำทั้งต้นที่ยังไม่ออกดอกและออกดอกแล้ว เมื่อนำแขนงที่ปักชำมาดู พบว่า แขนงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และเน่า แสดงว่าแขนงของหญ้าตีนกาใหญ่ไม่สามารถขยายพันธุ์ได้

ความสามารถในการขยายพันธุ์ด้วยการแบ่งกอ

บันทึกข้อมูลการแตกแขนงจนกระทั่งใบและช่อดอกต้นหญ้าตีนกาใหญ่เริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง พบว่าทุกกรรมวิธีมีการแตกแขนงใหม่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีการแตกแขนงอยู่ระหว่าง 8 – 16 แขนง/ต้น (Table 2.3.1.4 และ Figure 2.3.1.5) แสดงให้เห็นว่าถึงแม้จะทำการแบ่งกอ หญ้าตีนกาใหญ่ยังสามารถแตกแขนงใหม่และเจริญเติบโตได้ปกติจนกระทั่งออกดอก และติดเมล็ด

การงอกของเมล็ดที่ความลึกของดินระดับต่างๆ

บันทึกข้อมูลเป็นเวลา 2 เดือน (ต้นเริ่มออกดอกจึงหยุดการบันทึกข้อมูล) พบว่า กรรมวิธีวางเมล็ดบนผิวดินมีความงอกสูงสุด 67.20 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากกรรมวิธีอื่น ในขณะที่ไม่พบการงอกในกรรมวิธีอื่นๆ (Table 2.3.1.5) ซึ่งระดับความลึกที่เมล็ดถูกฝังในดินอาจมีผลต่อการงอกของเมล็ดวัชพืชได้ เช่น Vanijajiva (2014) รายงานว่าเมล็ดตีนตุ๊กแก (*Tridax procumbens*) งอกได้ดีที่สุดที่ระดับผิวดิน หรือที่ความลึก 2 เซนติเมตร และไม่พบเมล็ดงอกเมื่อฝังเมล็ดไว้ลึก 3 เซนติเมตร โองการ (2556) พบว่าที่ระดับผิวดินเมล็ดผักเผ็ดแม้วดอกแดง ดอกฟ้า และดอกม่วง งอกได้ 63, 60 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบการงอกเมื่อฝังเมล็ดไว้ลึกตั้งแต่ 8 เซนติเมตร Fang *et al.* (2012) รายงานว่า เมล็ด Goatgrass (*Aegilops tauschii*) งอกได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อฝังเมล็ดไว้ลึก 1 - 3 เซนติเมตร และไม่พบเมล็ดที่งอก เมื่อฝังเมล็ดไว้ลึกตั้งแต่ 8 เซนติเมตร และ Javaid and Tanveer (2014) รายงานว่า เมื่อเพิ่มความลึกในการฝังเมล็ด *Emex spinosa* และ *Emex australis* เปอร์เซ็นต์การงอกจะยิ่งลดลง

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดหญ้าตีนกาใหญ่ โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ทั้งหมด 98 แหล่ง ในพื้นที่ 43 จังหวัด ได้แก่ ภาคเหนือ 8 จังหวัด ภาคกลาง

สำนักวิชาการเกษตร

14 จังหวัด ภาคตะวันออก 5 จังหวัด ภาคตะวันตก 3 จังหวัด ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 10 และภาคใต้ 3 จังหวัด พบหญ้าตีนกาใหญ่ 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ นครสวรรค์ สระบุรี กาญจนบุรี ตาก และนครพนม

เมล็ดหญ้าตีนกาใหญ่มีรูปทรงกระบอก สีน้ำตาล-แดง ผิวเมล็ดมีลักษณะเป็นคลื่นขรุขระ สุ่มวัดขนาดเมล็ด 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี เชียงใหม่ และนครพนม เมล็ดมีขนาดใกล้เคียงกันทั้ง 3 จังหวัด โดยมีความกว้างอยู่ระหว่าง 0.55-0.59 มิลลิเมตร และมีความยาวอยู่ระหว่าง 0.86-1.00 มิลลิเมตร การศึกษาเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด พบว่า มีความสูง แขนงย่อย จำนวนช่อดอก และจำนวนเมล็ดไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความสูงอยู่ระหว่าง 73.5 - 91.1 เซนติเมตร แขนงย่อยอยู่ระหว่าง 35 – 72 แขนง/ต้น ช่อดอกอยู่ระหว่าง 44 – 93 ช่อ/ต้น และจำนวนเมล็ดอยู่ระหว่าง 245,287 - 519,889 เมล็ด/ต้น แขนงหลัก พบว่า กรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 1 ต้น/กระบะ มีแขนงหลักมากที่สุด คือ 27 แขนง/ต้น แตกต่างจากกรรมวิธีอื่น น้ำหนักสด พบว่า กรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 1 ต้น/กระบะ มีน้ำหนักสดมากสุด คือ 174.27 กรัม/ต้น แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีปลูกต้นหญ้าตีนกาใหญ่ทั้งหมดที่งอก แต่ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 3 และ 5 ต้น/กระบะ ที่มีน้ำหนักสด 102.09 และ 124.50 กรัม/ต้น ตามลำดับ และน้ำหนักแห้ง พบว่า กรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 1 ต้น/กระบะ มีน้ำหนักแห้งมากสุด คือ 72.17 กรัม/ต้น แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 3 ต้น/กระบะ และกรรมวิธีปลูกต้นหญ้าตีนกาใหญ่ทั้งหมดที่งอก แต่ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 5 ต้น/กระบะ ที่มีน้ำหนักแห้ง 48.90 กรัม/ต้น และมีวงจรชีวิต 58 วัน หญ้าตีนกาใหญ่ไม่สามารถขยายพันธุ์โดยการปักชำแขนง แต่สามารถขยายพันธุ์ด้วยการแบ่งกอได้ แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติในทุกกรรมวิธีที่แบ่งกอกับไม่แบ่งกอ โดยมีการแตกแขนงอยู่ระหว่าง 8 – 16 แขนง/ต้น และเมล็ดหญ้าตีนกาใหญ่สามารถงอกได้บนผิวดินเท่านั้น โดยมีความงอก 67.20 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นหากต้องการกำจัดหญ้าตีนกาใหญ่ควรกำจัดก่อนออกดอก หรือก่อน 68 วันหลังงอก ทั้งนี้ถึงแม้ว่าเมล็ดหญ้าตีนกาใหญ่สามารถงอกได้ที่บนผิวดินเท่านั้น แต่เมล็ดที่อยู่ลึกจากผิวดินสามารถงอกได้ เมื่อพลิกดินขึ้นและเมล็ดขึ้นมาอยู่ด้านบน ดังนั้นจึงควรศึกษาวิธีการควบคุมอื่นๆ เพิ่มเติมสำหรับกำจัดเมล็ดที่ถูกพลิกขึ้นมาอยู่บนผิวดิน

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1) ได้ข้อมูลประกอบการสร้างมาตรการทางกฎหมายในการควบคุม ป้องกัน ไม่ให้เป็นวัชพืชร้ายแรงในประเทศไทยในอนาคต เพื่อจัดทำคำแนะนำ เผยแพร่ แก่ประชาชน หน่วยงานภายในกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

2) เผยแพร่ผลงานวิจัย ในเอกสารวิชาการต่างๆ เช่น รายงานผลงานวิจัยประจำปี ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

Table 2.3.1.1 Survey locations.

Region	Sub-district	District	Province	Habitat	Latitude-N	Longitude-E
Northern	Si Don Chai	Chiang Khong	Chiang Rai	roadside	20.165665	100.394985
	Mae Raem	Mae Rim	Chiang Mai	cabbage	18.929948	98.818185
	Kong Khaek	Mae Chaem	Chiang Mai	cabbage	18.430600	98.385980
	*Kong Khaek	Mae Chaem	Chiang Mai	pumpkin	18.285575	98.380048
	Mae Suek	Mae Chaem	Chiang Mai	passion fruit	18.783237	98.161082
	-	Fang	Chiang Mai	non-crop	19.908995	99.038360
	Ban Luang	Chom Thong	Chiang Mai	cabbage	18.541592	98.558003
	*Hang Dong	Hot	Chiang Mai	roadside	18.213855	98.584218
	Bo Luang	Hot	Chiang Mai	tomato	18.148513	98.347493
	Huai Pu Ling	Muang	Mae Hong Son	roadside	19.218865	98.079213
	Mok Champae	Muang	Mae Hong Son	non-crop	19.584419	97.946189
	Sala	Ko Kha	Lampang	non-crop	18.197622	99.407275
	Kong Khwai	Muang	Nan	chilli	18.402700	100.451023
	Nam Pua	Wiang Sa	Nan	chilli	18.402111	100.451376
	Pa Sao	Muang	Uttaradit	Taro	17.614595	100.122013
	Mae Sai	Rong Kwang	Phrae	tobacco	18.383247	100.309590
	Rong Khem	Rong Kwang	Phrae	tobacco	18.304997	100.301318
	Mae Tuen	Li	Lamphun	cabbage	17.926620	98.907747
	Pa Phai	Li	Lamphun	roadside	17.871980	98.925091
Central	*Khao Thong	Phayuhakhiri	Nakhon Sawan	cassava	15.598987	100.146133
	Nong Klap	Nongbua	Nakhon Sawan	Marian plum	15.923238	100.648837
	Sak Lek	Sak Lek	Phichit	melon	16.521672	100.460302
	Wang Thap Sai	Sak Lek	Phichit	Marian plum	16.465900	100.561162
	Wang Thap Sai	Sak Lek	Phichit	banana	16.466525	100.554478
	Tanot	Khiri Mat	Sukhothai	cassava	16.823252	99.795853
	Chai Nam	Wang Thong	Phitsanulok	non-crop	16.855842	100.477217
	Ban Noi Sum Khi Lek	Noen Maprang	Phitsanulok	Marian plum	16.558080	100.595850
	Ban Noi Sum Khi Lek	Noen Maprang	Phitsanulok	banana	16.558175	100.595505
	Ban Noi Sum Khi Lek	Noen Maprang	Phitsanulok	banana	16.526873	100.578518
	Wang Khrai	Tha Yang	Petchaburi	pumpkin	12.919672	99.823748
	Rai Sathon	Ban Lat	Petchaburi	banana	13.038722	99.878537
	-	Tha Yang	Petchaburi	winter melon	12.983760	99.870643
	Pu Sawan	Kaeng Krachan	Petchaburi	banana	12.992957	99.731675
	Hat Chao Samran	Muang	Petchaburi	non-crop	13.016743	100.045351
	Nam Hia	Lhomsak	Phetchabun	non-crop	16.836240	101.211970
	Ban Khlong Suan	Phra Samut Chedi	Samut Prakan	roadside	13.573928	100.464570
	Bang Sakae	Bang Khonthi	Samut Songkhram	banana	13.457265	99.925862
	Rang Pikun	Kam Paeng Saen	Nakhon Pathom	roadside	14.010530	99.949620
	Lam Lukka	Don Tum	Nakhon Pathom	roadside	13.999444	100.094583
	Nong Bua	Phatthana Nikom	Lopburi	roadside	14.818868	101.052513
	Di Lang	Phatthana Nikhom	Lopburi	sugarcane	14.860590	100.909040
	Phatthana Nikhom	Phatthana Nikhom	Lopburi	millet	14.848650	100.924780

สนวิชาการเกษตร

Region	Sub-district	District	Province	Habitat	Latitude-N	Longitude-E
	*Phu Kham Chan	Phraputthabath	Saraburi	cassava	14.738336	100.844742
	Than Kasem	Phraputthabath	Saraburi	roadside	14.750901	100.834435
	Nong Ya Sai	Nong Ya Sai	Suphan Buri	corn	14.762928	99.968192
	Bo Suphan	Song Phi Nong	Suphan Buri	eggplant	14.161005	99.920526
	Phrommani	Muang	Nakhon Nayok	roadside	14.228525	101.131233
	Ban Len	Bang Pa-in	Ayutthaya	roadside	14.228038	100.610422
Eastern	Salaeng	Muang	Chanthaburi	rubber trees	12.678906	102.082506
	Thung Sukhla	Si Racha	Chonburi	non-crop	13.075875	100.893142
	Nong Suea Chang	Nong Yai	Chonburi	rubber trees	13.087417	101.249756
	Bang Taen	Ban Srang	Prachin Buri	roadside	13.871375	101.150540
	Bang Krachet	Bang Khla	Chachoengsao	non-crop	13.840617	101.161305
	Ta Sit	Pluagdeang	Rayong	Oil palm	13.055987	101.274822
Western	*Wang Khanai	Tha Muang	Kanchanaburi	corn	13.959435	99.667782
	*Ko Samrong	Muang	Kanchanaburi	corn	13.942943	99.493508
	Tha Lo	Tha Muang	Kanchanaburi	Taro	13.982853	99.578283
	Phang Tru	Phanom Thuan	Kanchanaburi	melon	14.174198	99.750622
	Phang Tru	Phanom Thuan	Kanchanaburi	melon	14.173788	99.749902
	Tha Ruea	Tha Maka	Kanchanaburi	Shallot	13.966342	99.724533
	Tha Khanun	Thong Phaphum	Kanchanaburi	rubber trees	14.614794	98.667939
	*Ko Samrong	Muang	Kanchanaburi	banana	13.943144	99.493339
	*Takhram En	Tha Maka	Kanchanaburi	sugarcane	13.956564	99.769211
	*Mae Pa	Mae Sot	Tak	roadside	16.755861	98.629469
	*Tha Sai Luat	Mae Sot	Tak	roadside	16.690000	98.516390
	*Chong Khaep	Phop Phra	Tak	roadside	16.485266	98.644083
	*Chong Khaep	Phop Phra	Tak	roadside	16.483584	98.650180
	*Ko Taphao	Ban Tak	Tak	roadside	17.046015	99.057516
	Thong Fa	Ban Tak	Tak	corn	17.072569	98.862306
	Mahawan	Mae Sot	Tak	banana	16.558897	98.648269
	Tha Sai Luat	Mae Sot	Tak	roadside	16.712833	98.505782
	Mahawan	Mae Sot	Tak	banana	16.563067	98.644527
	Thong Fa	Ban Tak	Tak	corn	17.072569	98.862306
	Mae Pa	Mae Sot	Tak	roadside	16.728790	98.595385
	Huai Yang Thon	Paktho	Ratchaburi	cucumber	13.359542	99.715003
Northeastern	Pak Chong	Pak Chong	Nakhon Ratchasima	roadside	14.658607	101.343093
	Kaeng Sanam Nang	Kaeng Sanam Nang	Nakhon Ratchasima	sugarcane	15.740897	102.289680
	*Tha Khue	Muang	Nakhon Phanom	non-crop	17.333585	104.799785
	Ban Paeng	Ban Phaeng	Nakhon Phanom	banana	17.986600	104.203703
	Ban Paeng	Ban Phaeng	Nakhon Phanom	banana	17.986840	104.203693
	Ban Paeng	Ban Phaeng	Nakhon Phanom	pumpkin	17.905967	104.247585
	Dong Bang	Bueng Khong Long	Bueng Kan	tomato	18.063828	104.146063
	Ban Phae	Khu Muang	Buri Ram	non-crop	15.430520	103.016633
	Bo Yai	Borabue	Maha Sarakham	roadside	16.084777	103.163953
	-	Atsamat	Roi Et	tobacco	15.912133	103.754605

กรมวิชาการเกษตร

Region	Sub-district	District	Province	Habitat	Latitude-N	Longitude-E
	Huai Lua	Ban Muang,	Sakon Nakhon	roadside	17.820390	103.389403
	Ban Duea	Muang	Nong Khai	pumpkin	17.985397	102.988060
	Sa Saming	Warin Chamrap	Ubon Ratchathani	roadside	15.001097	104.888407
	Sai Mun	Phibunmangsahan	Ubon Ratchathani	roadside	15.262245	105.275402
	Kham Khuean Kaeo	Sirinthon	Ubon Ratchathani	roadside	15.284893	105.494957
	Ban Muang	Ban Dung	Udon Thani	roadside	17.764588	103.367565
	Ban Chan	Ban Dung	Udon Thani	non-crop	17.778575	103.365573
Southern	Wang Phai	Muang	Chumphon	rubber trees	10.528050	99.116172
	Khun Krathing	Muang	Chumphon	roadside	10.468143	99.128425
	Ko Thuat	Pak Phanang	Nakhon Si Thammarat	pumpkin	8.316020	100.091245
	Ko Thuat	Pak Phanang	Nakhon Si Thammarat	pumpkin	8.303480	100.089348
	Pak Phun	Muang	Nakhon Si Thammarat	Oil palm	8.575220	99.959364
	Ko Lak	Muang	Prachuap Khiri Khan	non-crop	11.818293	99.780343

*****Locations found *Acrachne racemosa*.

Table 2.3.1.2 Seed size of *A. Racemosa.*

Province	Seed size (mm)					
	Average		Maximum		Minimum	
	Width	Length	Width	Length	Width	Length
Kanchanaburi	0.58	0.92	0.68	1.11	0.49	0.76
Chiang Mai	0.59	1.00	0.65	1.14	0.46	0.79
Nakhon Phanom	0.55	0.86	0.62	0.99	0.47	0.76

Not = Average from 100 seeds.

Table 2.3.1.3 Height, main-branch, sub-branch, inflorescence, fresh and dry weight of *A. Racemosa.*

Treatments	Height (cm.)	Main-branch/ plant	Sub-branch/ plant	Inflorescence/ plant	Number of seed/ plant	Fresh weight/ Plant (g)	Dry weight/ Plant (g)
1 plant/plot	89.0 ^{ns}	27 a$^{1/}$	72 ^{ns}	93 ^{ns}	519,889 ^{ns}	174.27 a	72.17 a
3 plants/plot	75.8	17 b	35	44	245,287	102.09 ab	41.20 b
5 plants/plot	73.5	19 b	50	64	359,080	124.50 ab	48.90 ab
Control	91.1	18 b	36	47	262,782	94.62 b	37.74 b
C.V. (%)	13.04	20.88	51.08	45.00	45.00	32.45	28.94

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

^{ns}Average are not significantly different at 5% level by ANOVA

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Table 2.3.1.4 Effect of divided parts on number of shoots of *A. Racemosa.*

Treatments	Number of shoots/plant
Control	10 [ns]
Divided into 2 parts	13
Divided into 4 parts	16
Divided into 8 parts	8
C.V. (%)	37.50

[ns]Average are not significantly different at 5% level by ANOVA

Table 2.3.1.5 Effect of depth on seed germination of *A. Racemosa.*

Treatments	Seed germination (%)
Surface	67.20 a[1/]
Depth 5 cm	0.00 b
Depth 10 cm	0.00 b
Depth 15 cm	0.00 b
Depth 20 cm	0.00 b
Depth 25 cm	0.00 b
C.V. (%)	3.99

[1/]Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by HSD

Figure 2.3.1.1 *A. racemosa*; (a)-(b) inflorescence, and (c) habitat.

กรมวิชาการเกษตร

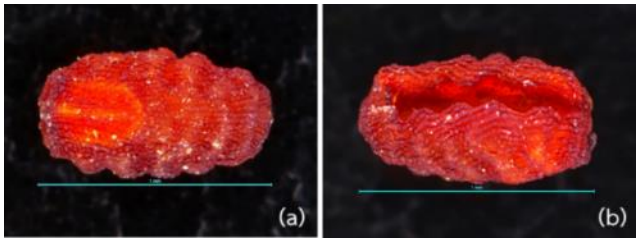


Figure 2.3.1.2 Seeds of *A. racemosa*; (a) front, and (b) back.

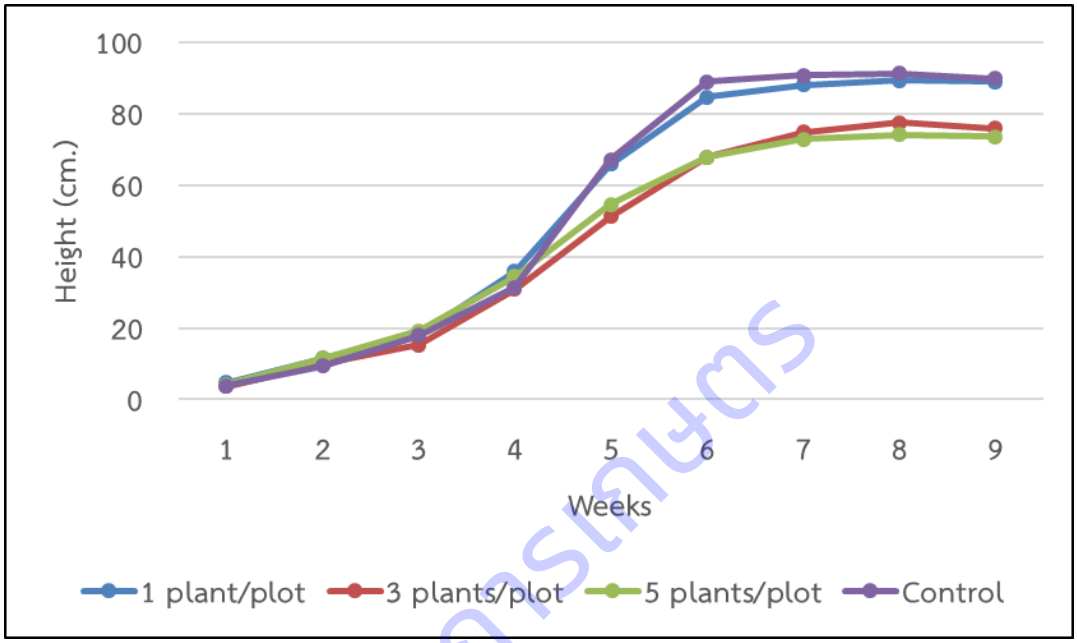


Figure 2.3.1.3 Height of *A. Racemosa.*

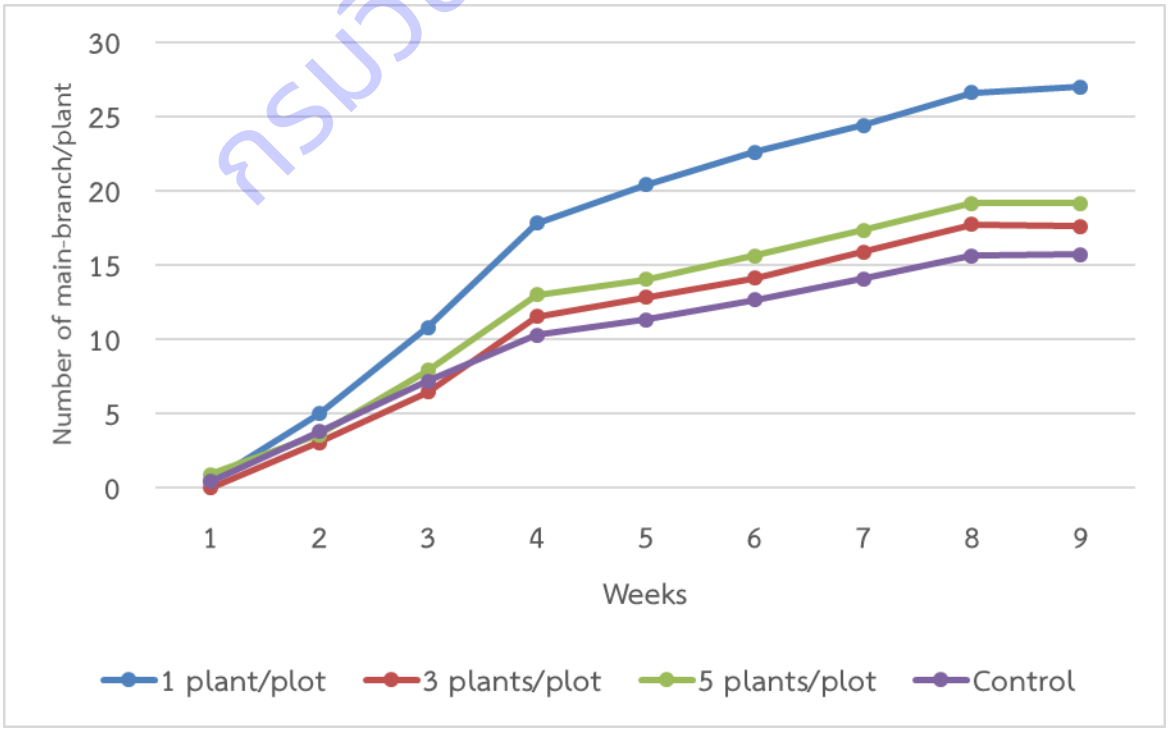


Figure 2.3.1.4 Number of main-branch of *A. Racemosa.*

กรมวิชาการเกษตร

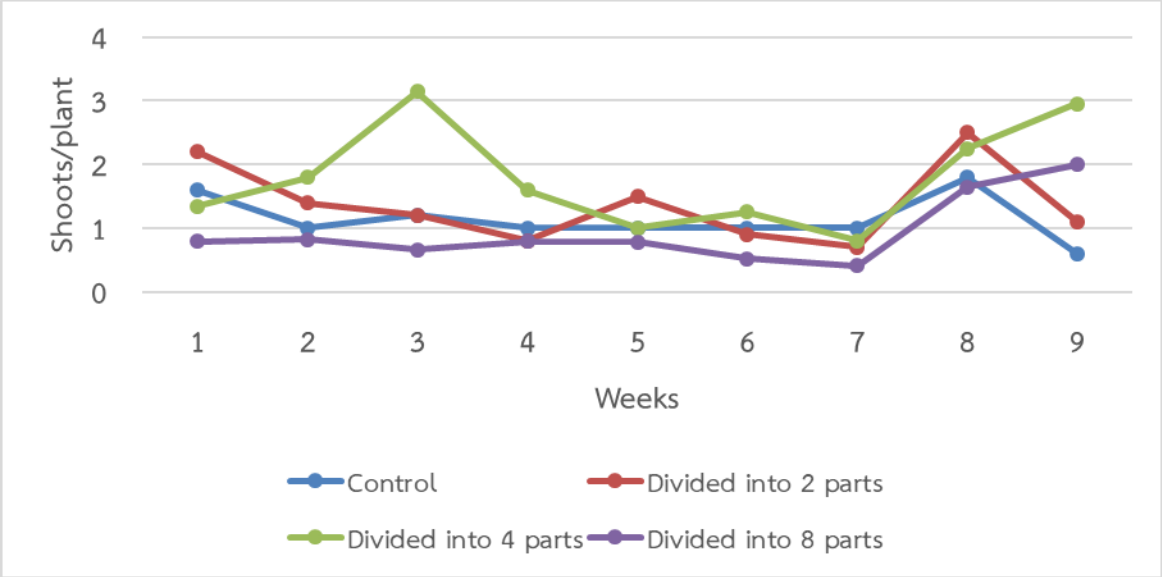


Figure 2.3.1.5 Effect of divided parts on number of shoots of *A. Racemosa.*

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.3.2. ชีววิทยา และนิเวศวิทยาของลูกใต้ใบใบใหญ่ (*Phyllanthus caroliniensis* Walter)
Biology and ecology of *Phyllanthus caroliniensis* Walter

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวธัญชนก จงรักไทย	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นางสาวศิริพร ซึงสนธิพร	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางอัณศยา พรมมา	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นายเอกรัตน์ ธนูทอง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ลูกใต้ใบใบใหญ่ (*Phyllanthus caroliniensis* Walter) เป็นวัชพืชประเภทใบกว้างที่มีถิ่นกำเนิดในแถบตะวันออกเฉียงใต้ของสหรัฐอเมริกา และถูกรายงานเป็นพืชพบใหม่ในไทยเมื่อปี 2005 การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพื่อศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยา ของ *P. caroliniensis* และหาแนวทางการจัดการ และป้องกันการแพร่ระบาด โดยทำการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2559-กันยายน 2561 ภายใต้สภาพโรงเรือน และห้องปฏิบัติการ และการสำรวจในพื้นที่ทำการเกษตร โดยศึกษาชีววิทยา การงอก การเจริญเติบโต ความสามารถในการขยายพันธุ์ และการงอกของเมล็ดที่ความลึกของระดับดินระดับต่างๆ ณ ห้องปฏิบัติการ และโรงเรือน กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ผลการทดลอง พบว่า จากสำรวจ พบลูกใต้ใบใบใหญ่ในแปลงมันสำปะหลังของจังหวัดลพบุรี และจังหวัดสระบุรี ลูกใต้ใบใบใหญ่มีผลสีเขียว เมื่อแก่มีสีน้ำตาล 1 ผล มี 6 เมล็ด สีน้ำตาลเข้ม มีจุดเรียงเป็นแถวบนผิวเมล็ด เมล็ดมี 3 ด้านชัดเจน โดยลูกใต้ใบใบใหญ่ จะงอกหลังจากเพาะเมล็ด 7 วัน ออกดอกติดผลจนกระทั่งเมล็ดแก่ใช้เวลา 44 วัน และต้นเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่ระยะ 131 วัน หลังติดผลชุดแรก ลูกใต้ใบใบใหญ่ มีวงจรชีวิต 175 วันหลังงอก การติดดอก และเมล็ดเกิดขึ้นไม่พร้อมกัน เป็นแบบทยอยไปเรื่อยๆ ทั้งนี้ 1 ต้น ที่สมบูรณ์ 1 รอบวงจรชีวิต สามารถผลิตเมล็ดได้ จำนวน 22,620 เมล็ด และสามารถขยายพันธุ์โดยการปักชำได้ แต่มีเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำกว่าการงอกจากเมล็ด และการงอกของเมล็ดสามารถงอกได้เพียงที่ระดับผิวดิน

คำหลัก: ชีววิทยา นิเวศวิทยา ลูกใต้ใบใบใหญ่

Abstract

Phyllanthus caroliniensis Walter is a broad leaf weed that originated in the southeastern United States. It was reported as a new crop in Thailand in 2005. This study was biology, ecology of *P. caroliniensis* and manage. The experiments between October 2016 - September 2018 under the condition of net house and laboratory Surveys in agricultural areas. The experiments consist of biology, germination, growth, ability to propagate and seed germination at each depth of soil level at various levels at weed science and research groups. The results showed that from the survey, found *P. caroliniensis* in the cassava plot at Lopburi province and Saraburi

province. *P. caroliniensis* had green fruits. When matured there is brown color. 6 seeds per fruits, dark brown, with spots arranged in rows on the seed surface. The seed has 3 distinct sides. That is germinate after 7 day. They were flowering, fruiting until the seed in 44 days. The tree begins to turn brown at 131 stage after fruit set. A life cycle on 175 days after germination. The flowers and seeds were not formed at the same time. A life cycle could produce 22,620 seeds. *P. caroliniensis* was reproducing by cuttings but lower percentage than seed germination. Seed germination can germinate only at the surface level.

Keywords: Biology ecology *Phyllanthus caroliniensis*

คำนำ

วัชพืชร้ายแรงหลายชนิดสามารถสร้างเมล็ดจำนวนมาก เมล็ดมีการพักตัวเมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม หรือมีอายุยาว นอกจากนี้หลายชนิดยังมีขนาดเล็ก ยากต่อการตรวจสอบ หรือมีขนาดใกล้เคียงกับเมล็ดพืชปลูก ทำให้แยกออกจากเมล็ดพันธุ์พืชปลูกได้ยาก (Muenscher, 1980) เมล็ดวัชพืชเป็นส่วนสำคัญของต้นวัชพืช เพราะทำหน้าที่เป็นส่วนขยายพันธุ์ หากเรารู้จักลักษณะและสัณฐานวิทยาของวัชพืชแล้วจะสามารถช่วยลดการระบาด และแพร่กระจายโดยการปนเปื้อนไปกับเมล็ดพันธุ์ของพืชปลูก วัสดุปลูก และอุปกรณ์ทางการเกษตรได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นคู่มือในการสำรวจชนิดและจำนวนเมล็ดของวัชพืชที่อยู่ในดินในฤดูปลูก เพื่อคาดคะเนถึงผลเสียหายที่จะเกิดขึ้นและสามารถเลือกวิธีจัดการได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป (ดวงพรและรังสิต, 2544)

การพักตัวของเมล็ด หมายถึงเมล็ดที่ไม่สามารถงอกได้ แม้มีปัจจัยที่เอื้อ เช่น น้ำ อุณหภูมิ และออกซิเจน เป็นระยะหนึ่งของวงจรการดำรงชีพที่พืช หรืออวัยวะของพืชหยุดการเจริญเติบโตชั่วคราว เพื่อหลีกเลี่ยงสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม หรือเกิดจากสภาวะภายในของพืชเอง หรือทั้งสองอย่างเพื่อความอยู่รอดของพืช (สมบุญ, 2538) การพักตัวของเมล็ดเกิดจากสภาพตามธรรมชาติของพืช ส่วนใหญ่เมล็ดของพืชปลูกจะไม่ค่อยพบการพักตัวเนื่องจากถูกคัดทิ้งไปในระบบปรับปรุงพันธุ์ เมล็ดที่มีการพักตัวส่วนใหญ่ คือวัชพืช และพืชป่า การพักตัว คือการที่ส่วนของพืชต่อต้านการเจริญเติบโต และพัฒนาการ ภายใต้สภาวะที่สามารถเจริญเติบโตได้ ส่วนของพืชที่เกิดการพักตัว เช่น เมล็ด หน่อ และส่วนอื่น ๆ ของพืช ส่งผลให้เกิดการกระจายพันธุ์ และการสืบพันธุ์ของเมล็ดวัชพืช โดยเฉพาะในวัชพืชปีเดียว (Devlin และ Witham, 1983; Radosevich และคณะ, 1996)

พื้นฐานทางด้านชีววิทยาของวัชพืชช่วยให้สามารถวางแผนในการจัดการวัชพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้สามารถลดการใช้สารกำจัดวัชพืชที่เกินความจำเป็นซึ่งอาจมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และระบบนิเวศเกษตร ความสัมพันธ์ระหว่างวัชพืช และสิ่งแวดล้อม ระบบการปลูกพืช และการจัดการพื้นที่เพาะปลูก ดังนั้นการจัดการวัชพืชอย่างเหมาะสมจึงควรเริ่มจากการศึกษาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับประชากรของเมล็ดวัชพืช รวมทั้งชีววิทยาของวัชพืชที่สำคัญ เพื่อใช้ประโยชน์ในการพยากรณ์จำนวน และชนิดของวัชพืชที่มีแนวโน้มจะ

กรมวิชาการเกษตร

ก่อให้เกิดปัญหาต่อพื้นที่การปลูกพืช และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนการจัดการวัชพืชต่อไป (ดวงพร, 2543)

ลูกใต้ใบใบใหญ่ (*Phyllanthus caroliniensis* Walter) เป็นวัชพืชประเภทใบกว้างที่มีถิ่นกำเนิดในแถบตะวันออกเฉียงใต้ของสหรัฐอเมริกา และถูกรายงานเป็นพืชพบใหม่ในไทยเมื่อปี 2005 (Pranom, 2005) เป็นวัชพืชในสกุลลูกใต้ใบใบใหญ่เพียงชนิดเดียวที่แพร่ระบาดได้ทุกสภาพภูมิอากาศ แพร่กระจายได้ทั่วทั้งประเทศสหรัฐอเมริกา และเป็นวัชพืชสำคัญในถั่วเหลือง (Webster, 1970) พบเป็นวัชพืชในอ้อย (ศิริพร และธัญชนก, 2556) จากการสำรวจวัชพืชในแปลงปลูกมันสำปะหลังในเขตอำเภอพัฒนานิคม จังหวัดลพบุรี ในปี 2557 พบวัชพืชชนิดนี้ระบาดรุนแรง ปกคลุมพื้นที่ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แปลงปลูกมันสำปะหลังอายุประมาณ 1 เดือน โดยเกือบไม่มีวัชพืชชนิดอื่นขึ้นเลย ทั้งนี้มันสำปะหลังและ *P. caroliniensis* Walter เป็นพืชในวงศ์ Euphorbiacaea เช่นเดียวกัน การควบคุมด้วยสารกำจัดวัชพืชจึงทำได้ยาก เพราะอาจทำให้เกิดความเป็นพิษต่อมันสำปะหลังด้วย ทางเลือกคือควบคุมด้วยวิธีอื่น ซึ่งในภาวะขาดแคลนแรงงานภาคการเกษตรและราคาแพง เกษตรกรบางรายเลือกที่จะปล่อยให้วัชพืชตายเอง ซึ่งเป็นการปล่อยเมล็ดพันธุ์ลงสู่ดิน และพร้อมที่จะระบาดในฤดูปลูกถัดไป หรือเมื่อดินมีความชื้นพอ ประกอบกับมีการใช้เครื่องจักรกลทางการเกษตรมากขึ้นตั้งแต่ขั้นตอนเตรียมดิน จนถึงการเก็บเกี่ยว ซึ่งการเคลื่อนย้ายเครื่องจักรกลเหล่านี้มักไม่มีการคำนึงถึงเมล็ดวัชพืชที่ติดไปกับเครื่องจักรกล และนำไปแพร่พันธุ์ในพื้นที่อื่นต่อไป ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษา ชีววิทยาและนิเวศวิทยา เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานสนับสนุนการแจ้งเตือนเกษตรกร และแนวทางการจัดการวัชพืชชนิดนี้

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. กล้องถ่ายรูปแบบดิจิตอล
2. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
3. เลนส์ขยาย 10 เท่า สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นในภาคสนาม
4. จานแก้ว บีกเกอร์ กระบอกตวง หลอดแก้วก้นตัด และเครื่องแก้วอื่นๆ ที่จำเป็น สำหรับการศึกษาในห้องปฏิบัติการ
5. กระดาษกรอง ผงวุ้น ผงเซลลูโลส พลาสติกใสสำหรับปิดอาหาร
6. กรรไกร มีด เสียม หรือพั่ว สำหรับตัด/ขุด ตัวอย่างพืช
7. ดินและกระถาง สำหรับปลูกพืชทดสอบในเรือนทดลอง
8. แผงอัดตัวอย่างพรรณไม้พร้อมกระดาษฟูก ฟองน้ำและหนังสือพิมพ์ พร้อมเชือกไส้ตะเกียงและป้ายชื่อสำหรับผูกตัวอย่างพืช
9. กระดาษติดตัวอย่างพืช พร้อมแฟ้มปก
10. ขวดแก้ว และน้ำยาสำหรับดองตัวอย่างพืช (หากจำเป็น)
11. น้ำยาชุบตัวอย่างวัชพืช ประกอบด้วย ฟีนอล เมอคิวริคคลอไรด์ เอทธิลอัลกอฮอล์
12. การบูร
13. เครื่องรับสัญญาณดาวเทียม เพื่อระบุพิกัด

กรมวิชาการเกษตร

14. อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น เช่น ถุงพลาสติกขนาดต่างๆ กระถางขนาดต่างๆ พร้อมดินและป้ายปัก สำหรับปลูกพืชตัวอย่างเพื่อเก็บเมล็ด และศึกษารายละเอียดของพืชเพิ่มเติม สมุดบันทึก

- วิธีการ

1. การสำรวจ และเก็บตัวอย่าง

สำรวจแบบสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ และเก็บตัวอย่าง

- กำหนดพื้นที่สำรวจ วางแผนการ โดยมี *P. caroliniensis* เป็นพืชเป้าหมาย ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม

- สำรวจและเก็บตัวอย่างเมล็ด และต้น เพื่อนำมาทดลอง และนำมาปลูกที่กลุ่มวิจัยวัชพืช และจัดทำตัวอย่างแห้ง

บันทึก สถานที่หรือพิกัด สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูก ลักษณะวัชพืช วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ

2. ศึกษาการงอกในห้องปฏิบัติการ

นำเมล็ดที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน สุ่มเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์และแก่ จำนวน 50 เมล็ด ใส่ในจานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร ที่บรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดฝา จำนวน 10 ซ้ำนำไปวางในห้องปฏิบัติการ สภาพอุณหภูมิห้อง บันทึกจำนวนเมล็ดงอกทุกวัน จนเมล็ดงอกหมด แต่ไม่เกิน 30 วัน

3. การเจริญเติบโต และความสามารถในการผลิตเมล็ด

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 5 ซ้ำ กรรมวิธี 4 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 ถอนออก ให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง จำนวนตามกรรมวิธีต่างๆ ที่กำหนดจำนวน 3 กรรมวิธีๆ ละ 4 ซ้ำ บันทึกความสูงต้น จำนวนกิ่ง ทุกสัปดาห์ วันที่ออกดอก ติดผล จำนวนผลต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อผลของพืชแต่ละต้นในแต่ละกระบะ

4. ความสามารถในการขยายพันธุ์ จากส่วนของต้น

วิธีการปฏิบัติการทดลอง หว่านเมล็ดวัชพืช จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1.5 ตารางเมตร หลังวัชพืชงอก 1 สัปดาห์ ถอนออก ให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง เมื่อต้นมีอายุ 1 เดือน นำชิ้นส่วนเหนือดินของวัชพืชมาตัดแบ่งเป็นท่อนๆ ละ 5-10 เซนติเมตร เป็นท่อนพันธุ์สำหรับปักชำ แยกท่อนพันธุ์ออกตามระยะห่างจากโคน ได้แก่ ท่อนโคน กลางต้น และปลายยอด

ศูนย์วิทยทรัพยากร

นำมาปักชำในกระถางขนาด 12 นิ้ว กระถางละ 10 ท่อน จำนวน 10 ซ้ำ บันทึกการแตกยอดใหม่ จากกิ่งที่ปักชำ แล้วนำไปวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย

5. ศึกษาการงอกของเมล็ดที่ความลึกของระดับดินระดับต่างๆ

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 วางเมล็ดบนผิวดิน

กรรมวิธีที่ 2 ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 3 ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 10 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 4 ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 5 ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 20 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 6. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 25 เซนติเมตร

วิธีการปฏิบัติการทดลอง บรรจุดินใส่กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร สูง 45 เซนติเมตร ให้ผิวดินห่างจากขอบบนของกระถาง 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 เซนติเมตร นำเมล็ดที่แก่และมีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด โรยลงให้ทั่วกระถาง แล้วเติมดินจนถึงระดับห่างจากขอบบนของกระถาง 5 เซนติเมตร บันทึก ความงอกของเมล็ดที่งอกโดยเปรียบเทียบในแต่ละกรรมวิธี

- เวลาและสถานที่

ทำการทดลอง ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2561 ณ ภาคต่างๆ ของประเทศไทย และศึกษาชีววิทยา ในห้องปฏิบัติการ และเรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษานิเวศวิทยา

1.1 สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดลูกใต้ใบใบใหญ่

สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดลูกใต้ใบใบใหญ่ โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ใน-ภาคเหนือ จำนวน 5 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำพูน และลำปาง ภาคกลาง จำนวน 9 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดนครสวรรค์ นครปฐม ลพบุรี ปทุมธานี พิจิตร สระบุรี กำแพงเพชร สุพรรณบุรี และสิงห์บุรี ภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 5 จังหวัด ได้แก่ จังหวัด นครราชสีมา ชัยภูมิ สกลนคร ขอนแก่น และอุดรธานี ภาคตะวันออก จำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ ระยอง จันทบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา สระแก้ว และตราด ภาคตะวันตก จำนวน 3 จังหวัด ได้แก่ ตาก เพชรบุรี และกาญจนบุรี และภาคใต้ จำนวน 5 จังหวัด ได้แก่ เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร นครศรีธรรมราช และสงขลา โดยยังไม่พบลูกใต้ใบใบใหญ่ในพื้นที่เพิ่ม มีเพียงพื้นที่เดิม จำนวน 2 จังหวัด คือ จังหวัดลพบุรี และสระบุรี ในพื้นที่ทำการเกษตร ได้แก่ แปลงมันสำปะหลัง (Table 2.3.2.1)

1.2 ลักษณะเมล็ด

เมล็ดที่เก็บจากแปลง และที่ปลูกไว้ที่เรือนทดลองกลุ่มวิจัยวัชพืช ที่ทำความสะอาด แล้วเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับทำการทดลองต่อไป

ศรีวิชาการเกษตร

เลือกเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด ถ่ายภาพ และวัดขนาดเมล็ด โดยลูกใต้ใบใบใหญ่มีผลสีเขียว เมื่อแก่มีสีน้ำตาล 1 ผล มี 6 เมล็ด สีน้ำตาลเข้ม มีจุดเรียงเป็นแถวบนผิวเมล็ด เมล็ดมี 3 ด้านชัดเจน มีขนาดเมล็ดเฉลี่ย คือยาว 1.22 มิลลิเมตร (ต่ำสุด 1.10 มิลลิเมตร สูงสุด 1.32 มิลลิเมตร) และกว้าง 1.03 มิลลิเมตร (ต่ำสุด 0.87 มิลลิเมตร สูงสุด 1.12 มิลลิเมตร) (Table 2.3.2.2)

2. การศึกษาการงอก

การศึกษาการงอกในห้องปฏิบัติการ โดยสุ่มเมล็ดที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่เก็บจากที่ต่างๆ และที่เก็บเพิ่มเติมจากจังหวัดลพบุรี นำไปเพาะในจานแก้ว บันทึกข้อมูลเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าเมล็ดจากที่ต่างๆ และเมล็ดจากจังหวัดลพบุรี เริ่มงอกที่ 8 และ 14 วันหลังเพาะ ตามลำดับ โดยเมล็ดจากทั้งสองแหล่งมีการงอกเพียง 0.2-1 เปอร์เซ็นต์

และการศึกษาการงอกในกระถาง โดยสุ่มเมล็ดที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่เก็บจากที่ต่างๆ และที่เก็บเพิ่มเติมจากจังหวัดลพบุรี นำไปเพาะในกระถาง บันทึกข้อมูลเป็นเวลา 2เดือน พบว่าเมล็ดจากที่ต่างๆ และเมล็ดจากจังหวัดลพบุรี เริ่มงอกที่ 6 และ 11 วันหลังเพาะ และงอกสูงสุดที่ 39 วันหลังเพาะเมล็ด 6.8 เปอร์เซ็นต์ และที่ 22 หลังเพาะเมล็ด 56.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อครบ 60 วันหลังเพาะเมล็ด เมล็ดจากที่ต่างๆ มีการงอกรวม 44 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เมล็ดจากจังหวัดลพบุรี มีการงอกครบ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ 37 วันหลังเพาะเมล็ด (Figure 2.3.2.3)

3. การเจริญเติบโต และความสามารถในการผลิตเมล็ด

การศึกษาการเจริญเติบโต และความสามารถในการผลิตเมล็ด พบว่า ลูกใต้ใบใบใหญ่ จะงอกหลังจากเพาะเมล็ด 7 วัน ออกดอกที่ระยะ 14 วันหลังงอก ดอกบานที่ 1 วันหลังออกดอก ติดผลที่ระยะ 2 วันหลังดอกบาน เมล็ดแก่ที่ระยะ 20 วันหลังติดผล และต้นเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่ระยะ 131 หลังติดผลชุดแรก โดยลูกใต้ใบใบใหญ่ มีวงจรชีวิต 175 วันหลังงอก การติดดอก และเมล็ดเกิดขึ้นไม่พร้อมกัน เป็นแบบทยอยไปเรื่อยๆ ทั้งนี้ 1 ต้น ที่สมบูรณ์ 1 รอบวงจรชีวิต สามารถผลิตเมล็ดได้ จำนวน 22,620 เมล็ด (Figure 2.3.2.4)

4. ความสามารถในการขยายพันธุ์ จากส่วนของต้น

หว่านเมล็ดวัชพืช จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1.5 ตารางเมตร หลังวัชพืชงอก 1 สัปดาห์ ถอนออกให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง เมื่อต้นมีอายุ 1 เดือน นำชิ้นส่วนเหนือดินของวัชพืชมาตัดแบ่งเป็นท่อนๆ ละ 5-10 เซนติเมตร แยกท่อนพันธุ์ออกตามระยะห่างจากโคน ได้แก่ ท่อนโคน กลางต้น และปลายยอด นำมาปักชำในกระถาง บันทึกข้อมูลเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ท่อนโคน กลางต้น และปลายยอด มีจำนวนกิ่งที่แตกยอดใหม่ 38, 46 และ 38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 2.3.2.3)

5. ศึกษาการงอกของเมล็ดที่ความลึกของระดับดินระดับต่างๆ

บรรจุดินใส่กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตรสูง 45 เซนติเมตร ให้ผิวดินห่างจากขอบบนของกระถาง 5, 10, 15, 20 และ 25 เซนติเมตร นำเมล็ดที่แก่และมีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด โรยลง

กรมวิชาการเกษตร

ให้ทั่วกระถาง แล้วเติมดินจนถึงระดับห่างจากขอบบนของกระถาง 5 เซนติเมตร บันทึก จำนวนเมล็ดงอกในแต่ละกรรมวิธีทุกวัน เป็นเวลา 2 เดือน โดยเมล็ดงอกเพียงที่ระยะ 5 เซนติเมตร จากผิวดิน โดยมีความงอก 44 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับอื่นๆ ไม่มีการงอกของเมล็ด แต่เมื่อมีการพลิกดินกลับขึ้นมาพบว่า เมล็ดสามารถงอกได้อีก (Table 2.3.2.4)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการทดลอง พบว่า จากสำรวจ พบลูกใต้ใบใบใหญ่ในแปลงมันสำปะหลังของจังหวัดลพบุรี และจังหวัดสระบุรี ลูกใต้ใบใบใหญ่มีผลสีเขียว เมื่อแก่มีสีน้ำตาล 1 ผล มี 6 เมล็ด สีน้ำตาลเข้ม มีจุดเรียงเป็นแถวบนผิวเมล็ด เมล็ดมี 3 ด้านชัดเจน โดยลูกใต้ใบใบใหญ่ จะงอกหลังจากเพาะเมล็ด 7 วัน ออกดอกติดผลจนกระทั่งเมล็ดแก่ใช้เวลา 44 วัน และต้นเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่ระยะ 131 หลังติดผลชุดแรก ลูกใต้ใบใบใหญ่ มีวงจรชีวิต 175 วันหลังงอก การติดดอก และเมล็ดเกิดขึ้นไม่พร้อมกัน เป็นแบบทยอยไปเรื่อยๆ ทั้งนี้ 1 ต้น ที่สมบูรณ์ 1 รอบวงจรชีวิต สามารถผลิตเมล็ดได้ จำนวน 22,620 เมล็ด และสามารถขยายพันธ์โดยการปักชำได้ แต่มีเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำกว่าการงอกจากเมล็ด และการงอกของเมล็ดสามารถงอกได้เพียงที่ระดับผิวดิน แต่เมื่อมีการพลิกดินกลับขึ้นมาพบว่า เมล็ดสามารถงอกได้อีก ดังนั้นในการป้องกันกำจัดลูกใต้ใบใบใหญ่ ควรมีการไถดินที่ระดับความลึกต่างๆ เพื่อพลิกดินให้เมล็ดสามารถงอกได้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัด

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1) ได้ข้อมูลประกอบการสร้างมาตรการทางกฎหมายในการควบคุม ป้องกัน ไม่ให้เป็นวัชพืชร้ายแรงในประเทศไทยในอนาคต เพื่อจัดทำคำแนะนำ เผยแพร่ แก่ประชาชน หน่วยงานภายในกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

2) เผยแพร่ผลงานวิจัย ในเอกสารวิชาการต่างๆ เช่น รายงานผลงานวิจัยประจำปี ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

Table 2.3.2.1 Table 1 Survey location of *Phyllanthus caroliniensis* Walter.

Region	Province	Present	Absent	Location
Northern	Chiang Rai		☐	
	Chiang Mai		☐	
	Mae Hong Son		☐	
	Lamphun		☐	
	Lampang		☐	
Central	Nakhon Sawan		☐	
	Nakhon Pathom		☐	
	Lop Buri	☐		แปลงมันสำปะหลัง
	Pathum Thani		☐	
	Phichit		☐	
	Saraburi	☐		แปลงมันสำปะหลัง
	Kamphaeng Phet		☐	
	Suphan Buri		☐	
	Sing Buri		☐	
Northeastern	Nakhon Ratchasima		☐	
	Chaiyaphum		☐	
	Sakon Nakhon		☐	
	Khon Kaen		☐	
	Udon Thani		☐	
Eastern	Rayong		☐	
	Chanthaburi		☐	
	Prachin Buri		☐	
	Chachoengsao		☐	
	Sa Kaeo		☐	
	Trad		☐	
Western	Tak		☐	
	Phetchaburi		☐	
	Karnchanaburi		☐	

กรมวิชาการเกษตร

Table 2.3.2.2 seeds size of *P. caroliniensis* Walter

	Phyllanthus caroliniensis Walter	
	length (mm)	width (mm)
minimum	1.10	0.87
maximum	1.32	1.12
mean	1.22	1.03
mode	1.2	1.05

Table 2.3.2.3 The ability to propagate from part of plant.

Treatments	Number of brunching (brunch/plant)
Base part	38.00 a
Central part	46.00 a
Shoot part	38.00 a
C.V. (%)	48.63

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

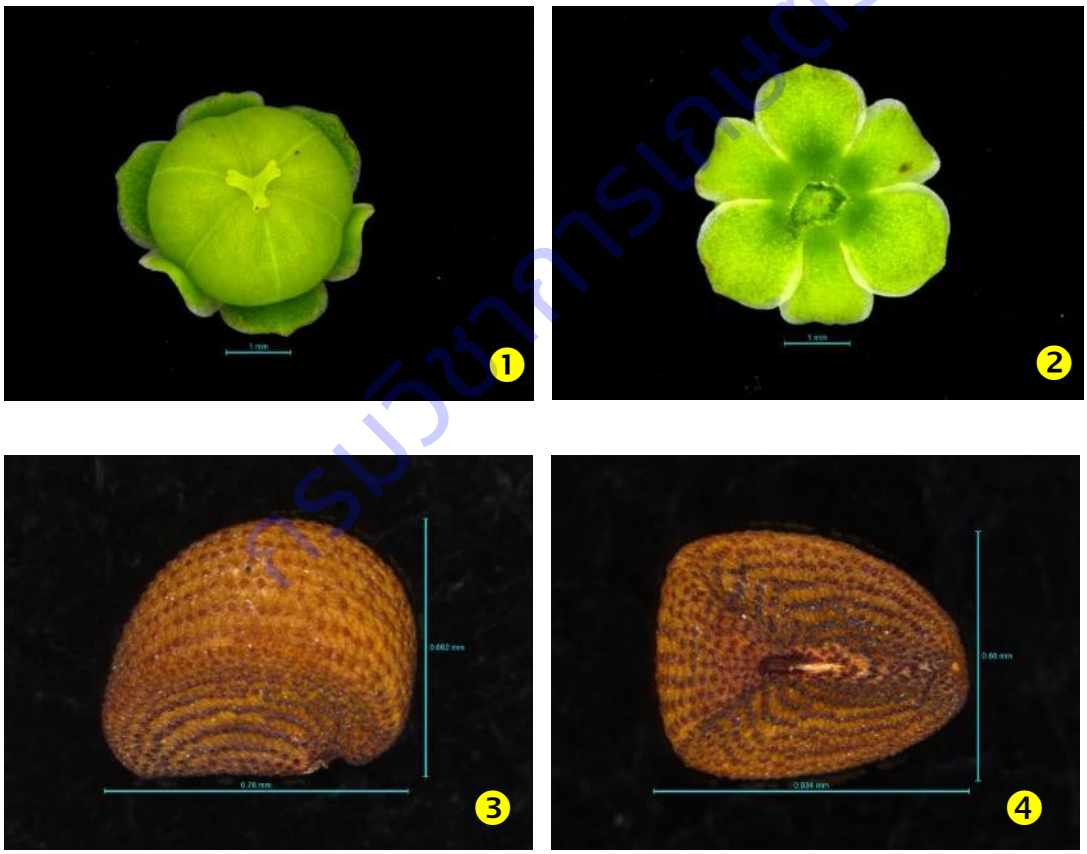
Table 2.3.2.4 Seed germination at various soil depths.

Treatments	Germination (%)
Place seeds on the soil surface	44.00 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. (%)	70.86

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

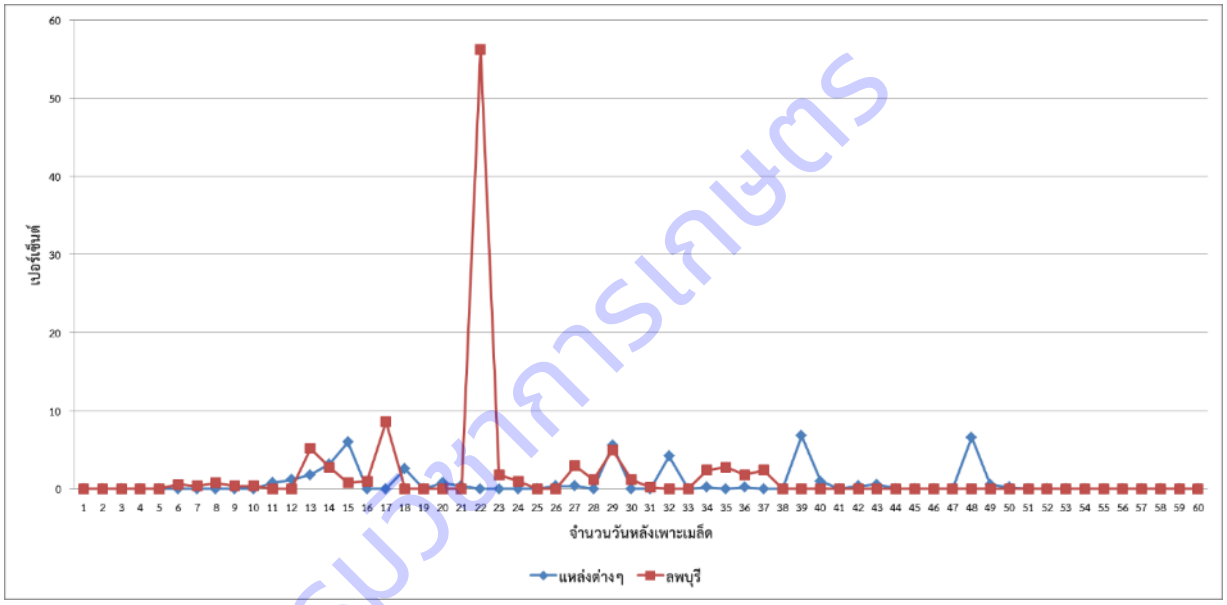
กรมวิชาการเกษตร

Figure 2.3.2.1 *P. caroliniensis* Walter in Cassava (1) *P. caroliniensis* Walter (2)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

Figure 2.3.2.2 Characteristics of fruits and seed Upper of fruit (1) Lower of fruit was 6 sepal (2) Seed (3) (4) Group of seeds (5) Fruit set (6)



กรมวิชาการเกษตร

Figure 2.3.2.3 Germination of *P. caroliniensis* Walter

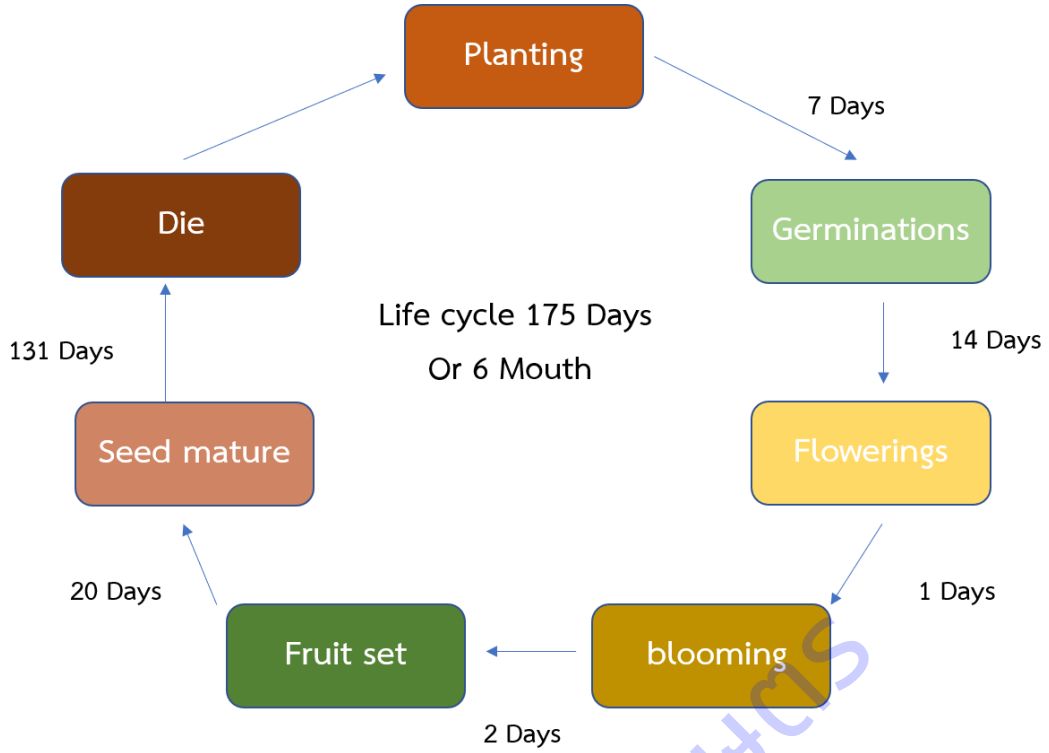


Figure 2.3.2.4 Life cycle of *P. caroliniensis* Walter

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.3.3 ชีววิทยาของวัชพืช *Asystasia gangetica* (L.) T. Anderson

The Biological Study of *Asystasia gangetica* (L.) T. Anderson

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	จรัญญา ปิ่นสุภา	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	วิไล อินทรเจริญสุข	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

วัชพืช *Asystasia gangetica* (L.) T. Anderson หรือมีชื่อไทยเรียกว่า บาหยา เป็นวัชพืชที่สำคัญในยางพารา ปาล์มน้ำมัน สับปะรด และไม้ผล เป็นต้น การศึกษาข้อมูลทางชีววิทยาจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการหาแนวทางการควบคุมและป้องกันกำจัดที่เหมาะสมในพื้นที่ทำการเกษตรต่อไป ดำเนินการทดลอง ในเรือนทดลองและห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช ในเดือน ตุลาคม 2559- ตุลาคม 2561 การศึกษาชีววิทยาของต้นบาหยา (*Asystasia gangetica*) ประกอบด้วย การศึกษาวงจรชีววิทยา การเจริญเติบโต การขยายพันธุ์ ศักยภาพการผลิตเมล็ด และอิทธิพลของระยะเวลาต่อการงอกของเมล็ด ผลการศึกษา พบว่า บาหยา เป็นวัชพืชอายุข้ามปี สามารถขยายพันธุ์ได้ทั้งเมล็ดและลำต้น หลังจากเมล็ดงอกประมาณ 1 สัปดาห์ มีใบจริงเป็นใบเดี่ยวออกตรงข้าม และมีการเจริญเติบโตทางด้านใบและลำต้นอย่างรวดเร็ว สร้างเมล็ดที่ระยะ 7 สัปดาห์หลังงอก และหลังจากดอกบาน 2-3 สัปดาห์ เมล็ดสุกแก่ และในช่วง 15 สัปดาห์หลังงอก ต้นบาหยาติดผลมากที่สุด จากนั้นในช่วง 19 สัปดาห์หลังงอก การเจริญเติบโตลดลงทั้งทางด้านลำต้น ใบ การสร้างผลและเมล็ดลดลง การขยายพันธุ์ ด้วยเมล็ด พบว่า เมล็ดอยู่บนผิวดิน มีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงถึง 92.8 เปอร์เซ็นต์ หากเมล็ดอยู่ในระดับความลึกของดิน 15 เซนติเมตร เมล็ดไม่สามารถงอกได้ เช่นเดียวกับส่วนของลำต้น

Abstract

Asystasia gangetica (L.) T. Anderson (common name in Thai “Baisha”) is one of the potential weeds in Thailand. This weed plays pivotal problems on rubbers, oil-palms, pineapples, and fruit crops across the country. The study of its biology is mandatory, since understanding the basic information leads to suitable prevention as well as effectiveness in control management on agricultural areas in the long run. The study was implemented in both a green houses and a laboratory of the Weed Science group from October 2017 – October 2018. The biological study of *Asystasia gangetica* included the observation of life cycles, plant growths, propagations, seed productions, and effect of times on seed emergences.The results showed that *Asystasia gangetica* is a perennial weed and can propagate by both seeds and stems. One week after seed germination, the plant had first opposite true leaves, after that the vegetative growth grew very rapidly.The seeds were produced at 7 weeks after seed germination and developed to mature seeds at 2-3 weeks after blooming. Maximum fruits of *Asystasia gangetica* were obtained 15 weeks after seed germination. Subsequently at 19 weeks

กรมวิชาการเกษตร

after seed germination, the vegetative growth diminished as well as fruits and seeds. For the seeds propagation, the study showed that the seeds on the surface soil provided high germination up to 92.8 percent. Neither seeds nor stems were able to germinate at 15 cm. deep in the soil.

คำนำ

Asystasia gangetica (L.) มีชื่อไทยว่าบาหยา เป็นพืชอยู่ในสกุล Asystasia วงศ์ Acanthaceae (วงศ์ต้อยติ่ง) เป็นพืชดั้งเดิมในประเทศแถบ South Africa ในปี 1997 Kiew และ Vollesen พบวัชพืชชนิดนี้เป็นวัชพืชที่สำคัญในประเทศมาเลเซีย เป็นปัญหาในพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน ยางพารา และโกโก้ โดยเฉพาะในพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันที่มีการแพร่ระบาดวัชพืชนี้ทั้งแปลง ทำให้ผลผลิตลดลง ในประเทศไทยพบว่าวัชพืชชนิดนี้ มีการนำเข้ามาเพื่อปลูกเป็นไม้ประดับ มีชื่อไทยว่าบาหยา การเป็นพืชไม้ประดับทำให้นิยมนำไปปลูก จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่เอื้อให้พืชในสกุลนี้เกิดการแพร่กระจายไปในที่ต่างๆได้ง่ายประกอบกับพืชชนิดนี้มีการแพร่ขยายพันธุ์ได้ดี ทั้งส่วนของเมล็ด และลำต้นหรือกิ่ง จึงง่ายต่อการแพร่ขยายพันธุ์ ในปี 2549 ศิริพรและคณะ พบวัชพืชชนิดนี้มีการระบาดลงในพืชปลูกเศรษฐกิจ คือปาล์มน้ำมัน และยางพาราในเขตภาคใต้ของประเทศไทย และในปี 2551 สำราญและคณะ รายงานว่าวัชพืชชนิดนี้สร้างปัญหาให้เกษตรกรชาวไร่สับปะรดในเขตพื้นที่ปลูกจังหวัดพัทลุง ทำให้ผลผลิตลดลงและในปัจจุบันพบวัชพืชนี้ ในพื้นที่ปลูกไม้ผล ในเขตภาคตะวันออก จะเห็นได้ว่าวัชพืชชนิดนี้มีศักยภาพการแพร่ระบาดได้ดีในพื้นที่ทำการเกษตรของประเทศไทย แต่ยังไม่มีข้อมูลงานวิจัยพื้นฐานทางด้านชีววิทยาในด้านการเจริญเติบโต วงจรชีวิตการขยายพันธุ์ ศักยภาพการผลิตเมล็ด อัตราการงอกของเมล็ด และระดับความลึกของเมล็ด และลำต้นต่อการงอก เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการหาแนวทางการควบคุมและป้องกันกำจัดที่เหมาะสมต่อไป

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์
  - เมล็ดบาหยา
  - กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร
  - ไม้บรรทัด
  - เคาร์เตอร์
  - ถุงกระดาษและป้ายแปลง
- วิธีการ

1.ศึกษาการเจริญเติบโต

1.1 ศึกษาวงจรชีวิตของบาหยา

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

รวบรวมเมล็ดบาหยาจากแปลงเกษตรกรหรือที่พบตามธรรมชาติ เลือกเมล็ดที่สมบูรณ์และสุกแก่ ลงปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร โรยเมล็ด 5 เมล็ดต่อกระถาง ถอนแยกให้เหลือ กระถางละ 1 ต้น จำนวน 10 ซ้ำ

- การบันทึกข้อมูล

การบันทึก วันงอก ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้า ระยะเวลาใบจริงคู่แรก เกิดเป็นตุ่มตา ดอกแรก ระยะดอกแรกบาน ดอกติดเมล็ด จนกระทั่งต้นตาย

1.2 ศึกษาการพัฒนาการเจริญเติบโต

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

ปลูกบาหยาในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร กระถางละ 5 ต้น จำนวน 60 กระถาง หลังจากงอกมีใบเลี้ยง 2 ใบ ทำการถอนแยกให้เหลือ 1 ต้นต่อกระถาง

- การบันทึกข้อมูล

ในทุกๆ1 สัปดาห์ ทำการถอนต้นบาหยาจำนวน 5 กระถาง เพื่อชั่งน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง วัดความสูง นับจำนวนช่อดอก สุ่มช่อดอกมานับจำนวนดอกย่อยต่อช่อดอก จำนวนเมล็ดต่อดอก เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

2. ศึกษาการขยายพันธุ์

2.1 การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดในระดับความลึกของดิน

- กรรมวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 วางเมล็ดบนผิวดิน

กรรมวิธีที่ 2 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 3 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 3 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 4 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

นำเมล็ดบาหยาที่สุกแก่และมีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 50 เมล็ด ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร สูง 18 เซนติเมตร จำนวน 20 กระถาง วางแผนการทดลองแบบ มี 5 ซ้ำ โดยมีระดับความลึกของดินเป็นกรรมวิธีต่างๆ ได้แก่ วางเมล็ดบนผิวดิน (0), 3, 5, และ 15 เซนติเมตร รดน้ำทุกวัน

- การบันทึกข้อมูล

จำนวนต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน

2.2 การขยายพันธุ์ด้วยลำต้นในระดับความลึกของดิน

- กรรมวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 3x4 Factorial in RCB จำนวน 3 ซ้ำ

ปัจจัยที่ 1 ส่วนของลำต้น มี 3 ระดับ

- โคนต้น
- กลางต้น
- ปลายต้น

กรมวิชาการเกษตร

ปัจจัยที่ 2 ระดับความลึกของดิน

- ระดับผิวดิน(0)
- ระดับความลึกจากผิวดิน 3 เซนติเมตร
- ระดับความลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร
- ระดับความลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 1 วางส่วนโคนต้นบนผิวดิน

กรรมวิธีที่ 2 วางส่วนกลางต้นบนผิวดิน

กรรมวิธีที่ 3 วางส่วนปลายต้นบนผิวดิน

กรรมวิธีที่ 4 วางส่วนโคนต้นที่ระดับความลึกจากผิวดิน 3 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 5 วางส่วนกลางต้นที่ระดับความลึกจากผิวดิน 3 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 6 วางส่วนปลายต้นที่ระดับความลึกจากผิวดิน 3 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 7 วางส่วนโคนต้นที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 8 วางส่วนกลางต้นที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 9 วางส่วนปลายต้นที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 10 วางส่วนโคนต้นที่ระดับความลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 11 วางส่วนกลางต้นที่ระดับความลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 12 วางส่วนปลายต้นที่ระดับความลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

นำส่วนลำต้นของบาหยา มาตัดเป็นท่อนมีความยาวประมาณ 4 เซนติเมตร และแยกเป็นส่วนคือ ส่วนโคนต้น กลางต้น และปลายต้น และนำไปปลูกในกระถางที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร โดยนำส่วนของลำต้นของบาหยาในแต่ละส่วนจำนวน 10 ท่อน วางในแต่ละกระถางที่มีระดับความลึกของดิน 4 ระดับคือ ระดับบนผิวดิน(0), 3, 5 และ 15 เซนติเมตร หลังจากนั้นดูแลรักษาโดยรดน้ำทุกวัน

การบันทึกข้อมูลจำนวนต้นอ่อนที่งอกจากลำต้นทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน

3. ศึกษาศักยภาพการผลิตเมล็ด

- แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 3 ซ้ำ 7 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 บาหยา 1 ต้น /ตารางเมตร

กรรมวิธีที่ 2 บาหยา 2 ต้น /ตารางเมตร

กรรมวิธีที่ 3 บาหยา 4 ต้น /ตารางเมตร

กรรมวิธีที่ 4 บาหยา 6 ต้น /ตารางเมตร

กรรมวิธีที่ 5 บาหยา 8 ต้น /ตารางเมตร

กรรมวิธีที่ 6 บาหยา 10 ต้น /ตารางเมตร

กรรมวิธีที่ 7 บาหยา 50 ต้น /ตารางเมตร (ตามธรรมชาติ ประมาณ 50 ต้น/ตารางเมตร)

กรมวิชาการเกษตร

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

ปลูกต้นบาหยาในพื้นที่ขนาด 1 ตารางเมตร เพื่อศึกษาศักยภาพในการผลิตเมล็ดของต้นบาหยา ในสมีการแข่งขันของต้นบาหยาในอัตราที่แตกต่างกัน โดยเปรียบเทียบกับการขึ้นในสภาพธรรมชาติในพื้นที่ 1 ตารางเมตร ประมาณ 50 ต้น

- การบันทึกข้อมูล

จำนวนเมล็ดของแต่ละต้นในแต่ละกรรมวิธี

4. ศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาต่อการงอกของเมล็ดบาหยา

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

นำเมล็ดบาหยา ที่เก็บในระยะเวลาต่างๆ ได้แก่

- ทันทีหลังจากสุกแก่จากแปลง
- 1 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
- 2 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
- 3 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
- 4 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
- 5 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
- 6 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
- 7 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
- 8 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
- 9 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
- 10 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
- 11 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
- 12 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ

นำเมล็ดที่เก็บในช่วงเวลาต่างๆมาเพาะโดย นับเมล็ดบาหยา จำนวน 100 เมล็ด ใส่จานแก้วบรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร จำนวน 5 ซ้ำ นำไปวางในสอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ

- การบันทึกข้อมูล

นับจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน

- เวลาและสถานที่

เรือนทดลอง และห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช เดือน ตุลาคม 2559- ตุลาคม 2561

ผลการทดลองและวิจารณ์

วงจรชีวิต และการเจริญเติบโตของต้นบาหยา (*Asystasia gangetica*)

ศึกษาวงจรชีวิต และการเจริญเติบโตของต้นบาหยา (*Asystasia gangetica*) พบว่า ตั้งแต่เมล็ดเริ่มงอกจนกระทั่งออกดอกและติดผลพบว่าหลังจากปลูกเมล็ดลงดิน เมล็ดสามารถงอก 3-5 วันหลังปลูก หลังจากนั้นประมาณ 1 สัปดาห์ มีใบจริงเป็นใบเดี่ยวออกตรงข้าม ต่อจากนั้นที่ระยะ 2-3 สัปดาห์ มีการแตกกิ่งตรงบริเวณโคนต้นและลำต้นเป็นลักษณะสี่เหลี่ยม ลำต้นบาหยาแตกกิ่งมากขึ้นเรื่อยๆ โดยในแต่ละข้อของลำต้น

แตกออกเป็นกิ่ง 2 กิ่ง พร้อมกับความสูงและจำนวนใบที่เพิ่มมากขึ้น จนกิ่งด้านล่างชิดดินเกิดรากบริเวณข้อของกิ่ง จนในระยะ 6 สัปดาห์เกิดช่อดอก ดอกบานหลังเกิดช่อดอกประมาณ 1 สัปดาห์หรือ 7 สัปดาห์หลังงอก ดอกบานและมีการสร้างเมล็ดอยู่ภายในรังไข่ ซึ่งภายในมีเมล็ดประมาณ 2-4 เมล็ด ผลแรกสุก(ผลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล)ที่ระยะ 2-3 สัปดาห์หลังจากดอกบาน หรือ 9-10 สัปดาห์หลังงอก ต้นบาหยาทยอยออกดอกและติดผลจนถึงช่วงสัปดาห์ที่ 15 โดยติดผลมากที่สุด จากนั้นจะค่อยๆลดลงจนถึง 19 สัปดาห์หลังงอก ต้นเริ่มโทรมใบเหลือง ไม่มีการออกดอกติดผล และมีน้ำหนักแห้งของบาหยาลดลง (ภาพที่ 2.3.3.1 และตารางที่ 2.3.3.1) แต่ในส่วนของลำต้นโดยเฉพาะส่วนของโคนต้นมีการสร้างตาตามข้อและรอบโคนต้น เมื่อลำต้น กิ่ง หรือโคนต้นทอดนอนกับผิวดิน สามารถที่จะสร้างรากงอกติดกับผิวดิน และตามข้อมีการเจริญเติบโตแตกใบใหม่ แต่สภาพแวดล้อมบริเวณนั้นต้องมีความชื้นและแสงแดดที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของต้นบาหยา สอดคล้องกับการรายงานของ Hsu *et al*.(2005) และ Westaway *et al*.(2016) ที่พบว่าบาหยาเป็นวัชพืชอายุหลายปี (perennial weed) ขยายพันธุ์ได้ทั้งเมล็ด และส่วนของลำต้น

การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดในระดับความลึกของดิน

นำเมล็ดบาหยา หว่านลงในกระถางในระดับความลึกของดินที่ระดับ 0, 3, 5 และ 15 เซนติเมตร เพื่อศึกษาการงอกของเมล็ดบาหยาในระดับความลึกต่างๆ พบว่า เมล็ดบาหยาที่หว่านที่ระดับความลึก 0 เซนติเมตร (ผิวหน้าดิน) มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดสูงกว่า เมล็ดที่ถูกหว่านในระดับความลึก 3 และ 5 เซนติเมตร โดยพบว่าเมล็ดที่หว่านที่ระดับความลึก 0 เซนติเมตร(บนผิวหน้าดิน) มีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงถึง 92.8 เปอร์เซ็นต์ และ เมล็ดที่หว่านที่ระดับความลึก 3, 5 และ 15 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์ความงอก 84.8 72.4 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าเมล็ดที่หว่านที่ระดับความลึกของดิน 15เซนติเมตร เมล็ดไม่สามารถงอกโผล่พ้นหน้าดินได้ และการงอกของเมล็ดที่ระดับความลึกของดิน 0 เซนติเมตร (ผิวหน้าดิน) และ 3 เซนติเมตร เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดบาหยาไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เมล็ดที่หว่านที่ระดับความลึกของดิน 5 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดแตกต่างทางสถิติกับเมล็ดที่หว่านระดับความลึกของดินที่ระดับ 0 เซนติเมตร (ผิวหน้าดิน) และ 3 เซนติเมตร (ตารางที่ 2.3.3.2)

การขยายพันธุ์ด้วยลำต้นในระดับความลึกของดิน

จากการที่นำส่วนของลำต้นของบาหยามาศึกษาการขยายพันธุ์ โดยนำส่วนลำต้นของบาหยา มาตัดเป็นท่อนมีความยาวประมาณ 4 เซนติเมตร และแยกเป็นส่วนคือ ส่วนโคนต้น กลางต้น และปลายต้น และนำไปปลูกในกระถางที่มีระดับความลึกของดิน 4 ระดับคือ 0 (ผิวดิน), 3, 5 และ 15 เซนติเมตร พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างความลึกของดินและส่วนต่างๆของต้น(โคนต้น กลางต้น และปลายต้น) ไม่มีผลต่อการขยายพันธุ์ เช่นเดียวกับส่วนของลำต้น คือ ส่วนโคนต้น กลางต้น และปลายต้น ไม่มีผลต่อการขยายพันธุ์ การขยายพันธุ์ด้วยส่วนโคนต้น กลางต้น และปลายต้น สามารถที่จะงอกเจริญเติบโตเป็นต้นบาหยาได้ไม่แตกต่างกัน แต่ระดับความลึกของดินมีผลต่อการงอกหรือการขยายพันธุ์ของส่วนของลำต้นบาหยา ซึ่งจะพบว่าส่วนที่วางส่วนของโคนต้น กลางต้น และปลายต้น ในระดับความลึกของดินคือ 0 (ผิวดิน), 3 และ 5 เซนติเมตร ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่จะแตกต่างทางสถิติกับที่วางส่วนของโคนต้น กลางต้น และปลายต้นที่ 15 เซนติเมตร ซึ่งเป็นระดับความลึกของดินที่บาหยาไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (ตารางที่ 2.3.3.3)

กรมวิชาการเกษตร

ศักยภาพการผลิตเมล็ด

ศึกษาศักยภาพในการผลิตเมล็ดของต้นบาหยา ในสมีการแข่งขันของต้นบาหยาในอัตราที่แตกต่างกัน โดยเปรียบเทียบกับการขึ้นในสภาพธรรมชาติในพื้นที่ 1 ตารางเมตร ประมาณ 50 ต้น จากผลการทดลอง (ตารางที่ 2.3.3.4) จะเห็นว่า ค่าเฉลี่ยของเมล็ดบาหยาต่อต้นโดยเพิ่มความหนาแน่นของต้นบาหยาในพื้นที่ปลูก 1 ตารางเมตร กรรมวิธีที่มีต้นบาหยา 1 ต้นต่อตารางเมตร และ 2 ต้นต่อตารางเมตร มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อต้นมากกว่ากรรมวิธีที่อื่นๆ ฉะนั้นหากพบต้นบาหยาในพื้นที่เพียง 1 หรือ 2 ต้น จำเป็นต้องกำจัดออกจากพื้นที่ เนื่องจากต้นบาหยา สามารถที่จะผลิตเมล็ดได้สูงมากว่า 1000 เมล็ดต่อต้น และมีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดสูงมากว่า 90 เปอร์เซ็นต์

อิทธิพลของระยะเวลาต่อการงอกของเมล็ดบาหยา

เก็บรวบรวมเมล็ดจากต้นบาหยาที่มีการสุกแก่พร้อมกัน เมล็ดทั้งหมดเก็บในห้องปฏิบัติ อุณหภูมิปกติ โดยแบ่งเมล็ดมาทำการเพาะในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน แล้วนำเมล็ดมาเพาะหาเปอร์เซ็นต์ความงอกในแต่ละเดือนเพื่อจะศึกษาเมล็ดบาหยาสามารถพักตัวได้นานเท่าไร หากยังอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต ทดสอบความงอกในแต่ละเดือนหลังจากที่เก็บเมล็ดจากต้นบาหยา โดยเพาะเมล็ดเป็นระยะเวลา 1 ปี พบว่า เมล็ดบาหยามีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูง โดยเฉพาะในช่วง 1-6 เดือน เปอร์เซ็นต์ความงอก 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นในเดือนที่ 7 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ความงอกลดลง แต่ยังมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ยสูงมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นที่ระยะ 9 เดือน เปอร์เซ็นต์ความงอกลดลง จนกระทั่งที่ระยะ 12 เดือนหรือ 1 ปี เมล็ดไม่สามารถงอกได้ เปอร์เซ็นต์ความงอกเป็น 0 (ตารางที่ 2.3.3.5)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

บาหยา (*Asystasia gangetica*) เป็นวัชพืชอายุข้ามปี สามารถขยายพันธุ์ได้ทั้งเมล็ดและลำต้น สร้างเมล็ดที่ระยะ 7 สัปดาห์หลังงอก และหลังจากดอกบาน 2-3 สัปดาห์ เมล็ดสุกแก่ และในช่วง 15 สัปดาห์หลังงอก ต้นบาหยาติดผลมากที่สุด จากนั้นในช่วง 19 สัปดาห์หลังงอก การเจริญเติบโตลดลงทั้งทางด้านลำต้น ใบ และการสร้างผลและเมล็ดลดลง การขยายพันธุ์ ด้วยเมล็ด สามารถขยายพันธุ์ได้ดีกว่าการขยายพันธุ์ด้วยลำต้น โดยเมล็ดสามารถงอกได้ดีที่ระดับผิวดิน มีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงถึง 92.8 เปอร์เซ็นต์ และศักยภาพในการผลิตเมล็ดสามารถผลิตเมล็ดได้มากกว่า 1000 เมล็ดต่อต้น และการผลิตเมล็ดลดลงหากมีความหนาแน่นของต้นบาหยาเพิ่มขึ้น และเมล็ดที่สุกแก่มีชีวิตอยู่ได้นานสูงถึง 8 เดือน โดยมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ยมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ งานทดลองนี้อาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องฤดูกาล(ฤดูฝนและฤดูแล้ง)อาจมีผลต่อการเจริญเติบโตต่อบาหยา

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลจากการทดลองที่ได้ใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนการจัดการวัชพืชบาหยาระบาดในพื้นที่ไม้ยืนต้น ได้แก่ ไม้ผล ปาล์มน้ำมัน และยางพารา

กรมวิชาการเกษตร

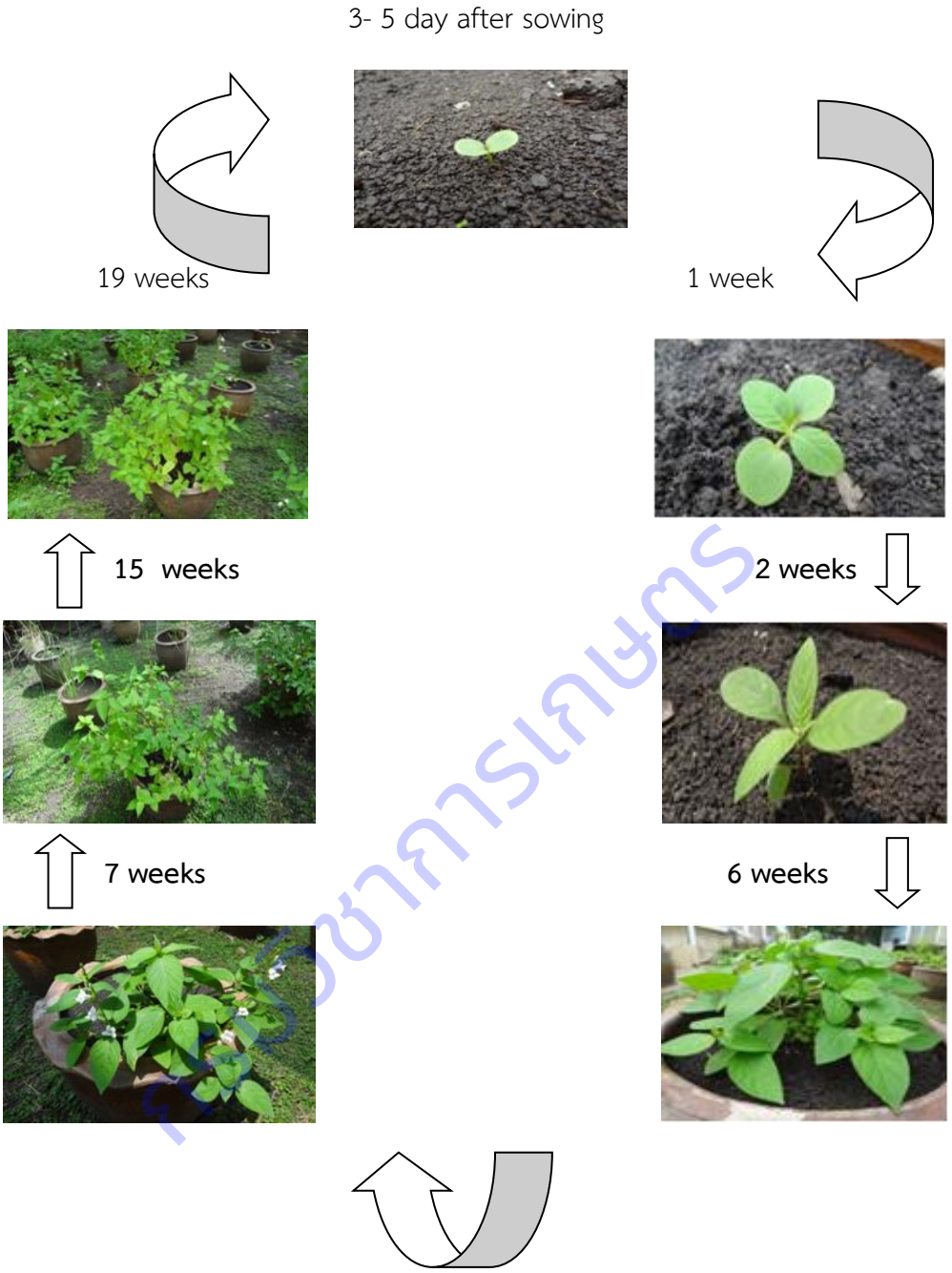


Figure 2.3.3.1. Life cycle of *Asystasia gangetica*

กรมวิชาการเกษตร

Table 2.3.3.1. Growth of Asystasia gangetica

Weeks after seed germination	Height (cm.)	Leaf/plant	Branches/plant	Inflorescence /plant	Flower/plant	Fruits/plant	Dry weight (g)
1	2.08	2.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
2	6.22	4.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.34
3	8.76	14.40	4.00	0.00	0.00	0.00	0.23
4	12.32	26.60	5.20	0.00	0.00	0.00	0.60
5	17.70	41.40	5.80	0.00	0.00	0.00	1.47
6	20.38	57.00	6.20	1.40	0.00	0.00	2.99
7	26.52	117.00	9.60	1.60	1.60	0.00	5.68
8	30.76	161.20	14.80	1.80	2.00	0.00	9.62
9	37.72	187.60	21.80	2.0	2.60	0.00	15.18
10	52.40	267.20	26.60	21.80	23.00	0.60	25.62
11	61.40	293.60	39.40	29.20	32.80	1.80	33.56
12	62.33	438.00	40.33	24.67	30.33	5.00	48.77
13	65.33	446.67	47.33	14.33	12.33	21.00	61.80
14	64.50	446.50	46.00	18.00	8.00	21.50	42.20
15	64.00	501.00	56.50	13.50	1.00	23.50	61.65
16	66.00	515.00	48.50	13.50	3.00	21.50	61.60
18	82.00	672.50	67.00	10.00	1.00	9.50	93.90
19	88.50	518.00	59.50	13.00	0.00	0.00	87.02
20	83.00	504.00	60.00	14.67	3.00	14.33	63.54
21	73.00	453.67	46.33	20.00	0.33	11.00	41.35

กรมวิชาการเกษตร

Table 2.3.3.2. Percentage germination of *Asystasia gangetica* buried seeds in the soil

Soil depth(cm.)	Percentage germination (%)
0	92.8 a
3	84.8 a
5	72.4 b
15	0 c
CV(%)	11.98

Means within columns followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

Table 2.3.3.3. Propagation of *Asystasia gangetica* by stems in the soil

Part of stems	Soil depth(cm.)				Means
	0	3	5	15	
stub	0.0	36.7	46.7	0.0	12.7 a[1/]
middle	46.7	40.0	26.7	0.0	27.5 a
tip	66.7	438.9	33.3	0.0	35.0 a
ค่าเฉลี่ย	37.8 a[1/]	38.9 a	35.6a	0 b	
CV(%)	75.07				

Means within columns followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

Table 2.3.3.4. Means of number seeds under competed between *Asystasia gangetica* in

Treatments	Means/plant
1.one plant /m^2	1305 b
2.two plants / m^2	5229 a
3.four plants / m^2	517 c
4.six plants / m^2	493 c
5.eight plants / m^2	316 d
6.ten plants / m^2	258 de
7.fifty plants / m^2	35 f
CV(%)	12.41

Means within columns followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Table 2.3.3.5. Percentage germination of *Asystasia gangetica* mature seeds within 12 months after harvesting

Months after harvesting	Means(%)
0	100
1	100
2	100
3	100
4	100
5	100
6	100
7	97.8
8	86.2
9	72.6
10	43
11	15.8
12	0

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.3.4 ชีววิทยา และนิเวศวิทยาของกระดุมใบใหญ่ (*Borreria latifolia* (Aubl), Schum.)
Biology and ecology of *Borreria latifolia* (Aubl.) Schum.

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง นางสาวธัญชนก จงรักไทย สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน อัณศยา พรมมา และเอกรัตน์ ธนูทอง
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

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 วัน โดยเฉลี่ย เนื่องจากมีการติดดอก และเมล็ดไม่พร้อมกัน โดย 1 ต้น ที่สมบูรณ์ สามารถผลิตเมล็ดได้ จำนวน 2,850 เมล็ด ทั้งนี้กระดุมใบใหญ่มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน ทั้งในสภาพการแข่งขัน และไม่มีการแข่งขัน กระดุมใบใหญ่ 1 ผลมี 2 ลูป แต่ละลูป 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.

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,

กรมวิชาการเกษตร

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.

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 ผลรูปร่างรีหรือค่อนข้างกลม เปลือกผลย่นและมีขน ผลแก่จะแตกตามยาว เมล็ดสีน้ำตาลรูปทรงรียาว (วิรัช และคณะ, 2547) ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด เนื่องจากเมล็ดค่อนข้างสมบูรณ์ แต่ขณะงอกจำเป็นต้องมีแสง เมื่องอกแล้วจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และสามารถขยายพันธ์ได้อีกภายในระยะเวลา 2 เดือน การที่กระดุมใบใหญ่สามารถผลิตเมล็ดได้มาก จึงมีความสมารถในการแข่งขันกับพืช แก่งแย่งอาหารและน้ำ ทำให้น้ำหนักแห้ง และความสูงของยางพาราในระยะเริ่มปลูกลดลง 12 และ 17% ตามลำดับ การเจริญเติบโตร่วมกันกับพืชอื่น ๆ กระดุมใบใหญ่จะมีช่วงวิกฤตของการแข่งขันในยางพาราที่ระยะ 4-6 สัปดาห์หลังปลูก (Suryaningtyas and Terry, 1993) ในข้าวไร่ที่ระยะ 4-8 สัปดาห์หลังหยอดเมล็ด (Tjitrosoedirdjo, 1992)

กระดุมใบใหญ่เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนชื้น พื้นที่ที่มีฤดูแล้งสั้น มีทั้งแดดและร่มเงา ในพื้นที่ทำการเกษตร นอกพื้นที่ทำการเกษตร ริมถนน หรือริมแม่น้ำ สามารถเติบโตได้ทั้งในดินที่ขาดความอุดมสมบูรณ์ และโดยชอบดินทราย (Soerjani *et al*., 1987) นอกจากนี้ยังพบได้ถึงระดับความสูง 1,600 เมตรในไทย (Harada *et al*., 1987) กระดุมใบใหญ่เป็นวัชพืชที่พบในอ้อย ยางพารา ปาล์มน้ำมัน สวนผลไม้ ชา มันสำปะหลัง และพืชไร่หลายปี เช่น ข้าวโพดถั่วเหลืองและข้าว (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 ดังนั้นจึงเห็นควรที่จะทำการศึกษาข้อมูลทางด้านชีววิทยา และนิเวศวิทยาเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการหาแนวทางการป้องกันกำจัดวัชพืชสกุลนี้ เนื่องจากพื้นฐานทางด้านชีววิทยาของวัชพืชช่วยให้สามารถวางแผนในการจัดการวัชพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพทำให้สามารถลดการใช้สารกำจัดวัชพืชที่เกินความจำที่อาจมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และระบบนิเวศเกษตร ความสัมพันธ์ระหว่างวัชพืช และสิ่งแวดล้อม ระบบการปลูกพืช และการจัดการพื้นที่เพาะปลูก หรือหากเกษตรไม่ต้องการใช้สารกำจัดวัชพืช ก็หันมาใช้แรงงานคน แต่ปัจจุบันอยู่ในภาวะขาดแคลนแรงงานภาคการเกษตร และราคาแพง เกษตรกรบางรายเลือกที่จะปล่อยให้วัชพืชตายเอง ซึ่งเป็นการปล่อยเมล็ดลงสู่ดิน และ

กรมวิชาการเกษตร

พร้อมที่จะระบาดในฤดูปลูกถัดไป หรือเมื่อดินมีความชื้นพอ ประกอบกับมีการใช้เครื่องจักรกลทางการเกษตรมากขึ้น ตั้งแต่ขั้นตอนเตรียมดิน จนถึงการเก็บเกี่ยว ซึ่งการเคลื่อนย้ายเครื่องจักรกลเหล่านี้มักไม่มีการคำนึงถึงเมล็ดวัชพืชที่ดินไปกับเครื่องจักรกล และนำไปแพร่พันธุ์ในพื้นที่อื่นต่อไป ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษา ชีววิทยาและนิเวศวิทยา เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานสนับสนุนการแจ้งเตือนเกษตรกร และแนวทางการจัดการวัชพืชชนิดนี้

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. กล้องถ่ายรูปแบบดิจิตอล
2. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
3. เลนส์ขยาย 10 เท่า สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นในภาคสนาม
4. จานแก้ว บีกเกอร์ กระบอกตวง หลอดแก้วก้นตัด และเครื่องแก้วอื่นๆ ที่จำเป็น สำหรับการศึกษาในห้องปฏิบัติการ
5. กระดาษกรอง ผงวุ้น ผงเซลลูโลส พลาสติกใสสำหรับปิดอาหาร
6. กรรไกร มีด เสียม หรือพั่ว สำหรับตัด/ขุด ตัวอย่างพืช
7. ดินและกระถาง สำหรับปลูกพืชทดสอบในเรือนทดลอง
8. แผงอัดตัวอย่างพรรณไม้พร้อมกระดาษฟูก ฟองน้ำและหนังสือพิมพ์ พร้อมเชือกไส้ตะเกียงและป้ายชื่อสำหรับผูกตัวอย่างพืช
9. กระดาษติดตัวอย่างพืช พร้อมแฟ้มปก
10. ขวดแก้ว และน้ำยาสำหรับดองตัวอย่างพืช (หากจำเป็น)
11. น้ำยาชุบตัวอย่างวัชพืช ประกอบด้วย ฟีนอล เมอคิวริคคลอไรด์ เอทธิลอัลกอฮอล์
12. การบูร
13. เครื่องรับสัญญาณดาวเทียม เพื่อระบุพิกัด
14. อุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็น เช่น ถุงพลาสติกขนาดต่าง ๆ กระถางขนาดต่าง 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

กรมวิชาการเกษตร

ตราด ปราจีนบุรี และระยอง) ภาคตะวันตก (จังหวัดกาญจนบุรี ตาก และราชบุรี) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดนครราชสีมา นครพนม บุรีรัมย์ ร้อยเอ็ด ศรีสะเกษ และหนองคาย) และภาคใต้ (จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระนอง นครราชสีมา และสงขลา) บันทึกข้อมูล สถานที่หรือพิกัดที่เก็บตัวอย่าง ได้แก่ อำเภอ จังหวัด และพิกัดภูมิศาสตร์ สภาพนิเวศ ได้แก่ สภาพพื้นที่ที่ขึ้นเป็นพื้นที่แห้ง ชื้นแฉะ 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 พร้อมติดป้าย ระบุ 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 เก็บใส่กล่องพลาสติก พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

2. ศึกษาการงอกในห้องปฏิบัติการ

นำเมล็ดที่เก็บจากที่ต่าง ๆ มารวมกัน เลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ จำนวน 50 เมล็ด ใส่ในจานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 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 ถอนออก ให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง จำนวนตามกรรมวิธีต่าง ๆ ที่กำหนด กรรมวิธีๆ ละ 4 ซ้ำ บันทึกการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 3 เดือน หรือจนพืชตาย บันทึก ความสูงต้น จำนวนกิ่ง ทุกสัปดาห์ วันที่ออกดอก ระยะเวลาที่พัฒนาจากดอกเป็นผล ผลแก่ จำนวนผลต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อผล คำนวณการผลิตเมล็ดต่อต้น การผลิตเมล็ด/ตารางเมตร วงจรชีวิต

4. ความสามารถในการขยายพันธุ์ จากส่วนของต้น

กรมวิชาการเกษตร

หว่านเมล็ดวัชพืช จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1.5 ตารางเมตร หลังวัชพืชงอก 1 สัปดาห์ ถอนออกให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง เมื่อต้นมีอายุ 1 เดือน นำชิ้นส่วนเหนือดินของวัชพืชมาตัดแบ่งเป็นท่อนๆ 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 นำเมล็ดที่แก่และมีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด โรยลงให้ทั่วกระถาง แล้วเติมดินจนถึงระดับห่างจากขอบบนของกระถาง 5 เซนติเมตร บันทึก จำนวนเมล็ดงอกในแต่ละกรรมวิธีทุกวัน นาน 60 วัน หรือจนกว่าเมล็ดจะงอกหมด

- เวลาและสถานที่

ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 – กันยายน 2562 ณ ภาคต่างๆ ของประเทศไทย ได้แก่ ภาคเหนือ (จังหวัดเชียงราย แม่ฮ่องสอน ลำปาง และอุตรดิตถ์) ภาคกลาง (จังหวัดนครสวรค์ 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

ผลการทดลองและวิจารณ์

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

1. ศึกษานิเวศวิทยา

กรมวิชาการเกษตร

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 และประจวบคุรีขันธ์ 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 2.3.4.1) (Figure 2.3.4.1)

1.2 การจัดทำตัวอย่างแห้ง นำตัวอย่างกระดุมใบใหญ่มาอัดในแผงพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 X 30 เซนติเมตร เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ 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 โดยตัวอย่างเมล็ดเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

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

3) การเจริญเติบโต และความสามารถในการผลิตเมล็ด พบว่า จากการทดลองในทุกกรรมวิธีมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันทางสถิติ 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 ลูป แต่ละลูป มี 1

กรมวิชาการเกษตร

4) ความสามารถในการขยายพันธุ์ จากส่วนของต้น พบว่า กิ่งที่ปักชำ ท่อนโคน กลางต้น และปลายยอด ของต้น มีจำนวนกิ่งที่แตกยอดใหม่ 49, 68 และ 52 เปอร์เซ็นต์ (Table 2.3.4.3)

5) ศึกษาการงอกของเมล็ดที่ความลึกของระดับดินระดับต่าง ๆ พบว่า เมล็ดงอกเพียงที่ระยะ 5 เซนติเมตร จากผิวดิน โดยมีความงอก 53 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับอื่น ๆ ไม่มีการงอกของเมล็ด แต่เมื่อมีการพลิกดินกลับขึ้นมาพบว่า เมล็ดสามารถงอกได้อีก (Table 2.3.4.3)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

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 และประจวบคุรีขันธ์ 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 สามารถผลิตเมล็ดได้จำนวน 2,850 เมล็ด ซึ่งในแต่ละกรรมวิธีมีความสูง ขนาดทรงพุ่ม และจำนวนกิ่งต่อต้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติ กระดุมใบใหญ่ 1 ผลมี 2 ลูป แต่ละลูป มี 1 เมล็ด สีเหลือง-น้ำตาล มีขนาดยาว 2.0-3.4 มิลลิเมตร กว้าง 0.6-1.6 มิลลิเมตร โดยกระดุมใบใหญ่ สามารถขยายพันธุ์ได้ จากทุกส่วนของต้นทั้ง ท่อนโคน กลางต้น และปลายยอด และเมล็ดงอกได้เพียงที่ระดับ 5 เซนติเมตรจากผิวดิน และจากการปรับเปลี่ยนข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ ปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงชื่อวิทยาศาสตร์จากเดิม *Borreria latifolia* (Aubl), Schum. เป็น (*Spermacoce alata* Aubl.)

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1) ได้ข้อมูลการแพร่กระจาย และชีววิทยา ที่จะนำไปใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์หาแนวทางป้องกัน และจัดการ

2) ได้ข้อมูลประกอบการสร้างมาตรการทางกฎหมายในการควบคุม ป้องกัน พืชต่างถิ่นที่รุกราน ไม่ให้เป็นวัชพืชร้ายแรงในประเทศไทยในอนาคต

กรมวิชาการเกษตร

3) ได้ตัวอย่างพืชและเมล็ดเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และตัวอย่างพืช เก็บรักษาไว้ ณ พิพิธภัณฑ์กรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร สำหรับเป็นข้อมูลพื้นฐานของประเทศไทย

Table 2.3.4.1 Survey location of *S. 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)
Southern	Chumphon		✓	
	Nakhon Sri Thammarat	✓		Coconut crop
	Phuket		✓	
	Phang Nga		✓	
	Ranong		✓	

กรมวิชาการเกษตร

Table 2.3.4.2 The ability to propagate from part of *S. 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 2.3.4.3 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

กรมวิชาการเกษตร

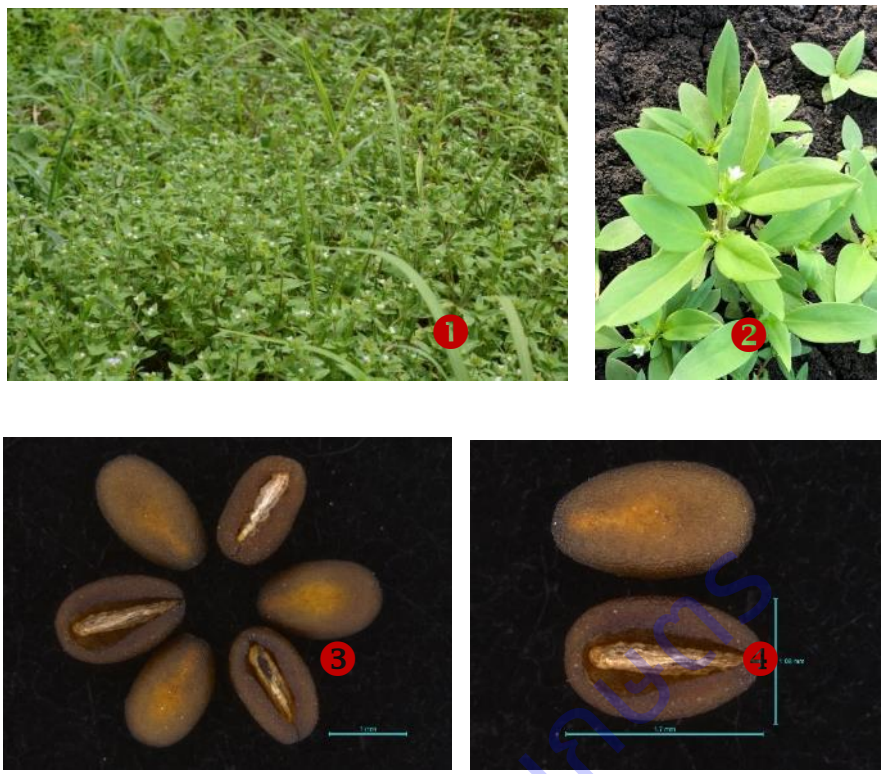


Figure 2.3.4.1 *S. alata* Aubl (1) Flowers (2) Seed (3, 4)

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.3.5 ชีววิทยาของเทียนนา (*Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Excel

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

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ธัญชนก จงรักไทย	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	อัณศยา พรมมา	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	เอกรัตน์ ธนูทอง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชอ

บทคัดย่อ

การศึกษาชีววิทยาของเทียนนา ทำการทดลองระหว่าง ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564 โดยสำรวจในพื้นที่นาข้าว และพื้นที่ชุ่มน้ำ ด้วยวิธีแบบสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่ 27 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เพชรบุรี เพชรบูรณ์ กาญจนบุรี กำแพงเพชร จันทบุรี ชัยนาท ตราด ตาก นครพนม นครราชสีมา นครสวรรค์ น่าน ประจวบคีรีขันธ์ พระนครศรีอยุธยา พิจิตร พิษณุโลก ระยอง ลพบุรี ลำปาง ลำพูน สิงห์บุรี สุโขทัย สุพรรณบุรี อ่างทอง อุทัยธานี และอุบลราชธานี ได้ตัวอย่างเทียนนา จำนวน 80 ตัวอย่าง และเมล็ดแห้ง เก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์วัชพืช กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ โดยเมล็ดเทียนนามีความงอกในห้องปฏิบัติการเฉลี่ย 55 เปอร์เซ็นต์ ความงอกสูงที่สุด 74 เปอร์เซ็นต์ ต่ำที่สุด 29 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดที่เก็บจากบางพื้นที่สามารถงอกได้ที่ระยะ 102 วันหลังทดสอบ แสดงให้เห็นว่าเมล็ดมีการพักตัว และการงอกในสภาพเรือนทดลอง เมล็ดเทียนนามีความงอกเฉลี่ย 20.7 เปอร์เซ็นต์ ความงอกสูงที่สุด 39 เปอร์เซ็นต์ ต่ำที่สุด 2 เปอร์เซ็นต์ การเจริญเติบโตทั้งความสูง ขนาดทรงพุ่ม จำนวนแขนง จำนวนฝัก และการผลิตเมล็ด ในจำนวนต้น 1, 3 และ 5 ต้นต่อตารางเมตร มีค่ามากกว่าสภาวะแข่งขันสูงที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก โดยเทียนนา 1 ต้นที่เจริญเติบโตได้อย่างสมบูรณ์ครบวงจรชีวิตโดยเฉลี่ย 162 วัน สามารถผลิตเมล็ดได้มากถึง 58,424 เมล็ดต่อต้น ซึ่งมากกว่าต้นที่เจริญเติบโตในสภาวะแข่งขันสูงที่มีจำนวนเมล็ดเพียง 5,858 เมล็ดต่อต้น เมล็ดเทียนนาสามารถงอกได้ดีที่ระดับผิวดินลึกไม่เกิน 5 เซนติเมตรเท่านั้น และยังสามารถขยายพันธุ์ได้โดยใช้กิ่งปักชำ แต่หากส่วนของลำต้นถูกฝังกลบใต้ดินก็สามารถทำให้เทียนนาตายได้ ในสภาพพื้นที่เกษตร หากเกษตรกรต้องการควบคุมเทียนนาตั้งแต่เริ่มควรทำการไถพรวนฝังกลบเทียนนาทั้งต้นและเมล็ดให้มีความลึกมากกว่า 5 เซนติเมตร ก็จะควบคุมการงอกของเทียนนาได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีกำจัดวัชพืช

Abstract

The study of biology of *Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Excell during October 2019-September 2021. Explore in the rice fields and wetlands using a detection survey method in 27

กรมวิชาการเกษตร

provinces as follows: Chiang Mai Phetchaburi Phetchabun Kanchanaburi Kamphaeng Phet Chanthaburi Chai Nat Trat Tak Nakhon Phanom Nakhon Ratchasima Nakhon Sawan Nan Prachuap Khiri Khan Phra Nakhon Si Ayutthaya Phichit Phitsanulok Rayong Lopburi Lampang Lamphun Sing Buri Sukhothai Suphan Buri Ang Thong Uthai Thani and Ubon Ratchathani Province. Collected 80 samples and dried seeds. Preserved at the Weed Museum, weed science and research group, Plant Protection Research and Development office, Department of Agriculture, Bangkok. The germination of seeds in the laboratory was 55 percent, the maximum germination 74 percent, the minimum 29.0 percent. Seeds collected from some sites were able to germinate at 102 days after planting, indicating that the seeds were dormant. Germination in house conditions the average germination of seeds was 20.7 percent, the maximum germination was 39 percent, the minimum was 2 percent. The growth of *Ludwigia hyssopifolia,* height, canopy size, number of branches, number of pods and seed production in 1, 3 and 5 plants per square meter. This was greater than that of highly competitive conditions with all survival plants that germinated. A plant that fully matured for an average life cycle of 162 days was able to produce 58,424 seeds per plant, which was more than plants growing under competitive conditions with only 5,858 seeds per plant. The seeds can germinate well at the soil surface, depth of not more than 5 centimeters. and can also be propagated using cuttings but if part of the trunk is buried underground it can kill that. In agricultural conditions If farmers want to control the whole plant and seeds should be tilled to a depth of more than 5 cm. It was controlled without the herbicides.

คำนำ

เทียนนา (*Ludwigia hyssopif*olia (G. Don) Excell.) อยู่ในวงศ์ Onagraceae เป็นพืชอายุปีเดียว ลำต้นตั้ง สูง 30-70 ซม. ลำต้นมักมีสีม่วงแดง เป็นเหลี่ยม โคนต้นส่วนที่แช่น้ำมักมีเยื่อสีขาวหุ้ม รากมีเนื้อสีขาว เพื่อช่วยหายใจ ใบเดี่ยวแตกจากลำต้นแบบสลับ แผ่นใบรูปหอก ปลายแหลม ใบเรียบไม่เป็นขน ใบและเส้นกลางใบและลำต้น กลีบเลี้ยงสีเขียว 4 กลีบ กลีบดอกสีเหลือง 4 กลีบ ผลรูปทรงกระบอก ยาวประมาณ 1.5 ซม. เมล็ดรูปกระสวย สีน้ำตาล ในบางท้องที่จะพบเทียนนาอีกชนิดหนึ่งขึ้นปะปน เรียกว่าหญ้ารักนา (*Jussiaea suffruticosa* L.) ชนิดนี้ลำต้นสีม่วงแดง ตามใบและลำต้นเป็นขน ดอกสีเหลืองเช่นกัน แต่มีขนาดใหญ่กว่า (วิรัช และคณะ, 2547)

เทียนนาเป็นวัชพืชที่มักขึ้นในพื้นที่ชื้นแฉะในเขตร้อน มักอยู่ในน้ำ นาข้าว ริมชายน้ำ และหนองน้ำ โดยถูกบันทึกว่าเป็นวัชพืชหลักในนาข้าว ทั้งดินร่วนปนดินเหนียวและดินเหนียว Holm *et al*. (1979) กล่าวไว้ว่าเทียนนาเป็นวัชพืชที่แพร่หลายอย่างมากในข้าว และพื้นที่ชุ่มน้ำทั่วทั้งสามทวีป โดยมีรายงานว่าเป็นวัชพืชที่รุนแรงใน

กรมวิชาการเกษตร

ประเทศอินเดีย เกาะบอร์เนียว ไทย มาเลเซีย ไนจีเรีย และตรินิแดด อีกทั้งยังเป็นวัชพืชสามัญในประเทศโคลัมเบีย และฟิลิปปินส์ โดยมีการยืนยันสถานะความสำคัญของเทียนนาในมาเลเซียในปี 2553 Begum *et al*., (2008) รายงานว่าโดยปกติเทียนนาจะสูงไม่เกิน 1 เมตร แต่ในบางพื้นที่สามารถสูงได้ถึง 3 เมตร เทียนนาถูกนำเข้ามาแพร่กระจายในหมู่เกาะแปซิฟิก รวมทั้งประเทศฟิจิ เกาะคริสต์มาส ดังนั้น เทียนนาจึงจัดว่าเป็นวัชพืชที่มีผลกระทบต่อระบบนิเวศของข้าว และพื้นที่ชุ่มน้ำ และประเทศสเปนเพิ่งระบุว่าเทียนนาเป็นวัชพืชที่รุกรานตัวใหม่ในปี 2549 (Ferrer and Laguna; 2009; Ferrer *et al*., 2009)

เทียนนา เป็นวัชพืชที่มีการแพร่กระจายโดยทั่วไปในนาข้าว และที่ชื้นแฉะ มีรายงานในต่างประเทศว่าเทียนนาสามารถผลิตเมล็ดต่อต้นได้มากถึง 75,000 เมล็ด (Begum *et al*., 2008) อีกทั้งเมล็ดยังมีการสะสมในดินปริมาณมาก (Gordon and Valk, 2003) ปัจจุบันพบว่าทำให้เกิดปัญหาต่อข้าว และต้องใช้สารกำจัดวัชพืชปริมาณมาก เกษตรกรบางรายปล่อยให้ต้นวัชพืชแห้งตายไปเอง หากมีปริมาณไม่มาก ทำให้เมล็ดวัชพืชหล่นลงสู่ดิน ซึ่งการปล่อยเมล็ดลงสู่ดิน ทำให้วัชพืชพร้อมที่จะระบาดในฤดูปลูกถัดไป หรือเมื่อดินมีความชื้นพอ ประกอบกับมีการใช้เครื่องจักรกลทางการเกษตรมากขึ้น ตั้งแต่ขั้นตอนเตรียมดิน จนถึงการเก็บเกี่ยว ซึ่งการเคลื่อนย้ายเครื่องจักรกลเหล่านี้มักไม่มีการคำนึงถึงเมล็ดวัชพืชที่ดินไปกับเครื่องจักรกล และนำไปแพร่พันธุ์ในพื้นที่อื่นต่อไป ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษา ชีววิทยา เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานสนับสนุนการแจ้งเตือนเกษตรกร และแนวทางการจัดการวัชพืชชนิดนี้

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1) กล้องถ่ายรูปแบบดิจิตอล

2) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)

3) เลนส์ขยาย 10 เท่า สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นในภาคสนาม

3) กรรไกร มีด เสียม หรือพลั่ว สำหรับตัด/ขุด ตัวอย่างพืช

4) ดินและกระถาง สำหรับปลูกพืชทดสอบในเรือนทดลอง

5) แผงอัดตัวอย่างพรรณไม้พร้อมกระดาษฟูก ฟองน้ำและหนังสือพิมพ์ พร้อมเชือกไส้ตะเกียงและป้ายชื่อสำหรับผูกตัวอย่างพืช

6) กระดาษติดตัวอย่างพืช พร้อมแฟ้มปก

7) น้ำยาชุบตัวอย่างวัชพืช ประกอบด้วย ฟีนอล เมอคิวริคคลอไรด์ เอทธิลแอลกอฮอล์

8) การบูร

9) เครื่องรับสัญญาณดาวเทียม เพื่อระบุพิกัด

10) อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น เช่น ถุงพลาสติกขนาดต่างๆ กระถางพลาสติก กระบะปูน และป้ายแสดงกรรมวิธี

12) สมุดบันทึก

กรมวิชาการเกษตร

- วิธีการ

1) การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

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

บันทึกข้อมูล บันทึก สถานที่หรือพิกัด สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูก ลักษณะวัชพืช การถูกทำลายโดยศัตรูพืชตามธรรมชาติ วัน/เดือน/ปีที่สำรวจ

2) ศึกษาการงอกในห้องปฏิบัติการ

นำเมล็ดที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน นับเมล็ด จำนวน 100 เมล็ด ใส่ในจานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร ที่บรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดฝา จำนวน 10 ซ้ำ นำไปวางในห้องปฏิบัติการ สภาพอุณหภูมิห้อง

บันทึกข้อมูล จำนวนเมล็ดงอกทุกวัน ในระยะเวลา 30 วัน หรือจนเมล็ดงอกหมด

3) การงอกในสภาพเรือนทดลอง

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

บันทึกข้อมูล จำนวนเมล็ดงอกทุกวัน นาน 30 วัน หรือจนกว่าเมล็ดงอกหมด

4) การเจริญเติบโต และความสามารถในการผลิตเมล็ด

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 5 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1. ต้นวัชพืชจำนวน 1 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 2. ต้นวัชพืชจำนวน 3 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 3. ต้นวัชพืชจำนวน 5 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 4 ต้นวัชพืชทั้งหมดที่งอก

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

บันทึกข้อมูล ความสูงต้น จำนวนกิ่ง ทุกสัปดาห์ วันที่ออกดอก ติดผล จำนวนผลต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อผลของพืชแต่ละต้นในแต่ละกระบะ

5) ความสามารถในการขยายพันธุ์ จากส่วนของต้น

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำ 3 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ปักชำชิ้นส่วนจากโคนต้น

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 2 ปักชำชิ้นส่วนจากกลางต้น

กรรมวิธีที่ 3 ปักชำชิ้นส่วนจากปลายยอด

หว่านเมล็ดวัชพืช จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1.5 ตารางเมตร หลังวัชพืชงอก 1 สัปดาห์ ถอนออก ให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง เมื่อต้นมีอายุ 1 เดือน ถอนและนำชิ้นส่วนเหนือดินของวัชพืชมาตัดแบ่งเป็นท่อนๆ ละ 5-10 เซนติเมตร เป็นท่อนพันธุ์สำหรับปักชำ แยกท่อนพันธุ์ออกตามระยะห่างจากโคน ได้แก่ ท่อนโคน กลางต้น และปลายยอด นำมาปักชำในกระถางขนาด 12 นิ้ว กระถางละ 10 ท่อน จำนวน 10 ซ้ำ

บันทึกข้อมูล การแตกยอดใหม่ จากกิ่งที่ปักชำ ทุกสัปดาห์

6) ศึกษาการงอกของเมล็ดที่ความลึกของระดับดินระดับต่างๆ

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 วางเมล็ดบนผิวดิน

กรรมวิธีที่ 2 ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 3 ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 10 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 4 ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 5 ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 20 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 6. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 25 เซนติเมตร

บรรจุดินใส่กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร สูง 45 เซนติเมตร ให้ผิวดินห่างจากขอบบนของกระถาง 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 เซนติเมตร นำเมล็ดที่แก่และมีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด โรยลงให้ทั่วกระถาง แล้วเติมดินจนถึงระดับห่างจากขอบบนของกระถาง 5 เซนติเมตร

บันทึกข้อมูล ความงอกของเมล็ดที่งอกโดยเปรียบเทียบในแต่ละกรรมวิธี

- เวลาและสถานที่

ทำการทดลอง ระหว่าง ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564 (ระยะเวลา 2 ปี) ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ พื้นที่นาข้าว และพื้นที่ทำการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1) การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

การสำรวจและเก็บตัวอย่างต้น และเมล็ดเทียนนา โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในนาข้าว และสำรวจเพิ่มเติมในพื้นที่การเกษตรอื่นๆ ที่มีความชุ่มชื้น พบเทียนนาในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เพชรบุรี เพชรบูรณ์ กาญจนบุรี กำแพงเพชร จันทบุรี ชัยนาท ตราด ตาก นครพนม นครราชสีมา นครสวรรค์ น่าน ประจวบคีรีขันธ์ พระนครศรีอยุธยา พิจิตร พิษณุโลก ระยอง ลพบุรี ลำปาง ลำพูน สิงห์บุรี สุโขทัย สุพรรณบุรี

กรมวิชาการเกษตร

อ่างทอง อุทัยธานี และอุบลราชธานี ได้ตัวอย่างเทียนนา จำนวน 80 ตัวอย่าง และเมล็ดแห้ง เก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์วัชพืช กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ (ภาพที่ 2.3.5.1) (ตารางที่ 2.3.5.1)

จากการสำรวจมีพื้นที่เป้าหมายเป็นนาข้าว และยังพบในพื้นที่การเกษตรอื่นที่มีลักษณะมีความชื้นสูง หรือเกษตรกรให้น้ำในปริมาณมาก ส่วนใหญ่พบในแปลงพืชผัก เช่น พริก มะเขือ และพริกไทย หรือแปลงพืชไร่ที่ทำการเพาะปลูกหลังการทำนา เช่นถั่วเหลือง หรือแปลงพืชไร่ที่มีความชุ่มชื้น เช่น สับปะรดที่ปลูกในสวนยางพารา

ภาพที่ 2.3.5.1 ลักษณะของเทียนนา (*Ludwigia hyssopifolia.*) 1) ต้น 2) ดอก and 3) เมล็ด

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2.3.5.1 พื้นที่สำรวจพบเทียนนา

พืชปลูก	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด	ละติจูด (N)	ลองจิจูด (E)
มะเขือ	ช่างเคิ่ง	แม่แจ่ม	เชียงใหม่	18.491435	98.375353
ถั่วเหลือง	สันโป่ง	แม่ริม	เชียงใหม่	18.959458	98.969659
	แม่วิน	แม่วาง	เชียงใหม่	18.627917	98.507390
ถั่วเหลือง	ขี้เหล็ก	แม่ริม	เชียงใหม่	18.974370	98.956123
ข้าว	สันโป่ง	แม่ริม	เชียงใหม่	18.969111	98.000000
ข้าว	ยุหว่า	สันป่าตอง	เชียงใหม่	18.632048	98.891930
ข้าว	บ้านแม	สันป่าตอง	เชียงใหม่	18.600824	98.860570
ถั่วเหลือง	ป่าซาง	แม่จัน	เชียงราย	20.187009	99.864823
มะนาว	โรงเข้	บ้านลาด	เพชรบุรี	13.069172	99.890011
พริก	สะเดาพง	เขาค้อ	เพชรบูรณ์	16.583499	100.956029
มะเขือ	หนองไขว่	หล่มสัก	เพชรบูรณ์	16.760766	101.247407
ขนุน	ไทรโยค	ไทรโยค	กาญจนบุรี	14.486522	98.846164
พริก	ท่าล้อ	ท่าม่วง	กาญจนบุรี	13.988194	99.566528
ข้าว	คลองน้ำไหล	คลองลาน	กำแพงเพชร	16.222338	99.362157
ข้าว	แสนตอ	ขาณุวรลักษบุรี	กำแพงเพชร	16.063062	99.847397
สับปะรด	เขาแก้ว	ท่าใหม่	จันทบุรี	12.820273	101.911452
สับปะรด	เขาแก้ว	ท่าใหม่	จันทบุรี	12.839515	101.951148
Black pepper	เขาแก้ว	ท่าใหม่	จันทบุรี	12.851570	101.955520
Black pepper	เขาแก้ว	ท่าใหม่	จันทบุรี	12.851776	101.954845
ข้าว	วังไก่เถื่อน	หันคา	ชัยนาท	14.970390	100.068358
ขนุน	ประณีต	เขาสมิง	ตราด	12.479897	102.386137
ขนุน	ประณีต	เขาสมิง	ตราด	12.479863	102.386075
สับปะรด	Saen Tung	เขาสมิง	ตราด	12.427363	102.377800
ถั่วเหลือง	ท้องฟ้า	บ้านตาก	ตาก	17.082653	98.838195
แก้วมังกร	แสนสำราญ	ปลาปาก	นครพนม	17.249645	104.661018
แก้วมังกร	หนองยาง	ปากช่อง	นครราชสีมา	14.743840	101.365200
แก้วมังกร	Nong Phak Sen	ปากช่อง	นครราชสีมา	14.765638	101.337830
แก้วมังกร	Klang Dong	ปากช่อง	นครราชสีมา	14.626649	101.331011
ข้าว	ช่องแค	ตาคลี	นครสวรรค์	15.1866903	100.435968
ข้าว	ช่องแค	ตาคลี	นครสวรรค์	15.1726483	100.435266
ข้าว	ช่องแค	ตาคลี	นครสวรรค์	15.195307	100.428925

กรมวิชาการเกษตร

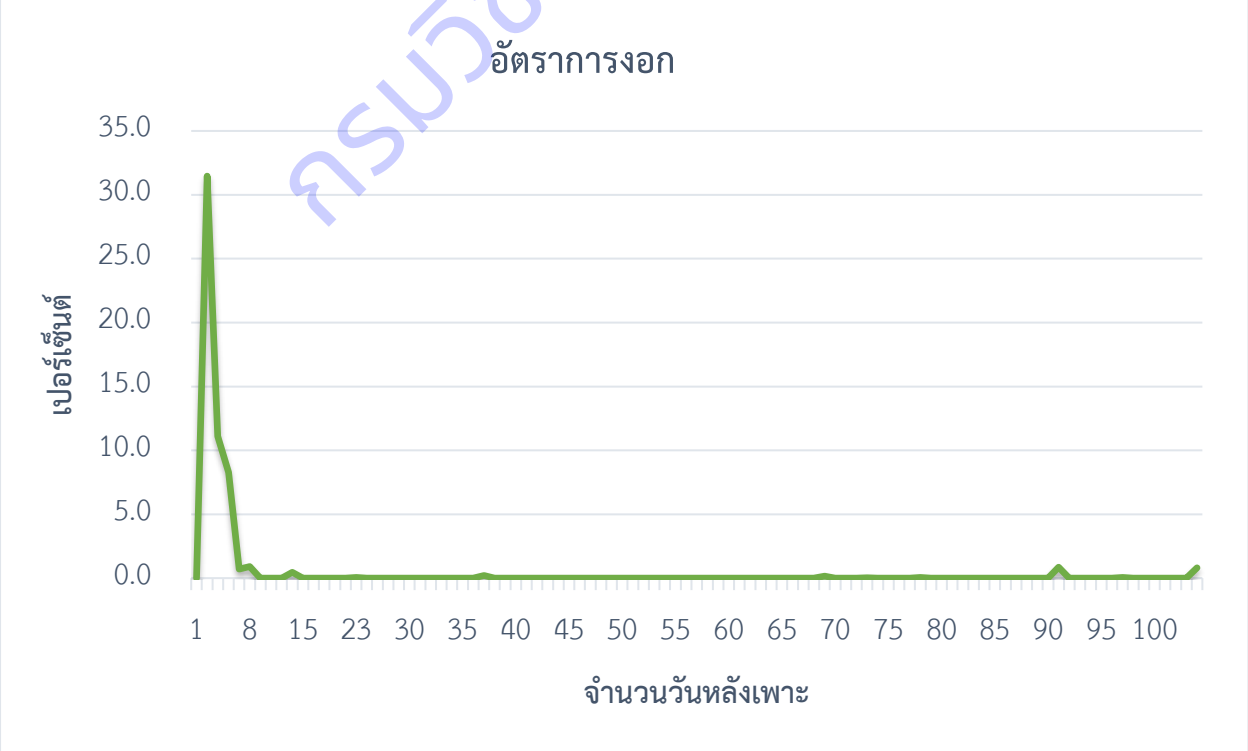
พืชปลูก	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด	ละติจูด (N)	ลองจิจูด (E)
พริก	กองคลาย	เมือง	น่าน	18.674167	100.752842
ข้าว	ส้าน	เวียงสา	น่าน	18.511990	100.764800
ขนุน	ศาลาลัย	สามร้อยยอด	ประจวบคีรีขันธ์	12.288432	99.766160
ขนุน	ศาลาลัย	สามร้อยยอด	ประจวบคีรีขันธ์	12.269999	99.809110
ข้าว	บางประแดง	บางปะอิน	พระนครศรีอยุธยา	14.265969	100.533431
ข้าว	วัดขวาง	โพทะเล	พิจิตร	16.149308	100.288375
พริก	บางกระทุ่ม	บางกระทุ่ม	พิษณุโลก	16.569264	100.285408
พริก	บางกระทุ่ม	บางกระทุ่ม	พิษณุโลก	16.569999	100.284606
พริก	บางกระทุ่ม	บางกระทุ่ม	พิษณุโลก	16.562470	100.278258
พริก	บางกระทุ่ม	บางกระทุ่ม	พิษณุโลก	16.562952	100.278147
ขนุน	วังนกแอ่น	วังทอง	พิษณุโลก	16.842728	100.752941
มะเขือ	บางกระทุ่ม	บางกระทุ่ม	พิษณุโลก	16.566102	100.284091
พริก	วังนกแอ่น	วังทอง	พิษณุโลก	16.819992	100.785705
ข้าว	วังนกแอ่น	วังทอง	พิษณุโลก	16.818987	100.779360
ข้าว	วังยาง	เนินมะปราง	พิษณุโลก	16.445253	100.706551
สับปะรด	วังหว้า	แกลง	ระยอง	12.781507	101.615511
สับปะรด	บ้านนา	แกลง	ระยอง	12.843108	101.674336
พริก	หนองบัว	พัฒนานิคม	ลพบุรี	14.875300	101.017320
ถั่วเหลือง	นาโป่ง	เถิน	ลำปาง	17.677849	99.071161
ข้าว	Sala	Ko Kha	ลำปาง	18.172634	99.406438
ข้าว	ป่าซาง	ป่าซาง	ลำพูน	18.493001	98.945096
ข้าว	บ้านเรือน	ป่าซาง	ลำพูน	18.502300	98.885327
ข้าว	ถอนสมอ	ท่าช้าง	สิงห์บุรี	14.750967	100.383274
ข้าว	นาทุ่ง	สวรรคโลก	สุโขทัย	17.309992	99.727370
ข้าว	หนองผักนาก	สามชุก	**สุพรรณบุรี**	14.734532	100.066459
ข้าว	แจงงาม	หนองหญ้าไซ	**สุพรรณบุรี**	14.825008	99.847892
ข้าว	สีบัวทอง	แสวงหา	อ่างทอง	14.796371	100.241050
ข้าว	วังน้ำเย็น	แสวงหา	อ่างทอง	14.713404	100.221708
ข้าว	ทุ่งโพ	หนองฉาง	อุทัยธานี	15.396673	99.746281
ข้าว	ทุ่งโพ	หนองฉาง	อุทัยธานี	15.395430	99.745542
ข้าว	คำหว้า	ตาลสุม	อุบลราชธานี	15.408398	105.22102
ข้าว	ห้วยยาง	โขงเจียม	อุบลราชธานี	15.455434	105.484849

กรมวิชาการเกษตร

2) ศึกษาการงอกในห้องปฏิบัติการ

หลังจากทดสอบความงอกในสภาพห้องปฏิบัติการ เป็นระยะเวลา 4 เดือน หลังเริ่มทดสอบ พบว่า เมล็ดเทียนนามีความงอกเฉลี่ย 55.2 เปอร์เซ็นต์ เริ่มงอกครั้งแรกเพียง 2 วันหลังเพาะเมล็ด และมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุดในช่วง 2-4 วันหลังเพาะเมล็ด เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุด 74 เปอร์เซ็นต์ ต่ำสุด 29 เปอร์เซ็นต์ โดยเมล็ดที่เก็บจากบางพื้นที่สามารถงอกได้ช้าสุดที่ระยะ 102 วันหลังเพาะ แสดงให้เห็นว่าเมล็ดมีการพักตัว (ภาพที่ 2.3.5.2 และ ภาพที่ 2.3.5.3) (ตารางที่ 2.3.5.2)

ภาพที่ 2.3.5.2 การทดสอบความงอกของเมล็ดเทียนนาในห้องปฏิบัติการ 1) จานเพาะ 2) เมล็ดที่งอก



ภาพที่ 2.3.5.3 อัตราการงอกของเมล็ดในสภาพห้องปฏิบัติการ

กรมวิชาการเกษตร

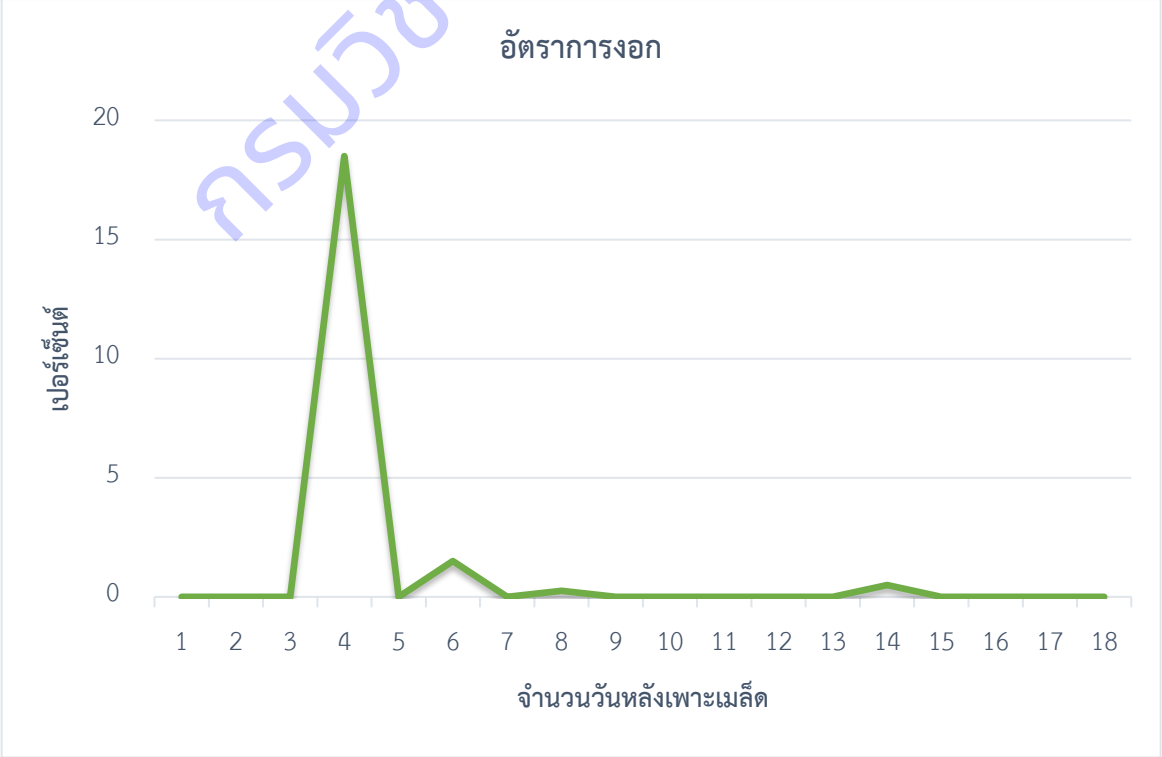
ตารางที่ 2.3.5.2 เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียนนา

เปอร์เซ็นต์ความงอก	ห้องปฏิบัติการ	เรือนทดลอง
ค่าสูงสุด	74.0	39.0
ค่าต่ำสุด	29.0	2.0
ค่าเฉลี่ย	55.0	20.7

3) การงอกในสภาพเรือนทดลอง

หลังจากทดสอบความงอกในสภาพเรือนทดลอง เป็นระยะเวลา 4 เดือน หลังเริ่มทดสอบ พบว่า เมล็ดเทียนนามีความงอกเฉลี่ย 20.7 เปอร์เซ็นต์ เริ่มงอกครั้งแรก 4 วันหลังเพาะเมล็ด เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุด 39 เปอร์เซ็นต์ ต่ำสุด 2 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2.3.5.4 และ ภาพที่ 2.3.5.5) (ตารางที่ 2.3.5.2)

ภาพที่ 2.3.5.4 การทดสอบความงอกในเรือนทดลอง 1) กระถางเพาะเมล็ด 2) ลักษณะต้นกล้าเทียนนา



ภาพที่ 2.3.5.5 อัตราการงอกของเมล็ดในสภาพเรือนทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

4) การเจริญเติบโต และความสามารถในการผลิตเมล็ด

ความสูง พบว่า เทียนนาในกรรมวิธีมีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอกในระยะ 3 สัปดาห์แรกหลังงอกมีความสูงมากกว่ากรรมวิธีที่ปลูก 1, 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ แต่หลังจาก 4 สัปดาห์เป็นต้นไปจนถึงระยะเก็บเกี่ยวที่ต้นเริ่มแห้งตายมีความสูงน้อยกว่า โดยข้อมูลที่ระยะเก็บเกี่ยว พบว่า กรรมวิธีที่ปลูก 1, 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ มีความสูงต้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ อยู่ระหว่าง 39.4-50.4 เซนติเมตร มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก ที่มีความสูง 21.4 เซนติเมตร (ภาพที่ 2.3.5.6 และ ภาพที่ 2.3.5.7) (ตารางที่ 2.3.5.3)

ขนาดทรงพุ่ม พบว่า เทียนนาในกรรมวิธีมีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอกในระยะ 3 สัปดาห์แรกหลังงอกมีขนาดทรงพุ่มมากกว่ากรรมวิธีที่ปลูก 1, 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ แต่หลังจาก 4 สัปดาห์เป็นต้นไปจนถึงระยะเก็บเกี่ยวที่ต้นเริ่มแห้งตายมีขนาดทรงพุ่มน้อยกว่า โดยข้อมูลที่ระยะเก็บเกี่ยว พบว่า กรรมวิธีที่ปลูก 1 ต้นต่อกระบะ มีขนาดทรงพุ่มใหญ่ที่สุด มีขนาด 48.8 เซนติเมตร ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีที่ปลูก 3 ต้นต่อกระบะ ที่มีขนาด 35.5 เซนติเมตร แต่มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ปลูก 5 ต้นต่อกระบะ ที่มีขนาด 28.2 เซนติเมตร โดยกรรมวิธีที่ปลูก 1, 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ มีความกว้างทรงพุ่มมากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก ที่มีความสูง 12.9 เซนติเมตร (ตารางที่ 2.3.5.3)

จำนวนกิ่งต่อต้น พบว่า เทียนนาในกรรมวิธีมีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอกในระยะ 2 สัปดาห์แรกหลังงอกมีจำนวนกิ่งไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ปลูก 1, 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ แต่หลังจาก 4 สัปดาห์เป็นต้นไปจนถึงระยะเก็บเกี่ยวที่ต้นเริ่มแห้งตายมีจำนวนกิ่งน้อยกว่า โดยข้อมูลที่ระยะเก็บเกี่ยว พบว่า กรรมวิธีที่ปลูก 1, 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ มีจำนวนกิ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ อยู่ระหว่าง 13.8-16.8 กิ่งต่อต้น มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก ที่มีจำนวนกิ่ง 4.2 กิ่งต่อต้น (ตารางที่ 2.3.5.3)

จำนวนฝักต่อต้น พบว่า กรรมวิธีที่ปลูก 1, 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ มีจำนวนฝักไม่แตกต่างกันทางสถิติ อยู่ระหว่าง 247.9-436.0 ฝักต่อต้น มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก ที่มีจำนวนฝัก 43.7 ฝักต่อต้น (ตารางที่ 2.3.5.3)

จำนวนเมล็ดต่อต้น พบว่า กรรมวิธีที่ปลูก 1, 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ มีจำนวนเมล็ดไม่แตกต่างกันทางสถิติ อยู่ระหว่าง 33,211.9-58,424.0 เมล็ดต่อต้น มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก ที่มีจำนวนฝัก 5,858.1 เมล็ดต่อต้น (ตารางที่ 2.3.5.3)

น้ำหนักสด พบว่า กรรมวิธีที่ปลูก 1 ต้นต่อกระบะ มีน้ำหนักสดมากที่สุด 30.1 กรัมต่อต้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีที่ปลูก 3 ต้นต่อกระบะ ที่มีน้ำหนัก 16.9 กรัมต่อต้น แต่มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ปลูก 5 ต้นต่อกระบะ และกรรมวิธีที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก ที่มีน้ำหนักระหว่าง 2.5-10.2 กรัมต่อต้น (ตารางที่ 2.3.5.3)

น้ำหนักแห้ง พบว่า กรรมวิธีที่ปลูก 1 ต้นต่อกระบะ มีน้ำหนักแห้งมากที่สุด 10.1 กรัมต่อต้น มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ปลูก 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ และกรรมวิธีที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก ที่มีน้ำหนักแห้งระหว่าง 0.9-5.2 กรัมต่อต้น (ตารางที่ 2.3.5.3)

กรมวิชาการเกษตร

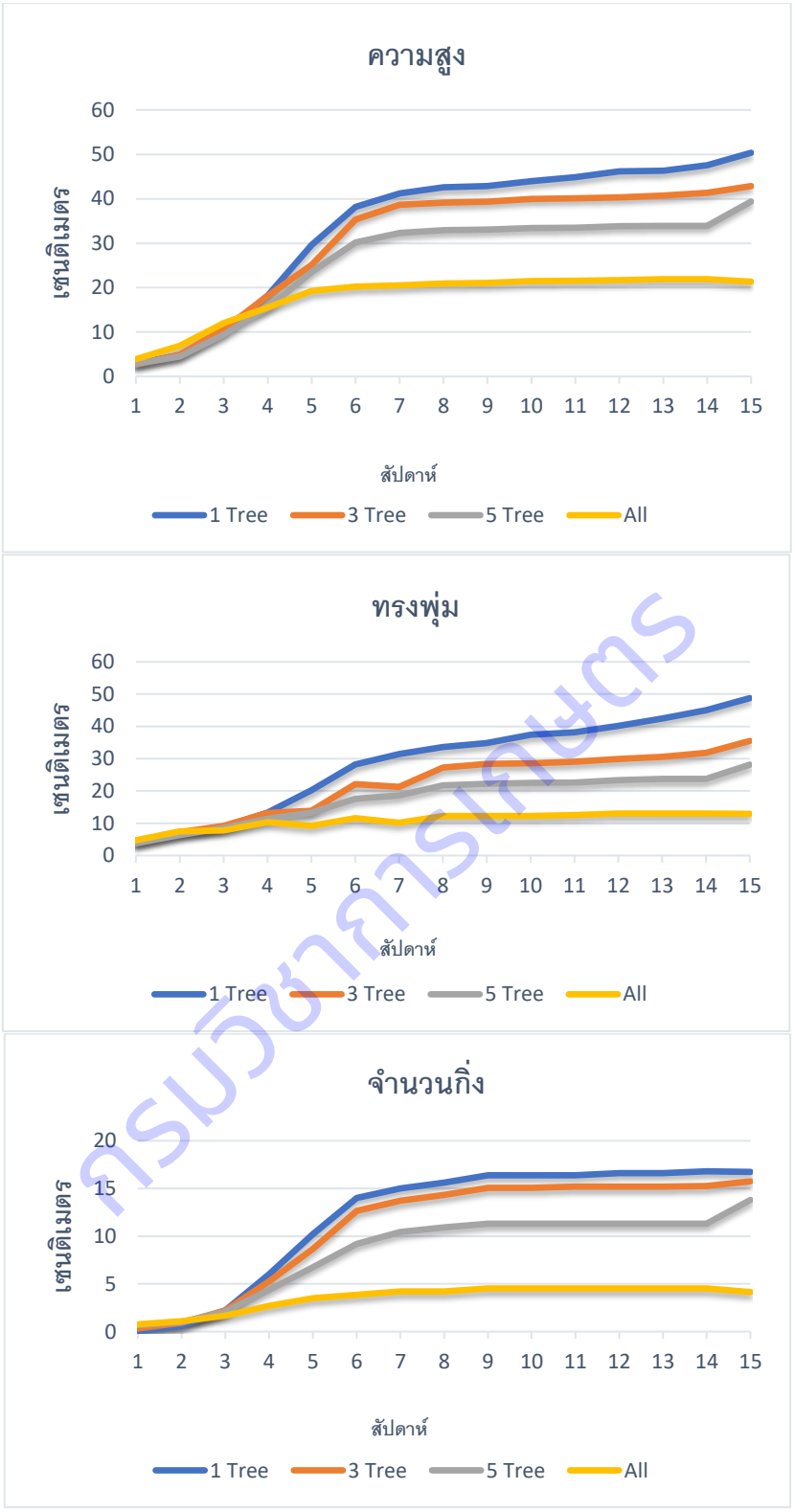
ตารางที่ 2.3.5.3 การเจริญเติบโตของเทียนนา

กรรมวิธี	ความสูงต้น (เซนติเมตร)	ขนาดทรงพุ่ม (เซนติเมตร)	จำนวนกิ่ง (กิ่ง/ต้น)	จำนวนฝัก (ฝัก/ต้น)	จำนวนเมล็ด (เมล็ด/ต้น)	น้ำหนักสด (กรัม/ต้น)	น้ำหนักแห้ง (กรัม/ต้น)
1 ต้น/กระบะ	50.4 a	48.8 a	16.8 a	436.0 a	58,424.0 a	30.1 a	10.1 a
3 ต้น/กระบะ	42.9 a	35.5 ab	15.8 a	336.7 a	45,113.3 a	16.9 ab	5.2 b
5 ต้น/กระบะ	39.4 a	28.2 b	13.8 a	247.9 a	33,211.9 a	10.2 b	3.4 b
ทั้งหมด	21.4 b	12.9 c	4.2 b	43.7 b	5,858.1 b	2.5 b	0.9 b
C.V. (%)	24.8	29.6	24.1	46.7	43.0	69.2	62.3

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.3.5.6 การทดลองการเจริญเติบโตของเทียนนา 1) กระบะทดลอง 2) ต้นกล้าเทียนนา 3) และ 4) ลักษณะต้นเทียนนาที่เลือกใช้ทดสอบ

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2.3.5.7 การเจริญเติบโตของเทียนนา

กรมวิชาการเกษตร

วงจรชีวิตของเทียนนา หลังหว่านเมล็ดเทียนาและให้น้ำพบว่าเมล็ดเทียนนางอกในระยะเวลา 3-5 วัน ออกดอกที่ระยะ 30-44 วันหลังงอก ติดฝักที่ระยะ 14-21 วันหลังออกดอก เมล็ดแก่ที่ระยะ 14-21 วันหลังติดฝัก และเทียนนาเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและไม่มีการเจริญเติบโต ที่ระยะ 74-102 วันหลังเมล็ดชุดแรกสุกแก่ ซึ่งมีวงจรชีวิตตั้งแต่เริ่มงอกจนแห้งตายโดยเฉลี่ย 162 วัน (ภาพที่ 2.3.5.8)

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าเทียนนาที่เจริญเติบโตโดยไม่มีการแข่งขันหรือมีการแข่งขันน้อยสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าในสภาพการแข่งขัน มีองค์ประกอบผลผลิตที่มากกว่าซึ่งทำให้ในสภาพธรรมชาติพบเทียนนาในปริมาณมากถึงแม้มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ต่ำ แต่ด้วยมีจำนวนเมล็ดที่ผลิตได้ในปริมาณที่มากจึงพบมีการแพร่กระจายได้ดี

ภาพที่ 2.3.5.8 วงจรชีวิตของเทียนนา

5) ความสามารถในการขยายพันธุ์ จากส่วนของต้น

จากการทดลองพบว่า ชิ้นส่วนต้นของเทียนนาทุกส่วนที่มีตาสามารถแตกยอดใหม่ได้ทุกส่วน แต่ในสภาพเรือนทดลองเทียนนาไม่สามารถเจริญเติบโตจนออกดอกและติดเมล็ดได้ อาจเนื่องจากสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม มีความชื้นไม่เพียงพอ และจากการทดลองเพิ่มเติมโดยฝังชิ้นส่วนของลำต้นเทียนนาทุกส่วนใต้ดินลึก 5 เซนติเมตร ไม่พบการแตกตาใหม่ และที่ระยะ 30 วันหลังปักชำ พบว่า ชิ้นส่วนมีลักษณะเน่าเละ แสดงให้เห็นว่าในการไถพรวนพื้นที่ก่อนการทำการเกษตรให้ดินฝังกลบต้นเทียนนาก็สามารถทำให้ต้นตายได้ (ตารางที่ 2.3.5.4)

ตารางที่ 2.3.5.4 เปอร์เซ็นต์การแตกยอดใหม่

กรรมวิธี	ปักชำบนดิน	ปักชำโดยฝังใต้ดิน
ปักชำชิ้นส่วนจากโคนต้น	70.0	0.0
ปักชำชิ้นส่วนจากกลางต้น	70.0	0.0
ปักชำชิ้นส่วนจากปลายยอด	70.0	0.0

6) ศึกษาการงอกของเมล็ดที่ความลึกของระดับดินระดับต่างๆ

จากการทดลองพบว่า การเพาะเมล็ดโดยโรยเมล็ดบนผิวดินมีเปอร์เซ็นต์ความงอกมากที่สุด 27.63 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเมล็ดที่ระดับ 5, 10, 15, 20 และ 25 เซนติเมตร แสดงให้เห็นว่าเมล็ดเทียนนาหากถูกไถพลิกดินที่ระยะ 5 เซนติเมตรขึ้นไปจะสามารถยับยั้งความงอกของเทียนนาได้ (เป็นส่วนสำคัญของการทำงานวิจัย)

ตารางที่ 2.3.5.5 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดที่ระดับความลึกต่างๆ

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด
วางเมล็ดบนผิวดิน	27.63 a
วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร	0.00 b
วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 10 เซนติเมตร	0.00 b
วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร	0.00 b
วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 20 เซนติเมตร	0.00 b
วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 25 เซนติเมตร	0.00 b
C.V. (%)	38.76

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

จากการสำรวจเทียนนาในพื้นที่นาข้าวและพื้นที่ทำการเกษตรอื่นๆ พบเทียนนาในพื้นที่ 27 จังหวัด พบ และได้ตัวอย่างเทียนนา จำนวน 80 ตัวอย่าง และเมล็ดแห้ง เก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์วัชพืช กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ โดยเมล็ดเทียนนามีความงอกในห้องปฏิบัติการเฉลี่ย 55 เปอร์เซ็นต์ ความงอกสูงที่สุด 74 เปอร์เซ็นต์ ต่ำที่สุด 29 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดที่เก็บจากบางพื้นที่สามารถงอกได้ที่ระยะ 102 วันหลังทดสอบ แสดงให้เห็นว่าเมล็ดมีการพักตัว และการงอกในสภาพเรือนทดลอง เมล็ดเทียนนามีความงอกเฉลี่ย 20.7 เปอร์เซ็นต์ ความงอกสูงที่สุด 39 เปอร์เซ็นต์ ต่ำที่สุด 2 เปอร์เซ็นต์ การเจริญเติบโตทั้งความสูง ขนาดทรงพุ่ม จำนวนแขนง จำนวนฝัก และการผลิตเมล็ด ในจำนวนต้น 1, 3 และ 5 ต้นต่อตารางเมตร มีค่ามากกว่าสภาวะแข่งขันสูงที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก โดยเทียนนา 1 ต้นที่เจริญเติบโตได้อย่างสมบูรณ์ครบวงจรชีวิตโดยเฉลี่ย 162 วัน สามารถผลิตเมล็ดได้มากถึง 58,424 เมล็ดต่อต้น ซึ่งมากกว่าต้นที่เจริญเติบโตในสภาวะแข่งขันสูงที่มีจำนวนเมล็ดเพียง 5,858 เมล็ดต่อต้น เมล็ดเทียนนาสามารถงอกได้ดีที่ระดับผิวดินลึกไม่เกิน 5 เซนติเมตรเท่านั้น และยังสามารถขยายพันธุ์ได้โดยใช้กิ่งปักชำ แต่หากส่วนของลำต้นถูกฝังกลบใต้ดินก็สามารถทำให้เทียนนาตายได้ ในสภาพพื้นที่เกษตร หากเกษตรกรต้องการควบคุมเทียนนาตั้งแต่เริ่มควรทำการไถพรวนฝังกลบเทียนนาทั้งต้นและเมล็ดให้มีความลึกมากกว่า 5 เซนติเมตร ก็จะควบคุมการงอกของเทียนนาได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีกำจัดวัชพืช

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากผลการทดลองที่ได้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันกำจัดแบบไม่ใช้สารเคมี เป็นการลดการใช้สารเคมี และเพื่อให้เกษตรกรมีความระมัดระวังในการกำจัด โดยเมื่อกำจัดแล้วต้องนำออกจากพื้นที่ เพื่อไม่ให้เกิดการงอกใหม่ได้อีก

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 3 การจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด

การทดลองที่ 3.1 การจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* (Hendel) complex (Diptera:Tephritidae) ด้วยลักษณะทางพันธุกรรมในประเทศไทย

การทดลองที่ 3.2 การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในกล้วยไม้ในเขตภาคกลางของประเทศไทย

การทดลองที่ 3.3 การสำรวจโรคและจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา Cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช

การทดลองที่ 3.4 การสำรวจโรคและจัดทำรหัสดีเอ็นเอบาร์โค้ดของราสนิมสาเหตุโรคพืช

การทดลองที่ 3.5 การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Alternaria* สาเหตุโรคพืช

การทดลองที่ 3.6 การตรวจวินิจฉัยชนิดของแตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae (Platygastridae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

การทดลองที่ 3.7 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกชนิดแมงมุมแม่หม้ายสกุล *Latrodectus* ในประเทศไทย

การทดลองที่ 3.8 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจัดจำแนกเชื้อรา *Beauveria bassiana*

การทดลองที่ 3.9 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา *Trichoderma asperellum T. harzianum* และ *T. viride*

การทดลองที่ 3.10 การประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* spp. ที่เป็นศัตรูพืชกักกันแบบรวดเร็ว

การทดลองที่ 3.11 การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนกชนิดเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera (Thysanoptera: Tubulifera) ในประเทศไทย

การทดลองที่ 3.12 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา *Chaetomium cupreum* และ *C. globosum*

การทดลองที่ 3.13 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกแมงมุมวงศ์ Salticidae

การทดลองที่ 3.14 การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Curvularia* สาเหตุโรคพืช

การทดลองที่ 3.15 การศึกษาชนิดแมลงวันผลไม้เผ่า (Tribe) Dacini (Diptera: Tephritidae) ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด

การทดลองที่ 3.16 การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3.1 การจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex (Diptera: Tephritidae) ด้วยลักษณะทางพันธุกรรมในประเทศไทย

Molecular Identification of Pest Species in Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* complex (Diptera: Tephritidae) Species Complex in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ยุวรินทร์ บุญทบ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ชมัยพร บัวมาศ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	จารุวัตถ์ แต้กุล	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

แมลงวันผลไม้กลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรอย่างสูงนั้นมีรูปร่างลักษณะภายนอกที่ใกล้เคียงกันมาก ก่อให้เกิดความสับสนแก่นักอนุกรมวิธานเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้นการใช้เทคนิคชีวโมเลกุลช่วยในการวินิจฉัยชนิด จะทำให้ได้ผลที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือ การใช้ลักษณะทางพันธุกรรม เช่นดีเอ็นเอบาร์โค้ด จำแนกและยืนยันชนิดแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex โดยเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากทุกภูมิภาคของประเทศไทย และสกัด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง *cox1* และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบบนฐานข้อมูล GenBank (standard nucleotide BLAST) พบแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex ที่สามารถยืนยันชนิดได้มี 2 ชนิด ได้แก่ *B. dorsalis* และ *B. carambolae* และจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อช่วยยืนยันการจำแนกแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex โดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง *cox1* จาก 70 ตัวอย่าง ได้แก่ *B. dorsalis* complex จำนวน 61 ตัวอย่าง และแมลงวันผลไม้ในวงศ์ Tephritidae จำนวน 9 ตัวอย่าง ได้แก่ *Anastrata ludens, B. tryoni, B. cucumis, B. latifrons, B. umbrosa, B. zonata, B. correcta, Zeugodacus cucurbitae* และ *Z. tau* มาวิเคราะห์ด้วย Maximum Likelihood และ Bayesian analysis พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกัน โดยแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex เป็น sister group ของแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ ใน Family Tephritidae อย่างชัดเจน และพบว่าความสัมพันธ์ภายในกลุ่มทั้ง *B. dorsalis* แล *B. carambolae* นั้นมีลักษณะเป็น polyphyletic ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* และ *B. carambolae* มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลเบื้องต้นของจำนวนชนิดของ *B. dorsalis* ในประเทศไทย แต่การจำแนกชนิดภายในกลุ่มของ *B. dorsalis* complex ต้องมีการศึกษาต่อไป โดยเพิ่มข้อมูลของยีนตำแหน่งอื่นมาร่วมวิเคราะห์ด้วย

คำหลัก: แมลงวันผลไม้ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด พันธุกรรม

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

One of most serious groups of horticultural pests, the *Bactrocera dorsalis* complex, is of particular biosecurity/quarantine concern. Unfortunately, species of this complex are notoriously difficult to identify using morphology. Molecular diagnostic tools provide valuable support for the rapid and accurate identification of morphologically indistinct fruit fly species. DNA barcoding of the mitochondrial Cytochrome Oxidase I (*cox1*) gene could be employed to increase the accuracy of fruit fly identifications. Fresh material of *B. dorsalis* complex was collected from all regions of Thailand. Sequences were analysed using a 'barcode' approach and also phylogenetic analysis. Species were identified using standard nucleotide BLAST from GENBANK. Two species of the dorsalis complex (*B. dorsalis* and *B. carambolae*) were found. Phylogenetic analyses (Maximum Likelihood and Bayesian analysis) of the sequences gave consistent results. Neighbor-joining distance and Bayesian analysis analyses were used to investigate patterns of clustering of the dorsalis complex sequences with other pest species of fruit flies. *Cox1* proved effective in resolving *dorsalis* and *carambolae* from other fruit fly species but failed to resolve *B. dorsalis* from *B. carambolae.* This study provides basic information on the number of species of *B. dorsalis* complex present in Thailand. However, an understanding of the classification within the *B. dorsalis* complex group will requires further study making use of additional genes.

Keywords: Fruit fly, DNA barcoding, molecular diagnostics

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

ผักและผลไม้ของไทย ถือเป็นอีกหนึ่งประเภทสินค้าที่มีความสำคัญของประเทศ ซึ่งเป็นรายได้หลักของเกษตรกรไทย ปัจจุบันสภาวะการแข่งขันการส่งออกผักและผลไม้ของประเทศในภูมิภาคอาเซียนที่สูงขึ้น เพราะฉะนั้นการส่งออกผักผลไม้ไปตลาดต่างประเทศจะต้องมีมาตรฐานการรับรอง และมีการตรวจสอบคุณภาพที่เข้มงวด การจัดจำแนกศัตรูพืชที่มีโอกาสติดไปกับการส่งออกให้มีความถูกต้องนั้นมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะแมลงวันผลไม้ซึ่งเป็นศัตรูสำคัญของผักผลไม้

ในทวีปเอเชียพบว่าแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรเป็นอย่างสูง และพบว่าแมลงวันผลไม้ในกลุ่มนี้มีรูปร่างทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่ใกล้เคียงกันมาก (Vergilo *et al*., 2015) จึงมีการจัดแมลงวันผลไม้หลายชนิดให้อยู่ในกลุ่มที่มีความซับซ้อน (complex) เนื่องจากมีความยากเป็นอย่างยิ่งในการใช้เพียงลักษณะสัณฐานภายนอกมาเป็นตัวจัดจำแนก โดยเฉพาะแมลงวันผลไม้กลุ่ม *dorsalis* complex นั้นก่อให้เกิดความสับสนแก่นักอนุกรมวิธานแมลงเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากแมลงวันผลไม้กลุ่มนี้มีความแปรผันทางรูปร่างลักษณะภายนอก ยากต่อการตัดสินใจว่าเป็นความแปรผันทางสัณฐานภายในชนิดเดียวกันหรือเป็นความแตกต่างระหว่างชนิดนั้นๆ (Cameron *et al*., 2010; Schutze *et al*., 2012; Kitthawee & Rungsri,

2011; Hernández-Ortiz *et al*., 2012) ดังนั้นจึงมีการนำเทคโนโลยีต่าง ๆ เช่น การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) มาประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex (Krosch *et al*, 2012; Krosch *et al*, 2013; Schutze *et al*, 2012)

การนำเทคโนโลยีทางชีวโมเลกุลมาใช้จำแนกสิ่งมีชีวิต ทำให้สามารถจำแนกและยืนยันชนิดของสิ่งมีชีวิตให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น ซึ่งจากข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันผลไม้แต่ละชนิดในครั้งนี้จะสามารถนำมาใช้ในการจำแนกและยืนยันชนิดของแมลงผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex ในประเทศไทยได้และยังจะเป็นการปรับปรุงแก้ไขข้อมูลของแมลงวันผลไม้กลุ่มนี้ให้มีความทันสมัยตามหลักสากลซึ่งจะก่อให้เกิดผลดีทั้งด้านอนุกรมวิธานและการนำเข้าส่งออกพืชผักผลไม้ของไทยสู่ตลาดโลกอีกด้วย

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope
- กล้องถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์
- อุปกรณ์และสารเคมีในการเก็บตัวอย่างแมลง (ขวดดอง กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก กับดักแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก (wet bucket trap) สารฟีโรโมนล่อแมลงวันผลไม้ ได้แก่ เมทิล ยูจีนอล (methyl Eugenol) รวมทั้งโพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) สำหรับรักษาคุณภาพของแมลงวันผลไม้ระหว่างติดกับดักไว้ในแปลงสำรวจ
- สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอ เช่น ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction kit: Isolate Genomic DNA Kit), GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Bioline, Australia), Agarose gel (Bioline, Australia) และ TBE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), MyTag (Bioline, Australia) HS Red DNA Polymerase และ $MgCl_2$
- สารเคมี และไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

- วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง (ดำเนินการปี 2560-2561)

วิธีดำเนินการวิจัยในการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเพื่อนำมาศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

1.1 การศึกษาครั้งนี้มีแผนการปฏิบัติการเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากพื้นที่การเกษตร และพื้นที่ป่าธรรมชาติ แต่เนื่องจากแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex มีการเข้าทำลายพืชอาหารแตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องพยายามเก็บรวบรวมตัวอย่างตัวอ่อนจากพืชอาหารที่แมลงวันผลไม้เข้าทำลาย ให้มีความหลากหลายที่สุด โดยจะเก็บรวบรวมตัวอย่างจากพื้นที่ต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้) ซึ่งภายในหนึ่งปีสามารถเก็บตัวอย่างได้ 3 ภาค ภาคละ 3-5 จังหวัด และในแต่ละจังหวัดจะเก็บสามจุดสำรวจ และใช้กับดักฟีโรโมนได้แก่ methyl Eugenol โดยติดตั้งใน

กรมวิชาการเกษตร

พื้นที่เก็บตัวอย่างละ 5 อันต่อจุดสำรวจ บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ (Global Positioning System: GPS) โดยแบ่งเป็น พื้นที่ต่าง ๆ ดังนี้

(1) แปลงพืชผักสวนครัว เช่น แตงกวา ฟักทอง ถั่วฝักยาว

(2) แปลงผลไม้ เช่น มะเฟือง ชมพู่ ฝรั่ง มะม่วง พุทรา

(3) พื้นที่ป่าธรรมชาติ เช่น สวนพฤกษศาสตร์ อุทยานแห่งชาติ

รายละเอียดจังหวัดที่เป็นตัวแทนพื้นที่ปลูกพืชที่ต้องการไปเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้

ปี 2560 สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจาก 3 ภาค ดังนี้

(1) ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม นนทบุรี ปทุมธานี และนครนายก

(2) ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ตาก ราชบุรี และเพชรบุรี

(3) ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย น่าน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน แพร่ ลำปาง และลำพูน

ปี 2561 สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจาก 3 ภาค ดังนี้

(1) ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดสระแก้ว ปราจีนบุรี ชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด

(2) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัด ขอนแก่น เลย หนองคาย หนองบัวลำภู บุรีรัมย์ สุรินทร์ และอุดรธานี

(3) ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดชุมพร ระนอง พังงา สตูล สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง ตรัง และสงขลา

1.2 นำส่วนของพืชที่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้มายังห้องปฏิบัติการ นำตัวอ่อนที่เหลือใส่กล่องพลาสติกที่มีตะแกรงรองก้นซึ่งด้านล่างใส่ขี้เลื่อย และนำกล่องพลาสติกใส่ในกรงผ้าเพื่อเลี้ยงตัวอ่อนให้เจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยเจริญออกมาให้อาหาร คือ น้ำตาลผสม บรีเวอร์ยีสต์ในอัตรา 1:4 เพื่อให้สืบนลำตัวพัฒนาได้ดี

1.3 จำแนกชนิดแมลงวันผลไม้จากแนวทางวินิจฉัยด้วย The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in Asia (Drew and Hancock, 1994) และ Keys to the Tropical Fruit Flies of South-East Asia (Tephritidae: Dacinae) (Drew and Romig, 2016)

1.4 นำตัวเต็มวัยบางส่วนดองไว้ในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอและนำไปใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

1.5 เตรียมตัวอย่างตัวเต็มวัยบางส่วนเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดและเป็นข้อมูลอ้างอิงในพิพิธภัณฑ์ โดยใช้ตัวอย่างตัวเต็มวัยที่อบแห้งหรือฆ่า ด้วยเอทิลอะซิเตท หรือเก็บแมลงใส่หลอดแก้ว แช่ในช่องน้ำแข็ง 1 - 2 ชั่วโมง วิธีนี้จะทำให้สีไม่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อได้ตัวอย่างแล้ว ใช้เข็มขนาดเล็ก (micropin) แทงบริเวณ ด้านข้างของส่วนอกใต้ปีก ให้ไปทางด้านหน้าของลำตัว แล้วจึงเสียบ micropin กับโฟมหรือ ค๊อกขนาดเล็กที่มีเข็มปักแมลงเสียบอยู่ โดยมีป้ายเล็ก ๆ บันทึกกำกับ บอก สถานที่ วัน เดือน ปี และชื่อผู้เก็บ และมีป้ายบันทึก แยกบันทึกชื่อพืช ที่เก็บมา และชื่อแมลงที่จำแนกได้อีก 1 ป้าย

ศูนย์วิทยทรัพยากร

2. การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (ดำเนินการปี 2560-2561)

2.1 นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มาทำการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) โดยใช้วิธีการตาม Boontop, 2016 ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Bioline, Australia) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัท โดยนำขาด้านขวาจำนวนสามข้างของขาแมลงวันผลไม้ (25 มิลลิกรัม) มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ตัวอย่างแมลงที่เหลือเก็บไว้เพื่อเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ เพื่อเป็น Voucher specimen) เติม lysis buffer GL ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และ protinase K solution ปริมาณ 25 ไมโครลิตรปิดหลอดให้สนิท พร้อมทั้งพันด้วยพาราฟิน (paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 - 20 ชั่วโมง แล้วเติม lysis buffer G3 ปริมาณ 200 ไมโครลิตรและบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เขย่าให้สม่ำเสมอ 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 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) จากนั้นเติม wash buffer GW2 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีอีกครั้ง ย้ายหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge) 1.5 ไมโครลิตร และชะล้างอีเอ็นเอด้วยสารละลาย elution buffer G ปริมาณ 50 ไมโครลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอ ที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

2.2 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ดังนี้

Primer Name	Sequence	Base
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	25
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	26

เตรียมปฏิกิริยา PCR ปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

		1 reaction (ไมโครลิตร)
5X Buffer		5
MyTag		0.1
ddH_2O		15.9
Primer Forward	LCO1490	1
Primer Reverse	HCO2198	1
DNA		2

กรมวิชาการเกษตร

Total	25

นำปฏิกิริยา PCR ใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR ดังนี้ initial-denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วย denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (ทำซ้ำ denaturing, annealing และ extension จำนวน 35 รอบ) จากนั้น final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส (electrophoresis) โดยหยดผลิตภัณฑ์ PCR ลงในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1.5 % และให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย TBE โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ 400 mp เป็นเวลา 45 นาที

2.4 ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ของแมลงวันผลไม้ที่ได้ไปทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์โดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

2.5 นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน *cox*1 ที่ผ่านการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ มาทำการวิเคราะห์โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่นำมาศึกษาทั้งหมด (sequence assembly) โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ (assemble) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999).

2.6 บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดนำผลที่ได้มาตรวจสอบชนิด กับฐานข้อมูล Gene Bank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บ รวบรวมฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ จากทั่วโลกอีกครั้ง เพื่อยืนยันความถูกต้องข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด และข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้จะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืช และดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้เป็นดีเอ็นเออ้างอิงที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2.7 ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อยืนยันความถูกต้องในการจัดจำแนก โดยการประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สองเกณฑ์มาตรฐาน 2 ประเภท คือ Maximum Likelihood และ Bayesian Inference โดยการเตรียมชุดข้อมูลที่จะใช้ในการวิเคราะห์ในแต่ละวิธี 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 และกำหนดค่า 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=4samplefreq=1000 pintfreq=1000 nchains=4 savebrlens=yes stoprules=yes stopval=0.01; ปรับค่า generation temperature substitution model parameters จำนวน generation และ burnin

กรมวิชาการเกษตร

เพื่อให้ได้ concensus topology ตรวจสอบความเชื่อมั่นของผลวิเคราะห์ด้วย cumulative and compare functions โดย AWTY (Nylander *et al.*, 2008)

- **การบันทึกข้อมูล**

1) บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบของ FASTA ไฟล์

2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบ ให้สอดคล้องกับ ชนิดแมลงวันผลไม้ที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบด้วย พิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้แต่ละชนิด และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

3) ชื่อวิทยาศาสตร์ของแมลงวันผลไม้ พร้อมทั้งรายละเอียดของพืชอาหารที่พบแมลงวันผลไม้เข้าทำลาย เช่น ชนิดพืช และชื่อวิทยาศาสตร์

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561

สถานที่ : 1) แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่างๆ ในภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้

จากการใช้กับดักแมลงวันผลไม้แบบ steiner ซึ่งเป็นกับดักที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในประเทศไทยนั้น พบว่าตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ได้นั้น มีลักษณะแห้งหรือเน่าเสีย ทำให้ไม่สามารถนำตัวอย่างมาศึกษาด้านชีวโมเลกุลได้ ดังนั้นจึงมีการนำเอากับดักแบบถังเปียก (Figure 3.1.1) เป็นดักที่มีลักษณะเป็นถ้วยพลาสติกใสสีขาว มีช่องว่างขนาด 1.5 เซนติเมตร อยู่รอบๆ กับดัก ซึ่งเป็นทางเข้าของแมลงวันผลไม้ มีฝาปิดที่ภายในมีที่ใส่สารล่อซึ่งผสมยาฆ่าแมลงติดอยู่ กับดักประเภทนี้เหมาะสำหรับการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาใช้ศึกษาด้านชีวโมเลกุล เนื่องจากสามารถป้องกันความร้อน ความชื้น ลม ฝน และเชื้อรา นอกจากนี้ภายในถ้วยบรรจุสารโพรไพลีนไกลคอลซึ่งเป็นสารเคมีที่ช่วยในการคงรักษาสภาพดีเอ็นเอไม่ให้เสื่อมสลายไปตามสภาวะแวดล้อม และจากการใช้กับดักแมลงวันผลไม้ และการรวบรวมจากพืชอาหารต่างๆ สามารถรวบรวมแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex (Figure 3.1.2) ได้ จำนวน 397 ตัวอย่าง (Table 3.1.1) ทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดแมลงวันผลไม้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ด้วยแนวทางวินิจฉัย Keys to the Tropical Fruit Flies of South-East Asia (Tephritidae: Dacinae) (Drew & Romig, 2016) พบแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* complex ที่สามารถจำแนกได้ 2 ชนิด ได้แก่ *B. carambolae* (Figure 3.1.3) และ *B. dorsalis* (Figure 4) และยังมีอีกหลายตัวอย่างที่มีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาทำให้ไม่สามารถจำแนกได้ และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ และศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่อไป

จากการสำรวจพืชอาศัย (Table 3.1.2) และการแพร่กระจายของแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex พบว่าแมลงวันผลไม้ *B. carambolae* กระจายตัวเฉพาะเขตภาคใต้ของไทย (Figure 3.1.5) ซึ่งแตกต่างจาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร

B. dorsalis ที่มีการกระจายทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย (Figure 3.1.6)

2. การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

การศึกษาครั้งนี้ทำการสกัดดีเอ็นเอของแมลงวันผลไม้ *B. caramolae* 20 ตัวอย่าง และ *B. dorsalis* 41 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cox1* (Figure 3.1.7) ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจากแมลงวันผลไม้ *B. carambolae* จำนวน 20 ตัวอย่าง และ *B. dorsalis* จำนวน 41 ตัวอย่าง บันทึกผลนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่า Barcode (ภาคผนวกที่ 3.1.1) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ทำการศึกษามาเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่รายงานในฐานข้อมูลสากล คือ Gene Bank เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของดีเอ็นเอบาร์โค้ด พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่ทำการศึกษามีความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลสูงถึง 99 - 100%

แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้บางตัวอย่าง เมื่อนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cox1* มาใช้ศึกษาความแตกต่างของแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex นั้น ยังมีความคลุมเครือ ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *B. dorsalis* กับ *B. carambolae* ได้อย่างชัดเจนในบางตัวอย่าง จึงใช้ไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการแยกความแตกต่างระหว่าง *B. dorsalis* กับ *B. carambolae* คือ ITS1:

ITS7F GAA TTT CGC ATA CAT TGT AT และ

ITS6R AGC CGA GTG ATC CAC CGC T (Boykin *et al*., 2013)

ซึ่งเมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน ITS1 (Figure 3.1.8) ตรวจวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์และนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Gene bank พบว่ามีความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์สูงถึง 99 - 100 % (ภาคผนวกที่ 3.1.2) และสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่าง *B. carambolae* และ *B. dorsalis* ได้อย่างชัดเจน

<u>การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex</u>

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex เพื่อใช้ยืนยันข้อมูลการจัดจำแนกชนิด โดยทำการวิเคราะห์ sequences ของตำแหน่ง *cox1* จาก 70 ตัวอย่าง ได้แก่ *B. dorsalis* complex จำนวน 61 ตัวอย่าง และแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในวงศ์ (Family) Tephritidae 9 ตัวอย่าง ได้แก่ *Anastrata ludens, B. tryoni, B. cucumis, B. latifrons, B. umbrosa, B. zonata, B. correcta, Zeugodacus cucurbitae* และ *Z. tau* วิเคราะห์ด้วย Maximum Likelihood และ Bayesian analysis พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกัน (Figures 3.1.9 – 3.1.10) โดยแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex เป็น sister group ของแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ ใน Family Tephritidae อย่างชัดเจน แต่เมื่อพิจารณาดูความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้ในแต่ละกลุ่ม พบว่าความสัมพันธ์ภายในกลุ่มทั้ง *B. dorsalis* และ *B. carambolae* นั้นมีลักษณะเป็น polyphyletic ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* แล *B. carambolae* สามารถจัดจำแนกความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้ แต่การจัดจำแนกชนิดภายในกลุ่มต้องเพิ่มข้อมูลของดีเอ็นเอของยีนตำแหน่งอื่นมาร่วมวิเคราะห์ ซึ่งยีนตำแหน่ง *cox1* สามารถจำแนกได้เพียงความแตกต่างในระดับกลุ่มของ *B.*

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

dorsalis และ *B. carambolae* เท่านั้น อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถทราบข้อมูลเบื้องต้นของจำนวนชนิดของ *B. dorsalis* ในประเทศไทย แต่การยืนยันชนิดหรือจัดจำแนกชนิดภายในกลุ่มของ *B. dorsalis* complex นั้นต้องมีการศึกษาต่อไป

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจากพื้นที่ภาคเหนือ ภาคใต้ ภาคกลาง และภาคตะวันตก โดยการใช้กับดักแมลงวันผลไม้ ร่วมกับสารล่อที่ใช้ CUE lure และ Methyl eugenol รวมทั้งการรวบรวมจากพืชอาหารต่างๆ พบแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex ทั้งหมด จำนวน 397 ตัวอย่าง และในการจำแนกเบื้องต้นพบแมลงวันผลไม้ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *B. dorsalis, B. carambolae* และ *Bactrocera* spp. และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอ สกัดดีเอ็นเอ ทำพีซีอาร์ บริเวณยีน *cox1* ได้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* จำนวน 41 ตัวอย่าง และ *B. carambolae* จำนวน 20 ตัวอย่าง

จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลทางชีวโมเลกุลของแมลงวันผลไม้ที่มีความซับซ้อนหรือใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นการยากที่จะใช้เพียงลักษณะสัณฐานภายนอกมาเป็นตัวจัดจำแนก และยืนยันว่า *cox1* เป็นยีนที่สามารถใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex ได้ เนื่องจากยีน *cox1* มีความแตกต่างมากพอที่จะทำให้แยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้ เป็นยีนที่มีบริเวณอนุรักษ์ (conserve area) มีขนาด นิวคลีโอไทด์มีความเหมาะสมคือประมาณ 500 - 800 คู่เบส ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนั้น ไพรเมอร์ที่เป็น universal primer จะสามารถเข้ามาจับและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ได้ง่ายและรวดเร็ว นอกจากนี้ลำดับดีเอ็นเอของยีน *cox1* ยังสามารถแยกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากได้อีกด้วย และการเลือกบริเวณยีนที่จะนำมาใช้มีความสำคัญมาก เพราะหากเลือกขนาดและบริเวณที่นำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้เหมาะสมกับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาจะทำให้สามารถนำไปใช้ได้ง่ายสะดวกและรวดเร็วมากยิ่งขึ้น การศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อใช้ *cox1* มีบางตัวอย่างที่แสดงผลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันในกลุ่ม *B. dorsalis* complex ยังไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงมีการศึกษา เพิ่มเติมด้วยไพรเมอร์ ITS1 ซึ่งพบว่าสามารถจำแนกชนิดของ *B. dorsalis* และ *B. carambolae* ได้อย่างถูกต้องถึง 99-100% นอกจากนี้ยังสามารถใช้ ITS1 ในการแยกความแตกต่างระหว่างแมลงวันผลไม้ *B. carambolae* และ *B. dorsalis* เพียงแค่การในวิธีการ gel electrophoresis เท่านั้น เนื่องจาก ขนาดของจำนวนคู่เบสนั้นมีความแตกต่างกันประมาณ 44 คู่เบส (Figure 8) ซึ่งสามารถจัดจำแนกได้ในระดับสายตาซึ่งเป็นการตรวจสอบในเบื้องต้นที่มีความน่าเชื่อถือ โดยเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ ทางวิวัฒนาการโดยวิธีการ Maximum Likelihood และ Bayesian analysis ซึ่งเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และยืนยันชนิดของแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex นั้นพบว่าแยกออกมาจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ ใน Family Tephritidae อย่างเห็นได้ชัด แต่มีความแตกต่างในการจัดกลุ่ม ซึ่งหากต้องการศึกษาการแบ่งกลุ่มที่ชัดเจนมากขึ้น จะต้องมีการใช้จำนวนยีนในการศึกษาเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ Boykin *et al*., 2013 ที่ใช้ยีนถึง 6 ตำแหน่ง (*cox1, nad4-3'*, CAD, *period*, ITS1, ITS2) หรือ

กรมวิชาการเกษตร

ทำการศึกษาอนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้แบบผสมผสานโดยการประยุกต์ใช้เทคนิคมอร์โฟเมตริกแบบจีโอเมตริก (geometric morphometric) มาผสมผสานกับการศึกษาทางชีวโมเลกุลในแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex ซึ่งจะช่วยสนับสนุนและยืนยันการตรวจจำแนกได้เป็นอย่างดี เช่นเดียวกับการศึกษาของ Krosch *et al*. (2012, 2013) และ Schutze *et al*., (2012; 2015)

นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ยังช่วยยืนยันจำนวนชนิดของ *B. dorsalis* ในประเทศไทย ให้มีความสอดคล้องและทันสมัยเทียบเท่าระดับสากล ดังเช่น Schutze *et al.*, 2015 ศึกษาแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex ด้วยการศึกษาอนุกรมวิธานแบบผสมผสาน (Integrative Taxonomy) และยืนยันได้ว่าแมลงวันผลไม้ที่เคยเป็น *B. papayae* และ *B. philipinensis* จริง ๆ แล้วเป็นชนิดเดียวกับ *B. dorsalis* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าเมื่อนำดีเอ็นเอของแมลงวันผลไม้ *B. papaya* และ *B. philipinensis* มาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนั้น แมลงวันผลไม้ทั้งสองชนิดจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *B. dorsalis* และแยกออกมาจาก *B. carambolae* อย่างเห็นได้ชัด

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไปซึ่งจากการทดลองจะได้ชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ ที่ถูกต้อง ได้ตัวอย่างดีเอ็นเอบาร์โค้ด ของแมลงวันผลไม้ใน *B. dorsalis* complex และสามารถนำมาใช้เพื่อจัดจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ในกลุ่มของ *B. dorsalis* complex ได้อย่างถูกต้องและมาตรฐานสากล นอกจากนี้ยังได้ข้อมูลโครงสร้างดีเอ็นเอเป็นข้อมูลพื้นฐานในการควบคุม ป้องกันกำจัด และข้อมูลในการนำเข้าส่งออก ซึ่งเป็นแหล่ง ข้อมูลทางด้านกีฏวิทยาที่สำคัญของประเทศ ซึ่งหน่วยงานที่สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ หน่วยงานราชการ กระทรวงพาณิชย์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ บริษัทเอกชนผู้ส่งออก มหาวิทยาลัย โรงเรียน

ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นข้อมูลที่มีความหลากหลายทางชีวภาพที่สามาถนำไปใช้บ่งชี้ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตของประเทศไทย ถือเป็นฐานข้อมูลทางด้านพันธุกรรมที่มีความสำคัญยิ่งสำหรับการนำไปใช้ในการศึกษาต่อไปในอนาคต

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.1.1 Fruit fly trap (wet bucket trap) for molecular work

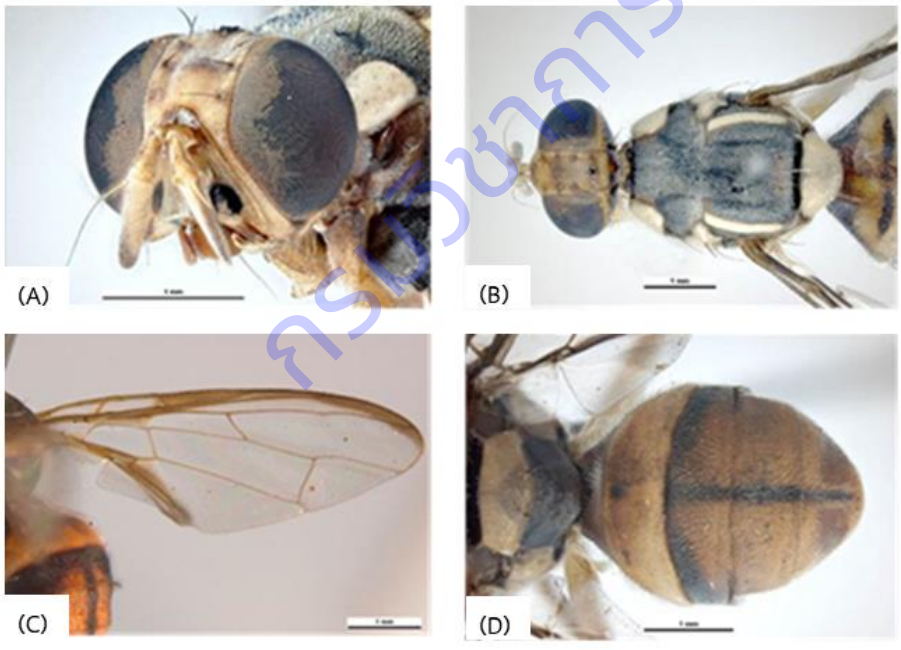


Figure 3.1.2 Morphological character of *Bactrocera dorsalis* complex.

(A) Distinct dark facial spots (B) Lateral postsutural vittae present

(C) Wing colourless and anal streak (D) Abdominal terga III-V with a dark "T" pattern

กรมวิชาการเกษตร

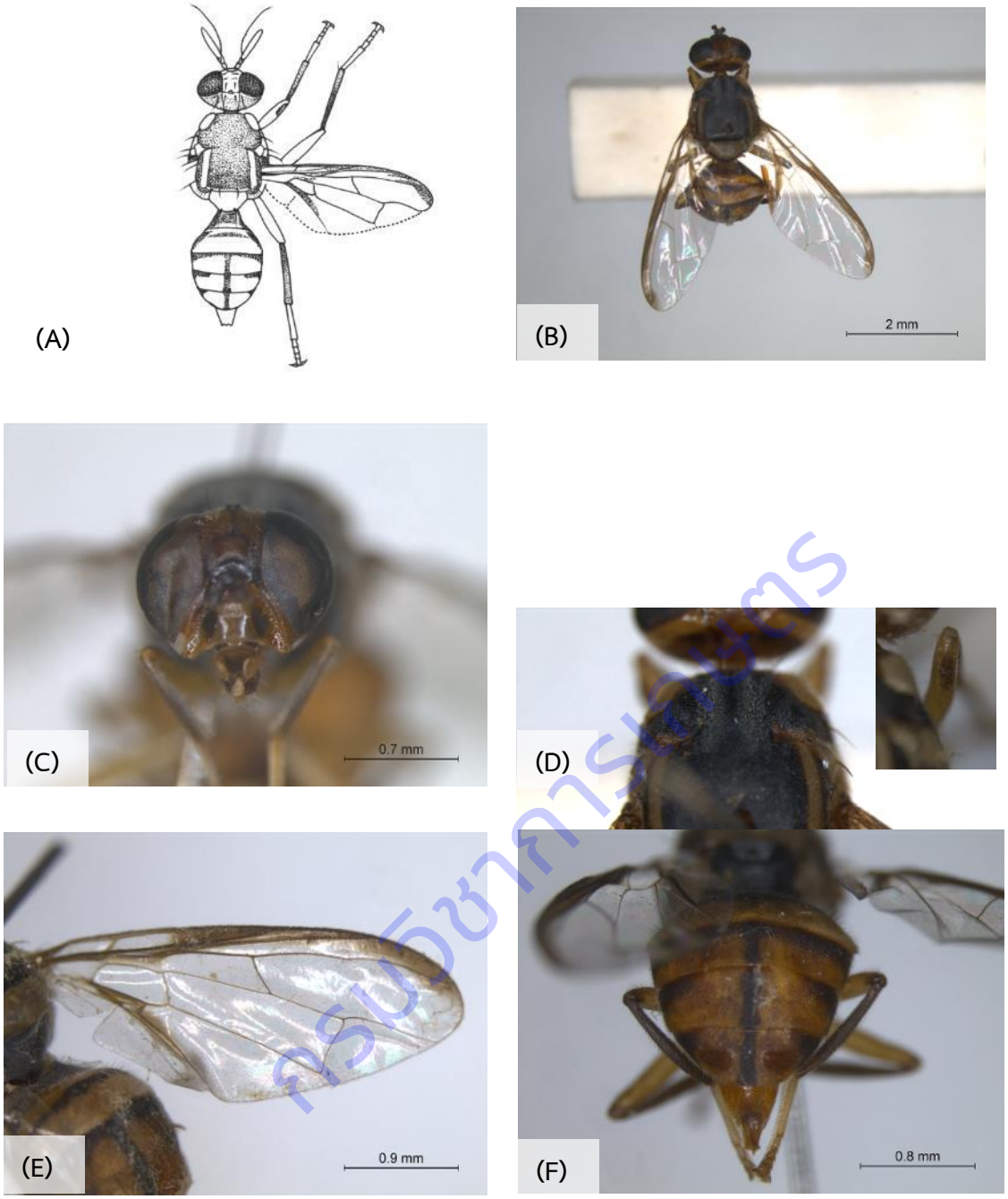


Figure 3.1.3 *Bactrocera* (*Bactrocera*) *carambolae* Drew & Hancock

(A) Taxonomic characters (B) Body

(C) Head (D) Thorax

(E) Wing (F) Abdomen

กรมวิชาการเกษตร

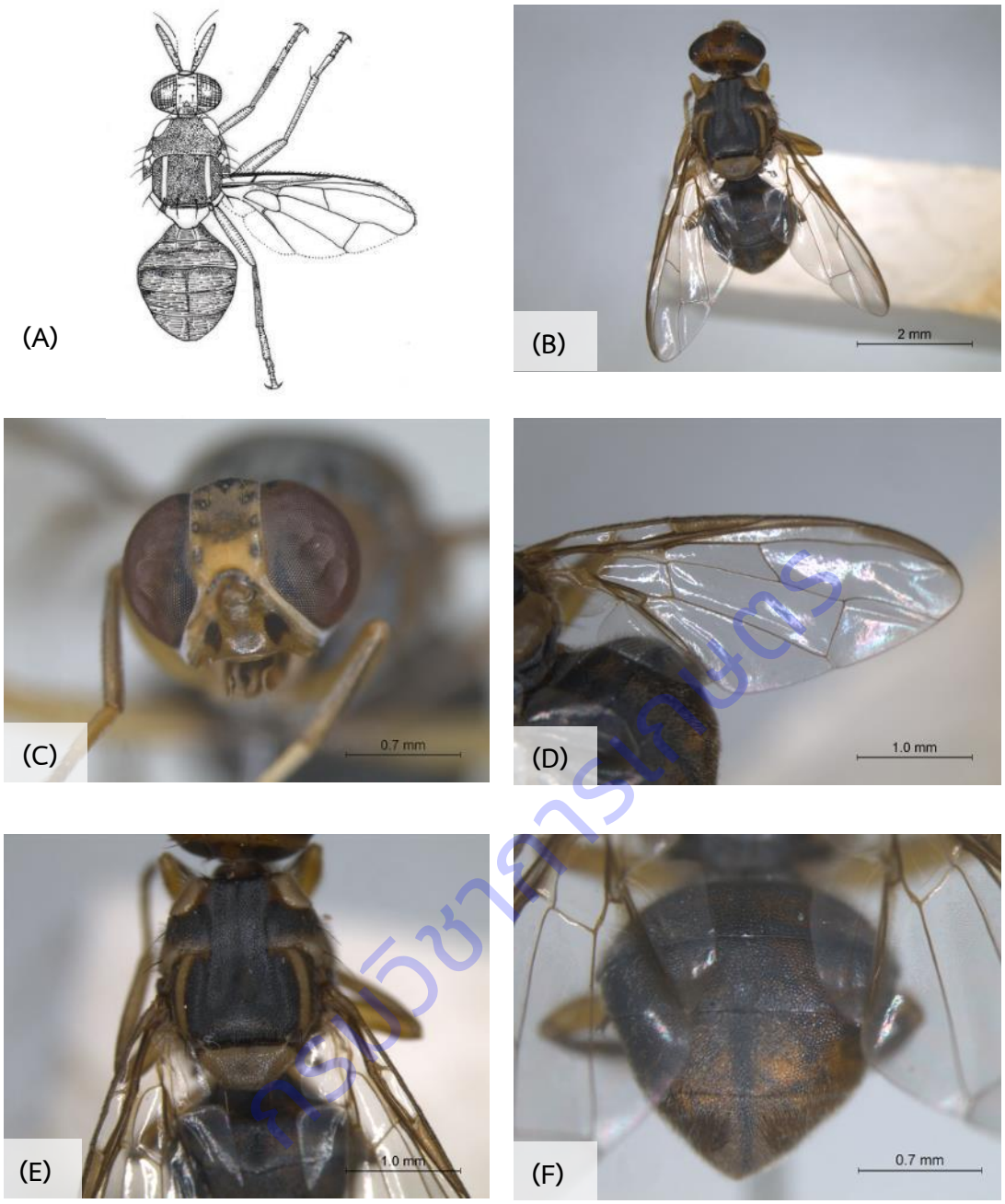


Figure 4 *Bactrocera* (*Bactrocera*) *dorsalis* Hendel

(A) Taxonomic characters (B) Body

(C) Head (D) Thorax

(E) Wing (F) Abdomen

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

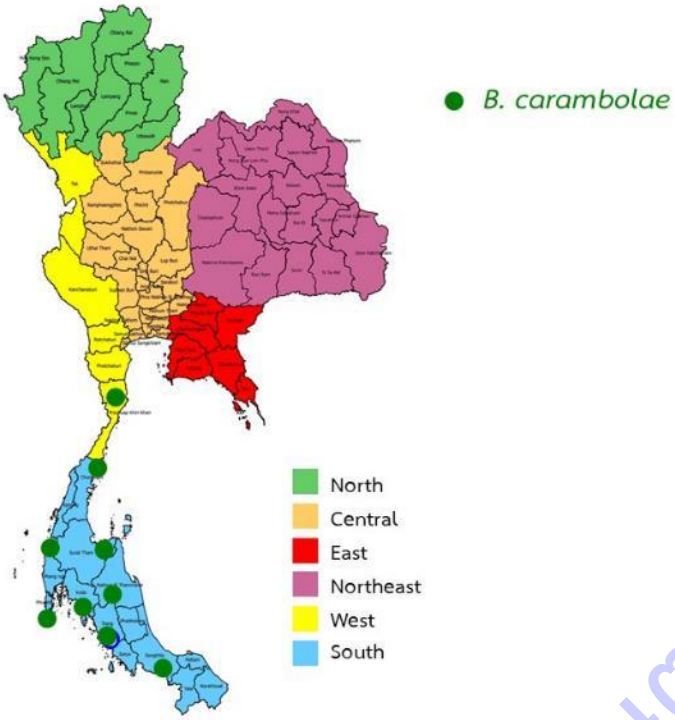


Figure 3.1.5 Distribution of *Bactrocera carambolae* in Thailand

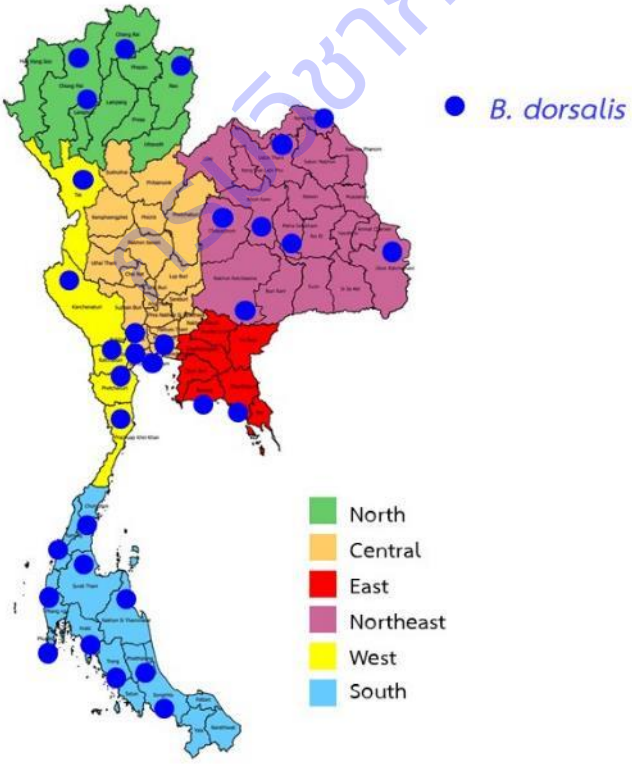


Figure 3.1.6 Distribution of *Bactrocera dorsalis* in Thailand

สำนักวิชาการเกษตร

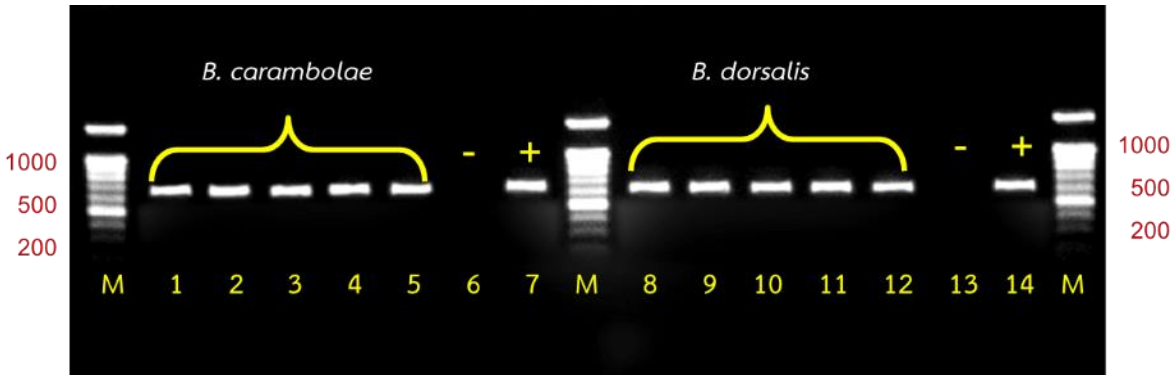


Figure 3.1.7 PCR results using the *cox1* (LCO1490/HCO2198) universal primer pair.

Lane 1- 5: *B. dorsalis* from different geographical populations.

Lane 6: negative control (ddH_2O) Lane 7: Positive control (*Z. cucurbitae*)

Lane 8 -12: *B. carambolae* from different geographical populations.

Lane 13: negative control (ddH_2O) Lane 14: Positive control (*Z. cucurbitae*)

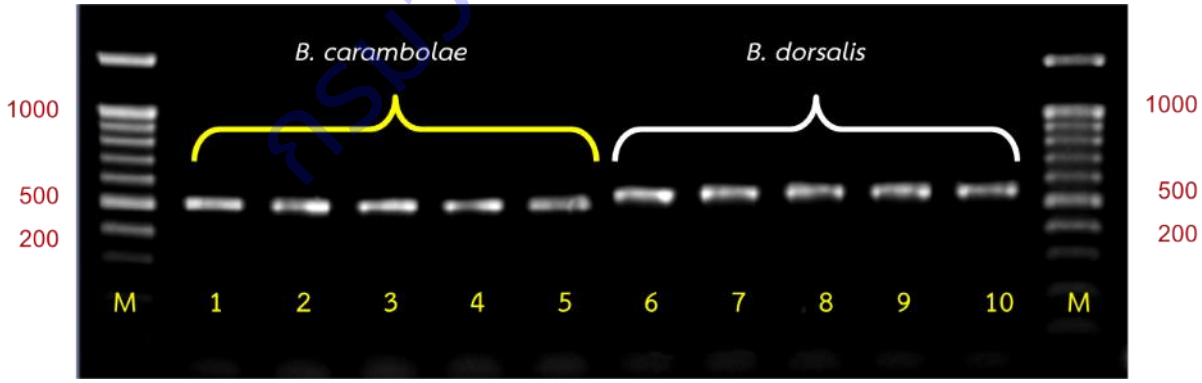


Figure 3.1.8 PCR results using the ITS (ITS7F/ITS6R) primer pair.

Lane 1- 5 *B. carambolae* from different geographical populatons;

Lane 6 -10 *B. dorsalis*; Lane 11: negative control (ddH_2O);

Lane M Marker

กรมวิชาการเกษตร

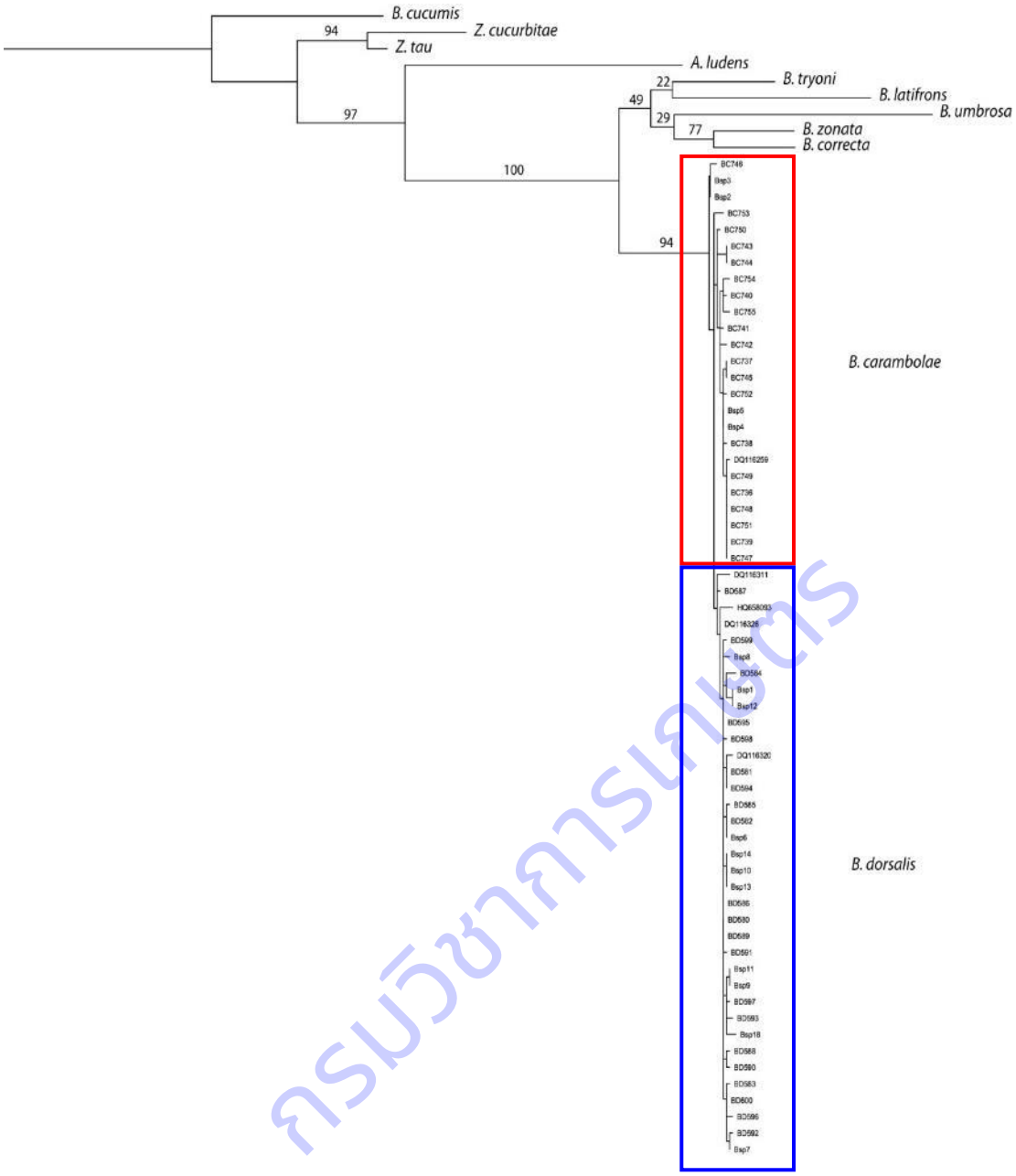


Figure 3.1.9 Maximum likelihood phylogenetic tree based on *cox1* gene sequences, showing the phylogenetic relationship among 11 fruit fly species, other *Bactrocera* species, *Zeugodacus* species and *Anastrapha*. *Anastrapha ludens* was used as outgroup. The number of sites are 650, and scale bar = 0.005 substitutions per nucleotide position. Percent bootstrap values above 50 (1000 replicates) are indicated at notes.

กรมวิชาการเกษตร

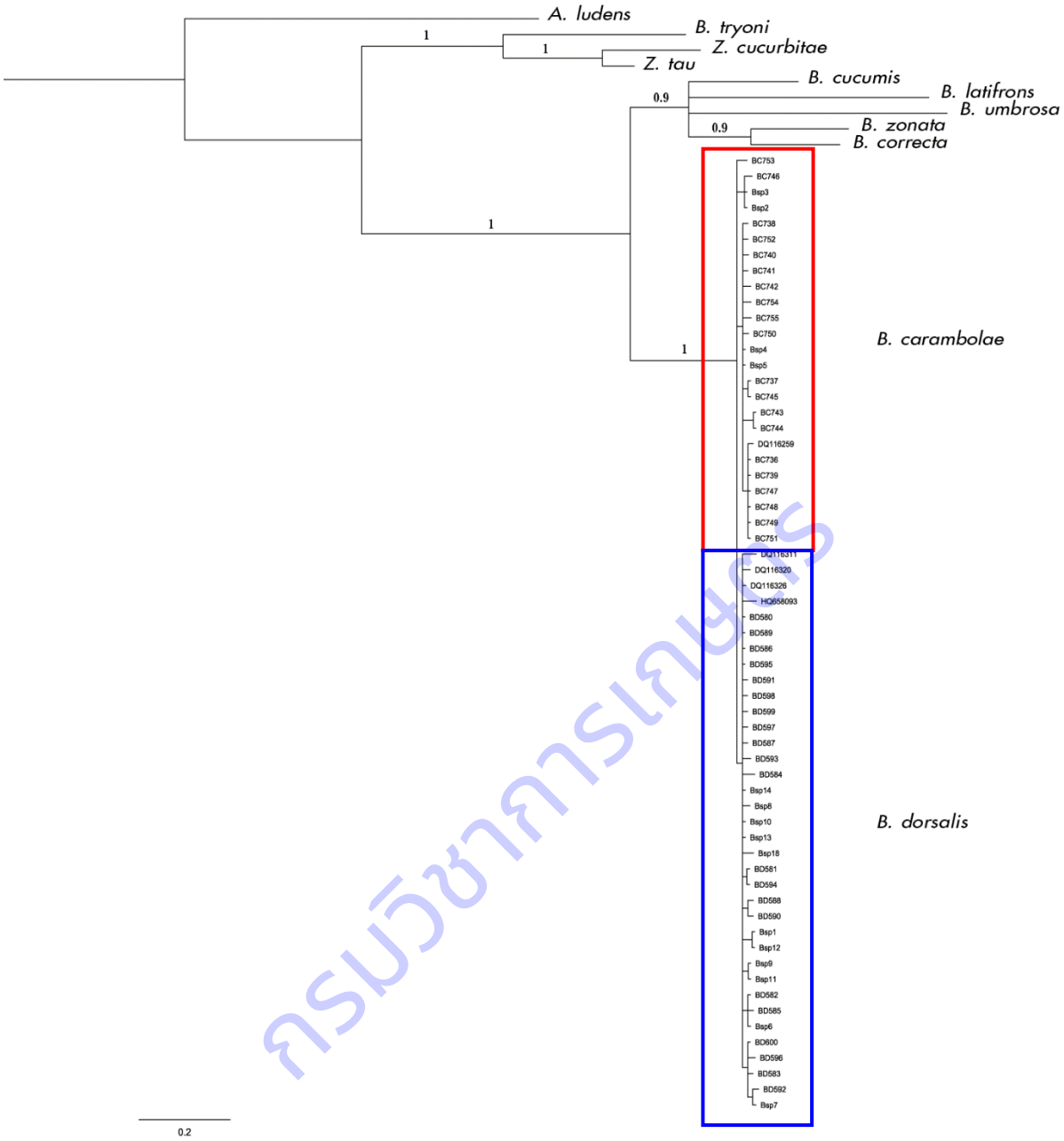


Figure 3.1.10 Bayesian analysis phylogenetic tree based on *cox1* gene sequences, showing the phylogenetic positions of 11 fruit fly species, other *Bactrocera* species, *Zeugodacus* species and *Anastrapha*. *A. ludens* was used as outgroup. The scale bar = 0.2 substitutions per nucleotide position. Percent bootstrap values above 50 (1000 replicates) are indicated at notes.

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.1.1 Scientific name, number of samples, host plants and distribution.

	Scientific Name	Number of samples	Host plants	Distribution
1	*B. dorsalis*	50	rose apple guava, cucumber winter melon bitter gourd pumpkin, santon guava, mango, jackfruit and water melon	Chiang-mai, Chiang-rai, Lamphun Nan, Nakhon Ratchasrima Chaiyaphum, Khon Kaen, Udonthani, Nongkhai, Mahasarakham, Kanchanaburi, Tak, Chanthaburi, Rayong, Suratthani, Chumphon Ranong, Trang, Phatthalung Songkhla, Nakhon Si Thammarat Krabi, Phang-nga, Phuket, Bangkok, Nakhon Pathom, Samut Songkhram, Samut Sakhon, Ratchaburi, Prachuap Khiri khan, Phetchaburi and Ubon Ratchathani
2	*B. carambolae*	22	star fruit rose apple mango	Prachuap Khiri khan, Chumphon, Trang, Songkhla, Surat Thani, Krabi Nakhon Si Thammarat, Phang-nga, and Phuket
3	*Bactrocera* spp.	325	rose apple guava, cucumber winter melon bitter gourd pumpkin, santon guava, mango, jackfruit and water melon	Chiang-mai, Chiang-rai, Lamphun Nan, Nakhon Ratchasrima Chaiyaphum, Khon Kaen Udonthani, Nongkhai Mahasarakham, Kanchanaburi Tak, Chanthaburi, Rayong Suratthani, Chumphon Ranong, Trang, Phatthalung Songkhla, Nakhon Si Thammarat Krabi, Phang-nga, Phuket Bangkok, Nakhon Pathom Samut Songkhram, Samut Sakhon Ratchaburi, Prachuap Khiri khan Phetchaburi and Ubon Ratchathani

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3.2 การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในกล้วยไม้ในเขตภาคกลางของประเทศไทย

DNA Barcoding for Identification of Thirps in Subfamily Thripinae (Thysanoptera: Thripidae) in Orchids in the Middle part of Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	อิทธิพล บรรณาการ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	จารุวัตถ์ แต้กุล	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในกล้วยไม้ในเขตภาคกลางของประเทศไทย โดยการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกกล้วยไม้ในเขตภาคกลางของประเทศไทย เช่น นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สุพรรณบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ เป็นต้น ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2561 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน เพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถเก็บรวบรวมเพลี้ยไฟได้ 290 ตัวอย่าง และสามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae ได้ 2 ชนิด ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae ได้แก่ เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* (Karny) 288 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟดอกไม้ *Frankliniella schultzei* (Trybom) 2 ตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงชนิด ลักษณะการทำลาย เขตการแพร่กระจายโดยเพลี้ยไฟจะเข้าทำลายทั้งยอดอ่อน ดอก และใบอ่อนของกล้วยไม้ ทั้งนี้ได้ดำเนินการศึกษาลำดับดีเอ็นเอบาร์โค๊ดของยีน COI (Cytochrome Oxidaes subunit I) ของเพลี้ยไฟฝ้ายที่เก็บรวบรวมได้ในจังหวัดนนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี สมุทรสาคร และสุพรรณบุรี สามารถสรุปได้ว่าชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripidae ที่พบในเขตภาคกลางของประเทศไทยคือ เพลี้ยไฟฝ้าย ซึ่งตัวอย่างเพลี้ยไฟที่เก็บรวมรวมได้จากพื้นที่ดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยา จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดและถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยไฟทั้ง 2 สกุลนี้ นำตัวอย่างเพลี้ยไฟจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลงพร้อมนำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดทำรายชื่อชนิดแมลงศัตรูพืชรองรับปัญหาด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

คำสำคัญ เพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae อนุกรมวิธาน อณูชีววิทยา

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Taxonomy and DNA sequence of Thrips in subfamily Thripinae was studied by surveying and collecting in orchids in the Middle part of Thailand during October 2016 and September 2018. Thrips was taken to Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture for detecting by study the taxonomy and morphology from permanent slides including compared with the specimens of Thirps in DOA Insect Museum. The result from detecting Thrips, 290 were found to represent Thrips in Order Thysanoptera Family Thripidae subfamily Thripinae (2 species 2 genera): 288 cotton thrips; *Thrips palmi* (Karny) and 2 common blossom thrips; *Frankliniella schultzei* (Trybom). Some specimens that preserved in 95% alcohol were analyzed by using PCR technique with mitochondrial COI gene in order to reveal lineage. The results of Neighbor Joining/UPGMA showed the closely relation between *Thrips palmi* (Karny) which collected from Nonthaburi, Pathumthani, Nakhon Prathom, Kanchanaburi, Ratchaburi Samutsakorn and Suphanburi Province. Conclusion, thrips that belong to subfamily Thripinae which found in orchids in the Middle part of Thailand is *Thrips palmi* Key and photographic taxonomic characters of 2 species were provided.

Keyword *Thrips palmi Frankliniella schultzei* Taxonomy Molecular Biology

คำนำ

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ในวงศ์ Orchidaceae เป็นไม้ตัดดอกยอดนิยม เนื่องจากมีลักษณะดอกรวมถึงมีสีสันลวดลายที่สวยงาม อีกทั้งยังเป็นไม้ตัดดอกที่มีอายุการใช้งานได้นาน มีแหล่งปลูกใหญ่ในเขตภาคกลางของประเทศไทย กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของไทยที่สามารถทำรายได้ให้กับเกษตรกรจากการจำหน่ายทั้งในและต่างประเทศได้ปีละหลายพันล้านบาท (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2541) นอกจากนี้ประเทศไทยยังได้รับการยกย่องว่าเป็นแหล่งผลิตกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญของโลก กระทรวงเกษตรและสหกรณ์จึงได้พิจารณาให้กล้วยไม้เป็นพืชในโครงการนำร่อง Product Champion พร้อมสนับสนุนการส่งออกโดยได้กำหนดยุทธศาสตร์ในการพัฒนาเกี่ยวกับแผนควบคุมจนสามารถทำรายได้สูงและมีปริมาณการส่งออกเพิ่มขึ้นทุกปี ปัจจุบันมีเกษตรกรให้ความสนใจเพาะปลูกกล้วยไม้เพื่อการพาณิชย์เป็นจำนวนมาก เฉพาะในปี พ.ศ. 2550 มีจำนวนผู้ประกอบธุรกิจที่ขึ้นทะเบียนผู้ผลิตและผู้ประกอบการกล้วยไม้ไว้กับกรมส่งเสริมการเกษตรในพื้นที่ภาคกลางและพื้นที่ใกล้เคียง ถึง 1,313 ราย ซึ่งเป็นผู้ประกอบธุรกิจกล้วยไม้ ที่ดำเนินธุรกิจทางด้านการผลิต และการจัดจำหน่ายในฐานะเกษตรกรผู้เพาะปลูกกล้วยไม้ ผู้ค้าส่งและผู้ค้าปลีก ซึ่งจากการที่มีผู้ประกอบการธุรกิจกล้วยไม้เป็นจำนวนมาก ประกอบกับตลาดทั้งในและต่างประเทศ มีความต้องการกล้วยไม้ในปริมาณสูง แต่ปัจจุบันปัญหาหลักของการส่งออกกล้วยไม้ไปยังต่างประเทศคือ การพบเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* (Karny) ติดไปกับดอกกล้วยไม้ ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2539 เป็นต้นมา ประเทศฝรั่งเศสได้เข้มงวดในการตรวจสอบกล้วยไม้ที่นำเข้าจากประเทศไทย หากพบว่ามี

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

เพลี้ยไฟติดไปกับดอกกล้วยไม้ ก็จะดำเนินการยึดและเผาทำลาย จึงทำให้ผู้ส่งออกได้รับความเดือดร้อนอย่างมาก (กรมวิชาการเกษตร, 2541) ส่งผลให้มีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในแปลงกล้วยไม้เพิ่มขึ้นจนเพลี้ยไฟสามารถสร้างความต้านทานและอยู่รอดบนกล้วยไม้ดีมากขึ้น ซึ่งนอกจากเพลี้ยไฟฝ้ายจะลงทำลายกล้วยไม้แล้ว ยังสามารถพบเพลี้ยไฟอีกหลายชนิดในวงศ์ย่อย Thripinae (Thysanoptera: Thripidae) ที่ระบาดและลงทำลายกล้วยไม้ในเขตภาคกลาง (ศิริณี, 2544) การศึกษาชนิดและดีเอนเอบาร์โค้ดของเพลี้ยไฟจะทำให้ทราบถึงชนิดที่แน่นอนของเพลี้ยไฟที่ระบาดในแปลงปลูกกล้วยไม้นั้นๆ ทั้งนี้จะทำให้ชนิดที่ถูกต้องและเหมาะแก่การป้องกันกำจัด สามารถวิเคราะห์ชนิดของเพลี้ยไฟศัตรูพืชในระยะไข่และตัวอ่อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในตอบสนองการตรวจพบชนิดเพลี้ยไฟจากประเทศปลายทางว่าเป็นชนิดเพลี้ยไฟฝ้ายจริงหรือไม่ นอกจากนี้การศึกษาลำดับพันธุกรรมจะทำให้ทราบถึงความแปรปรวนของยีน เพลี้ยไฟในพื้นที่ภาคกลางว่ามีความแตกต่างหรือใกล้เคียงกันอย่างไร การศึกษานี้จะได้ข้อมูลซึ่งไม่มีหน่วยงานอื่นในประเทศทำวิจัยเชิงลึกเช่นนี้ อีกทั้งยังเป็นการวิเคราะห์ชนิดเพลี้ยไฟศัตรูพืชโดยวิธีใหม่ที่ทันสมัย สามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษาให้กับนักวิชาการทั่วไป บริษัทเอกชน และผู้ประกอบการที่เกี่ยวข้องกับการเกษตร ทั้งนี้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และลำดับยีน COI ของเพลี้ยไฟที่พบในกล้วยไม้ที่วิเคราะห์ได้นี้สามารถนำมาศึกษา 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% โคลฟออย แคนาดาบัลซัม เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องสไลด์ถาวร และ ตู้อบสไลด์ถาวร อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ PCR ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์ 99% กรดอะซิติก DNeasy Kit, dNTP mixtures, 10X PCR buffer, Automatic pipette บีกเกอร์ หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ DNA Thermal Cycle เครื่อง Electrophoresis, Gel Documentary, Gene Amp PCR กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope ที่ติด camera lucida เป็นอุปกรณ์เสริมช่วยในการวาดภาพแมลงที่พบ กล้องถ่ายภาพ อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา rotring และกระดาษไขเขียนแบบ เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae

- วิธีการ

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกกล้วยไม้ในเขตภาคกลางของประเทศไทย เช่น นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี เป็นต้น เพื่อศึกษาจำนวนชนิดของเพลี้ยไฟในกล้วยไม้ โดยใช้วิธีการตีหรือเขย่าส่วนของพืช เช่น ใบ และดอก ให้เพลี้ยไฟตกลงบนกระดาษขาวที่รองรับ และใช้พู่กันเขี่ยเพลี้ยไฟแต่ละตัวลงในขวดที่บรรจุน้ำยา AGA (Alcohol 60%: Glycerine: Acetic acid อัตราส่วน 10:1:1) สำหรับศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและ แอลกอฮอล์ 95% สำหรับศึกษาลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I

กรมวิชาการเกษตร

(COI) รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่มีชีวิตด้วย บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟที่เก็บได้ เช่น พืชที่เก็บ ส่วนของพืชที่เก็บ สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันที่เก็บ และชื่อผู้เก็บ ลงในขวดดองเพลี้ยไฟ นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ และนำตัวเต็มวัยไปทำสไลด์ถาวร

วิธีการทำสไลด์ถาวรของเพลี้ยไฟ มีขั้นตอนดังนี้

- ย้ายตัวอย่างเพลี้ยไฟจากขวดลงเก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 60 % แช่ทิ้งไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง
- ย้ายลงในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) 5% เพื่อทำให้สีของเพลี้ยไฟจางลง เวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างเพลี้ยไฟ เจาะส่วนท้องของเพลี้ยไฟบริเวณต้นขาของขาหลังด้วยเข็มแหลมขนาดเล็ก เพื่อให้ของเหลวภายในออกจากตัวเพลี้ยไฟ
- ย้ายเพลี้ยไฟที่เจาะแล้วลงในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 50 % ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที
- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 60 % ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 70 % ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 80 % ทิ้งไว้ 20 นาที
- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95 % ทิ้งไว้ 10 นาที
- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 100 % ทิ้งไว้ 5 นาที ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง
- ย้ายลงในโคลฟออย (clove oil) เพื่อให้ตัวอย่างของเพลี้ยไฟใส แช่ทิ้งไว้ 20 – 30 นาที
- หยดแคนาดาบัลซัม (Canada balsam) ซึ่งเป็นน้ำยาเมาท์สไลด์ (Mounting media) เพียงเล็กน้อยลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ ป้ายเพลี้ยไฟลงในหยดแคนาดาบัลซัมลงบนกึ่งกลางของแผ่นสไลด์แก้ว ค่อยๆคว่ำแผ่นสไลด์ช้าๆ จนกระทั่งจรดแผ่นแก้วปิดสไลด์ รีบพลิกแผ่นสไลด์แก้วให้ด้านแผ่นแก้วปิดสไลด์กลับขึ้นด้านบน นำไปอบให้แห้ง วาดภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของแมลงที่ได้ศึกษา

การศึกษาลำดับพันธุกรรม

นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่ได้จำแนกชนิดเบื้องต้นภายใต้ stereo microscope (ตัวอย่างกลุ่มเดียวกับตัวอย่างที่ใช้ทำสไลด์ถาวร) ที่เก็บรวมรวมได้จากแต่ละพื้นที่ไปศึกษาลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

วิธีการหาลำดับเบส COI ปรับปรุงจากวิธีการศึกษายีน COI ของ Karimi *et al.* (2010)

<u>ขั้นตอนการสกัด ดีเอ็นเอ</u>

- บดตัวอย่างเพลี้ยไฟ 1 ตัวอย่างใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ด้วย sterilized polypropylene pestle โดยดำเนินการตามกรรมวิธีของชุดสกัด DNeasy blood and tissue qiagen kit
- นำสารละลายที่ได้ incubated ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นแรงเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 14,000 รอบ/นาที เวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- ดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ 2 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็น DNA Template ในขั้นตอน PCR (polymerase chain reaction)

<u>การศึกษายีน COI โดยเทคนิค PCR</u>

กรมวิชาการเกษตร

- ศึกษายีน COI (cytochrome oxidase subunit I) ซึ่งมีขนาด 642 bp และเป็น Conserved region ของแมลงทุกชนิด (บาร์โค้ด) โดยใช้ universally conserved mtDNA COI primers, LC01490 และ HC02198 (Folmer *et al*., 1994)
- นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 3 ทำปฏิกิริยากับ 10 mM dNTPs, 5 U/µl Amplitaq, 25 mM MgCl2 , 10X PCR buffer, 20 mM sense and antisense primer ขั้นตอนและอุณหภูมิของขั้นตอนการทำ PCR (Biomethra thermocycler) คือ

Initial denaturation	ที่ 94 °C	3 นาที	
Denaturation	ที่ 94 °C	1 นาที	35 cycles
Annealing	ที่ 52 °C	30 วินาที	
Extension	ที่ 72 °C	90 วินาที	
Final extension	ที่ 72 °C	30 นาที	

- หลังจากนั้นนำไป purified โดยดำเนินตามกรรมวิธีของชุดสกัด Bioneer's PCR purification kit

<u>การหาและวิเคราห์ลำดับเบสของ ยีน COI</u>

- ดำเนินการส่งผลผลิตดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้) และนำผลของลำดับเบสที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม BioEdit 7.0.5.2 (Hall, 1999), nBLAST program, MEGA4 (Kimura, 1980) และ neighbor-joining tree (Saitou and Nei, 1987) เพื่อหาความจำเพาะเจาะจงของเพลี้ยไฟภายในแหล่งเดียวกันและระหว่างแหล่งที่เก็บตัวอย่าง รวมถึงเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank และศึกษาความใกล้เคียงกันของเพลี้ยไฟแต่ละชนิด

-การบันทึกข้อมูล

พืชอาศัย สถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง

- เวลาและสถานที่ เดือน ตุลาคม 2559 ถึง เดือน กันยายน 2561

1. แปลงปลูกกล้วยไม้ในภาคกลางของประเทศไทย
2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง ห้องปฏิบัติการกลาง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแปลงปลูกกล้วยไม้ในจังหวัดนนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สมุทรสาคร กาญจนบุรี ราชบุรี และสุพรรณบุรี และนำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อตรวจจำแนกชนิด โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยซึ่งปรับปรุงมาจาก (Palmer *et al*., 1989) และ (ศิริณี, 2544) ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae ได้ 2 ชนิด ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae ได้แก่ เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* (Karny) 288 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟดอกไม้ *Frankliniella schultzei* (Trybom) 2 ตัวอย่าง โดยมีแนวทางการวินิจฉัยชนิดและลักษณะทางอนุกรมวิธานดังนี้

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

แนวทางการวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* และ *Frankliniella*

- Pronotum without a pair of long anteromarginal setae, abdominal sterna without discal setae. Forewing first vein setal row with long gap medially and 2 or more setae nearer apex, rarely micropterous. Metanotum with paired campaniform sensilla. Tergites V–VIII with paired ctenidia laterally, on VIII posteromesad to spiracles; posteromarginal comb complete metanotal sculpture longitudinal striate; body colour uniformly yellow..... .....***Thrips palmi*** **(Karny)**

– Pronotum with a pair of long anteromarginal setae and an additional pair of small setae between the median posteromarginal setae. Forewings clear; ocellar setae III close together within ocellar triangle but sometimes near anterior margin of posterior ocelli. Metanotum without paired campaniform sensilla. Abdominal tergites VI–VIII with paired ctenidia, on VIII anterolateral to spiracle; posteromarginal comb weakly developed; body colour brown, yellow or bicoloured. .... ***Frankliniella schultzei*** **(Trybom)**

เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* (Karny, 1925)

Thrips palmi Karny, 1925: 10

ลำตัว (Body) ขนาดเล็ก ลำตัวสีเหลืองอ่อน (Figure 3.2.1-A, 3.2.1-B) เพศผู้ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.00 – 1.05 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.15 – 1.25 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียมีปีกขนาดใหญ่

หัว (Head) ส่วนหัวกว้างกว่าความยาว หนวดสีน้ำตาลอ่อน 8 ปล้อง ส่วนปลายของปล้องหนวดปล้องที่ 3 และ 4 เรียวและมีสีน้ำตาลอ่อนที่บริเวณโคนปล้องหนวดมีสีเทาเข้มที่ส่วนปลาย และเป็นที่ตั้งของอวัยวะรับความรู้สึกรูปส้อม ปล้องหนวดปล้องที่ 6 ถึง 8 มีสีน้ำตาล ปล้องหนวดปล้องที่ 8 ยาวกว่าปล้องที่ 7 มีขนบริเวณตาเดี่ยว 3 คู่ ขนตาเดี่ยวคู่ที่ 3 อยู่ด้านนอกของตาเดี่ยวที่เรียงตัวเป็นรูปสามเหลี่ยม (Figure 3.2.1-C) ขนตาเดี่ยวบริเวณท้ายส่วนหัวยาวกว่าขนตาเดี่ยวคู่ที่ 3

อก (Thorax) ส่วนของอกปล้องแรกมีขนาดใหญ่ มีขนยาวตั้งอยู่บริเวณมุมขอบล่างของอกปล้องแรก 2 คู่ และมีขนบริเวณส่วนท้ายอกปล้องแรก 3 คู่ (Figure 3.2.1-D) สันหลังอกปล้องสุดท้ายมีลวดลายเป็นเส้นตรงไม่ต่อเนื่อง แต่มุ่งสู่ส่วนท้ายของสันหลังอกปล้องสุดท้าย (Figure 3.2.1-D) เส้นขนยาว 2 เส้นปรากฏด้านล่างของขอบบนสันหลังอกปล้องสุดท้ายและมีรูรับความรู้สึก (campaniform sensilla) (Figure 3.2.1-E) ปีกคู่หน้าขาว โปร่งแสง และมีการเรียงตัวของเส้นปีกบริเวณโคนปีก 3 เส้นและเส้นปีกรองที่ส่วนปลายประมาณ 15 เส้น ขามีสีเดียวกับลำตัว ส่วนของปลายขามี 2 ปล้อง

ท้อง (Abdomen) ปล้องท้องปล้องที่ 2 มีขนด้านข้าง 2 คู่ ส่วนท้องด้านบนของลำตัวปล้องที่ 6 ถึง 8 มีกลุ่มขนเรียงตัวกันเป็นเส้น ปล้องละ 1 คู่ ตำแหน่งการเรียงตัวอยู่ด้านล่างรูหายใจที่บริเวณขอบด้านนอกของส่วน

กรมวิชาการเกษตร

ท้อง เส้นขนรูปหวีที่ด้านล่างของขอบท้องปล้องที่ 8 พัฒนาสมบูรณ์เป็นเส้นขนยาว (Figure 1-F) ส่วนท้องด้านล่างของลำตัวปล้องที่ 3 ถึง 7 ปรากฏเส้นขนคู่ที่ 3 อยู่ตรงกลางส่วนท้อง

เพศผู้ มีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย เส้นขนรูปหวีที่ปล้องท้องปล้องที่ 8 สมบูรณ์ ปล้องท้องด้านล่างปล้องที่ 3-7 มีต่อมในส่วนช่องท้องรูปร่างเรียวยาวเรียงตัวขวางกัน

เพลี้ยไฟฝ้ายมีลักษณะคล้ายคลึงกลับเพลี้ยไฟมะเขือ (*Thrips flavus* Schrank) โดยมีลักษณะที่แตกต่างคือ ขนตาเดี่ยวคู่ที่สามของเพลี้ยไฟฝ้ายจะอยู่ใกล้กับฐานของขนตาเดี่ยวคู่แรกมากกว่าเพลี้ยไฟมะเขือ

ความสำคัญ เพลี้ยไฟฝ้าย (cotton thrips) เป็นเพลี้ยไฟขนาดเล็ก-กลาง สีเหลือง เพลี้ยไฟชนิดนี้เข้าทำลายพืชเกือบทุกชนิดที่ปลูกและทุกพื้นที่การเกษตรทั่วประเทศไทย นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดปัญหาอย่างมากต่อผลิตผลเกษตรส่งออก โดยเฉพาะกล้วยไม้ อีกทั้งยังพบว่าเป็นพาหะนำโรคมาสู่พืชตระกูลแตง ทั้งนี้สามารถพบได้ในมีการระบาดของเพลี้ยไฟดอกไม้ [*Frankliniella schultzei* (Trybom)] และ เพลี้ยไฟพริก (*Scirtothrips dorsalis* Hood) (Palmer *et al*., 1989)

พืชอาหาร ถั่วลิสง ถั่วเหลือง มันฝรั่ง ข้าวโพด งา ทานตะวัน ฝ้าย มะขามเทศ ตำลึง บวบ มะระ มะระขี้นก ผักบุ้งจีน พริก กะเพรา กวางตุ้ง ฟักทอง ฟัก มะรุม แตงกวา ถั่วแปปผี ถั่วฝักยาว หอมหัวใหญ่ หน่อไม้ฝรั่ง โหระพา ผักชี กระเจี๊ยบเขียว มะเขือเปราะ มะเขือม่วง มะเขือเทศ สะเดา แตงไทย ลำโพง กล้วยไม้ กุหลาบ จำปา บัว เบญจมาศ ดาวเรือง กระท้อน ฝรั่ง พุทรา มะม่วง มะละกอ ทุเรียน องุ่น ลิ้นจี่ กล้วย ส้มโอ ส้มเขียวหวาน มังคุด แตงโม ท้อ แคนตาลูป มะม่วงหิมพานต์ ยาสูบ หม่อน หญ้าข้าวนก พญายอ วัชพืช

เขตการแพร่กระจาย เพลี้ยไฟฝ้ายมีต้นกำเนิดแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และติดไปกับผลผลิตทางการเกษตรที่ส่งไปยังประเทศเขตร้อนทั่วโลก

เพลี้ยไฟดอกไม้ *Frankliniella schultzei* (Trybom, 1910)

Physopus schultzei Trybom 1910: 151., *Euthrips gossypii* Shiraki 1912: 56., *Frankliniella schultzei* Karny 1912: 334., *Frankliniella sulphurea* Schmutz 1913: 1018-1019.

ลำตัว ขนาดเล็ก มีทั้งสีเหลืองอ่อนและสีน้ำตาลเข้ม (Figure 3.2.2-A, 3.2.2-B) เพศผู้ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.05 – 1.15 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.15 – 1.45 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียมีปีกขนาดใหญ่

หัว ส่วนหัวกว้างกว่าความยาว มีหนวด 8 ปล้อง ปล้องหนวดปล้องที่ 3 และ 4 มีสีเทาอ่อนที่บริเวณตอนต้น มีสีเทาเข้มที่ตอนปลาย และเป็นที่ตั้งของอวัยวะรับความรู้สึกรูปส้อม ปล้องหนวดปล้องที่ 6 ถึง 8 มีสีน้ำตาล ปล้องหนวดปล้องที่ 8 ยาวกว่าปล้องที่ 7 มีขนบริเวณตาเดี่ยว 3 คู่ ขนตาเดี่ยวคู่ที่ 3 อยู่ด้านในของตาเดี่ยวที่เรียงตัวเป็นรูปสามเหลี่ยม (Figure 3.2.2-C) และยาวเท่ากับระยะห่างของตาเดี่ยวทั้ง 3 ขนตาเดี่ยวด้านข้างอกปล้องแรกยาวเท่ากับความห่างของตาเดี่ยวที่ในส่วนฐาน

อก ส่วนของอกปล้องแรกมีขนาดใหญ่ มีขนยาวตั้งอยู่บริเวณขอบบนและล่างของอกปล้องแรกรวม 5 คู่ ขนที่บริเวณมุมขอบบนยาวกว่าขนที่อยู่ถัดเข้ามาตรงกลาง ปรากฏขนสั้น 1 คู่ที่บริเวณส่วนกลางของ ขอบอก (Figure 3.2.2-D) สันหลังอกปล้องสุดท้ายมีขนยาวสองเส้นอยู่ที่ขอบด้านบน ไม่มีรูรับความรู้สึก (Figure 3.2.2-F) ปีกคู่หน้าขาว โปร่งแสง และมีการเรียงตัวของเส้นขนกันอย่างสมบูรณ์ ขามีสีเดียวกับลำตัว ส่วนของปลายขามี 2 ปล้อง

กรมวิชาการเกษตร

ท้อง ส่วนท้องด้านบนของลำตัวปล้องที่ 6 ถึง 8 มีกลุ่มขนเรียงตัวกันเป็นเส้น ปล้องละ 1 คู่ ตำแหน่งการเรียงตัวอยู่บนรูหายใจที่บริเวณขอบด้านนอกของส่วนท้อง ลักษณะพิเศษรูปฟันที่ด้านล่างของขอบท้องปล้องที่ 8 ไม่พัฒนามาก (Figure 3.2.2-G) ส่วนท้องปล้องที่ 3 มีขนที่ปลายของส่วนท้อง และส่วนท้องด้านล่างของลำตัวปล้องที่ 3 ถึง 7 ไม่มีเส้นขนที่ตั้งอยู่ตรงการส่วนท้อง และมีเส้นขนละเอียด (microtrichia) อยู่ที่บริเวณด้านล่างของปล้องท้องเล็กน้อย

ความสำคัญ เพลี้ยไฟดอกไม้ (common blossom thrips) เข้าทำลายพืชได้หลายชนิด อาทิ ข้าวฟ่าง ถั่วลิสง ฝ้าย พริก หอมใหญ่ และไม้ดอกหลายชนิด โดยจะทำลายใบอ่อนและดอก ตั้งแต่ระยะยังเป็นตุ่มตา นอกจากนี้ยังเป็นพาหะนำโรคมาสู่พืชตระกูลถั่ว ทั้งนี้สามารถพบได้ในมีการระบาดของเพลี้ยไฟฝ้าย (*Thrips palmi* Karny) และ เพลี้ยไฟพริก (*Scirtothrips dorsalis* Hood) (Palmer *et al*., 1989)

พืชอาหาร ทานตะวัน พู่ม่วง พุดแอฟริกัน มะลิ บัว ดาวเรือง กล้วยไม้ กุหลาบ โป๊ยเซียน จำปา งวงช้าง ถั่วลิสง หน่อไม้ฝรั่ง ข้าวโพด พริก หอมหัวใหญ่ มะเขือยาว แตงไทย ฟักทอง กะเพรา มะเขือเทศ แฟง มะระ แตงกวา กวางตุ้ง กระเจี๊ยบ งา แตงเทศ ผักชีลาว โหระพา มะม่วง องุ่น แตงโม มะม่วงหิมพานต์ มังคุด

เขตการแพร่กระจาย ทวีปเอเชีย บังกลาเทศ อินเดีย อินโดนีเซีย อิสราเอล อิหร่าน อิรัก มาเลเซีย ปากีสถาน ฟิลิปปินส์ ศรีลังกา ไต้หวัน ไทย เยเมน ทวีปแอฟริกา แคมารูน อียิปต์ เอทิโอเปีย แกมเบีย กานา เคนยา มาดากัสกา โมรอคโค นามิเบีย ไนจีเรีย ทวีปยุโรป อิตาลี เนเธอแลนด์ ออสเตรีย ทวีปอเมริกาใต้ บราซิล อาร์เจนติน่า ชิลี

จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* และเพลี้ยไฟดอกไม้ *Franklinella schultzei* โดยการศึกษาความสัมพันธ์กับประวัติการวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ (Molecular phylogenetics of Thysanoptera) และใช้โปรแกรม neighbor joining/UPGMA แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (sequence divergence) พบว่า เพลี้ยไฟฝ้าย และเพลี้ยไฟดอกไม้ มีความใกล้ชิดกันที่ 0.07842 และ 0.07568 ตามลำดับ และอยู่ในกลุ่มเดียวกับเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae วงศ์ย่อย Thripinae นอกจากนี้สามารถสรุปได้ว่าชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripidae ที่พบในเขตภาคกลางของประเทศไทยคือ เพลี้ยไฟฝ้าย ซึ่งตัวอย่างเพลี้ยไฟที่เก็บรวมรวมได้จากพื้นที่ดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยา การศึกษานี้ทำให้ทราบถึงชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อยที่เป็นศัตรูสำคัญของกล้วยไม้ในเขตภาคกลางของประเทศไทย และใช้เป็นข้อมูลรองรับการแจ้งเตือนชนิดของเพลี้ยไฟที่พบในกล้วยไม้จากนานาประเทศได้ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาวิธีการจำแนกชนิดเพลี้ยไฟหรือแมลงชนิดอื่นๆ โดยมีข้อได้เปรียบที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างแมลงได้ทุกระยะทั้งระยะไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็วโดยไม่ต้องอาศัยเวลาในการเลี้ยงตัวอย่างแมลงนั้นๆ ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ตัวเต็มวัยในการจำแนกชนิด อีกทั้งยังสามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษาให้กับเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงทั้งในระยะไข่และตัวอ่อนได้อย่างทันต่อเหตุการณ์ ช่วยลดระยะเวลาการกักเก็บสินค้าเพื่อตรวจสอบ และสามารถป้องกันชนิดแมลงศัตรูพืชสำคัญที่ติดมากับสินค้านำเข้าได้ทันต่อเหตุการณ์

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

กรมวิชาการเกษตร

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในกล้วยไม้ในเขตภาคกลางของประเทศไทย โดยการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกกล้วยไม้ในเขตภาคกลางของประเทศไทย เช่น นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สุพรรณบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ เป็นต้น ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2561 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน เพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถเก็บรวบรวมเพลี้ยไฟได้ 290 ตัวอย่าง และสามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae ได้ 2 ชนิด ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae ได้แก่ เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* (Karny) 288 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟดอกไม้ *Frankliniella schultzei* (Trybom) 2 ตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงชนิด ลักษณะการทำลาย พืชอาศัย เขตการแพร่กระจายโดยเพลี้ยไฟจะเข้าทำลายทั้งยอดอ่อน ดอก และใบพืช รวมถึงได้วิธีการ เทคนิคที่เหมาะสม และเรียนรู้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับการหาลำดับพันธุกรรมของยีน COI (Cytochrome Oxidaes subunit I) ของเพลี้ยไฟฝ้าย และเพลี้ยไฟดอกไม้ มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ 0.07842 และ 0.07568 ตามลำดับ นอกจากนี้สามารถสรุปได้ว่าชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripidae ที่พบในเขตภาคกลางของประเทศไทยคือ เพลี้ยไฟฝ้าย ซึ่งตัวอย่างเพลี้ยไฟที่เก็บรวมรวมได้จากพื้นที่ดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยา จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดและถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยไฟทั้ง 2 สกุลนี้ นำตัวอย่างเพลี้ยไฟจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลงพร้อมนำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดทำรายชื่อชนิดแมลงศัตรูพืชรองรับปัญหาด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร นำตัวอย่างเพลี้ยไฟจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลงพร้อมนำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อใช้ตรวจสอบความถูกต้อง นำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาด้านอื่นๆ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูเพื่อประกอบในงานสำคัญด้านการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร ตลอดจนใช้ในด้านการกักกันพืช ซึ่งเป็นไปตามมาตรการด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measure: SPS Agreement) ขององค์การการค้าโลก (WTO) ที่ประเทศสมาชิกรวมทั้งประเทศไทยจะต้องใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชเพื่อปกป้องสุขภาพมนุษย์ สัตว์ พืชและสิ่งแวดล้อม (อรุณี, 2543) ทั้งนี้สามารถใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ได้เรียนรู้จากการศึกษาทดลองจำแนกชนิดแมลงต่างๆ ได้ และสามารถถ่ายทอดเทคนิคให้กับบุคลากรที่เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติงานได้ในอนาคต

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae ที่พบในกล้วยไม้ในเขตภาคกลางของประเทศไทย จัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการหาวิธีการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟที่ถูกต้องและเหมาะสม และใช้เป็นข้อมูลสำหรับการอ้างอิงถึงชนิดเพลี้ยไฟศัตรูสำคัญของพืชนำเข้าส่งออกที่สำคัญ

2. ถ่ายทอดแนวทางการวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟฝ้าย เพลี้ยไฟดอกไม้ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางอณูชีววิทยา จากการหาลำดับพันธุกรรมของยีน COI ของเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* และ *Frankliniella*

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

โดยการจัดทำเอกสารชุดวิชาอนุกรมวิธานแมลง เพื่อใช้ในการฝึกอบรมหลักสูตรแมลงปากดูด “ศัตรูสำคัญของพืชนำเข้า-ส่งออก” และ หลักสูตรแมลง-สัตว์ศัตรูพืช และการป้องกันกำจัด ที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชจัดขึ้นทุกปี เพื่อให้ความรู้แก่นักวิชาการจากหน่วยงานต่าง ๆ ทั้งภาครัฐและเอกชน ตลอดจนเกษตรกร และนิสิต นักศึกษาที่สนใจ

3. ใช้ข้อมูลชนิดของเพลี้ยไฟฝ้าย เพลี้ยไฟดอกไม้ที่เป็นปัจจุบันเป็นข้อมูลสำหรับนักวิชาการ บริษัทเอกชนและผู้ประกอบการรายอื่นๆ

4. นำข้อมูลเพลี้ยไฟฝ้าย เพลี้ยไฟดอกไม้ที่ได้จากการศึกษา จัดทำฐานข้อมูลแมลงของพิพิธภัณฑ์แมลงของกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ซึ่งเป็นแหล่งข้อมูลทางด้านกีฏวิทยาสำคัญของประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

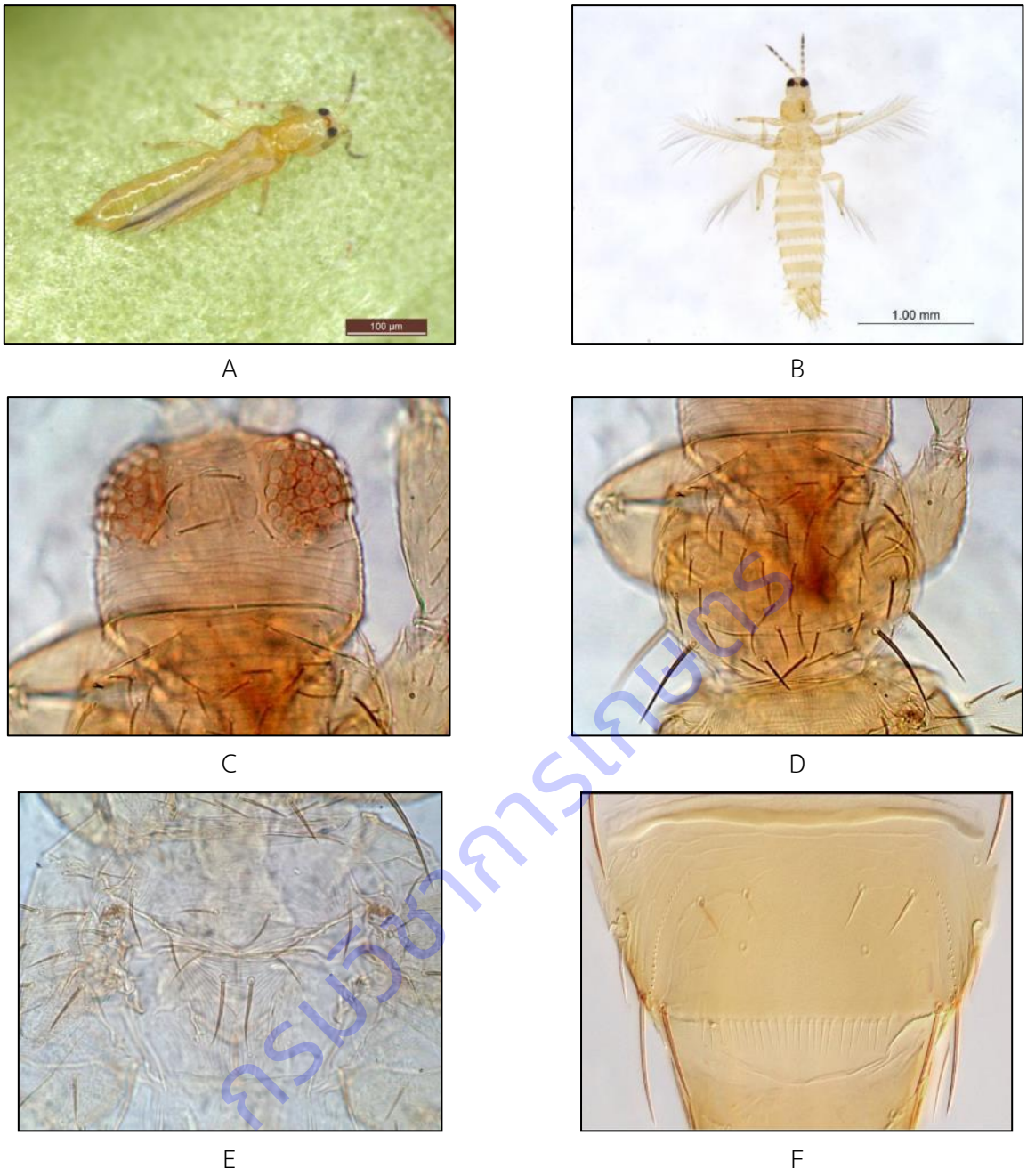


Figure 3.2.1 Morphology of cotton thrips; *Thrips palmi* (Karny)

A. Adult B. Slide permanent

C. Head D. Pronotum

F. Metanotum G. Abdominal tergite VIII

กรมวิชาการเกษตร

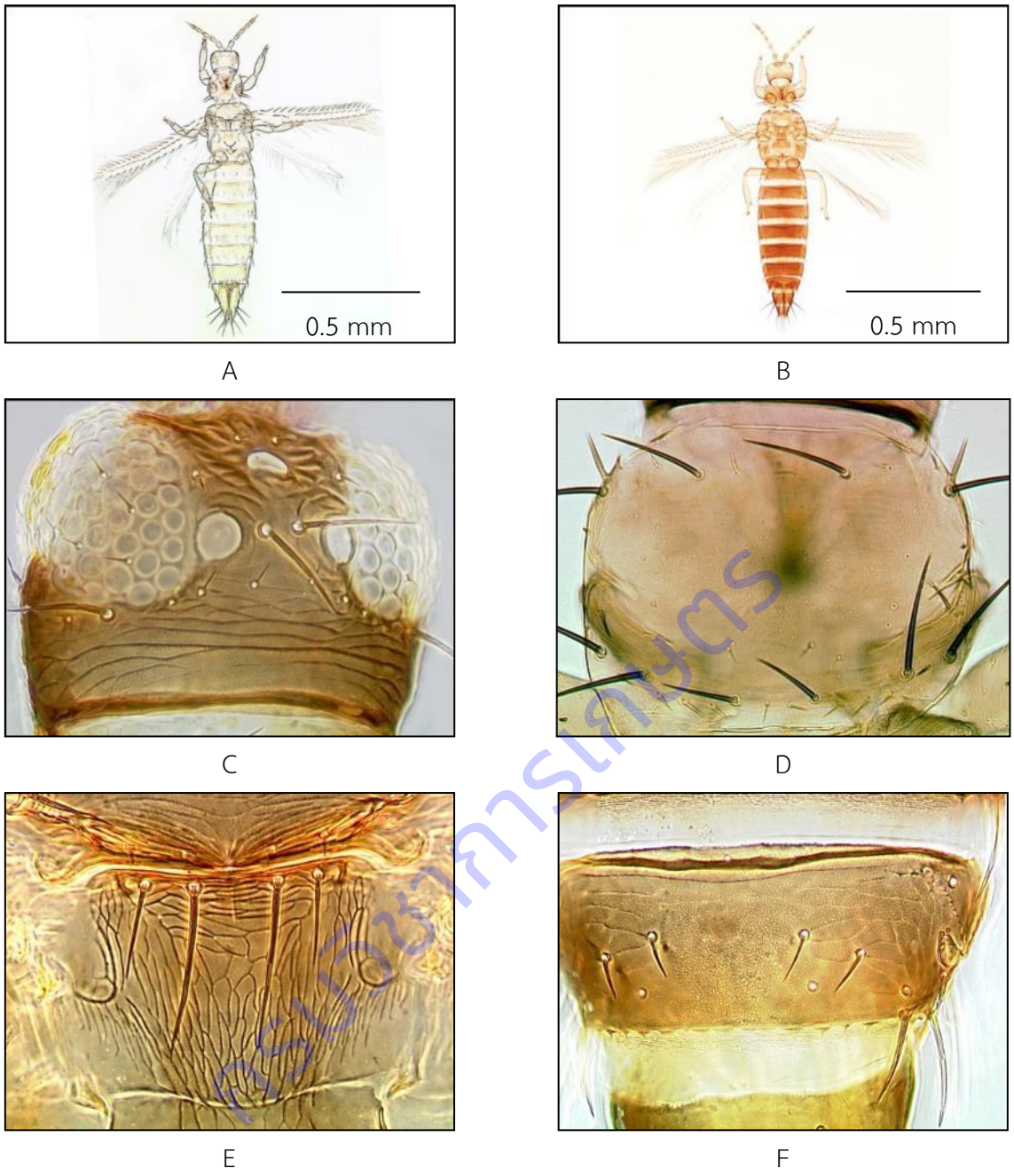


Figure 3.2.2 Morphology of common blossom thrips; *Frankliniella schultzei* (Trybom)

A. Slide permanent B. Slide permanent

C. Head D. Pronotum

F. Metanotum G. Abdominal tergite VIII

ตัวอย่างการใช้งาน

Primer UEA 7

TACAGTTGGAATAGACGTTGATACCCCACGATTAAATAACATAAGATTTTGACTTGAACCACCCTCTTTA
ACTCTTTTAATTATAGGTTTATATAAAGAAGGAGCGGGAACAGGATGAACAGTCTGTCCACCTTTATCAACAT
TTTACCATGCTGGTATTTCAGTAGACTTAACAATGTTTTCTCTTCATTTAGCTGGAGTCTCCTCAATTTTAGG
AGCATTAAATTTCATTACTACAATTTTAAATTTAAAAAATTTTAATTTATCAAGAGAAAAATTAAGATTATTTG
TGTGGTCAGTAGTATTAACAGCAATTCTTTTACTTTTATCTTTACCTGTACTAGCAGGAGCCATTACAATACT
TTTAACAGACCGTAATTTAAGGACGTCATTCTTTGACCCAAGAGGGCCTGGAGATCCTGTACTTTATCAACAT
CTATTCTGATTCTTTGGACATC**TAATATGGCAGATTAGTGTGCATTGGA**

Primer UEA 10

Figure 3.2.3 Sequences of Cytochrome oxidase subunit I (COI) of cotton thrips; *Thrips palm*i (Karny), DNA shaded showed primer UEA 7 and UEA 10 respectively.

Primer UEA 7

TACAGTTGGAATAGACGTTGATACGACTAAACAATATAAGATTTTGACTTCTTCCACCTTCAATAACTT
TACTTATTATAGGTTTAAGAAAAGAAGGAGCAGGAACAGGATGAACAGTTTATCCACGTTTATCAACATTT
TATCATTCAGGTATATCAGTAGATTTAACTATATTTTCCCTTCATTTAGCAGGTATTTCTTCAATTTTAGGA
GCACTAAATTTTATTACTACCATCTTAAATTTAAAGTTAAAAAATTTATCTTACGATAAAATCACTTTATTT
ATTTGATCAGTTATTTTAACTGCTATTTTACTACTTTTATCTTTACCAGTCTTAGCTGGTGCTATTACTATA
TTATTAACTGATCGAAATTTAAACACTTCATTTTTTGACCCTAGAGGGGGAGGTGATCCAGTTCTTTATCA
ACACCTATTTTGATTTTATGGTCATCCAGAAGTTTACATTTTAATTTTACCAGCATTTGGACTAATTTCTCA
TATTATTACACAAGAAACAAATAAAAAATCTACATTTGGTTTATTAGGAATAATTTATGCAATAATAGCTAT
TGGATTTTT**TAATATGGCAGATTAGTGTGCATTGGA**

Primer UEA 10

Figure 3.2.4 Sequences of Cytochrome oxidase subunit I (COI) of Common blossom thrips; *Frankliniella schultzei* (Trybom), DNA shaded showed primer UEA 7 and UEA 10 respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

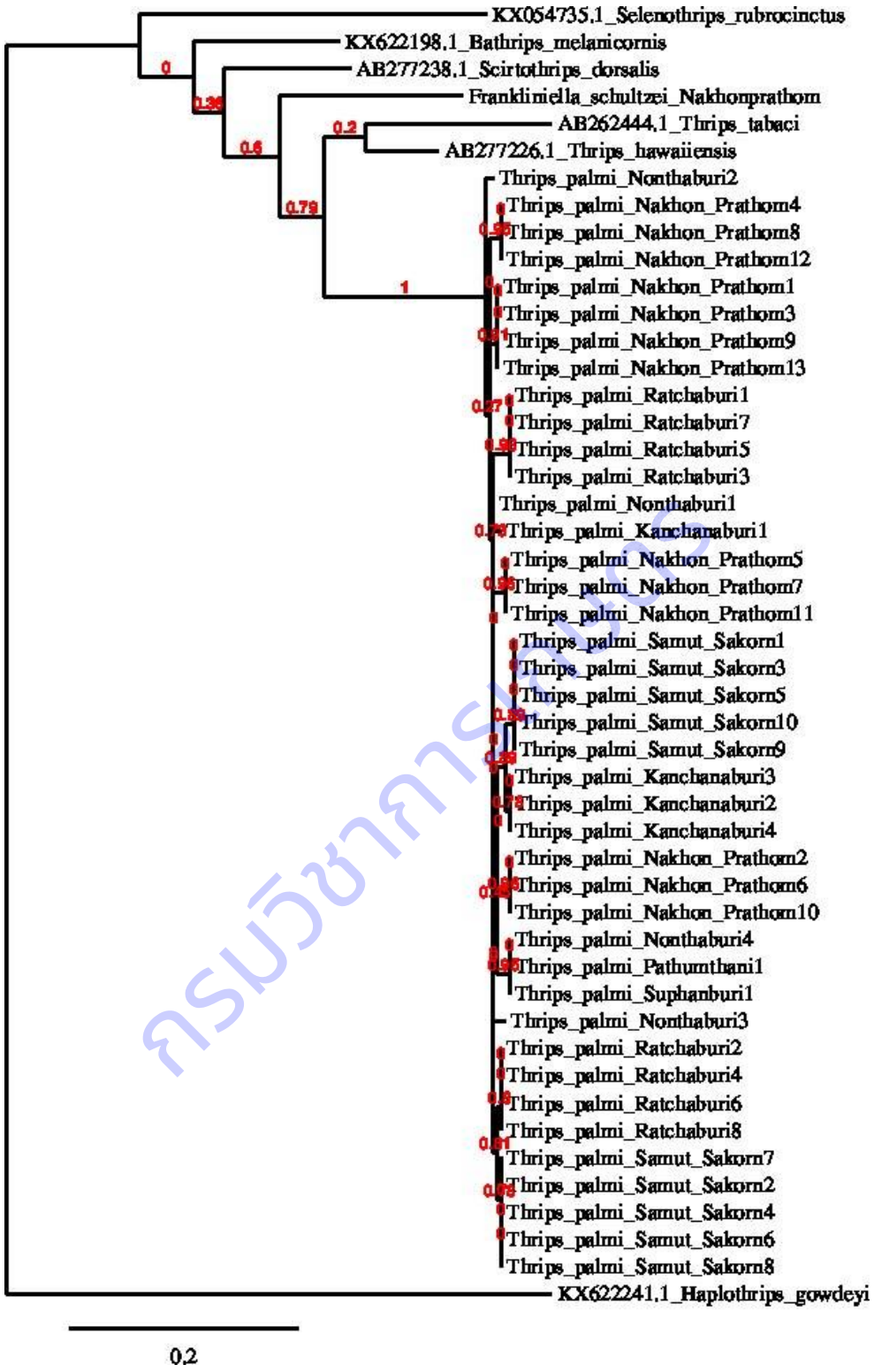


Figure 3.2.5 Phylogenetic trees showing the relationship among six thrips populations comparing with *Thrips palmi* and *Frankliniella schultzei* which collected from orchids in the Middle part of Thail

Table 3.2.1 Location and number of thrips collected from orchids fields during October 2016 – September 2018

Province	District	Sub-district	Number of thrips sample	GPS	Accession No.
Nonthaburi	Sai noi	Sai yai	6	N 14 ° 72’ 76” E 100 ° 301’ 414”	Nonthaburi1
	Sai noi	Klong yuang	5	N 14 ° 013’ 780” E 100 ° 300’ 495”	Nonthaburi2
	Sai noi	Khun sri	5	N 18 ° 59’ 52” E 100 ° 17’ 30”	Nonthaburi3
	Sai noi	Bang khun sri	7	N 15 ° 0’ 14” E 58 ° 16’ 100”	Nonthaburi4
Nakhon Prathom	Bang len	Khun sri	7	N 14 ° 01’ 504” E 100 ° 16’ 123”	Nakhonprathom1
	Bang len	Klong gra thum	6	N 14 ° 002’ 940” E 100 ° 213’ 599”	Nakhonprathom2
	Bang len	Don thum	6	N 14 ° 013’ 160” E 100 ° 199’ 529”	Nakhonprathom3
	Bang len	Don thum	7	N 13 ° 59’ 264” E 100 ° 06’ 915”	Nakhonprathom4
	Bang len	Bang len	10	N 14 ° 024’ 377” E 100 ° 141’ 991”	Nakhonprathom5
	Bang len	Lam phaya	7	N 13 ° 57’ 45” E 100 ° 13’ 58”	Nakhonprathom6
	Bang len	Pai hu chang	9	N 14 ° 2’ 40” E 100 ° 4’ 38”	Nakhonprathom7
	Bang len	Bang pla	5	N 13 ° 58’ 50” E 100 ° 9’ 11”	Nakhonprathom8
	Phutamonthon	Klong yong	1	N 13 ° 54’ 21” E 100 ° 16’ 36”	Nakhonprathom9
	Phutamonthon	Klong yong	8	N 13 ° 51’ 06” E 100 ° 18’ 11”	Nakhonprathom10
	Nakhon chaisri	Bang keaw fah	6	N 13 ° 53’ 924” E 100 ° 14’ 997”	Nakhonprathom11
	Don thum	Lam huaey	7	N 13 ° 56’ 635” E 100 ° 01’ 575”	Nakhonprathom12
	Donthum	Lam Lukbua	8	N 14 ° 2’ 11” E 100 ° 5’ 24”	Nakhonprathom13
Samut Sakorn	Ban peaw	Kaset patana	8	N 13 ° 39’ 198” E 100 ° 09’ 051”	SamutSakorn1
	Ban peaw	Kaset patana	6	N 13 ° 39’ 738” E 100 ° 10’ 374”	SamutSakorn2
	Ban peaw	Klong tun	11	N 13 ° 39’ 056” E 100 ° 09’ 397”	SamutSakorn3

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.2.1 Location and number of thrips collected from orchids fields during October 2016 – September 2018 (Cont.)

Province	District	Sub-district	Number of thrips sample	GPS	Accession No.
	Ban peaw	Suan som	10	N 13 ° 38’ 436” E 100 ° 13’ 677”	SamutSakorn4
	Ban peaw	Suan som	8	N 13 ° 36’ 23” E 100 ° 9’ 42”	SamutSakorn5
	Ban peaw	Nong song hong	9	N 13 ° 36’ 149” E 100 ° 03’ 932”	SamutSakorn6
	Ban peaw	Yok ka bat	11	N 13 ° 33’ 14” E 100 ° 04’ 38”	SamutSakorn7
	Kra thum ban	Nong nok kai	12	N 13 ° 40’ 023” E 100 ° 11’ 572”	SamutSakorn8
	Kra thum ban	Nong nok kai	14	N 13 ° 39’ 297” E 100 ° 12’ 572”	SamutSakorn9
	Kra thum ban	Tha mai	12	N 13 ° 40’ 78” E 100 ° 14’ 14”	SamutSakorn10
Pathumthani	Lad lum keaw	Nha mai	7	N 14 ° 02’ 972” E 100 ° 21’ 692”	Pathumthani1
Ratchaburi	Ban pong	Nong or	5	N 13 ° 47’ 23” E 99 ° 53’ 42”	Ratchaburi1
	Bang pear	Pho hak	5	N 13 ° 38’ 8” E 100 ° 3’ 8”	Ratchaburi2
	Bang pear	Wat keaw	6	N 13 ° 38’ 45” E 99 ° 54’ 17”	Ratchaburi3
	Photharam	Kao cha ngum	2	N 13 ° 42’ 21” E 99 ° 39’ 26”	Ratchaburi4
	Photharam	Kao cha ngum	7	N 13 ° 43’ 24” E 99 ° 39’ 26”	Ratchaburi5
	Photharam	Bang singh	4	N 13 ° 37’ 25” E 99 ° 53’ 44”	Ratchaburi6
	Damnern saduak	Bua ngam	7	N 13 ° 35’ 59” E 100 ° 0’ 23”	Ratchaburi7
	Damnern saduak	Prasart Sith	4	N 13 ° 32’ 40” E 100 ° 1’ 46”	Ratchaburi8
Suphanburi	Song phe nong	Thung kok	7	N 14 ° 187’ 144” E 99 ° 976’ 903”	Suphanburi1
Kanchanaburi	Tha maka	Ta klam en	4	N 13 ° 59’ 167” E 99 ° 44’ 258”	Kanchanaburi1
	Tha maka	Ta klam en	4	N 13 ° 50’ 901” E 99 ° 43’ 957”	Kanchanaburi2
	Tha muang	Pung tru	10	N 13 ° 52’ 683” E 99 ° 41’ 549”	Kanchanaburi3
	Tha muang	Muang chum	7	N 13 ° 56’ 712” E 99 ° 38’ 301”	Kanchanaburi4

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3.3 การสำรวจโรคและจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา Cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช
Disease survey and DNA barcoding of plant pathogenic Cercosporoid fungi

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวชนินทร	ดวงสอาด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นางสาวพรพิมล	อธิปัญญาคม	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวสุณีรัตน์	สีมะเดื่อ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวมะโนรัตน์	สุดสงวน	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวอมรรัชฎ์	คิดใจเดียว	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวสุทธิณี	ลิขิตตระกูลรุ่ง	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

บทคัดย่อ

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

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. *Unguiculate* and *Zinnia* sp., respectively.

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

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

รา cercosporoid เป็นรากลุ่มใหญ่ในกลุ่ม Hyphomycetes (Crous and Braun, 2003) มีการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามวิธีที่มีการปฏิบัติกันมา โดยแต่เดิมรากลุ่ม cercosporoid ประกอบไปด้วยสองระยะของวงจรชีวิต คือระยะ telemorph และ anamorph ซึ่งระยะ teleomorph ของรา cercosporid มักอยู่ใน genus *Mycosphaerella* Johanson และราชนิดนี้ยังเป็นระยะ telemorph ของราอื่นๆอีกหลายสกุลของ Coelpmycetes และ Hyphomycetes (Crous *et al.*, 2007) ความซ้ำซ้อนและซับซ้อนของทั้งสองระยะการเจริญนี้ ทำให้เกิดความยุ่งยากและสับสนในการจัดจำแนกชนิดของรากลุ่ม 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 genusอื่นๆ 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 Mycovellosiella Passalora Phaeoisariopsis Phaeoramularia Sirosporium Cercoseptoria Mycocentrospora Pseudocercospora* และ *Stigmina* (Deighton, 1967, 1974, 1976, 1979) นอกจากลักษณะของ conidia แล้ว ยังคงมีลักษณะอื่นๆที่ใช้ในการจำแนกรา *Cercospora* ออกจากรากลุ่มอื่นที่มีความใกล้เคียงกัน เช่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Braun (1995) จำแนกรา *Cercospora* ออกจากเชื้อรา *Passalora* และ *Phaeoisariopsis* โดยอาศัยลักษณะของ stroma

ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ค่อนข้างใกล้เคียงกันทำให้การจำแนกชนิดค่อนข้างมีความสับสน ทำให้พบว่ามีมักมีการจัดกลุ่มของรา *Cercospora* ขึ้นมาใหม่ หลังจากการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ซับซ้อนมากขึ้น เช่น Crous และ Braun (2003) จัดกลุ่มของรา cercosporoid ใหม่หลังจากที่ศึกษาตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราใน สกุล *Cercospora* และ *Passalora* กว่า 3,500 ตัวอย่าง โดยอาศัยลักษณะของ conidial scar hila และลักษณะความเข้มของ conidia และ conidiophore มีราหลายชนิดที่ถูกจำแนกให้เป็น *Pseudocercospora* แม้จะมีลักษณะของ scar ที่หนา ทั้งนี้เพราะลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ ค่อนข้างที่จะเข้าลักษณะของรา *Pseudocercospora* มากกว่าที่จะเป็นรา *Cercospora* เช่น *P. mississipiensis P. madhauliensis* (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 แต่ลักษณะความแตกต่างดังกล่าวไม่เพียงพอในการจำแนกราไอโซเลทนั้นๆ 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 ในดรรชนีโรคพืชของประเทศไทย รายงานพบเชื้อรา *Cercospora* จำนวน 47 สปีชีส์ และไม่สามารถวินิจฉัยในระดับสปีชีส์ได้อีก 13 ขนิด และอีก 49 สปีชีส์ รายงานโดย Petcharat และ Kanjanamaneesathian (1989) Phengsintham *et al*. (2012) รายงานพบการเข้าทำลายของรา cercosporoid ในเขตภาคเหนือของประเทศไทย จำนวน 14 ชนิด ได้แก่ *Cercospora Passalora Pseodocercospora* และ *Zasmidium* โดยเป็นการพบเป็นครั้งแรกจำนวน 2 ชนิดในประเทศไทยคือ *Cercospora verniciferae* และ *Zasmidium cassiicola*

ปัจจุบันได้มีการนำข้อมูลของรหัสพันธุกรรมหรือ DNA มาใช้ประกอบการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ โดยมีการถอดรหัสพันธุกรรมจากแต่ละตำแหน่งบน DNA ซึ่งจะมีความจำเพาะต่อชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยแต่ละตำแหน่งก็จะมีความแปรผันในระดับที่แตกต่างกัน โดยรหัสพันธุกรรมที่ถอดรหัสได้จากแต่ละตำแหน่งสามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ (DNA barcoding) (Cräutlein *et al*., 2011) โดยการนำไปเปรียบเทียบกับรหัสพันธุกรรมอ้างอิง (reference libraries) ที่ทราบชนิดแล้ว ตำแหน่งของรหัสพันธุกรรม (locus) ของราที่นิยมนำมาถอดรหัส โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการจำแนก ศึกษาวิวัฒนาการ และประชากรของสิ่งมีชีวิตนั้นมีหลายตำแหน่ง หรือแม้กระทั่งมีการถอดรหัสทั้งจีโนมซึ่งจะบรรจุข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ (Next Generation Sequencing) เช่น Internal Transcribed Spacer (ITS) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่นิยมใช้ (Seifert, 2009) ซึ่งตำแหน่งนี้มีสามารถบอกความแตกต่างได้ในระดับสปีชีส์ (White *et al*., 1990)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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 ถึงแม้พบว่ามีบางรายงานได้มีการนำข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลมาประกอบการศึกษาของรากลุ่ม cercosporoid เช่น การศึกษาโดย To-Anun *et al*. (2011) Nakashia *et al*. (2007) และ Phensintham *et al*. (2013) แต่ข้อมูลที่มีก็ยังไม่มีความหลายหลาก อีกทั้งรากลุ่ม cercosporoid สามารถเข้าทำลายพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะสินค้าทางเกษตรเกษตรที่มีการส่งออก เช่น พืชผัก ไม้ดอก ดังนั้น ดังนั้นหากข้อมูลของบัญชีรายชื่อศัตรูพืชมีความครอบคลุมและมีรายละเอียดข้อมูลในเชิงลึกมาสนับสนุน จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำเข้าและส่งออกสินค้า

เนื่องจากปัจจุบันความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุล เข้ามามีบทบาทในงานด้านอนุกรมวิธานมากขึ้น โดยมีการนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาช่วยเปรียบเทียบในบ่งการชี้หรือจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ (genealogical concordance) ควบคู่กับการวินิจฉัยด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางชีวโมเลกุลที่ได้นั้น สามารถใช้เป็นข้อมูลเฉพาะเพื่อการวินิจฉัยราชนิดนั้นๆ (DNA barcoding) ทำให้ทำให้สามารถชี้ชัดในการจำแนก ในกรณีที่การวินิจฉัยเชื้อสาเหตุไม่สามารถชี้ขาดได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาและจำแนกชนิดของรา cercosporoid สาเหตุโรคพืชในระดับสปีชีส์ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลด้านชีวโมเลกุล และ ได้ DNA barcode ของรา cercosporoid เพื่อใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้า

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

6. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทับตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง

7. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่

- Microcentrifuge
- Thermal cyclers
- Vortex
- Tissue Lyser
- Gel electrophoresis
- เครื่องถ่ายภาพเจล
- microwave

กรมวิชาการเกษตร

- micropipette ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร
- กล้องจุลทรรศน์แบบ compound
- กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo
- Dry heat block

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

9. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บิกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate

10.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 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.ศรีษะเกษ จ.อุดรธานี ภาคตะวันตก จ.ตาก จ.กาญจนบุรี จ.เพชรบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์ จ.ราชบุรี ภาคใต้ จ.ชุมพร จ.สุราษฎร์ธานี จ.ตรัง จ.กระบี่ โดยเลือกเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรค ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างในสภาพที่แห้ง เพื่อให้ส่วนของแผลอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์และหลีกเลี่ยงที่เชื้อราชนิดอื่นจะขึ้นปกคลุม เนื่องจากความชื้น บันทึกข้อมูลรายละเอียดของการเก็บตัวอย่าง วันที่ พิกัด สถานที่ ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้ตัวอย่างโรคที่ใช้ในการศึกษา จะรวมถึงตัวอย่างแห้งของโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid ที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของรากลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะอาการของโรค และแยกราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช

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

แยกราโดยวิธี Tissue transplanting และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

- แยกราโดยวิธี Tissue transplant โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 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 ที่หยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 1 มิลลิลิตร ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ เอียงจานเลี้ยงเชื้อโดยวนเป็นลักษณะวงกลมนานประมาณ 1-3 นาที จากนั้นเทของเหลวที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ ลงบน PDA จานใหม่ หากผิวหน้าอาหาร PDA เริ่มแห้ง ให้เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อประมาณอีกประมาณ 0.5-1 มิลลิลิตร ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำซ้ำแบบเดิมอีก จนได้จานเลี้ยงเชื้ออย่างน้อย 3 จาน บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน หากพบราเจริญขึ้นก่อนเวลา 10 วัน ให้ทำการคัดทิ้ง เนื่องจากราในกลุ่ม cercosporoid เจริญช้า ซึ่งจะใช้ระยะเวลานานกว่า 10 วัน จึงจะพบ colony

3. ศึกษา และจำแนกชนิดของราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore conidia ขนาด สี และโครงสร้างอื่น ๆ ของรา โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา cercosporoid ที่ศึกษากับคู่มือของ Deighton (1967, 1974, 1976 และ 1979) Ellis (1971) Braun (1995) และ Crous and Braun (2003)

4. จำแนกชนิดของรากลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืชโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอ

ศรีมหาสารคาม

ตักและย้ายเส้นใยของรา cercosporoid ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ และทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง ไว้ที่อุณหภูมิ -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,

กรมวิชาการเกษตร

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 รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

แปลงปาล์มน้ำมันในประเทศ

ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการใบจุด (Figure 3.3.1) จากจังหวัด กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ยโสธร ชัยภูมิ เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง กรุงเทพ เพชรบูรณ์ ราชบุรี และเพชรบุรี จำนวน 69 ตัวอย่าง (Table 3.3.1)

Figure 3.3.1 Leaf spot specimens caused by cercosporoid fungi collected from this study (2016-2019)

กองวิชาการเกษตร

นำตัวอย่างมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สกัดและเพิ่มปริมาณของ DNA ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) และ translation elongation factor (EF1-α) ของรา cercosporoid จำนวน 6 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างใบจุดมะละกอ ใบจุดถั่วลิสง ปื้นเหลืองกล้วยไม้ ใบจุดกระเจี๊ยบเขียว และใบจุดบานไม่รู้โรย ทำการวิเคราะห์ ตรวจสอบความถูกต้องของ consensus sequence และวิเคราะห์ชนิดพบว่าเชื้อราดังกล่าวคือ *Corynespora cassiicola*, *Passalora arachidicola*, *Pseudocercospora dendrobii*, *Pseu. abelmoschi* และ *Cercospora zinnia* ตามลำดับ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

Table 3.3.1 Leaf spot specimens caused by cercosporoid fungi collected from this study (2016-2019)

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

กรมวิชาการเกษตร

ใบจุดมะละกอ

เชื้อราสาเหตุ

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

Synonymy:

=*Helminthosporium cassiaecola* 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	*Corynespora*
Species	*cassiicola*

พืชและส่วนที่พบ ใบมะละกอ (*Carica papaya*)

ลักษณะอาการของโรค พบอาการบนใบโดยพบลักษณะแผลจุดน้ำตาลอ่อนตรงกลางสีขาวและมีสีเหลืองล้อมรอบ ขนาดแผลมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร แผลมีทั้งลักษณะเป็นวงกลมหรือแบบเหลี่ยม (Figure 3.3.2) มักพบการแสดงอาการในใบล่างๆหรือใบแก่ หากมีอาการหรือการเข้าทำลายที่รุนแรงใบจะหลุดร่วง เชื้อราสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้โดยลมและฝน

ลักษณะของเชื้อ เชื้อราเจริญได้ดีบนอาหาร PDA เส้นใยสีเขียวเข้ม ก้านชูสปอร์เป็นกลุ่มสีน้ำตาลอ่อน มีผนังกั้น ไม่แตกก้าน ขนาดประมาณ 100-800 x 4-11 µm พบทั้งลักษณะตรงและโค้ง มีลักษณะโป่งพองตรงผนังกั้น สปอร์หรือโคนีเดียยาวต่อกันเป็นเส้น ลักษณะเป็นแท่งยาวหรือคล้ายกระบอง มีสีจางแต่จะมีสีน้ำตาลเข้มข้นเมื่อสปอร์

กรมวิชาการเกษตร

เริ่มแก่ ผนังเซลล์ตรงฐานหนา ผนังเรียบ สปอร์มีผนังกั้นพบได้ระหว่าง 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

GTAGGGGCCTCGCCCCCTTCGAGATAGCACCCTTTGTTTATGAGCACCTCTCGTTTCCTCGGCAGGCTCGCCTGCCAACGGG
GACCCACCACAAACCCATTGTAGTACAAGAAGTACACGTCTGAACAAAACAAAACAAACTATTTACAACTTTCAACAACGGAT
CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
TGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCTTAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCTAGCTTGGTGTTG
GGCGTCTGTCCCGCCTCCGCGCGCCTGGACTCGCCTCAAAAGCATTGGCGGCCGGTTCCCAGCAGGCCACGAGCGCAGCAG
AGCAAGCGCTGAAGTGGCTGCGGGTCGGCGCACCATGAGCCCCCCCACACCAGAATTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAC
CCGCTGAACTTAAG

Translation Elongation Factor 1 (EF1-α)

CACCAACAGCGACGGTTTGACGCATGTCACGGACAGCGAAACGACCGAGAGGAGGGTAGTCAGTGAAAGCCTCAACGCACAT
GGGCTTGGAGGGAACCATCTTGACGATGGCGGCGTCACCGGACTTGATGAACTTGGGAGAGTTCTCAACAGACTTTCCGGTA
CGGCGGTCAATCTTCTCGAGGAGCTCAGAGAACTTGCAAGCAATGTGGGCGGTGTGGCAGTCGAGGACTGGGGCGTAACCAG
CACCGACCTGACCAGGGTGGTTGAGGACGATGACCTGGGCGTTGAAGGACTCGGCACCCTTGGGGGGGTCGTTCTTGGAGTC
ACCGGCAACGTTACCACGACGGATCTCCTTGACGGAGACGTTCTTGACGTTGAAGCCGACGTTGTCACCGGGGACACCCTCG
GTGAGCTGCTCGTGGTGCATCTCGACGGACTTGACTTCAGTGGTGACACAGCGGGGGCGAAAGTGACGACCATACCGGCCTT
GATGATACCGGTCTCGACACGACCGACGGGCACCGTGCCAATACCACCAATCTTGTAAACATCCTGGAAGGGGAAAACGGAA
GGGCTTGTCCGTGGGACGGCTGGGAGGGTCGATGGCGTCGATGGCCTCGAGGAGGGTCTTACCAGTGGCCTTGGCCTTGGT
CTCCTTCTCCCAACCCTTGTACCAGGGGCAGTTGGATGAGGCCTCAATCATGTTGTCACCGTTGAAACCGGAGATGGGGACG
AAGGGAACGTGCTTGGGGTTGTAGCCGACCTTCTTGATGAAGTTGGAGGTCTCCTTGATGATCTCCTGGTAACGCTCCTCGG
ACCACTTGGTGGTGTCCATTTTGTTGATGGCAACGATGAGCTGCTTGACACCGAGGGTGTAAGCGAGGAGAGCGTGCTCACG
AGTCTGGCCATCCTTGGAGATACCAGCCTCGAACTCACCAGTACCGGCGGCAATGATGAGAATAGCGCAGTCGGCCTGGGAG
GTACCAGTGATCATGTTCTTGATAAAATCACCATGACCAG

กรมวิชาการเกษตร

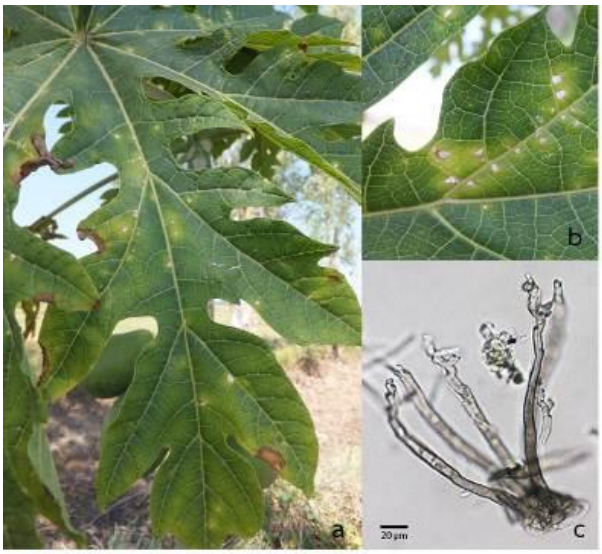


Figure 3.3.2 Leaf spot symptom on *Carica papaya* (a-b), conidiophores of *C. cassiicola* (c)

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	*Passalora*
Species	*arachidicola*

พืชและส่วนที่พบ ใบถั่วลิสง

ลักษณะอาการของโรค พบอาการบนใบโดยพบลักษณะแผลจุดกลมสีน้ำตาลเข้มและมีสีเหลืองล้อมรอบ ขนาดแผลมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-10 มิลลิเมตร (Figure 3.3.3) การเข้าทำลายของเชื้อราชนิดนี้มักพบในระยะแรกของการปลูกหรือต้นอ่อน จึงเรียกโรคใบจุดที่พบในระยะนี้ว่า early leaf spot หากในระยะต้นแก่อาจพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *Cercosporidium personatum* (late leaf spot)

ศรีวิชาการเกษตร

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

พืชอาศัย ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.)

Consensus sequence

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

GTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGCGCGAGCCCGACCTCCAACCCTTTGTGCACCAACTCTGTTGCTT
CGGGGGCGACCCCGCCGTCTGGGCGACGGCGCCCCCGGAGGTCGTCAAAACACTGCATCTCTGCGTCGGAGTCGTCAAGTA
AATTGAAACAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGTGGTATTCCGCGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCA
TTTCACCACTCAAGCCTAGCTTGGTATTGGGCGTGCGGTTCCGCGCGCCTTAAAGTCTCCGGCTGAGCAGTCCGTCTCTAAG
CGTTGTGGCACATATTTCGCTGCAGAGTCCGGGCGGCTTTCGGCCGTTAAATCTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAG
GG

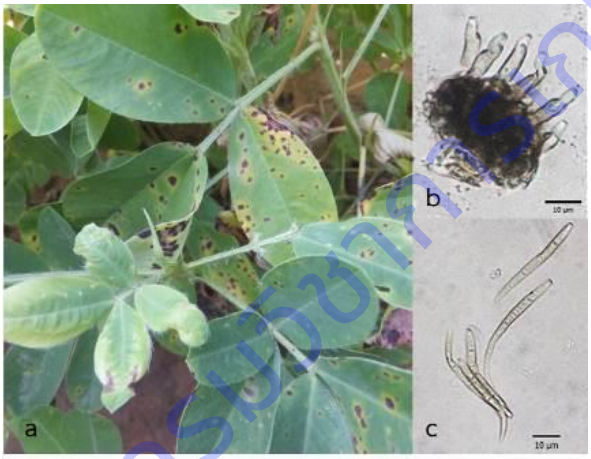


Figure 3.3.3 Leaf spot symptom on *Arachis hypogaea* (a) conidiophores (b) and conidia (c) of *P. arachidicola*

ใบปื้นเหลือง

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)

กรมวิชาการเกษตร

=*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	*Pseudocercospora*
Species	*dendrobii*

พืชและส่วนที่พบ ใบกล้วยไม้

ลักษณะอาการของโรค พบอาการบนใบโดยพบลักษณะเป็นปื้น ไม่มีขอบแผลชัดเจน อาการเริ่มแรกพบลักษณะสีเหลืองซีดบนผิวใบหรือหน้าใบ ขนาดแผลประมาณ 3-10 mm เมื่อแผลขยายหรือเริ่มแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือเทาดำ (Figure 3.3.4) หากมีอาการหรือการเข้าทำลายที่รุนแรงใบจะหลุดร่วง เชื้อราสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้โดยลมและฝน

ลักษณะของเชื้อ พบการสร้าง fruiting body สีเขียวมะกอกบนกระจายผิวใบ อาจพบการเกาะกลุ่มเป็นจุดเล็ก ๆ สีเข้ม ไม่พบการสร้าง secondary mycelium stromata มีขนาดเล็กขนาดความกว้างประมาณ 90 µm ลักษณะกลม สีเขียวมะกอกปนน้ำตาล conidiophores พบเป็นช่อหลวม (loosely fasciculate) หรืออัดกันแน่น (densely fasciculate) โผล่ออกมาจาก stromata และแตกกิ่งก้านอย่างชัดเจน conidiophores มีสีเขียวกมะกอก หรือ สีเขียวมะกอกปนน้ำตาล สีอ่อนตรงปลาย ลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีผนังกั้นที่ชัดเจน 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

AACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGCTCACGCCCGACCTCCAACCCTTTGTGAACACATCTTGTTGCTTCGGGGGC
GACCCTGCCGGCACTACTTAGCCGGGCGCCCCCGAAGGTCTCCAAACACTGCATCTTTGCGTCGGAGTTTCAACAAATTAAA
CAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT

ศูนย์วิทยทรัพยากร

TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCACCAC
TCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGCTCCGCGCGCCTTAAAGTCTCCGGCTGAGCCATTCGTCTCTAAGCGTTGTGG
ATTTTCTAATTCGCTTCGGAGTGCGGGTGGCCGCGGCCGTTAAATCTTTACTTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGG

Translation Elongation Factor 1 (EF1-α)

CGAGAAGGTAAGCTACCACCATCACCACATCGCCGCCGTCACACGACTGCAACACCACTTTTTTCGCTCTTATCATCGTTGCG
CTGGCGACGAGGGGCAAATTTGGTGGGGTGCGAGAATTTTGGCGCTTCGGCTCCACAGCCAATGACCTCACCCCATATCCAC
TTCACATTCCTCCGCTCATTTCAGCGACGACGGCGACGGCGATGTGCTTCACACTTGAACAGCTCGCTAACGACATGCCTCAC
AGGAAGCTGCCGAACTTGGTAAGGGTTCCTTCAAGTA

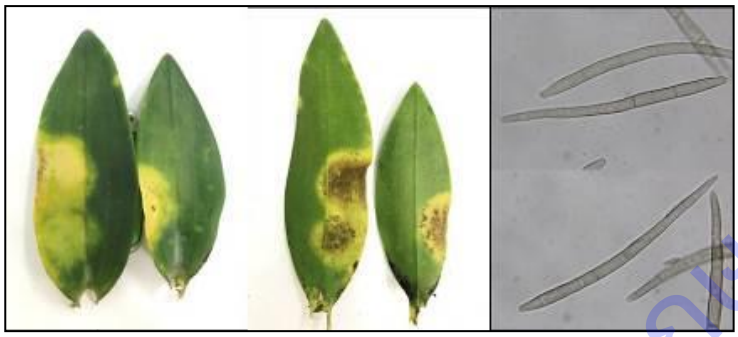


Figure 3.3.4 Leaf spot symptom on *Orchid* sp. and conidia of *Pseudocercospora dendrobii*

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	*Pseudocercospora*

กรมวิชาการเกษตร

Species *abelmoschi*

พืชและส่วนที่พบ ใบกระเจี๊ยบเขียว

ลักษณะอาการของโรค พบอาการที่ชัดเจนบริเวณใต้ใบโดยพบลักษณะของเชื้ออยู่เป็นกลุ่มปื้นสีน้ำตาลเข้มถึงเทาดำ บนผิวใบหรือหน้าใบจะพบลักษณะสีซีดไม่ชัดเจน หากมีอาการหรือการเข้าทำลายที่รุนแรงใบจะหลุดร่วง เชื้อราสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้โดยลมและฝน (Figure 3.3.5)

ลักษณะของเชื้อ พบการสร้าง fruiting body สีน้ำตาลเข้มหรือเทาดำใต้ผิวใบ stromata มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-30 µm conidiophores อัดกันแน่น (densely fasciculate) โผล่ออกมาจาก stromata และแตกกิ่งก้านอย่างชัดเจน conidiophores มีสีน้ำตาลอ่อน ลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีผนังกั้นที่ชัดเจน 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 3.3.5)

พืชอาศัย กระเจี๊ยบเขียว (*Abelmoschus* sp.)

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

ACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGCTCACGCCCGACCTCCAACCCTTTGTGAACCAAACTTGTTGCTTCGGGGGCG
ACCCTGCCGACGACTTCGTCGCCGGGCGCCCCCGGAGGTCTTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCGGAGTTTAAACAAATTAA
ACAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA
TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCACCA
CTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTGTTTCCGCGCGCCTTAAAGTCTTCCGGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGT
TGTGGATTTTTCAATTCGCTTCGGAGTGCGGATGGCCGCGGCCGTTAAATCTTTATTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG
GAT

Translation Elongation Factor 1 (EF1-α)

AAGGTAAGCCATCGCCATCACTTTTTCGCGGCCGCCGCTCGACTACAACACCATTTTTTCGCTCTTATCATCGTTGCGCTGGC
GACGAGGGGCAAATTTTGGTGGGGTGCGAGAATTTCGACTCGGCTCCACAGCCAATGACTTCATCTCAAGCCCAGTGCCCAT
CCCTCTTCCATCACTTCTGGCATCGACAGCGATGTTCATTCGTGAACAACGGCATCGACGATCGCCTCTTCTCTCTATCTGAA
CAGCTCACTAACGATGTCCCTCACAGGAAGCCGCCGAACTTGGCAAGGGTTCCT

Figure 3.3.5 Leaf spot symptom on *Abelmoschus* sp. and characters of conidiophore and conidia

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ใบจุดบานชื่น

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	*Cercospora*
Species	*zinniae*

พืชและส่วนที่พบ ใบและกลีบดอกบานชื่น

ลักษณะอาการของโรค พบอาการที่ชัดเจนทั้งบนผิวใบ หากอาการรุนแรงจะพบอาการบนกลีบดอก เริ่มแรกแผลมีขนาดเล็กประมาณ 0.5 mm. และเมื่อแผลขยายอาจมีขนาดใหญ่ถึง 8 mm. แผลมีลักษณะกลมจนถึงรูปร่างไม่แน่นอน ตรงกลางแผลมีสีขาวจนถึงเทา ขอบแผลสีน้ำตาล น้ำตาลแดง หรือน้ำตาลเข้ม เชื้อราสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้โดยลมและฝน (Figure 3.3.6)

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

พืชอาศัย บานชื่น (*Zinnia* sp.)

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.3.6 Leaf spot symptoms on leaves and petals of *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	*Pseudocercospora*
Species	*cruenta*

ศรีวิชาการเกษตร

พืชและส่วนที่พบ ใบถั่วฝักยาว

ลักษณะอาการของโรค พบอาการที่ชัดเจนบริเวณใต้ใบโดยพบลักษณะของเชื้ออยู่เป็นกลุ่มปื้นสีน้ำตาลเข้มถึงเทาดำ บนผิวใบหรือหน้าใบจะพบลักษณะสีซีดไม่ชัดเจน หากมีอาการหรือการเข้าทำลายที่รุนแรงใบจะหลุดร่วง เชื้อราสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้โดยลมและฝน

ลักษณะของเชื้อ พบการสร้าง fruiting body สีน้ำตาลเข้มหรือเทาดำใต้ผิวใบ stromata มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-30 µm conidiophores อัดกันแน่น (densely fasciculate) โผล่ออกมาจาก stromata และแตกกิ่งก้านอย่างชัดเจน conidiophores มีสีน้ำตาลอ่อน ลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีผนังกั้นที่ชัดเจน 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. *unguiculate*)

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

AACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGCTCACGCCCGACCTCCAACCCTTTGTGAACCAAACTTGTTGCTTCGGGGGC
GACCCTGCCGACGACTTCGTCGCCGGGCGCCCCCGGAGGTCTTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCGGAGTTTAAACAAATTA
AACAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCACC
ACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTGTTCCGCGCGCCTTAAAGTCTTCCGGCTGAGCTGTCCGTCTCTAAGCGT
TGTGGATTTTTCAATTCGCTTCGGAGTGCGGATGGCCGCGGCCGTTAAATCTTTATTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG
GATA

Translation Elongation Factor 1 (EF1-α)

TCGAGAAGGTAAGCCATCGCCATCACCTTTTCACGACCGCCGCTCGACTACAATACCATTTTTTTCGCTCTTATCATCGTTGC
GCTGGCGACGAGGGGCAAAATTTGGTGGGGTGCGAGAATTTCTACTCGGCTCCACAGCCAATGACTTCATCTCAAGCCCACT
ACCCATTCCGTCTCCGTCACCTCTGGCATCGACAGCGATGTTATCTGTGAACAATGGCATCGACGAGCGCTTGTTGTCACTAT
CTGAACAGTCCACTAACGACATGCCTCACAGGAAGCCGCCGAACTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTA

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการใบจุดที่เกิดจากรา cercosporoid จำนวน 69 ตัวอย่าง ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – เดือนกันยายน 2562 จากจังหวัด กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ยโสธร ชัยภูมิ เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง กรุงเทพ 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 ปื้นเหลืองกล้วยไม้ ใบจุดกระเจี๊ยบเขียว ใบจุดถั่วฝักยาว และใบจุดบานไม่รู้โรย ทำการวิเคราะห์ ตรวจสอบความถูกต้องของ consensus sequence วิเคราะห์ชนิดเบื้องต้นพบว่าเชื้อราดังกล่าวคือ คือ *Corynespora cassiicola*, *Passalora arachidicola*,

กรมวิชาการเกษตร

Pseudocercospora dendrobii, *Pseu. abelmoschi Pseu. cruenta* และ *Cercospora zinnia* ตามลำดับ ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.ใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืชรวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

2.สามารถเผยแพร่งานวิจัยในรายงานประจำปีของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รวมถึงงานประชุมวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3.4 การสำรวจโรคและจัดทำรหัสดีเอ็นเอบาร์โค้ดของราสนิมสาเหตุโรคพืช

Disease survey and DNA barcoding of plant pathogenic rust fungi

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวชนินทร ดวงสอาด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวอมรรัชฎ์ คิดใจเดียว	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวสุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

บทคัดย่อ

เพื่อจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของราสนิมสาเหตุโรคพืช เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคราสนิม ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – เดือนกันยายน 2562 จากจังหวัด ลำปาง อุตรดิตถ์ เชียงราย เชียงใหม่ พิจิตร พะเยา แพร่ 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

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.

กรมวิชาการเกษตร

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 สปีชีส์ จาก 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 และในแต่ระยะมีการสร้างสปอร์ที่มีลักษณะทางสัญฐานวิทยาที่แตกต่างกัน (Cummins and Hiratsuka, 2003; Eckardt, 2006; Petersen, 1974) อีกทั้งราสนิมบางชนิดสามารถเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ได้บนพืชอาศัยเพียงชนิดเดียว แต่บางชนิดต้องอาศัยบนพืชต่างชนิดกันอย่างน้อยสองชนิดเพื่อให้ครบวงจรชีวิต (Cunningham, 1931) เพื่อการเจริญเติบโตและสร้างส่วนขยายพันธุ์ในระยะที่จำเพาะเจาะจง เนื่องจากราสนิมมีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย และมีระยะการเจริญเติบโตในวงจรชีวิตที่ซับซ้อน ดังนั้น ในการจำแนกชนิดของราสนิมแต่เดิมจึงอาศัยข้อมูลของพืชอาศัย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะวงจรชีวิตของราสนิม มาใช้ในการจัดจำแนกชนิด

ในประเทศไทย ราสนิมสามารถเข้าทำลายและทำให้เกิดโรคกับพืชหลายชนิด โดยเฉพาะพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่นโรคราสนิมของข้าวโพด ที่เกิดจาก *Puccinia polysora* และ *Puccinia sorghi* (ชุติมันต์ และคณะ, 2547) โรค ราสนิมของกาแฟ 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 สปีชีย์ จาก 7 วงศ์ ได้แก่ *Crossospora fici 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 สามารถใช้เป็นข้อมูลเฉพาะเพื่อการวินิจฉัยราชนิดนั้นๆ (DNA barcoding) (Cräutlein *et al*.,

ศรีวิชัยการเกษตร

2011) โดยการนำไปเปรียบเทียบกับรหัสพันธุกรรมอ้างอิง (reference libraries) ที่ทราบชนิดแล้ว ตำแหน่งของรหัสพันธุกรรม (locus) ของเชื้อราที่นิยมนำมาถอดรหัส โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการจำแนก ศึกษาวิวัฒนาการ และประชากรของสิ่งมีชีวิตนั้นมีหลายตำแหน่ง เช่น Internal Transcribed Spacer (ITS) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่นิยมใช้ (Seifert, 2009) ซึ่งตำแหน่งนี้มีสามารถบอกความแตกต่างได้ในระดับสปีชีส์ (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 นอกจากสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในด้านการจำแนกชนิดของราสนิมแล้ว ยังสามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิวัฒนาการของราสนิม ประโยชน์ในทางด้านโรคพืช การเกษตรทั่วไป และสามารถใช้ข้อมูลเหล่านี้ในการใช้สำหรับการอ้างอิงหรือยืนยันในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้า

ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและจำแนกชนิดของราสนิม (Pucciniales) สาเหตุโรคพืชโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลด้านชีวโมเลกุล และได้ DNA barcode ของราสนิม (Pucciniales) สาเหตุโรคพืช เพื่อใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้า

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทับตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่
    - Microcentrifuge
    - Thermal cyclers
    - Vortex
    - Tissue Lyser
    - Gel electrophoresis
    - เครื่องถ่ายภาพเจล

กรมวิชาการเกษตร

- 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 บิกเกอร์ 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 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) และthe 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

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากโรคราสนิมวงศ์ Pucciniales จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ในเขตภาคเหนือได้แก่ จังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย พะเยา ลำพูน อุตรดิตถ์ ภาคกลางได้แก่ จังหวัด สุโขทัย พิษณุโลก สุพรรณบุรี นครสวรรค์ นครปฐม ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ จังหวัด นครราชสีมา ขอนแก่น สุรินทร์ ศรีษะเกษ อุดรธานี 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 ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บใน

กรมวิชาการเกษตร

พิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้ตัวอย่างโรคที่ใช้ในการศึกษา จะรวมถึงตัวอย่างแห้งของโรคพืชที่เกิดจากราสนิม ที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของราสนิมสาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของ teliospore urediniopsore 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

ตักชิ้นส่วนของราสนิมที่พบบนชิ้นส่วนของพืช 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 ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ 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 ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

- **การบันทึกข้อมูล**

กรมวิชาการเกษตร

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 รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

แปลงปาล์มน้ำมันในประเทศ

ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการของโรคราสนิม (Figure 3.4.1) จากจังหวัด ลำปาง อุตรดิตถ์ เชียงราย เชียงใหม่ พิจิตร พะเยา แพร่ เพชรบูรณ์ พิษณุโลก เพชรบุรี กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี นครราชสีมา ลพบุรี ยโสธร และชัยภูมิ จำนวน 62 ตัวอย่าง (Table 3.4.1) นำตัวอย่างมาทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตักสปอร์จากตัวอย่างใบที่พบสปอร์ของราสนิม ได้แก่ สัก เบญจมาศ ถั่วฝักยาว และกาแฟ ภายใต้กล้อง stereo microscope จากนั้นสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Doungsa-ard, *et al*. (2015) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่ง Large Subunit (LSU) the Small Subunit (SSU) และตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) โดยใช้ Phusion DNA Polymerase วิเคราะห์เพื่อการจัดจำแนกด้วยวิธี Phylogenetic reconstruction ได้ผลดังนี้

Figure 3.4.1 Rust disease specimens collected from this study (2016-2019)

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.4.1: Rust disease specimens collected from this study (2016-2019)

Common name	Scientific name	location	Lat.	Long.
Sorghum	*Sorghum bicolor*	Nakhoratchasima	15° 11' 40.0622"	101° 29' 42.5740"
Peanut	*Arachis hypogaea*	Lopburi	14° 57' 26.8660"	101° 16' 21.0011"
Bamboo	*Bambusa vulgaris*	Lampang	18° 19' 33.7337"	99° 16' 31.8475"
Teak	*Tectona grandis*	Phrae	18° 01' 01.9"	99° 42' 55.8"
Guinea grass	*Megathyrsus maximus*	Nakhoratchasima	15° 8' 32.5187"	101° 50' 58.3782"
Bermuda grass	*Cynodon dactylon*	Uttaradit	17° 34' 49.6"	100° 07' 08.1"
Maize	*Zea mays*	Uttaradit	70° 34' 49.7451"	100° 07' 8.1989"
Coffee	*Coffea robusta*	Chiang Rai	20° 5' 19.4812"	99° 58' 39.8915"
Blady grass	*Imperata cylindrica*	Chiang Rai	20° 3' 40.2543"	99° 57' 23.8213"
Grass	*Apluda sp.*	Uttaradit	17° 50' 14.3338"	100° 3' 20.2243"
Bermuda grass	*Cynodon dactylon*	Uttaradit	17° 49' 31.9007"	100° 4' 31.9007"
Grass	*Cynodon dactylon*	Uttaradit	17° 49' 31.7298"	100° 4' 15.1078"
Golden shower	*Cassia fistula*	Phichit	16° 16' 37.2320"	100° 35' 57.2604"
Grass	*Cynodon dactylon*	Uttaradit	17° 50' 14.3629"	100° 3' 23.6889"
Sorghum	*Sorghum bicolor*	Nakhoratchasima	15° 6' 2.0426"	101° 25' 47.3486"
Weed	*Cynodon dactylon*	Uttaradit	17° 50' 14.3338"	100° 3' 20.2243"
Teak	*Tectona grandis*	Nakhoratchasima	15° 6' 2.0426"	101° 25' 42.3486"
Globe amaranth	*Gomphrena globosa*	Phayao	19° 5' 38.7834"	99° 54' 37.6888"
Grass	*Cynodon dactylon*	Phrae	18° 15' 12.4412"	100° 13' 41.4469"
Weed	*Cynodon dactylon*	Phrae	18° 15' 12.4413"	100° 13' 41.4469"
Wild sugarcane	*Saccharum spontaneum*	Phitsanulok	17° 42' 31.9007"	100° 4' 11.4627"
Grass	*Cynodon dactylon*	Phitsanulok	17° 50' 14.3629"	100° 3' 23.5859"
Grass	*Cynodon dactylon*	Chiang Rai	19° 39' 37.7013"	99° 32' 49.4195"
Globe amaranth	*Gomphrena globosa*	Chiang Mai	18° 57' 58.8930"	99° 14' 30.2139"
Maize	*Zea mays*	Chiang Mai	18° 56' 45.8935"	98° 58' 55.8608"
Soybean	*Glycine max*	Chiang Mai	18° 54' 20.6499"	99° 00' 42.0400"
Blady grass	*Imperata cylindrica*	Chiang Rai	19° 49' 28.8331"	99° 45' 39.8342"
Lemon Grass	*Cymbopogon citratus*	Chiang Rai	19° 46' 29.4117"	99° 39' 12.6582"
Grass	*Cynodon dactylon*	Chiang Rai	19° 46' 29.7841"	99° 39' 12.9850"
Grass	*Cynodon dactylon*	Chiang Rai	19° 46' 29.7841"	99° 39' 12.9850"
Bamboo	*Bambusa vulgaris*	Chiang Rai	19° 46' 32.0395"	99° 39' 8.2557"
Spanish needles	*Bidens biternata*	Chiang Rai	19° 46' 31.4483"	99° 39' 8.0433"
Peanut	*Arachis hypogaea*	Chiang Rai	19° 46' 29.4112"	99° 39' 12.6582"
Grass	*Cynodon dactylon*	Chiang Rai	19° 49' 28.8331"	99° 45' 39.8342"

กรมวิชาการเกษตร

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	*Olivea*
Species	*tectonae*

พืชและส่วนที่พบ ใบสัก

ลักษณะอาการของโรค พบจุดสีน้ำตาลส้มกระจายทั่วใบ เมื่อลูบหรือดูบริเวณใต้ใบจะพบสปอร์เป็นผงฝุ่นสีส้มหรือน้ำตาล พบกระจายทั่วใบ หากอาการรุนแรงจะทำให้ใบร่วง (Figure 3.4.2)

ลักษณะของเชื้อ uredenia อยู่บริเวณใต้ผิวใบ สีส้มเหลือง เป็นจุดขนาดเล็กประมาณ 0.2-0.5 mm. เมื่อเจริญเต็มที่ uredenia จะปริออก 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

CCCGAAGGTAAACCTCCTGACCCACATGTGACCTTGTAGTTGCTTCTGTTGATTCTGTCGGCGTCTGGACGGCCGTCGCGCC
GCCCGCGACCCGGAACCAGGCGGCCGCCTGGGACCAATATCAACTCTTTGTATCCACTAGTCTTCTGATCAGCCGCACGGCA
CCAAGAAATGGATCAAAACTTTCCTTACAGAAGGGAGGGATCCGTGAATTGGAAAACGCAACGAACCGTGAAAAGTAAAGGG

กรมวิชาการเกษตร

AATTGTGGAATTCTAGGAATCATGCAATCTTTGAATGTTCATTGCGCCTGCCAGCATTTTGGCGGGGATGGCTGTTCGAGGGA
CATTTCAACCCTCGAGCTCCCCTTTGGAAGTCCGGGAGTTGGGACCTGTAGACTTACCGTTTGTGAAACCATGGATTTGTGGC
TGTGATTCATTTACCTCCGCGTAGAATCTATACACCGCATCGGAAACTCGGCGGGGCCACCCCGCAAAACCCCTTAATTTGGG
AACATTTATCATTGAACAAGAAAGATTACCCGCTGAACTTAATCATAACAATGTAACGGAAG

Figure 3.4.2 Rust disease symptom on *Tectona grandis* (a) sori on lower leaf (b) urediniospores of *O. tectonae* (c)

ราสนิมขาวเบญจมาศ

เชื้อราสาเหตุ

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

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Subphylum	Pucciniomycotina
Class	Pucciniomycetes
Order	Pucciniales
Family	Pucciniaceae
Genus	*Puccinia*
Species	*horiana*

พืชและส่วนที่พบ ใบเบญจมาศ

ลักษณะอาการของโรค พบจุดสีน้ำตาลส้มกระจายทั่วใบ เมื่อลูบหรือดูบริเวณใต้ใบจะพบสปอร์เป็นผงฝุ่นสีส้มหรือน้ำตาล พบกระจายทั่วใบ หากอาการรุนแรงจะทำให้ใบร่วง (Figure 3.4.3)

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.4.3 Rust disease symptom on *Chrysanthemum* (a-d) teliospore of *P. horiana* (e)

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

พืชอาศัย เบญจมาศ (*Chrysanthemum*)

Consensus sequence

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCTGTAGGTGAACCTGCAGAAGGATCATTATTAAAAGAACTAGAGTGCACTTTATTGTG
GCTTGACCCCTTTTAAATATATCACCCAAACTATTTTAACACTTGGATGCATGAATTTTTGAAAGGTTCATTGCAATTGAGTAT
AAGTAACTTCTTTTTACTAAGAAATGTTACATTACCCCCCCCCCCTTTATTTTTTACCCCCTTTTTTATTATATAACACAAGT
TTAAATGAATGTAAAAAACCCTTTAATTATAAAATAACTTTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAG
TGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCACCTTTTGGTATTCCAA
AAGGTACACCTGTTTGAGTGTCATGAAACCCTCTCACAAAATAATTTTTGTTAATTATTTAGTGGATGTTGAGTGTTGCTGTC
ATTAGCTCACTTTAAATATATCAGTCACTTTTTTTTTTTTTCAAATAAGTTGGATTGACTTGGTGTAATAATTTTTTCATCAA
GGAAAGTAGCAATACTTGCCAGCTTTTGTTTTGAAAAAAAAAAAAGAAGACTTCTAAAAACCCAAAATTAATCTTTAAGACCTC
AAATCAGGTGGGACTACCCGCTGAACTTAAG

ราสนิมกาแฟ

เชื้อราสาเหตุ

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

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota

กรมวิชาการเกษตร

Subphylum	Pucciniomycotina
Class	Pucciniomycetes
Order	Pucciniales
Genus	*Hemileia*
Species	*vastatrix*

พืชและส่วนที่พบ ใบกาแฟ (*Coffea robusta*)

ลักษณะอาการของโรค เริ่มพบเป็นจุดสีเหลืองขนาดเล็กบนผิวใบเมื่อโรคเริ่มพัฒนาจะพบจุดขยายใหญ่ขึ้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-25 mm. โดยสีเหลืองจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลส้ม พบการสร้างสปอร์บริเวณใต้ใบ โดยบนใบจะเห็นเป็นจุดสีซีด หากพบอาการรุนแรงบริเวณแผลจะกลายเป็นสีน้ำตาลเข้มและแผลมีลักษณะแห้งและใบกาแฟจะร่วง เชื้อสามารถแพร่กระจายได้โดยลม (Figure 3.4.4)

ลักษณะของเชื้อ sori สร้างบริเวณใต้ใบ อยู่เป็นกลุ่มลักษณะเป็นวงขนาดประมาณ 3-25 mm. มีสีเหลืองถึงเหลืองส้ม (Figure 3.4.4) มี clavate filaments รอบ stomata โดยตรงส่วนปลายของ filaments จะติดกับ pedicels ของ urediospores ซึ่งมีลักษณะใส ขนาด 28-36 x 18-28 µm ผิวของ urediospore มีลักษณะเป็น warted ตรงส่วนโค้งและเรียบตรงส่วนโคน หรือด้านเรียบ ผนังหนา 1 µm teliospores รูปร่างแบบ spherical ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-28 µm ผนังใส เรียบ หนา 1 µm

Figure 3.4.4 Rust disease symptom on coffee and sori of *H. vastatrix*

พืชอาศัย *Coffea arabica*, *C. canephora*, *C. liberica* และ *Coffea* spp.

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

CGAATTTAACCCCGGCGGTTAGGCATATATAATTCTCTCTGAGGGTTGTATGTGTTCTAATCTTTTTTTTTTTATTTTCAACCA
CAAATTTATACATATGTATATATGTATTATTTACTATCAAGTAAATAAATATAAAACTTTTAACAATGGATCTCTTGGCTCTCA
CATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATTTTTGAACGCATATTG
CGCCTTTTGGCTATTCCAAAAGGTACACCTGTTTGAGAGTATGAAAGGTCAGGGTGTTGAGAGAGTTATTAAAAAAAAGAAAA
AGGCAAAGTAACACTTTAAGTGTTATTTTGTCTTTGATTTTTTTTTTCTCTTAGCATCTTGGATATTGGGTGCTTGCCATTATT

AAGTTTGATGGCTCACCTTAAATTTATAAGTTGTTTTTTATTAAGGATGAAAAGTCTTTTGATGGCTTGATGTTATTGATATAT
GAAATGTCATTCATCAAGAAATCAGGGGGGTGACTAACCTTGATGAGAAATGTTGACTTT

Large Subunit (LSU)

CTAACAAGGATTCCCCTAGTAATGGCGAATGAAGAGGGAAAAGCCCAATTTTGTAATCTGGCCCTTTTAGGGTCCGAGTTGTA
AAGTGAAGAGGTGCTTTCTTGTGCTGGACCATATATAAGTCTGTTGGAATACAGCATCATTGAAGGTGAGAATCCTGTCTAAT
GATATGGACTACCAGTGCTTTTATGAAGCAGTCTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAATGGGTGGTAAATTC
CATCTAAGGCTAAATATTGGTGAGAGACCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGAACTTTGGAAAGAGAGT
TAACAGTATGTGAAATTGTTAAAAGGGAAACACTTGAAGTTAGACTTGATAATGTCAGTTCAGCCTTTTATTAGGGTGTATTC
TGTGCATTATCAGACCAACATCAATTTTGGGTGTTAGATAAGGGTTTGGGAAATGTAGCAACTTTGGTTGTGTTATAGTCCTG
AATTTCATATATAATGCCCAAGATTGAGGAGATTCACAGTAAGCTGGAAAGAGATTTTCAGTAGGTCACCAAAATGGTTGACA
CTCTTACTATGGATGTTGGTGCAATAGCTTTAAATGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATGCTTGCAAGTAT
TTGAGTGGTAAAACTCACATGCGCAATGAAAGTGAATGTAAATGGGATCCAAAA

Large Subunit (SSU)

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAAATTAAGAGTGCACTTAATTGTGGCTTGAAATTTTACTTATTTACACCCA
ACGTCTTCGGGACACTGCGGCAATTTATTGCTTAGCGAATTTAACCCCTGCGGTTAGGCATATATAATTCTCTCTGAGGGTTG
TATGTGTTCTAATCTTTGTTTTTTTTATTTTCAACCACAAATTTATACATATGTATATGTATTATTTACTATCAAGTAAATAA
ATATAAAACTTTTAACAATGGATCTCTTGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAG
AATTCAGTGAATCATCGAATTTTTGAACGCATATTGCGCCTTTTGGCTATTCCAAAAGGTACACCTGTTTGAGAGTATGAAAG
GTCAGGGTGTTGAGAGAGTTATTAAAAAAAAAGAAAAAGGCAAAGTAACACTTTAAGTGTTATTTTGTCTTTGATTTTTTTTTT
TCTCTTAGCATCTTGGATATTGGGTGCTTGCCATTATTAAGTTTGATGGCTCACCTTAAATTTATAAGTTGTTTTTTTATTAAG
GATGAAAAGTCTTTTGATGGCTTGATGTTATTGATATATGAAATGTCATTCATCAAGAAATCAGGGGGGTGACTAACCTTGAT
GAGAAATGTTGACTTTATAAACACATGTTAAAAGATAAATAAAAAGTAAAAGATAAAAAAAAATTAAAAATTAAAAATTAAAGG
GAAAGAAGTAAAAAGAATGAGAGGTATGACATATT

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

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	*Uromyces*
Species	*appendiculatus*

พืชและส่วนที่พบ ใบถั่วฝักยาว (*Phaseolus vulgaris*)

ลักษณะอาการของโรค พบได้มากที่สุดบนใบ อาการเริ่มแรกเริ่มจุดสีเขียวซีดหรือเหลืองที่มีลักษณะกลมเล็กต่อมาตอนกลางจุดจะนูนขึ้น ต่อมาจะแตกออกพบผงหรือกลุ่มของสปอร์สีน้ำตาลแดง กรณีที่เป็นรุนแรงจะพบจุดแผลสนิมเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากมาย จนปกคลุมทั่วใบ (Figure 3.4.5) 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±equatorial หรือ superequatorial teliospores รูปร่างแบบ ellipsoidal มีลักษณะ umbonate ตรงส่วนปลายยอด ขนาด 28-38 x 20-36 µm ผนังเรียบ อาจพบลักษณะ warted หรือ striate ได้บางครั้ง ผนังด้านข้างหนา 2.5-3.5 µm และมีความหนาของผนังตรงส่วนยอด 4-8 µm pedicels แบบ fragile ลักษณะใส จนถึงสีน้ำตาลจาง pedicels ยาวประมาณ 20 µm (Figure 3.4.5)

พืชอาศัย *Phaseolus* spp. และ *Vigna* spp.

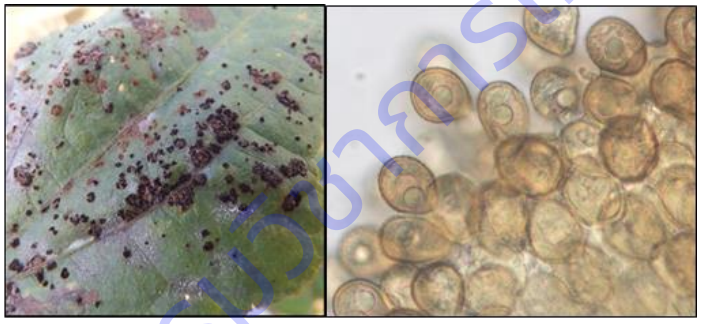


Figure 3.4.5 Aecia of rust on *P. vulgaris* and teliospore of *U. appendiculatus*

กรมวิชาการเกษตร

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

AAATGAGTGCACTTTATTGTGGCTCAAAACTTTTTATTTTTTAACCCCAAGACTTGTTTGTGTGGCGTCTTTGCCATTGCACTC
AGGTATACGTAACACTTTTGTGTTACATTACCCCCCTCCCCAATTTTTTTTTTTTTTATAAACACATGTTGAAATAAGAATGTAA
TATATATATATCTTGAAAATAACTTTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAGT
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGCATCTTTTGGTATTCCAAAAGGTATGCCTGTTT
GAGTGTCATGAAAATCTCTCATCAAATTAATTTTTGGTGGATTTTGAGTGCGCTGTTATCTAGCTCACTTTAAATATATAAGTT
CTTATCTTATTATGTTGGATTGACTTGGTGTAATATTTAACTTTTGTTTCACCAAGGAAAGCT
GCAATGCTTGCCAATGTTTTCAAGTCA

Large Subunit (LSU)

CCCCTAGTAATGGCGAATGAAAAGGGAAAAGCCCAAATTTGTAATCTGGCTCTCCTGAGACCGAATTGTCATCCTTTTAACTG
TTTTCAGTGCTGGACCATATATCAGACCGTCTGACAACGCTTCATCATATAAGGAGAGAATCCTGGTAATGATATGGACTCCC
ATTGCGATATGATACAGACTCTAAGAACCAAGTTGTTTGGGAATGCATCTCAAAGACGGCGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAA
TATTGATGACAGACCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGACCAGAACTTTGGAAAGAGAGTTAACAGTACGTGAA
ATTGTTAAAAGGGAAACAATTGAAGTTAGACTTGTTATTGTTAGTTCAACCTTTTTTTTAAAGGGAGTATTCTGATGATTAACA
GACCAACATCAACTTTTGAGTGTTGGAGAAGGGTTTAAGGAAATGTAGCAGTCTCTGATTGTGTTATAGTCCTGAGCTTTGAT
ACAATGCTTAAGGTTGAGGATTGCAGTAAGCCTCTTTTTTTTTTTGGGGGGAAACA

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	*Phakopsora*
Species	*pachyrhizi*

พืชและส่วนที่พบ ใบถั่วเหลือง

ลักษณะอาการของโรค พบได้มากที่สุดบนใบ อาการเริ่มแรกเริ่มจุดสีเขียวซีดหรือเหลืองที่มีลักษณะกลมเล็กต่อมา ตอนกลางจุดจะนูนขึ้น ต่อมาจะแตกออกพบผงหรือกลุ่มของสปอร์สีน้ำตาลแดง กรณีที่เป็นรุนแรงจะพบจุดแผลสนิมเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากมาย จนปกคลุมทั่วใบ (Figure 3.4.6) เชื้อสามารถแพร่กระจายได้โดยลม

ลักษณะของเชื้อ ไม่พบการสร้าง pycnia หรือ aecia แต่พบ uredia ใต้ใบขนาดประมาณ 0.4 mm ภายในพบ payaphyses ลักษณะโค้ง สีใส ขนาดยาว 25-45 µm ปลายยอดหนา 8-13 µm peridium อยู่รวมเป็นกลุ่ม มีผนังเซลล์หนาขนาด 10-15 x 8-12 µm urediospores รูปร่างแบบ globose ถึง subglobose หรือบางครั้งพบลักษณะแบบ ellipsoid มีสีส้ม ไม่ค่อยพบ germpores มีขนาด 20-28 x 18-22 µm ส่วนใหญ่พบแต่ urediospores ไม่ค่อยพบการสร้าง teliospores บนถั่วเหลือง

พืชอาศัย ถั่วเหลือง (*Glycine max*)

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.4.6 Rust disease symptom on *Glycine max*

กรมวิชาการเกษตร

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATAAAAAGCTAAAGAGTGCACTTTATTGTGGC
TCAAAACTAAACTTTTTAATAAACCCATTTAATTGGCTCATTGATTGATAAGATCTTTGGGCAATGGTAGCTTTGAAAAAAGCT
GCAACCCACCTATTAATCATAATCTTTTTTTTTTTAACTCAAAGTCAAATAGAATGTTTTATAAATTTAAATATATATATAACT
TTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
ATCATCAAGTTTTTGAACGCACCTTGCACCTTTTGGTATTCCAAAAGGTACACCTGTTTGAGTGTCATGAAATCTTCTCAACA
TTATTTCTTTTTTTTAAAGGGAAATTGTTGGATTTTGAGTGTTGCTGTTGCTTTTTTTTGCAGCTCACTTTAAATAAATAAATA
TATATAAGTTTCAGTATATTTTGATGTAATAATAAAATCATTTCATCAAAAAAATAAATATATGTGAGATTTATTATAACATTA
ATTGAATGTAAATTTTTTTTTTAAGACCTCAAATCAGGTGAGACTACCCACTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG

Small Subunit (SSU)

GCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGATACCTTACTACATGGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACA
TGCTGAAAAACCCTAACCTTTTGGAAGGGGTGTATTTATTAGATAAAAAACCAATGGCCCTCGGGTCTCTTTGGTGATTCATA
ATAACTTCTCGAATCGCATGGCCTTTGTGCTGGTGATGCTTCATTCAAATATCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGA
GGCCTACCATGGTGATGACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCGATTCCGGAGAGAGGGCCTGAGAAACGGCCCTCAAATCTAA
GGATTGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATGTATGGCTCTTTTGGGT
CTTACAATTGGAATGAGTACAATTTAAATCTCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATT
CCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGACGTTAAAAAGCTCGTAGTCGAACTTCGGTCTCTGGCAGTTGGTCCGCCATT
TGGTGTGTACTGATTTGTTGGAGGCTTACCTCTTGGTGAGCCTCAATGCACTTTACTGGGTGTTGAGGGGAACCAGGATTTTT
ACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTATTGCCTGAATACATTAGCATGGAATAATAAAATAGGACGTGTGATCCTA

TTTTGTTGGTTTCTAGGATTACCGTAATGATTAATAGGGTCAGTTGGGGGCATTTGTATTACATCGTCAGAGGTGAAATTCTT
GGATTGATGTAAGACAAACTACTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGACTTCATTGATCAAGAACGAAGGTTAAGGGTTCAAAAA
CGATCAGATACCGTTGTAGTCTTAACAGTAAACTATGCCGACTGGGGATCAGACAAGGATTTATAATGACTTGTTTGGCACCC
AAAGGGAAACCTGAAGTTTAGGTTCGTGGGGGAGTACGGTCACAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACC
AGGTGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCCAGACACAGTAAGGATTGACAGATTGATA
GCTCTTTCGTGATTTTGTGGTTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGATAACGAAC
GAGACCTTCTCCTGCTAAATAGTCCAGCTGGCTACGGCTGGCTGCTGACTTCTTAGAGGGACTATCAACGTTTAGTTGATGGA
AGTTGGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACCAGGCCAGCGAGTATA
TCACCTTATCTGAAAAGATTGGGTAATCTTGGGAAACCTGGTCGTGATGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGA
GGAATACCTAGTAAGCGTATGTCATCAGCATGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGAT
TGGATGGCTTAGTGAGGCGTTCGGAGAGCCTATAAGGAGCTGGCAACAGCAC

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 zeae* Berenger, Herb. Viv. Mycol. Suppl. no. 18: no. 18 (1851)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Subphylum	Pucciniomycotina
Class	Pucciniomycetes
Order	Pucciniales
Family	Pucciniaceae
Genus	*Puccinia*
Species	*sorghi*

พืชและส่วนที่พบ ใบโพดหวาน

ลักษณะอาการของโรค พบได้มากที่สุดบนใบ อาการเริ่มแรกเริ่มจุดสีเขียวซีดหรือเหลืองที่มีลักษณะกลมเล็กต่อมา ตอนกลางจุดจะนูนขึ้น ต่อมาจะแตกออกพบผงหรือกลุ่มของสปอร์สีน้ำตาลแดง กรณีที่เป็นรุนแรงจะพบจุดแผลสนิมเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากมาย จนปกคลุมทั่วใบ ส่วนใหญ่จะพบบนผิวใบ(Figure 3.4.7) เชื้อสามารถแพร่กระจายได้โดยลม

กรมวิชาการเกษตร

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 germpores จำนวน 3 หรือ 3-4((-5)) บริเวณกึ่งกลางสปอร์

พืชอาศัย ข้าวโพด (*Zea mays* L.)

Figure 3.4.7 Rust disease symptom on *Zea mays*

กรมวิชาการเกษตร

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

GCACTTAATTGTGGCTCGACCCCTTTTAAACTCACCCCAAACTTTCAAAGACTCTTTTGCATGGTTTGTAACAAATCATTGCA
CCTGAGTAAAAGTAACATTCTTGATTGAATGTTACATTACCCACCCCCTTTTATTTTTCCAAAACTTTTTTTTTTACACATACAC
ACAAGTTTAAAAGAATGTAAACAACCACCTTTAATTATAAAATAACTTTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAA
GAACACAGTGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCCTTTTGG
TATTCCAAAAGGCACACCTGTTTGAGTGTCATGAAACCCTCTCACAAAATAAATAATTTTTATTATGATTTTTGTGGATGTTGA
GTGCTGCTGTGTTACACATAGCTCACTTTAAATGTATAAGTCATCTTCTTTATATAGCAAAAAAGAAGAGATGGATTGACTTG
ATGTGTAATAATTTTTTTTTCATCACATTGAGGAAAGTAGCAATACTTGCCATCTTTATATTATTTTGTTGTTGAGATAGAGAC
TACTAAACAAACAATTTAAAATTTAAGACCTCAAATCAGGTGGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

Large Subunit (LSU)

ATGAAACCCTCTCACAAAATAAATAATTTTTATTATGATTTTTGTGGATGTTGAGTGCTGCTGTGTTACACATAGCTCACTTTA
AATGTATAAGTCATCTTCTTTATATAGCAAAAAAGAAGAGATGGATTGACTTGATGTGTAATAATTTTTTTTTCATCACATTGA
GGAAAGTAGCAATACTTGCCATCTTTATATTATTTTGTTGTTGAGATAGAGACTACTAAACAAACAATTTAAAATTTAAGACCT
CAAATCAGGTGGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACTAACAAGGATTCCCCCAGTAACG
GCGAGTGAAGAGGGAAAAGCCCAAATTTGTAATCTGACTCTTTCAGAGTCCGAGTTGTAATTTTGAGAACTGTTTTCAGTGCT
GGACCATGTATAAGTCTGTTGAAAAGCAGCATCATTGAGGGTGATAATCCCGTTTATGATATGGACTACCAGTGCATTATGAT
ACAGTCTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATATAGGTGAGAGA

CCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGAACTTTGGAAAGAGAGTTAACAGTGCGTGAAATTGTTAAAAGGG
AAACAATTGAAGTTAGACTTGTTATTATTAGTTCAACCTTTTTGGAGTATTCTAATGATTAACAGACCAACATCAATTTTTGAG
TGTTGGAGAAGGGTTTAAGGAAATGTAGCAGTCTCTGACTGTGTTATAGTCCTGAGCTTTGATACAATGCTTAAGATTGAGGA
AGGCAGTAAGCGCATGTTGTGTGTGTGGAACAAACTAATGTTCTTCTTACTGAGGATGTTGGTGTAATAGCTTTAAATGACCC
GTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATGCCTGCGAGTATTTGGGTGCTTGAAACCCTTATGCGTAATGAAAGTAAATGT
AAATGGGATCTGTTAAAAGTGCACCATTGACCAGTCCAGATTATTTATATGATGGTACTGAGTAAGAGCAAGTATGTTGGGAC
CCGAAAGATGGTGAACTATGCCTGAATAGGGTGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAAGCTCGTAGCGGTTCTGACGTGCAAA

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคราสนิมจากแหล่งปลูกในพื้นที่จังหวัด ลำปาง อุตรดิตถ์ เชียงราย เชียงใหม่ พิจิตร พะเยา แพร่ 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 สักเบญจมาศ ถั่วฝักยาว กาแฟ ถั่วเหลือง และข้าวโพดหวาน พบว่าเชื้อราดังกล่าวคือ *Olivea tectonae Puccinia horiana Hemileia vastatrix Uromyces appendiculatus Phakopsora pachyrhizi* และ *Puccinia sorghi* ตามลำดับ ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป
2. สามารถเผยแพร่งานวิจัยในรายงานประจำปีของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รวมถึงงานประชุมวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

สรุปวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3.5 การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Alternaria* สาเหตุโรคพืช

DNA barcoding of plant pathogenic *Alternaria*

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ชนินทร ดวงสอาด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	มะโนรัตน์ สุดสงวน	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	พรพิมล อธิปัญญาคม	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่คาดว่าเกิดจากรา *Alternaria* ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2560 กันยายน 2562 จากแปลงปลูกพืชใน จังหวัด เพชรบูรณ์ สระบุรี ราชบุรี ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ชัยภูมิ นครราชสีมา ขอนแก่น เลย เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง น่าน ตาก แพร่ และอุตรดิตถ์ ได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* จำนวน 145 ตัวอย่าง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลชีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง ITS, GAPDH และ EF1-**α** จำนวน 37 ไอโซเลท และจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด พบว่าเกิดจากรา *Alternaria* 6 species และ 1 complex species คือ *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดคะน้า กะหล่ำปลี กะหล่ำปลีรูปหัวใจ ผักกาดขาว หัวไชเท้า บรอกโคลี และกะหล่ำดอก *A. porri* สาเหตุโรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง หอมหัวใหญ่ กระเทียม หอมแบ่ง และหอมญี่ปุ่น *A. solani* สาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศ *A. alternata* สาเหตุโรคใบจุดของมันฝรั่ง โรคใบจุดใบไหม้ดาวเรือง และโรคใบจุดใบไหม้ทานตะวันเม็กซิโก *A. dauci* สาเหตุโรคใบไหม้ทานตะวัน และโรคใบไหม้ผักชี *A. tagetica* สาเหตุโรคใบจุดใบไหม้ดาวเรือง และ *A. porri* complex จากอาการโรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง หอมหัวใหญ่ และกระเทียม

คำค้น: ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, ออลเทอร์นาเรีย

ABSTRACT

Plant disease samples caused by *Alternaria* fungi had been collected during November 2016 – September 2019. One hundred and forty-five plant disease samples were collected from plantation located in Phetchabun, Sarabur,i Ratchaburi, Chonburi, Chachoengsao, Prachuap Khiri Khan, Phetchaburi, Kanchanaburi, Supunburi, Chaiyaphum, Nakhon Ratchasima, Khon Kaen, Loei, Chiangmai, Lumpun, Lampang, Nan, Tak, Phrae and Uttaradit provinces. Thirty-seven specimens had been observed and identified using morphological and molecular data of Internal Transcribed Spacer (ITS), translation elongation factor 1-alpha (EF1-**α**) and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenasebeta (GAPDH) gene regions. It was found that the causal agent could be identified

กรมวิชาการเกษตร

as *Alternaria brassicicola Alternaria porri Alternaria solani Alternaria alternata Alternaria dauci Alternaria tagetica* and *Alternaria porri* complex.

Keywords: *Alternaria* DNA barcoding

คำนำ

ราสกุล *Alternaria* เป็นสาเหตุโรคทำความเสียหายต่อผลผลิตของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ทั้งพืชผัก ไม้ผล ไม้ดอก ไม้ประดับ รวมทั้งวัชพืช รา *Alternaria* ที่เป็นสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Alternaria dauci* สาเหตุโรคใบไหม้ของแครอท *A. radicina* สาเหตุโรคเน่าดำของแครอท *A. brassicae* และ *A. brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของพืชตระกูลกะหล่ำ และโรคเน่า (head rot) ของบรอคโคลี่ *A. solani* สาเหตุโรคไบไหม้ และผลเน่าของมะเขือเทศ *A. tenuis* และ *A. alternata* สาเหตุโรคผลจุดของพริก โรคใบจุดของ geranium หรือ จิบโซฟิลล่า *A. porri* สาเหตุโรคใบจุดสีม่วงหรือใบไหม้กับพืชตระกูลหอมกระเทียม *A. dianthi* และ *A. dianthicola* สาเหตุโรคใบไหม้และกลีบดอกจุดของคาร์เนชั่น และทานตะวัน *A. zinniae* สาเหตุโรคใบจุด และกลีบดอกจุดของบานชื่น *A. tennuissima* สาเหตุโรคใบจุดของแพนซี่ *A. citri* สาเหตุโรคเน่าดำ ซึ่งเป็นโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลส้ม (พัฒนา และคณะ, 2526, 2537 ; Katoh *et al*., 2005 ; Chase, 1998 : Laemmlen, 2009) เป็นต้น *Alternaria* จัดอยู่ใน Phylum Ascomycota Class Dothideomycetes Order Pleosporales Family Plosporaceae Genus *Alternaria* ราสกุลนี้สร้าง conidiophore สีเข้มไม่แตกกิ่งก้าน conidium จัดอยู่ในพวก porospore และ dictyospore มีสีเข้ม รูปร่างรูปไข่จนถึง obclavate หรือทรงกระบอก สปอร์อันแรกเกิดที่ปลายก้าน conidiophore และสามารถทำหน้าที่เป็น conidiophore โดยสร้างรูที่ปลายของสปอร์ และให้กำเนิดสปอร์อันต่อไปต่อกันเป็นลูกโซ่ยาว สปอร์อาจมีส่วนปลายเรียวเป็น beak (วิจัย, 2551)

ในประเทศไทยการศึกษาด้านการจำแนกชนิดของรา *Alternaria* ส่วนใหญ่ เป็นการจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ซึ่งปัจจุบันความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุล เข้ามามีบทบาทในงานด้านการจำแนกชนิด และอนุกรมวิธานของเชื้อมากขึ้น โดยมีการนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาใช้จำแนกชนิดควบคู่กับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งจะทำให้การจำแนกชนิดของรามีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งทางชีวโมเลกุล ที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมาก เพราะมีประสิทธิภาพ และความแม่นยำ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ในระยะเวลาอันสั้น และสามารถจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต ในกลุ่มที่มีความซับซ้อนมาก (species complex) เชื้อรา *Alternaria* บางชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ใกล้เคียงกันมากและยังใกล้เคียงกับ *Nimbya* และ *Stemphylium* ดังนั้น เพื่อให้การจำแนกชนิดของรามีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น ในงานวิจัยนี้ จึงนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาใช้จำแนกชนิดควบคู่กับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา *Alternaria* โดยการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Alternaria* ซึ่งข้อมูลที่ได้นอกจากจะเป็นประโยชน์ในด้านการจำแนกชนิดของราแล้ว ยังเป็นประโยชน์สำหรับการค้นคว้าวิจัยด้านวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ รวมถึงการอนุรักษ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

พันธุกรรมของเชื้อรา และยังเป็นข้อมูลอ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* จากแหล่งปลูกพืชของประเทศไทย

2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทับตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง

3. 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

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

5. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บิกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ จานเลี้ยงเชื้อ

6. 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

กรมวิชาการเกษตร

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

ITS1: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA (White *et al*., 1990)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al*., 1990)

the translation elongation factor 1-alpha (EF1-α)

EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG (Carbone and Kohn, 1999)

EF1-986R: TACTTGAAGGAACCCTTACC (Carbone and Kohn, 1999)

Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenasebeta (GAPDH)

gpd1: CAACGGCTTCGGTCGCATTG (Berbee *et al*., 1999)

gpd2: GCCAAGCAGTTGGTTGTGC (Berbee *et al*., 1999)

- อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) และ potato carrot agar (PCA)

7. Sequence assemble programs ได้แก่ Geneious Prime 2020 (http://www.geneious.com, Kearse et al., 2012)

วิธีการ

1. เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria*

เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการเป็นโรคซึ่งคาดว่าเกิดจากรา *Alternaria* จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย โดยเลือกเก็บส่วนของพืชที่แสดงอาการของโรค ได้แก่ ใบ ดอก ผล กิ่ง และลำต้น ห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก พร้อมแนบกระดาษบันทึกรายละเอียด ชื่อพืช สถานที่เก็บ วันที่เก็บ และลักษณะอาการของโรค บรรจุห่อตัวอย่างโรคพืชลงในกล่องเก็บความเย็น เพื่อนำมาจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการ

2. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และจำแนกชนิดของรา *Alternaria*

ศึกษาลักษณะอาการของโรคและเชื้อสาเหตุโรคโดยตรงจากพืช

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

แยกเชื้อรา และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplant โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ 10% เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 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

พิสูจน์โรคตามวิธีการ Koch's postulate

ศรีวิชัยการเกษตร

นำรา *Alternaria* บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน จากนั้นใช้ cork boror ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดวุ้นอาหารบริเวณส่วนปลายเส้นใยของเชื้อรา นำไปปลูกเชื้อบนพืชชนิดเดิม สำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบปลูกเชื้อด้วยชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่ปราศจากเชื้อสาเหตุโรค เมื่อพืชเป็นโรคนำส่วนที่แสดงอาการเป็นโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ตรวจดู เพื่อยืนยันเชื้อสาเหตุโรคอีกครั้ง

ศึกษาลักษณะของรา

นำราที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA และบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนี ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราได้แก่ รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย conidia conidiophore และโครงสร้างอื่น ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope และถ่ายภาพ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของขนาดโครงสร้างต่างๆของราที่วัดขนาดไว้

จำแนกชนิดรา *Alternaria* สาเหตุโรคพืช

โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา *Alternaria* ที่ศึกษากับเอกสารการจัดจำแนกรา *Alternaria* คือ *Alternaria* An Identification Manual (Simmons, 2007)

เก็บรักษาสายพันธุ์รา

เชื้อราที่แยกได้เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

จัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืช

ตัวอย่างโรคพืชที่เก็บมาได้ ส่วนหนึ่งนำมาจัดทำตัวอย่างแห้ง แล้วส่งเก็บในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

3. จัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Alternaria*

สกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) ของรา *Alternaria*

โดยเลี้ยงรา *Alternaria* ที่ต้องการศึกษาในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง (25-27 องศาเซลเซียส) ให้มีอายุประมาณ 7 วัน จากนั้นเขี่ยเส้นใยของราย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป ปฏิบัติตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต โดยก่อนสกัด จะเติมเอ็นไซม์ Proteinase K เพื่อช่วยในการย่อยผนังเซลล์ ใช้ที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร หลังจากสกัดได้ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) หากยังไม่ทำ PCR ทันที จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของรา *Alternaria* โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

ITS1: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA (White *et al*., 1990)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al*., 1990)

the translation elongation factor 1-alpha (EF1-α)

EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG (Carbone and Kohn, 1999)

กรมวิชาการเกษตร

EF1-986R: TACTTGAAGGAACCCTTACC (Carbone and Kohn, 1999)

Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenasebeta (GAPDH)

gpd1: CAACGGCTTCGGTCGCATTG (Berbee *et al*., 1999)

gpd2: GCCAAGCAGTTGGTTGTGC (Berbee *et al*., 1999)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของตำแหน่ง the Internal Transcribed Spacer (ITS) the translation elongation factor 1-alpha (EF1-**α**) และ Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenasebeta (GAPDH) ด้วย Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนด annealing temperature ที่ 56 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

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

วิเคราะห์และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2020 (http://www.geneious.com; Kearse *et al*., 2012) บันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของเชื้อราที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม 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)

ทำ dataset ของแต่ละตำแหน่ง และ partitioned (combined) dataset ของตำแหน่ง ITS GAPDH และ EF1-**α** บันทึก dataset และ partitioned dataset ในรูปแบบไฟล์ .nexus โดยใช้โปรแกรม Mesquite

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

จำแนกชนิดของ *Alternaria* โดยวิเคราะห์ concatenated dataset ของยีนตำแหน่ง ITS-GAPDH-EF1-**α** (1,780 bases/taxa; ITS = 569, GAPDH = 599 และ EF1-**α** = 611) ด้วย phylogenetic criteria คือ Maximum Likelihood (ML) มีรายละเอียดการวิเคราะห์ ดังนี้ เตรียมไฟล์ phy วิเคราะห์โดยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ซึ่งจำเพาะต่อการวิเคราะห์

ศรีวิชัยการเกษตร

ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command –f a) เริ่มจาก random starting tree และกำหนด maximum likelihood bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง

จัดเก็บข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ

บันทึกและจัดเก็บข้อมูลรหัสดีเอ็นเอ หรือ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ซึ่งเป็นลักษณะประจำพันธุ์ของราในแต่ละตัวอย่าง และเก็บดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ ไว้ที่อุณภูมิ –40 องศาเซลเซียส ที่กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เพื่อใช้ศึกษาในด้านอื่นๆต่อไป

- **เวลาและสถานที่**

เวลา **เริ่มต้น** ตุลาคม 2559 **สิ้นสุด** กันยายน 2562

สถานที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่คาดว่าเกิดจากรา *Alternaria* ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2560 กันยายน 2562 ได้จำนวน 145 ตัวอย่าง จากแปลงปลูกพืชใน จังหวัด เพชรบูรณ์ สระบุรี ราชบุรี ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ชัยภูมิ นครราชสีมา ขอนแก่น เลย เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง น่าน ตาก แพร่ และอุตรดิตถ์

แยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา พบว่า ได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* จำนวน 109 ตัวอย่าง จากพืช 18 ชนิด จำแนกได้ Alternaria 6 ชนิด (species) และ 1 complex species ที่มีลักษณะใกล้เคียงระหว่าง *Alternaria porri* และ *A. solani* (ตารางที่3.5.1)

จัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Alternaria* สาเหตุโรคพืช ที่รวบรวมได้ โดยเลือกตัวแทนของเชื้อ *Alternaria* แต่ละชนิด (species) จากพืช 16 ชนิด จำนวน 37 ตัวอย่าง (ไอโซเลท) นำมาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของรา *Alternaria* ด้วยเทคนิค PCR ที่ตำแหน่ง ITS, GAPDH และ EF1-α หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตดีเอ็นเอของรา *Alternaria* วิเคราะห์และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ชนิด พบว่า ได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* 6 ชนิด (species) และ 1 complex species สอดคล้องกับการศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ

Alternaria brassicicola สาเหตุโรคใบจุดคะน้า กะหล่ำปลี กะหล่ำปลีรูปหัวใจ ผักกาดขาว หัวไชเท้า บรอกโคลี และกะหล่ำดอก

Alternaria porri สาเหตุโรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง หอมหัวใหญ่ กระเทียม หอมแบ่ง และหอมญี่ปุ่น

Alternaria solani สาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศ

Alternaria alternata สาเหตุโรคใบจุดของมันฝรั่ง โรคใบจุดใบไหม้ดาวเรือง และโรคใบจุดใบไหม้ทานตะวันเม็กซิโก

Alternaria dauci สาเหตุโรคใบไหม้ทานตะวัน และโรคใบไหม้ผักชี

Alternaria tagetica สาเหตุโรคใบจุดใบไหม้ดาวเรือง

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Alternaria porri complex จากอาการโรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง หอมหัวใหญ่ และกระเทียม (รายละเอียดดังตารางที่ 3.5.1และ 3.5.2 และภาพที่ 3.5.1) ในกรณีของเชื้อที่เป็น complex species ต้องศึกษาเพิ่มเติมในยีนตำแหน่งอื่น เพื่อให้ได้ผลการจำแนกที่ถูกต้องและชัดเจน

จัดเก็บข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ ไว้ที่อุณภูมิ –40 องศาเซลเซียส ที่กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เพื่อใช้ศึกษาในด้านอื่นๆต่อไป

เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของรา *Alternaria* จำนวน 109 ไอโซเลท และจัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* จำนวน 109 ตัวอย่าง ส่งเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืชสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

ตารางที่ 3.5.1 ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* จากการเก็บรวบรวม ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2560 ถึง กันยายน 2562

Host	Symptom	No. of Sample	Fungi	Location
คะน้า	ใบจุด	24	*Alternaria brassicicola*	ต.ท่าเรือ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี (3) ต.บ้านขาม อ.จตุรัส จ.ชัยภูมิ (1) ต. แจงงาม อ.หนองหญ้าไทร จ.สุพรรณบุรี (4) ต.ลุ่มน้ำชี อ.บ้านเขว้า จ.ชัยภูมิ (2) ต.ท่าน้าว อ.ภูเพียง จ.น่าน (1) ต.แก้มอ้น อ.จอมบึง จ.ราชบุรี (2) ต.ท่าม่วง อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี (3) ต.ท่าเรือ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี (6) ต.ทุ่งทอง อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี (2)
กะหล่ำปลี	ใบจุด	10	*A. brassicicola*	ต.วังสวาบ อ.ภูผาม่าน จ.ขอนแก่น (2) ต.ปากช่อง อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์ (1) ต.หนองแม่นา อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์ (2) ต.เขาค้อ อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์ (2) ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก (2) ต.คีรีราษฎร์ อ.พบพระ จ.ตาก (1)
ผักกาดขาว	ใบจุด	2	*A. brassicicola*	ต.ปากช่อง อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์ (1) ต.บ้านแม อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่ (1)
กะหล่ำดอก	ใบจุด	2	*A. brassicicola*	ต.ปากช่อง อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์ (1) ต.ม่วงตื๊ด อ.ภูเพียง จ.น่าน (1)
กะหล่ำปลีรูปหัวใจ	ใบจุด	1	*A. brassicicola*	ต.โหล่งขอด อ. พร้าว จ.เชียงใหม่ (1)
บรอคโคลี่	ใบจุด	2	*A. brassicicola*	ต.ม่วงตื๊ด อ.ภูเพียง จ.น่าน (1) ต.คีรีราษฎร์ อ.พบพระ จ.ตาก (1)
หัวไชเท้า	ใบจุด	2	*Alternaria alternata*	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก (2)
มะเขือเทศ	ใบจุด (อาการที่ใบ กิ่ง ต้นและผล)	11	*Alternaria solani*	ต.โป่งตาลอง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา (6) ต.มวกเหล็ก อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี (1) ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก (2) ต.เวียงตาล อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง (2)

กรมวิชาการเกษตร

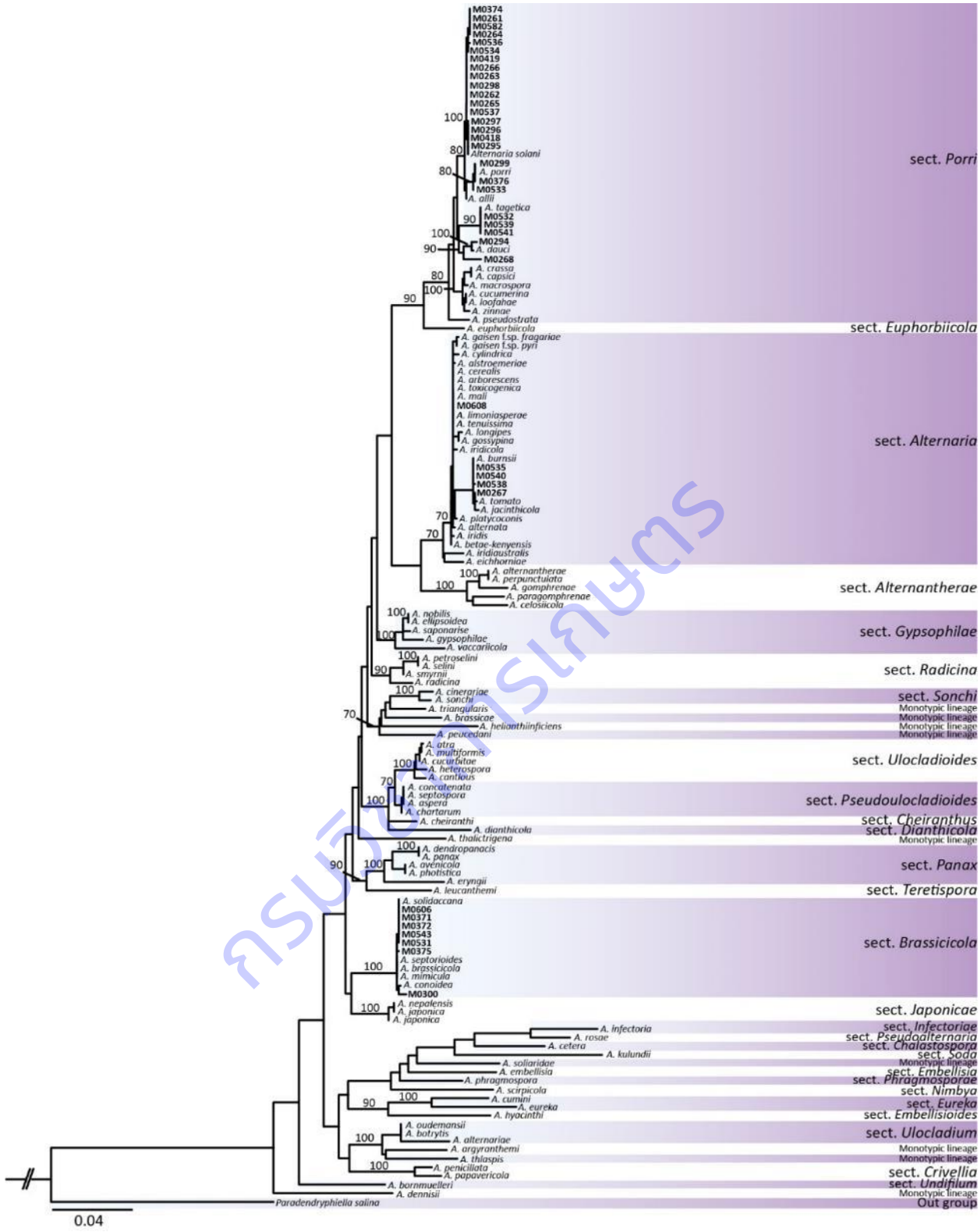
ทานตะวันเม็กซิโก	ใบจุด ใบไหม้		*Alternaria alternata*	ต.ทุ่งทอง อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี (1)
ทานตะวัน	ใบไหม้	3	*Alternaria dauci*	ต.หมูสี อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา (1)
				ต.มวกเหล็ก อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี (1)
				ต.ลาดบัวขาว อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา (1)
		1	*Alternaria alternata*	จ.เชียงราย (1)
ดาวเรือง	ใบจุด ใบไหม้	1	*Alternaria alternata*	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก (1)
		6	*Alternaria tagetica*	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก (2)
				ต.พบพระ อ.พบพระ จ.ตาก (1)
				ต.คีรีราษฎร์ อ.พบพระ จ.ตาก (3)
ผักชี	ใบไหม้	1	*Alternaria dauci*	ต.หินฮาว อ.หล่มเก่า จ.เพชรบูรณ์ (1)
กระเทียม	ใบจุดสีม่วง	3	*Alternaria porri*	ต.โหล่งขอด อ.พร้าว จ.เชียงใหม่ (1)
				ต.แม่ฮ้อยเงิน อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (2)
		1	*A. porri complex*	ต.บ้านขาม อ.จตุรัส จ.ชัยภูมิ (1)
หอมแดง	ใบจุดสีม่วง	13	*A. porri*	ต.บ้านม่วง อ.น้ำปาด จ.อุตรดิตถ์ (5)
				ต.ลุ่มน้ำชี อ.บ้านเขว้า จ.ชัยภูมิ (2)
				ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ (1)
				ต.บ้านหวาย อ.ป่าซาง จ.ลำพูน (3)
				ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก (2)
		7	*A. porri complex*	ต.บ้านขาม อ.จตุรัส จ.ชัยภูมิ (1)
				ต.ลานบ่า อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์ (1)
				ต.แม่ฮ้อยเงิน อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (3)
				ต.ทุ่งสะโตก อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่ (2)
หอมแบ่ง	ใบจุดสีม่วง	6	*A. porri*	ต.แม่ยางร้อง อ.ร้องกวาง จ.แพร่ (1)
				อ.ลับแล จ.อุตรดิตถ์ (1)
				ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก (2)
				ต.ท่าม่วง อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี (2)
หอมญี่ปุ่น	ใบจุดสีม่วง	1	*A. porri*	ต.กกสะท้อน อ.ด่านซ้าย จ.เลย (1)
หอมหัวใหญ่	ใบจุดสีม่วง	10	*A. porri*	ต.บ้านแม อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่ (4)
				ต.ม่อนปิ่น อ.ฝาง จ.เชียงใหม่ (1)
				ต.ทุ่งทอง อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี (3)
			A. porri complex	ต.ดอนเปา อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ (2)
มันฝรั่ง	ใบจุด	2	*Alternaria alternata*	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก (1)
				ต.ช่องแคบ อ.พบพระ จ.ตาก (1)
รวม		109		

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3.5.2 ตัวอย่างรา *Alternaria* จากการเก็บรวบรวม ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2560 ถึง กันยายน 2562 และจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

DNA code	Genus	species	section	Host	Location
M 0261	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	ต.โป่งตาลอง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา
M 0262	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	ม. 13 ต.โป่งตาลอง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา
M 0263	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	ต.โป่งตาลอง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา
M 0264	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	ม. 13 ต.โป่งตาลอง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา
M 0265	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	ต.โป่งตาลอง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา
M 0266	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	ต.โป่งตาลอง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา
M 0267	*Alternaria*	*alternata*	*Alternaria*	ทานตะวัน เม็กซิโก	ต.ทุ่งทอง อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี
M 0268	*Alternaria*	*dauci*	*Porri*	ทานตะวัน	ต.หมูสี อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา
M 0294	*Alternaria*	*dauci*	*Porri*	ผักชี	บ้านหินฮาว ต.หินฮาว อ.หล่มเก่า จ.เพชรบูรณ์
M 0295	*Alternaria*	*porri complex*	*Porri*	หอมแดง	ต.ลานบ่า อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์
M 0296	*Alternaria*	*porri complex*	*Porri*	หอมแดง	อ.เมือง จ.เชียงใหม่
M 0297	*Alternaria*	*porri complex*	*Porri*	กระเทียม	ม. 10 ต.บ้านขาม อ.จตุรัส จ.ชัยภูมิ
M 0298	*Alternaria*	*porri complex*	*Porri*	กระเทียม	ต.โหล่งขอด อ.พร้าว จ.เชียงใหม่
M 0299	*Alternaria*	*porri*	*Porri*	หอมญี่ปุ่น	ต.กกสะท้อน อ.ด่านซ้าย จ.เลย
M 0300	*Alternaria*	*brassicicola*	*Brassicicola*	กะหล่ำปลี	ต.วังสวาบ อ.ภูผาม่าน จ.ขอนแก่น
M 0371	*Alternaria*	*brassicicola*	*Brassicicola*	กะหล่ำดอก	ต.ปากช่อง อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์
M 0372	*Alternaria*	*brassicicola*	*Brassicicola*	ผักกาดขาว	ต.ปากช่อง อ. หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์
M 0374	*Alternaria*	*porri complex*	*Porri*	หอมแดง	ต.บ้านขาม อ.จตุรัส จ.ชัยภูมิ
M 0375	*Alternaria*	*brassicicola*	*Brassicicola*	กะหล่ำปลี	ต.ปากช่อง อ. หลุมสัก จ.เพชรบูรณ์
M 0376	*Alternaria*	*porri*	*Porri*	หอมแบ่ง	ต.แม่ยางร้อง อ.ร้องกวาง จ.แพร่
M 0418	*Alternaria*	*porri complex*	*Porri*	หอมหัวใหญ่	บ.ริมขาน ต.ดอนเปา อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่
M 0419	*Alternaria*	*porri complex*	*Porri*	หอมแดง	บ้านป่าอ้อ ต.ทุ่งสโตก อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่
M 0531	*Alternaria*	*brassicicola*	*Porri*	กะหล่ำปลี	บ.สะเดาะบง ตำบลเขาค้อ อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์
M 0532	*Alternaria*	*tagetica*	*Porri*	ดาวเรือง	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก
M 0533	*Alternaria*	*porri*	*Porri*	หอมแดง	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก
M 0534	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก
M 0535	*Alternaria*	*alternata*	*Alternaria*	หัวไชเท้า	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก
M 0536	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก
M 0537	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก
M 0538	*Alternaria*	*alternata*	*Alternaria*	มันฝรั่ง	ตำบช่องแคบ อ.พบพระ จ.ตาก
M 0539	*Alternaria*	*tagetica*	*Porri*	ดาวเรือง	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก
M 0540	*Alternaria*	*alternata*	*Alternaria*	ดาวเรือง	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก
M 0541	*Alternaria*	*tagetica*	*Porri*	ดาวเรือง	ตำบพบพระ อ.พบพระ จังหวดตาก
M 0543	*Alternaria*	*brassicicola*	*Brassicicola*	กะหล่ำปลี	บ้านรางช้าง ตำบหนองไม้นา อ.เขาค้อ จ. เพชรบูรณ์
M 0582	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	
M 0606	*Alternaria*	*brassicicola*	*Brassicicola*	บล็อกโคลี	ม.1 ตำบคีรีราษฎร์ อ.พบพระ จ.ตาก
M 0608	*Alternaria*	*alternata*	*Alternaria*	ทานตะวัน	จ.เชียงราย

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3.5.1 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อรา *Alternaria* ได้จากการวิเคราะห์ชุดข้อมูลของยีนตำแหน่ง ITS, GAPDH และ EF1-**α** ด้วย phylogenetic criteria คือ Maximum Likelihood โดยโปรแกรม RAxML และมีค่า Bootstrap ≥70% จาก 1,000 ซ้ำเหนือ nodes

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการเก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่คาดว่าเกิดจากรา *Alternaria* ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2560 กันยายน 2562 จากแปลงปลูกพืชใน จังหวัด เพชรบูรณ์ สระบุรี ราชบุรี ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ชัยภูมิ นครราชสีมา ขอนแก่น เลย เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง น่าน ตาก แพร่ และอุตรดิตถ์ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Alternaria* สาเหตุโรคพืช ที่รวบรวมได้ โดยเลือกตัวแทนของเชื้อ *Alternaria* แต่ละชนิด (species) จากพืช 16 ชนิด จำนวน 37 ตัวอย่าง (ไอโซเลท) นำมาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของรา *Alternaria* ด้วยเทคนิค PCR ที่ตำแหน่ง ITS, GAPDH และ EF1-α หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตดีเอ็นเอของรา *Alternaria* วิเคราะห์และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ชนิด พบว่า ได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* 6 ชนิด (species) และ 1 complex species คือ *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดคะน้า กะหล่ำปลี กะหล่ำปลีรูปหัวใจ ผักกาดขาว หัวไชเท้า บรอกโคลี และกะหล่ำดอก *Alternaria porri* สาเหตุโรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง หอมหัวใหญ่ กระเทียม หอมแบ่ง และหอมญี่ปุ่น *Alternaria solani* สาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศ *Alternaria alternata* สาเหตุโรคใบจุดของมันฝรั่ง โรคใบจุดใบไหม้ดาวเรือง และโรคใบจุดใบไหม้ทานตะวันเม็กซิโก *Alternaria dauci* สาเหตุโรคใบไหม้ทานตะวัน และโรคใบไหม้ผักชี *Alternaria tagetica* สาเหตุโรคใบจุดใบไหม้ดาวเรือง และ *Alternaria porri* complex จากอาการโรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง หอมหัวใหญ่ และกระเทียม ในกรณีของเชื้อที่เป็น complex species ต้องศึกษาเพิ่มเติมในยีนตำแหน่งอื่น เพื่อให้ได้ผลการจำแนกที่ถูกต้องและชัดเจน

จัดเก็บข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จำนวน 37 ไอโซเลท ไว้ที่กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เพื่อใช้ศึกษาในด้านอื่น ๆ ต่อไป เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของรา *Alternaria* จำนวน 109 ไอโซเลท และจัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* จำนวน 109 ตัวอย่าง ส่งเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืชสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

2. สามารถเผยแพร่งานวิจัยในรายงานประจำปีของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รวมถึงงานประชุมวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3.6 การตรวจวินิจฉัยชนิดของแตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae (Platygastridae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

Species identification of egg parasitoids subfamily Telenominae (Platygastridae) in rice paddies using molecular technique

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง จารุวัตถ์ แต้กุล กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน ยุวรินทร์ บุญทบ ชมัยพร บัวมาศ อิทธิพล บรรณาการ จอมสุรางค์ ดวงธิสาร สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

แตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญมากที่สุดในวงศ์ Platygastridae:เนื่องจากมีศักยภาพสูงในการใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี แตนเบียนไข่ Telenominae สามารถเข้าทำลายไข่ของแมลงศัตรูข้าวได้หลายชนิด แต่ยังไม่มีข้อมูลการศึกษาความหลากชนิดของแมลงในกลุ่มนี้ในประเทศไทย การใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีภาพมาช่วยในการวินิจฉัยจำแนกชนิด ทำให้ได้ผลที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น วัตถุประสงค์ของการทดลองคือเพื่อทราบชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องของแตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae (Platygastridae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าว โดยใช้ ดี เอ็น เอ บาร์โค้ด ดำเนินการทดลองตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2559 ถึงเดือน กันยายน 2561 โดยดำเนินการเก็บแตนเบียนไข่จากแปลงปลูกข้าวที่สำคัญทางเศรษฐกิจ สกัดและเพิ่มปริมาณ ดี เอ็น เอ วิเคราะห์ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ โดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและนำมาร่วมวิเคราะห์ชนิดของแตนเบียนไข่ร่วมกับ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลจากการเทียบลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ บน GenBank (standard nucleotide BLAST) ผลการทดลองพบว่าได้แตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae ทั้งสิ้น 16 ชนิดได้แก่ *Gryon largi, Gryon saxatilis, Psix tunetanus, Psix watshami, Telenomus busseolae, Telenomus californicus, Telenomus crassiclava, Telenomus dignus, Telenomus floridanus, Telenomus grenadensis, Telenomus nysivorus, Telenomus podisi, Telenomus tabanivorus, Trissolcus basalis, Trissolcus ogyges* และ *Trissolcus thyantae* แตนเบียนไข่ *Telenomus* spp. เป็นกลุ่มชนิดที่มีความสำคัญที่สุด ควรนำมาศึกษาพัฒนาเพื่อใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูข้าวหรือหาแนวทางการอนุรักษ์ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวต่อไป

Abstract

The egg parasitoids subfamily Telenominae is the most important group within the family Platygastridae in respect to the use as biological control agents. Despite the fact that telenomine wasps are able to attack several rice pest species, the study of species richness in Thailand has

สำนักวิจัยการเกษตร

not yet been clear. Molecular technique for species identification is carried out for the precision and efficiency. The primary goal of this research is to obtain the taxonomic information of the subfamily telenominae at species level executed from DNA barcode method. The study was implemented from October 2016 to September 2018; collecting survey and study were done on the important rice paddy in Thailand. To obtain wasp species, molecular techniques were implemented including DNA extraction, amplification, sequencing as well as phylogenetic analysis. The species execution included morphological data and standard nucleotide BLAST from GenBank. The results revealed that 16 species of Telenominae were found: *Gryon largi, Gryon saxatilis, Psix tunetanus, Psix watshami, Telenomus busseolae, Telenomus californicus, Telenomus crassiclava, Telenomus dignus, Telenomus floridanus, Telenomus grenadensis, Telenomus nysivorus, Telenomus podisi, Telenomus tabanivorus, Trissolcus basalis, Trissolcus ogyges*, and *Trissolcus thyantae*. The egg parasitoids, *Telenomus* spp. Is considered most important species group to use as biological control agents. This group will pose significant impacts on the biological control research paradigm as well as natural enemy conservation on paddy fields in Thailand.

คำสำคัญ แตนเบียนไข่ แมลงศัตรูข้าว การควบคุมโดยชีววิธี ดี เอ็น เอ บาร์โค้ด egg parasitoids Telenominae Hymenoptera

คำนำ

แมลงในกลุ่ม ผึ้ง ต่อ แตนและมด (Hymenoptera) จัดว่าเป็นแมลงกลุ่มที่มีความสำคัญมากที่สุดในแง่แมลงที่มีประโยชน์ ความหลากชนิดของแมลงในกลุ่มนี้มีมากกว่า 115,000 ชนิด (LaSalle and Gauld, 1993) จากการศึกษาถึงสายวิวัฒนาการ (phylogenetic position) พบว่า Hymenoptera มีความสัมพันธ์มากที่สุด (sister group) ต่อกลุ่มแมลงที่มีการเจริญเติบโตครบวงจรหรือ Holometabola (Sharkey, 2007; Savard *et al*., 2006) โดยทั่วไปแล้วแมลงในกลุ่มผึ้ง ต่อ แตน แบ่งเป็น 2 กลุ่มหลักได้แก่ กลุ่มกินพืช paraphyletic Symphyta (sawflies, woodwasps) และแมลงผสมเกสร มด และ แตน monophyletic Apocrita ซึ่งประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย monophyletic Aculeata และ polyphyletic Parasitica กลุ่มย่อย Aculeata และ Parasitica เป็นแมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในแง่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มแตนเบียน (parasitoids wasps) พบว่าการนำเข้าแตนเบียนเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช (classical biological control) ประสบความสำเร็จสูงถึง 87% จากการนำเข้าแมลงศัตรูธรรมชาติทั้งหมด (Greathead, 1986; Lasalle and Gauld, 1993)

แมลงในกลุ่มแตนเบียนมีความน่าสนใจมากที่สุดในกลุ่มแมลงศัตรูธรรมชาติในแง่ของชีววิทยา แมลงในกลุ่มนี้สามารถอาศัยบริโภคอาหารทั้งในตัวเหยื่อ (endoparasitoids) และบนตัวเหยื่อ (ectoparasitoids) แตน

ศรีมวิชาการเกษตร

เบียนแตกต่างจาก ตัวห้ำและตัวเบียนกล่าวคือ ตัวห้ำ (predator) เข้าทำลายและฆ่าเหยื่อโดยทางตรงและครั้งละหลายตัว ตัวเบียน (parasite) สร้างความรำคาญหรือบาดเจ็บให้กับเหยื่อแต่จะไม่ฆ่าเหยื่อ ในทางกลับกันแตนเบียน (parasitoids) เข้าทำลายเหยื่อครั้งละ 1 ตัว ตัวอ่อนกัดกินอวัยวะภายในเหยื่อและทำให้เหยื่อตายในที่สุด จำนวนของแตนเบียนภายในเหยื่ออาจแตกต่างกัน มีเพียงแค่ 1 ตัว (solitary) หรือหลายตัว (gregarious) ความสำคัญของแตนเบียนประกอบไปด้วย 1) ช่วยรักษาสมดุลของระบบนิเวศ แตนเบียนเข้าทำลายเหยื่อจัดเป็นการรักษาระดับการระบาดของแมลง 2) สามารถใช้ในการวัดระดับการแพร่กระจายของแมลง พบว่าหากมีแตนเบียนชนิดใดอยู่เป็นจำนวนมาก อาจมีผลมาจากความอุดมสมบูรณ์ของเหยื่อ 3) การใช้แตนเบียนควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี พบว่าเป็นวิธีการที่ประสบความสำเร็จทั้งแมลงศัตรูทางการเกษตร ป่าไม้ และทางการแพทย์ และยังช่วยลดระดับการใช้สารเคมีควบคุมแมลงศัตรูพืช 4) แมลงศัตรูพืชลดระดับความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลง และ 5) ช่วยส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม

แตนแบนไข่ คือแตนเบียนที่เข้าทำลายไข่ของเหยื่อ พบว่ามีการใช้แตนเบียนไข่ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีถึง 7 วงศ์ และมี 1 ชนิด ผลิตเพื่อเป็นการค้าและประสบความสำเร็จในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ได้แก่ *Trichogramma* (Mills, 2010) ทั้งนี้จากแตนเบียนไข่ที่ถูกค้นพบ แต่ยังมีแตนเบียนไข่อีกหลายชนิดที่อยู่ในธรรมชาติที่ยังไม่มีการค้นพบและศึกษา แตนเบียนวงศ์ใหญ่ Platygastroidea จัดเป็นแตนเบียนไข่ที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง มีการจัดจำแนกสายบรรพบุรุษในกลุ่มเดียวกันกับวงศ์ใหญ่ Prototrupoidea และ Cynipoidea สร้างเครือข่ายความสัมพันธ์ชนิด monophyly (Sharkey, 2007) ระดับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน มีการรวบรวมข้อมูลปัจจุบันใน Hymenoptera On-line database โดย Johnson (2014) มีเพียง 1 วงศ์ได้แก่ Platygastridae ประกอบด้วย 5 วงศ์ย่อยและมีความหลากชนิดดังต่อไปนี้ Platygastrinae (45 genera, 1,745 species), Sceliotrachelinae (28 genera, 142 species), Scelioninae (155 genera, 2,571 species), Teleasinae (13 genera, 509 species), และ Telenominae (20 genera, 907 species) มีเขตการแพร่กระจายครอบคลุมทั่วโลก การศึกษาแมลงในกลุ่มนี้ เขตร้อนชื้นเป็นเขตที่ได้มีการศึกษาน้อยที่สุด (Austin *et al.*, 2005)

แตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae นับเป็นวงศ์ที่มีความสำคัญมากที่สุดใน Superfamily Platygastroidea ใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี แมลงในวงศ์ย่อยนี้มีเขตการแพร่กระจายทั่วโลกทั้ง โลกเก่าและโลกใหม่ ประกอบไปด้วย 20 สกุลและ 907 ชนิด ทั้วโลก ในประเทศไทยพบรายงานในแปลงปลูกข้าว 3 สกุล แต่ยังไม่มีการศึกษาโดยละเอียดในวงศ์ย่อยนี้ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญที่แยก Telenomine ออกจากวงศ์ย่อยอื่นคือ ปล้องท้องส่วนบน (dorsal metasomatic tergites) จับกันแบบหลวมๆ กับปล้องท้องส่วนล่าง (ventral metasomatic tergites) ดังนั้นจึงไม่สามารถเห็นส่วนของรอยกดด้านข้างลำตัว (impressed submarginal ridge) เหมือนวงศ์ย่อยอื่น ปล้องท้องปล้องที่ 2 (T2) มีขนาดใหญ่และยาวกว่าปล้องท้องอื่นๆ เพศเมียมีปล้องหนวด (antennal segments) 10 – 11 ปล้องในขณะที่เพศผู้มี 12 ปล้อง มีน้อยมากที่เพศผู้มีปล้องหนวด 11 ปล้อง (Masner, 1976)

แตนเบียนวงศ์ย่อย Telenominae เข้าทำลายไข่ของแมลงศัตรูข้าวหลายชนิด อาทิ ไข่ของมวนเขียวข้าว ผีเสื้อหนอนกอข้าว บั่วข้าว เป็นต้น ทั้งนี้แตนเบียนไข่วงศ์ย่อยนี้มีแนวโน้มที่สามารถนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในแปลงปลูกข้าวโดยชีววิธีอย่างมีประสิทธิภาพ แต่ทั้งนี้การวินิจฉัยความหลากชนิดของแมลงในกลุ่มนี้ ใน

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ส่วนใหญ่สามารถบ่งชี้ได้เพียงแค่ระดับสกุลเนื่องจากแมลงในวงศ์ย่อยนี้มีขนาดเล็กมาก ขนาดลำตัวยาวโดยประมาณ 2-3 มิลลิเมตร และลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความคล้ายคลึงกันมาก ส่งผลให้เกิดปัญหาที่เรียกว่า Cryptic species complex นั้นคือกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาไกล้เคียงกันมากจน ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยชนิดได้โดยง่าย ตัวอย่างเช่น แมลงในสกุล *Telenomus* (Haliday, 1833) การตรวจวินิจฉัยระดับชนิดจำเป็นต้องผ่าตัดท้องปล้องที่ 5–6 และวาดภาพอวัยวะสืบพันธุ์ (aedeagus) เพื่อเปรียบเทียบชนิด (Johnson, 1984) ซึ่งวิธีการเหล่านี้เป็นวิธีการที่ยุ่งยาก มีความซับซ้อนและเสียเวลา และที่สำคัญต้องอาศัยนักอนุกรมวิธานที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะในแมลงกลุ่มนี้ การใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีภาพมาช่วยยืนยันลักษณะความคลุมเครือทางสัณฐานวิทยาเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อการวินิจฉัยจำแนกชนิดที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น ทั้งนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับงานทางด้านควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีต่อไป

ดี เอ็น เอ บาร์โค้ด (DNA barcoding) เป็นแนวทางหนึ่งในการจัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต ที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง เป็นการจัดเก็บชิ้นส่วนของจีโนมและสามารถนำมาเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตที่ต้องการวินิจฉัยชนิด เหตุผลหลักของการใช้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลเพื่อช่วยในการจัดจำแนกชนิด คือ 1) มีความแม่นยำสูงในการบ่งบอกชนิดที่ถูกต้อง กล่าวคือในทางทฤษฎีแล้วหากใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่ใช้ในการตัดสินใจอย่างมากที่สุดวิเคราะห์ประเมินได้เพียง 100 ลักษณะโดยประมาณ แต่หากใช้ลักษณะความแตกต่างของลำดับเบสหรือ DNAอย่างต่ำประมาณ 500–600 ลักษณะขึ้นอยู่กับชนิดและขนาดของจีนที่ใช้ในการเปรียบเทียบ 2) ได้ฐานข้อมูลที่สำคัญ เพื่องานวิจัยทางด้านความสัมพันธ์ด้านวิวัฒนาการ ของแตนเบียนไข่สกุล Telenominae และสกุลไกล้เคียงหรือสกุลที่ต้องการศึกษา 3) ช่วยแก้ปัญหา cryptic species complex ของแตนเบียนไข่สายพันธุ์ในประเทศไทย และ 4) เป็นฐานข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลของแตนเบียนไข่ในประเทศไทย ดี เอ็น เอ บาร์โค้ดเป็นวิธีการ ที่รวดเร็วและแม่นยำ ใช้เป็นประโยชน์ในหลายด้านเช่น การอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพ, บริษัทควบคุมแมลง, การระบาดของแมลงที่ไม่ใช่แมลงท้องถิ่น (Invasive speices), การนำเข้าส่งออกสินค้าทางการเกษตร, และ ความปลอดภัยทางอาหาร (Hepert & Gregory, 2005)

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้คือ เพื่อทราบชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องของแตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae (Platygastridae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวโดยใช้ ดี เอ็น เอ บาร์โค้ด

วิธีดำเนินการ

- **อุปกรณ์**

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

8. สารเคมีในการทำแห้งตัวอย่างแมลง

9. พัดลมดูดอากาศ (Laminar Flow Clean Air Bench)

11.โรงเรือนทดลองกรณีการเลี้ยงแตนเบียน

12.กล้องจุลทรรศน์สเตริโอแบบกำลังขยายสูงสำหรับงานทางอนุกรมวิธานแมลง Leica M205 C พร้อมเลนซ์ Planapo Objective 1.0x สำหรับการถ่ายภาพเพื่อตีพิมพ์ในเอกสารวิชาการ

13.ชุดสกัด DNA (DNeasy etraction protocol for Hymenoptera) by C.D. Zhu and J.S. Noyes

14.Primer สำหรับ mitochondrial protein-coding gene cytochrome oxidase I (COI)

- วิธีการ

<u>การเก็บและรักษาตัวอย่างแตนเบียนไข่ (Taxonomic sampling and specimen vouchering)</u>

แตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae (Platygastridae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าว จะถูกเก็บด้วย 2 กรรมวิธีประกอบไปด้วย 1) การเก็บตัวอย่างแห้ง ซึ่งจะเก็บในห้องที่มีความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิต่ำ และ 2) การเก็บตัวอย่างสดเพื่องานวิจัยทางชีวโมเลกุล ทั้งนี้ใช้ 4 วิธีพื้นฐานทางกีฏวิทยาในการเก็บตัวอย่างได้แก่ สวิงโฉบแมลง Yellow Pan Trap (YPT), Malaise trap และ Slam trap. การใช้ YPT จะทำการเก็บแมลงทุกวันโดยทิ้งระยะเวลา 24 ชั่วโมงโดยวางกับดักเวลา 08:00 นาฬิกา และทำการเก็บแมลงในช่วงเช้าวันถัดไประหว่างเวลา 09:00 – 10:00 นาฬิกา และวางกับดัก Malaise trap และ Slam trap สามารถเว้นระยะเวลา 5-10 วัน นำแมลงออกจากกับดักโดยใช้ ตาข่ายความละเอียดพิเศษ (fine-mesh aquarium net) เก็บตัวอย่างใน ethanol ความเข้มข้น 95%หลังจากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รอเพื่อเตรียมตัวอย่างแห้ง และรอไว้เพื่องานวิจัยทางด้านสกัด ดี เอ็น เอ

<u>การจัดจำแนกโดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Specimens identification)</u>

แมลงที่เก็บได้จากแปลงปลูกข้าวทั้งในและนอกฤดูปลูก จะถูกจัดจำแนกในระดับอันดับ (order) โดยใช้การวินิจฉัยของ Goulet & Huber (1993) แมลงในกลุ่มเป้าหมาย Hymenoptera จะถูกแยกกลุ่มในระดับ Superfamily การจัดแบ่งในหมวด วงศ์และสกุล (Family และ genus) ดำเนินการเฉพาะในกลุ่มที่ต้องการศึกษา Platygastroidea (Platygastridae) เอกสารหลักที่ใช้ในการจัดจำแนกได้แก่ “Hymenoptera of the world: an identification guide to families” (Masner 1993) และความร่วมมือจากนักวิจัยจากประเทศแคนนาดา (CNCI:Canadian National Collection of Insects) การศึกษาภายใต้กล้อง stereo microscope ใช้โปรแกรมการถ่ายภาพ AutoMontage หรือ Cartograph extended-focus โดยใช้ JVC KY-F75U digital camera, Leica Z16 APOA โดยความร่วมมือกับพิพิธภัณฑ์แมลง สถาบันสมิธโซเนียน กรุงวอชิงตัน ดี ซี ประเทศสหรัฐอเมริกา

<u>การสกัด เพิ่มปริมาณและได้ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA extractoin, amplification, and sequencing)</u>

ทำการสกัด ดี เอ็น เอ ด้วยวิธี การสกัดเพื่อการเก็บรักษาตัวอย่าง (non-destructive DNA extraction protocol) ข้อดีของวิธีนี้คือหลังจากทำการสกัด ดี เอ็น เอ ยังสามารถเก็บตัวอย่างเพื่อใช้อ้างอิงต่อไป (voucher specimens) วิธีการสกัด ดี เอ็น เอ ชนิดนี้ ดำเนินการตามวิธีการ DNeasy extraction protocol (Qiagen Inc.) as modified for Hymenoptera by C.D. Zhu & J.S. Noyes at the British Museum of Natural

ศูนย์วิทยทรัพยากร

(unpublished) ทำการเพิ่มปริมาณ ดี เอ็น เอ โดยใช้ Primer สำหรับ mitochondrial protein-coding gene cytochrome oxidase I (COI) ได้แก่ FR-COI primer GGA GGA TTT GGA AAT TGR YTW RTT CC (F), ACT GTA AAT ATR TGA TGW GCT CA (R) (Simon *et al*., 1994) และ HCO/LCO primer TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA (F), GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G (R) (Folmer *et al*., 1994) อุณหภูมิและสภาพในการเพิ่มปริมาณ ดี เอ็น เอ (DNA amplification profile) ดำเนินการตาม Taekul *et al*. (2013) การทำให้ผลผลิต PCR บริสุทธิ์โดยการใช้ QIAquick PCR purification kit (Qiagen) protocol ก่อนส่ง sequencing ผลผลิตจากการ sequence นำมาปรับความสม่ำเสมอของลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ (both direction) โดยใช้ Sequencher v4.0.

<u>การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis)</u>

ดำเนินการตรวจสอบคุณภาพ ดีเอ็นเอ จากโปรแกรม Sequencer และ DNA-STAR หลังจากนั้นทำการจัดจัดเรียงลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (alignment) ของแต่ละชนิดโดยใช้โปรแกรม MEGA คัดเลือกตัวแทนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเหมือนกัน (100 % identical) ออกมาชนิดละ 1 เส้น หลังจากนั้นดำเนินการสร้างแผนภูมิรูปภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยมีแนวทางการสร้างแผนภูมิ 3 รูปแบบหลัก ได้แก่ 1) การวัดระยะระหว่างลำดับเบสหรือ distance method (neighbor joining) 2) การหาแผนภูมิที่เหมาะสมจาก แนวทางการสรุปค่าที่น่าเชื่อถือที่สุด (optimal criteria) หรือ parsimony .ใช้โปรแกรม TNT และ 3) การหาค่าความสัมพันธ์แผนภูมิจากอัตตราการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการโดยมี (rate of evolution) ของแต่ละลำดับเบสหรือ statistical analysis จากการศึกษาใช้วิธี Maximum likelihood โดยดำเนินการวิเคราะห์จากโปรแกรม MEGA โดยดำเนินการสุ่มจำนวน 1000 ครั้งใช้ค่า Boostrap เป็นค่าสนับสนุนในแต่ละกลุ่ม วิเคราะห์และคัดเลือกแผนภูมิที่เหมาะสมที่สุด โดยเปรียบเทียบจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ ผลจากการเทียบตัวอย่างลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ บน GenBank (standard nucleotide BLAST)

<u>การลงทะเบียนและระบบฐานข้อมูลแตนเบียนไข่ในประเทศไทย (Biodiversity Informatics)</u>

การค้นพบชื่อวิทยาศาสตร์ชนิดใหม่จะดำเนินการตีพิมพ์และขึ้นทะเบียนกับ IZCN-Zoobank (Polaszek *et al*., 2005) รวมถึงสถานที่ ที่ค้นพบ รูปแบบการเขียนตีพิมพ์ผลงานวิจัย (taxonomic description) ดำเนินการตามแบบมาตรฐานของ Pyle *et al*. (2008) และ Johnson *et al*. (2008) ตัวอย่างแมลงทั้งหมดรวมถึงตัวอย่างหลังจากการสกัด DNA (voucher specimen) จะถูกเก็บรวบรวม พร้อมทั้ง ลงบันทึกเขตการแพร่กระจาย แหล่งที่เก็บ แมลงอาศัย บันทึกในระบบฐานข้อมูลท้องถิ่น โดยการใส่บาร์โค้ด Number ของแต่ละตัวอย่าง เก็บรวมรวมตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร ส่งเข้าสู่ระบบฐานข้อมูล GenBank ในประเทศสหรัฐอเมริกา หรือฐานข้อมูลอื่นอาทิ DNA Data Bank ของประเทศญี่ปุ่น (ฐานข้อมูล เอเชีย) ฐานข้อมูล GBIF (Global Biodiversity Information Facility) ส่งเข้าสู่ระบบฐานข้อมูล EoL(Encyclopedia of Life) ส่งเข้าสู่ระบบฐานข้อมูล HOL (Hymenoptera online Database) นอกจากนี้ หลังจากตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการแล้ว ส่งลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ เพื่อเก็บลงบนฐานข้อมูล GenBank ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

- **เวลาและสถานที่**

ดำเนินการศึกษาระหว่างเดือน ตุลาคม 2559 ถึงเดือน กันยายน 2561 โดยเก็บตัวอย่างแตนเบียนไข่จากแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศได้แก่จังหวัด สุพรรณบุรี อยุธยา นครนายก ชัยนาท นนทบุรี ลพบุรี สิงห์บุรี นครราชสีมา สุรินทร์ บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี เป็นต้น โดยวางกับดักแบบถ้วยสีเหลือง (Yellow Pan Trap) โดยวางกับดักทั้งฤดูที่มีการปลูกข้าวและไม่มีการปลูกข้าว ทั้งนี้ในนอกฤดูจะทำการเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ใกล้เคียงแปลงปลูก เพื่อศึกษาถึงพืชอาศัยใกล้เคียงของแมลงศัตรูข้าว (alternative hosts) ของแตนเบียนไข่ วางกับดักผ้ามุ้ง (Malaise Trap) จำนวน 3 จุดในแต่ละพื้นที่ที่ปลูกข้าวโดยไม่ใช้สารเคมีควบคุมศัตรูพืชดังต่อไปนี้

- แปลงปลูกข้าวอินทรีย์ สวนเฉลิมพระเกียรติ กรมวิชาการเกษตร
- แปลงปลูกข้าวเพื่อพยากรณ์การระบาด ศูนย์วิจัยข้าวชัยนาท กรมการข้าว
- แปลงปลูกข้าวอินทรีย์ ศูนย์วิจัยข้าวปราจีนบุรี กรมการข้าว

การบันทึกข้อมูล

หลังจากเก็บตัวอย่างทำการบันทึกข้อมูลรายละเอียดแต่ละตัวอย่างที่เก็บตาม ISPM No.6 (FAO, 2006b) ได้แก่ แหล่งที่เก็บ พิกัดทางภูมิศาสตร์ พืชอาศัย วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง เทคนิคการเก็บตัวอย่าง ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง เป็นต้น การลงทะเบียนและระบบฐานข้อมูลแตนเบียนในประเทศไทย หากมีการค้นพบชื่อวิทยาศาสตร์ชนิดใหม่ ดำเนินการตีพิมพ์และขึ้นทะเบียนกับ IZCN-Zoobank (Polaszek et al. 2005) รวมถึงสถานที่ ที่ค้นพบรูปแบบการเขียนตีพิมพ์ผลงานวิจัย (taxonomic description) ดำเนินการตามแบบมาตรฐานของ Pyle *et al*. (2008) และ Johnson *et al*. (2008) เก็บรักษาตัวอย่างแมลงทั้งตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง ณ พิพิธภัณฑ์แมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การบันทึกข้อมูลในระบบ BOLD (Barcode of Life Data System) ดำเนินการส่งข้อมูล (upload) ในฐานข้อมูล BOLDsystem (www.boldsystems.org) โดยตัวอย่างแต่ละชนิดมีรายละเอียดประกอบด้วย ภาพถ่ายตัวอย่าง ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ แหล่งที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บตัวอย่าง พิกัดภูมศาสตร์ เทคนิคการเก็บตัวอย่าง ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ ดี เอ็น เอ เป็นต้น

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

วงศ์ย่อย Telenominae Thomson, 1860

Telenomini Thomson, 1860: 169. *Original description*, key to genera of Sweden.

Synonyms: Telenomeinae, Telenomides Thomson, Telenomini Thomson, Telenominiens Thomson

การวินิจฉัยทางสัณฐานวิทยา (Diagnosis) แตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae มีความแตกจากวงศ์ย่อยอื่นในวงศ์ Platygastridae จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญซึ่งใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัย คือ ปล้องท้องด้านข้าง (laterotergites) ติดกับปล้องท้องด้านบนแบบหลวมๆ ไม่แน่น บางครั้งสามารถเห็นแผ่นใสของปล้องท้องด้านข้างได้ชัดเจน ไม่มีแกนแข็งด้านข้าง (submarginal ridge) เหมือนกับวงศ์ย่อยอื่นๆ ปล้องท้องปล้องที่ 2 มี

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ขนาดใหญ่ที่สุด เพศเมียมีปล้องหนวดทั้งหมด 11 ปล้อง บางครั้งอาจพบ 10 ปล้องแต่มีโอกาศน้อยมาก ส่วนเพศผู้มีปล้องหนวด 12 ปล้อง

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่วงศ์ย่อยนี้มีร่วมกันได้แก่ ส่วนหัวมีขนาดเล็กกว่าส่วนอก รูปร่างของส่วนหัวเมื่อมองจากด้านบน (dorsal view) มีลักษณะแคบตามแนวขวาง (transverse) มีร่องลึกบนโหนกแก้ม (malar sulcus) เริ่มจากบริเวณด้านหลังของตารวมยกเว้นสกุล *Phanuromyia* ซึ่งร่องลึกนี้เริ่มจากบริเวณใต้ตารวม ในบางสกุลเช่น *Psix* และ *Paratelenomus* มีเส้นนูนพาดผ่านกลางใบหน้า (central keel) ลักษณะผนังลำตัวส่วนหน้าบริเวณใต้ตาเหนือส่วนปาก (frontal sculpture) มีลักษณะเรียบและบางครั้งสะท้อนแสง (smooth throughout) ไม่มีเส้นนูนพาดตามขวาง (frontal transverse carinae) สกุลส่วนใหญ่มีขนในตารวม ส่วนปลายของกราม (mandibles) มี 2 แฉก (bidentate) ผนังลำตัวบริเวณพื้นที่ด้านหลังของหัวกะโหลก (occiput) มีลักษณะเป็นหลุมเล็กๆ (punctate) กระจายตัวสม่ำเสมอ มีเส้นนูนแข็งด้านหลังของหัวกะโหลก (hyperoccipital carina) หัวกะโหลกมีลักษณะโค้งมนเว้าตามแนว mesosoma ตาเดี่ยวด้านข้างทั้ง 2 ข้าง (lateral ocelli) ตั้งอยู่ใกล้หรือเกือบติดกับขอบด้านในของตารวม เพศเมียมีหนวดจำนวน 3 และ 4 ปล้องที่รวมตัวกันแน่นมีรูปร่างเป็นกระบอง (clavomere) การจัดเรียงของต่อมรับรู้กลิ่นหรือฮอร์โมนที่พืชปลดปล่อยในเพศเมีย (claval formula) ได้แก่ A11-A8/1-2-2-2; A11-A9/1-2-2 เพศผู้มีปล้องหนวด 12 ปล้อง รูปร่างโดยทั่วไปของส่วนอกมีลักษณะนูนทั้งด้านบนและด้านข้าง ขอบด้านหลังของอกปล้องที่ 3 มีลักษณะโค้งมน ไม่มีเส้นขอบด้านข้าง (parapsidal line) บริเวณอกปล้องที่สองด้านบน (dorsal mesoscutum) มีพื้นที่บนส่วนผนังลำตัวรูปร่างคล้ายกระสวยทอผ้า (netrion) บริเวณด้านข้างของอก (lateral mesosoma) บนปีกคู่หน้าไม่มีเส้นปีก basal vein (Rs+M) เส้นปีก M เส้นปีก Rs พบเส้นปีก marginal vein (R) บนปีกคู่หน้าค่อนข้างสั้นเกือบเท่ากับเส้นปีก stigmalis (r-rs) หรือในบางสกุลสั้นกว่า มีเส้นปีก postmarginal vein (R1) ส่วนบนปีกคู่หลังมีเส้นปีก submarginal vein (R) ท้องมีรูปร่างเรียวยาว ไม่มีลักษณะนูนโหนกคล้ายเขา (horn) บริเวณฐานของท้องปล้องที่ 1 ท้องปล้องที่ 2 ยาวกว่าท้องปล้องที่ 3 อย่างชัดเจน ไม่มีหลุมบริเวณด้านข้างของท้องปล้องที่ 1 ไม่มีแนวร่องลึก (antecostal sulcus) อยู่ด้านบนของท้องปล้องที่ 2 และ 3 ระบบอวัยวะวางไข่ในเพศเมียเป็นแบบ Ceratobaeus-type (Austin & Field 1997)

แตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae มีเขตการแพร่กระจายครอบคลุมทั่วโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งพบความหลากชนิดสูงในเขตร้อนชื้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งทวีปแอฟริกาและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แตนเบียนไข่ในวงศ์ย่อยนี้จัดเป็นกลุ่มที่มีศักยภาพสูงในการเบียนและสามารถนำมาใช้ในการควบคุมศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ แตนเบียนไข่หลายชนิดในวงศ์ย่อยนี้มีความสัมพันธ์ในแง่การเข้าทำลายเหยื่อ พบว่าสามารถเบียนไข่ของแมลงได้หลายกลุ่ม ประกอบด้วยอันดับ Lepidoptera, Diptera, Neuroptera และอันดับย่อย Heteroptera และ Auchenorrhyncha ซึ่งอยู่ในอันดับ Hemiptera (Bin & Johnson, 1982; Johnson, 1984) แตนเบียนไข่ส่วนใหญ่ในวงศ์ย่อย Telenominae มีความสามารถในการตามหาไข่ของแมลงศัตรูจากสารเคมีที่ผลิตจากตัวเต็มวัยของแมลงอาศัยหรือในบางกรณีเป็นสารเคมีที่ผลิตจากพืชที่ตัวเต็มวัยของแมลงอาศัยเข้าทำลายหรือวางไข่บนพืชอาหารนั้นๆ (Colazza *et al*., 2009; Moraes *et al*., 2009; Conti *et al*., 2010; Arakaki *et al*., 2011; Peñaflor *et al*., 2011) ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานว่า แตนเบียนไข่ชนิดเดียวกันมีความสามารถเข้าทำลายเหยื่อได้ใน

หลายอันดับ พบแตนเบียนไข่วงศ์ย่อยนี้ในแปลงปลูกข้าวอินทรีย์ เป็นจำนวนมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะข้าวแตกกอ ผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ถึงปริมาณศัตรูข้าวในขณะนั้นว่ามีอยู่หลายชนิด ซึ่งมีแนวโน้มในการใช้แตนเบียนในวงย่อยนี้ วิจัยและพัฒนาเพื่อใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูข้าวโดยชีววิธีต่อไป

การวินิจฉัยชนิดจากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ดำเนินการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ จากแนวทางการสร้างแผนภูมิสามรูปแบบหลัก ได้แก่ 1) การวัดระยะระหว่างลำดับเบสหรือ distance method ใช้โปรแกรม neighbor joining 2) การหาแผนภูมิที่เหมาะสมจากแนวทางการสรุปค่าที่น่าเชื่อถือที่สุด (optimal criteria) หรือ parsimony .ใช้โปรแกรม MEGA และ 3) การหาค่าความสัมพันธ์แผนภูมิจากอัตตราการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการโดยมี (rate of evolution) ของแต่ละลำดับเบสหรือ statistical analysis จากการศึกษาใช้วิธี Maximum likelihood โดยดำเนินการวิเคราะห์จากโปรแกรม MEGA โดยดำเนินการสุ่มจำนวน 1000 ครั้งใช้ค่า Boostrap เป็นค่าสำหรับวัดค่าความน่าเชื่อถือในแต่ละแขนงของแผนภูมิ ได้แผนภูมิสรุป (consensus trees) ของแต่ละรูปแบบ พบว่ารูปแบบที่ให้ค่าเหมาะสมหลังจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชนิดจากลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ บน GenBank โดยวิธี Standard Nucleotide BLAST ซึ่งได้ผลการทดลองตาม ตารางที่ 1 พบชนิดที่สามารถวิเคราะห์ได้ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ แผนภูมิทางวิวัฒนาการจำนวนทั้งสิ้น 16 ชนิดได้แก่ *Gryon largi, Gryon saxatilis, Psix tunetanus, Psix watshami, Telenomus busseolae, Telenomus californicus, Telenomus crassiclava, Telenomus dignus, Telenomus floridanus, Telenomus grenadensis, Telenomus nysivorus, Telenomus podisi, Telenomus tabanivorus, Trissolcus basalis, Trissolcus ogyges* และ *Trissolcus thyantae* (Table 3.6.1) จากแผนภูมิรูปภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่า แตนเบียนไข่สกุล *Gryon* และ *Psix* แยกออกมาจากแตนเบียนไข่ *Telenomus* spp. และ *Trissolcus* spp. อย่างชัดเจนซึ่งมีค่า Boostrap support สนับสนุนถึง 100 ถึงแม่แตนเบียนกลุ่ม Psix อยู่ในวงศ์ย่อย Telenominae แต่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างจากวงศ์ย่อยนี้อย่างชัดเจนคือ ลักษณะของเส้นนูนตรงกลางในหน้า ริมฝีปากบนและแผ่นแข็งด้านบน (clypeus) เชื่อมติดกันเป็นเนื้อเดียว รวมถึงมีแถบลายเส้นด้านข้างแก้มรูปใบพัด (fan-like striae) ติดกับส่วนฐานของกราม ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่แยกสกุลนี้ออกจากสกุลอื่นในวงศ์ย่อย Telenominae แตนเบียนไข่สกุล *Psix* มีลักษณะโครงสร้างภายนอกคล้ายคลึงกับแตนเบียนไข่ในสกุล *Paratelenomus* แต่สามารถวินิจฉัยแยกออกมาจากสกุลดังกล่าวโดยลักษณะของ เส้นนูน (central keel) 2 เส้นล้อมรอบฐานหนวด (antennal insertion) มาบรรจบกันและพาดผ่านกลางใบหน้า และหยุดด้านหน้าตาเดี่ยวที่อยู่ตรงกลาง (medial occelus) ไม่สร้างเป็นรูปตัว Y เหมือนในสกุล *Paratelenomus* ฐานของขาปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 อยู่ชิดติดกัน มีลวดลายของหลุม (mesosoma sulcus) หนาแน่นบริเวณด้านข้างของผนังลำตัวส่วนอกปล้องกลาง ส่วนแตนเบียนไข่สกุล *Gryon* แยกออกมาจากกลุ่มต่างๆ ได้จากปล้องท้องด้านข้าง (laterotergites) ติดกับปล้องท้องด้านบนแบบแน่น สามารถเห็นแกนแข็งด้านข้างอย่างชัดเจน (submarginal ridge) ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังกล่าวสอดคล้องกันกับแผนภูมิรูปภาพทางวิวัฒนาการ (Figure 3.6.1)

จากผลการทดลองแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแตนเบียนไข่สกุล *Telenomus* และสกุล *Trissolcus* (in group) แยกตัวออกมาอย่างชัดเจนจาก outgroup ยกเว้นแตนเบียน ไข่สกุล *Psix* ซึ่งมีลักษณะ

ลิขสิทธิ์การเกษตร

พิเศษพิเศษเฉพาะกลุ่มอยู่แล้ว การแยกตัวออกมาเกิดเป็นกลุ่มที่มีวิวัฒนาการร่วมกัน (monophyletic) ของแตนเบียนไข่ 2 สกุลนี้สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาคือ คือ ปล้องท้องด้านข้าง (laterotergites) ติดกับปล้องท้องด้านบนแบบหลวมๆ ไม่แน่น บางครั้งสามารถเห็นแผ่นใสของปล้องท้องด้านข้างได้ชัดเจน ไม่มีแกนแข็งด้านข้าง (submarginal ridge) นอกจากนี้แล้วแตนเบียนไข่ในสกุล *Telenomus* ยังมีการจัดกลุ่มกันเป็นแบบ monophyletic ถึง 2 กลุ่มใหญ่โดยมีค่าสนับสนุน (Boostrap support) ที่ค่อนข้างสูงซึ่งสนับสนุนโดยหลักฐานทางสัณฐานวิทยาคือ ลักษณะผนังลำตัวส่วนหน้าบริเวณใต้ตาเหนือส่วนปาก (frontal sculpture) มีลักษณะเรียบและบางครั้งสะท้อนแสง (smooth throughout) มีขนในตารวมส่วนใหญ่อยู่อย่างหนาแน่น เพศเมียมีหนวดจำนวน 3 และ 4 ปล้องที่รวมตัวกันแน่นมีรูปร่างเป็นกระบอง (clavomere)

แตนเบียนไข่สกุล *Telenomus* เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญทางการเกษตร และมีแนวโน้มในการนำมาวิจัยพัฒนาเพื่อการควบคุมแมลงศัตรูข้าวโดยชีววิธี แตนเบียนไข่สกุลนี้มีความหลากชนิดสูง จากรายงานในปัจจุบันมี 625 ชนิด (Johnson, 2019) มีเขตการแพร่กระจายทั่วโลกโดยเฉพาะเขตร้อนชื้น Telenomus สามารถเบียนไข่ของแมลงศัตรูข้าวได้หลายอันดับ ได้แก่ แมลงกลุ่มเพลี้ยจักจั่นในอันดับ Hemiptera แมลงในกลุ่มมวนในหลายวงศ์เช่น Pentatomidae, Miridae, Scutelleridae, Reduviidae และแมลงที่อาศัยอยู่ในน้ำทั้งกลุ่มมวนและกลุ่มด้วง สามารถเข้าทำลายไข่ของแมลงในกลุ่มผีเสื้ออันดับ Lepidoptera มีการพบเข้าทำลายไข่ของหนอนกอข้าว อย่างไรก็ตาม มีการจัดแบ่งชนิดของแตนเบียนไข่ในสกุล *Telenomus* ออกเป็นกลุ่มชนิด (species group) คือในแต่ละกลุ่มประกอบด้วยหลายชนิด ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนชนิดที่สูง แมลงมีขนาดเล็กยากต่อการวินิจฉัย และลักษณะทางสัณฐานวิทยาส่วนใหญ่ลดรูปแสดงออกไม่ชัดเจน (apomorphic character) จากการทดลองพบแตนเบียนไข่สกุล *Telenomus* จำนวน 9 ชนิดได้แก่ *Telenomus busseolae, Telenomus californicus, Telenomus crassiclava, Telenomus dignus, Telenomus floridanus, Telenomus grenadensis, Telenomus nysivorus, Telenomus podisi* และ *Telenomus tabanivorus* ซึ่งแตนเบียนไข่เหล่านี้เข้าทำลายไข่ของแมลงศัตรูพืชในกลุ่มผีเสื้อโดยเฉพาะผีเสื้อหนอนกอข้าว ซึ่งกลุ่มแตนเบียนเหล่านี้ควรนำศึกษาถึงความหนาแน่นของประชากรในแต่ละแหล่งปลูกข้าว ประสิทธิภาพและศักยภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช เพื่อการนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูข้าว หรือหาแนวทางการอนุรักษ์ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวต่อไป

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการเก็บแตนเบียนไข่จากแปลงปลูกข้าวที่สำคัญทางเศรษฐกิจ สกัดและเพิ่มปริมาณ ดี เอ็น เอ วิเคราะห์ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ โดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและนำมาร่วมวิเคราะห์ชนิดของแตนเบียนไข่ร่วมกับ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลจากการเทียบลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ บน GenBank (standard nucleotide BLAST) ผลการทดลองพบว่าได้แตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae ทั้งสิ้น 16 ชนิดได้แก่ *Gryon largi, Gryon saxatilis, Psix tunetanus, Psix watshami, Telenomus busseolae, Telenomus californicus, Telenomus crassiclava, Telenomus dignus, Telenomus floridanus, Telenomus grenadensis, Telenomus nysivorus, Telenomus podisi, Telenomus tabanivorus, Trissolcus basalis, Trissolcus ogyges* และ *Trissolcus thyantae* ได้เสนอแนะให้ใช้แตนเบียนไข่ *Telenomus* spp. ซึ่งเป็นกลุ่ม

ชนิดที่มีความสำคัญที่สุด ควรนำมาศึกษาพัฒนาเพื่อใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูข้าว หรือหาแนวทางการอนุรักษ์ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถนำเทคนิคและสภาพที่เหมาะสมในการสกัดและเพิ่มปริมาณ ดี เอ็น เอ ของแตนเบียนในวงศ์ย่อย Telenominae รวมถึงเทคนิคในการสกัด ดี เอ็น เอ โดยสามารถเก็บรักษาตัวอย่าง (non-distructive DNA extraction protocol) ไปพัฒนาใช้ร่วมกับแมลงชนิดอื่น สามารถศึกษาเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ในแตนเบียนในวงศ์ย่อยเดียวกัน รวมถึงสามารถศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างแตนเบียนวงศ์ย่อย Telenominae กับแมลงชนิดอื่น (phylogenetic study) นอกจากนี้สามารถช่วยแก้ปัญหาความเหมือนและความต่างของลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ในแตนเบียนชนิดเดียวกันหรือชนิดที่ใกล้เคียงกัน กรณีการเกิด cryptic species นักวิชาการ เกษตรกร หรือนักวิจัยที่เกี่ยวข้อง สามารถตรวจวินิจฉัยชนิดของแตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae ได้โดยตรงจากฐานข้อมูลระบบออนไลน์ GenBank หรือ BOLD (Barcode of Life Data Systems) โดยศึกษาเปรียบเทียบตัวอย่างที่ได้ กับภาพโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ ที่สกัดได้ เกิดความสะดวกรวดเร็วทั้งในการประยุกต์พัฒนางานวิจัย เพื่อควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีหรือการอนุรักษ์ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวในอนาคต

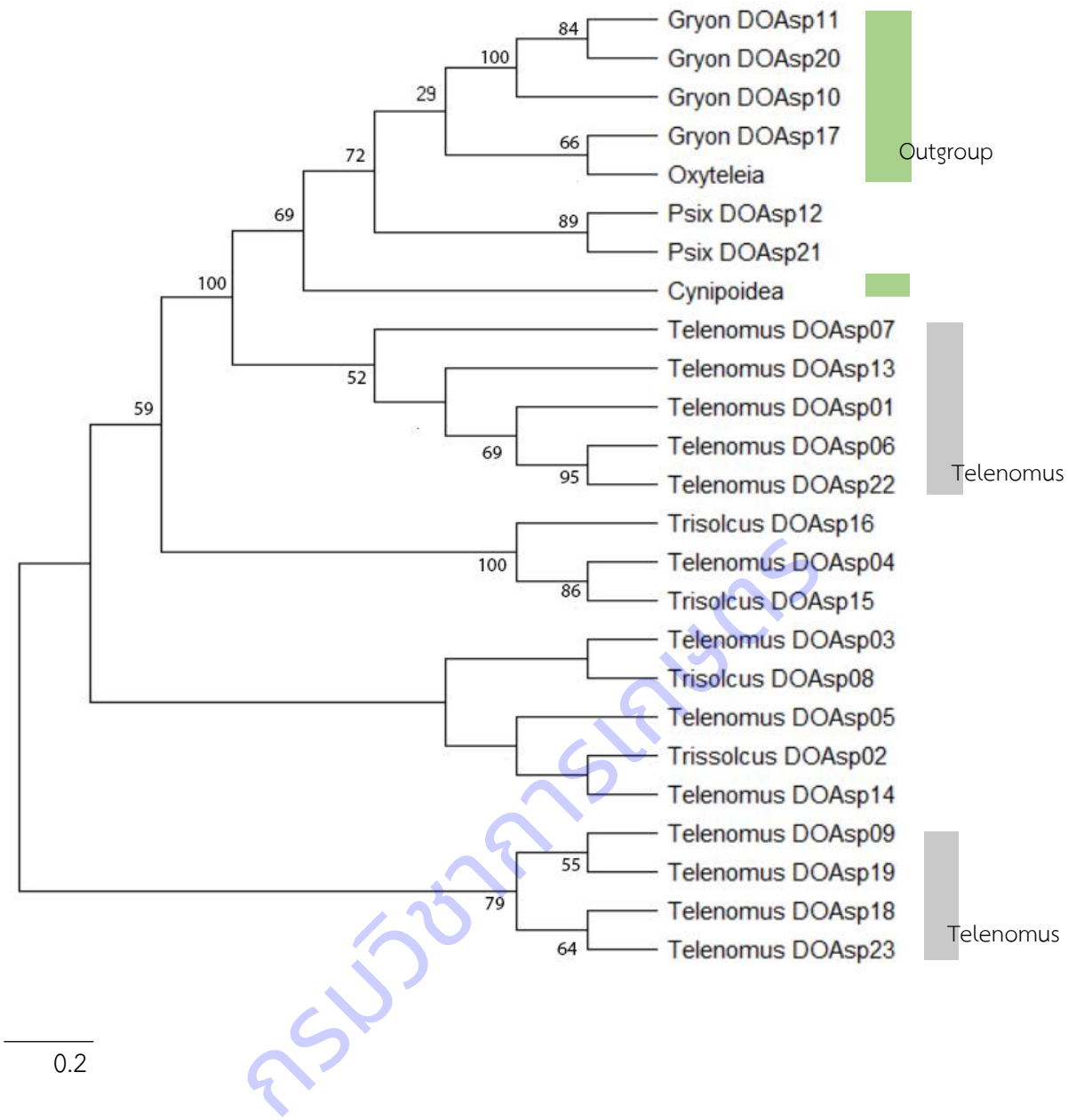
กรมวิชาการเกษตร

Table 3.6.1. List of taxa in relation to reference codes, collected localities, species identifications executed via standard nucleotide BLAST and phylogenetic analysis

Ref. code	Collected locality	Lists of taxa from NCBI (% identities)	Lists of taxa via phylogenetic analysis and morphological study
Telenomus_DOAsp01	14°10'47.13"N 100°17'30.71"E Phra Nakhon Si Ayutthaya	*Telenomus crassiclava* 100 %	*Telenomus crassiclava*
Trissolcus_DOAsp02	15°11’46.19”N100°08’10.20’’E Chainat	*Trissolcus ogyges* 90%	*Trissolcus ogyges*
Telenomus_DOAsp03	15°11’46.19”N100°08’10.20’’E Chainat	*Telenomus podisi* 87%	*Telenomus podisi*
Telenomus_DOAsp04	13°59’43.10”N101°13’18.3”E Prachin Buri.	*Telenomus nysivorus* 86%	*Telenomus nysivorus*
Telenomus_DOAsp05	15°11’46.19”N100°08’10.20’’E Chainat	*Telenomus podisi* 90%	*Telenomus podisi*
Telenomus_DOAsp06	13°59’43.10”N101°13’18.3”E Prachin Buri.	*Telenomus* sp. 100%	*Telenomus floridanus*
Telenomus_DOAsp07	14°10'47.13"N 100°17'30.71"E Phra Nakhon Si Ayutthaya	*Telenomus* sp. 91%	*Telenomus floridanus*
Trissolcus_DOAsp08	15°11’46.19”N100°08’10.20’’E Chainat	*Trissolcus thyantae* 100%	*Trissolcus thyantae*
Telenomus_DOAsp09	13°51’13.80”N100°34’28.20”E Bangkok	*Telenomus busseolae* 90%	*Telenomus busseolae*
Gryon_DOAsp10	13°59’43.10”N101°13’18.3”E Prachin Buri.	*Gryon largi* 90%	*Gryon largi*
Gryon_DOAsp11	13°51’13.80”N100°34’28.20”E Bangkok	*Gryon largi* 86%	*Gryon largi*
Psix_DOAsp12	13°51’13.80”N100°34’28.20”E Bangkok	*Psix tunetanus* 100%	*Psix tunetanus*
Telenomus_DOAsp13	13°59’43.10”N101°13’18.3” E Prachin Buri	*Telenomus* sp. 100%	*Telenomus crassiclava*
Telenomus_DOAsp14	15°11’46.19”N100°08’10.20’’E Chainat	*Telenomus grenadensis* 99%	*Telenomus grenadensis*
Trisolcus_DOAsp15	15°11’46.19”N100°08’10.20’’E Chainat	*Trissolcus basalis* 85%	*Trissolcus basalis s*
Trisolcus_DOAsp16	13°59’43.10”N101°13’18.3” E Prachin Buri	*Trissolcus* sp. 100%	*Trissolcus basalis*
Gryon_DOAsp17	14°10'47.13"N 100°17'30.71"E Phra Nakhon Si Ayutthaya	*Gryon saxatilis*. 85%	*Gryon saxatilis.*

Telenomus_DOAsp18	13°59’43.10”N101°13’18.3”E Prachin Buri.	*Telenomus dignus* 91%	*Telenomus dignus*
Telenomus_DOAsp19	13°59’43.10”N101°13’18.3”E Prachin Buri.	*Telenomus* 100%	*Telenomus californicus*
Gryon_DOAsp20	13°59’43.10”N101°13’18.3”E Prachin Buri.	*Gryon* sp 100%	*Gryon largi*
Psix_DOAsp21	15°11’46.19”N100°08’10.20’’E Chainat	*Psix watshami* 87%	*Psix watshami*
Telenomus_DOAsp22	13°51’13.80”N100°34’28.20”E Bangkok	*Telenomus* sp 100%	*Telenomus floridanus*
Telenomus_DOAsp23	15°11’46.19”N100°08’10.20’’E Chainat	*Telenomus* sp 89%	*Telenomus tabanivorus*
Cynipoidea sp. (out group)	13°59’43.10”N101°13’18.3”E Prachin Buri.	*Cynipoidea* sp. 100%	*Cynipoidea* sp.
Oxyteleia sp. (out group)	13°59’43.10”N101°13’18.3”E Prachin Buri.	*Oxyteliea* sp. 100%	*Cynipoidea* sp.

กรมวิชาการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.6.1 Relationships of the selected taxa of the subfamily Telenominae derived from Maximum likelihood analysis of partial cytochrome oxidase subunit 1 (CO1) gene (~ 600 bp), executed on MEGA (1000 standard bootstrap replicates) with Jukes-Cantor model, uniform rates using all codon positions. Bootstrap values above 50% indicated on branches.

การทดลองที่ 3.7 ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกชนิดแมงมุมแม่ม่ายสกุล Latrodectus ในประเทศไทย

DNA Barcoding for Identification Spider Fauna in genus *Latrodectus* in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาววิมลวรรณ โชติวงศ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นายคมสัน หงภัทรคีรี	ศูนย์ศึกษาเรียนรู้ระบบนิเวศป่าชายเลนสิรินาถราชินี
	นางสาวยุวรินทร์ บุญทบ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นายพิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

แมงมุมสกุล *Latrodectus* หรือแมงมุมแม่ม่าย (widow spider) เป็นแมงมุมที่มีความสำคัญทางด้านสาธารณสุขเนื่องจากเป็นกลุ่มแมงมุมที่มีพิษต่อระบบประสาทและพบในแปลงปลูกมันสำปะหลังซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกได้ทุกภาค จึงอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อเกษตรกร แมงมุมกลุ่มนี้มีลักษณะโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ตลอดจนสีสันบนลำตัวที่คล้ายกันหรือเหมือนกัน ทำให้ยากต่อการจำแนกชนิดแมงมุมโดยวิธีสัณฐานวิทยา ดังนั้นการใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดช่วยในการวินิจฉัยชนิด ทำให้ได้ผลที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือ การใช้ลักษณะทางพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอบาร์โค้ด จำแนกและยืนยันชนิดแมงมุมสกุล *Latrodectus* โดยเก็บตัวอย่างแมงมุมแม่ม่ายจากทุกภูมิภาคของประเทศไทย และสกัด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง COX1 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบบนฐานข้อมูล 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 ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าแมงมุมแม่ม่าย *L. geometricus* มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากกลุ่ม *L. thoracicus* และ *L. tredecimguttatus* อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถทราบข้อมูลเบื้องต้นของจำนวนชนิดของ แมงมุมสกุล *Latrodectus* ในประเทศไทย แต่การจำแนกชนิด ต้องมีการศึกษาต่อไปโดยเพิ่มข้อมูลของยีนตำแหน่งอื่นมาร่วมวิเคราะห์

คำหลัก: *Latrodectus* แมงมุมแม่ม่าย widow spider ดีเอ็นเอบาร์โค้ด พันธุกรรม

กรมวิชาการเกษตร

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 (*COX*1) 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 *COX*1 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* 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

คำนำ

แมงมุมสกุล *Latrodectus* หรือแมงมุมแม่ม่าย (widow spider) จัดอยู่ในวงศ์ Theridiidae นับว่าเป็นแมงมุมที่มีความสำคัญทางด้านสาธารณสุขเนื่องจากเป็นกลุ่มแมงมุมที่มีพิษ พิษของแมงมุมแม่ม่ายมีชื่อเรียกเฉพาะว่า Latrotoxin มีผลหลักต่อระบบประสาท (neurotoxin) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยพิษจะทำให้เกิดช่องว่างบริเวณปลายเซลล์ประสาท ส่งผลให้แคลเซียมไอออน (Ca2+) ไหลเข้าสู่ปลายเซลล์ประสาทซึ่งเป็นกลไกให้เกิดการปล่อยสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ตลอดเวลา ทำให้เกิดการส่งกระแสประสาทอย่างต่อเนื่องและมากกว่าปกติ ทำให้กล้ามเนื้อเกร็งจนเป็นอัมพาต ซึ่งสาเหตุการเสียชีวิตเกิดจากกล้ามเนื้อกระบังลมและกล้ามเนื้อ

ศรีนครินทรวิโรฒ

หัวใจหยุดทำงาน (Cristopher *et.al*., 2004; Shukla and Broome, 2007) แมงมุมแม่ม่ายเป็นกลุ่มแมงมุมที่มีการแพร่กระจายกว้างขวางทั่วโลก พบได้ทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่นทั้งบริเวณที่เป็นแผ่นดินใหญ่ และเกาะในมหาสมุทร (Shukla & Broome, 2007) หลายชนิดแพร่กระจายจากการติดไปกับการขนส่งสินค้าของมนุษย์ และส่วนใหญ่มักพบอาศัยอยู่ในแหล่งชุมชน ปัจจุบันทั่วโลกพบทั้งสิ้น 31 ชนิด (Platnick, 2014) โดยในทวีปเอเชียมีรายงานการพบ 4 ชนิด คือ *L. geometricus, L. erythromelas, L. hasselti และ L. elegans* (Schmidt & Klaas, 1991; Knoflach & 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 & van Harten, 2002) และบทความวิชาการในวารสารสารศิริราชปีที่ 32 ฉบับที่ 11 ซึ่งตีพิมพ์ในปี พ.ศ. 2523 รายงานว่ามีผู้ป่วยถูกแมงมุมกัดที่จังหวัดขอนแก่น และคาดว่าเป็นชนิด *L. curacaviensis* (Sucharit, 1980) แต่การวินิจฉัยและจำแนกชนิดของแมงมุมไม่มีความถูกต้องตามหลักอนุกรมวิธานแมงมุมเนื่องจากในบทความดังกล่าวกล่าวถึงแมงมุมที่มีลักษณะตัวสีน้ำตาลและมีขนบนลำตัวจำนวนมาก อาศัยอยู่บนพื้นดินและใช้เพียงความยาวของเขี้ยว (chericera) ในการจำแนกชนิดแมงมุม แต่ลักษณะดังกล่าวแตกต่างจากลักษณะของแมงมุมแม่ม่ายอย่างสิ้นเชิงโดยแมงมุมแม่ม่ายสีน้ำตาลไม่มีขนบนลำตัวจำนวนมากและไม่ได้อาศัยอยู่บนพื้น และที่สำคัญความยาวของเขี้ยว (chericera) ไม่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของแมงมุมได้ อย่างไรก็ตามเอกสารเหล่านี้ไม่ได้รายงานการพบแมงมุมแม่ม่ายอย่างเป็นทางการในประเทศไทย รวมถึงไม่มีตัวอย่างแมงมุมที่ใช้เป็นหลักฐานในการตรวจสอบเพื่อยืนยันชนิดดังนั้นข้อมูลดังกล่าวจึงไม่สามารถนำมาอ้างอิงหรือใช้ประโยชน์ได้

แมงมุมแม่ม่ายสกุล *Latrodectus* ได้แยกสายวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษร่วมกัน (monophyletic group) เพียงไม่กี่กลุ่ม โดยแบ่งเป็นสายวิวัฒนาการสองกลุ่มหลักๆ คือ กลุ่มสายวิวัฒนาการของแมงมุมแม่ม่ายดำ (*Latrodectus mactans* clade) และกลุ่มสายวิวัฒนาการของแมงมุมแม่ม่ายสีน้ำตาล (*Latrodectus geometricus* clade) นอกจากนี้ยังมีอีกหลายชนิดที่ยังหาข้อสรุปไม่ได้ โดยในแต่ละกลุ่มสายวิวัฒนาการจะมีลักษณะโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ตลอดจนสีสันบนลำตัวที่คล้ายกันหรือเหมือนกัน และหลายชนิดในกลุ่มเดียวกันยังสามารถผสมพันธุ์ข้ามชนิดกันและให้ลูกที่ไม่เป็นหมันได้ ทำให้เกิดปัญหาในการจำแนกทางอนุกรมวิธานของแมงมุมกลุ่มนี้เนื่องจากเป็นกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (complex species) (Garb *et al.* 2004)

การจำแนกชนิดแมงมุมโดยใช้วิธีสัณฐานวิทยานั้นจะศึกษาแมงมุมระยะที่เป็นตัวเต็มวัยเท่านั้นและมักใช้เวลานาน ส่วนมากแมงมุมที่พบมักจะอยู่ในระยะตัวอ่อนทำให้มีปัญหาในการจำแนกเนื่องจากอวัยวะเพศยังพัฒนาการไม่สมบูรณ์ทำให้วินิจฉัยชนิดผิด และแมงมุมบางกลุ่มจะมีลักษณะที่ตัวผู้และตัวเมียมีขนาดรูปร่างที่แตกต่างกันทำให้ขาดข้อมูลในการวินิจฉัยชนิด ซึ่ง Platnick (2009) รายงานว่า ตัวอย่างแมงมุมที่ได้จากการจัดจำแนก 46% พบเพียงแค่เพศเดียวเท่านั้น และอีก 1.5% เป็นแมงมุมที่อยู่ในระยะตัวอ่อนโดยอาจจะเป็นแมงมุมที่เป็นชนิดใหม่ (new species) แต่การจำแนกโดยใช้ DNA barcoding สามารถการจำแนกชนิดแมงมุมในระยะตัวอ่อนได้ด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ดังนั้นการใช้ DNA Barcoding จึงเป็นงานวิจัยพื้นฐานที่สำคัญ ทำให้ทราบถึงชนิดและเขตการแพร่กระจายของแมงมุมที่เป็นข้อมูลล่าสุดที่มีความถูกต้องและทันสมัย อีกทั้งยังเป็นข้อมูลที่ต่างประเทศยอมรับกันทั่วโลก นอกจากนี้ยังเป็นการรวบรวมและเก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุมของกรมวิชาการเกษตร เพื่อใช้เป็นแหล่งอ้างอิง สืบค้น ตามหลักมาตรฐานสากล

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

- อุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง หลอดแก้วทดลอง ขวดดองตัวอย่างแมงมุมขนาดต่างๆ กัน กล่องพลาสติกใสขนาดต่างๆ กัน กระดาษทิชชู่ ปากคีบ พู่กัน ถุงพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ กัน 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), $MgCl_2$, RNase A (0.5g/ml) และ Protinase K Solution (0.3g/ml)

- สารเคมี และ primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

- วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง (ดำเนินการปี 2560-2562)

วิธีดำเนินการวิจัยในการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนและตัวเต็มวัยแมงมุมแม่ม่ายเพื่อนำมาศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

1.1 การศึกษาครั้งนี้มีแผนการปฏิบัติการเก็บตัวอย่างแมงมุมแม่ม่ายตามใต้โต๊ะ เก้าอี้ ใต้พื้นรถยนต์ แปลงมันสำปะหลัง และขอบชายป่า ทั้งช่วงเวลากลางวันและกลางคืนโดยสังเกตใยที่ใช้ในการดักเหยื่อ 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 พื้นที่ต่างๆ ดังนี้

(1) แปลงผลไม้ พืชไร่

(2) โกดังสินค้า

(3) พื้นที่ป่าธรรมชาติ เช่น สวนพฤกษศาสตร์ อุทยานแห่งชาติ

รายละเอียดจังหวัดที่เป็นตัวแทนพื้นที่ที่ต้องการไปเก็บตัวอย่างแมงมุมแม่ม่าย

ศรีวิชาการเกษตร

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

(3) ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดสระแก้ว ปราจีนบุรี ชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด

(4) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัด นครราชสีมา ขอนแก่น เลย หนองคาย หนองบัวลำภู

ปี 2562 สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจาก 2 ภาคดังนี้

(1) ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัด เพชรบูรณ์ พิษณุโลก น่าน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน แพร่ ลำปาง และลำพูน

(2) ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พังงา พัทลุง ตรัง และสงขลา

1.2 นำตัวอย่างที่ได้มาฆ่าด้วยขวดน็อคแมลงที่บรรจุด้วยสารเอทิลอะซิเตต จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมในหลอดแก้วที่บรรจุแอลกอฮอล์ 95% เพื่อนำไปศึกษาดีเอ็นเอ สำหรับตัวอย่างที่ต้องการเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ให้เก็บรักษาในหลอดแก้วที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75%

1.3 บันทึกชื่อแมงมุม วันที่จับ สถานที่จับ ชื่อผู้เก็บ ลงในป้ายกระดาษขาวแผ่นเล็ก ๆ แล้วใส่ลงในหลอดแก้วที่ดองแมงมุม

1.4 เก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมที่ศึกษาดีเอ็นเอไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอและนำไปใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน (ดำเนินการปี 2560-2561)

- วิธีการเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างออกจากหลอดแก้วโดยใช้พู่กันเขี่ยตัวอย่างให้ขึ้นมาด้านบนของหลอดแก้ว ใช้คีมคีบตัวอย่างออกมาและใช้เข็มเขี่ยเขี่ยขาแมงมุมให้กางออก วางตัวอย่างไว้ในจานแก้วที่มีที่มีซิลิกาเจลสีขาวและถูกแช่ด้วยแอลกอฮอล์ 95 % ให้เต็ม จากนั้นนำไปวางไว้ใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคปรุ่น Olympus SZH-ILLD stereomicroscope สำหรับการเตรียมอวัยวะเพศเมีย (epigynum) จะใช้เข็มเขี่ยเจาะรอบๆอวัยวะเพศ จากนั้นจึงดึง spermathecae และ copulatory duct ออกมาและนำไปแช่ในโปรติเนสเค (proteinase K) ประมาณ 3-5 ชั่วโมง เพื่อกำจัดเนื้อเยื่อส่วนที่ไม่ต้องการออกไป จากนั้นนำไปล้างในน้ำสะอาด นำ spermathecae และ copulatory duct ใส่ในหลอดแก้วขนาดเล็กแล้วจึงนำกลับไปแช่ในขวดตัวอย่างเดิม สำหรับการเตรียม pedipalps ให้ดึงออกทางด้านซ้ายของตัวแมงมุมใส่จานแก้วที่มีแอลกอฮอล์ 75% จากนั้นนำ 10% KOH มาต้มที่อุณหภูมิ 60 ^{0}C ประมาณ 5-10 นาที และนำมาเทลงในจานแก้วที่มี pedipalp ให้ท่วมตัวอย่างโดยการเทแอลกอฮอล์ 75 % ทิ้งไปก่อน แช่จนกระทั่งอวัยวะเพศผู้ขยายตัวออก จึงนำไปศึกษาดูรายละเอียดต่างๆ ใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป เมื่อจำแนกชนิดเสร็จนำ pedipalp ใส่ในหลอดแก้วขนาดเล็กและนำกลับไปแช่ในขวดตัวอย่างเดิม

- การจำแนกชนิด

ศรีวิชาการเกษตร

นำตัวอย่างแมงมุม อวัยวะเพศเมีย และ อวัยวะเพศผู้ มาจำแนกชนิดด้วยคู่มือวินิจฉัยการจำแนกชนิดและจากตำราต่างๆ 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)

3.1 นำตัวอย่างแมงมุมแม่ม่ายที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มาทำการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) โดยใช้วิธีการตามคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit; Favorgen, Taiwan) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัท โดยใช้คีมคีบดึงขาด้านขวาของแมงมุมจำนวนหนึ่งข้าง (25 มิลลิกรัม) มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ข้ามคืน (ตัวอย่างแมงมุมที่เหลือเก็บไว้เพื่อเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ เพื่อเป็น Voucher specimen) เติม FATG1 buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และ Protinase K Solution (0.3g/ml) ปริมาณ 20 ไมโครลิตรปิดหลอดให้สนิท พร้อมทั้งพันด้วยพาราฟีน (Paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติม RNase A (0.5g/ml) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร แล้วเติม FATG2 buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตรและบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เขย่าให้สม่ำเสมอ เติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute alcohol) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน FATG Mini Column ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยง) เติม W1 Buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) จากนั้นเติม Wash Buffer ปริมาณ 750 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาทีอีกครั้ง ย้ายหลอด FATG Mini Column มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge) 1.5 ไมโครลิตร และชะล้างอีเอ็นเอด้วยสารละลาย Elution Buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอ ที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

3.2 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ดังนี้

Primer Name	Sequence	Base
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	25
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	26

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

แมงมุมแม่ม่าย *Latrodectus geometricus* เตรียมปฏิกิริยา PCR ปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

		1 reaction (ไมโครลิตร)
Green mastermix		26
ddH_2O		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

3.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis) โดยหยดผลิตภัณฑ์ PCR ลงในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1.2 % และให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย TBE โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ 400 mp เป็นเวลา 45 นาที

3.4 ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ของแมงมุมแม่ม่ายที่ได้ไปทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์โดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

3.5 นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน *Cox*1 ที่ผ่านการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ มาทำการวิเคราะห์โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมงมุมแม่ม่ายที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ (assemble) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงมุมแม่ม่ายแต่ละชนิด 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)

3.6 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) โดย

ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้จะถูกเก็บบันทึกเพื่อจัดเตรียมฐานข้อมูลและใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงตรวจสอบความถูกต้องของชนิดแมงมุมในสกุลนี้ รวมทั้งนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาด้านอื่นๆ สำหรับดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้เป็นดีเอ็นเออ้างอิงที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์แมงมุม กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

- **การบันทึกข้อมูล**

1) บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบของ FASTA ไฟล์

2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบ ให้สอดคล้องกับ ชนิดแมงมุมแม่ม่ายที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบด้วยพิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี สถานที่เก็บตัวอย่างแมงมุมแม่ม่ายแต่ละชนิด และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

3) ชื่อวิทยาศาสตร์ของแมงมุมแม่ม่าย 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. การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมแม่ม่าย

ผลจากการสำรวจชนิดแมงมุมแม่ม่ายในประเทศไทยตามใต้โต๊ะ เก้าอี้ ใต้พื้นรถยนต์ แปลงมันสำปะหลัง และขอบชายป่า (table 3.7.1) ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2562 ในพื้นที่ 18 จังหวัด พบแมงมุมแม่ม่ายในประเทศไทย 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 และตะวันตก ของประเทศไทย (Figure 3.7.1)

จากการสำรวจในบางพื้นที่อย่างต่อเนื่องพบว่าประชากรของแมงมุมแม่ม่ายทั้งสองชนิดลดลงอย่างเห็นได้ชัดจากพื้นที่เดิม โดยสาเหตุเกิดมาจากแหล่งอาศัยเดิมได้มีการเปลี่ยนแปลงไป การถูกแตนเบียนในวงศ์ Eurytomidae เบียนไข่ นอกจากนี้ยังพบว่าแมงมุมขายาว Pholcidae และแมงมุม Scytodidae (Figure 3.7.6) เป็นศัตรูธรรมชาติที่ช่วยควบคุมปริมาณแมงมุมแม่ม่ายสีน้ำตาล อีกทั้งแมงมุมแม่ม่ายมีพฤติกรรมการล่าพวกเดียวกันเอง (cannibalism) จึงทำให้จำนวนประชากรลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน ยิ่งไปกว่านี้จากข่าวสารที่มีความคลาดเคลื่อนเกี่ยวกับพิษของแมงมุมแม่ม่ายสีน้ำตาลในสื่อออนไลน์ และช่องข่าวต่างๆ ทำให้ประชาชนมีการตื่น

กรมวิชาการเกษตร

ตระหนกและหวาดกลัวต่อแมงมุมทุกชนิดจึงฉีดพ่นสารเคมีเพื่อทำลายแมงมุมทุกชนิดที่พบ จึงทำให้ปัจจุบันแมงมุมแม่ม่ายอยู่ในสถานะที่พบได้ยาก ยิ่งไปกว่านี้แมงมุมแม่ม่ายหลังเพลิงเป็นแมงมุมที่มีนิสัยชอบสันโดษ มีแหล่งอาศัยที่ไม่เฉพาะเจาะจง และมีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้น้อยจึงทำให้มีโอกาสที่จะสูญพันธุ์

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน

จากการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานของแมงมุมแม่ม่ายในประเทศไทยเพื่อจำแนกชนิด ตัวอย่างแมงมุมทั้งหมดที่เก็บได้ในห้องปฏิบัติการโดยการใช้ลักษณะที่สำคัญในการจำแนกชนิด เช่น ลักษณะการจัดเรียงของตา ลักษณะของ endite ลักษณะของ fovea ระยะห่างระหว่างตา ลักษณะ sternum labium maxillae ความยาวของขา ลักษณะรูปร่างและลวดลายบนด้านหลังของส่วนท้อง แถบสีส้มหรือสีแดงรูปร่างคล้ายนาฬิกาทรายบริเวณด้านล่างของส่วนท้อง ขนแข็งที่มีลักษณะโค้งงอเป็นฟันเลื่อยเรียงต่อกันคล้ายซี่หวีที่บริเวณขาปล้องสุดท้าย (tarsus) ของขาคู่ที่ 4 ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย พบแมงมุมในสกุล *Latrodectus* ทั้งหมด 2 ชนิด สามารถจำแนกชนิดได้ 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)

เนื่องด้วยกลุ่มแมงมุมแม่ม่ายหลายชนิดมีสีสันและลักษณะภายนอกที่ใกล้เคียงกัน (sibling species) และยังมีอีกหลายตัวอย่างที่มีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาก้ำกึ่งระหว่าง *L. hasselti* และ *L. elegans* จึงทำการเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ และศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่อไป

สำหรับคู่มือการวินิจฉัยชนิดที่ใช้ในการจำแนกและลักษณะอนุกรมวิธานของแมงมุมแม่ม่ายในสกุล *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

กรมวิชาการเกษตร

- 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 (2B), 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* ส่วนท้องมีรูปร่างลักษณะคล้ายแส้ สกุล *Proroncidia* จะมีหนามยาวรอบๆบริเวณส่วนท้อง โดยทั่วไปแมงมุมมีนิสัยแยกกันอยู่เนื่องจากถ้าอยู่รวมกันจะมีพฤติกรรมกินกันเอง (cannibalism) แต่แมงมุมขาหวีส่วนใหญ่เป็นแมงมุมที่อาศัยอยู่ร่วมกันเป็นสังคม (Avilés, 1997) เช่น *Anelosimus eximius* (Keyserling, 1884) จะอยู่รวมกันเป็นพันตัวและช่วยกันสร้างรังขนาดใหญ่ (Agnarsson, 2002) และ เป็นที่รู้จักอย่างดี ว่าสกุล *Argyrodes* ชอบอาศัยอยู่ร่วมกับแมงมุมชนิดอื่นที่เป็นเจ้าของรังแบบลักษณะ Kleptoparasitic ซึ่งเป็นรูปแบบปฏิสัมพันธ์ที่ผิดปกติโดยการที่อาศัยอยู่ร่วมกับเจ้าของรังและขโมยพวกเศษซากอาหารจากเจ้าของรัง (Elgar, 1993) ส่วนใหญ่แมงมุมวงศ์นี้พบอาศัยอยู่ในทรงพุ่มของต้นไม้ ตามใบไม้ บางชนิดอาศัยอยู่ใต้ใบไม้โดยสร้างเส้นใยยุ่งๆ กระจายคลุมตัว เช่น สกุล *Chrysso* สำหรับสกุล *Nihonhimea* จะนำใบไม้แห้งมาม้วนแล้วสร้างเป็นรังนอนและสร้างเส้นใย 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

กรมวิชาการเกษตร

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

มีการจัดเรียงตาเป็น 2 แถวโดยตาด้านข้างถูกแยกออกมาจากตากลางคู่หน้าและตาด้านหลังอย่างชัดเจน ไม่มีฟันบน chelicerae แผ่นแข็งด้านบน (carapace) มีลักษณะรูปร่างคล้ายลูกแพร์ fovea มีลักษณะเป็นหลุมตามด้านขวาง ท้องของเพศเมียมีลักษณะเป็นรูปทรงกลมป่อง ส่วนเพศผู้มีลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมผืนผ้า สีและลวดลายของส่วนท้องมีความผันแปรตั้งแต่สีครีม แดง ไปจนกระทั่งสีดำ ส่วนเครื่องหมายที่มีลักษณะคล้ายรูปนาฬิกาทรายสีส้มที่อยู่ด้านใต้ของส่วนท้องมักจะปรากฏให้เห็น เพศเมียมีขนาดใหญ่มากโดยมีขนาดลำตัวเกือบถึง 1 เซนติเมตร เพศผู้มีขนาดลำตัวเล็กกว่าเพศเมียประมาณ 4-5 เท่า บริเวณขาปล้องสุดท้าย (tarsus) ของขาคู่ที่ 4 มีขนแข็งที่มีลักษณะโค้งงอเป็นฟันเลื่อยเรียงต่อกันเป็นแถวเห็นชัดเจนคล้ายซี่หวี สร้างใยไม่เป็นระเบียบเป็นลักษณะ 3 มิติเพื่อทำรัง แต่สร้าง gumfoot lines (ภาพที่ 3.7.3B) เพื่อเป็นใยดักเหยื่อในเวลากลางคืน ขนาด spinneret คู่กลางมีขนาดเล็กกว่าคู่หน้าและคู่หลังมาก ขาคู่ที่ 1 และ 4 ยาวมากกว่าคู่ที่ 2 และ 3 และมี cololus ขนาดใหญ่

***Latrodectus geometricus* C.L. Koch, 1841** (ภาพ 3E, F)

ตัวอย่างต้นแบบ (Holotype): ปัจจุบันเก็บไว้ที่ Museum für Naturkunde, Berlin (ZMB) ประเทศเยอรมัน

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Koch ในปี 1841และพบแพร่กระจายที่ 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* ตรงที่ตาด้านข้างแยกออกจากตาคู่กลางและคู่หลังอย่างชัดเจน แต่เมื่อดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียพบว่าเป็นชนิดเดียวกัน Smithers, 1944 ได้พิจารณาทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพบว่า *L. concinnus* ที่ถูกตั้งขึ้นโดย Pickard-Cambridge ในปี 1904 เป็น synonym ของ *L. geometricus* ต่อมา Caporiacco, 1949 ได้จำแนกชนิดผิดและคิดว่าเป็น 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 ไม่มีฟันบนchelicerae ขามีสีน้ำตาลอ่อนบริเวณข้อต่อระหว่างปล้องขามีสีดำเข้ม ความยาวขา 4 ขา เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 1, 4, 2, 3

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ท้อง (Abdomen): สีพื้นของส่วนท้อง (abdomen) มีความหลากหลายสูงตั้งแต่สีขาวสว่าง สีเทา สีน้ำตาลอ่อน สีน้ำตาลเข้ม ไปจนถึงสีดำ กึ่งกลางด้านบนของส่วนท้องมีจุดรูปวงกลมหรือสามเหลี่ยมสีส้ม แดง หรือสีน้ำตาลเข้ม ล้อมรอบด้วยขอบสีขาว เรียงต่อกันเป็นแถว 3 จุด เชื่อมต่อด้วยแถบสีเดียวกันพาดไปทางด้านท้ายลำตัว สองข้างของแนวกลางตัวด้านบนส่วนท้อง มีจุดสีดำ เรียงต่อกันข้างละ 4 จุด เห็นชัดในแมงมุมขนาดเล็ก ส่วนแมงมุมที่มีอายุมากจะเห็นชัดเพียงข้างละ 3 จุด แต่ละจุดมีแถบสีอ่อนเชื่อมต่อพาดไปด้านข้างของส่วนท้องเกิดเป็นลวดลายสีอ่อนสลับเข้มตัดกับสีพื้นของส่วนท้อง ด้านล่างของส่วนท้องมีแถบสีส้มหรือสีแดงรูปร่างคล้ายนาฬิกาทรายเป็นลักษณะเด่น (ภาพที่ 3.7.3D) ส่วนของอวัยวะชักใย (spinnerets) ล้อมรอบด้วยแถบสีเข้มเรียงสลับกับสีอ่อนอย่างละ 6 แถบ โครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์มีส่วนของ spermatheca รูปร่างคล้ายดัมเบล 1 คู่ วางชิดขนานกัน (parallel spermatheca) (ภาพที่ 3.7.2B) โดย spermatheca แต่ละอัน มีกระเปาะส่วนหน้า (anterior lobes) และกระเปาะส่วนท้าย (posterior lobes) ที่มีขนาดเท่ากัน ส่วน spermatheca เชื่อมต่อกับท่อ copulatory ducts ที่ขดซ้อนกันจำนวนข้างละ 4 วง (ภาพที่ 3.7.2B) สำหรับโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้จะอยู่บริเวณด้านหน้าสุดของตัวเต็มวัยเพศผู้ จะมีส่วนของขาแปลง (palp) 1 คู่ ทำหน้าที่สำหรับเก็บน้ำเชื้อชั่วคราวและส่งถ่ายน้ำเชื้อต่อไปยังเพศเมีย โดยบนขาแปลงแต่ละข้าง มีส่วนของ embolus ที่ยาวและพันเป็นเกลียวขดเป็นวงซ้อนกันจำนวน 4 วง (ภาพที่ 3.7.2C 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 ศรีษะเกษ บุรีรัมย์ อุบลราชธานี ภาคกลางได้แก่ กรุงเทพมหานคร นครปฐม เพชรบูรณ์ พิษณุโลก ภาคตะวันออกได้แก่ ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ภาคตะวันตกได้แก่ กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี ภาคใต้ได้แก่ สุราษฎร์ธานี

***Latrodectus elegans* Thorell, 1898 (ภาพ 5C และD)**

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Thorell ในปี 1898 บริเวณภูเขา Carin Chebà ประเทศพม่า ต่อมาในปี 1909 Simon ได้พบตัวอย่างที่ ฮานอย ประเทศเวียดนามแต่เนื่องจากตัวอย่างที่พบมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับ *L. hasselti* จากประเทศออสเตรเลีย และใกล้เคียงกับ *L. elgans* ดังนั้นจึงตัดสินใจตั้งชื่อว่า *Latrodectus hasselti elegans* ในปี 1998 Zhu ได้จำแนกชนิดผิดโดยได้ตั้งชื่อว่าเป็น *L. mactans* ต่อมา Song, Zhu and Chen, 1999 ได้จำแนกชนิดผิดโดยได้ตั้งชื่อว่าเป็น *L. mactans* ปี 2002 ได้รายงานพบ *L. elgans* ในประเทศญี่ปุ่นโดย Ono ต่อมา Kananbala, *et al.* 2012 รายงานการพบ *L. elgans* ครั้งแรกที่หมู่บ้าน Thawai เมือง Ukhrul รัฐ Manipur ประเทศอินเดีย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย : เพศผู้ 2.28 มิลลิเมตร เพศเมีย 7.22 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): Carapace ถูกปกคลุมด้วยขนสั้นๆ สีดำกระจายตัวแบบไม่สม่ำเสมอ มีความยาวมากกว่าความกว้าง แผ่นแข็งด้านบน (carapace) มีลักษณะรูปร่างคล้ายลูกแพร์ fovea มีลักษณะเป็นหลุมตามด้านขวาง ส่วนหัวแคบกว่าส่วนอก มี 8 ตา เรียง 2 แถว (4-4) แบบ recurve โดยแถวหน้าเรียงโค้งมากกว่า

แถวหลัง ระยะห่างระหว่างตาข้างด้านหน้ากับตากลางคู่หน้ามีขนาดเท่ากัน ตาข้างของตาแถวหลังแยกห่างออกจากตาคู่กลางแถวหลังอย่างเด่นชัด sternum สีน้ำตาลอ่อนปกคลุมด้วยขน labium ยาวมากกว่าด้านกว้าง maxillae ยาวมากกว่าด้านกว้าง เห็น scapulae ชัดเจน chelicerae สีน้ำตาลเหลืองมีขนาดเล็ก ไม่มีฟันบน chelicerae ส่วนขามีสีดำเข้ม ความยาวขา 4 ขา เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 1, 4, 2, 3

ท้อง (Abdomen): สีพื้นของส่วนท้อง (abdomen) มีสีดำสนิท ด้านบนของส่วนท้องมีแถบสีแดงหรือสีส้มสดพาดขวางจากข้างลำตัวด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่งจำนวน 4 แถบ โดยแถบสีที่สองถึงสี่ด้านท้ายตัวเชื่อมต่อกัน (ภาพที่ 5A, D) แถบสีดังกล่าวมีรูปร่างคล้ายเปลวเพลิง สำหรับเพศผู้ส่วนท้องมีสีขาวสลับดำ 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 ที่ขดซ้อนกันจำนวนข้างละ 3 วง (ภาพที่ 3.7.4B)

สำหรับโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้จะอยู่บริเวณด้านหน้าสุดของตัวเต็มวัยเพศผู้ จะมีส่วนของขาแปลง (palp) 1 คู่ ทำหน้าที่สำหรับเก็บน้ำเชื้อชั่วคราวและส่งถ่ายน้ำเชื้อต่อไปยังเพศเมีย โดยบนขาแปลงแต่ละข้าง มีส่วนของ embolus ที่ยาวและพันเป็นเกลียวขดเป็นวงซ้อนกัน จำนวน 3 วง (ภาพที่ 3.7.4C) และมี colulus ขนาดใหญ่

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): อินเดีย พม่า จีน และญี่ปุ่น สำหรับในประเทศไทยพบที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ฉะเชิงเทรา ขอนแก่น อุบลราชธานี ลพบุรี ชลบุรี และชัยนาท

3. การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

การศึกษาครั้งนี้ทำการสกัดดีเอ็นเอของแมงมุมแม่ม่าย *L. geometricus* 100 ตัวอย่าง *L. elegans* 30 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *COX*1 ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจากแมงมุมแม่ม่าย *L. geometricus* จำนวน 48 ตัวอย่าง *L. thoracicus* จำนวน 5 ตัวอย่าง และ *L. tredecimguttatus* จำนวน 5 ตัวอย่าง บันทึกผลนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่า Barcode (ภาคผนวกที่ 3.7.1) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมงมุมแม่ม่ายที่ทำการศึกษามาเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของแมงมุมแม่ม่ายที่รายงานในฐานข้อมูลสากล คือ Gen Bank เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของดีเอ็นเอบาร์โค้ด พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมงมุมแม่ม่ายที่ทำการศึกษามีความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลสูงถึง 99 - 100%

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าแมงมุมแม่ม่ายบางตัวอย่างเมื่อนำ 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

ศูนย์วิทยทรัพยากร

C1N2191 CCC GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC (Simon *et al.*, 1994)

<u>การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมงมุมแม่ม่ายสกุล *Latrodectus*</u>

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมงมุมแม่ม่ายสกุล *Latrodectus* เพื่อใช้ยืนยันข้อมูลการจัดจำแนกชนิด โดยทำการวิเคราะห์ sequences ของตำแหน่ง *COX*1 จาก 58 ตัวอย่าง ได้แก่ *L. geometricus* จำนวน 48 ตัวอย่าง และ *L. elegans* จำนวน 10 ตัวอย่าง และสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *COX*1 ของแมงมุมแม่ม่าย *Steatoda triangulosa* จำนวน 1 ชนิด เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *COX*1 ของ *L. geometricus* จาก อาร์เจนตินา ฟลอริด้า และแอฟริกาใต้ ซึ่งเป็นแหล่งที่พบแมงมุมแม่ม่ายสีน้ำตาลครั้งแรกร่วมในการวิเคราะห์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย Neighbor Joining (NJ) และ Maximum Likelihood (ML) พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกัน (Figure8-9) โดยแมงมุมแม่ม่าย *L. geometricus* ได้แยกกลุ่มออกมาจาก *L. thoracicus* และ *L. tredecimguttatus* อย่างชัดเจน และเมื่อพิจารณาดูความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลุ่มแมงมุมแม่ม่าย *L. geometricus* พบว่าความสัมพันธ์ภายในกลุ่มมีลักษณะเป็น monophyletic ส่วนกลุ่ม ***L.*** *thoracicus* และ *L. tredecimguttatus* มีข้อมูลทางพันธุกรรมที่เหมือนกันนั่นคือเป็นชนิดเดียวกัน ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าแมงมุมแม่ม่ายสกุล *Latrodectus* สามารถจัดจำแนกความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้ แต่การจัดจำแนกชนิดภายในกลุ่มต้องเพิ่มข้อมูลของดีเอ็นเอของยีนตำแหน่งอื่นมาร่วมวิเคราะห์ ซึ่งยีนตำแหน่ง *COX*1 สามารถจำแนกได้เพียงความแตกต่างในระดับกลุ่มของ *L. geometricus L. thoracicus* และ *L. tredecimguttatus* เท่านั้น อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถทราบข้อมูลเบื้องต้นของจำนวนชนิดของแมงมุมแม่ม่ายสกุล *Latrodectus* ในประเทศไทย แต่การยืนยันชนิดหรือจัดจำแนกชนิดภายในกลุ่มของ *Latrodectus* complex นั้นต้องมีการศึกษาต่อไป

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ:

จากเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมแม่ม่ายสกุล *Latrodectus* ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยตามใต้โต๊ะ เก้าอี้ ใต้พื้นรถยนต์ แปลงมันสำปะหลัง และขอบชายป่า ทั้งช่วงเวลากลางวันและกลางคืนโดยสังเกตใยที่ใช้ในการดักเหยื่อจากพื้นที่ภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ พบแมงมุมแม่ม่ายสกุล *Latrodectus* จำนวน 205 ตัวอย่าง และในการจำแนกทางอนุกรมวิธานโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบแมงมุมแม่ม่าย จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *L. geometricus* และ *L. elegans* จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอ ทำการสกัดดีเอ็นเอและพีซีอาร์ บริเวณยีน *COX*1 ได้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมงมุมแม่ม่าย *L. geometricus* จำนวน 48 ตัวอย่าง และ *L. thoracicus* จำนวน 5 ตัวอย่าง *L. tredecimguttatus* จำนวน 5 ตัวอย่าง

จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลทางชีวโมเลกุลของแมงมุมแม่ม่ายที่มีความซับซ้อนหรือใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นการยากที่จะใช้เพียงลักษณะสัณฐานภายนอกมาเป็นตัวจัดจำแนก และยืนยันว่า *COX*1 เป็นยีนที่สามารถใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในแมงมุมแม่ม่ายกลุ่ม *Latrodectus* complex ได้ เนื่องจากยีน *COX*1 มีความ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

แตกต่างมากพอที่จะทำให้แยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้ เป็นยีนที่มีบริเวณอนุรักษ์ (conserve area) มีขนาดนิวคลีโอไทด์มีความเหมาะสมคือประมาณ 500 - 800 คู่เบส ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนั้น ไพรเมอร์ที่เป็น universal primer จะสามารถเข้ามาจับและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ได้ง่ายและรวดเร็ว นอกจากนี้ลำดับดีเอ็นเอของยีน *COX*1 ยังสามารถแยกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากได้อีกด้วย และการเลือกบริเวณที่จะนำมาใช้เป็นนั้นมีความสำคัญมาก เพราะหากเลือกขนาดและบริเวณที่นำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้เหมาะสมกับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาจะทำให้สามารถนำไปใช้ได้ง่ายสะดวกและรวดเร็วมากยิ่งขึ้น การศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อใช้ *COX*1 มีบางตัวอย่างที่ไม่สามารถแสดงผลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมงมุมแม่ม่ายได้เลย ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพิ่มเติมด้วยไพรเมอร์ C1J1718 และ C1N2191 แสดงผลผลิต PCR แสดงแถบแบนบนแผ่นเจล นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธีการ Neighbor Joining และ Maximum Likelihood พบว่าแมงมุมแม่ม่ายสกุล *Latrodectus* แยกออกมาจากแมงมุมแม่ม่ายสกุล *Steatoda* อย่างเห็นได้ชัดเจน ในขณะที่กลุ่ม ***L.*** *thoracicus* และ *L. tredecimguttatus* มีข้อมูลทางพันธุกรรมที่เหมือนกันนั่นคือเป็นชนิดเดียวกัน เนื่องจากฐานข้อมูล *L. elegans* ไม่ได้อยู่ใน Genbank จึงทำให้ประมวลผลพันธุกรรมออกมาเป็นชนิดที่ใกล้เคียงนั่นก็คือ *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 (*COX*1*, ITS1, ITS2*)

นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ยังช่วยยืนยันจำนวนชนิดของแมงมุมม่ายสกุล *Latrodectus* ในประเทศไทย ให้มีความสอดคล้องและทันสมัยเทียบเท่าระดับสากล ดังเช่นงานวิจัยของ Garb *et al*., 2004 ที่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมงมุมแม่ม่ายสกุล *Latrodectus* ชีวภูมิศาสตร์ และประวัติการแพร่กระจาย พบว่า *geometricus* clade เป็นแมงมุมแม่ม่ายที่พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่นและเป็นพี่น้องกับ the African *L. Rhodesiensis* ส่วน mactans clade ประกอบด้วย *Latrodectus* ชนิดอื่นที่มาจาก แอฟริกา อิสราเอล สเปน ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และอเมริกาเหนือ อเมริกาใต้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เป็นองค์ความรู้และฐานข้อมูลทางด้านพันธุกรรมในการวิจัยต่อไปซึ่งจากการทดลองจะได้ชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ ที่ถูกต้อง ได้ตัวอย่างดีเอ็นเอบาร์โค้ด ของแมงมุมแม่ม่ายสกุล *Latrodectus* ในประเทศไทย สามารถนำมาใช้เพื่อจัดจำแนกชนิดแมงมุมแม่ม่ายได้อย่างถูกต้องตามมาตรฐานสากล ซึ่งหน่วยงานที่สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ หน่วยงานราชการ กระทรวงพาณิชย์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ บริษัทเอกชนผู้ส่งออก มหาวิทยาลัย โรงเรียน

กรมวิทยาศาสตร์

Table 3.7.1 Spider Fauna in genus *Latrodectus* found in Thailand between 2016 until 2019

Scientific name	Habitat	Location	Reference
Latrodectus geometricus	Restaurant	Suan Phueng, Rachaburi	W. Chotwong
C. L. Koch, 1841	Rest room	Nong Kum, Kanchanaburi	W. Chotwong
	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

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Table 3.7.1 Spider Fauna in genus *Latrodectus* found in Thailand between 2016 until 2019 (Continue)

Scientific name	Habitat	Location	Reference
Latrodectus elegans	Edge of forest	Pranburi, Prachuap Khiri Khan	J. Bangtha
Thorell, 1898	Cassava field	Thung Phaya, Chachoengsao	S. Chaowarit
	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

กรมวิชาการเกษตร

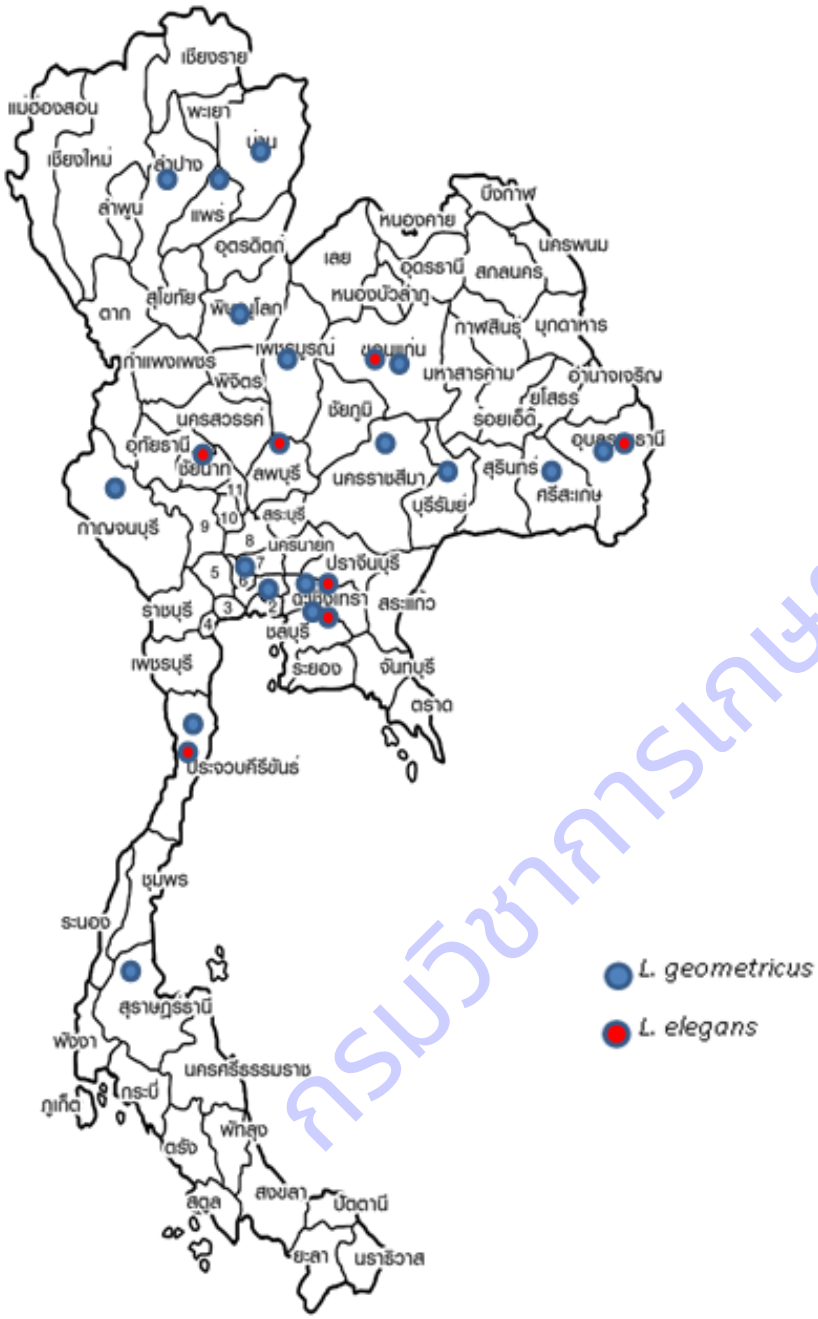


Figure 3.7.1 Distribution map of spider genus *Latrodectus* in Thailand

กรมวิชาการเกษตร

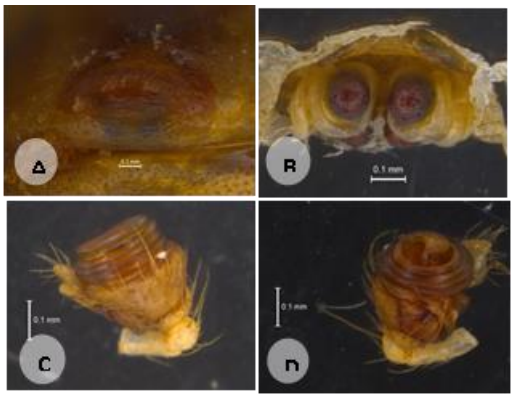


Figure 3.7.2 Genitalia and Epigyne structure of *Latrodectus. geometricus* A**.** Epigyne B. Spermathecae and copulatory duct C, D. left palpus show embolus with 4 loops

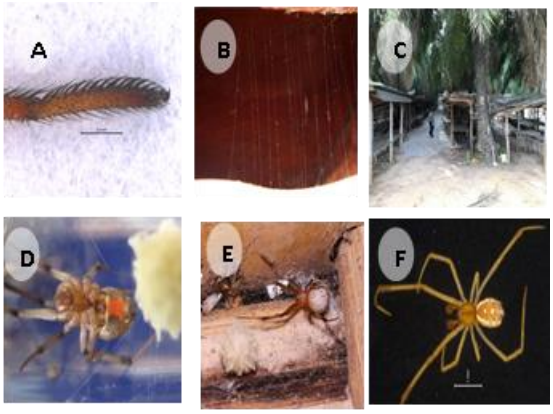


Figure 3.7.3 . *Latrodectus geometricus* A. the comb on the fourth tarsus B. gumfoot lines _C. Habitat D. red abdominal ‘‘hour-glass’’ mark, E. Adult female with egg sac F. Adult male

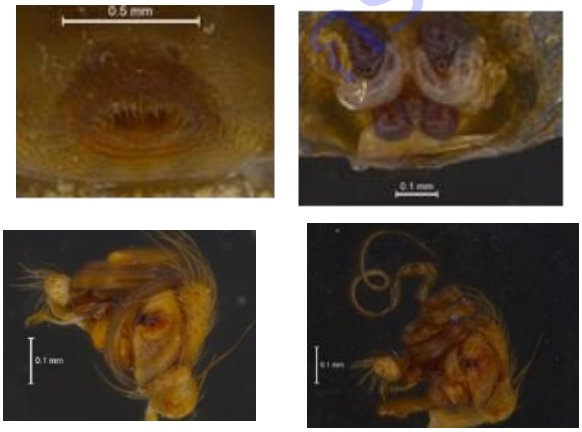


Figure 3.7.4 Genitalia and Epigyne structure *of Latrodectus. elegans* A. Epigyne

B. Spermathecae และcopulatory duct C. Left palp of male show embolus with 3 loops D. Left palp of male show extending embolus

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.7.5 *Latrodectus elegans* A. Habitat B. Egg sacs C. subadult male D. subadult female

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3.8 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจัดจำแนกเชื้อรา *Beauveria bassiana*

DNA barcode for identification of *Beauveria bassiana*

เมธาสิทธิ์ คนการ[1/] เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์[1/]ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[2/] รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล[3/]

[1/] กลุ่มวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/] กลุ่มวิจัยบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[3/] กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

แยกเชื้อรา *B. bassiana* จากแมลงที่ติดเชื้อราและดินบริเวณแปลงปลูกพืชของเกษตรกร โดยวิธี bating technique จำนวน 15 ไอโซเลต ในปีงบประมาณ 2561 เชื้อราในกลุ่มบิวเวอร์เรียมีโครงสร้างสัณฐานวิทยาของโคโลนีและโคนิเดียเหมือนกันจึงไม่สามารถจัดจำแนกด้วยลักษณะภายนอกได้ ดังนั้นได้นำเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบและจัดจำแนกเชื้อราในกลุ่มดังกล่าวในบริเวณ 3 ยีนคือ ITS, βt และ α-1factor โดยใช้ primer ITSF1-ITSF2, Bt2a-Bt2b และ EF1F-ER1R เพื่อเปรียบเทียบหาบริเวณชิ้นส่วนของยีนที่เหมาะสมการจัดจำแนกและตรวจสอบ ในปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction ร่วมกับการผลจากการวิเคราะห์ Automatic Barcode Gap Discovery พบว่าจากแผนภูมิต้นไม้ของ ITS gene สามารถแยก *Beauveria* spp. ออกจากเชื้อราโรคแมลงได้ ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็น DNA marker ในการตรวจสอบ และจัดจำแนกเชื้อราในกลุ่มบิวเวอร์เรีย และสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจพิสูจน์พันธุกรรมเชื้อราในกลุ่มนี้เพื่อขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตรได้ สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ beta-tubulin และ elongation factor เนื่องจากในบริเวณยีนดังกล่าวมีปริมาณ G-C content ที่สูง ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเชื้อราบางไอโซเลท และ barcode gaps บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์บน ITS และ βt มีเปอร์เซ็นต์ซ้อนทับใกล้เคียงกัน ส่วนบริเวณยีน α-1factor ซึ่งมีค่า distribute overlap ระหว่าง intra- และ interspecific genetic variation ค่อนข้างกล่าวซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับแผนภูมิต้นไม้พบว่าเชื้อราดังกล่าวสามารถแยกกลุ่มย่อยในระดับ *B. bassiana* species complex

คำหลัก เชื้อราแมลง ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ชีวโมเลกุล

Abstract

Isolation of B. bassiana from infected insects and soil at agricultural farm by using bating techniques about 15 isolates during 2561. This fungi was similar complexes structures such as characteristic of colonies and conidia that could not be able to distinguishes them by using morphological structure. Therefore, DNA barcoding techniques would be applied for detection and classification by using the data from 3 gene regions on ITS, βt and α-1factor for comparison

กรมวิชาการเกษตร

of nucleotide data which genes has to be potential of dna marker of this fungi by PCR techniques and Automatic Barcode Gap discovery. The phylogenetic inferences of ITS and βt showed Beauveria spp. were be able to be on corrected position on clade with supported by high bootraps and also the rage of distribute overlap was not high as much α-1factor . However, ITS was good for DNA barcode of this fungi which according to easy to amplify and phylogenetic inferences accurated. The βt and α-1factor were perfected but it was difficult to work out on amplification. In α-1factor gene was fit to be DNA marker for classification in *B. bassiana* species complex according to the distribute overlap between intra- and interspecific genetic variation were high gaps which could be seen on phylogenetic tree of Ef gene

Keyword Entomopathogenic fungi DNA barcode Biotechnology

คำนำ

ปัจจุบันการควบคุมแมลงศัตรูพืชในธรรมชาติโดยการใช้ ชีวินทรีย์ (biological control agents) ซึ่งเป็นวิธีการ ที่นำเอาความหลากหลายทางด้านชีวภาพ ประกอบด้วยตัวห้ำ (predator) ตัวเบียน (parasite or paracitoid) และเชื้อโรค (pathogen) ไม่ว่าจะเป็นแมลงศัตรูพืช โรคพืช หรือ วัชพืชทางการเกษตร รวมทั้งที่เป็นแมลงพาหะ (vectors) มาใช้ในการจัดการระบบปลูกพืช โดยเน้นการควบคุมศัตรูพืชแบบธรรมชาติโดยอาศัยหลักของนิเวศวิทยาเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี หรือ การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี (biocontrol) การใช้สารชีวินทรีย์หรือชีวภัณฑ์ต่างๆ ในปัจจุบันยังมีความจำกัดอยู่มากเช่น ไม่สามารถซื้อได้ตามท้องตลาด มีขบวนการที่ยุ่งยากซับซ้อนในการผลิต หรือ ผลิตภัณฑ์ที่วางขายตามท้องตลาดไม่มีคุณภาพ ทำให้เกษตรกรขาดความเชื่อถือในการใช้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ในปัจจุบันกรมวิชาการเกษตรเริ่มมีการผลักดันให้มีการขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์มากขึ้น เพื่อควบคุมคุณภาพของสารชีวภัณฑ์ และให้ผลิตภัณฑ์ถูกต้องเป็นไปตามข้อกฎหมาย โดยทั้งนี้ให้ขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายทางการเกษตร ซึ่งหน้าที่หลักกรมวิชาการเกษตรได้มอบหมายให้กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชเป็นผู้รับผิดชอบตรวจสอบผลิตภัณฑ์เชื้อราโรคแมลงที่นำมาขึ้นทะเบียนดังกล่าว

เชื้อรา *B. bassiana* เป็นเชื้อราอยู่ในกลุ่มของ entomopathogenic fungi มีความคล้ายคลึงกันทางด้านสัณฐานวิทยา (cryptic species) และอยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า species complex คือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบสายพันธุ์เชื้อราระดับพันธุ์กรรมได้ โดยวิธีสัณฐานวิทยา (morphological studies) จากปัญหาดังกล่าวจึงทำให้ระบบการตรวจสอบเชื้อราโรคแมลงในสารชีวภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตรไม่มี แม่นยำและถูกต้องตามมาตรฐานสากล

ดังนั้นการประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นระบบมาตรฐานมาช่วยระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตและสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ จึงมีความสำคัญมากเพราะเนื่องจากเทคนิคดังกล่าวมีความถูกต้อง รวดเร็วและแม่นยำ ตรวจสอบและจำแนกได้ตรงตามลักษณ์ทางพันธุกรรมได้ถูกต้องเป็นที่ยอมรับในระบบสากล ซึ่งผลการ

กรมวิชาการเกษตร

ตรวจสอบดังกล่าวจะช่วยในการสนับสนุนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวินทรีย์สู่เชิงพาณิชย์ของกรมวิชาการเกษตรนอกจากนั้นเทคนิคดังกล่าวยังช่วยในการปกป้องทรัพย์สินทางปัญญาของกรมวิชาการเกษตรได้ ในกรณีที่มีการนำเชื้อราสายพันธุ์กรมวิชาการเกษตรไปผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์เชิงพาณิชย์โดยไม่ได้รับอนุญาต และ ป้องกันการเอาเปรียบจากบริษัทผู้ผลิตสารชีวภัณฑ์ที่ผสมเชื้อราสายพันธุ์อื่นที่ไม่ตรงกับฉลากที่ระบุเอาไว้ รวมทั้งยังเป็นประโยชน์มากในการตรวจสอบเชื้อราแมลงสายพันธุใหม่ที่จะค้นพบในอนาคต และเป็นประโยชน์ต่อการสร้างฐานข้อมูลเชื้อราโรคแมลงของกรมวิชาการเกษตรในระบบสากล International code of nomenclature อีกด้วย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1 ชุดสำสำหรับสกัดดีเอ็น (Pepman Ultra DNA extraction)
2 ค่าสังเคราะห์ไพร์เมอร จำนวน 6 คู่
3 ค่าหลอดไมโครทูป 0.2 ml และ 1.5 ml
4 ค่าทิบ (Tip) ดูดสารเคมี (10 µl, 200 µl,1000µl)
5 เอการ์โรสเจล (agarose gel) 100 กรัม
6 เอ็นเอ มาค์เกอร์ (DNA marker 100 base pair) 75 UG
7 ชุดสกัดดีเอ็นเอจากพีซีอาร์โปรดัก (High pure PCR product Purification kit) 50 rxns
8 ชุดดีเอ็นเอ ตรวจสอบ Red gel
9 สีย้อมสารพันธุกรรม
10 สารเคมี (น้ำกลั่นสำหรับทำปฏิกิริยา พีซีอาร์, อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, MEA Tris-HCL, EDTA, NaCl, Na2SO3, Isomyl alcohol, Isopropanol)
11 . พีซีอาร์, เอมไซม์ และ เทคโพลีเมอร์เรส PCR & enzyme &Tag polymerase
12. เชื้อรา *B .bassiana*

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อรา *B .bassiana* จากแมลงที่เป็นโรคตามธรรมชาติ ดิน และสารชีวภัณฑ์

เก็บตัวอย่างแมลงที่เป็นโรค ดินจากแปลงปลูกพืชแปลงเกษตรกร ในเขตจังหวัดภาคเหนือ (จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง และอุตรดิตถ์) ภาคอีสาน (เลย หนองคาย และ อุบลราชธานี) ภาคกลาง (เพชรบูรณ์ กำเพชร) ภาคตะวันตก (ราชบุรี เพชรบุรี และกาญจนบุรี) ภาคตะวันออก (ตราด ระยอง และจันทร์บุรี) และภาคใต้ (นครศรีธรรมราช สงขลา และชุมพร) และสารชีวภัณฑ์ มาแยกเชื้อราดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อรา MEA (malt extract agar) ผสมสารปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนแบคทีเรีย โดยวิธี แยกจากโครงสร้างของเชื้อราโดยตรง และสำหรับตัวอย่างดินจะทำการแยกเชื้อราโดยวิธี insect – baiting technique บ่มเชื้อราไว้ที่อุณหภูมิห้องในสภาพปลอดแสงประมาณ 2-3 วัน หลังจากนั้นแยกเชื้อราบริสุทธิ์ โดยวิธี hypal trip isolation ลง

สำนักวิชาการเกษตร

ในอาหาร MEA และตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราชนิดอื่นๆ อย่างละเอียด ก่อนเก็บเชื้อราไว้เป็น stock culture และเพื่อจัดจำแนก (identification) ทางด้านสัณฐานวิทยาเบื้องต้น และบันทึกผลการทดลอง

2. การตรวจสอบและจัดจำแนกเชื้อ *Beauveria* spp. ในระดับชีวโมเลกุล

เลี้ยงเชื้อรา *Beauveria* spp. บนอาหาร MEA (Malt extract Agar) ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 7-10 วัน จากนั้นสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Prep man ultra (Applied Biosystems) โดยวิธีการขูดเส้นใยปริมาณเล็กน้อย ลงใน Eppendorf tube ขนาด 100 µl ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการบดเส้นใยแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที (rpm) ประมาณ 10 นาที เก็บสารแขวนลอยดีเอ็นเอที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอต่อไป วัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ โดยเครื่องวัดคุณภาพดีเอ็นเอ Nano Drop spectrophotometer เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีการ PCR (polymerase chain reaction) คัดเลือก primer และหาอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม โดยใช้ primer ในส่วนของ rDNA (ITS1, ITS2, และ 5.8 S rRNA Gene) คือ primer ITS F1(5-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3)-ITS4 (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) (Gardes and Brun 1993, White *et al.,* 1990) และ protein-code gene ได้แก่ partial of β-tubulin ; Bt2a (5-GGTAACCAAATCGGTGCTGCT-3)-Bt2b(5'-ACCCTCAGTGTAGTG ACCCTTGGC-3') (Glass and Donaldson 1995) และ translation elongation factor 1α ได้แก่ primer EF1F(5-TGCGGTGGTATCGA CAAGCGT-3 และEF1R (5- AGCATGTTGTCGCCGTTG AAG-3) (Linnakoski *et al.,* 2010)

ส่วนผสมปฏิกิริยา PCR 25 µl เพิ่มปริมาณดีเอ็น ระกอบไปด้วยสารเคมีต่อไปนี้ (Mytag buffer, Bioline,USA) (Linnakoski *et al.,* 2010)

PCR grade water	16.5 µl
PCR buffer	5 µl
Forward primer	0.5 µl
Reverse primer	0.5 µl
Tag polymerase	0.5 µl
DNA template	2 µl

จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง thermocycle ในสภาวะปฏิกิริยาดังนี้

Primer	hot start	denature	annealing	Extension	final extension
ITSF1-ITSF4	95 °C 4 นาที	95 °C 1 นาที ← °C 1 นาที 35 รอบ	50-52°C 30 วินาที →	72	72 °C 4 นาที
Bt2a-Bt2b	95 °C 4 นาที	95 °C 1 นาที ← °C 1 นาที 35 รอบ	54-57°C 30 วินาที →	72	72 °C 4 นาที

กรมวิชาการเกษตร

EF1F-ER1R	95 °C 4 นาที	95 °C 1 นาที ← °C 1 นาที 35 รอบ	55-60°C 30 วินาที →	72	72 °C 4 นาที

บันทึกผลการทดลอง

ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอ ภายใต้ UV light บน 1% agarose gel ในสารละลาย 0.5 x TAE buffer (40 mM Tris, 4mM sodium acetate, 1mM EDTA, pH 8)และย้อมสีดีเอ็นเอด้วย Gelred ™ nucleic acid (Biotium) จากนั้นทำดีเอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป DNA Clean and Concentrator ™—25 Kit, (Zumo Research) ส่งตัวอย่าง PCR product ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

วิเคราะห์ผลการทดลอง

1.1 วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม Bioinformatics เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ Basic local alignment search tool (BLAST) เพื่อให้ทราบสายพันธุ์ของเชื้อราในระบบ Gene bank ของ NCBI (National central for biotechnology information) จัดเตรียมข้อมูล DNA consensus โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al.,* 2013) และ MAFFT V7. (a multiple sequences alignment program) (Katoh, 2013) วิเคราะห์จัดลำดับวิวัฒนาการโดยวิธี Maximum likelihood phylogentic tree และลงทะเบียนเชื้อราใน NCBI (national central for biotechnology information) เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงในระบบสากล

1.2 วิเคราะห์หาตำแหน่งดีเอ็นบาร์โค้ดแก็ป (DNA barcoding gap) บนตำแหน่งยีนนั้นๆบริเวณ intra- และ interspecific genetic variation โดยใช้ความแตกต่างระหว่างชิ้นส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือที่เรียกว่า Automatic barcode gap เพื่อดูลักษณะของ Distribute overlap ทั้ง 3 gene คือ ITS βt และ EF (http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/temp/index.html) (Puillandre at al., 2012) โดยใช้โมเดล Jukes-Cantor(JC69) และแสดง phylogenetic tree โดยใช้ maximum likelihood

เวลาและสถานที่ ตุลาคม 2559 สิ้นสุด เดือนมกราคม 2561

1.ห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลง, กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ,
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2. ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

แยกเชื้อราโรคแมลง *B. bassiana* ที่มีศักยภาพในการควบคุมแมลง ในเบื้องต้นพบว่าเชื้อราในดินที่เก็บจากบริเวณแปลงปลูกพืชของเกษตรกรในเขตจังหวัดภาคเหนือ จังหวัด เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง และ ภาคตะวันตก ราชบุรี เพชรบุรี และกาญจนบุรี และภาคใต้ จังหวัด ชุมพร โดยวิธี bating technique แยกได้จำนวน 20 ไอโซเลต (*B. bassiana* สายพันธุ์ DOA) (Figure 3.8.1)ทำเชื้อราให้บริสุทธิ์โดยวิธี single spore และ hyphal trip แล้วจัดกลุ่มตามลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก (Figure 3.8.2) ในการตรวจสอบโดยวิธีชีวโมเลกุลต่อไป เลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นกสกัดดีเอ็นเอ พบว่าได้ปริมาณดีเอ็นเอที่

กรมวิชาการเกษตร

พอเหมาะและง่ายต่อการเพิ่มปริมาณในการทำปฏิกิริยา PCR และไม่ควรทิ้งเชื้อราดังกล่าวให้มีอายุเกิน 10 วัน เนื่องจากผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ปริมาณจะต่ำ โดยสังเกตุจากเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ หรือ ดูบน gel electrophoresis

ผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในยีนบริเวณ The internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้ primer ITSF1-ITSF2 ในปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งมีลำดับเบสความยาวประมาณ 750-800 bp สามารถเพิ่มบริมาณดีเอ็นเอได้ดี 100 % และจากการถอดระหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ DNA sequencing และ Blast เปรียบเทียบกับข้อมูลพื้นฐานบน Gene Bank ใน NCBI พบว่า *B. bassiana* สายพันธุ์ DOA และสายพันธุ์ จากบริษัทที่นำมาขึ้นทะเบียน มีลำดับนวิคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน (query cover) *B.bassiana* มากกว่า 99.8-100 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น B bassiana DOA-NP จะอยู่ในกลุ่มของ *Nomuraea rilei* ซึ่งปัจจุบันได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Metarhzium rilei* (Kepler *et al.,* 2014) *B bassiana* DOA-B12, DOA-B16, DOA-B17 คือ *Cordyceps cicadae* , *Isaria tenuipes* และ *Ophiocordyceps sobolifera* ตามลำดับ ผลจากการวิเคราะห์ DNA barcode gap โดยดูจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน intra- และ interspecific genetic (Puillandre *at al.,* 2012) พบว่าจากกราฟยังมีเปอร์เซนต์ซ้อนทับ(Distribute overlap)อยู่ระหว่าง species แต่เปอร์เซนต์ดังกล่าวไม่สูงมาก และเมื่อเปรียบเทียบกับผล phylogenetic tree แล้ว ซึ่งสอดคล้องกับแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ซึ่ง species ดังกล่าวแบ่งกลุ่มกันอย่างชัดเจน และในเบื้องต้นพบว่า ITS gene สามารถใช้เป็น DNA barcode ในการจัดจำแนกเชื้อราในกลุ่ม Beauveria species complex หรือ *B. bassiana* sensu lato ได้ (Akmal *et al.*, 2013, Seiffert 2009) ในกรณีที่ต้องการพิสูจน์ลักษณะทางพันธุกรรมเชื้อราในกลุ่มนี้ที่นำมาขึ้นทะเบียนกรมวิชาการเกษตร

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ beta-tubulin genes พบว่า primer Bt2a-Bt2b ในปฏิกิริยา PCR ซึ่งมีลำดับเบสความยาวประมาณ 450-500 bp พบว่า *B.bassiana* สายพันธุ์ DOA-B4 และ DOA-B17 เพิ่มปริมาณได้แต่ ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่สมบูรณ์ และมีข้อมูลเพียงพอที่จะนำมาวิเคราะห์ได้ เนื่องจากในบริเวณยีนดังกล่าวมีปริมาณ G-C content ที่สูง ทำให้ primer ไม่สามารถเริ่มต้นสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ และเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในเชื้อรากลุ่มดังกล่าวจากผลิตภัณฑ์ ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร พบว่าสามารถพิสูจน์เชื้อราดังกล่าวได้แม่นยำ คือเชื้อรา *B. bassiana* ซึ่งสอดคล้องกับผลของการวิเคราะห์ DNA barcode gap โดยดูจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน intra- และ interspecific genetic (Puillandre *at al.,* 2012) พบว่าจากกราฟมีเปอร์เซ็นต์ซ้อนทับ (Distribute overlap) ใกล้เคียงกับตำแหน่งยีน ITS อยู่ระหว่าง species แต่เปอร์เซนต์ดังกล่าวไม่สูงมาก (Figure 3.8.3)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Elongation Factor 1 (eEF1) พบว่า primer EF1F-ER1R ซึ่งมีลำดับเบสความยาวประมาณ 750 bp พบว่า การเพิ่มปริมาณในตำแหน่งยีนดังกล่าว มีปัญหาเรื่อง GC1 content มากบาง ไอโซเลตไม่สามารถทำได้ เนื่องจาก primer ไม่จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ หรือ การสังเคราะห์ไม่สมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามยีนดังกล่าวก็เหมาะที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์เชื้อราบิวเวอร์เรียในกลุ่ม species complex โดยเฉพาะในกลุ่มย่อย *B. bassiana* sensu stricto ซึ่งสามารถดูได้จากค่า Distribute overlap ระหว่าง intra- และ interspecific genetic variation (Puillandre *at el*., 2012, Silva *et al*., 2015) (Figure 3.8.5) ซึ่งผลที่

กรมวิชาการเกษตร

ได้สอดคล้องกับ phylogenetic tree ซึ่งพบว่า สามารถแยกกลุ่มย่อยออกมาจาก *B. bassiana* ซึ่งมีความเป็นไปได้เป็นสายพันธุ์เดียวกันสาเหตุที่แยกclade เกิด haplotype gene ที่ต่างกัน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการเปรียบเทียบข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 3 gene คือ The internal transcribed spacer (ITS) beta-tubulin genes และ Elongation Factor 1 (eEF1) พบว่า เครื่องหมายที่เหมาะที่จะนำมาตรวจสอบเชื้อราในกลุ่ม *B.bassiana* ซึ่งมีความซับซ้อนทางพันธุกรรรมนั้น คือ ITS และ BT gene ในกรณีที่ตรวจสอบระดับ species โดยเฉพาะงานการขึ้นทะเบียนของกรมวิชาการเกษตร ซึ่ง ITS gene ซึ่งใช้เป็นเครื่องหมายดังกล่าวควรใช้ primer ITSF1-ITS4 เพราะให้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ละเอียดกว่า ITS1-ITS4 ที่สำคัญเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาในขบวนการ PCR ง่าย ส่วน BT gene มักจะมีปัญหาเรื่อง GC- content สำหรับในกรณีต้องการตรวจสอบระดับกลุ่มย่อยหรือทำงานทางด้าน taxonomy เพื่อตั้งชื่อ หรือ identify เชื้อรากลุ่มนี้ควรใช้เครื่องหมายดังกล่าวเพิ่มเติมในส่วนของ RPB2 (encoding the second largest subunit of RNA polymerase II) เพื่อการจัดจำแนกที่ถูกต้อง

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.8.1. The structure of conidia and conidiophore showed on insects body and appeared on the ground (a,b,c)

กรมวิชาการเกษตร

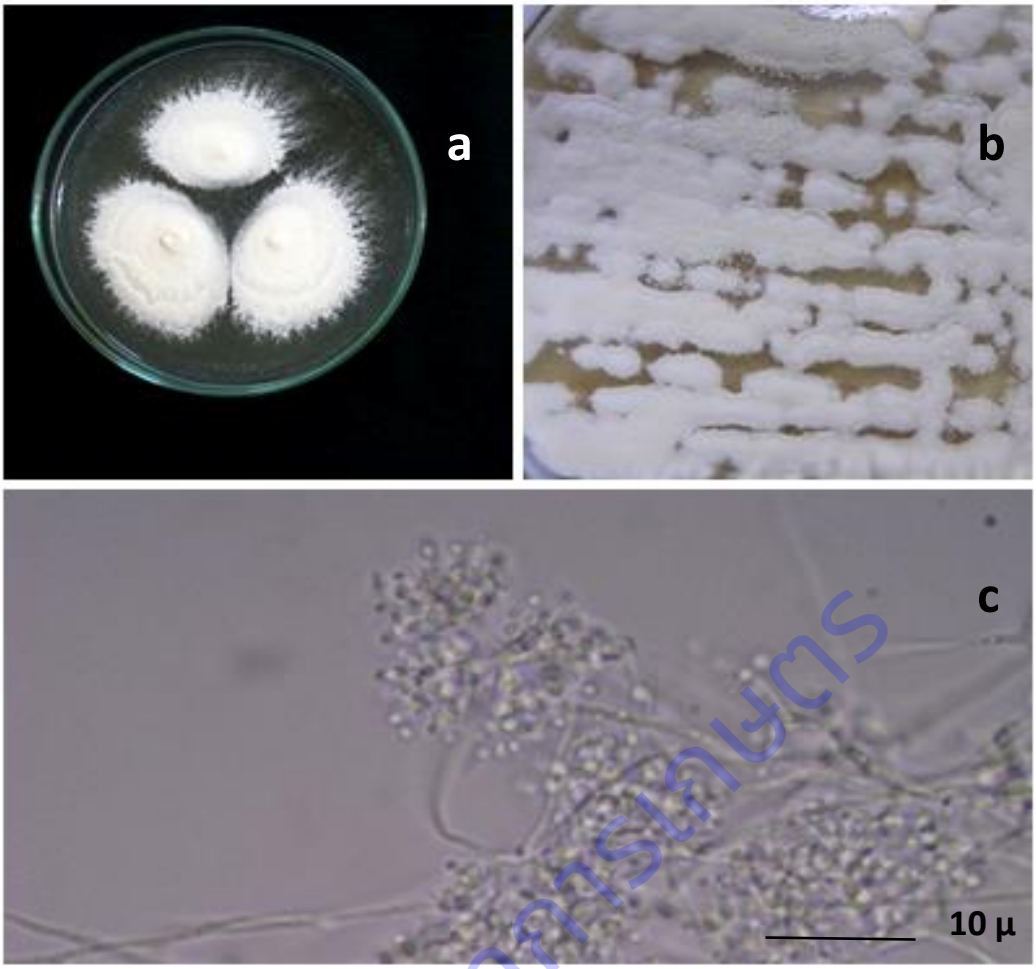
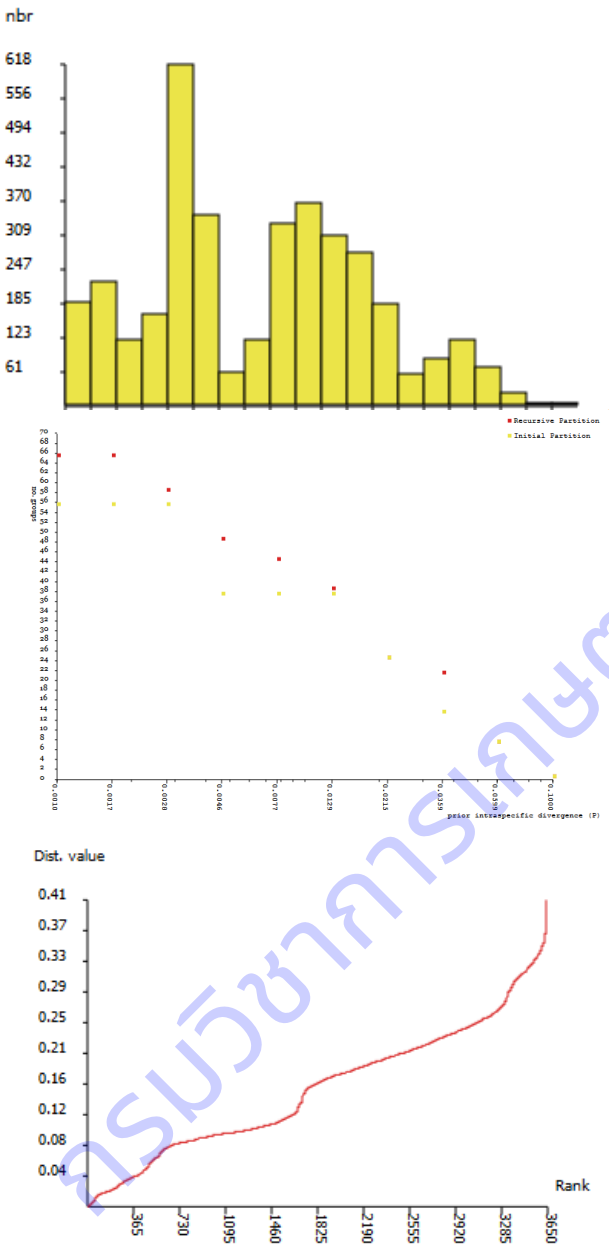


Figure 3.8.2 The colony of *B. bassiana* strain DOA-B4 on MEA and structure of conidiophore and conidia on microscope which representative of complex species

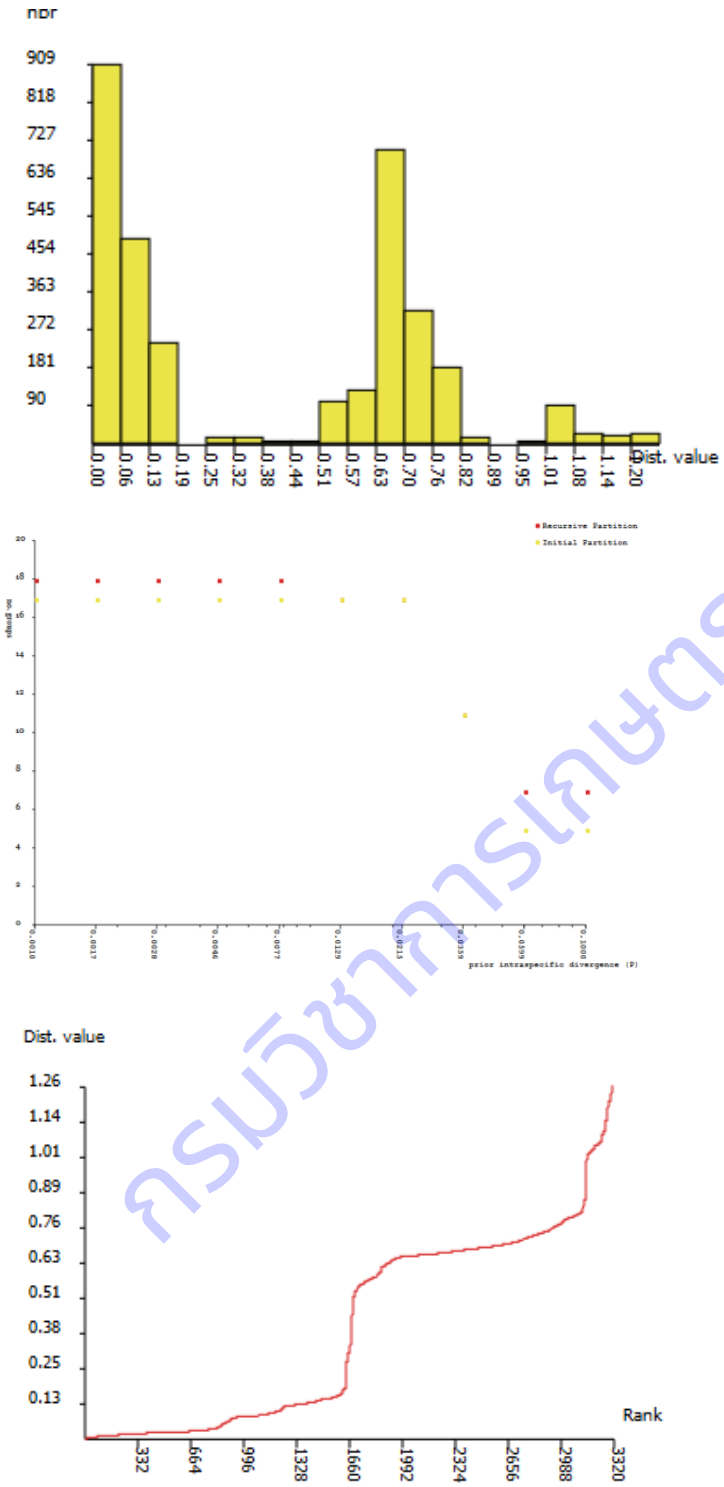
กรมวิชาการเกษตร



\

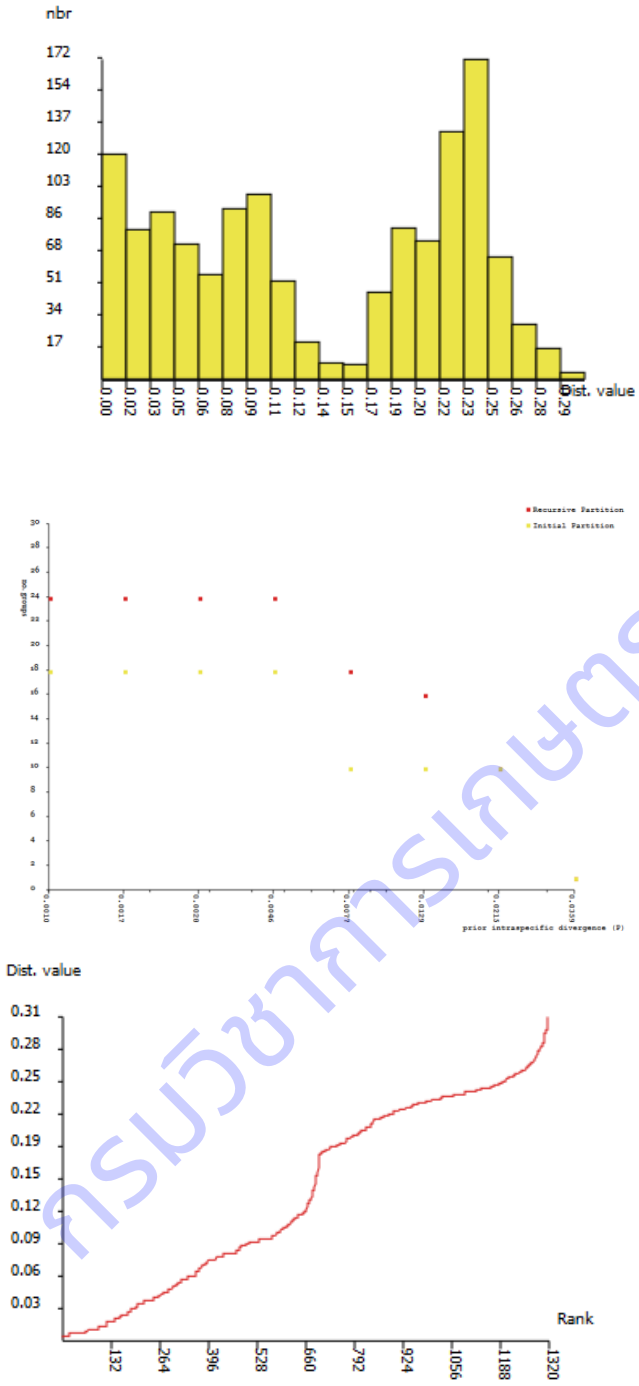
Figure 3.8.3. Distance values show a gap between the intra-specific and the inter-specific distances of ITS gene for detected barcode gaps .

สำนักวิทยบริการฯ



กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.8.4 Distance values show a gap between the intra-specific and the inter-specific distances of EF gene for detected barcode gaps .



กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.8.5. Distance values show a gap between the intra-specific and the inter-specific distances of BT gene for detected barcode gaps .

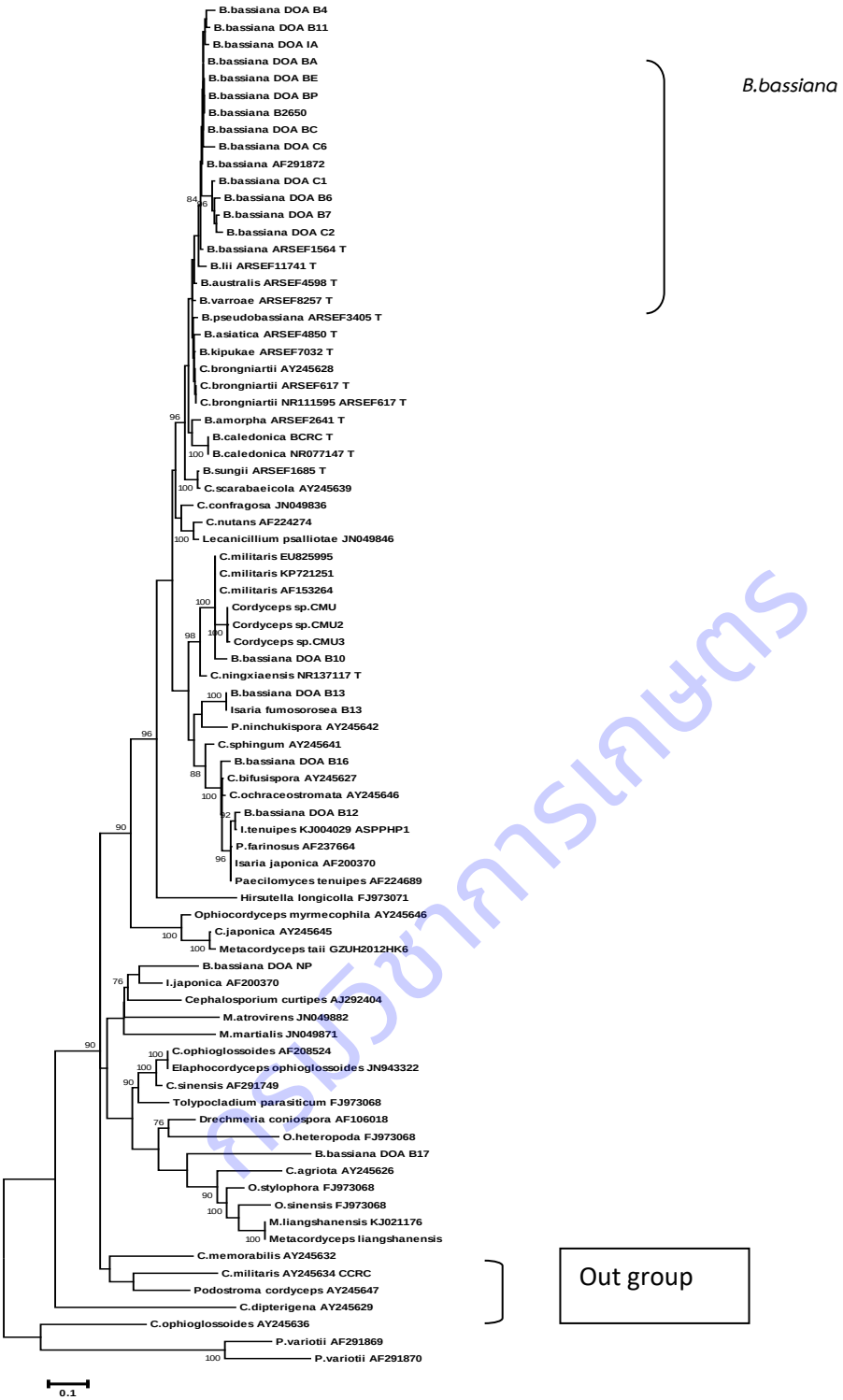


Figure 3.8.6. Maximum likelihood phylogentic tree of the internal transcribed spacer (ITS) in entomopathogenic fungi group. Bootstrap value (1,000 replication) are indicated above the node.

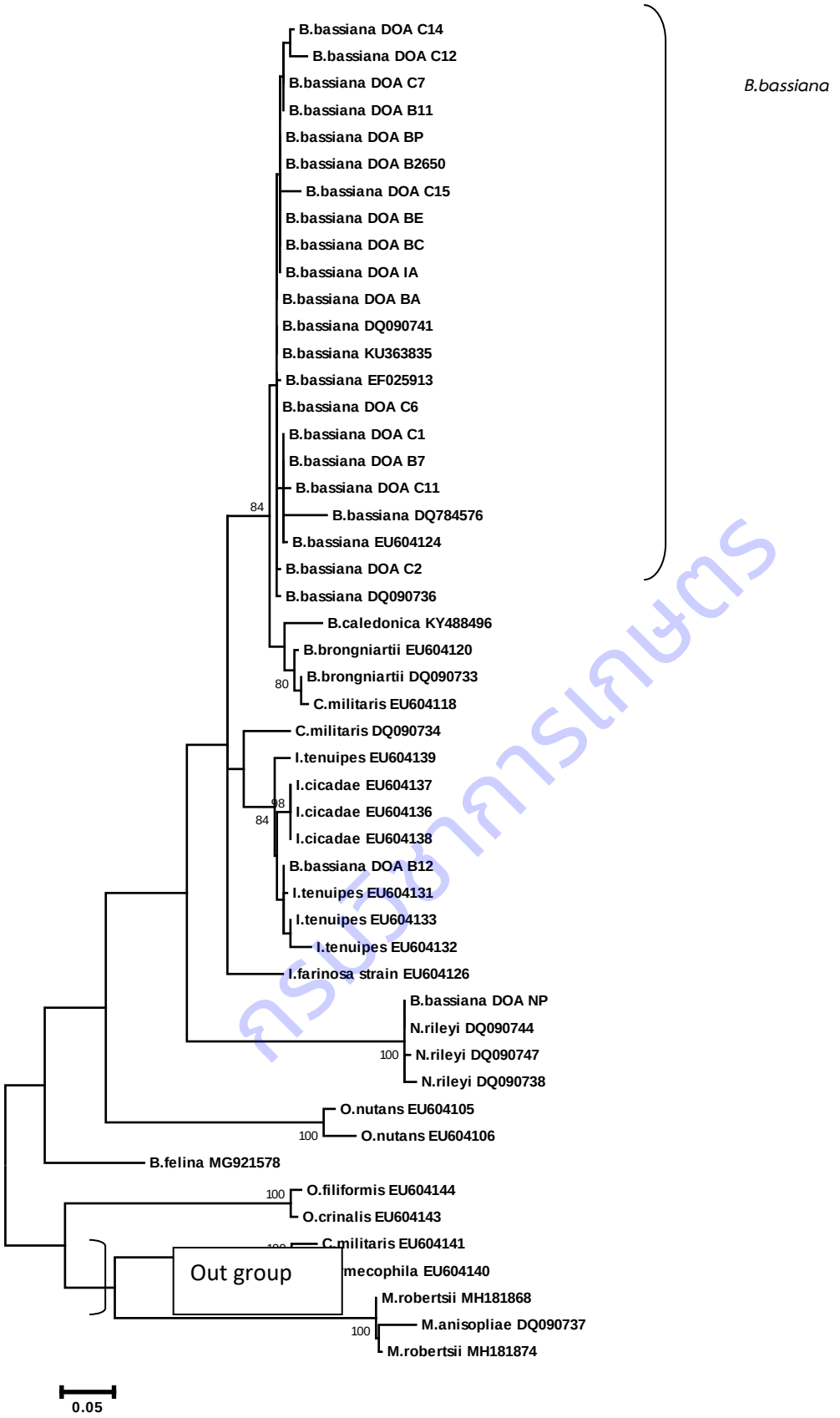


Figure 3.8.7 Maximum likelihood phylogentic tree of β t gene in *B. bassiana* complex species Bootstrap value (1,000 replication) are indicated above the node.

กรมวิทยาศาสตร

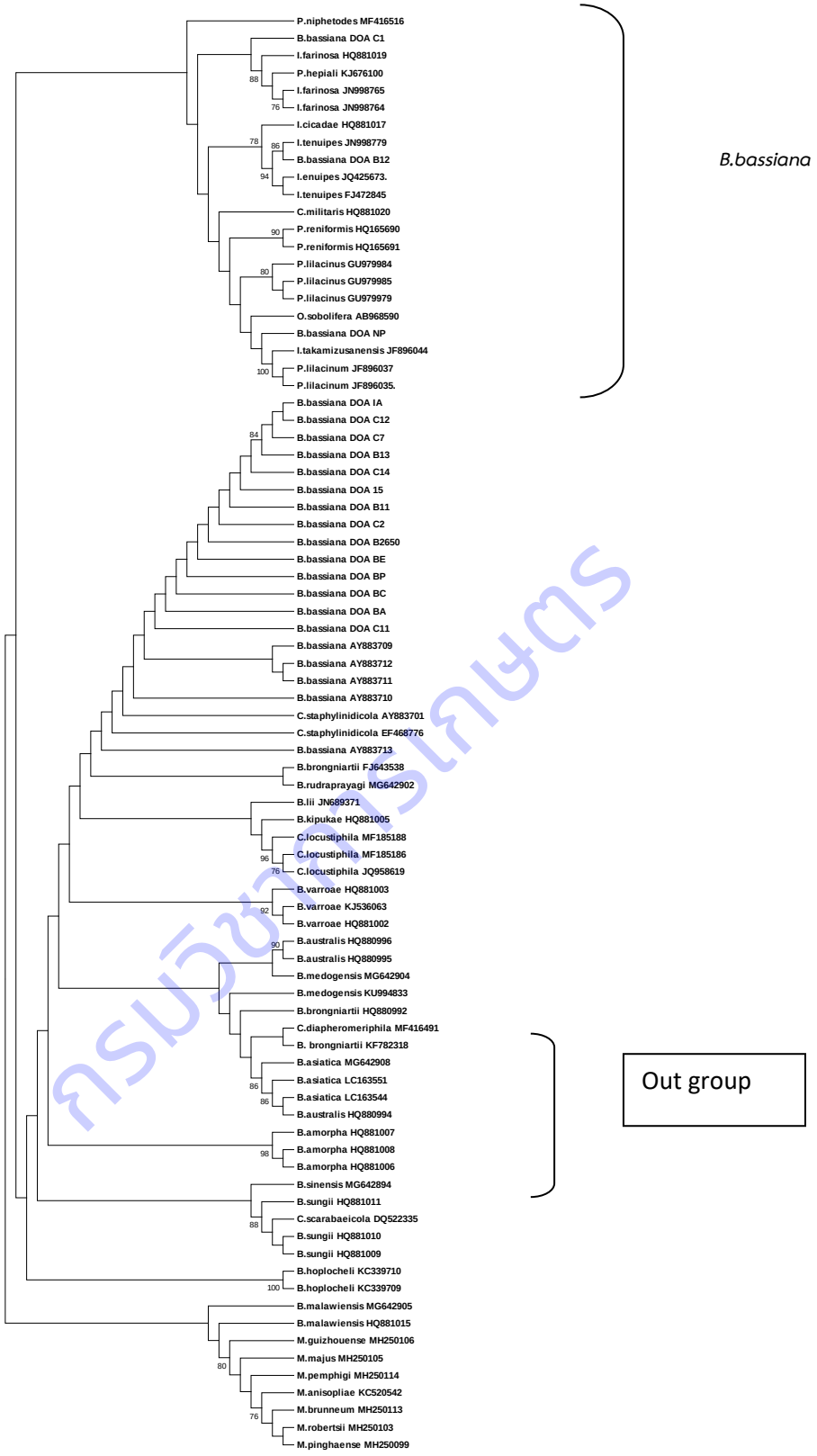


Figure 3.8.6. Maximum likelihood phylogentic tree of the Elongation factor in *B. bassiana* complex species. Bootstrap value (1,000 replication) are indicated above the node.

การทดลองที่ 3.9 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา *Trichoderma asperellum T. harzianum* และ *T. viride*

DNA barcoding for *Trichoderma asperellum, T. harzianum* and *T. viride* identification

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวชนินทร	ดวงสอาด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นางสาวพรพิมล	อธิปัญญาคม	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวสุณีรัตน์	สีมะเดื่อ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวมะโนรัตน์	สุดสงวน	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวอมรรัชฎ์	คิดใจเดียว	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวสุทธิณี	ลิขิตตระกูลรุ่ง	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

บทคัดย่อ

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

The fungal identification based on genealogical concordance has been applied to classify and identify fungal, especially in many cryptic and complex species. The DNA data of genes

กรมวิชาการเกษตร

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

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

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

ดังนั้น เชื้อรา *Trichoderma* จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืช โดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียแก่พืช เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และช่วยลดการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืช

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

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 ลักษณะความแตกต่างที่มีการรายงานหรือบันทึกไว้ดังกล่าวสามารถใช้แยกความแตกต่างของได้อย่างชัดเจนสำหรับบางสปีชีส์ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ หรือมีความคลุมเครือระหว่าง strain ของบางสปีชีส์ (Singh *et al*., 2014) เช่น ในเชื้อรา *T. harzianum* ซึ่งมีหลายการศึกษาพบว่า เชื้อราที่ถูกจัดจำแนกว่าเป็น *T. harzianum* มีมากกว่า 1 ชนิด ซึ่ง ลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมถึงลักษณะของ cultures นั้นมีความแตกต่าง 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) แต่พบว่าการจำแนกด้วย ITS เพียงหนึ่งตำแหน่งไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างรา *Trichoderma* บางสปีชีส์ได้ เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* เหล่านั้นมีวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน มักจะมีความคล้ายคลึงหรือมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมาก เช่น มีรายงานว่า *T. asperellum* เป็น complex species (มีมากกว่า 1 สปีชีส์ภายใต้ชื่อ *T. asperellum*) และลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะของ conidia ไม่สามารถใช้อ้างอิง หรือเปรียบเทียบเพื่อจำแนกชนิดได้ แต่เมื่อใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) 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* โดยสามารถแยกความแตกต่างได้โดยเปรียบเทียบข้อมูลของดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร

เอ็นเอเท่านั้น (Samuels *et al.*, 2010) สำหรับเชื้อรา *T. harzianum* นั้น Chaverri *et al*. (2003) ทำการเปรียบเทียบลักษณะทางด้านพันธุกรรมจาก 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS tef1 calmodulin และ actin เชื้อรา *Trichoderma* ที่พบในประเทศอินเดียจำนวนหลายไอโซเลทที่จัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาว่าเป็น *T. viride* แต่เมื่อใช้ข้อมูลของดีเอ็นเอจากตำแหน่ง ITS และ elongation factor พบว่าเชื้อราเหล่านี้คือเชื้อรา *T. asperellum* หรือ *T. asperelloides* (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 ดังนั้นการศึกษาการจัดจำแนกเชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride* โดยใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) จึงมีความสำคัญ โดยข้อมูลและผลที่ได้จากการวิจัยจะได้มาซึ่งวิธีการในการตรวจสอบชนิดเชื้อรา *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 เพื่อนำไปประยุกต์ในการตรวจสอบเชื้อราดังกล่าวในสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทับตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่
   - Microcentrifuge
   - Thermal cyclers
   - Vortex
   - Tissue Lyser

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

- 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 บิกเกอร์ 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

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990)

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG (Carbone and Kohn, 1999)

EF-2: GGARGTACCAGTSATCATGTT (O'Donnell et al., 1998)

the Large Subunit (LSU, 28S)

LROR: ACCCGCTGAACTTAAGC (Vilgalys and Hester, 1990)

LR6: CGCCAGTTTCTGCTTACC (Vilgalys and Hester, 1990)

- 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

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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 รวมถึงไอโซเลตที่มีการส่งเสริมโดยหน่วยงานของภาครัฐ โดยตัวอย่างของเชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride* ทั้งหมดจากการเก็บตัวอย่าง จะนำมาแยกเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการสกัด DNA และเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส โดยจัดเก็บใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ เพื่อใช้ในการศึกษาหรือเป็นตัวอย่างอ้างอิงต่อไป

3. ศึกษา และจำแนกชนิดเชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะของเชื้อรา *T. asperellum T. harzianum* และ *T. viride*

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

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

ตักหรือเขี่ยเส้นใยรวมถึง conidia ของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ และทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง ไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990)

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG (Carbone and Kohn, 1999)

EF-2: GGARGTACCAGTSATCATGTT (O'Donnell et al., 1998)

the Large Subunit (LSU, 28S)

LROR: ACCCGCTGAACTTAAGC (Vilgalys and Hester, 1990)

LR6: CGCCAGTTTCTGCTTACC (Vilgalys and Hester, 1990)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของตำแหน่ง the Internal Transcribed Spacer (ITS) the translation elongation factor 1-alpha (tef1) และ the Large Subunit (LSU, 28S) ด้วย Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนด annealing temperature ที่ 56 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

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

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2021.0.3 และบันทึกข้อมูลในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consensus sequence) แต่ละตำแหน่งมาจัดเรียง (align) เป็นชุดข้อมูล (dataset) รวมกับ type sequences ของแต่ละตำแหน่งได้แก่ ITS และ tef1 จากรายงานศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อราวงศ์ *Trichoderma* (Samuels et al., 2009; Li *et al*., 2012; Chaverri *et al*., 2015; Jaklitsch and Voglmayr, 2015; Robbertse *et al*., 2017) และตรวจสอบการจัดเรียงของชุดข้อมูล (alignment) ด้วยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MAFFT X (Kumar *et al.,* 2018) ใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) เพื่อกรองส่วนที่เป็น ambiguous sequence จากนั้นจัดทำ partitioned (combined) dataset ของตำแหน่ง ITS และ tef1 บันทึก dataset และ partitioned dataset ในรูปแบบไฟล์ nexus โดยใช้โปรแกรม Mesquite

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

จำแนกชนิดของรา *Trichoderma* โดยวิเคราะห์จาก combined dataset ของ ITS และ tef1 วิเคราะห์ด้วย phylogenetic criteria 2 แบบคือ

กรมวิชาการเกษตร

1. Maximum Likelihood (ML) โดยเตรียมไฟล์ phy และวิเคราะห์โดยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ซึ่งจำเพาะต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command –f a) เริ่มจาก random starting tree และ กำหนด maximum likelihood bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง

2. Bayesian inference (BI) เตรียมไฟล์ nexus วิเคราะห์โดยโปรแกรม MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) โดยใช้วิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ค่าตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้ กำหนด 4 runs แต่ละ run ประกอบด้วย 4 chains วิเคราะห์จำนวน 10 ล้าน generations ตั้งค่า cold chain ที่ temperature 0.25 สุ่มตัวอย่าง substitution model parameters และบันทึก trees ทุก 500 generations ตรวจสอบความเชื่อมั่นของ topology ด้วย cumulative and compare functions ด้วย AWTY (Nylander *et al*., 2008)

การบันทึกข้อมูล

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 รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างและจำแนกชนิดเชื้อรา *Trichoderma* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เก็บตัวอย่างดินมาแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ รวมถึงเชื้อราจาก culture collection เมื่อศึกษาด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบเชื้อราที่มีลักษณะพ้องกับเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 74 ไอโซเลท (Table 3.9.1, Figure 3.9.1) จากการจำแนกชนิดจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ได้แก่ การเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย conidia conidiophore และโครงสร้างอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope พบว่าเชื้อราทั้ง 74 ไอโซเลท สามารถจำแนกเบื้องต้นได้ เชื้อรา *T. asperellum* จำนวน 72 ไอโซเลท และเชื้อรา *T. harzianum* จำนวน 2 ไอโซเลท แต่ไม่พบเชื้อรา *T. viride* (Table 3.9.1)

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.9.1: List of specimens observed on this study

Voucher No.	Complex	*Trichoderma*	Sources	Locations
M0008	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Tak Fha, Nakhon Sawan
M0009	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Ban Rai, Uthai Thani
M0010	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Pak Chong, Nakhon Ratchasima
M0011	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Na Yaiarm, Chanthaburi
M0013	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil	Mae Tang, Chiangmai
M0097	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil	Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom
M0098	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil	San Sai, Chiangmai
M0099	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil	Tha Chana, Surat Thani
M0100	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0101	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0102	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil	Maejo, San Sai, Chiangmai
M0103	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0104	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Bang Yai, Nonthaburi
M0105	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0106	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0107	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0108	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0109	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0110	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0111	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Koh Samui, Suratthani
M0112	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Pak Chong, Nakhon Ratchasima
M0113	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Mae Saluai, Chiangrai
M0114	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Lad Yao, Nakhon Sawan
M0115	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Na Yaiarm, Chanthaburi
M0197	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Na Yaiarm, Chanthaburi
M0198	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Nakhon Sawan

กรมวิทยาศาสตร์

Table 3.9.1: Continued

Voucher No.	complex	*Trichoderma*	Sources	Locations
M0199	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0200	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0201	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0202	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0203	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0204	*T. harzianum*	*T. lentiforme*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0205	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0227	*T. asperellum*	*T. asperellum*	soil surround roots	Thamai, Chanthaburi
M0228	*T. asperellum*	*T. asperellum*	soil surround roots	Na Yaiarm, Chanthaburi
M0229	*T. asperellum*	*T. asperellum*	soil surround roots	Na Yaiarm, Chanthaburi
M0230	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Tha Muang, Kanchanaburi
M0231	*T. asperellum*	*T. asperellum*	soil surround roots	Klongnoi, Surat Thani
M0232	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Klongnoi, Surat Thani
M0233	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	*Citrus aurantifolia*	Plant Pathology Research Group
M0279	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0280	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0281	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0282	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0366	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	San Kam Pang, Chiangmai
M0367	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Doi Sa Ket, Chiangmai
M0427	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Mueang, Nong Khai
M0428	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Mueang, Nong Khai
M0530	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0570	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Phaya Mengrai, Chiangrai
M0571	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Chiang Khong, Chiangrai
M0572	*T. asperellum*	*T. asperellum*	soil surround roots	Phaya Mengrai, Chiangrai
M0573	*T. asperellum*	*T. asperellum*	soil surround roots	Phaya Mengrai, Chiangrai
M0574	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Phaya Mengrai, Chiangrai
M0575	*T. asperellum*	*T. asperellum*	soil surround roots	Phaya Mengrai, Chiangrai
M0576	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Phaya Mengrai, Chiangrai
M0577	*T. asperellum*	*T. asperellum*	soil surround roots	Phaya Mengrai, Chiangrai
M0578	*T. asperellum*	*T. asperellum*	soil surround roots	Phaya Mengrai, Chiangrai
M0579	*T. asperellum*	*T. asperellum*	soil surround roots	Phaya Mengrai, Chiangrai
M0651	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0673	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group

กรมวิทยาศาสตร์

Table 3.9.1: Continued

Voucher No.	complex	*Trichoderma*	Sources	Locations
M0745	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0876	*T. asperellum*	*T. asperellum*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0877	*T. asperellum*	*T. asperellum*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0884	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0885	*T. asperellum*	*T. asperellum*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0886	*T. asperellum*	*T. asperellum*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0887	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0929	*T. asperellum*	*T. asperellum*	soil surround roots	Pichai, Uttaradit
M0930	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Tha Muang, Kanchanaburi
M0931	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Tha Yang, Petchaburi
M0932	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	soil surround roots	Mueang, Chanthaburi
M0994	*T. harzianum*	*T. lixii*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0995	*T. asperellum*	*T. asperelloides*	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group

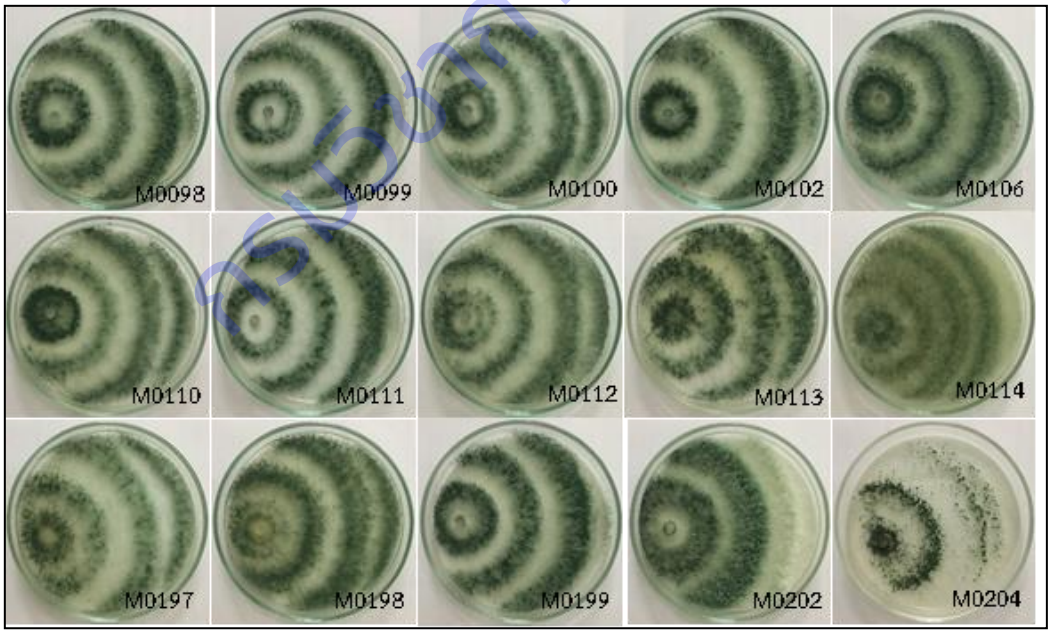


Figure 3.9.1: *Trichoderma* used in this study.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* โดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

นำเชื้อรา *T. asperellum* จำนวน 70 ไอโซเลท และเชื้อรา *T. harzianum* จำนวน 2 ไอโซเลท มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation เมื่อเชื้อราเจริญจนมีขนาดโคโลนีประมาณ 6 เซนติเมตร จึงดำเนินการสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นดำเนินการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของยีนตำแหน่ง ITS, LSU และ tef1 ด้วยไพร์เมอร์ของแต่ละตำแหน่ง ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็ก-โทรโฟรีซิส ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำ purification และ sequencing

จัดทำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2021.0.3 จากนั้นจัดเรียง (align) เป็นชุดข้อมูล (dataset) รวมกับ type sequences โดยใช้ข้อมูลของยีนตำแหน่ง ITS และ tef1 ในการวิเคราะห์เนื่องจากข้อมูลของตำแหน่ง LSU ของ type sequence มีข้อมูลจำกัด โดยข้อมูลที่ใช้มาจากรายงานศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อราวงศ์ *Trichoderma* (Samuels *et al*., 2009; Li *et al*., 2012; Chaverri *et al*., 2015; Jaklitsch and Voglmayr, 2015; Robbertse *et al*., 2017) (Table 3.9.2) จำแนกชนิดของรา *Trichoderma* โดยวิเคราะห์จาก combined dataset ของ ITS-tef1 ของ 322 taxa โดยมี *Protocrea* เป็น outgroup ทำการวิเคราะห์รวม 1,814 bases/taxa มีข้อมูลของแต่ละ partition ดังนี้ ITS = 766 basesและ tef1 = 1,048 bases

เมื่อวิเคราะห์ phylogenetic reconstruction พบว่า topology ที่ได้จาก ML และ BI มีความสอดคล้องกัน และเป็น monophyletic (Figure 3.9.2) โดย phylogram ที่ได้จาก ML พิจารณาค่า bootstrap support values (≥70%) ที่วิเคราะห์จาก 1,000 ซ้ำ และ BI ได้จากค่าเฉลี่ยของ 20,000 converged trees ดังนั้นผลการจัดจำแนกด้วยข้อมูลพันธุกรรมของเชื้อรา *Trichoderma* ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า เชื้อรากลุ่ม *T. asperellum* ซึ่งมีรายงานว่าเป็น complex species (Samuels *et al*., 2009; Jaklitsch and Voglmayr, 2015) จำนวน 72 ไอโซเลทสามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *T. asperellum* จำนวน 15 ไอโซเลท และจำแนกได้เป็นเชื้อรา *T. asperelloides* จำนวน 57 ไอโซเลท ซึ่งแต่ละชนิดจัดอยู่ใน clade เดียวกับ type sequences ของเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. asperelloides* ตามลำดับ (Figure 3.9.1 และTable 3.9.2)

ส่วนเชื้อรากลุ่ม *T. harzianum* ซึ่งมีรายงานว่าเป็น complex species (Chaverri *et al*., 2015; Jaklitsch and Voglmayr, 2015) จำนวน 2 ไอโซเลท สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *T. lentiforme* (M0994) และ *T. lexii* (M0204) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเชื้อราทั้งสองชนิดเมื่อพิจารณาด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *T. harzianum* จึงอาจกล่าวได้ว่าเชื้อราทั้งสองไอโซเลทสามารถจำแนกด้วยข้อมูลหรือลักษณะเดิมว่าเป็น *T. harzianum sensu lato* แต่หากพิจารณาจากการจำแนกด้วยข้อมูลเชิงลึกของข้อมูลพันธุกรรม พบว่าเชื้อราทั้งสองชนิดคือ *T. lentiforme sensu stricto* และ *T. lexii sensu stricto* (Figure 3.9.2 และ Table 3.9.2) ทั้งนี้จากตัวอย่างที่ทำการศึกษาครั้งนี้ยังไม่พบไอโซเลทของเชื้อรา *T. harzianum sensu stricto* และ เชื้อรา *T. viride sensu stricto*

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Table 3.9.2: List of *Trichoderma* included in this study

Trichoderma	Clade	Ex-type/Voucher	GenBank Number	
			ITS	tef1
T. aeroaquaticum	Viride	BCC 36135, NBRC 108034	NR134333	AB646530
T. aerugineum	Green	CBS 120541	NR134379	FJ860608
T. aethiopicum	Longibrachiatum	CBS 130628	MH865819	EU401616
T. afarasin	Harzianum/H complex	CBS 130755	NR137301	AF348093
	Harzianum/H complex	GJS 06-98	FJ442630	FJ463327
T. afroharzianum	Harzianum/H complex	GJS 04-186, CBS 124620	NR137304	FJ463301
T. aggressivum f. aggressivum	Harzianum	DAOM 222156, IMI 393971	NR137299	AF348098
T. aggressivum f. europaeum	Harzianum	CBS 100526	NR145035	FJ467645
T. alni	Harzianum	CBS 120623	NR134375	EU498312
T. alutaceum	Polysporum	CBS 120535	NR134382	FJ179567
T. americanum	Hypocreanum	GJS 96-191	DQ835411	DQ835435
T. andinense	Longibrachiatum	CBS 345.97, GJS 90-140	MH549084	AY956321
T. appalachiense	Viride	GJS 97-243, CBS 133558	NR134340	DQ307502
T. applanatum	Hypocreanum	CGMCC 3.17526, 7792	KJ783291	KJ634759
T. arundinaceum	Brevicompactum	CBS 119575, ATCC 90237	DQ080074	EU338291
T. asperelloides	Viride	CBS 125938, GJS 04-116 (pT)	GU198301	GU248412
	Viride	M0008	this study	this study
	Viride	M0009	this study	this study
	Viride	M0010	this study	this study
	Viride	M0011	this study	this study
	Viride	M0013	this study	this study
	Viride	M0097	this study	this study
	Viride	M0098	this study	this study
	Viride	M0099	this study	this study
	Viride	M0100	this study	this study
	Viride	M0101	this study	this study
	Viride	M0102	this study	this study
	Viride	M0103	this study	this study
	Viride	M0104	this study	this study
	Viride	M0105	this study	this study
	Viride	M0106	this study	this study
	Viride	M0107	this study	this study
	Viride	M0108	this study	this study
	Viride	M0109	this study	this study
	Viride	M0110	this study	this study
	Viride	M0111	this study	this study
	Viride	M0112	this study	this study
	Viride	M0113	this study	this study
	Viride	M0114	this study	this study
	Viride	M0115	this study	this study
	Viride	M0197	this study	this study
	Viride	M0198	this study	this study

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.9.2: Continued

Trichoderma	Clade	Ex-type/Voucher	GenBank Number	
			ITS	tef1
T. asperelloides	Viride	M0199	this study	this study
	Viride	M0200	this study	this study
	Viride	M0201	this study	this study
	Viride	M0202	this study	this study
	Viride	M0203	this study	this study
	Viride	M0205	this study	this study
	Viride	M0230	this study	this study
	Viride	M0232	this study	this study
	Viride	M0233	this study	this study
	Viride	M0279	this study	this study
	Viride	M0280	this study	this study
	Viride	M0281	this study	this study
	Viride	M0282	this study	this study
	Viride	M0366	this study	this study
	Viride	M0367	this study	this study
	Viride	M0427	this study	this study
	Viride	M0428	this study	this study
	Viride	M0530	this study	this study
	Viride	M0570	this study	this study
	Viride	M0571	this study	this study
	Viride	M0574	this study	this study
	Viride	M0576	this study	this study
	Viride	M0673	this study	this study
	Viride	M0745	this study	this study
	Viride	M0884	this study	this study
	Viride	M0887	this study	this study
	Viride	M0930	this study	this study
	Viride	M0931	this study	this study
	Viride	M0932	this study	this study
	Viride	M0995	this study	this study
T. asperellum	Viride	CBS 433.97, ATCC 204424	AY380912	AF456907
	Viride	CGMCC 6422	KF425754	KF425756
	Viride	M0227	this study	this study
	Viride	M0228	this study	this study
	Viride	M0229	this study	this study
	Viride	M0231	this study	this study
	Viride	M0572	this study	this study
	Viride	M0573	this study	this study
	Viride	M0575	this study	this study
	Viride	M0577	this study	this study
	Viride	M0578	this study	this study
	Viride	M0579	this study	this study

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.9.2: Continued

Trichoderma	Clade	Ex-type/Voucher	GenBank Number	
			ITS	tef1
T. asperellum	Viride	M0876	this study	this study
	Viride	M0877	this study	this study
	Viride	M0885	this study	this study
	Viride	M0929	this study	this study
T. atlanticum	Polysporum	CBS 120632	NR134397	FJ860649
T. atrobrunneum	Harzianum/H complex	GJS 92-110, CBS 548.92	NR137298	AF443942
T. atrogelatinosum	Harzianum	CBS 237.63	AF400751	KJ871083
T. atroviride	Viride	CBS 142.95	MH862505	AF456887
T. aurantеffusum	Brevicompactum	CBS 119284	NR134383	FJ860613
T. aureoviride	Green	CBS 120536, C.P.K. 2848	NR144877	-
	Green	CBS 245.63	MH858276	AF534575
T. austriacum	Hypocreanum	CBS 122494	NR134384	FJ860619
T. austrokoningii	Viride	CBS 119092, BPI GJS 99-146	NR134364	DQ307561
T. avellaneum	Basal	CBS 121667, CTR 77-155	DQ020000	AY225857
T. balearicum	Psychrophilum	CBS 133222, S402, WU 33371	-	KJ665434
T. bannaense	Harzianum/H complex	HMAS 248840	NR154570	KY688037
T. barbatum	Stromaticum	CBS 125733, BPI GJS 04-308	NR134430	HQ342223
T. bavaricum	Polysporum	CBS 120538	NR134385	FJ860620
T. bissettii	Longibrachiatum	CBS 137447, UTHSC 08-2443	NR134442	HG931266
T. brevicompactum	Brevicompactum	CBS 109720, GJS 04-381	DQ000635	EU338299
T. britannicum	Green	CBS 253.62, SB1	NR160088	KF134796
T. britdaniae	Longibrachiatum	WU 31610	NR138454	JQ685865
T. brunneoviride	Harzianum	CBS 121130	NR134376	EU498316
T. caerulescens	Viride	CBS 130011, S195	NR134432	JN715621
T. caesareum	Stromaticum	CBS 124369, BPI GJS 01-225	NR134427	HQ342216
T. calamagrostidis	Psychrophilum	CBS 121133	NR134386	FJ860622
T. camerunense	Harzianum/H complex	GJS 99-230, CBS 138272	NR137300	AF348107
T. capillare	Longibrachiatum	CBS 130629	-	JN182283
	Longibrachiatum	SFC 101151	MF185967	MF185944
T. caribbaeum var. caribbaeum	Viride	GJS 97-3, CBS 119093	NR166015	DQ284977
T. caribbaeum var. aequatoriale	Viride	DIS 320c, CBS 119055	DQ323436	DQ289010
T. catoptron	Harzianum	BPI 843645, CBS 114232	NR134348	AY737726
T. ceciliae	Lone lineage	CBS 130010	NR160253	KJ665444
T. ceraceum	Green	CBS 114245, DAOM 232831, ATCC MYA-3222, GJS 95-159	EU330953	AY937437
T. ceramicum	Harzianum	GJS 88-70, CBS 114576	NR134388	FJ860628
T. cerebriforme comb. nov	Viride	GJS85-245, CBS 139045	NR134447	KP109824
T. cerinum	Harzianum	DAOM 230012	NR111835	AY605802
T. chlamydosporicum	Green	HMAS 248850	NR154577	KY688052
T. chlorosporum	Green	GJS 88-33, CBS 114231	MH862958	KJ871143
T. christiani	Harzianum	CBS 132572	-	KJ665438
T. chromospermum	Green	CBS 114577, BPI 749362	NR138432	AY391974
T. cinnamomeum	Harzianum	CBS 114235, BPI 745554	NR144871	KJ871252

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.9.2: Continued

Trichoderma	Clade	Ex-type/Voucher	GenBank Number	
			ITS	tef1
T. citrinoviride	Longibrachiatum	DAOM 172792	NR077178	AY865637
T. citrinum	Hypocreanum	CBS 894.85	NR134368	DQ835481
T. compactum	Harzianum	CBS 121218	NR138435	KF134798
T. composticola	Viride	CBS 133497	-	KC285631
	Viride	CBS 439.95	DQ315439	AY937413
T. costaricense	Green	P.C. 21, INB 0003527695	NR134345	AY391980
T. crassum	Green	DAOM 164916, CBS 336.93	NR134370	EU280048
T. cremeoides	Green	CBS 131486, WU 33300	-	KJ665456
T. cremeum	Green	GJS 91-125, CBS 111146	AY737760	AY737736
T. croceum	Polysporum	DAOM 167068, CBS 337.93	DQ083026	AY750879
T. crystalligenum	Psychrophilum	CBS 118980	NR134365	DQ345342
T. dacrymycellum	Harzianum	WU 29042, WU 29044	FJ860749	FJ860633
T. danicum	Green	CBS 121273	NR134389	FJ860634
T. delicatulum	Basal	CBS 120631	FJ860751	FJ860636
T. deliquescens	Deliquescens	CBS 121131	NR134394	FJ860644
T. dingleyae	Viride	CBS 119056	NR138443	AF348117
T. dorotheae	Viride	GJS 99-202, CBS 119089	NR166014	DQ307536
T. effusum	Longibrachiatum	DAOM 230007	DQ083008	AY937419
T. eijii	Viride	TUFC 100002, CBS 133190	NR144879	JX684011
T. endophyticum	Harzianum/H complex	CBS 130729, DIS 217a	FJ442243	FJ463319
T. epimyces	Harzianum	CBS 120524	NR134377	EU498320
T. estonicum	Green	GJS 96-129, CBS 111147	AY737767	AY737733
T. europaeum	Polysporum	CBS 121276, WU 29250	-	FJ179574
T. euskadiense	Longibrachiatum	CBS 130013	NR160254	KJ665492
T. evansii	Viride	CBS 123079, DIS 341HI	NR138449	EU883566
T. fertile	Semiorbis	DAOM 167161	NR134336	AY605801
T. flagellatum	Longibrachiatum	CBS 130626	MH865822	FJ763149
T. flaviconidium	Viride	Lost, GJS 99-51	DQ023301	AY665710
T. flavofuscum	Green	CBS 248.59	AF398492	AF401020
T. floccosum	Stromaticum	GJS 01-238, CBS 124372	NR137306	HQ342218
T. foliicola	Polysporum	CBS 130008	NR134434	JQ685862
T. fomiticola	Semiorbis	CBS 121136	NR134391	FJ860639
T. gamsii	Viride	GJS 04-09, BPI 872183	NR131317	DQ307541
T. ghanense	Longibrachiatum	ATCC 208858, IAM 13109	NR120299	AY937423
T. gillesii	Longibrachiatum	CBS 130435	-	JN175583
T. gliocladium	Green	CBS 130009	NR160252	KJ665502
T. gracile	Longibrachiatum	CBS 130714, GJS 10-263, BPI 882295	-	JN175598
T. guizhouense	Harzianum/H complex	HGUP 0038, CBS 131803	JN191311	JN215484
T. hainanense	Green	HMAS 248837, CGMCC 3.18392	NR154568	KY688033
T. hamatum	Viride	DAOM 167057	NR134371	AF456911
T. harzianum	Harzianum/H complex	CBS 226.95	AF057606	AF348101
	Harzianum/H complex	GJS 05-107	FJ442679	FJ463329

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.9.2: Continued

Trichoderma	Clade	Ex-type/Voucher	GenBank Number	
			ITS	tef1
T. hausknechtii	Harzianum	CBS 133493	-	KJ665515
T. hebeiense	Stromaticum	HMAS 248743	NR153278	KX344434
T. helicolixii	Green	CBS 133499	-	KJ665517
T. helicum	Helicum	ATCC MYA-4845	NR153213	EU280055
T. hispanicum	Viride	CBS 130540, S453	NR138451	JN715659
T. hunua	Semiorbis	CBS 238.63	NR160091	KJ665519
T. hunanense	Green	HMAS 248841, CGMCC 3.18395	NR154571	KY688039
T. inhamatum	Harzianum/H complex	CBS 273.78	NR134378	AF348099
T. intricatum	Viride	GJS 97-88, CBS 119059	NR134343	AY376060
T. istrianum	Viride	CBS 130539	-	KJ665522
T. italicum	Harzianum	CBS 132567	-	KJ665525
T. ivoriense	Stromaticum	CBS 125734	NR134428	HQ342217
T. junci	Viride	CBS 120926	NR134392	FJ860641
T. konilangbra	Longibrachiatum	GJS 96-145, CBS 100808	MH862712	JN258681
T. koningii	Viride	CBS 457.96, ATCC 64262	NR138456	AY376046
	Viride	GJS 90-18	DQ323409	DQ289007
T. koningiopsis	Viride	CBS 119075	NR131281	AF456910
T. kunigamense	Longibrachiatum	TAMA 0193, NBRC 109640	NR134334	AB807645
T. lacuwombatense	Polysporum	CBS 122668, GJS 99-198	NR134356	KJ665547
T. lanuginosum	Stromaticum	CBS 125718, GJS 01-176	NR134429	HQ342221
T. leguminosarum	aff. Longibrachiatum	CBS 130014	-	KJ665551
T. lentiforme	Harzianum/H complex	GJS 98-6, CBS 100542	NR144868	AF469195
	Harzianum/H complex	M0204	this study	this study
T. leucopus	Polysporum	CBS 122499	NR134393	FJ179571
T. lieckfeldtiae	Viride	CBS 123049	NR138438	EU856326
T. lixii	Harzianum/H complex	CBS 110080, ATCC MYA-2478	NR131264	AF443938
	Harzianum/H complex	M0994	this study	this study
T. longibrachiatum	Longibrachiatum	CBS 816.68, ATCC 18648	NR120298	AY865640
T. longipile	Green	DAOM 177227-1a	NR134354	AF534622
T. longisporum	Green	HMAS 248843, CGMCC 3.18397	NR154573	KY688043
T. luteffusum	Polysporum	CBS 120537	NR134395	FJ860645
T. luteocrystallinum	Deliquescens	CBS 123828	NR134396	FJ860646
T. margaretense	Brevicompactum	CBS 120540	NR134387	FJ860625
T. martiale	Viride	CBS 123052, GJS 04-40	NR134363	EU248618
T. mediterraneum	Polysporum	CBS 136459	-	KJ665568
T. medusae	Stromaticum	CBS 125719, BPI GJS 01-171	NR134426	HQ342214
T. megalocitrinum	Psychrophilum	B.E.O. 00-09	DQ835511	AY225855
T. melanomagnum	Deliquescens	GJS 99-153, BPI 843663	NR134351	AY737751
T. microcitrinum	Hypocreanum	BPI 1112833	NR138445	DQ835449
T. mienum	Semiorbis	TUFC 61533, CBS 132690	NR134433	JQ621978
T. minutisporum	Polysporum	DAOM 167069	NR111192	KJ665612
T. moravicum	Semiorbis	CBS 120539	NR134398	FJ860651

กรมวิทยาศาสตร์

Table 3.9.2: Continued

Trichoderma	Clade	Ex-type/Voucher	GenBank Number	
			ITS	tef1
T. neocrassum	Green	CBS 114230, GJS 01-227	-	JN133572
T. neokoningii	Viride	CBS 120070	NR138446	KJ665620
T. neorufoides	Viride	CBS 119506	NR134399	FJ860553
T. neorufum	Viride	CBS 111144	NR077132	FJ860653
T. neosinense	Viride	CBS 134884, GJS 94-11	NR134362	KJ665624
T. neotropicale	Harzianum/H complex	GJS 11-185, CBS 130633	MH865818	FJ967803
T. nothescens	Viride	CBS 134882	NR138440	DQ307512
T. novae-zelandiae	Longibrachiatum	CBS 639.92, G.J.S 81-265	NR111193	AY865639
T. nybergianum	Polysporum	CBS 122500	NR134400	FJ179575
T. oblongisporum	Semiorbis	DAOM 176226, CBS 343.93	MH862412	AY750884
T. ochroleucum	Viride	CBS 119502	NR134401	FJ860659
T. olivascens	Viride	CBS 132574, CBS 119322	DQ677650	KC285624
T. orientale	Longibrachiatum	CBS 130428, GJS 88-81	NR111317	EU401581
T. oligosporum	Psychrophilum	HMAS 245079, CGMCC 3.17527	NR134444	KJ634764
T. ovalisporum	Viride	CBS 133299	NR134342	AY376037
T. pachypallidum	Polysporum	CBS 122126	NR134402	FJ860662
T. parapiluliferum	Polysporum	CBS 112771, BPI GJS 91-60	NR134341	FJ179578
T. parareesei	Longibrachiatum	CBS 125925	MH863773	GQ354353
T. pararogersonii	Viride	CBS 133496	-	KJ665625
	Viride	CTCCSJ-F-KZ40688	KY750455	KY978633
T. paratroviride	Viride	CBS 136489	-	KJ665627
	Viride	CS107-5	KT153590	KT153586
T. paraviridescens	Viride	CBS 119321	NR134367	DQ672610
T. parepimyces	Harzianum	CBS 122769	NR134403	FJ860664
T. parestonicum	Green	CBS 120636	NR134404	FJ860666
T. patella	Longibrachiatum	CBS 110081, BPI GJS 91-141	NR134338	AY937427
T. paucisporum	Viride	CBS 118645, BPI GJS 01-13	NR134360	DQ109540
T. peltatum	Psychrophilum	BPI GJS08-207	NR134422	EF392731
T. petersenii	Viride	CBS 119051	NR138442	DQ284979
T. pezizoides	Viride	CBS 115283	NR138436	AY225859
T. phellinicola	Hypocreanum	CBS 119283	NR134406	FJ860672
T. phyllostachydis	Green	CBS 114071	NR103608	FJ860673
T. piluliferum	Polysporum	CBS 120927	NR134407	FJ860674
T. pinnatum	Longibrachiatum	CBS 131292, GJS 04-100	-	JN175571
T. placentula	Polysporum	CBS 120924	NR134408	FJ179580
T. pleuroti	Harzianum	CBS 124387	NR134421	HM142382
T. pleuroticola	Harzianum	CBS 124383	NR134420	HM142381
T. polysporum	Polysporum	CBS 820.68	NR134448	AY605810
T. poronioideum	Polysporum	CBS 139046, BPI GJS 01-203	NR134446	KP109823
T. protopulvinatum	Hypocreanum	CBS 739.83	NR134409	FJ860679
T. protrudens	Brevicompactum	CBS 121320	NR134373	-
T. pseudocandidum	Green	BPI 843652, PC59	AY737757	AY737742

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.9.2: Continued

Trichoderma	Clade	Ex-type/Voucher	GenBank Number	
			ITS	tef1
T. pseudogelatinosum	Harzianum	TUFC 60186, CNUN309	NR144878	HM920202
T. pseudokoningii	Longibrachiatum	CBS 408.91	NR120296	AF400986
T. pseudolacteum	Lone lineage	TMI 8484, CBS 133191	NR134436	JX238493
T. pseudonigrovirens	Green	GJS 99-64, BPI 842416	AY737777	AF534582
T. pseudostramineum	Hypocreanum	TUFC 60104, CNUN334	HM769758	HM920206
T. psychrophilum	Psychrophilum	CBS 119129, Hy8	JN133558	AY737752
T. pubescens	Viride	DAOM 166162	NR077179	AY750887
T. pyramidale	Harzianum/H complex	CBS 135574	-	KJ665699
	Harzianum/H complex	SFC101249	MF185991	MF185943
T. reesei	Longibrachiatum	QM 6a, CBS 383.79	NR120297	AF401004
T. rifaii	Harzianum/H complex	DIS 355b, CBS 130746	NR137305	FJ463324
T. rossicum	Stromaticum	DAOM 230011	HQ342419	AY937441
T. rosulatum	Green	HMAS 252548	NR134438	KF729984
T. rubi	Lone lineage	CBS 127380, WU 33316	-	KJ665704
T. rufobrunneum	Harzianum	HMAS 252547	NR134439	KF729992
T. samuelsii	Viride	CBS 130537, S5	NR138452	JN715651
T. saturnisporopsis	Longibrachiatum	CBS 128829	NR138455	JQ685869
T. saturnisporum	Longibrachiatum	CBS 330.70, ATCC 18903	NR103704	EU280044
T. scalesiae	Viride	CBS 120069	NR144876	DQ841726
T. sempervirentis	Viride	CBS 133498, S599	-	KC285755
T. seppoi	Polysporum	C.P.K. 3161, CBS 122498	NR134413	FJ179581
T. silvae-virgineae	Green	CBS 120922	NR134414	FJ860696
T. simmonsii	Harzianum/H complex	GJS 91-138, CBS 130431	NR137297	AF443935
T. sinense	Longibrachiatum	DAOM 230000	NR134425	AY750889
T. sinoluteum	Polysporum	HMAS 252868	NR134445	KJ634777
T. sinuosum	Green	CBS 114247	NR144872	AY737743
T. solani	Longibrachiatum	CBS 130506, GJS 08-81	-	JN175597
T. solum	Harzianum	HMAS 248848	NR154576	KY688050
T. spinulosum	Green	CBS 310.50, CBS 311.50	NR134415	FJ860701
T. spirale	Green	DAOM 183974	NR077177	EU280049
T. stercorarium	Hypocreanum	CBS 148.85, ATCC 62321	NR134355	FJ860607
T. stilbohypoxyli	Viride	CBS 992.97, ATCC MYA 2970	NR134361	DQ109546
T. stipitatum	Green	HMAS 266613	NR134440	KF729991
T. stramineum	Harzianum	GJS 02-84, CBS 114248	NR134347	AY737746
T. strictipile	Green	DAOM 172827, CBS 347.93	NR134337	AY865644
T. strigosellum	Viride	CBS 102817, C.P.K. 3604	NR134437	EU248631
T. strigosum	Viride	DAOM 1661214, CBS 348.93	NR103571	AY376057
T. stromaticum	Stromaticum	CBS 101875, GJS 97-183	NR077128	AY937418
T. subalpinum	Lone lineage	CBS 119128	-	FJ860705
T. subeffusum	Viride	CBS 120929	NR134416	FJ860707
T. surrotundum	Green	GJS 88-73, CBS 111145	NR134350	AF534594
T. taiwanense	Viride	GJS 95-93, CBS 119058	NR144874	DQ284973

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.9.2: Continued

Trichoderma	Clade	Ex-type/Voucher	GenBank Number	
			ITS	tef1
T. tawa	Harzianum	GJS 97-174, CBS 114233	NR138430	FJ463313
T. taxi	Lone lineage	ZJUF0986, CGMCC 1672	NR134366	DQ859029
T. texanum	Viride	CBS 139784, LESF551	NR137308	KT278988
T. thailandicum	Green	GJS 97-61, BPI 745832	NR163514	AY737748
T. thelephoricola	Green	GJS 95-135, BPI 737702	NR134352	AY737735
T. theobromicola	Viride	DIS 85f, CBS 119120	NR134359	EU856321
T. tomentosum	Harzianum	CBS 349.93, DAOM 178713a	MH862417	AY750882
T. tremelloides	aff. Longibrachiatum	CBS 121140	NR134417	FJ860714
T. trixiae	Viride	CBS 134702	NR138444	DQ307526
T. tropicosinense	Green	HMAS 244983	NR134441	KF923286
T. tsugarense	Longibrachiatum	TAMA 0203, NBRC 109641	NR134335	AB807647
T. turrialbense	Brevicompactum	CBS 112445	NR138448	EU338284
T. valdunense	Viride	CBS 120923	NR134418	FJ860717
T. velutinum	Harzianum	DAOM 230013, TUB F-784	-	AF510444
T. vermipilum	Stromaticum	PPRI 3359, CBS 127103	AF400268	HQ342219
T. vinosum	Viride	GJS 99-158, CBS 119087	NR144870	AY376047
T. virens	Green	CBS 249.59, ATCC 13213	MH857855	AY750891
T. virescentiflavum	Green	PC 278	NR134349	AY737749
T. viridarium	Viride	CBS 132568, CBS 120065	NR138439	KC285658
T. viride	Viride	CBS 119325	NR138441	DQ672615
T. viridescens	Viride	CBS 433.34	NR138429	AF456905
T. viridialbum	Viride	CBS 133495, S177	-	KC285705
T. virilente	Viride	CBS 132569, DAOM 234234	NR138447	KJ665772
T. voglmayrii	Lone lineage	CBS 117711	NR134358	DQ086146
T. yunnanense	Viride	CBS 121219	NR134419	GU198243
T. yunnanense	Viride	YMF1.01694	AY941823	AY941825
Protocrea pallida	-	CBS 299.78	NR111329	EU703900
Protocrea farinosa	-	CBS 121551	NR119700	EU703889

กรมวิชาการเกษตร

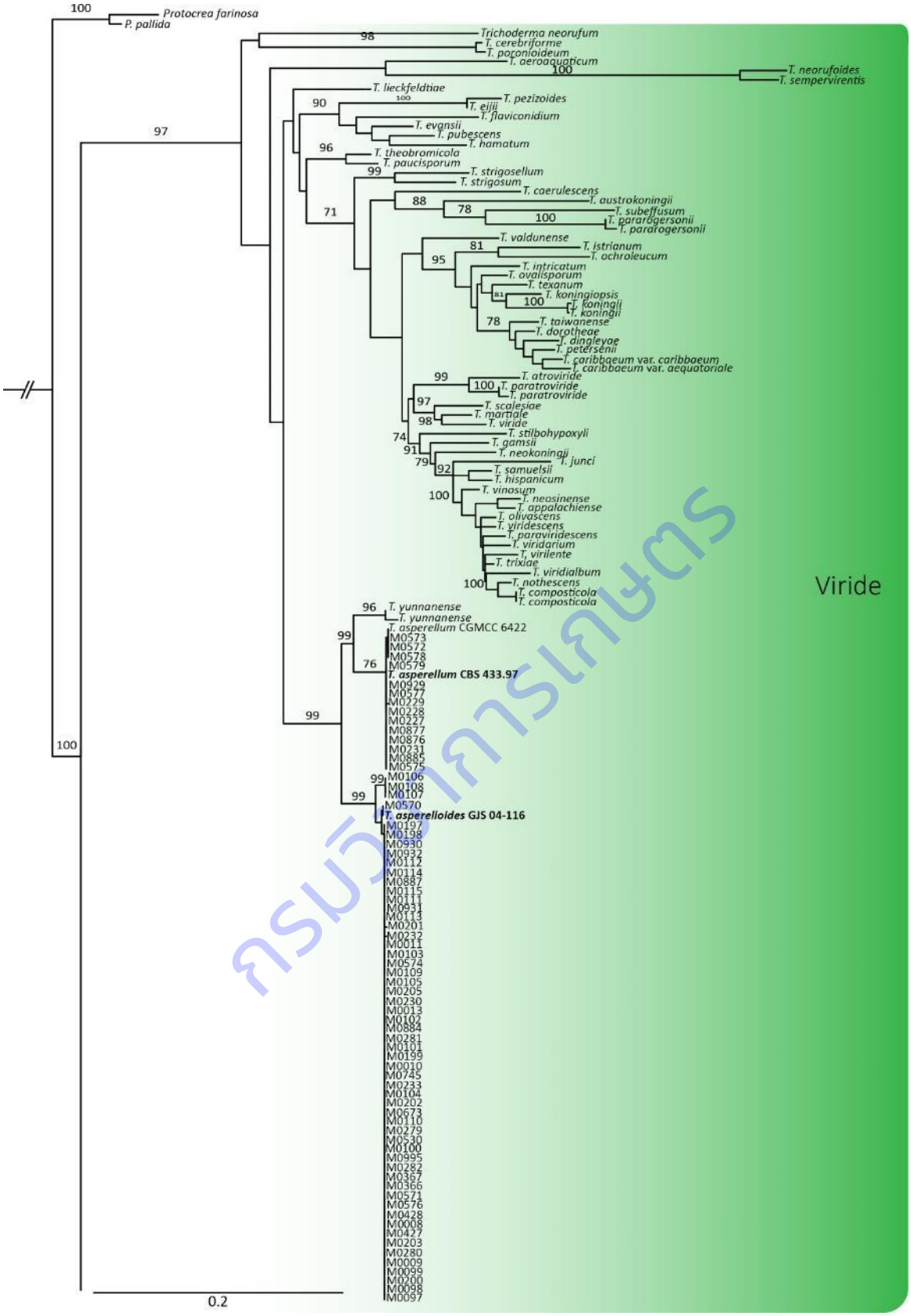


Figure 3.9.2: Phylogram obtained in a maximum likelihood search in RAxML of dataset of ITS and tef1 gene regions. Bootstrap support values (≥70%) from 1,000 replicates above nodes.

กรมวิชาการเกษตร

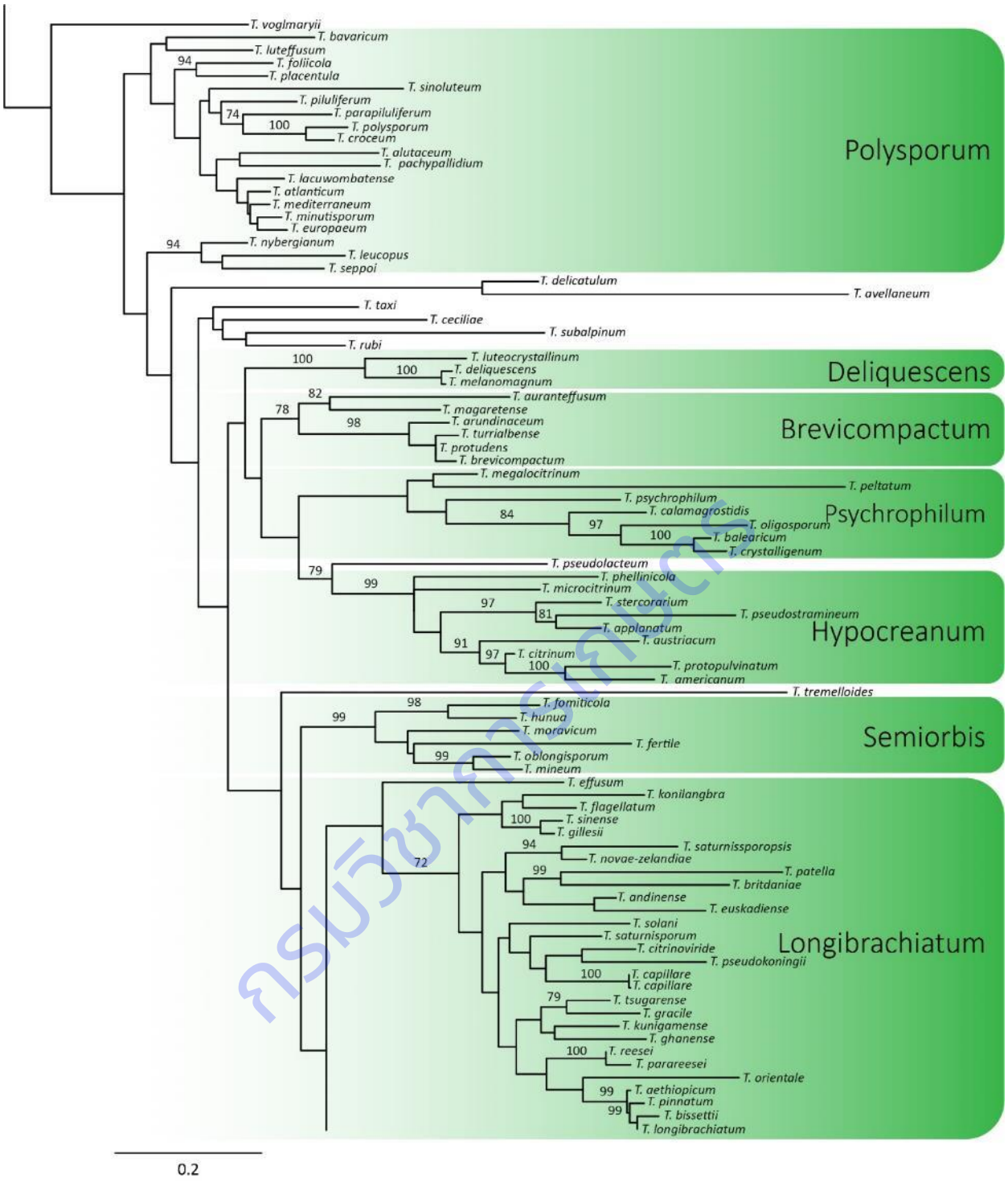


Figure 3.9.2: Continued

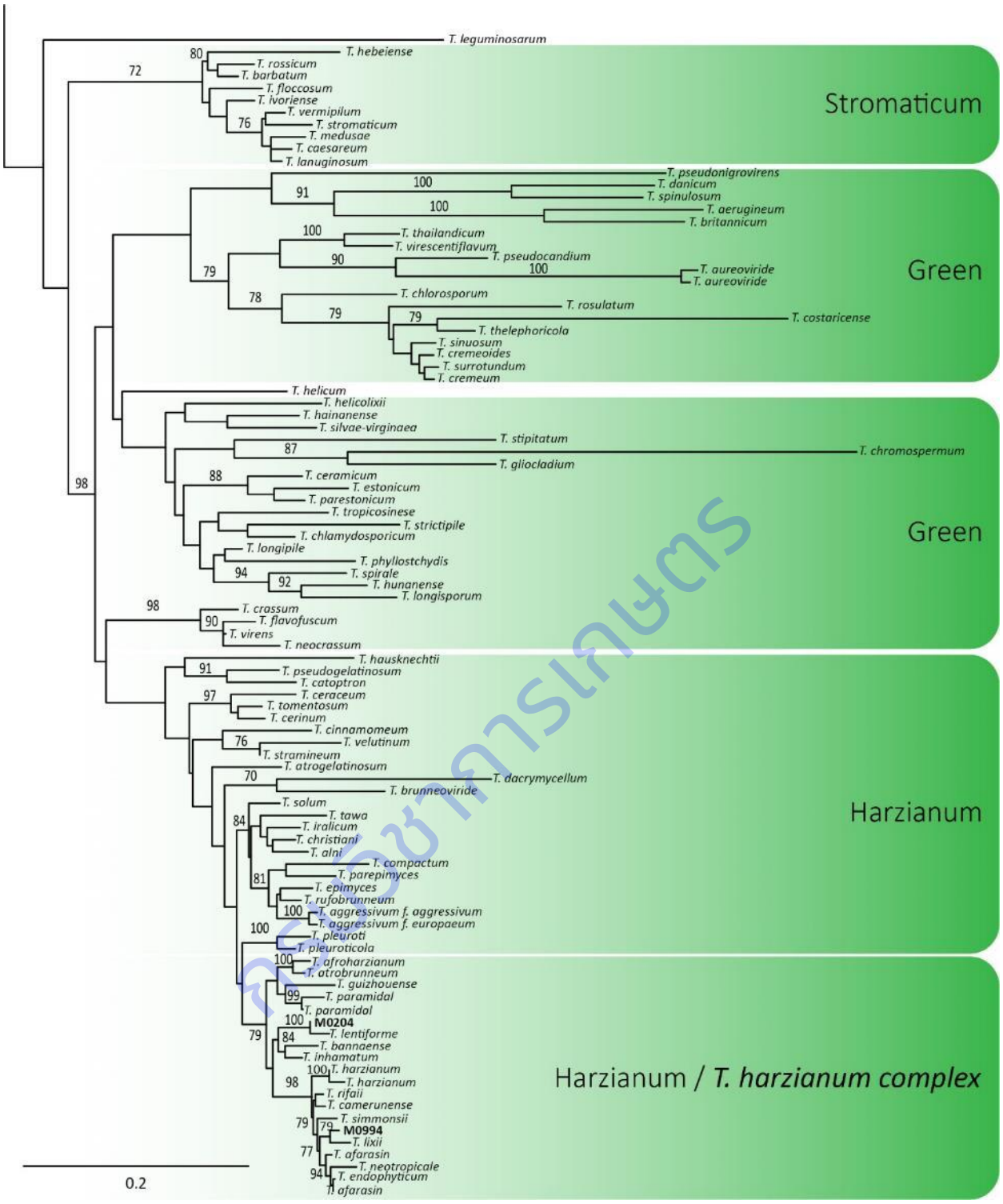


Figure 3.9.2: Continued

อนุกรมวิธานและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อรา *Trichoderma* มีดังนี้

Harzianum Clade

Trichoderma lentiforme (Rehm) P. Chaverri, Samuels & F.B. Rocha, Mycologia 107 (3): 577 (2015)

Synonymy:

≡*Hypocrea lentiformis* Rehm, Hedwigia 37: 193 (1898)

Classification

Kingdom	*Fungi*
Phylum	*Ascomycota*
Subphylum	*Pezizomycotina*
Class	*Sordariomycetes*
Subclass	*Hypocreomycetidae*
Order	*Hypocreales*
Family	*Hypocreaceae*
Genus	*Trichoderma*
Species	*lentiforme*

Optimum Growth Temperature 25-30 ℃

ลักษณะของเชื้อ เชื้อราสร้างสปอร์น้อยบนอาหาร PDA สร้างสปอร์สีเขียว (Figure 3) เป็นวงชั้น ๆ 1-2 วง บางครั้งพบสปอร์สีเขียวเหลืองบริเวณขอบวงแต่ละชั้น อาจได้กลิ่นหอมหวานอ่อนๆ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และสปอร์จะมีสีเข้มขึ้น ลักษณะของ phialides เป็นแบบ lageniform, obpyriform หรือ obclavate, ความยาวประมาณ (0.9-)1.3-1.9(-3.7) µm กว้างประมาณ 1.0-3.5 µm สปอร์มีลักษณะกลมแบน (2.0-)2.5-3.2 (-3.7) x (1.7-)2.5-2.7(-3.2) µm ผนังปอร์ผนังเรียบ ใส

Accession No.: M0204

หมายเหตุ – เดิมเชื้อรา *T. lentiforme* มีการจำแนกเป็นเชื้อรา *T. harzianum* มาก่อน เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกัน มีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคทางดินโดยชีววิธี (González *et al*., 2020) โดยเฉพาะโรคทางดิน (Chaverri and Samuels, 2002) และเชื้อราชนิดนี้เป็น telemorph ของเชื้อรา *T. harzianum* (Chaverri and Samuels, 2002) และ มีรายงานว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถพบได้ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และพบได้ในประเทศไทย (Chaverri *et al.*, 2015)

- การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.9.3: Colony and conidiophores with phialides (40x) of *Trichoderma lentiforme* (M0204)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

>GAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGC
GTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAAACTCTTATTGTATACCCCCTCGCGGGTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGC
GCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACC
CTCGAACCCCTCCGGGGGGGTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCC
TGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

>AACGTGGTCGTTATCGTACGTATCATCCTGTTCCCTCACGTCGGCATCATTCGCCGCTTTGATCCTCAAACACTTGTGCTAACTACCGTCTTCTAG
GGGTGCGTATTCCATCAATCATCTTGAAAGAGATCGATCGAACACAGTACTGACTTGCTACAACAGCCACGTCGACTCCGGAAAGTCGACCACCGT
GAGTTACACCCTCTTCCTTCGCTCCGACATCAGACATCATTTGGTGCGGGACATCTCTTGAATACAGGGCTAACCATTCATCATACAGACCGGTCAC
TTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACCGTCGTACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTTCAACTGATTTTCGCCTCGATTCTCCCTCCAAATTC
AATTGTGCCCGACGATTCTGAAGAGAATTTTCGTGTCGACAATTTTTCGTCACCCCGCTTTCCATTACCCCTCCTTTGCAGCGACGCAAATTTTTTT
TGCTGTCTTTTGGTTTTAGTGGGGTTTCTTGTGCACCCCACTAGCTCACTGCTTTTTTTTTTTTTTGGCTTCACTCTCACTTCCCCGCCATTCAACGT
ACTCTGTGTCTTTGGTCATTCAGCGATGCTAACCACTTTTCCATCAATAGGAAGCCGCCGAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGTTCT
TGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCTCTGTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTAT
GTCTTCTTCATCAACTTCATGCTTCAATTGCAAGCCAGTGCTAACAGGCAATCACAGACG

Trichoderma lixii (Pat.) P. Chaverri, Mycologia 107 (3): 578 (2015)

Synonymy:

≡*Hypocrea lixii* Pat., Revue Mycologique Toulouse 13 (51): 138 (1891)

Classification

Kingdom	*Fungi*
Phylum	*Ascomycota*
Subphylum	*Pezizomycotina*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Class	*Sordariomycetes*
Subclass	*Hypocreomycetidae*
Order	*Hypocreales*
Family	*Hypocreaceae*
Genus	*Trichoderma*
Species	*lixii*

Optimum Growth Temperature 25-35 ℃

ลักษณะของเชื้อ เชื้อราสร้างสปอร์น้อยบนอาหาร PDA สร้างสปอร์สีเขียวอ่อน (Figure 4) ตรงกลางโคโลนี เส้นใยรอบนอกสีใส ไม่มีกลิ่น ลักษณะของ phialides เป็นแบบ ampulliform หรือ lageniform ความยาวประมาณ 1.0-2.7 µm กว้างประมาณ 2 µm สปอร์มีลักษณะกลมแบน ขนาด (2.5-)3.0-3.5 (-3.7) x (2.2-)2.5-3.2(-3.5) µm ผนังปอร์ผนังเรียบ เมื่อแก่สปอร์จะมีสีเข้ม

Accession No.: M0994

หมายเหตุ - เดิมเชื้อรา *T. lixii* มีการจำแนกเป็นเชื้อรา *T. harzianum* มาก่อน เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกัน ลักษณะของเชื้อรา *T. lixii* จะคล้ายกับ *T. harzianum* และ *T. lentiforme* เชื้อรา *T. lixii* มีรายงานว่าสามารถนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Chaverri and Samuels, 2002) และ เชื้อราชนิดนี้สามารถพบได้ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Chaverri *et al.*, 2015)

- การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

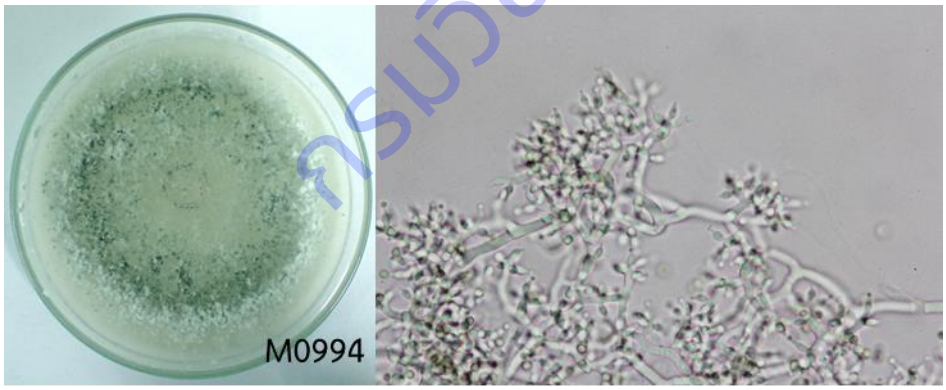


Figure 3.9.4: Colony and conidiophores with phialides (40x) of *Trichoderma lixii* (M0994)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

>TAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACTGTTGCCTCGGCG
GGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAAACTCTTTTTGTATACCCCCTCGCGGGTTTTTTTA

กรมวิชาการเกษตร

TAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA
GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTG
TCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGGTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCG
GTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACTTCTGAAATGTTGA
CCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

>CATGTTCTTGATGAAATCACGGTGGCCGGGAGCGTCTGTGAATTGCTTGTTAGCACTGGCTTGTAATCGCTGTGTGAAGTTGATGGAAAGAACAT
ACCAATGACGGTGACATAGTACTTGGGAGTCTCGAACTTCCACAGAGCAATGTCGATGGTGATACCACGCTCACGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAG
AACCCAAGCATACTTGAAGGAACCCTTGCCGAGTTCGGCGGCTTCCTATTGATGGAAAAGTGGTTAGCATCGCTGAAAGTGACGAGACACAGAACA
CGTTGAATGATGGCTGGGAAGTGAGAGCGAAGCAGAAAAAAAAGCAGTGAGCTAGTGGGGGTGCACAAGAAACCCCACTAAAACCAAACGACAGC
AAAAAAATTTTGCGTCGCTGCAAAGGAGGGGTAATGCAAAGCGGGGTGATGAAAAATTGTTGACACGAAAATTCTCTGCAGAATTGTCGGGCACAA
TTGAATGTGGAGGGAGAGTTGGGGCGAAAATGAGTTGAAGCTTACCTTCTCGAACTTCTCGATGGTACGACGGTCGATACCACCGCACTGGTAGAT
CAAGTGACCGGTCTGTATGATAACTGGTTAGCCCTGTGTTCAAAGAGTAGATGTCCCGTATCAAACGACGTTTGATATCGGAGCAGGAGAAGAGGG
TGCAACTCACGGTGGTCGACTTTCCGGAGTCGACGTGGCTGTTGTAGCAAGTCAGTACTGTGTTCGATCGATCTCATTCAAGATGATTGATGGAATA
CGCACCCCTAGAAGATGGTAGTTAGCACAAGTGTTTGAGAATCAGAGCGGCGACTGATGCCGACGTGAAAGGATAATACGTACGATAACGACCACG
TTGATGTGAGTCT

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	*Trichoderma*
Species	*harzianum*

Optimum Growth Temperature 30-35 ℃

ลักษณะของเชื้อ เชื้อราสร้างสปอร์น้อยบนอาหาร PDA สร้างสปอร์สีเขียว (Figure 2) เป็นวงชั้น ๆ บางครั้งพบสปอร์สีเขียวเหลืองบริเวณขอบวงแต่ละชั้น ไม่มีกลิ่น ลักษณะของ phialides เป็นแบบ ampulliform ตรงปลายแคบ ความยาวประมาณ 6.2-7.5 µm กว้างประมาณ 3.2-3.5 µm สปอร์มีลักษณะกลมแบน ขนาด (2.0-)2.5-3.0(-3.7) x (2.2-)2.7-3.5(-4.2) µm ผนังปอร์ผนังเรียบ

Enzyme Production protease chitinase β-1,3-glucanase (Kamala *et al.*, 2015)

กรมวิชาการเกษตร

Accession No.: neotype CBS 226.95

หมายเหตุ - อ้างอิงจาก type sequence (Mycobank, 2020)

- การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

>AF057606_ACCGAATTTAAACTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACTGTNGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGG
ACCAAGGCGCCCGCCGGAAGACCAACCTAAAACTCTTATTGTATACCCCCTCGCGGGTTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAG
GCGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCCAACAACGGAATCTCTTGGTTCTGGCATCGATAAAGAACCCACCAAAATGCAATAAATAATGTGAATTGC
AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCC
CTCCGGGGGGTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTA
GTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGAT

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

>AF348101_CTACCAGTGCGGTGGTATCGACCGTCGTACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTTCAACTCATTTTCGCCTCGATTCTCCCTCCA
CATTTAATTGTGCCCGATAATTCTGCAGAGAATTTTCGTGTCGACAATTTTTCATCACCCCGATTTGCATTACCCCTCCTTTGCAGCGACGCAAATT
TTTTTGGCTGTCGTTTGGTTTTAGTGGGGTTTCTCGTGCACCCCACTAGGTCACTGCTTTTTTTCTGCTTCGCTCTTACTGCCCAGCCATCATTCAA
CGTGCTCTGCGTCTCATCACTTTCAGCGATGCTAACCACTTTTCCATCAATAGGAAGCCGCCGAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGT
TCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCTCTGTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGG
TATGTTCTTTCCATCAACTTCACACAGCGATTACAAGCCAGTGCTAACAAGCAATTCACAGACGCTCCCGGCCACCGTGATTTCATCAAGAACATGA
TCACTGGTACTTCCCAGGCCGATTGCGCTATCCTCATCATTGCCGCCGGTACTGGTGAG

the Large Subunit (LSU, 28S)

>MH874152_GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCT
GGTCCCTAGGGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTGAGGTGCCGCCCGAGTTCCCTGGAACGGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCC
CGTCTGGCTGGCCGCCGAGCCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCT
AAATATTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACCTTGAAAAGAGGGTTAAATAGTACGTGAAATTGTTGAAA
GGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCGCGGCGGATCATCCGGGGTTCTCTCCGGTGCACTTCGCCGCGTCTAGGCCAGCATCAGTTCGTCGCGG
GGGAAAAAGGCTTCGGGAACGTGGCTCCTCCGGGAGTGTTATAGCCCGTTGCATAATACCCTGCGGTGGACTGAGGACCGCGCATCTGCAAGGATG
CTGGCGTAATGGTCACCAGCGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCGTCTTCGTATGCGAGTGTTCGGGTGTCAAACCCCTACGCGTAATGA
AAGTGAACGCAGGTGAGAGCTTCGGCGCATCATCGACCGATCCTGATGTTCTCGGATGGATTTGAGTAAGAGCATACGGGGCCGGACCCGAAAGAA
GGTGAACTATGCCTGTATAGGGTGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGCTCGCAGCGGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTCAAATATGGGCATGG
GGGGCGAAAGACTAATCGAACCTTCTAGTAGCTGGTTCCGCG

Viridae Clade

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	*Trichoderma*
Species	*asperellum*

Optimum Growth Temperature 30-35 ℃

ลักษณะของเชื้อ บนอาหาร PDA เชื้อราสร้างสปอร์สีเขียว (Figure 5) เป็นวงชั้น ๆ บริเวณวงแต่ละชั้นจะไม่พบการสร้างสปอร์ ไม่มีกลิ่น ลักษณะของ phialides เป็นแบบ terminated branches และ lageniform ยาว (4.0-)6.2-9.7(-15.2) µm กว้าง (2.5-)3.0-3.5(-5.0) µm สปอร์มีลักษณะกลมแบน หรือกลมรี ขนาด (2.2-)3.0-3.5(-4.7) x (3.0-)3.5-4.0(-4.7) µm สีเขียว ผนังปอร์ลักษณะแบบ warted ไม่พบการสร้าง chlamydospores บนอาหาร

Enzyme Production protease chitinase β-1,3-glucanase (Kamala *et al.*, 2015)

Accession No.: M0227, M0228, M0229, M0231, M0572, M0573, M0577, M0578, M0579, M0876, M0877, M0885, M0886, M0929

หมายเหตุ - การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

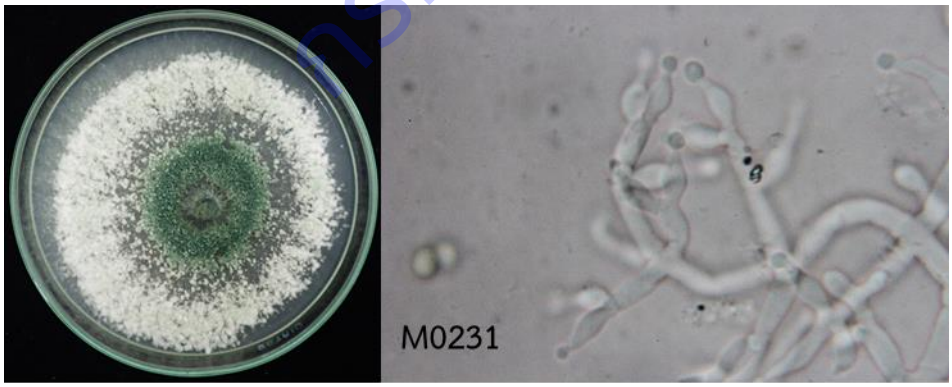


Figure 3.9.5: Colony and conidiophores with phialides (100x) of *Trichoderma asperellum* (M0108)

กรมวิชาการเกษตร

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

>GAGTTTACAACTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCC
CGCCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAACTTTCAAC
AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCC
CTCACACGGGTGCCGGCCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGT
CCACGTCCGTAAAACACCCAACTTTCTGAAA

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

>ATCGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTCATTTCACTGCTTTTCCCATCAATTTTTGGCACAATCATATGCCCGACAATTCTGCTCTCAGTTTTTGTCT
TTTTTTTCCAGCGTCACCCCGCTTTGCCAGTCTACCTACCCCTCCTTTGGCACAGCAAAAATTTTCTGGCTGCCTTGTTTGGCTTTTAGTGGGGTGT
CAAATTTTTTGGCAGCAACCCCGCTATCGCCACTGCACCTCTTCCATCACCCACCACATGCTATTTGCTCAATCGCGTCGTCTTTTTTTGTTCATTA
TGCTGATCATGCTTCAATCAATAGGAAGCCGCCGAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTATGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAG
CGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTTGGACTCTTCTCTCTAGCTATC
GACATTCCAAGTCCGCCATTCTAACATGCTCTTCCCACAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTCAT

the Large Subunit (LSU, 28S)

CGACCTCCACGTCCGCCTACTCCTCGGGGCATCGTTTCTAGACCGAGGGCGAGGTATGGGTGAGACGCTTGAGCGCCATCCATTTTCAGGGCTAGT
ACATTCGGCAGGTGAGTTGTTACACAGTCCTTAGCGGATTCCGACTTCCATGGCCACCGTCCTGCTGTCAAGATGTACTAACGCCTTTTGTGGTGTC
TGATGAGCGTCTACTCTGGCACCTTAACCTCGCGTTCGGTTCATCCCGCATCGCCAGTTCTGCTTACCAAAAATGGCCCACTAGTGTTGATACATTC
GAATGCCCACGTTCAACTAAGTAACAAGGGCTTCTTACATATTTAAAGTTTGAGAATGGATGAAGGCAATATAGCGCCCCCGAGTCCCTAATCATTC
GCTTTACCTCATAAAACTGAGCTCAACACTGCTATCCTGAGGGAAACTTCGGCGGAAACCAGCTACTAGAAGGTTCGATTAGTCTTTCGCCCCCATG
CCCATATTTGACGATCGATTTGCACGTCAGAACCGCTGCGAGCCTCCACCAGAGTTTCCTCTGGCTTCACCCTATACAGGCATAGTTCACCTTCTTT
CGGGTCCGGCCCCGTATGCTCTTACTCAAATCCATCCGAGAACATCAGGATCGGTCGATGATGCGCCGAAGCTCTCACCTGCGTTCACTTTCATTA
CGCGTAGGGGTTTGACACCCGAACACTCGCATACGAAGACGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTCGCTGGTGACCATTACGCCAGCATCCT
TGCAGATGCGCGGTCCTCAGTCCACCGCAGGGTATTATGCAACGGGCTATAACACTCCCGGAGGAGCCACGTTCCCGAAGCCTTTTTCCCCCGCGA
CGAACTGATGCTGGCCTGAACGCGGCGAAGTGCACCGGAGAGAACCCCGGATGATCCGCCGCGCCCAAGTCTGGTCACAAGCGCTTCCCTTTCAAC
AATTTCACGTACTGTTTAACCCTCTTTTCAAGGTGCTTTTCATCTTTCGATCACTCTACTTGTGCGCTATCGGTCTCTGGCCAATATTTAGCTTTAGA
AGACATATACCTCCCATTTTGAGCAGCATTCCCAAACTACTCGACTCGTCGAAGGAGCTTTACAGAGGCTCGGTGGCCAGCCAGACGGGGCTCTCA
CCCTCTGTGGCGTCCCGTTCCAGGGAACTCGGGCGGCACCTCACCAAAAGCATCCTCTACAAATTACAACTCGGACCCGGAGGGGCCAGATTTCAA
ATTTGAGCTGTTGCCGCTTCAC

Trichoderma asperelloides Samuels, Mycologia 102 (4): 961 (2010)

Classification

Kingdom	*Fungi*
Phylum	*Ascomycota*
Subphylum	*Pezizomycotina*
Class	*Sordariomycetes*
Subclass	*Hypocreomycetidae*

กรมวิชาการเกษตร

Order	*Hypocreales*
Family	*Hypocreaceae*
Genus	*Trichoderma*
Species	*asperelloides*

Optimum Growth Temperature 25-30 ℃

ลักษณะของเชื้อ บนอาหาร PDA เชื้อราสร้างสปอร์สีเขียว (Figure 6) เป็นวงชั้น ๆ บริเวณวงแต่ละชั้นจะไม่พบการสร้างสปอร์ ไม่มีกลิ่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะคล้ายคลึงกับ *T. asperellum* conidiophore ลักษณะยาวตรงปลายก้านเป็น single phialide หรือเป็นกลุ่มของ phialides 2-4 ที่แยกกันอย่างชัดเจน ลักษณะของ phialides เป็นแบบ flask-shaped และมีลักษณะโป่งพองตรงกลาง ยาว (4.0-)6.2-9.7(-15.2) µm กว้าง (2.5-)3.0-3.5(-5.0) µm สปอร์มีลักษณะกลมแบน หรือกลมรี ขนาด (2.2-)3.0-3.5(-4.7) x (3.0-)3.5-4.0(-4.7) µm สีเขียว ผนังปอร์ลักษณะแบบ warted chlamydospores แบบ subglobose มีขนาด (4.5-)7.2-11.2(-15.0) x (5.0-) 6.5-9.5(-11.0) µm

Enzyme Production protease chitinase β-1,3-glucanase (Kamala *et al.*, 2015)

Accession No.: M0008, M0009, M0010, M0011, M0013, M0097, M0098, M0099, M0100, M0101, M0102, M0103, M0104, M0105, M0106, M0107, M0108, M0109, M0110, M0111, M0112, M0113, M0114, M0115, M0197, M0198, M0199, M0200, M0201, M0202, M0203, M0205, M0230, M0232, M0233, M0279, M0280, M0281, M0282, M0366, M0367, M0427, M0428, M0530, M0570, M0571, M0574, M0576, M0651, M0673, M0745, M0884, M0887, M0930, M0931, M0932, M0995

หมายเหตุ การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

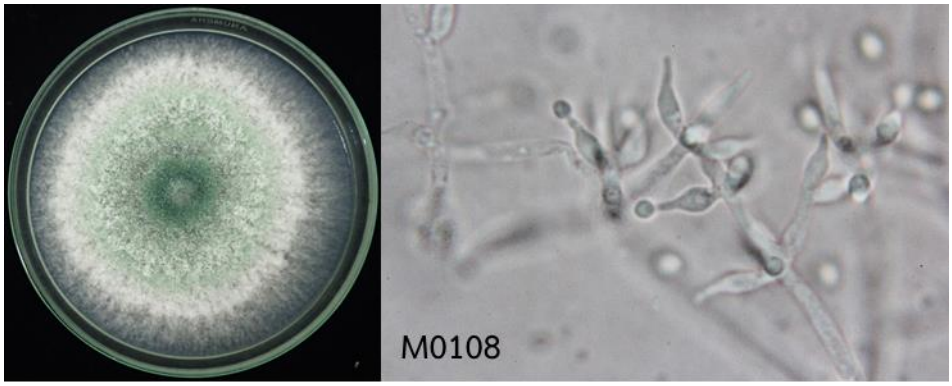


Figure 3.9.6: Colony and conidiophores with phialides (100x) of *Trichoderma asperelloides* (M0108)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

>GTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCAC
GCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTC
TGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAA
CCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAG
TAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG
CTGAACTTAAGCA

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

>TAAGCTAATTTCACTGCTTTTCCCATCAATTTTTGGCACAATTATATGCCCGACAATTCTGTTCTCAGTTTTGTCTCTTTTTTTTTCAGCATCACCC
CGCTTTGCCAGCCTACCTACCCCTCCTTTGGCACAGCAAAAAATTTTCTCGCTGCCTTGTTTGGCTTTTAGTGGGGTGTCAATTTTTTTGACGGCAA
CCCCACTATCGCCACTGTACCTCTTTCCATCATCCACCACATGCTATTTGTTCAATCGCATCGTCTATTTTCAATATCTCTTGTTCATTATGCTGATC
ATGCTTCAATCAATAGGAAGCCGCCGAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTATGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTAT
CACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTTGGACACTTCAGTCGACATTGCAAGATCGT
CATTCTAACATACTCTCCCCACAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTT

the Large Subunit (LSU, 28S)

>CTTCGTCACGACCTCCACGTCCGCCTACTCCTCGGGGCATCGTTTCTACCCCGAGGGCGAGGTATGGGTGAGACGCTTGAGCGCCATCCATTTTC
AGGGCTAGTACATTCGGCAGGTGAGTTGTTACACAGTCCTTAGCGGATTCCGACTTCCATGGCCACCGTCCTGCTGTCAAGATGTACTAACGCCTT
TTGTGGTGTCTGATGAGCGTCTACTCTGGCACCTTAACCTCGCGTTCGGTTCATCCCGCATCGCCAGTTCTGCTTACCAAAAATGGCCCACTAGTGT
TGATACATTCGAATGCCCACGTTCAACTAAGTAACAAGGGCTTCTTACATATTTAAAGTTTGAGAATGGATGAAGGCAATATAGCGCCCCCGAGTCC
CTAATCATTCGCTTTACCTCATAAAACTGAGCTCAACACTGCTATCCTGAGGGAAACTTCGGCGGAAACCAGCTACTAGAAGGTTCGATTAGTCTTT
CGCCCCCATGCCCATATTTGACGATCGATTTGCACGTCAGAACCGCTGCGAGCCTCCACCAGAGTTTCCTCTGGCTTCACCCTATACAGGCATAGTT
CACCTTCTTTCGGGTCCGGCCCCGTATGCTCTTACTCAAATCCATCCGAGAACATCAGGATCGGTCGATGATGCGCCGAAGCTCTCACCTGCGTTC
ACTTTCATTACGCGTAGGGGTTTGACACCCGAACACTCGCATACGAAGACGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTCGCTGGTGACCATTACG
CCAGCATCCTTGCAGATGCGCGGTCCTCAGTCCACCGCAGGGTATTATGCAACGGGCTATAACACTCCCGGAGGAGCCACGTTCCCGAAGCCTTTT
TCCCCCGCGACGAACTGATGCTGGCCTGAACGCGGCGAAGTGCACCGGAGAGAACCCCGGATGATCCGCCGCGCCCAAGTCTGGTCACAAGCGCT
TCCCTTTCAACAATTTCACGTACTGTTTAACCCTCTTTTCAAGGTGCTTTTCATCTTTCGATCACTCTACTTGTGCGCTATCGGTCTCTGGCCAATAT
TTAGCTTTAGAAGACATATACCTCCCATTTTGAGCAGCATTCCCAAACTACTCGACTCGTCGAAGGAGCTTTACAGAGGCTCGGTGGCCAGCCAGA
CGGGGCTCTCACCCTCTGTGGCGTCCCGTTCCAGGGAACTCGGGCGGCACCTCACCAAAAGCATCCTCTACAAATTACAACTCGGACCCGGAGGGG
CCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGGGGCA

Trichoderma viride Pers., Neues Magazin für die Botanik 1: 92 (1794)

Synonymy:

=*Pyrenium lignorum* Tode, Fungi Mecklenburgenses Selecti 1: 33, tab. 3, Figure 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	*Trichoderma*
Species	*viride*

Optimum Growth Temperature 25-30 ℃

ลักษณะของเชื้อ บนอาหาร PDA เชื้อราสร้างสปอร์สีเขียว บางครั้งพบว่าเชื้อสร้างกลิ่นคล้ายกลิ่นของมะพร้าว สปอร์มักพบสร้างกระจุกอยู่ตรงกลางโคโลนี ขนาดประมาณ 1-4 mm (Figure 4) ลักษณะของ phialides เป็นแบบ lageniform มักพองตรงกลาง ลักษณะตรง ปลายแบบตะขอ ยาว (5.0-)6.5-11(-18) µm กว้าง (1.5-)2.5-3.5(-4.0) µm สปอร์มีลักษณะกลมแบน ขนาด (2.7-)3.2-4.2(-5.0) x (3.0-)3.5-4.5(-5.5) µm สีเขียว ผนังปอร์ลักษณะแบบ warted

Enzyme Production protease chitinase β-1,3-glucanase (Kamala *et al.*, 2015)

Accession No.: epitype CBS 119325

หมายเหตุ - อ้างอิงจาก type sequence (Mycobank, 2020)

- การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

>NR138441_GAGGGATCATTACCGAGTTTACAACTCCCAAACCCAATGTGAACCATACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGT
CGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGGACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTTTACAGCTCTGAGCAAAAATTC
AAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGG
TCGGCGTTGGGGACTTCGGGAACCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCATGCGCAGTAGTTTGCAC
AACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAG

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

>DQ672615_CATTTCTGCTTTTTCACTACGCGTTCCTGGCCCAATCGTGCCCGACAATTCTGTTCTCAGTCTTGTCAACTTTGCCCTCGCAGCATCA
CACCCCGCTTTGCCTGCCTCTACCCCTCATTTTGCACAGCAAAAATTTTCTGGCTGTCTTATTTGGCTCTGAGTGGGGTGCCAACTTTTGTTGGCAG
CGACCCCGCTATCGCCACTGTCCCTCATCCATCGTCCCAACACATTGTGCTCATTCAATCGCATCGTCTTTTGCCTCAATTCCTTTGGGGTTTATTG
TGCTGATCATGTTTCAATCAATAGGAAGCCGCCGAACTCGGCAAGGGTTCTTTCAAGTATGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAG
CGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAGATACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTTTGGTTCCCTCAATGACATTTC

กรมวิชาการเกษตร

GCCATCATCATTCTAACGTGCCACTCTGCAGACGCTCCCGGCCACCGTGATTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCCCAGGCTGACTGCGCT
ATCCTGATTATCGCTGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCCTACACCCTGGGT
GTCAAGCAGCTCATCGTTGCCATCAACAAGATGGACACTGCCAACTGGGCCGAGGCTCGTTACCTTGAGATCATCAAGGAGACCTCCAACTTCATC
AAGAAGGTCGGCTTCAACCCCAAGACCGTTGCCTTCGTCCCCATCTCCGGCTTCAACGGCGACAACATGTTGGCCGCCTCCTCCAACTGCCCCTGG
TACAAGGGCTGGGAGAAGGAGACCAAGGCTGGCAAGTCCACCGGCAAGACCCTTCTCGAGGCCATTGACGCCATTGAGCCCCCCAAGCGTCCCAC
AGACAAGCCCCTCCGTCTGCCCCTTCAGGATGTTTACAAGATCGGTGGTATTGGAACAGTCCCTGTCGGCCGTATCGAGACTGGTATCCTCAAGCC
CGGTATGGTCGTTACCTTCGCTCCCGCCAACGTCACCACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTCGTTGAGGGTGTCCCCGGTGA
CAACGTTGGATTCAACGTCAAGAACGTCTCCGTCAAGGATATCCGCCGTGGAAACGTTGCCGGTGACTCCAAGAACGACCCTCCCATGGCTGCCGC
TTCTTTCAACGCCCAGGTCATTGTCATGAACCACCCTGGCCAGGTCGGTGCCGGATACGCTCCCTGCTCA

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้ ได้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา และดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อรา *T. asperellum, T. asperelloides, T. lentiforme*, *T. lexii*, *T. harzianum* และ *T. viride* และยังได้ไอโซลทของเชื้อรา *T. asperellum, T. asperelloides, T. lentiforme* และ *T. lexii* โดยได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดจำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ the Internal Transcribed Spacer (ITS), the translation elongation factor 1-alpha (tef1) และ the Large Subunit (LSU, 28S) เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการตรวจสอบชนิดของเชื้อรา ตรวจสอบความถูกต้องของชนิดเชื้อรา *Trichoderma* ที่มีการขอขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์กับกรมวิชาการเกษตร ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ใช้สารชีวภัณฑ์เชื้อรา *Trichoderma* โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเกษตรกร อีกทั้งข้อมูลลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) ที่ได้จากการศึกษาเป็นประโยชน์ทางการศึกษาในหน่วยงานราชการ เช่น กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สถาบันการศึกษา และหน่วยงานเอกชน โดยสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อศึกษาความหลากหลายและวิวัฒนาการของเชื้อรา *Trichoderma* ในประเทศไทย รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลและองค์ความรู้เพื่อใช้ในการต่อยอดงานวิจัยวิจัย เช่น การออกแบบไพร์เมอร์จำเพาะเพื่อการตรวจสอบชนิดที่แม่นยำและรวดเร็ว

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานของเชื้อรา *T. asperellum, T. asperelloides, T. lentiforme*, *T. lexii*, *T. harzianum* และ *T. viride* เพื่อใช้เปรียบเทียบและตรวจสอบความถูกต้องของชนิดเชื้อราในสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์กับกรมวิชาการเกษตร โดยจะช่วยลดความเสี่ยงในการใช้ชนิดของสารชีวภัณฑ์ที่ไม่ถูกต้องหรือไม่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผลประสิทธิภาพและความยั่งยืนของการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช

2. สามารถเผยแพร่ผลงานวิจัยในรายงานประจำปีของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รวมถึงงานประชุมวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3.10 การประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* spp. ที่เป็นศัตรูพืชกักกันแบบรวดเร็ว

Rapid Identification of Quarantine Pest Species of Genus *Tribolium* spp. Based on DNA barcoding

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นายนพรัตน์ บัวหอม	สังกัด สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร
ผู้ร่วมการทดลอง	นางสาวชลธิชา รักใคร่	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวชนินทร ดวงสอาด	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางช่อทิพย์ ศัลยพงษ์	สังกัด สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร
	นายอิทธิพล บรรณาการ	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นายมนตรี ธนรส	สังกัด สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

บทคัดย่อ

มอดแป้ง (Flour beetle) คือ แมลงในอันดับ Coleoptera วงศ์ Tenebrionidae สกุล *Tribolium* เป็นแมลงศัตรูโรงเก็บที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สามารถทำลายแป้งจากพืช และเมล็ดธัญพืช เป็นต้น สร้างความเสียหายแก่ผลิตผลเกษตรในโรงเก็บเป็นจำนวนมากในแต่ละปี องค์การอารักขาพืชแห่งชาติ (NPPO) หลายประเทศจึงกำหนดมอดแป้งบางชนิดให้เป็นศัตรูพืชกักกัน (quarantine pest) แต่เนื่องจากมอดแป้งมีขนาดเล็ก บางชนิดมีรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกัน การจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวจึงค่อนข้างยาก โดยเฉพาะตัวอย่างที่ไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ หรืออยู่ไม่อยู่ในระยะตัวเต็มวัย การทดลองนี้ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2560 โดยประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* ที่เป็นศัตรูพืชกักกันแบบรวดเร็ว ด้วยการใช้ยีน mtDNA *COI* ที่มีความยาว 658 bp เป็นดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยนำตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่รวบรวมได้จากโรงสีข้าว และด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ จำนวน 103 ตัว นำมาจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าประกอบด้วย 4 ชนิด คือ มอดแป้ง (*Tribolium castaneum*) มอดฟันเลื่อย (*Oryzaephilus surinamensis*) ด้วงงวงข้าวโพด (*Sitophilus oryzae*) ด้วงถั่วเขียว (*Callosobruchus maculatus*) และมีตัวอย่างบางส่วนไม่สามารถจำแนกได้ เนื่องจากไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ จากนั้น นำตัวอย่างของแมลงศัตรูโรงเก็บทั้ง 4 ชนิด และตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกได้จำนวน 24 ตัว มาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณยีน mtDNA *COI* ด้วยเทคนิค PCR ตรวจหาและวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานในฐานข้อมูล GenBank พบว่าผลการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดให้ผลตรงกันกับการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ คือ มอดแป้งชนิด *T. castaneum* โดยค่า sequences similarity ทั้งหมดอยู่ที่ระดับ 98.94% ขึ้นไป ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยการสร้าง Maximum Likelihood tree ด้วยแบบจำลอง K2P ได้ยืนยันความถูกต้องของการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยพบว่าลำดับ

กรมวิชาการเกษตร

นิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บทั้ง 4 ชนิด อยู่ใน clade เดียวกันกับลำดับ นิวคลีโอไทด์มาตรฐานของแต่ละชนิดที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank โดยมอดแป้งชนิด *T. castanuem* และชนิด *T. fremani* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ และการทดลองนี้ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บทั้ง 4 ชนิด ป้อนเข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank โดยได้รับ Accession numbers คือ MK649848 – MK649857 ดังนั้น การทดลองนี้จึงสามารถใช้เป็นพื้นฐานใน การประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นอย่างถูกต้อง และรวดเร็ว ช่วยอำนวยความสะดวกในการตรวจสอบกักกันสินค้าพืชและผลิตผลพืชนำเข้าส่งออก และเป็นพื้นฐานสำหรับ การศึกษาวิจัยพันธุศาสตร์ประชากร (Population Genetics) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Abstract

Flour betles of the genus *Tribolium* (Coleoptera: Tenebrionidae) are economically important stored – product pests of flours and grain, etc. Therefore, National Plant Protection Organization (NPPO) considered some species of flou beetle as quarantine pests. Because *Tribolium* individuals is small and similar in morphological characteristics for some species, especially damaged samples and non – adults state, it is difficult to identify base on external characteristics alone. The study carried out molecular identification of the genus *Tribolium* base on DNA barcoding, using mtDNA *COI* gene (length 658 bp), during October, 2016 – Septmber, 2018. We collected 103 stored – product pest individuals from rice mills and Bangkok port plant quarantine station and identified base on external morphological characteristics, the results showed that the individuals consisted of 4 species of pest, including *T. castaneum, Oryzaephilus surinamensis*, *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus maculatus*, and some individuals could not identified cause damaged. We applied molecular identification on 24 samples from 4 species individuals and damaged individuals, through DNA extraction, PCR amplification, sequencing and sequences alignment in GenBank. Results of two identification techniques are consistent, sequences similarity is highly at 98.94% above, and the damaged sample is *T. castaneum*. Phylogenetics analysis based on Maximum Likelihood method using K2P parameter further verified the molecular identification results above. Each species are in the same clade to the species got from GenBank. Genetics relationship between *T. castaneum* and *T. freemani* are very close, and conformed to previous studies. We submitted nucleotide sequences of 4 species to GenBank, accession numbers are MK649848 – MK649857. Therefore, the study can provide technical reference and support to rapid identification of other pests, which can provide convenience in release of plants and plant products consignments in entry - exit inspection and quarantine, and can also be a besis of population genetics study.

สำนักวิชาการเกษตร

คำนำ

มอดแป้ง (Flour beetle) เป็นแมลงในอันดับ Coleoptera วงศ์ Tenebrionidae สกุล *Tribolium* MacLeay 1825 ปัจจุบันมีรายงานการตรวจพบมอดแป้งแล้ว 36 ชนิด (Angelini และ Jockusch, 2008) โดยมี 10 ชนิดที่แมลงศัตรูโรงเก็บที่สำคัญ ได้แก่ *Tribolium castanium* ซึ่งพบการแพร่กระจายในหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย *T. confusum* ซึ่งพบการแพร่กระจายในหลายประเทศทั่วโลก แต่ยังไม่มีรายงานการตรวจพบในประเทศไทย (Crop Protection Compendium, 2019) รวมถึง *T. destructor, T. audax, T. madens, T. freemani, T. anaphe, T. brevicorne, T. parallelus* และ *T. thusa* (Wang, 2015; Crop Protection Compendium, 2019) โดยมอดแป้งเหล่านี้สามารถเข้าทำลายแป้งจากพืช เมล็ดธัญพืช เมล็ดข้าวโพด เมล็ดถั่วชนิดต่างๆ และเมล็ดพืชที่ให้น้ำมัน ได้ทั้งในระยะหนอนและตัวเต็มวัย ด้วยการเข้าทำลายภายหลังจากที่แมลงชนิดอื่นทำลายเมล็ดพืชจนเป็นรูหรือรอยแตกแล้ว โดยตัวเต็มวัยจะหลั่งสารบางชนิดที่มีกลิ่นเหม็น ทำให้แป้งจากพืชหรือ เมล็ดพืชที่ถูกทำลายจับตัวเป็นก้อน ขึ้นรา และมีกลิ่นเหม็น ไม่สามารถใช้รับประทานได้ สร้างความเสียหายแก่ผลผลิตในโรงเก็บเป็นจำนวนมากในแต่ละปี (Li et al., 2011) นอกจากนี้ มอดแป้งยังมีความสามารถในการขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว มีวงจรชีวิตที่ยาวนาน และมีความปราดเปรียวรวดเร็ว หากไม่มีมาตรการควบคุมป้องกันที่มีประสิทธิภาพ อาจส่งผลกระทบต่อความมั่นคงทางอาหารได้ (Rees, 2004) ด้วยเหตุนี้ หน่วยงานอารักขาพืช (National Plant Protection Organizations, NPPOs) หลายประเทศทั่วโลกกำหนดให้มอดแป้งเป็นศัตรูพืชกักกัน เช่น ประเทศจีนกำหนดให้มอดแป้งชนิด *T. destructor* เป็นศัตรูพืชกักกัน (General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the P.R. China, 2017) ประเทศไทยโดยกรมวิชาการเกษตรได้ทำการศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า มอดแป้งชนิด *T. confusum* มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน (ณัฏฐพร และคณะ, 2553) ด้วยเหตุนี้ จึงกำหนดให้มีการรมยาด้วยสารเมทิลโบรไมด์ หรือสารฟอสฟีนเพื่อกำจัดมอดแป้ง และแมลงศัตรูพืชชนิดอื่น

การค้าสินค้าเกษตรระหว่างประเทศที่ขยายตัวเพิ่มสูงขึ้น ทำให้โอกาสที่มอดแป้งจะติดปะปนไปกับสินค้าเกษตร และแพร่กระจายไปยังพื้นที่ใหม่ ๆ เพิ่มสูงขึ้น จากการรายงานของกระทรวงควบคุมคุณภาพตรวจสอบและกักกันโรคแห่งสาธารณรัฐประชาชนจีน (the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of P. R. China, AQSIQ) พบว่าระหว่างปี 2551 – 2554 ด่านตรวจพืชทั่วสาธารณรัฐประชาชนจีนมีการตรวจพบมอดแป้งในสินค้าเกษตรนำเข้าจากต่างประเทศทั้งหมด 32,718 ครั้ง เฉพาะในปีพ.ศ. 2555 ตรวจพบทั้งหมด 21,036 ครั้ง โดยตรวจพบ มอดแป้ง 5 ชนิด คือ *T. castanium, T. confusum, T. destructor, T. madens* และ *T. freeman* โดยตัวอย่างมอดแป้งที่ตรวจพบบางส่วน สามารถจำแนกได้ถึงระดับสกุลเท่านั้น (Wang และคณะ, 2015) ปัจจุบัน การจำแนกชนิดของมอดแป้งอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัยเท่านั้น การจำแนกชนิดของมอดแป้งในระยะไข่ หนอน และดักแด้ รวมถึงเศษชิ้นส่วนตัวเต็มวัยมีความยากลำบาก และต้องใช้เวลานาน โดยเฉพาะมอดแป้ง 2 ชนิด คือ *T. castanium* และ *T. confusum* ที่มีรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา และขนาดใกล้เคียงกัน แต่ในงานด้านการกักกันพืช มีการตรวจพบแมลงศัตรูพืชกักกันทุกระยะการเจริญเติบโต รวมถึงเศษชิ้นส่วนของแมลงศัตรูพืชกักกัน ดังนั้น การศึกษาค้นคว้าเทคนิคใหม่ที่

กรมวิชาการเกษตร

สามารถตรวจสอบแมลงศัตรูพืชกักกันได้ทุกระยะการเจริญเติบโต รวมถึงเศษชิ้นส่วนของแมลงศัตรูพืชกักกัน ได้อย่างรวดเร็วและถูกต้องแม่นยำ จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่ง (Zhang และคณะ, 2013)

ในระยะไม่กี่ปีที่ผ่านมา การตรวจจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (molecular identification) เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological identification) (Liu และคณะ, 2011) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ถูกคิดค้นโดย Hebert และคณะ (2003) กลายมาเป็นเครื่องมือสำคัญในการตรวจวินิจฉัยชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นลำดับของดีเอ็นเอที่สั้นและมีมาตรฐาน เหมาะสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยชนิดในระดับโมเลกุล ได้รับการยอมรับและถูกกำหนดให้เป็นวิธีหนึ่งในการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชกักกันในมาตรฐาน ISPM No. 27 เรื่อง Diagnostic protocols for regulated pests (FAO, 2006) เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นการนำเอาดีเอ็นเอมาตรฐานที่สามารถใช้ระบุชนิดของของสิ่งมีชีวิตได้ มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้ววิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตนั้น ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานในฐานข้อมูลสากล เช่น ฐานข้อมูลของ GenBank เป็นต้น และสร้าง phylogenetic tree เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ทำให้สามารถระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว โดยสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของตัวอย่างแมลง ได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ไม่ว่าตัวอย่างจะอยู่ในสภาพสมบูรณ์หรือไม่ก็ตาม (วุฒิพงษ์, 2554) โดยยีนที่นิยมนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในปัจจุบันคือ ยีน *COI* ซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรีย (mtDNA *COI*) มีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงพอที่จะใช้จำแนกชนิดสัตว์ได้ (Hebert และคณะ, 2003; วุฒิพงษ์, 2554) การประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการจำแนกชนิดของมอดแป้ง สามารถช่วยอำนวยความสะดวกทางการค้า ลดระยะเวลาในการตรวจปล่อย และสามารถให้ผลการจำแนกในระดับชนิด (species) ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ โดยหากด่านตรวจพืชมีการตรวจพบมอดแป้งที่เป็นศัตรูพืชกักกันในแป้งจากพืช หรือเมล็ดพืชนำเข้าจากต่างประเทศแล้ว กรมวิชาการเกษตรสามารถใช้ผลตรวจดังกล่าวเป็นข้อมูลแจ้งเตือนถึงปัญหาการไม่เป็นไปตามข้อกำหนดด้านสุขอนามัยพืช (The notification of non-compliance) ไปยังหน่วยงานอารักขาพืชแห่งชาติ (NPPO) ของประเทศผู้ส่งออก เพื่อให้เพิ่มความเข้มงวดในการตรวจสอบกักกันก่อนการส่งออก ป้องกันการเข้ามา (introduction) ของมอดแป้งต่างถิ่นที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และอาจส่งผลกระทบต่อการผลิตผลในโรงเก็บของประเทศไทย

จากการตรวจสอบเอกสารวิจัยที่ผ่านมา พบว่ามีการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการจำแนกชนิดของมอดแป้งด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลในต่างประเทศ ดังนี้ Mestrovic และคณะ (2006) ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างมอดแป้งสกุล *Tribolium* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ที่มีความยาว 642 bp และยีน 16S rDNA ที่มีความยาวระหว่าง 448 – 452 bp พบว่า phylogenetic tree สามารถแบ่งมอดแป้งสกุลดังกล่าวออกได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *T. brevicornis* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *T. castanium, T. freemani, T. madens* และ *T. audax* และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *T. confusum*, *T. anaphe* และ*T. destructor* โดยมอดแป้งชนิด *T. castanium* กับ *T. freemani* และมอดแป้งชนิด *T. madens* กับ *T. audax* เป็น sibling species pairs กัน Angelini และ Jockusch (2008) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมอดแป้งสกุล *Tribolium* ด้วยการใช้เครื่องหมาย

ชีวโมเลกุลหลายชนิด ได้แก่ ยีน *COI* ยีน 16S rDNA ยีน 28S rDNA และ wingless พบว่า มอดแป้งชนิด *T. castanium* และ *T. confusum* ต่างเป็น monophyletic ส่วน Nowaczyk และคณะ (2009) ศึกษาวิธีการจำแนกชนิดของมอดแป้งชนิด *T. confusum* โดยใช้เทคนิค Real-time PCR มีการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS และ ยีน COI ของมอดแป้งชนิด *T. confusum* ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank โดยมีการพิสูจน์ความน่าเชื่อถือและความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์ที่ได้ ทำให้ได้วิธีการจำแนกชนิดที่มีความรวดเร็วและแม่นยำ Ming และคณะ (2015) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างมอดแป้ง 2 ชนิด คือ *T. castanium* และ *T. confusum* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* และยีน Cytb ซึ่งอยู่บนไมโทคอนเดรีย จากตัวอย่างมอดแป้งชนิดละ 100 ตัวอย่างพบว่า มอดแป้งทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างทางพันธุศาสตร์ระหว่างกัน ถึงแม้ว่ารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและขนาดจะใกล้เคียงกันมากก็ตาม โดยเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับมอดแป้งอีก 2 ชนิด คือ *T. freemani* และ *T. destructor* พบว่าคู่มอดแป้งชนิด *T. castanium* กับ *T. freemani* และ *T. confusum* กับ *T. destructor* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่าคู่มอดแป้ง *T. castanium* และ *T. confusum* นอกจากนี้ ได้พิสูจน์แล้วว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* และ ยีน Cytb สามารถใช้ในการศึกษาการแบ่งแยกทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างสปีชีส์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสปีชีส์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน ส่วนในประเทศไทย ปัจจุบันยังไม่พบการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนั้น การทดลองนี้จึงเป็นพื้นฐานสำหรับการศึกษาวิจัยการจำแนกชนิดของ มอดแป้งสกุล *Tribolium* และสามารถใช้ต่อยอดในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร (Population Genetics) หรือการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง (specific primers) สำหรับมอดแป้งสกุล *Tribolium* ได้

วิธีดำเนินการ

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1) ตัวอย่างของแมลงศัตรูโรงเก็บ (stored – product pest)
2) วัสดุวิทยาศาสตร์และสารเคมี
3) อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่าง เช่น หลอดทดลอง พู่กัน ที่คีบแมลง และ micropin เป็นต้น
4) กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope)
5) เครื่อง PCR thermal cycler
6) เครื่องอ่านลำดับดีเอ็นเออัตโนมัติ (Automated DNA sequencer)
7) เครื่อง gel electrophoresis แบบแนวนอน และเครื่องอ่านวิเคราะห์ gel
8) เครื่อง autoclave
9) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
10) เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (high speed centrifuge)
11) เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยมสองตำแหน่ง (๒ digit digital scale)
12) ตู้เย็น (refrigerator)
13) เครื่องเขย่าสาร (vortex)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

14) เครื่องอบไมโครเวฟ

15) โปรแกรม DNAMAN V. 7.0, โปรแกรม MEGA V. 5.0, โปรแกรม ClustalX และโปรแกรม BLAST

แบบและวิธีการทดลอง

1) การเก็บรวบรวมตัวอย่าง (sample collection)

เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บระยะเต็มวัย ด้วย 2 วิธีการ ดังนี้

(1) เก็บรวบรวมจากด่านตรวจพืช

พนักงานเจ้าหน้าที่ของด่านตรวจพืช เช่น ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ด่านตรวจพืชท่าเรือ แหลมฉบัง เป็นต้น ทำการสุ่มตรวมสินค้าธัญพืชนำเข้าจากต่างประเทศ ระหว่างปี 2559 - 2561 โดยหากสุ่มตรวจพบแมลงศัตรูโรงเก็บระยะเต็มวัย ทั้งที่มีสภาพสมบูรณ์ และสภาพไม่สมบูรณ์ ในสินค้าธัญพืชนำเข้าใด ให้นำตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ได้มาแช่ในหลอดทดลองที่มีเอทานอลเข้มข้น 95% แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ – 20 C บันทึกข้อมูลผู้เก็บตัวอย่าง ชื่อที่อยู่ผู้ส่งออกและผู้นำเข้า ชนิดของสินค้าธัญพืช จำนวนและปริมาณของสินค้าธัญพืช ประเทศผู้ส่งออก วันที่นำเข้า เป็นต้น

(2) เก็บรวบรวมจากโรงสีข้าว หรือโรงเก็บผลิตผลเกษตร

เก็บรวบรวมแมลงศัตรูโรงเก็บระยะเต็มวัยจากโรงสีข้าว ทั้งที่มีสภาพสมบูรณ์ และมีสภาพไม่สมบูรณ์ ระหว่างการตรวจประเมินเพื่อขึ้นทะเบียนผู้ผลิตและแปรรูปข้าวส่งออกไปสาธารณรัฐประชาชนจีน หรือจากโรงเก็บผลิตผลเกษตร โดยนำตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ได้มาแช่ในหลอดทดลอง ที่มีเอทานอลเข้มข้น 95% แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ – 20 C บันทึกข้อมูลผู้เก็บตัวอย่าง วันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง ชื่อและที่อยู่ของโรงปรับปรุงคุณภาพข้าวหรือโรงสีข้าว

2) การตรวจจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological identification)

หากตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บอยู่ในระยะตัวเต็มวัย และมีสภาพสมบูรณ์ ให้นำมาตรวจจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ก่อนการจำแนกด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด ตามเอกสารแนวทาง การจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บ ภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) บันทึกภาพถ่ายลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อใช้ยืนยันผลการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด แต่หากตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บมีสภาพไม่สมบูรณ์ให้ข้ามไปดำเนินการในข้อ 3

3) การสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR (DNA extraction and PCR amplification)

การสกัดดีเอ็นเอ

(1) เตรียมความพร้อมของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ โดยนำตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บออกจากตู้เย็น และวางไว้บนกระดาษซับเป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เอทานอลเข้มข้น 95% ระเหยจนหมด และตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บแห้งสนิท เหมาะสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ เมื่อแห้งแล้วให้นำตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 mL และเขียนหมายเลขกำกับ นำปิเปตทิปขนาด 1,000 µL ที่ผ่านการนึ่งความดันสูงเพื่อฆ่าเชื้อ (autoclave) แล้ว มาลนด้วยเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ เพื่อปิด ปลายรูด้านที่ใช้ดูดสารเคมี ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น 10 นาที

กรมวิชาการเกษตร

(2) เตรียมชุดสกัดดีเอ็นสำเร็จรูปของ QIAamp DNA Mini Kit (GIAGEN, Germany) โดยเติม เอทานอลเข้มข้น 95% ลงในสารละลายต่างๆ ตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด

(3) เติมไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196 C) ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บในปริมาตรประมาณ 3/4 ของหลอดทดลอง จากนั้น เมื่อปริมาตรลดลงเหลือประมาณ 1/4 ของหลอดทดลอง ให้ใช้ปิเปตทิปที่เตรียมไว้ บดตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บให้ละเอียดด้วยความระมัดระวัง ระวังมิให้ตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บกระเด็นออกมานอกหลอดทดลอง

(4) เตรียมการสลายผนังเซลล์ (pre - lysis) โดยการเติม Buffer ATL ปริมาณ 180 µL และเติม proteinase K solution ปริมาณ 20 µL ปิดปากหลอดทดลองให้สนิท พันด้วยพาราฟีน (paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน แล้วสั่นสะเทือนเพื่อผสมสารกับตัวอย่างแมลงให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex) เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้น นำหลอดทดลองใส่ในทุ่นลอย แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 56 C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยระหว่างการบ่ม ให้พลิกหลอดทดลองกลับไปมา 3 – 4 ครั้ง ทุก 1 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวอย่างแมลงศัตรูพืชย่อยสลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อครบ 3 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที เพื่อขจัดหยดน้ำที่ติดบนฝาภายในหลอดทดลอง

(5) ย่อยตัวอย่าง (lyse samples) โดยการเติม Buffer AL ปริมาณ 200 µL ลงในหลอดทดลอง จากนั้นสั่นสะเทือนเพื่อผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 70 C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที เพื่อขจัดหยดน้ำที่ติดบนฝาภายในหลอดทดลอง

(6) เตรียมพร้อมในการจับสารพันธุกรรม (adjust DNA binding conditions) โดยการเติมเอทานอลเข้มข้น 100% ปริมาณ 200 µL จากนั้น สั่นสะเทือนเพื่อผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 15 วินาที

(7) การจับดีเอ็นเอ (Bind DNA) โดยการดูดสารละลายทั้งหมดจากหลอดทดลองข้างต้น มาใส่ใน QIAamp Mini spin column ที่บรรจุหลอด collection tube ขนาด 2 mL ปิดฝาแล้ว ปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ทิ้งหลอด collection tube ที่ภายในมีสารละลาย แล้วเปลี่ยนหลอด collection tube ขนาด 2 mL ลงไปแทน

(8) การล้างตะกอน (wash silica membrane) โดยการเติม Washing Buffer AW1 ปริมาณ 500 µL ปิดฝาแล้ว ปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ทิ้งหลอด collection tube ที่ภายในมีของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน แล้วเปลี่ยนหลอด collection tube ขนาด 2 mL ชิ้นใหม่ลงไปแทน จากนั้น เติม Washing Buffer AW1 ปริมาณ 500 µL ปิดฝาแล้ว ปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ทิ้งหลอด collection tube ที่ภายในมีของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน จากนั้นนำ Mini spin column ใส่ลงไปในหลอดทดลองขนาด 1.5 mL ชิ้นใหม่

(9) การละลายดีเอ็นเอ (Elute DNA) โดยการเติม Elution Buffer AE ปริมาณ 50 µL และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาทีแล้วปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ดูดสารละลายที่อยู่ในหลอดทดลองมาใส่ใน Mini spin column อีกครั้ง บ่มไว้ 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วที่

ลิขสิทธิ์กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 2 นาที ทิ้ง Mini spin column จากนั้นนำหลอดทดลองที่ภายในบรรจุ genomic DNA ปริมาณ 50 µL เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ - 20 C เพื่อรอการตรวจสอบคุณภาพ

(10) ตรวจสอบคุณภาพของ genomic DNA ด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis โดยเตรียม agarose จำนวน 150 กรัม ผสมกับสารละลาย 1 x TBE (Tris – Borate, EDTA) ปริมาณ 100 ml แล้วนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องอบไมโครเวฟประมาณ 5 นาที จนสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกันทั้งหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนใช้มือสัมผัสแล้วไม่ถูกความร้อนลวก จากนั้น เติมสารย้อมสี fluorescent GelRed ลงไปใน 1.5% agarose gel ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงไปในถาด รอให้เย็นลงจนแข็งตัวเป็นก้อน แล้วย้ายถาด 1.5% agarose gel ลงไปในเครื่อง electrophoresis ที่มีสารละลาย 1 x TBE เตรียม genomic DNA ของแต่ละตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ ปริมาณ 5 µL ผสมกับ 6 x loading dye (Promega) และนำ PCR marker (G316A, Promega) ปริมาณ 5 µL ผสมกับ 6 x loading dye จากนั้น นำ PCR products และ PCR marker ที่ผสมแล้ว หยดลงไปใน agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1.5% และให้ PCR products และ PCR marker เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย 1 x TBE โดยใช้กระแสไฟฟ้าปริมาณ 100 โวลต์ 400 mp (voltage) เป็นเวลา 40 นาที จากนั้น นำ 1.5% agarose gel ไปตรวจสอบด้วยเครื่องอ่านวิเคราะห์ gel เพื่อตรวจสอบคุณภาพของ genomic DNA ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR

(1) สังเคราะห์ *COI* universal primers (Folmer และคณะ, 1994) โดยบริษัท Sigma – Aldrich จำกัด ดังนี้

Primer name	Sequence	Length (bp)
LCO 1490	5’ – GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG – 3’	25
HCO 2198	5’ – TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA – 3’	26

(2) เตรียมสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยา PCR โดยมีส่วนประกอบ ดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (µL)
1. 2X PCR Marter Mix (Promega)	12.5
2. LCO 1490 (10 µM)	0.5
3. HCO 2198 (10 µM)	0.5
4. DNA template	1.5
5. ddH_2O	10
Total volume	25

(3) เพิ่มปริมาณยีน *COI* ด้วยเทคนิค PCR โดยมี Thermo cycling condition คือ

กรมวิชาการเกษตร

pre – denaturing ที่อุณหภูมิ 94 ℃ เป็นเวลา 3 นาที
denaturing ที่อุณหภูมิ 94 ℃ เป็นเวลา 1 นาที
annealing ที่อุณหภูมิ 52 ℃ เป็นเวลา 1 นาที } จำนวน 35 cycles
extension ที่อุณหภูมิ 72 ℃ เป็นเวลา 1 นาที
final – extension ที่อุณหภูมิ 72 ℃ เป็นเวลา 10 นาที

(4) ตรวจสอบคุณภาพของ PCR products ด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis โดยเตรียม agarose จำนวน 150 กรัม ผสมกับสารละลาย 1 x TBE (Tris – Borate, EDTA) ปริมาณ 100 ml แล้วนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องอบไมโครเวฟประมาณ 5 นาที จนสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกันทั้งหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนใช้มือสัมผัสแล้วไม่ถูกความร้อนลวก จากนั้น เติมสารย้อมสี fluorescent GelRed ลงไปใน 1.5% agarose gel ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงไปในถาด รอให้เย็นลงจนแข็งตัวเป็นก้อน แล้วย้ายถาด 1.5% agarose gel ลงไปในเครื่อง electrophoresis ที่มีสารละลาย 1 x TBE

เตรียม PCR product ของแต่ละตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ ปริมาณ 5 µL ผสมกับ 6 x loading dye (Promega) และนำ PCR marker (G316A, Promega) ปริมาณ 5 µL ผสมกับ 6 x loading dye จากนั้น นำ PCR products และ PCR marker ที่ผสมแล้ว หยดลงไปใน agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1.5% และให้ PCR products และ PCR marker เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย 1 x TBE โดยใช้กระแสไฟฟ้าปริมาณ 100 โวลต์ 400 mp (voltage) เป็นเวลา 40 นาที

จากนั้น นำ 1.5% agarose gel ไปตรวจสอบด้วยเครื่องอ่านวิเคราะห์ gel เพื่อตรวจสอบคุณภาพของ PCR products ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ

4) การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequencing)

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (bidirectional sequencing) ของ PCR products ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ โดยทำ PCR products ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PCR purification kit จากนั้น ใช้เครื่องอ่านลำดับดีเอ็นเออัตโนมัติ (Automated DNA sequencer) ของ Solgen Analysis Service ประเทศเกาหลีใต้ เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บแล้ว ใช้โปรแกรม DNAMAN V.7.0 ในการตัดต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บให้เป็นเส้นเดียวกัน โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองทิศทางที่ได้ และลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของยีน *COI* จากฐานข้อมูล GenBank มาใช้เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบกัน เพื่อตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนเกินทิ้งไป ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์เส้นเดียวที่มีความยาว 658 bp ของแต่ละตัวอย่าง

5) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing analysis)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ได้ มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST เพื่อตรวจค่า sequences similarity (%) หรือความคล้ายคลึงกัน เพื่อจำแนกชนิดของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด ดาวน์โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของแมลงศัตรูโรงเก็บชนิดที่เกี่ยวข้อง และตั๊กแตนไผ่ (*Ceracris kiangsu*) จากฐานข้อมูล GenBank จากนั้น ใช้โปรแกรม Clustal X ในการเรียบเรียงลำดับ นิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ได้ และนิ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

วคลีโอไทด์มาตรฐานทั้งหมด ให้อยู่ในไฟล์เดียวกัน และบันทึกข้อมูลในรูปแบบ FASTA เพื่อใช้วิเคราะห์ข้อมูลในขั้นตอนต่อไป

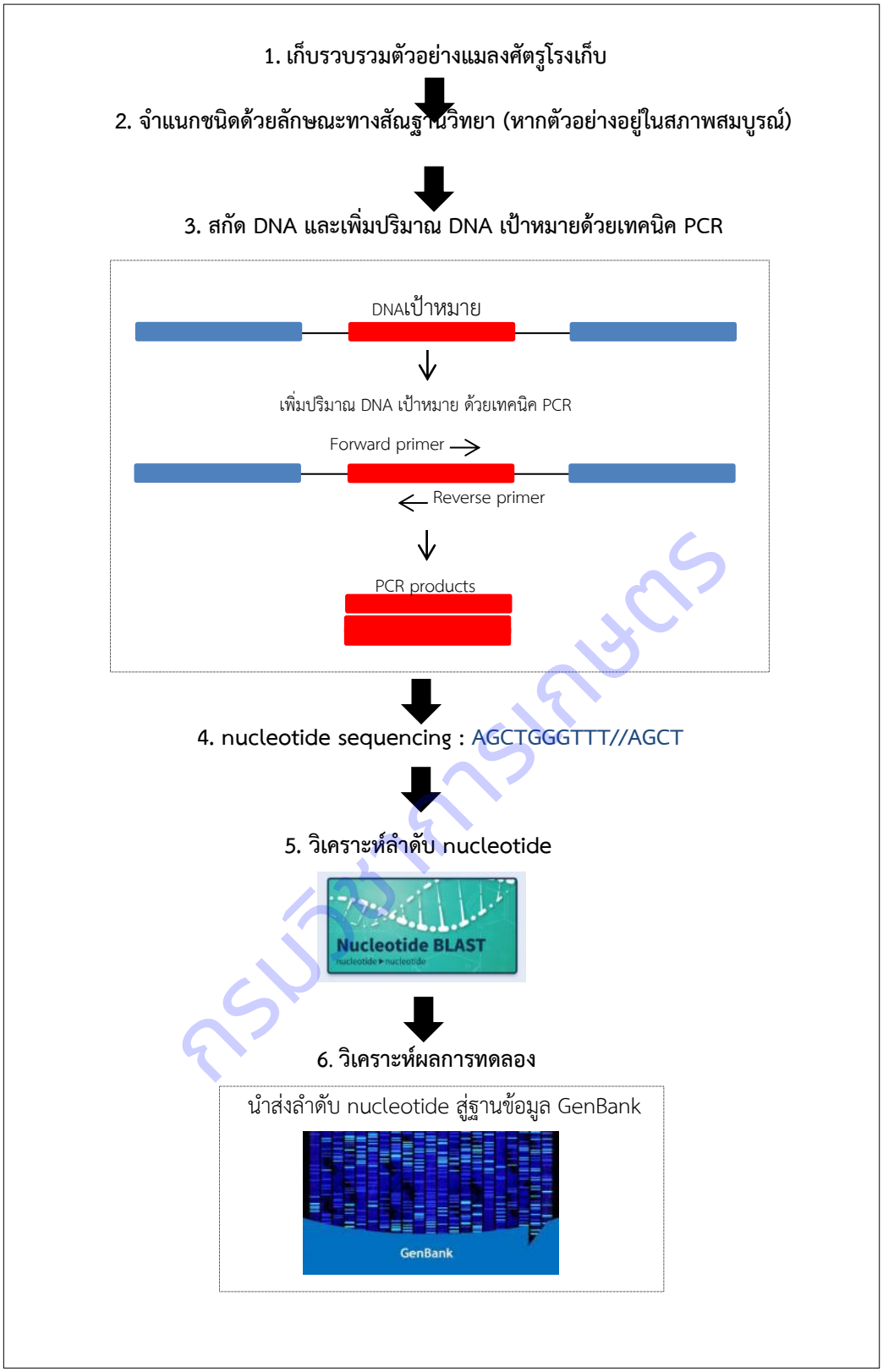
ใช้โปรแกรม MEGA V. 5.0 ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์ การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยวิธี Maximum Likelyhood (ML tree) ด้วยแบบจำลอง Kimura – 2 – Parameter (K2P) (Nei และ Kumar, 2000) ซึ่งเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยการทดลองนี้ใช้ ตั๊กแตนไผ่ (*Ceracris kiangsu*) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม (outgroup) เพื่อยืนยันผลการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างแมลงศัตรูโรงเก็บแต่ละชนิดในการทดลอง

6) การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ผลการจำแนกชนิดของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ สรุปจำนวนของแมลงศัตรูโรงเก็บแต่ละชนิดที่ได้ และนำมาเปรียบเทียบกับผลการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อยืนยันผลการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทั้ง 2 อย่าง (เฉพาะตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่มีสภาพสมบูรณ์) ทั้งนี้หากพบว่า แมลงศัตรูโรงเก็บที่ได้เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย ให้ทำการแจ้งเตือนปัญหา การไม่ปฏิบัติตามข้อกำหนดในการนำเข้า ไปยังองค์การอารักขาพืชของประเทศผู้ส่งออก เพื่อให้เพิ่มความเข้มงวดในการตรวจสอบกักกันสินค้าธัญพืชก่อนการส่งออกมายังประเทศไทย

ใช้โปรแกรม DNAMAN V.7.0 แปลลำดับนิวคลีโอไทดของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ได้จากการทดลองเป็นลำดับโปรตีนที่ไม่มี termination coding จากนั้น นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับโปรตีนที่มีคุณภาพดีของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่เป็นตัวแทน ป้อนเข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BankIt บันทึกข้อมูล GenBank Accession Numbers

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3.10.1 ภาพแสดงวิธีการทดลอง (ดัดแปลงจาก วุฒิพงศ์ มหาคำ, 2011)

กรมวิชาการเกษตร

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง ดำเนินการทดลองระหว่าง เดือน ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561

สถานที่ทำการทดลอง

1) ด่านตรวจพืช ของสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร (สคว.) เช่น ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ด่านตรวจพืชท่าเรือแหลมฉบัง เป็นต้น
2) โรงสีข้าว หรือ โรงเก็บผลิตผลการเกษตร
3) ห้องปฏิบัติการของกลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร สคว.
4) ห้องปฏิบัติการของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (สอพ.)
5) ห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานอนุกรมวิธาน กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สอพ.

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต จากโรงสีข้าว จำนวน 3 แห่ง ในพื้นที่จังหวัดสุรินทร์ จังหวัดชลบุรี และจังหวัดสุพรรณบุรี รวมถึงการเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ไม่มีชีวิตจากสินค้าธัญพืชนำเข้าจากต่างประเทศ จำนวน 2 ครั้ง ณ ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ระหว่างเดือนสิงหาคม 2559 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2560 แล้วนำตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่มีสภาพสมบูรณ์ มาจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตามเอกสารแนวทางการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บแล้ว พบว่าได้ตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ จำนวน 4 ชนิด คือ มอดแป้ง (*T. castaneum*) จำนวน 35 ตัว มอดฟันเลื่อย (*Oryzaephilus surinamensis*) จำนวน 20 ตัว ด้วงงวงข้าวโพด (*Sitophilus oryzae*) จำนวน 30 ตัว ด้วงถั่วเขียว (*Callosobruchus maculatus*) จำนวน 15 ตัว รวม 100 ตัว และพบว่าไม่สามารถจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ จำนวน 3 ตัว รวมทั้งสิ้น 103 ตัว (ตารางที่ 3.10.1) (ภาพที่ 3.10.2 – 3.10.4) โดยแมลงศัตรูโรงเก็บแต่ละชนิดในการทดลองมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้

1) มอดแป้ง: *Tribolium castanium* ชื่อสามัญ: red flour beetle
วงศ์: Tenebrionidae อันดับ: Coleoptera

ลักษณะที่สำคัญ: ตัวเต็มวัยมีสีน้ำตาลปนแดง ลำตัวแบนยาว มีความยาวประมาณ 2.3 –4.4 มิลลิเมตร ปลายหนวดเป็นรูปกระบอก มีลักษณะเป็นปล้อง โดย 3 ปล้องสุดท้ายเป็นตุ่มใหญ่ เห็นได้ชัดเจน

พืชอาศัย: เมล็ดธัญพืช แป้ง รำข้าว เป็นต้น (อุรุญากร และคณะ, 2540; พรทิพย์ และคณะ, 2548)

2) มอดฟันเลื่อย: *Oryzaephilus surinamensis* ชื่อสามัญ: Saw – toothed grain beetle
วงศ์: Silvanidae อันดับ: Coleoptera

ลักษณะที่สำคัญ: ตัวเต็มวัยสีน้ำตาลเข้ม แบนยาว ขนาดลำตัวยาวประมาณ 2.5 – 3.0 มิลลิเมตร ลักษณะเฉพาะที่แตกต่างจากแมลงชนิดอื่น คือ ขอบด้านข้างของส่วนอกจะมีลักษณะเป็นฟันเลื่อยข้างละ 6 ซี่

พืชอาศัย: เมล็ดธัญพืชทุกชนิด ข้าวสาร ถั่ว เป็นต้น

3) ด้วงงวงข้าวโพด *Sitophilus zeamais* ชื่อสามัญ: maize weevil
วงศ์: Curculionidae อันดับ: Coleoptera

ลักษณะที่สำคัญ: ตัวเต็มวัยมีสีน้ำตาลอ่อน ขนาดลำตัวยาวประมาณ 3.0 – 3.8 มิลลิเมตร ส่วนหัว จะยื่นออกมาเป็นงวง (snout)

พืชอาศัย: เมล็ดธัญพืชทุกชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด เป็นต้น

4) ด้วงถั่วเขียว *Callosobruchus maculatus* ชื่อสามัญ: Cowpea weevil

วงศ์: Bruchidae อันดับ: Coleoptera

ลักษณะที่สำคัญ: ตัวเต็มวัยมีสีน้ำตาล ปีกสั้นไม่คลุมมิดลำตัว และมีแถบหรือจุดสีน้ำตาลเข้มบนปีก ทั้งสองข้าง ปลายปีกมีสีดำ ลำตัวเรียวแคบไปทางส่วนหัว ทำให้หัวเล็ก และงุ้มเข้าหาส่วนอก หนวดเป็นแบบ subserrate ขนาดลำตัวยาวประมาณ 3.0 – 4.5 มิลลิเมตร

พืชอาศัย: เมล็ดถั่วทุกชนิด ยกเว้นถั่วเหลือง (พรทิพย์ และคณะ, 2548; Rees, 2004)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3.10.1 แสดงสถานที่เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ

ลำดับ	สถานที่เก็บรวบรวมตัวอย่าง	ชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บ	จำนวนที่เก็บได้/ที่นำมาทดลอง (ตัว)	ชื่อพืชอาศัย	ผู้เก็บตัวอย่าง/วันที่เก็บตัวอย่าง
1	โรงสีข้าว บริษัท พูนผล เทรดดิ้ง จำกัด ต.เฉนียง อ.เมือง จ.สุรินทร์	มอดแป้ง (*T. castaneum*)	20/10	ข้าว	18 ส.ค. 2559/ นพรัตน์ บัวหอม
		ไม่ทราบชนิด*	3/1	ข้าว	
2	โรงสีข้าว บริษัท พูนสินไทยโกลเด้นไรซ์ จำกัด ต.กระจัน อ.อู่ทอง จ.สุพรรณบุรี	มอดฟันเลื่อย (*O. surinamensis*)	20/1	ข้าว	7 ธ.ค. 2559/ นพรัตน์ บัวหอม
3	ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตคลองเตย กรุงเทพฯ	ด้วงงวงข้าวโพด** (*S. zeamais*)	30/1	ข้าวสาลี	30 ก.ย. 2559/ มนตรี ธนรส
4	ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตคลองเตย กรุงเทพฯ	ด้วงถั่วเขียว*** (*C. maculatus*)	15/1	ถั่วเขียว	19 ม.ค. 2560/ มนตรี ธนรส
5	โรงสีข้าว บริษัท เอช. เอช. แอล. อินเตอร์เทรด จำกัด ต.หนองเสือช้าง อ.หนองใหญ่ จ.ชลบุรี	มอดแป้ง	15/10	ข้าว	24 พ.ย. 2560/ นพรัตน์ บัวหอม

*ตัวอย่างอยู่ในระยะตัวเต็มวัย แต่สภาพไม่สมบูรณ์ จึงไม่สามารถจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้

**พบด้วงงวงข้าวโพดที่ไม่มีชีวิตในตัวอย่างของเมล็ดข้าวสาลี (Australian Hard Wheat) นำเข้าจากเครือรัฐออสเตรเลีย เมื่อวันที่ 30 กันยายน 2559

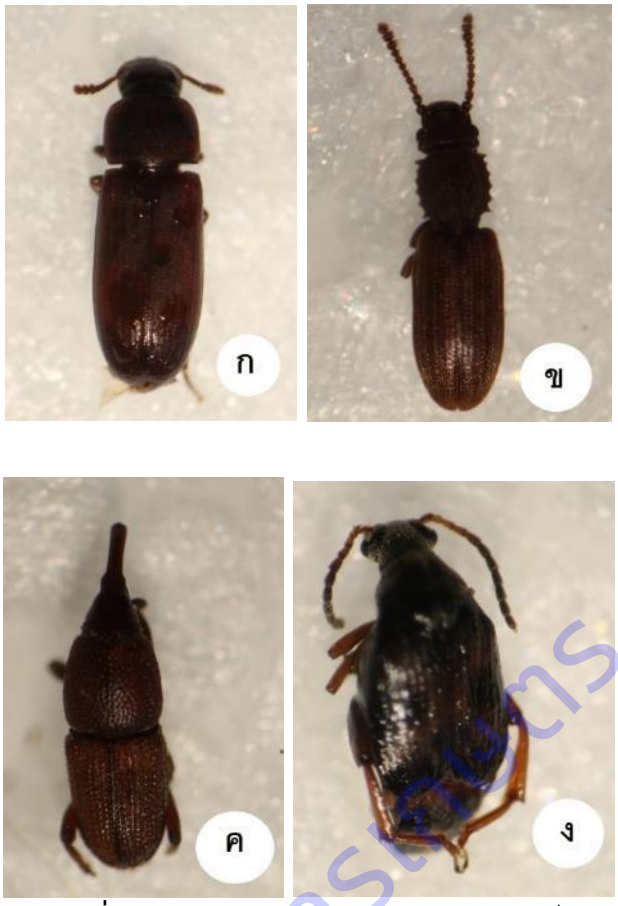
***พบด้วงถั่วเขียวที่ไม่มีชีวิตในตัวอย่างของเมล็ดถั่วเขียว นำเข้าจากสาธารณรัฐแห่งสหภาพเมียนมาร์ เมื่อวันที่ 19 มกราคม 2560

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 3.10.2 ก. การเก็บตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บจากโรงสีข้าว ข. การเก็บตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ ณ ด่านตรวจพืช

ภาพที่ 3.10.3 การจำแนกชนิดของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

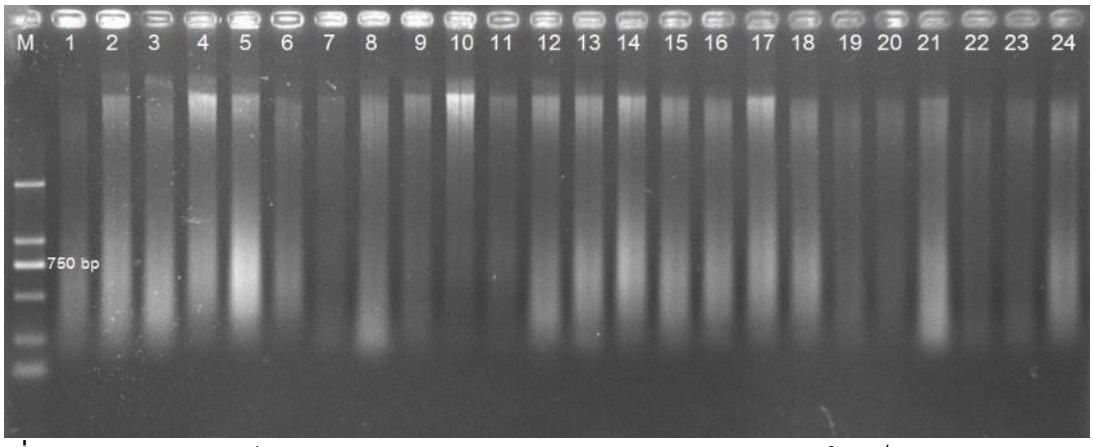
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3.10.4 ภาพตัวอย่างของแมลงศัตรูโรงเก็บ
ก. มอดแป้ง ข. มอดฟันเลื่อย ค. ด้วงงวงข้าวโพด ง. ด้วงถั่วเขียว

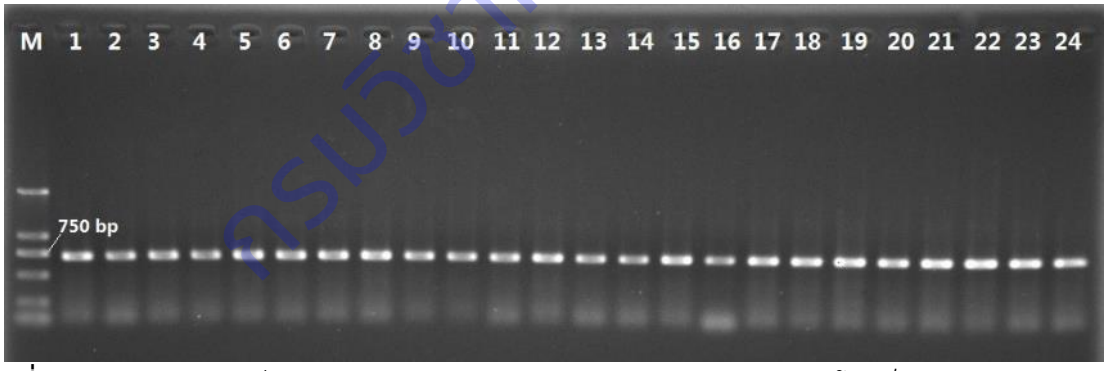
สำนักวิชาการเกษตร

จากการนำตัวอย่างมอดแป้งที่เก็บรวบรวมได้จากโรงสีข้าวของบริษัท พูนผลเทรดดิ้ง จำกัด จำนวน 10 ตัวอย่าง (กำหนดเป็นลำดับที่ 1 - 10) จากโรงข้าวของ บริษัท เอช. เอช. แอล. อินเตอร์เทรด จำกัด จำนวน 10 ตัวอย่าง (กำหนดเป็นลำดับที่ 11 - 20) ตัวอย่างมอดฟันเลื่อยที่เก็บรวบรวมได้จากโรงสีข้าวของบริษัท พูนสินไทยโกลเด้นไรซ์ จำกัด จำนวน 1 ตัวอย่าง (กำหนดเป็นลำดับที่ 21) ตัวอย่างด้วงงวงข้าวโพด และด้วงถั่วเขียวที่เก็บรวบรวมได้ ณ ด่านตรวจท่าเรือกรุงเทพ จำนวนชนิดละ 1 ตัวอย่าง (กำหนดเป็นลำดับที่ 21 และ 22 ตามลำดับ) รวมถึงตัวอย่างของแมลงศัตรูโรงเก็บไม่ทราบชนิดที่ไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ที่เก็บรวบรวมได้จากโรงสีข้าวของบริษัท พูนผลเทรดดิ้ง จำกัด จำนวน 1 ตัวอย่าง (กำหนดเป็นลำดับที่ 24) รวมทั้งหมด 24 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นสำเร็จรูปของ QIAamp DNA Mini Kit (GIAGEN, Germany) ตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด จากนั้น ตรวจสอบคุณภาพของ genomic DNA ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บทั้ง 24 ตัวอย่าง ด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis และตรวจภายใต้เครื่องวิเคราะห์ gel พบว่า genomic DNA ทั้งหมดมีความเข้มข้น เพียงพอสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR ภาพที่ 5



ภาพที่ 3.10.5 ผลวิเคราะห์คุณภาพของ genomic DNA ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ จำนวน 24 ตัวอย่าง M: Marker; 1 – 20: ตัวอย่างมอดแป้ง; 21: ตัวอย่างมอดฟันเลื่อย; 22: ตัวอย่างด้วงงวงข้าวโพด; 23: ตัวอย่าง ด้วงถั่วเขียว; 24: ตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ไม่ทราบชนิด

จากการนำ genomic DNA ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บข้างต้น จำนวน 24 ตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย คือ ยีน *COI* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ universal primers คือ LCO – 1490 และ HCO – 2198 จากนั้น ตรวจสอบคุณภาพของ PCR products ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บทั้ง 24 ตัวอย่าง ด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis แล้วตรวจภายใต้เครื่องวิเคราะห์ gel พบว่า PCR products ทั้งหมดมีความเข้มข้นมากกว่า 50 นาโนกรัม สามารถส่งไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ (ภาพที่ 3.10.6)



ภาพที่ 3.10.6 ผลวิเคราะห์คุณภาพของ genomic DNA ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ จำนวน 24 ตัวอย่าง M: Marker; 1 – 20: ตัวอย่างมอดแป้ง; 21: ตัวอย่างมอดฟันเลื่อย; 22: ตัวอย่างด้วงงวงข้าวโพด; 23: ตัวอย่าง ด้วงถั่วเขียว; 24: ตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ไม่ทราบชนิด

เมื่อนำ PCR products ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บข้างต้น จำนวน 24 ตัวอย่าง มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PCR purification kit จากนั้นตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอ่านลำดับดีเอ็นเออัตโนมัติ (Automated DNA sequence) และใช้โปรแกรม DNAMAN v.7.0 ในการตัดต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยตัดลำดับเบสของ primers ทิ้งไป นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองทิศทางที่ได้ และลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของยีน *COI* ของมอดแป้ง หมายเลข KM207082 ความยาว 658 bp จากฐานข้อมูล GenBank มาใช้เป็นมาตรฐานในการ

กรมวิชาการเกษตร

เปรียบเทียบกัน เพื่อตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนเกินทิ้งไป ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์เส้นเดียวที่มีความยาว 658 bp ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บแต่ละตัวอย่าง (ภาพที่ 3.10.8)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมอดแป้ง หมายเลข 1 ความยาว 658 bp

AACACTTTATTTCATTTTCGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGTACTTCATTAAGACTCCTAATTCGAGCAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATT
GGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCCACGCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACT
GATTAGTCCCTTTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTTCCACGAATAAACAACATAAGATTCTGACTACTTCCCCCATCCCTTTCACTTCTTCT
CATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTATCCACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCT
TGCCATTTTCAGACTACACTTAGCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGGAATAACC
CTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATCTCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCT
TACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGACCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมอดฟันเลื่อย หมายเลข 21 ความยาว 658 bp

AACTTTATACTTTCTTTTTGGAGCTTGAGCAGGAATAGTGGGAACATCCTTAAGAATCTTAATTCGAACAGAACTAGGAACAGCAGGTTCACTAATT
GGAAATGATCAAATCTACAATACAATTGTAACCGCCCATGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAGTAGTTATTGGAGGATTTGGAAACTG
ATTAATCCCTTTAATAATTGGGGCTCCTGATATAGCATTCCCACGACTTAATAATATAAGATTCTGATTATTACCCCCCTCAATCTCCCTTCTCTTAA
TCAGAAGAATTGTAGAAAAGGGGACAGGAACAGGATGAACAGTATACCCCCCTCTCTCATCCAATTTAGCCCACAACGGAACATCTGTTGACCTAG
CAATCTTTAGATTACATTTAGCAGGAATTTCCTCCATTTTAGGAGCAATTAACTTTATTTCTACAATTTTCAATATAAAACCAAAAAAAATAAATATA
GATCAAATACCTTTATTCTGTTGAGCTGTAATAATCACAGCCATTCTACTCCTTCTTTCCCTCCCAGTCTTAGCAGGAGCTATCACCATACTACTAA
CAGACCGAAATCTAAATACATCCTTCTTTGACCCCTCAGGAGGAGGAGACCCTATTTTATACCAACACCTGTTT

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างด้วงงวงข้าวโพด หมายเลข 22 ความยาว 658 bp

TACATTATACTTTATTTTTGGGGCCTGAGCTGGAATAGCAGGTACCTCACTAAGAATATTAATTCGAGCCGAATTAGGTAACCCAGGATCACTAATT
GGAAATGATCAAATTTATAACGTAATCGTTACTGCACATGCTTTCATTATAATTTTTTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGAGGATTCGGAAACTG
ACTTGTTCCCCTAATATTAGGAGCCCCTGATATGGCTTTCCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTACTACCTCCCTCATTAATTCTCCTTTTAA
TAAGAAGACTAGTCGAAAGGGGGGCAGGTACTGGGTGAACAGTTTACCCACCATTTGCCAGTAACATTGCCCATAGAGGATCATCTGTTGACTTAG
CCATTTTTAGGCTTCATTTAGCAGGAATCTCCTCTATTCTAGGAGCTGTAAATTTTATTACTACTGTAATCAATATACGACCAAGAGGAATAAAAATA
GACCAAATACCCCTATTCTCATGGGCAGTTACAATCACAGCAATTTTACTCCTTCTTTCACTCCCAGTATTAGCCGGTGCTATTACCATATTATTAAC
AGACCGAAATTTAAACACTTCATTCTTTGACCCCGCAGGAGGAGGAGACCCCATTCTCTATCAACACTTATTT

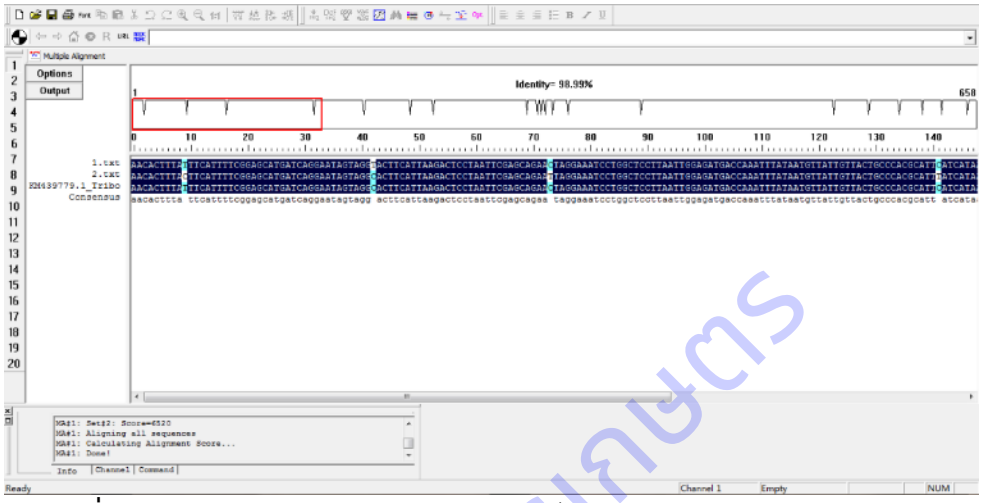
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างด้วงถั่วเขียว หมายเลข 23 ความยาว 658 bp

AACATTATACTTTATTTTTGGAGCATGATCAGGAATAGTGGGAACCTCATTGAGTTTACTAATTCGGGCTGAATTAGGGAATCCTGGATCATTAATT
GGAAATGATCAAATTTACAATACTATTGTTACAGCTCACGCATTCATTATAATTTTCTTTATAGTGATACCTATTATAATTGGAGGTTTCGGAAACTG
ATTAGTCCCACTAATACTAGGAGCCCCAGATATAGCATTCCCACGATTAAACAATATAAGGTTCTGATTACTCCCTCCATCATTAATTCTTTTATTAA
TAAGAAGATTCATTGAAAAAGGTGCCGGAACAGGATGAACTGTTTATCCCCCATTATCCTCAAATATTGCACACGAAGGAGCCTCTGTTGATTTAGC
AATTTTTAGTCTTCATATAGCAGGTATTTCATCTATTCTTGGAGCTATTAATTTTATTTCTACTACTTATAATATACGCCCCTCCGGTATATTATCAG
ATCGAATAACTTTATTTATTTGAGCAGTTAGAATTACAGCCATTCTTCTTTTACTTAGATTACCTGTTTTAGCTGGAGCAATCACTATGCTTCTTACT
GATCGTAATATCAATACCTCTTTTTTTGATCCTGCTGGAGGCGGAGACCCTATTCTCTATCAACACTTATTT

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ ไม่สามารถระบุชนิดได้ หมายเลข 24 ความยาว 658 bp

ลิขสิทธิ์กรมวิทยาศาสตร์บริการ

AACACTTTATTTCATTTTCGGAGCATGATCAGGAATAGTAGGCACTTCATTAAGACTCCTAATTCGAGCAGAACTAGGAAATCCTGGCTCCTTAATT
GGAGATGACCAAATTTATAATGTTATTGTTACTGCCCACGCATTCATCATAATTTTCTTCATAGTAATACCAATCGTAATTGGAGGATTCGGAAACT
GATTAGTCCCTTTAATACTAGGAGCCCCTGATATAGCATTTCCACGAATAAACAACATAAGATTCTGACTACTTCCCCCATCCCTTTCACTTCTTCT
CATAAGAAGAATTGTTGAAAGAGGAGCAGGAACAGGGTGAACCGTTTATCCACCCCTCTCATCAAACATTGCACATGGCGGATCCTCTGTTGATCT
TGCCATTTTCAGACTACACTTAGCAGGAATCTCATCAATTCTGGGAGCAGTTAATTTCATTACAACAGTAATCAATATACGACCCCAAGGAATAACC
CTTGAGCGAATACCCCTATTCGTTTGAGCAGTAGTAATTACTGCAATTTTACTTCTCTTATCTCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACCATACTCCT
TACAGATCGAAACATCAACACATCATTCTTTGACCCTGCTGGGGGAGGCGATCCAATCCTTTACCAGCACCTATTC



ภาพที่ 3.10.7 แสดงผลการตัดต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNAMAN V 7.0

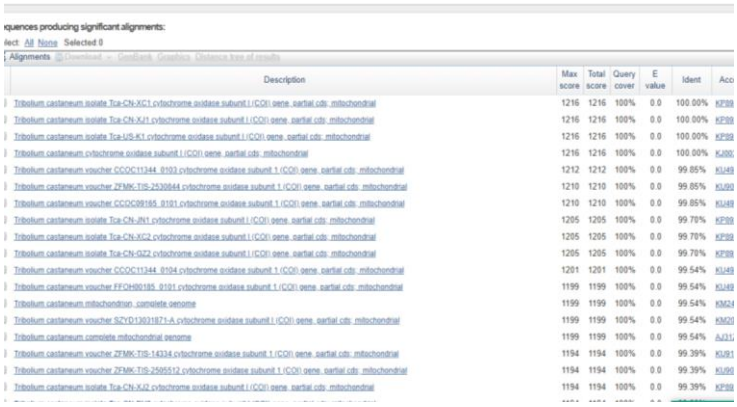
จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บทั้งหมด 24 ลำดับ มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Blast เพื่อตรวจค่า sequences similarity (%) หรือความคล้ายคลึงกัน พบว่า ผลการจำแนกชนิดของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ จำนวน 23 ตัวอย่างด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด ให้ผลตรงกันกับผลการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา กล่าวคือตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บในการทดลองนี้มีจำนวน 4 ชนิด คือ มอดแป้งชนิด *T. castaneum* มอดฟันเลื่อย ด้วงงวงข้าวโพด และด้วงถั่วเขียว ส่วนผลการจำแนกชนิดของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ เนื่องจากไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ จำนวน 1 ตัวอย่าง พบว่าเป็นมอดแป้งชนิด *T. castaneum* โดยค่า sequences similarity ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ กับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานในฐานข้อมูล GenBank อยู่ในระดับ 98.94% ขึ้นไป โดยเฉพาะตัวอย่างที่ 24 ซึ่งไม่สามารถระบุชนิดได้ เนื่องจากไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ มีค่า sequences similarity กับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของมอดแป้งถึง 99.85% (ตารางที่ 3.10.2) (ภาพที่ 3.10.8)

ศรีนครินทรวิโรฒ

ตารางที่ 3.10.2 ผลการจำแนกชนิดของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ลำดับของตัวอย่าง	ผลการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ผลการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด	ค่า sequences similarity (%)
1	*T. castaneum*	*T. castaneum*	100
2	*T. castaneum*	*T. castaneum*	99.09
3	*T. castaneum*	*T. castaneum*	98.94
4	*T. castaneum*	*T. castaneum*	99.70
5	*T. castaneum*	*T. castaneum*	99.85
6	*T. castaneum*	*T. castaneum*	100
7	*T. castaneum*	*T. castaneum*	99.39
8	*T. castaneum*	*T. castaneum*	99.39
9	*T. castaneum*	*T. castaneum*	99.70
10	*T. castaneum*	*T. castaneum*	99.70
11	*T. castaneum*	*T. castaneum*	100
12	*T. castaneum*	*T. castaneum*	99.85
13	*T. castaneum*	*T. castaneum*	99.78
14	*T. castaneum*	*T. castaneum*	99.85
15	*T. castaneum*	*T. castaneum*	99.70
16	*T. castaneum*	*T. castaneum*	99.85
17	*T. castaneum*	*T. castaneum*	99.85
18	*T. castaneum*	*T. castaneum*	99.78
19	*T. castaneum*	*T. castaneum*	100
20	*T. castaneum*	*T. castaneum*	99.85
21	มอดฟันเลื่อย	มอดฟันเลื่อย	99.70
22	ด้วงงวงข้าวโพด	ด้วงงวงข้าวโพด	100
23	ด้วงถั่วเขียว	ด้วงถั่วเขียว	99.24
24	ไม่สามารถระบุได้	*T. castaneum*	99.85

กรมวิชาการเกษตร



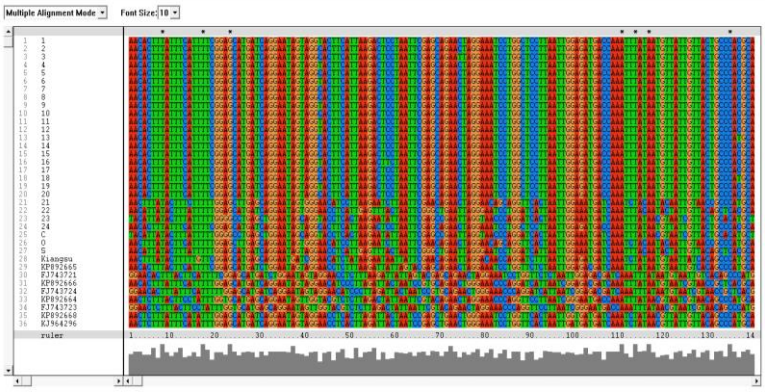
ภาพที่ 3.10.8 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Blast ในฐานข้อมูล GenBank

จากการเตรียมลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของมอดแป้งสกุล *Tribolium* จำนวน 6 ชนิด รวม 8 ลำดับ ของมอดฟันเลื่อย ด้วงงวงข้าวโพด ด้วงถั่วเขียว และตั๊กแตกไผ่ ชนิดละจำนวน 1 ลำดับ จากฐานข้อมูล GenBank ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐาน จำนวน 12 ลำดับ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทดลองนี้ จำนวน 24 ลำดับ รวม 36 ลำดับ ความยาวแต่ละลำดับคือ 658 bp มาเรียบเรียงให้อยู่ในไฟล์เดียวกันโดยใช้โปรแกรม CLUSTAL X และบันทึกข้อมูลในรูปแบบ FASTA ทำให้ได้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างแมลงศัตรูโรงเก็บชนิดที่เกี่ยวข้อง (ตารางที่ 3.10.3) (ภาพที่ 3.10.9)

ตารางที่ 3.10.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐาน จำนวน 12 ลำดับ ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank

ชนิดของแมลงที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank		จำนวนลำดับ	GenBank Accession Numbers
มอดแป้ง	*T. castaneum*	2	KM207082, KM439779
	T. confusum	2	KJ964296, KP892668
	T. destructor	1	KP892664
	T. madens	1	KP892665
	T. freemani	1	KP892666
	T. brevicornis	1	KP892667
มอดฟันเลื่อย	*O. surinamensis*	1	KU494196
ด้วงงวงข้าวโพด	*S. zeamais*	1	MG968936
ด้วงถั่วเขียว	*C. maculatus*	1	KU912434
ตั๊กแตกไผ่	*Ceracris kiangsu*	1	KJ667509 (outgroup)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3.10.9 แสดงผลการเรียบเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 36 ลำดับ โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL X

จากการใช้โปรแกรม MEGA V. 5.0 ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ จำนวน 24 ตัวอย่างในการทดลองนี้ พบว่าค่าเฉลี่ยของเบส A, T, G, และ C คือ 29.5% 31.0% 16.0% และ 23.5% ตามลำดับ โดยค่าเฉลี่ยของ A+T คือ 60.50% มากกว่าค่าเฉลี่ยของ G+C คือ 39.5% อย่างเห็นได้ชัด สอดคล้องกับลักษณะเด่นขององค์ประกอบของเบสใน mitochondria ของแมลง (ตารางที่ 3.10.4)

ตารางที่ 3.10.4 แสดงองค์ประกอบของเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บในการทดลอง

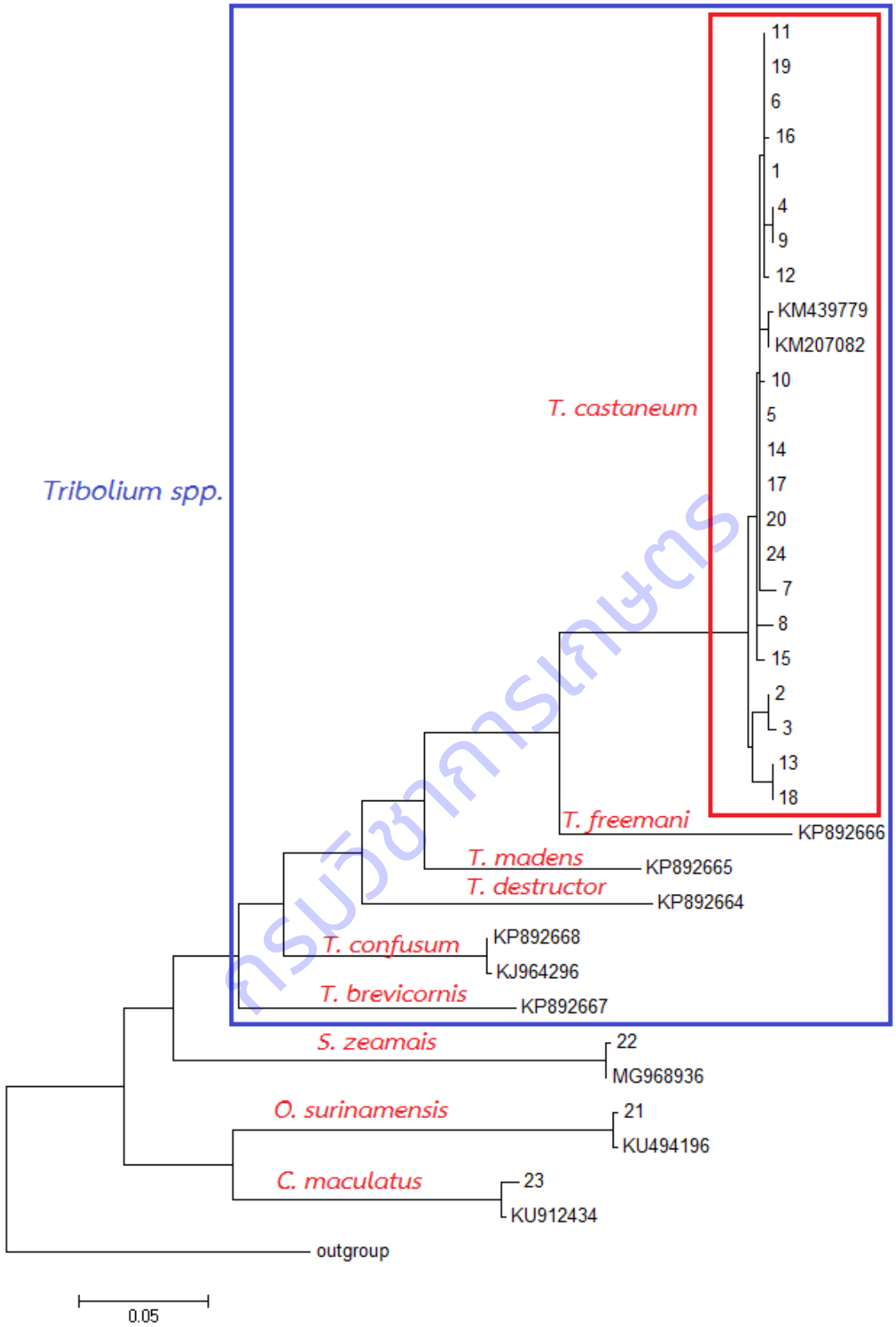
ลำดับของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ	ค่าเฉลี่ยของเบส (%)			
	T	C	A	G
1	30.7	23.9	29.3	16.1
2	30.7	23.9	29.2	16.3
3	30.7	23.9	29.2	16.3
4	30.4	24.0	29.5	16.1
5	30.5	24.0	29.3	16.1
6	30.7	23.9	29.3	16.1
7	30.7	24.0	29.3	16.0
8	30.7	23.6	29.6	16.1
9	30.4	24.0	29.5	16.1
10	30.5	24.0	29.2	16.3
11	30.7	23.9	29.3	16.1
12	30.7	23.9	29.2	16.3
13	30.9	23.7	29.2	16.3
14	30.5	24.0	29.3	16.1
15	30.4	24.2	29.6	15.8
16	30.9	23.7	29.3	16.1

กรมวิชาการเกษตร

17	30.5	24.0	29.3	16.1
18	30.9	23.7	29.2	16.3
19	30.7	23.9	29.3	16.1
20	30.5	24.0	29.3	16.1
21	31.2	21.9	32.8	14.1
22	36.5	18.8	29.3	15.3
23	32.2	21.0	30.7	16.1
24	30.5	24.0	29.3	16.1
ค่าเฉลี่ยทั้งหมด	31.0	23.5	29.5	16.0

ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ จำนวน 24 ตัวอย่างในการทดลอง และจากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 12 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 36 ตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม MEGA V. 5.0 ในการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยวิธี Maximum Likelyhood พบว่า ML tree สามารถแบ่งออกเป็น 4 clade โดยมอดแป้ง มอดฟันเลื่อย ด้วงงวงข้าวโพด และด้วงถั่วเขียวอยู่ต่าง clade กันอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าแมลงศัตรูโรงเก็บทั้ง 4 ชนิดมีระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างกันอย่างชัดเจน มอดแป้งสกุล *Tribolium* ทั้งหมดอยู่ใน clade ใหญ่เดียวกัน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของมอดแป้งชนิด *T. castaneum* จำนวน 21 ลำดับที่ได้จากการทดลอง อยู่ใน clade เดียวกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของมอดแป้งชนิด *T. castaneum* จำนวน 2 ลำดับที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank และอยู่ต่าง clade ย่อยกับมอดแป้งสกุล *Tribolium* ชนิดอื่น ได้แก่ *T. confusum*, *T. destructor*, *T. madens*, *T. freemani* และ *T. brevicornis* อย่างเห็นได้ชัด โดย ML tree แสดงให้เห็นว่ามอดแป้งชนิด *T. castaneum* และ *T. freeman* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกัน สอดคล้องกับการรายงานของ Mestrovic และคณะ (2006) ส่วนลำดับ นิวคลีโอไทด์ของมอดฟันเลื่อย ด้วงงวงข้าวโพด และด้วงถั่วเขียวที่ได้จากการทดลองต่างก็อยู่ใน clade เดียวกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ตามแต่ละชนิดเช่นกัน ดังนั้น การทดลองนี้จึงยืนยันได้ว่าการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บ โดยเฉพาะมอดแป้งสกุล *Tribolium* ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ใช้ยีน mtDNA COI เป็นดีเอ็นเอเป้าหมาย ให้ผลตรงกันกับการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และยังสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บที่ไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ได้อย่างแม่นยำ สอดคล้องกับการรายงานของ Ming และคณะ (2015) (ภาพที่ 3.10.10)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

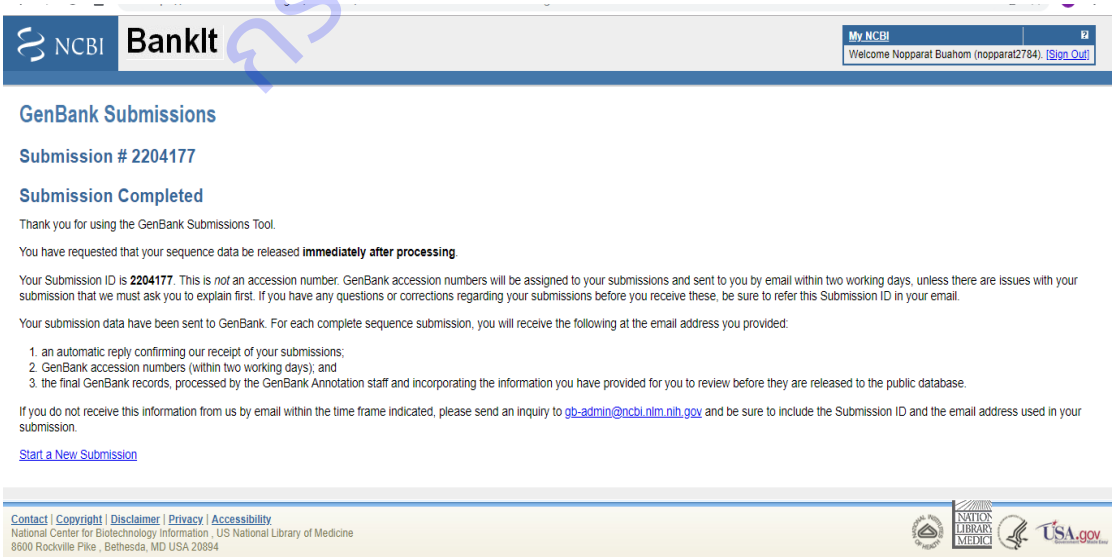


ภาพที่ 3.10.10 แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่สร้างโดยโปรแกรม MEGA V. 5.0 ด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML tree)

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมอดแป้ง หมายเลข 1 – 5, 7 และ 13 จำนวน 7 ลำดับ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมอดฟันเลื่อยด้วงงวงข้าวโพด และด้วงถั่วเขียว จำนวนชนิดละ 1 ลำดับ รวมทั้งหมด 10 ลำดับ ซึ่งเป็นตัวแทนของตัวอย่างทั้งหมด ใช้โปรแกรม DNAMAN V.7.0 ในการแปลลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับโปรตีน โดยเลือกลำดับโปรตีนของแต่ละตัวอย่างจาก frame ที่ไม่มี termination codon และนำข้อมูลที่เกี่ยวข้องป้อนเข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BankIt เพื่อใช้เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยด้านพันธุศาสตร์ประชากร (Population Genetics) และการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด (ตารางที่ 3.10.5) (ภาพที่ 3.10.11)

ตารางที่ 3.10.5 แสดงผลการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บเข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank

ลำดับ	หมายเลขของตัวอย่าง	ชนิดของตัวอย่าง	GenBank Accession Numbers
1	1	*T. castaneum*	MK649848
2	2	*T. castaneum*	MK649849
3	3	*T. castaneum*	MK649850
4	4	*T. castaneum*	MK649851
5	5	*T. castaneum*	MK649852
6	7	*T. castaneum*	MK649853
7	13	*T. castaneum*	MK649854
8	21	มอดฟันเลื่อย	MK649855
9	22	ด้วงงวงข้าวโพด	MK649856
10	23	ด้วงถั่วเขียว	MK649857



ภาพที่ 3.10.11 แสดงการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บเข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank ตัวอย่างแสดงผลการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมอดแป้งชนิด *T. castaneum* เข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank

กรมวิชาการเกษตร

LOCUS Seq1 658 bp DNA linear INV 14-MAR-2019
DEFINITION cytocrome oxidase subunit I (COI) gene, partial CDS, mitochondrial.
ACCESSION Seq1
VERSION
KEYWORDS .
SOURCE mitochondrion Tribolium castaneum (red flour beetle)
ORGANISM Tribolium castaneum
Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;
Pterygota; Neoptera; Holometabola; Coleoptera; Polyphaga;
Cucujiformia; Tenebrionidae; Tenebrionidae incertae sedis;
Tribolium.
REFERENCE 1 (bases 1 to 658)
AUTHORS Buahom,N., Rakkrai,C., Duangsaard,C., Salyapongse,C., Bannakarn,I.
and Thanaros,M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (14-MAR-2019) Department of Agriculture, Ministry of
Agriculture and Cooperatives, 50, Pahonyothin Rd., Ladyao,
Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand
COMMENT Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:7
##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..658
/organism="Tribolium castaneum"
/organelle="mitochondrion"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="TH1"
/db_xref="taxon:7070"
/country="Thailand-Surin"
/collection_date="2016-8-16"
/collected_by="B. Nopparat"
CDS <1..>658

ศรีนครินทรวิโรฒ

/codon_start=2
/transl_table=5
/product="mitochondrial COI gene protein coding sequences"
/translation="TLYFIFGAWSGMVGTSLSLLIRAELGNPGSLIGDDQIYNVIVTA
AFIMIFFMVMPIVIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSLLLMSSIV
ESGAGTGWTVYPPLSSNIAHGGSSVDLAIFSLHLAGISSILGAVNFITTVINMRPQGM
TLERMPLFVWAVVITAILLLLSLPVLAGAITMLLTDRNINTSFFDPAGGGDPILYQHL
F"

BASE COUNT 193 a 157 c 106 g 202 t

ORIGIN

1 aacactttat ttcattttcg gagcatgatc aggaatagta ggtacttcat taagactcct
61 aattcgagca gaactaggaa atcctggctc cttaattgga gatgaccaaa tttataatgt
121 tattgttact gcccacgcat tcatcataat tttcttcata gtaataccaa tcgtaattgg
181 aggattcgga aactgattag tccctttaat actaggagcc cctgatatag catttccacg
241 aataaacaac ataagattct gactacttcc cccatccctt tcacttcttc tcataagaag
301 aattgttgaa agaggagcag gaacagggtg aaccgtttat ccacccctct catcaaacat
361 tgcacatggc ggatcctctg ttgatcttgc cattttcaga ctacacttag caggaatctc
421 atcaattctg ggagcagtta atttcattac aacagtaatc aatatacgac cccaaggaat
481 aacccttgag cgaatacccc tattcgtttg agcagtagta attactgcaa ttttacttct
541 cttatctctt cctgttttag ctggagctat taccatactc cttacagatc gaaacatcaa
601 cacatcattc tttgaccctg ctgggggagg cgatccaatc ctttaccagc acctattc

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1.1 สรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* ที่เป็นศัตรูพืชกักกันอย่างรวดเร็ว โดยการเก็บรวมรวมตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บทั้งที่มีชีวิต และ ไม่มีชีวิตในระยะตัวเต็มวัย ทั้งที่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ และไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์จากโรงสีข้าว จำนวน 3 แห่ง ในจังหวัดสุรินทร์ จังหวัดสุพรรณบุรี และจังหวัดชลบุรี ระหว่างการตรวจประเมิน (pre - audit) เพื่อขึ้นทะเบียนผู้ผลิตและแปรรูปข้าวส่งออกไปสาธารณรัฐประชาชนจีน จำนวน 58 ตัวอย่าง และเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บระยะตัวเต็มวัยที่ไม่มีชีวิตจากสินค้าธัญพืช คือ เมล็ดข้าวสาลีนำเข้าจากเครือรัฐออสเตรเลีย และเมล็ดถั่วเขียวนำเข้าจากสาธารณรัฐแห่งสหภาพเมียนมาร์ โดยเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ระหว่างปี 2559 -2560 จำนวน 45 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 103 ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว พบว่าเป็นตัวอย่างของแมลงศัตรูโรงเก็บ จำนวน 4 ชนิด คือ มอดแป้ง จำนวน 45 ตัว มอดฟันเลื่อย จำนวน 20 ตัว ด้วงงวงข้าวโพด

จำนวน 30 ตัว ด้วงถั่วเขียว จำนวน 15 ตัว และไม่สามารถระบุชนิดได้เนื่องจากไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ จำนวน 3 ตัว จากนั้น นำตัวอย่างของมอดแป้ง จำนวน 20 ตัว ตัวอย่างของมอดฟันเลื่อย ด้วงงวงข้าวโพด ด้วงถั่วเขียว และตัวอย่างที่ไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ อย่างละ 1 ตัว รวมทั้งสิ้น 24 ตัว มาสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย คือ ยีน *COI* ด้วยวิธี PCR โดยใช้universal primers (LCO – 1490 และ HCO - 2198) ภายใต้ PCR volume และ thermal condition ที่กำหนด ทำให้ได้ PCR products ที่มีคุณภาพของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บสำหรับนำไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequencing) และทำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างให้เป็นเส้นเดียวกัน ความยาว 658 bp แล้วนำไปวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานในฐานข้อมูล GenBank พบว่าค่า sequences similarity ที่ได้มีค่าสูงถึง 98.94% ขึ้นไป และให้ผลการจำแนกชนิดตรงกับผลการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ส่วนตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ พบว่าเป็นตัวอย่างของมอดแป้งชนิด *T. castaneum* โดยมีค่า sequences similarity สูงถึง 99.85%

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานจากฐานข้อมูล GenBank ของมอดแป้งชนิด *T. castaneum*, *T. confusum*, *T. destructor*, *T. madens*, *T. freemany* และ T. brevicornis มอดฟันเลื่อย ด้วงงวงข้าวโพด ด้วงถั่วเขียว และตั๊กแตนไผ่ (outgroup) รวม 12 ลำดับ มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยวิธี Maximum Likelihood (ML tree) ด้วยแบบจำลอง Kimura – 2 – Parameter (K2P) ร่วมกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ จำนวน 24 ลำดับ พบว่าแมลงศัตรูโรงเก็บทั้ง 4 ชนิดมีระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างกันอย่างชัดเจน มอดแป้งสกุล *Tribolium* ทั้งหมดอยู่ใน clade เดียวกัน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของมอดแป้งชนิด *T. castaneum* จำนวน 21 ลำดับที่ได้จากการทดลอง อยู่ใน clade เดียวกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของมอดแป้งชนิด *T. castaneum* จำนวน 2 ลำดับที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank และอยู่ต่าง clade ย่อยกับมอดแป้งสกุล *Tribolium* ชนิดอื่นอย่างเห็นได้ชัด ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของมอดฟันเลื่อย ด้วงงวงข้าวโพด และด้วงถั่วเขียวที่ได้จากการทดลองต่างก็อยู่ใน clade เดียวกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ตามแต่ละชนิดเช่นกัน จึงยืนยันได้ว่าการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บ โดยเฉพาะมอดแป้งสกุล *Tribolium* ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด ให้ผลตรงกันกับการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา นอกจากนี้ เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดยังสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บที่ไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ได้อย่างแม่นยำ

ผลการลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมอดแป้ง จำนวน 7 ลำดับ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมอดฟันเลื่อยด้วงงวงข้าวโพด และด้วงถั่วเขียว จำนวนชนิดละ 1 ลำดับ รวมทั้งหมด 10 ลำดับ ซึ่งเป็นตัวแทนของตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการทดลอง ป้อนเข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank ทำให้ได้ GenBank GenBank Accession Number คือ MK649848 – MK649857 ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการวิจัยด้านพันธุศาสตร์ประชากร (Population Genetics) และการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในอนาคต นอกจากนี้ การทดลองนี้ได้พิสูจน์ยืนยันแล้วว่ายีน *COI* สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอเป้าหมายในการจำแนกชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับการรายงานของ Ming และคณะ (2015)

ศรีวิชัยการเกษตร

ข้อเสนอแนะ

การจำแนกชนิดด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด เป็นเครื่องมือสำคัญที่ช่วยในการจำแนกชนิดของสัตว์และพืชได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว แต่การใช้เทคนิคนี้ในพืชยังมีข้อจำกัดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้จำแนกชนิดของสัตว์ โดยเทคนิคนี้สามารถใช้จำแนกชนิดได้ ไม่ว่าตัวอย่างสัตว์จะอยู่ในสภาพสมบูรณ์หรือ ไม่สมบูรณ์ และอยู่ในระยะเติบโตใด (วุฒิพงศ์, 2011) ซึ่งดีเอ็นเอมาตรฐานที่นิยมนำมาใช้ในการเปรียบเทียบในปัจจุบัน คือ ยีน *COI* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ภายในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) มีการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในระดับภายในชนิดต่ำ หรือแทบไม่มีการแปรผัน และมีการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดเพียงพอที่จะใช้ในการจำแนก สามารถเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ได้ง่าย และส่วนของยีนที่นำมาวิเคราะห์มีความยาวไม่มากนัก เพียง 658 bp มี universal primers ที่มีความเฉพาะเจาะจงสูง อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า mtDNA *COI* ยีนเองก็มีข้อจำกัด ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการจำแนกชนิดที่เป็น complex (Jiang และคณะ, 2014) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* complex ดังนั้น เพื่อให้การจำแนกชนิดของแมลงศัตรูโรงเก็บมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น อาจจำเป็นต้องมีการใช้ยีนตัวอื่นเพิ่มเติม เช่น 16s rDNA, ND6 และ ITS เป็นต้น ในอนาคต

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* เป็นเครื่องมือในการจำแนกชนิดมอดแป้งชนิดสำคัญที่ยังไม่มีรายงานการพบในประเทศไทย และมีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันได้ในอนาคต โดยเฉพาะมอดแป้งชนิด *T. confusum* โดยเป็นเทคนิคที่ได้รับการยอมรับในระดับสากล และถูกกำหนดไว้ใน ISPM No. 27 “Diagnostic Protocol for Regulated Pests” สามารถใช้ในการจำแนกชนิดของแมลงศัตรูพืชได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ไม่ว่าจะอยู่ในสภาพสมบูรณ์หรือไม่ก็ตาม ก้าวข้ามขีดจำกัดของการจำแนกด้วยลักษณะทางสัญฐานวิทยา ที่ตัวอย่างที่สุ่มตรวจพบต้องอยู่ในระยะ ตัวเต็มวัยและมีสภาพสมบูรณ์ เหมาะกับงานด้านการตรวจสอบกักกันพืชที่ต้องใช้ความรวดเร็วในการตรวจปล่อยสินค้า

นอกจากนี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ได้จากการทดลองได้ถูกนำเข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank ซึ่งเป็นฐานข้อมูลในระดับสากล สามารถใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร (Population Genetics) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ระหว่างแมลงศัตรูโรงเก็บในแหล่งต่างๆ ทั่วโลก ทำการการศึกษาแหล่งกำเนิด เส้นทางการแพร่กระจาย แนวโน้มทิศทางของการแพร่กระจายในอนาคต เพื่อวางแผนในการเฝ้าระวัง (sueveilance) การเข้ามาของศัตรูพืชต่างถิ่น (alien pest species) เพิ่มความเข้มงวดในการตรวจสอบกักกันการนำเข้าส่งออกสินค้าธัญพืช

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3.11 การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนกชนิดเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera (Thysanoptera: Tubulifera) ในประเทศไทย

DNA Barcoding for Identification of Thirps in Suborder Tubulifera (Thysanoptera: Tubulifera) in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	อิทธิพล บรรณาการ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	เกศสุดา สนศิริ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera (Thysanoptera: Tubulifera) ในประเทศไทยโดยการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชในทุกภูมิภาคของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2563 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถเก็บรวบรวมเพลี้ยไฟได้ 361 ตัวอย่างและสามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera วงศ์ Phlaeothripidae ได้ 3 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยไฟไทร *Gynaikothrips ficorum* (Marchal) 34 ตัวอย่าง เพลี้ยไฟท่อ *Haplothrips gowdeyi* (Franklin) 325 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟ *Podothrips* sp. 2 ตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงชนิด ลักษณะการทำลายเขตการแพร่กระจายโดยเพลี้ยไฟจะเข้าทำลายทั้งยอดอ่อน ดอก ใบอ่อน และใบแก่ของพืชทั้งนี้ได้ดำเนินการศึกษาลำดับดีเอ็นเอบาร์โค๊ดของยีน COI (Cytochrome Oxidaes subunit I) ของเพลี้ยไฟที่เก็บรวบรวมได้ สามารถสรุปได้ว่าเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera 3 ชนิดที่พบในประเทศไทยมีความแตกต่างกันทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยา จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดและถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera นำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลงกรมวิชาการเกษตร สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดทำรายชื่อชนิดแมลงศัตรูพืชรองรับปัญหาด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

คำสำคัญ เพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera อนุกรมวิธาน อณูชีววิทยา

Abstract

Taxonomy and DNA sequences of Thrips in suborder Tubulifera was studied by surveying and collecting other crops such as agricultural plants, horticulture plants, and ornamental plants in the Middle, Northeast and Northern part of Thailand during October 2017 to September 2020. Thrips was taken to Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research and Development

Office, Department of Agriculture for detecting by study the taxonomy and morphology from permanent slides including compared with the specimens of Thirps in DOA Insect Museum. The result from detecting Thrips, 361 were found to represent Thrips in suborder Tubulifera Family Phlaeothripidae (3 genera, 3 species): 34 Cuban laurel thrips; *Gynaikothrips ficorum* (Marchal), 325 Gold-tipped tubular thrips; *Haplothrips gowdeyi* (Franklin) and 2 *Podothrips* sp.. Some samples of each location that preserved in 95% alcohol were analyzed by using PCR technique with mitochondrial COI gene in order to reveal lineage. The results of Neighbor Joining/UPGMA showed molecular identifications, 3 genera were found to be *Gynaikothrips*, *Haplothrips* and *Podothrips*. Photographic taxonomic characters of 3 species were provided. The results were contributed to be Insect Museum Databases for exported and imported agricultural goods considering and application of management strategies.

Keyword Tubulifera Taxonomy Molecular Biology

คำนำ

เพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera เป็นเพลี้ยไฟอีกอันดับย่อยหนึ่งที่มีความสำคัญทางการเกษตร โดยเพลี้ยไฟในอันดับย่อยนี้มักพบเป็นศัตรูสำคัญของชนิดพืชที่มีโครงสร้างของใบค่อนข้างแข็งและหนา เช่น มะม่วง มะม่วงหิมพานต์ ขนุน มังคุด กระท้อน ไทร และพืชพลังงานที่สำคัญ เช่น สบู่ดำ มันสำปะหลัง และปาล์มน้ำมัน โดยระยะตัวอ่อนของเพลี้ยไฟในอันดับย่อย Tubulifera แต่ละชนิดนั้นจะไม่มีความแตกต่างกันมากเหมือนกับอันดับย่อย Terebrantia ที่สามารถวิเคราะห์ชนิดได้บ้างในเบื้องต้นจากขนาด สีของลำตัว และลวดลายบนลำตัว จึงทำให้การศึกษาและวิเคราะห์เพลี้ยไฟในอันดับย่อยนี้มีความยากในการดำเนินการ ในประเทศไทยมีรายงานถึงชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อยนี้ค่อนข้างน้อย เช่น *Haplothrips gowdeyi* (Franklin) และ *Haplothrips* sp. เป็นศัตรูสำคัญของ มะม่วง ถั่วฝักยาว ส้มเขียวหวาน มะม่วงหิมพานต์ ส้มโอ เงาะ ลำไย ลิ้นจี่ กล้วย ชนิด *Gynaikothrips ficorum* และ *Gynaikothrips* sp. ชนิด *Ernothrips* sp. และ ชนิด *Liothrips* sp. ซึ่งเป็นศัตรูสำคัญของไทร (ศิริณี, 2544) นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างเพลี้ยไฟอันดับย่อยนี้ที่เก็บ-รักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง ซึ่งยังไม่ได้ดำเนินการศึกษาต่อถึงระดับชนิด จึงจำเป็นต้องดำเนินการศึกษาสัณฐานวิทยา และลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ซึ่งจะทำให้ทราบถึงข้อมูลและชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ที่ถูกต้อง และใช้เป็นข้อมูลสำหรับการป้องกันกำจัด อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์ชนิดของเพลี้ยไฟศัตรูพืชในระยะไข่และตัวอ่อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การศึกษาลำดับพันธุกรรมจะทำให้ทราบถึงความแปรปรวนของยีนเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ในพื้นที่ทุกภูมิภาคของประเทศไทยว่ามีความแตกต่างหรือใกล้เคียงกันอย่างไร การศึกษานี้จะได้ข้อมูลซึ่งไม่มีหน่วยงานอื่นในประเทศทำวิจัยเชิงลึกเช่นนี้ อีกทั้งยังเป็นการวิเคราะห์ชนิดศัตรูพืชโดยวิธีใหม่ที่ทันสมัย สามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษาให้กับนักวิชาการทั่วไป บริษัทเอกชน และผู้ประกอบการที่เกี่ยวข้องกับ

ศรีวิชัยกสิกรรม

การเกษตร ทั้งนี้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ที่วิเคราะห์ได้นี้สามารถนำมาศึกษา phylogeny กับเพลี้ยไฟศัตรูพืชอื่นๆ ได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

ตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง ปากคีบ พู่กัน ขวดดอง กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ถังรักษาความเย็น อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ 50-100% AGA โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10% โคลฟออย แคนาดาบัลซัม เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องสไลด์ถาวร และ ตู้อบสไลด์ถาวร อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ PCR ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์ 99% กรดอะซิติก DNeasy Kit, dNTP mixtures, 10X PCR buffer, Automatic pipette บีกเกอร์ หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ DNA Thermal Cycle เครื่อง Electrophoresis, Gel Documentary, Gene Amp PCR กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope ที่ติด camera lucida เป็นอุปกรณ์เสริมช่วยในการวาดภาพแมลงที่พบ กล้องถ่ายภาพ อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา rotring และกระดาษไขเขียนแบบ เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera

- วิธีการ

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟในแปลงปลูกพืช เช่น มะม่วง มะละกอ มังคุด ข้าวโพด แก้วมังกร หน่อไม้ฝรั่ง กระเจี๊ยบ ถั่วลิสง บัว ดาวเรือง ทานตะวัน เป็นต้น ในแหล่งปลูกพืชทุกภูมิภาคของประเทศไทย เพื่อศึกษาจำนวนชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera โดยใช้วิธีการตีหรือเขย่าส่วนของพืช เช่น ใบ และดอก ให้เพลี้ยไฟตกลงบนกระดาษขาวที่รองรับ และใช้พู่กันเขี่ยเพลี้ยไฟแต่ละตัวลงในขวดที่บรรจุน้ำยา AGA (Alcohol 60%: Glycerine: Acetic acid อัตราส่วน 10:1:1) สำหรับศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และแอลกอฮอล์ 95% สำหรับศึกษาลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่มีชีวิตด้วย บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟที่เก็บได้ เช่น พืชที่เก็บ ส่วนของพืชที่เก็บ สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันที่เก็บ และชื่อผู้เก็บ ลงในขวดดองเพลี้ยไฟนำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ และนำตัวเต็มวัยไปทำสไลด์ถาวรตามวิธีการของ ศิริณี (2544) บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของขวดดองตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง จัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิด (key) ของเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้ จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล

การศึกษาลำดับพันธุกรรม

นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่ได้จำแนกชนิดเบื้องต้นภายใต้ stereo microscope (ตัวอย่างกลุ่มเดียวกับตัวอย่างที่ใช้ทำสไลด์ถาวร) ที่เก็บรวมรวมได้จากแต่ละพื้นที่ไปศึกษาลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

วิธีการหาลำดับเบส COI ปรับปรุงจากวิธีการศึกษาของ Karimi, *et al*. (2010)

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนการสกัด ดีเอ็นเอ

- บดตัวอย่างเพลี้ยไฟ 1 ตัวอย่างใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ด้วย sterilized polypropylene pestle โดยดำเนินการตามกรรมวิธีของชุดสกัด DNeasy blood and tissue qiagen kit
- นำสารละลายที่ได้ incubated ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นแรงเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 14,000 รอบ/นาที เวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- ดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ 2 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็น DNA Template ในขั้นตอน PCR (polymerase chain reaction)

การศึกษายีน COI โดยเทคนิค PCR

- ศึกษายีน COI (cytochrome oxidase subunit I) ซึ่งมีขนาด 642bp และเป็น Conserved region ของแมลงทุกชนิด (บาร์โค้ด) โดยใช้ universally conserved mtDNA COI primers, LC01490 และ HC02198 (Folmer, *et al*., 1994)
- นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 3 ทำปฏิกิริยากับ 10mM dNTPs, 5 U/µl Amplitaq, 25 mM$MgCl_2$, 10X PCR buffer, 20mM sense and antisense primer ขั้นตอนและอุณหภูมิของขั้นตอนการทำ PCR (Biomethra Thermo Cycler) คือ

Initial denaturation	ที่ 94 °C	3 นาที	
Denaturation	ที่ 94 °C	1 นาที	} 35 cycles
Annealing	ที่ 52 °C	30 วินาที	
Extension	ที่ 72 °C	90 วินาที	
Final extension	ที่ 72 °C	30 นาที	

- หลังจากนั้นนำไป purified โดยดำเนินตามกรรมวิธีของชุดสกัด Bioneer's PCR purification kit

การหาและวิเคราห์ลำดับเบสของ ยีน COI

- ดำเนินการส่งผลผลิตดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้) และนำผลของลำดับเบสที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม BioEdit 7.0.5.2 (Hall, 1999), nBLAST program, MEGA4 (Kimura, 1980) และ neighbor-joining tree (Saitou and Nei, 1987) เพื่อหาความจำเพาะเจาะจงของเพลี้ยไฟภายในแหล่งเดียวกันและ ระหว่างแหล่งที่เก็บตัวอย่าง รวมถึงเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank และศึกษาความใกล้เคียงกันของเพลี้ยไฟแต่ละชนิด

-การบันทึกข้อมูล

พืชอาศัย สถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง

- เวลาและสถานที่ :เดือน ตุลาคม 2560 ถึง เดือน กันยายน 2563

1. แปลงปลูกพืชในทุกภูมิภาคของประเทศไทย
2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง ห้องปฏิบัติการกลาง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

สารบัญการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแปลงปลูกพืช เช่น มะม่วง มะละกอ มังคุด ข้าวโพด แก้วมังกร หน่อไม้ฝรั่ง กระเจี๊ยบ ถั่วลิสง บัว ดาวเรือง ทานตะวัน เป็นต้น ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย และนำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อตรวจจำแนกชนิด โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยซึ่งปรับปรุงมาจาก Okajima (2006) และ Palmer, *et. al.* (1989) ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera วงศ์ Phlaeothripidae ได้ 3 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยไฟไทร *Gynaikothrips ficorum* (Marchal) 34 ตัวอย่าง เพลี้ยไฟท่อ *Haplothrips gowdeyi* (Franklin) 325 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟ *Podothrips* sp. 2 ตัวอย่าง โดยมีแนวทางการวินิจฉัยชนิดและลักษณะทางอนุกรมวิธานดังนี้

แนวทางการวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera

1 - Forewings parallel-sided, not constricted medially; antennal segment III with one outer sense-cone, head as long as board or longer, tube longer than head, metathoracic sternopleral suture absent, maxillary stylets shorter and wider apart, abdominal terga II to VI (or VII) each with pair of sigmoid wing retaining setae, setae on abdominal tergite IX longer than half length of tube.....***Gynaikothrips ficorum***

- Forewings not parallel-sided, maxillary stylets narrower.....**2**

2 - Metathoracic sternopleural sutures absent, fore femur unarmed, abdomen gradually fore tarsus with or without tooth; antennal segment VII as long as segment VI, antennal segment III with one or two sense-cones, antennal segment IV with three sense-cones .....***Haplothrips gowdeyi* (Franklin)**

- Metathoracic sternopleural sutures present, basantra well developed, usually longer than board, fore tibia often with an inner subapical tubercle.....***Podothrips***

เพลี้ยไฟไทร *Gynaikothrips ficorum* (Marchal, 1980)

Phloeothrips ficorum Marchal, 1908: 252, *Leptothrips flavicornis* Bagnall, 1909: 529, *Liothrips bakeri* Crawford DL, 1910: 161, *Leptothrips reticulatus* Karny, 1912: 22, *Gynaikothrips flavus* Ishida, 1931: 40, *Haplothrips blesai* Plata, 1973: 165

ลำตัว (Body) ขนาดใหญ่ ลำตัวสีน้ำตาล (Figure 3.11.1-A) เพศเมียขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 2.50–2.80 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียมีปีกขนาดใหญ่ เพศผู้ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.00 –2.00 มิลลิเมตร

หัว (Head) ส่วนหัวมีความยาวมากกว่าความกว้าง มีเส้นจางด้านหลังของตารวม (Figure 3.11.1-B) ปลายเส้นขนด้านหลังตาเดี่ยวมีลักษณะทู่ และยาวไม่ถึงขอบด้านหลังของตารวม ส่วนปากเกือบอยู่ในระนาบ

กรมวิชาการเกษตร

เดียวกันกับเส้นขนด้านหลังตาเดี่ยว มีหนวด 8 ปล้อง ปล้องหนวดปล้องที่ 3-4 มีขนาดใหญ่ สีเหลือง ปล้องหนวดปล้องที่ 8 สีน้ำตาลอ่อนหนวดปล้องที่ 3-4 เป็นที่ตั้งของอวัยวะรับความรู้สึก 1 และ 3 เส้น ตามลำดับ

อก (Thorax) อกปล้องแรกมีขนาดใหญ่ มีเส้นขนขนาดใหญ่หลากหลายรูปแบบ พื้นที่ขอบอกด้านบน มีขนาดเล็ก พื้นที่ขอบอกด้านข้างเจริญดี เส้นเชื่อมระหว่างอกสั้นกว่าร่องแคบลึกบริเวณตรงกลางส่วนอก สันหลังอกปล้องสุดท้ายมีลวดลายเป็นแบบร่างแหเส้นยาว (Figure 3.11.1-C) ปีกคู่หน้าขนานกันมีสีขาวซีดประกอบด้วยเส้นขนที่ตั้งเป็นคู่กัน 15 เส้น แผ่นแข็งด้านล่างโคนปีกเป็นรูปสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ ปลายขามีสีเหลือง

ท้อง (Abdomen) ส่วนท้องปล้องท้องปล้องที่ 2-7 มีเส้นขนรูปโค้งปล้องละ 2 คู่ สำหรับใช้เก็บปีกเส้นขนที่ปล้องท้องปล้องที่ 9 ยาวกว่าครึ่งหนึ่งของปล้องท้องปล้องที่ 10 (มีความยาวประมาณ 0.8 เท่าของปล้องท้องปล้องที่ 10) (Figure 3.11.1-D)

เพศผู้ มีขนาดลำตัวเล็กกว่าเพศเมียปลายขาคู่หน้าไม่มีฟัน เส้นขนคู่ที่ 2 บนแผ่นแข็งด้านบนของ ปล้องท้องปล้องที่ 9 สั้นและแข็ง

ความสำคัญ เพลี้ยไฟไทร (cuban laurel thrips) เป็นชนิดที่สามารถพบได้มากที่สุดในสกุล *Gynaikothrips* เนื่องจากมีพืชอาหารหลายชนิดรวมถึงพื้นที่การปลูกพืชที่แพร่หลายในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เพลี้ยไฟไทรมีขนาดลำตัวใหญ่ และมีลักษณะเด่นที่บริเวณอกปล้องแรกซึ่งมีลักษณะเป็นร่างแห หนวดสีเหลือง และมีฟันที่ปลายขาคู่หน้าขนาดเล็กมาก ซึ่งแตกต่างจากชนิด *Gynaikothrips uzeli* ที่มีเส้นขนบริเวณด้านล่างของปลายส่วนอกยาวกว่าเส้นขนบริเวณด้านบนของส่วนอก แต่อย่างไรก็ตามประชากรเพลี้ยไฟในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้นั้นมีความแปรปรวนในเรื่องขนาดความยาวของเส้นขน ทั้งนี้ Wang และ Okajima (1995) ได้รายงานว่าเพลี้ยไฟชนิด *Gynaikothrips ficorum* อาจจะมีลักษณะคล้ายคลึงกับชนิด *Gynaikothrips uzeli* ที่มักพบมากในแหล่งที่ปลูกไม้ยืนต้นและพืชสวน

พืชอาหาร ไทร มะกอกฝรั่ง เบญจมาศ

เขตการแพร่กระจาย เพลี้ยไฟไทรมีต้นกำเนิดในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปัจจุบันสามารถพบได้ทั่วโลก

กรมวิชาการเกษตร

เพลี้ยไฟท่อ *Haplothrips gowdeyi* (Franklin, 1908)

Anthothrips gowdeyi Franklin, 1908: 724, *Anthothrips usitatus* Bagnall, 1910: 695, *Anthothrips variabilis* Crawford DL, 1910: 166, *Haplothrips karnyi* Bagnall, 1913: 296, *Haplothrips brevicollis* Bagnall, 1913: 297, *Haplothrips soror* Schmutz, 1913: 1036, *Haplothrips sororcula* Schmutz, 1913: 1036, *Anthothrips dozieri* Watson, 1918: 71, *Haplothrips mahensis* Bagnall, 1921: 267

ลำตัว ขนาดใหญ่ ลำตัวสีน้ำตาลเข้ม (Figure 3.11.2-A) เพศเมียขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.20– 1.50 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียมีปีกขนาดใหญ่ เพศผู้ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.00 – 1.05 มิลลิเมตร

หัว ส่วนหัวมีความยาวมากกว่าความกว้าง เส้นขนด้านหลังตาเดี่ยวอยู่บริเวณขอบของตารวมและมีความยาวเท่าขนาดความกว้างของตารวม ส่วนปากอยู่ในระนาบเดียวกันกับเส้นขนด้านหลังตาเดี่ยว (Figure 3.11.2-B)

มีหนวด 8 ปล้อง หนวดปล้องที่ 3-4 สีเหลือง หนวดปล้องที่ 5-6 มีสีเหลืองที่บริเวณโคนและมีสีน้ำตาลอ่อนที่ส่วนปลาย หนวดปล้องที่ 3 และ 4 เป็นที่ตั้งของอวัยวะรับความรู้สึก 2 และ 4 เส้นตามลำดับ

อก อกปล้องแรกมีขนาดใหญ่ มีเส้นขนขนาดใหญ่และยาว 5 คู่ ฐานอกปล้องแรกเจริญดี แผ่นแข็งด้านล่างของอกปล้องที่สอง (mesopresternum) มีรูปร่างคล้ายเรือ และมีร่องแคบลึกบริเวณตรงกลางของส่วนอก (Figure 3.11.2-C) ด้านล่างของอกปล้องสุดท้ายไม่มีเส้นเชื่อมระหว่างอกคู่กลางกับอกคู่สุดท้าย ปลายขาคู่หน้ามีฟันแหลมที่บริเวณส่วนปลาย ปีกคู่หน้ามีสีซีดแต่มีสีเข้มที่บริเวณฐานปีกปีกคู่หน้าประกอบด้วยเส้นขนที่ตั้งเป็นคู่กัน 8 เส้นแผ่นแข็งด้านล่างโคนปีกเป็นรูปสามเหลี่ยมขามีสีน้ำตาลเข้ม

ท้อง ส่วนท้องมีเส้นขนขนาดใหญ่ที่บริเวณแผ่นแข็งด้านหลังปล้องท้องยกเว้นปล้องท้องปล้องที่ 9 แผ่นแข็งปล้องท้องปล้องที่ 2-7 มีเส้นขนรูปโค้งปล้องละ 2 คู่ ในขณะที่ปล้องท้องปล้องที่ 9 มีเส้นขนตรงยาวเท่ากับความยาวของปล้องท้องปล้องที่ 10 ปลายส่วนท้องแคบกว่าส่วนหัว (Figure 3.11.2-D)

เพศผู้ มีขนาดลำตัวเล็กกว่าเพศเมียปลายขาคู่หน้ามีลักษณะเป็นฟัน (tasal tooth) แตกต่างกันตามขนาดของลำตัว เส้นขนคู่ที่ 2 บนแผ่นแข็งด้านบนของปล้องท้องปล้องที่ 9 สั้นและแข็ง แผ่นแข็งด้านล่างปล้องท้องปล้องที่ 8 ไม่ปรากฏบริเวณที่มีรู (pore plate)

ความสำคัญ เพลี้ยไฟท่อ (gold-tipped tubular thrips) จัดอยู่ในกลุ่มของเพลี้ยไฟสกุล *Haplothrips* มีลักษณะเด่นที่บริเวณปล้องหนวดปล้องที่ 3 ที่มีขนาดใหญ่แต่สั้น และมีเส้นขนรับความรู้สึกจำนวน 2 เส้น เพลี้ยไฟสกุลนี้มักพบมากในพืชตระกูลทานตะวัน มีรายงานทั่วโลกมากกว่า 245 ชนิด จึงสามารถกล่าวได้ว่าเพลี้ยไฟสกุลนี้จัดอยู่ใน 1 ใน 3 สกุลของเพลี้ยไฟที่พบมากที่สุด เพลี้ยไฟสกุล *Haplothrips* มักพบทำลายในไม้ดอก รวมถึงดอกหญ้า นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการเป็นตัวห้ำของไรศัตรูพืชอีกด้วย (Minaei and Mound, 2008)

พืชอาหาร มะม่วง มะละกอ มังคุด เงาะ น้อยหน่า กระท้อน มะยงชิด แก้วมังกร ดีปลี อโวคาโด้ หอม มันฝรั่ง ข้าวโพด หน่อไม้ฝรั่ง ชา หญ้าหวาน กระเจี๊ยบ ถั่วลิสง ถั่วฝักยาว โหระพา กระเพรา บัว ดาวเรือง ทานตะวัน ปอเทือง บานไม่รู้โรย หงอนไก่

เขตการแพร่กระจาย เพลี้ยไฟท่อมีต้นกำเนิดในทวีปแอฟริกา ปัจจุบันสามารถพบได้ทั่วโลกและพบมากในประเทศเขตร้อน

เพลี้ยไฟ *Podothrips* sp.

ลำตัว ขนาดใหญ่ ลำตัวสีน้ำตาล (Figure 3.11.3-A) เพศเมียขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.20–1.30 มิลลิเมตร เพศเมีย มีปีกขนาดใหญ่ เพศผู้ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.00 –1.20 มิลลิเมตร

หัว ส่วนหัวมีความยาวมากกว่าความกว้าง ส่วนแก้มนูนและแคบลงทางด้านล่าง มีเส้นจางๆ ด้านหลังของตารวม ปลายเส้นขนด้านหลังตาเดี่ยวมีลักษณะคล้ายลูกตุ้ม และยาวไม่ถึงขอบด้านหลังของตารวม ส่วนปากไม่ได้อยู่ในระนาบเดียวกันกับเส้นขนด้านหลังตาเดี่ยว (Figure 3.11.3-B) มีหนวด 8 ปล้อง ปล้องหนวดปล้องที่ 3-4 มีขนาดใหญ่ สีเหลือง ปล้องหนวดปล้องที่ 6-8 สีน้ำตาลอ่อนหนวดปล้องที่ 3-4 เป็นที่ตั้งของอวัยวะรับความรู้สึก 1 และ 2 เส้น ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

อก อกปล้องแรกมีขนาดใหญ่ ฐานอกด้างล่างยาวเป็นสองเท่าของขอบอกด้านบน (Figure 3.11.3-C) มีเส้นขนขนาดใหญ่ที่บริเวณมุมบนและมุมล่างของส่วนอกรวม 4 เส้น และมีขนาดใหญ่กว่าเส้นขนบนบริเวณขอบปล้องอก สันหลังอกปล้องกลางมีเส้นแบ่งกึ่งกลางอย่างชัดเจน สันหลังอกปล้องสุดท้ายไม่มีลวดลายแบบร่างแห เส้นขนบนสันหลังอกปล้องสุดท้ายมีขนาดเล็ก ปีกคู่หน้ามีเส้นขนเรียงบริเวณขอบปีก 1 แถว แผ่นแข็งด้านล่างโคนปีกเป็นรูประฆัง ปลายขาคู่หน้ามีตะขอโค้งและยาวยื่นออกมาจากปลายขา (Figure 3.11.3-D) ปลายขาทุกคู่มีสีเหลือง

ท้อง ปล้องท้องปล้องที่ 2 -7 จะมีเส้นขนรูปตัว S 2 คู่ไว้ใช้สำหรับเก็บขนบริเวณปีก ปล้องท้องปล้องที่ 9 มีเส้นขนแหลมความยาวเท่ากับปล้องท้องปล้องที่ 10 และความยาวของปล้องท้องปล้องที่ 10 สั้นกว่าความกว้างของส่วนหัว เส้นขนด้านข้างปล้องท้องปล้องที่ 10 ยาวกว่าเส้นขนที่บริเวณปลายส่วนท้อง

เพศผู้ มีรูปร่างคล้ายเพศเมียแต่มีขนาดลำตัวเล็กกว่าเส้นขนคู่ที่ 2 บนแผ่นแข็งด้านบนของปล้องท้องปล้องที่ 9 สั้นและแข็งแผ่นแข็งด้านล่างปล้องท้องปล้องที่ 8 ไม่ปรากฏบริเวณที่มีรู (pore plate)

ความสำคัญ เพลี้ยไฟสกุล *Podothrips* มีรายงานมากกว่า 30 ชนิดซึ่งส่วนใหญ่จะพบในแถบทวีปออสเตรเลีย (Ritchie, 1974) ทั้งนี้ชนิด *P. lucasseni* มีลักษณะเด่นที่บริเวณแผ่นแข็งใต้ส่วนอกแบ่งเป็น 3 ส่วนอย่างชัดเจน นอกจากนี้เพลี้ยไฟสกุล *Podothrips* นั้นมีความคล้ายคลึงกับเพลี้ยไฟสกุล *Haplothrips* แต่จะมีความแตกต่างกันที่บริเวณขอบบนของอกปล้องแรกด้านล่าง และมีความแตกต่างจากเพลี้ยไฟสกุล *Karnyothrips* ที่บริเวณปลายขาคู่หน้าจะมีลักษณะเป็นตะขอ

พืชอาหาร บานไม่รู้โรย ไส้ไก่

เขตการแพร่กระจาย พบในประเทศเขตร้อนในทวีปเอเชีย

จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของเพลี้ยไฟไทร *G. Ficorum* เพลี้ยไฟท่อ *H. gowdeyi* และเพลี้ยไฟ *Podothrips* sp. โดยการศึกษาความสัมพันธ์กับประวัติการวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ (Molecular phylogeneticsof Thysanoptera) และใช้โปรแกรม Neighbor joining/UPGMA แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (sequence divergence) พบว่า เพลี้ยไฟทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกันทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางอณูชีววิทยา โดยเพลี้ยไฟชนิดเดียวกันที่อยู่ในพื้นที่ใกล้เคียงกันจะมีความแปรปรวนของลำดับพันธุกรรมเล็กน้อย (Figure 3.11.4) การศึกษานี้ทำให้ทราบถึงชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อยที่เป็นศัตรูสำคัญของพืชไร่ พืชสวน ไม้ดอกไม้ประดับในประเทศไทย และใช้เป็นข้อมูลประกอบการจำแนกชนิดเพลี้ยไฟที่ติดมากับสินค้าเกษตรนำเข้าและส่งออก และสามารถนำเทคนิควิธีการศึกษามาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาวิธีการจำแนกชนิดเพลี้ยไฟหรือแมลงชนิดอื่นๆ โดยการศึกษาลักษณะทางอณูชีววิทยามีข้อได้เปรียบที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างแมลงได้ทุกระยะทั้งระยะไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็ว โดยไม่ต้องอาศัยเวลาในการเลี้ยงตัวอย่างแมลงนั้นๆ ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ตัวเต็มวัยในการจำแนกชนิด อีกทั้งยังสามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษาให้กับเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงทั้งในระยะไข่และตัวอ่อนได้อย่างทันต่อเหตุการณ์ช่วยลดระยะเวลาการกักเก็บสินค้าเพื่อตรวจสอบ และสามารถใช้เป็นเทคนิคตรวจสอบชนิดแมลงศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับสินค้านำเข้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera (Thysanoptera:Tubulifera) ในประเทศไทยโดยการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชในทุกภูมิภาคของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2563 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถเก็บรวบรวมเพลี้ยไฟได้ 361 ตัวอย่างและสามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera วงศ์ Phlaeothripidae ได้ 3 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยไฟไทร *Gynaikothrips ficorum* (Marchal) 34 ตัวอย่าง เพลี้ยไฟท่อ *Haplothrips gowdeyi* (Franklin) 325 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟ *Podothrips* sp. 2 ตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงชนิด ลักษณะการทำลายเขตการแพร่กระจายโดยเพลี้ยไฟจะเข้าทำลายทั้งยอดอ่อน ดอก ใบอ่อน และใบแก่ของพืช ทั้งนี้ได้ดำเนินการศึกษาลำดับดีเอ็นเอบาร์โค๊ดของยีน COI (Cytochrome Oxidaes subunit I) ของเพลี้ยไฟที่เก็บรวบรวมได้ สามารถสรุปได้ว่าเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera 3 ชนิดที่พบในประเทศไทยมีความแตกต่างกันทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยา จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดและถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera นำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดทำรายชื่อชนิดแมลงศัตรูพืชรองรับปัญหาด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร นำตัวอย่างเพลี้ยไฟจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลงพร้อมนำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อใช้ตรวจสอบความถูกต้องนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาด้านอื่นๆ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูเพื่อประกอบในงานสำคัญด้านการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร ตลอดจนใช้ในด้านการกักกันพืช ซึ่งเป็นไปตามมาตรการด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measure: SPS Agreement) ขององค์การการค้าโลก (WTO) ที่ประเทศสมาชิกรวมทั้งประเทศไทยจะต้องใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชเพื่อปกป้องสุขภาพมนุษย์ สัตว์ พืชและสิ่งแวดล้อม (อรุณี, 2543) ทั้งนี้สามารถใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ได้เรียนรู้จากการศึกษาทดลองจำแนกชนิดแมลงต่างๆ ได้ และสามารถถ่ายทอดเทคนิคให้กับบุคลากรที่เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติงานได้ในอนาคต

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ที่พบในแหล่งปลูกพืชที่สำคัญในประเทศไทยจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการหาวิธีการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟที่ถูกต้องและเหมาะสม และใช้เป็นข้อมูลสำหรับการอ้างอิงถึงชนิดเพลี้ยไฟศัตรูสำคัญของพืชนำเข้าส่งออกที่สำคัญ

2. ถ่ายทอดแนวทางการวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางอณูชีววิทยาจากการหาลำดับพันธุกรรมของยีน COI ของเพลี้ยไฟอันดับย่อยที่ศึกษา โดยการจัดทำเอกสารชุดวิชาอนุกรมวิธานแมลงเพื่อใช้ในการฝึกอบรมหลักสูตรแมลงปากดูด“ศัตรูสำคัญของพืชนำเข้า-ส่งออก” และ หลักสูตรแมลง-สัตว์ศัตรูพืช และการป้องกันกำจัด ที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จัดขึ้นทุกๆ 2 ปี เพื่อให้ความรู้แก่นักวิชาการจากหน่วยงานต่าง ๆ ทั้งภาครัฐและเอกชน ตลอดจนเกษตรกร นิสิต และนักศึกษาที่สนใจ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

3. ใช้ข้อมูลชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ที่เป็นปัจจุบันเป็นข้อมูลสำหรับนักวิชาการ บริษัทเอกชน และผู้ประกอบการรายอื่นๆ

4. นำข้อมูลเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulirera ที่ได้จากการศึกษา จัดทำฐานข้อมูลแมลงของพิพิธภัณฑ์แมลงของกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ซึ่งเป็นแหล่งข้อมูลทางด้านกีฏวิทยาสำคัญของประเทศไทย

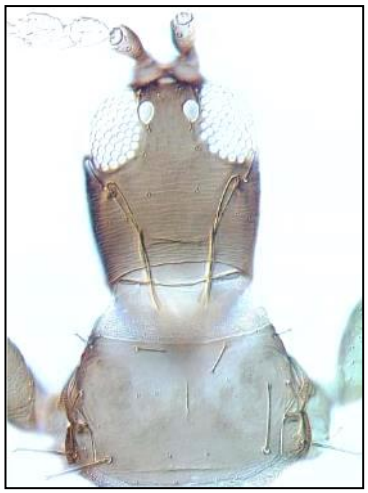
Figure 3.11.1 Morphology of Cuban laurel thrips; *Gynaikothrips ficorum* (Marchal, 1980)

A. Slide permanent B. Head-Pronotum

C. Metanotum D. Tergites IX–X (tube)

กรมวิชาการเกษตร

A



B

C

D

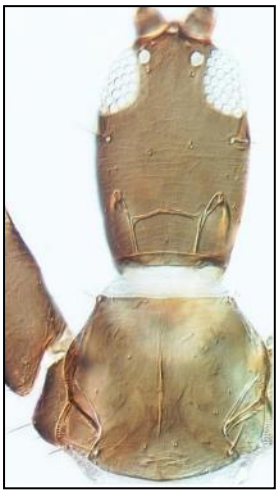
กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.11.2 Morphology of Gold-tipped tubular thrips; *Haplothrips gowdeyi* (Franklin, 1908)

A. Slide permanent B. Head-Pronotum

C. Mesopresternum D. Tergites IX–X (tube)

A



B

C

D

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.11.3 Morphology of *Podothrips* sp.

A. Slide permanent B. Head-Pronotum

C. Metanotum D. Fore tibia and tarsus

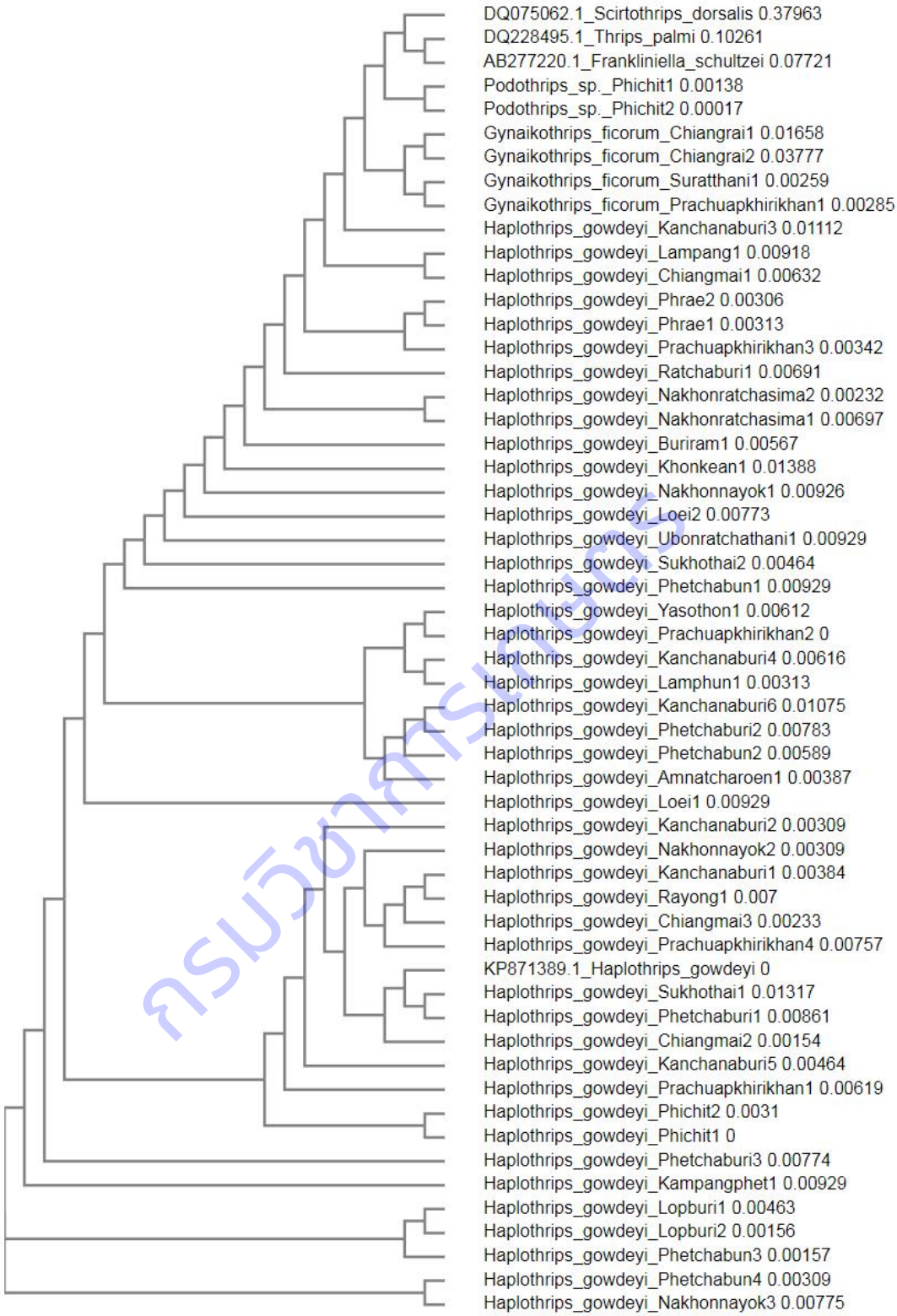


Figure 3.11.4 Phylogenetic trees showing the relationship among three thrips populations which collected from the other crops in Thailand comparing with *Scirtothrips dorsalis*, *Thrips palmi* and *Frankliniella schultzei*

Table 3.11.1 Location and number of thrips samples collected from the other crops during October 2017 – September 2020

Province	District	Sub-district	Host Plants	Number of thrips samples	Location	Accession No.
***Gynaikothrips ficorum* (Marchal, 1980)**						
Chiang Rai	Mae sai	Pong pha	Chrysanthemum	5	N 20° 23′ 0” E 99° 55′ 11”	Chiang Rai1
Chiang Rai	Mae sai	Mae sai	Chrysanthemum	9	N 14° 22′ 24” E 99° 58′ 38”	Chiang Rai2
Surat Thani	Ban na san	Kwuan su pan	Olive	10	N 8° 52′ 23” E 99° 23′ 37”	Surat Thani1
Prachuap Khiri Khan	Kui bu ri	Sam ka thai	Banyan	10	N 120° 11′ 21” E 99° 51′ 3”	Prachuap Khiri Khan1
Total				**34**		
***Haplothrips gowdeyi* (Franklin, 1908)**						
Phrae	Den chai	Sai yoi	Cockscomb	6	N 18° 4′ 28” E 99° 59′ 48.8”	Phrae1
Phrae	Long	Boh lek long	Globe Amaranth	12	N 18° 1′ 27.4” E 99° 43′ 9.9”	Phrae2
Lampang	Mae tah	Mae tah	Mango	6	N 18° 10′ 22.6” E 99° 33′ 27.1”	Lampang1
Lamphun	Ban hong	Ban hong	Spring onion	4	N 18° 19′ 269” E 98° 48′ 292”	Lamphun1
Chiang Mai	San sai	Mae fhak	Potato	4	N 19° 2′ 46.2” E 98° 57′ 60”	Chiang Mai1

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.11.1 Location and number of thrips samples collected from the other crops during October 2017 – September 2020 (Continued)

Province	District	Sub-district	Host Plants	Number of thrips samples	Location	Accession No.
Chiang Mai	Sa meong	Sa meong Nua	Basil	8	N 18° 57′ 51.1” E 98° 43′ 32.1”	Chiang Mai2
Chiang Mai	Sa meong	Sa meong Nua	Papaya	15	N 18° 57′ 100” E 98° 44′ 51.7”	Chiang Mai3
Phichit	Muang	Rong chang	Lotus	2	N 16° 27′ 45” E 100° 17′ 1”	Phichit1
Phichit	Muang	Rong chang	Gardenia	5	N 16° 29′ 6” E 100° 17′ 1”	Phichit2
Sukhothai	Srisachanalai	Tha chai	Mango	5	N 17° 24′ 35” E 99° 48′ 14”	Sukhothai1
Sukhothai	Srisachanalai	Tha chai	Marigold	5	N 16° 28′ 55” E 99° 44′ 14”	Sukhothai2
Kamphaeng Phet	Sai ngam	Ma ha chai	Lotus	3	N 17° 24′ 41” E 99° 48′ 21”	Kamphaeng Phet1
Phetchabun	Khao kho	Sa daoh pong	Rambutan	8	N 16° 35′ 22” E 100° 57′ 46”	Phetchabun1
Phetchabun	Khao kho	Nong mae na	Avocado	18	N 16° 35′ 22” E 100° 35′ 46”	Phetchabun2

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.11.1 Location and number of thrips samples collected from the other crops during October 2017 – September 2020 (Continued)

Province	District	Sub-district	Host Plants	Number of thrips samples	Location	Accession No.
Phetchabun	Lom sak	Nam chun	Sweet basil	2	N 16° 42′ 54” E 101° 10′ 51”	Phetchabun3
Phetchabun	Lom sak	Nam chun	Yard long bean	2	N 16° 42′ 50” E 101° 11′ 45”	Phetchabun4
Loei	Phu rua	Pla pah	Tea tree	4	N 17° 17′ 56” E 101° 24′ 39”	Loei1
Loei	Chaing khan	Bu hong	Custard apple	14	N 17° 53′ 49” E 101° 42′ 54”	Loei2
Khon Kaen	Muang	Si la	Peanut	8	N 16° 29′ 6” E 102° 49′ 50”	Khon Kaen1
Nakhon Ratchasima	Wang nam kheaw	Wang mhee	Sweet basil	10	N 14° 23′ 26” E 101° 42′ 33”	Nakhon Ratchasima1
Nakhon Ratchasima	Wang nam kheaw	Thai sa ma kee	Marigold	8	N 14° 22′ 24” E 101° 52′ 44”	Nakhon Ratchasima2
Yasothon	Pah tiew	Kra jai	Sunflower	9	N 15° 87′ 8” E 104° 19′ 38”	Yasothon1
Amnat Charoen	Muang	Bong	Sunn hemp	9	N 15° 52′ 26” E 104° 39′ 24”	Amnat Charoen1
Ubon Ratchathani	Warin cham lhab	Bung wai	Marigold	6	N 15° 9′ 5” E 104° 45′ 50”	Ubon Ratchathani1

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.11.1 Location and number of thrips samples collected from the other crops during October 2017 – September 2020 (Continued)

Province	District	Sub-district	Host Plants	Number of thrips samples	Location	Accession No.
Buriram	Nang rong	Nong sa nho	Marigold	10	N 14° 44′ 7” E 102° 55′ 6”	Buriram1
Nakhon Nayok	Muang	Sri nawa	Santol	8	N 14° 15′ 5” E 101° 16′ 41”	Nakhon Nayok1
Nakhon Nayok	Muang	Sri nawa	Golden dragon	6	N 14° 13′ 35” E 101° 16′ 9”	Nakhon Nayok2
Nakhon Nayok	Muang	Sarika	Mangosteen	7	N 14° 17′ 16” E 101° 13′ 48”	Nakhon Nayok3
Lopburi	Chai ba dan	Tha din dam	Asparagus	6	N 15° 7′ 20” E 101° 13′ 49”	Lopburi1
Lopburi	Chai ba dan	Tha din dam	Asparagus	7	N 15° 7′ 20” E 101° 8′ 20”	Lopburi2
Phetchaburi	Cha am	Nong sala	Marigold	6	N 12° 53′50.4” E 99° 59′ 20.7”	Phetchaburi1
Phetchaburi	Cha am	Nong sala	Marigold	12	N 12° 53′ 50.4” E 99° 65′ 41.3”	Phetchaburi2
Phetchaburi	Tha yang	Nong jok	Sunn hemp	9	N 12° 58′ 00.5” E 99° 58′ 52.5”	Phetchaburi3

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.11.1 Location and number of thrips samples collected from the other crops during October 2017 – September 2020 (Continued)

Province	District	Sub-district	Host Plants	Number of thrips sample	Location	Accession No.
Prachuap Khiri Khan	Muang	Aow noi	Papaya	3	N 11° 55′ 00.5” E 99° 47′ 59.6”	Prachuap Khiri Khan1
Prachuap Khiri Khan	Hua hin	Thab tai	Dragon fruit	4	N 12° 32′ 26.0” E 99° 49′ 38.8”	Prachuap Khiri Khan2
Prachuap Khiri Khan	Muang	Bo nok	Mango	15	N 11° 59′ 21.6” E 99° 45′ 35.2”	Prachuap Khiri Khan3
Prachuap Khiri Khan	Pran buri	Nong ta tam	Mango	13	N 12° 25′ 13.6” E 99° 49′ 9.2”	Prachuap Khiri Khan4
Ratchaburi	Muang	Rang bua	Papaya	3	N 13° 32′ 01.1” E 99° 33′ 35.5”	Ratchaburi1
Kanchanaburi	Muang	Chong sa dao	Dragon fruit	2	N 14° 12′ 26.3” E 99° 12′ 13.9”	Kanchanaburi1
Kanchanaburi	Muang	Chong sa dao	Dragon fruit	8	N 14° 12′ 42.3” E 99° 16′ 21”	Kanchanaburi2
Kanchanaburi	Dan ma kham tia	Dan ma kham tia	Corn	8	N 13° 50′ 08.1” E 99° 19′ 09.7”	Kanchanaburi3
Kanchanaburi	Tha muang	Thung thong	Roselle	3	N 13° 53′ 53.2” E 99° 38′ 50.2”	Kanchanaburi4
Kanchanaburi	Tha maka	Tha mai	Asparagus	9	N 13° 55′ 3.24” E 99° 47′ 52.39”	Kanchanaburi5

กรมวิทยาศาสตร

Table 3.11.1 Location and number of thrips samples collected from the other crops during October 2017 – September 2020 (Continued)

Province	District	Sub-district	Host Plants	Number of thrips sample	Location	Accession No.
Kanchanaburi	Sai yok	Singh	Long pepper	6	N 14° 05′ 108” E 99° 96′ 40.0”	Kanchanaburi6
Rayong	Pluak dang	Mab yang pon	Stevia	7	N 13° 1′ 20.7” E 101° 6′ 77.6”	Rayong1
Total				**325**		
***Podothrips* sp.**						
Phichit	Muang	Rong chang	Winter jasmine	1	N 16° 26′ 7” E 100° 17′ 1”	Phichit1
Phichit	Muang	Rong chang	Globe Amaranth	1	N 16° 26′ 9” E 100° 21′ 3”	Phichit2
Total				**2**		

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3.12 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา *Chaetomium cupreum* และ *Ch. globosum*

DNA barcoding for *Chaetomium cupreum* and *Ch. globosum* identification

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวชนินทร	ดวงสอาด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นางสาวพรพิมล	อธิปัญญาคม	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวสุณีรัตน์	สีมะเดื่อ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวมะโนรัตน์	สุดสงวน	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวอมรรัชฏ์	คิดใจเดียว	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวสุทธิณี	ลิขิตตระกูลรุ่ง	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

บทคัดย่อ

ปัจจุบันข้อมูลและวิธีการทางชีวโมเลกุล เข้ามามีบทบาทมากในงานอนุกรมวิธานเพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อราโดยเฉพาะกรณีที่ไม่สามารถชี้ขาดได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เป็นหน่วยงานรับผิดชอบตรวจสอบความถูกต้องของชนิดสายพันธุ์เชื้อราที่ระบุในสารชีวภัณฑ์ป้องกันกำจัดโรคพืช ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ใช้สารชีวภัณฑ์ที่สามารถใช้สารชีวภัณฑ์ได้ตรงชนิด การศึกษาครั้งนี้ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2561 - กันยายน 2563 เพื่อจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อรา *Chaetomium cupreum* และ *Ch. globosum* ในประเทศไทย เก็บและรวบรวมตัวอย่างเชื้อรา *Chaetomium* จากตัวอย่างดิน พืช และจาก culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช เมื่อจำแนกชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 มีลักษณะพ้องกับเชื้อรา *Ch. cupreum* กลุ่มที่ 2 มีลักษณะพ้องกับเชื้อรา *Ch. globosum* และ กลุ่มที่ 3 มีลักษณะพ้องกับเชื้อราเชื้อราในสกุล *Chaetomium* แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ เมื่อจำแนกชนิดด้วยวิธี phylogenetic reconstruction โดยเปรียบเทียบกับ type sequence ของเชื้อรา *Chaetomiaceae* พบว่า topology ที่ได้จาก Maximum Likelihood (ML) และ Bayesian inference (BI) มีความสอดคล้องกัน และเป็น monophyletic พบว่า เชื้อรากลุ่มที่ 1 คือ *Arcopilus cupreus* ซึ่งเป็นชื่อปัจจุบันของ *Ch. cupreum* เชื้อรากลุ่มที่ 2 คือ *Ch. globosum* และเชื้อรากลุ่มที่ 3 คือ *Ovatospora brasiliensis* ซึ่งเป็นชื่อปัจจุบันของ *Ch. brasiliensis* จากการศึกษาครั้งนี้ได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อรา *A. cupreus* (syn. *Ch. cupreum*), *Ch. globosum* และ *O. brasiliensis* (syn. *Ch. brasiliensis*) จำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ the Internal Transcribed Spacer (ITS), the translation elongation factor 1-alpha (EF1-α), the Large Subunit (LSU, 28S), Partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2) และ β-Tubulin 2 (TUB2) ไอโซเลทของเชื้อราและดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะเก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการตรวจสอบชนิดของเชื้อรา

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

The fungal identification based on genealogical concordance has been applied to classify and identify fungal, especially in many cryptic and complex species. The DNA data of genes obtained from fungi had been analyzed for the identification and also applied as barcodes of certain species of fungi. Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture is a responsible agency to verify the fungal species in the bioproduct, which to be registered. This will benefit users of biological control products. This study was conducted during October 2018 - September 2020 in order to obtain the DNA barcodes of *Chaetomium cupreum* and *Ch. globosum* for Thailand. The *Chaetomium* was isolated from soil surround roots and plant with additional isolates selected from culture collection of Plant Pathology Research Group. The morphological characters had been observed to identify the *Chaetomium* isolates, which could be identified into three groups. The first group was found to have the similarity morphology to *Ch. cupreum*, the characters of the second group was agreed with *Ch. globosum* and the third group could be identified at genus level as *Chaetomium* sp. The representative from each group were selected for further identification using molecular data compare with the type sequences of *Chaetomiaceae*. The phylogenetic reconstruction obtained from Maximum Likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) presented the monophyletic and congruent topology. The results showed that the first group was identity to *Arcopilus cupreus*, the current name of *Ch. cupreum*. The second group was identity to *Ch. globosum*, and the third group could be identified as *Ovatospora brasiliensis*, the current name of *Ch. brasiliensis*. The DNA barcodes of five loci namely, the Internal Transcribed Spacer (ITS), the translation elongation factor 1-alpha (EF1-**α**), the Large Subunit (LSU, 28S), Partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2) and β-Tubulin 2 (TUB2) had been obtained from *A. cupreus* (syn. *Ch. cupreum*), *Ch. globosum* and *O. brasiliensis* (syn. *Ch. brasiliensis*). The isolates and DNA barcodes of *A. cupreus*, *Ch. globosum* and *O. brasiliensis* have been curated and databased in culture collection of Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture for the identification.

คำนำ

ปัจจุบันการนำจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์ (antagonist) มาใช้ประโยชน์ และเริ่มมีบทบาทและความสำคัญทางเศรษฐกิจด้านการเกษตร เชื้อราหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อราปฏิปักษ์และนำมาใช้เป็นสารชีวภัณฑ์ (biocontrol agent) เนื่องมาจากคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น เชื้อรา *Trichoderma* (Ascomycetes, Hypocreales) (de los Santos-Villalobos *et al*., 2013; Kindermann *et al*., 1998; Mbarga *et al*., 2012) และ เชื้อรา *Chaetomium* (Sordariomycetes, Sordariales) (Soytong,

1990; Soytong, 2001) ลักษณะของเชื้อราปฏิปักษ์จะมีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการแย่งใช้สารอาหารและพื้นที่ในการเจริญ สามารถใช้สารอาหารและเจริญในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (mycoparasite) บางชนิดสร้างสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น *Ch. globosum* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium ultimum* สาเหตุโรค damping-off ของ sugar beet (Di-Pietro *et al.*, 1991) เชื้อรา *Ch. cupreum* มีรายงานว่าสร้างสารปฏิชีวนะและสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* sp., *Macrophomina phaseolina*, *Phomopsis* sp., *Cercospora kikuchii, Colletotrichum dematium* var. *truncate*, *Phomopsis* sp. และ *Rhizoctonia solani* พบว่าสารที่เชื้อราปฏิปักษ์บางชนิดสร้างขึ้นมีผลดีต่อพืช โดยช่วยในการเจริญเติบโต (plant growth) รวมถึงกระตุ้นให้พืชมีความแข็งแรงต่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (plant defence responses) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการควบคุมโรคพืชโดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียแก่พืช เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยช่วยลดการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืช (Yeh and Sinclair, 1980)

เชื้อราใน genus *Chaetomium* (Sordariomycetes, Sordariales) มีมากกว่า 400 ชนิด (Rodríguez *et al*., 2002; Wang and Zheng 2005a, b; Wang *et al*., 2014) เป็นเชื้อราที่สามารถพบและแยกได้โดยทั่วไปจากรากพืชและดิน ในประเทศไทยมีรายงานว่าพบเชื้อราปฏิปักษ์ชนิดนี้ประมาณ 20 ชนิด (Gené and Guarro, 1996; Petcharat and Soytong, 1991; Somrithipol, 2004; Somrithipol *et al*., 2004; Soytong, 1991; Udagawa, 1973) การจัดจำแนกเชื้อรา *Chaetomium* สามารถทำได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Doveri, 2013) เช่น ลักษณะและตำแหน่งของ ascomata setae รูปร่างลักษณะและขนาดของ ascospores (von Arx *et al*., 1986; Doveri, 2013)

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 ทำให้ผลการศึกษาความแตกต่างรวมถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ เชื้อรา *Chaetomium* ที่ไม่มีความชัดเจน ทำให้การจัดจำแนกเชื้อรา *Chaetomium* ด้วยลักษณะทางพันธุกรรมมีความคลุมเครือ (Wang *et al*., 2014) Wang *et al*. (2014) ใช้ข้อมูลของดีเอ็นเอจากยีน 5 ตำแหน่งคือ the Large Subunit (LSU) the Internal Transcribed spacer (ITS) β-tubulin elongation factor (TEF1-α) และ the large subunit of RNA polymerase II (RPB1) เพื่อแยกความแตกต่างของ *Ch. indicum* พบว่ามีเชื้อรา *Chaetomium* จำนวน 6 ชนิด ภายใต้ชื่อ *Ch. indicum* (Wang *et al*., 2014)

Pornsuriya *et al*. (2008) แยกเชื้อรา *Chaetomium* หลายชนิด จากดินในพื้นที่เพาะปลูกสัปปะรดในจังหวัดพัทลุง ได้แก่ *Ch. aureum*, *Ch. bostrychodes*, *Ch. carinthiacum*, *Ch. cochliodes*, *Ch. cupreum*, *Ch. flavigenum*, *Ch. gracile*, *Ch. perlucidum* และ *Ch. succineum* ซึ่งเชื้อราเหล่านี้มีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน ต่อมามีรายงานว่า เชื้อรา *Ch. siamense* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับเชื้อรา *Ch. cupreum* มาก แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบด้วยลักษณะทางพันธุกรรม (DNA) กลับพบว่าเชื้อราทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกัน (Pornsuriya *et al*., 2011) และพบข้อบ่งชี้ว่าเชื้อรา *Ch. cupreum* ที่รายงานพบในประเทศไทยมีความ

ศรีนครินทรวิโรฒ

หลากหลาย แต่ความหลากหลายนี้ไม่สามารถจำแนกได้ด้วยการวิเคราะห์ ITS เพียงตำแหน่งเดียว และ มีแนวโน้มเป็น complex species ที่อาจมีมากกว่า 1 ชนิดภายใต้ชื่อ *Ch. cupreum* เช่นเดียวกับ *Ch. globosum* (Pornsuriya *et al*., 2011)

Chaetomium cupreum และ *Ch. globosum* ถูกเลือกจากจำนวนหลายชนิดของเชื้อรา *Chaetomium* ที่มีการใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี และมีการส่งเสริมให้ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยทั้งทางรัฐและเอกชน รวมถึงมีการผลิตเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* ในเชิงพาณิชย์ ปัจจุบันหลายบริษัทได้แสดงความประสงค์ขอขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ของเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* เป็นสารชีวภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ การตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* ที่นำไปใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากส่งผลต่อประสิทธิภาพในการป้องกันและกำจัดเชื้อสาเหตุโรคพืช แต่เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา genus *Chaetomium* ชนิดมีความคล้ายคลึงกันมากและลักษณะความแตกต่างที่พบไม่เพียงพอทำให้เกิดข้อจำกัดต่อการจัดจำแนก อีกทั้งการจัดจำแนกนั้นต้องอาศัยความเชี่ยวชาญและชำนาญเป็นอย่างยิ่ง จึงต้องมีการพิจารณานำลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) มาร่วมวิเคราะห์ เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างและการจัดจำแนกที่ถูกต้อง

เนื่องจากกลุ่มวิจัยโรคพืช เป็นหน่วยงานที่รับผิดชอบในการตรวจสอบความถูกต้องของสายพันธุ์ที่ขอขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์ ดังนั้นการศึกษาเพื่อจำแนกเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* โดยใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรมจึงมีความสำคัญ ข้อมูลและผลที่ได้จากการวิจัยจะได้มาซึ่งวิธีการที่มีความแม่นยำและถูกต้องในการตรวจสอบชนิดของเชื้อราที่ระบุในสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้การตรวจสอบเพื่อยืนยันความถูกต้องของชนิดของเชื้อราในสารชีวภัณฑ์ จะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ใช้สารชีวภัณฑ์โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเกษตรกร อีกทั้งข้อมูลของลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) ที่ได้จากการศึกษาสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลเพื่อใช้เปรียบเทียบ หรือศึกษาความหลากหลายและการวิวัฒนาการของ เชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* ในประเทศไทยต่อไป

ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อให้ได้เชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* มาตรฐานที่ได้รับการจำแนกชนิดอย่างถูกต้อง และเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานของเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* เพื่อใช้ตรวจสอบความถูกต้องของชนิดเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* ในสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์กับกรมวิชาการเกษตร

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทับตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่
   - Microcentrifuge
   - Thermal cyclers

กรมวิชาการเกษตร

- 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 บิกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate
5. สารเคมี ได้แก่
    - Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™)
    - Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (Glucanex®)
    - Lithium Borate buffer (LB)
    - PureDireX Genomic DNA Isolation Kit
    - QIAquick Gel Extraction Kit
    - SERVA HiSens Stain G
    - Nuclease-Free Water
    - ไพร์เมอร์ ได้แก่

    the Internal Transcribed Spacer (ITS)

    V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

    ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990)

    the translation elongation factor 1-alpha (EF1-α)

    EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG (Carbone and Kohn, 1999)

    EF-2: GGARGTACCAGTSATCATGTT (O'Donnell et al., 1998)

    the Large Subunit (LSU, 28S)

    LROR: ACCCGCTGAACTTAAGC (Vilgalys and Hester, 1990)

    LR6: CGCCAGTTTCTGCTTACC (Vilgalys and Hester, 1990)

    Partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2)

    fRPB2-5F: GAYGAYMGWGATCAYTTYGG (Liu *et al*., 2000)

    fRPB2-7cR: CCCATRGCTTGYTTRCCCAT (Liu *et al*., 2000)

    ß-Tubulin 2 (TUB2)

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

T1: AACATGCGTGAGATTGTAAGT (O'Donnell and Cigelnik 1997)

Bt2b: ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC (Glass and Donaldson 1995)

- อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) และ rose bengal agar (RBA)

6. Sequence assemble programs ได้แก่ Geneious Prime 2021.0.3 (http://www.geneious.com; Kearse *et al*., 2012)

- วิธีการ

1. ศึกษาข้อมูลของเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum*

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

2. เก็บและรวบรวมตัวอย่างเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum*

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบราก ตัวอย่างพืช เพื่อแยกหาเชื้อรา *Chaetomium* ด้วยวิธี alcohol and heat treatment และตัวอย่างเชื้อรา *Chaetomium* ที่นำมาใช้ในการวิจัยบางไอโซเลท นำมาจาก culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ โดยตัวอย่างของเชื้อราบริสุทธิ์ จะเลี้ยงบนอาหาร PDA ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส โดยจัดเก็บใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ เพื่อใช้ในการศึกษาหรือเป็นตัวอย่างอ้างอิงต่อไป

3. ศึกษา และจำแนกชนิดเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะของเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum*

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

จำแนกชนิดเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum*

โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา *Chaetomium ที่*ศึกษากับคู่มือของ von Arx *et al*. (1986); Doveri (2013) และ Wang *et al.* (2014; 2016a; 2016b)

4. จำแนกชนิดของเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* โดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอ

ตักหรือเขี่ยเส้นใยรวมถึง conidia ของเชื้อรา *Ch. cupreum และ Ch. globosum* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ และทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง ไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ศรีวิชัยการเกษตร

ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White et al., 1990)

the translation elongation factor 1-alpha (EF1-α)

EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG (Carbone and Kohn, 1999)

EF-2: GGARGTACCAGTSATCATGTT (O'Donnell et al., 1998)

the Large Subunit (LSU, 28S)

LROR: ACCCGCTGAACTTAAGC (Vilgalys and Hester, 1990)

LR6: CGCCAGTTTCTGCTTACC (Vilgalys and Hester, 1990)

Partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2)

fRPB2-5F: GAYGAYMGWGATCAYTTYGG (Lie et al., 1990)

fRPB2-7cR: CCCATRGCTTGYTTRCCCAT (Lie et al., 1990)

ß-Tubulin 2 (TUB2)

T1: AACATGCGTGAGATTGTAAGT (O'Donnell and Cigelnik 1997)

Bt2b: ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC (Glass and Donaldson 1995)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของตำแหน่ง the Internal Transcribed Spacer (ITS) the translation elongation factor 1-alpha (EF1-α) the Large Subunit (LSU, 28S) Partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2) และ ß-Tubulin 2 (TUB2) ด้วย Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนด annealing temperature ที่ 56 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

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

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2021.0.3 และบันทึกข้อมูลในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consensus sequence) แต่ละตำแหน่งมาจัดเรียง (align) เป็นชุดข้อมูล (dataset) รวมกับ type sequences ของแต่ละตำแหน่งได้แก่ LSU, ITS, TUB2, rpb2 และ TEF1 จากรายงานศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อราวงศ์ *Chaetomiaceae* (Pornsuriya *et al.*, 2008; Doveri, 2013; Wang *et al.,* 2014; 2016a; 2016b) และตรวจสอบการจัดเรียงของชุดข้อมูล (alignment) ด้วยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MAFFT X (Kumar *et al.,* 2018) ใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) เพื่อกรองส่วนที่เป็น ambiguous sequence จากนั้นจัดทำ partitioned (combined) dataset ของตำแหน่ง LSU, ITS, TUB2, rpb2 และ TEF1 บันทึก dataset และ partitioned dataset ในรูปแบบไฟล์ nexus โดยใช้โปรแกรม Mesquite

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

จำแนกชนิดของรา *Chaetomium* โดยวิเคราะห์จาก combined dataset ของ LSU-ITS-TUB2-rpb2-TEF1 วิเคราะห์ด้วย phylogenetic criteria 2 แบบคือ

1. Maximum Likelihood (ML) โดยเตรียมไฟล์ phy และวิเคราะห์โดยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ซึ่งจำเพาะต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command –f a) เริ่มจาก random starting tree และ กำหนด maximum likelihood bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง

2. Bayesian inference (BI) เตรียมไฟล์ nexus วิเคราะห์โดยโปรแกรม MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) โดยใช้วิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ค่าตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้ กำหนด 4 runs แต่ละ run ประกอบด้วย 4 chains วิเคราะห์จำนวน 10 ล้าน generations ตั้งค่า cold chain ที่ temperature 0.25 สุ่มตัวอย่าง substitution model parameters และบันทึก trees ทุก 500 generations ตรวจสอบความเชื่อมั่นของ topology ด้วย cumulative and compare functions ด้วย AWTY (Nylander *et al*., 2008)

การบันทึกข้อมูล

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 รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2560 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างและจำแนกชนิดเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบราก และตัวอย่างพืช นำมาแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ รวมถึงเชื้อราจาก culture collection เมื่อศึกษาด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบเชื้อราที่มีลักษณะพ้องกับเชื้อรา *Chaetomium* จำนวน 12 ไอโซเลท จากการจำแนกชนิดจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ได้แก่ การเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment) รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย conidia conidiophore และโครงสร้างอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope พบว่าเชื้อราทั้ง 12 ไอโซเลท สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม (Table 3.12.1) ได้แก่

1. ลักษณะพ้องกับเชื้อรา *Ch. cupreum* จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อราไอโซเลท M0069 และ M0774 ที่แยกได้จากดิน จาก อ.เมือง จ. เพชรบุรี

2. ลักษณะพ้องกับเชื้อรา *Ch. globosum* จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ C0501, C0502, M0234, M0235, M0236, M0747, M0999, M1000 และ M1001

3. ลักษณะพ้องกับเชื้อราในสกุล *Chaetomium* แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ M0224

Table 3.12.1: List of specimens obtained from study

Voucher No.	Group	Taxa	Sources	Locations
M0069	1	*Chaetomium cupreum*	soil surround roots	Mueang, Phetchaburi
M0774	1	*Ch. cupreum*	soil surround roots	Mueang, Phetchaburi
M0234	2	*Ch. globosum*	*Citrullus lanatus*	Kaset Sombun, Chaiyaphum
C0501	2	*Ch. globosum*	*Citrullus lanatus*	Kaset Sombun, Chaiyaphum
M0235	2	*Ch. globosum*	*Cucumis sativus*	incubated seeds
M0236	2	*Ch. globosum*	*Cucumis sativus*	incubated seeds
M0747	2	*Ch. globosum*	*Paris polyphylla*	Mae Rim, Chiangmai
M0999	2	*Ch. globosum*	soil surround roots	Mae Rim, Chiangmai
M1000	2	*Ch. globosum*	soil surround roots	Pan, Chiangrai
C0502	2	*Ch. globosum*	soil surround roots	Pan, Chiangrai
M1001	2	*Ch. globosum*	soil surround roots	Wiang Pa Pao, Chiangrai
M0224	3	*Chaetomium* sp.	*Citrus maxima*	Kaset Sombun, Chaiyaphum

การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* โดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

นำเชื้อรากลุ่มที่ 1 จำนวน 2 ไอโซเลท เชื้อรากลุ่มที่ 2 คัดเลือกตัวแทน จำนวน 7 ไอโซเลท และเชื้อรากลุ่มที่ 3 จำนวน 1 ไอโซเลท รวมจำนวน 12 ไอโซเลท มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation เมื่อเชื้อราเจริญจนมีขนาดโคโลนีประมาณ 6 เซนติเมตร จึงดำเนินการสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นดำเนินการเพิ่มปริมาณ

กรมวิชาการเกษตร

ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของยีนตำแหน่ง LSU, ITS, TUB2, rpb2 และ TEF1 ด้วยไพร์เมอร์ของแต่ละตำแหน่ง ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยังบริษัท Macrogen Korea เพื่อทำ purification และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing)

จัดทำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2021.0.3 จากนั้นจัดเรียง (align) เป็นชุดข้อมูล (dataset) รวมกับ type sequences ของแต่ละตำแหน่งได้แก่ LSU, ITS, TUB2, rpb2 และ TEF1 จากรายงานศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อราวงศ์ *Chaetomiaceae* (Pornsuriya *et al.*, 2008; Doveri, 2013; Wang *et al.,* 2014; 2016a; 2016b) (Table 2) จำแนกชนิดของรา *Chaetomium* โดยวิเคราะห์จาก combined dataset ของ ITS-LSU-rpb2-TEF1-TUB2 ของ 140 taxa โดย *Microascus trigonosporus* เป็น outgroup ทำการวิเคราะห์รวม 3,581 bases/taxa มีข้อมูลของแต่ละ partition ดังนี้ ITS = 629 bases, LSU = 520 bases, rpb2 = 650, TEF1 = 866 bases และ TUB2 = 916 bases

เชื้อราในวงศ์ *Chaetomiaceae* ได้มีการศึกษาและจัดจำแนกด้วยวิธีการทางอนุกรมวิธานตามมาตรฐานสากลโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานร่วมกับข้อมูลพันธุกรรม จากข้อมูล MycoBank พบว่า วงศ์ *Chaetomiaceae* ประกอบไปด้วยเชื้อรากว่า 55 สกุล (MycoBank, 2021) ได้แก่ *Achaetomiella, Achaetomium, Acrophialophora, Allocanariomyces, Amesia, Aporothielavia, Arcopilus, Arxotrichum, Batnamyces, Bolacotricha, Bommerella, Botryotrichum, Brachychaeta, Canariomyces, Carteria, Chaetomidium, Chaetomiopsis, Chaetomiotricha, Chaetomium, Chrysanthotrichum, Chrysocorona, Cladochaete, Collariella, Condenascus, Corynascella, Corynascus, Crassicarpon, Dichotomopilus, Emilmuelleria, Erythrocarpon, Erythrocarpum, Farrowia, Floropilus, Humicola, Hyalosphaerella, Melanogone, Microthielavia, Myceliophthora, Mycothermus, Mycothermus, Ovatospora, Parachaetomium, Parathielavia, Parvabulbium, Pseudothielavia, Remersonia, Setiferotheca, Stellatospora, Stolonocarpus, Subramaniula, Taifanglania, Thermothelomyces, Thermothielavioides, Trichocladium* และ *Vanhallia*

เมื่อวิเคราะห์ phylogenetic reconstruction พบว่า topology ที่ได้จาก ML และ BI มีความสอดคล้องกัน และเป็น monophyletic (Figure 1) โดย phylogram ที่ได้จาก ML พิจารณาค่า bootstrap support values (≥70%) ที่วิเคราะห์จาก 1,000 ซ้ำ และ BI ได้จากค่าเฉลี่ยของ 20,000 converged trees ดังนั้นผลการจัดจำแนกด้วยข้อมูลพันธุกรรมของเชื้อรา *Chaetomium* ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เชื้อราไอโซเลท M0069 และ M0774 พบว่าอยู่ใน clade ของ genus *Arcopilus*สามารถจำแนกได้เป็น *Arcopilus cupreus* เชื้อราไอโซเลท M0234 M0235 M0236 M0747 M0999 M1000 และ M1001 สามารถจำแนกได้เป็น *Ch. globosum* และเชื้อราไอโซเลท M0224 สามารถจำแนกได้เป็น *Ovatospora brasiliensis*

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Table 3.12.2: List of *Chaetomiaceae* included in this study

Taxa	Voucher Number	Previous name	Locations	GenBank Number				
				ITS	LSU	rpb2	tef1	tub2
Achaetomium								
ACh. globosum	CBS 332.67		Rhizosphere, Lucknow, India	KX976570	KX976695	KX976793	KM655479	KX976911
Ac. luteum	CBS 618.68		Cucurbita rhizosphere, Delhi, India	KX976571	KX976696	KX976794	-	KX976912
	CBS 544.83		Rosa stem, Lahore, Pakistan	KX976572	KX976697	KX976795	-	KX976913
Ac. macrosporum	CBS 152.97		Leaf litter, Uttar Pradesh, India	KX976573	KX976698	KX976796	-	KX976914
	CBS 532.94		Mangrove mud, Japan	KX976574	KX976699	KX976797	-	KX976915
Ac. strumarium	CBS 333.67		Soil, Lucknow, India	AY681204	AY681170	KC503254	KC503252	AY681238
***Amesia* gen. nov.**								
Am. atrobrunnea	CBS 379.66	*Ch. atrobrunneum*	Mouldy mattress, Solomon Islands	JX280771	JX280666	KX976798	-	KX976916
	CBS 250.75		Air, Uttar Pradesh, India	KX976575	KX976700	KX976799	-	KX976917
Am. cymbiformis	CBS 175.84	*Ch. cymbiforme*	Tent rope, Solomon Islands	KX976576	KX976701	KX976800	-	KX976918
Am. nigricolor	CBS 600.66	*Ch. nigricolor*	Vegetable detritus, India	KX976578	KX976703	KX976802	KM655454	KX976920
Am. gelasinospora	CBS 673.80	*Ch. gelasinosporum*	Soil, Qus, Egypt	KX976580	KX976705	KX976804	-	KX976922
Arcopilus								
A. aureus	LC11932	*Ch. aureum*	*Saccharum officinarum*, China	MN215718	MN215556	MN255399	-	MN329889
A. cupreus	CBS 560.80	*Ch. cupreum*	Dung of moose, Mietta Hot Springs, Canada	KX976584	KX976709	KX976808	-	KX976926
	LC13497		*Saccharum officinarum*, China	MN215731	MN215569	MN255412	-	MN329902
	M0069		Soil, Phetchaburi, Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
	M0774		Soil, Phetchaburi, Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
A. fusiformis	CBS 484.85	*Ch. fusiforme*	Dung of rodent, Newberry Mts., Nevada, USA	KX976585	KX976710	KX976809	-	KX976927
A. flavigenus	CBS 337.67	*Ch. flavigenum*	Soil, Johannesburg, South Africa	KX976587	KX976712	KX976811	-	KX976929
A. turgidopilosus	CBS 169.52	*Ch. turgidopilosum*	Top of storage tent, USA	KX976588	KX976713	KX976812	-	KX976930
Botryotrichum								
B. atrogriseum	CBS 130.28		Dung of rabbit, The Netherlands	KX976589	KX976714	KX976813	-	KX976931
	CBS 604.69		Corn field soil, Waterloo, Ontario, Canada	KX976590	KX976715	KX976814	-	KX976932
B. murorum	CBS 163.52	*Ch. murorum*	Great Smoky Mts., Tennessee, USA	KX976591	KX976716	KX976815	-	KX976933
	CBS 173.68		*Homo sapiens*, Netherlands	KX976592	KX976717	KX976816	-	KX976934

กรมวิทยาศาสตร์

Table 3.12.2: Continued

Taxa	Voucher Number	Previous name	Locations	GenBank Number				
				ITS	LSU	rpb2	tef1	tub2
Botryotrichum								
B. peruvianum	CBS 460.90		Dung of herbivore, Massanella, Spain	KX976623	KX976720	KX976819	-	KX976937
	CBS 421.93		Air, La Habana, Cuba	KX976596	KX976721	KX976820	-	KX976938
B. piluliferum	CBS 654.79		Pastry, Enschede, Netherlands	KX976597	KX976722	KX976821	-	KX976939
B. spirotrichum	CBS 211.55	*Emilmuelleria spirotricha*	Dung of deer, California, USA	KX976601	KX976726	KX976825	-	KX976943
	CBS 828.71		Dung of donkey, Algeria	KX976602	KX976727	KX976826	-	KX976944
Chaetomium sensu stricto								
Ch. afropilosum	CBS 145.38		–	KT214574	KT214605	KT214675	KT214713	KT214751
Ch. angustispirale	CBS 137.58		Russia	JN209862	MH869263	KF001824	KF001734	JN256141
Ch. capillare	CBS 128489		USA	KT214583	KT214614	KT214686	KT214724	KT214760
Ch. cervicicola	CBS 128492		USA	KT214558	KT214592	KT214662	KT214697	KT214735
Ch. citrinum	CBS 693.82		Japan	KT214587	KT214617	KT214691	KT214730	KT214764
Ch. coarctatum	CBS 162.62		Russia	JN209863	MH869715	KF001802	KF001712	JN256142
Ch. contagiosum	CBS 128494		USA	KT214555	KT214589	KT214659	KT214694	KT214732
Ch. cucumericola	CBS 378.71		Turkey	KT214579	KT214610	KT214680	KT214718	KT214756
	CBS 126777		Iran	HM365247	MH875677	KT214681	KT214719	KT214757
Ch. elatum	CBS 142034	*Ch. pannosum*, *Ch. tenuissimum*	Denmark	KX976612	KX976733	KX976832	-	KX976954
	CBS 910.70	*Ch. ramipilosum*	Germany	KC109757	KC109757	KF001821	KF001731	KC109775
	CBS 374.66	*Ch. virgecephalum*	USA	KC109758	MH870466	KF001820	KF001730	KC109776
Ch. fimeti	CBS 139034	*Thielavia. fimeti*, *T. californica*	Germany	KT214559	KT214593	KT214663	KT214698	KT214736
	CBS 168.71		Canada	KT214560	FJ666358	FJ666389	KT214699	KT214737
Ch. globosporum	CBS 108.83		India	KC109750	JX280708	KF001825	KF001735	KC109768
Ch. globosum	CBS 160.62		Germany	KT214565	KT214596	KT214666	KT214704	KT214742
	CBS 132.30	*Ch. subterraneum*	USA	KC109755	KC109755	KF001792	KF001702	KC109773
	CBS 147.60	*Ch. mollipilium*	USA	JN209909	MH869475	KF001793	KF001703	JN256179
	CBS 164.62	*Ch. rectum*	Poland	JN209920	MH869717	KF001796	KF001706	JN256190
	CBS 371.66	*Ch. cruentum*	USA	JN209871	JN209871	KF001795	KF001705	JN256148

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.12.2: Continued

Taxa	Voucher Number	Previous name	Locations	GenBank Number				
				ITS	LSU	rpb2	tef1	tub2
Chaetomium sensu stricto								
	MUCL 39526	*Ch. globosum* var. *flavoviride*	Hungary	JN209875	JN209875	KF001800	KF001710	JN256152
	MUCL 39527	*Ch. globosum* var. *griseum*	Hungary	JN209899	JN209899	KF001799	KF001709	JN256173
	CBS 149.60	*Ch. subglobosum*	Russia	JN209930	MH869477	KF001808	KF001718	JN256200
	CBS 155.52	*Ch. cochliodes*	USA	KC109754	MH868494	KF001811	KF001721	KC109772
	CBS 373.66	*Ch. cochliodes*	USA	KC109756	MH870465	KF001809	KF001719	KC109774
	M0234		*Citrullus lanatus*, Chaiyaphum, Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
	M0235		incubated seeds of *Cucumis sativus*, Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
	M0236		incubated seeds of *Cucumis sativus*, Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
	M0747		*Paris polyphylla*, Chiangmai, Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
	M0999		soil, Mae Rim, Chiangmai, Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
	M1000		soil, Pan, Chiangrai, Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
	M1001		soil, Wiang Pa Pao, Chiangrai, Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
Ch. graminiforme	CBS 506.84		Canada	KT214584	KT214615	KT214687	KT214725	KT214761
Ch. grande	CBS 126780		Iran	HM365253	MH875679	KT214657	KT214692	HM365273
	CGMCC 3.9414		China	KC109749	KC109749	KF001826	KF001736	KC109767
Ch. interruptum	CBS 126660		Iran	HM365246	MH875650	KT214665	KT214703	KT214741
Ch. madrasense	CBS 315.74		India	KC109751	KC109751	KF001831	KF001741	KC109769
	CBS 113.83	*Ch. ascotrichoides*	Argentina	KC109752	KC109752	KF001832	KF001742	KC109770
	CBS 110.83	*Ch. gibberosporum*	Israel	KC109753	MH873286	KF001833	KF001743	KC109771
Ch. megalocarpum	CBS 149.59	*Ch. atrosporum*	Greece	KC109744	KC109744	KF001828	KF001738	KC109762
Ch. novozelandicum	CBS 124555		New Zealand	KT214576	KT214607	KT214677	KT214715	KT214753
	CBS 128484		USA	KT214578	KT214609	KT214679	KT214717	KT214755
Ch. nozdrenkoae	CBS 163.62	*Ch. difforme*	Russia	KT214556	KT214590	KT214660	KT214695	KT214733
	CBS 809.68		Germany	KT214557	KT214591	KT214661	KT214696	KT214734
Ch. pilosum	CBS 335.67	*Chaetomidium pilosum*	Australia	KT214586	FJ666356	FJ666387	KT214729	KT214763

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.12.2: Continued

Taxa	Voucher Number	Previous name	Locations	GenBank Number				
				ITS	LSU	rpb2	tef1	tub2
Chaetomium sensu stricto								
Ch. pseudocochliodes	CGMCC 3.9441		China	JN209925	JN209925	KF001816	KF001726	JN256195
	CGMCC 3.9469		China	JN209926	JN209926	KF001815	KF001725	JN256196
Ch. pseudoglobosum	CBS 574.71			KT214573	KT214604	KT214674	KT214712	KT214750
Ch. rectangulare	CBS 126778		Iran	HM365239	HM365239	KT214688	KT214726	HM365285
	CGMCC 3.9409		China	JN209873	JN209873	KF001822	KF001732	JN256150
Ch. spirochaete	CBS 730.84		USA	JN209921	MH873518	KF001819	KF001729	JN256191
Ch. subaffine	CBS 637.91		USSR	JN209929	MH873969	KF001817	KF001727	JN256199
Ch. subfimeti	CBS 370.66	*Chaetomidium subfimeti*	Wales	KT214562	FJ666354	FJ666385	KT214701	KT214739
	CBS 169.71		USA	KT214563	FJ666357	FJ666388	KT214702	KT214740
Ch. tectifimeti	CBS 142032		Dust, USA	KX976640	KX976737	KX976836	-	KX976982
Ch. telluricola	CBS 151.59		United Kingdom	KT214582	KT214613	KT214685	KT214723	KT214759
Ch. tenue	CBS 139.38			KT214568	KT214599	KT214669	KT214707	KT214745
	CBS 140.38			KT214570	KT214601	KT214671	KT214709	KT214747
Ch. umbonatum	CBS 293.83		Canada	KT214575	KT214606	KT214676	KT214714	KT214752
Ch. undulatulum	CBS 126775		Iran	HM365251	MH875675	KT214682	KT214720	HM365279
Ch. unguicola	CBS 128446		USA	KT214567	KT214598	KT214668	KT214706	KT214744
Collariella								
Col. bostrychodes	CBS 163.73	*Ch. bostrychodes*	Dung of antelope, East Africa	KX976641	KX976738	KX976837	-	KX976983
	CBS 586.83		Soil, Germany	KX976642	KX976739	KX976838	-	KX976984
Col. causiiformis	CBS 792.83	*Ch. causiiform*	Sweatband of helmet liner, Solomon Islands	KX976646	KX976741	KX976840	-	KX976988
Col. carteri	CBS 128.85		Air, British Columbia, Canada	KX976647	KX976742	KX976841	-	KX976989
Col. gracilis	CBS 146.60	*Ch. gracile*	Soil, Tsu, Mie, Japan	KX976648	KX976743	KX976842	-	KX976990
Col. quadrangulata	CBS 142.58	*Ch. quadrangulatum*	Soil, French Polynesia	KX976650	KX976745	KX976844	-	KX976992
	CBS 152.59		Dung of rabbit, Derbyshire, Chatsworth Park, England	KX976651	KX976746	KX976845	-	KX976993
Col. robusta	CBS 551.83	*Ch. robustum*	Litter, Portland Parish, Jamaica	KX976652	KX976747	KX976846	-	KX976994
Col. virescens	CBS 148.68	*Ch. virescens*	Agricultural soil, Lahore, Pakistan	KX976654	KX976749	KX976848	-	KX976996

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.12.2: Continued

Taxa	Voucher Number	Previous name	Locations	GenBank Number				
				ITS	LSU	rpb2	tef1	tub2
Corynascella								
Cor. humicola	CBS 337.72		Soil, Piedmont, North Carolina, USA	KX976656	KX976751	KX976850	-	KX976998
Cor. inaequalis	CBS 331.75	*T. inaequalis*	Soil, Kirovograd, Ukraine	KP204017	-	MK919363	KP204015	MK919420
Dichotomopilus								
D. dolichotrichus	CBS 162.48	*Ch. dolichotrichum*	Great Smoky Mts., USA	HM449049	HM449063	KX976852	KC485023	JF772462
D. erectus	CBS 140.56	*Ch. erectum*	Petroselinum sativum, USA	HM449044	HM449058	KX976854	KC485018	JF772458
D. funicola	CBS 159.52	*Ch. funicola*	Germany	GU563369	GU563354	KX976856	KC485013	JF772461
D. fusus	CBS 372.66	*Ch. fusum*	Leaf litter, Bataan, Costa Rica	KX976660	KX976754	KX976859	KM655466	KX977002
D. indicus	CGMCC 3.14184	*Ch. indicum*	Rhizosphere of Panax notoginseng, Yunnan, China	GU563367	GU563360	KX976861	KC485005	JF772453
D. pratensis	CBS 133396	*Ch. pratense*	Soil, Huangnan, Qinghai Province	GU563372	GU563357	KX976866	KC485017	JF772450
D. pseudoerectus	CBS 252.75		Air, Uttar Pradesh, India	KX976667	KX976761	KX976869	-	KX977009
D. pseudofunicola	CBS 142033		Dust, USA	KX976668	KX976762	KX976870	-	KX977010
D. ramosissimus	CGMCC 3.14183	*Ch. ramosissimum*	Rhizosphere of Panax Notoginseng, Yunnan, China	GU563371	GU563361	KX976871	KC485021	JF772452
D. reflexus	CBS 157.49	*Ch. reflexum*	Germinating seed, Toledo, Ohio, USA	HM449051	HM449055	KX976873	KC485027	JF772460
D. subfunicola	CGMCC 3.12892	*Ch. subfunicola*	Soil, Shihezi, Xinjiang Autonomous Region	JX867125	JX867125	KX976875	KC485014	JX867122
D. variostiolatus	CBS 179.84	*Ch. variostiolatum*	Tarpaulin, New Guinea	KX976672	KX976766	KX976879	-	KX977014
Humicola								
H. fuscoatra	CBS 118.14		Soil, Norway	KX976675	KX976769	KX976882	KM655463	KX977017
H. olivacea	CBS 142031		Dust, USA	KX976676	KX976770	KX976883	-	KX977018
Melanocarpus								
Me. albomyces	ATCC 16460		Chicken nest straw, Nevada, USA	KX976679	KX976773	KX976886	-	KX977021
Me. tardus	CBS 541.76		Cotton jacket, Switzerland	KX976681	KX976775	KX976888	-	KX977023
Myceliophthora								
My. lutea	CBS 145.77		Hay, Newmarket, UK	HQ871775	KM655351	HQ871816	HQ871722	KX977026
My. sepedonium	CBS 111.69	*T. sepedonium*	Soil, Allahabad, India	HQ871751	KX976777	HQ871827	HQ871734	KX977027

กรมวิทยาศาสตร์

Table 3.12.2: Continued

Taxa	Voucher Number	Previous name	Locations	GenBank Number				
				ITS	LSU	rpb2	tef1	tub2
Ovatospora								
O. brasiliensis	CBS 140.50	*Ch. brasiliense*	Moist jute cloth, Calcutta, India	KX976683	KX976781	KX976896	KM655468	KX977031
	M0224		*Citrus maxima*, Chaiyaphum, Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
O. medusarum	CBS 148.67	*Ch. medusarum*	Soil, Zaire	KX976684	KX976782	KX976897	-	KX977032
O. mollicella	CBS 583.83	*Ch. mollicellum*	Dung of spotted skunk, Washington, USA	KX976685	KX976783	KX976898	-	KX977033
O. pseudomollicella	CBS 251.75		Air, Uttar Pradesh, India	KX976686	KX976784	KX976899	-	KX977034
O. senegalensis	CBS 728.84	*Ch. senegalense*	Plant remains, Senegal	KX976687	KX976785	KX976900	-	KX977035
O. unipora	CBS 109.83	*Ch. uniporum*	Soil, Egypt	KX976689	KX976787	KX976902	-	KX977037
Subramaniula								
S. anamorphosa	CBS 137114	*Ch. anamorphosum*	Peritonitis of Homo sapiens, Kuwait	KP862598	KP970641	KP900667	KP900687	KP900704
S. asteroides	CBS 123294		Keratitis of Homo sapiens, USA	HQ906667	JX280731	KP900666	KP900686	KP900703
S. cristata	CBS 156.52	*Ch. cristatum*	Dung of rabbit, Virginia, USA	KX976690	KX976788	KX976903	KP900674	KX977038
S. cuniculorum	CBS 800.83	*Ch. cuniculorum*	Soil, Spain	KX976692	KX976790	KX976905	-	KX977040
S. fusispora	CBS 166.61	*Ch. fusisporum*	Adelaide, Australia	MH869571	NR160087	-	-	-
	CBS 199.84		Dung of marmot, Alberta, Canada	KP862601	KP970645	KP900653	KP900691	KP900707
S. flavipila	CBS 446.66	*Ch. irregulare*	Dead leaves, Bulgaria	KP862600	KP970647	KP900669	KP900689	KP900706
S. obscura	CBS 132916		Tinea pedis of Homo sapiens, Kuwait	KP862595	KP970653	KP900662	KP900681	KP900700
S. thielavioides	CBS 122.78		Dung of nilgai, Delhi Zoo, India	KP862597	KP970654	KP900670	KP900685	KP900708
Thielavia								
Hyalosphaerella fragilis	CBS 456.73	*T. fragilis*	Rhizosphere of Pennisetum	KX976693	KX976791	KX976907	-	KX977042
Parathielavia appendiculata	CBS 731.68	*T. appendiculata*	Dung of rabbit, Wales	KM655330	KM655369	KX976906	KM655460	KX977041
Pa. hyrcaniae	CBS 353.62	*T. hyrcaniae*	Sand dune soil, Iran	KM655329	KM655368	KX976908	KM655459	KX977043
Pa. kuwaitensis	CBS 945.72	*T. kuwaitensis*	Desert soil, Kuwait	KM655332	KM655371	KX976909	KM655462	KX977044
Pseudothielavia terricola	CBS 165.88	*T. terricola, Ch. terricola*	Barren soil, North Carolina, USA	KX976694	KX976792	KX976910	-	KX977045
Outgroup								
Microascus trigonosporus	CBS 218.31		USA	LM652443	HG380436	DQ470908	HG380359	LM652655

ศูนย์วิทยทรัพยากร

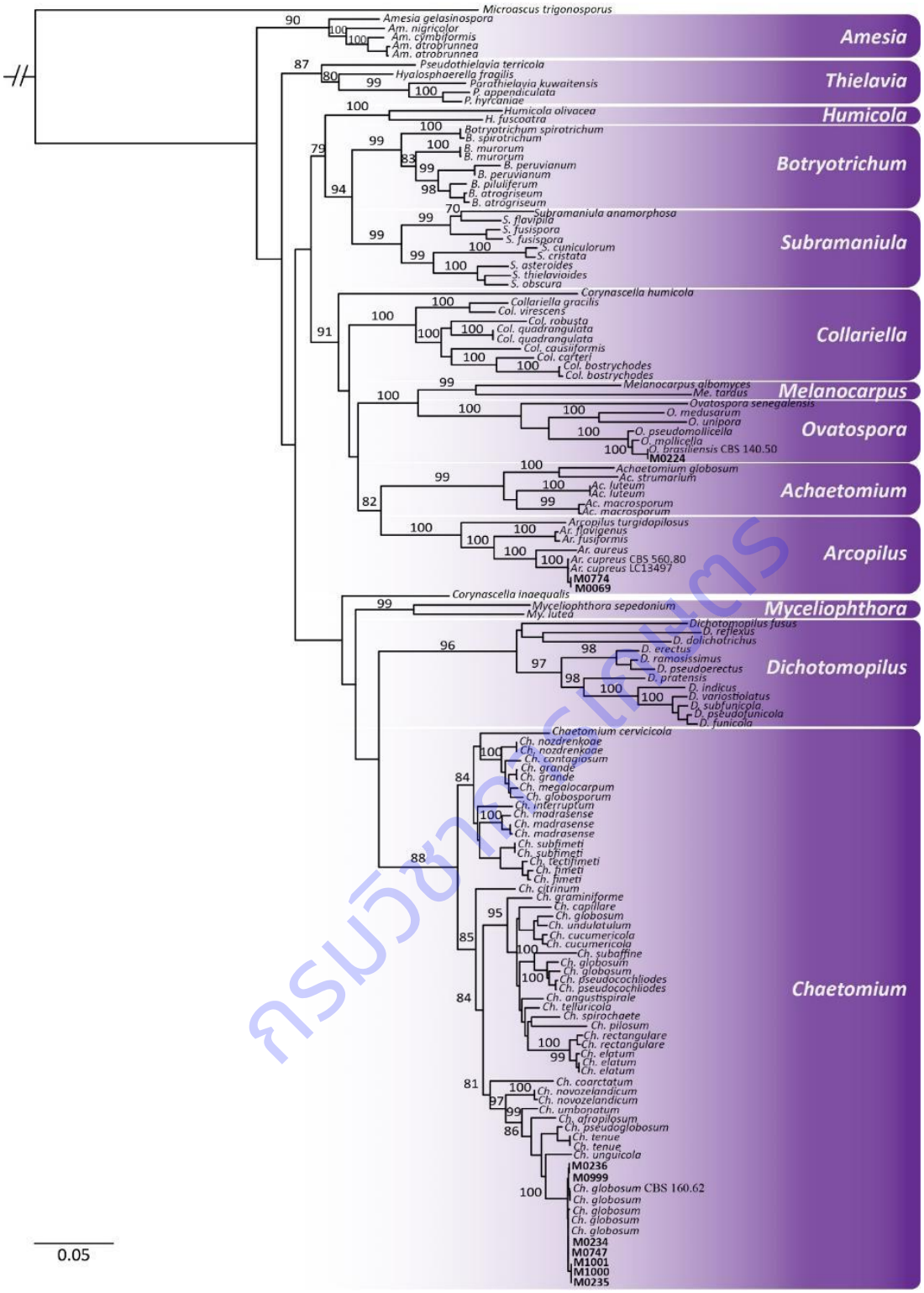


Figure 3.12.1: Phylogram obtained in a maximum likelihood search in RAxML of dataset of ITS-LSU-rpb2-TEF1-TUB2 gene regions. Bootstrap support values (≥70%) from 1,000 replicates above nodes.

กรมวิทยาศาสตร์

อนุกรมวิธานและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อรา *A. cupreus*, *Ch. globosum* และ *O. brasiliensis* มีดังนี้

Chaetomium cupreum L.M. Ames, Mycologia 41 (6): 642 (1949)

Synonymy:

≡*Chaetomium trilaterale var. cupreum* (L.M. Ames) J.C. Cooke, Mycologia 65 (5): 1218 (1973)

≡*Arcopilus cupreus* (L.M. Ames) X. Wei Wang & Samson, Studies in Mycology 84: 217 (2016)

Current Name: *Arcopilus cupreus* (L.M. Ames) X. Wei Wang & Samson, Studies in Mycology 84: 217 (2016)

Classification

Kingdom	*Fungi*
Phylum	*Ascomycota*
Subphylum	*Pezizomycotina*
Class	*Sordariomycetes*
Subclass	*Sordariomycetidae*
Order	*Sordariales*
Family	*Chaetomiaceae*
Genus	*Arcopilus*
Species	*cupreus*

ลักษณะของเชื้อ โคโลนีของเชื้อราและ ascomata มีชมพูถึงแดง ascomata รูปร่างคล้ายไข่ ขนาด 79.7-142.7 x 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 x 6.710.0 µm มี apical germ pore 1 รูอยู่ด้านบนสปอร์ (Figure 3.12.2)

Accession No.: M0069 และ M0774

หมายเหตุ - ชื่อวิทยาศาสตร์ปัจจุบันของ *Ch. cupreum* คือ *A. cupreus* (L.M. Ames) X. Wei Wang & Samson, Studies in Mycology 84: 217 (2016)

- การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

กรมวิชาการเกษตร

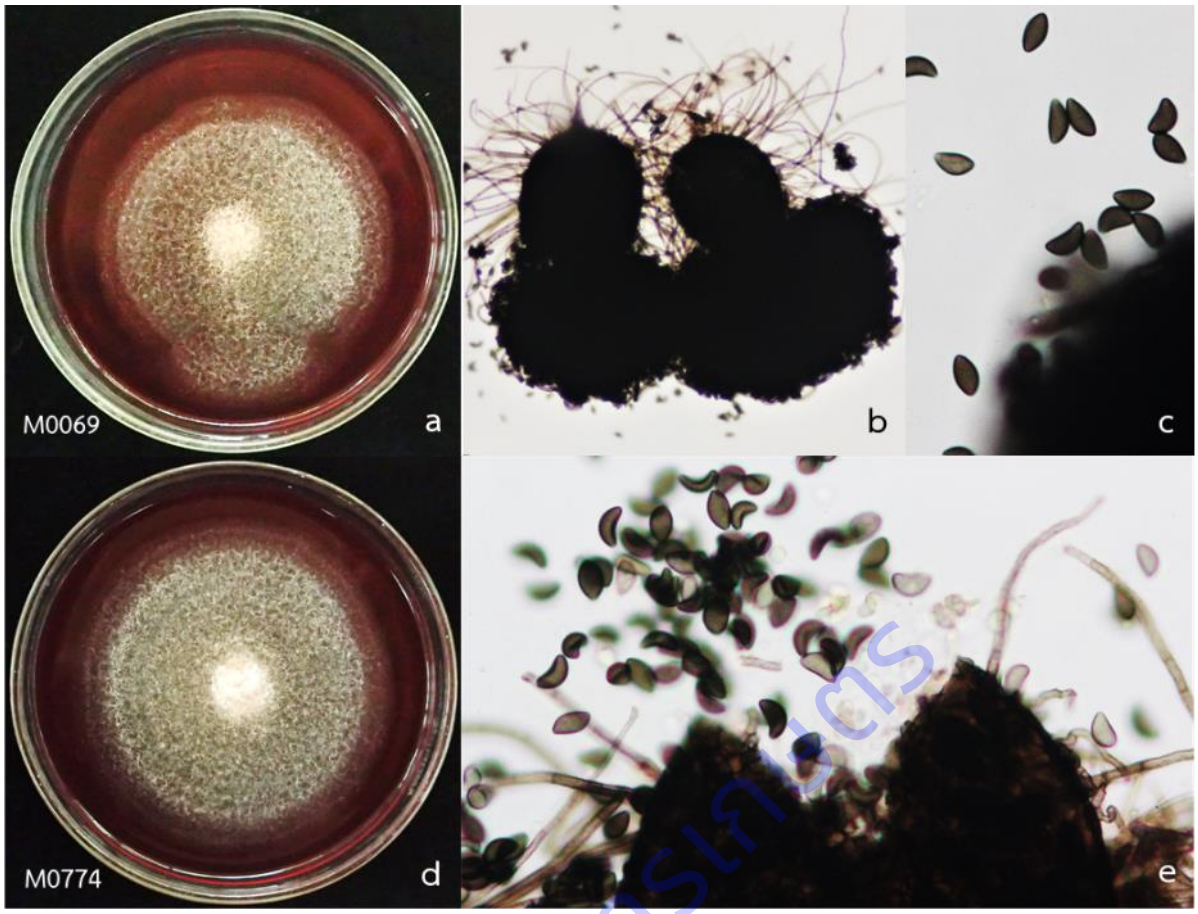


Figure 3.12.2: *Arcopilus cupreus* (syn. *Chaetomium cupreum*)

a, d. colonies of *A. cupreus* on PDA, presented the red pigment into media;

b. ascomata subglobose with brown walls (20x)

c, e. brown ascopsores

กรมวิทยาศาสตร์

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

>TTGTGGACGCTACCTTTTAACGTTGCTTCGGCGGGCGGCCCGCTCCCCTGGAAAGCCCCTGTGGCCGCCCGGGGCTGCGAGCCCCCCGGCCCCC
CTCGCGGGGGCGCCCGCCGGAGGATACCCAACTCTTGATTATTTTAGGCCTCTCTGAGTCTTCTGTACTGAATAAGTCAAAACTTTCAACAACGGAT
CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCATCAAGCCCCAGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTGCCGCAGGCCCTG
AAATCCAGTGGCGGGTTCGCTGTCACCCCGAGCGTAGTAGCAATATCTCGCTCAGGGCGTGCTGCGGGCACCGGCCGTTAAAAGCTGCCTTCTGGC
AACACCCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG

the translation elongation factor 1-alpha (EF1-α)

>GAGAAGGTTAGTCCTACAGTTCTATCTCTCTATTCTCATGATCTGGGAGTCCCCTCAGTCAGCATCGCATCACAAATTCCCTCCATCGCCGCATCA
TTTTCCGCCCATCTCCCGCATTTTCGCTGGGCCTGCCTTTGTGGCTCTACCCCTCCCTTATCAAGGCGGGGCAGAAAACCTGATAGCAATTTTTTTT
GTGGACCGCTTACCCCGCCCTTCCCATCCCCCGCCACATCTTAGGTGCCAAGACACAGGGCTGACAGCAGATCACAGGAAGCCGCTGAGCTCGGCA
AGGGCTCCTTCAAGTATGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATTGATATCGCCCTCTGGAAGTTCGAGACCC

CCCAGTACTATGTCACCGTCATCGGTACGTTTGCGGCCACTCCAGCGCGATGCCCCATAGCATCCTGTCTGGCGCACACGCTAACCAGTTGATTCT
TGCAGATGCCCCCGGCCATCG-TGACTTCATCAAGAACATGATCA

the Large Subunit (LSU, 28S)

>GGGCTCCGCCCTAGGCTTCGTCACTGACCTCCACGGCCGCCTACTCCTCAGGGCATCGTTTCTACCCTGAGGGCGGGGTATGGGTGGGACGCTTG
AGCGCCATCCATTTTCAGGGCTAGTACATTCGGCAGGTGAGTTGTTACACAGTCCTTAGCGGATTCCGACTTCCATGGCCACCGTCCTGCTGTCAA
GATGTACTAACGCCTTTTGTGGTGTCTGATGAGCGTCCACTCCGGCACCTTAACCCCGCGTTCGGTTCATCCCGCATCGCCAGTTCTGCTTACCAAA
AATGGCCCACTAGTGTTGGTACATTCGAATGCCCACGTTCAATTAAGTAACAAGGGCTTCTTACATATTTAAAGTTTGAGAATGGATGAAGGCTAAA
AAGCGCCCCCGAGTCCCTAATCATTCGCTTTACCTCATAAAACTGAAGACAACACTGCTATCCTGAGGGAAACTTCGGCGGTAACCAGCTACTAGA
TGGTTCGATTAGTCTTTCGCCCCCATGCTCAGATTTGACGATCGATTTGCACGTCAGAACCGCTGCGAGCCTCCACCAGAGTTTCCTCTGGCTTCAC
CCTATCCAAGCATAGTTCACCATCTTTCGGGTCCAAGGCTTAACGCTCCTACTCAAATCCATCCGAAAACATCAGGATCGGTCGATGATGCGCCGAA
GCTCTCACCTACGTTCACTTTCATTACGCGTGCGGGTTTTACACCCAAACACTCGCGCAAAACCTTGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTCG
CTGGTGACCATTACGCCAGCATCCTTGCAGATGCGCGAACCTCGGTCCCCGCGAGGGCATTGCACCCAGGGCTATAACACTCCCGGAGGAGCTACG
TTCCCTGGGCCTTTATCCCCCCGCGAGAACCGATGCTGGCCTGAGCCGGGCAGAGTGCACCGGTGAGAACACCGGATGATCAGCCCGGCGCAAGT
CTGGTCACAAGCGCTTCCCTTTCAACAATTTCACGTGCTATTTAACCCTCTTTTCAAAGTGCTTTTCATCTTTCGATCACTCTACTTGTGCGCTATCG
GTCTCTGGCCGGTATTTAGCTTTAGAAGAAATTTACCTCCCATTTTGAGCAGCATTCCCAAACTACTCGACTCGTCGAAGGAGCTTTACACAGGCTA
GGCATCCAACTATACGGGGCTCTCACCCTCTATGGCGCCCCGTTCCAGGGGACTCAGAAGGTGCCGCGCCTAAAGCTTCCTCTGCAAATTACAACT

partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2)

>TCGTCTCGCTGGTGCAGGGCCTGCGGAGGAAGAACGTCATCTCGTTTGAAGTCTCGCTGGTTCGGGACATTCGCGATCGCGAGTTCAAGATCTTC
TCGGATGCGGGACGCGTCATGCGGCCGCTCTTCACCGTGGAGCAGGAGGACAATGGTTCGAGTGGTGTGGAGAAGGGCCAGCTGATCCTCAACAA
GGAGCACATTCAGCGGCTCGAGGCGGACAAGGAGCTGGGCAAGTACCACCCCGACTACTGGGGCTGGAAAGGTCTCCTTAAGTCGGGGGCCATCG
AGTACCTGGATGCCGAGGAGGAAGAGACGGCCATGATCTGCATGACGCCCGAGGATCTCGACATGTACCGCCTGAGCAAGATGGGCTTCAGCGTC
GACGACCACTCTGGTCAAGGCAATAACCGGATCAGGACAAAGACGAACCCGACGACGCACATGTACACGCACTGCGAGATCCACCCCAGCATGCTG
CTCGGCATCTGCGCGAGCATCATTCCCTTCCCCGACCACAACCA

β-Tubulin 2 (TUB2)

>TTCTCTCCCCCCCGCATTCTTCGCCGCAGGGTCCAAGACGCGTCTGGGCTGCATTTTGGGGGCCCCTGAAATTACCCCACACACTGCGACGACCT
CCGGCTTCAGAGCCTCCCCGACCTACGCCCCGACCCGACACCCGCGATGACGCTGTTGGATGGATAGAAACGCGATGCTGACTAGTTCTTCGTGCT
ACAGGTCCACCTCCAGACCGGCCAATGCGTAAGTCGATTCGACTCGAGCTGTGCGACCGACCAGGTGATGCGGTGTACTGACACGCAGCTCTCCAG
GGTAACCAAATCGGTGCCGCCTTCTGGTATGTTTAACCTGCCGGATAATCCAACGTCGCGTCAGGAGGCATTCAAGATTAACTTCTCTACAGGCAG
ACCATCTCCGGCGAGCACGGCCTTGACAGCAATGGCGTGTATGTGACTGTCGCCAGTCCAACTTCGGTTAACCCCACGCTCACCGCCCTATTAGGT
ACAACGGCACCTCGGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGAACGTCTATTTCAACGAGGTGAGTTGTATTGCGAGGACCCGGGCTCAACAGTAGAGTTCTG
CTTGCTGACGGCATCTTTTCTGCAGGCCTCCGGCAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTCCTGGTCGATCTGGAGCCCGGCACCATGGACGCCGTCCG
CGCCGGCCCCTTCGGCCAG

Chaetomium globosum Kunze ex Fr., Systema Mycologicum 3: 255 (1829)

Synonymy:

≡*Chaetomium globosum* Kunze, Mykologische Hefte 1: 15, tab. 1, Figure 9 (1817)

=*Chaetomium globosum* var. *affine* Tschudy (?)

=*Chaetomium kunzeanum* var. *chlorina* Sacc. (?)

=*Chaetomium affine* Corda, Icones fungorum hucusque cognitorum 4: 37, tab. 8, Figure 101 (1840)

=*Chaetomium olivaceum* Cooke & Ellis, Grevillea 6 (39): 96 (1878)

=*Chaetomium kunzeanum* Zopf (1881)

=*Chaetomium spirale* Zopf, Nova Acta Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Germanicae Naturae Curiosorum 42 (5): 275 (1881)

=*Chaetomium cochlioides* Palliser (1910)

=*Chaetomium cochliodes* Palliser, North American Flora 3 (1): 61 (1910)

=*Chaetomidium barbatum* Traaen, Nytt Magazin for Naturvidenskapene 52: 19 (1914)

=*Chaetomium subterraneum* Swift & Povah, Mycologia 21 (4): 210 (1929)

=*Chaetomium ochraceum* Tschudy, American Journal of Botany 24: 472 (1937)

=*Chaetomium fibripilium* L.M. Ames, Mycologia 42 (5): 642 (1950)

=*Chaetomium mollipilium* L.M. Ames, Mycologia 42 (5): 644 (1950)

=*Chaetomium lusitanicum* M.R.M. Gomes, Estudos e Informação: 3 (1953)

=*Chaetomium subglobosum* Sergeeva, Not. syst. Pl. non-vasc.: 172 (1960)

=*Chaetomium rectum* Sergeeva, Not. syst. Pl. non-vasc.: 143 (1961)

=*Chaetomium spiculipilium* L.M. Ames, A monograph of the Chaetomiaceae: 37 (1963)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Sordariomycetes
Subclass	Sordariomycetidae
Order	Sordariales
Family	Chaetomiaceae
Genus	*Chaetomium*
Species	*globosum*

ลักษณะของเชื้อ โคโลนีของเชื้อรามีสีเขียวอ่อนถึงเขียวมะกอกเข้ม 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 3.12.3) 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)

Accession No.: M0234, M0235, M0236, M0747, M0999, M1000, M1001, C0501 และ C0502

ศรีนวิชาการเกษตร

หมายเหตุ - *Chaetomium globosum* เป็น species complex ประกอบไปด้วยอย่างน้อย 12 ชนิด (Wang *et al.*, 2016) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เชื้อรา *Ch. globosum* ที่ทำการศึกษาคือ *Ch. globosum sensu stricto* (true *Ch. globosum*)

- การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

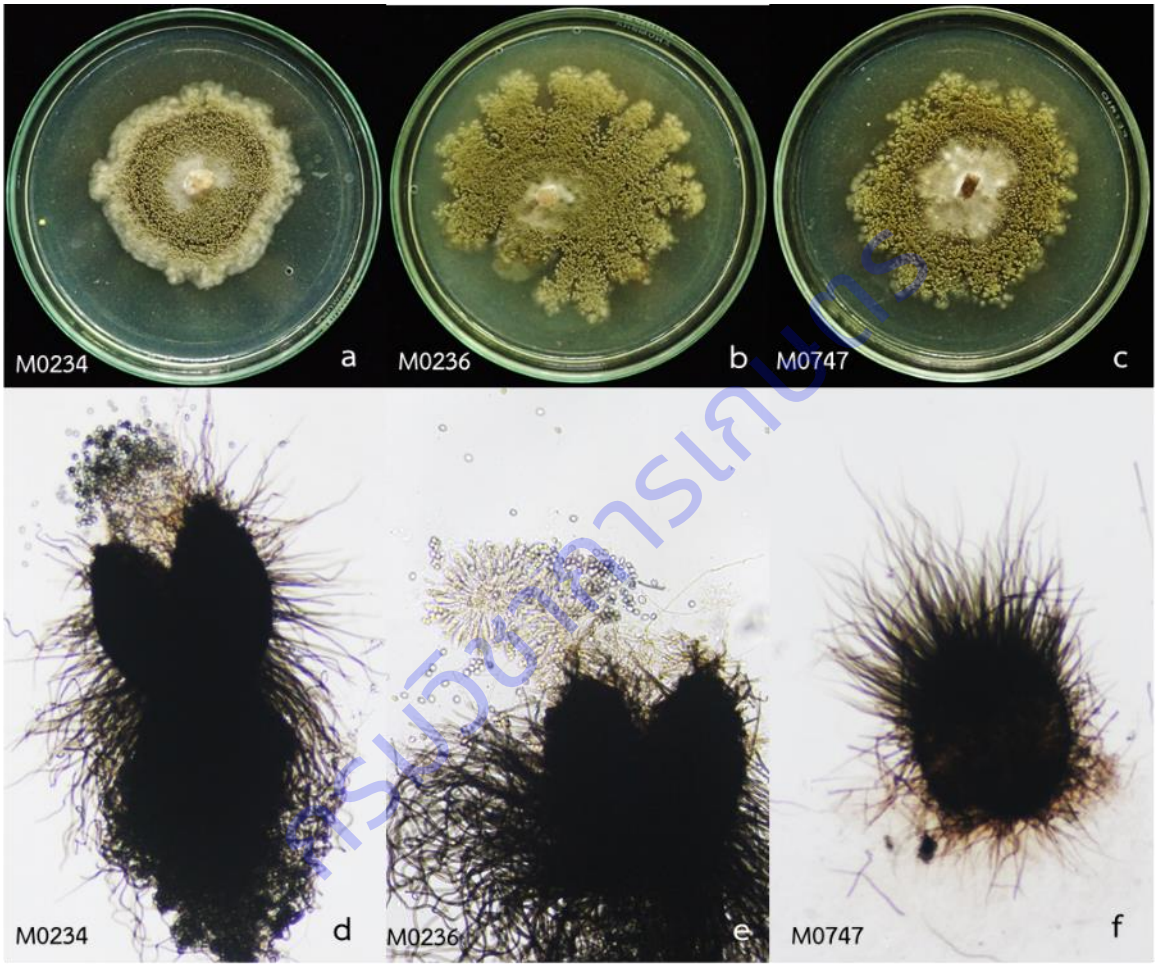


Figure 3.12.3: *Chaetomium globosum*

a-c. colonies of *Ch. globosum* on PDA;

d-f. ascomata superficial, slightly dark olivaceous buff or green (20x)

e. presented asci with 8 brown ascospores inside (20x)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

>CAGAGTTGCAAAACTCCCTAAACCATTGTGAACGTTACCTATACCGTTGCTTCGGCGGGCGGCCCCGGGGTTTACCCCCCGGGCGCCCCTGGGCC
CCACCGCGGGCGCCCGCCGGAGGTCACCAAACTCTTGATAATTTATGGCCTCTCTGAGTCTTCTGTACTGAATAAGTCAAAACTTTCAACAACGGAT
CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCATCAAGCCCCCGGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTGCCGCAGGCCCT
GAAAAGCAGTGGCGGGCTCGCTGTCGCACCGAGCGTAGTAGCATACATCTCGCTCTGGTCGCGCCGCGGGTTCCGGCCGTTAAACCACCTTTTAAC
CCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAGACCCGCTGAACT

the translation elongation factor 1-alpha (EF1-α)

>GATTGCGCTATTCTCATCATCGCCTCTGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCCTA
CACCCTGGGTGTCAAGCAGCTCATCGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCTGAGGCCCGCTACCAGGAGATCATCAAGGAGACCTC
CAACTTCATCAAGAAGGTCGGCTACAACCCCAAGTCCGTTGCCTTCGTCCCTATCTCCGGCTTCCACGGCGACAACATGCTTGAGCCCACCACCAA
CGCTCCTTGGTACAAGGGCTGGGAGAAGGAGGCCAAGGGGGGTGCCAAGGTCACTGGCAAGACCCTCCTCGAGGCCATCGACTCCATCGAGCCCC
CCAAGCGTCCTACCGACAAGCCGCTCCGTCTTCCCCTCCAGGATGTGTACAAGATCGGTGGTATCGGAACGGTCCCTGTCGGCCGTATCGAGACTG
GTATCCTGAAGCCCGGTATGGTCGTCACCTTCGCCCCTTCCAACGTCACCACGGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACCGAAG
GTGTTCCCGGCGACAACGTTGGTTTCAACGTCAAGAACGTCTCCGTCAAGGATATTCGCCGTGGCAACGTCGCTGGCGACTCCAAGAACGACCCGC
CCATGGGTGCTGCGTCGTTCGACGCTCAGGTCATTGTCCTGAACCACCCCGGCCAGGTCGGTGCTGGTTACGCCCCCGTCCTCGACTGCCACACGG
CCCACATTGCCTGCAAGTTCGCCGAGCTCCAGCAGAAGATCGATCGCCGTACCGGCAAGTCTGTTGAAGACTCGCCCAAGTTCATCAAGTCTGGCG
ATGCCGCCATCGTCAAGATGATCCCCTCCAAGCCCATGTGCGTTGAGT

the Large Subunit (LSU, 28S)

>GGGCTCCGCCCTAGGCTTCGTCACTGACCTCCACGGCCGCCTACTCCTCAGGGCATCGTTTCTACCCTGAGGGCGGGGTATGGGTGGGACGCTTG
AGCGCCATCCATTTTCAGGGCTAGTACATTCGGCAGGTGAGTTGTTACACAGTCCTTAGCGGATTCCGACTTCCATGGCCACCGTCCTGCTGTCAA
GATGTACTAACGCCTTTTGTGGTGTCTGATGAGCGTCCACTCCGGCACCTTAACCCCGCGTTCGGTTCATCCCGCATCGCCAGTTCTGCTTACCAAA
AATGGCCCACTAGTGTTGGTACATTCGAATGCCCACGTTCAATTAAGTAACAAGGGCTTCTTACATATTTAAAGTTTGAGAATGGATGAAGGCTAAA
AAGCGCCCCCGAGTCCCTAATCATTCGCTTTACCTCATAAAACTGAAGACAACACTGCTATCCTGAGGGAAACTTCGGCGGTAACCAGCTACTAGA
TGGTTCGATTAGTCTTTCGCCCCCATGCTCAGATTTGACGATCGATTTGCACGTCAGAACCGCTGCGAGCCTCCACCAGAGTTTCCTCTGGCTTCAC
CCTATCCAAGCATAGTTCACCATCTTTCGGGTCCAAGGCTTAACGCTCCTACTCAAATCCATCCGAAAACATCAGGATCGGTCGATGATGCGCCGAA
GCTCTCACCTACGTTCACTTTCATTACGCGTGCGGGTTTTACACCCAAACACTCGCGCAAAACCTTGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTCG
CTGGTGACCATTACGCCAGCATCCTTGCAGATGCGCGAACCTCGGTCCCCGCGAGGGCATTGCACCCAGGGCTATAACACTCCCGGAGGAGCTACG
TTCCCTGGGCCTTTATCCCCCCGCGAGAACCGATGCTGGCCTGAGCCGGGCAGAGTGCACCGGTGAGAACACCGGATGATCAGCCCGGCGCAAGT
CTGGTCACAAGCGCTTCCCTTTCAACAATTTCACGTGCTATTTAACCCTCTTTTCAAAGTGCTTTTCATCTTTCGATCACTCTACTTGTGCGCTATCG
GTCTCTGGCCGGTATTTAGCTTTAGAAGAAATTTACCTCCCATTTTGAGCAGCATTCCCAAACTACTCGACTCGTCGAAGGAGCTTTACACAGGCTA
GGCATCCAACTATACGGGGCTCTCACCCTCTATGGCGCCCCGTTCCAGGGGACTCAGAAGGTGCCGCGCCTAAAGCTTCCTCTGCAAATTACAACT

partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2)

>CGCTGGTTCAGGGGCTGCGGAGAAAGAACGTTATCTCGTTTGAGGTTTCGCTCGTTAGAGACATCCGCGACCGTGAGTTCAAGATCTTTTCAGAT
GCGGGTCGGGTGATGAGGCCGCTGTTCACGGTGGAGCAAGAACCGAATGGCGAGAGCGGCGCTGAGATGGGCGCACTGATCCTGAACAAGGATCA
TATTGGGCGCCTGAAGATGGACGCAGAGCTGGGCAAATACCACCCGGACTACTGGGGCTGGCAAGGCCTGTTGAAGTCGGGCGCTATTGAGTATCT
TGATGCTGAGGAGGAGGAGACGGTCATGATCTGCATGACCCCCCAGGATCTTGATCAGTTCCGTGCCCGCAAGATGGGAAGGATCGAGCCGGACA
ACTCCGGGTTGGGCAATAACCGGATCAAGACGAAACCAAATCCGACAACTCACATGTACACGCACTGCGAGATCCATCCGAGCATGCTCCTCGGCA
TCTGCGCAAGCATCATCCCCTTTCCTGATCATAACCAATCGCCCAGGAACACATACCAGTCCGCCATGGGCAAGCAGGCGATGGG

β-Tubulin 2 (TUB2)

>GGCCTCTGAACTACCCCACTCATCGGGACGACCCTCATTTCCACAGCTCCTGACGGATAGCAACACGACGATGATGCGAAGCTTGATGATGCTGA
CTGCTTTTTCGTACTATAGGTTCACCTCCAGACCGGCCAGTGCGTAAGTTGGACCGAATTGAACATTACGACCGACCGGCCGCGCAGGATAACTGA
CATGGAGCTCTCTAGGGTAACCAAATCGGTGCCGCTTTCTGGTACGTCCAAGCAAAGCAAACACTCTTGGCTGATGACAATCGAGACTGACTTCTTT
TCAGGCAGACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTCGACAGCAATGGCGTGTATGTGGGCATGACAGTTCCCAACCGATAAATCCCCGCTCACCGCTTCG

ATAGGTACAACGGCACCTCCGAGCTCCAGCTCGAGCGTATGAACGTGTACTTCAACGAGGTCAGTCGGGTCAAATAATTTTACACGACCGAGTGAT
GGCGTGCTCATAGTATTATACAGGCTTCCGGCAACAAGTATGTTCCTCGCGCTGTCCTCGTCGACTTGGAGCCCGGCACCATGGATGCCGTCCGTG
CCGGCCCCTTCGGCCAGCTCTTCCG

Ovatospora brasiliensis (Bat. & Pontual) X. Wei Wang & Samson, Studies in Mycology 84: 207 (2016)

Synonymy:

≡*Chaetomium brasiliense* Bat. & Pontual, Boletim da Secretaria de Agricultura Indústria e Comércio do Estado de Pernambuco 15: 70 (1948)

=*Chaetomium alba-arenulum* L.M. Ames, A monograph of the Chaetomiaceae: 10 (1963)

=*Chaetomium congoense* L.M. Ames, A monograph of the Chaetomiaceae: 18 (1963)

=*Chaetomium fuscum* Basu (?)

=*Chaetomium alba-avenulum* L.M. Ames (1963)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Sordariomycetes
Subclass	Sordariomycetidae
Order	Sordariales
Family	Chaetomiaceae
Genus	*Ovatospora*
Species	*brasiliensis*

ลักษณะของเชื้อ โคโลนีของเชื้อรามีเทาอ่อนถึงเทาเข้ม ascomata ลักษณะกลม หรือกลมแบนเล็กน้อย ความสูง 85-135 µm เส้นผ่าศูนย์กลาง 75-110 µm เริ่มแรก ascomata ไม่มีสี แต่สะท้อนต่อแสงได้ สปอร์อยู่เป็นกลุ่มบน ascomata ascomatal มีสีน้ำตาล เป็นแบบ septate (Figure 3.12.4) asci แบบ cylindrical ascospores มีสีน้ำตาลเขียว รูปร่างคล้ายไข่ ลักษณะ bilaterally flattened ขนาด (6.5 –)7 – 7.5(– 8) × (5.5–) 6–6.5(–7) × (4.5–)5–5.5(–6) µm มี apical germ pore 1 รูอยู่ด้านบนสปอร์ (Wang *et al.*, 2016)

Accession No.: M0224

หมายเหตุ - *Ovatospora brasiliensis* เป็น type species ของเชื้อราสกุล *Ovatospora* แต่เดิมเชื้อราชนิดนี้เคยจำแนกเป็น *Ch. brasiliensis*

- การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

กรมวิชาการเกษตร

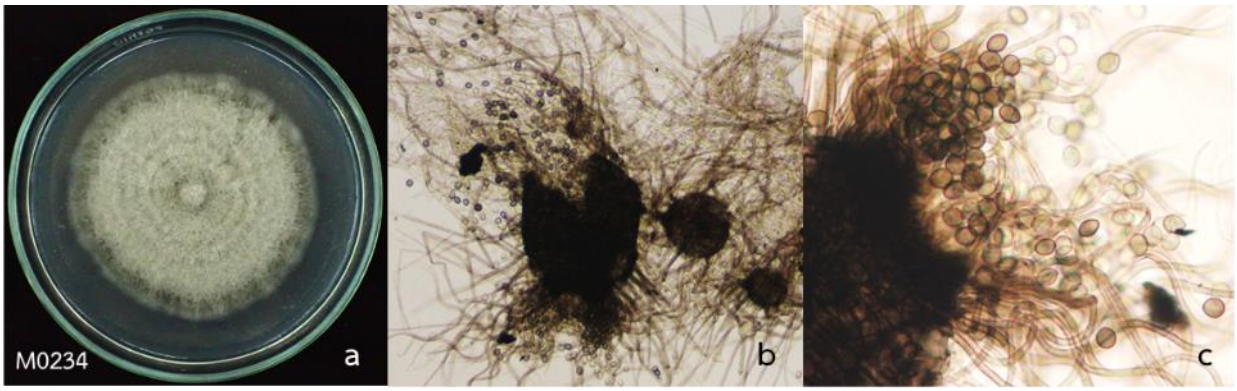


Figure 3.12.4: *Ovatospora brasiliensis* (syn. *Chaetomium brasiliensis*)

a. colonies of *O. brasiliensis* on PDA;

b. ascomata pale olivaceous grey to mouse grey (10x)

c. ascospores olivaceous brown when mature, ovate (40x)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

>AAAGAGTTGCAAAACTCCCTAAACCATTGTGAACCTACCTTCAACCGTTGCTTCGGCGGGTTGGCACCGGGTCTCCCGGCGCCCCCGGCCCCCTC
GCGGGGCGGCCCGCCGGAGGTACCTAACTCTTGAACATTGTATGGCCTCTCTGAGTCTTCTGTACTGAATAAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCT
CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG
CCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCATCAAGCCCCGGGCTTGTGTTGGGGACCTGCGGCTGCCGCAGGCCCTGA
AATGCAGTGGCGGGCTCGCTGTCACACCGAGCGTAGTAGCATTATCTCGCTCTGGGCGTGCTGCGTGTCCCGGCCGTAAAACGACCTTACACCCAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAGACCCGCTGAAC

the translation elongation factor 1-alpha (EF1-α)

>GGCCGACTGCGCCATTCTCATCATTGCCGCTGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCG
CCTACACCCTCGGTGTGAAGCAGCTCATCGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCCGAGGACCGCTACAACGAGATCATCAAGGAGA
CCTCCAACTTCATCAAGAAGGTCGGCTACAACCCCAAGGCTGTTGCCTTCGTCCCCATCTCGGGTTTCCATGGCGACAACATGCTTGAGCCCACTA
CCAACGCTCCCTGGTACAAGGGCTGGTCCCGCGAGAGCGGCTCCAACAAGTTCTCCGGCAAGACCCTCCTTGAGGCCATCGACTCGATCGAGCCCC
CCAAGCGTCCCACCGACAAGCCCCTCCGTCTTCCCCTCCAGGACGTGTACAAGATTGGCGGTATCGGCACTGTCCCCGTCGGCCGTATCGAGACTG
GTGTCCTCAAGCCCGGCATGGTTGTCACCTTCGCTCCCTCCAACGTCACCACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAG

the Large Subunit (LSU, 28S)

>ATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCTCGGCCC
GAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTAGGCGCGGCTCCTTCTGAGTGCCCTGGAACGGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCCGTATAGTTGGAAGC
CTAGCCTGTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAAATGGGAGGTAAATTTCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAG
ACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAATAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGA
CCAGACTTGCGCCGGGCTGATCATCCGGAGTTCTCTCCGGTGCACTCTGCCCGGCTCAGGCCAGCATCGGTTCTCGCGGGGGGATAAAGGCCTCG
GGAACGTAGCTCCTCCGGGAGTGTTATAGCCCGGGGCGTAATGCCCTCGCGGGGACCGAGGTTCGCGCATCTGC

กรมวิชาการเกษตร

partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2)

>CGTCTCGCTTGTCCAGAACCTTCGCCGGAAGAACGTCATTTCCTTCGAGGTTTCGCTGGTCCGCGATATCCGCGATCGCGAGTTCAAGATTTTCTC
GGACGCTGGGCGCGTGATGAGGCCGCTCTACACCGTGGAGCAGGAAGAGAATGGCGAGAACGACGTCGAGAAGGGCCAGCTCATCCTCACCAAGA
AGCACATCGAGAACCTGGAGCGGGACAAGGAGCTCGGCAAATACCACCCCGATTACTGGGGTTGGCCAGGCCTCCTGAGATCGGGTGCCATTGAG
TACCTCGATGCCGAGGAGGAAGAGACGGCCATGATCTGCATGACCCCAGAGGATCTCGACATGTACCGGCTTGCCAAACTAGGCTTCTCCGTCTCG
GACAACTCTGGAGTGGGCAACAACCGGATCAGGACCAAGATGAATCCGACAACTCACATGTACACACACTGTGAGATTCACCCCAGCATGTTGCTC
GGTATCTGTGCGAGCATTATTCCTTTCCCCGACCACAACCA

β-Tubulin 2 (TUB2)

>CGCGTCGGGGAAGCTACTTTTTTTTCTCGGTTCCCCTGGATCTACCCCACACTCTCGGGATGTGGCCGTTCCACACCCGACCTTCCTGACCGACA
GTCGAAGGGCGACGGCACCGCGTCGACGACGCGAAGAGGCATGATGCTGACTTTACTTTCTCTCTACAGGTTCACCTCCAGACCGGCCAATGCGTA
AGTGGACGAACATCGCCACGGGCGAACGATGGCGTGGTGATGGGGTGGACTGACATTGAGCTTTCCAGGGTAACCAAATTGGTGCCGCCTTTTGGT
ATGTTTGGAATCCGGAAATCAAGATCCGTTTGATCCAAGGTCATCGAGACTGACTCTCCATTACAGGCAGACCATCTCCGGCGAGCACGGCCTCGA
TAGCAACGGCGTGTATGTGACTGTCGCGATCCCCGACTCGGTTATTCCCTCGCTCACCACCGCCACAGGTACAATGGAACCTCTGAGCTCCAGCTC
GAGCGCATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGAGTGGGATTGAATACATACCGACGAGATTTTGATGGGAGGGTGTTTACTGACCGCCACTCCGCTCC
AGGCTTCCGGCAACAAGTATGTCCCTCGCGCCGTCCTGGTCGACTTGGAGCCCGGCACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGCCCCTTCGGCCAGC

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้ได้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อรา *Arcopilus cupreus* (syn. *Chaetomium. cupreum*) และ *Chaetomium globosum* และยังได้ไอโซลทของเชื้อรา *Ovatospora brasiliensis* (syn. *Chaetomium brasiliensis*) เพิ่มเติม โดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดจำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ the Internal Transcribed Spacer (ITS), the translation elongation factor 1-alpha (EF1-**α**), the Large Subunit (LSU, 28S), Partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2) และ β-Tubulin 2 (TUB2) เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการตรวจสอบชนิดของเชื้อรา ตรวจสอบความถูกต้องของชนิดเชื้อรา *Chaetomium* ที่มีการขอขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์กับกรมวิชาการเกษตร ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ใช้สารชีวภัณฑ์เชื้อรา *Chaetomium* โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเกษตรกร อีกทั้งข้อมูลลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) ที่ได้จากการศึกษาเป็นประโยชน์ทางการศึกษาในหน่วยงานราชการ เช่น กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สถาบันการศึกษา และหน่วยงานเอกชน โดยสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อศึกษาความหลากหลายและวิวัฒนาการของเชื้อรา *Chaetomium* ในประเทศไทย รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลและองค์ความรู้เพื่อใช้ในการต่อยอดงานวิจัยวิจัย เช่น การออกแบบไพร์เมอร์จำเพาะเพื่อการตรวจสอบชนิดที่แม่นยำและรวดเร็ว

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานของเชื้อรา *Arcopilus cupreus* (syn. *Chaetomium. cupreum*) และ *Chaetomium globosum* เพื่อใช้เปรียบเทียบและตรวจสอบความถูกต้องของชนิดเชื้อราในสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์กับกรมวิชาการเกษตร โดยจะช่วยลดความเสี่ยงในการใช้ชนิดของสารชีวภัณฑ์ที่ไม่ถูกต้องหรือไม่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผลประสิทธิภาพและความยั่งยืนของการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช

กรมวิชาการเกษตร

2. สามารถเผยแพร่ผลงานวิจัยในรายงานประจำปีของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รวมถึงงานประชุมวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3.13 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกแมงมุมวงศ์ Salticidae

DNA Barcoding for Identification Spider Fauna in Family Salticidae

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	วิมลวรรณ โชติวงศ์	สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	กาญจนา วาระวิชะนี	สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
	พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์	สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
	พลอยชมพู กรวิภาสเรือง	สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
	อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล	สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
	อทิติยา แก้วประดิษฐ์	สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

แมงมุมวงศ์ Salticidae หรือแมงมุมกระโดด (jumping spider) เป็นแมงมุมขนาดเล็กถึงขนาดกลาง และมีระบบสายตาดีที่สุดในบรรดาแมงมุมทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีจำนวนชนิดและปริมาณมากที่สุด เป็นแมงมุมที่ท่องเที่ยวโดยไม่มีจุดหมายที่แน่นอน ไม่สร้างเส้นใย มีลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยา พฤติกรรม และความสัมพันธ์เชิงนิเวศที่มีความหลากหลาย พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและในพืชเศรษฐกิจ เนื่องจากมีรูปร่างทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายและคล้ายคลึงกัน ตลอดจนมีลักษณะโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ที่คล้ายกันหรือเหมือนกัน ทำให้ยากต่อการจำแนกชนิดแมงมุมโดยวิธีสัณฐานวิทยา ดังนั้นการใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดช่วยในการวินิจฉัยชนิด ทำให้ได้ผลที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือ การใช้ลักษณะทางพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอบาร์โค้ด จำแนกและยืนยันชนิดแมงมุมวงศ์ Salticidae โดยเก็บตัวอย่างแมงมุมกระโดดจากทุกภูมิภาคของประเทศไทย และสกัด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง COX1 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบบนฐานข้อมูล GenBank (standard nucleotide BLAST) พบแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae จำนวน 6 สกุล 8 ชนิด ได้แก่ *Myrmaplata plataleoides, Plexippus paykulli, Plexippus petersi, Phintella vittata, Phintelloides versicolor, Telamonia dimidiata, Telamonia festiva* และ *Thiania bhamoensis* และจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อช่วยยืนยันการจำแนกแมงมุมวงศ์ Salticidaeโดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของตำแหน่ง *COX*1 จาก 60 ตัวอย่าง ได้แก่ *Myrmaraplata plataleoides* จำนวน 15 ตัวอย่าง *Plexippus paykulli* จำนวน 10 ตัวอย่าง *Plexippus petersi* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Phintella vittata* จำนวน 20 ตัวอย่าง *Phintelloides versicolor* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia dimidiata* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia festiva* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *Thiania bhamoensis* จำนวน 8 ตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์ด้วย Neighbor Joining และ Maximum Likelihood พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกันโดยแต่ละสกุลมีการแยกออกจากกันอย่างชัดเจน และความสัมพันธ์ภายในแต่ละกลุ่มมีลักษณะเป็น monophyletic ในขณะที่กลุ่มของ *Telamonia* ยังไม่สามารถแยกออกมาจากกลุ่มเดียวกันอย่างชัดเจน หากต้องการศึกษาการ

กรมวิชาการเกษตร

แบ่งกลุ่มที่ชัดเจนมากขึ้นจะต้องใช้จำนวนยีนที่มาศึกษาเพิ่มเติมมากขึ้น ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าแมงมุมกระโดดแต่ละสกุลมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถทราบข้อมูลเบื้องต้นของจำนวนชนิดของ แมงมุมวงศ์ Salticidae ในประเทศไทย แต่การจำแนกชนิด ต้องมีการศึกษาต่อไปโดยเพิ่มข้อมูลของยีนตำแหน่งอื่นมาร่วมวิเคราะห์

Spider family Salticidae or jumping spider is wandering spider and diverse body forms, behaviors and ecological relationships. They are common found in the nature and economic crops. Unfortunately, species of this genus are difficult to identify using morphology. Molecular diagnostic tools provide valuable support for the rapid and accurate identification of morphologically indistinct salticids species. DNA barcoding of the mitochondrial Cytochrome Oxidase I (COX1) gene could be employed to increase the accuracy of Spider Family Salticidae identifications. The samples were collected from all regions of Thailand. A 652 -bp portion of COX1 was sequenced from 60 spider specimens. Sequences were analysed using a 'barcode' approach and also phylogenetic analysis. Species were identified using standard nucleotide BLAST from GENBANK. BLAST sequence similarity searches of GenBank showed 99-100% similarity to each other / GENBANK sequences for 6 genus 8 species of the Salticidae spiders; Myrmaplata plataleoides, Plexippus paykulli, Plexippus petersi, Phintella vittata, Phintelloides versicolor, Telamonia dimidiata, Telamonia festiva and Thiania bhamoensis species were found. Phylogenetic analyses (Neighbor Joining and Maximum Likelihood) of the sequences gave consistent results. Neighbor-joining distance and Maximum Likelihood analyses were used to investigate patterns of clustering of the salticids spiders sequences with outgroup. Cox1 proved effective in resolving each genus clearly separated meanwhile Telamonia groups were not clearly distinguished from the same group.. This study provides basic information on the number of species of spider family Salticidae present in Thailand. However, an understanding of the classification within the salticids group will requires further study making use of additional genes, including the potentially informative ITS and ribosomal RNA.

คำนำ

แมงมุมกระโดด (jumping spider) เป็นแมงมุมที่อยู่ในวงศ์ Salticidae นับว่าเป็นแมงมุมที่มีขนาดเล็กและมีระบบสายตาดีที่สุดในบรรดาแมงมุมทั้งหมด ลักษณะเด่นคือตากลางคู่หน้ามีขนาดใหญ่มากและมีตาข้างขนาดเล็ก 3 คู่ ทำให้สามารถมองเห็นได้รอบทิศ มีความหลากหลายทางด้านสัณฐานวิทยาและพฤติกรรมอย่างมาก เป็นตัวห้ำที่ออกหากินในเวลากลางวันโดยการสะกดรอยตามและตะครุบเหยื่อ (Foelix, 1996) สามารถพบได้ทั่วไปในพืชเศรษฐกิจต่างๆ ตามต้นไม้ บนหญ้า และพื้นดิน และมีบทบาทสำคัญในการช่วยควบคุมประชากรแมลงศัตรูพืช

ศรีวิชัยการเกษตร

หลายๆ ชนิด เช่น *Zeuxippus* sp. นิสัยว่องไว จับเหยื่อกินโดยตรง ได้แก่ แมลงวัน ด้วง และผีเสื้อหนอนกอข้าว ซึ่งพบทั่วไปในนาข้าว นอกจากนี้วิภาดา (2539) รายงานว่า *Lyssomanes* sp. พบจับเหยื่อที่บริเวณใบกล้วยไม้, *Myrmarachne plataleoides* จากการศึกษาพบว่าสามารถกินแมลงวัน มวน และตัวอ่อนของมด, *Heliophanus* sp. หากินในเวลากลางวันบริเวณใบกล้วยไม้ พบว่าสามารถกินผีเสื้อ และเพลี้ยจักจั่น, *Evarcha flavocincta* หากินบริเวณใบกล้วยไม้ในเวลากลางวัน พบว่าสามารถกินผีเสื้อ และแมลงวันผลไม้, *Evarcha* sp. พบว่าสามารถกินผีเสื้อ และแมลงวันผลไม้ ปัจจุบันทั่วโลกพบทั้งสิ้น 658 สกุล 6,356 ชนิด (NMBE, 2021) โดยในแถบทวีปเอเชีย เช่นในประเทศจีนพบแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae จำแนกได้ 70 สกุล 281 ชนิด (Song *et al*., 1999) ประเทศญี่ปุ่นจำแนกได้ 41 สกุล 92 ชนิด (Ono, 2009) ในสิงค์โปร์ จำแนกได้ 45 สกุล 78 ชนิด (Koh, 1989, Song *et al*., 2002 และ Zhang *et al*., 2003)

ไม่นานมานี้มีการศึกษาแมงมุมกระโดดในประเทศไทย ได้แก่ Benjamin (2004, 2010) Logunov and Hereward (2006) Logunov and Azarkina (2007) Chotwong and Tanikawa (2013) Yamasaki and Ahmad (2013) Logunov and Marusik (2014) และ Żabka and Gardziński (2017) สำหรับในประเทศไทยพบแมงมุมกระโดด 42 ชนิด (Azarkina, 2019)

งานวิจัยด้านวิวัฒนาการแมงมุมกระโดดในสมัยก่อนได้แบ่งออกเป็น 3 สาย ได้แก่ Lyssomanines, Spartaeines และ Salticids โดย Lyssomanines, Spartaeines เป็นกลุ่มที่มีวิวัฒนาต่ำ สำหรับ Salticids จัดเป็นกลุ่มที่มีวิวัฒนาการสูง (Wanless, 1980, 1984; Maddison, 1988) ซึ่งลักษณะทาง monophyletic (สายวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษร่วมกัน) ของกลุ่ม Lyssomanines ยังไม่แน่ชัด ดังนั้นสมาชิกส่วนใหญ่ประมาณ 90% จึงตกไปอยู่กลุ่มของ Salticids ซึ่งกลุ่มนี้ได้จัดขึ้นเป็น new taxon ชื่อว่า Salticoida ต่อมาได้มีการถกเถียงถึงการตั้งเป็น subfamily ซึ่งยังหาข้อสรุปไม่ได้ นอกจากนี้ยังมีอีกหลายชนิดที่ยังหาข้อสรุปไม่ได้ โดยในแต่ละกลุ่มสายวิวัฒนาการจะมีลักษณะโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ตลอดจนสีสันบนลำตัวที่คล้ายกันหรือเหมือนกัน

การจำแนกชนิดแมงมุมโดยใช้วิธีสัณฐานวิทยานั้นจะศึกษาแมงมุมระยะที่เป็นตัวเต็มวัยเท่านั้นและมักใช้เวลานาน ส่วนมากแมงมุมที่พบมักจะอยู่ในระยะตัวอ่อนทำให้มีปัญหาในการจำแนกเนื่องจากอวัยวะเพศยังพัฒนาการไม่สมบูรณ์ทำให้วินิจฉัยชนิดผิด และแมงมุมบางกลุ่มจะมีลักษณะที่ตัวผู้และตัวเมียมีขนาดรูปร่างที่แตกต่างกันทำให้ขาดข้อมูลในการวินิจฉัยชนิด ซึ่ง Platnick (2009) รายงานว่า ตัวอย่างแมงมุมที่ได้จากการจัดจำแนก 46% พบเพียงแค่เพศเดียวเท่านั้น และอีก 1.5% เป็นแมงมุมที่อยู่ในระยะตัวอ่อนโดยอาจจะเป็นแมงมุมที่เป็นชนิดใหม่ (new species) แต่การจำแนกโดยใช้ DNA barcoding สามารถการจำแนกชนิดแมงมุมในระยะตัวอ่อนได้ด้วย

ดังนั้นการใช้ DNA Barcoding จึงเป็นงานวิจัยพื้นฐานที่สำคัญ ทำให้ทราบถึงชนิดและเขตการแพร่กระจายของแมงมุมที่เป็นข้อมูลล่าสุดที่มีความถูกต้องและทันสมัย อีกทั้งยังเป็นข้อมูลที่ต่างประเทศยอมรับกันทั่วโลกนอกจากนี้ยังเป็นการรวบรวมและเก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุมของกรมวิชาการเกษตร เพื่อใช้เป็นแหล่งอ้างอิง สืบค้น ตามหลักมาตรฐานสากล

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- อุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง หลอดแก้วทดลอง ขวดดองตัวอย่างแมงมุมขนาดต่างๆ กัน กล่องพลาสติกใสขนาดต่างๆ กัน กระดาษทิชชู่ ปากคีบ พู่กัน ถุงพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ กัน สารเคมี ได้แก่ alcohol 95%, ethyl acetate

- อุปกรณ์ในการจำแนกชนิด ได้แก่ lactic acid, 10% KOH, จานแก้ว petridish, ซิลิกาเจลสีขาว สำหรับใช้ใน 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 Protinase K Solution (0.3g/ml)

- สารเคมี และ primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

วิธีการ

1.การเก็บตัวอย่าง (ดำเนินการปี 2560-2562)

วิธีดำเนินการวิจัยในการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนและตัวเต็มวัยแมงมุมกระโดดเพื่อนำมาศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

- การศึกษาครั้งนี้มีแผนการปฏิบัติการเก็บตัวอย่างแมงมุมกระโดดจากพื้นที่แปลงมันสำปะหลัง สวนชมพู่ แปลงเกษตรกร และป่า ในประเทศไทย โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างหลายวิธีการดังนี้

- การมองหาและจับโดยตรง (visual search) วิธีนี้เหมาะสำหรับจับแมงมุมทุกเวลาและสถานที่ จับแมงมุมโดยใช้หลอดทดลอง ฆ่าแมงมุมโดยใส่ก้อนสำลีในกล่องพลาสติกที่เลี้ยงแมงมุมหยด เอทิลอะซิเตต 2 – 3 หยด ลงบนก้อนสำลีเพื่อทำให้แมงมุมสลบ ดองแมงมุมในขวดที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75 % เพื่อเก็บรักษาตัวอย่างและนำไปจำแนกชนิดต่อไป

- การใช้ Beating tray โดยเขย่ากิ่งไม้ที่มีขนาดเล็กลงบนตัวถาดสำหรับรองรับแมงมุมจากนั้นแมงมุมจะตกลงในถาด โดยถาดที่ใช้ทำมาจากผ้าดิบสีขาว รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 80 x 80 ซม โดยนำไม้ไผ่ หรือท่ออลูมิเนียม ทำเป็นโครงรูปกากบาท นอกจากผ้าดิบที่นำมาทำถาดแล้วอาจจะใช้ร่มแทน ฆ่าและรักษาตัวอย่างแมงมุมดังข้อ 1

- การใช้สวิงโฉบ (Sweep net) ใช้สวิงจับแมลงโฉบแมงมุมที่อาศัยตามวัชพืช แมงมุมจะติดในสวิงจากนั้นเทแมงมุมบนกระดาษขาวที่ปูบนพื้นดิน ใช้หลอดแก้วค่อย ๆ จับแมงมุมใส่ในหลอดแก้วที่เตรียมไว้ ฆ่าและเก็บตัวอย่างแมงมุมเพื่อนำไปรักษาตัวอย่างดังข้อ 1

1.1 นำตัวอย่างที่ได้มาฆ่าด้วยขวดน็อคแมลงที่บรรจุด้วยสารเอทิลอะซิเตต จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมในหลอดแก้วที่บรรจุแอลกอฮอล์ 95% เพื่อนำไปศึกษาดีเอ็นเอ สำหรับตัวอย่างที่ต้องการเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ให้เก็บรักษาในหลอดแก้วที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75%

1.2 บันทึกชื่อแมงมุม วันที่จับ สถานที่จับ ชื่อผู้เก็บ ลงในป้ายกระดาษขาวแผ่นเล็ก ๆ แล้วใส่ลงใน

กรมวิชาการเกษตร

หลอดแก้วที่ดองแมงมุม

1.3 เก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมที่ศึกษาดีเอ็นเอไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอและนำไปใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน (ดำเนินการปี 2560-2562)

- วิธีการเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างออกจากขวดจากนั้นโดยใช้พู่กัน forceps และ needles ยืดขาแมงมุมให้กางออกให้ตรง จากนั้นนำตัวอย่างมาวางไว้ในจาน petridish ที่มีทรายวิทยาศาสตร์สีขาวที่ถูกแช่ด้วยแอลกอฮอล์ให้เต็ม นำไปตั้งไว้ใต้กล้อง Olympus SZH-ILLD stereomicroscope สำหรับ epigynum (อวัยวะเพศเมีย) จะใช้ needles เจาะรอบๆ epigynum จากนั้นจึงดึงออกมาแล้วแล้วนำไปแช่ใน proteinase K ประมาณ 2-3 ชั่วโมง เพื่อกำจัดเนื้อเยื่อส่วนที่ไม่ต้องการออกไป แล้วจึงนำไปล้างในน้ำสะอาด เมื่อจำแนกชนิดเสร็จแล้วจึงนำไปใส่ในสไลด์หลุมแล้วปิดด้วย cover slip แล้วนำไปแช่ในขวดตัวอย่างเดิม ส่วน pedipalps (อวัยวะเพศผู้) จะถูกดึงออกทางด้านซ้าย จากนั้นจึงแล้วนำไปต้มด้วย 10% KOH ที่อุณหภูมิ 60 0C ประมาณ 5-10 นาที จนกระทั่ง pedipalp ขยายออก จึงนำไปศึกษาดูรายละเอียดใต้กล้อง stereomicroscope เมื่อจำแนกชนิดเสร็จแล้วจะนำ pedipalps (อวัยวะเพศผู้) ใส่ใน tube ขนาดเล็กแล้วนำไปแช่ในขวดตัวอย่างเดิม

- การจำแนกชนิด

นำตัวอย่างแมงมุม epigynum (อวัยวะเพศเมีย) และ pedipalps (อวัยวะเพศผู้) มาเปรียบเทียบจากตำราต่างๆ โดยเฉพาะจากเอกสารเกี่ยวกับการศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในแถบทวีปเอเชีย เช่น เช่น The Spiders of China (Song et al., 1999), The Spiders of Japan (Ono, 2009) และ Six new and one newly recorded species of salticidae (Arachnida: Araneae) from Singapore and Malaysia (Zhang et al., 2003), Chinese spiders illustrated (Zhang, 2017), Salticidae of Thailand. Part 1, genera Plexippus C. L. Koch, 1846 and Burmattus Prószyński, 1992.(Żabka and Gardzińska 2017) และ Borneo spiders (Koh and Bay 2019) โดยใช้รูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความยาวของขา การจัดเรียงของตา และแหล่งที่อยู่อาศัย ในการจำแนก จากนั้นบรรยายลักษณะทางอนุกรมวิธาน และทำคู่มือการจัดจำแนกชนิด (key) เพื่อใช้เป็นแนวทางในการจำแนก ถ่ายรูปแมงมุมและอวัยวะเพศของแมงมุม เก็บและรักษาตัวอย่างแมงมุมไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาอารักขาพืช

3. การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (ดำเนินการปี 2562-2563)

3.1 นำตัวอย่างแมงมุมกระโดดที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มาทำการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) โดยใช้วิธีการตามคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit; Favorgen, Taiwan) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัท โดยใช้คีมคีบดึงขาด้านขวาของแมงมุมจำนวนหนึ่งข้าง (25 มิลลิกรัม) มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ข้ามคืน (ตัวอย่างแมงมุมที่เหลือเก็บไว้เพื่อเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ เพื่อเป็น Voucher specimen) เติม FATG1 buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และ Protinase K Solution (0.3g/ml) ปริมาณ 20 ไมโครลิตรปิดหลอดให้สนิท พร้อมทั้งพันด้วยพาราฟิน (Paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน นำไปบ่มที่

กรมวิชาการเกษตร

อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติม RNase A (0.5g/ml) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร แล้วเติม FATG2 buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตรและบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เขย่าให้สม่ำเสมอ เติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute alcohol) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน FATG Mini Column ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยง) เติม W1 Buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) จากนั้นเติม Wash Buffer ปริมาณ 750 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาทีอีกครั้ง ย้ายหลอด FATG Mini Column มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge) 1.5 ไมโครลิตร และชะล้างอีเอ็นเอด้วยสารละลาย Elution Buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอ ที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

3.2 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ดังนี้

Primer Name	Sequence	Base
C1J1718	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC	26
C1N2191	CCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTC	23

แมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae เตรียมปฏิกิริยา PCR ปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

		1 reaction (ไมโครลิตร)
Dream Taq Green PCR Master mix		15
ddH_2O		3
Primer Forward	C1J1718	2
Primer Reverse	C1N2776	2
DNA		3
Total		25

นำปฏิกิริยา PCR ใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR ดังนี้ initial-denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (ทำซ้ำ denaturing, annealing และ extension จำนวน 30 รอบ) จากนั้น final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

กรมวิชาการเกษตร

3.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis) โดยหยดผลิตภัณฑ์ PCR ลงในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1.2 % และให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย TBE โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ 400 mp เป็นเวลา 45 นาที

3.4 ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ของแมงมุมกระโดดที่ได้ไปทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์โดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

3.5 นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน Cox1 ที่ผ่านการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ มาทำการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมงมุมกระโดดที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ (assemble) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงมุมกระโดดแต่ละชนิด ด้วยโปรแกรม ClustalW (Thomson *et al*., 1994) ศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ภายในและระหว่างชนิด ด้วยโปรแกรม MEGA version 7.0 (Kumar, S., Stecher G. and Tamura K. 2016.) และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor Joining (NJ) และ Maximum Likelihood (ML) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7.0 (Kumar, S., Stecher G. and Tamura K, 2016)

3.6 บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดนำผลที่ได้มาตรวจสอบชนิด กับฐานข้อมูล Gene Bank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บ 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 รวมทั้งนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาด้านอื่นๆ สำหรับดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้เป็นดีเอ็นเออ้างอิงที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์แมงมุม กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

- การบันทึกข้อมูล

1) บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบของ FASTA ไฟล์

2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบ ให้สอดคล้องกับ ชนิดแมงมุมกระโดดที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบด้วยพิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี สถานที่เก็บตัวอย่างแมงมุมกระโดดแต่ละชนิด และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

3) ชื่อวิทยาศาสตร์ของแมงมุมกระโดด เขตการแพร่กระจาย และแนวทางการวินิจฉัยชนิด

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : ตุลาคม 2560 – กันยายน 2563

สถานที่ : 1) พื้นที่ 11 จังหวัด ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ภาคเหนือได้แก่ จังหวัดพิษณุโลก แพร่ และน่าน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ จังหวัดขอนแก่น ภาคตะวันออกได้แก่ ระยอง จันทบุรี และตราด ภาคกลางได้แก่ จังหวัดสมุทรสาครและพิษณุโลก ภาคตะวันตกได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี เพชรบุรี ราชบุรี

กรมวิชาการเกษตร

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมกระโดด

ผลจากการสำรวจชนิดแมงมุมกระโดดในประเทศไทยตามพื้นที่การเกษตร ได้แก่ สวนชมพู่ สวนมะม่วงสวนยางพารา พื้นที่ป่าธรรมชาติ เช่น ป่าข้างทาง ขอบชายป่า วัชพืช และน้ำตก (table 3.13.1) ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2560 สิ้นสุด กันยายน 2563 ในพื้นที่ 11 จังหวัด พบแมงมุมกระโดดในประเทศไทย 6 สกุล 8 ชนิด ได้แก่ สกุล *Myrmaplata* จำนวน 1 ชนิด คือ *Myrmaplata plataleoides* สกุล *Plexippus* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Plexippus paykulli* และ *Plexippus petersi* สกุล *Phintella* จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *Phintella vittata* สกุล *Phintelloides* จำนวน 1 ชนิด คือ *Phintelloides versicolor* สกุล *Telamonia* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Telamonia dimidiata* และ *Telamonia festiva* สกุล *Thiania* จำนวน 1 ชนิด คือ *Thiania bhamoensis* และจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อช่วยยืนยันการจำแนกแมงมุมวงศ์ Salticidae โดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของตำแหน่ง COX1 จาก 60 ตัวอย่าง ได้แก่ 60 ตัวอย่าง ได้แก่ *Myrmaraplata plataleoides* จำนวน 15 ตัวอย่าง *Plexippus paykulli* จำนวน 10 ตัวอย่าง *Plexippus petersi* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Phintella vittata* จำนวน 20 ตัวอย่าง *Phintelloides versicolor* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia dimidiata* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia festiva* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *Thiania bhamoensis* จำนวน 8 ตัวอย่าง โดยแมงมุมแต่ละสกุลมีความหลากหลายทางด้านสัณฐานวิทยา พฤติกรรม และบทบาทการเป็นผู้ล่าในระบบนิเวศวิทยาแตกต่างกันเช่น สกุล *Myrmarachne* และ *Myrmaplata* มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะและกิริยาท่าทางคล้ายมดแดงเพื่อล่ามดแดงเป็นอาหาร เนื่องจากสกุล *Myrmarachne* และ *Myrmaplata* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมากทำให้ยากต่อการจำแนกชนิด เช่นเดียวกันกับสกุล *Phintella* และสกุล *Phintelloides* อีกทั้งจากการสำรวจพบว่าประชากรของแมงมุมกระโดดลดลงอย่างเห็นได้ชัดจากพื้นที่เดิม โดยสาเหตุเกิดมาจากแหล่งอาศัยเดิมได้มีการเปลี่ยนแปลงไป การใช้สารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชเพิ่มขึ้น ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศ (climae change)

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน

จากการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานของแมงมุมกระโดดในประเทศไทยเพื่อจำแนกชนิดตัวอย่างแมงมุมทั้งหมดที่เก็บได้ในห้องปฏิบัติการโดยการใช้ลักษณะที่สำคัญในการจำแนกชนิด เช่น ลักษณะการจัดเรียงของตา ลักษณะของ endite ลักษณะของ fovea ระยะห่างระหว่างตา ลักษณะ sternum labium maxillae ความยาวของขา ลักษณะรูปร่างและลวดลายบนด้านหลังของส่วนท้อง ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย และแหล่งที่อยู่อาศัย พบแมงมุมในวงศ์ Salticidae ทั้งหมด 6 สกุล 8 ชนิด สามารถจำแนกชนิดได้ 8 ชนิด ได้แก่ *Myrmaplata plataleoides* (O. Pickard-Cambridge, 1869), *Plexippus paykulli* (Audouin, 1826), *Plexippus petersi* (Karsch, 1878), *Phintella vittata* (C. L. Koch, 1846), *Phintelloides versicolor* (C. L. Koch, 1846), *Telamonia dimidiata* (Simon, 1899) และ *Telamonia festiva* Thorell,

1887 และ *Thiania bhamoensis* Thorell, 1887 จากการศึกษาโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ของ *Myrmarachne* และ *Myrmaplata* พบว่า Spermathecal ของเพศเมีย มีลักษณะเป็นท่อยาวและบาง ซึ่งแตกต่างจากสกุล *Myrmarachne* โดยไม่มีท่อตามเส้นขวางซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ PRÓSZYŃSKI (2016) เนื่องด้วยกลุ่มแมงมุมกระโดดหลายชนิดมีสีสันและลักษณะภายนอกที่ใกล้เคียงกัน (sibling species) และยังมีอีกหลายตัวอย่างที่มีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาก้ำกึ่งกันระหว่างสกุล *Myrmarachne* และ *Myrmaplata* หรือสกุล *Phintella* และสกุล *Phintelloides* จึงทำการเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ และศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่อไป

สำหรับคู่มือการวินิจฉัยชนิดที่ใช้ในการจำแนกและลักษณะอนุกรมวิธานของแมงมุมกระโดดในวงศ์ Salticidae แต่ละชนิดมีดังนี้

1. Retromargin of chelicerae with one tooth---------- 2
- Retromargin of chelicerae with more than one tooth---------- 15
2. Cephalothorax flattened---------- 3
- Cephalothorax not flattened---------- 6
3. . Ant like; cephalic - thoracic region distinctly marked by a constriction; pedicel long, conspicuous, visible from above---------- Myrmarachne MacLeay, 1839
- Not ant like; ---------- 4
4. Tibiae and metatarsi I and II with 3 and 2 pairs of ventral spines respectively ---------- Marpissa C. L. Koch, 1846
- Tibiae and metatarsi I and II not so---------- 5
5. Pale, brownish grey, broad band extending from the middle of cephalothorax up to the tip of abdomen; body entirely with lateral brown band----------Menemerus Simon, 1868
- No such bands; abdomen metallic, slender, ovoid, with flat setae -------- Thiania C. L. Koch, 1846
6. Cephalothorax circular or U shaped---------- 7
- Cephalothorax neither circular nor U shaped---------- 9
7. Cephalothorax yellow brown to black, moderately high, with eye field darker
-- Euophrys C. L. Koch, 1834
- Cephalothorax not so, eye field not darker---------- 8
9. Cephalothorax swollen or spherical, with horn like tuft of long, stiff, slightly curved bristles lateral to anterolateral eyes---------- 10
- Cephalothorax otherwise, without any hornlike tuft of long, stiff, curved bristles---------- 12
10. Abdomen of female pale with a pair of longitudinal dark lines, male slender with mid dorsal white band on abdomen----------Telamonia Thorell, 1887

กรมวิชาการเกษตร

- Abdomen with different pattern---------- 11
12. Cephalothoracic length always more than 1.2 x its width---------- 13
- Cephalothoracic length always less than 1.2 x its width---------- 14
13. Cephalothorax convex with cephalic margins nearly parallel; abdomen of female pale with series of chevron marks and white bands, in male such bands extending throughout the body---
---------- Plexippus C. L. Koch, 1846
- Cephalothorax slopping posteriorly; males usually black with 2 longitudinal white bands extending from thoracic region to tip of abdomen, females brownish, with pale yellow chevron pattern on abdomen---------- Carrhotus Thorell, 1891
14. Chelicerae slender, with fangs long, sometimes larger than chelicerae, curved at tip; abdomen often with gray, indistinct, linear pattern---------- Phintella Strand, 1906
- Cheliceral fang never so; abdomen of female with a series of chevron marks
---------- Epocilla Thorell, 1887
15. Cheliceral retromargin with 2 teeth---------- Cheliceroides Zabka, 1985
- Cheliceral retromargin with many teeth---------- 16

วงศ์ Salticidae Blackwall,1841 (แมงมุมกระโดด, jumping spiders)

แมงมุมกระโดดมีการจัดเรียงตาที่เป็นเอกลักษณ์ที่มีลักษณะโดดเด่นไม่เหมือนกับแมงมุมวงศ์อื่น โดยมีการจัดเรียงเป็น 3 แถว มองดูแล้วเกือบเป็นเส้นวงกลม มีการจัดเรียงตาคือ 4 – 2 - 2 โดยตากลางคู่หน้าจะมีขนาดใหญ่มากกว่าคู่อื่นๆ ซึ่งตาหลังคู่กลางและตาหลังด้านข้างจะมีขนาดเล็กมาก Koh and Ming (2013) รายงายเพิ่มเติมว่าตากลางคู่หน้าที่มีขนาดใหญ่จะทำหน้าที่เป็นเลนส์ Telescopic (เลนส์ส่องทางไกล) ตาข้างทำหน้าที่เป็นเลนส์ stereoscopic wide-angle (มุมกว้างสามมิติ) เนื่องจากมีการจัดเรียงตาเกือบเป็นเส้นวงกลมและมีทั้งเลนส์ telescopic และ stereoscopic จึงทำให้แมงมุมวงศ์นี้มีสายตาดีมากและมองเห็นเกือบ 360 องศา ส่วนใหญ่มีกลุ่มของเส้นขนยาวบริเวณรอบๆ พื้นที่ตา แมงมุมวงศ์นี้ส่วนใหญ่ไม่สร้างใยดักเหยื่อแต่จะสร้างเส้นใยที่มีลักษณะคล้ายถุงเพื่อซ่อนตัวในเวลาที่ลอกคราบ วางไข่ และผสมพันธุ์ มีนิสัยออกหากินในเวลากลางวัน Song *et.al*. (1999) กล่าวว่าเป็นวงศ์ที่มีลำตัวขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ (3-17 มิลลิเมตร) เพศผู้และเพศเมียมีรูปร่างทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน (World Spider Catalog, 2021) รายงานว่าเป็นวงศ์ที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุดในโลกประกอบด้วยสมาชิกที่ถูกจำแนกชนิดเรียบร้อยแล้วจำนวน 658 สกุล 6,356 ชนิด ซึ่ง Davies & Zabka (1989) รายงานว่าโดยทั่วไปแมงมุมกระโดดจะมีขนาดความยาวอยู่ระหว่าง 4 – 8 มิลลิเมตร ไม่ค่อยพบที่มีความยาวน้อยกว่า 2 มิลลิเมตร เพศผู้ส่วนมากจะมีขนาดใหญ่กว่าเพศเมียซึ่งแตกต่างจากแมงมุมทั่วไปโดยแมงมุมทั่วไปเพศเมียมักมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้

แต่ละสกุลมีความหลากหลายทางด้านสัณฐานวิทยา พฤติกรรม และบทบาทการเป็นผู้ล่าในระบบนิเวศวิทยาแตกต่างกัน (Foelix, 1996; Jackson & Pollard, 1996) เช่น สกุล *Myrmarachne* และ

กรมวิชาการเกษตร

Myrmaplata มีรูปร่างลักษณะและกิริยาท่าทางคล้ายมดแดง เช่นมี pedicel หรือเอวให้ยาวขึ้นเหมือนมด ส่วน cephalothorax มีขนาดยาวขึ้นเพื่อให้มองเหมือนว่าร่างกายแบ่งออกเป็น 3 ส่วนเหมือนมด ส่วนท้องมีลักษณะคอดลงไม่กลมป่อง มักหากินปะปนอยู่กับฝูงมดเพื่อคอยจับตัวอ่อนของมดกินเป็นอาหาร การที่มันมีรูปร่างลักษณะและกิริยาคล้ายมดก็เป็นวิธีป้องกันตัวชนิดหนึ่ง นั่นคือมดจะไม่มารุมทำร้ายเพราะคิดว่าเป็นพวกเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีพฤติกรรมเลียนแบบมดเช่นมีการยกขาคู่หน้า1 คู่ เพื่อเลียนแบบหนวดของมด Koh and Bay (2019) รายงานว่านอกจากสกุล *Myrmarachne* แล้วยังมีสกุล *Agorius* และ *Bocus* ที่มีรูปร่างลักษณะลักษณะคล้ายมดอีกด้วย Whyte and Andersonn (2017) รายงานเพิ่มเติมว่าแมงมุมกระโดดไม่ได้เลียนแบบมดเพียงชนิดเดียวแต่ยังสามารถเลียนแบบด้วงเต่าที่มีลักษณะสีดำทั้งตัวได้อีกด้วย เช่น *Coccorchestes ferrea*

สกุล *Myrmaplata* Prószyński, 2016

Type: *Salticus plataleoides* O. Pickard-Cambridge, 1869 เพศเมีย

ชื่อพ้อง :

เดิมถูกตั้งชื่อเป็น *Salticus plataleoides* เป็นชื่อพ้องกับ *Myrmarachne daitarensis* (Prószyński, 1992) และ *Myrmarachne plataleoides* (Edmunds & Prószyński (2003) ต่อมาได้ถูกย้ายไปเป็นสกุล *Myrmaplata* และเป็นชื่อพ้องกับ *Myrmarachne megachelae* (Ganesh Kumar & Mohanasundaram, 1998) แต่ปัจจุบันได้ถูกเปลี่ยนไปเป็น *Myrmaplata plataleoides* มีสมาชิกที่ถูกจำแนกชนิดเรียบร้อยแล้วทั้งหมด 5 ชนิด

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

PRÓSZYŃSKI (2016) รายงานว่า Spermathecal ของเพศเมีย มีลักษณะเป็นท่อยาวและบาง ซึ่งแตกต่างจากสกุล *Myrmarachne* โดยไม่มีท่อตามเส้นขวาง และส่วนปลายสุดของส่วนหน้าจะมีลักษณะกลม หรือช่องรูปไข่ขนาดเล็กซึ่งมีหนามอยู่ภายใน (Figure 2D). เพศผู้มีลักษณะแตกต่างจาก MYRMARACHNINES โดย embolus มีฐานที่กว้างและค่อยๆแคบลง เช่น ใน *Myrmaplata plataleoides* มี loop ของ embolus สั้นกว่าโดยซ้อนทับเฉพาะครึ่งด้านหน้าของ bulbus Tibial apophysis สั้น ตรง และเป็นทรงกรวย เพศผู้มีลำตัวยาวมากและมีการบีบรัดส่วนบริเวณ cephalothorax และ abdomen พื้นที่ส่วนหัวสูงกว่าส่วนอกถึง 2 เท่า Chelicerae ยาวและพองออกที่บริเวณส่วนปลาย pedicel ยาว ขณะที่เพศเมียมีส่วนท้องเป็นรูปไข่โดยด้านปลายเรียวและไม่มีการบีบรัดสัดส่วนที่บริเวณส่วนท้อง

Myrmaplata plataleoides (O. Pickard-Cambridge, 1869) (Figure 3.13.1)

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย O. Pickard-Cambridge ในปี 1869 โดยจำแนกชนิดเป็น *Salticus plataleoides* ต่อมา Simon (1901) ได้เปลี่ยนเป็นสกุล *Myrmarachne plataleoides* Prószyński (2016) ได้พยายามแยกออกไปเป็นสกุลใหม่คือสกุล *Myrmaplata* โดยใช้ลักษณะของ Spermatheca ที่มีลักษณะแตกต่างกันในการจำแนก กระนั้นก็ตาม Caleb (2016) ได้นำกลับมาอยู่สกุลเดิมคือ *Myrmarachne* เนื่องจาก *M. plataleoides* ส่วนใหญ่มีลำตัวสีดำแต่ตัวอย่างที่สำรวจพบจากเมืองเจนไน ประเทศอินเดีย เป็นตัวอ่อนและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่

กรมวิชาการเกษตร

หลากหลาย แต่อย่างไรก็ตาม Caleb (2020) ได้ยอมรับและใช้เป็นสกุล *Myrmaplata* ตาม Prószyński เนื่องจากงานที่เขาตีพิมพ์ในปี 2016 พบว่า *Myrmarachne megachelae* มีรูปร่างลักษณะเหมือนกับ *Myrmaplata plataleoides* ในรูปแบบสีของลำตัวที่เป็นสีดำ จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และจำนวนฟันบน chelicerae พบว่าเป็นชนิดเดียวกัน ดังนั้น *M. megachelae* จึงเป็น junior synonym ของ *M. plataleoides*

ชื่อพ้อง :

Salticus plataleoides O. Pickard-Cambridge, 1869

Salticus plataleoides Peckham & Peckham, 1892

Myrmarachne plataleoides Simon, 1901

Myrmarachne daitarensis Prószyński, 1992

Myrmarachne megachelae Ganesh Kumar & Mohanasundaram, 1998

Myrmaplata plataleoides Prószyński, 2016

Myrmarachne *plataleoides* Caleb, 2016

Myrmaplata plataleoides Caleb, 2020

ชื่อสามัญ: **Ant-mimicking Spider**

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศผู้ 6-7 มิลลิเมตร เพศเมีย 7 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): สีน้ำตาลส้มถึงน้ำตาลดำ มีความยาวเป็น 2 เท่าของความกว้าง ส่วนหัวและอกมีความยาวเท่ากันและมีการแบ่งสัดส่วนระหว่างส่วนหัวและส่วนอกอย่างชัดเจนโดยส่วนหัวจะยกอยู่สูงกว่าส่วนอก ส่วนอกรูปร่างเป็นรูปไข่ ไม่มี thoracic groove ตา 8 ตา เป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 4 – 2 - 2 แบบ recurve โดยแถวหน้าเรียงโค้งมากกว่าแถวหลัง labium และ sternum ยาว มีฟันแถวบน จำนวน 3 ซี่ ฟันแถวล่างขนาดเล็กจำนวน 10 ซี่ เพศผู้มักจะมีขนาด chelicerae ที่เรียวยาวกว่าเพศเมีย พองออกที่ด้านปลายและยื่นไปทางด้านหน้าของลำตัวเสมอ ส่วนด้านปลายที่พองออกจะมีสีออกดำทั้งสองฝั่งและมีจุดดำลักษณะคล้ายดวงตา ขาสีส้มมีลักษณะเรียวยาวโดยปล้อง tibia มีความยาวมากที่สุด มีขนน้อย ความยาวขา 4 ขา เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 4, 1, 3, 2

ท้อง (Abdomen): สีน้ำตาลส้มถึงน้ำตาลดำ เอว (pedicel) มีลักษณะเป็นปล้องเชื่อมต่อระหว่างส่วน cephalothorax (ส่วนหัวและอก) และ abdomen (ส่วนท้อง) ส่วนท้องมีลักษณะคล้ายรูปไข่ยาวเรียว สีส้มและมีความยาวเท่ากับส่วนอก ด้านปลายท้องตัด Epigynum และ vulva ดังรูป 1D สำหรับmale palp มี embolus ชี้ไปทางด้านปลายของ tegulum ดังรูป 1E และ 1F

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): อินเดีย ศรีลังกา จีน สิงคโปร์ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยสามารถพบทั่วทุกภาค ภาคเหนือได้แก่ ลำปาง น่าน แพร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น ศรีษะเกษ บุรีรัมย์ อุบลราชธานี ภาคกลางได้แก่ กรุงเทพมหานคร ปทุมธานี นครปฐม เพชรบูรณ์

กรมวิชาการเกษตร

พิษณุโลก ภาคตะวันออกได้แก่ ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ภาคตะวันตกได้แก่ กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี ภาคใต้ได้แก่ สุราษฎร์ธานี

โดยพบทั่วไปมีความแปรผันของสีสรรสูงตั้งแต่สีน้ำตาลสว่างจนกระทั่งถึงสีน้ำตาลดำ พบในสวนที่มีรังมดแดง หรือมดแดงที่เดินเป็นแถว แมงมุมจะซุ่มดักจับมดแดงที่เดินออกนอกแถวเป็นอาหาร และทำรังนอนอยู่ห่างไกลจากรังมดแดง มักมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและพฤติกรรมให้คล้ายกับมด คือ มีลักษณะสีน้ำตาลแดงเข้ม มีการแบ่งสัดส่วนส่วนหัวให้แยกออกจากส่วนอกอย่างชัดเจน โดยส่วนหัวจะยกอยู่สูงกว่าส่วนอก และยังลดจำนวนขาจาก 4 คู่ เหลือ 3 คู่ได้อย่างแนบเนียนและใช้ขาหน้าชูขึ้นโบกไปมาเหมือนกับหนวดของมด ตัวเมียจะเลียนแบบพฤติกรรมและท่าทางของมดงาน แต่ตัวผู้มีลักษณะแตกต่างจากตัวเมีย คือ ส่วนรยางค์จับเหยื่อยืดยาวออกมา เชื่อว่าการที่มีส่วนรยางค์จับเหยื่อยืดยาวออกมาเป็นการเลียนแบบมดงานที่กำลังขนอะไรบางอย่างอยู่ (encumbered ant) ซึ่งลักษณะเช่นนี้ทำให้มดงานคิดว่าเป็นพวกเดียวกันที่กำลังแบกซากเพื่อนกลับรัง เพื่อเป็นเกราะป้องกันไม่ให้มดเข้ามาทำร้าย

สกุล *Plexippus* C. L. Koch, 1846

Type: *Plexippus paykulli* (Audouin, 1826) เพศผู้

NB: ในปี 1951 Charitonov ได้พิจารณาว่าเป็น senior synonym ของ *Hissarinus kondarensis* (Charitonov, 1951) ในปี 1975 Andreeva ได้ย้าย type species เป็น *Plexippus condarensis* (Charitonov, 1951) ต่อมาในปี 1995 Ledoux & Hallé ได้พิจารณาและจำแนกชนิดว่า *Apamamia* Roewer 1944 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกับ *Plexippus* C.L. Koch 1846

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

สกุลนี้ค้นพบครั้งแรกโดย C. L. Koch ในปี 1846 โดยใช้ *Plexippus ligo* เป็นตัวต้นแบบในการจำแนกชนิดสกุลนี้แต่ว่าปัจจุบันได้กลายเป็น synonymy ของ *Plexippus paykulli* (Audouin, 1826) ซึ่งแมงมุมในสกุลนี้ถูกจำแนกแล้วทั้งสิ้น 45 ชนิด (NMBE, 2021) ส่วนใหญ่มีรูปร่างลักษณะที่คล้ายกัน มีขนาดกลางจนถึงขนาดใหญ่ cephalothorax (ส่วนหัวและส่วนอก) ยกสูงขึ้น ความยาวพื้นที่ตาน้อยกว่าความยาวครึ่งหนึ่งของ carapace ความยาวของ cephalothorax มากกว่าความกว้าง ตาหลังคู่กลาง (posterior median eyes) ตั้งอยู่ตรงกลางระหว่างตาหน้าด้านข้างและด้านหลังด้านข้าง ทั้งส่วนหัวและส่วนอก และส่วนท้องจะมีแถบลวดลายอย่างชัดเจน ส่วนใหญ่มีแถบสีขาวที่ส่วนท้อง ส่วนหัวและอก ขาหนาและแข็งแรง

***Plexippus petersi* (Karsch, 1878) (Figure 3.1.3.2)**

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Ferdinand Anton Franz Karsch ในปี 1878 โดยจำแนกชนิดเป็น *Euophrys petersii* ต่อมา Simon (1903) ได้จำแนกชนิดและเปลี่ยนเป็นสกุล *Plexippus petersi* ในปี 1968 Chrysanthus ได้จำแนกชนิดผิดเป็น *Plexippus paykulli* ตั้งแต่ปี 1985 จนกระทั่งถึงปี 2021 ได้มีการสำรวจและจำแนกแมงมุมสายพันธุ์นี้และได้รายงานว่าพบ new record ในประเทศ จีน ไต้หวัน เนปาล ภูฏาน เวียดนาม เกาหลี และไทย

ชื่อพ้อง :

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Euophrys petersii Karsch, 1878

Plexippus petersi Simon, 1903

ชื่อสามัญ: **Common Housefly Catcher**

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศผู้ 6-7 มิลลิเมตร เพศเมีย 7-9 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศผู้; สีน้ำตาล มีแถบสีน้ำตาลเข้มออกดำที่ด้านข้างทั้ง 2 ด้านของส่วนอก ตั้งแต่ด้านท้ายของส่วนหัวจนกระทั่งถึงตาแถวที่ 3 ตา 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 4 – 2 - 2 ความกว้างของพื้นที่ตามีมากกว่าความยาวของพื้นที่ตา chelicerae มีฟันแถวหน้า 2 ซี่ แถวหลัง1 ซี่ maxillae ขนานกัน labium มีความกว้างมากกว่าความยาว sternum ยาวมากกว่ากว้าง ขาอ้วนมีขนและหนามกระจายอยู่ทั่วไป เพศเมีย; สีน้ำตาลยกเว้นบริเวณขอบตาที่มีสีดำ

ท้อง (Abdomen): เพศผู้; สีครีม มีแถบสีน้ำตาลเข้มออกดำขนานกันที่ด้านข้างลำตัวทั้ง 2ด้านตั้งแต่ด้านหน้าของส่วนท้องจนกระทั่งเลยกึ่งกลางมาทางด้านท้าย ที่ปลายของส่วนท้องมี spinnerets จำนวน 6 อัน เพศเมีย; สีน้ำตาลและมีลวดลายสีน้ำตาลเข้มที่ที่ด้านข้างทั้ง 2 ข้าง Epigynum และ vulva ดังรูป 3.13.3C สำหรับmale palp ดังรูป 3.13.2D และ 3.13.2E

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): ถูกนำเข้าจากเอเชียไปยังแอฟริกา และหมู่เกาะแปซิฟิก สำหรับในประเทศไทยสามารถพบทั่วทุกภาคตามบ้านเรือน ภาคเหนือได้แก่ เชียงใหม่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ อุดรธานี ภาคกลางได้แก่ กรุงเทพมหานคร ภาคตะวันออกได้แก่ ชลบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ภาคใต้ได้แก่ สุราษฎร์ธานี

***Plexippus paykulli* (Audouin, 1826) (Figure 3.13.3)**

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Par Victor Audouin ในปี 1826 โดยจำแนกชนิดเป็น *Attus paykullii* ต่อมา Walckenaer (1837) จำแนกชนิดผิดคิดว่าเป็นแมงมุมชนิดใหม่จึงตั้งชื่อว่า *Attus ligo* ต่อมา C. L. Koch (1846) ได้พยายามแยกออกไปเป็นสกุลใหม่คือสกุล *Plexippus* และได้ตั้งชื่อใหม่ว่า *Plexippus ligo* Lucas (1846) ได้จำแนกชนิดผิดเป็น *Salticus vaillanttii* ในปี 1886 Peckham & Peckham ได้นำตัวอย่าง *Plexippus ligo* ของ C. Koch (1846), *Menemerus culicivorus* ของ Thorell (1877), *Menemerus paykulli* ของ Thorell (1881) มาอธิบายและบรรยายลักษณะทางสัณฐานวิทยาใหม่และเปลี่ยนชื่อตัวอย่างเหล่านี้เป็น *Plexippus paykulli* จากนั้นได้มีรายงานการพบแมงมุมชนิดนี้ในประเทศต่างๆ มากมาย เช่น จีน (Chamberlin (1924), Chen and Gao (1990)) ออสเตรเลีย (Davies and Żabka, 1989) เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Barrion and Litsinger, 1995) เกาหลี (Cho and Kim (2002)) เกาหลี (Namkung (2002), (Kim and Lee, 2014) ยุโรป (Wunderlich (2008) ญี่ปุ่น (Baba and Tanikawa, 2015) อิยิปต์ (El-Hennawy, Mohafez and El-Gendy, 2015) อินเดีย (Dhali, Saha and Raychaudhuri, 2017) อิหร่าน (Tabrizi, Rad and Hedayati, 2014.)

ชื่อพ้อง :

Attus paykullii Audouin, 1826

กรมวิชาการเกษตร

Attus ligo Walckenaer, 1837

Euophrys vetusta C. L. Koch, 1846

Plexippus ligo C. L. Koch, 1846

Plexippus paykulli Peckham & Peckham, 1886

Plexippus culicivorus Thorell, 1887

Plexippus paykulli Bösenberg & Strand, 1906

Menemerus crassus Hogg, 1922

Hyllus mimus Chamberlin, 1924

Plexippus paykulli Petrunkevitch, 1930

Plexippus quadriguttatus Mello-Leitão, 1946

Marpissa bengalensis Tikader, 1974

Marpissa mandali Tikader, 1974

Euophrys vetusta Prószyński, 1987

Plexippus paykulli Żabka & Gardziński, 2017

ชื่อสามัญ: **The Pantropical Jumper**

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศผู้ 7-8 มิลลิเมตร เพศเมีย 7-9 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศผู้; สีน้ำตาล มีแถบสีครีมออกเหลืองตามยาวตั้งแต่ส่วนหัวลงมาถึงส่วนอก และมีแถบสีน้ำตาลเข้มออกดำที่ด้านข้างทั้ง 2ด้าน มี8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 4 – 2 – 2 maxillae ขนานกัน labium มีความกว้างมากกว่าความยาว sternum ยาวมากกว่ากว้าง palpi มีขนปุกปุย ขาสีน้ำตาลอ่อนขาปล้องหน้าจะมีสีน้ำตาลเข้มออกดำ ขาปล้องที่ 3 และ 4 มีแถบสีดำ เพศเมีย; สีน้ำตาล

ท้อง (Abdomen): เพศผู้; ด้านบนส่วนท้องมีแถบยาวสีครีมตรงกลาง มีแถบสีน้ำตาลเข้มออกดำขนานกันที่ด้านข้างลำตัวทั้ง 2ด้านตั้งแต่ด้านหน้าของส่วนท้องจนกระทั่งเลยกึ่งกลางมาทางด้านท้าย มีแถบสีน้ำตาลเข้มรูปสามเหลี่ยมที่ด้านปลายของส่วนท้อง spinnerets จำนวน 6 อัน เพศเมีย; สีน้ำตาลมีลวดลายสีน้ำตาลเข้มที่ด้านข้างทั้ง 2 ข้างและมีจุดสีขาวที่ด้านท้ายของลำตัวจำนวน 4 จุด Epigynum และ vulva ดังรูป 3.13.3C สำหรับmale palp ดังรูป 3.13.3D และ 3.13.3E

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): ถูกนำเข้าจากแอฟริกาไปยังสหรัฐอเมริกา ยุโรป ตะวันออกกลาง อินเดีย จีน ญี่ปุ่น เกาหลี ฟิลิปปินส์ ปาปัวนิวกินี ออสเตรเลีย หมู่เกาะแปซิฟิก สำหรับในประเทศไทยสามารถพบทั่วทุกภาคตามบ้านเรือน

สกุล *Phintelloides* Kanesharatnam & Benjamin, 2019

Type: *Chrysilla jesudasi* Caleb & Mathai, 2014 เพศผู้

กรมวิชาการเกษตร

In synonymy:

Phintelloides albiocciput (Bösenberg & Strand, 1906)

Phintelloides davidi (Schenkel, 1963)

Phintelloides dimorphus (Dönitz & Strand, 1906)

Phintelloides munita (Bösenberg & Strand, 1906)

Phintelloides munita chinesica (Strand, 1907)

Phintelloides tschekiangensis (Schenkel, 1963)

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

เป็นสกุลที่ถูกยกขึ้นมาเป็นสกุลใหม่โดย Kanesharatnam & Benjamin ในปี 2019 เป็นการรวมคำระหว่าง “Phintell” ซึ่งมาจากสกุล *Phintella* และ “oides” แปลว่ามีรูปแบบของ ชื่อสกุลนี้มีความหมายว่าสกุลนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุล *Phintella* มากกว่า สกุล *Chrysilla* โดยสมาชิกเกือบทั้งหมดของสกุล *Chrysilla* ถูกปกคลุมด้วยเกล็ดขนที่มีสีส้มหรือสีดำเมทัลลิค สำหรับสมาชิกของสกุล *Phintella* บางชนิดถูกปกคลุมด้วยเกล็ดขนที่มีสีเมทัลลิคแวววาว อย่างไรก็ตามสมาชิกในสกุล *Phintelloides* กลับมีสีที่อ่อนกว่า Clypeus ของเพศผู้ *Phintelloides* ถูกปกคลุมไปด้วยปอยขนที่เป็นเกล็ดสีขาวเรียงเป็นแถว นอกจากนี้เพศผู้มีแถบตามยาวที่ด้านบนของส่วนท้องซึ่งไม่พบลักษณะแถบยาวแบบนี้ในเพศเมีย

***Phintelloides versicolor* (C. L. Koch, 1846) (Figure 3.13.4)**

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Carl Ludwig Koch ในปี 1846 โดยจำแนกชนิดเป็น *Plexippus versicolor* ในปี 1846 ได้จำแนกชนิดผิดเป็น *Maevia picta* ต่อมาปี 1894 Workman and Workman ใช้ตัวอย่างจาก C. L. Koch ที่จำแนกไว้แล้วได้แก่ *Plexippus versicolor* (1846) และ *Maevia picta* (1848) มาอธิบายบรรยายลักษณะสัณฐานวิทยาใหม่และเปลี่ยนเป็นชื่อ *Chrysilla versicolor ในปี* 1906 *Bösenberg & Strand* ได้ทำการสำรวจและจำแนกชนิดผิดคิดว่าเป็นแมงมุมชนิดใหม่จึงตั้งชื่อใหม่เป็น

Jotus munitus ต่อมาจึงมีคนตั้งชื่อผิดตามได้แก่ Strand ในปี1907, Yaginuma ในปี1955, Lee ในปี 1966, Yin & Wang ในปี1979 และHu ในปี1984 หลังจากปี 1985 จนกระทั่งถึงปี 2018 ได้มีการสำรวจแมงมุมกระโดดในประเทศญี่ปุ่น เกาหลี จีน และจำแนกชนิดเป็น *Phintella versicolor* แต่ในปี 2019 Kanesharatnam & Benjamin ได้แก้ไขการจัดกลุ่มสมาชิกแมงมุมกระโดดในทวีปเอเชียใต้สกุล *Chrysilla* และ *Phintella* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมและสัณฐานวิทยา ผลจากการวิเคราะห์พบว่าทั้ง 2 สกุลมีสายวิวัฒนาการที่ต่างกันดังนั้นเขาจึงกำหนดสกุลใหม่ขึ้นว่าชื่อว่า *Phintelloides*

ชื่อพ้อง :

Plexippus versicolor C. L. Koch, 1846

Maevia picta C. L. Koch, 1846

Attus versicolor Walckenaer, 1847

กรมวิชาการเกษตร

Chrysilla picta Thorell, 1891

Chrysilla picta Workman & Workman, 1894

Chrysilla versicolor Simon, 1901

Phintella versicolor Prószyński, 1983

Phintella davidi Prószyński, 1983

Phintella versicolor Prószyński, 1983

Phintella tschekiangensis Prószyński, 1983

Jotus munitus Hu, 1984

Phintella caprina Prószyński, 1984

Phintelloides versicolor Kanesharatnam & Benjamin, 2019

Phintella versicolor Peng, 2020

ชื่อสามัญ: **Multi-coloured Metallic Jumper**

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศผู้ 6-7 มิลลิเมตร เพศเมีย 5-6 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศผู้; สีดำ ส่วนหัวมีแต้มขนสีขาว 3 จุด ที่ตรงกลาง ด้านซ้ายและด้านขวา มีเส้นขอบสีขาวที่ด้านท้ายของหัวและอกส่วนนอก ส่วนหัวและอกมีความยาวมากกว่าความกว้างเล็กน้อย ตา 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 4 – 2 - 2 ความกว้างของพื้นที่ตามีมากกว่าความยาวของพื้นที่ตา clypcus มีขนสีน้ำตาลเข้มกระจายอยู่และมีกระจุกขนสีขาวยื่นออกมาอยู่ใต้ฐานของ chelicerae มีฟันแถวหน้า 2 ซี่ แถวหลังฟันขนาดใหญ่ 1 ซี่ chelicerae สีน้ำตาลเข้มและมีสีสว่างที่ด้านปลาย maxillae และ labium สีน้ำตาล maxillae ขนานกัน ขาคู่ที่ 1 สีน้ำตาลเข้มและมีขนสีขาวลักษณะเหมือนเกล็ดกระจายอยู่ทั่วไป ขาคู่ต่อๆมาจะซีดลง ขาปล้องที่ 1 และ 2 มีสีขาวขุ่นๆ เพศเมีย; สีครีมและมีแถบสีน้ำตาลบริเวณส่วนหัวและบริเวณส่วนอกมีลวดลายคล้ายเลข 6 สีน้ำตาลเข้ม ด้านซ้าย และด้านขวาซึ่งเป็นเลข 6 กลับด้าน

ท้อง (Abdomen): เพศผู้; มีแถบยาวสีเหลืองขุ่นที่ด้านข้างของส่วนท้องทั้ง 2 ด้าน และมีแถบสีน้ำตาลเข้ม 1 แถบอยู่ตรงกลาง spinnerets มีสีเหลืองขุ่น เพศเมีย; สีครีมและมีลวดลายสีน้ำตาลที่ไม่เป็นระเบียบที่ด้านข้างทั้ง 2 ข้าง แต่แถบตรงกลางไม่มีลวดลาย Epigynum และ vulva ดังรูป 3.13.4 B

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): อินเดีย พม่า ไทย มาเลเซีย จีน เกาหลี ไต้หวัน ญี่ปุ่น อินโดนีเซีย (สุมาตรา) และถูกนำเข้าไปที่ฮาวาย สำหรับในประเทศไทยสามารถพบทั่วทุกภาค ภาคเหนือได้แก่ ลำปาง น่าน แพร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น ศรีษะเกษ บุรีรัมย์ อุบลราชธานี ภาคกลางได้แก่ กรุงเทพมหานคร ปทุมธานี นครปฐม เพชรบูรณ์ พิษณุโลก ภาคตะวันออกได้แก่ ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ภาคตะวันตกได้แก่ กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี ภาคใต้ได้แก่ เพชรบุรี

สกุล *Phintella* Strand, 1906

Type: *Phintella typica* Strand, 1906 เพศเมีย

In synonymy:

Phintella aequipes longirostris (Lessert, 1925)

Phintella aninotata (Bösenberg & Strand, 1906)

Phintella bilineata (Saito, 1939)

Phintella clara (Peckham & Peckham, 1903)

Phintella crucifer (Dönitz & Strand 1906)

Phintella difficilis (Bösenberg & Strand, 1906)

Phintella lesserti (Schenkel, 1963)

Phintella lucai Żabka, 1985

Phintella mellotteei (Simon, 1888)

Phintella pallicolor (Bösenberg & Strand, 1906)

Phintella pupus (Karsch, 1879)

Phintella ranjita (Tikader, 1967)

Phintella solers (Peckham & Peckham, 1903)

Phintella typica Strand, 1906

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

เป็นแมงมุมขนาดกลางถึงขนาดเล็ก มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับสกุล *Chrysilla* ซึ่งสมาชิกของสกุลนี้ส่วนใหญ่เคยอยู่ในสกุล *Chrysilla*, *Telamonia*, *Icius*, และ *Jotus* มาก่อนแต่ปัจจุบันได้ถูกย้ายออกมาอยู่ในสกุล *Phintella* แทน แมงมุมสกุลนี้บางชนิดมีเกล็ดขนที่เป็นสีเมทัลลิคแวววาว clypeusถูกปกคลุมไปด้วยเกล็ดขนสีดำมันวาวหรือสีออกน้ำตาลเข้มออก เช่นบริเวณส่วนอกของ *Phintella vittata* ถูกปกคลุมไปด้วยเกล็ดขนที่เป็นสีฟ้าออกเขียวแวววาว แต่ *P. argentea* ถูกปกคลุมไปด้วยเกล็ดขนที่เป็นสีเงิน ลักษณะส่วนท้องของเพศผู้และเพศเมียจะกว้างทางด้านส่วนหน้าและเรียวยาวไปทางด้านปลายของส่วนท้องและมีแถบเกล็ดขนสีเงินแวววาวด้านขวาง

***Phintella vittata* (C. L. Koch, 1846) (Figure 3.13.5)**

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Carl Ludwig Koch ในปี 1846 โดยจำแนกชนิดเป็น *Plexippus vittatus* ในปี 1864 Simon ได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Thiania vittata* ปี 1891 Thorell ได้สำรวจเก็บตัวอย่างแมงมุมที่ปีนัง ประเทศมาเลเซียได้จำแนกชนิดผิดคิดว่าเป็นแมงมุมชนิดใหม่จึงได้ตั้งชื่อใหม่ว่า *Maevia alternans* ต่อมาปี 1894 Workman & Workman ได้ทำการเปรียบเทียบตัวอย่างแมงมุมที่เขาสำรวจพบกับตัวอย่าง *Plexippus vittatus* C. L. Koch, 1846, *Hyllus alternans* C. L. Koch, 1846 และ *Maevia alternans* Thorell, 1891 และได้จำแนกชนิดเป็น *Maevia alternans* ปี 1901 Simon ได้อธิบายบรรยายลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาและพยายามย้ายไปเป็นสกุล *Telamonia vittata* ในปี 1967 Tikader สำรวจแมงมุมที่ประเทศอินเดียและจำแนกชนิดผิดคิดว่าเป็นแมงมุมชนิดใหม่จึงตั้งชื่อใหม่เป็น *Salticus ranjitus* ต่อมาปี 1971 Prószyński ได้ย้ายจากสกุล *Telamonia* ไปเป็นสกุล *Chrysilla vittata* ตั้งแต่ปี 1985 จนกระทั่งถึงปี 2020ได้มีการค้นพบ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

แมงมุมชนิดนี้ในหลายๆ ประเทศ เช่น อินเดีย จีน และเอเชียใต้ และได้มีการตั้งชื่อเป็น *Phintella vittata*

ชื่อพ้อง :

Plexippus vittatus C. L. Koch

Hyllus alternans C. L. Koch, 1846

Thiania vittata Simon, 1864

Maevia alternans Thorell, 1891

Maevia vittata Thorell, 1892

Maevia alternans Workman & Workman, 1894

Telamonia vittata Simon, 1901

Salticus ranjitus Tikader, 1967

Chrysilla vittata Prószyński, 1971

Salticus ranjitus Tikader & Biswas, 1981

Phintella vittata Żabka, 1985

Phintella vittata Peng, 2020

ชื่อสามัญ: **Banded Phintella**

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศผู้ 3-4 มิลลิเมตร เพศเมีย 4-5 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศผู้; สีดำ มีแถบขนสีเขียวเหลือบแวววาว ตา 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 4 – 2 - 2 ตาแถวที่ 2 มีขนาดเล็กมากตั้งอยู่ใกล้กับตาข้างแถวที่ 1 chelicerae มีฟันแถวหน้าจำนวน 2 ซี่ และแถวหลังจำนวน 1 ซี่ fang ลักษณะยาว maxillae มีขนาดอ้วนปลายตัดและมี scopulae labium มีขอบหนามีความกว้างมากกว่าความยาว sternum มีความยาวมากกกว่าความกว้าง ขาสีดำ มีแถบขนสีเขียวเหลือบแวววาว

ท้อง (Abdomen): มีแถบขนสีเขียวเหลือบแวววาวและมีแถบสีดำขวางที่ด้านบนส่วนท้อง 1 แถบ ตรงกลาง 1 แถบ และที่ส่วนด้านท้ายอีก 1 แถบ สำหรับmale palp ดังรูป 3.13.5B และ 3.13.5C

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): อินเดีย จีน และฟิลิปปินส์ สำหรับในประเทศไทยสามารถพบที่กาญจนบุรี เพชรบุรี ปทุมธานี และกรุงเทพมหานคร

สกุล *Telamonia* Thorell, 1887

Type: *Telamonia festiva* Thorell, 1887 เพศเมีย

ชื่อพ้อง :

Telamonia pateli (Tikader, 1974)

Telamonia sikkimensis (Tikader, 1967)

Telamonia terebrifera (Thorell, 1892)

กรมวิชาการเกษตร

Telamonia trinotata (Thorell, 1895)

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

เป็นแมงมุมขนาดกลาง ค้นพบครั้งแรกโดย Tamerlan Thorell ในปี 1846 โดยใช้ *Telamonia festiva* เป็นตัวต้นแบบในการจำแนกชนิดสกุลนี้ ซึ่งแมงมุมในสกุลนี้ถูกจำแนกแล้วทั้งสิ้น 41 ชนิด (NMBE, 2021)

***Telamonia dimidiata* (Simon, 1899) (Figure 3.13.6)**

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Simon ในปี 1899 โดยจำแนกชนิดเป็น *Viciria dimidiate* ต่อมาปี 1974 Tikader ได้ทำการสำรวจแมงมุมสกุล *Phidippus* จากประเทศอินเดียและได้เปลี่ยนเป็นสกุล *Phidippus pateli* ซึ่ง Prószyński (1984) ได้ศึกษาตัวอย่างแมงมุม *Viciria dimidiata* ของ Simon ในปี 1899 และได้พบว่าสกุล *Viciria* จำนวน 58 ชนิด มีความแตกต่างทางด้านสัณฐานวิทยาและต้องถูกแยกกออกเป็นอย่างน้อย 6 สกุล และได้ตัดสินใจเปลี่ยนชื่อจาก *Viciria dimidiata* เป็น*Telamonia dimidiata*

ชื่อพ้อง :

Viciria dimidiata Simon, 1899

Phidippus pateli Tikader, 1974

Phidippus pateli Tikader & Malhotra, 1978

Phidippus pateli Tikader & Biswas, 1981

Telamonia dimidiata Sen *et al.,* 2015

ชื่อสามัญ: Two Striped Jumping Spider

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศผู้ 7 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศผู้; มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 4 – 2 - 2 พื้นที่ตาถูกล้อมรอบไปด้วยเกล็ดขนสีน้ำตาลออกแดง มีแถบสีขาวออกเหลืองใต้บริเวณตากลางคู่หน้าลากผ่านทั้งสองข้างยาวไปจนกระทั่งถึงด้านท้ายของ carapace ดังรูป 6B ตาแถวหน้าเรียงเป็น recurve ตาหน้าด้านข้างและตาหลังมีขนาดเกือบเท่ากัน chelicerae มีฟันแถวหน้าจำนวน 1 ซี่ และแถวหลังจำนวน 2 fovea มีลักษณะเป็นหลุมลึกขนาดเล็ก maxilla มีขนscopula แบบหนา ขาคู่ที่ 1 และ 2 แข็งแรงกว่าขาคู่ที่ 3 และ 4

ท้อง (Abdomen): ขนาดยาวมากกกว่ากว้างและชี้ไปทางด้านปลายของส่วนท้อง ปกคลุมไปด้วยขนละเอียดขนาดสั้นและขนาดยาว มีแถบขนสีดำเป็นรูปตัววี สำหรับmale palp ดังรูป 6C

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): ปากีสถาน อินเดีย เนปาล ภูฏาน มาเลเซีย สิงค์โปร์ อินโดนีเซีย (สุมาตรา) สำหรับในประเทศไทยสามารถพบที่ กาญจนบุรี เพชรบุรี ปทุมธานี และกรุงเทพมหานคร

***Telamonia festiva* Thorell, 1887 (Figure 3.13.7)**

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Thorell ในปี 1887 โดยจำแนกชนิดเป็น *Telamonia festiva* ต่อมา ในปี 1895 Thorell ได้สำรวจแมงมุมในพม่าและจำแนกชนิดผิดเป็น *Bathippus trinotatus* ปี 1899 Simon สำรวจแมงมุมในสุมาตรา

กรมวิชาการเกษตร

และคิดว่าเป็นแมงมุมชนิดใหม่จึงตั้งชื่อใหม่ว่า *Viciria signata* ปี 1967 Prószyński ได้ทำการตรวจสอบตัวอย่างต้นแบบของ Thorell และอธิบายบรรยายลักษณะทางสัณฐานวิทยาใหม่ Żabka ได้ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างแมงมุมในเวียดนามและพบแมงมุมชนิดนี้ครั้งแรกในประเทศเวียดนามในปี 1985 ต่อมาปี 2004 Logunov ได้ตรวจสอบตัวอย่างของ Tikader ที่พบแมงมุมชนิดนี้ในปี 1967 และจำแนกชนิดเป็นสกุลอื่นเป็น *Lyssomanes sikkimensis* หลังจากได้ตรวจสอบตัวอย่างแล้วจึงได้ย้ายตัวอย่างนี้กลับมาอยู่ในสกุล *Telamonia* เหมือนเดิม นอกจากนี้ยังได้มีการพบในประเทศจีนและในพื้นที่ปลูกชาในประเทศอินเดีย จนกระทั่งปี 2017 Prószyński ได้จัดทำคู่มือการจำแนกชนิดแมงมุมกระโดดและได้จัดทำเว็บไซด์คู่มือการจำแนกชนิดแมงมุมกระโดดทั่วโลกไว้อีกด้วย

ชื่อพ้อง :

Telamonia festiva Thorell, 1887

Viciria terebrifera Thorell, 1890

Bathippus trinotatus Thorell, 1895

Viciria signata Simon, 1899

Viciria terebrifera Simon, 1903

Viciria terebrifera Reimoser, 1925

Telamonia festiva Prószyński, 1967

Lyssomanes sikkimensis Tikader, 1967

Telamonia terebrifera Prószyński, 1976

Telamonia festiva Prószyński, 1984

Telamonia sikkimensis Logunov, 2004

Telamonia festiva Yin *et al*., 2012

ชื่อสามัญ: **Jolly Telamonia**

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศผู้ 6.5 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศผู้; มีแถบขนสีดำรูปครึ่งวงกลมลักษณะคล้ายเกือกม้าจากด้านท้ายของ carapace ไปจนถึงส่วนด้านหน้า ส่วนกลางของ carapace มีแถบขนสีขาวเป็นแถบยาวตั้งแต่ด้านหน้าของ carapace ไปจนถึงตาแถวที่ 3 และมีแถบขนสีขาวพาดยาวตั้งแต่ขอบล่างด้านซ้ายของ carapace ไปจนถึงขอบล่างด้านขวา ดังรูป 7 A ตา 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 4 – 2 - 2 clypeus แคบ มีฟันแถวหน้าจำนวน 2 ซี่ และแถวหลังจำนวน 1 ซี่ ขาเรียวยาวและมีขนกระจายทั่วทั้งขา ขาปล้องที่ 4 มีหนามสั้น

ท้อง (Abdomen): เรียวยาว มีแต้มขนสีขาวครีมกระจายตามยาวตั้งแต่ด้านบนของส่วนท้องไปจนกระทั่งด้านท้ายของส่วนท้อง spinneret ผอมและเรียวยาว สำหรับmale palp ดังรูป 3.13.7 B และ 3.13.7 C

กรมวิชาการเกษตร

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): อินเดีย เนปาล จีน พม่า เวียดนาม มาเลเซีย สิงค์โปร์ อินโดนีเซีย สำหรับในประเทศไทยพบที่จังหวัด กาญจนบุรี เพชรบุรี ปทุมธานี และกรุงเทพมหานคร

สกุล *Thiania* C. L. Koch, 1846

Type: *Thiania pulcherrima* C. L. Koch, 1846 เพศเมีย

ชื่อพ้อง :

Thiania chiriatapuensis (Tikader, 1977)

Thiania oppressa (Thorell, 1892)

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

สกุลนี้ค้นพบครั้งแรกโดย C. L. Koch ในปี 1846 โดยใช้ *Thiania pulcherrima* เป็นตัวต้นแบบในการจำแนกชนิดสกุลนี้แต่ว่าปัจจุบันได้กลายเป็น senior synonym ของ *Nicylla* (Thorell, 1890) ซึ่งแมงมุมในสกุลนี้ถูกจำแนกแล้วทั้งสิ้น 22 ชนิด (NMBE, 2021) สมาชิกส่วนใหญ่มีcephalothorax (ส่วนหัวและส่วนอก) กว้างและแบน ส่วนท้องผอมเรียวยาว เพศผู้ มี Palpal หนา และมี apophysis ค่อนข้างใหญ่

Thiania bhamoensis Thorell, 1887 (Figure 3.13.8)

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Thorell ในปี 1887 จากประเทศพม่าโดยจำแนกชนิดเป็น *Thiania bhamoensis* ต่อมา Thorell (1891) ได้จำแนกชนิดผิดคิดว่าเป็นแมงมุมชนิดใหม่จึงตั้งชื่อใหม่ว่า *Marptusa oppressa* ในปี 1977 และ 1981 (Tikader, Tikader & Biswas) ได้จำแนกชนิดแมงมุมจากประเทศอินเดียเป็น *Euophrys chiriatapuensis* ตั้งแต่ปี 1983 จนกระทั่งถึงปี 2020 ได้จำแนกชนิดเป็น *Thiania bhamoensis* โดย Chotwong and Tanikawa พบ new record ในประเทศไทยในปี 2013

ชื่อพ้อง :

Thiania bhamoensis Thorell, 1887

Marptusa oppressa Thorell, 1891

Thiania oppressa Simon, 1901

Euophrys chiriatapuensis Tikader & Biswas, 1981

Thiania bhamoensis Prószyński & Deeleman-Reinhold, 2010

Thiania bhamoensis Chotwong & Tanikawa, 2013

ชื่อสามัญ: Fighting Spider

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศผู้ 6-7 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศผู้: ลักษณะกว้างและแบนราบ พื้นที่รอบๆตา มีสีน้ำตาลเข้มออกดำ มีขนสีขาวออกหม่นๆ ลักษณะแววววาวหนาแน่นบริเวณรอบตาแถวแรก ตา 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 4 – 2 - 2 ความกว้างของพื้นที่ตามีมากกว่าความยาวของพื้นที่ตา chelicerae

กรมวิชาการเกษตร

สีน้ำตาลอ่อนและมีฟันแถวหน้าจำนวน 2 ซี่ และแถวหลังจำนวน 1 ซี่ Clypeus สีออกน้ำตาลและมีขนแข็งสีขาวจำนวนมาก maxillae, labium และ sternum สีออกเหลือง sternum สีน้ำตาลอ่อนมีความยาวมากกว่าความกว้างเล็กน้อย labium มีความกว้างมากกว่าความยาว ขาคู่ที่ 1 สีน้ำตาลเข้มออกดำมีลักษณะบวมเล็กน้อยและมีความยาวมากกว่าขาคู่อื่นๆ ขาคู่ที่ 2 ครึ่งหนึ่งทางด้านส่วนปลายของขาปล้องที่ 3 มีสีค่อนข้างเหลืองและครึ่งหนึ่งทางด้านส่วนปลายของขาปล้องที่ 4 และ 5 มีสีน้ำตาลเข้ม ขาปล้องที่ 6 และ7 มีสีน้ำตาลอ่อน ขาคู่ที่ 3 และ 4 มีสีซีดกว่าขาคู่ที่ 2 ซึ่งขาแต่ละข้างจะมีขนที่มีลักษณะเป็นเกล็ดสีฟ้าอมเขียวแแวววาวบนขาปล้องที่ 4 และ 5

ท้อง (Abdomen): เพศผู้; เรียวยาว มีแถบของเกล็ดขนที่มีสีฟ้าอมเขียวแวววาวที่ขอบด้านบน แถบกลาง และด้านล่าง Spinnerets สีออกดำ Palpal organ ไม่มี conductor (ภาพที่ 3.13.8 Bและ 3.13.8C)

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): จีน อินเดีย พม่า เวียดยาม ลาว อินโดนีเซีย (สุมาตราและบาหลี) ปากีสถาน ฟิลิปปินส์ ฮ่องกง ศรีลังกา มาเลเซีย ฮาวาย สำหรับในประเทศไทยสามารถพบทั่วทุกภาคตามบ้านเรือน ภาคเหนือได้แก่ เชียงใหม่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ อุดรธานี ภาคกลางได้แก่ ราชบุรี ภาคตะวันออกได้แก่ ชลบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ภาคใต้ได้แก่ สุราษฎร์ธานี

การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

การศึกษาครั้งนี้ทำการสกัดดีเอ็นเอของแมงมุมกระโดด 60 ตัวอย่าง ได้แก่ *Myrmaraplata plataleoides* จำนวน 15 ตัวอย่าง *Plexippus paykulli* จำนวน 10 ตัวอย่าง *Plexippus petersi* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Phintella vittata* จำนวน 20 ตัวอย่าง *Phintelloides versicolor* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia dimidiata* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia festiva* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *Thiania bhamoensis* จำนวน 8 ตัวอย่างเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *COX*1 ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจากแมงมุมกระโดด ได้แก่ *Myrmaraplata plataleoides* จำนวน 5 ตัวอย่าง *Plexippus paykulli* จำนวน 5 ตัวอย่าง *Plexippus petersi* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Phintella vittata* จำนวน 5 ตัวอย่าง *Phintelloides versicolor* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia dimidiata* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia festiva* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *Thiania bhamoensis* จำนวน 5 ตัวอย่าง บันทึกผลนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่า Barcode (ภาคผนวกที่ 3.13.1) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมงมุมกระโดดที่ทำการศึกษามาเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของแมงมุมกระโดดที่รายงานในฐานข้อมูลสากล คือ Gen Bank เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของดีเอ็นเอบาร์โค้ด พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมงมุมกระโดดที่ทำการศึกษามีความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลสูงถึง 99 - 100%

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าแมงมุมกระโดดบางตัวอย่างเมื่อนำ PCR product (ผลผลิต PCR) มาทำการตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยวิธีการ Gel electrophoresis กลับไม่แสดงแถบแบนบนแผ่นเจล จึงได้ปรับเปลี่ยนวิธีตั้งแต่เปลี่ยนอุณหภูมิในขั้นตอน Denaturation, Annealing และ Extension จำนวนรอบของ cycle จนกระทั่งเปลี่ยน primer ซึ่ง primer ที่สามารถทำให้ผลผลิต PCR แสดงแถบแบนบนแผ่นเจลได้คือ

C1J1718 GGA GGA TTT GGA AAT TGA TTA GTT CC และ

C1N2776 GGA TAA TCA GAA TAT CGT CGA GG (Simon *et al.,* 1994)

<u>การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae</u>

ลักษณะรูปร่างของตาและการจัดเรียงของตาของแมงมุมกระโดดเป็นลักษณะที่สืบทอดมาจากบรรพบุรุษ โดยเฉพาะตากลางคู่หน้าที่มีขนาดใหญ่ มีรูปร่างเป็นหลอด มีเรตินาที่เป็นแถบๆและเป็นชั้นๆซึ่งลักษณะนี้เป็นลักษณะที่ใช้ร่วมเดียวกันกับบรรพบุรุษ จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae เพื่อใช้ยืนยันข้อมูลการจัดจำแนกชนิด โดยทำการวิเคราะห์ sequences ของตำแหน่ง *COX*1 จาก 27 ตัวอย่าง ได้แก่ *Myrmaraplata plataleoides* จำนวน 5 ตัวอย่าง *Plexippus paykulli* จำนวน 6 ตัวอย่าง *Phintella vittata* จำนวน 5 ตัวอย่าง *Phintelloides versicolor* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia dimidiata* จำนวน 5 ตัวอย่าง *Telamonia festiva* จำนวน 1 ตัวอย่างและ *Thiania bhamoensis* จำนวน 1 ตัวอย่าง และสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *COX*1 ของแมงมุมปูวงศ์ Thomisidae *Xysticus lanio* จำนวน 1 ชนิด เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย Neighbor Joining (NJ) และ Maximum Likelihood (ML) พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกัน (Figure11-12) โดยแมงมุมกระโดด สกุล *Myrmaplata, Plexippus, Phintella, Phintelloides, Telamonia* และ *Thiania* มีการแยกเคลดอย่างชัดเจน และเมื่อพิจารณาดูความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลุ่มแมงมุมวงศ์ Salticidae พบว่าแต่ละสกุลมีความสัมพันธ์ภายในกลุ่มที่มีลักษณะเป็น monophyletic ส่วนสกุล *Plexippus paykulli* มีตัวอย่าง 1 ตัวอย่างที่ถูกแยกออกไปจากกลุ่ม จากการที่มีความสัมพันธ์เป็น monophyletic ทำให้มีข้อมูลทางพันธุกรรมที่เหมือนกันนั่นคือเป็นชนิดเดียวกัน ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae สามารถจัดจำแนกความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้ แต่การจัดจำแนกชนิดภายในกลุ่มต้องเพิ่มข้อมูลของดีเอ็นเอของยีนตำแหน่งอื่นมาร่วมวิเคราะห์ ซึ่งยีนตำแหน่ง *COX*1 สามารถจำแนกได้เพียงความแตกต่างในระดับกลุ่มของ สกุล *Myrmaplata, Plexippus, Phintella, Phintelloides,* เท่านั้น แต่สกุล *Telamonia* และ *Thiania* ยังอยู่ใกล้ชิดกัน อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถทราบข้อมูลเบื้องต้นของจำนวนชนิดของแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae ในประเทศไทย แต่การยืนยันชนิดหรือจัดจำแนกชนิดภายในกลุ่มของสกุล *Telamonia และ Thiania* นั้นต้องมีการศึกษาต่อไป

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจากแปลงมันสำปะหลัง สวนชมพู่ แปลงเกษตรกร และขอบชายป่า ในประเทศไทย จากพื้นที่ภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ พบแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae จำนวน 110 ตัวอย่าง และในการจำแนกทางอนุกรมวิธานโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบแมงมุมกระโดด 6 สกุล 8 ชนิด ได้แก่ สกุล Myrmaplata จำนวน 1 ชนิด คือ *Myrmaplata plataleoides* สกุล *Plexippus* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Plexippus paykulli* และ *Plexippus petersi* สกุล *Phintella* จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *Phintella vittata* สกุล *Phintelloides* จำนวน 1 ชนิด คือ *Phintelloides versicolor* สกุล *Telamonia* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Telamonia dimidiata* และ *Telamonia festiva* สกุล Thiania จำนวน 1 ชนิด คือ *Thiania bhamoensis* จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอ ทำการสกัดดีเอ็นเอและพีซีอาร์ บริเวณยีน COX1 ได้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมงมุมกระโดด 60 ตัวอย่าง

กรมวิชาการเกษตร

ได้แก่ *Myrmaraplata plataleoides* จำนวน 15 ตัวอย่าง *Plexippus paykulli* จำนวน 10 ตัวอย่าง Plexippus petersi จำนวน 2 ตัวอย่าง Phintella vittata จำนวน 20 ตัวอย่าง *Phintelloides versicolor* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia dimidiata* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia festiva* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *Thiania bhamoensis* จำนวน 8 ตัวอย่าง

จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลทางชีวโมเลกุลของแมงมุมกระโดดที่มีความซับซ้อนหรือใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นการยากที่จะใช้เพียงลักษณะสัณฐานภายนอกมาเป็นตัวจัดจำแนก และยืนยันว่า COX1 เป็นยีนที่สามารถใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในแมงมุมกระโดดกลุ่ม complex ได้ เนื่องจากยีน COX1 มีความแตกต่างมากพอที่จะทำให้แยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้ เป็นยีนที่มีบริเวณอนุรักษ์ (conserve area) มีขนาดนิวคลีโอไทด์มีความเหมาะสมคือประมาณ 500 - 800 คู่เบส ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนั้น ไพรเมอร์ที่เป็น universal primer จะสามารถเข้ามาจับและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ได้ง่ายและรวดเร็ว นอกจากนี้ลำดับดีเอ็นเอของยีน COX1 ยังสามารถแยกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากได้อีกด้วย และการเลือกบริเวณที่จะนำมาใช้เป็นนั้นมีความสำคัญมาก เพราะหากเลือกขนาดและบริเวณที่นำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้เหมาะสมกับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาจะทำให้สามารถนำไปใช้ได้ง่ายสะดวกและรวดเร็วมากยิ่งขึ้น การศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อใช้ COX1 มีบางตัวอย่างที่ไม่สามารถแสดงผลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมงมุมกระโดดได้เลย ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพิ่มเติมด้วยไพรเมอร์ C1J1718 และ C1N2191 เพื่อให้สามารถแสดงผลผลิต PCR แสดงแถบแบนบนแผ่นเจล นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธีการ Neighbor Joining และ Maximum Likelihood พบว่าแมงมุมกระโดดแต่ละสกุลมีการแยกเคลดอย่างชัดเจน ในขณะที่สกุล *Telamonia* ยังไม่สามารถแยกออกมาจากกลุ่มเดียวกันอย่างชัดเจน หากต้องการศึกษาการแบ่งกลุ่มที่ชัดเจนมากขึ้นจะต้องใช้จำนวนยีนที่มาศึกษาเพิ่มเติมมากขึ้น ดังเช่นงานวิจัยของ Hedin and Maddison (2001) ที่ใช้ยีนศึกษามากกว่า 1 ชนิด เช่น (COX1, ND1, 16S และ 28S) ซึ่งในปี2008 Maddison และคณะ ได้ใช้ยีนตำแหน่งเดิม 4 ชนิดมาใช้ในการศึกษา (COX1, 28S, 18S, 16S-ND1)

นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ยังช่วยยืนยันจำนวนชนิดของแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae ในประเทศไทย ให้มีความสอดคล้องและทันสมัยเทียบเท่าระดับสากล ดังเช่นงานวิจัยของ Maddison et. al (2008) ที่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมงมุมกระโดดในประเทศออสเตรเลียโดยได้จัดกลุ่มความสัมพันธ์ใหม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Table 3.13.1 Spider Fauna in Family Salticidae found in Thailand between 2017 until 2020

Scientific name	Habitus	Location	GPS	Reference
Myrmaplata plataleoides (O. Pickard-Cambridge, 1869)	dry evergreen forest	Nakron Rachasima	14^{0}30'26.6580",101^{0}55'39.3312"	W. Chotwong
	Cassava field	Kamphaeng Phet	-	J. Bangtha
	Rose apple orchard	Phetchaburi	12^{0}53'45.0", 99^{0}50'57.8"	W. Chotwong
	forest	Kanchanaburi	14° 50' 0.9" , 98° 39' 51.4"	W. Chotwong
	along forest	ChiangMai	12^{0}53'45.0", 99^{0}50'57.8"	W. Chotwong
Plexippus paykulli (Audouin, 1826)		Singburi	-	J. Bangtha
Plexippus petersi (Karsch, 1878)	forest	Kanchanaburi	14° 50' 0.9" , 98° 39' 51.4"	W. Chotwong
Phintella vittata (C. L. Koch, 1846),	cassava	Rayong	14^{0}30'26.6580",101^{0}55'39.3312"	W. Chotwong
Phintelloides versicolor (C. L. Koch, 1846),	mango	Rayong Kanchanaburi		W. Chotwong

Table 3.13.1 Spider Fauna in Family Salticidae found in Thailand between 2017 until 2020 (Continue)

Scientific name	Habitat	Location	Reference
Telamonia dimidiata (Simon, 1899)	Edge of forest	Pranburi, Prachuap Khiri Khan	J. Bangtha
	Cassava field	Thung Phaya, Chachoengsao	S. Chaowarit
	Edge of cassava field	Nai meuang, Khon Kaen	L. Chalermkiat
	grass	Lop Buri	R. Pongpattana
	Laterite pond	Lop Buri	R. Pongpattana
Telamonia festiva Thorell, 1887	Edge of cassava field	Thammamun, Chai Nat	J. Bangtha
Thiania bhamoensis Thorell, 1887	grass	Rachaburi	J. Bangtha

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.131 *Myrmaplata plataleoides* (O. Pickard-Cambridge, 1869); female abdomen dorsal view (A), male (B), chelicerae and fang; lateral view (C), epigyne; ventral view (D), left palp; ventral view (E), lateral view (F)

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.13.2 . *Plexippus petersi* (Karsch, 1878); female abdomen dorsal view (A), male (B), epigyne; ventral view (C), left palp; ventral view (D), lateral view (E)

Figure 3.13.3 *Plexippus paykulli* (Audouin, 1826); female abdomen dorsal view (A), male (B), epigyne; ventral view (C), left palp; ventral view (D), lateral view (E)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Figure 3.13.4 *Phintelloides versicolor* (C. L. Koch, 1846); female abdomen dorsal view (A), epigyne; ventral view (B)

Figure 3.13.5 *Phintella vittata* (C. L. Koch, 1846); male abdomen dorsal view (A), left palp; ventral view (B), lateral view (C)

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.13.6 *Telamonia dimidiata* (Simon, 1899); male abdomen dorsal view (A), chelicera and carapace (B), left palp; ventral view (B)

Figure 3.13.7 *Telamonia festiva* Thorell, 1887; male abdomen dorsal view (A), left palp; ventral view (B), lateral view (C)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Figure 3.13.8 *Thiania bhamoensis* Thorell, 1887; male abdomen dorsal view (A), left palp; ventral view (B), lateral view (C)

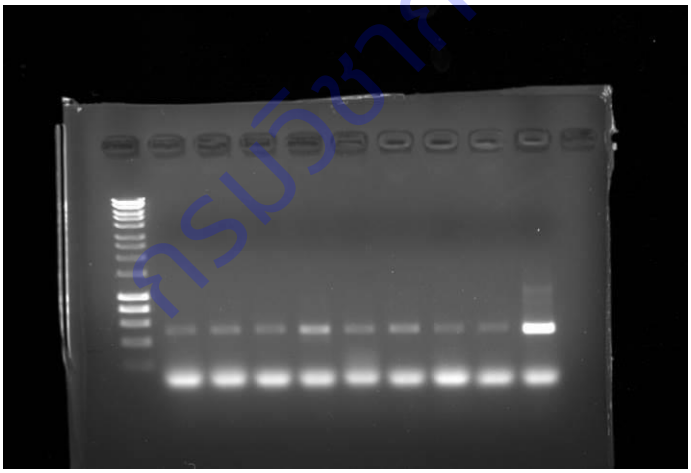


Figure 3.13.9 PCR product จาก ยีน COX1 จากแมงมุมกระโดด *Myrmaplata plataleoides* (ตัวอย่าง 1) *Plexippus petersi* (ตัวอย่าง 2) *Plexippus paykulli* (ตัวอย่าง 3) *Phintelloides versicolor* (ตัวอย่าง 4) *Phintella vittata* (ตัวอย่าง 5) *Telamonia dimidiata* (ตัวอย่าง 6) *Thiania bhamoensis* (ตัวอย่าง 7-8) และpositive (ตัวอย่าง 9)

กรมวิชาการเกษตร

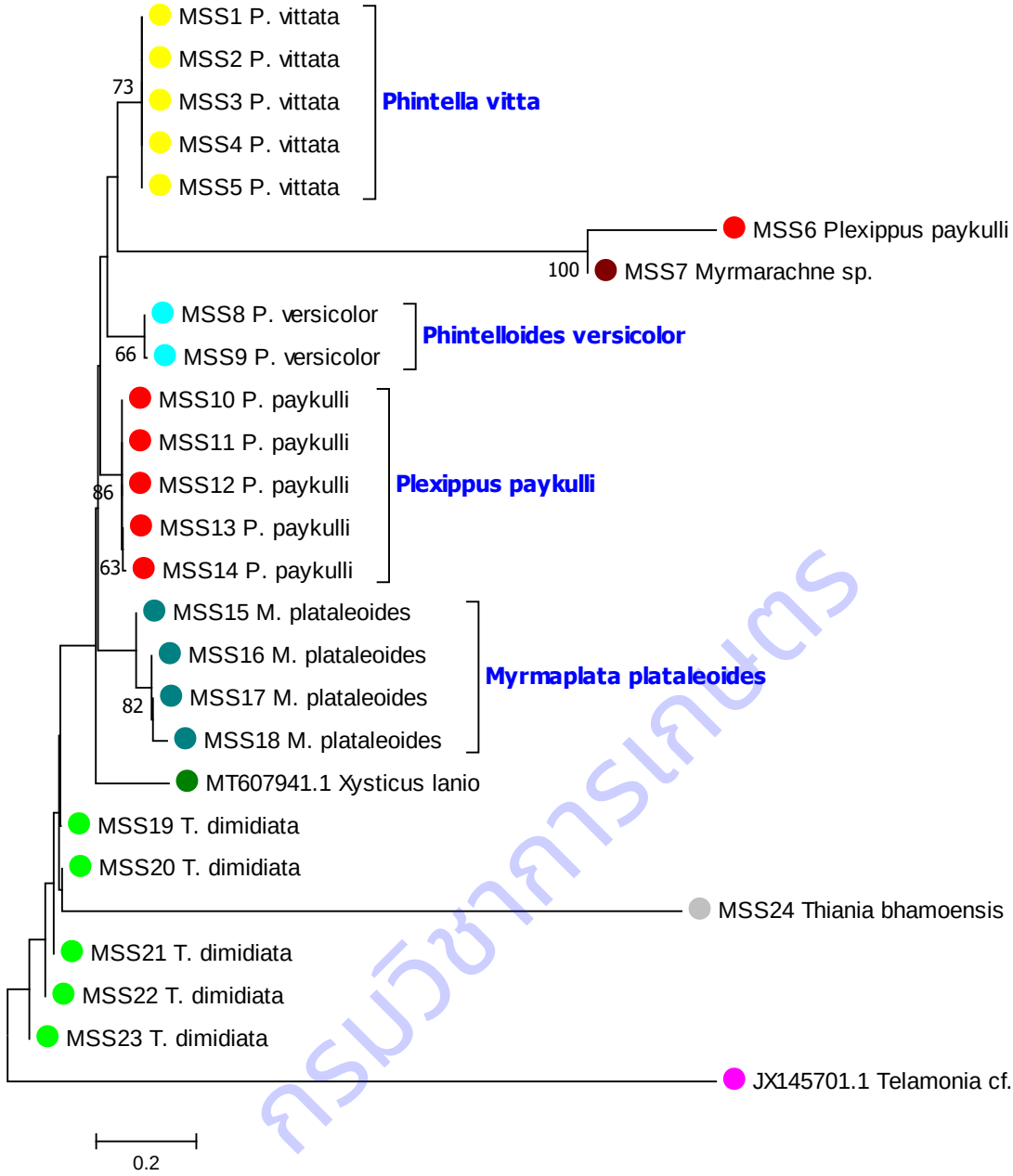


Figure 3.13.10 Neighbor joining analysis phylogenetic tree based on *COX*1 gene sequences. *Xysiticus lanio* was used as outgroup. The scale bar = 0.02 substitutions per nucleotide position. Percent bootstrap values above 50 (1000 replicates) are indicated at notes.

กรมวิชาการเกษตร

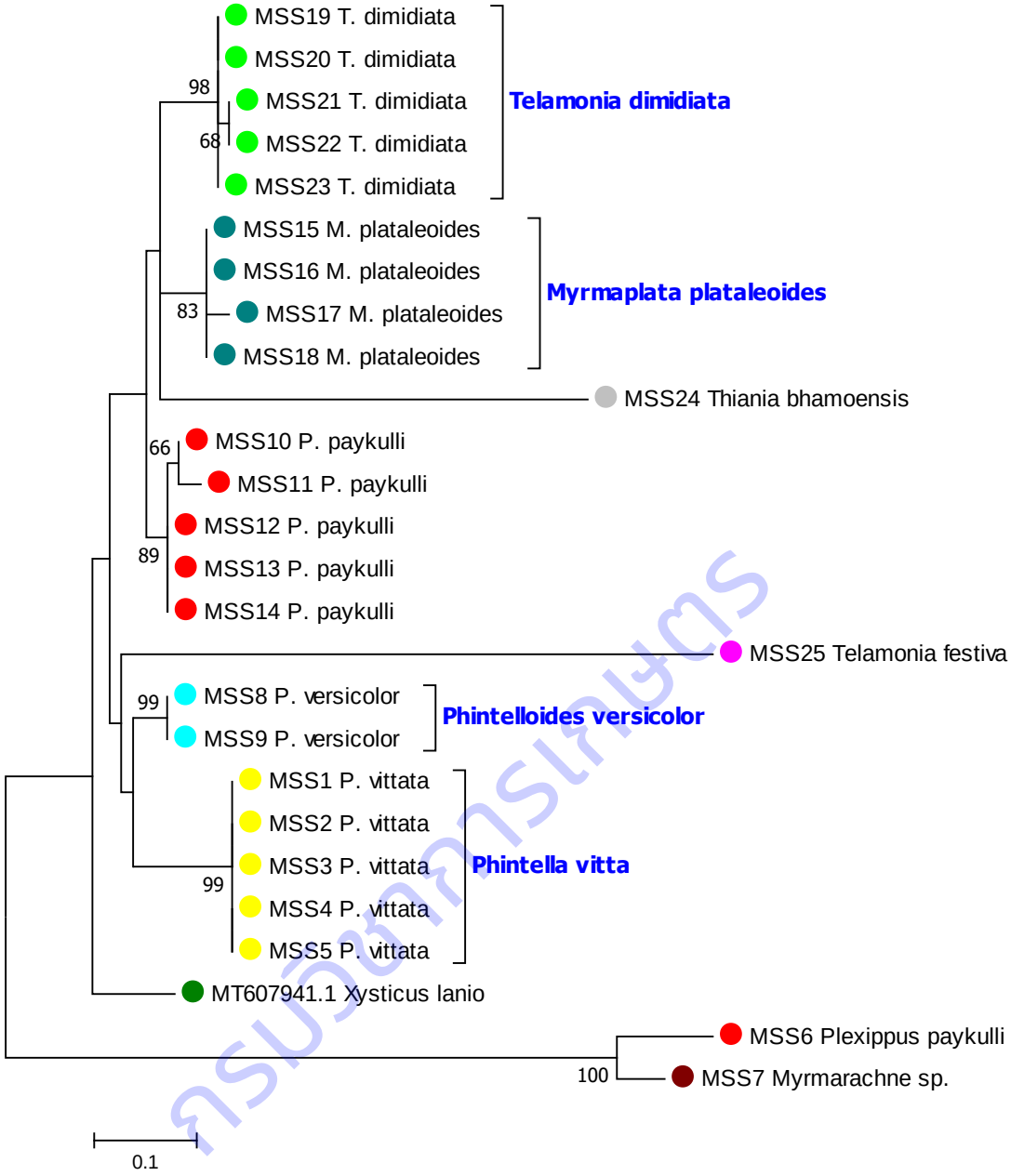


Figure 3.13.11 Maximum likelihood phylogenetic tree based on *COX*1 gene sequences, showing the phylogenetic relationship among Salticidae Specimens and *Xysiticus lanio* was used as outgroup. The number of sites are 650, and scale bar = 0.01 substitutions per nucleotide position. Percent bootstrap values above 50 (1000 replicates) are indicated at notes.

กรมวิทยาศาสตร์

การทดลองที่ 3.14 การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของราสกุล *Curvularia* สาเหตุโรคพืช

DNA Barcoding of Plant Pathogenic *Curvularia*

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวชนินทร ดวงสอาด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวอมรรัชฎ์ คิดใจเดียว	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Curvularia* ระหว่างเดือนตุลาคม 2561 - กันยายน 2562 จากจังหวัดกาญจนบุรี กระบี่ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชุมพร เชียงราย เชียงใหม่ ชลบุรี นครนายก นครปฐม นครราชสีมา ประจวบคีรีขันธ์ พิษณุโลก พะเยา เพชรบูรณ์ ราชบุรี ลำปาง สุโขทัย สุรินทร์ สระแก้ว และสุราษฎร์ธานี จำนวน 39 ตัวอย่าง แยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้จากตัวอย่างโรคพืชด้วยวิธี tissue transplanting ได้รา *Curvularia* spp. จำนวน 47 ไอโซเลต จำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) translation elongation factor 1-alpha (tef1) และ glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) ของรา *Curvularia* จำนวน 15 ไอโซเลต สามารถจำแนกชนิดได้ดังนี้ *C. akaiiensis C. dactyloctenicola C. eragrostidis C. geniculata C. lunata C. oryzae* และ *C. pseudobrachyspora* ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาจัดทำเป็นตัวอย่างแห้งเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

Plant disease samples caused by *Curvularia* had been collected from various located in Kanchanaburi, Krabi, Chanthaburi, Chachoengsao, Chumphon, Chiang Rai, Chiang Mai, Chonburi, Nakhon Nayok, Nakhon Pathom, Nakhon Ratchasima, Prachuap Khiri Khan, Phitsanulok, Phayao, Phetchabun, Ratchaburi, Lampang, Sukhotai, Surin, Sakaeo and Surat Thani provinces during October 2018 to September 2019. The causal agents of leaf spot and blight diseases were isolated from specimens of plants by tissue transplanting technique. The fifty-five isolates, which were obtained from 39 specimens, were identified based on morphological and molecular data of Internal Transcribed Spacer (ITS), translation elongation factor 1-alpha (tef1) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene regions. The result showed that 47 isolates were identified as *Curvularia* 15 isolates. The taxa in this species is *C. akaiiensis C. dactyloctenicola C. eragrostidis C. geniculata C. lunata C. oryzae* และ *C. pseudobrachyspora*. All specimens from this

กรมวิชาการเกษตร

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.

คำนำ

เชื้อรา *Curvularia* Boedijn (1933) เป็นระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา *Cochliobolus* Drechsler (1934) จัดอยู่ใน Kingdom fungi Phylum Ascomycota Class Dothideomycetes Order Pleosporales Family Pleosporaceae (Mycobank, 2019) พบแพร่กระจายทั่วไปและเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคพืชที่สำคัญของพืชหลายชนิด เช่น ปาล์มน้ำมัน กล้วยไม้ และข้าว เป็นต้น (จิตรา และคณะ, 2557; วรรณิภา และคณะ, 2555; เลขา และคณะ, 2544)

Cui and Sun (2012) รายงานพบเชื้อรา *Curvularia lunata* เป็นสาเหตุของโรคใบจุดของบัวเป็นครั้งแรก ในเมือง Pingxiang ประเทศจีน ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้บัวแห้งตายถึง 60 เปอร์เซ็นต์และส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทำให้ผลผลิตลดลงถึง 10-15 เปอร์เซ็นต์ บัวที่เกิดโรคจะมีลักษณะเป็นจุดสีม่วงแกมน้ำตาลเกิดบนใบมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-3 เซนติเมตร ต่อมาบริเวณตรงกลางแผลจะเปลี่ยนเป็นสีเทาถึงขาวและขอบแผลจะเป็นสีน้ำตาลเข้มถึงดำ นอกจากนี้ มีรายงานพบหญ้า Switchgrass (*Panicum virgatum* cv. Alamo) มีลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาลและอาการ necrotic root ซึ่งพบเป็นครั้งแรกใน Knoxville รัฐ Tennessee ประเทศสหรัฐอเมริกา แยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้จากพืชที่แสดงลักษณะอาการของโรค เชื้อที่แยกได้มีลักษณะโคโลนีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ สร้าง stromata สีดำ conidiophores มีสีน้ำตาลดำ ไม่แตกกิ่งก้าน มีผนังกั้น polytretic sympodial และ geniculate สร้างโคนิเดียที่บริเวณปลาย โคนีเดียมีลักษณะสีน้ำตาลดำ รูปร่าง cymbiform มีผนังกั้น 3-4 septate เซลล์บริเวณส่วนกลางของโคนิเดียประมาณ 1-2 เซลล์ มีขนาดใหญ่กว่าบริเวณปลาย ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับรา *Curvularia lunata* var. *aeria* (*Cochliobolus lunatus*) (Fajolu *et al*., 2012)

ในประเทศไทยมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อรา *Curvularia* ทั้งในด้านการสำรวจ ความหลากหลายของราชนิดนี้ทั้งในดินและในพืช โดยนิยม (2542) ทำการศึกษาความหลากหลายของราดินและราโรคพืชในดินปลูกพืชไร่ในจังหวัดสกลนครพบว่าสามารถแยกเชื้อรา *C. eragrostidis* ได้จากดินปลูกมันสำปะหลัง และดินปอแก้ว ในปี 2553 พีระวรรณ และคณะ ทำการสำรวจ รวบรวม และจำแนกเชื้อราสกุล *Curvularia* โดยเก็บตัวอย่างพืชที่มีลักษณะอาการไหม้และใบจุด มาทำการแยกเชื้อสาเหตุโรค พบว่าสามารถแยกได้เชื้อรา *Curvularia* ทั้งหมด 45 ไอโซเลต โดยแยกเชื้อสาเหตุได้จากพืชที่เป็นโรคต่างๆ ดังนี้ โรคใบจุดข้าวโพด โรคเมล็ดด่างข้าว โรคใบจุด โรคใบไหม้เยอบีร่า โรคเมล็ดเน่าดำข้าวฟ่าง โรคใบไหม้สบู่ดำ โรคใบไหม้วัชพืชหญ้ายาง โรคใบไหม้ปาล์มน้ำมัน โรคดอกสนิมหรือโรคจุดสนิมบนดอกไม้สกุลหวาย โรคจุดบนกล้วยไม้สกุลออยเดียม โรคใบแกลดดิโอลัส โรคใบไหม้ลิ้นมังกรใบจุดบานชื่น และ ฝักจุดกระเจี๊ยบแดงเช่นเดียวกันกับเลขา และคณะ (2544) ศึกษาเชื้อราโรคพืชและเชื้อราอื่นๆ บนข้าวโพด ข้าว และหญ้าโดยวิธี tissue transplanting พบเชื้อราจำนวน 19 ชนิด ซึ่ง 1 ใน 19 ชนิดนี้พบทั้งเชื้อราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris*

ศรีบัวการพิมพ์

สมศิริ และ ศศิวิมล (2011) รายงานการสำรวจโรคที่สำคัญของดอกกล้วยไม้ตัดดอกสกุลหวายเอียสกุลที่ผลิตเป็นการค้า (*Dendrobium* 'Earsakul') พบโรคสำคัญที่ดอก คือ โรคเกสรดำและโรคดอกสนิม โดยพบเชื้อราที่แยกได้จากโรคเกสรดำ ได้แก่ *Alternaria alternata, Curvularia lunata, Drechslera* sp., *Nigrospora* sp., *Fusarium* sp. และ *Cladosporium* sp. และเชื้อราแยกได้จากโรคดอกสนิม ได้แก่ เชื้อรา *A. alternata, Curvularia eragostidis, C. lunata, Nigrospora* sp. และ *Drechslera* sp. นำเชื้อราที่แยกได้ไปทดสอบการเกิดโรคกับดอกกล้วยไม้ พบว่า เชื้อสาเหตุของโรคเกสรดำ คือ *C. lunata* และเชื้อราสาเหตุของโรคดอกสนิม คือ *A. alternata* และ *C. eragrostidis*

Kittimorakul *et al*. (2013) ทำการสำรวจโรคใบไหม้และใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในภาคใต้ของประเทศไทย โดยทำการเก็บตัวอย่างโรค 277 ตัวอย่าง จาก 11 จังหวัดในภาคใต้ของประเทศไทย ทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคได้ 197 ไอโซเลต สามารถจัดจำแนกเป็น *Curvularia* 149 ไอโซเลต และ *Colletotrichum* 48 ไอโซเลต แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของปัญหาโรคใบจุดในระยะต้นกล้าของปาล์มน้ำมัน นอกจากนี้ Sunpapoa and Kittimorakul (2014) รายงานเชื้อรา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยแยกเชื้อราสาเหตุของโรคจากต้นกล้าปาล์มที่มีอายุ 3-4 เดือนที่แสดงลักษณะอาการของโรคใบจุด และนำเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้มาศึกษาลักษณะสัณฐานของเชื้อราและวิธีทางอนูชีวโมเลกุลร่วมด้วย

วรัญญู และ นิวัฒ (2559) ได้รายงานโรคของกล้าไม้พะยูง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre ex Laness) พบว่ามีเชื้อรา *Curvularia* sp. มีความเกี่ยวข้องต่อการเกิดโรคใบจุดของกล้าไม้พะยูง นอกจากพบมีรายงานการก่อโรคในพืชแล้วพบมีรายงานการศึกษาเชื้อรา *Curvularia* ที่แยกได้จากวัชพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ หญ้าแห้วหมู หญ้าปากควาย หญ้านกสีชมพู หญ้าตีนกา หญ้าตีนนก หญ้าตีนติด หญ้าโขย่ง หญ้าขจรจบดอกเล็ก น้ำนมราชสีห์ ผักขม ผักเบี้ยหิน และผักยาง (จิตรา, 2547)

จากงานวิจัยที่กล่าวมาในข้างต้นแสดงให้เห็นว่ารา *Curvularia* เป็นสาเหตุของโรคพืชหลายชนิด และการจัดจำแนกชนิดของราในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีบางงานวิจัยที่นำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลร่วมด้วย การจัดจำแนกรา *Curvularia* ยังมีความสับสน และมีปัญหาเนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจัดจำแนกนั้นมีความคล้ายคลึงกันกับรา *Bipolaris* และรา 2 ชนิดนี้มีระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเป็นรา *Cochliobolus* Drechsler (1934) เหมือนกัน Jeon *et al*., (2015) ได้นำข้อมูลทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาทำการจัดจำแนกชนิดของรา *Curvularia* โดยเลือกใช้ multi loci seguences (rDNA internal transcribed spacer (ITS), large ribosomal subunit (28S) และ glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)) เพื่อจำแนกและจัดกลุ่มของรา *Curvularia spicifera* นอกจากนี้ Sun *et al*., (2003) ได้ทำการแยกรา *Curvularia geniculata* group โดยใช้ *Brn1* gene sequences จำแนกชนิดและเพื่อยืนยันความแตกต่างของราในกลุ่มนี้ เชื้อรา *C. geniculata* group ประกอบไปด้วย *Curvularia affinis C. fallax* และ *C. senegalensis* ราทั้ง 3 ชนิดนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับรา *C. geniculata* มาก หากใช้ข้อมูลด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวคงไม่เพียงพอต่อการยืนยันผลความแตกต่างจึงจำเป็นต้องมีข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลช่วยยืนยันผลความแตกต่างเพื่อความถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น ดังนั้น การศึกษารา *Curvularia* จึงจำเป็นต้องใช้ทั้งข้อมูลด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับข้อมูลด้านชีวโมเลกุลเพื่อยืนยันผลการจัดจำแนก

ที่ถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น และข้อมูลทางชีโมเลกุลที่ได้สามารถนำไปศึกษาต่อทางด้านวิวัฒนาการของราชนิดนี้ เพื่อเป็นข้อมูลในการสืบค้นและเป็นแหล่งอ้างอิงในการทำงานวิจัยต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ มีด กรรไกร กรรไกรตัดกิ่ง ถุงพลาสติก กระดาษหนังสือพิมพ์ กระดาษบันทึก ปากกาเคมี และเครื่องระบุพิกัด

2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่

- ตู้เขี่ยเชื้อ
- หม้อนึ่งความดัน
- ตู้อบฆ่าเชื้อ
- Microcentrifuge
- Thermal cyclers
- Vortex
- Tissue Lyser
- Gel electrophoresis
- เครื่องถ่ายภาพเจล
- microwave micropipette ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร และ
- Dry heat block
- กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo พร้อมกล้องถ่ายภาพ

3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวดดูแรน บีกเกอร์ กระบอกตวง แท่งแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์ สไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์

4. เข็มเขี่ยปลายแหลม ห่วงถ่ายเชื้อ ปากคีบ ใบมีดผ่าตัด ด้ามมีด

5. อาหารแยกและเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Water Agar (WA), ½Potato Dextrose Agar (½PDA) และ Potato Dextrose Agar (PDA)

6. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ และเอธิลแอลกอฮอล์ 75%

7. สารเคมี ได้แก่

- Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™)
- High fidelity Phusion® DNA Polymerase (New England Biolabs)
- Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (Glucanex®)
- Lithium Borate buffer (LB)
- PureDireX Genomic DNA Isolation Kit
- QIAquick Gel Extraction Kit

ศรีวิชาการเกษตร

- SERVA HiSens Stain G

- Nuclease-Free Water

- ไพร์เมอร์ ได้แก่

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

ITS1: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA (White *et al*., 1990)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.,* 1990)

V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

EF1-983F: GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT (Rehner and Buckley, 2005)

EF1-2218R: ATGACACCRACRGCRACRGTYTG (Rehner and Buckley, 2005)

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

gpd1: CAACGGCTTCGGTCGCATTG (Berbee *et al*., 1999)

gpd2: GCCAAGCAGTTGGTTGTGC (Berbee *et al*., 1999)

8. อุปกรณ์ทำตัวอย่างแห้ง ได้แก่ กระดาษหนังสือพิมพ์ ไม้ทับตัวอย่าง กระดาษฟาง และซองกระดาษสำหรับใส่ตัวอย่าง

วิธีการ

1. เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia*

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia* โดยเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรค ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ บันทึกข้อมูลรายละเอียดของการเก็บตัวอย่าง วันที่ พิกัด สถานที่ ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ รวมถึงตัวอย่างแห้งที่เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. ศึกษาและจำแนกชนิดของราสกุล *Curvularia* สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือทำ moist chamber โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 3-7 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือโคนิเดียใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บางๆ และตรวจดูลักษณะต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปและบันทึกลักษณะต่างๆ ของเชื้อ

- แยกเชื้อราโดยวิธี tissue transplanting นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน หากพบเส้นใยของเชื้อราเจริญออกจากชิ้นส่วนพืชให้ทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อศึกษาต่อไป

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของเชื้อ โดยบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ลักษณะและสีของโคโลนี บันทึกลักษณะทางสัณฐาน ได้แก่ รูปร่าง ขนาด สี ของก้านชูสปอร์

กรมวิชาการเกษตร

(conidiophores) โคนิเดีย (conidia) และโครงสร้างอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound และถ่ายภาพ จากนั้นนำข้อมูลขนาดโครงสร้างต่างๆ ที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ย และจำแนกชนิดโดยเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อราที่ศึกษากับคู่มือของ Ellis (1971, 1976) Manamgoda *et al.* (2014) และ Seifert *et al.* (2011) นอกจากนี้สามารถใช้ข้อมูลบางส่วนจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องซึ่งได้มีการศึกษาและจำแนกชนิดของเชื้อรา *Curvularia* เพื่อประกอบการวิเคราะห์ต่อไป

3. การจำแนกชนิดของราสกุล *Curvularia* สาเหตุโรคพืช โดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

การสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยและโคนีเดียของรา *Curvularia* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ ทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

ITS1: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA (White *et al.*, 1990)

V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990)

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

EF1-983F: GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT (Rehner and Buckley, 2005)

EF1-2218R: ATGACACCRACRGCRACRGTYTG (Rehner and Buckley, 2005)

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

gpd1: CAACGGCTTCGGTCGCATTG (Berbee *et al*., 1999)

gpd2: GCCAAGCAGTTGGTTGTGC (Berbee *et al*., 1999)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของตำแหน่ง ITS tef1 และ GAPDH ด้วย Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนด annealing temperature ที่ 56 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ด้วย loading dye 1 ไมโครลิตร และ SERVA HiSens Stain G ในอัตราส่วน 1:50,000 ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยังบริษัท Macrogen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

กรมวิชาการเกษตร

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ที่ได้จากการทดลองมาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious version 8.1.9 (http://www.geneious.com, Kearse *et al*., 2012) บันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consencus sequence ที่บันทึกไว้ในรูปแบบ fasta ไฟล์) ที่ได้จากการทดลองและจากการรวบรวมข้อมูลมาจัดเรียง (align) เป็นชุดข้อมูล (dataset) ด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Katoh and Toh, 2008) จากนั้นตรวจสอบการจัดเรียงของชุดข้อมูล (alignment) โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 (Kumar *et al*., 2016) จากนั้นใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) ทำ dataset ของแต่ละตำแหน่ง และ partitioned (combined) dataset ของตำแหน่ง ITS TEF1 และ GAPDH บันทึก dataset และ partitioned dataset ในรูปแบบไฟล์ .nexus โดยใช้โปรแกรม Mesquite

การเก็บรักษา

การเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA templates) ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูล เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อรา และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการศึกษา เชื้อราที่แยกได้เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอต้นแบบจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และข้อมูลรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcodes หรือ consensus sequences) จะถูกเก็บบันทึกและรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

- เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2561 – กันยายน 2563

ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการใบจุดและใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia* (ภาพที่ 3.14.1) จากจังหวัดกาญจนบุรี กระบี่ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชุมพร เชียงราย เชียงใหม่ ชลบุรี นครนายก นครปฐม นครราชสีมา ประจวบคีรีขันธ์ พิษณุโลก พะเยา เพชรบูรณ์ ราชบุรี ลำปาง สุโขทัย สุรินทร์ สระแก้ว และสุราษฎร์ธานี จำนวน 39 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.14.1)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3.14.1 ตัวอย่างพืชที่แสดงลักษณะอาการใบจุดและใบไหม้ที่เกิดจากรา *Curvularia* ที่ทำการเก็บจากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย

ชื่อพืช	สถานที่
กล้วยไม้สกุลหวาย	ต.หนองลาน อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี
	ต.นราภิรมณ์ อ.บางเลน จ.นครปฐม
	ต.คลองใหญ่ อ.องครักษ์ จ.นครนายก
แก้วมังกร	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
ข้าว	ต.เขาค้อ อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์
	ต.เขาแก้วศรีสมบูรณ์ อ.ทุ่งเสรี่ยม จ.สุโขทัย
	ต.บุฤๅษี อ.เมือง จ.สุรินทร์
ข้าวโพด	ต.พระแท่น อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี
	ต.วังขนาย อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี
	ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่
	ต.ท่าตอน อ.แม่อาย จ.เชียงใหม่
	ต.แม่ข้าวต้ม อ.เมือง จ.เชียงราย
	อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา
	ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม
	ต.ทุ่งบัว อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม
	ต.ปลักแรด อ.บางระกำ จ.พิษณุโลก
	ต.มะต้อง อ.พรหมพิราม จ.พิษณุโลก
	ต.ทับพริก อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว
	ต.บางสง อ.ปากแคว จ.สุโขทัย
ขนุน	อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์
ปาล์มน้ำมัน	ต.เขาคราม อ.เมือง จ.กระบี่
	ต.ปกาสัย อ.เหนือคลอง จ.กระบี่
	ต.ท่าชนะ อ.คันธุลี จ.สุราษฎร์ธานี
	ต.คลองน้อย อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี
หญ้าปากควาย	อ. ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี
หญ้าตีนกา	อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม
	อ.แก่งกระจาน จ.เพชรบุรี
หญ้าสนามกอล์ฟ	ต.หอมศีล อ.บางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา
	จ.ชลบุรี
มะพร้าว	อ.สวี จ. ชุมพร
	ต.วังเย็น อ.บางแพ จ.ราชบุรี
	ต.คันธุลี อ.ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี
มะละกอ	อ.ดอกคำใต้ จ.พะเยา

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 3.14.1 ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการใบจุดและใบไหม้ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Curvularia*

แยกเชื้อรา *Curvularia* ได้จำนวน 47 ไอโซเลต จากนั้นนำเชื้อรา *Curvularia* ที่แยกได้จากตัวอย่างโรคพืชมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐาน โดยศึกษาลักษณะของโคโลนี ขนาด และสี ลักษณะของเส้นใย ลักษณะของก้านชูสปอร์ และลักษณะของโคนิเดียเปรียบเทียบกับเอกสารการจำแนกเชื้อรา Dematiaceous hyphomycetes และ more Dematiaceous hyphomycetes ของ Ellis M.B. (1971, 1976) และ The Genera of Hyphomycetes ของ Seifert *et al.* (2011) เลือกเชื้อรา *Curvularia* จำนวน 15 ไอโซเลต มาสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *Curvularia* โดยทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบด้วยเทคนิค PCR และทำการวิเคราะห์ phylogenetic reconstruction ด้วย sequences ของตำแหน่ง ITS tef1 และ GAPDH นำข้อมูลที่ได้ไปดำเนินการวิเคราะห์ผลโดยเทียบกับ type sequences สามารถจำแนกเชื้อรา *Curvularia* ได้ 7 ชนิด ได้แก่ *C. akaiiensis C. dactyloctenicola C. eragrostidis C. geniculata C. lunata C. oryzae* และ *C. pseudobrachyspora*

การจำแนกราสกุล *Curvularia* โดยมีรายละเอียดต่างๆ ดังต่อไปนี้

Scientific Classification

Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Class: Dothideomycetes

Subclass: Pleosporomycetidae

Order: Pleosporales

Family: Pleosporaceae

Genus: *Curvularia*

Curvularia akaiiensis Sivanesan

ชื่อโรค ใบจุด

พืชอาศัยที่พบ ข้าวโพด (*Zea mays*)

พืชอาศัยอื่น หญ้า

แหล่งที่พบ กาญจนบุรี นครปฐม นครราชสีมา พิษณุโลก สุโขทัย สระแก้ว

ลักษณะอาการของโรค จุดขนาดเล็กกระจายทั่วใบข้าวโพด บริเวณกลางแผลจะมีสีน้ำตาลเนื่องจากเนื้อเยื่อถูกเชื้อราสาเหตุโรคเข้าทำลาย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส มีสีเทา ด้านใต้วุ้นอาหารสีน้ำตาลถึงดำ ก้านชูสปอร์มีลักษณะเกิดแบบเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม สีน้ำตาล ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล บริเวณส่วนปลายหักแบบ geniculate โคนิเดียมีรูปร่างตรงหรือโค้งงอเล็กน้อย รูปคล้ายกระบอง ผนังเรียบ มีผนังกั้น 3 เส้น มี 4 เซลล์ เซลล์ที่สามจากฐานมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์อื่นๆ มีสีน้ำตาลเข้ม เซลล์หัวและท้ายมีสีอ่อน มีขนาด 22.00–26.5 × 7.3–14.5 ไมโครเมตร จากการศึกษาครั้งนี้แยกได้จากลักษณะอาการใบจุดของข้าวโพดสอดคล้องกับงานวิจัยของ เลขา และคณะ (2544)

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

TGTCTTTTGCGCACTTGTTGTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCGCCACCAGGACCACATGATAAACCTTTTTTATGCAGTTGCAAT
CAGCGTCAGTACAACAAAATGTAAATCATTTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAG
GGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTTGGGCGTCTTGTCTTTGCTCCGCCAAAGACTCGCC
TTAAAACGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGCAGCGCAGCACATTTTTGC

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

TGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGTCAGACTCGTGAGCACGCCCTGCTTGCCTACACCCTCGGTGTCAAGCAGCTC
ATCGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCTGAGGATCGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGACCTCCAACTTCA
TCAAGAAGGTCGGCTACAACCCCAAGCACGTTCCCTTCGTCCCCATCTCCGGTTTCAACGGAGACAACATGATTGAGGCCTC

CACCAACTGCCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGACCAAGTCCACTGGTAAGACCCTCCTCGAGGCCATCGAC
GCCATCGACGCTCCCGTCCGTCCTACCGACAAGCCTCTCCGCCTTCCCCTCCAGGATGTCTACAAGATTGGTGGTATTGGCA
CGGTTCCCGTCGGTCGTGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCCGGTATGGTCGTCACCTTCGCCCCCGCTGGTGTCACCACTGA
GGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACTGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTCAAGAACGTC
TCCGTCAAGGAGATCCGTCGTGGTAACGTTGCTGGTGACTCCAAGAACGACCCCCCCAAGGGTTGCGAGTCCTTCAACGCCC
AGGTCATCGTCCTCAACCACCCCGGTCAGGTCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCTTGACTGCCACACTGCCCACATTGCCTG
CAAGTTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGCCGTACCGGAAAGTCTGTTGAAA

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

CCGTATCGTCTTCCGCAATGCGTACGTGTTCCTGGATCCATTGATCCATTGTGTATCAAGGCTAATCAAGGCGCGCAGCATCG
AGCACAACGACGTCGAGATTGTCGCCGTCAACGACCCCTTCATCGAGCCCCACTACGCTGTAAGCATCCCCGACACAGATTC
CTACTGTCTGAGCAATGCGTGCTAATATCCACATAGGCATACATGCTCAAGTATGACAGCACACACGGCCAGTTCAAGGGCG
ACATCAAGGTTGACGGCAACAACCTGACCGTCAACGGCAAGACCGTCCGCTTCCACATGGAGAAGGACCCCGCCAACATCCC
ATGGAGCGAGACCGGCGCTTACTACGTCGTTGAGTCTACCGGTGTCTTCACCACCACCGAGAAGGCCAAGGCTCACTTGAAG
GGTGGAGCCAAGAAGGTTGTCATCTCTGCTCCCTCCGCCGATGCCCCCATGTTCGTCATGGGTGTCAACCACGAGACCTACA
AGTCTGACATTGAGGTGCTCTCCAACGCCTCCTG

Curvularia dactyloctenicola Y. Marín, Senwanna & Crous, sp. nov.

ชื่อโรค ใบจุด

พืชอาศัยที่พบ หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium* sp.)

พืชอาศัยอื่น หญ้า (*Dactyloctenium aegyptium*) (Marin-Felix *et al.*, 2017)

แหล่งที่พบ กาญจนบุรี

ลักษณะอาการของโรค เริ่มแรกมีจุดสีน้ำตาลแดง จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และมีสีเหลืองรอบๆ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ลักษณะฟูคล้ายคอทตอน มีสีเทา ใต้โคโลนีมีสำดำ สร้างก้านชูสปอร์แบบเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม ตั้งตรง หรือ งอ บางครั้งพบบริเวณปลายหักแบบ geniculate บริเวณปลายก้านชูสปอร์มีสีอ่อน โคนิเดียมีรูปร่างโค้งงอ บางครั้งพบรูปร่างรีหรือรูปไข่ ผนังเรียบ สีน้ำตาลอ่อน มี 3-4 เซลล์ มีขนาด 21.0-27.5 x 7.3-9.0 ไมโครเมตร จากการศึกษาครั้งนี้แยกได้จากหญ้าปากควายที่มีลักษณะอาการใบจุดสอดคล้องกับงานวิจัยของ Marin-Felix *et al.* (2017) รายงานแยกเชื้อราชนิดนี้จากใบจุดหญ้า (*Dactyloctenium aegyptium*)

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

AGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAATACAATATGAAGGCTGTCCGCAGCTGGAGTATTTTATTACCCT
TGTCTTTTGCGCACTTGTTGTTTCCTGGGCGGGTTCGCTCGCCACCAGGACCACCAAATAAACCTTTTTTATGCAGTTGCAAT
CAGCGTCAGTACAAACAATGTAAATCATTTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGG

กรมวิชาการเกษตร

GCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTTGGGCGTTTTTGTCTTTGGTCGCCCAAAGACTCGCC
TTAAAGTGATTGGCAGCCGGCCTTTCTGGTTTCGCAGCGCAGCACATTTTTGCGCTTGCCATCAGCAAAACGGCAATCCATCA
AGCCTCCTTCTCACGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAG

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

CATTGCCGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGTCAGACTCGTGAGCACGCTCTGCTCGCCTACACC
CTCGGTGTCAAGCAGCTCATCGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCTGAGGAGCGTTACCAGGAAATCATCA
AGGAGACCTCCAACTTCATCAAGAAGGTCGGCTACAACCCCAAGCACGTTCCCTTCGTCCCCATCTCCGGTTTCAACGGAGA
CAACATGATTGAGGCTTCCACCAACTGCCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACC
CTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCTACCGACAAGCCCCTCCGCCTTCCCCTCCAGGATGTCTACA
AGATTGGTGGTATTGGCACGGTCCCCGTCGGTCGTGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCCGGTATGGTCGTCACCTTCGCCCC
CGCTGGTGTCACCACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTCACCGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGC
TTCAACGTCAAGAACGTCTCCGTCAAGGAGATCCGTCGTGGTAACGTTGCCGGTGACTCCAAGAACGACCCCCCCAAGGGTT
GCGAGTCCTTCAACGCCCAGGTCATCGTCCTCAACCACCCCGGTCAGGTCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCTTGACTGCCA
CACTGCCCACATTGCTTGCAAGTTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGCCGTACCGGAAAGTCTGTTGAGAACTCCCCC
AAGTTCATCAAGTCCGGTGACGCTGCCATCGTCAAGATGGTTCCCTCCAAGCCCATGTGCGTTGAGGCTTTCACTGACTACCC
TCCTCTCGGTCGTTTC

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

TGGCCGTATCGTCTTCCGCAATGCGTAGGTGCCCTTGAATCCATTGATTCAGCGTGTATCGAAGCTAATCGAAGCTCGCAGCA
TCGAGCACAACGACGTCGAGATTGTCGCCGTGAACGACCCCTTCATCGAGCCCCACTACGCTGTAAGCATCCCCAGCACAGA
ATCCTTCCGTCAGAGCGATGCTTTGCATCATTGATTCCATCCTGGCATGATCCATTGGCGGAACAGTACAAGCTAACATGTCC
ATAGGCATACATGCTCAAGTATGACAGCACACACGGCCAGTTCAAGGGCGACATCAAGGTTGACGGCAACAACCTGACTGTC
AACGGCAAGACCGTCCGCTTCCACATGGAGAAGGACCCCGCCAACATCCCATGGAGCGAGACCGGCGCTTACTACGTCGTTG
AGTCCACTGGTGTCTTCACCACCACCGAGAAGGCCAAGGCTCACTTGAAGGGTGGAGCCAAGAAGGTTGTCATCTCTGCTCC
CTCCGCCGATGCCCCTATGTTCGTCATGGGTGTCAACCACGAGACCTACAAGTCTGACATTGAGGTCCTCTCCAACGCCTCCT
GC

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

ชื่อพ้อง ≡*Brachysporium eragrostidis* Henn., Annales du Musée du Congo 2(3): 230 (1908)

=*Spondylocladium maculans* C.K. Bancr. (1913)

ชื่อโรค ดอกจุดสนิมกล้วยไม้

พืชอาศัยที่พบ กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* spp.)

พืชอาศัยอื่น อะกาเว (*Agave*) สับปะรด (*Ananas*) พืชตระกูลถั่ว (*Arachis*) มะพร้าว (*Cocos*) หญ้าปล้อง (*Digitaria*) กลอย (*Dioscorea*) ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis*) หญ้า (*Eragrostis*) พืชอวบน้ำ (*Furcraea*) ยางพารา (*Hevea*) ผักบุ้ง (*Ipomoea*) หญ้าลิ้นงู (*Oldenlandia*) คำเตี้ย (*Polygala*) อ้อย (*Saccharum*) งา (*Sesamum*) ข้าวฟ่าง (*Sorghum*) หญ้า (*Sporobolus*) ข้าวโพด (*Zea*) ดิน (Soil) (Ellis, 1971)

แหล่งที่พบ กาญจนบุรี นครปฐม นครนายก

กรมวิชาการเกษตร

ลักษณะอาการของโรค เริ่มแรกจะเกิดจุดขนาดเล็ก มีสีเหลืองแกมน้ำตาลสีจะคล้ายๆ สนิม ต่อมาจะขยายขนาดใหญ่ขึ้นแผลมีลักษณะค่อนข้างกลม มีขนาดตั้งแต่ 0.1- 0.3 มิลลิเมตร บริเวณกลางแผลจะมีสีน้ำตาลเนื่องจากเนื้อเยื่อถูกเชื้อราสาเหตุโรคเข้าทำลาย มักพบบนกลีบดอกกล้วยไม้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ลักษณะฟูคล้ายกำมะหยี่ มีสีเทาเข้มถึงน้ำตาลดำ ใต้อาหารวุ้นมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ สร้างก้านชูสปอร์แบบเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม มีลักษณะตั้งตรงหรือโค้งงอ บริเวณส่วนปลายของก้านชูสปอร์หักแบบ geniculate ผนังเรียบ มีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม บริเวณปลายก้านชูสปอร์มีสีอ่อน โคนิเดียมีรูปร่างคล้ายถังเบียร์ (barrel shaped) ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล มีผนังกั้น 3 เส้น มี 4 เซลล์ เซลล์ที่อยู่บริเวณตรงกลางโป่งออก มีสีน้ำตาลเข้ม เซลล์บริเวณปลายทั้ง 2 ข้างมีสีอ่อนและผนังกั้นที่อยู่กึ่งกลางของโคนิเดียมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำมองเห็นชัดเจนซึ่งเป็นลักษณะเด่นของราชนิดนี้และมักพบโคนิเดียเกิดเป็นกลุ่มอยู่บริเวณปลายก้านชูสปอร์ มีขนาด 18.7-35.5 x 11.0-18.6 ไมครอน จากการศึกษาครั้งนี้แยกได้จากโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สอดคล้องกับงานวิจัยของพีระวรรณและคณะ (2553) รายงานแยกราชนิดนี้ได้จากโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวายและมีรายงานพบเชื้อราชนิดนี้ได้ทั้งในดินและพืชหลายชนิด ได้แก่ อ้อย ข้าวโพด ข้าวฟ่าง เป็นต้น (นิยม, 2542; Domsch *et al*., 1993)

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

AACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAAAAATATGAAGGCTGCAACCGCCAGTTTTGGCGGGGAA
GCTGAATTATTTTTCACCCATGTCTTTTGCGCACTTGTTGTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCGCCACCAGGACCACACCATAAAC
CTTTTTTATGCAGTTGCAATCAGCGTCAGTATAACAAATGTAAATCATTTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTTGGGCGTTTTGTCTTT
GGCTTTTGCCCAAAGACTCGCCTTAAAACGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACATTTTTGCGCTTGCAA
CTAGCTAAAGAGGCCAGCAATCCATCAAGACCTTCTTCTCACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAG
CATAT

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

CTGGTACCTCCCAGGCTGACTGCGCCATTCTCATCATTGCCGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGG
TCAGACTCGTGAGCACGCCCTGCTTGCCTACACCCTCGGTGTCAAGCAGCTCATCGTTGCCATCAACAAGATGGACACCACC
AAGTGGTCTGAGGAGCGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGACCTCCAACTTCATCAAGAAGGTCGGCTACAACCCCAAGCACG
TTCCCTTCGTGCCCATCTCCGGTTTCAACGGAGACAACATGATTGAGGCTTCCACCAACTGCCCCTGGTACAAGGGTTGGGA
GAAGGAGACCAAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCTCCTCGAGGCCATCGATGCCATCGACCCTCCCGTCCGTCCTACCGAC
AAGCCCCTCCGTCTTCCCCTCCAGGATGTTTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTGTCGAGACCGGTA
TCATCAAGCCCGGTATGGTCGTCACCTTCGCCCCCGCTGGTGTCACCACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCA
GCTTACTGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTTGGCTTCAACGTCAAGAACGTCTCCGTCAAGGAGATCCGTCGTGGTAACGTT
GCCGGTGACTCCAAGAACGACCCCCCCAAGGGTTGCGAGTCCTTCAACGCCCAGGTCATCGTCCTCAACCACCCTGGTCAGG
TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCTCGACTGCCACACTGCCCACATTGCCTGCAAGTTCTCTGAGCTCCTCGAGAAGATCGA

กรมวิชาการเกษตร

CCGCCGTACCGGAAAGTCTGTTGAGAACTCCCCCAAGTTCATCAAGTCCGGTGACGCTGCCATCGTCAAGATGGTTCCCTCC
AAGCCCATGTGCGTTGAGGCTTTCACTGACTACCCTCCTCTCGGTCGTTTCGCCGTCCGTGACATGCGTCAAACGT

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

GTTGTGCCACGAATTTGCCAAGCAGKTGGTTGTGCAGGAGGCGTTGGAGAGCACCTCAATGTCCGACTTGTAGGTCTCGTGG
TTGACGCCCATGACGAACATGGGGGCATCAGCGGAGGGAGCAGAAATGACAACCTTCTTGGCTCCGCCCTTCAAGTGGGCCT
TGGCCTTCTCGGTGGTGGTGAAGACACCGGTGGACTCAACGACGTAGTAAGCGCCGGTCTCGCCCCATGGGATGTTGGCGGG
GTCCTTCTCCATGTGGAAGCGGATGGTCTTGCCATTGACGGTCAGGTTGTTGCCGTCGACCTTGATCTCACCCTTGAACTGGC
CGTGTGTGCTGTCATACTTGAGCATGTATGCCTATGTAGATGTCAGCCTATACTCGTCCTCCAGAGAATGATGCTGGGGCGTC
AAGATGAAGCAAATGGCGCAGGCCATTGCTCTGACTGTACGATTCTATGCTGGGGATGCTTACAGCGTAGTGGGGCTCGATG
AAAGGGTCGTTTACGGCGACGATATCGACATCGTTGTGCTCAATGCTGCGAACTGTTGTTAGTTTTGATCCACATTGGATCAA
TGGGTTGAGGAGCACCTACGCATTGCGGAAGACGATACGGCCAATGCAMCAAAAACCCGTTGGAT

ภาพที่ 3.14.2 *Curvularia eragrostidis* : ก) ลักษณะอาการดอกจุดสนิมของกล้วยไม้
ข) ก้านชูสปอร์และโคนิเดีย
ค) โคนิเดีย

Curvularia geniculata (Tracy & Earle) Boedijn (ภาพที่ 3.14.3)

ชื่อพ้อง *Helminthosporium geniculatum* Tracy & Earle (1896)

Cochliobolus geniculatus R.R. Nelson (1964)

Pseudocochliobolus geniculatus (R.R. Nelson) Tsuda, Ueyama & Nishih (1978)

ชื่อโรค ใบจุด

พืชอาศัยที่พบ หญ้า (Tifdwarf grass)

พืชอาศัยอื่น ข้าวโพด (*Zea*) หญ้าแห้วหมู (*Cyperus rotundus*) หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium*) หญ้านกสีชมพู (*Echinochloa colana*) (กัญญา, 2545; จิตรา, 2547; Ellis, 1971)

กรมวิชาการเกษตร

แหล่งที่พบ ชลบุรี

ลักษณะอาการของโรค พบเป็นสาเหตุของโรคใบจุด ใบไหม้ มีลักษณะอาการจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กกระจายบนใบข้าวโพดหากอาการรุนแรงแผลจุดจะรวมกันเป็นแผลไหม้มีรายงานพบได้ทั่วไปและเป็นสาเหตุโรคจุดในพืชหลายชนิด เช่น โรคใบจุดใบ และไหม้ข้าวโพด (กัญญา 2545; Ellis, 1971)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.7 ซม. เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส มีลักษณะฟูเล็กน้อย มีสีน้ำตาลปนเขียวมะกอก ก้านชูสปอร์ มีลักษณะตั้งตรง ผนังเรียบ มีสีน้ำตาลเข้ม บริเวณปลายหักแบบ geniculate โคนีเดีย มีลักษณะคล้ายกระสวย โค้งงอเล็กน้อย ผนังเรียบ มีผนังกั้น 3-4 เส้น มีขนาด 8.7-12.3 x 19.6-30.5 ไมโครเมตร สอดคล้องกับรายงานของกัญญา (2545) และ จิตรา (2547) รายงานพบในข้าวโพด หญ้าแห้วหมู หญ้าปากควาย หญ้านกสีชมพู จังหวัดนครปฐม และนนทบุรี

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

AGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAAGTGATATAGAGTCTTGATGGAGTGCCGTCCTCTTTTGCTGATTGCA
AGCGCAAAAATGTGCTGCGCTGCGAAACCAGTAGGCCGGCTGCCAATCGTTTTAAGGCGAGTCTTTGGACAAAACCAAAGAC
AAAAAACGCCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCA
ATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCC
AGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAAATGATTTACATTTGTTGTACTGACGCTGATTGCAACTGCATAAAAAAGGTT
TATCATGTGGTCCTGGAGGCGGGCGAACCCGCCCAGGAAACAACAAGTGCGCAAAAGACAAGGGTAATAAAATACTCCAGCC
TTGCCGCCTGTTGGCGGTGCAGCCTTCATATGTTTATTGTGTAATGATCCCTCCGCAGGTTCACCTACGGAGACCTTGTTACG
ACTTTTACTTCCTCTAAATGACCGAGTTTGACGAACTTTCCGGCTTGGGGTGGTCGTTGCCAACCTCCCCGAGCCAGTCCGAA
CGCCTCACTGAGCCATTCAATCGGTAGTAGCGACGGGCGGTGTGTACAAGGGGGGGRGRAAAAAAAAA

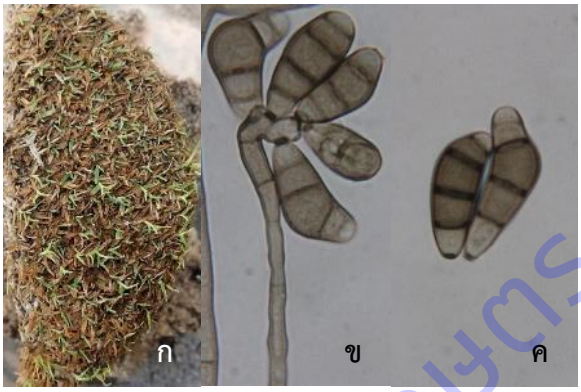
the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

TTCTCATCATTGCCGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGTCAGACTCGTGAGCACGCCCTGCTTGC
CTACACCCTCGGTGTCAAGCAGCTCATCGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCTGAGGAGCGTTACCAGGAA
ATCATCAAGGAGACCTCCAACTTCATCAAGAAGGTCGGCTACAACCCCAAGCACGTTCCCTTCGTCCCCATCTCCGGTTTCAA
CGGAGACAACATGATTGAGGCTTCCACCAACTGCCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGGCCAAGGCCACTGGT
AAGACCCTTCTCGAGGCCATCGATGCCATCGATGCCCCCGTCCGTCCTACCGACAAGCCCCTCCGTCTTCCCCTCCAGGATG
TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTCCCCGTCGGTCGTGTCGAGACCGGTGTCATCAAGCCCGGTATGGTCGTCACCTT
CGCCCCCGCTGGTGTCACCACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACCGAGGGTGTCCCCGGTGACAAC
GTCGGCTTCAACGTCAAGAACGTCTCCGTCAAGGAGATCCGTCGTGGTAACGTTGCCGGTGACTCCAAGAACGACCCCCCCA
AGGGTTGCGAGTCCTTCAACGCCCAGGTCATCGTCCTCAACCACCCCGGTCAGGTCGGTGCTGGTTACGCCCCAGTCCTTGA
CTGCCACACTGCCCACATTGCCTGCAAGTTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGCCGTACCGGAAAGTCTGTTGAGAAC
TCCCCCAAGTTCATCAAGTCCGGTGACGCTGCCATCGTCAAGATGGTTCCCTCCAAGCCCATGTGCGTTGAGGCTTTCACTGA
CTACCCTCCTCTTGGTCGTTTCGCCGTCCGTGACATGCGTC

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

กรมวิชาการเกษตร

GTTGGAGAGAACCTCAATGTCAGACTTGTAGGTCTCGTGGTTGACACCCATGACGAACATGGGGGCATCGGCGGAGGGAGCA
GAGATGACAACCTTCTTGGCTCCACCCTTCAAGTGAGCCTTGGCCTTCTCAGTGGTGGTGAAGACACCGGTGGACTCAACGA
CGTAGTAAGCGCCAGTCTCGCTCCATGGGATGTTGGCGGGGTCCTTCTCCATGTGGAAGCGGACGGTCTTGCCGTTGACAGT
CAGGTTGTTGCCGTCAACCTTGATGTCGCCCTTGAACTGGCCGTGTGTGCTGTCATACTTGAGCATGTAGGCCTATGTAGATA
TTAGCACGTGCTGCTCTGCCAATGGATGATTTCAAGGTTTCAGGATGATGCGAAGCATTTCCTTGACAGTAGGAATCTGTGTC
GGGGATGCTTACAGCGTAGTGGGGCTCGATGAAGGGGTCGTTCACGGCGACAATCTCGACGTCGTTGTGCTCGATGCTGCGA
GCTACGATTAGCTTTAATACGCACTGGATCAATGGATTCGAGAAGACCTACGCATTGCGGAAGACGATACGGCCAATGC



ภาพที่ 3.14.3 *Curvularia geniculata* : ก) ลักษณะอาการใบไหม้ของหญ้าสนามกอล์ฟ
ข) ก้านชูสปอร์และโคนิเดีย
ค) โคนิเดีย

Curvularia lunata (Wakker) Boedijn (ภาพที่ 3.14.4)

ชื่อพ้อง

≡*Acrethecium lunata* Wakker, De ziekten van her suikerriet op Java, die niet door dieren veroorzaakt worden worden: 196 (1898)

=*Helminyhosporium curvulum* Sacc., Atti della Accademia Scientifica Veneto-Trentino-Istriana10: 89 (1916)

=*Helmisporium curvulum* Sacc., (1916)

ชื่อโรค โรคเมล็ดด่างข้าว (*Oryza sativa*)

พืชอาศัยที่พบ เมล็ดข้าว (*Oryza sativa*) ข้าวโพด (*Zea mays*) หญ้าสนามกอล์ฟ (Tifdwarf grass) หญ้านวลน้อย (*Zoysia* sp.) แก้วมังกร (*Hylocereus undatus*) มะพร้าว (*Cocos nucifera*) ขนุน (*Artocarpus heterophyllus*) มะละกอ (*Carica papaya*)

พืชอาศัยอื่นๆ พบได้ทั่วไปทั้งในพืชและดิน เช่น ข้าวโพด (*Zea mays*) เมล็ดข้าว (*Oryza sativa*) ข้าวฟ่าง (*Sorghum* sp.) สบู่ดำ (*Jatropha curcas*) หน้าวัว (*Anthurium* spp.) เยอบีร่า (*Gerbera* sp.) หญ้ายาง

กรมวิชาการเกษตร

(*Euphorbia heterophylla*) กล้วยไม้สกุลหวายเอียย (*Dendrobium*) ถั่วดำ (*Vigna mungo*) เป็นต้น (นิยม, 2542; สมศิริ และ ศศิวิมล, 2011; Ellis, 1971; Lal *et al*., 2013)

แหล่งที่พบ กาญจนบุรี จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชุมพร ชลบุรี เชียงราย เชียงใหม่ นครปฐม นครราชสีมา พะเยา พิษณุโลก เพชบูรณ์ เพชรบุรี ราชบุรี ลพบุรี ลำปาง ลำพูน สุโขทัย สุราษฎร์ธานี สุรินทร์

ลักษณะอาการของโรค มักพบในระยะข้าวออกรวงโดยจะพบจุดสีน้ำตาลหรือดำ หรือสีน้ำตาลปนดำ บางครั้งอาจพบสีน้ำตาลปนสีชมพูอ่อนๆ บนเมล็ดที่อยู่บนรวงข้าว นอกจากรา *C. lunata* แล้วพบมีเชื้อราหลายชนิดเข้าทำลายและทำให้เกิดโรคนี้ได้ ซึ่งทำให้พบอาการที่แตกต่างกันออกไป

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ลักษณะฟูเล็กน้อยคล้ายกำมะหยี่ มีสีตาลเข้มถึงดำ ใต้อาหารวุ้นมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ ก้านชูสปอร์เกิดแบบเดี่ยว มีลักษณะตั้งตรงหรือหักไปมา ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล บริเวณปลายก้านชูสปอร์มีสีน้ำตาลอ่อน โคนีเดียมีลักษณะโค้งเล็กน้อย รูปร่างคล้ายครัวซองค์ ผนังเรียบ มีผนังกั้น 3 เส้น มี 4 เซลล์ บริเวณกลางเซลล์มีสีน้ำตาล บริเวณปลายเซลล์มีสีน้ำตาลอ่อน มีขนาด 18.0-31.7 x 8.3-15.9 ไมโครเมตร การศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกเชื้อราจากลักษณะอาการใบจุดข้าวโพด เมล็ดด่างข้าว และหญ้าสนามกอล์ฟสอดคล้องกับรายงานของพีระวรรณ และคณะ (2553) ที่ทำการศึกษาและแยกราชนิดนี้ได้จากโรคใบจุดข้าวโพด โรคเมล็ดด่างข้าว โรคเมล็ดเน่าดำข้าวฟ่าง โรคใบไหม้สบู่ดำ โรคใบจุดหน้าวัว โรคใบไหม้เยอบีร่า และโรคใบไหม้หญ้ายาง สมศิริ และ ศศิวิมล (2011) รายงานแยกราชนิดนี้ได้จากโรคเกสรดำในดอกกล้วยไม้สกุลหวายเอียยสกุลที่ผลิตเป็นการค้า นอกจากนี้พบเชื้อราชนิดนี้ในดินปลูกอ้อย ปอ มันสำปะหลัง และพบเป็นราเอนโดไฟลท์ในใบ *Globba* sp. (นิยม, 2542; Kokaew, 2011)

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

TTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAACGTGAGAAGGAGGCTTGATGGATTGCCGTTTTGCTGATGGCAAGCGCA
AAAATGTGCTGCGCTGCGAAACCAGAAAGGCCGGCTGCCAATCACTTTAAGGCGAGTCTTTGGGCGACCAAAGACAAAAACG
CCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGT
TCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAA
GAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAAATGATTTACATTGTTTGTACTGACGCTGATTGCAACTGCATAAAAAAGGTTTATTTGGT
GGTCCTGGTGGCGAGCGAACCCGCCCAGGAAACAACAAGTGCGCAAAAGACAAGGGTAATAAAATACTCCAGCTGCGGACAG
CCTTCATATTGTATTGTGTAATGATCCCTCCGCAGGTTCACCTACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCTCTAAATGACC
GAGTTTGACGAACTTTCCGGCTTGGGGTGGTCGTTGCCAACCTCCCCGAGCCAGTCCGAACGCCTCACTGAGCCATTCAATC
GGTAGTAGCGACGGGCGGTGTGTACAACGGG

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

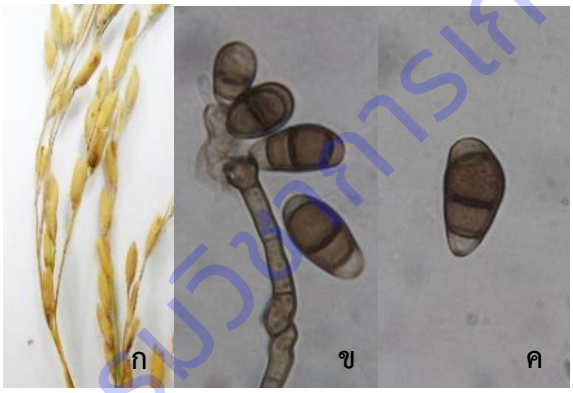
TTCTCATCATTGCCGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGTCAGACTCGTGAGCACGCTCTGCTCGC
CTACACCCTCGGTGTCAAGCAGCTCATCGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCTGAGGAGCGTTACCAGGAA
ATCATCAAGGAGACCTCCAACTTCATCAAGAAGGTCGGCTACAACCCCAAGCACGTTCCCTTCGTCCCCATCTCCGGTTTCAA
CGGAGACAACATGATTGAGGCTTCCACCAACTGCCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGGCCAAGGCCACTGGT
AAGACCCTCCTTGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCTACCGACAAGCCCCTCCGCCTTCCCCTCCAGGATG

กรมวิชาการเกษตร

TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTCCCCGTCGGTCGTGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCCGGTATGGTCGTCACCTT
CGCCCCCGCTGGTGTCACCACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTCACCGAGGGTGTCCCCGGTGACAAC
GTCGGCTTCAACGTCAAGAACGTCTCCGTCAAGGAGATCCGTCGTGGTAACGTTGCCGGTGACTCCAAGAACGACCCCCCCA
AGGGTTGCGAGTCCTTCAACGCCCAGGTCATCGTCCTCAACCACCCCGGTCAGGTCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCTTGA
CTGCCACACTGCCCACATTGCTTGCAAGTTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGCCGTACCGGAAAGTCTGTTGAGAAC
TCCCCCAAGTTCATCAAGTCCGGTGACGCTGCCATCGTCAAGATGGTTCCCTCCAAGCCCATGTGCGTTGAGGCTTTCACTGA
CTACCCTCCTCTCGGTCGTTTCGCCGTCCGTGAC

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

GGCGTTGGAGAGGACCTCAATGTCAGACTTGTAGGTCTCGTGGTTGACACCCATGACGAACATAGGGGCATCGGCGGAGGGA
GCAGAGATGACAACCTTCTTGGCTCCACCCTTCAAGTGAGCCTTGGCCTTCTCGGTGGTGGTGAAGACACCAGTGGACTCAA
CAACGTAGTAAGCGCCGGTCTCGCTCCATGGGATGTTGGCGGGGTCCTTCTCCATGTGGAAGCGGACGGTCTTGCCGTTGAC
AGTCAGGTTGTTGCCGTCAACCTTGATGTCGCCCTTGAACTGGCCGTGTGTGCTGTCATACTTGAGCATGTATGCCTATGGAC
ATGTTAGCTTGTACTGTTCCGCCAATGGATCATGCCAGGATGGAATCAATGATGCAAAGCATCGCTCTGACGGAAGGATTCTG
TGCTGGGGATGCTTACAGCGTAGTGGGGCTCGATGAAGGGGTCGTTCACGGCGACAATCTCGACGTCGTTGTGCTCGATGCT
GCGAGCTTCGATTAGCTTCGATACACGCTGAATCAATGGATTCAAGGGCACCTACGCATTGCGGAAGACGATACGGCCAATG
CGACCGAAAGCCGTTG



ภาพที่ 3.14.4 *Curvularia lunata* : ก) ลักษณะอาการเมล็ดด่างข้าว
ข) ก้านชูสปอร์และโคนิเดีย
ค) โคนิเดีย

Curvularia oryzae Bugnicourt (ภาพที่ 3.14.5)

ชื่อพ้อง -

ชื่อโรค ใบจุดปาล์มน้ำมัน

พืชอาศัยที่พบ ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis*)

พืชอาศัยอื่นๆ กล้วยไม้ดิน (*Curculigo*) ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) ข้าว (*Oryza sativa*) หญ้ารัดเขียด (*Fimbristylis miliacea*) อากาศ (air) (Ellis, 1971; de Luna *et al*., 2002)

แหล่งที่พบ กระบี่ สุราษฎร์ธานี

กรมวิชาการเกษตร

ลักษณะอาการของโรค มักพบอาการบนใบอ่อนและช่วงที่ใบเริ่มคลี่ โดยระยะแรกจะเกิดเป็นจุดเล็กๆ ต่อมาแผลขยายขนาดใหญ่ขึ้นรูปร่างเป็นวงกลมหรือรี มีสีน้ำตาล บริเวณขอบแผลมีสีเหลืองล้อมรอบ หากอาการรุนแรงจะทำให้เกิดใบไหม้ มักพบอาการรุนแรงในปาล์มน้ำมันระยะต้นกล้ามากกว่าต้นที่ให้ผลผลิตแล้ว

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.8 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ลักษณะฟูคล้ายกำมะหยี่ มีสีตาลเข้มถึงดำ ใต้อาหารวุ้นมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ ก้านชูสปอร์เกิดแบบเดี่ยว ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล โคนีเดียมีลักษณะตั้งตรงหรือโค้งเล็กน้อย รูปร่างคล้ายถังเบียร์ (barrel shaped) ผนังเรียบ มีผนังกั้น 3 เส้น และมี 4 เซลล์ มีสีน้ำตาลจนถึงน้ำตาลปนดำ บริเวณกลางเซลล์มีสีน้ำตาลเข้ม บริเวณปลายเซลล์ทั้ง 2 ข้างมีสีน้ำตาลอ่อน มีขนาด 24.0-40.7 x 13.3-22.7 ไมโครเมตร การศึกษาในครั้งนี้แยกได้ลักษณะอาการใบจุดและใบไหม้ของปาล์มน้ำมันสอดคล้องกับการวิจัยของ Sunpapoa and Kittimorakul (2014) ที่ทำการศึกษาโรคใบจุดปาล์มน้ำมันและรายงานรา *C. oryzae* เป็นเชื้อราของสาเหตุโรคนี้ มักพบมากในต้นปาล์มน้ำมันระยะต้นกล้า และพบที่ใบอ่อนมากกว่าใบแก่ นอกจากนี้มีรายงานราชนิดนี้เป็นสาเหตุของโรคเมล็ดพันธุ์ข้าว และแยกได้จากหญ้ารัดเขียด (*Fimbristylis miliacea*) ในประเทศฟิลิปปินส์ (De Luna *et al*., 2002)

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

GCGTTCGGACTGGCTCGGGGAGGTTGGCAACGACCACCCCAAGCCGGAAAGTTCGTCAAACTCGGTCATTTAGAGGAAGTAA
AAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAAAGAATATGAAGGCTGACTGCGGCTGCGCTT
CACGGCCAGTTTGCTGAGGCTGAATTATTTTTTCACCCATGTCTTTTGCGCACTTGTTGTTTCCTGGGCGGGTTCGCTCGCCA
CCAGGACCACACCATAAACCTTTTTATCTGTAGTTGCAATCAGCGTCAGTAACAAGTAAATAATCATTTACAACTTTCAACAA
CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTG
GTGTTGGGCGTTTTTGTCTTTGGCTACAGCCCAAAGACTCGCCTTAAAACGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGCAGCGC
AGCACATTTTTGCGCTTGCAACCAGCAAAAGAGGTTGGCAATCCATCAAGTCTTACTTTCTCACTTTTGACCTCGGATCAGGT
AGGGATACCCCG

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

CAGTGAAAGCCTCAACGCACATGGGCTTGGAGGGAACCATCTTGACGATGGCGGCGTCACCAGACTTGATGAACTTGGGGGA
GTTCTCAACAGACTTTCCGGTACGGCGGTCGATCTTCTCGAGGAGCTCAGAGAACTTGCAGGCAATGTGGGCAGTGTGGCAG
TCGAGGACTGGTGCGTAACCGGCACCGACCTGACCAGGGTGGTTGAGGACGATGACCTGGGCGTTGAAAGAGTCGCAGCCCT
TGGGGGGGTCGTTCTTGGTGTCACCGGCAACGTTACCACGACGGATCTCCTTGACGGAGACGTTCTTGACGTTGAAGCCGAC
GTTGTCACCGGGGACACCCTCGGTGAGCTGCTCGTGGTGCATCTCGACGGACTTGACTTCAGTGGTGACACCAGCGGGGGCG
AAGGTGACGACCATACCGGCCTTGATGACACCAGTCTCGACACGACCGACGGGGACCGTGCCAATACCACCAATCTTGTACA
CATCCTGGAGGGGAAGACGGAGAGGCTTGTCGGTAGGACGGCTGGGGGGGTCGATGGCATCGATGGCCTCGAGGAGGGTCT
TACCAGTGGCCTTGGCCTTGGTCTCCTTCTCCCAGCCCTTGTACCAGGGGCAGTTGGTGGAGGCCTCAATCATGTTGTCTCC
GTTGAAACCGGAGATGGGGACGAAGGGAACGTGCTTGGGGTTGTAGCCGACCTTCTTGATGAAGTTGGAGGTCTCCTTGATG

กรมวิชาการเกษตร

ATCTCCTGGTAACGGTCCTCAGACCACTTGGTAGTGTCCATCTTGTTGATGGCAACGATGAGCTGCTTGACACCGAGGGTGT
AGGCAAGCAGAGCGTGCTCACGAGTCTGGCCATCCTTGGAGATACCAGCCTCGAACTCACCAGTACCGG

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

CACAACGACGTCGACATTGTCGCCGTAAACGACCCCTTCATCGAGCCCCACTACGCTGTAAGCACTCCCCAAGACACCGCAA
GACCATCACCAGACCAAGGCTTCCCATCATTCGCTTCATTCTGATGCCCTGGCATCAACCATTGGCAGAGGAGCAGGGGCTA
ACATGCACATAGGCATACATGCTCAAGTATGACAGCACACACGGCCAGTTCAAGGGTGACATCAAGGTTGACGGCAACAACT
TGACCGTCAACGGCAAGACCATCCGCTTCCACATGGAGAAGGACCCCGCCAACATCCCATGGAGCGAGACCGGCGCCTACTA
CGTCGTTGAGTCCACTGGTGTCTTCACCACCACCGAGAAGGCCAAGGCTCACTTGAAGGGCGGAGCTAAGAAGGTCGTCATC
TCTGCTCCCTCCGCTGACGCCCCCATGTTCGTCATGGGTTCAACCACGAGACCTACAAGTCGGACATTGAGGTGCTC

ภาพที่ 3.14.5 *Curvularia oryzae* : ก) ลักษณะอาการใบจุดปาล์มน้ำมัน
ข) ก้านชูสปอร์และโคนิเดีย
ค) โคนิเดีย

กรมวิชาการเกษตร

Curvularia pseudobrachyspora Y. Marín, Cheew. & Crous, sp. nov.

ชื่อพ้อง -

ชื่อโรค ใบจุด

พืชอาศัยที่พบ หญ้าตีนกา (*Eleusine indica*)

พืชอาศัยอื่นๆ -

แหล่งที่พบ นครปฐม เพชรบุรี

ลักษณะอาการของโรค เริ่มแรกมีจุดรูปวงรีหรือรูปไข่สีน้ำตาลแดง จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส บริเวณขอบมีสีเทาอ่อน บริเวณอื่นๆ มีสีเขียวมะกอก ใต้โคโลนีมีสีเขียวมะกอกถึงดำ สร้างก้านชูสปอร์แบบเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม ตั้งตรง หรือ งอ บางครั้งพบบริเวณปลายหักแบบ

geniculate มีผนังกั้น โคนิเดียมีรูปร่างโค้งงอ บางครั้งพบรูปร่างรีถึงรูปไข่ ผนังเรียบ สีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม มี 2-3 เซลล์ มีขนาด 20.0-27.5 x 8.3-13.7 ไมโครเมตร จากการศึกษาครั้งนี้แยกได้จากหญ้าตีนกาที่มีลักษณะอาการใบจุดสอดคล้องกับงานวิจัยของ Marin-Felix *et al.* (2017) รายงานแยกเชื้อราชนิดนี้จากใบจุดหญ้าตีนกา

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

CGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAATTAAAATATGAAGGCTTCGGCTGGATTATTTTTAT
CACCCTTGTCTTTTGCGCACTTGTTGTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCGCCACCAGGACCACACCATAAACCTTTTTTTATGCAG
TTGCAATCAGCGTCAGTATAACAAATGTAAATCATTTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC
GCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATT
CCAAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTTGGGCGTCTTTTGTCTTTGGCCTCGCCCA
AAGACTCGCCTTAAAACGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGCAGCGCAGCACATTTTTGCGCTTGCAATCAGCAAAAAGG
ACGGCAATCCATCAAGACTACATTTTTACGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATC

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

TCATTGCCGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGTCAGACTCGTGAGCACGCCCTGCTTGCCTACAC
CCTCGGTGTCAAGCAGCTCATCGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCTGAGGAGCGTTACCAGGAAATCATC
AAGGAAACCTCCAACTTCATCAAGAAGGTCGGCTACAACCCCAAGCACGTTCCCTTCGTCCCCATCTCCGGTTTCAACGGAG
ACAACATGATTGAGGCTTCCACCAACTGCCCATGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGGCCAAGGCCACTGGTAAGAC
CCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCCTACCGACAAGCCCCTCCGCCTTCCTCTCCAGGATGTCTAC
AAGATTGGCGGTATTGGCACGGTTCCCGTCGGTCGTGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCCGGTATGGTCGTCACCTTCGCCC
CCGCTGGTGTCACCACCGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACTGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGG
CTTCAACGTCAAGAACGTCTCCGTCAAGGAGATCCGTCGTGGTAACGTTGCCGGTGACTCCAAGAGCGACCCTCCCAAGGGC
TGCGAGTCTTTCAACGCCCAGGTCATCGTCCTCAACCACCCTGGTCAGGTCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCTTGACTGCC
ACACTGCCCACATTGCCTGCAAGTTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGCCGTACCGGAAAGTCTGTTGAGAACTCCCC
CAAGTTCATCAAGTCCGGCGACGCTGCCATCGTCAAGATGGTTCCCTCTAAGCCCATGTGCGTTGAGGCCTTCACTGACTAC
CCTCCTCTCGGTCGTTT

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

GCCGTATCGTCTTCCGCAATGCGTAGGTGCCCTTGAATCCATTGATTCCGTGTATATCAATGCTAACGGTAGCCCGCAGCATC
GAGCACAACGACGTCGAGATCGTCGCCGTAAACGACCCTTTCATTGAGCCCCACTACGCTGTAAGCATCCCCCAGTACAGAC
TCGTTTCGACGGTCAGAGCAATGGCTTGCATCACTTGCTTTGGCCCGACGCCTCGGCATCATTCATTGGTAGAGCAGTGCAG
GCTAACATCTACATAGGCATACATGCTCAAGTATGACAGCACACACGGCCAGTTCAAGGGCGACATCAAGGTTGACGGCAAC
AACCTGACTGTCAACGGCAAGACTGTCCGCTTCCACATGGAGAAGGACCCCGCCAACATCCCATGGAGCGAGACCGGCGCCT
ACTACGTCGTTGAGTCCACCGGTGTCTTCACCACCACCGAGAAGGCCAAGGCTCACTTGAAGGGTGGAGCCAAGAAGGTTGT
CATCTCTGCTCCTTCCGCCGATGCCCCCATGTTCGTCATGGGTGTCAACCACGAGACCTACAAGTCCGACATTGAGGTGCTCT
CCAACGCCTCTTGC

กรมวิทยาศาสตร์

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการใบจุดและใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia* ระหว่างเดือนกันยายน 2561 - กันยายน 2562 จากจังหวัดกาญจนบุรี กระบี่ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชุมพร เชียงราย เชียงใหม่ ชลบุรี นครนายก นครปฐม นครราชสีมา ประจวบคีรีขันธ์ พิษณุโลก พะเยา เพชรบูรณ์ ราชบุรี ลำปาง สุโขทัย สุรินทร์ สระแก้ว และสุราษฎร์ธานี จำนวน 39 ตัวอย่าง แยกเชื้อรา *Curvularia* ได้จำนวน 47 ไอโซเลต เลือกเชื้อรา *Curvularia* จำนวน 15 ไอโซเลตมาสกัดและเพิ่มปริมาณของ DNA ตำแหน่ง ITS tef1 และ GAPDH ของ ทำการวิเคราะห์ ตรวจสอบความถูกต้องของ consensus sequence วิเคราะห์และจำแนกชนิดได้จำนวน 7 ชนิด ดังนี้ *C. akaiiensis C. dactyloctenicola C. eragrostidis C. geniculata C. lunata C. oryzae* และ *C. pseudobrachyspora*

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ข้อมูลและรายละเอียดการจัดจำแนกชนิดของรา *Curvularia* สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืชและสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการ นอกจากนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงประกอบการศึกษา งานวิจัย ในสถาบันการศึกษา หน่วยงานรัฐ และหน่วยงานเอกชน

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3.15 ชนิดแมลงวันผลไม้เผ่า (Tribe) Dacini (Diptera: Tephritidae) ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด
Molecular Identification of fruit fly in Tribe Dacini (Diptera: Tephritidae) using DNA Barcode

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ยุวรินทร์ บุญทบ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	จารุวัตถ์ แต้กุล	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	ชมัยพร บัวมาศ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	เกศสุดา สนศิริ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สุนัดดา เชาวลิต	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

แมลงวันผลไม้เผ่า (Tribe) Dacini เป็นเผ่าที่มีจำนวนชนิดเยอะที่สุดของแมลงวันผลไม้ในวงศ์ Tephritidae ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรอย่างสูงส่งผลต่อความกังวลใจด้านกักกันพืช และความปลอดภัยทางชีวภาพ แมลงวันผลไม้เผ่า Dacini นั้นมีรูปร่างลักษณะภายนอกที่ใกล้เคียงกันมากยากต่อการจำแนกชนิด การใช้เทคนิคชีวโมเลกุล โดยการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) จากยีน cytochrome c oxidase (*cox1*) นั้นสามารถช่วยแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ โดยเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากทุกภูมิภาคของประเทศไทย สกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง *cox1* และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบบนฐานข้อมูล GenBank (standard nucleotide BLAST) พบว่าสามารถยืนยันชนิดและบันทึกในฐานข้อมูล Genbank ได้ 20 ชนิด ได้แก่ แมลงวันผลไม้สกุล *Dacus* (1 ชนิด): *Dacus longicornis* Wiedemann; แมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* (10 ชนิด): *Bactrocera albistrigata* de Meijere, *B. carambolae* Drew & Hancock, *B. correcta* (Bezzi), *B. dorsalis* Hendel, *B. latifrons* (Hendel), *B. limbifera* (Bezzi), *B. nigrotibialis,* (Perkins), *B. tuberculata* (Bezzi), *B. umbrosa* (Fabricius), *B. zonata* (Saunders); และแมลงวันผลไม้สกุล *Zeugodaucs* (9 ชนิด): *Zeugodacus apicalis* (Meijere), *Z. caudatus* (Fabricius), *Z. cilifer* (Hendel), *Z. cucurbitae* (Coquillett), *Z. diversa* (Coquillett), *Z. hochii* (Zia), *Z. incisus* (Walker), *Z. isolatus* (Hardy), *Z. platamus* (Hardy) และ *Z. tau* (Walker) จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งยีน *cox1* จากแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini จำนวน 20 ชนิด มาวิเคราะห์ด้วย Maximum Likelihood และ Bayesian analysis พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกัน ยีน *cox1* แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการแก้ปัญหาขแง *Zeugodacus* และ *Dacus* จาก *Bactrocera* โดยความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่า *Zeugodacus* นั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Dacus* มากกว่า *Bactrocera* ซึ่งผลที่ได้นี้สามารถใช้สนับสนุนในการยกระดับของแมลงวันผลไม้ในสกุล *Zeugodacus* การศึกษานี้ให้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับจำนวนชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ในประเทศไทย และลำดับยีน *cox1* ได้รับการพิสูจน์ว่ามีประสิทธิภาพในการระบุชนิดของ

กรมวิชาการเกษตร

แมลงวันผลไม้เผ่า Dacini แม้ใช้จากบาร์โค้ดบางส่วน ดังนั้นสามารถนำยีน *cox1* ไปใช้ในห้องปฏิบัติการวินิจฉัยศัตรูพืชและงานด้านกักกันศัตรูพืชเพื่อระบุชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ได้อย่างถูกต้อง

คำสำคัญ: แมลงวันผลไม้ Dacini ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ตรวจวินิจฉัย และ ชีวโมเลกุล

Abstract

The Dacini is not only one of the most species-rich clades within the dipteran family Tephritidae. It is also one of most serious groups of horticultural pests and thus of particular biosecurity/quarantine concern. Dacini are notoriously difficult to identify by morphological characters. Molecular approaches, such as DNA 'barcoding' of the cytochrome c oxidase (*cox1*) gene, are commonly proposed to overcome this issue.

Fresh material of Dacini were collected from all regions of Thailand. Sequences were analyzed using a 'barcode' approach. Species were identified using standard nucleotide BLAST from GENBANK. Twenty species of Dacini were confirmed and their sequences deposited in Genbank: *Dacus* (1 species): *Dacus longicornis* Wiedemann; *Bactrocera* (10 species): *Bactrocera albistrigata* de Meijere, *B. carambolae* Drew & Hancock, *B. correcta* (Bezzi), *B. dorsalis* Hendel, *B. latifrons* (Hendel), *B. limbifera* (Bezzi), *B. nigrotibialis,* (Perkins), *B. tuberculata* (Bezzi), *B. umbrosa* (Fabricius), *B. zonata* (Saunders); and *Zeugodaucs* (9 species): *Zeugodacus apicalis* (Meijere), *Z. caudatus* (Fabricius), *Z. cilifer* (Hendel), *Z. cucurbitae* (Coquillett), *Z. diversa* (Coquillett), *Z. hochii* (Zia), *Z. incisus* (Walker), *Z. isolatus* (Hardy), *Z. platamus* (Hardy) and *Z. tau* (Walker).

A molecular phylogeny of these 20 Dacini was generated using *cox1* genes. Maximum Likelihood and Bayesian analysis analyses were used to investigate patterns of clustering of sequences with sequences of other pest species of fruit flies. Analyses of sequences gave consistent results. *Cox1* gene proved effective in resolving *Zeugodacus* and *Dacus* from *Bactrocera* fruit fly species. The phylogeny shows that *Zeugodacus* clade is more closely related to *Dacus* rather than *Bactrocera*. This result supportsraising *Zeugodacus* to genus level. This study provides basic information on the number of species of fruit flies of the tribe Dacini present in Thailand. *Cox1* sequences were demonstrated as effective in identifying Thai Dacini even from partial barcodes. Thus, we recommend that diagnostic and quarantine laboratories use the *cox1* gene for the accurate identification of Dacine species.

Keywords: Dacini Fruit fly, DNA barcoding, molecular diagnostics

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

แมลงวันผลไม้หรือแมลงวันทอง (Fruit Flies) เป็นแมลงศัตรูพืชที่สร้างความเสียหายให้แก่ผลไม้และพืชผักในเขตร้อน (tropical) และกึ่งเขตร้อน (subtropical) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยนั้นพบตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้เข้าทำลายผลไม้และผักชนิดต่าง ๆ โดยการวางไข่ จากนั้นตัวหนอนจะกัดกินและเจริญเติบโตอยู่ภายใน ทำให้ผักผลไม้เน่าเสียก่อนการเก็บเกี่ยว ทั่วโลกพบว่าแมลงวันผลไม้เข้าทำลายผัก ผลไม้ได้มากมายหลากหลายชนิด จึงจัดแมลงวันผลไม้ให้เป็นแมลงศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก แมลงวันผลไม้ที่เป็นศัตรูพืชสำคัญได้แก่แมลงวันผลไม้ในเผ่า (Tribe) Dacini ซึ่งเป็นกลุ่มที่สามารถเข้าทำความเสียหายอย่างมากต่อผลผลิตทางการเกษตร จากการสำรวจพบว่าทั่วโลกมีแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini มากกว่า 700 ชนิด (Krosch *et al*., 2012) และในทวีปเอเชียนั้นพบว่าแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini เข้าทำลายผลผลิตทางการเกษตรเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้ในสกุล *Dacus* Fabricius สกุล *Bactrocera* Macquart และสกุล *Zeugodacus* Hendel (Krosch *et al*., 2012)

ปัจจุบันประเทศไทยมีการศึกษาอนุกรมวิธานตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini (ยุวรินทร์ และคณะ, 2563) แต่พบว่าแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini นั้นมีลักษณะทางสัณฐานภายนอกใกล้เคียงกันมาก โดยเฉพาะกลุ่มที่มีความซับซ้อน (complex) ซึ่งมีความยากในการจัดจำแนกเป็นอย่างยิ่งหากใช้เพียงลักษณะสัณฐานภายนอกเป็นตัวตรวจวินิจฉัยชนิด โดยเฉพาะแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex นั้นก่อให้เกิดความสับสนแก่นักอนุกรมวิธานเป็นอย่างมาก (Drew and Romig, 1994) และยังมีแมลงวันผลไม้ในเผ่า Dacini อีกหลายชนิดที่แม้จะเป็นชนิดเดียวกัน แต่มีความแปรผันทางรูปร่างลักษณะภายนอก ยากต่อการตัดสินใจว่าเป็นความแปรผันทางสัณฐานภายในชนิดเดียวกัน หรือ เป็นความแตกต่างระหว่างชนิด (Cameron *et al*., 2010; Schutze *et al*., 2012) และจากความเสียหายที่เกิดขึ้นจากแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini นั้น ทำให้มีการศึกษาชนิดของแมลงวันผลไม้ การแพร่กระจาย และชนิดพืชอาหาร เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการควบคุมกำจัด แต่ในปัจจุบันการศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงวันผลไม้ในประเทศไทยนั้นจะใช้เพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกเท่านั้น และ การศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้จำเป็นต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญของนักอนุกรมวิธาน ดังนั้นการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีต่าง ๆ ที่น่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับในระดับสากลมาร่วมใช้ในการจัดจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้นั้นมีความสำคัญอย่างยิ่ง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลมาศึกษา ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA Barcode) เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของแมลงวันผลไม้ เผ่า Dacini นอกจากนี้ยังประยุกต์ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetics) ของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini และสามารถนำข้อมูลด้าน DNA Barcode จัดทำฐานข้อมูลชนิดของแมลงวันผลไม้ที่มีในประเทศไทยให้มีมาตรฐานทัดเทียมสากล และใช้ข้อมูลเหล่านี้เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการนำเข้าส่งออกพืช ผักของไทยอีกด้วย

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) Leica รุ่น M 165C (Leica Microsystems Ltd,

Switzerland) พร้อมกล้องถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์

- เครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ (Gel documentation XR) รุ่น Universal Hood II (Biorad, USA)

- อุปกรณ์และสารเคมีในการเก็บตัวอย่างแมลง (ขวดดอง กล่องพลาสติก ถุงพลาสติกกับดักแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก (wet bucket trap) จาก Bugs for Bugs Pty Ltd, Australia สารฟีโรโมนล่อแมลงวันผลไม้ ได้แก่ เมทิล ยูจีนอล (Methyl Eugenol) คิวลัวร์ (CUE lure) และลาติลัวร์ (Lati lure) รวมทั้งโพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) สำหรับรักษาคุณภาพของแมลงวันผลไม้ระหว่างติดกับดักไว้ในแปลงสำรวจ

- สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด ได้แก่ ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction kit: Isolate Genomic DNA Kit) (Bioline, Australia), GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Bioline, Australia), Agarose gel (Bioline, Australia) และ TBE Buffer (10 mMTris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), สารละลาย GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA)

- สารเคมี RedSafe dye (iNtRON Biotechnology, USA) และไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

- วิธีการ

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

รวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยจากพื้นที่การเกษตร โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ 6 ภูมิภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้) โดยเลือกพื้นที่เพื่อเป็นตัวแทนในการเก็บตัวอย่างภูมิภาคละ 3 จังหวัด (Figure 1) ใช้กับดักล่อแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก ซึ่งประกอบด้วยสำลีชุบสารล่อ (pheromone) แมลงวันผลไม้ 3 ประเภท ได้แก่ เมทิลยูจีนอล (Methyl Eugenol) คิวลัวร์ (CUE lure) และลาติลัวร์ (Lati lure) ผสมสารฆ่าแมลง malathionในอัตราส่วน 4 : 1 และภายในกับดักบรรจุสารโพรไพลีนไกลคอล เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างแมลงวันผลไม้ติดกับดัก 5 กับดักต่อสารล่อหนึ่งประเภทต่อหนึ่งพื้นที่ เก็บรวบรวมตัวอย่างระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 - กันยายน พ.ศ. 2564จำแนกชนิดแมลงวันผลไม้จากลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ร่วมกับแนวทางการวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้ Tropical Fruit Flies (Tephritidae: Dacinae) of South-East Asia (Drew & Romig, 2013) และ Keys to the Tropical Fruit Flies of South-East Asia (Tephritidae: Dacinae) (Drew & Romig, 2016) นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ดองในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

2.1 สกัดดีเอ็นเอแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini โดยการนำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยามาสกัดดีเอ็นเอ ตามกรรมวิธี Boontop (2016) ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Bioline, Australia) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัทโดยนำขาด้านขวาจำนวน 3 ข้างของแมลงวันผลไม้ (25 มิลลิกรัม) มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Lysis Buffer GL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และสารลาย Protinase K ปริมาตร 25 ไมโครลิตรจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 - 20 ชั่วโมง ทำการย่อยสลายตัวอย่างโดยเขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม Lysis Buffer G3 ปริมาตร 200

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ เติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 100%) ปริมาตร 210 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอด ISOLATE II Genomic DNA และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ล้างตะกอน โดยการเติม Wash Buffer GW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ตามด้วย Wash Buffer GW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ทิ้งของเหลวที่เหลือตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ย้ายหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตรละลายดีเอ็นเอ โดยการเติม Elution Buffer G ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ตกตะกอนดีเอ็นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000x g นาน 1 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้เก็บในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

2.2 เพิ่มปริมาตรดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์universal primer จากยีน *cox1*:LCO1490 (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) และ HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) (Folmer *et al*., 1994) ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร 10 µM ไพรเมอร์LCO1490 1 ไมโครลิตร 10 µM ไพรเมอร์ HCO2198 1 ไมโครลิตร สารละลาย GoTaq® 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตรโดยนำปฏิกิริยา PCR ใส่เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยกำหนดขั้นตอนและเวลาในปฏิกิริยา PCR cycle ดังนี้ 1) initial-denaturing 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที 2) denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 3) annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที 4) extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (จำนวน 35 รอบ) (โดยในขั้นตอน 2-4 ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ) และ 5) final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส(gel electrophoresis) ที่อะกาโรสเจลความความเข้มข้น 2% ผสม RedSafe dye ในสารละลาย 1X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) บันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ ตรวจหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) ABI BigDye terminator chemistry ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

2.3 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *cox1* ของแมลงวันผลไม้ที่นำมาศึกษาทั้งหมด ทำการวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence assembly) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ FASTA

2.4 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) ด้วยการ Blast

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) เพื่อยืนยันความถูกต้องลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ เก็บบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank ในรูปแบบ accession number

3. การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้จากยีน *cox1* ที่ศึกษาเปรียบเทียบความถูกต้อง กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้จากฐานข้อมูล Genbank จากนั้น นำลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าสู่ขั้นตอน alignment ด้วยโปรแกรม MEGA X (Kumar *et al*., 2018) ประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลใช้เกณฑ์มาตรฐาน 2 เกณฑ์ คือ Maximum Likelihood (ML) และ Bayesian Inference (BI) และเปรียบเทียบ topology ที่ได้จากทั้ง 2 เกณฑ์มาตรฐาน โดยมีรายละเอียดการวิเคราะห์ดังนี้ เตรียม dataset ของยีนตำแหน่ง cox1 สำหรับ Maximum Likelihood (ML) โดยเตรียมไฟล์ .phy วิเคราะห์โดยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ซึ่งจำเพาะต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command –f a) เริ่มจาก random starting tree และกำหนด maximum likelihood bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง และวิเคราะห์โดย Bayesian inference (BI) เตรียมไฟล์ .nexus ใช้โปรแกรม MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) ใช้วิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) ค่าตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้ Mcmcstartingtree = 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 burninเพื่อให้ได้ consensus topology ตรวจสอบความเชื่อมั่นของผลวิเคราะห์ด้วย cumulative and compare functions โดย AWTY (Nylander *et al*., 2008)

- การบันทึกข้อมูล

1) บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบของ FASTA ไฟล์

2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบให้สอดคล้องกับชนิดแมลงวันผลไม้ที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบ ด้วยพิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้แต่ละชนิดและชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

3) บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบ accession number ในฐานข้อมูล Genbank

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : เดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 - เดือนกันยายน พ.ศ. 2564

สถานที่ : 1) แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่าง ๆ ในภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

ศรีวิชาการเกษตร

การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ด้วยกับดักถังเปียกซึ่งบรรจุสารล่อเมทิลยูจีนอล คิวลัวร์ และลาติลัวร์จาก 6 ภูมิภาค ได้แก่ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ของไทยด้วยกับดักแมลงวันผลไม้ด้วยกับดักแบบถังเปียก ทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดแมลงวันผลไม้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ด้วยแนวทางวินิจฉัย (Drew & Romig, 2013, 2016) พบแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini สามารถจำแนกได้ 3 สกุล จำนวน 23 ชนิด ได้แก่

1) สกุล *Dacus* จำนวน 3 ชนิด (Figure 3.15.2) ได้แก่

Dacus (Callantra) formosanus (Tseng & Chu)

Dacus (Callantra) longicornis Wiedemann

Dacus (Callantra) sphaeroidalis (Bezzi)

2) สกุล *Bactrocera*จำนวน 10 ชนิด (Figure 3.15.3) ได้แก่

Bactrocera (Bactrocera) albistrigata de Meijere

Bactrocera (*Bactrocera*) *carambolae* Drew &Hancock

Bactrocera (Bactrocera) correcta (Bezzi)

Bactrocera (Bactrocera) dorsalis Hendel

Bactrocera (Bactrocera) latifrons (Hendel)

Bactrocera (Bactrocera) limbifera (Bezzi)

Bactrocera (Bactrocera) nigrotibialis (Perkins)

Bactrocera (Bactrocera) tuberculata (Bezzi)

Bactrocera (Bactrocera) umbrosa (Fabricius)

Bactrocera (Bactrocera) zonata (Saunders)

3) สกุล *Zeugodacus* จำนวน 10 ชนิด (Figure 3.15.4) ได้แก่

Zeugodacus (Asiadacus) apicalis (Meijere) comb. nov

Zeugodacus (Zeugodacus) caudatus (Fabricius), stat. rev.

Zeugodacus (Parasinodacus) cilifer (Hendel), comb. nov.

Zeugodacus (Zeugodacus) cucurbitae (Coquillett), stat. rev.

Zeugodacus (Hemigymnodacus) diversa (Coquillett)

Zeugodacus (Sinodacus) hochii (Zia), comb. nov.

Zeugodacus (Parasinodacus) incisus (Walker), comb. nov.

Zeugodacus (Zeugodacus) isolatus (Hardy), comb. nov.

Zeugodacus (Zeugodacus) platamus (Hardy)

Zeugodacus (Zeugodacus) tau (Walker), comb. nov.

กรมวิชาการเกษตร

เก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอและศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

2. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

จากการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ LCO1490/ HCO2198 จากยีน *cox1* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini จำนวน 20 ชนิด (Figure 3.15.5) ได้แก่

1) สกุล *Dacus* จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Dacus formosanus, D. longicornis* และ *D. sphaeroidalis*
2) สกุล *Bactrocera* จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera albistrigata, B. carambolae*, *B. correcta, B. dorsalis,B. latifrons, B. limbifera*, *B. nigrotibialis*, *B. tuberculata, B. umbrosa*และ *B. zonata*
3) สกุล *Zeugodacus* จำนวน 10 ชนิด *Zeugodacus apicalis, Z. caudatus, Z. cilifer, Z. cucurbitae, Z. diversus, Z. hochii, Z. incisus, Z. isolatus, Z. platamus* และ *Z. tau*

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (pcr product) จากแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ทั้ง 23 ชนิด ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอได้ขนาด 650 - 700 คู่เบส (Figure 3.15.5) แต่เมื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าสามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ได้เพียง 20 ชนิด ดังนี้

1) สกุล *Dacus* จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *Dacus formosanus* แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จากแมลงวันผลไม้ *D. longicornis* และ *D. sphaeroidalis* ได้
2) สกุล *Bactrocera* จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera albistrigata, B. carambolae*, *B. correcta, B. dorsalis, B. latifrons, B. limbifera*, *B. nigrotibialis*, *B. tuberculata, B. umbrosa* และ *B. zonata*
3) สกุล *Zeugodacus* จำนวน 9 ชนิด *Zeugodacus apicalis, Z. caudatus, Z. cilifer, Z. cucurbitae, Z. hochii, Z. incisus, Z. isolatus, Z. platamus* และ *Z. tau* แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จากแมลงวันผลไม้ *Z. diversus* ได้

และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการ Blast พบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100 % นั้น แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากกาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน *cox1* นั้นมีความถูกต้องและทำการบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ในรูปแบบ accession number (Table 3.15.1) และจากข้อมูลที่ถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว แสดงว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอมีความเหมาะสมสามารถนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างแมลงวันผลไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถใช้วิธีการสกัดดังกล่าวมาศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้ แต่สำหรับแมลงวันผลไม้ 3 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแต่ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้นั้น อาจเกิดจากความแปรผันของสารพันธุกรรม ของตัวอย่างทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้

3. การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini และนำมาทำการ alignment ชนิดละ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ยกเว้นแมลงวันผลไม้บางชนิดที่มีจำนวนตัวอย่างน้อย เช่น *D. longicornis, Z. apicalis*,

ศรีวิชาการเกษตร

และ *Z. cilifer* ที่ใช้ 5, 5 และ 9 ตัวอย่าง ตามลำดับนั้น (Table 3.15.1) ไม่พบความแตกต่างในลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้แต่ละชนิด ดังนั้น ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี phylogenetic reconstruction สามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ชนิดละจำนวน 1 ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini แต่ละชนิด (จำนวน 20 ชนิด) ดังนี้

1) แมลงวันผลไม้ *D. longicornis*

AGAATTTTAGTGCGAGCAGAACTAGGACACCCGGGAGCCCTAATTGGCGATGATCAAATCTATAACGTAATTGTAACAGCCCATGCATTTGTAATAA
TTTTTTTCATAGTTATACCTATTATAATTGGAGGATTCGGTAATTGATTAGTGCCTTTAATACTAGGAGCCCCAGATATAGCATTCCCCCGAATAAAT
AATATAAGCTTTTGATTACTACCACCCTCTCTCACATTACTTTTAACAAGCAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGAACAGGCTGAACCGTTTATCCCC
CCCTTTCTTCTGCTATCGCCCACGGAGGAGCTTCTGTAGACTTAGCTATCTTCTCATTACATTTAGCCGGAATCTCATCCATTTTAGGAGCCGTAAA
TTTCATTACCACAGTTATTAATATACGATCAACCGGAATTACATTCGACCGTATACCTTTATTTGTTTGAGCAGTTGTATTAACAGCCCTTCTTCTTC
TACTTTCCTTACCAGTATTAGCTGGAGCTATTACAATATTATTAACTGACCGAAATTTAAATACTTCATTCTTCGACCCAGCAGGTGGAGGAGACCC
TATCCTATACCAACATCTATT

2) แมลงวันผลไม้ *B. albistrigata*

AGAATTTTAGTTCGAGCTGAACTAGGACACCCAGGAGCACTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCCCACGCTTTCGTAATAA
TTTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTCTAATATTAGGTGCACCTGATATAGCTTTCCCACGAATGAAT
AATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTCTTACATTACTACTAGTAAGAAGTATAGTGGAAAACGGGGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCAC
CCCTATCATCTGTAATTGCTCACGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTCTCACTTCACCTAGCTGGTATTTCCTCAATTTTAGGGGCAGTTAA
TTTTATCACAACTGTAATTAATATACGATCAACAGGAATTTCATTTGACCGAATACCTCTTTTCGTTTGAGCAGTTGTACTAACAGCTCTATTACTTT
TATTATCCTTACCAGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTAACAGACCGAAATTTAAATACTTCCTTTTTTGACCCTGCCGGAGGAGGAGACCC
TATTCTTTACCAACATTTATT

3) แมลงวันผลไม้ *B. carambolae*

AGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCACGCTTTCGTAATAA
TTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTCGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCCACGAATGAAT
AATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCAC
CCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCCTCAATTTTAGGAGCAGTAAA
TTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACAGCTTTATTACTTT
TATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCCTTTTTTGACCCTGCCGGAGGAGGAGACCC
TATTCTTTACCAACACTTATT

4) แมลงวันผลไม้ *B. correcta*

AGAATTTTAGTTCGTGCCGAGCTAGGACACCCCGGAGCACTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCACATGCTTTCGTAATAA
TTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGATTTGGAAATTGACTTGTCCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATATAGCATTTCCACGAATAAAT
AATATAAGATTTTGATTATTACCCCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCTC
CCCTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGGTTGATCTAGCTATTTTCTCACTCCACTTAGCTGGTATTTCCTCAATTTTAGGAGCAGTAAA
TTTTATCACAACCGTTATTAACATACGATCGACAGGAATTTCATTTGACCGAATACCTCTATTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACAGCTTTATTGCTTT
TATTATCACTACCAGTTTTAGCAGGAGCTATCACTATACTATTAACAGATCGAAACTTAAATACTTCCTTTTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGATCC
TATTCTCTACCAACACTTATT

5) แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis*

AGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTCGTAATAA
TTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCCACGAATGAAT
AATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCAC
CCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTTCACTTCACTTAGCGGGTATTTCCTCAATTTTAGGAGCAGTAAA

TTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACAGCTTTATTACTTT
TATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCCTTTTTTGACCCTGCCGGAGGAGGAGATCC
TATTCTTTACCAACATTTATT

6) แมลงวันผลไม้ *B. latifrons*

AGAATCCTAGTTCGAGCTGAATTAGGGCACCCCGGAGCATTAATCGGAGACGACCAAATTTATAATGTAATCGTAACAGCCCATGCTTTCGTAATAA
TTTTCTTTATAGTTATACCTATTATAATTGGTGGGTTCGGAAATTGACTCGTTCCCTTAATACTAGGTGCACCAGATATAGCATTCCCACGAATAAA
CAATATAAGATTTTGGTTACTACCTCCTTCCCTTACACTATTATTAGTGAGAAGCATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGCTGAACAGTTTACCCT
CCCCTATCATCTGTTATTGCTCATGGAGGAGCATCAGTCGATCTAGCTATTTTCTCATTACACTTAGCCGGAATTTCCTCAATCTTAGGAGCAGTTA
ACTTCATCACAACAGTAATCAACATACGATCAACAGGAATTTCATTCGACCGAATGCCTCTTTTCGTTTGAGCAGTTGTACTAACGGCCCTATTACT
CTTACTGTCACTACCAGTTTTAGCGGGAGCTATTACCATGCTATTAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGACCCCGCTGGAGGAGGAGAT
CCTATCCTTTACCAACACTTATT

7) แมลงวันผลไม้ *B. limbifera*

AGAATTTTAGTTCGAGCTGAACTAGGACACCCTGGAGCATTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACCGCCCATGCCTTTGTAATAA
TTTTCTTTATAGTTATGCCTATTATAATTGGTGGCTTCGGAAATTGACTTGTCCCCTTAATATTAGGAGCTCCTGACATAGCCTTCCCACGAATAAAT
AATATAAGATTTTGACTCCTGCCTCCTTCCCTTACCCTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCTC
CCCTTTCATCTGTTATTGCTCACGGAGGGGCATCAGTTGATCTAGCTATTTTTTCACTTCACTTAGCCGGTATTTCTTCAATTCTAGGGGCAGTTAA
TTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTTCATTCGACCGAATACCTCTTTTCGTTTGAGCAGTTGTGTTAACAGCCCTATTACTCC
TGCTATCATTACCAGTCTTAGCAGGAGCCATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAACACTTCCTTCTTTGATCCCGCAGGAGGAGGAGACCC
TATTCTTTACCAGCACTTATT

8) แมลงวันผลไม้ *B. nigrotibialis*

AGAATTTTAGTTCGAGCTGAACTAGGTCATCCTGGAGCATTAATTGGAGATGATCAAATCTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTCGTAATAA
TTTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGGTTCGGAAATTGACTTGTTCCCCTAATATTAGGTGCACCTGATATAGCTTTCCCACGAATAAAT
AATATAAGATTTTGGTTACTACCTCCTTCCCTTACCCTTCTGTTAGTGAGAAGTATAGTGGAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACAGTTTATCCCC
CCCTATCATCTGTTATTGCTCATGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCCATTTTCTCACTTCACCTAGCTGGTATTTCTTCAATTTTAGGGGCGGTTAA
TTTTATCACAACCGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTTCATTTGACCGAATACCTCTATTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACAGCCTTATTGCTTC
TGCTATCCTTACCAGTTTTAGCCGGAGCTATTACTATGTTATTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCATTTTTTGACCCTGCTGGTGGAGGAGATCC
TATTCTTTACCAACACTTATT

9) แมลงวันผลไม้ *B. tuberculata*

AGAATTTTAGTTCGAGCTGAACTAGGTCACCCTGGAGCATTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTCGTAATAA
TTTTCTTTATAGTAATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGTGCTCCCGATATAGCATTTCCACGAATAAAT
AATATAAGATTTTGGTTATTACCTCCTTCCCTTACACTGCTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCTC
CCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGTGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTTCACTCCACTTAGCCGGGATCTCCTCAATTTTAGGGGCAGTTAA
TTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCAACAGGGATTTCTTTTGACCGAATACCACTTTTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACGGCCTTACTACTTT
TATTGTCTCTGCCAGTTTTAGCCGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGGAACTTAAATACTTCATTTTTTGACCCCGCCGGAGGGGGAGACCC
TATTCTTTACCAACATTTATT

10) แมลงวันผลไม้ *B. umbrosa*

AGAATTTTAGTGCGAGCTGAACTAGGTCACCCCGGGGCATTAATCGGAGACGATCAAATCTATAATGTAATTGTAACAGCGCATGCTTTCGTGATAA
TTTTTTTTATAGTTATGCCCATTATAATCGGGGGCTTCGGAAACTGGCTTGTTCCTCTAATACTAGGAGCACCCGACATAGCATTCCCACGAATGAA
TAATATAAGATTTTGATTATTGCCTCCTTCCCTTACGCTACTGTTAGTAAGAAGCATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACGGTTTACCCA
CCCCTATCATCAGTTATCGCCCACGGAGGAGCATCAGTCGATCTAGCTATTTTTTCACTCCACTTAGCTGGTATCTCTTCAATTCTAGGGGCCGTAA
ATTTCATTACTACAGTTATTAATATGCGGTCAACAGGCATCTCATTTGACCGAATACCTCTTTTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACAGCCTTATTACTT

ตรวจเอกสาร

TTATTATCACTTCCAGTTTTAGCGGGAGCTATTACCATATTATTAACAGACCGAAACTTAAACACCTCTTTTTTCGACCCCGCAGGAGGGGGGGACC
CAATTTTATACCAACATTTATT

11) แมลงวันผลไม้ *B. zonata*

AGAATTTTAGTTCGTGCTGAACTAGGACACCCCGGAGCACTAATTGGAGATGATCAGATTTATAATGTAATTGTAACAGCACACGCTTTCGTAATAA
TTTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCCCTAATATTAGGAGCACCCGACATAGCATTCCCACGAATGAA
TAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACGCTGCTATTAGTGAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTATCCT
CCCCTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTCTCACTTCACTTAGCTGGTATTTCTTCAATTCTAGGAGCAGTTA
ATTTTATTACAACTGTTATTAACATACGTTCAACAGGAATTTCATTTGATCGAATACCTCTCTTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACAGCCCTATTACTT
CTATTATCATTACCAGTTTTAGCGGGGGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTTTTTGACCCTGCAGGAGGAGGAGACC
CTATTCTCTATCAACACTTATT

12) แมลงวันผลไม้ *Z. apicalis*

AGAATTCTAGTGCGAGCAGAATTAGGGCACCCAGGAGCCTTAATTGGAGATGACCAAATCTATAATGTAATCGTAACAGCTCACGCATTTGTAATAA
TTTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCCCTTATACTTGGAGCCCCTGACATAGCCTTCCCCCGAATAAAT
AATATAAGATTTTGATTACTACCACCTTCTCTTACACTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTGGAAAACGGAGCTGGGACAGGATGAACTGTATACCCAC
CCCTTTCTTCTATTATTGCACATGGAGGAGCATCAGTAGATTTAGCTATCTTTTCTTTACACTTAGCAGGAATTTCATCTATTTTAGGTGCTGTAAAT
TTTATTACCACAGTAATTAACATGCGGTCTACAGGTATTACCTTCGATCGAATACCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGTTTTAACGGCCCTACTTTTATT
ACTTTCCCTTCCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACAATACTATTAACAGACCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGACCCAGCAGGAGGGGGAGACCCT
ATTTTATACCAACATTTATT

13) แมลงวันผลไม้ *Z. caudatus*

AGAATTTTAGTTCGAGCAGAATTAGGTCACCCAGGAGCCCTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATCGTAACAGCTCACGCATTTGTAATAA
TTTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAACTGACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCCCCAGATATAGCATTTCCACGAATAAAT
AATATAAGATTCTGATTACTGCCTCCTTCACTTACACTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAATGGAGCCGGAACAGGTTGAACTGTTTACCCTC
CCCTCTCATCAATCATCGCTCATGGAGGAGCTTCTGTTGATCTAGCTATTTTTTCTTTACATCTAGCTGGAATTTCCTCTATTTTAGGAGCCGTAAAT
TTTATTACTACAGTAATTAACATACGATCTACAGGAATTACATTCGACCGAATACCATTATTTGTTTGAGCAGTAGTGCTAACAGCCTTATTATTACT
ACTTTCATTACCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACTATATTATTAACAGACCGAAACTTAAATACCTCTTTCTTCGACCCAGCCGGAGGTGGAGACCCT
ATTTTATACCAACATTTATT

14) แมลงวันผลไม้ *Z. cilifer*

AGAATTTTAATTCGAGCAGAATTAGGACACCCCGGAGCATTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATCGTAACAGCACACGCATTTGTAATAA
TTTTTTTTATAGTAATACCAATCATAATTGGAGGATTTGGAAACTGATTAGTACCCCTAATACTTGGAGCACCAGATATAGCATTTCCTCGAATAAAT
AATATAAGATTTTGATTATTGCCTCCCTCTCTTACACTACTTTTAGTAAGCAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGATGAACAGTTTACCCAC
CCCTATCATCTATTATTGCCCATGGAGGAGCATCAGTTGATTTAGCAATTTTTTCTTTACATCTAGCAGGAATCTCATCTATTTTAGGGGCTGTAAAT
TTTATCACTACAGTCATTAATATACGATCAACGGGAATTACTTTCGATCGAATACCTTTATTTGTTTGAGCCGTTGTATTAACTGCCCTCCTTTTATT
ACTTTCATTACCAGTACTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTGACAGACCGAAATTTAAACACATCCTTCTTTGACCCAGCAGGAGGTGGAGACCCT
ATTCTTTACCAACATTTATT

15) แมลงวันผลไม้ *Z. cucurbitae*

AGAATCTTAGTCCGGGCAGAACTGGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGAGATGATCAAATCTATAATGTCATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATGA
TTTTTTTCATAGTGATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTGACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCGCCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAA
TAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCTCTTACATTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACTGTTTATCCTC
CCCTTTCATCAATTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTTAGCTATTTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTCATCAATTTTAGGGGCCGTAAAT
TTCATTACTACAGTAATTAATATGCGATCAACAGGAATCACATTTGACCGGATACCTTTATTCGTTTGAGCTGTAGTATTGACAGCTCTTCTTTTACT
TCTATCTCTACCTGTGTTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAACAGACCGAAATTTAAACACCTCTTTCTTCGACCCGGCTGGTGGTGGAGACCCT
ATTTTATACCAACATTTATT

16) แมลงวันผลไม้ *Z. hochii*

AGAATTTTAGTTCGTGCAGAATTAGGCCACCCGGGAGCTTTAATCGGAGATGATCAAATCTATAACGTAATCGTAACAGCTCATGCATTTGTAATAA
TTTTTTTTATGGTAATACCCATTATAATTGGAGGGTTTGGGAACTGACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCCCCCGACATAGCCTTCCCCCGAATAAA
TAACATAAGATTTTGATTACTGCCACCTTCTCTTACACTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTGGAAAATGGGGCTGGTACAGGTTGAACTGTTTACCCC
CCTCTTTCATCAATTATTGCCCACGGAGGGGCCTCAGTTGATTTAGCCATTTTTTCGCTTCACCTAGCTGGTATCTCATCAATTTTAGGGGCCGTAA
ATTTTATTACAACAGTAATCAACATACGATCAACGGGAATTACCTTTGACCGTATACCTTTATTCGTTTGAGCTGTAGTTCTTACAGCCCTTCTTTTA
CTACTCTCCCTACCAGTACTAGCAGGGGCTATTACAATACTTTTAACAGATCGAAACTTAAATACATCTTTTTTCGACCCGGCTGGTGGTGGAGACC
CTGTCTTATACCAACACTTATT

17) แมลงวันผลไม้ *Z. incisus*

AGAATTTTAATCCGAGCAGAATTAGGACACCCAGGAGCATTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCACACGCATTTGTAATAA
TTTTTTTTATAGTAATACCAATCATAATTGGAGGATTTGGGAACTGATTAGTTCCACTAATACTTGGAGCACCAGATATGGCTTTCCCACGAATAAA
TAATATAAGATTTTGGCTACTGCCTCCTTCCCTTACACTACTTTTAGTAAGCAGAATAGTAGAAAACGGGGCTGGTACAGGATGAACAGTTTACCCA
CCACTATCATCTATTATTGCTCATGGAGGTGCTTCAGTTGACCTAGCAATTTTCTCTTTACATTTAGCGGGTATCTCATCTATTTTAGGAGCTGTAAA
TTTTATTACTACAGTTATTAACATGCGATCGACAGGAATTACTTTCGATCGAATGCCTCTATTTGTATGAGCAGTTGTATTAACTGCTCTTCTTTTAC
TACTTTCATTACCAGTACTAGCCGGTGCCATCACTATACTTTTAACTGACCGAAACTTAAATACATCTTTCTTTGACCCAGCAGGAGGTGGAGACCC
TATTCTTTACCAACATTTATT

18) แมลงวันผลไม้ *Z. isolatus*

AGAATTTTAGTACGAGCAGAACTAGGCCACCCAGGAGCATTAATTGGGGATGACCAGATTTACAATGTAATTGTAACAGCCCATGCATTTGTAATAA
TTTTTTTCATAGTAATACCAATTATAATCGGAGGATTTGGTAACTGATTAGTGCCTTTAATATTAGGAGCCCCTGATATAGCATTCCCACGAATAAAT
AATATAAGATTTTGACTCCTACCACCATCTCTTACACTACTTTTAGTGAGCAGCATAGTGGAAAACGGAGCTGGAACAGGTTGAACTGTATACCCGC
CTCTTTCTTCAATTATTGCTCATGGAGGAGCCTCTGTCGATCTGGCTATTTTCTCTTTACATCTAGCCGGAATTTCATCAATCCTAGGAGCAGTAAA
TTTTATTACTACAGTAATTAATATACGATCTACTGGAATCACATTCGACCGAATACCTTTATTTGTCTGAGCAGTAGTACTAACAGCTCTGTTATTAC
TTCTTTCCCTCCCAGTTTTAGCCGGAGCCATCACCATACTTCTAACTGATCGAAACCTAAATACCTCTTTCTTTGACCCAGCTGGTGGTGGAGATCC
AATTCTATACCAACACCTATT

19) แมลงวันผลไม้ *Z. platamus*

AGAATCCTAGTTCGTGCAGAATTAGGTCATCCAGGAGCTTTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCATTTGTAATAA
TTTTTTTCATAGTAATACCTATTATAATTGGGGGATTCGGAAACTGATTAGTACCTTTAATATTAGGTGCCCCTGATATAGCTTTTCCCCGAATGAAT
AATATAAGATTTTGACTACTGCCTCCTTCACTTACATTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAATGGGGCTGGTACAGGTTGAACTGTTTATCCAC
CTCTTTCATCAATTATCGCTCATGGAGGAGCCTCAGTTGATTTAGCTATTTTCTCTTTACATTTAGCCGGTATTTCATCTATTTTAGGTGCCGTAAAT
TTTATTACCACAGTAATTAATATACGATCAACAGGAATTACTTTCGATCGAATACCTTTATTCGTTTGAGCTGTTGTATTAACAGCATTATTATTACT
ACTATCATTACCTGTATTAGCTGGAGCTATCACAATACTTTTAACTGATCGAAACTTAAATACTTCTTTCTTTGACCCAGCTGGAGGTGGAGATCCT
ATTTTATACCAACACTTATT

20) แมลงวันผลไม้ *Z. tau*

AGAATTTTAGTTCGAGCAGAACTAGGGCACCCAGGAGCTTTAATTGGAGATGACCAAATCTATAATGTAATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATAA
TTTTTTTCATGGTAATGCCTATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTACCTCTAATATTAGGAGCACCAGATATAGCGTTCCCTCGAATGAA
TAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCTCTTACATTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACTGTTTACCCT
CCCCTTTCATCAATTATCGCCCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTTAGCTATTTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTCATCAATTTTAGGGGCTGTAAA
TTTCATTACTACAGTAATTAATATACGATCAACAGGGATTACATTTGACCGAATACCTTTATTCGTTTGAGCTGTAGTATTAACAGCTCTTCTTTTAC
TTCTATCTCTCCCAGTATTAGCTGGAGCTATTACTATACTTTTAACAGACCGAAACTTAAATACATCTTTCTTCGACCCAGCTGGTGGTGGGGATCC
TATTTTATACCAACACTTATT

ศรีบัวทารกษณ

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ที่สำรวจพบในประเทศไทยจำนวน 20 ชนิด และลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันผลไม้ *Ceratitis capitata* เป็น outgroup (Bartolini *et al*., 2020) พบว่าข้อมูลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ maximum likelihood และ Bayesian Inference มีความสอดคล้องกัน (Figure 3.15.6) สามารถสนับสนุนการจำแนกและยืนยันชนิดแมลงวันผลไม้ทั้ง 20 ชนิดได้ โดยพบแมลงวันผลไม้ในสกุล *Dacus* นั้นมีความใกล้ชิดกับสกุล *Zeugodacus* และแยกออกจากสกุล *Bactrocera* อย่างชัดเจน โดยผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าแมลงวันผลไม้ใน 4 สกุลย่อย ได้แก่ *Asiaducus, Parasinodacus*, *Sinodacus* และ *Zeugodacus* นั้น แยกออกจากสกุลย่อย *Bactrocera* อย่างเห็นได้ชัด สอดคล้องกับการศึกษาของ Krosch *et al,* (2012) ที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini และพบว่า สกุล *Bactrocera* นั้น แยกจากสกุล *Zeugodacus* อย่างชัดเจน และสอดคล้องกับ De Meyer *et al*., (2015) และ Virgilio *et al*., (2015) ซึ่งได้ใช้หลักฐานทางความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมาสนับสนุนข้อมูลการจัดจำแนกแมลงวันผลไม้ขึ้นมาใหม่ โดยการย้ายแมลงวันผลไม้สกุลย่อย (subgenera) จำนวน 13 สกุลย่อย ในสกุล *Bactrocera* ซึ่งประกอบด้วย *Asiadacus, Austrodacus, Diplodacus, Hemigymnodacus,* comb. Nov., *Heminotodacus, Hemiparatridacus, Nesodacus, Niuginidacus, Papuodacus, Paradacus, Parasinodacus,* comb. nov., *Sinodacus* และ *Zeugodacus* ขึ้นมาเป็นสกุลใหม่ ได้แก่ สกุล *Zeugodacus* Hendel

และจากความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแมลงวันผลไม้ในสกุลย่อย *Parasinodacus* จำนวน 2 ชนิด คือ *Z. cilifer* และ *Z. incisus* นั้น มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และใกล้ชิดกับแมลงวันผลไม้ในสกุล *Asiadacus* ซึ่งได้แก่ *Z. apicalis* นอกจากนี้แมลงวันผลไม้ 2 ชนิด ในสกุลย่อย *Zeugodacus* คือ *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* นั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และใกล้ชิดกับสกุล *Sinodacus* ซึ่งได้แก่ *Z. hochii* ซึ่งเมื่อพิจารณาพืชอาหารของแมลงวันผลไม้ทั้งสามชนิด พบว่าแมลงวันผลไม้ทั้งสามชนิดนั้นเข้าทำลายพืชในวงศ์ Cucurbitaceae เช่นเดียวกัน (Allwood *et al.,* 1999)

และจากความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้ในสกุล *Bactrocera* สามารถสนับสนุนการศึกษาของ Drew and Romig (2013) ซึ่งรายงานชนิดแมลงวันผลไม้ยืนยันว่า *B. albistrigata* และ *B. frauenfeldi* เป็นคนละชนิดกัน เนื่องจากมีขนาดลำตัวที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นการแก้ไขการศึกษาของ Hardy (1954) ที่รายงานว่า *B. albistrigata* และ *B. frauenfeldi* นั้นเป็นชนิดเดียวกันและเป็นชื่อพ้อง (synonym) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์มาสนับสนุนและยืนยันถึงความแตกต่างของแมลงวันผลไม้ทั้งสองชนิดได้ สอดคล้องกับการกระจายที่พบว่า *B. albistrigata* กระจายตัวในประเทศไทย มาเลเซีย และอินโดนีเซียในขณะที่ *B. frauenfeldi* นั้น พบกระจายตัวอยู่เฉพาะใน Papua New Guinea, Solomon Islands และรัฐ Queensland ของเครือรัฐออสเตรเลียเท่านั้น

นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้ยังช่วยยืนยันข้อมูลแมลงวันผลไม้ใน 2 ชนิด ใน สกุล *Bactrocera* ซึ่งมักพบความผิดพลาดจากการจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera nigrotibialis* และ *Z. cilifer* เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานคล้ายคลึงกันนั้น เมื่อใช้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการสามารถยืนยันและสนับสนุนได้ว่า *Z. cilifer* นั้น มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันอย่างชัดเจนจาก *B. nigrotibialis* นอกจากนี้ยัง

ศูนย์วิทยทรัพยากร

สามารถแยกแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex ที่มีความซับซ้อน ได้แก่ *B. dorsalis* และ *B. carambolae* ได้อย่างชัดเจนเช่นเดียวกับ Schutze *et al*., (2012)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจากทุกภูมิภาคของประเทศไทย โดยใช้กับดักแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก ร่วมกับสารล่อที่ใช้ Methyl eugenol, CUE lure และ Lati lure และในการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบแมลงวันผลไม้จำนวน 3 สกุล ได้แก่ *Dacus, Bactrocera* และ *Zeugodacus* ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดโดยการสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน *cox1* ได้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini จำนวน 20 ชนิด

การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ซึ่งในประเทศไทยมักใช้เพียงลักษณะสัณฐานภายนอกมาเป็นตัวจัดจำแนก ซึ่งทำได้ยากและต้องอาศัยความชำนาญของนักอนุกรมวิธาน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ยืนยันว่า *cox1* เป็นยีนที่สามารถใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากยีน *cox1* เป็นยีนที่มีบริเวณอนุรักษ์ (conserve area) มีขนาดนิวคลีโอไทด์มีความเหมาะสมคือประมาณ 500 - 800 คู่เบส ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สามารถเข้ามาจับและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ง่ายและรวดเร็ว ลำดับดีเอ็นเอของยีน *cox1* ยังสามารถแยกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากได้อีกด้วย และสามารถจำแนกชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ได้อย่างถูกต้องถึง 99 - 100% และให้ผลที่สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงวันผลไม้ นอกจากนี้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธีการ Maximum Likelihood และ Bayesian analysis นั้นเป็นวิธีการที่เหมาะสมสามารถยืนยันชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ได้ โดยพบว่าแมลงวันผลไม้ทั้ง 3 สกุลนั้น แยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน แต่หากต้องการศึกษาการแบ่งกลุ่มที่ชัดเจนมากขึ้นจะต้องมีการใช้จำนวนยีนในการศึกษาเพิ่มขึ้น

การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นครั้งแรกที่ใช้ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ (DNA barcode) และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมาสนับสนุนในการจำแนกและยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ของแมลงวันผลไม้ในประเทศไทยให้มีความถูกต้อง สมบูรณ์ทันสมัยและเป็นที่ยอมรับในระดับสากลมากขึ้น (Doorenweerd *et al*., 2017)

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้ ทำให้ทราบลักษณะ และดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini เป็นฐานข้อมูลที่ก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมากมาย สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงเพื่อจัดจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ในเผ่า Dacini ได้อย่างถูกต้องและมาตรฐานสากล และใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนในการควบคุมป้องกันกำจัด และข้อมูลที่ใช้ประกอบในการนำเข้าส่งออก ซึ่งเป็นแหล่ง ข้อมูลทางด้านกีฏวิทยาที่สำคัญของประเทศ ซึ่งหน่วยงานที่สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ หน่วยงานราชการ กระทรวงพาณิชย์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ บริษัทเอกชนผู้ส่งออก และมหาวิทยาลัย

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.15.1 Locations of sampling sites in the six Thai biogeographical regions (North, Central, South, West, Northeast and East) at which fruit flies were collected.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.15.2 Fruit flies in Genus *Dacus*

(A) *D. formosanus* (B) *D. longicornis* (C) *D. sphaeroidalis*

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.15.3 Fruit flies in Genus *Bactrocera*

(A) *B. albistrigata* (B) *B. carambolae* (C) *B. correcta*

(D) *B. dorsalis* (E) *B. latifrons* (F) *B. limbifera*

(G) *B. nigrotibialis* (H) *B. tuberculata* (I) *B. umbrosa*

(J) *B. zonata*

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.15.4 Fruit flies in Genus *Zeugodacus*

(A) *Z. apicalis* (B) *Z. caudatus* (C) *Z. cilifer*

(D) *Z. cucurbitae* (E) *Z. diversus* (F) *Z. hochii*

(G) *Z. incisus* (H) *Z. isolatus* (I) *Z. platamus*

(J) *Z. tau*

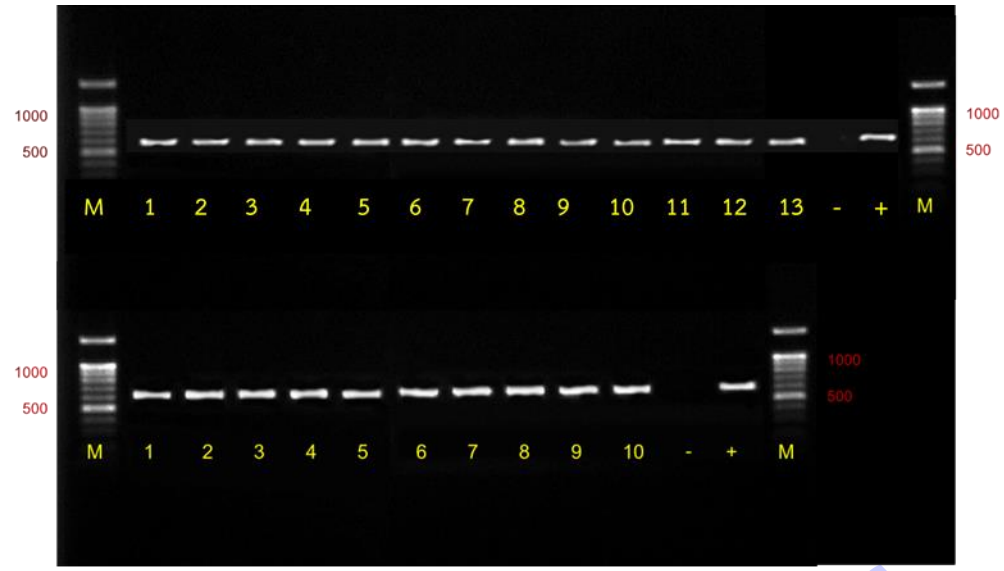


Figure 3.15.5 PCR results using the *cox1* (LCO1490/HCO2198) universal primer pair. *Dacus formosanus, D. longicornis, D. sphaeroidalis, Bactrocera albistrigata, B. carambolae, B. correcta, B. dorsalis, B. latifrons, B. limbifera, B. nigrotibialis, B. tuberculata, B.umbrosa, B. zonata, Zeugidacus apicalis, Z. caudatus, Z. cilifer, Z. cucurbitae, Z. diversus, Z. hochii, Z. incisus, Z. isolatus, Z. Platamus* and *Z. Tau* Negative ddH_2O and Positive (*Z. cucurbitae*).

กรมวิชาการเกษตร

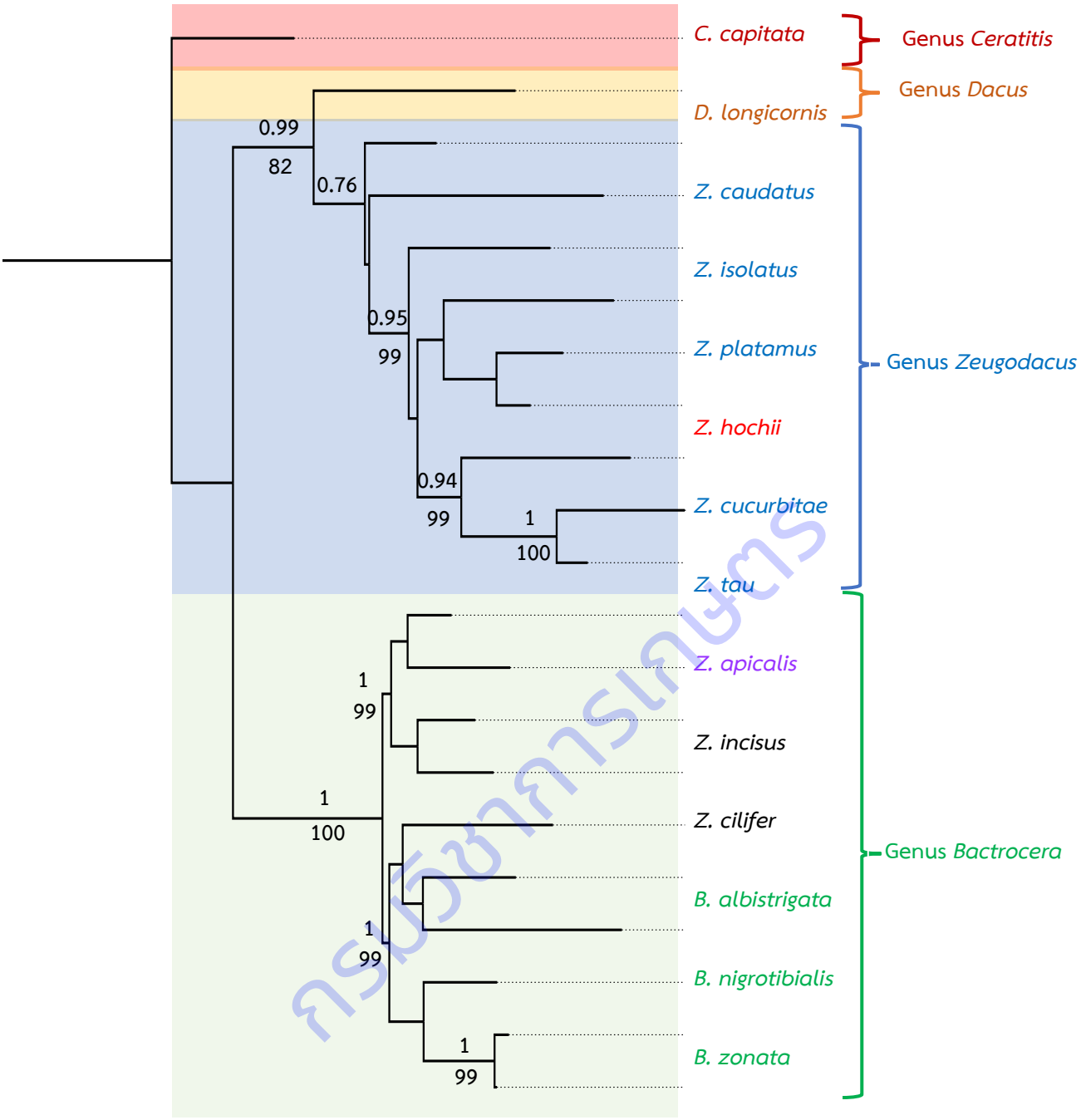


Figure 3.15.6 Phylogram obtained in a maximum likelihood search in RAxML of *cox1* gene regions. Bootstrap support values (≥70 %) from 1000 replicates above nodes. Posterior probabilities (≥ 0.95) summarised from 1500 converged trees obtained in a Bayesian search are shown below nodes.

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.15.1 Collection details (scientific name, specimen voucher, accession number and number of specimens) for fruit flies used in this study

No	Scientific name	Accession number	No of specimens	Voucher specimen
1	*B. albistrigata*	MW600096 - 15	20	EMBT0401 – EMBT0420
2	*B. carambolae*	MW052780 - 84, MW093419 - 23	10	EMBT1301 - EMBT1310
3	*B. correcta*	MW067300 - 09	10	EMBT0601 - EMBT0610
4	*B. dorsalis*	MW052785 - 89, MW093424 - 28	10	EMBT0701 - EMBT0710
5	*B. latifrons*	MW136282 - 93	12	EMBT0901 - EMBT 0913
6	*B. limbifera*	MZ129218 - 19	10	EMBT0901 – EMBT0920
7	*B. nigrotibialis*	MZ914401 - 10	10	EMBT1001 – EMBT1020
8	*B. tuberculata*	MW600156 - 75	10	EMBT1101 – EMBT1120
9	*B. umbrosa*	MW376156 - 73	14	EMBT1201 – EMBT1215
10	*B. zonata*	MW600176 - 95	10	EMBT1301 – EMBT1320
11	*D. formosanus*			EMBT0101 – EMBT0120
12	*D. longicornis*	MW376179 - 83	5	EMBT0201 – EMBT0220
13	*D. sphaeroidalis*			EMBT0301 – EMBT0320
14	*Z. apicalis*	MW376174 - 77	5	EMBT1401 – EMBT1405
15	*Z. caudatus*	MW376156 - 73	15	EMBT1501 – EMBT1520
16	*Z. cilifer*	MW376133 - 41	9	EMBT1601 – EMBT1620
17	*Z. cucurbitae*	MW045505 - 14, MW052790 - 94	14	EMBT1601.L(SEM) - 1620
18	*Z. diversus*			EMBT1801 – EMBT1820
19	*Z. hochii*	MW600116 - 35	20	EMBT1901 – EMBT1920
20	*Z. incisus*	MW600136 - 55	10	EMBT2001 – EMBT2020
21	*Z. isolatus*	MW600196 -215	20	EMBT2101 – EMBT2120
22	*Z. platamus*	MW600216 - 235	20	EMBT2201 – EMBT2220
23	*Z. tau*	MW052795 - 99, MW093429 - 33	10	EMBT1901.L(SEM) - 1920

กรมวิทยาศาสตร์

Table 3.15.2 Scientific name of Dacini fruit fly in Thailand.

	Homotypic synonym	Current name
1	*Bactrocera (Asiaducus) apicalis* de Meijere	*Zeugodacus (Asiadacus) apicalis* (Meijere), comb. nov.
2	*Bactrocera (Zeugodacus) caudata* (Fabricius),	*Zeugodacus (Zeugodacus) caudatus* (Fabricius), stat. rev.
3	*Bactrocera (Parasinodacus) cilifera* (Hendel)	*Zeugodacus (Parasinodacus) cilifer* (Hendel), comb. nov.
4	*Bactrocera (Zeugodacus) cucurbitae* (Coquillett)	*Zeugodacus (Zeugodacus) cucurbitae* (Coquillett), stat. rev.
5	*Bactrocera (Hemigymnodacus) diversa* (Coquillett)	*Zeugodacus (Hemigymnodacus) diversus* (Coquillett)
6	*Bactrocera (Sinodacus) hochii* (Zia)	*Zeugodacus (Sinodacus) hochii* (Zia), comb. nov.
7	*Bactrocera (Parasinodacus) incisa* (Walker)	*Zeugodacus (Parasinodacus) incisus* (Walker), comb. nov.
8	*Bactrocera (Zeugodacus) isolata* (Hardy)	*Zeugodacus (Zeugodacus) isolatus* (Hardy), comb. nov.
9	*Bactrocera (Zeugodacus) platamus* (Hardy)	*Zeugodacus (Zeugodacus) platamus* (Hardy)
10	*Bactrocera (Zeugodacus) tau* (Walker)	*Zeugodacus (Zeugodacus) tau* (Walker), comb. nov.

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3.16 การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย

DNA Barcoding for Identification of Thirps in Family Thripidae (Thysanoptera: Thripidae) in Aparagus in the Middle part of Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	อิทธิพล บรรณาการ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	เกศสุดา สนศิริ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย โดยการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกหน่อไม้ฝรั่งในจังหวัดนครปฐม กาญจนบุรี เพชรบุรี สุพรรณบุรี สิงห์บุรี ลพบุรี สระบุรี นครสวรรค์ และเพชรบูรณ์ เป็นต้น ระหว่างเดือนตุลาคม 2562 ถึงเดือนกันยายน 2564 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถเก็บรวบรวมเพลี้ยไฟได้ 220 ตัวอย่างและสามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae ได้ 3 ชนิด ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera ได้แก่ เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* (Hood) 181 ตัวอย่าง เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Karny 33 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย *Thrips hawaiiensis* (Morgan) 6 ตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงชนิด ลักษณะการทำลาย เขตการแพร่กระจายโดยเพลี้ยไฟจะเข้าทำลายทั้งยอดอ่อน ใบ ดอก และหน่อของหน่อไม้ฝรั่ง ทั้งนี้ได้ดำเนินการศึกษาลำดับดีเอ็นเอบาร์โค๊ดของยีน COI (Cytochrome Oxidaes subunit I) ของเพลี้ยไฟที่เก็บรวบรวมได้ในแต่ละจังหวัด สามารถสรุปได้ว่าชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae ที่พบในเขตภาคกลางของประเทศไทยไม่มีความแตกต่างกันทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยาในระดับชนิด จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดและถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยไฟทั้ง 3 ชนิด นำตัวอย่างเพลี้ยไฟจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลงพร้อมนำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดทำรายชื่อชนิดแมลงศัตรูพืชรองรับปัญหาด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

คำสำคัญ เพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae หน่อไม้ฝรั่ง อนุกรมวิธาน อณูชีววิทยา

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Taxonomy and DNA sequence of Thrips in Family Thripidae was studied by surveying and collecting in asparagus crops in the Middle part of Thailand during October 2019 and September 2021. Thrips was taken to Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture for detecting by study the taxonomy and morphology from permanent slides including compared with the specimens of Thirps in DOA Insect Museum. The result from detecting Thrips, 220 were found to represent Thrips in Order Thysanoptera Family Thripidae (3 species 2 genera): 181 chilli thrips; *Scirtothrips dorsalis* (Hood), 33 cotton thrips; *Thrips palmi* (Karny) and 6 Hawaiian flower thrips; *Thrips hawaiiensis* (Morgan). Specimens that preserved in 95% alcohol were analyzed by using PCR technique with mitochondrial COI gene in order to reveal lineage. The results of Neighbor Joining/UPGMA showed the closely relation between 3 thrips populations which collected from Nakhonpathom Kanchanaburi Phetburi Suphanburi Singhburi Lopburi Saraburi Nakhonsawan and Phetchabun Province. Conclusion, thrips that belong to Family Thripidae which found in asparagus crops in the Middle part of Thailand are *S. dorsalis, T. palmi* and *T. hawaiiensis.* Key and photographic taxonomic characters of 3 species were provided. The results were contributed to be Insect Museum Databases for exported and imported agricultural goods considering and application of management strategies.

Keyword Thripidae Asparagus Taxonomy Molecular Biology

คำนำ

หน่อไม้ฝรั่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกเพื่อการส่งออกเป็นสำคัญ ให้ผลตอบแทนต่อเกษตรกรสูง เป็นพืชที่ใช้พื้นที่ปลูกน้อย ส่วนใหญ่นิยมปลูกในแถบภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี สุพรรณบุรี และนครปฐม และภาคอีสาน ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา กาฬสินธิ์ และมหาสารคาม เพราะมีสภาพอากาศที่เหมาะแก่การเจริญเติบโตของหน่อไม้ฝรั่ง จากการที่หน่อไม้ฝรั่งเป็นพืชส่งออกสำคัญไปยังประเทศญี่ปุ่น จึงได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกหน่อไม้ฝรั่งเป็นวงกว้างเพื่อสร้างรายได้ให้กับครัวเรือน แต่การปลูกหน่อไม้ฝรั่งนั้นนอกจากจะประสบปัญหาของโรคแล้ว ยังพบปัญหาการทำลายของแมลง เช่น หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก เป็นต้น แต่แมลงขนาดเล็กที่เป็นศัตรูสำคัญที่ทำลายผลผลิตของหน่อไม้ฝรั่งอีกทั้งยังสามารถติดไปกับสินค้าได้คือ เพลี้ยไฟ ปัจจุบันนอกจากเพลี้ยไฟหน่อไม้ฝรั่ง *Chirothirps spiniceps* Hood และเพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* Hood จะลงทำลายหน่อไม้ฝรั่งแล้ว ยังมีเพลี้ยไฟหลายชนิดที่ระบาดและลงทำลายหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลาง (ศิริณี, 2544) จากการที่มีผู้ประกอบการธุรกิจการปลูกหน่อไม้ฝรั่งเป็นจำนวนมาก ประกอบกับตลาดทั้งในและต่างประเทศ มีความต้องการหน่อไม้ฝรั่งในปริมาณสูงได้กลายเป็นปัจจัยสำคัญในการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อชนิดของศัตรูพืชที่พบในหน่อไม้ฝรั่ง จึงอาจเกิดพิษตกค้างในผลผลิตมากขึ้น การศึกษาชนิดและลำดับพันธุกรรม

กรมวิชาการเกษตร

ของเพลี้ยไฟจะทำให้ทราบถึงชนิดที่แน่นอนของเพลี้ยไฟที่ระบาดในแปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่งนั้นๆ ทั้งนี้จะทำให้ชนิดที่ถูกต้องและเหมาะแก่การป้องกันกำจัด สามารถวิเคราะห์ชนิดของเพลี้ยไฟศัตรูพืชในระยะไข่และตัวอ่อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการทดสอบประสิทธิภาพวัตถุอันตรายทางการเกษตรได้อีกด้วย นอกจากนี้การศึกษาลำดับพันธุกรรมจะทำให้ทราบถึงความแปรปรวนของยีน เพลี้ยไฟในพื้นที่ภาคกลางว่ามีความแตกต่างหรือใกล้เคียงกันอย่างไร การศึกษานี้จะได้ข้อมูลซึ่งไม่มีหน่วยงานอื่นในประเทศทำวิจัยเชิงลึกเช่นนี้อีกทั้งยังเป็นการวิเคราะห์ชนิดเพลี้ยไฟศัตรูพืชโดยวิธีใหม่ที่ทันสมัย สามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษาให้กับนักวิชาการทั่วไป บริษัทเอกชน และผู้ประกอบการที่เกี่ยวข้องกับการเกษตร ทั้งนี้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟที่พบในหน่อไม้ฝรั่งที่วิเคราะห์ได้นี้สามารถนำมาศึกษา 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% โคลฟออย แคนาดาบัลซัม เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องสไลด์ถาวร และ ตู้อบสไลด์ถาวร อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ PCR ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์ 99% กรดอะซิติก DNeasy Kit, dNTP mixtures, 10X PCR buffer, Automatic pipette บีกเกอร์ หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ DNA Thermal Cycle เครื่อง Electrophoresis, Gel Documentary, Gene Amp PCR กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope ที่ติด camera lucida เป็นอุปกรณ์เสริมช่วยในการวาดภาพแมลงที่พบ กล้องถ่ายภาพ อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา rotring และกระดาษไขเขียนแบบ เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae

- วิธีการ

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย เช่น นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี กาญจนบุรี เป็นต้น เพื่อศึกษาจำนวนชนิดของเพลี้ยไฟในหน่อไม้ฝรั่ง โดยใช้วิธีการตีหรือเขย่าส่วนของพืช เช่น ใบ ดอก และหน่อ เป็นต้น ให้เพลี้ยไฟตกลงบนกระดาษขาวที่รองรับ และใช้พู่กันเขี่ยเพลี้ยไฟแต่ละตัวลงในขวดที่บรรจุน้ำยา AGA (Alcohol 60%: Glycerine: Acetic acid อัตราส่วน 10:1:1) สำหรับศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและ แอลกอฮอล์ 95% สำหรับศึกษาลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่มีชีวิตด้วย บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟที่เก็บได้ เช่น พืชที่เก็บ ส่วนของพืชที่เก็บ สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันที่เก็บ และชื่อผู้เก็บ ลงในขวดดองเพลี้ยไฟ นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ และนำตัวเต็มวัยไปทำสไลด์ถาวรตามวิธีการของศิริณี (2544) บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของขวดดองตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง

กรมวิชาการเกษตร

และชื่อผู้เก็บตัวอย่างจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิด (key) ของเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล

การศึกษาลำดับพันธุกรรม

นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่ได้จำแนกชนิดเบื้องต้นภายใต้ stereo microscope (ตัวอย่างกลุ่มเดียวกับตัวอย่างที่ใช้ทำสไลด์ถาวร) ที่เก็บรวมรวมได้จากแต่ละพื้นที่ไปศึกษาลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

วิธีการหาลำดับเบส COI ปรับปรุงจากวิธีการศึกษายีน COI ของ Karimi, *et al*. (2010)

ขั้นตอนการสกัด ดีเอ็นเอ

- บดตัวอย่างเพลี้ยไฟ 1 ตัวอย่างใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ด้วย sterilized polypropylene pestle โดยดำเนินการตามกรรมวิธีของชุดสกัด DNeasy blood and tissue qiagen kit
- นำสารละลายที่ได้ incubated ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นแรงเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 14,000 รอบ/นาที เวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- ดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ 2 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็น DNA Template ในขั้นตอน PCR (polymerase chain reaction)

การศึกษายีน COI โดยเทคนิค PCR

- ศึกษายีน COI (cytochrome oxidase subunit I) ซึ่งมีขนาด 642 bp และเป็น Conserved region ของแมลงทุกชนิด (บาร์โค้ด) โดยใช้ universally conserved mtDNA COI primers, LC01490 และ HC02198 (Folmer, *et al*., 1994)
- นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 3 ทำปฏิกิริยากับ 10m MdNTPs, 5 U/µl Amplitaq, 25 mM MgCl2 , 10X PCR buffer, 20mM sense and antisense primer ขั้นตอนและอุณหภูมิของขั้นตอนการทำ PCR (Biomethrathermocycler) คือ

Initialdenaturation	ที่ 94 °C	3 นาที	
Denaturation	ที่ 94 °C	1 นาที	35 cycles
Annealing	ที่ 52 °C	30 วินาที	
Extension	ที่ 72 °C	90 วินาที	
Final extension	ที่ 72 °C	30 นาที	

- หลังจากนั้นนำไป purified โดยดำเนินตามกรรมวิธีของชุดสกัด Bioneer's PCR purification kit

การหาและวิเคราห์ลำดับเบสของ ยีน COI

- ดำเนินการส่งผลผลิตดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้) และนำผลของลำดับเบสที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม BioEdit 7.0.5.2 (Hall, 1999), nBLAST program, MEGA4 (Kimura, 1980) และ neighbor-joining tree (Saitou and Nei, 1987) เพื่อหาความจำเพาะเจาะจงของเพลี้ยไฟภายในแหล่งเดียวกันและ

ศรีปทุมเกษตร

ระหว่างแหล่งที่เก็บตัวอย่าง รวมถึงเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank และศึกษาความใกล้เคียงกันของเพลี้ยไฟแต่ละชนิด

-การบันทึกข้อมูล

พืชอาหาร สถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง

- เวลาและสถานที่ : เดือน ตุลาคม 2562 ถึง เดือน กันยายน 2564

1. แปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย
2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง ห้องปฏิบัติการกลาง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกหน่อไม้ฝรั่งในจังหวัดนครปฐม กาญจนบุรี เพชรบุรี สุพรรณบุรี สิงห์บุรี ลพบุรี สระบุรี นครสวรรค์ และเพชรบูรณ์ และนำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อตรวจจำแนกชนิด โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยซึ่งปรับปรุงมาจาก Palmer (*et al*., 1989) และศิริณี (2544) ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae ได้ 3 ชนิด ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera ได้แก่ เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* (Hood) เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Karny และเพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย *Thrips hawaiiensis* (Morgan) โดยมีแนวทางการวินิจฉัยชนิดและลักษณะทางอนุกรมวิธานดังนี้

แนวทางการวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟที่พบในหน่อไม้ฝรั่ง

1 Usually small and pale species. Head and pronotum with sculpture of closely set of transverse striations. Tergites and sternites III – VII with dark patch medially. Abdominal tergites III–VI median setae small, close together; II–VIII with lateral thirds covered in closely spaced rows of fine microtrichia. Tergites laterally with 3 setae on microtrichia field. Microtrichia present medially on tergites VIII-IX..... ***Scirtothrips dorsalis*** **(Hood)**

\- Head and pronotum without sculpture. Ctenidia on tergite VIII situated posteromedial to the spiracle **2**

2 Abdominal sterna without discal setae. Forewing first vein setal row with long gap medially and 2 or more setae nearer apex, rarely micropterous. Metanotum with paired campaniform sensilla. Tergite VIII posteromarginal comb complete metanotal sculpture longitudinal striate; body colour uniformly yellow.....***Thrips palmi*** **(Karny)**

\- Abdominal sterna with at least 1 pair of discal setae. Forewing first vein usually with 3 setae on distal half of wing, distal to a long interval without setae. Metanotum usually striate to longitudinally reticulate with pair of campaniform sensilla, without markings

within reticles and with median setae closer to anterior margin Tergite VIII posteromarginal comb complete. Abdomen brown, head and thorax brown or yellow ..... ***Thrips hawaiiensis*** **(Morgan)**

เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* (Hood, 1919)

Scirtothrips dorsalis Hood, 1919: 90, *Heliothrips minutissimus* Bagnall, 1919: 260, *Anaphothrips andreae* Karny, 1925: 24, *Neophysopus fragariae* Girault, 1927:1, *Scirtothrips padmae* Ramakrishna, 1942: 169

ลำตัว (Body) ขนาดเล็ก ลำตัวสีเหลืองอ่อน (Figure 3.16.1-A, 3.16.1-B) เพศผู้ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 0.60 – 0.80 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 0.70 – 0.90 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียมีปีกขนาดใหญ่

หัว (Head) ส่วนหัวกว้างกว่าความยาว มีหนวด 8 ปล้อง หนวดปล้องที่ 1 สีขาว หนวดปล้องที่ 2-3 มีสีน้ำตาลอ่อนที่บริเวณโคนปล้องหนวดมีสีเทาเข้มที่ส่วนปลาย ปล้องหนวดปล้องที่ 3 และ 4 เป็นที่ตั้งของอวัยวะรับความรู้สึกรูปส้อม ปล้องหนวดปล้องที่ 5 ถึง 8 มีสีน้ำตาล ปล้องหนวดปล้องที่ 8 ยาวกว่าปล้องที่ 7 (Figure 3.16.1-C) มีขนบริเวณตาเดี่ยว 3 คู่ พื้นที่ฐานสามเหลี่ยมของตาเดี่ยวอยู่ใกล้ชิดกับเส้นร่างแหบนส่วนหัว เส้นขนตาเดี่ยวคู่ที่ 3 อยู่ชิดกึ่งกลางของตาเดี่ยวคู่หลัง

อก (Thorax) อกปล้องแรกมีลวดลายเป็นเส้นเรียงตัวชิดกันตามขวาง (Figure 3.16.1-D) มีขนยาวตั้งอยู่บริเวณมุมขอบล่างของอกปล้องแรก 2 คู่ ส่วนท้ายของสันหลังอกปล้องสุดท้ายมีลวดลายเป็นเส้นขนานตามยาว เส้นขนยาว 2 เส้นปรากฏด้านล่างของขอบบนสันหลังอกปล้องสุดท้าย ไม่มีรูรับความรู้สึก (campaniform sensilla) (Figure 3.16.1-E) ปีกคู่หน้ามีการเรียงตัวของเส้นปีกบริเวณโคนปีก 3 เส้น เส้นปีกรองมีขนแผ่ขยายกว้าง และส่วนปลายปีกมีเส้นขนเหยียดตรง

ท้อง (Abdomen) ด้านบนปล้องท้องปล้องที่ 3-6 มีแถบสีน้ำตาลบริเวณส่วนกลางของปล้องท้อง (Figure 3.16.1-F) บริเวณด้านข้างของปล้องท้องปล้องที่ 2-8 มีเส้นขนขนาดเล็กเรียงตัวกันหนาแน่นและพบเส้นขนเรียงตัวเป็นรูปหวีที่บริเวณด้านข้างปล้องท้อง ส่วนกลางท้องไม่ปรากฏการเรียงตัวของเส้นขน เส้นขนรูปหวีที่ด้านล่างของขอบท้องปล้องที่ 8 พัฒนาสมบูรณ์เป็นเส้นขนยาว

เพศผู้ มีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย ส่วนท้ายของปล้องท้องปล้องที่ 9 ไม่มีเส้นขนยาวเหมือนเพศเมีย ต้นขาคู่หลังไม่ปรากฏเส้นขนเรียงเป็นแถว และแผ่นแข็งด้านล่างของส่วนท้องไม่มีร่องหลุม

เพลี้ยไฟพริกมีลักษณะคล้ายคลึงกับเพลี้ยไฟส้มแอฟริกาใต้ (South African citrus thrips) *Scirtothrips aurantii* ซึ่งเป็นสกุลที่มีเส้นขนขนาดเล็กเรียงตัวกันบริเวณด้านล่างของส่วนท้อง แต่จะมีลักษณะแตกต่างกันตรงที่เพลี้ยไฟพริกจะมีเส้นขนบริเวณปีกเหยียดตรง ในขณะที่เพลี้ยไฟส้มแอฟริกาใต้จะมีเส้นขนโค้งงอเป็นคลื่น

ความสำคัญ เพลี้ยไฟพริก (chilli thrips) หรือ เพลี้ยไฟชาสีเหลือง เป็นเพลี้ยไฟขนาดเล็กพบเข้าทำลายพืชได้เกือบทุกชนิดโดยเฉพาะพืชผักสวนครัว มักเข้าทำลายบริเวณส่วนอ่อนๆ ของพืช เช่น ยอดอ่อน ใบอ่อน ตุ่ม

ศรีเวียงการเกษตร

ตาใบ ดอกและผลอ่อน ทั้งนี้สามารถพบเพลี้ยไฟพริกได้ในทุกสภาพภูมิอากาศโดยเฉพาะช่วงร้อนและอากาศแห้งแล้ง อีกทั้งยังพบว่าเป็นพาหะนำโรคมาสู่พืชตระกูลแตงอีกด้วย

พืชอาหาร มะม่วง มะม่วงหิมพานต์ ส้มเขียวหวาน ส้มโอ ทุเรียน แตงโม เงาะ มังคุด สำไย ลิ้นจี่ องุ่น เนคทารีน
สตอเบอรี่ พริก หน่อไม้ฝรั่ง มะเขือเปราะ มะเขือเทศ สะเดา ถั่วลิสง อ้อย ถั่วฝักยาว กุหลาบ มะลิ ดาวเรือง บัวชา หม่อน ผักชี กระถิน มะนาว ลองกอง กล้วยไม้ หอมแดง มันฝรั่ง พญายอ บวบ ชมพู่ มะขามเทศ แมงลัก โหระพา โป๊ยเซียน สาบเสือ มะขาม ผักกะเฉด หน่อไม้ฝรั่ง

เขตการแพร่กระจาย เพลี้ยไฟพริกมีต้นกำเนิดแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปัจจุบันสามารถพบได้ทั่วโลกจากการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตรโดยเฉพาะพืชผักสวนครัวและผลไม้

เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* (Karny, 1925)

Thrips palmi Karny, 1925: 10

ลำตัว ขนาดเล็ก ลำตัวสีเหลืองอ่อน (Figure 3.16.2-A, 3.16.2-B) เพศผู้ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.00 – 1.05 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.15 – 1.25 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียมีปีกขนาดใหญ่

หัว ส่วนหัวกว้างกว่าความยาว หนวดสีน้ำตาลอ่อน 8 ปล้อง ส่วนปลายของปล้องหนวดปล้องที่ 3 และ 4 เรียวและมีสีน้ำตาลอ่อนที่บริเวณโคนปล้องหนวดมีสีเทาเข้มที่ส่วนปลาย และเป็นที่ตั้งของอวัยวะรับความรู้สึกรูปส้อม ปล้องหนวดปล้องที่ 6 ถึง 8 มีสีน้ำตาล ปล้องหนวดปล้องที่ 8 ยาวกว่าปล้องที่ 7 มีขนบริเวณตาเดี่ยว 3 คู่ ขนตาเดี่ยวคู่ที่ 3 อยู่ด้านนอกของตาเดี่ยวที่เรียงตัวเป็นรูปสามเหลี่ยม (Figure 3.16.2-C) ขนตาเดี่ยวบริเวณท้ายส่วนหัวยาวกว่าขนตาเดี่ยวคู่ที่ 3

อก ส่วนของอกปล้องแรกมีขนาดใหญ่ มีขนยาวตั้งอยู่บริเวณมุมขอบล่างของอกปล้องแรก 2 คู่ และมีขนบริเวณส่วนท้ายอกปล้องแรก 3 คู่ (Figure 3.16.2-D) สันหลังอกปล้องสุดท้ายมีลวดลายเป็นเส้นตรงไม่ต่อเนื่องแต่มุ่งสู่ส่วนท้ายของสันหลังอกปล้องสุดท้าย เส้นขนยาว 2 เส้นปรากฏด้านล่างของขอบบนสันหลังอกปล้องสุดท้ายและมีรูรับความรู้สึก (Figure 3.16.2-E) ปีกคู่หน้าขาว โปร่งแสง และมีการเรียงตัวของเส้นปีกบริเวณโคนปีก 3 เส้นและเส้นปีกรองที่ส่วนปลายประมาณ 15 เส้น ขามีสีเดียวกับลำตัว ส่วนของปลายขามี 2 ปล้อง

ท้อง ปล้องท้องปล้องที่ 2 มีขนด้านข้าง 2 คู่ ส่วนท้องด้านบนของลำตัวปล้องที่ 6 ถึง 8 มีกลุ่มขนเรียงตัวกันเป็นเส้น ปล้องละ 1 คู่ ตำแหน่งการเรียงตัวอยู่ด้านล่างรูหายใจที่บริเวณขอบด้านนอกของส่วนท้อง เส้นขนรูปหวีที่ด้านล่างของขอบท้องปล้องที่ 8 พัฒนาสมบูรณ์เป็นเส้นขนยาว (Figure 3.16.2-F) ส่วนท้องด้านล่างของลำตัวปล้องที่ 3 ถึง 7 ปรากฏเส้นขนคู่ที่ 3 อยู่ตรงกลางส่วนท้อง

เพศผู้ มีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย เส้นขนรูปหวีที่ปล้องท้องปล้องที่ 8 สมบูรณ์ ปล้องท้องด้านล่างปล้องที่ 3-7 มีต่อมในส่วนช่องท้องรูปร่างเรียวยาวเรียงตัวขวางกัน

เพลี้ยไฟฝ้ายมีลักษณะคล้ายคลึงกลับเพลี้ยไฟมะเขือ (*Thrips flavus* Schrank) โดยมีลักษณะที่แตกต่างคือ ขนตาเดี่ยวคู่ที่สามของเพลี้ยไฟฝ้ายจะอยู่ใกล้กับฐานของขนตาเดี่ยวคู่แรกมากกว่าเพลี้ยไฟมะเขือ

ศรีวิชาการปุ่นตอง

ความสำคัญ เพลี้ยไฟฝ้าย (cotton thrips) เป็นเพลี้ยไฟขนาดเล็ก-กลาง สีเหลือง เพลี้ยไฟชนิดนี้เข้าทำลายพืชเกือบทุกชนิดที่ปลูกและทุกพื้นที่การเกษตรทั่วประเทศไทย นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดปัญหาอย่างมากต่อผลิตผลเกษตรส่งออก โดยเฉพาะกล้วยไม้ อีกทั้งยังพบว่าเป็นพาหะนำโรคมาสู่พืชตระกูลแตง ทั้งนี้สามารถพบได้ในมีการระบาดของเพลี้ยไฟดอกไม้ [*Frankliniella schultzei* (Trybom)] และ เพลี้ยไฟพริก (*Scirtothrips dorsalis* Hood) (Palmer *et al*., 1989)

พืชอาหาร ถั่วลิสง ถั่วเหลือง มันฝรั่ง ข้าวโพด งา ทานตะวัน ฝ้าย มะขามเทศ ตำลึง บวบ มะระ มะระขี้นก ผักบุ้งจีน พริก กะเพรา กวางตุ้ง ฟักทอง ฟัก มะรุม แตงกวา ถั่วแปปผี ถั่วฝักยาว หอมหัวใหญ่ หน่อไม้ฝรั่ง โหระพา ผักชี กระเจี๊ยบเขียว มะเขือเปราะ มะเขือม่วง มะเขือเทศ สะเดา แตงไทย ลำโพง กล้วยไม้ กุหลาบ จำปา บัว เบญจมาศ ดาวเรือง กระท้อน ฝรั่ง พุทรา มะม่วง มะละกอ ทุเรียน องุ่น ลิ้นจี่ กล้วย ส้มโอ ส้มเขียวหวาน มังคุด แตงโม ท้อ แคนตาลูป มะม่วงหิมพานต์ ยาสูบ หม่อน หญ้าข้าวนก พญายอ วัชพืช

เขตการแพร่กระจาย เพลี้ยไฟฝ้ายมีต้นกำเนิดแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และติดไปกับผลผลิตทางการเกษตรที่ส่งไปยังประเทศเขตร้อนทั่วโลก

Thrips hawaiiensis (Morgan, 1913)

Euthrips hawaiiensis Morgan, 1913: 3, *Physothrips emersoni* Girault, 1927a: 2, *Thrips io* Girault, 1927d: 351, *Thrips partirufus* Girault, 1927c: 1, *Thrips lacteicolor* Girault, 1928a: 2, *Physothrips marii* Girault, 1928b: 2, *Physothrips mjobergi* darci Girault, 1930: 1

ลำตัว ขนาดเล็ก ลำตัวสีน้ำตาลเข้ม หรือส่วนหัวและอกสีเหลืองส้ม ส่วนท้องสีน้ำตาล (Figure 3.16.3-A, 3.16.3-B) เพศผู้ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.10 – 1.15 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.20 – 1.25 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียมีปีกขนาดใหญ่

หัว ส่วนหัวกว้างกว่าความยาว หนวดสีน้ำตาลอ่อน 7-8 ปล้อง หนวดปล้องที่ 3 สีเหลือง ปล้องหนวดปล้องที่ 3 และ 4 เป็นที่ตั้งของอวัยวะรับความรู้สึกรูปส้อม ปรากฏขนบริเวณตาเดี่ยว 3 คู่ อยู่ด้านนอกของตาเดี่ยวที่เรียงตัวเป็นรูปสามเหลี่ยม (Figure 3.16.3-C) ขนตาเดี่ยวบริเวณท้ายส่วนหัวมีความยาวใกล้เคียงกับขนตาเดี่ยวคู่ที่ 3

อก ส่วนของอกปล้องแรกมีขนาดใหญ่ มีขนยาวตั้งอยู่บริเวณมุมขอบล่างของอกปล้องแรก 2 คู่ และมีขนบริเวณส่วนท้ายอกปล้องแรก 3 คู่ (Figure 3.16.3-D) สันหลังอกปล้องสุดท้ายมีลวดลายขวางแบบร่างแหที่บริเวณขอบด้านบน และเป็นเส้นตรงแบบห่างมุ่งสู่ขอบด้านล่างของอกปล้องสุดท้ายๆ เส้นขนยาว 2 เส้นปรากฏบนขอบสันหลังอกปล้องสุดท้ายและมีรูรับความรู้สึก (Figure 3.16.3-E) ปีกคู่หน้าขาว โปร่งแสง และมีการเรียงตัวของเส้นปีกบริเวณโคนปีก 3 เส้นและเส้นปีกรองสั้นกว่าเส้นปีกบริเวณปลายปีก ขามีสีเดียวกับลำตัว ส่วนของปลายขามี 2 ปล้อง

ท้อง ปล้องท้องปล้องที่ 2 มีขนด้านข้าง 2 คู่ เส้นขนรูปหวีที่ด้านล่างของขอบท้องปล้องที่ 8 พัฒนาสมบูรณ์แต่มีขนาดสั้น (Figure 3.16.3-F) ส่วนท้องด้านล่างของลำตัวปล้องที่ 3 ถึง 7 ปรากฏเส้นขนกระจายทั่วท้องประมาณ 12-25 เส้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร

เพศผู้ มีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย ลำตัวสีน้ำตาล

เพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย (Hawaiian thrips) มีลักษณะคล้ายคลึงกลับเพลี้ยไฟมะละกอ (*Thrips parvispinus* Karny) และเพลี้ยไฟหลากสี (*Thrips coloratus* Schmutz) เพลี้ยไฟทั้งสามชนิดนี้มีส่วนหัวและอกเป็นสีส้มเหลือง และส่วนท้องสีน้ำตาล แต่มีลักษณะที่แตกต่างคือ เพลี้ยไฟมะละกอจะไม่ปรากฏรูรับความรู้สึกที่บริเวณสันหลังอกปล้องสุดท้าย และเพลี้ยไฟหลากสีจะมีเส้นขนปรากฏด้านล่างของขอบบนสันหลังอกปล้องสุดท้ายและมีรูรับความรู้สึก

ความสำคัญ เพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย สีน้ำตาลหรือน้ำตาลปนส้ม โดยมีส่วนอกสีน้ำตาลอ่อนปนส้มหรือสีส้ม ส่วนท้องสีน้ำตาลเข้ม พบเข้าทำลายส่วนดอกของพืชหลายชนิด เช่น กุหลาบ บัว พุด มะม่วง ส้มโอ เนคทาลีน กล้วย เป็นต้น ทั้งนี้สามารถพบได้ในมีการระบาดของเพลี้ยไฟฝ้าย *(Thrips palmi* (Karny)) และ เพลี้ยไฟพริก (*Scirtothrips dorsalis* Hood) (Palmer *et al*., 1989)

พืชอาหาร ข้าวโพด มะเขือ หน่อไม้ฝรั่ง พริก กวางตุ้ง สะเดา กระถิน กระเจี๊ยบเขียว กุหลาบ ดาวเรือง เข็มขาว บานชื่น ดาวกระจาย พุทธรักษา ลำโพง ยี่โถ พุดสามสี ทานตะวัน บัว ว่านสี่ทิศ ปาล์ม มะคาเดเมีย ส้มโอ ส้มเขียวหวาน มังคุด ลองกอง ลำไย เงาะ ทุเรียน ลิ้นจี่ กล้วย กระท้อน ฝรั่ง มะยม มะละกอ มะม่วง มะม่วงหิมพานต์ ไผ่

เขตการแพร่กระจาย เพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวายสามารถพบได้ทั้งในแถบเอเชียและแปซิฟิค มีรายงานการพบทางตอนใต้ของสหรัฐอเมริกา และจาไมก้า (Nakahara, 1994) เพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวายมีทั้งชนิดสีอ่อนและสีเข้ม ทั้งนี้ชนิดที่มีสีเข้มมีรายงานว่าเป็นพาหะนำโรค Tosopovirus ในพืชตระกูลแตง (Wang *et al*., 2010)

ผลการหาลำดับพันธุกรรมของยีน COI (Cytochrome Oxidaes subunit I) ของเพลี้ยไฟพริก เพลี้ยไฟฝ้าย และเพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย โดยนำสารละลายที่ได้จากการทำ PCR มาดำเนินการโคลนด้วยเวคเตอร์ pGEM-T Easy และเลือกโคลนที่บรรจุยีนไปวิเคราะห์ลำดับเบส ด้วยเครื่อง automate sequencer ทำให้ทราบขนาดยีน COI ของเพลี้ยไฟทั้ง 3 ชนิด หลังจากนั้นดำเนินการเปรียบเทียบลำดับเบสของเพลี้ยไฟทั้ง 3 ชนิดกับฐานข้อมูล EMBI/GenBank และเพลี้ยไฟชนิดอื่น ได้แก่ เพลี้ยไฟดอกไม้ *Frankliniella schultzei* เพลี้ยไฟท่อ *Haplothrips gowdeyi* เพื่อหาความแตกต่างหรือความคล้ายคลึงกันของเพลี้ยไฟแต่ละชนิดที่เก็บรวบรวมได้ จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของเพลี้ยไฟพริก เพลี้ยไฟฝ้าย และเพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย โดยการศึกษาความสัมพันธ์กับประวัติการวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ (Molecular phylogenetics of Thysanoptera) และใช้โปรแกรม neighbor joining/UPGMA แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (sequence divergence) พบว่า เพลี้ยไฟทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกันทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางอนูชีววิทยา โดยเพลี้ยไฟชนิดเดียวกันที่อยู่ในพื้นที่ใกล้เคียงกันจะมีความแปรปรวนของลำดับพันธุกรรมเล็กน้อย (Figure 4) การศึกษานี้ทำให้ทราบถึงชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae ที่เป็นศัตรูสำคัญของหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย และใช้เป็นข้อมูลประกอบการจำแนกชนิดเพลี้ยไฟที่ติดมากับสินค้าเกษตรนำเข้าและส่งออก และสามารถนำเทคนิควิธีการศึกษามาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาวิธีการจำแนกชนิดเพลี้ยไฟหรือแมลงชนิดอื่นๆ โดยการศึกษาลักษณะทางอนูชีววิทยามีข้อได้เปรียบที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างแมลงได้ทุกระยะทั้งระยะไข่ ตัวอ่อน

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ดักแด้ และตัวเต็มวัย ให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วโดยไม่ต้องอาศัยเวลาในการเลี้ยงตัวอย่างแมลงนั้นๆ ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ตัวเต็มวัยในการจำแนกชนิด อีกทั้งยังสามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษาให้กับเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงทั้งในระยะไข่และตัวอ่อนได้ ช่วยลดระยะเวลาการกักเก็บสินค้าเพื่อตรวจสอบ และสามารถป้องกันชนิดแมลงศัตรูพืชสำคัญที่ติดมากับสินค้านำเข้าได้ทันต่อเหตุการณ์

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย โดยการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกหน่อไม้ฝรั่งในจังหวัดนครปฐม กาญจนบุรี เพชรบุรี สุพรรณบุรี สิงห์บุรี ลพบุรี สระบุรี นครสวรรค์ และเพชรบูรณ์ เป็นต้น ระหว่างเดือนตุลาคม 2562 ถึงเดือนกันยายน 2564 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถเก็บรวบรวมเพลี้ยไฟได้ 220 ตัวอย่างและสามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae ได้ 3 ชนิด ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera ได้แก่ เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* (Hood) 181 ตัวอย่าง เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Karny 33 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย *Thrips hawaiiensis* (Morgan) 6 ตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงชนิด ลักษณะการทำลาย เขตการแพร่กระจายโดยเพลี้ยไฟจะเข้าทำลายทั้งยอดอ่อน ใบ ดอก และหน่อของหน่อไม้ฝรั่ง ทั้งนี้ได้ดำเนินการศึกษาลำดับดีเอ็นเอบาร์โค๊ดของยีน COI (Cytochrome Oxidaes subunit I) ของเพลี้ยไฟที่เก็บรวบรวมได้ในแต่ละจังหวัด สามารถสรุปได้ว่าชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae ที่พบในเขตภาคกลางของประเทศไทยไม่มีความแตกต่างกันทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยาในระดับชนิด จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดและถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยไฟทั้ง 3 ชนิด นำตัวอย่างเพลี้ยไฟจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลงพร้อมนำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดทำรายชื่อชนิดแมลงศัตรูพืชรองรับปัญหาด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตรตลอดจนใช้ในด้านการกักกันพืช ซึ่งเป็นไปตามมาตรการด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measure: SPS Agreement) ขององค์การการค้าโลก (WTO) ที่ประเทศสมาชิกรวมทั้งประเทศไทยจะต้องใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชเพื่อปกป้องสุขภาพมนุษย์ สัตว์ พืชและสิ่งแวดล้อม (อรุณี, 2543) และใช้เป็นข้อมูลสำหรับตรวจสอบความถูกต้องนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาด้านอื่นๆ ทั้งนี้สามารถใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ได้เรียนรู้จากการศึกษาทดลองจำแนกชนิดแมลงต่างๆ ได้ และสามารถถ่ายทอดเทคนิคให้กับบุคลากรที่เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติงานได้ในอนาคต

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องของเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae ที่พบในหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทยจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการหาวิธีการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟที่ถูกต้องและเหมาะสม และใช้เป็นข้อมูลสำหรับการอ้างอิงถึงชนิดเพลี้ยไฟศัตรูสำคัญของพืชนำเข้าส่งออกที่สำคัญ

กรมวิชาการเกษตร

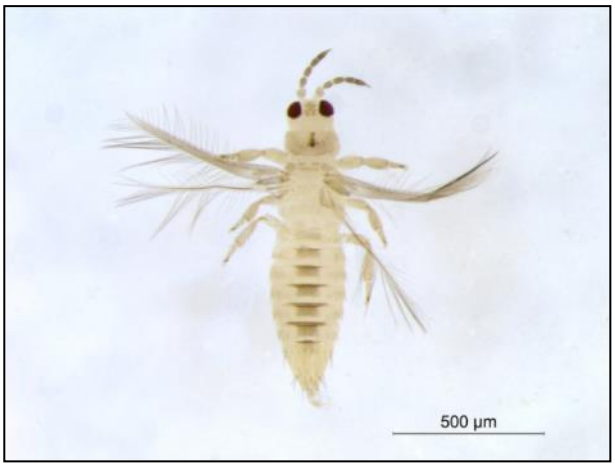
2. ถ่ายทอดแนวทางการวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางอณูชีววิทยาจากการหาลำดับพันธุกรรมของยีน COI ของเพลี้ยไฟวงศ์ชนิดที่ศึกษา โดยการจัดทำเอกสารชุดวิชาอนุกรมวิธานแมลงเพื่อใช้ในการฝึกอบรมหลักสูตรแมลงปากดูด “ศัตรูสำคัญของพืชนำเข้า-ส่งออก” และ หลักสูตรแมลง-สัตว์ศัตรูพืช และการป้องกันกำจัด ที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชจัดขึ้นทุกๆ 2 ปี เพื่อให้ความรู้แก่นักวิชาการจากหน่วยงานต่าง ๆ ทั้งภาครัฐและเอกชน ตลอดจนเกษตรกรและนิสิต นักศึกษาที่สนใจ

3. ใช้ข้อมูลชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae ที่เป็นปัจจุบันเป็นข้อมูลสำหรับนักวิชาการ บริษัทเอกชนและผู้ประกอบการรายอื่นๆ

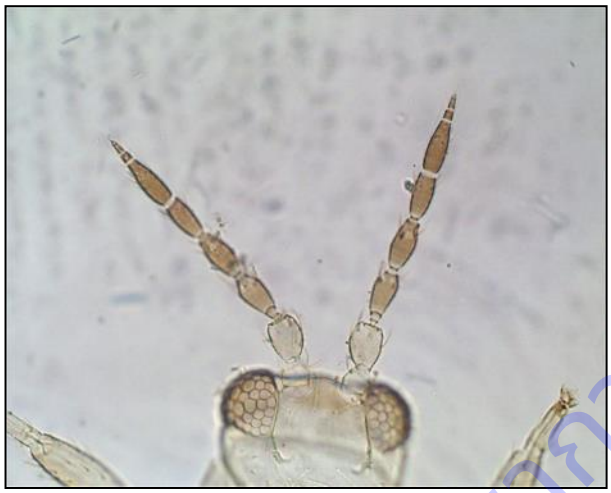
4. นำข้อมูลเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae ที่ได้จากการศึกษา จัดทำฐานข้อมูลแมลงของพิพิธภัณฑ์แมลงของกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ซึ่งเป็นแหล่งข้อมูลทางด้านกีฏวิทยาสำคัญของประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

A

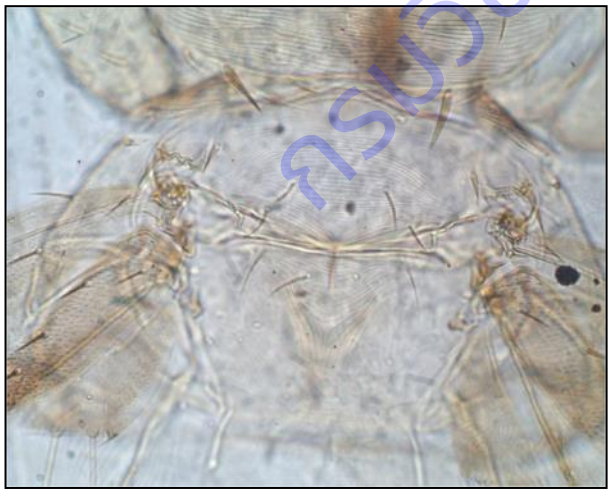


B

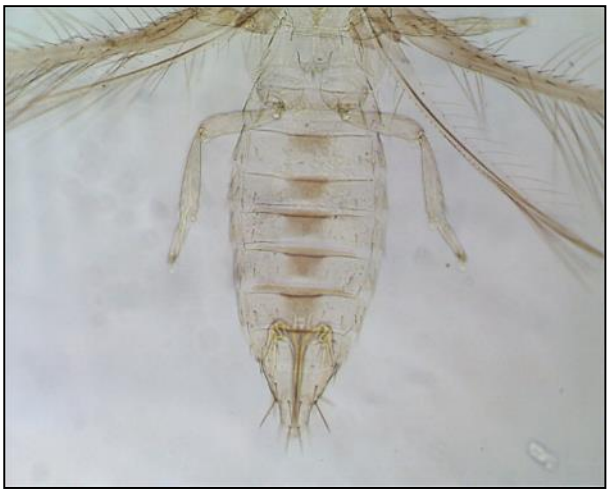


C

D



E



F

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.16.1 Morphology of chilli thrips; *Scirtothrips dorsalis* (Hood)

A. Adult B. Slide permanent

C. Head - antennae D. Pronotum

F. Metanotum G. Tergites III – VII with dark patch medially

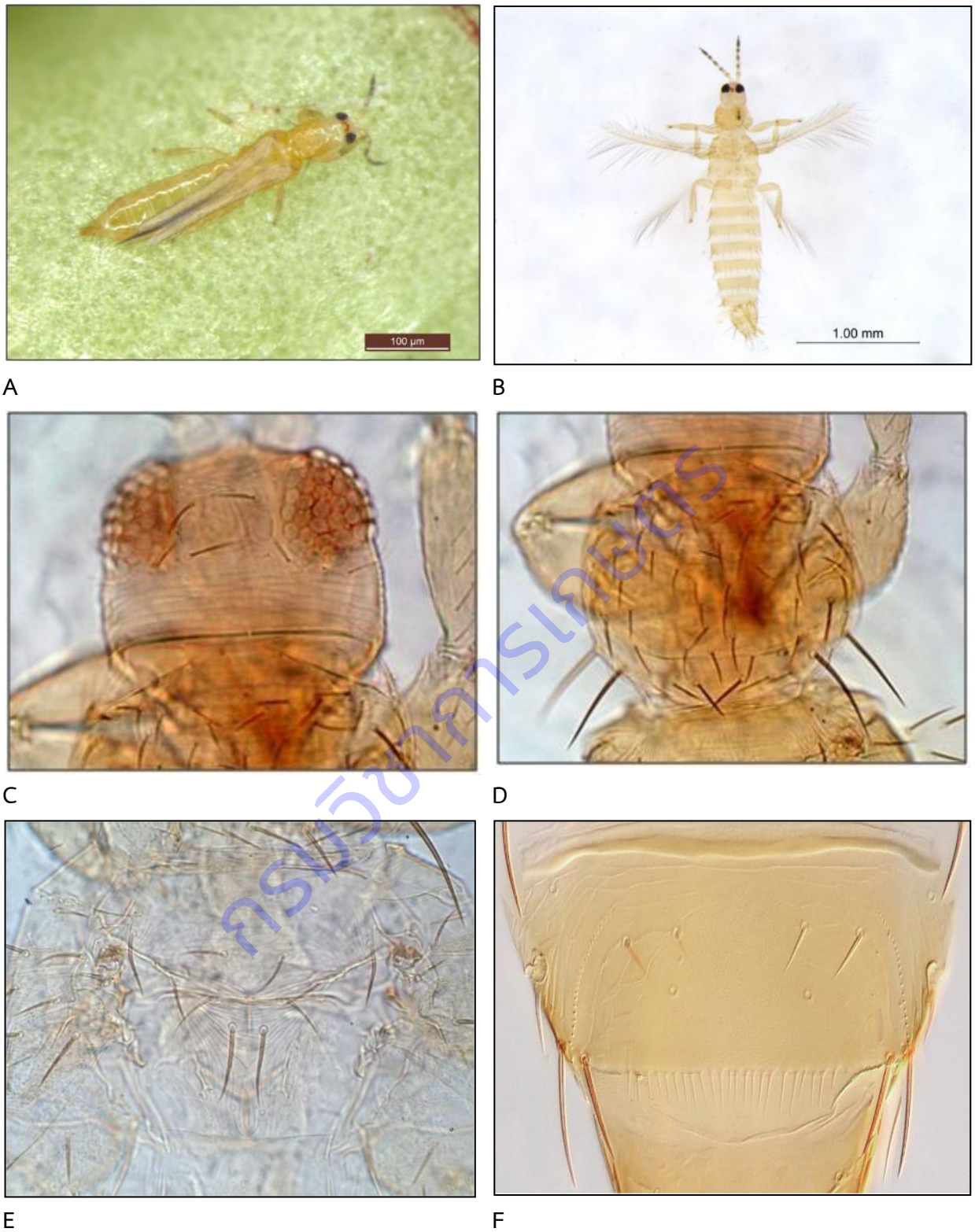


Figure 3.16.2 Morphology of cotton thrips; *Thrips palmi* (Karny)

A. Adult B. Slide permanent

C. Head D. Pronotum

F. Metanotum G. Abdominal tergite VIII

กรมวิชาการเกษตร

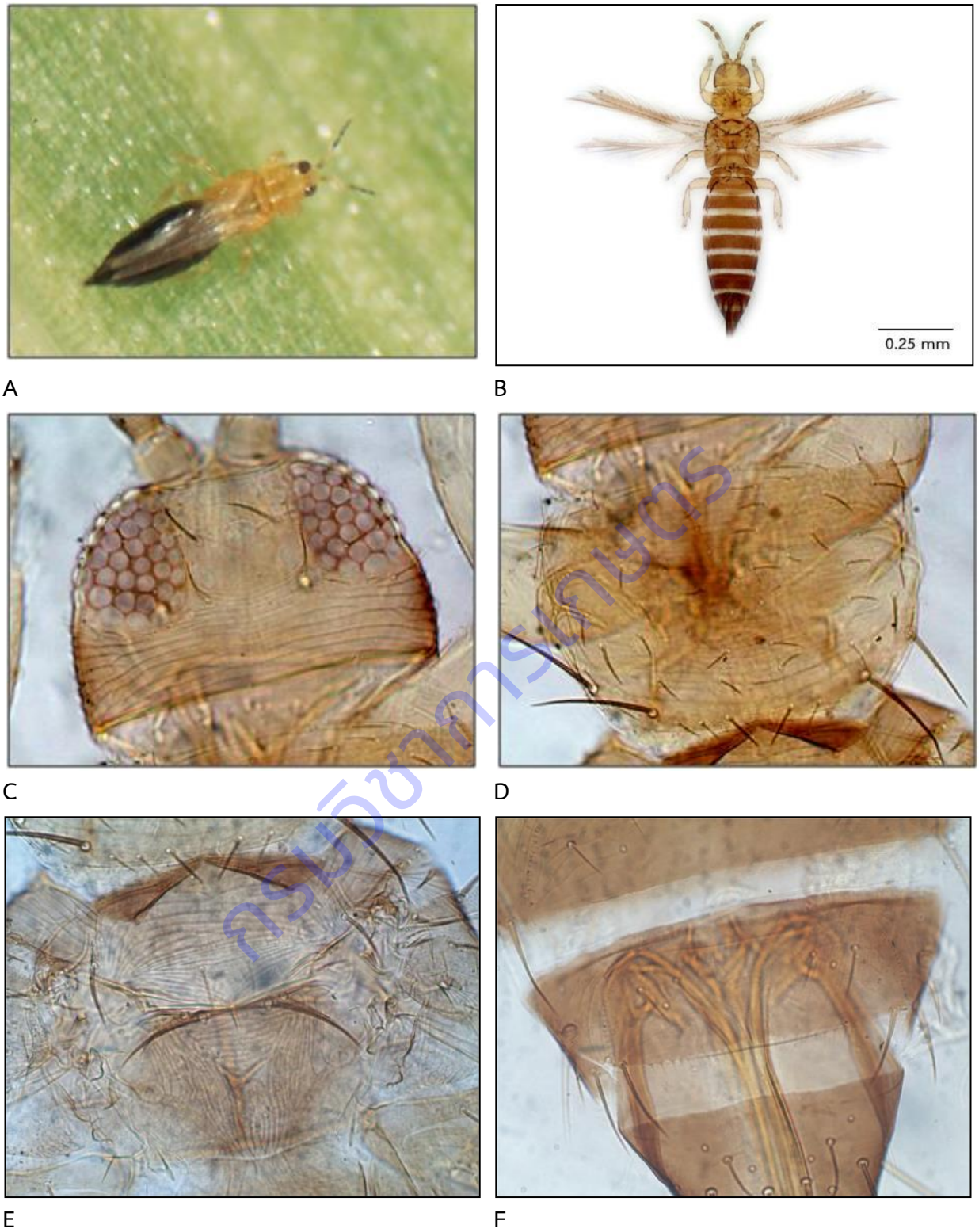


Figure 3.16.3 Morphology of Hawaiian thrips; *Thrips hawaiiensis* (Morgan)

A. Adult
B. Slide permanent
C. Head
D. Pronotum
F. Metanotum
G. Abdominal tergite VIII

กรมวิชาการเกษตร

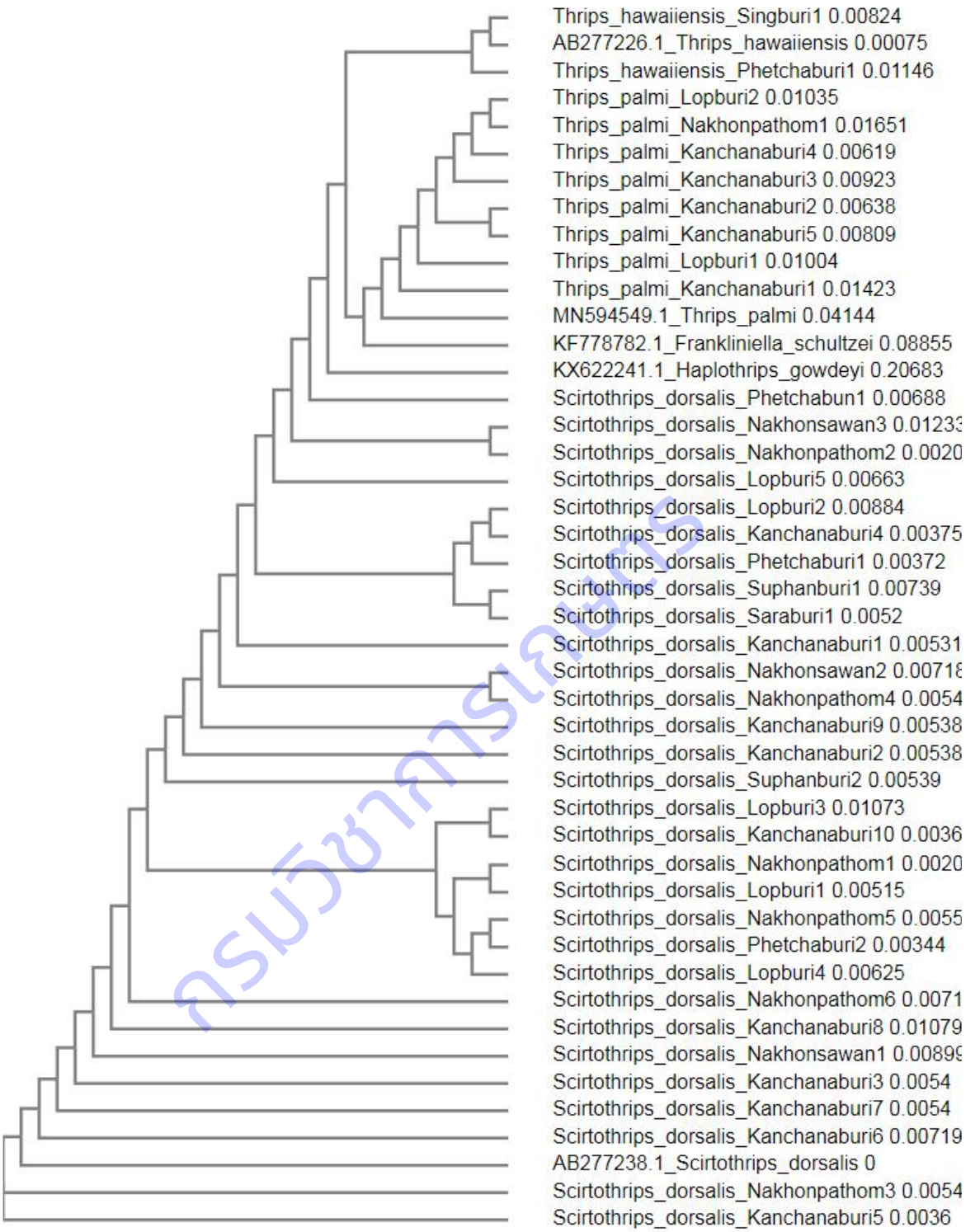


Figure 3.16.4 Phylogenetic trees showing the relationship among 3 thrips populations of *Scirtothrips dorsalis*, *Thrips palmi* and *Thrips hawaiiensis* which collected from asparagus crops in Thailand

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.16.1 Location and number of thrips samples collected from asparagus crops during October 2019 – September 2021

Province	District	Sub-district	Number of thrips samples	Location
Scirtothrips dorsalis (Hood)				
Phetchaburi	Tha yang	Khao ka pook	16	N 12° 44′ 49.9” E 99° 42′ 23.2”
Phetchaburi	Cha am	Khao yai	3	N 12° 51′ 07” E 99° 55′ 01”
Kanchanaburi	Tha ma ka	Tha mai	15	N 13° 54′ 24.31” E 99° 39′ 24”
Kanchanaburi	Tha ma ka	Tha ma ka	18	N 13° 55′ 41.7” E 99° 47′ 46.02”
Kanchanaburi	Tha ma ka	Tha ma ka	5	N 13° 55′ 51.63” E 99° 47′ 40.52”
Kanchanaburi	Tha ma ka	Tha mai	11	N 13° 44′ 50.3” E 99° 39′ 22”
Kanchanaburi	Tha ma ka	Tha mai	6	N 13° 55′ 10.07” E 99° 47′ 34.58”
Kanchanaburi	Tha ma ka	Tha mai	7	N 13° 55′ 3.24” E 99° 47′ 52.39”
Kanchanaburi	Tha muang	Thung thong	10	N 13° 58′ 54.5” E 99° 38′ 50.81”
Kanchanaburi	Huay kra jao	Sra long rua	6	N 14° 22′ 12.67” E 99° 46′ 52.59”
Kanchanaburi	Dan ma kham tia	Chorakae phueak	3	N 15° 50′ 53.88” E 99° 21′ 3.14”
Kanchanaburi	Bo ploy	Nong khum	4	N 14° 15′ 15.59” E 99° 27′ 39.96”
Nakhonpathom	Muang	Mab kae	7	N 13° 52′ 0.19” E 100° 3′ 4.54”
Nakhonpathom	Muang	Thab luang	6	N 13° 52′ 54.75” E 100° 0′ 42.86”
Nakhonpathom	Muang	Nong ngu leaum	3	N 13° 53′ 35” E 99° 56′ 59”
Nakhonpathom	Muang	Nong ngu leaum	2	N 13° 53′ 50” E 99° 57′ 55”

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.16.1 Location and number of thrips samples collected from asparagus crops during October 2019 – September 2021 (Continue)

Province	District	Sub-district	Number of thrips samples	Location
Nakhonpathom	Kam phang sean	Thung luk nok	6	N 14° 2′ 14.28” E 99° 53′ 10.44”
Nakhonpathom	Kam phang sean	Huay mon thong	3	N 13° 58′ 50” E 99° 56′ 57”
Nakhonsawan	Ta klee	Ta klee	2	N 15° 17′ 33.6” E 100° 24′ 59.27”
Nakhonsawan	Tak fha	U dom thun ya	2	N 15° 26′ 13.01” E 100° 28′ 45.31”
Nakhonsawan	Pai sa lee	Na khom	2	N 15° 25′ 24” E 100° 26′ 45”
Lopburi	Chai ba dan	Na som	3	N 15° 14′ 44.88” E 100° 27′ 52.6”
Lopburi	Chai ba dan	Tha din dum	8	N 15° 07′ 41.92” E 100° 9′ 5.64”
Lopburi	Tha luang	Sab jam pa	4	N 15° 0′ 46.64” E 101° 13′ 16.12”
Lopburi	Tha luang	Nong pak wan	5	N 15° 06′ 41” E 101° 10′ 33”
Lopburi	Ban mee	Yang cham	4	N 14° 58′ 33” E 100° 28′ 08”
Saraburi	Wang muang	Wang muang	3	N 14° 51′ 58” E 101° 6′ 35”
Phetchabun	Nong phai	Wat boat	5	N 16° 03′ 26” E 101° 09′ 07”
Suphanburi	U thong	Don ka	6	N 14° 27′ 56” E 99° 53′ 10”
Suphanburi	Song phi nong	Sri	6	N 14° 13′ 30” E 99° 58′ 15”
		Total	**181**	

กรมวิชาการเกษตร

Table 3.16.1 Location and number of thrips samples collected from asparagus crops during October 2019 – September 2021 (Continue)

Province	District	Sub-district	Number of thrips samples	Location
Thrips palmi **(Karny)**				
Kanchanaburi	Tha ma ka	Tha mai	6	N 13° 54′ 24.31” E 99° 39′ 24”
Kanchanaburi	Tha ma ka	Tha ma ka	2	N 13° 55′ 41.7” E 99° 47′ 46.02”
Kanchanaburi	Tha ma ka	Tha ma ka	4	N 13° 55′ 51.63” E 99° 47′ 40.52”
Kanchanaburi	Tha muang	Thung thong	4	N 13° 58′ 54.5” E 99° 38′ 50.81”
Kanchanaburi	Dan ma kham tia	Chorakae phueak	3	N 15° 50′ 53.88” E 99° 21′ 3.14”
Nakhonpathom	Kam phang sean	Thung luk nok	6	N 14° 2′ 14.28” E 99° 53′ 10.44”
Lopburi	Chai ba dan	Na som	4	N 15° 14′ 44.88” E 100° 27′ 52.6”
Lopburi	Chai ba dan	Tha din dum	4	N 15° 07′ 41.92” E 100° 9′ 5.64”
		Total	**33**	
Thrips hawaiiensis **(Morgan)**				
Phetchaburi	Cha am	Khao yai	3	N 12° 51′ 07” E 99° 55′ 01”
Singburi	Muang	Hua phai	3	N 14° 58′ 10” E 100° 25′ 55”
		Total	**6**	

กรมวิชาการเกษตร

บทสรุปและข้อเสนอแนะของโครงการ

โครงการอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย มีระยะในการดำเนินงาน 5 ปี ระหว่างปีงบประมาณ 2560 – 2564 โดยมี**วัตถุประสงค์หลัก** เพื่อได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน (validation) ข้อมูลทางอนุกรมวิธานซึ่งประกอบด้วยประวัติทางอนุกรมวิธาน การอธิบายลักษณะ (description) ชีววิทยาเบื้องต้น เขตการแพร่กระจาย รวมถึงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง (material examine) ที่ใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับอ้างอิงข้อมูลศัตรูพืชของประเทศไทย รวมทั้งข้อมูลในระดับโมเลกุล (ดีอ็นเอบาร์โค้ด DNA barcode) ของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่สำคัญทางการเกษตร เพื่อใช้ในการตรวจสอบย้อนกลับในกรณีมีข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่ไม่เพียงพอ และใช้ในงานวิจัยทางด้านการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogeny) เพื่อทราบทิศทางการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ผลลัพธ์ที่ได้จากงานวิจัยภายใต้โครงการวิจัยนี้สามารถใช้สำหรับการค้าระหว่างประเทศและสนับสนุนงานด้านกักกันพืช โดยเฉพาะการจัดทำข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List) ที่ต้องส่งให้ประเทศคู่ค้าได้นำไปพิจารณาก่อน นำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศไทย และใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืชของประเทศคู่ค้าที่ส่งมา เพื่อวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis) ก่อนนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศคู่ค้า และใช้สำหรับในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืชกักกัน (Quarantine Pest) เพื่อการควบคุมศัตรูพืชจากต่างประเทศไม่ให้เข้ามาแพร่กระจายในประเทศ และใช้ประโยชน์เพื่อการเจรจาตอบโต้ประเทศคู่ค้าที่ใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Sanitary and Phytosanitary Measure) มาเป็นเงื่อนไขในการกีดกันทางการค้า

โครงการอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทยนี้ ประกอบด้วย 3 กิจกรรม ได้แก่

กิจกรรมที่ 1 สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ มี 2 กิจกรรมย่อย ประกอบด้วย

กิจกรรมย่อยที่ 1.1 สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ (จำนวน 24 การทดลอง)

กิจกรรมย่อยที่ 1.2 สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชและจุลินทรีย์ควบคุมโรค (จำนวน 14 การทดลอง)

กิจกรรมที่ 2 ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ของศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติ (วงจรชีวิต การเข้าทำลาย พืชอาหาร และการแพร่กระจาย) ประกอบด้วย 3 กิจกรรมย่อย

กิจกรรมย่อยที่ 2.1 ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ของแมลง ไร สัตว์ ศัตรูพืช (จำนวน 10 การทดลอง)

กิจกรรมย่อยที่ 2.2 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของโรคพืช (จำนวน 8 การทดลอง)

กิจกรรมย่อยที่ 2.3 ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของวัชพืช (จำนวน 5 การทดลอง)

กิจกรรมที่ 3 การจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด (จำนวน 16 การทดลอง)

สำนักวิชาการ

สรุปผลการดำเนินงานของโครงการดังนี้

กิจกรรมที่ 1 สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ มี 2 กิจกรรมย่อย ประกอบด้วย

กิจกรรมย่อยที่ 1.1 สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน (validation) ข้อมูลทางอนุกรมวิธานซึ่งประกอบด้วยประวัติทางอนุกรมวิธาน การอธิบายลักษณะ (description) แนวทางการวินิจฉัย (key) ข้อมูลชีววิทยาเบื้องต้น เขตการแพร่กระจายและตัวอย่างเก็บรักษาตัวอย่างที่ใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับอ้างอิงข้อมูลศัตรูพืชของประเทศไทย ประกอบด้วย แมลงศัตรูพืช ได้แก่ เพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Aspidiotinae จำนวน 7 สกุล 12 ชนิด วงศ์ย่อย Diaspidinae จำนวน 8 สกุล 14 ชนิด เพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae จำนวน 3 สกุล 3 ชนิด แมลงหวี่ขาว วงศ์ Aleyrodidae จำนวน 3 ชนิด เพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วง จำนวน 4 สกุล 8 ชนิด มวนสกุล *Nysius* 3 ชนิด ผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo* จำนวน 7 ชนิด ผีเสื้อหนอนร่าน วงศ์ Limacodidae) จำนวน 60 ชนิด ใน 26 สกุล ตั๊กแตนทั้งสิ้น 3 วงศ์ 8 วงศ์ย่อย 23 ชนิด ตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ในเผ่า Dacini จำนวน 6 ชนิด และแมลงวันหนอนชอนใบ วงศ์ Agromyzidae จำนวน 5 ชนิด สัตว์ศัตรูพืช ได้แก่ หอยทากบกศัตรูพืช หอยทากบก จำนวน 10 ชนิด ทาก จำนวน 1 ชนิด หอยน้ำจืดศัตรูพืชจำนวน 2 สกุล 3 ชนิด โครโมโซมของหอยทากบกวงศ์ Succineidae มีค่าแฮพพลอยด์ (haploid, n) เท่ากับ 19-24 และ หนูหริ่งสกุล *Mus* (Rodentia: Muridae: Murinae) จำนวน 4 ชนิด ไรศัตรูพืชและแมงมุม ได้แก่ ไรขาวในวงศ์ Tarsonemidae พบไรทั้งหมด 2 วงศ์ 15 ชนิด และแมงมุมในวงศ์ Oxyopidae ทั้งหมด 4 สกุล 6 ชนิด ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง พบจำนวน 2 สกุล ศัตรูธรรมชาติ ได้แก่ แตนเบียนสกุล *Encarsia* จำนวน 3 ชนิด แตนเบียนไข่มวน 1 วงศ์ Platygastridae จำนวน 10 สกุล แมลงช้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae จำนวน 2 วงศ์ย่อย 8 ชนิด แมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae จำนวน 3 สกุล 3 ชนิด แมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae จำนวน 2 สกุล 2 ชนิด และมวนตัวห้ำสกุล *Orius* จำนวน 4 ชนิด รายละเอียดดังนี้

แมลงศัตรูพืช

เพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ย่อย Aspidiotinae ทั้งสิ้น 12 ชนิด 7 สกุล ได้แก่ 1) เพลี้ยหอยเกล็ดมะพร้าว *Aspidiotus destructor* Signoret 2) เพลี้ยหอยเกล็ดออเรนทัล *Aonidiella orientalis* (Newstead) 3) เพลี้ยหอยเกล็ดเหลืองเทียม *Aonidiella comperei* Mckenzie 4) เพลี้ยหอยเกล็ดแดงแคลิฟอร์เนีย *Aonidiella aurantii* (Maskell) 5) เพลี้ยหอยเกล็ดขิง *Aspidiella hartii* (Cockerell) 6) เพลี้ยหอยเกล็ดไตรโลไบท์ *Pseudaonidia trilobitiformis* (Green) 7) เพลี้ยหอยเกล็ด *Pseudaonidia* sp. 8) เพลี้ยหอยเกล็ดมอร์แกน *Chrysomphalus dictyospermi* (Morgan) 9) เพลี้ยหอยเกล็ด *Chrysomphalus sp.* 10) เพลี้ยหอยเกล็ดฟลอริดาน่า *Lindingaspis floridana* Ferris 11) เพลี้ยหอยเกล็ดลาทิเนีย *Hemiberlesia lataniae* (Signoret) 12) เพลี้ยหอยเกล็ด *Hemiberlisia* sp.

เพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Diaspidinae จากการตรวจจำแนกชนิดตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ด พบทั้งสิ้น 8 สกุล 14 ชนิด ได้แก่ 1) เพลี้ยหอยเกล็ดขาวมันสำปะหลัง *Aonidomytilus albus* (Cockerell) 2) เพลี้ยหอยเกล็ดกุหลาบ *Aulacaspis rosae* (Bouche') 3)เพลี้ยหอยเกล็ดขาวมะม่วง *Aulacaspis tubercularis* (Newstead) 4) เพลี้ยหอยเกล็ดขาวทุเรียน *Aulacaspis vitis* (Green) 5) เพลี้ยหอยเกล็ดขาว *Aulacaspis* sp. 6) เพลี้ยหอย

กรมวิชาการเกษตร

เกล็ดสับปะรด *Diaspis bromeliae* (Kerner) 7) เพลี้ยหอยเกล็ดยาวส้ม *Lepidosaphes gloverii* (Packard) 8) เพลี้ยหอยเกล็ดยาว *Lepidosaphes* sp. 9) เพลี้ยหอยเกล็ดกลมส้ม *Parlatoria pergandii* (Comstock) 10) เพลี้ยหอยเกล็ดดำมะนาว *Parlatoria ziziphi* (Locau) 11) เพลี้ยหอยเกล็ดเฟิร์น *Pinnaspis aspidiatrae* (Signorest) 12) เพลี้ยหอยเกล็ดขาวฝ้าย *Pinnaspis strachani* (Cooley) 13) เพลี้ยหอยเกล็ดยี่โถ *Pseudaulacaspis* cockerelli (Cooley) 14) เพลี้ยหอยเกล็ดหิมะส้ม *Unaspis citri* (Comstock)

เพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae จำนวน 3 สกุล 3 ชนิด ได้แก่ 1) *Geococcus coffeae* Green 2) *Rhizoecus americanus* (Hambleton) 3) *Ripersiella saintpauliae* (Williams)

เพลี้ยอ่อน (Hemiptera: Aphididae) สามารถจำแนกได้ 4 สกุล 6 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยอ่อนฝ้าย *Aphis gossypii* Glover เพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch เพลี้ยอ่อนถั่วเหลือง *Aphis glycines* Matsumura เพลี้ยอ่อนกะหล่ำ *Brevicorync brassicae* (Linnaeus) เพลี้ยอ่อนผัก *Lipaphis erysimi* Kaltenbach และเพลี้ยอ่อนยาสูบ *Myzus persicae* (Sulzer)

แมลงหวี่ขาว (Hemiptera: Aleyrodidae) สามารถจำแนกได้ 3 ชนิด ได้แก่ 1) แมลงหวี่ขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) 2) แมลงหวี่ขาวใยเกลียว *Aleurodicus dispersus* Russell และ 3) แมลงหวี่ขาวในโรงเรือน *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856)

เพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วงจำนวน 4 สกุล 8 ชนิด ได้แก่ *Amrasca splendens* Ghauri, *Amritodus atkinsoni* (Lethierry), *Idioscopus clypealis* (Lethierry), *Idioscopus nagpurensis* (Pruthi), *Idioscopus nitidulus* (Walker), *Idioscopus clavosignatus* Maldonado Capriles, *Idioscopus chumphoni* Hongsaprug และ *Mangganeura reticulata* Ghauri ซึ่งเพลี้ยจักจั่นสกุล *Amritodus* เป็นการรายงานครั้งแรกในประเทศไทย

มวนสกุล *Nysius* 3 ชนิด คือ *Nysius dissimillis* (Izzard), *Nysius ceylanicus* (Motsch) และ*Nysius minor* (Distant)

ผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo* จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *C. auricilius C. infuscatellus C. polychrysus C. Sacchariphagus, C. suppressalis C. terrenellus* และ *C. Tumidicostalis*

ผีเสื้อหนอนร่าน (Lepidoptera: Limacodidae) จำนวน 60 ชนิดใน 26 สกุล คือ สกุล *Altha* 2 ชนิด สกุล *Atosia* 1 ชนิด สกุล *Birthamoides* 1 ชนิด สกุล *Birthosea* 1 ชนิด สกุล *Cania* 3 ชนิด สกุล *Chalcocelis* 1 ชนิด สกุล *Cleromettia* 1 ชนิด สกุล *Darna* 6 ชนิด สกุล *Hampsonella* 1 ชนิด สกุล *Hyphorma* 1 ชนิด สกุล *Hyphormides* 1 ชนิด สกุล *Idonauton* 1 ชนิด สกุล *Miresa* 2 ชนิด สกุล *Narosoideus* 1 ชนิด สกุล *Nirmides* 1 ชนิด สกุล *Oxyplax* 1 ชนิด สกุล *Parasa* 17 ชนิด สกุล *Phlossa* 1 ชนิด สกุล *Phocoderma* 1 ชนิด สกุล *Praesetora* 1 ชนิด สกุล *Pseudonirmides* 1 ชนิด สกุล *Quasithosia* 1 ชนิด สกุล *Scopelodes* 5 ชนิด สกุล *Setora* 2 ชนิด สกุล *Susica* 1 ชนิด และสกุล *Thosea* 5 ชนิด ซึ่งสกุลและชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีจำนวน 6 สกุล 10 ชนิด คือ สกุล *Cania* ได้แก่ชนิด *C. siamensis* สกุล *Darna* ได้แก่ชนิด *D. furva D. diducta D. pallivitta D. sordid* สกุล *Parasa* ได้แก่ชนิด *P. corbetti P. lepida* สกุล *Quasithosia* ได้แก่ชนิด *Q. sythoffi* สกุล *Setora* ได้แก่ชนิด *S. fletcheri* และสกุล *Thosea* ได้แก่ชนิด *T. siamica*

กรมวิชาการเกษตร

ตั๊กแตนทั้งสิ้น 3 วงศ์ 8 วงศ์ย่อย 23 ชนิด ได้แก่ Acrididae: *Acrida willemsei* Dirsh 1954, *Gonista bicolor* (De Haan 1842), *Trilophidia annulata* (Thunberg 1815), *Phlaeoba infumata* Brunner 1893, *Phlaeoba antennata* Brunner 1893, *Calephorus vitalisi* I. Bolivar 1914, *Oedaleus abruptus* (Thunberg 1815), *Aiolopus thalassinus* (Fabricius 1781), *Gesonula mundata* (Walker 1870), *Oxya japonica* (Thunberg 1824), *Oxya hyla* Serville 1831, *Pseudoxya diminuta* (Walker 1871), *Apalacris varicornis* Walker 1870, *Hieroglyphus banian* (Fabricius 1798), *Spathosternum prasiniferum* (Walker 1871), *Choroedocus violaceipes* Miller 1934, *Atractomorpha psittacina* (De Haan 1842), *Atractomorpha crenulata* (Fabricius 1793), *Pyrgocorypha subulate* (Thunberg 1815), *Conocephalus longipennis* (Haan 1842), *Holochlora nigrothympana* Ingrisch 1990, *Orthelimaea leeuwenii* (Karny 1926) และ *Hexacentrus unicolor* Serville 1831

ตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ในเผ่า Dacini จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *B. correcta, B. latifrons*, *B. dorsalis*, *B. umbrosa, Z. cucurbitae* และ *Z. tau* และจากการศึกษา morphometric ปีกแมลงวันผลไม้ 10 ชนิด ได้แก่ *B. carambolae, B. cilifera*, *B. correcta, B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa, B. tuberculata, B. zonata*, *Z. cucurbitae* และ *Z. tau*

แมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Liriomyza brassicae* (Riley, 1884), *L. chinensis* (Kato, 1949), *L. huidobrensis* (Blanchard, 1926), *L. sativae* Blanchard, 1938 และ *L. trifolii* (Burgess 1880)

<u>สัตว์ศัตรูพืช</u>

ความหลากชนิดหอยทากบกศัตรูพืชในระบบนิเวศเกษตรและสิ่งแวดล้อมพบกลุ่มหอยทากบก 10 ชนิด ทาก 1 ชนิด โดยจัดเป็นหอยและทากชนิดที่มีรายงานเป็นศัตรูพืช 6 ชนิด คือ หอยดักดาน *Cryptozona siamensis*, หอยกระดุม *Bradybeana* sp, หอยขัดเปลือก *Macrochlamys* sp.,หอยสาลิกา *Sarika* sp., หอยทากยักษ์อัฟริกา *Achatina fulica* หอยเจดีย์เล็ก *Lamellaxis gracilis,* หอยเจดีย์ใหญ่ *Prosapea walkeri ,* หอยกระดุม *Bradybeana sp,* หอยอำพัน *Succinea sp.,* และทากเล็บมือนาง *Parmarion sp.,* หอยนักล่าสยาม *Perrottetia siamensis* (Pfeiffer,1862) และทากนักล่าซาราซิน *Atopos sarasini* (Collinge ,1902)

หอยน้ำจืดศัตรูพืชในพรรณไม้น้ำได้ตัวอย่างหอยน้ำศัตรูพืช พบว่าเป็นหอยน้ำจืดศัตรูพืช *Radix* และ *Indoplanorbis* และพบหอย *Physella* sp. 1 ซึ่งเป็นหอยศัตรูพืชต่างถิ่นในบริเวณเขื่อนลำพระเพลิง จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดนครปฐม และหอยศัตรูพืชต่างถิ่น *Physella* sp. 2

โครโมโซมจากตัวอย่างหอยทากบกวงศ์ Succineidae พบว่าจำนวนโครโมโซมมีค่าแฮพพลอยด์ (haploid, n) เท่ากับ 19-24 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่มีก่อนหน้านี้ ว่าค่าแฮพพลอยด์ของหอยทากบกวงศ์นี้เท่ากับ 5-25

ความหลากชนิดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหนูหริ่งสกุล *Mus* (Rodentia: Muridae: Murinae) ที่พบในประเทศไทย สามารถจำแนกชนิดหนูหริ่งศัตรูพืช ได้ 4 สปีชีส์ ได้แก่ หนูหริ่งนาหางสั้น (Fawn-colored

กรมวิชาการเกษตร

mouse; *Mus cervicolor*) หนูหริ่งใหญ่ (Cook's mouse; *Mus cookii*), หนูหริ่งนาหางยาว (Ryukyu mouse; *Mus caroli*) และหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน (Shortridge's shrewmouse; *Mus pahari*)

ไรศัตรูพืชและแมงมุม

ไรขาวในวงศ์ Tarsonemidae พบไรทั้งหมด 2 วงศ์ 15 ชนิด เป็นไรศัตรูพืช 8 ชนิด ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นศัตรูพืชหรืออาจจะเป็นไรที่กินเชื้อราอีก 6 ชนิดและ ไรตัวห้ำ 1 ชนิด ไรขาวศัตรูพืชที่พบได้แก่ *Polyphagotarsonemus latus* (Banks), *Polyphagotarsonemus* sp., *Nasuitarsonemus onami* Lofego, Hountondji, Al-Shanfari&Moraes, *Nasutitarsonemus* sp., *Steneotarsonemus furcatus* De Leon, *Steneotarsonemus* sp., *Steneotarsonemus spinki* Smiley และอีกชนิดไม่สามารถจำแนกชนิดได้ สำหรับไรขาวอีก 5 ชนิดได้แก่ *Fungitarsonemus setillus* Sousa, Lofego & Gondim, *Fungitarsonemus* sp. *Neotrsonemoides* sp., *Tarsonemus bilobatus* Suski *Tarsonemus* sp. และ *Steneotarsonemus* sp. ไม่พบอาการเข้าทำลายอย่างชัดเจน คาดว่าน่าจะเป็นไรขาวที่กินเชื้อราเป็นอาหาร นอกจากนี้พบไรตัวห้ำพบ 1 ชนิดคือ *Amblyseius largoensis* (Muma) จากการสำรวจพบว่าไรขาวชนิดที่มีความสำคัญมี 3 ชนิดคือ *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) เป็นไรขาวที่เข้าทำลายพืชได้หลากหลายชนิด ทำให้ใบพืชม้วนหงิกงอ *Steneotarsonemus furcatus* De Leon เป็นไรขาวศัตรูสำคัญบนผลมะพร้าวทำให้มะพร้าวเป็นแผลแข็งสีน้ำตาล ผลไม่ได้ขนาด หากเข้าทำลายรุนแรงผลจะบิดเบี้ย และ *Steneotarsonemus spinki* Smiley เป็นไรขาวที่พบบนใบข้าว ระบาดเป็นครั้งคราวแต่หากระบาดทำให้ผลผลิตข้าวลดลง

แมงมุมในวงศ์ Oxyopidae ทั้งหมด 4 สกุล 6 ชนิดได้แก่ *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch, 1847) *Oxyopes javanus* Thorell, 1887 *Oxyopes shweta* Tikader, 1970 *Peucetia viridans* (Hentz, 1832) *Hamataliwa* sp. และ *Hamadruas* sp.

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

การจำแนกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย ผลการคัดแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยหนอนกินรังผึ้ง ตรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินในพื้นที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดิน 3 ตัวอย่าง โดยในพื้นที่ตำบลบ้านฉาง อำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง พบจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ PC52 และ PC53 และในพื้นที่ตำบลบ้านแหลมกลัด อำเภอเมืองตราด จังหวัดตราด พบจำนวน 1 ตัวอย่าง คือ PC64 เมื่อนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมาจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่า ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง PC52 เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน และ PC64 เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ ทั้ง 2 ตัวอย่างจัดอยู่ในสกุล *Steinernema* สำหรับ PC53 จัดอยู่ในสกุล *Heterorhabditis* เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง และลักษณะโครงสร้างของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* คือ PC52 และ PC64 มีขนาดลำตัวสั้นความยาวประมาณ 500 ไมครอน ส่วน PC53 ขนาดความยาวลำตัวจะยาวประมาณ 700 ไมครอน เมื่อนำไปวิเคราะห์จัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล พบว่าผลการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่สำรวจพบยังไม่สมบูรณ์ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอได้ จำเป็นต้องทำเพิ่มเติมเพื่อความสมบูรณ์ของตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ศัตรูธรรมชาติ

แตนเบียนสกุล *Encarsia* พบทั้งสิ้น 3 ชนิดได้แก่ *Encarsia strenua* Polaszek 1992, *Encarsia dispersa* Polaszek 2004 และ *Encarsia bimaculata* Heraty & Polaszek 2000 แตนเบียนไข่มวน 1 วงศ์ ได้แก่ Platygastridae พบสกุลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้แก่สกุล *Trissolcus* sp. ซึ่งมี 7 ชนิดได้แก่ *Trissolcus basalis* (Wollaston), *T. japonicus* (Ashmead), *T. thyantae* Ashmead, *T. latisulcus* Crawford, *T. comperei* Ashmead, *T. mitsukurii* Ashmead, *T. vindicius* (Nixon) นอกจากนี้พบแตนเบียนไข่มวนในสกุลอื่นอีก 9 สกุล ได้แก่ *Gryon* sp., *Telenomus* sp., *Idris* sp., *Calliscelio* sp., *Scelio* sp., *Psix* sp., *Phanuromyia* sp., *Trichoteleia* sp. และ *Macroteleia* sp. แตนเบียนไข่ในสกุล *Trissolus* จัดว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพและมีการนำมาใช้ในการพัฒนาผลิตขยายเพื่อควบคุมมวนศัตรูพืชแล้วในหลายประเทศ

แมลงช้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae สามารถวินิจฉัยได้จำนวน 8 ชนิด ใน 2 วงศ์ย่อย และ 4 เผ่า คือ *Nobilinus 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

แมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae พบว่าสามารถวินิจฉัยแมลงช้างสีน้ำตาล ในระดับชนิดได้จำนวน 2 ชนิด และในระดับสกุลได้จำนวน 1 ชนิด ใน 3 วงศ์ย่อย และ 3 เผ่า คือ *Psectra siamica* Nakahara & Kuwayama, 1961 *Micromus timidus* Hagen, 1853 และ *Drepanacra* sp. และสามารถวินิจฉัยแมลงช้างปีกแป้ง ในระดับชนิดได้จำนวน 1 ชนิด และในระดับสกุลได้จำนวน 1 ชนิด ใน 1 วงศ์ย่อย และ 2 เผ่า คือ *Semidalis aleyrodiformis* (Stephens, 1836) และ *Coniopteryx* sp. โดยแมลงช้างทั้ง 2 วงศ์นี้ ชนิดที่สามารถพบได้ทุกภูมิภาคของประเทศไทย มีจำนวน 2 ชนิด คือ *M. timidus* และ *S. aleyrodiformis* ซึ่งแมลงช้างทั้งสองชนิดนี้ มักพบตัวอ่อนกัดกินแมลงปากดูด ได้แก่ เพลี้ยอ่อน และแมลงหวี่ขาว อยู่บ่อยครั้ง จึงจัดว่าเป็นแมลงตัวห้ำที่น่าจะมีความสำคัญทางการเกษตร นำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี โดยเฉพาะกลุ่มแมลงปากดูด ในอนาคต

มวนตัวห้ำสกุล *Orius* จำแนกได้ 4 ชนิด ได้แก่ *Orius dravidiensis* Muraleedharan, *Orius tantillus* (Motschulsky), *Orius maxidentex* Ghauri และ *Orius minutus* (Linnaeus) ทั้ง 4 ชนิดพบดูดกินเพลี้ยไฟ แมลงหวี่ขาว ไร เป็นต้น ซึ่งผลการศึกษาสามารถใช้คัดเลือกชนิดมวนตัวห้ำในสกุลนี้มาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

กิจกรรมย่อยที่ 1.2 สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชและจุลินทรีย์ควบคุมโรค ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน (validation) ข้อมูลทางอนุกรมวิธานซึ่งประกอบด้วยประวัติทางอนุกรมวิธาน การอธิบายลักษณะ (description) ชีววิทยาเบื้องต้น เขตการแพร่กระจายรวมถึงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยและตัวอย่างเก็บรักษาตัวอย่างที่ใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับอ้างอิงข้อมูลศัตรูพืช

กรมวิชาการเกษตร

ของประเทศไทย ประกอบด้วย ราสาเหตุโรคพืช ราสกุล *Phytophthora* ในเผือก จำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง β-tubulin และ translation elongation factor รา *Curvularia* spp. จำนวน 65 ไอโซเลท และ *Bipolaris* spp. จำนวน 37 ไอโซเลท รา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก จำแนกได้ 3 ชนิด เชื้อราในกลุ่ม cercosporoid จำนวน 5 สกุล และราสนิม Pucciniaceae จำนวน 22 ชนิด แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. สาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่ พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคมีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ผิวมัน สีเหลือง ไวรัสสาเหตุโรคพืช อาการ chlorotic ringspot บนใบกล้วยไม้สกุลฟาเลนอพซิส (Phalaenopsis) ที่พบในประเทศไทยมีความเหมือนกับเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) เชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) ในกระเทียม เกิดจากเชื้อไวรัสกลุ่ม Potyvirus และโรคของไวรัสในยาสูบ พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวก กับเชื้อไวรัส 2 ชนิด ไส้เดือนฝอยสาเหตุโรคพืช ไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จำนวน 1 ชนิด และไส้เดือนฝอยรากปม จำนวน 2 ชนิด และแบคทีเรียปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม จำนวน 11 ไอโซเลต รายละเอียดดังนี้

ราสาเหตุโรคพืช

ราสกุล *Phytophthora* ในเผือก ศึกษาและจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง β-tubulin และ translation elongation factor พบว่าคือ *P. colocasiae* รา เจริญได้ดีบนอาหาร 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) 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

ราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris* แยกราจากตัวอย่างโรคพืชด้วยวิธี 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*

ชนิดและเขตการแพร่กระจายของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของรา *Colletotrichum* spp. จำแนกได้ 3 ชนิด คือ *Colletotrichum acutatum* ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากที่สุด รองลงมาได้แก่รา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum capsici* ตามลำดับ จากการศึกษาความสัมพันธ์ของ clear zone และชนิดของรา *Colletotrichum* spp. โดยเลี้ยงรา *Colletotrichum* spp. ที่จัดกลุ่มไว้บนอาหาร Casein hydrolysis medium (CHM) พบว่ารา *Colletotrichum acutatum* สร้าง clear zone ได้ชัดเจนที่สุด มีความกว้างของ clear zone กว้างที่สุด รองลงมาได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum capsici* ตามลำดับ บนอาหาร CBM พบ *Colletotrichum acutatum* และ *Colletotrichum gloeosporioides* สร้าง clear zone ได้ชัดเจนและกว้างกว่า *Colletotrichum capsici* ที่สร้าง clear zone แคบที่สุดและบางไอโซเลตไม่สร้าง clear zone

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

จำแนกชนิด พิจารณาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและพืชอาศัย เพื่อเป็นแนวทางในการพิจารณาขอบเขตของพืชอาศัย ได้เชื้อราในกลุ่ม cercosporoid ได้แก่ *Cercospora apii*, *Cer. beticola*, *Cer. citrulina*, *Cer. arachidicola* (syn. *Passalora arachidicola*), *Cercospora* sp.1, *Cercospora* sp.2, *Corynespora torulosa*, *Cory. cassiicola*, *Pseudocercospora dendrobii*, *Pseu. Abelmoschi* และ *Mycosphaerella* sp.1 จากความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่าเชื้อรา *Cercospora* และ *Corynespora* หลายชนิดเป็นกลุ่ม complex จึงมีความจำเป็นที่การจำแนกชนิดต้องอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมที่เพียงพอ และเมื่อพิจารณาข้อมูลของพืชอาศัยประกอบ พบว่ามีแนวโน้มที่สามารถพิจารณาของเขตของพืชอาศัยของเชื้อรา cercosporoid บางชนิด หากมีศึกษาที่มีกำหนดเป้าหมายของชนิดเชื้อราต่อพืชตระกูลเป้าหมาย จะเป็นจุดเริ่มต้นที่สามารถใช้เป็นข้อมูลในการคาดการณ์การเกิดโรคได้ และได้รวบรวมข้อมูลการจัดจำแนกเชื้อรา cercosporoid ที่มีรายงานพบในประเทศไทย

ราสนิมจำแนกชนิดเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าได้ตัวอย่างราสนิมจาก 8 family ได้แก่ Albuginaceae, Coleosporiaceae, Crossopsoraceae, Phakopsoraceae, Pucciniaceae, Pucciniastraceae, Raveneliaceae และ Zaghouaniaceae นำราสนิม Pucciniaceae มาจำแนกชนิดพบราสนิมจำนวน 22 ชนิด เมื่อจำแนกชนิดด้วยข้อมูลพันธุกรรมพบว่าข้อมูลที่สามารถใช้อ้างอิงตามมาตรฐานสากลยังมีจำกัดจึงพิจารณาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในตัวอย่างราสนิมบางชนิด พบว่าราสนิมมีพืชอาศัยที่แคบ และราสนิมบางชนิดมีแนวโน้มที่มีความจำเพาะต่อพืชอาศัยในระดับสายพันธุ์ของพืช ซึ่งต้องมีการพัฒนาวิธีการศึกษาต่อไป เพื่อสามารถใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ รวมไปถึงการคาดการณ์การเกิดโรคได้ และได้รวบรวมข้อมูลการจัดจำแนกราสนิม Pucciniaceae ที่มีรายงานพบในประเทศไทย

<u>แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช</u>

เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. สาเหตุโรคใบแห้งของหอมที่ พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคมีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ ผิวมัน สีเหลือง การพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch สามารถทำให้เกิดอาการของโรคบนหอมแดง หอมแบ่ง และหอมหัวใหญ่ได้ ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเป็นแบคทีเรีย แกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญในสภาพที่มีอากาศ เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ 4% สามารถผลิตเอนไซม์ catalase และ pectinase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ oxidase, nitrate reductase, arginine dihydrolase และ urease เชื้อสามารถย่อย gelatin, casein, esculin, cellulose, Tween 80 และแป้งได้ สามารถสร้าง H_2S และเจริญบนอาหาร YPGA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สร้างกรดจาก cellobiose lactose และ glycerol ได้ แต่เชื้อไม่สร้าง indole และไม่สร้างเม็ดสีเรืองแสง (fluorescent pigment) บนอาหาร King's B การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อ *Xanthomonas* spp. การจำแนกชนิดของเชื้อด้วยวิธี Multilocus sequence analysis (MLSA) จากยีน *dna*K, *fyu*A, *gyr*B และ *rpo*D รวมทั้งข้อมูลคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *Allii*

กรมวิชาการเกษตร

ไวรัสสาเหตุโรคพืช

การตรวจวินิจฉัยลักษณะอาการ chlorotic ringspot บนกล้วยไม้ Phalaenopsis ที่พบอาการด่างเหลืองใบซีด (chlorosis) เป็นวงแหวน (ring spot) ขยายใหญ่บนใบกล้วยไม้และมีอาการใบจุด (local lesion) ตรงกลางแผล เมื่อตรวจสอบด้วย primer CaCV.NPF 5'TTA CAC TTC TAT AGA AGT ACT A 3' และ CaCV.NPR 5'ATG TCT AAC GTT AGG CAA CTT A 3' ด้วยเทคนิค reverse transcription PCR (RT-PCR) พบแถบดีเอ็นเอและได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเหมือนกับเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) percent identity เท่ากับ 92.62 เปอร์เซ็นต์ และทำการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อและลักษณะอาการบนพืชทดสอบ 4 ชนิด คือ *Nicotiana benthamiana*, *Lycopersicon esculentum*, *Vigna sinensis* และ *Chenopodium quinoa* ด้วยวิธี mechanical ในโรงเรือนควบคุมอุณหภูมิ 25-28 °C พบอาการจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบที่ปลูกเชื้อและต่อมาเนื้อเยื่อเป็นจุดเหลืองตายบน *N. Benthamiana* และ *C. quinoa* ส่วน *L. esculentum* และ *V. sinensis* ไม่แสดงอาการบนใบหลังปลูกเชื้อ จากการศึกษาทำให้พบว่าลักษณะอาการ chlorotic ringspot บนใบกล้วยไม้สกุลฟาเลนอพซิส (Phalaenopsis) ที่พบในประเทศไทยมีความเหมือนกับเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) ที่มีรายงานในไต้หวัน

การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) ในกระเทียม เกิดจากเชื้อไวรัสกลุ่ม Potyvirus เก็บตัวอย่างใบกระเทียมที่แสดงลักษณะอาการเป็นแถบสีเหลืองอ่อนที่ส่วนปลายใบและเป็นขีดๆ บนใบ ตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ในแปลงปลูกด้วยชุดตรวจสอบ Pocy kit ก่อนนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยใช้เทคนิค Brandes' dip พบอนุภาคไวรัสชนิดท่อนยาวคด (flexuous rod) มีขนาดความยาว 550-650 นาโนเมตร และ 800-820 นาโนเมตร ปะปนอยู่ด้วยกัน ได้ตรวจจำแนกเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primer LYSV_1F 5'ACAAGTAAGAAACAGAAGGACAGC3' LYSV_2R 5'GAGGTTCCATTTT CAATGCACCAC3' พบแถบอาร์เอ็นเอ LYSV ขนาดประมาณ 409 คู่เบส ตัวอย่างที่ 1, 2 และ 4 จึงทำการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัส บนพืชทดสอบทั้ง 3 ชนิด คือ *Nicotiana benthamiana*, *Chenopodium quinoa* และ *Vigna Sinensis* ในโรงเรือนควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-28 °C ตรวจพบอาการอาการจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) หลังปลูกเชื้อได้ 12-14 วัน บน *C. Quinoa* ส่วน *N. benthamiana* และ *V. sinensis* ไม่แสดงอาการปรากฏให้เห็น

โรคของไวรัสในยาสูบในแหล่งปลูกของประเทศไทย เมื่อนำมาตรวจด้วยวิธี ELISA สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัส 6 ชนิด คือ TLCV TMV TSV CMV TSWV และ PVY พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวก กับเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือ TLCV และ TMV จำนวนทั้งหมด 60 ตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวก มาตรวจสอบด้วย PCR พบว่า พบตัวอย่างยาสูบที่ให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อไวรัส TLCV จำนวน 24 ตัวอย่าง และ TMV จำนวน 22 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด จำนวน 46 ตัวอย่าง

ไส้เดือนฝอยสาเหตุโรคพืช

ไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* รวมทั้งสิ้นจำนวน 2,583 ตัวอย่าง พบไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จำนวน 26 กลุ่มประชากร คิดเป็นร้อยละ 1.0 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด และนำไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus*

กรมวิชาการเกษตร

เพศเมีย 28 ตัวอย่าง มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับการวินิจฉัยของ EPPO PM 7/88 (1) จัดจำแนกชนิดได้เป็น *Radopholus similis*

ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุล *Radopholus* ที่พบในไม้ประดับ เช่น คล้า หน้าวัว เป็นต้น ยังไม่สามารถจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ได้ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเพื่อจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุลนี้ โดยใช้แนวทางการจัดจำแนกของ EPPO PM 7/88 (1) : *Radopholus similis* ซึ่งใช้การจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางชีวโมเลกุล จากการเก็บตรวจตัวอย่างพืชรวมทั้งสิ้นจำนวน 1,210 ตัวอย่าง จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูพืชด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาผลการจำแนกภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิด Differential interference contrast (DIC) ของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* เพศเมีย จำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่าเป็น *Radopholus similis*

ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลโดยวิธีทางอณูชีววิทยา โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA gene กับฐานข้อมูล พบว่าคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ชอง *Pratylenchus dellatrei* 11 ตัวอย่างและ *P. brachyurus* 1 ตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา การเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกหอมครั้งนี้ พบไส้เดือนฝอยรากแผลในพื้นที่ จ. กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และราชบุรี ยังไม่มีข้อมูลการเข้าทำลาย และความเสียหายที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากแผลทั้ง 2 ชนิดต่อหอม ซึ่งควรศึกษาในลำดับต่อไป

การทวนสอบแนวทางการจำแนกชนิดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อยืนยันความใช้ได้ของ Molecular Diagnostic Key ที่รายงานโดย Adam *et al.* (2007) กับประชากรไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย เพื่อนำไปใช้จำแนกชนิดของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม ลดขั้นตอนและความยุ่งยากในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้สัณฐานวิทยา ซึ่งต้องใช้ตัวเต็มวัยในการจำแนก และต้องใช้นักวิชาการด้านไส้เดือนฝอยที่มีความเชี่ยวชาญ โดยเริ่มจากการทดสอบคู่ไพรเมอร์ 194/195 ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม และคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้แก่ MI-F/MI-R, Inc-K14-F/Inc-K14-R, Finc/Rinc และ F/R พบว่าทุกคู่ไพรเมอร์ให้ผลผลิตปฏิกิริยา PCR ตรงตามรายงานต้นฉบับ ยกเว้นคู่ไพรเมอร์ F/R ที่ให้ผลผลิตปฏิกิริยาขนาดเล็กกว่าในรายงานต้นฉบับ และพบว่าคู่ไพรเมอร์ Inc-K14-F/Inc-K14-R เหมาะสมในการใช้ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* มากที่สุดเนื่องจากมีความไวสูงที่สุด ในปี พ.ศ. 2560 ตรวจตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปม 23 ประชากร จากตัวอย่างดิน จ. เพชรบูรณ์ จ. ฉะเชิงเทรา จ. ตาก จ. ราชบุรี จ. กาญจนบุรี จ. อุตรดิตถ์ จ. แม่ฮ่องสอน จ. เชียงใหม่ จ. ลำพูน จ. เชียงราย จ.นครศรีธรรมราช จ. ชุมพร จ. พังงา จ. สกลนคร จ. อุดรธานี จ.หนองคาย พบว่าทุกประชากรเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* โดยเปรียบเทียบกับลักษณะสัณฐานของริ้วรอยย่นส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมียพบว่าให้ผลตรงกัน ในปี พ.ศ. 2561 เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกพืชต่างๆ ใน จ. เชียงราย แม่ฮ่องสอน พะเยา เชียงใหม่ และน่าน รวม 107 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 13 ตัวอย่าง เมื่อเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมให้ได้ประชากรที่บริสุทธิ์โดยการเริ่มเลี้ยงจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม และตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง 13 ประชากร พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* 11 ตัวอย่าง และ *M. javanica* 2 ตัวอย่าง การทดลองนี้ยืนยันความใช้ได้ของ Molecular Diagnostic Key ที่รายงานโดย Adam *et al.* (2007) ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ประชากรในประเทศไทยได้

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

การศึกษาการจำแนกชนิดโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลซึ่งดำเนินการ 3 เทคนิค 1) การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในส่วน D2-D3 expansion region ของ 28s ribosomal RNA gene (rDNA) โดยใช้ forward primer D2A (5' - ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG -3') และ reverse primer D3B (5' - TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3') ซึ่งได้ตัวอย่าง PCR product ที่ดี จำนวน 70 ตัวอย่าง ส่งวิเคราะห์ลำดับเบสจำนวน 10 แล้วนำไปเทียบเคียงความเหมือนกันของลำดับเบสที่ได้กับที่มีอยู่ในกับฐานข้อมูล BLASTN จากการประมวลผลพบว่าเป็น *R.similis* ทุกตัวอย่าง และ 2)การทดสอบตัวอย่าง PCR product 10 ตัวอย่าง ด้วยการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region โดยใช้ Real-Time PCR ไพรเมอร์ forward primer RAD-F: AGACTTGA TGAGCGCAGA และ reverse primer RAD-R: CGTGCCAGAGGAAGTGA ที่ออกแบบให้จำเพาะเจาะจงกับส่วน ITS ของ *R. similis* ขนาด 227 bp พบว่าทั้ง 10 ตัวอย่างเป็น *R. similis* และ 3) การตรวจตัวอย่าง PCR product 10 ตัวอย่าง ด้วยการใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* คือ ไพรเมอร์ forward primer RsimF 5'- GATTCCGTCCTTTGGTGGGCA-3' และ reverse primer RsimR 5'- GAACCAGGCGTGCCAGAGG-3' ขนาด 398 bp พบว่าทั้ง 10 ตัวอย่างเป็น *R. similis* และ ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของยีนส่วน ITS ของไส้เดือนฝอย *R. similis* ประชากรจากประเทศไทยกับตัวอย่างในฐานข้อมูล ด้วยวิธี maximum likelihood พบว่าเป็น *R. similis*

<u>แบคทีเรียปฏิปักษ์</u>

แบคทีเรีย *P. penetrans* แบคทีเรียปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งเป็นไอโซเลตที่รวบรวมได้จากพื้นที่ปลูกพืชในประเทศไทย ได้แก่ มันฝรั่ง จ. ตาก 2 ไอโซเลต พริก จ. ขอนแก่น 1 ไอโซเลต มันขี้หนู จ. สุราษฎร์ธานี 7 ไอโซเลต พริกไทย จ. จันทบุรี 2 ไอโซเลต และ โหระพา จ. สกลนคร 1 ไอโซเลต รวม 13 ไอโซเลต โดยนำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง แช่ในเซลล์แขวนลอยของสปอร์แบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ เพื่อให้แบคทีเรียเกาะผนังลำตัว จากนั้นนำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมที่มีสปอร์ไปเลี้ยงในรากมะเขือเทศ เพื่อให้ไส้เดือนฝอยรากปมเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยที่มีสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* อยู่ภายในแยกไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศเมียออกจากรากมะเขือเทศ นำไปแยกสปอร์ของแบคทีเรียออกจากตัวไส้เดือนฝอย และสกัดดีเอ็นเอ ทำปฏิกิริยา PCR ในส่วน 16S rDNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ 27f/440r และ 440f/1492r ได้แถบดีเอ็นขนาด 448 และ 1,063 bp คู่เบส ตามลำดับ รวม 11 ไอโซเลต วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรวจแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์และอยู่ระหว่างการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรม

กิจกรรมที่ 2 ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ของศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติ (วงจรชีวิต การเข้าทำลาย พืชอาหาร และการแพร่กระจาย) ประกอบด้วย 3 กิจกรรมย่อย

<u>กิจกรรมย่อยที่ 2.1</u> ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ของแมลง ไร สัตว์ ศัตรูพืช ได้ชีววิทยา พืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย ของ<u>แมลงศัตรูพืช</u> จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยแป้งมะละกอ เพลี้ยอ่อนถั่ว หนอนแดง แมลงวันผลไม้ <u>ไรศัตรูพืช</u> จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ ไรแดงมันสำปะหลัง <u>สัตว์ศัตรูพืช</u> จำนวน 4 สกุล ได้แก่ หอยซัคซีเนีย หอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Indoplanorbis, Radix,* และ *Physella* <u>แมลงศัตรูธรรมชาติ</u> จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ แตนเบียนไข่ไตรโคแกรมมา รายละเอียดดังนี้

แมลงศัตรูพืช

การศึกษาชีวประวัติและอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งมะละกอ *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink โดยนำมาเลี้ยงบนพืชอาหารจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ มะละกอ มันสำปะหลัง ลีลาวดี และชบา พบว่า ตัวเต็มวัยของเพลี้ยแป้งมะละกอ (*P. marginatus*) ที่เลี้ยงในมะละกอมีช่วงอายุเฉลี่ยยาวนานที่สุด รองลงมาได้แก่ ลีลาวดี มันสำปะหลัง และชบา ตามลำดับ สำหรับวงจรชีวิต พบว่า เมื่อเลี้ยงในมะละกอมีวงจรชีวิตเฉลี่ยนานที่สุด คือ 39.8 วัน รองลงมา คือ ลีลาวดี 38.9 วัน เมื่อเลี้ยงในมันสำปะหลัง มีวงจรชีวิตเพียง 34.3 วัน และ 33.2 วันในชบา เพลี้ยแป้งมะละกอ (*P. marginatus*) สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ วางไข่อยู่ภายในถุงไข่ ซึ่งแต่ละถุงไข่เมื่อทำการตรวจนับจำนวนไข่มีความแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด พบว่า จำนวนไข่เฉลี่ยที่เลี้ยงด้วยมะละกอมีจำนวนสูงสุดและในชบาน้อยที่สุด

ศึกษาชีววิทยา พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจายของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* พบว่า เพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดกลาง ลำตัวยาวเฉลี่ย 2.18 $\pm$ 0.38 มิลลิเมตร มีสีเทาดำ ถึงสีดำเป็นมันเงามีผงแป้งปกคลุมที่ส่วนท้อง หนวดมี 6 ปล้อง ปาก (rostrum) ยาวถึงโคนขาคู่กลาง ไซฟังคูไล (siphunculi) เรียวและยาวกว่าส่วนหาง (cauda) ส่วนหางมีรูปร่างคล้ายลิ้น (tongue-shape) มีขน 4 – 7 เส้น ตุ่มด้านข้างลำตัว (lateral tubercles) บนปล้องท้องที่ 1 และ 7 อยู่ข้างใต้ด้านหลังรูหายใจ (spiracles) บริเวณส่วนท้องด้านสันหลังมีแถบสีดำ วงจรชีวิตมีการลอกคราบทั้งหมด 4 ครั้ง ระยะตัวอ่อนมี 4 วัย ระยะตัวอ่อน 4 - 6 วัน ระยะตัวเต็มวัย 6 – 14 วัน ตัวเต็มวัยมีทั้งพวกมีปีกและไม่มีปีก ผลการวิเคราะห์ค่าคุณลักษณะทางชีววิทยาจากตารางชีวิตแบบ biological life table ของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* ที่เลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว มีอัตราการขยายพันธุ์สุทธิ (R_0) เท่ากับ 67.1600 เท่า ค่าสัมประสิทธิ์การเพิ่มทางกรรมพันธุ์ (r_c) เท่ากับ 0.2832 ค่าสัมประสิทธิ์ของการขยายพันธุ์ ($\boldsymbol{\lambda}$) มีค่าเท่ากับ 1.9100 เท่า และชั่วอายุขัยของกลุ่ม (T_c) เท่ากับ 14.854 วัน ตัวเต็มวัยสามารถออกลูกได้ในชั่วโมง 6 หลังจากเป็นตัวเต็มวัย และออกลูกได้มากที่สุดในวันที่ 3 การศึกษาตารางชีวิตแบบ Partial ecological life table ของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* เมื่อเลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว ในสภาพห้องปฏิบัติการ ระยะตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 มีอัตราการตายสูงที่สุด และระยะตัวอ่อนวัยที่ 3 มีอัตราการตายต่ำสุด

ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ฤดูการระบาด ของหนอนแดงในฝรั่ง และพุทรา พบว่าตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็กสีน้ำตาล อายุ 5-8 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ บนผลฝรั่ง ผลพุทรา ดอกและผลชมพู่ ผลละ 1-2 ฟอง ไข่สีขาวใส ผิวเป็นมันสะท้อนแสง รูปร่างกลมรี มีขนาดค่อนข้างเล็ก ขนาดกว้าง 0.1 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 0.15 มิลลิเมตร ระยะไข่ 2-3 วัน เฉลี่ย 2.49$\pm$0.44 วัน หนอนระยะแรกสีขาวแล้วค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีแดง ระยะหนอน 9-12 วัน เฉลี่ย 11.78$\pm$0.56วัน หนอนที่โตเต็มที่จะเจาะออกจากผลและเข้าดักแด้ในดิน โดยนำดินมาทำเป็นรังเพื่อห่อหุ้มตัว ดักแด้อาศัยอยู่ในดินลึกประมาณ 2.0 เซนติเมตร หรืออยู่ใต้ใบไม้ที่ร่วงหล่นอยู่รอบๆ โคนต้น ระยะดักแด้ 8-9 วัน เฉลี่ย 8.46$\pm$0.84วัน การศึกษาระยะการเข้าทำลายของหนอนแดงในชมพู่ ฝรั่ง และพุทรา พบหนอนแดงเข้าทำลายชมพู่ที่ผลอายุ 21, 28, 35 และ 42 วัน โดยพบการทำลายของหนอนแดง 50, 80, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนฝรั่งพันธุ์แป้นสีทอง อายุ 4 ปี ที่ตำบลคลองจินดา อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม พบหนอนแดงเข้าทำลายฝรั่งที่ผลอายุ 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91 และ 98 วัน โดยพบการทำลายของหนอนแดง 55, 60, 70, 85, 90, 90, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพุทรา ที่ตำบลบ้านเกาะ

ศรีวิชัยการเกษตร

อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร พบหนอนแดงเข้าทำลายพุทราที่ผลอายุ 70, 77, 84, 91, 98, 105 และ 112 วัน โดยพบการทำลายของหนอนแดง 10, 45, 50, 75, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa* (Fabricius) พบว่า ตัวเต็มวัยเริ่มจับคู่ผสมพันธุ์หลังออกจากดักแด้ 15 วัน โดยวางไข่เป็นฟองเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม ๆ ตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัว สามารถวางไข่ได้ 110-422 ฟอง เฉลี่ย 175.50±89.77 ฟอง ไข่มีเปอร์เซ็นต์การฟัก 85% ระยะไข่ 84-96 ชั่วโมง เฉลี่ย 84.21±1.45 ชั่วโมง ระยะหนอน 8-10 วัน เฉลี่ย 8.85±0.74 วัน มีเปอร์เซ็นต์การรอด 47.06% ระยะดักแด้ 11-13 วัน เฉลี่ย 11.50±0.66 วัน มีเปอร์เซ็นต์การรอด 60.00% ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุ 87-119 วัน เฉลี่ย 100.30±11.03 วัน ตัวเต็มวัยเพศผู้มีอายุ 80-106 วัน เฉลี่ย 89.90±6.87 วัน โดยสรุปวงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* ในห้องปฏิบัติการ จากไข่ถึงตัวเต็มวัยใช้เวลา 22.51-25.51 วัน เฉลี่ย 23.72±0.83 วัน สำหรับการศึกษาตารางชีวิต (Life table) บนชิ้นเนื้อขนุน พบว่า ระยะหนอนมีอัตราการตายสูงที่สุด คือ 52.94% โดยการรอดชีวิตในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของแมลงวันผลไม้จะลดลงตามระยะและอายุที่มากขึ้น จากไข่มีโอกาสรอดเป็นตัวเต็มวัยเพียง 24%

<u>ไรศัตรูพืช</u>

ศึกษาวงจรชีวิตของไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis* บนใบพืชอาศัย 2 ชนิด ได้แก่ มันสำปะหลัง และชมพู่ พบว่า ระยะเวลาในการเจริญเติบโตตั้งแต่ไข่จนเป็นตัวเต็มวัยของไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis* บนมันสำปะหลังและชมพู่ เฉลี่ยนาน 7.16 ± 0.04 และ 9.78 ± 0.06 วัน ตามลำดับ ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุยืนยาวเฉลี่ย 13.19 ± 0.76 และ 7.34 ± 0.44 วัน ตามลำดับ ตัวเต็มวัยเพศเมียระยะก่อนวางไข่เฉลี่ย 1.16 ± 0.06 และ 2.04 ± 0.02 วัน ระยะวางไข่เฉลี่ย 12.21 ± 0.76 และ 4.65 ± 0.39 วัน และระยะหลังวางไข่เฉลี่ยนาน 0.49 ± 0.11 และ 0.65 ± 0.12 วัน ตามลำดับ ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ได้ทั้งหมดประมาณ 92.95 ± 5.19 และ 44.58 ± 4.03 ฟองต่อตัว เฉลี่ยวันละ 7.10 ± 0.30 และ 4.94 ± 0.34 ฟองต่อวัน ตามลำดับ อัตราการขยายพันธุ์สุทธิในชั่วอายุขัย (R_0) ชั่วอายุขัยของกลุ่ม (G) ผลิตลูกได้สุทธิต่อวัน (λ) และอัตราส่วนเพศของไรแดงมันสำปะหลังบนมันสำปะหลังมีค่ามากกว่าบนชมพู่ อัตราการเพิ่มประชากร (r_m) ของไรแมงมุมบนมันสำปะหลัง และชมพู่นั้นใกล้เคียงกัน 0.26 และ 0.22 ตามลำดับ

<u>สัตว์ศัตรูพืช</u>

ศึกษาชีววิทยาและพลวัตประชากรของหอยซัคซีเนียในแปลงปลูกกล้วยไม้พบว่า ค่าพลวัตประชากรในจังหวัดกาญจนบุรีมีค่าต่ำสุดในเดือนเดือนมิถุนายน 2560 (4.60 ตัวต่อตารางเมตร) และมีค่าสูงสุดในเดือนสิงหาคม 2560 (เท่ากับ 63.6 ตัวต่อตารางเมตร) ขณะที่ในจังหวัดนครปฐมมีค่าต่ำสุดในเดือนเดือนมิถุนายน 2560 (6.37 ตัวต่อตารางเมตร) และมีค่าสูงสุดในเดือนพฤศจิกายน 2559 (60.31 ตัวต่อตารางเมตร) ปริมาณน้ำฝนและฤดูกาลไม่สัมพันธ์กับพลวัตประชากรของหอยซัคซีเนีย หอยซัคซีเนียมีอายุขัยตั้งแต่ 90 ถึง 145 วัน และสามารถเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนครบวงจรชีวิตได้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

การแพร่กระจายของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Indoplanorbis* จำแนกชนิดได้ 1 ชนิด คือ *Indoplanorbis exustus* (Deshayes, 1834) ศึกษาศักยภาพการกินโดยเปรียบเทียบอัตราการกินพืชอาหาร 8 ชนิด ได้แก่ ใบพาย *Cryptocoryne* sp. อเมซอน *Echinodorus* sp. หญ้าเทเนลูส *Echinodorus tenellus* สาหร่าย

Cabomba sp. สาหร่าย *Egeria* sp. อนูเบียส *Anubias* sp. ชบาน้ำ *Aponogeton* sp. และบัวประดับ *Nymphaea* sp. พบว่าอัตราการกินพืชอาหารทุกชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หอยชนิดนี้ออกไข่เป็นกลุ่มมีเมือกล้อมรอบ มีวงชีวิตประมาณ 115 วัน สามารถสืบพันธุ์ให้ลูกมากกว่า 10 ครอกต่อวงชีวิต

ศึกษาชีววิทยา การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Radix* ได้ตัวอย่าง ทั้งหมด 80 ตัวอย่างจาก 8 จังหวัด (ตาก ยโสธร อุบลราชธานี ศรีสะเกษ นครราชสีมา สุพรรณบุรี นครปฐม และกาญจนบุรี) พบว่า 71 ตัวอย่างคือ *R. rubiginosa* และอีก 9 ตัวอย่างคือ *R. swinhoei* ผลจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมสอดคล้องกับการระบุชนิดหอย *Radix* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี NJ ML และ BI อย่างไรก็ตามมีความจำเป็นต้องศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของหอยชนิดนี้เพื่อให้เข้าใจถึงพฤติกรรมเชิงนิเวศวิทยาซึ่งมีความจำเป็นต่อการวางแผนจัดการและการกำจัด

ศึกษาชนิด ชีววิทยา และการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Physella* ได้ตัวอย่างหอย *Physella* ทั้งหมด 163 ตัวอย่างจาก 3 จังหวัด (จังหวัดกรุงเทพ กาญจนบุรี และนครปฐม) พบว่าเป็นชนิด *Physella acuta* จำนวน 78 ตัวอย่าง และ *Physella bonushenricus* จำนวน 23 ตัวอย่าง หอยชนิดนี้พบอาศัยอยู่กับพืชน้ำบางชนิด ได้แก่ สาหร่ายหางกระรอก และบัวประดับ จากการศึกษาลักษณะการวางไข่ในห้องปฏิบัติการ พบว่ามีลักษณะเป็นเมือกเหนียวห่อหุ้มกลุ่มไข่อีกชั้นหนึ่ง จำนวนไข่ต่อคลัสเตอร์ประมาณ 11-43 ฟอง ลูกหอยที่เพิ่งเริ่มเกิดในสัปดาห์แรกมีความยาวเปลือกเฉลี่ย 1.37 มิลลิเมตร น้ำหนัก 0.002 กรัม และจะเริ่มวางไข่ได้เมื่ออายุ 5-6 สัปดาห์

<u>แมลงศัตรูธรรมชาติ</u>

วงจรชีวิตของแตนเบียนไข่ไตรโคแกรมมาจะสั้นมากที่สุดที่ 35 องศาเซลเซียส โดยมีวงจรชีวิต 6-7 วัน และมีค่าเฉลี่ยที่ 6.47-6.73 วัน ซึ่งการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมาเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 24.4-36.13 องศาเซลเซียส เฉลี่ย 30.80 องศาเซลเซียส) มีวงจรชีวิตที่สั้นที่สุด และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะมีวงจรชีวิตยาวที่สุด เป็นเวลา 6-9 วัน และมีค่าเฉลี่ยที่ 6.85-7.00 วัน เมื่อเลี้ยงที่ระยะเวลาต่างกัน และการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 และ 39 องศาเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน สามารถพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยได้ แต่มีวงจรชีวิตที่ยืดยาวออกไปมากกว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องปกติที่ไม่ได้ควบคุมอุณหภูมิ แสดงให้เห็นว่า เมื่อตัวอ่อนต้องเจริญเติบโตในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงติดต่อกันหลายวัน จะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนมากขึ้น โดยทำให้มีพัฒนาการที่ไม่ปกติ ต้องใช้ระยะเวลาในการพัฒนาการจนออกเป็นตัวเต็มวัยนานมากขึ้น และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีอัตราการเบียนของพ่อแม่พันธุ์ 95% และแตนเบียนรุ่นที่ 1 อัตราการเบียน 93% และมีอัตราการเบียนลดลงในแตนเบียนที่มีอายุวันที่เพิ่มขึ้นในอุณภูมิต่าง ๆ และที่อุณหภูมิ 37 และ 39 องศาเซลเซียส แตนเบียนไข่รุ่นที่ 1 ไม่พบอัตราการเบียนเนื่องจากไม่พบการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย และพบอัตราการออกเป็นตัวเต็มวัยในแตนเบียนเบียนไข่รุ่นที่ 1 จากพ่อแม่พันธุ์แตนเบียนไข่อายุ 2 วัน มากที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอายุแตนเบียนไข่ตัวเต็มวัยมีผลต่อประสิทธิภาพการเบียนและการออกเป็นตัวเต็มวัยของแตนเบียนรุ่นถัดไป

ศูนย์วิชาการเกษตร

กิจกรรมย่อยที่ 2.2 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของโรคพืช ได้ชีววิทยาพืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย ของ ราสาเหตุโรคพืช จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Phyllosticta citriasiana*, *Fusarium oxysporum, Curvularia eragrostidis* และรา *C. oryzae*, *Neoscytalidium dimidiatum* แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า และ ไวรัสสาเหตุโรคพืช จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ Citrus chlorotic dwarf associated virus (CCDav), *Pepper vein yellows virus* (PeVYV), *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) รายละเอียดดังนี้

ราสาเหตุโรคพืช

ศึกษาอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *Phyllosticta citriasiana* ไอโซเลต DOA 009 (ส้มโอ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย) DOA 040 (ส้มโอ อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม) DOA 088 (ส้มโอ อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่) และ DOA 090 (ส้มโอ อำเภอเกษตรสมบูรณ์ จังหวัดชัยภูมิ) จาก culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยศึกษาการเจริญของเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) malt extract agar (MEA) oat meal agar (OMA) V-8 juice agar (V-8 A) และ cherry decoction agar ผลการทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* พบว่า รา *P. citriasiana* ทุกไอโซเลตมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA ยกเว้นราไอโซเลต DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร MEA และผลการทดสอบอุณหภูมิที่ 25 30 35 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ปฏิบัติการพบว่ารา *P. citriasiana* เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ยกเว้นราไอโซเลต DOA 040 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาพืชอาศัยพบว่า ส้มโอเป็นพืชอาศัยของราชนิดนี้ พบการเกิดโรคที่ใบและผลเท่านั้น ไม่เกิดโรคที่ลำต้น สำหรับการเข้าทำลายของรา *P. citriasiana* บนผลส้มโอพบราสร้าง สปอร์ 2 ชนิด ได้แก่ โคนิเดีย (conidia) และสเปอร์มาเทีย (spermatia) เข้าทำลายที่ใบบนต้นและสร้างสปอร์สะสมอยู่บนใบที่ร่วงลงดินด้วยซึ่งเป็นที่อาศัยของเชื้อราในการแพร่ระบาดในฤดูต่อไป และมักพบรา Phyllosticta capa และมักพบรา *Phyllosticta capitalensis* (Teleomorph state*: Guignardia mangiferae*) เป็นราเอ็นโดไฟท์เจริญอยู่บนใบและผลส้มโอด้วยแต่ไม่ทำให้เกิดโรคซึ่งเป็นลักษณะของ Non-pathogenic fungi และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ารา *P. citriasiana* ไม่สร้างระยะสืบพันธุ์แบบมีเพศ

เชื้อรา *Fusarium oxysporum* เมื่อนำตัวอย่างพืชเป็นโรคมาแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potaro Dextrose Agar) และแยกเชื้อราบริสุทธิ์บนอาหาร WA (Water Agar) แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคโดยวิธีการ Koch's postulate รวมทั้งศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร CLA (Corn Leaf Agar) และการทำ Slide Culture สามารถจัดจำแนกได้เป็นเชื้อรา *F.oxysporum* จำนวน 60 ไอโซเลท จากอาการโรคเหี่ยวของพืช 9 ชนิด ได้แก่ โรคเหี่ยวของกล้วย (โรคตายพรายของกล้วยน้ำว้า และกล้วยไข่) โรคเหี่ยวของโหระพา โรคเหี่ยวของผักชี โรคเหี่ยวของพริก โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ โรคเหี่ยวของเบญจมาศ โรคเหี่ยวของยาสูบ โรคเหี่ยวของถั่วลันเตา และ โรคเหี่ยวของผักหวานบ้าน จาก 17 จังหวัด เมื่อประเมินการเกิดโรคในพื้นที่ที่พบโรคตายพราย (Panama disease) พบว่า โดยเฉลี่ยจำนวนต้นที่พบโรคคือ 5-10 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคตายพราย (panams disease) ของกล้วยไข่ พบว่า มีต้นกล้วยไข่เป็นโรคประมาณ 30 – 40 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคเหี่ยวของถั่วลันเตา พบว่า เป็นโรคประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคเหี่ยวของเบญจมาศ

ศรีนครินทร์

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 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรจ และโรคเหี่ยวของโหระพา พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ

ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Curvularia eragrostidis* และรา *C. oryzae* แยกราจากตัวอย่างโรคพืชด้วยวิธี 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 และนำรา *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 วันหลังปลูกเชื้อรา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดปาล์มน้ำมันแสดงอาการของโรคบนใบปาล์มน้ำมันเป็นเวลา 7 วันหลังปลูกเชื้อ

การศึกษารายละเอียดของชีววิทยาและนิเวศของ *Neoscytalidium dimidiatum* จากอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา โดยเก็บกิ่งของแก้วมังกรปกติมาทำการแยกเชื้อ ไม่พบรา *N. dimidiatum* และเก็บส่วนที่เป็นโรคมา 6 ระยะ ระยะที่ 1 ลักษณะอาการระยะเริ่มแรกแสดงอาการจุดเล็กๆ สีขาว มักจะพบแผลสเก็ดสีแดงตรงกลางจุดแผล ระยะที่ 2 ลักษณะจุดกลางแผลเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีเทา จากการตรวจเชื้อระยะที่ 1 และ 2 ไม่พบเชื้อสาเหตุ ระยะที่ 3 แผลขยายใหญ่ขึ้นตรงกลางเป็นสเก็ดสีน้ำตาล แข็ง ตรงกลางแผลเชื้อสร้างส่วนขยายพันธุ์เรียกว่า pycnidia ฝังอยู่ภายในแผล ระยะที่ 4 แผลสีเหลืองเป็นวงเกิดล้อมรอบจุดแผลสเก็ดสีน้ำตาลหรือเกิดแผลด้านข้างด้านใดด้านหนึ่งของกิ่ง ระยะที่ 5 แผลขยายตัวใหญ่ขึ้น มีลักษณะคล้ายสเก็ด สีเทา เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน ระยะที่ 6 เมื่ออาการรุนแรงแผลหลุดออกกลายเป็นรูขนาดใหญ่บนกิ่ง พบเชื้อรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์แบบ pycnidiospore ในส่วนขยายพันธุ์ที่เรียกว่า pycnidia ในระยะที่ 3-6 และยังพบเชื้อสาเหตุสร้างสร้างสปอร์ที่เรียกว่า arthroconidia ในส่วนของเนื่อเยื่อที่ตายระยะที่ 6 เมื่อทำการแยกเชื้อสาเหตุบนอาหารสังเคราะห์ PDA ในระยะที่ 3-6 พบรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์ที่เรียกว่า arthroconidia เช่นกัน และไม่พบสปอร์แบบ pycnidiospore บนอาหารเลี้ยงเชื้อ การศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ M 0328 (จากจังหวัดสกลนคร) M 0331 (จากจังหวัดอุทัยธานี) M 0354 (จากจังหวัดจันทบุรี) และ M 0355 (จากจังหวัดนครราชสีมา) พบว่า ราทั้ง 4 ไอโซเลตนี้เจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 9 เซ็นติเมตร นาน 3 วัน การศึกษาชนิดของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* จำนวน 4 ไอโซเลตพบว่าเชื้อรา *N. dimidiatum* ทุกไอโซ

เลตเจริญได้ดีที่ อุณหภูมิ 25 30 35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ และเจริญได้น้อยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

<u>แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช</u>

ศึกษาชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส เชื้อไม่เจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะสเตร็ปโตมัยซินความเข้มข้นมากกว่า 5 ppm และทองแดงความเข้มข้นมากกว่า 9,000 ppm สามารถทำให้เกิดโรคได้บนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสายพันธุ์บางขุนเทียน คาลิปโซ จิตติ กล้วยไม้สกุลแวนดา (ลูกผสมฟ้ามุ่ย) และกล้วยไม้สกุลช้าง (ช้างแดง) แต่ไม่ทำให้เกิดโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย (บอม) และแคทลียา การปลูกเชื้อโดยฉีดเชื้อสาเหตุเข้าสู่หัวหอมใหญ่ทำให้กาบของหัว (bulb scale) เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วนการปลูกเชื้อสาเหตุในข้าวโพดโดยการพ่นไม่ทำให้เกิดอาการโรคจุดสีขาว เก็บข้อมูลการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียในเศษซากพืชอาศัย พบว่าใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการของโรคและร่วงจากต้นสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียหลังจากร่วงแล้วจนถึง 60 วัน เมื่อตรวจสอบเบื้องต้นโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* พบว่าให้ผลของปฏิกิริยาเป็นบวก การจำแนกชนิดของเชื้อเพื่อยืนยันผลการตรวจสอบโดยใช้การประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) จากยีน *gyr*B, *rpo*B, *atp*D และ *inf*B ทำให้สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าที่พบระบาดในประเทศไทยใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* LMG 2632^{T}

<u>ไวรัสสาเหตุโรคพืช</u>

ศึกษาอาการใบหงิกในพืชตะกูลส้มที่ปลูกในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยพบว่าตัวอย่างส้มโอและมะนาวที่แสดงอาการลักษณะใบหงิกงอ บิด ด่างเป็นจุดจ้ำตามด้านหลังตามแนวเส้นใบและมีลักษณะเป็นรอยบาก (notch) เว้าเข้ามาด้านใดด้านหนึ่งของใบ ซึ่งอาการจะเห็นได้ชัดเจนในช่วงแตกใบอ่อน เกิดจากเชื้อไวรัส Citrus chlorotic dwarf associated virus (CCDav) จัดอยู่ในวงศ์ Gemiviridae ปัจจุบันมีรายงานในประเทศตุรกี (2012) และประเทศจีน (2015) เชื้อไวรัส CCDaV แพร่ระบาดจากการใช้ส่วนขยายพันธุ์ เช่น ตา, กิ่ง, การตอนกิ่ง ไม่พบการถ่ายทอดโรคทางเมล็ดพันธุ์และการถ่ายทอดโรคจากการกรีดสร้างบาดแผล พบระบาดใสสวนส้มโอและมะนาวในแหล่งปลูกสำคัญของประเทศไทย

ศึกษาโรคเส้นใบเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ก่อความเสียหายต่อผลผลิตพริก ตรวจพบเชื้อ PeVYV จำนวน 7 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น 3 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต BKK (กรุงเทพมหานคร) ไอโซเลต SBR (สุพรรณบุรี) และ ไอโซเลต KBR (กาญจนบุรี) ในงานวิจัยนี้ใช้ไอโซเลต BKK ศึกษาการตอบสนองของพริกต่อเชื้อไวรัส พบว่าพริกแสดงอาการใบม้วนขึ้นและเนื้อใบเหลืองชัดเจนหลังจากได้รับการปลูกเชื้อ 20 วัน จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *CP* ของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต พบว่ายีน *CP* มีขนาด 621 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 206 เรซดิวส์ มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 99.2% - 99.8% และ 99% - 99.5% ตามลำดับ และจากผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CP* พบว่าเชื้อ PeVYV ที่แยกได้จากพริกของไทยจับกลุ่มใกล้ชิดกันและแยกออกจากเชื้อ PeVYV ที่พบในต่างประเทศ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ศึกษาโรคเส้นใบเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) และ *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) ได้เก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตง ได้แก่ แตงกวา ฟักทอง มะระจีน และตำลึง ที่แสดงอาการเนื้อใบเหลือง ใบด่างและลำต้นแคระแกร็นในจังหวัดกรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม เชียงราย เชียงใหม่ จันทบุรี สระแก้ว และศรีสะเกษ จำนวน 110 ตัวอย่าง มาตรวจสอบหาเชื้อ *Crinivirus* ด้วยเทคนิค One step RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณอนุรักษ์ของยีน RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ของไวรัสในกลุ่ม *Crinivirus* ผลการตรวจด้วย เทคนิค One step RT-PCR ปรากฏว่าตรวจไม่เชื้อ *Crinivirus* จากตัวอย่างพืชตระกูลแตงทั้งหมดที่เก็บมาตรวจครั้งนี้

กิจกรรมย่อยที่ 2.3 ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของวัชพืช ได้ชีววิทยา เขตการแพร่กระจาย ของวัชพืช จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ หญ้าตีนกาใหญ่ ลูกใต้ใบใบใหญ่ บาหยา กระดุมใบใหญ่ และเทียนนา รายละเอียดดังนี้

ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของหญ้าตีนกาใหญ่ พบว่า เมล็ดหญ้าตีนกาใหญ่มีรูปทรงกระบอก สีน้ำตาล-แดง ผิวเมล็ดมีลักษณะเป็นคลื่นขรุขระ เมล็ดมีความกว้างอยู่ระหว่าง 0.55 - 0.59 มิลลิเมตร และมีความยาวอยู่ระหว่าง 0.86 - 1.00 มิลลิเมตร การศึกษาเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด พบว่า มีความสูง แขนงย่อย จำนวนช่อดอก และจำนวนเมล็ด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แขนงหลัก พบว่า กรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 1 ต้น/กระบะ มีแขนงหลักมากที่สุด คือ 27 แขนง/ต้น แตกต่างจากกรรมวิธีอื่น น้ำหนักสด พบว่า กรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 1 ต้น/กระบะ มีน้ำหนักสดมากสุด คือ 174.27 กรัม/ต้น แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีปลูกต้นหญ้าตีนกาใหญ่ทั้งหมดที่งอก แต่ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 3 และ 5 ต้น/กระบะ ที่มีน้ำหนักสด 102.09 และ 124.50 กรัม/ต้น ตามลำดับ และน้ำหนักแห้ง พบว่า กรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 1 ต้น/กระบะ มีน้ำหนักแห้งมากสุด คือ 72.17 กรัม/ต้น แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 3 ต้น/กระบะ และกรรมวิธีปลูกต้นหญ้าตีนกาใหญ่ทั้งหมดที่งอก แต่ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีปลูกหญ้าตีนกาใหญ่ 5 ต้น/กระบะ ที่มีน้ำหนักแห้ง 48.90 กรัม/ต้น และมีวงจรชีวิต 58 วัน หญ้าตีนกาใหญ่ไม่สามารถขยายพันธุ์ด้วยการปักชำแขนง แต่สามาราถขยายพันธุ์ด้วยการแบ่งกอได้ และเมล็ดงอกได้บนผิวดินเท่านั้น โดยมีความงอก 67.20 เปอร์เซ็นต์

ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยา ลูกใต้ใบใบใหญ่ (*Phyllanthus caroliniensis* Walter) พบว่า จากสำรวจพบลูกใต้ใบใบใหญ่ในแปลงมันสำปะหลังของจังหวัดลพบุรี และจังหวัดสระบุรี ลูกใต้ใบใบใหญ่มีผลสีเขียว เมื่อแก่มีสีน้ำตาล 1 ผล มี 6 เมล็ด สีน้ำตาลเข้ม มีจุดเรียงเป็นแถวบนผิวเมล็ด เมล็ดมี 3 ด้านชัดเจน โดยลูกใต้ใบใบใหญ่จะงอกหลังจากเพาะเมล็ด 7 วัน ออกดอกติดผลจนกระทั่งเมล็ดแก่ใช้เวลา 44 วัน และต้นเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลที่ระยะ 131 วัน หลังติดผลชุดแรก ลูกใต้ใบใบใหญ่ มีวงจรชีวิต 175 วันหลังงอก การติดดอก และเมล็ดเกิดขึ้นไม่พร้อมกัน เป็นแบบทยอยไปเรื่อยๆ ทั้งนี้ 1 ต้น ที่สมบูรณ์ 1 รอบวงจรชีวิต สามารถผลิตเมล็ดได้ จำนวน 22,620 เมล็ด และสามารถขยายพันธ์โดยการปักชำได้ แต่มีเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำกว่าการงอกจากเมล็ด และการงอกของเมล็ดสามารถงอกได้เพียงที่ระดับผิวดิน

ศึกษาชีววิทยาของต้น บาหยา (*Asystasia gangetica*) พบว่า บาหยา เป็นวัชพืชอายุข้ามปี สามารถขยายพันธุ์ได้ทั้งเมล็ดและลำต้น หลังจากเมล็ดงอกประมาณ 1 สัปดาห์ มีใบจริงเป็นใบเดี่ยวออกตรงข้าม และมีการเจริญเติบโตทางด้านใบและลำต้นอย่างรวดเร็ว สร้างเมล็ดที่ระยะ 7 สัปดาห์หลังงอก และหลังจากดอกบาน 2-3

สัปดาห์ เมล็ดสุกแก่ และในช่วง 15 สัปดาห์หลังงอก ต้นบาหยาติดผลมากที่สุด จากนั้นในช่วง 19 สัปดาห์หลังงอก การเจริญเติบโตลดลงทั้งทางด้านลำต้น ใบ การสร้างผลและเมล็ดลดลง การขยายพันธุ์ ด้วยเมล็ด พบว่า เมล็ดอยู่บนผิวดิน มีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงถึง 92.8 เปอร์เซ็นต์ หากเมล็ดอยู่ในระดับความลึกของดิน 15 เซนติเมตร เมล็ดไม่สามารถงอกได้ เช่นเดียวกับส่วนของลำต้น

ศึกษาชีววิทยาของต้นกระดุมใบใหญ่ 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 ลูป แต่ละลูป 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.

ศึกษาชีววิทยาของเทียนนา พบว่าความงอกในห้องปฏิบัติการเฉลี่ย 55 เปอร์เซ็นต์ ความงอกสูงที่สุด 74 เปอร์เซ็นต์ ต่ำที่สุด 29 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดที่เก็บจากบางพื้นที่สามารถงอกได้ที่ระยะ 102 วันหลังทดสอบ แสดงให้เห็นว่าเมล็ดมีการพักตัว และการงอกในสภาพเรือนทดลอง เมล็ดเทียนนามีความงอกเฉลี่ย 20.7 เปอร์เซ็นต์ ความงอกสูงที่สุด 39 เปอร์เซ็นต์ ต่ำที่สุด 2 เปอร์เซ็นต์ การเจริญเติบโตทั้งความสูง ขนาดทรงพุ่ม จำนวนแขนง จำนวนฝัก และการผลิตเมล็ด ในจำนวนต้น 1, 3 และ 5 ต้นต่อตารางเมตร มีค่ามากกว่าสภาวะแข่งขันสูงที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก โดยเทียนนา 1 ต้นที่เจริญเติบโตได้อย่างสมบูรณ์ครบวงจรชีวิตโดยเฉลี่ย 162 วัน สามารถผลิตเมล็ดได้มากถึง 58,424 เมล็ดต่อต้น ซึ่งมากกว่าต้นที่เจริญเติบโตในสภาวะแข่งขันสูงที่มีจำนวนเมล็ดเพียง 5,858 เมล็ดต่อต้น เมล็ดเทียนนาสามารถงอกได้ดีที่ระดับผิวดินลึกไม่เกิน 5 เซนติเมตรเท่านั้น และยังสามารถขยายพันธ์ได้โดยใช้กิ่งปักชำ แต่หากส่วนของลำต้นถูกฝังกลบใต้ดินก็สามารถทำให้เทียนนาตายได้ ในสภาพพื้นที่เกษตร หากเกษตรกรต้องการควบคุมเทียนนาตั้งแต่เริ่มควรทำการไถพรวนฝังกลบเทียนนาทั้งต้นและเมล็ดให้มีความลึกมากกว่า 5 เซนติเมตร ก็จะควบคุมการงอกของเทียนนาได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีกำจัดวัชพืช

กิจกรรมที่ 3 การจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงศัตรูพืช ประกอบด้วย แมลงวันผลไม้กลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex แมลงวันผลไม้เผ่า Dacini เพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae วงศ์ Thripidae เพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera และมอดแป้งสกุล *Tribolium* ศัตรูธรรมชาติ ประกอบด้วย แตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae (Platygastridae) แมงมุม ประกอบด้วย แมงมุมสกุล *Latrodectus* แมงมุมวงศ์ Salticidae ราสาเหตุโรคพืช ประกอบด้วย cercosporoid fungi ราสนิมสาเหตุโรคพืช รา *Alternaria* เชื้อรา *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum และ T. viride* เชื้อรา *Chaetomium cupreum* และ *Ch. Globosum* และเชื้อรา *Curvularia* รายละเอียดดังนี้

แมลงศัตรูพืช

แมลงวันผลไม้กลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex จำแนกและยืนยันชนิดแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex โดยเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากทุกภูมิภาคของประเทศไทย และสกัด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง *cox1* และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลจากการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบบนฐานข้อมูล GenBank (standard nucleotide BLAST) พบแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex ที่สามารถยืนยันชนิดได้มี 2 ชนิด ได้แก่ *B. dorsalis* และ *B. carambolae* และจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อช่วยยืนยันการจำแนกแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex โดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง *cox1* จาก 70 ตัวอย่าง ได้แก่ *B. dorsalis* complex จำนวน 61 ตัวอย่าง และแมลงวันผลไม้ในวงศ์ Tephritidae จำนวน 9 ตัวอย่าง ได้แก่ *Anastrata ludens, B. tryoni, B. cucumis, B. latifrons, B. umbrosa, B. zonata, B. correcta, Zeugodacus cucurbitae* และ *Z. tau* มาวิเคราะห์ด้วย Maximum Likelihood และ Bayesian analysis พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกัน โดยแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* complex เป็น sister group ของแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ ใน Family Tephritidae อย่างชัดเจน และพบว่าความสัมพันธ์ภายในกลุ่มทั้ง *B. dorsalis* แล *B. carambolae* นั้นมีลักษณะเป็น polyphyletic ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* และ *B. carambolae* มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลเบื้องต้นของจำนวนชนิดของ *B. dorsalis* ในประเทศไทย แต่การจำแนกชนิดภายในกลุ่มของ *B. dorsalis* complex ต้องมีการศึกษาต่อไป โดยเพิ่มข้อมูลของยีนตำแหน่งอื่นมาร่วมวิเคราะห์ด้วย

แมลงวันผลไม้เผ่า Dacini นั้นมีรูปร่างลักษณะภายนอกที่ใกล้เคียงกันมากยากต่อการจำแนกชนิด การใช้เทคนิคชีวโมเลกุล โดยการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) จากยีน cytochrome c oxidase (*cox1*) นั้นสามารถช่วยแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ โดยเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากทุกภูมิภาคของประเทศไทย สกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง *cox1* และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบบนฐานข้อมูล GenBank (standard nucleotide BLAST) พบว่าสามารถยืนยันชนิดและบันทึกในฐานข้อมูล Genbank ได้ 20 ชนิด ได้แก่ แมลงวันผลไม้สกุล *Dacus* (1 ชนิด): *Dacus longicornis* Wiedemann; แมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* (10 ชนิด)*: Bactrocera albistrigata* de Meijere, *B. carambolae* Drew & Hancock, *B. correcta* (Bezzi)*, B. dorsalis* Hendel, *B. latifrons* (Hendel), *B. limbifera* (Bezzi), *B. nigrotibialis,* (Perkins), *B. tuberculata* (Bezzi), *B. umbrosa* (Fabricius), *B. zonata* (Saunders); และแมลงวันผลไม้สกุล *Zeugodaucs* (9 ชนิด): *Zeugodacus apicalis* (Meijere)*, Z. caudatus* (Fabricius), *Z. cilifer* (Hendel), *Z. cucurbitae* (Coquillett), *Z. diversa* (Coquillett)*, Z. hochii* (Zia), *Z. incisus* (Walker)*, Z. isolatus* (Hardy), *Z. platamus* (Hardy) และ *Z. tau* (Walker)

ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งยีน *cox1* จากแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini จำนวน 20 ชนิด มาวิเคราะห์ด้วย Maximum Likelihood และ Bayesian analysis พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกัน ยีน *cox1* แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการแก้ปัญหาขแง *Zeugodacus* และ *Dacus* จาก *Bactrocera* โดยความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Zeugodacus นั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Dacus* มากกว่า *Bactrocera* ซึ่งผลที่ได้นี้สามารถใช้สนับสนุนในการยกระดับของแมลงวันผลไม้ในสกุล *Zeugodacus* การศึกษานี้ให้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับจำนวนชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ในประเทศไทย และลำดับยีน *cox1* ได้รับการพิสูจน์ว่ามีประสิทธิภาพในการระบุชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini แม้ใช้จากบาร์โค้ดบางส่วน ดังนั้นสามารถนำยีน *cox1* ไปใช้ในห้องปฏิบัติการวินิจฉัยศัตรูพืชและงานด้านกักกันศัตรูพืชเพื่อระบุชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ได้อย่างถูกต้อง

ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในกล้วยไม้ในเขตภาคกลางของประเทศไทย สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae ได้ 2 ชนิด ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae ได้แก่ เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* (Karny) 288 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟดอกไม้ *Frankliniella schultzei* (Trybom) 2 ตัวอย่าง เมื่อศึกษาลำดับดีเอ็นเอบาร์โค๊ดของยีน COI (Cytochrome Oxidaes subunit I) ของเพลี้ยไฟฝ้ายที่เก็บรวบรวมได้ในจังหวัดนนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี สมุทรสาคร และสุพรรณบุรี สามารถสรุปได้ว่าชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripidae ที่พบในเขตภาคกลางของประเทศไทยคือ เพลี้ยไฟฝ้าย ซึ่งตัวอย่างเพลี้ยไฟที่เก็บรวมรวมได้จากพื้นที่ดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยา

เพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera (Thysanoptera: Tubulifera) ในประเทศไทยสามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera วงศ์ Phlaeothripidae ได้ 3 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยไฟไทร *Gynaikothrips ficorum* (Marchal) 34 ตัวอย่าง เพลี้ยไฟท่อ *Haplothrips gowdeyi* (Franklin) 325 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟ *Podothrips* sp. 2 ตัวอย่าง ดำเนินการศึกษาลำดับดีเอ็นเอบาร์โค๊ดของยีน COI (Cytochrome Oxidaes subunit I) ของเพลี้ยไฟที่เก็บรวบรวมได้ สามารถสรุปได้ว่าเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera 3 ชนิดที่พบในประเทศไทยมีความแตกต่างกันทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยา

เพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae ได้ 3 ชนิด ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera ได้แก่ เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* (Hood) 181 ตัวอย่าง เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Karny 33 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย *Thrips hawaiiensis* (Morgan) 6 ตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงชนิด ลักษณะการทำลาย เขตการแพร่กระจายโดยเพลี้ยไฟจะเข้าทำลายทั้งยอดอ่อน ใบ ดอก และหน่อของหน่อไม้ฝรั่ง ทั้งนี้ได้ดำเนินการศึกษาลำดับดีเอ็นเอบาร์โค๊ดของยีน COI (Cytochrome Oxidaes subunit I) ของเพลี้ยไฟที่เก็บรวบรวมได้ในแต่ละจังหวัด สามารถสรุปได้ว่าชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae ที่พบในเขตภาคกลางของประเทศไทยไม่มีความแตกต่างกันทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยาในระดับชนิด

การประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* ที่เป็นศัตรูพืชกักกันแบบรวดเร็ว ด้วยการใช้ยีน mtDNA *COI* ที่มีความยาว 658 bp เป็นดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยนำตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่รวบรวมได้จากโรงสีข้าว และด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ นำมาจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าประกอบด้วย 4 ชนิด คือ มอดแป้ง (*Tribolium castaneum*) มอดฟันเลื่อย (*Oryzaephilus surinamensis*) ด้วงงวงข้าวโพด (*Sitophilus oryzae*) ด้วงถั่วเขียว (*Callosobruchus maculatus*) และมีตัวอย่างบางส่วนไม่สามารถจำแนกได้ เนื่องจากไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ จากนั้น นำตัวอย่างของแมลงศัตรูโรงเก็บทั้ง

ศรีวิชาการเกษตร

4 ชนิด และตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกได้ มาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณยีน mtDNA *COI* ด้วยเทคนิค PCR ตรวจหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานในฐานข้อมูล GenBank พบว่าผลการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดให้ผลตรงกันกับการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ คือ มอดแป้งชนิด *T. castaneum* โดยค่า sequences similarity ทั้งหมดอยู่ที่ระดับ 98.94% ขึ้นไป ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยการสร้าง Maximum Likelihood tree ด้วยแบบจำลอง K2P ได้ยืนยันความถูกต้องของการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บทั้ง 4 ชนิด อยู่ใน clade เดียวกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของแต่ละชนิดที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank โดยมอดแป้งชนิด *T. castanuem* และชนิด *T. fremani* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ และการทดลองนี้ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บทั้ง 4 ชนิด ป้อนเข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank โดยได้รับ Accession numbers คือ MK649848 – MK649857

ศัตรูธรรมชาติ

ศึกษาแตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae (Platygastridae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าว โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด พบว่าได้แตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae ทั้งสิ้น 16 ชนิดได้แก่ *Gryon largi, Gryon saxatilis, Psix tunetanus, Psix watshami, Telenomus busseolae, Telenomus californicus, Telenomus crassiclava, Telenomus dignus, Telenomus floridanus, Telenomus grenadensis, Telenomus nysivorus, Telenomus podisi, Telenomus tabanivorus, Trissolcus basalis, Trissolcus ogyges* และ *Trissolcus thyantae* แตนเบียนไข่ *Telenomus* spp. เป็นกลุ่มชนิดที่มีความสำคัญที่สุด ควรนำมาศึกษาพัฒนาเพื่อใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูข้าว หรือหาแนวทางการอนุรักษ์ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวต่อไป

แมงมุม

ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอบาร์โค้ด แมงมุมสกุล *Latrodectus* หรือแมงมุมแม่ม่าย (widow spider) 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 ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าแมงมุมแม่ม่าย L. geometricus มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากกลุ่ม L. thoracicus และ L. tredecimguttatus อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถทราบข้อมูล

ศูนย์วิทยทรัพยากร

เบื้องต้นของจำนวนชนิดของ แมงมุมสกุล Latrodectus ในประเทศไทย แต่การจำแนกชนิด ต้องมีการศึกษาต่อไปโดยเพิ่มข้อมูลของยีนตำแหน่งอื่นมาร่วมวิเคราะห์

การใช้ลักษณะทางพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอบาร์โค้ด จำแนกและยืนยันชนิดแมงมุมวงศ์ Salticidae หรือแมงมุมกระโดด (jumping spider) พบแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae จำนวน 6 สกุล 8 ชนิด ได้แก่ *Myrmaplata plataleoides, Plexippus paykulli, Plexippus petersi, Phintella vittata, Phintelloides versicolor, Telamonia dimidiata, Telamonia festiva* และ *Thiania bhamoensis* และจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อช่วยยืนยันการจำแนกแมงมุมวงศ์ Salticidaeโดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของตำแหน่ง *COX*1 จาก 60 ตัวอย่าง ได้แก่ *Myrmaraplata plataleoides* จำนวน 15 ตัวอย่าง *Plexippus paykulli* จำนวน 10 ตัวอย่าง *Plexippus petersi* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Phintella vittata* จำนวน 20 ตัวอย่าง *Phintelloides versicolor* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia dimidiata* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia festiva* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *Thiania bhamoensis* จำนวน 8 ตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์ด้วย Neighbor Joining และ Maximum Likelihood พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกันโดยแต่ละสกุลมีการแยกออกจากกันอย่างชัดเจน และความสัมพันธ์ภายในแต่ละกลุ่มมีลักษณะเป็น monophyletic ในขณะที่กลุ่มของ *Telamonia* ยังไม่สามารถแยกออกมาจากกลุ่มเดียวกันอย่างชัดเจน หากต้องการศึกษาการแบ่งกลุ่มที่ชัดเจนมากขึ้นจะต้องใช้จำนวนยีนที่มาศึกษาเพิ่มเติมมากขึ้น ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าแมงมุมกระโดดแต่ละสกุลมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถทราบข้อมูลเบื้องต้นของจำนวนชนิดของ แมงมุมวงศ์ Salticidae ในประเทศไทย แต่การจำแนกชนิด ต้องมีการศึกษาต่อไปโดยเพิ่มข้อมูลของยีนตำแหน่งอื่นมาร่วมวิเคราะห์

<u>ราสาเหตุโรคพืช</u>

จัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช จากจังหวัด กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ยโสธร ชัยภูมิ เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง กรุงเทพ เพชรบูรณ์ ราชบุรี และเพชรบุรี จำนวน 69 ตัวอย่าง ศึกษาและจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) และ translation elongation factor 1-alpha (EF1-α) ของรา cercosporoid จำนวน 6 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างใบจุดมะละกอ ใบจุดถั่วลิสง ปื้นเหลืองกล้วยไม้ ใบจุดกระเจี๊ยบเขียว ใบจุดถั่วฝักยาว และใบจุดบานไม่รู้โรย พบว่าเชื้อราดังกล่าวคือ *Corynespora cassiicola*, *Passalora arachidicola*, *Pseudocercospora dendrobii*, *Pseu. abelmoschi Pseu. cruenta* และ *Cercospora zinnia* ตามลำดับ

จัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของราสนิมสาเหตุโรคพืช เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคราสนิม จากจังหวัดลำปาง อุตรดิตถ์ เชียงราย เชียงใหม่ พิจิตร พะเยา แพร่ 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

ศูนย์วิทยทรัพยากร

เบญจมาศ ถั่วฝักยาว กาแฟ ถั่วเหลือง และข้าวโพดหวาน พบว่าเชื้อราดังกล่าวคือ *Olivea tectonae Puccinia horiana Hemileia vastatrix Uromyces appendiculatus Phakopsora pachyrhizi* และ *Puccinia sorghi* ตามลำดับ

เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่คาดว่าเกิดจากรา *Alternaria* จากแปลงปลูกพืชใน จังหวัด เพชรบูรณ์ สระบุรี ราชบุรี ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ชัยภูมิ นครราชสีมา ขอนแก่น เลย เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง น่าน ตาก แพร่ และอุตรดิตถ์ ได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* จำนวน 145 ตัวอย่าง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลชีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง ITS, GAPDH และ EF1-**α** จำนวน 37 ไอโซเลท และจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด พบว่า เกิดจากรา *Alternaria* 6 species และ 1 complex species คือ *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดคะน้า กะหล่ำปลี กะหล่ำปลีรูปหัวใจ ผักกาดขาว หัวไชเท้า บรอกโคลี และกะหล่ำดอก *A. porri* สาเหตุโรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง หอมหัวใหญ่ กระเทียม หอมแบ่ง และหอมญี่ปุ่น *A. solani* สาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศ *A. alternata* สาเหตุโรคใบจุดของมันฝรั่ง โรคใบจุดใบไหม้ดาวเรือง และโรคใบจุดใบไหม้ทานตะวันเม็กซิโก *A. dauci* สาเหตุโรคใบไหม้ทานตะวัน และโรคใบไหม้ผักชี *A. tagetica* สาเหตุโรคใบจุดใบไหม้ดาวเรือง และ *A. porri* complex จากอาการโรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง หอมหัวใหญ่ และกระเทียม

จัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อรา *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum และ T. viride* เก็บและรวบรวมตัวอย่างเชื้อรา *Trichoderma* จากตัวอย่างดิน และจาก culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช เมื่อจำแนกชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกได้เชื้อรา *T. asperellum* และ *T. harzianum* แต่ไม่พบเชื้อรา *T. viride* เมื่อจำแนกชนิดด้วยวิธี phylogenetic reconstruction โดยเปรียบเทียบกับ type sequence ของเชื้อรา *Trichoderma* พบว่า topology ที่ได้จากการวิเคราะห์ยีนตำแหน่ง the Internal Transcribed Spacer (ITS) และ the translation elongation factor 1-alpha (tef1) ด้วย Maximum Likelihood (ML) และ Bayesian inference (BI) มีความสอดคล้องกัน และเป็น monophyletic พบว่า ตัวอย่างเชื้อรากลุ่ม *T. asperellum* เป็น complex species สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. asperelloides* ส่วนเชื้อรากลุ่ม *T. harzianum* ก็พบว่าเป็น complex species สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *T. lentiforme* และ *T. lexii* จากการศึกษาครั้งนี้ได้ไอโซเลทของเชื้อรา *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. lentiforme* และ *T. lexii* รวมถึงดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง ITS และ tef1 ของเชื้อรา *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. lentiforme*, *T. lexii*, *T. harzianum* และ *T. viride* จะเก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการตรวจสอบชนิดของเชื้อรา จัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อรา *Chaetomium cupreum* และ *Ch. globosum* ในประเทศไทย เก็บและรวบรวมตัวอย่างเชื้อรา *Chaetomium* จากตัวอย่างดิน พืช และจาก culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช เมื่อจำแนกชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 มีลักษณะพ้องกับเชื้อรา *Ch. cupreum* กลุ่มที่ 2 มีลักษณะพ้องกับเชื้อรา *Ch. globosum* และ กลุ่มที่ 3 มีลักษณะพ้องกับเชื้อราเชื้อราในสกุล *Chaetomium* แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ เมื่อจำแนกชนิดด้วยวิธี phylogenetic reconstruction โดยเปรียบเทียบกับ type sequence ของเชื้อรา *Chaetomiaceae* พบว่า topology ที่ได้จาก Maximum Likelihood (ML) และ Bayesian inference (BI) มีความสอดคล้องกัน และเป็น monophyletic พบว่า เชื้อรา

สำนักวิชาการเกษตร

กลุ่มที่ 1 คือ *Arcopilus cupreus* ซึ่งเป็นชื่อปัจจุบันของ *Ch. cupreum* เชื้อรากลุ่มที่ 2 คือ *Ch. globosum* และเชื้อรากลุ่มที่ 3 คือ *Ovatospora brasiliensis* ซึ่งเป็นชื่อปัจจุบันของ *Ch. brasiliensis* จากการศึกษาครั้งนี้ได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อรา *A. cupreus* (syn. *Ch. cupreum*), *Ch. globosum* และ*O.brasiliensis* (syn. *Ch. brasiliensis*) จำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ the Internal Transcribed Spacer (ITS), the translation elongation factor 1-alpha (EF1-**α**), the Large Subunit (LSU, 28S), Partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2) และ β-Tubulin 2 (TUB2) ไอโซเลทของเชื้อราและดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะเก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการตรวจสอบชนิดของเชื้อรา

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Curvularia* จากจังหวัดกาญจนบุรี กระบี่ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชุมพร เชียงราย เชียงใหม่ ชลบุรี นครนายก นครปฐม นครราชสีมา ประจวบคีรีขันธ์ พิษณุโลก พะเยา เพชรบูรณ์ ราชบุรี ลำปาง สุโขทัย สุรินทร์ สระแก้ว และสุราษฎร์ธานี จำนวน 39 ตัวอย่าง แยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้จากตัวอย่างโรคพืชด้วยวิธี tissue transplanting ได้รา *Curvularia* spp. จำนวน 47 ไอโซเลต จำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) translation elongation factor 1-alpha (tef1) และ glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) ของรา *Curvularia* จำนวน 15 ไอโซเลต สามารถจำแนกชนิดได้ดังนี้ *C. akaiiensis C. dactyloctenicola C. eragrostidis C. geniculata, C. lunata C. oryzae* และ *C. pseudobrachyspora* ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาจัดทำเป็นตัวอย่างแห้งเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

ผลงานที่ได้จากงานวิจัยภายในโครงการอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชนั้น สามารถได้นำไปใช้เป็นข้อมูลในการแก้ปัญหาการค้าระหว่างประเทศ ในการส่งออกสินค้าเกษตร และนำงานวิจัยไปต่อยอดงานวิจัยต่าง ๆ เช่น โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรในการส่งออกตามเงื่อนไขของประเทศคู่ค้า นอกจากนี้ยังนำงานวิจัยไปใช้เป็นแนวทางในการตรวจรับรองการขึ้นทะเบียนการค้าของชีวภัณฑ์ และมีตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการต่างๆ รวมทั้งการนำเสนอเผยแพร่ผลงานเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดดังรายละเอียด ดังนี้

1. งานวิจัยต่อยอดในโครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร (2560-2564) ได้แก่

1.1 การทดลองที่ 1.2.9 การทวนสอบแนวทางการจำแนกชนิดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองด้วยวิธีอณูชีววิทยากับไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย (2560-2561) นำผลงานวิจัยที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในศึกษา

กรมวิชาการเกษตร

การใช้เทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita, M. javanica, M. arenaria และ M. enterolobii* (2562-2564)

1.2 การทดลองที่ 1.2.10 การศึกษาและจำแนกโรค Leek yellow stripe virus (LYSV) ในกระเทียม (2560-2561) นำผลงานวิจัยไปต่อยอดในการผลิตชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบไวรัส Leek yellow stripe virus (LYSV) (2563-2564)

1.3 การทดลองที่ 2.2.6 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Neoscytalidium dimidiatum* (2561-2563) นำผลงานที่ได้ศึกษาการตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (2561-2563) ไปควบคู่กัน

1.4 การทดลองที่ 3.1 การจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* (Hendel) complex (Diptera:Tephritidae) ด้วยลักษณะทางพันธุกรรมในประเทศไทย (2560-2561) นำผลงานวิจัยไปต่อยอดในการพัฒนาการตรวจสอบแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) เพื่อการนำเข้าและส่งออกด้วยไพร์เมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง (2562-2564)

2. การนำผลงานวิจัยเพื่อไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการขึ้นทะเบียนของชีวภัณฑ์ เมื่อได้ฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด เช่น การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจัดจำแนกเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา *Trichoderma asperellum T. harzianum* และ *T. Viride* เป็นต้น

3. การนำเสนอผลงานวิจัยและตีพิมพ์เผยแพร่

3.1 การจำแนกชนิดตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera: Tephritidae) ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ใน วารสารวิชาการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ปีที่ 38, ฉบับที่ 3 (ก.ย.-ธ.ค. 2563), หน้า 293-306

3.2 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และข้อมูลมอร์โฟเมทริกส์ของปีก แมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera: Tephritidae) ในประเทศไทย ใน วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 38, ฉบับที่ 2 (พ.ค. - ส.ค. 2564), หน้า 118-123.

3.3 อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Aspidiotinae (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) ในประเทศไทย ในวารสารกีฏและสัตววิทยา (ม.ค.-มิ.ย. 2565) อยู่ระหว่างรอต่อตีพิมพ์

4. การนำเสนองานวิจัยและตีพิมพ์เผยแพร่ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 14 ระหว่างวันที่ 12 - 14 พฤศจิกายน 2562 โรงแรมดุสิตธานีหัวหิน จังหวัดเพชรบุรี รายละเอียดดังนี้

4.1 การจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex (Diptera: Tephritidae) ในประเทศไทยด้วยลักษณะทางพันธุกรรม

4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera: Tephritidae) ร่วมกับการใช้เทคนิค Morphometrics ในตัวเต็มวัย

4.3 อนุกรมวิธานเพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วง (Hemiptera: Cicadellidae) ในประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

4.4 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกชนิดแมงมุมแม่หม้ายสกุล *Latrodectus* ในประเทศไทย

4.5 การประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* spp. ที่เป็นศัตรูพืชกักกันแบบรวดเร็ว

4.6 ชีววิทยาของวัชพืช *Asystasia gangetica* (L.) Anderson subsp. *micrantha* (Nees.) Ensermu

4.7 การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอม

5. การนำเสนอผลงานวิจัยภายในหน่วยงานในการประชุมวิชาการทั้งในรูปแบบการบรรยายและโปสเตอร์เพื่อเป็นการเผยแพร่องค์ความรู้ เช่น 1) อนุกรมวิธานมวนตัวห้ำสกุล *Orius* (Heteroptera: Anthocoridae) ในประเทศไทย 2) การตรวจวินิจฉัยชนิดของแตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae (Platygastridae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล 3) อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Aspidiotinae (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) ในประเทศไทย 4) การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางสัณฐานวิทยาในไม้ประดับส่งออก เป็นต้น

6.นำผลงานวิจัยภายใต้โครงการไปจัดอบรมให้แก่นักวิชาการและเกษตรกร ได้แก่ 1) การอบรมหลักสูตร “การจำแนกและการจัดการวัชพืช” ระหว่างวันที่ 12-14 มิถุนายน 2561 2) การอบรมหลักสูตร “การเก็บและการจำแนกตัวอย่าง แมลงจำพวกปากดูด ศัตรูสำคัญของพืชนำเข้าและส่งออก” ระหว่างวันที่ 24-26 มกราคม 2560

7. นอกจากนี้ยังมีการนำผลงานวิจัยที่ได้เสร็จสิ้นในปี 2564 ไปต่อยอดในโครงการวิจัยอนุกรมวิธานเชิงลึกมุ่งแก้ปัญหาท้าทายด้านศัตรูพืชเพื่อสนับสนุนและเพิ่มศักยภาพการผลิตสินค้าเกษตร (2565-2567) เพื่อนำไปสู่ศัตรูธรรมชาติชนิดใหม่และมีศักยภาพเพื่อพัฒนาในการเลี้ยงขยายและส่งเสริมเกษตรกรต่อไป รวมทั้งการจำแนกชนิดด้วยแนวทางและเทคนิคใหม่ๆ เพื่อให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากลและแก้ปัญหาได้ทันถวงที ได้แก่ 1) การทดลองชีววิทยา และศักยภาพภาพการกินเหยื่อ ของแมลงช้างสีน้ำตาล ชนิด *Micromus timidus* Hagen, 1853 (Neuroptera: Hemerobiidae) และแมลงช้างปีกแป้ง ชนิด *Semidalis aleyrodiformis* (Stephens, 1836) (Neuroptera: Coniopterygidae 2) การจำแนกชนิดเพลี้ยหอยเกล็ด สกุล *Pinnaspis* Cockerell, 1892 ด้วยสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุล 3) การจำแนกไบโอไทป์ของแมลงหวี่ขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* ในแหล่งปลูกพริกอินทรีย์และแหล่งปลูกพริกใช้สารเคมี ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล และ 4) การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และมอร์โฟเมตริกส์ของแมลงวันหนอนชอนใบในพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ

ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะนำไปใช้ประโยชน์

1. แนวทางการวินิจฉัย ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่ทำการศึกษาวิจัย ในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับอ้างอิงข้อมูลศัตรูพืชของประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

2. ข้อมูลชีววิทยา (พืชอาศัย เขตการแพร่กระจายของศัตรูพืชและนิเวศวิทยาของศัตรูพืช) ของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เพื่อเป็นข้อมูลในการหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม และใช้เป็นข้อมูลสำหรับอ้างอิงในการวางแผนการป้องกันกำจัดโรคและใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาระบบการเตือนภัย/เฝ้าระวังการแพร่ระบาดของศัตรูพืช

3. ข้อมูลที่มีความสำคัญเพื่อประกอบการแก้ไขปัญหาการค้าระหว่างประเทศทั้งในด้านการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร รวมทั้งนำข้อมูลไปจัดทำ Pest List และ Pest Risk Analysis เพื่อประโยชน์ในการค้าผลิตผลเกษตร เพื่อการนำเข้า-ส่งออก

4. ตัวอย่างศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติของประเทศไทย เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลงของกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เพื่อใช้ในการอ้างอิงตรวจสอบความถูกต้อง

5. ตัวอย่างพืชและเมล็ดเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และตัวอย่างพืช เก็บรักษาไว้ ณ พิพิธภัณฑ์กรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร สำหรับเป็นข้อมูลพื้นฐานของประเทศไทย

6. ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ และรวบรวมเป็นระบบ สามารถสืบค้น อ้างอิง และ ใช้ในการตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง

7. สามารถนำผลงานไปเผยแพร่ในวารสารของกรมวิชาการเกษตร งานประชุมวิชาการหรือการโปสเตอร์วิชาการที่จัดโดยหน่วยงานอื่น ๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ และสามารถถ่ายทอดองค์ความรู้นี้ไปเพื่อพัฒนาต่อยอดในโครงการวิจัยอื่นๆ และถ่ายทอดสู่บริษัทภาคเอกชนได้

กลุ่มเป้าหมาย คือ

1.นักวิจัยในโครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล

2.นักวิชาการภายในกรมวิชาการเกษตร เมื่อมีการจัดอบรมหลักสูตร การจำแนกและการจัดการวัชพืช และการอบรมหลักสูตร “การเก็บและการจำแนกตัวอย่าง แมลงจำพวกปากดูด ศัตรูสำคัญของพืชนำเข้าและส่งออก

3. นักวิจัยในแผนงานวิจัยด้านการพัฒนาชีวภัณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ต่อยอดได้

4. หน่วยงานที่สามารถนำข้อมูลจากผลการทดลองและฐานข้อมูลศัตรูพืช ศัตรูธรรมชาติไปใช้ ได้แก่ หน่วยงานที่ต้องการความถูกต้องของข้อมูลศัตรูพืช ศัตรูธรรมชาติ หรือนักวิจัยด้านอนุกรมวิธาน และชีววิทยา เช่น ด่านตรวจพืชทุกแห่ง หน่วยงานราชการ สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออก กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กระทรวงพาณิชย์ ตลอดจนเอกชนที่ทำการค้าสินค้าเกษตรกับต่างประเทศ มหาวิทยาลัยต่างๆ โรงเรียน บริษัทเอกชนผู้ส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร รวมทั้งเกษตรกรและบุคคลทั่วไป

กรมวิชาการเกษตร

บรรณานุกรม

กรมวิชาการเกษตร. 2541. กล้วยไม้ส่งออก ปัญหาและแนวทางแก้ไข. กรุงเทพมหานคร. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนา.

กรมวิชาการเกษตร. 2552. คู่มือโรคผัก. บริษัท เอ-วันฟิวเจอร์ จำกัด กรุงเทพฯ.153 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร. 2556. ผักเศรษฐกิจของไทย. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: www.doa.go.th/index.php.?option (13 พฤษภาคม 2557).

กรมวิชาการเกษตร. 2558. กองพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/psco/index.php?option=com_content&view=article&id=225:2015-10-01-08-20-01&catid=42:2010-08-06-04-08-08&Itemid=71, 18 กรกฎาคม 2561

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2541. เอกสารคำแนะนำ : “สถิติการปลูกไม้ดอกไม้ประดับ”

กองกีฏและสัตววิทยา. 2542. แมลงศัตรูไม้ผล. เอกสารวิชาการกลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูไม้ผล สมุนไพร และเครื่องเทศ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 145 หน้า.

กองกีฏและสัตววิทยา. 2544. คู่มือตรวจแมลงไรและสัตว์ศัตรูพืชเศษฐกิจ. เอกสารวิชาการ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 275 หน้า

กองโรควิทยา สถานีทดลองยาสูบแม่โจ้ 2555. คู่มือโรคยาสูบ ฝ่ายใบยา โรงงานยาสูบ กระทรวงการคลัง 58 หน้า

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา. 2553. คำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลงและสัตว์ศัตรูพืชปี 2553. เอกสารวิชาการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 303 หน้า.

กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร, 2544. หนูและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย 136 หน้า

กลุ่มพยากรณ์และเตือนการระบาดศัตรูพืช กองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย. 2558. รายงานสถานการณ์ศัตรูมันสำปะหลัง วันที่ 15 เมษายน 2558. www.doae.go.th/uploads/agriqua-20150424-105457. 14 มิถุนายน 2558.

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, 2554, โรคผักและการป้องกันกำจัด, หน้า 138.

กลุ่มวิจัยโรคพืช. 2555. *คู่มือโรคผัก*. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 153 หน้า.

กรรณิการ์ เพี้ยนภักตร์ วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2529. รวบรวมและจำแนกเชื้อราต่างๆ ที่เป็นสาเหตุโรคมะละกอ, น. 26-37. *ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2529*. กลุ่มงานวิทยาไมโค. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร.

กรรณิการ์ เพี้ยนภักตร์ กัญจนา โป๊ะเงิน อุบล คือประโคน และวิรัช ชูบำรุง. 2530. โรคมะละกอที่เกิดจากเชื้อรา *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei, น. 7-16. *ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2530*. กลุ่มงานวิทยา ไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ศรีวิชาการเกษตร

กัญญา อังศุพานิช. 2520. ชีววิทยาบางประการของหอย *Lymnaea* (*Radix*) *auricularia rubiginosa* Michelin (1831). วิทยานิพนธ์ระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาสัตววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กัญญา เจริญไทย. 2545. *เชื้อรา Dematiaceous Hyphomycetes บนข้าว ข้าวโพด วัชพืชใบแคบและดินบริเวณราก*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 163 หน้า.

กลุ่มบริหารศัตรูพืช. 2555. *คู่มือแมลงวันผลไม้และการป้องกันกำจัด.* เอกสารวิชาการกลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 50 หน้า.

กลุ่มบริหารศัตรูพืช. 2557. *แมลงศัตรูไม้ผล*. กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 151 หน้า

กุลฉวี กำจายภัย. 2526. โรคและแมลงศัตรูกล้วยไม้. บริษัทบางกอกฟลาวเวอร์เซนเดอร์ จำกัด, กรุงเทพฯ. 113 หน้า.

กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์ และอัมพร วิโนทัย. 2544. การแก้ไขปัญหาการระบาดของหนอนชอนใบบนพื้นที่สูงภาคเหนือ. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. กรุงเทพฯ. 42 หน้า.

ขวัญไทย วังอุดม. 2509. *การทดสอบยาบางชนิดและวิธีการเพาะปลูกเพื่อป้องกันโรคราน้ำค้างของแตงเทศ*. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 42 น.

ขจรศักดิ์ ภวกุล, พิพัฒน์ เชียงหลิว, สุชาติ คูอาริยะกุล, สุพัตรา อินทวิมลศรี, สมสิทธิ์ ชำนาญศิลป์ และ สุชาติ วิจิตรานนท์. 2522. โรคของฝรั่งเวียดนาม, น. 372-373. *ใน รายงานประจำปี 2522*. กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร.

เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์ และ วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2545. โรคไวรัสที่สำคัญของพืชผักและพืชน้ำมัน.

คะนึงนิจ บุศราคำ. 2545. *โรคของกล้วยไม้ดิน ราเอนโดไฟท์บนใบและราก และราดินบริเวณรอบราก*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 245 หน้า.

จิตรา เกาะแก้ว. 2547. *ความหลากหลายของเชื้อราบนวัชพืชที่เป็นโรคในแปลงผักและแนวทางการนำมาใช้ควบคุมวัชพืชทางชีวภาพ*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 150 หน้า.

จิตรา กิตติโมรากุล วสันณ์ เพชรรัตน์ และ เสมอใจ ชื่นจิตต์. 2557. การควบคุมเชื้อ *Curvularia oryzae* สาเหตุโรคใบจุดปาล์มน้ำมัน โดยการใช้สารเคมีและชีววิธี. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์*. 1(1): 39-47.

ฉายแสง หล่อสุวรรณ และ ปิยะ เกียรติก้อง. 2525. โรคใบจุดเหลี่ยมของถั่วแขก. *วารสารโรคพืช* 2: 16.

ฉายแสง หล่อสุวรรณ, ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์, สัญชัย ตันตยาภรณ์ และ อภิชัย อยู่เอี่ยม. 2526. วิทยาและอนุกรมวิธานของเชื้อโรคราสนิมของพืชเศรษฐกิจและวัชพืช, ไม่มีเลขหน้า. *ใน* รายงานผลการทดลอง พ.ศ. 2526. การศึกษาสัณฐานวิทยาและอนุกรมวิธานของเชื้อโรคราสนิมของพืชเศรษฐกิจและวัชพืช, ไม่มีเลขหน้า. *ใน รายงานผลการทดลอง พ.ศ.2526 เล่มที่ 1*. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

เฉลิมพล ไหลรุ่งเรือง อุดม เลียบวัน อรรถสิทธิ์ บุญธรรม ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ วันทนีย์ อู่วานิชย์ ณัฐกฤติ พิทักษ์ วัลลิภา สุชาโต สมศักดิ์ ทองศรี และตุลย์ อินทรัมพรรย์. 2547. *เอกสารวิชาการอ้อย.* กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพ ฯ. 147 หน้า

เฉลิมลาภ ช่วยประสิทธิ์, จินตนา ชะนะ, สมศิริ แสงโชติ และ พงศ์พันธุ์ เธียรหิรัญ. 2524. โครงการธัญพืช : โรคและการป้องกันกำจัด, น. 69. *ใน รายงานการค้นคว้าวิจัยประจำปี.* มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เฉลิมชัย ปราสาทศรี, สุทิน ราชธา และ W.M. Brown Jr. 2513. การทดลองสารเคมีต่างๆ เพื่อป้องกันกำจัดโรคใบจุดและโรคราสนิมของถั่วลิสง, น. 35. *ใน รายงานประจำปี 2513ศูนย์เกษตรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ*, ขอนแก่น.

ชนินทร ดวงสอาด. 2552. โรคของพืชตระกูลแตง. น. 59 - 60. *ใน คู่มือโรคของผัก* พิมพ์ครั้งที่ 1. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, บริษัทเอ-วันฟิวเจอร์ จำกัด, นนทบุรี. 153 หน้า.

ชมพูนุท จรรยาเพศ และ ปิยาณี หนูกาศ. 2545. ชีววิทยาหอยทากซัคซิเนียศัตรูกล้วยไม้. *รายงานผลงานวิจัยประจำปี.* กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 304.

ชมพูนุท จรรยาเพศ ทักษิณ อาชวาคม ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ และ เกษม ทองทวี. 2537. หอยทากในประเทศไทย. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาทางวิชาการแมลงและสัตว์ศัตรูพืช 2537 ครั้งที่ 9 ณ โรงแรมแกรนด์จอมเทียนพาเลซ ชลบุรี. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร . 21 - 24 มิถุนายน 2537. หน้า 495 - 522.

ชมพูนุท จรรยาเพศ ปราสาททอง พรหมเกิด ปิยาณี หนูกาศ และดาราพร รินทะรักษ์. 2550. ความหลากชนิดของหอยทากและทากในแหล่งสงวนชีวมณฑลสะแกราช. การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 8 : อารักขาพืชใต้ร่มพระบารมี. หน้า

ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา, ทวี เก่าศิริ, สมภาค สิทธิพงศ์ และ ชัยวัฒน์ จันทรศรีวงศ์. 2524. ใบจุด : โรคระบาดใหม่ของฝ้าย, น. 109. *ใน รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 19 สาขาพืช*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.(บทคัดย่อ).

ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา, เพลินพิศ สงสังข์, นลินี ศิวากรณ์ และ ปรีชา สุรินทร์. 2536. โรคของถั่วหรั่ง, น. 836-837. *ใน กำหนดการและบทคัดย่อการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 19*. โรงแรมดุสิต เจ.บี. หาดใหญ่, สงขลา.

ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา โกมินทร์ วิโรจน์วัฒนกุล และอดิศักดิ์ คำนวณศิลป์. 2547. *โรคข้าวโพดและการป้องกันกำจัด.* เอกสารวิชาการ สถาบันวิจัยพืชไร่ ปี 2547 พิมพ์ครั้งที่ 2 สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร , กรุงเทพฯ. 69 หน้า

ชมัยพร บัวมาศ ชลิดา อุณหวุฒิ ลักขณา บำรุงศรี สุนัดดา เชาวลิต และ สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์. 2557. อนุกรมวิธานเพลี้ยแป้งในมันสำปะหลัง หน้า 34- 69. ใน : รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2556 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

กรมวิชาการเกษตร

ดวงพร สุวรรณกุล. 2543. ชีววิทยาวัชพืช พื้นฐานการจัดการวัชพืช. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 178 น.

ดวงพร สุวรรณกุล และรังสิต สุวรรณเขตนิคม. 2544. สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชในประเทศไทย. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 146 น.

ดวงขวัญ ลีวงศ์เจริญ. 2520. *ชีววิทยาบางประการของหอยอินโดพลานอร์บิสเอ็กซัสตัส*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาชีววิทยา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 72 หน้า.

ดวงเดือน ไกรลาส, สุลักษณ์ นามโชติ, ธัญญารัตน์ กุญชรบุญ และวศิน อิงคพัฒนากุล. 2552. *การติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียของหอยน้ำจืดวงศ์ Thiaridae ในประเทศไทย*. สถาบันวิจัยและพัฒนา, มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.

ไตรเดช ข่ายทอง ธิติยา สารพัฒน์ มนตรี เอี่ยมวิมังสา และปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2558. *Pasteuria penetrans* แบคทีเรียปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม. หน้า 193-200. ใน: การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 12 20-22 ตุลาคม 2558 ณ โรงแรมดุสิต ไอส์แลนด์ รีสอร์ท จังหวัดเชียงราย

ไตรเดช ข่ายทอง ธิติยา สารพัฒน์ มนตรี เอี่ยมวิมังสา. 2558. อนุกรมวิธานและความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย migratory endoparasitic nematodes. หน้า 2375-2387. ใน: รายงานผลการวิจัยประจำปี 2558. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ทวีศักดิ์ ชโยภาส. 2544. แมลงศัตรูปาล์มน้ำมันในประเทศไทย. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูพืชสวนอุตสาหกรรม กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 126 หน้า.

ทองพูน ศรีวรนาถ. 2502. *การทดลองใช้ Fungicides บางชนิดกับโรคตากบของยาสูบ*. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 39 หน้า.

ทะนง พงษ์พานิช. 2508. *การสำรวจโรคอ่อนชั้นต้นในบางท้องที่ของประเทศไทย*. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 61 หน้า.

ทัศนีย์ มุงเมือง, นิดารัตน์ ไพรคณะฮก, วีรชัย วิโรจน์แสงอรุณ และนพพร ศราธพันธุ์. 2543. หอยลิมเนีย รูบิจิโนซาและหอยอินโดพลานอร์บิส เอกซัสตัสที่ติดพยาธิใบไม้ของโคตามธรรมชาติในหนองน้ำที่อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38: สาขาสัตวแพทยศาสตร์, กรุงเทพ. หน้า 370-378

ทัศนาพร ทัศคร และสุรภี กีรติยะอังกูร. 2548. โรคของกล้วยไม้. น. 1 - 31. *ใน โรคไม้ดอก*. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, บริษัทเอ-วันฟิวเจอร์ จำกัด, นนทบุรี. 153 หน้า.

ทัศนาพร ทัศคร ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และสุรภี กีรติยะอังกูร. 2553. โรคของกล้วยไม้. น. 3-44. *ใน โรคไม้ดอกไม้ประดับ*. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 163 หน้า.

ธนาคร จารุพัฒน์ วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล นิพนธ์ ทวีชัย และ ศศินาฏ แสงวงศ์. 2526. *โรคอ้อยในประเทศไทย*. สมาคมนักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย. กรุงเทพ ฯ. 180 หน้า.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ธนากร จันทร์มาลี และวราภรณ์ ประกอบ. 2553. การจำแนกไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. บางไอโซเลทของไทย โดยเทคนิค PCR. วารสารเกษตร 26: 195-202.

ธรรมศักดิ์ สมมาตย์ และ M.K. Beute. 2529. ลักษณะรูปร่างและการงอกของเชื้อ *Phaeoisariopsis personata* (Berk. & Curt.) von Arx. *วารสารโรคพืช* 6: 7-11.

ธารทิพย ภาสบุตร ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ. หน้า 1004 – 1016. สำรวจรวบรวมและจำแนกชนิดราสนิมสาเหตุโรคไม้ผล ไม้ยืนต้นและวัชพืชในแปลงปลูก. *ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549.* สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

ธารทิพย ภาสบุตร. 2553. โรคของว่านเศรษฐีเรือนนอก. น. 134 – 139. *ใน โรคไม้ดอกไม้ประดับ.* กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 163 หน้า.

ธารทิพย ภาสบุตร. 2553. โรคของเยอร์บีร่า. น. 86 – 93. *ใน โรคไม้ดอกไม้ประดับ*. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 163 หน้า.

ธิติยา สารพัฒน์ ไตรเดช ข่ายทอง วีรกรณ์ แสงไสย์ และวานิช คำพานิช . 2559. สถานการณ์การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออก. หน้า 41-53.*ใน : การประชุมวิชาการประจำปี 2559 วิจัยการอารักขาพืช และปัจจัยการผลิตเพื่อขับเคลื่อน เศรษฐกิจไทย* สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 25-27 กรกฎาคม 2559 ณ ณ โรงแรมบางแสน เฮอริเทจ จังหวัดชลบุรี.

ณัฏฐพร อุทัยมงคล, วาสนา ฤทธิ์ไธสง, ชลิดา อุณหวุฒิ. 2553. การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากสหรัฐอเมริกา.*คลังผลงานวิจัยกรมวิชาการเกษตร: ผลงานวิจัและพัฒนาปี 2553*. หน้า 1147 – 1174

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และวนิดา ฐิตะฐาน. 2539. การศึกษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเนื้อแกนของสับปะรด. หน้า 60-70. ใน: รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2539. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ณัฐกฤต พิทักษ์. 2544. เทคโนโลยีทางเลือกสำหรับ ไอ พี เอ็ม. หน้า 241-255. ใน การประชุมสัมมนาทางวิชาการการป้องกันและกำจัดแมลงศัตรูอ้อยโดยวิธีผสมผสานครั้งที่ 4. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ณัฐกฤต พิทักษ์ และอนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ. 2545. เอกสารวิชาการ แมลงศัตรูอ้อยโรงงาน อ้อยเคี้ยว อ้อยคั้นน้ำ และการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรข้าวโพดและพืชไร่อื่นๆ. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 102 หน้า

ณัฐกฤติ พิทักษ์. 2547. แมลงศัตรูอ้อยและการป้องกันกำจัด หน้า 57 – 117 *ใน* เฉลิม ไหลรุ่งเรือง อุดม เลียบวัน อรรถลิทธิ์ บุญธรรม ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ วันทนีย์ อู่วานิชย์ ณัฐกฤติ พิทักษ์ วิลลิภา สุชาโต สมศักดิ์ ทองศรี และตุลย์ อินทรัมพรรย์ *เอกสารวิชาการอ้อย*. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพมหานคร.147 หน้า.

ทิพวรรณ กันหาญาติ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ และรุ่งนภา ทองเครั่ง. 2562. การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า.หน้า 60-73. *ใน*: เอกสารประกอบการประชุม

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

วิชาการประจำปี 2562 อารักขาพืชสร้างสรรค์ ก้าวทันยุทธศาสตร์ชาติ ภาคแผ่นภาพ. วันที่ 10-12 มิถุนายน 2562 ณ โรงแรมรอยัล ฮิลล์ กอล์ฟ รีสอร์ท แอนด์ สปา, นครนายก.

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด. กลุ่มวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 50 หน้า.

นิยมรัฐ ไตรศรี, ลักษณา วรรณภีร์, สิริลักษณ์ โล่ห์สวัสดิ์ และ พัฒนา สนธิรัตน. 2531. ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืชบางชนิดต่อโรคใบจุดของกระเจี๊ยบเขียว น. 112-116. *ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2531*. กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

นิยม สุดเพราะ. 2542. *ความหลากหลายของราดินและราโรคพืชในดินปลูกพืชไร่ จังหวัดสกลนคร*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 321 หน้า.

นิรนาม. 2501. การตรวจโรคพืชให้แก่ประชาชนและหน่วยราชการ, น. 83-86. *ใน รายงานประจำปี*. แผนกโรควิทยา กองพืชพันธุ์ กรมกสิกรรม.

นิรนาม. 2505. รายชื่อโรคที่ตรวจพบ, น. 207-215. *ใน รายงานประจำปี*. แผนกโรควิทยา กองพืชพันธุ์ กรมกสิกรรม.

นิรนาม. 2508. โรคพืชที่ตรวจพบเป็นครั้งคราว, น. 299-312. *ใน รายงานประจำปี*. แผนกโรคพืชวิทยา กองพืชพันธุ์ กรมกสิกรรม.

นิรนาม. 2552. *คู่มือโรคผัก* กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 154 หน้า.

นลินี ศิวากรณ์, ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา และ ปรีชา สุรินทร์. 2537. โรคทานตะวัน. *ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา* 4: 21

นิวัฒ เสนาะเมือง และ พิศาล ศิริธร. 2529. โรคงาและการป้องกันกำจัด. *แก่นเกษตร* 14: 296-298.

นิตยา กันหลง พัน อินทร์จันทร์ วนิดา ฐิติฐาน และลักษณา วรรณภีร์. 2530. การป้องกันกำจัดโรคใบแห้งของหอมหัวใหญ่. *ใน* รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2530 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 69-76.

นิตยา กันหลง พัน อินทร์จันทร์ วนิดา ฐิติฐาน และลักษณา วรรณภีร์. 2532. การป้องกันกำจัดโรคใบแห้งของหอมหัวใหญ่. *ใน* รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2532 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 106-114.

นิตยา กันหลง. 2545. สมุดภาพโรคสำคัญของพืชสกุลหอมกระเทียมในประเทศไทย. เอกสารวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยาปี 2545. 33 หน้า.

นุชนารถ จงเลขา. 2525. โรคที่สำคัญของพืชบางชนิดในภาคเหนือ. *วารสารโรคพืช* 2: 1 -6.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2551. *Burrowing Nematode ศัตรูพืชกักกันของไม้น้ำส่งออก*. ข่าวอารักขาพืช 3(3): 3.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และช่อทิพย์ ศัลยพงษ์. 2556. *อนุกรมวิธานและชีววิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล Radopholus*. รายงานผลงานวิจัยประจำปี ๒๕๕๖ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2555. *ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชพรรณไม้น้ำและการป้องกันกำจัด*. นิวธรรมดาการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 72หน้า.

กรมวิชาการเกษตร

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

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ศรีสุข พูนผลกุล และ จงวัฒนา พุ่มหิรัญ. 2552. การศึกษาโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากแบคทีเรีย. หน้า 1947-1967. *ใน*: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2552. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ วรัญญา มาลี และวันเพ็ญ ศรีชาติ. 2555. การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์ยาสูบนำเข้าจากบราซิล. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2556 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

ประพันธ์ บุญกลิ่นขจร และ ประวิทย์ กฤตยานวัช. 2514. *การศึกษาเรื่องถั่วเหลือง.* สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์, กรุงเทพฯ. 71 หน้า.

ประพาส วีระแพทยุ, อรุณี จันทรสนิท, สุรีย์ สุขพันธ์โพธาราม, กรองกาญจน์ เจียมกนกชัย, สงบ ไชยมงคล และ กันตี ทิพจร. 2520. การสำรวจและศึกษาโรคสำคัญๆ ของข้าวสาลี ทริติเคลี่ บาร์เลย์ และโอ๊ต, น. 69-70. *ใน รายงานผลการค้นคว้าวิจัยปี 2520.* กองการข้าว กรมวิชาการเกษตร. (บทคัดย่อ).

ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน, พัฒนา สนธิรัตน, วิรัช ชูบำรุง, ปิยะ เกียรติก้อง และ อภิชัย อยู่เอี่ยม. 2525. รวบรวมและจำแนกเชื้อราชนิดต่างๆ ที่เป็นสาเหตุโรคกล้วย, ไม่มีเลขหน้า. *ใน รายงานผลการทดลอง พ.ศ. 2525* เล่มที่ 1. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน, วิรัช ชูบำรุง, อภิชัย อยู่เอี่ยม และ สัญชัย ตันตยาภรณ์. 2526. โรคราน้ำค้างของพืชตระกูลแตงบางชนิด, ไม่มีเลขหน้า. *ใน รายงานผลการทดลอง พ.ศ. 2526* เล่มที่ 1. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน, ศิริพงษ์ คุ้มภัย, วิรัช ชูบำรุง และ พัฒนา สนธิรัตน. 2527. ศึกษาเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกับถั่วใช้รับประทานฝักสด, น. 39-49. *ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2527 เล่ม ที่ 3.* กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน, ศิริพงษ์ คุ้มภัย, วิรัช ชูบำรุง และ พัฒนา สนธิรัตน. 2528. ศึกษาเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกับถั่วใช้รับประทานฝักสด, น. 95-101. *ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2528.* กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ปราณีต ศิริวัลลภ, ทศพล วิสุทธารมณ์, สุรสิทธ์ บุญทวี และ ลักษณา วรรณภีร์. 2528. ศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืชบางชนิดเพื่อป้องกันกำจัดโรคดอกเน่าของบวบและฟักทอง. น. 858-867. *ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2528* เล่มที่ 2. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ปราสาททอง พรหมเกิด ปิยาณี หนูกาฬ ดาราพร รินทะรักษ์ สมเกียรติ กล้าแข็ง และ ทรงทัพ แก้วตา. 2554. ความหลากชนิดและประชากรของหอยทากและทากในโรงเรือนปลูกพืช. *รายงานความก้าวหน้า*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1822-1828.

กรมวิชาการเกษตร

ปราสาททอง พรหมเกิด ปิยาณี หนูกาฬ ดาราพร รินทะรักษ์ สมเกียรติ กล้าแข็ง และวิไลวรรณ เวชยันต์ 2555. การควบคุมหอยซัคซิเนีย *Succinea* sp. ในสวนกล้วยไม้โดยวิธีผสมผสาน. *รายงานประจำปี.* สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 278-283.

ผ่องศรี ธาราภูมิ. 2531. *การสำรวจโรคของเบญจมาศและการศึกษาโรคใบจุดของเบญจมาศในประเทศไทย*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 106 หน้า.

พิมลพร นันทะ อัมพร วิโนทัย สถิตย์ ปฐมรัตน์ รัตนา นชะพงษ์ รุจ มรกต และประภัสสร เชยคำแหง. 2544. รายชื่อแมลงศัตรูธรรมชาติของพืชเศรษฐกิจบางชนิดในประเทศไทย. หน้า 245-272. *ใน* เอกสารวิชาการการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

พิมลพร นันทะ. 2545. ศัตรูธรรมชาติ หัวใจของ IPM. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 215 หน้า.

พรทิพย์ วิสารทานนท์, กุสุมา นวลวัฒน์, บุษรา จันทร์แก้วมณี, และคณะ. 2548 . แมลงที่พบในผลิตผลเกษตรและการป้องกันกำจัด. กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร, กรมวิชาการเกษตร, จตุจักร, กรุงเทพ, 158 หน้า

พรพิมล อธิปัญญาคม ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช สุธามาศ ณ น่าน บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ ดารุณี ปุญญพิทักษ์ และไมตรี พรหมมินทร์. 2550. โรคจุดดำของส้มโอสาเหตุเกิดจากรา *Phyllosticta citricarpa*. หน้า 1-12. *ใน* การประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8 “อารักขาพืชไทยใต้ร่มพระบารมี” ณ โรงแรมอมรินทร์ลากูน จังหวัดพิษณุโลก. 20-22 พฤศจิกายน 2550.

พรพิมล อธิปัญญาคม และศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. 2550. สำรวจ รวบรวมและจำแนกราดำ. หน้า 1050-1057. *ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549* เล่ม 2. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

พรพิมล อธิปัญญาคม. 2552. โรคของผักตระกูลกะหล่ำและตระกูลผักกาด. น. 91 - 102. *ใน คู่มือโรคผัก*. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, บริษัทเอ-วันฟิวเจอร์ จำกัด, นนทบุรี. 153 หน้า.

พรพิมล อธิปัญญาคม. 2553. โรคของกวนอิม. น.140 - 149. *ใน โรคไม้ดอกไม้ประดับ* กลุ่มวิจัยโรคพืชสำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 163 หน้า.

พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. 2554. สำรวจรวบรวมและจำแนกราสกุล *Cercosporoid* fungi และ teleomorph Surveying, Collecting, and Identification of *Cercosporoid* fungi and their teleomorph. หน้า 1746 – 761. *ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553* เล่ม 3. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

พรพิมล อธิปัญญาคม และ สุรภี กีรติยะอังกูร.2548. โรคของดอกคาร์เนชั่น. น. 74 -89. *ใน โรคไม้ดอก.* กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ. 132 หน้า.

ศรีวิชาการเกษตร

พลอยชมพู กรวิภาสเรือง, มานิตา คงชื่นสิน และเทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์. 2553. การศึกษาอนุกรมวิธานไรแมงมุมในสกุล *Oligonychus*. น. 2085-2104. *ใน* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร.

พินิจ หวังสมนึก. 2542. *ผลของยาฆ่าหอยและสารสกัดจากพืชต่อเนื้อเยื่อและเซลล์ในระบบทางเดินอาหาร ระบบสืบพันธุ์ ระบบหายใจ และระบบประสาทของหอยคัน Indoplanorbisexustus.* (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล :http://www.thaithesis.org/detail.php?id=42100 (15 พฤษภาคม 2557).

พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์, มานิตา คงชื่นสิน เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และวัฒนา จารณศรี 2548. การศึกษาชนิดของไรเพื่อการส่งออก. หน้า 1373-1391. *ใน* รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม ประจำปี 2548 เล่มที่ 1. กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม, กลุ่มกีฏและสัตววิทยา, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

พีระวรรณ พัฒนวิภาส ทัศนาพร ทัศคร และ ธารทิพย ภาสบุตร. 2553. สำรวจ รวบรวม และจำแนกเชื้อรา *Curvularia* spp. หน้า 1782-1793. *ใน* : *ผลงานวิจัยและพัฒนา ปี 2553*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

พีระวรรณ พัฒนวิภาส ทัศนาพร ทัศคร และ ธารทิพย ภาสบุตร. 2555. การป้องกันกำจัดโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Curvularia eragrostidis* โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และสารเคมี. หน้า 284-293. *ใน* : *รายงานผลการวิจัยประจำปี 2555*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

พงษ์เทพ ขจรไชยกูล และ กาญจนสินธุ์ มีศุข. 2530. โรคใบจุดก้างปลาของยางพารา. *วารสารยางพารา* 8: 92-98.

พัฒนา สนธิรัตน, เกษม ชมภูนุชประภา, สมชาย กันหลง. วิไล ปราสาทศรี, สืบศักดิ์ สนธิรัตน และ อาทิตย์ ฟุ้งเกียรติไพบูลย์. 2520. การสำรวจและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชชนิดต่าง ๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, น. 154-161. *ใน รายงานประจำปี 2520*. สำนักงานเกษตรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, ขอนแก่น.

พัฒนา สนธิรัตน, ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน, วิรัช ชูบำรุง และ ปิยะ เกียรติก้อง. 2522. การศึกษาสัญฐานวิทยาอนุกรมวิธาน และวงจรชีวิตของเชื้อรา *Cercospora* spp. สาเหตุโรคใบจุดของพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ, น. 1 - 13. *ใน รายงานประจำปี 2522*. กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร.

พัฒนา สนธิรัตน, ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน, วิรัช ชูบำรุง และ ปิยะ เกียรติก้อง. 2523. การศึกษาสัญฐานวิทยาอนุกรมวิธาน และวงจรชีวิตของเชื้อรา *Cercospora* spp. สาเหตุโรคใบจุดของพืช, น. 1 - 10. *ใน รายงานประจำปี 2523 เล่มที่ 1*. กองโรคพืช กรมวิชาการเกษตร.

พัฒนา สนธิรัตน, ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน, วิรัช ชูบำรุง และ ปิยะ เกียรติก้อง. 2523. การศึกษาสัญฐานวิทยาอนุกรมวิธาน และวงจรชีวิตของเชื้อรา *Cercospora* spp. สาเหตุโรคใบจุดของพืช, น. 1 – 9 *ใน รายงานประจำปี 2523* เล่มที่ 2. กองโรคพืช กรมวิชาการเกษตร.

พัฒนา สนธิรัตน วิรัช ชูบำรุง ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และปิยะ เกียรติก้อง. 2526. รา *Alternaria* ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดของพืชผักบางชนิด. *วารสารโรคพืช* ปีที่ 3 เล่มที่ 4. ต.ค.-ธ.ค. 2526. น. 154-167.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

พัฒนา สนธิรัตน, ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และวิรัช ชูบำรุง. 2529. รวบรวมและจำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium* ในดินจากแปลงปลูกพืชเศรษฐกิจของเกษตรกร. รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2529 กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

พัฒนา สนธิรัตน, ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และ วิรัช ชูบำรุง. 2534. รายงานโรคพืชเกิดจากเชื้อรา ชุดที่ 2. *วารสารโรคพืช* 11: 65-72.

พัฒนา สนธิรัตน์. 2534. รายงานโรคพืชเกิดจากเชื้อรา ชุดที่ 1. *วารสารโรคพืช* 11: 52-55.

พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประ โคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 285 หน้า

พงษ์วิภา หล่อสมบูรณ์. 2529. *ราสนิมในประเทศไทย.* วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 193 น.

พิศาล ศิริธร และ นิวัฒ เสนาะเมือง. 2526. โรคของถั่วพุ่ม. *แก่นเกษตร* 11: 158-164.

พีระวรรณ พัฒนวิภาส. 2552. โรคของข้าวโพด. น. 119- 130. *ใน คู่มือโรคผัก.* กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, บริษัทเอ-วันฟิวเจอร์ จำกัด, นนทบุรี. 153 หน้า.

มานิตา คงชื่นสิน. 2553. รู้จักไรในไร่มันสำปะหลัง ศัตรูตัวเล็กที่ไม่เล็กอย่างที่คิด. ว. เคหการเกษตร. 34(10): 166-167.

มานพ แก้วกำเนิด อินทร์ทอง เมฆขยาย. 2527. โรคยาสูบเมืองไทย กองโรควิทยา สถานีทดลองยาสูบแม่โจ้ เชียงใหม่ 44 หน้า

มาลินี พิทักษ์ สมศรี บุญเรือง และรังสิมันตุ์ สัมฤทธิ์. ม.ป.ท. *การปลูกเผือก*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://eto.ku.ac.th/neweto/e-book/plant/herb_gar/pukperk.pdf (7 มีนาคม 2562).

มงคล เครือตาชู, ประศาสน์ วนสานต์, พงศ์เจริญ ชุ่มใจ, ประชุม บัวประเสริฐ, สนาม ถิรจันทรา, ณรงค์ สุขสมบัติ และสามารถ กระจ่างแสง. 2511. การศึกษาวงชีวิตของหอยอินโดพลานอร์บิสเอ็กซัสตัส ในห้องทดลอง. หน้า 1 – 40.*ใน: รายงานประจำปีการศึกษา 2510 – 2511*. คณะอายุรศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล.

ไมตรี พรหมมินทร์, กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร, เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์และนวลจันทร์ ดีมา.2529.ความ แตกต่างของลักษณะอาการโรคทริสเทซ่าในมะนาวที่เกิดจาก isolate ที่ต่างกัน. วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 4 เล่มที่ 2 หน้า 143-148.

มนตรี จิรสุรัตน์. 2544. *แมลงวันผลไม้ในประเทศไทย*. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 244 หน้า.

ยุพา วรยศ. 2534. พันธุ์ไม้น้ำ Aquatic Plants BO351 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 500 หน้า

ยุวรินทร์ บุญทบ ศิริณี พูนไชยศรี ชลิดา อุณหวุฒิ ลักขณา บำรุงศรี และสิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์. การศึกษาอนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* ในประเทศไทย. รายงานการประชุมประจำปี *2554.* กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพ. *1899* หน้า

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ยุวรินทร์ บุญทบ ศิริณี พูนไชยศรี ชลิดา อุณหวุฒิ ลักขณา บำรุงศรี และสิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์. 2554. อนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera*. หน้า 2009-2025. *ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553.* สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

ยุวรินทร์ บุญทบ ศิริณี พูนไชยศรี ชลิดา อุณหวุฒิ ลักขณา บำรุงศรี และสิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์. 2555. อนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้ทองสกุล *Bactrocera* จากสารล่อแมลงในเขตภาคใต้ของประเทศไทย. หน้า 1742-1758. *ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2554*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และธารทิพย ภาสบุตร. 2550. สำรวจ รวบรวม และจำแนกชนิดเชื้อราสนิมสาเหตุโนตพืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับและวัชพืชในแปลงปลูก. หน้า 993 – 1003. *ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549 เล่ม 2*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

รจนา ไวยเจริญ อัมพร วิโนทัย และประภัสสร เชยคำแหง. 2555. ทดสอบผลของสารป้องกันกาจัดศัตรูอ้อยต่อแตนเบียนไข่ *Trichogramma confusum*. หน้า 1319-1330. *ใน* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

รัติยา พงศพิสุทธา วรานันท วิญญูรัตน โชติรส รอดเกตุ และเทพพนม แสงเพลิง. 2553. ความผันแปรทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. ปที่ 41 ฉบับที่ 1 (พิเศษ) มกราคม-เมษายน. หน้า 318 -321.

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

รัตนา นชะพงษ์ และประภัสสร เชยคำแหง. 2554. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้แมลงตัวห้ำ. หน้า 11-15. *ใน* เอกสารประกอบการอบรมหลักสูตร แมลง-สัตว์ศัตรูพืช และการป้องกันกำจัด ครั้งที่ 15. กลุ่มกีฏและสัตววิทยา 25-29 กรกฎาคม 2554 ณ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพ.

ลักขณา บำรุงศรี และ ชฎาภรณ์ เฉลิมวิเชียรพร. 2554. แมลงปากดูดชนิดที่สำคัญในประเทศไทย. กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. หน้า 39-64.

เลขา มาโนช กัญญา เจริญไทย คนึงนิจ บุศราคำ พรพิมล อธิปัญญาคม อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และ อรอุมา เจียมจิตต์. 2544. เชื้อราโรคพืช รา endophyte และราดินในประเทศไทย. หน้า 502-510. *ใน : การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

วนาพร วงษ์นิคง, ศรุต สุทธิอารมณ์, ศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา, วิภาดา ปลอดครบุรี, บุษบง มนัสมั่นคง, พวงผกา อ่างมณี. 2553. การศึกษาชนิดและทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพรรณไม้น้ำ. รายงานวิจัยประจำปี. กลุ่มบริหารศัตรูพืชสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1569-1580.

วนิดา ฐิติฐาน นิตยา กันหลง สมใจ วิวิธจินดา และสุเนตรา ภาวิจิตร. 2529. ศึกษาเชื้อบักเตรีสาเหตุโรคใบไหม้ของหอมแดง. *ใน* รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2529 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 47-54.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

วสันณ์ เพชรรัตน์ และ มานะ กาญจนมณีเสถียร. 2532. เชื้อรา *Cercospora* สาเหตุโรคพืชในภาคใต้ของประเทศไทย. *วารสารโรคพืช* 9: 23 - 27.

วรานันท์ วิญญูรัตน์ รัติยา พงศ์พิสุทธา และชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล. 2553. การทดสอบ casein hydrolysis เพื่อจำแนก species ของ *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร.* ปีที่ 41 ฉบับที่ 1 (พิเศษ) มกราคม-เมษายน. หน้า 299-302.

วรานันท์ วิญญูรัตน์. 2554. *การจำแนกชนิดและศึกษาความรุนแรงของเชื้อรา Colletotrichum สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 136 หน้า.

วรัญญู ชัยรพ และ นิวัฒ เสนาะมือง. 2559. โรคของกล้าไม้พะยูง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre ex Laness) และเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับโรคใบจุดกลมสีน้ำตาล. แก่นเกษตร 44 ฉบับพิเศษ 1: 977-982.

วารี หงษ์พฤกษ์. 2543. เพลี้ยจักจั่นและเพลี้ยกระโดด ศัตรูพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย. กลุ่มกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 126 หน้า.

วัฒนา จารณศรี, ฉัตรชัย ศฤงฆไพบูลย์ และเทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์. 2526. การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของไรศัตรูกล้วยไม้ในประเทศไทย. หน้า 1-7. *ใน* รายงานผลการค้าวิจัย กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2526. กลุ่มงานอนุกรมวิธานและวิจัยไร, กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

วัฒนา จารณศรี และ มานิตา คงชื่นสิน. 2533. อนุกรมวิธานไรศัตรูส้มโอในประเทศไทย. หน้า 260-273. *ใน* รายงานผลงานวิจัย กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2533. กลุ่มงานอนุกรมวิธานและวิจัยไร, กองกีฏ และสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

วัฒนา จารณศรี, มานิตา คงชื่นสิน, เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และฉัตรชัย ศฤงฆไพบูลย์. 2535. การศึกษาอนุกรมวิธานของไรบนมะม่วงในประเทศไทย. หน้า 201-233. *ใน* รายงานผลการค้นคว้า และวิจัยปี 2535. กลุ่มงานอนุกรมวิธานและวิจัยไร, กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

วัฒนา จารณศรี, มานิตา คงชื่นสิน, เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และพิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์. 2543. ไรศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด. เอกสารวิชาการของกองกีฏและสัตววิทยา ปี พ.ศ. 2544. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 192 น.

วันทนีย์ อู่วาณิชย์, อัปสร เปลี่ยนสินไชย, สุนี ศรีสิงห์ และ อนุสรณ์ กุศลวงศ์. 2537. ความก้าวหน้าในงานวิจัยโรคใบจุดเหลืองของอ้อย, น. 25. *ใน บทคัดย่อประชุมวิชาการประจำปี 2537. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา*. กรมวิชาการเกษตร.

วรรณนิภา มธุรส พัฒน ทวีโภค จุฬาภรณ์กำเนิดเพชร อุดมศักดิ์เลิศสุชาตวนิช และ รัตนนุช จันทร์เพ็ญ. 2555. หน้า 1144-1150. *ใน* : *การประชุมวิชาการแห่งชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9*.

วิกิพิเดีย สารานุกรมเสรี (2557). กระเทียม สืบค้นเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2557 Web site: http://th.wikipedia.org/wiki/กระเทียม

วิลาวัณย์ ใคร่ครวญ. 2557. *พริกของไทย...พริกใหญ่ พริกเล็ก*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://www.doa.go.th/pibai/pibai/n17/v_3-apr/korkui.html. (23 กุมภาพันธ์ 2560).

ศรีวิชาการเกษตร

วิวิชชุตา เดชรักษา. 2549. การติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียของหอยน้ำจืดวงศ์ Thiaridae ในภาคเหนือของประเทศไทย.วิทยานิพนธ์ระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน, นครปฐม.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2551. ราวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 351 หน้า.

วิเชียร บำรุงศรี. 2543. แมลงศัตรูถั่วเขียวและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูพืชน้ำมันและพืชไร่ตระกูลถั่ว กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 44 หน้า.

วิมลวรรณ โชติวงศ์ วิภาดา วังศิลาบัตร เกรียงไกร จำเริญมา พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์ และ วิภาดา ปลอดครบุรี. 2556. ศึกษาอัตราการกินแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis*) (Hendel) ของแมงมุมตาหกเหลี่ยม: *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch, 1847) ในห้องปฏิบัติการ. วารสารกีฏและสัตววิทยา ปีที่ 31 ฉบับที่ 1 หน้า 29-35.

วิจิตร ขจรมาลี. 2501. *การตรวจโรคข้าวบางท้องที่ในภาคกลาง.* วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 75 หน้า.

วิรัช ชูบำรุง ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และพัฒนา สนธิรัตน. 2528. *Colletotrichum spp. ในประเทศไทย.* หน้า128-140. *ใน*: *รายงานผลงานวิจัย พ.ศ.2528.* กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

วิรัช ชูบำรุง, อาภรณ์ ธรรมเขต, ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และ พัฒนา สนธิรัตน. 2529. การจำแนกชนิดเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคของชา, น. 171 -178. *ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2529*. กลุ่มงานวิทยาไมโค. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร.

วิรัช จันทรัศมี ชอุ่ม เปรมัษเฐียร ทวี แสงทอง จันทร์เพ็ญ ประคองวงศ์ ไชยยศ สุพัฒนกุล มาลี ณ นคร สุนันทา เพ็ญสุต ศรีสม สุวรรณวงศ์ ศิริพร ซึงสนธิพร. 2547. *วัชพืชสามัญภาคกลาง.* สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย. กรุงเทพ. 135 หน้า.

วิภาดา วังศิลาบัตร. 2539. การศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในกล้วยไม้. รายงานผลการวิจัย กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม, กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ หน้า 1 – 76.

วิภาดา วังศิลาบัตร และอัมพร วิโนทัย. 2544. การศึกษาอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และประสิทธิภาพการกินแมลงวันผลไม้ Bactrocera correcta (Saunders) ของแมงมุมตาหกเหลี่ยม *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch) (Araneae : Oxyopidae) 23(4) : 241 – 252.

วิภาดา วังศิลาบัตร. 2551. การศึกษาชนิด ชีววิทยา และประสิทธิภาพการกินของแมงมุมตัวห้ำต่อแมลงวันผลไม้ในสวนมะม่วง. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551. สำนักวิจัยพัฒนากาอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 356 – 388.

วีรศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และ อุดม ภู่พิพัฒน์. 2525. การสำรวจโรคของถั่วพู. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* 15: 225-239.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วุฒิพงศ์ มหาคำ. 2554. ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืช: หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้ และข้อจำกัด. *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*, 3(1): 1 – 30

วุฒิศักดิ์ บุตรธนู ไมตรี พรหมมินทร์ ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2550. การศึกษาชนิดโรคของส้มเพื่อการนำเข้า. หน้า 763 – 772. *ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขา กรมวิชาการเกษตร.

วัชรี สมสุข, อัจฉรา ตันติโชดก และอุทัย เกตุนุติ. 2529. ไส้เดือนฝอยควบคุมหนอนกินใต้ผิวเปลือกไม้สกุลลางสาด. วารสารกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาเกษตร. 8: 115-119.

วัชรี สมสุข วินัย รัชตปกรณ์ชัย และพิมลพร นันทะ. 2534ก. การใช้ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ควบคุมด้วงหมัดผักในผักกาดหัว. วารสารกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาเกษตร. 13: 183-188.

วัชรี สมสุข สุธน สุวรรณบุตร และพิมลพร นันทะ. 2534ข. ศึกษาการใช้ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ในการควบคุมด้วงงวงมันเทศในสภาพธรรมชาติ. รายงานผลวิจัยประจำปี 2534 กองกีฏและสัตววิทยา. 10 หน้า.

วัชรี สมสุข พิมลพร นันทะ และ เอนก บุตรรักษ์. 2537. การควบคุมหนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* ในดาวเรืองด้วยไส้เดือนฝอย ผลงานแผ่นภาพในการประชุมสัมมนาทางวิชาการ แมลงและสัตว์ศัตรูพืช ครั้งที่ 9 กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 55-62.

วัฒนา จารณศรี, มานิตา คงชื่นสิน, เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และพิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์. 2544.ไรศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด. เอกสารวิชาการ กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพ. 192 น.

ศานิต รัตนภุมมะ. 2550. กีฏวิทยาแม่บท. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ดีพริ้น และแทนก้อปปี้เซนเตอร์, เชียงใหม่. 571 หน้า.

ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. 2560. *ข้อมูลภาวะการผลิตพืช ปี 2559/60.* (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://www.agriinfo.doae.go.th/year60/plant/rortor/ page1.pdf (7 มีนาคม 2562).

ศิริณี พูนไชยศรี. 2544. เพลี้ยไฟ. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 75 หน้า.

ศิริพร ซึงสนธิพร. 2549. การสำรวจวัชพืชต่างถิ่นในประเทศไทย (เขตภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ). ผลงานประจำปี 2545,สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ, 2545, หน้า 944-971

ศิริพร ซึงสนธิพร ธัญชนก จงรักไทย มัตติกา ทองรส และจรัญญา ปิ่นสุภา. 2554. สำรวจและรวบรวมวัชพืชในพืชผัก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง. หน้า 1665-1684. *ใน : รายงานผลงานประจำปี 2553* สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด. นนทบุรี.

ศิริพร ซึงสนธิพร และธัญชนก จงรักไทย 2556. การศึกษาชนิดของวัชพืชของพืชส่งออก ข้าวโพดฝักอ่อน และมะม่วง พืชนำเข้า ได้แก่ อ้อย และ ข้าวฟ่าง. ผลงานวิจัยประจำปี 2556. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. นนทบุรี.

ศรีวิชาการเกษตร

ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช พรพิมล อธิปัญญาคม ธารทิพย ภาสบุตร ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี ศรีสุข พูนผลกุล วุฒิศักดิ์ บุตรธนู พจนา ตระกูลสุขรัตน์ และเพลินพิศ สงสังข์. 2549. สำรวจ รวบรวม ตัวอย่างโรคพืชในประเทศไทย. หน้า 1108–1126. *ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549 เล่ม 2*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

ไสว บูรณพานิชพันธุ์. 2544. อนุกรมวิธานแมลง. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. 441 หน้า.

สมุทร มงคลกิติ. 2524. ตั๊กแตนที่สำคัญและการป้องกันกำจัด. เอกสารวิชาการประกอบการบรรยาย ในการอบรม เรื่อง แมลง – สัตว์ศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด ณ ห้องประชุมสาขาสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา 9 – 20 มีนาคม 2524. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 72 หน้า

สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน. ม.ป.ท. *พืชหัว/เผือก*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://kanchanapisek.or.th/kp6 / sub/book/book.php?book=5 &chap=5 &page=t5 - 5 - infodetail04.html (7 มีนาคม 2562).

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2560. ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร, ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/assets/portals/1/files/production/หอมแดง60.pdf, 18 กรกฎาคม 2561.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2561. สถิติการนำเข้าส่งออกมะม่วง. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php. (10 กรกฎาคม 2562).

สิทธิ กุหลาบทอง. บัญชีรายชื่อหอยน้ำจืดในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย. *วารสารคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร*.2(3): 15-22.

สืบศักดิ์ สนธิรัตน. 2538. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในประเทศไทย. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 275 หน้า.

สุชาติ ผึ่งฉิมพลี และประสิทธิ์ นิยมไทย. 2555. *ความหลากหลาย ปริมาณและการแพร่กระจายของหอยน้ำจืดในแม่น้ำบางปะกงและแม่น้ำปราจีนบุรี*. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 85 หน้า.

สุชาติ อุปถัมภ์, มาลียา เครือตราชู, เยาวลักษณ์ จิตรามวงศ์ และศิริวรรณจันทเตมีย์. 2538. *สังขวิทยา*. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. 517 หน้า.

สุกัญญา พริกจำรูญ. 2548. คู่มือการเพาะเลี้ยงและส่งออกพรรณไม้น้ำปลาสวยงาม. สำนักพิมพ์นีออนบุ๊คมีเดีย. 130 หน้า

สุดารัตน์ สุตพันธ์ และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2552. การเก็บรวบรวมและจำแนกเชื้อราคอลเลตโตตริคัม. *ใน* การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9 วันที่ 24-26 พฤศจิกายน 2552 โรงแรมสุนีย์ แกรนด์ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ อภิรัชต์ สมฤทธิ์ ธารทิพย ภาสบุตร และ พีระวรรณ พัฒนวิภาส. 2550.สำรวจ รวบรวม และจำแนกชนิดเชื้อราสนิมสาเหตุโรคพืชไร่ และวัชพืชในพืชปลูก. หน้า 1017 - 1025. *ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549 เล่ม 2*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ. 2552. โรคของถั่วฝักยาว. น.53 - 54. *ใน คู่มือโรคผัก* พิมพ์ครั้งที่ 1. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, บริษัทเอ-วันฟิวเจอร์ จำกัด, นนทบุรี. 153 หน้า.

สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2553. โรคของดอกเบญจมาศ. น.58 - 69. *ใน โรคไม้ดอกไม้ประดับ.* กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 163 หน้า.

สุรพล ยินอัศวพรรณ, อำภา ชินสว่างวัฒนกุล, ปรีชา สุรินทร์ และ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2530. โรคราสนิมของถั่วเขียวผิวมันและถั่วเขียวผิวดำ, น. 50. *ใน การประชุมวิชาการโรคพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 1*. สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย. (บทคัดย่อ).

สุวัฒน์ รวยอารี.2544. เรียนรู้การจัดการแมลงศัตรูข้าวโดยวิธีผสมผสาน กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 262 หน้า

สมคิด ดิสถาพร. 2524. การแพร่ระบาดและผลงานวิจัยใหม่ล่าสุดของโรคข้าวที่สำคัญในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2523. *ข่าวสารโรคพืช* 1: 1 -6.

สมชัย เบญจาทิกุล, จุมพล สาระนาค, นิยมรัฐ ไตรศรี, วิชิต แซ่เฮง และ ศุภชัย ลีจีรจำเนียร. 2522. การศึกษาทดลองและสำรวจโรคบางชนิดของมะเขือเทศ, น. 476-483. *ใน รายงานประจำปี 2522.* กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร.

สมศิริ แสงโชติ และศศิวิมล ลักษณพิสุทธิ์. 2011. โรคที่สำคัญของดอกกล้วยไม้ตัดดอกสกุลหวายเอียสกุลที่ผลิตเป็นการค้า. วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร 42: 1(พิเศษ): 315-318.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน. 2538. สรรี วิทยาของพืช. สำนักพิมพ์รั้วเขียว. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 203 น.

สำราญ สะรุโณ สุภาค รัตนสุภา อริยธัช เสนเกตุ ศุกร์ เก็บไว้ ศริณนา ชูธรรมธัช อุดร เจริญแสง นลินี จาริกภากร ไพดรจน์ สุวรรณจินดา. 2551. การพัฒนาเทคโนโลยีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสับปะรดเพื่อบริโภคสดภาคใต้ตอนล่าง. การประชุมวิชาการประจำปี 2551 ผลงานวิจัยที่ใช้ได้จริงจากหิ้งสู่ห้าง ครั้งที่ 2 วันที่ 16-17 กันยายน 2551 โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 205-227.

โสภณ วงศ์แก้ว. 2528. *โรคของถั่วลิสงในประเทศไทย*. เอกสารเผยแพร่ของกลุ่มนักวิจัยโรคถั่วลิสง โครงการร่วมถั่วลิสง ฉบับที่ 1 ประเทศไทย. 76 หน้า.

องุ่น ลิ่ววานิช. 2544. ผีเสื้อและหนอน. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 230 หน้า.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ พีระวรรณ พัฒนวิภาส และเพลิงพิศ สงสังข์. 2550.สำรวจ รวบรวม เชื้อราโรคราน้ำค้างของพืชผักและไม้ผล. หน้า 1063 - 1070. *ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549 เล่ม 2*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. 2552. *รา Phytophthora สาเหตุโรคพืชในประเทศไทย*. เอกสารวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 74 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. 2556. *พืชที่เป็นโรคไฟทอปธอรา*. เอกสารวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 189 หน้า.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และพีระวรรณ พัฒนาวิภาส. 2556. การศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phytophthora capsici*. หน้า 2281-2292. *ใน : ผลงานวิจัย ประจำปี 2555*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2515. โรคและศัตรูที่สำคัญของกุหลาบ. *กสิกร* 45: 277-282.

อภิรัชต์ สมฤทธิ์. 2544. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* สาเหตุโรคตายพรายของกล้วยในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 133 หน้า.

อรุณี วงษ์กอบรัษฎ์. 2543. การจัดทำบัญชีรายชื่อแมลง ไร และสัตว์ศัตรูพืช. เอกสารประกอบการบรรยายพิเศษการประชุมสัมมนา เรื่อง “การจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List) และการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis) เพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร” วันที่ 26 กันยายน 2543 ณ โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ.

อรุณี รอดลอย,สุจินต์ หนูขวัญ และยุพเยาว์ สายจันทร์. 2555. การศึกษาชนิดและการกระจายพันธุ์ของพรรณไม้น้ำในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของประเทศไทย. กลุ่มงานวิจัยพรรณไม้น้ำ สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง. 316 หน้า.

อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข,ณัฐฐิญา กาญจนนิธิพัฒน์,ดาราพร รินทะรักษ์ และปราสาททอง พรหมเกิด ความหลากชนิดและการป้องกันก้าจัดหอยศัตรูพรรณไม้น้ำประดับ รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2557 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร หน้า 2682-2693.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2520. โรคและศัตรูไม้ประดับ. บริษัทสำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด กรุงเทพฯ. 163 หน้า.

อนุสรณ์ อัตตปัญโญ, วิรัช ชูบำรุง, วันทนีย์ อู่วาณิชย์, สุทธิรักษ์ แซ่หลิม, วิสูตร เกตุทองแถม และ นิยม จิ้วจิ้น. 2519. การศึกษาสาเหตุและการแพร่ระบาดของโรคราสนิมของอ้อยในประเทศไทย, น. 493-497. *ใน รายงานผลการวิจัยประจำปี 2518-2519*. กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร.

อารีย์ ศรีพิจิตต์. 2516. *การศึกษาโรคของพริกและการป้องกันกำจัด*. ปัญหาพิเศษ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ 21 หน้า.

อารีรัตน์ เทียนขาว. 2550. *ประสิทธิภาพของเชื้อรา Trichoderma spp. ในการยับยั้งเชื้อราCurvularia eragrostidis และควบคุมโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวาย*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 85 หน้า.

อรรถสิทธิ์ บุญธรรม. 2544. สถานการณ์การผลิตอ้อยและน้ำตาล.ข่าวสารสมาคมนักวิจัยอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย. 8(3)2-3

อรนุช กองกาญจนะ และ วัชรา ชุณหวงศ์. 2540. แมลงศัตรูข้าวโพดและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานวิจัยแมลงศตรูข้าวโพดและพืชไร่อื่นๆ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 37 หน้า

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

อินทวัฒน์ บุรีคำ. 2548. นิเวศวิทยาวิเคราะห์ทางกีฏวิทยา. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม.

อุดม ภู่พิพัฒน์ กิตติ ชุณหวงศ์ ประพันธ์โอสถาพันธ์, ขุติมันต์ พาณิชศักดิ์พัฒนา และสมศักดิ์ หัตถเลขา. 2525. โรคต่างๆ ของถั่วเหลืองในประเทศไทย, น. 20-21. *ใน รายงานค้นคว้าวิจัยประจำปี*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อุรุญากร จันทร์แสง มาลี บรรจบ,นิภา เบญจพงศ์ และคณะ. 2540. การศึกษาชนิดของแมลงที่เข้าทำลายพืชสมุนไพรในโรงเก็บ. *วารสารองค์การเภสัชกรรม*, 23(1): 1 – 9

โองการ วณิชาชีวะ. 2556. เปรียบเทียบปัจจัยที่มีต่อการงอกของเมล็ดวัชพืชต่างถิ่นสกุลผักเผ็ดแม้วในประเทศไทย. *วารสารแก่นเกษตร*. 41(3): 317-326.

อังศุมาลย์ จันทราปัตย์. 2550. ไรการเกษตร. โรงพิมพ์สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ. 315 น.

Abbott, R.T. 1989. *Compendium of landshell*. Melbourne,Australia : American Malacologist,Inc.

Abou-Jawdah, Y., Sobh, H., Fayad, A., Lecoq, H., Delécolle, B., Trad-Ferré, J., 2000. *Cucurbit yellow stunting disorder virus*: A new threat to cucurbits in Lebanon. *J. Plant Pathol.* 80(1), 55-60.

Abrahamian, P.E., Abou-Jawdah, Y., 2014. Whitefly-transmitted criniviruses of cucurbits: current status and future prospects. *Virus Dis.* 25(1), 26-38.

Abrahamian, P.E., Seblani, R., Sobh, H. and Abou-Jawdah, Y., 2013. Detection and quantitation of two cucurbit criniviruses in mixed infection by real-timeRT-PCR. *J. Virol. Methods* 193(2): 320-326.

Adam, M. A. M., M.S. Phillips and V.C. Blok. 2007. Molecular diagnostic key for identification for single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* sp.). Journal of Plant Pathology 56: 190-197.

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.

Agarwal, R.A. and Singh, D.K. 1988. Harmful gastropods and their control. *ActaHydrochimHydrobiol*.16: 113-138.

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.

Akmal, M., S., Freed., M.N. Malik and H.T Gul 2013. Efficacy of Beauveria bassiana (Deuteromycotina: Hypomycetes) against different aphid species under laboratory conditions. PakistanJ. Zool., 45: 71-78.

ลิขสิทธิ์กรมเกษตร

Amgelini DR, Jockusch EL. 2008. Relationship among pest flour beetles of the genus *Tribolium* (Tenebrionidae) inferred from multiple molecular markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46(1): 127 – 141

Alam N, Singh R, and Mishra SB. 1993. Impact of weeds and methods of weed control on the incidence of stemborer (Scirpophaga incertulas Wlk., Chilo suppressalis Wlk. and Sesamia inferens Wlk.) in deep water rice. Journal of Entomological Research 17, 125-128.

Al-Banna, L., V. Williamson and S.L. Gardner. 1997. Phylogenetic analysis of nematodes of the genus *Pratylenchus* using nuclear 26S rDNA. Molecular Phylogenetics and Evolution 7:94-102.

Al-Banna, L., A.T. Ploeg, V.M. Williamson and I. Kaloshian. 2004. Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. Journal of Nematology 36:142-146.

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.

Alcorn, J. 1992. *Parapithomyces clitoriae* sp. nov. (Fungi: Hyphomycetes) and its *Pseudocercospora* synanamorph. *Australian Systematic Botany* 5: 711-715.

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

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.

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

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. 1990. "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410.

Aluja, M., Norrbom, A.L. 2001. *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of behavior***.** Florida, USA, CRC Press.

Alvarez, A.M., I.W. Buddenhagen, E.S. Buddenhagen and H.Y. Domen. 1978. Bacterial blight of onion, a new disease caused by *Xanthomonas* sp. *Phytopathol*. 68: 1132-1136.

Anderson, R. 2008. Annotated List of the Non-Marine Mollusca of Britain and Ireland.

Anderson, J.M., J.F. Preston, D.W. Dickson, T.E. Hewlett, N.H. Williams, and J.E. Maruniak. 1999. Phylogenetic analysis of *Pasteuria penetrans* by 16S rRNA gene cloning and sequencing. Journal of Nematology 31:319-325.

Anonymous. n.p. *Phytophthora colocasiae*. (Online). Available : http://www.extento. hawaii.edu/ kbase/crop/type/p_coloc.htm. (June 22, 2014)

Anon. 1987. Pests. Mauritius, Sugar Industry Research Institute. Annual report Mauritius Sugar Industry Research Institute 43-44.

Anufriev, G.A., 1970b. Description of new genus: *Amritodus* for Idiocerus atkinsoni Leth. (Hemiptera: Cicadellidae). Journal of Natural History 4: 375-376.

Arakaki, N., H. Yamazawa and S. Wakamura. 2011. The egg parasitoid Telenomus euproctidis (Hymenoptera: Scelionidae) uses sex pheromone released by immobile female tussock moth Orgyia postica (Lepidoptera: Lymantriidae) as kairomone. *Applied Entomology and Zoology.* 46: 195–200.

Ashlock, P.D. 1967. A general classification of the Orsillinae of the world (Hemiptera-Heteroptera: Lygaeidae). *University of the California Publications in Entomology* 48, 1–82.

Asgari, B. and R. Zare. 2011. The genus *Chaetomium* in Iran, a phylogenetic study including six new species. *Mycologia* 103: 863-882.

Atibalentja, N., G.R. Noel, and L.L. Domier. 2000. Phylogenetic position of the North American isolate of *Pasteuria* that parasitizes the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, as inferred from 16S rDNA sequence analysis. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50:605-613.

Atibalentja, N., G.R. Noel, and A. Ciancio. 2004. A Simple Method for the Extraction, PCR-amplification, Cloning, and Sequencing of *Pasteuria* 16S rDNA from Small Numbers of Endospores. Journal of Nematology 36:100-105.

APPPC, 1987. Insect pests of economic significance affecting major crops of the countries in Asia and the Pacific region. Technical Document No. 135. Bangkok, Thailand: Regional Office for Asia and the Pacific region (RAPA).

Aplin K.P., P.R. Brown, J. Jacob, C.J. Krebs and G.R. Singleton. 2003. Fields method for rodent studies in Asia and the Indo-Pacific. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Austalia.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Austin, A. D. and S. A. Field. 1997. The ovipositor system of scelionid and platygastrid wasps (Hymenoptera: Platygastroidea): comparative morphology and phylogenetic implications. *Invertebrate Taxonomy*. 11: 1-87.

Austin, A. D., N. F. Johnson, and M. Dowton. 2005. Systematics, evolution, and biology of scelionid and platygastrid wasp (Hymenoptera). *Annual Review of Entomology*. 50: 553–582.

Azarkina, G.N. 2019. A new species of Aelurillus Simon, 1884 (Aranei: Salticidae) from Thailand, with the first description of the male of A. afghanus Azarkina, 2006. Arthropoda Selecta 28(3): 408–416.

Avilés, L. 1997. Causes and consequences of coo Agnarsson, I. 2002. Morphological phylogeny of cobweb spiders and their relatives (Araneae, Araneoidea, Theridiidae). Zoological Journal of the Linnean Society, 2004, 141, 447–626p.

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.

Baba, Y. G. and Tanikawa, A. 2015. The handbook of spiders. Bun-ichi Sogo Shuppan, Tokyo, 112 pp.

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.

Baker, C.F., 1915. Studies in Philippine Jassoidea: III. The Idiocerini of the Philippines.Philippine Jour. Sci. 10: 317-343.

Baker, E. W. 1975. Plant Feeding Mites of Thailand (Tetranychidae, Tenuipalpidae, and Tuckerellidae). Plant Protection Service Technical Bulletin No. 35. Department of Agricultrue, Ministry of Agriculture and Co-operativers Bangkok, Thailand. 43 pp.

Brooks, F.E. 2005. *Taro leaf blight*. (Online). Available : https://www.apsnet.org/edcenter/ intropp/ lession/fungi/Oomycetes/Pages/TaroLeafBlight.aspx. (June 22, 2014)

Bailey, J. A. and M. J Jeger. 1992. *Colletotrichum*: *Biology, Pathology and Control*. Commonwealth Mycological Institute, Wallingford, UK: CAB International. 388 p.

Bandelt, H-J., Forster, P., and Rohl, A. 1999. Median-joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16:37-48.

Banziger, H. 1976. Winged Aphids of Species Economically Important in Thailand. Plant Protection Service Technical Bulletin No.36. 41 pp.

ศรีบูรพา

Barron, G.L. 1977. The Genera of Hyphomycetes from Soil. 3rd ed. Noble offset printers, Inc., New York. 364 p.

Barrion, A. T. and Litsinger, J. A. 1995. Riceland spiders of South and Southeast Asia. CAB International, Wallingford, UK, xix + 700 pp.

Bartolini I, Rivera J, Nolazco N, Olórtegui A. 2020. Towards the implementation of a DNA barcode library for the identification of Peruvian species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). PLoS ONE 15(1): e0228136. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228136.

Barnes DE, Chan LG, *1990. Common Weeds of Malaysia and their Control*. Kuala Lumpur, Malaysia: Ancom Berhad Persiaran Selangor.Chee, 1994 p.

Barrientos, Z. 2000. *Population Dynamics and Spatial Distribution of the Terrestrial Snail Ovachlamys fulgens (Stylommatopbora: Helicarionidae) in a Tropical Environment*. Rev. Biol. Trop. 48(1): 71-87.

Beck, K. G., Zimmerman, K., Schardt, J. D., Stone, J., Lukens, R. R., Reichard, S., Randall, J., Cangelosi, A. A., Cooper, D., and Thompson, J. P. 2008. Invasive Species Defined in a Policy Context: Recommendations from the Federal Invasive Species Advisory Committee. Invasive Plant Science and Management 1(4) :414-421.

Begum M, Juraimi AS, Azmi M, Omar SRS, Rajan A, 2008. *Soil seedbank of the Muda ข้าว granary in north-west Peninsular Malaysia invaded by the weed Fimbristylis miliacea* (L.) Vahl. Plant Protection Quarterly, 23(4):157-161. (Online) Available: http://www.weedinfo. com .au (March 9, 2018)

Beenken, L., S. Zoller and R. Berndt. 2012. Rust fungi on Annonaceae II: the genus Dasyspora Berk. & M.A. Curtis. *Mycologia* 104: 659-681.

Belair, G., D.J. Wright and G. Curto. 2005. Vegetable and tuber crop applications, pp. 255-264. *In* Grewal, P.S., R.U. Ehlers and D.I. Shapiro-Ilan, eds. Nematodes and Biological Control Agents. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK.

Ben-Dov, Y. 1994. A systematic catalogue of the mealybugs of the world. Intercept Ltd., Andover, UK, 686 pp.

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

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.

Berbee, M. L., M. Pirseyedi and S. Hubbard. 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91(6): 964-977.

Benjamin, S. P. 2004. Taxonomic revision and phylogenetic hypothesis for the jumping spider subfamily Ballinae (Araneae, Salticidae). Zoological Journal of the Linnean Society 142(1):1 - 82

Benjamin, S. P. 2010. Revision and cladistic analysis of the jumping spider genus *Onomastus* (Araneae: Salticidae). Zoological Journal of the Linnean Society 159(3): 711-745.

Benson, A. J., Kipp, R. M., Larson, J., and Fusaro, A. 2014. Potamopyrgus antipodarum. USGS Nonindigenous Aquatic Species Database, Gainesville, FL. http://nas.er.usgs.gov/queries/factsheet.aspx?SpeciesID=1008 Revision Date: 6/11/2012 (Online).

Bettini, S. 1964. Epidemiology of latrodectism. Toxicon. 2:93-101p.

Betbeder-Matibet M & Malinge P. 1968. Un succès de la lutte biologique: contrôl de Procerassacchariphagus Boj. (Borer ponctue) de la canne à sucre à madagascar par un parasite introduït: Apanteles flavipes Cam. Agronomie Tropicale 22, 1196-1220.

Bhuiya, B.A., S. Mazumdar, M.K. Pasha, W. Islam, M.I. Miah And M.S. Hossain. 2010. A preliminary report on the agromyzid leaf miner pest attack on some agricultural crops and weeds in Bangladesh. J. Taxon. Biodiv. Res., 4. 47-50

Bibi, S., M.S. Nadeem, M.B. Anwar, S.I. Shah, A.R. Kayani, M. Mushtaq, M.A. Beg and T. Mahmood. 2019. First record of *Mus cookii* (Cook's mouse) from Pothwar, Pakistan: a probable case of range extension? Mammalia. 83: 198-202.

Birnbaum, C. 2011. NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet – Dreissena polymorpha. – From: Online Database of the European Network onInvasive Alien Species – NOBANIS www.nobanis.org, Date of access 16/5/2014.

Bin, F. and N.F. Johnson. 1982. Potential of Telenominae in biocontrol with egg parasitoids (Hym., Scelionidae). *Les Colloques de l'INRA.* 9: 275–287.

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.

Blackman, R.L. and V.F. Eastop. 2000. Aphids on the World Crops. An Identification and Information Guide. Chichester, John Wiley & Sons Ltd, England.

Blackwall, J. 1858. Descriptions of six newly discovered species and characters of a new genus of Araneida. *Annals and Magazine of Natural History* (3) **1**: 426-434.

Blanford, W.T. 1904. The Fauna of British India, Ceylon and Burma, pp.17-19. Vol. II. Distant W. L., *Rhynchota (Heteroptera)*.

Bleszynski, S. 1970. A revision of the world species of *Chilo* Zincken (Lepidoptera: Pyralidae). Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology 25: 101-195, pls 1-5.

Bolland, H. R., J. Gutierrez and C. H. W. Flechtmann. 1998. World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae). Koninklike brill NV, Leiden, The Netherlands. 392 p.

Boontop, Y. 2016. Natural variation and biogeography of the melon fruit fly, *Zeugodacuscucurbitae* (Diptera: Tephritidae), in Southeast-Asia and the West-Pacific. Ph.D. Thesis. Queensland University of Technology, Australia.

Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. C.M.I., Kew, Surrey, England. 237 p.

Boonman-Berson, S., Turnhout, E., and van Tatenhove, J. 2014. Invasive Species: The Categorization of Wildlife in Science, Policy, and Wildlife Management.

Borah BK & Sarma KK. 1995. Seasonal incidence of plassey borer, *Chilo tumidicostalis* Hmpsn. in ratoon sugarcane. *Plant Health* 1, 29-33.

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.

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.

Boykin, L.M, M.K Schutze and M.N. Krosch. 2013. Multi-gene phylogenetic analysis of south-east Asian pest members of the Bactrocera dorsalis species complex (Diptera: Tephritidae) does not support current taxonomy. *Journal of Applied Entomology* 138(4).

Brandt, R. A. M. 1974. The non-marine aquatic mollusca of Thailand. Archiv fuer Molluskenkunde 105: 1 – 423.

Brady, A. R. 1964. The lynx spiders of North America, north of Mexico (Araneae: Oxyopidae). *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* **131**: 510.

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.

Braun, U. 1995. *A monograph of Cercosporella, Ramularia and allied genera (phytopathogenic hyphomycetes)*. Vol. 1. IHW-Verlag, Eching, Germany. 333 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.

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.

Brotman, Y., Kapuganti, J.G. and A. Viterbo. 2010. *Trichoderma*. *Current Biology* 20: R390-R391.

Brown, D. S. 1994. Freshwater snails of Africa and their medical importance. 2 eds, Taylor and Francis, London, UK.

Brown, R.H., and B.R. Kerry. 1987. Principles and practices of nematode control in crops. New York: Academic Press.

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.

Bruto, B. D., and J. A. Duthie. 2006. Fusarium rot. http://www.apsnet.org/online/feature/pumpkin/fusrot.html.

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.

Butani, D. K. 1979. Insect and Fruits , Periodical Experts Book Agency, New Delhi. 415 p

Burch, J. B. 1989. North American Freshwater Snails. Malacological Publications. 365 pp.

Byrne, R. A., Reynolds, J. D., and McMahon, R. F. 1989. Shell Growth, Reproduction and Life Cycles of *Lymnaea peregra* and *L. palustris* (Pulmonata: Basommatophora) in Oligotrophic Turloughs (Temporary Lakes) in Ireland. Journal of Zoology, London 217: 321-339.

CAB 1972. *Chilo infuscatellus* Sn. Distribution maps of pests No. 301. Commonwealth Agricultural Bureaux, Commonwealth Institute of Entomology, London.

CABI/EPPO, 2012. *Chilo sacchariphagus*. [Distribution map]. Distribution Maps of Plant Pests, No.June. Wallingford, UK: CABI, Map 177 (1st revision).

CABI. 2018. Invasive Species Compendium. https://www.cabi.org/isc/datasheet/26876 (12 June 2018)

Cabanillas, H.E., R.J. Wright and R.V. Vyas. 2005. Cereal, fibre, oilseed and medicanal Crop applications, pp. 265-279. *In* Grewal, P.S., R.U. Ehlers and D.I. Shapiro-Ilan, eds. Nematodes and Biological Control Agents. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK.

Carl KP. 1962. Gramineous moth borers in West Pakistan. *Technical Bulletin* CIBC 2, 29-76 (RAE 51: p.277).

Catling HD, Islam Z & Pattrasudhi R. 1984. Seasonal occurrence of the yellow stem borer *Scirpophaga incertulas* (Walker) on deepwater rice in Bangladesh and Thailand. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 12(1), 47-71.

Cameron, E.C., Sved, J.A. & Gilchrist, A.S. 2010. Pest fruit fly (Diptera: Tephritidae) in north-western Australia: one species or two? *Bulletin of Entomological Research* 100: 197-206.

Carbone, I. and L.M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.

Carta, L.K., A.M., Skantar and Z.A. Handoo. 2001. Molecular, morphological and thermal characters of 19 *Pratylenchus* spp. and relatives using the D3 segment of the nuclear LSU rRNA gene. Nematropica 31: 193-207.

Carayon, J. 1972. Caractéres systématiques et classification des Anthocoridae (Hemipt.). Annales de la Société Entomologique de France (N.S.) *In French*. 8: 309-349.

Caleb, J. T. D. 2020. Spider (Arachnida: Araneae) fauna of the scrub jungle in the Madras Christian College campus, Chennai, India. Journal of Threatened Taxa 12(7): 15711-15766.

Cameron, E.C., Sved, J.A. & Gilchrist, A.S. 2010. Pest fruit fly (Diptera: Tephritidae) in north western Australia: one species or two? Bulletin of Entomological Research 100: 197-206.

Castillo, P., and N. Vovlas. 2007. Pratylenchus (Nematoda: Pratylenchidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. Nematology Monographs and Perspectives, vol. 6. Leiden, NL: Koninklijke Brill NV.

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.

Centre for overseas pest research. 1982. *The Locust and Grasshopper Agricultural Manual.* Hobbs the printers of Southampton, Great Britain, United Kingdom. 690 pp.

CIE, 1972. Distribution Maps of Plant Pests, No. 300. Wallingford, UK: CAB International

Chaijuckam, P., Saralamba, S., Sriariyanum, M., Chowpongpang, S. and J.J. G.Guerrero. 2020. Genetic Variation of *Coleosporium plumeriae* from Different Provinces in Thailand. *Applied Science and Engineering Progress* 13: 38-47.

Chamberlin, R. V. 1924. Descriptions of new American and Chinese spiders, with notes on other Chinese species. Proceedings of the United States National Museum 63(13): 1-38.

Chandra Nayaka, S., A.C. Udayashankar, S.R.Niranjana, H.S. Prakash and C.N. Mortensen. 2009. *Anthracnose 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.

Chandrasrikul, A. 1962. A preliminary host list of plant disease in Thailand. Tech. Bull. No.6, Department of Agriculture, Bangkok. 23 p.

Chandrasrikul, A. 1962. A supplementary host list of plant disease in Thailand. Tech. Bull. No.6, Department of Agriculture, Bangkok. 14 p.

Chang,M.U., A.Kei, D.Yoji and Y. Koyoshi. 2007. Morphology and Intracellular Appearance of Orchid fleck virus. The Phytopathological Society of Japan Vol 42 (2) :156-167.

Chang, M.U., H.H. Chun, D.H. Baek and J.D. Chung. 1991. Study on the Viruses in Orchids in Korea : Dendrobium mosaic virus, Odontoglossum ringspot virus, Orchid fleck virus, and unidentified potyvirus. The Plant Pathology Jurnal. Vol. 6 :118-129.

Chatzivassiliou E. K., E. Konstantinos. D. Elisseos. P. Alexandra. P. Georgios. And N. I. Katis. 2004. A survey of tobacco viruses in tobacco crops and native flora in Greece. European Journal of Plant Pathology. December 2004, Volume 110, Issue 10, pp 1011–1023.

Charanasri, V., A. Bhandhufalk and C. Saringkaphaibul. 1977. Mites associated with economic crops of Thailand. Thai J. Agric. Sci. 10: 81-89.

Charles, I., I. Carbone, K.G. Davies, D. Bird, M. Burke, B.R. Kerry, and C.H. Opperman. 2005. Phylogenetic Analysis of *Pasteuria penetrans* by Use of Multiple Genetic Loci. Journal of Bacteriology 187: 5700-5708.

Charleston, M. A. and D. L. Robertson. 2002. Preferential Host Switching by Primate Lentiviruses Can Account for Phylogenetic Similarity with the Primate Phylogeny. *Systematic Biology* 51, 528-535.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Charernsom, K. 2000. Parasite complex of sugarcane whitefly, *Aleurolobus barodensis* (Maskell) (Hemiptera: Aleyrodidae), in Thailand. *Sugarcane pest management in the New Millenium. 4th Sugarcane entomology workshop International Society of Sugar Cane Technologists, Khon Kaen, Thailand, 7-10 February 2000.* pp.80-84 (Eds: Allsopp, P.G.; Suasa-Ard, W.) International Society of Sugar Cane Technologists, c/o Bureau of Sugar Experiment Stations, Indooroopilly, Australia

Chaverri, P., F. Branco-Rocha, W. Jaklitsch, R. Gazis, T. Degenkolb and G.J. Samuels. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia* 107: 558-590.

Chaverri, P., L.A. Castlebury, G.J. Samuels and D.M. Geiser. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 302-313.

Chaverri, P. and G.J. Samuels. 2002. *Hypocrea lixii*. Pat., the telemorph of *Trichoderma harzianum* Rifai. *Mycological Progress* 1: 283-286.

Chase, A.R. 1998. Alternaria Diseases of Ornamentals *Western Connection turf & Ornamentals*, A Monthly publication 1(3). Available at

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.

Chen, X. E. and Gao, J. C. 1990. The Sichuan farmland spiders in China. Sichuan Science and Technology Publishing House, Chengdu, 226 pp.

Cheng WY, Wang ZT & Chen SM. 1997a. Occurrence of internodes and borer-damaged internodes on spring cane. *Report of the Taiwan Sugar Research Institute* No. 158, 15-29.

Chundurwar RD. 1989. Sorghum stem borers in India and Southeast Asia. International Workshop on Sorghum Stemborers, ICRISAT, India. 19-25.

Cheng, T., Xu, C., Lei, L., Li, C., Zhang, Y. and S. Zhou. 2016. Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources* 16(1): 138-149. doi: 10.1111/1755-0998.

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.

Chiemsombat, P., Sharman, M., Srivilai, K., Campbell, P., Persley, D., Attathom, S., 2010. A new *Tospovirus* species infecting *Solanum esculentum* and *Capsicum annuum* in Thailand. *Australasian Plant Dis. Notes* 5(1), 75-78.

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

Cho, J. H. and Kim, J. P. 2002. A revisional study of family Salticidae Blackwall, 1841 (Arachnida, Araneae) from Korea. Korean Arachnology 18: 85-169.

Cho, Myoung-R. 2013. Acari: Prositgmata: Tarsonemidae. pp. 5-47. *In* Myoung-R. Cho and Jong-H. Lee., eds. Invertebrate Fauna of Korea. National Institute of Biological Resources Ministry of environmentral. 157 pp.

Choi S-K, Yoon J-Y, Chung B-N (2009) Genome analysis and characterization of a tobacco mosaic virus isolate infecting balsam (Impatiens balsamina). Arch Virol 154:881–885

Chotwong, W. and Tanikawa, A. 2013. Four spider species of the families Theridiidae, Araneidae, and Salticidae (Arachnida; Araneae) new to Thailand. Acta Arachnologica 62(1): 15.http://www.westernfarmservice.com/newsletters/turf/alternaria.pdf. (Access date : August 24, 2009).

Ciancio, A., R. Bonsignore, N. Vovlas, and F. Lamberti. 1994. Host records and spore morphometrics of *Pasteuria penetrans* group parasites of nematodes. Journal of Invertebrate Pathology 63:260–267.

CIE, 1972. Distribution Maps of Plant Pests, No. 300. Wallingford, UK: CAB International

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.

Clampitt, P. T. 1970. Comparative ecology of the snails *Physa gyrina* and *Physa integra*. Malacologia 10:113-151.

Clayton, W.D., M. Vorontsova, K.T. Harman and H. Williamson. 2014. *Acrachne racemosa*. Royal Botanic Gardens, Kew. (Online). Available. http://www.kew.org/data/grasses-db/www/imp000 17 . htm (26 July 2014).

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.

Cui, R. Q. and X. T. Sun. 2012. First report of *Curvularia lunata* causing leaf spot on lotus in China. *The American Phytopathological Society* 96(7): 1068.

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.

Cobb, N.A. 1915. *Tylenchulus similis*, the cause of a root disease of sugarcane and banana. J. Agric. Res. 4: 561-568.

Cock, M.J.W., H.C.J. Godfray and J.D. Holloway. 1987. Slug and Nettle Caterpillars: The Biology, Taxonomy and Control of the Limacodidae of Economic Importance on Palms in South-east Asia. CAB international. UK. 270 pp.

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.

Colazza, S., M. L. Bue, D. L. Giudice and E. Peri 2009. The response of Trissolcus basalis to footprint contact kairomones from Nezara viridula females is mediated by leaf epicuticular waxes. *Naturwissenschaften.* 96: 975–981.

Conti, E., G. Salerno, B. Leombruni, F. Frati and F. Bin 2010. Short- range allelochemicals from a plant-herbivore association: a singular case of oviposition-induced synomone for an egg parasitoid. *Journal of Experimental Biology.* 213: 3911–3919.

Conti, E., G. Salerno, B. Leombruni, F. Frati and F. Bin 2010. Short- range allelochemicals from a plant-herbivore association: a singular case of oviposition-induced synomone for an egg parasitoid. *Journal of Experimental Biology.* 213: 3911–3919.

Conow, C., Fielder, D., Ovadia, Y. and R. Libeskind-Hadas. 2010. Jane: a new tool for the cophylogeny reconstruction problem. *Algorithms for Molecular Biology* 5: 16.

Conlong DE; Goebel FR, 2006. *Trichogramma bournieri* Pintureau & Babault (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Chilo sacchariphagus* Bojer (Lepidoptera: Crambidae) in

sugarcane in Mozambique: a new association. Annales de la Société Entomologique de France, 42(3/4):417-422.

Correa, A. C., Escobar, J. S., Durand, P., Renaud, F., David, P., Jarne, P., Pointier, J-P., and Hurtrez-Boussès, S. 2010. Bridging Gaps in the Molecular Phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), Vectors of Fascioliasis. BMC Evolutionary Biology 10: 381.

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.

Cowie, R. H., Dillon, Jr., R. T., Robinson, D. G. and Smith, J. W. 2009. *Alien non-marine snails and slugs of priority quarantine importance in the United States: A preliminary risk assessment*. Amer. Malac. Bull. 27: 113-132.

Cranshaw, W. 2004. Garden Insects of North America: The Ultimate Guide to Backyard Bugs. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 656 p.

Cristopher J. M., Tomlinson S. R., Perestenko P. V., Pomeral D. D., Duce I.R., Usherwood N. R. and Bell D. R. 2004. Latrophilin is required for toxicity of black widow spider venom in caenorhabditis elegans. Biochem. J. (2004) 378, 185 -191. table grape vineyard. Ecological. Entomology. 23,33–40p.

Crop Protection Compendium. 2019. CABI International, Wallingford, UK. https://www.cabi.org/cpc/, accessed on Febuary 4, 2019

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.

Coroiu, I., B. Krystufek and V. Vohralik. 2016. *Mus spicilegus.* The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T13984A544549.

CSIRO. 2004. Common names cassava red mite. (Online) http://www.ces.csiro.au/aicn/name_c/a_740.htm (January 22, 2018)

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.

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.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. and Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9(8): 772.

Ðatkauskienë, I. 2005. *Characteristic of Lifespan and Reproduction Period of Succinea putris (L.) (Gastropoda: Styllomatophora)*. Ekologija 3: 28-33.

David H, 1986. The internode borer, *Chilo sacchariphagus indicus* (Kapur). In: David H, Easwaramoorthy S, Jayanthi R, eds. Sugarcane Entomology in India. Coimbatore, Tamil Nadu, India: Sugarcane Breeding Institute, ICAR, 121-134.

David H & Easwaramoorthy S. 1990. Biological control of *Chilo* spp. in sugar-cane. Insect Science and its Application 11, 733-748.

Davies, V. T. and Żabka, M. 1989. Illustrated keys to the genera of jumping spiders (Araneae: Salticidae) in Australia. Memoirs of the Queensland Museum 27: 189-266.

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

De Luca, F., E. Fanelli, M. di Vito, A. Reyes, C. de Giorgi. 2004. Comparison of the sequences of the D3 expansion of the 26S ribosomal genes reveals different degrees of heterogeneity in different populations and species of *Pratylenchus* from the Mediterranean region. European Journal of Plant Pathology 110: 949-957.

De Grisse, A.T. 1969. Redescription ou modifications dequelques techniques utiliséesdans l'étude des nématodesphytoparasitaires. *Mededelingen Rijksfakulteit Landbouw-wetenschappen Gent* 34: 351-369.

Deighton, F.C. 1967. Studies on *Cercospora* and allied genera. II. *Passalora, Cercosporidium*, and some species of *Fusicladium* on *Euphorbia*. *Mycological Papers.* 112: 1-80.

Deighton, F.C. 1974. Studies on *Cercospora* and allied genera. V. *Mycovellosiella* Rangel, and a new species of *Ramulariopsis*. *Mycological Paper*.137: 1-76.

Deighton, F.C. 1976. Studies on *Cercospora* and allied genera. VI. *Pseudocercospora* Speg., *Pantospora* Cif. and *Cercoseptoria* Petr. *Mycological Paper*.140: 1-168.

Deighton, F.C. 1979. Studies on *Cercospora* and allied genera VII. New species and redispositions. *Mycological Paper*.137: 1-56.

Deeleman-Reinhold, C. L. 2009. Description of the lynx spiders of a canopy fogging project in northern Borneo (Araneae: Oxyopidae), with description of a new genus and six new species of *Hamataliwa.* Zoologische Mededelingen 83: 673-700.

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.

Devlin, R. M. and F. H. Witham. 1983. Plant Physiology. Wadsworth Publ. Co., California. 577p.

Dhali, D. C., Saha, S. and Raychaudhuri, D. 2017. Litter and ground dwelling spiders (Araneae: Arachnida) of reserve forests of Dooars, West Bengal. World Scientific News 63: 1-242.

Dietrich, C.H. 2005. Key to families of Cicadomorpha and subfamilies and tribes of Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorhyncha). Fla. Entomol. 88: 502-517.

Distant, W.L. 1908. Rhynchota-Homoptera; The Fauna of British India including Ceylon and Burma. Taylor and Francis Ltd. London. Iv: Pp. 501.

Dirsh V.M. 1965. The African genera of Acridoidea. pp. 559. Anti-Locust research centre, The Cambridge university press, London, UK.

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.

Dillen, L., Jordaens, K., and Backeljau, T. 2009. *Life-history Variation and Breeding System in the Hermaphroditic Land Snail Succinea putris (Pulmonata: Succineidae).*

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.

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.

Doveri, F. 2013. An additional update on the genus *Chaetomium* with descriptions of two coprophilous species, new to Italy. *Mycosphere* 4: 820-846.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D. and Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Molecular biology and evolution 29(8): 1969-1973.

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.

Domsch, K.H., W. Gams, and T.H. Anderson. 1980. Compendium of Soil Fungi. Academic Press, London. 859 p.

Domsh, K.H., W. Gams and T.H. Anderson. 1993. *Compendium of soil fungi*. Vol. 2. 2nd ed Academic Press, London. 405 p.

Doungsa-ard, C., McTaggart, A.R., Geering, A.D.W., Dalisay, T.U., Ray, J. and R.G. Shivas. 2015. *Uromycladium falcatarium* sp. nov., the cause of gall rust on *Paraserianthes falcataria* in south-east Asia. *Australasian Plant Pathology*. 44: 25-30.

De Meyer, M., H. Delatte, M. Mwatawala, S. Quilici, J.F. Vayssieres and M. Virgilio. 2015. A review of the current knowledge on *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) (Diptera, Tephritidae) in Africa, with a list of species included in *Zeugodacus*. *ZooKeys*. (540), 539-557.

Doorenweerd, C., L. Luc, N. Allen, S. Jose and R. Daniel. 2017. A global checklist of the 932 fruit fly species in the tribe Dacini (Diptera, Tephritidae). ZooKeys. 730. 17-54. 10.3897/zookeys.730.21786.

Drew, R.A.I. and D.L. Hancock. 1994. The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in Asia. *Bulletin of Entomological Research Supplement Series* 2: 1-68.

Drew, R.A.I. and M.C. Romig. 2013. *Tropical Fruit Flies (Tephritidae: Dacinae) of South-East Asia*. CABI. London, UK. 664 pp.

Drew, R.A.I. and Romig, M. 2016. *Keys to the tropical fruit flies of South-East Asia*. CABI, London, UK. 487 pp.

Duffy, T., Kleiman, F., Pietrokovsky, S., Issia, L., Schijman, A. G., and Wisnivesky-Colli, C. 2009. Real-time PCR Strategy for Rapid Discrimination among Main Lymnaeid Species from Argentina. Acta Tropica 109: 1–4.

Dumrongrojwattana, P., Chaijirawowg,R., Matchacheep, S. and R.G.Moolenbeek.2007. Comparative anatomy of land snail genus *Succinea* from eastern Thailand (Pulmonata : Succineidae). *Kasetsart Journal : Natural Science*, 41: 229-238.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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.

Dung, B. T., Doanh, P. N., The, D. T., Loan, H. T., Losson, B., and Caron, Y. 2013. Morphological and Molecular Characterization of Lymnaeid Snails and Their Potential Role in Transmission of *Fasciola* spp. in Vietnam. Korean Journal of Parasitology 51(6): 657-662.

Dworakowska, I. 1994. Typhlocybinae (Auchenorrhyncha: Cicadellidae) known to occur in Sri Luanka. Annotationes Zoologicae et Botanicae, 20 (216), 3-39.

Dyar, H.G. 1898. A New Parasa, With a Preliminary Table of the Species of the Genus. Psyche: A Journal of Entomology 8: 273–276.

Easwaramoorthy S & Nandagopal V. 1986. Life tables of internode borer, *Chilo sacchariphagus indicus* (K.), on resistant and susceptible varieties of sugarcane. *Tropical Pest Management* 32, 221-228, 257, 259.

Eckardt, N.A. 2006. Identification of Rust Fungi Avirulence Elicitors. *Plant Cell* 18: 1-3.

Emerton, J. H. 1902. *The common spiders of the United States*. Boston, 225 pp. doi:10.5962/bhl.title.5617

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.

Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surry, England. 608 p.

Ellis, M.B. 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surry, England. 507 p.

El-Hennawy, H. K., Mohafez, M. A. and El-Gendy, A. A. 2015. The first record of *Plexippus clemens* (O.P.-Cambridge, 1872) (Araneae: Salticidae) in Egypt. Serket 14(3): 128-133.

Elgar, M.A. 1993. Inter-specific associations involving spiders: kleptoparasitism, mimicry and mutualism. Memoirs of the Queensland Museum 33:411–430p.

Elger, A. and Barrat-Segretain, M. H. 2002. Use of the Pond Snail *Lymnaea stagnalis* (L.) in Laboratory Experiments for Evaluating Macrophyte Palatability. Archiv Fur Hydrobiologie 153(4): 669-683.

EPPO. 2009. PP 7/88(1): *Radopholus similis*. Bulletin OEPP / EPPO Bulletin 38, 374–378.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

(online). Available from https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2008.01248.x (17/02/2017).

European and Mediterranean Plant Protection Organization .2008. Diagnostic *Radopholus similis OEPP/EPPO Bulletin* 38, 374–378 (Online) . Available.https://archives.eppo.int/EPPOStandards/diagnostics.htm (June 8, 2014)

Erwin, D.C and O.K.Ribeiro. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St.Paul., MN., USA. 562 p.

Evans, J.W. 1936. A new species of *Nysius* from Tasmania, and notes on the economic importance of genus. *Bull*. Econ. Res. 27:673-676.

Esbenshade, P.R., and A.C. Triantaphyllou. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. Journal of Nematology 22: 10 –5.

Excoffier, L., and Lischer, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A New Series of Programs to Perform Population Genetics Analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources 10: 564-567.

Fajardo, T.V.M. Nishijima, M., Buso, J.A., Torres, A.C., Avila, A.C, and Resende, R.O. 2001. Garlic viral complex: identification of Potyviruses and Carlavirus in Central Brazil.Fitopatologia Brasileira 26(3): 619-626.

FAO. 2006. ISPM No.27: diagnosis protocols for regulated pests. International Standards for Phytosanitary Measures 1 to 29 (2007 edition), Secretariat of the International Plant Protection Convention, Rome, pp. 341 – 352

Fajolu, O. L., A. L. Vu, M. M. Dee, J. Zale, K. D. Gwinn and B. H. Ownley. 2012. First reporst of leaf spot and necrotic root on switchgrass caused by *Curvularia lunata* var. *aeria* in the United States. *Plant Disease* 96(9): 1372-1373.

Fang, F., C. Zhang, S. Wei, H. Huang and W. Liu. 2012. Factors Affecting Tausch's Goatgrass (*Aegilops tauschii* Coss.) Seed Germination and Seedling Emergence. *Journal of Agricultural Science*. Vol. 4, No. 1: 114-121.

Favret, C. and G.L. Miller. 2012. AphID, Identification Technology Program, CPHST, PPQ, APHIS, USDA; Fort Collins, CO. [4 May 2014]. http://AphID.AphidNet.org/>.

Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences. A maximum likelihood approach. Journal of Molecular Evolution. 17: 368-376.

Fitch, W.M. 1971. Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. Systematic Zoology. 20: 406-416.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Ferrer PP, and Laguna E, 2009. [English title not available]. (Sobre *Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Exell (Onagraceae) como integrante de la flora subespontánea valenciana.) Acta Botanica Malacitana, 34:228-230.

Ferrer PP, Laguna E, Collado-Rosique F, Vizcaíno-Matarredona A, 2009. About *Murdannia spirata* (L.) Brückn. (Commelinaceae), a new non-native species in the European flora. (Sobre *Murdannia spirata* (L.) Bruckn. (Commelinaceae), nueva especie alóctona en la *flora Europea.) Anales de Biología*, 31:117-120.

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.

Foelix RF. 1996. Biology of spiders, 2nd ed. New York: Oxford Thieme. 330 pp.

Fogain R. and S. Graff S. 2011. First records of the invasive pest, Halyomorpha halys (Hemiptera: Pentatomidae) in Ontario and Quebec. J. Entomol. Soc. Ont. 142: 45–48.

Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 3: 294–299.

Förster, A. 1878, Kleine monographien parasitischer Hymenopteren. Verhandlungen des Naturhistorischen Vereins der Preussischen Rheinlande und Westfalens, *Bonn* 35:65

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.

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.

Fu, Y.X. and Li, W.H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. Genetics. 133. 693-709.

Fu, X.Y., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics. 147. 915-925.

Fujiie, A. 1985. Seasonal life cycle of Halyomorpha mista. Bulletin of Chiba-Ken Agricultural Experiment. 26: 87–93.

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.

Gajbe, u.A. 2008. Fauna of India and the adjacent countries-Spider (Arachnida : Araneae : Oxyopidae) Volume-Ill: 1-117 (Published by the Director, Zool. Surv.

ศรีปทุมมหาวิทยาลัย

India, Kolkata)

Galanihe, L. D., MUP. Jayasundera, A. Vithana, N. Asselaarachchi and G.W. Watson. 2010. Occurrence, distribution and control of the papaya mealybug, *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudoccidae), an invasive alien pest in Sri Lanka. Tropical agricultural Research and Extension 13(3): 2010.

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. *Cited* C. Simon, F. Frati, A.

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

Garzon-Orduna, I.J., I. Menchaca-Armenta, A. Contreras-Ramos, X. Liu & S.L. Winterton. 2016. The phylogeny of brown lacewings (Neuroptera: Hemerobiidae) reveals multiple reductions in wing venation. *BMC Evolutionary Biology* 16(1): 192.

Gaten, E. 1986. Life Cycle of *Lymnaea peregra* (Gastropoda: Pulmonata) in the Leicester Canal, U.K., with an Estimate of Annual Production. Hydrobiologia 135: 45-54.

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.

Gibson, G. A. P. 1993. Superfamily Mymarommatoidea and Chalcidoidea, pp. 570 – 655. *In :* Goulet H., and J.T. Huber, eds. *Hymenoptera of the World: An Identification Guide to Families*. Ottawa, Agric. Canada.

Gené, J. and J. Guarro. 1996. A new *Chaetomium* from Thailand. *Mycological Research* 100: 1005-1009.

Gehring, I., Wensing, A., Gernold, M., Wiedemann, W., Coplin, D. L., and Geider, K. 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.

Ghauri, M.S.K. 1967. New mango leafhoppers from the Oriental and Austro-oriental regions (Homoptera: Cicadellidae). The proceedings of the Royal Entomological Society of London, (B). 36 (11-12), 159-166.

Ghahari H; Tabari M; Ostovan H; Imani S; Parvanak K, 2009. Host plants of rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) and identification of Chilo species in Mazandaran province, Iran. Journal of New Agricultural Science, 5(17): Pe65-Pe74, en10. http://www.m iau.ac.ir/SubPages/Emagazine.html

Ghosh, S.K. 2000. Neuroptera Fauna of North-East India. *Rec. zool. Surv. India, Occ. Paper No*. 184: 1-179.

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.

Glass, N.L. and G.C. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved gene from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323–1330.

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 Natherlands.

Grabner, D. S., Mohamed, F. A. M. M., Nachev, M., Meabed, E. M. H., Sabry, A. H. A., and Sures, B. 2014. Invasion Biology Meets Parasitology: A Case Study of Parasite Spill-Back with Egyptian Fasciola gigantica in the Invasive Snail Pseudosuccinea columella. PLOS One 9(2): e88537.

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.

Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Systematic Biology, 59(3): 307-321.

Gurung, S., B. N. Mahto, S. Gyawali and T. B. Adhikari. 2013. Phetypic and molecular diversity of *Cochlibolus sativus* populations from wheat. *Plant Disease*. 97: 62-73.

General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the P.R. China. 2017. List of Import Plant Quarantine Pest of the P.R. China.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

http://www.aqsiq.gov.cn/xxgk_13386/zvfg/gfxwj/dzwjy/201706/t20170614_490858.htm. Accessed on July 30, 2017

Goel, C.H. and Parshar, D.P. 1979. Effect of temperature on the development of *Indoplanorbis exustus* (Mollusca: Pulmonata). *Journal of invertebrate pathology*.33: 378-380.

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.

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.

Gordon E, and Valk AGvan der, 2003. Secondary seed dispersal in *Montrichardia arborescens* (L.) Schott dominated wetlands in Laguna Grande, Venezuela. Plant Ecology, 168(2):177-190.

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.

González, V., E. Armijos and A. Garcés-Claver. 2020. Fungal endophytes as biocontrol agents against the main soil-borne. *Agronomy* 10: 1-20. doi.org/10.3390/agronomy10060820.

Goulet, H. and J.T. Huber. 1993. *Hymenoptera of the World: An Identification Guide to Families*. Ottawa, Agric. Canada. 667 pp.

Greathead, D.J. 1986. Parasitoids in classical biological control. pp. 289–318. *In*: Waage, J. and Greathead, D.J., eds. *Insect Parasitoids.* Academic Press, London.

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

Guo LiangZhen; Feng RongYang; Liang EnYi; Wei DongTian; Kang FuGuo, 2000. Infestation by Tetramoera schistaceana Snellen, Chilo infuscatellus Snellen and C. sacchariphagus of sugarcane plants and their control by chemicals. Plant Protection, 26(1):23-25.

Gravesen, S., J. C. Frisvad and R. A. Samson. 1994. Microfungi, 1st ed. Munksgaard. 168 p.

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.

Haliday. 1833. An essay on the classification of the parasitic Hymenoptera of Britain, which correspond with the Ichneumones minuti of Linnaeus. Entomological Magazine, 1:259-276.

Hardy, D.E. 1973. The fruit flies (Tephritidae-Diptera) of Thailand and bordering countries. *Pacific Insects Monographs.* 31: 1-353.

Hardy, D. E., & Adachi, M. S. 1954. Studies in the Fruit Flies of the Philippine Islands, Indonesia, and Malaya Part 1. Dacini (Tephritidae-Diptera).

Harris, T.S., L.J. Sandal., and T.O. Powers. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. Journal of Nematology 22: 518 –24.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/. NT. Nucleic Acids Symposium Series 41:95-98.

Harris K.M. 1990. Biology of *Chilo* species. Insect Science and its Application 11, 4/5, 467-477.

Harrison, D.L. and P.J.J. Bates. 1991. The mammals of Arabia, 2nd edition. Harrison Zoological Museum, Sevenoaks, Kent, 354 pp.

Harada J, Paisooksantivatana Y, Zunsontiporn, 1987. *Weeds in the Highlands of Northern Thailand*. National Weed Science Research Institute Project. Bangkok, Thailand: Department of Agriculture.

Hauben, L., L. Vauterin, J. Swings and E.R.B. Moore. 1997. Comparison of 16s Ribosomal DNA Sequences of All Xanthomonas Species. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 47: 328-335.

Haun, T., Salinger, M., Pachzelt, A., and Pfenninger, M. 2012. On the Processes Shaping Small-Scale Population Structure in *Radix balthica* (Linnaeus, 1758). Malacologia 55(2): 219-233.

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.

Hattori I & Siwi SS. 1986. Rice stemborers in Indonesia. JARQ 20, 25-30.

Hayat, M. 1989. A revision of the specie of *Encarsia* Foerster (Hymenoptera: Aphelinidae) from India and adjacent countries. *Oriental Insects* 23: 1 – 131

Hayat, M. 2012. Additions to the Indian Aphelinidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) - III: the genus *Encarsia* Förster. *Oriental Insects*. 45(2-3):206 – 226.

Hernández, L.M. and G.M. Stonedahl. 1999. A review of the economically important species of the genus *Orius* (Heteroptera: Anthocoridae) in East Africa. *Journal of Natural History* 33: 543-568.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Hein, J., T. Jiang, L. Wang and K. Zhang. 1996. On the complexity of comparing evolutionary trees. *Discrete Applied Mathematics.* 71: 153-169.

Hemmen, J. and Hemmen, C. 2001. Akktualisierte liste der terrestrischen gastropoden Thailands. Schr. Malakozool. 18:53-70.

Heraty J.M. and A. D. Polaszek. 2000. Morphometric Analysis and Descriptions of Selected Species in the Encarsia strenua group (Hymenoptera: Aphelinidae). *J. HYM. Res.* Vol. 9(1)

Hill, D. S. 2008. Pests of Crops in Warmer Climates and Their Control. Springer Science + Business Media, Berlin. 704 pp.

Hodda, M., N. Banks and S. Singh. 2012. Nematode threats in the NAQS region. CSIRO Canberra, Australia. 82 p.

Hodgson, C.J. 2012. Comparison of the morphology of the adult males of the rhizoecine, phenacoccine and pseudococcine mealybugs (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea), with the recognition of the family Rhizoecidae Williams. Zootaxa 3291:1–79

Hoebeke, E.R. and M.E. Carter. 2003. Halyomorpha halys (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae). A polyphagous plant pest from Asia newly detected in North America. Proceedings of the Entomological Society of Washington. 105(1): 225–237

Hoffmann, W.E. 1931. A pentatomid pest of growing bean in south China. Peking Nat. Hist. Bull. 5: 25–26

Hongsaprug, W. 1984. Taxonomic study of mango leafhoppers in Thailand. Mitteilungen der schweizerischen Entomologischen Gesellschaft 57 (4): 423-24.

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.

Holloway, J. D. 1986. The Moths of Borneo Part 1. *The Malayan Nature Journal* 40: 47-156.

Hominick, W.M., A.P. Reid, D.A. Bohan and B.R. Briscoe. 1996. Entomopathogenic nematodes-biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. Biocontr. Sci. Technol. 6: 317-331.

Hominick, W.M. 2002. Biogeography, pp. 115-143. *In* R. Gaugler, ed. Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK.

Hori, S. 1911. A bacterial leaf-disease of tropical orchids. Zbl. Bakt. Parasitenk. Abt. II. 31: 85-92.

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.

Hedin, M.C. and W.P. Maddison. 2001. A combined molecular approach to phylogeny of the jumping spider family Dendry-phantinae (Araneae: Salticidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 18, 386–403.

Hernández-Ortiz, V., A.F Bartolucci, P. Morales-Valles, D. Frias and D. Selivon. 2012. Cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae): a multivariate approach for the recognition of South American morphotypes. *Annals of the Entomological Society of America* 105: 305-318.

Hentz, N. M. 1832. On North American spiders. Silliman's Journal of Science and Arts 21: 99-122.

Hentz, N. M. 1845. Descriptions and figures of the araneides of the United States. Boston Journal of Natural History 5(2): 189-202, pl. 16-17.

Hepert, P.D.N. and T.R. Gregory. 2005. The promise of DNA Barcording for taxonomy. *Systematic Biology*. 54(5):852–859

de Hoog, G.S. and A.H.G. Gerrits van den Ende. 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. *Mycosciences* 41: 183-189.

Hunova, K., Kasny, M., Hampl, V., Leontovyc., R., Kubena, A., Mikes, L. and Horak, P. 2012. *Radix* spp.: Identification of Trematode Intermediate Hosts in the Czech Republic. Acta Parasitologica 57(3): 273-284.

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.

Hsu T. W., Chiang T.Y., Peng J.J. Asystasia gangetica (L.) Anderson subsp. micrantha(Nees) Ensermu (Acanthaceae), A Newly Naturalized Plant in Taiwan. Taiwania, 50 : 117-122.

Husain M & Begum N. 1985. Seasonal stem borer (SB) population fluctuations in Mymensingh, Bangladesh. *International Rice Research Newsletter* 10(5), 22.

Ishida S, Kikui H & Tsuchida K. 2000. Seasonal prevalence of the rice stem borer moth, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) feeding on water oats (*Zizania latifolia*) and the influence of its two egg parasites. *Research Bulletin of the Faculty of Agriculture, Gifu University* 65, 21-27.

Irungbam, J.S., M.S. Chib and A.V. Solovyev. 2017. Moyhs of the Family Limacodidae Duponchel, 1845 (Lepidoptera: Zygaenoidea) from Bhutan wiyh six new Generic and 12 new Species Records. *Journal of Threatened Taxa* 9(2): 9795-9813.

Jackson, R R and Pollard, S.D. 1996. Predatory behavior of jumping spiders. Annu Rev Entomol. 41:287-308.

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.

Jaklitsch, W.M. and H. Voglmayr. 2015. Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in Mycology* 80: 1-87.

Jansen, M.G.M. 2003. A new species of *Rhizoecus* Kunkel d'Herculais (Hemiptera, Coccoidea, Pseudococcidae) on bonsai trees. Tijdschrift voor Entomologie 146: 297–300

Jansen, M.G.M. and Westenberg, M. 2015. Morphological and molecular studies of a new species of the root mealybug genus *Ripersiella* Tinsley (Hemiptera: Coccoidea: Rhizoecidae) from greenhouses in The Netherlands and a first incursion of the American root mealybug Rhizoecus keysensis Hambleton in Europe. Tijdschrift voor Entomologie 158 :1-19

Javaid, M. M. and A Tanveer. 2014. *Germination ecology of* Emex spinosa *and* Emex australis*, invasive weeds of winter crops*. *Weed Research*. 54 issue-6: 65–575.

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)

Jeon, S. J., T. T. T. Nguyen and H. B. Lee. 2015. Phylogenetic Status of an Unrecorded Species of *Curvularia*, *C. spicifera*, Based on Current Classification System of *Curvularia* and *Bipolaris* Group Using Multi Loci. *Mycobiology* 43(3): 210-217.

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.

Jess, S., H. Schweuzer and M. Kilpatrick. 2005. Mushroom applications, pp. 191-213. *In* Grewal, P.S., R.U. Ehlers and D.I. Shapiro-Ilan, eds. Nematodes and Biological Control Agents. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK.

Johnson N.F. 2011. A collaborative, integrated and electronic future for taxonomy. *Invertebrate Systematics*, 25:471–475

Johnson, N. F. 2019. *Hymenoptera* (Online). Available. http://hol.osu.edu/ (20 Jan. 2019).

Johnson, N.F. 1984. Systematics of Nearctic Telenomus: classifi-cation and revisions of the podisi and phymatae species groups (Hymenoptera: Scelionidae). *Bulletin of the Ohio Biological Survey*. 6: 1–113.

Johnson, N. F. 2014. Hymenoptera (Online). Available. http://hol.osu.edu/ (2 April 2018).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Johnson, N.F., L. Masner, L. Musetti, L., S. Van Noort, K. Rajmohana, D.C. Darling, A.E. Guidotti and A. Polaszek. 2008. Revision of world species of the genus *Heptascelio* Kieffer (Hymenoptera: Platygastroidea, Platygastridae). *Zootaxa*. 1776: 1–51.

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.

Jones R.A.C. and M. Sharman. 2005. Capsicum chlorosis virus infecting Capsicum annuum in the East Kimberley region ofWestern Australia. Australasian Plant Pathology, 2005, 34, 397–399.

Juraimi, A.S., M.S. Ahmad-Hamdani, A.R. Anuar, M. Azmi, M.P. Anwar and M. K. Uddin. 2012. Effect of water regimes on germination of weed seeds in a Malaysian rice field. *Australian journal of crop science*. 6(4): 598-605.

Kadota, I., K. Uehara, H. Shinohara and K. Nishiyama. 2000. Bacterial blight of Welsh onion: a new disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *allii* pv. nov. *J Gen Plant Pathol* 66: 310–315.

Kakishima, M., P. Lohsomboon, Y. Ono, L. Manoch and V. Niphon. 1988. *Newinia thaiana*, a new rust fungus from Thailand. *Mycologia* 80: 397-400.

Kalshoven LGE. 1981. Pest of Crops in Indonesia. P.T. Ichtiar Baru-van Hoeve, Jakarta.

Kanesharatnam N and Benjamin, S.P.. 2019. Multilocus genetic and morphological phylogenetic analysis reveals a radiation of shiny South Asian jumping spiders (Araneae, Salticidae). ZooKeys 839: 1–81.

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.

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.

Kaplan, D. T., Thomas, W. K., Frisse, L. M., Sarah, J. L., Stanton, J. M., Speijer, P. R., Marin, D. H., and Opperman, C. H. 2000.Phylogenetic Analysis of Geographically Diverse Radopholus similis via rDNA Sequence Reveals a Monomorphic Motif. *Journal of Nematology*. 32(2): 134–142.

Karsch, F. 1878. Über einige von Herrn JM Hildebrandt im Zanzibargebiete erbeutete

Arachniden. Zeitschrift für die Gesammten Naturwissenschaften 51: 311-322.

Katoh, H, A. Isshiki, A. Masunaka, H. Yamamoto and K. Akimitsu. 2005. Abstracts & Program. The Second Asian Conference on Plant Pathology 2005, 25-28 June 2005, National University of Singapore, Singapore. 113 p.

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

Karimi, J., M. Hassani-Kakhki and M. M. Awal. 2010. Identifying thrips (Insecta: Thysanoptera) using DNA Barcodes. Journal of Cell and Molecular Research. 2(1): 35-41.

Karssen, G. 2002. The Plant-Parasitic Nematode Genus *Meloidogyne* Goldi, 1892 (Tylenchida) in Europe. Leiden, Netherlands: Brill.

Kaset, C., Eursitthichai, V., Vichasri-Grams, S., Viyanant, V., and Grams, R. 2010. Rapid Identification of Lymnaeid Snails and Their Infection with *Fasciola gigantica* in Thailand. Experimental Parasitology 126: 482–488.

Katoh, K. and Standley, D. M. 2013. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. Molecular biology and evolution 30(4): 772-780.

Kathuria, J.B., Rao, R.S., and Hiregaudar. 1956. Some observations on the bionomics of *Indoplanorbis exustus* desm (Gastropoda). *Bobbay Veterinary collage magazine*. 5:355.

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.

Kern, F.D. 1913. The nature and classification of plant rusts. *Transactions of the American Microscopical Society* 32:41-67.

Kepler, Humber, Bischoff and S.A. Rehner .2014. Mycologia 106(4): 824

Keyserling, E. 1884. Die Spinnen Amerikas II. Theridiidae. Nürnberg 1, 1-222.

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.

Kiew, R. and K. Vollisen. 1997. Asystasis(Acanthaceae) in Malaysia. JOOR: Kew Bulletin, 52 (4):965-971.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

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.

Kim, S. T. and Lee, S. Y. 2014. Arthropoda: Arachnida: Araneae: Clubionidae, Corinnidae, Salticidae, Segestriidae. Spiders. Invertebrate Fauna of Korea 21(31): 1-186.

Kim, Y.H., J.H. Kim., H.W. Kim and Y.W. Byun, 2008. Biological Characteristics of Two Natural Enemies of Thrips, *Orius strigicollis* (Poppius) and *O. laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae). *Korean Journal of Applied Entomology* 47(4): 421-429.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16:111-120.

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.

Kitthawee, S. and N. Rungsri. 2011. Differentiation in wing shape in the *Bactrocera tau* (Walker) complex on a single fruit species in Thailand. *Science Asia* 37: 308-313.

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.

Kirk, H., Dorn, S., and Mazzi, D. 2013. Molecular Genetics and Genomics Generate New Insights into Invertebrate Pest Invasions. Evolutionary Applications 6: 842–856.

Kirk, P.M., P.E. Cannon, J.C. David and J.A. Stalpers. 2008. *Dictionary of The Fungi*. Egham, UK: CABI Bioscience. 655 pp.

Koch, C. L. 1846. Die Arachniden. J. L. Lotzbeck, Nürnberg, Dreizehnter Band, pp. 1-234, pl. 433-468 (f. 1078-1271); Vierzehnter Band, pp. 1-88, pl. 467-480.

Koh, JKH. 1989. A Guide to Common Singapore Spiders. Singapore:; Singapore Science Cemter. 160 pp.

Koh, J.H. and Ming, L.T. 2013. Biodiversity in the Heart of Borneo: Spiders of Brunei Darussalam. Natural History Publications (Borneo) ISBN: 978-983-812-145-3367 pp.

Koh, J.H. and Nicky, B. 2019. Borneo Spiders A Photographic Field Guide. Sabah Forestry Department, Kota Kinabalu. ISBN: 9789670180205

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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/

Kokaew, J. 2011. *Diversity and bioactivities of endophytic fungi from Thai forests*. Ph.D.Thesis, Kasetsart University. 202 p.

Kolmer, J.A., Ordonez, M.E. and J.V. Groth. 2001. The Rust Fungi. In *eLS*: John Wiley & Sons, Ltd. 8 p.

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)

Kotze, I.M. 1981. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. Plant Disease 65:945-950.

Konno Y & Tanaka F. 1996. Mating time of the rice feeding and water oat feeding strains of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* 40, 245-247.

Kongchuensisn, 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.

Komai F., Y. Yoshiyasu, Y. Nasu and T. Saito. 2011. A Guide to the Lepidoptera of Japan. Tokai University, Japan. 1305 pp.

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

Krosch, M.N., Schutze, M.K., Armstrong, K.F., Boontop, Y., Boykin, L.M., Chapman, T.A., Englezou, A., Cameron, S.L. & Clarke, A.R. 2013. Piecing together an integrative taxonomic puzzle: microsatellite, wing shape and aedeagus length analyses of *Bactrocera dorsalis s.l.* (Diptera: Tephritidae) find no evidence of multiple lineages in a proposed contact zone along the Thai/Malay Peninsula. *Systematic Entomology* 38: 2-13.

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.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Krystufek, B and V. Vohralik. 2016. *Mus macedonicus* (errata version published in 2017). The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T13966A115117069.

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.

Knight, W.J. 1965. Techniques for use in the identification of leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae) Entomologist' s Gazette, 1965; 16: 129-136.

Knight, W.J. 2010. Leafhoppers (Cicadellidae) of the Pacific. An annotated systematic checklist of the leafhoppers recorded in the Pacific during the period 1758-2000. (Online). Available. http://www. Tymbal.org/publicat/knight catalogus.pdf. (April 24. 2016)

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.

Krawczyk , K., J. Kamasa, A. Zwolinska and H. Pospieszny. 2010. First report of *Pantoea anantis* associated with leaf spot disease of maize in Poland. *J. Plant Pathol*. 92: 807-811.

Kulsantiwong, J., Prasopdee, S., Ruangsittichai, J., Ruangjirachuporn, W., Boonmars, T., Viyanant, V., Pierossi, P., Hebert, P. D. N., Tesana, S. 2013. DNA Barcode Identification of Freshwater Snails in the Family Bithyniidae from Thailand. PLOS ONE 8(11): e79144.

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.

Kumar, S., Stecher G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol. Biol. Evol. 33(7):1870–1874

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.

Kuniata LS. 1998. Borer damage and estimation of losses caused by *Sesamia grisescens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) in sugarcane in Papua New Guinea. *International Journal of Pest Management* 44, 93-98.

Kuroko, H. and A. Lewvanich. 1993. Lepidopterous Pests of Tropical Fruit Trees in Thailand (with Thai Text). Japan International Cooperation Agency, Bangkok. 132 pp.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Kuznik-Kowalska, E., Pokryszko, B. M., Proćków, M., and Oczkowska, M. 2013. On the Population Dynamics, Reproductive Biology and Growth of *Succinea putris* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda: Pulmonata: Succineidae). Folia Malacologica 21: 215-224.

Ladd, H. L. A., and Rogowski, D. L. 2012. Egg Predation and Parasite Prevalence in the Invasive Freshwater Snail, Melanoides tuberculata (Müller, 1774) in a West Texas Spring System. Aquatic Invasions 7(2): 287-290.

Lal, M., S. Kumar, M. Ali, A Khan, V. Singh and S. Murti. 2013. Host range, susceptibility period of *Curvularia lunata* causing leaf spot of black gram and germplasm screening. *Agriways* 1(2) : 142-146.

Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. Pp. 115–176 in E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. New York, NY: John Wiley.

Lang, J. M. , E. DuCharme, J. Ibarra Caballero, E. Luna, T. Hartman, M. Ortiz-Castro, K. Korus, J. Rascoe, T.A. Jackson-Ziems, K. Broders and J.E. Leach. 2017. Detection and Characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov. Causing Bacterial Leaf Streak of Corn in the United States. Phytopathology 107: 1312–1321.

LaSalle, J. and I.D. Gauld 1993. Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. pp. 1–26. *In*: LaSalle J., Gauld I.D., eds. *Hymenoptera and Biodiversity*. CAB International, Wallingford, UK.

Laws, H.M.1973.The chromosome of some Australian camaenid land snails. *Cytologia*. 38:p.229-235.

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.

Lee, S. and R.T. Hanlin. 1999. Phylogenetic relationships of *Chaetomium* and similar genera based on ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 91: 434-442.

Lecoq, H. 2003. Cucurbits. In G. Loebenstein, and G. Thottapilly (Eds.), Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries (pp. 665–688). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

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.

Lekagul, B. and A.M. Jeffery. 1977. Mammal of Thailand. Printed at Kurusapha Ladprao Press by Nai kamthon Sathirakul, Bangkok. 758 p.

Lethierry, L.F., 1889. Definitions of three new Homoptera. Jour. Asiatic Soc. Bengal. 58: 252-253.

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.

Levri, E. P., Kelly, A. A., and Love. E. 2007. The Invasive New Zealand Mud Snail (Potamopyrgus antipodarum) in Lake Erie. Journal of Great Lakes Research 33: 1–6.

Levri, E. P., Krist, A. C., Bilka, R., and Dybdahl, M. F. 2014. Phenotypic Plasticity of the Introduced New Zealand Mud Snail, Potamopyrgus antipodarum, Compared to Sympatric Native Snails. PLOS One 9(4): e93985.

Li, K-Y., Liu, Z-W., Hu, Y-H., and Yang, H-W. 2009. Snail Herbivory on Submerged Macrophytes and Nutrient Release: Implications for Macrophyte Management. Ecological Engineering 35: 1664–1667.

Li, Q., P. Tan, Y. Jiang, K.D. Hyde, E.H.C. McKenzie, A.H. Bahkali, J. Kang amd Y. Wanf. 2013. A nonel *Trichoderma* species isolated from soil in Guizhou, *T. guizhouense*. *Mycological Progress* 12: 167-172.

Librado, P., and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data. Bioinformatics 25**:** 1451-1452.

Li Cs. 1990. Status and control of Chilo spp., their distribution, host range and economic importance in Oceania. Insect Science and its application 11, 4/5. 535-539.

Li WJ. 1985. Efficacy of *Chelonus munakatae* against the millet borer. *Chinese Journal of Biological Control* 1, 41.

Lim G.S, S.S. Sastroutomo, W.H. Loke.1999. Workshop on leafminers of vegetables in Southeast Asia. CABI-SEARC.

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.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Lindquist, E. E. 1986. The wold genera of Tarsonemidae (Acari: Heterostigmata): A morphological, Phylogenetic, and systematic revision, whith a reclassification of family-Group Taxa in the Heterostigmata. The entomological society of Canad. 5165p.

Linnakoski R., ZW., De Beer, J. Ahtiainen, E. Sidorov, P. Niemelä, A. Pappinen, and M.J., Wingfield. 2010. *Ophiostoma* spp. associated with pine– and spruce–infesting bark beetles in Finland and Russia. Persoonia 25**:** 72–93.

Litovitz, T. L., W. Klein-Schwartz, K.S. Dyer, M. Shannon, S. Lee, M. Powers. 1998. Annual reports of the American Association of Poison Control Centers toxic exposure surveillance system. American Journal of Emergency Medicine. 16:443–497.

Litsinger JA 1977. *Chilo suppressalis* (Wlk.). In *Tropical Crops/Diseases, Pests and Weeds*. Paul Parey, Berlin and Hamburg. 450-452.

Liu, K.L., A. Porras-Alfaro, C.R. Kuske, S.A. Eichorst and G. Xie. 2012. Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 1523-1533.

Liu, M., Liu, X., Li, X., Zhang, D., Dai, L. and Tang, Q. 2015. Complete genome sequence of a Chinese isolate of pepper vein yellows virus and evolutionary analysis based on the CP, MP and RdRp coding regions. *Arch. Virol*. 161(3):677-683.

Liu, Y.J., S. Whelen and B.D. Hall. 2000. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerse II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16:1799-1808.

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.

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.

Lohsomboon, P., Manoch, L. and N. Visarathanonth. 1992. The rust fungi of Thailand 1.on Graminicolous plants. *Kasetsart Journal: Natural Science* 26:244-256.

Lohsomboon, P., Manoch, L., Visarathanonth, N., Kakishima, M., Ono, Y. and S. Sato. 1986. Materials for the rust flora in Thailand II. *Transaction of the Mycological Society of Japan* 27:271-281.

Lohsomboon, P., Kakishima, M. and Y. Ono. 1994. A monograph of *Sphaerophragmium* (Uredinales). *Mycological Research* 98:907–919.

Lorsuwan, C., Tontyaporn, S., Virasathanonth, N., Manoch, L. and M. Kakishima. 1984. Materials for the rust flora in Thailand I. *Transaction of the Mycological Society of Japan* 25:57-65.

Lot, H., Chovelon, V., Souche, S., and Delecolle, 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.

Lotz, L.N. 1994. Revision of the genus *Latrodectus* (Araneae: Theridiidae) in Africa. Navorsinge van die Nasionale Museum Bloemfontein. 10 (1): 1-60.

Louro, D., Vicente, M., Vaira, A.M., Accotto, G.P. and Nolasco, G., 2000. *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (Genus *Crinivirus*) Associated with the yellowing disease of cucurbit crops in Portugal. *Plant Dis*. 84(10): 1156-1156.

Logunov D.V. and Azarkina, G.N. 2007. New species of and records for jumping spidersof the subfamily Spartaeinae (Aranei: Salticidae). Arthropoda Selecta 16 (2): 97–114.

Logunov, D. V. and Marusik, Y. M. 2014. Taxonomic notes on the genus *Eupoa* Żabka, 1985 (Arachnida, Araneae, Salticidae). ZooKeys 410: 63-93.

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.

López-López, E. Sedeño-Díaz, J. E., Vega, P. T., and Oliveros, E. 2009. Invasive Mollusks Tarebia granifera Lamarck, 1822 and Corbicula fluminea Müller, 1774 in the Tuxpam and Tecolutla Rivers, Mexico: Spatial and Seasonal Distribution Patterns. Aquatic Invasions 4(3): 435-450.

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.

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.

Lucas, H. 1846. Histoire naturelle des animaux articulés. In: Exploration scientifique de

l'Algérie pendant les années 1840, 1841, 1842 publiée par ordre du Gouvernement et avec le concours d'une commission académique. Paris, Sciences physiques, Zoologie 1, 89-271, pl. 1-17.

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.

Lubigan, R.T and B.L. Mercado. 1974. Effect of different densities of *Scirpus maritimus* on yield of lowland rice. *In Philippine Weed Science Bulletin Vol. 1 No. 2*: 60-63.

Luna L.Z., A.K. Watson T.C. Paulitz. 2002. Reaction of Rice (*Oryza sativa*) Cultivars to Penetration and Infection by *Curvularia tuberculata* and *C. oryzae*. *Plant disease* 86(5): 470-476

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.

Mbarga, J.B., G.M. Ten Hoopen, J. Kuaté, 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.

Mackenzie, A.M., M.Nolan, K.J.Wel, M.A. Clements, D.Gowanlock, B.J.Wallace and A.J.Gibbs. 1998 . Ceratobium mosaic Potyvirus : another virus from orchids. Archives of Virology. Vol 143 (5) 903-914.

Machado, A.C.Z. and M.M. Inomoto. 2001. Host status of eighteen vegetable crops for *Pratylenchus brachyurus*. Nematropica. 31:259-265.

Maddison W.P. 1988. A revision of jumping spider species groups formerly placed in the genus *Metaphidippus*, with a discussion of salticid phylogeny (Araneae). PhD thesis, Harvard University.

Maddison W.P. and Hedin M.C. 2003. Jumping spider phylogeny (Araneae: Salticidae). Invertebrate Systematics. 17: 529-549.

Maddison W.P., Bodner M. R. and Needham K.M. 2008. Salticid spider phylogeny revisited, with the discovery of a large Australasianclade (Araneae: Salticidae). Zootaxa 1893: 49–64.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Makarkin, V.N. 1993. The Brown Lacewings from Vietnam (Neuroptera: Hemerobiidae). *Tropical Zoology* 6: 217–226.

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.

Marco, C.F. and Aranda, M.A., 2005. Genetic diversity of a natural population of *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. *J. Gen. Virol*. 86(Pt 3): 815-822.

Maina, S., Edwards, O.R., Jones, R.A.C., 2016. First complete genome sequence of *Pepper vein yellows virus* from Australia. *Genome Announcements* 4(3), e00450-00416.

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.

Maltz, T. M. 2005. Life Cycle and Population Dynamics of *Helicodonta obvoluta* (O. F. Müller, 1774) (Gastropoda: Pulmonata: Helicidae).

Maldonado-Capriles, J. 1973. Studies on Idiocerine leafhoppers: X. Idioscopus nitidulus (Walker), new combination (Homoptera: Cicadellidae). Proceedings of the Entomological Society of Washington. 75(2): 179-181.

Maldonado – Capriles, J., 1974. Studies on idiocerine leafhoppers XII. *Idioscopus clavosignatus* spec. nov. (Homoptera, Cicadellidae Zoologische Mededelingen. 48(15): 163-167

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.

Mankau, R. 1975a. *Bacillus penetrans* n. comb. causing a virulent disease of plant-parasitic nematodes. Journal of Invertebrate Pathology 26:333–339.

Mankau, R. 1975b. Prokaryote affinities of *Duboscqia penetrans*, Thorne. Journal of Protozoology 21:31–34.

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, E. Chukeatirote and K. D. Hyde. 2012. Two new *Curvularia* species from northern Thailand. *Sydowia* 64: 255-266.

Manamgoda, D. S., L. Cai, E. H. C. McKenzie, P.W. Crous, H. Madrid, E.i Chukeatirote, R. G. Shivas, Y. P. Tan and K. D. Hyde. 2012. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* Complex. *Fungal Diversity* 56: 131–144.

Manamgoda D.S., A.H. Madri, A.Y. Rossman, L.A. Castleburyd, E. Chukeatrirote and K.D. Hyde. 2014. The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology* 79: 221–288.

Maneesakorn, P., P.S. Grewal and A. Chandrapatya. 2010a. *Steinernema minutum* sp. nov. (Rhabditida: Steinernematidae): a new entomopathogenic nematode from Thailand. Int. J. Nematol. 20: 19-34.

Maneesakorn, P, R. An, P.S. Grewal and A. Chandrapatya. 2015. *Heterorhabditis somsookae* sp. nov. (Rhabditida: Heterorhabditidae): a new entomopathogenic nematode from Thailand. Int. J. Nematol. 25: 1-11.

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. Chiang Mai, Thailand.

Marin-Felix, Y., C. Senwanna, R. Cheewangkoon and P.W. Crous. 2017. New species and records of *Bipolaris* and *Curvularia* from Thailand. *Mycosphere* 8(9): 1555–1573.

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.

Masner, L. 1976. Revisionary notes and keys to world genera of Scelionidae (Hymenoptera: Proctotrupoidea). *Memoirs of the Entomological Society of Canada*. 97: 1–87.

Masner, L. 1980. Key to genera of Scelionidae of the Holarctic region, with descriptions of new genera and species (Hymenoptera: Proctotrupoidea). *Memoirs of the Entomological Society of Canada*. 1(13): 1–54.

Matile-Ferrero, D., J. Etienne, and G. Tiego. 2000. Introduction de deux ravageurs d'importance pour la Guyane francaise*: Maconellicoccus hirsutus et Paracoccus marginatus* (Hem., Coccoidea, Pseudococcidae). Bullentin de la Societe entomogigue de France 105: 479-485.

Matsumura, S., 1907. Die Cicadinen Japans. Annotationes Zoologicae Japonenses. Tokyo, 6: 83-116.

Miah MAH, Karim MA, Khuda AKMQE, Alam MZ & Islam MN. 1983. Control of sugarcane topshoot borer and stemborer. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 53, 590-592.

Minkenberg OPJM. 1988. Dispersal of *Liriomyza trifolii*. Bulletin of the. European and Mediterranean.Plant Protection Organisation 18, 173–182.

Mead AR. 1961. The Giant African Snail; a Problem in Economic Malacology. University of Chicago Press, 257 pp.

Meinander, M. 1972. A Revision of the Family Coniopterygidae (Planipennia). *Acta zoological Fennica* 136: 1-357.

Meng, Q.P., H. Long, and J.H. Xu. 2004. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. Acta Phytopathologica Sinica 34: 204 –10.

Melichar, L., 1903. Homopteren-Fauna von Ceylon. Verlag von Felix L. Dames. Berlin. Pp. i-iv, 1-248.

Mei-ju Lin and Wen-Hsiung Ko. 2008. Occurrence of isolates of *Phytophthora colocasiae* in Taiwan with homothaiiic behavior and its significance. *Mycologia*. 100(5) : 727-734.

Meyrick E. 1932. Crambinae exotic. *Microlepidoptera* 4, 321-352.

Minaei, K. and L. A. Mound. 2008. The Thysanoptera Haplothripini (Phlaeothripidae) of Iran. Journal of Natural History 42: 2617–2658.

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.

Mikó, I., L. Vilhelmsen, N.F. Johnson, L. Masner and Z. Pénzes 2007. Skeletomusculature of Scelionidae (Hymenoptera: Platygastroidea): head and mesosoma. *Zootaxa.* 1571: 1–78.

Mills, N. 2010. Egg parasitoids in biological control and integrated pest management. pp. 389–409. *In*: Consoli, F.L. et al., eds. *Egg parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*. Springer Science & Business Media B.V. US.

Miller, D. R., D. J. Willaims and A. B. Hamon. 1999. Notes on a new mealybug pest in Florida and the Caribbean: The papaya mealybug, *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink. Insecta Mundi 13: 179-181.

Miller, D.R. and Davidson, J.A. 1990. List of the Armored Scale Insect Pests, pp.299-306. *In* : D. Rosen, ed., *The Armored Scale Insects, Their Biology, Natural Enemies and Control, Vol. B*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

Miller, D.R. and Davidson, J.A. 2005. Armored Insect Pests of Trees and Shrubs (Hemiptera: Diaspididae). Cornell University Press, New York. 442 pp

Morin, L., Aveyard, R., Batchelor, K.L., Evans, K.J., Hartley, D., and M., Jourdan. 2006. Additional strains of *Phragmidium violaceum* released for the biological control of blackberry. Page 565-568. *In: 15th Australian Weeds Conference Proceedings: Managing Weeds in a Changing Climate*. September 24-28, 2006. the Adelaide Convention Centre. Adelaide, South Australia.

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

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.

Mound L.A. and S. H. Hasley. 1978. *Whitefly of the World, a systemic atalogue of th Aleyrodidae (Homoptera) with host plant and natural enemy data*. British Museum (Natural History), London and John Wiley and Sons, Chichester UK.

Muenscher, W.C. 1980. *Weeds. 2nd edition*. Cornell University Press, Ithaca and London.

Murakami, R., Kawano, S., 2017. A natural host and diversity of *Pepper vein yellows virus* in Japan. JARQ 51(1), 59-68.

Murakami, R., Nakashima, N., Hinomoto, N., Kawano, S., Toyosato, T., 2011. The genome sequence of *Pepper vein yellows virus* (family *Luteoviridae*, genus *Polerovirus*). *Arch. Virol*. 156(5), 921-923.

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.

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.

Müller, G.J., 1993. Black and brown widow spider bites in South Africa—a series of 45 cases. South African Medical Journal. 83, 399–405.

Muenscher, W. C. 1980. Weeds. 2nd edition. Cornell University Press, Ithaca and London.

Musser, G.G. 1979. Results of the Archbold Expeditions. No 102. The species of Chiropodomys arboreal mice of Indochina and the Malay Archipelago. Bulletin of the American Museum of Natural History 162: 381–445.

Musser, G.G. and M.D. Carleton. 2005. Family Muridae. In: Wilson DE, Reeder DM (Eds) Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference, 3rd ed. Johns Hopkins University Press Baltimore Maryland: 894–1531.

Mycobank. 2020. *Hypoceraceae*. (online data). source: https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search (18 February 2564).

Mycobank, 2019. *Curvularia*. (Online). Available. https://www.mycobank.org (February 19, 2019)

Nabhitabhata, J. 2009. *Checklist of Mollusca Fauna in Thailand*. Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning Bangkok, Thailand. 576 p.

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.

Nagahara, Y., T. Hiraoka and K. Iwabuchi. 2000. Growth-promoting effects of ecdysteroids and juvenile hormone on in vitro development of the larval endoparasitoid, *Venturia canescens* (Hymenoptera: Icheneumonidae). *J. Ins. Physio*. 46: 467-476.

กรมวิชาการเกษตร

Nakahara, S. .1994. The genus Thrips Linnaeus (Thysanoptera: Thripidae) of the New World. United States Department of Agriculture. Technical Bulletin, 1822, 1–183.

Nakamura, H.K. 1985.A review of molluscan cytologenetic information based on the CISMOCH:Computerized index system for molluscan chromosomes, Bivalvia, polyplacophora and cephalopoda . *Venus* 44(3): 199-225.

Nakatani, Y. 2015. Revision of the Lygaeid genus *Nysius* (Heteroptera: Lygaeidae: Orsillinae) of Japan, with description of a new species. *Entomological Science* 18, 435–441.

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.

Namkung, J. 2002. The spiders of Korea. Kyo-Hak Publishing Co., Seoul, 648 pp.

Napompeth, B. 1973. Ecology and Population Dynamics of the Cron Planthopper, *Peregrinus maidis* (Ashmead) (Homoptera: Delphacidae), in Hawaii: Ph.D. Dissertation, University of Hawaii.

Nasu Y., T. Hirowatari, Y. Kishida 2013, The standard of moths in Japan IV, Gakken Education Publishing, Tokyo, 552 pp.

Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia Univ. Press, New York.

Nei, M. and S. Kumar. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York. 333 pp.

Nene, Y.L. 2001. Mango through millennia. Asian Agri. History, 5(1) : 39-68.

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.

Nelson, S. M., and Nibling, F. 2013. Monitoring invasive quagga mussels, Dreissena rostriformis bugensis (Bivalvia: Dreissenidae), and other benthic organisms in a western US aqueduct. Management of Biological Invasions 4(1): 51–59.

Neupane FP. 1990. Status and control of *Chilo* spp. on cereal crops in southern Asia. Insect Science and its application 11, 501-534.

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

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.

Nguyen, K.B. and D.J. Hunt. 2007. Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacteria Symbionts. Brill Academic Publishers. 816 pp.

Norvell, L.L., D.L. Hawksworth, R.H. Petersen and S.A. Redhead. 2010. Fungal nomenclature. *Mycotaxon* 113: 503-514.

Nyffeler, M., D. A. Dean and W. L. Sterling. 1987. Predation by Green Lynx Spider, *Peucetia viridans* (Araneae: Oxyopidae), Inhabiting Cotton and Woolly Croton Plants in East Texas. Environmental Entomology, Vol. 16, No. 2, pp. 355-359(5)

Nylander, J. A., Wilgenbusch, J. C., Warren, D. L. and D. L., Swofford. 2008. AWTY (are we there yet?): a system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetics. *Bioinformatics* 24: 581-583.

Oke, O. C. and Alohan, F. I. 2006. The land snail diversity in a square kilometer of tropical rainforest in Okomu National Park, Edo State, Nigeria. African Scientist 2006;7(3):135-142.

Ono, H. 2009. The spiders of Japan with keys to the families and genera and illustrations of the species. Tokai University Press. p 558-588.

O'Bannon, J.H. and Tomerin, A.T.1977. Control of burrowing nematode, *Radopholus similis* with DBCP and Oxamyl. Plant Disease Reporter61,450-455 *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.

O'Donnell, K and E. Cigelnik. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7: 103–116. doi.10.1006/mpev.1996.0376.

O'Donnell, K., H.C. Kistler, E. Cigelnik and R.C. Ploetz. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and

mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2044–2049.

Okajima, S. 2006. The Insects of Japan 2: The Suborder Tubulifera (Thysanoptera). The Entomological Society of Japan, Touka Shobo Co. Ltd., Fukuoka. 720 p.

Okuda, M., Okazaki, S., Yamasaki, S., Okuda, S. and Sugiyama, M., 2010. Host range and complete genome sequence of *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a new member of the genus *Crinivirus*. *Phytopathology* 100(6): 560-566.

Orfanidou, C., Maliogka, V.I. and Katis, N.I., 2014. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in cucumber, melon, and watermelon in Greece. *Plant Dis.* 98(10): 1446-1446.

Orr, D. B. 1988. Scelionid wasps as biological control agents: a review. *The Florida Entomologist.* 71(4): 506-528.

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 Mycolological Society* 91: 467–472.

Oostendorp, M., D.W. Dickson, and D.J. Mitchell. 1990. Host range and ecology of isolates of *Pasteuria* spp. from the southeastern United States. Journal of Nematology 22:522–531.

Oostendrop, M., D.W. Dickson and D.J. Mitchell. 1991. Population development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. Journal of Nematology 23:58-64.

Oswald, J.D. 1993. Revision and Cladistic Analysis of the World Genera of the Family Hemerobiidae (Insecta: Neuroptera). *J. New York Entornol. Soc*. 101(2): 143-299.

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.

Panha, S. 1996. A Checklist and classification of the terrestrial Pulmonate snails of Thailand. *Walkerana*. 8 (19): 11-64.

Pang, W., S.L. Hafez, P. Sundararaj, B. Shafii and E. Fallah. 2009. Pathogenicity of *Pratylenchus penetrans* on onion. Nematropica 39:35-46.

Palmer, J. M., L. A. Mound and G. J. du Heaume. 1989. (ed.). CIE Guides to Insects of Importance to Man: 2. Thysanoptera. C.A.B International Institute of Entomology.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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.

Parrella MP. 1987. Biology of *Liriomyza*. Ann Rev Entomol 32: 201 – 224.

Parrella, M.P., Keil, C.B.and Morse, J.G. 1984. Insecticide resistance in *Liriomyza trifolii.* California Agriculture 38, 22-33.

Paulraj, L. and L. W. O'Garro. 1993. Leaf blight of onions in Barbados caused by *Xanthomonas campestris*. *Plant Dis*. 77: 198-201.

Patterson, C. M. 1971. Taxonomic studies of the land snails family Succineidae. *Malacological Reeview*. Vol. 4: 131-202.

Peckham, G. W. and Peckham, E. G. 1886. Genera of the family Attidae: with a partial synonymy. Transactions of the Wisconsin Academy of Sciences, Arts and Letters 6: 255-342.

Peñaflor, M. F. G. V., M. Erb, L. A. Miranda, A. G. Werneburg and J. M. S. Bento 2011. Herbivore-induced plant volatiles can serve as host location cues for a generalist and a specialist egg parasitoid. *Journal of Chemical Ecology.* 37: 1304–1313.

Péricart, J. 1972. Hemiptéres Anthocoridae, Cimicidae et Microphysidae de l'Quest-palearctique. *Faune de l'Europe et du basin méditerranéen*, 7 i-iv, pp. 1-44. Masson, Paris.

Petersen, R.H. 1974. The Rust Fungus Life Cycle. *Botanical Review* 40:453-513.

Petcharat, V. and M. Kanjanamaneesathian. 1989. Species of plant pathogen *Cercospora* in Southern Thailand. *Thai Phytopathology* 9: 23–27.

Petzoldt, C. Climate Change Effect on Insects and Pathogens. *In* Climate Change and Agriculture: Promoting Practical and Profitable Responses. [Online]. Available. http://umaine.edu/oxford/files/2012/01/III.2Insects.Pathogens1.pdf (February 12, 2014)

PestID. 2012. Pest Identification Database (PestID). United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Plant Protection and Quarantine. https://mokcs14.aphis.usda.gov/aqas/login.jsp. (Archived at PERAL).

Pfenninger, M., Salinger, M., Haun T., and Feldmeyer, B. 2011. Factors and Processes Shaping the Population Structure and Distribution of Genetic Variation Across the Species Range of the Freshwater Snail *Radix balthica* (Pulmonata, Basommatophora). BMC Evolutionary Biology 11: 135.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

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.

Petchanart, V. and K. Soytong. 1991. *Chaetomium* in soil under para rubber. Songklanakarin. *Journal of Science and Technology* 13: 129-132.

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.

Pimsai, U., M.J. Pearch, C. Satasook, S. Bumrungsri and P.J.J. Bates. 2014. Murine rodents (Rodentia: Murinae) of the Myanmar-Thai-Malaysian peninsula and Singapore: taxonomy, distribution, ecology, conservation status, and illustrated identification keys. Bonn zoological Bulletin. 63: 15-114.

Platnick NI. 1998. Advances in spider taxonomy 1992-1995, with redescriptions 1940-1980. New York: Entomol. Soc. Am. Mus. Nat. Hist. 976 pp.

Platnick, N.I. 2009. The world spider catalog, version 10.0. American Museum of Natural History, online at http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html

Platnick, N. I. 2013. The world spider catalog, version 14.5 Amerrican Museum of Natural History, online at http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/BIB1.html

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.

Plant Health Australia. 2010. Contingency Plan – Whitefly transmitted viruses (Online) Available http://www.planthealthaustralia.com.au/wp-content/uploads/2013/01/Whitefly-transmitted-viruses-CP-2011.pdf (19 June 2014)

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.

Pranom Chantaranothai. 2005. Taxonomic Notes on the genus *Phyllanthus caroliniensis* (Euphorbiaceae) in Thailand. THAI FOR. BULL. (BOT.) 33: 16–20

Prószyński, J. 1984. Remarks on Viciria and Telamonia (Araneae, Salticidae). Annales Zoologici, Warszawa 37: 417-436.

Prószyński, J. 2016. Delimitation and description of 19 new genera, a subgenus and a species of Salticidae (Araneae) of the world. Ecologica Montenegrina 7: 4-32.

Pruthi, H. 1930. Studies on Indian Jassidae (Homoptera). Part I. Introductory and description of some new genera and species. Mem. Indian Mus. 11: 1-68.

Pornsuriya, C., K. Soytong, 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. Soytong. 2008. New record of *Chaetomium* species isolated from soil under pineapple plantation in Thailand. *Journal of Agriculture Technology* 4: 91-103.

Pollack, F.G. 1987. *An annotated compilation of Cercospora names*. Berlin: J. Cramer. 212 p.

Polaszek A, 1998. African cereal stem borers: economic importance, taxonomy, natural enemies and control. African cereal stem borers: economic importance, taxonomy, natural enemies and control., x + 530 pp.; 42 pp. of ref.

Polaszek, A.D., D. Agosti, M. Alonso-Zarazaga, G. Beccaloni, P.P. BjØrn, *et al*. 2005. A universal register for animal names. *Nature*. 437: 477

Polaszek, A.D., S. Abd-Rabou and J. Huang. 1999. The Egyptian species of *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae): a preliminary review. *Zool. Med.* Leiden 73

Polaszek A, Manzari S and Quicke DLJ. 2004. Morphological and molecular taxonomic analysis of the *Encarsia meritoria* parasitoids of whiteflies (Hemiptera, Aleyrodidae) of economic importance. *Zoologica Scripta* 33(5): 403–421

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.

Powers, T.O., and T.S. Harris. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* spp. Journal of Nematology 25: 1– 6.

Pozzi, A.E., Bruno, C., Luciana, C.E., Celli, M.G., Conci, V.C. and Perotto, M.C. 2020. Relative incidence of cucurbit viruses and relationship with bio-meteorological variables. *Australas. Plant Pathol*. 49: 167–174.

Puckdeedindan, P. 1966. A supplementary host lost of plant disease in Thailand. Tech. Bull. No.7, Department of Agriculture, Bangkok. 24 p.

Puillandre N., A. Lambert, S. Brouillet and G. AchazABGD. 2012. Automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. Mol. Ecol. 1864-1877. pp.

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.

Pyle, R.L., J.L. Earle and B.D. Greene. 2008. Five new species of the damselfish genus *Chromis* (Perciform es: Labroidei: Pomacentridae) from deep coral reefs in the tropical western Pacific. *Zootaxa.* 1671: 3–31.

Quénéhervé, P. 2009. Integrated management of banana nematodes. pp.3-61. *In* A. Ciancio and K.G.Mukerji., eds. Integrated management of fruit crop sand forest nematodes. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Radosevich, S., J. Holt and C. Ghersa. 1996. Weeds Ecology Implication for Management. 2nd ed., John Wiley & Sons Inc., New York. 589 p.

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.

Ragini JC, Thangaraju D & David PMM. 2000. Stem borer species composition in Tamil Nadu, India. *International Rice Research Notes* 25(1), 15.

Raj, S.M., A.K. Mishraa, K.S., M.L.Jeevaa and V. Hegdea. 2011. Characterisation of *Phytophthora colocasiae* isolates associated with leaf blight of taro in India. *Phytopathology and Plant Protection*. 44(6) : 581-591.

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

Randig, O., F. Leroy, M. Bongiovanni, and P. Castagnone-Sereno. 2001. RAPD characterization of single females of the root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. European Journal of Plant Pathology 107: 639 – 43.

Rauf, A., Shepard, B. M., & Johnson, M. W. 2000. Leafminers in vegetables, ornamental plants and weeds in Indonesia: surveys of host crops, species composition and parasitoids. International Journal of Pest Management, 46(4), 257-266.

Rees David. 2004. Insects of Stored Products. Csiro Publishing. Collingwood. Auatralia. 181 p.

Rehner, S.A., E. Buckley. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-**α** sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97: 84–89.

Rehner, S. A. (2001) Primers for Elongation Factor 1-alpha (EF1-alpha). http://ocid.nacse.org/research/deephyphae/EF1primer.pdf.

Rinehart, J.P., G.D. Yocum and D.L. Delinger. 2000. Thermotolerance and rapid cold hardening ameliorate the negative effects of brief exposures to high or low temperatures on fecundity in the flesh fly, *Sarcophage crassipalpis*. *Physio. Entomol*. 25: 300-336.

Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116: 1-116.

Ritchie, J. M. 1974. A revision of the grass-living genus *Podothrips* (Thysanoptera: Phlaeothripidae). Journal of Entomology, B 43: 261–282.

Roach, R., R. Mann, C.G. Gambley, R.G. Shivas and B. Rodoni. 2018. Identification of Xanthomonas species associated with bacterial leaf spot of tomato, capsicum and chilli crops in eastern Australia. *Eur J Plant Pathol* 150: 595–608.

Robert, P.D., K.L. Pernezny and T.A. Kucharek. 2001. *Anthracnose 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/pdffiles/PP/PP10400.pdf (23 February 2017).

Robbertse, B. P.K. Strope, P. Chaverri, R. Gazis, S. Ciufo, M. Domrachev and C.L. Schoch. 2017. Improving taxonomic accuracy for fungi in public sequence databases: applying 'one name one species' in well-defined genera with *Trichoderma/Hypocrea* as a test case. *Database* 1-14. doi:10.1093/database/bax072.

Rodríguez, K., A. Stchigel and J. Guarro. 2002. Three new species of *Chaetomium* from soil. *Mycologia* 94: 116-126.

Roffey, J. 1979. Locusts and grasshoppers of economic importance in Thailand. *Anti-Locust Mem*. no. 14: 200 pp.

Rokas, A. and S.B., Carroll. 2005. More Genes or More Taxa? The Relative Contribution of Gene Number and Taxon Number to Phylogenetic Accuracy. *Molecular Biology and Evolution* 22:1337-1344.

Rokas, A., Williams, B.L., King, N. and S.B., Carroll. 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* 425:798-804.

Rojas MR, Gilbertson RL, Russell DR, Maxwell DP. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis* 77:340-347.

Roland, N.P and M. Moens. 2006. *Plant Nematode.* CABI. 447p.

Ronquist, F. and J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Roistacher C.N.1991. Graft-Transmission of Citrus Handbook for detection and diagnosis. IOCV.FAO.286p.

Roumagnac, P., L. Gagnevin, L. Gardan, L. Sutra, C. Manceau, E.R. Dickstein, J. B. Jones, P. Rott, and O. Pruvost. 2004. Polyphasic characterization of xanthomonads isolated from onion, garlic and Welsh onion (*Allium* spp.) and their relatedness to different Xanthomonas species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 54: 15-24.

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.

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

Sabelis, M. W. 1985. Reproductive strategies. *In Spider Mites. Their Biology, Natural Enemies and Control*, 1A (W. Helle and M. Sabelis eds.). Elsevier, Amsterdam. 265-278.

Saengyot, S. and I. Burikam. 2011. Host plants and Natural Enemies of Papaya Mealybug, *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink (Hemiptera: Pseudococcidae) in Thailand. Thai Journal of Agricultural Science, 44(3): 197-205.

Saito, S. 1959. The Spider Book Illustrated in Colours. Hokuryukan, Tokyo, 194 pp.

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.

Saikia DK, Devroy TC & Dutta SK. 1996. Biology and seasonal history of sugarcane early shoot borer *Chilo infuscatellus* Snell. *Journal of the Agricultural Science Society of North East India* 9, 155-158.

Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 4: 406-425.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

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.

Sayre, R. M., and M. P. Starr. 1988. Bacterial diseases and antagonisms of nematodes. Pp. 69–101 in G. O. Poinar, Jr., and H. -B. Janson, eds. Diseases of nematodes. Boca Raton, FL: CRC Press.

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., A. Ismaiel, M. Bon, S.D. Respinis, and O. Petrini. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia* 102: 944-966.

Santos, A. J. & Brescovit, A. D. 2003. A revision of the Neotropical species of the lynx spider genus *Peucetia* Thorell 1869 (Araneae: Oxyopidae). Insect Systematics & Evolution 34(1): 95-116. doi:10.1163/187631203788964863

Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for Reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4:406-425.

Sasakawa, M. (1960) A study of the Japanese Agromyzidae (Diptera) Part 1. Sci. Rep. Saikyo Univ. Agric. 12: 76–82.

Sasakawa, M. (1961) A study of the Japanese Agromyzidae (Diptera). Part 2. Pac. Insect 3: 307–472.

Sasakawa, M. (2013) Thailand Agromyzidae (Diptera) - 2. Zootaxa (in press).

Savard, J., T. Diethard, S. Richards, G.M. Weinstock, R.A. Gibbs, J.H. Werren, H. Tettelin and M.J. Lercher. 2006. Phylogenetic analysis reveals bees and wasps (Hymenoptera) at the base of the radiation of holometabolous insects. *Genome Research*. 16:1334–1338.

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.

Schaad, N.W., J.B. Jones and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, Minnessota, USA. 373 p.

Schauff, M.E., G. A. Evans and J. M. Heraty. 1996. A pictorial guide to the species of Encarsia (Hymenoptera: Aphelinidae) parasitic on whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) in North America. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*. 98(1): 1 – 35

Sharkey, M.J. 2007. Phylogeny and classification of Hymenoptera. Zootaxa. 1668: 521–548.

Sharkey, M.J. 2007. Phylogeny and classification of Hymenoptera. *Zootaxa*. 1668: 521–548.

Schizas, N.V., G.T. Street, B.C. Coull, G.T. Chandler and J.M. Quattro. 1997. An efficient DNA extraction method for small metazoans. Molecular Marine Biology and Biotechnology 6: 381-383.

Schmidt, G. and P. Klaas. 1991. Eine neue *Latrodectus*-Spezies aus Sri Lanka (Araneida: Theridiidae). Arachnologischer Anzeiger. 14: 6-9p.

Schubert, T., B. Sutton, and A. Jeyaprkash. 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.

Schutze, M.K., Jessup, A. & Clarke, A.R. 2012. Wing shape as potential discriminator of morphologically similar pest taxa within the *Bactroceradorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae). Bulletin of Entomological Research 102, 103-111.

Schutze, M. K., Aketarawong, N., Amornsak, W., Armstrong, K. F., Augustinos, A. A., Barr, N., ... Clarke, A. R. 2015. Synonymization of key pest species within the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae): taxonomic changes based on a review of 20 years of integrative morphological, molecular, cytogenetic, behavioural and chemoecological data. *Systematic Entomology, 40*(2), 456-471.

Sen A. C. and D. Prasad. 1961. Experiments with New synthetic Insecticide for the Control of Mango Hoppers in Bihar. Indian Journal of Entomology Vol.4 No.3 234-246 pp.

Sharman, M., Lapbanjob, S., Sebunruang, P. Belot, J.-L., Galbieri, R., Giband, M. and Suassuna, N. 2015. First report of *Cotton leafroll dwarf virus* in Thailand using a species-specific PCR validated with isolates from Brazil. *Australasian Plant Dis. Notes* 10:24.

Sharkey, M.J. 2007. Phylogeny and classification of Hymenoptera. *Zootaxa*. 1668: 521–548.

Shetaia, S. Z. S., Ismail, S. A. A. and Abdel-Kader, S. M. 2009. Survey, Population dynamics and Importance Value of Certain Land Snail Species Infesting Different Crops in Sharkia Governorate. Egypt. Acad. J. biolog. Sci. 1(1) :37-43.

Shiao, S. F. (2004). Morphological diagnosis of six *Liriomyza* species (Diptera: Agromyzidae) of quarantine importance in Taiwan. Applied Entomology and Zoology, 39(1), 27-39.

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.

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.

Shaffer, M. E. S. Nielsen, M. Horak, 1996. Pyraloidea, pp. 164-199 In: Nielsen, E.S.; E. D. Edwards, T. V.Rangsi (eds.). *Checklist of the Lepidoptera of Australia.* Monographs on Australian Lepidoptera 4: 1-529.

Slamka, F. 2008. Pyraloidea (Lepidoptera) of Europe, vol. 2, Crambinae & Schoenobiinae. Published by author, Bratislava. 223 pp.

Siddiqi, M.R. 2000. Tylenchida: parasites of plant sand insects. 2nded. CABI Publishing UK, Wallingford GB. pp.353–358.

Singh, O. and Agarwal, R.A. 1981. Toxicity of certain pesticides to two economic species of snail in northern Indea. *J Econ Entomol*. 38: 182-190.

Singh, M.K., A.R.Sherpa,V.Hallan and A.A.Zaidi. 2007. A Potyvirus in Cymbidium spp.in northern India. Australasian Plant Disease Notes 2(1) 11-13.

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.

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. *Annals of the Entomological Society of America*. 87: 651–701.

Simon, E. 1909. Etude sur les arachnides du Tonkin (1re partie). Bulletin Scientifique de la France et de la Belgique 42: 69-147p.

Simmons, E.G. 2007. *Alternaria* An Identification Manual. CBS Biodiversity Series No. 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 775 pp.

Silva, M. and O.L. Pereira. 2008. Postharvest *Cercospora apii* fruit rot disease on *Cucurbita maxima* (Cucurbitaceae). *Australasian Plant Disease Notes* 3: 21-23.

Silva JN, Costa A, Silva JV and C. Almeida. 2015. DNA barcoding and phylogeny in Neotropical species of the genus *Spondias*. Biochem Syst Ecol;61:240–243.

Sirikajornjaru, W. 2002. Taxonomic Study of Aphids (Homoptera: Aphididae) in Northern Thailand. A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy (Biology), Mahidol University, Bangkok.

Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312-1313.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Seifert, K.A. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* 9 Suppl s1: 83.

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.

Soes, D. M., Majoor, G. D., and Keulen, S. M. A. 2011. Bellamya chinensis (Gray, 1834) (Gastropoda: Viviparidae), a New Alien Snail Species for the European Fauna. Aquatic Invasions 6(1): 97-102.

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

Stevens, M. M. 2002. Planorbidae and Lymnaeidae as Pests of Rice, with Particular Reference to Isidorella newcombi (Adams & Angus). In Molluscs as Crop Pests, Baker, G. M. ed. CABI Publishing. UK.

Srihata,S., Tumpeesuwan, C and Tumpeesuwan, S. 2010. Species diversity, abundance and habitats of land snails in a square kilometer on Phu No, Kalasin Province. *J Sci Technol MSU*; 29(4): p. 359-371.

Subbotin, S.A., Sturhan, D., Chizhov, V.N., Vovlas,N.& Baldwin, J.G. 2006. Phylogenetic analysis of Tylenchida Thorne, 1949 as inferred from D2 and D3 expansion fragments of the 28S rRNA gene sequences. *Nematology***.** 8(3): 455-474

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.

Sun, G., S. Oide, E. Tanaka, K. Shimizu, C. Tanaka and M. Tsuda. 2003. Species separation in *Curvularia* "geniculata" group inferred from Brn1 gene sequences. *Mycoscience* 44: 239–244.

Sunpapoa, A. and J. Kittimorakul. 2014. Disease note: identification of *Curvularia oryzae* as cause of leaf spot disease on oil palm seedling in nurseries of Thailand. *Phytoparasitica.* 42: 529-533.

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.

Surakarn, R. 1997. Biological Studies of Some Chironomids (Diptera: Chironomidae) Dwelling in Paddy Fields. Doctoral Dissertation, Tottori University, Japan. 146 pp.

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

Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes, Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata*. CMI. Kew Surrey, England. 695 p.

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.

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.

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.

Soerjani M, Kostermans AJGH, Tjitrosoepomo G, 1987. *Weeds of Indonesia*. Jakarta, Indonesia: Balai Pustaka, 716 pp.

Sohi, A.S. and Sohi, A. S. (Snr). 1990. Mango leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae). A review Journal of Insect Science. 3, 1-12.

Solovyev, A.V. & T.J. Witt. 2009. The Limacodidae of Vietnam. *Entomofauna Supplement* 16. Ansfelden, Austria. 331 pp.

Solovyev, A.V. & A. Giusti. 2017. Revision of the genus *Scopelodes* Westwood, 1841 (Lepidoptera, Limacodidae) with description of 16 new species. *Insect Systematics & Evolution* (2017)**:** 1-62.

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.

Southwood, T.R.E. 1966. *Ecological methods, with particular reference to the study of insect populations*. London. 361 p.

Soytong, K. 1990. A taxonomic study of *Chaetomium* spp. in Thailand. Abstract, 4th International Mycological Congress, Regensburg, Germany, August 28-September 3, 1990.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Soytong, K. 1991. Species of *Chaetomium* in Thailand soils. *Thai Phytophathology* 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.

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

Song, H. 2010. Grasshopper systematic: past present and future. *Journal of Orthoptera Research.* 19(1): 57 – 68.

Snell, T. W. 1978. Fecundity, developmental time, and population growth rate. Oecologia. 32: 119-125.

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

Stamps, D.J., G. M. Waterhouse, F. J. Newhook and G. S. Hall. 1990. *Revised Tabular Key to the Species of Phytopthora*. Mycological Papers No. 162. CB. International Mycological Institute. 28 p.

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

Stevens, M. M. 2002. Planorbidae and Lymnaeidae as Pests of Rice, with Particular Reference to *Isidorella newcombi* (Adams & Angus). In Molluscs as Crop Pests, Baker, G. M. ed. CABI Publishing. UK.

Stirling, G.R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: Progress, problems, and prospects. Wallingford, UK: CAB International.

Stock, S.P., V. Somsook and A.P. Reid. 1998. *Steinernema siamkayai* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Thailand. Syst. Parasitol. 41: 105-113.

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.

Sturhan, D. 1988. New host and geographical records of nematode parasitic bacteria of the *Pasteuria penetrans* group. Nematologica 34: 350–356

Sucharit, S., 1980. A poisonous spider bite by Latrodectus sp. from Northeast Thailand. Siriraj. Hosp. Gaz. 32(11): 675-676p.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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.

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.

Sziráki, G. 2002. Coniopterygidae (Neuroptera) from Thailand. *Folia Entomol. Hung.* 63: 53–64.

Sziráki, G. 2011. Coniopterygidae of the World: Annotated Check-list and Identification keys for Living Species, Species Groups and Supraspecific Taxa of the Family. Lambert Academic Publishing, Delaware. 249 pp.

Tabrizi, S. S., Rad, S. P. and Hedayati, Z. 2014. A faunistic study on the spiders of several metropolis parks in Tehran, Iran. Indian Journal of Arachnology 3(2): 28-39.

Taekul, C., A. A. Valerio, A. D. Austin, H. Klompen and N.F. Johnson. 2013. Molecular phylogeny of telenomine egg parasitoids (Hymenoptera: Platygastridae s.l.: Telenominae): evolution of host shifts and implications for classification. *Systematic Entomology*. DOI: 10.1111/syen.12032

The Trustees of the Natural History Museum, London. 2014. *Universal Chalcidoidea Database*. (Online) Available. www.nhm.ac.uk. (19 June 2014)

Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. Genetics. 105: 437–460.

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics. 123: 597-601.

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.

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.

Tanaka, H. 2016. A new genus and species of Rhizoecidae (Hemiptera, Sternorryncha, Coccomorpha) associated with *Acropyga yaeyamensis* (Hymenoptera, Formicidae, Formicinae). ZooKeys 616:115–124

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution 28: 2731-2739.

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.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar .2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–2729

Tan, W.P., Dong, Y.Z., Sun, X.H., Liang, Y.C., Liu, H.X., Zhu, X.P. 2015. The first identification of *Pepper vein yellows virus* in Shandong Province, China. *Plant Dis*. 99(9), 1288.

Taylor, J.W. 2011. One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus* 2: 113-120.

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.

Thines, M., T. Aoki, P.W. Crous, K.D. Hyde, R. Lücking, E. Malosso, T. W. May, A.N. Miller, S.A. Redhead, A.M. Yurkov and D.L. Hawksworth. 2020. Setting scientific names at all taxonomic ranks in italics facilitates their quick recognition in scientific papers. *IMA Fungus* 11: 1-5.

Thomson, J.D., D.G. Higgins, and Gibson, T.J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673-4680 p.

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

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.

Thorne, G. 1961. *Principles of nematology*. McGraw-HillBook Company, New York, NY.

Thomsona, L.J., S. Macfadyenb and A. Hoffmanna. 2010. Predicting the effects of climate change on natural enemies of agriculture pests. *Biological Control* 52 (3): 296-306.

Tian, D. 2008. Container Production and Post-harvest Handling of Lotus (*Nelumbo*) and Micropropagation of Herbaceous Peony (*Paeonia*). Doctoral dissertation. Auburn University.

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).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

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.*

Tiwari, *F. 2013.* Behavioral responses of *Indoplanorbis exustus* snails against different amino acids in bait formulation. *Science pub*. 5(4): 16-18.

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.

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.

Tolman, J.H., D.G.R. McLeod and C.R. Harris. 2004. Cost of crop losses in processing tomato and cabbage in southwestern Ontario due to insects, weeds and/or diseases. *Canadian journal of plant science*. 915-921.

Tripathi MK, Senapati B & Dash SK. 1997. Pest status and seasonal incidence of stem borer complex of rice in semi deep water situation at Bhubaneswar. *Journal of Applied Biology* 7, 71-74.

Triplehorn, C.A. and N.F. Johnson. 2005.*Borror and Delong's Introduction of the Study of Insects 7th edition.* United State of America. 864 pp.

Tsai, W. S., Huang, Y. C., Zhang, D. Y., Reddy, K., Hidayat, S. H., Srithongchai, W. 2008. Molecular characterization of the CP gene and 30UTR of *Chilli veinal mottle virus* from South and Southeast Asia. *Plant Pathol*. 57:408–416.

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.

Tumpeesuwan, C. Species diversity, distribution and habitat relationships of terrestrial snails on The Phu Phan mountain range of Northeastern Thailand. Ph.D. thesis. Biological Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University; 2007. 160 pp.

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.

Ullstrup A.J. 1972. The impacts of the southern corn leaf blight epidemics of 1970–1971. *Annual Reviews of Phytopathology* 10: 37–50.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Untereiner, W.A., V. Debois and F.A. Naveau. 2001. Molecular systematics of the ascomycetes genus *Farrowia* (*Chaetomiaceae*). *Canandian Journal of Botany* 79: 321-333.

Uesumi Y, 1972. Some ecological notes on the sugar-cane borer, *Chilo sacchariphagus* stramineellus (Caradja)(=Proceras[chilo]venosatus (Walker)) in Japan. Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology, 16(1): 53-55

USDA-NIFA SCRI. 2014. Coordinated Agricultural Project, grant #2011-51181-30937 (Online). Available. http://www.stopbmsb.org/index.cfm (2 June 2017).

Vacante, V. 2015. The handbook of mites of economic plants identification, bio-ecology and control. Mediterranean University, Italy. 890 p.

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.

Vanijajiva, O. 2014. Effect of Ecological Factors on Seed Germination of Alien Weed *Tridax procumbens* (Asteraceae). *Journal of Agriculture and Ecology Research International*. 1(1): 30-39.

Vaught, K.C. 1989. A classification of the living mollusca. U.S.A. : *American Malacologists*.

Venzon, M., M. C. Rosado, A. J. Molina-Rugama, V. S. Duarte, R. Dias and A. Pallini. 2008. Acaricidal efficacy of neem againt *Polyphagotarsonemus latus* (Banks)(Acari: Tarsonemidae).Crop Protection 27: 869-872.

Verghese, A. and G.S.P. Rao 1985. Sequential sampling plan for mango leaf hopper, *Idioscopus clypealis* Lethierry. Entomon Vol.10 No.4. 285-290.

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.

Villanueva, F., Castillo, P., Font, M.I., Alfaro-Fernández, A., Moriones, E., Navas-Castillo, J., 2013. First report of *Pepper vein yellows virus* infecting sweet pepper in Spain. *Plant Dis*. 97(9), 1261-1261.

Villalobos, C. M., Monge-Nájera, J., Barrientos, Z., and Franco, J. 1995. Life Cycle and Field Abundance of the Snail *Succinea costaricana* (Stylommatophora: Succineidae), a Tropical Agricultural Pest. Rev. Biol. Trop. 43(1-3): 181-188.

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.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

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.

Viswanathan R, Malathi P, Sundar AR, Poongothai M & Singh N. 2006. Current status of sugarcane wilt in India. *Sugar Cane International* 24(4), 3-7, 12.

von Arx, J.A., J. Guarro and M.J. Figueras. 1986. The Ascomycetes genus *Chaetomium*. *Beih Nova Hedwigia* 84: 1-162.

Volcy, C. 2011. Past and present of the nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne with emphasis on Musa. A review, Agron. Colomb. 29(3).

Virgilio, M., Jordaens, K., Verwimp, C., White, I. M., & De Meyer, M. 2015. Higher phylogeny of frugivorous flies (Diptera, Tephritidae, Dacini): Localised partition conflicts and a novel generic classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution,85*, 171-179.

Walckenaer, C. A. 1837. Histoire naturelle des insectes. Aptères. Tome premier. Roret, Paris, 682 pp., pl. 1-15.

Walker, F. 1870. Catalogue of the homopterous insects collected in the Indian Archipelago by Mr. A. R. Wallace, with descriptions of new species. Jour. LinneanSoc. Zool. 10: 276-330.

Wang, C. L. and S. Okajima. 1995. Observation in Taiwan on the identity of the Cuban laurel thrips (Thysanoptera, Phlaeothripidae). Journal of New York Entomological Society. 103(2): 185-190.

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

Wang, X.W., L. Lombard, J.Z. Groenewald, J. Li, S.I.R. Videira, R.A. Samson, X.Z. Liu and P.W. Crous. 2016b. Phylogenetic reassessment of the *Chaetomium globosum* species complex. *Persoonia* 36: 83-133.

Wang, X.W., X.L. Wang, F.J. Liu, X.M. Zhao, J. Li and L. Cai. 2014. Phylogenetic assessment of *Chaetomium indicum* and allied species, with the introduction of three new species and epitypification of *C. funicola* and *C. indicum*. *Mycological Progress* 13: 719-732.

Wang, X.W. and R.Y. Zheng. 2005a. *Chaetomium acropullum* sp. nov. (*Chaetomiaceae, Ascomycota*), a new psychrotolerant mesophillic species from China. *Nova Hedwigia* 80: 413-417.

Wang, X.W. and R.Y. Zheng. 2005b. *Chaetomium ampulliellum* sp. nov. (*Chaetomiaceae, Ascomycota*) and similar species from China. *Nova Hedwigia* 81: 247-255.

Wang YJ. 2015. Molecular Techniques for identification of Stored *Tribolium*. China Agricultural University

Wang, X.W., J. Houbraken, J.Z. Groenewald, M. Meijer, B. Andersen, K.F. Nielsen, P.W. Crous and R.A. Samson. 2016a. Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and chaetomium-like fungi from indoor environments. *Studies in Mycology* 84: 145-224.

Wanless, F. R. 1980. A revision of the spider genera Asemonea and Pandisus (Araneae: Salticidae) Bull. Br. Mus. Nat. (Zool.) London, 39(4): 213-257.

Wanless F.R. 1984a. A review of the spider subfamily Spartaeinae nom. n. (Araneae: Salticidae) with description of six new genera. Bull. Br. Mus. Nat. (Zool.), London, 46(2): 135-198.

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

Wanmei, C., Y. Fu., F. Zhang. and Z. Peng. 2005. Effect of different varieties of litchi on the development and reproduction of *Oligonychus biharensis* (Hirst). Syst. Appl. Acarol. 10 (1): 11-16.

Waterhouse D.F, 1993. The Major Arthropod Pests and Weeds of Agriculture in Southeast Asia. ACIAR Monograph No. 21. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research, 141 pp.

Webster, G.L. 1970. A revision of Phyllanthus (Euphorbiaceae) in the continental United States. Brittonia 22: 44-76.

Webster, J. and W.S. Weber. 2007. *Introduction to fungi*. New York: Cambridge University Press. 841 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.

Wermelinger, B., D. Wyniger and B. Forster. 2008. First records of an invasive bug in Europe: Halyomorpha halys Stål (Heteroptera: Pentatomidae), a new pest on woody ornamentals and fruit trees? Mitteilungen Der Schweizer Entomologischen Gesellschaft. 81:1–8

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.

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.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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.

Westaway J.O., Alford L., Chandler G., and Schmid M. Asystasis gangetica subsp. micrantha, a new record of an exotic plant in the Northern Territory. Northern Territory Naturalist 27: 29-35

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. Inc.

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" (M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky and T. White, eds.), Academic Press. 315-322 pp.

White, G.F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Science. 66: 302-303.

Whiteside J.O., Garney S.M. and Timmer L.M. 1998. Compendium of Citrus Disease. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. 80p.

Whyte, R. and Anderson, G. H. 2017. A Field Guide to Spiders of Australia. CSIRO Publishing. ISBN: 9780643107076

Wikee, 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.

Williams, D.J. and M.C. Granara de Willink. 1992. Mealybugs of Central and South America. CAB International, London. England. 635 pp.

Williams, D.J. and G.W. Watson. 1988. *The Scale Insects of the Tropical South Pacific Region Part I, the armored scale (Diaspididae).* CAB Intemational Institute of Entomology, Wallingford. 290 pp.

Williams, D.J. 2004. *Mealybug of Southern Asia.* The Natural History Museum, Kuala Lumpur: Southdene SDN. BHD, 896 pp.

Williams, S.T., M.E. Sharpe, and J.G. Holt, eds. 1994. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 4. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.

Williams-Woodward, J. L. 1999. 1998 Georgia plant disease loss estimates. University of Georgia Crop Ext. Serv. Publ. Path 99-02.

Williamson, V.M., E.P. Caswell-Chen, B.B. Westerdahl, F.F. Wu, and G. Caryl, 1997. A PCR assay to identify and distinguish single juveniles of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. Journal of Nematology 29: 9 –15.

Williams JR, 1983. The sugar cane stem borer (*Chilo sacchariphagus*) in Mauritius. Revue Agricole et Sucriere de l'Ile Maurice, 62(1): 5-23

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 Apochrysine Green Lacewings (Neuroptera: Chrysopidae: Apochrysinae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95(1): 16-28

Wintermantel, W.M. and Hladky, L.L., 2010. Methods for detection and differentiation of existing and new crinivirus species through multiplex and degenerate primer RT-PCR. J. Virol. Methods 170(1-2): 106-114.

Wintermantel, W.M., Hladky, L.L., Cortez, A.A., Natwick, E.T., 2009. A new expanded host range of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* includes three agricultural crops. Plant Dis. 93(7): 685-690

Wong, P. K., Liang, Y., Liu, N. Y., and Qiu, J. W. 2010. Palatability of Macrophytes to the Invasive Freshwater Snail *Pomacea canaliculata*: Differential Effects of Multiple Plant Traits. Freshwater Biology 55(10): 2023-2031.

Wongsiri N. 2534. List of insect, Mite and other Zoological Pest of Econimic Plants in Thailand. Entomology and Zoology Division, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand. 168 pp.

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.

World Spider Catalog. 2021. World Spider Catalog, Version 22.5. Natural History Museum Bern. Available at URL http://wsc.nmbe.ch (Accessed on 20/09/2021).

Workman, T. & Workman, M. E. 1894. Malaysian spiders. Belfast, pp. 9-24.

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).

Wrensch, D. L. 1985. Reproductive parameters. *In Spider Mites. Their Biology, Natural Enemies and Control*, 1A (W. Helle and M. Sabelis eds.). Elsevier, Amsterdam. 165-170.

Wu, C.S. & A.V. Solovyev. 2011. A review of the genus *Miresa* Walker in China (Lepidoptera: Limacodidae). *Journal of Insect Science* 11: 34.

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 maximain Asia. Fungal Diversity 34:23-39.

Wunderlich, J. 2008. Identification key to the European genera of the jumping spiders (Araneae: Salticidae). Beiträge zur Araneologie 5: 698-719, 868.

Xiong, W., Yu, D., Wang, Q., Liu, C., and Wang, L. 2008. A Snail Prefers Native over Exotic Freshwater Plants: Implications for The Enemy Release Hypotheses. Freshwater Biology 53: 2256–2263.

Yang Z.Q., Y.X. Yao, L. Qui and Z. Li. 2009. A new species of *Trissolcus* (Hymenoptera: Scelionidae) parasitizing eggs of *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae) in China with comments on its biology. Annals of the Entomological Society of America. 102: 39–47.

Yaidya, D.P., Nagabhushanam, R. and Hanumante, M.M. 1980. Response of the neurosecretory cells of the freshwater snail. *Indoplanorbis exustus* to hydrothermal stress. *Hydrobiologia.* 69(3): 209-212.

Yamasaki, T. and Ahmad, A. H. 2013. Taxonomic study of the genus Myrmarachne of Borneo (Araneae: Salticidae). Zootaxa 3710: 501-556.

Yasunaga, T. 1997a. The flower bug Genus *Orius* Wolff (Heteroptera: Anthocoridae) from Japan and Taiwan, part I, *Applied Entomological Zoology* 32(2): 355-364.

Yasunaga, T., 1997b. The flower bug Genus *Orius* Wolff (Heteroptera: Anthocoridae) from Japan and Taiwan, part II, *Applied Entomological Zoology* 32(2): 379-386.

Yasunaga, T., 1997c. The flower bug Genus *Orius* Wolff (Heteroptera: Anthocoridae) from Japan and Taiwan, part III, *Applied Entomological Zoology* 32(2): 387-394.

Yeh, C.C. and J.B. Sinclair. 1980. Effect of *Chaetomium cuprerum* on seed germination and antagonism to other seedborne fungi of soybean. *Plant Disease* 64: 468-470.

Yi R.H., L.J. Gan, D.H. Yan, Z.J. Wu, Y.T. Tong, F.F Wu. 2013. Identification and biological characteristics of Neoscytalidium dimidiatum causing pitaya canker disease. Acta Phytophylacica Sinica (Journal of Plant Protection). 40 (2) :102–108.

Yi R.H., Q.L. Lin, J.J. Mo, F.F. Wu and J. Chen. 2015. Fruit internal brown rot caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on pitahaya in Guangdong province, China. Australasian Plant Pathology Society. Australasian Plant Dis. Notes. 10 (1): 13.

Yonaha, T., Toyosato, T., Kawano, S., Osaki, T, 1995. Pepper vein yellows virus, a novel *Luteovirus* from bell pepper plants in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn*. 61(3), 178-184.

Young, J.M., D.C. Park, H.M. Shearman and E. Fargier. 2008. A multilocus sequence analysis of Xanthomonas. *Sys. Appl. Microbiol*. 31: 366–377

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.

Yun, Y.H., A.M. Minnis, Y.H. Kim, L.A. Castlebury and M.C. Aime. 2011. The rust genus *Frommee¨lla* revisited: a later synonym of *Phragmidium* after all. *Mycologia* 103: 1451-163.

Żabka, M. and Gardziński, J. 2017. Salticidae of Thailand. Part 1, genera Plexippus C. L. Koch, 1846 and Burmattus Prószyński, 1992. Annales Zoologici, Warszawa 67(2): 229-242.

Zijlstra, C., D.T.H.M. Donkers-Venne, and M. Fargette. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. Nematology 2: 847–53.

Zettler, F.W., N.J. Ko, G.C. Wisler, M.S. Elliottanc and S.M. Wong. 1990. Viruses of Orchids and Thair Control. Plant Disease, Vol. 74(9) 621-626.

Zhang, Zhi-Q. 2003. Mites of Greenhouses identification, Biology and control. Cabi publishing, USA. 244pp.

Zhang, J. X., D. X. Song and D. Li. 2003. Six new and one newly recorded species of salticidae (Arachnida: Araneae) from Singapore and Malaysia. The Raffles bulletin of Zoology. 51(2): 187-195

Zhang, F., Y. Fu., Q. Jin and J. Zhang. 2007. Development and fecundity of *Oligonychus biharensis* on three southern fruit crops. J. Fruit Science. 24 (2): 185-188.

Zhang, S.B., Zhao, Z.B., Zhang, D.Y., Liu, Y. 2015. First report of *Pepper vein yellows virus* infecting red pepper in Mainland China. *Plant Dis.* 99(8), 1190-1190.

Zheng, Z., S. Schwartz, L. Wagner, and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*.7 (1-2) :203-214.

Zheng YX, Chen CC, Yang CJ, Yeh SD and Jan FJ. 2008. Identification and characterization of a tospovirus causing chlorotic ringspots on *Phalaenopsis* orchids. Eur J Plant Pathol (2008) 120:199-209.

Zheng YX, Chen CC and Jan FJ. 2011. Complete nucleotide sequence of capsicum chlorosis virus isolated from *Phalaenopsis* orchid and the prediction of the unexplored genetic information of tospoviruses. Archives of Virology (2011) 156:421-432.

Zincken, J. L. T. F. 1817: Die Linneischen Tineen in ihre natürlichen Gattungen aufgelöst und beschrieben. – Magazin der Entomologie, Halle **2**: 24–113

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Zhu, M. S. 1998. Fauna Sinica: Arachnida: Araneae: Theridiidae. Science Press, Beijing, xi + 436 pp.

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.

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก

กรมวิชาการเกษตร

<u>ภาคผนวกที่ 3.1.1</u> DNA Barcode ของแมลงวันผลไม้กลุ่ม *B. dorsalis* complex เพิ่มปริมาณ DNA ด้วย *COX*1

รายละเอียดของ DNA Barcode ของ *B. carambolae* จำนวน 10 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ 1 COI4

AAAAAGGAAGTATTTAAGTTTCGGTCTGTTAGTAATATAGTAATAGCCCCTGCTAAAACTGGTAATGATAATAAAAGTAATAAAGCTGTTAATACTA
CTGCTCAAACGAATAGAGGTATTCGATCAAAGGTAATTCCTGTCGATCGTATATTAATTACTGTTGTAATGAAATTTACTGCTCCTAAAATTGAGGA
AATACCTGCTAAGTGAAGTGAAAAAATAGCTAGATCAACTGAAGCTCCTCCGTGCGCAATAACAGATGATAGGGGTGGGTAAACTGTTCAACCTGT
ACCAGCTCCGTTTTCTACTATACTTCTTACTAATAGTAATGTAAGGGAAGGAGGTAATAATCAAAATCTTATATTATTCATTCGTGGAAATGCTATAT
CGGGAGCTCCTAATATTAAAGGAACAAGTCAATTTCCAAATCCACCAATTATAATTGGTATAACTATAAAGAAAATTATTACGAAAGCATGAGCTGT
TACAATTACATTATAAATTTGATCGTCACCGATTAAAGCTCCTGGGTGACCGAGTTCAGCTCGGACTAAAATTCTAAGGGATGTTCCTACTATTCCT
GCTCAGGCTCCGAAGATAAAATATAAAGTTCCAATATCTTTATGTTT

ตัวอย่างที่ 2 COI4.1

TCAGNGCAGGAATANTAAGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGANCTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATG
TAATTGTAACAGCTCATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGA
GCTCCCGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACG
GAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTTCACTTCACTTAGC
AGGTATTTCCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATTACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTT
GAGCAGTAGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCC
TTTTTTGACCCTGCCGGAGGAGGAGACCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCT

ตัวอย่างที่ 3 COI5

GGCAGGGTCAAAAAAGGAAGTATTTAAGTTTCGGTCTGTTAGTAATATAGTAATAGCCCCTGCTAAAACTGGTAATGATAATAAAAGTAATAAAGCT
GTTAATACTACTGCTCAAACGAATAGAGGTATTCGATCAAAGGTAATTCCTGTCGATCGTATATTAATTACTGTTGTAATGAAATTTACTGCTCCTA
AAATTGAGGAAATACCTGCTAAGTGAAGTGAAAAAATAGCTAGATCAACTGAAGCTCCTCCGTGCGCAATAACAGATGATAGGGGTGGGTAAACTG
TTCAACCTGTACCAGCTCCGTTTTCTACTATACTTCTTACTAATAGTAATGTAAGGGAAGGAGGTAATAATCAAAATCTTATATTATTCATTCGTGGA
AATGCTATATCGGGAGCTCCTAATATTAAAGGAACAAGTCAATTTCCAAATCCACCAATTATAATTGGTATAACTATAAAGAAAATTATTACGAAAG
CATGAGCTGTTACAATTACATTATAAATTTGATCGTCACCGATTAAAGCTCCTGGGTGACCGAGTTCAGCTCGGACTAAAATTCTAAGGGATGTTCC
TACTATTCCTGCTCAGGCTCCGAAGATAAAATATAAAGTTCCAATATCTTTATGTTT

ตัวอย่างที่ 4 COI5.1

TAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCA
TGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCAT
TTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTG
AACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCCTCAATTT
TAGGAGCAGTAAATTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATTACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGAGCAGTAGTATTAAC
AGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCCTTTTTTGACCCTGCCG
GAGGAGGAGACCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCT

ตัวอย่างที่ 5 COI3

TAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCA
TGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGNAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCAT
TTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTG
AACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCCTCAATTT
TAGGAGCAGTAAATTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATTACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGAGCAGTAGTATTAAC

กรมวิชาการเกษตร

AGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCCTTTTTTGACCCTGCCG
GAGGAGGAGACCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTT

ตัวอย่างที่ 6 COI3.1

AGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCAT
GCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGNAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATT
TCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGA
ACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCCTCAATTTT
AGGAGCAGTAAATTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATTACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGAGCAGTAGTATTAACA
GCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCCTTTTTTGACCCTGCCGG
AGGAGGAGACCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGA

ตัวอย่างที่ 7 COI4

AAGTATTTAAGTTTCGGTCTGTTAGTAATATAGTAATAGCCCCTGCTAAAACTGGTAATGATAATAAAAGTAATAAAGCTGTTAATACTACTGCTCA
AACGAATAGAGGTATTCGATCAAAGGTAATTCCTGTCGATCGTATATTAATTACTGTTGTAATGAAATTTACTGCTCCTAAAATTGAGGAAATACCT
GCTAAGTGAAGTGAAAAAATAGCTAGATCAACTGAAGCTCCTCCGTGCGCAATAACAGATGATAGGGGTGGGTAAACTGTTCAACCTGTACCAGCT
CCGTTTTCTACTATACTTCTTACTAATAGTAATGTAAGGGAAGGAGGTAATAATCAAAATCTTATATTATTCATTCGTGGAAATGCTATATCGGGAG
CTCCTAATATTAAAGGAACAAGTCAATTTCCAAATCCACCAATTATAATTGGTATAACTATAAAGAAAATTATTACGAAAGCATGAGCTGTTACAATT
ACATTATAAATTTGATCGTCACCGATTAAAGCTCCTGGGTGACCGAGTTCAGCTCGGACTAAAATTCTAAGGGATGTTCCTACTATTCCTGCTCAGG
CTCCGAAGATAAAATATAAAGTTCCAATATCTTTA

ตัวอย่างที่ 8 COI4.1

AGNGCAGGAATANTAAGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGANCTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTA
ATTGTAACAGCTCATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGC
TCCCGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGA
GCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTTCACTTCACTTAGCAG
GTATTTCCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATTACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGA
GCAGTAGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCCTT
TTTTGACCCTGCCGGAGGAGGAGACCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTC

ตัวอย่างที่ 9 COI5

AGGGTCAAAAAAGGAAGTATTTAAGTTTCGGTCTGTTAGTAATATAGTAATAGCCCCTGCTAAAACTGGTAATGATAATAAAAGTAATAAAGCTGTT
AATACTACTGCTCAAACGAATAGAGGTATTCGATCAAAGGTAATTCCTGTCGATCGTATATTAATTACTGTTGTAATGAAATTTACTGCTCCTAAAA
TTGAGGAAATACCTGCTAAGTGAAGTGAAAAAATAGCTAGATCAACTGAAGCTCCTCCGTGCGCAATAACAGATGATAGGGGTGGGTAAACTGTTC
AACCTGTACCAGCTCCGTTTTCTACTATACTTCTTACTAATAGTAATGTAAGGGAAGGAGGTAATAATCAAAATCTTATATTATTCATTCGTGGAAAT
GCTATATCGGGAGCTCCTAATATTAAAGGAACAAGTCAATTTCCAAATCCACCAATTATAATTGGTATAACTATAAAGAAAATTATTACGAAAGCAT
GAGCTGTTACAATTACATTATAAATTTGATCGTCACCGATTAAAGCTCCTGGGTGACCGAGTTCAGCTCGGACTAAAATTCTAAGGGATGTTCCTAC
TATTCCTGCTCAGGCTCCGAAGATAAAATATAAAGTTCCAATATCTTTATGTTT

ตัวอย่างที่ 10 COI5.1

ACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTT
TCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCCA
CGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAG
TTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCGCACGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCCTCAATTTTAGGA
GCAGTAAATTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATTACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGAGCAGTAGTATTAACAGCTT
TATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCCTTTTTTGACCCTGCCGGAGGA
GGAGACCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCA

DNA Barcode ของ *B. carambolae* จำนวน 10 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ 1 01501

TACATACCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGAGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGC
TTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTC
CACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAAC
AGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTTCACTTCACTTAGCGGGTATTTCCTCAATTTTA
GGAGCAGTAAATTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACAG
CTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATACTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCCTTTTTTGACCCTGCCGGA
GGAGGAGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGT

ตัวอย่างที่ 2 HPA-00701

ACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGAGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTT
TCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCCA
CGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAG
TTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTTCACTTCACTTAGCGGGTATTTCCTCAATTTTAGG
AGCAGTAAATTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACAGCT
TTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATACTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCCTTTTTTGACCCTGCCGGAGG
AGGAGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGG

ตัวอย่างที่ 3 HPL-00701

CATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTT
CGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCCAC
GAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGT
TTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTTCACTTCACTTAGCGGGTATTTCCTCAATTTTAGGA
GCAGTAAATTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCCTTATTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACAGCTT
TATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCCTTTTTTGATCCTGCCGGAGGA
GGAGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTC

ตัวอย่างที่ 4 HPL-00801

TGAGCAGGAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAA
TCGTAACAGCTCATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCT
CCCGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAG
CTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTTCACTCCACTTAGCGGG
TATTTCCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGAG
CAGTTGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATACTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCCTTT
TTTGACCCTGCCGGAGGAGGAGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTATTTTTTGATCA

ตัวอย่างที่ 5 HPL-00901

TGAGCAGGAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATCaATGTA
ATCGTAACAGCTCATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGC
TCCCGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGA
GCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTTCACTCCACTTAGCGG
GTATTTCCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGA
GCAGTTGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATACTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCCTT
TTTTGACCCTGCCGGAGGAGGAGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTA

ตัวอย่างที่ 6 01501

ACATACCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGAGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCT
TTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCC
ACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACA
GTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTTCACTTCACTTAGCGGGTATTTCCTCAATTTTAG
GAGCAGTAAATTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACAGC
TTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATANTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCCTTTTTTGACCCTGCCGGAG
GAGGAGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGG

ตัวอย่างที่ 7 HPA-00701

ATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGAGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTC
GTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCCACG
AATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTT
TACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTTCACTTCACTTAGCGGGTATTTCCTCAATTTTAGGAG
CAGTAAATTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACAGCTTTA
TTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATACTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCCTTTTTTGACCCTGCCGGAGGAG
GAGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGA

ตัวอย่างที่ 8 HPL-00701.1

ATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTC
GTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCCACG
AATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTT
TACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTTCACTTCACTTAGCGGGTATTTCCTCAATTTTAGGAG
CAGTAAATTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCCTTATTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACAGCTTTA
TTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCCTTTTTTGATCCTGCCGGAGGAGG
AGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGG

ตัวอย่างที่ 9 HPL-00801

AGCAGGAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATC
GTAACAGCTCATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCC
CGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCT
GGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTTCACTCCACTTAGCGGGTA
TTTCCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGAGCA
GTTGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATACTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCCTTTTT
TGACCCTGCCGGAGGAGGAGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTA

ตัวอย่างที่ 10 HPL-00901

AGCAGGAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATCaATGTAAT
CGTAACAGCTCATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTC
CCGATATAGCATTTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGC
TGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTTCACTCCACTTAGCGGGT
ATTTCCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTCGTTTGAGC
AGTTGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATACTACTAACAGACCGAAACTTAAATACTTCCTTTT
TTGACCCTGCCGGAGGAGGAGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTTA

<u>ภาคผนวกที่ 3.1.2</u> ตัวอย่างรายละเอียดข้อมูลสารพันธุกรรมบางส่วนที่ได้จากการทำ PCR ด้วยยีน ITS1

สำนักวิทยบริการฯ

แมลงวันผลไม้ *B. carambolae*

ตัวอย่างที่ 1 BC01

TTTAACATATATAGCTGTACTTATTATTATAAAAATGATAAGTTAATTTGTTCACATTAACGTGCAATTCCTTTTTTATGGTTATTTTCTATTTGTGTT
TAAGTATATGTTATATACATGTGTCATATACGTTAGTATAAGTATATGTATTATATACATATCATATACGTAGTATAGTATATAAATATACTCTGGTC
TGTTTTTATTCAAGAAGTTATGGTTAAATGCACAAATAAAAGANAATAACTAAAAACTGGTATTGCTGTTTTTGTTGACCTAAGACATGCGCAGCTT
GCAAATGTTTGGGTTTAAAATTACAATTTATTGAAAGATGTGTTGGAATTTTATTTTAAAAATTTGTTATAAATATTATTATTATTATTCTTTCAATAA
ATTAAAAACTCTTGACTTTGAATCAAAAAACACAAAAAATTTTTACTCTAAGCGGTGGACCACTC

ตัวอย่างที่ 2 BC01.1

TGCTTTTGATTCAAGTCAGAGTTTTTAATTTATTGAAAGAATAATAATAATAATATTTATAACAAATTTTTAAAATAAAATTCCAACACATCTTTCAA
TAAATTGTAATTTTAAACCCAAACATTTGCAAGCTGCGCATGTCTTAGGTCAACAAAAACAGCAATACCAGTTTTTAGTTATTCTCTTTTATTTGTGC
ATTTAACCATAACTTCTTGAATAAAAACAGACCAGAGTATATTTATATACTATACTACGTATATGATATGTATATAATACATATACTTATACTAACGT
ATATGACACATGTATATAACATATACTTAAACACAAATANAAAATAACCATAAAAAAGGAATTGCACGTTAATGTGAACAAATTAACTTATCATTTTT
ATAATAATAAGTACAGCTATATATGTTTAAAGGTTTTTTANCGTTCAAATACAATG

ตัวอย่างที่ 3 BC02

GTGTTTTTATTCAAGTCAGAGTTTTTAATTTATTGAAAGAATAATAATAATATTTATAACAAATTTTTAAAATAAAATTCCAACACATCTTTCAATAA
ATTGTAATTTTAAACCCAAACATTTGCAAGCTGCGCATGTCTTAGGTCAACAAAAACAGCAATACCAGTTTTTAGTTATTCTCTTATTTTGTGCATGT
ATACCAATCTTCTTGAATAAAAACAACCAGAGCATATTTATATACTATACTATGTATATGATATGTATATAAAACATATACTATATACTACGTATATG
GACATGTATATAACATATACTTAAACACAAATAGAAAATACCATAAAAAAGGAATTACACGTTAATGTGAACAAATTAACTTATCATTTACATATTTT
TTATAAAAAGATCATTTAACTTTTTATTAATTTTTCATAAATAATAAGTACAGCTATATATGTTTAAAGGTTTTTTAGCGTTCAAATACAATGAG

ตัวอย่างที่ 4 BC02.1

TATATAGCTGTACTTATTATTTATGAAAAATTAATAAAAAGTTAAATGATCTTTTTATAAAAAATATGTAAATGATAAGTTAATTTGTTCACATTAAC
GTGTAATTCCTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGTTTAAGTATATGTTATATACATGTCCATATACGTAGTATATAGTATATGTTTTATATACATATC
ATATACATAGTATAGTATATAAATATGCTCTGGTTGTTTTTATTCAAGAAGATTGGTATACATGCACAAAATAAGAGAATAACTAAAAACTGGTATTG
CTGTTTTTGTTGACCTAAGACATGCGCAGCTTGCAAATGTTTGGGTTTAAAATTACAATTTATTGAAAGATGTGTTGGAATTTTATTTTAAAAATTTG
TTATAAATATTATTATTATTCTTTCAATAAATTAAAAACTCTTGACTTTGAATTAAAAAACACAAAAAATTTTTACTCTAAGCGGTGGTCNA

ตัวอย่างที่ 5 BC03

TGTATAGCTGTACTTATTATTTATGAAAAATTAATAAAAAGTTAAATGATCTTTTTATAAAAAATATGTAAATGATAAGTTAATTTGTTCACATTAAC
GTGTAATTCCTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGTTTAAGTATATGTTATATACATGTCCATATACGTAGTATATAGTATATGTTTTATATACATATC
ATATACATAGTATAGTATATAAATATGCTCTGGTTGTTTTTATTCAAGAAGATTGGTATACATGCACAAAATAAGAGAATAACTAAAAACTGGTATTG
CTGTTTTTGTTGACCTAAGACATGCGCAGCTTGCAAATGTTTGGGTTTAAAATTACAATTTATTGAAAGATGTGTTGGAATTTTATTTTAAAAATTTG
TTATAAATATTATTATTATTCTTTCAATAAATTAAAAACTCTTGACTTTGAATTAAAAAACACAAAAAATTTTTACTCTAAGCGGTGGTC

แมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis*

ตัวอย่างที่ 1 DS01

TATATAGCTGTACTTATTATTATAAAAATGATAAGTTAATTTGTTCACATTAACGTGCAATTCCTTTTTTATGGTTATTTTCTATTTGTGTTTAAGTAT
ATGTTATATACATGTGTCATATACGTTAGTATAAGTATATGTATTATATACATATCATATACGTAGTATAGTATATAAATATACTCTGGTCTGTTTTT
ATTCAAGAAGTTATGGTTAAATGCACAAATAAAAGAGAATAACTAAAAACTGGTATTGCTGTTTTTGTTGACCTAAGACATGCGCAGCTTGCAAATG
TTTGGGTTTAAAATTACAATTTATTGAAAGATGTGTTGGAATTTTATTTTAAAAATTTGTTATAAATATTATTATTATTCTTTCAATAAATTAAAAACT
CTTGACTTTGAATCAAAAAACACAAAAAATTTTTACTCTAAGCGGTGGTCACTCGGC

ตัวอย่างที่ 2 DS02

TGCTTTTGATTCAAGTCAGAGTTTTTAATTTATTGAAAGAATAATAATAATATTTATAACAAATTTTTAAAATAAAATTCCNACACATCTTTCAATAA
ATTGTAATTTTAAACCCAAACATTTGCAAGCTGCGCATGTCTTANGTCAACAAAAACAGCAATACCAGTTTTTANTTATTCTCTTTTATTTGTGCATT
TAACCATAACTTCTTGAATAAAAACAGACCAGAGTATATTTATATACTATACTACGTATATGATATGTATATAATACATATACTTATACTAACGTATA
TGACACATGTATATAACATATACTTAAACACAAATANAAAATAACCATAAAAAAGGAATTGCACGTTAATGTGAACAAATTAACTTATCATTTTTATA
ATAATAAGTACAGCTATATATGTTTAAAGGTTTTTTANCGTTCAAATACAATGTTG

ตัวอย่างที่ 3 DS01

ACATATATAGCTGTACTTATTATTATAAAAATGATAAGTTAATTTGTTCACATTAACGTGCAATTCCTTTTTTATGGTTATTTTCTATTTGTGTTTAAG
TATATGTTATATACATGTGTCATATACGTTAGTATAAGTATATGTATTATATACATATCATATACGTAGTATAGTATATAAATATACTCTGGTCTGTT
TTTATTCAAGAAGTTATGGTTAAATGCACAAATAAAAGAGAATAACTAAAAACTGGTATTGCTGTTTTTGTTGACCTAAGACATGCGCAGCTTGCAA
ATGTTTGGGTTTAAAATTACAATTTATTGAAAGATGTGTTGGAATTTTATTTTAAAAATTTGTTATAAATATTATTATTATTATTCTTTCAATAAATTA
AAAACTCTTGACTTTGAATCAAAAAACACAAAAAATTTTTACTCTAAGCGGTGG

ตัวอย่างที่ 4 DS03

GTTTTTGATTCAAGTCAGAGTTTTTAATTTATTGAAAGAATAATAATAATAATATTTATAACAAATTTTTAAAATAAAATTCCAACACATCTTTCAAT
AAATTGTAATTTTAAACCCAAACATTTGCAAGCTGCGCATGTCTTAGGTCAACAAAAACAGCAATACCAGTTTTTAGTTATTCTCTTTTATTTGTGCA
TTTAACCATAACTTCTTGAATAAAAACAGACCAGAGTATATTTATATACTATACTACGTATATGATATGTATATAATACATATACTTATACTAACGTA
TATGACACATGTATATAACATATACTTAAACACAAATAGAAAATAACCATAAAAAAGGAATTGCACGTTAATGTGAACAAATTAACTTATCATTTTTA
TAATAATAAGTACAGCTATATATGTTTAAAGGTTTTTTAGCGTTCAAATACAATGT

ตัวอย่างที่ 5 DS05

TTGATTCAGGTCAGAGTTTTTAATTTATTGAAAGAATAATAATAATAATATTTATAACAAATTTTTAAAATAAAATTCCAACACATCTTTCAATAAAT
TGTAATTTTAAACCCAAACATTTGCAAGCTGCGCATGTCTTAGGTCAACAAAAACAGCAATACCAGTTTTTAGTTATTCTCTTTTATTTGTGCATTTA
ACCATAACTTCTTGAATAAAAACAGACCAGAGTATATTTATATACTATACTACGTATATGATATGTATATAATACATATACTTATACTAACGTATATG
ACACATGTATATAACATATACTTAAACACAAATAGAAAATAACCATAAAAAAGGAATTGCACGTTAATGTGAACAAATTAACTTATCATTTTTATAAT
AATAAGTACAGCTATATATGTTTAAAGGTTTTTTAGCGTTCAAATACAATGTAA

กรมวิชาการเกษตร

<u>ตารางภาคผนวก 3.6.1</u>

Telenomus_DOAsp01; *Telenomus crassiclava*

ATAGCCTTTCCACGATTAAATAATATAAGATTTTGGCTTTTAATCCCTTCAATTATATTACTTTTATATAGAAACATTTTTGGCATAGGAACAGGAAC
AGGATGAACAATTTATCCTCCCCTTTCATCTCAAATAAACCCATCTATTGATCTAACAATTTTTTCTTTACACGTAGCAGGAATTTCATCAATTTTAA
GATCAATTAATTTTATTTGTACAATAATTAATATAAGAACATCTATTAATTACTGAACTTTATTTTCATGATCAGTATTTATTACTACCATTCTCCTTT
TATTATCCCTTCCTGTATTAGCAGGAGGAATTACTATAATTTTATCAGATCGAAATATAAATACATCATTTTTTAACCCATCAGGAGGAGGAGATCC
TGTTCTTTACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGACATCCAGAAGTTTATATTCTTATTCTTCCTGGATTCGGACTAATTTCCCATATAATTTGTTTAG
AAAGAGGGAAAAAAGAAACATTTGGAGTATTAGGAATAATTTATGCAATAATATCAATTGGATTTTTAGGATTTAT

Trissolcus_DOAsp02; *Trissolcus ogyges*

ATGGCATTTCCACGATTAAATAATATAAGATTTTGATTATTAATTCCCGCATTCTTTTTATTAATTATAAGAAACATTGTTGGACAAGGATCAGGAAC
TGGATGAACACTTTATCCAACACTTTCTACCCAACTTAATCCTTCAGTTGATTATACAATTTTCTCTTTACATATTGCTGGGGTATCATCAATTTTAA
GATCAATTAACTTTTTATGTACAATTTTTATTCTAAGAAACTACCCTATAAAAAATTGAACACTATTTACATGAGCAATTTTAATTACAACAGTTTTA
TTATTATTATCCTTACCAGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATAGTTTTTTCAGATCGAAACTTAAATACATCATTTTTTGACCCAGCAGGAGGAGGGG
ATCCAATTTTATATCAACATTTATTCTGATTTTTTGGACATCCAGAAGTATATATTTTAATTATTCCAGGATTTGGAATAATTTCTCACATAATTTGT
TTAGAAAGAGGGAAAAAGGAAACATTTGGAACACTTGGAATAATCTATGCTATAATTTCAATTGGATTTTTAGGATTTAT

Telenomus_DOAsp03 *Telenomus podisi* 87%

ATAGCTTTCCCTCGGCTAAATAATATAAGATTCTGATTACTAATTCCATCTTTAACATTACTGATTTACAGAAATGTATTTGGATCTGGAACTGGAAC
AGGATGAACAGTTTACCCACCACTATCAACTCAATTAAACCCATCAATTGATTTAACAATTTTCTCTCTTCATATTGCCGGAATTTCTTCAATTTTAA
GATCAATTAATTTCTTATGTACAATTATTAACATAAGAAATTCTTCAATTAACAACTGAACTTTATTTACTTGATCTGTTTTAATTACTACAGTTCTTC
TTTTATTATCTCTACCCGTATTAGCAGGTGCAATTACAATAATTTTATCTGACCGAAATTTAAACACATCTTTCTTCAACCCAGCGGGTGGGGGAGA
TCCAGTTCTTTACCAACATTTATTTTGATTCTTTGGACACCCAGAAGTTTATATTCTAATTCTTCCAGGCTTTGGATTAATTTCTCATATAATTTGTT
TAGAAAGAGGGAAAAAGGAAACATTTGGTATACTAGGAATAGTATATGCAATAGTCTCAATTGGATTTCTTGGATTCAT

Telenomus_DOAsp04 *Telenomus nysivorus* 86%

AGGATTTGGAAATTGGTTTGTTCCACTTATACTTAATGCTCCTGATATAGCCTTTCCCCGCCTAAATAATATAAGATTTTGATTACTAATCCCTTCCT
TAATTCTATTAATCTATAGAAATGTATTTGGATCAGGAACAGGAACAGGATGAACAGTGTATCCCCCCCTTTCAACTCAACTCAATCCTTCAATTGA
TTTAACAATTTTTTCCCTTCATATTGCAGGGATTTCTTCAATTCTTAGATCAATTAATTTCCTCTGCACTATTATTAACATAAAAAATCATTCTATAAA
TAATTGAACATTATTTACATGATCAATCCTAATTACAACAATTTTACTACTTCTTTCCCTTCCAGTTCTAGCAGGAGCTATTACCATAATTTTATCAG
ATCGAAATCTAAATACCTCATTTTTTAATCCTGCTGGAGGGGGGGATCCTGTTCTTTACCAACATTTATTCTGATTTTTTGGACATCCTGAAGTTTAT
ATTTTAATTCTCCCTGGGTTTGGTTTAATCTCACATATGATTTGTTTAGAAAGTGGGAAAAAAGAAACATTTGGAATATTAGGAATAATTTATGCCAT
AGTTTCAATTGGATTCCTAGGATTTATTGTTTGAGCACATCACATATTTTACAGTA

Telenomus_DOAsp05; *Telenomus podisi* 90%

AAATTGGTTAGTTCCATTAATACTTAATGCCCCAGATATAGCTTTTCCACGATTAAATAATATAAGATTTTGATTATTAATTCCATCAATTACACTAT
TAATTTACAGAAATATTTTTGGATCAGGAACAGGAACAGGATGAACTGTTTATCCACCATTATCAACACAAATAAACCCATCTATTGACTTAACAAT
TTTCTCTTTACATATTGCAGGAATTTCTTCTATTCTCAGATCTATTAACTTTATATGTACAATTATTAATATAAAAAATAATTCAATAAATAACTGATC
TTTATTTACATGATCAGTATTAATTACAACAATTTTATTATTACTATCATTACCCGTATTAGCAGGAGCAATTACAATAATTTTATCAGACCGAAATT
TAAATACTACTTTTTTTAACCCTGCAGGAGGAGGAGATCCAATTTTATACCAACATTTATTCTGATTTTTTGGACATCCAGAAGTTTATATTCTAATT
CTTCCAGGATTTGGATTAATTTCACATATAATTTGTTTAGAGAGAGGGAAAAAAGAAACTTTTGGAATATTAGGAATAATTTATGCAATAATATCAAT
TGGATTTTTAGGATTTATTGTATGAGCACATC

Telenomus_DOAsp06; *Telenomus* sp. 100%

TAAAGATATTGGAACACTATACTTCTACTTTGGAATATGAGCTGGAATACTAGGATCCTCAATAAGATCAATAATTCGAATAGAATTAAGAATCCCC
GGCATATTAATTGGAAATGACCAAATTTATAACTCTATTGTAACTTCCCATGCCTTCATTATAATTTTTTTTATAGTTATACCAATTATATTAGGAGG
GTTTGGAAATTGAATTATCCCTTTAATAATTAATGCACCTGACATAGCTTTCCCTCGATTAAATAATATAAGATTTTGACTTCTAATTCCATCATTAA
CACTACTAATTTATAGAAATATTTTTGGAATAGGTACAGGAACCGGCTGAACAGTTTATCCCCCCCTTTCATCCCAAATAAACCCTTCTATTGATTTA
ACTATCTTTTCTCTCCATCTAGCAGGAATCTCCTCGATTCTTAGATCAATTAACTTTATTTGTACAATTATAAATATAAGAAATTCCGTTGAAAATTG
AACCTTATTCTCCTGATCAATTTTTATTACTACTATCCTTTTACTATTATCTCTTCCAGTCTTAGCTGGAGGAATCACTATAATTTTAACTGACCGAA
ATCTTAATACATCCTTCTTTAACCCTTCTGGTGGAGGGGATCCCGTTCTTTACCAACACTTATTCTGATTTTTT

Telenomus_DOAsp07; *Telenomus* sp. 91%

GGAAATTGGTTTGTTCCATTAATAATTAATGCCCCTGATATAGCCTTTCCACGTTTAAACAATTTAAGATTTTGATTACTAATTCCATCTTTAATTTT
ATTAATTTATAGAAACATTTTTGGTATAGGGACTGGAACAGGATGAACAATTTATCCTCCTCTATCCTCTCAACCTAATCCATCAATTGACTTAACAA
TTTTTTCTCTTCATATTGCAGGAATTTCATCAATTCTTAGATCAATTAATTTTATTTGTACTATTATAAACATAAGAAATTTTTCAATTAGAAACTGAT
CTTTATTCTCATGATCAATTTTTTATTACTACTATTCTTCTTCTTCTCTCTCTTCCAGTTCTAGCAGGAGGAATCACAATAATTTTATCTGATCGAAAC
TTAAATACTTCTTTTTTTAATCCATCAGGAGGGGGAGATCCTGTTCTTTATCAACATTTATTCTGATTTTTTGGACACCCTGAAGTATATATTCTAAT
TTTACCAGGATTCGGATTAATCTCTCATATAATTTGTTTAGAAAGAGGAAAAAAAGAAACATTTGGAGTTCTAGGAATAGTATATGCAATAATATCT
ATTGGATTCCTGGGATTTATTGTTTGAGCACATCA

Trissolcus_DOAsp08; *Trissolcus thyantae* 100%

GAAATTGGTTTGTTCCTTTAATAATTAATGCGCCAGATATAGCTTTTCCTCGTTTAAACAATATAAGATTCTGATTATTAATCCCCTCATTAATCCTA
CTAATTTATAGAAATATTTTTGGATCAGGAACGGGAACTGGATGAACACTATACCCCCCATTATCAACTCAATTAAATCCATCAATTGATTTAACAA

กรมวิทยาศาสตร์

TTTTTTCCTTACATATTGCTGGAATTTCCTCAATTTTAAGTTCAATTAATTTTATTTGTACAATTATAAATATAAATAATTGTTCAATTAATAATTGAA
CTCTTTTTACATGATCTGTATTAATTACTACAATCTTACTTTTACTATCTTTACCAGTATTAGCAGGAGCAATTACAATAATTTTATCAGATCGAAAC
CTTAATACATCTTTTTTTAATCCTGCAGGAGGAGGAGATCCAGTATTATACCAACATCTATTTTGATTTTTTGGGCATCCGGAGGTATATATTTTAAT
TTTACCTGGATTTGGATTAATTTCCCATATAATTTGTTTAGAAAGAGGAAAAAAAGAAACATTTGGGATACTAGGAATAGTATATGCAATAATTTCA
ATTGGGTTTCTTGGATTTATTGTTTGAGCACATC

Telenomus_DOAsp09; *Telenomus busseolae* 90%

ATAGCTTTTTCCCGATTAAATAATATAAGATTTTGATTATTAATCCCCTCCTTAATTTTATTAATCTATAGAAATGTATTTGGTTCAGGAACAGGAAC
TGGATGAACAGTTTATCCCCCTTTATCAACTCAATTAAATCCTTCAATTGATTTAACAATTTTTTCACTACACATTGCAGGAATTTCCTCAATTCTTA
GATCAATTAATTTTCTTTGTACAATTATAAATATAGCAAATTCATCAATTAATAACTGATCATTATTTACATGATCAGTTTTAATCACCACAATTTTA
CTTCTTCTATCATTACCCGTACTAGCAGGAGCAATTACAATAATTTTAACAGACCGAAATTTAAATACAGCATTTTTTAACCCTGCAGGAGGAGGAG
ACCCAATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTCGGACACCCAGAAGTTTATATTTTAATTTTACCAGGATTTGGTTTAATTTCCCATATAATCTGT
TTAGAAAGAGGAAAAAAAGAAACTTTTGGTATATTAGGAATAATTTACGCCATAATCTCAATTGGATTTTTAGGATTTATCGTTTGAGCACATAA

Gryon_DOAsp10; *Gryon largi* 90%

ATAAATAATATAAGATTCTGATTATTACCCCCATCATTAATTTTATTAATTTATAGAACATTATTTGGAATAGGATCCGGTACAGGATGAACAGTCTA
TCCCCCATTATCAATCCAAATTAATCCCTCAATTGACCTAACAATTTTTTCTCTTCATTTAGCTGGAATTTCCTCAATTATAAGATCAATTAATTTTA
TTTGCACAATTATTAACCTAAAAAATTTTAAATTAATAAGATTAAGACTATTTTCTTGATCAGTATTAATTACAACAATTTTATTACTATTATCACTTC
CAGTACTTGCAGGAGGTATCACAATATTATTAACAGATCGAAACTTTAACACCTCATTTTTTAATCCCTCAGGAGGAGGAGATCCAGTACTTTATCA
ACATTTATTTTGATTCTTTGGTCATCCAGAAGTATACATTTTAATCCTACCAGGATTTGGAATAATTTCCCATATAATTTGTATAGAAAGAGGAAAAA
AAGAACCATTTGGATCTTTAGGAATAATTTATGCAATAGTATCAATTGGATTTTTAGGTTTTATTGTTTGAGCACATCA

Gryon_DOAsp11; *Gryon largi* 86%

CACCAGATATAGCATTTCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGACTTTTACCACCATCACTAATTTTATTAATTTATAGATCAATATTTGGTATAGGA
TCAGGAACAGGGTGAACAGTATACCCTCCTTTTTCTTCTCAAACAAATCCATCTATTGATTTAACTATTTTTTCTCTTCATCTTGCTGGAATCTCCTC
AATTATAAGTTCAATTAACTTTATTAGAACAATTAAAAATTTTAATTTATATAAAATAAATAATTTATCCTTATTTTCATGATCAGTATTTATTACAAC
TATTTTATTACTTTTATCATTACCTGTACTAGCAGGAGGTATTACAATAATTTTAACTGATCGAAATTTTAATACATCATTCTTTAACCCTTCAGGTG
GGGGGGATCCAATTCTTTATCAACATCTATTTTGATTTTTTGGACATCCTGAAGTTTACATTTTAATTTTACCAGGATTTGGAATAATTTCTCATATA
ATTTGTATAGAAAGAGGAAAAAAAGAACCATTTGGATCATTAGGAATAATTTATGCAATAATTTCAATTGGATTTCTTGGATTTATTGTTTGAGCACA
TCACA

Psix_DOAsp12; *Psix tunetanus* 100%

AATTGGTTAGTTCCATTAATACTTAATGCACCTGATATAGCATTTCCACGACTTAATAATATAAGATTTTGACTTCTTCCACCATCATTAATTCTTTT
AATTTATAGAAATTTTTTTGGGAGAGGAACAGGTACAGGATGAACAGTTTATCCTCCATTTTCTAGACAACCTAACCCATCAATTGATTTAACAATT
TTTTCTCTTCATTTAGCAGGAATTTCATCAATTTTAAGATCAATTAATTTTATTTGTACAATTATTAATTTAAAAACTCATAAATTTACTATAAATAAT
ATTTCTCTTTTTACATGATCAGTGTTAATTACAACTATTCTTCTTTTACTTTCTCTCCCAGTTTTAGCTGGTGCAATTACAATACTTTTATCAGATCG
AAACTTAAATACATCATTTTTTAATCCAGCTGGTGGTGGAGATCCTATTTTATATCAACACTTATTCTGATTTTTTGGCCATCCAGAAGTTTATATTT
TAATTCTTCCAGGATTTGGAATAATTTCTCAAATAATTTGTATAGAAAGAGGAAAGAAAGAAACCTTTGGAATATTAGGTATAATTTATGCTATAATT
TCAATTGGATTTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCA

Telenomus_DOAsp13; *Telenomus* sp. 100%

CTTATATTTTTTCTTTGGTGTATGGTCAGGAATACTAGGATCTGCAATAAGATCAATAATCCGGATAGAACTTGCAGTCCCAGGAATACTAATTGGA
AATGACCAAATCTACAACTCTATTGTTACTTCCCACGCTTTTATTATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATTATACTTGGAGGATTTGGAAATTGAAT
CGTCCCATTAATAATTAATGCACCAGACATAGCATTTCCTCGTTTAAATAATCTTAGATTTTGATTGCTAATTCCATCCCTTATATTACTTATATACA
GAAATGTATTTGGTAGGGGAACAGGGACTGGATGAACTGTATACCCTCCTTTATCATCTCAAATTAATCCATCAATTGATCTAACCATCTTTTCACT
TCATATCGCAGGAATCTCTTCTATCCTTAGATCAATTAATTTTATTTGCACTATTATAAATATAAGAAATTGCTCAATTAATAATTGATCTTTATTTT

กรมวิทยาศาสตร์

CTTGATCAATCTATATTACTACAATTTTACTTCTTCTATCTCTTCCTGTTCTAGCAGGAGGTATTACAATAATTCTATCAGATCGTAACTTAAATACC
TCATTTTTCAACCCATCAGGAGGAGGAGACCCTGTTTTATACCAACACTTATTTTGATTT

Telenomus_DOAsp14; *Telenomus grenadensis* 99%

AACATAAGATTTTGATTTCTAATTCCATCCATCTCTCTATTAATTTATAGTAATATTTTTGGAGCCGGAACAGGAACTGGATGAACTGTTTACCCACC
CCTATCTACTCAATTAAATCCTTCAATTGATTTAACAATTTTCTCATTACATATTGCAGGAATTTCTTCAATTTTAAGTTCAATTAATTTTATATGTAC
CATTTTAAATATAAAAAACAGCTCAATAAACAACTGAACCCTTTTTACATGATCAGTACTAATTACTACAATCCTCCTACTCCTATCCCTCCCAGTTC
TAGCAGGAGCCATTACAATAATTCTATCTGACCGAAACCTAAACACAACATTTTTTAACCCAGCCGGAGGAGGAGATCCCATCCTTTATCAACATTT
ATTCTGATTCTTTGGACACCCAGAAGTTTATATTCTAATTTTACCAGGATTTGGATTAATTTCTCATATAATTTGTCTAGAAAGAGGAAAAAAAGAAA
CATTCGGAATACTTGGAATAATTTATGCAATAATATCTATTGGCTTTTTAGGATTTATTGTATGAGCACATCAC

Trissolcus_DOAsp15; *Trissolcus basalis* 85%

TGATATAGCCTTTCCCCGCCTAAATAATATAAGATTTTGATTACTAATCCCTTCCTTAATTCTATTAATCTATAGAAATGTATTTGGATCAGGAACAG
GAACAGGATGAACAGTGTATCCCCCCCTTTCAACTCAACTCAATCCTTCAATTGATTTAACAATTTTTTCCCTTCATATTGCAGGGATTTCTTCAATT
CTTAGATCAATTAATTTCCTCTGCACTATTATTAACATAAAAAATCATTCTATAAATAATTGAACATTATTTACATGATCAATCCTAATTACAACAAT
TTTACTACTTCTTTCCCTTCCAGTTCTAGCAGGAGCTATTACCATAATTTTATCAGATCGAAATCTAAATACCTCATTTTTTAATCCTGCTGGAGGGG
GGGATCCTGTTCTTTACCAACATTTATTCTGATTTTTTGGACATCCTGAAGTTTATATTTTAATTCTCCCTGGGTTTGGTTTAATCTCACATATGATT
TGTTTAGAAAGTGGGAAAAAAGAAACATTTGGAATATTAGGAATAATTTATGCCATAGTTTCAATTGGATTCCTAGGATTTATTGTTTGAGCTCATC
ACATATTTACAG

Trissolcus_DOAsp16; *Trissolcus* sp. 100%

TAGGATTTGGAAATTGGTTAGTTCCACTTATACTTAATGCTCCTGATATAGCCTTTCCCCGCCTAAATAATATAAGATTTTGATTACTAATCCCTTCC
TTAATTCTATTAATCTATAGAAATGTATTTGGATCAGGAACAGGAACAGGATGAACAGTGTATCCCCCCCTTTCAACTCAACTCAATCCTTCAATTG
ATTTAACAATTTTTTCCCTTCATATTGCAGGGATTTCTTCAATTCTTAGATCAATTAATTTCCTCTGCACTATTATTAACATAAAAAATCATTCTATAA
ATAATTGAACATTATTTACATGATCAATCCTAATTACAACAATTTTACTACTTCTTTCCCTTCCAGTTCTAGCAGGAGCTATTACCATAATTTTATCA
GATCGAAATCTAAATACCTCATTTTTTAATCCTGCTGGAGGGGGGGATCCTGTTCTTTACCAACATTTATTCTGATTTTTTGGACATCCTGAAGTTTA
TATTTTAATTCTCCCTGGGTTTGGTTTAATCTCACATATGATTTGTTTAGAAAGTGGGAAAAAAGAAACATTTGGAATATTAGGAATAATTTATGCCA
TAGTTTCAATTGGATTCCTAGGATTTATTGTTTGAGCACATCACA

Gryon_DOAsp17; *Gryon saxatilis* sp. 85%

AATTGGTTAGTTCCATTAATATTAAATGCACCAGATATAGCCTTCCCTCGACTTAATAATATAAGATTTTGACTTTTACCACCTTCAATTTTATTTTT
AATTTATAGAAATATTTTTGGAATAGGAACAGGAACTGGATGAACTGTTTATCCCCCTTTATCTTCACAATTAAATCCATCAATTGACCTAACAATTT
TTTCTCTTCATTTAGCTGGAATTTCTTCAATTATAAGATCAATTAATTTCATTTCTACAATTATAAATATAAATTCAGTAAAAATAATTAATTTATCAT
TATTTACTTGATCTGTTTTTATTACAACAATTTTATTACTTTTATCATTACCAGTATTAGCAGGGGGAATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTA
AATACTTCATTTTTTAATCCTGCAGGAGGGGGAGATCCAATTCTTTATCAACACTTATTTTGATTTTTTGGACACCCTGAAGTTTATATTTTAATTTT
ACCAGGATTCGGAATAATTTCACATTTAATTTGTATAGAAAGTGGTAAAAAAGAAACATTTGGTATATTAGGAATAATTTATGCAATATTATCTATTG
GATTTTTAGGATTTATTGTATGAGCACATCA

Telenomus_DOAsp18; *Telenomus dignus* 91%

TAGCTTTCCCTGGATGAAATAATATAAGATTTTGATTACTTATTCCTTCATTAATTTTATTAATTTATAGAAATATTTTTGGATCAGGAACAGGAACA
GGATGAACAATTTACCCCCCACTATCTACACAACTCAATCCCTCAATTGATTTAACTATTTTTTCATTACATATTGCAGGAATTTCTTCAATTTTAAG
ATCTATTAATTTTTTATGCACAATTATTAATATATCAAATTCTTCAATTAATAATTGATCATTATTTACTTGATCAGTTTTAATCACCACAGTTTTATT
ATTATTATCATTACCAGTACTAGCAGGAGCTATTACAATAATTTTAACTGATCGAAACTTAAATACAGCATTTTTTAACCCAGCAGGAGGAGGAGAC
CCAATTTTATATCAACATCTATTTTGATTTTTTGGACATCCAGAAGTTTATATTTTAATTCTACCAGGATTTGGATTAATTTCTCATATAATTTGTTTA
GAAAGAGGAAAAAAAGAAACTTTTGGAATACTAGGTATAATTTATGCTATAATTTCAATTGGATTCTTAGGATTCATTGTTTGAGCACATCACATATT

Telenomus_DOAsp19; *Telenomus* 100%

TGGCTTTCCCCGGGTTAAATAATATAAGATTTTGATTATTAATTCCATCTTTAATTTTATTAATCTATAGAAATATTTTTGGATCAGGAACAGGAACA
GGATGAACAATTTACCCCCCTCTATCTATTCAACTTAATCCATCAATTGATTTAACAATCTTTTCTCTTCATATTGCAGGAATCTCATCAATTCTTAG
ATCAATTAATTTCTTATGTACTATTATTAATATAAGTAACTTTTCTATTAATAATTGATCATTATTCACTTGATCTGTTTTAATTACTACAATTTTATT
GCTTCTATCATTACCCGTTTTAGCTGGAGCTATTACAATAATTTTAACCGACCGAAATTTAAATACCACATTTTTTAACCCAGCTGGGGGGGGAGAC
CCAATTTTATACCAACATTTATTTTGGTTTTTTGGGCATCCAGAAGTTTATATTTTAATTTTACCAGGATTCGGATTAATTTCACATATAATCTGTTT
AGAAAGAGGTAAAAAAGAAACTTTTGGTATATTAGGAATAATTTATGCAATAATTTCTATTGGATTTTTAGGATTTATTGTTTGAGC

Gryon_DOAsp20; *Gryon* sp 100%

TTCCATTAATAATTAATGCTCCTGATATAGCTTTTCCCCGAATAAATAATATAAGATTTTGATTACTCCCCCCATCATTAATTTTATTAATTTATAGA
TCATCTTTTGGAATAGGATCAGGAACAGGATGAACAATTTACCCCCCTTTATCCTCCCAATCTAATCCTTCTATTGATTTAACAATTTTTTCTCTTCA
TTTAGCAGGAATCTCATCAATTATAAGATCTATTAACTTTATTACAACAATTATTAACCTAAAAAATTTTAAACTAATTAATTTAACTTTATTTACATG
GTCAGTATTTATTACAACAATTCTATTACTACTATCATTACCAGTATTAGCCGGTAGAATTACAATAATTTTAACTGATCGAAATTTCAATACTTCAT
TTTTTAATCCCTCCGGAGGAGGAGATCCTATTTTATATCAACACTTATTTTGATTTTTTGGACATCCAGAAGTATATATTTTAATTCTTCCAGGATTT
GGAATAATCTCACATATAATTTGTATAGAAAGAGGAAAAAAAGAACCATTTGGAAGATTAGGTATAATTTATGCTATAATTTCAATTGGATTTCTAG
GATTTATTGTCTGAGCACATCACAT

Psix_DOAsp21; *Psix watshami* 87%

GGATTTGGAAATTGGTTTGTTCCATTAATATTAAATGCCCCAGATATAGCATTCCCTCGATTAAATAATGTTAGTTTCTGATTATTAATTCCTTCAAT
AATTTTACTAATCTTTAGAAATTTTTTTGGTAGAGGAACTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCTCCCTTTTCTGCACAAATAAATCCATCAATTGACT
TAACAATTTTTTCTCTTCACTTAGCTGGTGTATCCTCTATTCTTAGATCTATAAATTTTATTTCTACAATTTTAAATATAAAAACTAATATATTTACTA
TAAATAATATTTCATTATTCTCATGATCAGTCCTTATTACAACTATTTTACTTTTATTATCTCTTCCAGTTTTAGCAGGAGCTATCACCATACTTTTAA
CTGATCGAAATTTTAATACCTCATTCTTTAATCCATCAGGTGGAGGTGACCCAGTTCTTTATCAACACCTATTTTGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTA
TATATTTTAATTTTACCTGGATTTGGAATAATTTCCCAAATAATTTGTATAGAAAGAGGAAAAAAAGAAACATTTGGTATACTAGGAATAATTTATGC
TATAATTTCTATTGGATTCTTAGGATTTATTGTTTGAGCTCATCACATATTTTACA

Telenomus_DOAsp22; *Telenomus* sp. 100%

GATATTGGAACATTATATTTCTATTTTGGATTATGGGCAGGAATACTTGGATCCTCTATAAGATCAATAATCCGGATAGAACTAAGAATTCCCGGGA
TATTAATTGGTAATGATCAAATTTATAATTCCATTGTTACATCACACGCATTTATTATAATTTTCTTTATAGTTATACCAGTTATACTTGGAGGCTTT
GGAAACTGATTAATTCCTCTTATAATTAATGCCCCAGATATAGCATTTCCCCGTCTAAATAATATAAGATTTTGATTATTAATTCCAGCAATTATATT
ATTATTATATAGAAACATTTTTGGTATAGGGACCGGAACAGGATGAACAGTTTATCCCCCTCTTTCTTCTCAAATTAATCCTTCTATTGACTTAACCA
TTTTTTCACTCCATGTAGCAGGAATTCTTCTATTCTCAGATCTATTAATTTCATTTGTACAATAATAAATATAAGACTTTTAATTAATTTTTGGTCTC
TTTTTTCATGATCAGTATTTATTACAACTATTCTTTTATTATTATCATTACCTGTCCTAGCCGGAGGAATTACTATAATTTTATCAGACCGAAATCTT
AATACCTCATTTTTTAATCCTGCTGGAGGAGGAGATCCAATTCTTTATCAACACTTATTCTGATTTT

Telenomus_DOAsp23; *Telenomus* sp 89%

TTGGAAATTGGTTAGTTCCATTAATAATCAATGCACCCGATATAGCATTCCCACGATTAAATAATATAAGATTTTGATTATTAATCCCTTCATTAATT
TTATTAATCTATAGAAATATTTTTGGATCAGGAACAGGAACAGGATGAACTGTTTACCCCCCCTTATCTACACAATTAAATCCATCAATTGATTTAAC
CATTTTTTCCCTACATATTGCAGGAATTTCATCAATTTTGAGATCCATTAATTTTCTATGTACAATTATAAATATAACAAATTCATCCATTAATAATT
GATCTTTATTTACATGAGCAGTTCTTATTACAACCATTTTACTTCTATTATCACTACCAGTTCTAGCTGGAGCAATCACTATAATTCTAACTGATCGA
AACCTAAATACTACATTTTTTAACCCAGCAGGAGGAGGAGACCCTATTTTATATCAACACTTATTTTGATTTTTTGGACACCCAGAAGTTTATATTTT
AATCTTGCCAGGATTTGGCCTAATTTCTCATATAATTTGCATAGAAAGAGGAAAAAAAGAAACTTTTGGAATACTAGGAATAGTTTACGCAATAATT
TCTATTGGATTCCTAGGATTTATTGTATGAGCACATCACAT

Cynipoidea; *Cynipoidea* sp. 98%

AAAGATATTGGAGTAATATATTTTATTTTTGGTATTTGATCTGGGATAGTGGGGTCTAGGCTAAGGATAATTATTCGAATAGAATTGGGGACCCCTA
TACAATTAATTAATAATGATCAGATTTATAATGCTATTGTAACGGCTCATGCTTTTGTTATAATTTTTTTTATGGTTATGCCAATTATAGTAGGGGGA
TTTGGGAATTATTTAGTTCCTTTAATGTTGACAGTACCAGATATAGCTTTTCCTCGGTTAAATAATATAAGTTTATGATTGTTATATCCTTCTTTAGT

TTTAATAGTTTCAAGAATGTTTATTGATCAAGGGGCTGGGACAGGGTGAACAGTTTACCCTCCTTTATCTTTATCTGTAAGACACCCGGGGGTGTCT
ACTGATTTAGTTATTTTTTCTTTACATTTAAGAGGGGTATCTTCAATTTTAGGGTCTATTAATTTTATTACTACTATTTTAAATATACGATTAATTAAC
ATAATAATAGATAAAATTACTTTATTTATTTGATCAATTTTTTTAACTACAATTCTTTTATTATTGTCTTTACCTGTTTTAGCTGGGGGGATTACTATA
TTATTATTTGATCGTAATTTAAATACTTCTTTTTATGATCCTATAGGAGGGGGGGATCCTATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTG

Oxyteleia; *Oxyteliea* sp. 100%

GAAATTGGTTAGTTCCTTTAATATTAAACGCTCCTGATATATCTTTCCCACGAATAAATAATATAAGATTCTGATTATTACCTCCTTCATTAATATTA
TTAATTTTTAGAAATTTTTATGGAAGAGGAGTAGGAACAGGATGAACAGTATACCCCCCATTATCTACACAAATTAATCCATCTATTGACCCAGCAA
TTTTTTCCTTACATCTAGCTGGAATATCATCTATTATAGGATCAATTAATTTTCTTTCCACAGTTTTAAATATACGAACTTCAAAAATAACAATAATA
AATATTTCCTTATTTACTTGATCAATTTTTATTACAACTATTTTATTACTACTATCATTACCAGTATTAGCAGGAGGAGTAACTATATTATTAACTGA
CCGAAACTTAAATACATCATTTTTTAACCCAGCTGGAGGAGGAGACCCAGTTCTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGACACCCCGAAGTTTAT
ATTTTAATTTTACCCGGGTTTGGAATTATTTCTCATATAATTTGTATTGAAAGAGGAAAAAAAGAAACATTTGGAATATTAGGAATAGTATACGCTAT
ACTTTCAATTGGATTACTAGGATTTATTGTTTGAGCTCATCA

กรมวิชาการเกษตร

<u>ภาคผนวกที่ 3.7.1</u> DNA Barcode ของแมงมุมแม่ม่าย *Latrodetus geometricus* เพิ่มปริมาณ DNA ด้วย *COX*1

รายละเอียดของ DNA Barcode ของ แมงมุมแม่ม่าย *Latrodetus geometricus* จำนวน 10 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ 1 CBI0101

ATCGNATTAAANTTTCNATCCGNNAATAATATAGNAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAATGATAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATC
AAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAAATAGTAGAAATAAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCA
GCTAAGTGTAAAGAAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCCTACCC
CTATCTCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAAATCTTAAATTATTTATTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGC
ACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAAAAAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATT
ACATTATACAACTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCAATTCGAATAAGAACTCTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAG
CTCCAAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGNNTTGTT

ตัวอย่างที่ 2 CBI0201

AAATAGGATCCCCTCCCCCTGCAGGGTCAAAAAAAGATGTATTAAAATTTCGATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAATGA
TAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAAATAGTAGAAA
TAAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAAGAAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGA
TAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCCTACCCCTATCTCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAAATCTT
AAATTATTTATTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAA
AAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCAATTCGAATAAGA
ACTCTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGTTTTGTTGACACA

ตัวอย่างที่ 3 LPG0101

TTGAACAAATAGGATCCCCTCCCCCTGCAGGGTCAAAAAAAGATGTATTAAAATTTCGATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAGG
TAATGATAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAAATAG
TAGAAATAAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAAGAAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAA
TCCGGATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCCTACCCCTATCTCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAA
AATCTTAAATTATTTATTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCCAATTAATACTGGTATTA
CTATAAAAAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCAATTCGA
ATAAGAACTCTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGATTTTGTTGACCA

ตัวอย่างที่ 4 NAN0101

TTTAGATTTGTTGANACTCTTTCNGTGCAGGGGCAAAAAAAGATCGTATTAGAATTTCGATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAG
GTAATGATAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAAATA
GTAGAAATAAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAAGAAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTA
ATCCGGATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCCTACCCCTATCTCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCA
AAATCTTAAATTATTTATTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCCAATTAATACTGGTATT
ACTATAAAAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCAATTCG
AATAAAAACTCTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGNTTTGTTTGACAC

ตัวอย่างที่ 5 NAN0102

TAGATTTGTTGACATCTTTACGTGAAGGGGAAAAAAAAACGTATTAGAATTTCTATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAAT
GATAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAAATAGTAGA
AATAAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAAGAAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCG
GATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCCTACCCCTATCTCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAAATC
TTAAATTATTTATTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCCAATTAATACTGGTATTACTAT

กรมวิทยาศาสตร์

AAAAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCAATTCGAATAA
GAACTCTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGTTTTTGGTTGACA

ตัวอย่างที่ 6 NAN0201

TTTAGATTTGTTGANATCTTCCGGTGGAGGGGCAAAAAAAGATGTATTAGAATTTCGATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAGGT
AATGATAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAAATAGT
AGAAATAAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAAGAAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAAT
CCGGATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCCTACCCCTATCTCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAA
ATCTTAAATTATTTATTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCCAATTAATACTGGTATTAC
TATAAAAAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCAATTCGAA
TAAGAACTCTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGTTTTGGTTGACAC

ตัวอย่างที่ 7 NAN0202

CCCTTCCCGTGCAGGGGCAGAAAAAGATGTATTAAAATTTCGATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAATGATAATAAAAGT
AAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAAATAGTAGAAATAAAATTAAT
AGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAAGAAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGATAAAGGGGGA
TAAATCGTTCATCCTGCCCCTACCCCTATCTCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAAATCTTAAATTATTTAT
TCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAAAAAAAATTATT
ACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCAATTCGAATAAGAACTCTTATGG
CAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGTTTTGGTTGAA

ตัวอย่างที่ 8 NMA0101

AAATAGGATCCCCTCCCCCTGCAGGGTCAAAAAAAGATGTATTAAAATTTCGATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAATGA
TAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAAATAGTAGAAA
TAAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAAGAAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGA
TAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCCTACCCCTATCTCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAAATCTT
AAATTATTTATTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAA
AAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCAATTCGAATAAGA
ACTCTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCATT

ตัวอย่างที่ 9 NPT0101

GGGATGATCAGTTGTATAATGTAATTGTAACCGGTCATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTATAGTAATACCAGTATTAATTGGGGGATTTGGAAATTG
GTTGGTTCCGCTAATGTTGGGTGCACCGGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATTTAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCATTATTATTATTATTTA
TTTCTTCTATAGAAGAGATAGGGGTAGGGGCAGGATGAACGATTTATCCCCCTTTATCCGGATTAGAAGGCCATAGAGGGAGATCAGTAGATTTTG
CTATTTTTTCTTTACACTTAGCTGGGGCATCTTCAATTATAGGAGCTATTAATTTTATTTCTACTATTTTGAATATACGTTTATATGGAATGAGAATG
GAGAAGGTTAGATTATTTGTTTGATCAGTGTTAATTACAGCTGTTTTACTTTTATTATCATTACCTGTATTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTGAC
GGATCGAAATTTTAATACATCTTTTTTTGACCCTGCAGGGGGAGGGGATCCTATTTTGTTTCAACATTTGTTTTGATTTTTTGNTCACCC

ตัวอย่างที่ 10 PLK0101

AAATAGGATCCCCTCCCCCTGCAGGGTCAAAAAAAGATGTATTAAAATTTCGATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAATGA
TAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAAATAGTAGAAA
TAAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAAGAAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGA
TAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCCTACCCCTATCTCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAAATCTT
AAATTATTTATTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAA
AAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCAATTCGAATAAGA
ACTCTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGTTTTGTTGACCCA

ตรวจการเกษตร

รายละเอียดของ DNA Barcode ของ แมงมุมแม่ม่าย *Latrodetus elegans* จำนวน 10 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ 1 PKN0201

TGAACTATTTMTCCTCCTTTRTCAAGATTAGARGGTCATAGAGGGAGATCAGTAGATTTTGCAATTTTTTCTTTACATTTRGCAGGNGCNTCTTCTA
TTATRGGGGCTATTAATTTTATTTCTACTATTATNAATWTACGTTTGGTTGGNATATCTATRGAAAARGTAAGATTATTTGTTTGNTCNGTWTTNAT
TACTGCNGTNTTNTTATTATTATCATTACCTGTNTTGGCAGGGGCNATNACNATANTATTAACTGATCGTAATTTTAATACNTCATTTTTTGATCCN
GCAGGAGGGGGTGATCCTATNTTGTTTCNACATTTGTTTTGATTTTTTGGNCANCCTGAAGTTTATATTTTANTTTTACCGGGA

ตัวอย่างที่ 2 PKN0202

GCAAATCANAACAAATGTTGAACAAGATAGGATCACCCCCTCCTGCAGGATCAAAAAATGAAGTATTAAAATTACGATCAGTTAATAATATTGTAAT
TGCCCCTGCCAATACAGGTAATGATAATAATAATAATACTGCAGTAATTAAAACTGACCAAACAAATAATCTTACTTTTTCTATAGATATCCCAACCA
AACGTATATTCATAATAGTAGAAATAAAATTAATAGCCCCTATAATAGAAGAAGCTCCTGCTAAATGTAAAGAAAAAATTGCAAAATCTACTGATCT
CCCTCTATGACCATCTAATCTTGATAAAGGAGGATAAATAGTTCACCCTGATCCCACTCCAACTTCTTCTAAAGAAGAAATAAACAATAAAATTAAA
GAAGAAGGCAATAATCAAAATCTTAAATTATTTATACGAGGAAAAGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGAGGAACTAATCAATTTCAAAAATCCT
CC

ตัวอย่างที่ 3 CNT0101

GAGCTCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGATTTTGATTATTGCCTTCTTCTTTAATTTTATTGTTTATTTCTTCTTTAGAAGAAGTTG
GAGTGGGATCAGGGTGAACTATTTATCCTCCTTTATCAAGATTAGAGGGTCATAGAGGGAGATCAGTAGATTTTGCAATTTTTTCTTTACATTTAGC
AGGAGCTTCTTCTATTATAGGGGCTATTAATTTTATTTCTACTATTATGAATATACGTTTGGTTGGGATATCTATAGAAAAAGTAAGATTATTTGTTT
GGTCAGTTTTAATTACTGCAGTATTGTTATTATTATCATTACCTGTATTGGCAGGGGCAATTACAATATTATTAACTGATCGTAATTTTAATACTTCA
TTTTTTGATCCTGCAGGAGGGGGTGATCCTATCTTGTTTCAACATTTGTTTTGATTTTTTGGCCATCCTGAAGTTTATATTTTATTTTTACCGGGA

ตัวอย่างที่ 4 PKN0101

AGGATCCCCTCCCCCTGCAGGGTCAAAAAAAGATGTATTAAAATTTCGATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAATGATAAT
AAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAAATAGTAGAAATAAA
ATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAAGAAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGATAAA
GGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCCTACCCCTATCTCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAAATCTTAAAT
TATTTATTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAAAAAA
AATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCAATTCGAATAAGAACTC
TTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGTTT

ตัวอย่างที่ 5 CBI010

AATAATATAGNAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAATGATAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAACAAATAATCTAACCTTCTCCA
TTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAAATAGTAGAAATAAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAAGAAAAAATAGC
AAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCCTACCCCTATCTCTTCTATAGAAGAAATA
AATAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAAATCTTAAATTATTTATTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCCAACATTAGCGGAACCAACC
AATTTCCAAATCCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAAAAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACTGATCATCCCCT
AATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCAATTCGAATAAGAACTCTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAAATACTAAATACAAAGTCC
CAATATCTTTATG

ตัวอย่างที่ 6 PKN0102

TTTGGAGCTTGGGCTGCTATAGTAGGAACTGCCATAAGAGTTCTTATTCGAATTGAATTAGGTCAACCTGGAAGAATATTAGGGGATGATCAGTTGT
ATAATGTAATTGTAACCGGTCATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTTATAGTAATACCAGTATTAATTGGGGGATTTGGAAATTGGTTGGTTCCGCTAATG
TTGGGTGCACCGGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATTTAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCATTATTATTATTATTTATTTCTTCTATAGAAGA
GATAGGGGTAGGGGCAGGATGAACGATTTATCCCCCTTTATCCGGATTAGAAGGCCATAGAGGGAGATCAGTAGATTTTGCTATTTTTTCTTTACAC
TTAGCTGGGGCATCTTCAATTATAGGAGCTATTAATTTTATTTCTACTATTTTGAATATACGTTTATATGGAATGAGAATGGAGAAGGTTAGATTATT

กรมวิชาการเกษตร

TGTTTGATCAGTGTTAATTACAGCTGTTTTACTTTTATTATCATTACCTGTATTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTGACGGATCGAAATTTTAATA
CATCTTTTTTTGACCCTGCAGGGGGAGGGGATCCTATTTTGTTTCAACATTTGTTTTGATTTTTTGGTCACCCT

ตัวอย่างที่ 7 CNT0102

TTGGNCCCTGAATTAGAGCAGGAATACATAAGAACATCTGTGTAAGACTTTTAATTCGAGCTGAATTAGGAAATCCCGGATCTTTAATTGGAGATGA
CCAAATTTATAATACTATTGTAACAGCTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAGTTATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGATTAGTTC
CCCTGATATTAGGAGCCCCTGATATAGCCTTCCCACGAATAAATAATATAAGTTTTTGATTCTTACCCCCCTCTCTCACCCTTTTAATTTCAAGAAGA
ATCGTAGAAAATGGAGCAGGTACTGGTTGAACTGTCTATCCCCCCCTATCTTCTAATATTGCTCATGGAGGTAGTTCAGTAGATTTAGCTATTTTTT
CTTTACATTTAGCTGGTATTTCATCGATTTTAGGAGCTATTAATTTTATTACCACTATTATTAATATACGAGTTAATGGACTTTCATTTGATCAAATA
CCTTTATTTGTTTGAGCTGTTGGTATTACTGCTTTACTCCTTCTTTTATCATTGCCAGTTTTAGCTGGAGCTATCACAATATTATTAACGGATCGTAA
TTTAAATACATCATTCTTTGATCCTGCAGGTGGAGGAGACCCAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCTGAAGTTTA

ตัวอย่างที่ 8 KKN0201

GAGCTCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGATTTTGATTATTGCCTTCTTCTTTAATTTTATTGTTTATTTCTTCTTTAGAAGAAGTTG
GAGTGGGATCAGGGTGAACTATTTATCCTCCTTTATCAAGATTAGAGGGTCATAGAGGGAGATCAGTAGATTTTGCAATTTTTTCTTTACATTTAGC
AGGAGCTTCTTCTATTATAGGGGCTATTAATTTTATTTCTACTATTATGAATATACGTTTGGTTGGGATATCTATAGAAAAAGTAAGATTATTTGTTT
GGTCAGTTTTAATTACTGCAGTATTGTTATTATTATCATTACCTGTATTGGCAGGGGCAATTACAATATTATTAACTGATCGTAATTTTAACACTTCA
TTTTTTGATCCTGCAGGAGGGGGTGATCCTATTTTGTTTCAACATTTATTTTGATTTTTTGGCCATCCTGAAGTTTATATTTTAATTTTACCGGGA

ตัวอย่างที่ 9 KKN0202

CAAATAAATGTTGAACAAAATAGGATCACCCCCTCCTGCAGGATCAAAAAATGAAGTGTTAAAATTACGATCAGTTAATAATATTGTAATTGCCCCT
GCCAATACAGGTAATGATAATAATAACAATACTGCAGTAATTAAAACTGACCAAACAAATAATCTTACTTTTTCTATAGATATCCCAACCAAACGTAT
ATTCATAATAGTAGAAATAAAATTAATAGCCCCTATAATAGAAGAAGCTCCTGCTAAATGTAAAGAAAAAATTGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTA
TGACCCTCTAATCTTGATAAAGGAGGATAAATAGTTCACCCTGATCCCACTCCAACTTCTTCTAAAGAAGAAATAAACAATAAAATTAAAGAAGAAG
GCAATAATCAAAATCTTAAATTATTTATACGAGGAAAAGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGAGGAACTAATCAATTTCAAAATCCTCCA

ตัวอย่างที่ 10 CBI0202

TATTGGAGCTTGGGCTGCTATAGTAGGAACTGCCATAAGAGTTCTTATTCGAATTGAATTAGGTCAACCTGGAAGAATATTAGGGGATGATCAGTTG
TATAATGTAATTGTAACCGGTCATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTATAGTAATACCAGTATTAATTGGGGGATTTGGAAATTGGTTGGTTCCGCTAAT
GTTGGGTGCACCGGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATTTAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCATTATTATTATTATTTATTTCTTCTATAGAAG
AGATAGGGGTAGGGGCAGGATGAACGATTTATCCCCCTTTATCCGGATTAGAAGGCCATAGAGGGAGATCAGTAGATTTTGCTATTTTTTCTTTACA
CTTAGCTGGGGCATCTTCAATTATAGGAGCTATTAATTTTATTTCTACTATTTTGAATATACGTTTATATGGAATGAGAATGGAGAAGGTTAGATTAT
TTGTTTGATCAGTGTTAATTACAGCTGTTTTACTTTTATTATCATTACCTGTATTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTGACGGATCGAAATTTTAAT
ACATCTTTTTTTGACCCTGCAGGGGGAGGGGATCCTATTTTGTTTCAACATTTGTTTTGATTTTTTGGTCACCCTGGAAGTTTAAA

<u>ภาคผนวกที่ 3.13.1</u> DNA Barcode ของแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae เพิ่มปริมาณ DNA ด้วย *COX*1

รายละเอียดของ DNA Barcode ของ แมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae จำนวน 25 ตัวอย่าง

>**ตัวอย่างที่ 1** MSS1

AACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCTGCTATAGTAGGAACTGCTATGAGAGTTTTAATTCGAATAGAATTGGGTCAAACAGGAAGTTTTTTAG
GAAATGATCATATATATAATGTAATTGTAACGGCTCATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTATAGTAATGCCAATTTTAATTGGAGGTTTTGGAAATTGA
TTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCAGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATTTAAGATTTTGATTGTTACCTCCTTCTTTATTTTTATTATTTATT
TCTTCTATAGCTGAAATGGGTGTAGGAGCTGGGTGAACGGTATATCCTCCTCTTGCTTCAATTGTTGGACATAATGGTAGATCTGTTGATTTTGCAA
TTTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGCTTCTTCTATTATGGGGGCTATTAATTTTATTTCAACTGTTATTAATATACGGTCTGTTGGGATAAGATTGGAT

AAGGTTCCTTTATTTGTATGATCTGTTGTAATTACTGCTGTTTTATTATTATTATCATTACCTGTATTAGCAGGTGCTATTACAATATTGTTAACTGA
TCGTAATTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGGAGGTGGTGATCCAATTTTATTTCAACATTTGTTT

>**ตัวอย่างที่ 2** MSS2

AACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCTGCTATAGTAGGAACTGCTATGAGAGTTTTAATTCGAATAGAATTGGGTCAAACAGGAAGTTTTTTAG
GAAATGATCATATATATAATGTAATTGTAACGGCTCATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTATAGTAATGCCAATTTTAATTGGAGGTTTTGGAAATTGA
TTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCAGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATTTAAGATTTTGATTGTTACCTCCTTCTTTATTTTTATTATTTATT
TCTTCTATAGCTGAAATGGGTGTAGGAGCTGGGTGAACGGTATATCCTCCTCTTGCTTCAATTGTTGGACATAATGGTAGATCTGTTGATTTTGCAA
TTTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGCTTCTTCTATTATGGGGGCTATTAATTTTATTTCAACTGTTATTAATATACGGTCTGTTGGGATAAGATTGGAT
AAGGTTCCTTTATTTGTATGATCTGTTGTAATTACTGCTGTTTTATTATTATTATCATTACCTGTATTAGCAGGTGCTATTACAATATTGTTAACTGA
TCGTAATTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGGAGGTGGTGATCCAATTTTATTTCAACATTTGTTT

>**ตัวอย่างที่ 3** MSS3

AACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCTGCTATAGTAGGAACTGCTATGAGAGTTTTAATTCGAATAGAATTGGGTCAAACAGGAAGTTTTTTAG
GAAATGATCATATATATAATGTAATTGTAACGGCTCATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTATAGTAATGCCAATTTTAATTGGAGGTTTTGGAAATTGA
TTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCAGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATTTAAGATTTTGATTGTTACCTCCTTCTTTATTTTTATTATTTATT
TCTTCTATAGCTGAAATGGGTGTAGGAGCTGGGTGAACGGTATATCCTCCTCTTGCTTCAATTGTTGGACATAATGGTAGATCTGTTGATTTTGCAA
TTTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGCTTCTTCTATTATGGGGGCTATTAATTTTATTTCAACTGTTATTAATATACGGTCTGTTGGGATAAGATTGGAT
AAGGTTCCTTTATTTGTATGATCTGTTGTAATTACTGCTGTTTTATTATTATTATCATTACCTGTATTAGCAGGTGCTATTACAATATTGTTAACTGA
TCGTAATTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGGAGGTGGTGATCCAATTTTATTTCAACATTTGTTT

>**ตัวอย่างที่ 4 MSS4**

AACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCTGCTATAGTAGGAACTGCTATGAGAGTTTTAATTCGAATAGAATTGGGTCAAACAGGAAGTTTTTTAG
GAAATGATCATATATATAATGTAATTGTAACGGCTCATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTATAGTAATGCCAATTTTAATTGGAGGTTTTGGAAATTGA
TTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCAGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATTTAAGATTTTGATTGTTACCTCCTTCTTTATTTTTATTATTTATT
TCTTCTATAGCTGAAATGGGTGTAGGAGCTGGGTGAACGGTATATCCTCCTCTTGCTTCAATTGTTGGACATAATGGTAGATCTGTTGATTTTGCAA
TTTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGCTTCTTCTATTATGGGGGCTATTAATTTTATTTCAACTGTTATTAATATACGGTCTGTTGGGATAAGATTGGAT
AAGGTTCCTTTATTTGTATGATCTGTTGTAATTACTGCTGTTTTATTATTATTATCATTACCTGTATTAGCAGGTGCTATTACAATATTGTTAACTGA
TCGTAATTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGGAGGTGGTGATCCAATTTTATTTCAACATTTGTTT

>**ตัวอย่างที่ 5 MSS5**

AACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCTGCTATAGTAGGAACTGCTATGAGAGTTTTAATTCGAATAGAATTGGGTCAAACAGGAAGTTTTTTAG
GAAATGATCATATATATAATGTAATTGTAACGGCTCATGCTTTTGTAATAATTTTTTTTATAGTAATGCCAATTTTAATTGGAGGTTTTGGAAATTGA
TTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCAGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATTTAAGATTTTGATTGTTACCTCCTTCTTTATTTTTATTATTTATT
TCTTCTATAGCTGAAATGGGTGTAGGAGCTGGGTGAACGGTATATCCTCCTCTTGCTTCAATTGTTGGACATAATGGTAGATCTGTTGATTTTGCAA
TTTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGCTTCTTCTATTATGGGGGCTATTAATTTTATTTCAACTGTTATTAATATACGGTCTGTTGGGATAAGATTGGAT
AAGGTTCCTTTATTTGTATGATCTGTTGTAATTACTGCTGTTTTATTATTATTATCATTACCTGTATTAGCAGGTGCTATTACAATATTGTTAACTGA
TCGTAATTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGGAGGTGGTGATCCAATTTTATTTCAACATTTGTTT

>**ตัวอย่างที่ 6 MSS6**

AGTTARWTWAAAAATCAAACAAATGMTGAATAAAATTGGATCCCCTCCCTCCATSAGGATCAAAAAAAGATGTATTAAAATTTCGATCTGTTAACA
ATATATGTAATAGCTCCAGCTAAAACTGGTAATGATAATAATAATAAAACAGCTGTAATGATAACTGATCATACAAATAATGGTACCTTATCTAAAG
ATATTCCAATTCTTCGTATATTAATTACGGTAGAAATAAAATTAATAGCCCCTATAATTGAAGAAGCACCAGCCAAATGTAAAGAAAAAATAGCAAA
ATCCATAGATCTTCCATTATGTCCTACAATAGAAGCTAAAGGAGGATAAACAGTTCACCCCGCACCCACTCCTATTTCAGCTATAGAAGAAATAAAT
AATAATATTAATGATGGGGGTAAAAGTCAAAAACTCAAATTATTTATACGWGGAAAAGCCATATCAGGAGCACCTAATATTAAAGGAACTAATCAAT
TTCAAATCCTCCCA

>**ตัวอย่างที่ 7 MSS7**

NGTGNGNNACATCAAATAAATGTTGAAATAAAATTGGATCTCCTCCTCCTGCAGGATCAAAAAAAGAAGTATTAAAATTTCGATCAGTCAATAACAT
TGTAATAGCACCCGCTAATACAGGTAAAGATAATAATAATAAAATAGCAGTAATTATTACAGATCATACAAATAACGAAATTTTATCTATTGATATTC
CTACCGAACGTATATTAATAATTGTAGAAATAAAATTAATAGCTCCTATAATAGAAGAAGCACCAGCTAAATGTAAAGAAAAAATAGCAAAATCTAC
TGATCTTCCATTATGCCCAACAATAGATGCTAAAGGAGGATATACTGTTCATCCTGCCCCTACTCCCATTTCAACTATAGAAGAAATAAATAATAAT
ATTAAAGAAGGAGGTAACAATCAAAATCTTAAATTATTTATTCGAGGAAAAGCCATATCAGGTGCTCCTAATATTAATGGAACTAATCAATTTCAAA
ATCCTCCN

>ตัวอย่างที่ 8 MSS8

TTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGATTTTGATTATTACCACCTTCTTTATTTTTATTATTTATTTCTTCTAT
AGCAGAAATAGGCGTAGGTGCTGGTTGAACAGTTTACCCTCCTTTAGCTTCCATTGTGGGACATAATGGAAGTGCTGTTGATTTTGCTATTTTTTCT
CTTCATTTAGCTGGTGCCTCATCCATTATAGGAGCAATTAATTTTATTTCAACTGTAATTAATATACGTTCTATTGGTATAAGTTTAGATAAGGTTCC
TTTGTTTGTATGATCTGTAGTAATTACAGCTGTATTATTATTATTATCATTACCTGTATTAGCAGGTGCTATTACAATATTATTAACTGATCGAAATT
TTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGGTGGAGGAGATCCAATTTTATTTCAACATTTATTTTGATTTTTTGGACATCCT

>ตัวอย่างที่ 9 MSS9

GGAGCTCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGATTTTGATTATTACCACCTTCTTTATTTTTATTATTTATTTCTTTTATAGCAGAAATAG
GCGTAGGTGCTGGTTGAACAGTTTACCCTCCTTTAGCTTCCATTGTGGGACATAATGGAAGTGCTGTTGATTTTGCTATTTTTTCTCTTCATTTAGC
TGGTGCCTCATCCATTATAGGAGCAATTAATTTTATTTCAACTGTAATTAATATACGTTCTATTGGTATAAGTTTAGATAAGGTTCCTTTGTTTGTAT
GATCTGTAGTAATTACAGCTGTATTATTATTATTATCATTACCTGTATTAGCAGGTGCTATTACAATATTATTAACTGATCGAAATTTTAATACTTCT
TTTTTTGATCCTGCAGGTGGAGGAGATCCAATTTTATTTCAACATTTATTTTGATTTTTTGGACATCCTGAAGTTTATATTTTATTTTTACCGGGA

>ตัวอย่างที่ 10 MSS10

AACTTTATATTTAATTTTTGGAGCTTGAGCAGCTATAGTTGGAACAGCAATAAGAGTATTGATTCGAATAGAGTTAGGTCAAACGGGAAGTTTTTTA
GGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTTTTGTTATAATTTTTTTTATAGTAATACCTATTTTAATTGGAGGATTTGGAAATTG
ATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGTTTTTGACTATTACCCCCTTCTTTAATATTATTATTTAT
TTCTTCTATAGCTGAGATAGGAGTAGGTGCAGGTTGGACTGTTTATCCTCCTTTAGCATCAATTGTAGGTCATAATGGAAGATCTGTTGATTTTGCT
ATTTTTTCTTTACATTTAGCGGGTGCTTCATCGATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACGGTAATTAATATACGATCAGTAGGAATATCTATAGA
TAAGATTCCATTGTTTGTATGATCAGTAGTTATTACTGCTGTTTTATTATTATTATCTCTACCTGTTTTAGCAGGTGCTATTACTATATTGTTAACTG
ATCGAAATTTTAATACTTCTTTTTTTGACCCTGCAGGTGGTGGGGATCCTATTTTATTTCAACATTTATTT

>ตัวอย่างที่ 11 MSS11

AACTTTATATTTAATTTTTGGAGCTTGAGCAGCTATAGTTGGAACAGCAATAAGAGTATTGATTCGAATAGAGTTAGGTCAAACGGGAAGTTTTTTA
GGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTTTTGTTATAATTTTTTTTATAGTAATACCTATTTTAATTGGAGGATTTGGAAATTG
ATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGTTTTTGACTATTACCCCCTTCTTTAATGTTATTATTTAT
TTCTTCTATAGCTGAGATAGGAGTAGGTGCAGGTTGGACTGTTTATCCTCCTTTAGCATCAATTGTAGGTCATAATGGAAGATCTGTTGATTTTGCT
ATTTTTTCTTTACATTTAGCGGGTGCTTCATCGATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACGGTAATTAATATACGATCAGTAGGAATATCTATAGA
TAAGATTCCATTGTTTGTATGATCAGTAGTTATTACTGCTGTTTTATTATTATTATCTCTACCTGTTTTAGCAGGTGCTATTACTATATTGTTAACTG
ATCGAAATTTTAATACTTCTTTTTTTGACCCTGCAGGTGGTGGGGATCCTATTTTATTTCAACATTTATTT

>ตัวอย่างที่ 12 MSS12

AACTTTATATTTAATTTTTGGAGCTTGAGCAGCTATAGTTGGAACAGCAATAAGAGTATTGATTCGAATAGAGTTAGGTCAAACGGGAAGTTTTTTA
GGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTTTTGTTATAATTTTTTTTATAGTAATACCTATTTTAATTGGAGGATTTGGAAATTG
ATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGTTTTTGACTATTACCCCCTTCTTTAATATTATTATTTAT
TTCTTCTATAGCTGAGATAGGAGTAGGTGCAGGTTGGACTGTTTATCCTCCTTTAGCATCAATTGTAGGTCATAATGGAAGATCTGTTGATTTTGCT
ATTTTTTCTTTACATTTAGCGGGTGCTTCATCGATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACGGTAATTAATATACGATCAGTAGGAATATCTATAGA
TAAGATTCCATTGTTTGTATGATCAGTAGTTATTACTGCTGTTTTATTATTATTATCTCTACCTGTTTTAGCAGGTGCTATTACTATATTGTTAACTG
ATCGAAATTTTAATACTTCTTTTTTTGACCCTGCAGGTGGTGGGGATCCTATTTTATTTCAACATTTATTT

ตรวจการบ้าน

>ตัวอย่างที่ 13 MSS13

AACTTTATATTTAATTTTTGGAGCTTGAGCAGCTATAGTTGGAACAGCAATAAGAGTATTGATTCGAATAGAGTTAGGTCAAACGGGAAGTTTTTTA
GGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTTTTGTTATAATTTTTTTTATAGTAATACCTATTTTAATTGGAGGATTTGGAAATTG
ATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGTTTTTGACTATTACCCCCTTCTTTAATGTTGTTATTTA
TTTCTTCTATAGCTGAGATAGGAGTGGGTGCAGGTTGGACTGTTTATCCTCCTTTAGCATCAATTGTAGGTCATAATGGAAGATCTGTTGATTTTGC
TATTTTTTCTTTACATTTAGCGGGTGCTTCATCGATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACGGTAATTAATATACGATCAGTAGGAATATCTATAG
ATAAGATTCCATTGTTTGTATGATCAGTAGTTATTACTGCTGTTTTATTATTATTATCTCTACCTGTTTTAGCAGGTGCTATTACTATGTTGTTAACT
GATCGAAATTTTAATACTTCTTTTTTTGACCCTGCAGGTGGTGGGGATCCTATTTTATTTCAACATTTATTT

>ตัวอย่างที่ 14 MSS14

AACTTTATATTTAATTTTTGGAGCTTGAGCAGCTATAGTTGGAACAGCAATAAGAGTATTGATTCGAATAGAGTTAGGTCAAACGGGAAGTTTTTTA
GGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTTTTGTTATAATTTTTTTTATAGTAATACCTATTTTAATTGGAGGATTTGGAAATTG
ATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGTTTTTGACTATTACCCCCTTCTTTAATATTATTATTTAT
TTCTTCTATAGCTGAGATAGGAGTAGGTGCAGGTTGGACTGTTTATCCTCCTTTAGCATCAATTGTAGGTCATAATGGAAGATCTGTTGATTTTGCT
ATTTTTTCTTTACATTTAGCGGGTGCTC

ATCGATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACGGTAATTAATATACGATCAGTAGGAATATCTATAGATAAGATTCCATTGTTTGTATGATCAGTAG
TTATTACTGCTGTTTTATTATTATTATCTCTACCTGTTTTAGCAGGTGCTATTACTATATTGTTAACTGATCGAAATTTTAATACTTCTTTTTTTGACC
CTGCAGGTGGTGGGGATCCTATTTTATTTCAACATTTATTT

>ตัวอย่างที่ 15 MSS15

ATTATTATTTATTTCTTCTATAATTGAAATAGGAGTTGGGGCTGGATGGACTGTTTATCCTCCTTTAGCTTCTGTTGTAGGGCATGGAGGAAATTCT
GTTGATTTTGCTATTTTTTCTTTACATTTGGCTGGTGCTTCTTCTATTATAGGGGCTATTAATTTTATTTCTACTATTATTAATATACGTTCAGTTGG
GATATCTATAGATAAAATTTCTTTATTTGTTTGGTCTGTAATTATTACTGCTGTATTATTATTATTATCATTACCAGTTTTAGCTGGTGCTATTACTAT
ATTGTTAACTGATCGAAATTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGGAGGAGGGGATCCTATTTTATTTCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCATC
CAGAAGTGTATATTTTGATTTTGCCTGGATTTGGAATTGTTTCTCATGTGATTAGATCTTCTGTTGGAAAGCGAGAACCTTTTGGATTTTTAGGAATA
GTTTATGCTATAGTTGGAATTGGTGGTATAGGATTTGTTGTTTGAGCTCATCATATGTTTTCTGTTGGAATGGATGTAGATACTCGAGCTTATTTTAC
TGCTGCTACTATAATTATTGCTGTTCCTACAGGAATTAAAGT

>ตัวอย่างที่ 16 MSS16

ATTATTATTTATTTCTTCTATAATTGAAATAGGAGTTGGGGCTGGATGGACTGTTTATCCTCCTTTAGCTTCTGTTGTAGGGCATGGAGGAAATTCT
GTTGATTTTGCTATTTTTTCTTTACATTTGGCTGGTGCTTCTTCTATTATAGGGGCTATTAATTTTATTTCTACTATTATTAATATACGTTCAGTTGG
GATATCTATAGATAAAATTTCTTTATTTGTTTGGTCTGTAATTATTACTGCTGTATTATTATTATTATCATTACCAGTTTTAGCTGGTGCTATTACTAT
ATTGTTAACTGATCGAAATTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGGAGGAGGGGATCCTATTTTATTTCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCATC
CAGAAGTGTATATTTTGATTTTGCCTGGATTTGGAATTGTTTCTCATGTGATTAGATCTTCTGTTGGAAAGCGAGAACCTTTTGGATTTTTAGGAATA
GTTTATGCTATAGTTGGAATTGGTGGTATAGGATTTGTTGTTTGAGCTCATCATATGTTTTCTGTTGGAATGGATGTAGATACTCGAGCTTATTTTAC
TGCTGCTACTATAATTATTGCTGTTCCTACAGGAATTAAAGTATTTAGATGAATAGCTACTTTATATGGATCATATTTTAAAGTAGATACTCCATTAA
TATGGTGTATTGGATTTGTATTTTTATTTACTTTGGGAGGGATTACGGGTGTAATTTTATCTAATTCTTCTTTGGATATTGTATTACATGATACTTAT
TATGTGGTTGCACATTTTCATTATGTTTTAAGAATAGGAGCTGTGTTTGCTATTTTAGCTGGAATTACTTATTGATTTCCTTTATTTTTTGGAGTTGT
ATTAAA

>ตัวอย่างที่ 17 MSS17

AACGTTATATTTAATTTTTGGGGCTTGATCAGCTATAGTTGGTACTGCTATAAGAGTTTTGATTCGAATAGAATTAGGTCAGACAGGTGATTTTTTG
GGTAATGATCATTTATATAATGTGATTGTTACTGCTCATGCTTTTGTTATAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTTTAATTGGTGGTTTTGGTAATTG
ATTAGTTCCTTTAATATTGGGGGCTCCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTTTAATATTATTATTTAT
TTCTTCTATAATTGAAATAGGAGTTGGGGCTGGATGAACTGTTTATCCTCCTTTAGCTTCTGTTGTAGGACATGGAGGAAATTCTGTTGATTTTGCT

ATTTTTTCTTTACATTTGGCTGGTGCTTCTTCTATTATAGGGGCTATTAATTTTATTTCTACTATTATTAATATACGTTCAGTTGGAATATCTATAGA
TAAAGTTTCTTTATTTGTTTGATCTGTTATTATTACTGCTGTATTATTATTATTATC

>ตัวอย่างที่ 18 MSS18

TTCNNCNNTANATTNTTTTTNATTNGGGTTATTACCTCCTTCTTTAATATTATTATTTATTTCTTCTATAATTGAAATAGGAGTTGGGGCTGGATGG
ACTGTTTATCCTCCTTTAGCTTCTGTTGTAGGGCATGGAGGAAATTCTGTTGATTTTGCTATTTTTTCTTTACATTTGGCTGGTGCTTCTTCTATTAT
AGGGGCTATTAATTTTATTTCTACTATTATTAATATGCGTTCAGTTGGATTATCTATAGATAAAATTTCTTTATTTGTTTGGTCTGTAATTATTACTG
CTGTATTATTATTATTATCATTACCAGTTTTAGCTGGTGCTATTACTATATTGTTAACTGATCGAAATTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGGA
GGGGGGAGATCCTATTTTATTTCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGTTTATATTTTAATTTTACCGGGA

>ตัวอย่างที่ 19 MSS19

AACATTATATTTAATTTTTGGAGCTTGGGCTGCTATAGTAGGAACTGCTATAAGAGTATTAATTCGAATAGAGTTAGGACAAACAGGAAGATTTTTA
GGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTTTTGTTATAATTTTTTTTATAGTTATACCTATTTTAATTGGAGGTTTTGGAAATTG
ATTGGTTCCTTTAATGTTAGGGGCTCCAGATATAGCTTTTCCTCGAATGAATAATTTAAGTTTTTGATTACTTCCTCCGTCATTAATATTATTATTTA
TTTCATCAATAGTAGAAATAGGAGTAGGGGCTGGATGAACTGTATATCCTCCTTTAGCTTCTATTGTTGGTCATAATGGTAGATCAGTAGATTTTGC
TATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAGCTTCTTCTATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACAGTAGTAAATATACGATCTATTGGAATATCTATAG
ATAAGATTCCTTTGTTTGTATGATCGGTTATTATTACTGCTGTTTTATTATTGTTATCATTACCAGTATTAGCAGGTGCTATTACTATATTATTGACT
GATCGTAATTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGGAGATCCTATTTTATTTCAACATTTGTTT

>ตัวอย่างที่ 20 MSS20

AACATTATATTTAATTTTTGGAGCTTGGGCTGCTATAGTAGGAACTGCTATAAGAGTATTAATTCGAATAGAGTTAGGACAAACAGGAAGATTTTTA
GGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTTTTGTTATAATTTTTTTTATAGTTATACCTATTTTAATTGGAGGTTTTGGAAATTG
ATTGGTTCCTTTAATGTTAGGGGCTCCAGATATAGCTTTTCCTCGAATGAATAATTTAAGTTTTTGATTACTTCCTCCGTCATTAATATTATTATTTA
TTTCATCAATAGTAGAAATAGGAGTAGGGGCTGGATGAACTGTATATCCTCCTTTAGCTTCTATTGTTGGTCATAATGGTAGATCAGTAGATTTTGC
TATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAGCTTCTTCTATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACAGTAGTAAATATACGATCTATTGGAATATCTATAG
ATAAGATTCCTTTGTTTGTATGATCGGTTATTATTACTGCTGTTTTATTATTGTTATCATTACCAGTATTAGCAGGTGCTATTACTATATTATTGACT
GATCGTAATTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGGAGATCCTATTTTATTTCAACATTTGTTT

>ตัวอย่างที่ 21 MSS21

AACATTATATTTAATTTTTGGAGCTTGAGCTGCTATAGTAGGAACTGCTATAAGAGTATTAATTCGAATAGAGTTAGGACAAACAGGAAGATTTTTA
GGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTTTTGTTATAATTTTTTTTATAGTTATACCTATTTTAATTGGAGGTTTTGGAAATTG
ATTGGTTCCTTTAATGTTAGGGGCTCCAGATATAGCTTTTCCTCGAATGAATAATTTAAGTTTTTGATTACTTCCTCCATCATTAATATTATTATTTA
TTTCATCAATAGTAGAAATAGGAGTAGGGGCTGGATGAACTGTATATCCTCCTTTAGCTTCTATTGTTGGTCATAATGGTAGATCAGTAGATTTTGC
TATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAGCTTCTTCTATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACAGTAGTAAATATACGATCTATTGGAATATCTATAG
ATAAGATTCCTTTGTTTGTATGATCAGTTATTATTACTGCTGTTTTATTATTGTTGTCATTACCAGTATTAGCAGGTGCTATTACTATGTTATTAACT
GATCGTAACTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGGAGATCCTATTTTATTTCAACACTTGTTT

>ตัวอย่างที่ 22 MSS22

AACATTATATTTAATTTTTGGAGCTTGGGCTGCTATAGTAGGAACTGCTATAAGAGTATTAATTCGAATAGAGTTAGGACAAACAGGAAGATTTTTA
GGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTTTTGTTATAATTTTTTTTATAGTTATACCTATTTTAATTGGAGGTTTTGGAAATTG
ATTGGTTCCTTTAATGTTAGGGGCTCCAGATATAGCTTTTCCTCGAATGAATAATTTAAGTTTTTGATTACTTCCTCCGTCATTAATATTATTATTTA
TTTCATCAATAGTAGAAATAGGAGTAGGGGCTGGATGAACTGTATATCCTCCTTTAGCTTCTATTGTTGGTCATAATGGTAGATCAGTAGATTTTGC
TATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAGCTTCTTCTATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACAGTAGTAAATATACGATCTATTGGAATATCTATAG
ATAAGATTCCTTTGTTTGTATGATCGGTTATTATTACTGCTGTTTTATTATTGTTGTCATTACCAGTATTAGCAGGTGCTATTACTATATTATTGACT
GATCGTAATTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGGAGATCCTATTTTATTTCAACATTTGTTT

>ตัวอย่างที่ 23 MSS23

ศรีปทุมการเกษตร

AACATTATATTTAATTTTTGGAGCTTGGGCTGCTATAGTAGGAACTGCTATAAGAGTATTAATTCGAATAGAGTTAGGACAAACAGGAAGATTTTTA
GGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTTTTGTTATAATTTTTTTTATAGTTATACCTATTTTAATTGGAGGTTTTGGAAATTG
ATTGGTTCCTTTAATGTTAGGGGCTCCAGATATAGCTTTTCCTCGAATGAATAATTTAAGTTTTTGATTACTTCCTCCGTCATTAATATTATTATTTA
TTTCATCAATAGTAGAAATAGGAGTAGGGGCTGGATGAACTGTATATCCTCCTTTAGCTTCTATTGTTGGTCATAATGGTAGATCAGTAGATTTTGC
TATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAGCTTCTTCTATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACAGTAGTAAATATACGATCTATTGGAATATCTATAG
ATAAGATTCCTTTGTTTGTATGATCGGTTATTATTACTGCTGTTTTATTATTGTTATCATTACCAGTATTAGCAGGTGCTATTACTATATTATTGACT
GATCGTAATTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGGAGATCCTATTTTATTTCAACATTTGTTT

>ตัวอย่างที่ 24 MSS24

TTTGTTGTGTGGGCTCATCATATGTTTTCTGTAGGGATGGATGTTGATACTCGAGCATATTTTACAGCAGCTACTATAATTATTGCAGTACCTACCG
GTATTAAGGTTTTTAGTTGAATAGCTACATTGTATGGGTCTTATTTTAAAATTGATACACCTTTAATGTGATGTATTGGGTTTGTATTTTTGTTTACT
TTAGGTGGAATTACTGGTGTAGTTTTATCTAATTCTTCTTTGGATATCATTTTACATGATACTTATTATGTGGTTGCACATTTTCATTATGTATTAAG
AATAGGAGCTGTTTTTGCTATTTTAGGTGGTATTACTTATTGATTTCCTTTGTTTTTTGGTGTGGTTTTGAATGAGAGGAAAACTAAATTACAATTTT
TAGTAATATTTTTGGGTGTTAATATAACTTTTTTTCCTCAGCATTTTTTAGGGTTAAATGGTATACCGCGTCGATATGCTGACTATCCTGATGCTTTT
ATATTTTGAAATATAATTTCTTCTTTAGGGTCTTTATTGTCTTTAATTGGAGTTTTACTTTTTATTTATATTGTTTGGGAGAGTTTGGTTATGAAATAT
TCTTTTTATGATAGATATTATACTAGTTCTTCTTTAGAATGAAT

>ตัวอย่างที่ 25 MSS25

ACTATATTGTTAACTGATCGTAATTTTAATACTTCTTTCTTTGACCCAGCAGGAGGAGGAGATCCTATTTTATTTCAACATTTGTTTTGATTTTTTGG
TCATCCAGAGGTATATATTTTAATTTTACCTGGATTTGGTATTGTTTCTCATGTAATTAGAGCTTCTGTGGGAAAGCGAGAACCGTTTGGTTCTTTA
GGTATGATTTATGCCATAGTGGGAATTGGTGGAATAGGATTTGTAGTTTGGGCTCATCATATATTTTCTGTAGGTATAGATGTAGATACTCGAGCTT
ATTTTACAGCAGCTACTATAATTATTGCTGTACCTACTGGAATTAAAGTATTTAGATGAATAGCTACATTATACGGATCATATTTTAAAATTGATACT
CCTTTAATATGATGTATTGGTTTTGTATTCTTATTTACTTTAGGAGGAATTACTGGAGTAGTTTTATCAAATTCTTCTTTAGATATTGTATTACATGA
TACTTATTATGTTGTTGCTCATTTTCATTATGTACTAAGAATAGGAGCTGTATTTGCTATTTTAGCTGGAATTACTTATTGATTTCCTTTATTTTTTG
GAGTAGTTTTAAGAGAAAAGAAAACTAAATTACAATTTTTAGTTATATTTATTGGGGTAAAT

กรมวิชาการเกษตร