ศึกษาชนิดและเขตการแพร่กระจายของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

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

ธารทิพย ภาสบุตร อภิรัชต์ สมฤทธิ์
อมรรัชฏ์ คิดใจเดียว มะโนรัตน์ สุดสงวน
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

เก็บตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสจากแหล่งปลูกพริกในจังหวัด เชียงราย เชียงใหม่ สุโขทัย แพร่ พิษณุโลก กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ราชบุรี และตาก ระหว่าง ตุลาคม 2560-กันยายน 2561 ได้ตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส จำนวน 40 ตัวอย่าง นำตัวอย่างไปศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อแยกเชื้อราสาเหตุโรคออกจากพืชโดยตรง (Direct observation) และโดยการแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค (Tissue transplanting) จากการแยกเชื้อและจำแนกชนิดของเชื้อราโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐาน ในเบื้องต้นจัดกลุ่มของราตามลักษณะรูปร่างของโคนิเดีย ได้ 2 กลุ่ม คือ 1.กลุ่มโคนิเดียรูปร่างทรงกระบอกหรือกระสวยตรง 2.กลุ่มโคนิเดียรูปร่างโค้งคล้ายพระจันทร์เสี้ยว และจัดจำแนกชนิดตามหลักเกณฑ ของ Sutton (1980) ได้เป็น *Colletotrichum gloeosporioides* *Colletotrichum acutatum* และ *Colletotrichum capsici*

คำหลัก: *Colletotrichum* โรคแอนแทรคโนสของพริก

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-02-11-61

คำนำ

พริก (Chili; *Capsicum* spp.) เปนพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ที่นิยมปลูกได้แก่ พริกขี้หนูผลใหญ่ พริกชี้ฟ้า พริกขี้หนูสวน พริกหยวก พริกเหลือง พริกหนุ่ม พริกกะเหรี่ยง และ พริกหวาน เป็นต้น เมื่อนำพริกแต่ละชนิดมาจัดกลุ่ม จัดได้ 3 กลุ่มคือ 1.กลุ่มพริกใหญ่ (*Capsicum annuum* L.) พริกกลุ่มนี้มีขนาดผลกว้างประมาณ 1-3 เซนติเมตร ยาว 8-20 เซนติเมตร มีความเผ็ดในระดับน้อยถึงเผ็ดปานกลาง พริกที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มพริกใหญ่ ได้แก่ พริกบางช้าง พริกมัน พริกหนุ่ม พริกเหลือง พริกซอส และพริกหวาน 2.กลุ่มพริกขี้หนูใหญ่ (*Capsicum annuum* L.) ขนาดของผลโดยประมาณกว้าง 0.3-1 เซนติเมตร ผลยาว 3-8 เซนติเมตร มีรสเผ็ด พริกที่จัดอยู่ในกลุ่มพริกขี้หนูใหญ่ ได้แก่ พริกจินดา พริกหัวเรือ พริกห้วยสีทน พริกยอดสนและพริกช่อ 3. กลุ่มพริกขี้หนูเล็ก (*Capsicum frutescens* L.) ขนาดผลโดยประมาณยาวน้อยกว่า 3 เซนติเมตร พริกขี้หนูผลเล็กเป็นพริกที่มีรสเผ็ดจัด ตัวอย่างพริกขี้หนูเล็ก ได้แก่ พริกขี้หนูหอม พริกขี้นกและพริกกะเหรี่ยง (วิลาวัณย์, 2557) ในระบบการปลูกพริกโรคที่สำคัญที่สุดโรคหนึ่งคือ โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) หรือ โรคกุ้งแห้งของพริก ซึ่งจะพบระบาดทำความเสียหายต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิตพริกในแปลงปลูกพริกของเกษตรกรในทุกแหล่งปลูก (นิรนาม, 2552) มีรายงานว่าเกิดจากราสกุล *Colletotrichum* หลายสปีชีส์ ซึ่งโดยส่วนใหญ่พบว่ามีสาเหตุจากรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. และ *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler & Bisby การแพร่ระบาดของโรคเกิดจากโคนิเดียของเชื้อราบนผลพริกที่เป็นโรคแพร่ไปกับลม น้ำฝน และแมลง เชื้อราอยู่ข้ามฤดูปลูกโดยเส้นใย ราที่อาศัยอยู่ในเมล็ดจะเข้าทำลายต้นกล้าในระยะพืชงอกเป็นต้นกล้าเกิดอาการกล้าเน่าตายและเข้าทำลายพืชต่อเนื่องในระยะติดผลกระทั่งผลเริ่มสุกแก่ (Chandra *et al*., 2009; Than *et.al*., 2008) ลักษณะอาการส่วนใหญ่มักพบบนผลพริกในระยะเริ่มสุกก่อนที่จะเปลี่ยนสี อาการในระยะแรกจะปรากฏเป็นจุดฉ่ำน้ำเล็กๆ แผลบุ๋มลึกลงไปเล็กน้อย ต่อมาแผลขยายขนาดออกไปในลักษณะวงรี หรือวงกลม เกิดเป็นวงดำซ้อนกันเป็นชั้นๆ บางครั้งจะพบเมือกเยิ้มสีส้มอ่อนที่บริเวณแผล ผลพริกที่เป็นโรคจะเหี่ยวแฟบ สีเหลืองซีด ผลโค้งงอ ในสภาพแวดล้อมเหมาะสม และหรือพริกเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค แผลจะขยายลุกลามสู่ต้นอื่นๆอย่างรวดเร็ว ทำความเสียหายมาก บางแปลงอาจเก็บเกี่ยวผลผลิตไม่ได้เลย โรคแอนแทรคโนสในพริกจะระบาดรุนแรงมากในสภาพฟ้าอากาศที่มีความชื้นสูง และอุณหภูมิร้อนอบอ้าว (Robert *et. al*., 2001; Chandra *et al*., 2009; Than *et.al*., 2008)

ปัจจุบันระบบนิเวศน์เกษตรมีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ ทั้งสภาพอากาศและชนิดของพันธุ์พืชที่ปลูก จึงอาจมีแนวโน้มทำให้ราสาเหตุโรคมีความผันแปรในหลายๆด้านรวมทั้งความสามารถในการทำให้เกิดโรค ซึ่งพบว่าปัจจุบันพบการเขาทำลายผลพริกไดทุกระยะทั้งที่ผลยังเขียวและผลที่เปลี่ยนสีแล้ว ดังนั้นการศึกษาชนิดและเขตการแพร่กระจายของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก จึงมีความสำคัญที่ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานและชนิดของราสาเหตุโรคบนพริกแต่ละสายพันธุ์ รวมทั้งแหล่งการแพร่ระบาดของโรค ซึ่งข้อมูลดังกล่าวเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญสำหรับการศึกษาวิธีการป้องกันกำจัดโรค รวมทั้งได้สายพันธุ์รา *Colletotrichum* spp. เก็บรักษาไว้ในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพริกเป็นโรคที่รวบรวมได้จากแปลงปลูก
2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างโรคพืช
3. อาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดต่าง ๆ วุ้น มันฝรั่ง
4. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง
5. วัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ
6. วัสดุอุปกรณ์สำหรับการบันทึกข้อมูลและบันทึกภาพ

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการเป็นโรคแอนแทรคโนส

เก็บตัวอย่างพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนสจากแหล่งปลูกพริกที่สำคัญโดยกำหนดพื้นที่แหล่งปลูกที่ ดังนี้

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

ภาคเหนือ เช่น จังหวัดเชียงราย แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง แพร่ น่าน พะเยา อุตรดิตถ์

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดอุบลราชธานี นครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น ร้อยเอ็ด นครพนมอำนาจเจริญศรีสะเกษ เลย

ภาคตะวันออกเช่น จังหวัดปราจีนบุรี สระแก้ว ระยอง ชลบุรี จันทบุรี ตราด ฉะเชิงเทรา

ภาคตะวันตก เช่น จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์

ภาคใต้ เช่น จังหวัดกระบี่ ชุมพร นครศรีธรรมราช พัทลุง สุราษฎร์ธานี

วางแผนการสำรวจในพื้นที่ในระหว่างฤดูปลูก แต่ละแปลงทำการสุ่มเก็บตัวอย่างโรค 5 แถวต่อแปลง กำหนดการสุ่มแบบแถวเว้นแถว นำตัวอย่างโรคที่ได้ห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก เจาะระบายความชื้น นำตัวอย่างพืชมาแยกเชื้อราสาเหตุโรคและศึกษาชนิดที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช

2. การศึกษารา *Colletotrichum* spp.

2.1 ศึกษาเชื้อสาเหตุจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง (Direct observation) ศึกษาลักษณะโครงสร้างที่สร้างโคนิเดียของราบนผลพริกภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo ใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยส่วน โคนิเดีย หรือโครงสร้างที่สร้างส่วนขยายพันธุ์ของรา มาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ ตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ้าไม่พบโคนิเดียของราบนชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคหลังจากตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo ไม่พบราบนชิ้นส่วนพืชให้ทำ moist chamber โดยนำตัวอย่างพืชมาไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว วางชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคไว้บนกระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และหยดน้ำนึ่งที่ฆ่าเชื้อแล้วบนกระดาษกรองเพื่อให้ความชื้น วางไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ 2-5 วัน ใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยราที่เจริญอยู่บนชิ้นส่วนพืชมาตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound บันทึกลักษณะต่าง ๆ วัดขนาดส่วนต่าง ๆ ของราและ ถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ เมื่อพบการสร้างกลุ่มโคนิเดีย เขี่ยกลุ่มโคนิเดียนำไปเลี้ยงให้บริสุทธิ์

2.2 ศึกษาเชื้อสาเหตุโดยวิธีแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค (Tissue transplanting) ตัดตัวอย่างพืชที่เป็นโรคบริเวณที่เป็นรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติขนาดประมาณ 2x2

มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวพืช โดยแช่ชิ้นส่วนพืชลงในสารละลายคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้งสนิท นำชิ้นส่วนพืชมาวางบนอาหาร half strength Potato Dextrose Agar (1/2 PDA) ภายใต้ aseptic condition บ่มไว้ที่ อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจดูเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo ตัดปลายเส้นใย (hyphal tip) ของราที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนพืช วางลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เก็บไว้ที่ อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ จนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ศึกษารายละเอียดของราเพื่อจำแนกชนิดและเก็บรักษาสายพันธุ์ราไว้ในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

2.3 จำแนกชนิดของรา *Colletotrichum* spp.

- ศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ เช่น ลักษณะการเจริญและสีของโคโลนี ลักษณะโครงสร้างที่ให้กำเนิดโคนิเดีย

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

- นำลักษณะสัณฐานที่ได้จากการศึกษาเปรียบเทียบกับคู่มือการจัดจำแนกชนิดรา *Colletotrichum* spp. ตามเอกสารและวิธีการของ Sutton (1980) Bailey and Jeger (1992) วิรัช และคณะ (2528) รัติยาและคณะ (2553) และ วรานันท์ (2554)

3. ศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ตามวิธีการของ วรานันท์ (2564)

ศึกษาการสร้าง clear zone บนอาหาร Casein hydrolysis medium (CHM)

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

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

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

การบันทึกข้อมูล

รายละเอียดของของข้อมูลในการสำรวจเช่น ชื่อที่อยู่ที่ตั้งของแปลง ตำแหน่งที่ตั้ง (พิกัดทางภูมิศาสตร์) วัน เดือน ปีที่เก็บตัวอย่าง พันธุ์พริก เป็นต้น

ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราเช่น ลักษณะการเจริญและสีของโคโลนี ลักษณะและขนาดของเส้นใย ลักษณะรูปร่าง ขนาดและสีของโคนิเดีย รูปร่างและขนาดของแอพเพรสซอเรีย

วัดขนาดของ clear zone ศึกษาความสัมพันธ์ของ clear zone และชนิดของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้น เดือน ตุลาคม 2560 ถึง เดือน กันยายน 2561
สถานที่ทำการทดลอง แปลงปลูกพริกของเกษตรกร
ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการเป็นโรคแอนแทรคโนส

เก็บรวบรวมตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสจากแหล่งปลูกพริกจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน สุโขทัย แพร่ พิษณุโลก กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ราชบุรี และตาก ได้ผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส จำนวน 40 ตัวอย่าง นำมาตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นในหองปฏิบัติการ

2. การศึกษารา *Colletotrichum* spp. จากส่วนของพืชที่เป็นโรค

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

3. การศึกษารา *Colletotrichum* spp.

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของรา *Colletotrichum* spp. จัดกลุ่มของราตามลักษณะรูปร่างของโคนิเดีย ได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่มโคนิเดียรูปร่างทรงกระบอกหรือกระสวยตรง และ กลุ่มโคนิเดียรูปร่างโค้งคล้ายพระจันทร์เสี้ยว จัดจำแนกชนิดของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกในเบื้องต้นได้เป็น *Colletotrichum gloeosporioides Colletotrichum acutatum* และ *Colletotrichum capsici*

Colletotrichum capsici ลักษณะแผลบนผลพริกยุบตัวลงเป็นแอ่ง มีจุดสีดำหรือกลุ่ม acervulus เรียงซ้อนกันเป็นวงทำให้มองเห็นเป็นแผลสีน้ำตาลเข้มถึงดำ มี setae สีดำยาวสูงกวา conidia mass ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA โคโลนีมีสีเทาถึงสีเทาดำ เส้นใยฟูเหนืออาหารเล็กน้อย บางครั้งแบนราบไปบนอาหาร พบกลุ่มของโคนิเดียเมื่อเชื้อเจริญได้ 10-14 วัน ลักษณะกลุ่มโคนิเดียเป็นเมือกสีครีมถึงส้มอ่อนปกคลุม acervulus ที่มีลักษณะเป็นจุดสีดำฝังอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยของราใสไม่มีสี มีผนังกั้น (septum) โคนิเดียรูปร่างโค้งคล้ายพระจันทร์เสี้ยว เซลล์เดียว ใส ไม่มีสี

Colletotrichum gloeosporioides ลักษณะแผลบนผลพริกยุบตัวลงเป็นแอ่ง แผลสีน้ำตาลเข้มถึงดำ มักพบกลุ่มโคนิเดียเป็นเมือกสีส้มปกคลุม acervulus ที่เรียงซ้อนกันเป็นวง ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA โคโลนีมีสีขาวอมเทา เมื่อมีอายุมากขึ้นมีสีเทาถึงสีเทาเข้ม เส้นใยเจริญฟูเหนืออาหาร พบกลุ่มของโคนิเดียเมื่อเชื้อเจริญได้ 10-14 วัน ลักษณะกลุ่มโคนิเดียเป็นเมือกสีส้ม เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยของราใสไม่มีสี มีผนังกั้น โคนิเดียรูปร่างเป็นทรงกระบอกตรง เซลล์เดียว ใส ไม่มีสี ปลายมน ส่วนฐานตัดตรง โคนิเดียขนาดเฉลี่ย 5.72-5.96 x 15.26-18.77 ไมครอน

Colletotrichum acutatum ลักษณะแผลบนผลพริกยุบตัวลงเป็นแอ่งลึก ตรงกลางแผลสีอ่อน บริเวณแผลพบรอยแตกเป็นสเก็ด ภายในรอยแตกพบกลุ่มโคนิเดียสีส้มจำนวนมาก ไม่พบการสร้าง setae ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA โคโลนีมีสีขาวอมชมพู แล้วเปลี่ยนเป็นสีเทาอมชมพู เส้นใยคล้ายกำมะหยี่ฟูเหนืออาหารเล็กน้อย เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยของรามีผนังกั้น โคนิเดียรูปร่างกระสวยตรง ปลายแหลม เซลล์เดียว ใส ไม่มีสี

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

-

เอกสารอ้างอิง

นิรนาม. 2552. *คู่มือโรคผัก* กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 154 หน้า.

รัติยา พงศพิสุทธา วรานันท วิญญูรัตน โชติรส รอดเกตุ และเทพพนม แสงเพลิง. 2553. ความผันแปรทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. ปที่ 41 ฉบับที่ 1 (พิเศษ) มกราคม-เมษายน. 318 -321.

วรานันท์ วิญญูรัตน์ รัติยา พงศ์พิสุทธา และชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล. 2553. การทดสอบ casein hydrolysis เพื่อจำแนก species ของ *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร.* ปีที่ 41 ฉบับที่ 1 (พิเศษ) มกราคม-เมษายน. 299-302.

วรานันท์ วิญญูรัตน์. 2554. *การจำแนกชนิดและศึกษาความรุนแรงของเชื้อรา Colletotrichum สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิยาลัยเกษตรศาสตร์. 136 หน้า.

วิลาวัณย์ ใคร่ครวญ. 2557. *พริกของไทย.พริกใหญ่ พริกเล็ก*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://www.doa.go.th/pibai/pibai/n17/v_3-apr/korkui.html. (23 กุมภาพันธ์ 2560).

วิรัช ชูบำรุง ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และพัฒนา สนธิรัตน. 2528. *Colletotrichum spp. ในประเทศไทย*. หน้า128-140. *ใน*: *รายงานผลงานวิจัย พ.ศ.2528.* กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

Bailey, J. A. and M. J Jeger. 1992. *Colletotrichum*: *Biology, Pathology and Control*. Commonwealth Mycological Institute, Wallingford, UK: CAB International. 388 p.

Chandra, S. Nayaka, A.C. Udaya Shankar, 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 p.

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).

Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes, Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata*. CMI. Kew Surrey, England. 695 p.

Than, P.P., Haryudian Prihastuti, Sitthisak Phoulivong, Paul V.J.Taylor and Kevin D. hyde. 2008. Chili Anthracnose Disease Caused by Colletotrichum species. *Journal of Zhejiang Univ. Sci*. B. 9 (10): 764-778.

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

ชมัยพร บัวมาศ ยุวรินทร์ บุญทบ สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Life history and taxonomic characteristic of papaya mealybug (*Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink) were conducted between October 2016 and September 2018. Rearing *P. marginatus* was on four host plants including papaya, cassava, frangipani and Chinese rose in the laboratory of Insect Taxonomy Section, Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research and Development office. The adult female longevity of *P. marginatus* on four host plants varied in the order, papaya > frangipani > cassava > Chinese rose. The life cycle of *P. marginatus* was observed on papaya, frangipani, cassava and Chinese rose; total life span is 39.8, 38.9, 34.3 and 33.2 days respectively. The total number of eggs from each ovisac recorded the highest and lowest on papaya and Chinese rose respectively. Slide-mounted of *P. marginatus* in each stage were collected at insect museum of Department of Agriculture and did the key for identification of all stages of *P. marginatus*.

Keyword : life history, papaya mealybug, *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-01-01-60

บทคัดย่อ

การศึกษาชีวประวัติและอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งมะละกอ (papaya mealybug) *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink โดยนำมาเลี้ยงบนพืชอาหารจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ มะละกอ มันสำปะหลัง ลีลาวดี และชบา ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยทำการศึกษาตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 ถึง กันยายน 2561 พบว่า ตัวเต็มวัยของเพลี้ยแป้งมะละกอ (*P. marginatus*) ที่เลี้ยงในมะละกอมีช่วงอายุเฉลี่ยยาวนานที่สุด รองลงมาได้แก่ ลีลาวดี มันสำปะหลัง และชบา ตามลำดับ สำหรับวงจรชีวิต พบว่า เมื่อเลี้ยงในมะละกอมีวงจรชีวิตเฉลี่ยนานที่สุด คือ 39.8 วัน รองลงมา คือ ลีลาวดี 38.9 วัน เมื่อเลี้ยงในมันสำปะหลัง มีวงจรชีวิตเพียง 34.3 วัน และ 33.2 วันในชบา เพลี้ยแป้งมะละกอ (*P. marginatus*) สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ วางไข่อยู่ภายในถุงไข่ ซึ่งแต่ละถุงไข่เมื่อทำการตรวจนับจำนวนไข่มีความแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด พบว่า จำนวนไข่เฉลี่ยที่เลี้ยงด้วยมะละกอมีจำนวนสูงสุดและในชบาน้อยที่สุด ตัวอย่างของเพลี้ยแป้งแต่ละระยะได้นำมาทำสไลด์ถาวรเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลเปรียบเทียบ จัดทำเป็นคู่มือในการจำแนกเพลี้ยแป้งมะละกอ (*P. marginatus*) แต่ละระยะการเจริญเติบโตพร้อมจัดเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง

คำหลัก : ชีวประวัติ เพลี้ยแป้งมะละกอ *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

คำนำ

เพลี้ยแป้งมะละกอ (papaya mealybug) *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink จัดเป็นเพลี้ยแป้งไม่ประจำถิ่นของประเทศไทยและแถบเอเชีย ซึ่ง Miller *et al*. (1999) เชื่อว่าน่าจะเป็นเพลี้ยแป้งประจำถิ่นในประเทศเม็กซิโก หรือในแถบอเมริกากลาง และได้ระบาดไปยังประเทศต่าง ๆ ทั่วทุกภูมิภาคของโลกอย่างรวดเร็ว ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบเพลี้ยแป้งมะละกอครั้งแรก เมื่อปี 1998 และ ปี 2000 พบมีการระบาดในแถบอเมริกากลาง (Matile-Ferrero *et al*., 2000) และเริ่มมีการรายงานการระบาดจากภูมิภาคต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น เช่น ปี 2008 มีรายงานการพบเพลี้ยแป้งมะละกอลงทำลายพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ได้แก่ ลีลาวดี และมะละกอ ในประเทศศรีลังกา (Galanihe *et al*., 2010) และในปีเดียวกันนี้ ยังพบรายงานเพลี้ยแป้งมะละกอในประเทศอินโดนีเซียและอินเดียอีกด้วย (Muniappan *et. al*., 2008) ซึ่งเพลี้ยแป้งชนิดนี้ถือเป็นเพลี้ยแป้งต่างถิ่นรุกราน (alien invasive species) สามารถสร้างความเสียหายให้แก่พืชเศรษฐกิจจำนวนมาก และยังมีพืชอาหารที่หลากหลายถึง 22 วงศ์ (Ben-Dov, 1994)

สำหรับในประเทศไทยได้มีการพบเพลี้ยแป้งมะละกอลงระบาดในมันสำปะหลังเมื่อปี 2553 และพบว่าเพลี้ยแป้งมะละกอมีความสามารถในการทำลายมันสำปะหลังได้ค่อนข้างสูงโดยเฉพาะช่วงที่ไม่มีเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูระบาด และยังพบลงทำลายในพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ ได้แก่ ลีลาวดี ชบา สบู่ดำ มะเขือ พริก ปอ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย (ชมัยพร และคณะ 2557) เนื่องจากเพลี้ยแป้งมะละกอเป็นเพลี้ยแป้งที่มีพืชอาหารหลากหลายและมีการสำรวจพืชอาศัยของเพลี้ยแป้งชนิดนี้ในประเทศไทย พบว่า มีพืชอาศัยถึง 10 ชนิด ได้แก่ มะละกอ ลีลาวดีดอกแดง ลีลาวดีดอกขาว หญ้าก้นจำขาว 2 ชนิด ปัตตาเวีย มันสำปะหลัง ชบา พุดสามสี และมะเขือพวง (Saengyot and Burikam, 2011) ในปัจจุบันมีแนวโน้มที่เพลี้ยแป้งชนิดนี้จะลงทำลายพืชอื่น ๆ และเพิ่มความรุนแรงมากขึ้น แต่ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลด้านชีวประวัติซึ่งเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญในการหาแนวทางป้องกันกำจัดที่

ถูกต้องและเหมาะสมจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาชีวประวัติของเพลี้ยแป้งชนิดนี้เพื่อนำไปใช้ในการหาแนวทางในการป้องกันกำจัดต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเพลี้ยแป้งมะละกอ

2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างเพลี้ยแป้ง ได้แก่ แอลกอฮอล์ 70 – 80% หรือน้ำยา AGA ขวดดองตัวอย่างแมลง คัตเตอร์ กรรไกรตัดกิ่ง กล่องพลาสติก ถุงกระดาษและถุงพลาสติก

3. อุปกรณ์และพืชอาหารสำหรับเลี้ยงแมลง ได้แก่ กล่องพลาสติก พู่กัน สำลี ขวดแก้ว และพืชอาหารที่ใช้เลี้ยง ได้แก่ มันสำปะหลัง มะละกอ ลีลาวดี และชบา

4. อุปกรณ์บันทึกข้อมูล ได้แก่ กระดาษ ดินสอ เวอร์เนียร์คาลิเปอร์ เป็นต้น

5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวรเพลี้ยแป้ง ได้แก่ สารเคมีต่าง ๆ เช่น alcohol 70 %, potassium hydroxide 10%, hydrochloric acid, glacial acetic acid, acid fuchsin, alcohol 95%, clove oil และ Canada balsam เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องใส่สไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร

6. กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ,compound microscope กล้องถ่ายภาพและเครื่องระบุพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS)

7. อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา rotting และกระดาษไขเขียนแบบ

วิธีการ

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

2. เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากแหล่งปลูก เช่น มันสำปะหลัง มะละกอ ชบาและลีลาวดี ในจังหวัดสระบุรี นครราชสีมา ราชบุรี กาญจนบุรี เพื่อนำเพลี้ยแป้งมะละกอที่ได้มาทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการ โดยตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยแป้งอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษแล้วใส่ในถุงพลาสติก บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง ชนิดพืชอาศัย ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ

3. นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งมะละกอที่รวบรวมได้จากการสำรวจ 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 รวมทั้งพฤติกรรมต่าง ๆ 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 ขึ้นอยู่กับขนาดตัวอย่าง และระยะการเจริญเติบโตของเพลี้ยแป้ง

7.2 นำตัวอย่าง ที่ได้จากข้อ 7.1 มากดเบา ๆ บนลำตัวด้วยเข็มดัดปลายโค้ง เพื่อทำของเหลวที่อยู่ในลำตัวหลุดออกมาทางรอยที่เจาะไว้ ถ้ายังมีก้อนไขมันตกค้างอยู่ให้นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 2 – 3 นาที

7.3 ย้ายลงในกรดแอลกอฮอล์ (acid alcohol) ซึ่งเป็นสารละลายของกรดแกลเซียลอะซิติก 1 ส่วน และแอลกอฮอล์ 50% 4 ส่วน แช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

7.4 ย้อมสีตัวอย่างโดยแช่ในน้ำยาย้อมสี ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิดฟุชซิน (acid fuchsin) กรดเกลือ (hydrochloric acid) และน้ำกลั่น แช่ทิ้งไว้นาน 5-10 นาที

7.5 ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95% แช่ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที เพื่อกำจัดสีส่วนเกิน

7.6 แช่แอลกอฮอล์ 95% ทิ้งไว้ 10 นาที

7.7 ย้ายลงในโคล์ฟออย (clove oil) แช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

7.8 นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากข้อ 7.8 วางบนแผ่นสไลด์แก้ว ใช้กระดาษกรองซับโคล์ฟออยส่วนที่เกินออก หยดแคนาดาบัลซัม (canada balsam) 1 หยดบนตัวอย่างแมลงจัดรูปร่าง ให้สวยงามไม่บิดเบี้ยวหรือทับซ้อนกัน ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

7.9 นำไปอบให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 1-2 เดือน

8. ตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยแป้งบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Williams and Granara de Willink (1992) ตรวจดูลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก ได้แก่ หนวด (antennae) ขน (setae) รู (pores) ท่อ (tubular ducts) กลุ่มอวัยวะที่ผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว (cerarii) ช่องเปิดที่มีลักษณะคล้ายรอยแตกตามขวางของลำตัว (ostioles) และวงแหวนที่ล้อมรอบช่องเปิดของอวัยวะขับถ่าย (anal ring)

9. วาดรูปแสดงลักษณะทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งแต่ละระยะโดยวาดลงบนกระดาษกราฟและลอกลงบนกระดาษไขเขียนแบบและจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพลี้ยแป้งมะละกอในแต่ละระยะ

10. การบันทึกรายละเอียดบนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้วโดยวางแผ่นสไลด์หันด้านหัวของเพลี้ยแป้งเข้าหาตัว ด้านขวาเขียนรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ด้านซ้ายมือเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ เพศ วันเดือนปี ที่ทำสไลด์และชื่อผู้จำแนก ควรลงรายละเอียดดังกล่าวเป็นภาษาอังกฤษ

11. จัดเก็บตัวอย่างเพลี้ยแป้งในกล่องใส่สไลด์ถาวรและนำเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น เดือนตุลาคม 2559 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2561

สถานที่ : 1. แหล่งปลูกพืชต่าง ๆ

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ 1. ศึกษาด้านชีววิทยาของเพลี้ยแป้งมะละกอ โดยนำเพลี้ยแป้งมะละกอมาเลี้ยงบนพืชอาหารจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ มะละกอ มันสำปะหลัง ชบา และลีลาวดี 2. ศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งแต่ละระยะการเจริญเติบโต โดยนำตัวอย่างเพลี้ยแป้งแต่ละระยะการเจริญเติบโตที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการในพืชแต่ละชนิด มาทำสไลด์ถาวร เพื่อจัดทำคู่มือวินิจฉัยเพลี้ยแป้งมะละกอแต่ละระยะการเจริญเติบโต ดำเนินการทดลองทั้ง 2 ส่วน ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

1. การศึกษาชีววิทยาของเพลี้ยแป้งมะละกอ (papaya mealybug) *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

โดยนำเพลี้ยแป้งมะละกอมาเลี้ยงบนพืชอาหารจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ มะละกอ มันสำปะหลัง ลีลาวดี และ ชบา ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช พบว่า เพลี้ยแป้งมะละกอ (papaya mealybug) *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink เป็นเพลี้ยแป้งที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ตัวเต็มวัยเมื่อได้รับการผสมพันธุ์จากตัวผู้จะออกลูกเป็นไข่ (oviparity) มีถุงไข่ (ovisac) ตัวเมีย 1 ตัวสามารถสร้างถุงไข่ได้ 1 ถุง โดยถุงไข่จะหุ้มไข่ไว้อยู่บริเวณปลายส่วนท้องของตัวเต็มวัยเพศเมีย ไข่มีลักษณะทรงรี สีของไข่จะค่อยๆ เข้มขึ้นเมื่อใกล้ฟัก ไข่มีอายุประมาณ 2-7 วัน จากนั้นจะฟักออกเป็นตัวอ่อนวัยที่ 1 (crawler) และคลานออกมาภายนอกถุงไข่ ผนังลำตัวค่อนข้างใสหรือเหลืองใส ส่วนขาและหนวดมีการเจริญเติบโตดี เห็นได้ชัดเจน ขนาดค่อนข้างเล็กความยาว ประมาณ 0.7-1.7 มิลลิเมตร ตัวอ่อนเพศเมียจะมีการลอกคราบจำนวน 3 ครั้ง ตัวเต็มวัยเพศเมียจะมีผนังลำตัวสีเหลือง มีแป้งสีขาวปกคลุมลำตัว ขนาดตัวเต็มวัยด้านกว้างประมาณ 1.7–3.5 มิลลิเมตร ด้านยาวประมาณ 3.0–4.1 มิลลิเมตร

วงจรชีวิต

ตัวเต็มวัยเพศเมีย (adult female) จะมีการลอกคราบจำนวน 3 ครั้งหลังจากฟักออกจากไข่ ได้แก่ ตัวอ่อนวัยที่ 1 (crawler/1st instar) ตัวอ่อนวัยที่ 2 (2nd instar) และตัวอ่อนวัยที่ 3 (3rd instar) หลังจากนั้นจะเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งใช้เวลาตลอดอายุขัยประมาณ 31-42 วัน ส่วนตัวผู้เมื่อผ่านระยะตัวอ่อนวัยที่ 2 จะมีขนาดตัวเรียวยาวขึ้น (pre pupa) และมีการสร้างเส้นไยปกคลุมลำตัวคล้ายดักแด้ (pupa) โดยตัวอ่อนภายในดักแด้จะมีการพัฒนาส่วนของหนวดและขาและปีก ซึ่งส่งผลให้ตัวเต็มวัยเพศผู้ (adult male) ของเพลี้ยแป้งมีลักษณะไม่เหมือนกับตัวเต็มวัยเพศเมียและสามารถที่จะบินได้

เพลี้ยแป้งมะละกอ *P. marginatus* เมื่อเลี้ยงในพืชอาหารทั้ง 4 ชนิด พบว่าวงจรชีวิตของเพลี้ยแป้งในแต่ละพืชอาหารมีความแตกต่างกัน (Table 1) รายละเอียดดังนี้

วงจรชีวิตจากตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัยเมื่อเลี้ยงบนใบมะละกอภายในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส มีอายุเฉลี่ย 39.8 วัน โดยตัวอ่อนวัยที่ 1 (crawler) อายุเฉลี่ย 4.5 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 2 อายุเฉลี่ย 4.7 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 3 อายุเฉลี่ย 5.0 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมีย อายุเฉลี่ย 25.5 วัน สามารถวางไข่เฉลี่ย 101.6 ฟองต่อตัว

วงจรชีวิตจากตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัยเมื่อเลี้ยงบนใบมันสำปะหลังภายในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส มีอายุเฉลี่ย 38.9 วัน โดยตัวอ่อนวัยที่ 1 (crawler) อายุเฉลี่ย 4.8 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 2 อายุเฉลี่ย 4.6 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 3 อายุเฉลี่ย 5.0 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมีย อายุเฉลี่ย 24.5 วัน สามารถวางไข่เฉลี่ย 92.0 ฟองต่อตัว

วงจรชีวิตจากตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัยเมื่อเลี้ยงบนใบลีลาวดีภายในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส มีอายุเฉลี่ย 34.3 วัน โดยตัวอ่อนวัยที่ 1 (crawler) อายุเฉลี่ย 4.6 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 2 อายุเฉลี่ย 4.4 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 3 อายุเฉลี่ย 4.8 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมีย อายุเฉลี่ย 20.5 วัน สามารถวางไข่เฉลี่ย 71.1 ฟองต่อตัว

วงจรชีวิตจากตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัยเมื่อเลี้ยงบนใบชบาภายในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส มีอายุเฉลี่ย 33.2 วัน โดยตัวอ่อนวัยที่ 1 (crawler) อายุเฉลี่ย 4.5 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 2 อายุเฉลี่ย 4.1 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 3 อายุเฉลี่ย 4.8 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมีย อายุเฉลี่ย 19.8 วัน สามารถวางไข่เฉลี่ย 67.5 ฟองต่อตัว

ลักษณะในธรรมชาติของเพลี้ยแป้งมะละกอ *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

ไข่ (egg) (Figure 1A)

รูปร่างทรงรี เป็นฟองเดี่ยว ๆ อยู่ภายในถุงไข่ของตัวแม่ เมื่อวางไข่ระยะแรก ไข่จะมีสีขาวใส และเข้มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อใกล้ฟัก ขนาดไข่ยาว 0.31-0.35 มิลลิเมตร กว้าง 0.12-0.15 มิลลิเมตร

ตัวอ่อน (nymph)

ตัวอ่อนวัยที่ 1 (crawler) (Figure 1B) รูปร่างรูปไข่ ลำตัวยาว 0.4-0.5 มิลลิเมตร กว้าง 0.2-0.3 มิลลิเมตร เคลื่อนไหวรวดเร็ว ขายาวชัดเจนเมื่อเทียบกับขนาดตัว ผนังลำตัวใสหรือเป็นสีเหลืองใส ไม่มีไขแป้งปกคลุม หรือมีน้อยมาก ยังไม่ปรากฏเส้นแป้งด้านข้างลำตัวและด้านท้าย เริ่มดูดกินน้ำเลี้ยงจากส่วนต่าง ๆ ของพืช

ตัวอ่อนวัยที่ 2 (second instar) (Figure 1C) รูปร่างรูปไข่ ลำตัวยาว 0.5-0.7 มิลลิเมตร กว้าง 0.3-0.5 มิลลิเมตร เคลื่อนไหวรวดเร็ว ขนาดตัวเริ่มขยายขึ้นเมื่อเทียบกับส่วนขาซึ่งเห็นขาสั้นลง ผนังลำตัวเริ่มเป็นสีเหลืองอ่อน เริ่มมีเส้นแป้งด้านข้างแต่ไม่ยาวนัก แต่เห็นเส้นแป้งด้านท้ายยาวกว่าด้านข้างชัดเจน มีไขแป้งปกคลุมเห็นได้อย่างชัดเจน

ตัวอ่อนวัยที่ 3 (third instar) (Figure 1D) รูปร่างรูปไข่ ลำตัวยาว 0.7-1.8 มิลลิเมตร กว้าง 0.5-0.9มิลลิเมตร เคลื่อนไหวช้าและมักไม่ค่อยเคลื่อนไหว ยกเว้นหาแหล่งอาหาร ผนังลำตัวสีเหลือง มีเส้นแป้งด้านข้างยาวชัดเจน เส้นแป้งด้านท้ายมีขนาดยาวกว่าเส้นแป้งด้านข้างเล็กน้อย มีไขแป้งปกคลุมชัดเจน

ตัวเต็มวัย (adult)

เพศเมีย (female) (Figure 2A,B) รูปร่างรูปไข่ ลำตัวยาว 1.5-2.3 มิลลิเมตร กว้าง 0.9-1.7 มิลลิเมตร เคลื่อนไหวช้า และมักไม่ค่อยเคลื่อนไหว ผนังลำตัวสีเหลือ ปกคลุมด้วยไขแป้งสีขาว ผนังลำตัวด้านข้างมีเส้นแป้งสั้นล้อมรอบ เส้นแป้งด้านท้ายลำตัวยาวกว่าเส้นแป้งด้านข้างเล็กน้อย มีเส้นแป้งทั้งหมด 34 เส้น

เพศผู้ (male) (Figure 2C,D) ลำตัวเรียวยาว มีหนวด 10 ปล้อง ปีก 1 คู่ บริเวณปากไม่พัฒนา หนวดยาว หลังออกจากดักแด้ สามารถดำรงชีวิตได้ในระยะสั้นๆ เนื่องจากไม่สามารถกินอาหารได้

2. การจำแนกเพลี้ยแป้งมะละกอในแต่ละระยะการเจริญเติบโต

Paracoccus marginatus **Williams and Granara De Willink**

1. – Without wings or wing buds on thorax.....2
   – Without wings or wing buds on thorax.....male
2. – Antennae 6-segmented.....3
   – Antennae with 7 or 8 segmented 6
3. – Without tubular ducts or with less than 5 ducts 4
   – With more than 5 tubular ducts particularly on dorsal abdomen..... second-instar male
4. – Third antennal segment with more than 4 setae; anal-lobe cerarius with at least 1 auxiliary seta.....5
   – Third antennal segment with more than 4 setae; anal-lobe cerarius without auxiliary seta.....first instar
5. – Third antennal segment with 5 setae .....second-instar female
   – Third antennal segment with 9 setae ..... third-instar female
6. – Antenna 7-segmented;with less than 5multilocular pores; without vulva .....third-instar female
   – Antenna 8-segmented;with more than 5 multilocular pores; without vulva ..... adult female

ลักษณะบนแผ่นสไลด์แก้ว

ตัวอ่อนวัยที่ 1 (Figure 3) รูปร่างรูปไข่ หนวดมี 6-7 ปล้อง ความยาว 0.3-0.5 มิลลิเมตร กว้าง 0.2-0.3 มิลลิเมตร กลุ่มอวัยวะผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว มีจำนวน 7-10 คู่ แต่ละคู่ประกอบด้วยขนปลายแหลมรูปกรวย จำนวน 2 เส้น รู อวัยวะผลิตเส้นแป้งคู่สุดท้ายบริเวณปลายส่วนท้องจะประกอบด้วยขนปลายแหลมรูปกรวย จำนวน 2 เส้น มีรูรูปสามเหลี่ยม 1 รู

ตัวอ่อนวัยที่ 2 (Figure 4) รูปร่างรูปไข่ หนวดมี 6-7 ปล้อง ความยาว 0.5-0.8 มิลลิเมตร กว้าง 0.3-0.5 มิลลิเมตร กลุ่มอวัยวะผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว มีจำนวน 4-11 คู่ แต่ละคู่

ประกอบด้วยขนปลายแหลมรูปกรวย จำนวน 2 เส้นและมีรูรูปสามเหลี่ยม 1 รู อวัยวะผลิตเส้นแป้งคู่สุดท้ายบริเวณปลายส่วนท้องจะประกอบด้วยขนปลายแหลมรูปกรวย จำนวน 2 เส้น ขนขนาดเล็ก 1 เส้น

ตัวอ่อนวัยที่ 3 (Figure 5) รูปร่างรูปไข่ หนวดมี 6-7 ปล้อง ความยาว 0.7-1.8 มิลลิเมตร กว้าง 0.3-1.1 มิลลิเมตร กลุ่มอวัยวะผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว มีจำนวน 1-10 คู่ แต่ละคู่ประกอบด้วยขนปลายแหลมรูปกรวย จำนวน 2 เส้นและมีรูรูปสามเหลี่ยม 1 รู ขนขนาดเล็ก 1 เส้น อวัยวะผลิตเส้นแป้งคู่สุดท้ายบริเวณปลายส่วนท้องจะประกอบด้วยขนปลายแหลมรูปกรวย จำนวน 2 เส้น ขนขนาดเล็ก 1 เส้น รูรูปสามเหลี่ยม จำนวน 5 รู

ตัวเต็มวัยเพศเมีย (Figure 6) รูปร่างรูปไข่ หนวดมี 8 ปล้อง ความยาว 1.5-2.7 มิลลิเมตร กว้าง 0.9-1.7 มิลลิเมตร มีรูโปร่งแสงบนต้นขา (femur) ของขาคู่หลัง มีกลุ่มของรูเปิดรูปวงกลม อยู่บริเวณกึ่งกลางของส่วนท้องปล้องที่ 6-8 ปรากฏกระจายตัวอยู่เป็นจำนวนมากบริเวณท้องปล้องที่ 7 ระหว่างขอบด้านบนและด้านล่าง กลุ่มอวัยวะผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว มีจำนวน 17 คู่ คู่สุดท้ายบริเวณปลายส่วนท้องจะประกอบด้วยขนปลายแหลมรูปกรวย จำนวน 2 เส้น

ตัวอ่อนเพศผู้วัยที่ 2 (Figure7) รูปร่างยาว ความยาว 1.45-1.57 มิลลิเมตร กว้าง 0.42-0.53 มิลลิเมตร ส่วนของปากไม่มีการเจริญเติบโต หนวดมี 10 ปล้องซึ่งยาวประมาณ 2/3 ส่วนของความยาวลำตัว ขาเจริญเติบโตดี ด้านขอบของผนังลำตัวส่วนท้องมีขนขนาดยาว ปีกแบบบางใส จำนวน 1 คู่

ตัวอ่อนเพศผู้วัยที่ 3 (Figure 8) รูปร่างเรียวยาว ความยาว 1.45-1.57 มิลลิเมตร กว้าง 0.42-0.53 มิลลิเมตร ส่วนของปากไม่มีการเจริญเติบโต หนวดมี 10 ปล้องซึ่งยาวประมาณ 2/3 ส่วนของความยาวลำตัว ขาเจริญเติบโตดี ด้านขอบของผนังลำตัวส่วนท้องมีขนขนาดยาว ปีกแบบบางใส จำนวน 1 คู่

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาชีวประวัติและอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งมะละกอ (papaya mealybug) *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink โดยนำมาเลี้ยงบนพืชอาหารจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ มะละกอ มันสำปะหลัง ลีลาวดี และชบา ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยทำการศึกษาตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 ถึงกันยายน 2561 พบว่า ตัวเต็มวัยของเพลี้ยแป้งมะละกอ (*P. marginatus*) ที่เลี้ยงในมะละกอมีช่วงอายุเฉลี่ยยาวนานที่สุด รองลงมาได้แก่ ลีลาวดี มันสำปะหลัง และชบา ตามลำดับ สำหรับวงจรชีวิต พบว่า เมื่อเลี้ยงในมะละกอมีวงจรชีวิตเฉลี่ยนานที่สุด คือ 39.8 วัน รองลงมา คือ ลีลาวดี 38.9 วัน เมื่อเลี้ยงในมันสำปะหลัง มีวงจรชีวิตเพียง 34.3 วัน และ 33.2 วันในชบา เพลี้ยแป้งมะละกอ (*P. marginatus*) สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ วางไข่อยู่ภายในถุงไข่ ซึ่งแต่ละถุงไข่เมื่อทำการตรวจนับจำนวนไข่มีความแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด พบว่า จำนวนไข่เฉลี่ยที่เลี้ยงด้วยมะละกอมีจำนวนสูงสุดและในชบาน้อยที่สุด แม้ว่าการเลี้ยงเพื่อศึกษาชีววิทยาของเพลี้ยแป้งชนิดนี้ ในพืชอาหารที่แตกต่างกันทั้ง 4 ชนิดจะมีความแตกต่างกันไม่มาก แต่ก็ได้เห็นข้อมูลที่มีความแตกต่างกันของพืชอาหารแต่ละชนิดที่สามารถส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเพลี้ยแป้ง

ตัวอย่างของเพลี้ยแป้งแต่ละระยะได้นำมาทำสไลด์ถาวรเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลเปรียบเทียบ จัดทำเป็นคู่มือในการจำแนกเพลี้ยแป้งมะละกอ (*P. marginatus*) แต่ละระยะการเจริญเติบโตพร้อมจัดเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง ซึ่งจัดเป็นข้อมูลที่สำคัญที่นำมาใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์เพื่อยืนยันชนิดและพัฒนางานด้านอนุกรมวิธานในด้านต่าง ๆ ต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ข้าราชการ และลูกจ้างกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บและเตรียมตัวอย่างทั้งในภาคสนามและห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

ชมัยพร บัวมาศ ชลิดา อุณหวุฒิ ลักขณา บำรุงศรี สุนัดดา เชาวลิต และ สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์. 2557. อนุกรมวิธานเพลี้ยแป้งในมันสำปะหลัง หน้า 34- 69. *ใน : รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2556 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์*

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.

Ben-Dov, Y. 1994. *A systematic catalogue of the mealybugs of the world.* Intercept Ltd., Andover, UK, 686 pp.

Williams, D.J. and M.C. Granara de Willink. 1992. *Mealybugs of Central and South America.* CAB International, London. England. 635 pp.

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.

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.

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.

Table 1 Total life cycle of mealybug on 4 host plant in laboratory; crawler, second, third instar, adult durations and number of eggs per ovisac

host plant	Duration (Days)						number of eggs/ovisac
	crawler	2nd instar	3rd instar	total life of immature stages	adult	total life cycle	
papaya	4.5	4.7	5.0	14.2	25.5	39.8	101.6
frangipani	4.8	4.6	5.0	14.5	24.5	38.9	92.0
cassava	4.6	4.4	4.8	13.8	20.5	34.3	71.1
Chinese rose	4.5	4.1	4.8	13.4	19.8	33.2	67.5

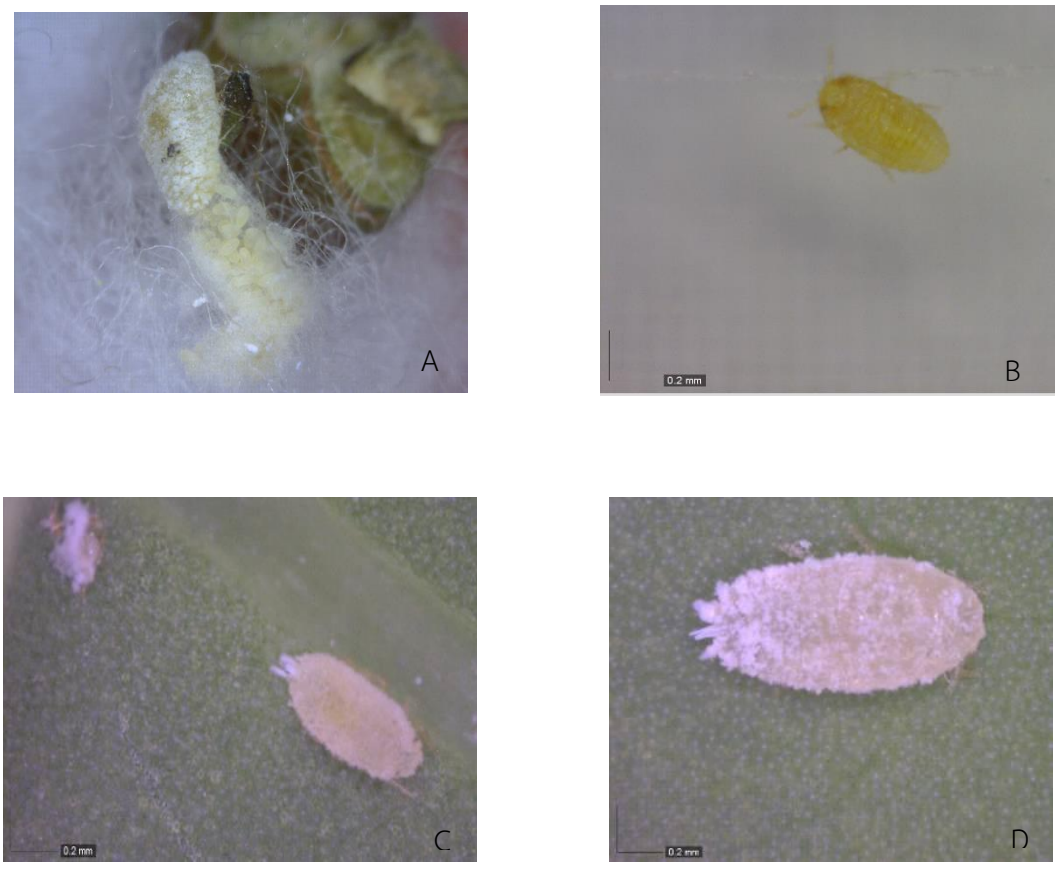

Figure 1 Immature stages of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink (A) Crawler stage (first stage), (B) Mounting to second stage, (C) Second stage, (D) Third stage

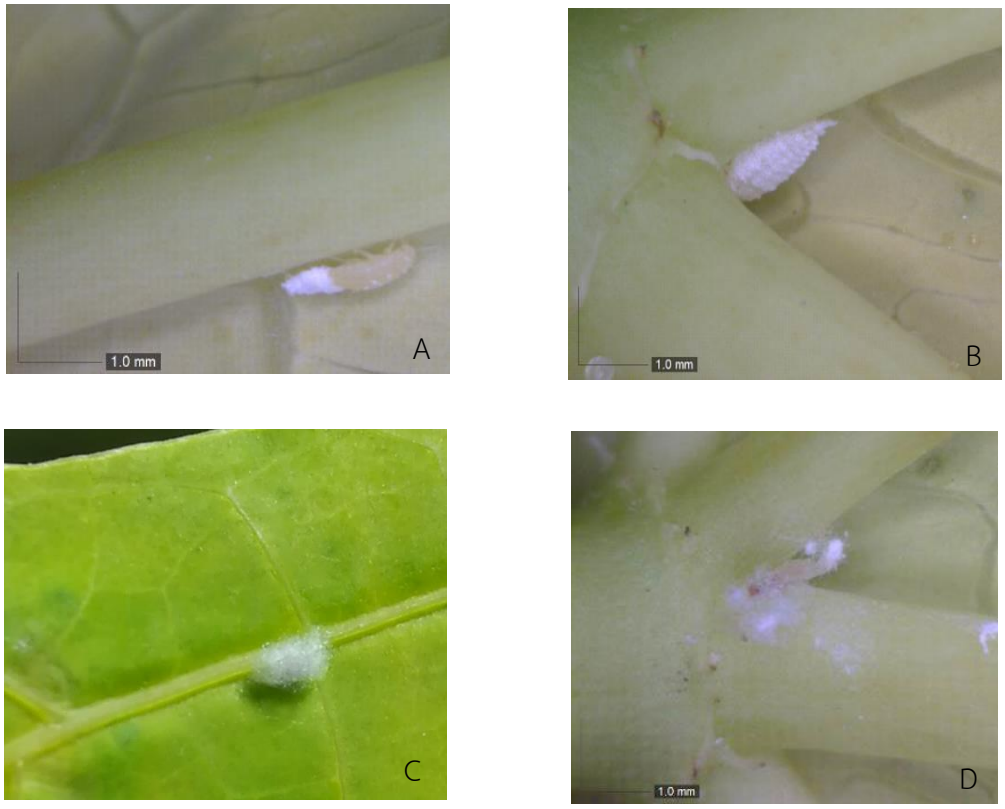

Figure 2 Adult female and male of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink (A) Mounting to adult stage, (B) Adult female, (C) Male pupa with cocoon,
(D) Adult male

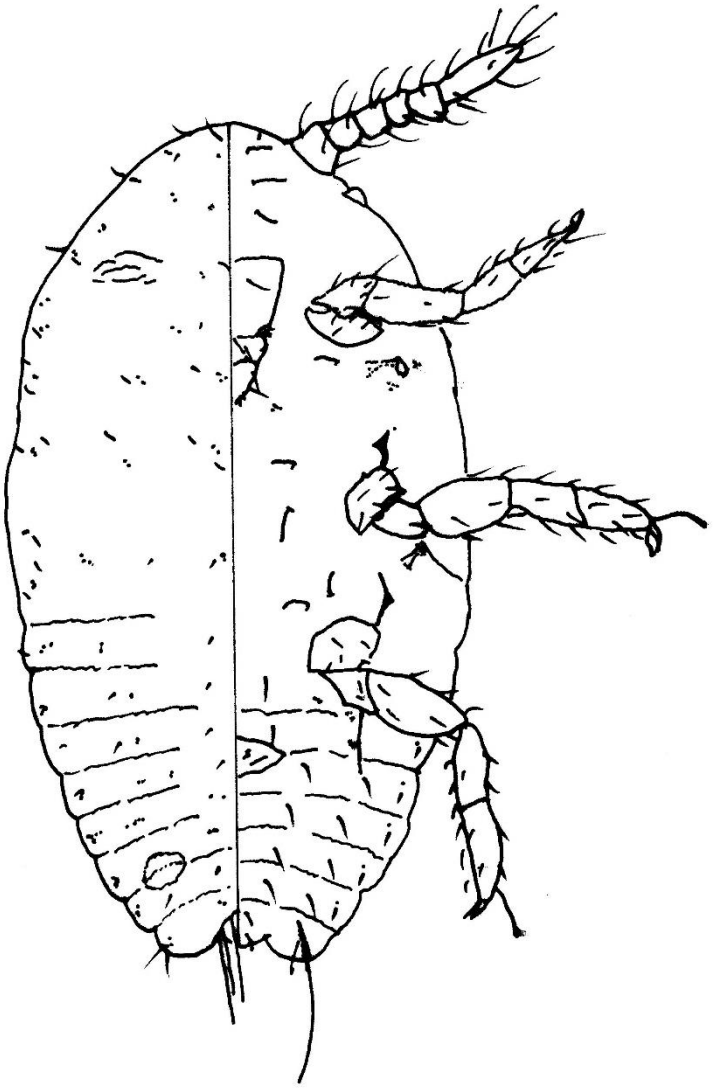

Figure 3 First instar of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

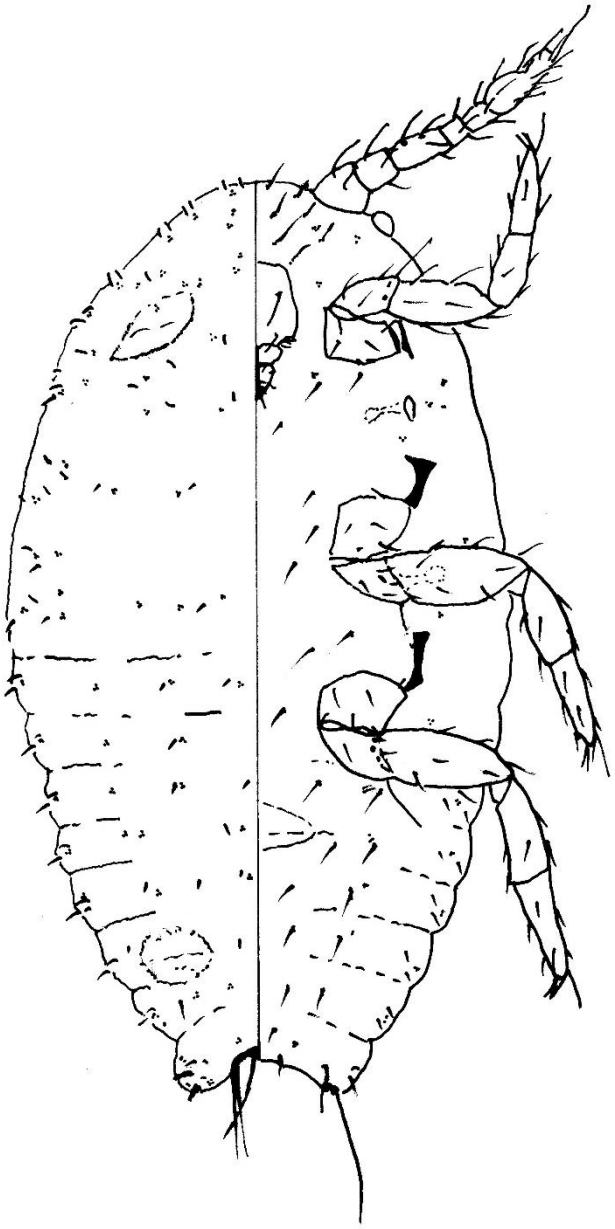

Figure 4 Second instar of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

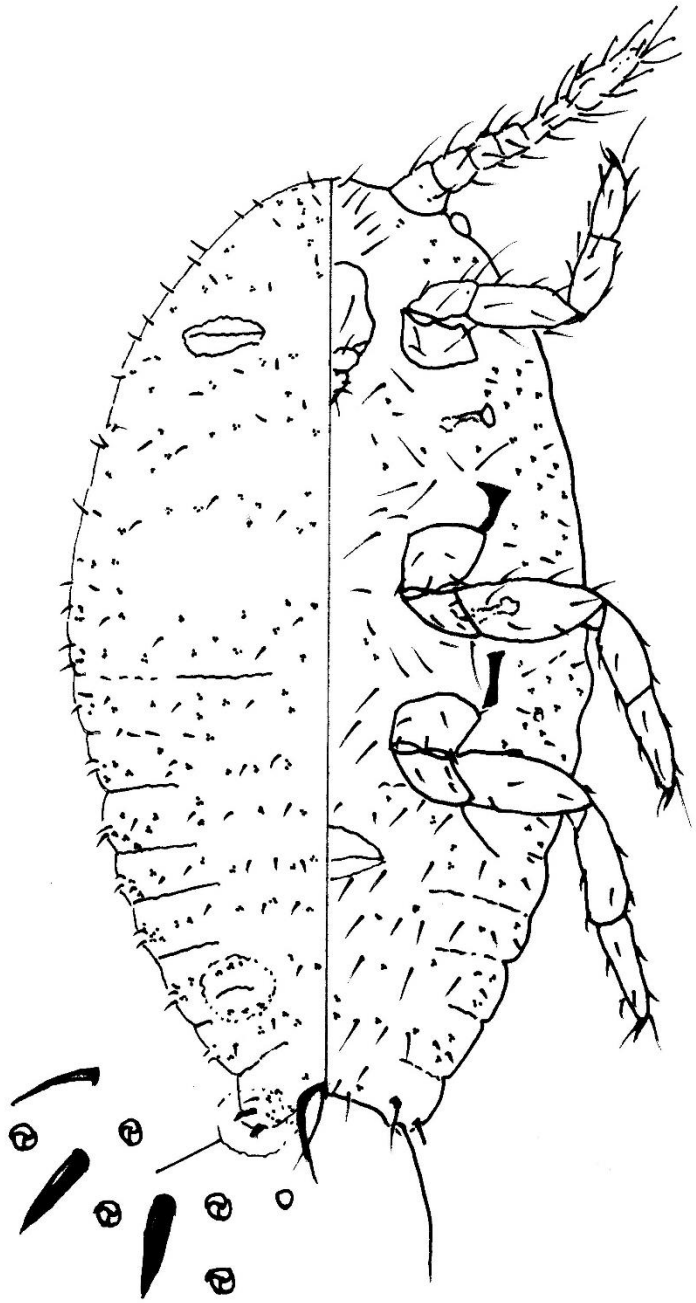

Figure 5 Third instar of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

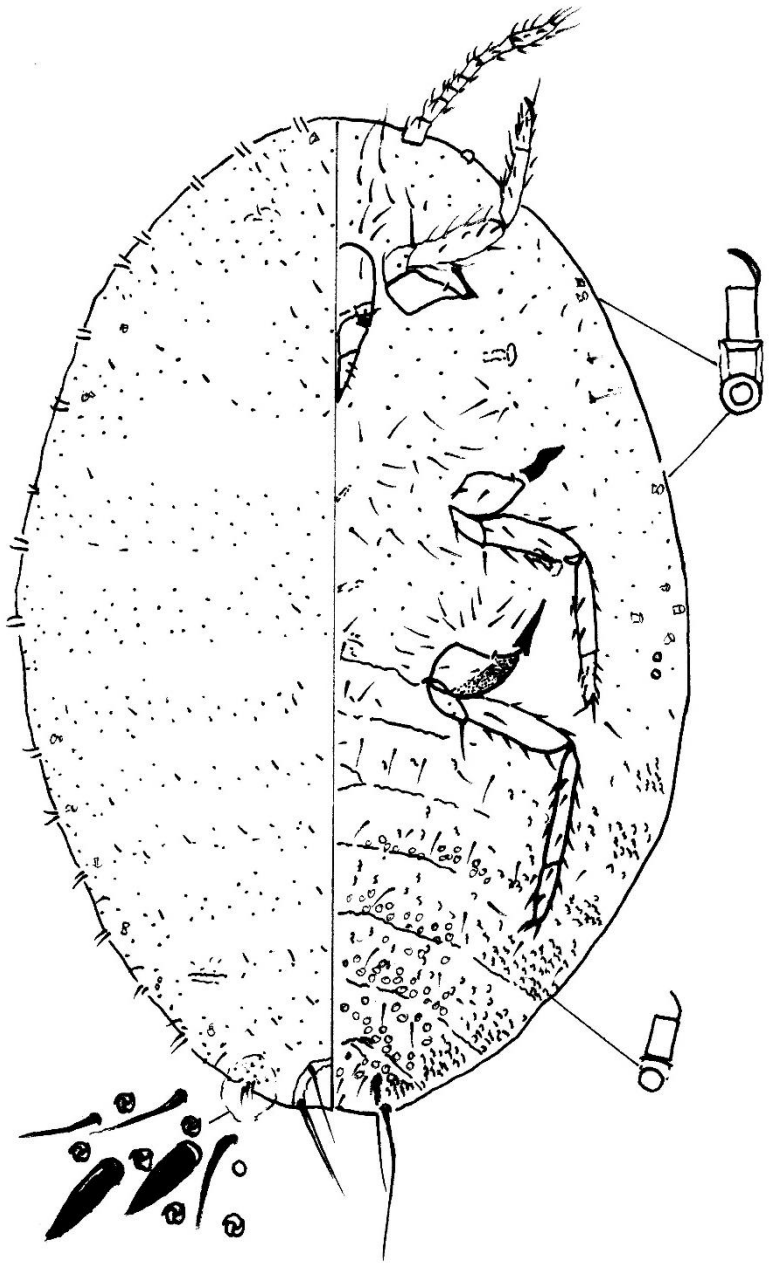

Figure 6 Adult female of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

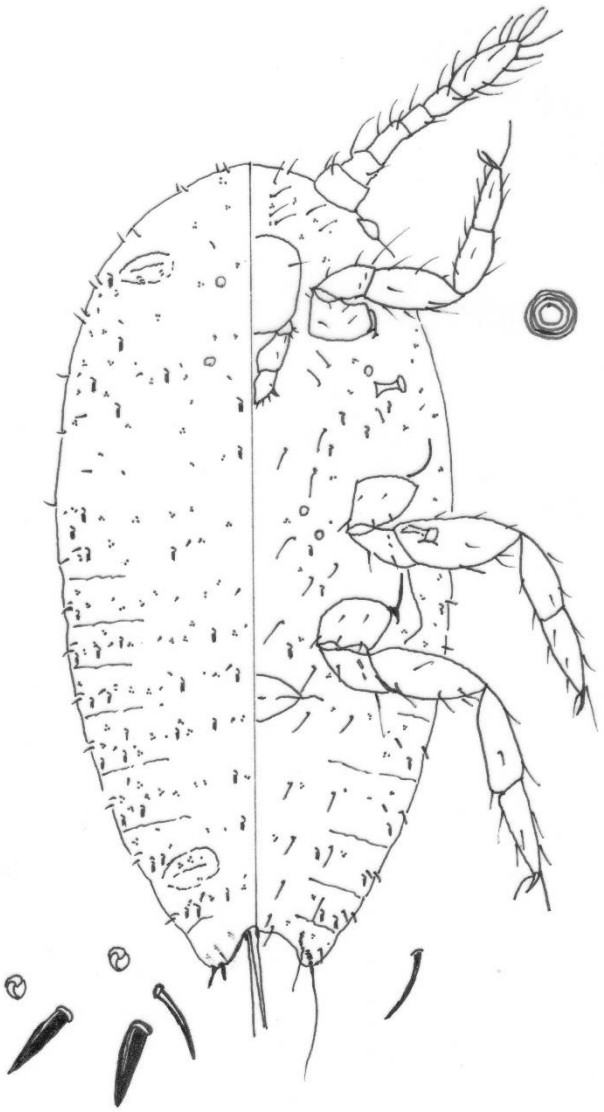

Figure 7 Second instar male of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

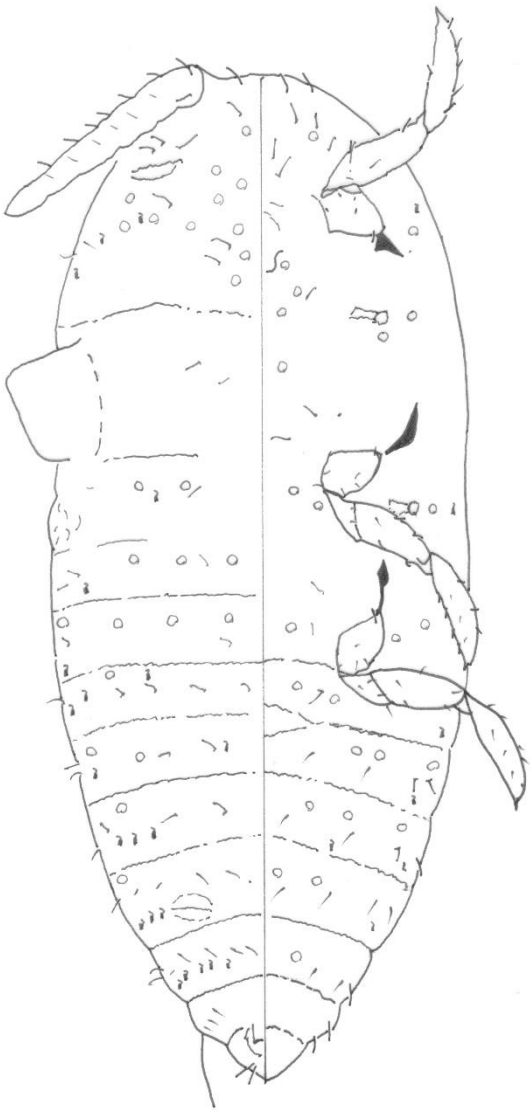

Figure 8 Third instar male of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink

ภาคผนวก

Appendix 1 Total life cycle of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink on papaya in laboratory; crawler, second, third instar, adult durations and number of eggs per ovisac

No.	Duration (Days)						Number of eggs/ovisac
	crawler	2nd instar	3rd instar	Total life of immature stages	Adult	Total life cycle	
1	4	4	5	13	27	40	150
2	4	5	4	13	27	40	80
3	5	4	4	13	25	39	85
4	4	4	4	12	27	39	103
5	5	4	5	14	27	41	110
6	4	5	5	14	25	39	92
7	5	4	4	13	27	41	83
8	4	6	5	15	24	39	115
9	6	5	4	15	25	40	112
10	6	5	4	15	25	40	87
11	4	6	6	16	23	39	95
12	4	4	6	14	26	40	65
13	3	4	5	13	25	39	80
14	5	4	6	15	25	40	110
15	6	4	6	16	26	42	150
16	4	5	5	14	26	40	85
17	5	5	4	14	23	37	50
18	3	6	4	14	25	40	98
19	4	5	7	16	24	40	105
20	4	4	6	14	27	41	120
period	3-6	4-6	4-7	13-16	23-27	37-42	50-150
$\overline{x}$	4.5	4.7	5.0	14.2	25.5	39.8	101.6

Appendix 2 Total life cycle of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink on frangipani in laboratory; crawler, second, third instar, adult durations and number of eggs per ovisac

No.	Duration (Days)						Number of eggs/ovisac
	crawler	2nd instar	3rd instar	Total life of immature stages	Adult	Total life cycle	
1	5	4	5	14	25	39	80
2	4	5	6	15	26	41	105
3	5	4	4	13	25	38	50
4	4	4	4	12	23	35	75
5	5	4	5	16	26	42	120
6	4	5	5	14	25	39	100
7	5	4	5	13	27	40	100
8	4	6	5	15	24	39	90
9	5	5	4	14	25	39	112
10	5	5	4	14	25	39	95
11	6	4	5	15	23	38	65
12	5	4	6	15	24	39	89
13	4	4	5	13	23	36	60
14	5	4	6	15	25	40	110
15	6	4	6	16	22	38	100
16	5	5	5	15	25	40	105
17	5	5	4	14	22	36	50
18	4	6	4	14	25	39	98
19	4	5	7	16	24	40	115
20	6	4	6	16	25	41	120
period	4-6	4-6	4-7	12-16	22-27	36-42	50-120
$\overline{x}$	4.8	4.6	5.0	14.5	24.5	38.9	92.0

Appendix 3 Total life cycle of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink on cassava in laboratory; crawler, second, third instar, adult durations and number of eggs per ovisac

No.	Duration (Days)						Number of eggs/ovisac
	crawler	2nd instar	3rd instar	Total life of immature stages	Adult	Total life cycle	
1	4	4	5	13	20	33	85
2	4	4	6	14	19	33	60
3	5	4	4	13	22	35	80
4	3	4	4	11	23	34	85
5	5	4	5	16	20	36	77
6	4	5	5	14	20	34	70
7	5	4	4	13	19	32	55
8	4	5	5	14	18	32	45
9	5	5	4	14	20	34	85
10	5	5	4	14	21	35	83
11	6	4	5	15	23	38	80
12	5	4	6	15	21	36	81
13	4	5	5	14	23	37	60
14	5	4	6	15	20	35	78
15	6	5	5	16	18	34	60
16	5	4	4	13	19	32	65
17	5	4	4	13	22	35	50
18	4	4	4	12	20	32	75
19	4	5	5	14	21	35	77
20	3	4	6	13	20	33	70
period	3-6	4-5	4-6	12-16	18-23	32-37	45-85
$\overline{x}$	4.6	4.4	4.8	13.8	20.5	34.3	71.1

Appendix 4 Total life cycle of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara De Willink on Chinese rose in laboratory; crawler, second, third instar, adult durations and number of eggs per ovisac

No.	Duration (Days)						Number of eggs/ovisac
	crawler	2nd instar	3rd instar	Total life of immature stages	Adult	Total life cycle	
1	5	4	4	13	18	31	60
2	4	4	6	14	19	33	50
3	5	4	4	13	22	35	80
4	3	4	4	11	21	32	85
5	5	4	5	16	20	36	90
6	4	5	5	14	20	34	70
7	5	4	4	13	30	33	55
8	4	4	5	13	19	32	40
9	4	5	4	13	19	32	45
10	5	4	4	13	21	34	85
11	4	4	5	13	20	33	80
12	5	4	6	15	20	35	80
13	4	4	5	13	19	32	60
14	5	4	6	15	20	35	85
15	6	4	5	15	18	33	60
16	5	4	5	14	19	33	65
17	5	4	4	13	20	33	55
18	4	4	4	12	21	33	70
19	4	3	4	11	20	31	60
20	4	4	6	14	20	34	75
period	3-6	3-5	4-6	11-16	18-21	31-36	40-85
$\overline{x}$	4.5	4.1	4.8	13.4	19.8	33.2	67.5