

สัณฐานวิทยาและลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟดอกไม้ *Frankliniella schultzei*  
(Trybom)

Morphology and DNA Sequence of Common Blossom Thrips;  
*Frankliniella schultzei* (Trybom)

อิทธิพล บรรณาการ จารุวัฒน์ แท้กุล สุนัดดา เขาวลิต ชมัยพร บัวมาศ  
ชฎาภรณ์ เฉลิมวิเชียรพร เกศสุตา สนศิริ สิทธิศิโรตม แก้วสวัสดิ์  
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สำรวจ รวบรวมเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชต่างๆ เช่น มะเขือ ข้าวโพด หอม พืชตระกูลแตง และไม้ดอก ไม้ประดับ ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ระหว่างเดือนตุลาคม 2555 ถึง เดือนกันยายน 2556 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน เพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟดอกไม้ได้ 125 ตัวอย่าง ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae ชื่อวิทยาศาสตร์ *Frankliniella schultzei* Trybom ทำให้ทราบถึงพืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย และได้ตัวอย่างเพลี้ยไฟดอกไม้ที่ถูกต้องสำหรับใช้ทำการทดลองหา ลำดับพันธุกรรมต่อไป การทดลองเรื่องนี้ยังไม่สิ้นสุดต้องดำเนินการต่อในปี 2557

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-30-56

## คำนำ

ปัจจุบันความรู้ทางด้านอนุชีววิทยาได้ก้าวหน้าไปอย่างมาก และมีบทบาทสำคัญในการวินิจฉัยด้านต่างๆ มากขึ้นเรื่อยๆ ให้ผลการวินิจฉัยที่รวดเร็วและถูกต้องกว่า ทำให้เทคนิคทางอนุชีววิทยาได้ถูกพัฒนานำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมาย รวมทั้งด้านการหาลำดับพันธุกรรม (DNA Sequencing) ของแมลง และ Phylogeny ของแมลง เช่น แมลงสาบ ตั๊กแตน และปลวก (Srinivas, 1995) เพลี้ยไฟดอกไม้ (Common Blossom Thrips) เป็นเพลี้ยไฟชนิดที่เป็นศัตรูพืชสำคัญของพืชหลายชนิด อาทิ ข้าวฟ่าง ถั่วลิสง ฝ้าย พริก หอมใหญ่ และไม้ดอกหลายชนิด บางชนิดเป็นพาหะนำโรค TSWV มาสู่พืชจำพวกถั่วเหลือง (ศิริณี, 2544) แต่จากการเก็บสำรวจรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟชนิดนี้ พบว่า เพลี้ยไฟดอกไม้ในเขตภาคเหนือจะมีลำตัวสีเข้ม ในขณะที่เพลี้ยไฟดอกไม้ในเขตภาคกลางจะมีลำตัวสีเหลือง แต่เมื่อนำมาทำสไลด์ถาวรเพื่อจำแนกชนิดแล้วพบว่า เป็นชนิดเดียวกัน การศึกษาลำดับพันธุกรรมจะทำให้ทราบถึงความแปรปรวนของลำดับยีนของเพลี้ยไฟดอกไม้ในแต่ละพื้นที่ ฉะนั้นการศึกษาลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟดอกไม้จึงมีบทบาทสำคัญในการช่วยวินิจฉัยชนิด และให้ผลการจำแนกชนิดถูกต้องแม่นยำ มีความสะดวกรวดเร็ว อีกทั้งผลการศึกษายังเป็นที่ยอมรับในระดับสากล การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ควบคู่กับการศึกษาลำดับพันธุกรรม จะช่วยแก้ปัญหาในการตรวจวินิจฉัยชนิดเพลี้ยไฟดอกไม้ที่มีสีของลำตัวแตกต่างกัน และมีข้อได้เปรียบเรื่องการได้มาของข้อมูลซึ่งไม่มีหน่วยงานอื่นในประเทศทำวิจัยเชิงลึกเช่นนี้ อีกทั้งยังเป็นการริเริ่มการวิเคราะห์ชนิดศัตรูพืชโดยวิธีใหม่ที่ทันสมัย สามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษาให้กับเจ้าหน้าที่ด้านตรวจพืชสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงทั้งในระยะไข่และตัวอ่อนได้อย่างทันต่อเหตุการณ์ ช่วยลดระยะเวลาการกักเก็บสินค้าเพื่อตรวจสอบ สร้างความน่าเชื่อถือและไม่ส่งผลเสียในภาพรวม ทั้งนี้การหาลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟดอกไม้ ที่วิเคราะห์ได้นี้สามารถนำมาศึกษา phylogeny กับเพลี้ยไฟชนิดอื่นๆ ได้ในอนาคต

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

ตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง ปากคิ๊บ พู่กัน ขวดดอง กล่องพลาสติก ถังพลาสติก ถังรักษาความเย็น ฯลฯ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ 50-100%, AGA, โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10%, โคลฟอย และ แคนาดาบัลซัม เข้มแข็ง แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องสไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ PCR ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์ 99% กรดอะซิติก dNTP mixtures, 10X PCR buffer, Automatic pipette ปีกเกอร์ หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ DNA Thermal Cycle เครื่อง Electrophoresis, Gel Documentary, Gene Amp PCR กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope ที่ติด camera lucida เป็นอุปกรณ์เสริมช่วยในการวาดภาพแมลงที่พบ กล้องถ่ายภาพ อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา rotring และกระดาษไขเขียนแบบ

## วิธีการ

### การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเปลือกไฟในแหล่งปลูกพืชต่างๆ ทุกภูมิภาคของประเทศไทย เพื่อศึกษาความแปรปรวนของลำดับพันธุกรรมของเปลือกไฟดอกไม้ ในพื้นที่ภูมิภาคเดียวกันและระหว่างภูมิภาค โดยใช้วิธีการตีหรือเขย่าส่วนของพืชเช่น ใบ และดอก ให้เปลือกไฟตกลงบนกระดาษขาวที่รองรับ และใช้ฟู่กันเขี่ยเปลือกไฟแต่ละตัวอย่างลงในขวดที่บรรจุน้ำยา AGA สำหรับศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและ แอลกอฮอล์ 95% สำหรับศึกษาลำดับพันธุกรรม รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่มีชีวิตด้วย บันทึกรายละเอียดของเปลือกไฟที่เก็บได้ เช่น พืชที่เก็บ ส่วนของพืชที่เก็บ สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) และชื่อผู้เก็บ ลงในขวดดองเปลือกไฟ นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาพฤติกรรมและการเจริญเติบโต และนำตัวเต็มวัยไปทำสไลด์ถาวร

#### วิธีการทำสไลด์ถาวรของเปลือกไฟ มีขั้นตอนดังนี้

- ย้ายตัวอย่างเปลือกไฟจากขวดดองเก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 60 % แช่ทิ้งไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง

- ย้ายลงในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) 5% เพื่อให้สีของเปลือกไฟจางลง เวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างเปลือกไฟ เจาะส่วนท้องของเปลือกไฟบริเวณต้นขาของขาหลังด้วยเข็มแหลมขนาดเล็ก เพื่อให้ของเหลวภายในออกจากตัวเปลือกไฟ

- ย้ายเปลือกไฟที่เจาะแล้วลงในน้ำกลั่น 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) เพื่อให้ตัวอย่างของเปลือกไฟใส แช่ทิ้งไว้ 20 – 30

นาที

- หยดแคนาดาบัลซั่ม (Canada balsam) ซึ่งเป็นน้ำยาเมาท์สไลด์ (Mounting media) เพียงเล็กน้อยลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ ป้ายเปลือกไฟลงในหยดแคนาดาบัลซั่มลงบนกึ่งกลางของแผ่นสไลด์แก้ว ค่อยๆคว่ำแผ่นสไลด์ช้าๆ จนกระทั่งจรดแผ่นแก้วปิดสไลด์ รีบพลิกแผ่นสไลด์แก้วให้ด้านแผ่นแก้วปิดสไลด์กลับขึ้นด้านบน นำไปอบให้แห้ง

3. วาดภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของแมลงที่ได้ศึกษา

#### 13.1.2 การศึกษาลำดับพันธุกรรม

1. นำตัวอย่างเปลือกไฟที่ได้จำแนกชนิดเบื้องต้นภายใต้ stereo microscope (ตัวอย่างกลุ่มเดียวกับตัวอย่างที่ใช้ทำสไลด์ถาวร)

2. ศึกษาลำดับพันธุกรรม

## วิธีการหาลำดับพันธุกรรมปรับปรุงจากวิธีการศึกษายีน COI ของ Tada (2004)

### ขั้นตอนการสกัด ดีเอ็นเอ

- บดตัวอย่างเพลี้ยไฟ 1 ตัวอย่างใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ด้วย sterilized polypropylene pestle ในสารละลาย STE buffer [100 mM NaCl, 10 mM Tris- HCL (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)] 100 ไมโครลิตร
- นำสารละลายที่ได้ incubated ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นแรงเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 14,000 รอบ/นาที เวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- ตูดสารละลายส่วนใสที่ได้ 2 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็น DNA Template ในขั้นตอน PCR (polymerase chain reaction)

### การศึกษายีน COI โดยเทคนิค PCR

- ศึกษายีน COI (cytochrome oxidase subunit I) ซึ่งมีขนาด 642 bp และเป็น conserved region ของแมลงทุกชนิด (บาร์โค้ด) โดยใช้ primer UEA 7 และ UEA 10 ลำดับของ primer คือ

UEA 7            5'-TACAGTTGGAATAGACGTTGATAC-3'

UEA 10           5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3'

- นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 3 ทำปฏิกิริยากับ 20  $\mu$ l reaction volumes [12.5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l 10X PCR buffer (Promega), 2  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ l dNTP (10 mM each), 0.5  $\mu$ l 20 mM forward and reverse primers และ *Taq* DNA polymerase 1 unit (Promega) ขั้นตอนและอุณหภูมิของขั้นตอนการทำ PCR คือ

Initial denaturation	ที่ 94 °C	3 นาที	} 35 cycles
Denaturation	ที่ 94 °C	1 นาที	
Annealing	ที่ 55 °C	1 นาที	
Extension	ที่ 72 °C	1 นาที	
Final extension	ที่ 72 °C	30 นาที	

- หลังจากขั้นตอน PCR นำสารที่ได้ 10 ไมโครลิตรทดสอบใน 1% w/v agarose gel เปรียบเทียบ กับ 100 bp DNA ladder เพื่อหาขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ว่ามีขนาดประมาณ 700 bp หรือไม่

### การหาและวิเคราะห์ลำดับเบสของ ยีน COI

- วิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบส นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ยีนของ NCBI

### เวลาและสถานที่

เวลา            เดือนตุลาคม 2555 ถึง เดือนกันยายน 2556

สถานที่        1. แปลงปลูกพืชในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ  
2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มงานวิจัยการปราบ

ศัตรูพืช ทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

### ผลและผลวิจารณ์การทดลอง

ได้ตัวอย่างเพลี้ยไฟดอกไม้ 125 ตัวอย่าง ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae ชื่อวิทยาศาสตร์ *Frankliniella schultzei* Trybom ทำให้ทราบถึงพืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย และได้ตัวอย่างเพลี้ยไฟดอกไม้ที่ถูกต้องสำหรับใช้ทำการทดลองหาลำดับพันธุกรรมต่อไป

### สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาสัณฐานวิทยาและลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟดอกไม้ *Frankliniella schultzei* (Trybom) โดยการรวบรวมเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชต่างๆ เช่น มะเขือ ข้าวโพด หอม พืชตระกูลแตง และไม้ดอกไม้ประดับ ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ระหว่างเดือน ตุลาคม 2555 ถึง เดือนกันยายน 2556 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน เพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟดอกไม้ได้ 125 ตัวอย่าง ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae ชื่อวิทยาศาสตร์ *Frankliniella schultzei* Trybom ทำให้ทราบถึงพืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย และได้ตัวอย่างเพลี้ยไฟดอกไม้ที่ถูกต้องสำหรับใช้ทำการทดลองหาลำดับพันธุกรรมต่อไป การทดลองเรื่องนี้ยังไม่สิ้นสุดต้องดำเนินการต่อในปี 2557

### เอกสารอ้างอิง

- ศิริณี พูนไชยศรี. 2544. เพลี้ยไฟ *Terebrantia*. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. กรุงเทพฯ. 75 หน้า.
- Palmer, J. M., L. A. Mound and G. J. du Heunme. 1989. Cie Guides to Insects of Importance to Man. 2. Thysanoptera. C.A.B International Institute of Entomology. British Museum Natural History. 69 p.

ภาคผนวก



ตัวเต็มวัยของ *Frankliniella schultzei* Trybom



ภาพสไลด์ถาวรของ  
*Frankliniella schultzei* Trybom