ระดับโครงการ

กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

รายงานผลสัมฤทธิ์สำหรับทุนสนับสนุนงานพื้นฐาน (Fundamental Fund)

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564

หน่วยงาน กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย

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

กรมวิชาการเกษตร

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวยุวรินทร์ บุญทบ

Misss Yuvarin Boontop

ปี 2564

บทสรุปผู้บริหาร

ปัญหาศัตรูพืช (แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช และวัชพืช) เป็นปัญหาสำคัญต่อการผลิตและคุณภาพผลผลิตทางการเกษตร ปัจจุบันการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมส่งผลให้ศัตรูพืชเกิดความแปรผันด้านรูปร่างและพันธุกรรม ทำให้มีศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ ก่อให้เกิดปัญหาตามมามากมาย ดังเช่น การเลือกวิธีการป้องกัน กำจัด และการวางแนวทางป้องกันกำจัด ดังนั้นการจำแนกชนิดศัตรูพืชให้มีความถูกต้องด้วยวิธีการที่แม่นยำ และได้รับความเชื่อมั่นจากนานาประเทศนั้นจะช่วยสนับสนุนการผลิตสินค้าเกษตรภายในประเทศให้มีคุณภาพเป็นที่ต้องการของตลาด และสามารถส่งขายยังต่างประเทศได้ ปัจจุบันการจำแนกชนิดศัตรูพืชในประเทศไทยนั้น ใช้หลักอนุกรมวิธานจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานเป็นวิธีการจำแนก (traditional taxonomy) แต่ในปัจจุบันมีการประยุกต์นำเทคโนโลยีชีวโมเลกุล เช่น ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA Barcode) เข้ามาเป็นเครื่องมือในการจำแนกชนิดศัตรูพืช รวมทั้งมีการศึกษาชีววิทยาของศัตรูพืช เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการป้องกันกำจัดศัตรูให้เกิด ประสิทธิภาพและประโยชน์สูงสุดอีกด้วย

ดังนั้นกรมวิชาการเกษตรในฐานะองค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization; NPPO) ของประเทศไทยมีบทบาทหน้าที่ดำเนินการวิจัยและศึกษาชนิดศัตรูพืช เพื่อให้ได้ข้อมูลศัตรูพืชที่ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล ใช้ในการสนับสนุนงานด้านการอารักขาพืชและแก้ปัญหาศัตรูพืชในประเทศไทยนั้น มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องจัดทำโครงการวิจัย **“อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย”** เพื่อให้สามารถจำแนกชนิด ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ และข้อมูลชีววิทยาที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันของศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางการเกษตรได้แนวทางวินิจฉัย (dichotomous key) ทำให้การจัดจำแนกศัตรูพืชเข้าถึงได้ง่าย มีประสิทธิภาพและมีความเหมาะสมในศัตรูพืชแต่ละชนิด และสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีความสำคัญยิ่งสำหรับพัฒนาวิธีการการตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชที่มีความจำเพาะต่อไป ได้ตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อเป็นแหล่งอ้างอิงที่สำคัญของประเทศเก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง พิพิธภัณฑ์โรคพืช และพิพิธภัณฑ์วัชพืชของกรมวิชาการเกษตร และได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ของศัตรูพืชเก็บไว้ในฐานข้อมูล Genbank เพื่อใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์ที่มีความน่าเชื่อถือของประเทศไทยและสากล

นอกจากนี้ยังสามารถนำผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยในครั้งนี้ ไปจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (pest list) และเอกสารวิชาการ คู่มือจำแนกชนิดศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางการเกษตรของประเทศไทย และเผยแพร่องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยภายใต้โครงการวิจัยนี้สู่นักวิชาการ และผู้ที่มีความสนใจ ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งต่อเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช นักวิชาการ นักวิจัยจากหน่วยงานภาครัฐและหน่วยงานเอกชนต่าง ๆ เช่น กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัย องค์กรการศึกษาต่างๆ สามารถเพิ่มองค์ความรู้และใช้ประโยชน์จากการจำแนกชนิดศัตรูพืช

สุดท้ายองค์ความรู้จากงานวิจัยภายใต้โครงวิจัยนี้สามารถพัฒนาเป็นฐานข้อมูลศัตรูพืช (big data) ของประเทศไทย ใช้เป็นฐานข้อมูลทางการเกษตร ที่นักวิจัยให้สามารถใช้ตอบสนองและกำหนดแนวทางการป้องกัน

กรมวิชาการเกษตร

กำจัดอย่างทันท่วงที เพิ่มความมั่นคงทางของผลิต และเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับงานด้านกักกันพืชในเจรจาตอบโต้กับประเทศคู่ค้าและก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อภาคการเกษตรของประเทศไทยอย่างยั่งยืน

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

ศัตรูพืช (แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช และวัชพืช) เป็นปัญหาสำคัญต่อการเกษตร ปัจจุบันพบว่ามีศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่สามารถระบุชนิดก่อให้เกิดปัญหาตามมาจำนวนมาก โครงการวิจัยนี้ดำเนินงานระหว่างปี 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 หอยทาก บกศัตรูพืช 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*

กรมวิชาการเกษตร

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยในครั้งนี้ ไปจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชและเอกสารวิชาการ คู่มือของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่มีความสำคัญในประเทศไทย เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับอ้างอิงข้อมูล และใช้ในการตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติได้ อย่างรวดเร็ว และถูกต้อง เพื่อเป็นแนวทางการป้องการกำจัดให้ถูกวิธี และเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาแก้ไขปัญหาการค้าระหว่างประเทศ ก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อภาคการเกษตรของประเทศไทยอย่างยั่งยืน

คำสำคัญ: อนุกรมวิธาน ชีววิทยา ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ศัตรูพืช

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

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, 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.,

กรมวิชาการเกษตร

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

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 ทั้งครุภัณฑ์ทางด้านวิทยาศาสตร์ และสาธารณูปโภคตลอดในการดำเนินการวิจัยจนลุล่วงด้วยดี รวมทั้งคณะผู้ทรงคุณวุฒิและผู้เชี่ยวชาญทุกท่าน ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่าในการให้ข้อเสนอแนะ แนวทางปรับปรุงแก้ไข และข้อคิดเห็นที่ก่อประโยชน์จนสามารถดำเนินงานได้ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

ยุวรินทร์ บุญทบ และคณะ

มกราคม 2565

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	2
บทคัดย่อ	4
Abstract	6
กิตติกรรมประกาศ	8
สารบัญ	9
บทที่ 1 บทนำ	10
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน	16
บทที่ 3 ผลการศึกษา	183
บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล	225
บรรณานุกรม	231
ภาคผนวก	316

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 1 บทนำ

1. วิสัยทัศน์ และพันธกิจของหน่วยงาน

วิสัยทัศน์

กรมวิชาการเกษตรเป็นองค์กรที่เป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาด้านพืช เครื่องจักรกลการเกษตร และเป็นศูนย์กลางรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตรด้านพืชในระดับสากล บนพื้นฐานการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

พันธกิจ

1. สร้างและถ่ายทอดองค์ความรู้จากงานวิจัยด้านพืชและเครื่องจักรกลการเกษตรสู่กลุ่มเป้าหมาย
2. กำหนดและกำกับดูแลมาตรฐานระบบการผลิตและผลิตพันธุ์พืชและปัจจัยการผลิต พัฒนาระบบตรวจรับรองสินค้าการเกษตรด้านพืชให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล
3. อนุรักษ์และพัฒนาการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพด้านพืช แมลง และจุลินทรีย์
4. กำกับ ดูแล และพัฒนากฎหมายที่กรมวิชาการเกษตรรับผิดชอบ

2. ยุทธศาสตร์ชาติที่สอดคล้องกับแผนปฏิบัติงานด้าน ววน. ของหน่วยงาน

❑ยุทธศาสตร์ที่ 1 ด้านความมั่นคงเพื่อบริหารจัดการสภาวะแวดล้อมของประเทศให้มีความมั่นคง ปลอดภัย และมีความสงบเรียบร้อยในทุกระดับและทุกมิติ

☑ยุทธศาสตร์ที่ 2 ด้านการสร้างความสามารถในการแข่งขันเน้นการยกระดับศักยภาพในหลากหลายมิติควบคู่กับการขยายโอกาสของประเทศไทยในเวทีโลก

❑ยุทธศาสตร์ที่ 3 ด้านพัฒนาและเสริมสร้างศักยภาพทรัพยากรมนุษย์คนไทยในอนาคต มีความพร้อมทั้งกาย ใจ สติปัญญา มีทักษะที่จำเป็นในศตวรรษที่ 21 มีทักษะสื่อสารภาษาอังกฤษและภาษาที่ 3 และมีคุณธรรม

❑ยุทธศาสตร์ที่ 4 ด้านการสร้างโอกาสและความเสมอภาคทางสังคมสร้างความเป็นธรรม และลดความเหลื่อมล้ำในทุกมิติ กระจายศูนย์กลางความเจริญทางเศรษฐกิจและสังคม เพิ่มโอกาสให้ทุกภาคส่วนเข้ามาเป็นกำลังของการพัฒนาประเทศในทุกระดับ

❑ยุทธศาสตร์ที่ 5 ด้านการสร้างการเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมคำนึงถึงความยั่งยืนของฐานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของประชาชนให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ผ่านมาตรการต่างๆ ที่มุ่งเน้นให้เกิดผลลัพธ์ต่อความยั่งยืน

❑ยุทธศาสตร์ที่ 6 ด้านการปรับสมดุลและพัฒนาระบบการบริหารจัดการภาครัฐ การปรับเปลี่ยนภาครัฐ ยึดหลัก “ภาครัฐของประชาชนเพื่อประชาชนและประโยชน์ส่วนรวม”

3. วงเงินงบประมาณกองทุน ววน. ที่ได้รับจัดสรรในปี 2564 และโปรดระบุแผนงาน/โครงการให้สอดคล้องกับ Program ของแผน ววน.

กรมวิชาการเกษตร

โปรแกรมตามแผน ววน.	งบประมาณ (บาท)
P7. โจทย์ท้าทายด้านทรัพยากรสิ่งแวดล้อม และการเกษตร โครงการ อนุกรมวิธาน ชีววิทยาและการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย	2,581,764

4. รายละเอียดรายแผนงาน

โครงการ อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย

ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล

กรมวิชาการเกษตร ในฐานะที่เป็นองค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ ได้ดำเนินการวิจัยด้านการจัดจำแนกชนิดและศึกษาอนุกรมวิธาน ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติมาอย่างต่อเนื่อง เพื่อแก้ไขปัญหาศัตรูพืชที่สำคัญทั้งปัญหาจากการผลิตพืชในประเทศและปัญหาการค้าระหว่างประเทศ โดยในปีงบประมาณ 2559-2564 ได้จัดทำข้อเสนอโครงการวิจัย อนุกรมวิธาน ชีววิทยาและ การจำแนกชนิดโดย ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย ซึ่งเป็นโครงการวิจัยใหม่ โดยศัตรูพืชที่ดำเนินการทดลองในโครงการเป็นศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย นอกจากสร้างความเสียหายให้แก่พืชเศรษฐกิจหลักหลายชนิดแล้วยังมีความสำคัญในแง่การนำเข้าส่งออกสินค้าเกษตร โดยได้สรุปประเด็นปัญหาหลักที่สำคัญในการวิจัยของโครงการไว้ดังนี้

1) ปัจจุบันศัตรูพืชบางชนิดยังไม่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์และข้อมูลทางชีววิทยาหรือข้อมูลเหล่านี้ไม่ได้รับการปรับปรุงมาเป็นเวลานาน จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาหาสาเหตุที่แน่ชัดว่าเกิดจากศัตรูพืชชนิดใดลักษณะทางชีววิทยาและนิเวศวิทยาเป็นอย่างไร ข้อมูลเหล่านี้นอกจากจะมีความสำคัญอย่างยิ่งในการหาแนวทางการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพแล้วยังเป็นข้อมูลสำคัญในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช สำหรับการเปิดตลาดสินค้าเกษตรและการเจรจาการค้าระหว่างประเทศ

2) การวินิจฉัยชนิดที่ไม่ถูกต้อง และการขาดความรู้ความเข้าใจในเรื่องชีววิทยา นิเวศวิทยา ของศัตรูพืชนั้นๆ เป็นสาเหตุหลักที่สำคัญของการป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ไม่มีประสิทธิภาพ จำเป็นที่จะต้องมีการวินิจฉัยชนิดที่ถูกต้องและการศึกษาชีววิทยาของศัตรูพืชประกอบไปด้วย วงจรชีวิต ลักษณะการเข้าทำลาย พืชอาศัย ช่วงฤดูการระบาด หรือแม้แต่ช่วงแสงอุณหภูมิความชื้นที่เหมาะสมต่อการระบาดของศัตรูพืช เป็นข้อมูลที่จำเป็นในการหาแนวทางป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพ

3) แนวทางการวินิจฉัยชนิดของศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติในบางกลุ่มหรือบางชนิดไม่ประสบผลสำเร็จเนื่องจาก ศัตรูพืชที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันมาก ทำให้เกิดความสับสนในการจำแนกชนิด จึงมีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลเช่น ดีเอ็นเอบาร์โค้ด มาใช้ในวินิจฉัยชนิดเพื่อให้ได้ชนิดที่ถูกต้อง

กรมวิชาการเกษตร

ซึ่งกรมวิชาการเกษตร ทำหน้าที่เป็นองค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization; NPPO) จำเป็นอย่างยิ่งต้องมีข้อมูลศัตรูพืชของประเทศไทย โดยเฉพาะข้อมูลด้านอนุกรมวิธานชีววิทยาของศัตรูพืชซึ่งเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เชื่อถือได้มากที่สุด เพื่อการอ้างอิงสำหรับการค้าระหว่างประเทศและสนับสนุนงานด้านกักกันพืช โดยเฉพาะการนำข้อมูลทั้งหมดไปจัดทำข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืช ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญที่ต้องส่งให้ประเทศคู่ค้าได้นำไปพิจารณาก่อนนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศไทย ในขณะเดียวกันก็ใช้เป็นข้อมูลสำคัญของประเทศ สำหรับเปรียบเทียบกับข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืชของประเทศคู่ค้าที่ส่งมา เพื่อประกอบในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ก่อนนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศคู่ค้า รวมทั้งยังเป็นประโยชน์ในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืชกักกัน เพื่อการควบคุมศัตรูพืชจากต่างประเทศไม่ให้เข้ามาแพร่กระจายในประเทศและใช้เป็นประโยชน์เพื่อการเจรจาตอบโต้กับประเทศคู่ค้าที่ใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช มาเป็นเงื่อนไขในการกีดกันทางการค้า

วัตถุประสงค์

1) เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานให้ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน พร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่ทำการศึกษาวิจัยในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับอ้างอิงข้อมูลศัตรูพืชของประเทศไทย

2) เพื่อศึกษาชีววิทยา พืชอาศัย เขตการแพร่กระจายของศัตรูพืชและนิเวศวิทยาของศัตรูพืชของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เพื่อเป็นข้อมูลในการหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม และเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญเพื่อประกอบการพิจารณาในการแก้ไขปัญหาการค้าระหว่างประเทศทั้งในด้านการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร

3) เพื่อศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ และรวบรวมเป็นระบบ สามารถสืบค้นอ้างอิงและใช้ในการตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติได้ อย่างรวดเร็วและถูกต้อง

ขอบเขตการศึกษา

อนุกรมวิธาน การจัดจำแนกชนิด ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เป็นสาขาทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง เปรียบได้ว่าเป็นหัวใจหลักของการวิจัยด้านอารักขาพืชของประเทศ เนื่องจากการทราบถึงชื่อชนิดที่ถูกต้องของสิ่งมีชีวิต ทำให้สามารถค้นคว้าข้อมูลทางวิชาการของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เช่น การแพร่กระจาย ชีววิทยาและนิเวศวิทยา รวมถึงแนวทางในการป้องกันกำจัด ศาสตร์สาขาอื่นทางชีววิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งงานวิจัยทางด้านอารักขาพืช ไม่สามารถเกิดขึ้นได้หากไม่ทราบถึงชื่อชนิดที่ถูกต้องของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาทดลอง การศึกษาด้านอนุกรมวิธาน ประกอบด้วยการใช้ลักษณะที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตอาทิ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โครงสร้างทางพันธุกรรม ข้อมูลด้านนิเวศวิทยาและเขตการแพร่กระจาย นำมาจัดจำแนกหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิต ในการ ตรวจวินิจฉัยเพื่อระบุชนิด และเมื่อมีการค้นพบชนิดใหม่ดำเนินการตั้งชื่อตามกฎเกณฑ์การตั้งชื่อ นอกจากนี้แล้วงานวิจัยด้านระบบของอนุกรมวิธาน ยังประกอบไปด้วย การจัดหมวดหมู่

กรมวิชาการเกษตร

โดยศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเพื่ออนุมานสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ความแปรปรวนหรือความแตกต่างทั้งในระดับสัณฐานวิทยาและในระดับโมเลกุล อีกทั้งกระบวนการเกิดชนิดใหม่

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด เป็นวิธีการสมัยใหม่อาศัยหลักการชีววิทยาโมเลกุลในการจำแนกชนิด จัดกลุ่มสิ่งมีชีวิต เนื่องจากการจำแนกสิ่งมีชีวิตแบบดั้งเดิม ซึ่งอาศัยความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีข้อจำกัดหลายประการ อาจไม่เพียงพอที่จะใช้แยกสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะภายนอกที่เหมือนกัน และไม่สามารถจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตในทุกช่วงอายุของการเจริญเติบโต บางครั้งอาจต้องรอให้เป็นระยะตัวเต็มวัยจึงสามารถจำแนกชนิดได้ นอกจากนี้ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านในการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนั้นการนำหลักการดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความผันแปรทางลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันได้ จะช่วยให้งานด้านการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตให้มีความรวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ และเป็นสากล

การได้มาของข้อมูลศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ซึ่งถือได้ว่าเป็นข้อมูลหลักของประเทศไทย มีองค์ประกอบหลักคือ รายชื่อศัตรูพืชศัตรูธรรมชาติที่มีความสำคัญทางการเกษตรรายละเอียดทางอนุกรมวิธานได้แก่ ประวัติทางอนุกรมวิธาน ชื่อวิทยาศาสตร์ที่เป็นปัจจุบัน ชื่อพ้อง แนวทางการวินิจฉัยทั้งในระดับสกุลและชนิด ลักษณะในการตรวจวินิจฉัยในชนิดนั้นๆ ชีววิทยา เขตการแพร่กระจาย พืชอาหารหรือแมลงอาศัยกรณีศัตรูธรรมชาติ เอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้อง ตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์และแหล่งรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิงศัตรูพืชของประเทศไทย สามารถสืบค้นและตรวจสอบย้อนกลับได้ ข้อมูลต่างๆ ที่เก็บรวบรวมไว้จะเป็นประโยชน์และมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อแก้ปัญหาด้านการอารักขาพืชในปัจจุบันทั้งในแง่ประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ข้อมูลทางวิชาการในการติดต่อค้าขายกับต่างประเทศ ได้แก่การจัดทำข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืช การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และเพื่อการเจรจาตอบโต้ประเทศคู่ค้าที่ใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชมาเป็นเงื่อนไขในการกีดกันทางการค้า

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

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 3 การจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เป็นการศึกษาวิธีการสมัยใหม่อาศัยหลักการชีววิทยาโมเลกุลในการจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติให้ชนิดที่ถูกต้องแม่นยำ โดยเฉพาะในศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่มีสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก (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

บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน

<u>กิจกรรมที่ 1 สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติ</u>

กิจกรรมย่อยที่ 1.1 สำรวจชนิด และอนุกรรมวิธานของแมลง ไร สัตว์ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

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

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดโดยสำรวจแหล่งปลูกพืชที่สำคัญตามภูมิภาคต่างๆ ทั่วประเทศไทย เมื่อพบตัวอย่างตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยหอยเกล็ดอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ แล้วใส่ในถุงพลาสติก 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

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

กรมวิชาการเกษตร

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 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

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

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. วิธีดำเนินการวิจัยเก็บตัวอย่างตัวอ่อนและตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้

- เก็บรวบรวมผลไม้ที่มีร่องรอยการทำลายของแมลงวันผลไม้ พร้อมพืชใส่ถุงพลาสติกหรือ กล่องพลาสติก เพื่อให้ระบายอากาศได้ดี 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

- 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

ระบบการวิจัย

(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 แล้วจึงเสียบ micropin กับโฟมหรือ ค๊อกขนาดเล็กที่มีเข็มปักแมลงเสียบอยู่ โดยมีป้ายเล็ก ๆ บันทึก สถานที่ วัน เดือน 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 รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของขวดดองตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ทุกขวด ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน เดือน ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

- จัดทำแนวทางวินิจฉัย (dichotomous key) ชนิดของตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ในเผ่า Dacini ที่รวบรวมได้ พร้อมภาพประกอบ

- 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

กรมวิชาการเกษตร

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

- ศึกษาความแตกต่างของสัณฐานวิทยา โดยใช้ โปรแกรม Morpho J เป็นตัววิเคราะห์ความแตกต่างของรูปร่างของปีกแมลงวันผลไม้ชนิดต่างๆ

- 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

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

2) การเตรียมตัวอย่างเพื่อจำแนกชนิด นำตัวอย่างเพลี้ยจักจั่นที่ได้จากการสำรวจ มาจัดรูปร่างโดยนำไปติดบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง นำไปอบแห้งในตู้อบตัวอย่างแมลงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 - 30 วัน เพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วงบางชนิดที่มีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมากจำเป็นต้องใช้ข้อแตกต่างของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia) ในการจำแนกชนิด ซึ่งจะทำตามวิธีการของ Knight (1965) 3) การตรวจจำแนกชนิด นำตัวอย่างเพลี้ยจักจั่นที่ผ่านการอบจนแห้งแล้วมาตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope ตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดของ Distant (1908) และ Dietrich (2005) ลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกชนิดได้แก่ ลักษณะลวดลายบนส่วนหัว (head) และใบหน้า (face) ตาเดี่ยว (ocelli) แผ่นเหนือริมฝีปากบน (clypeus) สันหลังอกปล้องแรก (pronotum) แผ่นแข็งทรงสามเหลี่ยมบริเวณท้ายส่วนอกด้านสันหลัง (scutellum) ลักษณะส่วนปลายของขาคู่หลัง (hind basitarsus) และอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia) ได้แก่ aedeagus

กรมวิชาการเกษตร

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

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

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

กรมวิชาการเกษตร

2.3) การสำรวจและเก็บตัวอย่างระยะหนอน โดยการเดินสุ่มสำรวจทั่วแปลงเก็บนอนทุกระยะใส่กล่องพลาสติกพร้อมพืชอาหาร 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 โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธาน เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชนิด 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) ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิตฟุชซิน 0.5 กรัม กรดเกลือ 10% 25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ นาน 2-3 นาทีหรือนานถึง 12 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์ของตัวอย่างผีเสื้อที่จะติดสีได้ง่ายหรือยาก

- ย้ายตัวอย่างลงในน้ำกลั่นเพื่อทำการผ่าเอาอวัยวะสืบพันธุ์ออกจากท้อง ถ้าเป็นเพศผู้ใช้ปากคีบปลายแหลมดึงอวัยวะสืบพันธุ์ออกจากท้องปล้องสุดท้ายได้เลย แต่ถ้าเป็นเพศเมียใช้มีดผ่าตัดผ่าผนังลำตัวด้านข้างออกเพื่อป้องกันการเสียหายของอวัยวะสืบพันธุ์ 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

กรมวิชาการเกษตร

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 พืชอาหารและวิธีการเก็บตัวอย่าง

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 และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยาสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 1.1.5 สำรวจความหลากชนิดหอยทากบกศัตรูพืชในระบบนิเวศเกษตรและสิ่งแวดล้อม Species Diversity of Terrestrial Pest Snails in Agricultural Ecosystem and Environment in Thailand

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

กรมวิชาการเกษตร

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 นาทีต่อ 1 แปลง

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)

กรมวิชาการเกษตร

pi คือ สัดส่วนจำนวนตัวอย่างทั้งหมดของชนิด i ต่อจำนวนตัวอย่างทั้งหมด
ของทุกชนิดที่พบ
(proportion of the total sample belonging to i species)

การวิเคราะห์ดัชนีความเด่น (dominance species index)

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

เมื่อ C คือ ดัชนีความเด่น (index of dominance)

pi คือ สัดส่วนจำนวนตัวอย่างทั้งหมดของชนิด i ต่อจำนวนตัวอย่างทั้งหมดของทุกชนิดที่พบ
(proportion of the total sample belonging to I species)

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2562 รวม 3 ปี

สถานที่ : พื้นที่ป่าธรรมชาติ เขาหินปูน และพื้นที่เกษตรกรรม ภาคต่างๆของประเทศไทย

: ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สอพ.

การทดลองที่ 1.1.6 ศึกษาโครโมโซมและการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยศัตรูพืชวงศ์ Succineidae ในประเทศไทย

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

กรมวิชาการเกษตร

2. ตรวจสอบและวิเคราะห์ชนิด

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.

การทดลองที่ 1.1.7 สำรวจความหลากชนิดหอยน้ำจืดศัตรูพืชในพรรณไม้น้ำ

Survey of aquatic pest snail in aquarium plants

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1) เก็บตัวอย่างหอยน้ำจืด

กรมวิชาการเกษตร

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

- เวลาและสถานที่

กรมวิทยาศาสตร์

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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 (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

กรมวิชาการเกษตร

(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 และไพรเมอร์ ชนิดละ 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

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) นั้นถูกสร้างจากการวิเคราะห์ข้อมูลคำนวณระยะห่างทาง

กรมวิทยาศาสตร์

พันธุกรรมระหว่างลำดับเบสของหนูแต่ละคู่ ด้วยแบบจำลอง kimura 2-parameter distance models (Kimura, 1980) วิธี Maximum parsimony (MP; Fitch, 1971) ทำbrance 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)

Nucleotide diversity (*Pi*) คือ ค่าเฉลี่ยความแตกต่างของลำดับเบส เป็นค่าที่สามารถบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรได้ คำนวณได้จากสูตร

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

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

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

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

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)

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

การเก็บและรักษาตัวอย่างแตนเบียนสกุล *Encarsia* (Acquisition of research material)

กรมวิชาการเกษตร

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 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 โดยดำเนินการ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

เก็บตัวอย่างในพื้นที่ที่มีการปลูกพืชเศรษฐกิจที่มีแมลงหวี่ขาวเป็นศัตรูพืชสำคัญเช่น 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

การทดลองที่ 1.1.10 อนุกรมวิธานของแมลงช้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ในประเทศไทย

Taxonomy of Green Lacewings (Family Chrysopidae) in Thailand

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

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 ด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิด 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 นาทีแล้วย้ายลงแอลกอฮอล์ 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) 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

การทดลองที่ 1.1.11 อนุกรมวิธานมวนตัวห้ำสกุล *Orius* (Heteroptera: Anthocoridae) ในประเทศไทย
Taxonomy of the genus *Orius* (Hemiptera: Anthocoridae) in Thailand

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

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

กรมวิชาการเกษตร

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

7) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง (มวนตัวห้ำสกุล *Orius* ทุกชนิดที่รายงานไว้ต้องเก็บรักษาตัวอย่างจริงไว้เพื่อการตรวจสอบ สืบค้นและอ้างอิงในภายหลัง)

- เวลาและสถานที่ : เดือนตุลาคม 2560 ถึง เดือนกันยายน 2562

1. แปลงปลูกพืชผัก ไม้ดอก และข้าวโพด ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย
2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง
   กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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 ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี ลพบุรี สระบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี ชัยนาท นครสวรรค์ กำแพงเพชร พิจิตร พิษณุโลก เพชรบูรณ์

ภาคเหนือ ได้แก่ อุตรดิตถ์ ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน เชียงราย แพร่ และน่าน

ปีที่ 2 ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี สระแก้ว ระยอง จันทบุรี ตราด และ ชลบุรี เป็นต้น

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา สุรินทร์ ชัยภูมิ กาฬสินธุ์ 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

กรมวิชาการเกษตร

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 เติมโคลฟอออย แช่ทิ้งไว้ 10-20 นาที หรือจนกว่าตัวอย่างเพลี้ยอ่อนใส

การเม้าท์สไลด์

หยดแคนนาดาบัลซัมเพียงเล็กน้อยลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ เขี่ยเพลี้ยอ่อนลงในหยดแคนนาดาบัลซัม ให้เพลี้ยอ่อนหงายท้องขึ้น จัดหนวด ขา ไซฟังคูไล และหางให้อยู่ในตำแหน่งสวยงาม จากนั้นหยดไซลีนลงบนกึ่งกลางแผ่นสไลด์ที่สะอาด 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 โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลเพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

การบันทึกข้อมูล

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

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

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

Taxonomy of the genus *Nysius* (Hemiptera: Lygaeidae) in Thailand

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

การทดลองที่ 1.1.14 อนุกรมวิธานและการศึกษาชนิดของตั๊กแตน (Orthoptera) ในพืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย

Taxonomic study and species richness of grasshoppers (Orthoptera) on economically important field crops in Thailand

วิธีปฏิบัติการทดลอง

การเก็บและรักษาตัวอย่างตั๊กแตน (Acquisition of research material)

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 การจัดวางขาและหนวดอยู่ในลักษณะสมมาตร

กรมวิชาการเกษตร

เหมือนกันทั้งสองข้าง หลังจากนั้นนำไปอบให้แห้งในตู้อบ (oven) ปรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15-30 วัน ขึ้นกับขนาดตัวอย่าง การศึกษาครั้งนี้นอกจากตัวอย่างตั๊กแตนที่ได้จากการสำรวจแล้ว ยังใช้ตัวอย่างที่มีอยู่เดิมในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตรด้วย รวมถึงตัวอย่างที่ได้รับจากนักวิชาการ หรือจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิดจากหน่วยต่างๆ ภายในกรมวิชาการเกษตร

<u>การจัดจำแนกโดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา</u>

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 ได้แก่จังหวัด การพสินธุ์ มหาสารคาม ระยอง จันทบุรี ตราด ขอนแก่น ชัยภูมิ เป็นต้น

กรมวิชาการเกษตร

ปี 2563 ดำเนินการเก็บตัวอย่าง พื้นที่ภาคตะวันตก ได้แก่ ราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี เป็นต้น การตรวจวินิจฉัยจัดหมวดหมู่ของตั๊กแตน ดำเนินการ ณ พิพิธภัณฑ์แมลงและห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

หมายเหตุ: ทุกขั้นตอนในการดำเนินการ วิธีการทำการทดลองเหมือนกันในแต่ละปี

การทดลองที่ 1.1.15 อนุกรมวิธานของผีเสื้อหนอนร่าน วงศ์ Limacodidae ในประเทศไทย.

Taxonomy of Nettle Caterpillar Moths, Family Limacodidae, in Thailand.

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

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 โฉบเพื่อเก็บตัวอย่างผีเสื้อหนอนร่านจากแปลงปลูกพืช ในช่วงเวลากลางวัน ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า (killing jar) ซึ่งบรรจุน้ำยาเอททิล อะซิเตด หลังจากผีเสื้อหนอนร่านตายแล้ว เก็บลงในซองกระดาษสามเหลี่ยมแยกใส่ไว้ในกล่องใส่ตัวอย่างแมลง นำกล่องใส่ตัวอย่างใส่ไว้ในกล่องรักษาความเย็นอีกชั้นเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเน่าเสีย

- การใช้กับดักแสงไฟ (light trap) ติดตั้งในแปลงเกษตร เพื่อดึงดูดผีเสื้อหนอนร่านในช่วงเวลากลางคืน คัดเลือกผีเสื้อหนอนร่านที่ต้องการศึกษา ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า และเก็บตัวอย่างโดยใช้ซองกระดาษสามเหลี่ยมเช่นเดียวกัน

- การสำรวจและเก็บตัวอย่างระยะตัวหนอนของผีเสื้อหนอนร่าน โดยการเดินสุ่มสำรวจทั่วแปลงเก็บตัวหนอนร่านทุกระยะใส่กล่องพลาสติกพร้อมส่วนของพืชที่พบ นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการทั้งตัวหนอนร่านและพืชอาหาร เพื่อศึกษาชีวประวัติ เปลี่ยนพืชอาหารและทำความสะอาดกล่องเลี้ยงตัวหนอนร่านเมื่อกล่องเลี้ยงเริ่มสกปรก บันทึกระยะเวลาการเจริญเติบโตโดยดูจากการลอกคราบของตัวหนอนแต่ละระยะ บันทึกขนาด สี รูปร่าง

กรมวิชาการเกษตร

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

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

การทดลองที่ 1.1.16 ชนิดของแมลงหวี่ขาว (Hemiptera: Aleyrodidae) ในพืชผักสวนครัวเพื่อการส่งออกของประเทศไทย

Species of Whitefly in backyard garden for export in Thailand

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1) กำหนดพื้นที่การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงหวี่ขาวจากแหล่งปลูกพืชผักสวนครัว (5 กลุ่ม 16 ชนิด ได้แก่ กะเพรา โหระพา แมงลัก ยี่หร่า พริกหยวก พริกชี้ฟ้า พริกขี้หนู มะเขือเปราะ มะเขือยาว มะเขือม่วง มะเขือ

กรมวิชาการเกษตร

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

- เวลาและสถานที่

กรมวิชาการเกษตร

เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2564

สถาณที่ แหล่งปลูกพืชทั้งพื้นที่เกษตรและพื้นที่ป่า โดยเน้นพื้นที่ปลูกพืชผักสวนครัว และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตวิทยาสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 1.1.17 อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ย่อย Diaspidinae (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) ในประเทศไทย

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดโดยสำรวจแหล่งปลูกพืชที่สำคัญตามภูมิภาคต่างๆ ทั่วประเทศไทย เมื่อพบตัวอย่างตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยหอยเกล็ดอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ แล้วใส่ในถุงพลาสติก 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

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

กรมวิชาการเกษตร

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

การทดลองที่ 1.1.18 อนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae (Hemiptera: Coccoidea) ในประเทศไทย

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

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 แกลเซียลอะซิติก 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

4.8 นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งในรากวางบนแผ่นสไลด์แก้ว ใช้กระดาษกรองซับโคล์ฟออยส่วนที่เกินออก 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

กรมวิชาการเกษตร

(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

การทดลองที่ 1.1.19 อนุกรมวิธานและความหลากชนิดของแตนเบียนไข่ของแมลงกลุ่มมวนวงศ์ Pentatomidae ศัตรูพืชสำคัญทางการเกษตรในประเทศไทย

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

<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

<u>การจัดจำแนกโดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา</u>

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)* การศึกษา

กรมวิชาการเกษตร

ภายใต้กล้อง 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) ตัวอย่างแมลงทั้งหมดจะถูกเก็บรวบรวม พร้อมทั้ง 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)

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

กรมวิชาการเกษตร

- 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

การทดลองที่ 1.1.20 อนุกรมวิธานของแมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae ในประเทศไทย

Taxonomy of Brown Lacewings (Family Hemerobiidae) and Dusty-wings (Family Coniopterygidae) in Thailand

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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) โฉบเพื่อเก็บตัวแมลงช้างปีกใส จากแปลงปลูกพืชในช่วงเวลากลางวัน 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

กรมวิชาการเกษตร

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 รูปร่างลักษณะ 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

การทดลองที่ 1.1.21 อนุกรมวิธานไรขาว วงศ์ Tarsonemidae ในประเทศไทย

Taxonomic Study of Mite Family Tarsonemidae in Thailand.

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

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

กรมวิชาการเกษตร

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

การทดลองที่ 1.1.22 การจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย Identification of Entomopathogenic Nematodes in Eastern Thailand.

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

กรมวิชาการเกษตร

- บันทึกพิกัดตำแหน่ง GPS พื้นที่จุดที่เก็บตัวอย่าง
- บันทึกลักษณะของดินตัวอย่าง ค่าความเป็นกรดด่างของดิน อุณหภูมิ และความชื้นของดินตัวอย่าง

ขั้นตอนที่ 2 การวิเคราะห์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ทำการเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่คัดแยกได้จากดินตัวอย่างในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย ให้ได้เป็นปริมาณมากเพื่อนำมาใช้ทดสอบในขั้นตอนนี้

การสกัด DNA ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

เตรียมไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (IJ) จำนวน 200 ตัวผสมน้ำ 10 มิลลิลิตร ใช้ auto pipette ดูดไส้เดือนฝอยหยดลงบนกระดาษกรองซึ่งวางในจานทดลองเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ปล่อยหนอนกินรังผึ้งลงไปในจาน จานละ 10 ตัว จากนั้นหยดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* ไว้ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ *Heterorhabditis* เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

คัดเลือกหนอนที่ถูกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเข้าทำลายแล้ว โดยใช้เข็มเขี่ยตัวหนอนให้แตกแล้วแยกเอาไส้เดือนฝอยเพศเมียออกมา โดยใช้ไม้ปลายแหลมเขี่ยไส้เดือนฝอยเพศเมียลงใน eppendorf ที่มี buffer ATL 180 ไมโครลิตร และ proteinase K 20 ไมโครลิตร 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

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยกระบวนการ PCR

เตรียม greentaq จำนวน 62.5 ไมโครลิตร ใส่หลอด eppendorf จากนั้นหยด Primer D2F: 5′-CCT TAG TAA CGG CGA GTG AAA-3′ (forward) และ 536 : 5′-CAG CTA TCC TGA GGA AAC-3′ (reverse) อย่างละ 5 ไมโครลิตร และน้ำ 37.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารใส่หลอด PCR หลอดละ 22 ไมโครลิตร โดยมีหลอด positive (+) เติม DNA template และหลอด nagative (-) เติมน้ำกลั่น จากนั้นผสมสารให้เข้ากันในแต่ละหลอดด้วยเครื่อง vortex จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตะกอนตกสู่ด้านล่างหลอด PCR จากนั้นนำเข้าเครื่อง thermocycler โดยกำหนดให้เครื่องทำงาน 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และรอบ 40 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ที่ 72

กรมวิชาการเกษตร

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป หรือนำดีเอ็นเอที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การทดสอบเจลอิเล็กโตรฟอเรซีส

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 ลงในเครื่องจนท่วมแผ่นเจล 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

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae

ทำการสำรวจแปลงเพาะปลูกพืชผักต่าง ๆ ทั่วประเทศ ที่พบลักษณะแมลงวันหนอนชอนใบเข้าทำลาย เก็บรวบรวมตัวอย่างจากพื้นที่ต่าง ๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคะวัน

กรมวิชาการเกษตร

ออก 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

- นำตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบมาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิดจากลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) Leica รุ่น M 165C (Leica Microsystems Ltd, Switzerland) โดยใช้ตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบแต่ละชนิดที่นำมาศึกษาจำนวน 20 ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนในการศึกษา การศึกษาอนุกรมวิธานจากลักษณะสัณฐานภายนอกโดยศึกษาลักษณะสำคัญ 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)

กรมวิชาการเกษตร

แมลงวันหนอนชอนใบบางชนิดที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกคล้ายคลึงกันมาก และยากในการตรวจวินิจฉัยชนิดนั้น ต้องมีการศึกษาอวัยวะเพศผู้ โดยมีวิธีการทำสไลด์ถาวรของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา รูปร่าง และขนาด ด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

- ตัดส่วนท้องของแมลงวันหนอนชอนใบแช่ในน้ำยาโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ผนังส่วนท้องและไขมันที่ไม่ต้องการย่อยสลาย

- นำชิ้นส่วนออกจากน้ำยา แช่ในน้ำกลั่น เขี่ยเอาไขมันและส่วนที่ไม่ใช่อวัยวะเพศออก โดยใช้เข็มแหลมเขี่ยเอาเฉพาะอวัยวะเพศออกมาจากส่วนของท้อง และแช่ในแอลกอฮอล์ (alcohol) 75% และ 95% ตามลำดับ นานครั้งละ 5 นาที เพื่อดึงน้ำที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อให้ออกไปจนหมด เนื่องจากหากดึงน้ำออกไม่หมดจะทำให้อวัยวะเพศที่อยู่ในสไลด์หดตัวเมื่อนำไปอบภายใต้อุณหภูมิสูง 40 - 45^{O}C เกิดความเสียหาย ไม่สามารถเก็บรักษาสไลด์ไว้ได้เป็นเวลานาน

- นำส่วนของอวัยวะเพศแช่ในกรดซิทริค (citric acid) ประมาณ 3 นาที

- เขี่ยอวัยวะเพศมาวางบนสไลด์ที่หยดน้ำยา Canada balsam แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์

- นำไปอบให้แห้งเป็นระยะเวลา 2 - 3 สัปดาห์ ในตู้อบอุณหภูมิ 40 - 45^{O}C จึงนำออกมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

- บันทึกรายละเอียดของแผ่นสไลด์ เช่น ชื่อวิทยาศาสตร์แมลงวันหนอนชอนใบ วัน/เดือน/ปี ที่ทำสไลด์ และชื่อผู้ทำสไลด์

2.3 จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของแมลงวันหนอนชอนใบที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

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

การทดลองที่ 1.1.24 อนุกรมวิธานแมงมุมวงศ์ Oxyopidae

Taxonomic study of Spider Fauna in Family Oxyopidae

กรมวิชาการเกษตร

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

กรมวิชาการเกษตร

จึงนำไปศึกษาดูรายละเอียดใต้กล้อง stereomicroscope เมื่อจำแนกชนิดเสร็จแล้วจะนำ pedipalps (อวัยวะเพศผู้) ใส่ใน tube ขนาดเล็กแล้วนำไปแช่ในขวดตัวอย่างเดิม

- การจำแนกชนิด

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

<u>กิจกรรมย่อยที่ 1.2 สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชและจุลินทรีย์ควบคุมโรค</u>

การทดลองที่ 1.2.1 ศึกษาราสกุล *Phytophthora* ในเผือก

Study on *Phytophthora* species of Taro

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

กรมวิชาการเกษตร

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 ขั่วโมง 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 ลักษณะอาการ

กรมวิชาการเกษตร

โรค 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

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

กรมวิชาการเกษตร

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*

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 °C และ 35 °C และปัจจัยที่สอง เป็น ระดับความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ระดับ ได้แก่ pH 6 7 8 9 และ 10

วิธีการทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

นำรา *P. colocasiae* บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร CA ที่ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง (ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ ไฮโดรคลอริคแอซิค) ในจานเลี้ยงเชื้อ จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ การบันทึกข้อมูล

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยรา ลักษณะสีของเส้นใย และการสร้างสปอร์

- เวลาและสถานที่ - ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงเผือกของเกษตรกร

การทดลองที่ 1.2.2. การจำแนกชนิดของราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris*

Identification of *Curvularia* and *Bipolaris*

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

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±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

กรมวิชาการเกษตร

- 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

การทดลองที่ 1.2.3. การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอม

Identification of the bacteria causes leaf blight disease on onion

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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)

กรมวิชาการเกษตร

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, 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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(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

การทดลองที่ 1.2.4 การสำรวจ จำแนกและศึกษาอาการ chlorotic ringspot บนกล้วยไม้ *Phalaenopsis*

กรมวิชาการเกษตร

Survey, Identification and characterization of chlorotic ringspot on *Phalaenopsis* orchid

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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 °C 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

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 -80°C

กรมวิชาการเกษตร

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.

การทดลองที่ 1.2.6 การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางสัณฐานวิทยาในไม้ประดับส่งออก

วิธีปฏิบัติการทดลอง

การเก็บตัวอย่างไม้ประดับส่งออกจะได้รับการสุ่มและเก็บตัวอย่างจากฟาร์มโดยกลุ่มงานศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช แล้วจึงส่งตัวอย่างพืชมาตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืช ที่กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยเฉพาะพรรณไม้น้ำซึ่งเป็นไม้ประดับส่งออกเพื่อเลี้ยงในตู้ปลา และไม้ประดับอื่น เช่น กวักมรกต มีขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

1. การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชจากรากพืชโดยการใช้เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงอัลตร้าโซนิค (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

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

3.การทำสไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอยศัตรู

เมื่อพบว่าเป็นไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จึงนำไปทำสไลด์ถาวร ตามวิธีการของ De Grisse,1969 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 ตรวจดูไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อไม่พบการหดตัวของผนังลำตัวไส้เดือนฝอย 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* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

กรมวิชาการเกษตร

กำลังขยายสูง 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

ชื่อการทดลองที่ 1.2.7 การจำแนกไส้เดือนฝอยรากแผล (*Pratylenchus* spp.) ในแหล่งปลูกหอมแดงด้วยวิธีอณูชีววิทยา

Molecular identification of lesion nematode (*Pratylenchus* spp.) in shallot fields

วิธีปฏิบัติการทดลอง

<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>

ศรีษะเกษ

ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลโดยใช้วิธีทางอณูชีววิทยาและสัณฐานวิทยา ตรวจสอบทางอณูชีววิทยาโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA gene กับฐานข้อมูล สกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอย 1 ตัวด้วย GeneReleaser® (BioVentures) 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

กรมวิชาการเกษตร

ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง โดยตรวจสอบลักษณะของไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างสด และตัวอย่างที่ทำการคงสภาพและทำสไลด์ถาวรตามวิธีของ Ryss (2003) จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลโดยใช้คู่มือการจัดจำแนกของ Castillo and Vovlas (2007) บันทึกภาพ

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 1.2.8 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ไอโซเลตไทย

Phylogenetic analysis of the Thai Isolates of *Pasteuria penetrans*

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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) นำไข่ไส้เดือนฝอยใส่ลงบนตะแกรงไนลอนขนาดเล็กที่มีขนาดช่องประมาณ 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-

กรมวิชาการเกษตร

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

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 1.2.9 การทวนสอบแนวทางการจำแนกชนิดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองด้วยวิธีอณูชีววิทยากับไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย

Validation of Molecular Diagnostic Key with Second Stage Juveniles of Root-Knot Nematodes in Thailand

วิธีปฏิบัติการทดลอง

การเก็บตัวอย่างดิน และรากพืช

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืชที่มีรายงานว่าเป็นพืชอาศัยของไส้เดือนฝอยรากปม โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 20 จุดต่อแปลง ความลึก ประมาณ 15-20 เซนติเมตรโดยใช้ท่อเก็บตัวอย่างดิน เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว คลุกเคล้าเข้าด้วยกันให้ได้ตัวอย่างดินอย่างน้อยแปลงละ 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติก บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์และชนิดพืชปลูก รวมทั้งเก็บตัวอย่างราก หรือส่วนของพืชที่แสดงอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมหากพบในพื้นที่

การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและพืช

กรมวิชาการเกษตร

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 เดือนที่ปลูกในกระถางในดินอบฆ่าเชื้อ 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

กรมวิชาการเกษตร

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

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

Study and Identification of *Leek yellow stripe virus* (LYSV) disease on garlic

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

นำตัวอย่างกลีบไม้จากรังกล้วยไม้ 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 แล้วเติม 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 เป็น

กรมวิชาการเกษตร

เวลา 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.

การทดลองที่ 1.2.111 ศึกษาชนิดและเขตการแพร่กระจายของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

Species and Distribution of *Colletotrichum* spp. Causing Chilli Anthracnose Disease.

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

ภาคตะวันตก เช่น จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์

ภาคใต้ เช่น จังหวัดกระบี่ ชุมพร นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา

เก็บตัวอย่างในพื้นที่ปลูก โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างโรค 5 แถวต่อแปลง กำหนดการสุ่มแบบแถวเว้นแถว นำตัวอย่างโรคที่ได้ห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก เจาะระบายความชื้น นำตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัย

กรมวิชาการเกษตร

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

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

กรมวิชาการเกษตร

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

การทดลองที่ 1.2.13 อนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของเชื้อรา Cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช
Taxonomy and phylogeny of Cercosporoid fungi in Thailand

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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 หรือใช้ใบมีด

กรมวิชาการเกษตร

ตัดขวางชิ้นส่วนพืช (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 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)

กรมวิชาการเกษตร

EF-2: GGARGTACCAGTSATCATGTT (O'Donnell et al., 1998)

the Large Subunit (LSU, 28S)

LROR: ACCCGCTGAACTTAAGC (Vilgalys and Hester, 1990)

LR6: CGCCAGTTTCTGCTTACC (Vilgalys and Hester, 1990)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของตำแหน่ง ITS EF1-α และ LSU ด้วย Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนด annealing temperature ที่ 56 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ 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

กรมวิชาการเกษตร

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. 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

การทดลองที่ 1.2.14 อนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืช
Taxonomy and phylogeny of Pucciniaceae in Thailand

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

กรมวิชาการเกษตร

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

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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)

4. บันทึกข้อมูลราสนิมวงศ์ Pucciniaceae ที่รายงานพบในประเทศไทย

รวบรวมข้อมูลการจัดจำแนกราสนิม Pucciniaceae ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและที่มีการจัดจำแนกด้วยข้อมูลชีวโมเลกุลของสนิม Pucciniaceae ที่มีรายงานพบในประเทศไทย เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาประเมินความเชื่อมั่นในการจัดจำแนกชนิด เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชเพื่อการวินิจฉัยที่ถูกต้อง

5. การเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราและเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ

กรมวิชาการเกษตร

ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2562 – กันยายน 2564

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.2.15 การจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล Radopholus ทางชีวโมเลกุล

The Identification of the Genus Radopholus with the Molecular Technique.

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1.เก็บตัวอย่างพืชอาศัยของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จากพืชวงศ์บอน (*Araceae*) พืชวงศ์คล้า (*Marantaceae*) พืชวงศ์กล้วย(*Musaceae*) พืชวงศ์กล้วยพัด (*Strelitziaceae*) กวักมรกรต และ พรรณไม้น้ำ เป็นต้น เก็บตัวอย่างจากพืช อย่างน้อย 100 ตัวอย่าง แต่ละพืชจำนวนตัวอย่างแล้วความเหมาะสมและโอกาสอำนวย โดยตัวอย่างต้นพืชเก็บใส่ถุงพลาสติกรัดปากถุงให้แน่นนำกลับมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างดินปลูกหรือวัดสดุปลูกเก็บบริเวณทรงพุ่มความลึกอยู่ในช่วงประมาณ 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) พร้อมคอมพิวเตอร์และอุปกรณ์ถ่ายภาพและโปรแกรมการวัดขนาด โดยมีลักษณะสำคัญที่ต้องบันทึก อาทิ ความยาวของลำตัว ลักษณะริมฝีปาก ความยาวของ stylet ลักษณะหาง เส้นผ่านศูนย์กลางลำตัว ความยาวของ oesophagus ค่า De Man’s ratios เช่น ค่า

กรมวิชาการเกษตร

a (อัตราส่วนของความยาวลำตัวต่อส่วนที่กว้างที่สุดของลำตัว) 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 ไมโครลิตร ลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟ เป็นเวลา 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 แล้วนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่อง UV-

กรมวิชาการเกษตร

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

การทดลองที่ 1.2.16 การศึกษาและจำแนกเชื้อไวรัสสาเหตุโรคของยาสูบที่พบในประเทศไทย

The study and classification of tobacco virus diseases in Thailand

วิธีปฏิบัติการทดลอง

การสำรวจโรคไวรัสในยาสูบ

สำรวจและเก็บตัวอย่างยาสูบที่มีลักษณะผิดปกติคล้ายเกิดจากโรคไวรัส ได้แก่ อาการใบม้วนงอ หนาแข็ง 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

กรมวิชาการเกษตร

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')

- เวลาและสถานที่ - 1 ตุลาคม 2562 วันที่สิ้นสุด 30 กันยายน 2564

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช 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

Life History and Taxonomic Characteristics of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink (Hemiptera: Pseudococcidae) in Thailand

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เตรียมพืชอาหารสำหรับการเลี้ยงเพลี้ยแป้งมะละกอ โดยใช้พืชอาหารทั้งสิ้น 4 ชนิด ได้แก่ มันสำปะหลัง มะละกอ ชบา และ ลีลาวดี

2. เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากแหล่งปลูกมันสำปะหลัง มะละกอ ชบา และ ลีลาวดี ใน จังหวัดสระบุรี นครราชสีมา ราชบุรี กาญจนบุรี เพื่อนำเพลี้ยแป้งมะละกอที่ได้มาทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการ โดยตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยแป้งอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษแล้วใส่ในถุงพลาสติก

กรมวิชาการเกษตร

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%

7. นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากขวดดองตัวอย่างในข้อ 6 มาทำสไลด์ถาวร โดยดัดแปลงวิธีการของ Williams and Watson (1988) มีขั้นตอนดังนี้

7.1 ใช้เข็มเขี่ยเจาะบริเวณกลางส่วนอกด้านบนของตัวอย่างเพลี้ยแป้ง นำไปใส่ในถาดแก้วที่บรรจุด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% แช่ทิ้งไว้ 12 - 24 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับขนาดตัวอย่างและระยะการเจริญเติบโตของเพลี้ยแป้ง

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) ตรวจดูลักษณะ

กรมวิชาการเกษตร

สำคัญที่ใช้ในการจำแนก 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

เริ่มต้น เดือนตุลาคม 2559 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2561

สถานที่ 1. แหล่งปลูกพืชต่างๆ

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.1.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อชีววิทยาและนิเวศวิทยาของแตนเบียนไข่ *Trichogramma confusum*

Study the effect of temperature on biology and ecology of *Trichogramma confusum*

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 เพื่อไม่ให้ไข่สามารถฟักเป็นตัวหนอนได้ ตัดแยกแต่ละช่องออกเป็นแผ่น ใส่ในหลอดทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร สูง 20 เซนติเมตร แต่ละหลอดให้ *T. confusum* เบียนแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ได้อายุตามที่กำหนด แล้วแยกแต่ละอายุใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 แผ่น อายุละ 8หลอด จำนวน 2 หลอด ต่อหน่วยทดลอง ใส่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เลี้ยงจนกระทั่งออกเป็นตัวเต็มวัย แล้วใส่ไข่ผีเสื้อข้าวสารเพื่อให้แตนเบียนวางไข่ ตรวจนับ จำนวนแตนเบียนไข่ที่ได้ จำนวนตัวตาย อัตราการเบียน อัตราการออกเป็นตัวเต็มวัยของรุ่นต่อไป และจำแนกเพศ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

กรมวิชาการเกษตร

การบันทึกข้อมูล: อายุแตนเบียนไข่, ระยะเวลาที่ออกเป็นแตนเบียน, จำนวนแตนเบียนไข่ที่ออกเป็นตัวเต็มวัย, จำนวนไข่ทั้งหมด, จำนวนไข่ที่ถูกเบียน, จำนวนตัวแต่ละเพศ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินงาน: ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561

สถานที่ดำเนินงาน: ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา

การทดลองที่ 2.1.3 ชีววิทยาของไรแดงมันสำปะหลัง (cassava red mite); *Oligonychus biharensis* (Hirst)

Biology of Cassava Red Mite; *Oligonychus biharensis* (Hirst)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1. การเลี้ยงขยายไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis*

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไรแดงมันสำปะหลัง ในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวอย่างไรที่เก็บได้บนพืชอาศัย ได้แก่ มันสำปะหลัง และชมพู่ มาเลี้ยงบนใบพืชอาศัย และวางอยู่บนสำลีชุ่มน้ำในถาดพลาสติก หล่อน้ำถาดเลี้ยงตลอดเวลา 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

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.1.4 ชีววิทยาและพลวัตประชากรของหอยศัตรูพืชสกุล *Succinea*

Biology and population dynamics of pest snail *Succinea*

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ศึกษาชีววิทยาของหอยศัตรูพืชสกุล *Succinea* โดยดำเนินการดังนี้

- การเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างหอยซัคซีเนียศัตรูพืชสกุล *Succinea* จากแปลงปลูกกล้วยไม้ และแปลงปลูกผัก ในแหล่งปลูกภาคตะวันตก 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

- 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

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.1.5 ชีววิทยา วงจรชีวิต และการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Indoplanorbis*

Geographical distribution and some biological aspects of freshwater pest snail *Indoplanorbis* sp.

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. สำรวจ เก็บตัวอย่าง จำแนกชนิด และเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (ดำเนินการในปี 2560)

1.1 สำรวจและเก็บตัวอย่างหอยสกุล *Indoplanorbis* ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ บ่อไม้ประดับ และแปลงเพาะขยายพรรณไม้น้ำของเกษตรกรในพื้นที่ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ของประเทศไทย

1.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง ดำเนินการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ที่กำหนด โดยแบ่งเก็บพื้นที่ละ 5 จุด ตามขอบตลิ่ง พื้นดินขอบบ่อ และพันธุ์พืชน้ำ

การบันทึกข้อมูล :

- 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* โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก การจำแนกชนิดยึดตามเอกสารของ Brandt (1974) และ Nabhitabhata (2009)

บันทึกข้อมูล :

- บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก เช่น ลักษณะรูปร่าง สี และลวดลายบนเปลือก ตรวจดูรายละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์
- บันทึกความกว้างและความสูงของเปลือก ความกว้างของวงรอบเปลือกความกว้าง ขนาดของปากเปิดเปลือก

2. ศึกษาชีววิทยาบางประการของหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* (ดำเนินการในปี 2560-2561)

2.1 ศึกษาศักยภาพการกินของหอยน้ำสกุล *Indoplanorbis* (ดำเนินการปี 2560)

(2.1.1) คัดเลือกพรรณไม้น้ำเพื่อใช้เป็นพืชอาหารในแต่ละกรรมวิธี โดยเก็บตัวอย่างพรรณไม้น้ำที่เกษตรกรนิยมปลูกเพื่อการค้าและการส่งออกที่สำคัญ 8 ชนิด ได้แก่ ใบพาย *Cryptocoryne* sp.

กรมวิชาการเกษตร

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%

<u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u> : นำข้อมูลมาคำนวณค่าความสามารถในการกินพืชอาหารคำนวณค่าความสามารถในการกินพืชของหอยโดยดัดแปลงจาก Wong *et al*., (2010) ดังนี้

(1) ค่าความสามารถในการกินพืช

<u>น้ำหนักพืชอาหารในวันแรก – น้ำหนักพืชอาหารหลังเวลาผ่านไป</u>

จำนวนวัน

(2) อัตราการกินพืชต่อตัว

<u>น้ำหนักของพืชอาหารก่อนการทดลอง - น้ำหนักของพืชอาหารหลังทดลอง</u>

จำนวนหอย (ตัว)

<u>การบันทึกข้อมูล</u> :

- บันทึกพฤติกรรมการกินพืชอาหารแต่ละชนิด
- บันทึกน้ำหนักพืชอาหารหลังจากให้หอยกินในแต่ละวัน

2.2 ศึกษาวงชีวิต การผสมพันธุ์ และวางไข่ (ดัดแปลงจาก ดวงขวัญ (2520)) (ดำเนินการปี 2561) โดยนำหอยที่ได้การเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ มาดำเนินการศึกษา

(2.2.1) ศึกษาวงชีวิตหอยสกุล *Indoplanorbis* ดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

- แยกไข่รุ่นที่ 1 แต่ละกลุ่มมาเลี้ยงในจานแก้ว (petri-dish) ใส่น้ำประมาณ 50 มิลลิเมตร เปลี่ยนน้ำทุกวัน จนกระทั่งไข่เริ่มฟักเป็นลูกหอย บันทึกวันที่ไข่เริ่มฟักจนกระทั่งฟักเป็นลูกหอยทั้งหมด

- 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 ใส่สาหร่ายพุงชะโดจนกระทั่งหอยวางไข่และฟักเป็นลูกหอย 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

- 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

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.1.6 ชีววิทยา การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Radix*

Biology, geographical distribution and genetic diversity of aquatic pest snail *Radix*

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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) ลักษณะของเปลือก 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% และนำไปใส่ในกล่องที่บรรจุทีบีอี บัฟเฟอร์ ผสมดีเอ็นเอกับสีย้อมในอัตราส่วน 1:5 และนำไปหยอดลงในหลุมของอะกาโรสเจล เปิดให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที นำอะกาโรสเจลมาย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

กรมวิชาการเกษตร

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
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 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที นำอะกาโรสเจลมาย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ ถ้ามีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการขนาดประมาณ 600 คู่เบสเกิดขึ้นให้นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสรอการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

4.3 การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

กรมวิชาการเกษตร

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated sequencer ที่มีให้บริการโดยบริษัทเอกชนที่รับจ้างอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำไปวิเคราะห์และสร้างสร้างแผนภูมิต้นไม้ต่อไป

4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างแผนภูมิต้นไม้

นำไฟล์ที่ได้จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated sequencer มาวิเคราะห์และตัดบริเวณสัญญาณรบกวนออก เพื่อให้ได้ไฟล์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน coxI ทุกตัวอย่าง หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงด้วยโปรแกรม MAFFT version 7 (Katoh and Standley, 2013) หลังจากนั้นนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธีการ 3 วิธี ดังนี้

4.4.1 วิธี neighbor-joining

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

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.1.7 ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ฤดูการระบาด ของหนอนแดงในฝรั่ง และพุทรา

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

การทดลองที่ 2.1.8 ศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa* (Fabricius)

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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 เมื่อ

กรมวิชาการเกษตร

ดักแด้เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม จึงร่อนขี้เลื่อยด้วยตะแกรงร่อน เพื่อแยกดักแด้ออกมานำไปใส่กล่องพลาสติก และคลุมทับด้วยขี้เลื่อยสูงประมาณ 0.5 นิ้ว นำไปไว้ในกรงเลี้ยงแมลง ที่ภายในมีน้ำและอาหารสำหรับตัวเต็มวัย (Brewer's yeast และน้ำตาลไอซ์ซิ่ง อัตราส่วน 3:7) เมื่อตัวเต็มวัยฟักออกมาและมีอายุประมาณ 7-10 วัน จะเป็นช่วงที่ตัวเต็มวัยมีการพัฒนาเจริญเติบโตมีสีสันเต็มที่แล้ว จึงทำการฆ่าตัวเต็มวัยโดยนำไปใส่ในหลอดแก้วแช่ในช่องทำน้ำแข็ง (freezer) นาน 4-5 ชั่วโมง แล้วนำไปจำแนกชนิดและตรวจนับจำนวน

การบันทึกข้อมูล

บันทึกชนิดผลไม้ บันทึกข้อมูลสถานที่ วัน/เดือน/ปี และพิกัดทางภูมิศาสตร์ที่เก็บผลไม้

2. การศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa*

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

กรมวิชาการเกษตร

- เวลาและสถานที่

- เริ่มต้น ตุลาคม 2561 - สิ้นสุด กันยายน 2563
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

แหล่งปลูกผลไม้ ขนุน จำปาดะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด ในพื้นที่ธรรมชาติหรือในพื้นที่แปลงปลูกของเกษตรกรที่ถูกแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* เข้าทำลาย ในเขตภาคกลาง เช่น จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร และสุพรรณบุรี หรือภาคตะวันออก เช่น จังหวัดจันทบุรี ตราด และระยอง หรือภาคตะวันตก เช่น จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ หรือภาคใต้ เช่น จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา และสตูล

การทดลองที่ 2.1.9 ศึกษาชนิด ชีววิทยา และการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Physella*

Species, biology, and geographical distribution of aquatic pest snail *Physella*

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

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

กรมวิชาการเกษตร

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 นำไปเลี้ยงในบริเวณที่มีแสง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้อาหารปลาชนิดเม็ดและผักกาดหอมทุก 3 วัน และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำและให้แคลเซียมผงทุก 7 วัน วัดความสูงความยาวของเปลือก น้ำหนัก วัดค่าความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิ

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>

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1) สืบค้นข้อมูลเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* ที่จากเอกสารต่าง ๆ ที่มีการรายงานไว้ในประเทศไทยและต่างประเทศ หรือจากข้อมูลอิเลคโทรนิค

2) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่าง

กรมวิชาการเกษตร

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 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 ให้ใบถั่วฝักยาวเป็นอาหาร โดยใช้สำลีชุบน้ำพันรอบก้านใบเพื่อรักษาความสด 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 และนับจำนวน

กรมวิชาการเกษตร

ตัวอ่อนที่ตัวเต็มวัยออกลูกทุกวัน จนกระทั่งตัวเต็มวัยตาย นำข้อมูลที่ได้ไปสร้างตารางชีวิตแบบ biological life table โดยใช้เทคนิคของ Napompeth (1973) และอินทวัฒน์ (2548)

4) การศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน

นำตัวอย่างตัวเต็มวัยของเพลี้ยอ่อนที่เก็บรวบรวมได้จากแปลงปลูกพืชมาตรวจลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาด รูปร่าง ลักษณะ สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพเพลี้ยอ่อนแต่ละระยะ

<u>การทำสไลด์ถาวร</u>

- 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 เติมกรดแกลเซียลอะซิติก แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

- ดูดกรดแกลเซียลอะซิติกออก เติมโคลฟอยย 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

กรมวิชาการเกษตร

- บันทึกรายละเอียดต่างๆ ของเพลี้ยอ่อนที่สำรวจพบ เช่น ลักษณะ รูปร่าง ขนาด สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพเพลี้ยอ่อนในแต่ละระยะ รวมถึงบันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายที่ต้องติดไว้กับสไลด์เพลี้ยอ่อนแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่จับ และ วัน/เดือน/ปีที่ทำสไลด์ถาวร ชื่อน้ำยาที่ใช้เมาท์ (mount) สไลด์

- จัดทำแนวทางการวินิจฉัยเพลี้ยอ่อนและวาดภาพลักษณะสำคัญประกอบ

- เก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษา เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล เพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

การบันทึกข้อมูล

บันทึกรายละเอียด ชื่อพืช พันธุ์พืช สถานที่เก็บตัวอย่าง วัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) ซึ่งประกอบด้วยค่าละติจูด (Latitude) 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

<u>กิจกรรมย่อยที่ 2.2 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของโรคพืช</u>

ชื่อการทดลองที่ 2.2.1 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phyllosticta citriasiana*

Study on Biology and Ecology of *Phyllosticta citriasiana*

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

การบันทึกผลการทดลอง

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยเชื้อราบนอาหารแต่ละชนิด เมื่อเส้นใยที่เจริญบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำผลมาวิเคราะห์สถิติ

1.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. citriasiana* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน10 ซ้ำ 9 กรรมวิธี โดยให้อาหารแต่ละชนิดเป็นกรรมวิธี ดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

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

วิธีการทดลอง

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

การบันทึกผลการทดลอง

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยเชื้อราบนอาหารแต่ละชนิด เมื่อเส้นใยที่เจริญบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำผลมาวิเคราะห์สถิติ

2. ศึกษาพืชอาศัยของรา *P. citriasiana* ในต้นกล้าของพืชตระกูลส้ม

2.1 <u>เตรียมพืชทดสอบในต้นกล้า</u>

ปลูกพืชทดสอบชนิดต่างๆ ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ส้มโอ และ มะนาว เป็นต้น ในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง 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>

กรมวิชาการเกษตร

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 และใบที่ร่วงลงบนพื้นดินใต้ต้นส้มโอ 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

กรมวิชาการเกษตร

compound บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscope)

3.5 บันทึกข้อมูลสิ่งแวดล้อม

บันทึกข้อมูลสภาพสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิสูงสุด อุณหภูมิต่ำสุด ความชื้นสัมพัทธ์ ปริมาณน้ำฝน ของอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

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

การทดลองที่ 2.2.2 การศึกษาพืชอาศัย และเขตการแพร่กระจายของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชในประเทศไทย

Hosts and Distribution areas of Pathogenic *Fusarium oxysporum* causing Wilt Disease of Crops in Thailand

วิธีปฏิบัติการทดลอง

กรรมวิธีและวิธีการทดลอง :

1. การเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรค

กรมวิชาการเกษตร

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 จากนั้นใช้เข็มเขี่ยตักสปอร์เดี่ยวที่งอก มาเลี้ยงบนอาหาร PDA

3.2 การจำแนกชนิด : ทำการศึกษาลักษณะของสัณฐานวิทยา ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และจำแนกตามวิธีการของ Nelson และคณะ (1983) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

- ศึกษาลักษณะการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *Fusarium* และศึกษาการสร้าง pigment, sclerotium และ sporodochium บนอาหาร PDA และศึกษาลักษณะและวัดขนาดของ conidium, conidiophore บนอาหาร CLA อายุ 10-14 วัน ที่อุณหภูมิ 26-28 °ซ. ภายใต้แสง NUV (near ultraviolet)
- ทำ slide culture เพื่อศึกษาลักษณะของ sporogenous cell, phialide, microconidium, macroconidium

3.3 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลในแปลงปลูก ระดับความเสียหายของโรค 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

กรมวิชาการเกษตร

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

สถานที่ : กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช แปลงปลูกพืชของเกษตรกร

การทดลองที่ 2.2.3 ชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

กรมวิชาการเกษตร

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 เขย่าบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 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

กรมวิชาการเกษตร

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) 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., Cambridge, UK)

กรมวิชาการเกษตร

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

การทดลองที่ 2.2.4 การศึกษาสาเหตุและการถ่ายทอดอาการใบหงิกของส้มโอ

Causal agent and transmission of Pummelo crinkly leaf symptom

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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 เพื่อป้องกันปัญหาโรครากเน่าโคนเน่าเมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 2 - 3 เดือน ทำการย้ายต้นกล้าใส่ในถุงพลาสติกขนาด 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 เก็บส่วนน้ำใสมาเติม absolute ethanol ปริมาตร 1.5 เท่า แล้วดูดส่วนน้ำใสปริมาตร 650 ไมโครลิตร ใส่ลงใน DNeasy Mini

กรมวิชาการเกษตร

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

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

กรมวิชาการเกษตร

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 ข้ามคืน จากนั้นจึงส่งไปทำการหาลำดับเบสที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัสที่มีรายงานใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST)

3. การถ่ายทอดเชื้อไวรัส *Citrus chlorotic dwarf associated virus*

3.1 การถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยวิธีกรีดแผลบนต้นกล้า

นำตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าส้มโอทองดีที่ได้รับการตรวจยืนยันว่าเป็นโรคใบหงิกแล้วด้วยเทคนิคพีซีอาร์และแสดงอาการใบหงิก บิดงอ และด้านหลังใบมีอาการจุดซ้ำตามแนวเส้นใบมาบดให้ละเอียดใน Phosphate buffer pH 7.2 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 เพื่อสังเกตอาการโรคและนำตัวอย่างใบไปสกัด

กรมวิชาการเกษตร

ดีเอ็นตามวิธีการในข้อ 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

การทดลองที่ 2.2.5 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Curvularia eragrostidis* และ *C. oryzae*

Study on biology and ecology of *Curvularia eragrostidis* and *C. Oryzae*

วิธีปฏิบัติการทดลอง

การศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *C. eragrostidis* และรา *C. oryzae* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

เก็บตัวอย่างโรคพืช สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพืชจากแหล่งปลูกปาล์มน้ำมันและแหล่งปลูกกล้วยไม้ในประเทศไทย ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ ข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์ และแบ่งตัวอย่างโรคพืชมาอัดทับตัวอย่างแห้ง จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 3-7 วัน เมื่อพบราสร้างเส้นใยหรือ conidia ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ และตรวจดูลักษณะต่าง 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)

กรมวิชาการเกษตร

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 นำมาวางบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อและนำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 25 30 35 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีราที่เจริญบนอาหารแต่ละชนิด ที่บ่มในอุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 7 และ 14 วัน บันทึกผล และนำผลมาวิเคราะห์สถิติ

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

1. ปลูกพืชทดสอบชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ปาล์มน้ำมัน และกล้วยไม้

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

3. ทดสอบการเกิดโรคบนพืชอาศัย

- ทดสอบการเกิดโรคเบื้องต้นบนใบปาล์มน้ำมันและดอกกล้วยไม้ โดยทำแผลบนใบปาล์มน้ำมันจากนั้นพ่นสารแขวนลอยสปอร์ของรา *C. oryzae* และทำแผลบนดอกกล้วยไม้ พ่นสารแขวนลอยสปอร์ของรา *C. eragrostidis* ที่เตรียมไว้ปริมาณเชื้อ 10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร สำหรับกรรมวิธีควบคุมพ่นด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียง

กรมวิชาการเกษตร

อย่างเดียวเพื่อเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ 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

การทดลองที่ 2.2.6 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Neoscytalidium dimidiatum* Crous & Slippers and Gruyter

Study on biology and ecology of *Neoscytalidium dimidiatum* Crous & Slippers and Gruyter

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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 ลักษณะของ

กรมวิชาการเกษตร

เส้นใย 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 แล้วนำตัวอย่างแห้งโรคพืชมาเก็บในถุงกระดาษพร้อมลงรายละเอียดข้อมูล ได้แก่ ชื่อพืช ลักษณะอาการโรค สถานที่เก็บ ชนิดของราสาเหตุโรคพืช วันที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ และชื่อผู้จัดจำแนกชนิดรา เป็นต้น แล้วส่งเก็บในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

1.5 การศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum*

เก็บแก้วมังกรแสดงอาการระยะต่าง ๆ มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ห่อตัวอย่างพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก เพื่อนำมาทำศึกษาชนิดและแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ

2. ศึกษาชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

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

กรมวิชาการเกษตร

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
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

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการของโรค

กรมวิชาการเกษตร

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 ลักษณะอาการที่พบในพริก และบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์

2. การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากพืช

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

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

2. ย้ายส่วนของพืชมาใส่ Filter Column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที จากนั้นดูดส่วนของเหลวใสใสใน 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

กรมวิชาการเกษตร

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

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดังนี้

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

เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ที่เติม Redsafe Nucleic Acid Straining Solution ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที 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) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับ

กรมวิชาการเกษตร

นิวคลิโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อ 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 แล้วจึงนำเพลี้ยอ่อนที่อดอาหารมาปล่อยลงบนต้นมันพริกที่มีเชื้อ 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

การทดลองที่ 2.2.8 การจำแนกชนิดเชื้อ *Crinivirus* ของพืชตระกูลแตงในประเทศไทย

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

กรมวิชาการเกษตร

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

2. ย้ายส่วนของพืชมาใส่ Filter Column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที จากนั้นดูดส่วนของเหลวใสใสใน 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*

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

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 ไมโครลิตรใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วตรวจสอบยีนที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *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

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

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

<u>กิจกรรมย่อยที่ 2.3 ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของวัชพืช</u>

การทดลองที่ 2.3.1 ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของหญ้าตีนกาใหญ่ (*Acrachne racemosa (Heyne* ex Roth) Ohwi)

Biology and Ecology of *Acrachne racemosa* (Heyne ex Roth) Ohwi

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ศึกษานิเวศวิทยา

1) สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดหญ้าตีนกาใหญ่ ใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ บันทึก สถานที่หรือพิกัดที่เก็บตัวอย่าง สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูกหลัก ลักษณะพืชเป้าหมาย 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

กรมวิชาการเกษตร

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) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง เมื่อต้นตีนกาใหญ่เจริญเติบโตและมีอายุ 1 เดือน ถอนออกจากแปลง ทำการตัดแขนงบริเวณโคนต้น ดังนี้

- 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 ถอนออกจากแปลงนำมาแบ่งกอตามกรรมวิธีข้างต้น (กรรมวิธีละ 5 ต้น) นำไปปลูกในกระถางขนาด 12 นิ้ว บันทึกจำนวนแขนงใหม่ที่เกิดขึ้น ทุกสัปดาห์

กรมวิชาการเกษตร

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 และพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อมในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้

การทดลองที่ 2.3.2. ชีววิทยา และนิเวศวิทยาของลูกใต้ใบใบใหญ่ (*Phyllanthus caroliniensis* Walter)

Biology and ecology of *Phyllanthus caroliniensis* Walter

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

กรมวิชาการเกษตร

นำเมล็ดที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน สุ่มเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์และแก่ จำนวน 50 เมล็ด ใส่ในจานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 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) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง 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) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง เมื่อต้นมีอายุ 1 เดือน นำชิ้นส่วนเหนือดินของวัชพืชมาตัดแบ่งเป็นท่อนๆ ละ 5-10 เซนติเมตร เป็นท่อนพันธุ์สำหรับปักชำ แยกท่อนพันธุ์ออกตามระยะห่างจากโคน ได้แก่ ท่อนโคน กลางต้น และปลายยอด 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 บันทึกความงอกของเมล็ดที่งอกโดยเปรียบเทียบในแต่ละกรรมวิธี

กรมวิชาการเกษตร

- เวลาและสถานที่

ทำการทดลอง ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2561 ณ ภาคต่างๆ ของประเทศไทย และศึกษาชีววิทยา ในห้องปฏิบัติการ และเรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช

การทดลองที่ 2.3.3 ชีววิทยาของวัชพืช *Asystasia gangetica* (L.) T. Anderson

The Biological Study of Asystasia gangetica (L.) T. Anderson

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1.ศึกษาการเจริญเติบโต

1.1 ศึกษาวงจรชีวิตของบาหยา

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

กรมวิชาการเกษตร

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

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

กรมวิชาการเกษตร

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)

- 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

กรมวิชาการเกษตร

นับจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน

- เวลาและสถานที่

เรือนทดลอง และห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช เดือน ตุลาคม 2559- ตุลาคม 2561

การทดลองที่ 2.3.4 ชีววิทยา และนิเวศวิทยาของกระดุมใบใหญ่ (*Borreria latifolia* (Aubl), Schum.)

Biology and ecology of *Borreria latifolia* (Aubl.) Schum.

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ศึกษานิเวศวิทยา

1.1 สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดกระดุมใบใหญ่ ใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในภาคเหนือ (จังหวัดเชียงราย แม่ฮ่องสอน ลำปาง และอุตรดิตถ์) ภาคกลาง (จังหวัดนครสวรรค์ นครปฐม ลพบุรี สระบุรี สุพรรณบุรี และอยุธยา) ภาคตะวันออก (จังหวัดจันทบุรี ตราด ปราจีนบุรี และระยอง) ภาคตะวันตก (จังหวัดกาญจนบุรี ตาก และราชบุรี) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดนครราชสีมา นครพนม บุรีรัมย์ ร้อยเอ็ด ศรีสะเกษ และหนองคาย) และภาคใต้ (จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระนอง นครราชสีมา และสงขลา) 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 ใส่ในจานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร ที่บรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดฝา จำนวน 10 ซ้ำนำไปวางในห้องปฏิบัติการ สภาพอุณหภูมิห้อง บันทึกจำนวนเมล็ดงอกทุกวัน ในระยะเวลา 30 วัน หรือจนเมล็ดงอกหมด

3. การเจริญเติบโต และความสามารถในการผลิตเมล็ด

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 5 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1. ต้นวัชพืชจำนวน 1 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 2. ต้นวัชพืชจำนวน 3 ต้นต่อกระบะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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

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

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.3.5 ชีววิทยาของเทียนนา (*Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Excel

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

กรรมวิธีที่ 2 ปักชำชิ้นส่วนจากกลางต้น

กรมวิชาการเกษตร

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

กิจกรรมที่ 3 การจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง (ดำเนินการปี 2560-2561)

วิธีดำเนินการวิจัยในการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเพื่อนำมาศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

กรมวิชาการเกษตร

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 โดยติดตั้งในพื้นที่เก็บตัวอย่างละ 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

กรมวิชาการเกษตร

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

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

กรมวิชาการเกษตร

ddH_2O		15.9
Primer Forward	LCO1490	1
Primer Reverse	HCO2198	1
DNA		2
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

กรมวิชาการเกษตร

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 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

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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 (COI) รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่มีชีวิตด้วย บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟที่เก็บได้ เช่น พืชที่เก็บ ส่วนของพืชที่เก็บ สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันที่เก็บ และชื่อผู้เก็บ ลงในขวดดองเพลี้ยไฟ นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ และนำตัวเต็มวัยไปทำสไลด์ถาวร

วิธีการทำสไลด์ถาวรของเพลี้ยไฟ มีขั้นตอนดังนี้

ลิขสิทธิ์การเกษตร

- 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>

- 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

กรมวิชาการเกษตร

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

การทดลองที่ 3.3 การสำรวจโรคและจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา Cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช
Disease survey and DNA barcoding of plant pathogenic Cercosporoid fungi

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

กรมวิชาการเกษตร

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

การทดลองที่ 3.4 การสำรวจโรคและจัดทำรหัสดีเอ็นเอบาร์โค้ดของราสนิมสาเหตุโรคพืช

Disease survey and DNA barcoding of plant pathogenic rust fungi

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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 ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้ตัวอย่างโรคที่ใช้ในการศึกษา จะรวมถึงตัวอย่างแห้งของโรคพืชที่เกิดจากราสนิม ที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของราสนิมสาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของ teliospore urediniopsore spermatia และลักษณะอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Stereo และ Compound เพื่อบันทึกขนาด รูปร่างและบันทึกภาพ รวมถึงการบันทึกข้อมูลของพืชอาศัย จำแนกชนิดราสนิม สาเหตุโรคพืช โดยเปรียบเทียบลักษณะของราสนิมที่

กรมวิชาการเกษตร

ศึกษา 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**

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

กรมวิชาการเกษตร

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

แปลงปาล์มน้ำมันในประเทศ

การทดลองที่ 3.5 การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Alternaria* สาเหตุโรคพืช

DNA barcoding of plant pathogenic *Alternaria*

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

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

กรมวิชาการเกษตร

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 จากนั้นเขี่ยเส้นใยของรา ย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ 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)

EF1-986R: TACTTGAAGGAACCCTTACC (Carbone and Kohn, 1999)

Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenasebeta (GAPDH)

gpd1: CAACGGCTTCGGTCGCATTG (Berbee *et al*., 1999)

gpd2: GCCAAGCAGTTGGTTGTGC (Berbee *et al*., 1999)

กรมวิชาการเกษตร

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 ซึ่งจำเพาะต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command –f a) เริ่มจาก random starting tree และกำหนด maximum likelihood bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง

จัดเก็บข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ

กรมวิชาการเกษตร

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

การทดลองที่ 3.6 การตรวจวินิจฉัยชนิดของแตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae (Platygastridae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

Species identification of egg parasitoids subfamily Telenominae (Platygastridae) in rice paddies using molecular technique

วิธีปฏิบัติการทดลอง

<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 (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 เอเซีย) ฐานข้อมูล GBIF (Global Biodiversity Information Facility) ส่งเข้าสู่ระบบฐานข้อมูล EoL(Encyclopedia of Life) ส่งเข้าสู่ระบบฐานข้อมูล HOL

กรมวิชาการเกษตร

(Hymenoptera online Database) นอกจากนี้ หลังจากตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการแล้ว ส่งลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ เพื่อเก็บลงบนฐานข้อมูล GenBank ต่อไป

- **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

การทดลองที่ 3.7 ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกชนิดแมงมุมแม่ม่ายสกุล Latrodectus ในประเทศไทย

DNA Barcoding for Identification Spider Fauna in genus *Latrodectus* in Thailand

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง (ดำเนินการปี 2560-2562)

วิธีดำเนินการวิจัยในการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนและตัวเต็มวัยแมงมุมแม่ม่ายเพื่อนำมาศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

1.1 การศึกษาครั้งนี้มีแผนการปฏิบัติการเก็บตัวอย่างแมงมุมแม่ม่ายตามใต้โต๊ะ เก้าอี้ ใต้พื้นรถยนต์ แปลงมันสำปะหลัง และขอบชายป่า ทั้งช่วงเวลากลางวันและกลางคืนโดยสังเกตใยที่ใช้ในการดักเหยื่อ ทำการเก็บ

กรมวิชาการเกษตร

ตัวอย่างแมงมุมโดยวิธีจับโดยตรงด้วยหลอดพลาสติกใส 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

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 จากนั้น

กรมวิชาการเกษตร

จึงดึง 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

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 โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 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

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 ใสในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 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) ศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอ

กรมวิชาการเกษตร

ไทด์ของยีน 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) โดยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้จะถูกเก็บบันทึกเพื่อจัดเตรียมฐานข้อมูลและใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงตรวจสอบความถูกต้องของชนิดแมงมุมในสกุลนี้ รวมทั้งนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาด้านอื่นๆ สำหรับดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้เป็นดีเอ็นเออ้างอิงที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์แมงมุม กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

- **การบันทึกข้อมูล**

1) บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบของ FASTA ไฟล์

2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบ ให้สอดคล้องกับ ชนิดแมงมุมแม่ม่ายที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบด้วย พิกัดทางภูมิศาสตร์ 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

การทดลองที่ 3.8 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจัดจำแนกเชื้อรา *Beauveria bassiana*

DNA barcode for identification of *Beauveria bassiana*

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

กรมวิชาการเกษตร

(malt extract agar) ผสมสารปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนแบคทีเรีย โดยวิธี แยกจากโครงสร้างของเชื้อรา โดยตรง และสำหรับตัวอย่างดินจะทำการแยกเชื้อราโดยวิธี insect – baiting technique บ่มเชื้อราไว้ที่อุณหภูมิห้องในสภาพปลอดแสงประมาณ 2-3 วัน หลังจากนั้นแยกเชื้อราบริสุทธิ์ โดยวิธี hypal trip isolation ลงในอาหาร 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

กรมวิชาการเกษตร

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
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

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

DNA barcoding for *Trichoderma asperellum, T. harzianum* and *T. viride* identification

วิธีปฏิบัติการทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

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)

กรมวิชาการเกษตร

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

กรมวิทยาศาสตร์

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

การทดลองที่ 3.10 การประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* spp. ที่เป็นศัตรูพืชกักกันแบบรวดเร็ว

Rapid Identification of Quarantine Pest Species of Genus *Tribolium* spp. Based on DNA barcoding

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

กรมวิชาการเกษตร

บันทึกข้อมูลผู้เก็บตัวอย่าง ชื่อที่อยู่ผู้ส่งออกและผู้นำเข้า ชนิดของสินค้าธัญพืช จำนวนและปริมาณของสินค้าธัญพืช ประเทศผู้ส่งออก วันที่นำเข้า เป็นต้น

(2) เก็บรวบรวมจากโรงสีข้าว หรือโรงเก็บผลิตผลเกษตร

เก็บรวบรวมแมลงศัตรูโรงเก็บระยะเต็มวัยจากโรงสีข้าว ทั้งที่มีสภาพสมบูรณ์ และมีสภาพ ไม่สมบูรณ์ 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

(2) เตรียมชุดสกัดดีเอ็นสำเร็จรูปของ QIAamp DNA Mini Kit (GIAGEN, Germany) โดยเติม เอทานอลเข้มข้น 95% ลงในสารละลายต่างๆ ตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด

(3) เติมไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196 C) ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ ในปริมาตรประมาณ 3/4 ของหลอดทดลอง จากนั้น เมื่อปริมาตรลดลงเหลือประมาณ 1/4 ของ หลอดทดลอง ให้ใช้ปิเปตทิปที่เตรียมไว้ บดตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บให้ละเอียดด้วยความระมัดระวัง ระวังมิให้ตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บกระเด็นออกมานอกหลอดทดลอง

(4) เตรียมการสลายผนังเซลล์ (pre - lysis) โดยการเติม Buffer ATL ปริมาณ 180 µL และเติม proteinase K solution ปริมาณ 20 µL ปิดปากหลอดทดลองให้สนิท พันด้วยพาราฟิน (paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน แล้วสั่นสะเทือนเพื่อผสมสารกับตัวอย่างแมลงให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex) เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้น นำหลอดทดลองใส่ในทุ่นลอย แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 56 C เป็นเวลา ๓ ชั่วโมง โดยระหว่างการบ่ม ให้พลิกหลอดทดลองกลับไปมา 3 – 4 ครั้ง ทุก 1 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวอย่าง

กรมวิชาการเกษตร

แมลงศัตรูพืช ย่อยสลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ 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 นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็ว ที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที เพื่อขจัดหยดน้ำที่ติดบนฝาภายในหลอดทดลอง

(6) เตรียมพร้อมในการจับสารพันธุกรรม (adjust DNA binding conditions) โดยการเติม เอทานอลเข้มข้น 100% ปริมาณ 200 µL จากนั้น สั่นสะเทือนเพื่อผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร เป็นเวลา 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 จากนั้น นำ 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 แล้ว ปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วที่ความเร็ว 12,000 รอบ เป็นเวลา 2 นาที ทิ้ง Mini spin column จากนั้น นำหลอดทดลองที่ภายในบรรจุ 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

กรมวิชาการเกษตร

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

pre – denaturing ที่อุณหภูมิ 94 ℃ เป็นเวลา 3 นาที

denaturing ที่อุณหภูมิ 94 ℃ เป็นเวลา 1 นาที
annealing ที่อุณหภูมิ 52 ℃ เป็นเวลา 1 นาที
extension ที่อุณหภูมิ 72 ℃ เป็นเวลา 1 นาที
} จำนวน 35 cycles

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

กรมวิชาการเกษตร

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 และนิวคลีโอไทด์มาตรฐานทั้งหมด 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

กรมวิชาการเกษตร

ใช้โปรแกรม DNAMAN V.7.0 แปลลำดับนิวคลีโอไทดของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่ได้จากการทดลองเป็นลำดับโปรตีนที่ไม่มี termination coding จากนั้น นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับโปรตีนที่มีคุณภาพดีของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บที่เป็นตัวแทน ป้อนเข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BankIt บันทึกข้อมูล GenBank Accession Numbers

การทดลองที่ 3.11 การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนกชนิดเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera (Thysanoptera: Tubulifera) ในประเทศไทย

DNA Barcoding for Identification of Thirps in Suborder Tubulifera (Thysanoptera: Tubulifera) in Thailand

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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)

<u>ขั้นตอนการสกัด ดีเอ็นเอ</u>

- บดตัวอย่างเพลี้ยไฟ 1 ตัวอย่างใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ด้วย sterilized polypropylene pestle โดยดำเนินการตามกรรมวิธีของชุดสกัด DNeasy blood and tissue qiagen kit

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

- นำสารละลายที่ได้ incubated ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที หลังจากนั้น นำเข้าเครื่องปั่นแรงเหวี่ยง (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>

- 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 mMMgCl_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

<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) เพื่อหาความจำเพาะเจาะจงของเพลี้ยไฟภายในแหล่งเดียวกันและ ระหว่างแหล่งที่เก็บตัวอย่าง รวมถึงเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank และศึกษาความใกล้เคียงกันของเพลี้ยไฟแต่ละชนิด

-การบันทึกข้อมูล

พืชอาศัย สถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง

- เวลาและสถานที่ :เดือน ตุลาคม 2560 ถึง เดือน กันยายน 2563

1. แปลงปลูกพืชในทุกภูมิภาคของประเทศไทย
2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง ห้องปฏิบัติการกลาง

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3.12 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา *Chaetomium cupreum* และ *Ch. globosum*

DNA barcoding for *Chaetomium cupreum* and *Ch. globosum* identification

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

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)

β-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 β-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

กรมวิชาการเกษตร

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

การทดลองที่ 3.13 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกแมงมุมวงศ์ Salticidae

DNA Barcoding for Identification Spider Fauna in Family Salticidae

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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 แล้วใส่ลงในหลอดแก้วที่ดองแมงมุม

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 เมื่อจำแนกชนิดเสร็จแล้วจึงนำไปใส่ในสไลด์หลุมแล้วปิด

กรมวิชาการเกษตร

ด้วย 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 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 โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที

กรมวิชาการเกษตร

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

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

กรมวิชาการเกษตร

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

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 3.14 การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของราสกุล *Curvularia* สาเหตุโรคพืช

DNA Barcoding of Plant Pathogenic *Curvularia*

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia*

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia* โดยเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรค ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ บันทึกข้อมูลรายละเอียดของการเก็บตัวอย่าง วันที่ พิกัด สถานที่ ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของ

กรมวิชาการเกษตร

โรค 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 (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

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

กรมวิชาการเกษตร

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

การทดลองที่ 3.15 ชนิดแมลงวันผลไม้เผ่า (Tribe) Dacini (Diptera: Tephritidae) ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด Molecular Identification of fruit fly in Tribe Dacini (Diptera: Tephritidae) using DNA Barcode

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

กรมวิชาการเกษตร

(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 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) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ universal 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 (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

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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 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)

<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>

- ศึกษายีน COI (cytochrome oxidase subunit I) ซึ่งมีขนาด 642 bp และเป็น

กรมวิชาการเกษตร

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

<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

พืชอาหาร สถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง

- เวลาและสถานที่ : เดือน ตุลาคม 2562 ถึง เดือน กันยายน 2564

1. แปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย
2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง ห้องปฏิบัติการกลาง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กรมวิชาการเกษตร

3. การปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

☑ ไม่มี ❑ มี ได้รับอนุมัติเมื่อวันที่..... (โปรดแสดงหลักฐานในภาคผนวก)

❑ เปลี่ยนแปลงงบประมาณ โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

❑ เปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์/ผลผลิต โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 3 ผลการศึกษา

3.1 ผลการดำเนินงานของโครงการ

โครงการอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย มีระยะในการดำเนินงาน 5 ปี ระหว่างปีงบประมาณ 2560 – 2564 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

ผลการดำเนินงานโดยสรุปของโครงการมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

กิจกรรมที่ 1 สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ มี 2 กิจกรรมย่อย ประกอบด้วย

กิจกรรมย่อยที่ 1.1 สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน (validation) ข้อมูลทางอนุกรมวิธานซึ่งประกอบด้วยประวัติทางอนุกรมวิธาน การอธิบายลักษณะ (description) แนวทางการวินิจฉัย (key) ข้อมูลชีววิทยาเบื้องต้น เขตการแพร่กระจายและตัวอย่างเก็บรักษาตัวอย่างที่ใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับอ้างอิงข้อมูลศัตรูพืชของประเทศไทย ประกอบด้วย <u>แมลงศัตรูพืช</u> 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 และแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae จำนวน 5 ชนิด <u>สัตว์ศัตรูพืช</u> ได้แก่ หอยทากบกศัตรูพืช หอยทากบก จำนวน 10 ชนิด ทาก จำนวน 1 ชนิด หอยน้ำจืดศัตรูพืชจำนวน 2 สกุล 3 ชนิด โครโมโซมของหอยทากบกวงศ์ Succineidae มีค่าแฮพพลอยด์ (haploid, n) เท่ากับ 19-24 และ หนูหริ่ง

กรมวิชาการเกษตร

สกุล *Mus* (Rodentia: Muridae: Murinae) จำนวน 4 ชนิด ไรศัตรูพืชและแมงมุม ได้แก่ ไรขาวในวงศ์ Tarsonemidae พบไรทั้งหมด 2 วงศ์ 15 ชนิด และแมงมุมในวงศ์ Oxyopidae ทั้งหมด 4 สกุล 6 ชนิด 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 ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง พบจำนวน 2 สกุล 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) 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)

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)

กรมวิชาการเกษตร

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 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*

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

กรมวิชาการเกษตร

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 mouse; *Mus cervicolor*) หนูหริ่งใหญ่ (Cook's mouse; *Mus cookii*), หนูหริ่งนาหางยาว (Ryukyu mouse; *Mus caroli*) และหนูหริ่งป่าเล็กขนเสี้ยน (Shortridge's shrewmouse; *Mus pahari*)

<u>ไรศัตรูพืชและแมงมุม</u>

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,

กรมวิชาการเกษตร

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.

<u>ศัตรูธรรมชาติ</u>

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

กรมวิชาการเกษตร

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 วงศ์นี้ชนิดที่สามารถพบได้ทุกภูมิภาคของประเทศไทย 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

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

กิจกรรมย่อยที่ 1.2 สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชและจุลินทรีย์ควบคุมโรค ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน (validation) ข้อมูลทางอนุกรมวิธานซึ่งประกอบด้วยประวัติทางอนุกรมวิธาน การอธิบายลักษณะ (description) ชีววิทยาเบื้องต้น เขตการแพร่กระจายรวมถึงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยและตัวอย่างเก็บรักษาตัวอย่างที่ใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับอ้างอิงข้อมูลศัตรูพืชของประเทศไทย ประกอบด้วย ราสาเหตุโรคพืช ราสกุล *Phytophthora* ในเผือก จำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลชีว

กรมวิชาการเกษตร

โมเลกุลของยีนตำแหน่ง 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* ราเจริญได้ดีบนอาหาร V8, CA OMA และ PDA สร้างสปอร์ได้ดีบนอาหาร CA และ PDA สามารถเก็บรักษาไว้ในหลอดอาหารเอียง PDA ได้อย่างน้อย 10 เดือน ทั้งในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17^{O}C) และ ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27^{O}C) แต่ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27^{O}C) การมีชีวิตรอดลดลงและมีการปนเปื้อนมากกว่าการเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17^{O}C) ราเจริญได้ดีที่ pH 5, 6 และ pH 7 อุณหภูมิ 25^{O}C และอุณหภูมิ 30^{O}C ราสร้างสปอร์ได้ดีที่ pH 5, 6 และ pH 7 อุณหภูมิ 25^{O}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*

กรมวิชาการเกษตร

gloeosporioides สร้าง clear zone ได้ชัดเจนและกว้างกว่า *Colletotrichum capsici* ที่สร้าง clear zone แคบที่สุดและบางไอโซเลตไม่สร้าง clear zone

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

กรมวิชาการเกษตร

(MLSA) จากยีน *dna*K, *fyu*A, *gyr*B และ *rpo*D รวมทั้งข้อมูลคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอมมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *Allii*

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 พบตัวย่างยาสูบที่ให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อไวรัส TLCV จำนวน 24 ตัวอย่าง และ TMV จำนวน 22 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด จำนวน 46 ตัวอย่าง

ไส้เดือนฝอยสาเหตุโรคพืช

กรมวิชาการเกษตร

ไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ที่ดำเนินการตรวจวินิจฉัย 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*

ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุล *Radopholus* ที่พบในไม้ประดับ เช่น คล้า หน้าวัว เป็นต้น ยังไม่สามามารถจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ได้ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเพื่อจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุลนี้ โดยใช้แนวทางการจัดจำแนกของ EPPO PM 7/88 (1) : *Radopholus similis* ซึ่งใช้การจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางชีวโมเลกุล ดำเนินการระหว่างตุลาคม 2562 ถึง กันยายน 2564 ได้เก็บตรวจตัวอย่างพืชรวมทั้งสิ้นจำนวน 1,210 ตัวอย่าง จากการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูพืชด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาผลการจำแนกภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิด 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 พบว่าคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *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 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* โดยเปรียบเทียบกับลักษณะสัณฐานของริ้วรอย

กรมวิชาการเกษตร

ย่นส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมียพบว่าให้ผลตรงกัน 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

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 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

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 2 ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ของศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติ (วงจรชีวิต การเข้าทำลาย พืชอาหาร และการแพร่กระจาย) ประกอบด้วย 3 กิจกรรมย่อย

กิจกรรมย่อยที่ 2.1 ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ของแมลง ไร สัตว์ ศัตรูพืช ได้ชีววิทยา พืชอาศัย เขตการแพร่กระจายของแมลงศัตรูพืช จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยแป้งมะละกอ เพลี้ยอ่อนถั่ว หนอนแดง แมลงวันผลไม้ ไรศัตรูพืช จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ ไรแดงมันสำปะหลัง สัตว์ศัตรูพืช จำนวน 4 สกุล ได้แก่ หอยซัคซีเนีย หอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Indoplanorbis, Radix,* และ *Physella* แมลงศัตรูธรรมชาติ จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ แตนเบียนไข่ไตรโคแกรมมา รายละเอียดดังนี้

แมลงศัตรูพืช

การศึกษาชีวประวัติและอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งมะละกอ (papaya mealybug) *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 (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

กรมวิชาการเกษตร

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±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 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

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%

ไรศัตรูพืช

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) ชั่วอายุขัยของ

กรมวิชาการเกษตร

กลุ่ม (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

กรมวิชาการเกษตร

(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

กิจกรรมย่อยที่ 2.2 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของโรคพืช ได้ชีววิทยาพืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย ของ <u>ราสาเหตุโรคพืช</u> จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Phyllosticta citriasiana*, *Fusarium oxysporum, Curvularia eragrostidis* และรา *C. oryzae*, *Neoscytalidium dimidiatum* <u>แบคทีเรียสาเหตุโรคพืช</u> จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า และ <u>ไวรัสสาเหตุโรคพืช</u> จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ Citrus chlorotic dwarf associated virus (CCDav), *Pepper vein yellows virus* (PeVYV), *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) รายละเอียดดังนี้

<u>ราสาเหตุโรคพืช</u>

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) เข้าทำลายที่ใบบนต้นและสร้างสปอร์สะสมอยู่บนใบที่ร่วงลงดินด้วยซึ่งเป็นที่อาศัยของเชื้อราใน

กรมวิชาการเกษตร

การแพร่ระบาดในฤดูต่อไป 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 พบว่าเป็นโรคประมาณ 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

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 วันหลังปลูกเชื้อ รา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดปาล์มน้ำมันแสดงอาการของโรคบนใบปาล์มน้ำมันเป็นเวลา 7 วันหลังปลูกเชื้อ

กรมวิชาการเกษตร

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* ทุกไอโซเลตเจริญได้ดีที่ 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}

กรมวิชาการเกษตร

ไวรัสสาเหตุโรคพืช

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 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

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

กรมวิชาการเกษตร

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 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 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.

กรมวิชาการเกษตร

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 และยังสามารถขยายพันธุ์ได้โดยใช้กิ่งปักชำ 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*

กรมวิชาการเกษตร

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 *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)

กรมวิชาการเกษตร

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 4 ชนิด และตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกได้ 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 โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บทั้ง 4 ชนิด อยู่ใน clade เดียวกันกับลำดับ นิวคลีโอไทด์มาตรฐานของแต่ละชนิดที่ได้

กรมวิชาการเกษตร

จากฐานข้อมูล 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 โดยใช้ ดี เอ็น เอ บาร์โค้ด 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 อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถทราบข้อมูลเบื้องต้นของจำนวนชนิดของ 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

กรมวิชาการเกษตร

*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 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

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

กรมวิชาการเกษตร

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 และโรคใบจุดใบไหม้ทานตะวัน เม็กซิโก *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 เชื้อรากลุ่มที่ 1 คือ *Arcopilus cupreus* ซึ่งเป็นชื่อปัจจุบันของ *Ch. cupreum* เชื้อรากลุ่มที่ 2 คือ *Ch. globosum* และ เชื้อรากลุ่มที่ 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

กรมวิชาการเกษตร

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

3.2 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง (Output)

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
1. องค์ความรู้	17	เรื่อง	**1. องค์ความรู้ใหม่**	77	เรื่อง	1.ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย พืชอาหาร ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา พร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ของเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Aspidiotinae (Hemiptera:Coccoidea: Diaspididae) ในประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						2.ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย พืชอาหาร ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา พร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ร่วมกับการใช้เทคนิค Morphomertic ในตัวเต็มวัย ของอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera:Tephritidae)	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร

						3.ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย พืชอาหาร ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา พร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ของเพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วง (Hemiptera: Cicadellidae) ในประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						4.ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย พืชอาหาร ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา พร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo* (Lepidoptera: Crambidae, Crambinae) ในประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						5.ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย และตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาของหอยทากบกศัตรูพืชในระบบนิเวศเกษตรและสิ่งแวดล้อม	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						6.ได้โครโมโซมและการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยศัตรูพืชวงศ์ Succineidae ในประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						7.ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย และตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาหอยน้ำจืดศัตรูพืชในพรรณไม้น้ำ	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร

						8. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหนูหริ่งสกุล *Mus* (Rodentia: Muridae: Murinae) ที่พบในประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						9.ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย และตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาพร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ของแตนเบียนสกุล *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงหวี่ขาว (Hemiptera: Aleyrodidae) ในประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูธรรมชาติของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						10. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา พร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ของแมลงช้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ในประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูธรรมชาติของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						11. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา พร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ของมวนตัวห้ำสกุล *Orius* (Heteroptera: Anthocoridae) ในประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูธรรมชาติของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						13. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย พืชอาหาร ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา พร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ของมวนสกุล	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ เพื่อเป็นหลักฐานทาง

กรมวิชาการเกษตร

						Nysius (Hemiptera: Lygaeidae) ในประเทศไทย	วิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						14. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย พืชอาหาร ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาพร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ของตั๊กแตน (Orthoptera) ในประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						15. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย พืชอาหาร ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาพร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ของผีเสื้อหนอนร่าน วงศ์ Limacodidae ในประเทศ	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						16.ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย พืชอาหาร ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาพร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ของแมลงหวี่ขาว (Hemiptera: Aleyrodidae) ในพืชผักสวนครัวเพื่อการส่งออกของประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						17.ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย พืชอาหาร ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา พร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ของเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Diaspidinae (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae)ในประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						18.ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย พืชอาหาร ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาพร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ของเพลี้ย	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์

กรมวิชาการเกษตร

						แป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae (Hemiptera: Coccoidea) ในประเทศไทย	เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						19.ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา พร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ของแตนเบียนไข่ของแมลงกลุ่มมวนวงศ์ Pentatomidae ศัตรูพืชสำคัญทางการเกษตรในประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูธรรมชาติของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						20.ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา พร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ของแมลงช้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae ในประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูธรรมชาติของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						21. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย พืชอาหาร ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา พร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ของไรขาว วงศ์ Tarsonemidae ในประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						22.ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันของชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูธรรมชาติของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						23.ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย พืชอาหาร ตัวอย่าง	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้

กรมวิชาการเกษตร

						ที่ใช้ในการศึกษา พร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ของแมลงวันหนอนชอนใบในวงศ์ Agromyzidae (Order: Diptera) ในพืชผัก	ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						24.ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน เขตการแพร่กระจาย ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา พร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ของแมงมุมวงศ์ Oxyopidae	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ใน เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						25.ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาของราสกุล *Phytophthora* ในเผือก	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในแหล่งรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						26. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาของราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris*	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในแหล่งรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						27. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันของแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอม	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้พื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร

						28. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันของอาการ Chlorotic ringspot บนกล้วยไม้ *Phalaenopsis*	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						29. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางสัณฐานวิทยาในไม้ประดับส่งออก	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						30. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันของไส้เดือนฝอยรากแผล (*Pratylenchus* spp.) ในแหล่งปลูกหอมแดงด้วยวิธีอณูชีววิทยา	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						31. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันของของแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ไอโซเลตไทย	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						32. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันพร้อมยืนยันการใช้ Molecular Diagnostic Key ที่มีประสิทธิภาพของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองด้วยวิธีอณูชีววิทยากับไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร

						33. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันของโรค Leek yellow stripe virus (LYSV) ในกระเทียม	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						34. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันและเขตการแพร่กระจายของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในแหล่งรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						35. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา และเป็นปัจจุบันพร้อมความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและพืชอาศัยของเชื้อรา Cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในแหล่งรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						36. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา และเป็นปัจจุบันพร้อมความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและพืชอาศัยของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืช	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในแหล่งรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						37. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันของของไส้เดือน	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อม

กรมวิชาการเกษตร

						ฝอยสกุล *Radopholus* ทางชีวโมเลกุล	ตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						38.ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคของยาสูบที่พบในประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						39. ได้ชีวประวัติและแนวทางการวินิจฉัยในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของเพลี้ยแป้งมะละกอ; *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink (Hemiptera: Pseudococcidae) ในประเทศไทย	ได้ชีววิทยาของศัตรูพืชเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในเพาะเลี้ยงขยายในห้องปฏิบัติการและหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						40. ได้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อชีววิทยาและนิเวศวิทยาของแตนเบียนไข่ *Trichogramma confusum* ในห้องปฏิบัติการ	ได้อุณหภูมิที่เหมาะสมของศัตรูธรรมชาติเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในเพาะเลี้ยงขยายในห้องปฏิบัติการ
						41. ได้ชีววิทยาของไรแดงมันสำปะหลัง *Oligonychus biharensis* (Hirst) บนพืชอาศัย 2 ชนิดและเขตการแพร่กระจาย	ได้ชีววิทยาของศัตรูพืชเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในเพาะเลี้ยงขยายในห้องปฏิบัติการและหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						42. ได้ชีววิทยาและพลวัตประชากรของหอยศัตรูพืชสกุล *Succinea*	ได้ชีววิทยาของศัตรูพืชเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในเพาะเลี้ยงขยายในห้องปฏิบัติการและหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม

กรมวิชาการเกษตร

						43. ได้ชีววิทยา วงจรชีวิต และการแพร่กระจายของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Indoplanorbis*	ได้ชีววิทยาของศัตรูพืชเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในเพาะเลี้ยงขยายในห้องปฏิบัติการและหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						44. ได้ชีววิทยา การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์และชนิดของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Radix*	ได้ชีววิทยาของศัตรูพืชเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในเพาะเลี้ยงขยายในห้องปฏิบัติการและหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						45. ได้ชีววิทยา นิเวศวิทยา ฤดูการระบาด ของหนอนแดงในฝรั่ง และพุทรา	ได้ชีววิทยาของศัตรูพืชเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในเพาะเลี้ยงขยายในห้องปฏิบัติการและหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						46. ได้ชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa* (Fabricius)	ได้ชีววิทยาของศัตรูพืชเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในเพาะเลี้ยงขยายในห้องปฏิบัติการและหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						47. ได้ชนิด ชีววิทยา และการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Physella*	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง และชีววิทยาของศัตรูพืชเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในเพาะเลี้ยงขยายในห้องปฏิบัติการและหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						48. ได้สัณฐานวิทยาและชีววิทยาของเพลี้ยอ่อนถั่ว	ได้ชีววิทยาของศัตรูพืชเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ใน

กรมวิชาการเกษตร

						Aphis craccivora Koch (Hemiptera: Aphididae) ในประเทศไทย	เพาะเลี้ยงขยายในห้องปฏิบัติการและหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						49. ได้ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phyllosticta citriasiana*	ได้ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของศัตรูพืชเพื่อหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						50. ได้พืชอาศัย และเขตการแพร่กระจายของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชในประเทศไทย	ได้ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของศัตรูพืชเพื่อหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						51. ได้ชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า	ได้ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของศัตรูพืชเพื่อหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						52. ได้สาเหตุและการถ่ายทอดอาการใบหงิกของส้มโอ	ได้สาเหตุและการถ่ายทอดนิของศัตรูพืชเพื่อหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						53. ได้ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Curvularia eragrostidis* และรา *C. oryzae*	ได้ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของศัตรูพืชเพื่อหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						54. ได้ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Neoscytalidium dimidiatum* Crous & Slippers and Gruyter	ได้ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของศัตรูพืชเพื่อหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						55. ได้ลักษณะทางชีววิทยาและชีวโมเลกุลของเชื้อ Pepper vein yellows virus (PeVYV) ที่เข้าทำลายพริกในประเทศไทย	ได้ชีววิทยาและชีวโมเลกุลของศัตรูพืชเพื่อหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						56. ได้ชนิดเชื้อ *Crinivirus* และเขตการแพร่กระจายของพืชตระกูลแตงในประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ เพื่อเป็นหลักฐานทาง

กรมวิชาการเกษตร

							วิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						57. ได้ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของหญ้าตีนกาใหญ่ (*Acrachne racemosa* (Heyne ex Roth) Ohwi)	ได้ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของศัตรูพืชเพื่อหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						58. ได้ชีววิทยา และนิเวศวิทยาของลูกใต้ใบใบใหญ่ (*Phyllanthus caroliniensis* Walter)	ได้ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของศัตรูพืชเพื่อหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						59. ได้ชีววิทยาของวัชพืช *Asystasia gangetica* (L.) Anderson subsp. *micarantha* (Nees.) Ensermu	ได้ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของศัตรูพืชเพื่อหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						60. ได้ชีววิทยา และนิเวศวิทยาของกระดุมใบใหญ่ (*Borreria latifolia* (Aubl), Schum.)	ได้ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของศัตรูพืชเพื่อหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						61. ได้ชีววิทยาของเทียนนา (*Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Excell.)	ได้ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของศัตรูพืชเพื่อหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
						62. ได้ชนิดแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis*(Hendel) complex (Diptera:Tephritidae) และการจำแนกด้วยลักษณะทางพันธุกรรม	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						63. ได้ชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae (Thysanoptera: Thripidae) และการจำแนกด้วยลักษณะทางพันธุกรรมที่พบในกล้วยไม้ในเขตภาคกลางของประเทศไทย	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร

						64. ได้ชนิดและจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด ของรา Cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในแหล่งรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						65. ได้ชนิดและจัดทำรหัสดีเอ็นเอบาร์โค้ดของราสนิมสาเหตุโรคพืช	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในแหล่งรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						66. ได้ชนิดและจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา Alternaria สาเหตุโรคพืช	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในแหล่งรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						67. ได้ชนิดของแตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae (Platygastridae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวที่ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการจำแนก	ได้รายชื่อศัตรูธรรมชาติของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						68. ได้ชนิดของแมงมุมแม่หม้าย	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อม

กรมวิชาการเกษตร

						สกุล *Latrodectus* ในประเทศไทยที่ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดจำแนก	ตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						69. ได้ชนิดของเชื้อรา *Beauveria bassiana* โดยการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจัดจำแนก	ได้รายชื่อศัตรูธรรมชาติของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในแหล่งรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						70. ได้ชนิดที่ถูกต้องของเชื้อรา *Trichoderma asperellum T. harzianum* และ *T. viride* โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด	ได้รายชื่อศัตรูธรรมชาติของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในแหล่งรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						71. ได้ชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* spp. ที่เป็นศัตรูพืชกักกันโดยประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนก	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						72. ได้ชนิดเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera (Thysanoptera: Tubulifera) ในประเทศไทยและการจำแนกด้วยลักษณะทางพันธุกรรม	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร

						73. ได้ชนิดของเชื้อรา *Chaetomium cupreum* และ *C. globosum* โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนก	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในแหล่งรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						74. ได้ชนิดของแมงมุมวงศ์ Salticidae ที่ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนก	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						75. ได้ชนิดและจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Curvularia* สาเหตุโรคพืช	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในแหล่งรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						76. ได้ชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า (Tribe) Dacini (Diptera: Tephritidae) ที่ใช้เอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนก	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง
						77. ได้ชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในหน่อไม้ฝรั่ง	ได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูก

กรมวิชาการเกษตร

						ในเขตภาคกลางของประเทศไทยและการจำแนกด้วยลักษณะทางพันธุกรรม	จัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง

3.3 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง (Outcome) (ถ้ามี) (ภาคผนวก 4)

ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลลัพธ์
1. งานวิจัยต่อยอดในโครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร (2560-2564) รายละเอียดดังนี้	
1.1 การทดลองที่ 1.2.9 การทวนสอบแนวทางการจำแนกชนิดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองด้วยวิธีอณูชีววิทยากับไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย (2560-2561) นำผลงานวิจัยที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในศึกษาการใช้เทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita, M. javanica, M. arenaria และ M. enterolobii* (2562-2564)	2562
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)	2563
1.3 การทดลองที่ 2.2.6 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Neoscytalidium dimidiatum* (2561-2563) นำผลงานที่ได้ศึกษาการตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum* ดวยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (2561-2563) ไปควบคู่กัน	2561
1.4 การทดลองที่ 3.1 การจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* (Hendel) complex (Diptera:Tephritidae) ด้วยลักษณะทางพันธุกรรมในประเทศไทย (2560-2561) นำผลงานวิจัยไปต่อยอดในการพัฒนาการตรวจสอบแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) เพื่อการนำเข้าและส่งออกด้วยไพร์เมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง (2562-2564)	2562
2. การนำเสนองานวิจัยและตีพิมพ์เผยแพร่ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 14 ระหว่างวันที่ 12 - 14 พฤศจิกายน 2562 โรงแรมดุสิตธานีหัวหิน จังหวัดเพชรบุรี รายละเอียดดังนี้	
2.1 การจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex (Diptera: Tephritidae) ในประเทศไทยด้วยลักษณะทางพันธุกรรม	2562
2.2 การศึกษาอนุกรมวิธานตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera: Tephritidae) ร่วมกับการใช้เทคนิค Morphometrics ในตัวเต็มวัย	2562
2.3 อนุกรมวิธานเพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วง (Hemiptera: Cicadellidae) ในประเทศไทย	2562
2.4 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกชนิดแมงมุมแม่หม้ายสกุล *Latrodectus* ในประเทศไทย	2562
2.5 การประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* spp. ที่เป็นศัตรูพืชกักกันแบบรวดเร็ว	2562
2.6 ชีววิทยาของวัชพืช *Asystasia gangetica* (L.) Anderson subsp. *micrantha* (Nees.) Ensermu	2562

กรมวิชาการเกษตร

2.7 การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอม	2562
3.ตีพิมพ์เผยแพร่ในประเทศและต่างประเทศ	
3.1 การจำแนกชนิดตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera: Tephritidae) ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ใน วารสารวิชาการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ปีที่ 38, ฉบับที่ 3 (ก.ย.-ธ.ค. 2563), หน้า 293-306	2563
3.2 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และข้อมูลมอร์โฟเมทริกส์ของปีก แมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera: Tephritidae) ในประเทศไทย ใน วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 38, ฉบับที่ 2 (พ.ค. - ส.ค. 2564), หน้า 118-123.	2564 2565
3.3 อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Aspidiotinae (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) ในประเทศไทย ในวารสารกีฏและสัตววิทยา (ม.ค.-มิ.ย. 2565) อยู่ระหว่างรอตีพิมพ์	
4.การนำเสนอผลงานวิจัยภายในหน่วยงานในการประชุมวิชาการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ทั้งในรูปแบบการบรรยายและโปสเตอร์ เพื่อเป็นการเผยแพร่องค์ความรู้	2562
4.1 อนุกรมวิธานมวนตัวห้ำสกุล *Orius* (Heteroptera: Anthocoridae) ในประเทศไทย	2562
4.2 การตรวจวินิจฉัยชนิดของแตนเบียนไข่วงศ์ย่อย Telenominae (Platygastridae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล	2563
4.3 อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Aspidiotinae (Hemiptera:Coccoidea: Diaspididae) ในประเทศไทย	2563
4.4 การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางสัณฐานวิทยาในไม้ประดับส่งออก	2563
4.5 การศึกษาสาเหตุและการถ่ายทอดอาการใบหงิกของส้มโอ	

*ผลลัพธ์ : ผลสำเร็จที่เกิดจากการนำผลผลิต (Output) ไปต่อยอด การเปลี่ยนรูปของผลผลิตไปสู่รูปแบบที่ใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง หรือการเคลื่อนผลผลิตไปสู่กิจกรรมที่ต่อเนื่อง ซึ่งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลง (Change) ที่ปรากฏชัด และมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม

3.4 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง (Impact) (ถ้ามี)

ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลกระทบ
ด้านเศรษฐกิจ :	
ด้านสังคม :	
ด้านสิ่งแวดล้อม :	

* ผลกระทบ : ผลประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงตามผลลัพธ์ (Results of the change) ซึ่งวัดได้อย่างชัดเจนและมีหลักฐานปรากฏชัด (Evidence-based) ทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม ทั้งที่วัดในเชิงปริมาณได้และไม่ได้ ผลกระทบอาจเป็นได้ทั้งทางบวกและทางลบ

กรมวิชาการเกษตร

3.5 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (ภาคผนวก 4)

วิธีการ/กระบวนการผลักดันงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (โปรดแนบหลักฐานเชิงประจักษ์การนำผลงานไปใช้ประโยชน์)

นำองค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากงานวิจัยมาประยุกต์ใช้ต่อยอดงานวิจัย หรือ นำไปใช้ในการบูรณาการเพื่อจัดอบรมเผยแพร่และจัดทำหนังสือ

ด้านเศรษฐกิจ โดย 1. นายชัยณรัตน์ สนศิริ และคณะ กลุ่มวิจัยกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ได้นำองค์ความรู้จากงานวิจัย เรื่องการจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* (Hendel) complex (Diptera:Tephritidae) ด้วยลักษณะทางพันธุกรรมในประเทศไทย และการศึกษาชนิดแมลงวันผลไม้เผ่า (Tribe) Dacini (Diptera: Tephritidae) ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด มาใช้ในการตรวจสอบชนิดของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera carambolae* (Drew & Hancock) เพื่อนำสู่ขั้นตอนในการศึกษา การกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera carambolae* (Drew & Hancock) (Diptera: Tephritidae) ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ เพื่อเปิดตลาดมังคุดไปไต้หวัน จนทำให้ประเทศไทยสามารถใช้นำงานวิจัยไปใช้เพื่อเปิดตลาดมังคุดไปไต้หวันได้

ด้านวิชาการ โดย 1. กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้นำองค์ความรู้ใหม่จากงานวิจัยด้านแมลงศัตรูพืชโดยเฉพาะกลุ่มแมลงปากดูดภายใต้โครงการไปจัดอบรมให้แก่นักวิชาการเกษตร ในหลักสูตร การเก็บและการจำแนกตัวอย่างแมลงจำพวกปากดูด ศัตรูสำคัญของพืชนำเข้าและส่งออก” ระหว่างวันที่ 24-26 มกราคม 2560 เพื่อเป็นการเพิ่มพูนความรู้และศักยภาพให้แก่นักวิชาการเกษตรที่ทำงานเกี่ยวกับแมลงศัตรูพืชกลุ่มแมลงปากดูด เช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยหอย และแมลงหวี่ขาว เป็นต้น

2. กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้นำองค์ความรู้ใหม่จากงานวิจัยด้านวัชพืชภายใต้โครงการไปจัดอบรมให้แก่นักวิชาการและเกษตรกร ในหลักสูตร“การจำแนกและการจัดการวัชพืช” ระหว่างวันที่ 12-14 มิถุนายน 2561 เพื่อเป็นการเพิ่มพูนความรู้และศักยภาพด้านวัชพืช

3. ASEAN Network on Taxonomy (ASEANET) ได้นำองค์ความรู้ใหม่จากงานวิจัยด้านวัชพืชภายใต้โครงการไปจัดทำหนังสือ เรื่อง Weeds and Weed Seeds of Southeast Asia with special focus on Thailand ตีพิมพ์เผยแพร่ในปี ค.ศ. 2020

กรมวิชาการเกษตร

4. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้นำองค์ความรู้ใหม่ในการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา *Trichoderma asperellum T. harzianum* และ *T. Viride* ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการขึ้นทะเบียนของชีวภัณฑ์

* คำจำกัดความการนำใช้ประโยชน์ในแต่ละด้าน

1. **ด้านโยบายและสาธารณะ** การนำความรู้จากงานวิจัยไปใช้ในกระบวนการกำหนดนโยบาย อาจเป็นนโยบายระดับประเทศ ระดับภูมิภาค ระดับจังหวัด ระดับท้องถิ่นการใช้ประโยชน์ด้านนโยบายจะรวมทั้งการนำองค์ความรู้ไปสังเคราะห์เป็นนโยบายหรือทางเลือกเชิงนโยบาย (Policy options) แล้วนำนโยบายนั้นไปสู่ผู้ใช้ประโยชน์ในวงกว้างเพื่อประโยชน์ของสังคม และประชาชนทั่วไป เพื่อเพิ่มคุณภาพชีวิตของประชาชน สร้างสังคมคุณภาพและส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม
2. **ด้านพาณิชย์/เศรษฐกิจ** เป็นผลงานวิจัยที่เน้นสร้างนวัตกรรม เทคโนโลยี ผลิตภัณฑ์ใหม่ หรือการพัฒนาจากสิ่งที่มีอยู่เดิม โดยเป็นการนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตเชิงพาณิชย์หรือลดการนำเข้าเทคโนโลยีจากต่างประเทศ หรือนำไปสู่การพัฒนารูปแบบธุรกิจใหม่ โดยมีเป้าหมายเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม เพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตและบริการ
3. **ด้านสังคมและชุมชน** การนำกระบวนการ วิธีการ องค์ความรู้ การเปลี่ยนแปลงการเสริมพลัง อันเป็นผลกระทบ ที่เกิดจากการวิจัยและพัฒนาชุมชนท้องถิ่นพื้นที่ ไปใช้ให้เกิดประโยชน์การขยายผลต่อชุมชน ท้องถิ่น หรือรวมถึงสังคมอื่น
4. **ด้านวิชาการ** เป็นผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการ การนำองค์ความรู้จากผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ระดับชาติหนังสือ ตำรา บทเรียน ไปเป็นประโยชน์ด้านวิชาการ การเรียนรู้ การเรียนการสอนในวงนักวิชาการและผู้สนใจด้านวิชาการ รวมถึงการนำผลงานวิจัยไปวิจัยต่อยอดสื่อสาธารณะ การเผยแพร่ความรู้จากผลงานวิจัยที่ได้ต่อสาธารณะ ผ่านทางหนังสือพิมพ์ / วารสาร / โทรทัศน์ / วิทยุ / คู่มือ / แผ่นพับ การฝึกอบรม และสื่อสังคมออนไลน์ต่าง ๆ เป็นต้น

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล

สรุปผลและอภิปรายผล

สรุปผล

โครงการอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย มีระยะในการดำเนินงาน 5 ปี ระหว่างปีงบประมาณ 2560 – 2564 โดยมี **วัตถุประสงค์หลัก** เพื่อได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน (validation) ข้อมูลทางอนุกรมวิธานซึ่งประกอบด้วยประวัติทางอนุกรมวิธาน การอธิบายลักษณะ (description) ชีววิทยาเบื้องต้น เขตการแพร่กระจาย รวมถึงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง (material examine) ที่ใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับอ้างอิงข้อมูลศัตรูพืชของประเทศไทย รวมทั้งข้อมูลในระดับโมเลกุล (ดีเอ็นเอบาร์โค้ด 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

กรมวิชาการเกษตร

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)

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 และแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ 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

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมย่อยที่ 1.2 สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชและจุลินทรีย์ควบคุมโรค ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน (validation) ข้อมูลทางอนุกรมวิธานซึ่งประกอบด้วยประวัติทางอนุกรมวิธาน การอธิบายลักษณะ (description) ชีววิทยาเบื้องต้น เขตการแพร่กระจายรวมถึงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยและตัวอย่างเก็บรักษาตัวอย่างที่ใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับอ้างอิงข้อมูลศัตรูพืชของประเทศไทย 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

กิจกรรมที่ 2 ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ของศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติ (วงจรชีวิต การเข้าทำลาย พืชอาหาร และการแพร่กระจาย) ประกอบด้วย 3 กิจกรรมย่อย

กิจกรรมย่อยที่ 2.1 ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ของแมลง ไร สัตว์ ศัตรูพืช ได้ชีววิทยา พืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย ของแมลงศัตรูพืช จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยแป้งมะละกอ เพลี้ยอ่อนถั่ว หนอนแดง แมลงวันผลไม้ ไรศัตรูพืช จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ ไรแดงมันสำปะหลัง สัตว์ศัตรูพืช จำนวน 4 สกุล ได้แก่ หอยซัคซีเนีย หอยน้ำศัตรูพืช สกุล *Indoplanorbis, Radix,* และ *Physella* แมลงศัตรูธรรมชาติ จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ แตนเบียนไข่ไตรโคแกรมมา

กิจกรรมย่อยที่ 2.2 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของโรคพืช ได้ชีววิทยาพืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย ของราสาเหตุโรคพืช 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)

กิจกรรมย่อยที่ 2.3 ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของวัชพืช ได้ชีววิทยา เขตการแพร่กระจาย ของวัชพืช จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ หญ้าตีนกาใหญ่ ลูกใต้ใบใบใหญ่ บาหยา กระดุมใบใหญ่ และเทียนนา

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 3 การจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงศัตรูพืช ประกอบด้วย แมลงวันผลไม้กลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex แมลงวันผลไม้เผ่า Dacini เพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae วงศ์ Thripidae เพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera และมอดแป้ง สกุล *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*

อภิปรายผล

โครงการอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทยนี้ ประกอบด้วย 3 กิจกรรม ดังนี้

กิจกรรมที่ 1 สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

ผลลัพธ์ที่ได้จากงานวิจัยในกิจกรรมที่ 1 จำนวน 38 การทดลองนั้น ทั้งหมดเป็นองค์ความรู้ใหม่ ทำให้ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน (validation) ข้อมูลทางอนุกรมวิธานซึ่งประกอบด้วยประวัติทางอนุกรมวิธาน การอธิบายลักษณะ (description) แนวทางการวินิจฉัย (key) และตัวอย่างของแมลง ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ และจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชและจุลินทรีย์ควบคุมโรค 38 องค์ความรู้ นอกจากนี้ ตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการศึกษานั้นถูกเก็บรักษาไว้เพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับอ้างอิงข้อมูลศัตรูพืชของประเทศไทย

องค์ความรู้ที่เกิดจากงานวิจัยในครั้งนี้ไม่เพียงแต่เป็นความรู้ที่ไม่เคยมีความศึกษามาก่อนเท่านั้น ผลลัพธ์ที่ได้จากงานวิจัยภายใต้โครงการวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนในงานอารักพืช โดยเฉพาะงานด้านการป้องกันกำจัด เนื่องจากเมื่อทราบชนิดศัตรูพืชที่ถูกต้อง แน่นอนและเป็นปัจจุบัน หากเกิดการระบาดก็สามารถควบคุมกำจัดได้ถูกต้องตรงชนิดศัตรูพืชที่เข้าทำลาย ซึ่งก่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดต่อการกำจัด นอกจากนี้หากเกษตรกรสามารถควบคุมกำจัดศัตรูพืชได้ตรงเป้าหมาย จะเป็นการลดการใช้สารเคมี และลดโอกาสที่ศัตรูพืชเหล่านั้นจะเกิดการดื้อ (resistant) ต่อสารกำจัดศัตรูพืช นอกจากนี้ยังลดโอกาสการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม และลดอันตรายต่อเกษตรอีกด้วย

ชนิด และชื่อวิทยาศาสตร์ของศัตรูพืชที่ถูกต้องภายใต้กิจกรรมนี้ ยังก่อให้เกิดประโยชน์สำหรับการค้าระหว่างประเทศ เนื่องจากสามารถนำข้อมูลเหล่านี้ไปเป็นข้อมูลสนับสนุนงานด้านกักกันพืช โดยเฉพาะการจัดทำข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List) ที่ต้องส่งให้ประเทศคู่ค้าได้นำไปพิจารณาก่อน นำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศไทย และใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืชของประเทศคู่ค้าที่ส่งมา เพื่อวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis) ก่อนนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศคู่ค้า และใช้สำหรับในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืชกักกัน (Quarantine Pest) เพื่อการควบคุมศัตรูพืชจากต่างประเทศไม่ให้เข้ามาแพร่กระจายในประเทศ และใช้ประโยชน์เพื่อ

กรมวิชาการเกษตร

การเจรจาตอบโต้ประเทศคู่ค้าที่ใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Sanitary and Phytosanitary Measure) มาเป็นเงื่อนไขในการกีดกันทางการค้า ส่งผลให้การเจราเปิดตลาดการค้าเพื่อส่งออกผลผลิตทางการเกษตรที่มีความน่าเชื่อเป็นที่ยอมรับทั่วโลก และลดข้อจำกัดในการกีดกันทางการค้าอีกด้วย

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

ข้อมูลชีววิทยา พืชอาศัย เขตการแพร่กระจายและนิเวศวิทยาของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ จากกิจกรรมที่ 2 ในครั้งนี้มีจำนวน 23 การทดลอง ผลการศึกษาที่ได้นั้นเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่ไม่เคยมีการศึกษามาก่อนในประเทศไทย องค์ความรู้ที่ได้สามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยต่าง ๆ มากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ด้านการควบคุมศัตรูพืช สามารถใช้เป็นข้อมูลในการหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสม หากพบศัตรูพืชรุกรานชนิดใหม่ (Invasive species) เกิดขึ้นในประเทศไทย ข้อมูลศัตรูพืชที่ถูกต้อง เขตการแพร่กระจาย และพืชอาหาร จะสามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการวางแผนควบคุมได้อย่างรวดเร็ว ทันเวลา และสามารถนำข้อมูลพื้นฐานเหล่านี้ไปออกเป็นมาตราการในการป้องกันศัตรูศัตรูพืชอย่างยั่งยืนต่อไป

นอกจากนี้ผลลัพธ์ที่ได้จากกิจกรรมที่ 2 นั้น สามารถใช้เป็นข้อมูลสำหรับอ้างอิงในการวางแผนการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาระบบการเตือนภัย/เฝ้าระวังการแพร่ระบาดของศัตรูพืช ทำให้การป้องกันกำจัดมีประสิทธิภาพสูงสุด เป็นการลดต้นทุนการผลิตให้กับเกษตรกร อีกทั้งเป็นการเพิ่มคุณภาพและสร้างมูลค่าของผลผลิตทางการเกษตรให้มีราคาสูง เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ เป็นการเพิ่มโอกาสการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรของไทยให้มีมากขึ้นอีกด้วย

กิจกรรมที่ 3 การจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด (จำนวน 16 การทดลอง)

การทดลองภายใต้กิจกรรมที่ 3 นี้ ประกอบด้วย 16 การทดลอง การทดลองต่าง ๆ ภายใต้กิจกรรมนี้เกิดขึ้นการที่พบว่าปัจจุบันนี้ มีศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่สามารถใช้เพียงลักษณะทางสัณฐานภายนอกในการระบุชนิด ชื่อวิทยาศาตร์ได้ ด้วยเหตุนี้เอง จึงมีการประยุกต์ใช้การจำแนกแบบดั้งเดิมร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุล ได้แก่ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogeny) มาใช้ประกอบเพื่อยืนยันชนิดศัตรูพืชให้มีความถูกต้องแม่นยำ ทันสมัย และน่าเชื่อถือตามมาตรฐานสากลมากยิ่งขึ้น ซึ่งดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชหลายชนิดนั้นได้มีการจัดเก็บในฐานข้อมูล Genbank ซึ่งเป็นฐานข้อมูลที่เป็นที่ยอมรับในระดับสากล และดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้จากการศึกษาภายใต้กิจกรรมนี้ พบว่ามีศัตรูพืชหลายชนิดที่เป็นครั้งแรกที่มีการบันทึกลำดับพันธุกรรมด้านศัตรูพืชครั้งแรกของประเทศไทย นอกจากนี้ผลลัพธ์ที่ได้นี้สามารถใช้สนับสนุนในการยกระดับความน่าเชื่อถือของศัตรูพืชในประเทศไทย ให้มีความทันสมัยและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล

กรมวิชาการเกษตร

ดังนั้นผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยในครั้งนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งที่จะใช้เป็นข้อมูลในการสนับสนุนและเพิ่มศักยภาพการผลิตสินค้าเกษตร ทำให้สามารถส่งออกสินค้าเกษตรไปจำหน่ายยังต่างประเทศได้มากขึ้น เพิ่มความเชื่อมั่นและสร้างความน่าเชื่อถือในการเจรจาต่อรองเพื่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรของไทยไปสู่ตลาดโลก เกิดการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทย ส่งผลในองค์รวมต่อความเป็นอยู่ที่ดีขึ้นของประชาชนชาวไทย ซึ่งความสอดคล้องกับยุทธศาสตร์ของชาติ ที่มุ่งเน้นใช้ความรู้ การวิจัยและนวัตกรรมเพื่อจัดการกับศัตรูพืชซึ่งเป็นปัญหาท้าทายสำคัญของการผลิตสินค้าเกษตรของประเทศไทย ทำให้ประเทศไทยเกิดความมั่นคงทางเศรษฐกิจและอาหาร ส่งผลให้ประชากรชาวไทยสามารถดำรงชีวิตได้อย่างมีความสุขและมีคุณค่า

ข้อเสนอแนะต่อผู้เกี่ยวข้องสำหรับการดำเนินงานในระยะต่อไป

ผลลัพธ์จากงานวิจัยภายใต้โครงการวิจัยนี้เป็นองค์ความรู้ที่จะก่อให้เกิดคุณค่าอเนกอนันต์ต่อประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งงานด้านอารักพืช ผู้เกี่ยวข้องควรนำองค์ความรู้ที่ได้ไปต่อยอดในการตรวจวินิจฉัยชนิดศัตรูพืชโดยชีววิธี (Detection) และงานเฝ้าระวังศัตรูพืชต่างถิ่น (Surveillance) และนำผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยในครั้งนี้จัดทำเอกสารวิชาการ คู่มือ (National Guidelines for Plant Pest Identification) ของศัตรูพืชที่ได้ทำการศึกษามาแล้วนั้น และควรจัดอบรมการจำแนกชนิดของศัตรูพืชในระดับชาติ เพื่อเป็นการเผยแพร่องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยภายใต้โครงการวิจัยนี้สู่นักวิชาการ และผู้ที่มีความสนใจ ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งต่อเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช นักวิชาการ นักวิจัยจากหน่วยงานภาครัฐและหน่วยงานเอกชนต่าง ๆ เช่น กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัย องค์กรการศึกษา ต่าง ๆ สามารถเพิ่มองค์ความรู้และใช้ประโยชน์จากการจำแนกชนิดศัตรูพืช

สุดท้ายองค์ความรู้จากงานวิจัยภายใต้โครงวิจัยนี้ควรได้รับการพัฒนาเป็นฐานข้อมูลศัตรูพืช (big data) ของประเทศไทย ใช้เป็นฐานข้อมูลในการสร้างระบบเตือนภัยทางการเกษตร เพิ่มศักยภาพในการเข้าถึงข้อมูลของนักวิจัยให้สามารถตอบสนองและกำหนดแนวทางการป้องกันกำจัดอย่างทันท่วงที เพิ่มความมั่นคงทางของผลิต และเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับงานด้านกักกันพืชในเจรจาตอบโต้กับประเทศคู่ค้าและก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อภาคการเกษตรของประเทศไทยอย่างยั่งยืน

ปัญหาและอุปสรรคในการทำงาน

จากสถานการณ์การระบาดของโควิด CO-VID 19 ทำให้การรวบรวมตัวอย่างที่ต้องออกเดินทางในต่างจังหวัดได้รับผลกระทบไม่สามารถออกปฏิบัติงานได้ ซึ่งการทดลองส่วนใหญ่ที่ต้องออกเก็บรวบรวมตัวอย่างมาใช้ในการ

กรมวิชาการเกษตร

ดำเนินการทดลอง รวมถึงการถูกปรับลดงบประมาณมากร้อยละ 50 ในปี 2563-2564 ทำให้ผลการดำเนินงานบางการทดลองของแต่ละกิจกรรมไม่เป็นไปตามเป้าหมายที่ตั้งไว้ และการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการบางส่วนมีความล่าช้า รวมทั้งการดำเนินการในโรงเรือนทดลอง ตามมาอีกด้วย อย่างไรก็ตาม นักวิจัยภายใต้โครงการได้มีความพยายามและทุ่มเทอย่างเต็มที่ในการบริหารและจัดสรรทรัพยากรที่มีเพื่อให้บรรลุเป้าหมายและวัตถุประสงค์ของโครงการ

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. รายงาน สถานการณ์ศัตรูมันสำปะหลัง 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 ที่เป็นสาเหตุ โรคมะละกอ, 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*. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

กัญญา อังศุพานิช. 2520. ชีววิทยาบางประการของหอย *Lymnaea* (*Radix*) *auricularia rubiginosa* Michelin (1831). วิทยานิพนธ์ระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาสัตววิทยา บัณฑิตวิทยาลั 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

กรมวิชาการเกษตร

กุลฉวี กำจายภัย. 2526. โรคและแมลงศัตรูกล้วยไม้. บริษัทบางกอกฟลาวเวอร์เซนเตอร์ 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* สาเหตุ โรคใบจุดปาล์มน้ำมัน 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. *ในรายงานผลการทดลอง พ.ศ.2526 เล่มที่ 1*. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

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 เพื่อป้องกันกำจัดโรค ใบจุดและโรคราสนิมของถั่วลิสง, น. 35. *ใน รายงานประจำปี 2513ศูนย์เกษตรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ*, ขอนแก่น.

กรมวิชาการเกษตร

ชนินทร ดวงสอาด. 2552. โรคของพืชตระกูลแตง. น. 59 - 60. *ใน คู่มือโรคของผัก* พิมพ์ครั้งที่1. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, บริษัทเอ-วันฟิวเจอร์ จำกัด, นนทบุรี. 153 หน้า.

ชมพูนุท จรรยาเพศ และ ปิยาณี หนูกาฬ. 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 หนูกาฬ 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

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.

กรมวิชาการเกษตร

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: รายงาน ผลการวิจัยประจำปี 2558. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ทวีศักดิ์ ชโยภาส. 2544. แมลงศัตรูปาล์มน้ำมันในประเทศไทย. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูพืชสวนอุตสาหกรรม กอง กีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 126 หน้า.

ทองพูน ศรีวรนาถ. 2502. *การทดลองใช้ Fungicides บางชนิดกับโรคตากบของยาสูบ.* วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 39 หน้า.

ทะนง พงษ์พานิช. 2508. *การสำรวจโรคอุ่นขั้นต้นในบางท้องที่ของประเทศไทย.* วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 61 หน้า.

ทัศนีย์ มุงเมือง, นิดารัตน์ ไพรคณะฮก, วีรชัย วิโรจน์แสงอรุณ และนพพร ศราธพันธุ์. 2543. หอยลิมเนีย รูบิจิโน ซาและหอยอินโดพลานอร์บิส 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.

ธนากร จันทร์มาลี และวราภรณ์ ประกอบ. 2553. การจำแนกไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. บางไอโซ เลทของไทย โดยเทคนิค PCR. วารสารเกษตร 26: 195-202.

ธรรมศักดิ์ สมมาตย์ และ M.K. Beute. 2529. ลักษณะรูปร่างและการงอกของเชื้อ *Phaeoisariopsis personata* (Berk. & Curt.) von Arx. *วารสารโรคพืช* 6: 7-11.

กรมวิชาการเกษตร

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.* กลุ่มวิจัยโรค พืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 163 หน้า.

ธารทิพย ภาสบุตร. 2553. โรคของเยอร์บีร่า. น. 86 – 93. *ใน โรคไม้ดอกไม้ประดับ.* กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัย การอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 163 หน้า.

ธิติยา สารพัฒน์ ไตรเดช ข่ายทอง วีรกรณ์ แสงไสย์ และวานิช คำพานิช . 2559. สถานการณ์การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออก. หน้า 41-53.*ใน : การประชุมวิชาการประจำปี 2559 วิจัยการอารักขาพืช และปัจจัยการผลิตเพื่อขับเคลื่อน เศรษฐกิจไทย* สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขา พืช 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 การประชุมสัมมนาทางวิชาการ การป้องกันและกำจัดแมลงศัตรูอ้อยโดยวิธีผสมผสานครั้งที่ 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 ทองเครือ. 2562. การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า.หน้า 60-73. *ใน*: เอกสารประกอบการประชุม

กรมวิชาการเกษตร

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*

กรมวิชาการเกษตร

Radopholus. รายงานผลงานวิจัยประจำปี ๒๕๕๖ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2555. *ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชพรรณไม้น้ำและการป้องกันกำจัด*. นิวธรรมดาการพิมพ์,กรุงเทพฯ. 72หน้า.

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. ศึกษาเชื้อราที่ทำให้เกิดโรค กับถั่วใช้รับประทานฝักสด, น. 39-49. *ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2527 เล่ม ที่ 3*. กองโรคพืชและจุล ชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน, ศิริพงษ์ คุ้มภัย, วิรัช ชูบำรุง และ พัฒนา สนธิรัตน. 2528. ศึกษาเชื้อราที่ทำให้เกิดโรค กับถั่วใช้รับประทานฝักสด, น. 95-101. *ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2528*. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรค พืชและจุล ชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ปราณีต ศิริวัลลภ, ทศพล วิสุทธารมณ์, สุรสิทธ์ บุญทวี และ ลักษณา วรรณภีร์. 2528. ศึกษาประสิทธิภาพของ สาร ป้องกันกำจัดโรคพืชบางชนิดเพื่อป้องกันกำจัดโรคดอกเน่าของบวบและฟักทอง. น. 858-867. *ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2528* เล่มที่ 2. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

กรมวิชาการเกษตร

ปราสาททอง พรหมเกิด ปิยาณี หนูกาฬ ดาราพร รินทะรักษ์ สมเกียรติ กล้าแข็ง และ ทรงทัพ แก้วตา. 2554. ความหลากชนิดและประชากรของหอยทากและทากในโรงเรือนปลูกพืช. *รายงานความก้าวหน้า*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1822-1828.

ปราสาททอง พรหมเกิด ปิยาณี หนูกาฬ ดาราพร รินทะรักษ์ สมเกียรติ กล้าแข็ง และวิไลวรรณ เวชยันต์ 2555. การควบคุมหอยซัคซิเนีย *Succinea* sp. ในสวนกล้วยไม้โดยวิธีผสมผสาน. *รายงานประจำปี*. สำนักวิจัย พัฒนาการอารักขาพืช 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* เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. 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

กรมวิชาการเกษตร

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.* กลุ่มวิจัย โรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ. 132 หน้า.

พลอยชมพู กรวิภาสเรือง, มานิตา คงชื่นสิน และเทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์. 2553. การศึกษาอนุกรมวิธานไรแมงมุม ในสกุล *Oligonychus*. น. 2085-2104. *ใน* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553. สำนักวิจัยพัฒนาการ อารักขาพืช. 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. การศึกษาชนิดของ ไรเพื่อการส่งออก. หน้า 1373-1391. *ใน* รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม ประจำปี 2548 เล่มที่ 1. กลุ่ม งานวิจัยไรและแมงมุม, 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. การศึกษาสัญฐานวิทยา อนุกรมวิธาน และวงจรชีวิตของเชื้อรา *Cercospora* spp. สาเหตุโรคใบจุดของพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ, น. 1 - 13. *ใน รายงานประจำปี 2522.* กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร.

กรมวิชาการเกษตร

พัฒนา สนธิรัตน, ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน, วิรัช ชูบำรุง และ ปิยะ เกียรติก้อง. 2523. การศึกษาสัณฐานวิทยา อนุกรมวิธาน และวงจรชีวิตของเชื้อรา *Cercospora* spp. สาเหตุโรคใบจุดของพืช, น. 1 - 10. *ใน รายงานประจำปี 2523 เล่มที่ 1*. กองโรคพืช กรมวิชาการเกษตร.

พัฒนา สนธิรัตน วิรัช ชูบำรุง ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และปิยะ เกียรติก้อง. 2526. รา *Alternaria* ที่เป็นสาเหตุ โรคใบจุดของพืชผักบางชนิด. *วารสารโรคพืช* ปีที่ 3 เล่มที่ 4. ต.ค.-ธ.ค. 2526. น. 154-167.

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.

กรมวิชาการเกษตร

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

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 รายงาน ผลงานวิจัยประจำปี 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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

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.

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. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์ การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 192 น.

วันทนีย์ อู่วาณิชย์, อัปสร เปลี่ยนสินไชย, สุนี ศรีสิงห์ และ อนุสรณ์ กุศลวงศ์. 2537. ความก้าวหน้าในงานวิจัยโรค ใบจุดเหลืองของอ้อย, น. 25. *ใน บทคัดย่อประชุมวิชาการประจำปี 2537. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา*. กรมวิชาการเกษตร.

วรรณนิภา มธุรส พัฒน ทวีโภค จุฬาภรณ์กำเนิดเพชร อุดมศักดิ์เลิศสุชาตวนิช และ รัตนนุช จันทร์เพ็ญ. 2555. หน้า 1144-1150. *ใน* : *การประชุมวิชาการแห่งชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้ง ที่ 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).

วิวิชชุตา เดชรักษา. 2549. การติดเชื้อตัวอ่อนพยาธิใบไม้ระยะเซอร์คาเรียของหอยน้ำจืดวงศ์ Thiaridae ในภาคเหนือของประเทศไทย.วิทยานิพนธ์ระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

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.

กรมวิชาการเกษตร

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. กองโรค พืช และจุลชีววิทยา. 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 กลุ่มงานวิจัยไรและแมง มุม, 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 และประสิทธิภาพการกินของแมงมุมตัวห้ำต่อแมลงวันผลไม้ ในสวนมะม่วง. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551. สำนักวิจัยพัฒนากาอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 356 – 388.

วีรศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และ อุดม ภู่พิพัฒน์. 2525. การสำรวจโรคของถั่วพู. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* 15: 225-239.

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.

กรมวิชาการเกษตร

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 ครั้ง ที่ 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 และแทนก๊อปปี้เซนเตอร์, 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.

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.

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 รายงาน ผลงานวิจัยประจำปี 2549 เล่ม 2*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ. 2552. โรคของถั่วฝักยาว. น.53 - 54. *ใน คู่มือโรคผัก* พิมพ์ครั้งที่ 1. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัย การอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, บริษัทเอ-วันฟิวเจอร์ จำกัด, นนทบุรี. 153 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร

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 สีจีรจำเนียร. 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 ไพโรจน์ สุวรรณจินดา. 2551. การพัฒนาเทคโนโลยีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสับปะรดเพื่อบริโภคสดภาคใต้ตอนล่าง. การประชุมวิชาการประจำปี 2551 ผลงานวิจัยที่ใช้ได้จริงจากหิ้งสู่ห้าง ครั้งที่ 2 วันที่ 16-17 กันยายน 2551 โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร กระทรวง เกษตรและสหกรณ์ หน้า 205-227.

โสภณ วงศ์แก้ว. 2528. *โรคของถั่วลิสงในประเทศไทย*. เอกสารเผยแพร่ของกลุ่มนักวิจัยโรคถั่วลิสง โครงการร่วม ถั่วลิสง 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*. สำนักวิจัย พัฒนาการอารักขาพืช 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. การศึกษาชีววิทยาและ นิเวศวิทยาของรา *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. เอกสารประกอบการบรรยายพิเศษ การประชุมสัมมนา เรื่อง “การจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List) และการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis) เพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร” วันที่ 26 กันยายน 2543 ณ โรงแรมมิรา เคิลแกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ.

อรุณี รอดลอย,สุจินต์ หนูขวัญ และยุพเยาว์ สายจันทร์. 2555. การศึกษาชนิดและการกระจายพันธุ์ของพรรณไม้ น้ำในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของประเทศไทย. กลุ่มงานวิจัยพรรณไม้น้ำ สถาบันวิจัยสัตว์น้ำ สวยงามและพรรณไม้น้ำ 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

กรมวิชาการเกษตร

อรนุช กองกาญจนะ และ วัชรา ชุณหวงศ์. 2540. แมลงศัตรูข้าวโพดและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูข้าวโพดและพืชไร่อื่นๆ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 37 หน้า

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. C*ucurbit 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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

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.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

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.

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

กรมวิชาการเกษตร

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)*.

กรมวิทยาศาสตร์

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

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.

กรมวิชาการเกษตร

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

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

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.

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

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.

กรมวิชาการเกษตร

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. (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.

กรมวิชาการเกษตร

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. 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

กรมวิทยาศาสตร์

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. 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.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

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.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

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).

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: I mprovements 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.

กรมวิชาการเกษตร

Kiew, R. and K. Vollisen. 1997. Asystasis(Acanthaceae) in Malaysia. JOOR: Kew Bulletin, 52 (4):965-971.

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

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.

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

กรมวิชาการเกษตร

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.

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

กรมวิทยาศาสตร์

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.

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 T he 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.

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

กรมวิชาการเกษตร

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

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.

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.

กรมวิชาการเกษตร

Petcharat, V. and M. Kanjanamaneesathian. 1989. Species of plant pathogen *Cercospora* in Southern Thailand. *Thai Phytopathology* 9: 23–27.

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.

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

กรมวิชาการเกษตร

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

กรมวิชาการเกษตร

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 a nd 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.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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. I nternational 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.

กรมวิชาการเกษตร

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,

กรมวิชาการเกษตร

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.

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.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

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.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

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.

กรมวิชาการเกษตร

Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312-1313.

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

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.

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).

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

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.

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

กรมวิชาการเกษตร

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

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

ผนวก 1

ภาพและตารางประกอบผลงานวิจัย

กิจกรรมที่ 1

สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.1 Field view of *Aonidiella aurantii* (Maskell)

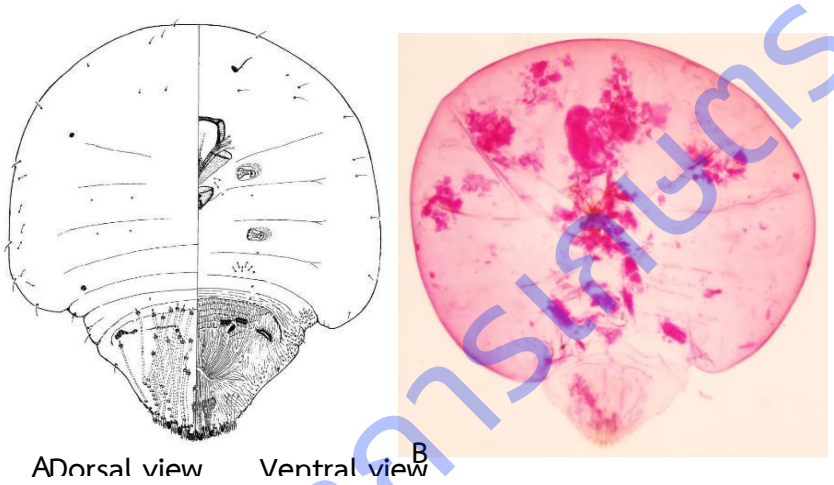


Figure 1.1.1.2 *Aonidiella aurantii* (Maskell, 1879) A) Morphology of slide – mounted B) Microscope view of adult female C) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.3 Field view of *Aonidiella comperei* Mckenzie

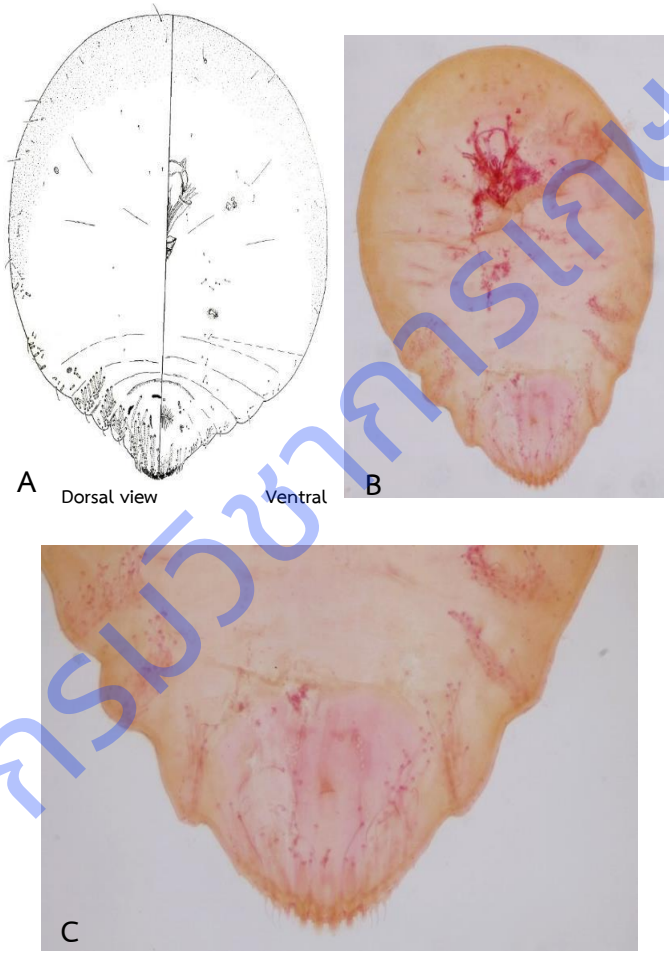


Figure 1.1.1.4 *Aonidiella comperei* Mckenzie, 1937 A) Morphology of slide – mounted B) Microscope view of adult female C) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.5 Field view of *Aonidiella orientalis* (Newstead)

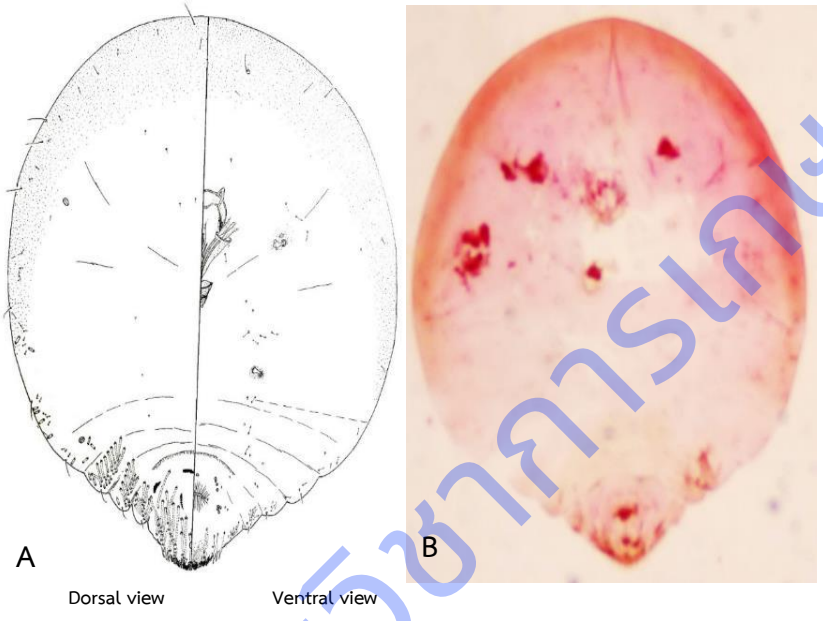
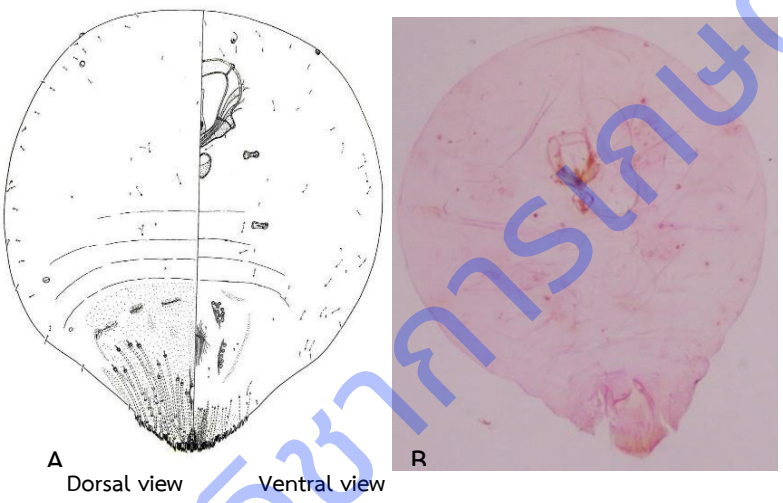


Figure 1.1.1.6 *Aonidiella orientalis* (Newstead, 1894) A) Morphology of slide – mounted B) Microscope view of adult female C) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.7 Field view of *Aspidiotus destructor* Signoret



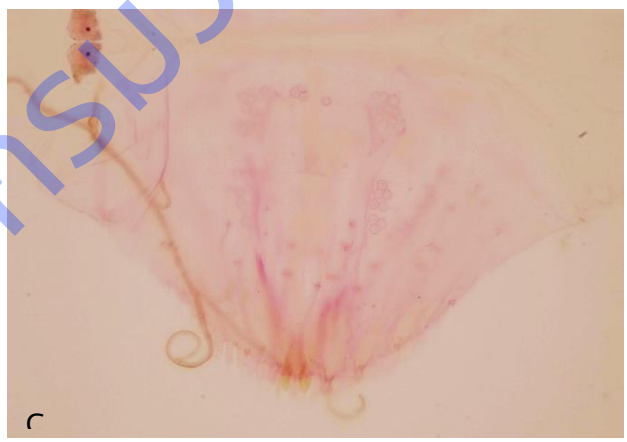


Figure 1.1.1.8 *Aspidiotus destructor* Signoret, 1869 **A)** Morphology of slide – mounted B) Microscope view of adult female **B)** Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

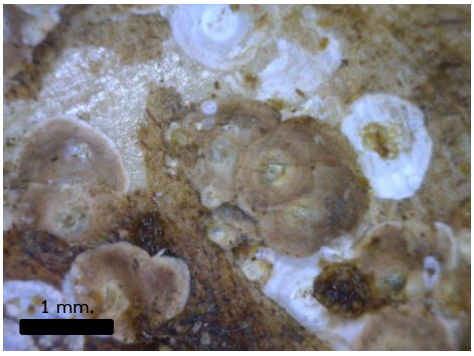


Figure 1.1.1.9 Field view of *Aspidiella hartii* (Cockerell)

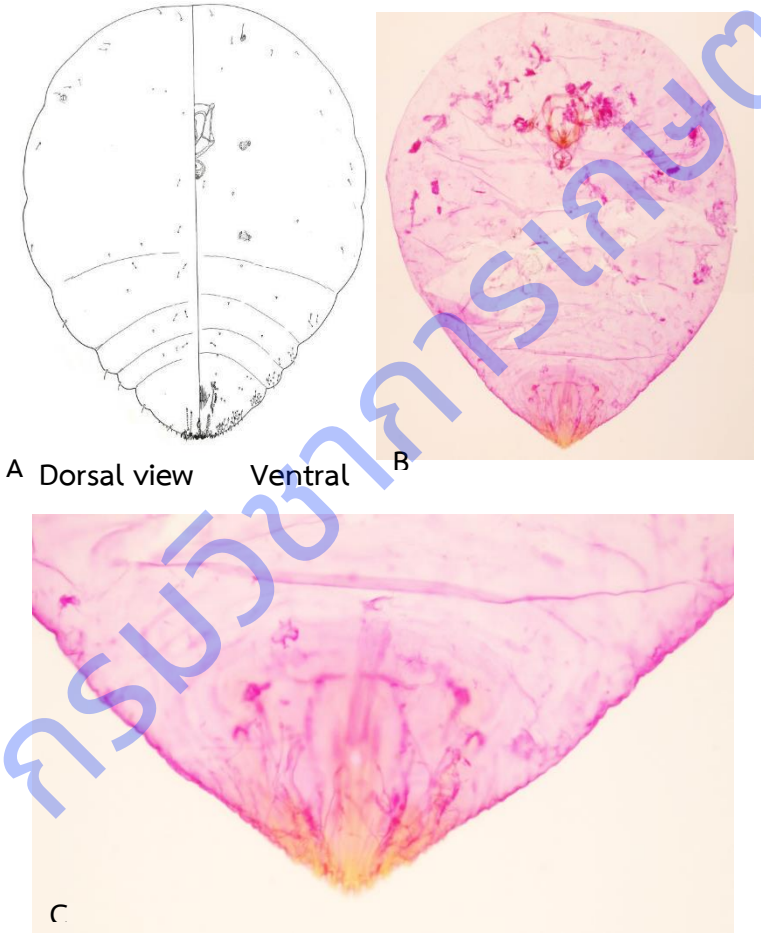


Figure 1.1.1.10 *Aspidiella hartii* (Cockerell, 1895) A) Morphology of slide – mounted B) Microscope view of adult female C) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.11 Field view of *Chrysomphalus dictyospermi* (Morgan)

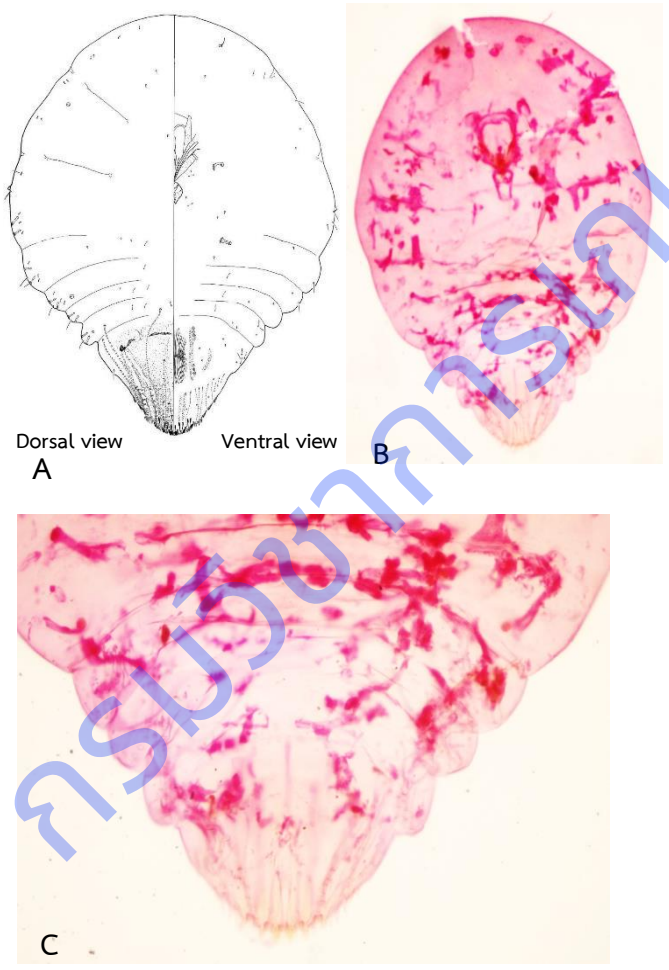


Figure 1.1.1.12 *Chrysomphalus dictyospermi* (Morgan, 1889) A) Morphology of slide – mounted B) Microscope view of adult female C) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.13 Field view of *Chrysomphalus* sp.

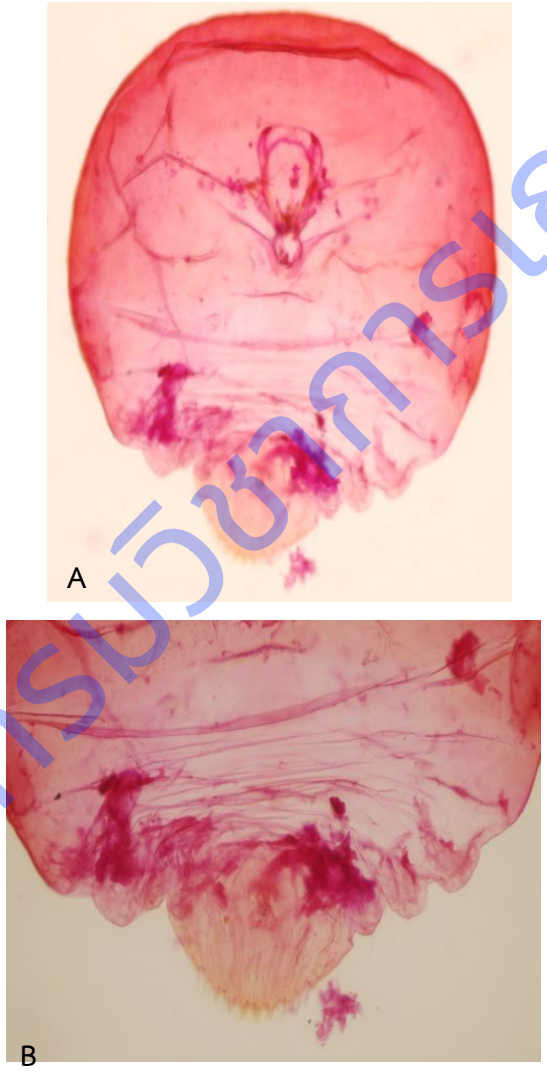


Figure 1.1.1.14 Adult female of *Chrysomphalus* sp. A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.15 Field view of *Hemiberlesia lataniae* (Signoret)

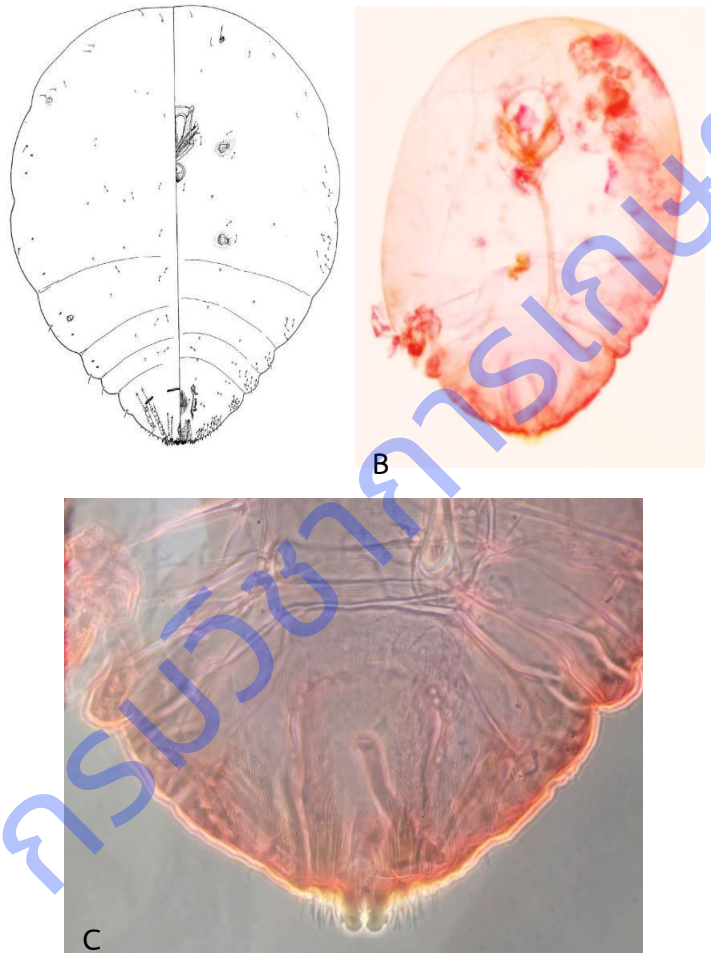


Figure 1.1.1.16 *Hemiberlesia lataniae* (Signoret, 1869) A) Morphology of slide – mounted B) Microscope view of adult female **C)** Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

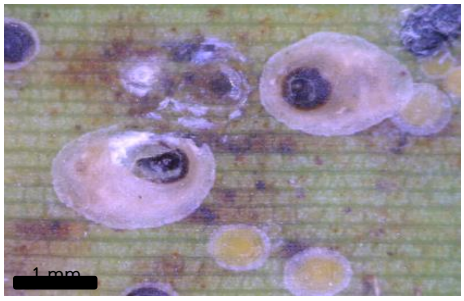


Figure 1.1.1.17 Field view of *Hemiberlesia palmae* (Cockerell)

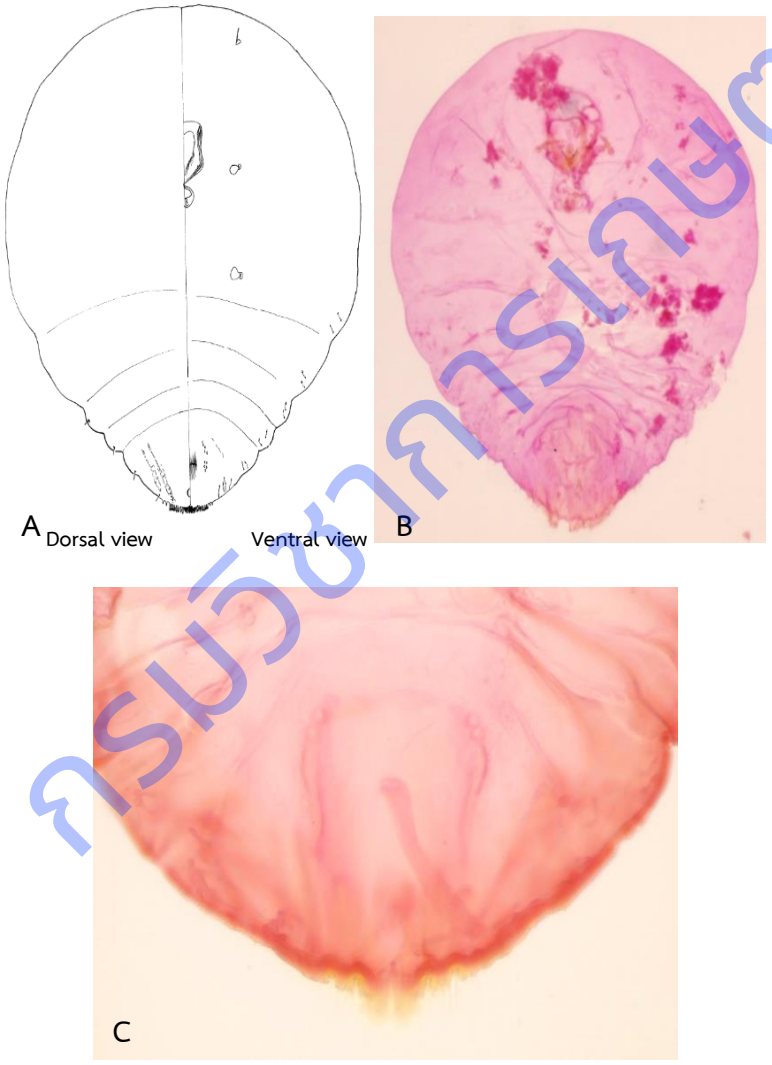


Figure 1.1.1.18 *Hemiberlisia palmae* (Cockerell)A) Morphology of slide – mounted B) Microscope view of adult female C) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

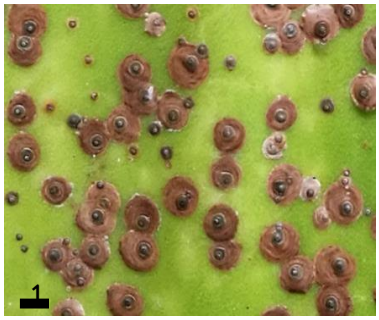


Figure 1.1.1.19 Field view of *Lindingaspis floridana* Ferris

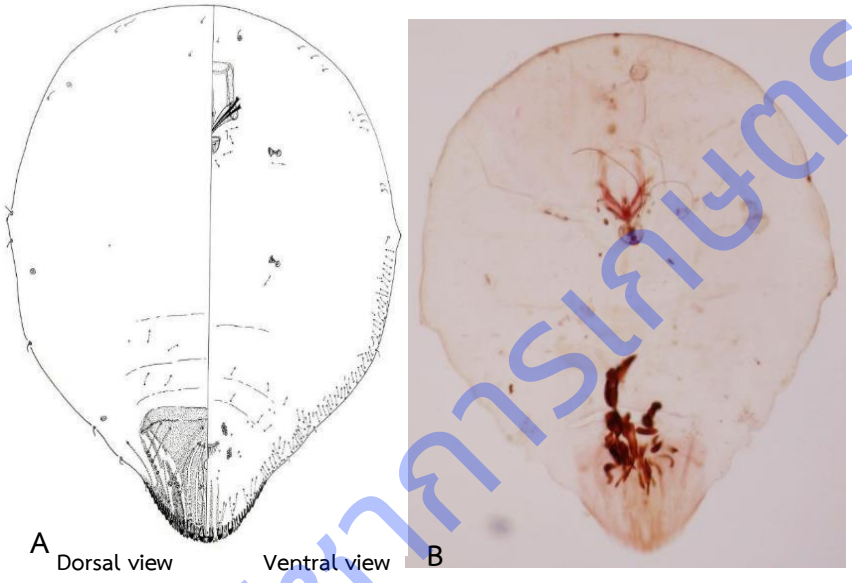


Figure 1.1.1.20 *Lindingaspis floridana* Ferris, 1942 A) Morphology of slide – mounted B) Microscope view of adult female C) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.21 Field view of *Pseudaonidia trilobitiformis* (Green)

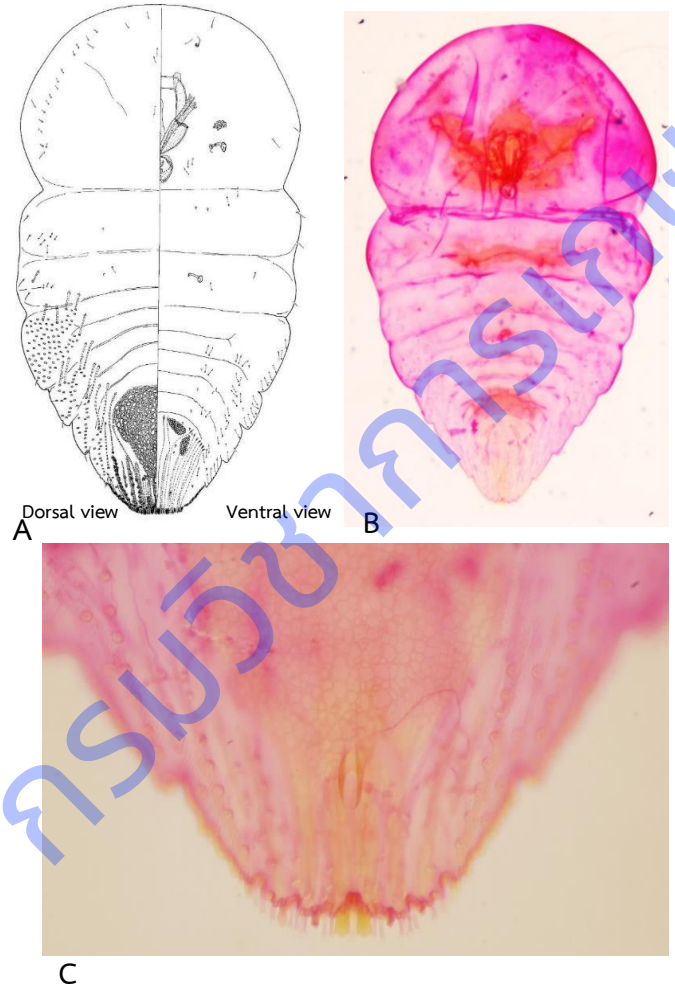


Figure 1.1.1.22 *Pseudaonidia trilobitiformis* (Green, 1896) A) Morphology of slide – mounted B) Microscope view of adult female C) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.1.23 Field view of *Pseudaonidia* sp.

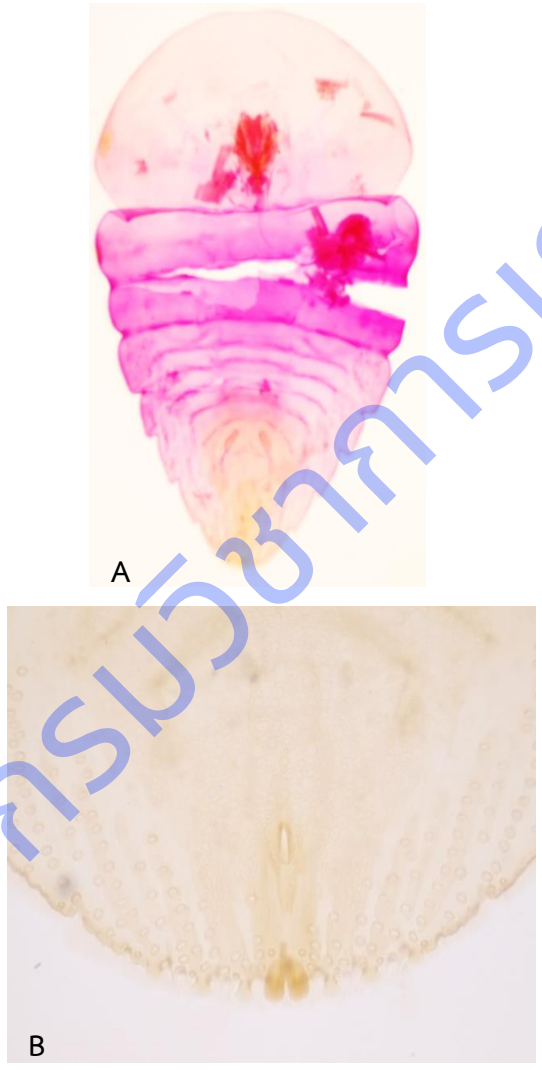


Figure 1.1.1.24 Adult female of *Pseudaonidia* sp. A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

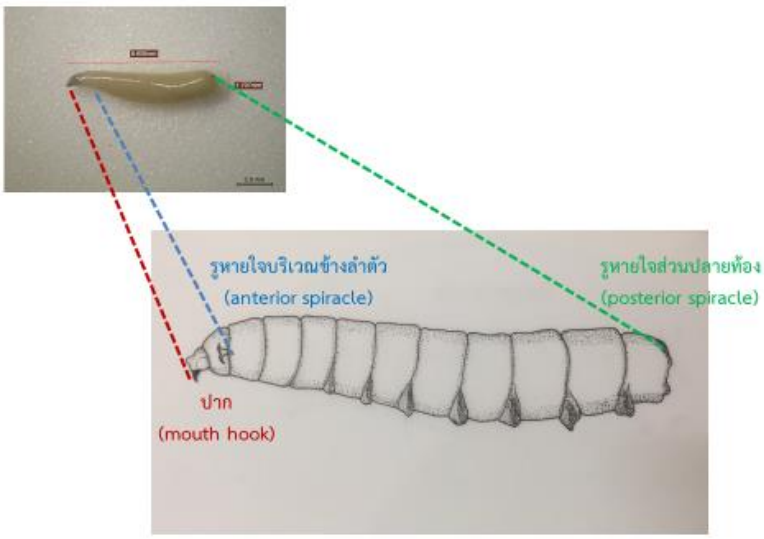


Figure 1.1.2.1 Morphological character of third instar of fruit fly larva (lateral view). The important characteristics of larvae are mouth hook, anterior spiracle and caudal segment.

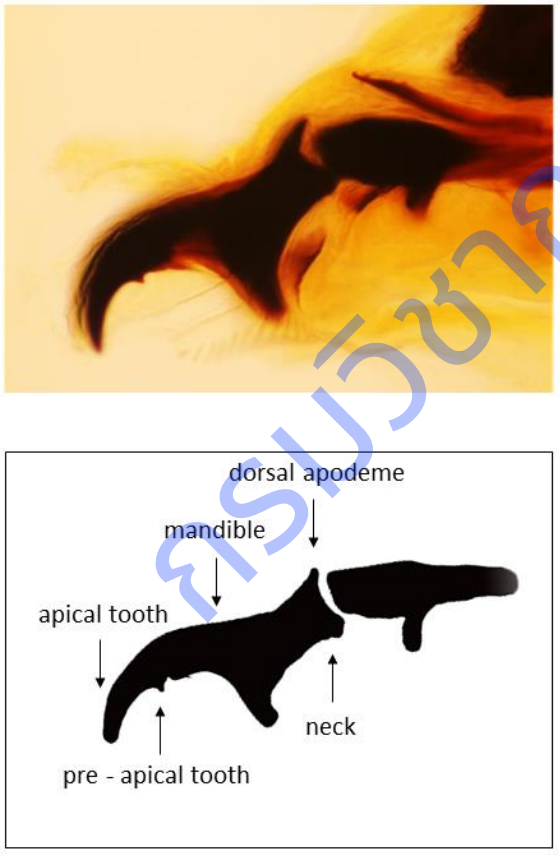


Figure 1.1.2.2 Cephalopharyngeal skeleton of third instar larva in lateral view.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

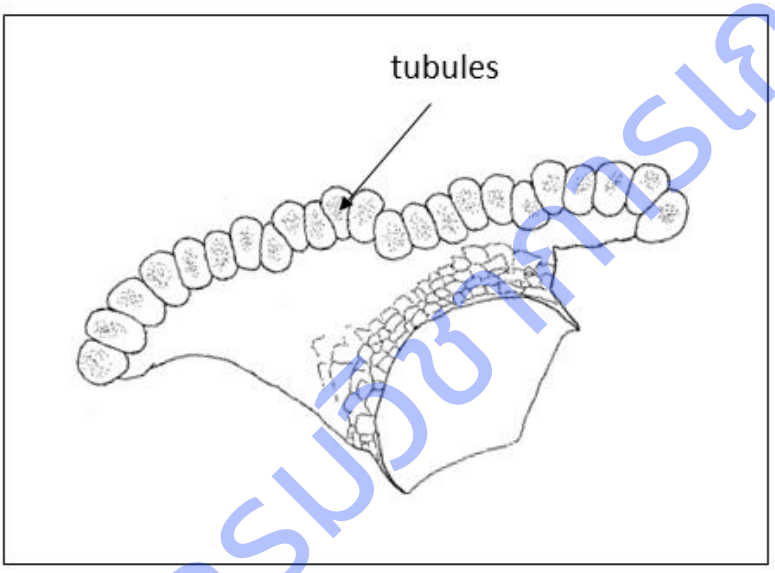
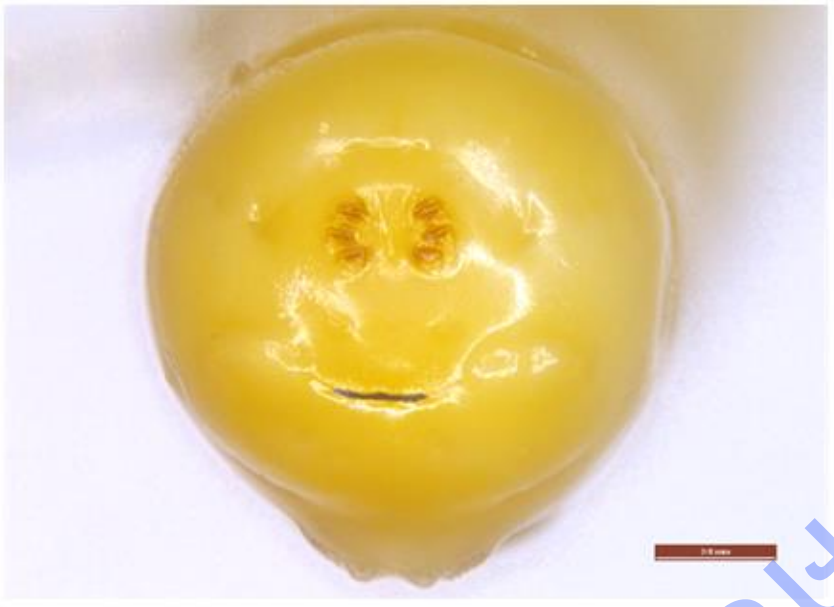
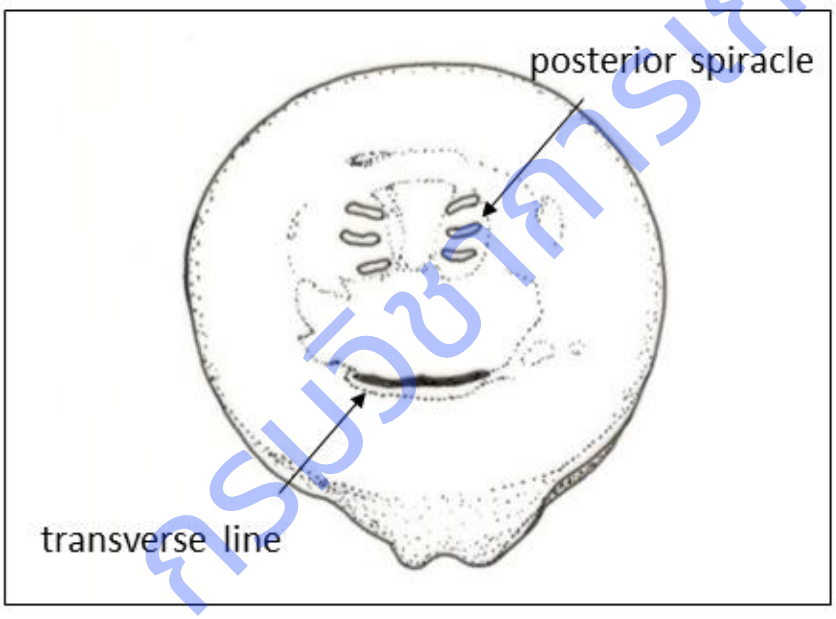


Figure 1.1.2.3 Anterior spiracle of third instar larva in lateral view.

กรมวิชาการเกษตร





กรมวิชาการเกษตร

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

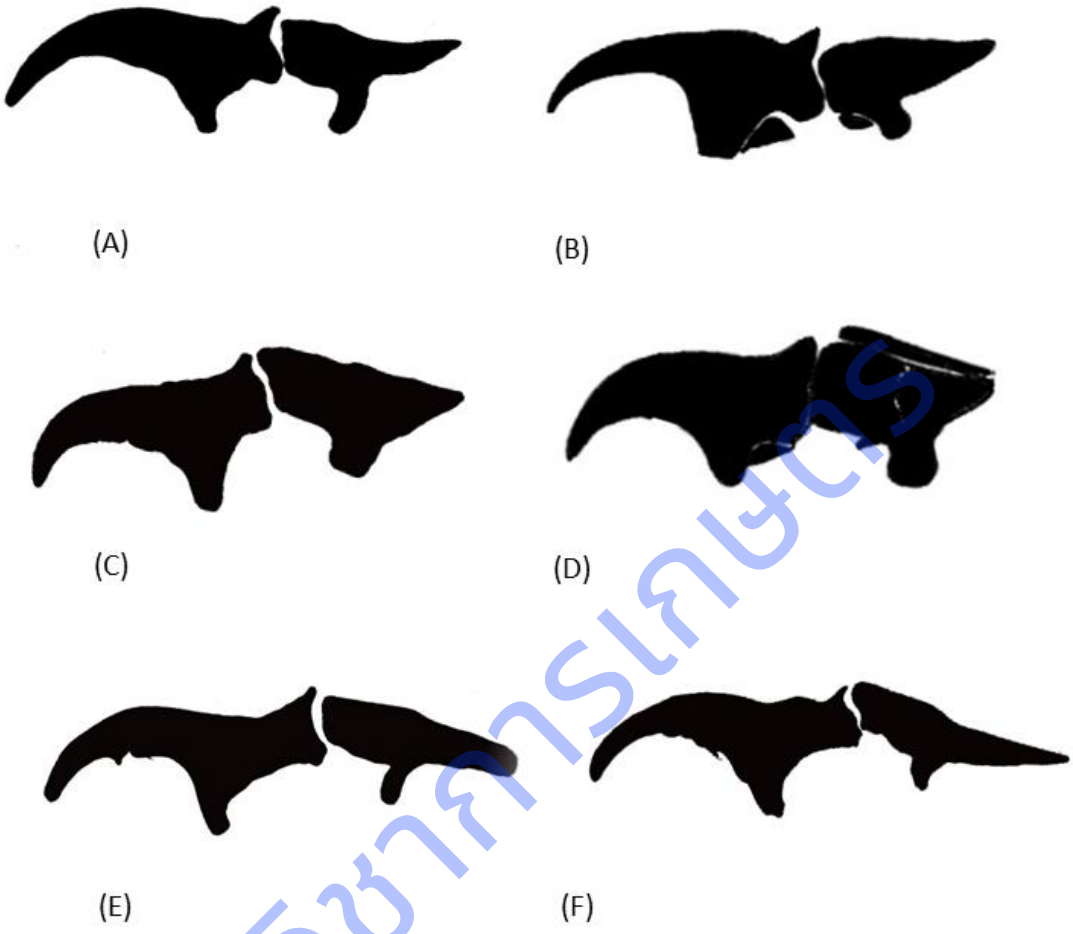


Figure 1.1.2.5 Cephalopharyngeal skeleton of third instar larva of Dacini fruit fly

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

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

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

กรมวิชาการเกษตร

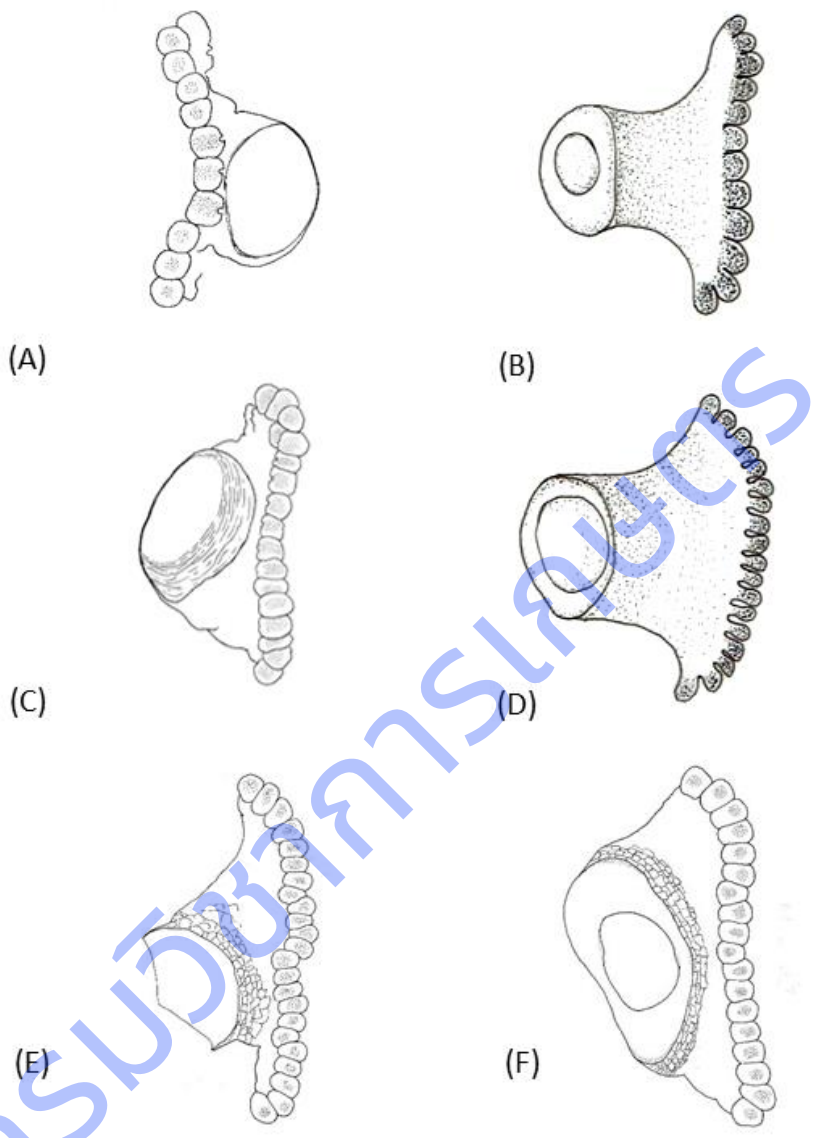


Figure 1.1.2.6 Anterior spiracle of third instar of Dacini larvae (lateral view).

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

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

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

กรมวิชาการเกษตร

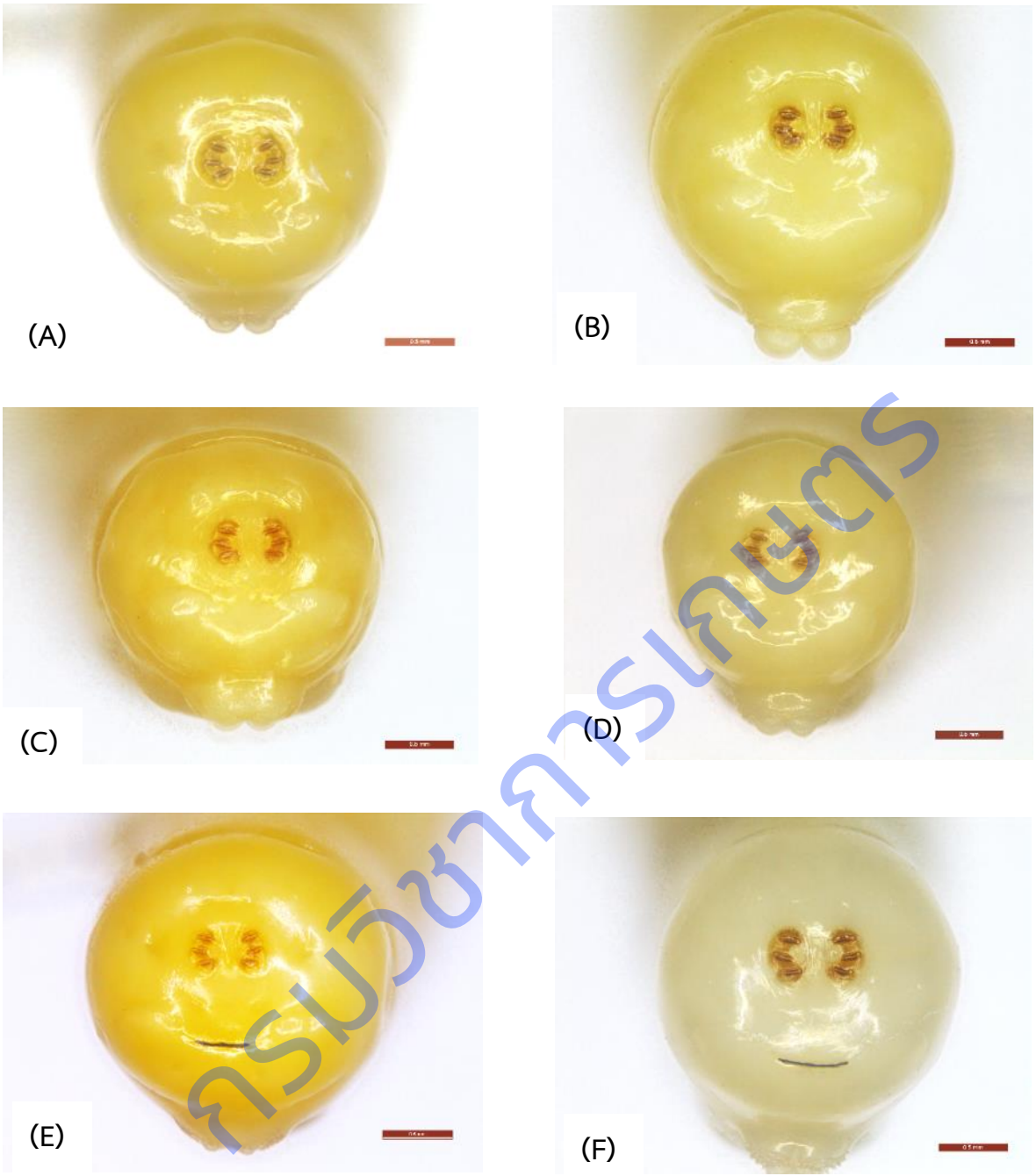


Figure 1.1.2.7 Caudal segment of third instar of Dacini larvae (lateral view).

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

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

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

กรมวิชาการเกษตร

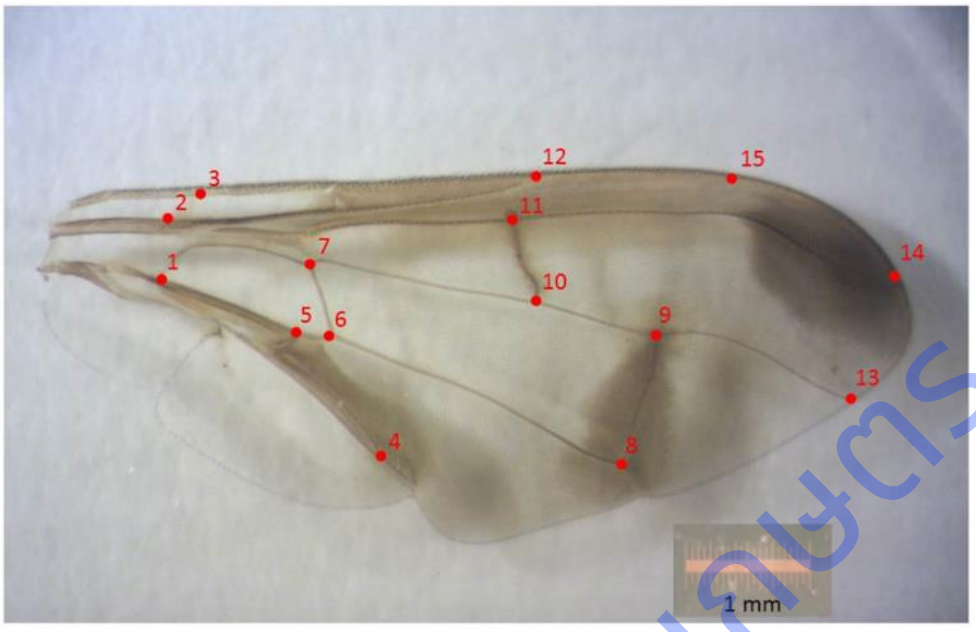


Figure 1.1.2.8 Right-hand wing of a Dacini fruit flies individual showing each of the 15 landmarks used in the geometric morphometric analysis. Wing with 15 landmarks using TPS Program. Landmark information can be found in Table 1.1.2.3

กรมวิชาการเกษตร

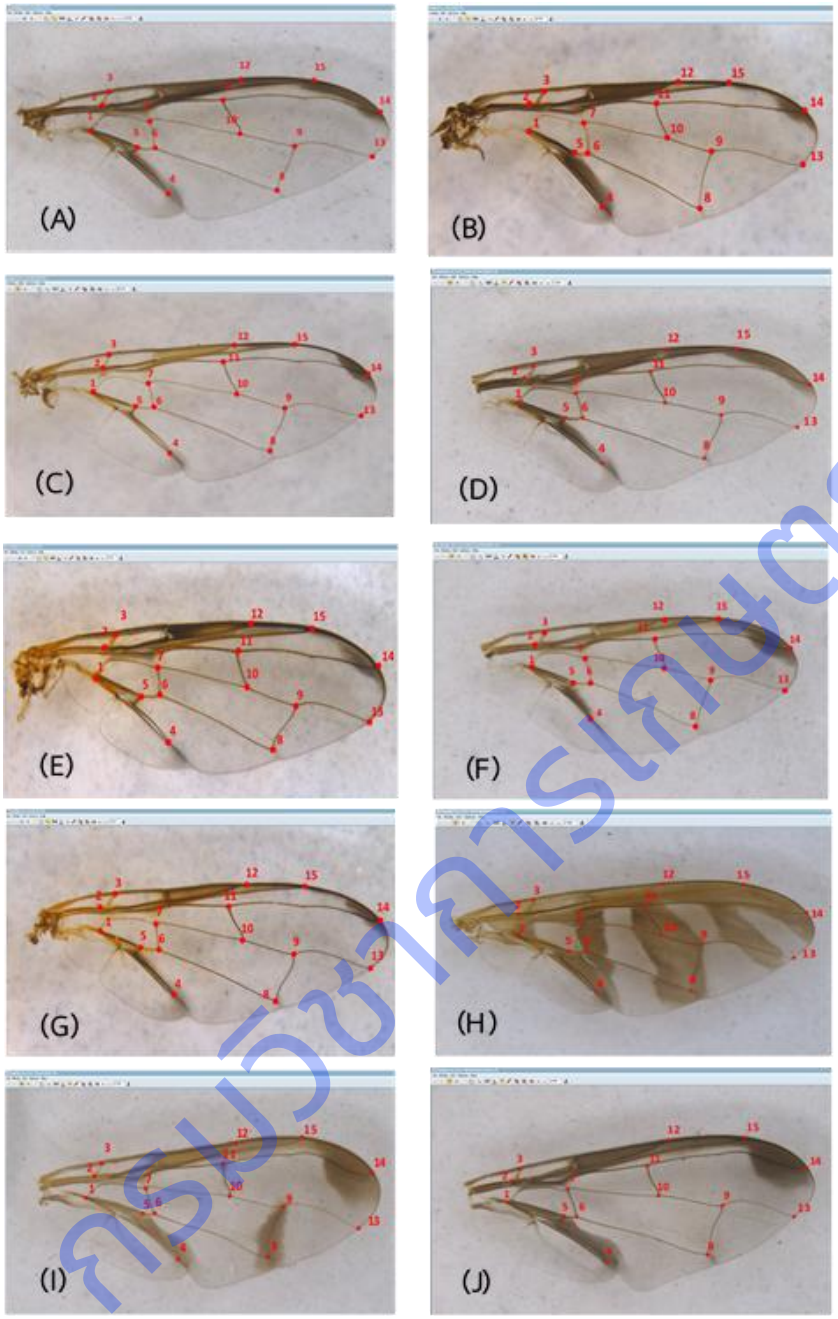


Figure 1.1.2.9 Right-hand wing of a Dacini fruit flies individual showing each of the 15 land marks used in the geometric morphometric analysis

(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

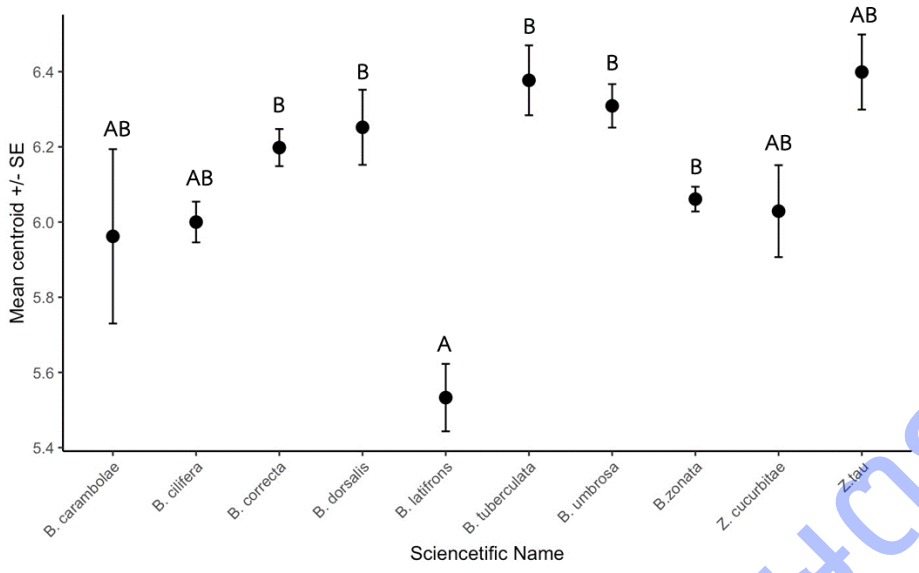


Figure 1.1.2.10 Mean (±SE) wing centroid size of Dacini fruit flies from ten species. Samples sharing the same letter are not statistically different from each other based on one-way ANOVA with a Tukey *post hoc* test ($F_{9, 190} = 6.495$; $P > 0.05$).

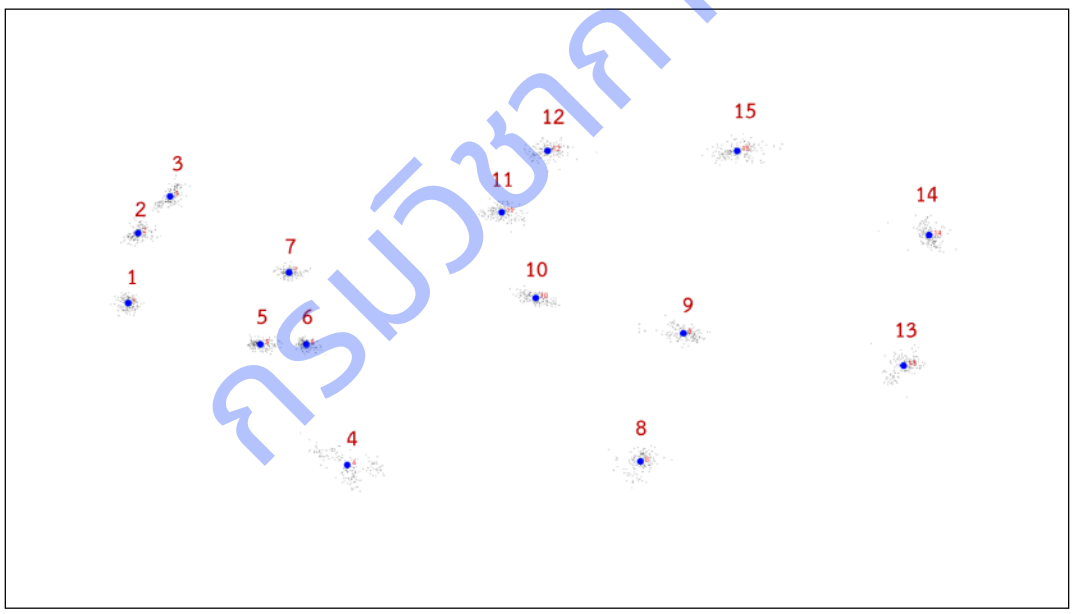


Figure 1.1.2.11 Procrustes superposition showing the variation of 15 landmarks of Dacini fruit flies wings from ten species. The figure shows the configurations of landmarks for which differences in position, scale and orientation have been removed. The position of the landmarks in relation to a real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

กรมวิชาการเกษตร

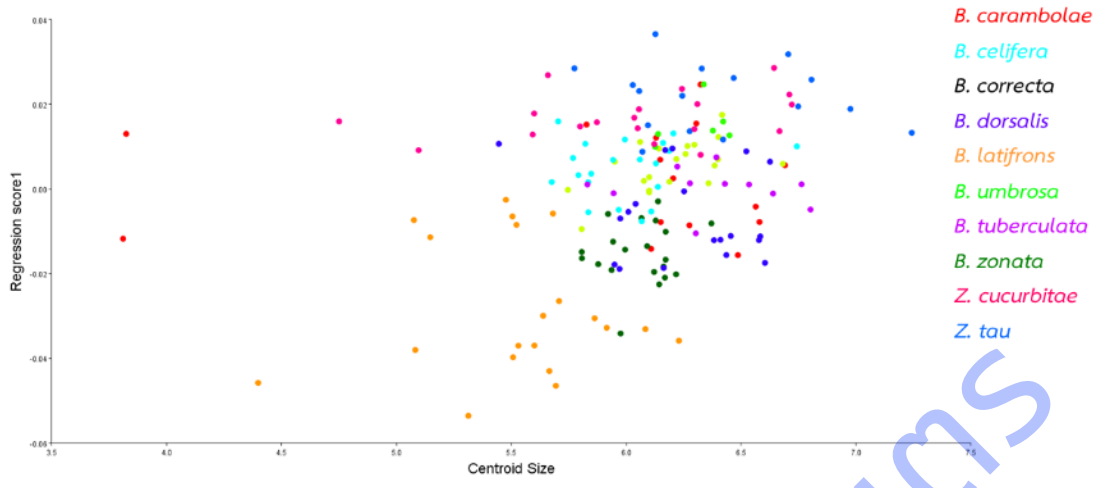


Figure 1.1.2.12 Multiple regression of wing shape (regression score one) on centroid size (a measure of wing size) from Dacini fruit flies. Each coloured dot represents the wing of a fly from one of the listed species.

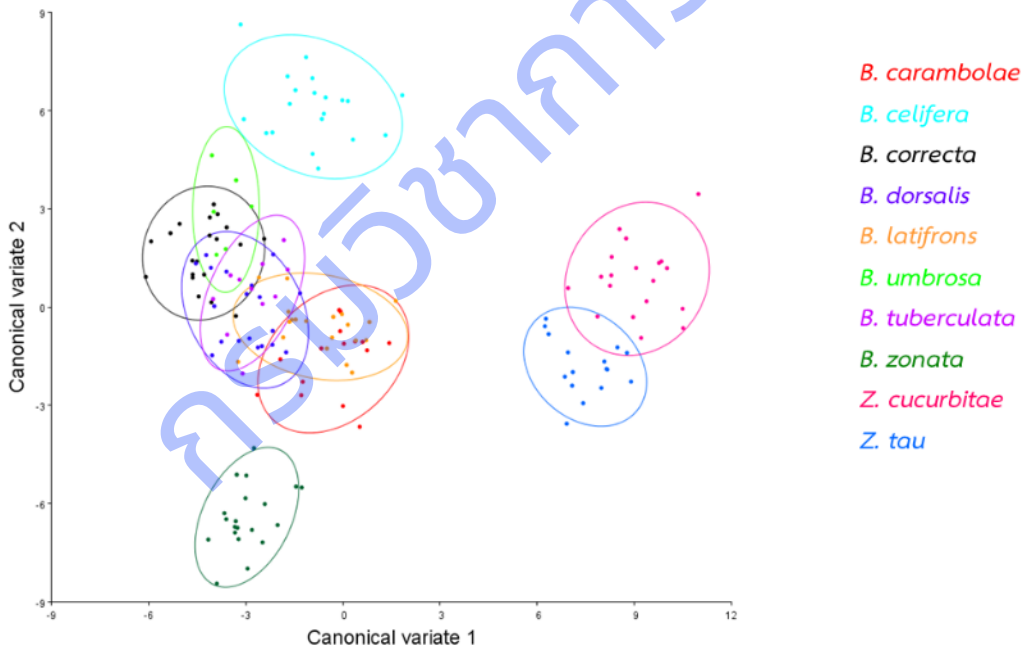
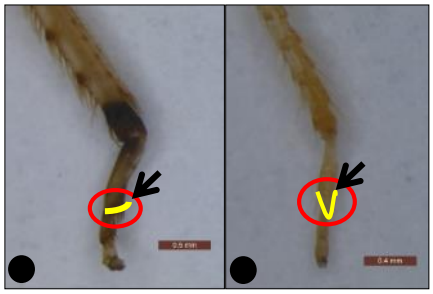


Figure 1.1.213 First two principal components resulting from CVA of wing shape data of Dacini fruit flies; 95% confidence ellipses are shown for each group. Each coloured dot represents the wing of a fly from one of the listed species.

กรมวิชาการเกษตร

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

กรมวิชาการเกษตร

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

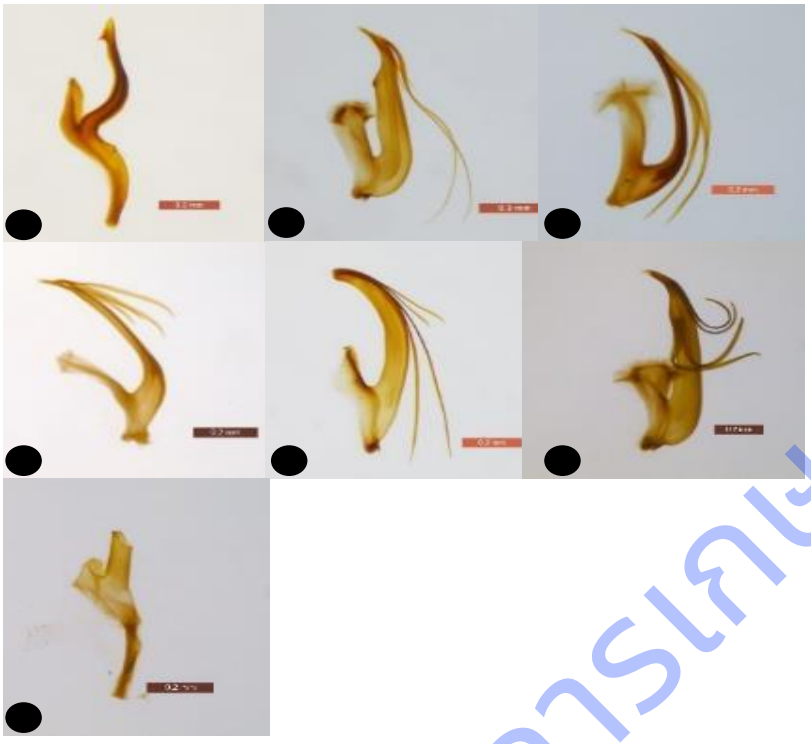
จ). *Idioscopus clypealis* (Lethierry)

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

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

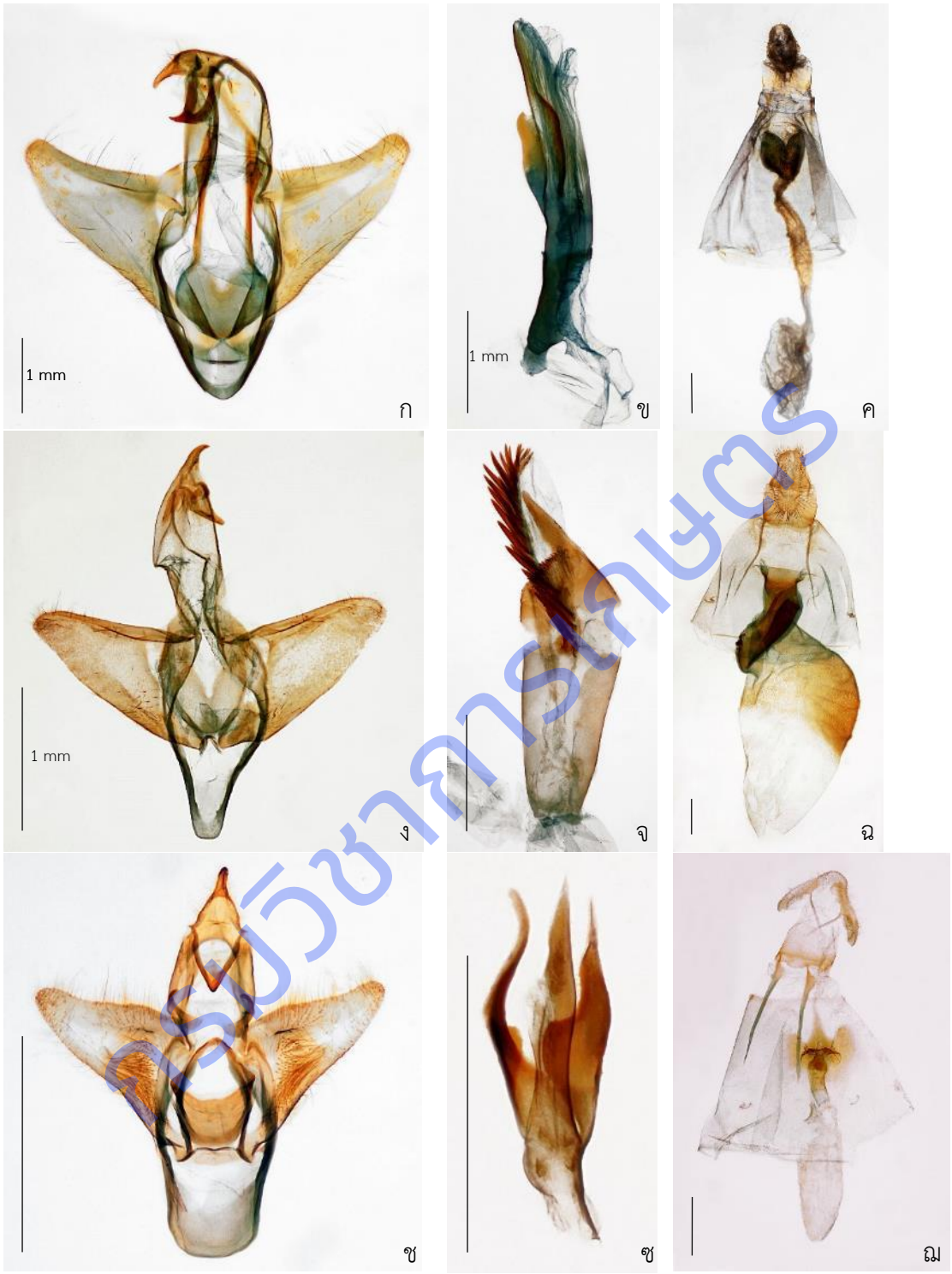
กรมวิชาการเกษตร

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

กรมวิชาการเกษตร

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

กรมวิชาการเกษตร

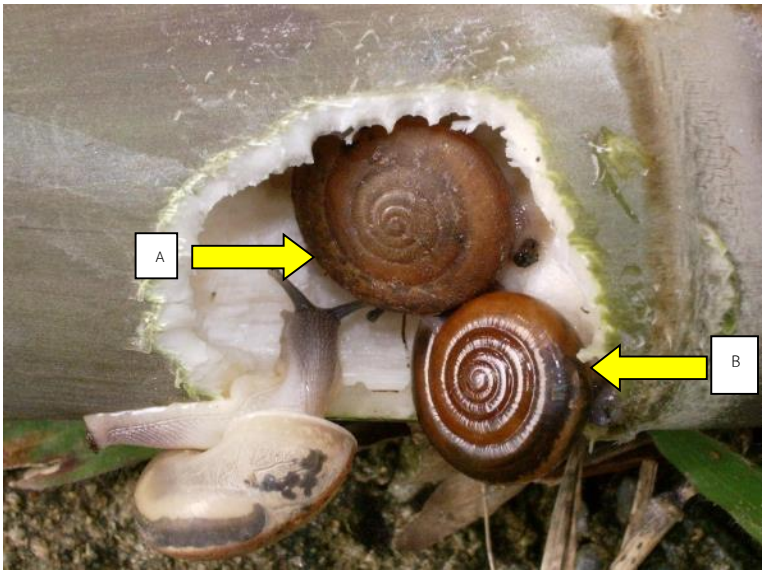


Figure 1.1.5.1 Two species of terrestrial pest snail , *Cryptozona siamensis* (A) and *Sarika* sp. (B) are feeding on bamboo plants in Chiangmai agricultural ecosystem.

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

ศรีนครินทรวิโรฒ

Figure 1.1.5.3 *Bradybeana similaris*

กรมวิทยาศาสตร์

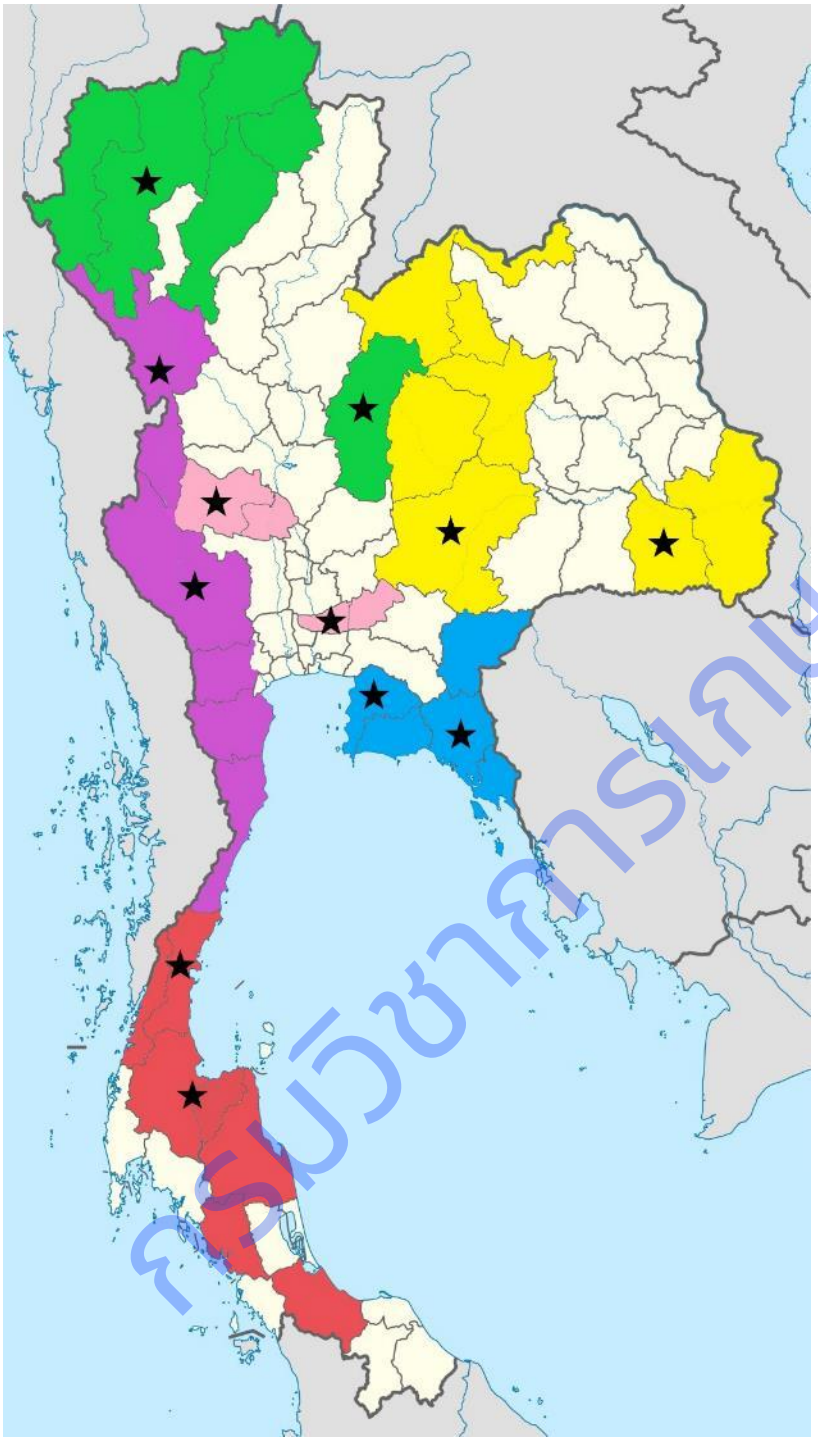


Figure 1.1.5.4 Species Diversity of Terrestrial Pest Snails in Agricultural Ecosystem and Environment in Thailand

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

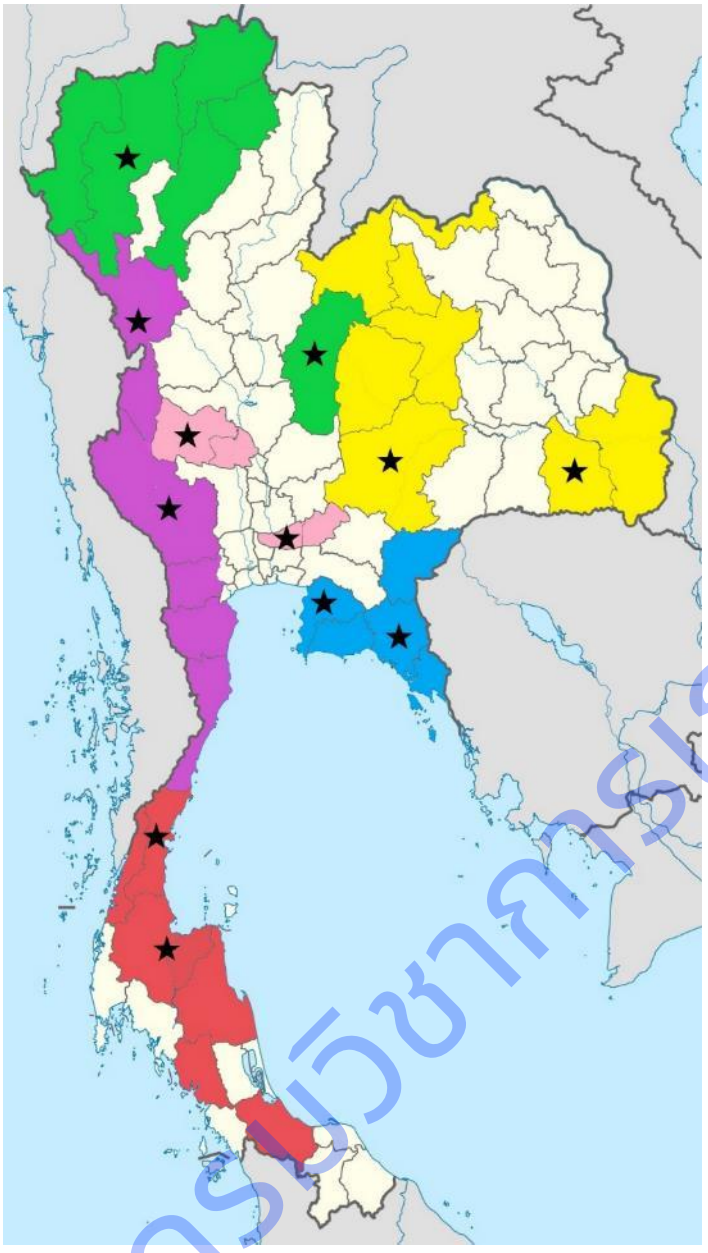


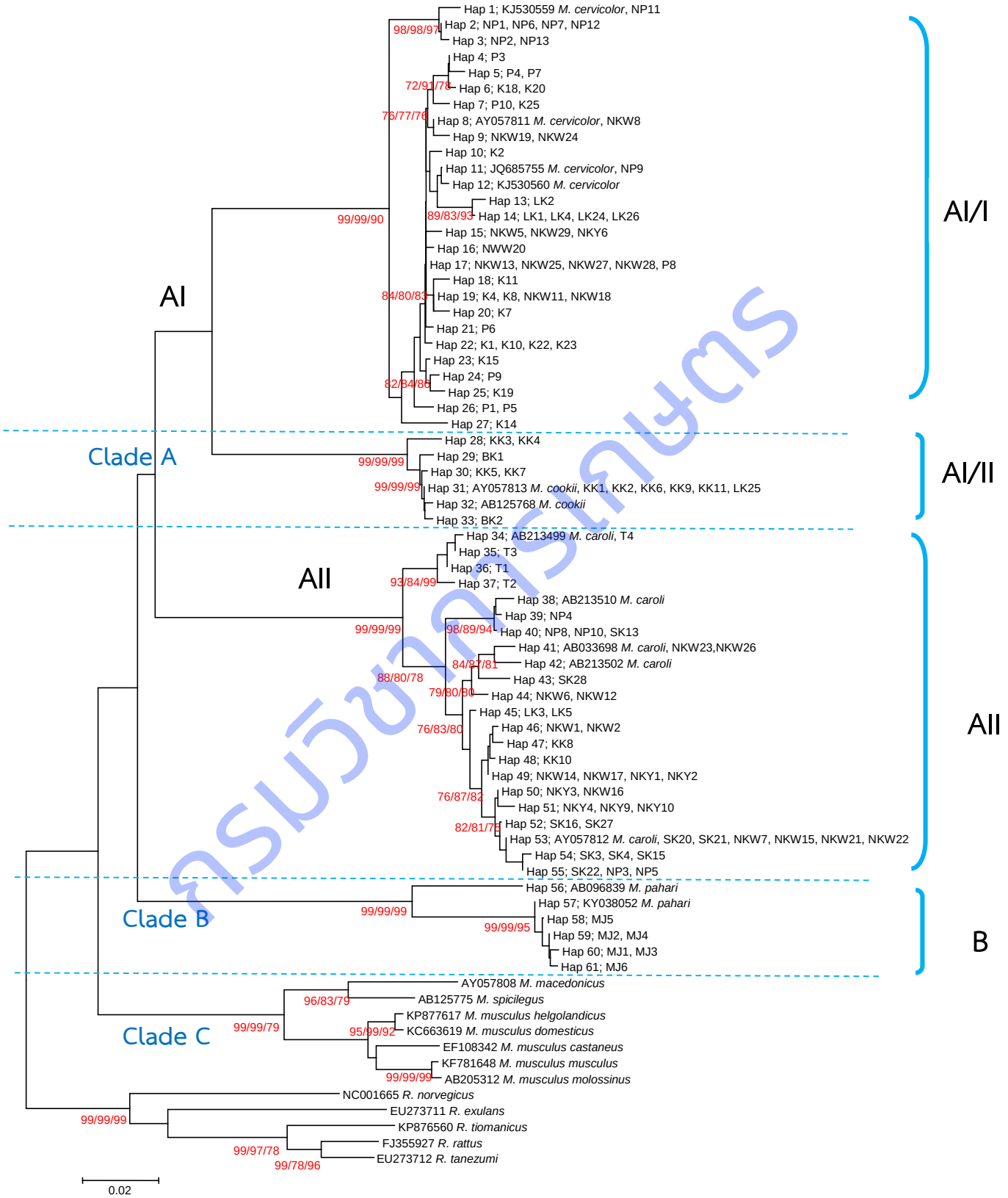
Figure 1.1.6.4 Species Diversity of Terrestrial Pest Snails in Agricultural Ecosystem and Environment in Thailand

กรมวิชาการเกษตร

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

Figure 1.1.7.2 หอย *Physella* sp. 2

กรมวิชาการเกษตร



ลิขสิทธิ์กรมวิทยาศาสตร์

Figure 1.1.8.1 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 1.1.8.2 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.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

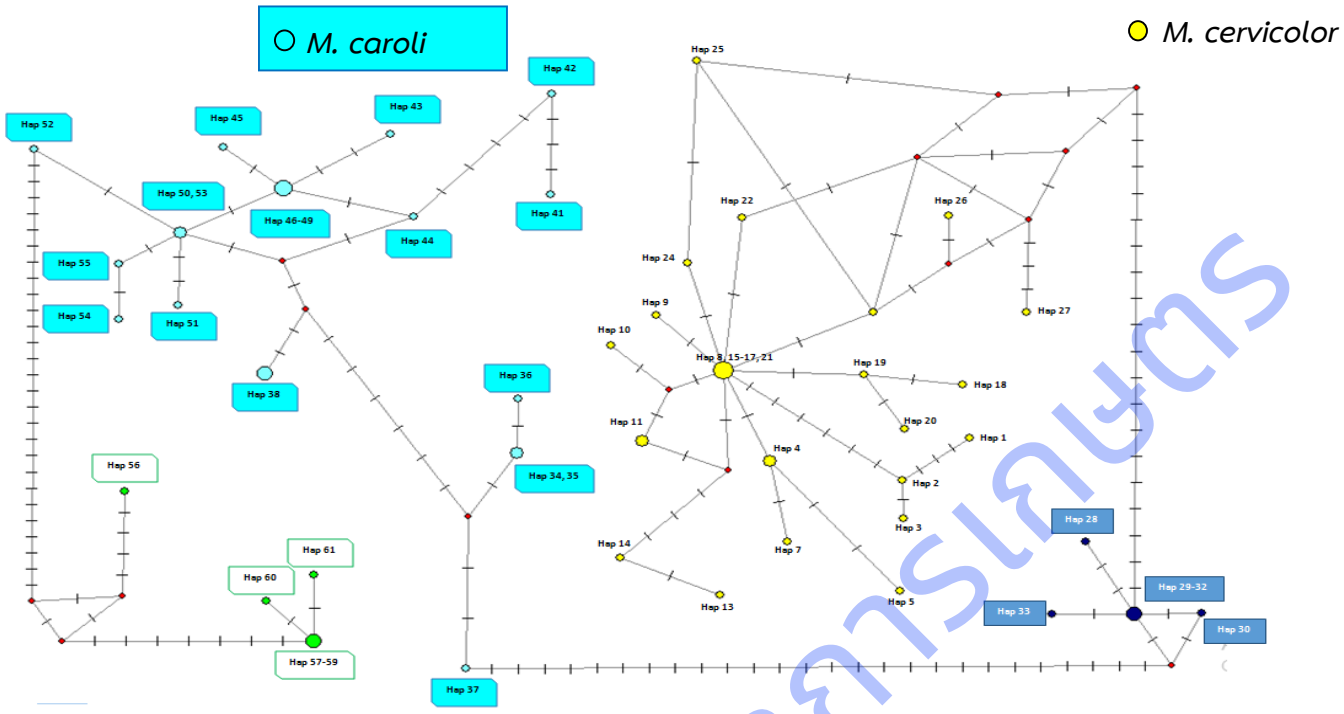


Figure 1.1.8.3 Haplotype network based on partial cytochrome *b* sequences (500 bp) reconstructed by Median-joining analysis (NETWORK 4.6.1.3 program). All haplotypes were plotted on to their sampling areas and haplotypes were represented by circles with diameter proportional to their population size.

M. pahari

M. cookii

กรมวิทยาศาสตร

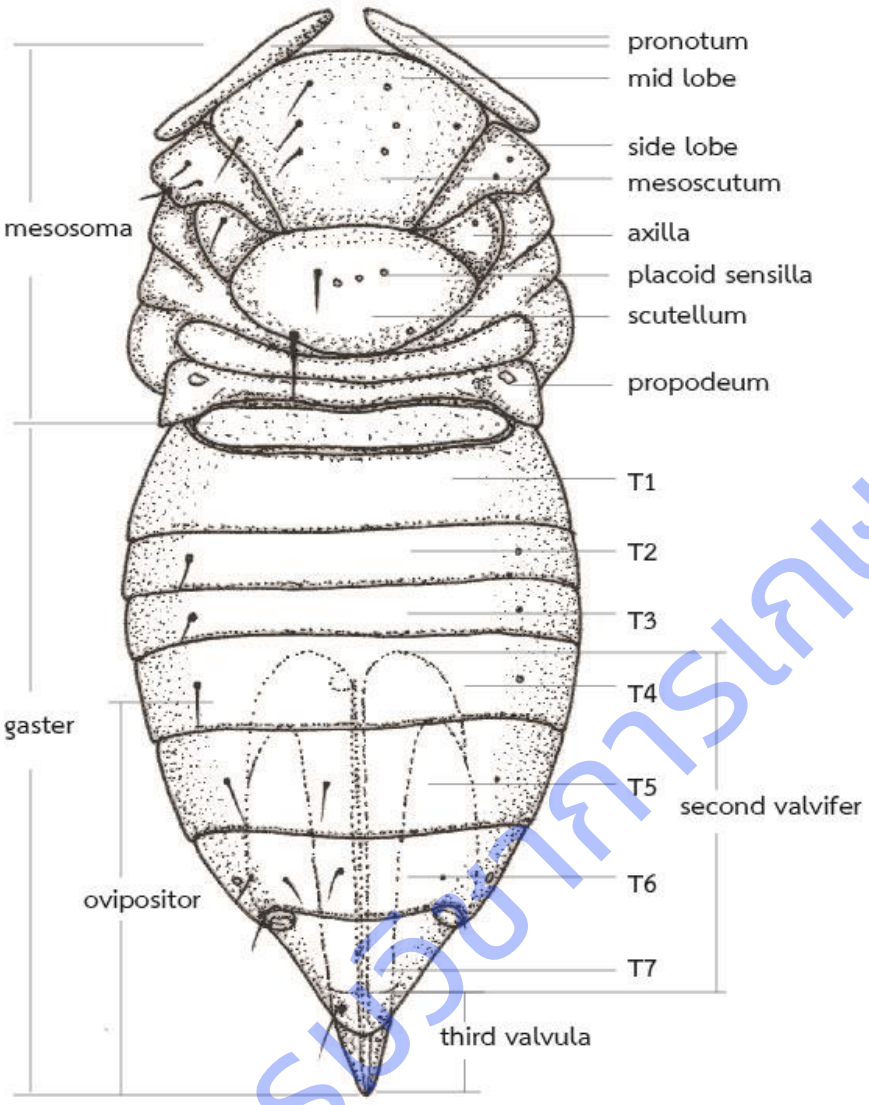
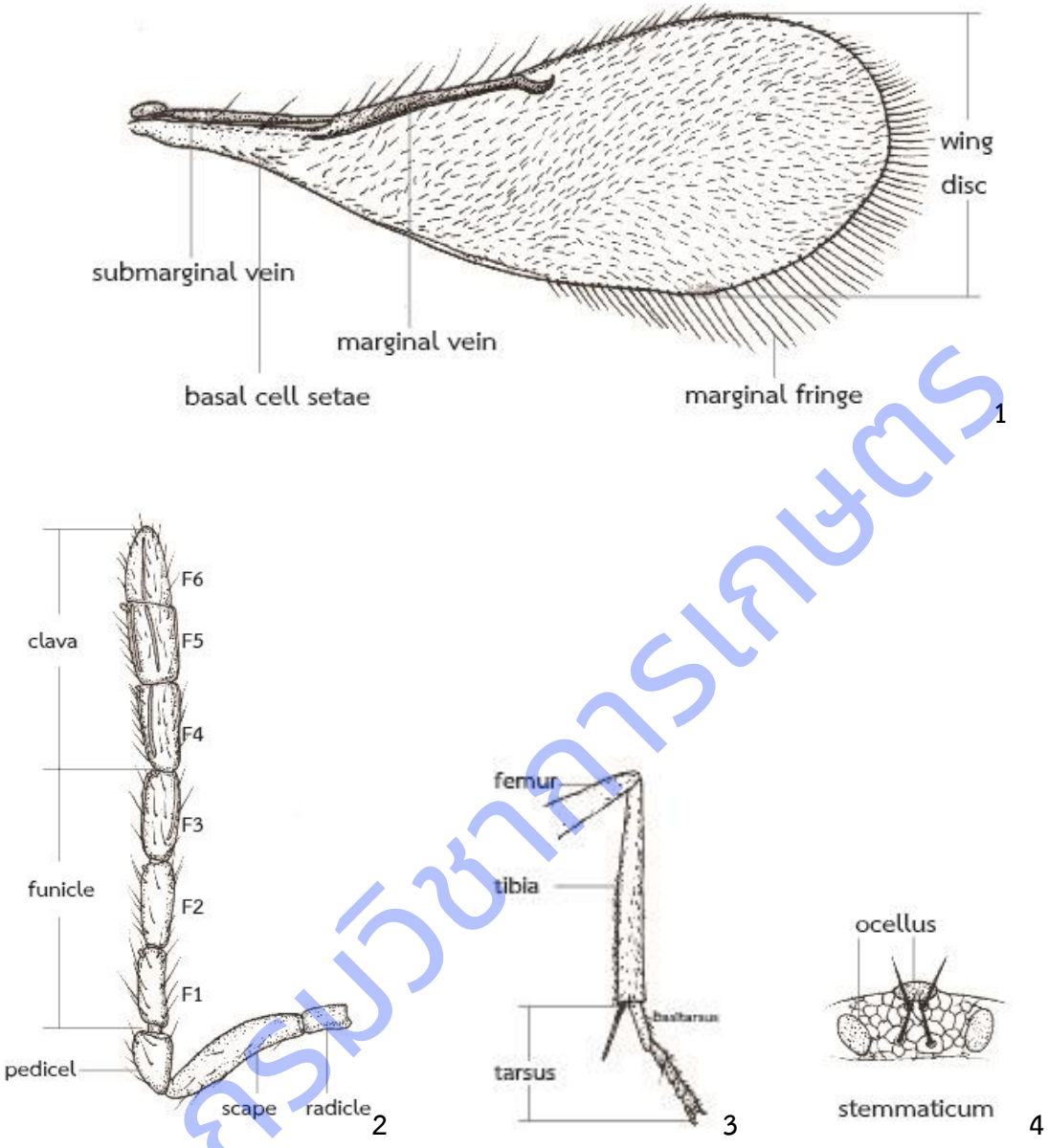


Figure 1.1.9.1. *Encarsia* general morphology; Mesosoma and Gaster (female). Image modified from Polaszek *et al.* (1999)

กรมวิชาการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

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)

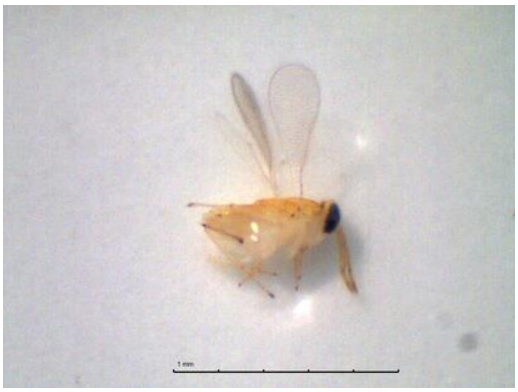


Figure 1.1.9.5. *Encarsia dispersa* Polaszek □ (Hymeoptera: Aphelinidae)

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

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

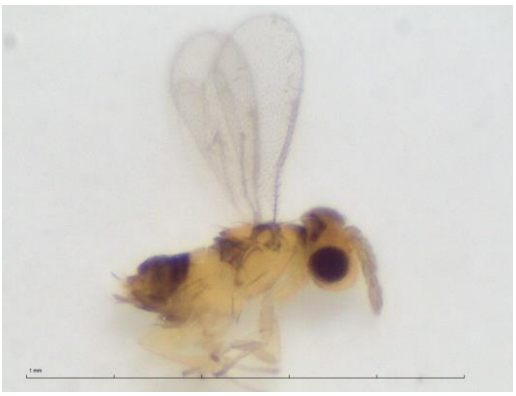


Figure 1.1.9.8. *Coccophagus* sp. (Hymenoptera: Aphilinidae), scale insect parasitoids

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.10.1. *Nobilinus albardae* (MacLachlan, 1875) male.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.10.2. *Ankylopteryx* (*Ankylopteryx*) *octopunctata* (Fabricius, 1793) male.

Figure 1.1.10.3. *Ankylopteryx* (*Sencera*) *anomala* Brauer, 1864 male.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.10.4. *Evanochrysa evanescens* (MacLachlan, 1869) male (left) female (right).

Figure 1.1.10.5. *Italochrysa aequalis* (Walker, 1853) male (left) female (right).

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.10.6. *Italochrysa japonica* (MacLachlan, 1875) male.

Figure 1.1.10.7 *Mallada basalis* (Walker, 1853) male (left) female (right).

กรมวิชาการเกษตร

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

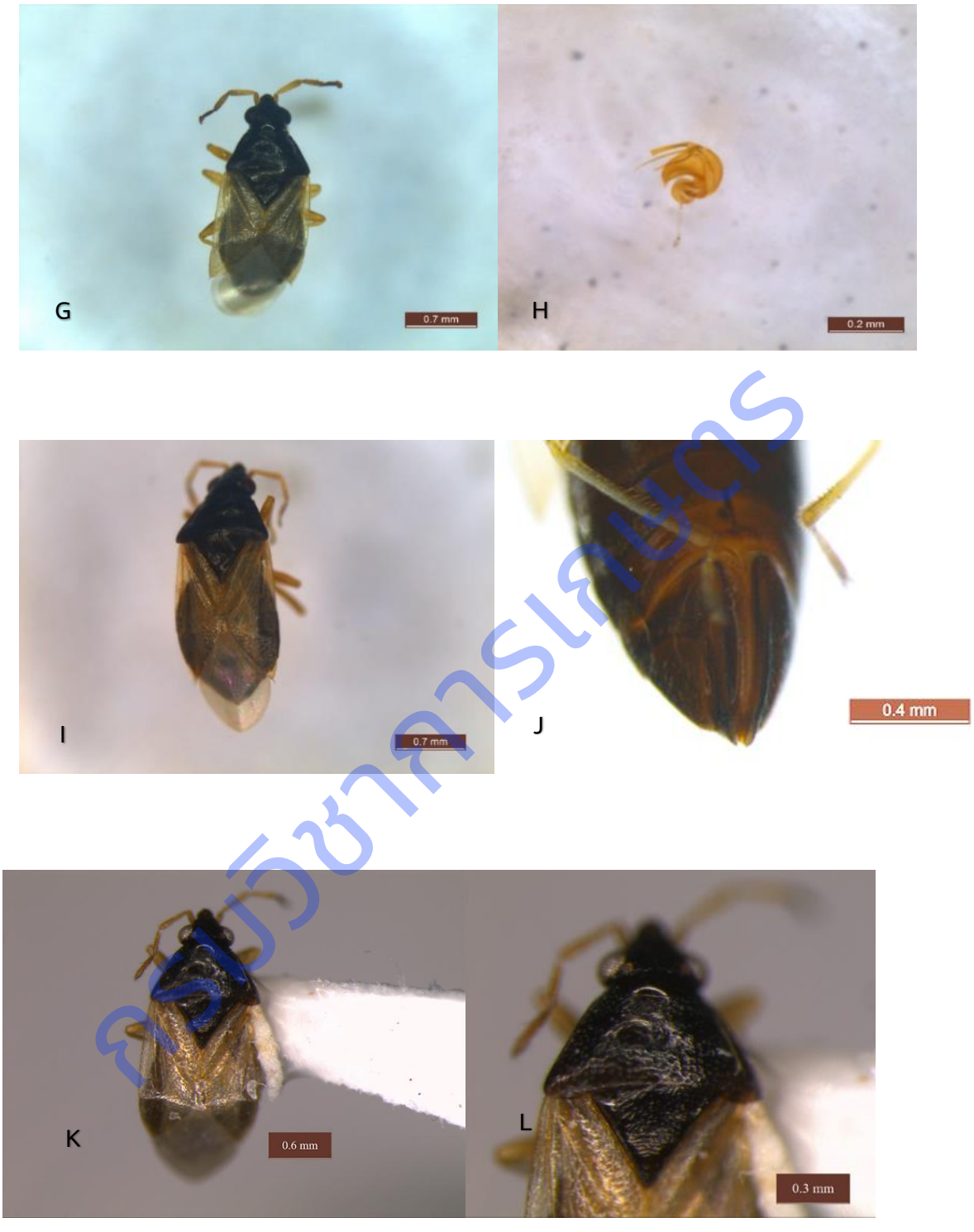


Figure 1.1.11G-L) *O. tantillus* G) male H) male genitalia (male paramere) I) female J) female genitalia J) body adult J) pronotum

ศูนย์วิทยทรัพยากร

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.11M-R) *O. maxidentex* M) male N) male genitalia (male paramere) O) female P) female genitalia Q) body adult R) pronotum

Figure 1.1.11S-V) *O. minutus* S) male T) male genitalia (male paramere) U) body adult V) pronotum

กรมวิชาการเกษตร

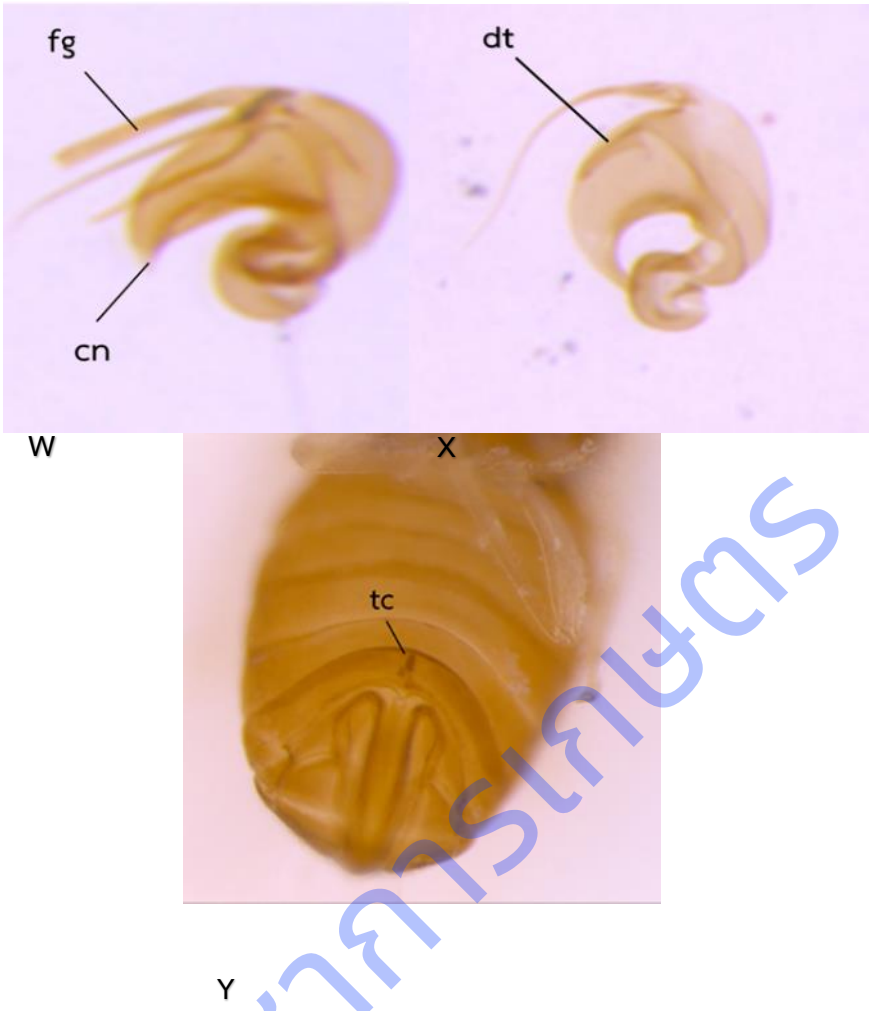


Figure 1.1.11W-Y) genitalia W,X) male paramere; fg: flagellum, cn: cone, dt: denticule
Y) female genitalia; tc: copulatory tube

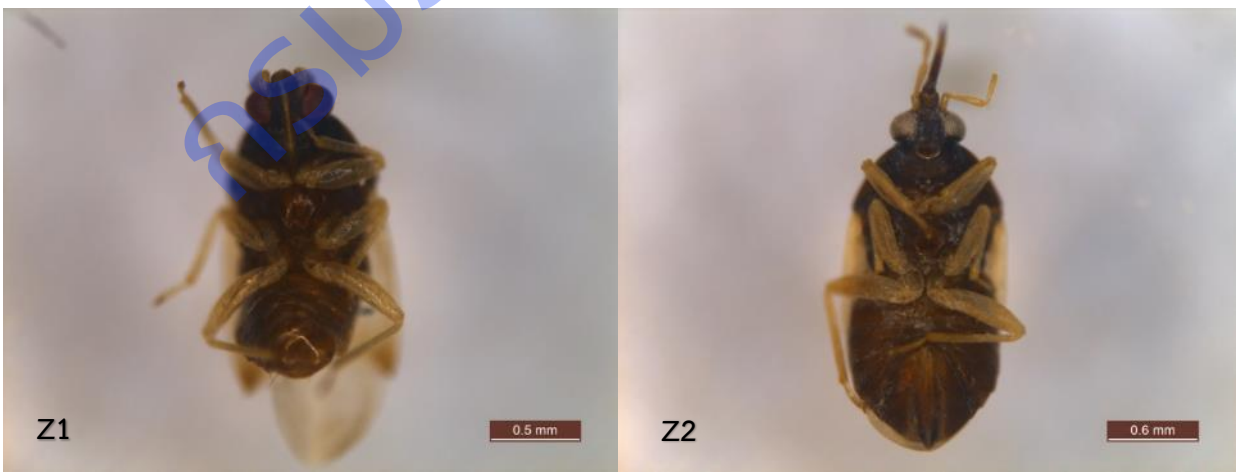


Figure 1.1.11Z1-Z2) adult Z1) male Z2) female

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.12.1 Aphids collected from various vegetable (Family Cucurbitae, Brassicaceae, Solanaceae and Leguminose) growing areas.

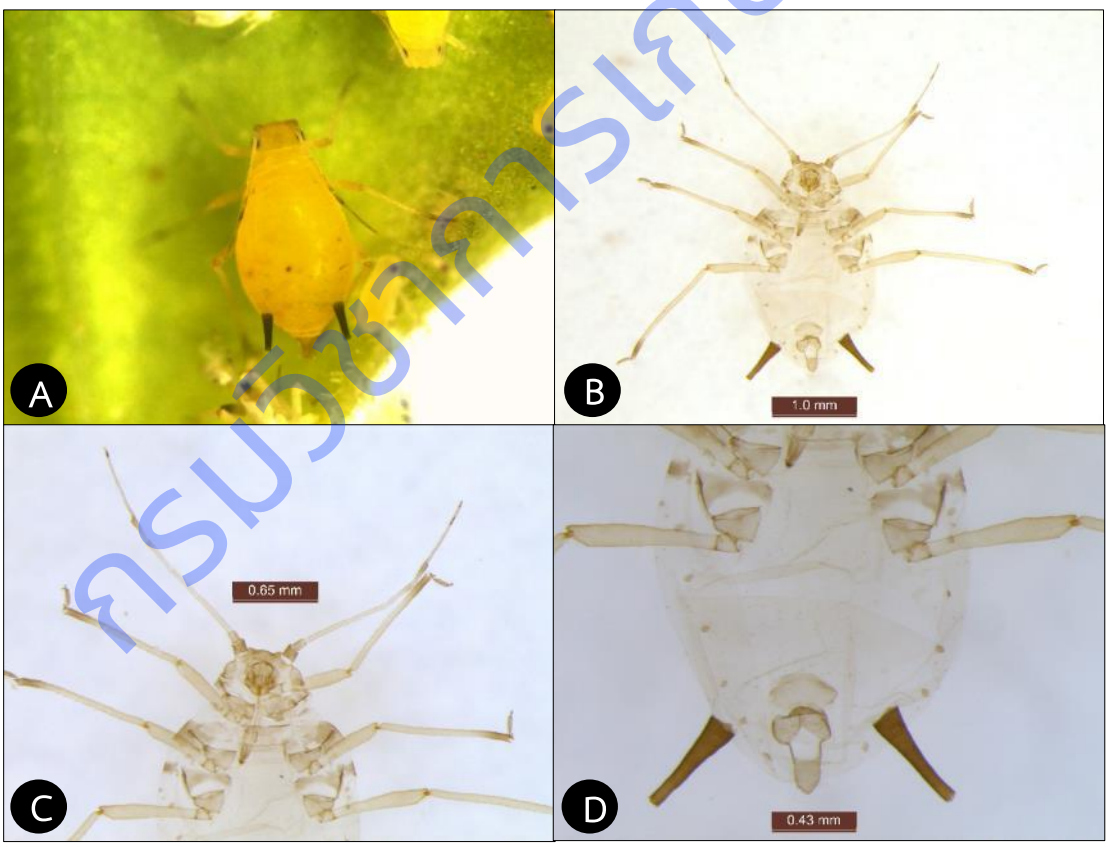


Figure 1.1.12.2 *Aphis gossypii* Glover**;** A. dorsal view of the body, B. dorsal view of the body on slide C. head, D. caudal and siphunculi on slide.

กรมวิชาการเกษตร

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

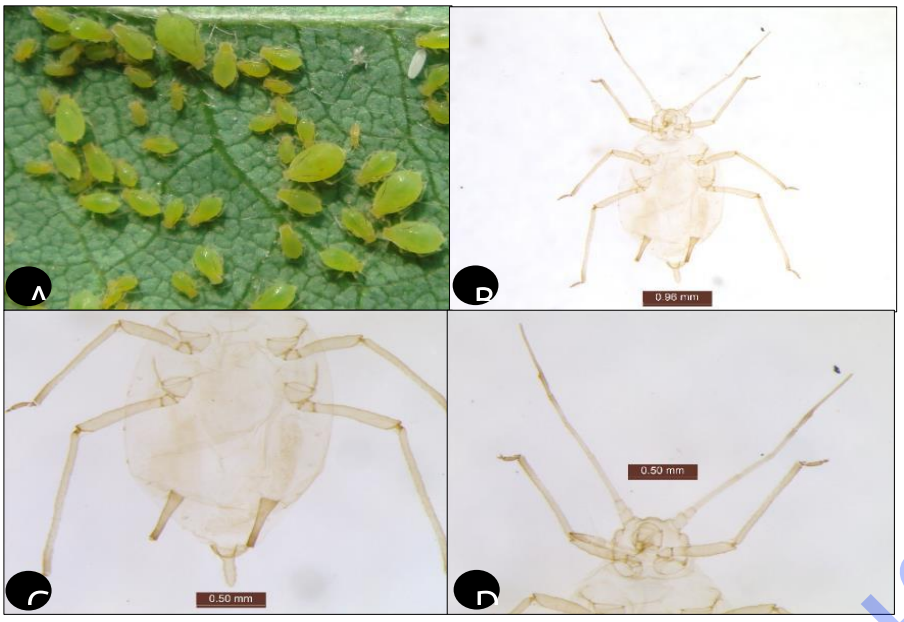


Figure 1.1.12.4 *Aphis glycine* Matsumura**;** A. dorsal view of the body, B. dorsal view of the body on Slide C. caudal and siphunculi on slide D. head

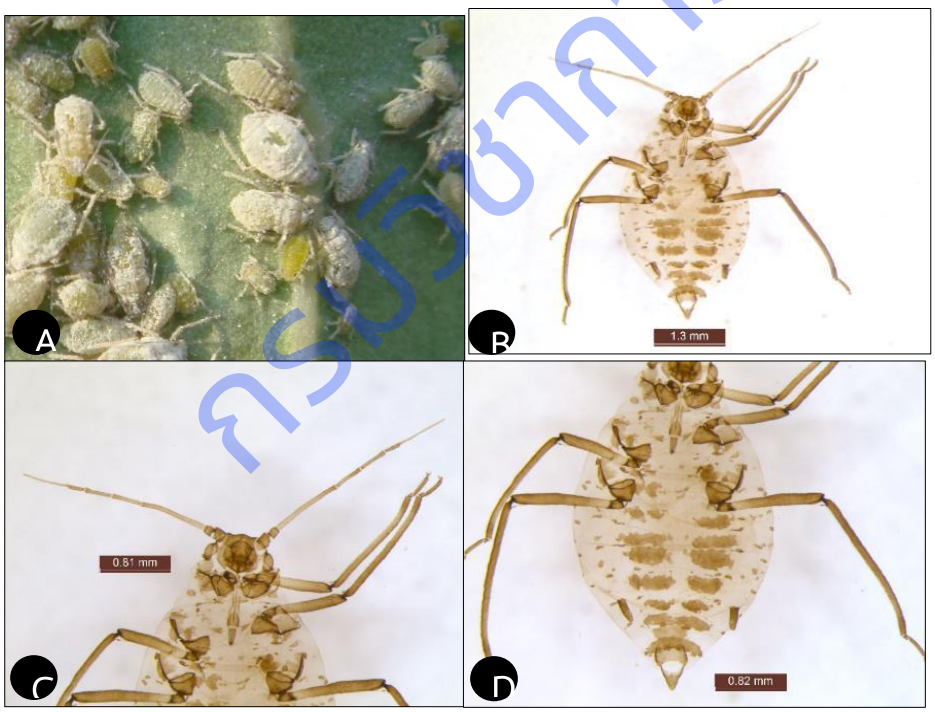


Figure 1.1.12.5 *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus)**;** A. dorsal view of the body, B. dorsal view of the body on slide C. head, D. caudal and siphunculi on slide.

กรมวิชาการเกษตร

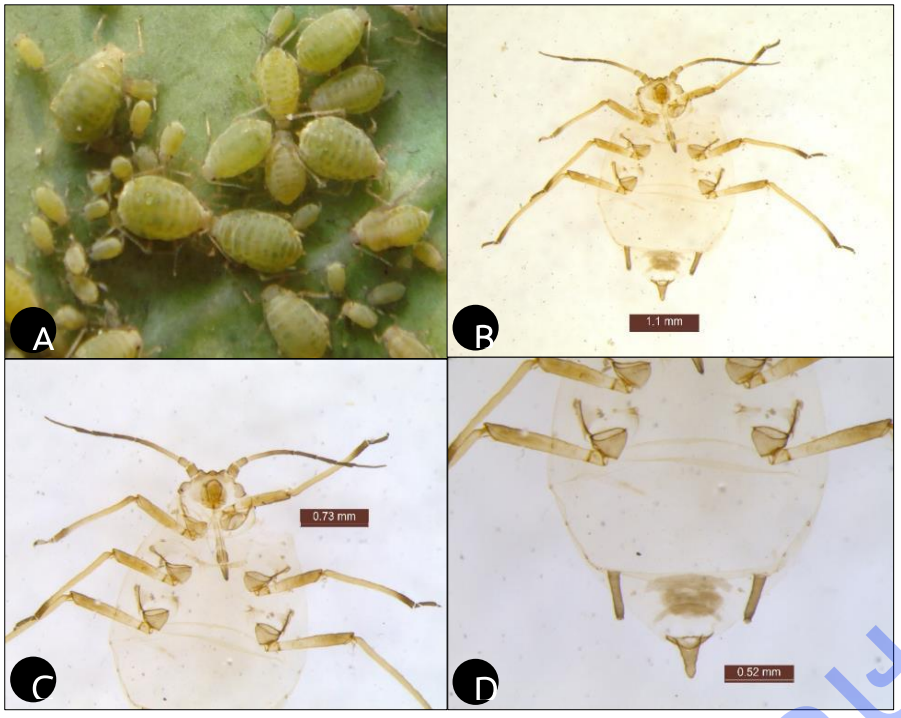


Figure 1.1.12.6 *Lipaphis erysimi* Kaltenbach**;** A. dorsal view of the body, B. dorsal view of the

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

Figure 1.1.13A-B) collecting *Nysius* sp.

กรมวิชาการเกษตร

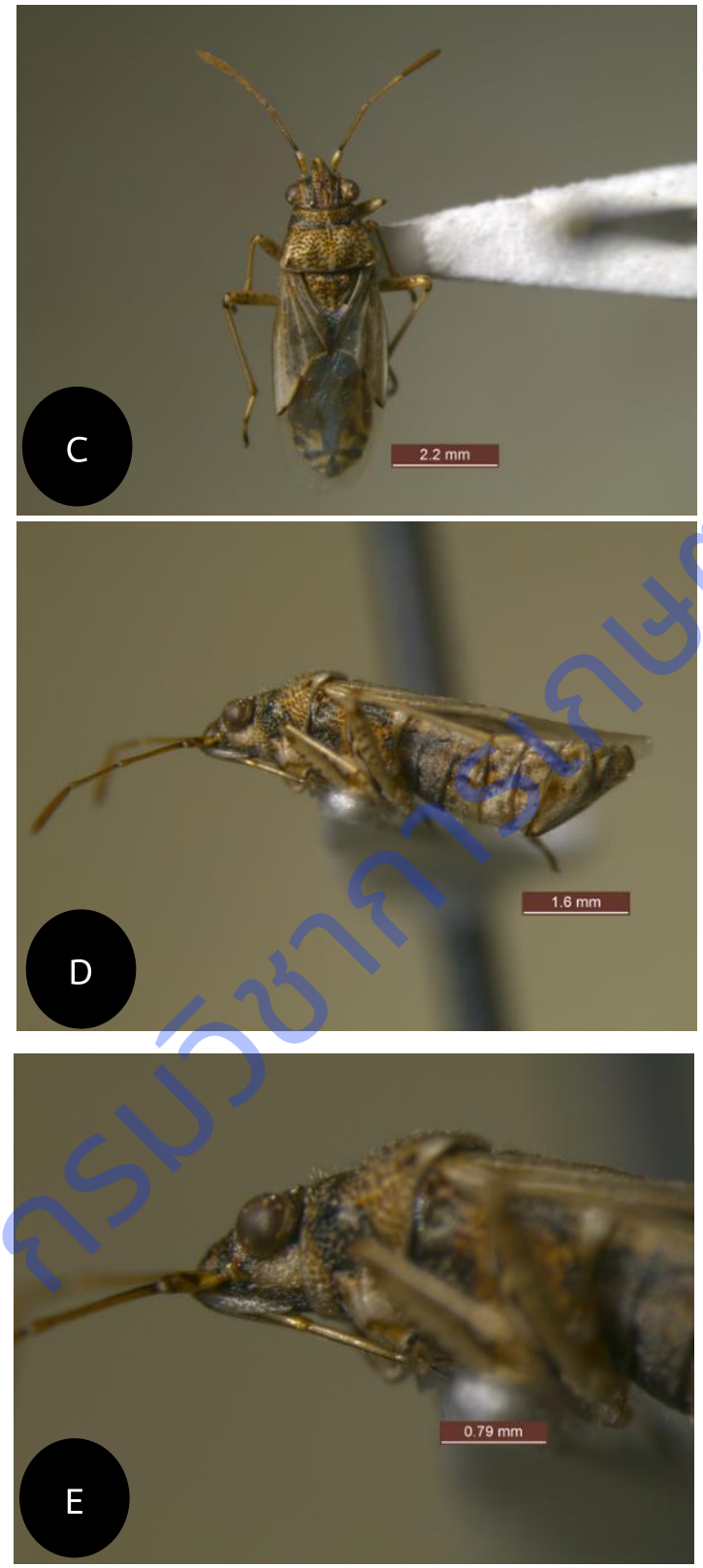


Figure 1.1.13C-E) *Nysius* sp. C) dorsal habitus; D) lateral habitus; E) head and pronotum habitus.

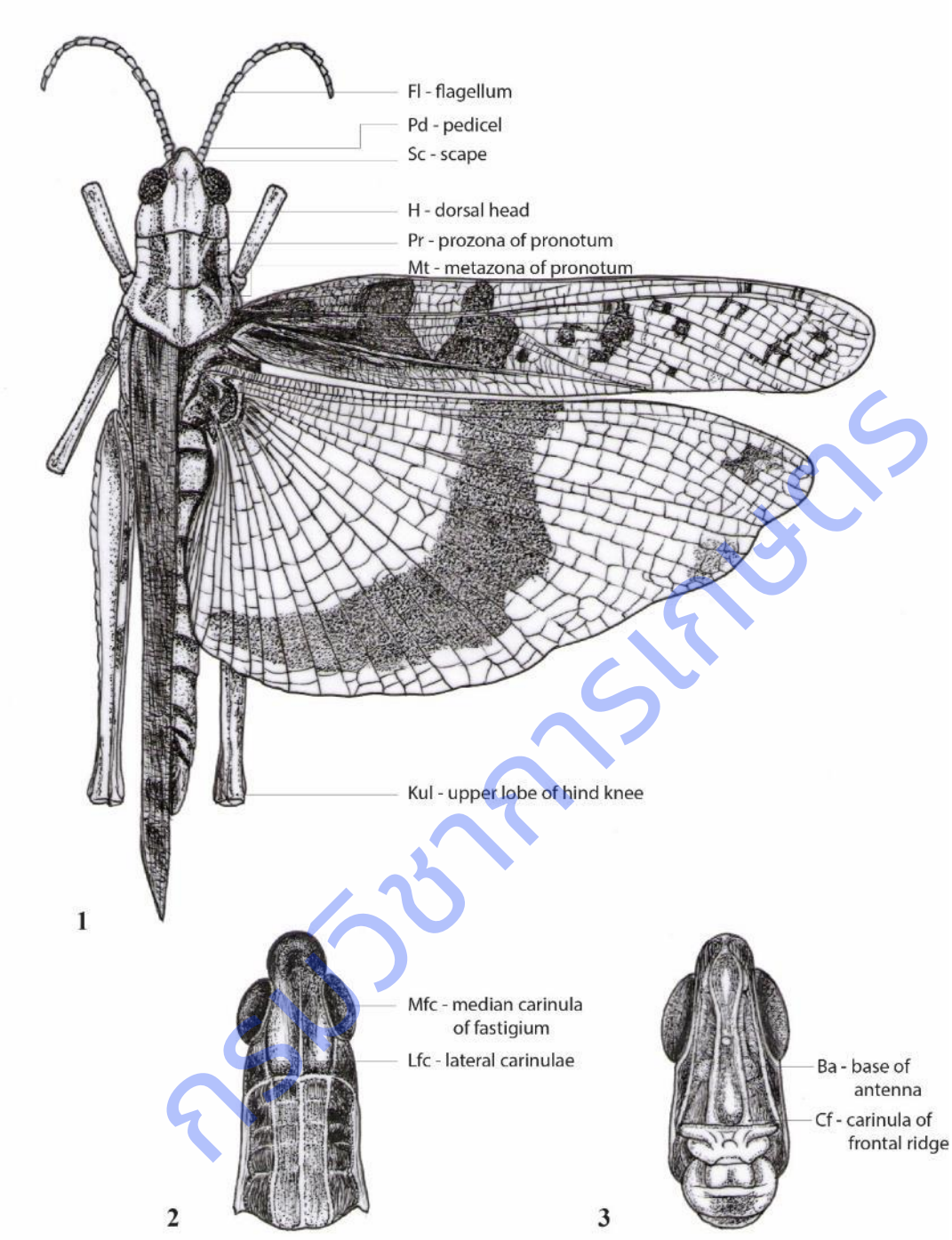
กรมวิชาการเกษตร

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



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)

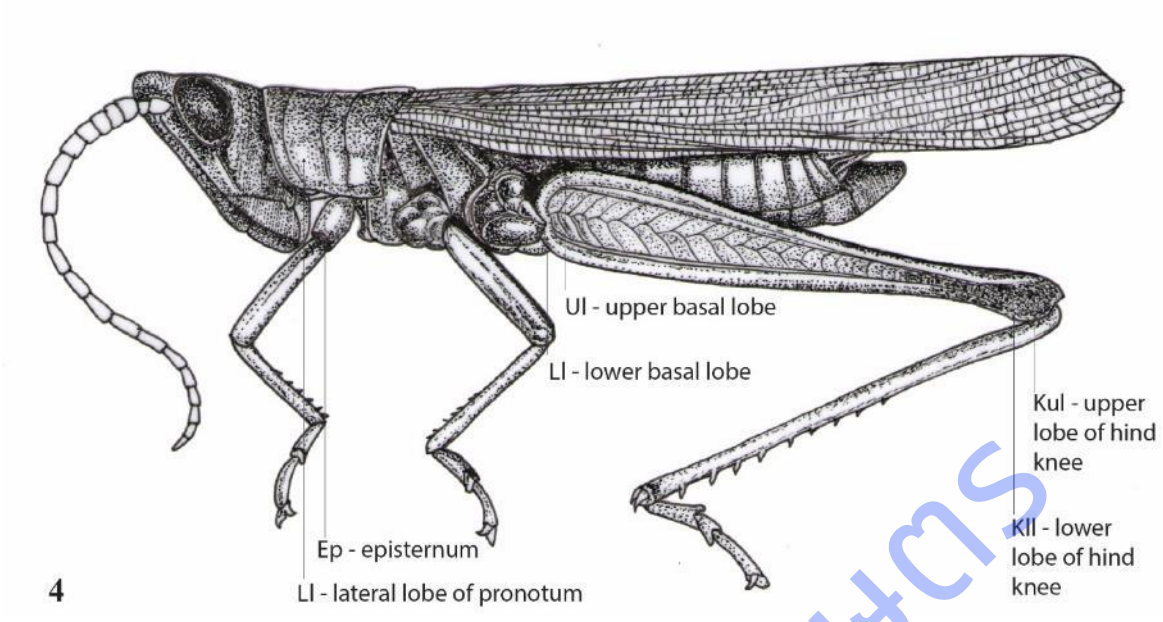
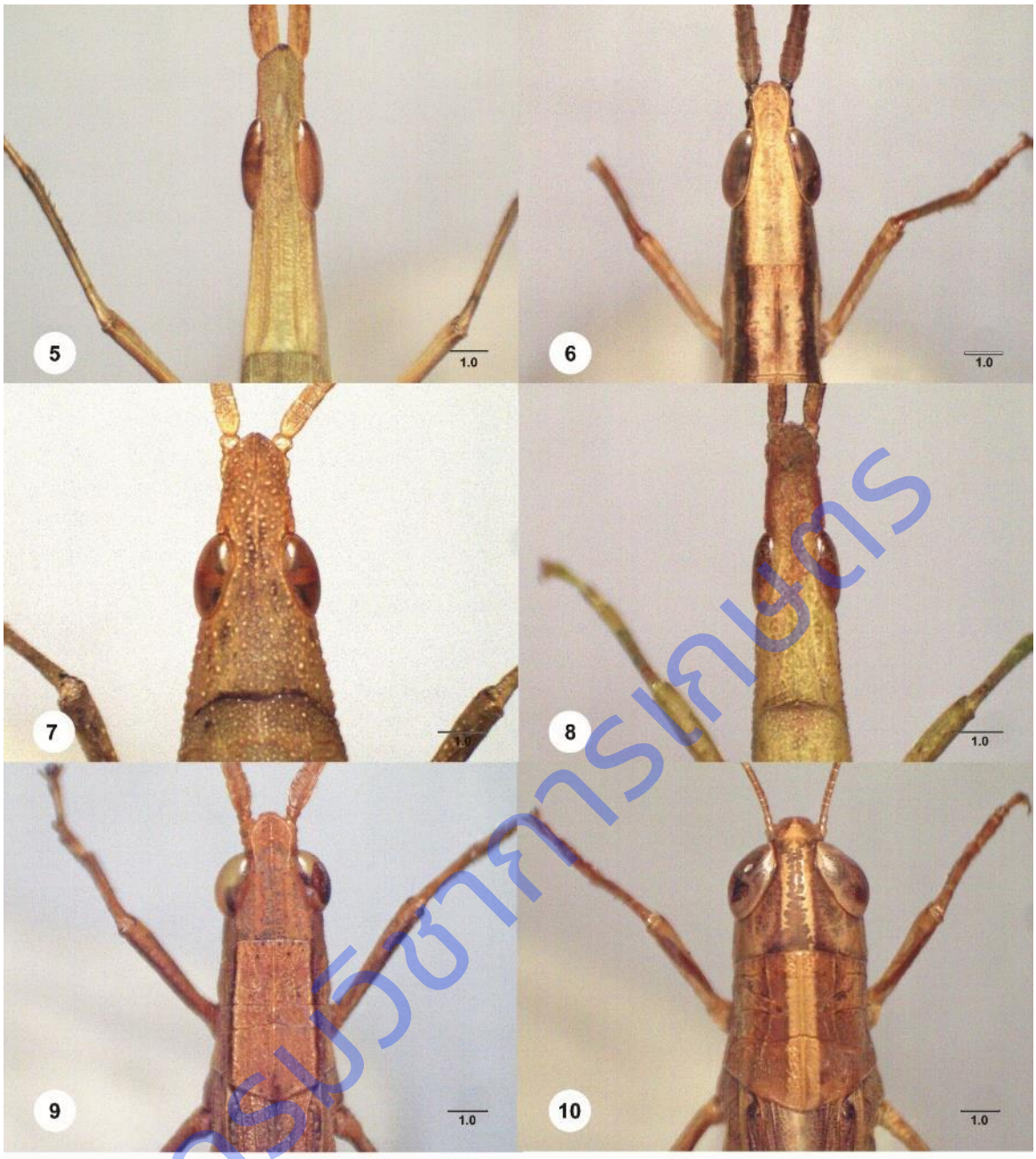


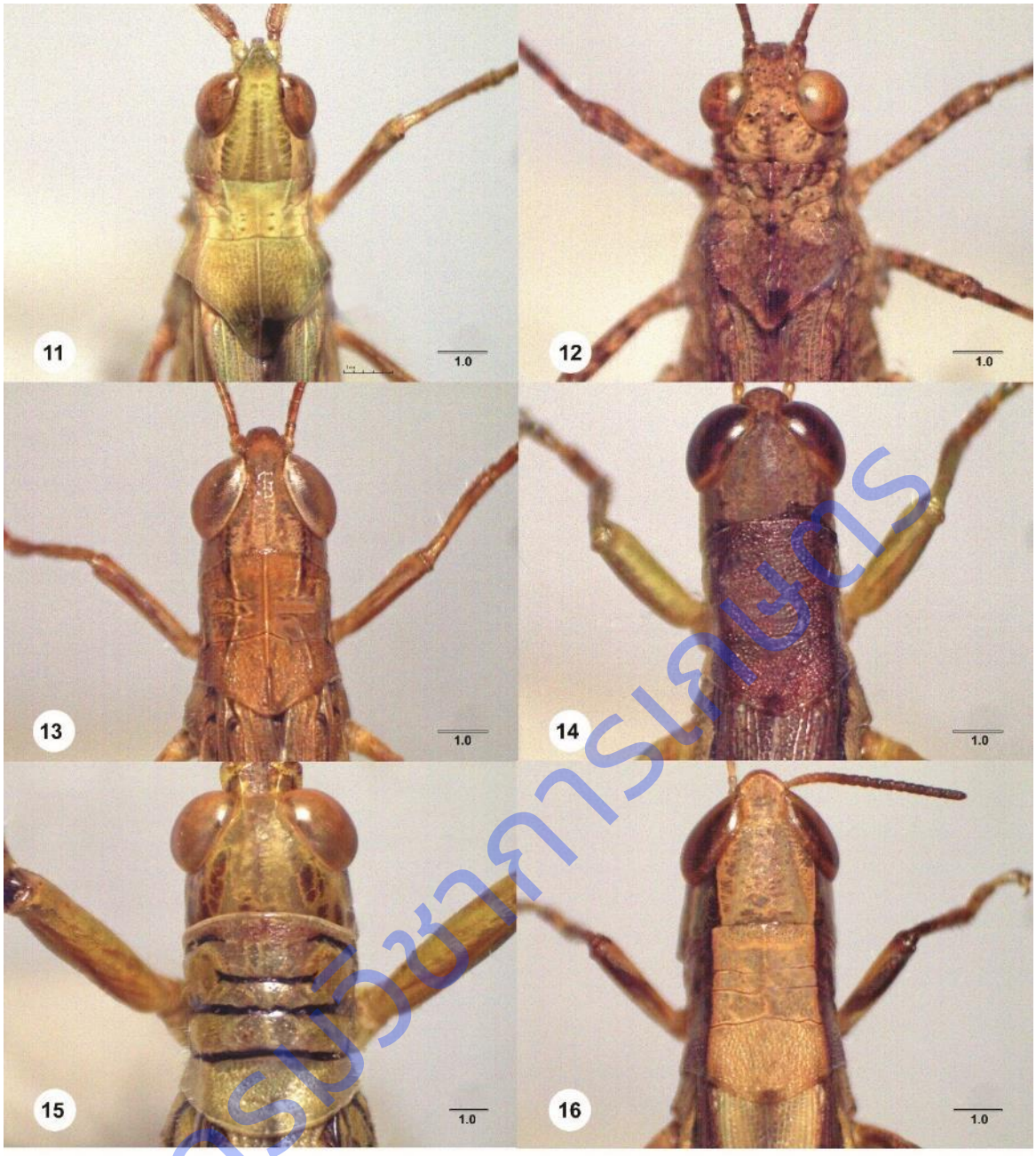
Figure 1.1.14.4. Grasshopper morphology; lateral habitus of body, Image modified from Dirsh (1965)

กรมวิชาการเกษตร



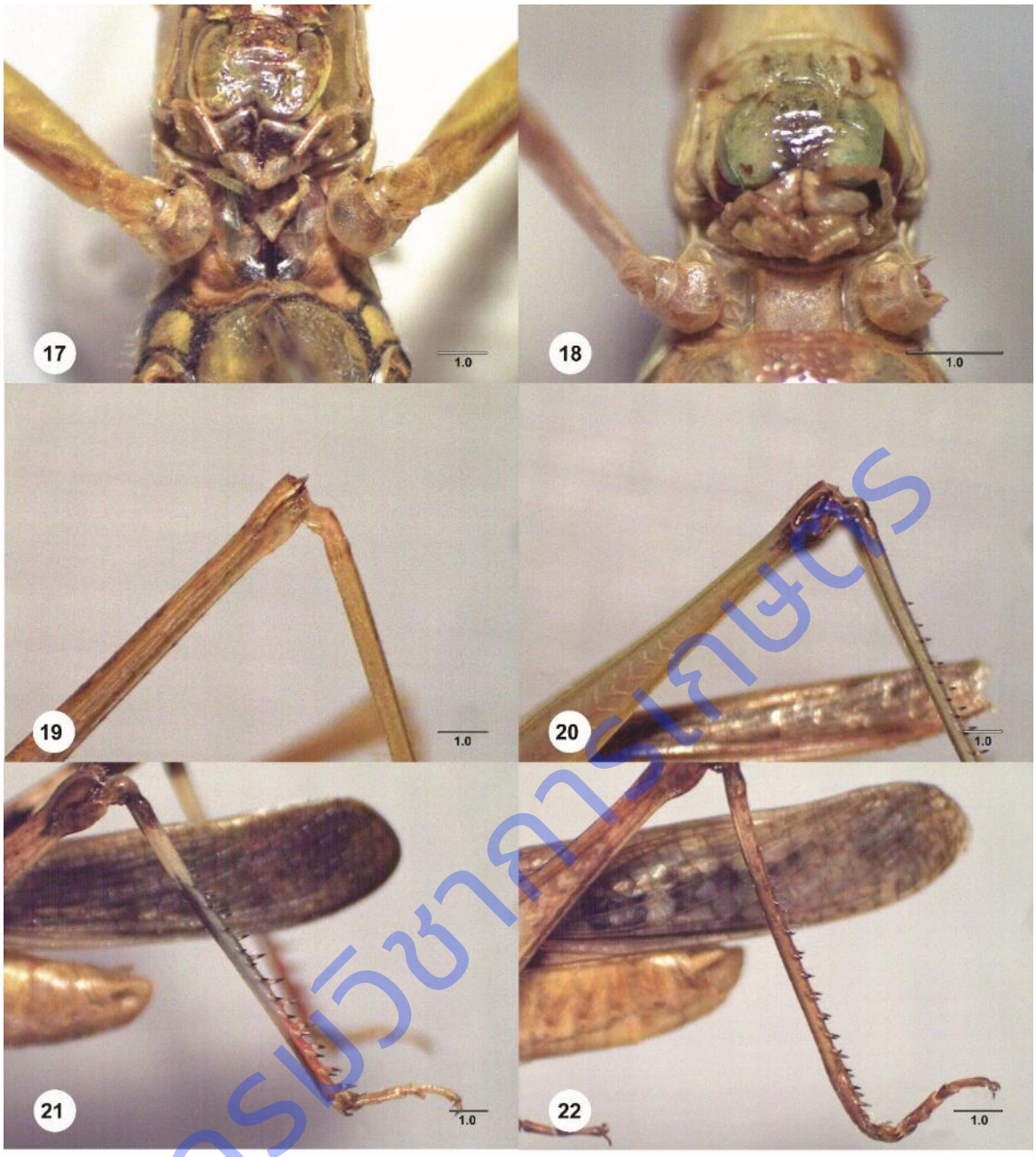
Figures 1.1.14.5 – 1.1.14.10. Head, dorsal view. 5, *Acrida willemsei* Dirsh; 6, *Gonista bicolor* (De Haan); 7, *Atractomorpha crenulata* (Fabricius); 8, *Atractomorpha psittacina* (De Haan); 9, *Phlaeoba antennata* Brunner; 10, *Phlaeoba infumata* Brunner. Scale bar in millimeters.

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.

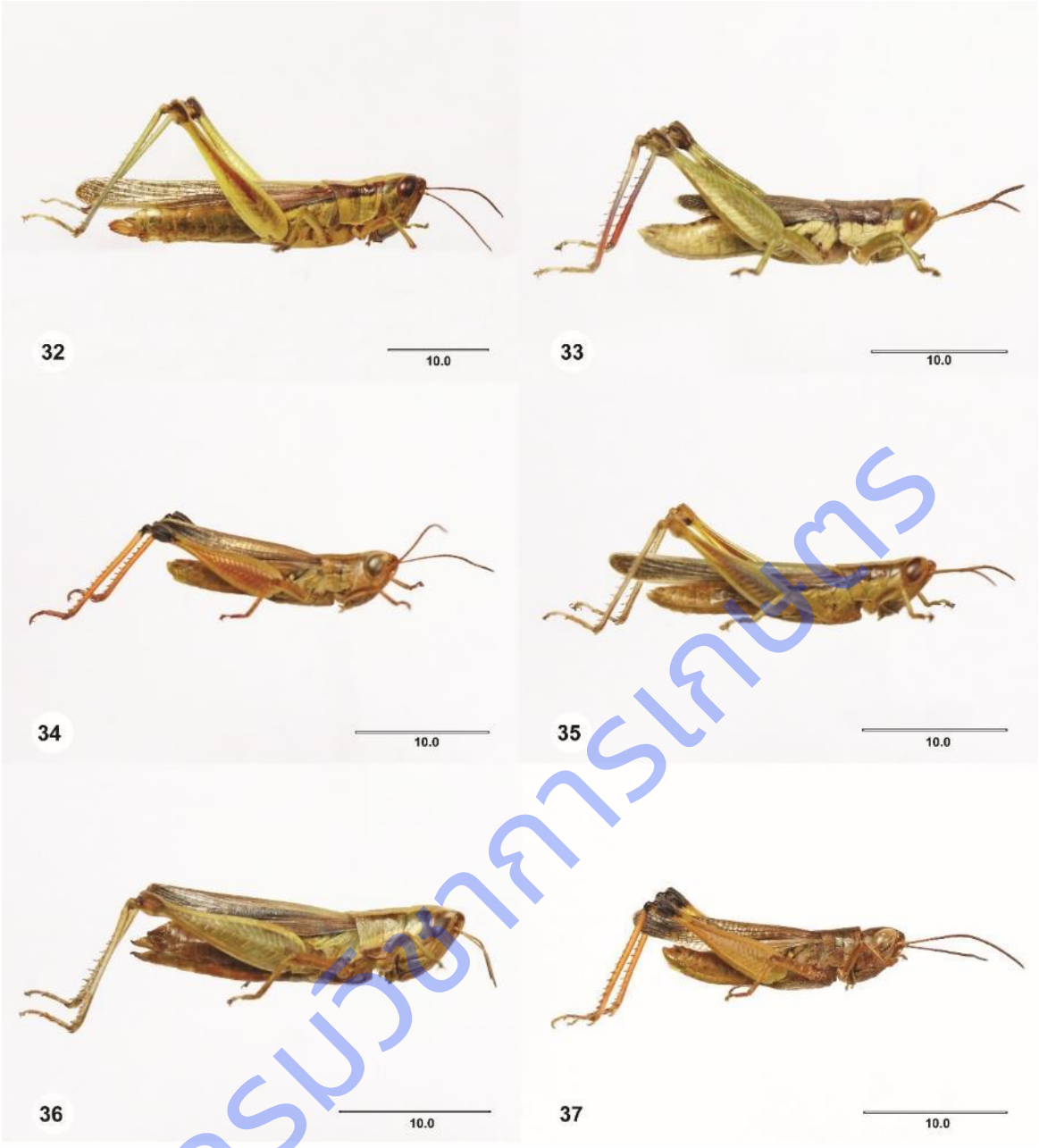
กรมวิชาการเกษตร

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.

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

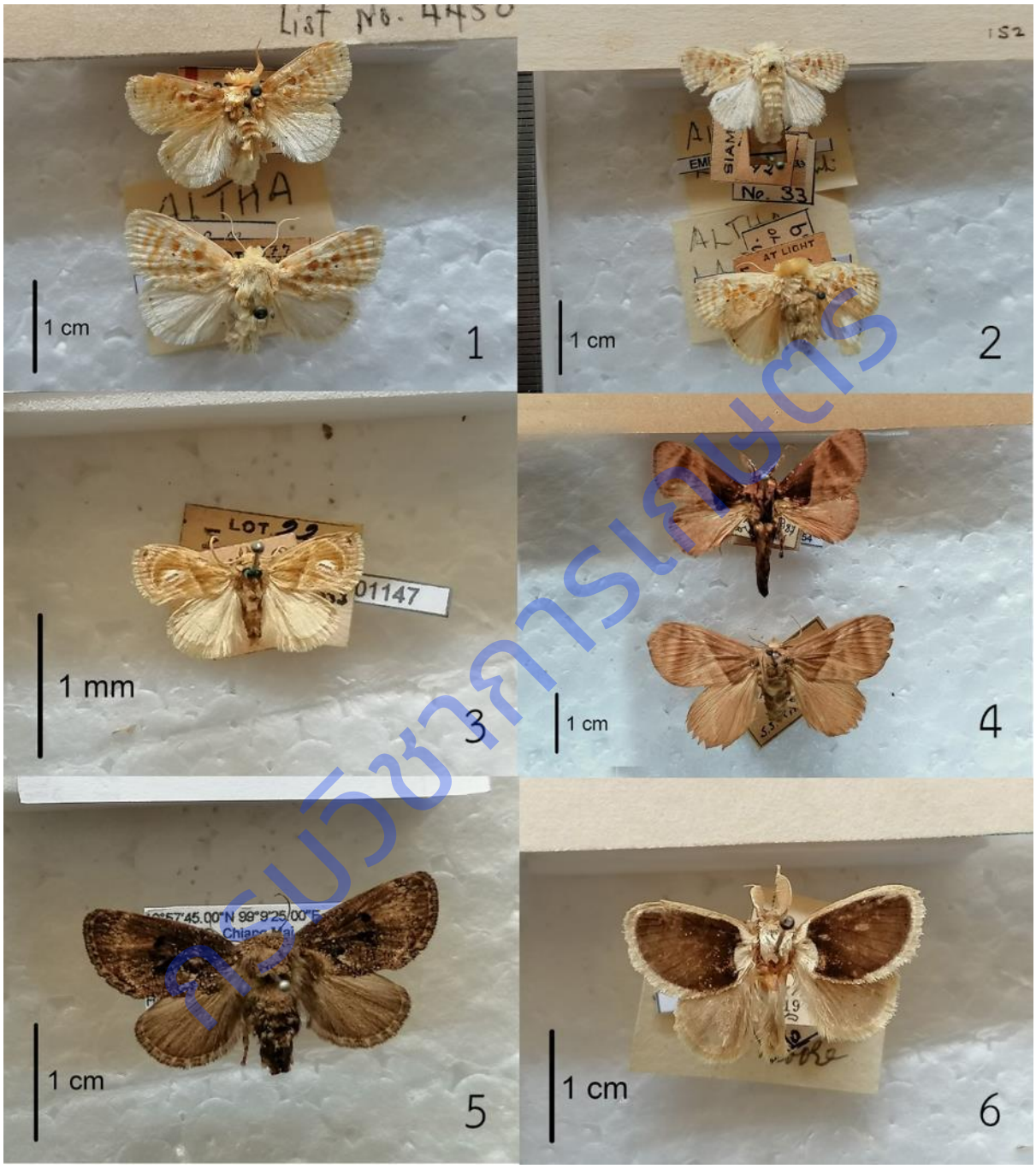


Figure 1.1.15.1. *Altha adala* (male & female) **1.1.15.2**. *Altha lacteola* (male & female)

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)

กรมวิชาการเกษตร

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)

กรมวิชาการเกษตร

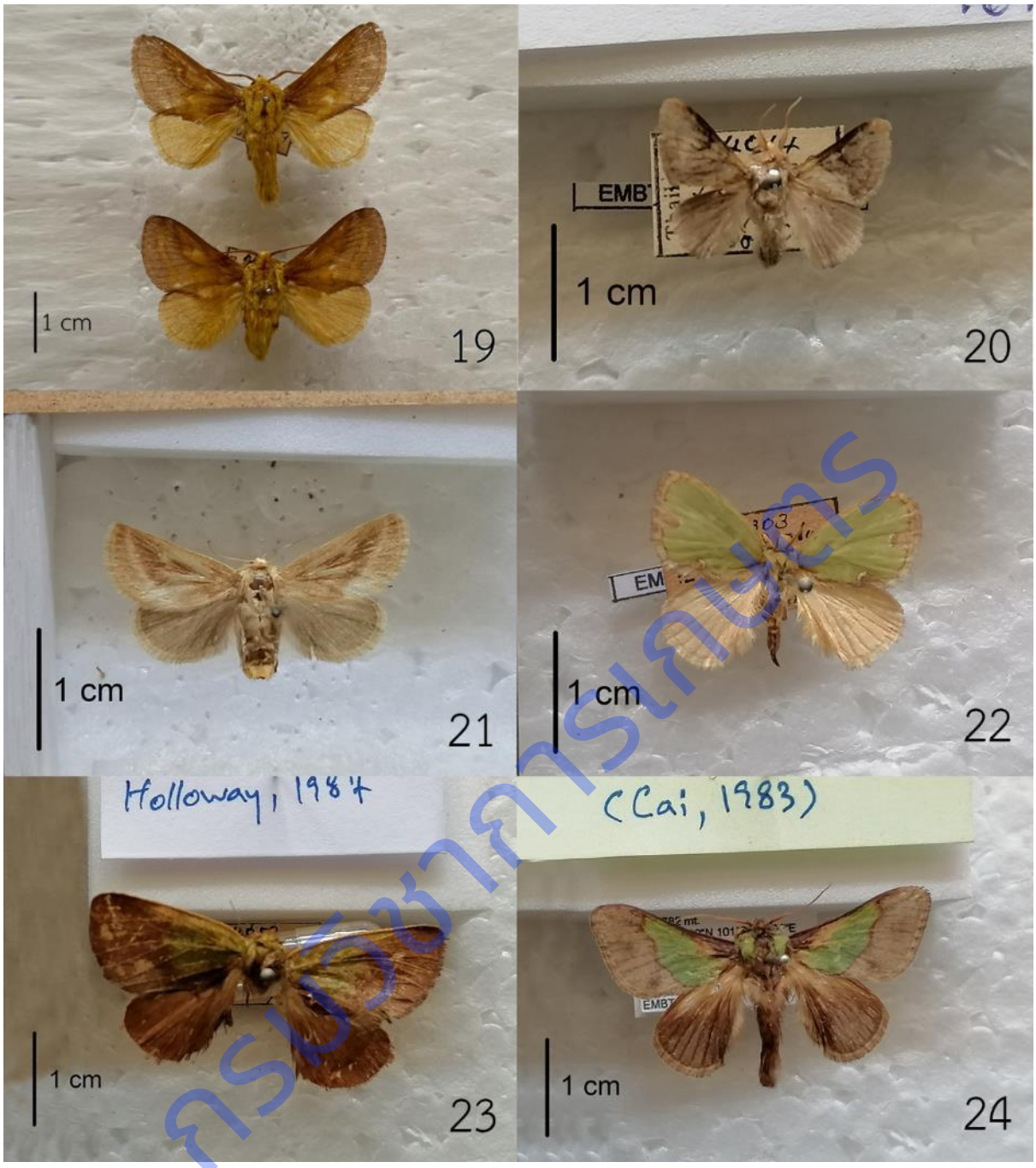


Figure 1.1.15.19. *Narosoideus vulpina* (2 males) **1.1.15.20**. *Nirmides basalis* (male)

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)

กรมวิทยาศาสตร์

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)

กรมวิทยาศาสตร์

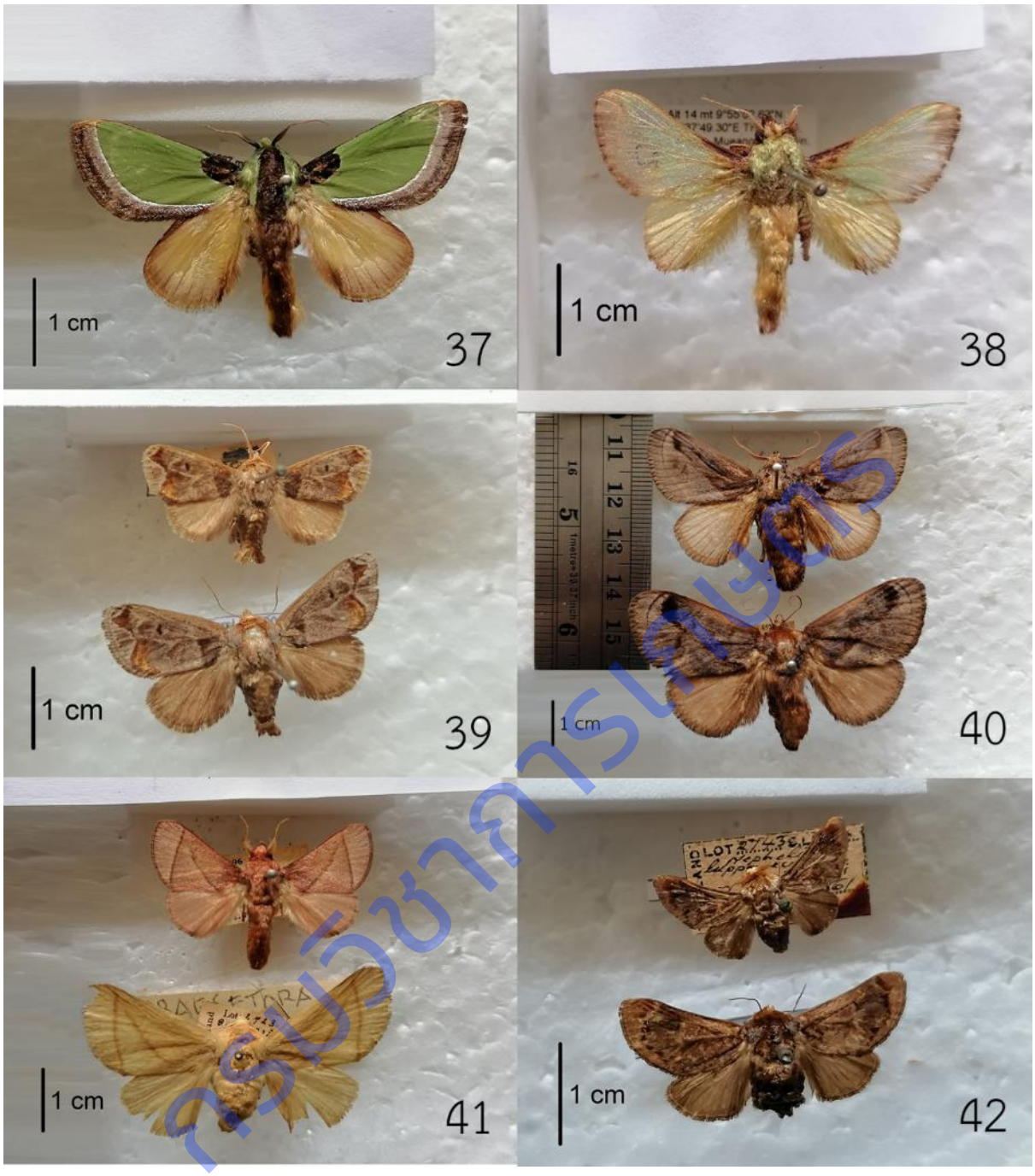


Figure 1.1.15.37. *Parasa pseudorepanda* (male) **1.1.15.38**. *Parasa sundalepida* (male) **1.1.15.39**. *Phlossa conjuncta* (male & female) **1.1.15.40**. *Phocoderma velutina* (male & female) **1.1.15.41**. *Praesetora divergens* (male & female) **1.1.15.42**. *Pseudonirmides cyanopasta* (male & female)

สำนักวิทยบริการฯ

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)

กรมวิชาการเกษตร

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)

กรมการยาง

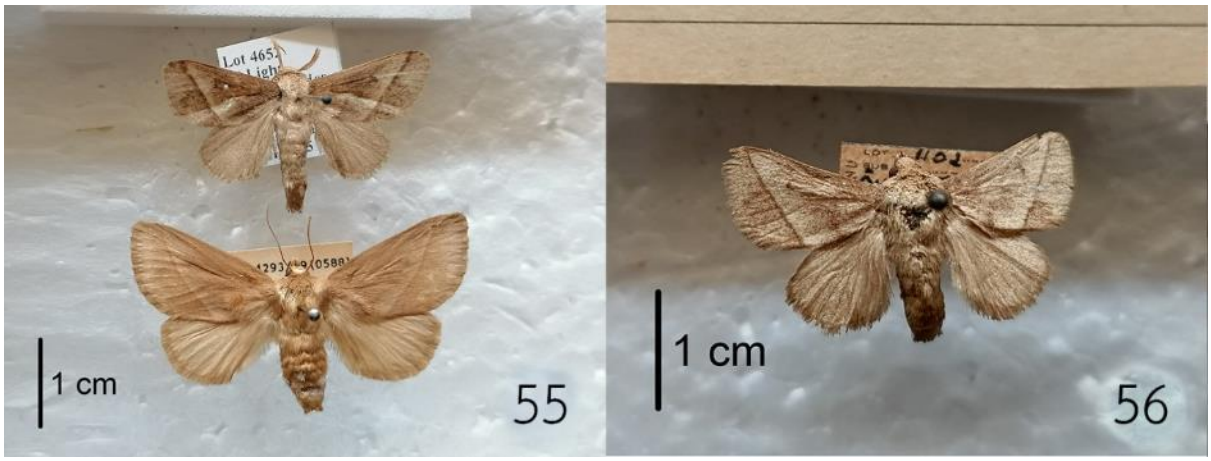
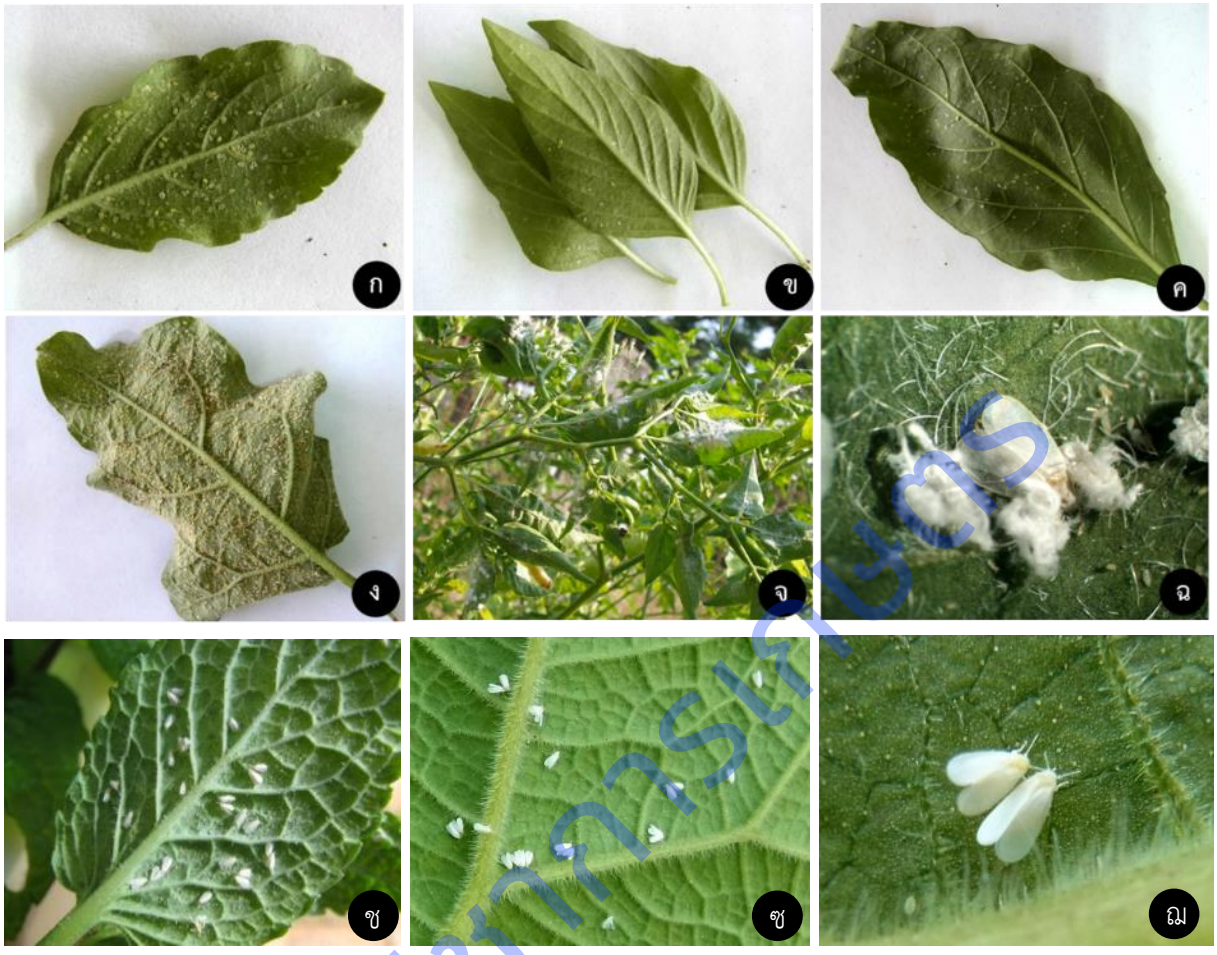


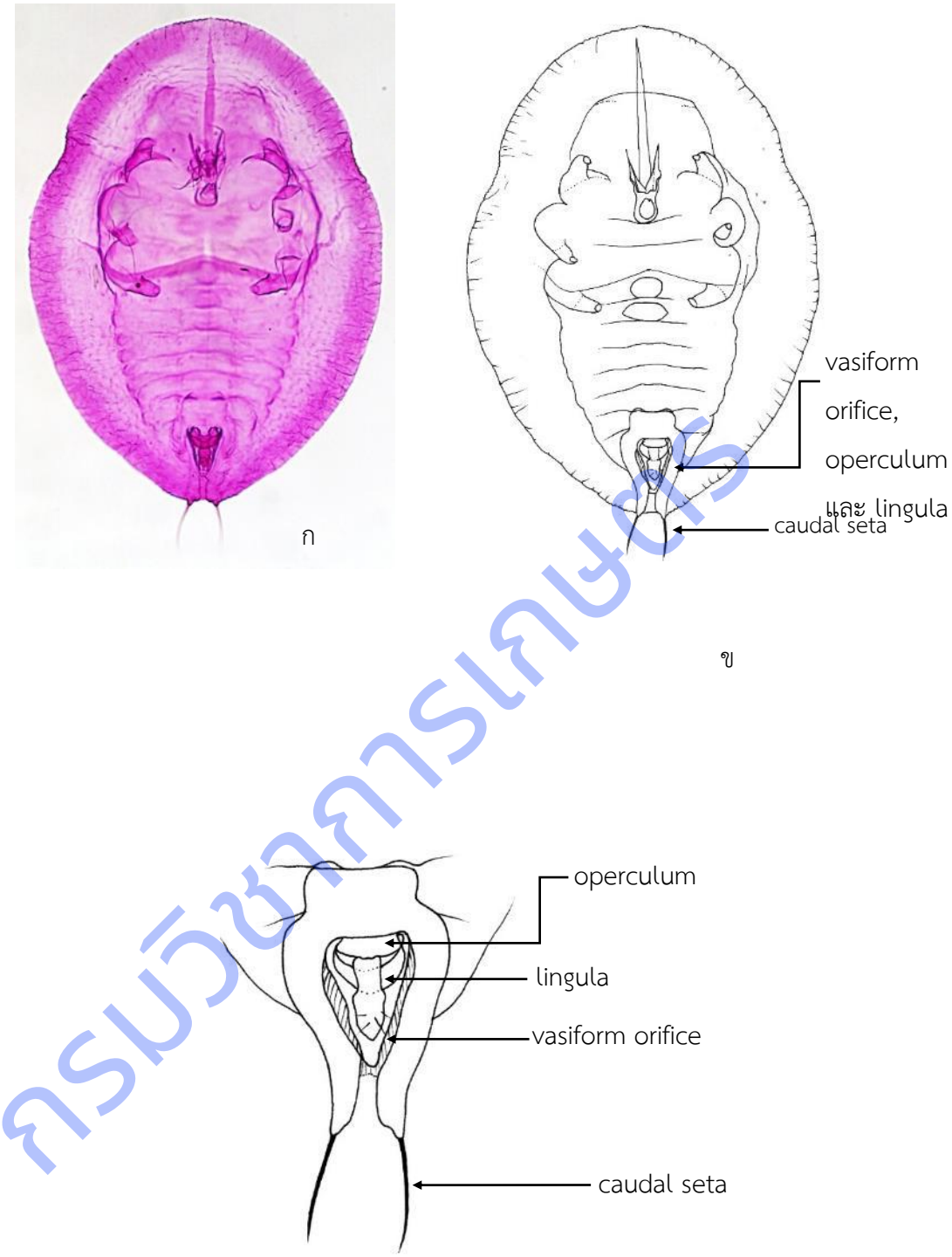
Figure1.1.15. 55. *Thosea siamica* (male & female) **1.1.15.56**. *Thosea unifascia* (male)

กรมวิชาการเกษตร



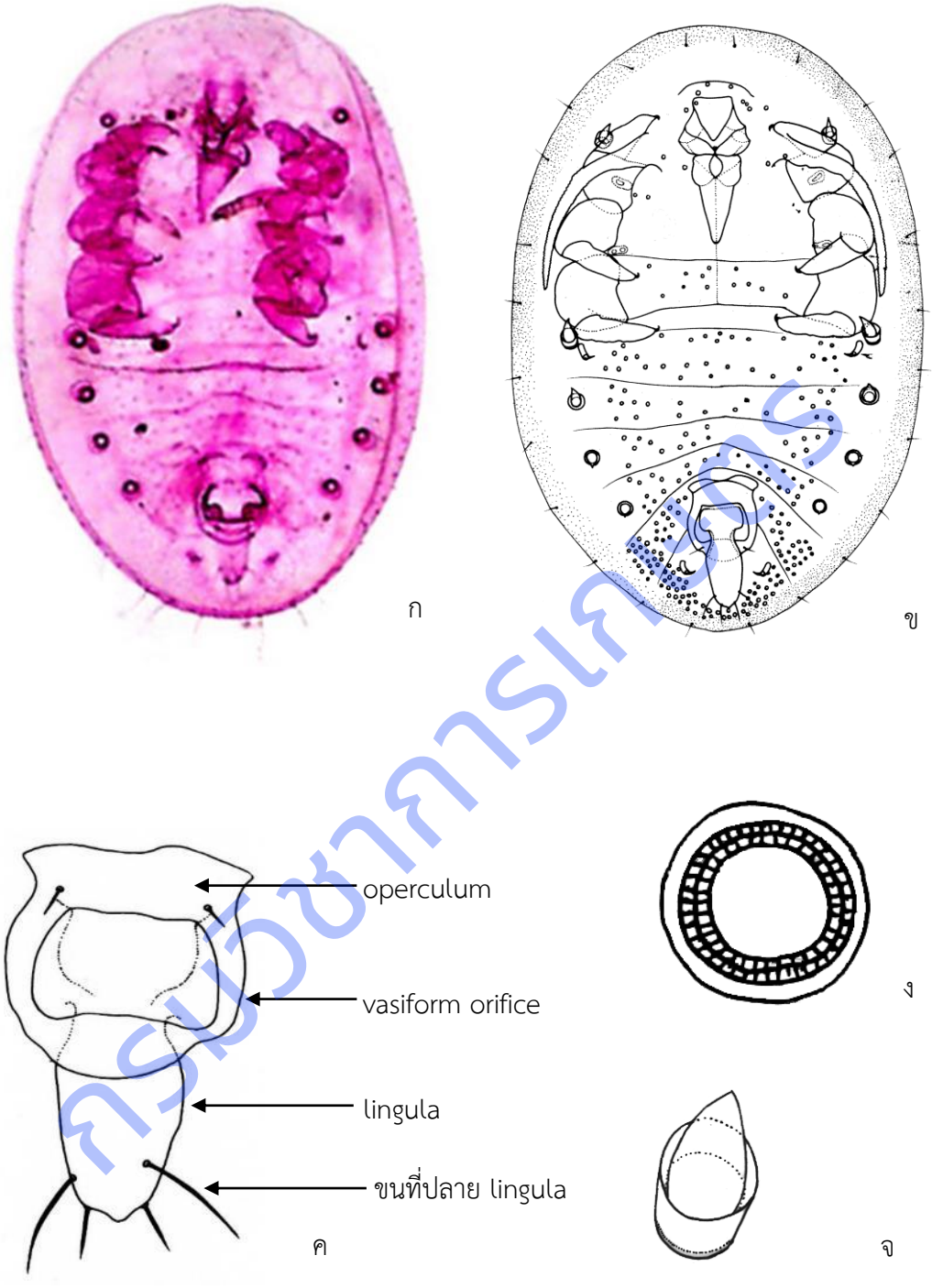
ภาพที่ 1.1.16.1 แมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัว ก-ง) แมลงหวี่ขาว *Bemisia tabaci* จ-ฉ) แมลงหวี่ขาว *Aleurodicus dispersus* ช-ฌ) แมลงหวี่ขาว *Trialeurodes vaporariorum*

กรมวิชาการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

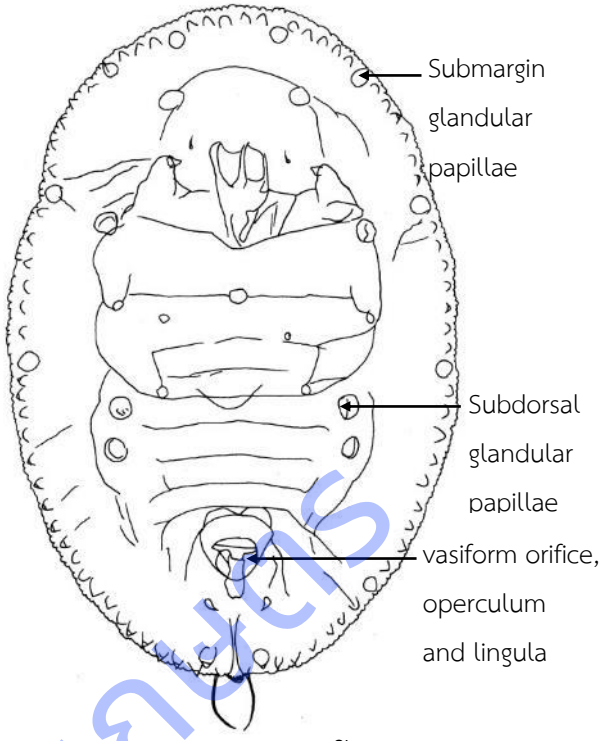
ภาพที่ 1.1.16.2 ลักษณะดักแด้ของแมลงหวี่ขาวยาสูบ; *Bemisia tabaci* (Gennadius)
ก) ลักษณะดักแด้บนสไลด์ ข) ลักษณะลายเส้นของดักแด้ ค) vasiform orifice, operculum



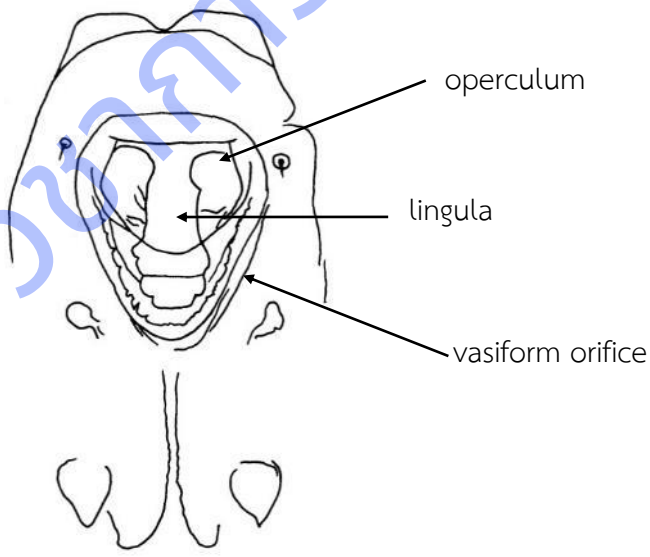
ภาพที่ 1.1.16.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงหวี่ขาวใยเกลียว; *Aleurodicus disperses* Russell, 1965 ก) ลักษณะดักแด้บนสไลด์ ข) ลักษณะลายเส้นของดักแด้ ค) vasiform orifice, operculum และ lingual ง) ลักษณะของ compound pore จ) ลักษณะด้านในของ compound pore

กรมวิชาการเกษตร

ก



ข



ค

ภาพที่ 1.1.16.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาดักแด้ของ *Trialeurodes vaporariorum* Westwood
ก) ลักษณะดักแด้บนสไลด์ ข) ลักษณะลายเส้นของดักแด้ ค). vasiform orifice, operculum

กรมวิชาการเกษตร

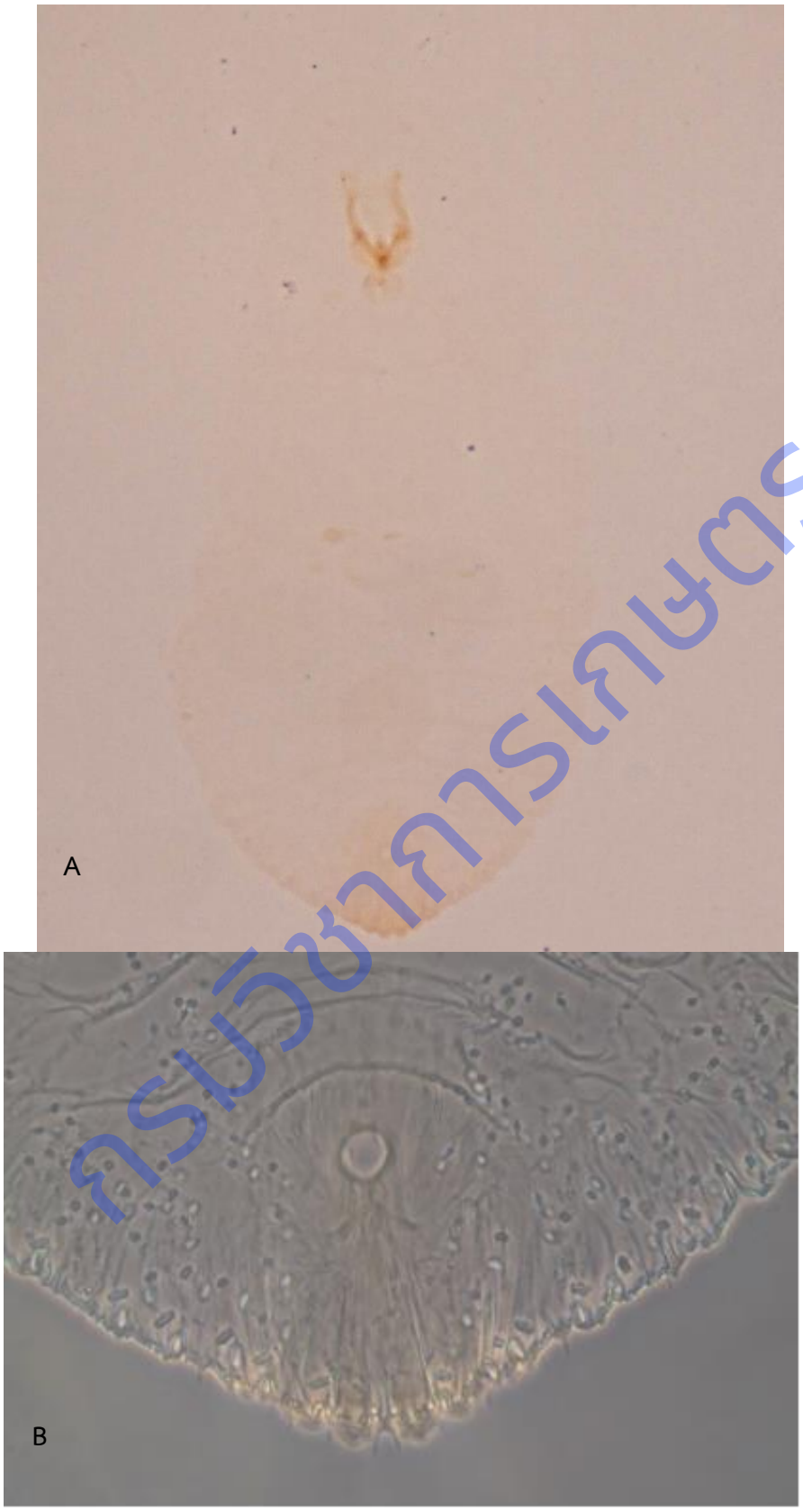


Figure 1.1.17.1 *Aonidomytilus albus* (Cockerell, 1893); A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium**.**

กรมวิชาการเกษตร

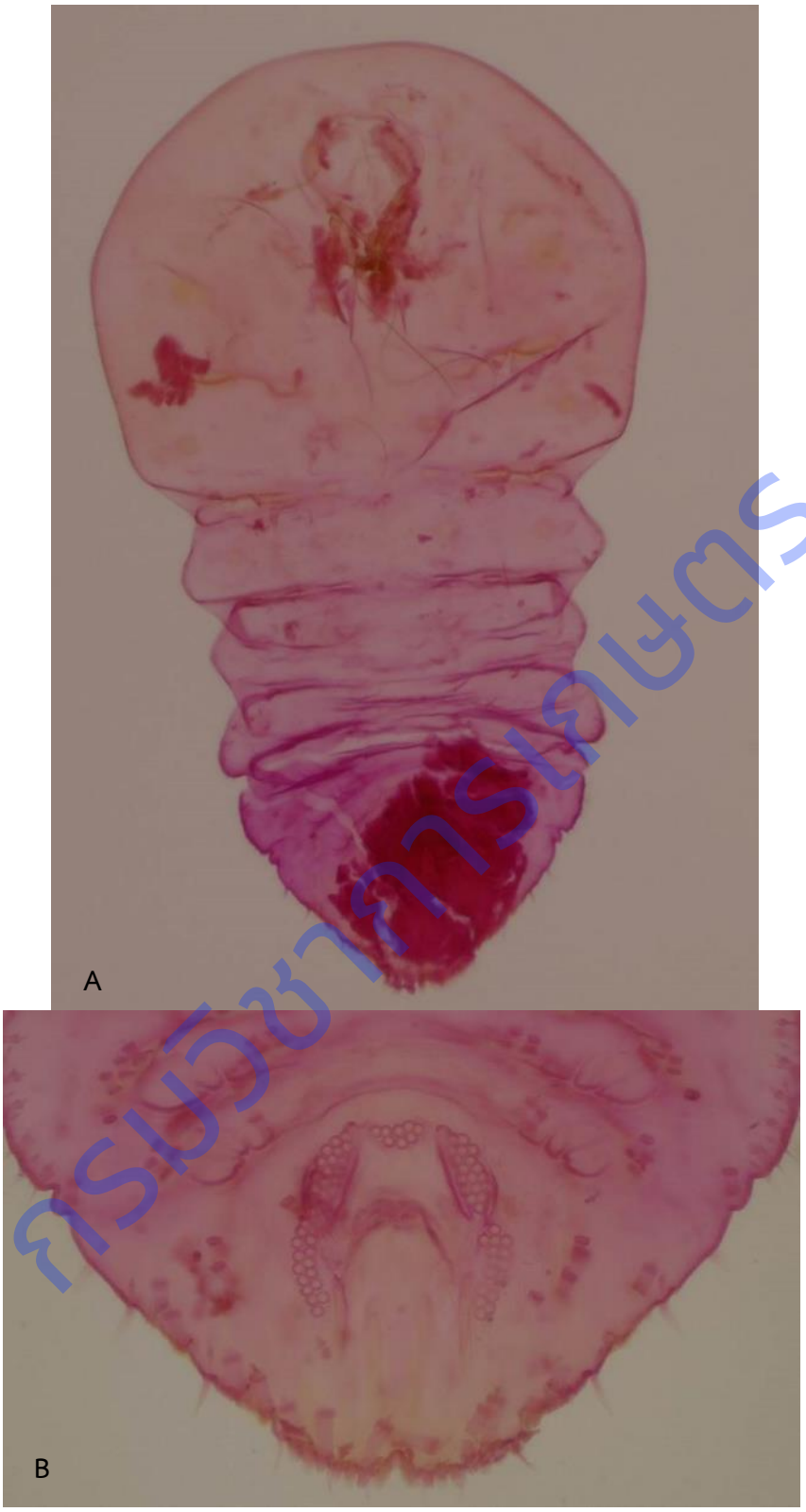


Figure 1.1.17.2 *Aulacaspis rosae* (Bouché, 1833); A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium.

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.17.3 A*ulacaspis tubercularis* Newstead, 1906; A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium

Figure 1.1.17.4 *Aulacaspis vitis* (Green, 1896); A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

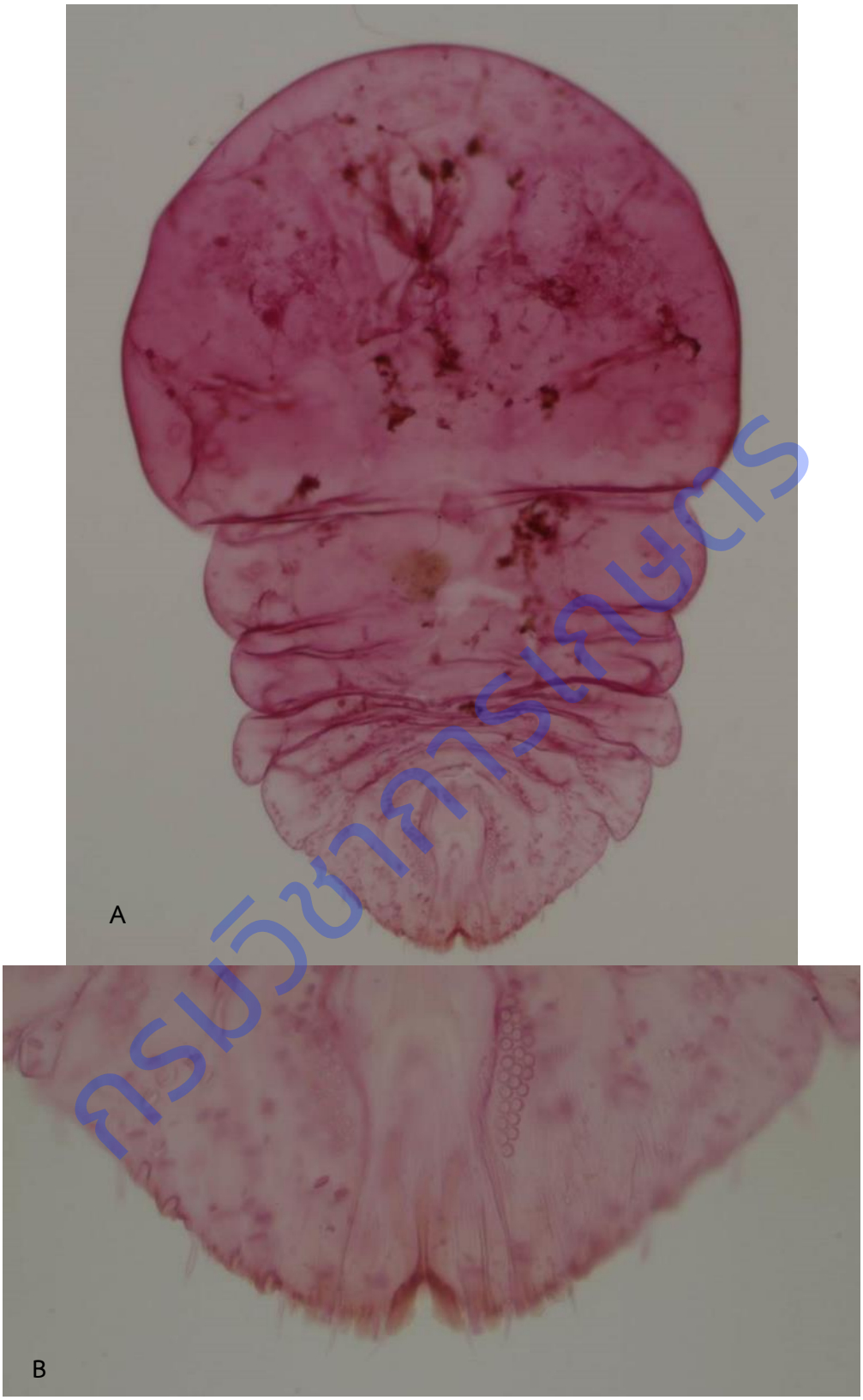


Figure 1.1.17.5 *Aulacaspis* sp.; A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium.

กรมวิชาการเกษตร

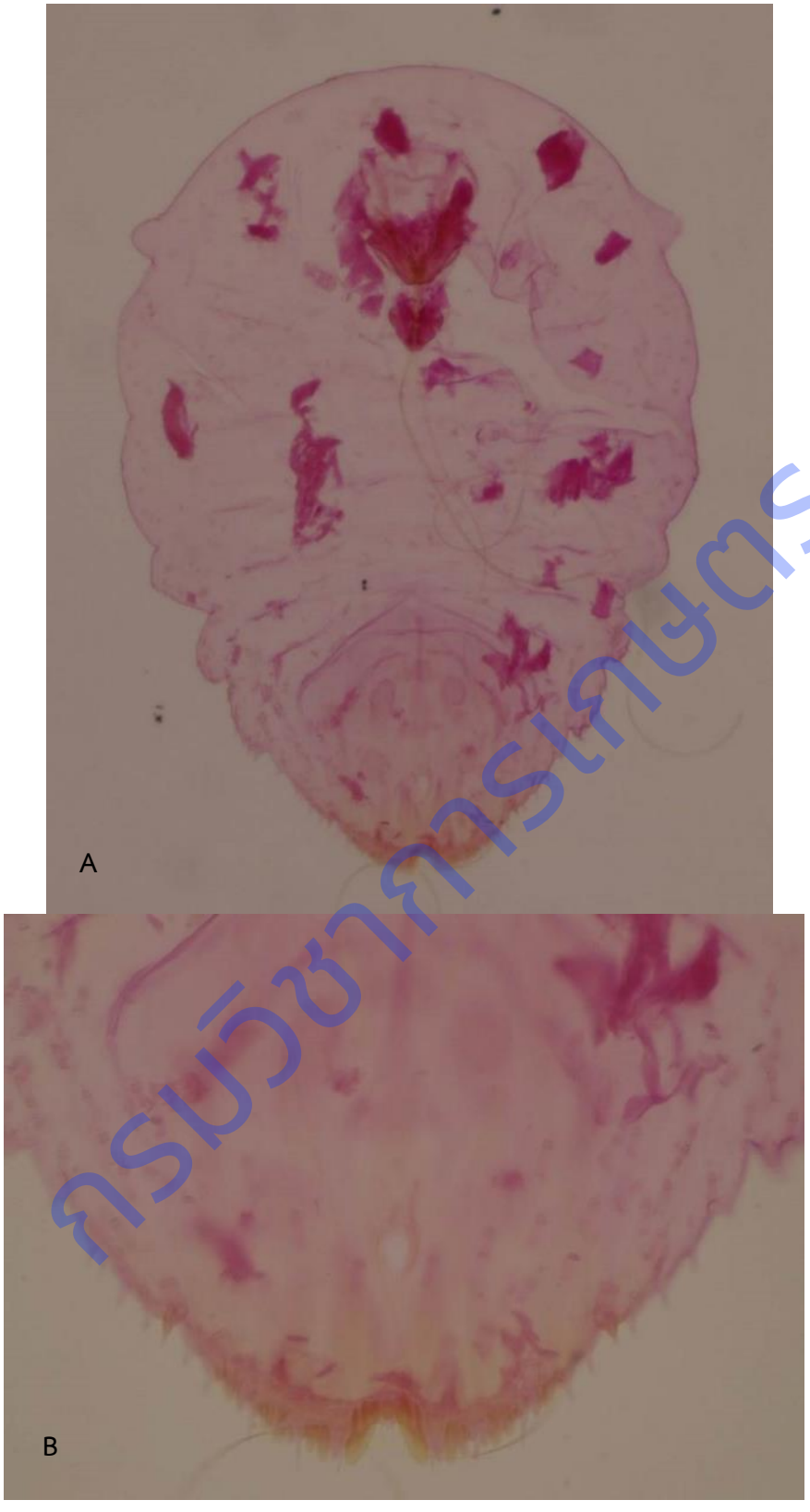


Figure 1.1.17.6 *Diaspis bromeliae* (Kerner, 1778); A)Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.17.7 *Lepidosaphes gloverii* (Packard, 1869); A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium

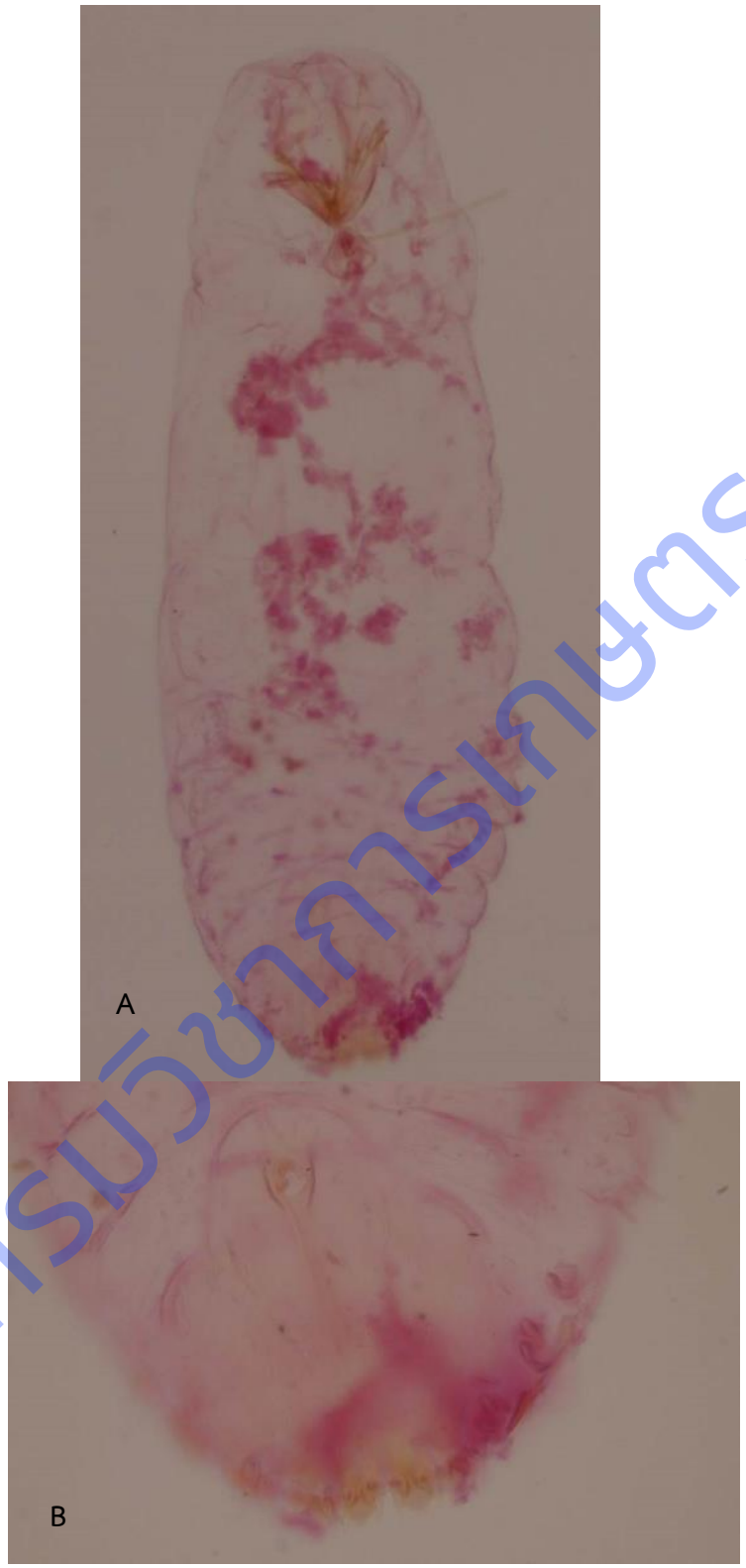


Figure 1.1.17.8 *Lepidosaphes* sp.; A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

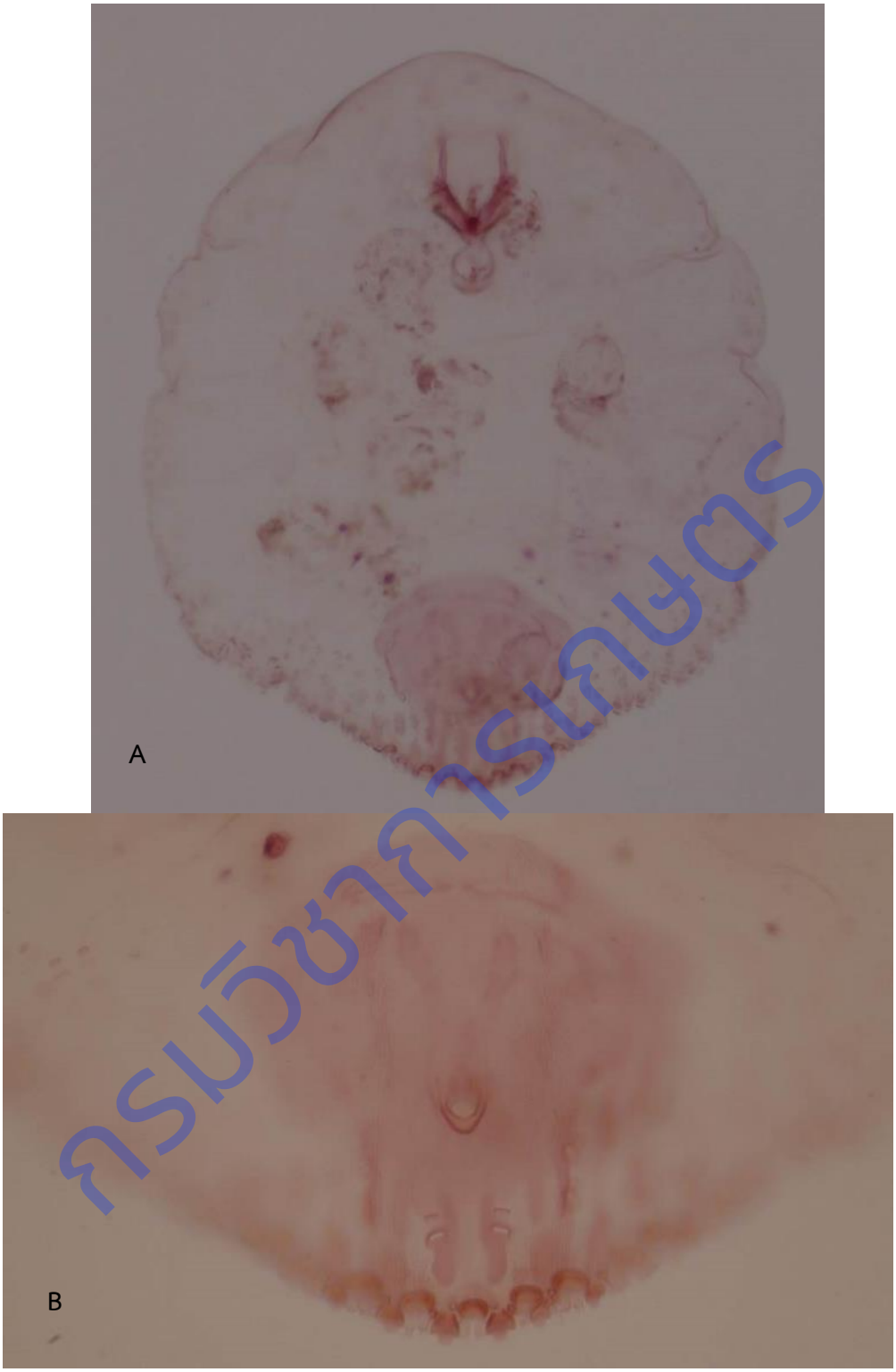


Figure 1.1.17.9 *Parlatoria pergandii* Comstock, 1881; A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.17.10 *Parlatoria ziziphi* (Lucas, 1853); A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium.

กรมวิชาการเกษตร

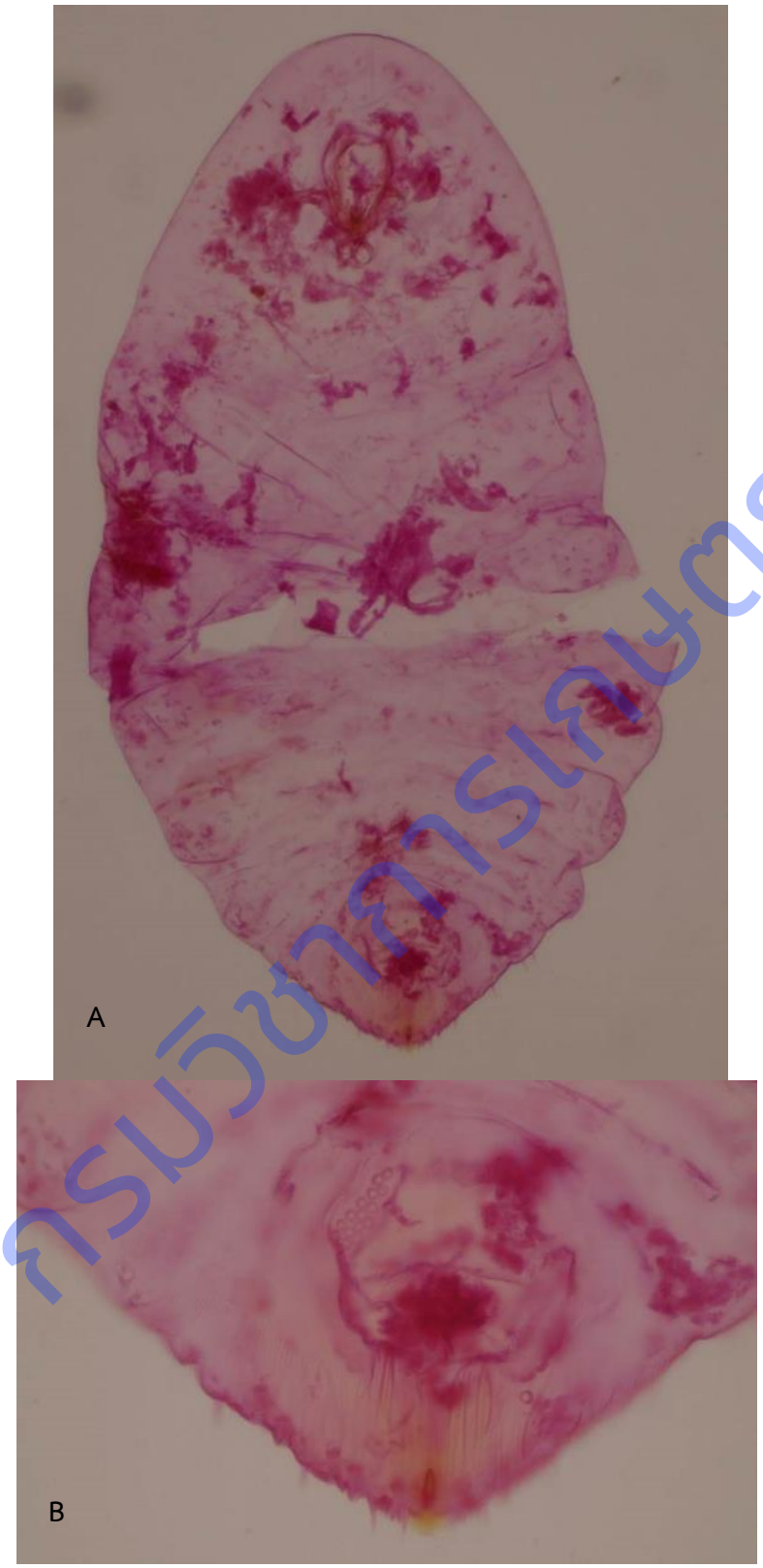


Figure 1.1.17.11 *Pinnaspis aspidiatrae* (Signoret, 1869); A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium

กรมวิชาการเกษตร

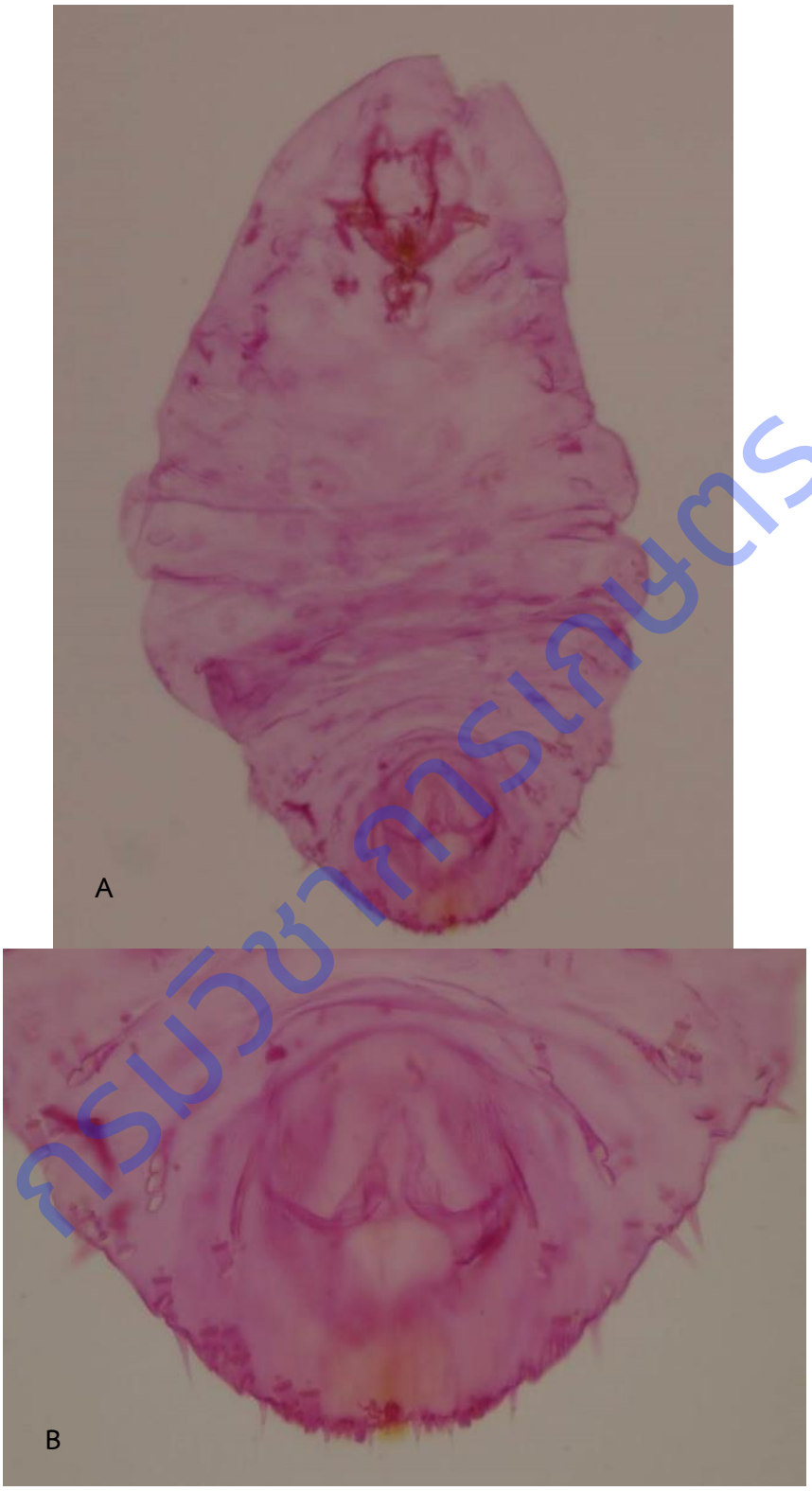


Figure 1.1.17.12 *Pinnaspis strachani* (Cooley, 1899); A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium.

กรมวิชาการเกษตร

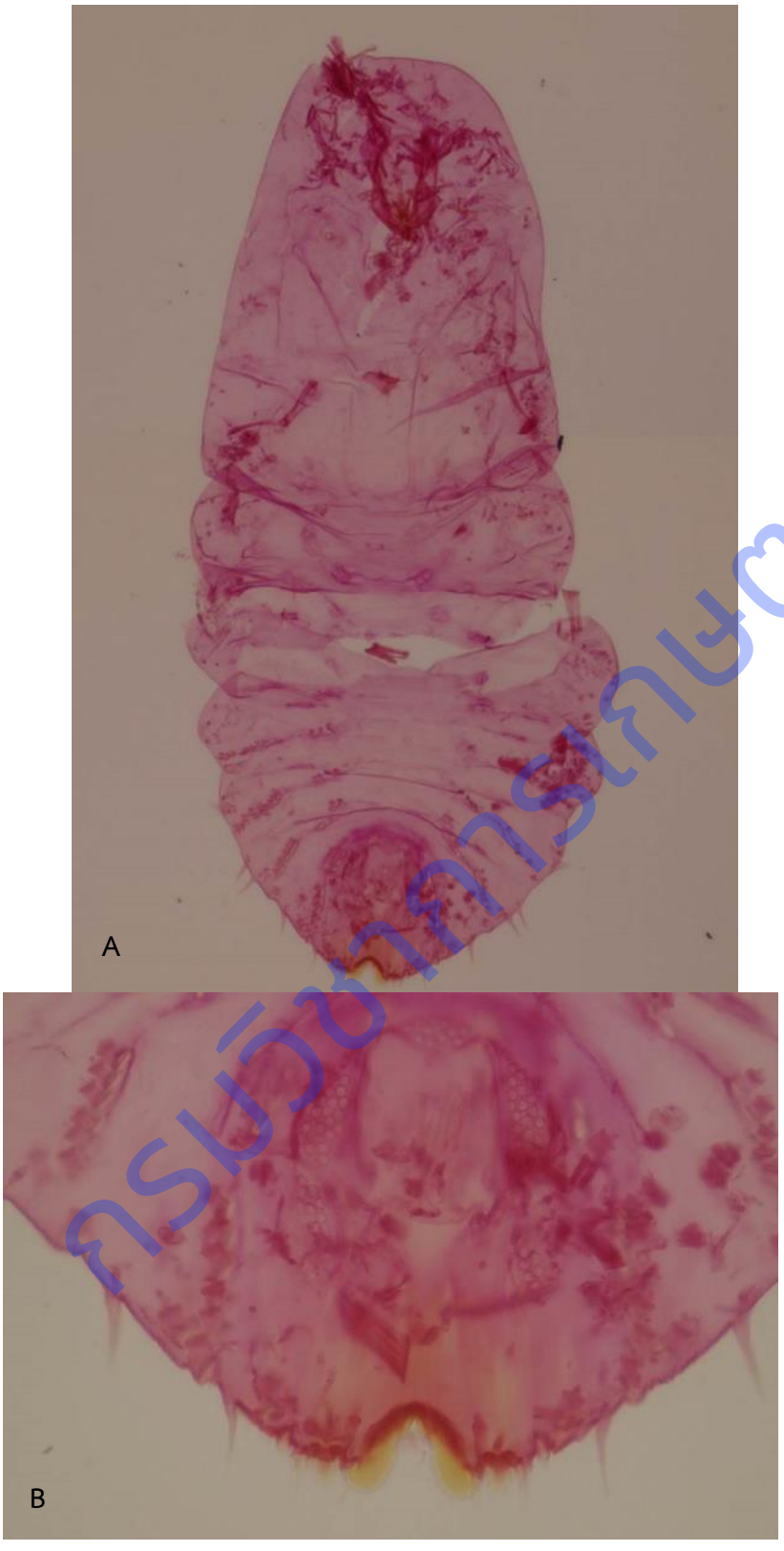
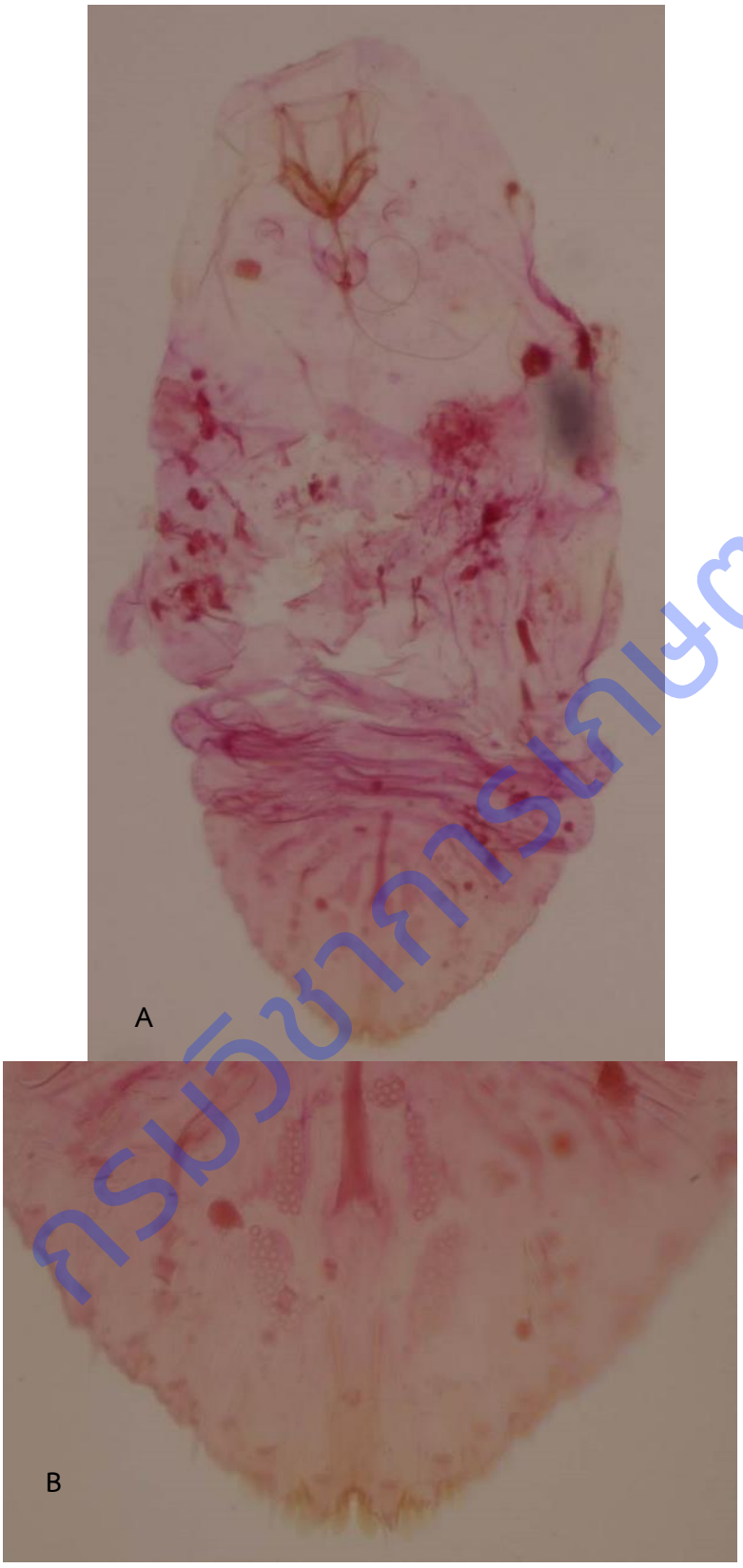


Figure 1.1.17.13 *Pseudaulacaspis cockerelli* (Cooley, 1897); A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium.

กรมวิชาการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.17.14 *Unaspis citri* (Comstock, 1883); A) Microscope view of adult female B) Microscope view of pygidium.

Figure 1.1.17.15 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)

กรมวิชาการเกษตร

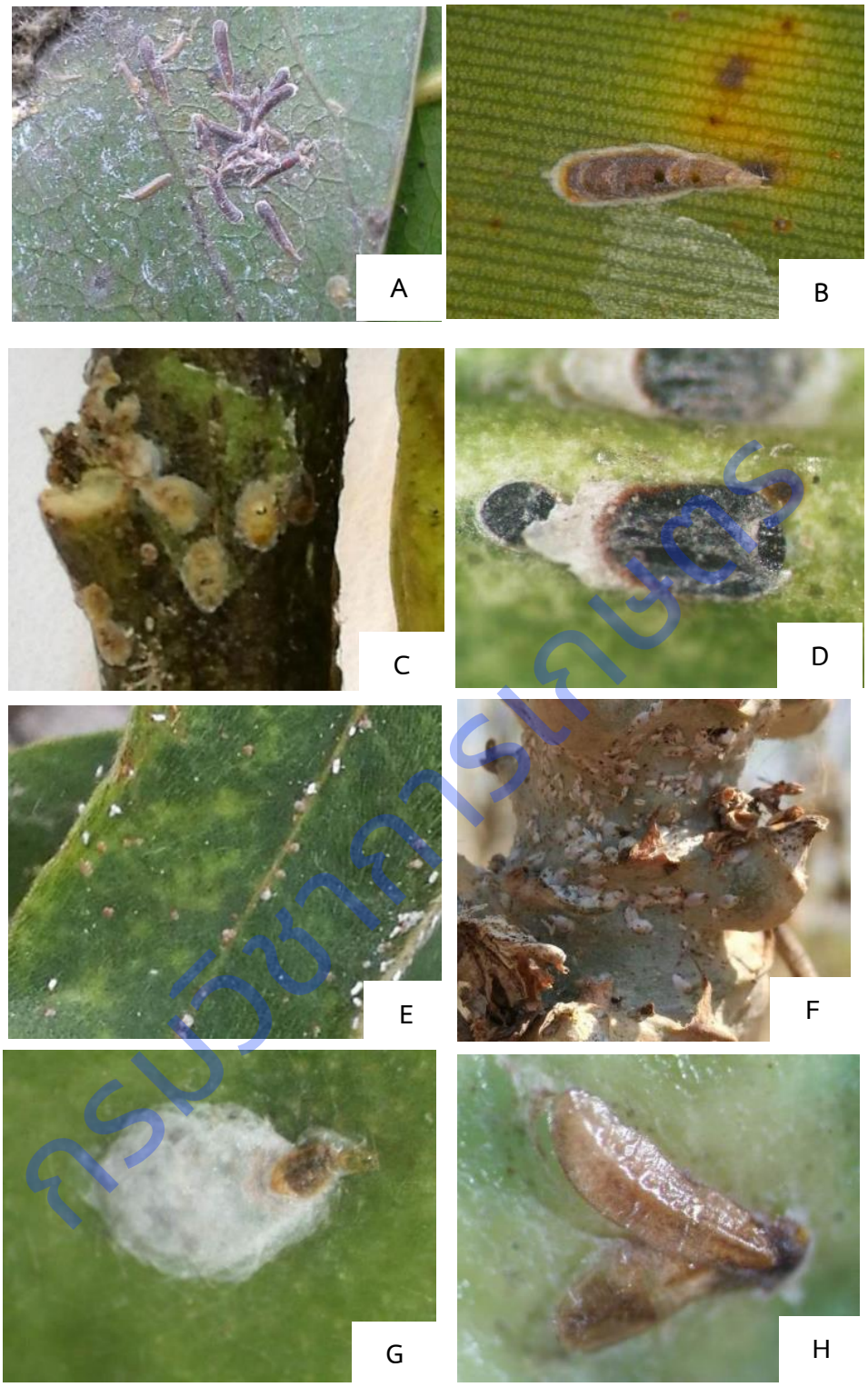


Figure 1.1.17.16 Field view of Diaspidinae; A) *Lepidosaphes gloverii* (Packard), B) *Lepidosaphes* sp., C) *Parlatoria pergandii* (Comstock), D) *P. ziziphi* (Locau), E) *Pinnaspis aspidiatrae* (Signorest), F) *P. strachani* (Cooley), G) *Pseudaulacaspis* cockerelli (Cooley), H) *Unaspis citri* (Comstock).

กรมวิชาการเกษตร

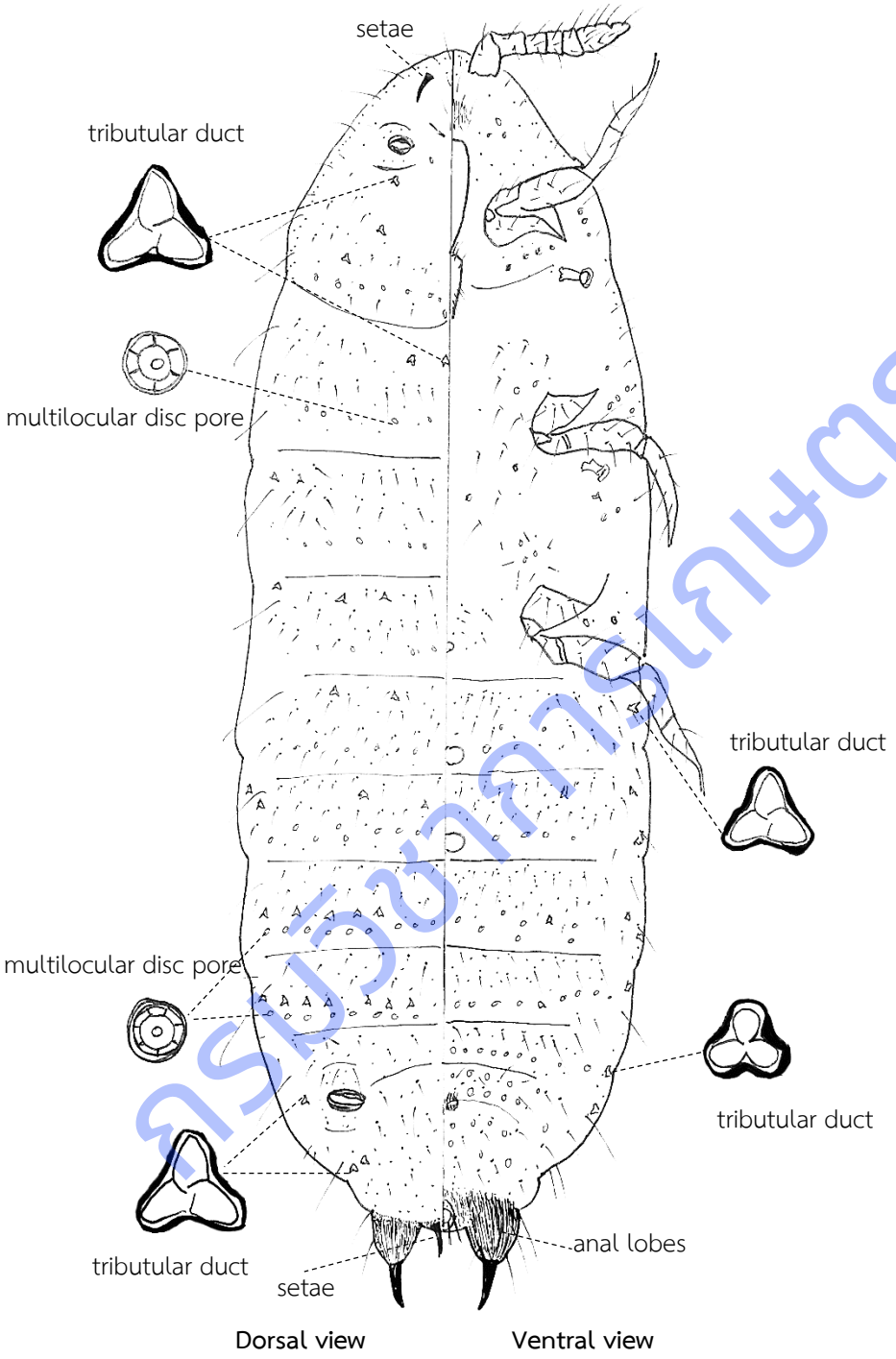


Figure 1.1.18.1 Morphology of slide-mounted adult female of *Gerococcus coffeae* Green, 1933

สำนักวิทยบริการฯ

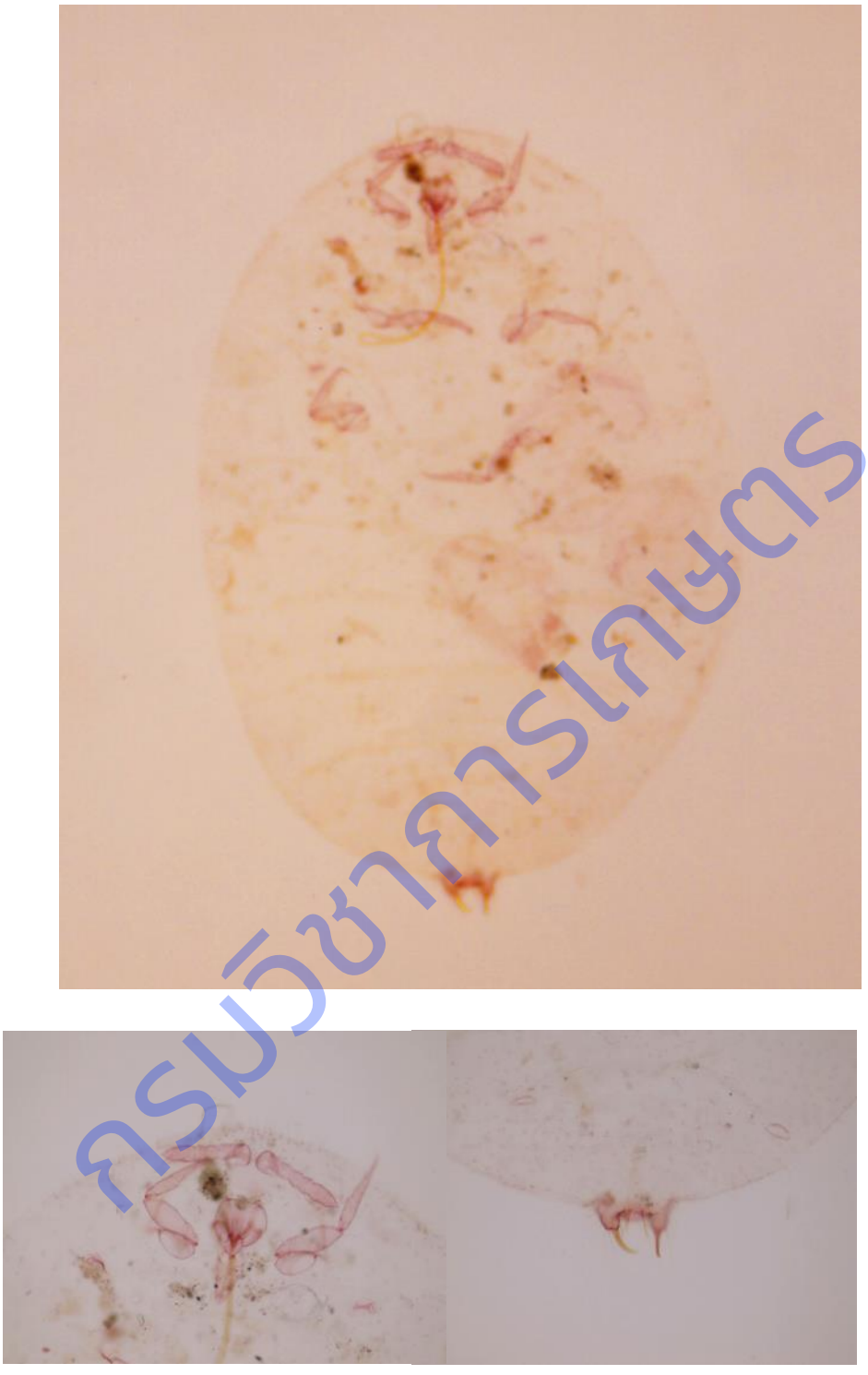


Figure 1.1.18.2 Microscope view of *Geococcus coffeae* Green, 1933

กรมวิชาการเกษตร

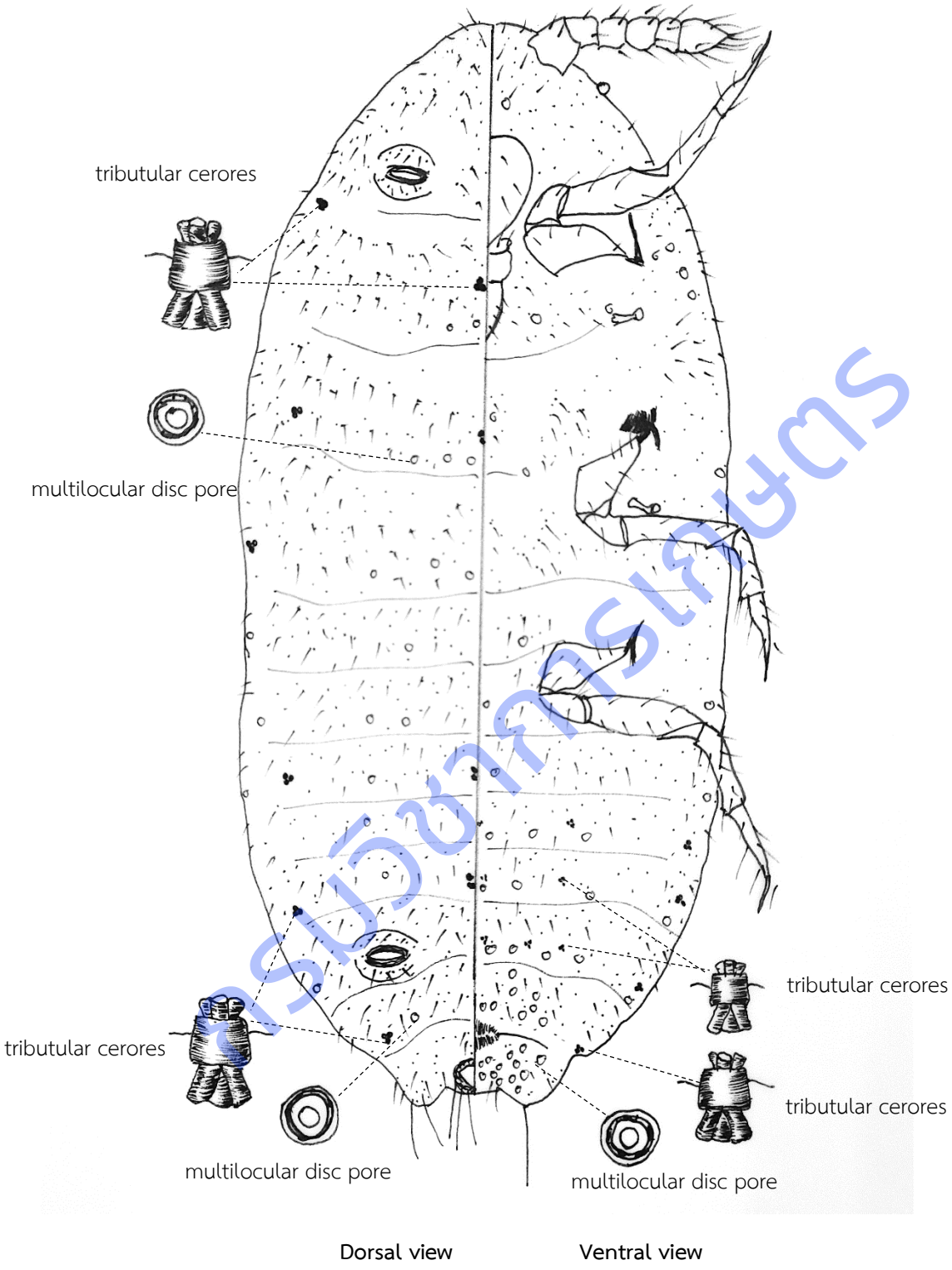


Figure 1.1.18.3 Morphology of slide-mounted adult female of *Rhizoecus americanus* (Hambleton, 1946)

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.18.4 Microscope view of *Rhizoecus americanus* (Hambleton, 1946)

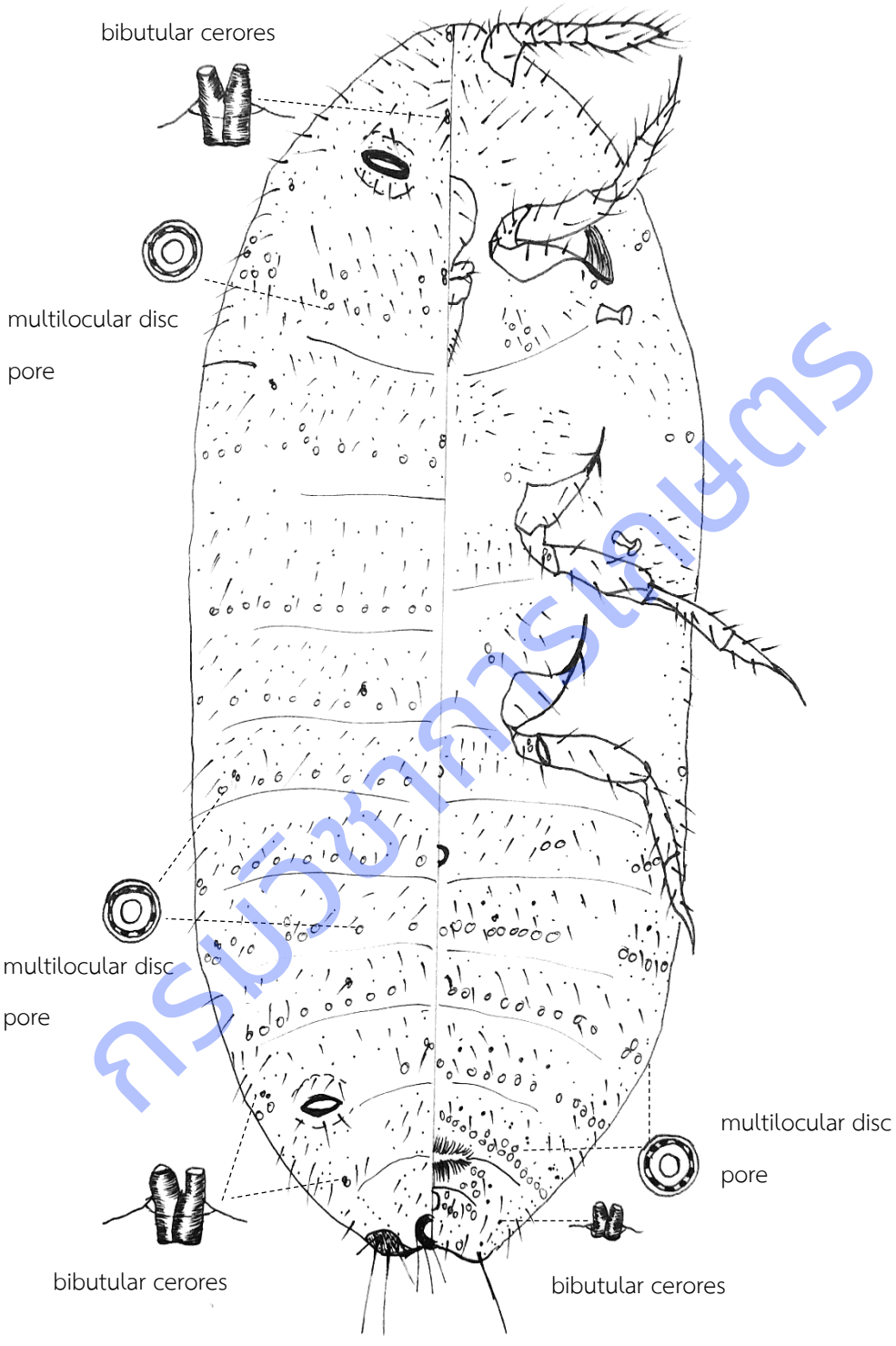


Figure 1.1.18.5 Morphology of slide-mounted adult female of *Ripersiella saintapauliae* (Williams, 1985)

กรมวิชาการเกษตร

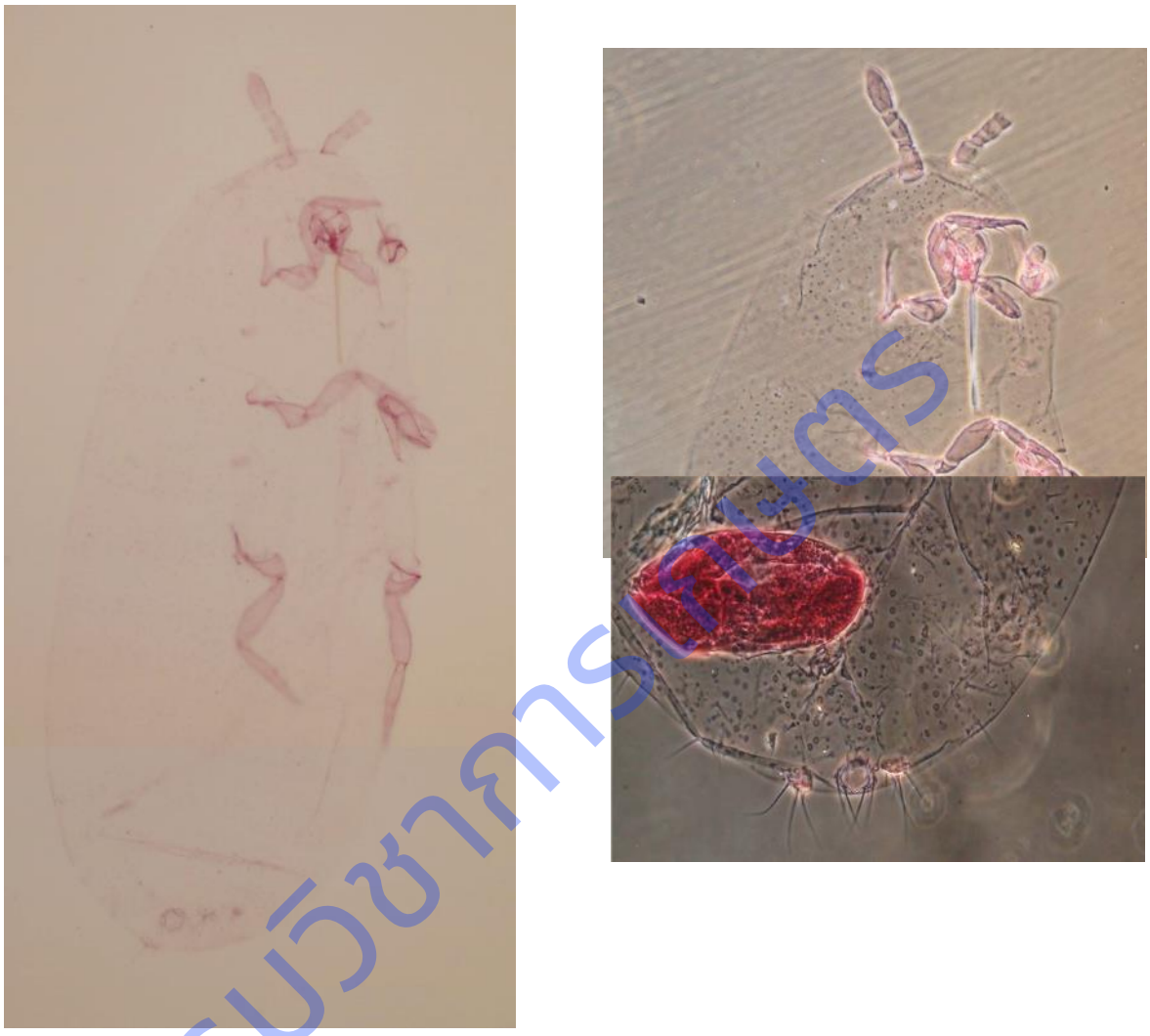


Figure 1.1.18.6 Microscope view of *Rhizoecus americanus* (Hambleton, 1946)

กรมวิชาการเกษตร

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.

กรมวิชาการเกษตร

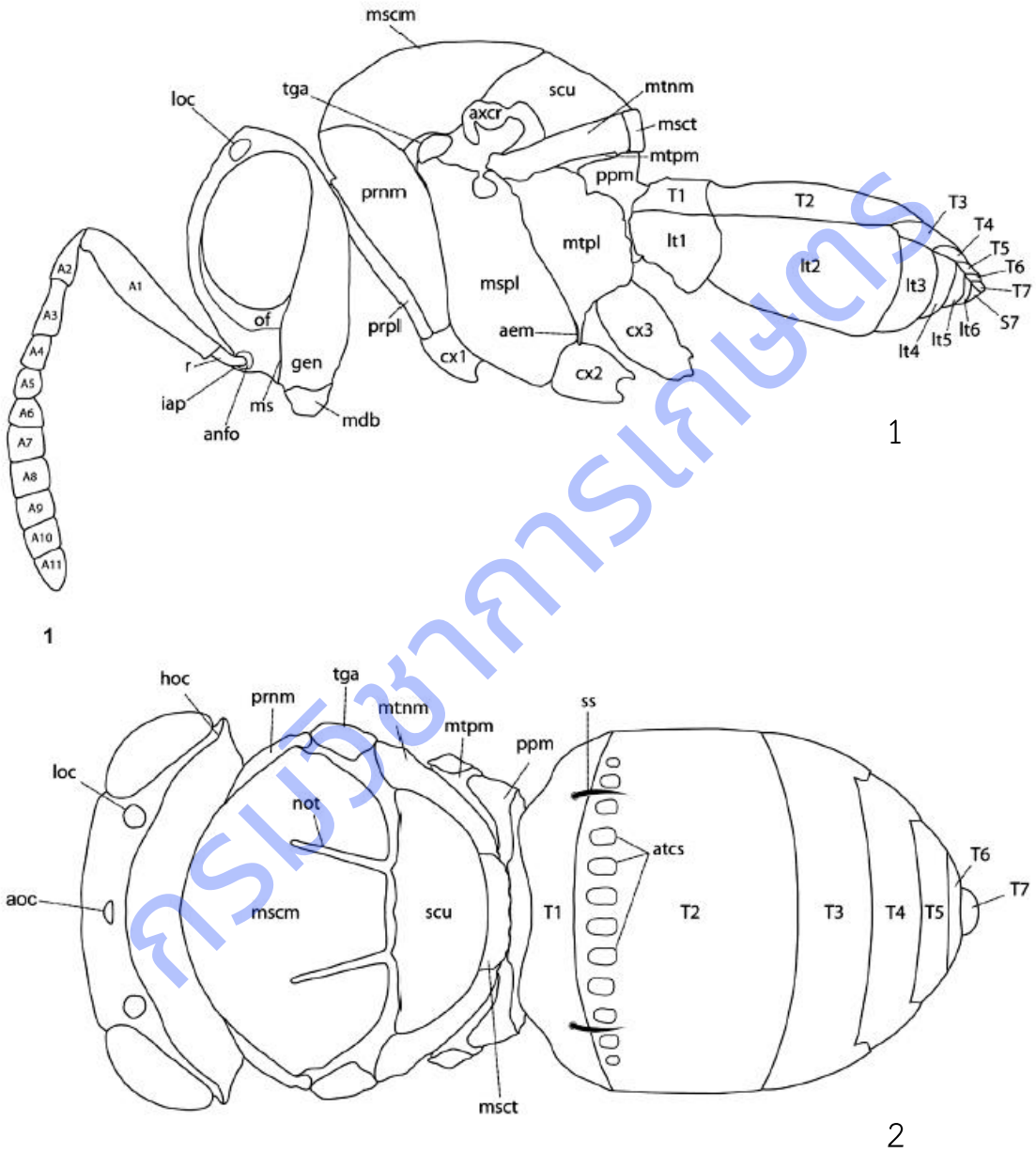


Figure 1.1.19.1-1.1.19.2. Morphological characters of *Trissolcus* sp.; 1, Dorsal habitus; 2, Lateral habitus

กรมวิชาการเกษตร

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.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

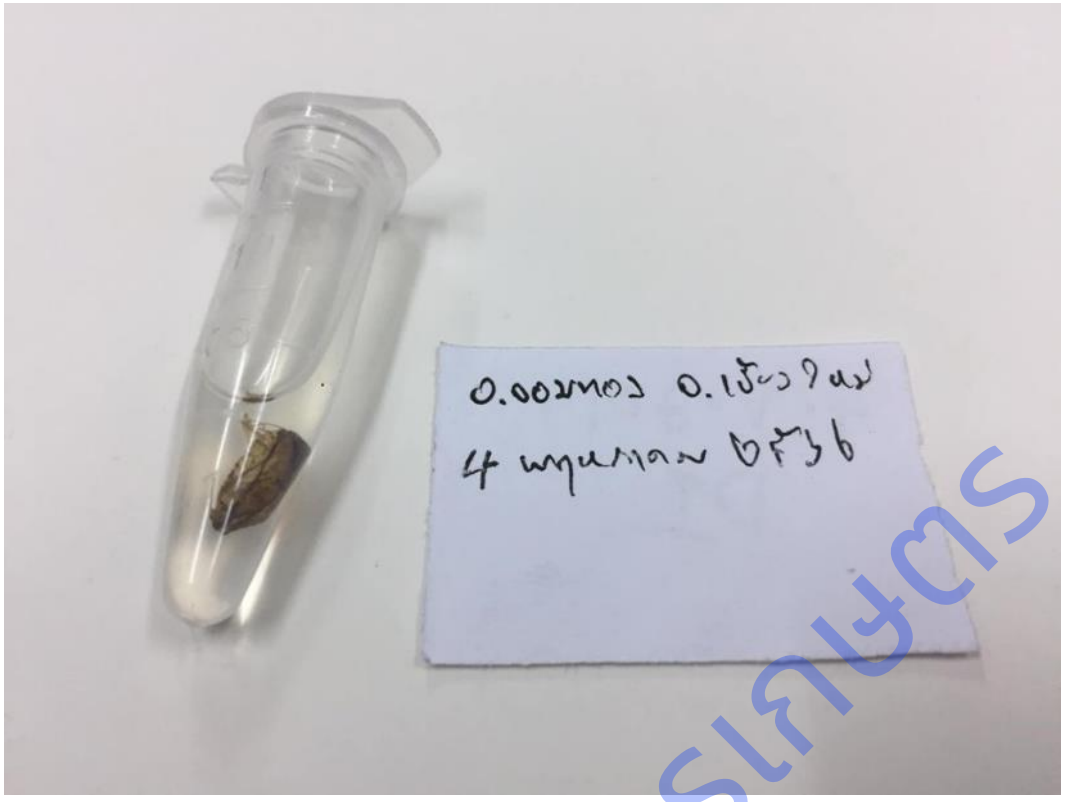


Figure 1.1.20.1. Preserved *Drepanacra* Tillyard, 1916 in 70% ethyl alcohol.

Figure 1.1.20.2. *Psectra siamica* Nakahara & Kuwayama, 1961.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.20.3. *Micromus timidus* Hagen, 1853

Figure 1.1.20.4. A final instar larva of *M. timidus*

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.20.5. *M. timidus* larva feeding on whitefly larvae.

Figure 1.1.20.6. *M. timidus* larva feeding on aphids.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.20.7. *Coniopteryx* Curtis, 1834

Figure 1.1.20.8. *Semidalis aleyrodiformis* (Stephens, 1836)

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.20.9. A living *S. aleyrodiformis*

Figure 1.1.20.10. *S. aleyrodiformis* larva feeding on whitefly larvae.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.20.11. Cocoon of *S. aleyrodiformis*

Figure 1.1.20.12. *S. aleyrodiformis* pupa in the cocoon.

กรมวิชาการเกษตร

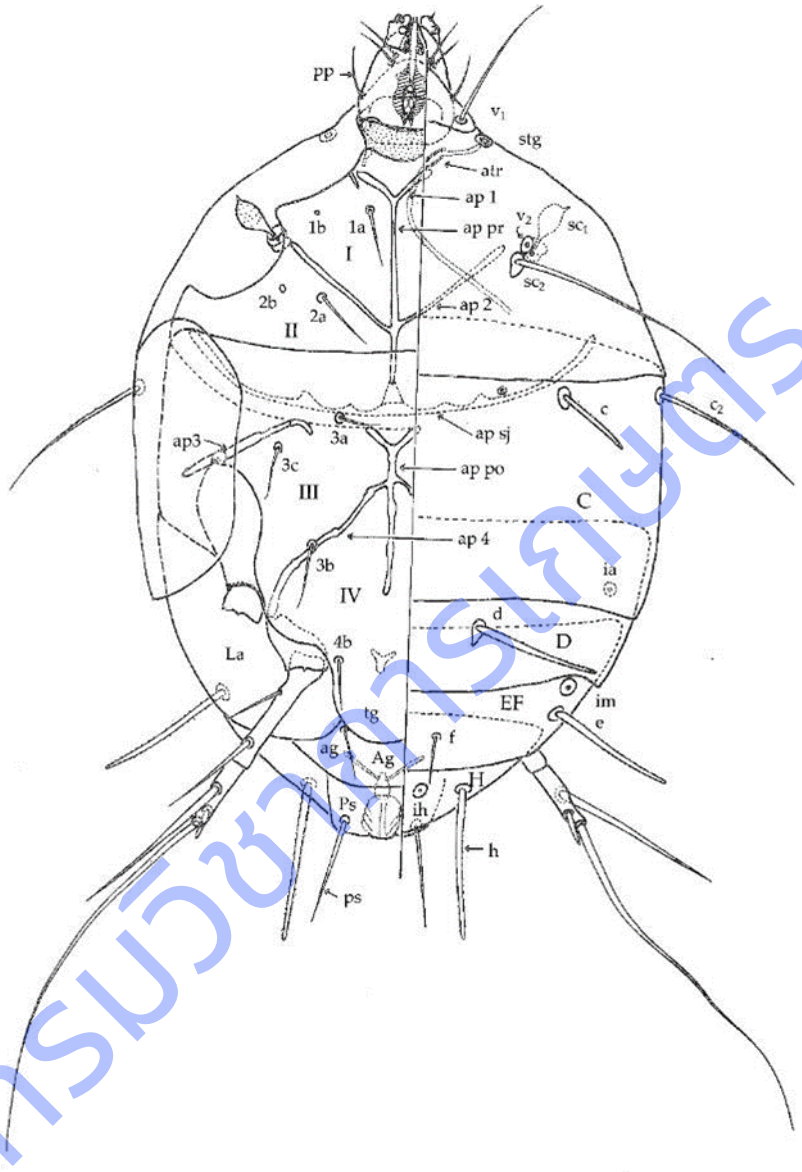


Figure 1.1.21.1. Ununguiarsonemus beameri (Beer), ตัวเต็มวัยเพศเมีย, ด้านซ้ายภาพส่วนด้านล่าง ด้านขวาภาพส่วนด้านบน; ap 1-4, ร่อง apodeme; ap po, poststernal apodeme; ap pr, prosternal apodeme; ap aj, sejugal apodeme; atr, atrium; pp, plapcoxal seta; stg stigmata; tg, tegula (Lindquist, 1986)

กรมวิชาการเกษตร

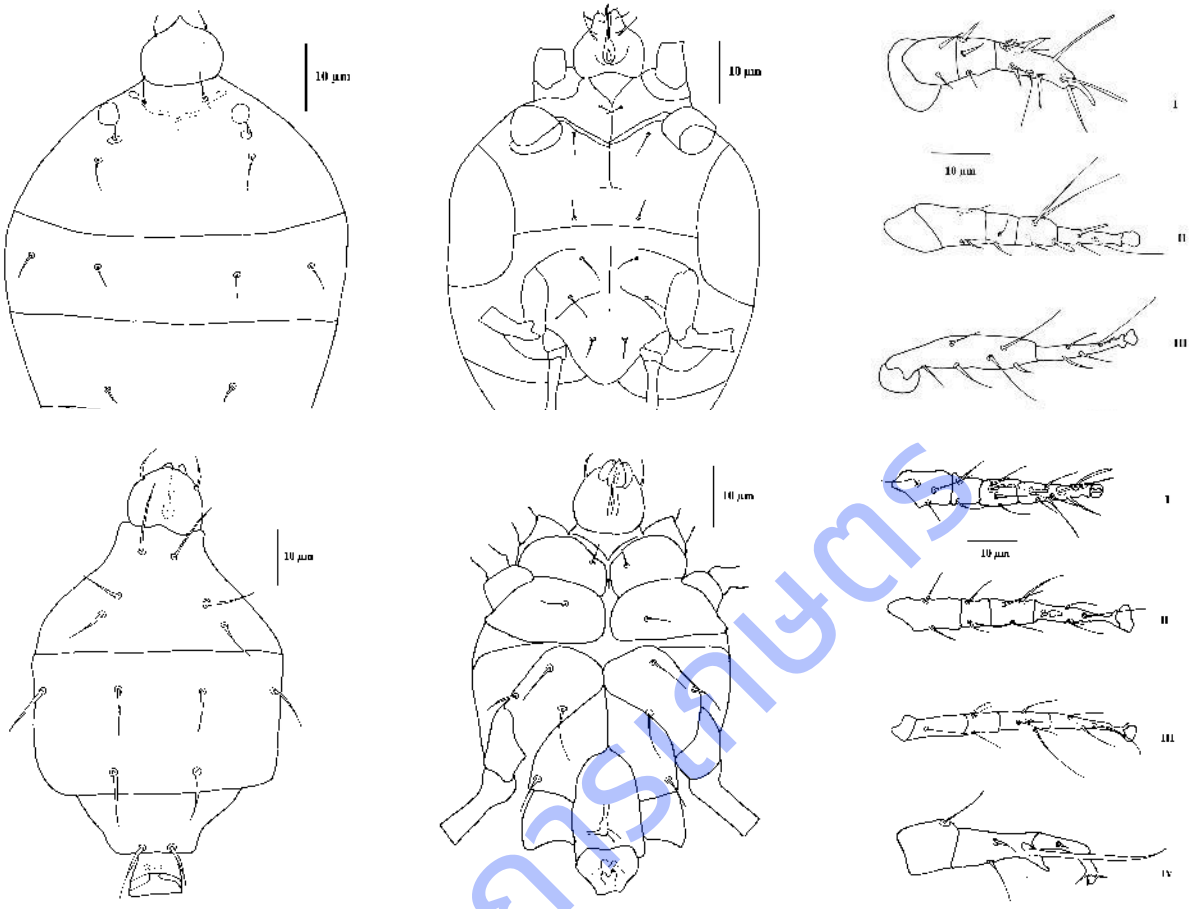
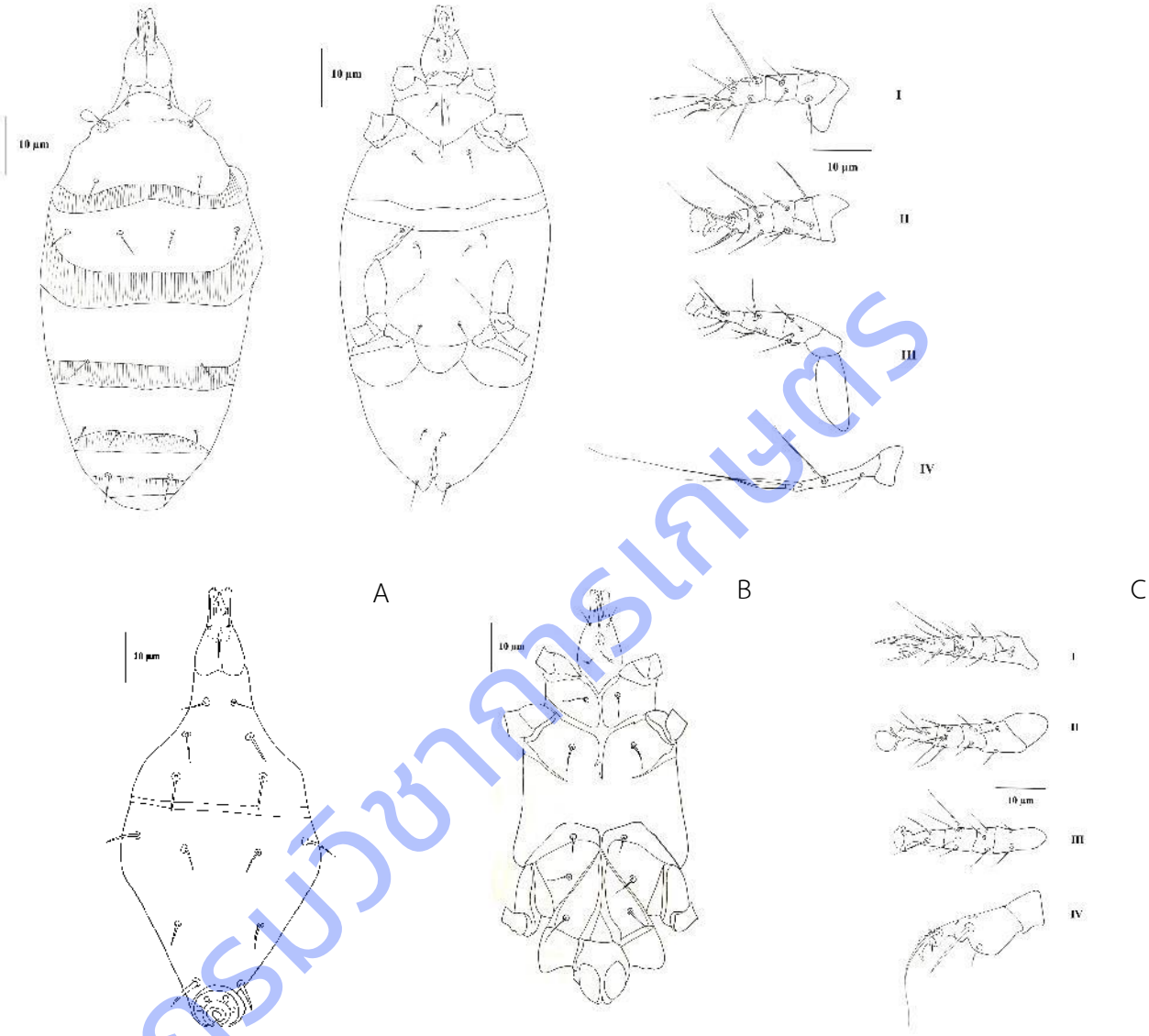


Figure 1.1.21.2. *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) เพศเมีย; A. ด้านสันหลัง, B ด้านล่าง, C. ขา I-IV, เพศผู้; D, ด้านสันหลัง, E. ด้านล่าง, F. ขา I-IV.

กรมวิชาการเกษตร



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.

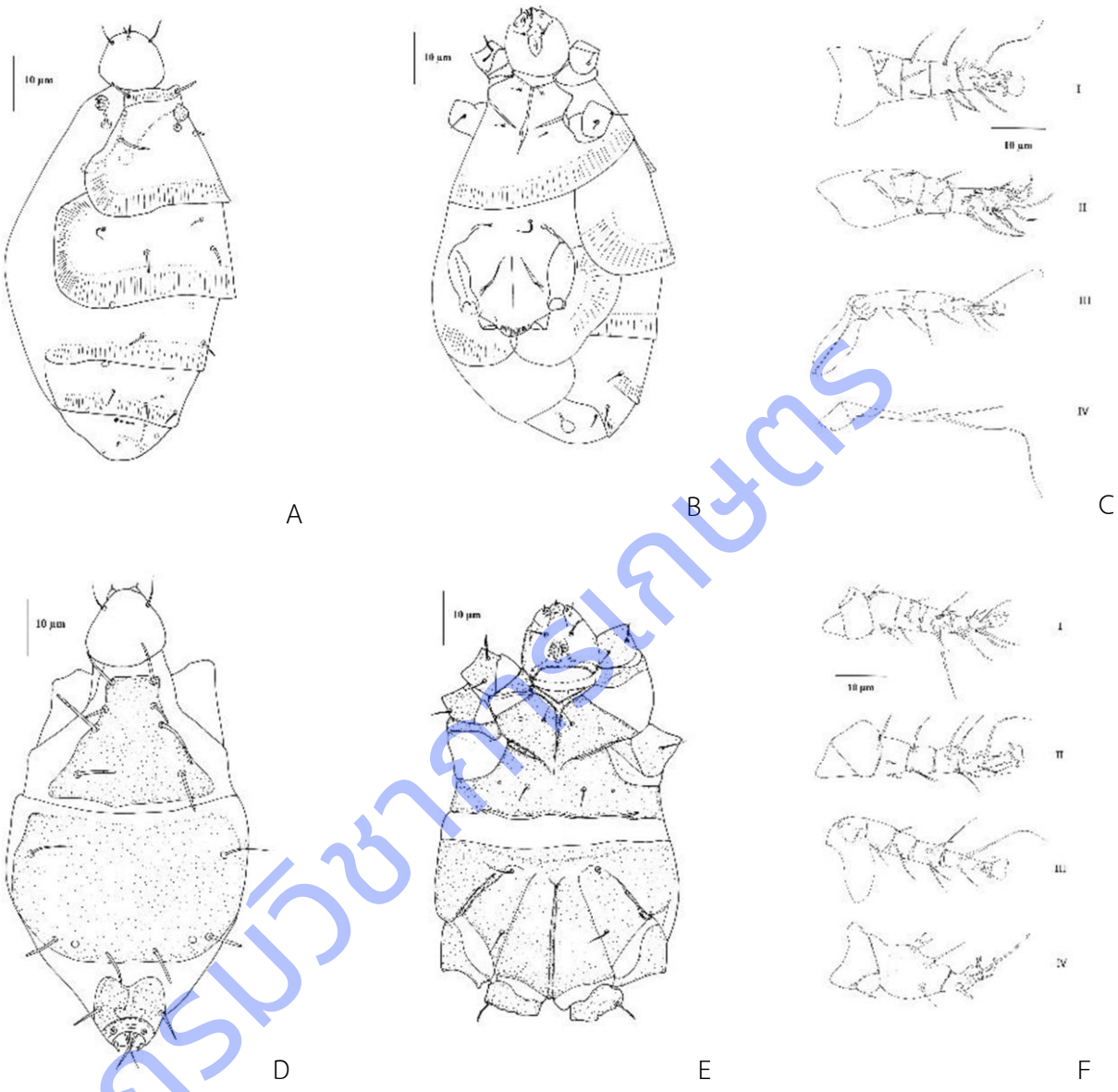


Figure 4. *Steneotarsonemus furcatus* De Leon เพศเมีย; A. ด้านสันหลัง, B ด้านล่าง, C. ขา I-IV, เพศผู้; D, ด้านสันหลัง, E. ด้านล่าง, F. ขา I-IV.

กรมวิชาการเกษตร

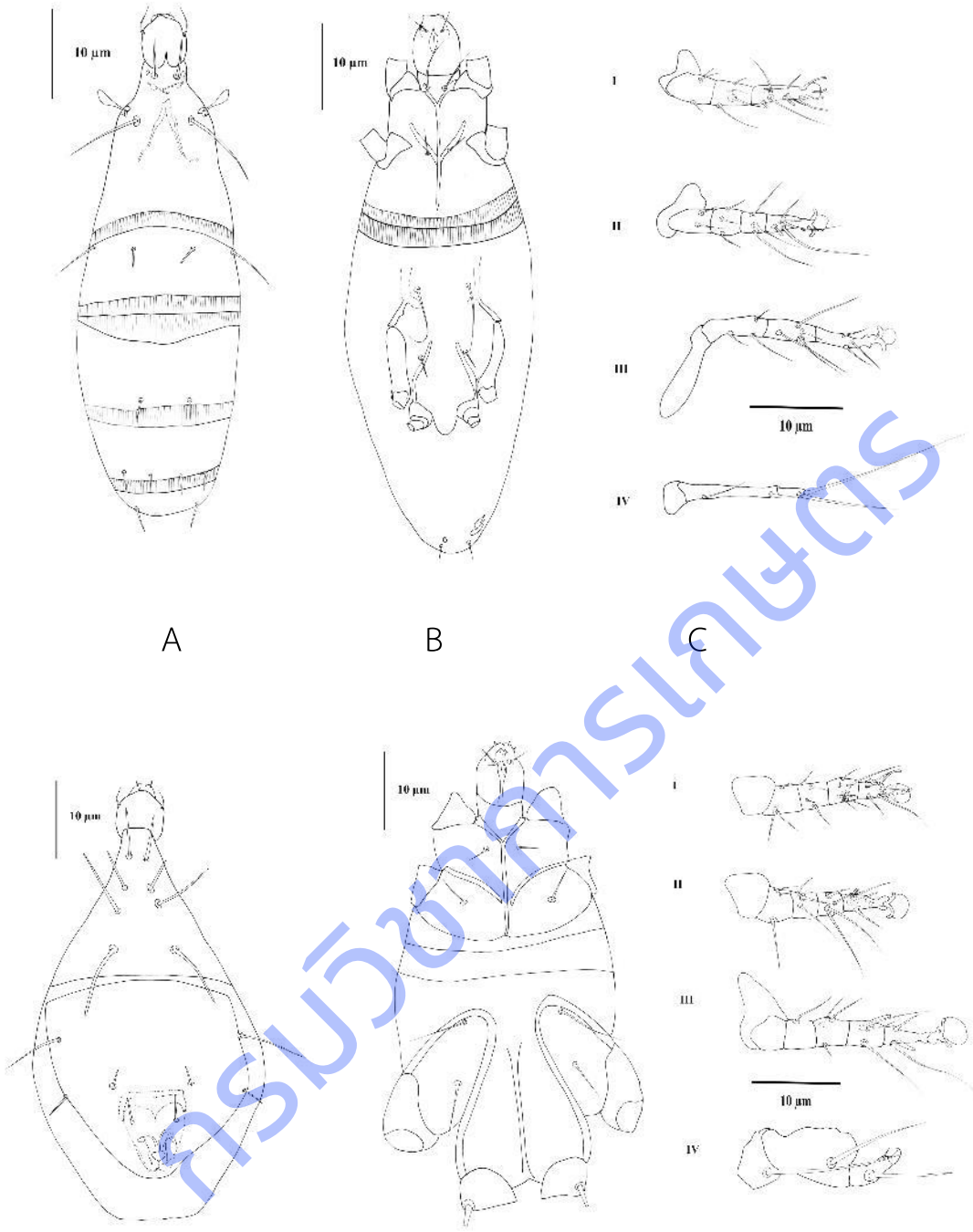


Figure 1.1.21.5. *Steneotarsonemus spinki* Smiley เพศเมีย; A. ด้านสันหลัง, B ด้านล่าง, C. ขา I-IV, เพศผู้; D, ด้านสันหลัง, E. ด้านล่าง, F. ขา I-IV.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.21.6. A. ไรขาวพริก เพศผู้ด้านบน และเพศเมีย *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) B. อาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของไรในพริก

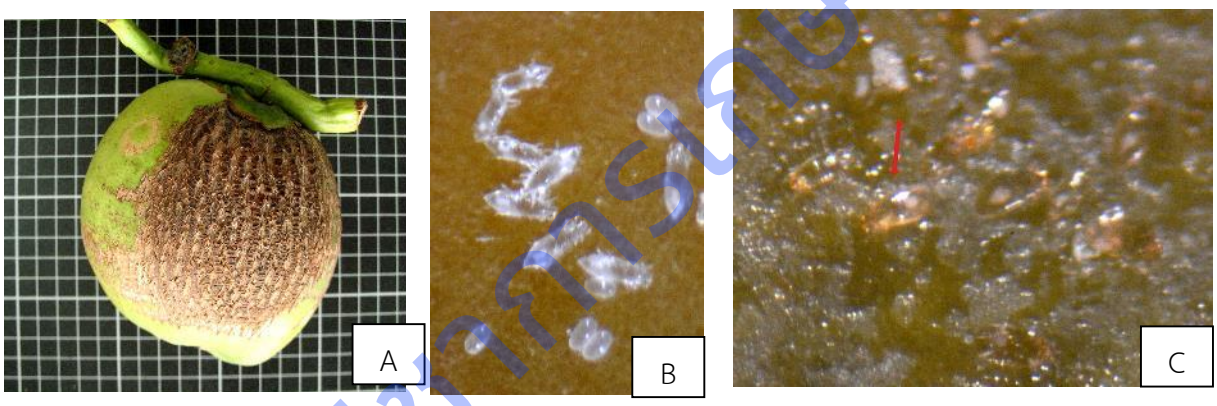


Figure 1.1.21.7. *Steneotarsonemus furcatus* De Leon; A. ลักษณะอาการเข้าทำลายบนผล, B, ตัวอ่อน, C, ตัวเต็มวัยขณะมีชีวิต

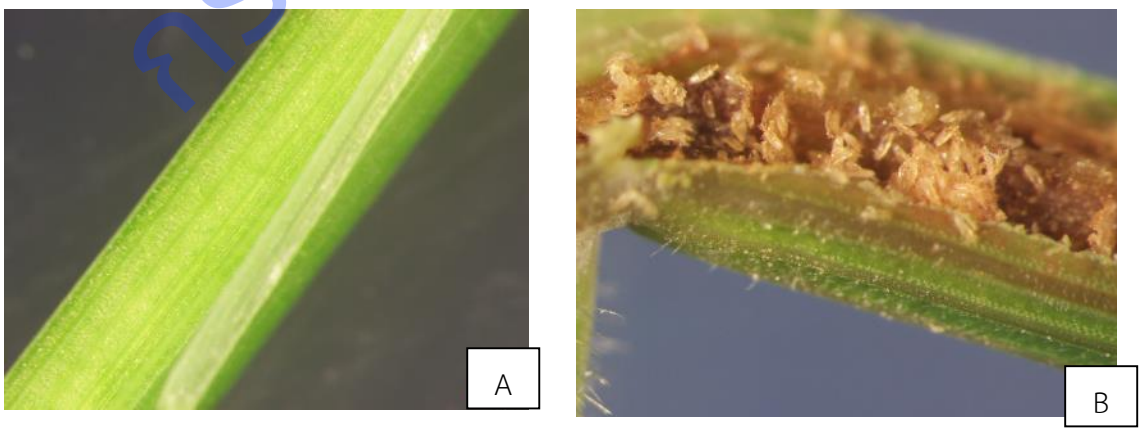


Figure 1.1.21.8. *Steneotarsonemus spinki* Smiley A. ลักษณะอาการเข้าทำลายบนใบข้าว, B, ตัวอ่อนและเต็มวัยขณะมีชีวิต

กรมวิชาการเกษตร

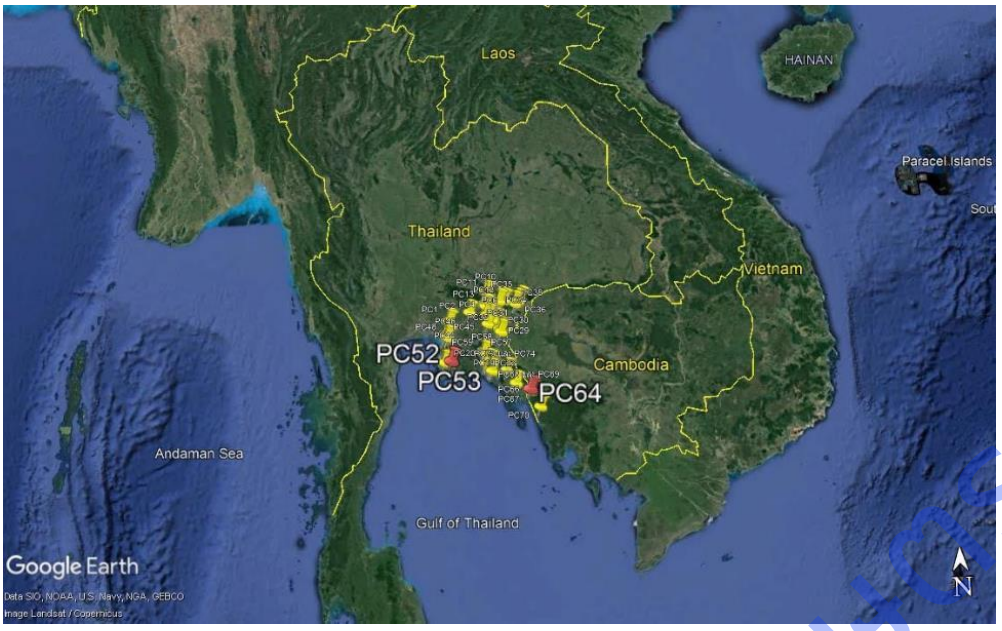


Figure 1.1.22.1. The sampling sites of collected 76 soil samples in Thailand.

Figure 1.1.22.2. The sampling sites of collected 76 soil samples in Eastern Thailand.

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

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.

ลิขสิทธิ์การเกษตร

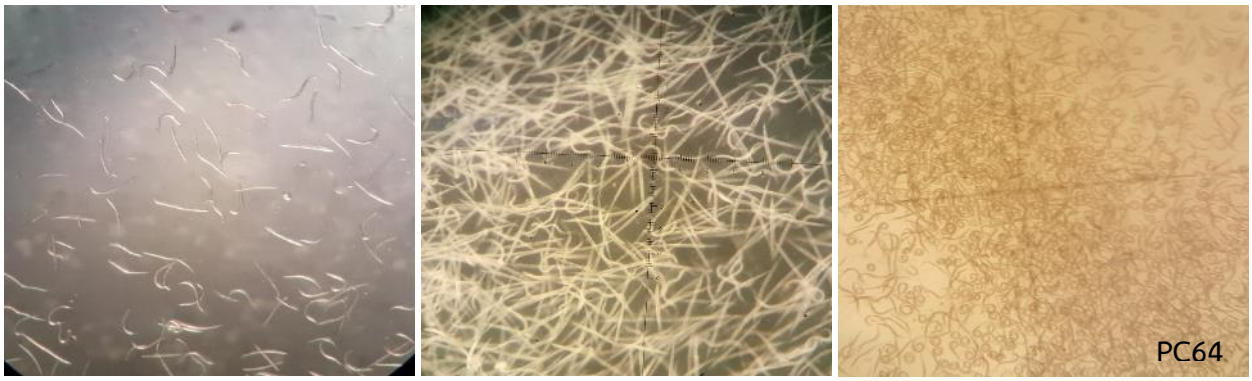


Figure 1.1.22.5. The characteristic of three different entomopathogenic nematodes.

PC52 : *Steiernema* sp.

PC53 : *Heterorhabditis* sp.

PC64 : *Steiernema* sp.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.23.1 Samples of Agromyzid leafminer collected from host plants in Thailand.

ZSUBSTRATES

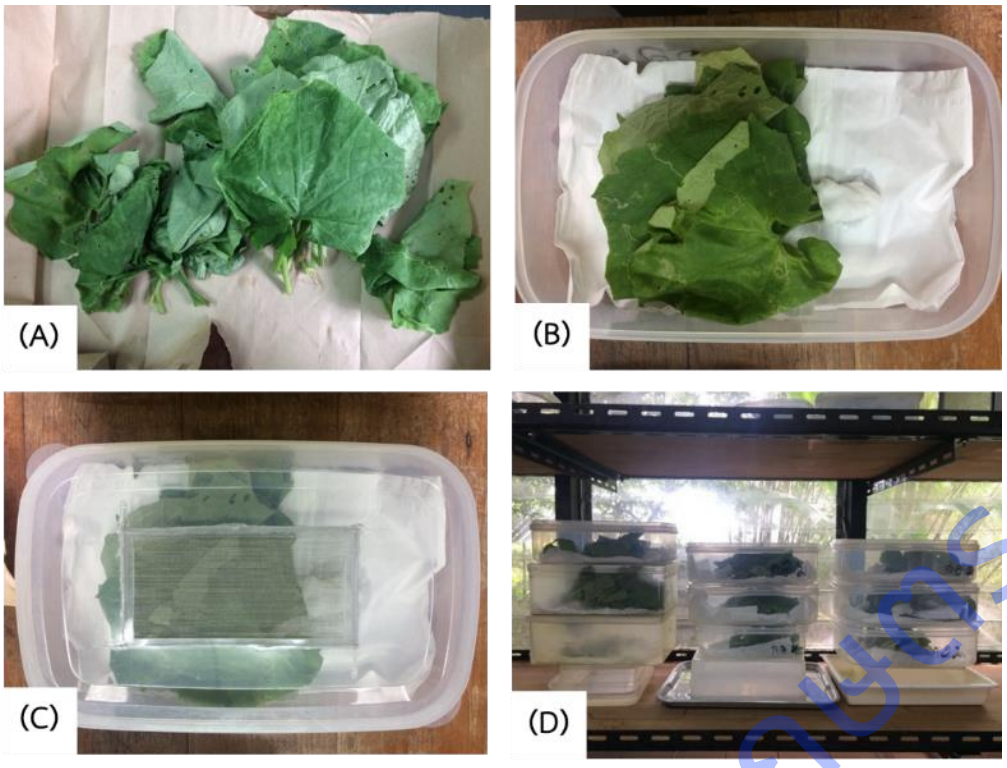


Figure 1.1.23.2 Agromyzid leafminer larvae reared on vegetable leaflets: (A) leaflets collected from vegetable farms, leaflets with mines containing agromyzid larvae; (B-D) larval rearing containers with leaflets on moisturized paper towels.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.23.3 Abdomen in adult of Agromyzid leafminer

(A) Female of leafminer

(B) Male of leafminer

กรมวิชาการเกษตร

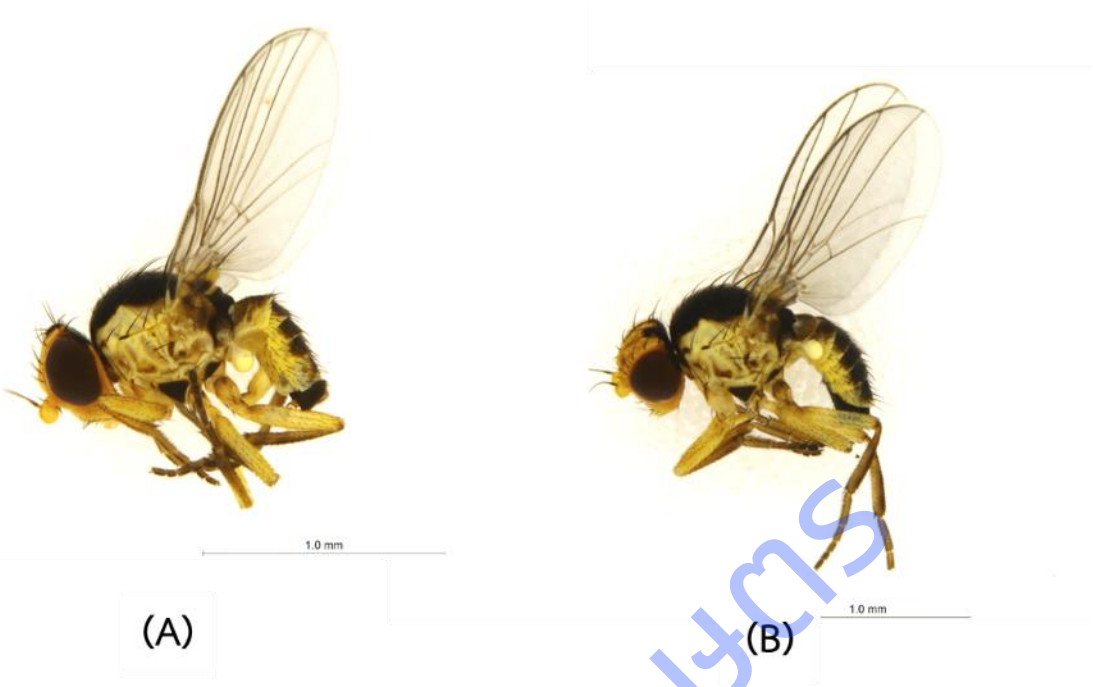


Figure 1.1.23.4 Adult of *Liriomyza brassicae* (Riley) (side view of typical)

(A) Male (B) Female

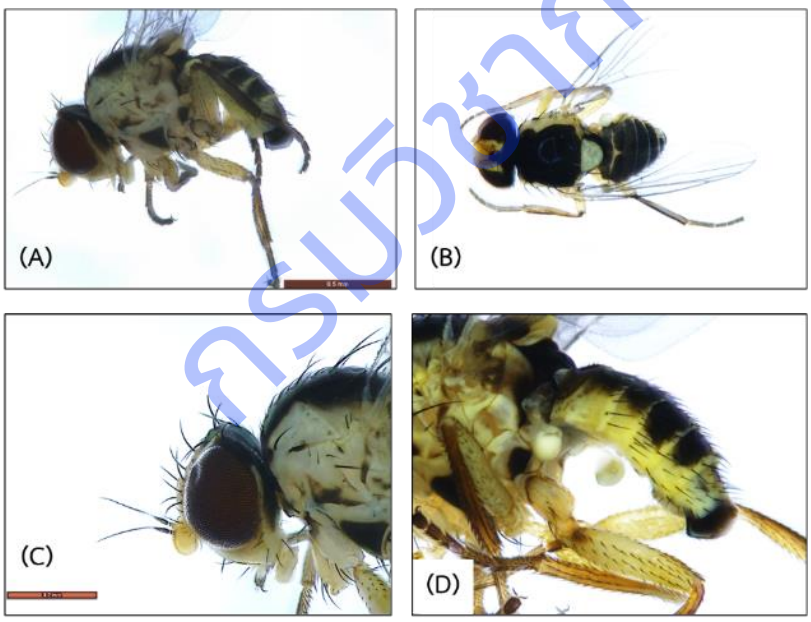


Figure 1.1.23.5 Adult of *Liriomyza brassicae* (Riley)

(A) head (B) thorax

(C) pronotum (D) abdomen

กรมวิชาการเกษตร

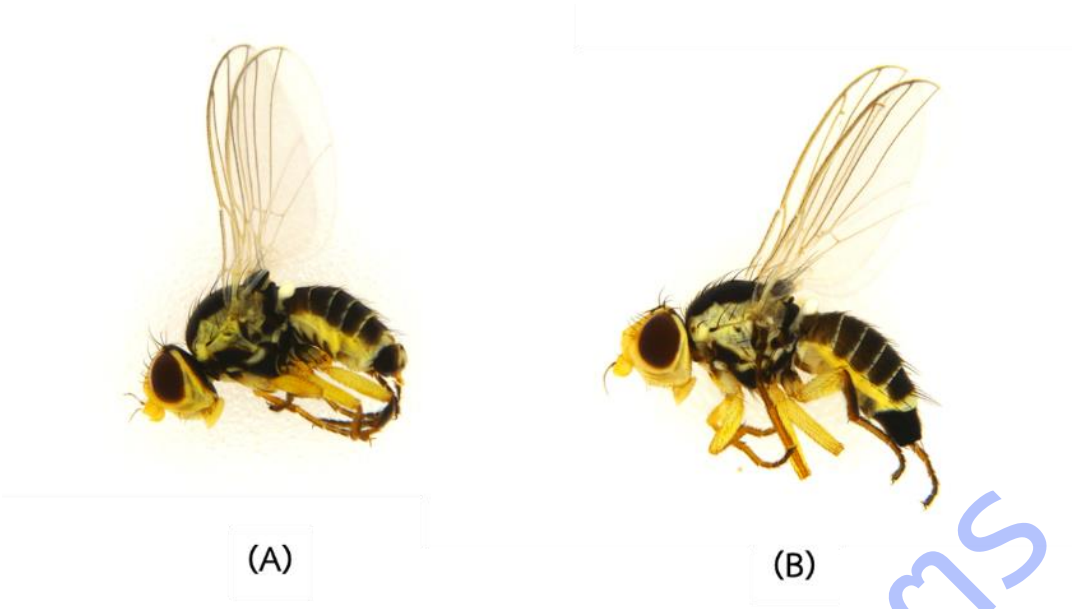


Figure 1.1.23.6 Adult of *Liriomyza chinensis* (side view of typical)

(B) Male (B) Female

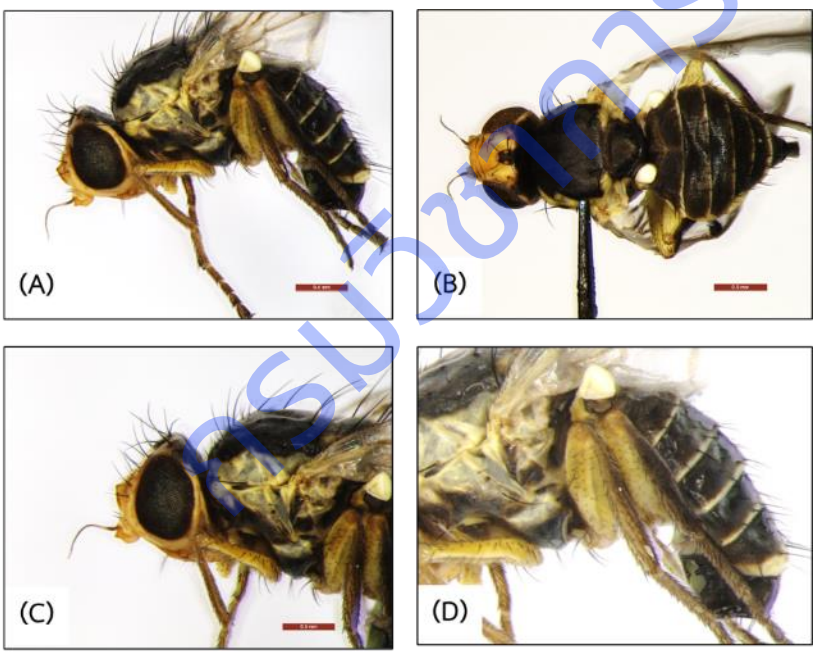


Figure 1.1.23.7 Adult of *Liriomyza chinensis*

(A) head (B) thorax

(C) pronotum (D) abdomen

กรมวิชาการเกษตร

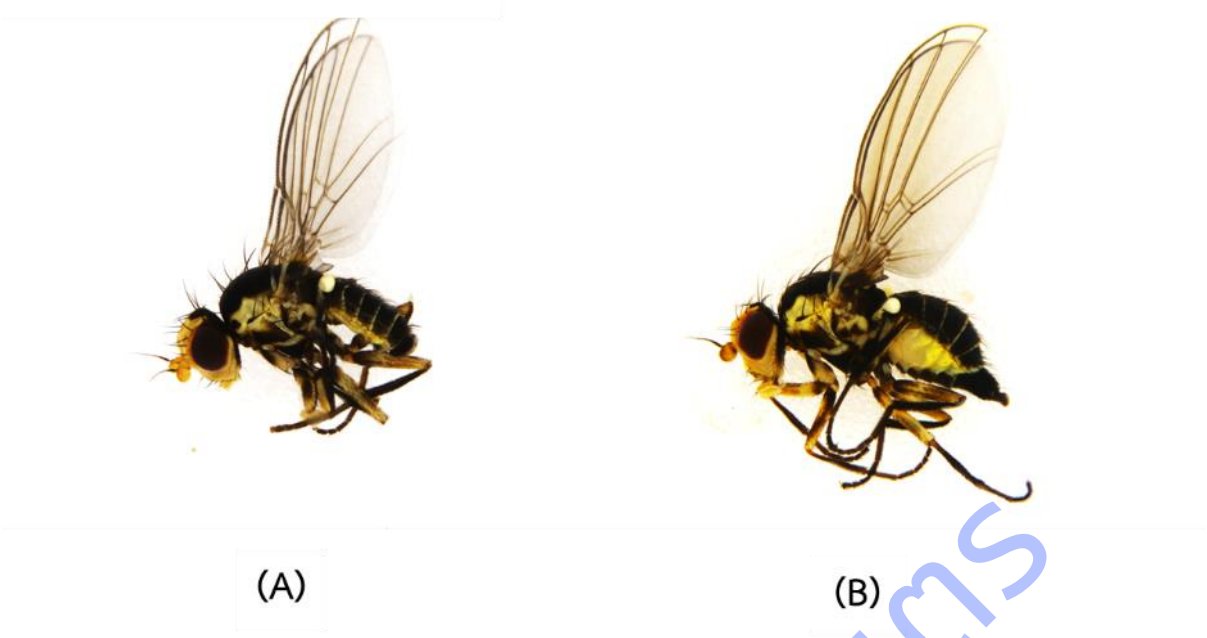


Figure 1.1.23.8 Adult of *Liriomyza huidrobrensis* (side view of typical)

(A) Male (B) Female

Figure 1.1.23.9 Adult of *Liriomyza huidrobrensis*

(A) head (B) thorax

(C) pronotum (D) abdomen

กรมวิชาการเกษตร

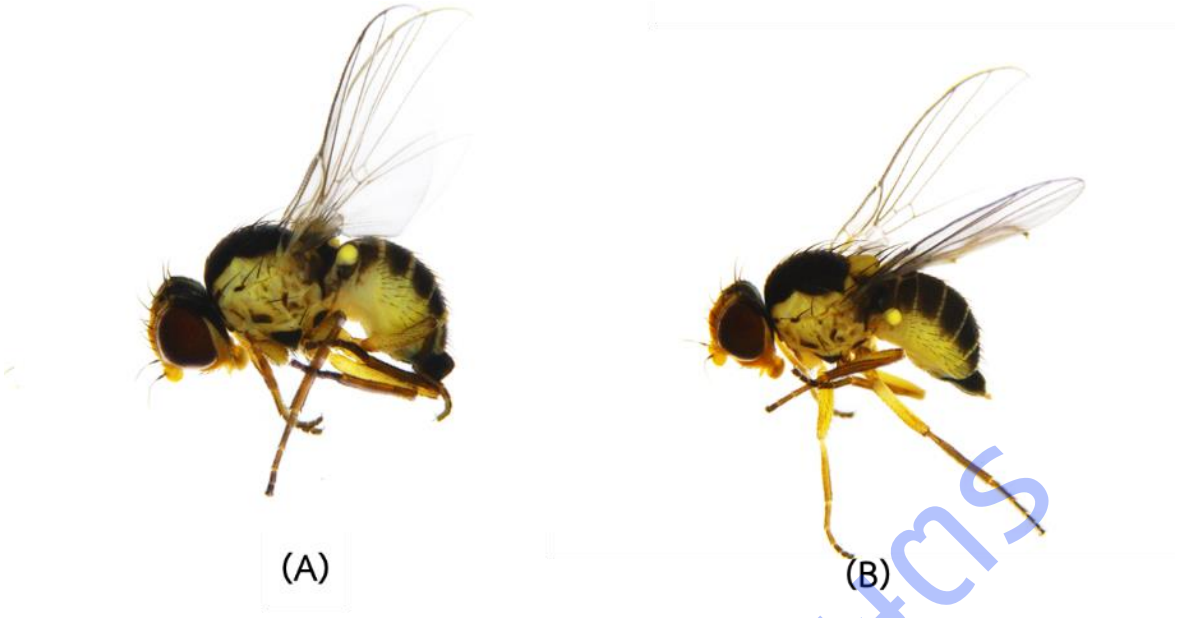


Figure 1.1.23.10 Adult of *Liriomyza sativae* (side view of typical)

(C) Male (B) Female

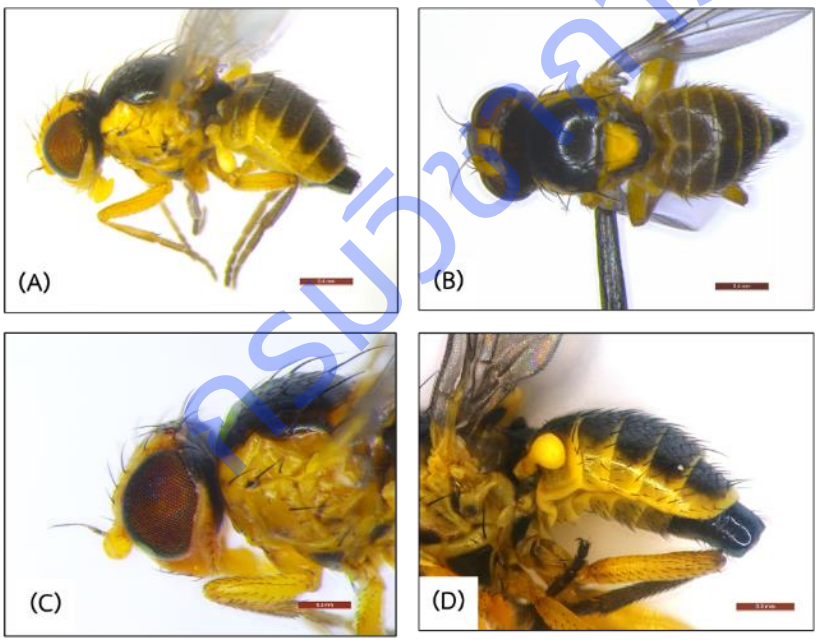


Figure 1.1.23.11 Adult of *Liriomyza sativae*

(A) head (B) thorax

(C) pronotum (D) abdomen

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.23.12 Adult of *Liriomyza trifolii* (Burgess, 1880) (side view of typical)

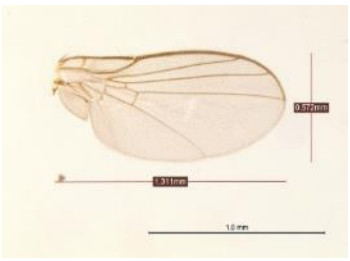
(A) Male (B) Female

Figure 1.1.23.13 Adult of *Liriomyza trifolii* (Burgess, 1880)

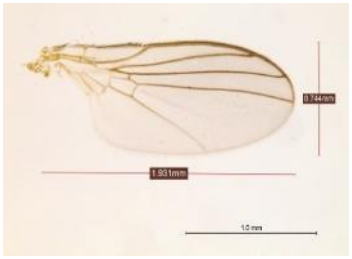
(A) head (B) thorax

(C) pronotum (D) abdomen

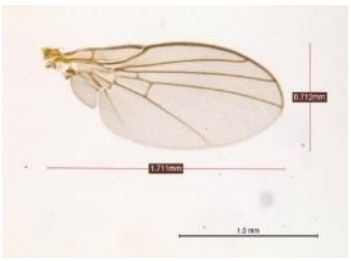
กรมวิชาการเกษตร



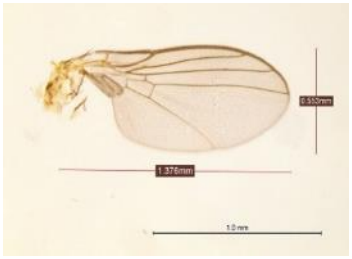
L. brassicae



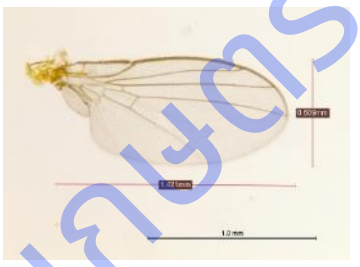
L. chinensis



L. huidobrensis



L. trifolii



L. sativae

Figure 1.1.23.14 Wing length and width of five *Liriomyza* species.

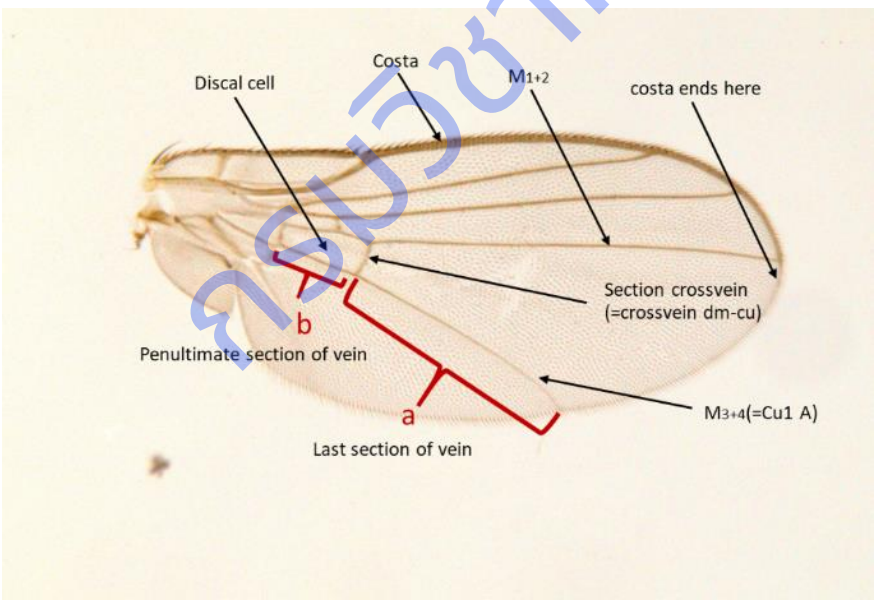
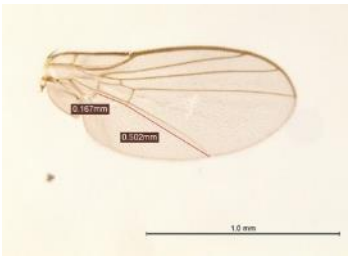
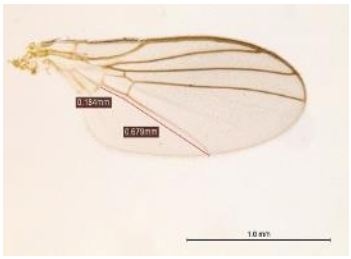


Figure 1.1.23.15 Wing venation of leafminer. Comparison of the wing patterns of*Liriomyza* species. The length of ultimate section of vein CuA_1 divided by penultimate section (a and b sections).

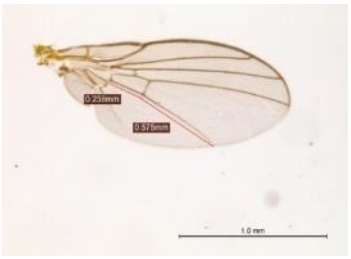
กรมวิชาการเกษตร



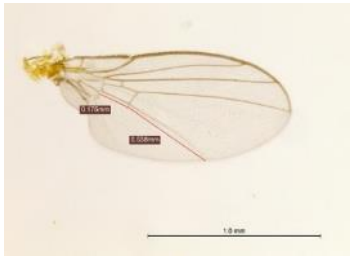
L. brassicae



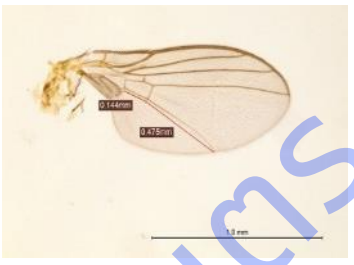
L. chinensis



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

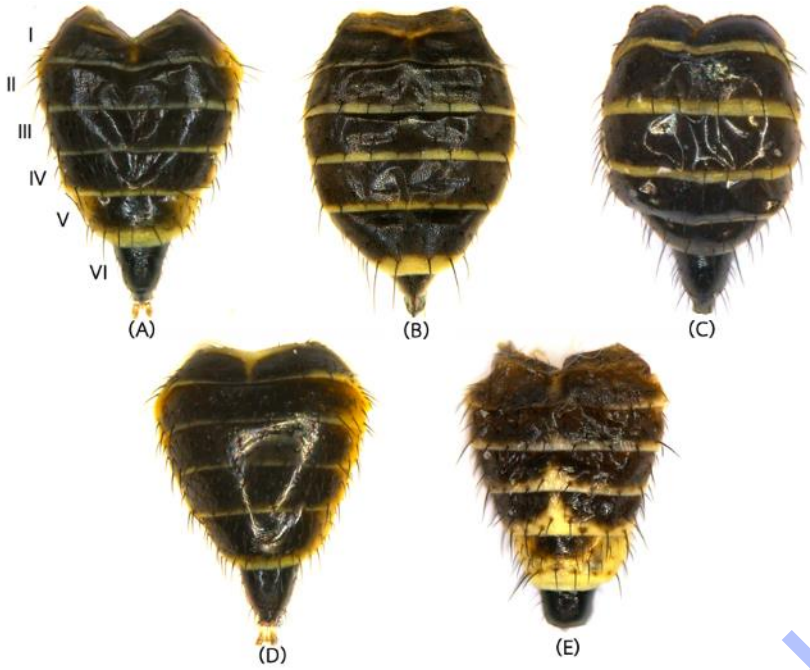


Figure 1.1.23.17 Diagrams of abdominal color patterns of five *Liriomyza* species. I to VI indicate the first to sixth visible abdominal tergites

A) *L. brassicae* B) *L. chinensis* C) *L. huidobrensis*

D) *L. sativae* E) *L. trifolii*

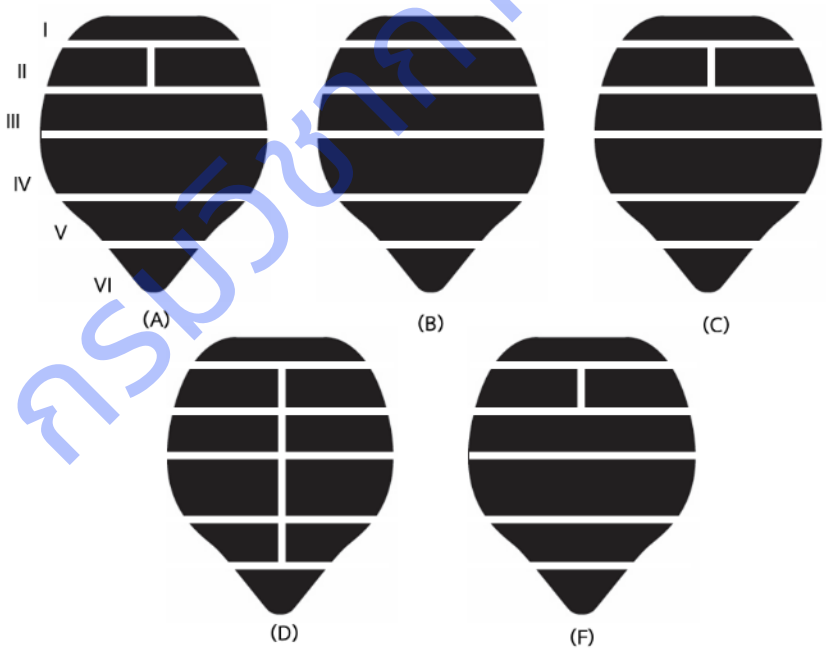
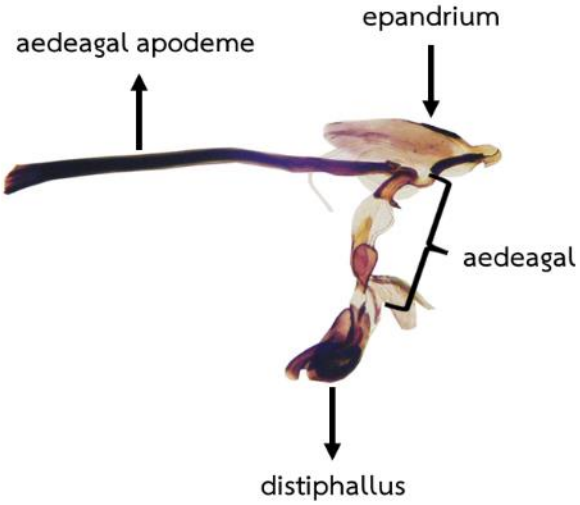


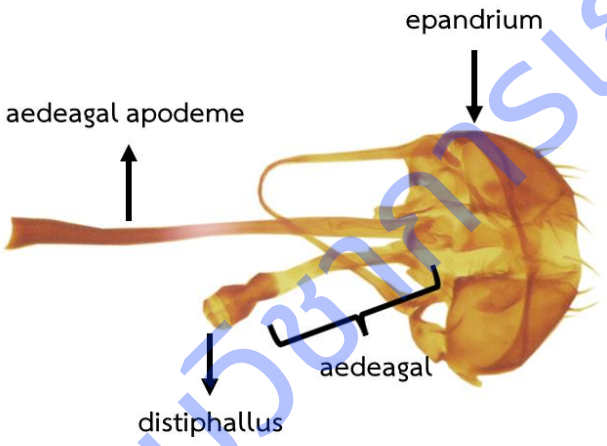
Figure 1.1.23.18 Diagrams of abdominal color patterns of five *Liriomyza* species. I to VI indicate the first to sixth visible abdominal tergites

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

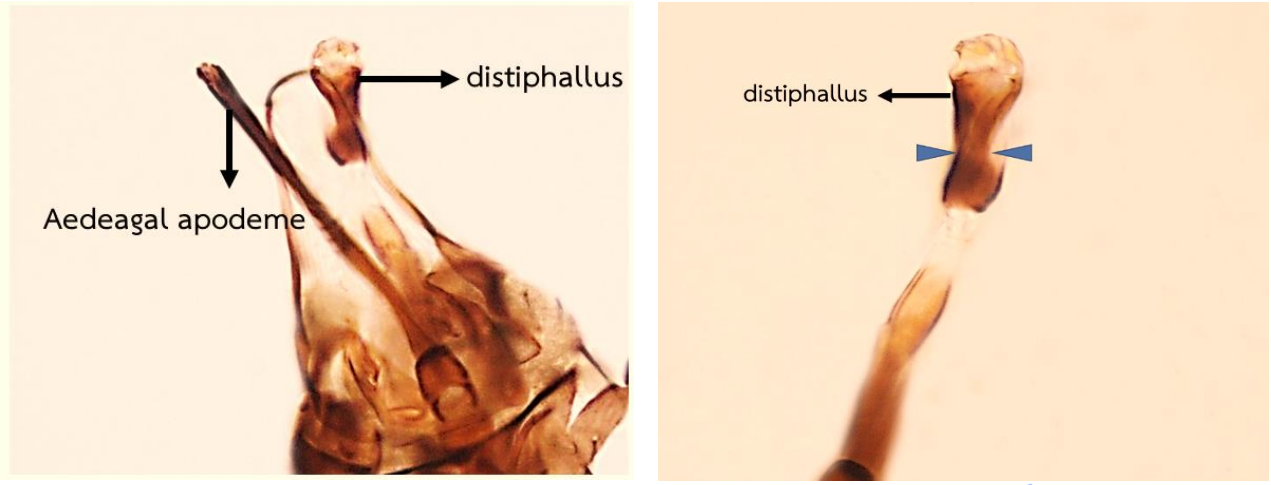


Figure 1.1.23.20 Male genitalia and phalluses of *Liriomyza brassicae* (Riley) (lateral view). Arrows indicate the distiphallus

Figure 1.1.23.21 Male genitalia and phalluses of *Liriomyza chinensis* (lateral view). Arrows indicate the distiphallus.

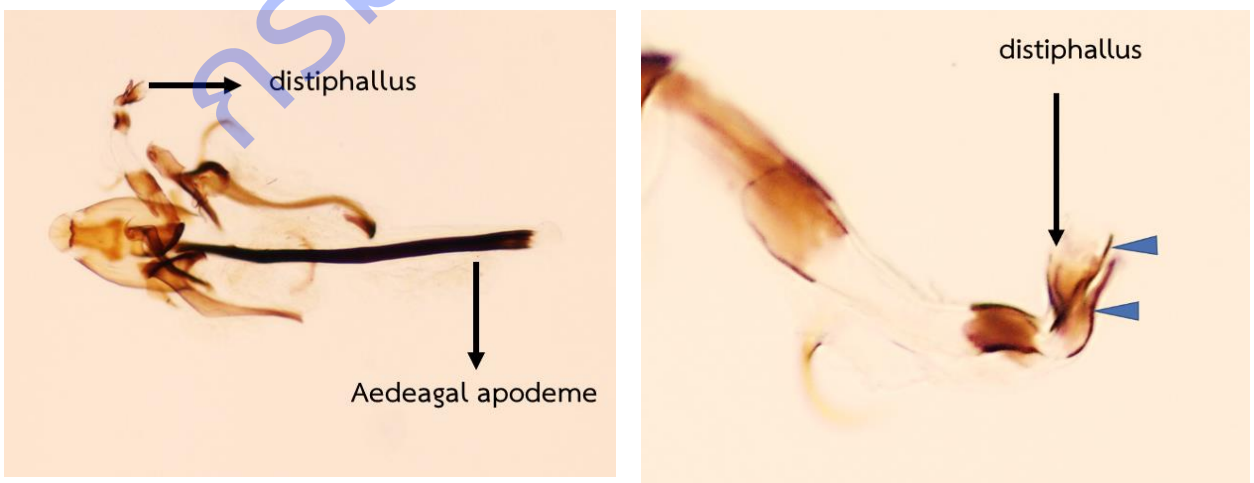
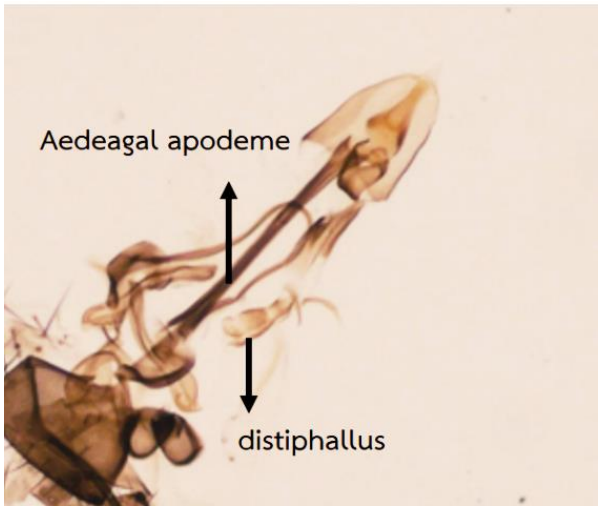


Figure 1.1.23.22 Male genitalia and phalluses of *Liriomyza huidrobrensis* (lateral view). Arrows indicate the distiphallus.

กรมวิชาการเกษตร



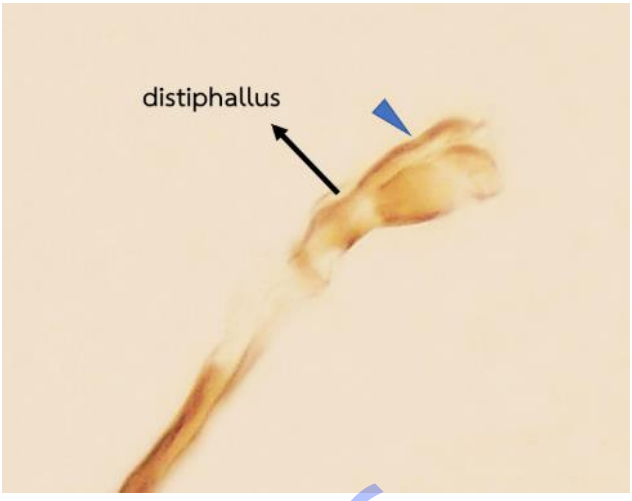
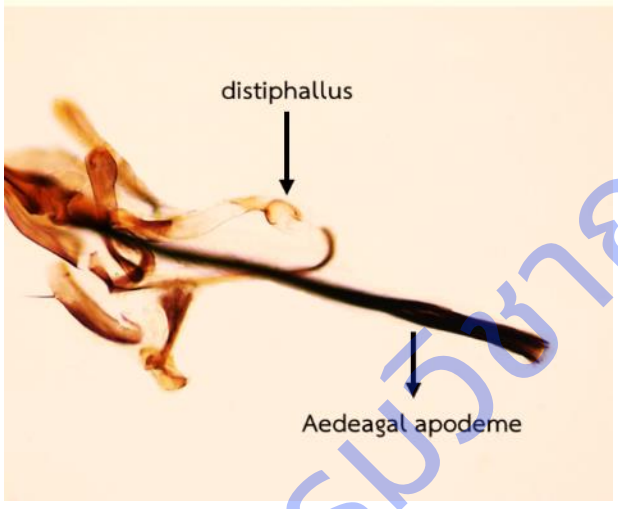
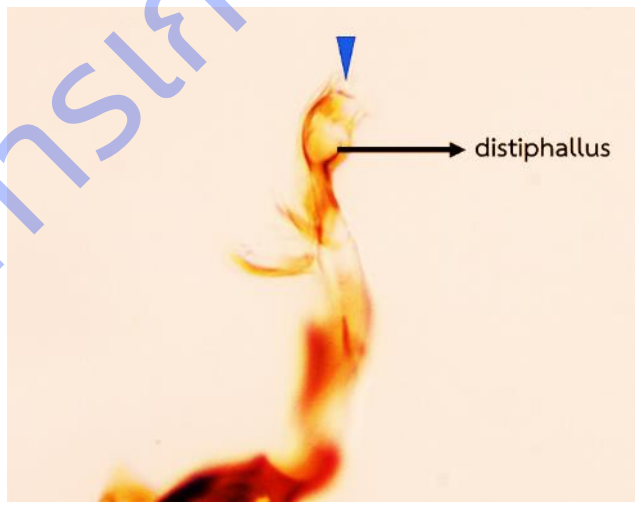


Figure 1.1.23.23 Male genitalia and phalluses of *Liriomyza sativae* (lateral view). Arrows indicate the distiphallus.





กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.1.23.24 Male genitalia and phalluses of *Liriomyza trifolii* (lateral view). Arrows indicate the distiphallus.

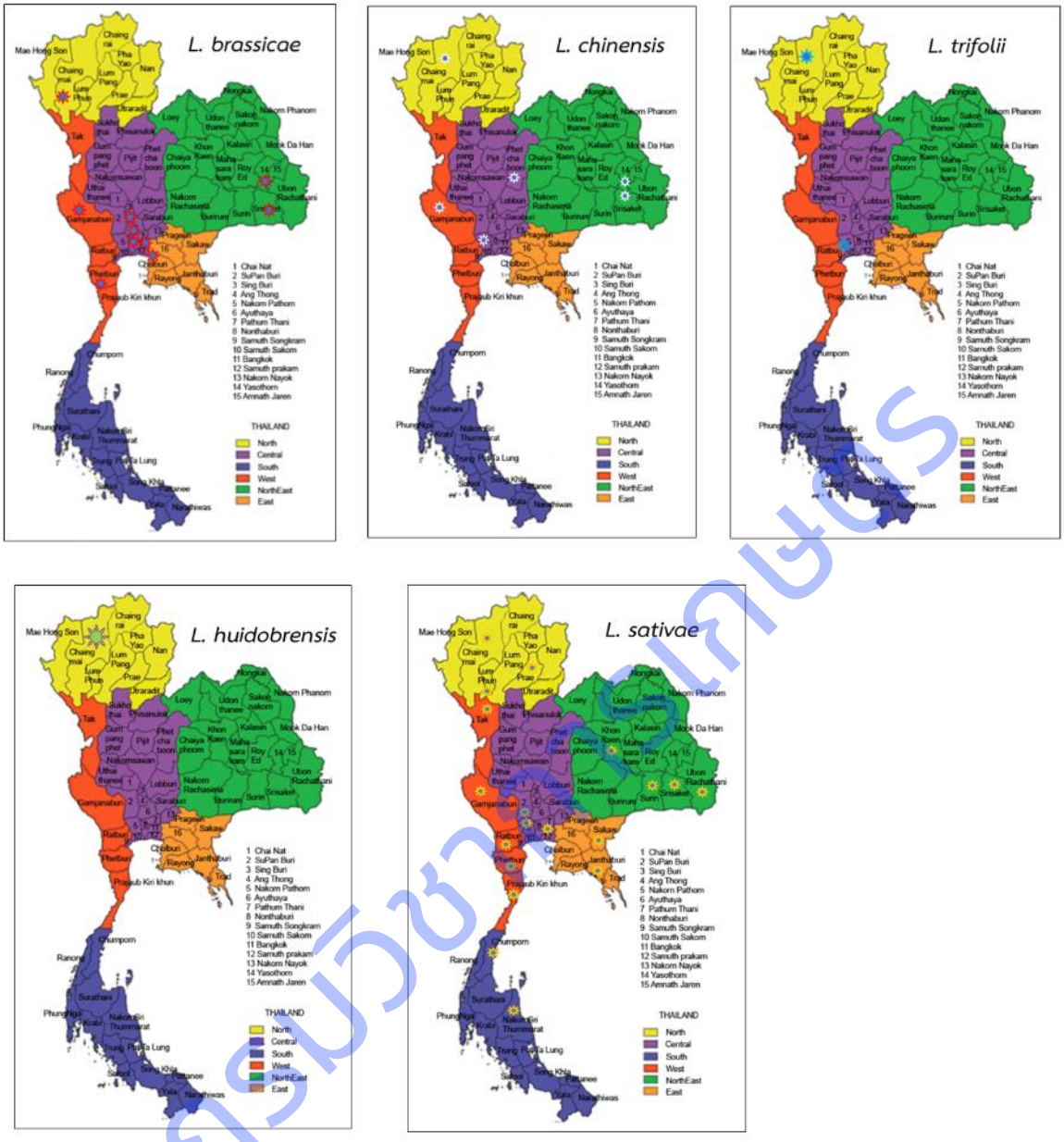


Figure 1.1.23.25 The distribution of leafminers in Thailand

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

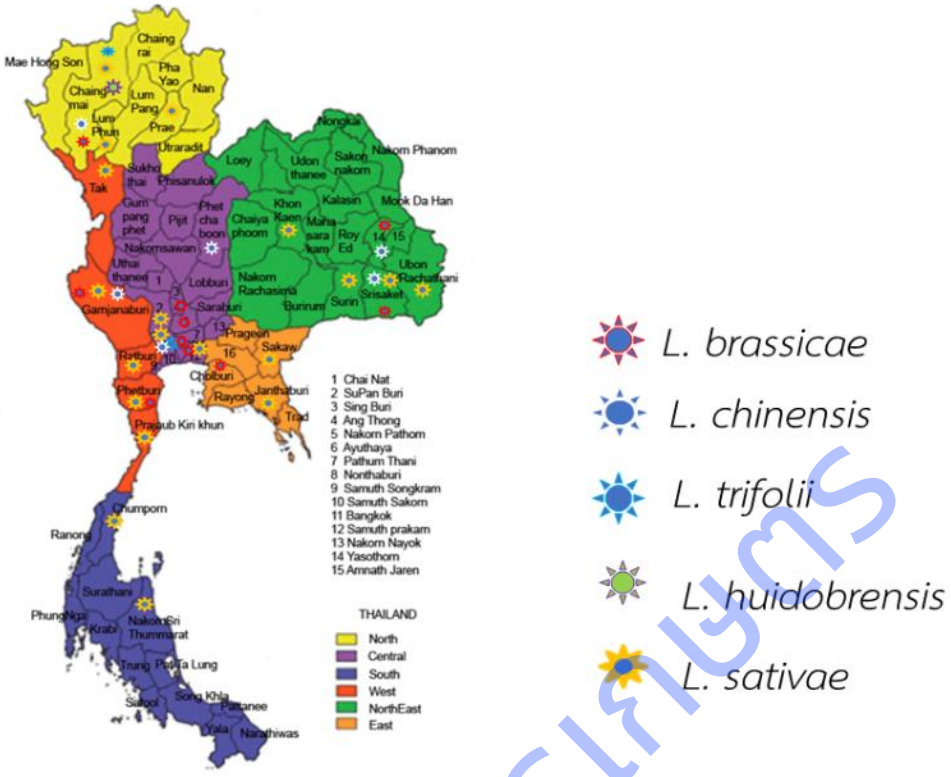


Figure 1.1.23.26 The distribution of leafminers in Thailand

กรมวิชาการเกษตร

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

กรมวิทยาศาสตร์

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)

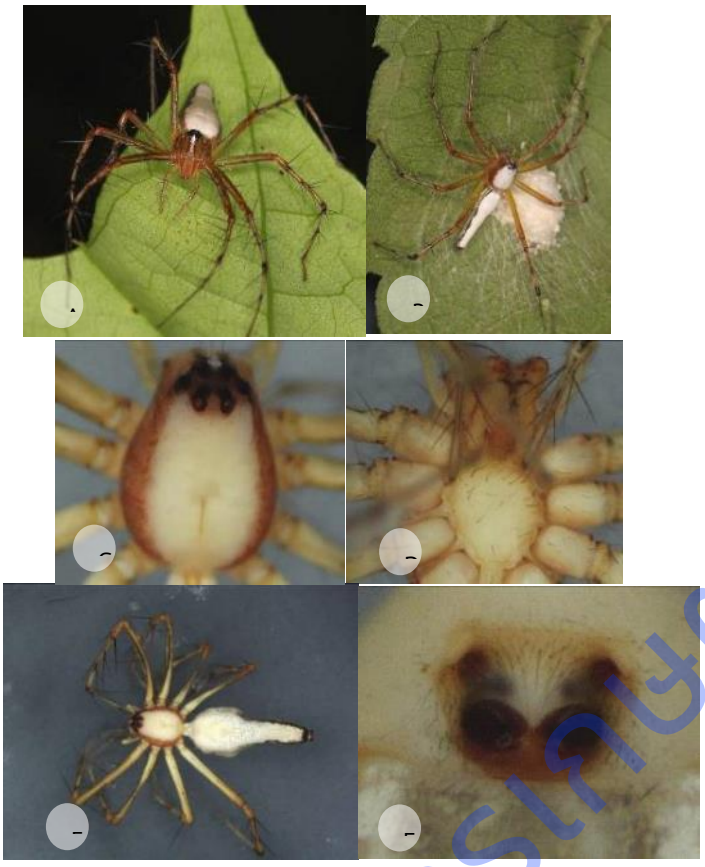


Figure 1.1.24.5 *Oxyopes shweta* Tikader, 1970; female habitat (A), female abdomen dorsal view (B), eye arrangement and carapace (C), labium and sternum (D), in alcohol (E), epigyne; ventral view (F)

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)

สถาบันวิทยบริการ

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)

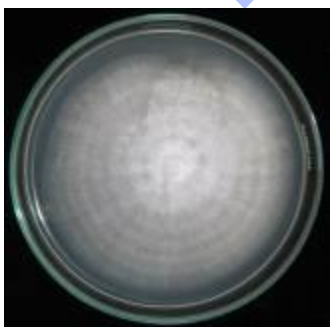


Figure 1.2.1.3 Colony types of *Phytophthora* isolated from taro on Potato dextrose agar (PDA) after 9 days incubation (left) and on Carrot agar (CA) after 11 days incubation. (right)

กรมวิชาการเกษตร

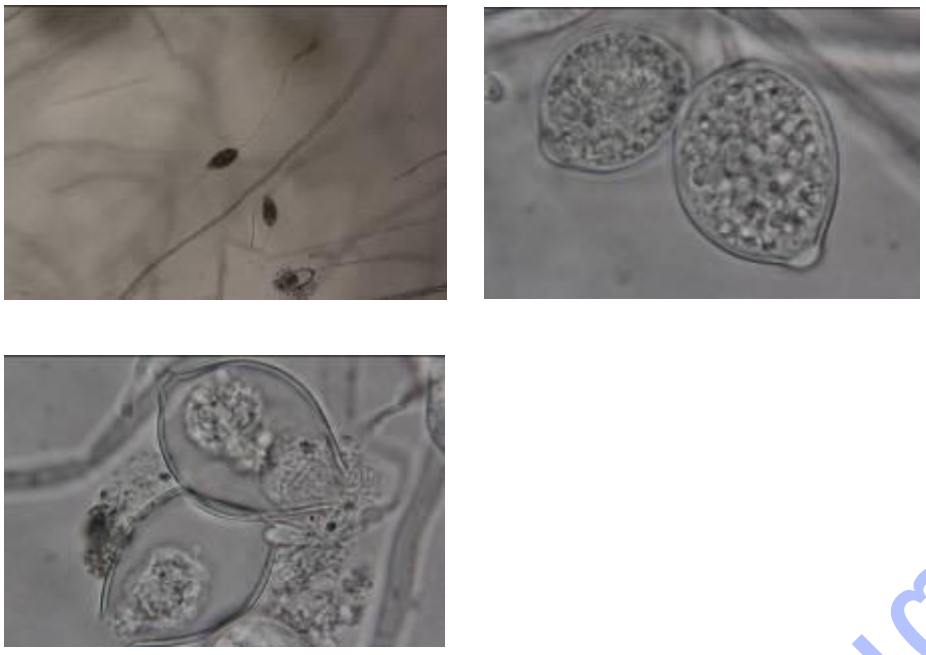


Figure 1.2.1.4 Microscopic view of mycelium and sporangium of *Phytophthora* on Potato dextrose agar (PDA)

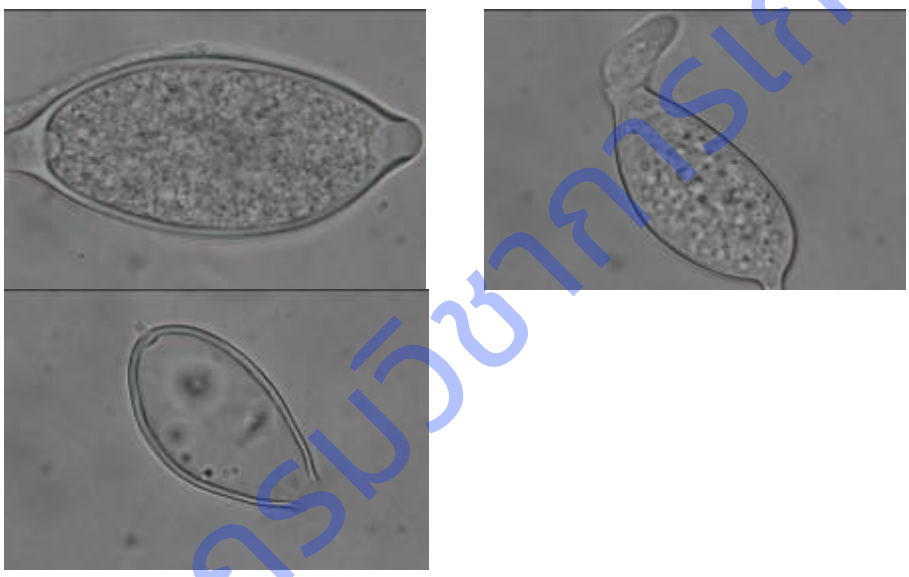


Figure 1.2.1.5 Microscopic view of sporangium of *Phytophthora* on Carrot agar (CA)

กรมวิชาการเกษตร

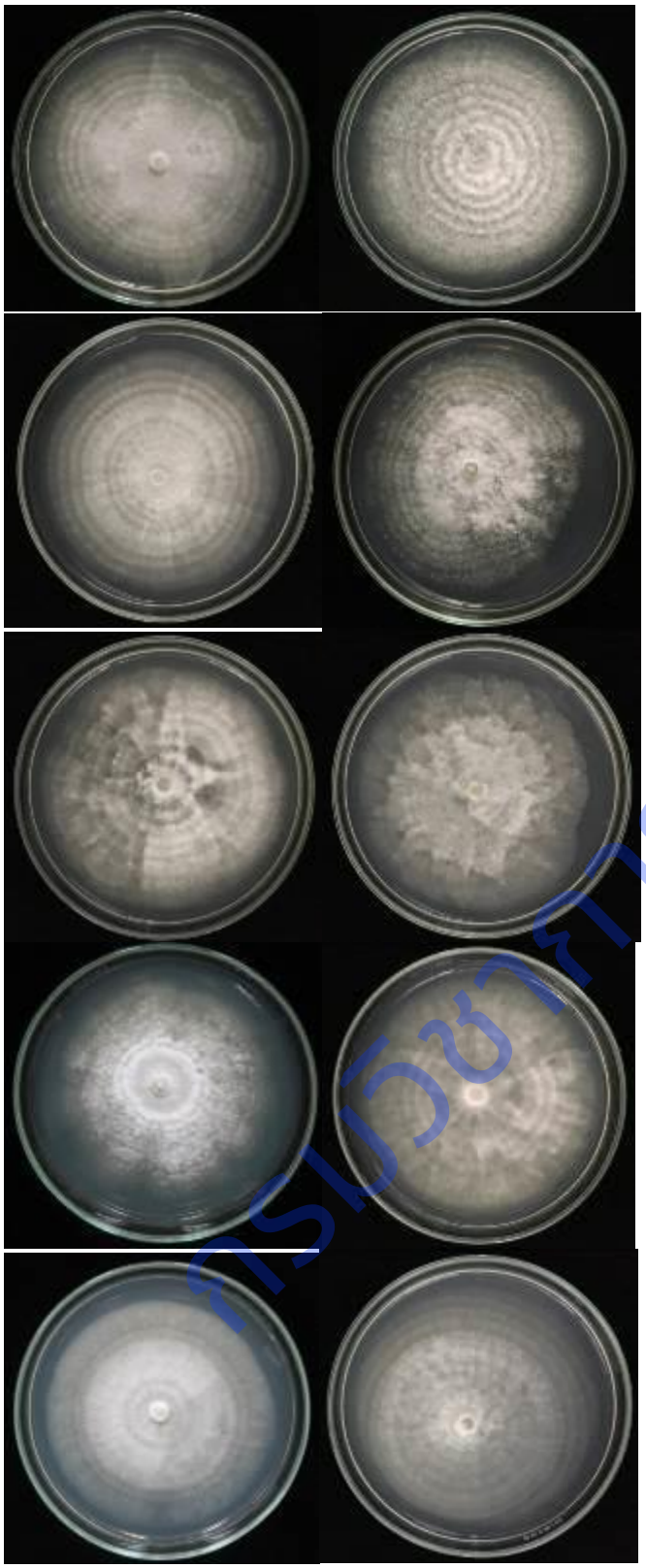


Figure 1.2.1.6 *Phytophthora colocasiae* isolates used for genetic characteristics.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตร

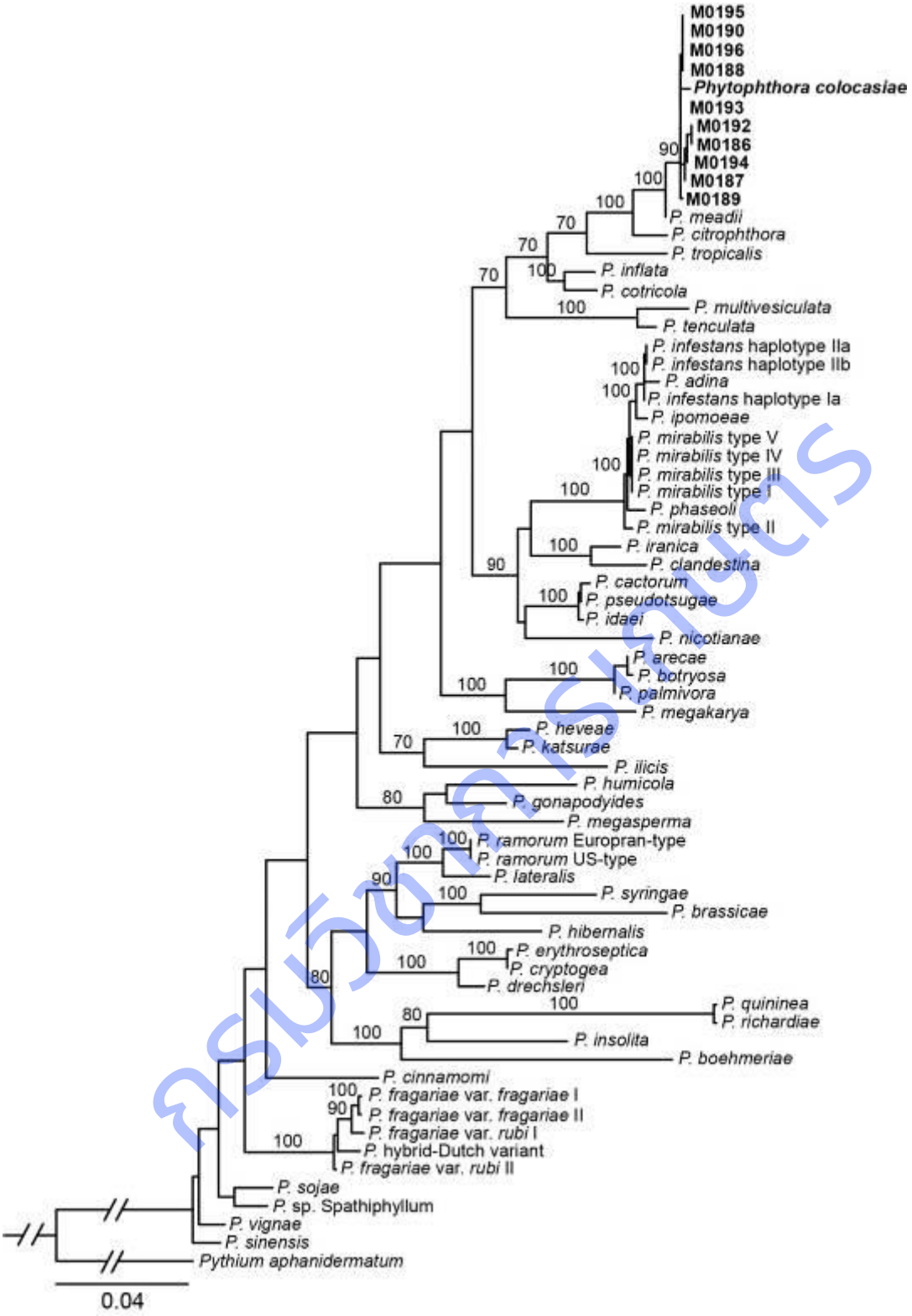


Figure 1.2.1.7 Phylogram obtained in a maximum likelihood search in RAxML of concatenated β-tubulin2 and TEF1 gene regions. Bootstrap support values (≥70%) from 1,000 replicates above nodes.

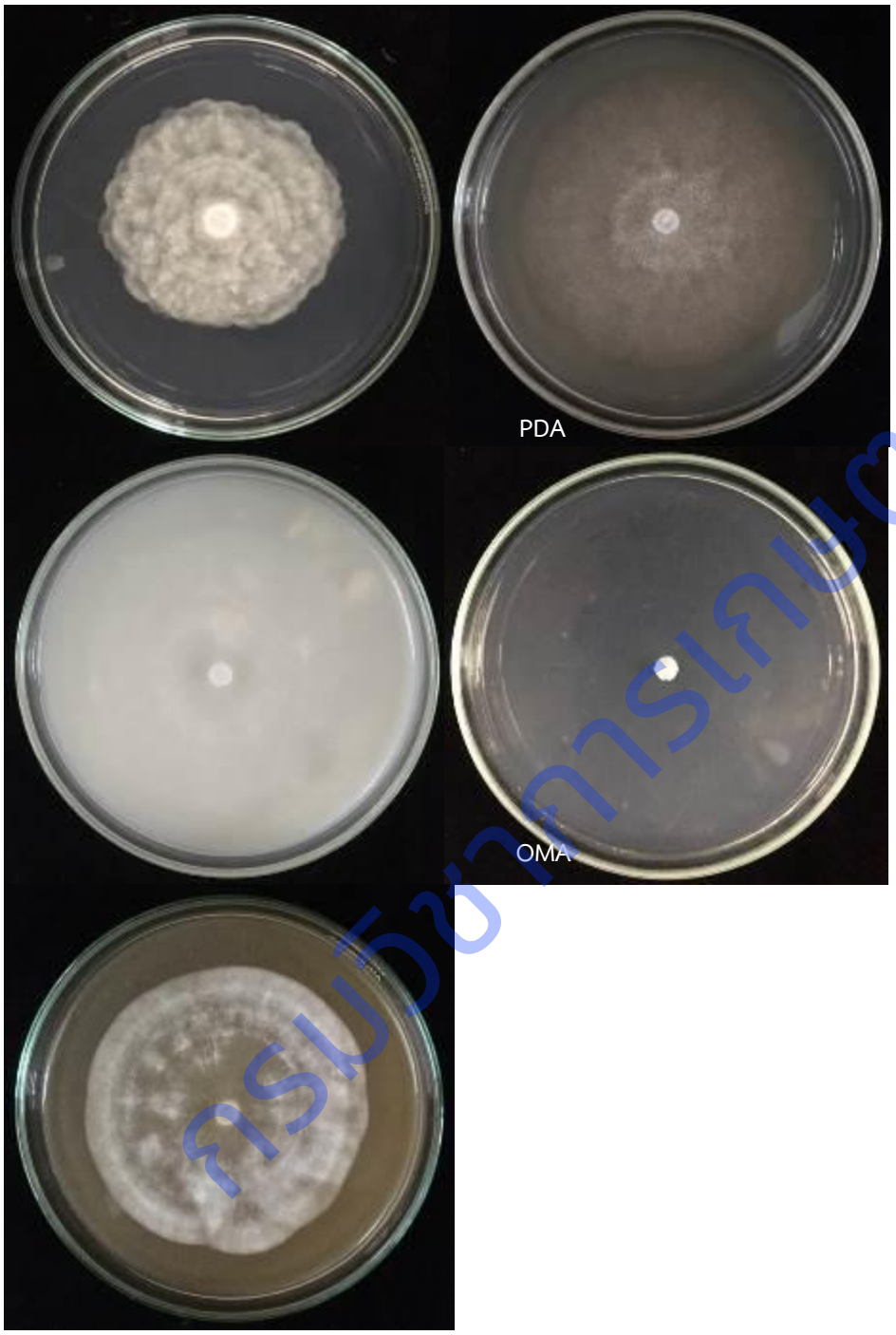


Figure 1.2.1.8 Colony growths of *Phytophthora colocasiae* on 5 selective media at 7 day.

กรมวิชาการเกษตร

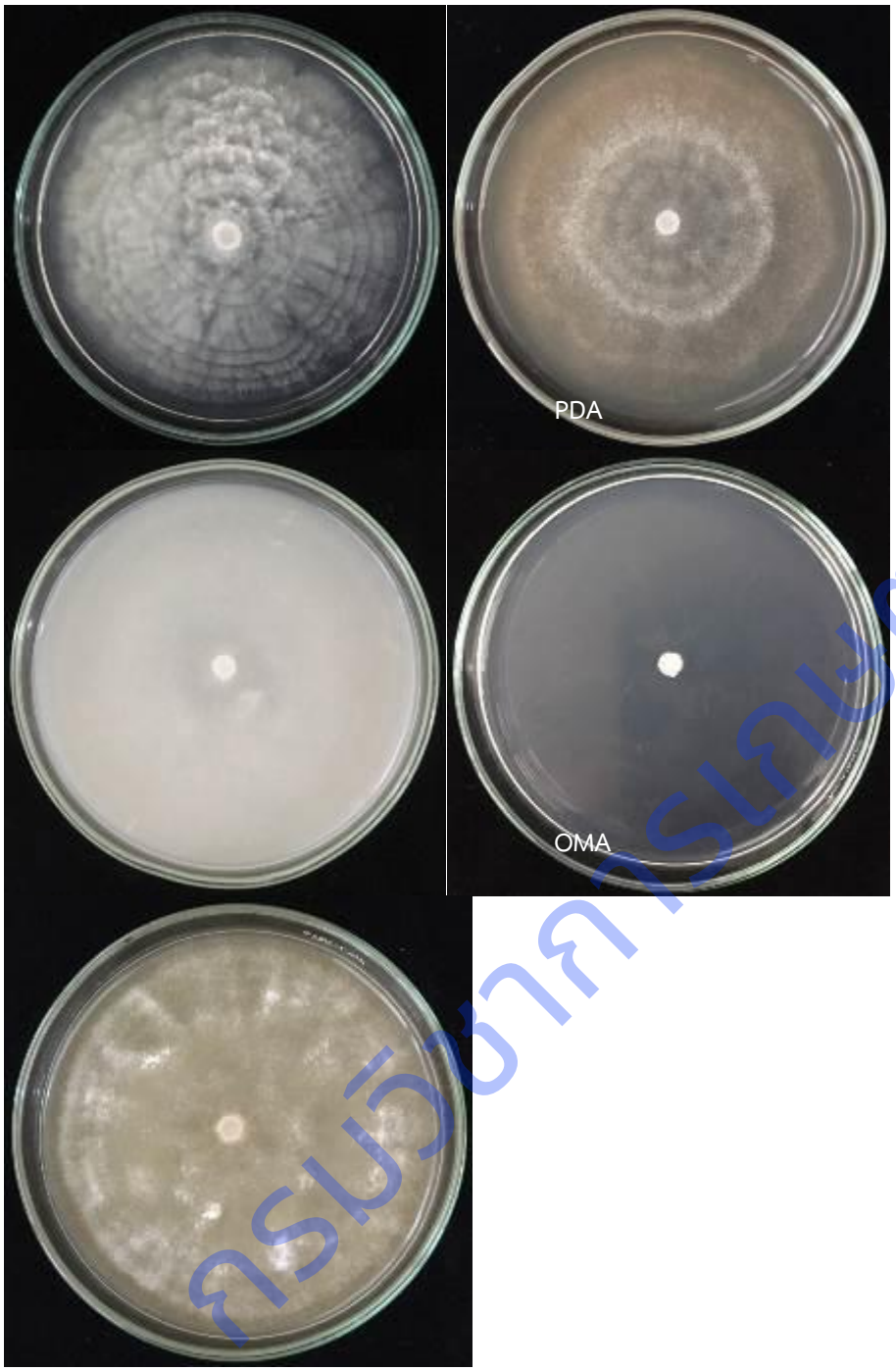
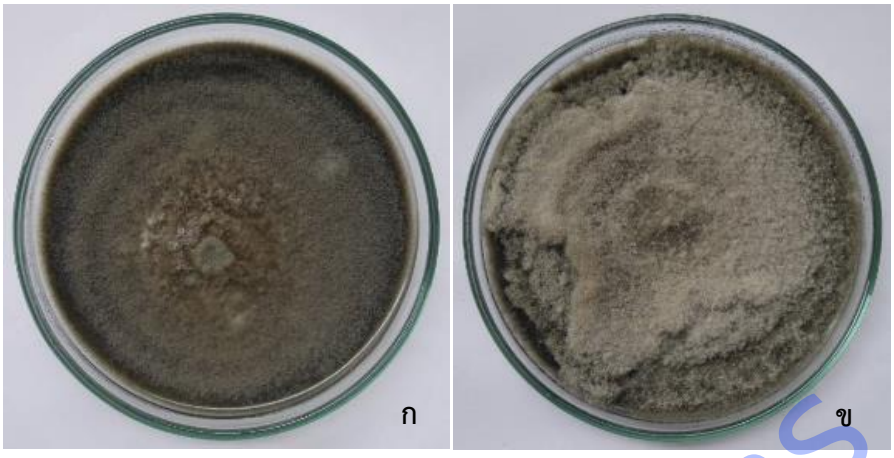


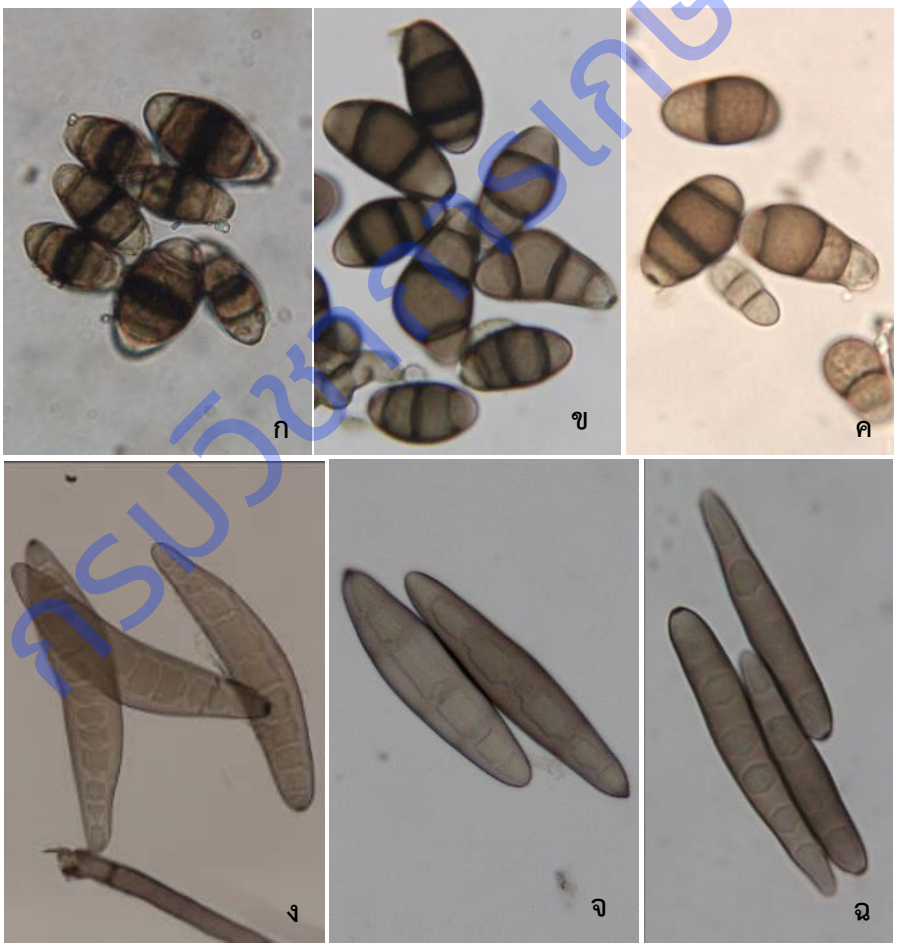
Figure 1.2.1.9 Colony growths of *Phytophthora colocasiae* on 5 selective media at 14 day.

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.2.2.1 ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคใบจุดและโรคใบไหม้ที่เกิดจากราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris* ที่เก็บจากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย



ภาพที่ 1.2.2.2 ลักษณะโคโลนีของรา ก) *Curvularia* sp. และ ข) *Bipolaris* sp.

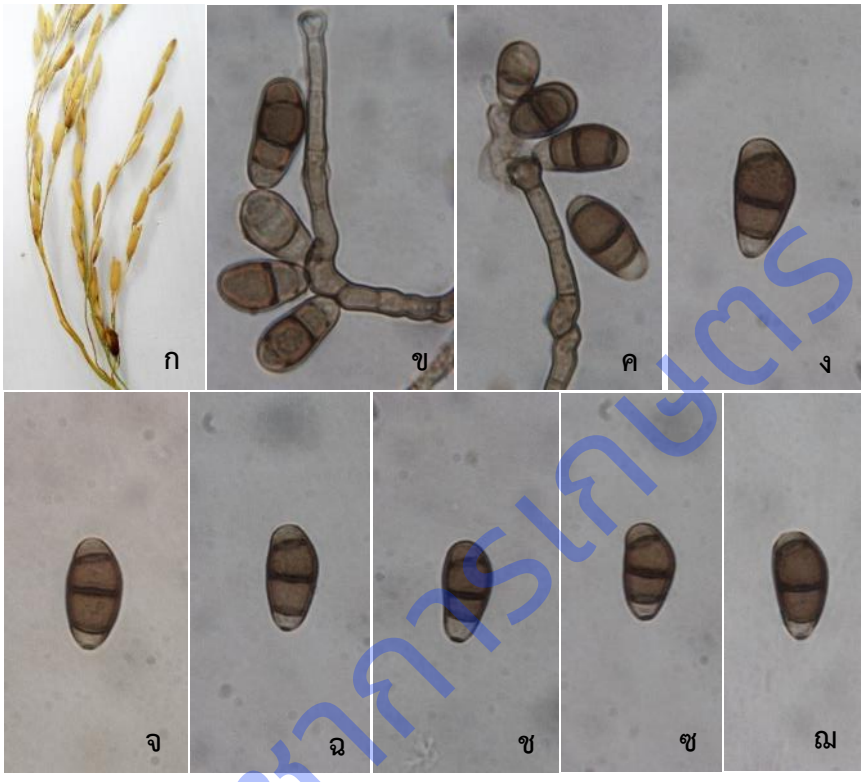


ภาพที่ 1.2.2.3 ลักษณะโคนิเดียของรา ก-ค) *Curvularia* และ ง-ฉ) *Bipolaris*

กรมวิชาการเกษตร

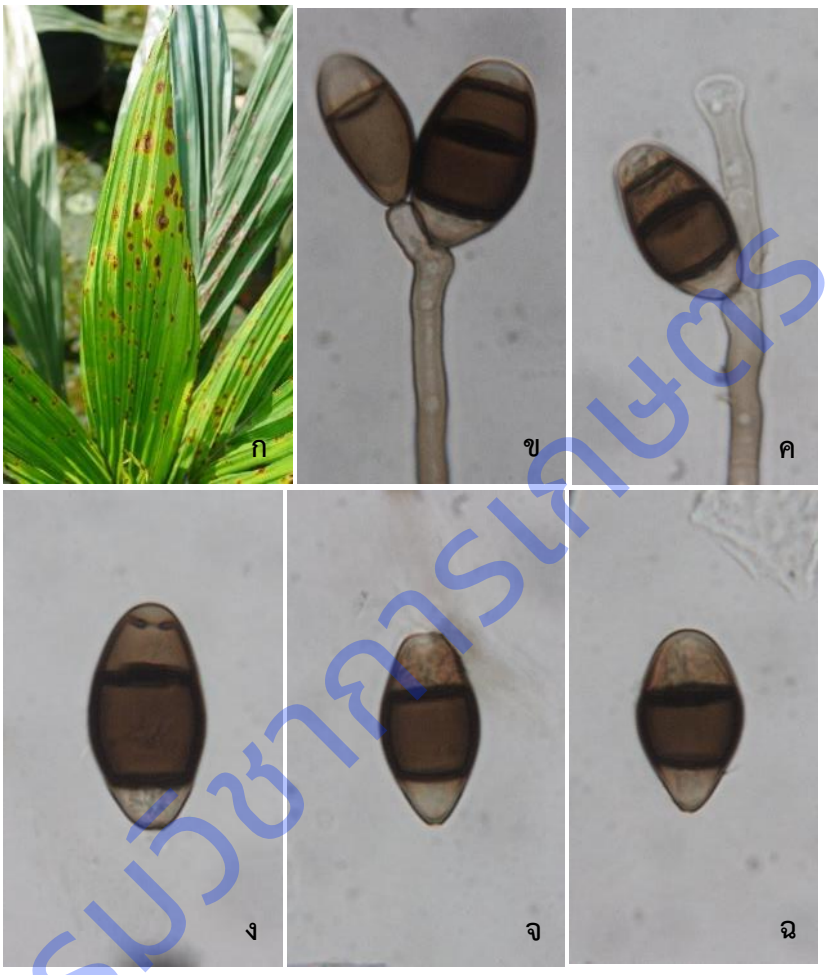
ภาพที่ 1.2.2.4 *Curvularia eragrostidis* : ก) ลักษณะอาการดอกจุดสนิมของกล้วยไม้
ข - ง) ก้านชูสปอร์และโคนิเดีย
จ - ซ) โคนิเดีย

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.2.2.5 *Curvularia lunata* : ก) ลักษณะอาการเมล็ดด่างข้าว
ข - ค) ก้านชูสปอร์และโคนิเดีย
จ - ฌ) โคนิเดีย

กรมวิชาการเกษตร

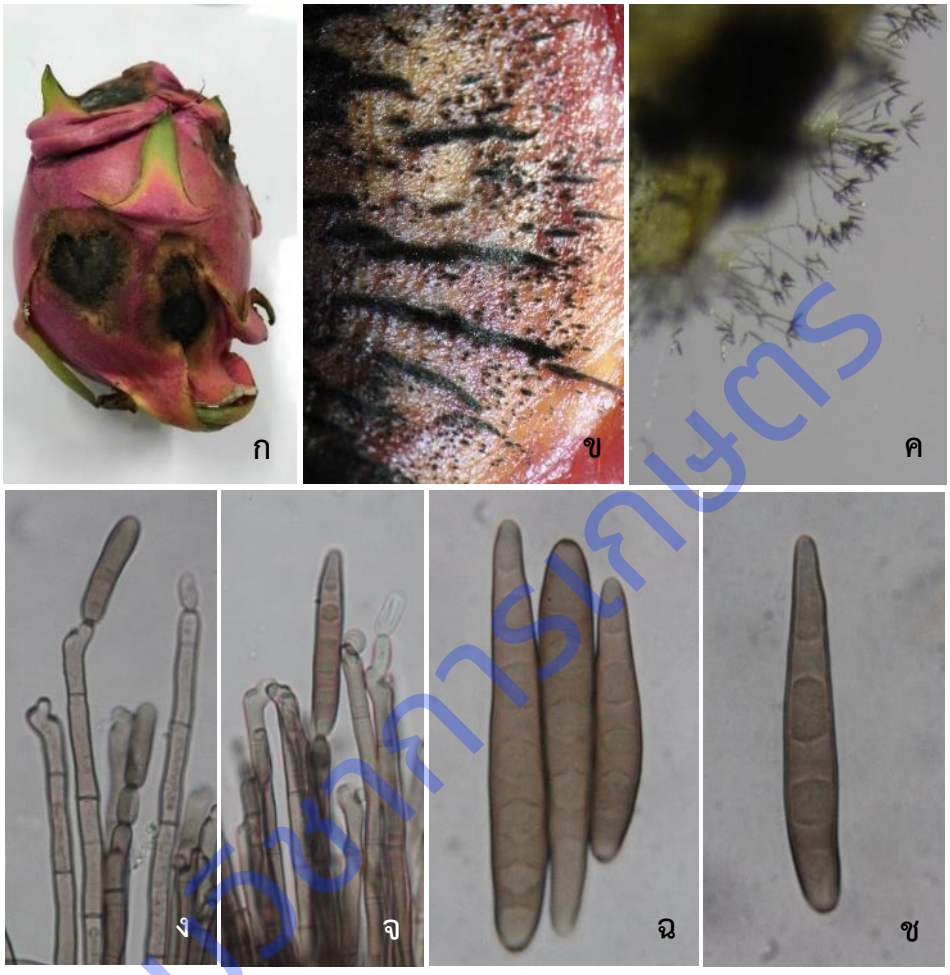


ภาพที่ 1.2.2.6 *Curvularia oryzae* : ก) ลักษณะอาการใบจุดปาล์มน้ำมัน
ข - ค) ก้านชูสปอร์และโคนิเดีย
ง - ฉ) โคนิเดีย

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

Figure 1.2.3.1 Bacterial blight on field grown multiplied onion (*A. cepa* var. *aggregatum*)

กรมวิชาการเกษตร

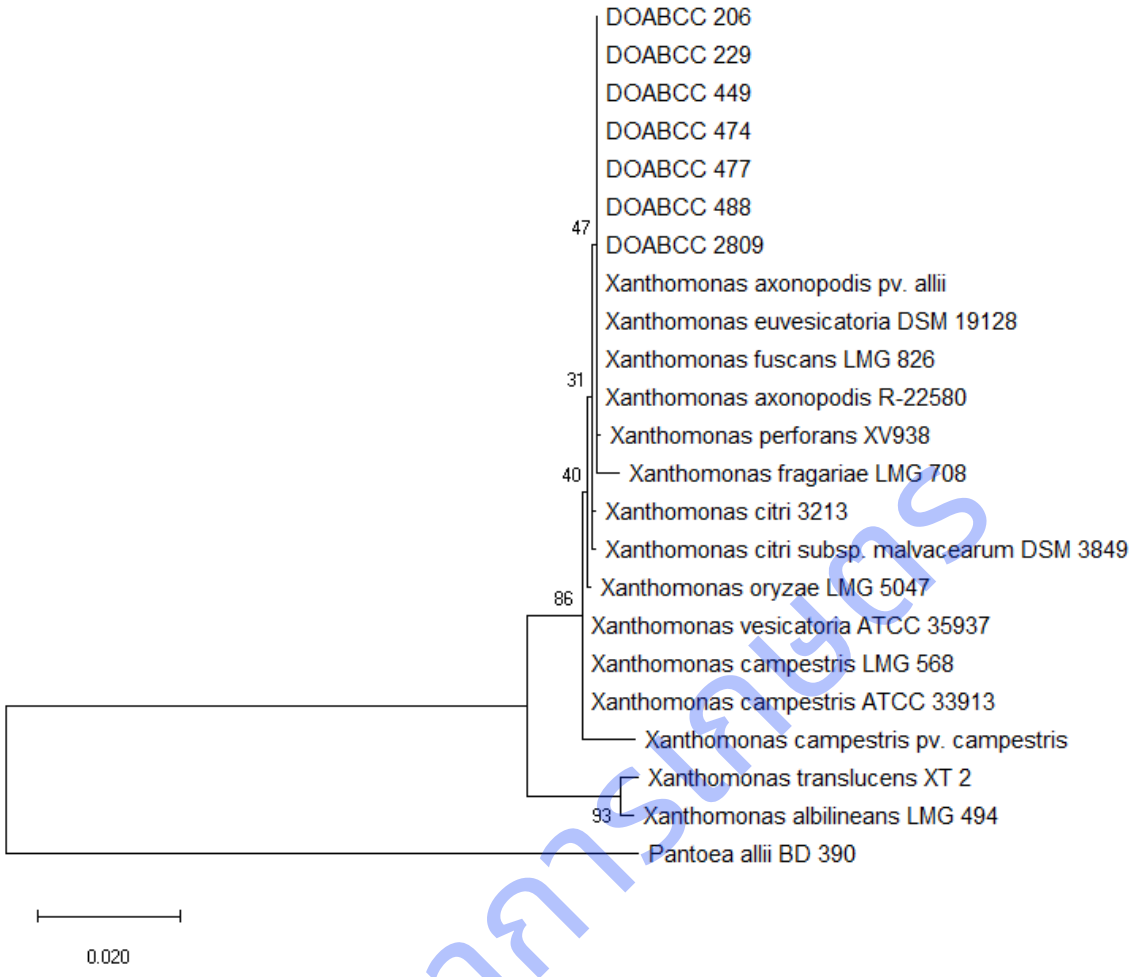


Figure 1.2.3.2 Maximum-likelihood tree based on partial 16S rDNA gene sequences showing the relationships of 7 BBO isolates (DOABCC 206, DOABCC 229, DOABCC 449, DOABCC 474, DOABCC 477, DOABCC 488 and DOABCC 2809) and type strains of species. Bootstrap values based on 1,000 replicates are shown at branch nodes

กรมวิชาการเกษตร

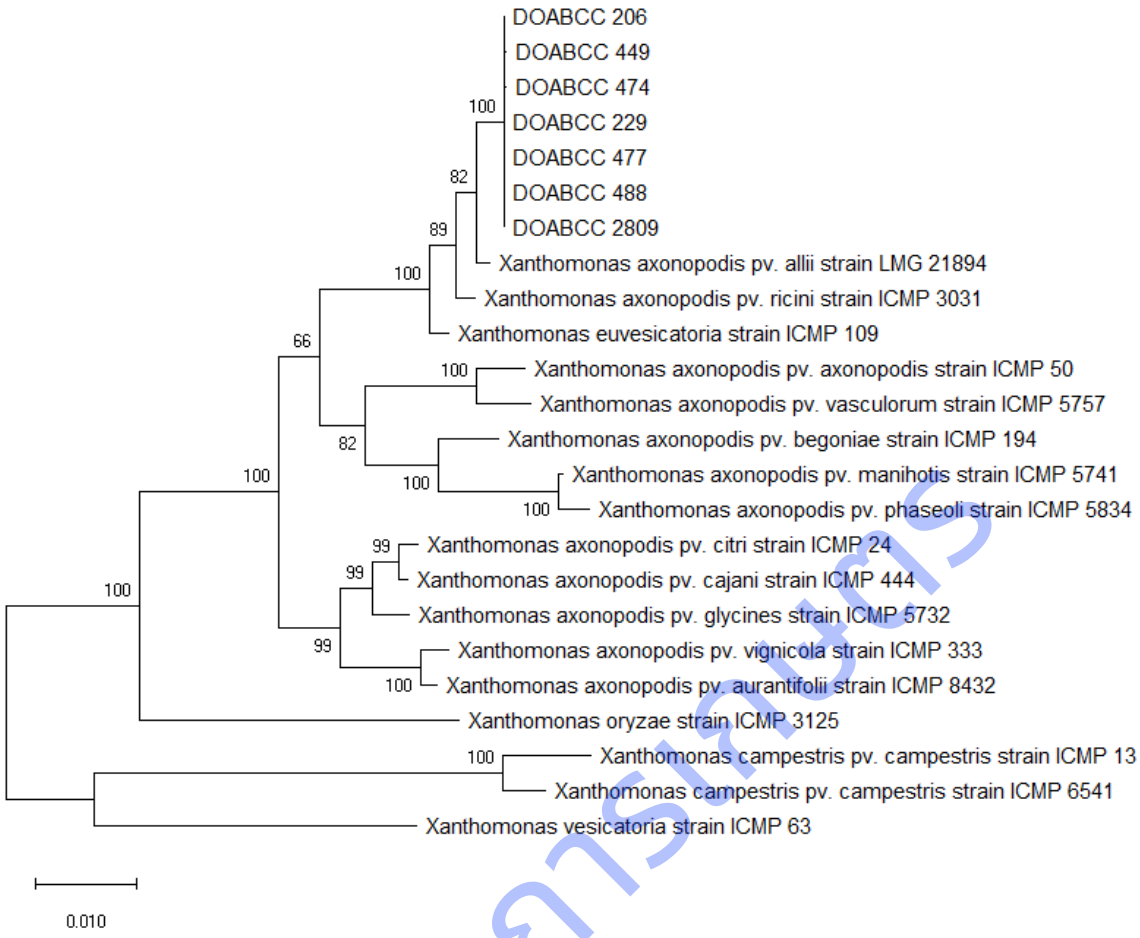


Figure 1.2.3.3 Maximum-likelihood tree based on the concatenated *dna*K, *fyu*A, *gyr*B and rpoD nucleotide sequences showing the relationships of 7 BBO isolates (DOABCC 206, DOABCC 229, DOABCC 449, DOABCC 474, DOABCC 477, DOABCC 488 and DOABCC 2809) and type strains of species. Bootstrap values based on 1,000 replicates are shown at branch nodes

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.2.4.1 Symptoms chlorotic ringspot on orchids *Phalaenopsis*

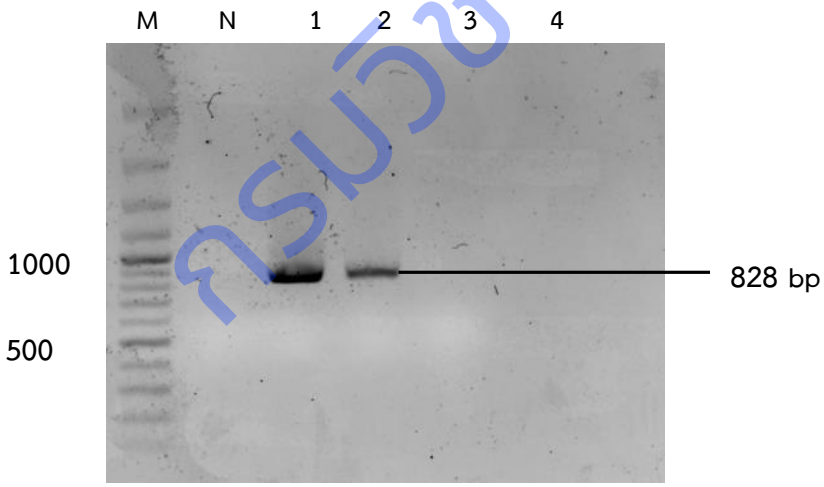


Figure 1.2.4.2 Detection of CaCV infecting plant samples by RT-PCR specific primer for gene of CaCV (828 bp) M: 100 bp Plus DNA ladder (Thermo), N: dH_2O as negative control, Lane 1: Pepper positive control, Lane 2: Orchid 1, Lane 3: Orchid 2, Lane 4: Orchid 3 and Lane 5: Orchid 4

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

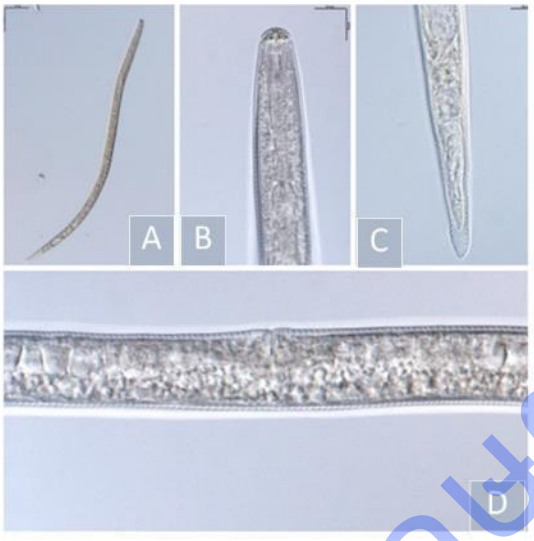
651 GAAACTGAAT CCAGGAGTTG AATCTTCGGT TTCAATTTCA ACATCTGCAG
CTTTGACTTA GGTCCTCAAC TTAGAAGCCA AAGTTAAAGT TGTAGACGTC

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*

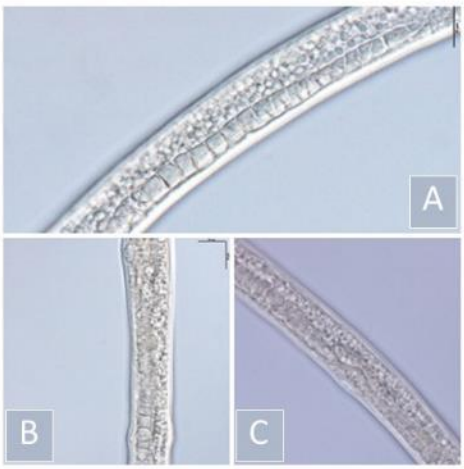
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.2.6.1 แสดงภาพไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* โดย A- ไส้เดือนฝอยทั้งตัว B ไส้เดือนฝอยส่วนบนของร่างการ C- ส่วนหาง D- อวัยวะเพศเมียและระบบสืบพันธุ์ทั้งสองด้าน

ภาพที่ แสดงภาพร่างกายส่วนบนของไส้เดือนฝอย *Radopholus similis*

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ แสดงภาพไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* โดย A-รังไข่ส่วนหน้า B- อวัยวะเพศระบบสืบพันธุ์ส่วนหลัง C- อวัยวะเพศเมียและระบบสืบพันธุ์ทั้งสองด้าน

ภาพที่ แสดงภาพส่วนหางของไส้เดือนฝอย *Radopholus similis*

กรมวิชาการเกษตร

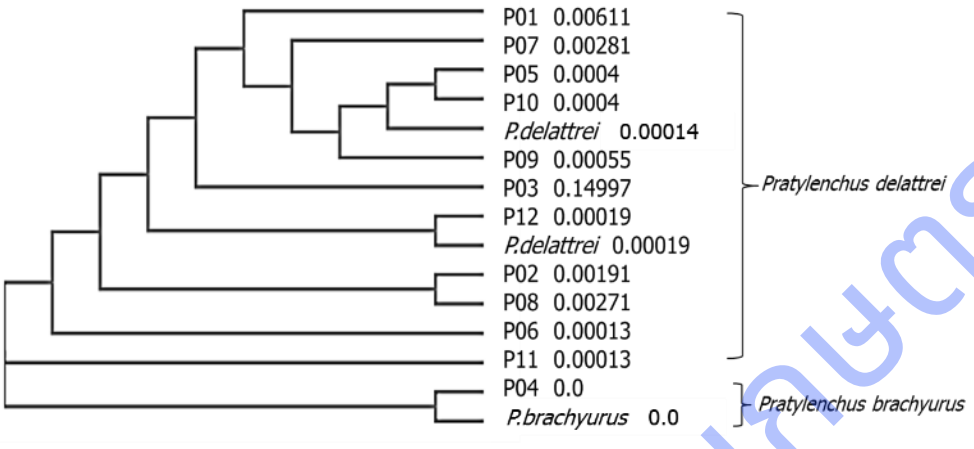


Figure 1.2.7.1. Phylogenetic tree of the *Pratylenchus* species constructed using D2D3 expansion segments of the 28S rDNA.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.2.7.2. *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 1.2.7.3. *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

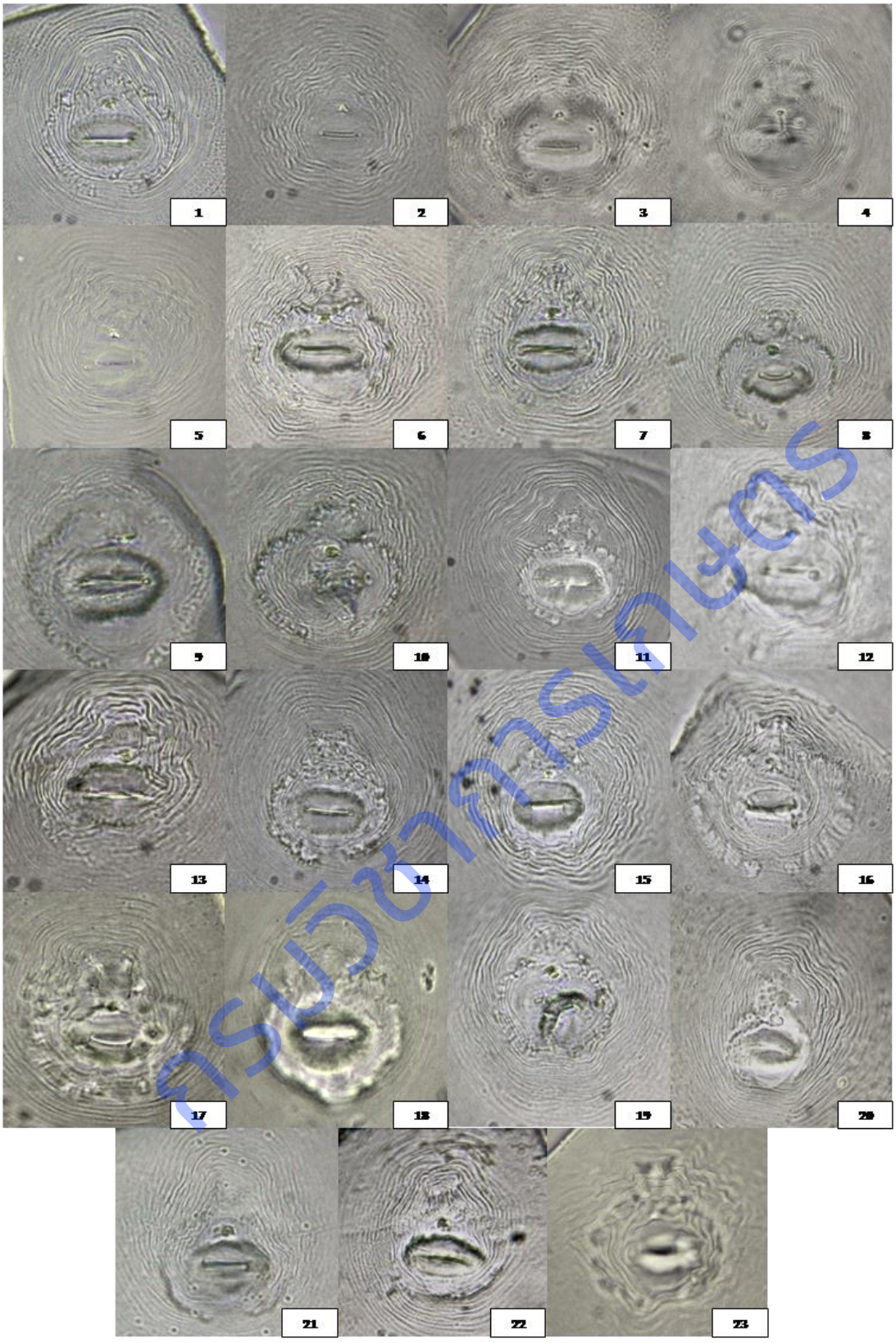
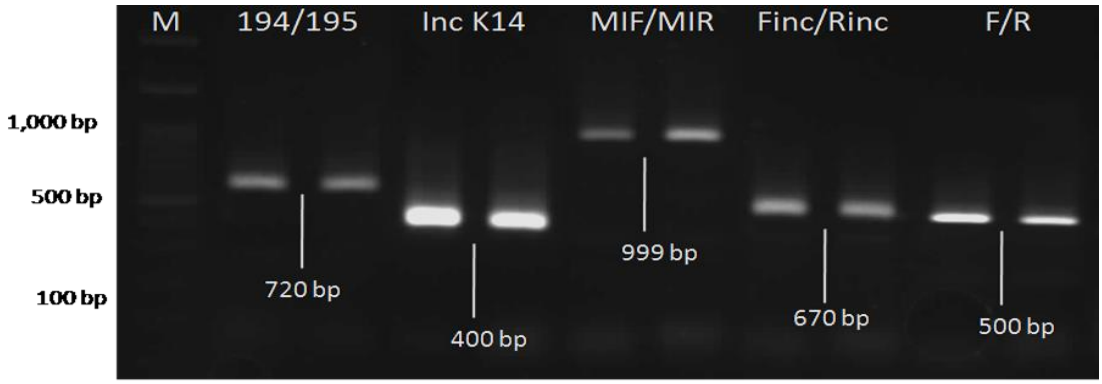
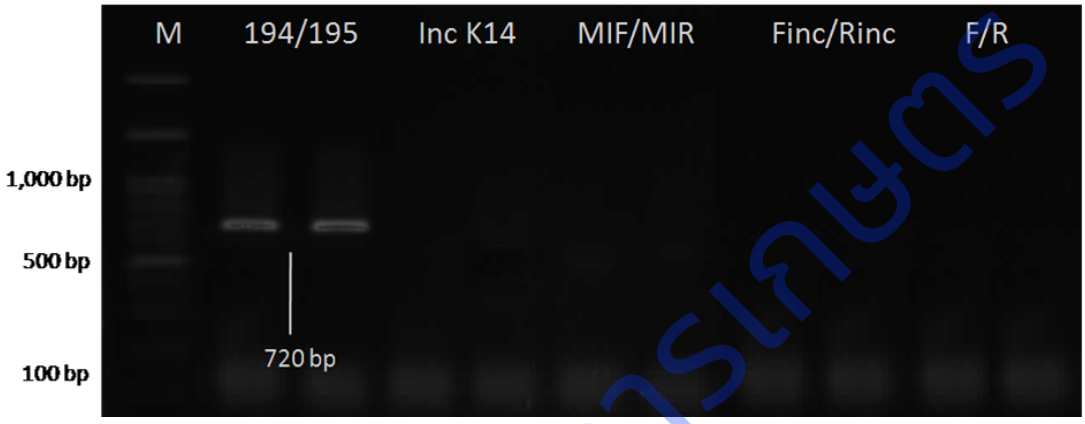


Figure 1.2.8.1 Perineal patterns of 23 *M. incognita* populations.

กรมวิชาการเกษตร



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)

กรมวิชาการเกษตร

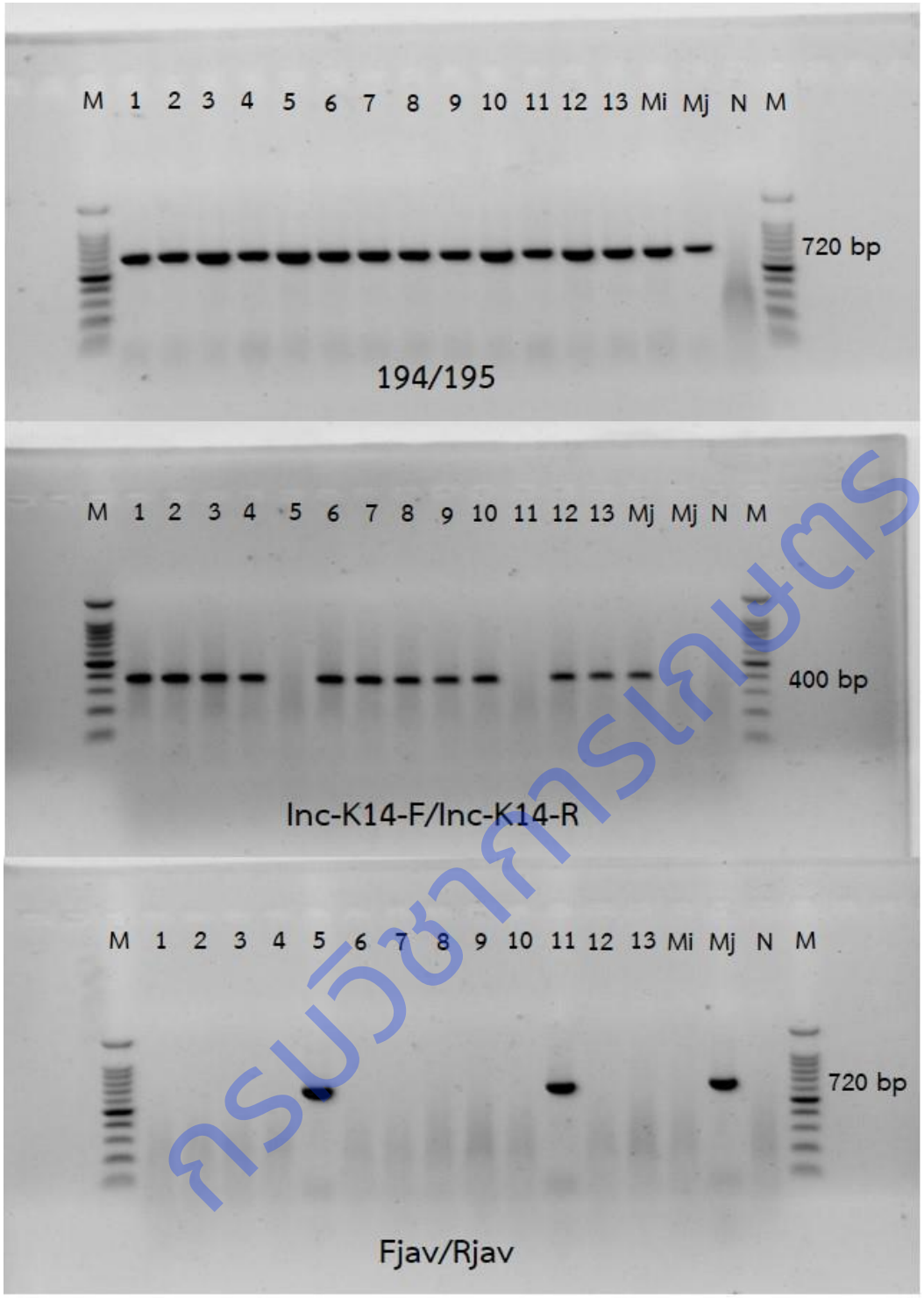


Figure 1.2.8.3 Identification of *M. incognita* and *M. javanica* using 194/195, Inc-K14-F/Inc-K14-R and Fjav/Rjav primers.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.2.10.1 presenting the characteristics of *Leek Yellow Stripe Virus* (LYSV) in garlic leaves.

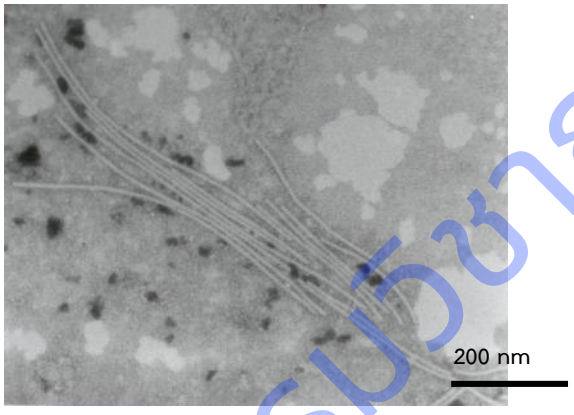


Figure 1.2.10.2 presenting the particle of *Leek Yellow Stripe Virus* in the garlic leaves showing the symptoms of chlorotic yellow stripe and a small streak on the leaves which is dipped with the negative Brandes method and is examined under the HITACHI H-7700 transmission electron microscopy in the magnification of 70,000 times (80 kv) and in the approximate particle size of 800 to 820 nanometres.

กรมวิชาการเกษตร

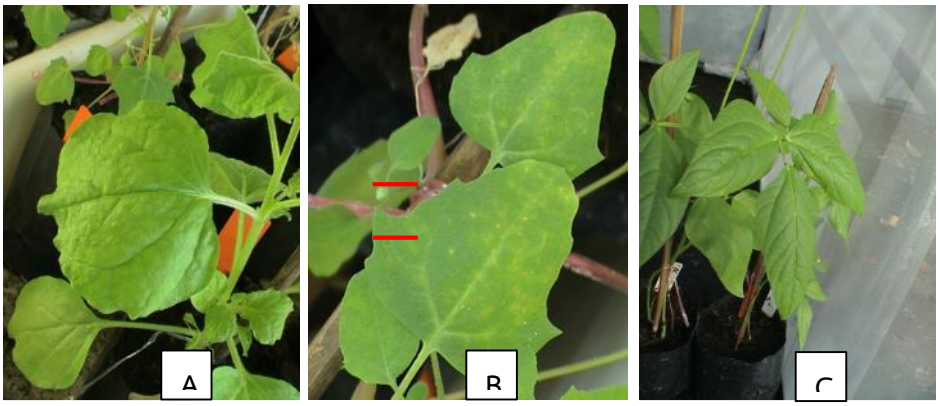


Figure 1.2.10.3 The characteristics of the plants symptoms after inoculating the *Leek Yellow Stripe Virus*

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.

Figure 1.2.11.1 Anthracnose symptoms on chilli fruits

สำนักวิชาการเกษตร

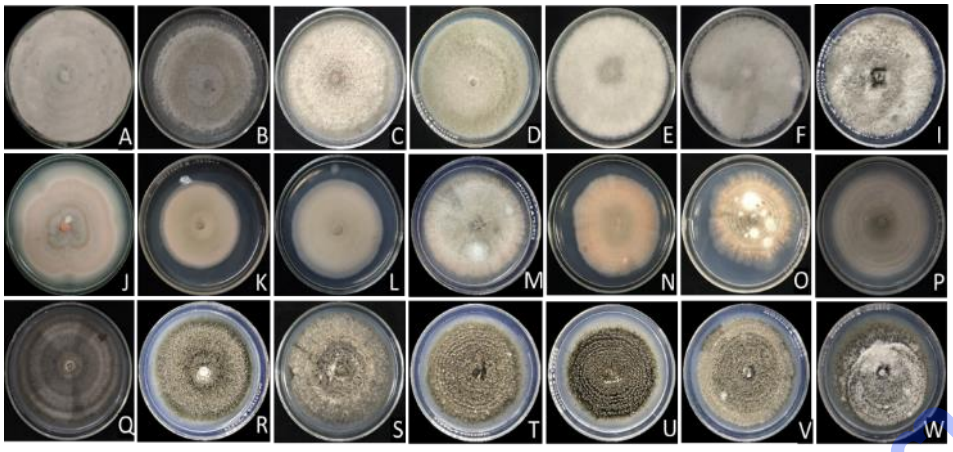


Figure 1.2.11.2 Colony of *Colletotrichum* spp.

A-I = *Colletotrichum gloeosporioides*

J-P = *Colletotrichum acutatum*

Q-W = *Colletotrichum capsici*

กรมวิชาการเกษตร

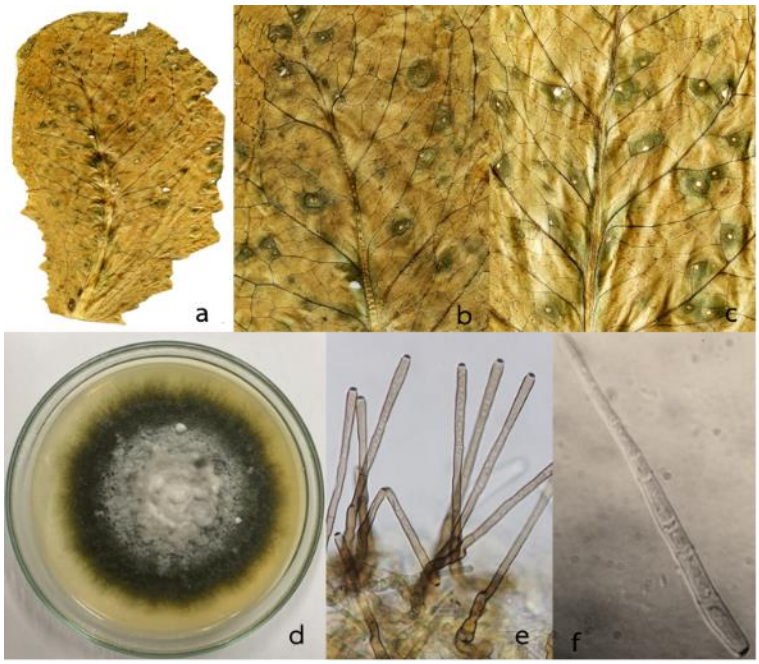


Figure 1.2.13.1: Leaf spot on *Romaine lettuce* (M0351) caused by *Cercospora* sp.1
a-c: spot symptoms leaves; d: colony of fungi on PDA;
e: conidiophores; f: conidia

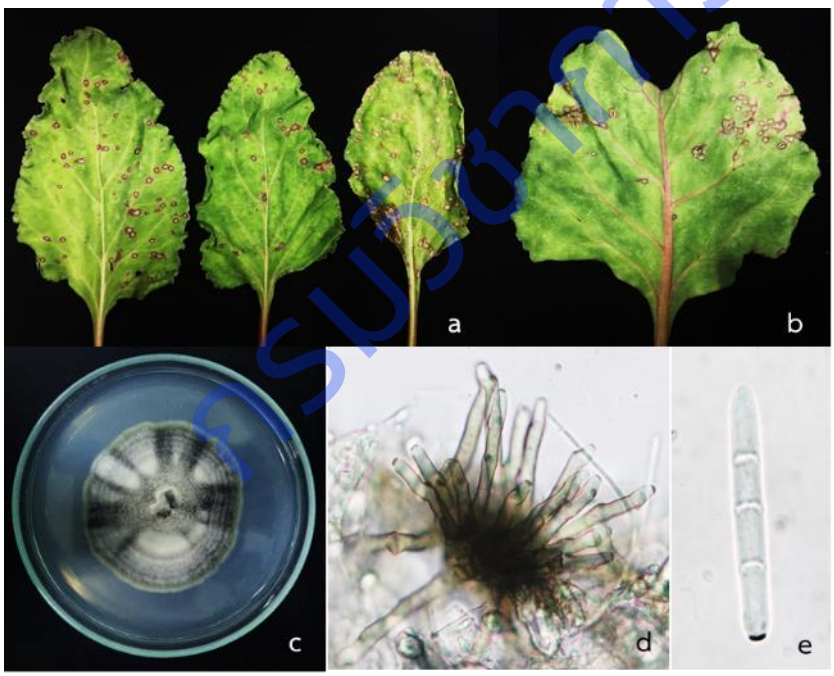


Figure 1.2.13.2: Leaf spot on leaves of *Beta vulgaris* (M0879) caused by *Cer. beticola*
a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;
d: conidiophores; e: conidia

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

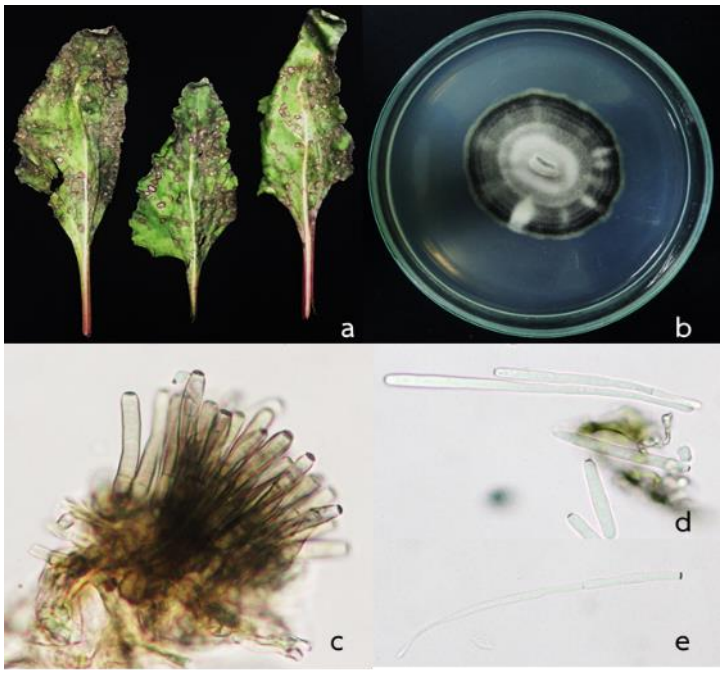


Figure 1.2.13.3: Leaf spot on leaves of *Beta vulgaris* (M0878) caused by *Cercospora beticola*

a: spot symptoms leaves; b: colony of fungi on PDA;

c: conidiophores; d-e: conidia

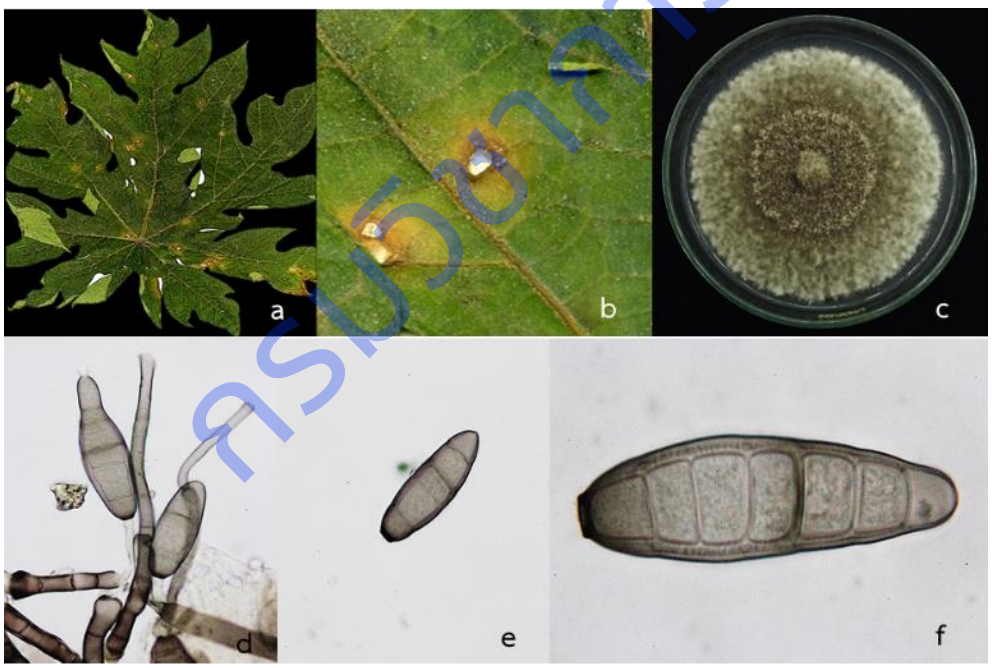


Figure 1.2.13.4: Leaf spot on leaves of *Carica papaya* (M0987) caused by *Corynespora cassiicola*

a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;

d-f: conidia

กรมวิชาการเกษตร

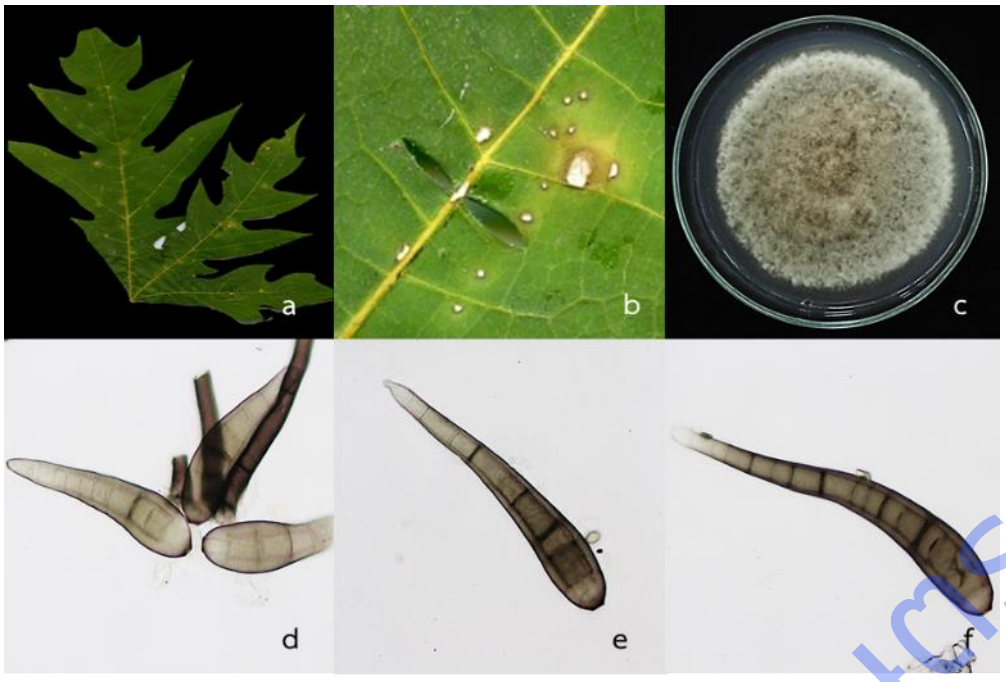


Figure 1.2.13.5: Leaf spot on leaves of *Carica papaya* (M0990) caused by *Corynespora cassiicola*

a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;

d-f: conidia

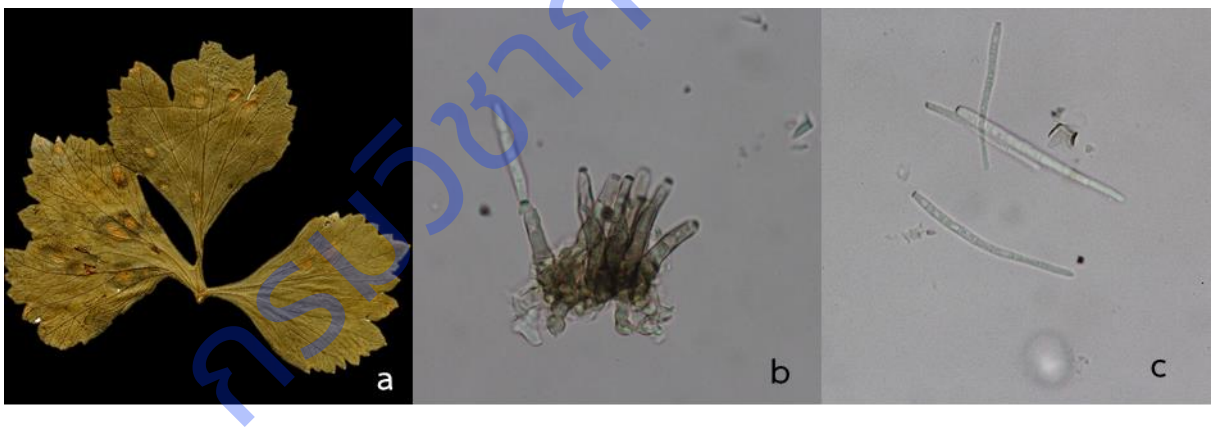


Figure 1.2.13.6: Leaf spot on leaves of *Apium graveolens* (M1095) caused by *Cercospora apii*

a: spot symptoms leaves; b: conidiophore; c: conidia

กรมวิชาการเกษตร

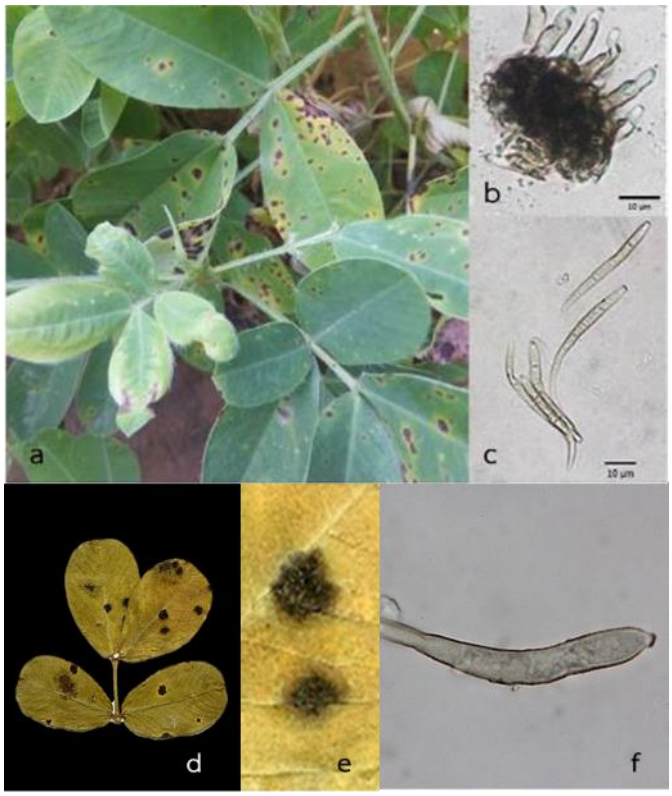


Figure 1.2.13.7: Leaf spot on leaves of *Arachis hypogaea* (C-23) caused by *Cercospora arachidicola* (syn. *Passalora arachidicola*)

a, d-e: spot symptoms leaves; b: conidiophore; c, f: conidia

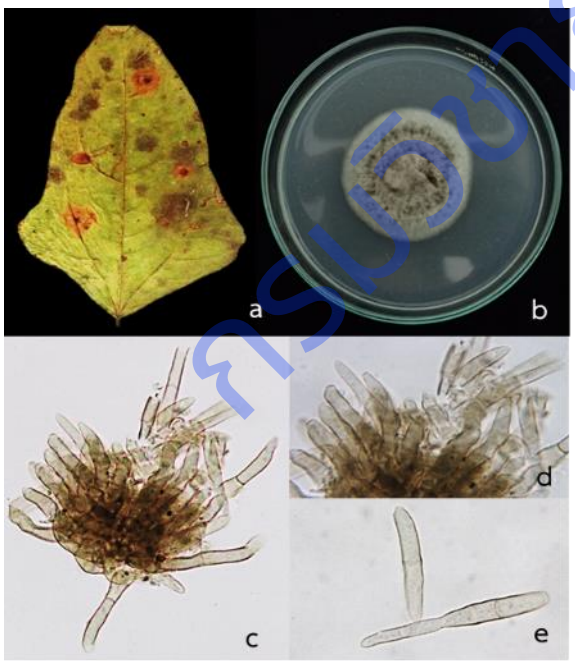


Figure 1.2.13.8: Leaf spot on leaves of *Vigna unguiculata* (M0521) caused by *Corynespora cassiicola*

a: spot symptoms leaf; b: colony of fungi on PDA;

c-d: conidiophoresd; e: conidia

กรมวิชาการเกษตร

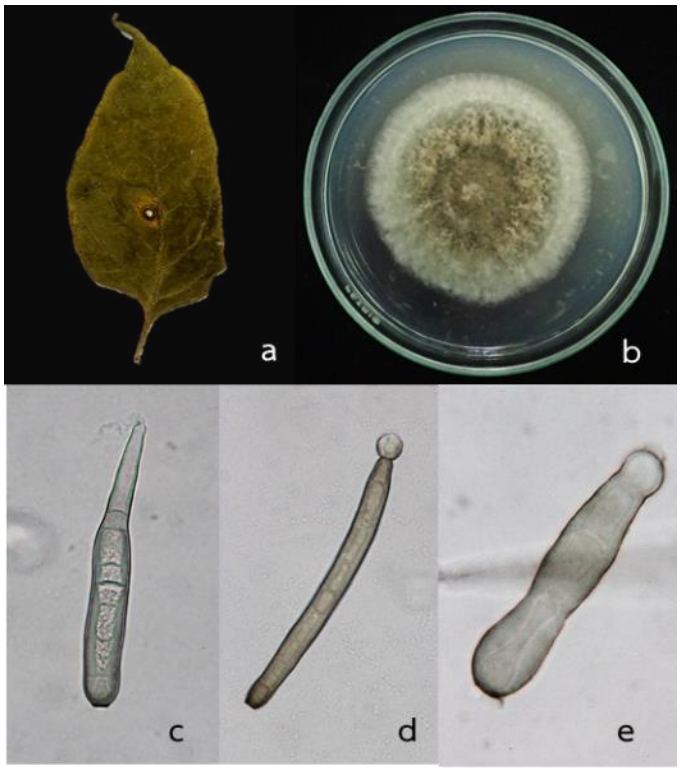


Figure 1.2.13.9: Leaf spot on leaves of *Capsicum furtescens* (M0529) caused by *Corynespora cassiicola*

a: spot symptoms leaf; b: colony of fungi on PDA; c-e: conidia

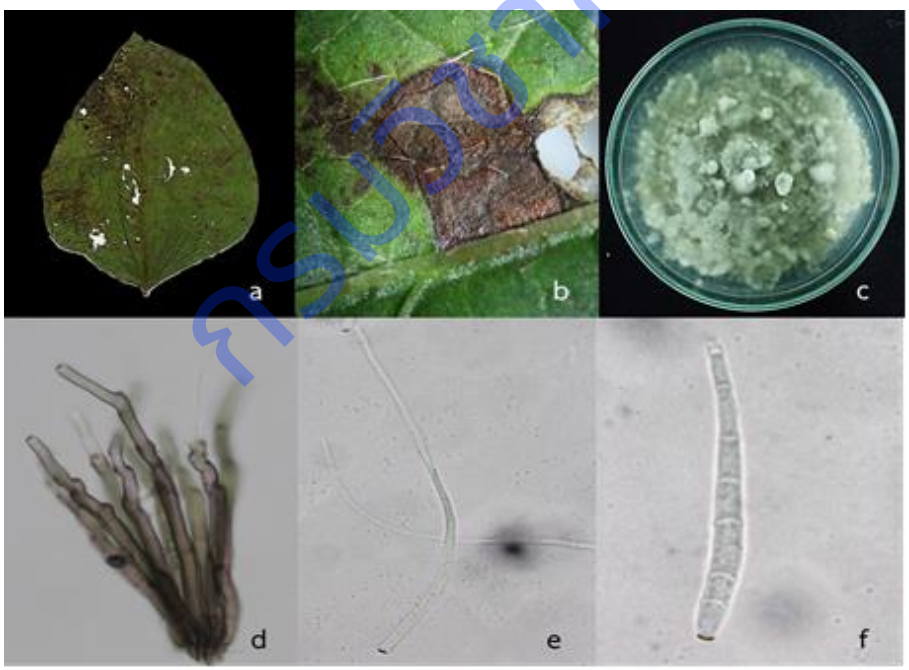


Figure 1.2.13.10: Leaf spot on *Romaine lettuce* (M0967) caused by *Cercospora* sp.2

a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;

d: conidiophores; e-f: conidia

กรมวิชาการเกษตร

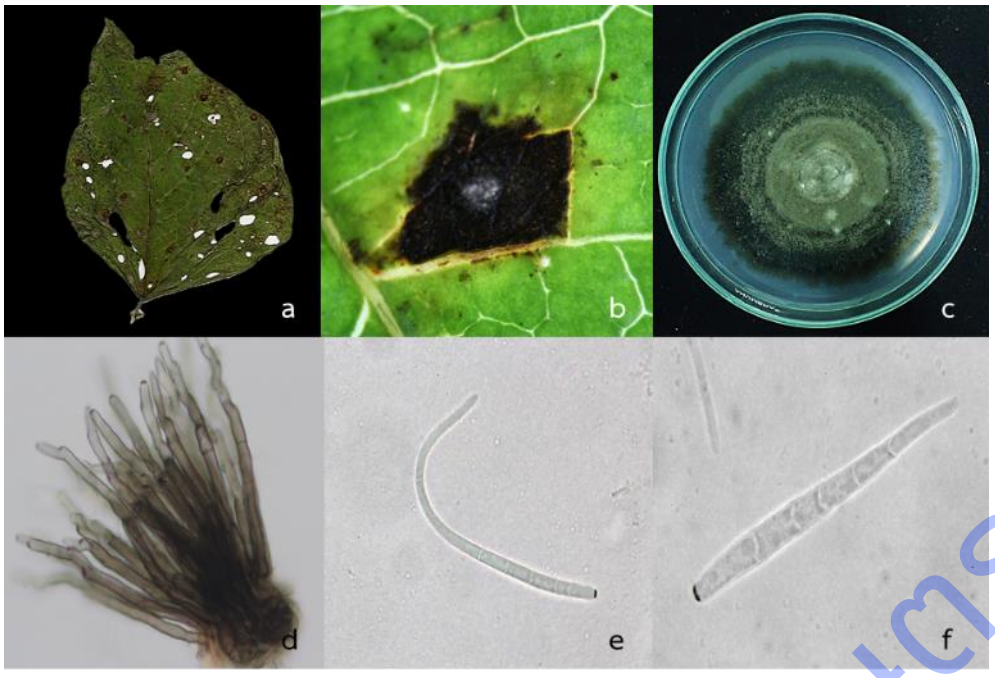


Figure 1.2.13.11: Leaf spot on *Romaine lettuce* (M0967) caused by *Cercospora* sp.2
a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;
d: conidiophores; e-f: conidia

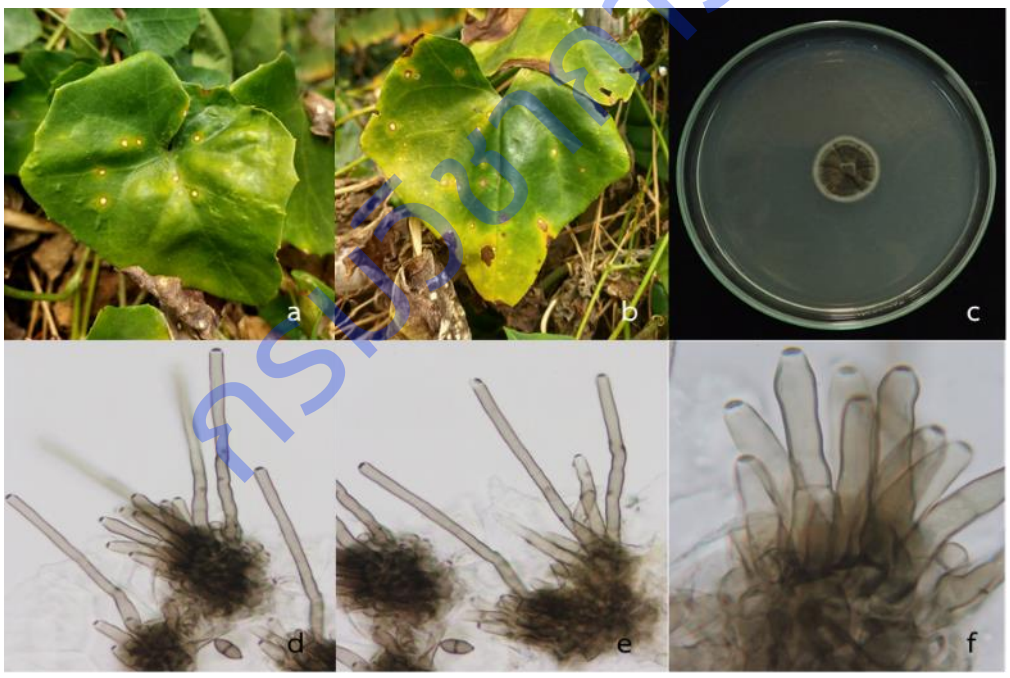


Figure 1.2.13.12: Leaf spot on *Coccinia grandis* (M0983) caused by *Cercospora citrulina*
a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;
d-f: conidiophores

กรมวิชาการเกษตร

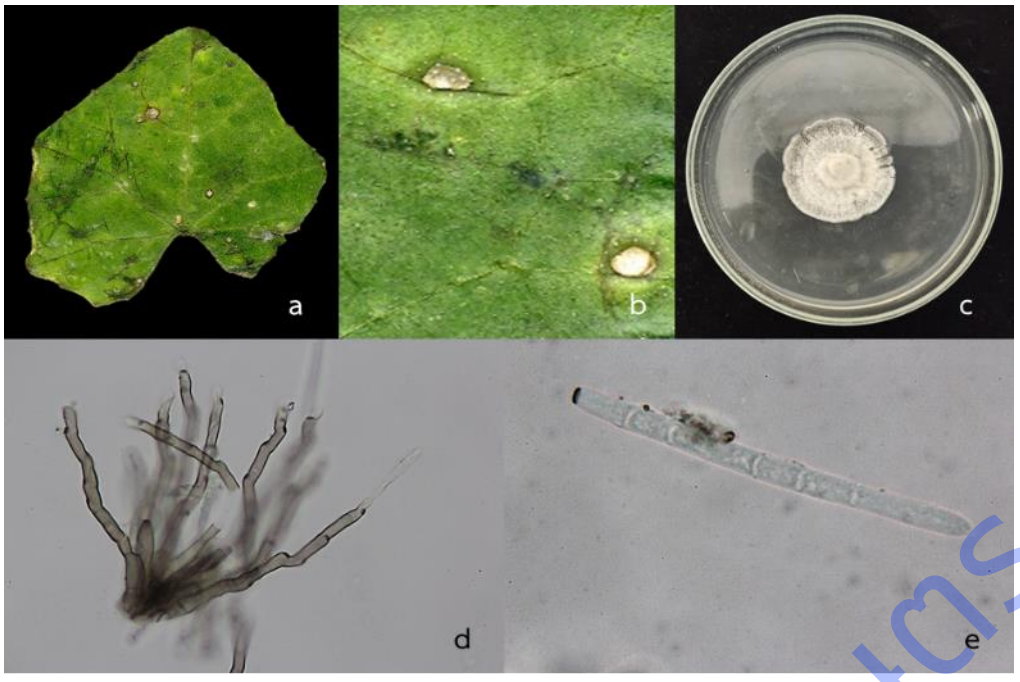


Figure 1.2.13.13: Leaf spot on *Coccinia grandis* (M1008) caused by *Cercospora citrulina*
a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;
d: conidiophores; e: conidia

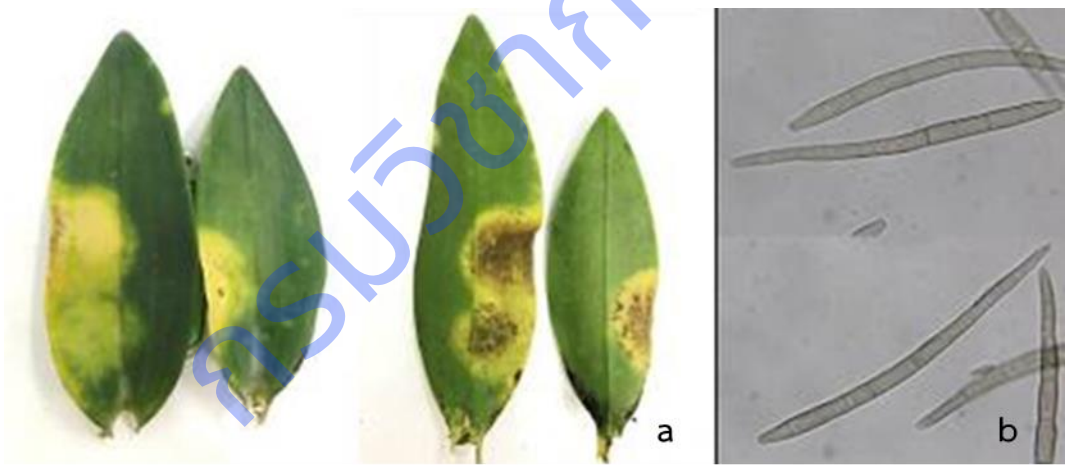


Figure 1.2.13.14: Leaf spot on *Dendrobium sp.* caused by *Pseudocercospora dendrobii*
a-b: spot symptoms leaves; b: conidia

กรมวิชาการเกษตร

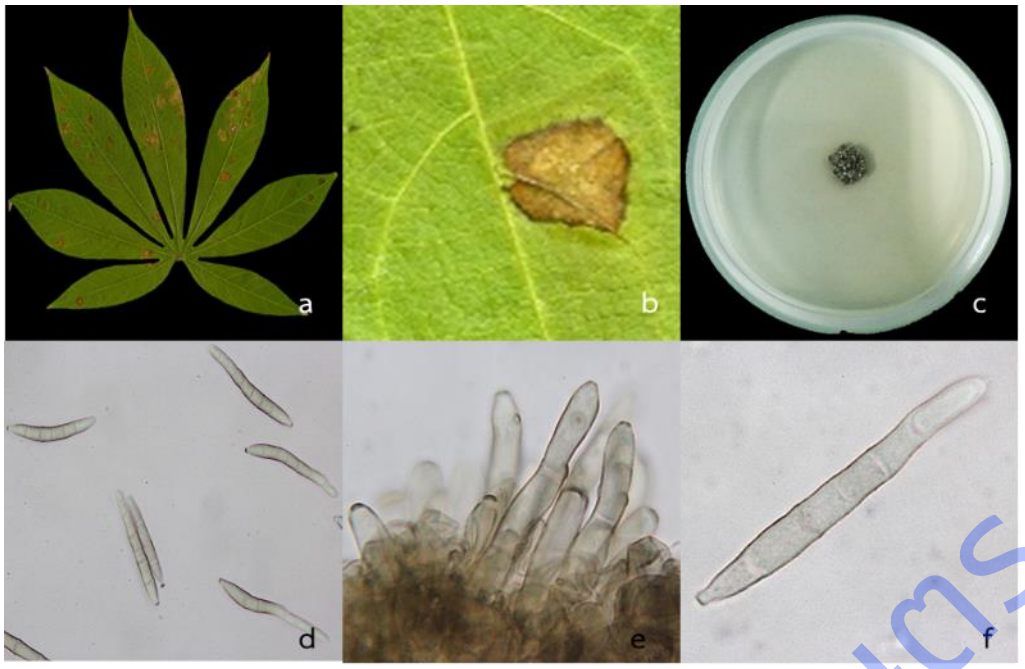


Figure 1.2.13.15: Leaf spot on *Manihot esculenta* (M0993) caused by *Mycosphaerellaceae*

a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;

e: conidiophores; d, f: conidia

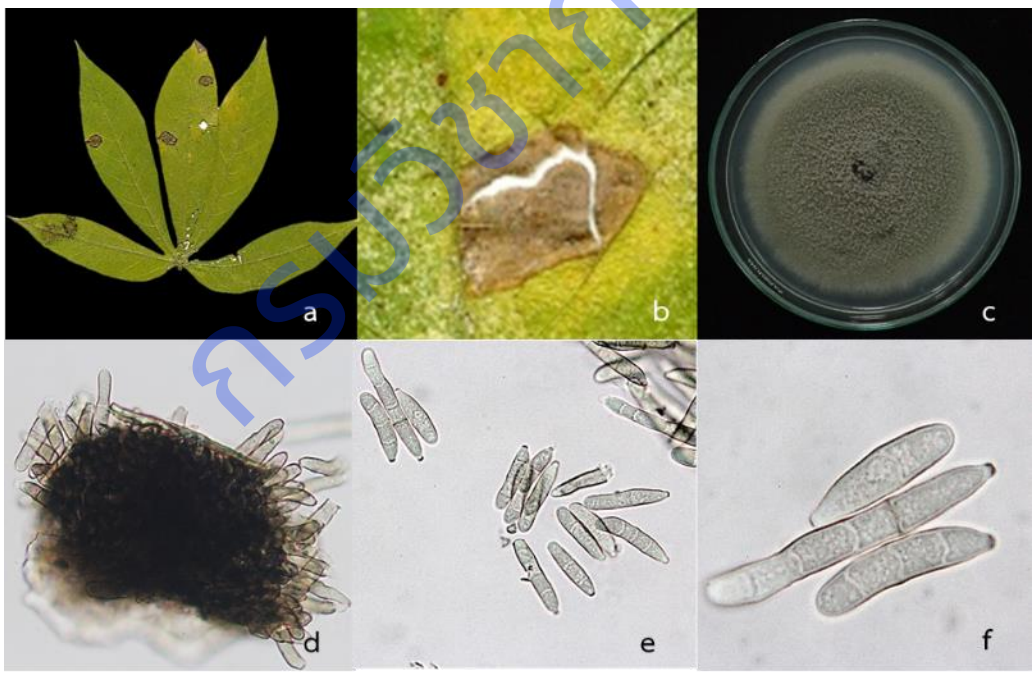


Figure 1.2.13.16: Leaf spot on *Manihot esculenta* (M0988) caused by *Mycosphaerellaceae*

a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;

d: conidiophores; e-f: conidia

กรมวิชาการเกษตร

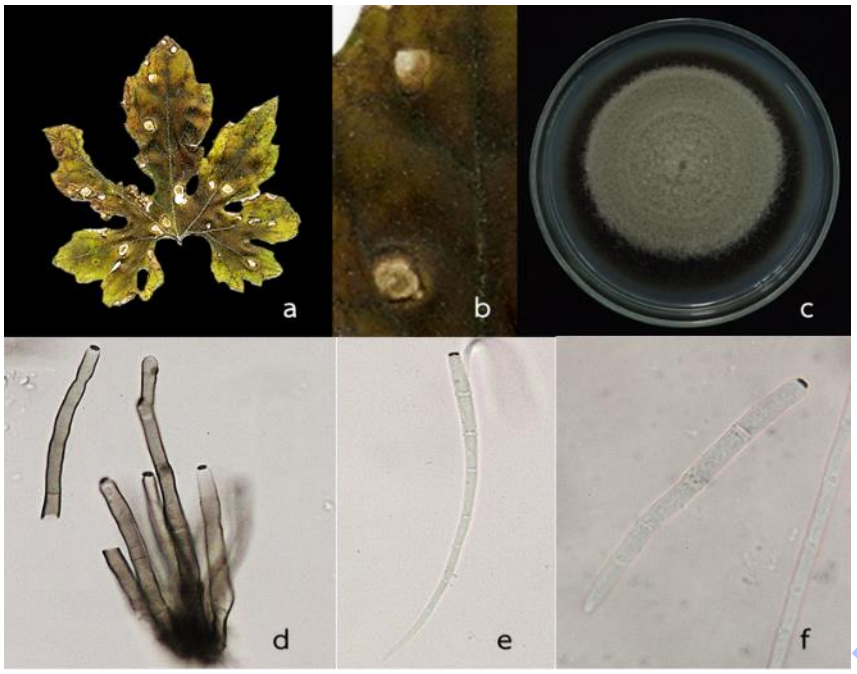


Figure 1.2.13.17: Leaf spot on *Momordica charantia* (M0985) caused by *Cercospora citrulina*

a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;

d: conidiophores; e-f: conidia

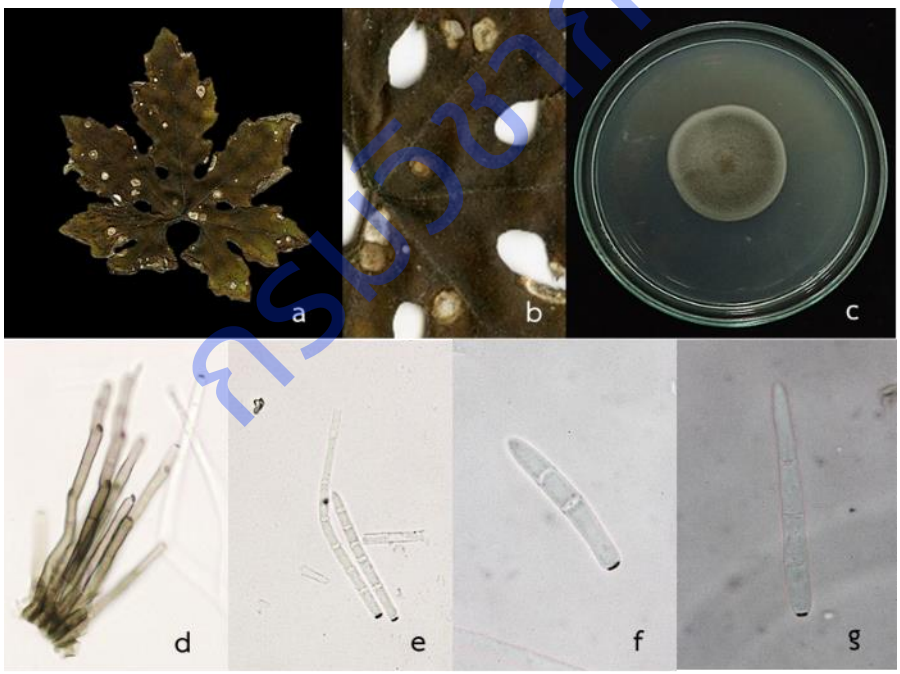


Figure 1.2.13.18: Leaf spot on *Momordica charantia* (M0986) caused by *Cercospora citrulina*

a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;

d: conidiophores; e-f: conidia

กรมวิชาการเกษตร

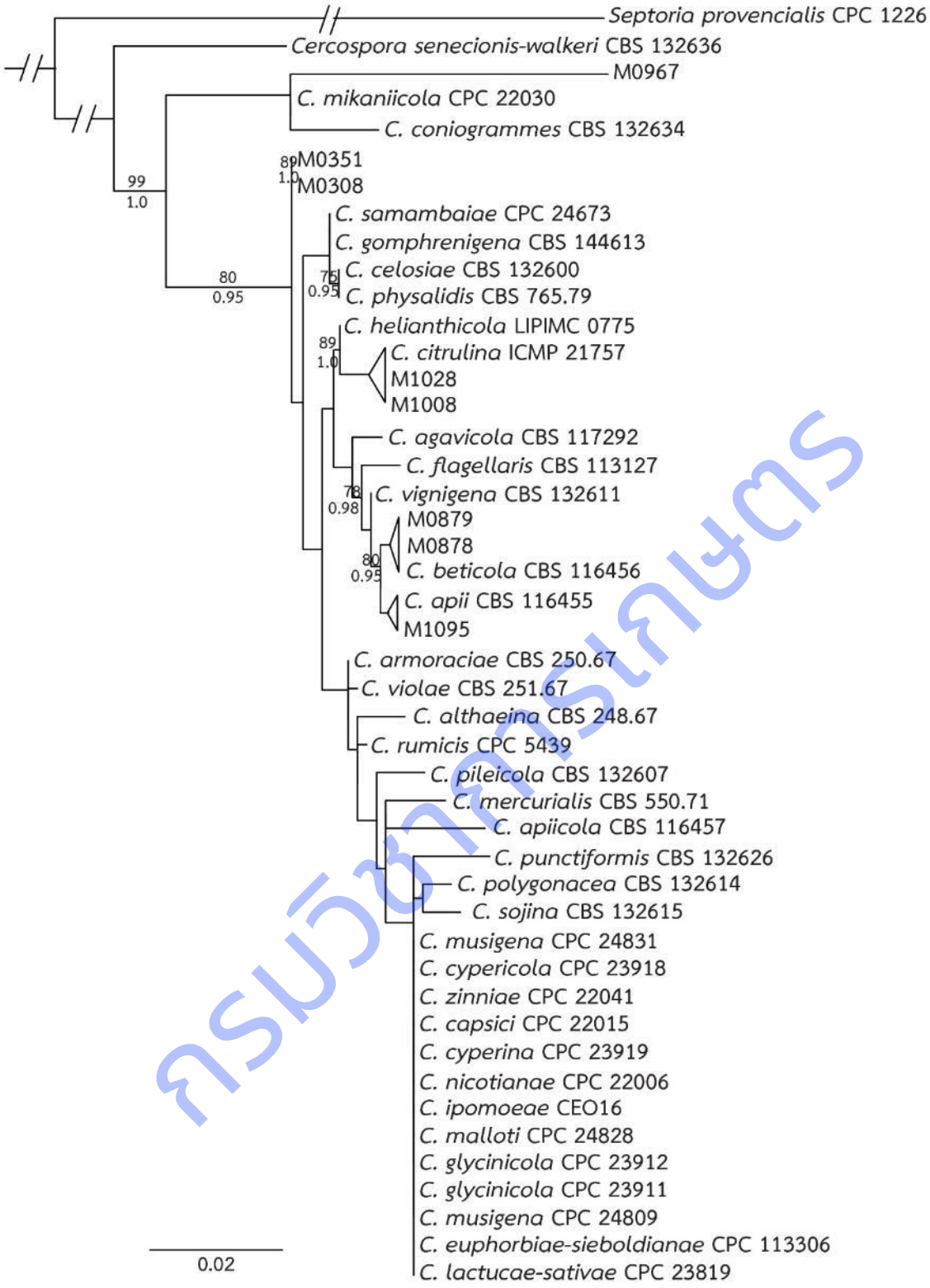


Figure 1.2.13.19: Phylogram of *Cercospora* obtained in a maximum likelihood search in RAxML of concatenated dataset of ITS and TEF1 gene regions. Bootstrap support values (≥70%) from 1,000 replicates above nodes. Posterior probabilities (≥0.95) summarized from 10,000 converged trees obtained in a Bayesian search are shown below nodes.

กรมวิทยาศาสตร

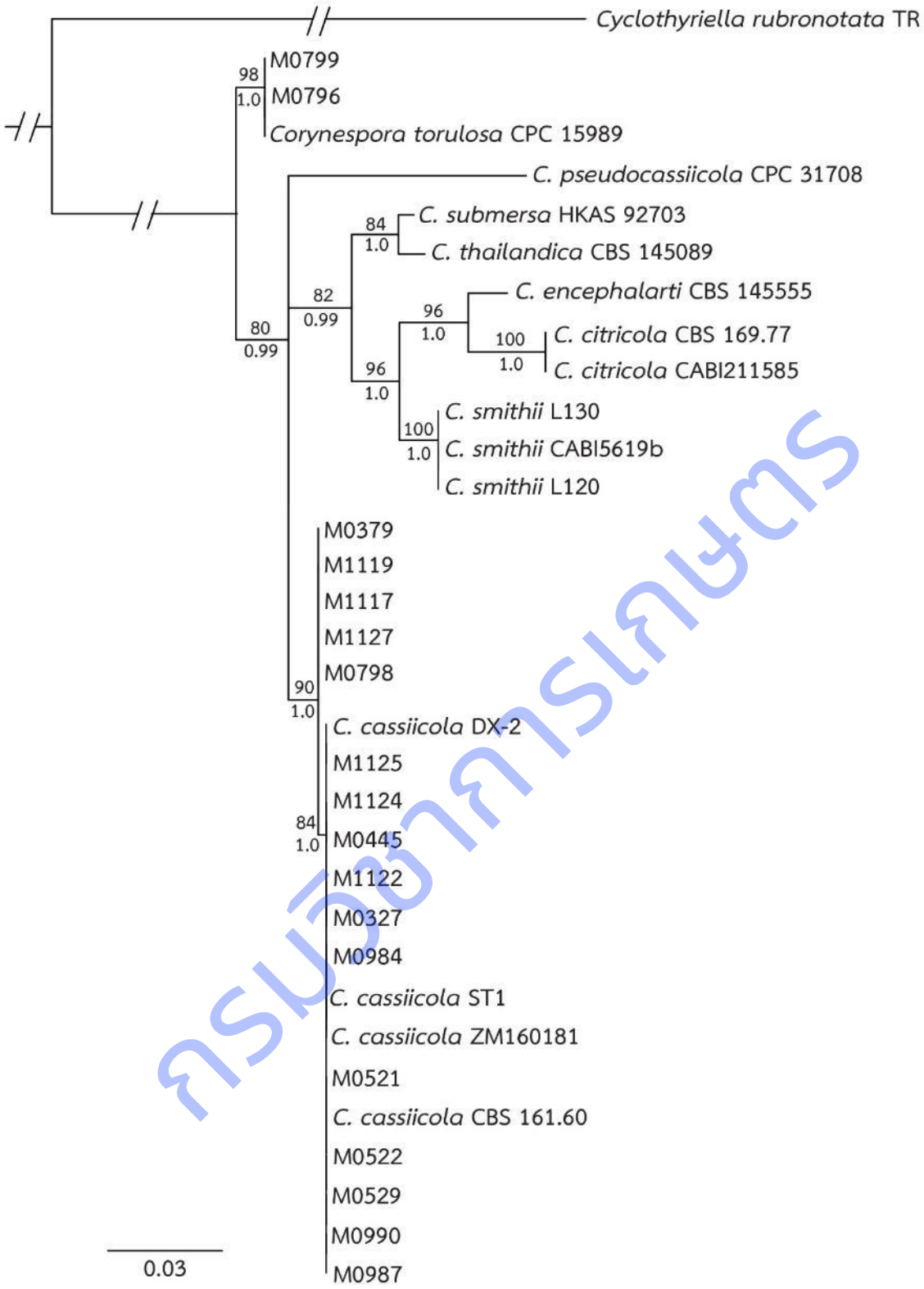


Figure 1.2.13.20: Phylogram of *Corynespora* obtained in a maximum likelihood search in RAxML of concatenated dataset of ITS and TEF1 gene regions. Bootstrap support values (≥70%) from 1,000 replicates above nodes. Posterior probabilities (≥0.95) summarized from 10,000 converged trees obtained in a Bayesian search are shown below nodes.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.2.14.1: Rust disease specimens collected from this study (2019-2021)

กรมวิชาการเกษตร

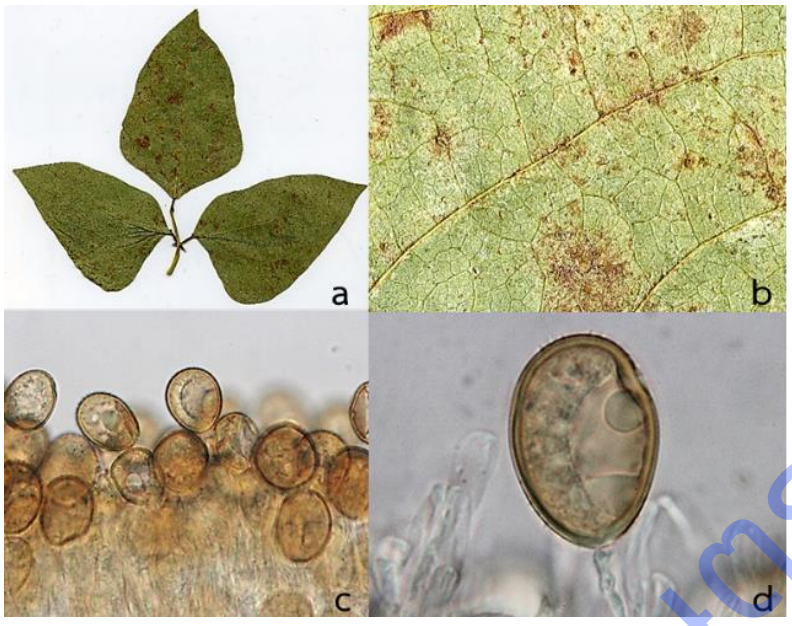


Figure1.2.14. 2: *Uromyces appendiculatus* on *Vigna unguiculata* (M0960)

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

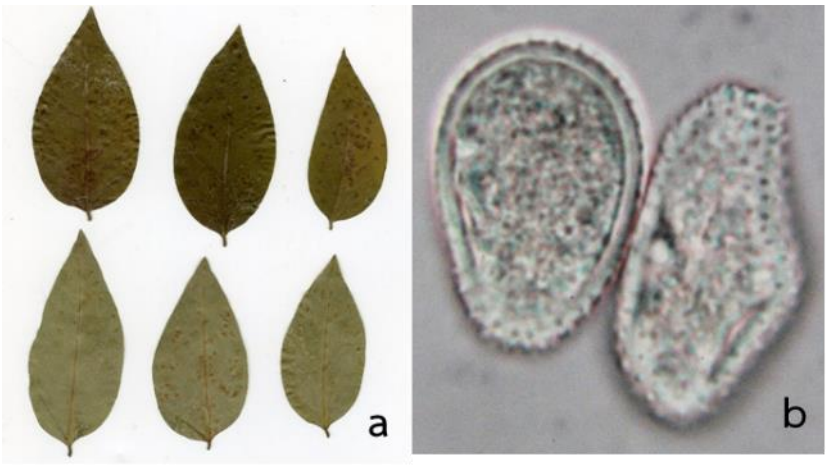


Figure 1.2.14.4: *Phakopsora phyllanthi* on *Phyllanthus acidus* (M0945)

a: symptom on leaves; b: urediospores

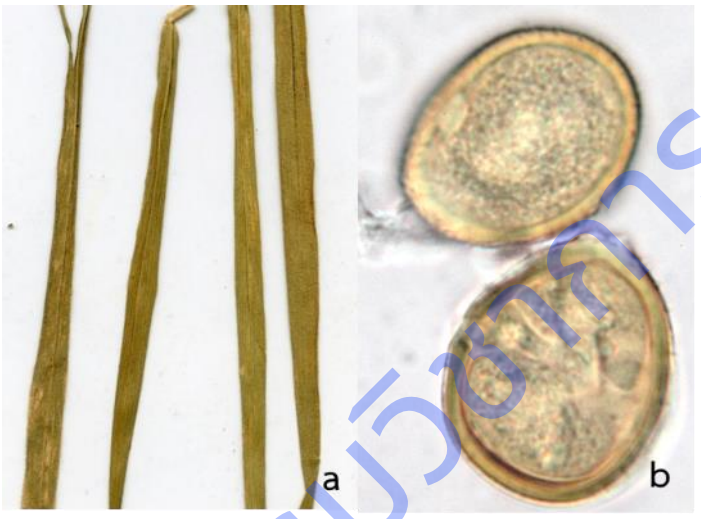


Figure 1.2.14.5: *Uromyces stariae-italicae* on *Brachiaria mutica* (M0947)

a: symptom on leaves; b: urediospores

กรมวิชาการเกษตร

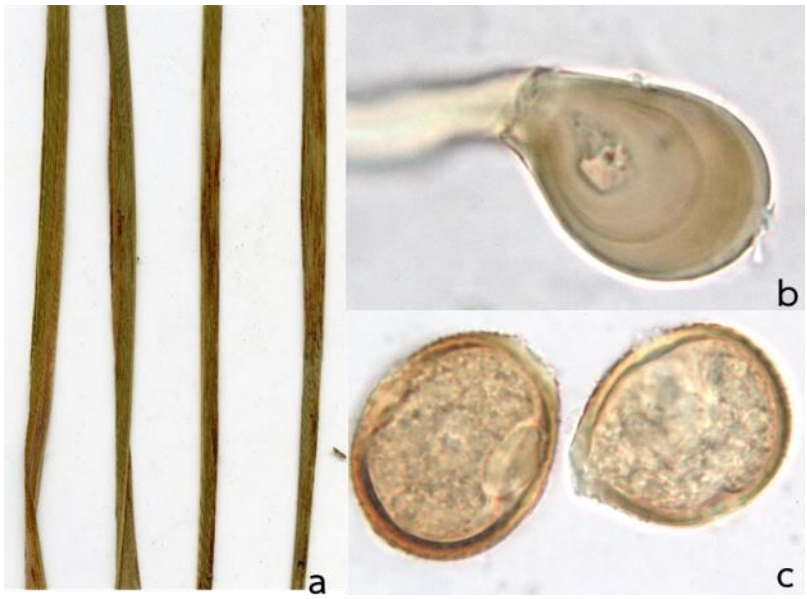


Figure 1.2.14.6: *Puccinia nakanishikii* on *Cymbopogon citratus* (M0949)

a: symptom on leaves; b-c: urediospores

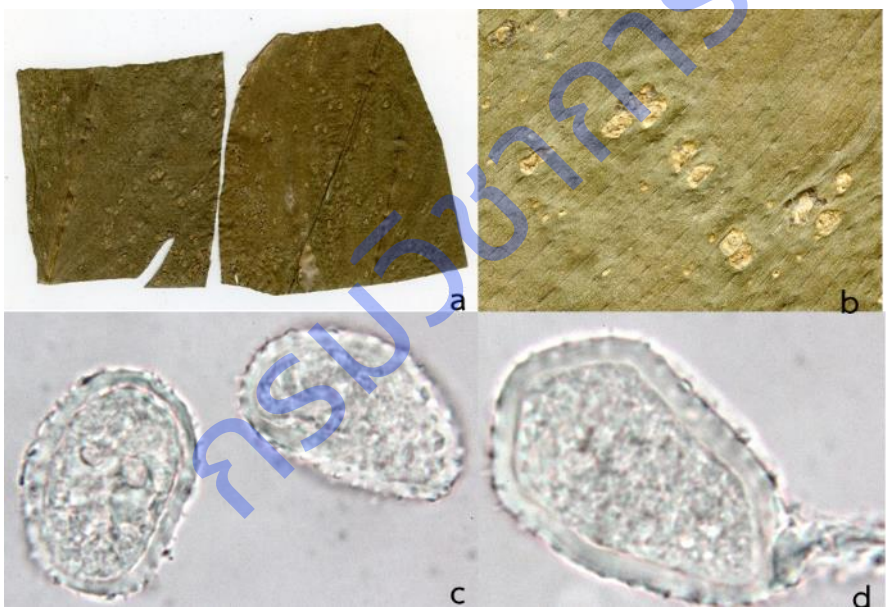


Figure 1.2.14.7: *Puccinia thaliae* on *Canna indica* (M0951)

a: symptom on leaves; b: sori c-d: urediospores

กรมวิชาการเกษตร

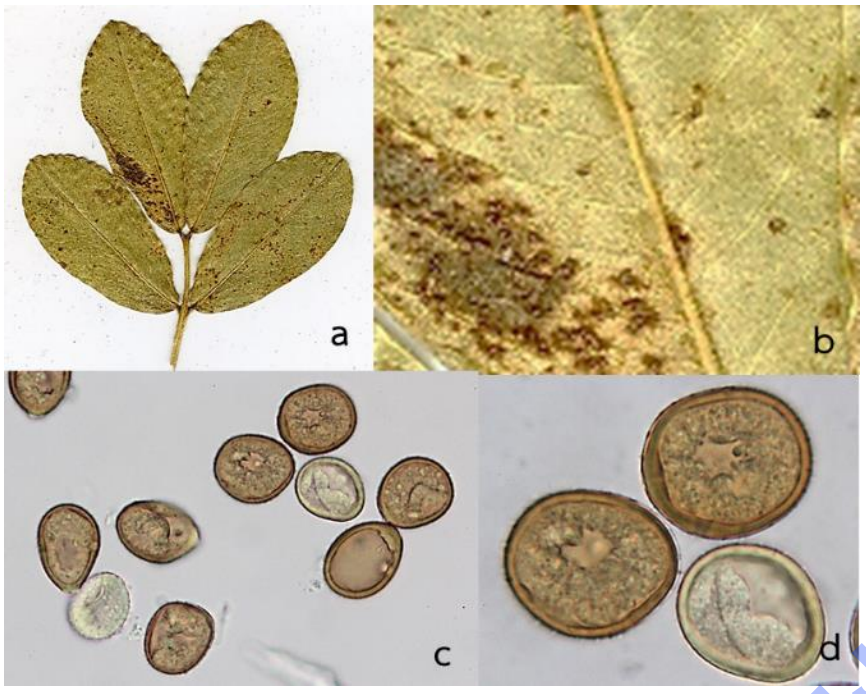


Figure 1.2.14.8: *Puccinia arachnidis* on *Arachis hypogaea* (M0956)

a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf c-d: urediospores

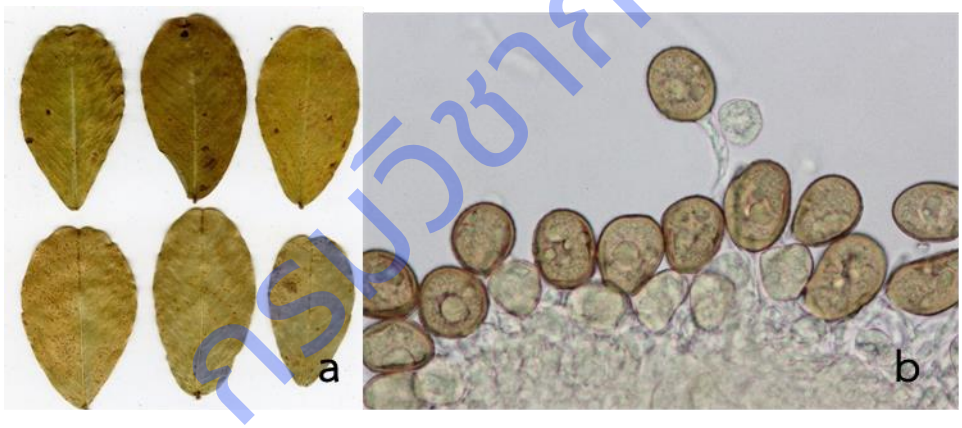


Figure 1.2.14.9: *Puccinia arachnidis* on *Arachis hypogaea* (M0952)

a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf c-d: urediospores

กรมวิชาการเกษตร

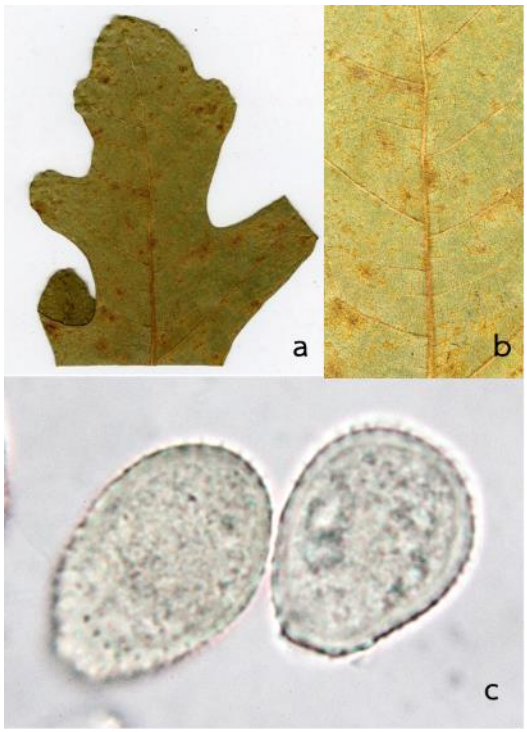


Figure 1.2.14.9: *Cerotelium fici* on *Ficus carica* (M0953)

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

กรมวิชาการเกษตร

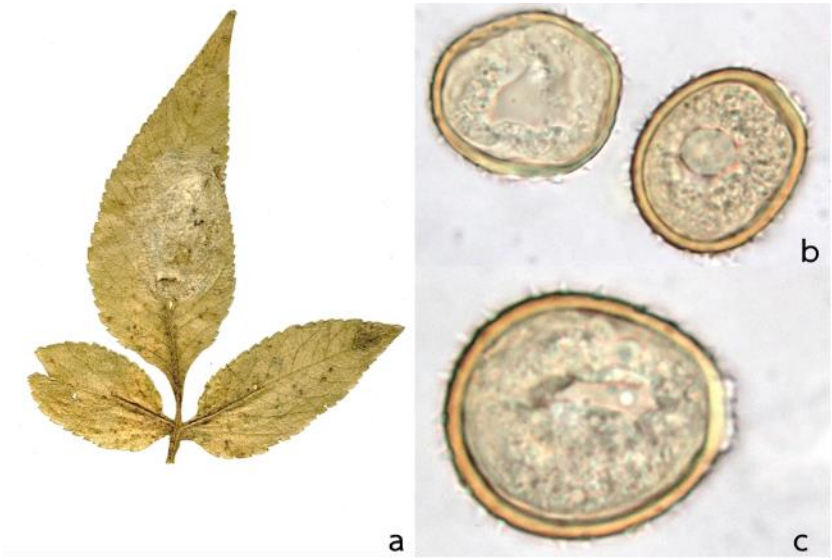


Figure 1.2.14.11: *Puccinia* sp.1 on *Bidens biternata* (M0950)

a: symptom on leaves; b-c: urediospores

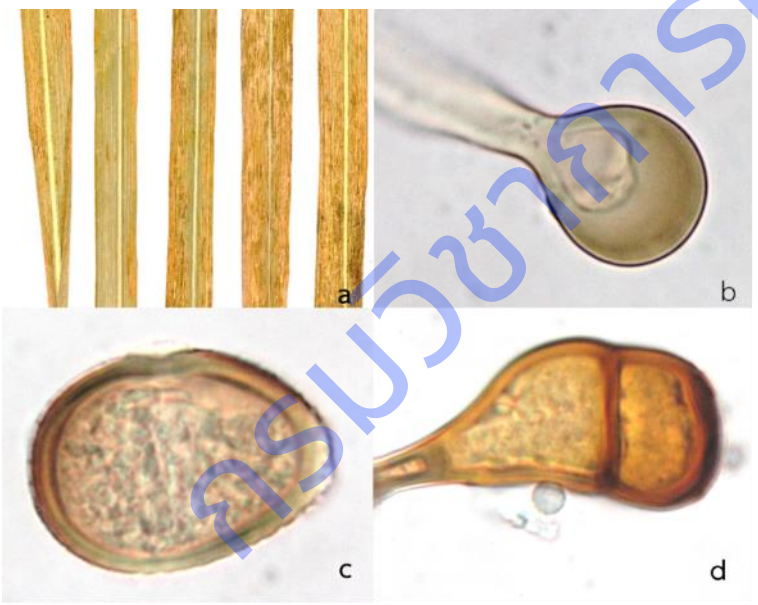


Figure 1.2.14.12: *Puccinia* sp.4 on *Chrysopogon zizanioides* (M0948)

a: symptom on leaves; b-c: urediospores; d: teliospore

กรมวิชาการเกษตร

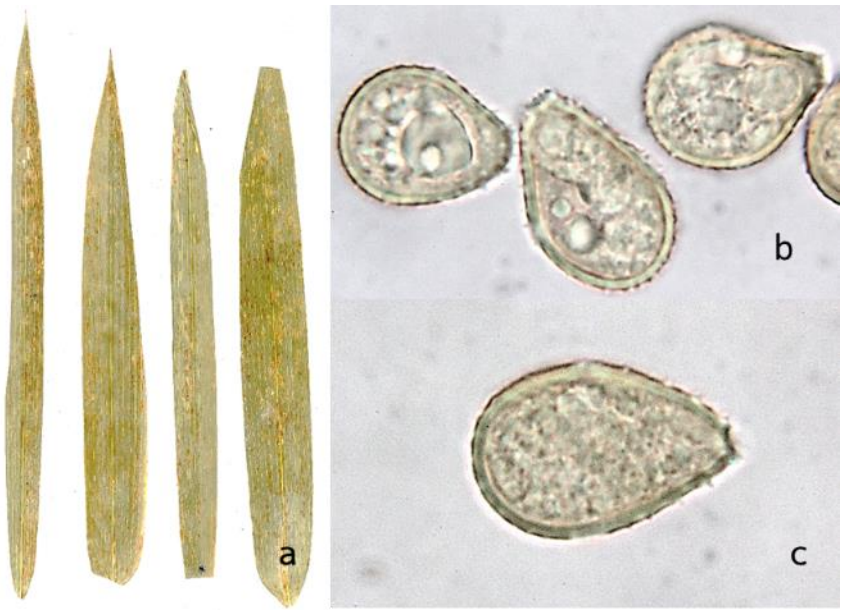


Figure 1.2.14.13: *Dasturella* sp.1 on *Bambusa* sp. (M0955)

a: symptom on leaves; b-c: urediospores

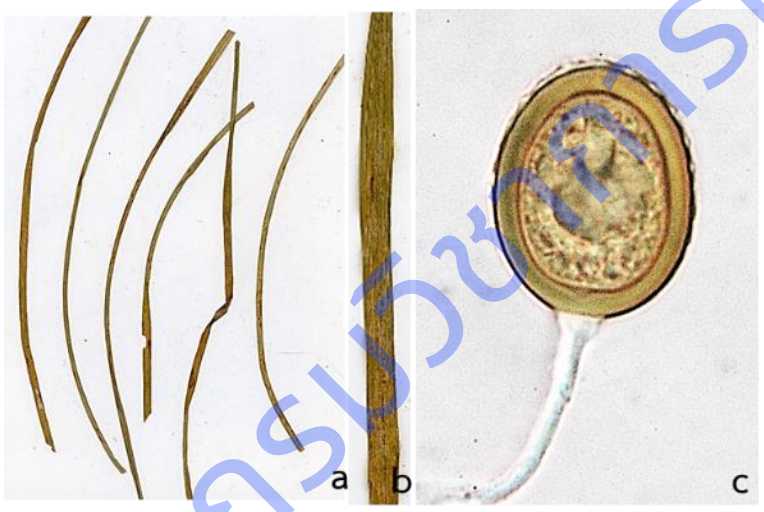


Figure 1.2.14.14: *Puccinia* sp.3 on *Cyperus* sp. (M0961)

a-b: symptom on leaves; c: urediospore on pedicel

กรมวิชาการเกษตร

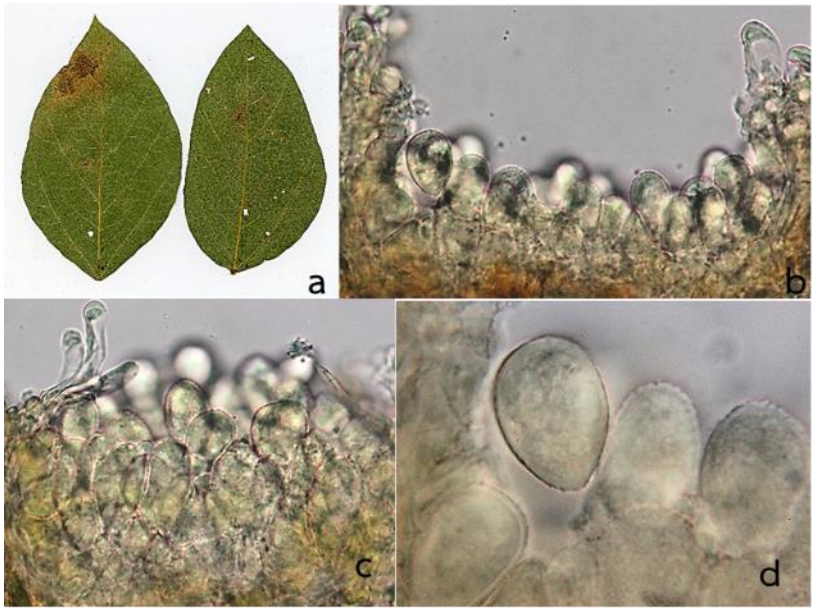


Figure 1.2.14.15: *Phakopsora pachyrhizi* on *Glycine max* (สจ.5) (M1035)

a: symptom on leaves; b-d: urediospores embedded in sori

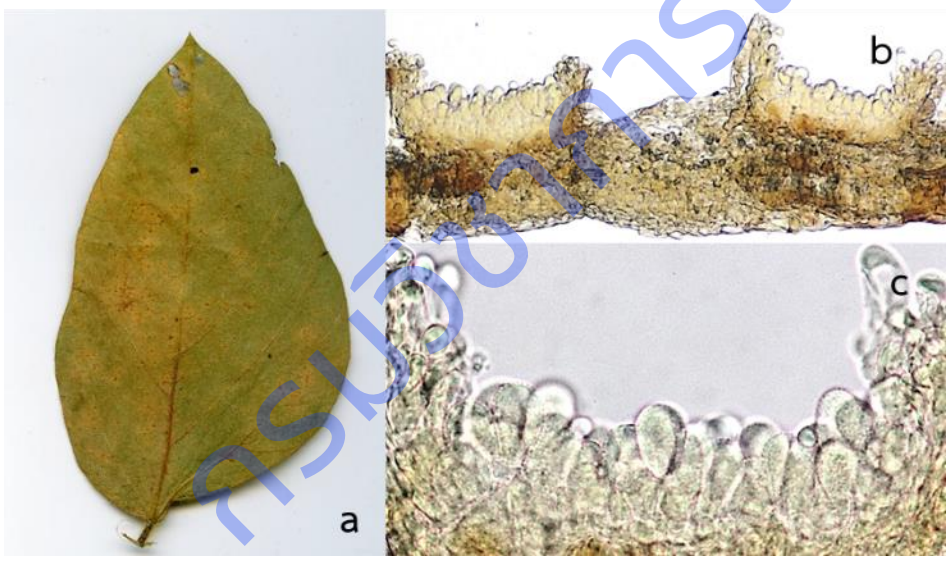


Figure 1.2.14.16: *Phakopsora pachyrhizi* on *Glycine max* (สจ.5) (M1036)

a: symptom on leaf; b: cross section of sori; c: urediospores

กรมวิชาการเกษตร

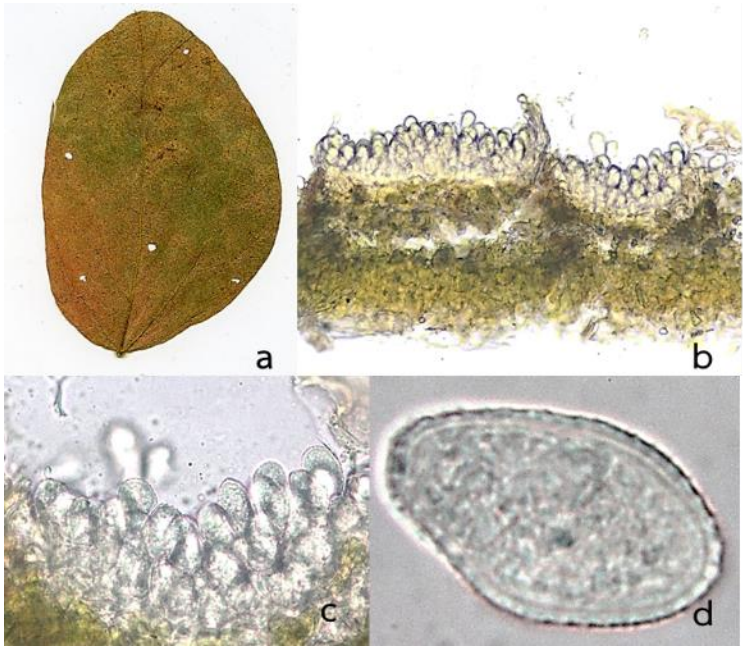


Figure 1.2.14.17: *Phakopsora pachyrhizi* on *Glycine max* (ชม.60) (M1041)

a: symptom on leaf; b: cross section of sori; c-d: urediospores

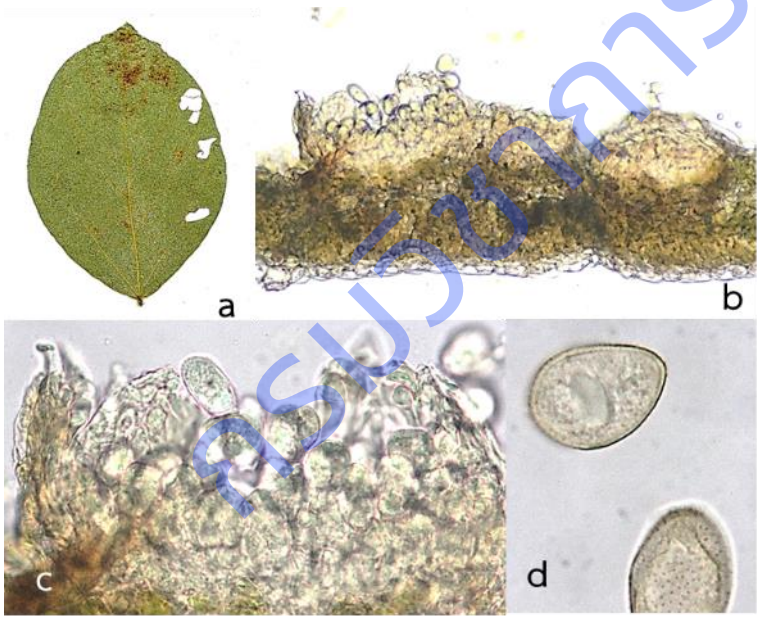


Figure 1.2.14.18: *Phakopsora pachyrhizi* on *Glycine max* (ชม.60) (TPPH 005378)

a: symptom on leaf; b: cross section of sori; c-d: urediospores

สงวนลิขสิทธิ์

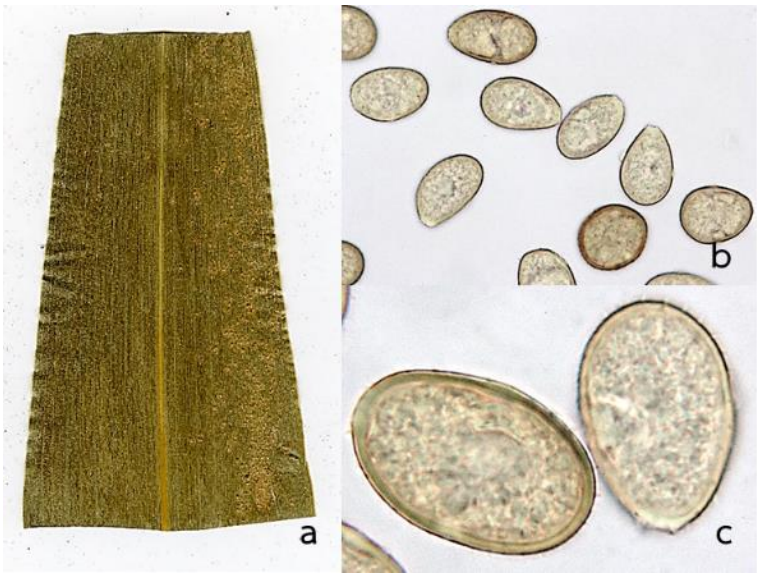


Figure 1.2.14.19: *Puccinia sorghi* on *Zea mays* (M0957)

a: symptom on leaf; b-c: urediospores

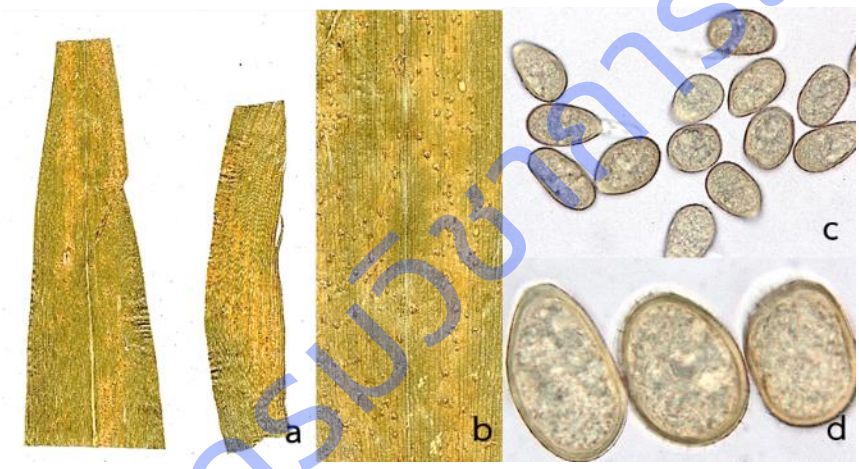


Figure 1.2.14.20: *Puccinia sorghi* on *Zea mays* (M0962)

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

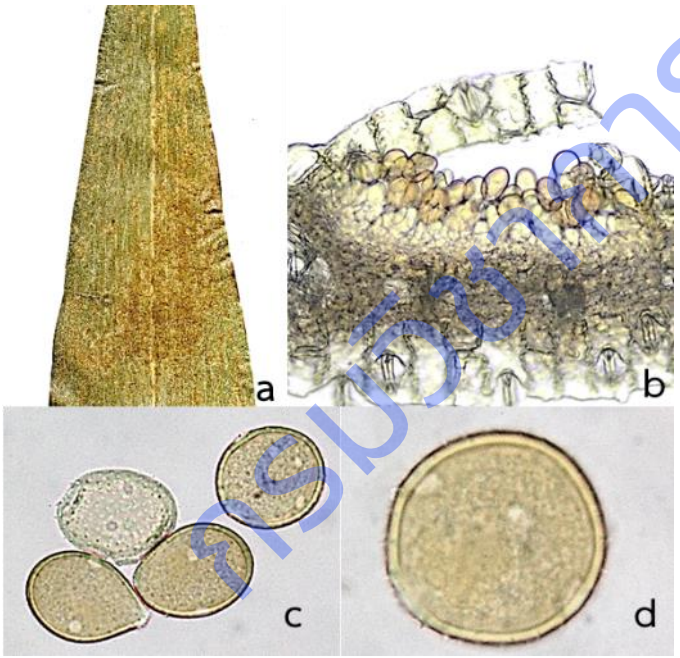


Figure 1.2.14.22: *Puccinia polysora* on *Zea mays* var. *rugosa* (M0055)

a: symptom on leaf; b: sorus, c-d: urediospores

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Figure 1.2.14.23: *Puccinia polysora* on *Zea mays* (M0966)

a: symptom on leaf; b-d: urediospores

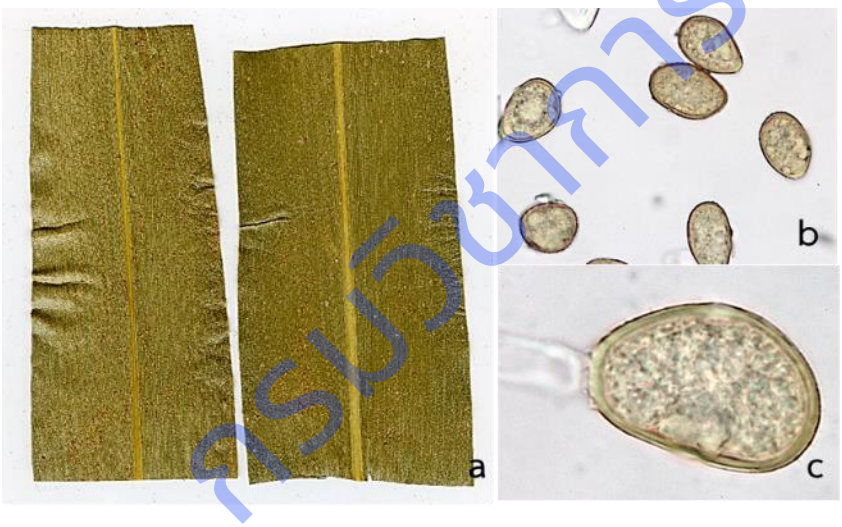


Figure 1.2.14.24: *Puccinia polysora* on *Zea mays* (M0959)

a: symptom on leaves; b-c: urediospores

กรมวิชาการเกษตร

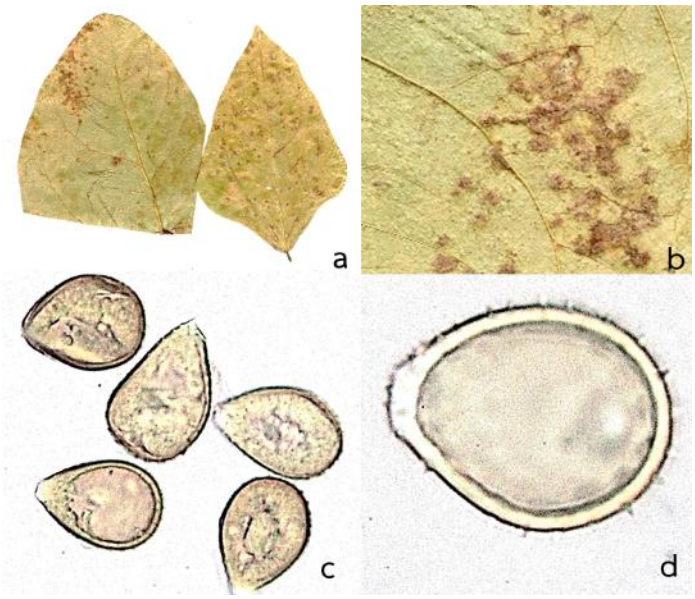


Figure 1.2.14.25: *Uromyces appendiculatus* on *Phaseolus vulgaris* (M0960)

a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf; c-d: urediospores

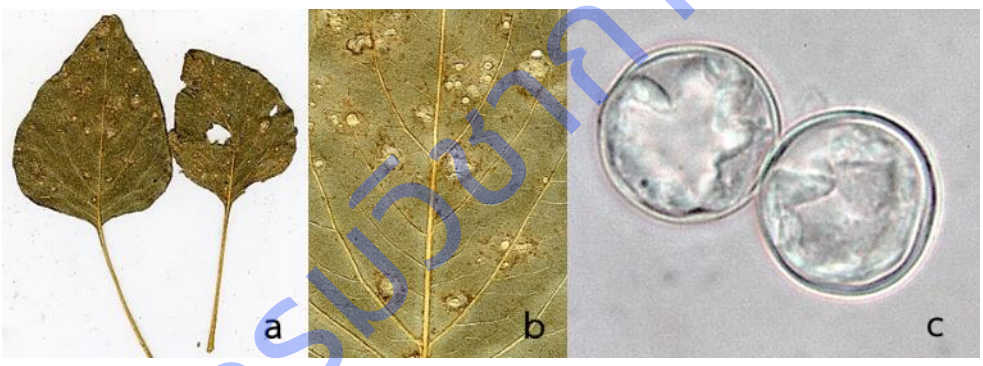


Figure 1.2.14.26: *Albugo* sp.1 on *Amaranthus viridis* (M0965)

a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf; c-d: teliospores

สำนักวิชาการเกษตร

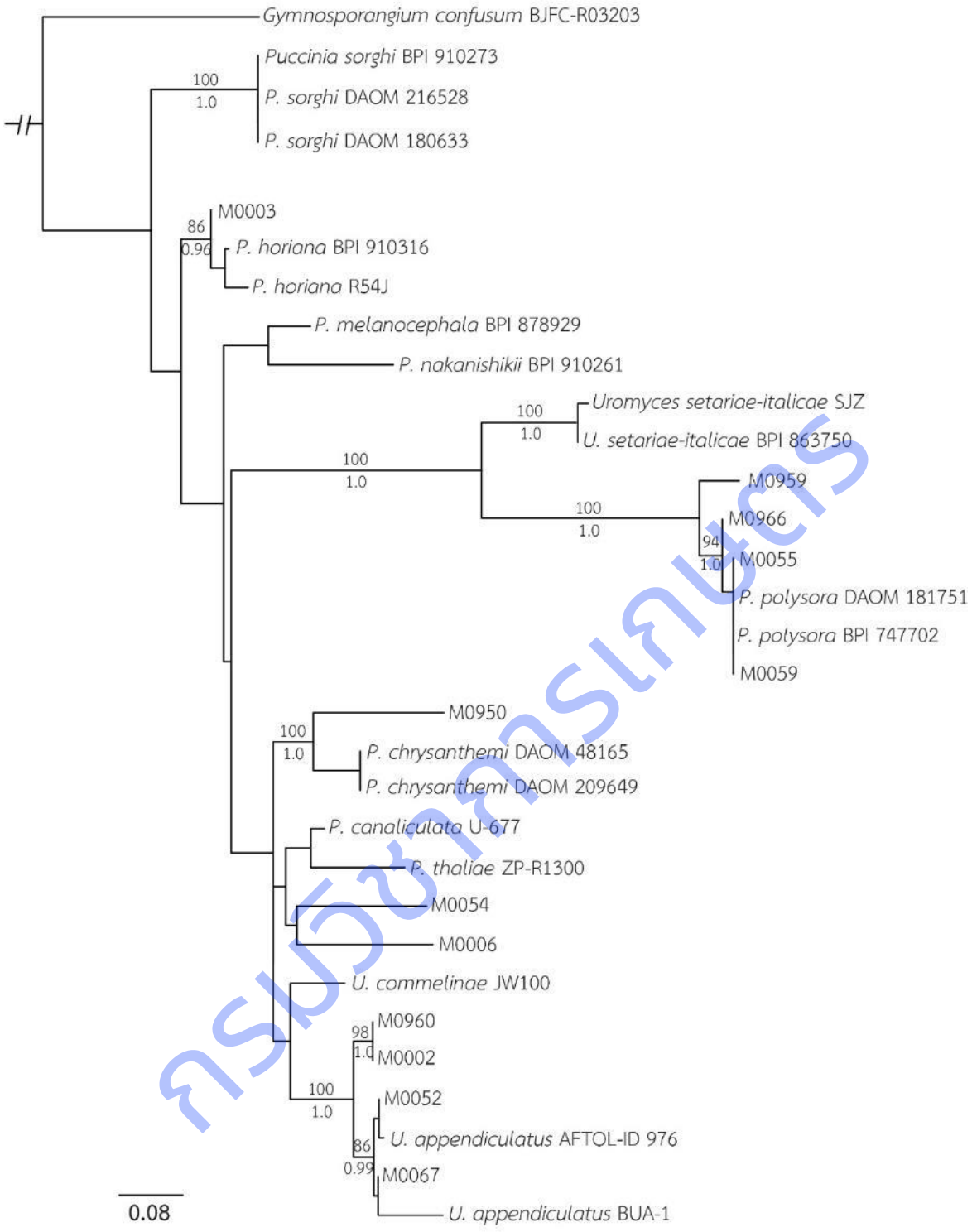
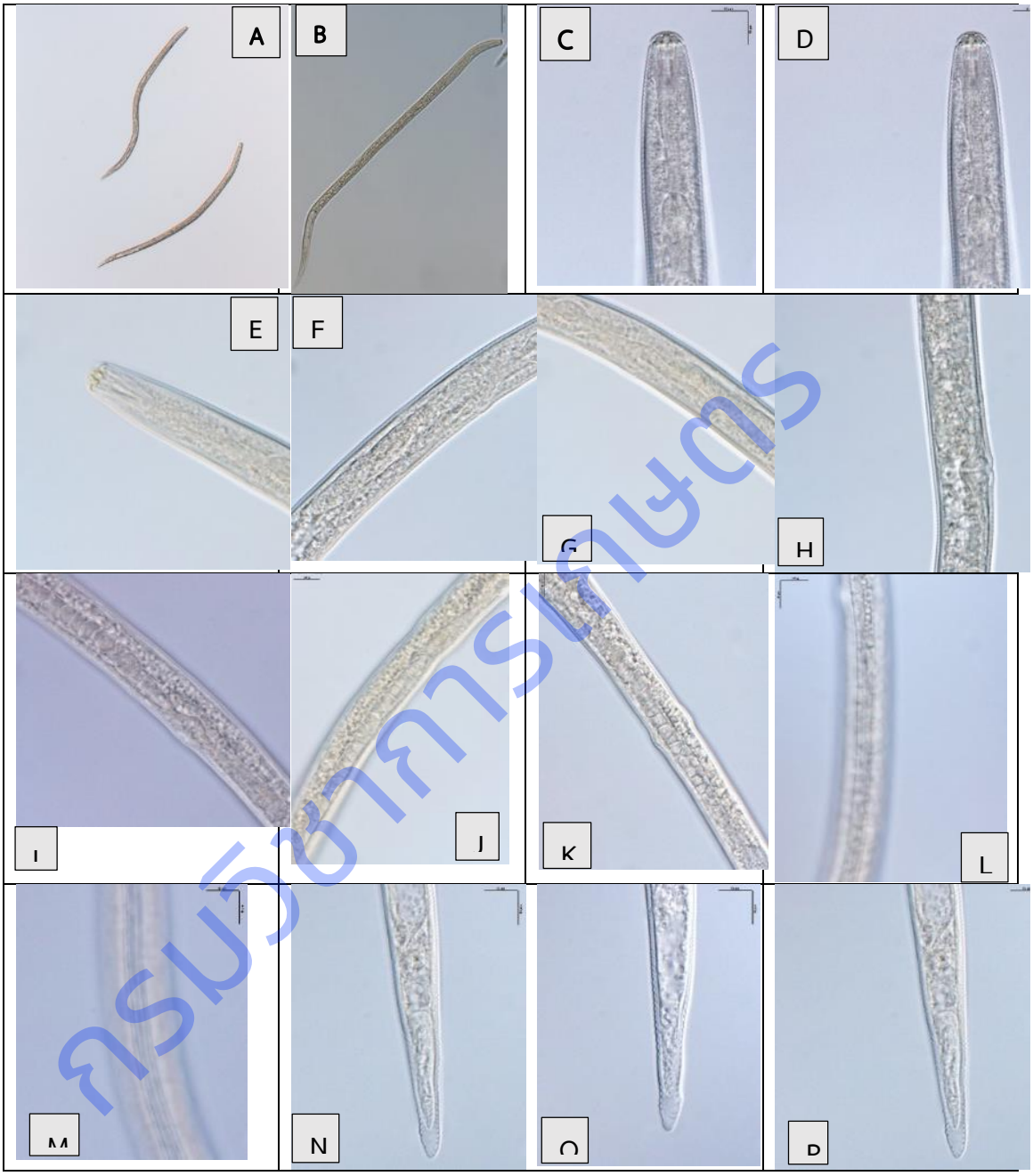


Figure 1.2.14.27: Phylogram of *Pucciniaceae* obtained in a maximum likelihood search in RAxML of the ITS dataset. Bootstrap support values (≥70%) from 1,000 replicates above nodes. Posterior probabilities (≥0.95) summarized from 10,000 converged trees obtained in a Bayesian search are shown below nodes.

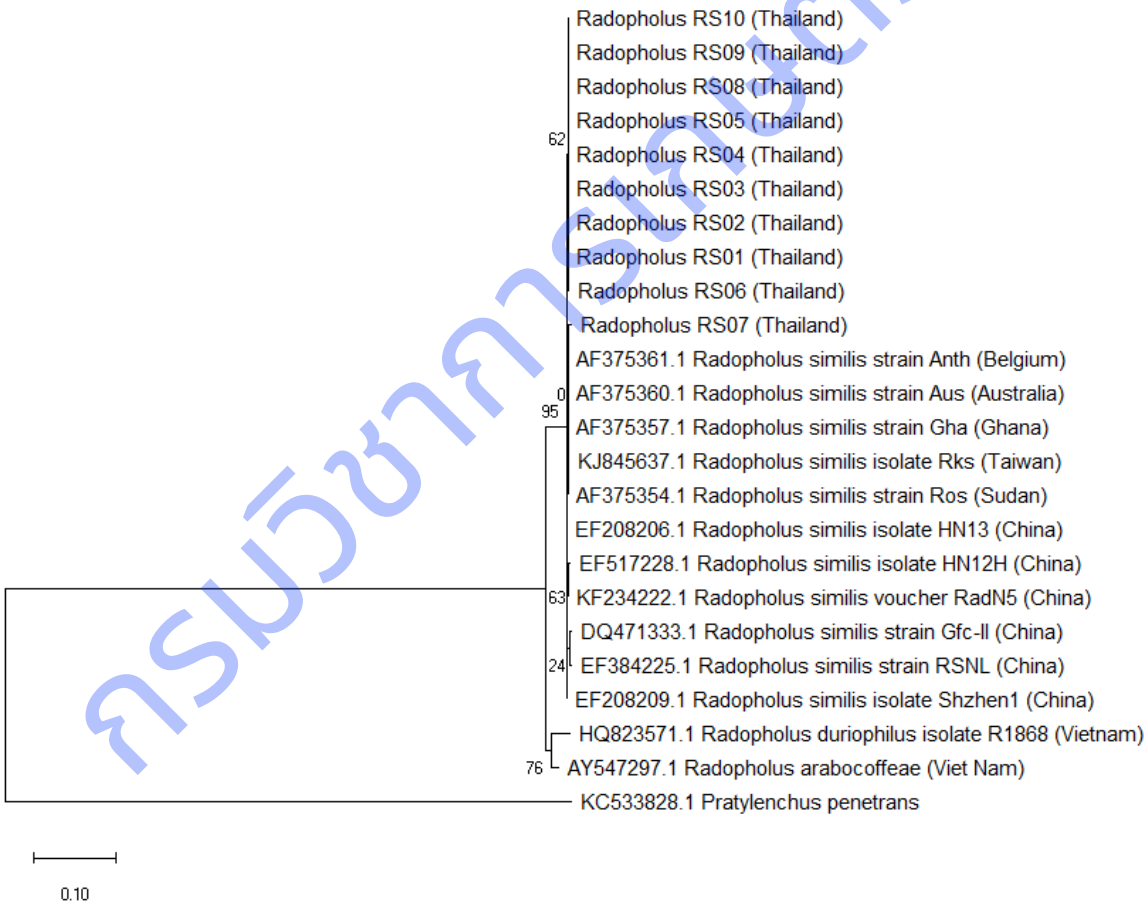
กรมวิชาการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.2.15.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ที่ทำสไลด์ถาวรแล้วตรวจวินิจฉัยภายใต้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง differential interference contrast (DIC) ของลักษณะไส้เดือนฝอยรากโพรง *R. similis* (A-B) ลักษณะไส้เดือนฝอยเพศเมียซึ่งโครงสร้างส่วนหัว (labial framework) และหลอดดูดอาหาร (stylet) พัฒนาดี และ ปากช่องคลอด (vulva) อยู่ค่อนขางกึ่งกลางลำตัว (C-E) ส่วนหัวมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลม (Head hemispherical) ยกสูงเพียงเล็กน้อย ในส่วนของหลอดอาหารมีพัฒนาการดีและมี stylet knobs ซึ่งมีรูปร่างกลมและขนาดเท่ากัน (F-G) ส่วนหน้ารวมทั้งหลอดอาหาร(oesophagus) และ

ต่อมน้ำลาย(oesophageal glands) ซึ่งได้ขยายตัวเป็นกลีบยาวซ้อนทับลำไส้ไปด้นหลัง 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



ภาพที่ 1.2.15.4 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของยีนส่วน ITS ของไส้เดือนฝอย *R. similis* ประชากรจากประเทศไทยกับตัวอย่างในฐานข้อมูล ด้วยวิธี maximum likelihood

กรมวิชาการเกษตร

ผนวก 2

ภาพและตารางประกอบผลงานวิจัย

กิจกรรมที่ 2

ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ของศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติ (วงจรชีวิต การเข้าทำลาย พืชอาหาร และการแพร่กระจาย)

กรมวิชาการเกษตร

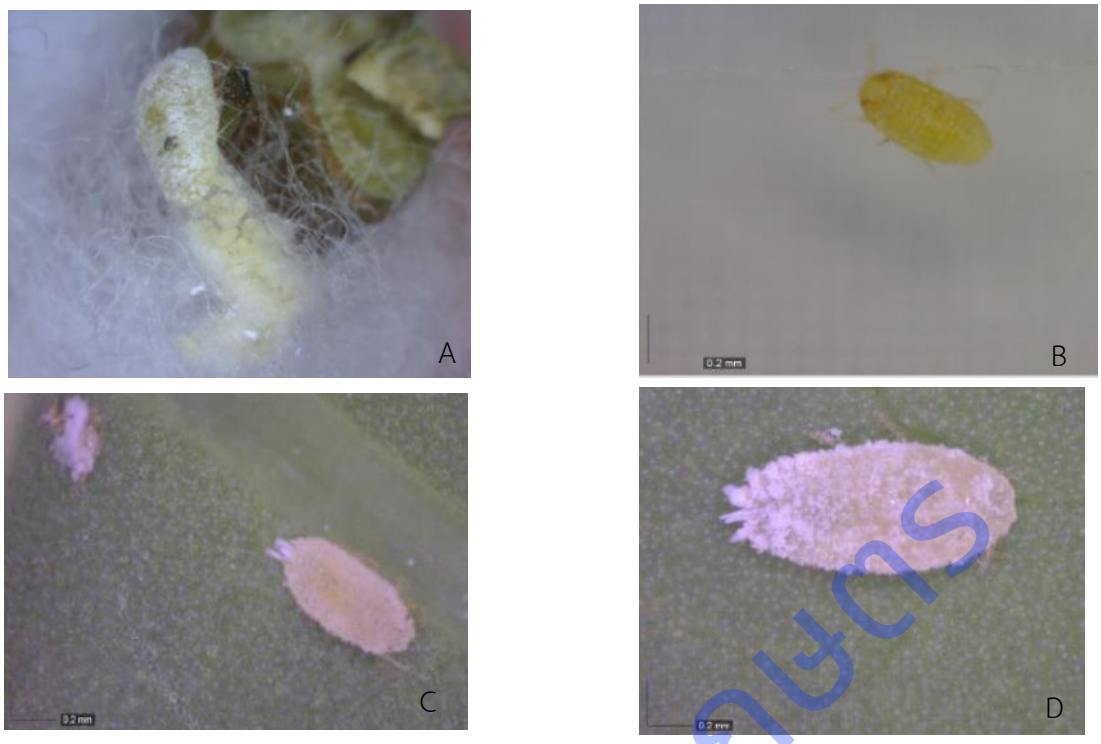


Figure 2.1.1.1 Immature stages of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink (A) Crawler stage (first stage), (B) Mounting to second stage, (C) Second stage, (D) Third stage.

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

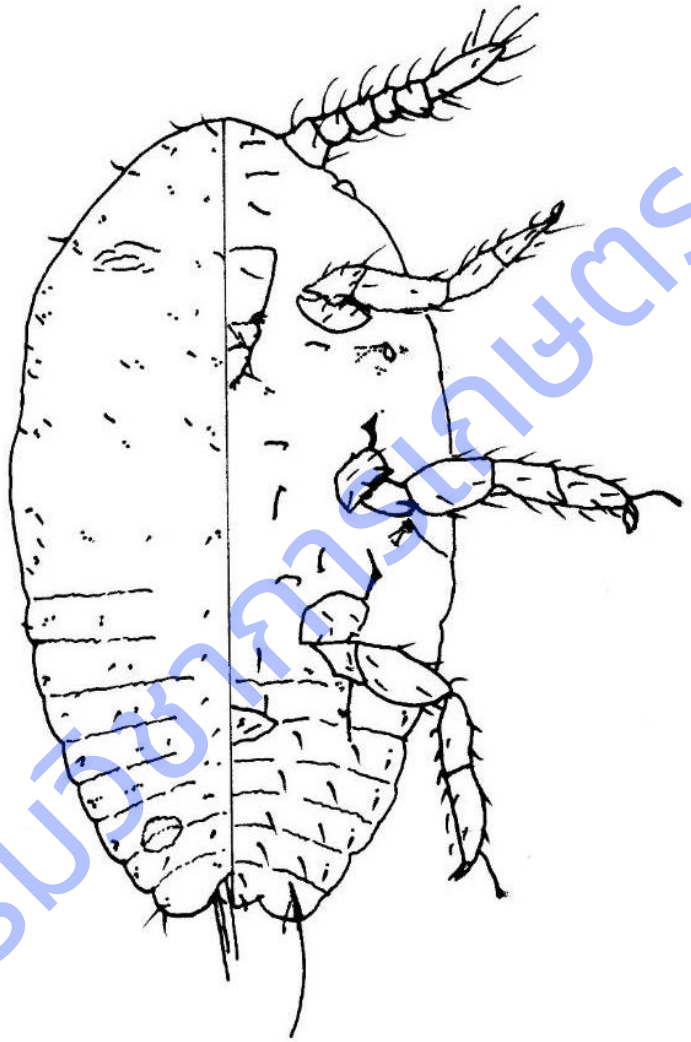


Figure 2.1.1.3 First instar of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

กรมวิชาการเกษตร

Figure 2.1.1.4 Second instar of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

กรมวิชาการเกษตร

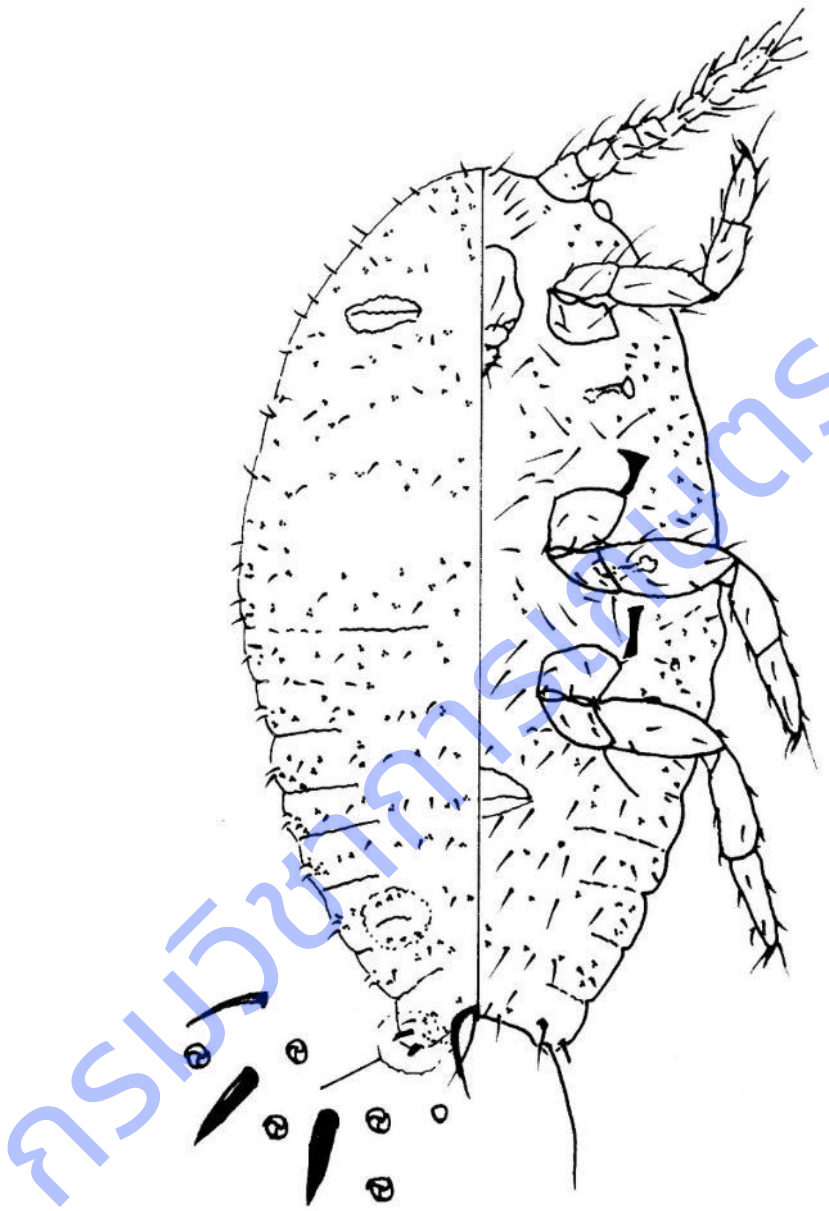


Figure 2.1.1.5 Third instar of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

กรมวิชาการเกษตร

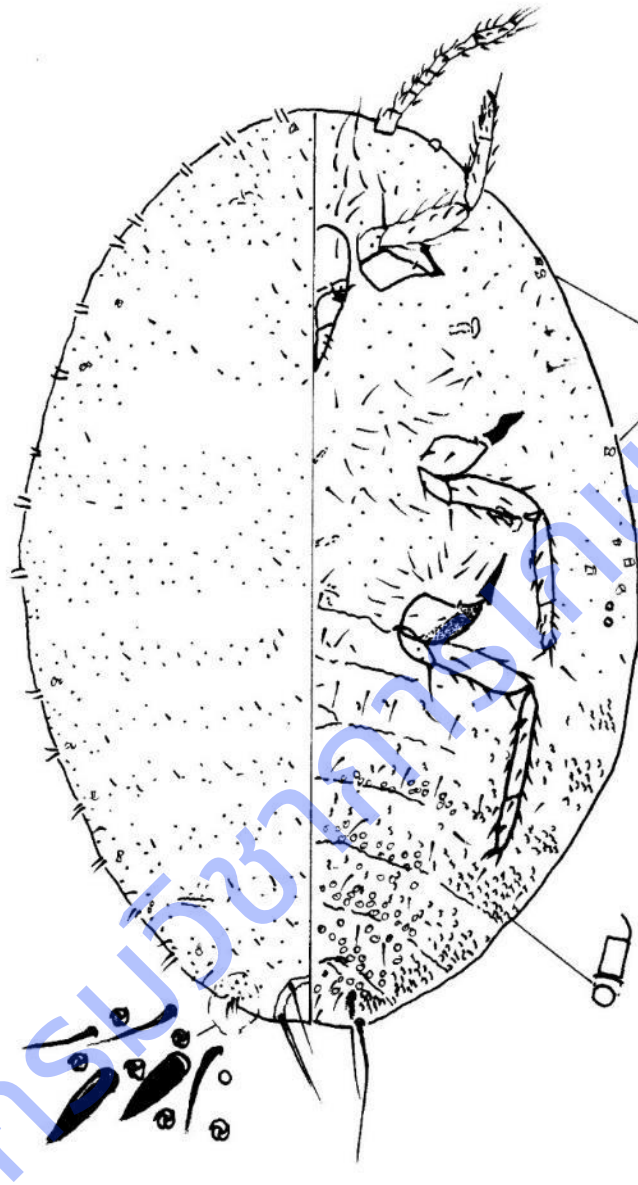


Figure 2.1.1.6 Adult female of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

กรมวิชาการเกษตร

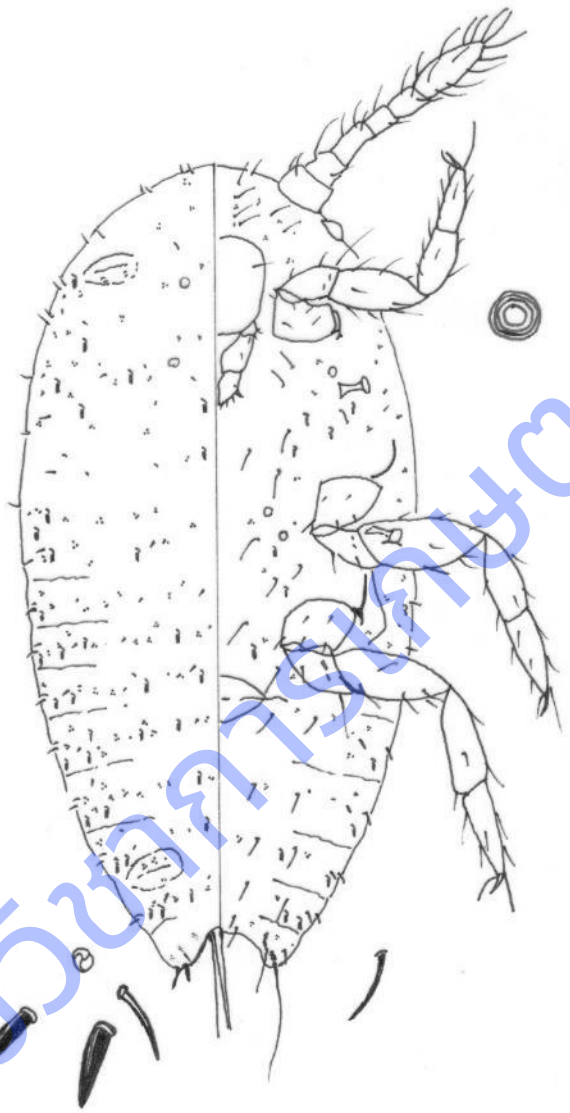


Figure 2.1.1.7 Second instar male of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

กรมวิชาการเกษตร

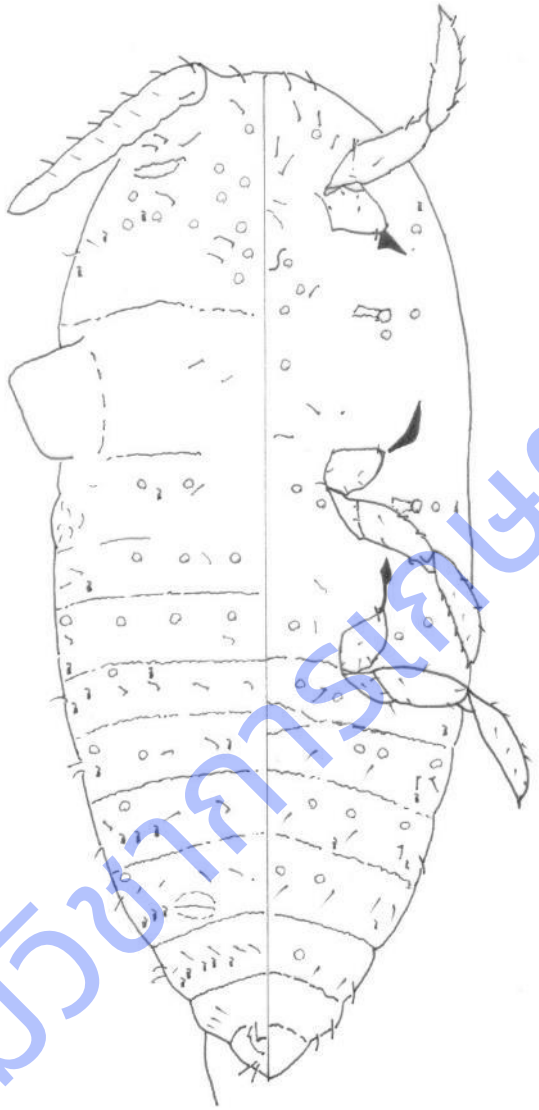


Figure 2.1.1.8 Third instar male of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

กรมวิชาการเกษตร

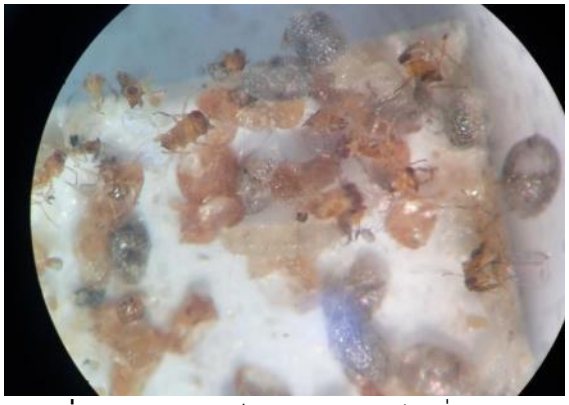
ภาพที่ 2.1.2.1 ลักษณะแตนเบียนไข่ที่ทำการทดลองในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

ภาพที่ 2.1.2.2 ลักษณะแตนเบียนไข่ที่ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้องปกติ

ภาพที่ 2.1.2.3 การวางเปรียบเทียบเพื่อตรวจนับจำนวนไข่ที่ถูกเบียนที่อุณหภูมิต่างๆ

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.1.2.3 ไข่ผีเสื้อข้าวสารที่ถูกเบียนและออกเป็นตัวเต็มวัยที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2.1.2.4 ตัวเต็มวัยแตนเบียนไข่ที่ตายในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

กรมวิชาการเกษตร

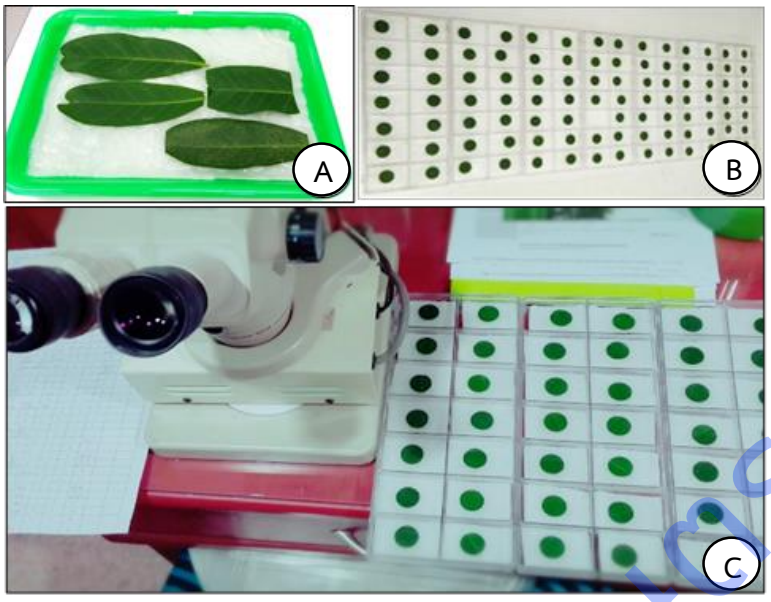


Figure 2.1.3.1 *O. biharensis* were reared on each host plant leaves in laboratory. (A) Only one egg was left on each leaflet. (B) The duration for each developmental stage was recorded every 6 hours. (C)

กรมวิชาการเกษตร

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)

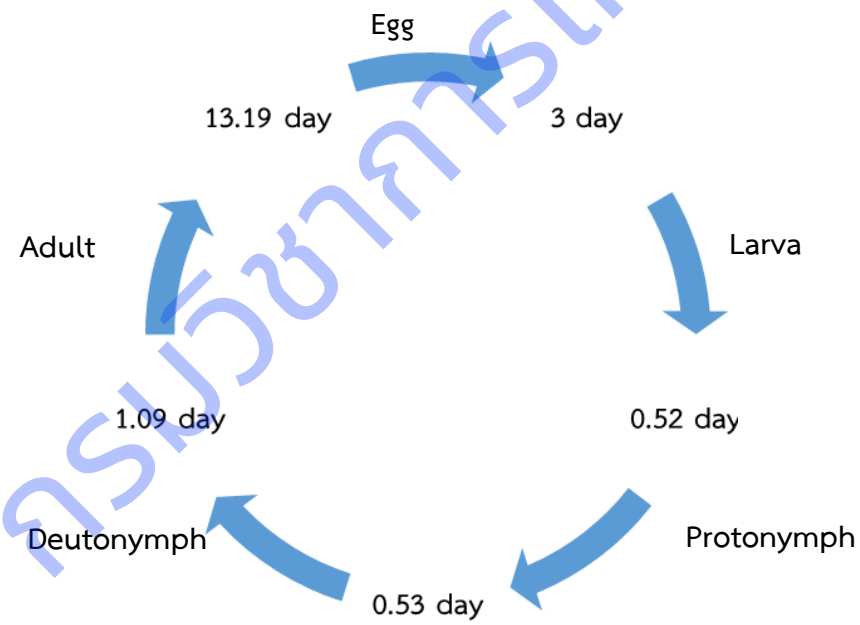


Figure 2.1.3.3 Life cycle of *O. biharensis* when feeding on cassava.

กรมวิชาการเกษตร

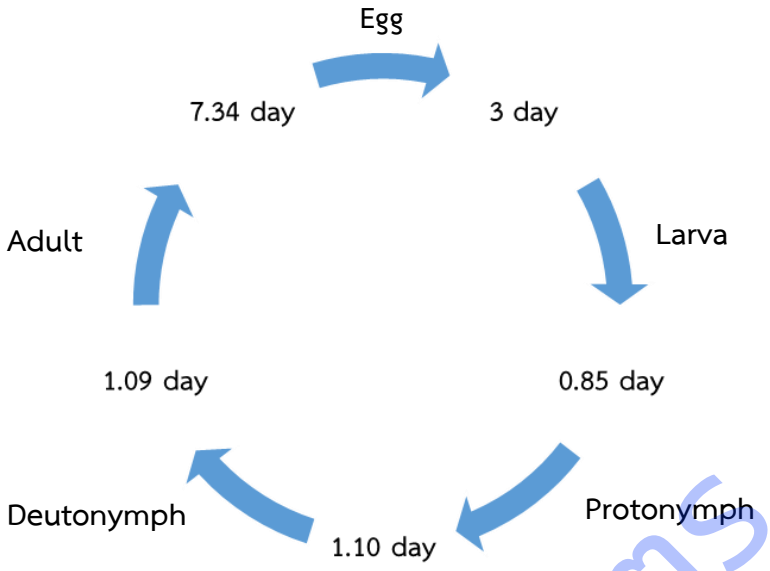


Figure 2.1.3.4 Life cycle of *O. biharensis* when feeding on rose apple.

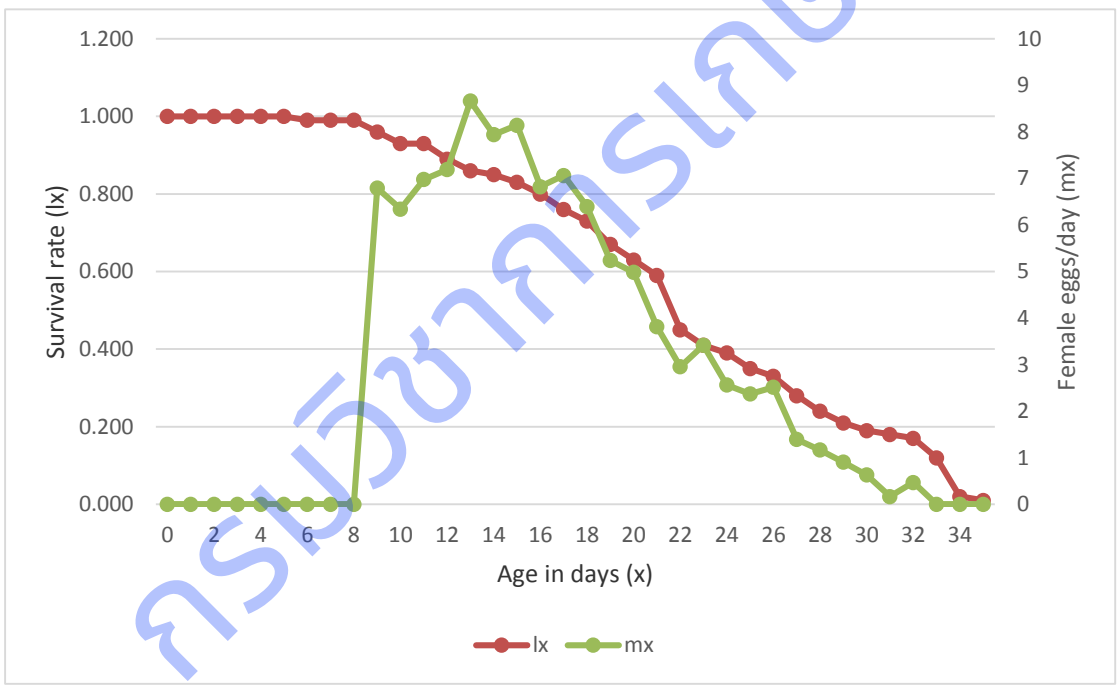


Figure 2.1.3.5 Age-specific survival rate and age-specific fecundity rate of *O. biharensis* when feeding on cassava.

กรมวิชาการเกษตร

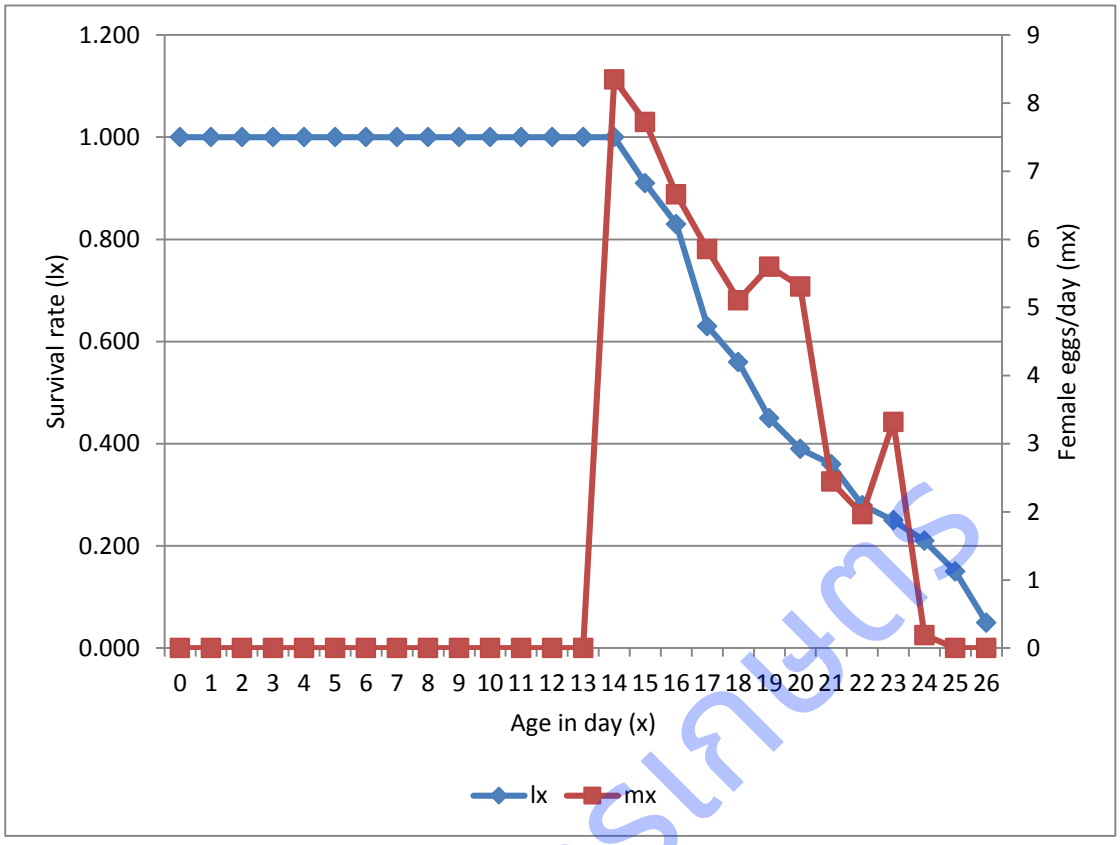
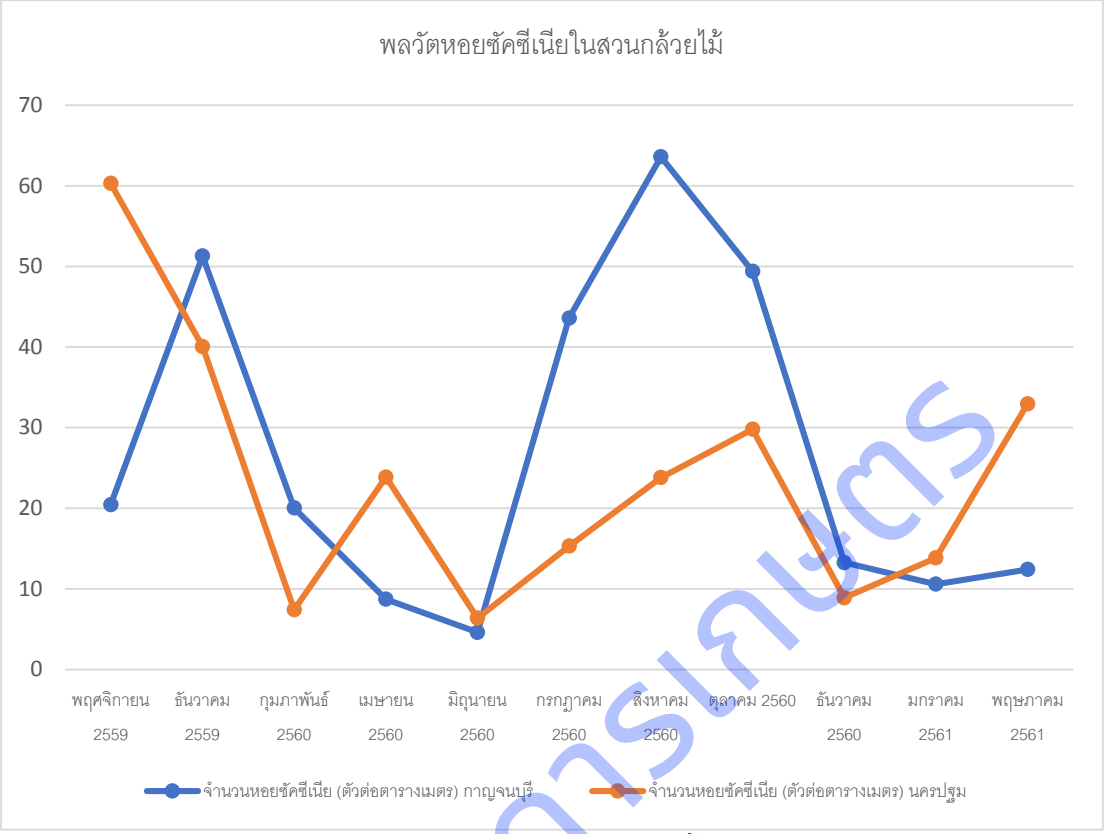
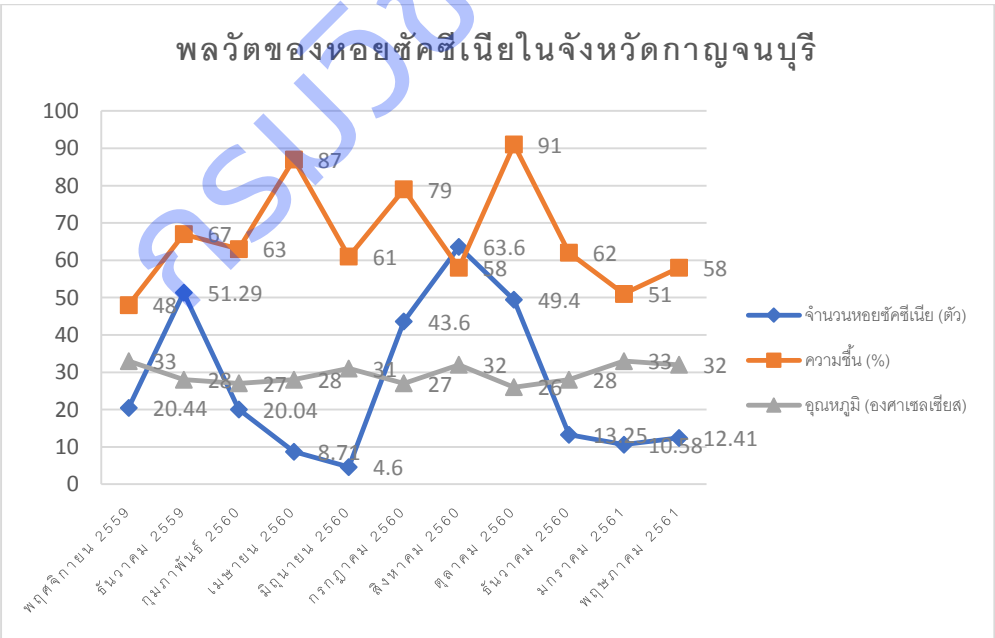


Figure 2.1.3.6 Age-specific survival rate and age-specific fecundity rate of *O. biharensis* when feeding on rose apple.

กรมวิชาการเกษตร

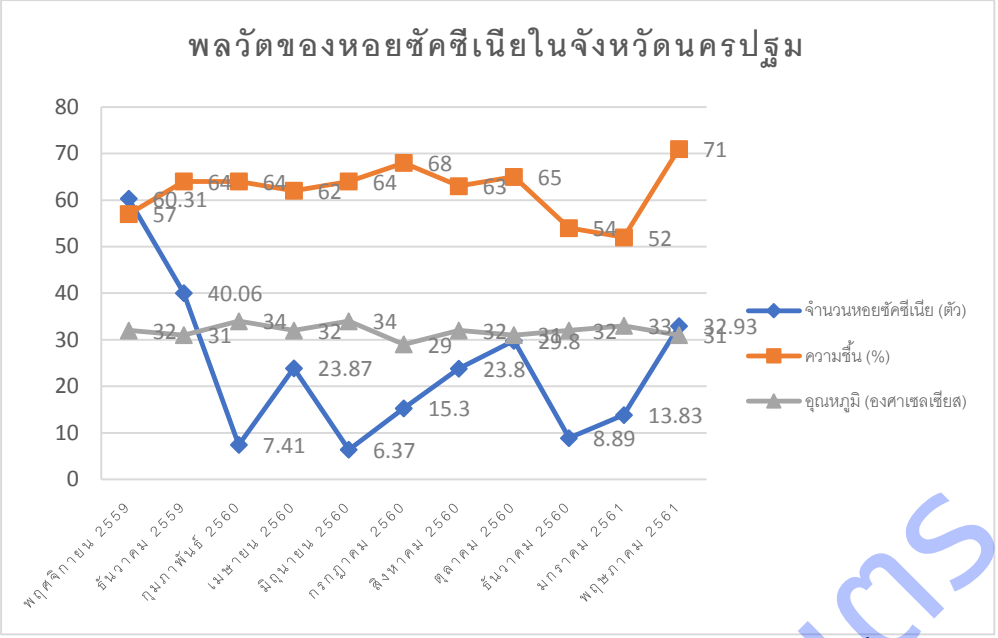


ภาพที่ 2.1.4.1 กราฟแสดงพลวัตหอยซัคซีเนียในสวนกล้วยไม้ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2559 ถึงพฤษภาคม 2561



ภาพที่ 2.1.4.2 พลวัตของหอยซัคซีเนียในกาญจนบุรีเทียบกับอุณหภูมิและความชื้น

ระบบวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2.1.4.3 พลวัตของหอยซัคซีเนียในนครปฐมเทียบกับอุณหภูมิและความชื้น

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)

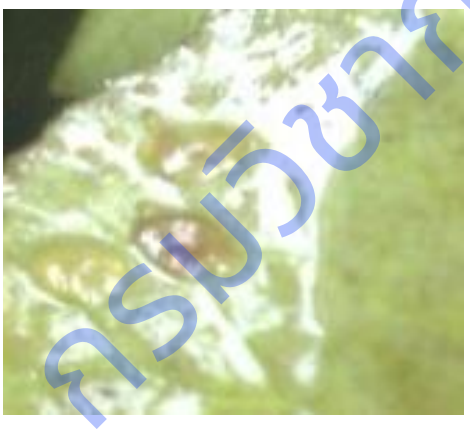
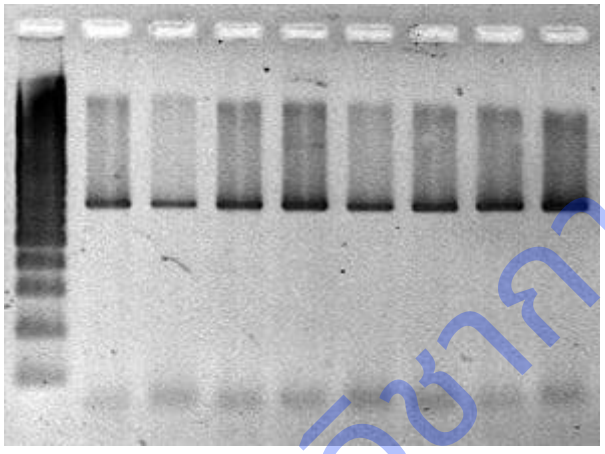


Figure 2.1.5.3 ลักษณะไข่ของหอย *Indoplanorbis* sp.

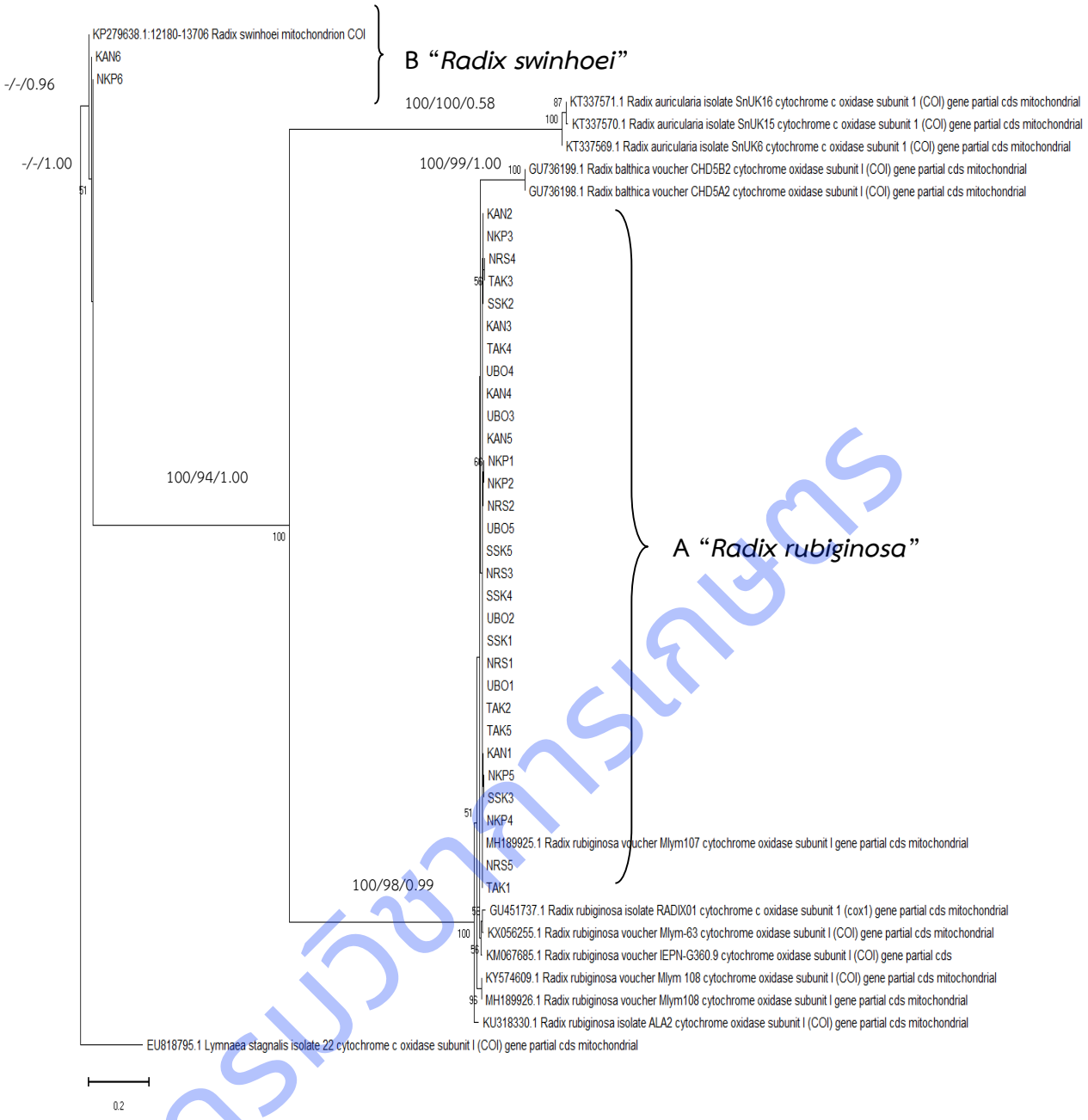
กรมวิชาการเกษตร

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



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

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

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)

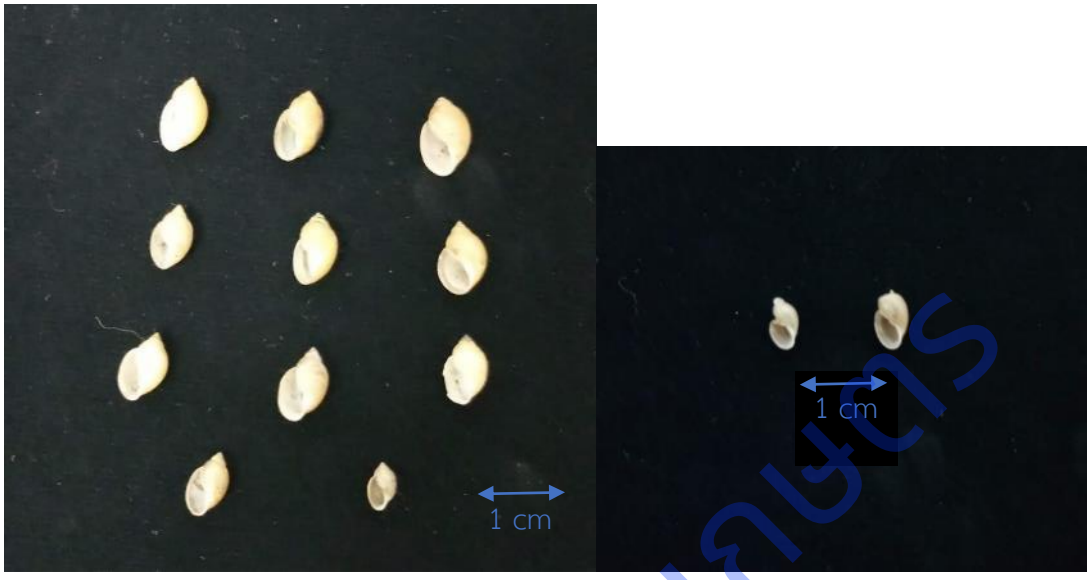


Figure 2.1.9.1: *Physella acuta* (left) and *Physella bonushenricus* (right)

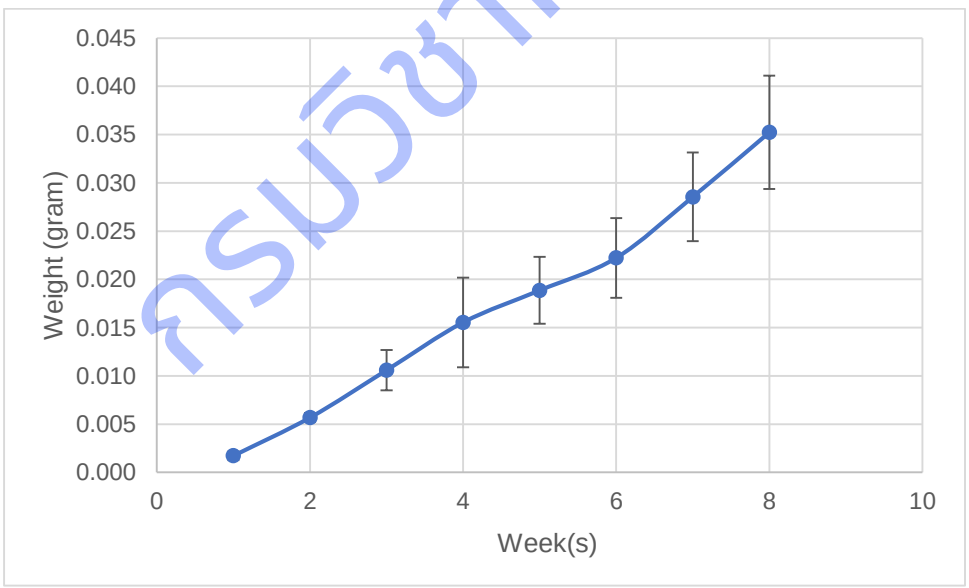


Figure 2.1.9.2: Average weight of *Physella acuta* individuals from first week to eighth week after hatching.

กรมวิชาการเกษตร

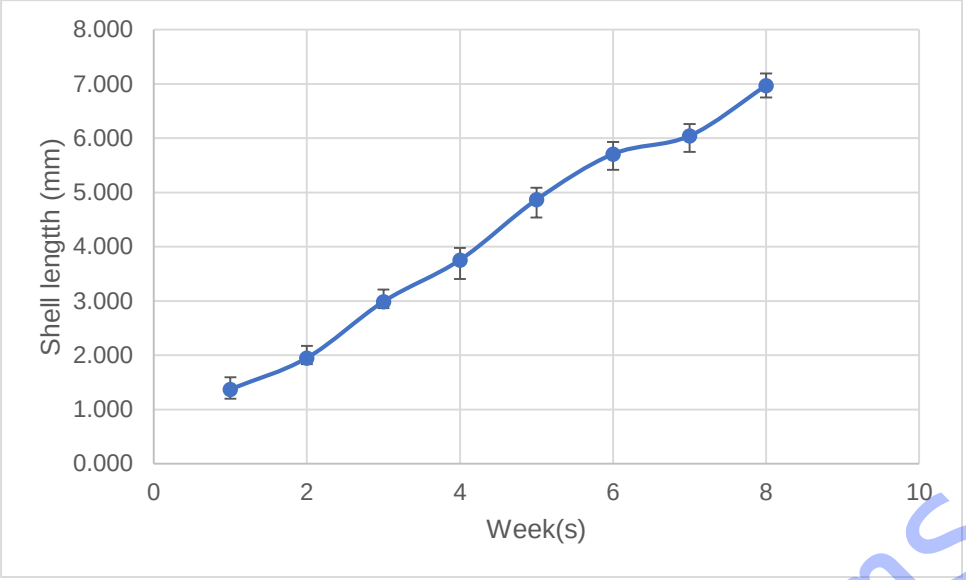


Figure 2.1.9.2: Average shell length of *Physella acuta* individuals from first week to eighth week after hatching.

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.1.10.1 เพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch ที่สำรวจพบในพืชอาหารต่างๆ

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 ± SD (วัน)	พิสัย (วัน)
ตัวอ่อน (Nymph) :	วัยที่ 1	20	1.14 ± 0.11	1 - 2
	วัยที่ 2	20	1.21 ± 0.21	1 - 2
	วัยที่ 3	20	1.17 ± 0.12	1 - 2
	วัยที่ 4	20	1.15 ± 0.09	1 - 2
ระยะตัวอ่อน (Nymphal period)		20	4.51 ± 0.11	4 - 6
ระยะตัวเต็มวัย (Adult period)		20	16.75 ± 1.16	6 - 14
อายุขัย (Life span)		20	14.10 ± 1.48	7 - 16

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2.1.10.2 คุณลักษณะทางชีววิทยาของเพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch

คุณลักษณะทางชีววิทยา	**สูตร**	**ค่าที่ได้**
อัตราการขยายพันธุ์สุทธิ (R_o) (Net Reproductive Rate of Increase)	$\sum lxmx$	67.1600
อัตราการขยายพันธุ์ทางกรรมพันธุ์ (r_c) (Capacity for Increase)	$\frac{\log_e R_o}{T_c}$	0.2832
ชั่วอายุขัยของกลุ่ม (T_c) (Cohort Generation time)	$\frac{\sum lxmx.X}{\sum lxmx}$	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

ภาพที่ 2.1.10.4 **เพลี้ยอ่อนถั่ว** *Aphis craccivora* Koch

ก. ตัวเต็มวัย

ข. ลักษณะตัวเต็มวัยเมื่อนำไปทำสไลด์ถาวรเพื่อจัดจำแนกชนิด

ค. ลักษณะของส่วนหัว หนวด ปาก ขา

ง. ลักษณะส่วนท้อง ไซฟังคูไล และส่วนหาง

กรมวิชาการเกษตร

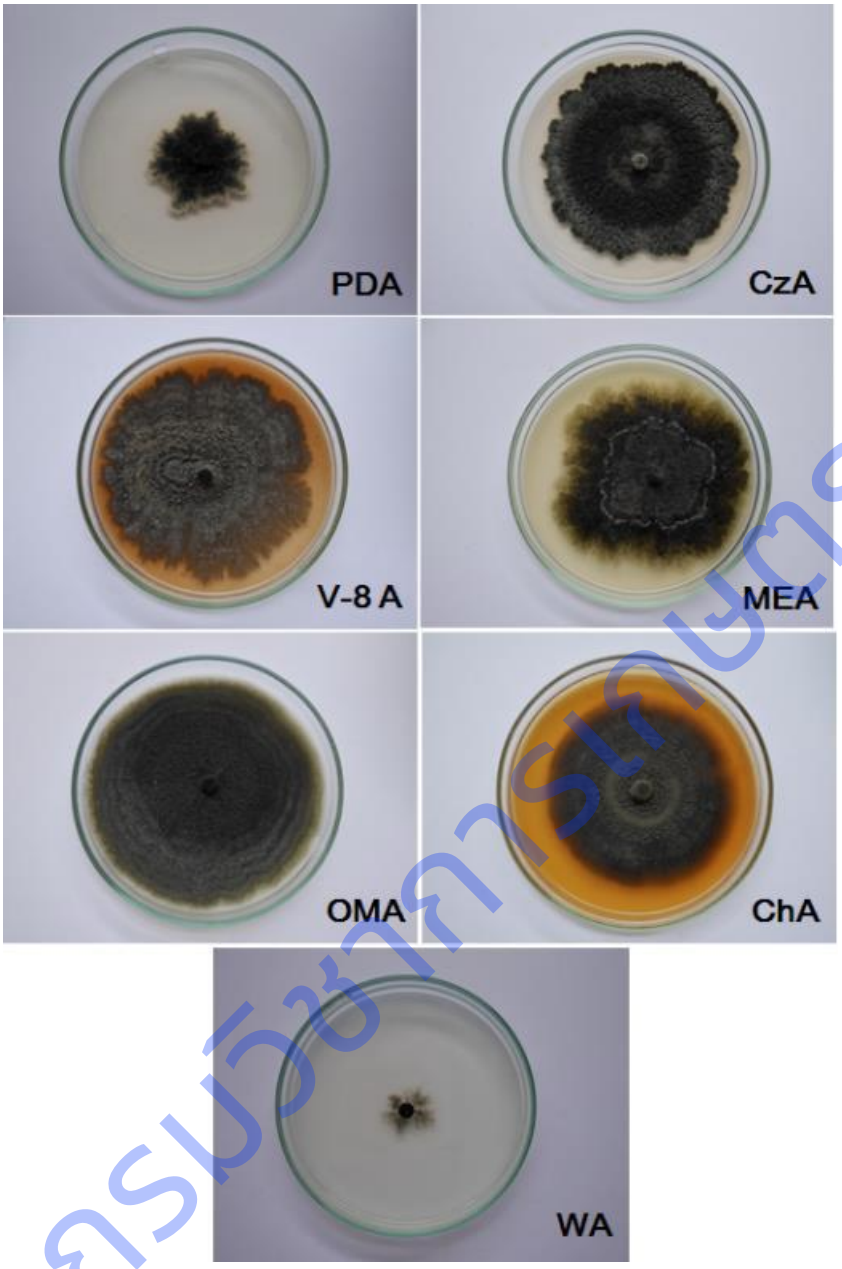


Figure 2.2.1.1: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 088) collected from tan spot of pummelo in Chiang Dao district, Chiang Mai province after 14 days on various media.

กรมวิชาการเกษตร

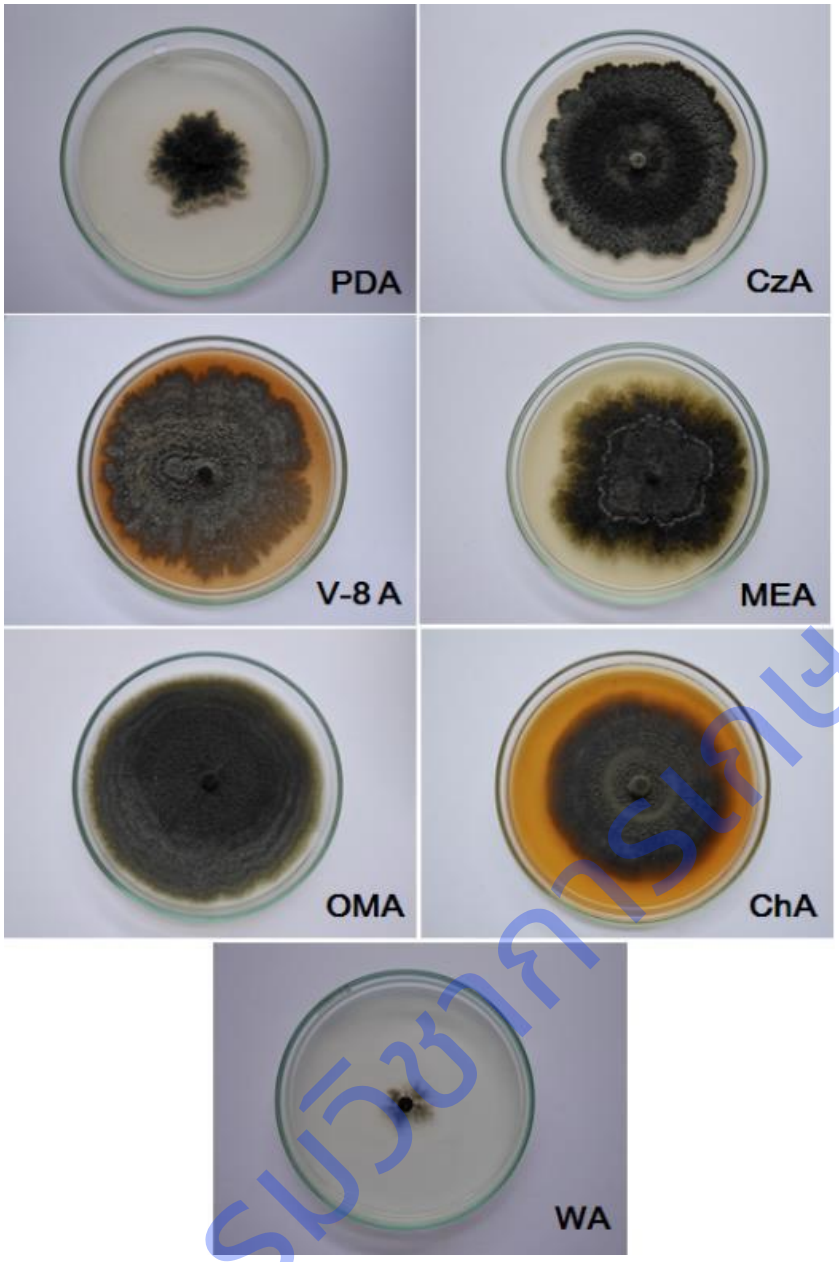


Figure 2.2.1.2: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 009) collected from tan spot of pummelo in Wiang Kaen district, Chaing Rai province after 14 days on various media.

กรมวิชาการเกษตร

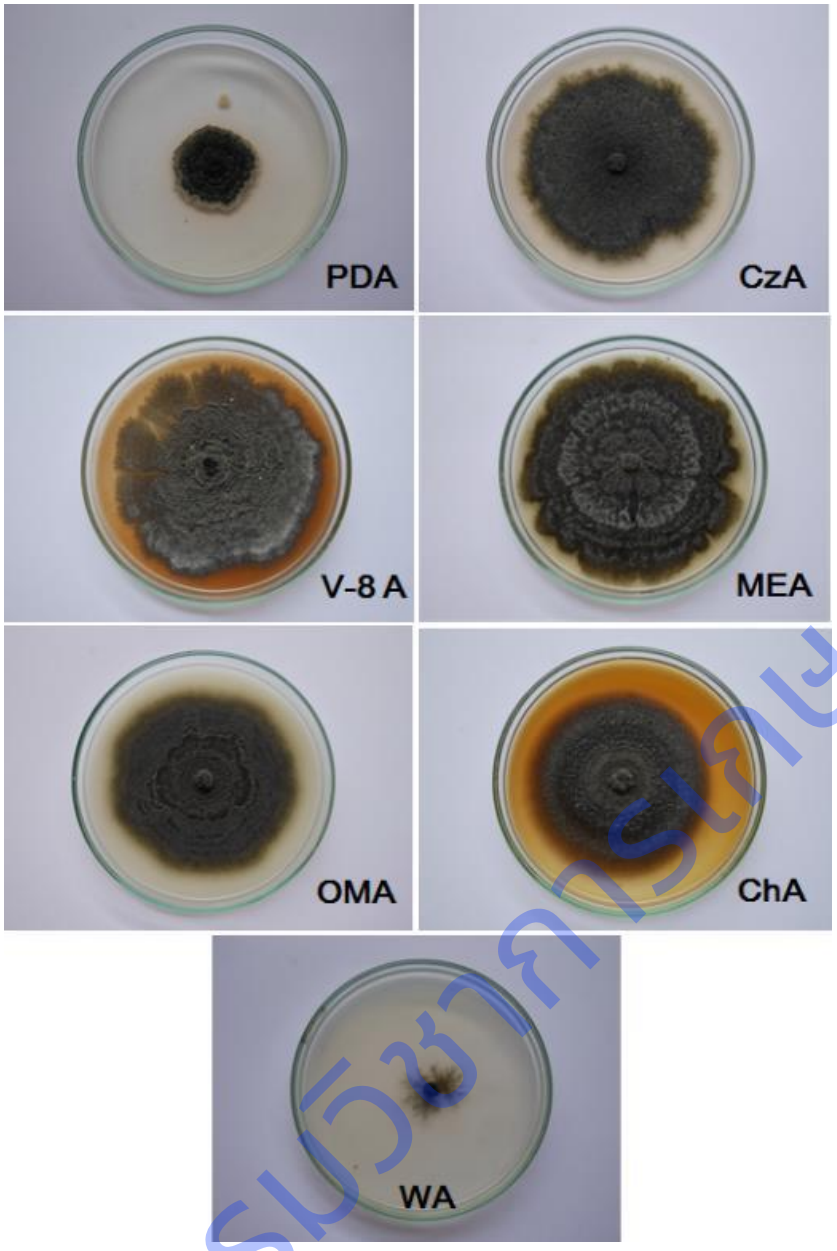


Figure 2.2.1.3: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 040) collected from tan spot of pummelo in Nakhon Chaisi district, Nakhon Pathom province after 14 days on various media.

กรมวิชาการเกษตร

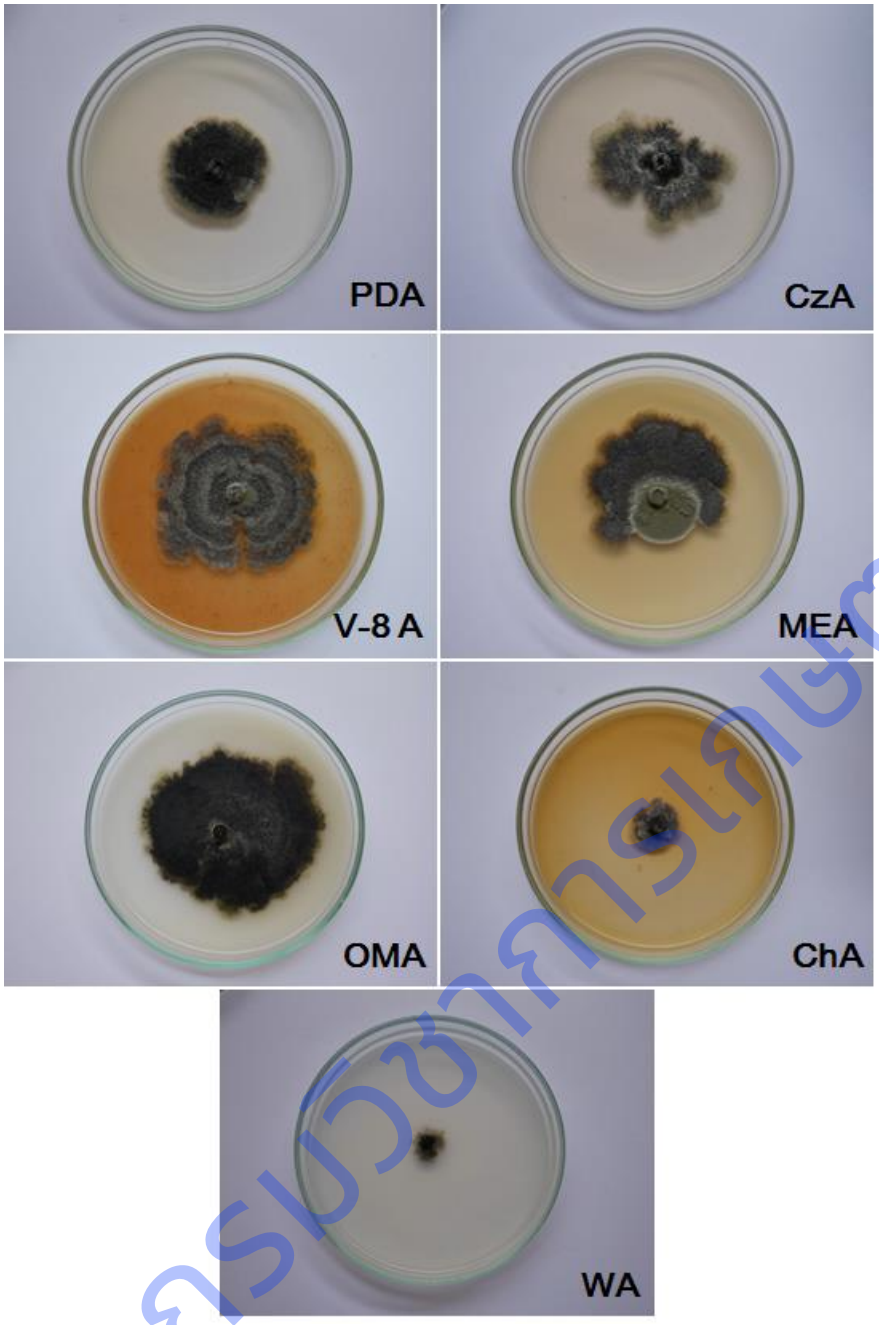


Figure 2.2.1.4: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 090) collected from tan spot of pummelo in Kaset Sombun district, Chaiyaphum province after 14 days on various media.

กรมวิชาการเกษตร

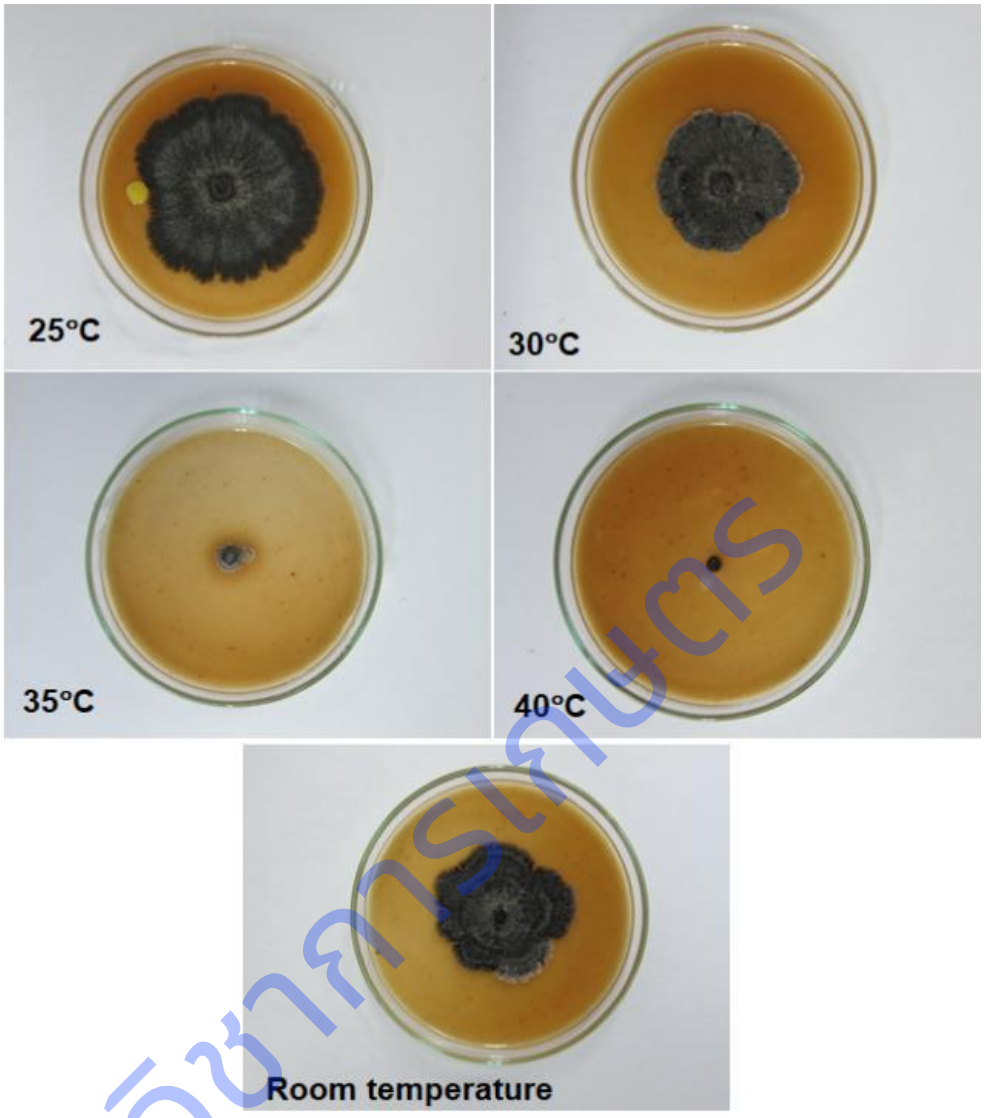


Figure 2.2.1.5: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 088) after 14 days on various temperature.

กรมวิชาการเกษตร

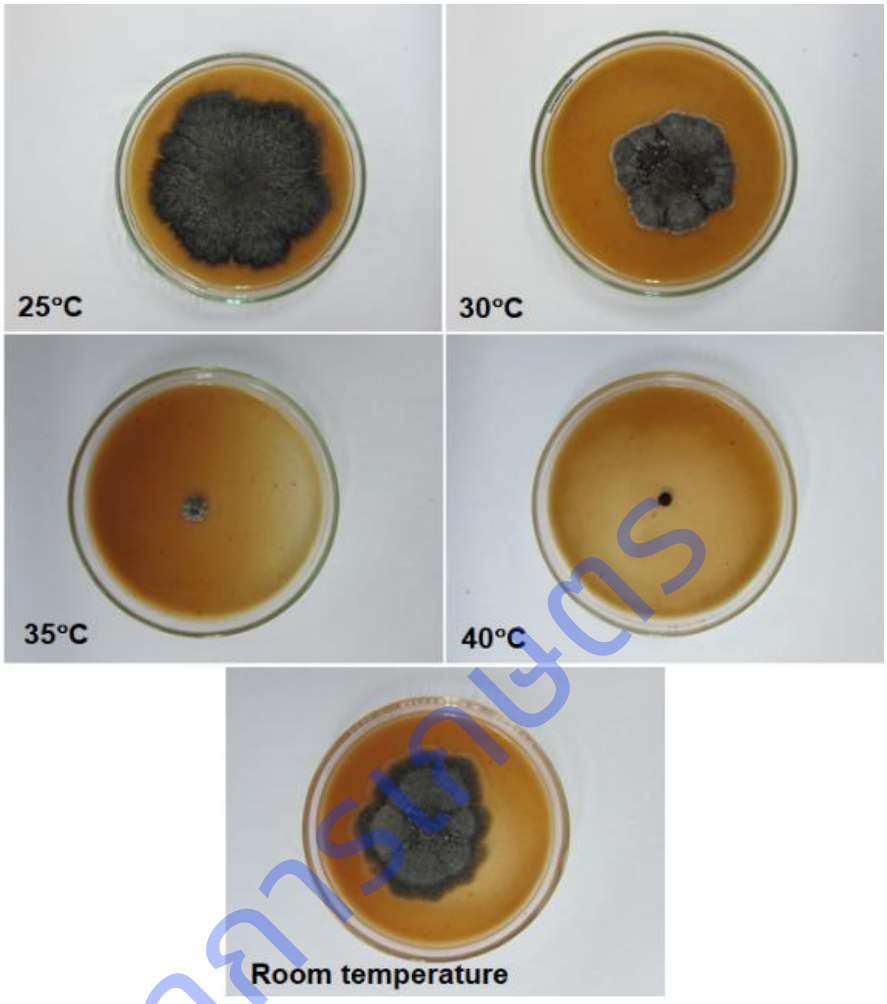


Figure 2.2.1.6: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 009) after 14 days on various temperature.

กรมวิชาการเกษตร

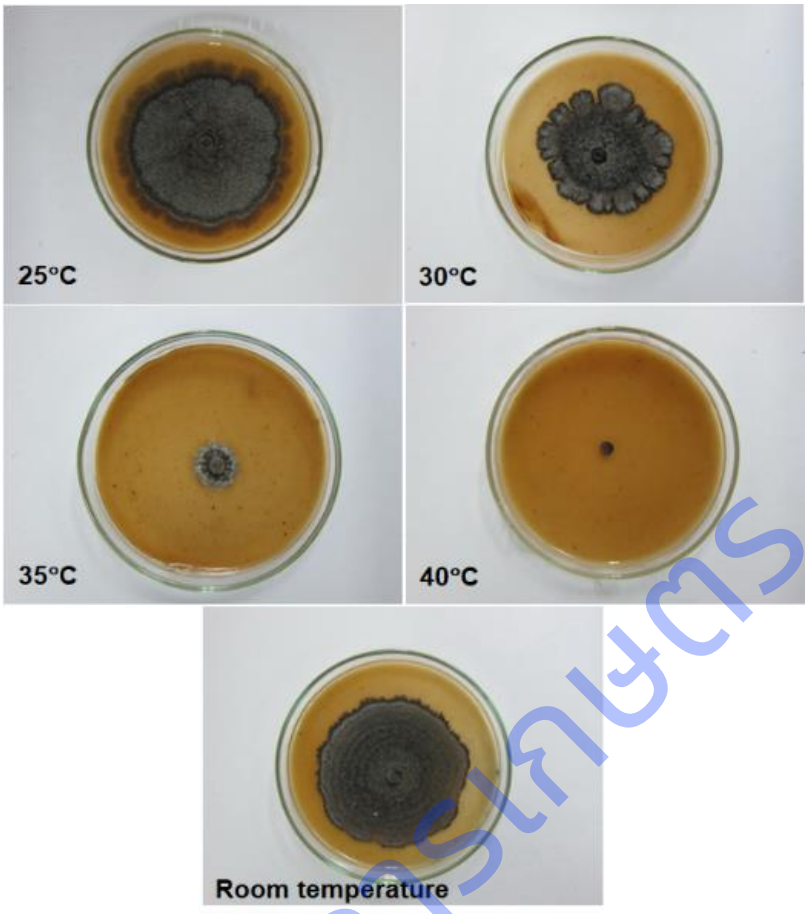


Figure 2.2.1.7: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 040) after 14 days on various temperature.

กรมวิชาการเกษตร

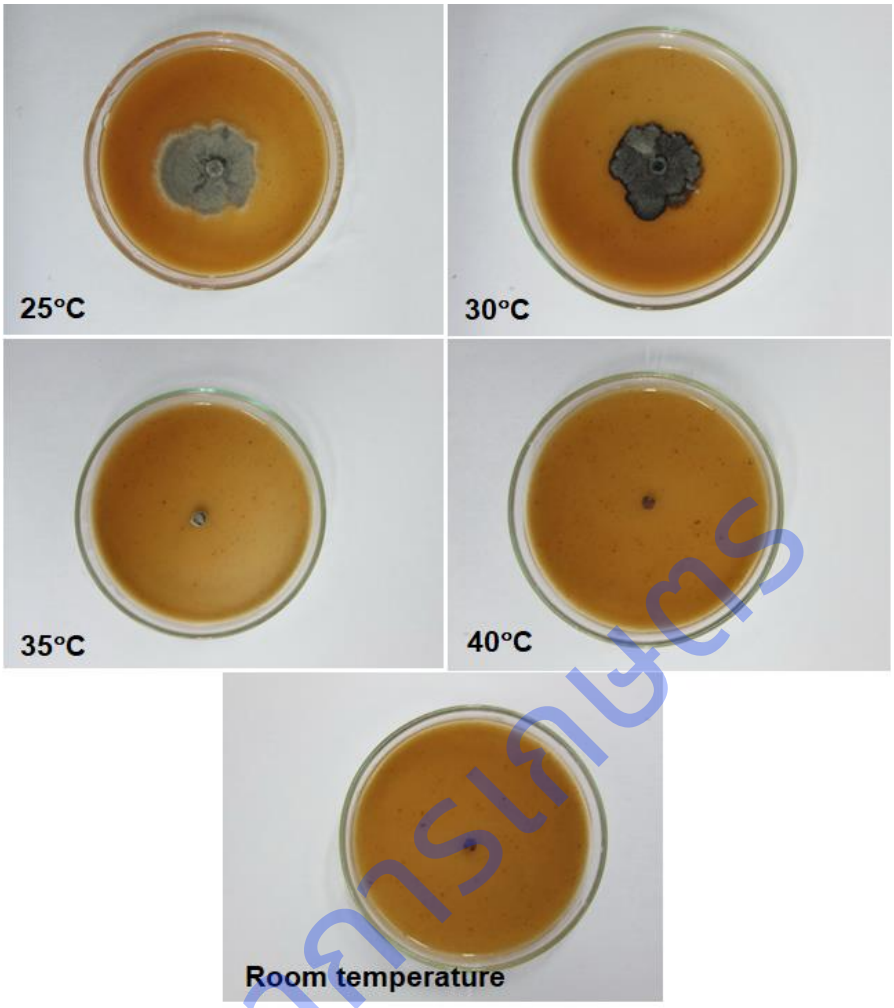


Figure 2.2.1.8: Cultural characteristics of *Phyllosticta citriasiana* (DOA 090) after 14 days on various temperature.

กรมวิชาการเกษตร

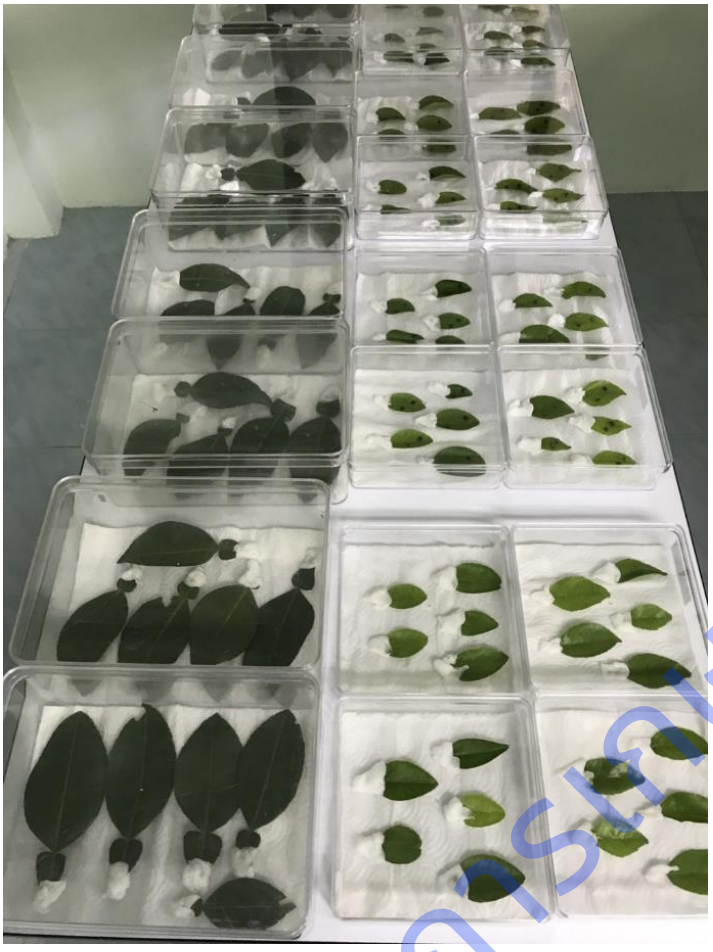


Figure 2.2.1.9: Pathogenicity of *Phyllosticta citriasiana* on *Citrus maxima, C. reticulata* and *C. aurantiifolia*

Figure 2.2.1.10: Global Positioning System (GPS) of pummelo plantation in Lai Ngao Sub-district, Wiang Kaen District, Chiang Rai province.

กรมวิชาการเกษตร

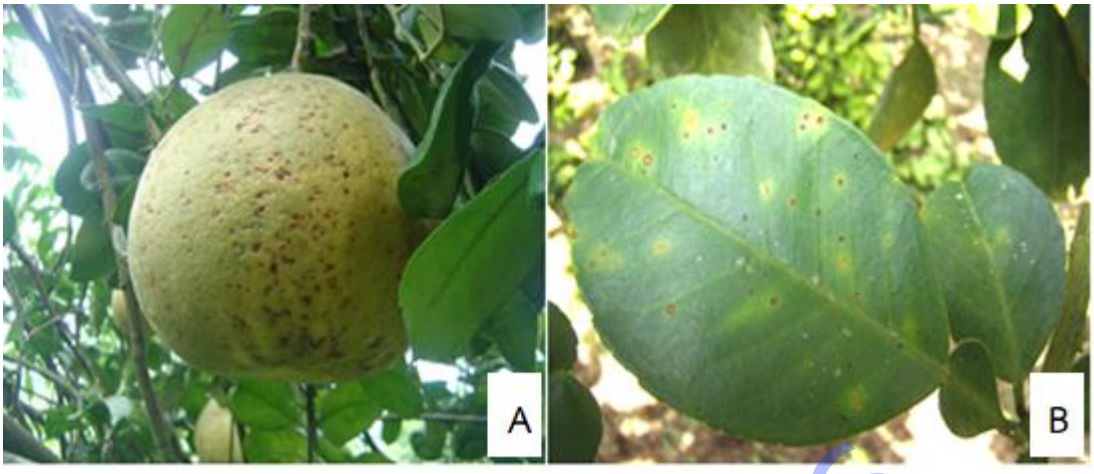


Figure 2.2.1.11: Tan spot symptoms caused by *Phyllosticta citriasiana*:

(A) Typical hard and virulent spot on pummelo fruit;

(B) Hard spot lesion on pummelo leaf

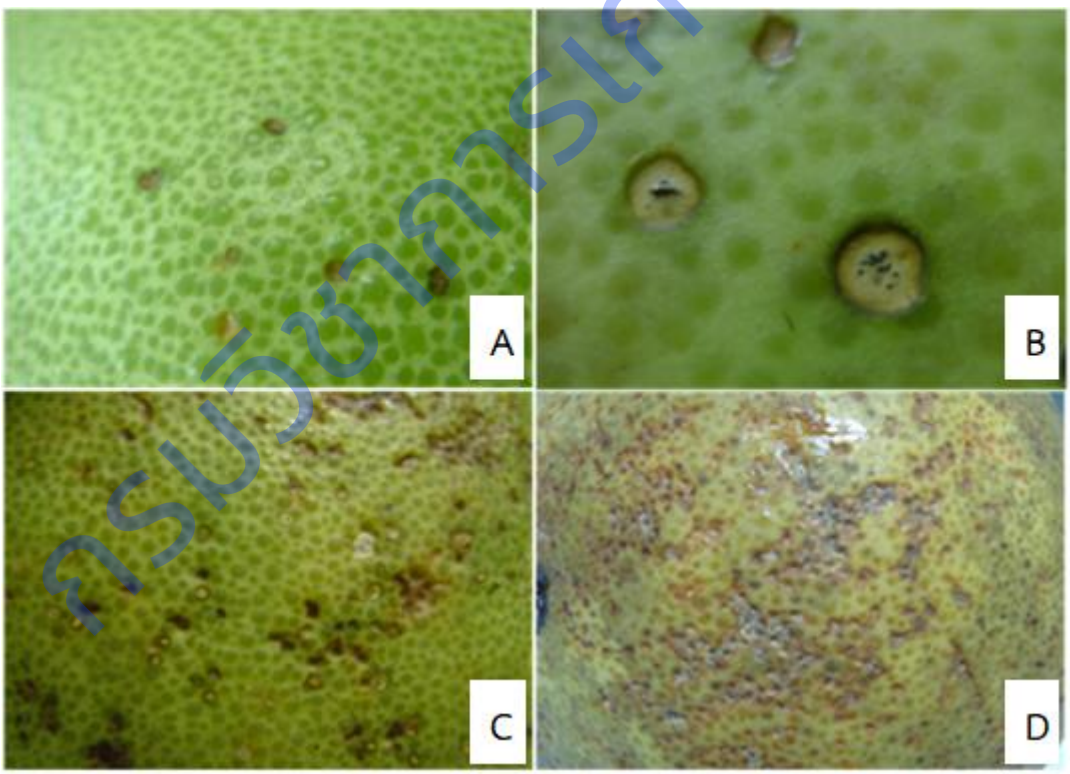


Figure 2.2.1.12: Typical symptoms of tan spot disease on Pummelo:

(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.

กรมวิชาการเกษตร

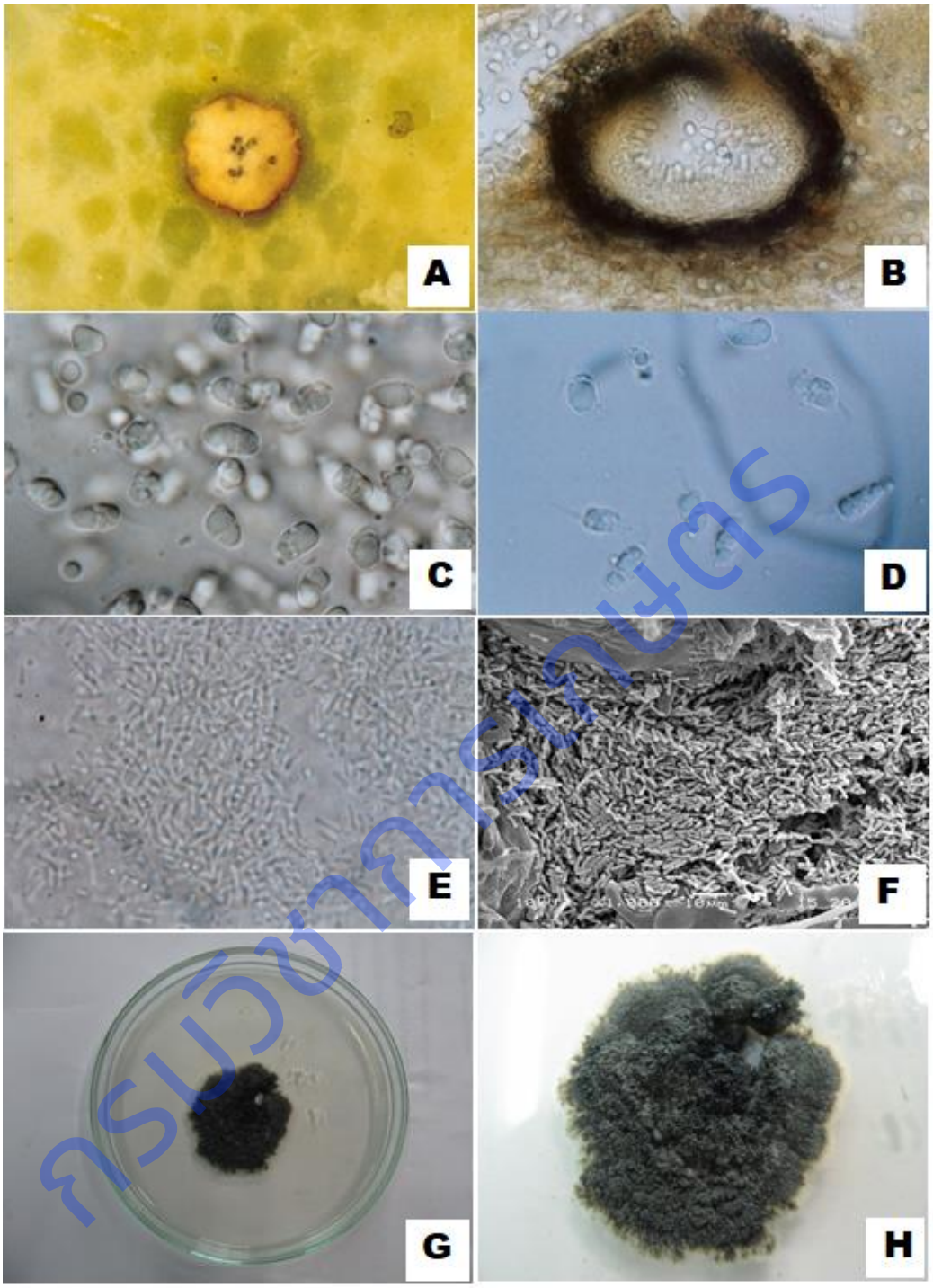


Figure 2.2.1.13: *Phyllosticta citriasiana* isolated from tan spot of Pummelo

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 ℃; H) Colony with loab margin

กรมวิชาการเกษตร

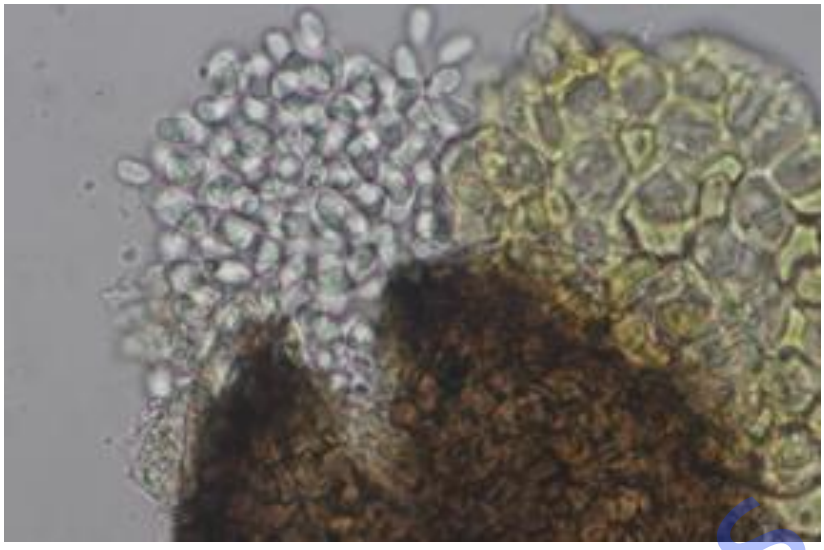
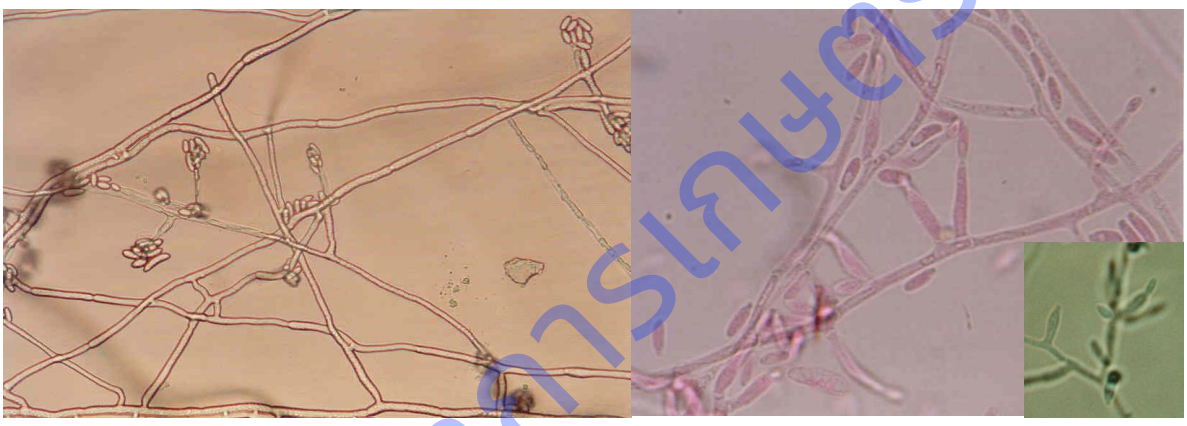


Figure 2.2.1.14: *Phyllosticta capitalensis* isolated from young fruit disease.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 2.2.2.1 Colony Characteristic of *F. oxysporum* isolates on PDA



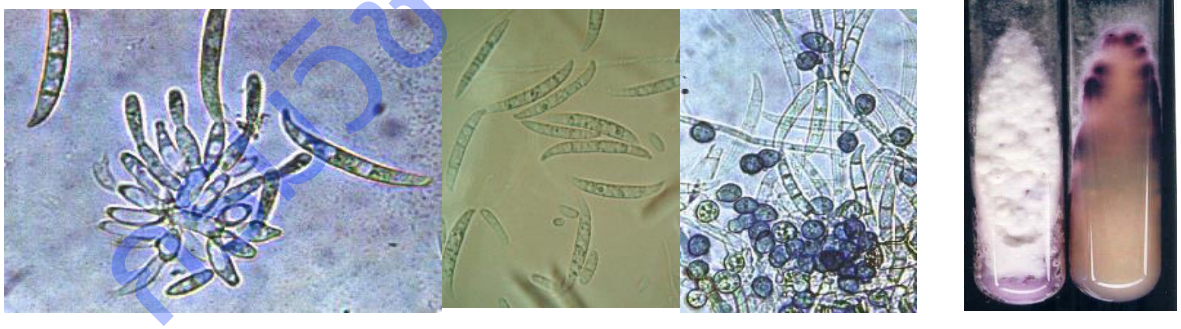


Figure 2.2.2.2 Morphology of *F. oxysporum* Schlecht ex Fries, emend. Snyder & Hansen

ภาควิชากีฏวิทยาเกษตร

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*

กรมวิชาการเกษตร

Figure 2.2.2.12 Symptom of Wilt disease in Pak Wan Ban (Sweet leaf; *Sauropus androgynous*) caused by *F. oxysporum*

กรมวิชาการเกษตร

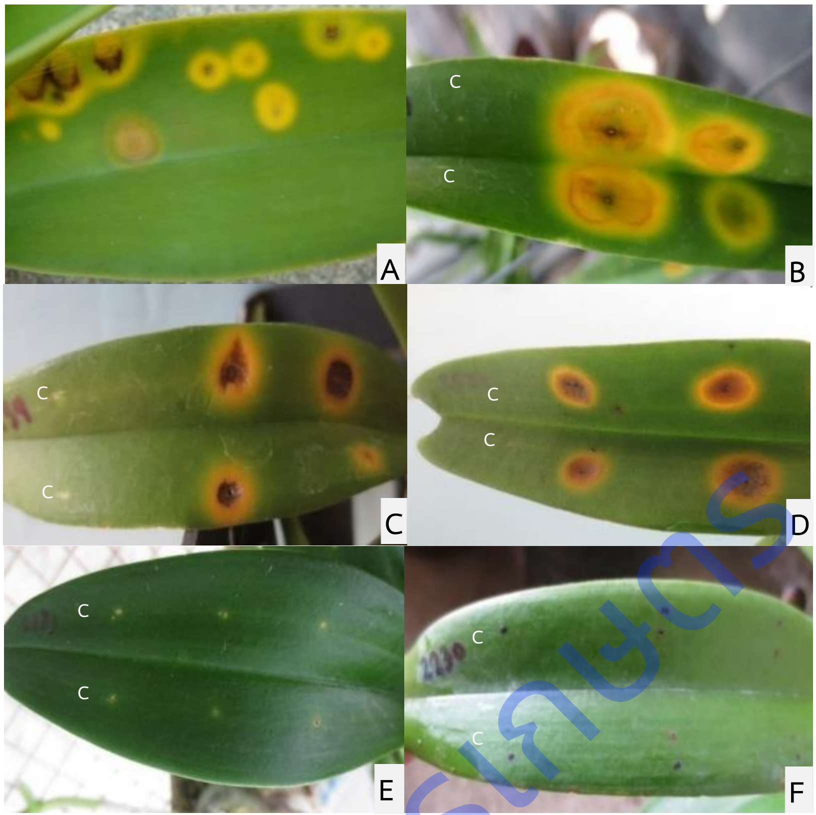


Figure 2.2.3.1 Leaf spot disease of Mokara orchid and pathogenicity test

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

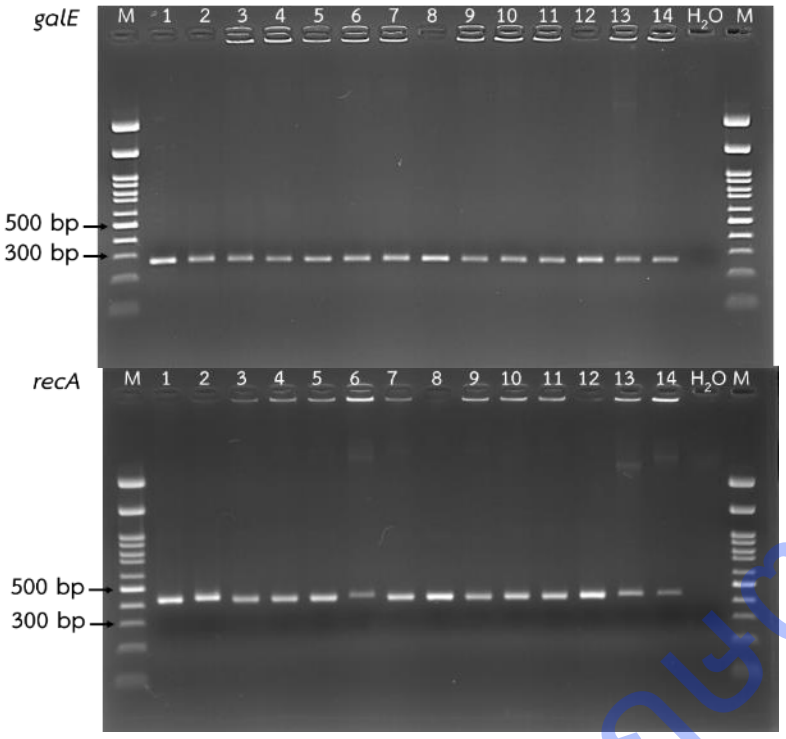


Figure 2.2.3.2 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified for detection *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* using *galE* and *recA* primers, M: onemark 100, lane 1–14: bacterial isolated from leaf spot disease of mokara orchid

กรมวิชาการเกษตร

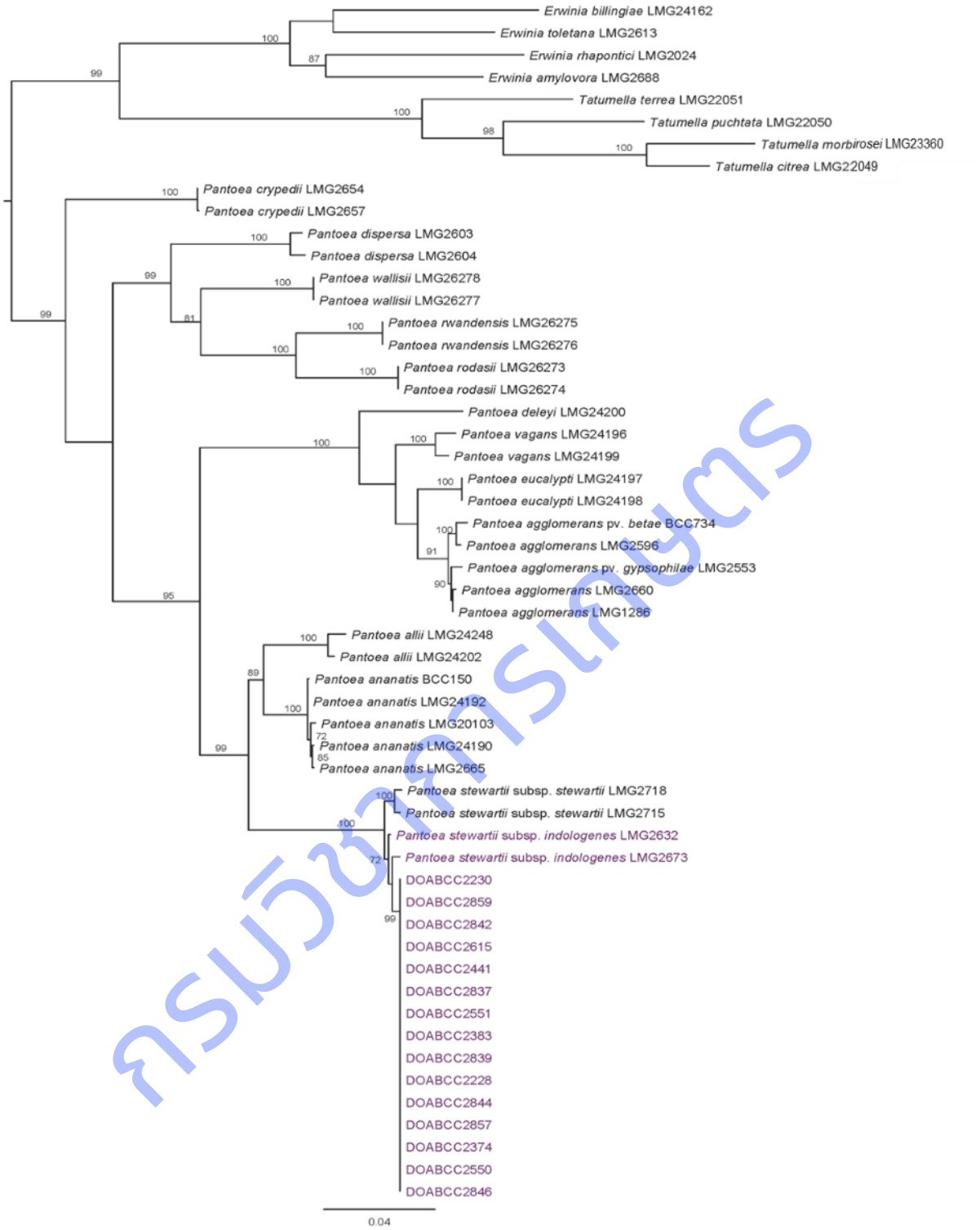


Figure 2.2.3.3 Maximum-likelihood tree based on on the concatenated *gyrB*, *rpoB*, *atpD* and *infB* nucleotide sequences showing the relationships of Mokara orchid isolates and type strains of species. Bootstrap values based on 1,000 replicates are shown at branch nodes.

กรมวิชาการเกษตร

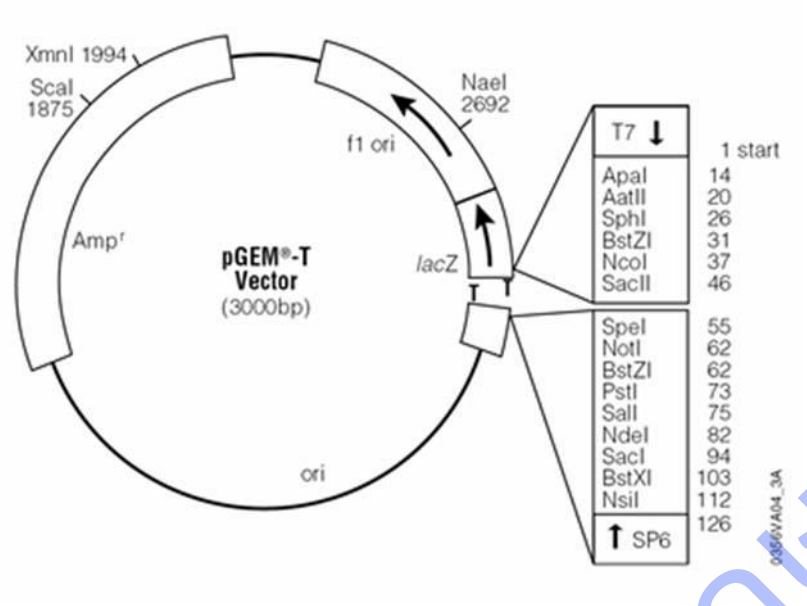


Figure 2.2.4.1 pGEM® - T easy vector map

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.

มรม. นครศรีธรรมราช

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

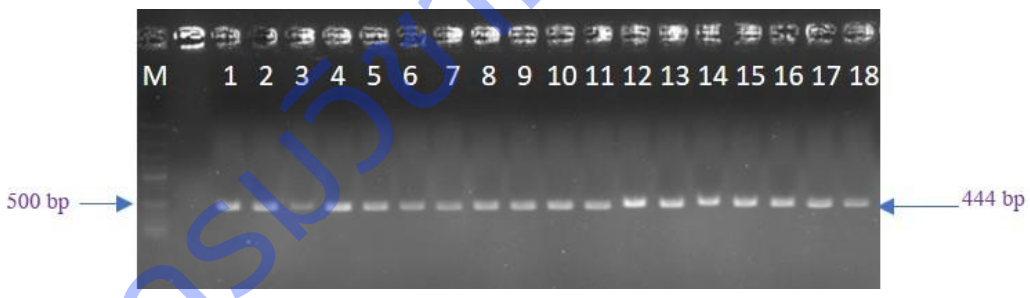


Figure 2.2.4.4 Gel electrophoresis of crinkly leaf samples show PCR product about 444 bp Electrophoresis is on 1.5% agarose gel of DNA amplified using 3202fw/6rev primers

กรมวิชาการเกษตร

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.

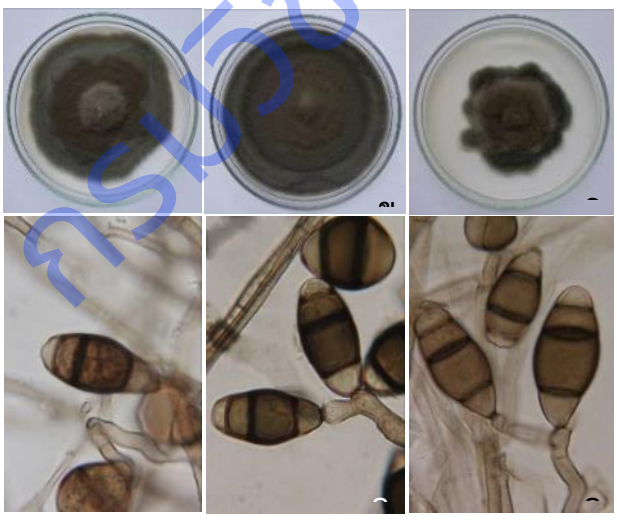
Figure 2.2.4.7 Pummelo (Thong Dee cultivar) seeds and seedlings from infected tree (A) Vigor seeds (left), abortion seed (right); (B) Pummelo seedlings

กรมวิชาการเกษตร

Figure 2.2.4.8 Pummelo seedings (Thong Dee cultivar) from infected trees uninfected with crinkly leaf disease

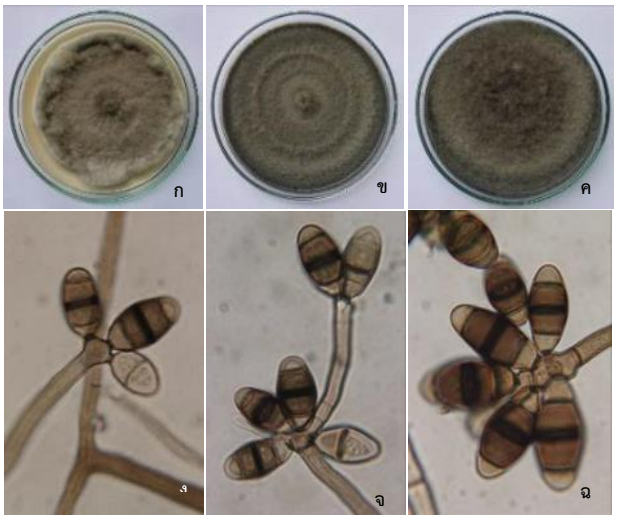
กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.2.5.1 ตัวอย่างโรคใบไหม้ปาล์มน้ำมัน (ภาพบน) และดอกจุดสนิมกล้วยไม้ (ภาพล่าง)

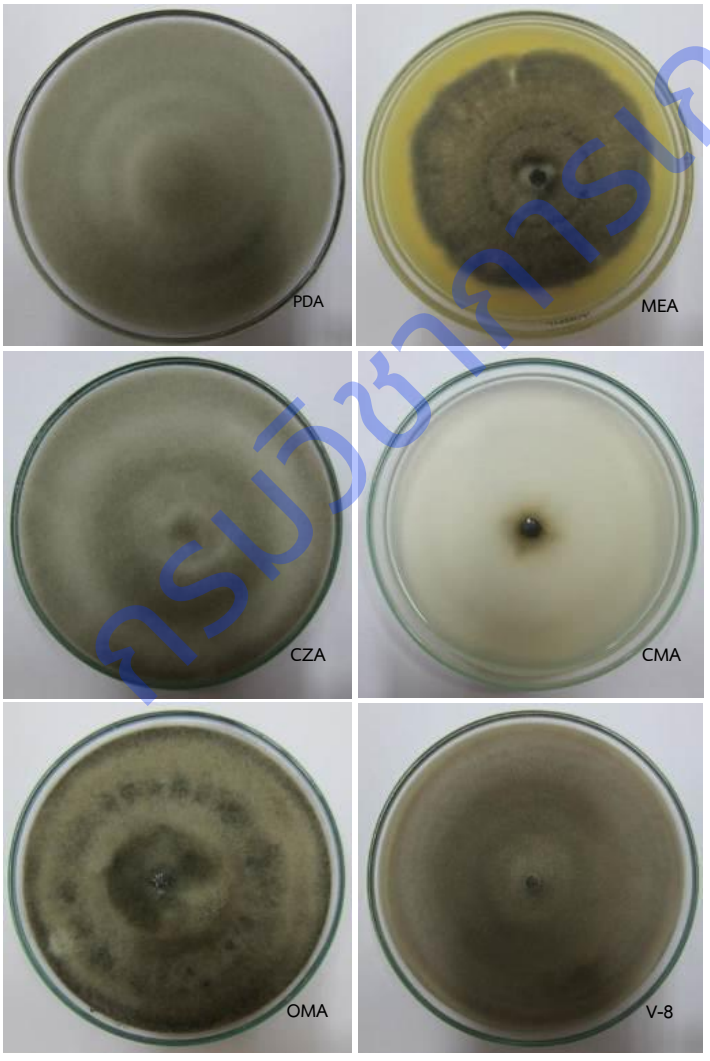


ภาพที่ 2.2.5.2 ลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของรา *c. oryzae* จากปาล์มน้ำมัน : ก และ ง) P001, ข และ จ) P002, ค และ ฉ) P003

กรมวิชาการเกษตร

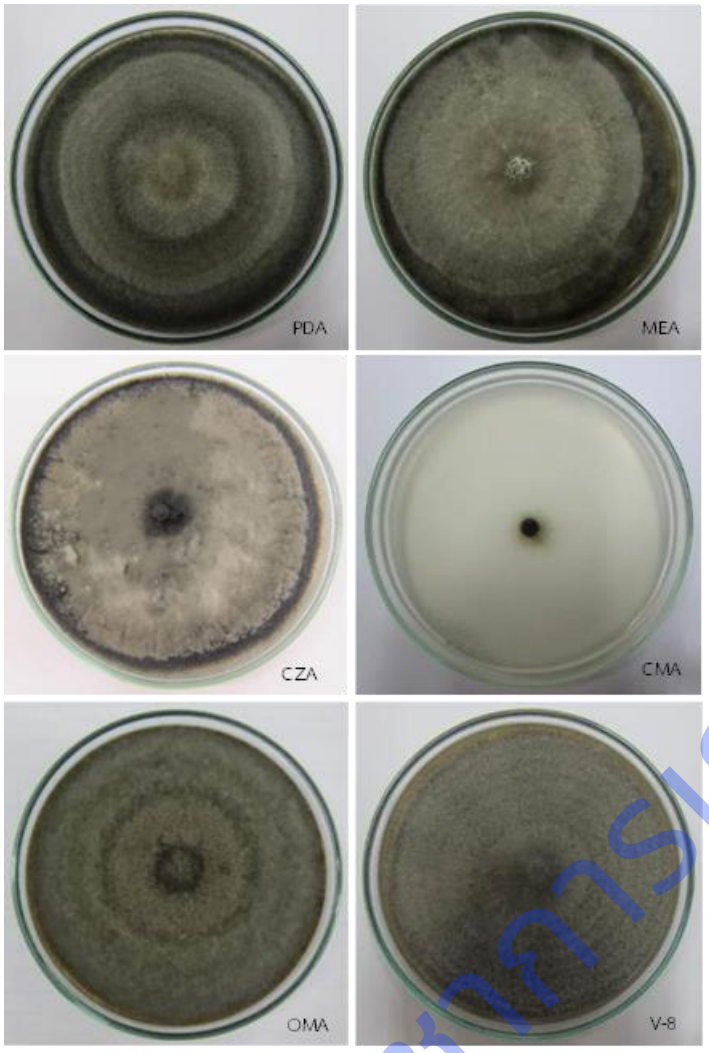


ภาพที่ 2.2.5.3 ลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของรา *C. eragrostidis* จากกล้วยไม้ : ก และ ง) P001, ข และ จ) P002, ค และ ฉ) P003



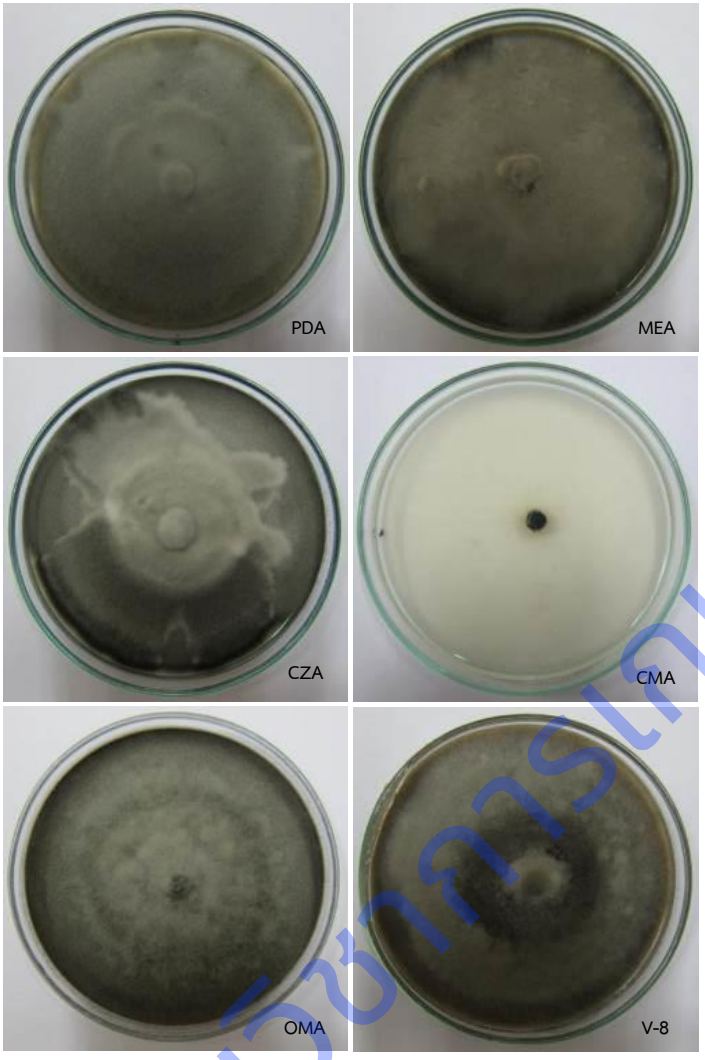
ภาพที่ 2.2.5. 4 การเจริญของโคโลนีของ *C. eragrostidis* (F028-5) บนอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

กรมวิชาการเกษตร



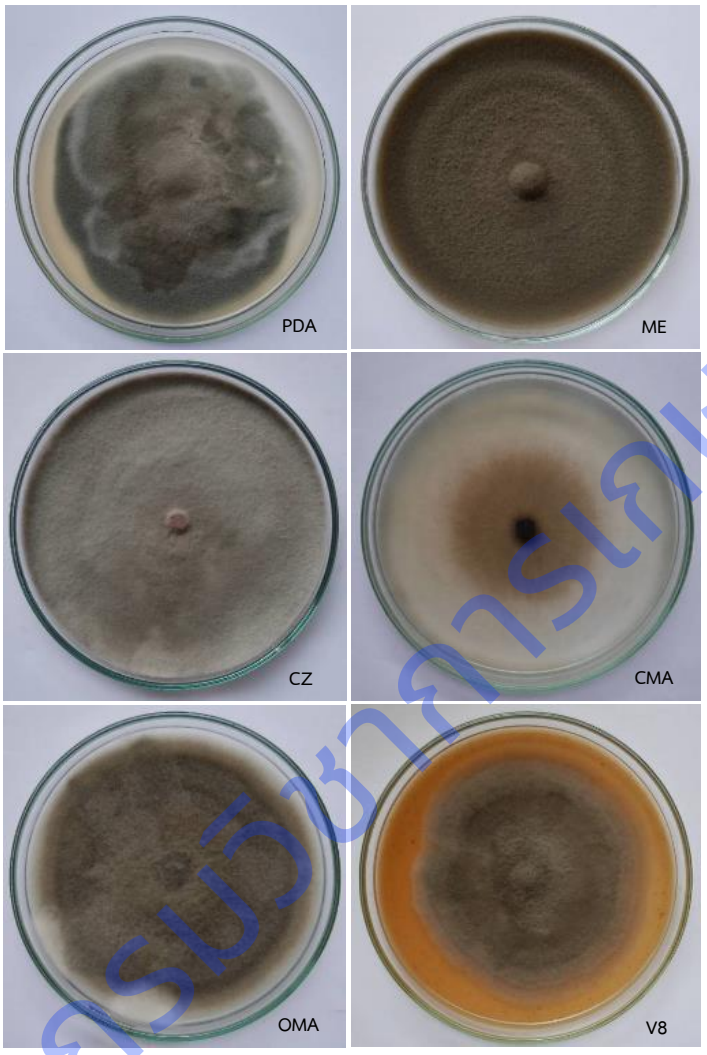
ภาพที่ 2.2.5.5 การเจริญของโคโลนีของ *C. eragrostidis* (F028-6) บนอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

กรมวิชาการเกษตร



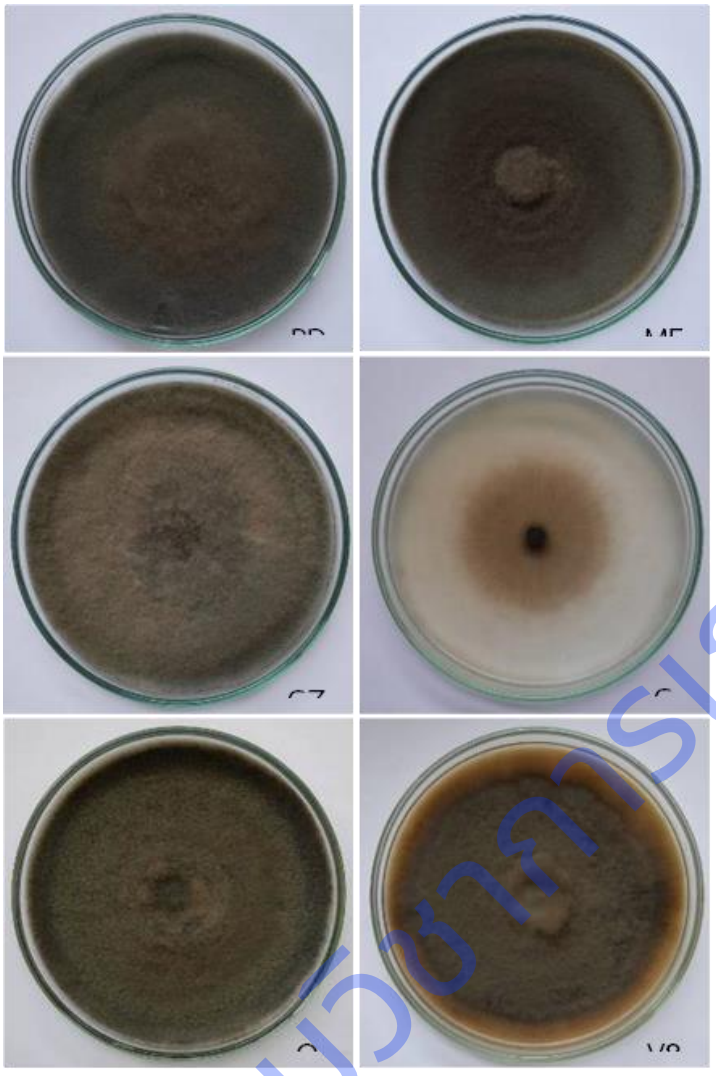
ภาพที่ 2.2.5.6 การเจริญของโคโลนีของ *C. eragrostidis* (F029-4) บนอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

กรมวิชาการเกษตร



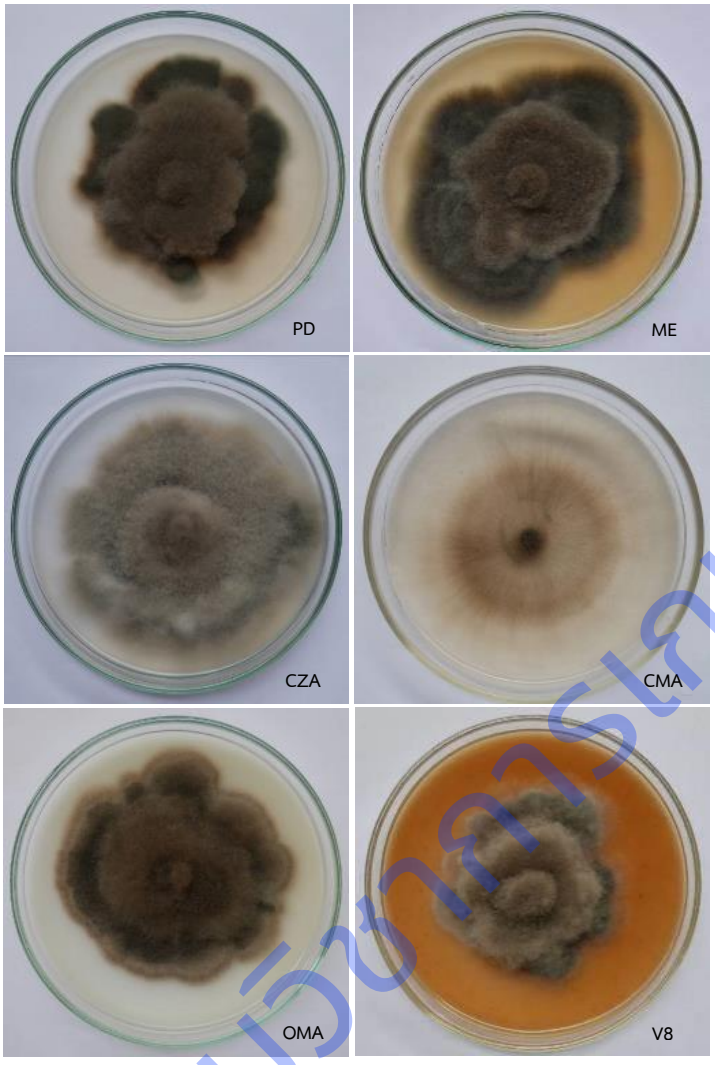
ภาพที่ 2.2.5.7 การเจริญของโคโลนีของ *C. oryzae* (P001) บนอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

กรมวิชาการเกษตร



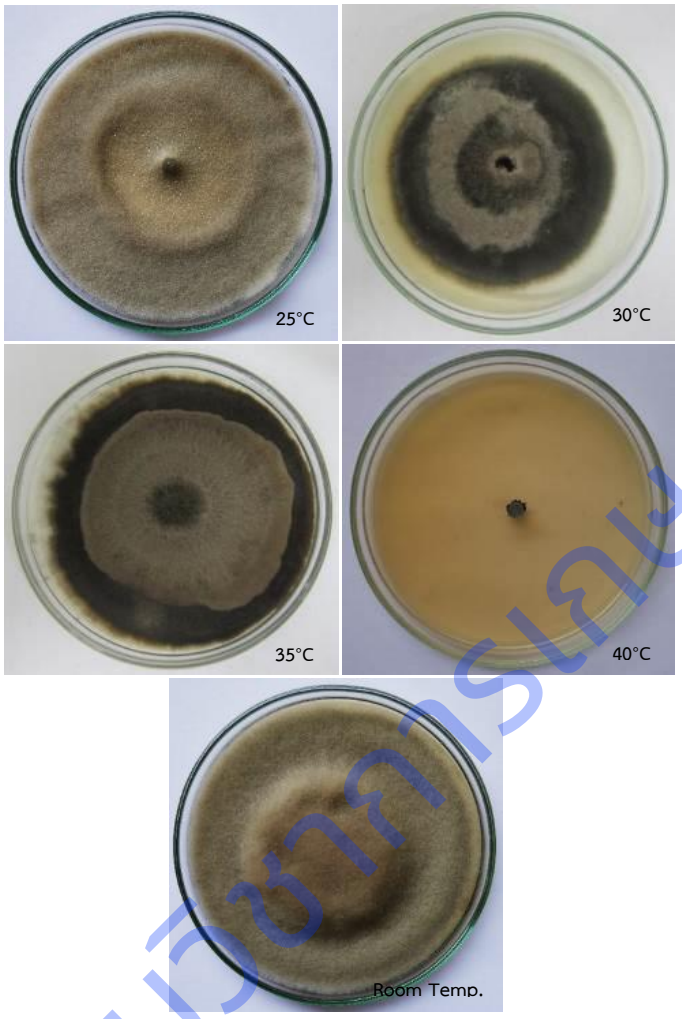
ภาพที่ 2.2.5.8 การเจริญของโคโลนีของ *C. oryzae* (P002) บนอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

กรมวิชาการเกษตร



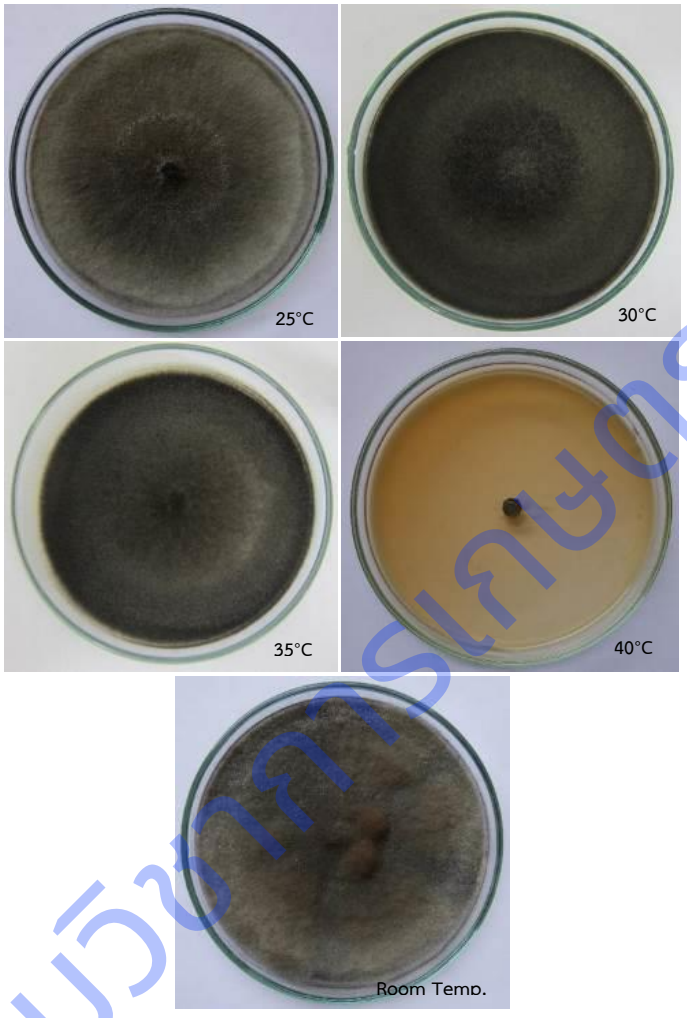
ภาพที่ 2.2.5.9 การเจริญของโคโลนีของ *C. oryzae* (P003) บนอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

กรมวิชาการเกษตร



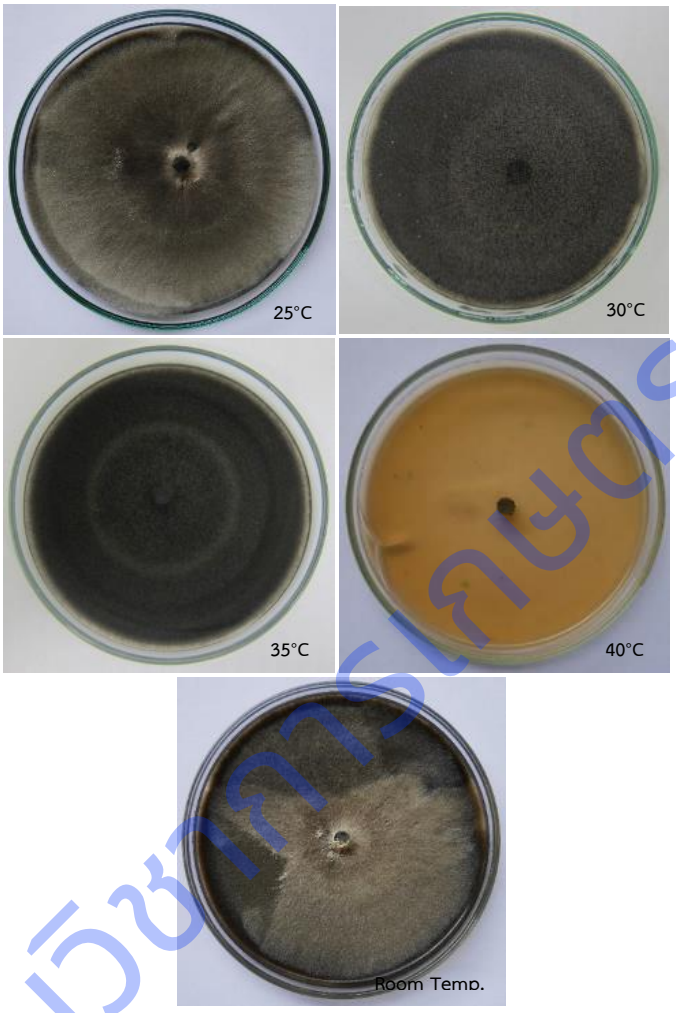
ภาพที่ 2.2.5.10 การเจริญของโคโลนีของ *C. eragrostidis* (F028-5) ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

กรมวิชาการเกษตร



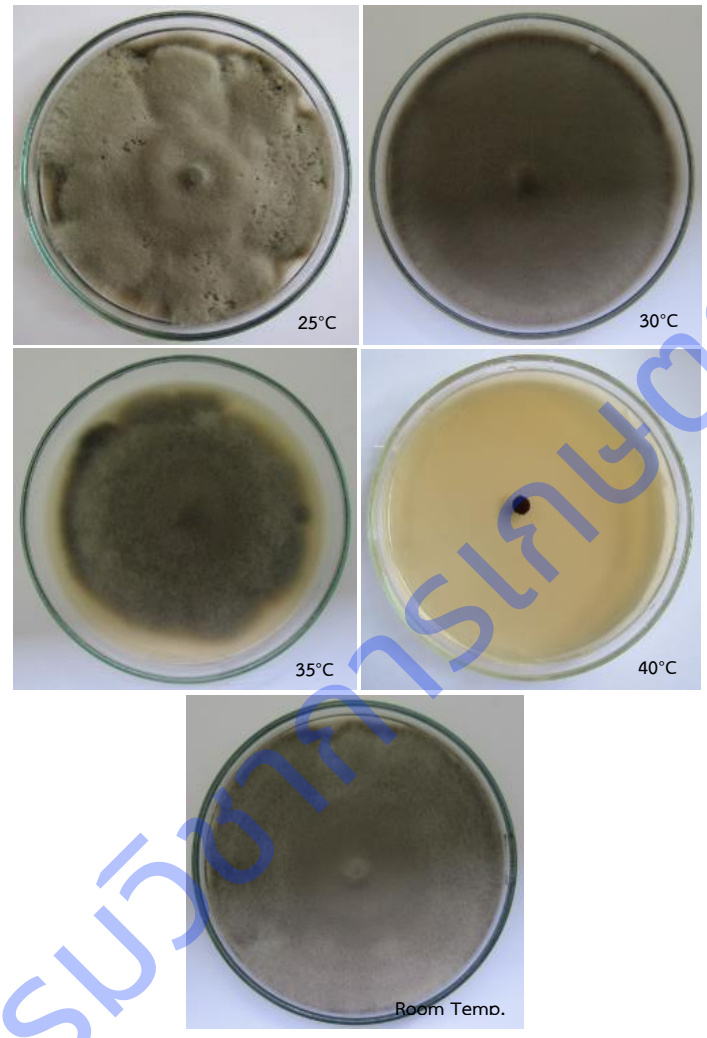
ภาพที่ 2.2.5.11 การเจริญของโคโลนีของ *C. eragrostidis* (F028-6) ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

กรมวิชาการเกษตร



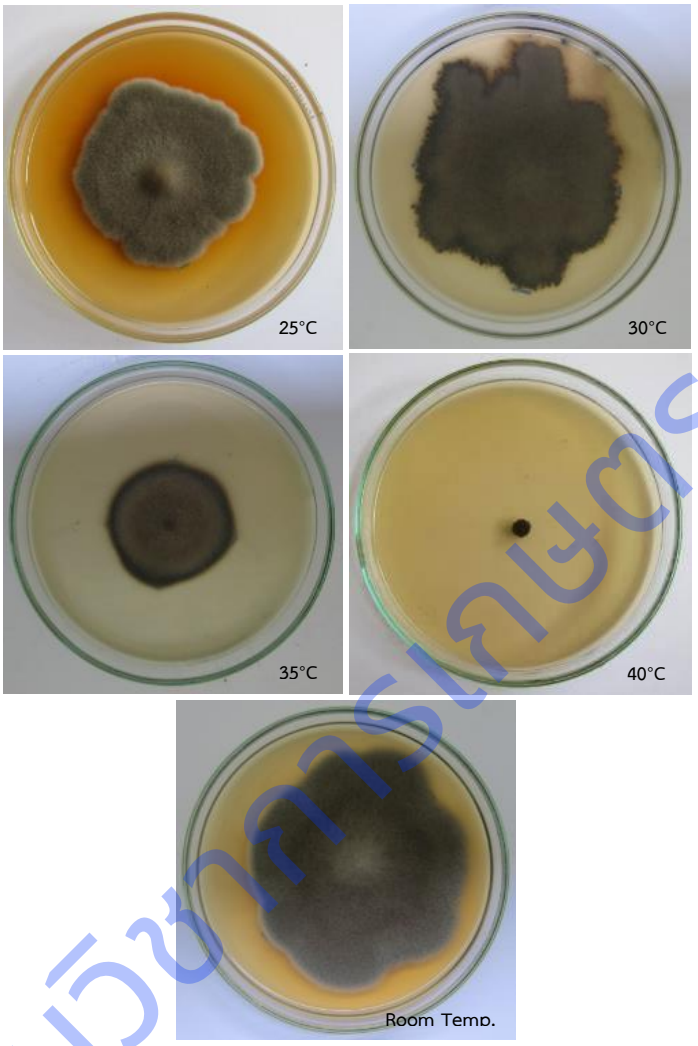
ภาพที่ 2.2.5.12 การเจริญของโคโลนีของ *C. eragrostidis* (F029-4) ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

กรมวิชาการเกษตร



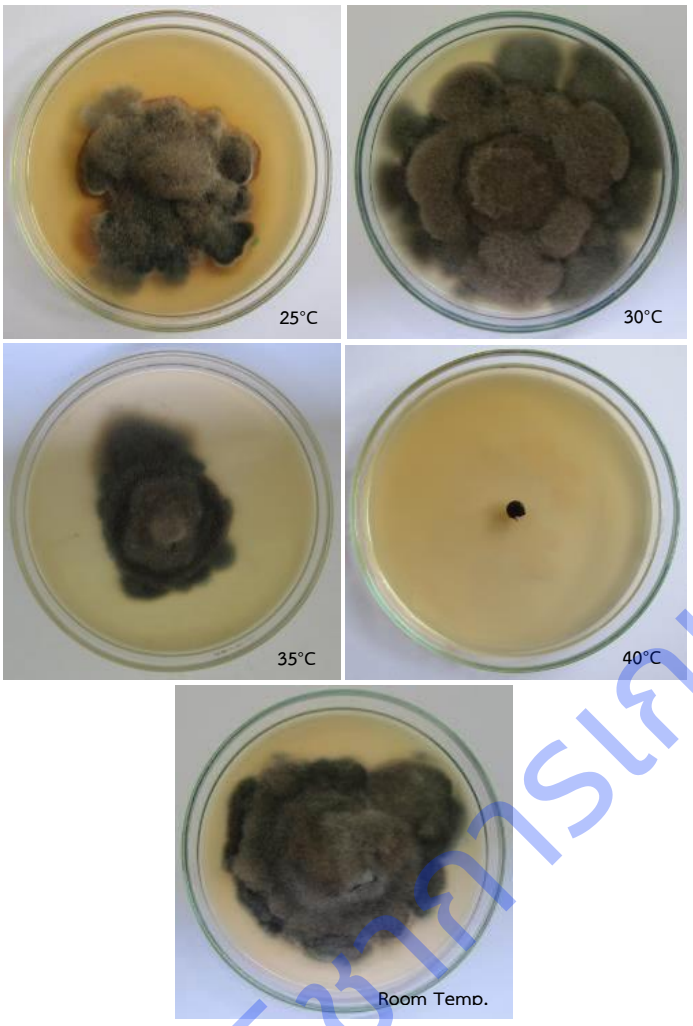
ภาพที่ 2.2.5.13 การเจริญของโคโลนีของ *C. oryzae* (P001) อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2.2.5.14 การเจริญของโคโลนีของ *C. oryzae* (P002) อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

กรมวิชาการเกษตร

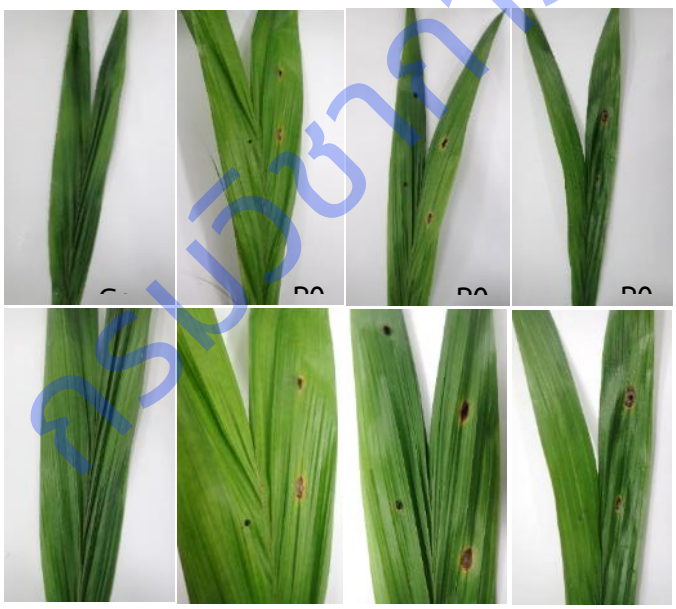


ภาพที่ 2.2.5.15 การเจริญของโคโลนีของ *C. oryzae* (P003) อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน

ภาพที่ 2.2.5.16 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันและกล้วยไม้สำหรับทดสอบพืชอาศัย

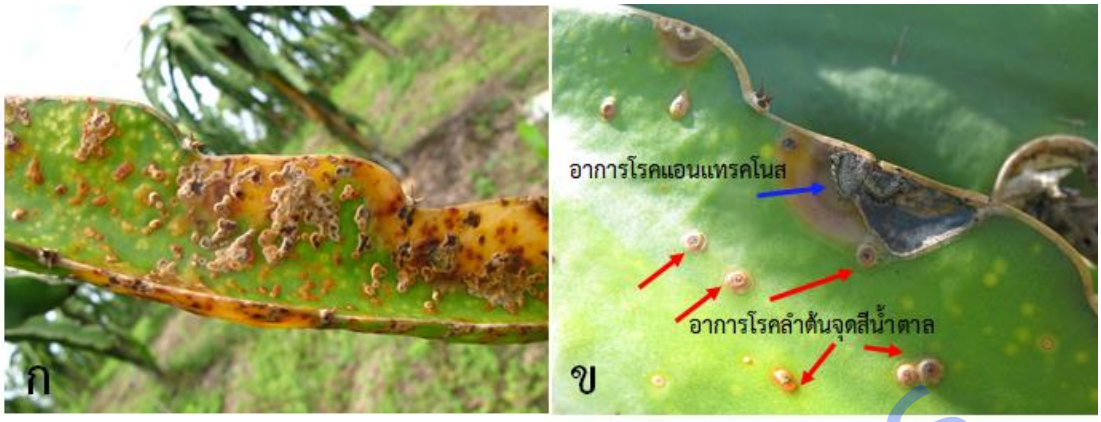
ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.2.5.17 การทดสอบการเกิดโรคเบื้องต้นบนพืชอาศัย: อาการของโรคเป็นเวลา 7 วันหลังปลูกเชื้อ



ภาพที่ 2.2.5.18 การทดสอบการเกิดโรคเบื้องต้นบนพืชอาศัย: อาการของโรคเป็นเวลา 14 วันหลังปลูกเชื้อ

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ **2.2.6.1:** อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลและอาการโรคแอนแทรคโนสของแก้วมังกรที่อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี

ก) อาการโรคลำต้นจุดแก้วมังกร

ข) โรคลำต้นจุดสีน้ำตาลเกิดร่วมกับโรคแอนแทรคโนสที่ลำต้น

ภาพที่ 2.2.6.2: เชื้อราที่แยกได้จากโรคของแก้วมังกร ที่เก็บจากแปลงแก้วมังกร อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

ก) อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล ข) อาการโรคแอนแทรคโนส

ค) รา *Neocystalidium dimidiatum* แยกจากอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล

ง) รา *Colletotrichum gloeosporioides* แยกจากอาการโรคแอนแทรคโนส

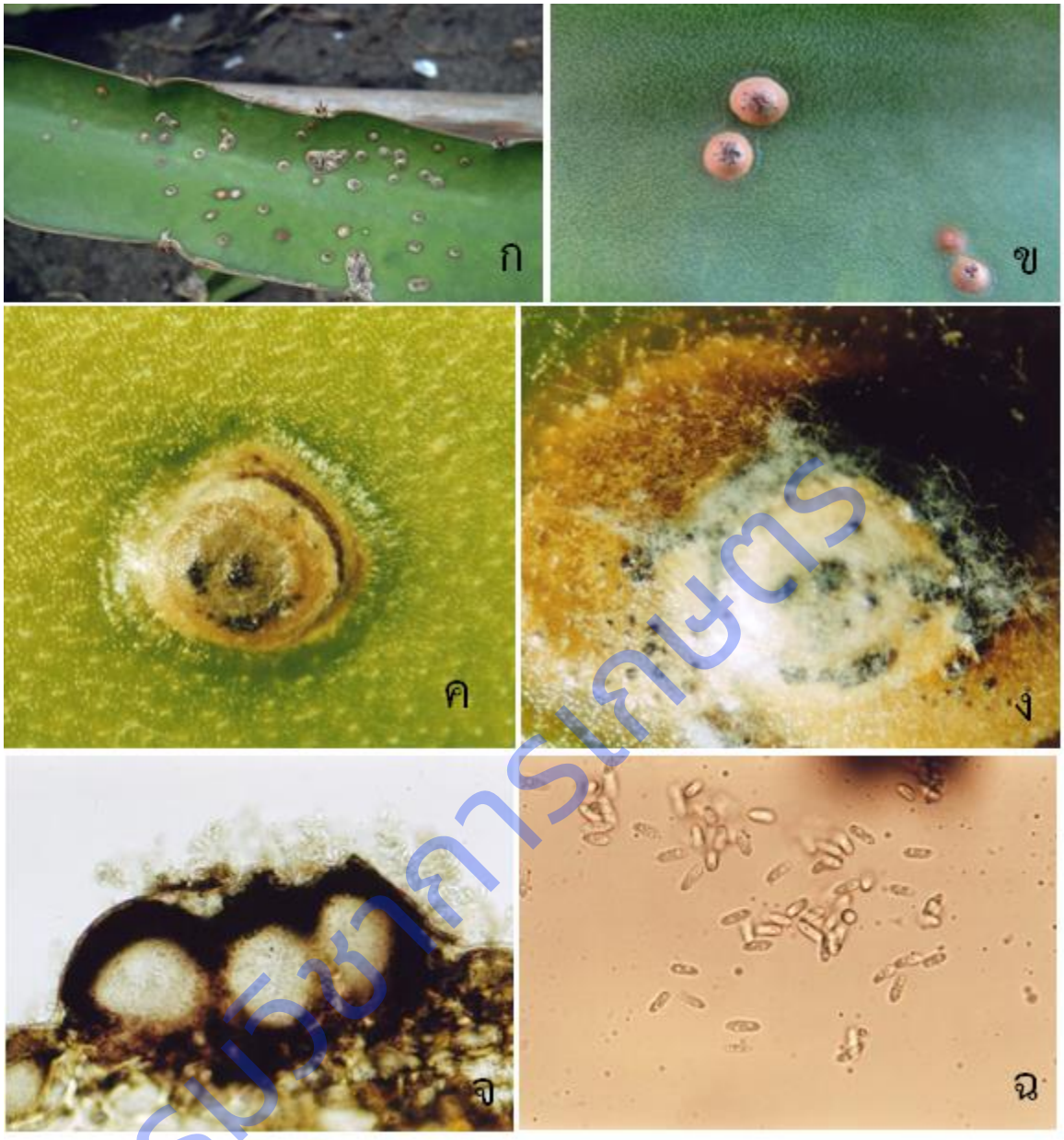
กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.2.6.3: อาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร แสดงอาการจุดขาว

กรมวิชาการเกษตร

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

ภาพที่ 2.2.6.6: ลักษณะอาการโรคจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร เกิดจากรา *Neoscytalidium dimidiatum*

ก) ระยะที่ 1 อาการเริ่มแรก จุดเล็กๆ สีขาว

ข) ระยะที่ 2 จุดกลางแผลเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีเทา

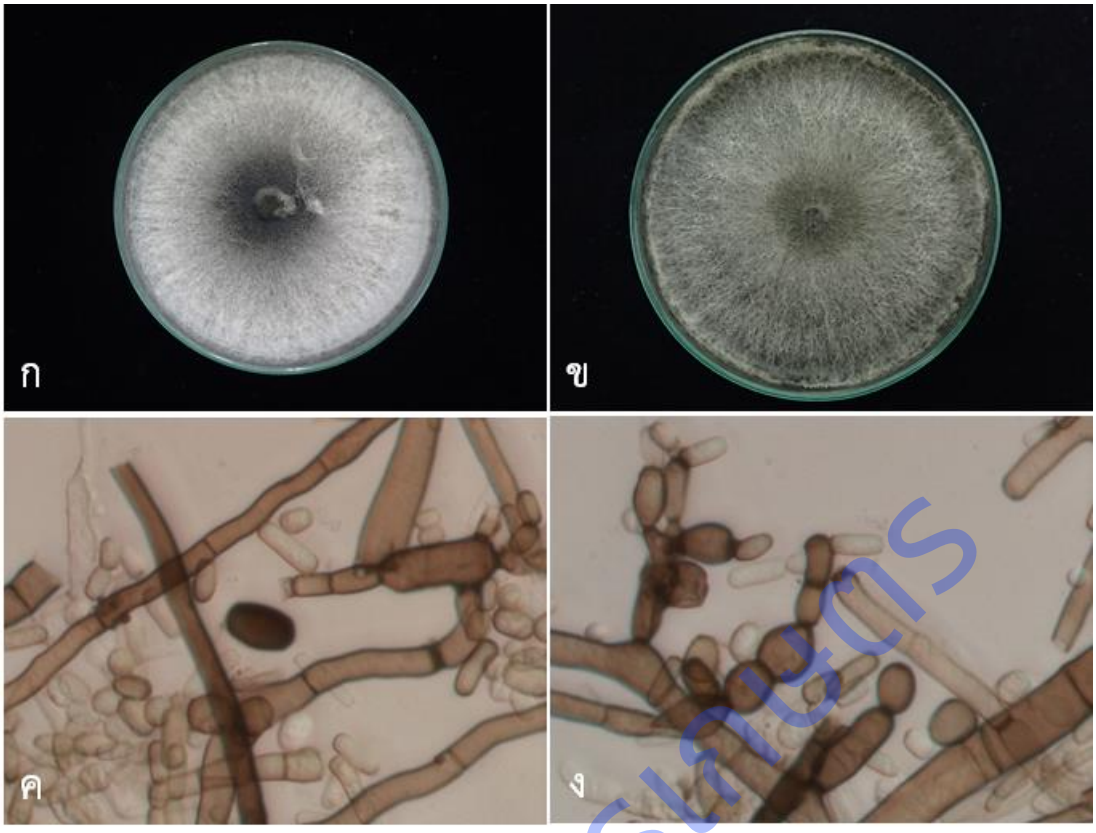
ค) ระยะที่ 3 แผลสเก็ดสีน้ำตาล แข็ง เชื้อสร้างส่วนขยายพันธุ์เรียกว่า pycnidia ฝังอยู่ภายในแผล

ง) ระยะที่ 4 แผลสีเหลืองเป็นวงเกิดล้อมรอบจุดแผลสเก็ดสีน้ำตาล

จ) ระยะที่ 5 แผลคล้ายสเก็ด สีเทา เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน

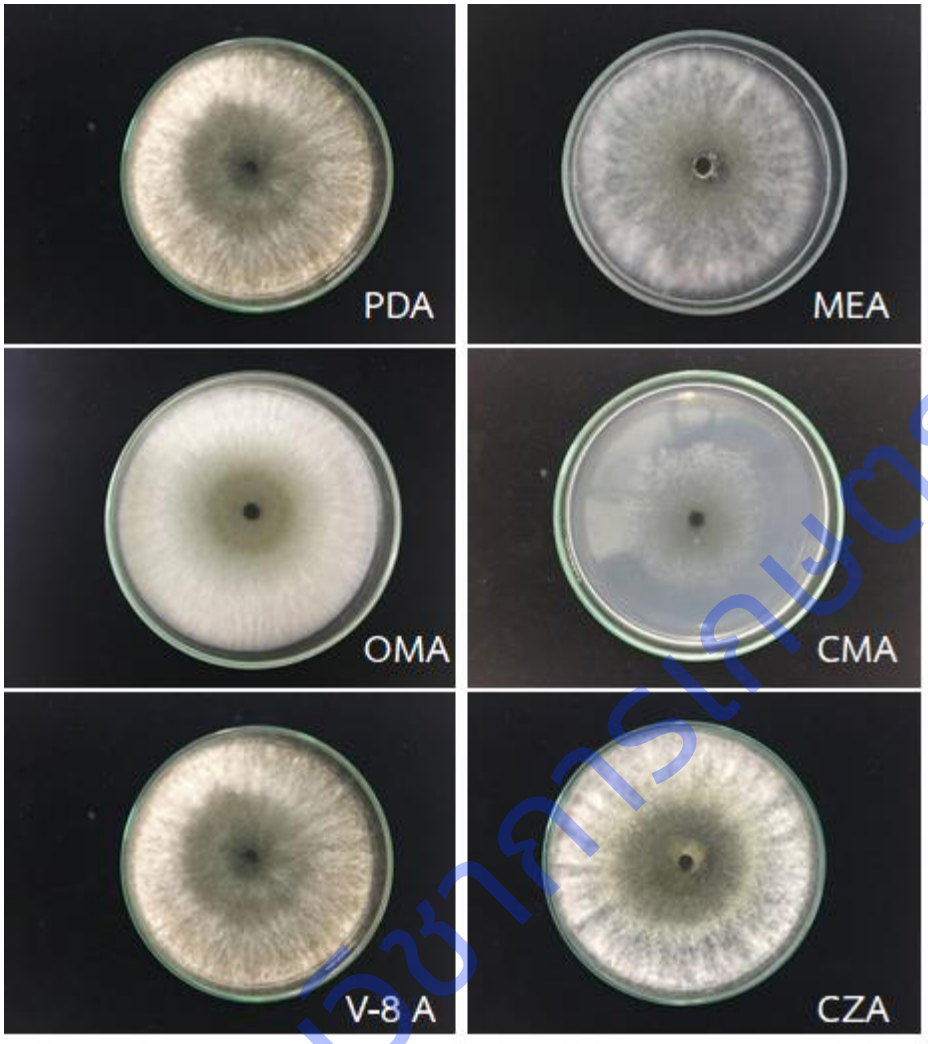
ฉ) ระยะที่ 6 แผลหลุดออกกลายเป็นรูขนาดใหญ่บนกิ่ง

กรมวิชาการเกษตร



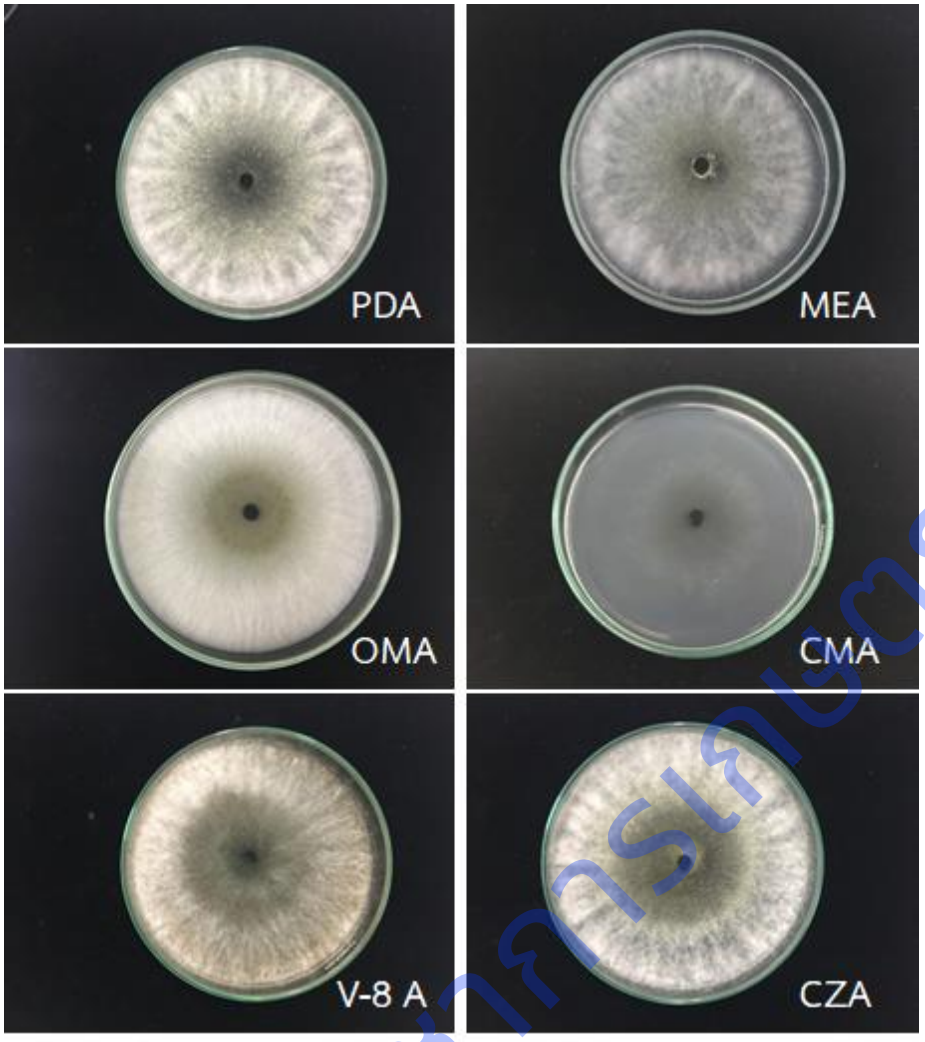
ภาพที่ 2.2.6.7: รา *Neoscytalidium dimidiatum* บนอาหารสังเคราะห์อายุ 3 วัน
ก) โคโลนีบนอาหาร PDA ข) โคโลนีบนอาหาร MEA
ค-ง) ราสร้างสปอร์เรียกว่า arthroconidia บนอาหารสังเคราะห์ PDA

กรมวิชาการเกษตร



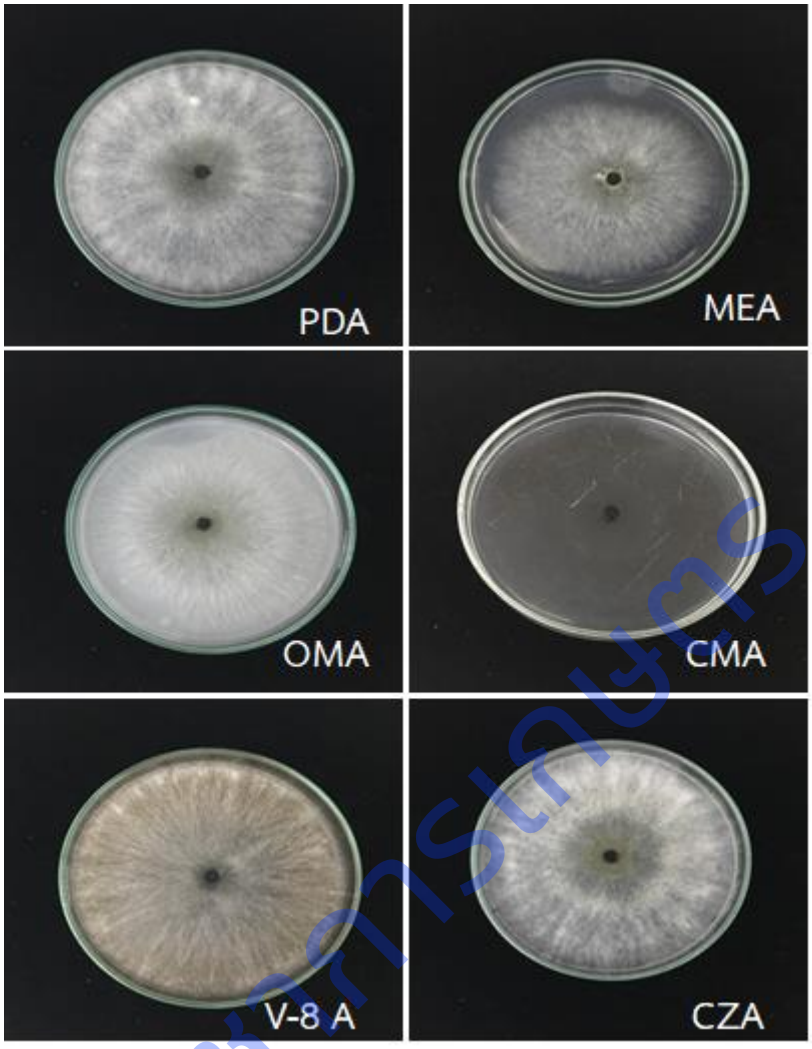
ภาพที่ 2.2.6.8: การเจริญของโคโลนีของรา *Neoscytalidium dimidiatum* ไอโซเลต M 0328 แยกจากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จังหวัดสกลนคร บนอาหารชนิดต่างๆ นาน 3 วัน

กรมวิชาการเกษตร



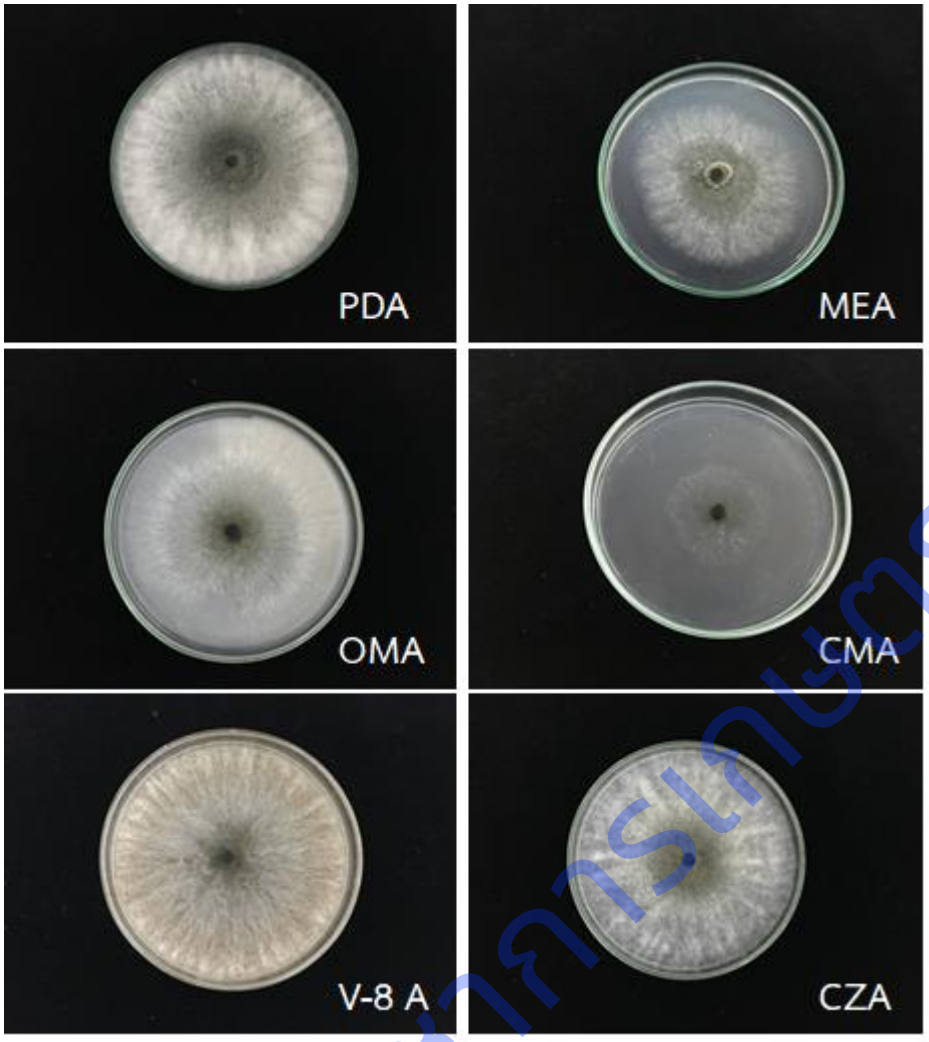
ภาพที่ 2.2.6.9: การเจริญของโคโลนีของรา *Neoscytalidium dimidiatum* ไอโซเลต M 0331 แยกจากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จากจังหวัดอุทัยธานี บนอาหารชนิดต่างๆ นาน 3 วัน

กรมวิชาการเกษตร



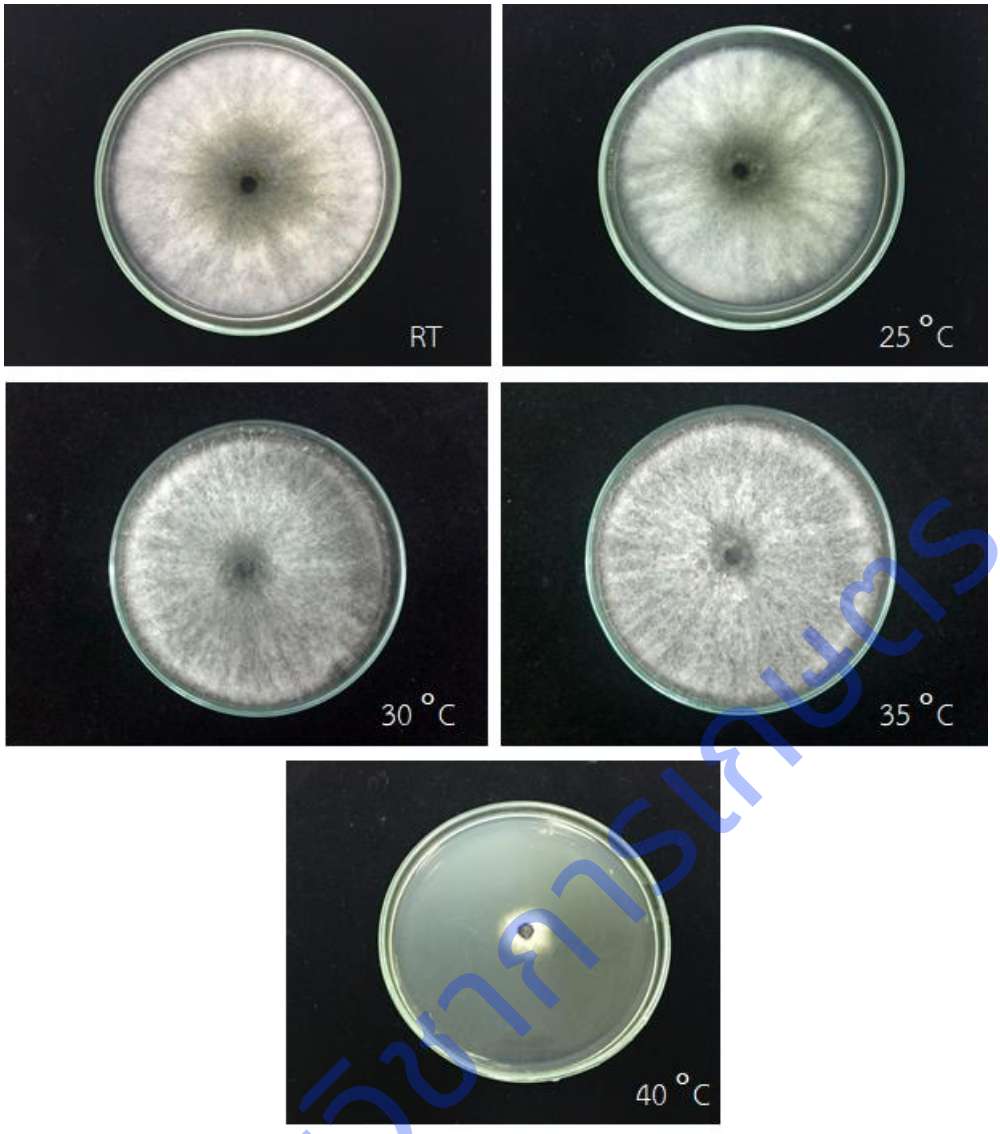
ภาพที่ 2.2.6.10: การเจริญของโคโลนีของรา *Neoscytalidium dimidiatum* ไอโซเลต M 0354 แยกจากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จากจังหวัดจันทบุรี บนอาหารชนิดต่างๆ นาน 3 วัน

กรมวิชาการเกษตร



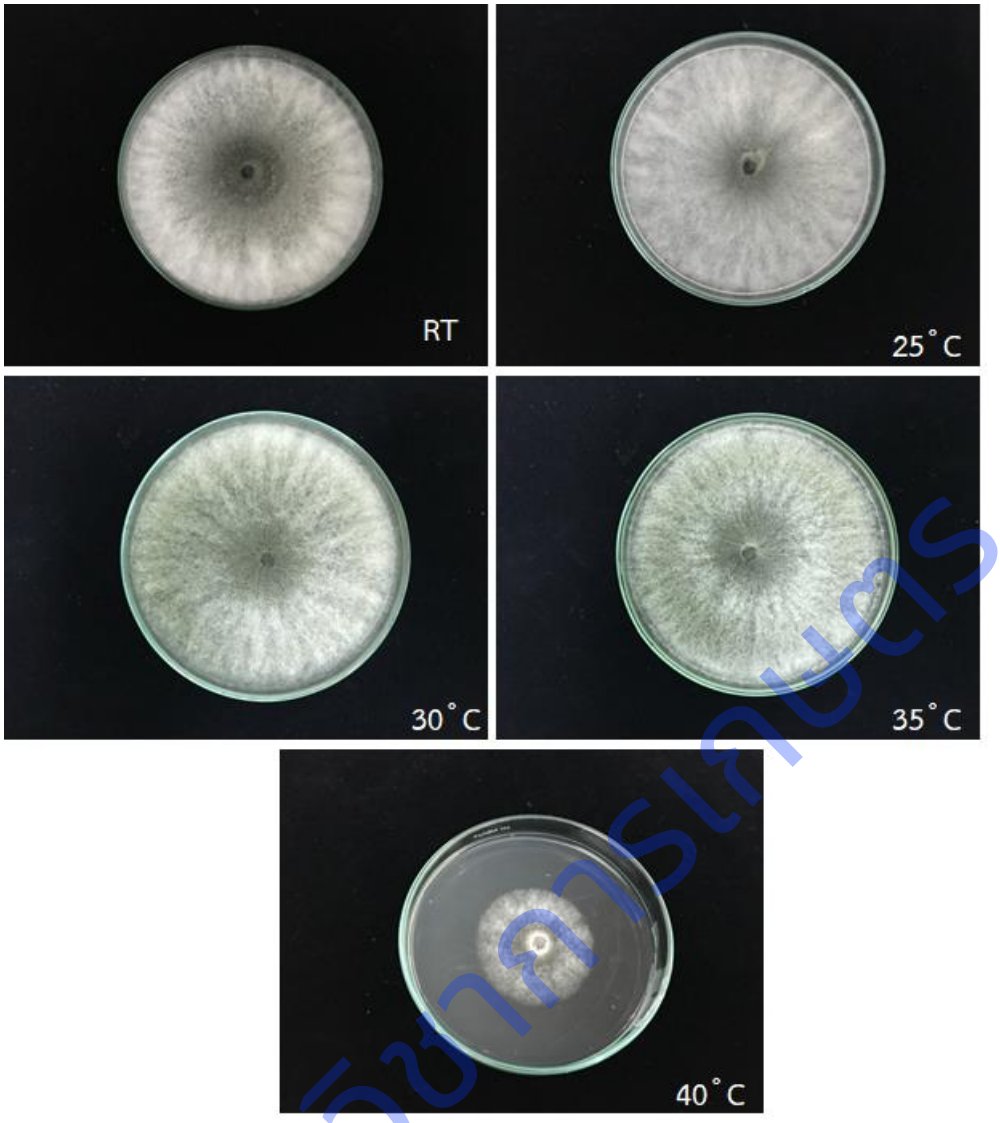
ภาพที่ 2.2.6.11: การเจริญของโคโลนีของรา *Neoscytalidium dimidiatum* ไอโซเลต M 0355 แยกจากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จากจังหวัดจันทบุรี บนอาหารชนิดต่างๆ นาน 3 วัน

กรมวิชาการเกษตร



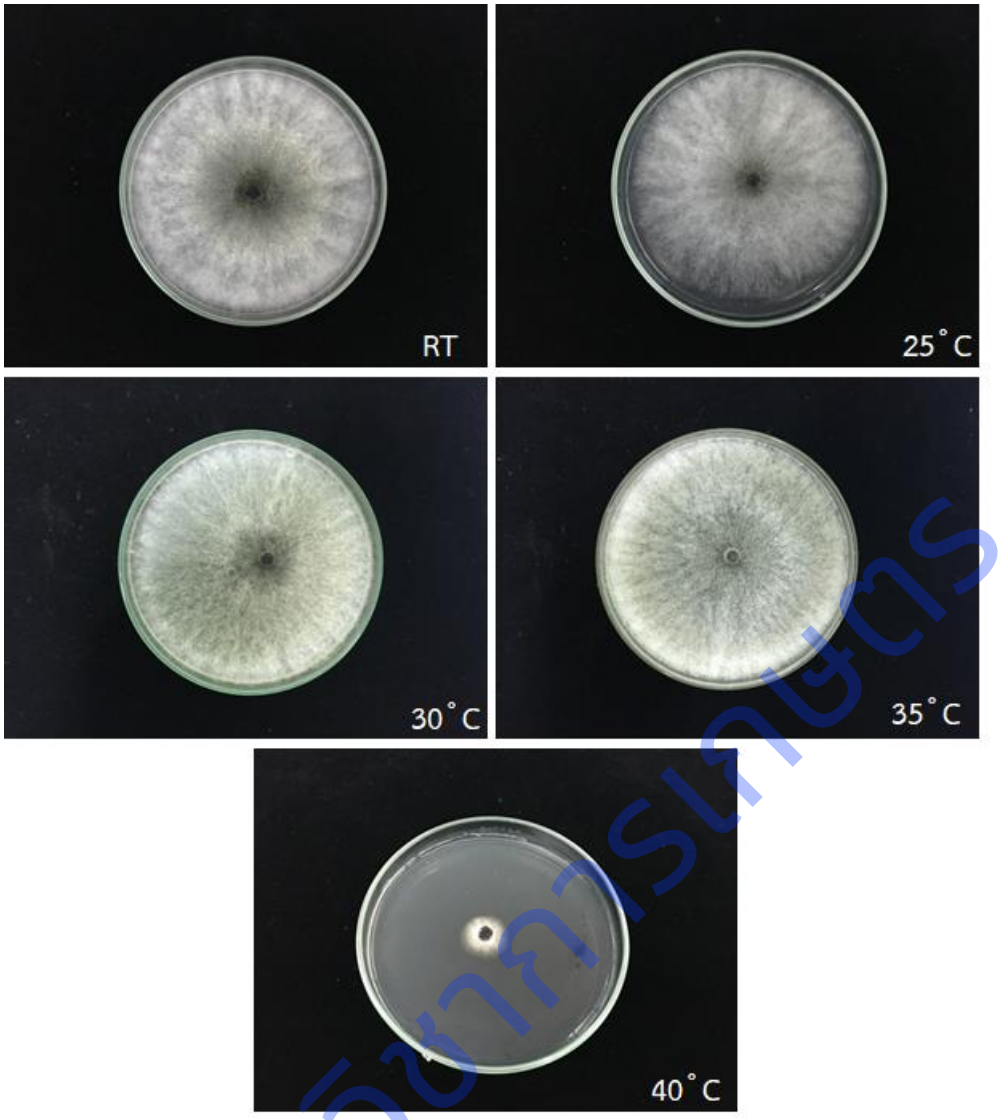
ภาพที่ 2.2.6.12: การเจริญของโคโลนีของรา *Neoscytalidium dimidiatum* ไอโซเลต M 0328 แยกจากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จังหวัดสกลนคร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 3 วัน

กรมวิชาการเกษตร



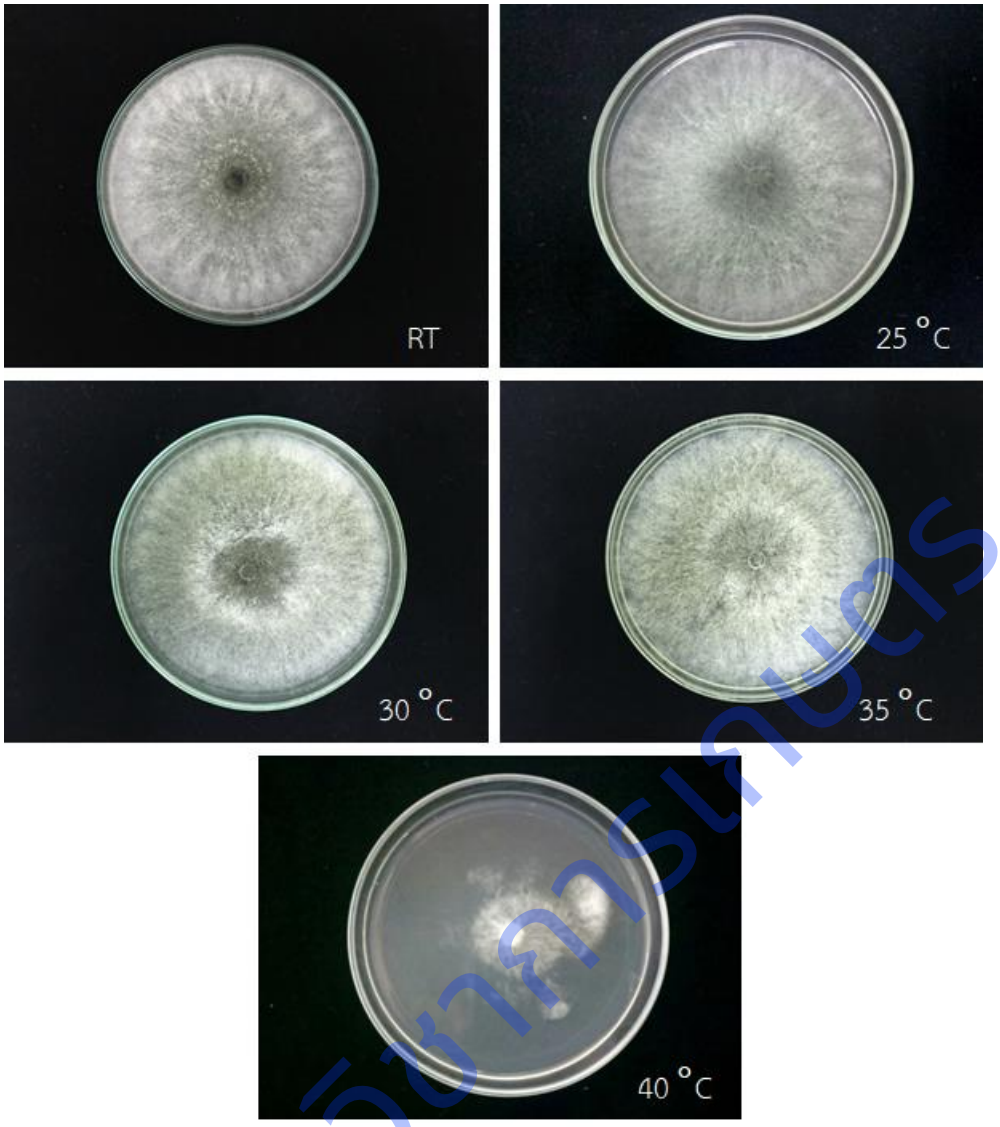
ภาพที่ 2.2.6.13: การเจริญของโคโลนีของเชื้อรา *Neoscytalidium dimidiatum* ไอโซเลต M0331 แยกจากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จังหวัดอุทัยธานี บ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 3 วัน

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2.2.6.14: การเจริญของโคโลนีของเชื้อรา *Neoscytalidium dimidiatum* ไอโซเลต M0354 แยกจากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จังหวัดจันทบุรี บ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 3 วัน

กรมวิชาการเกษตร

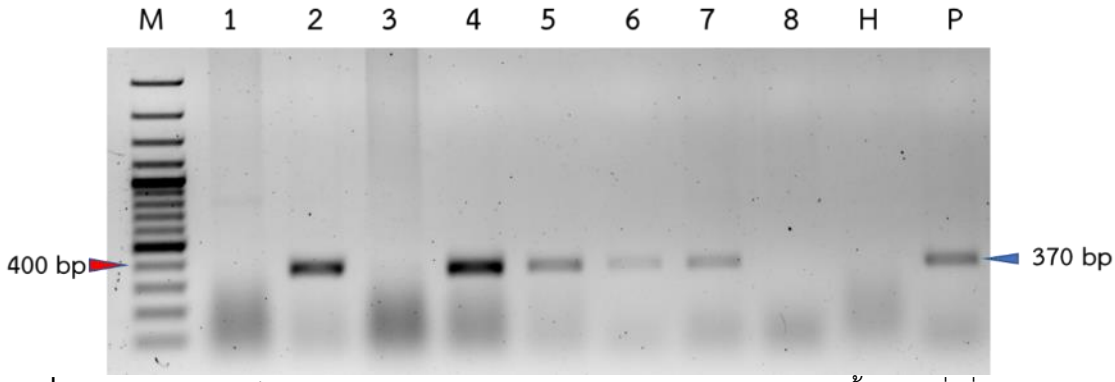


ภาพที่ 2.2.6.15: การเจริญของโคโลนีของเชื้อรา *Neoscytalidium dimidiatum* ไอโซเลต M0355 แยกจากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จังหวัดนครราชสีมา บ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 3 วัน

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.2.7.1 ลักษณะอาการของพริกที่แสดงอาการใบเหลือง ใบเสียรูปทรง ใบม้วนงอขึ้น พบในแปลงปลูกพริก ก : กาญจนบุรี, ข : สุพรรณบุรี, ค : กรุงเทพมหานคร, ง-จ : พระนครศรีอยุธยา และ ฉ : ศรีสะเกษ

กรมวิชาการเกษตร



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

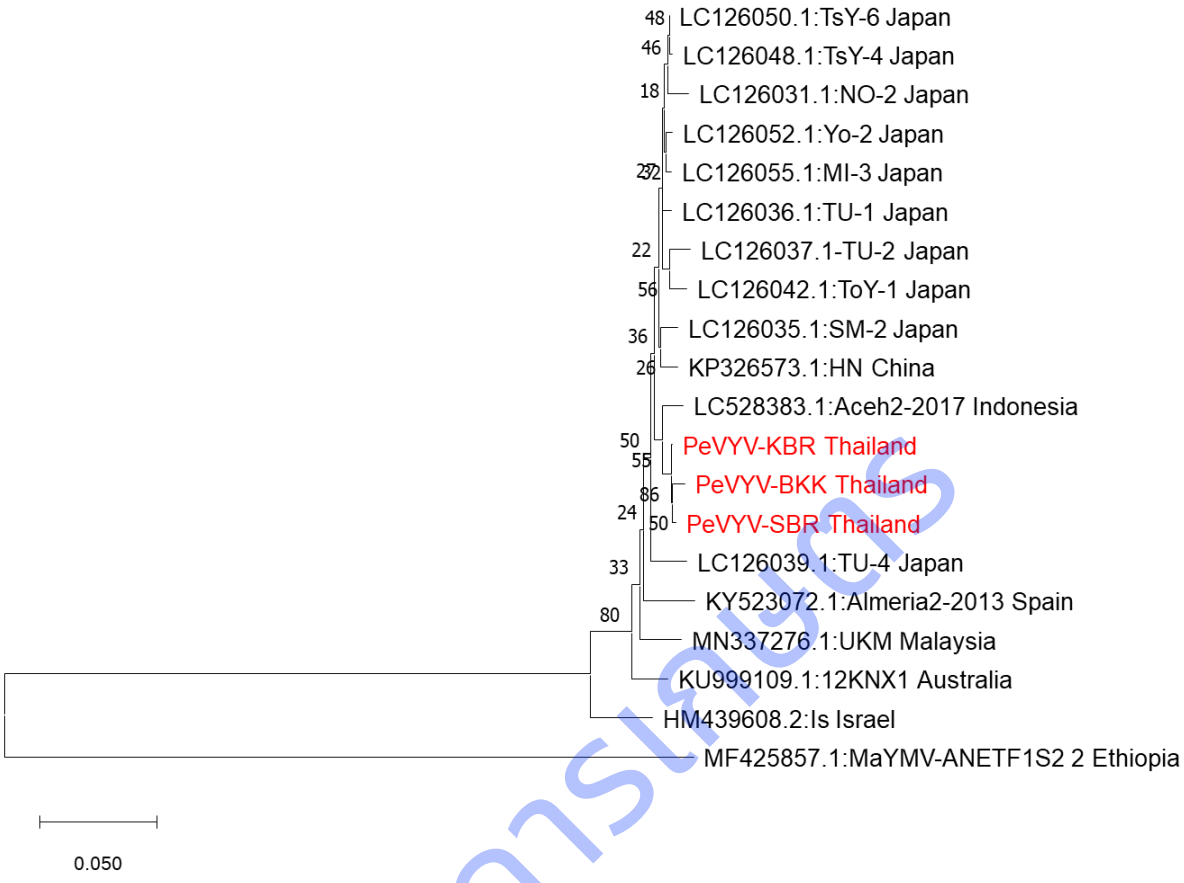
4 และ 8 : ตัวอย่างพริกในแปลงจังหวัดสุพรรณบุรี

5-7 : ตัวอย่างพริกที่พบในกรุงเทพมหานคร

H : พริกปกติ (Negative control)

P : ตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control)

กรมวิชาการเกษตร

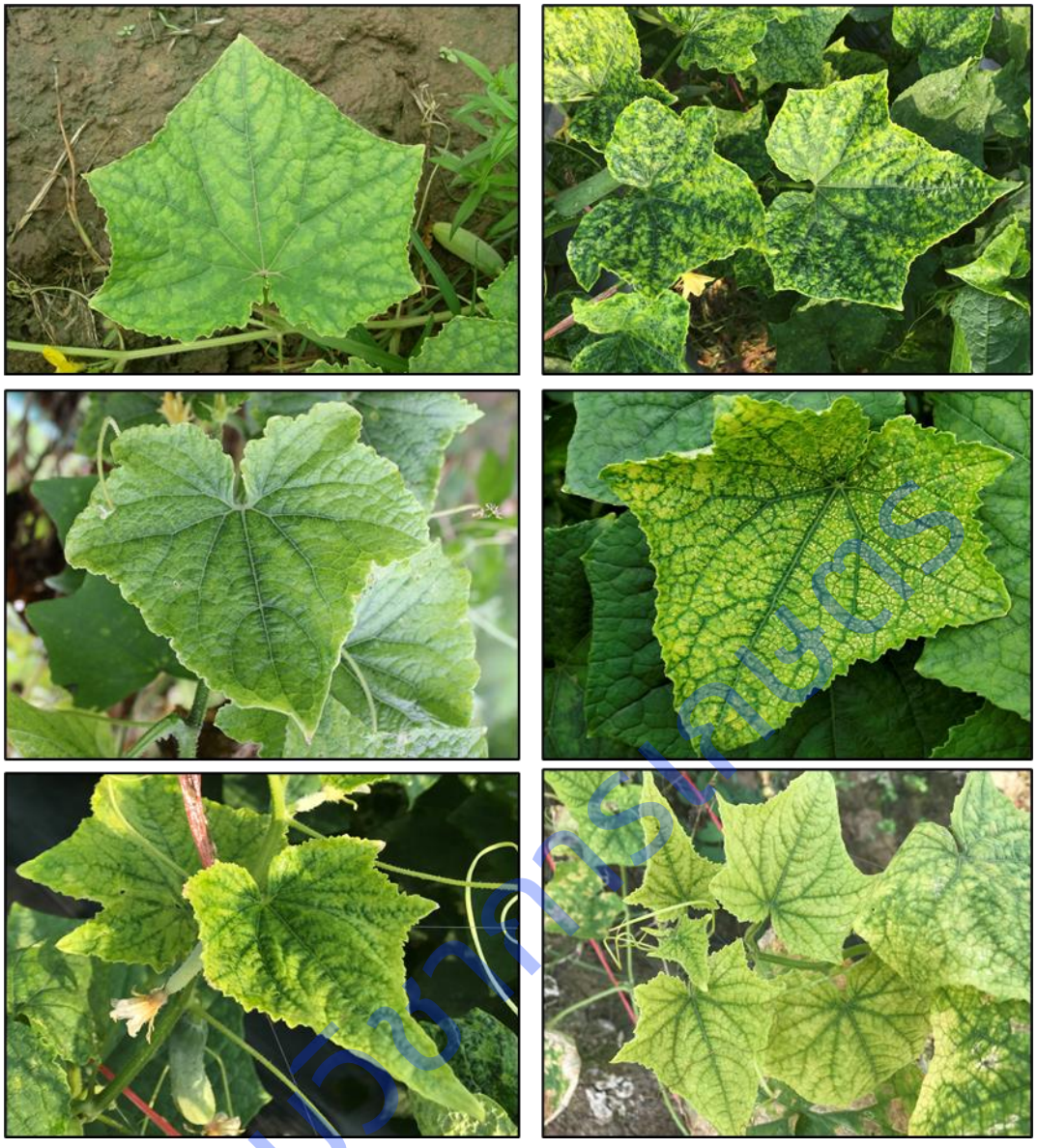


ภาพที่ 2.2.7 .3 Neighbor-joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน *CP* แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Pepper vein yellows virus* ที่แยกได้จากพริกในประเทศไทย (อักษรสีแดง) กับไอโซเลตอื่น ๆ ในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA X และใช้ค่า bootstrap จาก 1,000 replications และใช้ข้อมูลของเชื้อ *Maize yellow mosaic virus* (MaYMV) ไอโซเลต ANETF1S2_2 ของประเทศเอธิโอเปียเป็น outgroup

กรมวิชาการเกษตร

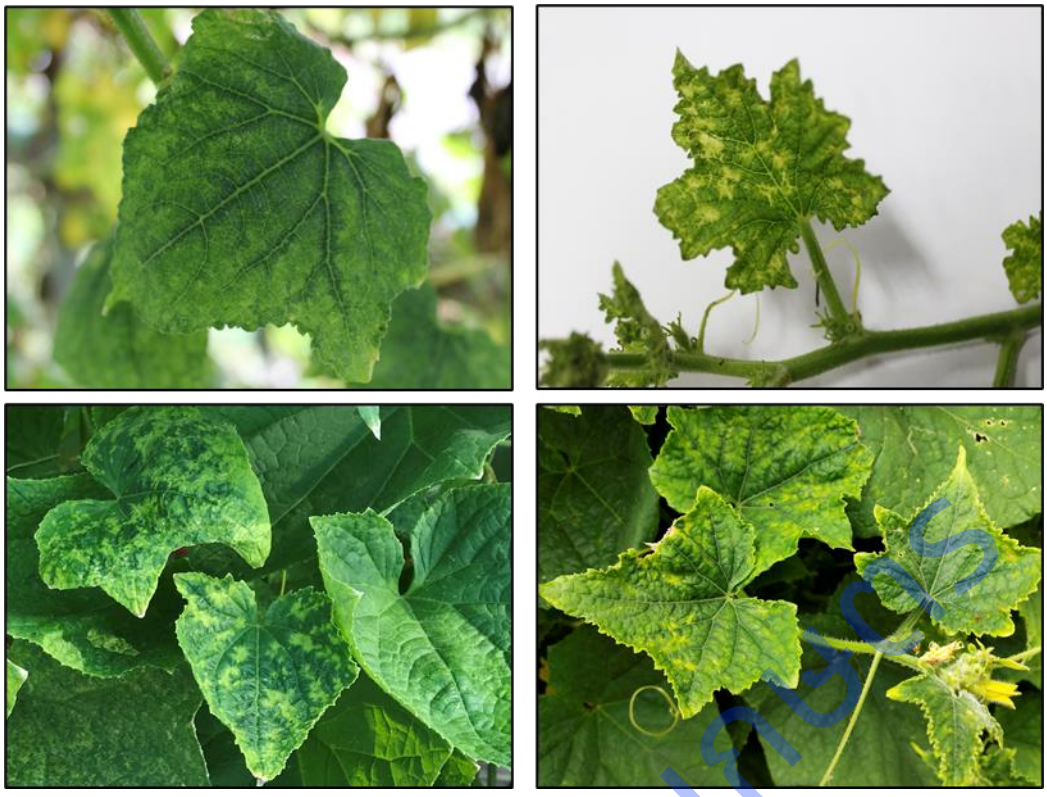
ภาพที่ 2.2.7.4 ต้นพริกที่ได้รับการปลูกเชื้อโดยเพลี้ยอ่อนที่ 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ต้นพริกแสดงอาการใบเหลืองในส่วนของเนื้อใบอย่างชัดเจนหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 20 วัน

กรมวิชาการเกษตร



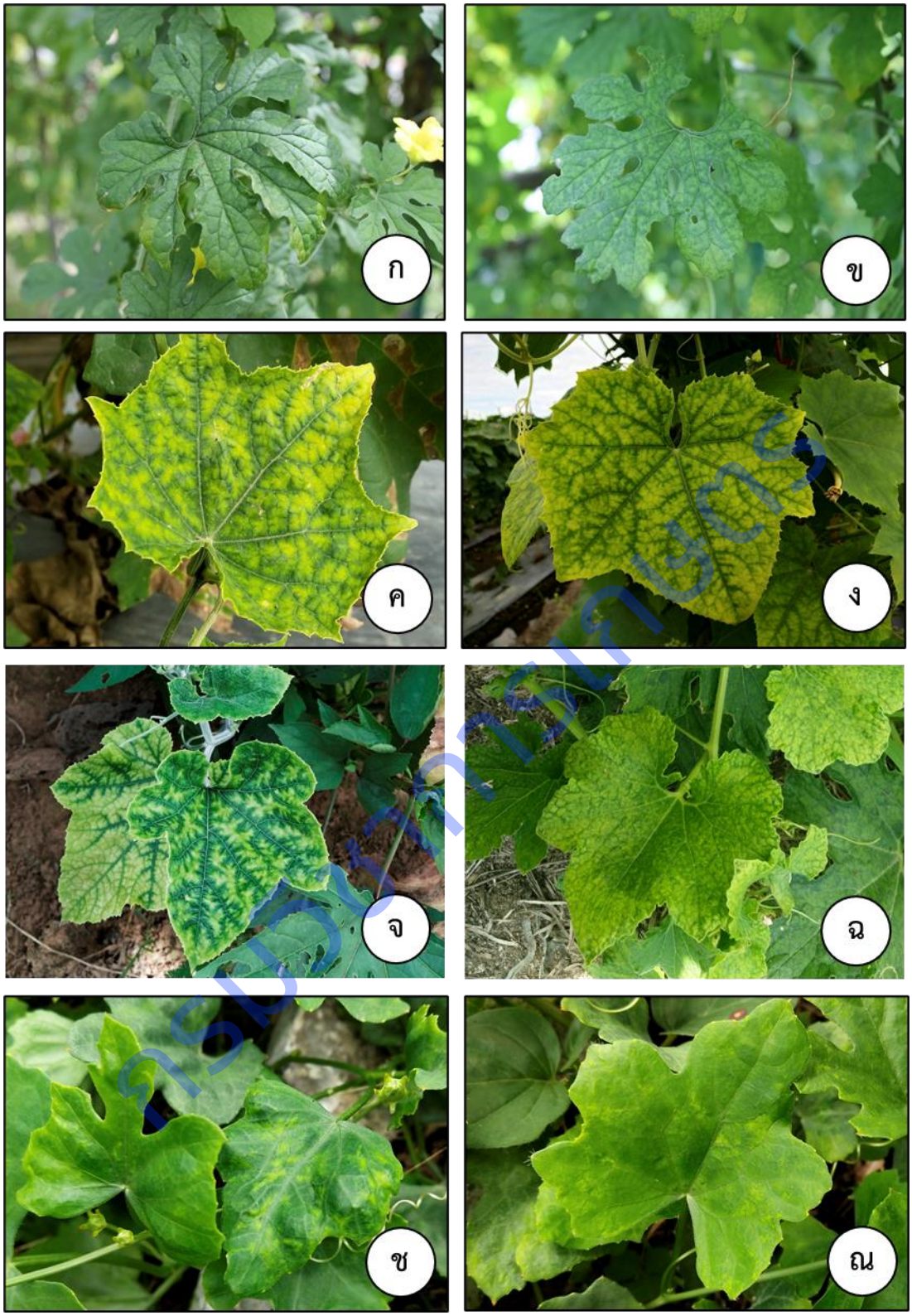
ภาพที่ 2.2.8.1 แตงกวาที่แสดงอาการใบด่าง ใบด่างประ เส้นใบใส เนื้อใบเหลือง คล้ายอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Crinivirus* ที่พบในแปลงปลูก

กรมวิชาการเกษตร



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

Table 2.3.1.1 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 2.3.1.2 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

กรมวิชาการเกษตร

Table 2.3.1.3 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 2.3.1.4 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

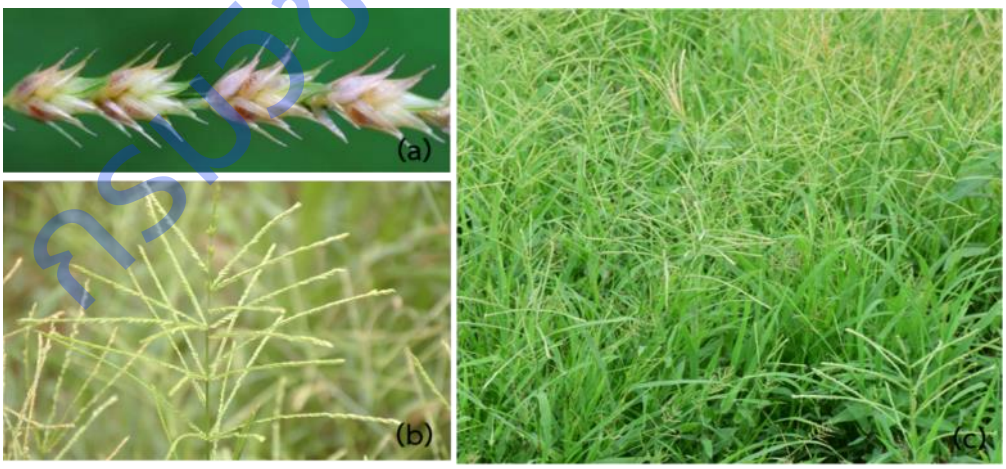


Figure 2.3.1.1 *A. racemosa*; (a)-(b) inflorescence, and (c) habitat.

กรมวิชาการเกษตร

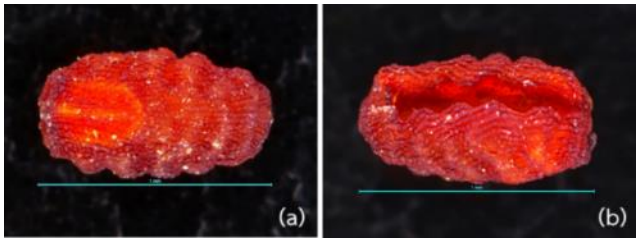


Figure 2.3.1.2 Seeds of *A. racemosa*; (a) front, and (b) back.

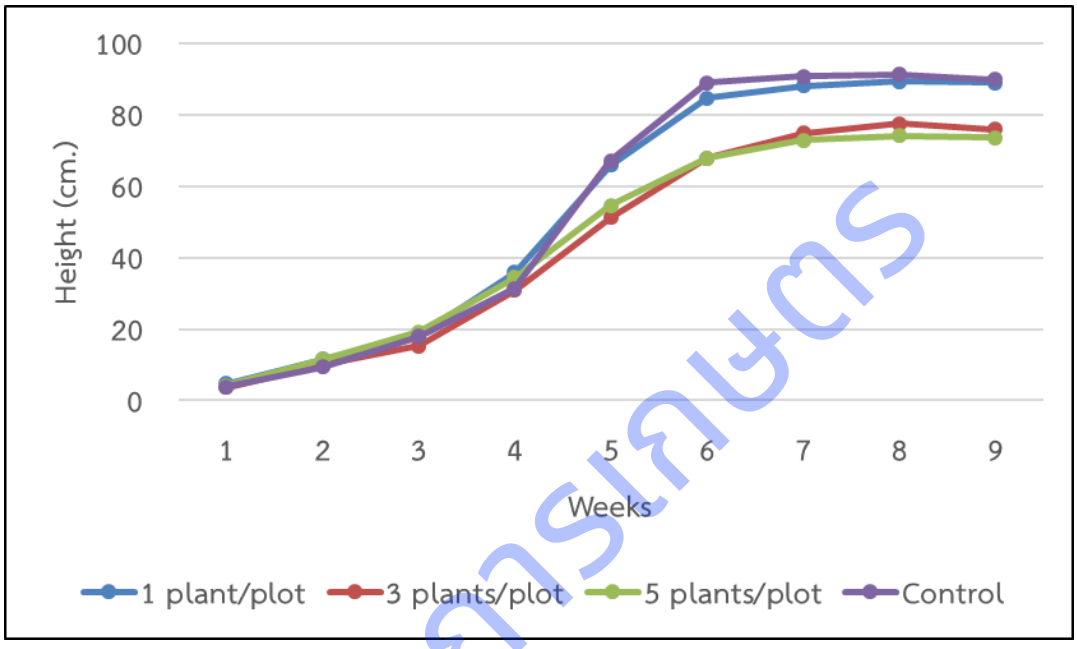
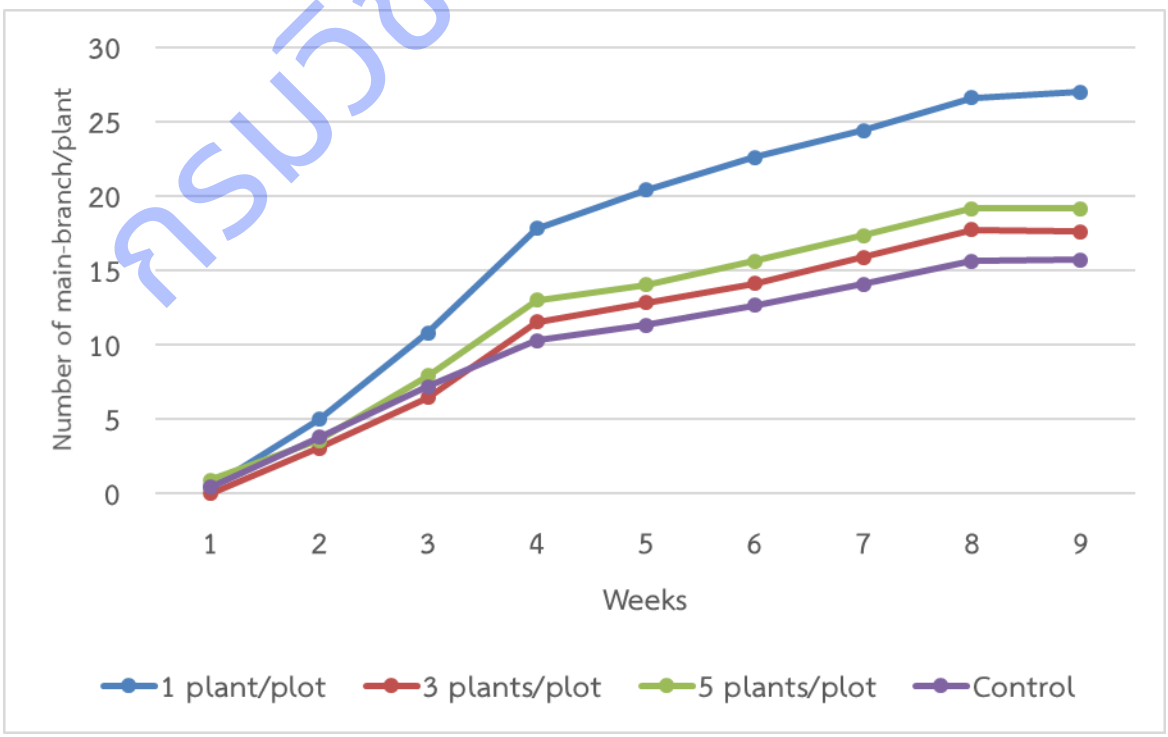


Figure 2.3.1.3 Height of *A. Racemosa.*



กรมวิชาการเกษตร

Figure 2.3.1.4 Number of main-branch of *A. Racemosa.*

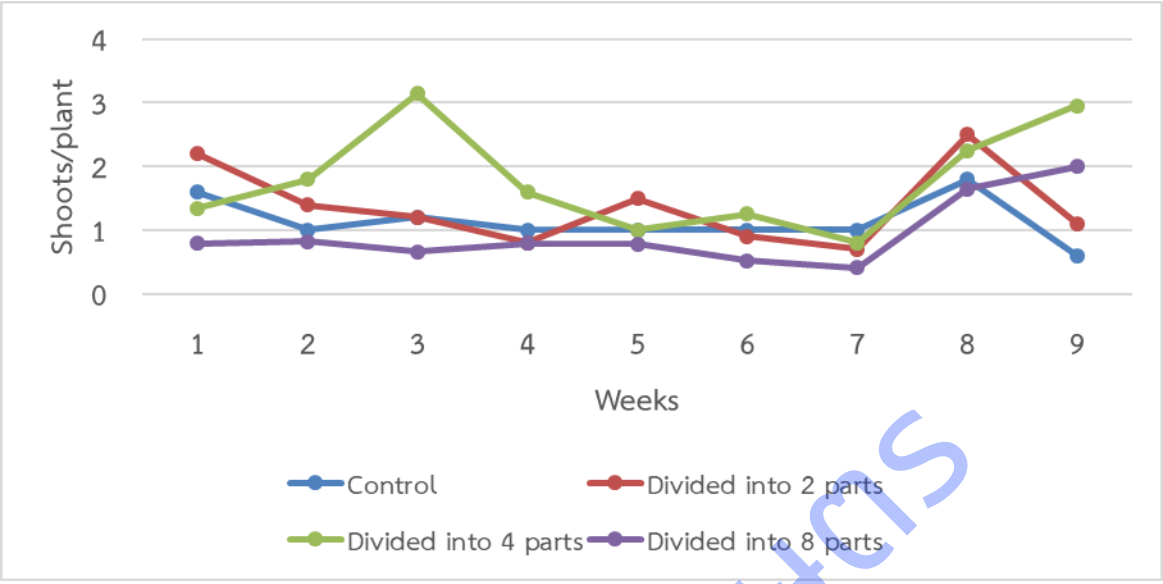


Figure 2.3.1.5 Effect of divided parts on number of shoots of *A. Racemosa.*

กรมวิชาการเกษตร

Table 2.3.2.1 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 2.3.2.2 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

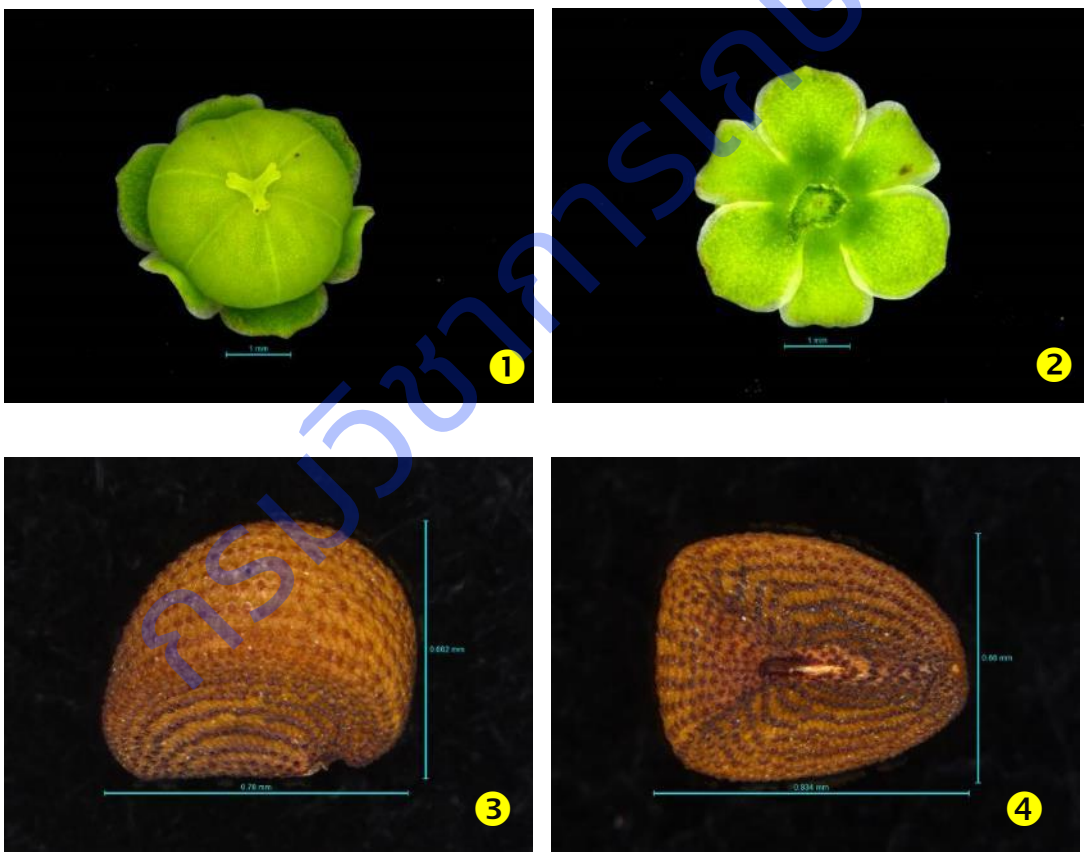
Table 2.3.2.3 Seed germination at various soil depths.

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)



กรมวิชาการเกษตร

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)

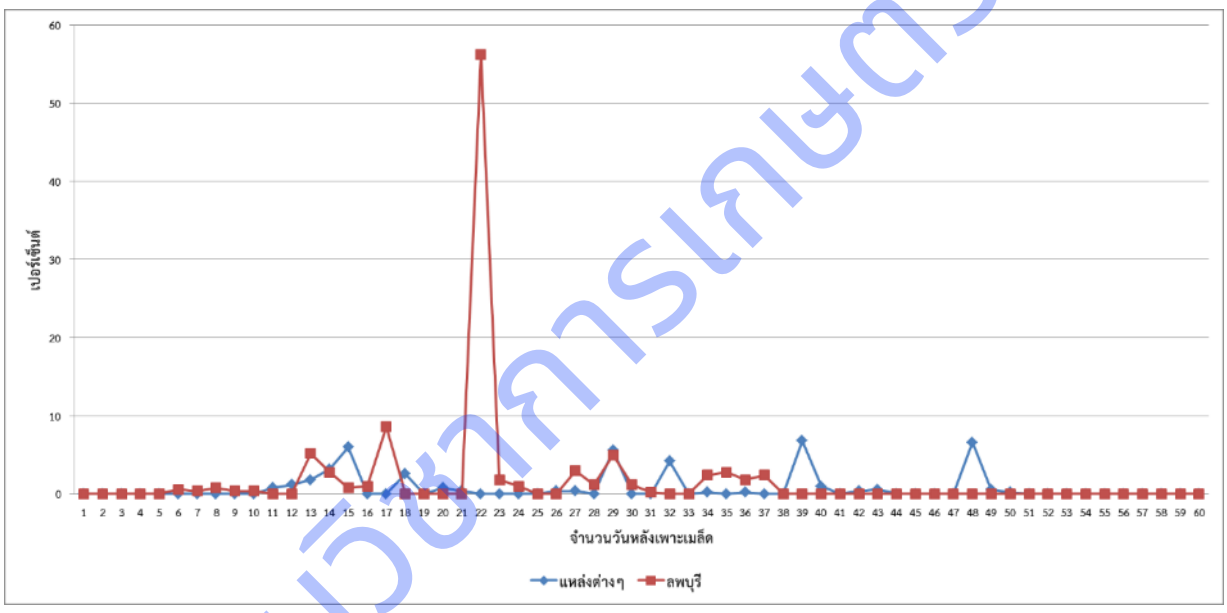


Figure 2.3.2.3 Germination of *P. caroliniensis* Walter

กรมวิชาการเกษตร

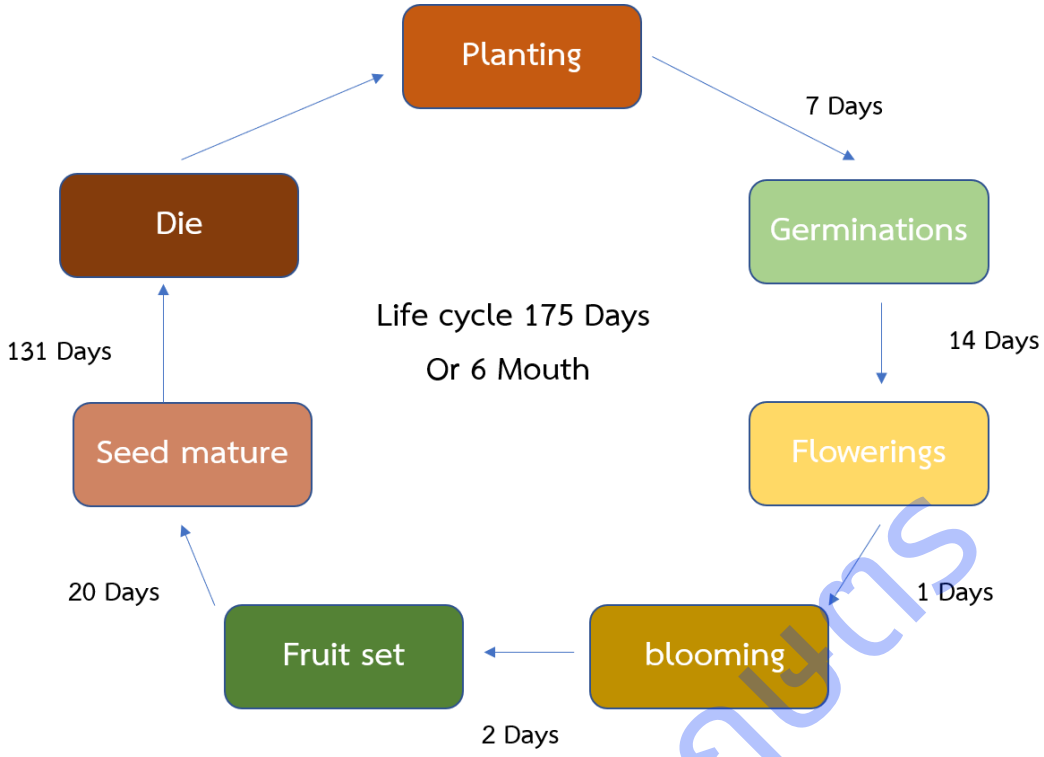


Figure 2.3.2.4 Life cycle of *P. caroliniensis* Walter

กรมวิชาการเกษตร

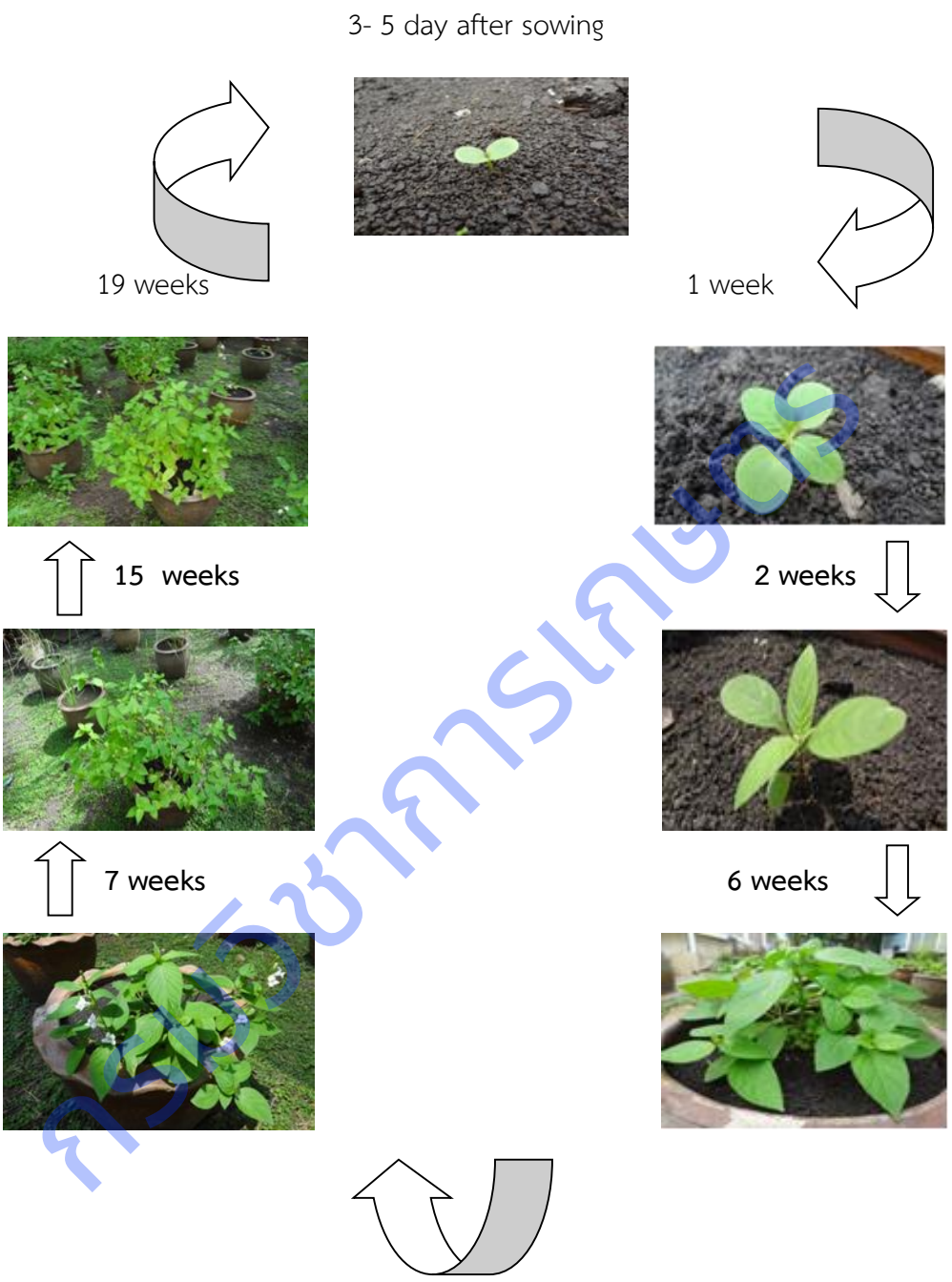


Figure 2.3.3.1. Life cycle of *Asystasia gangetica*

ภาควิชาการเกษตร

Table 2.3.3.1. 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 2.3.3.2. 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 2.3.3.3. 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

กรมวิชาการเกษตร

Table 2.3.3.4. 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

Table 2.3.4.1 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 2.3.4.2 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

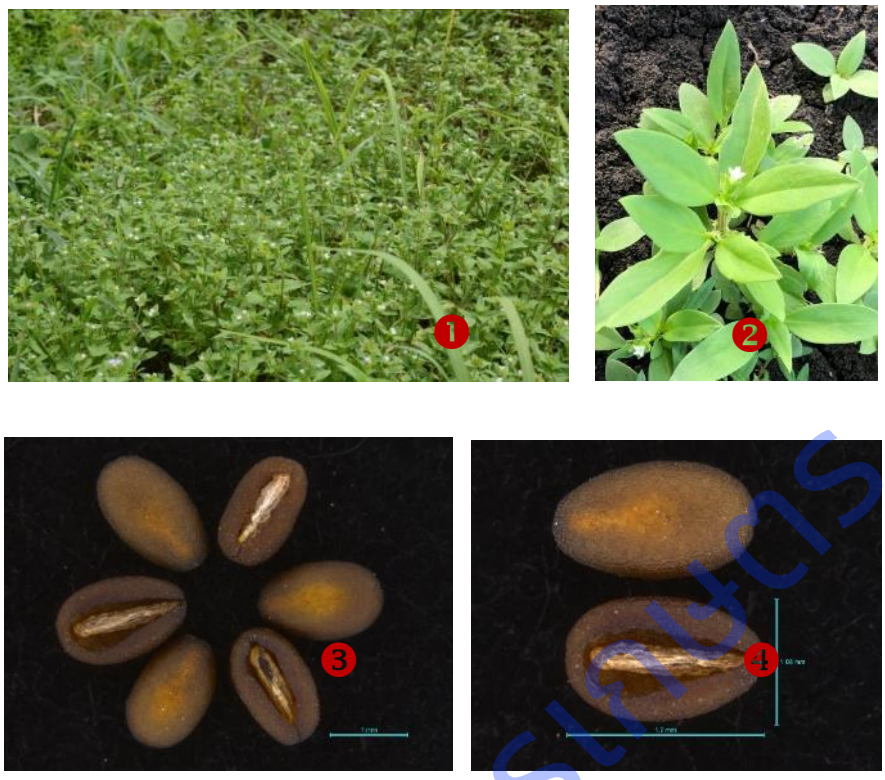
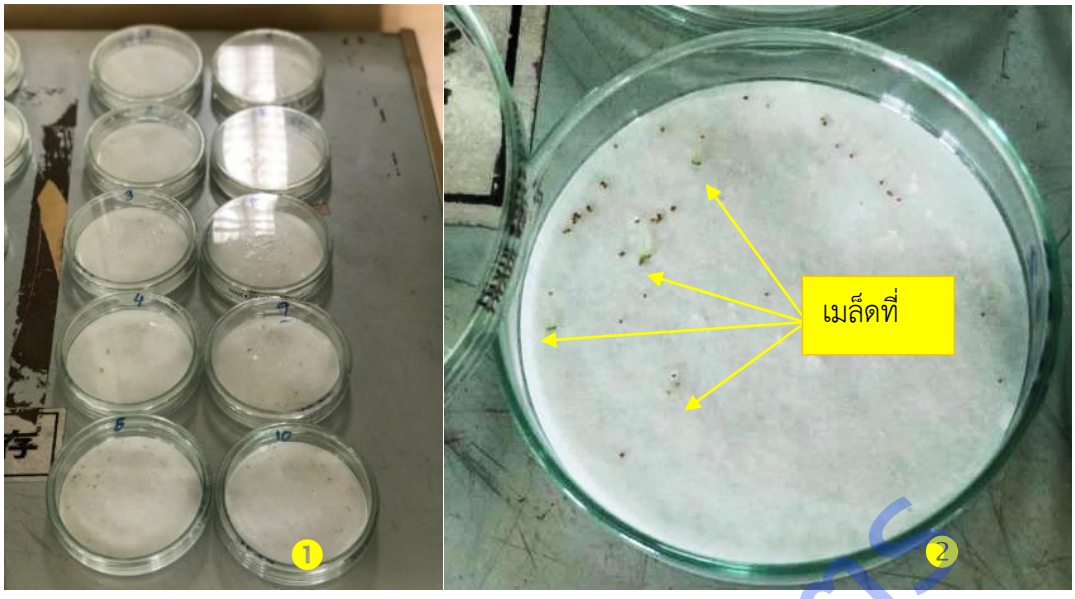


Figure 2.3.4.1 *S. alata* Aubl (1) Flowers (2) Seed (3, 4)

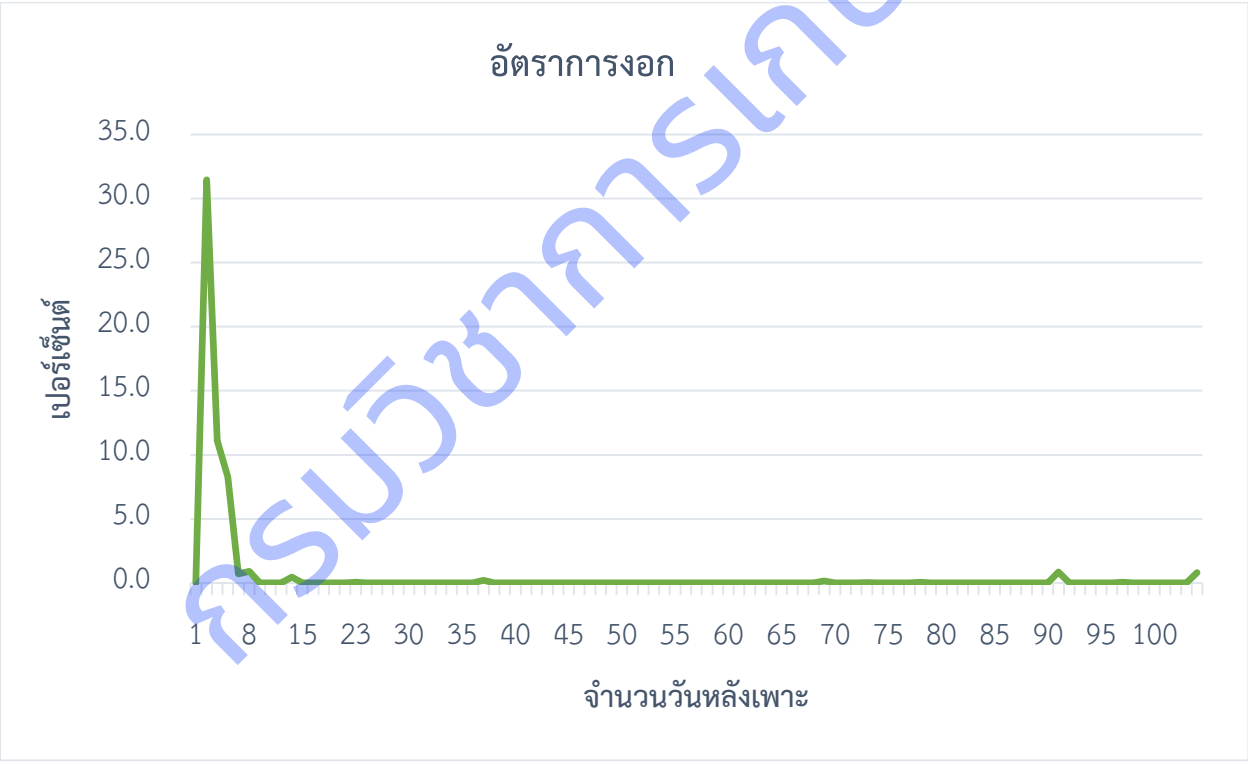
กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.3.5.1 ลักษณะของเทียนนา (*Ludwigia hyssopifolia.*) 1) ต้น 2) ดอก and 3) เมล็ด

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2.3.5.2 การทดสอบความงอกของเมล็ดเทียนนาในห้องปฏิบัติการ 1) จานเพาะ 2) เมล็ดที่งอก



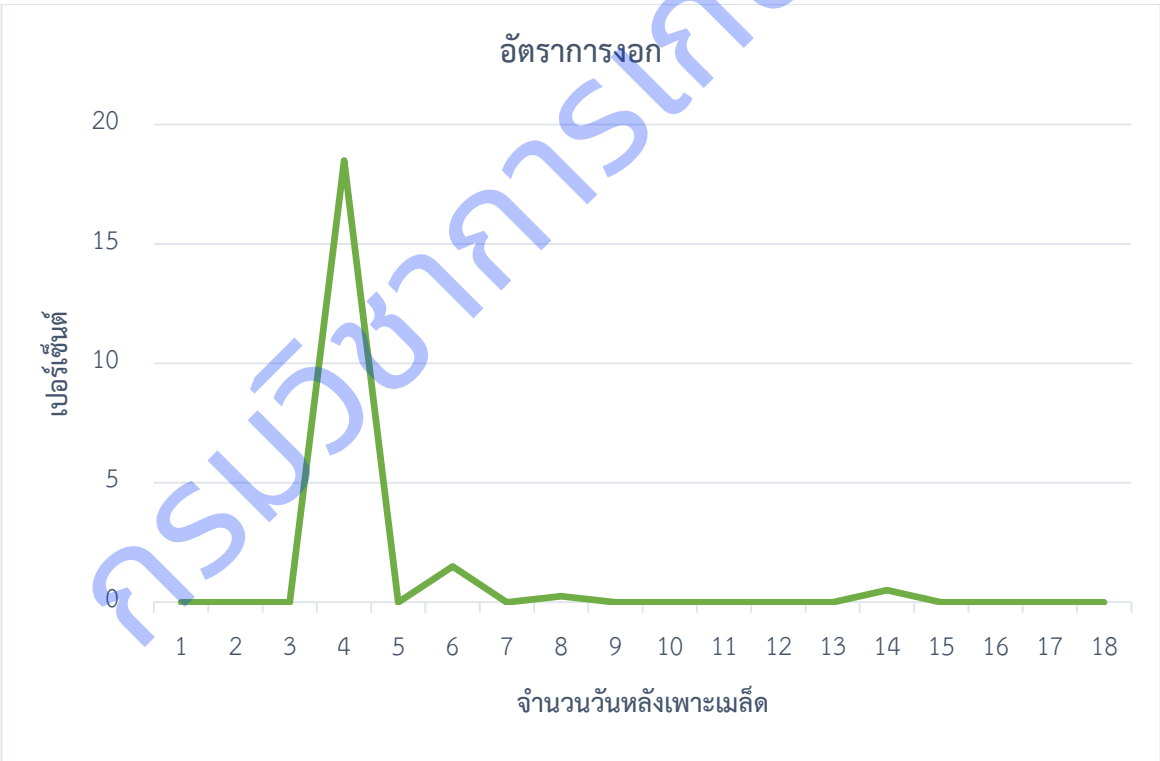
ภาพที่ 2.3.5.3 อัตราการงอกของเมล็ดในสภาพห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 2.3.5.2 เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียนนา

เปอร์เซ็นต์ความงอก	ห้องปฏิบัติการ	เรือนทดลอง
ค่าสูงสุด	74.0	39.0
ค่าต่ำสุด	29.0	2.0
ค่าเฉลี่ย	55.0	20.7

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.3.5.4 การทดสอบความงอกในเรือนทดลอง 1) กระถางเพาะเมล็ด 2) ลักษณะต้นกล้าเทียนนา 3) การงอกในสภาพเรือนทดลอง

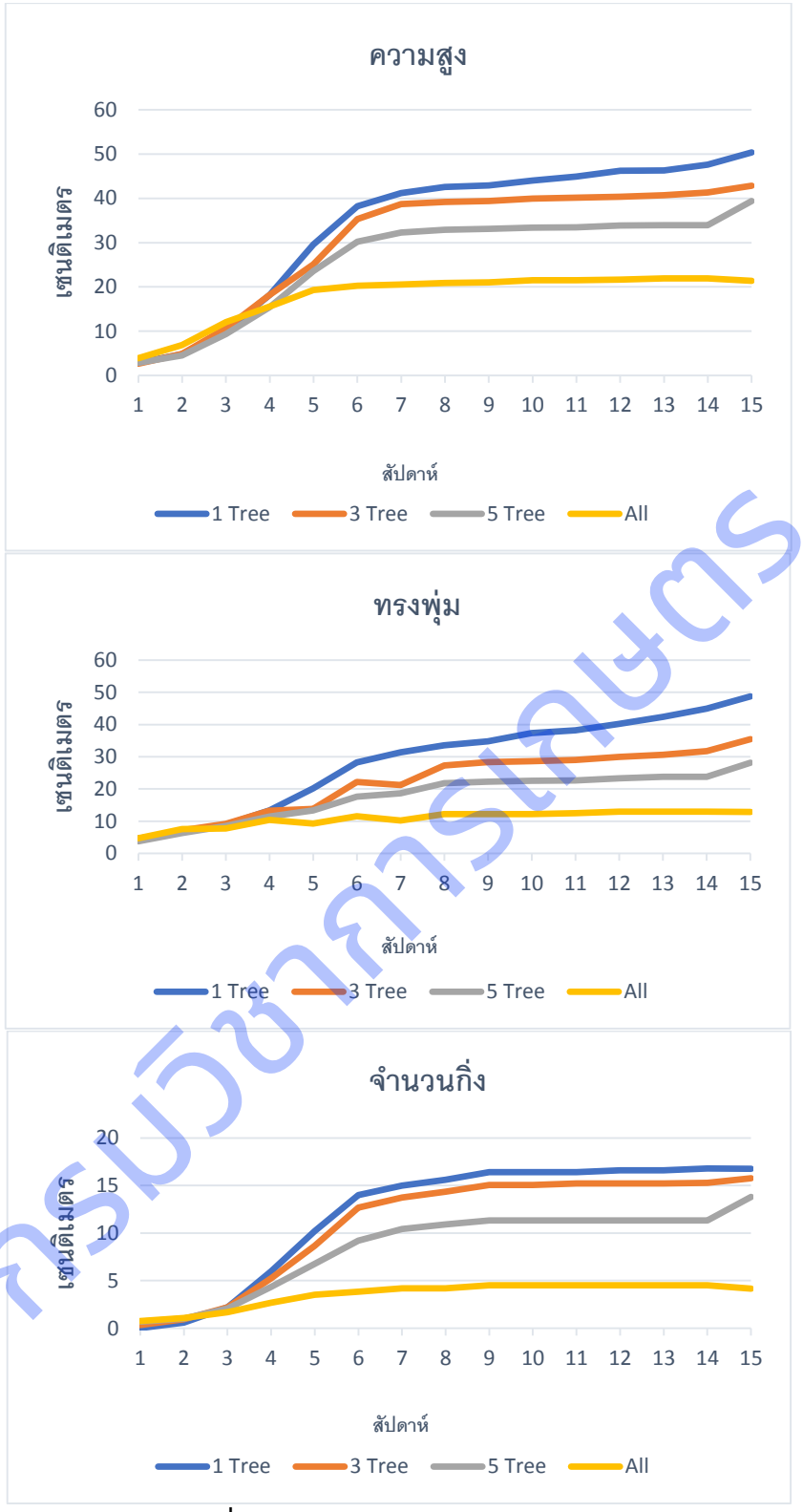


ภาพที่ 2.3.5.5 อัตราการงอกของเมล็ดในสภาพเรือนทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.3.5.6 การทดลองการเจริญเติบโตของเทียนนา 1) กระบะทดลอง 2) ต้นกล้าเทียนนา 3) และ 4) ลักษณะต้นเทียนนาที่เลือกใช้ทดสอบ

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2.3.5.7 การเจริญเติบโตของเทียนนา

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.3.5.8 วงจรชีวิตของเทียนนา

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2.3.5.3 เปอร์เซ็นต์การแตกยอดใหม่

กรรมวิธี	ปักชำบนดิน	ปักชำโดยฝังใต้ดิน
ปักชำชิ้นส่วนจากโคนต้น	70.0	0.0
ปักชำชิ้นส่วนจากกลางต้น	70.0	0.0
ปักชำชิ้นส่วนจากปลายยอด	70.0	0.0

ตารางที่ 2.3.5.4 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

ผนวก 3

ภาพและตารางประกอบผลงานวิจัย

กิจกรรมที่ 3

การจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.1.1 Fruit fly trap (wet bucket trap) for molecular work

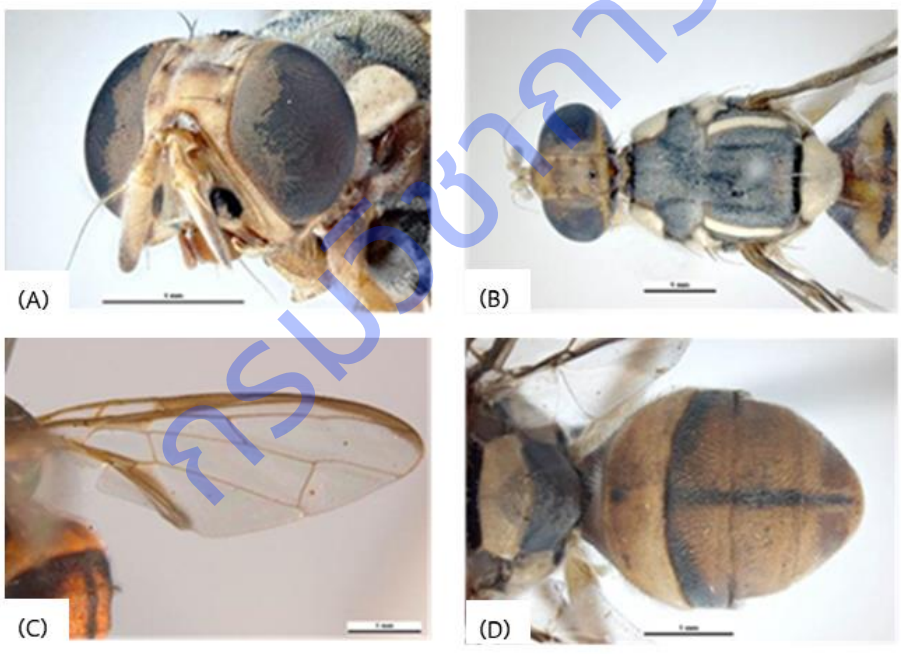
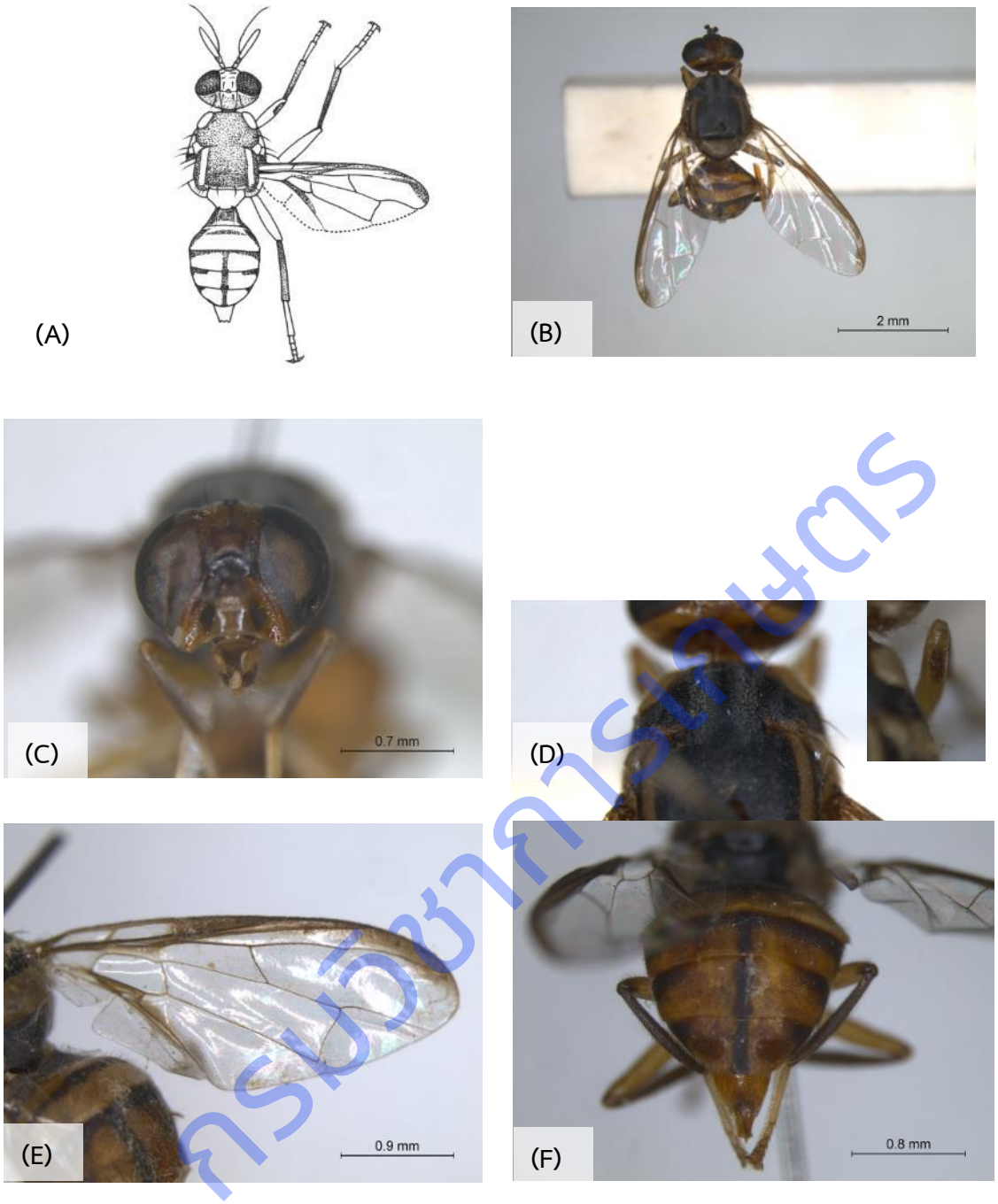


Figure 3.1.2 Morphological character of *Bactrocera dorsalis* complex.

(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



กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.1.3 *Bactrocera* (*Bactrocera*) *carambolae* Drew & Hancock

(A) Taxonomic characters (B) Body

(C) Head (D) Thorax

(E) Wing (F) Abdomen

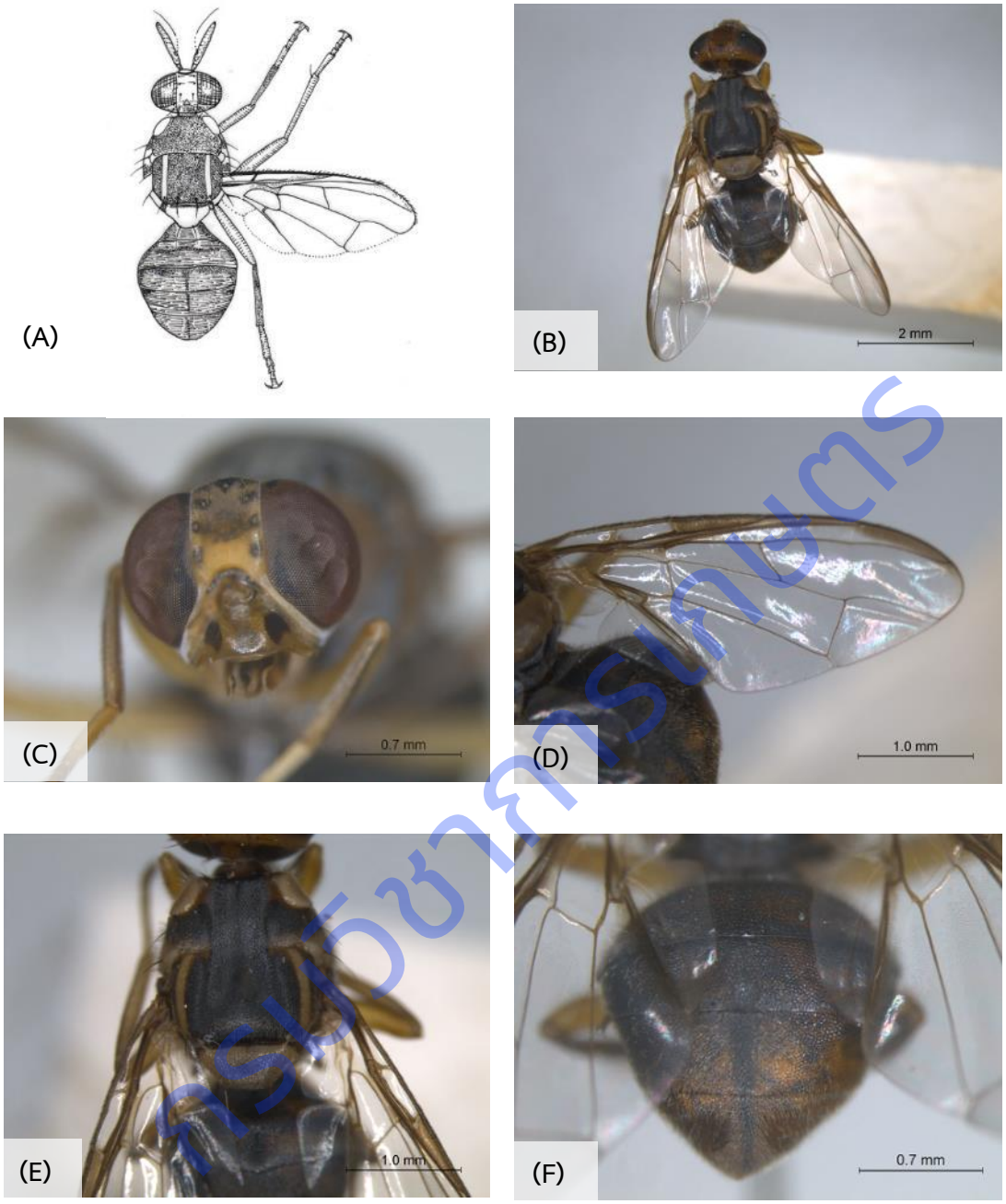


Figure 4 *Bactrocera* (*Bactrocera*) *dorsalis* Hendel

(A) Taxonomic characters (B) Body

(C) Head (D) Thorax

(E) Wing (F) Abdomen

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

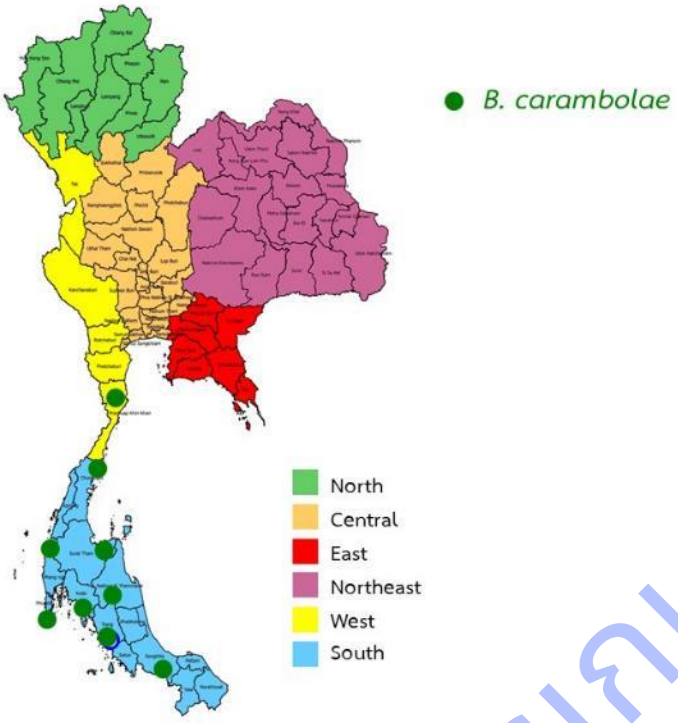


Figure 3.1.5 Distribution of *Bactrocera carambolae* in Thailand

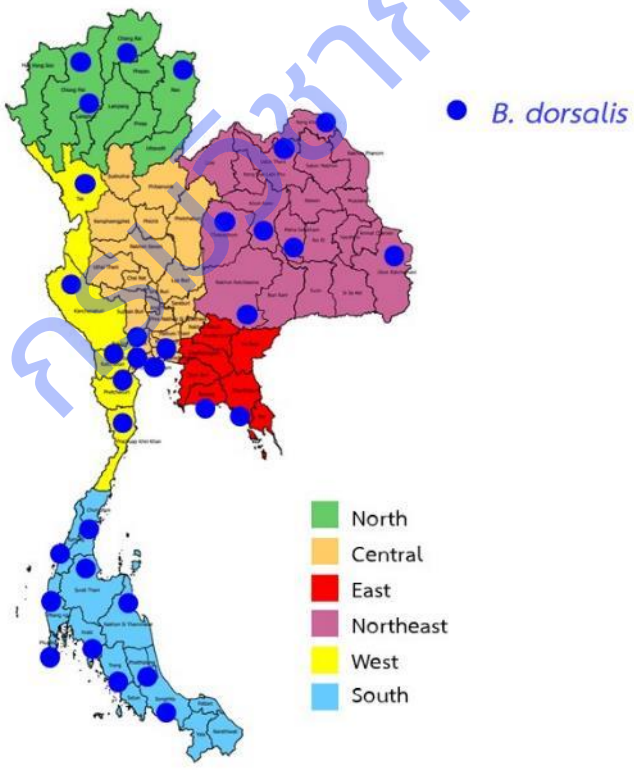


Figure 3.1.6 Distribution of *Bactrocera dorsalis* in Thailand

กองวิชาการเกษตร

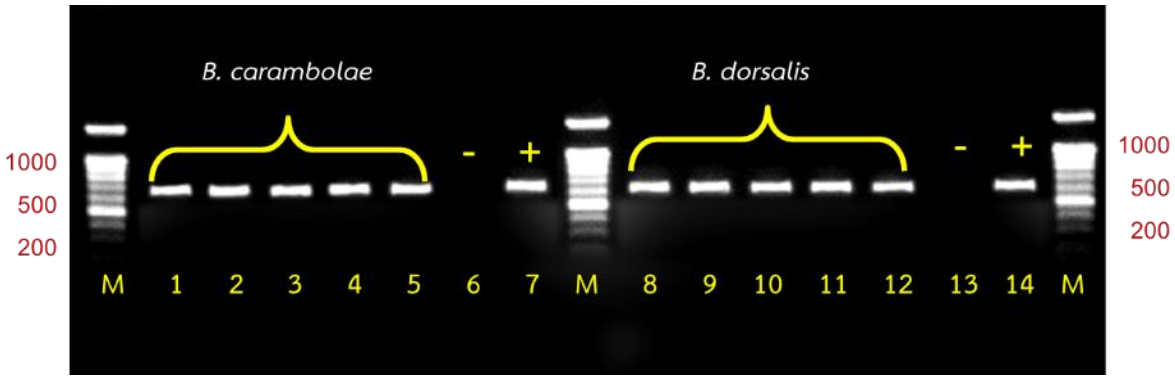


Figure 3.1.7 PCR results using the *cox1* (LCO1490/HCO2198) universal primer pair.

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*)

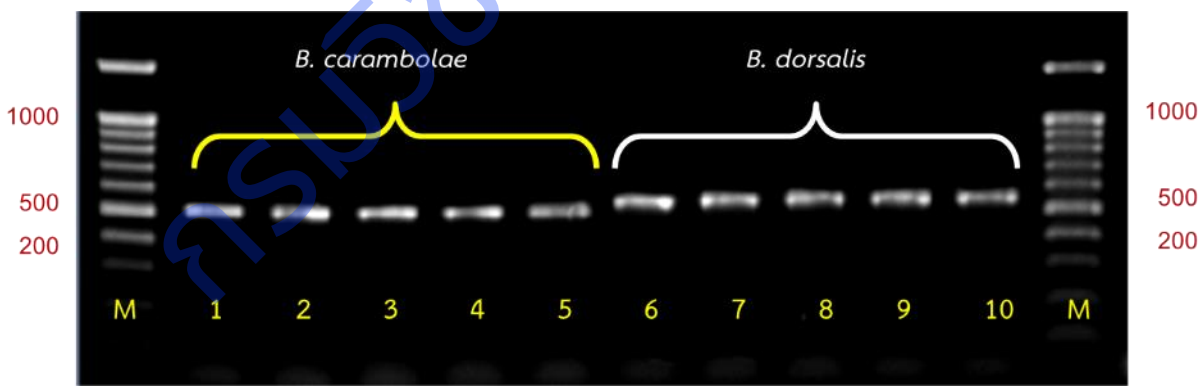


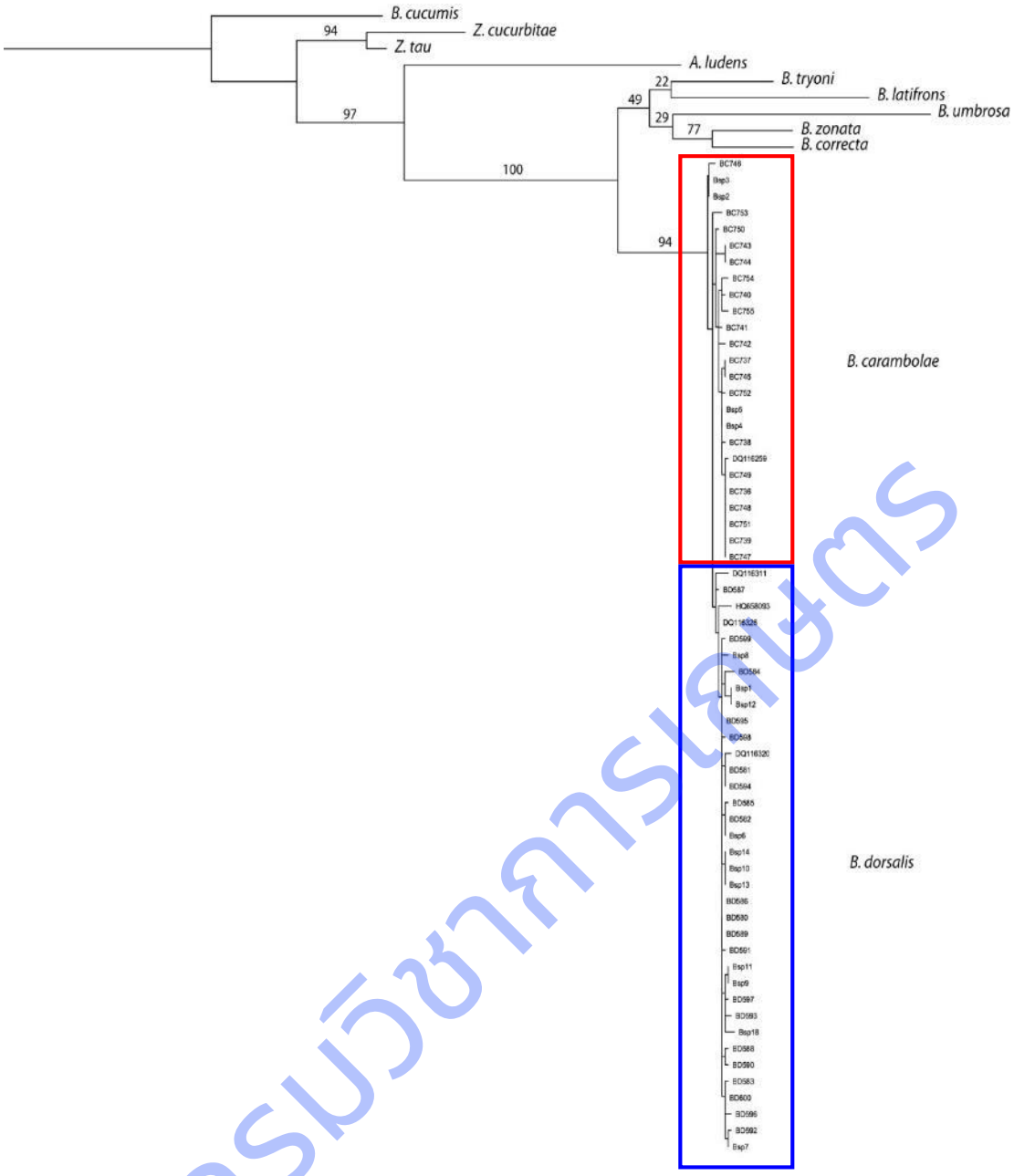
Figure 3.1.8 PCR results using the ITS (ITS7F/ITS6R) primer pair.

Lane 1- 5 *B. carambolae* from different geographical populatons;

Lane 6 -10 *B. dorsalis*; Lane 11: negative control (ddH_2O);

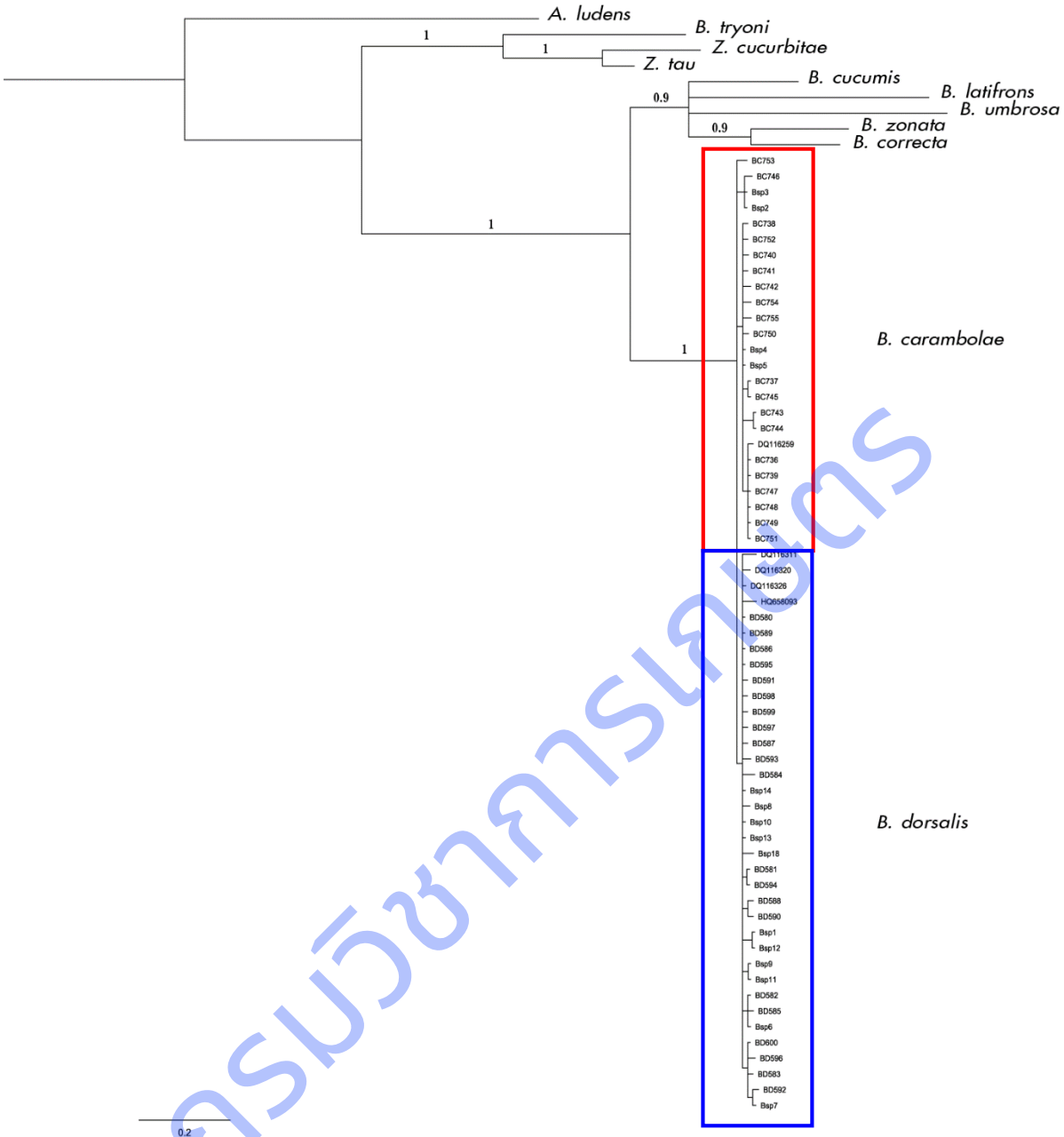
Lane M Marker

กรมวิชาการเกษตร



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.

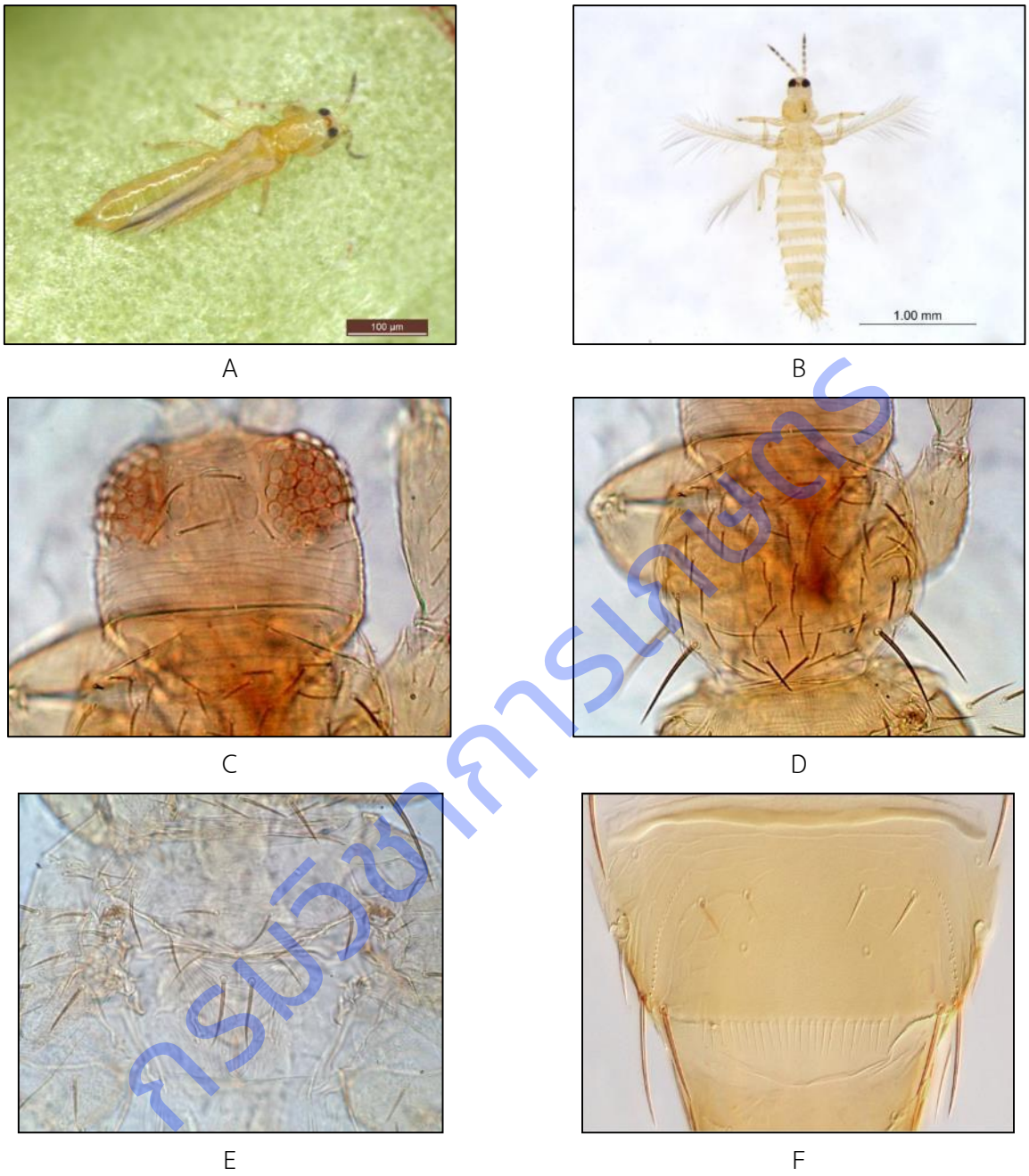


Figure 3.2.1 Morphology of cotton thrips; *Thrips palmi* (Karny)

A. Adult B. Slide permanent

C. Head D. Pronotum

F. Metanotum G. Abdominal tergite VIII

กรมวิชาการเกษตร

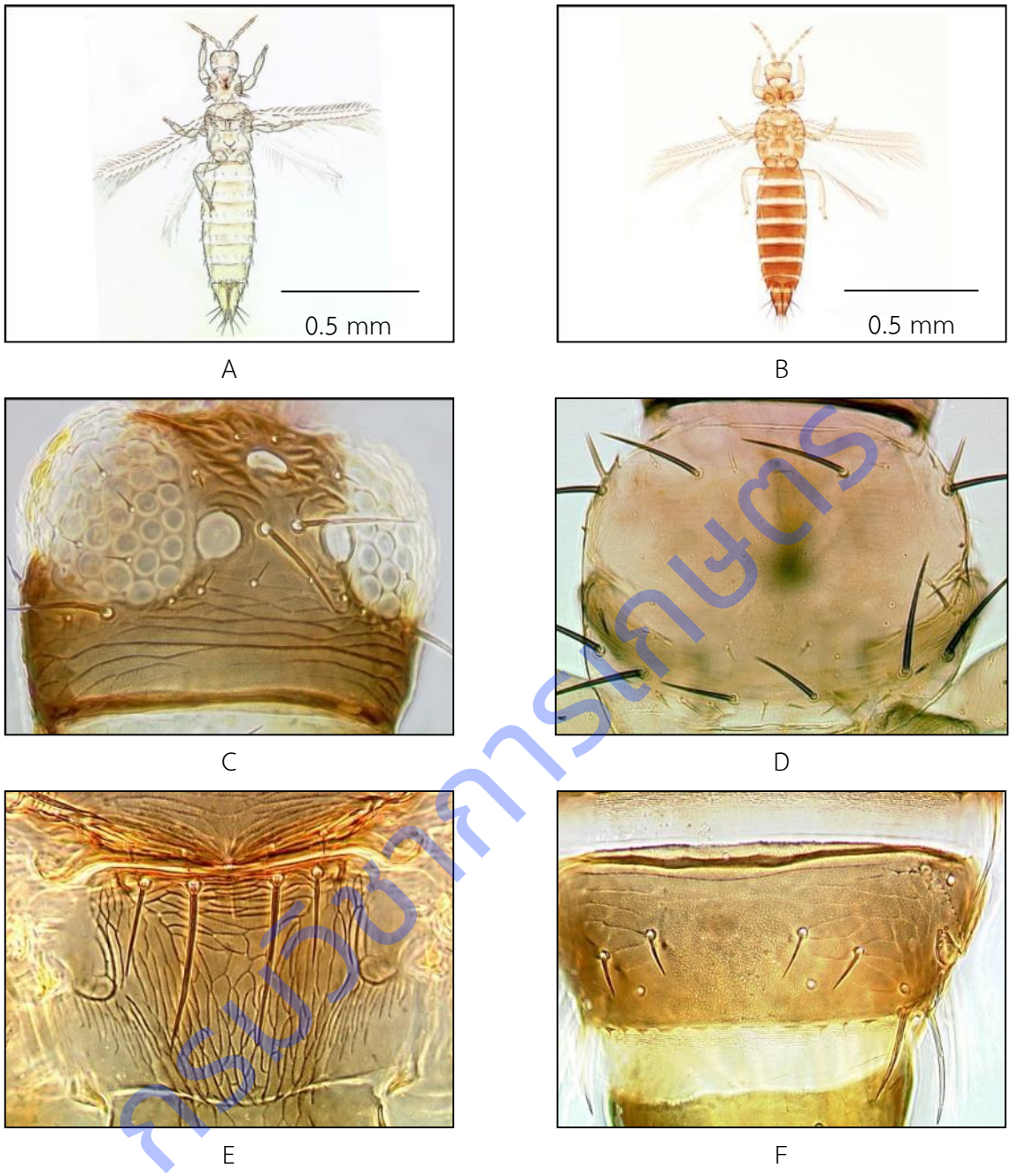


Figure 3.2.2 Morphology of common blossom thrips; *Frankliniella schultzei* (Trybom)

A. Slide permanent B. Slide permanent

C. Head D. Pronotum

F. Metanotum G. Abdominal tergite VIII

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

Primer UEA 7

TACAGTTGGAATAGACGTTGATACCCCACGATTAAATAACATAAGATTTTGACTTGAACCACCCTCTTTA
ACTCTTTTAATTATAGGTTTATATAAAGAAGGAGCGGGAACAGGATGAACAGTCTGTCCACCTTTATCAACAT
TTTACCATGCTGGTATTTCAGTAGACTTAACAATGTTTTCTCTTCATTTAGCTGGAGTCTCCTCAATTTTAGG
AGCATTAAATTTCATTACTACAATTTTAAATTTAAAAAATTTTAATTTATCAAGAGAAAAATTAAGATTATTTG
TGTGGTCAGTAGTATTAACAGCAATTCTTTTACTTTTATCTTTACCTGTACTAGCAGGAGCCATTACAATACT
TTTAACAGACCGTAATTTAAGGACGTCATTCTTTGACCCAAGAGGGCCTGGAGATCCTGTACTTTATCAACAT
CTATTCTGATTCTTTGGACATCTAATATGGCAGATTAGTGTGCATTGGA

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
TGGATTTTTTAATATGGCAGATTAGTGTGCATTGGA

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.

กรมวิทยาศาสตร์

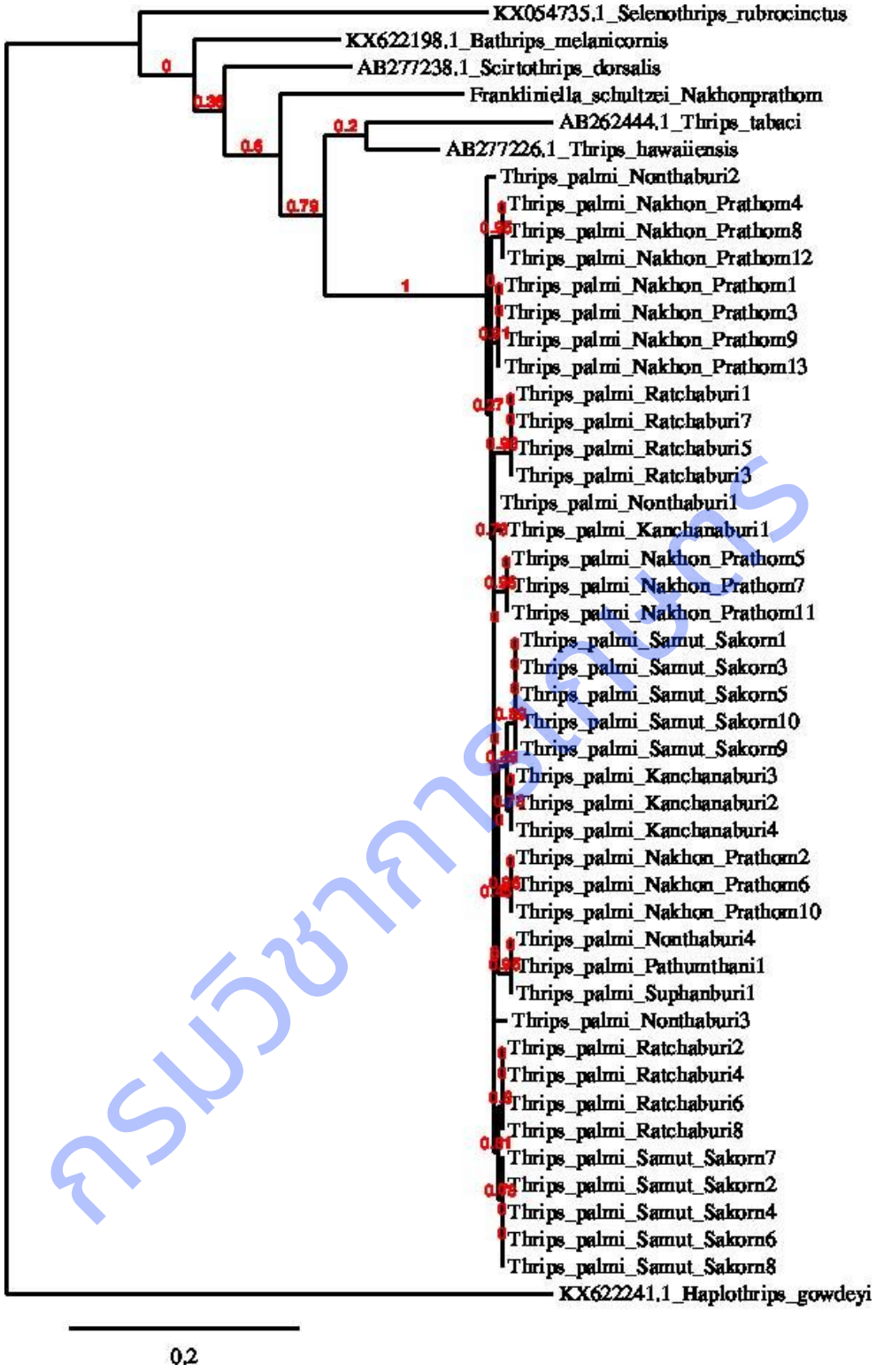


Figure 3.2.5 Phylogenetic trees showing the relationship among six thrips populations comparing with *Thrips palmi* and *Frankliniella schultzei* which collected from orchids in the Middle part of Thail

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.3.1 Leaf spot specimens caused by cercosporoid fungi collected from this study (2016-2019)

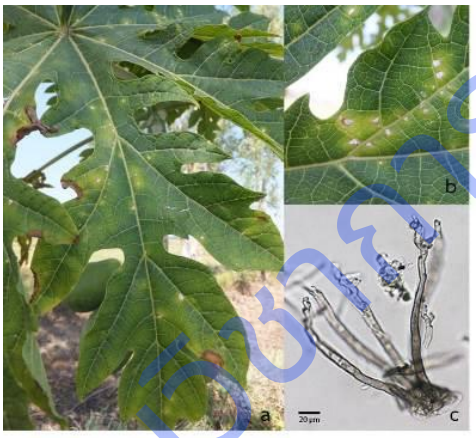


Figure 3.3.2 Leaf spot symptom on *Carica papaya*

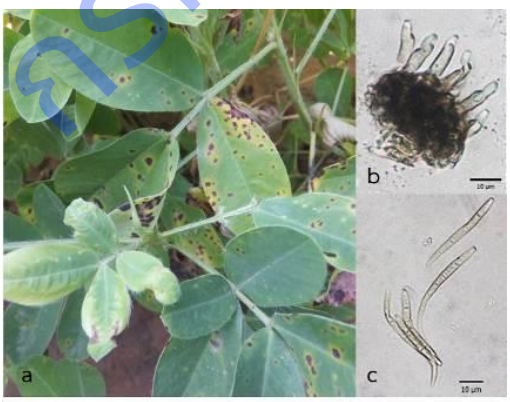


Figure 3.3.3 Leaf spot symptom on *Arachis hypogaea* (a) conidiophores (b) and conidia (c) of *P. arachidicola*

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.3.4 Leaf spot symptom on *Orchid* sp. and conidia of *Pseudocercospora dendrobii*

Figure 3.3.5 Leaf spot symptom on *Abelmoschus* sp. and characters of conidiophore and conidia

พืชอาศัย บานชื่น (*Zinnia* sp.)

Figure 3.3.6 Leaf spot symptoms on leaves and petals of *Zinnia* sp.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.4.1 Rust disease specimens collected from this study (2016-2019)

Figure 3.4.2 Rust disease symptom on *Tectona grandis* (a) sori on lower leaf (b) urediniospores of *O. tectonae* (c)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Figure 3.4.3 Rust disease symptom on *Chrysanthemum* (a-d) teliospore of *P. horiana* (e)

Figure 3.4.4 Rust disease symptom on coffee and sori of *H. vastatrix*

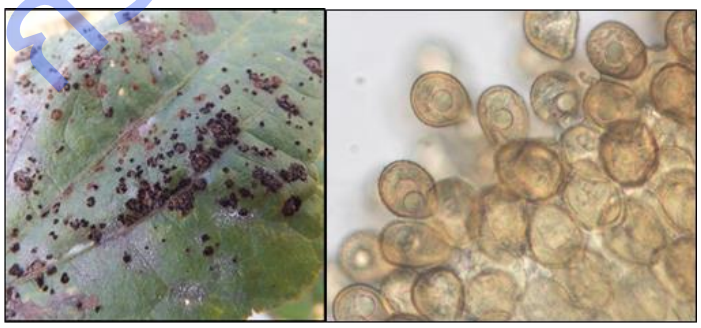


Figure 3.4.5 Aecia of rust on *P. vulgaris* and teliospore of *U. appendiculatus*

กรมวิชาการเกษตร

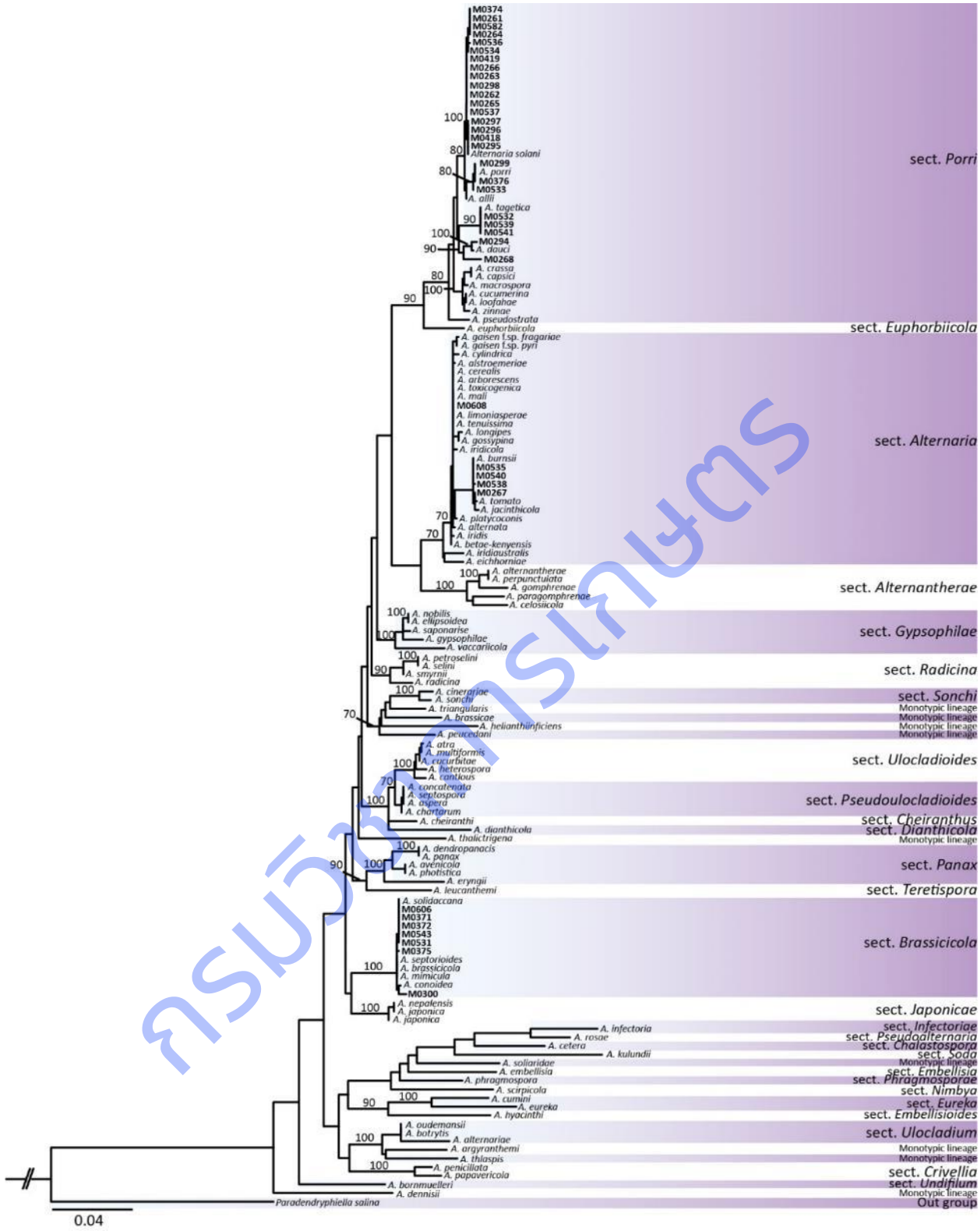
Figure 3.4.6 Rust disease symptom on *Glycine max*

Figure 3.4.7 Rust disease symptom on *Zea mays*

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



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

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.*

กรมวิทยาศาสตร์

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

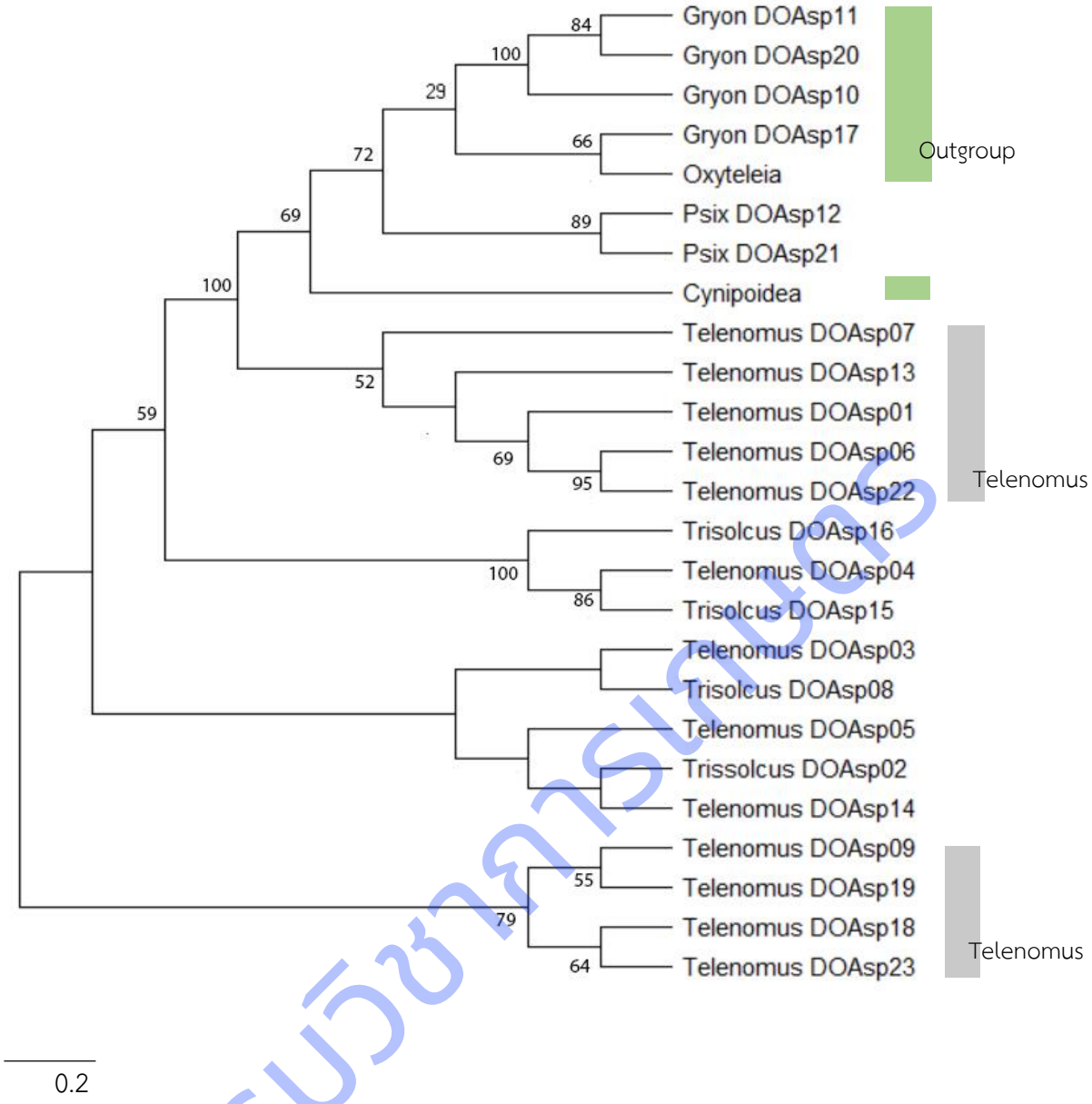


Figure 3.6.1 Relationships of the selected taxa of the subfamily Telenominae derived from Maximum likelihood analysis of partial cytochrome oxidase subunit 1 (CO1) gene (~ 600 bp), executed on MEGA (1000 standard bootstrap replicates) with Jukes-Cantor model, uniform rates using all codon positions. Bootstrap values above 50% indicated on branches.

กรมวิชาการเกษตร

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
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

กรมวิทยาศาสตร์

Figure 3.7.1 Distribution map of spider genus *Latrodectus* in Thailand

กรมวิชาการเกษตร

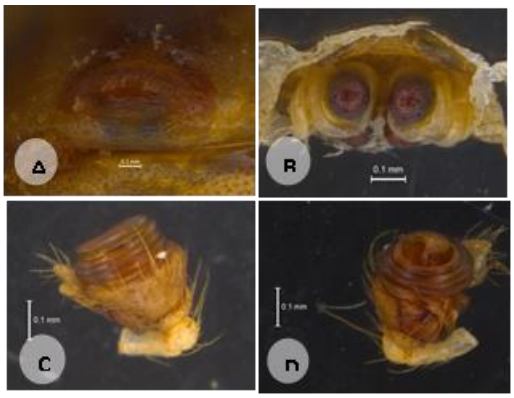


Figure 3.7.2 Genitalia and Epigyne structure of *Latrodectus. geometricus* A**.** Epigyne B. Spermathecae and copulatory duct C, D. left palpus show embolus with 4 loops

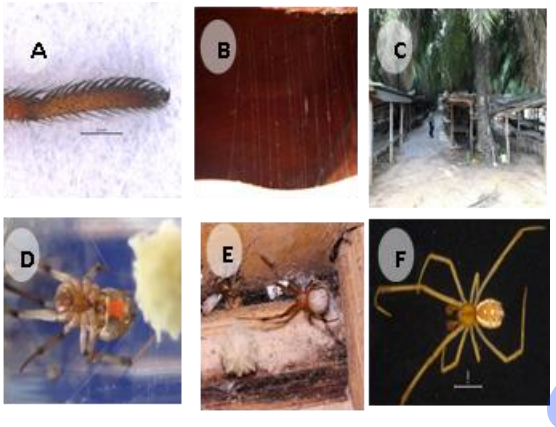


Figure 3.7.3 . *Latrodectus geometricus* A. the comb on the fourth tarsus B. gumfoot lines _C. Habitat D. red abdominal ‘‘hour-glass’’ mark, E. Adult female with egg sac F. Adult male

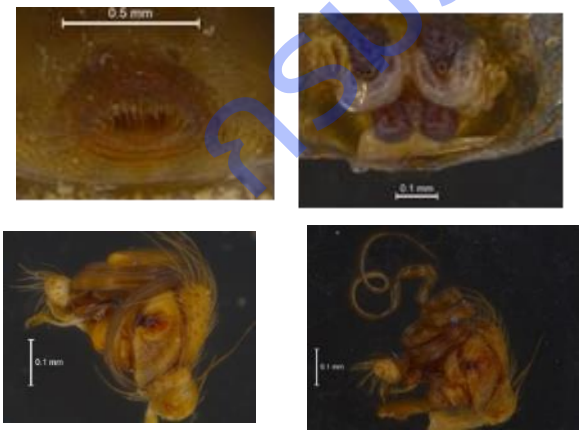


Figure 3.7.4 Genitalia and Epigyne structure *of Latrodectus. elegans* A. Epigyne

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

Figure 3.8.1. The structure of conidia and conidiophore showed on insects body and appeared on the ground (a,b,c)

กรมวิชาการเกษตร

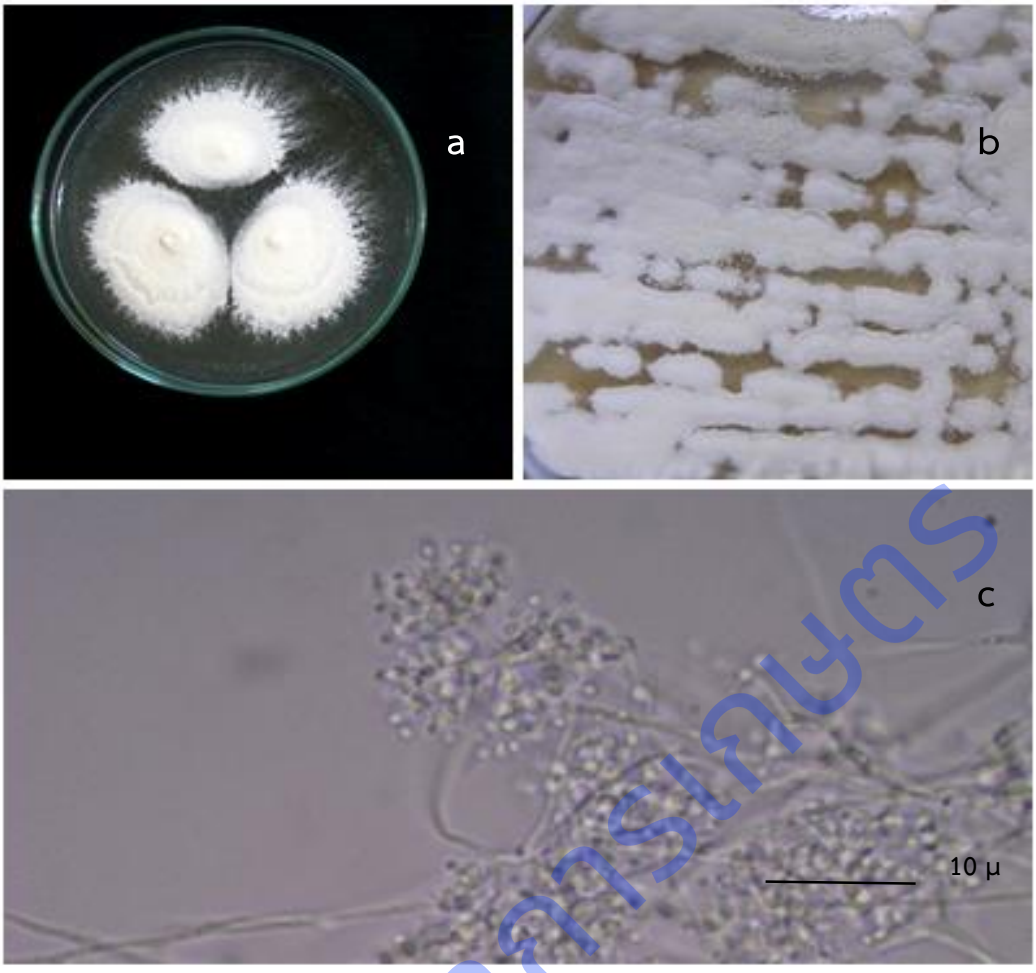


Figure 3.8.2 The colony of *B. bassiana* strain DOA-B4 on MEA and structure of conidiophore and conidia on microscope which representative of complex species

กรมวิชาการเกษตร

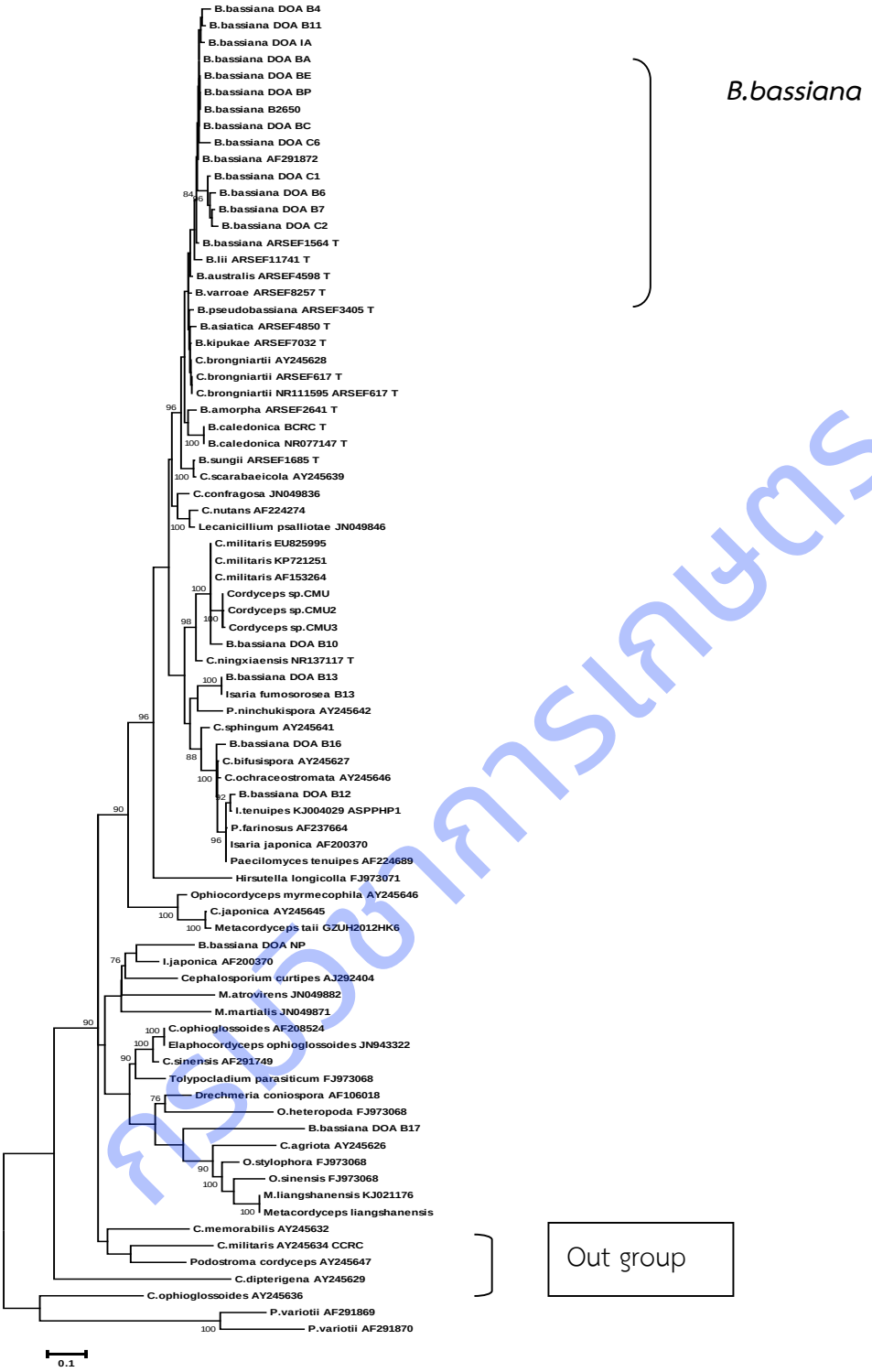


Figure 3.8.6. Maximum likelihood phylogentic tree of the internal transcribed spacer (ITS) in entomopathogenic fungi group. Bootstrap value (1,000 replication) are indicated above the node.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตร

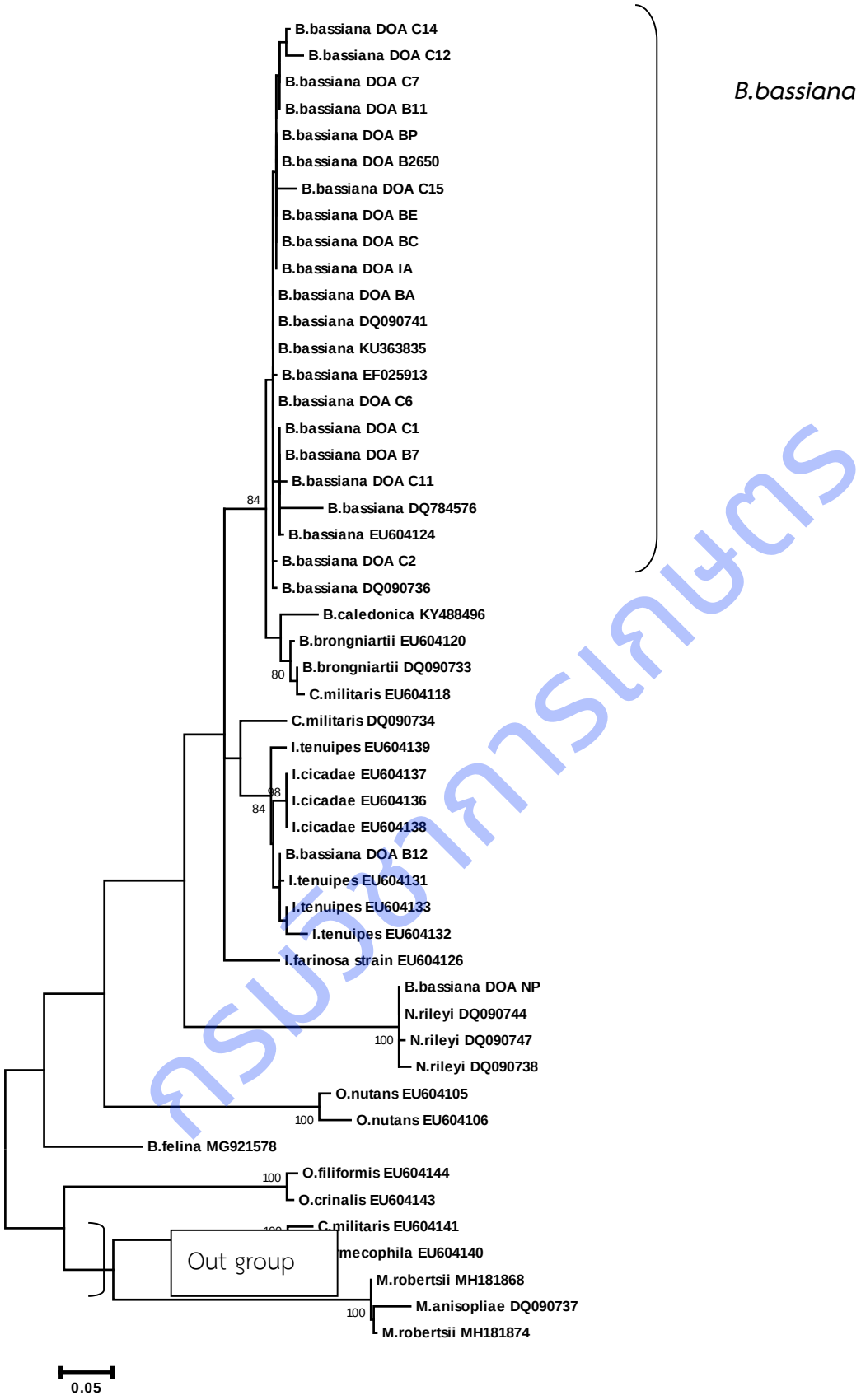


Figure 3.8.7 Maximum likelihood phylogentic tree of β t gene in *B. bassiana* complex species Bootstrap value (1,000 replication) are indicated above the node.

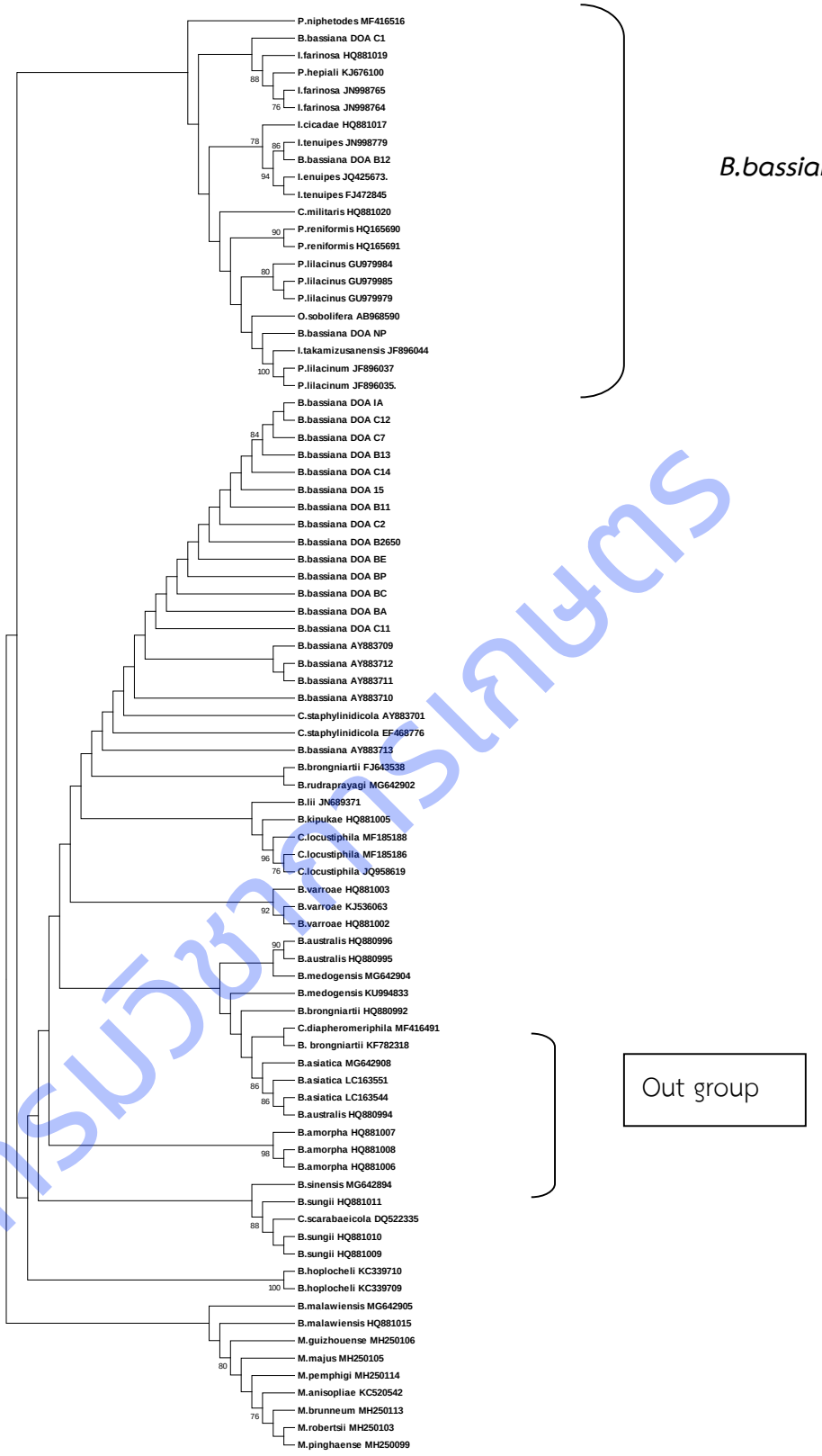


Figure 3.8.6. Maximum likelihood phylogentic tree of the Elongation factor in *B. bassiana* complex species. Bootstrap value (1,000 replication) are indicated above the node.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตร

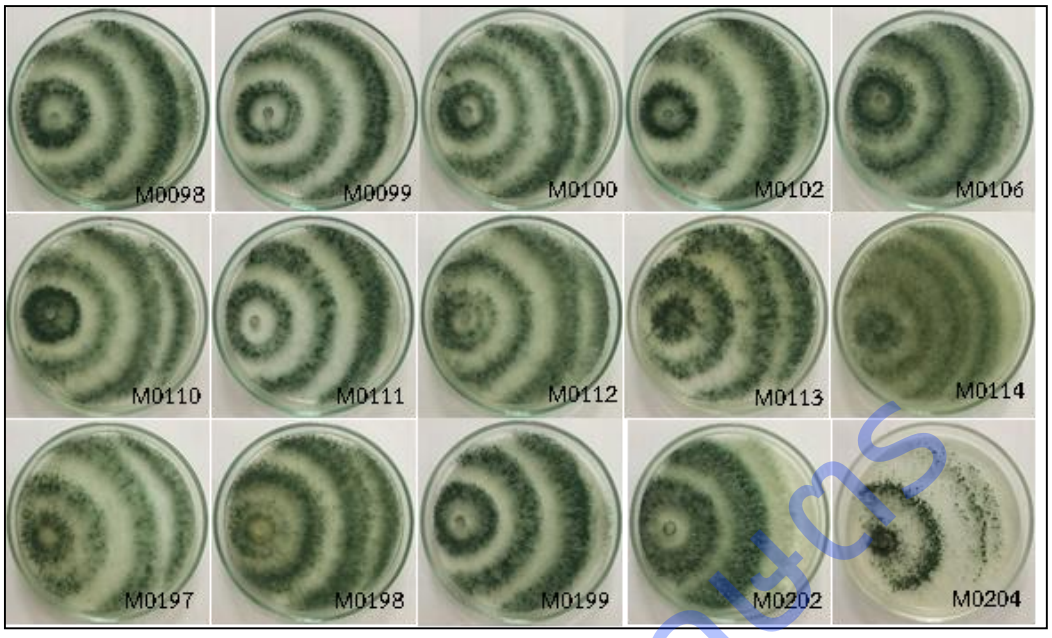


Figure 3.9.1: *Trichoderma* used in this study.

กรมวิชาการเกษตร

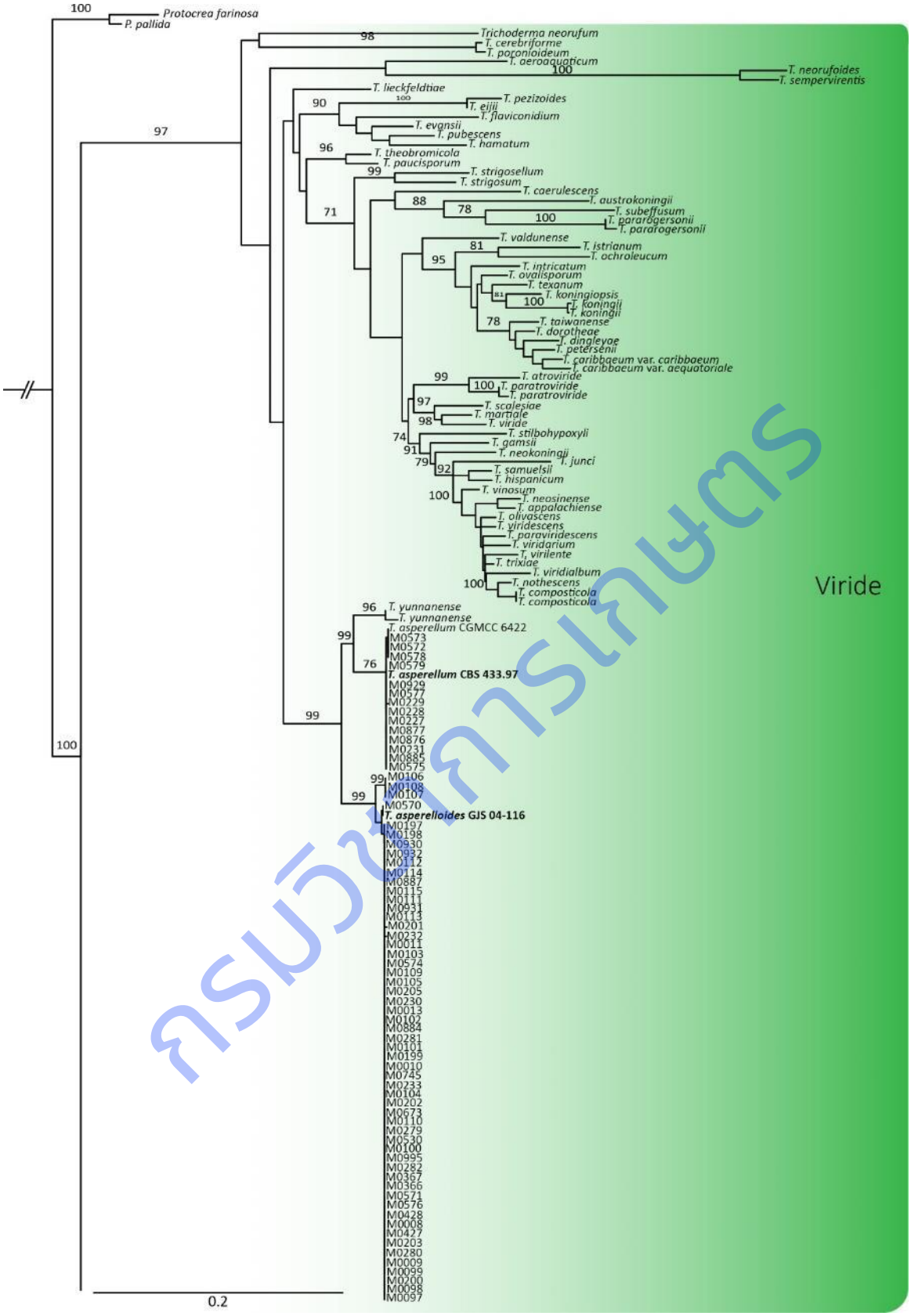


Figure 3.9.2: Phylogram obtained in a maximum likelihood search in RAxML of dataset of ITS and tef1 gene regions. Bootstrap support values (≥70%) from 1,000 replicates above nodes.

กรมวิชาการเกษตร

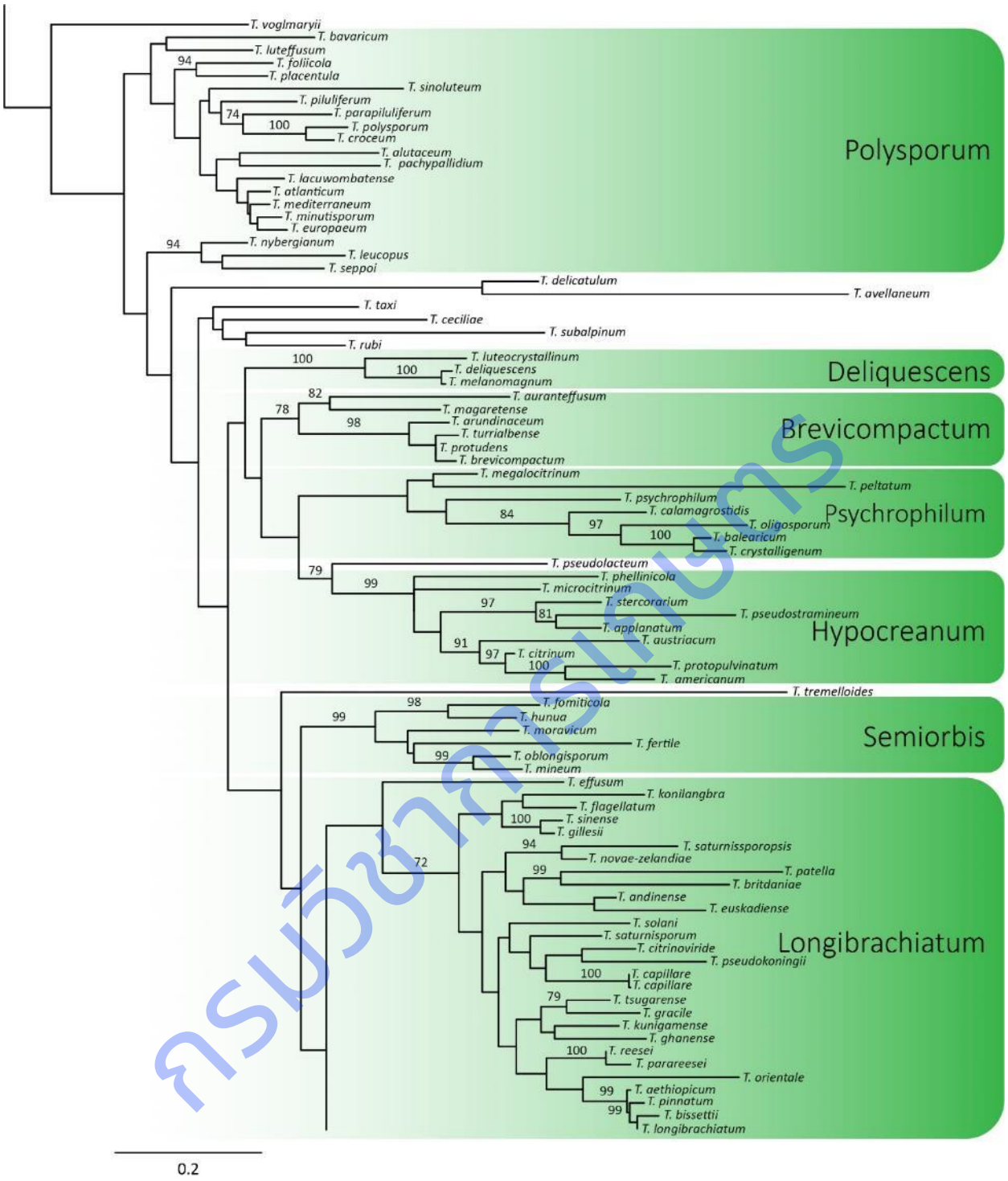


Figure 3.9.2: Continued

กรมวิทยาศาสตร์

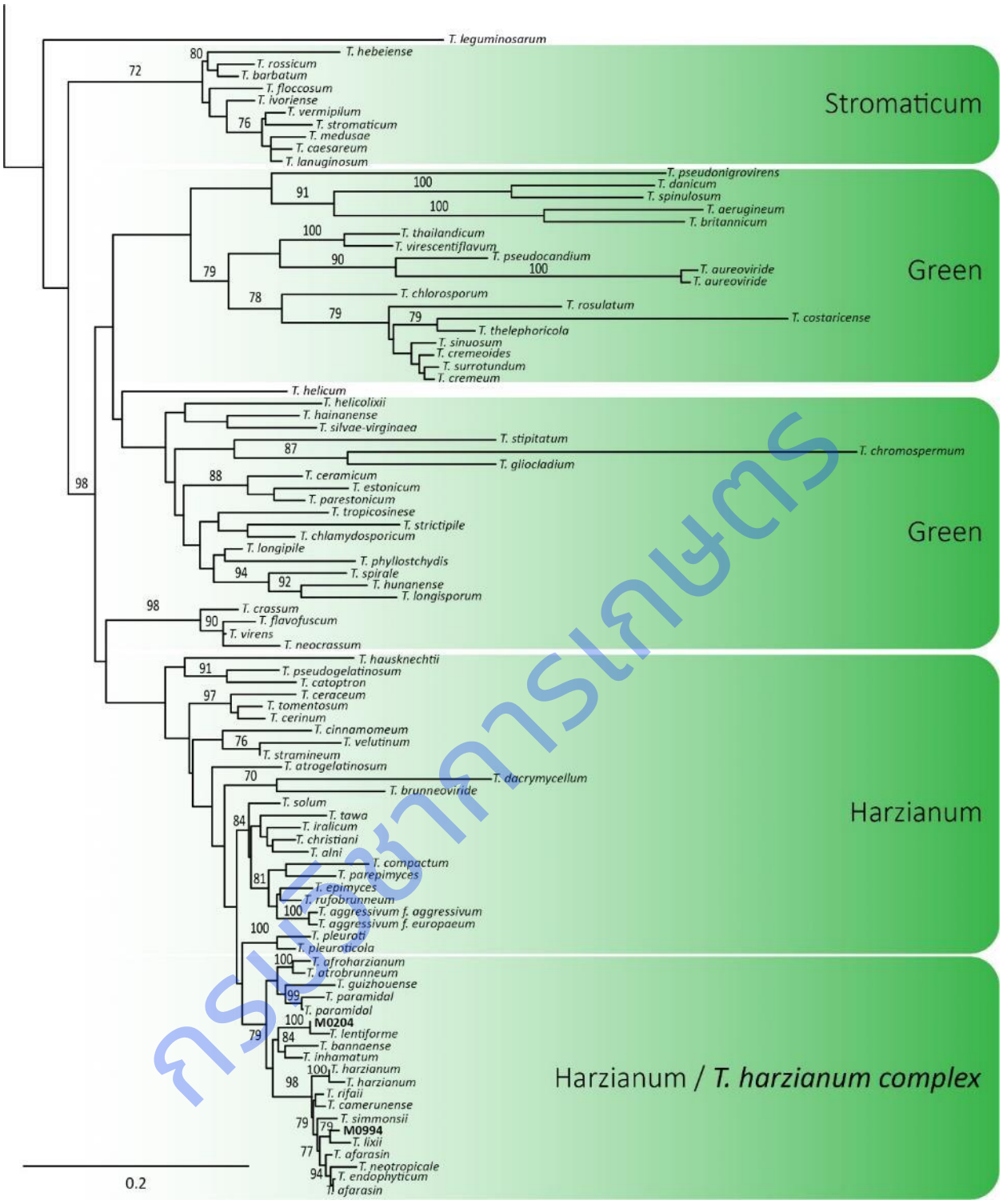


Figure 3.9.2: Continued

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.9.3: Colony and conidiophores with phialides (40x) of *Trichoderma lentiforme* (M0204)

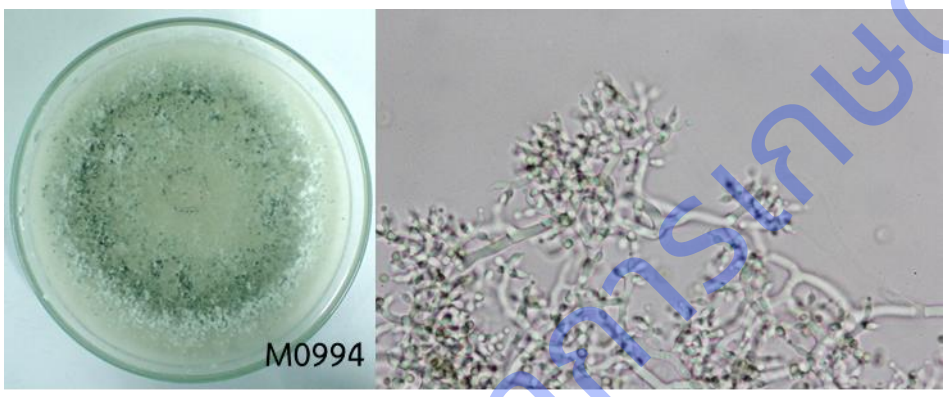


Figure 3.9.4: Colony and conidiophores with phialides (40x) of *Trichoderma lixii* (M0994)

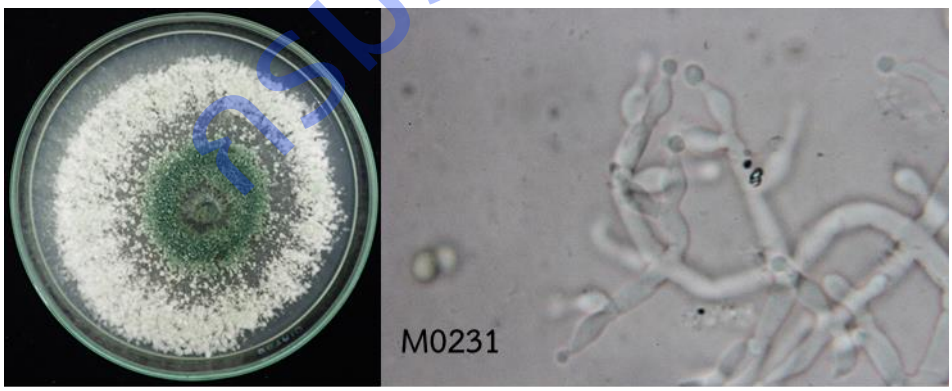


Figure 3.9.5: Colony and conidiophores with phialides (100x) of *Trichoderma asperellum* (M0108)

กรมวิชาการเกษตร

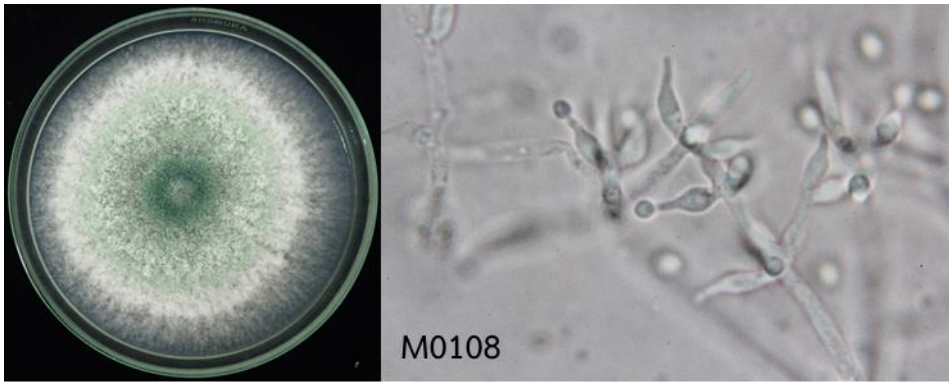


Figure 3.9.6: Colony and conidiophores with phialides (100x) of *Trichoderma asperelloides* (M0108)

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 3.10.1 ก. การเก็บตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บจากโรงสีข้าว ข. การเก็บตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บ ณ ด่านตรวจพืช

ภาพที่ 3.10.2 การจำแนกชนิดของตัวอย่างแมลงศัตรูโรงเก็บด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

กรมวิชาการเกษตร

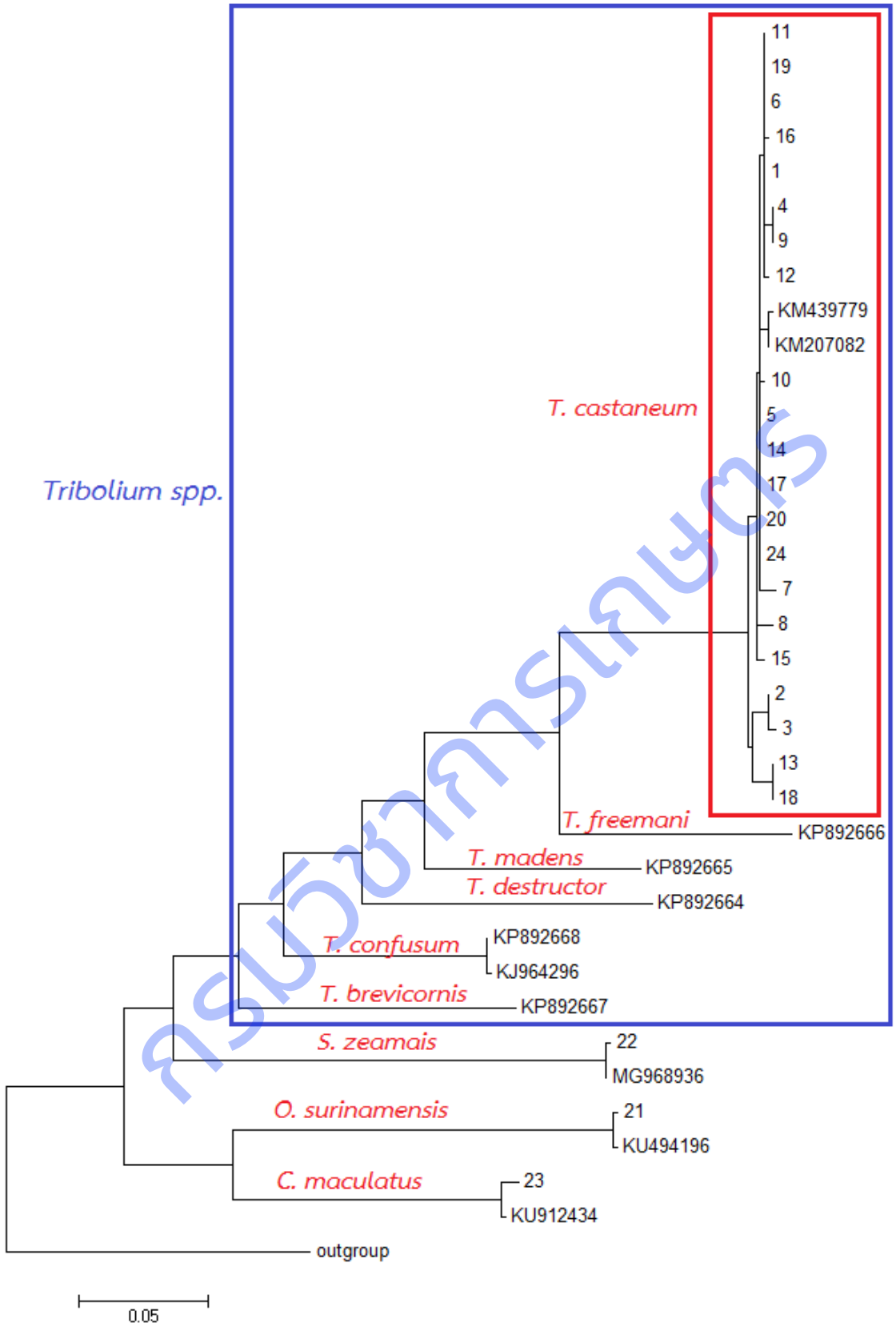
ภาพที่ 3.10.3 ภาพตัวอย่างของแมลงศัตรูโรงเก็บ
ก. มอดแป้ง ข. มอดฟันเลื่อย ค. ด้วงงวงข้าวโพด ง. ด้วงถั่วเขียว

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3.10.1 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



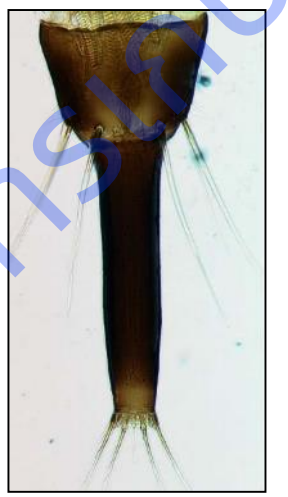
ภาพที่ 3.10.4 แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่สร้างโดยโปรแกรม MEGA V. 5.0 ด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML tree)

กรมวิชาการเกษตร

A

B

C



D

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

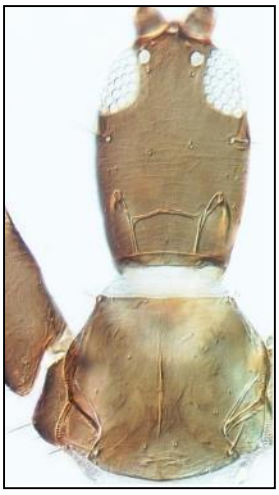
Figure 3.11.2 Morphology of Gold-tipped tubular thrips; *Haplothrips gowdeyi* (Franklin, 1908)

A. Slide permanent B. Head-Pronotum

C. Mesopresternum D. Tergites IX–X (tube)

กรมวิชาการเกษตร

A



B

C

D

Figure 3.11.3 Morphology of *Podothrips* sp.

A. Slide permanent B. Head-Pronotum

C. Metanotum D. Fore tibia and tarsus

กรมวิชาการเกษตร

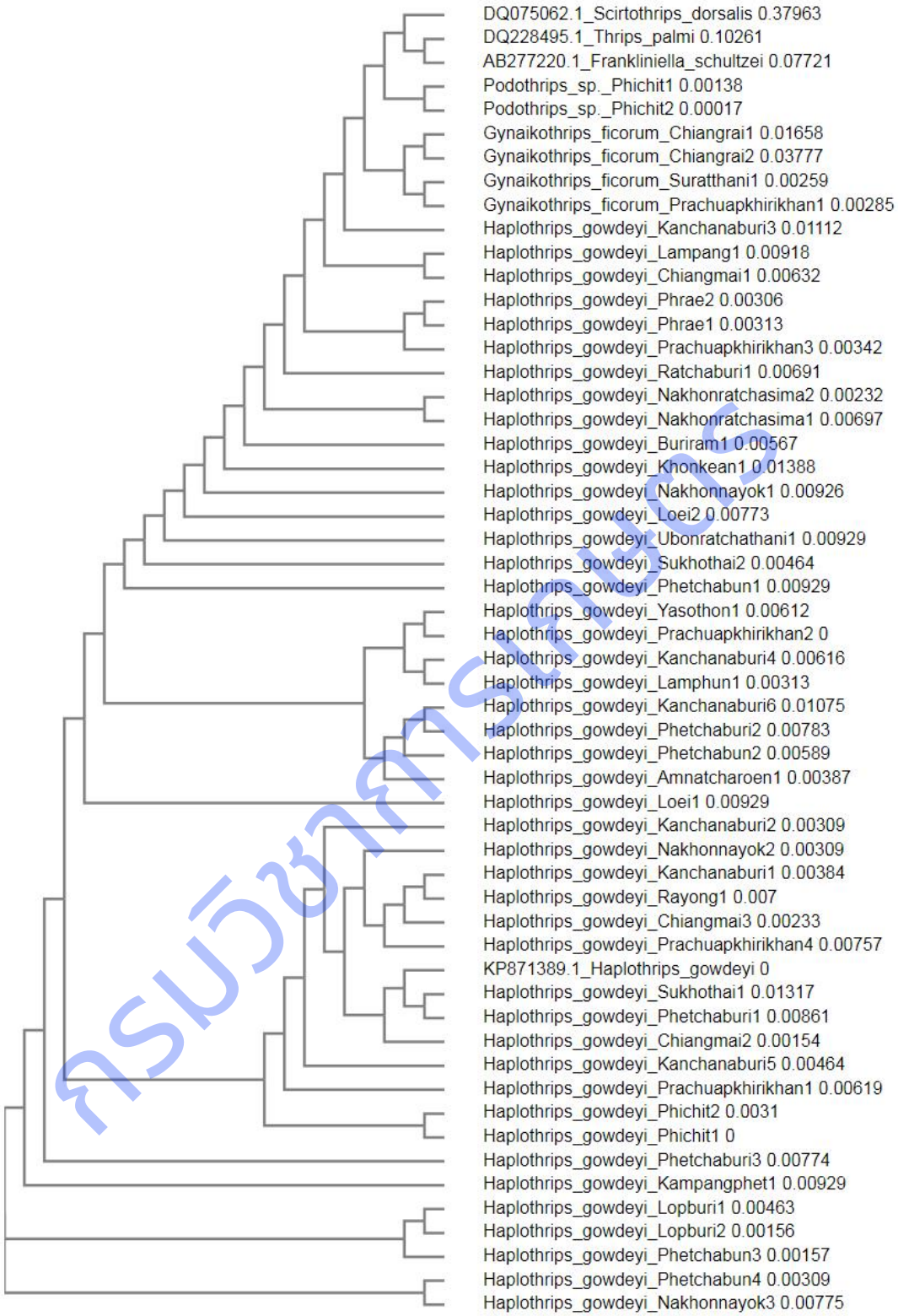


Figure 3.11.4 Phylogenetic trees showing the relationship among three thrips populations which collected from the other crops in Thailand comparing with *Scirtothrips dorsalis*, *Thrips palmi* and *Frankliniella schultzei*

กรมวิชาการเกษตร

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

กรมวิชาการเกษตร

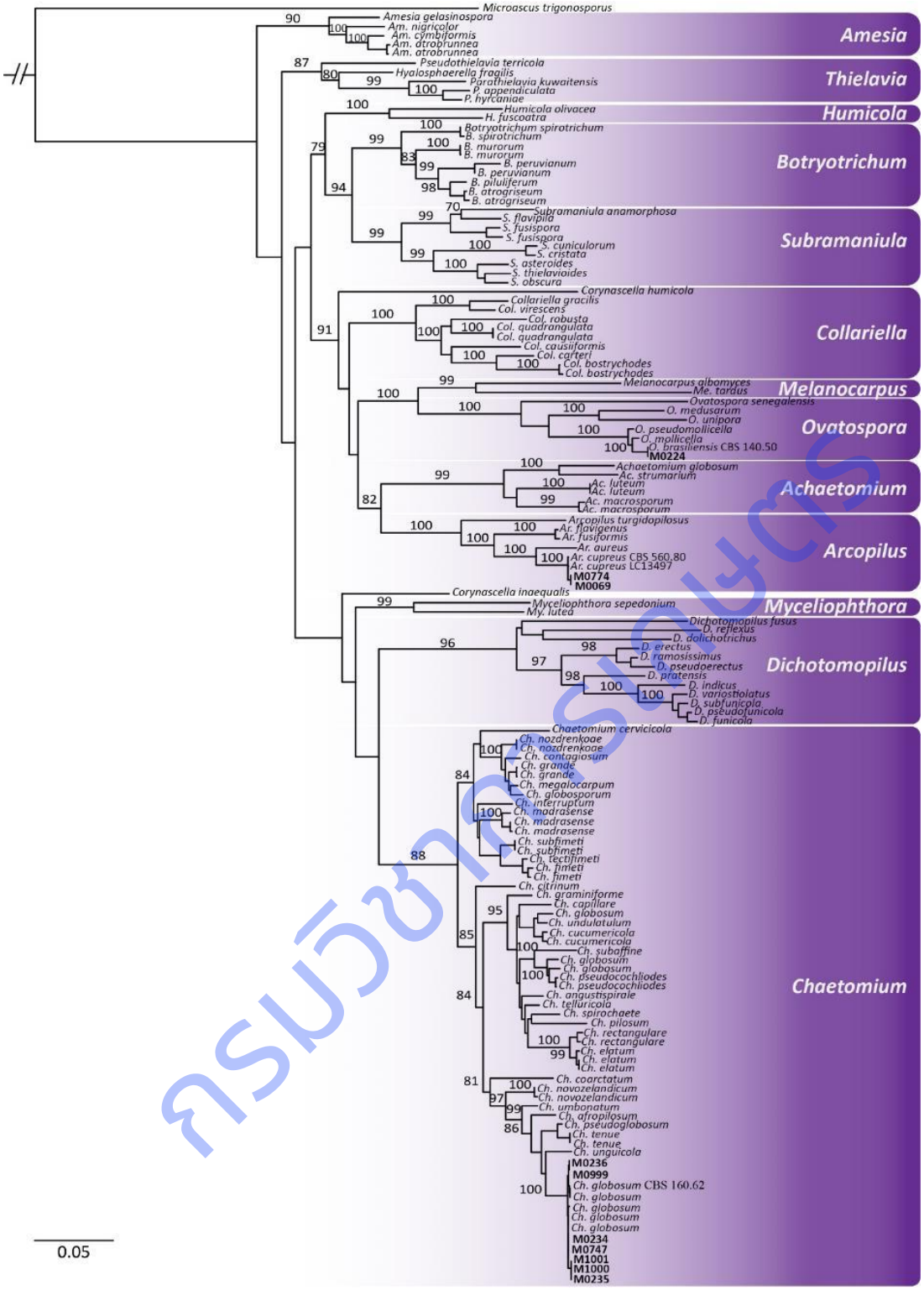


Figure 3.12.1: Phylogram obtained in a maximum likelihood search in RAxML of dataset of ITS-LSU-rpb2-TEF1-TUB2 gene regions. Bootstrap support values (≥70%) from 1,000 replicates above nodes.

กรมวิชาการเกษตร

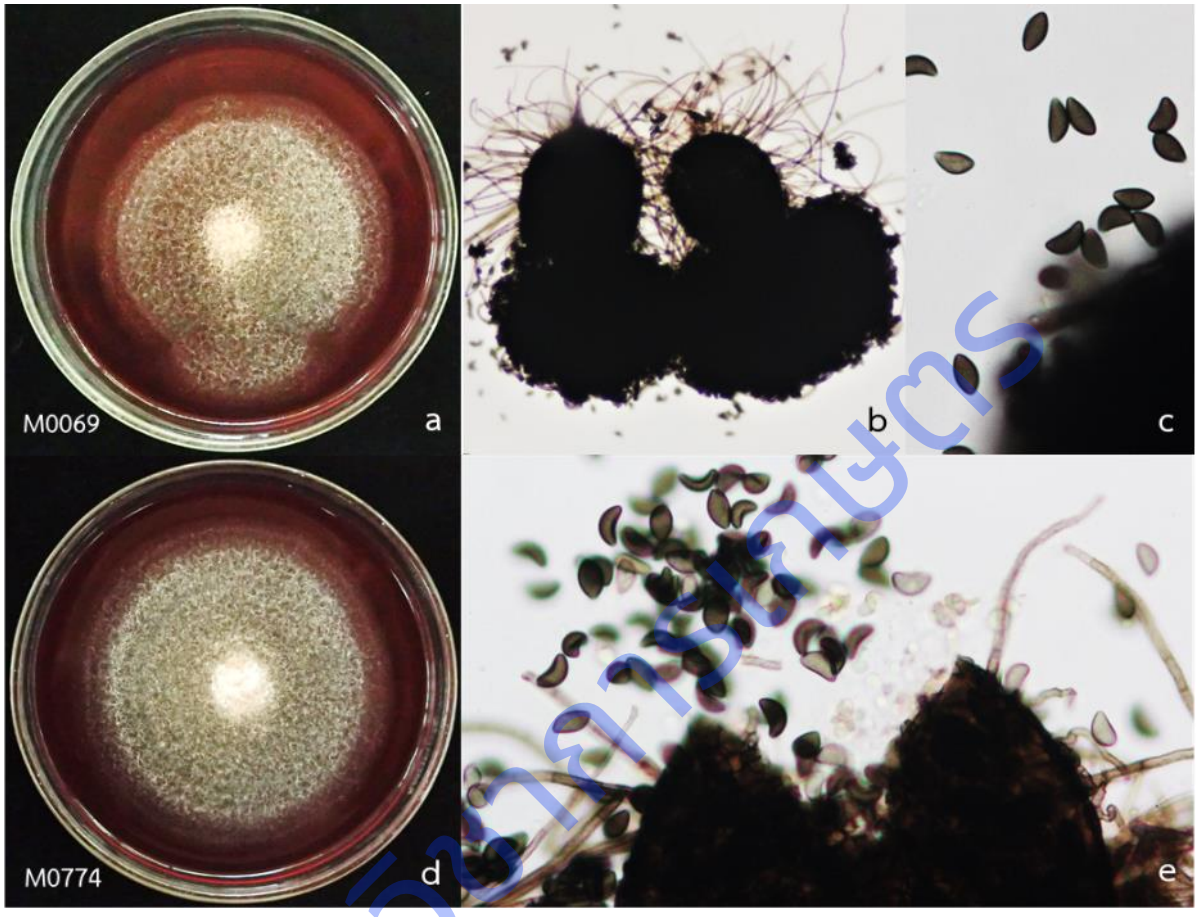


Figure 3.12.2: *Arcopilus cupreus* (syn. *Chaetomium cupreum*)

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

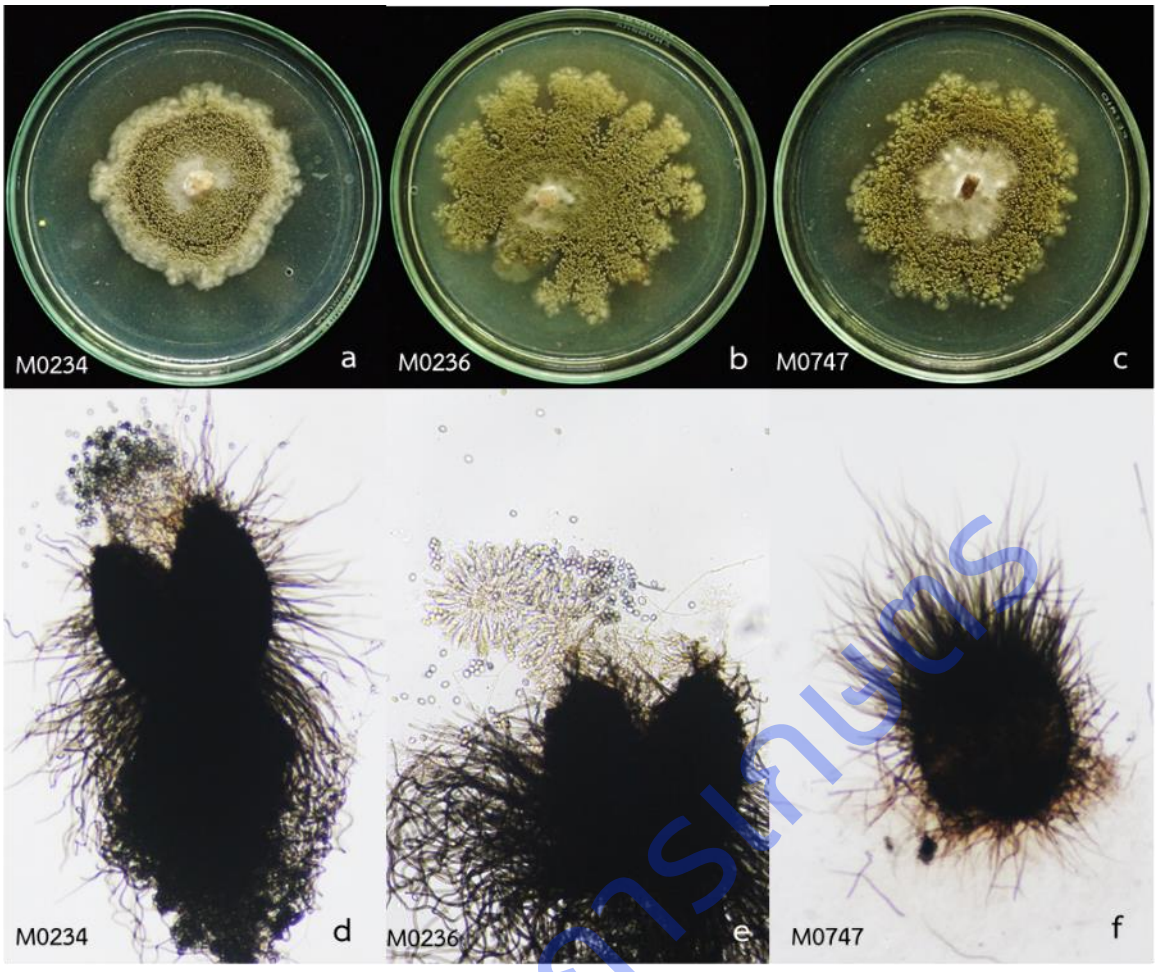


Figure 3.12.3: *Chaetomium globosum*

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)

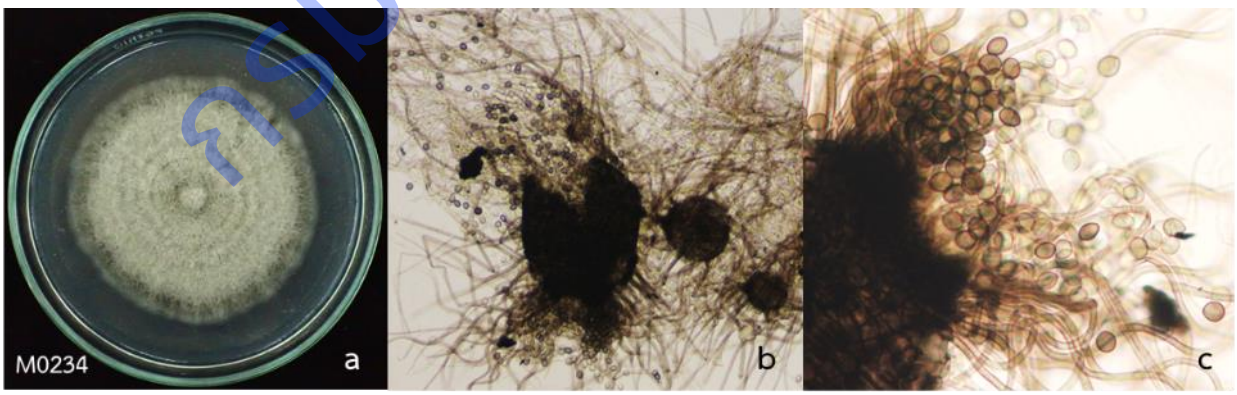


Figure 3.12.4: *Ovatospora brasiliensis* (syn. *Chaetomium brasiliensis*)

a. colonies of *O. brasiliensis* on PDA;

b. ascomata pale olivaceous grey to mouse grey (10x)

c. ascospores olivaceous brown when mature, ovate (40x)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

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

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)

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)

กรมวิชาการเกษตร

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

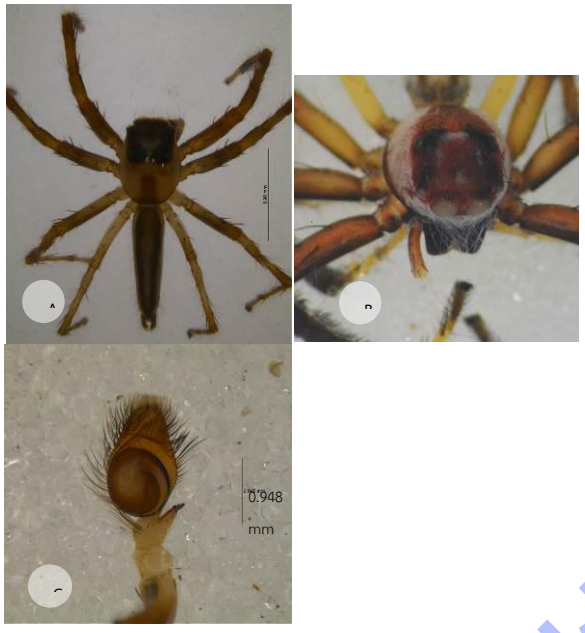


Figure 3.13.6 *Telamonia dimidiata* (Simon, 1899); male abdomen dorsal view (A), chelicera and carapace (B), left palp; ventral view (B)

Figure 3.13.7 *Telamonia festiva* Thorell, 1887; male abdomen dorsal view (A), left palp; ventral view (B), lateral view (C)

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.13.8 *Thiania bhamoensis* Thorell, 1887; male abdomen dorsal view (A), left palp; ventral view (B), lateral view (C)

กรมวิชาการเกษตร

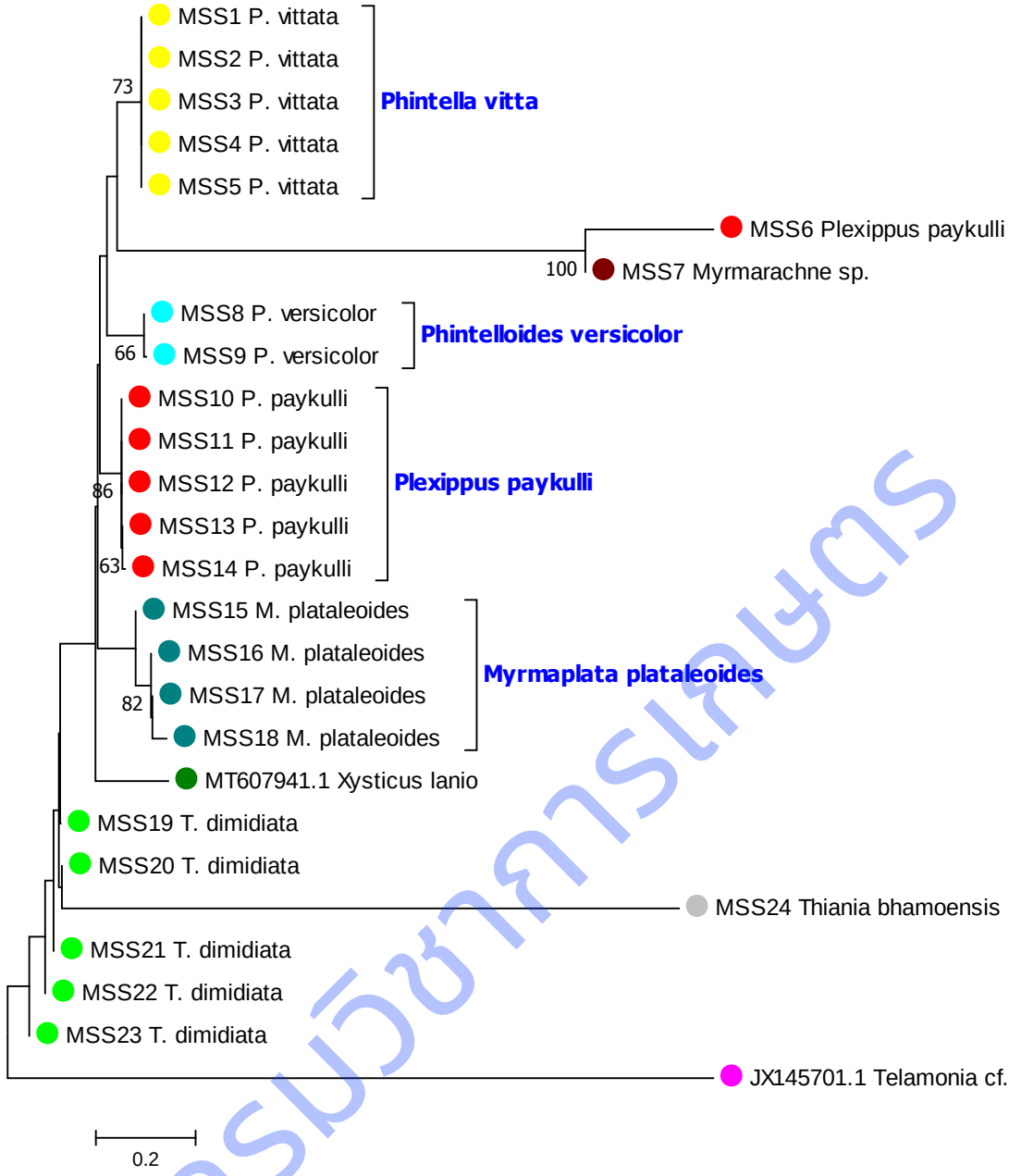


Figure 3.13.9 Neighbor joining analysis phylogenetic tree based on *COX*1 gene sequences. *Xysiticus lanio* was used as outgroup. The scale bar = 0.02 substitutions per nucleotide position. Percent bootstrap values above 50 (1000 replicates) are indicated at notes.

กรมวิชาการเกษตร

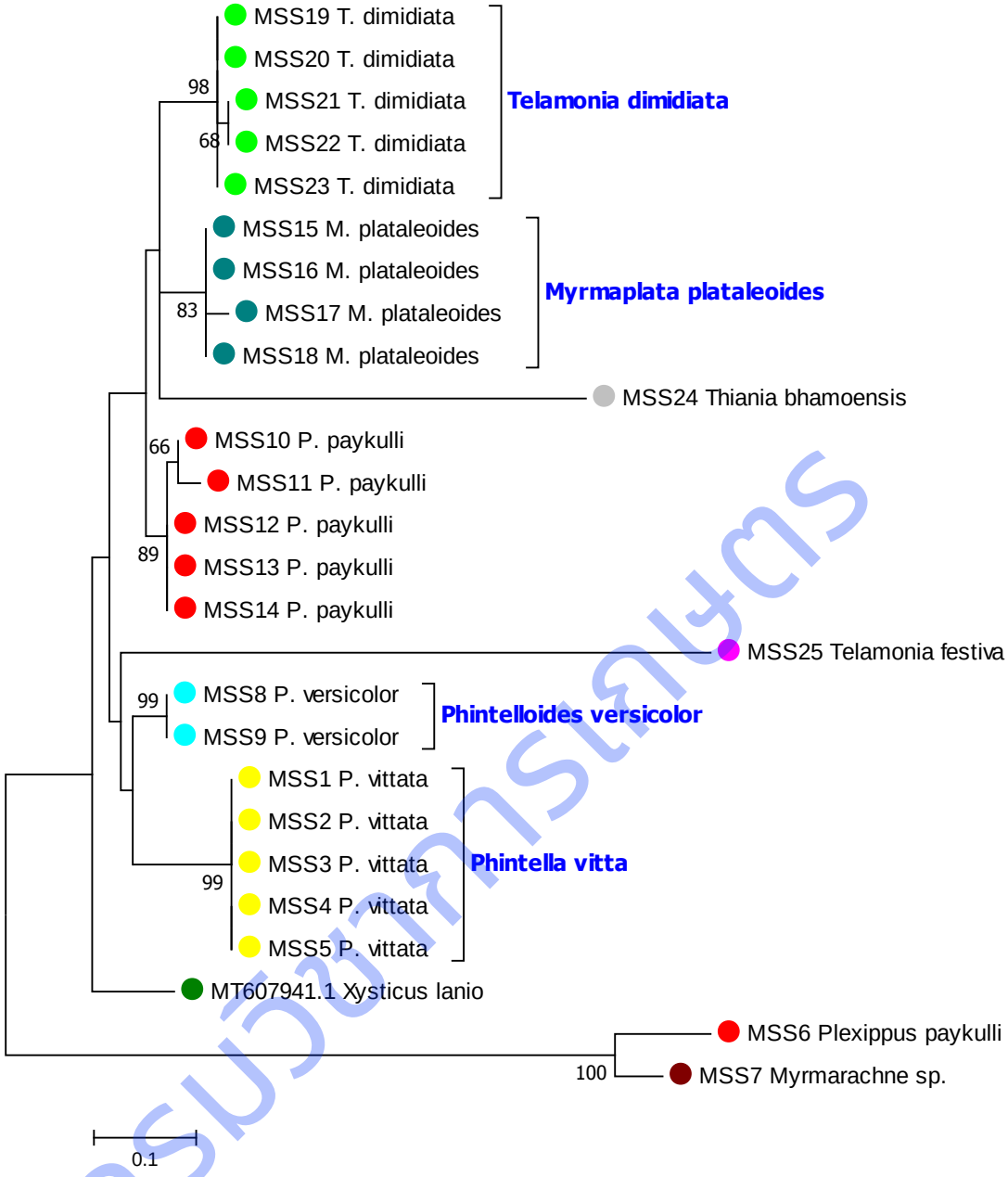
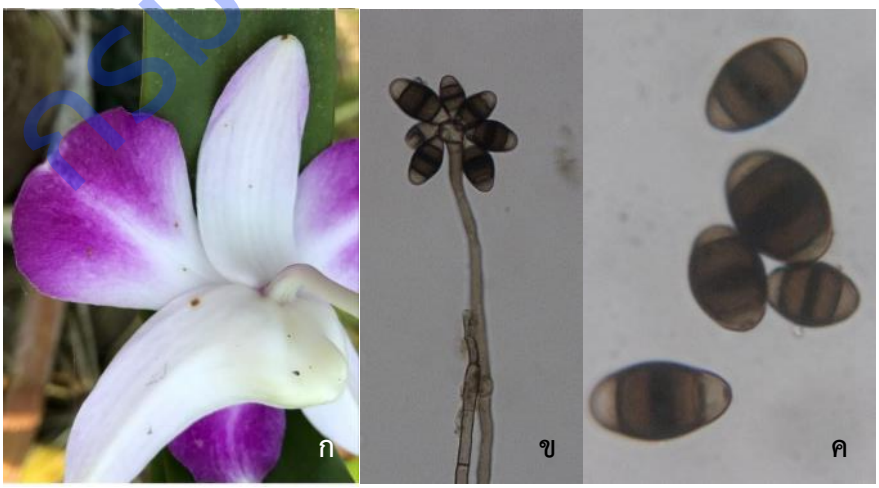


Figure 3.13.10 Maximum likelihood phylogenetic tree based on *COX*1 gene sequences, showing the phylogenetic relationship among Salticidae Specimens and *Xysiticus lanio* was used as outgroup. The number of sites are 650, and scale bar = 0.01 substitutions per nucleotide position. Percent bootstrap values above 50 (1000 replicates) are indicated at notes.

กรมวิทยาศาสตร์

ภาพที่ 3.14.1 ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการใบจุดและใบไหม้ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Curvularia*

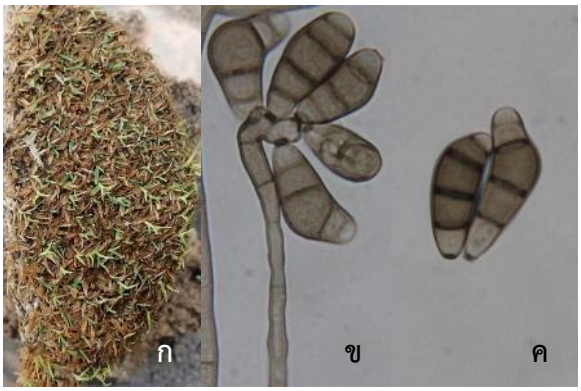


ภาพที่ 3.14.2 *Curvularia eragrostidis* : ก) ลักษณะอาการดอกจุดสนิมของกล้วยไม้

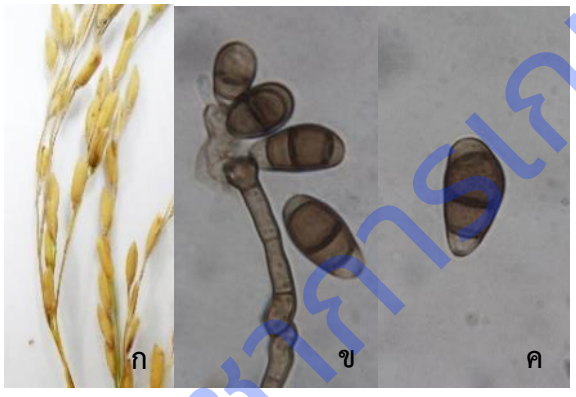
ข) ก้านชูสปอร์และโคนิเดีย

ค) โคนิเดีย

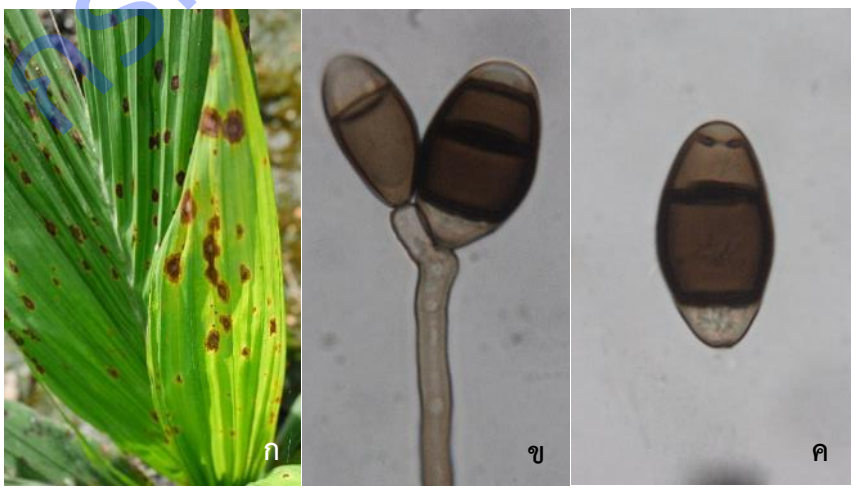
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3.14.3 *Curvularia geniculata* : ก) ลักษณะอาการใบไหม้ของหญ้าสนามกอล์ฟ
ข) ก้านชูสปอร์และโคนิเดีย
ค) โคนิเดีย



ภาพที่ 3.14.4 *Curvularia lunata* : ก) ลักษณะอาการเมล็ดด่างข้าว
ข) ก้านชูสปอร์และโคนิเดีย
ค) โคนิเดีย



ภาพที่ 3.14.5 *Curvularia oryzae* : ก) ลักษณะอาการใบจุดปาล์มน้ำมัน
ข) ก้านชูสปอร์และโคนิเดีย
ค) โคนิเดีย

กรมวิชาการเกษตร

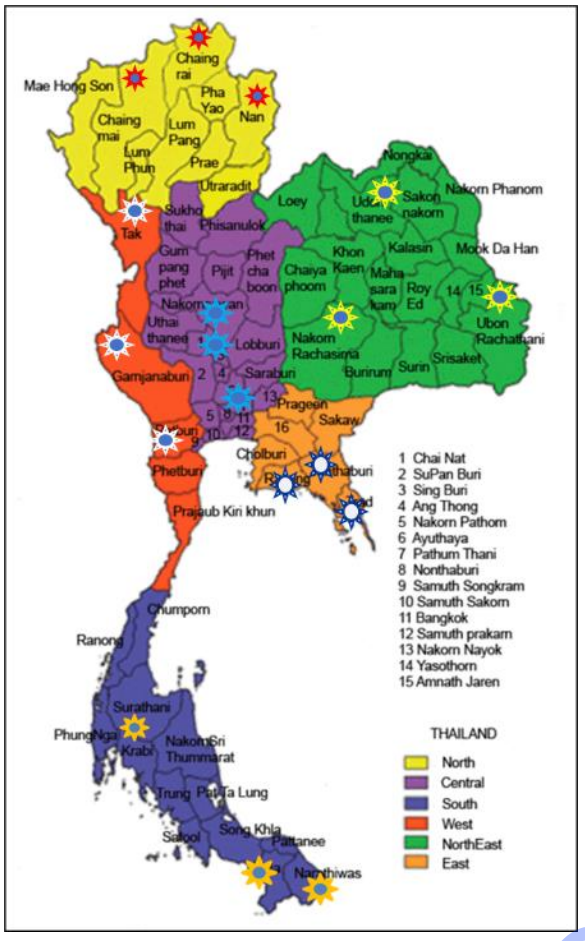


Figure 3.15.1 Locations of sampling sites in the six Thai biogeographical regions (North, Central, South, West, Northeast and East) at which fruit flies were collected.

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3.15.2 Fruit flies in Genus *Dacus*

(A) *D. formosanus* (B) *D. longicornis* (C) *D. sphaeroidalis*

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*

กรมวิชาการเกษตร

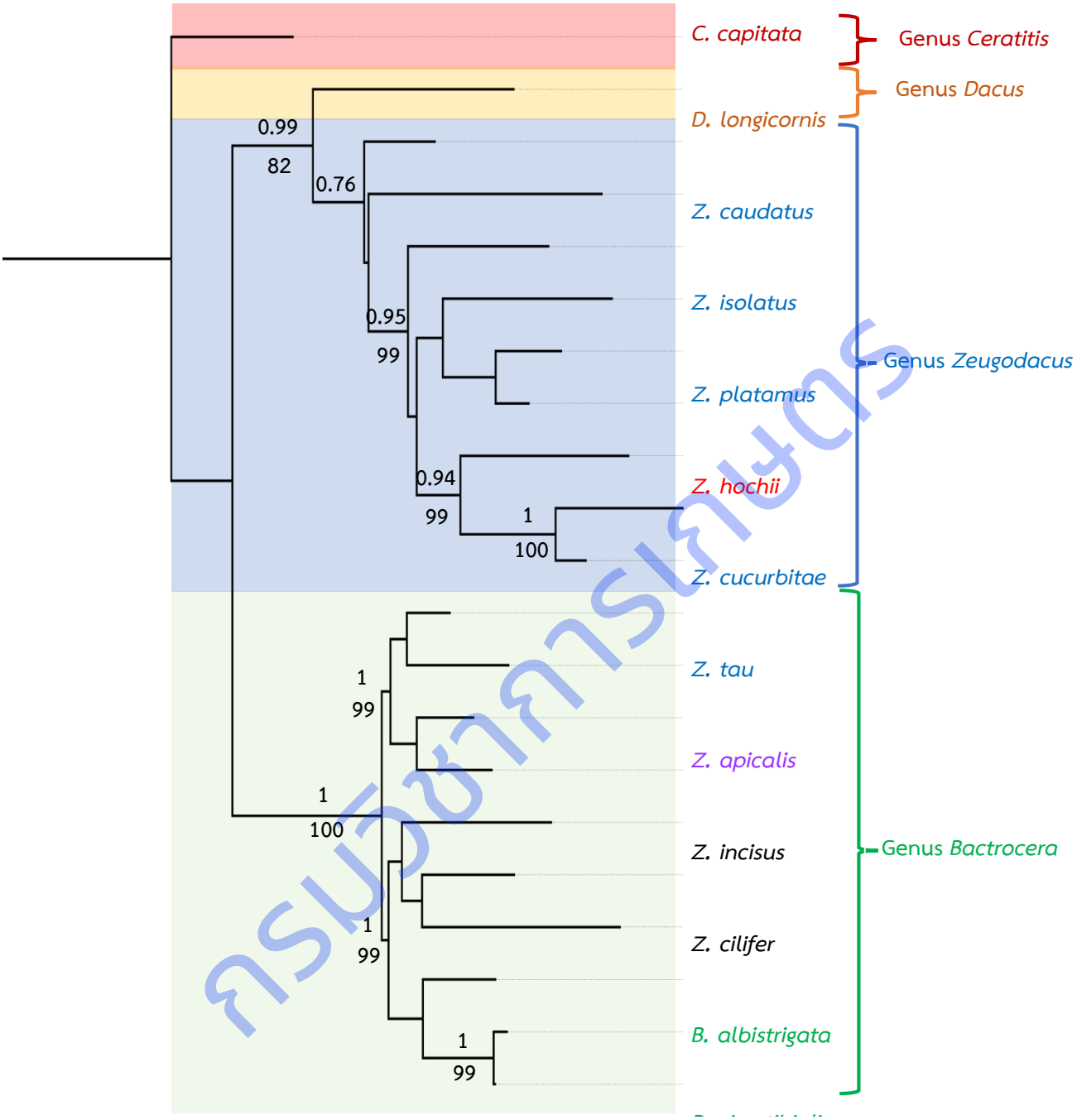


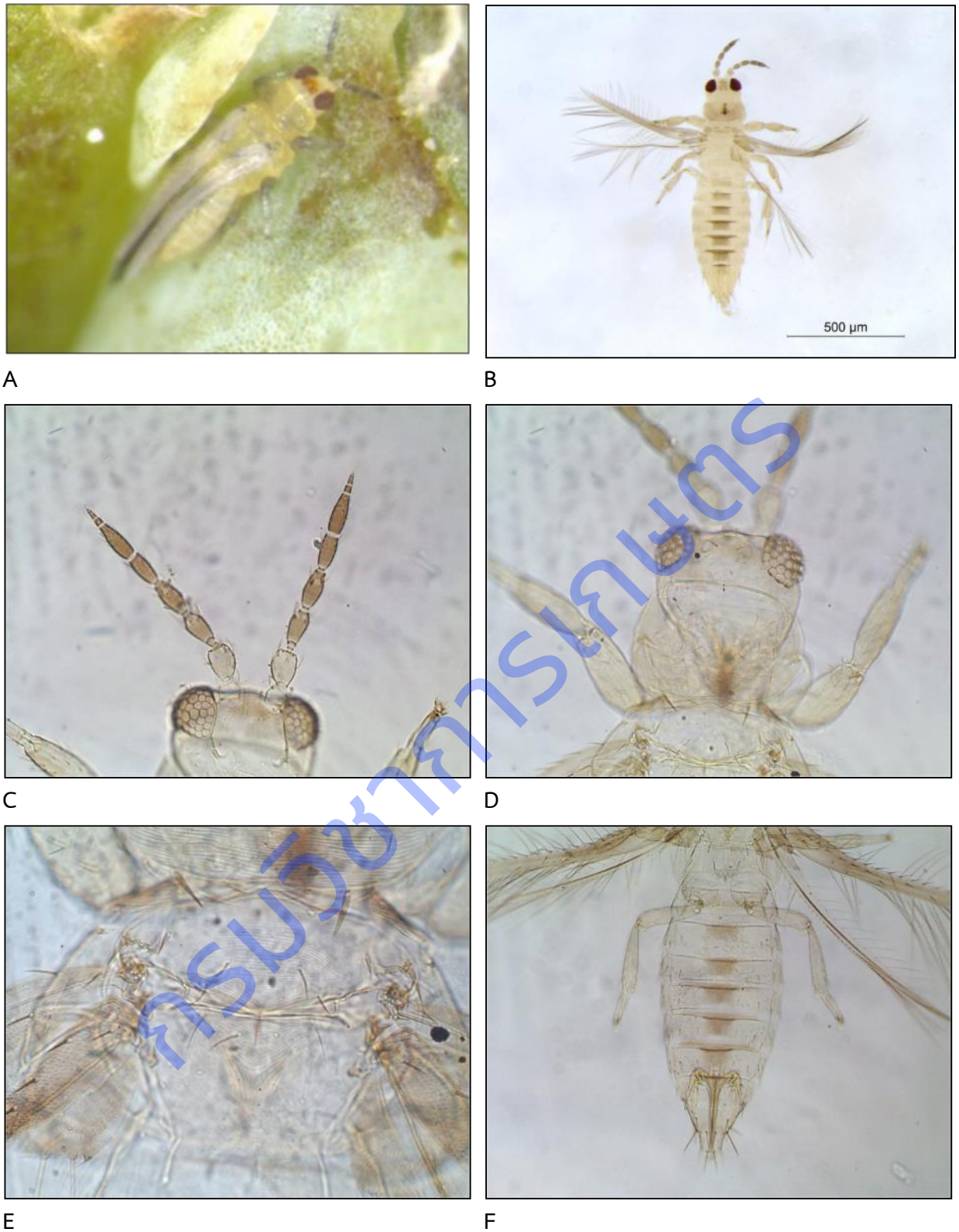
Figure 3.15.5 Phylogram obtained in a maximum likelihood search in RAxML of *cox1* gene regions. Bootstrap support values (≥70 %) from 1000 replicates above nodes. Posterior probabilities (≥ 0.95) summarised from 1500 converged trees obtained in a Bayesian search are shown below nodes.

Table 3.15.1 Scientific name of Dacini fruit fly in Thailand.

กรมวิชาการเกษตร

	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



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

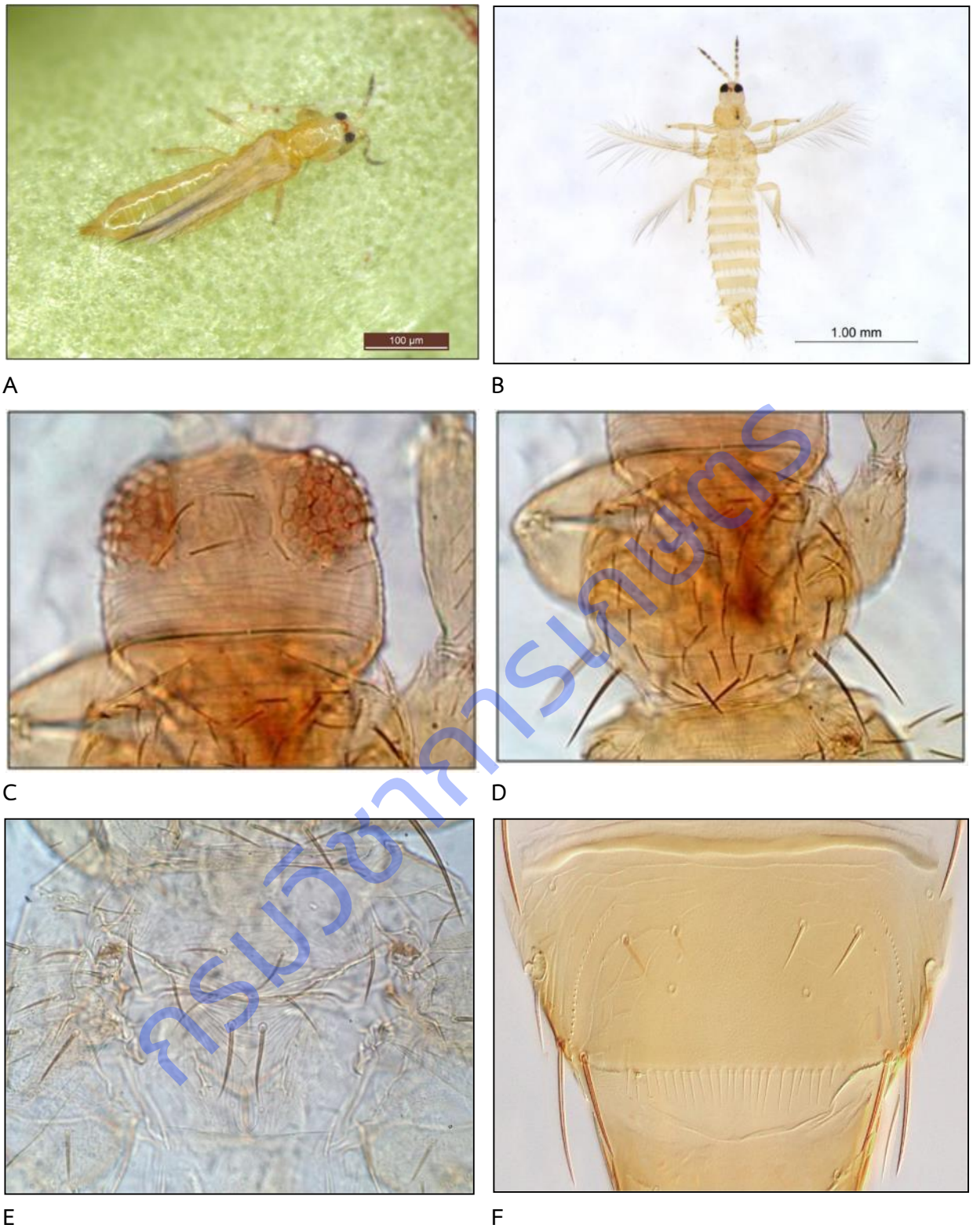


Figure 3.16.2 Morphology of cotton thrips; *Thrips palmi* (Karny)

A. Adult B. Slide permanent

C. Head D. Pronotum

F. Metanotum G. Abdominal tergite VIII

ศรีบวรการเกษตร

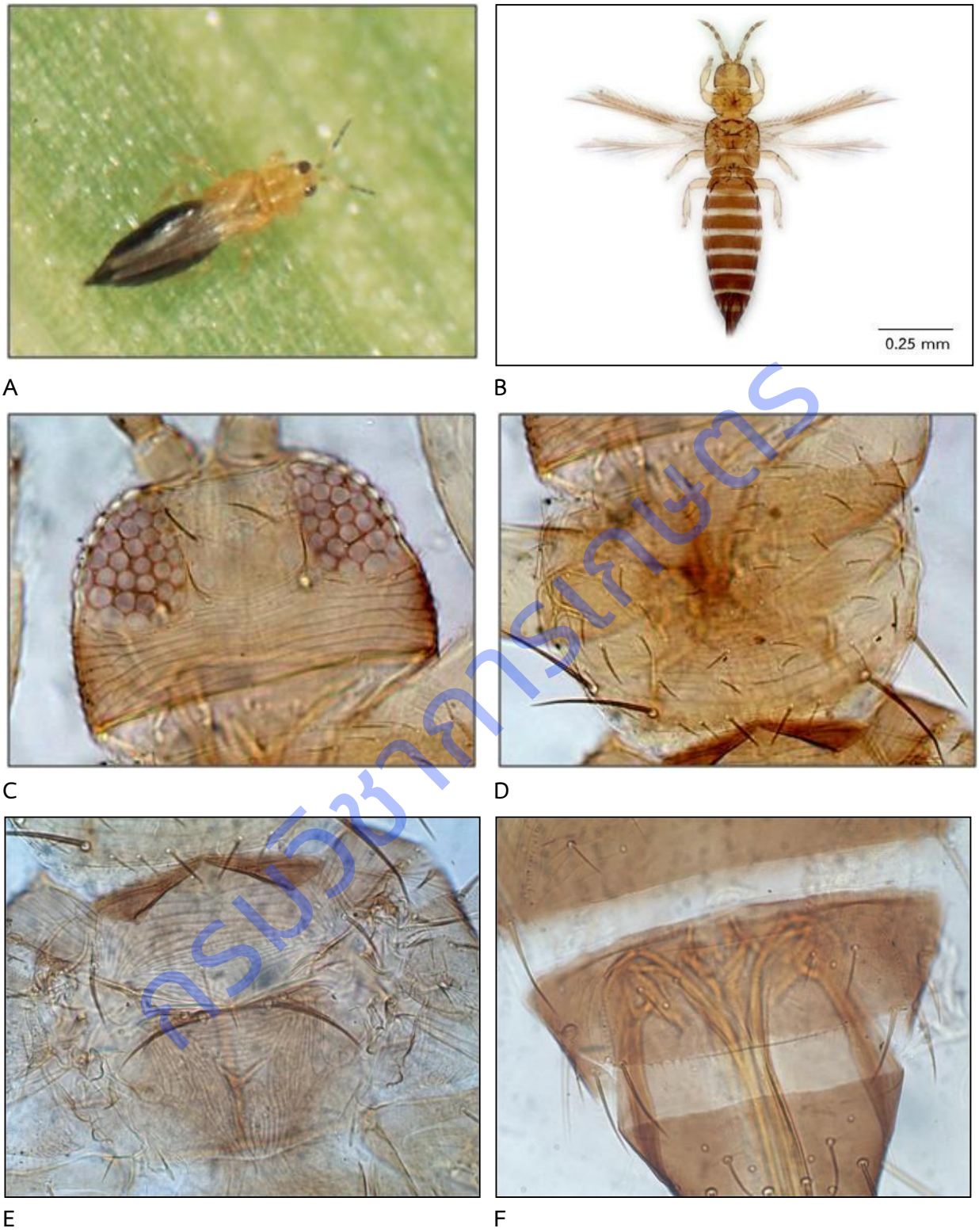


Figure 3.16.3 Morphology of Hawaiian thrips; *Thrips hawaiiensis* (Morgan)

A. Adult
B. Slide permanent
C. Head
D. Pronotum
F. Metanotum
G. Abdominal tergite VIII

กรมวิชาการเกษตร

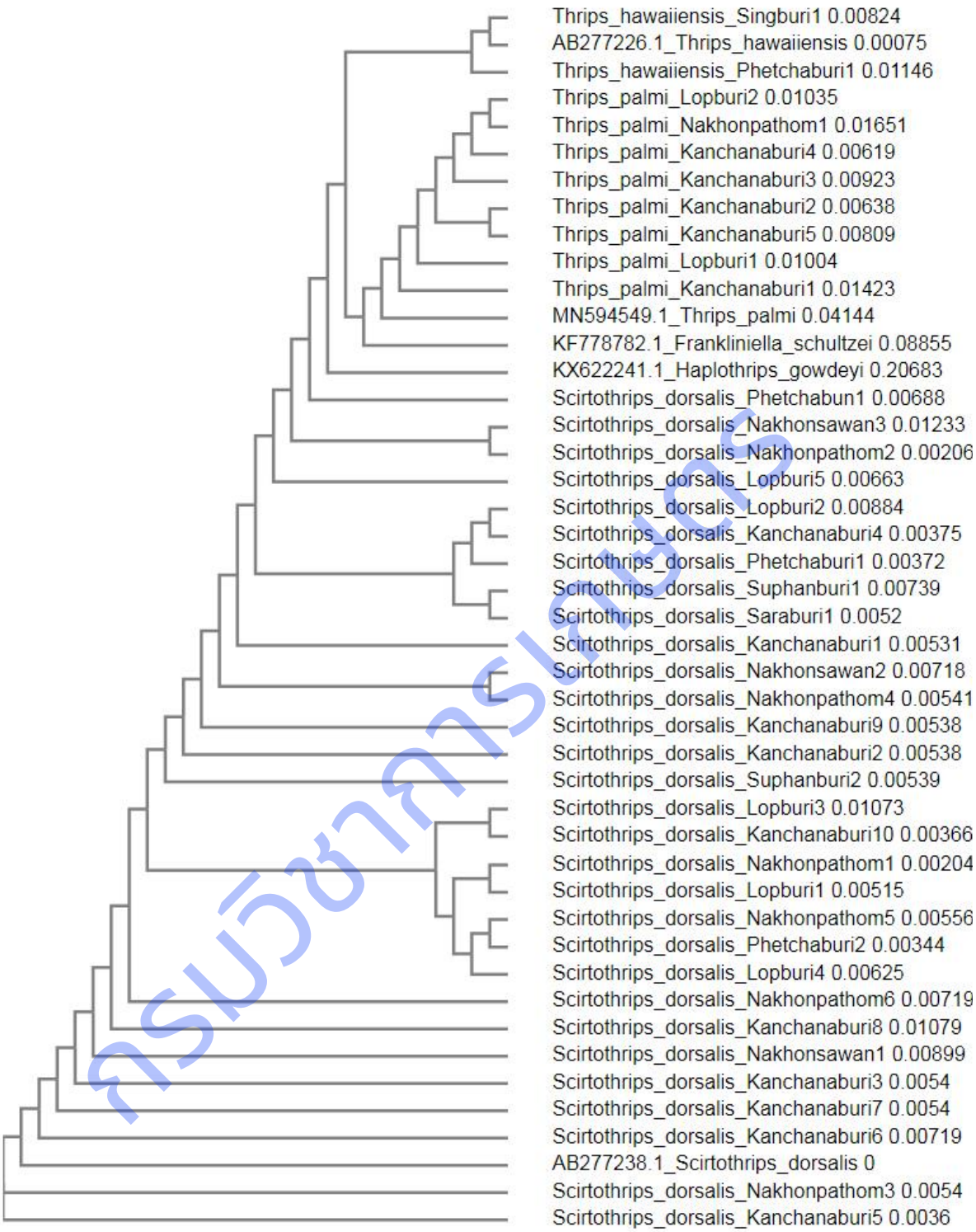


Figure 3.16.4 Phylogenetic trees showing the relationship among 3 thrips populations of *Scirtothrips dorsalis*, *Thrips palmi* and *Thrips hawaiiensis* which collected from asparagus crops in Thailand

กรมวิชาการเกษตร

ผนวก 4

เอกสารประกอบ

ข้อ 3.3 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง (Outcome) และ
ข้อ 3.5 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารประกอบ ข้อ 3.3 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง (Outcome)

การนำเสนองานวิจัยและตีพิมพ์เผยแพร่ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 14 ระหว่างวันที่ 12 - 14 พฤศจิกายน 2562 โรงแรมดุสิตธานีหัวหิน จังหวัดเพชรบุรี จำนวน 7 เรื่อง

กรมวิชาการเกษตร

การประชุมวิชาการ อารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 14

THE 14th NATIONAL PLANT PROTECTION CONFERENCE

"เกษตรแม่นยำ ก้าวนำเกษตรไทย"

"Precision Agriculture Approaches to Thai Farming"

ผลงานวิจัยเรื่องเต็ม

FULL PAPER

จัดทำโดย

สมาคมอารักขาพืชไทย

สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย

สมาคมกีฏและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย

สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย

สมาคมวิศวกรรมเกษตรแห่งประเทศไทย

สมาคมคนไทยธุรกิจเกษตร

12 - 14 พฤศจิกายน 2562

โรงแรมดุสิตธานีหัวหิน จังหวัดเพชรบุรี

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ CONTENTS

ภาคบรรยาย ORAL PRESENTATION

ลำดับ	เรื่อง	หน้า
OEB-01	ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของผีเสื้อหนอนกระทู้ สกุล *Spodoptera* Guenée, 1852 (Lepidoptera: Noctuidae) ชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศไทย อาทิตย์ ฤกษ์สิกร ลุนิดดา เขาวสิต ดนัย ขันเรือนแก้ว อนุสรณ์ พงษ์มี กัลยา บุญลงา และจินตนา ไชยวงค์ The Morphological Differences Between Economically Important Species of Armyworm Moths, Genus *Spodoptera* Guenée, 1852 (Lepidoptera: Noctuidae), In Thailand Arit Rukkasikorn Sunadda Chaovalit Danai Chaireunkaew Anusorn Pongmee Kunlayaa Boonsanga and Jintana Chaiwong	1
OEB-02	การจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex (Diptera: Tephritidae) ในประเทศไทยด้วยลักษณะทางพันธุกรรม ยุวรินทร์ บุญทบ ณัฏฐิมา ไฉยอินเจริญกุล ชนัยพร บัวมาศ และ จารุวัฒ์ แก้กุล Molecular Identification of Pest Species In Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* complex (Diptera: Tephritidae) Species Complex In Thailand Yuvarin Boontop Nutthima Kosichardcenkul Chamaiporn Buamas and Charuwat taekul	16
OEB-03	การศึกษาความเป็นพืชอาศัย: การเข้าทำลายของแมลงวันทองในแก้วมังกรเนื้อแดง บวิณา บุญเจียน วลัยกร รัตนเดชากุล รัชญา อินทรกำแหง ศิริพร ดงทวี อนัญญา บุญเจียว และ สลักจิต พานคำ Host Status: Infestability of Red Dragon Fruit by Oriental Fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) Paweena Buchatlan Walaikorn Rattanadechakul Ratchada Intarakumheng Siriporn Khongchawile Ananya Nuchkeaw and Salucklit phankum	30
OEB-04	ศึกษาชนิดไรแมงมุมที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงด้วงเต่าตัวห้ำสตีธอรัส *Stethorus pauperculus* (Weise) (Coleoptera: Coccinellidae) อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล อิทธิพล บรรณาการ ทิพฐ เขาวนิวัฒนวงศ์ พลอยชมพู กรวิภาเรือง อทิติยา แก้วประสิทธิ์ และ ณพชรกร ธโนษัยย์ Study on Suitable Spider Mites for Mass Rearing of Acarophagous Lady Beetles, *Stethorus pauperculus* (Weise) (Coleoptera: Coccinellidae)	41
OEB-10	Thrips (*Thrips palmi* Karny) Damaging Orchids In Laboratory Suprada Sukonhabhirom na Pattalung Srijumnun Srijuntra and Somsak Siriphontaengmun ความเป็นพิษของอีโคฟูมที่มีต่อด้วงถั่วเขียว *Callosobruchus maculatus* F. และด้วงถั่วเหลือง *Callosobruchus chinensis* L. (Bruchidae: Coleoptera)	123
OEB-11	สิริรัช โพธิกัน ดวงสมร ฤทธิสุทธ์ รังสิมา เก่งการพานิช และ อธิราช หนูสีดำ Toxicity of $ECO_2FUME^{®}$ against *Callosobruchus maculatus* F. and *Callosobruchus chinensis* L. (Bruchidae: Coleoptera) Sirikorn Potikan Dungsamorn Suthisut Rungsima Kengkanpanich and Asirach Noosidum	
OEA-01	การศึกษาศักยภาพการก่อโรคในหนูศัตรูพืชและการเพิ่มปริมาณของค็อคซิเดีย โปรโตซัวในลำไส้ (Apicomplexa: Eimeriidae) จากหนูศัตรูพืชสกุล *Rattus* และ *Mus* ที่พบในประเทศไทย วิชาญ วรรธนะไกวัล ปราลาทหทอง พรหมเสิด ลมเกียรติ กล้าแข็ง และ ทรงทัน แก้วดา Pathology and Oocysts Propogation In Rats of Enteric Coccidia Protozoa (Apicomplexa: Eimeriidae) from *Rattus* spp. and *Mus* spp. In Thailand Vichan Wasthanakalwan Prasarong Promkerd Somkiat Klakaeng and Songsap Kaewsa	132
OEA-02	การศึกษาระยะห่างที่เหมาะสมในการใช้เหยื่อพิษโปรตีนในรูปแบบกับดักสำหรับการป้องกันกำจัดแมลงวันทองพริก *Bactrocera latifrons* (Hendel) ในพริก กรกต สำรักษ์ สัญญาณี ศรีคชา และ วิภาดา ปลอดครบุรี The Study of Poison Protein Bait Trap Spacing for Controlling Fruit Fly (*Bactrocera latifrons* (Hendel)) In Chili Plantations Korrakot Damrak Sunyanee Srikachar and Wipada Plodkornburee	152
OEA-03	ประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในการควบคุมแมลงวันผลไม้ ปิยะลิดา สนิท และ จุรีมาศ รังสีธี Efficiency of Entomopathogenic Fungi to Control Fruit Fly Piyalida Sanit and Jureemart Wangkeeree	162
OEA-04	ผลของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงต่ออัตราการตาย และการแพร่กระจายตัวในประชากรแมลงวันผลไม้ กมลรัตน์ สุวรรณไชยสี และ จุรีมาศ รังสีธี Effect of Entomopathogenic Fungi on Surviving and Its Transmission In Fruit Fly Kamonrat Suwanchaisri and Jureemart Wangkeeree	173
	การเปลี่ยนแปลงการระบาดของแมลงดำหนามมะพร้าวในเกาะสมุย จ. สุราษฎร์ธานี วลัยพร ทะศิประภา และ ยิ่งนิยม ธียาทิมร์	183
	Atcharabhorn Prasoetphon Itsipon Bannakan Pichate chaowattanawong Ploychompoo Konvipasruang Athitiya Kaewpradit and Naphacharakorn Ta-Phaisach	
OEB-05	ชีววิทยาและศักยภาพของไรตัวห้ำ *Amblyselus swirskii* (Athias-Henriot) ในการกำจัดเพลี้ยไฟในห้องปฏิบัติการและโรงเรือนทดลอง อทิติยา แก้วประสิทธิ์ ทิพฐ เขาวนิวัฒนวงศ์ พลอยชมพู กรวิภาเรือง อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล วิมลวรรณ โชติวงศ์ และ ณพชรกร ธโนษัยย์ Biological and Potential as a Bio-agent of *Amblyselus swirskii* (Athias-Henriot) for Controlling *Thrips* spp. In Laboratory and Greenhouse Athitiya Kaewpradit Pichate Chaowattanawong Ploychompoo Konvipasruang Atcharabhorn Prasoetphon Wimolwan Chotwong and Naphacharakorn Ta-Phaisach	51
OEB-06	อนุกรมวิธานและเขตการแพร่กระจายแมงมุมแม่ม่ายในประเทศไทย วิมลวรรณ โชติวงศ์ พลอยชมพู กรวิภาเรือง อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล อทิติยา แก้วประสิทธิ์ และ ณพชรกร ธโนษัยย์ Taxonomic and Distribution of Widow Spider Genus *Latrodectus* In Thailand Wimolwan Chotwong Ploychompoo Konvipasruang Atcharabhorn Prasoetphon Athitiya Kaewpradit and Naphacharakorn Taphaisach	63
OEB-07	ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงกลุ่มกลไกการออกฤทธิ์ต่าง ๆ ในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟเมล่อน (*Thrips palmi* Karny) ในกล้วยไม้สกุลหวาย ศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา ลุดราดา ลุดนราภิรมย์ ณ พัทลุง และ ลมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น Efficacy of Various Insecticides from Different Mode of Action for Controlling Melon Thrips (*Thrips palmi* Karny) In Dendrobium Orchids Srijumnun Srijuntra Suprada Sukonhabhirom na Pattalung and Somsak Siriphontaengmun	78
OEB-08	รูปแบบการใช้สารฆ่าแมลงแบบหมุนเวียนกลุ่มกลไกการออกฤทธิ์เพื่อป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟเมล่อน (*Thrips palmi* Karny) ในกล้วยไม้สกุลหวาย ศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา ลุดราดา ลุดนราภิรมย์ ณ พัทลุง และ ลมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น Rotation Spraying Pattern for Insecticides with Different Mode of Action for Controlling Melon Thrips (*Thrips palmi* Karny) In Dendrobium Srijumnun Srijuntra Suprada Sukonhabhirom na Pattalung and Somsak Siriphontaengmun	94
OEB-09	การทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ ต่อการตายของเพลี้ยไฟเมล่อน (*Thrips palmi* Karny) ที่ทำลายกล้วยไม้ในห้องปฏิบัติการ ลุดราดา ลุดนราภิรมย์ ณ พัทลุง ศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา และ ลมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น Efficacy Testing of Various Insecticides on Mortality of Melon	108

ภาคแผ่นภาพ POSTER PRESENTATION

ลำดับ	เรื่อง	หน้า
PEB-01	การศึกษาอนุกรมวิธานตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera: Tephritidae) ร่วมกับการใช้เทคนิค Morphometrics ในตัวเต็มวัย ยุวรินทร์ บุญทบ ชนัยพร บัวมาศ เกศสุดา ลนสิริ จอมสุรางค์ ดวงสิสาร และ สิทธิสิโรตม แก้วสวัสดิ์ Taxonomy of Fruit Fly Larvae In Tribe Dacini (Diptera: Tephritidae) and Using Morphometrics Technique In Adults Yuvarin Boontop Chamaiporn Buamas Kessuda Sonsiri Jomsurang Duangthisan and Sitisaroddom Kaewsawat	402
PEB-02	อนุกรมวิธานเพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วง (Hemiptera: Cicadellidae) ในประเทศไทย เกศสุดา ลนสิริ จารุวัฒ์ แก้กุล ยุวรินทร์ บุญทบ ลุนิดดา เขาวสิต ชนัยพร บัวมาศ และ อิทธิพล บรรณาการ Taxonomy of Mango Leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae) In Thailand Kessuda Sonsiri Charuwat Taekul Yuvarin Boontop Sunadda Chaowalit Chamaiporn Buamas and Itsipon Bannakan	418
PEB-03	ความหลากหลายของแมลงศัตรูพืชและแมลงศัตรูธรรมชาติในแปลงปลูกกะหล่ำปลีระหว่างการใช้การจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานและการใช้สารเคมีกำจัดแมลง วรนาฏ โคกเย็น เบญจคุณ แสงทองเทวา และ จารุวัฒน์ เอารรรมทิทักษ์ Diversity of Insect Pests and Natural Enemy Insects In Cabbage Crops between Integrated Pest Management and Insecticide Uses Woranad Khokyen Banjakhun Sangtongpraow and Jaruwat Thowthampitak	434
PEB-04	ความหลากชนิดของแมลงวันผลไม้ในแปลงรวบรวมพันธุ์กีวีฟรุตในพื้นที่สถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ สรายุทธ ปิตตระเมต รัตนากรณ์ หมายเหมั้น และ พัชรินทร์ ครุฑเมือง Species Diversity of Fruit fly In Kiwifruit Orchard In The Royal Agricultural Station Inthanon, Chiang Mai Province Sarayut Pittarate Patsanaporn Maimun and Pascharin Krutmuang	446
PEB-05	การประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกชนิดของมอดแป้งสกุล *Tribolium* spp. ที่เป็นศัตรูพืชกักกันแบบรวดเร็ว นพรัตน์ บัวหอม ชลธิชา รักไกร ชนินทร ดวงอาสา ช่อฟ้าพ์ ศัลยพงษ์ อิทธิพล บรรณาการ และ มนตรี ธนรส Rapid Identification of Quarantine Pest Species of Genus *Tribolium* spp. Based on DNA barcoding Nopparat Buahom Chonticha Rakkrai Chanintorn Doungsa – ard Chonlip Saliyaponsee Itsipon Bannakan and Montri Tanaros	459

ตัวอย่างการใช้งาน

PEB-06 ชีววิทยาและผลกระทบของแตนเบียนไฮเปอร์ *Chartocerus hyalipennis* และ *Prochiloneurus insolitus* ต่อแตนเบียน *Anagyrus lopezi* 478
เดวลักษณ์ แก้วแหวี เบญจคุณ แสงทองทราว และ อัญชนา ท่านเธรัญ
Biology and Effect of Hyperparasitoids, *Chartocerus hyalipennis* and *Prochiloneurus insolitus* on Parasitoid, *Anagyrus lopezi*
Saowaluck Kaewsawee Banjakhun Sangtongpraow and Anchana Thancharoen

PEB-07 การตรวจสอบเอกลักษณ์ของกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ในการควบคุมแมลงในสารสกัดบัวตองด้วยเทคนิคทีแอลซีสมรรถนะสูง 491
พจนีย์ หนอร์ฟัน ณัฐพร ฉันทศักดา ชนิดา คำอำนวย ศิริพร ลอแห่โก และ ธิติยาภรณ์ อุดมสิลป์
High-performance Thin-layer Chromatography (HPTLC) Screening for Insecticidal Compounds of Extracts from *Tithonia diversifolia*
Poachanee Norfun Nattaporn Chanthasakda Thanika Kham-amnouy Siriporn Sornthako and Thitiyaporn Udomsilp

PEB-08 การประเมินความหลากหลายของสัตว์ขาข้อที่ลงใช้พืช 4 ชนิดในสกุล *Passiflora* 502
ชิษณุพงศ์ ทานเที่ยน และ ชัชวาล ไชยิกุล
Utilization Assessment of Arthropod Diversity on 4 Plants in Genus *Passiflora*
Chitsanuphong Phanthian and Chatchawan Chaisuekul

PEB-09 ฤทธิ์สัมผัสตายของสารสกัดยาสูบ (*Nicotiana tabacum* Linnaeus) ต่อไรแมงมุมสองจุด (*Tetranychus urticae* Koch) 518
วสันต์ ตฤณธวัช และ วนิดา อ่วมเจริญ
Contact Toxicity Activity of Tobacco Extract (*Nicotiana tobacum* Linnaeus) on Two-Spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae* Koch)
Wasan Trinsawat and Wanida Auamcharoen

PEB-10 ประสิทธิภาพของ *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ที่มีต่อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) 533
สัทธพล เหมือนตา นิยากรณ์ บวัญเกตุ รัตนาวลี ออนวงษ์ ฟิสิฐ อำนาจนิยมรันทร์ พลช หนูเส็ง และ อธิราช หนูสีดำ
Efficacy of *Steinernema carpocapsae* (Weiser) against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)
Ratapol Muanta Niyaporn Khwanket Rattanawadee Onwong Pisit Amnaeniyomjan Phalot Nooseng and Asirach Noosidum

Phuttaporn Lachaphiboonrattana and Waraporn Ruamsuk

PPB-04 การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบแห้งของหอม 656
ทิพวรรณ กันหายาศิ ณัฏฐิมา ไฉยิกเจริญกุล บุรณี ทิวงษ์แพทย์ รุ่งนภา ทองครึง และ กาญจนา ศรีไม้
Identification of Bacteria Causing Leaf Blight Disease on *Allium*
Tippawan Kanhayarit Nuttima Kositcharoenkul Buranee Puawongphat Rungnapha Thongkreng and Kanchana Srimal

PPB-05 การศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคราน้ำค้างในชายโยเต้ 669
ทิวา บุบผาประเสริฐ พจนา ตระกูลสุรรัตน์ รัญพร งามอ่อน และ วิทยา ทองอินทร์
Study on Some Fungicides Efficacy to Control Downy Mildew Disease in Chayote
Thiva Bubpaprasert Photchana Trakunsukharat Thunyaporn Ngamngon and Witthaya Thongin

PPB-06 ประสิทธิภาพของสารใบโอแอคทีฟอิสิเตอร์ต่อการแสดงออกของยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคในถั่วเหลือง 681
ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต พรนิภา ถาโน และ ฉันทนา คงนคร
Efficiency of Elicitor for Induced Resistance Gene Expression Against Disease in Soybean
Supalak Sattayasamitsathit Pornipa Thano and Janana Kongnakorn

PPB-07 ผลของสารไดเมโทมอร์ฟ 50% W/V SC และเมทาแลกซิล 25% WP ในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนหมอนทองในห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง 689
เรวัฒ เกียงซ้าย เนตรนลิส เขียวขำ และ อรอุมา เกียงซ้าย
Effect of Dimethomorph 50% W/V SC and Metalaxyl 25% WP for Controlling *Phytophthora palmivora* Causing Root and Stem Rot of Monthong Durian in Laboratory and Greenhouse
Rawat Plasai Netnapis Khewkhom and Onuma Plasai

PPB-08 การแสดงออกของโปรตีนอ้อยที่ต้านทานต่อโรคใบขาว 699
ลาวัลย์ กลัดลุวรรณ จิรวัฒน์ ประสิทธิ์สม กนกวรรณ ลวาง สิริวรรณ์ โคตรโสภา วรินทร จารย์คุณ และ ทีรญา กลมสอาด
Gene Expression of Sugarcane for Resistant of White Leaf Disease
Lawan Kladsuwan Chirawat Prasitsom Kanokwan Sawang Siriwan Kodsopa Varinthon Jarnkoon and Peeraya Klomsa-ard

PPB-09 การประเมินความต้านทานของพันธุ์อ้อยต่อโรคแส้ดำในการปรับปรุงพันธุ์ 707
กนกวรรณ สวาง ลาวัลย์ กลัดลุวรรณ สิริวรรณ์ โคตรโสภา มานูวัศร์ ตินตะรสาละ ณ ราชสีมา วรินทร จารย์คุณ และ ทีรญา กลมสอาด
Smut Resistant Evaluation of Breeding Program
Kanokwan Sawang Lawan Kladsuwan Siriwan Kodsopa Manuwat Tintarasaranaraschaseema Varinthon Jarnkoon and Peeraya Klomsa-ard

PPB-14 ประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราในการควบคุมเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง 716
วีรเศรัสก์ ลิขิตมั่นใจ เทพเชิย เทพช่วยสุข และ อุดมศักดิ์ เลิศลุชาตวนิช
Efficacy of Fungicides to Control *Colletotrichum gloeosporioides* Causal Agent of Mango Anthracnose Disease
Veerasak Likitmanchai Thepchai Thepchuasook and Udomsak Lertsuchasavanich

PPB-15 ประสิทธิภาพเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสพริก 722
ยุวดี ชูประภาวรรณ สุภาวดี แก้วระหัน และนายสมชาย คำแนน
The Effectiveness of Antagonistic Yeasts for Controlling *Colletotrichum capsici* Causing Chili Anthracnose Disease
Yuwadee chupraphawan Supawadee kaewrahun and Somchai khamnan

PPB-17 การศึกษาผลของสารป้องกันกำจัดเชื้อราบางชนิดต่อการเจริญของเชื้อรา สาเหตุโรคใบจุดของพริกไทย 735
ทิวา บุบผาประเสริฐ ธารทิพย ภาสบุตร พจนา ตระกูลสุรรัตน์ และ อัศดาวัลย์ อินทรสังข์
Study on Some Fungicides to Growth of Causing Fungus of Pepper Anthracnose Disease
Thiva Bubpaprasert Tharnsip Bhasabutra Photchana Trakunsukharat and Laddawan Insung

PPA-01 ประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดเชื้อราในการควบคุมโรคราสนิมสาเหตุจากเชื้อ *Puccinia allii* Rud. ในกุยช่าย 747
นพพล สัทยาสัย วรางคนา โชติใครษฐี และ หทัยภัทร เธษฎารมย์
Efficacy of Fungicides for Control Garlic Chives Rust Disease Caused of *Puccinia allii* Rud.
Noppon Sathayasai Warangkana Chotsetthee and Hataipat Jessadarom

PPA-02 ทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคพืชบางชนิดต่อการแพร่ระบาดของโรคราสนิมขาวในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ผักบุ้งจีน 762
พจนา ตระกูลสุรรัตน์ ทนงศักดิ์ ลุวรรณวงศ์ และ อรณิชา ลุวรรณโถม
Efficiency Test of Some Fungicides to Control White Rust of Chinese Water Morning Glory in Seed Production Field
Photchana Trakunsukharat Thanongsak Suwannawong and Onnitcha Suwanchom

PPA-03 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคราสนิมของถั่วเหลืองสาเหตุจากเชื้อรา *Phakopsora pachyrhizi* 775
ชนินทร ควงสอาด ฤทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง มงโนรัตน์ ลุดลงรน ทิมทันภา วุนทิลึก พรทิมล อธิปัญญากุล ลุณีรัตน์ สัมเสถียร และ อมรรัฐ์ ศิลโรเลียว
Efficacy of Some Fungicides for Control *Phakopsora pachyrhizi* the Causal Agent of Soybean Rust

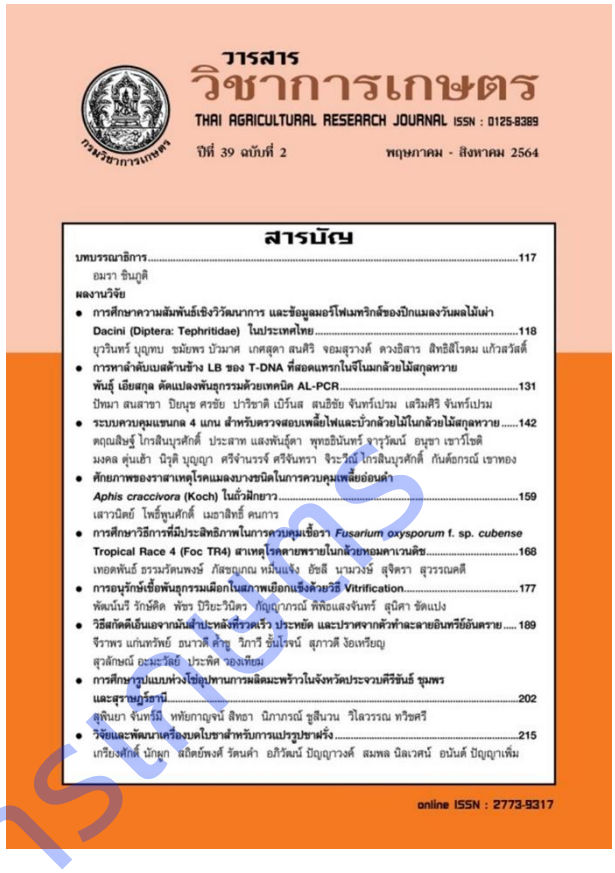
กรมวิชาการเกษตร

ตีพิมพ์เผยแพร่ในประเทศ จำนวน 3 เรื่อง

วารสาร
วิชาการเกษตร
THAI AGRICULTURAL RESEARCH JOURNAL ISSN : 0125-8389
ปีที่ 38 ฉบับที่ 3 กันยายน - ธันวาคม 2563

สารบัญ

บทบรรณาธิการ 229
อิงอร ปัญญากิจ
ผลงานวิจัย
- วิจัยและพัฒนาเครื่องขัดหนามผลสละสำหรับการส่งออก 230
พุทธอินันทร์ จารุรัมณ์ ปิยชาติ พุ่มมณี ธนาวัฒน์ ทิพย์ชิต กิตติศักดิ์ กิติวัณณ์ ตฤณสิษฐ์ ไกรสินบุรศักดิ์ อนุชา เชาว์โชติ อำนาจ ช่างประเสริฐ
- ความหลากหลาย สัณฐานวิทยาดอก และเรณูพืชอาหารผึ้งและชันโรงในสวนผลไม้ พื้นที่โครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี 241
เบญจวรรณ ชิวปรีชา รุ่งวิทย์ ชัยจิรวงศ์ ชัยมงคล คงภักดี
- การถ่ายฝากยีนสังเคราะห์ในรูปอินทรอนแฮร์พิน RNAi เวคเตอร์ของยีน *ERD15* เข้าสู่ต้นยาสูบ 256
พยุงศักดิ์ รวยอารี อรุโณทัย ชาววา ภรณี สร่างศรี บุญเรือนวัฒน์ เรืองวิเศษ
- การตอบสนองต่อแสงของไบมันสำปะหลัง พันธุ์ห้วยบง 60 ภายใต้ความเข้มข้น O_2 ระดับปกติและระดับต่ำ ร่วมกับความเข้มข้น CO_2 3 ระดับ 267
พรชัย ไพบูลย์ สุนทรี ยิ่งชัชวาลย์
- การรวบรวมพันธุ์และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะเขือลักษณะผลสั้น 277
พัชร ปิริยะวินิตร พัฒน์นรี รักษ์คิด เสาวณี เดชะคำภู กัญญากานณ์ พิพิธแสงจันทร์ สุนิตา ชัดแปง
- การจำแนกชนิดด้วงอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera: Tephritidae) ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด 293
ยุวรินทร์ บุญทบ ชมัยพร บัวมาศ เกศสุดา สนศิริ จอมสุรางค์ ดวงธิสาร สิทธิสิโรดม แก้วสรัสดี์
- อัตราครึ่ง CO_2 สุทธิ ปริมาณกรดไนโน และไฟโตเคมีในรอบวันของใบสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย 307
พรวณี ชื่นนคร สุนทรี ยิ่งชัชวาลย์
- K2 a Newly Isolated Strain of *Bacillus amyloliquefaciens* Regulates Responsive Proteins for Its Survival and Promotes Plant Growth of Rice Seedlings against Bacterial Leaf Blight and Salt Stresses 317
Sasiprapha Marach Tiyakhon Chatnaparat Supot Kasem Sutruedee Prathuangwong

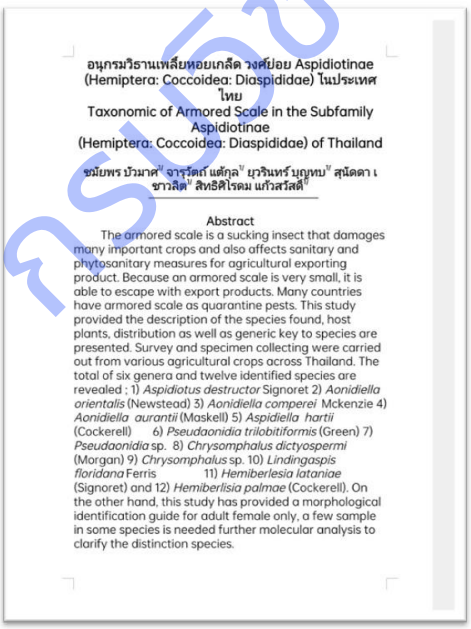


วารสาร
วิชาการเกษตร
THAI AGRICULTURAL RESEARCH JOURNAL ISSN : 0125-8389
ปีที่ 39 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม - สิงหาคม 2564

สารบัญ

บทบรรณาธิการ 117
อมรา ชินภูติ
ผลงานวิจัย
- การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และข้อมูลมอร์โฟเมทริกส์ของปีกแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera: Tephritidae) ในประเทศไทย 118
ยุวรินทร์ บุญทบ ชมัยพร บัวมาศ เกศสุดา สนศิริ จอมสุรางค์ ดวงธิสาร สิทธิสิโรดม แก้วสรัสดี์
- การหาตำแหน่งบนดีเอ็นเอข้าง LB ของ T-DNA ที่สอดแทรกในจีโนมกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์ เอียสกุล ตัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค AL-PCR 131
ปิหมา สนสาชา ปิยนุช ศรชัย ปาริชาติ เบิร์นส สนธิชัย จันทร์เปรม เสริมศิริ จันทร์เปรม
- ระบบควบคุมแทนกล 4 แกน สำหรับตรวจสอบเพลี้ยไฟและบั๊วกล้วยไม้ในกล้วยไม้สกุลหวาย 142
ตฤณสิษฐ์ ไกรสินบุรศักดิ์ ประสาท แสงพันธุ์ดา พุทธอินันทร์ จารุรัมณ์ อนุชา เชาว์โชติ มงคล ตุ้นเฮ้า นิรุติ บุญญา ศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา จิระวิณี ไกรสินบุรศักดิ์ กันต์กรณ์ เชาทอง
- ศักยภาพของราสาเหตุโรคแมลงบางชนิดในการควบคุมเพลี้ยอ่อนดำ *Aphis craccivora* (Koch) ในถั่วฝักยาว 159
เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ เมธาสิทธิ์ คนการ
- การศึกษาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (Foc TR4) สาเหตุโรคตายพรายในกล้วยหอมคาเวนดิช 168
เทอดพันธ์ ธรรมวัตนพงษ์ ภัสชญากณ หมื่นแจ้ง ยัชลี นามวงษ์ สุจิตรา สุวรรณคดี
- การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมเมือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrification 177
พัฒน์นรี รักษ์คิด พัชร ปิริยะวินิตร กัญญากานณ์ พิพิธแสงจันทร์ สุนิตา ชัดแปง
- วิธีสกัดดีเอ็นเอจากมันสำปะหลังที่รวดเร็ว ประหยัด และปราศจากตัวทำละลายอินทรีย์อันตราย 189
จิราพร แก่นทวิพย์ ธนาวดี ค้ารุ ริภาวี ชื่นโรจน์ สุภาวดี ง้อเหรียญ สุวลักษณ์ อะมะวัลย์ ประพิศ วงษ์เทียม
- การศึกษารูปแบบห่วงโซ่อุปทานการผลิตมะพร้าวในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี 202
สุพินยา จันทร์มี หทัยกาญจน์ สิทธา นิภากรณ์ รูสินวน วิไลวรรณ ทวิยศรี
- วิจัยและพัฒนาเครื่องบดใบชาสำหรับการแปรรูปชาฝรั่ง 215
เกรียงศักดิ์ นักผูก ลือศย์พงศ์ รัตนคำ อภิวัฒน์ ปัญญาวงศ์ สมพล นิลเวศน์ อนันต์ ปัญญาเพิ่ม

online ISSN : 2773-9317



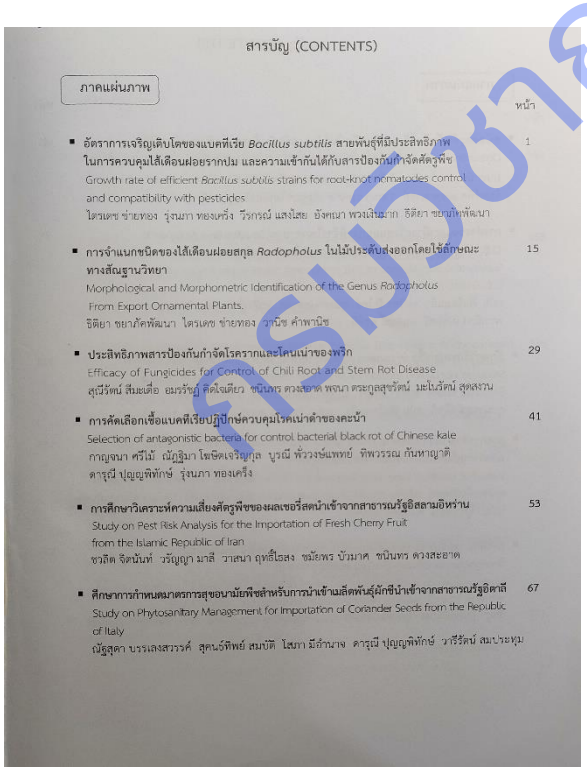
อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ย่อย Aspidiotinae (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) ในประเทศไทย
Taxonomic of Armored Scale in the Subfamily Aspidiotinae (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) of Thailand

ชมัยพร บัวมาศ[1] จารุรัตน์ แต้กุล[1] ยุวรินทร์ บุญทบ[1] สุนัดดา เ
ชาวลิต[1] สิทธิสิโรดม แก้วสรัสดี[1]

Abstract
The armored scale is a sucking insect that damages many important crops and also affects sanitary and phytosanitary measures for agricultural exporting product. Because an armored scale is very small, it is able to escape with export products. Many countries have armored scale as quarantine pests. This study provided the description of the species found, host plants, distribution as well as generic key to species are presented. Survey and specimen collecting were carried out from various agricultural crops across Thailand. The total of six genera and twelve identified species are revealed ; 1) *Aspidiotus destructor* Signoret 2) *Aonidiella orientalis* (Newstead) 3) *Aonidiella comperei* Mckenzie 4) *Aonidiella aurantii* (Maskell) 5) *Aspidiella hartii* (Cockerell) 6) *Pseudaonidia trilobitiformis* (Green) 7) *Pseudaonidia* sp. 8) *Chrysomphalus dictyospermi* (Morgan) 9) *Chrysomphalus* sp. 10) *Lindingaspis floridana* Ferris 11) *Hemiberlesia lataniae* (Signoret) and 12) *Hemiberlisia palmae* (Cockerell). 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.

กรมวิชาการเกษตร

การนำเสนอผลงานวิจัยภายในหน่วยงานในการประชุมวิชาการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ทั้งในรูปแบบการบรรยายและโปสเตอร์ เพื่อเป็นการเผยแพร่องค์ความรู้

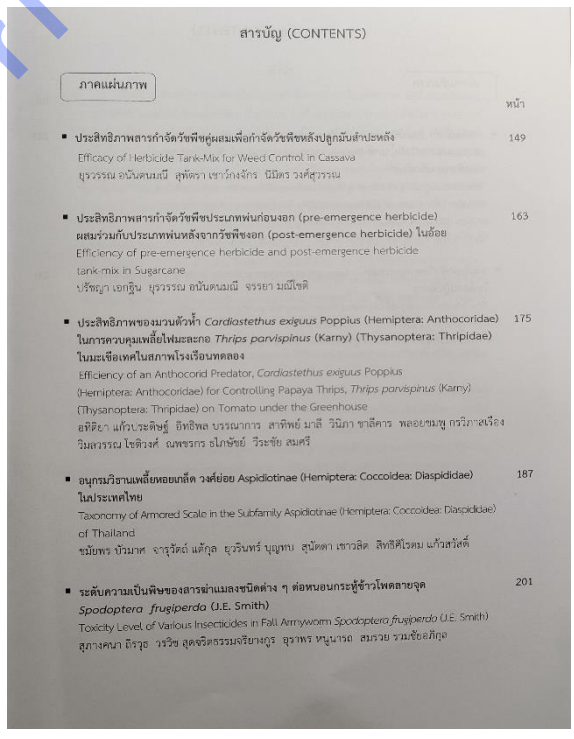


สารบัญ (CONTENTS)

ภาคแผ่นภาพ

หน้า

- อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม และความเข้ากันได้กับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช 1
  Growth rate of efficient *Bacillus subtilis* strains for root-knot nematodes control and compatibility with pesticides
  ไตรเดช ช่ายทอง รุ่งนภา ทองเครือ วีรกรณ์ แสงโสย อังคนา พวงเงินยวง ธิติยา ชยาภิพัฒนา
- การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ในไม้ประดับส่งออกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 15
  Morphological and Morphometric Identification of the Genus *Radopholus* From Export Ornamental Plants.
  ธิติยา ชยาภิพัฒนา ไตรเดช ช่ายทอง วานิช คำพานิช
- ประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรครากและโคนเน่าของพริก 29
  Efficacy of Fungicides for Control of Chili Root and Stem Rot Disease
  สุนีวีรัตน์ สีมะเดื่อ อมรรัฐ คีตโฉเดียว ชนินทร ดวงสอาด พจนา ตระกูลสุขรัตน์ มยโนรัตน์ สุดสงวน
- การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ควบคุมโรคเน่าดำของคะน้า 41
  Selection of antagonistic bacteria for control bacterial black rot of Chinese kale
  กาญจนา ศรีไม้ ณัฏฐิมา โพธิ์ดเจริญกุล บุรณี พิวงษ์แพทย์ ทิพวรรณ กันหาญาติ ดารุณี ปุญญพิทักษ์ รุ่งนภา ทองเครือ
- การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของผลเชอรี่สดนำเข้าจากสาธารณรัฐอิสลามอิหร่าน 53
  Study on Pest Risk Analysis for the Importation of Fresh Cherry Fruit from the Islamic Republic of Iran
  ชวลิต จิตนันท์ วรัญญา มาลี วาสนา ฤทธิ์ไธสง ชมัยพร บัวมาศ ชนินทร ดวงสะอาด
- ศึกษาการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ผักชีนำเข้าจากสาธารณรัฐอิตาลี 67
  Study on Phytosanitary Management for Importation of Coriander Seeds from the Republic of Italy
  ณัฐสุดา บรรเลงสวรรค์ สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ โสบา มีอำนาจ ดารุณี ปุญญพิทักษ์ วารีรัตน์ สมประหุม



สารบัญ (CONTENTS)

ภาคแผ่นภาพ

หน้า

- ประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชคู่ผสมเพื่อกำจัดวัชพืชหลังปลูกมันสำปะหลัง 149
  Efficacy of Herbicide Tank-Mix for Weed Control in Cassava
  ยุววรรณ อนันตนนท์ สุพัตรา เชาว์กังจักร นิมิตร วงศ์สุวรรณ
- ประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นก่อนงอก (pre-emergence herbicide) ผสมร่วมกับประเภทพ่นหลังจากวัชพืชงอก (post-emergence herbicide) ในอ้อย 163
  Efficiency of pre-emergence herbicide and post-emergence herbicide tank-mix in Sugarcane
  ปริชญา เอกฐิน ยุววรรณ อนันตนนท์ จรรยา มณีโชติ
- ประสิทธิภาพของมวนตัวห้ำ *Cardiastethus exiguus* Poppius (Hemiptera: Anthocoridae) ในการควบคุมเพลี้ยไฟมะละกอ *Thrips parvispinus* (Karny) (Thysanoptera: Thripidae) ในมะเขือเทศในสภาพโรงเรือนทดลอง 175
  Efficiency of an Anthocorid Predator, *Cardiastethus exiguus* Poppius (Hemiptera: Anthocoridae) for Controlling Papaya Thrips, *Thrips parvispinus* (Karny) (Thysanoptera: Thripidae) on Tomato under the Greenhouse
  อธิติยา แก้วประดิษฐ์ อิทธิพล บรรณาการ สาทิพย์ มาลี วินิภา ชาลีคาร พลอยชมพู กรวิภาสเรือง วิมลวรรณ ไชดิวงศ์ ณพชรกร ธโกษัยย์ วีระชัย สมศรี
- อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ย่อย Aspidiotinae (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) ในประเทศไทย 187
  Taxonomy of Armored Scale in the Subfamily Aspidiotinae (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) of Thailand
  ชมัยพร บัวมาศ จารุวัฒน์ แต้กุล ยุววิรินทร์ บุญทา สุนัตตา เชาวลิต สิทธิศักดิ์ไวทม แก้วสวัสดิ์
- ระดับความเป็นพิษของสารฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ ต่อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด 201
  Spodoptera frugiperda (J.E. Smith)
  Toxicity Level of Various Insecticides in Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)
  สุภางคนา ถิรวุธ วรวิช อุดจริตธรรมจริยางกูร อุราพร หนูนารถ สมรวย รวมชัยสิกุล

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารประกอบ ข้อ 3.5 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ด้านเศรษฐกิจ

การกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera carambolae* (Drew & Hancock) (Diptera: Tephritidae) ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ เพื่อเปิดตลาดมังคุดไปไต้หวัน

Modified vapor heat treatment for *Bactrocera carambolae* (Drew & Hancock) (Diptera: Tephritidae) Quarantine pest of Mangosteen export to Taiwan

ชัยณรัตน์ สนศิริ สลักจิต พานคำ ชลธิชา รักใคร่ มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์
พงษ์ศักดิ์ จิณฤทธิ์ พุฒิพงษ์ เพ็งฤกษ์
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Importation of mangosteen from Thailand to Taiwan has been suspended since 2003 due to the revision of Taiwan's quarantine regulations by the Bureau of Animal and Plant Inspection and Quarantine (BAPHIQ). Mangosteen is the host of *Bactrocera carambolae, B. papayae, B. correcta* and *B. zonata* and these fruit flies are quarantine pests of Taiwan. To be allowed to import again, research must be conducted to prove quarantine treatment by using *B. carambolae*. The objective of this study is to develop treatment for fresh mangosteen export to Taiwan. This study was conduct during October 2015 – September 2018 at Plant Quarantine Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture. Modified vapor heat treatment (MVHT)was developed as a quarantine treatment for *B. Carambolae*. The complete mortality of 24-hour old eggs which is the most resistent developmental stage to MVHT was achieved when the infested fruits were heated with hot air at 50-80 % RH from ambient temperature to 43 °C (dry pre-heating period) and the fruits were then gradually warmed to 46 °C with high temperature air saturated with water vapor.Subsequently, the center fruit temperature was kept at 46 °C for 58 minutes. Treated fruits were air cooled after treatment for 1 hour. During confirmatory test of this treatment schedule, none of the treated 23,766 eggs survived. So the result is proposed to be the quarantine treatment to disinfest *B. carambolae* in mangosteen. Taiwan has allowed Thai mangosteen imported into the country since July 12, 2019, after being banned for 16 years. Currently, 205,000 kilograms of mangosteen has been exported to Taiwan, worth 76,875,000 bath.

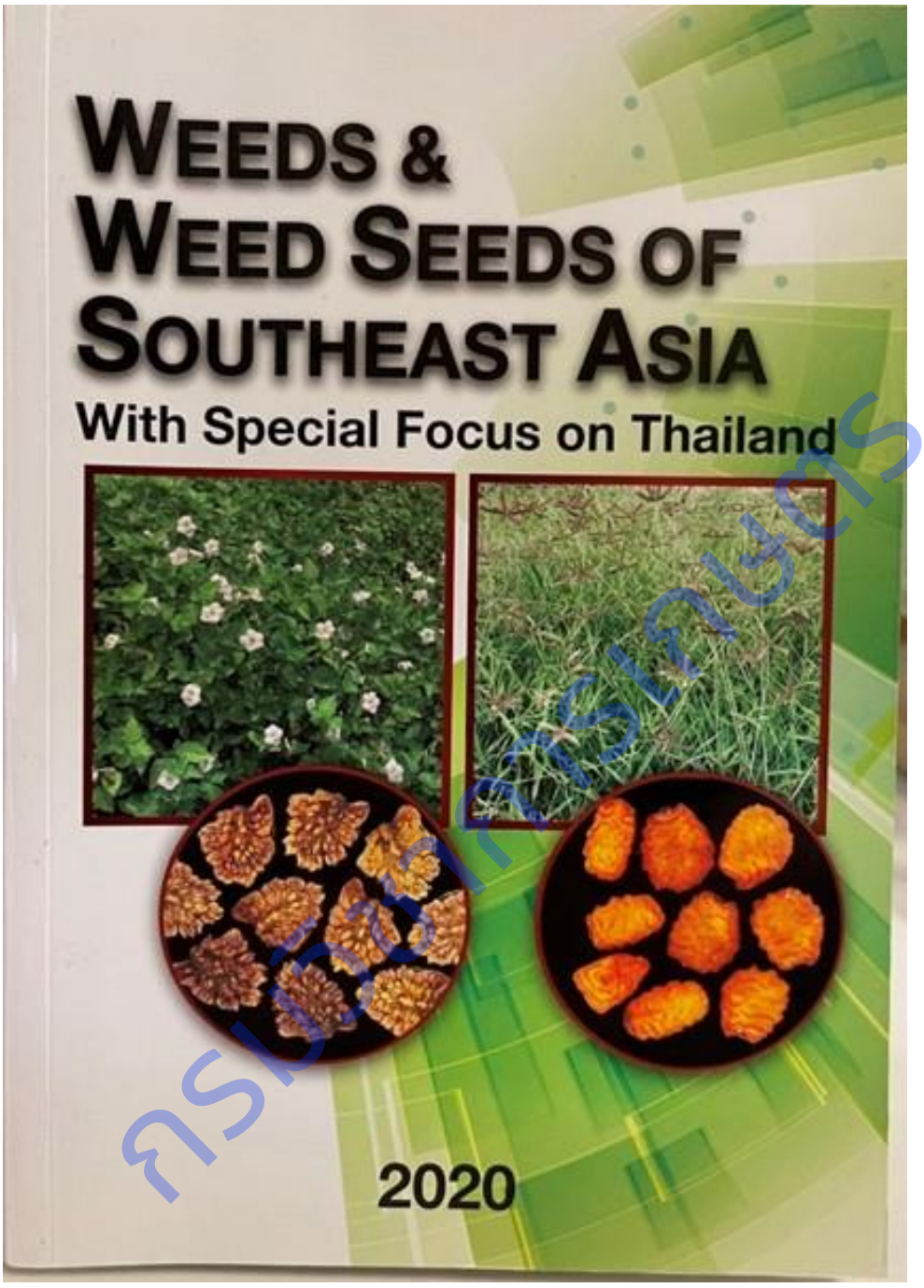
Keywords : *Bactrocera carambolae*, *Garcinia mangostana*,
Modified vapor heat treatment (MVHT), Quarantine treatment

กรมวิชาการเกษตร

ด้านวิชาการ

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

ผลการดำเนินงานตรวจสอบชนิดและปริมาณชีวภัณฑ์ เพื่อการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายทางการเกษตร และงานวิเคราะห์ตรวจสอบ

ผู้ใช้ประโยชน์	วันที่ขอรับบริการ	วัตถุประสงค์	จำนวนตัวอย่าง
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 2	14 ก.พ. 2560	เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อรา *Trichoderma*	1
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 5	เม.ย. 2560	เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อรา *Trichoderma*	1
สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร	1 พ.ค. 2560	เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อรา *Trichoderma*	1
บริษัท ไบโอ อโกรไซเอนซ์ จำกัด	8 มิ.ย. 2560	เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อรา *Chaetomium*	1
บริษัท อะโกรไบโอเมท จำกัด ผ่าน สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร	11 ก.ค. 2560	เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อประกอบการขอขึ้นทะเบียนชีวภัณฑ์เชื้อรา *Trichoderma*	1
บริษัทเนเจอรัล ฟาร์ม จำกัด	18 ส.ค. 2560	เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อประกอบการขอขึ้นทะเบียนชีวภัณฑ์เชื้อรา *Trichoderma*	1
วิสาหกิจชุมชนกลุ่มผลิตจุลินทรีย์บ้านดงสัก	ต.ค. 2560	เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อรา *Trichoderma*	1
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 6	9 ต.ค. 2560	เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อรา *Trichoderma*	1
บริษัทไอออนิค จำกัด	2 พ.ย. 2560	เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อรา *Trichoderma*	1
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 4	21 พ.ย. 2560	เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อรา *Trichoderma*	1
บริษัทเมเจอร์ฟาร์ คอร์ปเรชั่น จำกัด	12 ธ.ค. 2560	เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อประกอบการขอขึ้นทะเบียนชีวภัณฑ์เชื้อรา *Trichoderma*	1
บริษัทเอฟี-ไบเทค (ประเทศไทย) จำกัด	14 ธ.ค. 2560	เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อรา *Trichoderma*	1
บริษัทไอออนิค จำกัด	19 ก.พ. 2561	เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อรา *Trichoderma*	1
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 4	25 มิ.ย. 2561	เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อรา *Trichoderma*	3
บริษัทเมเจอร์ฟาร์ คอร์ปเรชั่น จำกัด	3 ก.ค. 2561	เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อรา *Trichoderma*	1
บริษัทไอออนิค จำกัด	19 ก.ค. 2561	เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อรา *Trichoderma*	1
บริษัทแอพพลายเคม (ประเทศไทย) จำกัด	7 พ.ย. 2561	เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณเชื้อรา *Trichoderma*	1

กรมวิชาการเกษตร

กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
รับที่ 1363
วันที่ 10 มิ.ย. 62

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
กรมวิชาการเกษตร
เลขรับ ๑๙๖๖๐
วันที่ ๑๙ มิ.ย. ๒๕๖๒
เวลา

บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร โทร. ๐ ๒๕๗๙ ๗๙๗๐

ที่ กษ ๐๙๓๓ (๓๒)/[redacted] ๒๕๖๒ **วันที่** ๑๙ มิถุนายน ๒๕๖๒

เรื่อง ขอส่งตัวอย่างวัตถุอันตรายเพื่อวิเคราะห์ขึ้นทะเบียน

เรียน ผอ. สอพ.

เนื่องจากบริษัท [redacted] จำกัด

ซึ่งเป็นผู้ขอขึ้นทะเบียนวัตถุอันตราย ได้ส่งตัวอย่างวิเคราะห์เพื่อประกอบการขึ้นทะเบียนตามใบอนุญาตนำเข้า/ผลิต เลขที่ [redacted]

ชื่อการค้า [redacted]

ชื่อสามัญ ไตรโคเดอร์มา แอสเพอร์เรลลัม (*Trichoderma asperellum*)

ความเข้มข้นและสูตร [redacted] cfu/g WP

ผู้ผลิต [redacted]

ผู้นำเข้า -

ลักษณะภาชนะบรรจุ ซองฟอยล์ ขนาด ๑,๐๐๐ กรัม จำนวน ๑ ซอง

ปริมาณ ๑,๐๐๐ กรัม

จึงขอส่งตัวอย่างวัตถุอันตรายดังกล่าวมาเพื่อวิเคราะห์ประกอบการขึ้นทะเบียน

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาดำเนินการต่อไป

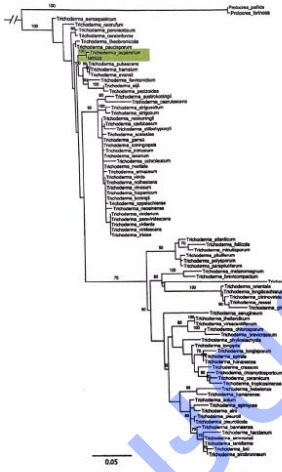
(นางสาวพิพรรณ เกิดศิริ)
ผู้อำนวยการกลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย

ตัวอย่างยังไม่ได้รับ ๒๕ มิ.ย. ๒๕๖๒ [redacted]

(นางวิไลวรรณ พรหมคำ)
ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการวิเคราะห์และจัดจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ผู้ผลิต บริษัท [redacted] จำกัด
ผู้ส่งตัวอย่าง กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร
ชื่อการค้า [redacted]
ชื่อสามัญ *Trichoderma asperellum*



ภาพที่ 1 Phylogram ได้จากการวิเคราะห์ชุดข้อมูลตำแหน่งยีน ITS และ TEF1 ด้วยวิธี maximum likelihood ด้วยโปรแกรม RAxML ค่า bootrap (มากกว่าหรือเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์) เหนือแต่ละ nodes ได้จากการวิเคราะห์ 1,000 ซ้ำ

กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
รับที่ 28
วันที่ 07 ส.ค. 2564
เวลา 10.00 น.

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
กรมวิชาการเกษตร
เลขรับ ๕๓
วันที่ - ๕ มค ๒๕๖๕
เวลา

บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กลุ่มสารวิทยาเกษตร โทร ๐-๒๗๔๐-๕๗๓๓ ต่อ ๕๗๓๓

ที่ กษ ๐๙๓๓/ [redacted] **วันที่** ๕ มกราคม ๒๕๖๕

เรื่อง ส่งตัวอย่างวัตถุอันตรายเพื่อวิเคราะห์

เรียน ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร ขอส่งตัวอย่างวัตถุอันตราย จำนวน ๑ ตัวอย่าง ตามใบส่งตัวอย่างวัตถุอันตราย เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ ชนิดและปริมาณจุลินทรีย์

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

(นายภัสชญณ หนิ่นแจ้ง)
ผู้อำนวยการสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

เรียน ผอ.สพ.
เพื่อทราบ

(นายศรุต สุทธิธรรมณี)
ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
๖ มค ๒๕๖๕

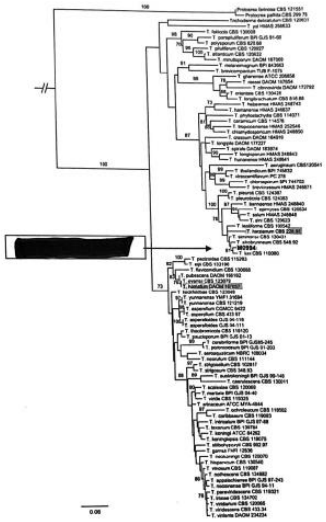
เรียน [redacted]
เพื่อทราบ และ [redacted]

(นางณัฐสิมา โชษิตเจริญกุล)
นักวิชาการโรคพืชชำนาญการพิเศษ
ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยโรคพืช

เอกสารแนบ 2

ผลการวิเคราะห์และจัดจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ผู้ผลิต ไม่ระบุ
ผู้ส่งตัวอย่าง กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร
โดย ส่วนตรวจสอบกำกับดูแลศูนย์วิจัยเกษตรเขตที่ ๒ กรมส่งเสริมการเกษตร หนังสือเลขที่ [redacted]
ชื่อการค้า [redacted]
ชื่อสามัญ *Trichoderma harzianum, Trichoderma hamatum, Bacillus subtilis*



ภาพที่ 1 Phylogram ได้จากการวิเคราะห์ชุดข้อมูลของยีนตำแหน่ง ITS และ TEF1 ด้วยวิธี maximum likelihood ด้วยโปรแกรม RAxML ค่า bootstrap (มากกว่าหรือเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์) เหนือแต่ละ nodes ได้จากการวิเคราะห์ 1,000 ซ้ำ

ผลการตรวจวิเคราะห์นี้ รับรองผลเฉพาะตัวอย่าง หรือรายการที่ระบุไว้เท่านั้น

กรมวิชาการเกษตร

บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กลุ่มสารวัตรเกษตร โทรศัพท์ ๐-๒๕๗๙-๖๐๐๐

ที่ กษ ๐๙๓๓/[redacted] วันที่ ๕ พฤศจิกายน ๒๕๖๔

เรื่อง ส่งตัวอย่างวัตถุอันตรายเพื่อวิเคราะห์

เรียน ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร ได้รับหนังสือที่ ตช [redacted] ลงวันที่ ๓ พฤศจิกายน ๒๕๖๔ กองกำกับการ ๒ กองบังคับการปราบปรามการกระทำความผิดเกี่ยวกับการคุ้มครองผู้บริโภค เรื่อง ขอส่งวัตถุของกลางมาเพื่อตรวจวิเคราะห์ จำนวน ๒ รายการ

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร โดยกลุ่มสารวัตรเกษตร ขอส่งตัวอย่างวัตถุอันตราย จำนวน ๒ ตัวอย่าง ตามใบนำส่งตัวอย่างวัตถุอันตราย เพื่อวิเคราะห์หาชนิดจุลินทรีย์และปริมาณจุลินทรีย์ รายละเอียดตามเอกสารแนบ ซึ่งตัวอย่างไม่ได้ผนึกตามคู่มือวิธีการปฏิบัติการเก็บตัวอย่าง เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่ได้รับจากการร้องเรียน

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

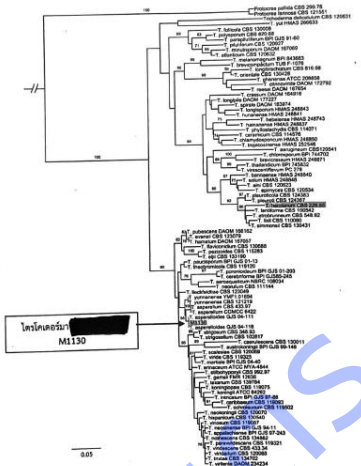
(นายธรรมญญ แก้วลงคา)
ผู้อำนวยการสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

(นายศรุต สุทธิอารมณ์)
ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เอกสารแนบ 2

ผลการวิเคราะห์และจัดจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ผู้ผลิต ไม่ระบุ
ผู้ส่งตัวอย่าง กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร
โดย กองกำกับการ 2 กองบังคับการปราบปรามการกระทำความผิดเกี่ยวกับการคุ้มครองผู้บริโภค หนังสือเลขที่ ตช [redacted]
ชื่อการค้า [redacted]
ชื่อสามัญ ไตรโคเดอร์มา ฮาร์เซียนัม (*Trichoderma harzianum*)



ภาพที่ 1 Phylogram ได้จากการวิเคราะห์ชุดข้อมูลของยีนตำแหน่ง ITS และ TEF1 ด้วยวิธี maximum likelihood ด้วยโปรแกรม RAxML ค่า bootstrap (มากกว่าหรือเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์) เหนือแต่ละ nodes ได้จากการวิเคราะห์ 1,000 ซ้ำ

ionique CO.,LTD. บริษัท ไอออนิค จำกัด
71/13 ถนนบรมราชชนนี แขวงอรุณอมรินทร์ เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700
71/13 Boromrajchonnee Rd., Arun Amarin, Bangkok Noi, Bangkok 10700
TEL : 02-884-9155 FAX : 02-884-9383 E-mail : admin@ionique.co.th

20 เมษายน 2564

เรื่อง ขอส่งตัวอย่างวิเคราะห์

เรียน ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บริษัท ไอออนิค จำกัด ขอส่งวิเคราะห์เชื้อราไบโอวัณฑ์ ชื่อสามัญ *Trichoderma* [redacted] ผู้ผลิต บริษัท ไอออนิค จำกัด จำนวน 1 คิโลกรัม เพื่อตรวจแยกชนิด/ลักษณะ รวมทั้งตรวจนับปริมาณเชื้อราในชีวภัณฑ์

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาและโปรดพิจารณา

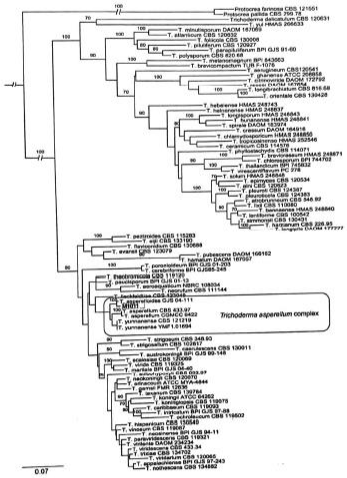
ขอแสดงความนับถือ
ionique CO.,LTD. บริษัท ไอออนิค จำกัด
(นางสาววรัญญา เดอะสกุล)
เจ้าหน้าที่งานทะเบียน

(นายศรุต สุทธิอารมณ์)
ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
๒๐ เม.ย. ๒๕๖๔

เอกสารแนบ 2

ผลการวิเคราะห์และจัดจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ผู้ผลิต บริษัท ไอออนิค จำกัด
ผู้ส่งตัวอย่าง บริษัท ไอออนิค จำกัด
ชื่อการค้า ไม่ระบุ
ชื่อสามัญ *Trichoderma* [redacted]



ภาพที่ 1 Phylogram ได้จากการวิเคราะห์ชุดข้อมูลของยีนตำแหน่ง ITS และ TEF1 ด้วยวิธี maximum likelihood ด้วยโปรแกรม RAxML ค่า bootstrap (มากกว่าหรือเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์) เหนือแต่ละ nodes ได้จากการวิเคราะห์ 1,000 ซ้ำ

กรมวิชาการเกษตร