

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย
Thripinae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในกล้วยไม้ในเขตภาคกลางของประเทศไทย
DNA Barcoding for Identification of Thrips in Subfamily Thripinae
(Thysanoptera: Thripidae) in Orchids in the Middle Part of Thailand

อิทธิพล บรรณาการ จารุวัฒน์ แท้กุล สิทธิศิโรตม์ แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สำรวจ รวบรวมเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกกล้วยไม้ในเขตภาคกลางของประเทศไทย เช่น นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สุพรรณบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ เป็นต้น ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2560 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน เพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟได้ 1 ชนิด คือ เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* (Karny) ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae จำนวน 150 ตัวอย่าง โดยสำรวจพบในจังหวัด นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สมุทรสาคร และราชบุรี ทำให้ทราบถึงชนิดของเพลี้ยไฟที่สำคัญในกล้วยไม้พันธุ์กล้วยไม้ที่สำรวจพบเพลี้ยไฟ เขตการแพร่กระจายของเพลี้ยไฟในภาคกลาง และได้ตัวอย่างเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae ที่ถูกต้องสำหรับดำเนินการทดลองหาดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่อไป

รหัสการทดลอง 03 30 60 01 03 00 02 60

คำนำ

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ในวงศ์ Orchidaceae เป็นไม้ตัดดอกยอดนิยม เนื่องจากมีลักษณะดอก รวมถึงมีสีสันลวดลายที่สวยงาม อีกทั้งยังเป็นไม้ตัดดอกที่มีอายุการใช้งานได้นาน มีแหล่งปลูกใหญ่ในเขตภาคกลางของประเทศไทย กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของไทยที่สามารถทำรายได้ให้กับเกษตรกรจากการจำหน่ายทั้งในและต่างประเทศได้ปีละหลายพันล้านบาท (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2541) นอกจากนี้ประเทศไทยยังได้รับการยกย่องว่าเป็นแหล่งผลิตกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญของโลก กระทรวงเกษตรและสหกรณ์จึงได้พิจารณาให้กล้วยไม้เป็นพืชในโครงการนำร่อง Product Champion พร้อมสนับสนุนการส่งออกโดยได้กำหนดยุทธศาสตร์ในการพัฒนาเกี่ยวกับแผนควบคุมจนสามารถทำรายได้สูงและมีปริมาณการส่งออกเพิ่มขึ้นทุกปี ปัจจุบันมีเกษตรกรให้ความสนใจเพาะปลูกกล้วยไม้เพื่อการพาณิชย์เป็นจำนวนมาก เฉพาะในปี พ.ศ. 2550 มีจำนวนผู้ประกอบการธุรกิจที่ขึ้นทะเบียนผู้ผลิตและผู้ประกอบการกล้วยไม้ไว้กับกรมส่งเสริมการเกษตรในพื้นที่ภาคกลางและพื้นที่ใกล้เคียง ถึง 1,313 ราย ซึ่งเป็นผู้ประกอบการกล้วยไม้ ที่ดำเนินธุรกิจทางการผลิต และการจัดจำหน่ายในฐานะเกษตรกรผู้เพาะปลูกกล้วยไม้ ผู้ค้าส่งและผู้ค้าปลีก ซึ่งจากการที่มีผู้ประกอบการธุรกิจกล้วยไม้เป็นจำนวนมาก ประกอบกับตลาดทั้งในและต่างประเทศ มีความต้องการกล้วยไม้ในปริมาณสูง แต่ปัจจุบันปัญหาหลักของการส่งออกกล้วยไม้ไปยังต่างประเทศคือ การพบเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* (Karny) ติดไปกับดอกกล้วยไม้ ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2539 เป็นต้นมา ประเทศฝรั่งเศสได้เข้มงวดในการตรวจสอบกล้วยไม้ที่นำเข้ามาจากประเทศไทย หากพบว่ามียุงไฟติดไปกับดอกกล้วยไม้ ก็จะดำเนินการยึดและเผาทำลาย จึงทำให้ผู้ส่งออกได้รับความเดือดร้อนอย่างมาก (กรมวิชาการเกษตร, 2541) ส่งผลให้มีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในแปลงกล้วยไม้เพิ่มขึ้นจนเพลี้ยไฟสามารถสร้างความต้านทานและอยู่รอดบนกล้วยไม้ได้มากขึ้น ซึ่งนอกจากเพลี้ยไฟฝ้ายจะลงทำลายกล้วยไม้แล้ว ยังสามารถพบเพลี้ยไฟอีกหลายชนิดในวงศ์ย่อย Thripinae (Thysanoptera: Thripidae) ที่ระบาดและลงทำลายกล้วยไม้ในเขตภาคกลาง (ศิริณี, 2544) การศึกษาชนิดและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเพลี้ยไฟจะทำให้ทราบถึงชนิดที่แน่นอนของเพลี้ยไฟที่ระบาดในแปลงปลูกกล้วยไม้นั้นๆ ทั้งนี้จะทำให้ชนิดที่ถูกต้องและเหมาะสมแก่การป้องกันกำจัด สามารถวิเคราะห์ชนิดของเพลี้ยไฟศัตรูพืชในระยะไข่และตัวอ่อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในตอบสนองการตรวจพบชนิดเพลี้ยไฟจากประเทศปลายทางว่าเป็นชนิดเพลี้ยไฟฝ้ายจริงหรือไม่ และยังสามารถใช้เป็นข้อมูลสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพวัตถุอันตรายทางการเกษตรได้อีกด้วย นอกจากนี้การศึกษาลำดับพันธุกรรมจะทำให้ทราบถึงความแปรปรวนของยีน เพลี้ยไฟในพื้นที่ภาคกลางว่ามีความแตกต่างหรือใกล้เคียงกันอย่างไร การศึกษานี้จะได้ข้อมูลซึ่งไม่มีหน่วยงานอื่นในประเทศไทยทำวิจัยเชิงลึกเช่นนี้ อีกทั้งยังเป็นการวิเคราะห์ชนิดเพลี้ยไฟศัตรูพืชโดยวิธีใหม่ที่ทันสมัย สามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษาให้กับนักวิชาการทั่วไป บริษัทเอกชน และผู้ประกอบการที่เกี่ยวข้องกับการเกษตร ทั้งนี้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และลำดับยีน COI ของเพลี้ยไฟที่พบในกล้วยไม้ที่วิเคราะห์ได้นี้สามารถนำมาศึกษา phylogeny กับเพลี้ยไฟที่ทำลายพืชอื่นๆ ได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

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

วิธีการ

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกกล้วยไม้ในเขตภาคกลางของประเทศไทย เช่น นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี เป็นต้น เพื่อศึกษาจำนวนชนิดของเพลี้ยไฟในกล้วยไม้ โดยใช้วิธีการตีหรือเขย่าส่วนของพืช เช่น ใบ และดอก ให้เพลี้ยไฟตกลงบนกระดาษขาวที่รองรับ และใช้พู่กันเขี่ยเพลี้ยไฟแต่ละตัวลงในขวดที่บรรจุน้ำยา AGA (Alcohol 60%: Glycerine: Acetic acid อัตราส่วน 10:1:1) สำหรับศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและ แอลกอฮอล์ 95% สำหรับศึกษาลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่มีชีวิตด้วยบันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟที่เก็บได้ เช่น พืชที่เก็บ ส่วนของพืชที่เก็บ สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันที่เก็บ และชื่อผู้เก็บ ลงในขวดดองเพลี้ยไฟ นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาพฤติกรรมและการเจริญเติบโต และนำตัวเต็มวัยที่เก็บรวบรวมได้ทั้งหมดมาจำแนกชนิดเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนำตัวเต็มวัยในน้ำยา AGA ไปทำสไลด์ถาวร และนำตัวเต็มวัยที่บรรจุใน แอลกอฮอล์ 95% เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองทางอนุชีววิทยา ดำเนินการทำสไลด์ถาวรของเพลี้ยไฟ ตามวิธีการของ ศิริณี (2544) บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของขวดดองตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง จัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิด (key) ของเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้ จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล

เวลาและสถานที่

- เวลา** เดือนตุลาคม 2559 ถึง เดือนกันยายน 2560
- สถานที่**
1. แปลงปลูกกล้วยไม้ในภาคกลางของประเทศไทย
 2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง ห้องปฏิบัติการกลาง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแปลงปลูกกล้วยไม้ในจังหวัดนนทบุรี นครปฐม สมุทรสาคร ปทุมธานี และราชบุรี และนำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อตรวจจำแนกชนิด โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยซึ่งปรับปรุงมาจาก (Palmer *et al.*, 1989) และ (ศิริณี, 2544) ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟได้ 1 ชนิด คือ เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* (Karny) ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae จำนวน 150 ตัวอย่าง โดยมีลักษณะทางอนุกรมวิธานดังนี้

Thrips palmi (Karny, 1925)

ลำตัวขนาดเล็กเฉลี่ย 1-1.2 มิลลิเมตร ลำตัวสีเหลืองอ่อน เพศผู้มีขนาดลำตัวเล็กกว่าเพศเมีย เพศเมียมีปีกขนาดใหญ่ ส่วนหัวกว้างกว่าความยาว หนวดสีน้ำตาลอ่อน 8 ปล้อง ส่วนปลายของปล้องหนวดปล้องที่ 3 และ 4 เรียวและมีสีน้ำตาลอ่อนที่บริเวณโคนปล้องหนวดมีสีเทาเข้มที่ส่วนปลาย และเป็นที่ตั้งของอวัยวะรับรู้ความรู้สึกรูปส้อม ปล้องหนวดปล้องที่ 6 ถึง 8 มีสีน้ำตาล ปล้องหนวดปล้องที่ 8 ยาวกว่าปล้องที่ 7 มีขนบริเวณตาเดี่ยว 3 คู่ ขนตาเดี่ยวคู่ที่ 3 อยู่ด้านบนของตาเดี่ยวที่เรียงตัวเป็นรูปสามเหลี่ยม ขนตาเดี่ยวบริเวณท้ายส่วนท้ายยาวกว่าขนตาเดี่ยวคู่ที่ 3 ส่วนของอกปล้องแรกมีขนาดใหญ่ มีขนยาวตั้งอยู่บริเวณมุมขอบล่างของอกปล้องแรก 2 คู่ และมีขนบริเวณส่วนท้ายอกปล้องแรก 3 คู่ สันหลังอกปล้องสุดท้ายมีลวดลายเป็นเส้นตรงไม่ต่อเนื่อง แต่มุ่งสู่ส่วนท้ายของสันหลังอกปล้องสุดท้าย เส้นขนยาว 2 เส้นปรากฏด้านล่างของขอบบนสันหลังอกปล้องสุดท้ายและมีรูรับรู้ความรู้สึก (campaniform sensilla) ปีกคู่หน้าขาว โปร่งแสง และมีการเรียงตัวของเส้นปีกบริเวณโคนปีก 3 เส้น และเส้นปีกรองที่ส่วนปลายประมาณ 15 เส้น ขามีสีเดียวกับลำตัว ส่วนของปลายขามี 2 ปล้อง ปล้องท้องปล้องที่ 2 มีขนด้านข้าง 2 คู่ ส่วนท้องด้านบนของลำตัวปล้องที่ 6 ถึง 8 มีกลุ่มขนเรียงตัวกันเป็นเส้นปล้องละ 1 คู่ ตำแหน่งการเรียงตัวอยู่ด้านล่างรูหายใจที่บริเวณขอบด้านบนนอกของส่วนท้อง เส้นขนรูปหวีที่ด้านล่างของขอบท้องปล้องที่ 8 พัฒนาสมบูรณ์เป็นเส้นขนยาว ส่วนท้องด้านล่างของลำตัวปล้องที่ 3 ถึง 7 ปรากฏเส้นขนคู่ที่ 3 อยู่ตรงกลางส่วนท้อง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในกล้วยไม้ในเขตภาคกลางของประเทศไทย โดยการสำรวจ รวบรวมเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชกล้วยไม้ในเขตภาคกลางของประเทศไทย เช่น นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สุพรรณบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ เป็นต้น ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2560 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน เพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟได้ 1 ชนิด คือ เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* (Karny) ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae จำนวน 150 ตัวอย่าง โดยสำรวจพบในจังหวัดนนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สมุทรสาคร และราชบุรี ทำให้ทราบถึงชนิดของเพลี้ยไฟที่สำคัญในกล้วยไม้ พันธุ์กล้วยไม้ที่สำรวจพบเพลี้ยไฟ เขตการแพร่กระจายของเพลี้ยไฟในภาคกลาง และได้ตัวอย่างเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae ที่ถูกต้องสำหรับดำเนินการทดลองหาดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2541. กล้วยไม้ส่งออก ปัญหาและแนวทางแก้ไข. กรุงเทพมหานคร. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนา.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2541. เอกสารคำแนะนำ : “สถิติการปลูกไม้ดอกไม้ประดับ”
- ศิริณี พูนไชยศรี. 2544. เพลี้ยไฟ *Terebrantia*. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. กรุงเทพฯ. 75 หน้า.
- Palmer, J. M., L. A. Mound and G. J. du Heume. 1989. (ed.). CIE Guides to Insects of Importance to Man: 2. Thysanoptera. C.A.B International Institute of Entomology. 69 p.

จำนวนตัวอย่างและสถานที่พบเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* (Karny)

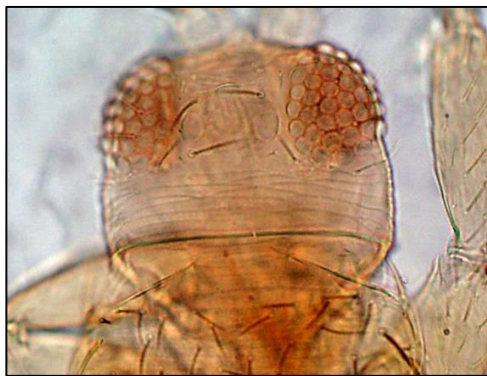
จังหวัด	จำนวนตัวอย่างที่พบ	พิกัดทางภูมิศาสตร์
นนทบุรี	19	ต.โทรใหญ่ อ.โทรน้อย จ.นนทบุรี N 14° 72' 76" E 100° 301' 14"
	8	ต.คลองยวง อ.โทรน้อย จ.นนทบุรี N 14° 013' 780" E 100° 300' 495"
นครปฐม	27	ต.ขุนศรี อ.บางเลน จ.นครปฐม N 14° 01' 504" E 100° 16' 123"
	22	ต.คลองกระทุ่ม อ.บางเลน จ.นครปฐม N 14° 002' 940" E 100° 213' 599"
สมุทรสาคร	22	ต.เกษตรพัฒนา อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร N 13° 39' 198" E 100° 09' 051"
	25	ต.คลองตัน อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร N 13° 39' 056" E 100° 09' 397"
ปทุมธานี	9	ต.หน้าไม้ อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี N 14° 02' 972" E 100° 21' 692"
ราชบุรี	4	ต.หนองอ้อ อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี N 13° 47' 23" E 99° 53' 42"
	14	ต.โพหัก อ.บางแพ จ.ราชบุรี N 13° 38' 8" E 100° 3' 8"
รวม	150	



ตัวเต็มวัย



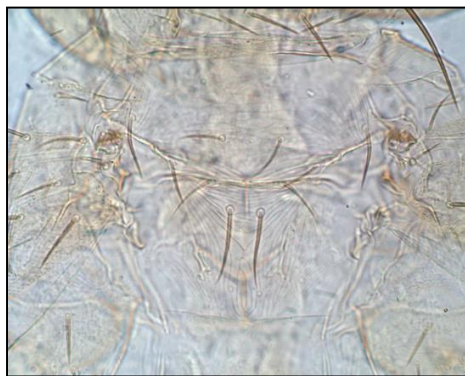
ตัวอย่างสไลด์ถาวร



ส่วนหัว



อกปล้องแรก



อกปล้องสุดท้าย



ปล้องท้องปล้องที่ 8

ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* (Karny)