รายงานโครงการวิจัย

อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

Taxonomy, Biology and Technique for Identification of Pests and Natural Enemies

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย
นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล
Mrs. Nuttima Kositcharoenkul

ปี พ.ศ. 2558

รายงานโครงการวิจัย

อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

Taxonomy, Biology and Technique for Identification of Pests and Natural Enemies

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย
นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล
Mrs. Nuttima Kositcharoenkul

ปี พ.ศ. 2558

คำปรารภ

กรมวิชาการเกษตรมีนโยบายเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรที่มีคุณภาพและปลอดภัยเพื่อบริโภคภายในประเทศและส่งไปจำหน่ายยังต่างประเทศเพื่อสร้างรายได้แก่เกษตรกรและนำเงินเข้าสู่ประเทศสำหรับใช้พัฒนาประเทศ แต่เป้าประสงค์ยังไม่บรรลุเนื่องจากปัญหาศัตรูพืช ยิ่งในสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงทำให้เกิดการระบาดของศัตรูพืชหลากหลายมีทั้งแมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช (หนู หอย นก) วัชพืช และจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช (รา แบคทีเรีย ไวรัส ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช) บางชนิดไม่เคยเป็นศัตรูสำคัญมาก่อนแต่กลับระบาดและสร้างความเสียหายให้กับพืช บางชนิดปรับสภาพตัวเองเข้าทำลายพืชได้มากชนิดขึ้น และบางชนิดอาจเป็นสายพันธุ์ใหม่ สำหรับศัตรูธรรมชาติก็ได้รับผลกระทบเช่นเดียวกัน วิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งต่องานอารักขาพืช ดังนั้นงานวิจัยด้านอนุกรมวิธาน ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติจึงมีความสำคัญมากเพื่อการวิเคราะห์ชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง และได้ข้อมูลเกี่ยวกับชีวประวัติ พฤติกรรม การแพร่กระจาย พืชอาศัย/สัตว์อาศัย ฯลฯ จัดเก็บในรูปแบบฐานข้อมูล และงานวิจัยความหลากชนิดของแมลงเพื่อเก็บ – รักษาในพิพิธภัณฑ์ เป็นการศึกษาและประเมินสถานภาพของแมลงอันดับต่างๆ แมลงที่หายากหรือใกล้สูญพันธุ์ เพื่อหาแนวทางหรือวิธีการอนุรักษ์ให้คงอยู่ในระบบนิเวศอย่างยั่งยืน ซึ่งจะต้องมีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง ไม่มีจุดสิ้นสุด เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นปัจจุบันตลอดเวลา อีกทั้งศึกษาหาเทคนิคใหม่ๆ ในการตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้อง และรวดเร็วควบคู่กันไปด้วยซึ่งรวมถึงการพัฒนาเครื่องมือและเทคนิคการตรวจแยกศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพด้วย เพื่อนำไปพัฒนาสู่การผลิตชุดตรวจสอบศัตรูพืชบางชนิดต่อไป ผลงานวิจัยของโครงการวิจัยอนุกรมวิธาน ชีววิทยาและเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเป็นประโยชน์ในการพิจารณาหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพทันต่อเหตุการณ์ และงานวิจัยด้านอื่นๆ เช่นงานวิจัยด้านกักกันพืช การตรวจศัตรูพืชที่ติดกับสินค้าเกษตร นำเข้าและส่งออก ณ ด่านตรวจพืชต่างๆ นอกจากนี้ผลการศึกษาวิจัยโครงการนี้ได้สร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ๆ ที่มีความชำนาญทั้งทางด้าน แมลง ไร สัตว์ จุลินทรีย์และวัชพืช ทดแทนนักวิจัยที่กำลังขาดแคลนในปัจจุบัน

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล
นักวิชาการโรคพืชชำนาญการพิเศษ
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ 1

คณะผู้วิจัย 2

บทนำ 4

บทคัดย่อ 7

1. ชื่อกิจกรรมงานวิจัย 1 อนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศวิทยาของแมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติ 10

กิจกรรมย่อยที่ 1 อนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศวิทยาของแมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช และ ศัตรูธรรมชาติ 10

กิจกรรมย่อยที่ 2 อนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช 56

กิจกรรมย่อยที่ 3 อนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศวิทยาของวัชพืช 86

2. ชื่อกิจกรรมงานวิจัย 2 วิจัยความหลากชนิดของแมลงเพื่อเก็บ-รักษาในพิพิธภัณฑ์ 104

3. ชื่อกิจกรรมงานวิจัย 3 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี การวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ 1 การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูพืชโดยเซรุ่มวิทยา 108

กิจกรรมย่อยที่ 2 การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชโดยอณูชีววิธี 127

กิจกรรมย่อยที่ 3 การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูธรรมชาติโดยอณูชีววิธี 150

กิจกรรมย่อยที่ 4 การพัฒนาเทคโนโลยีอย่างง่ายและรวดเร็วในการแยกศัตรูพืชเพื่อการวินิจฉัย 206

4. ผลการทดลองและวิจารณ์ 156

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ 207

เอกสารอ้างอิง 209

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ พนักงานราชการ ลูกจ้างประจำ และข้าราชการ ของกลุ่มกีฏและสัตววิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มวิจัยวัชพืช กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย และเก็บข้อมูลของงานวิจัย จนทำให้การวิจัยในครั้งนี้ประสบความสาเร็จด้วยดีในระยะเวลาการทำการวิจัย

คณะผู้วิจัย

นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล	หัวหน้าโครงการวิจัย	
นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม	หัวหน้ากิจกรรมที่ 1	
นางสาวสุนัดดา เชาวลิต	หัวหน้ากิจกรรมที่ 2	
นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล	หัวหน้ากิจกรรมที่ 3	
นายจารุวัตถ์ แต้กุล	ผู้ร่วมงาน	สอพ./กส.
นางสาวยุวรินทร์ บุญทบ	ผู้ร่วมงาน	สอพ./กส.
นางสาวชมัยพร บัวมาศ	ผู้ร่วมงาน	สอพ./กส.
นายอิทธิพล บรรณาการ	ผู้ร่วมงาน	สอพ./กส.
นางเกศสุดา สนศิริ	ผู้ร่วมงาน	สอพ./กส.
นางสาวสัญญาณี ศรีคชา	ผู้ร่วมงาน	สอพ./กส.
นางสาวธีราทัย บุญญะประภา	ผู้ร่วมงาน	สอพ./กส.
นางสาวพลอยชมพู กรวิภาสเรือง	ผู้ร่วมงาน	สอพ./กส.
นางสาววิมลวรรณ โชติวงศ์	ผู้ร่วมงาน	สอพ./กส.
นางสาวอัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล	ผู้ร่วมงาน	สอพ./กส.
นายปราสาททอง พรหมเกิด	ผู้ร่วมงาน	สอพ./กส.
นางสาวดาราพร รินทะรักษ์	ผู้ร่วมงาน	สอพ./กส.
นายเกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์	ผู้ร่วมงาน	สอพ./กส.
นายสมเกียรติ กล้าแข็ง	ผู้ร่วมงาน	สอพ./กส.
นายวิชาญ วรรธนะไกวัล	ผู้ร่วมงาน	สอพ./กส.
นายอภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข	ผู้ร่วมงาน	สอพ./กส.
นางสาวภัทรพร สรรพนุเคราะห์	ผู้ร่วมงาน	สอพ./กส.
นางสาวชนินทร ดวงสะอาด	ผู้ร่วมงาน	สอพ./รพ.
นางสาวสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ	ผู้ร่วมงาน	สอพ./รพ.
นายอภิรัชต์ สมฤทธิ์	ผู้ร่วมงาน	สอพ./รพ.
นางสาวทัศนาพร ทัศคร	ผู้ร่วมงาน	สอพ./รพ.
นางสาวธารทิพย ภาสบุตร	ผู้ร่วมงาน	สอพ./รพ.
นางพีระวรรณ วัฒนวิภาส	ผู้ร่วมงาน	สอพ./รพ.
นางสาวรุ่งนภา คงสุวรรณ์	ผู้ร่วมงาน	สอพ./รพ.

นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์	ผู้ร่วมงาน	สอพ./รพ.
นายไตรเดช ข่ายทอง	ผู้ร่วมงาน	สอพ./รพ.
นางฐิติยา สารพัฒน์	ผู้ร่วมงาน	สอพ./รพ.
นางสาวเยาวภา ตันติวานิช	ผู้ร่วมงาน	สอพ./รพ.
นายสิทธิศักดิ์ แสไพศาล	ผู้ร่วมงาน	สอพ./รพ.
นางสาวกาญจนา วาระวิชะนี	ผู้ร่วมงาน	สอพ./รพ.
นายปริเชษฐ์ ตั้งกาจนภาสน์	ผู้ร่วมงาน	สอพ./รพ.
นางอมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์	ผู้ร่วมงาน	สอพ./รพ.
นายแสนชัย คำหล้า	ผู้ร่วมงาน	สอพ./รพ.
นางสาวทิพวรรณ กันหาญาติ	ผู้ร่วมงาน	สอพ./รพ.
นางสาวรุ่งนภา ทองเครั่ง	ผู้ร่วมงาน	สอพ./รพ.
นางเพ็ญศรี นันทสมสราญ	ผู้ร่วมงาน	สอพ./วว.
นางเสริมศิริ คงแสงดาว	ผู้ร่วมงาน	สอพ./วว.
นางสาวศิริพร ซึงสนธิพร	ผู้ร่วมงาน	สอพ./วว.
นางสาวจรัญญา ปิ่นสุภา	ผู้ร่วมงาน	สอพ./วว.
นางสาวธัญชนก จงรักไทย	ผู้ร่วมงาน	สอพ./วว.
นายสิริชัย สาธุวิจารณ์	ผู้ร่วมงาน	สอพ./วว.
นางสาวภัทร์พิชชา รุจิรพงศ์ชัย	ผู้ร่วมงาน	สอพ./วว.
ช่อทิพย์ ศัลยพงษ์	ผู้ร่วมงาน	สอพ./กก.

บทนำ

โครงการวิจัยอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เป็นงานศึกษาวิจัยถึงลักษณะ(Character) ที่สำคัญของศัตรูพืช ศัตรูธรรมชาติ เพื่อนำไปใช้ในการจำแนกแจกแจง (Classification) ในระดับต่างๆ ตามระบบอนุกรมวิธาน และรวบรวมรายละเอียดลักษณะความแตกต่างที่สำคัญทั้งหมด ไปสู่การตรวจวิเคราะห์ เพื่อระบุชนิด (Identification) และการตั้งชื่อ (Naming) ตามกฎเกณฑ์การตั้งชื่อ (Nomenclature) ตลอดจนการศึกษาวิจัยด้านพันธุกรรม (Genetic) ชนิด (Species) ชีววิทยา (Biology) นิเวศวิทยา (Ecology) เขตแพร่กระจาย (Distribution Area) และพฤติกรรม (Ethology) รวมทั้งด้านวิวัฒนาการ (Evolution) ความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการ (Phylogeny) ความแปรปรวนหรือความผันแปรหรือความแตกต่างทั้งในระดับสัณฐานวิทยาและในระดับโมเลกุล (Morphology and Genetic Variation) อีกทั้งกระบวนการเกิดชนิดใหม่ (Speciation) และนำตัวอย่างที่ได้ศึกษาวิจัยทั้งหมด เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ในการสืบค้น อ้างอิง สามารถตรวจสอบย้อนกลับได้ ซึ่งกรมวิชาการเกษตร ได้มีการเก็บ-รักษาตัวอย่างแมลงไว้ในพิพิธภัณฑ์มานานกว่า 80 ปี นับเป็นพิพิธภัณฑ์แมลงที่เก่าแก่และมีตัวอย่างแมลงมากที่สุดในประเทศไทยและในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ศิริณี, 2542) ปัจจุบันมีแมลงที่วิเคราะห์ชนิดแล้วกว่า 9,000 ชนิด มากกว่า 500,000 ตัวอย่าง (Poonchaisri, 2004) และมีตัวอย่างแมลงต้นแบบ (type specimen) จำนวน 113 ตัวอย่าง(ศิริณีและคณะ,2549) พิพิธภัณฑ์แมลงมีการจัดการในเรื่องการเก็บ-รักษา ตัวอย่างแมลงอย่างดียิ่ง ตัวอย่างแมลงทุกตัวอย่างอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ตลอดจนมีการจัดเก็บตามระบบมาตรฐานสากล และในปี 2552 ได้เริ่มดำเนินการจัดทำฐานข้อมูลแมลงในพิพิธภัณฑ์ มาอย่างต่อเนื่องซึ่งต้องบันทึกข้อมูลให้เป็นปัจจุบันเพิ่มเติมตลอดไปควบคู่กับการเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลง ซึ่งการจัดทำฐานข้อมูลนี้นับว่ามีประโยชน์อย่างมากทำให้สืบค้นข้อมูลแมลงในพิพิธภัณฑ์ได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว

พิพิธภัณฑ์แห่งนี้ จึงเป็นแหล่งรวมองค์ความรู้ทั้งด้านจำนวนชนิด และข้อมูลต่างๆ ที่ได้บันทึกกำกับไว้กับตัวอย่างแมลง ได้แก่ พืช ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย สถานที่ วัน เดือน ปีที่เก็บ และชื่อผู้เก็บ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถใช้ในการค้นคว้า อ้างอิง เปรียบเทียบตรวจสอบ ข้อมูลจากอดีตถึงปัจจุบัน อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อนักอนุกรมวิธานและนักวิจัยด้านกีฏวิทยาทั้งในและต่างประเทศ ตลอดจนบุคคลทั่วไปที่ประสบปัญหา หรือสอบถามข้อมูลเกี่ยวกับแมลง โดยภารกิจดังกล่าวพิพิธภัณฑ์แมลงจะต้องมีการวิจัยและพัฒนาอย่างต่อเนื่องไม่มีที่สิ้นสุด ทั้งในการวิจัยเพื่อเก็บรวบรวมตัวอย่างและการจัดการพิพิธภัณฑ์ให้อยู่ในระดับมาตรฐานสากล ตลอดจนเพิ่มเติมข้อมูลรายละเอียดของตัวอย่างแมลง และการจะได้มาซึ่งตัวอย่างแมลงรวมทั้งข้อมูลดังกล่าว จำเป็นต้องมีการศึกษาและรวบรวมตัวอย่างแมลงให้ได้มากที่สุด ซึ่งนอกจากจะเป็นการเพิ่มจำนวนและชนิด หรือเพื่อทดแทนตัวอย่างแมลงที่ชำรุดเสียหายแล้ว ยังเป็นโอกาสของนักวิจัยที่จะได้ตรวจสอบ ค้นคว้าชนิดของแมลงที่ไม่เคยพบในประเทศไทย (new record) หรือแมลงที่ไม่เคยพบมาก่อนในโลกนี้ (new species) และในสถานการณ์ปัจจุบัน สภาวะโลกร้อน (global warming) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ (climate change) ซึ่งหมายถึงความเปลี่ยนแปลง หรือความแปรปรวนของ

ลม ฟ้า อากาศ ทั้งที่เกิดขึ้นแล้วในอดีต กำลังเกิดขึ้นในปัจจุบัน หรืออาจเกิดขึ้นในอนาคต (โชติชัย, 2552) ล้วนแล้วแต่ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศในธรรมชาติ และส่งผลกระทบต่อเนื่องมายังแมลง สัตว์ที่มีจำนวนชนิดมากถึงร้อยละ 70 ของสัตว์ทั้งหมด ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากต่อวงจรห่วงโซ่อาหารในธรรมชาติ ดังนั้นหากได้มีการศึกษาวิจัยถึงจำนวนชนิดของแมลงในพื้นที่ต่างๆของประเทศไทยมาอย่างต่อเนื่อง ก็สามารถนำข้อมูลมาเปรียบเทียบตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน และคาดการณ์ในอนาคตทั้งการเพิ่มหรือลดจำนวนของแมลงหลากหลายชนิด รวมทั้งการดำรงอยู่หรือสูญพันธุ์ของแมลงบางชนิด ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาวิจัย เกี่ยวกับสิ่งสิ่งแวดล้อมเพื่อเป้าหมายในการฟื้นฟูระบบนิเวศธรรมชาติให้กลับคืนสู่สภาวะสมดุลอย่างยั่งยืนตลอดไป

นอกจากนี้ในโครงการยังศึกษาหาเทคนิคการวินิจฉัยและการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อพัฒนาเทคนิคใหม่ทางอณูชีววิทยา เช่น PCR Real time PCR Multiplex PCR LAMP และทางเซรุ่มวิทยา เช่น การผลิตชุดตรวจสอบศัตรูพืชสำเร็จรูป Glift Kit ในการตรวจวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติให้มีประสิทธิภาพและความแม่นยำสูงเพิ่มขึ้น เป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยที่ได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับ และสามารถตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติได้ในปริมาณของเพียงเล็กน้อย และพัฒนาให้รวดเร็วยิ่งขึ้น สามารถย่นระยะเวลาการตรวจวินิจฉัยให้เร็วขึ้น ทำให้สามารถวางแผนการป้องกันกำจัดได้รวดเร็วทันต่อเหตุการณ์ นอกจากนี้เป็นการประหยัดงบประมาณในการนำเข้าชุดตรวจสอบศัตรูพืชจากต่างประเทศ เป็นการพัฒนางานวิจัยของนักวิชาการไทยให้เป็นที่ยอมรับของต่างประเทศอีกด้วย

ข้อมูลรายละเอียดทั้งหมดจากการศึกษาวิจัย และตัวอย่างแมลงศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ รวมทั้งวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับศัตรูพืช ศัตรูธรรมชาติ ทั้งในระดับหน่วยงานและระดับประเทศ เพราะนอกจากจะช่วยให้สามารถจำแนกว่าเป็นชนิดศัตรูพืชหรือศัตรูธรรมชาติ ยังสามารถช่วยแก้ปัญหาการระบาดของศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เพราะหากมีการศึกษาและรวบรวมข้อมูลไว้อย่างมีระบบเป็นปัจจุบันในรูปแบบฐานข้อมูล ซึ่งสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชได้รับงบประมาณจัดทำระบบฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลง ในปีงบประมาณ 2552 ขณะนี้ได้ติดตั้งระบบและเริ่มบันทึกข้อมูล เมื่อระบบฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลงสามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ข้อมูลต่างๆ ที่เก็บรวบรวมไว้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง เมื่อเกิดการระบาดของศัตรูพืชจะสามารถสืบค้นและตรวจสอบได้ทันทีว่าศัตรูพืชนั้นๆ คืออะไร มีชีวประวัติและพฤติกรรมการทำลายพืชผลหรือผลผลิตอย่างไร ซึ่งจะทำให้สามารถหาวิธีป้องกันกำจัดได้อย่างเหมาะสมถูกต้องรวดเร็วทันต่อเหตุการณ์ ในสถานการณ์ปัจจุบันข้อมูลเหล่านี้มีความสำคัญต่อการแก้ไขปัญหาการค้าระหว่างประเทศในด้านการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร โดยการนำข้อมูลทั้งหมดไปจัดทำข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List) ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญอย่างยิ่งที่ต้องส่งให้ประเทศคู่ค้าได้นำไปพิจารณาก่อนนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศไทย ในขณะเดียวกันก็ใช้เป็นข้อมูลสำคัญของประเทศ สำหรับเปรียบเทียบกับข้อมูลบัญชีรายชื่อของประเทศคู่ค้าที่ส่งมา เพื่อประกอบในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis) ก่อนนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศคู่ค้า รวมทั้งยังเป็นประโยชน์ในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืชกักกัน (Quarantine Pest) เพื่อการควบคุม

ศัตรูพืชจากต่างประเทศไม่ให้เข้ามาแพร่กระจายในประเทศ และใช้ประโยชน์เพื่อการเจรจาตอบโต้ประเทศคู่ค้าที่ใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Sanitary and Phytosanitary Measure) มาเป็นเงื่อนไขในการกีดกันทางการค้า

งานวิจัยของโครงการนี้ยังมีความสำคัญอย่างมากในการพัฒนาบุคลากร เพื่อก้าวสู่การเป็นนักอนุกรมวิธาน ซึ่งเป็นบุคลากรที่อยู่ในภาวะขาดแคลนอย่างมากและไม่สามารถพัฒนาขึ้นมาทด แทนได้ทันเวลา จึงจำเป็นต้องเร่งพัฒนาเพื่อให้เป็นบุคลากรด้านอนุกรมวิธานที่มีความรู้ความสามารถพร้อมจะปรับเปลี่ยนและก้าวทันต่อเทคโนโลยีของงานด้านนี้ที่ก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เพื่อจะได้นำมาพัฒนางานด้านอนุกรมวิธานโดยตรงและพร้อมที่จะเอื้อประโยชน์ต่องานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เป็นงานวิจัยพื้นฐานทางด้านอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และนิเวศวิทยาของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ และศึกษาพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ในการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ดำเนินการระหว่างปี พ.ศ.2554 – 2558 ผลการดำเนินการ ได้ทราบชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน ลักษณะความแตกต่าง พืชอาศัย เขตการแพร่กระจายของแมลง ไร สัตว์ ศัตรูพืช และ ศัตรูธรรมชาติ ได้แก่ เพลี้ยอ่อนในวงศ์ย่อย Hormaphidinae จำนวน 4 สกุล เพลี้ยอ่อนเผ่า Macrosiphini จำนวน 6 ชนิด เพลี้ยแป้งสกุล *Phenacoccus* 2 ชนิด เพลี้ยหอยสกุล *Pulvinaria* 1 ชนิด แมลงหวี่ขาววงศ์ย่อย Aleurodicinae 3 สกุล เพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Panchaetothripinae 3 ชนิด ผีเสื้อกลางคืน วงศ์ย่อย Pyraustinae 5 ชนิด ตัวอ่อนแมลงวันทองสกุล *Bactrocera* ทำสไลด์ถาวร 2 ชนิด มดที่อยู่ร่วมกับเพลี้ยแป้งสกุล *Phenacoccus* จัดรูปร่าง ทำสไลด์ถาวรตัวอย่างมด 7 ชนิด เพลี้ยแป้ง 2 ชนิด ได้ข้อมูลชีววิทยาของแมลงวันทองชนิด *B. cucurbitae* ได้ข้อมูลชีววิทยาเพลี้ยแป้ง *Pseudococcus jackbeardsleyi* แมงมุมสกุล *Argiope* จำนวน 4 ชนิด แมงมุมวงศ์ Tetragnathidae จำนวน 4 ชนิด, จำแนกชนิดของหอยเจดีย์ใหญ่ หอยเจดีย์เล็ก หอยทากดักดาน หอยทากและทากในโรงเรือน จำนวน 6 ชนิด เพลี้ยหอยสกุล *Coccus* จำนวน 2 ชนิด, แมลงหวี่ขาวในวงศ์ย่อย *Aleyrodinae* จำนวน 9 ชนิด, เพลี้ยไฟในสกุล *Haplothrips* จำนวน 3 ชนิด, มวนปีกแก้วในสกุล *Stephanitis* จำนวน 2 ชนิด, ผีเสื้อกลางคืนในสกุล *Parapoynx* จำนวน 3 ชนิด , แตนเบียนไข่วงศ์ใหญ่ Platygastroidea ที่เข้าทำลายหนอนกอข้าว มวนเขียวข้าว และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล จำนวน 4 วงศ์ย่อย 9 สกุล, สัณฐานวิทยาและลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟดอกไม้ *Frankliniella schultzei*, ไรสี่ขาวงศ์ Eriophyidae จำนวน 12 ชนิด, ชีววิทยา การเข้าทำลาย ฤดูกาลระบาดของแมลงวันทองชนิด *Bactrocera tau*, ลักษณะโครโมโซมและเขตการกระจายของหอยสกุล *Pomacea* sp, ด้วงงวงสกุล *Rhynchophorus* จำนวน 2 ชนิด, ลักษณะ สัณฐานวิทยาและลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* และ *Bathrips*, แมงมุมวงศ์ Clubionidae จำนวน ทั้งหมด 2 สกุล 4 ชนิด, ชีววิทยาของเพลี้ยแป้ง *Phenacoccus solenopsis* ชีววิทยาและเขตการแพร่กระจายของไรแมงมุมคันซาวา *Tetranychus kanzawai* 40 ชีววิทยา นิเวศวิทยาของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม วงศ์ *Psyllidae* ในพืชตระกูลส้ม ชนิดของมดในแหล่งผลิตและโรคคัดบรรจุ จำนวน 6 วงศ์ย่อย 16 สกุล 19 ชนิด ชีววิทยา นิเวศวิทยาและการแพร่กระจายของหอยศัตรูพืช สกุล *Bradybeana* ประชากรนกแสกตามแหล่งอาศัย ชนิดและจำนวนสัตว์ศัตรูธรรมชาติของสัตว์ฟันแทะในพื้นที่เพาะปลูกพืชในพื้นที่สูง ลักษณะภายนอกของหนูนาใหญ่ ชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง สกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* พันธุกรรมของหนูนาใหญ่ (*Rattus argentiventer*) ที่พบในประเทศไทย การจำแนกสายพันธุ์และวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของปรสิตโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ระยะสปอร์โรซิสโดยใช้ multiplex PCR

อนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศวิทยา ของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ผลการทดลอง ได้ชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน และชีววิทยาของเชื้อสาเหตุโรคพืช ได้แก่ ได้ รา *Cladosporium* 4

ชนิด รา *Alternaria* ได้ 5 ชนิด รา *Stemphylium* 1 ชนิด รา *Choanephora* 1 ชนิดพร้อมลักษณะทางสัณฐานเป็นรา *Choanephora cucurbitarum* ราในกลุ่มของ *Botryosphaeria* จำนวน 5 สกุล 5 ชนิด ได้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ พืชอาศัยของรา *P. capsici* ได้ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Didymella bryoniae* ชนิดและเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของ Race แบคทีเรีย *Rasonia solanacearum* คือ race 1 ไส้เดือนฝอย migratory endoparasitic พร้อมทั้งชีววิทยา จำนวน 3 ชนิด ไส้เดือนฝอย *Radopholus* พร้อมทั้งชีววิทยา จำนวน 1 ชนิด รา *Colletotrichum* พร้อมลักษณะทางพันธุกรรม ชีววิทยา และนิเวศวิทยา จำนวน 9 ชนิด จำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้และใบจุดของกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าและแวนด้า มีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea ananatis* การถ่ายทอดเชื้อ *Exserohilum tuecicum* ไม่พบการถ่ายทอดเชื้อบนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด รากสกุล *Phyllosticta* พร้อมลักษณะทางพันธุกรรม ชีววิทยา และนิเวศวิทยา จำนวน 4 ชนิด จำแนกกลุ่ม Race ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. l*ycopersici* ในประเทศไทย คือ Race 2 ศึกษาพืชอาศัยของรา *Stemphylium* และ *Alternaria* พบพืชอาศัยของ รา *Stemphylium vesicarium* ได้แก่ หอมกระเทียม พืชอาศัยของรา *Alternaria porri* ได้แก่ หอมแดง หอมใหญ่ รา *A. brassicicola* ได้แก่ คะน้า รา *A. helianthi* ได้แก่ ทานตะวัน

อนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศวิทยาของวัชพืช ได้ชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน และชีววิทยาของวัชพืช ได้แก่ จำแนกพืชสกุลผักแว่น ได้ 4 ชนิด ได้ลักษณะการงอกและการเจริญของหญ้าอีหนาวในสภาพเรือนทดลอง และความสามารถในการผลิตเมล็ดของหญ้าอีหนาว -รายละเอียดลักษณะเมล็ดวัชพืชวงศ์ผักโขม 10 ชนิด รายละเอียดลักษณะวัชพืชสกุลน้ำนมราชสีห์และลักษณะของเมล็ด จำนวน 4 ชนิด ศึกษาวัชพืช ในแปลงหม่อน บัวบก และพริกไทย พบวัชพืช จำนวน 18 ชนิด สำรวจวัชพืชที่เป็นพืชอาศัยของเพลี้ยแป้ง 3 สกุล พบ 6 ชนิด ศึกษาความสามารถในการงอกของเมล็ดดาดตะกั่ว พบ เมล็ดดาดตะกั่วเมื่อตกลงดินจะงอกได้ดี ตั้งแต่ผิวดินถึง 2 เซนติเมตร เมล็ดจะงอกเร็วและมีจำนวนต้นมากที่สุด ตั้งแต่ 1 สัปดาห์หลังปลูก พบว่าเมล็ดดาดตะกั่วสามารถแพร่กระจายได้โดยดีดออกจากต้นตกลงบนที่แห้งเช่นบนวัสดุปลูกหรือบนผิวดิน สำรวจการแพร่กระจายของสาบม่วงพบการแพร่กระจายในแปลงมันสำปะหลัง ยาพารา และแปลงไม้ผล โดยพบแพร่กระจายค่อนข้างหนาแน่น คิดเป็นร้อยละ 52.9 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยา ชนิด การแพร่กระจายและตัวอย่างของเมล็ดวัชพืชวงศ์หญ้างวงช้าง Boraginaceae พบ 5 กลุ่ม จำนวน 4 ชนิด, ลูกใต้ใบ *Phyllanthus* L. พบ จำนวน 8 ชนิด, วงศ์หญ้า *Poaceae* พบ จำนวน 33 ชนิด,วัชพืชสกุล *Boerhavia* L. จำนวน 4 ชนิด ได้ข้อมูลชีววิทยาและการแพร่กระจายของวัชพืชสกุลกะเม็ง *Eclipta* L., ผักเบี้ยเล็ก (*Portulaca quadrifida* L.), วัชพืชสกุล *Boerhavia* L วัชพืชวงศ์ทานตะวันสองชนิด: หญ้าหน้าแมว และทานตะวันหนูในประเทศไทย ได้ชนิดวัชพืชต่างถิ่นในพื้นที่เกษตรที่สูงภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ

ศึกษาความหลากหลายชนิดของแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ ได้แก่ ได้ตัวอย่างแมลงหายากใกล้สูญพันธุ์ในเขตสงวนชีวมลฑลสะแกราช 3 ชนิด จำนวน 6 ตัวอย่าง แมลงหายากใกล้สูญพันธุ์ในเขตภาคใต้ จำนวน 2 ชนิด 5 ตัวอย่าง ได้ตัวอย่างแมลงปอ 5 ชนิด จำนวน 270 ตัวอย่าง จำแนก

ตั๊กแตนหนวดสั้นวงศ์ Acrididae จำนวน 4 ชนิด 168 ตัวอย่าง ได้ตัวอย่างมด 31 ชนิด จำนวน278 ตัวอย่าง ได้ตัวอย่างด้วงงวง 9 ชนิด จำนวน 86 ตัวอย่าง ได้ตัวอย่างหิ่งห้อย 7 ชนิด จำนวน 105 ตัวอย่าง

ศึกษาวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี การวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืช ได้แก่ 1) การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูพืชโดยเซรุ่มวิทยา ผลการทดลองได้ ได้แอนติซีรั่มและโปรตีน จำนวน 4 ชนิด ได้แก่แอนติซีรัมของเชื้อไวรัส PMWaV-1 ไวรัส BYMV ไวรัส Citrus tristeza virus และ โปรตีน Sec A ยีน ของเชื้อไฟโตพลาสมา และชุดตรวจสอบสำเร็จรูป สำหรับตรวจสอบ เชื้อสาเหตุโรคพืชในภาคสนามจำนวน 7 ชุด ได้แก่ ได้ไวรัส Cucumber mosaic virus ไวรัส Sugarcane mosaic virus subgroup Maize dwarf mosic virus ไวรัสในกลุ่ม Tospovirus ไวรัส Bean yellow mosaic virus ไวรัส PVY PVX PVS ในมันฝรั่ง แบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* และแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ในกล้วยไม้ 2) การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูพืชโดยอณูชีววิธี ได้เทคโนโลยีที่ทันสมัยในการวินิจฉัยและการตรวจสอบอย่างรวดเร็วของโรคกรีนนิ่งและโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม โรคเหี่ยวของสัปปะรด โรคใบขาวของอ้อย โรคเน่าของกล้วยไม้ โรคไฟโตพลาสมาของมันสำปะหลัง โรคไวรัส Watermelon silver mottle virus ในแตง แบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* สาเหตุโรคข้าวที่สำคัญ แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ในหัวพันธุ์ปทุมมาด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เชื้อ Grapevine yellow speckle viroid (GYSVd) เชื้อสาเหตุโรคในองุ่น และ เพลี้ยไฟฝ้าย *Trips palmi* Karny โดยเทคนิค Real-time PCR 3) การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูธรรมชาติโดยอณูชีววิธี ได้เทคโนโลยีที่ทันสมัยในการวินิจฉัยและการตรวจสอบอย่างรวดเร็วของสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* และเชื้อไวรัส Nucleopolyhedrovirus 4) การพัฒนาเทคนิคอย่างง่ายและรวดเร็วในการแยกศัตรูพืชเพื่อการวินิจฉัย ได้ชุดตรวจสอบไส้เดือนฝอยภาคสนาม (Nema test kit) เพื่อในการตรวจแยกไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายราก ลำต้น ใบ และดอก

ระเบียบวิธีการวิจัย

กิจกรรมที่ 1 อนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศวิทยาของศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมย่อยที่ 1.1 อนุกรมวิธานชีววิทยา นิเวศวิทยาของ แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติ

การทดลองที่ 1.1.1 อนุกรมวิธานของเพลี้ยอ่อนวงศ์ย่อย Hormaphidinae

สำรวจรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนจากแปลงปลูกพืชทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยใช้พู่กันเขี่ยตัวอย่างเพลี้ยอ่อนบางส่วนใส่ขวดดองที่บรรจุน้ำยาสำหรับดองเพลี้ยอ่อน หรือตัดใบ/ยอด/ส่วนของพืชที่มีเพลี้ยอ่อนเกาะอาศัยอยู่ด้วยกรรไกรตัดกิ่ง นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนพร้อมพืชใส่ถุงพลาสติก กล่องพลาสติก หรือถุงกระดาษ บันทึกรายละเอียด ได้แก่ ส่วนของพืชที่พบ วัน/เดือน/ปี สถานที่ และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างดังกล่าวในกล่องรักษาความเย็น ภายในบรรจุน้ำแข็งแห้งเพื่อรักษาตัวอย่างให้สดอยู่เสมอ รวมทั้งการบันทึกภาพในสภาพธรรมชาติ จากนั้นนำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา เพื่อเลี้ยงให้เป็นตัวเต็มวัยและจำแนกชนิดเบื้องต้นใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น รูปร่าง ขนาดและสี เป็นต้น

นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่บันทึกรายละเอียดแล้วไปจัดเตรียมตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์ชนิดโดยการทำสไลด์ถาวร

การทำสไลด์ถาวร ตามวิธีการของ Blackman and Eastop (2000) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนออกจากขวดดอง ใช้เข็มเจาะที่ตรงกลางส่วนอกด้านบน และรีดเอาของเหลวภายในตัวออก ระวังอย่าให้ส่วนของปากเสียหาย นำเพลี้ยอ่อนที่เจาะแล้วใส่ในหลอดแก้วที่มีแอลกอฮอล์ 95% นำไปต้มโดยวิธี water bath นาน 1-2 นาที

2. ดูดแอลกอฮอล์ออก เติมสารละลายโปแตสเซี่ยมไฮดรอกไซด์ 10% แช่ทิ้งไว้ 3-5 นาที

3. ดูดสารละลายโปแตสเซี่ยมไฮดรอกไซด์ออก ล้างด้วยน้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำกลั่น 5-6 ครั้ง แล้วแช่ทิ้งไว้ในน้ำกลั่นอีก 5-6 นาที

4. ดูดน้ำกลั่นออก เติมกรดแกลเชียลอะซิติก แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วดูดออก ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

5. ดูดกรดแกลเชียลอะซิติกออกเติมโคลฟอออยแช่ทิ้งไว้ 10-20 นาที หรือจนกว่าตัวอย่างเพลี้ยอ่อนใส

การเมาท์สไลด์

หยดแคนาดาบัลซัมเพียงเล็กน้อยลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ เขี่ยเพลี้ยอ่อนลงในหยดแคนาดาบัลซัม ให้เพลี้ยอ่อนหงายท้องขึ้น จัดหนวด ขา siphunculi และ cauda ให้อยู่ในตำแหน่งสวยงาม จากนั้นหยดไซลีนลงบนกึ่งกลางแผ่นสไลด์ที่สะอาด ค่อยๆ คว่ำแผ่นสไลด์ลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ช้าๆ พลิกแผ่นสไลด์กลับขึ้นให้ด้านบนแผ่นแก้วปิดสไลด์อยู่ด้านบน นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7-15 วัน

นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนบนแผ่นสไลด์แก้วที่อบแห้งแล้วมาตรวจวิเคราะห์ชนิด โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง 600 เท่า ตรวจดูลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกชนิดได้แก่ หนวด cauda, siphunculi หรือ cornical

บันทึกภาพเพลี้ยอ่อนแต่ละชนิด ชื่อสกุล และชนิดของเพลี้ยอ่อน พืชอาศัย เก็บตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์

การทดลองที่ 1.1.2 อนุกรมวิธานของเพลี้ยอ่อนเผ่า Macrosiphini

สำรวจรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนจากแปลงปลูกพืชทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยใช้พู่กันเขี่ยตัวอย่างเพลี้ยอ่อนบางส่วนใส่ขวดดองที่บรรจุน้ำยาสำหรับดองเพลี้ยอ่อน หรือตัดใบ/ยอด/ส่วนของพืชที่มีเพลี้ยอ่อนเกาะอาศัยอยู่ด้วยกรรไกรตัดกิ่ง นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนพร้อมพืชใส่ถุงพลาสติก กล่องพลาสติก หรือถุงกระดาษ บันทึกรายละเอียด ได้แก่ ส่วนของพืชที่พบ วัน/เดือน/ปี สถานที่ และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างดังกล่าวในกล่องรักษาความเย็น ภายในบรรจุน้ำแข็งแห้งเพื่อรักษาตัวอย่างให้สดอยู่เสมอ รวมทั้งการบันทึกภาพในสภาพธรรมชาติ จากนั้นนำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา เพื่อเลี้ยงให้เป็นตัวเต็มวัยและจำแนกชนิดเบื้องต้นใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น รูปร่าง ขนาดและสี เป็นต้น

นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่บันทึกรายละเอียดแล้วไปจัดเตรียมตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์ชนิดโดยการทำสไลด์ถาวร

การทำสไลด์ถาวร ตามวิธีการของ Blackman and Eastop (2000) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนออกจากขวดดอง ใช้เข็มเจาะที่ตรงกลางส่วนอกด้านบน และรีดเอาของเหลวภายในตัวออก ระวังอย่าให้ส่วนของปากเสียหาย นำเพลี้ยอ่อนที่เจาะแล้วใส่ในหลอดแก้วที่มีแอลกอฮอล์ 95% นำไปต้มโดยวิธี water bath นาน 1-2 นาที

2. ดูดแอลกอฮอล์ออก เติมสารละลายโปแตสเซี่ยมไฮดรอกไซด์ 10% แช่ทิ้งไว้ 3-5 นาที

3. ดูดสารละลายโปแตสเซี่ยมไฮดรอกไซด์ออก ล้างด้วยน้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำกลั่น 5-6 ครั้ง แล้วแช่ทิ้งไว้ในน้ำกลั่นอีก 5-6 นาที

4. ดูดน้ำกลั่นออก เติมกรดแกลเชียลอะซิติก แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วดูดออก ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

5. ดูดกรดแกลเชียลอะซิติกออกเติมโคลฟออย แช่ทิ้งไว้ 10-20 นาที หรือจนกว่าตัวอย่างเพลี้ยอ่อนใส

การเมาท์สไลด์

หยดแคนาดาบัลซัมเพียงเล็กน้อยลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ เขี่ยเพลี้ยอ่อนลงในหยดแคนาดาบัลซัม ให้เพลี้ยอ่อนหงายท้องขึ้น จัดหนวด ขา siphunculi และ cauda ให้อยู่ในตำแหน่งสวยงาม จากนั้นหยดไซลีนลงบนกึ่งกลางแผ่นสไลด์ที่สะอาด ค่อยๆ คว่ำแผ่นสไลด์ลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ช้าๆ พลิกแผ่นสไลด์กลับขึ้นให้ด้านบนแผ่นแก้วปิดสไลด์อยู่ด้านบน นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7–15 วัน

นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนบนแผ่นสไลด์แก้วที่อบแห้งแล้วมาตรวจวิเคราะห์ชนิด โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง 600 เท่า ตรวจดูลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกชนิดได้แก่ หนวด cauda, siphunculi หรือ cornical

บันทึกภาพเพลี้ยอ่อนแต่ละชนิด ชื่อสกุล และชนิดของเพลี้ยอ่อน พืชอาศัย เก็บตัวอย่างในพิพิธภัณฑ

การทดลองที่ 1.1.3 อนุกรมวิธานเพลี้ยแป้งสกุล *Phenacoccus*

1.สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากแหล่งปลูกพืชทุกภาคของประเทศ ตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยแป้งอาศัยอยู่ใส่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วใส่ในถุงพลาสติก บันทึกสถานที่พิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง ชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ หลังจากนั้นนำตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพ บันทึกรายละเอียด เช่น ขนาด รูปร่างลักษณะและสีของเพลี้ยแป้งก่อนทำสไลด์ถาวร แล้วดองในแอลกอฮอล์ 80% สำหรับตัวอย่างอีกส่วนหนึ่งโดยเฉพาะตัวอ่อนจะถูกนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยใส่ตัวอย่างพร้อมพืชอาหารในกล่องพลาสติกใสที่มีฝากล่องเป็นตาข่าย พร้อมบันทึกรายละเอียดตามข้อ 1 เพื่อศึกษาแมลงศัตรูธรรมชาติต่อไป

2. นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากขวดดองตัวอย่างในข้อ 2 มาทำสไลด์ถาวร โดยดัดแปลงวิธีการของ Williams and Watson (1988) มีขั้นตอนดังนี้

2.1 ใช้เข็มเขี่ยเจาะบริเวณกลางส่วนอกด้านบนของตัวอย่างเพลี้ยแป้ง นำไปใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% จากนั้นนำหลอดทดลองไปต้มด้วยวิธีวอเตอร์บาทใช้เวลาประมาณ 15 นาที (เริ่มนับตั้งแต่น้ำในบีคเกอร์เดือด) โดยระวังไม่ให้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่อยู่ในหลอดทดลองเดือด เพราะจะทำให้ตัวอย่างเกิดความเสียหายได้

2.2 นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่ต้มแล้วมาล้างในน้ำกลั่น กดเบาๆ บนลำตัวด้วยเข็มดัดปลายโค้งเพื่อทำให้ไข่ ตัวอ่อน และของเหลวที่อยู่ในลำตัวหลุดออกมาทางรอยที่เจาะไว้ ถ้ายังมีก้อนไขมันตกค้างอยู่ให้นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 2–3 นาที

2.3 ย้ายลงในคาร์บอลไซลีน (carbol xylene) แช่ทิ้งไว้ 10 นาทีจนกระทั่งตัวอย่างใส นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95%

2.4 ย้ายลงในกรดแอลกอฮอล์ (acid alcohol) ซึ่งเป็นสารละลายของกรดแกลเชียลอะซิติก 1 ส่วน และแอลกอฮอล์ 50% 4 ส่วน แช่ทิ้งไว้ 2–3 นาที

2.5 ย้อมสีตัวอย่างโดยแช่ในน้ำยาย้อมสี ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิดฟุชซิน (acid fuchsin) กรดเกลือ (hydrochloric acid) และน้ำกลั่น แช่ทิ้งไว้นาน 30-60 นาที

2.6 ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95% แช่ทิ้งไว้ 2–3 นาที เพื่อกำจัดสีส่วนเกิน

2.7 ย้ายลงในสารละลายเอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alcohol) กับ แอลกอฮอล์ 95% ในอัตราส่วน 1:1 แช่ทิ้งไว้ 10 นาที

2.8 ย้ายลงในเอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ แช่ทิ้งไว้ 10 นาที

2.9 ย้ายลงในโคล์ฟออย (clove oil) แช่ทิ้งไว้ 20 นาที

2.10 นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งวางบนแผ่นสไลด์แก้ว ใช้กระดาษกรองซับโคล์ฟอยส่วนที่เกินออก หยดแคนาดาบัลซัม (canada balsam) 1 หยดบนตัวอย่างแมลงจัดรูปร่าง ให้สวยงามไม่บิดเบี้ยวหรือทับซ้อนกัน ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

2.11 นำไปอบให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 1-2 เดือน

3. ตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยแป้งบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง ตรวจดูลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก ได้แก่ หนวด (antennae) ขน (setae) รู (pores) ท่อ (tubular ducts) กลุ่มอวัยวะที่ผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว (cerarii) ช่องเปิดที่มีลักษณะคล้ายรอยแตกตามขวางของลำตัว (ostioles) และวงแหวนที่ล้อมรอบช่องเปิดของอวัยวะขับถ่าย (anal ring)

4. วาดรูปแสดงลักษณะทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งแต่ละชนิด โดยวาดลงบนกระดาษกราฟและลอกลงบนกระดาษไขเขียนแบบและจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพลี้ยแป้งสกุล *Phenacoccus*

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

6. จัดเก็บตัวอย่างเพลี้ยแป้งในกล่องใส่สไลด์ถาวรและนำเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลงโดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล

การทดลองที่1.1.4 อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยสกุล *Pulvinaria*

1.สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยจากแหล่งปลูกพืชทุกภาคของประเทศ ตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยหอยอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วใส่ในถุงพลาสติก บันทึกสถานที่พิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง ชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ นำตัวอย่างเพลี้ยหอยที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพ บันทึกรายละเอียด เช่น ขนาด รูปร่างลักษณะและสีของเพลี้ยหอยก่อนทำสไลด์ถาวรแล้วดองในแอลกอฮอล์ 80% สำหรับตัวอย่างอีกส่วนหนึ่งโดยเฉพาะตัวอ่อนจะถูกนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยใส่ตัวอย่างพร้อมพืชอาหารในกล่องพลาสติกใสที่มีฝากล่องเป็นตาข่าย เพื่อศึกษาแมลงศัตรูธรรมชาติต่อไป

2. นำตัวอย่างเพลี้ยหอยจากขวดดองมาทำสไลด์ถาวร โดยดัดแปลงวิธีการของ Williams and Watson (1990) มีขั้นตอนดังนี้

2.1 ใช้เข็มเขี่ยเจาะบริเวณกลางส่วนอกด้านบนของตัวอย่างเพลี้ยหอย นำไปใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% จากนั้นนำหลอดทดลองไปต้มด้วยวิธีวอเตอร์บาท ใช้เวลาประมาณ 15 นาที (เริ่มนับตั้งแต่น้ำในบีคเกอร์เดือด) โดยระวังไม่ให้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่อยู่ในหลอดทดลองเดือด เพราะจะทำให้ตัวอย่างเกิดความเสียหายได้

2.2 นำตัวอย่างเพลี้ยหอยที่ต้มแล้วมาล้างในน้ำกลั่น กดเบาๆ บนลำตัวด้วยเข็มดัดปลายโค้ง เพื่อทำให้ไข่ ตัวอ่อน และของเหลวที่อยู่ในลำตัวหลุดออกมาทางรอยที่เจาะไว้ ถ้ายังมีก้อนไขมันตกค้างอยู่ให้นำแช่ในแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 2–3 นาที

2.3 ย้ายลงในคาร์บอลไซลีน (carbol xylene) แช่ทิ้งไว้ 10 นาทีจนกระทั่งตัวอย่างใส นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95%

2.4 ย้ายลงในกรดแอลกอฮอล์ (acid alcohol) ซึ่งเป็นสารละลายของกรดแกลเซียลอะซิติก 1 ส่วน และแอลกอฮอล์ 50% 4 ส่วน แช่ทิ้งไว้ 2–3 นาที

2.5 ย้อมสีตัวอย่างโดยแช่ในน้ำยาย้อมสี ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิดฟุชซิน (acid fuchsin) กรดเกลือ (hydrochloric acid) และน้ำกลั่น แช่ทิ้งไว้นาน 30-60 นาที

2.6 ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95% แช่ทิ้งไว้ 2–3 นาที เพื่อกำจัดสีส่วนเกิน

2.7 ย้ายลงในสารละลายเอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alcohol) กับแอลกอฮอล์ 95% ในอัตราส่วน 1:1 แช่ทิ้งไว้ 10 นาที

2.8 ย้ายลงในเอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ แช่ทิ้งไว้ 10 นาที

2.9 ย้ายลงในโคล์ฟออย (clove oil) แช่ทิ้งไว้ 20 นาที

2.10 นำตัวอย่างเพลี้ยหอยวางบนแผ่นสไลด์แก้ว ใช้กระดาษกรองซับโคล์ฟออยส่วนที่เกินออก หยดแคนาดาบัลซัม (canada balsam) 1 หยดบนตัวอย่างแมลงจัดรูปร่าง ให้สวยงามไม่เบี้ยวหรือทับซ้อนกัน ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

2.11 นำไปอบให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 1-2เดือน

3. ตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยหอยบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง ตรวจดูลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก ได้แก่ หนวด (antennae) ขน (setae) รู (pores) ท่อ (tubular ducts) และแผ่นแข็งที่อยู่บริเวณปลายส่วนท้อ (anal plate)

4. วาดรูปแสดงลักษณะทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยแต่ละชนิด โดยวาดลงบนกระดาษกราฟและลอกลงบนกระดาษไขเขียนแบบและจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพลี้ยหอยสกุล *Pulvinaria*

5. การบันทึกรายละเอียดบนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้วโดยวางแผ่นสไลด์หันด้านหัวของเพลี้ยหอยเข้าหาตัว ด้านขวาเขียนรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ด้านซ้ายมือเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ เพศ วันเดือนปี ที่ทำสไลด์และชื่อผู้จำแนก ควรลงรายละเอียดดังกล่าวเป็นภาษาอังกฤษ

6. จัดเก็บตัวอย่างเพลี้ยหอยในกล่องใส่สไลด์ถาวรและนำเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล

การทดลองที่ 1.1.5 อนุกรมวิธานแมลงหวี่ขาวในวงศ์ย่อย Aleurodicinae

1 สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงหวี่ขาวศัตรูพืชในแหล่งปลูกพืชทั่วไป ทั้งพื้นที่เกษตร และพื้นที่ป่า ทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยตัดส่วนของพืชที่มีตัวอ่อน ดักแด้ หรือตัวเต็มวัยแมลงหวี่ขาวเกาะอยู่ด้วยกรรไกรตัดกิ่ง นำตัวอย่างแมลงหวี่ขาวที่เก็บรวบรวมได้พร้อมพืชอาศัยห่อกระดาษแล้วนำใส่ถุงพลาสติกหรือกล่องพลาสติก หากตัวอย่างแมลงหวี่ขาวที่รวบรวมได้อยู่ในระยะตัวอ่อน ต้องนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนเป็นดักแด้ บันทึกข้อมูลเบื้องต้น เช่น พืชอาหาร สถานที่ วัน เดือน ปี และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง

2 นำตัวอย่างดักแด้และตัวเต็มวัยแมลงหวี่ขาวที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาด รูปร่าง ลักษณะ สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพแมลงหวี่ขาวแต่ละระยะ

3 นำตัวอย่างดักแด้ที่สำรวจได้ในข้อ 2 บางส่วนมาทำสไลด์ถาวร โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Martin (1987) โดยตัดชิ้นส่วนของพืชเฉพาะที่มีดักแด้ติดอยู่ แช่ในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10% ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หรือแช่ในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10% ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-20 นาที จะช่วยให้แยกดักแด้ออกจากพืชอาศัยได้ง่าย โดยไม่ทำให้ตัวอย่างเสียหาย (ขั้นตอนนี้ระวังไม่ให้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เดือด) ดูดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ออก เติมกรดแกลเซียลอะซิติก แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วดูดกรดแกลเซียลอะซิติกออก เติมสารละลายคลอรอล-ฟีนอล แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาทีเช่นกัน แล้วดูดสารผสมนี้ออก วิธีนี้นอกจากจะช่วยกำจัดคราบไขมันที่ห่อหุ้มดักแด้แล้ว ยังช่วยในการย้อมสีทำให้ตัวอย่างติดสีได้ดีขึ้น การย้อมสีแมลงหวี่ขาวปฏิบัติตามขั้นตอนดังนี้

-ดักแด้ที่มีสีเข้มหรือสีดำ ให้ล้างตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ 95% แล้วย้ายตัวอย่างลงในสารละลายที่เป็นส่วนผสมของแอมโมเนียกับไฮโดรเยนเปอร์ออกไซด์ ในอัตราส่วน 80: 20 โดยปริมาตร แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที สารละลายนี้จะช่วยทำให้ตัวอย่างที่มีสีเข้มใสขึ้น

-ดักแด้ที่มีสีจางหรือสีชีด ให้ล้างตัวอย่างด้วยกรดแกลเซียลอะซิติก ย้ายตัวอย่างลงในสารละลายแอซิกฟุชซินสเตน ใช้เพียง 2-3 หยดเพื่อย้อมสีตัวอย่าง แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที ดูดสารละลาย หรือสีย้อมออก ล้างด้วยกรดแกลเซียลอะซิติก และแช่ในกรดแกลเซียลอะซิติก ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วดูดสารละลายนี้ออก เติมโคลฟอออยหรือไซลีน แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที เมาท์ตัวอย่างบนแผ่นสไลด์ด้วยคานาดาบาซัม แล้วนำไปอบให้แห้งใช้เวลา 5 สัปดาห์

4 นำสไลด์ที่ผ่านการอบจนแห้งแล้วมาตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope ตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดของแมลงหวี่ขาว ลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกชนิดได้แก่ ขนและหนาม (setae &spine) ขอบลำตัว (margin) อวัยวะที่ใช้ในการขับไข เช่น ช่องเปิดบนลำตัวชนิดต่างๆ (pores) vesiform orifice lingula และ operculum เป็นต้น

5 บันทึกรายละเอียดของแมลงหวี่ขาวชนิดต่างๆ ที่สารวจพบ และข้อมูลอื่นที่สำคัญ ถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงบันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายที่ต้องติดไว้กับสไลด์แมลงหวี่ขาวแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่จับ และวัน/เดือน/ปีที่ทาสไลด์ถาวร ชื่อน้ำยาที่ใช้เมาท์ (mount) สไลด์

6 จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษา โดยนำตัวอย่างแมลงหวี่ขาวพร้อมตัวอย่างพืชที่มีดักแด้เกาะอยู่ และสไลด์ถาวรที่จำแนกชนิดเรียบร้อยแล้ว เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล เพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

การทดลองที่ 1.1.6 อนุกรมวิธานเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Panchaetothripinae

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

1. สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟโดยใช้วิธีการตีหรือเขย่าส่วนของพืชเช่น ใบ และดอก ให้เพลี้ยไฟตกลงบนกระดาษขาวที่รองรับ และใช้พู่กันเขี่ยเพลี้ยไฟแต่ละตัวลงในขวดที่บรรจุน้ำยา AGA (แอลกอฮอล์ 60%: กระอะซิติก: กรีเซอรอล อัตราส่วน 10:1:1) รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่มีชีวิตด้วย บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟที่เก็บได้ เช่น พืชที่เก็บ ส่วนของพืชที่เก็บ สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) และชื่อผู้เก็บ ลงในขวดดองเพลี้ยไฟ

2. นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาพฤติกรรมและการเจริญเติบโต และนำตัวเต็มวัยไปทำสไลด์ถาวร

วิธีการทำสไลด์ถาวรของเพลี้ยไฟตามวิธีการของศิริณี (2544) มีขั้นตอนดังนี้

-ย้ายตัวอย่างเพลี้ยไฟจากขวดลงเก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 60% แช่ทิ้งไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง

-ย้ายลงในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5% เพื่อทำให้สีของเพลี้ยไฟจางลง เวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างเพลี้ยไฟ เจาะส่วนท้องของเพลี้ยไฟบริเวณต้นขาของขาหลังด้วยเข็มแหลมขนาดเล็ก เพื่อให้ของเหลวภายในออกจากตัวเพลี้ยไฟ

-ย้ายเพลี้ยไฟที่เจาะแล้วลงในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 50% ทิ้งไว้ 2–3 นาที

-ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 60% อีกครั้ง 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 เพื่อให้ตัวอย่างของเพลี้ยไฟใส แช่ทิ้งไว้ 20–30 นาที

-หยดแคนาดาบัลซัม ซึ่งเป็นน้ำยาเมาท์สไลด์ (mounting media) เพียงเล็กน้อยลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ ป้ายเพลี้ยไฟลงในหยดแคนาดาบัลซัมลงบนกึ่งกลางของแผ่นสไลด์แก้ว ค่อยๆ คว่ำแผ่นสไลด์ช้าๆ จนกระทั่งจรดแผ่นแก้วปิดสไลด์ รีบพลิกแผ่นสไลด์แก้วให้ด้านแผ่นแก้วปิดสไลด์กลับขึ้นด้านบน นำไปอบให้แห้ง

3. วาดภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของแมลงที่ได้ศึกษา จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดและถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยไฟ

การทดลองที่ 1.1.7 อนุกรมวิธานผีเสื้อกลางคืนวงศ์ย่อย Pyraustinae

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างผีเสื้อจากแหล่งปลูกพืชทั่วไป ทั้งพื้นที่เกษตร และพื้นที่ป่า ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ใช้สวิงจับแมลง (insect net) โฉบ เพื่อเก็บตัวอย่างผีเสื้อในช่วงเวลากลางวัน และติดตั้งกับดักแสงไฟ (light trap) เพื่อดึงดูดผีเสื้อช่วงเวลากลางคืน ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า (killing jar) ซึ่งบรรจุ

น้ำยา ethyl acetate หลังจากผีเสื้อตายแล้ว ใช้เข็มไร้สนิม (stainless steel) ปักกลางอกด้านบนเพื่อรักษาตัวอย่างไม่ให้เสียหาย บันทึกรายละเอียด พืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง นำตัวอย่างใส่กล่อง เก็บรวมไว้ในกล่องรักษาความเย็นเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเน่าเสีย นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ นอกจากตัวอย่างผีเสื้อที่ได้จากสภาพธรรมชาติแล้ว มีตัวอย่างผีเสื้อที่มีอยู่เดิมในพิพิธภัณฑ์ กรมวิชาการเกษตร ตัวอย่างที่ได้รับจากนักวิชาการ และตัวอย่างจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

2) นำตัวอย่างผีเสื้อที่ได้จากการสำรวจ มาจัดรูปร่าง บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) จัดปีกให้กางออกโดยให้ขอบล่างของปีกคู่หน้าตั้งฉากกับลำตัว ขอบบนของปีกคู่หลังอยู่ใต้ขอบล่างของปีกคู่หน้า นำไปอบให้แห้งในตู้อบ (oven) ปรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15-30 วัน ขึ้นกับขนาดตัวอย่าง

3) นำตัวอย่างผีเสื้อที่รวบรวมได้มาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาดลำตัว รูปร่าง ลักษณะ และสี เป็นต้น โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิด ผีเสื้อกลางคืนวงศ์ย่อย Pyraustinae ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ ในผีเสื้อบางชนิดซึ่งมีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมากต้องใช้อวัยวะสืบพันธุ์เพศในการจำแนก ซึ่งมีขั้นตอนการทำสไลด์ดังนี้

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

- ดูดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ออก เติมน้ำกลั่นเพื่อล้างโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่ยังหลงเหลืออยู่ออกให้หมด 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 ถ้าเป็นเพศผู้ใช้ปากคีบปลายแหลมดึงอวัยวะสืบพันธุ์ออกจากท้องได้เลย แต่ถ้าเป็นเพศเมียใช้มีดผ่าตัดผ่าผนังลำตัวด้านข้างออกเพื่อป้องกันการเสียหายของอวัยวะสืบพันธุ์ ใช้พู่กันและปากคีบปลายแหลมทำความสะอาดไขมันส่วนเกินออกให้หมด

- ย้ายตัวอย่างลงแอลกอฮอล์ 30% จัดรูปร่างอวัยวะสืบพันธุ์ ให้ได้ตามลักษณะที่ต้องการ ย้ายตัวอย่างแช่ในแอลกฮอล์ 100% กำจัดน้ำออกให้หมด

- เมาท์ลงบนแผ่นสไลด์แก้ว โดยนำอวัยวะสืบพันธุ์ วางบนสไลด์ที่หยดน้ำยา canada balsam แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 50 $^{\circ}$C นาน 4 - 6 สัปดาห์
จึงนำออกมาศึกษา

4) บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาพร้อมทั้งถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope วาดรูปโดยใช้เครื่องมือ camera lucida ช่วยทำให้ทราบสัดส่วนที่แท้จริงได้ บันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้าย

บันทึกของผีเสื้อ แต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่พบตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

5) จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุลและชนิดของผีเสื้อกลางคืนวงศ์ย่อย Pyraustinae ที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

6) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง (ผีเสื้อกลางคืนวงศ์ย่อย Pyraustinae ทุกชนิดที่รายงานไว้ต้องเก็บรักษาตัวอย่างจริงไว้เพื่อการตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง)

การทดลองที่ 1.1.9 อนุกรมวิธานตัวอ่อนแมลงวันทองสกุล *Bactrocera*

1. สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างตัวอ่อนแมลงวันทองในแปลงเพาะปลูก และในสภาพธรรมชาติ โดยใช้กับดักแบบ Steiner เก็บรวบรวมผลไม้ที่มีร่องรอยการทำลายของตัวอ่อน-แมลงวันทอง พร้อมพืชใส่ถุงพลาสติกหรือกล่องพลาสติก เพื่อให้ระบายอากาศได้ดี บันทึกวันที่ เดือน พ.ศ. และสถานที่เก็บ และนำกลับมาเลี้ยงยังห้องปฏิบัติการ

2. นำตัวอ่อนแมลงวันทองที่เก็บได้ไปดองในแอลกอฮอล์ 75% และอีกส่วนนำไปเลี้ยงจนเป็นตัวเต็มวัยและเลี้ยงต่อจนกลายเป็นตัวหนอนระยะสุดท้าย นำตัวหนอนที่ได้ไปทำสไลด์ถาวรเพื่อเปรียบเทียบดูกับหนอนที่ได้จากการเก็บและทำสไลด์เลย โดยไม่เลี้ยงเป็นตัวเต็มวัย

3. เตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดตัวอ่อนแมลงวันทอง โดยใช้ตัวอย่างตัวอ่อนที่เก็บดองไว้ในแอลกอฮอล์

4. นำตัวอย่างตัวอ่อนมาศึกษาลักษณะต่างๆ โดยละเอียดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ โดยดูลักษณะที่แตกต่างกันซึ่งเป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกชนิด

5. นำลักษณะบางอย่างที่มีขนาดเล็กมาก เช่น ส่วนต่างๆ ของปาก แยกมาทำสไลด์ถาวร และทำการวิเคราะห์ชนิดตัวอ่อนแมลงวันทอง

6. บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น รูปร่าง ลักษณะ ขนาด และสีเป็นต้น โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดของตัวอ่อนแมลงวันทอง ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์

7. บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยา โดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของขวดดองตัวอ่อนแมลงวันทองทุกขวด ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้
วัน/เดือน/ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

8. จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุลและชนิดของตัวอ่อนแมลงวันทองที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

9. จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง

การทดลองที่ 1.1.11 อนุกรมวิธานและชีววิทยาเพลี้ยแป้ง *Pseudococcus jackbeardsleyi* Gimpel & Miller

1.สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีเทา จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยแป้งอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วใส่ในถุงพลาสติก บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง ชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่รวบรวมได้จากการสำรวจ นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยใช้พู่กันเขี่ยตัวอ่อน ตัวเต็มวัยและถุงไข่ ลงบนผลฟักทองประมาณ 5-10 ตัว ต่อผล รอจนเพลี้ยแป้งวางไข่และมีตัวอ่อนวัยที่ 1 ที่เริ่มฟัก หลังจากนั้นให้ ใช้พู่กันเขี่ยตัวอ่อนเพลี้ยแป้งวัยที่ 1 ลงในฟักทองซึ่งวางไว้ในกล่องพลาสติก จำนวน 1 ตัวต่อ 1 ผล จานวน 60 ตัว (60 ผล) เปลี่ยนพืชอาหารเมื่อจำเป็น นำตัวอย่างเพลี้ยแป้ง บางส่วนจากที่เลี้ยงบนฟักทองเมื่อลอกคราบแต่ละวัย จำนวน 10 ตัวต่อวัย มาตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพ บันทึกรายละเอียด เช่น ขนาด รูปร่างลักษณะ สี ทุกระยะของเพลี้ยแป้งก่อนดองในแอลกอฮอล์ 80% เพื่อศึกษาด้านอนุกรมวิธานต่อไป

สำหรับตัวอย่างอีกส่วนหนึ่ง (20 ตัว) นำไปศึกษาด้านชีววิทยา โดยบันทึกรูปร่างลักษณะ สี ขนาด ระยะการเจริญเติบโตรวมทั้งพฤติกรรมต่างๆ ตลอดการทดลองพร้อมกับถ่ายภาพประกอบ

2. นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากขวดดองตัวอย่างในข้อ 1 มาทำสไลด์ถาวร โดยดัดแปลงวิธีการของ Williams and Watson (1988) มีขั้นตอนดังนี้

2.1 ใช้เข็มเขี่ยเจาะบริเวณกลางส่วนอกด้านบนของตัวอย่างเพลี้ยแป้ง นำไปใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% จากนั้นนำหลอดทดลองไปต้มด้วยวิธีวอเตอร์บาท ใช้เวลาประมาณ 15 นาที (เริ่มนับตั้งแต่น้ำในบีคเกอร์เดือด) โดยระวังไม่ให้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่อยู่ในหลอดทดลองเดือด เพราะจะทำให้ตัวอย่างเกิดความเสียหายได้

2.2 นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่ต้มแล้วมาล้างในน้ำกลั่น กดเบาๆ บนลำตัวด้วยเข็มดัดปลายโค้งเพื่อทำให้ไข่ ตัวอ่อน และของเหลวที่อยู่ในลำตัวหลุดออกมาทางรอยที่เจาะไว้ ถ้ายังมีก้อนไขมันตกค้างอยู่ให้นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 2–3 นาที

2.3 ย้ายลงในคาร์บอลไซลีน (carbol xylene) แช่ทิ้งไว้ 10 นาทีจนกระทั่งตัวอย่างใส นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95%

2.4 ย้ายลงในกรดแอลกอฮอล์ (acid alcohol) ซึ่งเป็นสารละลายของกรดแกลเซียลอะซิติก 1 ส่วน และแอลกอฮอล์ 50% 4 ส่วน แช่ทิ้งไว้ 2–3 นาที

2.5 ย้อมสีตัวอย่างโดยแช่ในน้ำยาย้อมสี ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิดฟุชซิน (acid fuchsin) กรดเกลือ (hydrochloric acid) และน้ำกลั่น แช่ทิ้งไว้นาน 30-60 นาที

2.6 ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95% แช่ทิ้งไว้ 2–3 นาที เพื่อกำจัดสีส่วนเกิน

2.7 ย้ายลงในสารละลายเอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alcohol) กับ แอลกอฮอล์ 95% ในอัตราส่วน 1:1 แช่ทิ้งไว้ 10 นาที

2.8 ย้ายลงในเอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ แช่ทิ้งไว้ 10 นาที

2.9 ย้ายลงในโคล์ฟอออย (clove oil) แช่ทิ้งไว้ 20 นาที

2.10 นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งวางบนแผ่นสไลด์แก้ว ใช้กระดาษกรองซับโคล์ฟอออยส่วนที่เกินออก หยดแคนาดาบัลซัม (canada balsam) 1 หยดบนตัวอย่างแมลงจัดรูปร่าง ให้สวยงามไม่บิดเบี้ยวหรือทับซ้อนกัน ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

2.11 นำไปอบให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 40 -50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 1-2 เดือน

3. ตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยแป้งบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง ตรวจดูลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก ได้แก่ หนวด (antennae) ขน (setae) รู (pores) ท่อ (tubular ducts) กลุ่มอวัยวะที่ผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว (cerarii) ช่องเปิดที่มีลักษณะคล้ายรอยแตกตามขวางของลำตัว (ostioles) และวงแหวนที่ล้อมรอบช่องเปิดของอวัยวะขับถ่าย (anal ring)

4. วาดรูปแสดงลักษณะทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งแต่ละชนิด โดยวาดลงบนกระดาษกราฟและลอกลงบนกระดาษไขเขียนแบบและจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสี

5. การบันทึกรายละเอียดบนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้ว โดยวางแผ่นสไลด์หันด้านหัวของเพลี้ยแป้งเข้าหาตัว ด้านขวาเขียนรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ด้านซ้ายมือเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ เพศ วันเดือนปี ที่ทำสไลด์และชื่อผู้จำแนก ควรลงรายละเอียดดังกล่าวเป็นภาษาอังกฤษ

6. จัดเก็บตัวอย่างเพลี้ยแป้งในกล่องใส่สไลด์ถาวร และนำเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล

การทดลองที่ 1.1.12 การศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมสกุล *Argiope*

การเก็บและรักษาตัวอย่างแมงมุม แมงมุมแต่ละชนิดที่มีอุปนิสัยแตกต่างกัน การเก็บตัวอย่างจึงมีหลายวิธี ดังนี้

- การมองหาและจับโดยตรง วิธีนี้เหมาะสำหรับจับแมงมุมทุกเวลาและสถานที่และทำให้ผู้จับสามารถทราบถึงพฤติกรรมต่าง ๆ ของแมงมุมแต่ละชนิด บันทึกพฤติกรรมต่าง ๆ ของแมงมุมแต่ละชนิดในสภาพธรรมชาติ เช่น วิธีจับเหยื่อ ชนิดของเหยื่อ เวลาที่ออกหากิน ลักษณะใยดักเหยื่อ เป็นต้น จับแมงมุมโดยใช้หลอดทดลอง ฆ่าแมงมุมโดยใส่ก้อนสำลีในกล่องพลาสติกที่เลี้ยงแมงมุมหยด ethyl acetate 2 – 3 หยดลงบนก้อนสำลีเพื่อทำให้แมงมุมสลบ ดองแมงมุมในขวดที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75 % เพื่อเก็บรักษาตัวอย่างและนำไปจำแนกชนิดต่อไป

- การเคาะ ใช้ท่อนไม้กลมยาวเคาะซึ่งมีสวิงจับแมลงรองรับข้างใต้ แมงมุมจะตกลงในสวิง ฆ่าและรักษาตัวอย่างแมงมุมดังข้อ 1)

- การโฉบ ใช้สวิงจับแมลงโฉบแมงมุมจากวัชพืชในไร่ สวน ในหญ้า หรือในนาข้าว ฆ่าและเก็บตัวอย่างแมงมุมเพื่อนำไปรักษาตัวอย่างดังข้อ 1)

การศึกษาอนุกรมวิธาน ของแมงมุมสกุล *Ariope* และ *Neoscon*

แมงมุมที่เก็บรักษาไว้ นำมาจำแนกเป็นวงศ์ สกุล ชนิด การจำแนกจะศึกษาจากตำราต่างๆ โดยเฉพาะจากเอกสารเกี่ยวกับการศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในแถบทวีปเอเชีย วาดรูปโดยใช้ grid scale เพื่อให้ได้ขนาดและสัดส่วนที่แท้จริงตามตัวอย่างแมงมุมที่วาด บรรยายลักษณะทางอนุกรมวิธาน ทำ key เพื่อใช้เป็นแนวทางในการจำแนก ถ่ายรูปแมงมุม เก็บและรักษาตัวอย่างแมงมุมไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาอารักขาพืช

การทดลองที่ 1.1.13 ชนิดของมดที่อาศัยร่วมกับเพลี้ยแป้งสกุล *Phenacoccus*

1. สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างมดที่พบอยู่ร่วมกับเพลี้ยแป้ง จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ เก็บตัวอย่างมดที่พบอยู่ร่วมกับเพลี้ยแป้งใส่ในกล่องพลาสติกหรือถุงกระดาษ นำตัวอย่างมดและเพลี้ยแป้งที่เก็บรวบรวมได้มาตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพและบันทึก รายละเอียด เช่น ขนาด รูปร่างลักษณะ และสี เป็นต้น แล้วดองในแอลกอฮอล์ 80% สำหรับมด นำไปจัดรูปร่าง ใช้เข็มไร้สนิมปักที่กึ่งกลางบริเวณอกถ้าเป็นตัวขนาดใหญ่ แต่ถ้าขนาดเล็กนำติดกระดาษสามเหลี่ยมขนาดเล็ก (card point) และสำหรับเพลี้ยแป้งนำไปทำสไลด์ถาวรเพื่อจำแนกชนิด นำไปอบให้แห้ง

2. ตรวจจำแนกชนิดมดที่จัดรูปร่างและอบแห้งแล้ว โดยอาศัยหลักการทางด้านอนุกรมวิธาน และวาดรูปแสดงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกแต่ละชนิด พร้อมภาพประกอบ เขตการแพร่กระจายและจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์ นำตัวอย่างมดที่จำแนกชนิดแล้ว ให้จัดเก็บลงในกล่องกระดาษสี่เหลี่ยมสีขาว จัดเรียงตามอักษรของลำดับ ชนิด นำจัดเข้าลิ้นชักในตู้เก็บแมลง บันทึกข้อมูลแต่ละตัวอย่างบนแผ่นป้ายบันทึกกำกับตัวอย่าแมลง (labeling specimen) เช่น ชนิดเพลี้ยแป้งที่พบอยู่ร่วมกัน วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

3. ตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยแป้ง บนแผ่นสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง โดยอาศัยหลักการทางด้านอนุกรมวิธาน และวาดรูปแสดงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกแต่ละชนิด พร้อมเขตการแพร่กระจายและพืชอาหารของแต่ละชนิดและ การบันทึกรายละเอียดบนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้วโดยวางแผ่นสไลด์หันด้านหัวของเพลี้ยหอยเข้าหาตัว ด้านขวาเขียนรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร ชนิดมดที่พบอยู่ร่วมกัน วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ด้านซ้ายมือเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ เพศ วันเดือนปี ที่ทำสไลด์และชื่อผู้จำแนก ควรลงรายละเอียดดังกล่าวเป็นภาษาอังกฤษ

4. จัดเก็บตัวอย่างมดที่จัดรูปร่างและอบแห้ง รวมทั้งเพลี้ยแป้งในกล่องใส่สไลด์ถาวร ไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลงโดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล

การทดลองที่ 1.1.14 ชีววิทยา การเข้าทำลาย ฤดูกาลระบาดของแมลงวันทองชนิด *Bactrocera cucurbitae* (Coquillet)

1. สำรวจชนิดแมลงวันผลไม้ที่ลงพืชตระกูลแตง

โดยเก็บรวบรวมผลพืชตระกูลแตงเช่น ฟัก ฟักทอง แตงกวา มะระ แตงโม เมล่อน ที่ถูกแมลงวันผลไม้ทำลายจากแหล่งปลูกต่างๆ โดยนำมาชั่งน้ำหนัก และนับจำนวน บันทึกวัน/เดือน/ปี ระยะพืช และสถานที่เก็บตัวอย่าง จากนั้นนำมาเลี้ยงต่อในห้องปฏิบัติการ โดยนำผลใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 22x29x10 เซนติเมตร ที่รองก้นกล่องด้วยขี้เลื่อยที่มีความชื้น สูงประมาณ 1 นิ้ว รอจนหนอนแมลงวันผลไม้ออกมาเข้าดักแด้ในขี้เลื่อยประมาณ 10 วัน จากนั้นใช้ตะแกรงรอนเบอร์ 20 ร่อนแยกดักแด้ออกจากขี้เลื่อย แล้วนำดักแด้ใส่ในกล่องพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร คลุมทับด้วยขี้เลื่อยที่มีความชื้น สูงประมาณ ½ นิ้ว จากนั้นนำไปไว้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 0.35x0.35x0.50 เมตร ที่ภายในมีน้ำและอาหารสำหรับตัวเต็มวัย (Brewer's yeast และน้ำตาลไอซ์ซิ่ง อัตรา 1:4) เมื่อตัวเต็มวัยมีอายุประมาณ 7-10 วัน ทำการฆ่าโดยนำตัวเต็มวัยใส่ในหลอดแก้วแช่ในช่องทำน้ำแข็ง (freezer) นาน 4-5 ชั่วโมง แล้วนำไปจำแนกชนิดและตรวจนับจำนวน

2. การศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. cucurbitae*

ทำการเก็บรวบรวมผลพืชตระกูลแตงที่ถูกแมลงวันผลไม้เข้าทำลายจากแหล่งปลูก จากนั้นนำมาเลี้ยงต่อในห้องปฏิบัติการ เมื่อได้แมลงวันผลไม้ชนิด *B. cucurbitae* จึงนำมาเลี้ยงขยายพันธุ์ต่อจนได้รุ่นที่ 1 (F1) จากนั้นทำการศึกษา

2.1 วงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. cucurbitae* โดยดำเนินการศึกษาวงจรชีวิตในระยะต่างๆ ดังนี้

ระยะไข่ ศึกษาอายุของไข่ด้วยการทำ Hatching Rate โดยเขี่ยไข่ลงบนกระดาษกรองเบอร์ 91 ที่ให้ความชื้นตลอดเวลา แล้วเก็บไว้ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จากนั้นตรวจนับและบันทึกจำนวนหนอนที่ฟักออกจากไข่ทุก 6 ชั่วโมง ทา 5 ซ้าๆ ละ 100 ฟอง

ระยะหนอน ศึกษาอายุและลักษณะของหนอนวัยต่างๆ โดยเลี้ยงหนอนในผลแตงกวา บันทึกขนาด ลักษณะ และการตายของหนอนวัยต่างๆ โดยศึกษาจากหนอน 100 ตัว

ระยะดักแด้ ศึกษาอายุและลักษณะของดักแด้ โดยทำการบันทึกขนาด และลักษณะของดักแด้ โดยศึกษาจากดักแด้ 100 ดักแด้

ระยะตัวเต็มวัย ศึกษาอายุขัย การผสมพันธุ์ การวางไข่ และลักษณะของตัวเต็มวัย โดยเลี้ยงแมลงวันผลไม้ชนิด *B. cucurbitae* เพศผู้ 1 ตัวและเพศเมีย 1 ตัว ในกล่องพลาสติกขนาด 21x15x8 เซนติเมตร ที่ภายในมีน้ำ อาหาร และกระบอกพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร สูง 4.5 เซนติเมตร เจาะรูขนาดเล็กจานวน 20 รู ภายในกระบอกใส่ชิ้นฟักเพื่อล่อให้แมลงวางไข่ บันทึกปริมาณการวางไข่ทุกวันจนตัวเต็มวัยเพศเมียตาย นอกจากนี้ทำการบันทึกลักษณะตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย ลักษณะการจับคู่ผสมพันธุ์ และการตายของตัวเต็มวัย โดยศึกษาจากแมลงวันผลไม้จำนวน 10 คู่

2.2 ตารางชีวิต (Life table) ของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. cucurbitae* ทำการศึกษาโดยเจาะรูขนาด 1x1x1 เซนติเมตร บนผลแตงกวา จากนั้นนำกระดาษสีดำขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตรวางในช่องที่เจาะไว้แล้วจึงนำไข่ของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. cucurbitae* วางในกระดาษจำนวน 100 ฟองต่อผล ทำ 3 ซ้ำ จากนั้นทำการปิดช่องที่เจาะไว้ด้วย parafilm บันทึกจำนวนไข่ที่ฟัก หนอนวัยต่างๆ ดักแด้ และตัวเต็มวัย แล้วนำมาคำนวณตามวิธีของ Southwood (1966)

3. การศึกษานิเวศน์วิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. cucurbitae*

3.1 การศึกษาช่วงฤดูการระบาดของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. cucurbitae* ทำการติดตั้งกับดักแมลงวันผลไม้แบบ Steiner ซึ่งภายในแขวนก้อนสำลีชุบสาร Cur-lure ผสมสารฆ่าแมลง malathion (ไดมาร์ค 83% EC) ในอัตรา 4:1 โดยปริมาตร จำนวน 8 กับดักต่อพื้นที่ 1 ไร่ โดยนำไปแขวนในแปลงปลูกเก็บแมลงวันผลไม้ในกับดักออกทุกสัปดาห์ หลังจากนั้นทำการจำแนกชนิดและบันทึกจำนวนที่พบ

3.2 การศึกษาระยะการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้ในผลชมพู่ โดยทำการเก็บผลแตงกวาในระยะต่างๆ จากแปลงปลูกมาผ่าเพื่อตรวจสอบการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้ทุกสัปดาห์ บันทึกชนิด จำนวน สัดส่วนเพศเมียและเพศผู้ของแมลงวันผลไม้ที่พบ ปริมาณน้ำฝน อุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์

3.3 สำรวจศัตรูธรรมชาติที่ทำลายแมลงวันผลไม้ชนิด *B. cucurbitae* ในแหล่งปลูก โดยทำการสารวจและเก็บรวบรวมศัตรูธรรมชาติจากแปลงปลูกพืชตระกูลแตง จากนั้นจำแนกชนิดและบันทึกจำนวนที่พบ

การทดลองที่ 1.1.15 สัณฐานวิทยาของเปลือกและกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์ ของหอยเจดีย์เล็ก *Lamellaxis gracilis* และหอยเจดีย์ใหญ่ *Prosopea walkeri* (Benson)

มีขั้นตอนการทดลอง ดังนี้

1. สำรวจ /รวบรวม/ เก็บตัวอย่าง /บันทึกเขตการแพร่กระจาย และทำแผนที่การกระจายของหอยเจดีย์เล็ก และหอยเจดีย์ใหญ่

สำรวจ หอยทั้งสองชนิดตามพื้นที่ๆ กำหนด เช่น ในพื้นที่ป่าธรรมชาติ พื้นที่ปลูกกล้วยไม้และ/หรือพื้นที่เกษตรกรรมภาคต่างๆ ของประเทศไทย เพื่อจัดทำแผนที่การกระจายพันธุ์ของหอยเจดีย์เล็ก และหอยเจดีย์ใหญ่ และเก็บตัวอย่างมาเพาะเลี้ยงเพื่อให้หอยปรับสภาพในตู้กระจกของห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร

2 เตรียมสถานที่สำหรับเพาะเลี้ยงหอยเจดีย์เล็ก และเจดีย์ใหญ่เพื่อศึกษาชีววิทยา

โดยเพาะเลี้ยงในโรงเรือน พื้นที่ 4.30 x 4.30 เมตร ใช้ตู้กระจกขนาด 25x40x26 เซนติเมตร รองพื้นตู้กระจกด้วยด้วยดิน ผสมขุยมะพร้าว (อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อฆ่าปรสิตบางชนิด) อัตราส่วน 1:1 ให้สูงจากพื้นตู้กระจกประมาณ 5 เซนติเมตร โดยวางกาบมะพร้าวไว้ในตู้กระจกสำหรับให้หอยวางไข่ ให้ความชื้นโดยฉีดพ่นน้ำอย่างสม่ำเสมอ วันละ 1 ครั้ง

3. ตรวจสอบชนิด และสัณฐานวิทยาของเปลือกของหอยเจดีย์เล็ก และเจดีย์ใหญ่

นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์ชื่อตามระบบอนุกรมวิธานของหอย เปรียบเทียบกับเอกสารหอยทากบกทั้งในและต่างประเทศ โดยยึดหลักของ Abbott (1989), Hemmen and Hemmen (2001) และ Panha (1996)

4. ศึกษาสัณฐานวิทยาเปลือกและกายวิภาคระบบสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เล็ก และเจดีย์ใหญ่ โดยการสังเกต เปรียบเทียบ ถ่ายภาพและวาดภาพในห้องปฏิบัติการ โดยมีขั้นตอนดังนี้

4.1 ทำความสะอาดเปลือกหอยเจดีย์เล็กและเจดีย์ใหญ่ ด้วยน้ำอุ่น โดยใช้พู่กันหรือแปรงขนาดเล็ก ปัดคราบดินและคราบสกปรกอื่นๆ

4.2 นำตัวอย่างเปลือกหอยทั้ง 2 ชนิด มาผึ่งให้แห้ง ในที่มีอากาศถ่ายเท

4.3 ใช้สำลีชุบน้ำยาพาราฟินเหลว (liquid paraffin) เพื่อรักษาสีสัน และลวดลาย ของเปลือกหอย

4.4 นำตัวอย่างเปลือกหอย ทั้ง 2 ชนิดๆ ละ 10-15 เปลือก มาวัดค่า shell length, shell width, last whorl height, aperture length และ aperture width ด้วยเวอร์เนีย จากนั้นจึงเข้าสู่การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้ ANOVA จากโปรแกรม SPSS

4.5 ศึกษากายวิภาคศาสตร์ของระบบสืบพันธุ์เจดีย์เล็ก และเจดีย์ใหญ่ โดยนำตัวอย่างหอย ที่ยังมีชีวิตมาทำให้อวัยวะภายในเปลือกยืดตัวโดยใช้ suffocation technique จนกระทั่งหอยมีการยืดตัวเต็มที่และไม่ตอบสนองต่อการสัมผัส จึงนำมา fix และ dissection ด้วย 70% ethyl alcohol (criteria of Patterson, 1971) พร้อมสังเกต เปรียบเทียบ ถ่ายภาพและวาดภาพในห้องปฏิบัติการ

การทดลองที่ 1.1.16 ความชุกชุมและแหล่งอาศัยของนกแสก (*Tyto alba javanica* (Gmelin, 1788) ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

1. ดำเนินการสำรวจตามพื้นที่ๆ ตรวจสอบจากเอกสารรายงานการพบเห็น หรือจากการสอบถาม โดยเน้นในบริเวณวัด ป่าชุมชน หมู่ไม้และอาคารที่ถูกปล่อยทิ้งร้าง ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือและภาคกลาง สำรวจนับจำนวนประชากรนกแสกที่พบในแต่ละแหล่งอาศัย รวมทั้งทำการสำรวจนับโดยการใช้เสียงล่อในเวลากลางคืนในพื้นที่เกษตรกรรม ตามวิธีการของปริญญา (2551) ทำพิกัดจุดที่สำรวจพบด้วยเครื่อง GPS เพื่อจัดทำแผนที่การกระจาย

2. เก็บตัวอย่างก้อนสำรอกที่นกแสกคายทิ้งจากแต่ละแหล่ง นำมาตรวจวิเคราะห์ชนิดและสัดส่วนสัตว์ที่ถูกนกแสกแต่ละแหล่งล่าเป็นอาหารในห้องปฏิบัติการ

3. บันทึกภาพถ่ายสถานที่ที่พบนกแสกและแหล่งอาศัยของนกแสก บันทึกข้อมูลทางภูมิศาสตร์และข้อมูลการใช้ประโยชน์ที่ดินโดยรอบบริเวณสถานที่เก็บตัวอย่างก้อนสำรอกที่นกแสกคายทิ้ง บันทึกชนิดและจำนวนของสัตว์ที่พบซากในก้อนสำรอกของนกแสก

การทดลองที่ 1.1.17 อนุกรมวิธานไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis*

การการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis*

1) การสกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอย การสกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย จำนวน 6 ไอโซเลท คือ *Steinernema* sp. ของไอโซเลท KBs, KPs, REs, UBs และ *Heterorhabditis* sp. ของไอโซเลท REh, PRh ตามวิธีการของ Hominick *et al.* (1997) โดยนำไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศเมียของแต่ละไอโซเลท จำนวน 10 ตัว ใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมด้วย homogenizing buffer (100mM NaCl, 200mM sucrose, 10mM EDTA, 30mM Tris HCl, 1% β- mercapto-ethanol) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บดด้วย mini blue pestle ให้ละเอียด เติมด้วย lysis buffer (500 mM Tris- HCl, 50mM EDTA, 2.5% SDS, pH 8.0) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ใส่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 65 °ซ นาน 10 นาที เติมด้วย precipitation solution (3M potassium acetate, pH 8.0) 192 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย chloroform / iso-amyl-alcohol (24/1) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Germany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบนใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ ที่บรรจุสาร isopropanol ที่แช่เย็นในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 °ซ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer pH. 8.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วัดปริมาณความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอนเอที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่อง spectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอ เท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR)

<u>การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 28 S rDNA ด้วยปฏิกิริยา PCR</u>

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 28S rDNA ของไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลทด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 502 (5'-CCTTAGTAACGGCGAGTGAAA -3') / 536 (5'-CAGCTATCCTGAGGA AAC-3') ตามรายงานของ Stock *et al.* (2001) สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ส่วน D2/D3 regions ของยีน 28S rDNA ซึ่งออกแบบมาจากยีน 28S rDNA ของไส้เดือนฝอย *Caenorhabditis elegans* จาก Genbank accession number X03680 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ที่ใช้ในการออกแบบ primers ใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 50 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยปฏิกิริยาประกอบ ด้วยดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลท ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม ที่เตรียมไว้ข้างต้นผสมกับ 10X PCR buffer [67 mM Tris-HCl, pH8.8, 83 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2.0 mM $MgCl_2$, 30 mM β -mercaptoethanol, 10% dimethylsulfoxide และ bovine serum albumin] dNTPs ชนิดละ 125 uM เอนไซม์ Taq DNA polymerase 1.0 ยูนิต (Invitrogen Corporation Grand Island, NY, USA) และไพรเมอร์ที่ออกแบบและสังเคราะห์ไว้แล้วข้างต้นชนิดละ 20 uM แล้วเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามวิธีการของ Nguyen *et al*. (2001) ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (initial denaturing)	94	5
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	1
3. ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (primer annealing)	50	1
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension)	72	1
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72	5

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 35 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 °ซ นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาผสมกับ loading dye (0.025% bromophenol blue, 40% Ficoll 400, 0.5% SDS) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1% อะกาโรสใน 0.5 xTAE (40mM Tris, 4mM sodium acetate, 1mM EDTA, pH 7.9) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 135 โวลต์ นาน 25 นาที ย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

<u>การหาลำดับนิวคลีโอไทด์</u> (sequencing)

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ 502/536 ข้างต้น มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด Wizard®Plus SV minipreps DNA purification system (Promega®, USA) จากนั้นนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจำแนกชนิด โดยส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First BASE Laboratories ประเทศมาเลเซีย

<u>วิเคราะห์การเรียงตัวกันของลำดับ Multiple aligment และ Phylogenetic relationships</u>

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์การเรียงตัว โดยนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 28S rDNA ของไส้เดือนฝอยชนิดต่างๆ ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) และโปรแกรม CLUSTAL W2 (http://www.ebi.ac.uk/clustal2w/) วิเคราะห์ความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอย โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 28S rDNA ในส่วน D2/D3 regions ของไส้เดือนฝอย

<u>การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไส้เดือยฝอย</u>

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 28S rDNA ไส้เดือนฝอย และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 28S rDNA ไส้เดือนฝอยที่ได้จาก Genbank (accession number AF331907) ซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยกลุ่มที่พบในประเทศไทยเช่นกัน มาเปรียบเทียบวิเคราะห์ความเหมือนและความ สัมพันธ์สายวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยด้วยโปรแกรม CLUSTAL W2 (http:// www.ebi.ac.uk/ clustal 2w/) และโปรแกรม EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms (http://www. ebi.ac.uk/ emboss/ align/)

2) การศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา *Steinernema* และ *Heterorhabditis*

เตรียมไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* (ไอโซเลท KBs, KPs, REs และ UBs) และ *Heterorhabditis* (ไอโซเลท REh และ PRh) เพื่อการวัดขนาดสัดส่วน ได้จากหนอนกินรังผึ้งที่ปลูกเชื้อด้วยไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย (IJ) โดยตัวเต็มวัยเพศผู้ เพศเมียของไส้เดือนฝอยใน 1st และ 2nd generation ได้จากการผ่าหนอนกินรังผึ้งหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 3 วัน และ 6 วัน ตามลำดับ และไส้เดือนฝอยระยะ IJ ได้จากการเคลื่อนที่ออกมาจากซากของหนอนเป็นเวลาประมาณ 10 วันหลังปลูกเชื้อ ไส้เดือนฝอยทุกระยะการเจริญเติบโตนำมาฆ่าด้วยน้ำอุ่น (50 °ซ) เป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำยา fixative (TAF, 7 ml of 40 % formaldehyde, 2 ml tri-ethanolamine, 91 ml distilled water) นำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเขี่ยไส้เดือนฝอยลงใน solution I (20 parts 95 % ethanol, 1 part glycerine, 79 parts distilled water) นำไปวางใน desiccator ที่มี 95 % ethanol บรรจุอยู่ วางไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 12 ชม. เพื่อดึงน้ำออกจากตัวไส้เดือนฝอยช้าๆ และมีการแทนที่ด้วยกลีเซอรีน จากนั้นเติม solution II (5 parts of glycerine, 95 parts of 95 % ethanol) ลงไป นำไปไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 3 ชม. กลีเซอรีนจะเข้าแทนที่น้ำในตัวไส้เดือนฝอย สามารถเห็นอวัยวะสำคัญภายในตัวไส้เดือนฝอยได้ชัดเจน เขี่ยไส้เดือนฝอยลงในหยดกลีเซอรีนบนสไลด์แก้ว หนุนด้วยใยแก้วก่อนปิดทับด้วย cover slip และซิล ด้วยน้ำยาซิลสไลด์ ถ่ายภาพรูปร่างลักษณะและวัดขนาดสัดส่วนภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง โดยวัดส่วนต่างๆ ดังนี้

ตัวเต็มวัยเพศผู้ : ความยาวลำตัว (L); ความกว้างลำตัว (W); ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP); ความยาววัดจากหัวถึง esophagus (ES); ความยาวหาง (Tail); ความกว้างบริเวณ anus; ความยาว spicule และความยาว gubernaculum

ตัวเต็มวัยเพศเมีย : ความยาวลำตัว (L); ความกว้างลำตัว(W); ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP); ความยาววัดจากหัวถึง esophagus (ES); ความยาวหาง (Tail); ความกว้างบริเวณ anus และ % vulva

ตัวอ่อนระยะ Infective juvenile : ความยาวลำตัว (L); ความกว้างลำตัว(W); ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP); ความยาววัดจากหัวถึง esophagus (ES) และความยาวหาง (Tail)

นำมาคำนวณค่าสัดส่วน (ratio) โดยใช้ De Man's formula (Poinar, 1986) ดังนี้

Ratio : a = L/W; b = L/ES; c = L/Tail; d = EP/ES; e = EP/Tail

และคำนวณค่าพารามิเตอร์ตามวิธีการของ Nguyen (1993) ดังนี้

D% = EP/ES x 100; E% = EP/Tail x 100

ถ่ายภาพรูปร่างลักษณะที่สำคัญของไส้เดือนฝอยระยะ Infective juvenile ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่างๆ ค่าการวัดขนาดสัดส่วนและรูปร่างลักษณะสำคัญของไส้เดือนฝอย นำไปเปรียบเทียบ กับ key to species of the genus *Steinernema* and *Heterorhabditis* (Nguyen and Smart, 1996)

การทดลองที่ 1.1.18 ความหลากชนิดของสัตว์ศัตรูธรรมชาติของสัตว์ฟันแทะในพื้นที่เกษตรที่สูงภาคเหนือ

การสำรวจชนิดและความชุกชุมของสัตว์ศัตรูธรรมชาติของสัตว์ฟันแทะในพื้นที่เกษตรที่สูงทางภาคเหนือ จะทำการสำรวจด้วยวิธีการหลายวิธีร่วมกัน เนื่องจากสัตว์ศัตรูธรรมชาติแต่ละกลุ่มมีนิเวศวิทยาแหล่งที่อยู่อาศัย และพฤติกรรมการหากินแตกต่างกัน ในกลุ่มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะใช้การสำรวจรอยเท้า กองมูล การวางกรงดัก และการส่องไฟ ในกลุ่มนกแสกและนกเค้า จะใช้วิธีสำรวจด้วยการใช้เสียงล่อ การฟังจากเสียงร้อง การวางกับดัก และการค้นหาตามสถานที่ที่คาดว่าจะเป็นแหล่งหลบซ่อนตัวในเวลากลางวัน พวกเหยี่ยว จะใช้การสำรวจและจำแนกชนิดด้วยกล้องส่องทางไกลและกล้องถ่ายรูป สัตว์เลื้อยคลาน ใช้การสำรวจร่องรอย การวางกับดัก และการค้นหาตัวตามแหล่งอาศัย

พื้นที่ศึกษาจะดำเนินการสำรวจตามพื้นที่เกษตรกรรมบนพื้นที่สูงใน 5 จังหวัดคือ ตาก เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน และน่าน โดยจะเน้นในพื้นที่เพาะปลูกข้าวไร่ ข้าวโพด ถั่วเหลือง และไม้ผลที่ประสบปัญหาการกัดทำลายจากสัตว์ฟันแทะ ในแต่ละพื้นที่เพาะปลูกพืชแต่ละชนิดจะมีพื้นที่ตัวแทนที่ทำการสำรวจอย่างน้อย 5 แปลงสำรวจ โดยจะทำการสำรวจปีละ 1 จังหวัด ออกสำรวจเดือนละ 1 ครั้ง เดือนละ 4-6 วัน

การทดลองที่ 1.1.19 ความหลากชนิดและประชากรของหอยทากและทากในโรงเรือนปลูกพืช

1.สำรวจ ชนิด และประชากรหอยทากและทากในโรงเรือนปลูกพืชได้แก่ ไม้ดอกและไม้ประดับ พืชผักเรือนเพาะชำกล้าไม้ เป็นต้น ของแต่ละจังหวัดในแต่ละภาคของประเทศ

2. สำรวจ ชนิด และประชากรหอยทากและทากด้วยการใช้ตารางสุ่มขนาด 1 ตารางเมตร โดยสุ่มนับประมาณ 10 จุดต่อไร่ ให้กระจายทั่วพื้นที่ด้วยการเดินสุ่มตามแนวเส้นทะแยงมุมทั้งสองด้าน พร้อมทั้งเก็บหอยที่มีชีวิตอยู่มาเลี้ยงที่กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร และเก็บรวบรวมเปลือกหอยมาทำความสะอาดเพื่อชั่งน้ำหนักและวัดขนาดแล้วเก็บไว้เป็นตัวอย่างใช้จำแนกชนิดของหอย

3. สำรวจความเสียหายของพืชที่ปลูกด้วยตารางสุ่มขนาด 1 ตารางเมตรซึ่งเป็นจุดเดียวกันกับที่นับประชากรหอย สุ่มนับประมาณ 10 จุดต่อไร่ โดยนับจำนวนต้นพืชที่ถูกทำลายและต้นพืชทั้งหมดในแต่ละกรอบตารางสุ่ม

4.เก็บดินหรือวัสดุปลูกจากแปลงมาวัดความชื้นและความเป็นกรด-ด่าง และบันทึกสภาพแวดล้อมของพื้นที่ในโรงเรือน

5. วัดพิกัดตำแหน่งโรงเรือนแปลงปลูกพืช

การทดลองที่ 1.1.20 อนุกรมวิธานแมงมุมวงศ์ Tetragnathidae

1.สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่าง ดังนี้

1) การมองหาและจับโดยตรง วิธีนี้เหมาะสำหรับจับแมงมุมทุกเวลาและสถานที่และทำให้ผู้จับสามารถทราบถึงพฤติกรรมต่าง ๆ ของแมงมุมแต่ละชนิด บันทึกพฤติกรรมต่าง ๆ ของแมงมุมแต่ละชนิดในสภาพธรรมชาติ เช่น วิธีจับเหยื่อ ชนิดของเหยื่อ เวลาที่ออกหากิน ลักษณะใยดักเหยื่อ เป็นต้น จับแมงมุมโดยใช้หลอดทดลอง ฆ่าแมงมุมโดยใส่ก้อนสำลีในกล่องพลาสติกที่เลี้ยงแมงมุมหยด ethyl acetate 2 – 3 หยดลง

บนก้อนสำลีเพื่อทำให้แมงมุมสลบ ดองแมงมุมในขวดที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75 % เพื่อเก็บรักษาตัวอย่างและนำไปจำแนกชนิดต่อไป

2) การเคาะ ใช้ท่อนไม้กลมยาวเคาะซึ่งมีสวิงจับแมลงรองรับข้างใต้ แมงมุมจะตกลงในสวิง ฆ่าและรักษาตัวอย่างแมงมุมดังข้อ 1

3) การโฉบ ใช้สวิงจับแมลงโฉบแมงมุมจากวัชพืชในไร่ สวน ในหญ้า หรือในนาข้าว ฆ่าและเก็บตัวอย่างแมงมุมเพื่อนำไปรักษาตัวอย่างดังข้อ 1)

2. ตัวอย่างแมงมุมที่ได้จากการสำรวจ มาจัดรูปร่าง จำแนกเป็นวงศ์ สกุล ชนิด วาดรูปโดยใช้ grid scale เพื่อให้ได้ขนาดและสัดส่วนที่แท้จริงตามตัวอย่างแมงมุมที่วาด บรรยายลักษณะทางอนุกรมวิธาน ทำ key เพื่อใช้เป็นแนวทางในการจำแนก ถ่ายรูปแมงมุม เก็บและรักษาตัวอย่างแมงมุมไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาอารักขาพืช

การทดลองที่ 1.1.21 ศึกษาชีววิทยาหอยดักดาน *Cryptozona siamensis* (Pfeiffer)

1. สำรวจและรวบรวม พร้อมเก็บตัวอย่างหอยทากดักดานที่พบในพื้นที่เพาะปลูกในสวนผัก สวนผลไม้ของเกษตรกร ตลอดจนแหล่งที่พบการแพร่ระบาด แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 25x40x26 เซนติเมตร รองพื้นตู้กระจก ด้วยดินผสมขุยมะพร้าว อัตรา 1:1 ให้สูงจากพื้นตู้กระจกประมาณ 5 เซนติเมตร ในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร และให้ความชื้นโดยฉีดพ่นน้ำทุกวัน ให้ผักต่างๆ และอาหารปลาอัดเม็ดเป็นอาหาร

2. ศึกษาการผสมพันธุ์ของหอย โดยเลือกหอยตัวเต็มวัย มาแยกเลี้ยงในกล่องพลาสติก ขนาด 15x22x7.5 เซนติเมตร 2 ตัว/ กล่อง จำนวน 20 กล่อง เมื่อหอยผสมพันธุ์กันแล้ว แยกหอยใส่กล่องๆ ละ หนึ่งตัว เพื่อสังเกตการออกไข่

3. ศึกษาการวางไข่ และจำนวนไข่จากตัวแม่ 30 ตัว นำไข่ที่ได้มาเลี้ยงในกล่องพลาสติก ที่มีขนาดกล่อง 6.5x9.5x2 เซนติเมตร บันทึกขนาดไข่ จำนวนไข่หอยในแต่ละกลุ่ม และลักษณะของไข่ พร้อมถ่ายภาพ

4. ศึกษาระยะเวลาการฟักจากไข่ของหอยดักดาน โดยแยกไข่หอยแต่ละกลุ่มมาเลี้ยงในกล่องพลาสติก ขนาด 6.5x9.5x2 เซนติเมตร ที่รองด้วยดินผสมขุยมะพร้าว อัตรา 1:1 สูง 1.5 เซนติเมตร ฉีดพ่นน้ำ เพื่อให้ความชื้น บันทึกระยะเวลาที่ลูกหอยฟักออกจากไข่ วัดขนาดลูกหอยและถ่ายภาพ

5. ศึกษาการเจริญเติบโต โดยแยกลูกหอยมาเลี้ยงในกล่องพลาสติกและให้ความชื้นโดยฉีดพ่นน้ำทุกวัน ให้อาหารปลาอัดเม็ดและผักต่าง ๆ เป็นอาหาร

การทดลองที่ 1.1.22 การแพร่กระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของหนูนาใหญ่ *Rattus argentiventer* (Robinson and Kloss, 1916) ในประเทศไทย

1. การดักหนู โดยใช้กรงดักชนิดจับเป็น บ่วงลวดดักหนูและตัวอย่างหนูนาใหญ่ที่เกษตรกรช็อตด้วยไฟฟ้า จำนวนไม่น้อยกว่า 50 ตัว ที่สำรวจเป็นตัวแทนหนูนาใหญ่ของแต่ละภาค โดยใน ปี 2555 สำรวจและ

เก็บตัวอย่างภาคกลาง ในจังหวัดสุพรรณบุรี ลพบุรี กาญจนบุรี อยุธยา ชัยนาท อ่างทอง สิงห์บุรี ปทุมธานี นครนายกและกรุงเทพมหานคร เป็นต้น

2. ศึกษาพฤติกรรมบางประการของหนูนาใหญ่ในสภาพธรรมชาติ

2.1 ขนาดขุยดินของรูหนูนาใหญ่ ทำการสุ่มวัดขนาดของขุยดิน โดยสุ่มวัดขนาด กว้างxยาว จำนวน 30 ก้อน ต่อ 1 รู มีหน่วยวัดเป็นมิลลิเมตร

2.2 ทำการบันทึกการหากิน เวลาออกหาอาหาร ลักษณะการกัดกินและการทำลายของต้นพืช เป็นต้น

3. ศึกษาลักษณะภายนอกของหนูนาใหญ่ (external characters) ดังนี้

3.1 เตรียมสัตว์ทดลอง

สำรวจและดักจับหนูนาใหญ่ ด้วยกรงดักชนิดจับเป็น (Life trap) และบ่วงลวดดักหนู จากแปลงนาเกษตรกรในแต่ละภาค นำมาเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร แล้วคัดเลือกหนูนาใหญ่ที่โตเต็มวัย ภาคละไม่น้อยกว่า 50 ตัว และที่จากเกษตรกรทำการช็อตด้วยไฟฟ้า บันทึกลักษณะของสีขน นำมาชั่งน้ำหนัก วัดขนาดความยาวหัวลำตัว (Head Body Length : HB) โดยวัดตั้งแต่ปลายสุดของหัว คือ ตั้งแต่ปลายจมูกถึงช่องอวัยวะขับถ่าย ความยาวหาง (Tail Length : T) วัดตั้งแต่ช่องเปิดของอวัยวะขับถ่ายจนถึงปลายสุดของหาง ความยาวตีนหลัง (Hind Foot Length : HF) วัดตั้งแต่ปลายสุดของตีนหลังจนถึงเนื้อปลายของนิ้วที่ยาวที่สุด ไม่รวมเล็บ ความยาวหู (Ear Length : E) วัดตั้งแต่ขอบหูล่างถึงปลายสุดของหู หน่วยการวัดเป็นมิลลิเมตร เป็นต้น

3.2 การเก็บโครงร่างสัตว์ทดลอง (Specimen)

นำหนูนาใหญ่ตัวเต็มวัย มาทำให้สลบด้วยไดเอธิลอีเทอร์ และบันทึกลักษณะภายนอก เช่น น้ำหนัก ลักษณะสีขน วัดขนาดความยาวหัวลำตัว (Head Body Length : HB) ความยาวหาง (Tail Length : T) ความยาวตีนหลัง (Hind Foot Length : HF) ความยาวหู (Ear Length : E) ทำการผ่าตัดเก็บส่วนโครงร่างของหนูนาใหญ่ ทั้งส่วนที่เป็นหนัง (strave) และกระดูก (skeleton)

3.2.1 การเก็บส่วนที่เป็นหนัง โดยลอกส่วนของหนังออกจากลำตัวให้มี ขน หาง และหู ติดอยู่อย่างสมบูรณ์ ใช้บอแรกซ์ทาผนังด้านในของหนังจนทั่ว จึงนำสำลีมาปั้นเป็นหุ่นใส่ข้างในหนังหนูที่ลอกออกเพื่อตรึงและคงสภาพของตัวหนู และเย็บให้สนิท ติดรหัสที่ตัวหนู แล้วนำไปอบในตู้อบความร้อน ที่อุณหภูมิ 70 ^{0}C นาน 2–3 วัน จนหนังแห้งจึงเก็บใส่กล่องเก็บตัวอย่างที่บรรจุแนบทาลีนป้องกันแมลงทำลาย

3.2.2 การเก็บชิ้นส่วนกระดูกหนูนาใหญ่ หลังจากลอกเอาหนังออกไปแล้ว นำส่วนลำตัวมาตัดเอากระดูกรยางค์ คือ กระดูกท่อนบนของขาหน้า (Humerus) กระดูกขาหลังท่อนบน (Femur) และท่อนล่าง (Tibia) ตัดส่วนของกระดูกกะโหลกมาชำแหละเอาเนื้อออกแล้วนำไปต้มด้วยโซเดียมไฮดร็อกไซด์ จนได้ชิ้นส่วนของกระดูกที่ขาวสะอาด และครบสมบูรณ์ ติดรหัสเดียวกับส่วนของหนังที่เป็นตัวเดียวกัน แล้วจึงนำไปอบจนแห้ง เพื่อนำไปศึกษาลักษณะสัณฐานของกะโหลกต่อไป

4. การวัดขนาดกระดูกรยางค์และกระดูกกะโหลก

การวัดขนาดกระดูกทั้งความยาวและความกว้างของกระดูกรยางค์และกระดูกกะโหลก รวมทั้งสิ้น 24 ลักษณะ ด้วยเวอร์เนีย โดยมีหน่วยวัดเป็นมิลลิเมตร (millimeter) ตามวิธีการของ Musser *et. al* (2006) และ Lin L. *et. al* (1992) ดังนี้

4.1 วัดขนาดกระดูกระยางค์ (Appendage bone)

1. ความยาวกระดูกขาหน้าท่อนบน (Humerus length ; HL.)
2. ความยาวกระดูกขาหลังท่อนบน (Femur length ; FL.)
3. ความยาวกระดูกขาหลังท่อนล่าง (Tibia length ; TL.)

4.2 ศึกษาลักษณะสัณฐานของกะโหลก (Skull bone) 21 ลักษณะ

1. Breadth of Rostrum (BR)
2. Length of Rostrum (LR)
3. Occipitonasal Length (ONL)
4. Interorbital Breadth (IB)
5. Breadth of Brain Case (BBC)
6. Zygomatic Breadth (ZB)
7. Breadth of Incisive Foramina (BIF)
8. Breadth of First Upper Molar (BM1)
9. Length of Diastema (LD)
10. Length of Incisive Foramina (LIF).
11. Length of Bony Palate (LBP).
12. Postpalatal Length (PPL)
13. Length of Auditory Bulla (LB)
14. Breadth of Mesopterygoid Fossa (BMF)
15. Breadth of Bony Palate at First Molars (BBP)
16. Crown Length of Maxillary Molar Row (CLM1-3)
17. Height of Brain Case (HBC)
18. Breadth of Zygomatic (BZP)
19. Length of Mandible (LM).
20. Height of Mandible (HM)
21. Length of Lower Molar Series (LLM)

การทดลองที่ 1.1.23 อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยสกุล *Coccus*

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยจากแหล่งปลูกพืชทุกภาคของประเทศ ตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยหอยอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วใส่ในถุงพลาสติก บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ

2) นำตัวอย่างเพลี้ยหอยที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพ บันทึกรายละเอียด เช่น ขนาด รูปร่างลักษณะและสีของเพลี้ยหอยก่อนทำสไลด์ถาวรแล้วดองในแอลกอฮอล์ 80% หรือน้ำยา AGA

3) นำตัวอย่างเพลี้ยหอยเพศเมีย จากข้อ 2) ไปทำสไลด์ถาวรเพื่อจำแนกชนิด

4) วิธีการทำสไลด์ถาวร

4.1) ใช้เข็มเขี่ยเจาะบริเวณกลางส่วนอกด้านบนของตัวอย่างเพลี้ยหอย

4.2) นำไปต้มในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% ด้วยวิธีวอเตอร์บาท โดยนำตัวอย่างแมลงใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และใส่ในบีคเกอร์ซึ่งมีน้ำอยู่ ใช้เวลา 15 นาที (เริ่มนับตั้งแต่น้ำในบีคเกอร์เดือด)

4.3) นำตัวอย่างเพลี้ยหอยที่ต้มแล้วมาล้างในน้ำกลั่น กดเบา ๆ บนลำตัวด้วยเข็มดัดปลายโค้ง เพื่อทำให้ไข่ ตัวอ่อน และของเหลวที่อยู่ในลำตัวหลุดออกมาทางรอยที่เจาะไว้ ถ้ายังมีก้อนไขมันตกค้างอยู่ให้นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 2 – 3 นาที

4.4) ย้ายลงในคาร์บอลไซลีน (carbol xylene) แช่ทิ้งไว้ 10 นาที จนกระทั่งตัวอย่างใส นำไปล้างในแอลกอฮอล์ 95%

4.5) ย้ายลงในกรดแอลกอฮอล์ (acid alcohol) ซึ่งเป็นสารละลายของกรดแกลเซียลอะซิติก 1 ส่วน และแอลกอฮอล์ 50% 4 ส่วน แช่ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที

4.6) ย้อมสีตัวอย่างโดยแช่ในน้ำยาย้อมสี ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิดฟุชซิน (acid fuchsin) กรดเกลือ (hydrochloric acid) และน้ำกลั่น แช่ทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง

4.7) ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95% แช่ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที เพื่อกำจัดสีส่วนเกิน

4.8) ย้ายลงในสารละลายเอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alcohol) กับแอลกอฮอล์ 95% ในอัตราส่วน 1:1 แช่ทิ้งไว้ 10 นาที

4.9) ย้ายลงในเอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ แช่ทิ้งไว้ 10 นาที

4.10) ย้ายลงในโคล์ฟออย (clove oil) แช่ทิ้งไว้ 20 นาที

4.11) นำตัวอย่างเพลี้ยหอยวางบนแผ่นสไลด์แก้ว ใช้กระดาษกรองซับโคล์ฟออยส่วนที่เกินออก หยดแคนาดาบัลซัม (canada balsam) 1 หยดบนตัวอย่างแมลงจัดรูปร่าง ให้สวยงามไม่บิดเบี้ยวหรือทับซ้อนกัน ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

4.12) นำไปอบให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 1-2 เดือน

5) ตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยหอยบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง โดยอาศัยหลักการทางด้านอนุกรมวิธานและวาดรูปแสดงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกเพลี้ยหอยแต่ละชนิด และจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพลี้ยหอยสกุล *Coccus*

6) การบันทึกรายละเอียดบนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้วโดยวางแผ่นสไลด์หันด้านหัวของเพลี้ยหอยเข้าหาตัว ด้านขวาเขียนรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ด้านซ้ายมือเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ เพศ วันเดือนปี ที่ทำสไลด์และชื่อผู้จำแนก ควรลงรายละเอียดดังกล่าวเป็นภาษาอังกฤษ

7) จัดเก็บตัวอย่างเพลี้ยหอยในกล่องใส่สไลด์ถาวรและนำเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล

การทดลองที่ 1.1.24 อนุกรมวิธานแมลงหวี่ขาวในวงศ์ย่อย Aleyrodinae

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงหวี่ขาวศัตรูพืชในแปลงเพาะปลูก โดยตัดส่วนของพืชที่มีตัวอ่อน ดักแด้ หรือตัวเต็มวัยแมลงหวี่ขาวเกาะอยู่ด้วยกรรไกรตัดกิ่ง นำตัวอย่างแมลงหวี่ขาวที่เก็บรวบรวมพร้อมพืชอาศัยห่อกระดาษแล้วนำใส่ถุงพลาสติก หรือกล่องพลาสติก หากตัวอย่างแมลงหวี่ขาวที่รวบรวมได้อยู่ในระยะตัวอ่อน ต้องนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนเป็นดักแด้ บันทึกข้อมูลเบื้องต้น เช่น พืชอาหาร สถานที่ วัน เดือน ปี วัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง

2) นำตัวอย่างดักแด้และตัวเต็มวัยแมลงหวี่ขาวที่เก็บรวบรวม มาตรวจลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาด รูปร่าง ลักษณะ สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพแมลงหวี่ขาวแต่ละระยะ

3) นำตัวอย่างดักแด้ที่สำรวจได้ บางส่วนมาทำสไลด์ถาวร โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Martin (1987) โดยตัดชิ้นส่วนของพืชเฉพาะที่มีดักแด้ติดอยู่ แช่ในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 % ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หรือแช่ในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 % ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-20 นาที จะช่วยให้แยกดักแด้ออกจากพืชอาศัยได้ง่าย โดยไม่ทำให้ตัวอย่างเสียหาย (ขั้นตอนนี้ระวังไม่ให้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เดือด) ดูดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ออก เติมกรดแกลเซียลอะซิติก แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วดูดกรดแกลเซียลอะซิติกออก เติมสารละลายคลอรอล-ฟีนอล (chloral-phenol) แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาทีเช่นกัน แล้วดูดสารผสมนี้ออก วิธีนี้นอกจากจะช่วยกำจัดคราบไขมันที่ห่อหุ้มดักแด้แล้ว ยังช่วยในการย้อมสีทำให้ตัวอย่างติดสีได้ดีขึ้น การย้อมสีแมลงหวี่ขาวปฏิบัติตามขั้นตอนดังนี้

- ดักแด้ที่มีสีเข้มหรือสีดำ ให้ล้างตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ 95% แล้วย้ายตัวอย่างลงในสารละลายที่เป็นส่วนผสมของแอมโมเนีย (Ammonia) กับไฮโดรเยนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ในอัตราส่วน 80: 20 โดยปริมาตร แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที สารละลายนี้จะช่วยทำให้ตัวอย่างที่มีสีเข้มใสขึ้น

- ดักแด้ที่มีสีจางหรือสีซีด ให้ล้างตัวอย่างด้วยกรดแกลเซียลอะซิติก ย้ายตัวอย่างลงในสารละลายแอซิกฟุชซินสเตน ใช้เพียง 2-3 หยดเพื่อย้อมสีตัวอย่าง แช่ทิ้งไว้ 2 -3 นาที ดูดสารละลาย หรือสีย้อมออก ล้างด้วยกรดแกลเซียลอะซิติก และแช่ในกรดแกลเซียลอะซิติก ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วดูดสารละลาย

นี้ออก เติมโคลฟอออยหรือไซลีน แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที เมาท์ตัวอย่างบนแผ่นสไลด์ แล้วนำไปอบให้แห้งใช้เวลา 5 สัปดาห์

4) นำสไลด์ที่ผ่านการอบจนแห้งแล้วมาตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope ตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดของแมลงหวี่ขาว ลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกชนิดได้แก่ ขนและหนาม (setae & spine) ขอบลำตัว (margin) อวัยวะที่ใช้ในการขับไข่ เช่น ช่องเปิดชนิดต่างๆ(pores) vesiform orifice lingula และ operculum เป็นต้น

5) บันทึกรายละเอียดของแมลงหวี่ขาวชนิดต่างๆที่สำรวจพบ และข้อมูลอื่นที่สำคัญ ถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงบันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายที่ต้องติดไว้กับสไลด์แมลงหวี่ขาวแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่จับ และ วัน/เดือน/ปีที่ทำสไลด์ถาวร ชื่อน้ำยาที่ใช้เมาท์ (mount) สไลด์

6) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษา โดยนำตัวอย่างแมลงหวี่ขาวพร้อมตัวอย่างพืชที่มีดักแด้เกาะอยู่และสไลด์ถาวรที่ทำเสร็จแล้ว เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล เพื่อตรวจสอบสืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

การทดลองที่ 1.1.25 อนุกรมวิธานเพลี้ยไฟสกุล *Haplothrips*

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

1) ใช้วิธีการตีหรือเขย่าส่วนของพืชให้เพลี้ยไฟตกลงบนกระดาษขาวที่รองรับ และใช้พู่กันเขี่ยเพลี้ยไฟแต่ละตัวลงในขวดที่บรรจุน้ำยา AGA รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่มีชีวิตด้วย

2) นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาด้านอนุกรมวิธาน โดยนำไปทำสไลด์ถาวร

วิธีการทำสไลด์ถาวรของเพลี้ยไฟ

1. ย้ายตัวอย่างเพลี้ยไฟจากขวดลงเก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 60 % แช่ทิ้งไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง
2. ย้ายลงในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) 5% เพื่อทำให้สีของเพลี้ยไฟจางลง เวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างเพลี้ยไฟ เจาะส่วนท้องของเพลี้ยไฟบริเวณต้นขาของขาหลังด้วยเข็มแหลมขนาดเล็กเพื่อให้ของเหลวภายในออกจากตัวเพลี้ยไฟ
3. ย้ายเพลี้ยไฟที่เจาะแล้วลงในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 50 %ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที
4. ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 60 % อีกครั้ง ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
5. ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 70 % อีกครั้ง ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
6. ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 80 % อีกครั้ง ทิ้งไว้ 20 นาที
7. ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95 % อีกครั้ง ทิ้งไว้ 10 นาที
8. ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 100 % อีกครั้ง ทิ้งไว้ 5 นาที ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง
9. ย้ายลงในโคลฟออย (clove oil) เพื่อให้ตัวอย่างของเพลี้ยไฟใส แช่ทิ้งไว้ 20 – 30 นาที

10. หยดแคนาดาบัลซัม (Canada balsam) ซึ่งเป็นน้ำยาเมาท์สไลด์ (Mounting media) เพียงเล็กน้อยลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ ป้ายเพลี้ยไฟลงในหยดแคนาดาบัลซัมลงบนกึ่งกลางของแผ่นสไลด์แก้ว ค่อยๆคว่ำแผ่นสไลด์ช้าๆ จนกระทั่งจรดแผ่นแก้วปิดสไลด์ รีบพลิกแผ่นสไลด์แก้วให้ด้านแผ่นแก้วปิดสไลด์กลับขึ้นด้านบน นำไปอบให้แห้ง

11) วาดภาพ/ถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานและจัดทำแนวทางการวินิจฉัยระดับชนิด ของเพลี้ยไฟที่ได้ศึกษา

การทดลองที่ 1.1.26 อนุกรมวิธานมวนปีกแก้วในสกุล *Stephanitis*

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างมวนปีกแก้วในแปลงเพาะปลูกพืชที่มีรายงานว่าเป็นพืชอาหารของมวนปีกแก้วทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยตัดส่วนของพืชที่มีตัวอ่อน หรือตัวเต็มวัยมวนปีกแก้ว นำตัวอย่างที่เก็บรวบรวมพร้อมพืชอาศัยห่อกระดาษแล้วนำใส่ถุงพลาสติก หรือกล่องพลาสติก หากตัวอย่างมวนปีกแก้วที่รวบรวมได้อยู่ในระยะตัวอ่อน ต้องนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนเป็นตัวเต็มวัย พร้อมทั้งถ่ายภาพมวนปีกแก้วแต่ละระยะ บันทึกรายละเอียด พืชอาหาร สถานที่เก็บตัวอย่าง วัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) ซึ่งประกอบด้วยค่าละติจูด (Latitude) ค่าลองติจูด (Longitude) ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (Altitude) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างและชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง สำหรับตัวเต็มวัยของมวนปีกแก้วจะทำการฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า (killing jar) ซึ่งบรรจุน้ำยา ethyl acetate หลังจากมวนปีกแก้วตายให้เก็บตัวเต็มวัยในกระดาษรูปสามเหลี่ยมใส่ในกล่องพลาสติกเพื่อป้องกันการเสียหาย นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ นอกจากตัวอย่างมวนปีกแก้วที่ได้จากสภาพธรรมชาติแล้ว มีตัวอย่างมวนปีกแก้วที่มีอยู่เดิมในพิพิธภัณฑ์ กรมวิชาการเกษตร ตัวอย่างที่ได้จากนักวิชาการ และตัวอย่างจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

2) นำตัวอย่างมวนปีกแก้วที่ได้จากการสำรวจ มาจัดรูปร่างโดยนำไปติดบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง หรือวางตะแคงข้างให้ส่วนอกติดอยู่บนปลายแหลมของกระดาษแข็งรูปสามเหลี่ยม นำไปอบแห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15-30 วัน

3) นำตัวอย่างของมวนปีกแก้วที่รวบรวมได้มาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาดลำตัว รูปร่าง ลักษณะและสี เป็นต้น โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดมวนปีกแก้วที่เป็นศัตรูพืชสำคัญของโลก ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์

4) จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุลและชนิดของมวนปีกแก้วสกุล *Stephanitis* ที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

5) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษา เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง เพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

การทดลองที่ 1.1.27 อนุกรมวิธานผีเสื้อกลางคืนสกุล *Parapoynx*

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างผีเสื้อจากแหล่งปลูกพืชทั่วไป ทั้งพื้นที่เกษตร และพื้นที่ป่า ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ใช้สวิงจับแมลง (insect net) โฉบ เพื่อเก็บตัวอย่างผีเสื้อในช่วงเวลากลางวัน และติดตั้งกับดักแสงไฟ (light trap) เพื่อดึงดูดผีเสื้อช่วงเวลากลางคืน ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า (killing jar) ซึ่งบรรจุน้ำยา ethyl acetate หลังจากผีเสื้อตายแล้ว ใช้เข็มไร้สนิม (stainless steel) ปักกลางอกด้านบนเพื่อรักษาตัวอย่างไม่ให้เสียหาย บันทึกรายละเอียด พืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง วัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง นำตัวอย่างใส่กล่อง เก็บรวมไว้ในกล่องรักษาความเย็นเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเน่าเสีย นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ นอกจากตัวอย่างผีเสื้อที่ได้จากสภาพธรรมชาติแล้ว มีตัวอย่างผีเสื้อที่มีอยู่เดิมในพิพิธภัณฑ์ กรมวิชาการเกษตร ตัวอย่างที่ได้รับจากนักวิชาการ และตัวอย่างจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

2) นำตัวอย่างผีเสื้อที่ได้จากการสำรวจ มาจัดรูปร่าง บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) จัดปีกให้กางออกโดยให้ขอบล่างของปีกคู่หน้าตั้งฉากกับลำตัว ขอบบนของปีกคู่หลังอยู่ใต้ขอบล่างของปีกคู่หน้า นำไปอบให้แห้งในตู้อบ (oven) ปรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15-30 วัน ขึ้นกับขนาดตัวอย่าง

3) นำตัวอย่างผีเสื้อที่รวบรวมได้มาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาดลำตัว รูปร่าง ลักษณะ และสี เป็นต้น โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิด ผีเสื้อกลางคืนสกุล *Parapoynx* ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ ในผีเสื้อบางชนิดซึ่งมีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมากต้องใช้อวัยวะสืบพันธุ์เพศในการจำแนก ซึ่งมีขั้นตอนการทำสไลด์ดังนี้

- 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) ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิตฟุซซิน 0.5 กรัม กรดเกลือ 10% 25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ นาน 2-3 นาทีหรือนานถึง 12 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์ของตัวอย่างผีเสื้อที่จะติดสีได้ง่ายหรือยาก
- ย้ายตัวอย่างลงในน้ำกลั่นเพื่อทำการผ่าเอาอวัยวะสืบพันธุ์ออกจากท้อง ถ้าเป็นเพศผู้ใช้ปากคีบปลายแหลมดึงอวัยวะสืบพันธุ์ออกจากท้องได้เลย แต่ถ้าเป็นเพศเมียใช้มีดผ่าตัดผ่าผนังลำตัวด้านข้างออกเพื่อป้องกันการเสียหายของอวัยวะสืบพันธุ์ ใช้พู่กันและปากคีบปลายแหลมทำความสะอาดไขมันส่วนเกินออกให้หมด
- ย้ายตัวอย่างลงแอลกอฮอล์ 30% จัดรูปร่างอวัยวะสืบพันธุ์ ให้ได้ตามลักษณะที่ต้องการ ย้ายตัวอย่างแช่ในแอลกฮอล์ 100% กำจัดน้ำออกให้หมด

- เมาท์ลงบนแผ่นสไลด์แก้ว โดยนำอวัยวะสืบพันธุ์ วางบนสไลด์ที่หยดน้ำยา canada balsam แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 50 ^{O}C นาน 4 - 6 สัปดาห์ จึงนำออกมาศึกษา

4) บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาพร้อมทั้งถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope วาดรูปโดยใช้เครื่องมือ camera lucida ช่วยทำให้ทราบสัดส่วนที่แท้จริงได้ บันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของผีเสื้อ แต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ วัน/เดือน/ปี สถานที่พบตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

5) จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุลและชนิดของผีเสื้อกลางคืนสกุล *Parapoynx* ที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

6) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง (ผีเสื้อกลางคืนสกุล *Parapoynx* ทุกชนิดที่รายงานไว้ต้องเก็บรักษาตัวอย่างจริงไว้เพื่อการตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง)

การทดลองที่ 1.1.28 อนุกรมวิธานและการแพร่กระจายของแตนเบียนไข่วงศ์ใหญ่ Platygastroidea ที่เข้าทำลายหนอนกอข้าว มวนเขียวข้าว และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

1) การเก็บและรักษาตัวอย่างแตนเบียนไข่ (Acquisition of research material)

ตัวอย่างแมลงจะถูกเก็บโดย 2 กรรมวิธีประกอบไปด้วย การเก็บตัวอย่างแห้งและการเก็บตัวอย่างสดเพื่องานวิจัยทางชีวโมเลกุล ใช้ 4 วิธีพื้นฐานทางกีฏวิทยาในการเก็บตัวอย่างได้แก่ สวิงโฉบแมลง yellow pan traps, Malaise trap และ Slam trap. การใช้ yellow pan trap จะทำการเก็บแมลงทุกวัน สำหรับ Malaise trap และ Slam trap สามารถเว้นระยะเวลา 5-10 วัน นำแมลงออกจากกับดักโดยใช้ ตาข่ายความละเอียดพิเศษ (fine-mesh aquarium net) เก็บใน 95% ethanol หลังจากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส รอเพื่อเตรียมตัวอย่างแห้ง หรือทั้งนี้สำหรับตัวอย่างบางส่วน สามารถนำมาสกัดดี เอ็น เอ ต่อไป

2) การจัดจำแนกโดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงที่เก็บได้จากแปลงปลูกข้าวทั้งในและนอกฤดูปลูก จะถูกจัดจำแนกในระดับอันดับ (order) นับจำนวนของแมลงในแต่ละอันดับในแต่ละครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่าง ทั้งนี้เพื่อศึกษาถึงศักยภาพของกับดัก วิธีการเก็บแมลง แมลงในกลุ่มเป้าหมาย Hymenoptera จะถูกแยกกลุ่มในระดับ Superfamily การจัดแบ่งในหมวดวงศ์และสกุล (Family และ genus) ดำเนินการเฉพาะในกลุ่มที่ต้องการศึกษา Chalcidoidea (Trichogrammatidae) และ Platygastroidea (Platygastridae) เอกสารหลักที่ใช้ในการจัดจำแนกได้แก่ “Hymenoptera of the world: an identification guide to families” (Masner, 1993) และความร่วมมือจากนักวิจัยจากประเทศแคนนาดา (CNCI:Canadian National Collection of Insects) การศึกษาภายใต้กล้อง stereo microscope ใช้โปรแกรมการถ่ายภาพ AutoMontage หรือ Cartograph extended-

focus โดยใช้ JVC KY-F75U digital camera, Leica Z16 APOA สำหรับการถ่ายภาพและการวัดระยะโดยได้รับความร่วมมือจาก Platygastroid PBI project ประเทศ สหรัฐอเมริกา

3) 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).

4) การลงทะเบียนและระบบฐานข้อมูลแตนเบียนไข่ในประเทศไทย

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

การทดลองที่ 1.1.29 สัณฐานวิทยาและลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟดอกไม้ Common Blossom Thrips; *Frankliniella schultzei* (Trybom)

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชต่างๆ ทุกภูมิภาคของประเทศไทย เพื่อศึกษาความแปรปรวนของลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟดอกไม้ ในพื้นที่ภูมิภาคเดียวกันและระหว่างภูมิภาค โดยใช้วิธีการตีหรือเขย่าส่วนของพืชเช่น ใบ และดอก ให้เพลี้ยไฟตกลงบนกระดาษขาวที่รองรับ และใช้พู่กันเขี่ยเพลี้ยไฟแต่ละตัวลงในขวดที่บรรจุน้ำยา AGA สำหรับศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและ แอลกอฮอล์ 95% สำหรับศึกษาลำดับพันธุกรรม รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่มีชีวิตด้วย บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟที่เก็บได้ เช่น พืชที่เก็บ ส่วนของพืชที่เก็บ สถานที่เก็บ พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) และชื่อผู้เก็บ ลงในขวดดองเพลี้ยไฟ

2) นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาพฤติกรรมและการเจริญเติบโต และนำตัวเต็มวัยไปทำสไลด์ถาวร

วิธีการทำสไลด์ถาวรของเพลี้ยไฟ มีขั้นตอนดังนี้

- ย้ายตัวอย่างเพลี้ยไฟจากขวดลงเก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 60 % แช่ทิ้งไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง

- ย้ายลงในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) 5% เพื่อทำให้สีของเพลี้ยไฟจางลง เวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างเพลี้ยไฟ เจาะส่วนท้องของเพลี้ยไฟบริเวณต้นขาของขาหลังด้วยเข็มแหลมขนาดเล็กเพื่อให้ของเหลวภายในออกจากตัวเพลี้ยไฟ

- ย้ายเพลี้ยไฟที่เจาะแล้วลงในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 50 %ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที

- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 60 % อีกครั้ง ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 70 % อีกครั้ง ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 80 % อีกครั้ง ทิ้งไว้ 20 นาที

- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95 % อีกครั้ง ทิ้งไว้ 10 นาที

- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 100 % อีกครั้ง 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

3) วาดภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของแมลงที่ได้ศึกษา

การศึกษาลำดับพันธุกรรม

นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่ได้จำแนกชนิดเบื้องต้นภายใต้ stereo microscope ใช้ตัวอย่างกลุ่มเดียวกับที่ใช้ทำสไลด์ถาวร) มาศึกษาลำดับพันธุกรรมโดยปรับปรุงจากวิธีการศึกษายีน COI ของ Tada (2004)

1) <u>ขั้นตอนการสกัด ดีเอ็นเอ</u>

- 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

- ดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ 2 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็น DNA Template ในขั้นตอน PCR (polymerase chain reaction)

2) <u>การศึกษายีน COI โดยเทคนิค PCR</u>

- 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 µl reaction volumes [12.5 µl ddH_20, 2 µl10X PCR buffer (Promega), 2 µl 25 mM $MgCl_2$, 0.5 µl dNTP (10 mM each), 0.5 µl 20 mM forward and reverse primers และ *Tag* DNA polymerase 1 unit (Promega) ขั้นตอนและอุณหภูมิของขั้นตอนการทำ PCR คือ

Initial denaturation	ที่ 94 °C	3 นาที	
Denaturation	ที่ 94 °C	1 นาที	35 cycles
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 เปรียบเทียบกับ 100 bp DNA ladder เพื่อหาขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ว่ามีขนาดประมาณ 700 bpหรือไม่

3) <u>การหาและวิเคราะห์ลำดับเบสของ ยีน COI</u>

- วิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบส นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ยีนของ NCBI

การทดลองที่ 1.1.30 อนุกรมวิธานไรสี่ขาในวงศ์ Eriophyidae ของประเทศไทย

การเก็บตัวอย่างและการทำสไลด์ถาวร

1)โดยเก็บใบ กิ่ง ผล หรือส่วนต่าง ๆ ของพืช ที่แสดงอาการผิดปกติ ลงในกล่องพลาสติก หรือถุงกระดาษพับปากถุง

2) บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับตัวอย่างไร เช่น ชื่อพืช ผู้เก็บ สถานที่ที่เก็บตัวอย่างไร บันทึกข้อมูลพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) จากนั้นนำตัวอย่างแช่ลงในกระติกน้ำแข็งก่อนนำกลับมายังห้องปฏิบัติการ

3) การทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereomicroscope หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน

4) จัดท่าทางของไรสี่ขาให้อยู่ในท่าคว่ำ และท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย กระจกปิดสไดล์ ใช้ปากกาเขียนแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น

5) นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบกระจกสไลด์ ด้วยน้ำยา ทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บและพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

การศึกษาอนุกรมวิธาน

1) ตรวจจำแนกชนิดไรสี่ขาบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง โดยอาศัยหลักการทางด้านอนุกรมวิธาน

2) การบันทึกรายละเอียดบนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้ว ด้านขวาเขียนรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่ และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ด้านซ้ายมือเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ เพศ ชื่อผู้จำแนก ควรลงรายละเอียดดังกล่าวเป็นภาษาอังกฤษ

3) วาดรูปแสดงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดพร้อมทั้งทำ key สำหรับใช้ในการจำแนกชนิดของไรสี่ขาในในวงศ์ Eriophyidae ของประเทศไทย นำเข้าเก็บในพิพิธภัณฑ์โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล

การทดลองที่ 1.1.31 ชีววิทยา การเข้าทำลาย ฤดูกาลระบาดของแมลงวันทองชนิด *Bactrocera tau* (Walker)

ขั้นตอนที่ 1. สำรวจชนิดแมลงวันทองที่เข้าทำลายพืชตระกูลแตง

โดยเก็บผลพืชตระกูลแตง เช่น ฟักทอง ฟักเขียว มะระ ฟักข้าว ที่ถูกแมลงวันทองทำลายจากแหล่งปลูกต่างๆ ชั่งน้ำหนักและนับจำนวน บันทึกวัน/เดือน/ปี ระยะพืช และสถานที่เก็บ แล้วนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการพืช โดยนำผลใส่กล่องพลาสติกที่รองก้นกล่องด้วยขี้เลื่อยที่มีความชื้น สูงประมาณ 2.50 ซม. รอจนหนอนแมลงวันทองออกมาเข้าดักแด้ในขี้เลื่อย (ประมาณ 10 วัน) จากนั้นใช้ตะแกรงร่อนเบอร์ 20 ร่อนแยกดักแด้ออกจากขี้เลื่อย แล้วนำใส่กล่องพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 ซม. สูง 5 ซม. คลุมทับด้วยขี้เลื่อยที่มีความชื้น สูงประมาณ 1.50 ซม. แล้วนำไปไว้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 35x35x50 ซม. ภายในมีน้ำและอาหารสำหรับตัวเต็มวัย (Brewer's yeast :น้ำตาลไอซ์ซิ่ง อัตรา 1:4) เมื่อตัวเต็มวัยมีอายุประมาณ 7-14 วัน นำใส่หลอดแก้วแช่ในช่องทำน้ำแข็ง (freezer) นาน 4-5 ชั่วโมง แล้วนำไปจำแนกชนิดและนับจำนวน บันทึกจำนวนและเพศของแมลงวันทอง

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาชีววิทยาของแมลงวันทองชนิด *B. tau* ในห้องปฏิบัติการ

เก็บรวบรวมแมลงวันทองชนิด *B. tau* จากแปลงฟักเขียว ฟักทอง มะระและฟักข้าว โดยเก็บผลที่ถูกแมลงวันทองทำลายจากแหล่งปลูกมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เมื่อได้แมลงวันทองชนิด *B. tau* จึงนำมาเลี้ยงขยายพันธุ์ต่อจนได้รุ่นที่ 1 (F_1) จากนั้นทำการศึกษา

2.1) วงจรชีวิตของแมลงวันทองชนิด *B. tau* ดำเนินการศึกษาวงจรชีวิตในระยะต่างๆ ดังนี้

<u>ระยะไข่</u> ศึกษาอายุของไข่ด้วยการทำ Hatching Rate ด้วยการเขี่ยไข่ลงบนกระดาษกรองเบอร์ 91 ที่ให้ความชื้นตลอดเวลา แล้วเก็บไว้ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. จากนั้นตรวจนับและบันทึกจำนวนหนอนที่ฟักออกจากไข่ทุก 6 ชั่วโมง ทำ 5 ซ้ำๆ ละ 100 ฟอง

<u>ระยะหนอน</u> ศึกษาอายุและลักษณะของหนอนวัยต่างๆ โดยเลี้ยงหนอนในผลฟักทอง บันทึกขนาด ลักษณะ และการตายของหนอนวัยต่างๆ โดยศึกษาจากหนอน 100 ตัว

<u>ระยะดักแด้</u> ศึกษาอายุและลักษณะของดักแด้ โดยทำการบันทึกขนาด และลักษณะของดักแด้ โดยศึกษาจากดักแด้ 100 ดักแด้

<u>ระยะตัวเต็มวัย</u> ศึกษาอายุขัย การผสมพันธุ์ การวางไข่ และลักษณะของตัวเต็มวัย โดยเลี้ยงแมลงวันทองชนิด *B. tau* 1 คู่ ในกล่องพลาสติกขนาด 21x15x8 ซม. ที่ภายในมีน้ำ อาหาร และกระบอกพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 ซม. สูง 4.5 ซม. เจาะรูขนาดเล็กจำนวน 20 รู ภายในใส่ชิ้นฟักทองตัดให้พอดีกับหลอด เพื่อล่อให้แมลงวางไข่ บันทึกปริมาณไข่ทุกวันจนตัวเต็มวัยเพศเมียตาย นอกจากนี้ทำการบันทึกลักษณะ

ตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย ลักษณะการจับคู่ผสมพันธุ์ และการตายของตัวเต็มวัย โดยศึกษาจากแมลงวันทองจำนวน 10 คู่

2.2) ตารางชีวิต (Life table) ของแมลงวันทองชนิด *B. tau* ทำการเจาะรูขนาด 1x1x1 ซม. บนผลฟักทอง จากนั้นนำกระดาษกรองสีดำขนาด 0.5x0.5 ซม. วางในช่องที่เจาะไว้ แล้วนำไข่ของแมลงวันทองชนิด *B. tau* วางในกระดาษจำนวน 100 ฟองต่อผล ทำ 5 ซ้ำ จากนั้นปิดด้วย parafilm บันทึกจำนวนไข่ที่ฟัก หนอนวัยต่างๆ ดักแด้ และตัวเต็มวัย แล้วนำมาคำนวณตามวิธีของ Southwood (1966)

ขั้นตอนที่ 3. การศึกษานิเวศวิทยาของแมลงวันทองชนิด *B. tau* ในแหล่งปลูก

3.1) การศึกษาระยะการเข้าทำลายของแมลงวันทองชนิด *B. tau* ในแหล่งปลูก เก็บผลของฟักเขียวและฟักทองในระยะต่างๆ ตั้งแต่เริ่มติดผล 1 สัปดาห์จนถึงระยะเก็บเกี่ยวจากแปลงปลูก โดยเลือกเก็บผลที่มีอายุเท่ากันสัปดาห์ละ 10 ผล นำเข้าห้องปฏิบัติการวัดขนาดและชั่งน้ำหนักผล จากนั้นตรวจร่องรอยการวางไข่ของแมลงวันผลไม้ ถ้าพบนำผลใส่กล่องพลาสติกรองก้นกล่องด้วยขี้เลื่อยที่มีความชื้น สูงประมาณ 2.50 ซม. รอจนหนอนแมลงวันผลไม้ออกมาเข้าดักแด้ในขี้เลื่อย แล้วใช้ตะแกรงร่อนเบอร์ 20 ร่อนแยกดักแด้ออกจากขี้เลื่อย แล้วนำใส่กล่องพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 ซม. สูง 5 ซม. คลุมทับด้วยขี้เลื่อยที่มีความชื้นสูงประมาณ 1.50 ซม. จากนั้นนำไปไว้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 35x35x50 ซม. ภายในมีน้ำและอาหารสำหรับตัวเต็มวัย เมื่อตัวเต็มวัยมีอายุประมาณ 7-10 วัน นำใส่หลอดแก้วแช่ในช่องทำน้ำแข็ง (freezer) นาน 4-5 ชั่วโมง แล้วนำไปจำแนกชนิดและนับจำนวน บันทึกจำนวนและเพศของแมลงวันผลไม้

3.2) สำรวจศัตรูธรรมชาติที่ทำลายแมลงวันทองชนิด *B. tau* ในแหล่งปลูก เก็บรวบรวมศัตรูธรรมชาติจากแปลงปลูกในแหล่งต่างๆ จากนั้นนำมาจำแนกชนิด บันทึกจำนวนและแหล่งที่พบ

3.3) การศึกษาช่วงฤดูการระบาดของแมลงวันทองชนิด *B. tau* ในแปลงปลูก ทำการแขวนกับดักแมลงวันผลไม้แบบ Steiner ภายในแขวนก้อนสำลีชุบสารล่อแมลงวันผลไม้ชนิด Cue lure ผสมสารฆ่าแมลง malathion ในอัตรา 1:1 โดยปริมาตร จำนวน 8 กับดัก/พื้นที่ 1 ไร่ โดยเก็บแมลงวันทองในกับดักออกทุกสัปดาห์ทำการจำแนกชนิดและบันทึกจำนวนที่พบ

การทดลองที่ 1.1.32 ศึกษาโครโมโซมและเขตการกระจายของหอยสกุล *Pomacea* ในประเทศไทย

1) สำรวจ/ เก็บตัวอย่าง และจัดทำแผนที่การกระจายพันธุ์ของหอยสกุล *Pomacea* .

โดยสำรวจทุกๆ 2 เดือน ตามแหล่งน้ำธรรมชาติ หรือพื้นที่ทำการเกษตร ตามภาคต่างๆของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างพื้นที่ละ 30 ตัว และบันทึกพิกัดด้วย GPS เพื่อจัดทำแผนที่การกระจายพันธุ์ของหอยสกุล *Pomacea* ด้วยโปรแกรม ArcView หรือ ArcGis จากนั้นนำตัวอย่างมาพักในตู้กระจกขนาด 25x40x26 เซนติเมตร และอ่างซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เมตร เพื่อรอจำแนกชนิดจากลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร (ในขั้นตอน12.2) โดยให้ผักชนิดต่างๆเป็นอาหาร และเปลี่ยนถ่ายน้ำ สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

2) ตรวจสอบชนิดจากสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยสกุล *Pomacea*

นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือก ด้วยเทคนิคมอร์โฟเมตริก โดยการถ่ายภาพ วาดภาพ และวัดค่า shell length, shell width, last whorl height, aperture length และ aperture width ด้วยเวอร์เนีย จากนั้นจึงเข้าสู่การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้ ANOVA จากโปรแกรม SPSS และวิเคราะห์ชื่อตามระบบอนุกรมวิธานของหอย เปรียบเทียบกับเอกสารหอยทากทั้งในและต่างประเทศ ตามวิธีการของ Abbott (1989), Laws (1973) และ Vaught (1989) จากนั้นนำข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยที่วิเคราะห์แล้ว มาเปรียบเทียบเพื่อ*คัดเลือกเฉพาะตัวอย่างที่มีความแตกต่างกัน*ไปศึกษาจำนวนโครโมโซมและการจัดเรียงคาริโอไทป์ในขั้นตอนต่อไป

3) ขั้นตอนการศึกษาคาริโอไทป์ โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อ gill ดังนี้

3.1) Pre-treatment โดยการฉีด 0.01 -0.02 % colchicines จำนวน 1-2 มล. เข้าไปในหอย เป็นเวลา 3-4 ชม. เพื่อยับยั้งการทำงานของ spindle fiber ในโครโมโซม

3.2) Hypotonic treatment โดยการนำเนื้อเยื่อส่วน gill ของหอยมาแช่ใน hypotonic solution (สารละลาย KCl) ประมาณ 30- 45 นาที เพื่อให้เซลล์บวม

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

3.4) Air-dried slide ดูดตัวอย่าเซลล์ที่ผ่านขั้นตอน fixation ลงบนสไลด์ และทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

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

3.6) Analization นำสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 100X วิเคราะห์โครโมโซมโดยเลือกจากระยะเมทาเฟส (metaphase) ซึ่งมีการกระจายดี ไม่ซ้อนทับกัน นับจำนวนโครโมโซม จับคู่โครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome) มาจัดเรียงคาริโอไทป์ตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ ถ่ายภาพเซลล์ที่เลือกไว้ จากนั้นใช้ภาพถ่ายมาวิเคราะห์และคำนวณหาค่า relative length (RL) และค่า centromeric index (CI) เพื่อจัดชนิดโครโมโซม ต่อไป

4) บันทึกข้อมูล (ทุกขั้นตอนการทดลอง) ดังนี้

1. บันทึกสถานที่และสภาพนิเวศ ที่เก็บตัวอย่างหอยสกุล *Pomacea*
2. บันทึกข้อมูลทางพิกัดภูมิศาสตร์และข้อมูลกายภาพ ของสถานที่เก็บตัวอย่าง
3. บันทึก ถ่ายภาพ วาดภาพและวัดขนาดเปลือกหอยสกุล *Pomacea* เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อ
4. นับจำนวน ชนิดและรูปแบบการจัดเรียงคาริโอไทป์ของหอยสกุล *Pomacea*
5. บันทึกข้อมูลอื่นๆ ที่สังเกตได้ ตลอดการทดลอง

การทดลองที่ 1.1.33 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ (*Rattus argentiventer*) ที่พบในประเทศไทย

1) สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อศึกษาเป็นแนวทาง

2) สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของยีนต่างๆที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank (data base ของ NCBI) ของหนูนาใหญ่ หนูศัตรูพืชสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย และกลุ่มอื่นที่ใกล้เคียงกัน เพื่อมาใช้เปรียบเทียบอ้างอิง

3) ออกแบบ primer โดยใช้ลำดับเบสของหนูนาใหญ่ที่มีในฐานข้อมูล Genbank Accession number AB033701 , FR 775875 – 82 , HM217362 – 64 , JN675488 – 94 จำนวน 2 ชุด โดยชุดแรกออกแบบให้จำเพาะกับหนูนาใหญ่เท่านั้น เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของหนูด้วยเทคนิค PCR ชุดที่สองออกแบบ primer ให้ครอบคลุมนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ เพื่อนำมาใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรมด้วยเทคนิค Sequencing

4) เก็บตัวอย่างหนูนาใหญ่ที่คัดเลือกไว้ภาคละจำนวน 3 ตัว เพื่อเป็นตัวแทนของหนูในภูมิภาคนั้นๆ ทั้งตัวอย่างสดที่แช่แข็งที่ อุณหภูมิ -70°C และตัวอย่างแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เช่น กล้ามเนื้อ หัวใจ ตับ ไต ปลายหู และปลายหาง

5) สกัดดีเอ็นเอของหนูนาใหญ่ด้วยเทคนิค Phenol extraction/Alcohol precipitation DNA ทั้งจากธรรมชาติและในห้องปฏิบัติการโดยเลือกตัวอย่างหนูนาใหญ่ให้ครบทุกภูมิภาคในประเทศไทยเพื่อเป็นตัวแทนในแต่ละภาคของประเทศด้วยวิธีการจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาในเบื้องต้นแล้วเก็บ ดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่ อุณหภูมิ -20 หรือ -70°C

6) ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ ที่พบภูมิภาคต่างๆในประเทศไทย โดยวิธี Multiplex (2 plex) PCR และ Single plex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นส่วนของ ไซโตโครม บี จำนวน 3 คู่ มีลำดับเบสดังนี้

Multiplex (2 plex) PCR

R.a outer F 5’ ACA GCA TTC TCA TCA GTT ACT C

R.a outer R 5’ GTT GTT TGA TCC TGT TTC GTG

R.a Inner F 5’ GAT ATT TAC ACG CCA ACG GG

R.a Inner R 5’ GAT TAC GGT GGC TCC TCA A

Single plex PCR

Rat- 1w 5’ AAT CCG ATA TTT ACA CGC CAA CTG G

Rat- 2w 5’ ATA GCT GAT AAT AGG TTT GTG ATT TCG

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ul ในหลอดขนาด 0.2 ml โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของหนูนาใหญ่ 2ul ผสมกับ 5x PCR buffer , 10mM dNTPs , เอนไซม์ Hot start taq DNA polymerase 1 ยูนิต และไพร์เมอร์ชนิดละ 10 mM แล้วเติมน้ำกลั่น จนครบปริมาตร 20 ul ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ(Thermal cycler) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ(°c)	เวลา(นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (Initial Denaturing)	98	30 วินาที
2. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ (Denaturing)	98	30 วินาที
3. ไพร์เมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing)	59	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Extension)	72	45 วินาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ รอบสุดท้าย (Final Extension)	72	5 นาที

ทำปฏิกิริยาซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 40 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 °c นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 5 ul มาผสมกับ loading dye ปริมาณ 1 ul จากนั้นทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (Agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5% อะกาโรสใน 0.5xTAE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักดิ์ 135 โวลต์ นาน 45 นาที ย้อมดีเอ็นด้วย เอธิเดียมโบรไมด์หรือสีย้อม Syber green dye ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

7) วิเคราะห์ผลลักษณะทางพันธุกรรมที่ได้จากหนูนาใหญ่แต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MEGA 5 วิเคราะห์ค่า Bootstrap วิเคราะห์ค่า Dendogram และนำมาเปรียบเทียบวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตัวอย่างหนูนาใหญ่ในประเทศไทยแต่ละตัวอย่างกับหนูนาใหญ่และหนูชนิดอื่นๆที่มีในฐานข้อมูล Genbank ด้วย Maximum likely hood แล้วจัดทำ Phylogenetic tree เพื่อศึกษาความหลากหลาย ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้น รวมไปถึงการกระจายตัวของหนูนาใหญ่ที่พบในประเทศไทย

8) วิเคราะห์ผลลักษณะทางพันธุกรรมที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับผลข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของหนูนาใหญ่แล้วนำมาสรุปเป็นผลการทดลองที่ได้

การทดลองที่ 1.1.34 ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์และวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของปรสิตโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ระยะสปอร์โรซิส โดยวิธีทางอณูชีววิทยา

ทำการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อโดยวิธีทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิค PCR เพื่อเป็นการสนับสนุนผลที่ได้จากสัณฐานวิทยาและยืนยันชนิดของเชื้อ รวมถึงการถอดรหัสทางพันธุกรรมของเชื้อโดยวิธีทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิค sequencing มีรายละเอียดดังนี้

1) สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อศึกษาเป็นแนวทาง

2) สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของยีนต่างๆที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank (data base ของ NCBI) ของ *S. singaporensis* และกลุ่มอื่นที่ใกล้เคียงกันเพื่อนาใช้เปรียบเทียบอ้างอิง

3) ออกแบบ primer โดยใช้ลำดับเบสของ *S. singaporensis* ที่มีในฐานข้อมูล Genbank Accession number AF 434050-59, AF 237617 เพื่อนำมาใช้ในการโคลนนิ่งและถอดรหัสพันธุกรรมด้วยเทคนิค Sequencing

4) เก็บตัวอย่างโปรโตซัว *S. singaporensis* จากกล้ามเนื้อลำตัวหนูโดยดูผ่านกล้องสเตอริโอสโคป

5) สกัดดีเอ็นเอของโปรโตซัว *S. singaporensis* ด้วยเทคนิค Phenol extraction/Alcohol precipitation DNA แล้วเก็บ ดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่ อุณหภูมิ -20 หรือ -70°C

6) ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของโปรโตซัว *S. singaporensis* ด้วยวิธีโคลนนิ่ง โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นส่วนของ ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ จำนวน 1 คู่ มีลำดับเบส ดังนี้

SSU F 5'-TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA

LSU R 5'-GCC TCT CGA GGC TAC AAC T

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 50 ul ในหลอดขนาด 0.2 ml โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของโปรโตซัว *S. singaporensis* 5 ul ผสมกับ 5x PCR buffer , 10mM dNTPs , เอนไซม์ Hot start taq DNA polymerase 1 ยูนิต และไพร์เมอร์ชนิดละ 10 mM แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 50 ul ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ(°c)	เวลา(นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (Initial Denaturing)	98	30 วินาที
2. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ (Denaturing)	98	30 วินาที
3. ไพร์เมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing)	55	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Extension)	72	45 วินาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ รอบสุดท้าย (Final Extension)	72	5 นาที

ทำปฏิกิริยาซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 40 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 °c นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ทั้งหมดมาผสมกับ loading dye ปริมาณ 10 ul จากนั้นทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (Agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5% อะกาโรสใน 0.5xTAE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักดิ์ 135 โวลต์ นาน 45 นาที ย้อมดีเอ็นด้วย เอธิเดียมโบรไมด์หรือสีย้อม Syber green dye ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จากนั้นทำการตัดแถบดีเอ็นเอและ ทำให้บริสุทธิ์แล้วทำการ Ligation , Transformation , Sequencing ตามลำดับ

7) วิเคราะห์ผลลักษณะทางพันธุกรรมที่ได้จากโปรโตซัว *S. singaporensis* แต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MEGA 5 วิเคราะห์ค่า Bootstrap วิเคราะห์ค่า Dendogram และนำมาเปรียบเทียบวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโปรโตซัว *S. singaporensis* ในประเทศไทยกับค็อคซิเดียนโปรโตซัวและโปรโตซัว ชนิดอื่นๆที่มีในฐานข้อมูล Genbank ด้วย Maximum likely hood แล้วจัดทำ Phylogenetic tree เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.35 อนุกรมวิธานด้วงงวงสกุล *Rhynchophorus*

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

1) สำรวจและเก็บรวบรวมด้วงงวงในแหล่งปลูกพืชตระกูลปาล์ม เช่น มะพร้าว และปาล์มน้ำมัน ถ่ายภาพและเก็บตัวอย่าง โดยเก็บตัวอ่อนในหลอดบรรจุแอลกอฮอล์ 80 % และตัวเต็มวัยในขวดฆ่าที่บรรจุสารเอทิลอะซิเตท หลังจากด้วงตายให้เก็บตัวเต็มวัยในกระดาษรูปสามเหลี่ยมโดยห่อแบบท๊อฟฟี่ บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น รูปร่าง ลักษณะ ขนาด สี พืชอาศัย วันเดือนปี ชื่อผู้เก็บ สภาพแวดล้อม อุณหภูมิ และพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) เป็นต้น ในเวลากลางคืนจะเก็บตัวอย่างด้วงงวงจากกับดักแสงไฟ (light trap) นำตัวอย่างใส่กล่อง เก็บรวบรวมไว้ในกล่องรักษาความเย็นเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเน่าเสีย นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ

2) นำตัวอย่างด้วงงวงที่รวบรวมได้มาจัดรูปร่าง บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) จัดให้อยู่ในสภาพธรรมชาติ นำไปอบให้แห้งในตู้อบ (oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15-30 วัน ขึ้นกับขนาดตัวอย่างด้วงงวง

3) นำตัวอย่างด้วงงวงที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธาน โดยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดของด้วงงวง ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ขนาดลำตัว รูปร่าง ลักษณะ และสี เป็นต้น พร้อมทั้งถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope บันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของด้วงงวง แต่ละตัวอย่าง เช่น ชื่อวิทยาศาสตร์ วัน เดือน ปี สถานที่พบตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

4) จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุล และชนิดของด้วงงวง ที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

5) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง เพื่อการตรวจสอบ สืบค้น อ้างอิงในภายหลัง

การทดลองที่ 1.1.36 สัณฐานวิทยาและลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟสกุล *Bathrips* และ *Thrips* การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชต่างๆ ทุกภูมิภาคของประเทศไทย เพื่อศึกษาความแปรปรวนของลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟสกุล *Bathrips* และ *Thrips* ในพื้นที่ภูมิภาคเดียวกันและระหว่างภูมิภาค โดยใช้วิธีการตีหรือเขย่าส่วนของพืชเช่น ใบ และดอก ให้เพลี้ยไฟตกลงบนกระดาษขาวที่รองรับ และใช้พู่กันเขี่ยเพลี้ยไฟแต่ละตัวลงในขวดที่บรรจุน้ำยา AGA สำหรับศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและแอลกอฮอล์ 95% สำหรับศึกษาลำดับพันธุกรรม รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่มีชีวิตด้วย บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟที่เก็บได้ เช่น พืชที่เก็บ ส่วนของพืชที่เก็บ สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) และชื่อผู้เก็บ ลงในขวดดองเพลี้ยไฟ

2) นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาพฤติกรรมและการเจริญเติบโต และนำตัวเต็มวัยไปทำสไลด์ถาวร

วิธีการทำสไลด์ถาวรของเพลี้ยไฟ มีขั้นตอนดังนี้

- ย้ายตัวอย่างเพลี้ยไฟจากขวดลงเก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 60 % แช่ทิ้งไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง

- ย้ายลงในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) 5% เพื่อทำให้สีของเพลี้ยไฟจางลง เวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างเพลี้ยไฟ เจาะส่วนท้องของเพลี้ยไฟบริเวณต้นขาของขาหลังด้วยเข็มแหลมขนาดเล็ก เพื่อให้ของเหลวภายในออกจากตัวเพลี้ยไฟ

- ย้ายเพลี้ยไฟที่เจาะแล้วลงในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 50 %ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที

- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 60 % อีกครั้ง ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 70 % อีกครั้ง ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 80 % อีกครั้ง ทิ้งไว้ 20 นาที

- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95 % อีกครั้ง ทิ้งไว้ 10 นาที

- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 100 % อีกครั้ง 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

3) วาดภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของแมลงที่ได้ศึกษา

การศึกษาลำดับพันธุกรรม

นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่ได้จำแนกชนิดเบื้องต้นภายใต้ stereo microscope ใช้ตัวอย่างกลุ่มเดียวกับที่ใช้ทำสไลด์ถาวร) มาศึกษาลำดับพันธุกรรมโดยปรับปรุงจากวิธีการศึกษายีน 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

- ดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ 2 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็น DNA Template ในขั้นตอน PCR (polymerase chain reaction)

การศึกษายีน COI โดยเทคนิค PCR

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

UEA 7 5’-TACAGTTGGAATAGACGTTGATAC-3’

UEA 10 5’-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3’

- นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 3 ทำปฏิกิริยากับ 20 µl reaction volumes [12.5 µl ddH_20, 2 µl10X PCR buffer (Promega), 2 µl 25 mM $MgCl_2$, 0.5 µl dNTP (10 mM each), 0.5 µl 20 mM forward and reverse primers และ *Tag* DNA polymerase 1 unit (Promega) ขั้นตอนและอุณหภูมิของขั้นตอนการทำ PCR คือ

Initial denaturation	ที่ 94 °C	3 นาที	
Denaturation	ที่ 94 °C	1 นาที	35 cycles
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 เปรียบเทียบกับ 100 bp DNA ladder เพื่อหาขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ว่ามีขนาดประมาณ 700 bpหรือไม่

<u>การหาและวิเคราะห์ลำดับเบสของ ยีน COI</u>

- วิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบส นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ยีนของ NCBI

การทดลองที่ 1.1.37 อนุกรมวิธานแมงมุมวงศ์ Clubionidae

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมโดยวิธีมองหาและจับโดยตรง, การเคาะโดยใช้ท่อนไม้ซึ่งมีสวิงจับแมลงรองรับข้างใต้ และ การใช้สวิงโฉบ หากตัวอย่างแมงมุมที่รวบรวมได้อยู่ในระยะตัวอ่อน ต้องนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนเป็นตัวเต็มวัย บันทึกพฤติกรรมต่าง ๆ ของแมงมุมแต่ละชนิดในสภาพธรรมชาติ เช่น วิธีจับเหยื่อ ชนิดของเหยื่อ เวลาที่ออกหากิน ลักษณะใยดักเหยื่อ เป็นต้น

2) ฆ่าแมงมุมโดยใส่ก้อนสำลีในกล่องพลาสติกที่เลี้ยงแมงมุมหยด ethyl acetate 2 – 3 หยดลงบนก้อนสำลี

3) เก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมในขวดที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75 % เพื่อนำไปจำแนกชนิดต่อไป

4) นำแมงมุมมาตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง โดยอาศัยหลักการทางด้านอนุกรมวิธาน และเอกสารตำราต่างๆ ที่เกี่ยวกับการศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุม

5) วาดรูป/ถ่ายภาพ แสดงลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานที่ใช้ในการจำแนกแมงมุมแต่ละชนิด และจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดแมงมุมวงศ์ Clubionidae

6) การบันทึกรายละเอียดของแมงมุมชนิดต่างๆที่สำรวจพบ พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) และข้อมูลอื่นที่สำคัญ รวมถึงบันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้าย ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ วัน เดือน ปี สถานที่ และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

7) จัดเก็บตัวอย่างแมงมุมในขวดดองและนำเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาอารักขาพืชโดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล

การทดลองที่ 1.1.38 ลักษณะทางอนุกรมวิธานและชีววิทยาของเพลี้ยแป้ง *Phenacoccus solenopsis* Tinsley

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้ง *P. solenopsis* จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยแป้งอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วใส่ในถุงพลาสติก บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง ชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ

2) นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่รวบรวมได้จากการสำรวจ นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยใช้พู่กันเขี่ยตัวอ่อนตัวอ่อน ตัวเต็มวัย และถุงไข่ ลงบนผลฟักทองประมาณ 5-10 ตัว ต่อผล และต้นชบาประมาณ 5-10 ตัว ต่อต้น รอจนเพลี้ยแป้งวางไข่และมีตัวอ่อนวัยที่ 1 ที่เริ่มฟัก

3) หลังจากนั้นให้ ใช้พู่กันเขี่ยตัวอ่อนเพลี้ยแป้งวัยที่ 1 ลงในฟักทองซึ่งวางไว้ในกล่องพลาสติก จำนวน 1 ตัวต่อ 1 ผล เปลี่ยนพืชอาหารเมื่อจำเป็นบันทึกรูปร่างลักษณะ สี ขนาด ทุกระยะการเจริญเติบโตรวมทั้งพฤติกรรมต่างๆตลอดการทดลอง พร้อมกับถ่ายภาพประกอบ

4) ทำเหมือนขั้นตอนที่ 3 แต่เปลี่ยนพืชอาหารเป็นชบา

5) นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งบางส่วนจากที่เลี้ยงบนฟักทอง มาตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพ บันทึกรายละเอียด เช่น ขนาด รูปร่างลักษณะ สี และระยะการเจริญเติบโตของเพลี้ยแป้งก่อนดองในแอลกอฮอล์ 80%

6) นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากขวดดองตัวอย่างในข้อ 4 มาทำสไลด์ถาวร โดยดัดแปลงวิธีการของ Williams and Watson (1988) มีขั้นตอนดังนี้

6.1) ใช้เข็มเขี่ยเจาะบริเวณกลางส่วนอกด้านบนของตัวอย่างเพลี้ยแป้ง นำไปใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% จากนั้นนำหลอดทดลองไปต้มด้วยวิธีวอเตอร์บาท ใช้เวลาประมาณ 15 นาที (เริ่มนับตั้งแต่น้ำในบีคเกอร์เดือด) โดยระวังไม่ให้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่อยู่ในหลอดทดลองเดือด เพราะจะทำให้ตัวอย่างเกิดความเสียหายได้

6.2) นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่ต้มแล้วมาล้างในน้ำกลั่น กดเบา ๆ บนลำตัวด้วยเข็มดัดปลายโค้ง เพื่อทำให้ไข่ ตัวอ่อน และของเหลวที่อยู่ในลำตัวหลุดออกมาทางรอยที่เจาะไว้ ถ้ายังมีก้อนไขมันตกค้างอยู่ให้นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 2 – 3 นาที

6.3) ย้ายลงในคาร์บอลไซลีน (carbol xylene) แช่ทิ้งไว้ 10 นาทีจนกระทั่งตัวอย่างใส นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95%

6.4) ย้ายลงในกรดแอลกอฮอล์ (acid alcohol) ซึ่งเป็นสารละลายของกรดแกลเซียลอะซิติก 1 ส่วน และแอลกอฮอล์ 50% 4 ส่วน แช่ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที

6.5) ย้อมสีตัวอย่างโดยแช่ในน้ำยาย้อมสี ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิดฟุชซิน (acid fuchsin) กรดเกลือ (hydrochloric acid) และน้ำกลั่น แช่ทิ้งไว้นาน 30 - 60 นาที

6.6) ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95% แช่ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที เพื่อกำจัดสีส่วนเกิน

6.7) ย้ายลงในสารละลายเอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alcohol) กับ แอลกอฮอล์ 95 % ในอัตราส่วน 1:1 แช่ทิ้งไว้ 10 นาที

6.8) ย้ายลงในเอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ แช่ทิ้งไว้ 10 นาที

6.9) ย้ายลงในโคล์ฟออย (clove oil) แช่ทิ้งไว้ 20 นาที

6.10) นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งวางบนแผ่นสไลด์แก้ว ใช้กระดาษกรองซับโคล์ฟออยส่วนที่เกินออก หยดแคนาดาบัลซัม (canada balsam) 1 หยดบนตัวอย่างแมลงจัดรูปร่าง ให้สวยงามไม่บิดเบี้ยวหรือทับซ้อนกัน ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

6.11) นำไปอบให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 1-2 เดือน

7) ตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยแป้งบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง ตรวจดูลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก ได้แก่ หนวด (antennae) ขน (setae) รู (pores) ท่อ (tubular ducts) กลุ่มอวัยวะที่ผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว (cerarii) ช่องเปิดที่มีลักษณะคล้ายรอยแตกตามขวางของลำตัว (ostioles) และวงแหวนที่ล้อมรอบช่องเปิดของอวัยวะขับถ่าย (anal ring)

8) วาดรูปแสดงลักษณะทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งแต่ละชนิด โดยวาดลงบนกระดาษกราฟและลอกลงบนกระดาษไขเขียนแบบและจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพลี้ยแป้ง *P. solenopsis* แต่ละระยะการเจริญเติบโต

9) การบันทึกรายละเอียดบนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้วโดยวางแผ่นสไลด์หันด้านหัวของเพลี้ยแป้งเข้าหาตัว ด้านขวาเขียนรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ด้านซ้ายมือเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ เพศ วันเดือนปี ที่ทำสไลด์และชื่อผู้จำแนก ควรลงรายละเอียดดังกล่าวเป็นภาษาอังกฤษ

10) จัดเก็บตัวอย่างเพลี้ยแป้งในกล่องใส่สไลด์ถาวรและนำเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล

การทดลองที่ 1.1.39 ชีววิทยาและเขตการแพร่กระจายของไรแมงมุมคันซาวา *Tetranychus kanzawai* Kishida

การศึกษาชีววิทยาของไรแมงมุมคันซาวา *Tetranychus kanzawai* Kishida ในพืชอาศัยได้แก่ กุหลาบมันสำปะหลัง และมะละกอ

ขั้นตอนที่ 1. การเลี้ยงขยายไรแมงมุมคันซาวา *Tetranychus kanzawai*

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไร *T. kanzawai* ในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวอย่างไรที่เก็บได้บนพืชอาศัยได้แก่ กุหลาบ มันสำปะหลัง และมะละกอ มาเลี้ยงบนใบพืชอาศัย ได้แก่ กุหลาบ มันสำปะหลัง และมะละกอ และวางอยู่บนสำลีชุ่มน้ำในถาดพลาสติก หล่อน้ำถาดเลี้ยงตลอดเวลา และวางบนชั้นใต้แสงไฟฟลูออเรสเซ็นต์ เป็นเวลา 8

ชั่วโมงต่อวัน ในห้องปฏิบัติการอุณหภูมิ 27 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70-80 % RH. เพื่อให้ไรเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆจนมากเพียงพอ

ขั้นตอนที่ 2. ศึกษาชีววิทยาของไรแมงมุมคันซาวา *Tetranychus kanzawai* Kishida ในพืชอาศัย ได้แก่ กุหลาบ มันสำปะหลัง และมะละกอ

การศึกษาชีววิทยาไร *T. kanzawai* โดยนำตัวเต็มวัยเพศเมียของไรที่เลี้ยงไว้จำนวน 40-50 ตัวลงบนใบพืชอาศัย (กุหลาบ, มันสำปะหลัง, มะละกอ) ทิ้งไว้ให้วางไข่ 3-4 ชั่วโมง นำไข่ที่ได้มาแยกเลี้ยงเดี่ยวๆบนใบพืชอาศัย (กุหลาบ, มันสำปะหลัง, มะละกอ) ที่ตัดเป็นแผ่นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.7 เซนติเมตร วางบนแผ่นสำลีชุ่มน้ำในกล่องพลาสติกที่แบ่งเป็นช่องย่อย 14 ช่อง ช่องละ 1 ฟอง บันทึกระยะเวลาการเจริญเติบโตทุกๆ 6 ชั่วโมง จากระยะไข่ ตัวอ่อนวัยต่างๆจนเป็นตัวเต็มวัย เขี่ยไรตัวผู้ที่เลี้ยงไว้ใส่ลงไปบนใบให้ผสมพันธุ์กับไรตัวเมีย บันทึกจำนวนไข่และการตายของตัวเมียที่เกิดขึ้นทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งตัวเมียตาย เขี่ยไข่ที่ตัวเมียแต่ละตัวผลิตได้ทั้งหมดแยกออกรวมไว้ บันทึกจำนวนลูกที่ฟักออกเป็นเพศเมีย คำนวณอัตราส่วนทางเพศ (sex ratio) อัตราการขยายพันธุ์สูงสุด (intrinsic rate of increase, r_m) อัตราการขยายพันธุ์สุทธิในชั่วอายุขัย (net reproductive rate, R_0) ทำการทดลอง 5 ซ้ำๆ ละ 28 ตัว ในแต่ละพืชอาศัย ได้แก่ กุหลาบ มันสำปะหลัง และมะละกอ

ขั้นตอนที่ 3. การศึกษาเขตการแพร่กระจายของไรแมงมุมคันซาวา *Tetranychus kanzawai* Kishida

เก็บตัวอย่างไร *T. kanzawai* บนพืชชนิดต่างๆ ตัดส่วนของพืชที่พบไรหรือที่มีร่องรอยอาการถูกทำลายของไรใส่ถุงกระดาษ แล้วใส่ถุงพลาสติกมัดให้แน่น ใส่ในถังเก็บความเย็นนำไปทำสไลด์ให้เร็วที่สุด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรที่พบบนพืชแต่ละตัววางลงบนสไลด์ เมาส์ด้วยน้ำยา Hoyer's ตามวิธีของวัฒนาและคณะ (2544) ส่วนไรที่ไม่สามารถทำเป็นสไลด์ได้ทันที ให้เขี่ยดองในขวดด้วย ethyl alcohol 70% นำไปทำเป็นสไลด์ภายหลัง เมื่อสไลด์แห้งดีแล้ว ทำการวินิจฉัยไรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกสถานที่และชนิดของพืชอาศัย

-การบันทึกข้อมูล

1) บันทึกวงจรชีวิต ระยะเวลาในการเจริญเติบโตตั้งแต่ไข่จนเป็นตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย ความสามารถในการผลิตไข่ตลอดอายุขัย และความสามารถในการอยู่รอดตั้งแต่ฟักจากไข่จนตาย (life table) อัตราการเพิ่มประชากร (intrinsic rate of increasing) ในแต่ละพืชอาศัย ได้แก่ กุหลาบ มันสำปะหลัง และมะละกอ

2) บันทึกเขตการแพร่กระจาย พิกัดทางภูมิศาสตร์ และชนิดของพืชอาศัยของไร *T. kanzawai* ที่พบจากการสำรวจและจากตัวอย่างสไลด์ไร *T. kanzawai* ที่มีแล้วอยู่ในพิพิธภัณฑ์ไร กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม

การทดลองที่ 1.1.40 ชีววิทยา นิเวศวิทยาของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม วงศ์ Psyllidae ในพืชตระกูลส้ม

1) การสำรวจ และเก็บตัวอย่าง

1.1) สำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่าง เพลี้ยไก่แจ้ส้มวงศ์ Psyllidae ในแหล่งปลูก

1.2) ตัดส่วนของพืชที่มีตัวอ่อน ดักแด้ หรือตัวเต็มวัยของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม พร้อมพืชอาศัย ใส่ห่อกระดาษ และใส่ถุงพลาสติก หรือกล่องพลาสติก

1.3) เก็บรวบรวมไว้ในกล่องรักษาความเย็น เพื่อป้องกันตัวอย่างเน่าเสีย

2) จำแนกชนิดตัวอย่าง

นำตัวอย่างตัวอ่อน ดักแด้ หรือตัวเต็มวัยของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจลักษณะภายนอก เพื่อจำแนกชนิด ภายใต้กล้อง หรือส่งตัวอย่างให้กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงเพื่อจำแนกชนิด

3) การเพาะเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณ

ดำเนินการขั้นตอนการเพาะเลี้ยงขยาย ในโรงเรือนที่อุณหภูมิ และความชื้นเหมาะสมกับการเจริญเติบโต

3.1) ทำการปลูกต้นส้มโอหรือต้นแก้ว ในกระถาง กระถางละ 1 ต้น

3.2) ย้ายกระถางที่ปลูกต้นส้มโอหรือต้นแก้ว ที่เริ่มมีการแตกยอดใหม่ ตั้งแต่ 5 ยอดขึ้นไป จำนวน 20 กระถาง ไปวางในกรงสำหรับเพาะเลี้ยงแมลง ขนาด 1.2 x 1.2 x 1 เมตร (พนมกร และคณะ, 2530 ข)

3.3) นำเพลี้ยไก่แจ้ส้มตัวเต็มวัยมาปล่อยจำนวน 10 คู่ เป็นตัวผู้และตัวเมีย ชนิดละ 10 ตัว เพื่อให้ ขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณบนต้นส้มโอหรือต้นแก้วที่ปลูกไว้

4) การศึกษาชีววิทยา

4.1) นำต้นส้มโอหรือต้นแก้วที่มีการวางไข่ จากขั้นตอนการเพาะเลี้ยงขยาย แยกออกมาใส่ในกรง สำหรับเพาะเลี้ยงแมลง กรงใหม่ จำนวน 10 กระถาง

4.2) สังเกตการเจริญเติบโต ลักษณะทางชีววิทยา วงจรชีวิต และพฤติกรรม

5) การศึกษานิเวศวิทยาและศัตรูธรรมชาติ

5.1) ในสภาพสวน ดำเนินการในพื้นที่ปลูกส้มโอ จำนวน 2 แห่ง แห่งละ 20 ต้น ทำการสังเกตในส่วนของยอดที่เพิ่งแตกใหม่ ระยะของแมลงที่เข้าทำลาย ลักษณะการเข้าทำลาย ลักษณะอาการของพืช การแพร่กระจายของแมลง

5.2) เก็บตัวอย่างแมลงที่ถูกศัตรูธรรมชาติเข้าทำลาย และนำมาเลี้ยงต่อ จนเก็บสามารถเก็บศัตรู ธรรมชาติได้ และส่งศัตรูธรรมชาติดังกล่าวให้ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงจำแนกชนิดต่อไป

-การบันทึกข้อมูล

-บันทึกข้อมูลเบื้องต้น เช่น พืชอาหาร สถานที่ พิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) วัน เดือน ปี และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง

-บันทึกลักษณะภายนอกของตัวอย่างที่เก็บ เช่น ขนาด รูปร่าง ลักษณะ ฯลฯ

- บันทึกวงจรชีวิต ระยะเวลาในการเจริญเติบโตตั้งแต่ไข่จนเป็นตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย ความสามารถในการผลิตไข่ตลอดอายุขัย สังเกตพฤติกรรมการทำลายของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ระยะของแมลงที่เข้าทำลาย ลักษณะของต้นพืช และการแพร่กระจายของแมลง ทั้งในสภาพโรงเรือน และสภาพสวน จดบันทึกอุณหภูมิ ความชื้น ทั้งในสภาพโรงเรือน และสภาพสวน

-บันทึกศัตรูธรรมชาติที่พบ

การทดลองที่ 1.1.41 ชนิดมดที่พบในแหล่งผลิตและโรงคัดบรรจุไม้ผลเพื่อการส่งออก

1) สำรวจความหลากชนิดของมดจากแปลงปลูกสับปะรด เงาะ ทุเรียน มังคุด ลองกอง ให้ครอบคลุมแหล่งที่อยู่อาศัยของมด โดยจะดำเนินการเก็บตัวอย่างมดตามวิธีที่ปรับปรุงจาก Agosti *et al*., (2000) ดังนี้

- การเก็บโดยใช้มือ เก็บมดที่อาศัยอยู่ตามต้นไม้ กิ่ง ดอก และผล ไม้พื้นล่าง ไม้พุ่มหรือวัชพืช โดยใช้ปากคีบและใช้สวิงโฉบโดยจับมดใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง วิธีการนี้จะได้ตัวอย่างมดที่อาศัยตามต้นไม้หรือกลุ่มมดที่กินน้ำหวานจากแมลงที่อาศัยอยู่ตามต้นไม้ ไม้พุ่ม หรือวัชพืช

- การร่อนดิน โดยใช้พลั่วหรือเสียมขุดดินในแปลงนำมาร่อนในตะแกรงที่มีถาดรองรับด้านล่าง ใช้ปากคีบจับมดใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง ซึ่งการเก็บมดในวิธีนี้จะทำการเก็บหลังจากเก็บมดโดยใช้กับดักน้ำหวานแล้ว วิธีนี้เป็นการเก็บมดที่อาศัยอยู่ในดิน

- การใช้เหยื่อล่อ เช่นการใช้น้ำหวาน หรือใช้เนยแข็ง วางเป็นจุดๆ เพื่อล่อมดให้ออกมากินเหยื่อที่วางไว้ หลังจากนั้นใช้ปากคีบจับมดใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง

- การใช้กับดัก Winkler extractor โดยเก็บซากพืชที่อยู่ในพื้นที่ใส่ไว้ใน Winkler extractor และแขวนไว้ มดที่อยู่ในซากใบไม้จะหล่นลงมาในขวดตัวอย่างที่อยู่ด้านล่าง

- การใช้กับดักหลุม (pit fall trap) โดยขุดหลุม เพื่อดักมดที่เดินผ่านไปมาตกลงไป โดยทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้มดทั้งที่หากินกลางวันและกลางคืน

2) สำรวจชนิดของมดจากโรงคัดบรรจุสับปะรด เงาะ ทุเรียน มังคุด ลองกอง ให้ครอบคลุมแหล่งที่อยู่อาศัยของมด โดยจะดำเนินการเก็บตัวอย่างมดตามวิธีดังนี้

- การเก็บโดยใช้มือเก็บมดที่อาศัยตามผลไม้ที่อยู่ภายในโรงคัดบรรจุ โดยใช้ปากคีบจับมดใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างที่อยู่ภายในโรงคัดบรรจุ

- การใช้เหยื่อล่อ เช่นการใช้น้ำหวาน หรือใช้เนยแข็ง วางเป็นจุดๆ โดยรอบโรงคัดบรรจุเพื่อล่อมดให้ออกมากินเหยื่อที่วางไว้ หลังจากนั้นใช้ปากคีบจับมดใส่ในขวดเก็บตัวอย่างเพื่อเป็นข้อมูลของชนิดมดที่พบว่าเป็นมดที่อยู่กับผลไม้หรือเป็นมดที่อาศัยอยู่ในโรงคัดบรรจุอยู่แล้ว

- การใช้กับดัก Winkler extractor โดยสุ่มเก็บผลผลิตที่อยู่ในโรงคัดบรรจุใส่ไว้ใน Winkler extractor และแขวนไว้ มดที่อยู่ในผลผลิตจะหล่นลงมาในขวดตัวอย่างที่อยู่ด้านล่าง

3) การบันทึกรายละเอียดของข้อมูลมด พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วัน เดือน ปี สถานที่ที่เก็บและชื่อผู้เก็บ

4) การเตรียมตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างที่รวบรวมได้นำไปจัดรูปร่าง ใช้เข็มไร้สนิมปักที่กึ่งกลางบริเวณอกถ้าเป็นตัวขนาดใหญ่ แต่ถ้าขนาดเล็กนำไปติดกระดาษสามเหลี่ยม (card point) และนำไปอบให้แห้งในตู้อบ (oven) ปรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 5-10 วัน ขึ้นกับขนาดตัวอย่าง

5) บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาพร้อมทั้งถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope วาดรูปโดยใช้เครื่องมือ camera lucida ช่วยทำให้ทราบสัดส่วนที่แท้จริงได้ บันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของมดแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ วัน/เดือน/ปี สถานที่พบตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

6) จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุลและชนิดของมดที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบนำตัวอย่างมดที่จำแนกชนิดแล้วให้จัดเก็บลงในกล่องกระดาษสี่เหลี่ยมสีขาว จัดเรียงตามอักษรของลำดับชนิด นำจัดเข้าลิ้นชักในตู้เก็บแมลง บันทึกข้อมูลแต่ละตัวอย่างบนแผ่นป้ายบันทึกกำกับตัวอย่าแมลง (labeling specimen)

การทดลองที่ 1.1.42 ชีววิทยา นิเวศวิทยาและการแพร่กระจายของหอยศัตรูพืช สกุล *Bradybeana*

1) สำรวจ เก็บตัวอย่าง และจัดทำแผนที่การกระจายพันธุ์หอยศัตรูพืชสกุล *Bradybaena* โดยสำรวจทุกๆ 2 เดือน ตามพื้นที่ๆกำหนด เช่น ในพื้นที่ป่า พื้นที่เกษตรกรรม ตามภาคต่างๆของประเทศไทย บันทึกข้อมูลของสถานที่เก็บตัวอย่าง และบันทึกพิกัดด้วย GPS เพื่อจัดทำแผนที่การกระจายพันธุ์ของหอยสกุล *Bradybaena* ด้วยโปรแกรม ArcView หรือ ArcGis นำตัวอย่างมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 25x40x26 เซนติเมตร รองพื้นตู้กระจก ด้วยดินผสมขุยมะพร้าว (อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อฆ่าปรสิตบางชนิด) อัตราส่วน 1:1 ให้สูงจากพื้นตู้กระจกประมาณ 5 เซนติเมตร ในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร และให้ความชื้นโดยฉีดพ่นน้ำ วันละ 1 ครั้ง

2) ตรวจสอบชนิดและสัณฐานวิทยาเปลือกของหอยศัตรูพืชสกุล *Bradybaena*

2.1) นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์ชื่อตามระบบอนุกรมวิธานของหอย เปรียบเทียบกับเอกสารหอยทากทั้งในและต่างประเทศ ตามวิธีการของ Abbott (1989), Laws (1973), Panha (1996) และ Vaught (1989)

2.2) ศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือก โดยการวัดค่า shell length, shell width, last whorl height, aperture length และ aperture width ด้วยเวอร์เนีย จากนั้นจึงเข้าสู่การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ ANOVA และถ่ายภาพและวาดภาพในห้องปฏิบัติการ

3) ศึกษาการผสมพันธุ์และการวางไข่ของหอยศัตรูพืชสกุล *Bradybaena*

3.1) ศึกษาพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของหอยศัตรูพืชสกุล *Bradybaena* โดยสุ่มเลือกหอยตัวเต็มวัย ซึ่งเป็นเพศรวม (hermaphrodite) มาเลี้ยงในกล่องพลาสติก ขนาด 15.5x22x7 เซนติเมตร จำนวน10 ตัว/ กล่อง จำนวน 5 กล่อง ให้อาหารปลาสำเร็จรูปและผักสดเป็นอาหาร และฉีดพ่นน้ำเพื่อให้ความชื้น สังเกตพฤติกรรมการเลือกคู่ก่อนการผสมพันธุ์และพฤติกรรมอื่นๆ ที่สังเกตได้ บันทึกบันทึกขนาด อายุ และลักษณะของหอยที่เริ่มจับคู่ผสมพันธุ์

3.2) ศึกษาการวางไข่ของหอยศัตรูพืชสกุล *Bradybaena* โดยเลือกหอยที่ผสมพันธุ์แล้ว (มีการ copulation) จากข้อ 12.3.1 มาแยกเลี้ยงในกล่องพลาสติก ขนาด 6.5x9.5x2 เซนติเมตร 1 ตัว/ กล่อง จำนวน 30 กล่อง โดยให้อาหารปลาสำเร็จรูปและผักสดเป็นอาหาร และฉีดพ่นน้ำเพื่อให้ความชื้น สังเกตและบันทึกผลการทดลองทุกวัน จนหอยวางไข่ วัดขนาดไข่ ขนาดของกลุ่มไข่ บันทึกจำนวน และลักษณะของไข่หอย พร้อมถ่ายภาพไข่หอยภายใต้กล้อง stereo microscope

3.3) ศึกษาระยะเวลาการฟักจากไข่ (eclosion time) ของหอยศัตรูพืชสกุล *Bradybaena* โดยแยกไข่หอยแต่ละกลุ่มมาศึกษาในกล่องพลาสติก ขนาด 6.5 x 9.5 x 2 เซนติเมตร ที่รองด้วยดินผสมขุยมะพร้าว (อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อฆ่าปรสิตบางชนิด) อัตรา 1:1 หนา 2 เซนติเมตร ฉีดพ่นน้ำ เพื่อให้ความชื้น บันทึกระยะเวลาที่ลูกหอยฟักออกจากไข่ วัดขนาดและชั่งน้ำหนักลูกหอยและถ่ายภาพภายใต้กล้อง stereo microscope

3.4) ศึกษาการเจริญเติบโต โดยแยกลูกหอยมาเลี้ยงในกล่องพลาสติก ขนาด 6.5 x 9.5 x 2 เซนติเมตร 1ตัว/ กล่อง จำนวน 30 กล่อง โดยให้อาหารปลาสำเร็จรูปและผักสดเป็นอาหาร และฉีดพ่นน้ำเพื่อให้ความชื้น บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดและชั่งน้ำหนักลูกหอย เพื่อจัดทำกราฟการเจริญเติบโต

4) การศึกษาวงจรชีวิต (life cycle) ของหอยศัตรูพืชสกุล *Bradybaena*

ศึกษาวงจรชีวิต หอยสกุล *Bradybaena* ที่เลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาด 15.5x22x7 เซนติเมตร และขนาด 6.5 x 9.5 x 2 เซนติเมตร รองด้วยดินผสมขุยมะพร้าว (อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อฆ่าปรสิตบางชนิด) อัตรา 1:1 หนา 2 เซนติเมตร ตามขั้นตอนต่างๆที่กล่าวมาโดยแต่ละขั้นตอนปฏิบัติดังนี้

- บันทึกวันที่เริ่มต้น เห็นระยะไข่ครั้งแรก (F1)
- เก็บกลุ่มไข่หอยรุ่น F1 มาแยกเลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาด 15.5 x 22 x 7 เซนติเมตร
- บันทึกวัน ที่ลูกหอยรุ่น F1 ฟักออกมาจากไข่ วัดขนาดลูกหอย
- เมื่อเริ่มสังเกตเห็นหอยเริ่มจับคู่ผสมพันธุ์ บันทึกอายุและวัดขนาดตัวเต็มวัย (รุ่นF1)
- บันทึกวัน ที่เริ่มเห็นกลุ่มไข่ รอบใหม่ (รุ่น F2) จากตัวเต็มวัย (รุ่นF1)
- บันทึกอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ ในตู้กระจกเลี้ยงหอย เป็นช่วงๆ ตลอดการทดลอง

กิจกรรมย่อยที่ 1.2 อนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช

การทดลองที่ 1.2.1 อนุกรมวิธานและชีววิทยาของราสกุล *Cladosporium* สาเหตุโรคพืช

1. สืบค้นเอกสารและเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

สืบค้น ตรวจเอกสารที่เกี่ยวข้อง และเตรียมวัสดุอุปกรณ์ที่ต้องใช้ในการทดลอง

2. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพืช

เก็บตัวอย่างโรคพืช ได้แก่ ใบ ดอก ผล กิ่ง ลำต้น และราก จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ และแบ่งตัวอย่างโรค

พืชมาอัดทับตัวอย่างแห้ง จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

3. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรง

ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือ conidium ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปลักษณะเชื้อและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

- แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplant

นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar หรือ water agar บ่มที่อุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียส นาน 3-7 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

4. การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

นำเชื้อราที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar หรือ water agar โดยบันทึกลักษณะอาการต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

- บันทึกอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารชนิดต่าง ๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกสีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment)
- ศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อรา โดยการ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution
- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscope)

5. การพิสูจน์โรค

นำรา *Cladosporium* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างพืชแต่ละชนิด ทำการปลูกเชื้อบนพืชชนิดเดียวกับตัวอย่างพืชที่แยกราได้ โดยวิธี detach leaf เพื่อพิสูจน์ความเป็นสาเหตุโรคของพืชชนิดนั้นๆ

6. เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อรา

เชื้อราที่แยกได้นั้น เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์ โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

- **การบันทึกข้อมูล**

บันทึกอัตราการเจริญ สีของโคโลนี การสร้างเม็ดสีของเชื้อราบนอาหารชนิดต่าง ๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope ได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ conidiophore สี ขนาด วาดภาพและบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscope)

การทดลองที่ 1.2.2 อนุกรมวิธานและชีววิทยาของราสกุล *Alternaria* และ *Stemphylium* สาเหตุโรคพืช

1 เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืช

เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการเป็นโรคซึ่งคาดว่าเกิดจากเชื้อรา *Alternaria* spp. **และ** *Stemphylium* spp. จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย โดยเลือกเก็บส่วนของพืชที่แสดงอาการของโรค ได้แก่ ใบ ดอก ผล กิ่งและลำต้น ห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก พร้อมแนบกระดาษบันทึกรายละเอียด ชื่อพืช สถานที่เก็บ วันที่เก็บ และลักษณะอาการของโรค บรรจุห่อตัวอย่างโรคพืชลงในกล่องเก็บความเย็น เพื่อนำมาจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการ

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของรา *Alternaria* spp. และ *Stemphylium* spp.

- ศึกษาลักษณะอาการของโรคและเชื้อสาเหตุโรคโดยตรงจากพืช

ศึกษาลักษณะอาการของโรคและเชื้อสาเหตุโรคโดยตรงจากพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือ conidium 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

นำเชื้อรา *Alternaria* spp. และ *Stemphylium* spp. บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน จากนั้นใช้ cork boror ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดวุ้นอาหารบริเวณส่วนปลายเส้นใยของเชื้อรา นำไปปลูกเชื้อบนพืชชนิดเดิม สำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบปลูกเชื้อด้วยชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่ปราศจากเชื้อสาเหตุโรค เมื่อพืชเป็นโรคนำส่วนที่แสดงอาการเป็นโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ตรวจดู เพื่อยืนยันเชื้อสาเหตุโรคอีกครั้ง

- ศึกษาลักษณะของเชื้อรา

นำเชื้อราที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA และบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment) ศึกษา และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราได้แก่ รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย conidia conidiophore และโครงสร้างอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope และถ่ายภาพ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของขนาดโครงสร้างต่างๆของราที่วัดขนาดไว้

- จำแนกชนิดเชื้อรา *Alternaria* spp. และ *Stemphylium* spp, สาเหตุโรคพืช

โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา *Alternaria* spp. และ *Stemphylium* spp, ที่ศึกษากับเอกสารการจัดจำแนกรา *Alternaria*_spp._และ *Stemphylium* spp.

3. ศึกษาชีววิทยาของราสกุล *Alternaria* และ *Stemphylium*

- ศึกษาชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของเชื้อรา

นำเชื้อรา *Alternaria* spp. และ *Stemphylium* spp. บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหารทดสอบชนิดต่างๆ ได้ แก่ PDA; PCA, V8 agar; และ CA ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนี นับปริมาณการสร้างสปอร์ และวัดขนาดสปอร์ของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของอัตราการเจริญของเชื้อ ปริมาณสปอร์และขนาดสปอร์ของเชื้อบนอาหารชนิดต่างๆนำมาเปรียบเทียบกัน

- ศึกษาผลของแสงต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของเชื้อรา

นำเชื้อรา *Alternaria* spp. และ *Stemphylium* spp. บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง near UV และ fluorescent ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ต่อวัน เปรียบเทียบกับไม่ใช้แสง จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนี นับปริมาณการสร้างสปอร์ และวัดขนาดสปอร์ของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของอัตราการเจริญของเชื้อ ปริมาณสปอร์และขนาดสปอร์ของเชื้อเมื่อได้รับแสงชนิดต่างๆนำมาเปรียบเทียบกัน

- ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของเชื้อรา

นำเชื้อรา *Alternaria* spp. และ *Stemphylium* spp. บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ27 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

บันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนี การสร้างสปอร์ และวัดขนาดสปอร์ของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของอัตราการเจริญของเชื้อ ปริมาณสปอร์และขนาดสปอร์ของเชื้อเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆนำมาเปรียบเทียบกัน

4. เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อรา

เชื้อราที่แยกได้เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

5. จัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืช

ตัวอย่างโรคพืชที่เก็บมาได้ ส่วนหนึ่งนำมาจัดทำตัวอย่างแห้ง โดยตัดส่วนของพืชบริเวณที่แสดงอาการโรค วางบนกระดาษฟาง พร้อมแนบกระดาษบันทึกข้อมูลพืช แล้วปิดทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ อัดทับด้วยแผงไม้อัดตัวอย่างโรคพืช นำไปวางผึ่งลม ไม่ให้ถูกแดด เปลี่ยนกระดาษทุกวัน จนกระทั่งตัวอย่างพืชแห้ง จึงนำมาเก็บในถุงกระดาษสำหรับเก็บตัวอย่างแห้ง พร้อมลงรายละเอียดข้อมูลตัวอย่างตามระบบสากล (Anonymous, 2005) ได้แก่ ชื่อพืช ลักษณะอาการโรค สถานที่เก็บ ชนิดของราสาเหตุโรคพืช วันที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ และชื่อผู้จัดจำแนกชนิดรา เป็นต้น แล้วส่งเก็บในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

- **การบันทึกข้อมูล**

1. บันทึกรายละเอียดตัวอย่างโรคพืช ได้แก่ ชื่อพืช สถานที่เก็บ วันที่เก็บ และลักษณะอาการของโรค

2. บันทึกลักษณะต่าง ๆของเชื้อรา ได้แก่ อัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment)

3. บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราได้แก่ รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย conidia conidiophore และโครงสร้างอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope และถ่ายภาพ

4. บันทึกอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนี ปริมาณการสร้างสปอร์ และขนาดสปอร์ เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารทดสอบชนิดต่างๆ การได้รับแสง และอุณหภูมิต่างๆ

การทดลองที่ 1.2.3 อนุกรมวิธานและชีววิทยาของราสกุล *Choanephora* สาเหตุโรคเน่าเปียก

1. สืบค้นข้อมูลโรคเน่าเปียกหรือโรคยอดและดอกเน่าที่เกิดจากรา *Choanephora* spp. ของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญและพืชอื่นๆในประเทศไทย

สืบค้นข้อมูลโรคเน่าเปียกหรือโรคยอดและดอกเน่าที่เกิดจากรา *Choanephora* spp. ของพืชในประเทศไทยจากเอกสารต่าง ๆ หรือจากข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์

2. สำรวจรวบรวมเก็บตัวอย่างพืชเป็นโรคและศึกษาลักษณะอาการ

เก็บตัวอย่างพืชเศรษฐกิจที่สำคัญและพืชอื่นๆ ที่แสดงอาการโรค โดยเก็บตัวอย่างจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย ห่อตัวอย่างพืชที่เก็บมาด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก บันทึกข้อมูลเช่น สถานที่

เก็บตัวอย่าง วันที่เก็บตัวอย่าง ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง และข้อมูลภูมิศาสตร์ เป็นต้น นำตัวอย่างพืชที่ได้มาศึกษาลักษณะอาการในห้องปฏิบัติการ

3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของราสาเหตุโรค

- ศึกษาราสาเหตุโรคจากตัวอย่างพืชเป็นโรคโดยตรง

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของราจากตัวอย่างพืชที่เป็นโรค โดยเขี่ยเชื้อจากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคลงบนแผ่นสไลด์แล้วตรวจเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

- ศึกษาราสาเหตุโรคโดยวิธีแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชเป็นโรค (Tissue transplant)

แยกเชื้อจากส่วนที่เป็นโรคโดยตัดชิ้นส่วนพืชบริเวณที่เป็นรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติ ขนาดประมาณ 2x2 มิลลิเมตร ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวพืชโดยแช่ชิ้นส่วนพืชลงในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้งสนิท นำชิ้นส่วนพืชมาวางบนอาหาร water agar แล้วบ่มไว้ในห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิ 25+2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 – 3 วัน ตรวจดูเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ตัด hyphal tip ของราที่เจริญออกมาจากชิ้นตัวอย่างพืช ย้ายไปวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเข้ากันได้ของสายพันธุ์ (mating type) เพื่อดูการสร้าง zygosporangium ของรา *Choanephora* spp. จำแนกชนิดและทำการเก็บรักษาเพื่อใช้ทดลองต่อไป

4. การพิสูจน์โรค

ทำการพิสูจน์การเกิดโรค โดยนำรา *Choanephora* spp. ที่แยกได้จาก 11.2 มาทำการปลูกเชื้อให้กับพืช ด้วยวิธีการทำแผลและไม่ทำแผล เปรียบเทียบกับการเกิดโรคบนพืชที่ไม่ปลูกเชื้อด้วยวิธีการเดียวกัน แยกราสาเหตุจากพืชที่แสดงอาการโรคซ้ำอีกครั้งตามกฎการพิสูจน์โรคของ Koch (Koch's postulation) เปรียบเทียบชนิดของราที่แยกได้กับรา *Choanephora* spp. ที่ใช้ในการปลูกเชื้อ

5. การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการเจริญของรา *Choanephora* spp.

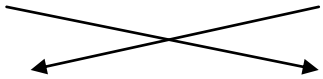
นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้และจำแนกชนิดแล้วมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงธรรมชาติ วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ ตรวจผลโดย วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในแนวราบทุก 3 6 9 และ 12 วัน

6. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของรา *Choanephora* spp.

เลี้ยงเชื้อไอโซเลทเดียวกันบนอาหารที่เหมาะสมจากผลการทดลองในข้อ 11.5 นำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ไม่มีแสงสว่าง ที่ระดับอุณหภูมิ 20 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในแนวราบทุก 3 6 9 และ 12 วัน

7. การศึกษาชนิดพืชอาศัยโดยการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคของพืชชนิดหนึ่งไปยังพืชทดสอบอีกชนิดหนึ่ง (cross inoculation)

ดังแผนผัง



การเตรียมรา *Choanephora* sp.

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์โดย นำรา *Choanephora* sp. ที่แยกได้จากพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ มาเลี้ยงบนอาหารที่ทดสอบแล้วว่ารามีการเจริญและสร้างสปอร์ดี ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นล้างสปอร์บนผิวหน้าอาหารด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำมารวมกัน แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เพื่อให้สปอร์กระจายออกจากกันอย่างสม่ำเสมอ ตรวจนับสปอร์ด้วย haemacytometer

การปลูกเชื้อลงบนต้นพืชทดสอบ

ปลูกพืชชนิดต่างๆ ที่จะใช้ทดสอบในกระถาง เมื่อพืชมีอายุประมาณ 3 สัปดาห์ นำสารแขวนลอยสปอร์รา *Choanephora* sp. ที่เตรียมไว้ พ่นลงบนพืชทดสอบ คลุมด้วยถุงพลาสติกใสเพื่อให้พืชได้รับความชื้นสูง หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง เปิดถุงพลาสติก ตรวจผลการเกิดโรคหลังจากปลูกเชื้อ 5-7 วัน แล้วทำการแยกเชื้ออีกครั้งหนึ่งและตรวจสอบว่าเป็นเชื้อชนิดเดียวกันหรือไม่

โดยประเมินระดับความรุนแรงของโรค

ระดับ 0 พืชไม่แสดงอาการเป็นโรค

ระดับ 1 พืชแสดงอาการเป็นโรคไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์

ระดับ 2 พืชแสดงอาการเป็นโรคไม่เกิน 25 เปอร์เซ็นต์ และมีสปอร์ของราอยู่บ้าง

ระดับ 3 พืชแสดงอาการเป็นโรคไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ และมีสปอร์ของราทั้งสปอร์แก่และสปอร์อ่อน

ระดับ 4 พืชแสดงอาการเป็นโรคมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และมีสปอร์แก่สีน้ำตาลเข้มลักษณะแผลช้ำจนยุบหรือยอดหักพับ

การปลูกเชื้อลงบนผลของพืชทดสอบ

นำผลของพืชที่จะทดสอบมาพืชละ 10 ผล นำราที่เตรียมไว้ มาปลูกเชื้อลงบนผลของพืชโดยวิธีทำแผล นำผลพืชที่ทดสอบไปไว้ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจผลการเกิดโรคหลังจากปลูกเชื้อ ทุกวัน จนครบ 10 วัน ประเมินระดับความรุนแรงของโรค

ระดับ 0 พืชไม่แสดงอาการเป็นโรค

ระดับ 1 พืชแสดงอาการเป็นโรคไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์

ระดับ 2 พืชแสดงอาการเป็นโรคไม่เกิน 25 เปอร์เซ็นต์ และมีสปอร์ของราอยู่บ้าง

ระดับ 3 พืชแสดงอาการเป็นโรคไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ และมีสปอร์ของราทั้งสปอร์แก่และสปอร์อ่อน

ระดับ 4 พืชแสดงอาการเป็นโรคมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และมีสปอร์แก่สีน้ำตาลเข้มลักษณะแผลช้ำจนยุบและมีขนาดใหญ่

การทดลองที่ 1.2.4 การจำแนกชนิดของราสกุล *Botryosphaeria* สาเหตุโรคพืช โดยใช้ลักษณะการสัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพืช

เก็บตัวอย่างโรคพืช ได้แก่ ใบ ดอก ผล กิ่ง ลำต้น และราก จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ และแบ่งตัวอย่างโรคพืชมาอัดทับตัวอย่างแห้ง จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- 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 transplant

นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar หรือ water agar บ่มที่อุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียส นาน 3-7 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

3. ศึกษาลักษณะของเชื้อบนอาหารชนิดต่าง ๆ

นำรา *Botryosphaeria* ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar, Oat meal agar หรือ water agar โดยบันทึกลักษณะต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

บันทึกอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารชนิดต่าง ๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกสีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment)

4. การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- ศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อรา โดยการ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะ ของสปอร์ conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscope)

5. เก็บรักษาสายพันธุ์ราและตัวอย่างแห้ง

เก็บรักษาราที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์ โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

6. การพิสูจน์การเกิดโรค

ทำการพิสูจน์การเกิดโรค โดยทำการปลูกเชื้อส่วนของพืช โดยทำแผลและไม่ทำแผลอย่างละ 10 ซ้ำ เปรียบเทียบกับการเกิดโรคบนส่วนที่ไม่ปลูกเชื้อด้วยวิธีเดียวกัน แยกเชื้อสาเหตุจากต้นที่แสดงอาการโรค เปรียบเทียบชนิดของราสาเหตุโรคใช้ในการปลูกเชื้อ

7. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของรา *Botryosphaeria*

7.1 การเตรียมรา *Botryosphaeria*

เลี้ยงรา *Botryosphaeria* บนอาหาร MEA (Malt extract agar) นาน 7-10 วัน หลังจากนั้นใช้เข็มเขี่ยเอาเส้นใยของรามาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB (Potato dextrose broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน flask 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 7 วัน หลังจากนั้นนำราในอาหารเหลวมากรองด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ และทำให้แห้งด้วยการดูดอากาศออกด้วยเครื่องดูดสัญญากาศ เก็บเส้นใยราที่แห้งด้วยหลอดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาสกัด DNA

7.2 การสกัด DNA จากรา

นำรา *Botryosphaeria* อย่างน้อย 5 genera 5 species อย่างละ 4 isolates ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาสกัด DNA โดยใช้วิธีของ Crous และคณะ (2000)

7.3 การเพิ่มปริมาณยีน Internal Transcribed Spacer โดยใช้เทคนิค PCR

นำ DNA ของราที่แยกได้ในข้อ 7.2 มาทำ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS1 (5'TTTCCGTAGGTGAACCTGC3') และ ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC)

- สังเคราะห์คู่ primer ITS1 และ ITS4 เพื่อทำการเพิ่มปริมาณของ rDNA ในช่วง ITS1-5.8S rDNA-ITS2-26SrDNA

- นำ DNA ของราทั้งหมดในข้อ 7.2 มาเพิ่มปริมาณของ rDNA ในช่วง

ITS1-5.8S rDNA-ITS2-26SrDNA โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ITS1 และ ITS4 ด้วยวิธี PCR ประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

10X PCR buffer	6 ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	3 ไมโครลิตร
10 mM dNTP	1 ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS1 (50 พิโคโมล / ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS4 (50 พิโคโมล / ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
Taq DNA Polymerase (5 ยูนิต / ไมโครลิตร)	0.25 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	28.75 ไมโครลิตร
สารละลาย DNA (50 นาโนกรัม / ไมโครลิตร)	10 ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	50 ไมโครลิตร

- ส่วนของ β-tubulin นั้นเพิ่มปริมาณโดยใช้คู่ไพร์เมอร์ Bt2a และ Bt2b นำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA โดยมีรอบการทำปฏิกิริยา (Slippers *et al.,* 2004) ดังนี้

94 องศาเซลเซียส	5 นาที		1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	1 นาที	50 วินาที	30 รอบ
52 องศาเซลเซียส	2 นาที		
72 องศาเซลเซียส	1 นาที		
72 องศาเซลเซียส	5 นาที		1 รอบ
4 องศาเซลเซียส	hold		

7.4 <u>การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน ITS1-5.8SrDNA-ITS2-26SrDNA</u>

นำผลผลิตที่ได้จากข้อ 13.2.3 มาตรวจวิเคราะห์ผลด้วย electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 0.5XTBE buffer โดยตัดแถบ DNA ที่เป็นยีนเป้าหมาย ภายใต้ UV transilluminator โดยใช้วิธีของ Slippers และคณะ (2004)

7.5 <u>การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาศึกษาทั้งหมด</u>

การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาศึกษาทั้งหมดไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ในช่วงลำดับเบส 15 ITS rDNA และ 15 β-tubulin ซึ่งเป็นราในกลุ่ม *Botryosphaeria* โดยนำมาเปรียบเทียบวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการวิวัฒนาการด้วย PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) version 4.0b8 โดย Swofford (2000)

8. <u>สรุปผลการทดลอง</u>

รวบรวมข้อมูลและสรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1.2.5 ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phytophthora capsici*

1. สืบค้นเอกสารและวางแผนการ สำรวจ และเก็บตัวอย่างโรคที่เกิดจาก รา *P. capsici*

2. สำรวจ และเก็บตัวอย่างโรคที่เกิดจาก รา *P. capsici* แยกเชื้อบริสุทธิ์ แล้วศึกษาความรุนแรงของรา *P. capsici* ที่มีอยู่ใน culture collection และจากตัวอย่างโรคที่เก็บได้จากแปลงปลูกพริกในภาคเหนือตะวันออกเฉียงเหนือ และทั่วทุกภาคของประเทศไทย เพื่อหาเชื้อที่มีความรุนแรงที่สุดในการทำให้เกิดโรค โดยปลูกเชื้อดังกล่าวกับต้นพริก และใบพริก โดยวิธี detached leaf ประเมินผลการเป็นโรคโดยเปรียบเทียบกับพริกที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

3. ทดสอบพืชอาศัยของรา *P. capsici* โดยการปลูกเชื้อรา *P. capsici* ไอโซเลทที่มีความรุนแรงที่สุดแก่พืชเศรษฐกิจ และวัชพืช ที่พบในแปลงปลูกทั่วประเทศ ประเมินผลการเกิดโรคเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

4. ศึกษานิเวศวิทยาของ รา *P. capsici* โดยเก็บตัวอย่างดิน และตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำในแหล่งปลูกพืชที่มีการระบาดของโรค นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้เมล็ดแตงกวาลอยลงในน้ำดิน หรือน้ำที่เก็บมา นั้นเป็นเวลา 24 – 36 ชั่วโมง นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ จำแนกชนิดเชื้อที่แยกได้

5. รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ผล

6. สรุป เขียนรายงาน และตีพิมพ์ผลงานวิจัย

การทดลองที่ 1.2.6 ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Didymella bryoniae*

1. การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ และปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้าง perithecium ของรา *D. bryoniae*

1.1 เก็บตัวอย่างโรคยางไหลจากแหล่งปลูกพืชตระกูลแตงที่สำคัญ บันทึกข้อมูลต่างๆที่สำคัญในพื้นที่ปลูกรวมถึงข้อมูลเกษตรกร และข้อมูลพืช

1.2 นำตัวอย่างพืชที่เป็นโรคมาแยกหาเชื้อราสาเหตุโรคโดยวิธี tissue transplanting เมื่อพบ
มีเส้นใยเชื้อราเจริญจากชิ้นส่วนพืช จึงย้ายเชื้อและแยกเก็บเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.3 ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราและการสร้าง perithecium โดยวางแผนการทดลองแบบ Split plot 2 ปัจจัย ปัจจัยหลักคือสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Corn Meal Agar (CMA) Oat Agar (OA) และ Malt Extract Agar (MEA) ส่วนปัจจัยรองคือ อุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเตรียมอาหารตามสูตรที่ทดลองแล้ว จึงย้ายเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้ จำนวน 50 จานอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออาหาร 1 ชนิด จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิต่างๆ

จำนวน 10 ซ้ำต่ออุณหภูมิ บันทึกข้อมูลโดยการวัดขนาดโคโลนีเมื่อเชื้อรา 9 วัน ลักษณะสีของเส้นใย การเจริญของเส้นใย เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ

1.4 การศึกษาการสร้าง perithecium นั้น ให้ปฏิบัติตามขั้นตอนเช่นเดียวกันกับข้อ1.3 แต่จะมีการวางชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปบนอาหารเลี้ยงด้วยหลังขั้นตอนการวางเชื้อรา โดยให้มีระยะห่างจากเชื้อรา *D. bryoniae* 3 ซ.ม. วางจำนวน 2 ชิ้นต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส จำนวน 10 ซ้ำต่ออุณหภูมิ เมื่อเชื้อมีอายุ 9 วัน บันทึกการเจริญของเชื้อรา และการสร้าง perithecium ที่อุณหภูมิต่างๆ

2. การศึกษาพืชอาศัยและการเข้าทำลายของรา *D. bryoniae*

2.1 เลี้ยงขยายรา *D. bryoniae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่เหมาะสม ตามผลที่ได้จากการศึกษาข้อ 1

2.2 ปลูกพืชอาศัยที่สำคัญโดยเฉพาะพืชตระกูลแตง เพื่อใช้ในการศึกษาการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 10 ซ้ำ กรรมวิธีคือพืชทดลองแต่ละชนิด และเมื่อพืชมีอายุประมาณ 30 วัน จึงนำเชื้อราที่เลี้ยงขยายจากข้อ 2.1 ทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคบริเวณโคนต้น กิ่งก้าน และใบ โดยการทำแผลและไม่ทำแผลก่อนการปลูกเชื้อ

2.3 บันทึกการเกิดโรค ลักษณะอาการโรค และวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคทุก 3, 5, 7 และ 9 วัน

3. ศึกษาการถ่ายทอดโรคทางเมล็ดของรา *D. bryoniae*

3.1 นำเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตงที่ได้จากเกษตรกรโดยตรง และร้านค้าที่จำหน่ายเล็ดพันธุ์มาทำการศึกษาครั้งนี้ โดยสุ่มเมล็ดพันธุ์ตัวอย่างละ 100 เมล็ด และนำเมล็ดมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม 10 เมล็ดต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่เหมาะสม ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราสาเหตุโรคและเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

3.2 ศึกษาการอยู่อาศัยของเชื้อราในเมล็ดที่เป็นโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยนำเมล็ดแตงที่พบมีเชื้อราสาเหตุโรคเจริญจากข้อ 3.1 มาผ่าเมล็ดและย้อมสี เพื่อศึกษาการอยู่อาศัยของเชื้อราภายในเมล็ด บันทึกส่วนที่พบเชื้อราอาศัยและเจริญอยู่

3.3 นำเมล็ดพันธุ์ที่มีแต่ละชนิดจากข้อ 3.1 จำนวน 100 เมล็ดไปปลูกลงในกระบะพลาสติกที่ใส่ดินปลูกที่ผ่านการฆ่าเชื้อในดินแล้วเพื่อศึกษาการเกิดโรค บันทึกข้อมูลโดยการตรวจนับจำนวนต้นที่เป็นโรค อาการของโรค และนำค่าที่ได้มาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค

การทดลองที่ 1.2.7 การจำแนกชนิดและเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของ Race แบคทีเรีย *Rasonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย

<u>การจำแนกชนิด Race แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย</u>

1. ปลูกพืชอาศัยของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ได้แก่ พืชตระกูลมะเขือ (มะเขือเทศ พริก มันฝรั่ง มะเขือยาว มะเขือพวง มะเขือเปราะ ยาสูบ) ตระกูลขิง(ขิง ขิงแดง ปทุมมา กระเจียว กระทือ) หน้าวัว ฤาษีผสม กล้วยชนิดต่างๆ เป็นต้น

2. การเตรียมเชื้อ *Ralstonia solanacearum* นำเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมโรคพืช จำนวน 300 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหาร TTC ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว 523 บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำ 100 µl ของสารละลายเชื้อมาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง 523 บ่มที่อุณหภูมิ 30 C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการละลายเชื้อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นของเชื้อโดยการวัดค่าความขุ่นโดยใช้เครื่องspectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD เท่ากับ 0.3 มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^{8} cfu/ml

3. การปลูกเชื้อ *R. solanacearum* บนพืชอาศัย โดยก่อนปลูกเชื้องดการให้น้ำพืชทดสอบเป็นเวลา 1 วัน ทำการปลูกพืชทดสอบโดยใช้มีดหรือคัตเตอร์ที่สะอาดตัดส่วนรากห่างจากต้น 1-2 เซนติเมตร ราดด้วยสารละลายเชื้อที่เตรียมข้างต้นทันที โดยใช้อัตราส่วนสารละลายต่อดินในกระถาง 1: 10(V/V) (~ 25 มิลลิลิตร/ต้น)

4. บันทึกผล ตรวจผลการทดลองทุกๆ 7 วัน หลังการปลูกเชื้อ โดยให้ค่าคะแนนความรุนแรงของโรคตั้งแต่ 1-5 ตามอาการของพืช ดังนี้

1 = พืชปกติ (healthy plant)

2 = ใบเหี่ยว 1 ใบต่อต้น (one leaflet or leaf wilting)

3 = 1/3 ของต้นแสดงอาการเหี่ยว (1/3 of plant wilting)

4 = 2/3 ของต้นแสดงอาการเหี่ยว (2/3 of plant wilting)

5 = แสดงอาการเหี่ยวทั้งต้นหรือต้นตาย (whole plant wilting or dead)

ยืนยันการเกิดโรคเหี่ยวโดยการตรวจด้วย ELISA และ แยกเชื้อบนอาหาร TTC

<u>ทดสอบชนิด Biovar</u>

นำเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่ทดสอบพืชอาศัยเรียบร้อยแล้วมาทดสอบการใช้น้ำตาล 6 ชนิด เพื่อจัดจำแนก biovar ของแต่ละไอโซเลทเพื่อหาความสัมพันธ์ของ biovar กับการเกิดโรคบนพืชอาศัยของสายพันธุ์ประเทศไทยเปรียบเทียบกับรายงานในต่างประเทศ

<u>การศึกษาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของ Race แบคทีเรีย *Ralstoonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย</u>

1. **การเตรียมแบคทีเรีย *R. solanacearum* เพื่อสกัดดีเอ็นเอ** นำเชื้อแบคทีเรีย *R.solanacearum* มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Wakimoto's medium ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ย้ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวมา

เลี้ยงในอาหารแข็ง LB (Luria &Bertani medium) (Sambrook et al., 1989) อายุ 48 ชั่วโมง เตรียมไว้สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

2. **การแยกสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ให้บริสุทธิ์** ใช้การแยกสกัดจีโนมิค ดีเอ็นเอ โดยตามวิธีของ Pitcher et al. (1989) ใช้เชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย *R.solanacearum* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง LB อายุ 48 ชั่วโมง ใช้ลูปฆ่าเชื้อ แตะเชื้อแบคทีเรียให้เต็มหนึ่งลูปละลาย ใน 1 ml ของ Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA, pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย 100 µl ของ TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA, pH 8.0) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ เครื่องปั่น Vortex เติมด้วย 500 µl ของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 µl ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เก็บไว้ในตู้เย็น -20 oC ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วย 500 µl ของสารผสม chloroform : isoamyl alcohol อัตรา 24/1 ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุสาร isopropanol ที่แช่เก็บไว้ในตู้เย็น -20 oC จำนวน 378 µl ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ ที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 150 µl ของ 70 % ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย TE buffer, pH. 8.0 ปริมาณ 100 µl วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่ช่วงคลื่น A260 และ A280 ด้วยเครื่อง UV/Vis spectrophotometer และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 50 ng/µl เพื่อนำไปศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

3. **การศึกษาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ด้วยเทคนิค rep-PCR** การศึกษาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ด้วยเทคนิค rep PCR ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ในการทดลองได้แก่ enterobacteria repetitive intergenic concensus (ERIC) และ interspersed repetitive BOX sequence (BOX) (Louws *et al*., 1994) เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 25 µl ในหลอดขนาด 0.2 ml โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv..*citri* 50 ng ผสมกับ 10X PCR buffer [67 mM Tris-HCl, pH8.8, 83 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2.0 mM $MgCl_2$, 30 mM 2-mercaptoethanol, 10% dimethylsulfoxide และ bovine serum albumin] dNTPs ชนิดละ 125 µM, เอนไซม์ Taq DNA polymerase 1.0 ยูนิต (Invitrogen Corporation Grand Island, NY, USA) และไพรเมอร์ ERIC ชนิดละ 50 pM และ ไพรเมอร์ BOX จำนวน 100 pM แล้วเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 25 µl ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามวิธีของ Louws *et al.* (1994)

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95	7

2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94		1
3. ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (primer annealing)	53	(BOX)	1
	53	(ERIC)	1
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension)	65		8
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	65		15

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 ℃ นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 10 µl มาผสมกับ loading dye (0.025% bromophenol blue, 40% Ficoll 400, 0.5% SDS) ปริมาณ 2 µl จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5 % อะกาโรสใน 0.5 xTAE (40mM Tris, 4mM sodium acetate, 1mM EDTA, pH 7.9) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง ย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

การทดลองที่ 1.2.9 อนุกรมวิธานและชีววิทยาของไส้เดือนฝอย migratory endoparasitic nematodes

การดำเนินงานในปีงบประมาณ 2554 จะเป็นการเก็บตัวอย่างดิน จากแหล่งปลูกพืชชนิดต่างๆ ในประเทศไทย เพื่อตรวจหาไส้เดือนฝอย ทำการคงสภาพไส้เดือนฝอย และทำสไลด์ถาวร จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอย รวมทั้งเพิ่มจำนวนไส้เดือนฝอยในพืชอาศัย เพื่อให้ได้จำนวนประชากรของไส้เดือนฝอยมากพอในการศึกษาด้านชีววิทยาต่อไป

การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินและรากพืชจากแปลงปลูกพืชในจังหวัดต่างๆ ทั้งพืชล้มลุกและพืชยืนต้นโดยใช้ท่อเก็บตัวอย่างดินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 นิ้ว เก็บดินลึกประมาณ 20 เซนติเมตร โดยสุ่มเก็บจำนวน 20 จุดต่อ 1 ตัวอย่าง *การบันทึกข้อมูล*

บันทึกวันที่เก็บตัวอย่าง ชนิดพืช ชนิดดินอุณหภูมิของดินในขณะเก็บตัวอย่าง บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์โดยใช้เครื่อง GPS

การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและจัดจำแนก

แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดินโดยวิธีการล้างตัวอย่างดิน และกรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงแยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดินที่ค้างอยู่บนตะแกรง โดยนำตัวอย่างใส่ลงบนกระดาษกรอง ที่วางอยู่บนตะแกรงไนลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) แยกไส้เดือนฝอยจากน้ำ โดยการเขี่ยไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และฆ่าไส้เดือนฝอยโดยใช้ความร้อนและคงสภาพใน TAF solution (Seinhorst, 1959) ทำสไลด์ถาวร (Cobb's Slide) ของไส้เดือนฝอย โดยเตรียมไส้เดือนฝอยให้อยู่ใน anhydrous glycerine โดยวิธีของ Hooper and Evans (1993) จัดจำแนกไส้เดือนฝอยโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) และวัดขนาดสัดส่วน

ของไส้เดือนฝอย (morphometrics) บันทึกภาพ และจัดจำแนกโดยใช้คู่มือ(key) ในการจัดจำแนกไส้เดือนฝอยในสกุลต่างๆ หรือข้อมูลจากตำรา หรือเอกสารทางวิชาการ ที่เกี่ยวข้องกับไส้เดือนฝอยสกุลที่ต้องการศึกษา

การเลี้ยงเพิ่มจำนวนไส้เดือนฝอย

ในกรณีที่มีไส้เดือนฝอยจำนวนมากพอ หากเป็นไส้เดือนฝอยในสกุล *Radopholus* หรือ *Pratylenchus* บางชนิดสามารถเลี้ยงบนชิ้นแครอท (carrot disc) โดยวิธีของ O' Bannon & Taylor (1968) หากมีจำนวนไส้เดือนฝอยไม่มากพอ จะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในพืชอาศัย จนได้จำนวนมากพอก่อน จึงนำไปเลี้ยงในชิ้นแครอท การเลี้ยงเพิ่มจำนวนไส้เดือนฝอยจะทำเฉพาะไส้เดือนฝอยชนิดที่สำคัญ ที่คาดว่าอาจทำความเสียหายให้กับพืชเศรษฐกิจได้

การทดลองที่ 1.2.10 อนุกรมวิธานและชีววิทยาของไส้เดือนฝอย *Radopholus*

การศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้ Light microscope (LM)

นำไส้เดือนฝอยระยะตัวอ่อน ตัวเต็มวัยเพศเมียและเพศผู้ ฆ่าด้วยน้ำอุ่น (50 °ซ) เป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำยา fixative (TAF, 7 ml of 40 % formaldehyde, 2 ml tri-ethanolamine, 91 ml distilled water) นำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเขี่ยไส้เดือนฝอยลงใน solution I (20 parts 95 % ethanol, 1 part glycerine, 79 parts distilled water) นำไปวางใน desiccator ที่มี 95 % ethanol บรรจุอยู่ วางไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 12 ชม. เพื่อดึงน้ำออกจากตัวไส้เดือนฝอยช้าๆ และมีการแทนที่ด้วยกลีเซอรีน จากนั้นเติม solution II (5 parts of glycerine, 95 parts of 95 % ethanol) ลงไป นำไปไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 3 ชม. กลีเซอรีนจะเข้าแทนที่น้ำในตัวไส้เดือนฝอย สามารถเห็นอวัยวะสำคัญภายในตัวไส้เดือนฝอยได้ชัดเจน เขี่ยไส้เดือนฝอยลงในหยดกลีเซอรีนบนสไลด์แก้ว หนุนด้วยใยแก้วก่อนปิดทับด้วย cover slip และซิล ด้วยน้ำยาซิลสไลด์ ถ่ายภาพรูปร่างลักษณะและวัดขนาดสัดส่วนภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง โดยวัดส่วนต่างๆ ดังนี้

ตัวเต็มวัยเพศผู้ : ความยาวลำตัว (L); ความกว้างลำตัว(W); หลอดดูดอาหาร; ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP); ความยาววัดจากหัวถึง esophagus (ES); ความยาวหาง (Tail); ความกว้างบริเวณ anus; ความยาว spicule และความยาว gubernaculum

ตัวเต็มวัยเพศเมีย : ความยาวลำตัว (L); ความกว้างลำตัว(W); หลอดดูดอาหาร; ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP); ความยาววัดจากหัวถึง esophagus (ES); ความยาวหาง (Tail); ความกว้างบริเวณ anus และ % vulva

ตัวอ่อนระยะ Infective juvenile : ความยาวลำตัว (L); ความกว้างลำตัว(W); หลอดดูดอาหาร; ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP); ความยาววัดจากหัวถึง esophagus (ES) และความยาวหาง (Tail)

นำมาคำนวณค่าสัดส่วน (ratio) โดยใช้ De Man's formula (Poinar, 1986) ดังนี้

Ratio : a = L/W; b = L/ES; c = L/Tail; d = EP/ES; e = EP/Tail

และคำนวณค่าพารามิเตอร์ตามวิธีการของ Nguyen (1993) ดังนี้

D% = EP/ES x 100; E% = EP/Tail x 100

- การบันทึกข้อมูล ถ่ายภาพรูปร่างลักษณะที่สำคัญของไส้เดือนฝอยระยะตัวอ่อน ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่างๆ ค่าการวัดขนาดสัดส่วนและรูปร่างลักษณะสำคัญของไส้เดือนฝอย นำไปเปรียบเทียบกับ key

ศึกษาการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *Radopholus* ในชิ้นส่วนพืชที่อุณหภูมิ 2 ระดับ

1. เตรียมหัวเชื้อไส้เดือนฝอย *R. similis* ทำการล้างฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในสาร 0.1% hyamine เป็นเวลา 15 นาที และแช่ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำ 2 ครั้ง

2. เตรียมวุ้น 1.5 % (วุ้นผง 15 กรัม + น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) นึ่งฆ่าเชื้อ นำไปเทลงในจานเพาะเลี้ยง (Petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ปริมาตรวุ้นเท่ากับ 1 ใน 4 ของความสูงจานเพาะ ในสภาพปลอดเชื้อ

3. เตรียมชิ้นส่วนพืช (แครอท) โดยนำหัวแครอทปอกเปลือกให้สะอาด และหั่นตามขวางของหัวให้เป็นชิ้นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ทำการล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 % โดยวิธีการจุ่ม และจุ่มล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำ 2 ครั้ง วางผึ่งชิ้นแครอทให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อประมาณ 30 นาที จากนั้นใช้ปากคีบฆ่าเชื้อ คีบชิ้นแครอทวางลงบนอาหารวุ้นบริเวณกลางจาน ได้เป็นจานอาหารเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย

4. การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในชิ้นแครอท นำไส้เดือนฝอย (จากข้อ 1) จำนวน 100$\pm$10 ตัว/น้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร หยดลงบนชิ้นแครอทในจานอาหารเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ (จากข้อ 3) โดยปฏิบัติในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นหุ้มจานเพาะเลี้ยงด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟรอยด์ เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 22 และ 32 $^{\circ}$ซ

- การบันทึกข้อมูล ตรวจการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยโดยบันทึกการเปลี่ยนแปลงเป็นระยะต่างๆ แต่ละอุณหภูมิ ทุก 5 วัน

การทดลองที่ 1.2.12 ลักษณะทางพันธุกรรม ชีววิทยา และนิเวศวิทยาของรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคพืช

- **สิ่งที่ใช้ในการทดลอง**

ขั้นตอนที่ 1 การจำแนกชนิดของรา *Colletotrichum* โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพืช

เก็บตัวอย่างโรคพืช ได้แก่ ใบ ดอก ผล กิ่ง ลำต้น และราก จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์ วันที่เก็บ ผู้เก็บ และแบ่งตัวอย่างโรคพืชมาอัดทับตัวอย่างแห้ง จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช

ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์แบบ 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 ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar หรือ water agar บ่มที่อุณหภูมิ 32$\pm$2 องศาเซลเซียส นาน 3-7 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

3. ศึกษาลักษณะของเชื้อบนอาหารชนิดต่าง ๆ

นำรา *Colletotrichum* ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar, Oat meal agar หรือ water agar โดยบันทึกลักษณะต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

บันทึกอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารชนิดต่าง ๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกสีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment)

4. การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- ศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อรา โดยการ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscope)

5. เก็บรักษาสายพันธุ์ราและตัวอย่างแห้ง

เก็บรักษาราที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์ โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

6. การพิสูจน์การเกิดโรค

ทำการพิสูจน์การเกิดโรค โดยทำการปลูกเชื้อส่วนของพืช โดยทำแผลและไม่ทำแผลอย่างละ 10 ซ้ำ เปรียบเทียบกับการเกิดโรคบนส่วนที่ไม่ปลูกเชื้อด้วยวิธีเดียวกัน แยกเชื้อสาเหตุจากต้นที่แสดงอาการโรค เปรียบเทียบชนิดของราสาเหตุโรคใช้ในการปลูกเชื้อ

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของรา *Colletotrichum*

1. การเตรียมรา *Colletotrichum*

เลี้ยงรา *Colleotrichum* บนอาหาร MEA (Malt extract agar) นาน 7-10 วัน หลังจากนั้นใช้เข็มเขี่ยเอาเส้นใยของรามาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB (Potato dextrose broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน flask 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 7 วัน หลังจากนั้นนำราในอาหารเหลวมากรองด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ และทำให้แห้งด้วยการดูดอากาศออกด้วยเครื่องดูดสัญญากาศ เก็บเส้นใยราที่แห้งด้วยหลอดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาสกัด DNA

2. การสกัด DNA จากรา

นำรา *Colletotrichum* อย่างน้อย 5 genera 5 species อย่างละ 4 isolates ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาสกัด DNA โดยใช้วิธีของ Crous และคณะ (2000)

3. การเพิ่มปริมาณยีน Internal Transcribed Spacer โดยใช้เทคนิค PCR

นำ DNA ของราที่แยกได้ในข้อ 13.2.3 มาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5'TTTCCGTA GGTGAACCTGC3') และ ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC)

- สังเคราะห์คู่ primer ITS1 และ ITS4 เพื่อทำการเพิ่มปริมาณของ rDNA ในช่วง ITS1-5.8S rDNA-ITS2-26SrDNA
- นำ DNA ของราทั้งหมดในข้อ 13.2.3 มาเพิ่มปริมาณของ rDNA ในช่วง ITS1-5.8S rDNA-ITS2-26SrDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ด้วยวิธี PCR ประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

10X PCR buffer	6 ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	3 ไมโครลิตร
10 mM dNTP	1 ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS1 (50 พิโคโมล / ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS4 (50 พิโคโมล / ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
Taq DNA Polymerase (5 ยูนิต / ไมโครลิตร)	0.25 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	28.75 ไมโครลิตร
สารละลาย DNA (50 นาโนกรัม / ไมโครลิตร)	10 ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	50 ไมโครลิตร

- ส่วนของ β-tubulin นั้นเพิ่มปริมาณโดยใช้คู่ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b นำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA โดยมีรอบการทำปฏิกิริยา (Slippers *et al.,* 2004) ดังนี้

94 องศาเซลเซียส	5 นาที		1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	1 นาที	50 วินาที	30 รอบ
52 องศาเซลเซียส	2 นาที		
72 องศาเซลเซียส	1 นาที		
72 องศาเซลเซียส	5 นาที		1 รอบ
4 องศาเซลเซียส	hold		

4. การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน ITS1-5.8SrDNA-ITS2-26SrDNA

นำผลผลิตที่ได้จากข้อ 13.2.3 มาตรวจวิเคราะห์ผลด้วย electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 0.5XTBE buffer โดยตัดแถบ DNA ที่เป็นยีนเป้าหมาย ภายใต้ UV transilluminator โดยใช้วิธีของ Slippers และคณะ (2004)

5. การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาศึกษาทั้งหมด

การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาศึกษาทั้งหมดไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ในช่วงลำดับเบส 15 ITS rDNA และ 15 β-tubulin ซึ่งเป็นราในกลุ่ม *Botryosphaeria* โดยนำมาเปรียบเทียบวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการวิวัฒนาการด้วย PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) version 4.0b8 โดย Swofford (2000)

การทดลองที่ 1.2.14 การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้และใบจุดของกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าและแวนด้า

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างกล้วยไม้

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างกล้วยไม้จากแหล่งปลูกที่มีการระบาดของอาการโรคใบไหม้และใบจุดของกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าและแวนด้า ในแหล่งปลูกกล้วยไม้ที่สำคัญ เช่น จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร สมุทรสงคราม นนทบุรี กาญจนบุรี ปทุมธานี และราชบุรี เป็นต้น บันทึกข้อมูลลักษณะอาการของโรค ถ่ายภาพ และแหล่งที่พบ เก็บตัวอย่างห่อกระดาษและใส่ถุง นำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชและเก็บเชื้อบริสุทธิ์

แยกจากส่วนของพืชที่มีอาการของโรค ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 4 ตร.มม. ระหว่างรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง หลังจาก surface sterilize แล้วนำมาบดในน้ำกลั่น และ streak บนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PSA (Potato semi synthetic agar) หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เลือกเก็บโคโลนีและทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี streak plate หลายๆ ครั้ง เก็บเชื้อบริสุทธิ์ใน กลีเซอรอล 15% และ 50% ไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

3. ทดสอบการเกิดโรค (Pathogenicity test)

ทดสอบการเกิดโรคกับกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าและแวนดา โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกล้วยไม้บนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml แล้วพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch's postulation)

4. จำแนกลักษณะสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

4.1ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อ ทำการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อแบคทีเรียบางประการที่เหมาะสมและจำเป็นต่อการจำแนกเชื้อ โดยศึกษาตามวิธีการของ Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition และ Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria Third Edition

4.2 ทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนด้วยอาหารทดสอบ Biolog®

4.3จำแนกลักษณะสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชตามลักษณะทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค repetitive sequence based polymerase chain reaction (rep PCR) และ เปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA gene

4.3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสาเหตุอาการใบไหม้และใบจุดบนอาหารแข็ง Wakimoto's medium ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ อายุ 24-48 ชั่วโมง เตรียมไว้สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

4.3.2 การแยกสกัดดีเอ็นเอ

ทำการแยกสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ โดยใช้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เตรียมไว้จำนวน 1 ลูป ละลาย ใน Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 1 ml นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติม TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 100 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมด้วยสารละลาย GES (Guanidine thiocyanate – EDTA– Sarkosyl solution) ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เก็บไว้ในตู้เย็น -20 °C ปริมาตร 250 µl ผสมให้เข้ากัน วางแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วยสาร chloroform : isoamyl alcohol อัตรา 24 : 1 ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสใส่หลอดใหม่ที่มี isopropanol ที่แช่เก็บไว้ในตู้เย็น -20 °C ปริมาตร 378 µl ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 150 µl จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร

100 µl ปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 50 ng/µl เพื่อนำไปศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep PCR และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

4.3.3 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นด้วยเทคนิค rep PCR

ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep PCR ด้วยไพรเมอร์ 2 ชุด ได้แก่ ERIC1R (5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC 3') กับ ERIC2 (5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3') และ BOXA1R (5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3') เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany)โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 25 µl ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 50 ng/ µl, TopTaq Master Mix (QIAGEN Inc., USA) และไพรเมอร์ ERIC ชนิดละ 0.5 µM และ ไพรเมอร์ BOX จำนวน 1 µM กำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเริ่มต้น 95 °C เป็นเวลา 7 นาที แยกสาย ดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing) ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (primer annealing) ที่อุณหภูมิ 53 °C เป็นเวลา 1 นาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 8 นาที และสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 15 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5 % agarose ใน 0.5X TAE (40mM Tris, 4mM sodium acetate, 1mM EDTA, pH 7.9) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง ย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต และวิเคราะห์ผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS) ค่า coefficiency ที่ใช้คือค่า Dice และวิเคราะห์ค่า bootstrap ด้วยโปรแกรม Winboot

4.3.4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA gene

ทำการเพิ่มปริมาณ 16S rDNA gene ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้ universal primer แล้วเชื่อมต่อผลผลิต PCR กับพลาสมิดพาหะ และย้ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย นำพลาสมิดสายผสมที่คัดเลือกได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA gene ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) และโปรแกรม CLUSTAL W (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)

การทดลองที่ 1.2.15 การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ *Exserohilum tuecicum* บนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด

1. การเตรียมเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่

เก็บใบข้าวโพดที่เป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ นำมาแยกเชื้อด้วยวิธี Tissue Transplanting โดยฆ่าเชื้อที่ผิวนอกใบพืชด้วย คลอร๊อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงนำชิ้นส่วนข้าวโพดมาเลี้ยงบนอาหารพีดีเอที่ผสมด้วย

$CaCO_3$ อัตราส่วน 0.85 กรัมต่อลิตร เมื่อมีเส้นใยเจริญออกมาจึงตัดปลายเส้นใยไปเลี้ยงบนอาหารชนิดเดิม พิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (koch's postulation) แล้วจึงแยกเชื้อจากใบที่เป็นโรคอีกครั้ง

2. การเพิ่มปริมาณเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่

แช่เมล็ดข้าวฟ่างค้างคืน หลังจากนั้นนำมาผึ่งให้สะเด็ดน้ำ บรรจุลงในถุงพลาสติก ปริมณ 250 กรัมต่อถุง เติมน้ำกลั่น 10 ซีซี ปิดถุงด้วยสำลี แล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง วันต่อมานำถุงข้าวฟ่างไปนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้ง จากนั้นจึงย้ายเส้นใยของเชื้อลงในถุงข้าวฟ่าง หลังจากที่มีการเจริญของเส้นใยบนเมล็ดข้าวฟ่างแล้วแล้วจึงขยำเชื้อให้กระจายทั่วทั้งถุง

3. การเตรียมสารแขนลอยสปอร์

นำเมล็ดข้าวฟ่างทีมีเชื้อเจริญอยู่มาผสมกับน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ล้างเอาเฉพาะส่วนของสปอร์และเส้นใยโดยกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น ตรวจนับปริมาณสปอร์ให้ได้ 5000 สปอร์ต่อซีซี โดยตรวจนับใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วย Hematocytometer จากนั้นจึงเติมสาร Tween ลงในสารแขวนลอยสปอร์เพื่อช่วยในการกระจายตัวของสปอร์และเป็นสารจับใบข้าวโพด

4. การปลูกเชื้อลงบนต้นข้าวโพดพันธุ์ทดสอบ

ปลูกข้าวโพดเป็นอ่อนแอ คือ ไฮบริกซ์ 3 เป็นแถวสำหรับแพร่กระจายเชื้อ (spreader row) ในลักษณะตาราง ปลูกเชื้อให้พันธุ์อ่อนแอหลังจากที่ข้าวโพดงอกโดยการหยอดเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อลงในใบกรวย หลังจากนั้น 3 สัปดาห์จึงปลูกข้าวโพดพันธุ์ทดสอบลงในพื้นที่ว่าง

5. การทดสอบการถ่ายทอดเชื้อรา *Exerohilum turcicum* บนเมล็ดพันธุ์ของข้าวโพด

เก็บเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากข้อ 11.2.4 นำมาตรวจสอบเชื้อราดังนี้

-วิธีตรวจเมล็ดโดยตรง (dry seed examination) นำเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากแปลงปลูก มาตรวจและคัดแยกและจัดกลุ่มเมล็ดพันธุ์

-วิธีวางเมล็ดบนกระดาษเพาะชื้น(blotter method) นำเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่ไม่แสดงอาการผิดปกติและที่ผ่านการตรวจเมล็ดโดยตรงแล้วมาวางบนกระดาษเพาะชื้น ตรวจสอบเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

-วิธีวางเมล็ดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ(agar method) นำเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่ไม่แสดงอาการผิดปกติและที่ผ่านการตรวจเมล็ดโดยตรงแล้วมาวางบนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจสอบเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

-วิธีดูการเข้าทำลายเซลล์พืชด้วยวิธีการย้อมสีเชื้อรา นำเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดมาเพาะบนกระดาษกรองเมื่อข้าวโพดเริ่มงอกเฉือนบริเวณยอดอ่อนบางๆแล้วนำมาย้อมสีตามวิธีการของ Shinha และคณะ(1982)

6. การบันทึกข้อมูล

ประเมินการเกิดโรคบนใบข้าวโพด ดังนี้

คะแนน 1 ใบไม่แสดงอาการโรค

คะแนน 2 ใบแสดงอาการโรค 1-25% ของพื้นที่ใบ

คะแนน 3 ใบแสดงอาการโรค 26-50% ของพื้นที่ใบ

คะแนน 4 ใบแสดงอาการโรค 51-75% ของพื้นที่ใบ

คะแนน 5 ใบแสดงอาการโรค 76-100% ของพื้นที่ใบ
ตรวจสอบเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 1.2.16 การจำแนกชนิดของรากสกุล *Phyllosticta* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ขั้นตอนที่ 1 การจำแนกชนิดของรา *Phyllosticta* โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพืช

เก็บตัวอย่างโรคพืช ได้แก่ ใบ ดอก ผล กิ่ง ลำต้น และราก จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์ วันที่เก็บ ผู้เก็บ และแบ่งตัวอย่างโรคพืชมาอัดทับตัวอย่างแห้ง จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช

ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 5-10 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใย หรือ 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 ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar หรือ water agar บ่มที่อุณหภูมิ 32$\pm$2 องศาเซลเซียส นาน 3-7 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

3. ศึกษาลักษณะของเชื้อบนอาหารชนิดต่าง ๆ

นำรา *Phyllosticta* ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar, Oat meal agar หรือ water agar โดยบันทึกลักษณะต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

บันทึกอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารชนิดต่าง ๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกสีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment)

4. การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- ศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อรา โดยการ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscope)

5. เก็บรักษาสายพันธุ์ราและตัวอย่างแห้ง

เก็บรักษาราที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์ โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

6. การพิสูจน์การเกิดโรค

ทำการพิสูจน์การเกิดโรค โดยทำการปลูกเชื้อส่วนของพืช โดยทำแผลและไม่ทำแผล อย่างละ 10 ซ้ำ เปรียบเทียบกับการเกิดโรคบนส่วนที่ไม่ปลูกเชื้อด้วยวิธีเดียวกัน แยกเชื้อสาเหตุจากต้นที่แสดงอาการโรค เปรียบเทียบชนิดของราสาเหตุโรคใช้ในการปลูกเชื้อ

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของรา *Phyllosticta*

1. การเตรียมรา *Phyllosticta*

เลี้ยงรา *Phyllosticta* บนอาหาร MEA (Malt extract agar) นาน 7-10 วัน หลังจาก นั้นใช้เข็มเขี่ยเอาเส้นใยของรามาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB (Potato dextrose broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน flask 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 7 วัน หลังจากนั้นนำราในอาหารเหลวมากรองด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ และทำให้แห้งด้วยการดูดอากาศออกด้วยเครื่องดูดสัญญากาศ เก็บเส้นใยราที่แห้งด้วยหลอดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาสกัด DNA

2. การสกัด DNA จากรา

นำรา *Phyllosticta* อย่างน้อย 5 genera 5 species อย่างละ 4 isolates ที่เก็บรักษาไว้ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาสกัด DNA โดยใช้วิธีของ Crous และคณะ (2000)

3. การเพิ่มปริมาณยีน Internal Transcribed Spacer โดยใช้เทคนิค PCR

นำ DNA ของราที่แยกได้ในข้อ 13.2.3 มาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5'TTTCCGTA GGTGAACCTGC3') และ ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC)

- สังเคราะห์คู่ primer ITS1 และ ITS4 เพื่อทำการเพิ่มปริมาณของ rDNA ในช่วง ITS1-5.8S rDNA-ITS2-26SrDNA

- นำ DNA ของราทั้งหมดในข้อ 13.2.3 มาเพิ่มปริมาณของ rDNA ในช่วง ITS1-5.8S rDNA-ITS2-26SrDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ด้วยวิธี PCR ประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

10X PCR buffer	6 ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	3 ไมโครลิตร
10 mM dNTP	1 ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS1 (50 พิโคโมล / ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS4 (50 พิโคโมล / ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
Taq DNA Polymerase (5 ยูนิต / ไมโครลิตร)	0.25 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	28.75 ไมโครลิตร
สารละลาย DNA (50 นาโนกรัม / ไมโครลิตร)	10 ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	50 ไมโครลิตร

- ส่วนของ β-tubulin นั้นเพิ่มปริมาณโดยใช้คู่ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b นำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA โดยมีรอบการทำปฏิกิริยา (Slippers *et al.,* 2004) ดังนี้

94 องศาเซลเซียส	5 นาที		1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	1 นาที	50 วินาที	30 รอบ
52 องศาเซลเซียส	2 นาที		
72 องศาเซลเซียส	1 นาที		
72 องศาเซลเซียส	5 นาที		1 รอบ
4 องศาเซลเซียส	hold		

4. การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน ITS1-5.8SrDNA-ITS2-26SrDNA

นำผลผลิตที่ได้จากข้อ 13.2.3 มาตรวจวิเคราะห์ผลด้วย electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 0.5XTBE buffer โดยตัดแถบ DNA ที่เป็นยีนเป้าหมาย ภายใต้ UV transilluminator โดยใช้วิธีของ Slippers และคณะ (2004)

5. การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาศึกษาทั้งหมด

การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาศึกษาทั้งหมดไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ในช่วงลำดับเบส 15 ITS rDNA และ 15 β-tubulin ซึ่งเป็นราในกลุ่ม *Botryosphaeria* โดยนำมาเปรียบเทียบวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการวิวัฒนาการด้วย PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) version 4.0b8 โดย Swofford (2000)

การทดลองที่ 1.2.17 การจำแนกกลุ่ม Race ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. l*ycopersici* ในประเทศไทย

1. การสำรวจ รวบรวมและเก็บตัวอย่างโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ

สำรวจและรวบรวมต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการโรคเหี่ยวเหลืองจากแปลงเกษตรกร นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ บันทึกระดับการเกิดโรคในต้นที่พบโรค และระดับความเสียหายที่เกิดขึ้นในแต่ละพื้นที่ที่พบโรค

2. การแยกเชื้อ *Fusarium* จากพืชที่เป็นโรค

2.1 การแยกเชื้อรา *Fusarium* ด้วยวิธีการ tissue transplanting method : ตัดชิ้นส่วนพืชระหว่างส่วนเป็นโรคและส่วนปกติ หรือบริเวณท่อน้ำท่ออาหารของลำต้นและส่วนโคนของพืชที่แสดงอาการโรคเหี่ยว หรือ บริเวณผลที่มีอาการเน่า ให้มีขนาด 3 x 3 มม. ทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวของชิ้นส่วนพืชด้วย chlorox 10% นาน 3-4 นาที แล้วแต่ขนาดของชิ้นส่วน ย้ายลงวางบนอาหาร WA บ่มเชื้อ 24-36 ชั่วโมง ที่ 28 °ซ. เมื่อเส้นใยเจริญออกมา ทำการแยกเชื้อลงบนอาหาร เลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

2.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยการใช้ single–spore technique : เขี่ยกลุ่มสปอร์ลงใน vial ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทำสปอร์แขวนลอยให้มีปริมาณสปอร์ประมาณ 10 สปอร์ ต่อ 1 loop ภายใต้ objective กำลังขยายต่ำ ใช้ห่วงลวด (loop) ที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในสปอร์แขวนลอย แล้วลาก (streak) ลงบนผิวหน้าของอาหาร WA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ตักสปอร์เดี่ยวที่งอก มาเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม

3. การจำแนกชนิด

ทำการศึกษาลักษณะของสัณฐานวิทยา ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และจำแนกตามวิธีการของ Nelson และคณะ (1983) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

– ศึกษาลักษณะการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *Fusarium* และศึกษาการสร้าง pigment, sclerotium และ sporodochium ในอาหาร PDA

– บันทึกลักษณะและวัดขนาดของ conidium, conidiophore บนอาหาร CLA อายุ 10-14 วัน ที่อุณหภูมิ 26-28 °ซ. ภายใต้แสง NUV

– ทำ slide culture เพื่อศึกษาลักษณะของ sporogenous cell, phialide, microconidium, macroconidium

4. การทดสอบการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity test)

4.1. เลี้ยงเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*ไอโซเลตต่าง ๆ บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4.2. เตรียมสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีปริมาณสปอร์เท่ากับ 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร

4.3. จุ่มรากของต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดา อายุ20 วัน ในสปอร์แขวนลอย (root dip) ของเชื้อราไอโซเลทต่าง ๆ เป็นเวลานาน 20 นาที โดยประยุกต์ตามวิธีการของ Rowe (1980), Windels (1992) และ Marlatt และคณะ (1996)

4.4. นำต้นกล้ามะเขือเทศไปปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 นิ้ว จำนวน 4 ต้น / กระถาง เชื้อราไอโซเลทละ 5 กระถาง ตรวจสอบความรุนแรงในการเกิดโรค 20 วันหลังจากปลูกเชื้อ โดยกำหนดระดับความรุนแรงของโรคเป็น 5 ระดับดังนี้

1 = ไม่แสดงอาการของโรค

2 = ใบซีดและเหี่ยวเล็กน้อย, ต้นแคระแกร็น

3 = ใบซีดมากและเหี่ยว, ต้นแคระแกร็น

4 = ใบเหลอือง เหี่ยวมาก, ต้นแคระแกร็น

5 = ต้นมะเขือเทศตาย

ถ้าระดับความรุนแรงมากกว่า 2.5 แสดงว่าพันธุ์มะเขือเทศนั้นอ่อนแอต่อเชื้อ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Marlatt และคณะ 1996)

4.5. วิเคราะห์ผลการเกิดโรค ทางสถิติ

5. การศึกษาเพื่อบ่งชี้ race ของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ที่รวบรวมได้โดยใช้ชุดพันธุ์พืชตรวจสอบ (differential cultivars)

5.1 เลี้ยงเชื้อราไอโซเลทต่าง ๆ บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

5.2 เตรียมสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับให้มีปริมาณสปอร์เท่ากับ 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร

5.3 จุ่มต้นกล้ามะเขือเทศที่เป็นพันธุ์พืชอาศัยตรวจสอบ race (differential cultivars) เป็นเวลา 20 นาที ตามวิธีการของ Grattidge (1982) และ Marlatt และคณะ (1996) ในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา นำต้นกล้ามะเขือเทศไปปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 นิ้ว จำนวน 4 ต้น /กระถาง เชื้อราไอโซเลทละ 5 กระถาง ตรวจสอบความรุนแรงในการเกิดโรค 20 วันหลังจากปลูกเชื้อโดยกำหนดระดับความรุนแรงของโรคเป็น 5 ระดับดังนี้

1 = ไม่แสดงอาการของโรค

2 = ใบซีดและเหี่ยวเล็กน้อย, ต้นแคระแกร็น

3 = ใบซีดมากและเหี่ยว, ต้นแคระแกร็น

4 = ใบเหลือง เหี่ยวมาก, ต้นแคระแกร็น

5 = ต้นมะเขือเทศตาย

ถ้าระดับความรุนแรงมากกว่า 2.5 แสดงว่าพันธุ์มะเขือเทศนั้นอ่อนแอต่อเชื้อ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Marlatt และคณะ 1996)

การทดลองที่ 1.2.18 อนุกรมวิธานและพืชอาศัยของรา *Stemphylium* และ *Alternaria* สาเหตุโรคพืช

1. เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืช

เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการเป็นโรคซึ่งคาดว่าเกิดจากราสกุล *Stemphylium* หรือ *Alternaria* จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย โดยเลือกเก็บส่วนของพืชที่แสดงอาการของโรค ได้แก่ ใบ ดอก ผล กิ่ง และลำต้น ห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก พร้อมแนบกระดาษบันทึกรายละเอียด ชื่อพืช สถานที่เก็บ วันที่เก็บ และลักษณะอาการของโรค บรรจุห่อตัวอย่างโรคพืชลงในกล่องเก็บความเย็น เพื่อนำมาจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการ

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของราสกุล *Stemphylium* และ *Alternaria*

2.1 ศึกษาลักษณะอาการของโรคและเชื้อสาเหตุโรคโดยตรงจากพืช

ศึกษาลักษณะอาการของโรคและเชื้อสาเหตุโรคโดยตรงจากพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน เมื่อพบราสร้างเส้นใยหรือ conidium นำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เข็มเขี่ยส่วนของราวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืช (cross section)ให้บาง ๆ และนำมาตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope ถ่ายรูปและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

2.2 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 แยกราให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2.3 พิสูจน์โรคตามวิธีการ Koch's postulate

นำรา *Stemphylium* spp. และ *Alternaria* spp. บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน จากนั้นใช้ cork boror ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดวุ้นอาหารบริเวณส่วนปลายเส้นใยของรา นำไปปลูกเชื้อบนพืชชนิดเดิม สำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบปลูกเชื้อด้วยชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่ปราศจากเชื้อสาเหตุโรค เมื่อพืชเป็นโรคนำส่วนที่แสดงอาการเป็นโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ตรวจดู เพื่อยืนยันเชื้อสาเหตุโรคอีกครั้ง

2.4 ศึกษาลักษณะของรา

- นำราที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA
- ศึกษา และบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนี รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment)
- ศึกษาและบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราได้แก่ รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย conidia conidiophore และโครงสร้างอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope และถ่ายภาพ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของขนาดโครงสร้างต่างๆของราที่วัดขนาดไว้

2.5 จำแนกชนิดราสกุล *Stemphylium* และ *Alternaria* สาเหตุโรคพืช

โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา *Stemphylium* spp. และ *Alternaria* spp. ที่ศึกษากับเอกสารการจัดจำแนกราสกุล *Stemphylium* และ *Alternaria*

3. เก็บรักษาสายพันธุ์รา

ราที่แยกได้เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

4. จัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืช

ตัวอย่างโรคพืชที่เก็บมาได้ ส่วนหนึ่งนำมาจัดทำตัวอย่างแห้ง โดยตัดส่วนของพืชบริเวณที่แสดงอาการโรค วางบนกระดาษฟาง พร้อมแนบกระดาษบันทึกข้อมูลพืช แล้วปิดทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ อัดทับด้วยแผงไม้อัดตัวอย่างโรคพืช นำไปวางผึ่งลม ไม่ให้ถูกแดด เปลี่ยนกระดาษทุกวัน จนกระทั่งตัวอย่างพืชแห้ง จึงนำมาเก็บในถุงกระดาษ สำหรับเก็บตัวอย่างแห้ง พร้อมลงรายละเอียดข้อมูลตัวอย่างตามระบบสากล (Anonymous, 2005) ได้แก่ ชื่อพืช ลักษณะอาการโรค สถานที่เก็บ ชนิดของราสาเหตุโรคพืช วันที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ และชื่อผู้จัดจำแนกชนิดรา เป็นต้น แล้วส่งเก็บในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

5. ศึกษาพืชอาศัยของรา *Stemphylium* sp. และ *Alternaria* sp.

5.1 เตรียมพืชทดสอบ

ปลูกพืชทดสอบชนิดต่างๆ ในกระถาง ในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง รดน้ำตามปกติ พืชที่ใช้ทดสอบ เป็นพืชซึ่งพบปลูกในบริเวณเดียวกัน หรือใกล้เคียง กับพืชที่พบโรคที่เกิดจากราสกุล*Stemphylium* หรือ *Alternaria* เช่น พืชในวงศ์ Solanaceae ได้แก่ มะเขือยาว พริก และยาสูบ เป็นต้น วงศ์ Leguminosae ได้แก่ ถั่วฝักยาว ถั่วลิสง และถั่วเหลือง วงศ์ Cucurbitaceae ได้แก่ ฟักทอง แตงกวา และแตงเทศ วงศ์ Umbelliferae ได้แก่ แครอท คื่นฉ่าย และผักกาดหัว วงศ์ Cruciferae ได้แก่ ผักกาดหอม คะน้า และผักกาดเขียวปลี วงศ์ Liliaceae ได้แก่ หอม และกระเทียม และวัชพืชในแปลงปลูก เป็นต้น

5.2 เตรียมรา *Stemphylium* sp. และ *Alternaria* sp.

เตรียม conidial suspension ของแต่ละเชื้อโดย นำรา *Stemphylium* sp. หรือ *Alternaria* sp. แต่ละเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร V-8 juice agar ในจานเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้น ล้างสปอร์บนผิวหน้าอาหารด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำมารวมกันในฟาล์ค เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 100 ครั้งต่อนาที นาน 20 นาที เพื่อให้ conidia กระจายออกจากกันโดยสม่ำเสมอ แล้วตรวจนับ conidia ด้วย haemacytometer เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^5 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

5.3 ทดสอบพืชอาศัย

โดยพ่น conidial suspension ของรา *Stemphylium* sp.หรือ *Alternaria* sp. ที่เตรียมไว้ บนพืชทดสอบชนิดต่างๆ ซึ่งมีกรรมวิธีพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ รดน้ำตามปกติ และ ตรวจบันทึกการ

เกิดโรคทุกวัน เมื่อพืชเป็นโรคนำส่วนที่แสดงอาการโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ตรวจดู เพื่อยืนยันเชื้อสาเหตุโรคอีกครั้ง

กิจกรรมย่อยที่ 3 อนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศวิทยาของวัชพืช

การทดลองที่ 1.3.1 ชีววิทยาและ การแพร่กระจายของวัชพืชสกุลผักแว่น (*Marsilea* L.) และศักยภาพการเป็นวัชพืชของผักแว่นต่างถิ่น

1. **สำรวจผักแว่น** ตามสภาพนิเวศน์ที่เหมาะสม คือแหล่งน้ำ หรือที่ชื้นแฉะ ศึกษาสภาพพื้นที่ ลักษณะสปอโรคาร์ป และเก็บตัวอย่างสด นำมาปลูกเพื่อศึกษารายละเอียดเพิ่มเติม ที่กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร

2. **การตรวจสอบชนิด** เนื่องจากพืชในสกุลนี้จะมีลักษณะของสปอโรคาร์ปแตกต่างกัน เช่น ตำแหน่ง รูปร่าง จำนวน เป็นต้น ดังนั้น หากไม่สามารถระบุชนิดได้ทันที ต้องนำมาปลูกและรอจนกว่าพืชจะสร้างสปอโรคาร์ป จึงทำการเก็บพืชที่มีการสร้างสปอโรคาร์ปแล้วมาจัดทำตัวอย่างแห้ง และตรวจสอบชนิดต่อไป

3. ชีววิทยาของพืชสกุลผักแว่น รวบรวมตัวอย่างผักแว่นทุกชนิดมาปลูกในกระบะ ขนาด กว้าง 1 เมตร ยาว 3 เมตร บรรจุดิน และเติมน้ำให้ดินชุ่ม สภาพน้ำท่วมขัง เมื่อผักแว่นทุกชนิดเจริญเติบโตดีแล้ว เลือกยอดที่สมบูรณ์แต่ละชนิด จำนวน 20 ยอด ความยาว 45 เซนติเมตร นำแต่ละยอดมาตรวจนับจำนวนใบและชั่งน้ำหนักสด ของแต่ยอด แล้วนำไปปลูกในกระถางปูน ขนาด 35x45x15 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุดิน ¾ ส่วนของความสูงกระถาง ใส่น้ำจนเต็ม กระถางละ 1 ยอด ชนิดละ 20 กระถาง รักษาระดับน้ำให้เต็ม สุ่มเก็บผักแว่นแต่ละชนิด 2 กระถาง ทุก 14 วัน จำนวน 6 ครั้ง (3 เดือน) ล้างดินออก นำตัวอย่างไปวัดความยาว จำนวนแขนง จำนวนใบ พื้นที่ใบ น้ำหนักสด และนำไปอบที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน นำมาชั่งน้ำหนักแห้ง

4. ความสามารถในการแข่งขันของผักแว่นไทยกับผักแว่นต่างถิ่น นำยอดผักแว่นใบมัน ผักแว่นใบมันกลายพันธุ์ ผักแว่นขน และผักแว่นวง ที่มีความยาวเท่าๆ กันมาปลูกในกระถางขนาด 35x45x15 เซนติเมตร ที่บรรจุดิน ¾ ส่วนของความสูงกระถาง ใส่น้ำจนเต็ม กระถางละ 2 ชนิด โดยมีจำนวนยอดรวม 5 ยอด โดยใช้วิธีแทนที่ บันทึกผลการทดลองหลังเริ่มการทดลองได้ 2, 4 และ 6 สัปดาห์ นำผักแว่นแต่ละคู่มาล้างดินออก นำไปแยกชนิด ชั่งน้ำหนักสด วัดความยาว จำนวนใบ และน้ำหนักแห้งของผักแว่นแต่ละชนิด ในแต่ละคู่ คู่ละ 3 ซ้ำ

5. การศึกษาศักยภาพการเป็นวัชพืชของผักแว่นต่างถิ่น โดยการประเมินตามวิธีการประเมินศักยภาพของออสเตรเลีย ซึ่งพัฒนาโดย Dr Paul Pheloung ประกอบกับข้อมูลที่สังเกตุจากเจริญเติบโตในประเทศไทย สำหรับข้อมูลที่ไม่สามารถสืบค้นได้ ทำการทดลองเพิ่มเติมได้แก่ คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิ ทำโดยนำตัวอย่างพืชแห้งของผักแว่นทุกชนิดที่พบ อบแห้งที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน นำใบแห้งมาชั่งน้ำหนัก 0.05, 0.1 0.3 และ 0.5 กรัม ใส่ลงในหลอดแก้วก้นต้น เส้นผ่านศูนย์กลาง 29 มิลลิเมตร ความสูง 130 มิลลิเมตร ที่บรรจุสารละลายวุ้น 0.3% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ระดับน้ำหนักละ 3 หลอด (3 ซ้ำ) เมื่อวุ้นชั้นล่างเย็น เติมลงไปอีก 10 มิลลิลิตร ให้ใบผักแว่นอยู่กึ่งกลางระหว่างชั้นของวุ้น เมื่อวุ้นชั้นบนเย็น นำต้นอ่อน

ไมยราบยักษ์ที่เพิ่งเริ่มงอก (มีรากโผล่ออกมา 1-2 มิลลิเมตร) วางบนวุ้นหลอดละ 6 เมล็ด ปิดปากหลอดด้วยพลาสติกใส นำไปวางในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 30 องศาเซลเซียส แสงตลอดเวลา นาน 7 วัน นำต้นอ่อนไมยราบยักษ์มาวัดความยาวรากและต้น และชั่งน้ำหนักสดโดยรวมของแต่ละหลอด นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับไมยราบยักษ์ที่เจริญเติบโตในหลอดแก้วบรรจุวุ้นที่ไม่มีใบผักแว่น

การทดลองที่ 1.3.2 ชีววิทยาและการแพร่ระบาดของหญ้าอีหนาว *Digera muricata* (L.) Mart.

1. สำรวจการแพร่กระจายของหญ้าอีหนาวในพื้นที่ต่างๆ เมื่อพบจดบันทึกพิกัด และบันทึกรายละเอียดอื่นๆ เช่น สภาพพื้นที่ ชนิดพืชข้างเคียง เป็นต้น

2. การงอกของเมล็ด เก็บรวบรวมเมล็ดแก่ของหญ้าอีหนาว นำมาทดสอบการงอกในห้องปฏิบัติการโดยการเพาะในจานแก้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร และทดสอบในเรือนทดลอง และศึกษาปัจจัยต่างๆ ต่อการงอกของหญ้าอีหนาว ดังนี้

2.1 การกระตุ้นด้วยการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เก็บเมล็ดหญ้าอีหนาวที่เก็บจากแปลงเกษตรกร เลือกสิ่งเจือปนออก คัดเลือกเฉพาะเมล็ดที่มีความสมบูรณ์ เมล็ดเต่ง ไม่เหี่ยว ขนาดใกล้เคียงกัน นำเมล็ดหญ้าอีหนาว 50 เมล็ด ใส่ในหลอดแก้วก้นตัด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 29 มิลลิเมตร สูง 130 มิลลิเมตร ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ นำไปวางในตู้อบที่ตั้งอุณหภูมิคงที่ 80 องศาเซลเซียส โดยนำไปวางตามระยะเวลาที่กำหนด และให้ทุกหลอดมีได้รับความร้อนครบตามระยะเวลาที่กำหนด 6, 5, 4, 3, 2, 1 ชั่วโมง 30, 15, 10, 5 และ 1 นาที พร้อมกัน ระยะเวลาละ 3 หลอด (3 ซ้ำ) นำเมล็ดที่อบแล้ว ใส่จานแก้ว (petri dish) (ø 9 เซนติเมตร) บรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดฝา นำไปวางในสภาพห้องที่ไม่มีการปรับอุณหภูมิและแสง ตรวจนับจำนวนเมล็ดงอกทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน

2.2 การกระตุ้นด้วยการต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6, 5, 4, 3, 2, 1 ชั่วโมง 30, 15, 10, 5 และ 1 นาที ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่นำหลอดแก้วก้นตัดไปวางในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้ และนำเมล็ดหญ้าอีหนาวใส่ในน้ำร้อนตามระยะเวลากำหนด ครั้งละ 3 หลอด (3 ซ้ำ)

2.3 กระตุ้นด้วยการแสงอาทิตย์ นำเมล็ดหญ้าอีหนาว จำนวน 100 เมล็ดใส่ในจานแก้ว นำไปตากแดด ที่ระยะเวลา 45, 30, 15, 10, 5 และ 1 วัน อย่างละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปเพาะในกระถางพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 นิ้ว ที่บรรจุดิน โดยหน้าดินอยู่ห่างจากขอบกระถางด้านบน 1 นิ้ว บันทึกการงอกทุกวัน เป็นระยะเวลานาน 1 เดือน

2.4 การงอกของหญ้าอีหนาว ในดินที่เก็บเก็บจากแปลงเกษตร ขุดดินจากแปลงเกษตรกรที่มีหญ้าอีหนาวระบาด ที่ยังไม่ได้มีการพ่นสารกำจัดวัชพืช และแปลงที่มีการพ่นสารกำจัดวัชพืชแล้ว โดยขุดในพื้นที่ 30x30 เซนติเมตร ลึกหนึ่งหน้าพั่ว แปลงละ 9 จุด แต่ละจุดแบ่งเป็น 3 ถุง เท่าๆ กัน นำดินไปโรยหน้ากระถางปูน ขนาด 35x45x15 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุดิน ¾ ส่วนของความสูงกระถาง กระถางละ 1 ถุง ตรวจนับจำนวนต้นงอกทุกสัปดาห์ เป็นเวลานาน 3 เดือน

3. การเจริญเติบโต นำเมล็ดหญ้าอีหนาวมาโรยในกระถางพลาสติก (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 เซนติเมตร) จำนวน 10 กระถาง เมื่องอกแล้ว ถอนออกและเหลือต้นที่แข็งแรงที่สุดไว้เพียงต้นเดียว บันทึกความสูงและจำนวนกิ่งก้านทุกสัปดาห์

4. ความสามารถในการสร้างหน่วยขยายพันธุ์ รวบรวมต้นหญ้าอีหนาวจากแปลงเกษตรกรในจังหวัดสระบุรี เลือกต้นที่สมบูรณ์ จำนวน 15 ต้น นำมาศึกษา บันทึกจำนวนกิ่ง จำนวนใบ ความยาว จำนวนช่อดอก จำนวนดอก จำนวนผล น้ำหนักแห้งในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิ รวบรวมส่วนเหนือดินของหญ้าอีหนาวจากแปลงเกษตรกร นำมาตากแห้งในร่มเงา นำใบอีหนาว หนัก 0 (ชุดควบคุม) 0.5, 0.1, 0.3, 0.5 และ 1.0 กรัม ใส่ในหลอดแก้วก้นตัด (ø 29 มิลลิเมตร สูง 130 มิลลิเมตร) ที่บรรจุสารละลายวุ้น 0.3% 10 มิลลิลิตร เมื่อวุ้นเย็นแล้ว เติมลงไปอีก 10 มิลลิลิตร ให้ใบหญ้าอีหนาว อยู่ระหว่างชั้นของวุ้น เมื่อวุ้นเย็นแล้ว อัตราละ 3 หลอด (3 ซ้ำ) นำเมล็ดไมยราบยักษ์ที่เริ่มงอก (มีรากโผล่มา 1-2 มิลลิเมตร) จำนวน 6 เมล็ด ใส่ด้านบน วางให้มีระยะห่างเท่าๆ กันปิดปากหลอดด้วยพลาสติกใส แล้วนำไปวางในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 30 องศาเซลเซียส แสงตลอด 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 7 วัน นำต้นอ่อนไมยราบยักษ์มาวัดความยาวต้นและราก และน้ำหนักสด นำค่าที่ได้มาคำนวนเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

6. การแข่งขันกับพืชปลูก นำเมล็ดข้าวโพดและหญ้าอีหนาวมาหว่านในกระถางปูนขนาด 100x100x60 เซนติเมตร โดยมีจำนวนต้นข้าวโพดและหญ้าอีหนาวแปรเปลี่ยน แต่มีจำนวนรวมคงที่เท่ากับ 5 ต้น จดบันทึกการเจริญเติบโตของพืชทั้งสองชนิดทุก 10 วัน จนกว่าจะเก็บเกี่ยว

การทดลองที่ 1.3.3 สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชวงศ์ผักโขม Amaranthaceae

1) กำหนดพื้นที่ สำรวจและเก็บตัวอย่างในภาคกลาง เหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ

2) เก็บตัวอย่างพืชสด และเมล็ดแก่ จดบันทึกสภาพนิเวศ และลักษณะต่างๆ ที่จำเป็น เพื่อการวิเคราะห์ชนิด

3) การตรวจวิเคราะห์ชนิดพืช ทำโดยเปรียบเทียบตัวอย่างแห้งของพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ หอพรรณไม้ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ สอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิของแต่ละวงศ์หรือสกุลของพืชนั้น ๆ ตลอดจนการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่างๆ

4) ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะเมล็ด เพื่อจัดทำคู่มือการตรวจชนิดจากเมล็ด

5) การจัดทำตัวอย่างแห้ง เก็บวัชพืชที่มีใบและดอกสมบูรณ์ ไม่ถูกแมลงทำลาย หากพืชมีขนาดเล็กควรมีราก ต้น ใบ –ดอก ครบ หากเป็นพืชไร้ดอก ควรมีส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ หรือลักษณะอื่นที่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดได้ อัดในแผงอัดพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 x30 เซนติเมตร อย่างน้อยชนิดละ 2 ตัวอย่าง เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่

– นิเวศน์ พืชอาศัย วัน-เวลา ชื่อผู้เก็บ เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

6) การเก็บตัวอย่างเมล็ดวัชพืช เก็บเมล็ดที่แก่เต็มที่ ไม่ถูกแมลงทำลาย และไม่เป็นโรค ทำความสะอาดเมล็ด ไม่มีส่วนอื่นปะปน ผึ่งแดดให้แห้ง เพื่อลดความชื้นในเมล็ด นำใส่กล่องพลาสติก ปิดให้สนิท เพื่อกันแมลงเข้าทำลาย เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช เพื่อใช้ในการตรวจสอบ สืบค้นต่อไป

การบันทึกข้อมูล

บันทึก - สถานที่ พิกัด สภาพนิเวศน์ ของแหล่งที่พบวัชพืชวงศ์ผักโขม

- ลักษณะรูปร่าง สี ผิว ขนาดเมล็ด และถ่ายภาพ

การทดลองที่ 1.3.4 สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชสกุลน้ำนมราชสีห์ *Euphorbia*

สำรวจวัชพืช ในพื้นทำการเกษตร และนอกพื้นที่ทำการเกษตร ในพื้นที่ที่สามารถเข้าถึงโดยรถยนต์หรืออยู่ในระยะที่สามารถเดินเข้าถึงได้ การสำรวจโดยเดินตามแนวตั้งฉากกับด้านยาวของแปลงอย่างน้อย 3 แนว หากเป็นแปลงขนาดใหญ่เดินตามแนวทแยงมุม จดบันทึกวัชพืชที่พบ จนกว่าจะไม่พบชนิดใหม่เพิ่มเติม สำหรับวัชพืชที่ไม่สามารถระบุชนิดได้นำตัวอย่างสดมาศึกษารายละเอียดเพิ่มเติม ที่กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร

การตรวจสอบชนิดพืชโดยการเทียบกับตัวอย่างพันธุ์ไม้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร หรือหอพรรณไม้ กรมอุทยาน พรรณพืชและสัตว์ป่า และ/หรือ ตรวจสอบกับเอกสารเกี่ยวกับวัชพืช และพืชพรรณต่างๆ เช่น Flora of Thailand, Weeds of Rice in Indonesia, Common Weeds of Malaysia, Major Weed of Thailand, Weeds in Highland of Northern Thailand, Major Weeds of the Philippines, Common Weeds in Vietnam, Weeds of Soybean Fields in Thailand, Wild Flowers of Japan, Chinese Colored Weed Illustrated Book, Weed Flora of Japan – Illustrated by Colour, Weeds in Australia, Western Weeds, Weeds เป็นต้น

การทดลองที่ 1.3.5 จำแนกชนิดวัชพืชในพืชสมุนไพร 10 พืช

วางแผนการสำรวจแบบ Unrestricted Sampling Method (Anonymous, 1982) ในแต่ละแปลงปลูกเก็บวัชพืชอย่างน้อยจำนวน 4-8 กรอบ หรือมากกว่าโดยกรอบมีขนาด 50X50 ซม. หรือ 1X1 เมตร ขึ้นอยู่กับขนาดของแปลงเพื่อให้เป็นตัวแทนของแปลงพืชปลูกสมุนไพรจำนวน 10 พืชในแหล่งปลูกของพืชสมุนไพรแต่ละชนิดทั่วประเทศไทยทั้งในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ ดำเนินงานด้วยการสุ่ม 4-8 จุดต่อหนึ่งแปลง บันทึกจำนวน ชนิด นับปริมาณวัชพืชแต่ละชนิด และหาชื่อวัชพืช บันทึกภาพ เก็บตัวอย่างวัชพืชที่สมบูรณ์ คือมีส่วนของราก ต้น ใบ และดอก อัดไว้ในแผงไม้ เพื่อ

นำมาตากแห้ง นำมาวิเคราะห์ หาชื่อที่แน่นอน (กรณีที่ยังไม่สามารถหาชื่อได้ทันที) และเก็บไว้เป็นหลักฐานอ้างอิง รวมถึงการเทียบเคียงในการตรวจวิเคราะห์ หาชื่อวัชพืช นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณและเขตการแพร่กระจายพันธุ์ ของวัชพืชแต่ละชนิด ทำการวิเคราะห์ ลักษณะเชิงปริมาณ (Quantitative characteristic analysis) ของวัชพืชที่สำรวจพบในแปลงเพื่อจัดลำดับวัชพืชเด่น (dominant species) และวัชพืชรอง (co-dominant species) โดยอาศัยค่าของ sum dominant ratio ซึ่งคำนวณได้จากค่า relative density และค่า relative frequency จากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{Relative density (RD)} = \frac{\text{Density for a species} \times 100}{\text{Total density for all species}}$$

$$\text{Relative frequency(RF)} = \frac{\text{Frequency value for a species} \times 100}{\text{Total frequency value for all species}}$$

$$\text{Sum dominant ratio (SDR)} = \frac{\text{RD} + \text{RF}}{2}$$

-การบันทึกข้อมูล

การเก็บข้อมูล จำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ ให้ถูกต้องตามหลักสากล บันทึกชนิดและปริมาณของวัชพืช หาค่า RD, RF, SDR ระยะเจริญเติบโตของพืชสมุนไพร

การทดลองที่ 1.3.6 ศึกษาชนิดวัชพืชที่เป็นพืชอาศัยของเพลี้ยแป้งสกุล *Phenacoccus*

1. สำรวจแปลงมันสำปะหลังที่มีการระบาดของเพลี้ยแป้ง จำนวน 100 แปลง ใน 20 จังหวัด ได้แก่

ภาคเหนือตอนล่าง นครสวรรค์ กำแพงเพชร พิษณุโลก

ภาคกลาง ลพบุรี สระบุรี ฉะเชิงเทรา สระแก้ว อุทัยธานี ปราจีนบุรี กาญจนบุรี

ภาคตะวันออก ชลบุรี ระยอง จันทบุรี

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นครราชสีมา เลย มหาสารคาม บุรีรัมย์ ร้อยเอ็ด ยโสธร กาฬสินธุ์

2. แต่ละแปลง บันทึกชนิดวัชพืชและจำนวนเพลี้ยแป้งที่พบบนต้นวัชพืชในพื้นที่ 0.5x0.5 เมตร จำนวน 20 quadrats โดยให้แต่ละจุดห่างกันประมาณ 20 เมตร เดินสุ่มเป็นรูปตัว W (Thomas, 1985)

3. บันทึกค่า GPS ของแต่ละ quadrat เพื่อสะดวกในการติดตามครั้งต่อไป

4. นับจำนวนและจำแนกชนิดวัชพืช เพื่อหาความหนาแน่นของวัชพืชในแต่ละแปลง

5. สุ่มนับตัวอ่อน ตัวเต็มวัย และ ถุงไข่ของเพลี้ยแป้งบนต้นมันสำปะหลังใน 20 จุดที่สุ่มนับบนต้นวัชพืช

6. หาความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของวัชพืชและการระบาดเพลี้ยแป้ง

การทดลองที่ 1.3.7 ชีววิทยาและการแพร่กระจายของดาดตะกั่ว

1. ศึกษาความงอกและการเจริญเติบโตของดาดตะกั่ว

-แบบและวิธีการทดลอง และวิธีปฏิบัติการทดลอง คัดเลือกเมล็ดดาดตะกั่วที่สมบูรณ์ วางแผนการทดลองแบบ CRD แบ่งเมล็ดออก 9 ชุด ชุดแรกนำมาเพาะทันทีหลังจากเก็บจากธรรมชาติ และส่วนชุดที่เหลือเก็บไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องนำมาเพาะเดือนละครั้งเป็นเวลา 8 เดือน เพาะใน 4 สภาพ คือ ได้รับแสงแดดธรรมชาติ และในที่มืด บนดิน บนกาบมะพร้าว ใช้เมล็ดดาดตะกั่วหน่วยทดลองละ 50 เมล็ด แต่ละสภาพเพาะครั้งละ 20 หน่วยทดลอง

-การบันทึกข้อมูล เมื่อเมล็ดดาดตะกั่วงอก บันทึกความงอกของเมล็ดหลังจากปลูก 2 และ 3 สัปดาห์ สำหรับการเพาะในดินและในกาบมะพร้าวถอนให้เหลือต้นที่แข็งแรง 10 ต้น เพื่อบันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต

1.2. **ศึกษาการเจริญเติบโตของดาดตะกั่ว**

-แบบและวิธีการทดลอง

1.2.1.ผิวดิน คัดเลือกพื้นที่ที่มีดาดตะกั่วขึ้นหนาแน่น สุ่ม 3 จุดพื้นที่ขนาด 50x50 เซนติเมตร

1.2.2.วัสดุปลูก (กาบมะพร้าว) คัดเลือกกระถางกล้วยไม้ที่มีต้นดาดตะกั่วขึ้นหนาแน่น จำนวน 30 กระถาง

-วิธีปฏิบัติการทดลอง สุ่มต้นดาดตะกั่วที่เป็นตัวแทนออกมาจุดละ 20 ต้น บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต ได้แก่ ความสูงต้น ขนาดใบ ความยาวกิ่ง จำนวนกิ่ง จำนวนช่อดอก ช่อดอกย่อย จำนวนฝัก จำนวนเมล็ด จำนวนรากและความยาวราก

2. ศึกษาความสามารถในการงอกของเมล็ดดาดตะกั่ว

-แบบและวิธีการทดลอง -

ปลูกดาดตะกั่วที่ระดับความลึกต่างๆจากผิวดิน 0, 1, 2, 3 และ 4 เซนติเมตร แต่ละกรรมวิธีใช้เมล็ด 100 เมล็ดต่อแปลงย่อย ระดับความลึกละ 10 ซ้ำ

ระดับผิวดิน

-วิธีปฏิบัติการทดลอง เตรียมดินบริเวณทางเดินและใต้โต๊ะกล้วยไม้โดยขุดดิน แปลงย่อยขนาด 30x30 เซนติเมตร ความลึกต่างๆ กันดังภาพ โรยเมล็ดดาดตะกั่วที่คัดเลือกแต่เมล็ดที่สมบูรณ์นับเตรียมไว้สำหรับแต่ละแปลงย่อย แล้วกลบดินให้เสมอระดับผิวหน้าดิน รดน้ำทันทีหลังปลูก หลังจากนั้นแปลงทดลองจะได้รับนำจากการรดน้ำกล้วยไม้ตามปกติ บันทึกความงอกของต้นดาดตะกั่วทุกสัปดาห์ นาน 4 สัปดาห์ และเก็บเกี่ยวต้นดาดตะกั่วทั้งแปลงย่อยบันทึกจำนวนต้นและน้ำหนักต้นสดทั้งหมด (จำเป็นต้องเก็บเกี่ยวทั้งแปลงย่อยเนื่องจากต้นดาดตะกั่วงอกทะยอยงอกทำให้ขนาดต้นคละกันสุ่มให้ได้ต้นที่สม่ำเสมอยาก)

3. **การศึกษาความสามารถในการแพร่กระจายของเมล็ดดาดตะกั่ว**

-แบบและวิธีการทดลอง

ทดลอง 2 ปัจจัย ปัจจัยสภาพแวดล้อมของเมล็ด มี 4 ระดับ คือ เมล็ดที่อยู่ในที่แห้ง, เมล็ดที่อยู่บนผิวดินใต้น้ำ, เมล็ดที่ฝังอยู่ในดินใต้น้ำ และ เมล็ดที่ลอยอยู่ในน้ำ และ และปัจจัยระยะเวลา มี 4 ระดับ เริ่มทดลองจากเมล็ดอายุ 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์หลังสุกแก่ แต่ละหน่วยทดลอง (1 ห่อ) ใช้เมล็ด 100 เมล็ด กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ

-วิธีปฏิบัติการทดลอง รวบรวมเมล็ดดาดตะกั่วที่สุกแก่พร้อมกัน (เมล็ดที่ดีดออกจากฝักในวันที่เก็บมาจากต้น) คัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์นับ 100 เมล็ดห่อด้วยผ้าไนล่อน มัดด้วยเชือกเอ็น ปล่อยปลายเชือกยาว จำนวน 160 ห่อ เริ่มการทดลองที่ 1 สัปดาห์หลังสุกแก่ โดยนำห่อเมล็ดที่เตรียมไว้ไปวางตามสภาพที่กำหนดในพื้นที่เดียวกันสภาพละ 10 ห่อ คือ สภาพเมล็ดที่อยู่ในที่แห้งผูกห่อเมล็ดติดกับกะบะกล้วยไม้ สภาพเมล็ดที่อยู่บนผิวดินใต้น้ำใช้หลักไม้ยึดให้ห่อเมล็ดวางอยู่บนผิวดิน สภาพเมล็ดที่ฝังอยู่ในดินใต้น้ำขุดดินใต้น้ำฝังกลบห่อเมล็ดยึดติดไว้กับหลักไม้ และสภาพเมล็ดที่ลอยอยู่ในน้ำผูกห่อเมล็ดปล่อยเชือกยาวให้ลอยน้ำยึดไว้กับหลัก และทำเช่นเดียวกันที่ 2, 3 และ 4 สัปดาห์หลังสุกแก่ เมื่อเมล็ดมีอายุ 80 วันหลังสุกแก่ นำห่อเมล็ดทั้งหมดขึ้นมาล้างห่อทำความสะอาดแล้วเพาะเมล็ด ห่อละ 1 จานแก้ว นับจำนวนต้นที่งอกเพื่อวัดผลการทดลอง

4. **การศึกษาความสามารถในการขยายพันธุ์โดยกำจัดต้นดาดตะกั่วอายุต่างๆ กัน**

-แบบและวิธีการทดลอง กำจัดต้นดาดตะกั่วขนาดอายุต่างๆ คือ ระยะใบจริง 2 คู่, ระยะใบจริง 3 คู่, ระยะเริ่มออกดอก และ ระยะออกดอกติดเมล็ด แต่ละอายุใช้ต้นดาดตะกั่ว 50 ต้น ทำการทดลอง 2 ชุด คือ ชุดที่ขึ้นในดิน และชุดที่ขึ้นในวัสดุปลูก (กาบมะพร้าว)

-วิธีปฏิบัติการทดลอง ใช้ต้นดาดตะกั่วที่ขึ้นในแปลงกล้วยไม้ คัดเลือกต้นตามขนาดอายุที่กำหนด แต่ละขนาดอายุใช้ต้น 50 ต้น เริ่มการทดลองโดยทำการกำจัดดาดตะกั่วด้วยมือ ปักป้ายที่แตกต่างกันกำกับ (ใช้หลอดกาแฟสีต่างๆ ประกอบกับป้ายพลาสติก และยางวงระบุตำแหน่งและอายุทีกำจัดต้นดาดตะกั่วออก) ที่ 30 วันหลังกำจัดเก็บเกี่ยวต้นดาดตะกั่ว วัดการเจริญเติบโต ผลการทดลองดูจากค่าเฉลี่ยที่แตกจากตอเดิม

การทดลองที่ 1.3.8 ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของสาบม่วง (Praxelis); *Praxelis clematidea* R.M King & H. Rob.

ขั้นตอนที่ 1 การแพร่กระจายของสาบม่วง

แผนการทดลอง (Experimental Design) แบบสุ่มโดยวิธี Unrestricted sampling method

กรรมวิธี (Treatment) การทดลองมี 2 กรรมวิธี คือ การสำรวจ และรวบรวมชนิดวัชพืช

วิธีสุ่มตัวอย่างวัชพืช

ในการสำรวจนั้นใช้กรอบสี่เหลี่ยม (Quadrat) ขนาด 0.5×0.5 เมตร วางแปลงสุ่มโดยวิธี Unrestricted sampling method (Anonymous, 1982) ทำการสุ่ม 4 จุดต่อหนึ่งแปลง บันทึกจำนวนชนิด นับปริมาณวัชพืชแต่ละชนิด และหาชื่อวัชพืช บันทึกภาพ ส่วนการวิเคราะห์ลักษณะเชิงปริมาณ (Quantitative characteristic) ของวัชพืชที่สำรวจพบในแปลงเพื่อจัดลำดับวัชพืชเด่น (dominant species) และวัชพืชรอง (co-dominant species) นั้นได้อาศัยค่าของ sum dominance ratio ซึ่งคำนวณได้จากค่า relative density และค่า relative frequency

วิธีการการสำรวจ

สำรวจการระบาดของสาบม่วงในแปลงปลูกสับปะรด ยางพารา และมันสำปะหลังในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคตะวันออก จำนวนละ 50 แปลง โดยสุ่มนับสาบม่วง จำนวน 4 จุดๆ ละ 0.25 ตารางเมตร เพื่อเก็บข้อมูลความหนาแน่น และจดบันทึกข้อมูลพิกัด GPS สภาพพื้นที่ ชนิดดิน

การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) ตำแหน่งที่พบสาบม่วง บันทึกสภาพพื้นที่ / นิเวศน์ ชนิดพืชปลูก อายุพืชปลูก ลักษณะการระบาด และข้อมูลอื่นๆ

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาวงจรชีวิตและการเจริญเติบโตของสาบม่วงในดินชนิดต่างๆ

นำเมล็ดสาบม่วง มาเพาะทดสอบความงอกในห้องปฏิบัติการ และปลูกในโรงเรือน ใช้เมล็ดสาบม่วง จำนวน 50 เมล็ดต่อกระถาง ปลูกในกระถางที่บรรจุดินชนิดต่างๆ ได้แก่ ดินร่วน ดินทราย ดินเหนียวและดินลูกรัง ชนิดละ 27 กระถาง เพื่อดูเปอร์เซ็นต์ความงอก การเจริญเติบโตและวงจรชีวิตของสาบม่วง

การเก็บข้อมูล ในโรงเรือน นำเมล็ดสาบม่วงมาเพาะ และเก็บข้อมูล เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด วัดความสูง นับจำนวนใบ ระยะการออกดอก จำนวนวนดอก การติดเมล็ด จำนวนเมล็ดต่อดอก จำนวนเมล็ดต่อต้น น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งต่อต้น พร้อมกับบันทึกภาพช่วงระยะการเจริญเติบโตในระยะต่างๆ

ขั้นตอนที่ 3 ทดสอบความงอกของเมล็ดสาบม่วงในสภาพมีแสงและไม่มีแสง

ในการทดสอบความงอกนาเมล็ดสาบม่วง ที่เก็บจากจังหวัดกาฬสินธุ์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความงอกดีที่สุด โดยนำเมล็ดสาบม่วงเพาะลงบนกระดาษเพาะที่มีความชื้น จำนวน 50 เมล็ดต่อจานเพาะทำทั้งหมด 5 ซ้ำ วางไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิภายใต้สภาพมีแสงและไม่มีแสง ทำการนับจำนวนต้นที่งอกทุก 3, 5, 7 และ 14 วัน

การทดลองที่ 1.3.10 สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชวงศ์หญ้างวงช้าง Boraginaceae

1) การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

- กำหนดพื้นที่สำรวจ วางแผนการสำรวจเก็บตัวอย่าง แบบการสืบพบ (detection survey) โดยมีพืชในวงศ์หญ้างวงช้างเป็นพืชเป้าหมาย ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม

- เก็บตัวอย่างพืชทุกชนิดที่มีลักษณะตรงหรือคล้ายคลึงตามลักษณะเด่นของพืชวงศ์หญ้างวงช้าง เช่น ช่อดอกม้วนแบบก้นหอย ใบเป็นใบเดี่ยว ออกสลับหรือเกือบตรงข้าม นำมาปลูกที่กลุ่มวิจัยวัชพืช เพื่อตรวจสอบชนิด รวบรวมเมล็ด และอีกส่วนนำมาจัดทำตัวอย่างแห้ง

2) **การตรวจสอบชนิดพืช** เทียบนำตัวอย่างพืชที่สำรวจพบ กับตัวอย่างพืชในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช พิพิธภัณฑ์พืชของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ ของแต่ละวงศ์หรือสกุลของพืชนั้น ๆ ตลอดจนการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่างๆ

3) การศึกษาลักษณะเมล็ด รวบรวมเมล็ดที่แก่จัดจากพื้นที่สำรวจ หรือหากไม่สามารถเก็บเมล็ดจากพื้นที่สำรวจได้ นำตัวอย่างสดมาปลูก ณ เรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช นำเมล็ดเหล่านั้นมาศึกษา ขนาด รูปร่าง

สี และลักษณะผิวเมล็ด ด้วยแว่นขยาย หรือกล้องกำลังขยายต่ำ ของแต่ละชนิด บันทึกภาพลักษณะเมล็ด นำมาเปรียบเทียบลักษณะของแต่ละชนิด เพื่อการจัดทำคู่มือ สำหรับการจำแนกต่อไป

4) การเก็บตัวอย่างเมล็ดวัชพืชเพื่อการสืบค้น เก็บผลที่แก่เต็มที่ เลือกเมล็ดที่ไม่ถูกแมลงทำลาย และไม่เป็นโรค ทำความสะอาดเมล็ด ไม่มีส่วนอื่นปะปน ผึ่งแดดให้แห้ง เพื่อลดความชื้นในเมล็ด นำใส่กล่องพลาสติกใส ปิดให้สนิท เพื่อกันแมลงเข้าทำลาย ปิดป้ายระบุชนิด วงศ์ วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ผู้เก็บ ให้เรียบร้อย เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5) การจัดทำตัวอย่างแห้ง เก็บวัชพืชที่มีใบและดอกสมบูรณ์ ไม่ถูกแมลงทำลาย หากพืชมีขนาดเล็ก ควรมีราก ต้น ใบ –ดอก ครบ หากไม่พบดอก ควรมีส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ หรือลักษณะอื่นที่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดได้ อัดในแผงอัดพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 x30 เซนติเมตร อย่างน้อยชนิดละ 2 ตัวอย่าง เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่ – นิเวศน์ พืชอาศัย วัน-เวลา ชื่อผู้เก็บ เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

- **การบันทึกข้อมูล**

ข้อมูลภาคสนาม : สถานที่หรือพิกัดภูมิศาสตร์ สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูก ชนิดลักษณะวัชพืช วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ และข้อมูลอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบชนิด

ข้อมูลในห้องปฏิบัติการ : ขนาด รูปร่าง สี ลักษณะผิวเมล็ด และภาพเมล็ด

นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบลักษณะที่สามารถใช้ระบุชนิดจากเมล็ดและจัดทำคู่มือ

การทดลองที่ 1.3.11 สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชสกุลลูกใต้ใบ *Phyllanthus* L.

1) การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

- กำหนดพื้นที่สำรวจ วางแผนการสำรวจเก็บตัวอย่าง แบบการสืบพบ (detection survey) โดยมีพืชสกุลลูกใต้ใบ เป็นพืชเป้าหมาย ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม

- สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชทุกชนิดที่มีลักษณะของพืชสกุลลูกใต้ใบ ตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย นำมาปลูกที่กลุ่มวิจัยวัชพืช เพื่อตรวจสอบชนิด และจัดทำตัวอย่างแห้ง

2) การตรวจสอบชนิดพืช โดยเทียบตัวอย่างพืชในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช พิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิน สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ ของแต่ละวงศ์หรือสกุลของพืชนั้น ๆ ตลอดจนการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่างๆ

3.) การศึกษาลักษณะเมล็ด รวบรวมเมล็ดที่แก่จัดจากพื้นที่ หรือต้นที่นำมาปลูก ณ เรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช ศึกษาลักษณะ รูปร่าง สี และลักษณะผิวเมล็ด ด้วยแว่นขยาย หรือกล้องกำลังขยายต่ำ ของแต่ละชนิด บันทึกภาพลักษณะเมล็ด นำมาเปรียบเทียบลักษณะของแต่ละชนิด เพื่อการจัดทำคู่มือ สำหรับจำแนกต่อไป

4) การเก็บตัวอย่างเมล็ดวัชพืชเพื่อ เก็บผลที่แก่เต็มที่ เลือกเมล็ดที่ไม่ถูกแมลงทำลาย และไม่เป็นโรค ทำความสะอาดเมล็ด ไม่ให้มีส่วนอื่นปะปน ผึ่งแดดให้แห้ง เพื่อลดความชื้นในเมล็ด นำใส่กล่องพลาสติกใส ปิดให้สนิท เพื่อกันแมลงเข้าทำลาย ปิดป้ายระบุชนิด วงศ์ วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ผู้เก็บ ให้เรียบร้อย เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5) การจัดทำตัวอย่างแห้ง เก็บวัชพืชที่มีใบและดอกสมบูรณ์ ไม่ถูกแมลงทำลาย หากพืชมีขนาดเล็ก ควรมีราก ต้น ใบ –ดอก ครบ หากเป็นพืชไร้ดอก ควรมีส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ หรือลักษณะอื่นที่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดได้ อัดในแผงอัดพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 x30 เซนติเมตร อย่างน้อยชนิดละ 2 ตัวอย่าง เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่ – นิเวศน์ พืชอาศัย วัน-เวลา ชื่อผู้เก็บ เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

6) การเก็บตัวอย่างเมล็ดวัชพืช เก็บเมล็ดที่แก่เต็มที่ ไม่ถูกแมลงทำลาย และไม่เป็นโรค ทำความสะอาดเมล็ด ไม่มีส่วนอื่นปะปน ผึ่งแดดให้แห้ง เพื่อลดความชื้นในเมล็ด นำใส่กล่องพลาสติก ปิดให้สนิท เพื่อกันแมลงเข้าทำลาย เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช เพื่อใช้ในการตรวจสอบ สืบค้นต่อไป

- การบันทึกข้อมูล

ข้อมูลภาคสนาม : สถานที่หรือพิกัดภูมิศาสตร์สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูก ชนิดลักษณะวัชพืช วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ และข้อมูลอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบชนิด

ข้อมูลในห้องปฏิบัติการ : ขนาด รูปร่าง สี ลักษณะผิวเมล็ด และภาพเมล็ด นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบลักษณะที่สามารถใช้ระบุชนิดจากเมล็ดและจัดทำคู่มือ

การทดลองที่ 1.3.12 ชีววิทยา นิเวศวิทยา และการแพร่กระจายของวัชพืชสกุลกะเม็ง *Eclipta* L.

1) การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

- กำหนดพื้นที่สำรวจ วางแผนการสำรวจเก็บตัวอย่าง แบบการสืบพบ (detection survey) โดยมีพืชสกุลกะเม็ง *Eclipta* L. เป็นพืชเป้าหมาย ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม

- สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชทุกชนิดที่มีลักษณะของพืชสกุลกะเม็ง *Eclipta* L. ตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย นำมาปลูกที่กลุ่มวิจัยวัชพืช เพื่อตรวจสอบชนิด และจัดทำตัวอย่างแห้ง

2) การตรวจสอบชนิดพืช โดยเทียบตัวอย่างพืชในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช พิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิน- สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ ของแต่ละวงศ์หรือสกุลของพืชนั้น ๆ ตลอดจนการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่างๆ

3) การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของพืชสกุลกะเม็ง รวบรวมเมล็ดจากแหล่งที่พบ หรือพืชที่นำมาปลูก (เมื่อไม่สามารถรวบรวมเมล็ดจากพื้นที่สำรวจ) และทำการศึกษา

- เปอร์เซ็นต์การงอกในห้องปฏิบัติการ โดยนำเมล็ดวัชพืชที่แก่เต็มที่และมีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 50 เมล็ด ใส่ในจานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซ็นติเมตร บรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดผา นำไปวางในห้องปฏิบัติการ สภาพอุณหภูมิ-แสง ปกติ บันทึกจำนวนเมล็ดงอกทุกวัน จนเมล็ดงอกหมด แต่ไม่เกิน 30 วัน หากงอกไม่นำมาตรวจสอบการมีชีวิตโดยการย้อมสีด้วย 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride (tetrazolium chloride straining technique)

- การเจริญเติบโต นำเมล็ดพืชมาเพาะในกระถางปูน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40 เซนติเมตร กระถางละ 50 เมล็ด ชนิดละ 15 กระถาง หลังวัชพืชงอก 1 สัปดาห์ ถอนออก ให้เหลือเฉพาะต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์ที่สุด 1, 3 และ 5 ต้น/กระถาง โดยแต่ละต้นมีระยะห่างกันพอประมาณ บันทึกความสูง/ความยาวต้น จำนวนแขนง ทุกสัปดาห์ วันที่ออกดอก ระยะเวลาที่พัฒนาจากดอกเป็นผล ผลแก่ จำนวนผลต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อผล

- การขยายพันธุ์ ตรวจสอบความสามารถขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดและส่วนของต้น ในสภาพเรือนทดลอง

- คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิเบื้องต้น ใช้ใบสด/ใบแห้ง ของพืชในสกุลกะเม็ง *Eclipta* L. ทดสอบฤทธิ์ทางอัลลิโลพาธิในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Sandwich method ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ไมยราบยักษ์เป็นพืชทดสอบ

4) การจัดทำตัวอย่างแห้ง เก็บวัชพืชที่มีใบและดอกสมบูรณ์ ไม่ถูกแมลงทำลาย หากพืชมีขนาดเล็กควรมีราก ต้น ใบ –ดอก ครบ หากไม่พบดอก ควรมีส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ หรือลักษณะอื่นที่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดได้ อัดในแผงอัดพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 x30 เซนติเมตร อย่างน้อยชนิดละ 2 ตัวอย่าง เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่ – นิเวศน์พืชอาศัย วัน-เวลา ชื่อผู้เก็บ เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

-การบันทึกข้อมูล

ข้อมูลภาคสนาม : สถานที่หรือพิกัดภูมิศาสตร์ สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูก ลักษณะวัชพืช วัน/เดือน/ปีที่เก็บ และข้อมูลอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบชนิด

ข้อมูลในห้องปฏิบัติการ/เรือนทดลอง การงอก การเจริญเติบโต (ความยาวต้น จำนวนแขนง) การสร้างดอก เมล็ด

นำข้อมูลที่ได้คำนวนอัตราการงอก อัตราการเจริญเติบโต ความสามารถในการสร้างหน่วยขยายพันธุ์ คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิ เปรียบเทียบกันทุกชนิดในสกุลกะเม็ง *Eclipta* L.

นำข้อมูลสถานที่หรือพิกัดที่ได้จากการสำรวจ จัดทำแผนที่การระบาด/การแพร่กระจาย

การทดลองที่ 1.3.13 ชีววิทยา นิเวศวิทยา และการแพร่กระจายผักเบี้ยเล็ก (*Portulaca quadrifida* L.)

1) การสำรวจเพื่อศึกษาการแพร่กระจาย สำรวจการแพร่กระจายของผักเบี้ยเล็กในจังหวัดต่างๆ โดยใช้วิธีการสำรวจแบบสืบพบ (detection survey) โดยมีผักเบี้ยเล็กเป็นพืชเป้าหมาย บันทึกสถานที่ พิกัด สภาพนิเวศน์ พืชปลูก บริเวณที่พบผักเบี้ยเล็ก นำค่าพิกัดที่พบผักเบี้ยเล็กมาจัดทำแผนที่การระบาด

2) ศึกษาการงอกจากเมล็ด เก็บเมล็ดผักเบี้ยเล็ก คัดแยกเมล็ดที่แก่และสมบรูณ์ แบ่งเมล็ดออกเป็น 2 ส่วน เพื่อความงอกของเมล็ด โดยศึกษาดังนี้

2.1) การงอกในห้องปฏิบัติการ

2.1.1) ผลของระยะเวลาการได้รับแสงต่อการงอก

-วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

- กรรมวิธีที่ 1 สภาพเมล็ดได้รับแสงตลอด 24 ชั่วโมง
- กรรมวิธีที่ 2 สภาพเมล็ดได้รับความมืดตลอด 24 ชั่วโมง
- กรรมวิธีที่ 3 สภาพเมล็ดได้รับแสงสลับกลางวัน/กลางคืน 12 ชั่วโมง
- กรรมวิธีที่ 4 สภาพห้องปฏิบัติการ (อุณหภูมิและแสงตามธรรมชาติ)

-วิธีการปฏิบัติการทดลอง

รวบรวมเมล็ดผักเบี้ยเล็กจากแปลงเกษตรกรหรือที่พบตามธรรมชาติ เลือกเมล็ดที่สมบูรณ์และแก่ เพาะในจานแก้วที่ใส่กระดาษกรอง 1 แผ่น จานใส่เมล็ด 100 เมล็ด ใส่น้ำกลั่นจานละ 5 มิลลิลิตร นำไปวางในสภาพที่กำหนด 4 สภาพ คือ ได้รับแสงตลอด 24 ชั่วโมง สภาพมืดตลอด 24 ชั่วโมง สภาพได้รับแสงสลับกลางวัน/กลางคืน และสภาพห้องปฏิบัติการ สภาพละ 5 ซ้ำ บันทึกจำนวนเมล็ดงอกหลังเริ่มทดลองทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน

2.1.2) การงอกของผักเบี้ยเล็ก หลังจากเก็บไว้เป็นระยะเวลาต่างๆ กัน รวบรวมเมล็ดผักเบี้ยเล็กจากแปลงเกษตรกรหรือที่พบตามธรรมชาติ เลือกเมล็ดที่สมบูรณ์และแก่ เก็บไว้ในสภาพห้องปฏิบัติการ นำมาทดสอบการงอกที่ระยะเวลาต่างๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ทันทีหลังจากเก็บจากแปลง
กรรมวิธีที่ 2 1 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
กรรมวิธีที่ 3 2 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
กรรมวิธีที่ 4 3 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
กรรมวิธีที่ 5 4 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
กรรมวิธีที่ 6 5 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
กรรมวิธีที่ 7 6 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
กรรมวิธีที่ 8 7 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
กรรมวิธีที่ 9 8 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
กรรมวิธีที่ 10 9 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ
กรรมวิธีที่ 11 10 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ

กรรมวิธีที่ 12 11 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ

กรรมวิธีที่ 13 12 เดือนหลังจากเก็บในห้องปฏิบัติการ

การเพาะทำโดย นับเมล็ดผักเบี้ยเล็ก จำนวน 100 เมล็ด ใส่จานแก้วบรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร จำนวน 5 ซ้ำ นำไปวางในสภาพที่ให้ผลการงอกดีที่สุด จากการทดลองที่ 2.1.1 บันทึกจำนวนเมล็ดงอกของเมล็ดหลังเริ่มทดลอง 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 และ 15 วัน

2.2) การงอกในสภาพเรือนทดลอง : การงอกที่ระดับความลึกต่างๆ กัน

-วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1. วางเมล็ดบนผิวดิน

กรรมวิธีที่ 2. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 2 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 3. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 4 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 4. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 6 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 5. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 8 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 6. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 10 เซนติเมตร

- วิธีการปฏิบัติการทดลอง

บรรจุดินใส่กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สูง 18 เซนติเมตร ให้ผิวดินห่างจากขอบบนของกระถาง 4, 6, 8, 10 และ 12 เซนติเมตร นำเมล็ดที่แก่และมีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด โรยลงให้ทั่วกระถาง แล้วเติมดินจนถึงระดับห่างจากขอบบนกระถาง 2 เซนติเมตร แต่ละระดับจำนวน 5 กระถาง (ซ้ำ) รดน้ำทุกวัน บันทึกจำนวนต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน

3) ศึกษาการขยายพันธุ์ด้วยลำต้น

- วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 5 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1. วางลำต้นบนผิวดิน

กรรมวิธีที่ 2. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 2 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 3. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 4 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 4. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 6 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 5. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 8 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 6. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 10 เซนติเมตร

-วิธีการปฏิบัติการทดลอง

บรรจุดินใส่กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สูง 18 เซนติเมตร ให้ผิวดินห่างจากขอบบนของกระถาง 4, 6, 8, 10 และ 12 เซนติเมตร นำลำต้นของผักเบี้ยเล็กจากโคน และปลายยอด ตัดเป็นท่อนๆ ให้มีความยาว 2 เซนติเมตร ส่วนละ 20 ท่อนต่อกระถาง วางลงให้ทั่วกระถาง แล้วเติมดินจนถึงระดับห่างจากขอบบนกระถาง 2 เซนติเมตร แต่ละระดับจำนวน 5 กระถาง (ซ้ำ) รดน้ำทุกวัน บันทึกจำนวนต้นอ่อนที่งอกจากลำต้นทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน

4) การเจริญเติบโตและวงจรชีวิต ทำการศึกษาในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40 ซม. สูง 45 ซม. จำนวน 40 กระถาง กระถางละ 50 เมล็ด เมื่อเมล็ดงอกถอนให้เหลือต้นที่แข็งแรงไว้กระถางละ 1 ต้น บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต คือ ความสูงหรือความยาวต้น จำนวนใบ จำนวนกิ่งแขนง น้ำหนักสดและแห้ง จำนวนวันที่ออกดอก จำนวนดอก ผลและจำนวนเมล็ด เป็นต้น ทุกสัปดาห์ละ 1 ครั้ง จำนวน 15 สัปดาห์

การทดลองที่ 1.3.14 สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชวงศ์หญ้า Poaceae

1) การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

- กำหนดพื้นที่สำรวจ วางแผนการสำรวจเก็บตัวอย่าง แบบการสืบพบ (detection survey) โดยมีวัชพืชในวงศ์หญ้า Poaceae เป็นพืชเป้าหมาย ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม

- เก็บตัวอย่างพืชทุกชนิดที่มีลักษณะเด่นของพืชวงศ์หญ้า เช่น ลำต้นตรง มีข้อ ปล้องชัดเจน แผ่นใบเป็นแถบยาว นำมาปลูกที่กลุ่มวิจัยวัชพืช เพื่อตรวจสอบชนิด รวบรวมเมล็ด และอีกส่วนนำมาจัดทำตัวอย่างแห้ง

2) การตรวจสอบชนิดพืช นำตัวอย่างพืชที่สำรวจพบ ไปเทียบกับตัวอย่างพืชในพิพิธภัณฑ์พืช กรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช พิพิธภัณฑ์พืชของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ ของแต่ละวงศ์หรือสกุลของพืชนั้น ๆ ตลอดจนการตรวจสอบกับเอกสาร คู่มือต่างๆ เช่น Flora of China, Flora of Pakistan เป็นต้น

3) การศึกษาลักษณะเมล็ด รวบรวมเมล็ดที่แก่จัดจากพื้นที่ หรือต้นที่นำมาปลูก ณ เรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช ศึกษา ขนาด รูปร่าง สี และลักษณะผิวเมล็ด ด้วยแว่นขยาย หรือกล้องกำลังขยายต่ำ ของแต่ละชนิด บันทึกภาพลักษณะเมล็ด นำมาเปรียบเทียบลักษณะของแต่ละชนิด เพื่อการจัดทำคู่มือ สำหรับการจำแนกต่อไป

4) การเก็บตัวอย่างเมล็ดวัชพืชเพื่อการสืบค้น เก็บผลที่แก่เต็มที่ เลือกเมล็ดที่ไม่ถูกแมลงทำลายและไม่เป็นโรค ทำความสะอาดเมล็ด ไม่มีส่วนอื่นปะปน ผึ่งแดดให้แห้ง เพื่อลดความชื้นในเมล็ด นำใส่กล่องพลาสติกใส ปิดให้สนิท เพื่อกันแมลงเข้าทำลาย ปิดป้ายระบุชนิด วงศ์ วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ผู้เก็บ ให้เรียบร้อย เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5) การจัดทำตัวอย่างแห้ง เก็บวัชพืชที่มีใบและดอกสมบูรณ์ ไม่ถูกแมลงทำลาย หากพืชมีขนาดเล็กควรมีราก ต้น ใบ –ดอก ครบ หากไม่พบดอก ควรมีส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ หรือลักษณะอื่นที่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดได้ อัดในแผงอัดพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 x30 เซนติเมตร อย่างน้อยชนิดละ 2 ตัวอย่าง เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่ – นิเวศน์ พืชอาศัย วัน-เวลา ชื่อผู้เก็บ เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

6) การบันทึกข้อมูล

(1) ข้อมูลภาคสนาม : สถานที่หรือพิกัดภูมิศาสตร์สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูก ชนิดลักษณะวัชพืช วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ และข้อมูลอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบชนิด

(2) ข้อมูลในห้องปฏิบัติการ บันทึกขนาด รูปร่าง สีผิว ลักษณะผิว หรืออื่นๆ ที่จำเป็นสำหรับการระบุชนิด

การทดลองที่ 1.3.15 ชีววิทยา นิเวศวิทยา และการแพร่กระจายของวัชพืชสกุล *Boerhavia* L.

1) การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

- กำหนดพื้นที่ วางแผนการสำรวจเก็บตัวอย่าง แบบการสืบพบ (detection survey) โดยมีพืชสกุล *Boerhavia* L. เป็นพืชเป้าหมาย ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม

- สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชทุกชนิดที่มีลักษณะของพืชสกุล *Boerhavia* L. ตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย นำมาปลูกที่กลุ่มวิจัยวัชพืช เพื่อตรวจสอบชนิด และจัดทำตัวอย่างแห้ง

2) การตรวจสอบชนิดพืช โดยเทียบกับตัวอย่างพืชในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช พิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิน สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ ของแต่ละวงศ์หรือสกุลของพืชนั้น ๆ ตลอดจนการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่างๆ

3) การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของพืชสกุล *Boerhavia* L. รวบรวมเมล็ดจากแหล่งที่พบ หรือพืชที่นำมาปลูก (เมื่อไม่สามารถรวบรวมเมล็ดจากพื้นที่สำรวจ) เลือกเฉพาะเมล็ดที่แก่และมีลักษณะสมบูรณ์ เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

- **การงอกในห้องปฏิบัติการ** โดยนำเมล็ดวัชพืชที่แก่เต็มที่และมีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 50 เมล็ด ใส่ในจานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซ็นติเมตร บรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น จำนวน 10 จานสำหรับพืชแต่ละชนิด และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดผา นำไปวางในห้องปฏิบัติการ สภาพอุณหภูมิ-แสง ปกติ บันทึกจำนวนเมล็ดงอกทุกวัน จนเมล็ดงอกหมด แต่ไม่เกิน 30 วัน หากงอกไม่นำมาตรวจสอบการมีชีวิตโดยการย้อมสีด้วย 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride (tetrazolium chloride straining technique)

- **การงอกในสภาพเรือนทดลอง** นำเมล็ดวัชพืชที่แก่และมีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 50 เมล็ด โรยหน้าผิวดิน ที่บรรจุในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์ 20 เซนติเมตร สูง 18 เซนติเมตร ที่บรรจุดินจนถึงระดับห่างจากขอบกระถางด้านบน 2-3 เซนติเมตร จำนวนชนิดละ 10 กระถาง รดน้ำทุกวัน บันทึกจำนวนต้นงอกทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน

- **การเจริญเติบโต** นำเมล็ดพืชมาเพาะในกระถางปูน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40 เซนติเมตร กระถางละ 50 เมล็ด ชนิดละ 15 กระถาง หลังวัชพืชงอก 1 สัปดาห์ ถอนออก ให้เหลือเฉพาะต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์ที่สุด 1, 3 และ 5 ต้น/กระถาง โดยแต่ละต้นมีระยะห่างกันพอประมาณ บันทึกความสูง/

ความยาวต้น จำนวนแขนง ทุกสัปดาห์ วันที่ออกดอก ระยะเวลาที่พัฒนาจากดอกเป็นผล ผลแก่ จำนวนผลต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อผล

- **การขยายพันธุ์ด้วยส่วนของลำต้น** ตรวจสอบความสามารถด้วยส่วนของลำต้น ในสภาพเรือนทดลอง โดยตัดส่วนของต้นจากโคน และจากยอด ให้มีความยาวประมาณ 5 เซนติเมตร ส่วนละ 50 ท่อน ต่อชนิด นำมาปักในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์ 20 เซนติเมตร สูง 18 เซนติเมตร ที่บรรจุดินจนถึงระดับห่างจากขอบกระถางด้านบน 2-3 เซนติเมตร จำนวนชนิดละ 10 ท่อนต่อกระถาง บรรจุในถุงพลาสติก รดน้ำทุกวัน เพื่อรักษาความชื้นในถุง ตรวจนับต้นที่สามารถสร้างใบใหม่ขึ้นมาได้ทุกสัปดาห์ นาน 1 เดือน

- **คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิ** (Allelopathy) เบื้องต้น ใช้ใบสด/ใบแห้ง ของพืชในสกุล *Boerhavial* L. ทดสอบฤทธิ์ทางอัลลิโลพาธิในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Sandwich method ในห้องปฏิบัติการ และใช้ไมยราบยักษ์เป็นพืชทดสอบ วางหลอดทดลองในตู้ควบคุมอุณหภูมิแสง วัดความยาวรากไมยราบยักษ์ หลังทดลอง 7 วัน

4) การจัดทำตัวอย่างแห้ง เก็บวัชพืชที่มีใบและดอกสมบูรณ์ ไม่ถูกแมลงทำลาย หากพืชมีขนาดเล็กควรมีราก ต้น ใบ –ดอก ครบ หากไม่พบดอก ควรมีส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ หรือลักษณะอื่นที่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดได้ อัดในแผงอัดพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 x30 เซนติเมตร อย่างน้อยชนิดละ 2 ตัวอย่าง เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่ – นิเวศน์ พืชอาศัย วัน-เวลา ชื่อผู้เก็บ เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

-การบันทึกข้อมูล

- ข้อมูลภาคสนาม : สถานที่หรือพิกัดภูมิศาสตร์ สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูก ชนิดลักษณะวัชพืช วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ และข้อมูลอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบชนิด

- ข้อมูลในห้องปฏิบัติการ/เรือนทดลอง การงอก การเจริญเติบโต (ความยาวต้น จำนวนแขนง) การสร้างดอก เมล็ด

- นำข้อมูลที่ได้คำนวนอัตราการงอก อัตราการเจริญเติบโต ความสามารถในการสร้างหน่วยขยายพันธุ์ คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิ เปรียบเทียบกันทุกชนิดในสกุล *Boerhavia* L.

- นำข้อมูลสถานที่หรือพิกัดที่ได้จากการสำรวจ ทำแผนที่การระบาด/การแพร่กระจาย

การทดลองที่ 1.3.16 ชีววิทยา การแพร่ระบาด และการจัดการวัชพืชวงศ์ทานตะวันสองชนิด : หญ้าหน้าแมว และทานตะวันหนู

1) การสำรวจและเก็บตัวอย่าง กำหนดพื้นที่ วางแผนการสำรวจเก็บตัวอย่าง แบบการสืบพบ (Detection survey) โดยมีหญ้าหน้าแมว และทานตะวันหนู เป็นพืชเป้าหมาย ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย บันทึกข้อมูลพื้นที่ พิกัด พืชปลูก สภาพนิเวศ

2) การตรวจสอบชนิดพืช โดยเทียบตัวอย่างพืชในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช พิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิน สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ ของแต่ละวงศ์หรือสกุลของพืชนั้น ๆ ตลอดจนการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่างๆ

3) การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของหญ้าหน้าแมว และทานตะวันหนู รวบรวมเมล็ดจากแหล่งที่พบ หรือพืชที่นำมาปลูก (เมื่อไม่สามารถรวบรวมเมล็ดจากพื้นที่สำรวจ) และทำการศึกษา

- **การงอกในห้องปฏิบัติการ** โดยนำเมล็ดวัชพืชที่แก่เต็มที่และมีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 50 เมล็ด ใส่ในจานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซ็นติเมตร บรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดผา นำไปวางในห้องปฏิบัติการ สภาพอุณหภูมิ-แสง ปกติ บันทึกจำนวนเมล็ดงอกทุกวัน จนเมล็ดงอกหมด แต่ไม่เกิน 30 วัน หากไม่งอกนำมาตรวจสอบการมีชีวิตโดยการย้อมสีด้วย 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride (tetrazolium chloride straining technique) เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ด

- **การงอกในสภาพเรือนทดลอง** นำเมล็ดวัชพืชที่แก่และมีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 50 เมล็ด โรยหน้าผิวดิน ที่บรรจุในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์ 20 เซนติเมตร สูง 18 เซนติเมตร ที่บรรจุดินจนถึงระดับห่างจากขอบกระถางด้านบน 2-3 เซนติเมตร จำนวนชนิดละ 10 กระถาง รดน้ำทุกวัน บันทึกจำนวนต้นงอกทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน

- **การเจริญเติบโต** นำเมล็ดพืชมาเพาะในกระถางปูน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40 เซนติเมตร กระถางละ 50 เมล็ด จำนวน 15 กระถาง หลังวัชพืชงอก 1 สัปดาห์ ถอนออก ให้เหลือเฉพาะต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์ที่สุด 1, 3 และ 5 ต้น/กระถาง ความหนาแน่นละ 5 กระถาง บันทึกความสูง/ความยาวต้น จำนวนแขนง ทุกสัปดาห์ วันที่ออกดอก ระยะเวลาที่พัฒนาจากดอกเป็นผล ผลแก่ จำนวนผลต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อผล

- **การขยายพันธุ์** ตรวจสอบความสามารถด้วยส่วนของลำต้น ในสภาพเรือนทดลอง โดยตัดส่วนของต้นจากโคน และจากยอด ให้มีความยาวประมาณ 5 เซนติเมตร ส่วนละ 50 ท่อน ต่อชนิด นำมาปักในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์ 20 เซนติเมตร สูง 18 เซนติเมตร ที่บรรจุดินจนถึงระดับห่างจากขอบกระถางด้านบน 2-3 เซนติเมตร จำนวนชนิดละ 10 ท่อนต่อกระถาง บรรจุในถุงพลาสติก รดน้ำทุกวัน เพื่อรักษาความชื้นในถุง ตรวจนับต้นที่สามารถสร้างใบใหม่ขึ้นมาได้ทุกสัปดาห์ นาน 1 เดือน

- **คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิเบื้องต้น** ใช้ใบสด/ใบแห้ง ของหญ้าหน้าแมว และทานตะวันหนู ทดสอบฤทธิ์ทางอัลลิโลพาธิในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Sandwich method ในห้องปฏิบัติการ และใช้ไมยราบยักษ์เป็นพืชทดสอบ วางหลอดทดลองในตู้ควบคุมอุณหภูมิแสง วัดความยาวรากไมยราบยักษ์ หลังทดลอง 7 วัน

4) การจัดทำตัวอย่างแห้ง เก็บวัชพืชที่มีใบและดอกสมบูรณ์ ไม่ถูกแมลงทำลาย หากพืชมีขนาดเล็กควรมีราก ต้น ใบ –ดอก ครบ หากไม่พบดอก ควรมีส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ หรือลักษณะอื่นที่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดได้ อัดในแผงอัดพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 x30 เซนติเมตร อย่างน้อยชนิดละ 2 ตัวอย่าง เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่

– นิเวศน์ พืชอาศัย วัน-เวลา ชื่อผู้เก็บ เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

-การบันทึกข้อมูล

ข้อมูลภาคสนาม : สถานที่หรือพิกัดภูมิศาสตร์สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูก ชนิดลักษณะวัชพืช วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ และข้อมูลอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบชนิด

ข้อมูลในห้องปฏิบัติการ/เรือนทดลอง การงอก การเจริญเติบโต (ความสูงต้น จำนวนแขนง) การสร้างดอก เมล็ด

นำข้อมูลที่ได้คำนวนอัตราการงอก อัตราการเจริญเติบโต ความสามารถในการสร้างหน่วยขยายพันธุ์ คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิ

นำข้อมูลสถานที่หรือพิกัดที่ได้จากการสำรวจ ทำแผนที่การระบาด/การแพร่กระจาย

การทดลองที่ 1.3.17 ศึกษาชนิดวัชพืชต่างถิ่นในพื้นที่เกษตรที่สูงภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ

1) ตรวจสอบ สืบค้น ข้อมูล เอกสาร งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชนิดพืชในพื้นที่เกษตรที่สูงและพื้นที่สูงในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

2) การสำรวจและเก็บตัวอย่าง กำหนดพื้นที่ วางแผนการสำรวจเก็บตัวอย่าง ในพื้นที่เกษตรที่สูงในภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ สำรวจแบบสืบพบ (Detection survey) โดยการเดินสำรวจในพื้นที่ที่สามารถเข้าถึงด้วยรถยนต์ หรืออยู่ในระยะที่เดินเข้าได้ ในพื้นที่เกษตรที่สูง ความสูงเหนือระดับน้ำทะเลเฉลี่ยมากกว่า 700 เมตรขึ้นไป เก็บตัวอย่างทุกชนิดที่ไม่เคยพบรายงานในประเทศไทย และมีรายงานเป็นวัชพืชในต่างประเทศ สำหรับชนิดที่ไม่สามารถระบุได้ขณะสำรวจ นำมาปลูกเพื่อศึกษารายละเอียดและตรวจสอบชนิดต่อไป

3) ศึกษาคุณสมบัติการเป็นพืชทีรุกราน/วัชพืชร้ายแรง หากพบวัชพืชต่างถิ่นที่ไม่พบรายงานมาก่อน มีลักษณะแข็งแรง สมบูรร์ สามารถเจริญเติบโตได้ดี ไม่มีร่องรอยถูกทำลายจากศัตรูธรรมชาติ และไม่ได้เป็นพืชที่ปลูกเพื่อวัตถุประสงค์ใด สำรวจเพิ่มเติมเพื่อทราบขอบเขตการระบาด และเก็บตัวอย่างสด นำมาศึกษารายละเอียดเพิ่มเติม เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นพืชที่รุกรานหรือวัชพืชร้ายแรง เช่น การเจริญเติบโต ความสามารถในการสร้างหน่วยขยายพันธุ์ การเกิดต้นใหม่จากหน่วยขยายพันธุ์ คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิ เป็นต้น

4) การตรวจสอบชนิดพืช เทียบตัวอย่างวัชพืชกับตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช พิพิธภัณฑ์พืชของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ ของแต่ละวงศ์หรือสกุลของพืชนั้นๆ ตลอดจนการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่างๆ

5) การจัดทำตัวอย่างแห้ง เก็บวัชพืชที่มีใบและดอกสมบูรณ์ ไม่ถูกแมลงทำลาย หากพืชมีขนาดเล็กควรมีราก ต้น ใบ –ดอก ครบ หากเป็นพืชไร้ดอก ควรมีส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ หรือลักษณะอื่นที่สามารถใช้

ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดได้ อัดในแผงอัดพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 x30 เซนติเมตร อย่างน้อยชนิดละ 2 ตัวอย่าง เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่ – นิเวศน์ พืชอาศัย วัน-เวลา ชื่อผู้เก็บ เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

- **การบันทึกข้อมูล**

- พื้นที่ บันทึก ที่ตั้ง พิกัดภูมิศาสตร์ และระดับความสูงเฉลี่ยเหนือระดับน้ำทะเล สภาพพื้นที่-นิเวศน์

- พืชปลูก บันทึกข้อมูล ชนิด อายุ หรือระยะพืชปลูก ความสูง การบังร่มเงาในพื้นที่

- ชนิดวัชพืชที่พบ บันทึกประเภท ลักษณะ ระยะการเจริญ การขยายพันธุ์ในพื้นที่ ความสูง ปริมาณที่พบ การกระจายในพื้นที่ และลักษณะการถูกทำลายจากศัตรูพืชอื่นในพื้นที่

กิจกรรมที่ 2 วิจัยความหลากชนิดของแมลงเพื่อเก็บ – รักษาในพิพิธภัณฑ์

การทดลองที่ 2.1 ชนิดของแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย

1) สำรวจและรวบรวมตัวอย่างแมลงจากแหล่งที่มีสภาพป่าอุดมสมบูรณ์ เช่น จากสวนพฤกษศาสตร์ สถานีวิจัย และบริเวณที่มีป่าไม้อุดมสมบูรณ์ต่างๆ ในเขตพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย โดยออกสำรวจทุกๆ 2 เดือน ในระยะเวลา 5 ปี

2) บันทึกลักษณะของพื้นที่ที่ทำการสำรวจแมลง รวมทั้งเก็บรายละเอียดเกี่ยวกับความชื้นสัมพัทธ์ อุณหภูมิ ความสูงจากระดับน้ำทะเล วันเดือนปี ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง และสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง

3) นำตัวอย่างแมลงที่รวบรวมได้ มาจัดรูปร่างและตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิดจากลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น รูปร่าง ลักษณะ ขนาด และสี เป็นต้น โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดแมลงประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ ซึ่งทำให้ทราบถึงชนิดของแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์

4) บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงโดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของแมลงแต่ละตัว โดยบันทึกรายละเอียดของแมลงชนิดต่างๆที่สำรวจพบ และข้อมูลอื่นที่สำคัญ ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่พบตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

5) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบการเก็บรักษาตัวอย่างสากล โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล

6) สรุปและจัดทำรายงานผลการวิจัย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำการวิจัยต่อไป

การทดลองที่ 2.2 ความหลากชนิดของแมลงปออันดับโอโดนาทา (Odonata) ในภาคเหนือของประเทศไทย

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงปอโดยในปี 2553-2556 สำรวจในเขตภาคเหนือตอนบน (เชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง ลำพูน แพร่) และในปี 2557-2558 สำรวจในเขตภาคเหนือตอนล่าง (สุโขทัย ตาก กำแพงเพชร) สำรวจและเก็บตัวอย่างแมลงปอทุกๆ 2 เดือน เดินสำรวจแมลงปอ โดยเฉพาะบริเวณใกล้แหล่งน้ำในพื้นที่เกษตรกรรม ที่ราบเชิงเขา พื้นที่ราบลุ่มน้ำ พื้นที่ป่าต้นน้ำลำธาร พื้นที่ภูเขา ถ่ายภาพและเก็บตัวอย่าง โดยใช้สวิงช้อนตัวอ่อนในแหล่งน้ำ เก็บรักษาในหลอดบรรจุแอลกอฮอล์ 80% และใช้สวิงโฉบตัวเต็มวัยและในขวดฆ่าที่บรรจุสารเอทิลอะซิเตท หลังจากแมลงปอตายต้องจัดส่วนหางซึ่งมีลักษณะผอมเรียวบางและหักง่ายให้มีสภาพคงเดิม โดยใช้เส้นขนที่มีความแข็ง (ขนหมูหรือขนหางม้า) แทงผ่านจากส่วนอกไปยังส่วนท้องแต่ไม่ให้สุดปลายส่วนท้อง เพราะอวัยวะสืบพันธุ์เป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการวิเคราะห์จะเสียหาย เก็บตัวเต็มวัยในซองกระดาษรูปสามเหลี่ยม บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น รูปร่าง ลักษณะ ขนาด สี วันเดือนปี ชื่อผู้เก็บ สภาพแวดล้อม อุณหภูมิ และพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) เป็นต้น นำแมลงปอที่รวบรวมไปจัดรูปร่าง (set) ตามวิธีการของ Poonchaisri (2004) และนำมาศึกษาชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2) ตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดของแมลงปอ ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์

3) บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของขวดดองตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

4) จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุล และชนิดของแมลงปอ ที่รวบรวมได้
พร้อมภาพประกอบ

5) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง

-การบันทึกข้อมูล

พืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย สถานที่ วันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง

การทดลองที่ 2.3 ความหลากชนิดของตั๊กแตนหนวดสั้นวงศ์ Acrididae ในพื้นที่ภาคใต้ ของประเทศไทย

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างตั๊กแตนหนวดสั้นวงศ์ Arcrididae จากพื้นต่างๆ เช่น พื้นที่เพาะปลูกทางการเกษตร ทุ่งหญ้า ป่าเขา ทางภาคใต้ของประเทศไทย

2) เก็บตัวอย่างโดยใช้สวิงจับแมลง (insect net) โฉบ เพื่อเก็บตัวอย่างตั๊กแตนหนวดสั้นในช่วงเวลากลางวัน และติดตั้งกับดักแสงไฟ (light trap) เพื่อดึงดูดตั๊กแตนหนวดสั้นที่ออกหากินตอนกลางคืน ฆ่าตัวเต็มวัยในขวดฆ่า (killing jar) ซึ่งใส่สารฆ่าแมลงเอทิลอะซิเตท หลังจากตั๊กแตนตายแล้ว ห่อในกระดาษห่อแบบท๊อฟฟี่ บันทึกรายละเอียดเกี่ยวกับตัวอย่างแมลง ได้แก่ พืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง วัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างใส่กล่องกระดาษ เก็บรวมไว้ในกล่องรักษาความ

เย็นเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเน่า ตัวอ่อนที่ต้องการเลี้ยงให้เป็นตัวเต็มวัยนำใส่กล่องพลาสติกพร้อมใส่พืชอาหาร บันทึกรายละเอียดเช่นเดียวกับตัวเต็มวัย รวมทั้งบันทึกโดยการถ่ายภาพ นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ นอกจากการเก็บตัวอย่างตั๊กแตนจากสภาพธรรมชาติแล้ว มีตัวอย่างตั๊กแตนที่มีอยู่เดิมในพิพิธภัณฑ์ กรมวิชาการเกษตร ตัวอย่างที่ได้รับจากนักวิชาการ และตัวอย่างจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

3) ตัวเต็มวัยที่ตายแล้วนำไปจัดรูปร่างบนไม้จัดรูปร่างตัวอย่างแมลง โดยใช้เข็มไร้สนิม ปักที่กึ่งกลางบริเวณอก ใช้ปากคีบจัดขาทั้ง 3 คู่ ให้อยู่ในลักษณะเกาะหรือเดินโดยใช้เข็มหมุดขนาดกลางเป็นตัวยึด นำไปอบให้แห้งในตู้อบ (oven) ปรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15-30 วัน ขึ้นกับขนาดตัวอย่าง

4) นำตัวอย่างตั๊กแตนหนวดสั้นที่รวบรวมได้มาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาดลำตัว รูปร่าง ลักษณะและสี เป็นต้น โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดตั๊กแตนหนวดสั้นวงศ์ Arcrididae ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ ของกรมวิชาการเกษตร

5) ตัวอย่างตั๊กแตนที่มีการจัดจำแนกแล้ว ให้จัดเก็บลงในกล่องกระดาษสี่เหลี่ยมสีขาว จัดเรียงตามอักษรของลำดับชนิด นำจัดเข้าลิ้นชักในตู้เก็บแมลงจัดเก็บแมลงในพิพิธภัณฑ์

การทดลองที่ 2.4 ความหลากชนิดของมดในพื้นที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรตากและป่าธรรมชาติของจังหวัดตาก

1. สำรวจความหลากชนิดของมดจากพื้นที่ต่างๆ ทั้งพื้นที่แปลงเกษตรและป่าธรรมชาติ เพื่อให้ครอบคลุมแหล่งที่อยู่อาศัยของมด โดยจะดำเนินการเก็บตัวอย่างมดตามวิธีดังนี้

- การเก็บโดยใช้มือ เก็บมดที่อาศัยอยู่ตามต้นไม้ ไม้พื้นล่าง ไม้พุ่มหรือวัชพืช โดยใช้ปากคีบและใช้สวิงโฉบโดยจับมดใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง วิธีการนี้จะได้ตัวอย่างมดที่อาศัยตามต้นไม้หรือกลุ่มมดที่กินน้ำหวานจากแมลงที่อาศัยอยู่ตามต้นไม้ ไม้พุ่ม หรือวัชพืช

- การร่อนซากพืช ทำการร่อนซากพืชที่ปกคลุมผิวดิน เก็บซากพืชที่อยู่ในแปลงใส่ในตะแกรงร่อนที่มีถาดรองรับด้านล่างและใช้ปากคีบจับมดใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง

- การร่อนดิน โดยใช้พลั่วหรือเสียมขุดดินในแปลงนำมาร่อนในตะแกรงที่มีถาดรองรับด้านล่าง ใช้ปากคีบจับมดใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง ซึ่งการเก็บมดในวิธีนี้จะทำการเก็บหลังจากเก็บมดโดยใช้กับดักน้ำหวานแล้ว วิธีนี้เป็นการเก็บมดที่อาศัยอยู่ในดิน

- การใช้เหยื่อล่อ เช่นการใช้น้ำหวาน หรือใช้เนยแข็ง วางเป็นจุดๆ เพื่อล่อมดให้ออกมากินเหยื่อที่วางไว้ หลังจากนั้นใช้ปากคีบจับมดใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง

- การใช้กับดัก เช่น Winkler extractor โดยเก็บซากพืชที่อยู่ในพื้นที่ใส่ไว้ใน Winkler extractor และแขวนไว้ มดที่อยู่ในซากใบไม้จะหล่นลงมาในขวดตัวอย่างที่อยู่ด้านล่าง

2. การบันทึกรายละเอียดของข้อมูลแมลง ในแต่ละพื้นที่ที่ทำการสำรวจตัวอย่างจะต้องบันทึกข้อมูลดังนี้ พิกัดภูมิศาสตร์ ปริมาณน้ำฝน อุณหภูมิอากาศ ความชื้นอากาศ วัน เดือน ปี สถานที่ที่เก็บ และชื่อผู้เก็บ เพื่อนำมาใช้เป็นฐานข้อมูลในการวิเคราะห์ด้านความสัมพันธ์กับปัจจัยแวดล้อมต่างๆ

3. การบันทึกรายละเอียดของกิจกรรมทางการเกษตร เนื่องจากในศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรตาก มีแปลงทดลองและวิจัยต่างๆ ทั้งไม้ผลเมืองหนาว กาแฟ และไม้ดอกต่างๆ และการปลูกพืชเหล่านี้มักมีกิจกรรมทางการเกษตร เช่น การไถพรวน การกำจัดวัชพืช การตัดแต่งกิ่ง การใส่ปุ๋ย การใช้สารเคมีกำจัดแมลง ข้อมูลเหล่านี้จะนำมาหาความสัมพันธ์ของกิจกรรมทางการเกษตรที่ได้ดำเนินการกับจำนวนชนิดที่สำรวจพบในแปลงต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลต่อไป

4. การเตรียมตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างที่รวบรวมได้นำไปจัดรูปร่าง ใช้เข็มไร้สนิมปักที่กึ่งกลางบริเวณอกถ้าเป็นตัวขนาดใหญ่ แต่ถ้าขนาดเล็กนำติดกระดาษสามเหลี่ยมขนาดเล็ก (card point) และนำไปอบให้แห้ง

5. จำแนกชนิดมดและจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์ นำตัวอย่างมดที่จำแนกชนิดแล้วให้จัดเก็บลงในกล่องกระดาษสี่เหลี่ยมสีขาว จัดเรียงตามอักษรของลำดับ ชนิด นำจัดเข้าลิ้นชักในตู้เก็บแมลง บันทึกข้อมูลแต่ละตัวอย่างบนแผ่นป้ายบันทึกกำกับตัวอย่าแมลง (labeling specimen)

6. นำข้อมูลจำนวนชนิดมดที่ได้มาหาความสัมพันธ์กับข้อมูลกิจกรรมทางการเกษตรเพื่อประมวลผลต่อไป

การทดลองที่ 2.5 ความหลากชนิดของด้วงงวงในเขตสงวนชีวมณฑลสะแกราช

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

1) สำรวจและเก็บรวบรวมด้วงงวงในบริเวณป่าดิบแล้งและป่าเต็งรัง ทุกๆ 2 เดือน เดินสำรวจด้วงงวง ถ่ายภาพและเก็บตัวอย่าง โดยเก็บตัวอ่อนในหลอดบรรจุแอลกอฮอล์ 80 % และตัวเต็มวัยในขวดฆ่าที่บรรจุสารเอทิลอะซิเตท หลังจากด้วงตายให้เก็บตัวเต็มวัยในกระดาษรูปสามเหลี่ยมโดยห่อแบบท๊อฟฟี่ บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น รูปร่าง ลักษณะ ขนาด สี พืชอาศัย วันเดือนปี ชื่อผู้เก็บ สภาพแวดล้อม อุณหภูมิ และพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) เป็นต้น ในเวลากลางคืนจะเก็บตัวอย่างด้วงงวงจากกับดักแสงไฟ (light trap) จากนั้นนำด้วงงวงที่รวบรวมได้มาศึกษาชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2) ตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดของด้วงงวงประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์

3) บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของขวดดองตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

4) จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุล และชนิดของด้วงงวง ที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

5) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง

-การบันทึกข้อมูล

พืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย สถานที่ วันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง

กิจกกรมที่ 3 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี การวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ 3.1 การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูพืชโดยเซรุ่มวิทยา

การทดลองที่ 3.1.1 การผลิตแอนติซีรัมของไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus-1* สาเหตุโรคเหี่ยวสับปะรดโดยใช้ระบบเซลล์แบคทีเรีย

1. การเตรียมแอนติเจน

- ออกแบบไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนใน ribosome จำนวน 1 คู่ จากส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (cp gene) ของเชื้อไวรัสสาเหตุของโรคเหี่ยวสับปะรด ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับ PMWaV-1 เพื่อนำ ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอ ในกระบวนการ cloning เข้าสู่ vector
- สกัด total RNA ของเชื้อ โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (RNeasy Kit ของ QIAGEN และนำมาทำปฏิกิริยา RT-PCR เพื่อเพิ่มปริมาณของชิ้น cDNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้
- นำ PCR product ที่ได้มาเชื่อมต่อ (ligation) เข้าสู่ cloningเ/expression vector และถ่ายเข้าสู่ (transformation) เข้า *E. coli* โดยใช้ $CaCl_2$ ที่ 42°C นาน 90 วินาที และแช่บนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนบนอาหาร 2XYT ที่มี สารปฏิชีวนะผสมอยู่
- ตรวจสอบลำดับเบสและแปรรหัสเป็นโปรตีนโดยใช้ Program analysis โดยตรวจสอบโคลนด้วยเทคนิค PCR และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง จากนั้น transform เข้า competent cell ของ *E. coli* BL21 (DES 3) โดยใช้ $CaCl_2$ ที่ 42°C นาน 90 วินาที และแช่บนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที คัดเลือกโคโลนีของพลาสมิดบนอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อนำไปสังเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนต่อไป
- สังเคราะห์โปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย โดยเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DES 3) ที่มีพลาสมิดสายผสม ในอาหารเหลว 2XYT 100 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เขย่า 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น starter จากนั้นแบ่งใส่ในอาหารเหลว 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในอัตราส่วนของเชื้อ 10 % ของอาหาร เขย่าต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงเชื้อต่อโดยการเขย่าบนเครื่อง shaker และเก็บตัวอย่างเซลล์หลังการเติม IPTG ที่ 2 4 6 8 และ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นตกตะกอน ที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 2

นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 50 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่ -20 °ซ แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

- การแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์ และตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีนที่แยกได้ โดยนำแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DES 3) ที่มีพลาสมิดสายผสม หลังจากลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ที่เวลาอันเหมาะสมในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน มาปั่นตกตะกอนที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที (4°ซ) นำตะกอนมาผสมกับน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติม lysozyme เพียงเล็กน้อย และกวนให้เข้ากันจนเหนียว เก็บที่ -20 ° ซ ข้ามคืน จากนั้นนำมาเติมด้วย lysis buffer ในอัตรา 50 มิลลิลิตร/อาหารเหลว 1 ลิตร และนำมาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator แบบ probe จนกว่าเซลล์จะหายหนืดและใส แล้วนำไปปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เก็บน้ำใสไปแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column โดยเก็บเป็น fraction หลอดละ 500 ไมโครลิตร เพื่อนำไปตรวจสอบขนาดของโปรตีนว่าอยู่ใน fraction ใดด้วยด้วยเทคนิค SDS-PAGE

2. การผลิตแอนติซีรัม

โดยใช้กระต่ายเป็นสัตว์ทดลองให้สร้างแอนติบอดีผสมโปรตีนของเชื้อที่บริสุทธิ์ (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)กับ complete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 ให้เข้ากันเป็น emulsion สำหรับการฉีดกระต่ายครั้งแรก และใช้ incomplete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 สำหรับการฉีดครั้งต่อๆไปอีก 4 ครั้ง ทำการฉีดทุก 2 สัปดาห์ เริ่มทำการเจาะเลือดหลังจากการฉีดครั้งที่ 2 และดำเนินการเจาะเลือดทุก 1 สัปดาห์อีก 5 ครั้ง นำเลือดที่เจาะได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บที่ 4 °C อีก 24 ชั่วโมง รินส่วนน้ำใสมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 g นาน 10 นาที เก็บน้ำใสที่เป็นส่วนของแอนติบอดีไว้ที่ -80 °ซ จากนั้นทำการทดสอบและหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัม โดยวิธี Indirect ELISA

3. ทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัม

โดยวิธี Indirect ELISA โดยนำใบสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวและใบปกติ มาบดใน coating buffer ในอัตรา 1 กรัม : 5, 10 , 15 มิลลิลิตร หยอดน้ำคั้นพืชลงในหลุมของไมโครเพลท (microplate) 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1-2 ชั่วโมง แล้วนำไมโครเพลทมาล้างด้วย phosphate buffer saline ที่มี tween 20 ผสมอยู่ (PBS-Tween 20) 3 ครั้งๆละ 3 นาที หยอดแอนติซีรัมจากการเลือดครั้งที่ 5 ที่เจือจางใน conjugate buffer 1: 500 และ 1 : 1,000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย PBS-Tween 20 จำนวน 3 ครั้งๆละ 3 นาที แล้วหยอด Goat-Anti Rabbit อัตรา 1: 2,000 ใน conjugate buffer 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง นำเพลทมาล้างอีก 3 ครั้งใน PBS-Tween 20 แล้วหยอด p-nitrophenyl phosphatase substrate (5 มิลลิกรัม/ substrate buffer 10 มิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร และอ่านผลด้วยเครื่องอ่านอิไลซา (ELISA Reader)

4. พัฒนาระบบการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา

เปรียบเทียบชนิดของเพลท บัฟเฟอร์ที่ใช้ และซับเสตท ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการตรวจสอบหน่อสับปะรดว่ามีไวรัสติดมาหรือไม่

5 วิเคราะห์ผลพร้อมสรุปเขียนรายงาน

การทดลองที่ 3.1.1 การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus*

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างแกลดิโอลัสจากแปลงปลูกของเกษตรกร

2. แยกเชื้อไวรัสเพื่อนำเชื้อมาเตรียมสำหรับใช้ผลิตแอนติซีรัมพร้อมทั้งเตรียมพืชอาศัยของเชื้อไวรัส BYMV ไว้สำหรับปลูกเชื้อ โดยบดตัวอย่างใบแกลดิโอลัสที่เป็นโรคจำนวน 300 gm ใน blander กับ 600 ml ของ 0.5 M sodiumcitrate pH 6.5 ที่มี 5 mM EDTA และ 0.5 thioglycollic acid บดในสภาพเย็น กรองกากพืชทิ้งไปด้วยผากรอง นำน้ำคั้นผสมกับ 25% chloroform ให้เข้ากัน ตกตะกอนเอาเศษพืชออกไปด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 g นาน 10 นาท นำน้ำใสส่วนบนมาเติม polyethyleneglycol (mol.wt. 6,000) จำนวน 10% ของของเหลวโดยกวนให้เข้าก้นที่ 4oC นาน 1 ชั่วโมงแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 5,000 g นาน 30 นาท ละลายตะกอนด้วย 50 ml ของ 5 mM soidum borate buffer ที่มี 0.5 mM EDTA pH 8.0 แล้วเติม Triton X-100 ลงไป 2% ของของเหลวกวนให้เข้ากันนาน 30 นาท หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 g นาน 15 นาที นำสารละลายข้างบนมาหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วสูง เพื่อตกตะกอนไวรัสลงมาที่ความเร็ว 37,000 g นาน 1½ ชั่วโมง ละลายตะกอนด้วย 2 ml ของ 5 mM soidum borate buffer มี 0.5 mM EDTA pH 8.0 นำมาผ่านวิธีการ sucrose density gradient ที่มีน้ำตาลที่ 10-40% แล้วหมุนเหวี่ยงทที่ 24,000 g นาน 1½ ชั่วโมง ดึงแถบสีขาวของไวรัสออกจากชั้นของน้ำตาลแล้วเจือจางด้วย 5 mM soidum borate buffer มี 0.5 mM EDTA pH 8.0 นำมาตกตะกอนไวรัสด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 37,000 g นาน 2 ชั่วโมง ละลายตะกอนของไวรัส นำไปวัด spectrophotometer เพื่อคำนวณความเข้มข้นของไวรัสและตรวจสอบขนาดอนุภาคของเชื้อด้วยกลองจุลทรรศอิเลกตรอน

3. ฉีดกระต่ายและเจาะเลือดเก็บแอนติซีรัม โดยละลายเชื้อ BYMV ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant 1 ml ใหเข้ากันดี แล้วจึงฉีดเข้ากล้ามเนื้อสะโพกของกระต่ายสลับกันสัปดาห์ละข่าง 3 สัปดาห์หลังจากฉีดครั้งสุดท่ายแล่ว 20 วัน เจาะเลือดติดตอกันสัปดาหละครั้ง 6 ครั้ง วางเลือดท่อเจาะมาไดในตู่เย็นให่เม็ดเลือดแดงเกาะตัวกันเปนก่อน จึงแยกเม็ดเลือดแดงออกทิ้งไป แล่วเก็บแอนติซีรัม แบงใสหลอดขนาด 1.5 ml เก็บแอนติซีรัมไวที่–40oC

4. เตรียม IgG ของแอยติซีรัม นำแอนติซีรัม BYMV ที่เจาะครั้งที่ 2, 5 และ 7 มาสกัด IgG อย่างละ 1 ml แยกกันผสมกับ น้ำกลั่น 9 ml แลว ผสมกับ ammonium sulfate ที่อิ่มตัว 10 ml แล้วผสมให้เข้ากันดี นำไปตกตะกอนด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 oC ละลายตะกอนด้วย 4 ml ของ ½ เทา PBS แล้วใสถุง dialysis tubing เพื่อ dialyse ใน PBS 1 ลิตร นาน 3 ชั่วโมง 2 ครั้งวัดความเข้มข้นของ IgG ด่วย spectrophotometer แล้วปรับให้ IgG มีความเข้มข้นที่ OD280 = 1.4 เพื่อใหมีความเข้มข้นของโปรตีน = 1 mg/ml

5. การทดสอบคุณภาพของแอนติซีรัมด้วยวิธี NCM-ELISA ทดสอบหาค่า titer และความไวจำเพาะของ แอนติซีรัม

6. สรุปผลการดำเนินงาน

การทดลองที่ 3.1.3 การผลิตชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบไวรัส *Cucumber mosaic virus* ในพืชเศรษฐกิจ

1. การสกัด IgG ของเชื้อ CMV

โดยนำแอนติซีรัมมาผสมกับน้ำกลั่น ในอัตรา 1:9 แล้วเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวในปริมาตรเท่ากัน ปั่นเก็บตะกอนและละลายใน ½ phosphate buffer saline (PBS) dialyse นาน 24 ชั่วโมง

2. การทดสอบคุณภาพ IgG ของเชื้อ CMV อาศัยเทคนิค Dot immunobinding assay (DIBA) โดยใช้ nitrocellulose membrane และ substrate คือ fast red

3. การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง โดยนำ 1% gold chloride ที่ต้มเดือดแล้วมาเติม sodium citrate ทำให้เย็นลง แล้ววัด OD ที่ 530 นาโนเมตร ให้มีค่า = 0.5 ได้อนุภาคทองแขวนลอยในสารละลาย ขนาด 40 นาโนเมตร

4. การติดฉลาก IgG ของเชื้อ CMV ด้วยอนุภาคทอง นำ IgG ของเชื้อ CMV 2 มล. เติมลงในสารละลายทองแขวนลอย 200 มล. กวนนาน 1 ชม. แล้วเติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ปั่นเก็บตะกอน แล้วปรับให้ได้ค่า 0.5 ที่ OD 540

5. การทดสอบชนิดของ membrane ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อ CMV บนเส้น test line ทดสอบ 3-4 ชนิด ที่มีขนาดประมาณ 5-12 ไมโครเมตร

6. การประกอบเป็นชุดตรวจสอบ และทดสอบปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืช

7. ทดสอบประสิทธิภาพของความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อ CMV

8. รวบรวม วิเคราะห์ผล และเขียนรายงาน

การทดลองที่ 3.1.4 การวิจัยและพัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบเชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) subgroup *Maize dwarf mosic virus*

1. การเตรียมไวรัสที่ใช้ในการทดลองจากตัวอย่างข้าวโพดหวานที่เป็นโรคและการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส

เก็บตัวอย่างข้าวโพดหวานที่แสดงอาการใบด่างจากแปลงเกษตรกร ตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้แอนติซีรัมต่อเชื้อ SCMV เพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสในข้าวฟ่างพันธุ์ UT432B โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล เตรียมโดยบดใบข้าวโพดที่แสดงอาการด่างกับ 0.05 M potassium phosphate buffer, pH 7.2 ผสม 0.01 M Na2SO3 อัตราส่วนใบพืช 1 กรัมต่อ บัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร ผสมผง carborandum ลงไปในน้ำคั้นและนำไปทาบนใบข้าวฟ่างพันธุ์ UT432B ที่มีใบจริง 2-4 ใบ

2. การเตรียมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์

ใช้ข้าวฟ่างพันธุ์ UT432B เพิ่มปริมาณเชื้อโดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล เมื่อข้าวฟ่างแสดงอาการใบด่างชัดเจนเก็บใบมา เตรียมเชื้อให้ค่อนข้างบริสุทธิ์ ตามวิธีการดังนี้ คือ ตัดใบข้าวฟ่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ

1 x 1 เซนติเมตร น้ำหนัก 150 กรัม แช่แข็งที่ – 20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 คืน นำมาบดในเครื่องบด Blender โดยเติม 0.5 M sodium citrate buffer pH 8.0 ปริมาตร 300 มล. ที่ผสม 2-mercaptoethanol ปริมาตร 3 มล. กรองผ่านผ้าขาวบางกำจัดเศษพืช เอาแต่ส่วนน้ำคั้น ปริมาตรประมาณ 300 มล. เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 150 มล. กวนบนน้ำแข็ง นาน 45 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 rpm นาน 15 นาที เก็บน้ำใสปริมาตร 300 มล. ใส่บีกเกอร์ แล้วเติม polyethylene glycol 6000 อัตรา 5% และ triton X-100 อัตรา 1% ของปริมาตรของเหลว กวนบนน้ำแข็ง นาน 1.30 ชั่วโมง แล้วหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm นาน 15 นาที เทของเหลวทิ้ง ละลายตะกอน ด้วยสารละลาย 0.5 M Potassium phosphate buffer pH 7.5 ที่เติม 0.5M Urea ปริมาตร 100 มล.กวนในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 rpm นาน 20 นาที เก็บของเหลวที่มีไวรัส นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 40,000 rpm นาน 1.30 ชั่วโมงที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.05M Potassium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 1 มล. แล้วนำไปตรวจดูอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน

3. การผลิตแอนติบอดีของเชื้อSCMV

การผลิตแอนติบอดีของเชื้อ SCMV สาเหตุโรคใบด่างของข้าวโพด เตรียมแอนติเจนโดยการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสในข้าวฟ่าง การแยกเชื้อไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์จากข้าวฟ่างด้วยวิธีหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำสลับสูง (differential centrifugation) ได้สารละลายไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ มีความเข้มข้น 45 มก./มล. ผลิตแอนติซีรัมในกระต่ายด้วยวิธีการฉีดเข้าผิวหนัง การทดสอบไตเตอร์ด้วยวิธี ELISA พบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้มีไตเตอร์ตั้งแต่ 1: : 2,048 ถึง 1: 32,768 และมีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ SCMV สามารถนำไปใช้ตรวจไวรัส SCMV ในพืช ด้วยวิธีการต่าง ๆ ทางเซรัมวิทยา

4. ผลิตชุดตรวจสอบไวรัสวิธี GLIFT kit

4.1 การสกัด IgG ของเชื้อSCMV นำแอนติซีรั่มที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ SCMV มาแยกเฉพาะส่วนอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) ออกจากสารอื่น ๆ ในเซรุ่มนั้น โดยใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation) (Hampton el al,1990) นำ 1 มิลลิลิตรของแอนติซีรั่มผสมกับ 1 มิลลิลิตรของน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ หยด 1.3 มิลลิลิตร ของ saturated ammonium sulfate pH 7.2 ที่แช่เย็นค่อย ๆ หยดบนเครื่องกวน (stirring) ทำให้มีแอนติซีรั่ม มีความเข้มข้นของ ammonium sulfate 40% ผสมบนเครื่องกวนต่อไป 30 นาที เก็บไว้ข้ามคืนในตู้เย็น นำมาหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนค่อย ๆ ละลายตะกอนด้วย 1 มิลลิลิตร ของ Phosphate buffer Saline (PBS) (0.01 M phosphate buffer pH 7.2 และ 0.15 M NaCl) เติม 1 มิลลิลิตร น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และ 1.02 มิลลิลิตรของ saturated ammonium sulfate ทำให้แอนติซีรัมมีความเข้มข้นของ ammonium sulfate 33% ผสมบนเครื่องกวน 30 นาที ตกตะกอนที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วย 1.5 มิลลิลิตร ของ PBS นำไปทำให้ ammonium sulfate เจือจางโดย dialysis ใน PBS ที่ 40C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยมีการเปลี่ยน PBS ทุก ๆ 4 ชั่วโมง นำมากรองผ่าน filter ขนาด 0.2 ไมครอน เก็บ IgG ไว้ที่ –20oC

4.2 ทดสอบคุณภาพของ IgG โดยนำ IgG ของเชื้อSCMV ที่ได้มาวัดความเข้มข้น ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 280 นาโนเมตร เจือจางให้เชื้อมีค่า O.D. เท่ากับ 1.4 โดยใช้ครึ่งเท่าของ PBS เพื่อให้มีปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปทดสอบคุณภาพโดยการตรวจเชื้อSCMV ในตัวอย่างข้าวโพดด้วยวิธี Indirect Dot Immunobinding assay (DIBA) (Hampton el al,1990 โดยใช้ IgG ของเชื้อSCMV ที่เจือจาง 1: 500

4.3 การติดฉลาก IgG ของเชื้อSCMV ด้วยอนุภาคทอง เตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง โดยนำ 1% gold chloride ที่ต้มเดือดแล้วมาเติม sodium citrate ทำให้เย็นลง แล้ววัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 530 นาโนเมตร ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ได้อนุภาคทองแขวนลอยในสารละลาย ขนาด 40 นาโนเมตร นำ IgG ของเชื้อ SCMV 2 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายทองแขวนลอย 200 มิลลิลิตร กวนบนเครื่องกวนนาน 60 นาที แล้วเติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ปั่นเก็บตะกอน แล้วปรับให้ได้ค่า 0.5 ที่ OD 540

4.4 การทดสอบชนิดของ membrane ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อ SCMV บนเส้น test line ทดสอบ 3-4 ชนิด ที่มีขนาดประมาณ 5-12 ไมโครเมตร

4.5 การประกอบเป็นชุดตรวจสอบ และทดสอบปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืช (sap)

4.6 ทดสอบประสิทธิภาพของความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อ SCMV

การทดลองที่ 3.1.5 การพัฒนาชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli*

1. การเตรียมแอนติเจน (Antigen) นำเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* ที่จำแนกชนิดและทดสอบความรุนแรงโรคแล้วมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA (Potato semi-synthetic agar) ให้มีอายุ 48 ชั่วโมง นำมาล้างเซลล์แบคทีเรีย 3 ครั้งด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) (Allan and Kelman, 1977) แล้วนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 20 นาที นำเซลล์แบคทีเรียที่ล้างแล้วมาละลายในPBSจากนั้นนำไปทำการ fix เซลล์แบคทีเรีย ด้วย 2% glutaraldehyde (Allan and Kelman, 1977) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาทำให้ glutaraldehyde เจือจางหมดไปโดยการ dialysis ใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที โดยเปลี่ยน PBS ทุกๆ 4 ชั่วโมง เก็บสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ได้ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการฉีดกระต่ายต่อไป

2. การผลิตแอนติซีรัม ทำการละลายเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการ fix เซลล์ด้วย glutaraldehyde แล้วปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้ได้ประมาณ 10^9 หน่วยโคโลนี ต่อมิลลิลิตร ด้วย PBS จากนั้นนำไปผสมกับ Freund's incomplete adjuvant ในอัตรา 1:1 ผสมให้เข้ากันเพื่อนำไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่ายทดลองพันธุ์ New Zealand สีขาว โดยก่อนการฉีด 1 สัปดาห์ เจาะเก็บเลือดกระต่ายไว้ก่อนเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (Normal serum) จากนั้นนำสารละลายแบคทีเรียที่ผสมกับ adjuvant แล้วฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่าย โดยฉีดอาทิตย์ละหนึ่งครั้ง รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 4 สัปดาห์ หลังการฉีดครั้งสุดท้าย 1 อาทิตย์ เจาะ

เก็บเลือดกระต่าย 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ แยกและเก็บแอนติซีรัม โดยนำเลือดกระต่ายที่ได้ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแข็งตัว จากนั้นใช้เข็มลนไฟฆ่าเชื้อ แล้วกรีดที่ผิวตรงรอยต่อระหว่างบีกเกอร์กับเลือดจนรอบ นำบีกเกอร์ไปตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 12 ชั่วโมง แล้วนำเอาเฉพาะส่วนน้ำใสมาปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเอาส่วนเม็ดเลือดแดงออกไป นำส่วนน้ำใสที่ได้ซึ่งเป็นแอนติซีรัมเก็บแช่แข็งไว้

3. ทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัม โดยนำแอนติบอดีที่ได้แต่ละครั้ง มาทำให้เจือจางจนถึง 1: 10^6 และทดสอบปฏิกิริยากับแบคทีเรีย *B. gladioli* ที่ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร โดยเทคนิควิธี Dot Immunobinding assay (DIBA) (Hamplton et al, 1990)

4. ผลิตชุดตรวจสอบไวรัสวิธี GLIFT kit

4.1 นำแอนติซีรั่มที่มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *B. gladioli* มาแยกเฉพาะส่วนอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) ออกจากสารอื่น ๆ ในเซรุ่มนั้น โดยใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation) (Hampton el al,1990) นำ 1 มิลลิลิตรของแอนติซีรั่มผสมกับ 1 มิลลิลิตรของน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ หยด 1.3 มิลลิลิตร ของ saturated ammonium sulfate pH 7.2 ที่แช่เย็น ค่อย ๆ หยดบนเครื่องกวน (stirring) ทำให้มีแอนติซีรั่ม มีความเข้มข้นของ ammonium sulfate 40% ผสมบนเครื่องกวนต่อไป 30 นาที เก็บไว้ข้ามคืนในตู้เย็น นำมาหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนค่อย ๆ ละลายตะกอนด้วย 1 มิลลิลิตร ของ Phosphate buffer Saline (PBS) (0.01 M phosphate buffer pH 7.2 และ 0.15 M NaCl) เติม 1 มิลลิลิตร น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และ 1.02 มิลลิลิตรของ saturated ammonium sulfate ทำให้แอนติซีรัมมีความเข้มข้นของ ammonium sulfate 33% ผสมบนเครื่องกวน 30 นาที ตกตะกอนที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วย 1.5 มิลลิลิตร ของ PBS นำไปทำให้ ammonium sulfate เจือจางโดย dialysis ใน PBS ที่ 40C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยมีการเปลี่ยน PBS ทุก ๆ 4 ชั่วโมง นำมากรองผ่าน filter ขนาด 0.2 ไมครอน เก็บ IgG ไว้ที่ –20°C

4.2 การทดสอบคุณภาพ IgG โดยนำ IgG ของแบคทีเรีย *B. gladioli* ที่ได้มาวัดความเข้มข้น ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 280 นาโนเมตร เจือจางให้เชื้อมีค่า O.D. เท่ากับ 1.4 โดยใช้ครึ่งเท่าของ PBS เพื่อให้มีปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปทดสอบคุณภาพโดยการตรวจแบคทีเรีย *B. gladioli* ที่ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ด้วยวิธี Indirect Dot Immunobinding assay (DIBA) (Hampton *el al*,1990 โดยใช้ IgG ของแบคทีเรีย *B. gladioli* ที่เจือจาง 1: 500

4.3 การติดฉลาก IgG ของแบคทีเรีย *B. gladioli* ด้วยอนุภาคทอง เตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง โดยนำ 1% gold chloride ที่ต้มเดือดแล้วมาเติม sodium citrate ทำให้เย็นลง แล้ววัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 530 นาโนเมตร ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ได้อนุภาคทองแขวนลอยในสารละลาย ขนาด 40 นาโนเมตร นำ IgG ของแบคทีเรีย *B. gladioli* จำนวน 2 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายทองแขวนลอย 200 มิลลิลิตร กวนบนเครื่องกวนนาน 60 นาที แล้วเติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ปั่นเก็บตะกอน แล้วปรับให้ได้ค่า 0.5 ที่ OD 540

4.4 การทดสอบชนิดของ membrane ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของแอนติซีรัม ของแบคทีเรีย *B. gladioli* บนเส้น test line ทดสอบ 3-4 ชนิด ที่มีขนาดประมาณ 5-12 ไมโครเมตร

4.5 การประกอบเป็นชุดตรวจสอบ และทดสอบปฏิกิริยากับแบคทีเรีย *B. gladioli* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 10^2-10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร และจากตัวอย่างกล้วยไม้

4.6 ทดสอบประสิทธิภาพของความไว (sensitivity) ในการตรวจแบคทีเรีย *B. gladioli*

4.7 รวบรวม วิเคราะห์ผล และเขียนรายงาน

การทดลองที่ 3.1.6 การวิจัยและพัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบ GLIFT Kit (Gold Labeling IgG Flow Test) สำหรับตรวจไวรัสในกลุ่ม Tospovirus

1. การเตรียมไวรัสที่ใช้ในการทดลองและการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส

นำตัวอย่างพืชที่ตรวจพบทอสโพไวรัส โดยการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค RT-PCR นำมาเพิ่มปริมาณโดยการปลูกเชื้อลงในพืชอาศัยด้วยวิธีกล เตรียมโดยบดใบพืชกับ 0.05 M potassium phosphate buffer, pH 7.2 ผสม0.01 M Na2SO3 อัตราส่วนใบพืช 1 กรัมต่อ บัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร ผสมผง carborandum ลงไปในน้ำคั้นและนำไปทาใบพืชอาศัย

2. การเตรียมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์

ใช้พืชอาศัยที่ เพิ่มปริมาณเชื้อโดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล เมื่อต้นพืชแสดงอาการชัดเจนเก็บใบมา เตรียมเชื้อให้ค่อนข้างบริสุทธิ์ ตามวิธีการดังนี้ คือ ตัดใบเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร น้ำหนัก 150 กรัม แช่แข็งที่ – 20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 คืน นำมาบดในเครื่องบด Blender โดยเติม 0.5 M sodium citrate buffer pH 8.0 ปริมาตร 300 มล. ที่ผสม 2-mercaptoethanol ปริมาตร 3 มล. กรองผ่านผ้าขาวบางกำจัดเศษพืช เอาแต่ส่วนน้ำคั้น ปริมาตรประมาณ 300 มล. เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 150 มล. กวนบนน้ำแข็ง นาน 45 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 rpm นาน 15 นาที เก็บน้ำใสปริมาตร 300 มล. ใส่บีกเกอร์แล้วเติม polyethylene glycol 6000 อัตรา 5% และ triton X-100 อัตรา 1% ของปริมาตรของเหลว กวนบนน้ำแข็ง นาน 1.30 ชั่วโมง แล้วหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm นาน 15 นาที เทของเหลวทิ้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.5 M Potassium phosphate buffer pH 7.5 ที่เติม 0.5M Urea ปริมาตร 100 มล.กวนในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 rpm นาน 20 นาที เก็บของเหลวที่มีไวรัส นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 40,000 rpm นาน 1.30 ชั่วโมงที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.05M Potassium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 1 มล. แล้วนำไปตรวจดูอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน

3. การผลิตแอนติบอดีของเชื้อทอสโพไวรัส

การผลิตแอนติบอดีของเชื้อทอสโพไวรัส เตรียมแอนติเจนโดยการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสในพืชอาศัย การแยกเชื้อไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์จากพืชด้วยวิธีหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำสลับสูง (differential centrifugation) ได้สารละลายไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ มีความเข้มข้น 45 มก./มล. ผลิตแอนติซีรัมในกระต่ายด้วยวิธีการฉีดเข้า

ผิวหนัง การทดสอบไตเตอร์ด้วยวิธี ELISA พบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้มีไตเตอร์ตั้งแต่ 1: : 2,048 ถึง 1: 32,768 และมีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อทอสโพไวรัส สามารถนำไปใช้ตรวจทอสโพไวรัส ในพืช ด้วยวิธีการต่าง ๆ ทางเซรัมวิทยา

4. ผลิตชุดตรวจสอบไวรัสวิธี GLIFT kit

4.1 การสกัด IgG ของเชื้อทอสโพไวรัส นำแอนติซีรั่มที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อทอสโพไวรัส มาแยกเฉพาะส่วนอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) ออกจากสารอื่น ๆ ในเซรุ่มนั้น โดยใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation) (Hampton el al,1990) นำ 1 มิลลิลิตรของแอนติซีรั่มผสมกับ 1 มิลลิลิตรของน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ หยด 1.3 มิลลิลิตร ของ saturated ammonium sulfate pH 7.2 ที่แช่เย็น ค่อย ๆ หยดบนเครื่องกวน (stirring) ทำให้มีแอนติซีรั่ม มีความเข้มข้นของ ammonium sulfate 40% ผสมบนเครื่องกวนต่อไป 30 นาที เก็บไว้ข้ามคืนในตู้เย็น นำมาหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนค่อย ๆ ละลายตะกอนด้วย 1 มิลลิลิตร ของ Phosphate buffer Saline (PBS) (0.01 M phosphate buffer pH 7.2 และ 0.15 M NaCl) เติม 1 มิลลิลิตร น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และ 1.02 มิลลิลิตรของ saturated ammonium sulfate ทำให้แอนติซีรัมมีความเข้มข้นของ ammonium sulfate 33% ผสมบนเครื่องกวน 30 นาที ตกตะกอนที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วย 1.5 มิลลิลิตร ของ PBS นำไปทำให้ ammonium sulfate เจือจางโดย dialysis ใน PBS ที่ 40C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยมีการเปลี่ยน PBS ทุก ๆ 4 ชั่วโมง นำมากรองผ่าน filter ขนาด 0.2 ไมครอน เก็บ IgG ไว้ที่ –20°C

4.2 ทดสอบคุณภาพของ IgG โดยนำ IgG ของเชื้อทอสโพไวรัส ที่ได้มาวัดความเข้มข้น ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 280 นาโนเมตร เจือจางให้เชื้อมีค่า O.D. เท่ากับ 1.4 โดยใช้ครึ่งเท่าของ PBS เพื่อให้มีปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปทดสอบคุณภาพโดยการตรวจเชื้อทอสโพไวรัสในตัวอย่างข้าวโพดด้วยวิธี Indirect Dot Immunobinding assay (DIBA) (Hampton *el al*,1990 โดยใช้ IgG ของเชื้อทอสโพไวรัส ที่เจือจาง 1: 500

4.3 การติดฉลาก IgG ของเชื้อทอสโพไวรัส ด้วยอนุภาคทอง เตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง โดยนำ 1% gold chloride ที่ต้มเดือดแล้วมาเติม sodium citrate ทำให้เย็นลง แล้ววัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 530 นาโนเมตร ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ได้อนุภาคทองแขวนลอยในสารละลาย ขนาด 40 นาโนเมตร นำ IgG ของเชื้อทอสโพไวรัส 2 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายทองแขวนลอย 200 มิลลิลิตร กวนบนเครื่องกวนนาน 60 นาที แล้วเติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ปั่นเก็บตะกอน แล้วปรับให้ได้ค่า 0.5 ที่ OD 540

4.4 การทดสอบชนิดของ membrane ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อทอสโพไวรัส บนเส้น test line ทดสอบ 3-4 ชนิด ที่มีขนาดประมาณ 5-12 ไมโครเมตร

4.5 การประกอบเป็นชุดตรวจสอบ และทดสอบปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืช (sap)

4.6 ทดสอบประสิทธิภาพของความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อทอสโพไวรัส

การทดลองที่ 3.1.7 การผลิตชุดตรวจสอบ Bean yellow mosaic virus สำเร็จรูปโดยเทคนิค Gold labeling IgG flow test

1. เก็บตัวอย่างแกลดิโอลัส เตรียมต้นพืชทีเป็นโรคและต้นพืชปลอดโรค

2. สกัด IgG จากแอนติซีรัมของเชื้อ BYMV โดยนำแอนติซีรัม BYMV จำนวน 1 ml มาสกัด IgG โดยผสมกับ น้ำกลั่น 9 ml แล้วผสมกับ ammonium sulfate ที่อิ่มตัว 10 ml ผสมให้เข้ากันดี นำไปตกตะกอน 8,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25^0C ละลายตะกอนด้วย 4 ml ของ ½ เท่า PBS แล้วใส่ถุง dialysis tubing เพื่อละลาย ammonium sulfate ออกให้หมดโดยแช่ ใน ½ PBS 1 ลิตร นาน 3 ชั่วโมง 3 ครั้ง วัดความเข้มข้นของ IgG ที่ได้ด้วย spectrophotometer เพื่อ ปรับให้ IgG มีความเข้มข้นที่ OD_{280}= 1.4 มีความเข้มข้นของโปรตีน = 1 mg/ml ทดสอบคุณภาพ IgG ด้วยวิธี NCM-ELISA โดยเจือจาง IgG เป็น 1:500

3. เตรียมอนุภาคของทองให้ได้ขนาดอนุภาคประมาณ 40 nm จากการต้ม $HAuCl_4$ ผสมกับ sodium citrate เพื่อให้ได้อนุภาคของทองที่บริสุทธิ์ และมีขนาดตามต้องการแล้วนำสารละลายของ Colloidal Gold ไปใช้ในการ conjugate กับ IgG ของไวรัส BYMV ที่เข้มข้น

4. เชื่อม IgG ของ BYMV เข้ากับ Colloidal Gold ได้เป็น Colloidial Gold conjugated IgG โดยผสม IgG ของ BYMV ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 1 mg/ml กับ Colloidal Gold ในอัตรา 1:100 เติม 10% bovine serum albumin ในอัตรา 1:50 แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 rpm นาน 40 นาที เพื่อตกตะกอน Colloidial Gold conjugated IgG แล้วละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Passive Gold Diluent แล้วนำไปหยดหรือพ่น ลงบนแผ่นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) โดยทดลองหยด Gold labeling IgG ในปริมาณ 2 μl/cm

5. ทำการเตรียมเส้น Test line, control line และประกอบเป็น GLIFT kit โดยพ่น IgG ลงบนแผ่น NCM ทดลองใช้ประมาณ 1, 1.5 และ 2 μl/cm แยกกันคนละเส้น ทดลองใช้ GAR ในการทำเส้น control line ในปริมาณ 1 μl/cm แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ 37^0C นาน 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาประกอบกันแล้วตัดเป็น strip บรรจุลงในตลับพลาสติกเป็นชุดนำไปทดสอบตรวจตัวอย่างใบแกลดิโอลัสเป็นโรคจากเชื้อ BYMV และทดลองหยดน้ำคั้นจากพืชที่เจือจางเป็น 1:100, 1:200, 1:500 และ 1:1000 เพื่อดูความไวในการตรวจของ GLIFT kit

6. เปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ใน sample pad buffer-Na_2BO_3 เปรียบเทียบกับการใช้ extraction buffer ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างพืชในการตรวจสอบโรคไวรัสของพืช ด้วยวิธี NCM-ELISA แล้วดูดน้ำคั้นหยอดลงในตลับ GLIFT kit แล้วเปรียบเทียบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

7. ทดสอบหาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำคั้นจากแกลดิโอลัสในการตรวจเชื้อ BYMVในเนื้อมันฝรั่งทดลองนำ sample pad buffer-Na_2BO_3 มาเติมสาร Na_2SO_3 เปรียบเทียบกันในปริมาณ0.4, 0.6 และ 0.8 % นำมาบดตัวอย่างเนื้อมันฝรั่งเป็นน้ำคั้นหยอดลงในตลับ GLIFT kit แล้วตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยา

8. ตรวจสอบเชื้อ BYMV ในแกลดิโอลัสโดยทดลองตรวจสอบเชื้อ BYMV จากส่วนต่างๆ ของหัวพันธุ์เป็นโรค โดยเตรียมตัวอย่างในบัฟเฟอร์ sample pad buffer-Na_2BO_3 ทีมี 0.8% Na_2SO_3 ในอัตรา 1:5 เปรียบเทียบกับใบแกลดิโอลัสเป็นโรคและใบแกลดิโอลัสไม่เป็นโรค

9. ทดสอบจำนวนหยดที่เหมาะสมโดยทดลองเปรียบเทียบจำนวนหยดที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ชัดเจน โดยทดสอบที่จำนวน 3, 4 และ 5 หยด

การทดลองที่ 3.1.8 การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัส PVY PVX PVS ในมันฝรั่ง

1. สกัด IgG จากแอนติซีรัมของเชื้อ PVY PVX PVS โดยนำแอนติซีรัม PVY PVX PVS แต่ละเชื้อจำนวน 1 ml มาสกัด IgG โดยผสมกับ น้ำกลั่น 9 ml แล้วผสมกับ ammonium sulfate ที่อิ่มตัว 10 ml ผสมให้เข้ากันดี นำไปตกตะกอน 8,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25^0C ละลายตะกอนด้วย 4 ml ของ ½ เท่า PBS แล้วใส่ถุง dialysis tubing เพื่อละลาย ammonium sulfate ออกให้หมดโดยแช่ ใน ½ PBS 1 ลิตร นาน 3 ชั่วโมง 3 ครั้ง วัดความเข้มข้นของ IgG ที่ได้ด้วย spectrophotometer เพื่อ ปรับให้ IgG มีความเข้มข้นที่ OD_{280}= 1.4 มีความเข้มข้นของโปรตีน = 1 mg/ml ทดสอบคุณภาพ IgG ด้วยวิธี NCM-ELISA โดยเจือจาง IgG เป็น 1:500

2. เตรียมอนุภาคของทองให้ได้ขนาดอนุภาคประมาณ 40 nm จากการต้ม $HAuCl_4$ ผสมกับsodium citrate เพื่อให้ได้อนุภาคของทองที่บริสุทธิ์ และมีขนาดตามต้องการแล้วนำสารละลายของ Colloidal Gold ไปใช้ในการ conjugate กับ IgG ของไวรัส PVY PVX PVS ที่เข้มข้น

3. เชื่อม IgG ของ PVY PVX PVS เข้ากับ Colloidal Gold ได้เป็น Colloidial Gold conjugated IgG โดยผสม IgG ของ PVY PVX PVS ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 1 mg/ml กับ Colloidal Gold ในอัตรา 1:100 เติม 10% bovine serum albumin ในอัตรา 1:50 แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 rpm นาน 40 นาที เพื่อตกตะกอน Colloidial Gold conjugated IgG แล้วละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Passive Gold Diluent แล้วนำไปหยดหรือพ่น ลงบนแผ่นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) โดยทดลองหยด Gold labeling IgG ในปริมาณ 2 μl/cm

4. ทดสอบ membrane และการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมของไวรัสทั้ง 3 ชนิด ทำการเตรียมเส้น Test line, control line และประกอบเป็น GLIFT kit โดยพ่น IgG ลงบนแผ่น NCM ทดลองใช้ประมาณ 1, 1.5 และ 2 μl/cm แยกกันคนละเส้น ทดลองใช้ GAR ในการทำเส้น control line ในปริมาณ 1 μl/cm แล้วนำไป อบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ 37^0C นาน 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาประกอบกันแล้วตัดเป็น strip บรรจุลงในตลับพลาสติกเป็นชุดนำไปทดสอบตรวจตัวอย่างใบที่เป็นโรคจากเชื้อ PVY PVX PVS และทดลองหยดน้ำคั้นจากพืชที่เจือจางเป็น 1:100, 1:200, 1:500 และ 1:1000 เพื่อดูความไวในการตรวจของ GLIFT kit

5. เปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ใน sample pad buffer-Na_2BO_3 เปรียบเทียบกับการใช้ extraction buffer ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างพืชในการตรวจสอบโรคไวรัสของพืช ด้วยวิธี NCM-ELISA แล้วดูดน้ำคั้นหยอดลงในตลับ GLIFT kit แล้วเปรียบเทียบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

6. ทดสอบหาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำคั้นจากใบมันฝรั่งในการตรวจเชื้อ PVY PVX PVS ทดลองนำ sample pad buffer-Na2BO3 มาเติมสาร Na2SO3 เปรียบเทียบกันในปริมาณ 0.4, 0.6 และ 0.8 % นำมาบดตัวอย่างเนื้อมันฝรั่งเป็นน้ำคั้นหยอดลงในตลับ GLIFT kit แล้ว ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยา

7. ตรวจสอบเชื้อ PVY PVX PVS ในมันฝรั่งโดยทดลองตรวจสอบเชื้อ PVY PVX PVS จากส่วนต่างๆ ของหัวพันธุ์เป็นโรค โดยเตรียมตัวอย่างในบัฟเฟอร์ sample pad buffer-Na2BO3 ทีมี 0.8% Na2SO3 ในอัตรา 1:5 เปรียบเทียบกับใบมันฝรั่งเป็นโรคและใบมันฝรั่งไม่เป็นโรค

8. ทดสอบจำนวนหยดที่เหมาะสมโดยทดลองเปรียบเทียบจำนวนหยดที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ชัดเจนโดยทดสอบที่จำนวน 3, 4 และ 5 หยด

9. สรุปผลการดำเนินงาน

การทดลองที่ 3.1.9 การโคลนและสังเคราะห์โปรตีน Sec A ยีน ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยในระบบเซลล์แบคทีเรีย

1) การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอของยีน *Sec A* จากพลาสมิดสายผสม

นำโคลนเชื้อแบคที่เรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH 5α ที่มีพลาสมิดสายผสมมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Wizard PlusSV Minipreps DNA Purification System, Promega, USA) และใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วนยีน SecA

ทำการบันทึกผลข้อมูลด้วยเทคนิค gel agarose electrophoresis

2) การเพิ่มชิ้นส่วนของยีน *Sec A*-adapter ด้วยปฏิกิริยา PCR

นำโคลนของเชื้อแบคทีเรียที่มี *Sec A* gene มาใช้เป็นต้นแบบสำหรับสังเคราะห์ยีนที่ขนาดประมาณ 413 เบส ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ SceA-F (5’ GATCC ATG TGT AAT TGT TGA TGA AGT AGA TTC 3’) และ SecA-R (5’AGCTT CTT CTT TGG CTT CTA AAG CTT G 3’) ที่มีการต่อด้วย adater ซึ่งมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *HindIII* และ start codon

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ได้แก่

-	น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH_2O)	17.0	ไมโครลิตร
-	10x buffer	2.5	ไมโครลิตร
-	$MgCl_2$ (25 mM)	1	ไมโครลิตร
-	dNTP (10 mM)	1	ไมโครลิตร
-	ไพรเมอร์ forward (R16F2) (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
-	ไพรเมอร์ reverse (R16R2) (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
-	*taq* DNA polymerase (0.1 unit/µl)	0.5	ไมโครลิตร

- ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร

รวม 25.0 ไมโครลิตร

นำมาส่วนประกอบการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร ผสมกัน แล้วนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) โดยการตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

ขั้นที่ 1: 94°C นาน 3 นาที 1 รอบ

ขั้นที่ 2: 94°C นาน 1 นาที

ขั้นที่ 3: 52-56°C นาน 2 นาที

ขั้นที่ 4: 72°C นาน 3 นาที (ขั้นที่ 2 - 4) 34 รอบ

ขั้นที่ 5: 72°C นาน 10 นาที 1 รอบ

ขั้นที่ 6: 15°C นาน 15 นาที 1 รอบ

วิเคราะห์ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตร-โฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1% gel agarose เตรียมในสารละลาย 0.5 TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 8 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye 2 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 มาส่องดูขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator
ทำการบันทึกผลข้อมูลด้วยเทคนิค gel agarose electrophoresis

3) การโคลนยีน *Sec A*-adapter ของเชื้อไฟโตรพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา PCR

3.1 โดยเตรียม DNA ให้บริสุทธิ์ ด้วยการแยกดีเอ็นเอตามขนาดโดยใช้วิธีการอีเล็คโตรโฟริซิส ด้วย 1.2% agarose gel ในสารละลาย 0.5X TBE buffer และตัดเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ ใส่หลอด centrifuge tube ชั่งน้ำหนักของเจล โดยจะต้องไม่เกิน 300 มิลลิกรัม นำมาสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป (QIAquickGel Extraction Kit, Qiagen, Germany)

3.2 เชื่อมต่อดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตรพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวที่บริสุทธิ์เข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega, USA.) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase และบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน

ซึ่งมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

T4 DNA Ligase 2X buffer	10.0 ไมโครลิตร
PGEM-T easy vector	1.0 ไมโครลิตร
SecA-adapter(purified PCR product)	1.0 ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase (3 unit/μl)	2.0 ไมโครลิตร
H_2O	6.0 ไมโครลิตร

รวม 20.0 ไมโครลิตร

และถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่คอมพีเท็นเซลล์ (completen cell) แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5α ใช้วิธีการ heat shock transformation (Sambrook *et. al.,* 1989) ทำการบันทึกผลข้อมูลด้วยเทคนิค gel agarose electrophoresis

4) การโคลนยีน *Sec A*-adapter กับพลาสมิด Expression vector pQE-80L

นำโคลนเชื้อแบคที่เรีย *E. coli* ที่มีพลาสมิดสายผสม (pGEM-T Easy/SecA-adapter) มาสกัดดีเอ็นเอ *Sec A*-adapter ด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Wizard PlusSV Minipreps DNA Purification System, Promega, USA) จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม 1 ไมโครกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* 5 ยูนิต และ *HindIII* 5 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 37 oC เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และทำการเชื่อมชิ้นยีนส่วน *Sec A*-adapter กับพลาสมิด Expression vector pQE-80L ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *HindIII* เช่นกันด้วยเอนไซม์ T4 ligase ที่อุณหภูมิ 16 0C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นย้ายยีนลูกผสมนี้เข้าไปในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5α หรือ BL21(DE3) วิธีการ heat shock transformation (Sambrook *et. al.,* 1989) แล้วทดสอบโคลนที่ได้รับพลาสมิดที่ต้องการบนอาหารแข็ง 2XYT ที่มียาปฏิชีวนะแอมพลิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเลือกโคโลนีสีขาวของเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดสายผสมมาตรวจด้วยเทคนิค PCR หรือทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมและนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *HindIII* อีกครั้ง เพื่อทดสอบการมีชิ้นส่วนยีนของ *Sec A*-adapter/6xHisTag
ทำการบันทึกผลข้อมูลด้วยเทคนิค SDS PAGE

5) ศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์โปรตีน *Sec A*-adapter/6xHisTag ในเซลล์แบคทีเรีย

นำโคลนแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5α หรือ BL21(DE3) ที่ตรวจสอบแล้วว่ามีพลาสมิดสายผสมชิ้นส่วนยีนของ *Sec A*-adapter/6xHisTag ใน pQE-80L vector จำนวน 1 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพลิซิลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 0C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวงลอยที่ได้มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ 2XYT ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพลิซิลิน (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5–0.7 แล้วจึงเติมสารละลาย 0.5 M isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์) ลงในสารแขวนลอยเซลล์ และเลี้ยงต่อเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 0C เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ นำมาแยกสกัดโปรตีนจากเซลล์และวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนที่สังเคราะห์ได้ด้วย เทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrphoresis (SDS-PAGE) โดยใช้ 15% SDS-PAGE และทำการแยกขนาดของ fusion protein บนเครื่อง Mini-Protein®II Cell (BioRad, USA.) ย้อมดูโปรตีนด้วยสารละลาย coomassie brilliant blue ตรวจดูขนาดและปริมาณของ

fusion protein เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (protein molecular weight markers Cat.No. SMO431, LabAid, USA)

ทำการบันทึกผลข้อมูลด้วยเทคนิค SDS PAGE

6) การแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์ (ดำเนินการปี 2558)

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5α หรือ BL21(DE3) ที่มีพลาสมิดสายผสมในช่วงเวลาที่มีการผลิตโปรตีนมากที่สุด เก็บตะกอนเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงและละลายตะกอนด้วย lysis buffer A (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea หรือ 6 M Guanidine hydrochloride; pH 8.0) และ Lysozyme นำไป sonicate ด้วยเครื่อง utra schall BANDELIN SONOPULS HD จนได้สารละลายใส แล้วจึงนำเซลล์ไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นเก็บส่วนน้ำใส (supernatant) มาทำให้บริสุทธิ์โดยนำมาผสมกับ Ni^{2}+-NTA resin (QIAGEN, USA.) นำมาเติมลงใน column (BioRad, USA.) ทำการล้าง column ด้วย washing buffer C (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-HCl 8 M Urea ; pH 6.3) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นล้าง column ด้วย buffer D ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง ทำการแยกเอาส่วน fusion protein ออกจาก column โดยการเติม elution buffer E (100 mM NaH_2 PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 8 Urea ; pH 4.5) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 6 ครั้ง เก็บสารละลายโปรตีนที่ผ่าน Amicon®Ultra-4 Column (MILLIPORE) เพื่อให้โปรตีนที่ผลิตได้มีความเข้มข้นสูง ทำการวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 15% separating gel และ 5% stacking gel นำตัวอย่างสารละลายที่ไหลผ่าน column flow through, wash และ elution แต่ละ fraction ผสมกับ 2x loading buffer อัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที เมื่อครบเวลาแช่ตัวอย่างในน้ำแข็งทันที หยอดตัวอย่างสารละลายที่เตรียมได้ลงหลุม หลุมละ 10 ไมโครลิตร แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาทีและเปลี่ยนค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นนำเจลมาย้อม COSMASIE BLUE บนเครื่องเขย่าเบาๆเป็นเวลานาน 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำเจลไปล้างสีออกด้วย Destain solution I บนเครื่องเขย่าเบาๆ นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างเจลด้วย Destain solution II บนเครื่องเขย่าเบาๆ นาน2 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจน เปรียบเทียบขนาดโปรตีน Recombinant PRSV coat protein ด้วยแถบโปรตีนมาตรฐาน (protein molecular weight markers Cat.No. SMO431, LabAid, USA)

ทำการบันทึกผลข้อมูลด้วยเทคนิค SDS PAGE

การทดลองที่ 3.1.10 การผลิตแอนติซีรัมของไวรัส Citrus tristeza virus สาเหตุโรคทริสเทซ่าของพืชตระกูลส้มด้วยระบบเซลล์แบคทีเรีย

1. **สืบค้นข้อมูลเชื้อไวรัส CTV สาเหตุโรคในพืชตระกูลส้มเพื่อใช้ประกอบการวิจัย (ดำเนินการปี 2557)**

ทำการสืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูลทางพันธุกรรม (genbank: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) ฐานข้อมูลของเชื้อไวรัส (ICTV: http://ictvonline.org/index.asp) เวปไซต์ของสมาคมนักโรคพืชประเทศสหรัฐอเมริกา (APS: http://www.apsnet.org/Pages/default.aspx) วารสาร Plant disease, Phytopathology และเอกสารทางวิชาการอื่นๆ ที่สามารถสืบค้นได้

2. การเตรียมแอนติเจนสำหรับการผลิตแอนติซีรัม (ดำเนินการปี 2557)

ออกแบบไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนใน ribosome จำนวน 1 คู่ จากส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (cp gene) ของเชื้อไวรัสสาเหตุของโรคทริสเทซ่า ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับ CTV เพื่อนำ ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอ ในกระบวนการ cloning เข้าสู่ vector

3. สกัด total RNA ของเชื้อไวรัส CTV (ดำเนินการปี 2557)

ใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (RNeasy Kit ของ QIAGEN และนำ มาทำปฏิกิริยา RT-PCR เพื่อเพิ่มปริมาณของชิ้น cDNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ นำ PCR product ที่ได้มาเชื่อมต่อ (ligation) เข้าสู่ cloning/expression vector และถ่ายเข้าสู่ (transformation) เข้า *E. coli* โดยใช้ $CaCl_2$ ที่ 42°C นาน 90 วินาที และแช่บนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนบนอาหาร 2XYT ที่มี สารปฏิชีวนะผสมอยู่

4. ตรวจสอบลำดับเบสและแปรรหัสเป็นโปรตีน (ดำเนินการปี 2557)

ตรวจสอบโคลนด้วยเทคนิค PCR และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ใช้ program analysis ตรวจสอบลำดับเบสและแปรรหัสเป็นโปรตีน เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง จากนั้น transform เข้า competent cell ของ *E. coli* BL21 (DES 3) โดยใช้ $CaCl_2$ ที่ 42°C นาน 90 วินาที และแช่บนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที คัดเลือกโคโลนีของพลาสมิดบนอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อนำไปสังเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนต่อไป

5. สังเคราะห์โปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย (ดำเนินการปี 2557)

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DES 3) ที่มีพลาสมิดสายผสม ในอาหารเหลว 2XYT 100 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เขย่า 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น starter จากนั้นแบ่งใส่ในอาหารเหลว 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในอัตราส่วนของเชื้อ 10 % ของอาหาร เขย่าต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงเชื้อต่อโดยการเขย่าบนเครื่อง shaker และเก็บตัวอย่างเซลล์หลังการเติม IPTG ที่ 2, 4, 6, 8 และ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นตกตะกอน ที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 50 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่ -20 °ซ แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

6. การแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์ และตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีน (ดำเนินการปี 2558)

นำแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DES 3) ที่มีพลาสมิดสายผสม หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ที่เวลาอันเหมาะสมในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน มาปั่นตกตะกอนที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที (4°ซ) นำตะกอนมาผสมกับน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติม lysozyme เพียงเล็กน้อย และกวนให้เข้ากันจนเหนียว เก็บที่ -20 °ซ ข้ามคืน จากนั้นนำมาเติมด้วย lysis buffer ในอัตรา 50 มิลลิลิตร/อาหารเหลว 1 ลิตร และนำมาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator แบบ probe จนกว่าเซลล์จะหายหนืดและใส แล้วนำไปปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เก็บน้ำใสไปแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column โดยเก็บเป็น fraction หลอดละ 500 ไมโครลิตร เพื่อนำไปตรวจสอบขนาดของโปรตีนว่าอยู่ใน fraction ใดด้วยด้วยเทคนิค SDS-PAGE (ดำเนินการปี 2557)

7. ฉีดแอนติเจนเข้าสัตว์ทดลองเพื่อกระตุ้นให้สร้างแอนติซีรัม (ดำเนินการปี 2558)

ผสมโปรตีนของเชื้อที่บริสุทธิ์ (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)กับ complete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 ให้เข้ากันเป็น emulsion สำหรับการฉีดกระต่ายครั้งแรก และใช้ incomplete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 สำหรับการฉีดครั้งต่อๆไปอีก 3 ครั้ง ทำการฉีดทุก 1 สัปดาห์ เริ่มทำการเจาะเลือดหลังจากการฉีดครั้งที่ 4 และดำเนินการเจาะเลือดทุก 1สัปดาห์อีก 5 ครั้ง นำเลือดที่เจาะได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บที่ 4 °C อีก 24 ชั่วโมง รินส่วนน้ำใสมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 g นาน 10 นาที เก็บน้ำใสที่เป็นส่วนของแอนติบอดีไว้ที่ -20 °ซ จากนั้นทำการทดสอบและหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัม โดยวิธี Indirect ELISA (ดำเนินการปี 2558)

8. ทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัม โดยวิธี Indirect ELISA (ดำเนินการปี 2558)

นำใบพืชตระกูลส้มที่เป็นโรคทริสเทซ่าและใบปกติ(ใช้เฉพาะเส้นกลางใบ) มาบดใน coating buffer ในอัตรา 1 กรัม : 5, 10 , 15 มิลลิลิตร หยอดน้ำคั้นพืชลงในหลุมของไมโครเพลท (microplate) 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1-2 ชั่วโมง แล้วนำไมโครเพลทมาล้างด้วย phosphate buffer saline ที่มี tween 20 ผสมอยู่ (PBS-Tween 20) 3 ครั้งๆละ 3 นาที หยอดแอนติซีรัมจากการเลือดครั้งที่ 1- 5 ที่เจือจางใน conjugate buffer 1: 500 และ 1 : 1,000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย PBS-Tween 20 จำนวน 3 ครั้งๆละ 3 นาที แล้วหยอด Goat-Anti Rabbit อัตรา 1: 1,000 ใน conjugate buffer 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง นำเพลทมาล้างอีก 3 ครั้งใน PBS-Tween 20 แล้วหยอด p-nitrophenyl phosphatase substrate (5 มิลลิกรัม/ substrate buffer 10 มิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร และอ่านผลด้วยเครื่องอ่านอิไลซา (ELISA Reader)

9. ทำการบันทึกข้อมูล (ดำเนินการปี 2557 – 2558)

ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของ coat protein ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Gel electrophoresis วัดปริมาณแอนติเจนที่สกัดได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE, วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm. ทดสอบและหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัม โดยวิธี Indirect ELISA อ่านผลด้วยเครื่อง ELISA reader

การทดลองที่ 3.1.11 การพัฒนาชุดตรวจสอบแบบ Immuno Strip เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ในกล้วยไม้

1. การเตรียมแอนติเจน (Antigen) นำเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่จำแนกชนิดและทดสอบความรุนแรงโรคแล้วมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA (Potato semi-synthetic agar) ให้มีอายุ 48 ชั่วโมง นำมาล้างเซลล์แบคทีเรีย 3 ครั้งด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) (Allan and Kelman, 1977) แล้วนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 20 นาที นำเซลล์แบคทีเรียที่ล้างแล้วมาละลายใน PBS จากนั้นนำไปทำการ fix เซลล์แบคทีเรีย ด้วย 2% glutaraldehyde (Allan and Kelman, 1977) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาทำให้ glutaraldehyde เจือจางหมดไปโดยการ dialysis ใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาที โดยเปลี่ยน PBS ทุกๆ 4 ชั่วโมง เก็บสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ได้ไว้ที่ 4 °C เพื่อใช้ในการฉีดกระต่ายต่อไป

2. การผลิตแอนติซีรั่ม ทำการละลายเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการ fix เซลล์ด้วย glutaraldehyde แล้วปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้ได้ประมาณ 10^9 หน่วยโคโลนี ต่อมิลลิลิตร ด้วย PBS จากนั้นนำไปผสมกับ Freund's incomplete adjuvant ในอัตรา 1:1 ผสมให้เข้ากันเพื่อนำไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่ายทดลองพันธุ์ White New Zealand สีขาว โดยก่อนการฉีด 1 สัปดาห์ เจาะเก็บเลือดกระต่ายไว้ก่อนเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (Normal serum) จากนั้นนำสารละลายแบคทีเรียที่ผสมกับ adjuvant แล้วฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่าย โดยฉีดอาทิตย์ละหนึ่งครั้ง รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 4 สัปดาห์ หลังการฉีดครั้งสุดท้าย 1 อาทิตย์ เจาะเก็บเลือดกระต่าย 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ แยกและเก็บแอนติซีรั่ม โดยนำเลือดกระต่ายที่ได้ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแข็งตัว จากนั้นใช้เข็มลนไฟฆ่าเชื้อ แล้วกรีดที่ผิวตรงรอยต่อระหว่างบีกเกอร์กับเลือดจนรอบ นำบีกเกอร์ไปตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 12 ชั่วโมง แล้วนำเอาเฉพาะส่วนน้ำใสมาปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อเอาส่วนเม็ดเลือดแดงออกไป นำส่วนน้ำใสที่ได้ซึ่งเป็นแอนติซีรั่มเก็บแช่แข็งไว้

3. ทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรั่ม โดยนำแอนติบอดีที่ได้แต่ละครั้ง มาทำให้เจือจางจนถึง 1: 10^6 และทดสอบปฏิกิริยากับแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร โดยเทคนิค วิธี Dot Immunobinding assay (DIBA) (Hamplton *et al.*, 1990)

4. บันทึกผลการทดลอง บันทึกผลปฏิกริยาที่เกิดขึ้นบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส โดยปฏิกริยาบวกจะเกิดจุดสีม่วงเข้ม ปฏิกริยาลบ จะไม่เกิดจุดสีม่วง

5. ผลิตชุดตรวจสอบแบคทีเรียด้วยวิธี GLIFT kit

5.1 นำแอนติซีรั่มที่มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* มาแยกเฉพาะส่วนอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) ออกจากสารอื่น ๆ ในเซรุ่มนั้น โดยใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation) (Hampton *el al.,* 1990) นำ 1 มิลลิลิตรของแอนติซีรั่มผสมกับ 1 มิลลิลิตรของน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ หยด 1.3 มิลลิลิตร ของ saturated ammonium sulfate pH 7.2 ที่แช่เย็นค่อย ๆ หยดบนเครื่องกวน (stirring) ทำให้มีแอนติซีรั่ม มีความเข้มข้นของ ammonium sulfate 40% ผสม

บนเครื่องกวนต่อไป 30 นาที เก็บไว้ข้ามคืนในตู้เย็น นำมาหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนค่อย ๆ ละลายตะกอนด้วย 1 มิลลิลิตร ของ Phosphate buffer Saline (PBS) (0.01 M phosphate buffer pH 7.2 และ 0.15 M NaCl) เติม 1 มิลลิลิตร น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และ 1.02 มิลลิลิตรของ saturated ammonium sulfate ทำให้แอนติซีรัมมีความเข้มข้นของ ammonium sulfate 33% ผสมบนเครื่องกวน 30 นาที ตกตะกอนที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วย 1.5 มิลลิลิตร ของ PBS นำไปทำให้ ammonium sulfate เจือจางโดย dialysis ใน PBS ที่ 40 ๐C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยมีการเปลี่ยน PBS ทุก ๆ 4 ชั่วโมง นำมากรองผ่าน filter ขนาด 0.2 ไมครอน เก็บ IgG ไว้ที่ –20 ๐C

5.2 การทดสอบคุณภาพ IgG โดยนำ IgG ของแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่ได้มาวัดความเข้มข้น ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 280 นาโนเมตร เจือจางให้เชื้อมีค่า O.D. เท่ากับ 1.4 โดยใช้ครึ่งเท่าของ PBS เพื่อให้มีปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปทดสอบคุณภาพโดยการตรวจแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ด้วยวิธี Indirect Dot Immunobinding assay (DIBA) (Hampton *el al.*, 1990) โดยใช้ IgG ของแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่เจือจาง 1: 500 บันทึกผลปฏิกริยาที่เกิดขึ้นบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส โดยปฏิกริยาบวกจะเกิดจุดสีม่วงเข้ม ปฏิกริยาลบ จะไม่เกิดจุดสีม่วง

5.3 การติดฉลาก IgG ของแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ด้วยอนุภาคทอง เตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง โดยนำ 1% gold chloride ที่ต้มเดือดแล้วมาเติม sodium citrate ทำให้เย็นลง แล้ววัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่นแสง 530 นาโนเมตร ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ได้อนุภาคทองแขวนลอยในสารละลาย ขนาด 40 นาโนเมตร นำ IgG ของแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* จำนวน 2 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายทองแขวนลอย 200 มิลลิลิตร กวนบนเครื่องกวนนาน 60 นาที แล้วเติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ปั่นเก็บตะกอน แล้วปรับให้ได้ค่า 0.5 ที่ OD 540

5.4 การทดสอบชนิดของ membrane ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของแอนติซีรั่ม ของแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* บนเส้น test line ทดสอบ 3-4 ชนิด ที่มีขนาดประมาณ 5-12 ไมโครเมตร บันทึกผลปฏิกริยาที่เกิดขึ้นบน membrane แต่ละชนิด โดยปฏิกริยาบวกจะเกิดแถบสีม่วงเข้ม ปฏิกริยาลบ จะไม่เกิดแถบสีม่วง เปรียบเทียบความชัดเจนและความเข้มของแถบสีในแต่ละชนิดของ membrane

5.5 การประกอบเป็นชุดตรวจสอบ และทดสอบปฏิกิริยากับแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 10^2-10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร และจากตัวอย่างกล้วยไม้ บันทึกผลปฏิกริยาที่เกิดขึ้นบน membrane โดยปฏิกริยาบวกจะเกิดแถบสีม่วงเข้ม ปฏิกริยาลบ จะไม่เกิดแถบสีม่วง

5.6 ทดสอบประสิทธิภาพของความไว (sensitivity) ในการตรวจแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* บันทึกผลปฏิกริยาที่เกิดขึ้นบน membrane โดยปฏิกริยาบวกจะเกิดแถบสีม่วงเข้ม ปฏิกริยาลบ จะไม่เกิดแถบสีม่วง

กิจกรรมย่อยที่ 3.2 การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูพืชโดยอณูชีววิธี

การทดลองที่ 3.2.1 การตรวจสอบเชื้อ *Candidatus* Liberibacter species สาเหตุโรคฮวงลองบิง (กรีนนิ่ง) ด้วยเทคนิค Real-time PCR

1. ออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจง โดยออกแบบไพรเมอร์จากลำดับเบสในช่วง 16S rDNA ของเชื้อ *Ca.* Liberibacter species ทำให้ได้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *Ca.* Liberibacter species ที่เป็นสาเหตุโรคฮวงลองบิง

2. สกัดดีเอ็นเอจากเส้นกลางใบส้มด้วย CTAB buffer

3. ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR โดยการหา Tm ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR จะได้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์กับ ดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่เหมาะสม ตลอดจนทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาในแต่ละช่วงเวลา

4. ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของ Real time PCR เพื่อหา crossing point และ วิเคราะห์หา melting curve

5. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR ในการตรวจเชื้อ *Ca.* Liberibacter species

6 . ทดสอบเทคนิค Real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Ca.* Liberibacter species จากตัวอย่างโรคฮวงลองบิง ที่เก็บจากแปลงปลูก โดยสุ่มเก็บตัวอย่างที่แสดงอาการโรคฮวงลองบิงจำวน 10 % จากตัวอย่างส้มทั้งหมดในแปลงปลูก

7 . การใช้วิธี Real-time PCR ในการตรวจวินิจฉัยโรคฮวงลองบิง ในแปลงปลูก

การทดลองที่ 3.2.2 การการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomomnas axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real-time PCR

1. ออกแบบ specific primer โดยใช้ primer design software ชื่อ Primer3 จาก *pthA* gene family ได้แก่ *pthA* gene (Gene Bank accession U28802) *apl1* (AB021363) *apl2* (AB021364) *apl3* (AB021365) *pthA*1, *pthA2, pthA3, pthA4* (Gene Bank accession AE008925) จำนวน 1 คู่สาย นำไปสั่งสังเคราะห์ primer จาก หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ โดยมีprimer 2/3 ที่ Hartung *et.al* (1993) รายงานว่าสามารถตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ เพื่อเปรียบเทียบกับ primer ที่ออกแบบไว้

2. การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ (Purified genomic DNA) การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีของ Pitcher *et al.* (1989) โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง LB ใช้ลูปฆ่าเชื้อ แตะเชื้อแบคทีเรียให้เต็มหนึ่งลูป

ละลาย ใน1 มิลลิลิตร Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย 100 ไมโครลิตร TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA pH 8.0) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ เครื่องปั่น vortex เติมด้วย 500 ไมโครลิตรของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 ไมโครลิตร ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 $^{\circ}$C ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วย 500 ไมโครลิตร chloroform/iso-amyl-alcohol (24/1) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุ สาร isopropanol ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 $^{\circ}$C จำนวน378 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอนเอด้วย 150 ไมโครลิตร ของ 70 % ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ลายตะกอนDNA ด้วย TE buffer pH. 8.0 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอนเอ ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องspectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลทให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

3. ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR โดยการหา Tm ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR จะได้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่เหมาะสม ตลอดจนทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาในแต่ละช่วงเวลา ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของ Real time PCR เพื่อหา crossing point และ วิเคราะห์หา melting curve

4. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR ในการตรวจเชื้อ *X. axonopodis* pv.*citri* เป็นการทดสอบ primer ที่ออกแบบไว้ โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 มาทำการทดสอบความจำเพาะของ primer โดยใช้ DNA และเซลของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ความเข้มข้นของ DNA ที่ 50 ng และความเข้มข้นของเซลล์ที่ 10^8 cfu/ml การทดสอบความไวในการตรวจสอบเชื้อแคงเกอร์ (sensitivity) ของ primer เป็นการทดสอบ primer ที่ออกแบบไว้ โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 โดยใช้ DNA ของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม และใช้เซลล์แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ความเข้มข้น 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร

5. ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv.*citri* จากตัวอย่างโรคแคงเกอร์ ทำการเก็บตัวอย่างโรคแคงเกอร์ของส้มโอจากแปลงเกษตรกรใน อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย จำนวน 10 ตัวอย่าง ตัดแผลตัวอย่างโรค โดย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm. นำตัวอย่างใส่หลอด 1.5 ml microcentrifuge ที่เติมด้วย 100 ul ของ phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic

disposable pestles ให้ละเอียดนำไปตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ทิ้งส่วนตะกอน นำ 2 ul ของตัวอย่างเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Real time PCR ตามปฏิกิริยาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และทุกตัวอย่างเปรียบเทียบกับการตรวจเชื้อบนอาหาร semi-selective for *Xanthomonas* (SX media) โดยนำตัวอย่างโรคแคงเกอร์แต่ละตัวอย่างปริมาณ 50 ไมโครลิตรไปเกลี่ยให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SX โดยใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28^0 C นาน 72 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณเชื้อที่ขึ้นบนอาหาร

การทดลองที่ 3.2.3 .วิจัยพัฒนาเทคนิคการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและเน่าเละของกล้วยไม้ด้วยเทคนิค PCR และ Real-time PCR

1. การแยกเชื้อและการเก็บรักษาเชื้อ

เก็บตัวอย่างโรคเน่าและเน่าเละ จากกล้วยไม้สกุลหวาย แวนดา ม็อคคาร่า ฟาแลนอปซิส และแคทลียา ทำการแยกเชื้อจากส่วนที่เป็นโรค โดยตัดเนื้อเยื่อพืชส่วนที่เกิดโรคเป็นชิ้นเล็ก ๆ ล้างด้วยน้ำกรองฆ่าเชื้อ 1-2 ครั้ง จากนั้นหยดน้ำกรองฆ่าเชื้อบนชิ้นส่วนพืช บดด้วยแท่งแก้วลนไฟฆ่าเชื้อ จนเซลล์พืชแตก ทิ้งไว้ 3-5 นาที ใช้ลูปลนไฟฆ่าเชื้อแตะไปลากบนอาหาร Nutrient Glucose Agar บ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง นำมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหาร NGA ทดสอบคุณสมบัติการก่อให้เกิดโรค เก็บเชื้อบริสุทธิ์แต่ละไอโซเลทในหลอดอาหารเอียง น้ำนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการศึกษาระยะสั้น และเก็บในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาระยะยาว

2. การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว Nutrient broth บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ไปเปตดูดเชื้อ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ใน tube ทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ดูด supernatant (ส่วนใส) ที่อยู่ด้านบนทิ้ง เก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรีย นำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด Genomic DNA ตามขั้นตอนของชุดสกัด ดังนี้ ละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ด้วยน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำผสมให้เข้ากันด้วย vortex เติม Lysis solution 400 มิลลิลิตร เติม Chloroform 600 มิลลิลิตร (ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา) นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เก็บ supernatant ใส่หลอดใหม่ เติม Precipitation 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ดูด supernatant ทิ้ง เติม NaCl Solution 100 มิลลิลิตร (ละลายตะกอนให้เข้ากันดี) เติม Cold ethanol 300 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เก็บตะกอนดีเอ็นเอ เติม 70% ethanol 300 มิลลิลิตร เพื่อล้างดีเอ็นเอ หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCL, pH 8.0, 1 mM EDTA) ปริมาตร 50 µl เก็บไว้ที่ - 20°C จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอบนอะกาโรส 0.8% ด้วยวิธี eletophoresis เก็บสารละลายดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. ทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการตรวจเชื้อ

ทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์ สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีในรายงานเอกสารวิชาการต่าง ๆ สังเคราะห์คู่ไพรเมอร์แต่ละชนิด ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อทดสอบความจำเพาะ (specificity) ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค และแบคทีเรียซาโปรไฟท์ต่างๆ

ในเบื้องต้นทำการสังเคราะห์และทดสอบ คู่ไพรเมอร์สำหรับตรวจเชื้อ *B. gladioli* ได้แก่

LP1 (GGGGGGTCC ATTGCG) และ LP4 (AGAAGCTCGCGCCACG)

CMG-23-1 (ATAGCTGGTTCTCTCCGAA) และ G-23-2 (CCTACCATGCAYA TAAAT)

CMG-16-1 (AGAGTTTGATCMTGGCTC) และ G-16-2 (CGAAGGATATTAGCCCTC)

BG-CF (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) และ BG-CR (GGCTACCTTGTTACGACTTC)

คู่ไพรเมอร์สำหรับตรวจเชื้อ *E. chrysanthemi* และ/หรือ *E. carotovora* subsp. *carotovora*

ADE1 (GATCAGAAAGCCCGCAGCCAGAT) และ

ADE2 (CTGTGGCCGATCAGGATGG TTTTGTCGTGC)

ERWFOR (ACGCATGAAATCGGCCATGC) และ

CHRREV (AGTGCTGCCGTACAGCACGT)

และสืบค้นเพิ่มเติม เพื่อทดสอบหาคู่ไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการตรวจความจำเพาะและความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดในระดับดีเอ็นเอ และเซลล์

ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

สารประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10 X บัฟเฟอร์	2.5	1 X
$MgCl_2$	1.5	1.5 mM
dNTPs 2.5 mM	2	0.2 mM
ไพรเมอร์ ชนิดที่1 25 pM	1	25 pM
ไพรเมอร์ ชนิดที่ 2 25 pM	1	25 pM
Taq DNA polymerase 5 U/ ul	0.25	1.25 U
ดีเอ็นเอต้นแบบ 50 นาโนกรัม	1	50 ng
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	15.75	-

4. ทดสอบความจำเพาะในการตรวจเชื้อ *B. gladioli, E. chrysanthemi, E. carotovora* subsp. *carotovora* โดยการทดสอบปฏิกิริยาการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างดีเอ็นเอ และเซลล์ของแบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้แต่ละชนิด อย่างน้อย 50 ไอโซเลท และทดสอบกับแบคทีเรียซาโปรไฟท์ที่แยกเก็บจากตัวอย่างพืชและน้ำในแหล่งปลูก

5. ทดสอบปฏิกิริยาความไวในการตรวจเชื้อของคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในระดับดีเอ็นเอ และเซลล์แขวนลอยเชื้อ โดยใช้ดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *B. gladioli, E. chrysanthemi, E. carotovora* subsp. *carotovora* จำนวนชนิดละ 3 ไอโซเลท

การทดสอบความไวของคู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (sensitivity) โดยนำดีเอ็นเอของแบคทีเรียแต่ละชนิด จำนวนชนิดละ 3 ไอโซเลท นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เตรียมดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ ดังนี้

50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng, 10 fg, 5 fg, 1 fg

ทดสอบประสิทธิภาพความไวในการตรวจเชื้อด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ได้จากการทดสอบในข้อที่ 3 โดยใช้ DNA template ชนิดละ 1 ไมโครลิตร ต่อปฏิกิริยา

ทดสอบความไวในการตรวจเชื้อในระดับเซลล์ โดยเลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิบนอาหาร ชนิดละ 3 ไอโซเลท เช่นเดียวกับตัวอย่างที่ทดสอบความไวระดับดีเอ็นเอ นำแบคทีเรียเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยเชื้อด้วยน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ เจือจางความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 6 ระดับ (cell/ ml) ดังนี้ 10e8, 10e7, 10e6, 10e5, 10e4, 10e3, 10e2 ทดสอบความไวในการตรวจเชื้อ โดยใช้ตัวอย่างละ 1 ไมโครลิตร ต่อปฏิกิริยา

6. **ทดสอบปฏิกิริยาการตรวจเชื้อจากตัวอย่างตัวอย่างพืช และน้ำในแหล่งปลูก** โดยการเลียนแบบการติดเชื้อจากสภาพธรรมชาติ ทดสอบการตรวจเชื้อ *B. gladioli* จากกล้วยไม้สกุลแวนดา และม็อคคาร่า ทดสอบการตรวจเชื้อ *E. chrysanthemi* จากกล้วยไม้สกุลแวนดา และหวาย และทดสอบการตรวจเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* จากกล้วยไม้สกุลหวาย

<u>การตรวจเชื้อจากตัวอย่างพืช</u>

โดยตัดชิ้นส่วนพืชขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร นำมาบดตัวอย่างในน้ำ 500 ไมโครลิตร ดูดน้ำส่วนใสใส่หลอดทดลอง ทำการใส่เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย ให้มีความเข้มข้น 6 ระดับ (cell/ ml) ดังนี้ 10e8, 10e7, 10e6, 10e5, 10e4, 10e3, 10e2 นำไปทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เพื่อยืนยันผลการทดลอง

การตรวจเชื้อจากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการในแปลงที่มีปัญหาโรคระบาด เก็บตัวอย่างใบกล้วยไม้ นำมาเตรียมตัวอย่าง โดยสุ่มตัดใบ มาบดหรือสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยวางแผนการทดสอบอย่างน้อย 5 แหล่งปลูก แหล่งละ 10 ตัวอย่าง โดยสุ่มตรวจเป็นระยะในช่วงฤดูร้อนและฝน

<u>การตรวจเชื้อจากตัวอย่างน้ำ</u>

การตรวจเชื้อจากตัวอย่างน้ำในแหล่งปลูก เก็บตัวอย่างน้ำในแหล่งปลูกล้วยไม้ นำมาเตรียมตัวอย่างทดสอบ โดยใส่เชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และไม่ใส่เชื้อ ทดสอบปฏิกริยาพีซีอาร์ และวางแผนการเก็บตัวอย่างน้ำในแหล่งปลูกเพื่อตรวจทดสอบอย่างน้อย 5 แหล่งปลูก แหล่งละ 10 ตัวอย่าง โดยสุ่มตรวจเป็นระยะในช่วงฤดูร้อนและฝน

7. พัฒนาเทคนิค Real-Time PCR เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจเชื้อในระยะเวลารวดเร็ว สามารถอ่านผลได้ในเวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง โดยเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม จากการทดสอบคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ข้างต้น เลือกใช้คู่ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาดไม่เกิน 500 bp นำมาทดสอบปฏิกิริยา Real-time PCR เช่นเดียวกับในข้อที่ 4-6 ในกรณีที่มีปัญหาการยับยั้งปฏิกิริยาจากสารที่อยู่ในน้ำคั้นพืช หรือสารเคมีจากแหล่งปลูก จะทำการทดสอบโดย นำตัวอย่างที่เตรียมได้ในข้อที่ 6 เกลี่ยบนอาหารสังเคราะห์ก่อน แล้วบ่มทิ้งไว้ 4-24 ชั่วโมง จึงล้างผิวหน้าอาหาร และนำตัวอย่างมาทดสอบ ตามขั้นตอน Bio-PCR

8. รวบรวมและวิเคราะห์ผล สรุป เขียนรายงาน และตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัย เพื่อใช้เป็นวิธีการมาตรฐานสำหรับการตรวจเชื้อจากตัวอย่างเพื่อการนำเข้าและส่งออก

การทดลองที่ 3.2.4 การตรวจสอบไวรัส Pineapple mealybug wilt-associated virus-1 และ 2 สาเหตุโรคเหี่ยวสับปะรดโดยเทคนิค multiplex PCR

1. การออกแบบ primer

สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบส (full length) ของยีนต่างๆที่มีรายงานใน GenBank ของ PMWaV 1 และ PMWaV 2 แล้วออกแบบ primer ให้ครอบคลุมนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะเจาะจงกับไวรัสแต่ละ strain และออกแบบ primer ให้ครอบคลุมนิวคลีโอไทด์ที่พบทั่วไปในไวรัสทั้งสอง strain อย่างน้อย 3 คู่

2. การสกัด อาร์เอ็นเอ ของเชื้อ PMWaV-1 และ PMWaV-2 จากใบสับปะรด โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (MasterPureTMRNA Purification Kit ของบริษัท EPICENTRE)

3. ทดสอบและปรับระยะเวลารวมทั้งอุณหภูมิให้เหมาะสมในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณ cDNA โดยวิธี RT-PCR

นำ cDNA ของ PMWaV-1, PMWaV-2 และ PMWaV-1 + PMWaV-2 มาทดสอบ primer แต่ละคู่เพื่อหาคู่ primer และcondition ที่เหมาะสม ในการตรวจหาไวรัสทั้งสอง strain

4. ทดสอบความเฉพาะเจาะจงกับตัวอย่างพืชที่เก็บจากแปลงสับปะรด

สุ่มเก็บตัวอย่างสับปะรดพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้า เช่น พันธุ์ปัตตาเวีย พันธุ์เพชรบุรี พันธุ์ภูเก็ต และพันธุ์นางแล จากแหล่งปลูกต่างๆ มาทดสอบด้วยเทคนิค multiplex PCR หลังจากทราบว่า primer ชุดใดมีประสิทธิภาพสูงสุดในการตรวจว่า สับปะรด 1 ตัวอย่างมีไวรัส strain ใดเข้าทำลาย หรือเป็นการเข้าทำลายร่วมกัน

5. รวบรวมและวิเคราะห์ผล

6. สรุปและเขียนรายงาน

การทดลองที่ 3.2.5 การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุของโรคในอ้อยด้วย Membrane protein translocation system genes (Sec protein genes)

1. พัฒนาวิธีการตรวจสอบ *secA* gene ในอ้อยที่เป็นโรคใบขาวโดยประยุกต์วิธีการของ Hodgetts และคณะ (2008)

2. สำรวจเชื้อ จากแหล่งปลูกต่างๆ บันทึกอาการโรค ตำแหน่ง และแหล่งเก็บตัวอย่าง ได้แก่ อุดรธานี ขอนแก่น กาฬสินธุ์ มหาสารคาม สุพรรณบุรี อุตรดิตถ์ ลพบุรี กาญจนบุรี สระแก้ว รวมถึงตัวอย่างวัชชพืชบางชนิดที่พบในไร่อ้อย

3. เก็บตัวอย่างเชื้อที่ได้ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4. สกัดดีเอ็นเอ และทำการตรวจและสกัด *secA* gene ในตัวอย่างต่างๆ ตามวิธีการที่พัฒนาได้

5 สกัดชิ้นยีนที่ได้จากผลผลิตพีซีอาร์ ทำการถ่ายฝากเข้าสู่แบคทีเรีย

6 คัดเลือกโคลนอย่างน้อย 5 โคลน เพื่อตรวจสอบลำดับเบส

7 เปรียบเทียบลำดับเบส และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เปรียบเทียบข้อมูลในฐานข้อมูลของ NCBI จำแนกกลุ่ม

8. ออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะกับเชื้อชนิดต่างๆ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

9. ทดสอบไพร์เมอร์กับเชื้อที่มาจากแหล่งต่างๆ โดยใช้วิธีพีซีอาร์

10. ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไพร์เมอร์คู่ต่างๆ

11. คัดเลือกไพร์เมอร์ที่สามารถแสดงความแตกต่างของเชื้อจากแหล่งต่างๆ ได้อย่างชัดเจน

12. ทดสอบกับตัวอย่างและประเมินผล

13. วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกข้อมูลแถบดีเอ็นเอด้วยการถ่ายภาพโดยใช้เครื่อง Gel Documentation และวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักของแถบดีเอ็นเอยีนด้วยโปรแกรม Photocapt ของ Vilber Lourmat (France)
- บันทึกลำดับนิวคลิโอไทด์จากแต่ละตัวอย่างในฐานข้อมูลเพื่อใช้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI

การทดลองที่ 3.2.6 การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคพุ่มแจ้ (witches' broom) ของมันสำปะหลังโดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไฟโตรพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้(witches' broom) ของมันสำปะหลังจากข้อมูลที่เคยมีรายงานมาเพื่อใช้ประกอบการวิจัย

2. สำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคพุ่มแจ้(witches' broom) ของมันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกสำคัญของประเทศไทยโดยทำการบันทึกข้อมูลระหว่างการสำรวจได้แก่ ชื่อพืช สถานที่ วันที่

ลักษณะอาการ ส่วนของพืชที่แสดงอาการ ระยะการเจริญเติบโตของพืช และระดับความรุนแรงของโรค เป็นต้น

3. ทำการเก็บใบพืชและเก็บท่อนพันธุ์ที่แสดงอาการโรคจากที่สำรวจมาเพื่อใช้ทดสอบต่อไป

4. สกัดดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตรพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ (witches' broom) ของมันสำปะหลังด้วยวิธีที่เหมาะสม แล้วเก็บไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียล เพื่อใช้ทดสอบต่อในขั้นต่อไป

5. ทำการเลือกหรือออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความเฉพาะต่อกับเชื้อไฟโตรพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ (witches' broom) ของมันสำปะหลัง

6. ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเชื้อไฟโตรพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้(witches' broom) ของมันสำปะหลังด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยไพร์เมอร์ที่ได้เลือกหรือออกแบบไว้

7. การโคลนยีนในส่วนดีเอ็นเอเชื้อไฟโตรพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้(witches' broom) ของมันสำปะหลังที่สังเคราะห์ได้จากเทคนิค PCR โดยใช้พลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega) ทำการเพิ่มดีเอ็นเอสายผสมโดยถ่ายฝากสู่แบคทีเรีย E. coli โดยวิธีการ heat shock transformation

8. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของในส่วนดีเอ็นเอเชื้อไฟโตรพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ (witches' broom) ของมันสำปะหลังที่สังเคราะห์ได้ ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (ABI PRISM Version 3.0 model 377) ของหน่วยบริการชีวภาพ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez)

9. ทำการบันทึกข้อมูล และจัดทำรายงาน

การทดลองที่ 3.2.7 พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยกรดนิวคลีอิกตัวตรวจ

1. เก็บตัวอย่างโรคอ้อยใบขาว จากแปลงปลูกอ้อย จ.กาญจนบุรี แล้วนำท่อนพันธุ์จากแปลงที่ไปสำรวจมาเก็บไว้ในเรือนทดลองเพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อต่อไป

2.สืบค้นข้อมูลส่วนยีนของเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีศักยภาพเหมาะสมเพื่อนำมาสร้างเป็นกรดนิวคลีอิกตัวตรวจที่มีประสิทธิภาพสูง ดังนี้

2.1 สืบค้นข้อมูลจากรายงานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับเชื้อในกลุ่มไฟโตรพลาสมา หรือกลุ่มใกล้เคียง เช่น เชื้อในกลุ่มไมโครพลาสมา เป็นต้น

2.2 สืบค้นข้อมูลจากยีนของเซลล์แบคทีเรีย

3.ทำการออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนยีนที่มีศักยภาพเหมาะสมจาก GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) เพื่อนำมาออกแบบไพร์เมอร์โดยอาศัยโปรแกรม เช่น GeneFisher (http://www.bibiserv.techfak.unibielefeld.de/genefisher/)

4.สกัดดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยวิธี CTAB buffer (Doyle and Doyle, 1990) โดยตัดตัวอย่างอ้อยที่สุ่มมาจากแปลงทดสอบทั้งในส่วนกาบใบ ก้านใบ และใบ มาตัดให้ละเอียดเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.3-0.5 กรัม แล้วใส่ลงในโกร่งบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นเติมสารละลาย CTAB extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ; 20 mM EDTA, pH 8.0; 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 หรือ 2% 2-mercaptoethanol และ 2.0% PVP-40) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บดต่อให้เป็นเนื้อเดียวกันย้ายใส่ไมโครทิวบ์หลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ไมโครทิวบ์หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบนใส่ในไมโครทิวบ์หลอดใหม่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเติม isopropanal (2 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติม 3M sodium acetate,pH 5.2 (0.1 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 60ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนมาล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง และละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ หรือ TE buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร แล้วเก็บดีเอ็นเอที่สกัดแล้วไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียล เพื่อใช้ทดสอบต่อในขั้นต่อไป ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเชื้อไฟโตรพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยไพร์เมอร์ที่ได้ออกแบบไว้แล้ว

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ได้แก่

-	น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH_2O)	17.0	ไมโครลิตร
-	10x buffer	2.5	ไมโครลิตร
-	$MgCl_2$ (25 mM)	1	ไมโครลิตร
-	dNTP (10 mM)	1	ไมโครลิตร
-	ไพรเมอร์ forward (R16F2) (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
-	ไพรเมอร์ reverse (R16R2) (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
-	*taq* DNA polymerase (0.1 unit/µl)	0.5	ไมโครลิตร
-	ดีเอ็นเอต้นแบบ	1	ไมโครลิตร
	รวม	**25.0**	**ไมโครลิตร**

นำมาส่วนประกอบการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร ผสมกัน แล้วนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) โดยการตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

ขั้นที่ 1: 94°C นาน 3 นาที 1 รอบ

ขั้นที่ 2: 94°C นาน 1 นาที

ขั้นที่ 3: 52-56°C นาน 2 นาที

ขั้นที่ 4: 72°C นาน 3 นาที (ขั้นที่ 2 - 4) 34 รอบ

ขั้นที่ 5: 72°C นาน 10 นาที 1 รอบ

ขั้นที่ 6: 15°C นาน 15 นาที 1 รอบ

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% gel agarose เตรียมในสารละลาย 0.5 TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 8 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye 2 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 มาส่องดูขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator ทำการบันทึกภาพและสรุปผลที่เกิดขึ้น

5.ทำการโคลนยีนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตรพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยนำเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega) ดังนี้

5.1 โดยเตรียม DNA ให้บริสุทธิ์ ด้วยการแยกดีเอ็นเอตามขนาดโดยใช้วิธีการอีเล็คโตรโฟริซิส ด้วย 1.2% agarose gel ในสารละลาย 0.5X TBE buffer และตัดเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ ใส่หลอด centrifuge tube ชั่งน้ำหนักของเจล โดยจะต้องไม่เกิน 300 มิลลิกรัม นำมาสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)

5.2 เชื่อมต่อดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตรพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวที่บริสุทธิ์เข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega)) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase และบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

ซึ่งมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

T4 DNA Ligase 2X buffer	10.0 ไมโครลิตร
PGEM-T easy vector	1.0 ไมโครลิตร
PCR product	1.0 ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase (3 unit/μl)	2.0 ไมโครลิตร
H_2O	6.0 ไมโครลิตร
รวม	20.0 ไมโครลิตร

5.3 นำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย โดยถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH 5α ใช้วิธีการ heat shock transformation (Sambrook *et. al.,* 1989)

5.4 สกัดพลาสมิดลูกผสม ใช้วิธีการ Alkaline lysis (Sambrook *et. al.,* 1989) โดยเลือกโคโลนีสีขาวของเชื้อ *E. coli* ที่คาดว่ามีพลาสมิดลูกผสม เลี้ยงในอาหารเหลว LB 1 มิลลิลิตรที่เติมแอมพิซิลิน ปริมาตร 1 ไมโคลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูดเอาอาหารเหลวทิ้ง

เติมสารละลาย Solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 100ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture แล้วเติมสารละลาย Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS,ต้องเตรียมก่อนใช้งาน) ปริมาตร 200ไมโครลิตร ที่ ผสมให้เข้ากันแล้วแช่บนน้ำแข็งนาน 10 นาที และเติมสารละลาย Solution III (3 M potassium acetate, 0.2 M glacial acetic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแช่บนน้ำแข็งนาน 10นาที นำไปปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำส่วนใสใส่หลอดใหม่ และเติม absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรน้ำใส ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนพลาสมิดที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บตะกอนพลาสมิดและตากให้แห้ง แล้วละลายตะกอนพลาสมิดด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 ไมโครลิตร

6. นำพลาสมิดลูกผสมที่สกัดแล้วไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอเชื้อไฟโตรพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวที่สังเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (ABI PRISM Version 3.0 model 377) ของหน่วยบริการชีวภาพ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez)

7. ทำการติดฉลากกรดนิวคลีอิกด้วยการเชื่อมต่ออนุพันธุ์กับสารไดกอกซิเจนิน (digoxigenin-11-dUTP) (Roch)นำดีเอ็นเอเชื้อไฟโตรพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวที่สังเคราะห์จากผลผลิต PCR ปริมาตร 1 ไมโครลิตรในน้ำกลั่น 16 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือด 5 นาทีแล้วแช่น้ำแข็งทันทีเพื่อแยกสายดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว ทำการติดฉลากด้วยdigoxigenin-11-dUTP (Roch) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง ครบเวลาแล้วเติมสารละลาย 0.2 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นเติม 4 M LiCl ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ absolute ethanol ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอตัวตรวจที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ตากตะกอนดีเอ็นเอตัวตรวจให้แห้งและละลายด้วย TE buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

8. ทดสอบประสิทธิภาพกรดดีเอ็นเอตัวตรวจในตรวจวินิจฉัยเชื้อไฟโตรพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวด้วยเทคนิค dot blot hybridization

8.1 หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของดีเอ็นเอตัวตรวจสำหรับทำ dot blot hybridization โดยเจือจางดีเอ็นเอตัวตรวจในอัตราส่วน 1 : 10 1 : 20 1 : 40 1 : 80 และ 1 : 160 แล้วหยดลงแผ่นเมมเบรนที่มีอาร์เอ็นเอไวรัสที่ความเข้มข้น 20 30 40 และ 50 นาโนกรัม

8.2 ตรวจด้วยดีเอ็นเอตัวตรวจสำหรับทำ dot blot hybridization โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดจากพืชมาหยดลงบนแผ่นเมมเบรน ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วหยด 2X SSC ปริมาตร 2 ไมโครลิตรเพื่อแยกดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยว ผึ่งให้แห้งหมาดๆ นำไปฉายแสงอุลตราไวโอเลต นาน 2 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้ติดแน่นกับแผ่นเมมเบรน ย้ายแผ่นเมมเบรนใส่ถุงพลาสติกแล้วเติมสารละลาย hybridization นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ดีเอ็นเอตัวตรวจปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือนนาน 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที จากนั้นเติมในสารละลาย hybridization ปริมาตร 1

มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างแผ่นเมมเบรนด้วย washing solution I นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที และ washing solution II นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วย้ายแผ่นเมมเบรนในสารละลาย anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate ที่เจือจาง 1 : 5000 ใน buffer2 เติมสารละลายซับสเตรท BCTP/NBT ใน Alkaline phosphatase ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บแผ่นเมมเบรนบ่มในที่มืดและนิ่งที่อุณหภูมิ37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที สามารถอ่านผลจากของปฏิกิริยา hybridization จากสี หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

9. ทำการบันทึกข้อมูล สรุปผล และเขียนรายงานผลการวิจัย

- **การบันทึกข้อมูล**

1. เก็บข้อมูลที่ได้ในรูป data sheet และจัดทำรายงาน ผลการวิจัย

การทดลองที่ 3.2.8 การตรวจสอบเชื้อไวรัส Watermelon silver mottle virus (WSMoV)ที่เป็นสาเหตุโรคของพืชตระกลูแตงด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา

1.สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไวรัส Watermelon silver mottle virus (WSMoV) สาเหตุโรคในพืชตระกลูแตง เพื่อใช้ประกอบการวิจัย

2. สำรวจ และเก็บตัวอย่างแตงโมที่มีเชื้อไวรัส Watermelon silver mottle virus (WSMoV) สาเหตุโรคในพืชตระกลูแตงในพื้นที่ปลูกสำคัญของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น สกลนคร มหาสารคาม กาฬสินธุ์ ราชบุรี เป็นต้น โดยเก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตงโมที่แสดงอาการคล้ายกับที่เกิดจากทอสโพไวรัสเข้าทายลาย ได้แก่ แสดงอาการด่างจุดวงแหวน แผลเนื้อเยื่อตาย ผลมีสะเก็ดสีน้ำตาลเข้ม ใบด่าง เป็นต้น ใส่ตัวอย่างพืชในถุงพลาสติก ทำการบันทึกข้อมูลระหว่างการสำรวจได้แก่ สถานที่ วันที่ ชื่อพืช ระยะการเจริญเติบโตของพืช อาการและส่วนของพืชที่แสดงอาการ ความรุนแรงของโรค และถ่ายภาพลักษณะอาการโรค เป็นต้น

3.ทำการปลูกเชื้อไวรัส Watermelon silver mottle virus (WSMoV) บนพืชอาศัยโดยวิธีกล (Mechanical inoculation) โดยนำตัวอย่างเก็บจากข้อที่ 1 มาบดใน extraction buffer (0.05M phosphate buffer ph 7.0) ที่แช่เย็นโดยผสม 2-mercaptoethanol ในอัตรา 0.2 % ก่อนใช้ เมื่อบดจนได้น้ำคั้นพืชแล้วนำมาผสมกับผงซีไลย์หรือผงคาร์โบรันดัม ทาน้ำคั้นบนพืชอาศัย แล้วล้างใบพืชด้วยน้ำสะอาด นำไปไว้ที่โรงเรือนปลูกพืชเพื่อไว้เป็นแหล่งเชื้อสำหรับใช้ทดสอบและทำการ purification ต่อไป

4. หาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส Watermelon silver mottle virus (WSMoV) ที่เหมาะสม ได้แก่ โดยเปรียบเทียบจากคุณภาพของอาร์เอ็นเอของพืชทดสอบ ที่สกัดได้ด้วยวิธีการ 3 วิธี ได้แก่ วิธี CTAB buffer (Chang *et. al.,* 1993), วิธี GIC buffer โดยดัดแปลงวิธีของ MacKenzie *et. al.,* 1997, และ extraction buffer (Cenis *et. al.,* 1993) จากนั้นนำอาร์เอ็นเอมาตรวจสอบคุณภาพด้วยจากแถบอาร์เอ็นเอทั้งหมดโดยแยกขนาดใน 1 % agarose gel electrophoresis และการตรวจสอบ ndhB gene (NADH

dehydrogenase ND2 subunit) ซึ่งเป็น housekeeping gene ในคลอโรพลาสต์ โดยเทคนิค RT-PCR ซึ่งวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 3 วิธี มีขั้นตอนดังนี้

- วิธี CTAB buffer (Chang *et. al.,* 1993) โดยตัดตัวอย่างพืชมาตัดให้ละเอียดเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.3-0.5 กรัม แล้วใส่ลงในโกร่งบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นเติมสารละลาย CTAB extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ; 20 mM EDTA, pH 8.0; 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 หรือ 2% 2-mercaptoethanol และ 2.0% PVP-40) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บดต่อให้เป็นเนื้อเดียวกันย้ายใส่ไมโครทิวบ์หลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ไมโครทิวบ์หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบนใส่ในไมโครทิวบ์หลอดใหม่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเติม isopropanal (2 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติม 3M sodium acetate,pH 5.2 (0.1 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 60ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนมาล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง และละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ หรือ TE buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

- วิธี GIC buffer โดยดัดแปลงวิธีของ MacKenzie *et. al.,* 1997 โดยตัดตัวอย่างพืชมาตัดให้ละเอียดเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.3-0.5 กรัม แล้วใส่ลงในโกร่งบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นเติมสารละลาย GIC buffer (4M Guanindine thiocyanate, 0.2 M Sodium acetate pH 5.2, 25 mM EDTA pH 8.0 ,2.5% PVP-40 ,1% β-mercaptoethanol) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติม 20 % SDS ผสมให้เข้ากัน ย้ายใส่ไมโครทิวบ์หลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ปั่นตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ไมโครทิวบ์หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบนใส่ในไมโครทิวบ์หลอดใหม่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเติม isopropanal (2 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติม 3M sodium acetate,pH 5.2 (0.1 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนมาล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง และละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่ผ่านการทำลายเอนไซม์ RNase ด้วย diethylpyrocarbonate

(DEPC-water) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

- extraction buffer (Cenis *et. al.,* 1993) โดยตัดตัวอย่างพืชมาตัดให้ละเอียดเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.3-0.5 กรัม แล้วใส่ลงในโกร่งบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นเติมสารละลาย extraction buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.0 , 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 8.0; 1.0% Na_2SO_3 ,2% 2-mercaptoethanol) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บดต่อให้เป็นเนื้อเดียวกันย้ายใส่ไมโครทิวบ์หลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ไมโครทิวบ์หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบนใส่ในไมโครทิวบ์หลอดใหม่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเติม isopropanal (2 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติม 3M sodium acetate,pH 5.2 (0.1 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 60ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนมาล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง และละลายตะกอนด้วย Rnase-free water ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

6. ทำการเลือกหรือออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัส Watermelon silver mottle virus (WSMoV) ทำการค้นหาข้อมูลไพร์เมอร์ที่เคยมีรายงานมาแล้วเพื่อนำมาลองทดสอบกับโปรแกรม blast 2 เพื่อใช้เป็นแนวทางในการออกแบบไพร์เมอร์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส WSMoV ของส่วน coat protein geme ใน GenBank มาวิเคราะห์เพื่อออกแบบเป็นไพร์เมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง

7. ทำการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส Watermelon silver mottle virus (WSMoV) ด้วยเทคนิค One step reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยไพร์เมอร์ที่ทำการเลือกหรือออกแบบไว้แล้ว

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา One step RT-PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ได้แก่

-	น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH_2O)	17.0	ไมโครลิตร
-	10x buffer	2.5	ไมโครลิตร
-	$MgCl_2$ (25 mM)	1	ไมโครลิตร
-	dNTP (10 mM)	1	ไมโครลิตร
-	ไพรเมอร์ forward (10 pmol)	1	ไมโครลิตร

-	ไพรเมอร์ reverse (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
-	SuperscriplIIRT/platinum Taqmix (Invitogen,0.1 unit/µl)	0.5	ไมโครลิตร
-	อาร์เอ็นเอต้นแบบ	1	ไมโครลิตร
รวม		**25.0**	**ไมโครลิตร**

นำมาส่วนประกอบการทำปฏิกิริยา RT-PCR ปริมาตร ผสมกัน แล้วนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) โดยการตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

ขั้นที่ 1: 94°C นาน 3 นาที 1 รอบ

ขั้นที่ 2: 94°C นาน 1 นาที

ขั้นที่ 3: 52-56°C นาน 2 นาที

ขั้นที่ 4: 72°C นาน 3 นาที (ขั้นที่ 2 - 4) 34 รอบ

ขั้นที่ 5: 72°C นาน 10 นาที 1 รอบ

ขั้นที่ 6: 15°C นาน 15 นาที 1 รอบ

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% gel agarose เตรียมในสารละลาย 0.5 TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 8 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye 2 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 มาส่องดูขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator ทำการบันทึกภาพและสรุปผลที่เกิดขึ้น

8. ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส Watermelon silver mottle virus (WSMoV) แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) เพื่อยืนยันว่าไพร์เมอร์ที่ทำการเลือกหรือออกแบบไว้มีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุจริง

9. เมื่อมีการผลยืนยันจากข้อ 7 จึงใช้เทคนิค PCR รวมด้วยไพร์เมอร์ที่เลือกหรือออกแบบให้เฉพาะเจาะจงกับไวรัส WSMoV มาใช้ในการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ของพืชตระกูลแตงต่อไป

- ทดสอบกับเมล็ดพันธุ์ของพืชตระกูลแตงจากต้นที่เป็นโรค
- เพาะกล้าเมล็ดพันธุ์แตงที่เป็นโรคเพื่อทดสอบ

10. ทำการบันทึกข้อมูล และจัดทำรายงาน

การทดลองที่ 3.2.9 การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* โดยเทคนิค multiplex PCR

1. สืบค้นข้อมูล เพื่อหาลำดับเบสของชุดไพรเมอร์ที่ Lang et.al, (2010) ได้ออกแบบไว้ในการตรวจวินิจฉัยแบคทีเรีย X. oryzae pv. oryzae และ X. oryzae pv. oryzicola นำลำดับเบสมาสังเคราะห์ชุดไพรเมอร์เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2. การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ (Purified genomic DNA) การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีของ Pitcher *et al*. (1989) โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย X. oryzae pv. oryzae และ X. oryzae pv. oryzicola อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง LB ใช้ลูปฆ่าเชื้อ แตะเชื้อแบคทีเรียให้เต็มหนึ่งลูปละลาย ใน1 มิลลิลิตร Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย 100 ไมโครลิตร TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA pH 8.0) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ เครื่องปั่น vortex เติมด้วย 500 ไมโครลิตรของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 ไมโครลิตร ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20°C ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วย 500 ไมโครลิตร chloroform/iso-amyl-alcohol (24/1) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุ สาร isopropanol ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20°C จำนวน378 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอนเอด้วย 150 ไมโครลิตร ของ 70 % ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ลายตะกอนDNA ด้วย TE buffer pH. 8.0 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร บันทึกผลโดยวัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอนเอ ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่อง spectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลทให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

3. **ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR** โดยทดสอบปฏิกิริยา multiplex PCR ในการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ ด้วยชุดไพรเมอร์ที่ Lang et.al, (2010) ได้ออกแบบไว้ในการตรวจวินิจฉัยแบคทีเรีย X. oryzae pv. oryzae และ X. oryzae pv. oryzicola หา Tm ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยา multiplex PCR จะได้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่เหมาะสม ตลอดจนทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาในแต่ละช่วงเวลา บันทึกผล โดยบันทึก Tm และเวลา ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR ในแต่ละช่วงเวลา

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา multiplex PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ได้แก่

	Initial concentration	**V tube (1l)**	**Final concentration**
PCR buffer	10.0 x	2.00	1.0 x

MgCl2	25.0 mM	1.60	2.0 mM
dNTPs	2.5 mM	1.60	0.2 mM
Primer mix*		3.20*	
Xo3756F	5.0 8M	0.40	0.1 8M
Xo3756R	5.0 8M	0.40 0	1 8M
Xoo281-80F	5.0 8M	0.40 0	1 8M
Xoo281-80R	5.0 8M	0.40 0.	1 8M
Xoc318-3866F	5.0 8M	0.40 0	1 8M
Xoc318-3866R	5.0 8M	0.40 0	1 8M
Xoc321-3864F	5.0 8M	0.40 0	1 8M
Xoc321-3864R	5.0 8M	0.40 0	1 8M
Taq DNA Pol	5.0 U/1l	0.10	0.5 U
Water		6.50	
DNA template	80 ng/ 1l	5.00	

ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา multiplex PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามวิธีของ Lang et.al, (2010)

ปฏิกิริยา	**อุณหภูมิ ($^{\circ}$C)**	**เวลา (นาที)**
1. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (initial denaturing)	94	3
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	0.5
3. ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (primer annealing)	64	0.5
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension)	68	2
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	68	10

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 35 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 10 ul มาผสมกับ loading dye (0.025% bromophenol 28 blue, 40% Ficoll 400, 0.5% SDS) ปริมาณ 2 ul จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5 % อะกาโรสใน 0.5 xTAE (40mM Tris, 4mM sodium acetate, 1mM EDTA, pH 7.9) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง ย้อมดีเอ็นเอด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตพร้อมขนาดของแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับ marker

4. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา multiplex PCR ในการตรวจแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* เป็นการทดสอบ

primer ที่ออกแบบไว้ โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 มาทำการทดสอบความจำเพาะของ primer โดยใช้ DNA และเซลของแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ความเข้มข้นของ DNA ที่ 50 ng และความเข้มข้นของเซลล์ที่ 108 cfu/ml การทดสอบความไวในการตรวจสอบแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* (sensitivity) ของ primer เป็นการทดสอบ primer ที่ออกแบบไว้ โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 โดยใช้ DNA ของเชื้อแบคทีเรีย แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม และใช้เซลล์แบคทีเรีย แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ที่ความเข้มข้น 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตพร้อมขนาดของแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับ marker

5. ทดสอบวิธี multiplex PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* จากตัวอย่างโรคขอบใบแห้งและใบขีดโปร่งแสง และจากเมล็ดข้าว

การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างจากใบที่เป็นโรค นำใบที่เป็นโรคนำมาตัดเอาเฉพาะส่วนแผลที่มีทั้งส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กๆ นำไปแช่ในหลอดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ml เขย่าบนเครื่องเขย่า นาน 30 นาที นำน้ำที่ได้ไปตรวจด้วยเทคนิค multiplex PCR

ตัวอย่างจากเมล็ด นำเมล็ดข้าวจำนวน 5 กรัม นำมาใส่ลงในสารละลาย PBS 15 ml นำไปใส่ในเครื่อง sonicator นาน 10 นาที นำมาใส่สาร PVPP จำนวน 300 กรัม และ 150 mg ของ Na2SO3 จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 3 เก็บน้ำใสนำไปตรวจด้วยเทคนิค multiplex PCR บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตพร้อมขนาดของแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับ marker

ทดสอบวิธี multiplex PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* จากตัวอย่างที่เตรียมจากข้างต้นทั้งจากใบและเมล็ดตามวิธีการข้อที่ได้จากข้อ 3 บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตพร้อมขนาดของแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับ marker

การทดลองที่ 3.2.10 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ในหัวพันธุ์ปทุมมาด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

1. เตรียมเชื้อ *R. solanacearum* เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อ *R. solanacearum* ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ และเก็บรวบรวมไว้ใน culture collection ของกลุ่มงานบักเตรีวิทยา มาเลี้ยงในอาหาร Wakimoto's semisynthetic potato medium (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. การสกัดดีเอ็นเอเชื้อ *R. solanacearum* เพื่อใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา LAMP

ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เตรียมไว้จำนวน 1 ลูป ละลาย ใน Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 1 ml นำไปปั่นตกตะกอนด้วย

เครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติม TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 100 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมด้วยสารละลาย GES (Guanidine thiocyanate – EDTA– Sarkosyl solution) ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เก็บไว้ในตู้เย็น -20 $^{\circ}$C ปริมาตร 250 µl ผสมให้เข้ากัน วางแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วยสาร chloroform : isoamyl alcohol อัตรา 24 : 1 ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสใส่หลอดใหม่ที่มี isopropanol ที่แช่เก็บไว้ในตู้เย็น -20 $^{\circ}$C ปริมาตร 378 µl ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 150 µl จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 100 µl ปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 50 ng/µl เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา LAMP

3. ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP

ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP โดยการหาความเข้มข้นของสารในการทำปฏิกิริยา อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจาก *fliC gene* ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีน flagellin ของเชื้อ *R. solanacearum* และมีลักษณะ conserved (Kubota *et al*., 2008) ปฏิกิริยา LAMP 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยชุดไพรเมอร์ 1.6 µM FIP และ BIP, 0.2 µM F3 และ B3 primer, 0.4 µM loop B primer, 0.4 µM dNTPs, 1.0 M Betaine, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 6 mM $MgSO_4$, 0.1% Triton X-100 และ cell suspension ของเชื้อที่ต้องการทดสอบ บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งก่อน แล้วเติม 8U *Bst* DNA polymerase บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

4. ตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา LAMP ด้วยวิธีต่างๆ

4.1 วิธี gel electrophoresis เพื่อดูผลของปฏิกิริยา โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2% ใน 1X TBE (88.9 mM Tris, 8.9 mM boric acid, 2.5 mM EDTA) และใช้ Hyper ladder II (Bioline, USA) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 85 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นย้อมสีเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

4.2 วิธีการดูความขุ่นที่เกิดขึ้น โดยหลังจากเสร็จปฏิกิริยาแล้วจึงเติม 10 mU Tth-pyrophosphatase ทำให้เกิดตะกอนสีขาวของ magnesium pyrophosphate ขึ้น สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า

4.3 วิธีการดูสีฟลูออเรสเซนต์ โดยใส่ 50 µM calcein เพิ่มเติมในปฏิกิริยา เมื่อปฏิกิริยาเป็นบวก สาร calcein จะจับกับ magnesium มีสาร pyrophosphate เกิดขึ้น สาร pyrophosphate จะแย่งจับกับ magnesium ทำให้สาร calcein เป็นอิสระจึงให้แสงฟลูออเรสเซนต์ออกมา จากนั้นเลือกวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจสอบ

5. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อ *R. solanacearum*

เลี้ยงเชื้อ *R. solanacearum* และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคอื่นๆ บนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาละลายใน TE buffer (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ส่วนน้ำใส (supernatant) 5 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP ส่วนที่เหลือเก็บไว้ทำซ้ำ 3 ซ้ำ

6. ทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อ *R. solanacearum*

เลี้ยงเชื้อ *R. solanacearum* ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ บนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ทำให้เจือจางโดย วิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-7} เท่า จากนั้นนำ suspension ที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร มากระจายบนอาหาร Triphenyltetrazolium chloride (TZC) ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น และใช้ suspension ที่เหลือแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 80 ไมโครลิตร และ 10X TE ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ส่วนน้ำใส 5 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP ส่วนที่เหลือเก็บไว้ทำซ้ำ 3 ซ้ำ

7. ทดสอบเทคนิค LAMP ในการตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* จากตัวอย่างหัวพันธุ์ปทุมมา

นำหัวพันธุ์ปทุมมามาตัดแช่น้ำนึ่งฆ่าเชื้อให้ท่วม ตั้งทิ้งไว้นาน 15 นาที นำส่วนน้ำใสละลายใน TE buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ส่วนน้ำใส (supernatant) 5 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP

การทดลองที่ 3.2.11 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Grapevine yellow speckle viroid* (GYSVd) เชื้อสาเหตุโรคในองุ่นด้วยวิธีอณูชีววิทยา

ขั้นที่1 สืบค้นข้อมูลและเตรียมการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูลของเชื้อ Grapevine yellow speckle viroid
2. ออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับใช้ตรวจสอบโรค
3. เตรียมอุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็นสำหรับงานวิจัยในขั้นตอน; การปลูกเชื้อ, การสกัดอาร์เอ็นเอ, การทำ RT-PCR, การ cloning และ sequencing

ขั้นที่2 สำรวจ เก็บตัวอย่าง และการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคจากพื้นที่ผลิตองุ่นที่มีรายงานการระบาดของโรค เช่น นครราชสีมา สระบุรี และราชบุรี

2. ปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ ได้แก่ มะเขือเทศพันธุ์ Rutgers มะอึก และ Gynura เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติการถ่ายทอดโรค

ขั้นที่3 การตรวจวินิจฉัยเชื้อด้วยเทคนิค RT-PCR และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

1. ทดสอบหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอจากใบอ่อนที่เหมาะสมและมีประสิทธิ

2. สกัดอาร์เอ็นเอตัวอย่างด้วยวิธีการที่เหมาะสม และตรวจวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิค RT-PCR และหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา RT-PCR พร้อมตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ

3. cloning ชิ้น DNA ที่เพิ่มปริมาณได้จากขั้นตอนที่ (7) โดยเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด (pGEM-T easy vector) และถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย E. coli สายพันธุ์ DH 5□ □ โดยใช้วิธีการ heat shock transformation (Fristch et al., 2001) ตรวจสอบ clone ที่ได้พร้อมกับสกัดพลาสมิดลูกผสม และส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

4. วิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรอยด์ที่ได้กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานใน GenBank โดยอาศัยโปรแกรม Blastn วิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของเชื้อไวรอยด์ด้วยโปรแกรม mfold RNA-Folding-Form และทำการจัดจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อไวรอยด์ด้วยโปรแกรม ClustalW2

5. เก็บรวบรวมและวิเคราะห์ผลข้อมูลที่ได้ รวมถึงเก็บรักษา clone ของเชื้อไวรอยด์ที่ตรวจพบ

6. สรุปผลและเขียนรายงานผลการวิจัย พร้อมจัดทำรายงานผลการทดลอง

การทดลองที่ 3.2.12 การจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟฝ้าย *Trips palmi* Karny ในประเทศไทยโดยเทคนิค Real-time PCR

1. การเตรียมตัวอย่างเพลี้ยไฟ (Acquisition of *Thrips* material)

การเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟดำเนินการในแปลงปลูกพืชเกษตรกร ทั้งนี้โดยทำการบันทึกรายละเอียดประกอบไปด้วย พืชอาศัย แหล่งที่เก็บ รวมถึงพิกัดทางภูมิศาสตร์ เก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟชนิดอื่นนอกเหนือจาก *T. palmi* เพื่อใช้เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบ เช่น *T. tabaci* เก็บรักษาตัวอย่างในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็น (95% ethanol) หลังจากนั้นนำตัวอย่างแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แบ่งตัวอย่างที่เก็บออกเป็น 2 ส่วน ตัวเต็มวัยส่วนหนึ่งเก็บเพื่อทำสไลด์ถาวร (ตัวอย่างแห้ง) อีกส่วนทั้งระยะตัวเต็มวัยและระยะอื่นๆ เก็บเพื่อรอการสกัด ดี เอ็น เอ (ตัวอย่างสด) ทำการจัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาดำเนินการตามคู่มือการตรวจจำแนกชนิดโดย ศิริณี (2554) ณ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การสกัด ดี เอ็น เอ (DNA extractoin)

การสกัด ดี เอ็น เอ สามารถดำเนินการได้ ทั้งระยะไข่ ดักแด้ และตัวเต็มวัย (Kox *et at*., 2005) การสกัด ดี เอ็น เอ สามารถเลือกดำเนินการได้ 2 ลักษณะขึ้นอยู่กับสถานะการ และความเหมาะสมของเครื่องมือและห้องปฏิบัติการ ในที่นี้ดำเนินการสกัด ดี เอ็น เอ โดยวิธีเพื่อการเก็บรักษาตัวอย่างหลัง (non-destructive DNA extraction) หากไม่ได้ผลผลิต ดี เอ็น เอ จึงดำเนินการโดยวิธี การบดตัวอย่าง การปฏิบัติการวิจัย

ขั้นตอนนี้ดำเนินการ ณ ห้องปฏิบัติการวิจัยทางชีวโมเลกุล สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2.1 การสกัด ดี เอ็น เอ เพื่อการเก็บรักษาตัวอย่าง (non-destructive DNA extraction protocol) ข้อดีของวิธีนี้คือหลังจากทำการสกัด ดี เอ็น เอ ยังสามารถเก็บตัวอย่าง ใช้ในการทำสไลด์เพื่อใช้อ้างอิงต่อไป (voucher specimens) วิธีการสกัด ดี เอ็น เอ ชนิดนี้เรียกว่า “salting-out” ซึ่งพัฒนาจาก Sunnucks and Hales (1996) และ Rugman-Jones *et al*. (2006) โดยนำตัวอย่างเพลี้ยไฟจาก 95% ethanol มาทำให้แห้งโดยวางไว้บนกระดาษกรอง 2 นาที เตรียมหลอดทดลองขนาด 0.5 ml (low-binding microfuge tube) เติมสารทำละลายบัฟเฟอร์ TNES (50 mM Tris, pH 7.5, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA, and 0.5% SDS) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และ เอ็นไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteinase K 10 mg/ml) 1.7 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดทดลอง ใช้เข็มขนาดเล็ก (sterilized minute pin) เจาะตรงบริเวณส่วนท้องของเพลี้ยไฟ นำหลอดทดลองอบ (incubate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง เติมสารละลาย 5M NaCl ปริมาณ 28 ไมโครลิตรและเขย่านาน 15 วินาที นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 5 นาที ถ่ายสารละลายส่วนบน (supernatant) ลงในหลอดทดลองใหม่ เติม 100% ethanol ที่แช่เย็นในปริมาณที่เท่ากันทุกหลอด นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 5 นาที ทำการล้าง ดี เอ็น เอ ด้วยการเติม 70% ethanol ที่แช่เย็น หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น 30 ไมโครลิตร นำตัวอย่างเพลี้ยไฟ จากการปั่นเหวี่ยงในครั้งที่ 1 แช่ใน 5% NaOH นาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาทำสไลด์ถาวรต่อไป

2.2 การบดตัวอย่าง (destructive techniques) ดำเนินการตามเทคนิคในการสกัด ดี เอ็น เอ จากเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตทั้วไป (DNA extraction protocol from mammalian tissue) ดำเนินการโดยบดตัวอย่าง ด้วยหลอดขนาดเล็ก (micro pestle) ในสารละลาย Lysis buffer 200 ไมโครลิตร. หลังจากนั้นทำการสกัด ดี เอ็น เอ ด้วยสารละลาย STE buffer 50 ไมโครลิตร (เตรียมจาก 10 mM Tris-HCL, pH 8.5) นำสารละลายที่ได้มาอบ (incubate) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที ทั้งนี้อาจใช้เอ็นไซม์เพื่อย่อยสลายโปรตีน (proteinase-K-based DNA extraction) ช่วยในการสกัด ดี เอ็น เอ

3 การเพิ่มปริมาณ ดี เอ็น เอ ด้วยเทคนิค real-time PCR เพื่อตรวจวินิจฉัยชนิดเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* (real-time PCR assay for *Thrips palmi*)

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วนตามชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1 ไพรเมอร์ SCAR (SCAR marker-generated sequence-based real-time PCR assay) พัฒนาประยุกต์วิธีการทดลองตาม Walsh *et al*. (2005) ไพรเมอร์และโพรบ (Probe) ที่ใช้สำหรับการทดลองได้แก่

PCR primer: P4E8-362F (5’-CCGACAAAATCGGTCTGATGA-3’)

PCR primer: P4E8-439R (5’-GAAAAGTCTCAGGTACAACCCAGTTC-3’)

TaqMan probe: P4E8-385T (FAM 5’-AGACGGATTGACTTAGACGGGAACGGTT-3’)

ดำเนินการโดยใช้ชุดเพิ่มปริมาณ ดี เอ็น เอ สำเร็จรูป (core reagent kit) TaqMan PCR โดยใช้ ดี เอ็น เอ ตั้งต้น 1 µl (10-20 ng), ไพรเมอร์แต่ละชนิดใช้ 7.5 pmol, และโพรบ (probe) 2.5 pmol ซึ่งรวมสารละลายตั้งต้นปฏิกิริยาที่ใช้ทั้งสิ้น 25 µl ดำเนินปฏิกิริยา PCR อุณหภูมิรอบ (PCR thermocycler steps: Initial denaturation, Denaturation, Annealing, and Extention) ตามขั้นตอนดังนี้ 95 °C นาน 10 นาที ใช้ระยะเวลา 40 รอบใน 1 นาทีที่อุณภูมิรอบ 60 °C และ 95 °C 15 วินาที ตรวจจับการเพิ่มของปริมาณ ดี เอ็น เอ โดยใช้ fluorescence ของ ABI Prism 7700 หรือ ABI 7900HT (Sequence Detection Systems) หากสารละลายตั้งต้นเป็น ดี เอ็น เอ จากตัวอย่างของ *T. palmi* ค่า cycle threshold (Ct values) ควรมีค่าต่ำกว่า 40

3.2 ไพรเมอร์ CO I (CO I sequence-based real-time PCR assay) พัฒนาประยุกต์วิธีการทดลองตาม Kox *et al*. (2005) ไพรเมอร์และโพรบ (Probe) ที่ใช้สำหรับการทดลองได้แก่

PCR primer: Tpalmi 139F* (5’-TCATGCTGGAATTTCAGTAGATTTAAC -3’)

PCR primer: Tpalmi 286R* (5’-TCACACTRAATAATCTTAGTTTTTCTCTTG-3’)

TaqMan probe: TpP (6-FAM 5’-TAGCTGGGGTATCCTCAA-3’ MGB)

ดำเนินการโดยใช้ชุดเพิ่มปริมาณ ดี เอ็น เอ สำเร็จรูป (core reagent kit) TaqMan PCR ชุดสารละลาย ดี เอ็น เอ ตั้งต้น (reaction mixture) มีปริมาณ 25 µl ซึ่งประกอบไปด้วย 2x TaqMan Universal Master Mix 12.5 µl, ไพรเมอร์แต่ละชนิดใช้ 0.9 µM, และโพรบ (probe) 0.1 µM TaqMan probe ใช้ ดี เอ็น เอ ตั้งต้น 1 µl ตรวจจับการเพิ่มของปริมาณ ดี เอ็น เอ โดยใช้ fluorescence ของ ABI Prism 7700 หรือ ABI 7900HT (Sequence Detection Systems) ปฏิกิริยา PCR อุณหภูมิรอบ (PCR thermocycler steps: Initial denaturation, Denaturation, Annealing, and Extention) ตามขั้นตอนดังนี้ 95 °C นาน 10 นาที ใช้ระยะเวลา 40 รอบใน 1 นาทีที่อุณภูมิรอบ 60 °C และ 94 °C 15 วินาที หากสารละลายตั้งต้นเป็น ดี เอ็น เอ จากตัวอย่างของ *T. palmi* ค่า Ct values ควรมีค่าต่ำกว่า 40

การบันทึกข้อมูลของทั้ง 2 การทดลอง ทำการบันทึกอุณหภูมิของ PCR thermocycler steps และค่า cycle threshold (Ct values) เมื่อมีการตรวจวินิจฉัยพบ *T. palmi* บันทึกระยะเวลาในการตรวจวินิจฉัยในแต่ละตัวอย่าง ส่วนในกรณีที่ค่า Ct สูงกว่า 40 แสดงว่าไม่มีการพบ *T. palmi* ถึงแม้ว่ามี product DNA และตัวอย่างที่ศึกษาทดลองเป็นเพลี้ยไฟฝ้ายจริง ให้ปรับเปลี่ยนค่า PCR thermocycler steps หลังจากนั้นทำการทดลองซ้ำ หากยังไม่มีการตรวจพบให้บันทึกผลเป็น negative result สำหรับตัวอย่างเพลี้ยไฟที่ไม่ใช่ *T. palmi* และค่า Ct values มากกว่า 40 ให้บันทึกผลเป็น negative

กิจกรรมย่อยที่ 3.3 การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูธรรมชาติโดยอณูชีววิธี

การทดลองที่ 3.3.1 การจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* ที่พบในประเทศไทย โดยเทคนิค PCR

ขั้นตอนที่ 1 ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bt* ในการกำจัดหนอนกระทู้ผักหรือหนอนกระทู้หอม โดยให้หนอนกินอาหารที่มีเชื้อ *Bt* จากนั้นบันทึกข้อมูลหนอนตายทุก 24 ชั่วโมง 7 วัน วิเคราะห์ข้อมูล

ขั้นตอนที่ 2 นำเชื้อแบคทีเรีย *Bt* ที่เก็บได้จากแหล่งต่างๆ และทดสอบแล้วว่าสามารถกำจัดหนอนกระทู้ผักหรือหนอนกระทู้หอมที่มีการตายมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ มาสกัดสารพันธุกรรม DNA โดยนำเชื้อ *Bt* 5 ml บ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB และเขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C 1 คืน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที 5 นาที ทำให้แขวนลอยอีกครั้งในน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่ม ใน dry- ice แอลกอฮอล์ 10 นาที และบ่มในน้ำเดือด 10 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที 5 นาที นำส่วนที่ตกตะกอนไปใช้ในปฏิกิริยา PCR ต่อไป

ขั้นตอนที่ 3 ใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ ได้แก่

cry1Aa(d)	5′ ATTATCATATTGATCAAGTTC 3′
(r)	5′ CATAAGGAACCCGTACCTGG 3′
cry1Ab (d)	5′ GGACCAGGATTTACAGGAGG 3′
(r)	5′ GTTCTCCTACTAATGGTTTCC 3′
cry1Ac (d)	5′ CTCAATGGGACGCATTTCTT 3′
(r)	5′ CGGTTGTAAGGGCACTGTTC 3′
cry1I (d)	5′ AGCTATGGCCTAAGGGGAAA 3′
(r)	5′ TTCCAACCCAACTTTCAAGC 3′
cry25 (d)	5′ CAAAAGAATGGATGAGAGTG 3′
(r)	5′ CTTTATTTGCACAGGCACG 3′
cry3(d)	5′ CCTGGCTATGTGGATTTCGT 3′
(r)	5′ CGAATGGCTTGGTTATGGAA 3′

ขั้นตอนที่ 4 นำดีเอ็นเอ ที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2.5 ไมโครลิตร ของ10x PCR buffer (500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris HCl, (pH 8.3), 1 mg /ml BSA, 100 mM $(NH_4)_2SO_4$), 1.25 ไมโครลิตร ของ 2 mM dNTP mixture, 0.25 ไมโครลิตร ของ 20 mM ไพรเมอร์ แต่ละชนิด, 0.1 ไมโครลิตร ของ 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (RBC bioscience, Taiwan) จากนั้นนำไปทำ PCR โดยมีขั้นตอนดังนี้

Initial denaturation	ที่ 94°C	3 นาที
Denaturation	ที่ 94°C	1 นาที
Annealing	ที่ 55°C	2 นาที
Extension	ที่ 72°C	2 นาที
Final extension	ที่ 72°C	7 นาที

35 รอบ

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 0.5x TBE (0.045 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.045 M Boric acid, 0.013 M EDTA) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ของยีนที่อยู่ใน recombinant plasmid เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี สายพันธุ์ ต่าง ๆ ที่มีรายงานใน GenBank

การทดลองที่ 3.3.2 การจำแนกเชื้อ Nucleopolyhedrovirus ที่พบในประเทศไทยโดยเทคนิค PCR

การเก็บตัวอย่าง

1. เก็บตัวอย่างเชื้อไวรัสจากหนอนหนอนผีเสื้อศัตรูพืช หรือแมลงที่มีอาการติดเชื้อไวรัสจากแหล่งปลูกผัก แปลงไม้ดอกไม้ประดับ ในภาคเหนือได้แก่ จังหวัดตาก กำแพงเพชร ภาคอีสานได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา ขอนแก่น เลย ภาคกลางได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม เพชรบุรี ลพบุรี สระบุรี ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดเพชรบุรี นครศรีธรรมราช สงขลา

2. เก็บตัวอย่างหนอนผีเสื้อศัตรูพืชใส่ในขวดดองแมลงที่มีน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร บันทึกข้อมูลสถานที่เก็บตัวอย่าง ชนิดพืชอาศัย อาการของหนอนที่เป็นโรค

การจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผลึกไวรัส

1. นำขวดตัวอย่างเชื้อที่เก็บได้มาทำสไลด์ โดยเขย่าให้ตัวอย่างหนอนแตกออกด้วยเครื่องเขย่า

2. เตรียมสไลด์โดยใช้น้ำกลั่นเจือจางตัวอย่างเชื้อปริมาณ 1 loop ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

3. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า ตรวจดูผลึกเชื้อไวรัสซึ่งจะมีลักษณะเป็นรูปหลายเหลี่ยม บันทึกข้อมูล

4. เตรียมตัวอย่างผลึกไวรัสเพื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน บันทึกภาพ

การเพาะเลี้ยงแมลงอาศัยของเชื้อไวรัส

1. เก็บหนอนศัตรูพืชจากแปลงปลูกพืชมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารเทียมสูตรของกรมวิชาการเกษตร จนครบวงจรชีวิต

2. เพาะเลี้ยงหนอนศัตรูพืช ให้อยู่ในวัย 3 (อายุประมาณ 5 วัน) ก่อนนำไปทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดแมลงของเชื้อไวรัส

การศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง

1. นำเชื้อไวรัสใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยน้ำตาลซูโครส ที่ 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยตะแกรงขนาด 0.5 ไมครอน เพื่อทำให้เชื้อบริสุทธิ์

2. เตรียมตัวอย่างเชื้อไวรัสแต่ละตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น $1x10^{9}$ ด้วยน้ำกลั่น

3. หยดเชื้อไวรัส 30 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเทียมขนาด 4 กรัม ในถ้วยขนาด 2 ออนซ์ ทิ้งให้แห้ง จำนวน 30 ถ้วย ต่อไวรัสแต่ละตัวอย่าง

4. ใส่หนอนที่อดอาหาร 2 ชั่วโมง 1 ตัวต่อถ้วย

5. บันทึกการข้อมูลอาการหนอนทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 10 วัน นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนของเชื้อไวรัสแต่ละตัวอย่าง คัดเลือกเชื้อที่ทำให้หนอนตาย มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในการจำแนกเชื้อโดยวิธี PCR ต่อไป

<u>การจำแนกเชื้อ Nucleopolyhedrovirus โดยเทคนิค PCR</u>

1. ปั่นตกตะกอนไวรัส เอ็นพีวี ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำกลั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. สกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี CTAB (Fluton *et al.*, 1995) โดยเติม CTAB ซึ่งอุ่น 65°C ก่อนใช้ จำนวน 2 มิลลิลิตร ลงในตะกอนที่ได้ ดูดสารละลาย 700 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มตัวอย่างไว้ที่ 65°C เป็นเวลา 30 นาที เขย่าตัวอย่างไปมาทุกๆ 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย chloroform:octanol (24:1) 700 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอดให้แน่น เขย่าอย่างแรงประมาณ 2-3 นาทีนำไปปั่นตกตะกอนที่ 14,000 รอบต่อนาที 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบน ใส่หลอดทดลองใหม่ เติม isopropanol 700 ไมโครลิตร ลงในส่วนใส เขย่าเบาๆ 30 วินาที ปั่นตกตะกอน 14,000 รอบต่อนาที 1 นาที เทสารละลายทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอที่ตกตะกอนอยู่ก้นหลอดไว้ให้แห้ง เติมสารละลาย 80% ethanol 1000 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุดออกจากก้นหลอด ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ 14,000 รอบต่อนาที 3 นาที เทสารละลายทิ้ง ตากตะกอนให้แห้งประมาณ 3 ชั่วโมงหรือข้ามคืน เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE buffer 500 ไมโครลิตร รอจนดีเอ็นเอละลายหมด วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A260/A280

3. นำดีเอ็นเอ ที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2.5 ไมโครลิตร ของ 10x PCR buffer (500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris HCl, (pH 8.3), 1 mg /ml BSA, 100 mM $(NH_4)_2SO_4$), 1.25 ไมโครลิตร ของ 2 mM dNTP mixture, 0.25 ไมโครลิตร ของ 20 mM ไพรเมอร์ แต่ละชนิด, 0.1 ไมโครลิตร ของ 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (RBC bioscience, Taiwan) จากนั้นนำไปทำ PCR โดยมีขั้นตอนดังนี้

Initial denaturation ที่ 94°C	3 นาที		
Denaturation ที่ 94°C	1 นาที		
Annealing	ที่ 55°C	2 นาที	35 รอบ
Extension	ที่ 72°C	2 นาที	
Final extension	ที่ 72°C	7 นาที	

4. นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 0.5x TBE (0.045 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.045 M Boric acid, 0.013 M EDTA).

5. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ของยีนที่อยู่ใน recombinant plasmid เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี สายพันธุ์ ต่าง ๆ ที่มีรายงานใน GenBank

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกข้อมูลสถานที่เก็บตัวอย่างท้องที่ ตำบล อำเภอ จังหวัด อาการของหนอนที่เป็นโรค ชนิดพืชอาศัย

2. บันทึกข้อมูลสัณฐานวิทยาผลึกไวรัสจากหนอนแต่ละตัวอย่าง ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

3. บันทึกข้อมูลอาการหนอนที่ได้รับเชื้อไวรัส ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 10 วัน

กิจกรรมย่อยที่ 4 การพัฒนาเทคนิคอย่างง่ายและรวดเร็วในการแยกศัตรูพืชเพื่อการวินิจฉัย

การทดลองที่ 3.4.1 การพัฒนาชุดตรวจสอบและเทคนิคการแยกไส้เดือนฝอยในรากพืช

1. การทดสอบประสิทธิภาพของสารบางชนิดในการแยกไส้เดือนฝอยกลุ่ม migratory endoparasite ออกจากรากพืช

วิธีดำเนินการ

1. สารที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ สารฆ่าเชื้อ สารกำจัดแมลง และสารสกัดจากพืช

2. ไส้เดือนฝอยที่ใช้ในการทดสอบคือ *Radopholus similis* ที่เพาะเลี้ยงจากชิ้นแครอทในสภาพปลอดเชื้อ

3. ต้นพืชทดสอบ ได้แก่ กล้วย กล้วยไม้ กวักมรกต ฟิโลเดนดรอน หน้าวัว และพืชน้ำสกุล *Vallisnaria* sp. เตรียมต้นพืชโดยวิธีการปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย *R. similis* จำนวน 200-500 ตัว/ต้น

4. วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD ประกอบด้วย 2 ปัจจัยคือ ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของสาร 4 ระดับ และปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาการแช่ 3 ระดับ จำนวน 4 ซ้ำ แบ่งเป็นการทดลองตามชนิดของสารคือ

4.1 ทดสอบความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่รากในสารฆ่าเชื้อ

4.2 ทดสอบความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่รากในสารกำจัดแมลง

4.3 ทดสอบความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่รากในสารสกัดจากพืช

วิธีปฏิบัติ นำรากพืชทดสอบที่ถูกไส้เดือนฝอย *R. similis* เข้าทำลาย จำนวน 5 ต้น/ซ้ำ ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แช่ในสารกลุ่มต่างๆ ตามระยะเวลาในแต่ละกรรมวิธี โดยใส่ในขวด flask ขนาด 250 มล. ปริมาตร 100 มล. จากนั้นเทน้ำผ่านตะแกรงหยาบ 20 mesh แยกชิ้นส่วนรากทิ้งไป นำน้ำที่ได้ผ่านตะแกรงละเอียดขนาด 400 mesh แยกได้ไส้เดือนฝอยที่อยู่บนตะแกรง เทเก็บน้ำและไส้เดือนฝอยนำไปตรวจนับจำนวน

<u>บันทึกผล</u> จำนวนของไส้เดือนฝอย *R. similis* แต่ละกรรมวิธี ที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย

2. การพัฒนาชุดตรวจสอบ (Nema test kit) ภาคสนาม

2.1 เปรียบเทียบวิธีการแช่สารกับวิธีการอื่นๆ เพื่อแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพืช โดยทำการทดสอบในรากพืชทดสอบที่ถูกไส้เดือนฝอย *R. similis* เข้าทำลาย วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ได้แก่ กรรมวิธีที่ 1 แยกโดยวิธีแช่รากพืชในเครื่อง Ultrasonic ความถี่ 50/60 KHz เป็นเวลา 20 นาที กรรมวิธีที่ 2 แยกโดยเครื่องพ่นหมอก (Mist chamber) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรรมวิธีที่ 3 แยกโดยวิธีหมุนเหวี่ยงด้วยสารละลายน้ำตาล (Sucrose-centrifuge method) กรรมวิธีที่ 4 แยกโดยวิธีแช่รากในสารและระยะเวลาที่ได้จากข้อ 1

<u>บันทึกผล</u> จำนวนของไส้เดือนฝอย *R. similis* แต่ละกรรมวิธี ที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย

2.2 การพัฒนาชุดตรวจสอบ เป็นชุดตรวจสอบภาคสนามแบบใหม่หรือเรียกว่า Nema test kit ประดิษฐ์เป็นกล่องเครื่องมือ (Toolkit) ใช้ตรวจไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายในรากพืชซึ่งพัฒนาให้มีขนาดเล็กน้ำหนักเบา โดยเจ้าหน้าที่ผู้ตรวจรับรองฟาร์มผลิต (Inspector) หรือเกษตรกร สามารถพกพาไปใช้ในแหล่งผลิตพืชไม้น้ำ สวนไม้ดอกไม้ประดับได้สะดวก ตลอดจนใช้ตรวจแยกไส้เดือนฝอยจากชิ้นส่วนของพืชต้องสงสัยชนิดอื่นๆ เช่น กล้วยไม้ หน้าวัว Philodendron และกวักมรกต ได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ
ภายใน Nema test kit ประกอบด้วย

1) สารเคมีชนิดดูดซึมมีประสิทธิภาพในการขับไล่ไส้เดือนฝอยออกจากรากอย่างรวดเร็ว

2) กระบอกบรรจุเลนส์ขยายขนาด 50-100 เท่า สำหรับตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอย

3) คู่มือการตรวจไส้เดือนฝอยในรากพืชส่งออก ประกอบด้วยรายละเอียดของวิธีการใช้ Nema test kit ภาพแสดงรูปร่างลักษณะของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชกักกันที่สำคัญ (*Radopholus* และ *Hirschmanniella*) และคำแนะนำหรือข้อควรปฏิบัติในการกำจัดไส้เดือนฝอยและควบคุมการแพร่ระบาดในแหล่งผลิตพืช

4) วัสดุ-อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็นในการตรวจไส้เดือนฝอย ได้แก่ จานตรวจไส้เดือนฝอย ที่ดูดสาร และสไลด์แก้ว เป็นต้น

<u>บันทึกผล</u> นำไปทดสอบการใช้งานจริงในภาคสนามโดย Inspector และเกษตรกร พร้อมกรอกข้อมูลแบบสอบถามความพึงพอใจของผู้ใช้ Nema test kit

a. การฝึกอบรมการใช้เครื่องมือ Nema test kit ให้กับเกษตรกร ผู้ประกอบการไม้น้ำ-ไม้ประดับ เจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช และบุคลากรที่เกี่ยวข้อง

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

กิจกรรมที่ 1 อนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศวิทยาของศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมย่อยที่ 1.1 อนุกรมวิธานชีววิทยา นิเวศวิทยาของ แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติ

การทดลองที่ 1.1.1 อนุกรมวิธานของเพลี้ยอ่อนวงศ์ย่อย Hormaphidinae

เพลี้ยอ่อนวงศ์ย่อย Hormaphidinae อยู่ในวงศ์ (family) Aphididae เป็นแมลงปากดูดขนาดเล็ก ลำตัวอ่อนนุ่มเคลื่อนไหวช้า ลำตัวค่อนข้างกลมแบน มีไขรอบลำตัว หนวดสั้นมี 4 -5 ปล้องการศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยอ่อนวงศ์ย่อย Hormaphidinae ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2555 เพื่อทราบชนิด พืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย ของเพลี้ยอ่อนในวงศ์ย่อย Hormaphidinae ที่มีอยู่ในประเทศไทย จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในจังหวัดเพชรบุรี กาญจนบุรี นนทบุรี นครราชสีมา เชียงใหม่ เชียงราย จันทบุรี และกรุงเทพมหานคร พบเพลี้ยอ่อนวงศ์ย่อย Hormaphidinae 4 สกุล 5 ชนิดคือ *Ceratovacuna lanigera* Zehntner, *Cerataphis brassiliensis* (Hempel), *Astgopteryx nipae* (van der Goot), *Astgopteryx rhapidis* (van der Goot) และ *Pseudoregma bambusicola* (Takahashi)

การทดลองที่ 1.1.2 อนุกรมวิธานของเพลี้ยอ่อนเผ่า Macrosiphini

เพลี้ยอ่อนเผ่า (Tribe) Macrosiphini เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดเล็กถึงขนาดกลาง อยู่ในวงศ์ย่อย Aphidinae เป็นศัตรูสาคัญของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น เพลี้ยอ่อนลูกท้อ เพลี้ยอ่อนผัก เพลี้ยอ่อนกุหลาบ การศึกษาด้านอนุกรมวิธานเพื่อทราบข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการศึกษาด้านอื่นต่อไป รวมทั้งใช้เป็นข้อมูลประกอบการทาบัญชีรายชื่อศัตรูพืชเพื่อการส่งออกสินค้าเกษตร จากการสารวจรวบรวมเพลี้ยอ่อนจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2555 เพื่อทราบสกุล ชนิด พืชอาศัย และเขตการแพร่กระจาย ของเพลี้ยอ่อนเผ่า Macrosiphini ในประเทศไทย พบเพลี้ยอ่อนวงศ์เผ่า Macrosiphini 6 ชนิด คือ *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus), *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach), *Macrosiphum rosae* (Linnaeus), *Metopolophium alpinum* Hill Ris Lambers, *Myzus persicae* (Sulzer) และ *Ovatus crateagarius* (Walker)

การทดลองที่ 1.1.3 อนุกรมวิธานเพลี้ยแป้งสกุล *Phenacoccus*

การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งสกุล *Phenacoccus* ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2555 เพื่อทราบชนิด พืชอาศัย เขตการแพร่กระจายของเพลี้ยแป้งสกุล *Phenacoccus* ที่มีอยู่ในประเทศไทย ได้เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช พบเพลี้ยแป้งสกุล *Phenacoccus* จานวน 4 ชนิด คือ เพลี้ยแป้งมันสาปะ

หลังสีเขียว (*Phenacoccus madeirensis* Green) พบในมันสาปะหลัง เพลี้ยแป้งงา (*Phenacoccus solani* Ferris) พบในว่านสี่ทิศ เพลี้ยแป้งชบา (*Phenacoccus solenopsis* Tinsley) พบในชบา ชบาหนู มะเขือเปราะ มะเขือพวง มะแว้ง กระเจี๊ยบเขียว กระเจี๊ยบแดง คุณนายตื่นสาย ลั่นทมหัวลูกศร ทานตะวัน ปอผากรอง ยาสูบ พันงู-เขียว หญ้าขัดมอญ หญ้ายาง และเหลืองปรีดิยาธร เพลี้ยแป้งมันสาปะหลังสีชมพู (*Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero) พบในมันสาปะหลัง โสมคน และยางพาราอายุไม่เกิน 2 ปี

การทดลองที่1.1.4 อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยสกุล *Pulvinaria*

การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยสกุล *Pulvinaria* ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2555 เพื่อทราบชนิด พืชอาศัย การกระจาย ของเพลี้ยหอยสกุล *Pulvinaria* ที่มีอยู่ในประเทศไทย สารวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ใน ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เขตภาคกลาง และภาคตะวันตก นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สานักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช พบเพลี้ยหอยสกุล *Pulvinaria* จานวน 3 ชนิด คือ เพลี้ยหอยเกราะอ่อนลาไย (*Pulvinaria psidii* Maskell) พบใน ลาไย ลิ้นจี่ ฝรั่ง ยี่หร่า เพลี้ยหอยเกราะอ่อนมะม่วง (*Pulvinaria floccifera* (Westwood)) พบใน ลาไย ลิ้นจี่ มะม่วง บุหง่าสาหรี่ และ เพลี้ยหอยเกราะอ่อน (*Pulvinaria* sp.) พบในต้นตะขาบ และกล้วยไม้ป่า

การทดลองที่ 1.1.5 อนุกรมวิธานแมลงหวี่ขาวในวงศ์ย่อย Aleurodicinae

การศึกษาอนุกรมวิธานแมลงหวี่ขาววงศ์ย่อย Aleurodicinae เพื่อให้ทราบชนิด ลักษณะความแตกต่าง พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจาย พร้อมจัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิด เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงแมลงศัตรูพืชในการนำเข้าและส่งออกผลผลิตทางการเกษตร รวมทั้งเป็นข้อมูลพื้นฐานนำไปสู่การศึกษาด้านกีฏวิทยาและทุกสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2555 ในแหล่งปลูกพืชทั่วทุกภาคของประเทศไทย นำตัวอย่างที่สารวจได้มาจาแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จากการศึกษาครั้งนี้ ได้ตัวอย่างแมลงหวี่ขาววงศ์ย่อย Aleurodicinae จำนวน 180 ตัวอย่าง ผลการตรวจจำแนกชนิดโดยใช้แนวทางการวินิจฉัยตามหลักอนุกรมวิธาน รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างแมลงหวี่ขาวที่มีในพิพิธภัณฑ์แมลง สามารถจาแนก ได้ 3 ชนิด ได้แก่ แมลงหวี่ขาวใยเกลียว; *Aleurodicus disperses* Russell จานวน 161 ตัวอย่าง อาศัยดูดกินน้าเลี้ยงจากพืชอาหาร 43 ชนิด พบแพร่กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย แมลงหวี่ขาวมะพร้าว; *Aleuroctarthus destructor* (Mackie) จำนวน 15 ตัวอย่าง อาศัยดูดกินน้าเลี้ยงจากใบมะตาด และกล้วยไม้ป่าพันธุ์เอื้องตาควาย พบแพร่กระจายในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง และแมลงหวี่ขาวแมลงหวี่ขาวเกลียวเล็ก; *Paraleyrodes bondari* Peracchi จำนวน 4 ตัวอย่าง อาศัยดูดกินน้าเลี้ยงจาก

ใบยางนาและพืชป่าตระกูลกระดังงา พบแพร่กระจายในพื้นที่จังหวัดตรัง ตัวอย่างแมลงหวี่ขาวทั้งหมดนาเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.6 อนุกรมวิธานเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Panchaetothripinae

การศึกษาอนุกรมวิธานเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Panchaetothripinae โดยการสำรวจและรวบรวมเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชต่างๆ เช่น มะม่วง มะม่วงหิมพานต์ ถั่วฝักยาว ถั่วเหลือง ข้าวโพด สบู่ดำ ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2555 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาจำแนกชนิดโดยวิธีการทำสไลด์ถาวรและตรวจวิเคราะห์ชนิดใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound microscope ศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน และเปรียบเทียบกับตัวอย่างเพลี้ยไฟในพิพิธภัณฑ์แมลง ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟได้ 5 ชนิด จานวน 225 ตัวอย่าง จัดอยู่ในอันดับ (Order) Thysanoptera วงศ์ (Family) Thripidae วงศ์ย่อย (Subfamily) Panchaetothripinae ได้แก่ เพลี้ยไฟองุ่น grapevine thrips; *Rhipiphorothrips cruentatus* Hood จานวน 45 ตัวอย่าง เพลี้ยไฟหนาม leaf thrips; *Astrothrips globiceps* (Karny) จำนวน 20 ตัวอย่าง เพลี้ยไฟโกโก้ cocoa thrips; *Selenothrips rubrocinctus* Giard จานวน 60 ตัวอย่าง เพลี้ยไฟถั่วลิสง bean thrips; *Caliothrips phaseoli* Hood จำนวน 50 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟถั่วเหลือง soybean thrips; *Caliothrips indicus* Bagnall จำนวน 50 ตัวอย่าง รายงานเขตการแพร่กระจาย พืชอาศัย รวมทั้งจัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิด ถ่ายภาพและวาดภาพลักษณะสาคัญทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยไฟทั้ง 5 ชนิด นำตัวอย่างเพลี้ยไฟทั้งหมดจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลง พร้อมนำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดทำรายชื่อชนิดแมลงศัตรูพืชเพื่อเตรียมพร้อมรองรับปัญหาด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

การทดลองที่ 1.1.7 อนุกรมวิธานผีเสื้อกลางคืนวงศ์ย่อย Pyraustinae

การศึกษาอนุกรมวิธานผีเสื้อกลางคืนวงศ์ย่อย Pyraustinae เพื่อทราบชนิด พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจาย สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการวินิจฉัยชนิดแมลงศัตรูพืช รวมถึงการจำทำรายชื่อแมลงศัตรูพืชรองรับปัญหาการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2556 เก็บตัวอย่างโดยใช้กำดักแสงไฟในเวลากลางคืน และเก็บตัวหนอนจากแหล่งปลูกพืชทั่วไปประเทศไทย จำแนกชนิดโดยใช้รูปร่างลักษณะภายนอกและอวัยวะสืบพันธุ์ของตัวเต็มวัย รวมทั้งเปรียบเทียบจากตัวอย่างเดิมในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างผีเสื้อกลางคืนวงศ์ย่อย Pyraustinae จำนวน 1,579 ตัวอย่าง จำแนกได้ 20 สกุล จำนวน 28 ชนิด พบว่า 13 ชนิด เป็นศัตรูของพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่ *Ostrinia furnacalis* (Guenée, 1854), *Conogethes pluto* (Butler), *Conogethes punctiferalis* (Guenée, 1854), *Cydalima laticostalis* Gueéne, *Diaphania indica* (Saunders, 1851), *Glyphodes pulverulantis* Hampson, 1896, *Herpetogramma bipunctalis*

Guenee, *Leucinodes orbonalis* Guenée, 1854, *Maruca vitrata* (Fabricius, 1787), *Nausinoe geometralis* Guenée, *Omiodes diemenalis* (Guenée, 1854), *Omiodes indicatus* (Fabricius, 1775), *Omphisa anastomosalis* Guenée 6 ชนิด เป็นศัตรูของพืชไม่สำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่ *Agathodes ostentalis* (Geyer, 1837), *Botyodes asialis* Guenée, 1854, *Conogethes evaxalis* Walker, *Glyphodes bivitralis* Guenée, *Glyphodes conclusalis* Walker, *Meroctena tullalis* Walker และ 9 ชนิด ไม่ทราบพืชอาหาร ได้แก่ *Glyphodes caesalis* Walker, *Glyphodes ernalis* Swinhoe, *Nevrina procopia* (Stoll, 1781), *Parotis incurvata* Warren, *Palpita annulata* Fabricius, *Pygospila tyres* (Cramer, 1780), *Parotis punctiferalis* Lederer, *Prooedema inscisala* (Walker, 1866), *Syllepte iophanes* Meyrick ตัวอย่างผีเสื้อกลางคืนวงศ์ย่อย Pyraustinae ที่จำแนกเรียบร้อยแล้วนำเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.9 อนุกรมวิธานตัวอ่อนแมลงวันทองสกุล *Bactrocera*

การศึกษาอนุกรมวิธานของตัวอ่อนแมลงวันทองสกุล *Bactrocera* ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2555 ในภาคต่างๆ ของประเทศไทย เพื่อทราบชนิด พืชอาศัย เขตการแพร่กระจายของตัวอ่อนแมลงวันทองสกุล *Bactrocera* ที่มีอยู่ในประเทศไทย โดยเก็บรวบรวมตัวอ่อนแมลงวันทองจากผลไม้และพืชผัก รวมทั้งการติดกับดักแบบ Steiner จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ เช่น พริก กระท้อน ฝรั่ง ชมพู่ มะเฟือง ทั่วทุกภาคในประเทศไทย นำตัวอย่างที่รวบรวมได้กลับมายังห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช นำจัดรูปร่างและตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน จากการตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดพบตัวอ่อนแมลงวันทอง 2 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera latifron* (Hendel), *Bactrocera correcta* (Bezzi)

การทดลองที่ 1.1.11 อนุกรมวิธานและชีววิทยาเพลี้ยแป้ง *Pseudococcus jackbeardsleyi* Gimpel & Miller

การศึกษาอนุกรมวิธาน และชีววิทยาของเพลี้ยแป้งมันสาปะหลังสีเทา (*Pseudococcus jackbeardsleyi* Gimpel & Miller) ดาเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2555 เพื่อทราบลักษณะความแตกต่างทางด้านอนุกรมวิธานในแต่ละระยะการเจริญเติบโต ชีววิทยา รวมทั้งวิธีการและพืชอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเพลี้ยแป้งโดยเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งมันสาปะหลังสีเทา จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ นาตัวอย่างที่รวบรวมได้มาเลี้ยงบนฟักทอง และทาสไลด์ถาวร ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สานักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช พบว่าเพลี้ยแป้งมันสาปะหลังสีเทา เลี้ยงบนฟักทอง พบระยะตัวอ่อนเพศเมีย 3 ระยะ ลอกคราบ จานวน 3 ครั้ง ตัวเต็มวัยวางไข่ จานวน 344-495 ฟอง ระยะไข่ประมาณ 7-10 วัน หลังจากนั้นจะฟักออกมาเป็นตัวอ่อนวัยที่ 1 (crawler) ขนาดค่อนข้างเล็ก ลาตัว

ยาว 0.4-1.2 มิลลิเมตร ใช้เวลา 3-8 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 2 ลาตัวยาว 1.0-1.7 มิลลิเมตร ใช้เวลา 7-9 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 3 ลาตัวยาว 2.0-2.8 มิลลิเมตร ใช้เวลา 6-15 วัน หลังจากนั้นจะลอกคราบครั้งสุดท้ายเป็นตัวเต็มวัย ลาตัวยาว 3.0-3.3 มิลลิเมตร ใช้เวลา 11-15 วัน รวมตลอดอายุขัย 31-43 วัน

การทดลองที่ 1.1.12 การศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมสกุล *Argiope*

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมในสกุล *Argiope* ของประเทศไทยบนพื้นที่ 14 จังหวัด เริ่มต้นเดือน ตุลาคม 2553 สิ้นสุด กันยายน 2556 นำตัวอย่างมาศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานและจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ โดยการใช้ลักษณะที่สำคัญในการจำแนกชนิด เช่น ลักษณะรูปร่างและลวดลายบนส่วนหลัง ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ฯลฯ ผลจากการศึกษาพบแมงมุมในสกุล *Argiope* ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *A. catenulata* (Doleschall, 1859), *A. dang* Jäger & Praxaysombath, 2009 ซึ่งเป็นแมงมุมที่พบครั้งแรกในประเทศไทย (new record), *A. pulchella* Thorell, 1881, *A. versicolor* (Doleschall, 1859)

การทดลองที่ 1.1.13 ชนิดของมดที่อาศัยร่วมกับเพลี้ยแป้งสกุล *Phenacoccus*

การศึกษาชนิดของมดที่อาศัยร่วมกับเพลี้ยแป้งสกุล *Phenacoccus* ดาเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2554 เพื่อทราบชนิด การกระจาย ของของมดที่อาศัยร่วมกับเพลี้ยแป้งสกุล *Phenacoccus* ที่มีอยู่ในประเทศไทย สารวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในเขตภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันตก และภาคตะวันออก นาตัวอย่างมดที่รวบรวมได้มาจัดรูปร่าง และตัวอย่างเพลี้ยแป้งมาทาสไลด์ถาวร ตรวจจาแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สานักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช พบมด จานวน 8 ชนิด คือ มดคันไฟ (*Solenopsis geminata* Fabricius) พบอาศัยร่วมกับ เพลี้ยแป้งมันสาปะหลังสีชมพู (*Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero) และ เพลี้ยแป้งชบา (*Phenacoccus solenopsis* Tinsley) มดโล่บ้าน (*Meranoplus bicolor* Guérin-Méneville) พบอาศัยร่วมกับ เพลี้ยแป้งมันสาปะหลังสีชมพู (*Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero) และ เพลี้ยแป้งชบา (*Phenacoccus solenopsis* Tinsley) มดน้าผึ้ง (*Anoplolepis gracilipes* Fr.Smith) พบอาศัยร่วมกับ เพลี้ยแป้งมันสาปะหลังสีชมพู (*Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero) และ เพลี้ยแป้งชบา (*Phenacoccus solenopsis* Tinsley) มดเหม็น (*Tapinoma melanocephalum* Fabricius) พบอาศัยร่วมกับ เพลี้ยแป้งมันสาปะหลังสีชมพู (*Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero) เพลี้ยแป้งชบา (*Phenacoccus solenopsis* Tinsley) และเพลี้ยแป้งมันสาปะหลังสีเขียว (*Phenacoccus madeirensis* Green) มดดาทุ่ง (*Iridomyrmex anceps* Roger) พบอาศัยร่วมกับเพลี้ยแป้งชบา (*Phenacoccus solenopsis* Tinsley) มดน้าตาล (*Paratrechina longicornis* (Latreille)) พบอาศัยร่วมกับ เพลี้ยแป้งมันสาปะหลังสีชมพู (*Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero) และ เพลี้ยแป้งชบา (*Phenacoccus solenopsis* Tinsley) มดละเอียด (*Monomorium* sp.1)

และมดละเอียด (*Monomorium* sp.2) พบอาศัยร่วมกับ เพลี้ยแป้งชบา (*Phenacoccus solenopsis* Tinsley)

การทดลองที่ 1.1.14 ชีววิทยา การเข้าทำลาย ฤดูกาลระบาดของแมลงวันทองชนิด *Bactrocera cucurbitae* (Coquillet)

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมผลพืชตระกูลแตงที่ถูกแมลงวันทองเข้าทำลาย ในจังหวัดกาญจนบุรี นครราชสีมา และสุพรรณบุรี พบแมลงวันทอง 2 ชนิด ลงทำลาย คือ *B. cucurbitae* และ *B. tau* การศึกษาวงจรชีวิตของแมลงวันทองชนิด *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) ในห้องปฏิบัติการโดยมีอุณหภูมิเฉลี่ย 23.10±1.27 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพันธ์เฉลี่ย 91.07±0.25 เปอร์เซ็นต์ พบว่าตัวเต็มวัยเพศเมียจะเริ่มจับคู่ผสมพันธุ์เมื่ออายุ 14 วัน โดยวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ หรือกลุ่มๆ ละ 2-3 ฟอง ตัวเมีย 1 ตัว สามารถวางไข่ได้ 376-453 ฟอง มีเปอร์เซ็นต์การฟัก 78% ระยะไข่ 3-4 วัน หนอนมี 3 ระยะ ระยะหนอน 8-9 วัน ระยะดักแด้ 9-10 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมียอายุ 79-120 วัน และตัวเต็มวัยเพศผู้มีอายุ 86-132 วัน การศึกษาช่วงฤดูการระบาดของแมลงวันทองชนิด *B. cucurbitae* ในแปลงปลูกแตงกวา บวบหอม และมะระ โดยใช้สารล่อชนิด Cur-lure ในกับดักแบบ Steiner พบว่าแมลงวันทองชนิด *B. cucurbitae* เข้าทำลายพืชทั้งสามชนิดได้

การทดลองที่ 1.1.15 สัณฐานวิทยาของเปลือกและกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์ ของหอยเจดีย์เล็ก *Lamellaxis gracilis* และหอยเจดีย์ใหญ่ *Prosopea walkeri* (Benson)

ผลการสารวจและเก็บตัวอย่างหอยเจดีย์เล็กและหอยเจดีย์ใหญ่ตามพื้นที่เกษตรกรรมภาคต่างๆของประเทศไทย ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2555 พบว่าช่วงเดือนเมษายน -มิถุนายน พบการระบาดของหอยเจดีย์เล็กค่อนข้างมาก เฉลี่ย 32 ตัว/ ตร.ม. และช่วงเดือนกรกฎาคม -กันยายน พบการระบาดของหอยเจดีย์ใหญ่มาก เฉลี่ย 46 ตัว/ ตร.ม. โดยวัดค่า pH ดินเฉลี่ย = 7.0 และความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 65-70 % นามาจาแนกชนิดตามระบบอนุกรมวิธานของหอย พบว่าทั้งหอยเจดีย์เล็กและหอยเจดีย์ใหญ่ จัดอยู่ใน Class Gastropoda , Order Stylommatophora, Family Subulinidae แต่ถูกจาแนกคนละ Genus โดยหอยเจดีย์เล็กจัดอยู่ใน Genus *Lamellaxis,* Species: *Lamellaxis gracilis* (Hutton) ส่วนหอยเจดีย์ใหญ่จัดอยู่ใน Genus *Prosopeas*, Species: *Prosopeas walkeri* (Benson)

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยเจดีย์เล็กและหอยเจดีย์ใหญ่ พบว่าหอยเจดีย์เล็กตัวเต็มวัยมีขนาด 5.42 -9.91 มิลลิเมตร (n= 42) มีจานวนไม่เกิน 7 whorls เปลือกสีน้าตาลโปร่งแสง และเป็นมันวาว ยอดเปลือกแหลม จานวนไข่ 2-13 ฟอง และหอยเจดีย์ใหญ่ตัวเต็มวัย มีขนาด 12.33 -24.45 มิลลิเมตร (n= 60) มีจานวนมากกกว่า 7 whorls เปลือกสีน้าตาลค่อนข้างโปร่งแสง เปลือกเป็นมันวาวน้อยกว่าหอยเจดีย์เล็ก ยอดเปลือกทู่มน จานวนไข่ 4-15 ฟอง จานวนไข่ของหอยเจดีย์ทั้งสองชนิดขึ้นอยู่กับอายุและขนาดของตัวเต็ม

วัยแต่ละตัว ซึ่งยังต้องวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS และการวิเคราะห์ ANOVA พร้อมกับเปรียบเทียบกายวิภาคระบบสืบพันธุ์ ของหอยทั้ง 2 ชนิด ต่อไป

การทดลองที่ 1.1.16 ความชุกชุมและแหล่งอาศัยของนกแสก (*Tyto alba javanica* (Gmelin, 1788) ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ประชากรนกแสกในพื้นที่ที่ทำการสำรวจส่วนใหญ่มีประชากรน้อย บางพื้นที่ไม่พบนกแสกและแหล่งสร้างรังแต่บางพื้นที่มีความชุกชุมสูง เช่น อำเภอเมืองและอำเภอบางปลาม้า จังหวัดสุพรรณบุรี อำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ ความชุกชุมของนกแสกดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับสภาพการใช้ประโยชน์ที่ดินและเกี่ยวข้องกับความชุกชุมของสัตว์ที่เป็นอาหารของนกแสก สถานที่หลบพักนอนและแหล่งสร้างรัง ชนิดของสถานที่ทำรังส่วนใหญ่เป็นโพรงใต้หลังคาโบสถ์ โพรงไม้ตามต้นไม้ขนาดใหญ่ หลืบหินและถ้ำเล็กๆบนภูเขา ชนิดสัตว์ที่นกแสกล่าเป็นอาหารมีความแตกต่างกัน ขึ้นกับสภาพการใช้ประโยชน์ที่ดินและพืชที่เพาะปลูก สัตว์ที่นกแสกล่าเป็นอาหารส่วนใหญ่เป็นหนูศัตรูพืชในนาข้าว พืชไร่ และในชุมชน เช่น หนูท้องขาว หนูหริ่ง หนูนาเล็กและหนูนาใหญ่ มีบางพื้นที่ที่พบนกแสกล่าค้างคาวกินแมลง หนูผีนาและกบเขียดเป็นอาหาร ซึ่งเป็นพื้นที่ที่เป็นป่าไม้ สวนป่า พื้นที่ปลูกพืชไร่ ซึ่งมีความชุกชุมของหนูน้อยกว่าสัตว์กลุ่มอื่นๆ

การทดลองที่ 1.1.17 อนุกรมวิธานไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis*

จากการวัดขนาดสัดส่วนและถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และพิจารณารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* (CMs) และ *Heterorhabditis* (PRh) ที่แยกได้จาก จ.เชียงใหม่ และ จ. เพชรบุรี ตามลำดับ พบว่าไส้เดือนฝอย CMs มีขนาดเฉลี่ยของตัวอ่อนระยะที่ 3 ความยาวลำตัว (L) = 442.49 ไมครอน ความกว้างลำตัว (W) = 23.05 ไมครอน ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP) = 38.22 ไมครอน ความยาววัดจากหัวถึง esophagus (ES) = 106.55ไมครอน และความยาวหาง (Tail) = 39.99 ไมครอน มีค่าสัดส่วน (ratio) a = 19.21, b = 4.15, c = 11.08, D% = 35.83 และ E% = 95.44 สำหรับไส้เดือนฝอย PRh พบว่า ตัวอ่อนระยะที่ 3 มีความยาวลำตัว = 572.00 ไมครอน ความกว้างลำตัว = 22.31 ไมครอน ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore = 82.09ไมครอน ความยาววัดจากหัวถึง esophagus = 117.50 ไมครอน และความยาวหาง = 90.82 ไมครอน มีค่าสัดส่วน a = 25.65, b = 4.87, c = 6.30, D% = 69.88 และ E% = 90.43 ตัวเต็มวัยเพศเมียมีลักษณะหางแบบ conoid มีค่า D% = 122 ตัวเต็มวัยเพศผู้มีลักษณะหางแบบ conoid ความยาวของอวัยวะสืบพันธุ์ (spicule length) = 48 ไมครอน จากการศึกษา DNA sequencing โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวเต็มวัยเพศเมีย *Steinernema* (KPs, CMs, UBs, *S. riobrave*) และ *Heterorhabditis* (PRh) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 28S rDNA ในไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลทด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 502/536 พบว่าได้ดีเอ็นเอที่สะอาด โดยทุกไอโซเลทได้ PCR product ขนาด 946 base pair (bp)

การทดลองที่ 1.1.19 ความหลากชนิดและประชากรของหอยทากและทากในโรงเรือนปลูกพืช

การสำรวจชนิดและประชากร หอยทากและทากในโรงเรือนปลูกพืช ได้แก่ โรงเรือนไม้ดอกไม้ประดับ เช่นกล้วยไม้ ดอกเบญจมาศ ดอกหน้าวัว โรงเรือนปลูกผัก เช่น ผักชีฝรั่ง ผักกาด ผักคะน้า โรงเรือน เพาะชำกล้าไม้ เช่น เพาะชำกล้าไม้ยืนต้นของกรมป่าไม้ เพาะชำกล้าไม้สาหรับขาย เพาะชำกล้าต้นหม่อน เพาะชำกล้าไม้ยางพารา และโรงเรือนส้มปลอดโรค พื้นที่จังหวัดต่างๆในภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคใต้ของประเทศ ด้วยการใช้ตารางสุ่มขนาด 1 ตารางเมตร สุ่มนับประมาณ 10จุดต่อไร่ ให้กระจายทั่วพื้นที่ อาจเดินสุ่มตามแนวเส้นทแยงมุมทั้งสองด้าน หรือแนวขนานกับพื้นที่ พร้อมทั้งเก็บหอยที่มีชีวิตอยู่มาเลี้ยงที่กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตรและเก็บรวบรวมเปลือกหอยมาทำความสะอาดเพื่อชั่งน้าหนักและวัดขนาดแล้วเก็บไว้เป็นตัวอย่างใช้จำแนกชนิดของหอยพร้อมทั้งเก็บดินหรือวัสดุปลูกจากแปลงมาวัดความชื้นและความเป็นกรด-ด่าง และบันทึกสภาพแวดล้อมในโรงเรือน จากการสำรวจพบว่าหอยและทากหลายชนิดในโรงเรือน ปลูกพืชต่างๆ จำแนกเป็นชนิด (ช่วงจานวนประชากรหอยทากหรือทากเฉลี่ย ตัว/ม2) ได้แก่ชนิดที่เป็นศัตรูพืชที่สาคัญ พบ ทากเล็บมือนาง (0.1 – 2.9) หอยดักดาน(0.1 - 12.2) หอยสาริกา(0.1 – 4.3) หอยทากยักษ์แอฟริกา(0.2 – 5.3) หอยเจดีย์เล็ก(0.1 – 4.3) หอยเจดีย์ใหญ่ (0.2- 3.4) หอยแรบบิดินา (4.2) และหอยซัคซิเนีย(0.3 - 45.0)

การทดลองที่ 1.1.20 อนุกรมวิธานแมงมุมวงศ์ Tetragnathidae

จากการจำแนกชนิดตัวอย่างแมงมุม สำรวจและเก็บรวบรวมแมงมุมวงศ์ Tetragnathidae ณ จังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ระยอง จันทบุรี ตราด นครราชสีมา และ ตาก จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาจำแนกชนิดภายใต้กล้องสเตอริโอ พบแมงมุมทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ *Tetragnatha* sp. จำนวน 1 ตัวอย่าง *Tetragnatha maxillosa* จำนวน 7 ตัวอย่าง , *Tetragnatha ceylonica* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Tetragnatha virescens* จำนวน 3 ตัวอย่าง , *Tetragnatha nitens* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Leucauge sp.* จำนวน 3 ตัวอย่าง *Tylorida ventralis* จำนวน 10 ตัวอย่าง *Opadometa grata* จำนวน 2 ตัวอย่าง และ *Tetragnatha madibulata* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Tetragnatha haselti* จำนวน 1 ตัวอย่าง และสำหรับตัวอย่างที่เป็นตัวอ่อนจะนำไปเลี้ยงต่อที่ห้องปฏิบัติการจนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัยจึงจะสามารถนำมาจำแนกชนิดได้

การทดลองที่ 1.1.21 ศึกษาชีววิทยาหอยดักดาน *Cryptozona siamensis* (Pfeiffer)

หอยดักดาน หรือบางครั้งเรียกว่า หอยทากสยาม (*Cryptozona siamensis* , Pfeiffer) เป็นศัตรูพืชที่สำคัญเพราะกินและทำลายพืชผักได้เกือบทุกชนิด และมีเขตการแพร่กระจายทั่วประเทศไทย ไม่ว่าจะเป็นพื้นที่เกษตรกรรม ตามป่าเขา หรือแม้กระทั่งตามเกาะต่าง ๆ จากการศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยาในห้องปฏิบัติการ พบว่า หอยทากดักดานซึ่งมีสองเพศในตัวเดียวกันนั้น มีการผสมพันธุ์ข้าม โดยถ่าย sperm ให้แก่กันและกัน การผสมพันธุ์ของหอยทากดักดานใช้เวลาโดยเฉลี่ย 45 - $1^{1/}_{2}$ ชั่วโมง และจะวางไข่เป็นกลุ่ม เฉลี่ย 57

ฟอง/กลุ่ม (N = 60) โดยหอยจะทำโพรงเล็กๆ ลึกลงไปใต้ผิวดินประมาณ 3-5 เซนติเมตร ลักษณะของไข่เป็นสีขาวขุ่น นิ่ม รูปทรงกลม หัวท้ายบุ๋ม ขนาดเฉลี่ย 3.1 x 3.5 มิลลิเมตร และหนักเฉลี่ย 0.028 กรัม เมื่อได้รับความชื้น ลักษณะของไข่จะเป็นทรงกลมรี ใช้เวลาในการฟักประมาณ 7-18 วัน ลูกหอยหนักเฉลี่ย 0.0187 กรัม มีขนาดเฉลี่ย 3.7982 มิลลิเมตร โดยมีอัตราการฟักเป็นตัว 60.72 % อุณหภูมิ 27±3 องศาเซลเซียส

การทดลองที่ 1.1.22 การแพร่กระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของหนูนาใหญ่ *Rattus argentiventer* (Robinson and Kloss, 1916) ในประเทศไทย

การศึกษาการแพร่กระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของหนูนาใหญ่,*Rattus argentiventer* (Robinson &Kloss,1916) ในประเทศไทย โดยการใช้กรงจับเป็นและบ่วงลวดดักหนูจากการศึกษา พบว่าหนูนาใหญ่มีเขตการแพร่กระจายจากเดิมที่พบเฉพาะในภาคใต้และภาคกลาง จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างในปัจจุบันพบการแพร่กระจายทั่วทุกภูมิภาค โดยในภาคเหนือตอนล่างพบการแพร่กระจายตั้งแต่จังหวัดนครสวรรค์ สุโขทัย พิษณุโลก จนถึงจังหวัดอุตรดิตถ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบการแพร่กระจายตั้งแต่จังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ หนองบัวลำภูอุดรธานีร้อยเอ็ด มหาสารคาม กาฬสินธุ์อุบลราชธานีขอนแก่น ศรีษะเกษสุรินทร์ ภาคตะวันออก พบการแพร่กระจายจังหวัดปราจีนบุรีและจังหวัดฉะเชิงเทรา ภาคใต้ พบในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา พัทลุง กระบี่และจังหวัดตรัง ภาคกลาง พบการแพร่กระจายทุกจังหวัดที่มีการทำนา และการศึกษาลักษณะสัณฐานของกระดูกรยางค์และกระดูกกะโหลกหนูนาใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละภูมิภาคพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติบางลักษณะจากลักษณะที่ปรากฏดังกล่าว กลุ่มประชากรของหนูนาใหญ่เริ่มมีความแปรปรวนของลักษณะที่ปรากฏ เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่าง เช่น สภาพแวดล้อม ทั้งภูมิอากาศและภูมิประเทศ การดำรงกิจกรรมของคนในพื้นที่ที่ต่างกัน อีกทั้งการทำการเกษตรที่ต่างกันไป มีการผสมพันธุ์กันทั้งภายในและภายนอกกลุ่ม ทำให้เกิดความหลากหลายพันธุกรรมซึ่งเป็นสาเหตุให้กลุ่มประชากรของหนูนาใหญ่แต่ละภูมิภาคเริ่มมีลักษณะบางประการที่เปลี่ยนแปลงไป

การทดลองที่ 1.1.23 อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยสกุล *Coccus*

เพลี้ยหอยเกราะอ่อนสกุล *Coccus* Linnaeus, 1758 (Hemiptera: Coccidae) มีเขตการแพร่กระจายเกือบทั่วโลก มีรายงานจำนวนชนิดมากถึง 112 ชนิดทั่วโลกและยังเป็นศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจอีกหลายชนิด แต่สำหรับในประเทศไทยมี รายงานเพียง 2 ชนิดเท่านั้น การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยเกราะอ่อนสกุล *Coccus* ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2555 ถึงเดือนกันยายน 2558 เพื่อทราบชนิด พืชอาศัย การกระจาย ที่มีอยู่ในประเทศไทย สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ใน ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้ นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช พบเพลี้ยหอยเกราะอ่อน สกุล *Coccus* จำนวน 2 ชนิด คือ เพลี้ยหอยเกราะอ่อนสีน้ำตาล; *Coccus hesperidum* Linnaeus พบดูดน้ำเลี้ยงบริเวณยอดอ่อน ใบและกิ่ง ของพืชในวงศ์ Araceae (เดหลี) Costaceae (เอื้องหมายนา Verbenaceae (บุหงาสาหรี) และดูดน้ำเลี้ยงบริเวณยอดอ่อน ใบ กิ่งและขั้วผลของพืชในวงศ์ Rubiaceae (กาแฟ) Myrtaceae (ฝรั่ง) Anacardiaceae (มะปรางหวาน, มะม่วง) และ เพลี้ยหอยกาแฟสีเขียว; *Coccus viridis* (Green) พบดูดน้ำเลี้ยงบริเวณยอดอ่อน ใบ กิ่งและขั้วผลของพืชในวงศ์ Anacardiaceae (มะม่วง) Apocynaceae (ลีลาวดี) Bignoniaceae (ทองอุไร) Meliaceae (สะเดา) Myrtaceae (หว้า) Rubiaceae (กาแฟ) Phyllanthaceae (มะเม่า) และ Rutaceae (มะนาว) นอกจากนี้ยังสำรวจพบแมลงศัตรูธรรมชาติ คือ ด้วงเต่า; Cryptolaemus montrouzieri (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae) ซึ่งเป็นตัวห้ำของเพลี้ยหอยกาแฟสีเขียวอีกด้วย

การทดลองที่ 1.1.24 อนุกรมวิธานแมลงหวี่ขาวในวงศ์ย่อย Aleyrodinae

แมลงหวี่ขาวเป็นแมลงศัตรูพืชขนาดเล็กที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง มีการระบาดรุนแรงไปทั่วโลก อาศัยอยู่กับพืชมากมายหลายชนิด ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพืช ทำให้ผลผลิตลดลงด้วย การศึกษาอนุกรมวิธานแมลงหวี่ขาววงศ์ย่อย Aleyrodinae ครั้งนี้ ทำให้ทราบชนิด พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจาย เพื่อประโยชน์ในการจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชของประเทศไทย ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนกันยายน 2558 เก็บตัวอย่างจากแปลงปลูกพืชจากทุกภูมิภาคของประเทศไทย โดยเก็บส่วนของพืชที่มีตัว ดักแด้แมลงหวี่ขาวเกาะอยู่ การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ตัวอย่างแมลงหวี่ขาววงศ์ย่อย Aleyrodinae ที่มีในพิพิธภัณฑ์แมลงกรมวิชาการเกษตรร่วมด้วย ตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธานโดยใช้ลักษณะดักแด้ จำนวน 235 ตัวอย่าง สามารถจำแนก ได้ 9 ชนิด พบว่า แมลงหวี่ขาว *Aleurocanthus woglumi* Ashby, *Aleurocanthus spiniferus* Quaintanceและ *Dialeurodes citri* (Ashmead) เป็นศัตรูสำคัญของพืชสกุลส้ม แมลงหวี่ขาว *Aleurolobus barodensis* (Maskell), *Neomaskellia andropogonis* Corbett และ *Neomaskellia bergii* (Signoret) เป็นศัตรูสำคัญของอ้อย แมลงหวี่ขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) พบแพร่กระจายทั่วทุกภาคของประเทศ จัดเป็นแมลงศัตรูพืชที่มีพืชอาหารมากมากกว่า 150 ชนิด อยู่ใน 63 วงศ์ โดยเฉพาะกลุ่มพืชผักที่ถูกแจ้งเตือนเป็นพืชควบคุมของสหภาพยุโรปได้แก่ 16 ชนิด แมลงหวี่ขาว *Dialeuropora decempuncta* (Quaintance & Baker, 1917) เป็นศัตรูสำคัญของ อา-โวคาโด น้อยหน่า กุหลาบ ชะพลู แมลงหวี่ขาว *Trialeurodes vaporariorum* Westwood เป็นศัตรูสำคัญของไม้ประดับเช่น คริสต์มาส พริมโรส เดฟกระเป๋า และไม้ผลเช่น มะยม ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร และได้จัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชของประเทศไทยพร้อมแนวทางการวินิจฉัยไว้ด้วย

การทดลองที่ 1.1.25 อนุกรมวิธานเพลี้ยไฟสกุล *Haplothrips*

เพลี้ยไฟสกุล *Haplothrips* จัดอยู่ในอันดับ Thysanoptera อันดับย่อย (suborder) Tubulifera และวงศ์ Phlaeothripidea ประกอบด้วย 450 สกุล จำนวน 3500 ชนิด เพลี้ยไฟในสกุล *Haplothrips* ถูกค้นพบและบรรยายครั้งแรกโดย Amyot & Serville ในปี คศ.1843 ปัจจุบันพบจำนวน 250 ชนิด มีการแพร่กระจายทั่วโลก เพลี้ยไฟในสกุลนี้พบเข้าทำลายส่วนดอกของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เช่น พืชในวงศ์ Poaceae (ข้าว อ้อย ข้าวโพด ข้าวฟ่าง) และวงศ์ Asteraceae (ดาวเรือง ดาวกระจาย เบญจมาศ เบญจมาศสวน ทานตะวัน เยอรบีรา บานชื่น ฯลฯ) สร้างความเสียหายให้กับพืชโดยการดูดกินโดยตรง และสร้างความเสียหายทางอ้อมจากสิ่งขับถ่ายที่เพลี้ยไฟถ่ายออกมา ซึ่งมีลักษณะคล้ายหยดน้ำ เมื่อแห้งจะทำให้พืชเกิดรอยตำหนิสีดำตามส่วนต่างๆของพืช ทั้งนี้ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน และเขตการแพร่กระจายของเพลี้ยไฟในสกุลนี้ วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อให้ทราบชนิด พืชอาหารและเขตการแพร่กระจาย พร้อมจัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิด จากการศึกษาโดยการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟในสกุลนี้จากแปลงปลูกพืชทั่วทุกภาคของประเทศไทย ระหว่างเดือน ตุลาคม 55 ถึง กันยายน 58 พบเพลี้ยไฟในสกุล *Haplothrips* 3 ชนิด ได้แก่ *Haplothrips aculeatus* (Fabricius) มีพืชอาหารคือ ข้าวโพด พบที่จังหวัดนครปฐม นครราชสีมา ราชบุรี กาญจนบุรี เพลี้ยไฟ *Haplothrip gowdeyi* (Franklin) มีพืชอาหาร 8 ชนิด ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวบาร์เล่ย์ พริก มะม่วง ลำไย เยอบีร่า และดาวเรือง พบแพร่กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย และเพลี้ยไฟ *Haplothrips robustus* Bangnall มีพืชอาหารคือ ดาวเรือง สำรวจพบในจังหวัดบึงกาฬ ซึ่งได้ทำการบรรยายถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตลอดถึงเสนอแนวทางการวินิจฉัยจำแนกชนิด (Key to species) ของเพลี้ยไฟในสกุล *Haplothrips* Amyot & Serville ที่ได้สำรวจพบในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษายังสามารถนำไปใช้ในการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืชและวิเคราะห์ความเสี่ยงแมลงศัตรูพืช ในการนำเข้าและส่งออกผลผลิตทางการเกษตร

การทดลองที่ 1.1.26 อนุกรมวิธานมวนปีกแก้วในสกุล *Stephanitis*

มวนปีกแก้ว (lace bugs) จัดอยู่ในอันดับ Hemiptera อันดับย่อย Heteroptera และวงศ์ Tingidae ประกอบด้วย 250 สกุล จำนวน 2000 ชนิด มวนปีกแก้วในสกุล *Stephanitis* ได้ถูกค้นพบและบรรยายครั้งแรกโดย Stål ในปี คศ. 1873 ปัจจุบันพบจำนวน 68 ชนิด มีเขตการแพร่กระจายทั่วโลก สำหรับในประเทศไทยมีรายงานแล้วว่ามีการค้นพบ 1 ชนิด ได้แก่ *Stephanitis typica* (Distant, 1903) มวนปีกแก้วในสกุลนี้พบเข้าทำลายในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เช่น พืชในวงศ์ปาล์ม (Palmae) กุหลาบ (Rosaceae) ขิง ข่า (Zingiberaceae) กล้วย (Musaceae) กุหลาบพันปี (Ericaceae) และขนุน (Moraceae) เป็นต้น นอกจากนี้มวนในสกุลนี้มีความสำคัญโดยเป็นพาหะนำโรคมาสู่พืช เช่น *Stephanitis typica* (Distant, 1903) เป็นพาหะนำเชื้อไวรัส และไมโครพลาสมา ก่อให้เกิดโรครากเหี่ยวในมะพร้าว (coconut root wilt) ทั้งนี้ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน และเขตการแพร่กระจายของมวนในสกุลนี้ วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อให้ทราบชนิด พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจาย พร้อมจัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิด นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษายังสามารถนำไปใช้ในการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืชและวิเคราะห์ความเสี่ยงแมลง

ศัตรูพืช ในการนำเข้าและส่งออกผลผลิตทางการเกษตร จากการศึกษาโดยการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างมวนปีกแก้วในสกุลนี้จากแปลงปลูกพืชทั่วภูมิภาคของประเทศไทย ระหว่างเดือน ตุลาคม 2555 ถึง กันยายน 2557 พบมวนปีกแก้วในสกุล *Stephanitis* 2 ชนิด คือ *Stephanitis typica* (Distant, 1903) จำนวน 1,591 ตัวอย่าง มีพืชอาหาร 6 ชนิด ได้แก่ กล้วย มะพร้าว ข่า คล้าน้ำ อบเชย และปทุมมา พบแพร่กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย และ *Stephanitis suffusa* (Distant, 1903) จำนวน 64 ตัวอย่าง มีพืชอาหาร 2 ชนิด ได้แก่ ยอ และอะโวคาโด สำรวจพบในพื้นที่จังหวัดตาก ซึ่ง *Stephanitis suffusa* (Distant, 1903) ถือว่าเป็นมวนปีกแก้วที่พบครั้งแรกในประเทศไทย (new record) ซึ่งได้ทำการบรรยายถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาตลอดถึงเสนอแนวทางการวินิจฉัยจำแนกชนิด(Key to species)ของมวนปีกแก้วในสกุล *Stephanitis* Stål ที่ได้สำรวจพบในการศึกษาครั้งนี้

การทดลองที่ 1.1.27 อนุกรมวิธานผีเสื้อกลางคืนสกุล *Parapoynx*

ผีเสื้อกลางคืนสกุล *Parapoynx* Hübner (1825) ระยะหนอนเป็นแมลงศัตรูสำคัญของพืชวงศ์ ข้าวและอ้อย (Poaceae), ไม้น้ำ เช่น บัว (Nymphaceae) สาหร่าย (Hydrocharitaceae) กระจับ (Onagraceae) และตาลปัตรฤาษี (Alismataceae) ผีเสื้อสกุลนี้มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางทั่วโลก โดยเฉพาะภูมิภาคเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน แต่งานวิจัยเกี่ยวกับผีเสื้อกลางคืนสกุลนี้ในประเทศไทยมีน้อยมาก การศึกษาอนุกรมวิธานของผีเสื้อสกุล *Parapoynx* ครั้งนี้ทำให้ทราบชนิด พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจาย เพื่อประโยชน์ในการจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างจากทุกภูมิภาคของประเทศไทย ตัวเต็มวัยเก็บโดยการใช้กับดักแสงไฟ ตัวหนอนเก็บจากพืชอาหาร รวมทั้งใช้ตัวอย่างเพิ่มเติมจากพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนกันยายน 2558 จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกร่วมกับความแตกต่างของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย สามารถจำแนกได้ 6 ชนิด พบว่ามี 3 ชนิดเป็นศัตรูที่สำคัญของพืช ได้แก่ *P. fluctuosalis* Guenée เป็นศัตรูของ ข้าว อ้อย และบัว *P. stagnalis* (Zeller) เป็นศัตรูของข้าว และ *P. crisonalis* (Walker) เป็นศัตรูของบัวและกระจับ ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร และได้จัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชของประเทศไทยพร้อมแนวทางการวินิจฉัยไว้ด้วย

การทดลองที่ 1.1.28 อนุกรมวิธานและการแพร่กระจายของแตนเบียนไข่วงศ์ใหญ่ Platygastroidea ที่เข้าทำลายหนอนกอข้าว มวนเขียวข้าว และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

การใช้แตนเบียนไข่ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าว ถือเป็นการควบคุมแมลงศัตรูข้าวโดยชีววิธีที่สำคัญและมีประโยชน์ ถึงแม้ว่าแตนเบียนไข่วงศ์ใหญ่Platygastroideaมีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยที่สามารถเข้าทำลายแมลงอาศัยได้สูงถึง 9 อันดับแต่ยังมีการศึกษาแมลงกลุ่มนี้น้อยมากในประเทศไทย กรมการข้าวใช้แนวทางการวินิจฉัยสกุลตามเอกสารวิชาการจากต่างประเทศซึ่งได้รายงานไว้เพียง 3 – 4 สกุลเท่านั้น วัตถุประสงค์หลักของการทดลองคือการสำรวจศึกษาอนุกรมวิธานของแตนเบียนไข่กลุ่ม

Platygastroideaเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการควบคุมแมลงศัตรูข้าวโดยชีววิธีที่สำคัญในอนาคต ดำเนินการทดลองระหว่างเดือน ตุลาคม 2555 ถึงเดือน กรกฎาคม2558 โดยเก็บตัวอย่างแตนเบียนไข่จากแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศและพื้นที่บริเวณใกล้เคียงแหล่งปลูกนั้นๆ ผลจากการศึกษาพบว่า แตนเบียนไข่วงศ์ใหญ่ Platygastroideaมี 1 วงศ์ได้แก่ Platygastridaeซึ่งประกอบด้วย 4 วงศ์ย่อยคือ Scelioninae, Telenominae, Teleasinaeและ Platygastrinaeวงศ์ย่อย Scelioninaeมีจำนวน 16 สกุล ได้แก่ *Macroteleia* Westwood, *Palpoteleia*Kieffer, *Probaryconus*Kieffer, *Baryconus*Förster, *Tiphodytes* Bradley, *Cremastobaeus*Ashmead, *Dicroscelio*Kieffer, *Duta* Nixon, *Encyrtoscelio* Dodd, *Gryon*Haliday, *Idris*Förster, *Psilanteris*Kieffer, *Scelio*Latreille, *Trissoscelio*Kieffer, *Triteleia*Kiefferและ *Opisthacantha*Ashmead วงศ์ย่อย Telenominae พบจำนวน 5 สกุลได้แก่ *Paratelenomus* Dodd, *Trissolcus*Ashmead, *Phanuromyia* Dodd, *Telenomus*Haliday, *Psix*Kozlov&Lêวงศ์ย่อย Teleasinaeและ Platygastrinae พบวงศ์ย่อยละ 1 สกุลได้แก่ *Trimorus*Förster และ *Platygaster*Latreille ตามลำดับ ได้รายงานแนวทางการวินิจฉัยในระดับ วงศ์ย่อยและสกุลนอกจากนี้ในแต่ละสกุลที่พบได้บรรยายถึงลักษณะที่สำคัญทางสัณฐานวิทยา ประวัติทางอนุกรมวิธาน การวินิจฉัย เขตการแพร่กระจายและให้ข้อสังเกตในสกุลที่มีความสำคัญทางการเกษตรจัดทำบาร์โค้ดและแทคป้ายชื่อรายละเอียดของแต่ละตัวอย่างเพื่อใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงในพิพิธภัณฑ์แมลงกรมวิชาการเกษตร ซึ่งการทดลองนี้จะเป็นประโยชน์ต่อนักวิชาการเกษตรโดยเฉพาะกรมการข้าว และนักชีววิทยาในการสำรวจและศึกษาแตนเบียนศัตรูธรรมชาติที่สำคัญในอนาคต

การทดลองที่ 1.1.29 สัณฐานวิทยาและลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟดอกไม้ Common Blossom Thrips; *Frankliniella schultzei* (Trybom)

การศึกษาสัณฐานวิทยาและลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟดอกไม้ *Frankliniella schultzei* (Trybom) โดยการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชต่างๆ เช่น มะเขือ ข้าวโพด หอม พืชตระกูลแตง และ ไม้ดอกไม้ประดับ ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ระหว่างเดือนตุลาคม 2555 ถึง เดือนกันยายน 2557 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน เพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟดอกไม้ได้ 275 ตัวอย่าง ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae ชื่อวิทยาศาสตร์ *Frankliniella schultzei* (Trybom) ทำให้ทราบถึงชนิด ลักษณะการทำลาย พืชอาศัย เขตการแพร่กระจายโดยเพลี้ยไฟดอกไม้จะเข้าทำลายทั้งยอดอ่อน ดอก และใบพืช รวมถึงได้วิธีการ เทคนิคที่เหมาะสม และเรียนรู้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับการหาลำดับพันธุกรรมของยีน COI (Cytochrome Oxidaes subunit I) ของเพลี้ยไฟดอกไม้มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมกับเพลี้ยไฟดอกไม้ตะวันตกที่ 0.07568 และ 0.0844 ตามลำดับ จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดและถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยไฟดอกไม้ นำตัวอย่างเพลี้ยไฟจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลงพร้อมนำข้อมูลที่รวบรวมได้

จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดทำรายชื่อชนิดแมลงศัตรูพืชรองรับปัญหาด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

การทดลองที่ 1.1.30 อนุกรมวิธานไรสี่ขาในวงศ์ Eriophyidae ของประเทศไทย

ไรสี่ขาเป็นไรที่มีขนาดเล็กไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าลักษณะการเข้าทำลายของไรสี่ขาหลายชนิดคล้ายกับอาการของโรคพืช จึงทำให้เกิดการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ผิดประเภท นอกจากนี้ไรสี่ขาหลายชนิดเป็นพาหะนำโรคมาสู่พืช และมีหลายชนิดเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย จากการสำรวจชนิดของไรสี่ขาที่มีความสำคัญ และเขตแพร่กระจายในประเทศไทย ในพื้นที่ 26 จังหวัด 37 อำเภอ ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2556- กันยายน พ.ศ. 2558 และนำตัวอย่างที่ได้มาทำสไลด์ถาวรด้วยน้ำยา Berlese's medium เพื่อจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์รวมทั้งวาดรูปแสดงลักษณะทางอนุกรมวิธานด้วย camera lucida พบว่าไรสี่ขาในวงศ์ Eriophyidae ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดอาการผิดปกติต่าง ๆ บนใบพืชมีจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ *Aceria aloinis* (Keifer), *Aceria litchii*(Keifer), *Aceria longana* Boczek & Knihinicki, *Aceria neopaederiae* Konvipasruang, *et al*., *Aceria sandorici* Nalepa, *Aceria tulipae* (Keifer), *Abacarus pennatus* Chandrapatya, *Aculops caricae* Keifer, *Acalitus simplex* Flechtmann & Etienne,*Colomerus novahebridensis* Keifer,*Phyllocoptes azadirachtae* Chandrapatya และ *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) โดยพบไรที่มีความสำคัญและสร้างความเสียหายให้กับพืชเศรษฐกิจ ได้แก่*A. longana*ทำให้เกิดอาการพุ่มไม้กวาดบนลำไย แพร่ระบาดมากในแหล่งปลูกลำไย *P. oleivora*ทำให้เกิดอาการปื้นสีน้ำตาลคล้ายสนิมบนผลส้ม *A. litchii*ทำให้เกิดอาการใบกำมะหยี่บนใบลิ้นจี่ และ*A. tulipae* เป็นไรศัตรูที่สำคัญของกระเทียมทำให้ใบกระเทียมที่ปลูกในสภาพไร่บิดม้วนงอ และกลีบกระเทียมหลังการเก็บเกี่ยวเกิดอาการแห้งฝ่อ การศึกษาในครั้งนี้นี้พบไรชนิดใหม่ (new species) บนต้อยติ่งฝรั่งกำลังอยู่ระหว่างการตีพิมพ์ชื่อ นอกจากนั้นพบไรที่มีการค้นพบเป็นครั้งแรก (new record) ในประเทศไทยมีชื่อว่า *A. aloinis* ซึ่งทำให้ยอดและใบของว่านหางจระเข้เกิดอาการบิดม้วนงอ การสำรวจไรสี่ขาเข้าทำลายมะพร้าวในหลายพื้นที่พบเฉพาะไร *C. novahebridensis*แต่ไม่พบ ไร *Aceria guerreronis* Keifer ที่เป็นพาหะนำโรค Cadang Cadang ในมะพร้าว ซึ่งเป็นสาเหตุของการห้ามนำมะพร้าวเข้าในหลายประเทศ ข้อมูลนี้สามารถนำไปใช้ในเจรจาต่อรองทางการค้ากับต่างประเทศ เพื่อที่จะยืนยันว่าประเทศไทยไม่มีศัตรูพืชกักกันที่เป็นศัตรูสำคัญในประเทศ นอกจากนี้ผลงานวิจัยสามารถใช้เป็นข้อมูลเผยแพร่ให้นักวิชาการ นักส่งเสริม และเกษตรกร สำหรับการแนะนำในการป้องกันกำจัดไรศัตรูพืชได้อย่างถูกต้องและจัดทำบัญชีรายชื่อเพิ่มเติม เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับเปิดตลาดสินค้าเกษตรของไทยเพื่อส่งออกไปยังต่างประเทศ

การทดลองที่ 1.1.31 ชีววิทยา การเข้าทำลาย ฤดูกาลระบาดของแมลงวันทองชนิด *Bactrocera tau* (Walker)

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมผลพืชตระกูลแตงที่ถูกแมลงวันทองเข้าทำลาย ในจังหวัดกาญจนบุรี นครราชสีมา และสุพรรณบุรี พบแมลงวันทอง 2 ชนิด ลงทำลาย คือ *B. cucurbitae* และ *B. tau* การศึกษาวงจรชีวิตของแมลงวันทองชนิด *Bactrocera tau* (Walker) ในห้องปฏิบัติการโดยมีอุณหภูมิเฉลี่ย 23.50±1.02 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพันธ์เฉลี่ย 89.04±0.25 เปอร์เซ็นต์ พบว่าตัวเต็มวัยเพศเมียจะเริ่มจับคู่ผสมพันธุ์เมื่ออายุ 16 วัน โดยวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ หรือกลุ่มๆ ละ 2-3 ฟอง ตัวเมีย 1 ตัว สามารถวางไข่ได้ 397-533 ฟอง มีเปอร์เซ็นต์การฟัก 75% ระยะไข่ 2-3 วัน หนอนมี 3 ระยะ ระยะหนอน 8-9 วัน ระยะดักแด้ 7-8 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมียอายุ 115-145 วัน และตัวเต็มวัยเพศผู้มีอายุ 75-135 วัน จากการสำรวจและเก็บรวบรวมผลแตงร้าน แตงกวา มะระหวาน ฟักทอง บวบหอม ที่ถูกแมลงวันทองเข้าทำลายในแหล่งปลูกจังหวัดกาญจนบุรี นครราชสีมา และสุพรรณบุรี พบว่า *B. tau* ลงทำลายแตงกวา ฟักทอง มะระหวาน และบวบหอม ในการศึกษาช่วงฤดูการระบาดของแมลงวันทองชนิด *B.tau* ในแปลงปลูกแตงกวา และบวบหอม โดยใช้สารล่อชนิด Cur-lure ในกับดักแบบ Steiner พบว่าแมลงวันทองชนิด *B. tau* เข้าทำลายในแตงกวา และบวบหอม

การทดลองที่ 1.1.32 ศึกษาโครโมโซมและเขตการกระจายของหอยสกุล *Pomacea* ในประเทศไทย

ดำเนินการสำรวจการระบาด/เก็บตัวอย่างและบันทึกพิกัดภูมิศาสตร์พื้นที่ๆเก็บตัวอย่างตามแผนการสำรวจ พบว่าหอยเชอรี่สกุล *Pomacea*มีเขตการกระจายอยู่ทุกภาคของประเทศไทย เมื่อศึกษา feeding behavior พบว่าหอยเชอรี่สามารถกินได้ตลอดเวลา คิดเป็นน้ำหนักอาหารที่กินโดยเฉลี่ย 49.66 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว/ วัน(n=30) หอยเชอรี่จะวางไข่สีชมพูไว้ตามต้นพืชหรือวัสดุที่อยู่เหนือน้ำขนาดของกลุ่มไข่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง8.11 - 22.20 ม.ม. ยาว 15.32 - 55.92 ม.ม. เส้นผ่านศูนย์กลางของไข่1.65 - 2.49 ม.ม.ไข่หอยเชอรี่มีจำนวน 286 - 4,303 ฟอง เมื่อนำค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่มาคำนวณค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย ANOVA พบว่ามีอย่างน้อย 1 ตัวอย่างที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, 99% และ 99.9% และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Tukey's HSD และ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.9% พบว่ามีการแบ่งกลุ่มออกเป็นอย่างน้อย 2 กลุ่ม

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยเชอรี่วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เทคนิค morphometricsซึ่งขณะนี้กำลังศึกษาจากตัวอย่างหอยบางส่วนที่เก็บจากพื้นที่ภาคต่างๆของประเทศไทย โดยวัดค่า shell length, shell width, last whorl height, aperture length และ aperture width วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้ ANOVA จากโปรแกรม SPSS จากนั้นนำข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยที่วิเคราะห์แล้วมาเปรียบเทียบเพื่อ*คัดเลือกตัวอย่างที่มีความแตกต่างกัน*ไปศึกษาจำนวนโครโมโซมและการจัดเรียงคาริโอไทป์ในปีต่อไป

การทดลองที่ 1.1.33 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ (*Rattus argentiventer*) ที่พบในประเทศไทย

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ (*Rattus argentiventer* (Robinson and Kloss, 1916)) ทำการเก็บตัวอย่างหนูนาใหญ่จำนวน 77 ตัวอย่าง ใน 15 จังหวัด จาก 5 ภูมิภาค ในประเทศไทย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ในประเทศไทยการศึกษาครั้งนี้ เป็นการจำแนกชนิดหนูนาใหญ่ที่พบในประเทศไทย ด้วยเทคนิค multiplex PCR เป็น ครั้งแรก ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน พบว่าหนูนาใหญ่ให้แถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด ได้แก่ ขนาด 1,300 และ 199 คู่เบส ตามลำดับ และจากผลการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ของลำดับเบสบริเวณไซโตโครม บี และบริเวณไซโตโครม บี ถึงส่วนต้นบริเวณควบคุมในไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ สามารถแบ่งหนูนาใหญ่ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ clade A และclade B ซึ่งสามารถจำแนกออกได้เป็น 5 และ 9 haplotypes ตามลำดับ ในขณะที่ผลจากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม การวิเคราะห์ สายสัมพันธ์ของ haplotypes และการวิเคราะห์ประวัติศาสตร์ประชากร บริเวณไซโตโครม บี เป็นไปได้ว่าหนูนาใหญ่ในประเทศไทย ทีพบทางภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อพยพมาจากทางภาคใต้ของประเทศ และผลจากการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน สามารถแบ่งหนูนาใหญ่ที่พบในประเทศไทยได้เป็น 2 กลุ่มประชากร ซึ่งมีที่มาจากแหล่งที่ต่างกัน

การทดลองที่ 1.1.34 ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์และวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของปรสิตโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ระยะสปอร์โรซิส โดยวิธีทางอณูชีววิทยา

โปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* เป็นค็อคซิเดียโปรโตซัวที่มีการสร้างซีสต์ อยู่ในไฟลัม Apicomplexa วงศ์ Sarcocystidae มีวงจรชีวิตอยู่ในสัตว์อาศัย 2 ชนิด ได้แก่ หนูและงู ในการศึกษา ครั้งนี้ ทำการคัดแยกและจำแนกชนิดของโปรโตซัว *S. singaporensis* จากมูลงูเหลือมในประเทศไทย จำนวน 22 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีทางสัณฐานวิทยาและวิธีทางอณูชีววิทยา จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่าสปอร์โรซีสต์ที่พบมีลักษณะรูปไข่ มีขนาดเท่ากับ 9.47 x 6.91 (7.39-12.32 x 4.93-9.86) ไมโครเมตร ตามลำดับ และมีค่า shape index (SI) เท่ากับ 1.37 การจำแนกชนิดด้วยวิธี multiplex PCR พบว่า โปรโตซัว *S. singaporensis* จะให้แถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือขนาด 1,500 และ 265 คู่เบส ผลการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม บริเวณ 18S rDNA และ 28S rDNA สามารถแบ่งโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ได้เป็น 3 กลุ่ม ตามชนิดของสัตว์อาศัยสุดท้าย การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 18S rDNA และ 28S rDNA พบว่าโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมกับโปรโตซัว *S. singaporensis* ในฐานข้อมูลทางพันธุกรรม (GenBank) ร้อยละ 97.5-99.6 และ 98.7-99.3 ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้เป็นการจำแนกชนิดของโปรโตซัว *S. singaporensis* ในระยะสปอร์โรซีสต์จากมูลงูเหลือมด้วยวิธี multiplex PCR เป็นครั้งแรก ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

การทดลองที่ 1.1.35 อนุกรมวิธานด้วงงวงสกุล *Rhynchophorus*

การศึกษาอนุกรมวิธานของด้วงงวงสกุล *Rhynchophorus* โดยการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างด้วงงวงในแหล่งปลูกมะพร้าว และปาล์มน้ำมัน ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึง เดือนกันยายน 2558 นำตัวอย่างด้วงงวงที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานด้านสัณฐานวิทยา (Morphology) เพื่อตรวจจำแนกชนิดใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และเปรียบเทียบกับตัวอย่างด้วงงวงในพิพิธภัณฑ์แมลง ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดด้วงงวงได้ 2 ชนิด 265 ตัวอย่าง ซึ่งจัดอยู่ในอันดับ (Order) Coleoptera วงศ์ (Family) Curculionidae ได้แก่ ด้วงงวงมะพร้าวเล็ก *Rhynchopho rusferrugineus* (Olivier) 232 ตัวอย่างและด้วงงวงมะพร้าวใหญ่*Rhynchopho rusvulneratus* (Panzer) 33 ตัวอย่างด้วงงวงทั้ง 2 ชนิด พบในต้นลาน ต้นสาคู และจากกับดักแสงไฟ ทำให้ทราบชนิด พืชอาศัย ลักษณะการทำลาย และเขตการแพร่กระจายของด้วงงวงสกุล *Rhynchophorus* จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดและถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของด้วงงวงทั้ง 2 ชนิดนำตัวอย่างด้วงงวงจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลงพร้อมนำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลงกรมวิชาการเกษตร สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดทำรายชื่อชนิดแมลงศัตรูพืชรองรับปัญหาด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร และทราบถึงเขตการแพร่กระจายของด้วงงวงสกุล *Rhynchophorus* ในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1.36 สัณฐานวิทยาและลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟสกุล *Bathrips* และ *Thrips* การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

การศึกษาสัณฐานวิทยาและลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* และ *Bathrips* โดยการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชต่างๆ เช่น มะเขือ ข้าวโพด หอม พืชตระกูลแตง และไม้ดอกไม้ประดับ ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึง เดือนกันยายน 2558 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน เพื่อตรวจจำแนกชนิดณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* และ *Bathrips* ได้ 275 ตัวอย่าง ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae ได้แก่ เพลี้ยไฟฝ้าย *Thripspalmi* (Karny) 90 ตัวอย่าง เพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย *Thripshawaiiensis* (Morgan) 85 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟโหระพา *Bathripsmelanicornis* (Shumsher) 90 ตัวอย่างทำให้ทราบถึงชนิด ลักษณะการทำลายพืชอาศัย เขตการแพร่กระจายโดยเพลี้ยไฟจะเข้าทำลายทั้งยอดอ่อน ดอก และใบพืชรวมถึงได้วิธีการ เทคนิคที่เหมาะสม และเรียนรู้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับการหาลำดับพันธุกรรมของยีน COI (Cytochrome Oxidaes subunit I) ของเพลี้ยไฟฝ้าย เพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย และเพลี้ยไฟโหระพามีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ 0.12060, 0.07186 และ 0.09906 ตามลำดับจัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดและถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* และ *Bathrips* นำตัวอย่างเพลี้ยไฟจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลงพร้อมนำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลงกรม

วิชาการเกษตร สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดทำรายชื่อชนิดแมลงศัตรูพืชรองรับปัญหาด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

การทดลองที่ 1.1.37 อนุกรมวิธานแมงมุมวงศ์ Clubionidae

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมในวงศ์ Clubionidae ของประเทศไทยตั้งแต่เดือนตุลาคม 2556 สิ้นสุด กันยายน 2558 บนพื้นที่ 18 จังหวัด เพื่อนำมาศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานและจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ โดยการใช้ลักษณะที่สำคัญในการจำแนกชนิด เช่น ลักษณะการจัดเรียงของตา ลักษณะการจัดเรียงของฟันและจำนวนฟันบน chelicerae ความยาวของขา ลักษณะรูปร่างและลวดลายบนส่วนหลัง ลักษณะของอวัยวะปั่นเส้นใย ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ฯลฯ ผลจากการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานพบแมงมุมในวงศ์ Clubionidae ทั้งหมด 2 สกุล 4 ชนิด ได้แก่ *Clubiona filicata* O. Pickard-Cambridge, 1874, *Clubiona melanothele* Thorell, 1895, *Clubiona* sp. และ *Cheiracanthium insulanum* (Thorell, 1878)

การทดลองที่ 1.1.38 ลักษณะทางอนุกรมวิธานและชีววิทยาของเพลี้ยแป้ง *Phenacoccus solenopsis* Tinsley

จากการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานและชีววิทยาของเพลี้ยแป้งลายจุด; *Phenacoccus solenopsis* Tinsley ระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึง เดือนกันยายน 2558 เพื่อทราบลักษณะความแตกต่างทางด้านสัณฐานวิทยาในแต่ละระยะการเจริญเติบโต ชีววิทยา รวมทั้งวิธีการและพืชอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเพลี้ยแป้งโดยเก็บรวบรวมตัวอย่าง จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาเลี้ยงบนผลฟักทอง และบนใบและกิ่งชบา ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช พบเพลี้ยแป้ง *P. solenopsis* ลงทำลายพืชต่างๆ จำนวนมากถึง 9 วงศ์ 21 ชนิด และพบกระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย เมื่อทำการศึกษาวงจรชีวิต พบว่าเพลี้ยแป้ง *P. solenopsis* ตัวเต็มวัยเพศเมียไม่มีปีก มีการลอกคราบจำนวน 3 ครั้งหลังจากฟักออกจากไข่ ใช้เวลาตลอดอายุขัยประมาณ 40-49 วัน ส่วนตัวผู้มีการเข้าดักแด้ มีปีกสามารถบินได้ เพลี้ยแป้งชนิดนี้มีการผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศ ตัวเต็มวัยเพศเมียเมื่อได้รับการผสมพันธุ์จากตัวผู้จะออกลูกเป็นตัว (ovoviviparity) ไม่มีถุงไข่ (ovisac) หรือในบางครั้งอาจพบมีการออกลูกเป็นไข่ (oviparity) และปรากกฏถุงไข่ขนาดเล็กตรงปลายส่วนท้องได้ นอกจากนี้เพลี้ยแป้ง *P. solenopsis* เมื่อเลี้ยงในชบา มีอายุขัยเฉลี่ย 46.75 วัน ในขณะที่เลี้ยงในฟักทองมีอายุขัยเฉลี่ยเพียง 44.80 วัน ระยะตัวเต็มวัยเพศเมียที่เลี้ยงในชบาจะมีช่วงอายุเฉลี่ย 30.70 วันในขณะที่เมื่อเลี้ยงในฟักทองมีอายุเฉลี่ยเพียง 25.70 วันแต่พบว่าเพลี้ยแป้งที่เลี้ยงในชบามีปริมาณไข่เฉลี่ยเพียง 83.00 ฟองต่อตัว ซึ่งน้อยกว่าเพลี้ยแป้งที่เลี้ยงในฟักทองทีมีปริมาณไข่เฉลี่ย 93.55 ฟองต่อตัว

การทดลองที่ 1.1.39 ชีววิทยาและเขตการแพร่กระจายของไรแมงมุมคันซาวา *Tetranychus kanzawai* Kishida

ชีววิทยาของไรแมงมุมคันซาวา *T. kanzawai*ศึกษาด้วยตารางชีวิต บนใบพืชอาศัย 3 ชนิด ได้แก่ กุหลาบ, มะละกอ และมันสำปะหลัง ในห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิ26.23 ± 2.08 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 44.95 % ± 6.40 %RHและให้ได้รับแสงวันละ 10 ชั่วโมง พบว่า อายุตัวเต็มวัยเพศเมียระยะเวลาในการวางไข่ อัตราวางไข่ได้โดยเฉลี่ยตลอดชีวิต อัตราการขยายพันธุ์สุทธิในชั่วอายุขัย (R_0) และ ชั่วอายุขัยของกลุ่ม (G) ของไรแมงมุมคันซาวามากที่สุด เมื่อมีพืชอาศัยเป็นมันสำปะหลัง ส่วนอัตราการเพิ่มประชากร (r_m) ของไรแมงมุมคันซาวาในมะละกอ และมันสำปะหลังนั้นใกล้เคียงกัน 0.23 และ 0.24 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าในกุหลาบ แสดงให้เห็นว่า ประชากรของไรแมงมุมคันซาวาที่ลงทำลายบนมะละกอและมันสำปะหลัง สามารถเพิ่มประชากรได้ดี และทำให้เกิดการระบาดอย่างรวดเร็ว ส่วนเขตการแพร่กระจายของไรแมงมุมคันซาวาสามารถแพร่กระจายอยู่ทั่วประเทศไทยตลอดทั้งปี บนพืช 60 ชนิด ตั้งแต่ไม้ยืนต้นจนถึงวัชพืช

การทดลองที่ 1.1.40 ชีววิทยา นิเวศวิทยาของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม วงศ์ Psyllidae ในพืชตระกูลส้ม

การศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม *Diaphorina citri* Kuwayama ในพืชตระกูลส้ม ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มบริหารศัตรูพืช และในแปลงเกษตรกรพื้นที่ภาคเหนือได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ และกำแพงเพชร โดยทำการสำรวจในช่วงฤดูฝน เดือนกรกฎาคม –สิงหาคม 2557 ซึ่งเป็นฤดูกาลระบาดของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ในการศึกษานิเวศวิทยา พบว่าในแปลงปลูก พืชตระกูลส้มที่พบเพลี้ยไก่แจ้ส้มในปริมาณมาก ได้แก่ มะนาว และส้มเขียวหวาน ต้นที่ถูกทำลายก่อนมักอยู่บริเวณขอบด้านนอกของแปลง เนื่องจากปริมาณของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ต้นที่อยู่ขอบด้านนอกจะมีปริมาณมากกว่า มีการกระจายตัวทั่วทั้งต้น โดยลักษณะการเข้าทำลายจะพบมีการวางไข่บริเวณตายอด ใบอ่อนที่แตกใหม่ๆ บริเวณซอกระหว่างเส้นใบ และกิ่งอ่อน พบตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเกาะดูดกินต้นพืช ขณะเดียวกันมีการขับไขสีขาวเป็นเส้นยาวออกมา พืชที่ถูกทำลายมากๆ จะเริ่มมีอาการใบเหลือง หลุดร่วง และยังพบมีราดำเกาะอยู่บริเวณใบและกิ่ง เนื่องจากของเหลวที่ถูกขับออกมาขณะกินอาหาร สภาพแปลงที่พบการระบาดมาก คือแปลงที่มีการจัดการวัชพืชในแปลงน้อยหรือไม่มีการจัดการเลย การเพาะเลี้ยงขยายตัวอย่างแมลง เพื่อเก็บข้อมูลทางชีววิทยาพบว่าตัวเต็มวัยความยาวตั้งแต่ส่วนหัวถึงปลายปีก ขนาด 3-4 มิลลิเมตร ส่วนของปีกมีสีน้ำตาลเข้มบริเวณขอบปีก เนื้อปีกส่วนอื่นส่วนอก และหัว มีสีน้ำตาลอ่อนและขาว เกาะโดยทำมุม 45 องศา กับพื้นผิวที่เกาะ ตัวเต็มวัยสามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้หลายร้อยฟอง ตลอดช่วงชีวิตประมาณ 3-4 เดือน โดยตัวเต็มวัยจะวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ แต่อาจจะอยู่ใกล้ๆ กันโดยวางเป็นกลุ่มหรือเรียงกันเป็นแถว อยู่บนตายอด ส่วนที่แตกยอดแต่ใบยังไม่คลี่ ใบอ่อนหรือดอกอ่อน ไข่มีขนาดความยาว 0.2-0.3 มิลลิเมตร มีรูปทรงคล้ายหยดน้ำ หรือทองหยอด มีสีเหลืองสด ระยะไข่ 3-5 วัน จะฟักเป็นตัวอ่อนวัยที่ 1 ในวัยที่ 1 -5 มีความยาว 0.3 - 1.5 มิลลิเมตร โดยมีลักษณะลำตัวแบนสีเหลือง ในวัยที่ 1 พบการเคลื่อนที่ แต่ในวัย 2-5 พบว่ามักเกาะอยู่นิ่งๆ สามารถมองเห็นจุดสีแดงสองจุดบริเวณส่วนหัว ด้านข้างลำตัวมีแผ่นปีกปรากฏอยู่ทั้งสองข้างซ้ายและขวา ส่วนปลายท้องจะมีเส้นขนเรียงกันอยู่

ส่วนต่างๆ เห็นได้ชัดเจนขึ้นเมื่ออยู่ในวัย 4-5 ระยะเวลาเป็นตัวอ่อน 10-30 วัน จากนั้นจึงเจาะบริเวณด้านบนส่วนท้องออกมาเป็นตัวเต็มวัย

การทดลองที่ 1.1.41 ชนิดมดที่พบในแหล่งผลิตและโรงคัดบรรจุไม้ผลเพื่อการส่งออก

การศึกษาชนิดของมดที่พบในแหล่งผลิตและโรงคัดบรรจุไม้ผลเพื่อการส่งออก ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนกันยายน 2558 โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างจากแหล่งปลูกไม้ผล และโรงคัดบรรจุผลไม้ต่างๆ ได้แก่ มังคุด ทุเรียน ลองกอง เงาะ และ สับปะรด ในพื้นที่ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ตราด ระยอง ชลบุรี และในพื้นที่ภาคใต้ ได้แก่จังหวัด ชุมพร นครศรีธรรมราช สงขลา และพัทลุง นำตัวอย่างที่ได้มาจัดรูปร่าง และจำแนกได้ 6 วงศ์ย่อย 16 สกุล 19 ชนิด เมื่อพิจารณาชนิดมดในแปลงปลูกไม้ผล พบว่าในแปลงไม้ผลทั้ง 5 ชนิด พบมดทั้งหมด 19 ชนิด แต่ละแปลงมีชนิดมดที่พบแตกต่างกันดังนี้ ลองกองพบมดทั้งสิ้น 19 ชนิด เงาะ 18 ชนิด มังคุดและทุเรียนพบ 16 ชนิด ในขณะที่สับปะรดพบมดน้อยที่สุดเพียง 11 ชนิด โดยมีมด จำนวน 10 ชนิดที่พบได้ในแปลงไม้ผลทั้ง 5 ชนิด สำหรับในโรงคัดบรรจุพบมดเพียง 11 ชนิด และพบว่ามด *Dolichoderus thoracicus* Smith มีปริมาณและความหนาแน่นภายในแปลงปลูกและโรงคัดบรรจุ ลองกอง เงาะ มังคุดและทุเรียน ในขณะที่มด *Solenopsis geminata* Fabricius พบมากในแปลงสับปะรดและโรงคัดบรรจุอีกด้วย

การทดลองที่ 1.1.42 ชีววิทยา นิเวศวิทยาและการแพร่กระจายของหอยศัตรูพืช สกุล *Bradybeana*

ดำเนินการสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยสกุล Bradybeanaในพื้นที่เขาหินปูนและพื้นที่เกษตรกรรมอื่นตามภาคต่างๆของประเทศไทย ตั้งแต่เดือนตุลาคม ปี 2556 – กันยายน ปี 2557 นำมาจำแนกชนิดตามระบบอนุกรมวิธานของหอยตามเอกสารของ Abbott (1989), Laws (1973), Panha (1996) และ Vaught (1989)พบว่า ตัวอย่างหอยที่เก็บจากแปลงไม้น้ำ จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 13 ตัวอย่างเป็นหอย Asian Tramp Snail, Bradybaenasimilaris (Férussac, 1821) และตัวอย่างหอยจากกำแพงเพชร 8 ตัวอย่าง และตัวอย่างหอยจากเชียงใหม่ 12 ตัวอย่าง จัดเป็นหอยสกุล Bradybenaซึ่งต้องตรวจสอบเพื่อระบุชนิดเพิ่มเติมซึ่งจากการสำรวจยังไม่พบหอยที่อยู่ในสกุลดังกล่าวในพื้นที่ภาคกลาง ตะวันออก ตะวันตก และภาคใต้

จากการศึกษาการผสมพันธุ์การวางไข่และการเจริญเติบโตของหอยสกุล Bradybeana ในห้องปฏิบัติการเบื้องต้นพบว่าหอยสกุล Bradybena ไม่ชอบแสงต้องการความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 60 % ขึ้นไป โดยตัวเต็มวัยแต่ละตัวสามารถสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ได้ทั้งเพศผู้และเพศเมีย มีการแสดงพฤติกรรมก่อนการผสมพันธุ์คือการใช้หนวดที่อยู่บริเวณส่วนหัวแตะที่คู่ผสมพันธุ์ก่อนขึ้นขี่บนเปลือกของคู่ผสม มีการผสมพันธุ์ข้ามตัวในช่วงเวลากลางคืน หรือในสภาพที่มีความชื้นสูง ซึ่งหอยจะวางไข่เป็นกลุ่ม ๆเฉลี่ย 8-10 ฟอง โดยวางไข่วันละ 1-2 ฟอง จนครบจำนวน ใต้รอยแยกของดินที่ชื้น โดยไม่มีวุ้นใสปกคลุมกลุ่มไข่ ไข่หอยที่เกิดใหม่มีรูปร่างรีๆ ค่อนข้างใส เรียกว่า gelatinous egg การศึกษาดังกล่าวยังไม่เสร็จสิ้น ต้องทำการศึกษาการฟักจากไข่ วงจรชีวิตและการเจริญเติบโตของหอยสกุล Bradybeana ในห้องปฏิบัติการต่อไป

กิจกรรมย่อยที่ 1.2 อนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช

การทดลองที่ 1.2.1 อนุกรมวิธานและชีววิทยาของราสกุล *Cladosporium* สาเหตุโรคพืช

รวบรวมเก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการของโรคพืชที่เกิดจากรา *Cladosporium* จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ในจังหวัดกาญจนบุรี ฉะเชิงเทรา ราชบุรี นครราชสีมา ตาก พะเยา เพชรบุรี เพชรบูรณ์ ราชบุรี และ เชียงใหม่ ได้ตัวอย่างของพืชทั้งหมด 19 ตัวอย่าง จากพืช 6 ชนิด แตงกวา พริก ผักกาดขาว ผักกาดหอม เผือก และมะม่วง โดยการศึกษาลักษณะอาการของโรคโดยตรงและแยกเชื้อสาเหตุโดยใช้วิธี Tissue transplanting บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) จำแนกชนิดโดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope จำแนกได้ทั้งหมด 4 species 19 ไอโซเลท ได้แก่ *Cladosporium cladosporioides, C. colocasiae, C. cucumerinum* และ *C. oxysporum* รา เจริญได้ดีบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA) และ Oat Agar (OA)

การทดลองที่ 1.2.2 อนุกรมวิธานและชีววิทยาของราสกุล *Alternaria* และ *Stemphylium* สาเหตุโรคพืช

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคพืช ในช่วงตุลาคม 2553 ถึง กันยายน 2556 ได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* spp. และ *Stemphylium* sp. จำนวน 210 ตัวอย่าง บนพืช 21 ชนิด จำแนกชนิด โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานของเชื้อ พบว่า ได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* spp. จำนวน 191 ตัวอย่าง บนพืช 21 ชนิด คือ โรคใบจุดคะน้า ผักกาดขาว ผักกาดเขียว ผักกาดหางหงส์ กะหล่ำดอก กะหล่ำปลี กะหล่ำเจดีย์ บรอคโคลี่ กวางตุ้ง และ ผักกาดแม้ว เกิดจากเชื้อ *Alternaria brassicicola* โรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง หอมแบ่ง หอมหัวใหญ่ และกระเทียม เกิดจากเชื้อ *A. porri* โรคใบจุดของมะเขือเทศ และมันฝรั่ง เกิดจากเชื้อ *A. solani* โรคใบจุดของบานไม่รู้โรย และสร้อยไก่ เกิดจากเชื้อ *A. gomphrenae* โรคใบไหม้ของทานตะวัน เกิดจากเชื้อ *A. hilianthi* โรคใบไหม้ของดาวเรือง และชวนชม เกิดจากเชื้อ *Alternaria* sp และได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Stemphylium* sp. จำนวน 19 ตัวอย่าง บนพืช 3 ชนิด คือ โรคใบไหม้ของหอมแดง หอมหัวใหญ่ และกระเทียม เกิดจากเชื้อรา *Stemphylium vesicarium* และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ และตัวอย่างแห้งโรคพืช จำนวน 210 ไอโซเลท จากการศึกษาชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของรา *A. brassicicola A. gomphrenae* และ *Alternaria* sp. สาเหตุโรคใบจุดดาวเรือง พบว่า ทั้ง 3 ชนิด เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร V8 รองลงมาได้แก่ PDA ½ PDA เติม CaCo3 PCA ½ PDA WA และ CZA ตามลำดับ และสร้างสปอร์ได้ดีที่สุด บนอาหาร ½ PDA เติม CaCo3 รองลงมา ได้แก่ ½ PDA WA PCA V8 PDA และ CZA ตามลำดับ การศึกษาผลของแสงต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* และ *S. vesicarium* พบว่า เชื้อราเจริญ และสร้างสปอร์ได้ดีที่สุด เมื่ออยู่ภายใต้แสง fluorescent 8 ชั่วโมง สลับกับมืด 16 ชั่วโมง รองลงมา ได้แก่ แสง near UV 8 ชั่วโมง สลับกับมืด 16 ชั่วโมงต่อวัน แสง fluorescent 24 ชั่วโมงต่อวัน แสง near UV 24 ชั่วโมงต่อวัน และในที่มืด ตามลำดับ และจาก

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* และ *S. vesicarium* พบว่าเชื้อราเจริญและสร้างสปอร์ได้ดีที่สุด เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รองลงมา ได้แก่ 25 20 และ15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

การทดลองที่ 1.2.3 อนุกรมวิธานและชีววิทยาของราสกุล *Choanephora* สาเหตุโรคเน่าเปียก

การสำรวจเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรค จากแปลงปลูกของเกษตรกร ในพื้นที่ 10 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี ราชบุรี เชียงใหม่ เชียงราย ตาก เพชรบูรณ์ ชลบุรีและจันทบุรี ระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึง สิงหาคม ซึ่งเป็นช่วงที่มีฝนตกชุก ความชื้นสูงและมักพบการระบาดของโรค ได้ตัวอย่างพืชที่เป็นโรคเน่าเปียก (wet rot) ที่เกิดจากเชื้อรา *Choanephora* sp. จำนวน 33 ตัวอย่าง พืช 13 ชนิด ได้แก่ พริกขี้หนู 7 ตัวอย่าง พริกชี้ฟ้า 4 ตัวอย่าง กระเจี๊ยบ 2 ตัวอย่าง มะเขือเปราะ 2 ตัวอย่าง ถั่วพู 1 ตัวอย่าง ถั่วฝักยาว 2 ตัวอย่าง โทงเทง (วัชพืช) 2 ตัวอย่าง ผักโขม (วัชพืช) 2 ตัวอย่าง ถั่วลันเตา 3 ตัวอย่าง คะน้า 2 ตัวอย่าง ชบา 1 ตัวอย่าง มะเขือยาว 1 ตัวอย่าง ฟักทอง 2 ตัวอย่าง ถั่วเขียว 1 ตัวอย่าง และดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 1 ตัวอย่าง ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานจำแนกชนิดได้เป็นรา *Choanephora cucurbitarum* (Berk. & Rav.) Thaxt. ผลการศึกษาการเจริญของเส้นใยรา *Ch. cucurbitarum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, Half PDA, PCA, CA และ MEA ที่อุณหภูมิ 20 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเส้นใยรา *Ch. cucurbitarum* มีลักษณะฟูสูงขึ้นจากผิวอาหาร แต่มีบางส่วนที่เจริญแบนราบไปกับผิวอาหาร เมื่อโคโลนีมีอายุได้ 1 วัน เส้นใยยังไม่มีการสร้างโคนิเดีย เมื่อโคโลนีมีอายุได้ 2 วัน จะเห็นเป็นจุดๆของ sporangium และ conidium เมื่อโคโลนีมีอายุได้ 4-5 วัน เส้นใยจะมีลักษณะเหนียวและยุบเมื่อถูกสัมผัส ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส เส้นใยรา *Ch. cucurbitarum* เจริญอย่างรวดเร็วเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนอาหาร PDA และHalf PDA เส้นใยรา *Ch. cucurbitarum* สร้าง conidium ได้มากกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาชนิดพืชอาศัยของรา *Ch. cucurbitarum* โดยการสำรวจเก็บตัวอย่างพบพืชอาศัยของรา *Ch. cucurbitarum* คือพริกขี้หนู พริกชี้ฟ้า กระเจี๊ยบ มะเขือเปราะ ถั่วพู ถั่วฝักยาว โทงเทง(วัชพืช) ผักโขม (วัชพืช) ชบา ถั่วลันเตา คะน้า มะเขือยาว ฟักทอง ถั่วเขียวและดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ผลการศึกษาชนิดพืชอาศัยของรา *Ch. cucurbitarum* โดยการปลูกเชื้อบนต้นพืช พบว่ารา *Ch. cucurbitarum* ที่แยกได้จากพริกขี้หนู ทำให้ พริกขี้หนู พริกชี้ฟ้า แตงกวา คะน้า ผักโขม แสดงอาการโรคในระดับ 3 รา *Ch. cucurbitarum* ที่แยกได้จากถั่วลันเตา ทำให้ ถั่วลันเตา แสดงอาการโรคในระดับ 3 พริกขี้หนู พริกชี้ฟ้า แตงกวา คะน้า ผักโขม แสดงอาการโรคในระดับ 2 รา *Ch. cucurbitarum* ที่แยกได้จากคะน้า ทำให้ คะน้า พริกขี้หนู พริกชี้ฟ้า แตงกวา ผักโขม แสดงอาการโรคในระดับ 2 รา *Ch. cucurbitarum* ที่แยกได้จากผักโขมทำให้ ถั่วลันเตา ผักโขม แสดงอาการโรคในระดับ 3 พริกขี้หนู พริกชี้ฟ้า แสดงอาการโรคในระดับ 2แตงกวา คะน้า ไม่แสดงอาการโรค โดยการปลูกเชื้อบนผลพืช พบว่ารา *Ch. cucurbitarum* ที่แยกได้จากพริกขี้หนู ทำให้ ผลพริกขี้หนู พริกชี้ฟ้า แตงกวา แสดงอาการโรคในระดับ 2 รา *Ch. cucurbitarum* ที่แยกได้จากถั่วลันเตา ทำให้ฝักถั่วลันเตา ผลพริกขี้หนู พริกชี้ฟ้า แตงกวา แสดงอาการ

โรคในระดับ 2 รา *Ch. cucurbitarum* ที่แยกได้จากคะน้า ทำให้ผลพริกขี้หนู พริกชี้ฟ้า แตงกวา แสดงอาการโรคในระดับ 2

การทดลองที่ 1.2.4 การจำแนกชนิดของราสกุล *Botryosphaeria* สาเหตุโรคพืช โดยใช้ลักษณะการสัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ผลการรวบรวมและเก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Botryosphaeria* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 82 ตัวอย่าง จากพืชทั้งหมด 7 ชนิด จากจังหวัดกำแพงเพชร กรุงเทพฯ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา เชียงใหม่ ชลบุรี นครปฐม นครราชสีมา เพชรบุรี ปทุมธานี ประจวบคีรีขันธ์ ระยอง ราชบุรี สกลนคร สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม สุโขทัย และ สุพรรณบุรี ผลจากการศึกษาแยกราได้ทั้งหมดจำนวน 73 ไอโซเลท จำแนกชนิดเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกได้ราทั้งหมด 5 genera 5 species ได้แก่ *Lasiodiplodia theobromae, Lasiodiplodia pseudotheobromae, Dothiorella mangiferae, Fusicoccum* และ *Neocystalidium dimidiatum* จัดเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืชที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม ของรา *Botryosphaeria* ทั้งหมด 37 ไอโซเลท ได้แก่ ราที่แยกได้จากโรคเปลือกแตกยางไหลของมะเม่า 2 ไอโซเลท โรคลำต้นจุดแก้วมังกร 15 ไอโซเลท จากโรคผลเน่ากล้วยหอม 5 โซเลท จากลำต้นองุ่น 5 ไอโซเลท ผลเน่าของมะม่วง 7 ไอโซเลท และ ลำต้นยางไหลมะม่วง 3 ไอโซเลท พบว่า ลำดับเบสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง ITS ซึ่งรวมบางส่วนของยีน 18S และ 28S บน rDNA มีขนาดทั้งหมด 541 คู่เบส จากการวิเคราะห์จำแนกชนิดได้เป็นดังนี้ ราที่แยกได้จากโรคเปลือกแตกยางไหลของมะเม่า จำแนกชนิดได้เป็นรา *L. pseudotheobromae* โรคลำต้นจุดของแก้วมังกร จำนวน 15 ไอโซเลท จำแนกชนิดได้เป็นรา *Neocystalidium dimidiatum* จากกล้วยหอม 5 โซเลท จากลำต้นองุ่น 5 ไอโซเลท ผลเน่าของมะม่วง จำนวน 7 ไอโซเลท และ ลำต้นยางไหลมะม่วง จำนวน 3 ไอโซเลท จำแนกชนิดได้เป็นรา *L. theobromae*

การทดลองที่ 1.2.5 ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phytophthora capsici*

ได้เก็บรวบรวมตัวอย่างโรคเหี่ยวของพริก ระหว่าง เดือนตุลาคม 2553 - เดือนกันยายน 2555จากจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง ลำพูน เพชรบูรณ์ ตากและศรีสะเกษ เพื่อศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phytophthora capsici* พบโรครากเน่าโคนเน่าพริกหวานหรือพริกยักษ์ โรครากเน่าโคนเน่าพริกขี้หนู โรครากเน่าโคนเน่ามะเขือยาว โรครากเน่าโคนเน่าพริกขี้หนู และโรครากเน่าโคนเน่าพริกหนุ่ม เมื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้รา *Phytophthora* sp. จำนวน 14 ไอโซเลท ราทำให้พืชแสดงอาการเหี่ยวทั้งต้น ตั้งแต่ยอด ใบ และผลรากและโคนต้นถูกทำลาย เกิดอาการรากเน่า โคนเน่า และทำให้เกิดอาการเน่าคอดิน ราสร้างเส้นใยที่เจริญได้ดีบนอาหารวุ้นแครอท และ สร้างสปอร์จำนวนมากบนอาหารแข็ง เมื่อสปอร์มีอายุมากขึ้นจะหลุดออกจากก้านชูสปอร์ได้ง่าย โดยมีก้านสปอร์ขนาดยาวติดอยู่ ด้านบนของสปอร์มีส่วนเปิดสำหรับเป็นทางออกของสปอร์ที่มี

หางและว่ายน้ำได้ เด่นชัด รา *P. capsici* ทำให้พืชทดสอบ ได้แก่ พริกหวาน พริกหยวก พริกชี้ฟ้า พริกขี้หนู มะเขือเทศ ตำลึง และเส็ง เป็นโรค แผลขยาย 10–20 มิลลิเมตร แสดงอาการแผลเน่าสีน้ำตาลดำ ถึงสีดำ

การทดลองที่ 1.2.6 ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Didymella bryoniae*

โรคยางไหล (Gummy Stem Blight) มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm. (anamorph *Phoma cucurbitacearum*) พบมีการระบาดและทำความเสียหายกับพืชตระกูลแตง ในประเทศไทย การศึกษาชีววิทยาของเชื้อราจึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในงานวิจัย จากการศึกษาสูตร อาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยและการสร้าง pycnidia ของเชื้อราสาเหตุโรค จำนวน 3 ไอโซเลท บนอาหารสูตร PDA PSA PCA MEA CMA OMA และ V8 agar ที่อุณหภูมิ 10, 20 และ 25 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า เชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ดีในอาหาร PDA, PCA และ V8 agar ที่อุณหภูมิห้อง และเชื้อราสามารถเจริญได้ดีและเร็วในทุกสูตรอาหาร โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สำหรับการสร้าง pycnidia ของเชื้อรา พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อราสามารถสร้าง pycnidia ได้ในทุกสูตรอาหาร แต่จะพบสร้างได้ในปริมาณมากบนอาหาร MEA และ PCA หลังการทดลอง 40 วัน และในการศึกษาการติดเชื้อบนเมล็ดของแตงเมล่อน โดยการเก็บเมล็ดจากผลที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค มาวางทดสอบบนอาหาร WA และตรวจนับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อบนเมล็ดและเปอร์เซ็นต์การงอก ผลการทดลองพบว่า เมล็ดแตงมีทั้งการปนเปื้อนและการติดเชื้อที่เมล็ดทั้งในผลที่เป็นโรคและผลไม่เป็นโรค ซึ่งเมล็ดที่มีการติดเชื้อบนเปลือกหุ้มเมล็ดนั้น พบว่า เมล็ดสามารถงอกและเจริญได้ปกติ แต่เชื้อราเข้าทำลายต้นอ่อนทีหลัง ส่วนการติดเชื้อในเมล็ดนั้น ทำให้เมล็ดไม่งอกและเชื้อรามีการเจริญคลุมเมล็ด จากการศึกษาวิธีการปลูกเชื้อราสาเหตุบนต้นพืชพบว่า เชื้อราสามารถเข้าทำลายพืชได้โดยวิธีเข้าทางช่องเปิดธรรมชาติ และวิธี artificial inoculation ในการศึกษาพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุจึงได้นำวิธีการปลูกเชื้อ โดยวิธี toothpick's technique มาทดสอบการก่อให้เกิดโรคกับพืชตระกูลแตงจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ แตงร้าน แตงกวา แตงโม แตงไทย แฟง บวบหอม มะระจีน ฟักทอง บวบงู และเมล่อน ที่ 1, 3, และ 5 วันหลังการปลูกเชื้อสาเหตุ ผลการทดลองพบว่า ในพืชแตงเมล่อน และ แตงร้าน เชื้อสาเหตุโรคทุกไอโซเลท สามารถเข้าทำลายพืชได้รุนแรง และทำให้เกิดโรค 90-100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า พืชทั้ง 2 ชนิดนี้ มีความอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคยางไหล และเกิดโรคได้ง่าย รองลงมาคือ พืชแตงโม พบว่า ไอโซเลทสุพรรณบุรี และ พะเยา สามารถเข้าทำลายพืชได้รุนแรง และทำให้เกิดโรค 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลทสระแก้ว เข้าทำลายพืชได้ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลจากการศึกษาข้อมูลพื้นฐานทางด้านชีววิทยาและนิเวศวิทยาของเชื้อสาเหตุโรค สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคให้มีประสิทธิภาพและการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อโรคยางไหลต่อไป

การทดลองที่ 1.2.7 การจำแนกชนิดและเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของ Race แบคทีเรีย *Rasonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย

การจำแนกชนิด Race แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย ที่แยกได้จาก มะเขือเทศ มันฝรั่ง มะเขือยาว มะเขือเปราะ พริก ยาสูบ ขิง ปทุมมา ถั่วลิสง และ ยูคาลิปตัส จำนวน 130 สายพันธุ์ โดยทดสอบการเกิดโรคกับพืชอาศัยจำนวน 4 ชนิดได้แก่ พริก มะเขือเทศ มะเขือเปราะ มันฝรั่ง ผลการทดสอบแบคทีเรียทั้ง 130 สายพันธุ์ทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัย ทั้ง 4 ชนิด โดยทำให้พืชอาศัยทุกชนิดแสดงอาการของโรคเหี่ยวภายใน 15 วัน สามารถจัดจำแนกแบคทีเรีย *R. solanacearum* ทั้ง 130 สายพันธุ์ อยู่ใน Race เมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อจัดจำแนกชนิด Biovar ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* สามารถจัดจำแนกอยู่ใน Biovar 2 3 และ 4 จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค rep PCR ผลการศึกษาพบว่า แบคทีเรีย *R. solanacearum* Race 1 ที่พบในประเทศไทย ทั้ง 130 สายพันธุ์มีความหลากหลายสูง และแบคทีเรีย *R. solanacearum* .Biovar 2 มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากเชื้อ Biovar 3 และ 4 และ ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ Biovar 3 และ 4ได้

การทดลองที่ 1.2.9 อนุกรมวิธานและชีววิทยาของไส้เดือนฝอย migratory endoparasitic nematodes

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรากพืชในพื้นที่ปลูกพืชภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ตรวจหาไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* และเลี้ยงเพิ่มจำนวนจากตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัวบนรากข้าวโพดในสภาพปลอดเชื้อ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการคงสภาพไส้เดือนฝอย ทำสไลด์ถาวร จำแนกชนิดโดยใช้คู่มือการจัดจำแนก ซึ่งจำแนกชนิดได้เป็น *P. coffeae P. brachyurus* และ *P. zeae* ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *P. coffeae* ต่อกาแฟพันธุ์อาราบิก้า วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ใส่ไส้เดือนฝอยรากแผลจำนวน 3,000 6,000 9,000 12,000 ตัวตามลำดับเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่ไส้เดือนฝอย พบว่าไส้เดือนฝอย *P. coffeae* ไอโซเลตที่ใช้ในการทดลองไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ในกาแฟพันธุ์อาราบิก้า โดยทุกกรรมวิธีมีจำนวนไส้เดือนฝอยเมื่อสิ้นสุดการทดลองอยู่ในระดับต่ำ อย่างไรก็ตามต้นกาแฟที่ใส่ไส้เดือนฝอยมีลักษณะสีใบซีด ขอบใบสีน้ำตาล และรากบางส่วนมีสีน้ำตาลเมื่อเทียบกับต้นกาแฟที่ไม่ได้ใส่ไส้เดือนฝอย การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *P. brachyurus* ต่อถั่วเหลืองพันธุ์นครสวรรค์1 และพันธุ์เชียงใหม่ 60 วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 ซ้ำ 5 กรรมวิธี โดยใส่ไส้เดือนฝอยจำนวน 500 1,000 3,000 5,000 ตัวต่อกระถางตามลำดับ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่ไส้เดือนฝอย พบว่าในถั่วเหลืองพันธุ์นครสวรรค์1 น้ำหนักแห้งของต้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปริมาณไส้เดือนฝอยเมื่อสิ้นสุดการทดลองแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่มีไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 3,000 และ 5,000 ตัวต่อกระถางมีจำนวนประชากรไส้เดือนฝอยเมื่อสิ้นสุดการทดลองมากกว่ากรรมวิธีที่มีไส้เดือนฝอยเมื่อเริ่มทดลอง 500 ตัวต่อกระถาง อัตราการขยายพันธุ์ในแต่ละกรรมวิธีไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 น้ำหนักแห้งของต้นในกรรมวิธีที่ไม่ใส่ไส้เดือนฝอยน้อยกว่ากรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น้ำหนักแห้งของต้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอย จำนวนประชากรไส้เดือนฝอยเมื่อสิ้นสุดการทดลองในกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยไม่แตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กรรมวิธีที่มีไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 500 ตัวต่อกระถางมีอัตราการขยายพันธุ์สูงที่สุด การทดลองความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *P. zeae* ต่อข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 1 และข้าวโพดหวาน วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 ซ้ำ 5 กรรมวิธี โดยใส่ไส้เดือนฝอยจำนวน 1,000 3,000 6,000 และ 9,000 ตัวต่อกระถางตามลำดับ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่ไส้เดือนฝอย พบว่าในข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 1 น้ำหนักต้นและน้ำหนักรากไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกรรมวิธีที่ใส่และไม่ใส่ไส้เดือนฝอย ปริมาณไส้เดือนฝอยเมื่อสิ้นสุดการทดลองในกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 6,000 ตัวต่อกระถาง มากกว่ากรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 1,000 ตัวต่อกระถางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในข้าวโพดหวานผลการทดลองพบว่าน้ำหนักต้นในกรรมวิธีที่ใส่และไม่ใส่ไส้เดือนฝอยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่น้ำหนักรากในกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยต่ำกว่าน้ำหนักรากในกรรมวิธีที่ไม่ใส่ไส้เดือนฝอยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย *P. zeae* ในข้าวโพดหวานเป็นศูนย์ทุกกรรมวิธี แสดงว่าข้าวโพดหวานเป็นพืชอาศัยที่ไม่ดีของไส้เดือนฝอย *P. zeae* ไอโซเลตที่ใช้ในการทดลอง อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ปริมาณไส้เดือนฝอยเมื่อเริ่มทดลองเพียงพอที่จะทำลายรากของข้าวโพดหวานจนเกิดความเสียหายได้

การทดลองที่ 1.2.10 อนุกรมวิธานและชีววิทยาของไส้เดือนฝอย *Radopholus*

เก็บรากไม้น้ำจากแหล่งผลิตไม้น้ำเขตนครราชสีมา จำนวน 50 ตัวอย่าง และทำการแยกได้ไส้เดือนฝอย *Radopholus* sp. จากรากไม้น้ำ โดยวิธีใช้คลื่นเสียงอัลทราโซนิกและปั่นราก นำไส้เดือนฝอยปลูกเลี้ยงในต้นพืชอาศัย (ไม้น้ำสกุล *Anubias* sp.) ในบ่อซีเมนต์ เป็นเวลา 2 เดือน ทำการแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพรรณไม้น้ำ และจัดทำสไลด์ถาวรตัวเต็มวัยเพศเมียเพื่อศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้ Light microscope (LM) พบว่า ตัวเต็มวัยเพศเมียมีขนาดมีขนาดความยาวลำตัว 550-880 ไมครอน (0.55-0.88 มม.) รูปร่างใหญ่กว่าเพศผู้ โดยมีความกว้างลำตัว 20-24 ไมครอน ส่วนหัวโค้งมนแต่ไม่ยกขึ้น ประกอบด้วยรอยย่น 4 รอย หลอดดูดอาหารแข็งแรงมีความยาว 16-21 ไมครอน (เฉลี่ย 18 ไมครอน) มี Basal knob กลม ส่วนของ esophagus ซ้อนทับลำไส้ทางด้านหลัง (Dorsal) พบอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (Vulva) ในตำแหน่งกลางลำตัว โดยประมาณ 54 % ของความยาวลำตัว มีรังไข่ (Ovary) 2 ข้าง ส่วนของ Spermatheca มีลักษณะรี ส่วนหางเรียวยาวและบริเวณปลายหางมน มีเส้นข้างลำตัว 4 เส้น และตัวเต็มวัยเพศผู้มีขนาดความยาวลำตัว 500-600 ไมครอน (0.50-0.60 ไมครอน) รูปร่างผอมบางกว่าเพศเมีย ส่วนหัวโค้งมนกลมและยกขึ้น ประกอบด้วยรอยย่น 4 รอย หลอดดูดอาหาร (Stylet) ผอม เรียวเล็กความยาว 12-13 ไมครอน มี Basal knob ขนาดเล็กมาก ไม่พบ median bulb และส่วนของ Esophagus ลดขนาดลง มีส่วนหางเรียวและกลม บริเวณปลายหางมีอวัยวะสืบพันธุ์ (Spicule) ยาว 17-19 ไมครอน มีเส้นข้างลำตัว (Lateral line) 4 เส้น และจากการศึกษาวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *Radopholus* ในชิ้นส่วนพืช (แครอท) สภาพปลอดเชื้อ พบว่าวงจรชีวิตจากตัวเต็มวัยเพศเมียสร้างไข่ ไข่ฟัก เป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 ถึงระยะที่

4 และเป็นตัวเต็มวัยเพศเมียรุ่นใหม่ ใช้เวลา 32 และ 26 วัน ที่อุณหภูมิ 22 และ 32 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

การทดลองที่ 1.2.12 ลักษณะทางพันธุกรรม ชีววิทยา และนิเวศวิทยาของรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคพืช

ผลการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Colletotrichum* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 128 ตัวอย่าง จากพืชอาศัยจำนวน 27 ชนิด ใน 29 จังหวัด และศึกษาจำแนกชนิดเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการศึกษาจำแนกได้รา *Colletotrichum* จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum acutatum C. capsici C. circinans C. falcatum C. gloeosporioides C. musae C. truncatum* และ unidentified species *Colletotrichum* spp. 9 ชนิด ซึ่งมีลักษณะของสปอร์คล้ายๆ กัน ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และพบว่า *C. musae* เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร Oat Meal agar รองลงมา ได้แก่ Potato Dextrose Agar และ Czapek Dox Agar

ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของรา *Colletotrichum* ทั้งหมด 50 ไอโซเลท ได้แก่ ราที่แยกได้จากกล้วยหอม 5 ไอโซเลท จากพริก 17 ไอโซเลท จากแก้วมังกร 27 ไอโซเลท และ ลองกอง 1 ไอโซเลท และวิเคราะห์ลำดับเบสของรา *Colletotrichum* ที่แยกได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลท พบว่า ลำดับเบสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง ITS ซึ่งรวมบางส่วนของยีน 18S และ 28S บน rDNA มีขนาดทั้งหมด 578 คู่เบส จำแนกชนิดได้เป็นรา *C. musae C. gloeosporioides C. acutatum* และ *C. capsici*

การทดลองที่ 1.2.14 การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้และใบจุดของกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าและแวนด้า

ดำเนินการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้จากแหล่งปลูกที่มีการระบาดของโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า เพื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรค ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2555 – กันยายน 2558 ในจังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี และกาญจนบุรี พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคมีลักษณะโคโลนีกลม สีเหลือง การพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch สามารถทำให้เกิดอาการของโรคบนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าได้ ผลการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ 10% สร้างเอนไซม์ catalase สามารถผลิตเอนไซม์ tryptophanase ทำให้มี indole เกิดขึ้น เชื้อสามารถย่อยเจลาตินและ esculin ใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน และสร้างกรดจาก cellobiose lactose glycerol และ mannitol ได้ เชื้อไม่สามารถผลิตเอนไซม์ oxidase และ arginine dihydrolase ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตร์ท ไม่สามารถสร้าง H_2S และไม่สามารถย่อยแป้งได้ การศึกษาลักษณะสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) ด้วยไพรเมอร์ 2 ชุด ได้แก่

ERIC1R กับ ERIC2 และ BOXA1R พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย ผลการจัดกลุ่มไม่สอดคล้องกับแหล่งที่มาของเชื้อ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA gene ของเชื้อสาเหตุกับฐานข้อมูล GenBank ประกอบกับคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุใกล้เคียงกับเชื้อ *Pantoea ananatis* และไม่พบรายงานเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชชนิดนี้ในกล้วยไม้ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศมาก่อน

การทดลองที่ 1.2.15 การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ *Exserohilum tuecicum* บนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด

สำรวจและเก็บตัวอย่างข้าวโพดพืชที่มีลักษณะอาการใบไหม้และจุดแผลสีคล้ายฟางข้าวจากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทยตรวจลักษณะอาการของโรคในแปลงปลูก นำตัวอย่างพืชที่เป็นโรคมาจำแนกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ถ่ายรูปตัวอย่างโรคแล้วจัดทำ permanent slide เพื่อการวินิจฉัยโรค สามารถจำแนกเป็นเชื้อรา *Exserohilum turcicum* จำนวน 4 ไอโซเลท คือ อ. เมือง จ. กาญจนบุรี อ. แม่วาง จ. เชียงใหม่ อ. แม่สอด จ. ตาก แล อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา ปลูกข้าวโพดจำนวน 1 สายพันธุ์ สุ่มเก็บเมล็ดพันธุ์จากข้าวโพดนำมาศึกษาเชื้อในเมล็ดพันธุ์ โดยวิธีเพาะเมล็ดพันธุ์บนกระดาษชื้น (Blotter method) ผลการทดลองพบว่าไม่พบเชื้อรา *Exserohilum turcicum* บนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด

การทดลองที่ 1.2.16 การจำแนกชนิดของรากสกุล *Phyllosticta* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

เก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Phyllosticta* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 36 ตัวอย่าง จากพืชอาศัยจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ทับทิม ส้มโอ กล้วยหอม ฝรั่ง พริก และมะม่วง ในจังหวัดกระบี่ ฉะเชิงเทรา เชียงราย นครปฐม นครราชสีมา เพชรบุรี ราชบุรี และอุบลราชธานี นำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยการศึกษาราจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง การทำ moist chamber แยกราจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค ได้ทั้งหมด 36 ไอโซเลท และศึกษาจำแนกชนิดเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการศึกษาจำแนกได้รา *Phyllosticta* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Phyllosticta mangiferae* แยกได้จากอาการใบจุดของมะม่วง จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 4 ไอโซเลท *P. punicae* แยกได้จากอาการใบจุดของทับทิม จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 1 ไอโซเลท แยกได้จากอาการจุดดำบนผลส้มโอ จากอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย ได้จำนวน 16 ไอโซเลท จากอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม จำนวน 3 ไอโซเลท จำแนกชนิดเป็น *Phyllosticta citriasiana* และ *P. mangiferae* แยกได้จากผลเน่าฝรั่ง จากจังหวัดกระบี่ เพชรบุรี และราชบุรี จำแนกชนิดเป็นรา *P. psidiicola* จำนวน 11 ไอโซเลท และพบว่าราสร้างระยะสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ *Guignardia psidii* บนอาหารสังเคราะห์ PDA แยกได้จากพริกจ จังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 1 ไอโซเลท จำแนกชนิดเป็นรา *P. mangiferae* จัดเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชทั้งหมดไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืชที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของรา *Phyllosticta* ทั้งหมด 19 ไอโซเลท ที่แยกได้จากะส้มโอจำแนกชนิดได้รา 2 ชนิด คือ *P. citriasiana* จำนวน 15 ไอโซเลท และ *P. mangiferae* จำนวน 4 ไอโซเลท

การทดลองที่ 1.2.17 การจำแนกกลุ่ม Race ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. l*ycopersici* ในประเทศไทย

การสำรวจแหล่งปลูกมะเขือเทศของเกษตรกรในเขตจังหวัด จ.กาญจนบุรี จ.เชียงใหม่ จ.ตาก จ.บึงกาฬ จ.เพชรบูรณ์ จ.เลย จ.ลำพูน จ.หนองคาย และ จ.อุบลราชธานี เมื่อปี 2557 พบโรคเหี่ยวของมะเขือเทศจาก 5 แปลงปลูก สามารถแยกเชื้อสาเหตุโรคโดยการแยกสปอร์เดี่ยวได้เชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ จาก จ.เชียงใหม่ 2 ไอโซเลท จาก จ.บึงกาฬ 2 ไอโซเลท และ จาก จ.หนองคาย 5 ไอโซเลท เมื่อทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท กับต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดา พบว่าหลังจากปลูกเชื้อใส่ต้นมะเขือเทศอายุ 1 เดือน ได้ 20 วัน เชื้อราทุกไอโซเลททำให้เกิดอาการโรคเหี่ยวกับต้นมะเขือเทศได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ทำให้จำแนกได้ว่าเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท เป็นเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) ไอโซเลท FOL1, FOL2, FOL3, FOL4, FOL5, FOL6, FOL7, FOL8, FOL9 และ FOL10 ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท มาจำแนก race โดยการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคกับชุดพืชอาศัยตรวจสอบ race (differential host) ซึ่งประกอบด้วยพันธุ์มะเขือเทศ 4 พันธุ์ คือ พันธุ์สีดา (อ่อนแอต่อ race 1, 2 และ 3) พันธุ์ UC82 –L (ต้านทานต่อ race 1) พันธุ์ TW-4 (ต้านทานต่อ race 1, 2) และพันธุ์วาเลนไทน์ (ต้านทานต่อ race 1, 2 และ 3) พบว่า หลังจากปลูกเชื้อรากับต้นมะเขือเทศอายุ 1 เดือน ได้ 20 วัน เชื้อรา FOL1, FOL2, FOL3, FOL4, FOL5, FOL6, FOL7, FOL8, FOL9 และ FOL10 ตามลำดับ ทำให้เกิดโรคกับต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดา และพันธุ์ UC82 –L ได้อย่างชัดเจน แต่ไม่ทำให้เกิดโรคกับต้นมะเขือเทศพันธุ์ TW-4 และพันธุ์วาเลนไทน์ จากผลการทดลองทำให้สรุปได้ว่า เชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ จำนวน 10 ไอโซเลท ที่รวบรวมได้จาก จ.เชียงใหม่, จ.บึงกาฬ และ จ.หนองคาย เป็นเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) race 2

การทดลองที่ 1.2.18 อนุกรมวิธานและพืชอาศัยของรา *Stemphylium* และ *Alternaria* สาเหตุโรคพืช

จากการรวบรวมตัวอย่างโรคพืช ในช่วง ธันวาคม 2556 ถึง กันยายน 2557 จากแปลงปลูกพืช ในพื้นที่ 9 จังหวัด ได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Stemphylium* sp. และ *Alternaria* spp. จำนวน 36 ตัวอย่าง บนพืช 14 ชนิด ได้แก่ โรคใบไหม้ของหอมแดง และกระเทียม โรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง และหอมหัวใหญ่ โรคใบจุดคะน้า ผักกาดเขียว กะหล่ำดอก กวางตุ้ง หน่อไม้ฝรั่ง ผักชี มะเขือเทศ ยาสูบ และ เผือก โรคใบไม้ทานตะวัน และดาวเรือง จำแนกชนิด โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานของเชื้อ พบว่า โรคใบไหม้ของหอมแดง และกระเทียม เกิดจากเชื้อ *Stemphylium vesicarium* โรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง และหอมหัวใหญ่ เกิดจากเชื้อ *Alternaria porri* โรคใบจุดคะน้า เกิดจากเชื้อ *A. brassicicola* และ โรคใบไหม้

ของทานตะวัน เกิดจากเชื้อ *A. helianthi* เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของรา *S. vesicarium* จำนวน 7 ไอโซเลท และ *Alternaria* spp. จำนวน 29 ไอโซเลท เข้าศูนย์รวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคพืช และจัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืช ส่งเข้าพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ และศึกษาพืชอาศัยของรา *S. vesicarium* *A. brassicicola* และ *A. porri* บนพืชทดสอบ 10 ชนิด พบว่า หอม และกระเทียม เป็นโรคใบไหม้ เกิดจากเชื้อ *S. vesicarium* และ โรคใบจุดสีม่วง เกิดจากเชื้อ *A. porri* และคะน้า เป็นโรคใบจุด เกิดจากเชื้อ *A. brassicicola* ในขณะที่พืชทดสอบอื่นๆไม่เป็นโรค

กิจกรรมย่อยที่ 3 อนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศวิทยาของวัชพืช

การทดลองที่ 1.3.1 ชีววิทยาและ การแพร่กระจายของวัชพืชสกุลผักแว่น (*Marsilea* L.) และศักยภาพการเป็นวัชพืชของผักแว่นต่างถิ่น

สำรวจ รวบรวมพืชสกุลผักแว่น (*Marsilea* L.) จากแหล่งน้ำ ลำธาร คลองชลประทาน นาข้าว นาข้าวหลังการเก็บเกี่ยว และที่ชุ่มชื้น จากภาคต่างๆ ในประเทศไทย จำนวน 110 ตัวอย่าง นำมาปลูกในเรือนทดลองของกลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จตุจักร กรุงเทพมหานคร เพื่อตรวจสอบการสร้างสปอโรคาร์ป พบเพียง 2 ชนิด ได้แก่ ผักแว่นหรือผักลิ้นปี (*Marsilea crenata* C.Presl) จำนวน 48 ตัวอย่าง ผักแว่นใบมัน (*Marsilea scalaripes* D.M. Johnson) 1 ตัวอย่าง จากธารน้ำไหลข้างทางหลวง ในจังหวัดนครพนม ที่เหลือ 61 ตัวอย่างไม่สร้างสปอโรคาร์ป ซึ่งคาดว่าเป็นผักแว่นใบมันที่มีแต่ใบไม่สร้างสปอโรคาร์ป ส่วนผักแว่นต่างถิ่นสองชนิด ที่มีการนำเข้ามาเป็นไม้ประดับ ได้แก่ ผักแว่นขน (*M. drumondii* A.Braun) และผักแว่นวง (*M. mutica* Mett.) จากตัวอย่างผักแว่นที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ ยังไม่พบแพร่ระบาดในแหล่งน้ำธรรมชาติ หรือพื้นที่ทั่วไป และไม่พบผักแว่นชนิด *M. quadrifolia* L. เลย เมื่อนำพืชทั้งสี่ชนิดมาปลูกในกระถางขนาด 35x45x15 เซนติเมตร ปรากฏว่าผักแว่นหรือผักลิ้นปี่มีการเจริญเติบโต ความยาวต้น จำนวนใบ พื้นที่ใบ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ปรากฏว่าผักแว่นมีจำนวนใบสูงสุด แต่พื้นที่ใบและน้ำหนักสด-แห้ง ต่ำกว่าผักแว่นขน ซึ่งมีลำต้นค่อนข้างแข็ง ก้านใบยาวผักแว่นใบมันมีการเจริญต่ำสุดในทุกดัชนี ผักแว่นวงมีลักษณะการเจริญใกล้เคียงกับผักแว่นใบมัน แต่มีการเจริญเติบโตดีกว่า เมื่อปลูกผักแว่นใบมันกับผักแว่นวงในสัดส่วนต่างๆ ให้ได้จำนวนรวมเท่ากับ 5 ต้น ปรากฏว่าผักแว่นใบมันสามารถเจริญเติบโตได้ดีในระยะ 1.5 เดือนหลังเริ่มต้น หลังจากนั้นผักแว่นวงมีแนวโน้มการเจริญดีกว่า และการประเมินศักยภาพการเป็นวัชพืชของผักแว่นต่างถิ่น 2 ชนิด ผักแว่นขนมีความเสี่ยงการเป็นวัชพืชสูงกว่าผักแว่นวง สอดคลองกับผลการศึกษาทางชีววิทยา

การทดลองที่ 1.3.2 ชีววิทยาและการแพร่ระบาดของหญ้าอีหนาว *Digera muricata* (L.) Mart.

หญ้าอีหนาว (*Digera muricata* (L.) Mart.) อยู่ในวงศ์ผักโขม (Amaranthaceae) เป็นวัชพืชประเภทใบกว้าง เป็นพืชฤดูเดียว อายุ 3-4 เดือน อาจมีความสูงถึง 180 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับความอุดม

สมบูรณ์ ต้นที่มีความสมบูรณ์ สร้างแขนง ใบ และดอกได้มาก มีความสูง 100-150 เซนติเมตร สามารถสร้างเมล็ดได้ถึง 56,000 เมล็ดต่อต้น เมล็ดไม่งอกทันที่หลังแก่ หลุดจากต้น โดยเมล็ดที่รวบรวมจากผิวดินในเดือนมิถุนายน จะเริ่มงอกในเดือนธันวาคมของปีเดียวกัน และงอกสูงสุดในเดือนเมษายนของปีถัดไป ใบแห้งมีผลในการยับยั้งการเจริญของต้นไมยราบยักษ์ในสภาพห้องปฏิบัติการ ปัจจุบันพบระบาดในแปลงพืชไร่ พื้นที่จังหวัดสระบุรี ลพบุรี นครสวรรค์ สุพรรณบุรี และกาญจนบุรี แปลงผักในพื้นที่จังหวัดสระบุรี และนครพนม สาเหตุการแพร่ระบาดในประเทศไทยอาจเกิดจากการติดไปกับเครื่องจักรกลการเกษตร มีผลกระทบต่อผลผลิตของพืชผักมากกว่าพืชไร่ที่โตเร็ว มีความสูงมากกว่าอีหนาว เช่น ข้าวโพด แต่ทำให้ผลผลิตของผักคะน้าที่ปลูกในกระถางลดลง 53-83% ของต้นที่ปลูกโดยไม่มีหญ้าอีหนาวร่วม ขึ้นกับจำนวนต้นหรือความหนาแน่นของอีหนาว

การทดลองที่ 1.3.3 สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชวงศ์ผักโขม Amaranthaceae

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชวงศ์ผักโขม Amaranthaceae มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานเมล็ดวัชพืชชนิดต่างๆ ในวงศ์ผักโขม และรวบรวมตัวอย่างวัชพืช และเมล็ดวัชพืช จากการสำรวจ และการศึกษา พบ วัชพืชวงศ์ผักโขม 6 สกุล ได้แก่ ACHYRANTHES, ALTERNANTHERA, AMARANTHUS, CELOSIA, SIAMOSIA, GOMPHRENA ซึ่งลักษณะเด่นของเมล็ดวัชพืชวงศ์ผักโขมนี้คือ เมล็ดนูนทั้งสองด้าน ผิวเรียบ สีดำแกมน้ำตาล เป็นมันวาว เมล็ดขนาดเล็กไม่แตกต่างก้นมาก โดยมีตัวอย่างแห้ง และตัวอย่างเมล็ดเก็บรักษาอยู่ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช เพื่อใช้เปรียบเทียบและจัดจำแนกสำหรับผู้ที่สนใจ

การทดลองที่ 1.3.4 สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชสกุลน้ำนมราชสีห์ *Euphorbia*

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชสกุลน้ำนมราชสีห์ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานเมล็ดวัชพืชชนิดต่างๆ ในสกุลน้ำนมราชสีห์ และรวบรวมตัวอย่างวัชพืช และเมล็ดวัชพืชสำหรับการอ้างอิงในการศึกษา โดยการสำรวจ ผลการศึกษา พบวัชพืชสกุลน้ำนมราชสีห์ ได้แก่ หญ้ายาง *Euphorbia heterophylla* L. ใบต่างดอก *Euphorbia cyathophora* Murr น้ำนมราชสีห์ทะเล *Euphorbia atoto* G.Forst. *Euphorbia serpens* Kunth in Humb *Euphorbia bifida* (Hook. & Arn.) น้ำนมราชสีห์ *Euphobia hirta* L. *Euphorbia thymifolia* L. *Euphorbia reniformis* Blume. และ *Euphorbia protrata* Aiton, Hort. Kew. ed. Aiton, Hort. Kew. ed. ลักษณะเด่นของวัชพืชวงศ์นี้คือ มียางสีขาว และเมล็ดมีลักษณะ 3 พู ชัดเจน โดยเมล็ดมีขนาดเล็ก มีขนาดไม่แตกต่างกันมาก โดยมีตัวอย่างแห้ง และตัวอย่างเมล็ดเก็บรักษาอยู่ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช เพื่อใช้เปรียบเทียบและจัดจำแนกสำหรับผู้ที่สนใจ

การทดลองที่ 1.3.5 จำแนกชนิดวัชพืชในพืชสมุนไพร 10 พืช

การจำแนกชนิดวัชพืชในพืชสมุนไพร 10 พืช ได้แก่ กระเจี๊ยบแดง กวาวเครือขาว พริกไทย หม่อน บัวบก ไพล ขมิ้นชัน ฟ้าทะลายโจร กระชายดา ชุมเห็ดเทศ โดยการสำรวจวัชพืชด้วยวิธีการแบบ Unrestricted Sampling Method (Anonymous, 1982) ในแต่ละแปลงปลูกเก็บวัชพืชอย่างน้อยจำนวน 4-8 กรอบ หรือมากกว่าโดยแต่ละกรอบมีขนาด 50X50 ซม.พบว่า โดยส่วนใหญ่วัชพืชประเภทใบกว้างมีความเด่นด้วยค่าของ sum dominant ratio เพราะในพืชสมุนไพรมีร่มเงาและมีความชื้น โดยน้ำนมราชสีห์ (*Euphorbia hirta* L.)เป็นวัชพืชประเภทใบกว้างที่เด่นในพืชบัวบก ส่วนแห้วหมู (*Cyperus rotundus* L.)เป็นวัชพืชประเภทกกที่เด่นในกวาวเครือขาว ลูกใต้ใบ(*Phylanthus niruri* L.)เป็นวัชพืชประเภทใบกว้างที่เด่นในกระเจี๊ยบแดง ผักปราบ(*Commelina diffusa* Burm.f.) เป็นวัชพืชประเภทใบกว้างที่เด่นในหม่อน และผักเสี้ยนผี (*Cleome viscosa* L.) เป็นวัชพืชประเภทใบกว้างที่เด่นในพริกไทย สาบม่วง(*Prexelis clematidea*) เป็นวัชพืชประเภทใบกว้างที่เด่นในไพล ตีนตุ๊กแก (*Tridax procumbens*) เป็นวัชพืชประเภทใบกว้างที่เด่นในขมิ้นชัน หญ้ากาบหอย(*Lindernia crustacea*) เป็นวัชพืชประเภทใบกว้างที่เด่นในฟ้าทะลายโจร กะเม็ง(*Eclipta alba*) เป็นวัชพืชประเภทใบกว้างที่เด่นในกระชายดำ ส่วนหญ้ายาง(*Euphorbia heterophylla*) เป็นวัชพืชประเภทใบกว้างที่เด่นในชุมเห็ดเทศ โดยภาพรวมวัชพืชในพืชสมุนไพรที่ทำการสำรวจมีวัชพืชใบกว้างเป็นวัชพืชที่พบมากและมีความเด่นกว่าวัชพืชประเภทอื่นๆ

การทดลองที่ 1.3.7 ชีววิทยาและการแพร่กระจายของดาดตะกั่ว

ดาดตะกั่วเป็นวัชพืชที่พบมากในสวนกล้วยไม้ กำจัดให้หมดไปทำได้ยาก ได้ทำการทดลองที่ เรือนทดลองของกลุ่มวิจัยวัชพืช และแปลงกล้วยไม้ของเกษตรกรที่อำเภอสามพรานและอำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม ระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2555 ผลการทดลอง พบว่า 1.1) เมล็ดดาดตะกั่วสามารถงอกได้ทันทีตั้งแต่เมล็ดสุกแก่แล้วดีดออกจากต้น เมล็ดงอกได้ดีที่สุดในสภาพมีแสง รองลงมาคือเมล็ดที่อยู่ในดินงอกได้ดีกว่าเมล็ดที่ตกบนกาบมะพร้าว เมล็ดไม่งอกในสภาพมืด แต่เมื่อเมล็ดนั้นเจอแสงก็จะงอกได้ตามปกติ เมล็ดงอกได้ดีตั้งแต่เมล็ดสุกแก่จนถึงอายุ 1 เดือน และยังคงงอกได้ดีต่อไปจนถึงอายุ 4 เดือน หลังจากนั้นความงอกค่อยๆลดลงจนแทบไม่งอกเลยที่อายุ 8 เดือน 1.2) การเจริญเติบโตหลังจากดาดตะกั่วงอกจากเมล็ด ใบจริงคู่ที่ 3 แผ่ขยายเต็มที่ จะเริ่มแทงช่อดอกแรก รากแขนงทุกรากมีความแข็งแรง รากยาวและใหญ่ ยึดติดกับดินหรือกาบมะพร้าวแน่น ข้อที่โคนต้นถี่ การถอนทาให้ต้นขาด เหลือโคนต้นติดค้างอยู่ยังคงแตกกิ่งใหม่ได้ปกติ 2) เมล็ดดาดตะกั่วที่ถูกดีดออกจากต้น เมื่อบนผิวดินหรืออยู่ในดินที่ระดับความลึก 1 เซนติเมตร จะงอกได้ดีที่สุดโดยงอกได้ 75.1% และ 70.0% ตามลำดับ เมล็ดจะงอกเร็วและมีจำนวนต้นมากที่สุด ตั้งแต่ 1 สัปดาห์หลังปลูก 3) การแพร่กระจายของเมล็ดดาดตะกั่วหลังจากดีดออกจากต้น (บันทึกเมื่อเมล็ดอายุ 80 วันหลังสุกแก่) พบว่าเมล็ดที่ลอยในน้ำ / เมล็ดที่อยู่บนผิวดินใต้น้ำ/ เมล็ดที่จมฝังดินอยู่ในน้ำ จะสูญเสียความงอกและถูกทำลายโดยเชื้อราที่อยู่ในธรรมชาติ เมื่อนำเมล็ดมาเพาะไม่พบการงอกเลย ส่วนเมล็ดดาดตะกั่วที่อยู่ในที่แห้ง (เช่น บนใบกล้วยไม้ / บนกาบมะพร้าว) พบว่าเมล็ดที่เริ่มทดลองเมื่ออายุ 1 และ 2 สัปดาห์หลังสุกแก่ มีความงอก 79.6% และ 83.3% ตามลาดับ 4)ความสามารถในการขยายพันธุ์ พบว่าการ

ถอนต้นดาดตะกั่วที่ขึ้นบนดินตั้งแต่หลังงอกจนถึงมีใบจริง 2 คู่ กำจัดออกได้ง่ายรากจะหลุดขึ้นมาได้สมบูรณ์ การถอนตั้งแต่ใบจริง 3 คู่ กาจัดได้ไม่สมบูรณ์ สาหรับการถอนต้นดาดตะกั่วที่ขึ้นบนกาบมะพร้าว พบว่ากาจัดได้สมบูรณ์ที่ระยะใบเลี้ยงและที่ระยะใบจริงคู่ที่ 1 ส่วนการถอนกำจัดตั้งแต่ที่ระยะใบคู่ที่ 2 กำจัดได้ไม่สมบูรณ์ แตกกิ่งใหม่จากข้อขยายพันธุ์ได้ปกติ

การทดลองที่ 1.3.8 ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของสาบม่วง (Praxelis); *Praxelis clematidea* R.M King & H. Rob.

ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของสาบม่วง (*Praxelis clematidea* R.M King & H. Rob.) ดำเนิน

การที่โรงเรือนกลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชและพื้นที่เกษตรกรรมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออก ในปี 2554-56 พบว่า สาบม่วงเป็นพืชฤดูเดียว มีอายุตั้งแต่เริ่มงอกจนติดเมล็ดประมาณ 45-50 วัน ดอกสีม่วงมีประมาณ 35 ดอกต่อต้นและ สามารถสร้างเมล็ดได้ถึง 30-40 เมล็ดต่อดอก ไม่พบระยะพักตัวของเมล็ดสามารถเจริญเติบโตได้เมื่อได้รับความชื้นและแสง สาบม่วงมีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดและเจริญเติบโตได้ดีในดินทราย (31.2%) รองลงมา คือ ดินร่วน (28.6%) ดินเหนียว (20.8%) และ ดินลูกรัง (14%) ตามลำดับ

การแพร่กระจายของสาบม่วง พบการแพร่กระจายของสาบม่วงในแปลงปลูกมันสำปะหลัง ยางพารา สับปะรด และไม้ผล ค่อนข้างหนาแน่น ซึ่งพบในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง(65%) ยางพารา(20%) สับปะรด (12%) และ ไม้ผล (3%)

การทดลองที่ 1.3.10 สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชวงศ์หญ้างวงช้าง Boraginaceae

ศึกษาสัณฐานวิทยาของเม็ดวัชพืชวงศ์หญ้างวงช้าง โดยการสำรวจและรวบรวมตัวอย่างพืชสด และเมล็ด ร่วมกับการปลูกเพื่อรวบรวมเมล็ดและศึกษาลักษณะเพื่อตรวจสอบชนิด พบ 1 ชนิด ที่มีลักษณะแตกต่างกันตามพื้นที่ที่พบ และ 1 ชนิดไม่มีรายงาการเป็นวัชพืชในประเทศไทย รวบรวมตัวอย่างได้ 4 สกุล จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ หญ้าตีนตุ๊กแก *Coldenia procumbens* L. หญ้ามวนฟ้า *Cyanoglossum lanceolatum* Forssk. หญ้าดอกขาว *Heliotropium bracteatum* R.Br. หญ้างวงช้าง *Heliotropium indicum* L. หญ้างวงช้างดอกขาว *Heliotropium lasiocarpum* Fisch. & C.A.Mey. (จากจังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดเพชรบูรณ์) จุกนกยูง หรือหญ้านกยูง *Heliotropium strigosum* Willd. ผักแผ้วขาว *Trichodesma indicum* (L.) Lehm และต้นเอดส์ หรือปอคัน*Trichodesma zeylanicum* (Burm.f.) R.Br. เมล็ดวัชพืชแต่ละสกุลแตกต่างกันอย่างชัดเจน สกุลหญ้างวงช้างพบ 5 กลุ่ม จำนวน 4 ชนิด เมล็ดพืชในสกุลหญ้างวงช้างมีรูปร่างคล้ายกัน แต่ขนาดและขนบนเมล็ดแตกต่างกัน

การทดลองที่ 1.3.11 สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชสกุลลูกใต้ใบ *Phyllanthus* L.

ศึกษาสัณฐานวิทยาของเม็ดวัชพืชสกุลลูกใต้ใบ โดยการสำรวจและรวบรวมตัวอย่างพืชสด และเมล็ดร่วมกับการปลูกเพื่อรวบรวมเมล็ดและศึกษาลักษณะเพื่อตรวจสอบชนิด พบ 8 ชนิด ได้แก่ ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus* Schumach ex Thonn) ลูกใต้ใบใบใหญ่ (*Phyllanthus caroliniensis* Walter, Fl. Carol.) ลูกใต้ใบผลหยัก (*Phyllanthus urinaria* L.) ขางอำไพ (*Phyllanthus virgatus* G.Forst.) ลูกใต้ใบขน (*Phyllanthus chayamaritiae* Chantar. & Kantachot in Kantachot & Chantar.) ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus debilis* Klein ex Willd.(*Phyllanthus niruri* L. var. debilis (Klein ex Willd.) Müll.Arg.)) ลูกบนใบ (*Phyllanthus tenellus* L.) ว่านธรณีสาร (*Phyllanthus pulcher* Wall. ex Mull.Arg.) วัชพืชแต่ละชนิดมีลักษณะบางอย่างที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน เมล็ดพืชในสกุลลูกใต้ใบคล้ายกัน แต่ขนาดและลักษณะลายบนเมล็ดแตกต่างกัน

การทดลองที่ 1.3.12 ชีววิทยา นิเวศวิทยา และการแพร่กระจายของวัชพืชสกุลกะเม็ง *Eclipta* L.

สำรวจ รวบรวม วัชพืชสกุลกะเม็งเพื่อทราบความหลากหลายของวัชพืชสกุลนี้ในประเทศไทย ระหว่างปี 2557-2558 นำมาศึกษาชีววิทยา นิเวศน์วิทยา และการแพร่กกระจายของวัชพืชสกุลนี้ พบวัชพืชสกุลกะเม็ง สี่ชนิด ได้แก่ กะเม็ง (*Eclipta alba* (L.) Hassk.) กะเม็งเล็ก (*Eclipta angustata* Umemoto & H. Koyama, sp. Nov.) กะเม็งขน (*Eclipta prostrate* (L.) L.) กะเม็งใบแหลม (*Eclipta thermalis* Bunge, Enum.) เป็นวัชพืชฤดูเดียว ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด สามารถจำแนกได้จากลักษณะใบ และผล เป็นวัชพืชในพืชไร่ พืชผัก ไม้ผล พื้นที่รกร้าง ไหล่ทาง ไม่พบในแหล่งน้ำท่วมขัง ทุกชนิดสามารถทนแล้งได้ดี ทุกชนิดสามารถสร้างเมล็ดได้จำนวนมาก แต่มีเปอร์เซ็นต์การงอกในระยะ 1 เดือนต่ำ ทุกชนิดมีคุณสมบัติทางอัลลิโลพาธียับยั้งการเจริญรากของไมยราบยักษ์ในห้องปฏิบัติการ

การทดลองที่ 1.3.13 ชีววิทยา นิเวศวิทยา และการแพร่กระจายผักเบี้ยเล็ก (*Portulaca quadrifida* L.)

สำรวจการแพร่กระจายของผักเบี้ยเล็ก (*Portulaca quadrifida* L.) ในพื้นที่ปลูกผัก และพืชไร่ ในเขตภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และศึกษาข้อมูลชีววิทยา ณ เรือนทดลองกลุ่มวิจัยวัชพืช ในปี 2557-2558 จากการสำรวจการแพร่กระจายของผักเบี้ยเล็ก พบในพื้นที่ปลูกผักในเขตภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนภาคกลางพบทั้งในพื้นที่ปลูกผักและพืชไร่ ข้อมูลทางชีววิทยา เมล็ดสามารถงอกได้ในสภาพที่ได้รับแสง ตลอด 24 ชั่วโมง สภาพที่ได้รับแสงสลับกลางวันและกลางคืน และสภาพห้องปฏิบัติการ อัตราการงอกไม่แตกต่างกันทางสถิติ อยู่ระหว่าง 6.8-8.2 เปอร์เซ็นต์ แต่อัตราการงอกจากลำต้น สามารถงอกได้ดีสูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวางบนผิวดินในสภาพเรือนทดลอง เมื่อฝังเมล็ดลงในดินที่ระดับความลึกของดิน 3, 6, 10, 15 และ 30 เซนติเมตร เป็นระยะเวลานาน 1 ปี พบว่า เมล็ดยังมีชีวิตสามารถงอกได้ในทุกระดับความลึกของดิน โดยเฉพาะเมล็ดผักเบี้ยเล็กที่ฝังระดับความลึก 6 และ 10 เซนติเมตร มีการงอกสูงกว่าที่ระดับความลึกอื่นๆ ส่วนการเจริญเติบโตของผักเบี้ยเล็กนั้น เมล็ดงอกหลังจาก

หว่านลงดินที่ 4 - 7 วัน และมีใบจริงที่ระยะ 1 สัปดาห์ หลังงอก หลังจากนั้นประมาณ 3 สัปดาห์ ลำต้นผักเบี้ยเล็กทอดนอนเลื้อยไปกับผิวดิน และมีการเพิ่มความยาวต้นและจำนวนกิ่งไปเรื่อยๆ ออกดอกที่ระยะ 5 สัปดาห์หลังงอก และเริ่มมีการเจริญเติบโตเป็นผลแก่เมื่ออายุ 7 สัปดาห์หลังเมล็ดงอก เมื่อต้นเจริญเติบโตเต็มที่ให้จำนวนผลได้สูงเฉลี่ย 621.25 ผล โดยแต่ละผลมีจำนวนเมล็ด 2-16 เมล็ด

การทดลองที่ 1.3.14 สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชวงศ์หญ้า Poaceae

สำรวจ รวบรวมตัวอย่าง และเมล็ดวัชพืชวงศ์หญ้า ในพื้นที่ จังหวัดนนทบุรี สุพรรณบุรี อยุธยา นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี สระบุรี ลพบุรี เพชรบูรณ์ ชัยภูมิ หนองคาย ขอนแก่น อุดรธานี ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ ระหว่างปี 2557-2558 รวบรวมตัวอย่างพืชได้ทั้งสิ้น 33 ชนิด จำนวน 280 ตัวอย่าง ได้เมล็ดวัชพืชที่แก่ สมบูรณ์ ที่มีจำนวนมากกว่า 100 เมล็ด สำหรับวัดขนาด หาค่าเฉลี่ยความยาว ความกว้างของเมล็ด ได้ 29 ชนิด และศึกษาลักษณะเมล็ดของวัชพืชได้ 33 ชนิด เมล็ดวัชพืชที่รวบรวมได้มีขนาดกว้างต่ำกว่า 1 มิลลิเมตร แต่เกือบทั้งหมดมีความยาวมากกว่า 1 มิลลิเมตร เมล็ดส่วนใหญ่มีเปลือกนอกแข็ง ผิวเรียบ สีน้ำตาล-เหลือง จนถึงสีน้ำตาล ยกเว้น 7 ชนิด ที่มีเปลือกนอกบาง หรือมีขนอ่อนปกคลุม เมล็ดข้างในเรียบ สีน้ำตาล-เหลือง-น้ำตาลเข้ม ซึ่งมีรูปร่างแตกต่างกันในแต่ละชนิด

การทดลองที่ 1.3.15 ชีววิทยา นิเวศวิทยา และการแพร่กระจายของวัชพืชสกุล *Boerhavia* L.

สำรวจ รวบรวม วัชพืชสกุลผักโขมหินเพื่อทราบความหลากหลายของวัชพืชสกุลนี้ในประเทศไทย ระหว่างปี 2557-2558 นำมาศึกษาชีววิทยา นิเวศน์วิทยา และการแพร่กกระจายของวัชพืชสกุลนี้ พบวัชพืชสกุลผักโขมหินสี่ชนิด ได้แก่ ผักขมหินใบแหลม (*Boerhavia diandra* L.) ผักขมหิน (*Boerhavia diffusa* L.) ผักขมหินตั้ง (*Boerhavia erecta* L.) และผักขมหินเลื้อย (*Boerhavia repens* L.) มีเพียงผักขมหินตั้งที่เป็นวัชพืชฤดูเดียว ลำต้นตั้งตรง นอกนั้นเป็นวัชพืชหลายฤดู อยู่ข้ามปี ลำต้นทอดยาวไปกับพื้นดิน ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด สามารถจำแนกได้จากลักษณะใบ สีดอก และผล ทุกชนิดเป็นวัชพืชในพืชไร่ พืชผัก ไม้ผล พื้นที่รกร้าง ไหล่ทาง ริมทางรถไฟ ไม่พบในแหล่งน้ำท่วมขังทุกชนิดสามารถทนแล้งได้ดี บางชนิดสามารถพบได้ในโบราณสถาน ทุกชนิดสามารถสร้างเมล็ดได้จำนวนมาก แต่มีเปอร์เซ็นต์การงอกในระยะ 1 เดือนต่ำ ทุกชนิดมีคุณสมบัติทางอัลลิโลพาธียับยั้งการเจริญรากของไมยราบยักษ์ในห้องปฏิบัติการ

การทดลองที่ 1.3.16 ชีววิทยา การแพร่ระบาด และการจัดการวัชพืชวงศ์ทานตะวันสองชนิด : หญ้าหน้าแมว และทานตะวันหนู

วัชพืชวงศ์ทานตะวัน 2 ชนิดที่พบระบาดในพื้นที่ปลูกพืชไร่ ในพื้นที่ราบของลุ่มน้ำป่าสัก โดยไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับวัชพืชสองชนิดนี้มาก่อน ได้แก่หญ้าหน้าแมว และทานตะวันหนู การศึกษาชีววิทยาและการแพร่ระบาดของวัชพืชทั้งสองชนิด ได้ดำเนินการระหว่างปี 2557-2558 พบว่าหญ้าหน้าแมวคือ *Cyanthillium patulum* (Dryand. ex Dryand.) H.Rob เป็นวัชพืชอายุสั้นประมาณ 110-120 วัน สามารถสร้างเมล็ด

จำนวนมากกว่า 100,000 เมล็ด/ต้น เมล็ดงอกไม่พร้อมกัน ในระยะเวลา ในช่วง 1 เดือน งอกเพียง 10% แต่สามารถทยอยงอกเพิ่มขึ้นเป็น 40 % เมื่อปล่อยไว้นาน 172 วัน หรือประมาณ 6 เดือนพบระบาดในพื้นที่ปลูกพืชไร่ และไหล่ทางในจังหวัดสระบุรี ลพบุรี และเพชรบูรณ์ สำหรับทานตะวันหนูคือ *Blainvillea acmella* (L.) Philipson มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนของทวีปอาฟริกา และเอเชีย เป็นพืชอายุสั้น ประมาณ 80-100 วัน มีการสร้างเมล็ดประมาณ 20,000 เมล็ด/ต้น เมล็ดมีการงอกในดินสูงกว่าการทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยเมล็ดเริ่มงอกหลังเริ่มทดสอบ 60 วัน ในห้องปฏิบัติการ และมีการงอกเพียงร้อยละ 4.2 เมื่อปล่อยให้งอกนาน 210 วัน และสามารถงอกได้ร้อยละ 13.6 เมื่อปล่อยให้งอกในดินนาน 210 วัน และเมล็ดที่ยังไม่แก่จัด (สีเขียว-ดำ) ของทานตะวันหนูสามารถงอกได้เช่นเดียวกับเมล็ดที่แก่จัด (สีน้ำตาล-ดำ) พบระบาดในพื้นที่ปลูกพืชไร่ในจังหวัดสระบุรี และลพบุรี วัชพืชทั้งสองนี้มีคุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิ ยับยั้งการเจริญรากของไมยราบยักษ์ได้เล็กน้อย เมื่อทดสอบโดยวิธี Sandwich Method

การทดลองที่ 1.3.17 ศึกษาชนิดวัชพืชต่างถิ่นในพื้นที่เกษตรที่สูงภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ

110-120 วัน สามารถสร้างเมล็ดจำนวนมากกว่า 100,000 เมล็ด/ต้น เมล็ดงอกไม่พร้อมกัน ในระยะเวลา ในช่วง 1 เดือน งอกเพียง 10% แต่สามารถทยอยงอกเพิ่มขึ้นเป็น 40 % เมื่อปล่อยไว้นาน 172 วัน หรือประมาณ 6 เดือนพบระบาดในพื้นที่ปลูกพืชไร่ และไหล่ทางในจังหวัดสระบุรี ลพบุรี และเพชรบูรณ์ สำหรับทานตะวันหนูคือ *Blainvillea acmella* (L.) Philipson มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนของทวีปอาฟริกา และเอเชีย เป็นพืชอายุสั้น ประมาณ 80-100 วัน มีการสร้างเมล็ดประมาณ 20,000 เมล็ด/ต้น เมล็ดมีการงอกในดินสูงกว่าการทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยเมล็ดเริ่มงอกหลังเริ่มทดสอบ 60 วัน ในห้องปฏิบัติการ และมีการงอกเพียงร้อยละ 4.2 เมื่อปล่อยให้งอกนาน 210 วัน และสามารถงอกได้ร้อยละ 13.6 เมื่อปล่อยให้งอกในดินนาน 210 วัน และเมล็ดที่ยังไม่แก่จัด (สีเขียว-ดำ) ของทานตะวันหนูสามารถงอกได้เช่นเดียวกับเมล็ดที่แก่จัด (สีน้ำตาล-ดำ) พบระบาดในพื้นที่ปลูกพืชไร่ในจังหวัดสระบุรี และลพบุรี วัชพืชทั้งสองนี้มีคุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิ ยับยั้งการเจริญรากของไมยราบยักษ์ได้เล็กน้อย เมื่อทดสอบโดยวิธี Sandwich Method พรรณไม้ประดับด้วย วัชพืชทั้งสามชนิดที่พบสามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส เช่น กรุงเทพมหานครได้ด้วย

กิจกรรมที่ 2 วิจัยความหลากชนิดของแมลงเพื่อเก็บ – รักษาในพิพิธภัณฑ์

การทดลองที่ 2.1 ชนิดของแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย

การศึกษาชนิดของแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย เพื่อประเมินสถานภาพของแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ ให้ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง เขตการแพร่กระจาย พร้อมจัดทำฐานข้อมูลแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ซึ่งสามารถนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการ สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2558 จากแหล่งที่มีสภาพป่าอุดมสมบูรณ์ ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย จากการศึกษาครั้งนี้พบแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ ทั้งหมด 45 ตัวอย่าง จำแนกได้

6 ชนิด ได้แก่ ผีเสื้อร่อนลมสยาม, *Idea leuconoe* (Lepidoptera: Danaidae) จำนวน 5 ตัวอย่าง ผีเสื้อค้างคาว, *Lyssa zampa* Butler (Lepidoptera: Uraniidae) จำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วงดินปีกแผ่น, *Mormolyce phyllodes* Hegenb (Coleoptera: Carabidae) จำนวน 9ตัวอย่าง หิ่งห้อยยักษ์, *Lampigera* sp. (Coleoptera: Lampyridae) จำนวน 4 ตัวอย่าง; หิ่งห้อย ไดอะฟาเนส, *Diaphanes* sp.จำนวน 6 ตัวอย่าง และตั๊กแตนขาหนาม, *Heteropteryx dilatata* (Parkinson) (Phasmatodea, Phasmatidae) จำนวน 9 ตัวอย่าง ตัวอย่างแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ทั้งหมดนำเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.2 ความหลากชนิดของแมลงปออันดับโอโดนาทา (Odonata) ในภาคเหนือของประเทศไทย

การศึกษาความหลากชนิดของแมลงปออันดับโอโดนาทา (Odonata) ในภาคเหนือของประเทศไทย โดยการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงปอบริเวณใกล้แหล่งน้ำในพื้นที่เกษตรกรรม ที่ราบเชิงเขา พื้นที่ราบลุ่มน้ำ พื้นที่ป่าต้นน้ำลำธาร พื้นที่ภูเขาระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2558 นำตัวอย่างแมลงปอที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดแมลงปอได้ 2 อันดับย่อย (Suborder) คือ อันดับย่อย Anisoptera ได้แก่ วงศ์ (Family) Aeshnidae 1 ชนิด คือ แมลงปอยักษ์ *Gynacantha* sp. วงศ์ Gomphidae 2 ชนิด คือ แมลงปอเสือลายประดับ *Ictinogomphus decoratus* (Selys) แมลงปอเสือลาย *Gomphidictinus perakensis* (Laidlaw) วงศ์ Libellulidae 14 ชนิด ได้แก่ แมลงปอบ้านบ่อ *Crocothemis servilia* (Drury) แมลงปอบ้านสองสีเขียวฟ้า *Diplacodes trivialis* (Ramber) แมลงปอบ้านใหม่เฉียง *Neurothemis fluctuans* (Fabricius) แมลงปอบ้านใหม่กลม *Neurothemis fulvia* (Fabricius) แมลงปอบ้านเสือหน้าดำ *Ortherum glaucum* (Brauer) แมลงปอบ้านเสือผู้ม่วง *Orthetrum pruinosum* (Rambur) แมลงปอบ้านเสือสามเหลี่ยม *Orthetrum triangulare* (Selye) แมลงปอบ้านเสือลาย *Orthetrum sabina* (Drury) แมลงปอบ้านแผ่นปีกกว้าง *Pantala flavescens* (Fabricius) แมลงปอบ้านโคนท้องขาว *Pseudothemis jorina* (Forster) แมลงปอบ้านไร่เคลือบโลหะปลายใส *Rhyothemis plutonia* (Selys) แมลงปอบ้านไร่ปีกทอง *Rhyothemis phyllis* (Sulzer) แมลงปอบ้านใต้ผู้ม่วง *Trithemis aurora* (Burmeister) แมลงปอบ้านใต้โคนปีกดำ *Trithemis festiva* (Ramber) และ อันดับย่อย Zygoptera ได้แก่ วงศ์ Calopterygidae 3 ชนิด คือ แมลงปอเข็มภูเขาท้องเหลือง *Caliphaea thailandica* Asahina แมลงปอเข็มน้ำตกจีน *Neurobasis chinensis* (Linnaeus) แมลงปอเข็มน้ำตกปีกใส *Vestalis amoena* Selys วงศ์ Chlorocyphidae 3 ชนิด คือ แมลงปอเข็มหางโป่งจุดฟ้า *Helicocypha perforata* Percheron แมลงปอน้ำตก *Libellago lineata* (Burmeister) แมลงปอเข็มน้ำตกปลายลาย *Rhinocypha tincta* (Ramber) วงศ์ Coenagrionidae 1 ชนิด คือ แมลงปอเข็มแคระธรรมดา *Agriocnemis pygmaea* (Ramber) วงศ์ Lestidae 1 ชนิด คือ แมลงปอเข็มป่าปีกลาย *Orolestes*

octomaculatus (Martin) วงศ์ Euphaeidae 1 ชนิด คือ แมลงปอเข็มหางโป่งสีนิล *Euphaea mansoni* (Selys) และวงศ์ Platycnemididae 1 ชนิด คือ คือแมลงปอเข็มน้ำตก *Coeliccia chromothorax* (Selys) รวมพบแมลงปอทั้งสิ้น 9 วงศ์ 27 ชนิด 1,482 ตัวอย่าง ถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของแมลงปอทั้ง 27 ชนิด นำตัวอย่างแมลงปอจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลงพร้อมนำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลงกรมวิชาการเกษตร สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานความหลากชนิดของแมลงปอในลำดับต่อไป

การทดลองที่ 2.3 ความหลากชนิดของตั๊กแตนหนวดสั้นวงศ์ Acrididae ในพื้นที่ภาคใต้ ของประเทศไทย

การศึกษาความหลากชนิดของตั๊กแตนหนวดสั้นวงศ์ Arcrididae ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย ให้ทราบชนิด พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจาย เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับงานศึกษาวิจัย การวินิจฉัยชนิดแมลงศัตรูพืช รวมถึงการจำทำรายชื่อแมลงศัตรูพืช ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2556 ในพื้นที่เกษตร และป่าภาคใต้ของประเทศไทย นำตัวอย่างที่สำรวจได้มาจำแนกชนิด ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช การศึกษาครั้งนี้ใช้ตั๊กแตนหนวดสั้นวงศ์ Arcrididae จำนวน 295 ตัวอย่าง จำแนกได้ 13 ชนิด ได้แก่ Acrida bicolor (Thunberg, 1815); Apalacris varicornis Walk, 1870; Atractomorpha crenulata (Fabricius, 1793); Aularches miliaris (Linnaeus, 1758); Crondracris rosea (De Geer, 1773); Cyrtacanthacris tatarica (Linné, 1758); Gonista bicolor (De Haan, 1842); Oxya japonica (Thunberg, 1824); Oxya hyla Serville, 1831; Patanga succincta (Linnaeus, 1763); Pternoscirta caliginosa (De Haan, 1842); Stenocatantops splendens (Thunberg, 1815); Trilophidia annulata (Thunberg, 1815) ตัวอย่างตั๊กแตนหนวดสั้นวงศ์ Arcrididae ทั้งหมดที่จำแนกชนิดแล้วนำเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.4 ความหลากชนิดของมดในพื้นที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรตากและป่าธรรมชาติของจังหวัดตาก

การศึกษาความหลากชนิดของมดในศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรตาก จังหวัดตาก ระหว่างตุลาคม 2553 ถึง กันยายน 2556 ได้สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างมด จากแปลงปลูกชา กาแฟ อะโวกาโด และ มะคาเดเมีย โดยใช้วิธีวางกับดักน้ำหวาน กับดักชีส กับดักหลุม ร่อนซากใบไม้ และการจับด้วยมือ นำตัวอย่างทั้งหมดมาจำแนกชนิด พบมดทั้งสิ้น 55 ชนิด 37 สกุล 8 วงศ์ย่อย โดยแปลงชา และอะโวกาโด พบมดจำนวน 31 ชนิด แปลงกาแฟ จำนวน 29 ชนิด และแปลงมะคาเดเมีย จำนวน 22 ชนิด เมื่อพิจารณาชนิดมดที่เด่นในพื้นที่ พบว่า แปลงมะคาเดเมีย มีมดจำนวน 8 ชนิด แปลงอะโวกาโด ชาและกาแฟ มีจำนวน 7, 5 และ 3 ชนิด และมีมดน้ำผึ้ง (*Anoplolepis gracilipes* Smith) เป็นมดที่พบทุกครั้งและทุกพื้นที่สำรวจ มดก้นห้อยธรรมดา (*Dolichoderus thoracicus* Smith) พบทุกครั้งของการสำรวจในแปลงมะคาเดเมีย อะโวกาโด และกาแฟ ขณะที่มดไอ้ชื่นดำ (*Odontoponera denticulata* Smith) พบในแปลงมะคาเดเมีย อะโวกาโด และ

ชา นอกจากนี้ยังพบชนิดมดที่เป็นรายงานการพบครั้งแรก (new recorded) ในประเทศไทย จำนวน 1 ชนิด คือ *Cerapachys sauteri* Forel ซึ่งพบในแปลงกาแฟ

การทดลองที่ 2.5 ความหลากชนิดของด้วงงวงในเขตสงวนชีวมณฑลสะแกราช

การศึกษาความหลากชนิดของด้วงงวงในเขตสงวนชีวมณฑลสะแกราช โดยการสำรวจและรวบรวมด้วงงวงในพื้นที่สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช จังหวัดนครราชสีมา ระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2556 นำตัวอย่างด้วงงวงที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน ด้านสัณฐานวิทยา (Morphology) เพื่อตรวจจำแนกชนิดโดยตรวจวิเคราะห์ชนิดใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และเปรียบเทียบกับตัวอย่างด้วงงวงในพิพิธภัณฑ์แมลง ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดด้วงงวงได้ 12 วงศ์ย่อย (Subfamily) 28 ชนิด 302 ตัวอย่าง ซึ่งจัดอยู่ในอันดับ (Order) Coleoptera วงศ์ (Family) Curculionidae วงศ์ย่อย Apioninae คือ *Apion* sp. วงศ์ย่อย Attelabinae คือ *Apoderus notatus* Fabricius วงศ์ย่อย Baridinae ได้แก่ *Baris* sp., *Corpus* sp., *Pempherulus* sp. วงศ์ย่อย *Brentinae* คือ *Cordus plumipennis* วงศ์ย่อย Cryptorynchinae ได้แก่ *Sternochetus olivieri* (Faust), *Sybulus* sp1., *Sybulus* sp2. วงศ์ย่อย Curculioninae คือ *Balaninus* sp. วงศ์ย่อย Entiminae ได้แก่ *Astycus lateralis*, *Eugnathus alterans*, *Hypomeces squamosus* (Fabricius), *Phrixopogon hausti* Marshall, *Phytoscaphus* sp. *Platytrachelus paviei* Aurivillius, *Sepiomus* sp., *Trachelisus bioculatus* วงศ์ย่อย Ereminae คือ *Cyphicerus* sp. วงศ์ย่อย Erirhininae คือ *Tadius* sp. วงศ์ย่อย Molytinae ได้แก่ *Acicnemis* sp., *Alcidodes* obesus, *Alcidodes* sp2., *Colobodes* sp. วงศ์ย่อย Rhynchitinae คือ *Rhynchites* sp1., *Rhynchites* sp2., *Rhynchites* sp3. และวงศ์ย่อย Rhynchophorinae คือ *Cosmopolites sodidus* (Germar) ด้วงงวงทั้งหมดพบในเนื้อไม้ ใบไม้ และจากกับดักแสงไฟ ทำให้ทราบชนิด ลักษณะการทำลาย และเขตการแพร่กระจายของด้วงงวงในเขตสงวนชีวมณฑลสะแกราช จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดและถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของด้วงงวงทั้ง 28 ชนิด นำตัวอย่างด้วงงวงจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลง พร้อมนำข้อมูล ที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลงกรมวิชาการเกษตร สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดทำรายชื่อชนิดแมลงศัตรูพืชรองรับปัญหาด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร และทราบถึงเขตการแพร่กระจายของด้วงงวงในเขตสงวนชีวมณฑลสะแกราช

กิจกกรมที่ 3 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี การวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ 3.1 การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูพืชโดยเซรุ่มวิทยา

การทดลองที่ 3.1.1 การผลิตแอนติซีรัมของไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus-1* สาเหตุโรคเหี่ยวสับปะรดโดยใช้ระบบเซลล์แบคทีเรีย

การผลิตแอนติซีรัมโดยใช้ระบบเซลล์แบคทีเรีย เริ่มจากนำใบสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวมาแยกสกัดอาร์เอ็นเอ แล้วนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา โดยใช้ไพรเมอร์จากส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส PMWaV-1 ได้แก่ pet101_PMWaV1F (5'CACCATGGCTGA TTCGAGCAAACAAAAACAAC3') และ pet101_PMWaV1R (5'TTTGCGTCCACCCATAAAGAT GTGCG3') สังเคราะห์ ได้ชิ้นของดีเอ็นเอขนาด 771 คู่เบส จากนั้นนำไปโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ pET 101/D-TOPO® (Invitrogen) และคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปในพาหะ นำมาทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* BL 21 (DES 3) ในอาหารสูตร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้สารไอพีทีจี ในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน พบว่าระยะเวลาที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้สูงสุด คือ 24 ชั่วโมง โดยให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน ทำการแยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column เพื่อนำไปผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่าย ผลการตรวจสอบคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้ ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่า แอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 5-7 มีประสิทธิภาพสูงสุด สามารถทำปฏิกิริยาได้ถึง 1:10,000 จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมกับตัวอย่างสับปะรดที่แสดงอาการเหี่ยว โดยเปรียบเทียบชนิดของเพลท พบว่า โพลีซอฟท์ เพลท ของ Nunc ให้ปฏิกิริยาดีที่สุด แต่ให้ปฏิกิริยาค่อนข้างต่ำ ทำให้อ่านผลยาก แอนติซีรัมที่ผลิตได้อาจเหมาะนำไปใช้ในการตรวจหาไวรัสโดยวิธี Immunosorbent electron microscopy (IEM)

การทดลองที่ 3.1.1 การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus*

Bean yellow mosaic virus พบอาการปรากฏชัดบนใบและดอก เป็นรอยด่างเป็นทางขีดสีขาวทำให้ดอกแกลดิโอลัสด่างโดยมีเพลี้ยอ่อน (*Myzus persicae*) เป็นแมลงพาหะทำให้เกิดการระบาดได้มากและรวดเร็วในแปลงเมื่อศึกษาบนพืชทดสอบ chenopodium โดยทำการปลูกเชื้อ (inoculation)ลงบนใบต้น chenopodium ด้วย sap inoculation พบแสดงอาการ chlorotic local lesions ใบป็นจุดสีเหลืองถึงน้ำตาลและใบมีรูปร่างผิดปกติ และเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบอนุภาคไวรัส BYMV เป็นท่อนยาวคด การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส BYMV หลังแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ และนำไปฉีดกระต่ายทำการเจาะเลือดกระต่ายครั้งที่ 4-5 มีประสิทธิภาพสูงสุดสามารถทำปฏิกิริยาได้จนถึง 1:100,000 การสกัด gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้นของ IgG วัดความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยเครื่อง spectrophotomer ได้ค่าความเข้มข้น IgG ของ BYMV เท่ากับ9.6 และเมื่อนำไปตรวจหาเชื้อ ให้ปฏิกิริยาเป็นบวก IgG ของ BYMV มีสีแดงเข้ม ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ ดังนั้นจึงสามารถที่นำ IgG ของ BYMV นี้ไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ในแกลดิโอลัสได้

การทดลองที่ 3.1.3 การผลิตชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบไวรัส *Cucumber mosaic virus* ในพืชเศรษฐกิจ

การนำเทคนิค Gold Labeling IgG Flow Test (GLIFT) มาปรับใช้ในการตรวจเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) เพื่อการวินิจฉัยโรค ที่สามารถตรวจสอบได้แม่นยำ ใช้ง่าย สะดวกและอ่านผลได้รวดเร็ว ภายใน 5-10 นาที เร็วกว่าวิธี ELISA ที่ใช้เวลามากกว่า 4-5 ชั่วโมง GLIFT ได้ถูกพัฒนาโดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยาและ lateral flow technique บนแผ่น nitrocellulose membrane ซึ่งที่ให้ผลดีที่สุดคือ ด้วยการเลือกใช้อนุภาคของทอง (colloidal gold) มาต่อเชื่อมกับ IgG ของเชื้อ CMV ที่มีความเข้มข้นในปริมาณ 1 mg/ml ให้สีของปฏิกิริยาแดงเข้ม และให้สีของปฏิกิริยาที่ test line แดงเข้มชัดเจนเมื่อใช้ gold labeling IgG ในปริมาณ 2 μl /cm มีความเหมาะสมดีกว่าปริมาณ 1.0 และ 1.5 μl /cm สำหรับการใช้ IgG ของ CMV ในปริมาณ 1.0 μl /cm ทำ test line ให้ผลของปฏิกิริยาดี สามารถใช้ goat-anti rabbit IgG ทำ control line ได้ จากการเปรียบเทียบชนิดของ แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่แตกต่างกัน 7 ชนิด พบว่าปฏิกิริยาเกิดได้ดีในไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนชนิด AE 100 และ Unisart CN 140 และการเปรียบเทียบชนิดของ sample buffer ต่อปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบโดยใช้บัฟเฟอร์ที่แตกต่างกัน จำนวน 7 ชนิด พบว่าบัฟเฟอร์ที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาเกิดปฏิกิริยาบนเส้น control line และไม่เกิดปฏิกิริยาแบบ false positive คือเกิดปฏิกิริยาบนเส้นtest line หรือปฏิกิริยาข้ามนั้นคือบัฟเฟอร์ TBS-T และ PBS-T และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มของสีที่ control line พบว่า การใช้ TBS-T ให้ผลดีที่สุด

การทดลองที่ 3.1.4 การวิจัยและพัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบเชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) subgroup *Maize dwarf mosic virus*

การนำเทคนิค Gold labeled IgG flow test (GLIFT) มาพัฒนาและปรับใช้เป็นชุดตรวจสอบไวรัสโรคใบด่างข้าวโพด (SCMV) ที่สามารถตรวจสอบได้แม่นยำ ใช้ง่าย สะดวกและอ่านผลได้รวดเร็ว โดยอาศัยหลักการทางเซรุ่มวิทยา (serology) และ lateral flow technique บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane; NCM) การเตรียมและทดสอบคุณภาพ IgG ของ SCMV โดยการตรวจสอบด้วยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA) เตรียม Gold conjugated IgG โดยนำอนุภาคทอง (colloidal gold) มาเชื่อมต่อ (conjugate) กับ IgG ของ SCMV และเตรียม conjugated release pad (CRP) โดยใช้ปริมาณ 100-120 ไมโครลิตร/15–18 เซนติเมตร (6.6 ไมโครลิตร/เซนติเมตร) ทำเส้น control line ด้วย GAR (Goat anti rabbit เข้มข้นอัตรา 1:3) และ test line ด้วย IgG ของ SCMV ปริมาณ 40 ไมโครลิตร/2.5 X 18 เซนติเมตร (2.2 ไมโครลิตร/เซนติเมตร) บนแผ่น NCM (วัสดุเปน S&S – AE 99, ขนาด 8 ไมโครเมตร) เมื่อประกอบเปนชุดตรวจสอบแลว และทำการทดสอบกับน้ำคั้นใบข่าวโพดจากต้นข่าวโพดที่เปนโรคพบวา ชุดตรวจสอบ GLIFT kit ที่ได้พัฒนาปรับใช้ครั้งนี้สามารถตรวจสอบไวรัสใบด่างข้าวโพดได้ที่ความเข้มข้น 1 : 10 โดยสามารถทราบผลได้ภายในระยะเวลาที่รวดเร็ว คือ เส้น control line และ test line ปรากฏสีในเวลาประมาณ 5 นาที

การทดลองที่ 3.1.5 การพัฒนาชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli*

ชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip ถูกพัฒนาเพื่อตรวจสอบแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* ในกล้วยไม้ โดยอาศัยหลักการทางเซรุ่มวิทยา (serology) และ lateral flow test บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane ; NCM) โดยการเตรียมและทดสอบคุณภาพ IgG ของแอนติซีรั่มของแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ด้วยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA) การเตรียม Gold conjugated IgG โดยนำอนุภาคทอง (colloidal gold) มาเชื่อมต่อ (conjugate) กับ IgG ของแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* และเตรียม conjugated release pad (CRP) โดยใช้ปริมาณ 100-120 ไมโครลิตร/15 – 18 เซนติเมตร (6.6 ไมโครลิตร/เซนติเมตร) ผลการทดสอบชนิดของ membrane ที่เหมาะสมในการทำชุดตรวจสอบพบว่า membrane S&S AE 99 และ membrane S&S AE 100 ให้ผลการทดสอบในการทำtest line ได้ดีมาก และดี ตามลำดับ ทำชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip โดยทำเส้น control line ด้วย GAR (Goat anti rabbit เข้มข้นอัตรา 1:3) และ test line ด้วย IgG ของ แบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ปริมาณ 40 ไมโครลิตร/2.5 X 18 เซนติเมตร (2.2 ไมโครลิตร/เซนติเมตร) บนรแผ่น membrane S&S AE 99 เมื่อประกอบเป็นชุดตรวจสอบแล้ว ทำการทดสอบกับสารแขวนลอยแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร พบว่า ชุดตวจสอบ Lateral flow test strip สามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ได้อย่างรวดเร็ว โดยเส้น control line และ test line ปรากฏสี ในเวลาประมาณ 5 นาที จากการทดสอบประสิทธิภาพของความไวในการตรวจสอบแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* พบว่า สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ได้ในปริมาณต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร

การทดลองที่ 3.1.6 การวิจัยและพัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบ GLIFT Kit (Gold Labeling IgG Flow Test) สำหรับตรวจไวรัสในกลุ่ม Tospovirus

การนำเทคนิค Gold labeled IgG flow test (GLIFT) มาพัฒนาและปรับใชเปนชุดตรวจสอบไวรัสในกลุ่มทอสโพไวรัส ที่สามารถตรวจสอบได้แมนยำ ใช่ง่าย สะดวกและอานผลได้รวดเร็ว โดยอาศัยหลักการทางเซรุมวิทยา (serology) และ lateral flow technique บนแผนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane; NCM) การเตรียมและทดสอบคุณภาพ IgG ของโพไวรัส และเตรียม conjugated release pad (CRP) โดยใช่ปริมาณ 100-120 ไมโครลิตร/15–18 เซนติเมตร (6.6 ไมโครลิตร/เซนติเมตร) ทำเส่น control line ด่วย GAR (Goat anti rabbit เข่มข่นอัตรา 1:3) และ test line ด่วย IgG ของทอสโพไวรัส ปริมาณ 40 ไมโครลิตร/2.5 X 18 เซนติเมตร (2.2 ไมโครลิตร/เซนติเมตร) บนแผน NCM (วัสดุเปน S&S – AE 99, ขนาด 8 ไมโครเมตร) เมื่อประกอบเปนชุดตรวจสอบแล่ว และทำการทดสอบกับน้ำคั้นใบพืชจากต่นที่เปนโรคพบวาชุดตรวจสอบ GLIFT kit ที่ได้พัฒนานี้สามารถตรวจสอบทอสโพไวรัส แต่ให้ผลที่ไม่ชัดเจนและใช้เวลาในการตรวจสอบนานกว่า 5 นาที

การทดลองที่ 3.1.7 การผลิตชุดตรวจสอบ Bean yellow mosaic virus สำเร็จรูปโดยเทคนิค Gold labeling IgG flow test

จากการศึกษา Gold Labeling IgG Flow Test (GLIFT) ในการตรวจเชื้อ *Bean yellow Mosaic virus* (BYMV) โดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยาและ lateral flow technique บนแผ่น nitrocellulose membrane ที่ใช้ทดสอบ 7 ชนิด เลือกใช้อนุภาคของทอง (colloidal gold) ขนาด 40 นาโนเมตร มาต่อเชื่อมกับ IgG ของเชื้อ BYMV ทำการ conjugate กับ IgG ของไวรัส พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line แต่ control line เกิดในทุกชนิดของ nitrocellulose membrane ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบชนิดของบัฟเฟอร์และไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนอีกครั้ง เพื่อดูปฏิกิริยาของเส้น test line และ control line รวมทั้งทำการปรับเปลี่ยนปริมาณในการ spray การ conjugate กับ IgG ของ BYMV หรือปรับความเข้มข้นของ IgG เพื่อทดสอบปฏิกิริยาให้สามารถตรวจและเกิดปฏิกิริยาได้แถบแบนชัดเจน ก่อนที่จะทำการประกอบและตรวจสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ BYMV ต่อไป

การทดลองที่ 3.1.8 การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัส PVY PVX PVS ในมันฝรั่ง

ชุดตรวจสอบเชื้อ PVY PVX และ PVS พัฒนาขึ้นด้วยเทคนิค Gold Labeling IgG Flow Test (GLIFT) โดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยาและการเคลื่อนย้ายของสารละลายบนแผ่น nitrocellulose membrane (lateral flow technique) ทำการทดสอบคัดเลือกเมมเบรน 4 ชนิด ที่เหมาะสมกับขนาดอนุภาคของเชื้อไวรัสและทอง 40 นาโนเมตร ที่ต่อเชื่อมกับ IgG ของเชื้อ PVY PVX และ PVS ที่ปรับให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 1 mg/ml ในการใช้ผลิต GLIFT kit นั้น พบว่าเมมเบรนชนิด S&S AE 99 มีความเหมาะสมสามารถใช้ได้กับเชื้อทั้ง 3 ชนิด โดยเลือกปฏิกิริยาที่ชัดเจนที่สุดพบว่า การใช้อนุภาคทองต่อเชื่อมกับ IgG ปริมาณ 2 μl/cm และใช้ IgG ของเชื้อไวรัสแต่ละชนิดปริมาณ 2 μl/cm ในการทำเส้น test line บนเมมเบรน โดยชุดทดสอบ GLIFT kit นี้ ทำการแยกเป็น 2 หลุม ในชุดตรวจสอบ 1 ชุด หลุมแรกใช้ตรวจสอบเชื้อ PVY และ PVS ส่วนอีกหลุมใช้ตรวจสอบเชื้อ PVX พบว่าเส้น test line ของทั้ง 3 เชื้อ และ control line สามารถตรวจสอบและเกิดปฏิกิริยาแถบสีชัดเจน

การทดลองที่ 3.1.9 การโคลนและสังเคราะห์โปรตีน Sec A ยีน ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยในระบบเซลล์แบคทีเรีย

การนำเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาเข้ามาช่วยตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยนั้น พบว่า ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากยังไม่สามารถผลิตแอนติเจนเชื้อสาเหตุที่บริสุทธิ์ได้เพราะประสบปัญหาหลักในขั้นตอนการสกัดยังมีการปะปนของโปรตีนพืชมากเกินไปจึงส่งผลให้การผลิตแอนติบอดีที่ได้ไม่มีความจำเพาะต่อเชื้อสาเหตุมากพอ ในปัจจุบันมีการใช้ระบบเซลล์แบคทีเรียเข้ามาช่วยในกระบวนการผลิต

โปรตีนจึงเป็นอีกหนึ่งแนวทางเพื่อนำมาช่วยลดปัญหาดังกล่าวเพื่อให้ได้แอนติเจนคุณภาพดีสำหรับใช้ผลิตแอนติบอดีที่ความจำเพาะต่อเชื้อสาเหตุ กระบวนการเริ่มด้วยออกแบบไพร์เมอร์ SecAfor1 / SecArev3 ที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยจาก partial secA gene แล้วสังเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR ได้แถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 800 เบส ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน genbank พบว่า เหมือนกับ partial secA gene ของ Sugarcane grassy shoot phytoplasma และ Sugarcane white leaf phytoplasma อยู่ในระดับ 97-98 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาทำการสังเคราะห์ยีนลูกผสม partial secA-adapter gene/6xHisTag และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้จำนวน 969 bp เมื่อแปลรหัสลำดับอะมิโนตามตำแหน่ง frame shift ได้จำนวน 322 เรซิดิวส์ และพบตำแหน่งกรดอะมิโนของ HHHHHH-Polyhistidine Region (6xHisTag) ใช้ประโยชน์ในขั้นตอนการสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยระบบ ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.) ตรวจสอบสภาพทางกายภาพต่างๆ ของโปรตีนด้วยโปรแกรม ProtParam และ ProtScale พบว่า สามารถละลายน้ำได้ค่อนข้างดี แสดงค่า average of hydropathicity เท่ากับ -0.287 และช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อแสดงออกโปรตีน partial SecA-Protein/6xHisTag (fusion protein) ในเซลล์แบคทีเรีย E. coli สายพันธุ์ Top 10 หลังจากเหนี่ยวนำด้วย 2 เท่าของ 20 %L-(+)-Arabinose ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้นเพียง 50 ไมโครกรัม แสดงแถบแบนโปรตีนได้ชัดเจนเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง จากการทดสอบวิธีการสกัดโปรตีน 2 แบบ คือ Native condition และ denature condition พบว่าวิธีสกัดโปรตีนแบบ denature condition ได้ผลผลิตโปรตีนมากกว่าเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน เมื่อวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เท่ากับ 0.544 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สรุปผลการทดลองสามารถผลิตโปรตีน SecA-Protein/6xHisTag (fusion protein) ได้ด้วยการอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรียซึ่งสามารถใช้เป็นแอนติเจนบริสุทธิ์เพื่อในอนาคตนำไปผลิตแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะสูงต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวและคาดหวังว่าจะสามารถพัฒนาต่อเป็นชุดตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุโรคใบขาวอ้อยได้อย่างแม่นยำ รวดเร็ว และใช้งานง่าย

การทดลองที่ 3.1.10 การผลิตแอนติซีรัมของไวรัส Citrus tristeza virus สาเหตุโรคทริสเทซ่าของพืชตระกูลส้มด้วยระบบเซลล์แบคทีเรีย

โรคทริสเทซ่า (Citrus tristeza disease) เป็นโรคติดเชื้อภายในที่สำคัญของพืชตระกูลส้มเกิดจากเชื้อไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) จัดอยู่ในสกุล *Closterovirus* มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว ทำการสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสด้วยคู่ไพร์เมอร์ CP1/CP2 ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 672 เบส แปลรหัสลำดับอะมิโนได้ 223 อะมิโน เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่ามีความเหมือนในส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CTV ระดับ 93 – 94 เปอร์เซ็นต์ ทำการโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสเข้ากับ pBAD/His A expression vector สำหรับใช้สังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้ม

อนุภาคเชื้อไวรัส CTV ในระบบเซลล์แบคทีเรีย พบว่าสามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ประมาณ 30 กิโลดาลตัน ซึ่งสามารถนำไปใช้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีสำหรับใช้ตรวจเชื้อ *Citrus tristeza virus* ได้

การทดลองที่ 3.1.11 การพัฒนาชุดตรวจสอบแบบ Immuno Strip เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ในกล้วยไม้

พัฒนาชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปเพื่อตรวจสอบแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ในกล้วยไม้ โดยอาศัยหลักการทางเซรุ่มวิทยา (serology) และ lateral flow technique บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane ; NCM) โดยผลิตแอนติ-ซีรั่มที่จำเพาะต่อเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ด้วย Membrane protein complex (MPC) ทำการสกัด IgG โดยนำอนุภาคทอง (colloidal gold) มาเชื่อมต่อ (conjugate) กับ IgG และเตรียม conjugated release pad (CRP) ทำเส้น control line ด้วย Goat anti rabbit (GAR) และ test line ด้วย IgG บนแผ่นmembrane S&S-AE 99 เมื่อประกอบเป็นชุดตรวจสอบแล้ว ทำการทดสอบกับสารแขวนลอยแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนี-ต่อมิลลิลิตร พบว่าชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป สามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ได้อย่างรวดเร็ว โดยเส้น control line และ test line ปรากฏสีในเวลา 5 นาที จากการทดสอบประสิทธิภาพความไวของชุดตรวจสอบ สามารถตรวจแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ได้ในปริมาณต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร

กิจกรรมย่อยที่ 3.2 การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูพืชโดยอณูชีววิธี

การทดลองที่ 3.2.1 การตรวจสอบเชื้อ *Candidatus* Liberibacter species สาเหตุโรคฮวงลองบิง (กรีนนิ่ง) ด้วยเทคนิค Real-time PCR

โรคฮวงลองบิง (Citrus Huanglongbing, HLB) หรือ ที่ประเทศไทยนิยม เรียกว่า โรคกรีนนิ่ง (Citrus greening) เป็นโรคที่สำคัญที่สุดของพืชตระกูลส้ม โรคนี้เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ที่อาศัยอยู่ในท่ออาหาร Fastidious phloem-limited bacteria (FLB) หรือ Bacteria-like organism (BLO) ที่มีชื่อว่า *Candidatus* Liberibacter species เมื่อส้มถูกเชื้อ *Ca.* Liberibacter เข้าทำลายจะแสดงอาการใบเล็กเหลืองคล้ายอาการโรคใบแก้วซึ่งเกิดจากการขาดธาตุสังกะสี ใบด่าง ใบด่างเส้น ใบเขียว ใบแก่หนา และหยาบโค้งเส้นใบแตก กิ่งแห้ง ผลร่วง ต้นส้มแสดงอาการทรุดโทรม เนื่องจากอาการของโรคมีความหลากหลาย และ มีอาการคล้ายขาดธาตุอาหารทำให้การวินิจฉัยโรคทางสายตาไม่สามารถยืนยันการเป็นโรคได้ การตรวจสอบโรคฮวงลองบิงจึงมีความสำคัญ เป็นการตรวจสอบยืนยันการเกิดโรคกรีนนิ่ง เพื่อจะได้หาแนวทางป้องกันกำจัดไม่ให้แพร่ระบาดเพิ่มมากขึ้น การทดลองนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบโรคกรีนนิ่งโดยเทคนิค Real time PCR โดยดำเนินสังเคราะห์ probe ที่ออกแบบมาจาก 16S rDNA sequence –ของ Ca. *Liberibacter* species สาเหตุโรคฮวงลองบิง (GenBank accession no. L22532 ของ Las, L22533ของ Laf และ Ay742824ของ Lam) ให้มีความเฉพาะเจาะจง ต่อเชื้อ Ca. *Liberibacter* species โดยทำการสังเคราะห์ probe ทั้งหมด 3

probe ได้แก่ Las, Laf และ Lam ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ Ca. *Liberibacter* species จากตัวอย่างที่แสดงอาการของโรค กรีนนิ่ง โดยใช้ชุดสกัด DNeasy Plant Kit (Qiagen) ทำการทดสอบ probe ที่ได้สังเคราะห์ไว้ทั้ง 3 probe โดยนำมาตรวจกับ DNA ของเชื้อ Ca. Liberibacter species พบว่า probe ของ Lasและ Laf สามารถตรวจ DNA- ของเชื้อ Ca. Liberibacter species ได้ โดยมี positive internal control เป็น primer ทีสังเคราะห์มาจาก ยีน cytochrome oxidase (COX) จากพืชตระกูลส้ม ทดสอบการใช้ probe และเทคนิค Real time PCR ในการตรวจเชื้อ Ca. Liberibacter species กับตัวอย่างใบส้มเขียวหวานที่เก็บมาจากแปลงปลูกอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ พบสามารถตรวจได้ผลดี

การทดลองที่ 3.2.2 การการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomomnas axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real-time PCR

การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomomnas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ primer D1/D2 และ primer 2/3 ที่ออกแบบมาจาก ยีน avirulence/ pathogenicity *(pthA gene)* ผลการทดสอบพบว่า primer D1/D2 และ primer 2/3 มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A โดยสามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบและเซลล์แบคทีเรีย *X .axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยทั้ง 50 ไอโซเลท มีความไว(sensitivity) ในการตรวจ ชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดของDNA เท่ากับ 5 พิโคกรัม และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจได้คือ 81 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ผลการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* จากตัวอย่างโรคแคงเกอร์ที่เก็บมาจากแปลงปลูกส้มโอที่ อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย ด้วยเทคนิค Real time PCR โดย primer D1/D2 และ primer 2/3 จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่า primer ทั้ง 2 คู่ สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ทั้ง 10 ตัวอย่าง

การทดลองที่ 3.2.3 .วิจัยพัฒนาเทคนิคการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและเน่าเละของกล้วยไม้ด้วยเทคนิค PCR และ Real-time PCR

ทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละของกล้วยไม้ ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* subsp.*carotovora* (Ecc.) และ *E. chrysanthemi* (Ech.) โดยใช้ไพรเมอร์ 5 คู่ ได้แก่ ERWFOR/CHRREV, ADE1/ADE2, CHPG/R23-1R, Ec3F/Ec4R และ LF/LR ไพรเมอร์ทุกคู่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าแต่มีความจำเพาะและความไวแตกต่างกัน คู่ไพรเมอร์ LF/LR สามารถสังเคราะห์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละได้มากที่สุด จากการเปรียบเทียบปฏิกิริยา PCR และ Real-time PCR ในการตรวจเชื้อพบว่าคู่ไพรเมอร์ LR/LF สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากแบคทีเรียโรคเน่าเละได้ แต่อย่างไรก็ตามยังพบ false positive กับแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ซึ่งอาจทำให้การแปลผลปฏิกิริยาไม่ถูกต้อง แต่เมื่อปรับสภาพการตรวจวิเคราะห์โดยเพิ่มอุณหภูมิ annealing เพื่อให้เกิดความจำเพาะของปฏิกิริยามากขึ้น พบปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอลดลง เมื่อทำการทดสอบปฏิกิริยา multiplex PCR ใน

การตรวจเชื้อ พบว่าไพรเมอร์ LF/LR และ ADE1/ADE2 สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียโรคเน่าเละได้ 171 และ 420 bp ตามลำดับ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง Ecc. และ Ech. ได้ ทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย Ecc. และ Ech. ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่ เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเชื้อต่อไป

การทดลองที่ 3.2.4 การตรวจสอบไวรัส Pineapple mealybug wilt-associated virus-1 และ 2 สาเหตุโรคเหี่ยวสับปะรดโดยเทคนิค multiplex PCR

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวสับปะรดทั้ง 2 strain (PMWaV-1 และ PMWaV-2) ในปฏิกิริยาเดียวกัน โดยอาศัยเทคนิค Multiplex RT-PCR เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์บริเวณ (1) Heat shock protein gene (HS) ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-1 ได้แก่ PM1_HS_M_F และ PM1_HS_M_R ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 635 คู่เบส และ ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-2 ได้แก่ PM2_HS_M_F และPM2_HS_M_R ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 380 คู่เบส (2) บริเวณ Coat protein gene (CP) ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-1 ได้แก่ PM1_CP_M_F และ PM1_CP_M_R ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 428 คู่เบส และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-2 ได้แก่ PM2_CP_M_F และ PM2_CP_M_R ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 727 คู่เบส หลังจากการสกัดอาร์เอ็นเอ ของเชื้อ PMWaV-1 และ PMWaV-2 จากใบสับปะรดเป็นโรคโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป แล้วนำมาทดสอบและปรับระยะเวลารวมทั้งอุณหภูมิให้เหมาะสมในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณ cDNA โดยเทคนิค Multiplex RT-PCR พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับระยะ annealing ของ HS gene คือ 60 °ซ และ CP gene คือ 62 °ซ จากการทดสอบการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้จากยีน HS และ CP โดยเทคนิค multiplex RT-PCR เปรียบเทียบกับไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบ PMWaV-1 และ PMWaV-2 เพียง strain เดียว โดยเทคนิค RT-PCR ปรากฏว่า ให้ผลวิเคราะห์ด้วยวิธี gel electrophoresis ตรงกัน

การทดลองที่ 3.2.5 การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุของโรคในอ้อยด้วย Membrane protein translocation system genes (Sec protein genes)

การพัฒนาวิธีตรวจโรคใบขาวของอ้อยวิธีใหม่ในตำแหน่ง *secA gene* พบว่าได้ไพร์เมอร์ชุดใหม่ที่ได้ชิ้นยีนขนาด 275 bp ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในอ้อยโดยไม่จับกับไฟโตพลาสมาในพืชอื่นหรือเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น การวิเคราะห์ชิ้นยีนที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค genotyping พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน และการตรวจข้อมูลลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลสากลพบว่าถูกต้อง วิธีการใหม่นี้ใช้ระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์ประมาณ 1 ชั่วโมงครึ่ง ทำให้สามารถรู้ผลการตรวจได้ภายใน 2-3 ชั่วโมง และไม่มีปัญหาปนเปื้อนในปฏิกิริยาควบคุม ดังนั้นจึงเป็นวิธีการที่สามารถใช้ในการตรวจโรคใบขาวในอ้อยได้อย่างแม่นยำ ถูกต้อง และรวดเร็ว เมื่อเทียบกับวิธีการเดิมที่ตรวจเชื้อที่

ตำแหน่ง 16S-23S ISR ที่พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอได้กับเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่อยู่ภายในพืชได้ ซึ่งอาจไม่ใช่เชื้อก่อโรค ไม่จำเพาะกับชนิดพืช และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์รวมประมาณ 6-7 ชั่วโมง ใช้เวลารวมในการรายงานผลทั้งสิ้นประมาณ 1-2 วัน หากไม่มีปัญหาเรื่องผลลบปลอมในหลอดควบคุมซึ่งมักเกิดขึ้นได้บ่อยครั้ง อย่างไรก็ตามความไวของวิธีการใหม่ที่ได้นี้ต่ำกว่าวิธีเดิมที่ใช้เทคนิค nested-PCR เล็กน้อยซึ่งสามารถเพิ่มความไวได้ด้วยการใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์สองครั้ง หรือใช้การตรวจด้วย Realtime PCR

การทดลองที่ 3.2.6 การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคพุ่มแจ้ (witches' broom) ของมันสำปะหลังโดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

โรคพุ่มแจ้ของมันสำปะหลังมีรายงานว่าเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังที่สำคัญของประเทศไทยตั้งแต่ปี 2552 ซึ่งลักษณะอาการคล้ายคลึงกับการทำลายของเพลี้ยแป้งและพบอาการพุ่มแจ้ระบาดทุกแหล่งปลูกมันสำปะหลังที่สำคัญของประเทศไทย จึงต้องเร่งสำรวจนำมาพิสูจน์เพื่อให้ทราบว่าอาการพุ่มแจ้เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาจริงหรือไม่ เพื่อลดความเสี่ยงที่จะเกิดไดขึ้นกับผลผลิตต่อไปในอนาคต จากการตรวจสอบตัวอย่างมันสำปะหลังที่มีอาการแตกยอดเป็นกระจุกที่ยอดและ กลางลำต้นจากแปลงปลูกรวม 13 จังหวัด รวม 2 วิธีการ (1.) ด้วยวิธี Nested PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ 2 คู่ คือ P1 & T7 และ R16F2n & R16R2 ใช้ดีเอ็นเอของ Manihot esculenta' witches'-broom ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากนักวิจัยของ CIAT มาเป็น positive control และตรวจสอบด้วย restriction enzyme พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,200 เบส นั้นไม่ใช่เชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งเกิดมาจากการเกาะที่ผิดพลาดของตำแหน่งไพร์เมอร์เอง และเมื่อตัดพิสูจน์ดีเอ็นเอไฟโตพลาสมา restriction enzyme *Eco*RI ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาดประมาณ 522 เบส และ 726 เบส แต่ในการทดสอบใช้ restriction enzyme ดังกล่าว ไม่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง และวิธีการ (2.) ด้วยการปักชำศึกษาการเกิดอาการของท่อนพันธุ์ในโรคเรือนทดลองเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าใบและกิ่งที่แตกออกมาเป็นปกติ จากผลการทดลองครั้งนี้จึงสรุปว่ายังไม่พบโรคแตกพุ่มฝอย (Phyllody) ที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา แต่อาจเกิดจากการเข้าทำลายของศัตรูพืชชนิดอื่นเพราะจะสังเกตพบเพลี้ยแป้งจำนวนมากบริเวณแตกพุ่มฝอย และอาจมีการเข้าทำลายซ้ำจากเชื้อโรคอื่นร่วมด้วย จึงพบบริเวณท่อน้ำท่ออาหารของพืชบริเวณที่แตกพุ่มฝอยนั้นเป็นสีน้ำตาล

การทดลองที่ 3.2.7 พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยกรดนิวคลีอิกตัวตรวจ

อ้อยเป็นพืชอุตสาหกรรมหลักอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทยที่นำรายได้เข้าประเทศในปีหนึ่งๆ มากกว่าหมื่นล้านบาท และในปัจจุบันอ้อยยังเป็นวัตถุดิบที่สำคัญอย่างหนึ่งในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล จากศักยภาพดังกล่าวจึงต้องมีการขยายพื้นที่ปลูกให้เพิ่มมากขึ้นซึ่งส่วนใหญ่อยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่ผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยพื้นที่ปลูกกลับมีแนวโน้มลดลง ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้อ้อยสูญเสียผลผลิตไปมาก คือ ปัญหาของโรค ใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา ในปัจจุบันยังไม่มีเทคโนโลยีใดที่สามารถแก้ไขปัญหานี้

ได้ ดังนั้นวิธีการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคที่ดีที่สุด คือ การปลูกอ้อยโดยใช้ท่อนพันธุ์ที่ปราศจากโรคควบคู่กับการจัดการในแปลงผลิต ดังนั้น วิธีการตรวจสอบที่มีความแม่นยำจึงสามารถตรวจการปนเปื้อนโรคโดยทำการออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย คือ ยีนในส่วน *secA* gene โดยออกแบบไพร์เมอร์ 2 คู่ คือ SecA-F & SecA-R และ SecAfor1 & SecArev3 ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 เบส และ 800 เบส ตามลำดับ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลใน genbank พบว่าเหมือน Sugarcane grassy shoot phytoplasma และ Sugarcane white leaf phytoplasma อยู่ในระดับ 97-98 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า expect value เท่ากับ 0.0 เมื่อนำมาสร้างกรดนิวคลีอิกตัวตรวจ พบว่า มีประสิทธิภาพการแสดงผลตรวจเทียบเท่ากับกรดนิวคลีอิกตัวตรวจในส่วนของ 16S rDNA ทั้งนี้ตามการสร้างกรดนิวคลีอิกตัวตรวจจากยีน *secA* gene ถือว่าเป็นอีกหนึ่งเครื่องมือที่สามารถนำมาใช้บูรณาการร่วมกันเพื่อยืนยันผลการตรวจสอบหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยทำให้ผลทดสอบที่ได้มีความถูกต้องและแม่นยำเพิ่มมากขึ้น

การทดลองที่ 3.2.8 การตรวจสอบเชื้อไวรัส Watermelon silver mottle virus (WSMoV)ที่เป็นสาเหตุโรคของพืชตระกูลแตงด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา

สำรวจและเก็บตัวอย่างแตงโมที่แสดงอาการคล้ายกับทอสโพไวรัสเข้าทำลายจากพื้นที่ปลูกภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยรวม 4 จังหวัด ได้แก่ ขอนแก่น สกลนคร มหาสารคาม และกาฬสินธุ์ รวมจำนวนทั้งหมด 78 อย่าง เพื่อนำมาตรวจหาเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) สาเหตุโรคในพืชตระกูลแตง ด้วยเทคนิค Double antibody-sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent (DAS-ELISA) พบว่า ตัวอย่างที่ตรวจสอบเป็น positive จำนวน 39 ตัวอย่าง แล้วนำไปสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain (RT-PCR) ด้วยคู่ไพร์เมอร์ WSMoV-N-F/WSMoV-N-R ที่มีความจำเฉพาะเจาะจงกับส่วน N gene ของเชื้อไวรัส WSMoV พบว่า สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 700 เบส ได้ทั้ง 39 ตัวอย่าง จึงทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega) และส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม พบว่า ตัวอย่างที่ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นส่วน N gene ของเชื้อไวรัส WSMoV ทั้ง 39 ตัวอย่างมีอาการที่แสดงลักษณะยอดและเนื้อเยื่อใบเป็นแผลไหม้ ตายจากปลายยอดเข้ามา ผลมีขนาดเล็ก รูปร่างผิดปกติ มีจุดแผลสะเก็ดเงิน จากการทดลองครั้งนี้พบว่า เทคนิค DAS-ELISA และ RT-PCR สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัส WSMoV ในพืชตระกูลแตงได้อย่างแม่นยำและมีประสิทธิภาพสูง

การทดลองที่ 3.2.9 การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* โดยเทคนิค multiplex PCR

แบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้ง (Bacterial leaf Blight disease) และแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* สาเหตุโรคใบขีดโปร่งแสง (bacterial leaf streak disease) ของข้าว เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางกักกันพืช ดังนั้นจึงต้องมีวิธีการตรวจสอบแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* เพื่อป้องกันการไม่ให้สายพันธุ์อื่นจากต่างประเทศเข้ามาในประเทศ การทดลองนี้เป็นการนำเทคนิค multiplex PCR มาใช้เพื่อการตรวจสอบแบคทีเรียทั้งสองชนิดในหลอดเดียวกัน โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ Xo3756F/ Xoc3756R, Xoo80F/ Xoo80R Xoc3866F/ Xoc3866R และ Xoc3864F/ Xoc3864R ผลการทดลองพบว่า วิธี Multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ สามารถใช้ตรวจสอบแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ได้ และมีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* โดยไพรเมอร์ Xoo80F/ Xoo80R เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ไพรเมอร์ Xoc3866F/ Xoc3866R และ Xoc3864F/ Xoc3864R เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzicola* ส่วนไพรเมอร์ Xo3756F/ Xoc3756R เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรียทั้งสองชนิด มีความไวในการตรวจ แบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอในระดับ 5 pg และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลแบคทีเรียที่ตรวจได้คือ 240 และ 320 CFU/ปฏิกิริยา ตามลำดับ

การทดลองที่ 3.2.10 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ในหัวพันธุ์ปทุมมาด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

การทดสอบใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจสอบเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2556 – กันยายน 2558 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิคงที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิสพบแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะคล้ายขั้นบันได การทดสอบความจำเพาะในการตรวจพบว่าเทคนิค LAMP มีความจำเพาะเจาะจงสามารถตรวจสอบเชื้อ *R. solanacearum* ที่พบในประเทศไทยได้ถูกต้องทุกสายพันธุ์และไม่เกิดผลบวกกับเชื้อในการตรวจ พบว่าเมื่อเติมสารเรืองแสงในตัวอย่างที่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเกิดขึ้น สารมีการเปลี่ยนแปลงโดยปรากฏการเรืองแสงของสารเป็นสีเขียว ส่วนตัวอย่างที่ไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสารดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิส

การทดลองที่ 3.2.11 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Grapevine yellow speckle viroid* (GYSVd) เชื้อสาเหตุโรคในองุ่นด้วยวิธีอณูชีววิทยา

เชื้อ *Grapevine yellow speckle viroid* 1 (GYSVd-1) และ *Grapevine yellow speckle viroid* 2 (GYSVd-2) เป็นเชื้อสาเหตุโรค “grapevine yellow speckle disease” ในองุ่น พบได้ทั่วไปในหลายพื้นที่ที่มีการปลูกองุ่น สามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางท่อนพันธุ์และวัสดุอุปกรณ์เกษตรที่ปนเปื้อนเชื้อได้ง่าย ทำให้

เชื้อไวรอยด์ดังกล่าวสามารถแพร่กระจายโรคได้ง่ายและรวดเร็ว ประกอบกับในปัจจุบันมีผู้ศึกษาเชื้อดังกล่าวน้อยมาก ทำให้มีข้อมูลผลกระทบของโรคชนิดนี้น้อยตามไปด้วย ดังนั้นการศึกษาพัฒนาวิธีการในการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ มีความถูกต้องแม่นยำสูง จึงมีความจำเป็นต่อการศึกษาเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิด จากการสำรวจโรคไวรัสและไวรอยด์ในพื้นที่ปลูกองุ่นในพื้นที่จังหวัดสระบุรีและนครราชสีมา เดือนกุมภาพันธ์และมีนาคม ปี 2557 ตรวจพบองุ่นแสดงอาการผิดปกติ ใบมีจุดเหลือง (chlorosis) กระจายทั่วใบ เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคอณูชีวโมเลกุลโดยการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB method และปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ GYSVd1 (c-GYSVd1: CGAGGCTCACTCCCCCTCTGCC / h-GYSVd1: TCGTCGACG AAGGGGTGCACTCC) และ GYSVd2 (upper) (c-GYSVd2 (upper): GGTCCGCGGAGGCCTTCCGAGG / h-GYSVd2 (upper): TGCAGAGAAAAGAAGAAGGGCCCAG) สามารถตรวจพบเชื้อ GYSVd-1 จำนวน 6 ตัวอย่าง และ GYSVd-2 จำนวน 11 ตัวอย่าง จากตัวอย่างใบองุ่นทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง โดยเชื้อ GYSVd-1 ที่ตรวจพบมีขนาดตั้งแต่ 353-389 นิวคลีโอไทด์ และเชื้อ GYSVd-2 มีขนาดตั้งแต่ 362-365 นิวคลีโอไทด์ และมีความเหมือนกับเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 ในฐานข้อมูลของ GenBank ที่ 93-99% และ 98-99% ตามลำดับ ซึ่งการสำรวจในครั้งนี้เป็นการตรวจพบเชื้อ GYSVd-2 ครั้งแรกในประเทศไทย

การทดลองที่ 3.2.12 การจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟฝ้าย *Trips palmi* Karny ในประเทศไทยโดยเทคนิค Real-time PCR

เพลี้ยไฟฝ้าย Thrips palmi Karny (Thysanoptera: Thripidae) เป็นศัตรูพืชที่สำคัญสามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิด ปัจจุบันเป็นปัญหาที่สำคัญของกล้วยไม้ส่งออก สำนักงานอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention: IPPC) ได้กำหนดวิธีตรวจวินิจฉัยเพลี้ยไฟชนิดนี้โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเรียกว่า real-time PCR assay for Thrips palmi ลงใน ISPM No.27: Annex 01 อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการทดลองอย่างจริงจังเกี่ยวกับวิธีการนี้กับเพลี้ยไฟฝ้ายสายพันธุ์ในประเทศไทยมาก่อน การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเทคนิค real-time PCR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟฝ้ายสายพันธุ์ในประเทศไทย เพื่อให้ได้วิธีการที่เหมาะสม แม่นยำและมีเสถียรภาพ ดำเนินการทดลองระหว่างเดือน ตุลาคม 2556 – กรกฎาคม 2558 โดยใช้ตัวอย่างเพลี้ยไฟฝ้ายที่เก็บจากแหล่งปลูกกล้วยไม้ตัดดอกเพื่อการส่งออกที่สำคัญ ในเขตปริมณฑลกรุงเทพฯ ผลการทดลองพบว่า เมื่อนำไพรเมอร์และโพรบทั้งชนิด COI (Cytochrom oxydase Subunit I) และ SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) ทดสอบในปฏิกิริยา real-time PCR เพื่อตรวจจับ DNA ของเพลี้ยไฟฝ้าย พบว่าสภาพที่แนะนำโดย ISPM สามารถตรวจพบเพลี้ยไฟฝ้ายได้โดยไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดให้ค่า Cp ต่ำกว่า 35 การทดสอบความไวของปฏิกิริยาพบว่าที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ COI และ SCAR ได้แก่ 900 และ 300 nM ตามลำดับ โดยใช้โพรบความเข้มข้นเท่ากันคือ 100 nM ส่วนการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยา โดยใช้ตัวอย่างเพลี้ยไฟฝ้าย 5 ตัวอย่างทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเปรียบเทียบกับเพลี้ยไฟชนิดอื่นอีก 14 ตัวอย่าง พบว่าไพรเมอร์และโพรบทั้ง 2 ชนิดมีความเฉพาะเจาะจงในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายโดยไพรเมอร์ COI มีค่า

Cp อยู่ระหว่าง 23.92 – 27.76 และไพรเมอร์ SCAR มีค่า Cp อยู่ระหว่าง 25.14 – 28.25 ผลการทดลองนอกจากได้วิธีการในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายในกล้วยไม้ตัดดอกก่อนการนำเข้าและส่งออกแล้วยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการตรวจวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชกักกันที่สำคัญชนิดอื่นๆ ในอนาคต

กิจกรรมย่อยที่ 3.3 การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูธรรมชาติโดยอณูชีววิธี

การทดลองที่ 3.3.1 การจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* ที่พบในประเทศไทย โดยเทคนิค PCR

จากคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ของกรมวิชาการเกษตรที่สามารถควบคุมหนอนกระทู้หอมและหนอนกระทู้ผักได้มากกว่า 80% จำนวน 11 และ 153 isolate ตามลำดับ นำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าโคโลนีมีสีขาวขุ่น ผิวด้าน ขอบไม่เรียบ ขนาดประมาณ 0.5-0.8 เซนติเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร NB 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อทั้งหมดสร้างผลึกโปรตีนเป็นรูป พีระมิดคู่ (Bipyramid) ขนาดเล็ก และขนาดใหญ่ ปะปนกัน และเชื้อบางไอโซเลท มีผลึกโปรตีนทั้งรูป bipyramid และ rhomboid ปะปนกัน เมื่อนำไปทดสอบกับหนอนกระทู้หอมและหนอนกระทู้ผักวัย 2 พบว่า ไม่มี isolate ใดสามารถทำให้หนอนกระทู้หอมตายมากกว่า 80% มี 63 isolate ที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตายตั้งแต่ 80% ทดลองนำเชื้อ 5 isolate ไปตรวจสอบด้วยวิธี PCR จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis พบว่าเชื้อทั้ง 5 isolate มี *cry* โปรตีนเป็นชนิด *Cry 1AC* ซึ่งเป็นชนิดที่สามารถควบคุมหนอนผีเสื้อได้ดี

การทดลองที่ 3.3.2 การจำแนกเชื้อ Nucleopolyhedrovirus ที่พบในประเทศไทยโดยเทคนิค PCR

การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนกระทู้ผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย และหนอนกระทู้หอมในห้องปฏิบัติการโดยใช้อาหารเทียม และทดสอบเชื้อไวรัสกับหนอนกับหนอนทั้ง 3 ชนิด พบว่าไวรัสเอ็นพีวีหนอนกระทู้ผัก ความเข้มข้น $1x10^{9}$ ผลึก ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 93.33% ไวรัสเอ็นพีวีหนอนกระทู้หอม ความเข้มข้น $1x10^{7}$ ผลึก ทำให้หนอนกระทู้หอมตาย 93.33% และไวรัสเอ็นพีวีหนอนเจาะสมอฝ้าย ความเข้มข้น $1x10^{6}$ ผลึก ทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตาย 96.67% เมื่อเปรียบเทียบกับหนอนที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัส และหนอนกระทู้ผักใช้เวลามากกว่าไวรัสชนิดอื่นๆ ในการทำให้หนอนตาย

การสำรวจและเก็บตัวอย่างหนอนที่มีอาการผิดปกติ เป็นโรคจากแปลงปลูกผัก แปลงไม้ดอก ของเกษตรกรในภาคเหนือ และภาคตะวันตก พบหนอนตายจำนวน 12 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ไม่พบผลึกไวรัส และทดสอบการเกิดโรคกับหนอนกระทู้หอม และหนอนกระทู้ผักในห้องปฏิบัติการ พบว่าทำให้หนอนตายน้อยกว่า 30% จึงไม่นำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์

กิจกรรมย่อยที่ 4 การพัฒนาเทคนิคอย่างง่ายและรวดเร็วในการแยกศัตรูพืชเพื่อการวินิจฉัย

การทดลองที่ 3.4.1 การพัฒนาชุดตรวจสอบและเทคนิคการแยกไส้เดือนฝอยในรากพืช

การทดสอบวิธีการแยกไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* ออกจากรากพืชส่งออก 4 ชนิด ได้แก่ พรรณไม้น้ำ กล้วยประดับ หน้าวัว และฟิโลเดนดรอน ที่ทำการปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยจำนวน 200 ตัว/ต้น บริเวณรากของพืชทดสอบเป็นเวลา 2-3 เดือน และนำรากพืชที่ถูกเข้าทำลายมาทดสอบแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากโดยวิธีซอยรากละเอียด นำไปแช่และเขย่าในแอลกอฮอล์ 5% คลอร็อกซ์ 0.5% อะบาเม็กติน 0.3% และฟิโปรนิล 0.3% พบว่าการเขย่ารากเป็นเวลา 3 นาที ด้วยแอลกอฮอล์ 5% สามารถแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพืชทดสอบได้ดีที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 73 62 48 และ 78 % ของรากพรรณไม้น้ำ กล้วยประดับ หน้าวัว และฟิโลเดรนดอน ตามลำดับ รองลงมาคือ อะบาเม็กติน 0.5 % เท่ากับ 35 24 18 และ 42 % ของราก พรรณไม้น้ำ กล้วยประดับ หน้าวัว และฟิโลเดรนดอน ตามลำดับ และมีความแตกต่างกับความเข้มข้นอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำวิธีการเขย่ารากพรรณไม้น้ำ (*Anubias nana*) ซอยละเอียดในแอลกอฮอล์ 5% เป็นเวลา 3 นาที เปรียบเทียบกับวิธีใช้ Ultrasonic 20 นาที วิธีพ่นหมอกบนรากพืช 48 ชั่วโมง และวิธีปั่นรากและหมุนเหวี่ยงด้วยสารละลายน้ำตาล พบว่า การใช้แอลกอฮอล์ 5% เขย่า 3 นาที สามารถแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากได้ 51.2 ตัวต่อราก 10 กรัม มากกว่าวิธีพ่นหมอก 4 เท่า และเป็นวิธีที่ใช้วัสดุ-อุปกรณ์ที่มีต้นทุนต่ำกว่าวิธีใช้ Ultrasonic และวิธีการหมุนเหวี่ยงด้วยสารละลายน้ำตาล แต่มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการนำไปใช้ในการตรวจแยกไส้เดือนฝอยกักกันในภาคสนามได้อย่างเหมาะสม

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เป็นงานวิจัยพื้นฐานทางด้านอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และนิเวศวิทยาของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ และศึกษาพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ในการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ดำเนินการระหว่างปี พ.ศ.2554 – 2558 ภายในระยะเวลา 5 ปี จะได้ผลผลิตและผลสำเร็จ ดังนี้

1. ได้ทราบชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน ลักษณะความแตกต่าง พืชอาศัย เขตการแพร่กระจายของศัตรูพืช (แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช) เป็นองค์ความรู้และเป็นข้อมูลสำคัญต่อการจัดทำระบบฐานข้อมูลศัตรูพืช ศัตรูธรรมชาติ และแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ ของกรมวิชาการเกษตร สามารถนำมาใช้อ้างอิงทางวิชาการ สำหรับนักอนุกรมวิธานและนักวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2. ได้ตัวอย่างและข้อมูลรายละเอียดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เก็บ-รักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์อย่างน้อย 150 ชนิด 4,000 ตัวอย่าง

- ตัวอย่างแมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช อย่างน้อย 195 ชนิด 4,000 ตัวอย่าง
- ตัวอย่างศัตรูธรรมชาติ (แมงมุม และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง) 35 ชนิด 300 ตัวอย่าง

3. ได้แนวทางวินิจฉัย (Key) ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ สำหรับนักอนุกรมวิธานและนักวิจัยที่เกี่ยวข้อง

4. ได้ข้อมูลความหลากชนิดของแมลง ที่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สามารถนำมาใช้อ้างอิงทางวิชาการ

5. ได้ข้อมูลรายละเอียดด้านชีววิทยา และนิเวศวิทยาของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาวิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและงานวิจัยด้านอื่นๆ เช่น งานวิจัยด้านกักกันพืช

6. ได้นักวิจัยที่เชี่ยวชาญเฉพาะด้าน เช่น นักอนุกรมวิธาน ซึ่งสามาถตรวจวิเคราะห์และตรวจสอบความถูกต้องของชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการส่งตัวอย่างไปจำแนกวิเคราะห์ต่างประเทศ

ผลสำเร็จของโครงการวิจัยนี้ เป็นผลสำเร็จตามวัตถุประสงค์ คือได้องค์ความรู้ด้านอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และนิเวศวิทยาของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่ได้ศึกษาวิจัย และได้ตัวอย่างศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ รวมทั้งได้เทคนิคใหม่ๆ และชุดตรวจสอบศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังได้นักอนุกรมวิธานที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะกลุ่มอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ ลาชโรจน์. 2552. โรคใบจุดสีเทาของพริก. Available Source: http://www.oard1.org/techniquestory/28052552/oksitel/Index4.htm. August 24, 2009.

กรรณิการ์ เพี้ยนภักตร์, วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคหน้า. 2528. รวบรวมและจำแนกเชื้อราต่างๆ ที่เป็นสาเหตุโรคมะละกอ, หน้า 26-37. *ใน* รายงานผลงานวิจัย พ.ศ.2528. กลุ่มงานวิทยาไมโค. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร.

กรรณิการ์ เพ็งคุ้ม, โกวิทย์ พงษ์แสวง และวินัย จิตชื่น. 2542. การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงบางชนิดและน้ำมันปิโตรเลียมในการป้องกันกำจัดเพลี้ยหอยสีเขียว, *Coccus viridis* (Green) (Homoptera :Coccidae) ในกาแฟอาราบิก้า. วารสารกีฏและสัตววิทยา 21(3): 181 – 189.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2547. แผนยุทธศาสตร์การพัฒนาอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์สมุนไพร. คณะกรรมการพัฒนาอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์สมุนไพร. กระทรวงสาธารณสุข. 120 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร. 2542. นโยบายการอารักขาพืชของกรมวิชาการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 20 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร. 2552. เพลี้ยไฟ. การเก็บและจำแนกตัวอย่างแมลงจำพวกปากดูดศัตรูพืชนำเข้าและส่งออก ครั้งที่ 3 ระหว่างวันที่ 19 – 21 พฤษภาคม 2552. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. 29 หน้า.

_____. 2552. คู่มือการผลิตไม้ดอกแกลดิโอลัส. แหล่งที่มา: http://www.eto.ku.ac.th/neweto/e-book/

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. ยุทธศาสตร์สับปะรด Pineapple National Strategy 2547-2551. 51 หน้า

กลุ่มวิจัยวัชพืช. 2548. คำแนะนำการป้องกันกำจัดวัชพืชและการใช้สารกำจัดวัชพืช ปี 2547. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. 133 หน้า.

กองกีฏและสัตววิทยา. 2544. แมลงวันผลไม้ในประเทศไทย. เอกสารวิชาการกองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ 244 หน้า.

กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์ และอัมพร วิโนทัย. 2544. การแก้ไขปัญหาการระบาดของหนอนชอนใบบนพื้นที่สูงภาคเหนือ. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. กรุงเทพฯ. 42 หน้า.

กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์, ปิยรัตน์ เขียนมีสุข, สมศักดิ์ ศิริผลตั้งมั่น, อุทัย เกตุนุติ, อัจฉรา ตันติโชดก และลักษณา วรรณภีร์. 2540. การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูหอมแดงโดยวิธีผสมผสาหน้า. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 85-91.

กิตติพงษ์ ศิริวานิชกุลม และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2528. โรคของถั่วลันเตาในท้องที่ภาคเหนือของประเทศไทย. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 13 หน้า.

กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร, สุรภี กีรติยะอังกูร และ นวลจันทร์ ดีมา 2532. การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ PVX, PVY ด้วยวิธี EM, IEM และ ELISA. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2532. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า. 103-109

กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร, สุรภี กีรติยะอังกูร และเยาวภา ตันติวานิช. 2549. GLIFT kit เพื่อการตรวจสอบเชื้อไวรัส Potato virus Y ในมันฝรั่ง. วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 24 (2) : 168-177.

เกลียวพันธ์ สุวรรณรักษ์. 2546. วัชพืชในไร่อ้อยและการป้องกันกำจัด. กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ, 33 หน้า.

ขจรศักดิ์ ภวกุล, พิพัฒน์ เชี่ยงหลิว, สุรชาติ คูอาริยะกูล, สุพัตรา อินทวิมลศรี, สมสิทธิ์ ชำนาญศิลป์ และสุชาติ วิจิตรานนท์. 2522. โรคเหี่ยวของฝรั่งเวียตนาม, หน้า 372-373. *ใน* รายงานประจำปี 2522. กองโรคพืช. กรมวิชาการเกษตร.

คนึงนิตย์ เหรียญวรากร. 2527. โรคของส้มโอและการผลิตส้มโอให้ปราศจากโรค. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ 62 หน้า.

คณะเภสัชศาตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2538. สยามไภษัชยพฤกษ์ ภูมิปัญญาของชาติ. ภาควิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. อมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์ พับลิชชิ่ง จำกัด. 272 หน้า.

เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์ และวันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2545. โรคไวรัสที่สำคัญของพืชผักและพืชน้ำมันหน้า. กองโรคพืชและจุลชีวิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 88 หน้า.

ฉวีวรรณ หุตะเจริญ 2539. ผลกระทบจากชนิดพันธุ์ต่างถิ่นต่อความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้. หน้า 70-79.*ใน* รายงานการประชุมวิชาการ “ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นในประเทศไทย” สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 24-26 ตุลาคม 2539. โรงแรมอมารีออคิด รีสอร์ท พัทยา.

ชลิดา อุณหวุฒิ. 2534. เพลี้ยไก่แจ้ส้ม แมลงพาหะโรคใบเหลืองต้นโทรม.วารสารกีฏและสัตววิทยา ปีที่ 13 ฉบับที่ 4 ประจำเดือน ตุลาคม-ธันวาคม 2534.กองกีฏและสัตววิทยา. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

ชลิดา อุณหวุฒิ ชมัยพร บัวมาศ ลักขณา บำรุงศรี และ สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์. 2555. อนุกรมวิธานเพลี้ยแป้ง สกุล *Phenacoccus,* หน้า 1712-1716. *ใน* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2554 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ชลธิชา รักใคร่, อุดร อุณหวุฒิ, สุรพล ยินอิศวพรรณ, จำลอง ลภาสาธุกุล และณัฏฐพร อุทัยมงคล. 2550. การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูสำหรับการนำเข้าองุ่นผลสดจากประเทศสหรัฐอเมริกา. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2550. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. เล่ม 2:1084-1096 หน้า.

ชมพูนุท จรรยาเพศ. 2538. หอยทากศัตรูพืช. เอกสารประกอบการบรรยาย การฝึกอบรมหลักสูตรอารักขาพืช สัตว์ศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 11 หน้า.

ชมพูนุท จรรยาเพศ, ปราสาททอง พรหมเกิด, ธีรเดช เจริฐรักษ์, เสริมศักดิ์ หงส์นาค และปิยาณี หนูกาฬ. 2542. ชีววิทยา การแพร่กระจายและการป้องกันกำจัดหอยทากและทากในไม้ผลส่งออก. รายงานผลการค้นคว้าวิจัยประจำปี 2542 . กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ชมพูนุท จรรยาเพศ ปิยาณี หนูกาฬ. 2545. ชีววิทยาหอยทากซัคซิเนียศัตรูกล้วยไม้. รายงานผลการวิจัย กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร. 304 หน้า.

โชติชัย สุวรรณาภรณ์ . 2552. ผลกระทบ และแนวทางการแก้ไขปัญหา Climate Change. สำนักงานเศรษฐกิจการคลังแหล่งที่มา http://www.nidambe11.net/ekonomiz/2007q2/2007may11p4.htm. 9 กันยายน 2552

ณรงค์ สิงห์บุระอุดม. 2527. โรคเน่าแห้งดำของถั่วแขก. วารสารโรคพืช 4: 123-132.

ณรงค์ สิงห์บุระอุดม. 2528. โรคเน่าที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในการผลิตถั่วแขกฝักสดเพื่ออุตสาหกรรมแช่แข็ง วารสารโรคพืช 5 (4): 150-159

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์ ปิยะรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ วิชัย โฆสิตรัตน และ วงศ์ บุญสืบสกุล. 2548. การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม โดยวิธี Polymerase Chain Reaction. วารสารโรคพืช. 19 (1-2): 35-46.

ณัฐกฤต พิทักษ์ และ อนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ. 2544. เอกสารวิชาการ แมลงศัตรูอ้อยโรงงาน อ้อยเคี้ยว อ้อยคั้นน้ำ และการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูข้าวโพดและพืชไร่อื่นๆ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 102 หน้า

ดาราพร รินทะรักษ์ ชมพูนุท จรรยาเพศ ปิยาณี หนูกาฬ. 2548. ชีววิทยาหอยเลขหนึ่ง *.ใน* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2550 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เล่ม 3. หน้า 1500 - 1505

ดวงพร สุวรรณกุล. 2543. ชีววิทยาวัชพืช พื้นฐานการจัดการวัชพืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 178 หน้า.

เดชา วิวัฒน์วิทยา. 2539. มดตัวห้ำของมอดป่าเจาะต้นสัก (*Xyleutes ceramicus*). วารสารเกษตรศาสตร์ 30 (3) : 330–335.

เดชา วิวัฒน์วิทยา และ วาลุลี โรจนวงศ์. 2542. โครงการความหลากหลายของมดในบริเวณอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ รหัสโครงการ BRT 141003. คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เดชา วิวัฒน์วิทยา และ วียะวัฒน์ ใจตรง. 2544. คู่มือจัดจำแนกมดบริเวณอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่. ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.นาวี หนุนอนันต์. 2546. ชนิดและความชุกชุมของมดตามฤดูกาลในป่าบาลา เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าฮาลา-บาลา จังหวัดนราธิวาส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ทวีศักดิ์ ชโยภาส. 2544. แมลงศัตรูปาล์มน้ำมันในประเทศไทย. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 126 หน้า.

ทิพวรรณ บุญกอง. 2547. การควบคุมคุณภาพของชุดการติดเชื้อเอชไอวี ‘Biotine HIV1/2”, Thai : Medical Technologist Letteer; ข่าวสารเพื่อสมาชิกในกลุ่มบริษัทเบรีย.

ทักษิณ อาชวาคม ชมพูนุท จรรยาเพศ ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐและ เกษม ทองทวี. 2532. สำรวจชนิดหอยทากศัตรูพืช. *ใน* รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 101-114.

ทัศนาพร ทัศคร และ สุรภี กีรติยะอังกูร. 2548. โรคกล้วยไม้. หน้า 3-31. *ใน* โรคไม้ดอก. เอกสารวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ.

ทัศนาพร ทัศคร, อภิรัชต์ สมฤทธิ์, ธารทิพย ภาสบุตร และสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ. 2547. การศึกษาชนิดของโรคหน่อไม้ฝรั่งเพื่อการส่งออก. หน้า. 1037-1079 *ใน* รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม สำนักวิจัยพัฒนา-การอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

ทัศนีย์ แจ่มจรรยา. 2537. การระบาดของแมลงชนิดใหม่: หนอนชอนใบ. ว. แก่นเกษตร 22:118-121.

นลินี ศิวากรณ์, ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา และปรีชา สุรินทร์. 2537. โรคทานตะวันหน้า. ข่าวสารโรคพืช และจุลชีววิทยา 4 (4): 21.

นวลฉวี เวชประสิทธิ์, 2549. หลักการพื้นฐานและปฏิบัติการทางพันธุวิศวกรรม. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง 494 หน้า

นวลพรรณ งามยิ่งสุ่หน้า. 2527. การสำรวจและการปลูกเชื้อโรคผลเน่าขององุ่นพันธุ์ไวท์มะละกอและการควบคุมด้วยสารเคมี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 110 หน้า.

นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2526. การสำรวจโรคของไม้ผลบนเกษตรที่สูง, หน้า 420-427. *ใน* รายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 21 สาขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

นิพนธ์ วิสารทานนท์ และสุรชาติ คูอาริยะกุล. 2526. การทดสอบการเป็นโรคยางไหลด้วยเชื้อรา *Botryodiplodia theobromae* Pat. ที่แยกจากอาการยางไหล กิ่งแห้งและขั้วผลเน่ากับมะม่วงพันธุ์เขียวเสวย, หน้า 297-306. *ใน* รายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 21 สาขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

นิยม จิ้วจิ้น และ ฤกษ์ ศยามานนท์. 2513. โรคยางพารา. เอกสารทางวิชาการ เล่มที่ 10. กองพืชพันธุ์. กรมกสิกรรม. 25 หน้า.

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด. กลุ่มวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพมหานคร. 50 หน้า.

_____. 2547. โรคของกล้วยไม้และการป้องกันกำจัด. หน้า 47-74. *ใน* เอกสารวิชาการ กล้วยไม้. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

นิรนาม. 2547. การควบคุมวัชพืชในมันสำปะหลัง, หน้า 68-70. *ใน* คำแนะนำการป้องกันกำจัดวัชพืชและการใช้สารกำจัดวัชพืช. กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

นิรนาม. 2550. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2550. ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร 115 หน้า.

นิรนาม. 2551 สถิติการค้าสินค้าเกษตรไทยกับต่างประเทศ ปี 2551 ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร 115 หน้า.

นิรนาม. 2552. วิธีป้องกันกำจัด" เพลี้ยแป้งมันสำปะหลัง" ที่ระบาดอย่างแรง. ข่าวเกษตร หนังสือพิมพ์เดลินิวส์ ประจำวันที่ 13 พฤษภาคม 2552.

นิภา จันท์ศรีสมหมาย, ไพศาล รัตนเสถียร, จาตุรงค์ ฤกษ์สังเกต, สุปราณี อิ่มพิทักษ์, อัจฉรา ตันติโชดก, อุทัย เกตุนุติ, กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์, ปิยรัตน์ เขียนมีสุข และ มานิตา คงชื่นสิน. 2543. การป้องกันแมลงศัตรูถั่วฝักยาวโดยวิธีผสมผสาน. หน้า 175–197. *ใน* : รายงานผลการดำเนินงานการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน ครั้งที่ 3. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

นิตยา กันหลง. 2545. โรคสำคัญของพืชสกุลหอมและกระเทียมในประเทศไทย. เอกสารวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 96 หน้า.

นิวัฒ เสนาะเมือง และพิศาล ศิริธร. 2529. โรคงาและการป้องกันกำจัด. แก่นเกษตร 14 (6): 296-298.

นุชนารถ จงเลขา. 2546. คู่มือการควบคุมโรคและศัตรูต่างๆของพืชผักแบบผสมผสาน. สำหรับเจ้าหน้าที่ส่งเสริมผักบนที่สูง. ศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง. 163 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2544. อนุกรมวิธานไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง STEINERNEMATID. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 63 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และวราภรณ์ ประกอบ. 2552. การใช้คลื่นเสียงตรวจแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชจากรากพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออก. เอกสารงานประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9, อุบลราชธานี. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และวานิช คำพานิช. 2551. การพัฒนาเครื่องมือและเทคนิคการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ติดมากับพืชนำเข้าและส่งออก. ผลงานวิจัยฉบับเต็ม ปี 2551, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 26 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด, พรพิมล อธิปัญญาคม และ สาโรจน์ ประชาศรัยสรเดช. 2543. งานวิจัยและพัฒนาไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. Thai isolate เพื่อควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี. หน้า 31-32. *ใน :* รายงานประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา 8-10 มีนาคม 2543 ณ โรงแรมลองบีช เพชรบุรี. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

บุปผา เหล่าสินชัย. 2540. การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยศัตรูมะม่วง. วารสารกีฏและสัตววิทยา 19 (4): 196 -211.

บุปผา เหล่าสินชัย วิทย์ นามเรืองศรี และ ม.ร.ว. จิราพันธ์ จันทรทัต. 2526. การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของตั๊กแตนหนวดสั้นในนาข้าวในประเทศไทย. กลุ่มงานอนุกรมวิธานและวิจัยไร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 18 หน้า.

บรรพต ณ ป้อมเพชร. 2539. ชนิดพันธุ์ต่างถิ่น: การควบคุมโดยชีววิธี. หน้า 85-97.*ใน* รายงานการประชุมวิชาการ “ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นในประเทศไทย” สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 24-26 ตุลาคม 2539. โรงแรมอมารีออคิด รีสอร์ท พัทยา.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และจงวัฒนา พุ่มหิรัญ 2551. การศึกษาโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ประชุม จุฑาวรรธนะ. 2530. การศึกษาโรค Charcoal stalk rot และ Anthracnose stack rot ของข้าวโพดและข้าวฟ่างที่เกิดจากเชื้อรา *Macrophomina phaseolona* (Tissi) Goid และ *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ. 117 หน้า.

ประเสริฐ อวภาค และเกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์. 2546. ประสบการณ์และแนวทางการป้องกันกำจัดหนูของเอกชน. จดหมายข่าวปาล์มน้ำมัน. 4(2) : 9-11.

ปราสาททอง พรหมเกิด และยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ. 2536. ศึกษาการป้องกันกำจัดสัตว์ฟันแทะ โดยการใช้สารกำจัดหนูร่วมกับการใช้กรงดัก, หน้า.160-197 . *ใน.* รายงานประจำปี 2536. กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ปราสาททอง พรหมเกิด กรแก้ว เสือสะอาด ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ ทรงทัพ แก้วตา , 2553 ศึกษาความแปรปรวนของลักษณะภายนอกในประชากรหนูนาใหญ่ *Rattus argentiventer* ในเอกสารการประชุมสัมมนาวิชาการอารักขาพืช สะนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร. หน้า 80-83.

ปรียพรรณ พงศาพิชณ์. 2543. การพัฒนากรดนิวคลีอิคตัวตรวจสำหรับวินิจฉัยทอสโพไวรัสในมะเขือเทศและพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ. 71 หน้า.

พเยาว์ พรหมพันธุ์ใจ และ ทัศนีย์ แจ่มจรรยา. 2543. ศึกษาฤดูกาลระบาดและการพ่นสารป้องกันกำจัดหนอนเจาะฝักถั่วมารูคา (*Maruca vitrata* Fabr.) ในถั่วพุ่ม. หน้า. 184-192. *ใน* รายงานการประชุมวิชาการถั่วเขียวแห่งชาติ ครั้งที่ 8. นครปฐม. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

พนมกร วีระวุฒิ สุพัตรา อินทวิมลศรี และ ชาญชัย บุญยงค์. 2530 (ก). การสำรวจเพลี้ยอ่อน เพลี้ยกระโดดส้ม และหนอนชอนใบส้ม.รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย ปี 2530. หน้า27-32. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูไม้ผลและพืชสวนอื่นๆ กองกีฏและสัตววิทยา. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 120 หน้า.

พนมกร วีระวุฒิ ไมตรี พรหมมินทร์ พัฒน์พงษ์ ภัทรโกศล และ ชาญชัย บุญยงค์. 2530(ข). การศึกษาชีววิทยาและการเพิ่มปริมาณแตนเบียนของเพลี้ยกระโดดส้ม.รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย ปี 2530. หน้า 22-26. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูไม้ผลและพืชสวนอื่นๆ กองกีฏและสัตววิทยา. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 120 หน้า.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2542. โครงการจัดการโรคใบขาวของอ้อย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา. ขอนแก่น 219 หน้า.

พรพิมล อธิปัญญาคม และศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. 2552. อนุกรมวิธานราสาเหตุโรคพืช Class Ascomycetes. เอกสารวิชาการ, หน้า. 73 – 77.*ใน* รายงานการประชุมสัมมนาวิชาการอารักขาพืช ณ โรงแรม เมธาวลัยอำเภอชะอำ จังหวัดเพรชบุรี วันที่ 1-3 มิถุนายน 2552. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ. 2544. โรคของมะเขือเทศที่เกิดจาก tomato spotted wilt virus. รายงานประจำปี 2544. ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

พัฒนา สนธิรัตน, วิรัช ชูบำรุง, ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน, และปิยะ เกียรติก้อง. 2526. เชื้อรา *Alternaria* ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดของพืชผักบางชนิด. วารสารโรคพืช 3 (4) : 154-167.

พัฒนา สนธิรัตน์, ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน, ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์, วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคหน้า. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 285 หน้า.

เพ็ญศรี นันทสมสราญ. 2546. สมุนไพรกับคนไทย (ตอนที่ 1) . กสิกร. 76(6) : 97-103.

_____. 2547. สมุนไพรกับคนไทย (ตอนจบ) . กสิกร. 77(1) : 72-81.

_____. 2549. สมุนไพรที่ใช้ตามอาการของโรค. กสิกร. 79(2) : 43-53.

_____. 2550. วัชพืชสมุนไพร. กสิกร. 80(1): 103-110.

_____. 2552. การจัดการวัชพืชในพืชสมุนไพร. เอกสารประกอบการฝึกอบรมวัพืชเสำคัญและการจัดการในพืชเศรฐกิจ 77-94 หน้า.

เพ็ญศรี นันทสมสราญ และอำไพ ประเสริฐสุข. 2552. ศึกษา การจัดการวัชพืชในฟ้าทะลายโจร. การประชุมวิชาการอารักขาพืช “อารักขาพืช หลากผลผลิตเพื่อเศรฐกิจยั่งยืน” 121-126 หน้า.

ภรณี ประสิทธิ์อยู่ศีล. 2544. ความหลากหลายและการกระจายของมดในบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มนตรี จิรสุรัตน์. 2536. โครงการวิจัยชีววิทยาและการป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้. รายงานผลการทดลอง ปี 2535 กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

_____. 2544. ฐานข้อมูลแมลงวันผลไม้ในประเทศไทย, หน้า. 168 – 233. *ใน* แมลงวันผลไม้ในประเทศไทยผลไม้ในประเทศไทย. เอกสารวิชาการกองกีฏและสัตววิทยา. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพ. 244 หน้า.

มนตรี จิรสุรัตน์ และโอชา ประจวบเหมาะ. 2541. แนวทางการป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้ในแปลงมะม่วงเพื่อการส่งออก. วารสารกีฏและสัตววิทยา 20(3) : 201-204.

ลำพึง เรียงวงษ์, สุภาภรณ์ เอี่ยมเข่ง และ อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์. 2547. การสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียวในระบบเซลล์แบคทีเรีย. รายงานการประชุม ทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. 3-6 กุมภาพันธ์ 2547. หน้า 110-117.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ, ปราสาททอง พรหมเกิด, ชมพูนุท จรรยาเพศ และเสริมศักดิ์ หงส์นาค. 2536. การสำรวจการใช้สารกำจัดหนูของเกษตรกรในสวนส้มเขียวหวาหน้า. รายงานประจำปี 2529. กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 144-158.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค กรแก้วเสือสะอาด เกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์ ปิยาณี หนูกาฬ และพวงทอง บุญทรง .2544. หนูและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย 136 หน้า.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด .2539. การศึกษาชนิดของโปรโตซัวที่เป็นปรสิต ในหนูพุกใหญ่และหนูพุกเล็ก. หน้า 25-40 ในรายงานผลการวิจัย ปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค T. Jaekel กรแก้ว เสือสะอาด ปราสาททอง พรหมเกิด และชูวิทย์ สุขปราการ. 2542. การใช้โปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ชีวินทรีย์กำจัดหนู ชนิดใหม่เพื่อควบคุมหนูในประเทศไทย. 43 หน้า.

รุ้งนภา พูลจำปา .2545. การใช้มดเป็นตัวบ่งชี้สังคมพืช ในบริเวณอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2539. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. ประชุมทองการพิมพ์ 2 หน้า.

วิทย์ นามเรืองศรี และบุษบง มนัสมั่นคง. 2540. การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูอุ่นโดยวิธีผสมผสาหน้า. เอกสารทางวิชาการ การป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาหน้า. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 122-134.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2546. ราวิทยาเบื้องต้หน้า. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 351 หน้า.

_____. 2551. ราวิทยาเบื้องต้หน้า. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

วิชัย โฆษิตรัตหน้า. 2531. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 133 หน้า.

วิภาดา วังศิลาบัตร. 2541. ความหลากหลายของชนิดแมงมุมในระบบนิเวศพืชเศรษฐกิจบางชนิด. การประชุมสัมมนาทางวิชาการ แมลง และสัตว์ศัตรูพืช ประจำปี 2541. ครั้งที่ 11 กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 121 – 144 หน้า.

_____. 2544. แมงมุมในสวนส้ม. เอกสารวิชาการ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพ. 108 หน้า.

_____. 2551. การศึกษาชนิด ชีววิทยา และประสิทธิภาพการกินของแมงมุมตัวห้ำต่อแมลงวันผลไม้ในสวนมะม่วง. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชากาเกษตร. หน้า 356 – 388.

วิภาดา วังศิลาบัตร มานิตา คงชื่นสิน เทวินทร์ กุลปิยวัฒน์ และพิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์. 2548. การศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในข้าวอินทรีย์. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม 2548 เล่มที่ 1. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 471- 513.

วิมล สีเทา. 2548. การตรวจวินิจฉัยและจำแนกทอสโพไวรัสของพริก มะเขือ แตงโม และถั่วลิสง ที่พบในประเทศไทย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

วิมล สีเทา พิสสวรรณ เจียมสมบัติ อรประไพ คชนันท์ อัญจนา บุญชด นุชนารถ วารินทร์ ปิยาภรณ์ เพชรสูงเนิน และชาญณรงค์ ศรีภิบาล. 2547. การจำแนกทอสโพไวรัสที่พบในพริก มะเขือเทศ และพืชตระกูลแตง, หน้า. 445-451 *ใน* การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 42. 1-4 กุมภาพันธ์ 2547 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

วิเชียร บำรุงศรี เตือนจิตต์ สัตยาวิรุทธ์ ศรีสมร พิทักษ์ สาทร สิริสิงห์ และวรัญญา ตันติยุทธ. 2543. แมลงศัตรูถั่วเขียวและการป้องกันกำจัด. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ. 44 หน้า.

วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2546. โรคเหี่ยว : ภัยคุกคามต่อการปลูกสับปะรดของไทย. วารสารโรคพืช (17) 1-2 : 48-53.

วัฒนา จารณศรี มานิตา คงชื่นสิน เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และพิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์. 2544. ไรศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด. เอกสารวิชาการของกองกีฏและสัตววิทยา ปี พ .ศ. 2544. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 192 หน้า.

ศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา, บุษบง มนัสมั่นคง และศรุต สุทธิอารมณ์. 2551. ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลง
และสารสกัดธรรมชาติกับแมลงศัตรูที่สำคัญในส้มเขียวหวาน. *ใน* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551.
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)

ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2545. โรคของผักและการควบคุมโรค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 182 หน้า.

ศิริพร ซึงสนธิพร. 2550. ผักแว่นใบมัน : พืชใหม่ของไทย. *ใน* เอกสารการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8. อารักขาพืชไทยใต้ร่มพระบารมี 5-8 พฤศจิกายน 2550.

_____. 2550. พืชต่างถิ่นที่รุกรานในประเทศไทย (Invasive alien Plants in Thailand). Available Source: http://as.doa.go.th/human/may/07-08-51/siriporn.pdf. August 20, 2009.

_____. 2552. พืชต่างถิ่น: วัชพืชในประเทศไทย. *ใน* เอกสารประกอบการฝึกอบรม วัชพืชสำคัญและการจัดการในพืชเศรษฐกิจ, วันที่ 29-30 เมษายน 2552 โดย กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรงเทพฯ, 205 หน้า.

ศิริพร ซึงสนธิพร, วินัย สมประสงค์ และปราโมทย์ ไตรบุญ. 2546. ก้นจ้ำขาวดอกใหญ่..วัชพืชชนิดใหม่ของไทย, หน้า478-489. *ใน* เอกสารการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 6 “หนึ่งทศวรรษแห่งการอารักขาพืชในประเทศ” 24-27 พฤศจิกายน 2546. ขอนแก่น

ศิริพร ซึงสนธิพร, วินัย สมประสงค์ และปราโมทย์ ไตรบุญ. 2550. การสำรวจพืชต่างถิ่นในประเทศไทย (ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ). หน้า 944-971. *ใน* รายงานประจำปี 2549 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

ศิริณี พูนไชยศรี. 2544. เพลี้ยไฟ *Terebrantia*. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. กรุงเทพฯ. 75 หน้า.

_____. 2545ก. พิพิธภัณฑ์นิทรรศการแมลง. แผ่นพับ. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. พิมพ์ครั้งที่ 1.

_____. 2545ข. พิพิธภัณฑ์แมลง. แผ่นพับ. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. พิมพ์ครั้งที่ 2.

_____. 2547. การเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษาวิจัย. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ. 32 หน้า.

_____. 2548. ทิ้งถ่วง. กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ศิริณี พูนไชยศรี และชลิดา อุณหวุฒิ. 2551. ด้วงงวงขั้วผลส้ม (Fuller Rose Weevil) *Pantomorus cervinus* (Boheman); Coleoptera: Curculionidae. แหล่งที่มา http://it.doa.go.th/pibai/pibai/n11/v_11-oct/korkui.html

ศิริณี พูนไชยศรี ชลิดา อุณหวุฒิ พรรณเพ็ญ ชโยภาส รัตนา นชะพงษ์ ลักขณา บำรุงศรี สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี ยุวรินทร์ บุญทบ และณัฐวัฒน์ แย้มยิ้ม. 2548. แมลง การจำแนก และการเก็บตัวอย่าง. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. กรุงเทพฯ. 100 หน้า.

ศิริณี พูนไชยศรี, ยุวรินทร์ บุญทบ, สุนัดดา เชาวลิต และ สุพี วนศิรากุล. 2549. ตัวอย่างแมลงต้นแบบ.โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว วังทองหลาง. กรุงเทพฯ. 48 หน้า.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, ทักษิณา ศันสยะวิชัย, วีระพล พลภักดี, สุนี ศรีสิงห์, นฤทัย วรสถิตย์ และมัทนา วานิชย์. 2551. การสำรวจโรคใบขาวและความทนทานต่อโรคของอ้อยป่าและอ้อยลูกผสม. รายงานผลงานวิจัย ปี 2551 เล่มที่ 1, ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น, สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3. หน้า 306 – 323.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา, วันเพ็ญ ศรีทองชัย, ทักษิณา ศันสยะวิชัย และสุนี ศรีสิงห์.

2552ก. การโคลนอิมมูนโนโกลบูลินยีนส์จากบีเซลล์ที่สร้างแอนติบอดี้ต่อเชื้อไฟโตพลาสมาเพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบโรคใบขาวในอ้อย. รายงานความก้าวหน้า.โครงการวิจัยปีงบประมาณ 2552 รอบ 9 เดือน กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, ทักษิณา ศันสยะวิชัย และสุนี ศรีสิงห์. 2552ข. การตรวจสอบความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยและ host อื่นจากแหล่งระบาดต่างๆ. รายงานความก้าวหน้า. โครงการวิจัยปีงบประมาณ 2552 รอบ 9 เดือน กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ. 2546. พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน สวนพฤกษศาสตร์ภาคตะวันออก (เขาหินซ้อน) อำเภอ พนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา. 101 หน้า.

สถาบันแพทย์แผนไทย. 2542.(ก) ผักพื้นบ้านภาคกลาง. สถาบันแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, กรุงเทพฯ. 278 หน้า.

_____. 2542.(ข) ผักพื้นบ้านภาคใต้. สถาบันแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, กรุงเทพฯ. 278 หน้า.

_____. 2542.(ค) ผักพื้นบ้านภาคเหนือ. สถาบันแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, กรุงเทพฯ. 280 หน้า.

สมุทร มงคลกิติ. 2524. ตั๊กแตนที่สำคัญและการป้องกันกำจัด. เอกสารประกอบการบรรยาย ในการอบรมเรื่อง “แมลง-สัตว์ศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด” กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 26 หน้า.

สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2542. พรรณไม้น้ำในประเทศไทย. อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ. 312 หน้า.

สุดา ลุยศิริโรจนกุล สนทนา ศิริตันติกร และระวิวรรณ ขันหยก. 2547. การตรวจวินิจฉัยไข้หวัดนกของห้องปฏิบัติการ. Thai : Medical Technologist Letteer; ข่าวสารเพื่อสมาชิกในกลุ่มบริษัทเบรีย. ปีที่ 15: กรกฎาคม- กันยายน.

สุเนตรา ภาวิจิตร, สุทธิพงษ์ ญาณวารี และศิริลักษณ์ โล่สวัสดิ์. 2532. การศึกษาสาเหตุโรคเน่าของกล้วยไม้สกุลหวายทางเคมีและฟิสิกซ์. รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัย กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. หน้า 30-40.

สุรภี กีรติยะอังกูร, ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และกิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร. 2547. GLIFT kit ตรวจไวรัสของกล้วยไม้ใน 5 นาที. ผลงานวิจัยเพื่อพิจารณาเป็นผลงานวิจัยดีเด่นประจำปี 2547.

สุรภี กีรติยะอังกูร, วันเพ็ญ ศรีทองชัย, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และเยาวภา ตันติวานิช. 2551. รายงานผลวิจัยเรื่องเต็ม “โครงการผลิต GLIFT kit เพื่อวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจเชิงพาณิชย์” กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 67 หน้า.

สุรภี กีรติยะอังกูร, กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร และนวลจันทร์ ดีมา. 2533. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบโรค Cymbidium mosaic virus ของหวายลูกผสมและสาวน้อยเต้นระบำ.รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2532. กองโรคพืชและ จุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. หน้า 115-122.

สุรภี กีรติยะอังกูร ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และกิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร. 2547. GLIFT kit ตรวจไวรัสของกล้วยไม้ใน 5 นาที. ผลงานวิจัยเพื่อพิจารณาเป็นผลงานวิจัยดีเด่นประจำปี 2547.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล,2545 . จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี, ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 115 หน้า

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2546. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2544/2545. เอกสารสถิติการเกษตร เลขที่ 3/2545 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 51 หน้า.

โสธร ประเสริฐผล. 2512. การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชด้วยเชื้อจุลินทรีย์. กสิกร 42(3) : 289-305.

โสภณ วงศ์แก้ว. 2536. โรคไวรัสของถั่วลิสงในประเทศไทย. กลุ่มพืชน้ำมัน กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 44 หน้า.

โสภณ วงศ์แก้ว และจุฑารัตน์ เชื้อพงษ์. 2536. ไวรัสสาเหตุโรคยอดไหม้ของถั่วลิสงและการสำรวจการแพร่ระบาดของโรควิสาของถั่วลิสง ปี 2535-2536. หน้า 233-238. *ใน* รายงานการสัมมนางานวิจัย ถั่วลิสง ครั้งที่ 11, 17-21 พฤษภาคม 2536. ระนอง.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2546. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2544/2545. เอกสารสถิติการเกษตร เลขที่ 3/2545 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 51 หน้า.

สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี. 2550 แมลงหวี่ขาว. เอกสารวิชาการ ประกอบการอบรมหลักสูตร การเก็บรักษาและจำแนกตัวอย่างแมลงจำพวกปากดูดและไรศัตรูพืชนำเข้าและส่งออก. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 24 หน้า

สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2526. แมลงศัตรูพืชทางการเกษตรของประเทศไทย. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์กรุงเทพฯ. 424 น.

สมพิศ ไม้เรียง และเพ็ญศรี นันทสมสราญ. 2548. พืชสมุนไพร..ในแผนยุทธศาสตร์ชาติ. กสิกร. 78(6):72-83.

สมภพ ประธานธุรารักษ์ และพร้อมจิตร ศรลัมพ์. 2547. สมุนไพรการพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ที่ยั่งยืน เฟื่องฟ้าการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 163 หน้า.

เสริมศักดิ์ หงส์นาค. 2543 ประวัติการป้องกันกำจัดหนูในประเทศไทย.หน้า 1-35.ในเอกสาร ประกอบการประชุมสัมมนาเรื่องหนูศัตรูพืชและมนุษย์ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

แสน ติกวัฒนานนท์. 2529. พืชอาหารของแมลงวันทองชนิดต่างๆ ในประเทศไทย. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 4 (1): 1-15 .

องุ่น ลิ่ววานิช. 2531. แมลงกินได้. กสิกร 61(6):545-551.

_____. 2540. การอนุรักษ์แมลงในประเทศไทย. ว.กีฏและสัตววิทยา. 19(2): 89 – 94.

_____. 2543. แมลงอนุรักษ์. เอกสารแผ่นพับ. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. พิมพ์ครั้งที่ 2.

อมรรัตน์ ภูไพบูลย์. 2552. รา *Phytophthora* สาเหตุโรคพืชในประเทศไทย. เอกสารประกอบการฝึก อบรมหลักสูตร การวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากราสกุล PHYTOPHTHORA และ PYTHIUM ระหว่างวันที่ 19-

21 พฤษภาคม 2552. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 74 หน้า.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์, ทวี เก่าศิริ และพัชราภรณ์ ลีลาภิรมย์กุล. 2548. พริกหวานที่อำเภอแม่ริม..เหี่ยว. กสิกร 78 (6) : 63-67.

อรพรรณ วิเศษสังข์ และจุมพล สาระนาค. 2550. โรคยอดและดอกเน่าในพริก. เคหการเกษตร 31(9): 221-223.

อังศุมาลย์ จันทราปัตย์. 2550. ไรการเกษตร. ภาคกีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 315 หน้า

อัจฉรา ตันติโชดก. 2527. การศึกษาความคงทนของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* บนกะหล่ำปลีในสภาพไร่. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย ปี 2527. กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. หน้า 110-114.

อัจฉรา ตันติโชดก. 2539. แบคทีเรียควบคุมแมลงศัตรูพืช. เอกสารทางวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 163-182.

อัจฉรา ตันติโชดก และอุทัย เกตุนุติ. 2537. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียสูตรผงละลายน้ำในการควบคุมหนอนกระทู้หอมบนองุ่นหน้า. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2537. กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. หน้า 22-29.

อุดม ภู่พิพัฒน์ และ วาย อาร์ เมธา. 2510. ผลการสำรวจและโรคที่พบใหม่ของข้าวโพด, หน้า 45-48. *ใน* รายงานประจำปี 2510. งานวิจัยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อุดม ภู่พิพัฒน์ , วาย อาร์ เมธา และ เลขา ศาตะนิมิ. 2510. ผลการสำรวจและโรคที่พบใหม่ของข้าวฟ่าง, หน้า 54-55. *ใน* รายงานประจำปี 2510. งานวิจัยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อุดร อุณหวุฒิ. 2551. การควบคุมการนำเข้าพืชเข้ามาในราชอาณาจักร ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507

ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551. *ใน* เอกสารประกอบการสัมมนา “พระราชบัญญัติกักพืชและแนวปฏิบัติที่ใช้ในปัจจุบัน” 6-8 พฤษภาคม 2551 ณ โรงแรมมารวยการ์เด้น กรุงเทพฯ.

อำไพวรรณ ภราดรนุวัฒน์, วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล, วิเชียร กำจายภัย, สุพัฒน์ อรรถธรรม และนิพนธ์ ทวีชัย 2527, โรคส้มในประเทศไทย. โรงพิมพ์ หจก. พันนีพับลิชชิง, กรุงเทพฯ. 126 หน้า.

อุทิศ กุฎอินทร์. 2542. นิเวศวิทยาพื้นฐานเพื่อการป่าไม้. คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กรุงเทพฯ.

Agassiz, D., 1982. *Parapoynx stagnalis* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae): acorrection. Entomologist’ Gaztte, 33(2): 122.

Agosti, D. 2000. Biodiversity studies, monitoring, and ants: An overview, pp. 1-8. *In* D. Agosti, L.E. Alonso, J. D. Majer, and T. R. Schultz, eds. Ants: Standard Methods for Measuring and Monitoring Biodiversity. Smithsonian Institution Press, United Satate of America.

AICAF. 1996. Weed in the Tropics. Association for International Cooperation of Agriculture & Forestry. Sanbi Printing, Japan. 304 pp.

Akhurst, R.J. and N.E. Boemare. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. Pages 75-90. *In* : Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Anderson, A. N. 1997a. The ants as bioindicators of ecosystem restoration following mining: A fuctional group approach, pp. 319-325. *In* P, Hale and D, Lamb, eds. Convention Outside Nature Reserves. Centre for Conservation Biology, The University of Queensland.

_____. 1997b. Using ants as bioindicators: Multiscales issues in ant community ecology. Conversation Ecology. Available Source: http://www.consecol.org/vol1/iss1/art8, June 19, 1997.

Anderson, A. N. 2000. A global ecology of rainforest ants: Functional group in relation to environmental stress and disturbance, pp. 25-34. *In* D. Agosti, L. E. Alonso, J. D. Majer, and T. R. Schultz, eds. Ants: Standard for Measuring and Monitoring Biodiversity. Smithsonian Institution Press, United State of America.

Anonymous. 2003 . *Australian Weed Management*. Available Source :http:// www.weeds.gov.au/.../alert/p-clematidea.html. 20 August 2009.

Anonymous. 2004. Cucumber Mosaic Virus. 2 p. Available Source:www.avrdc.org/pdf/pepper/CMV.pdf

Anonymous. 2009. Gardens' Bulletin Singapore. J. Veldkamp, Vol. 51, 119-124. Available Source:http://www.weeds.org.au/cgibin/weedident.cgi?tpl=plant.tpl&state=&s=&ibra=all&card=H33.28 August 2009.

Anonymous. [15 screens]. Available Source:http://www.indexf ungorum.org/ Names/Names.asp. 21 Aug 2009.

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 FAO Office for Asia and the Pacific (RAPA), 56 pp.

Arneodo, J.D. S. de Breuil, S.L. Lenardon, V.C. Conci and L.R. Conci. 2005. Detection of Bean yellow mosaic virus and Cucumber mosaic virus infecting gladiolus in Argentina. AGRISCIENTIA, VOL. XXII (2): 87-89.

Asahina, S. 1961. The Odonata from Thailand. Nature and Life in Southeast Asia. 1:209-223.

Austin, A. D., Johnson, N. F., & Dowton, M. (2005) Systematics, evolution, and biology of scelionid and platygastrid wasp (Hymenoptera). *Annual Review of Entomology*, 50: 553–582.

Baayen, R. ,P., Bonants, P. J. M., Verkley, G., Carroll, G. C., Van der Aa, H. A., Weerdt, M., van Brouweeershaven, I. R., Schutte, G. C., Maccheroni, W.,Jr., Glienke de Blanco, C., and Azevedo, J. L. 2002. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitant endophyte bof woody plants, G. *mangifera* (*Phyllosticta* capitalensis). Phytopathology 92:264-477

Badawai, A. 1981. Studies on some aspects of the biology and ecology of the citrus butterfly *Papilio demoleus* L. in Saudi Arabia (Papilionidae, Lepidoptera) Z. Angew. Ent. 91:286-292.

Bailey, J.A. and M.J. Jeger. 1992. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. CAB International, Kew. 380P.

Ballantyne, L.A. 1992 Revisional studies on flashing fireflies (Coleoptera: Lampyridae). Doctoral

Dissertation. Uni-versity of Queensland, St. Lucia, Brisbane, Australia. 420 pp.

Barker, K.R. 1985. Nematode extraction and bioassays. p. 19-35 in K.R. Barker, C. C. Carter and J. N. Sasser, eds. An Advanced Treatise on Meloidogyne, Vol. II Methodology. North Carolina State University Graphics, Raleigh, NC.

Bauernfeind, A., I. Schneider, R. Jungwirth, and C. Roller. 1999. Discrimination of Burkholderia gladioli from other Burkholderia species detectable in cystic fibrosis patients by PCR. J. Clin. Microbiol. 36:2748-2751.

Beardsley, J.W. 1993. The pineapple mealybug complex; taxonomy, distribution and host relationships. Acta Hort. (ISHS) 334:383-386.

Beattie, A. J. and D. C. Culvler. 1977. Effects of the mound nests of the ant *Formica obscuripes* on the surrounding vegetation. Am. Midl. Nat. 97(2): 390-399.

Beaver and Maleckar,1981. *Sarcocystis singaporensis* Zaman & Colley(1975) 1976.*Sarcocystis villivillosi* sp.p, and *Sarcocystis zamani* sp.n.:Development, morphology and persistence in the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. J.l of Parasitology, 67: 241-256.

Bedding, R.A. 1981. Low cost *in vitro* mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica* 27 : 109-114.

Berke, T.G., L.L. Black, R.A. Morris, N.S. Talekar and J.F. Wang. 2003. Suggested Cultural Practices for Sweet Pepper. 5 p. Available Source: http://www.avrdc.org.tw/LC/pepper/swtpepper.pdf

Betta, Y. A. 2004. *Cladosporium tenuissimum* Cooke (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a causal organism of new disease on cucumber fruits. European Journal of Plant Pathology 110:1003-1009.

Bin, F. & Johnson, N.F. (1982) Potential of Telenominae in biocontrol with egg parasitoids (Hym.,Scelionidae). *In*; Institut National de la Recherche Agronomique. 1982. Les trichogrammes. Ier symposium international, Antibes, 20-23 avril 1982. *Les Colloques de l'INRA*, pp. 275–287.

Bird, G. W. 1971. Influence of incubation solution on the rate of recovery of Pratylenchus brachyurus from cotton roots. Journal of Nematology 3 : 378-385.

Blancard, D., H. Lecoq., and M. Pitrat. 1994. A Colour Atlas of Cucurbit Diseases. John Wiley & Sons, New York, USA. 299 pp.

Bolland, H. R., J. Gutierrez. and C. H. W. Flechtmann. 1998. World Catalogue of the Spider Mite Family (Acari: Tetranychidae). Koninklijke Brill NV. Netherlands. 392 pp.

Bonants, P.J.M., G.C. Carroll, M. de Weerdt, I R van Brouwershaven and R.P. Baayen. 2003. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa/* European Journal of Plant Pathology, 109: 503-513.

Bourque, S.N, J.R. Valero, J.Mercier, M.C.Lavoie and R.C.Levesque. 1993. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide Bacillus thuringiensis. Appl. Environ. Microbiol. 59:523-527.

Branham, M. A., and J. W. Wenzel. 2003. The origin of photic behavior and the evolution of sexual communication in fireflies (Coleoptera: Lampyridae). Cladistics 19: 1-22.

Brehm and Frank .1980. Der Entwicklungskreislauf von *Sarcocystis singaporensis* Zaman & Colley 1976, in End- and Zwischenwirt. Zeitschr.fuer Parasittenkunde, 62 ;15-30.

Briese, D.T. 1982. The Effect of Ants on the Soil of Semi-Arid Saltbush Habitat. Insectes Sociaux 29 : 375-382.

Britton, K.O., F.F. Hendrik, P.L. Pusey, Okie W.R., Reilly, and J.W. Daniell. 1990. Evaluating the reaction of peach cultivars to infection by three *Botrysphaeria* species. HortScience 25: 468-470.

Bronstein, J. L. 1998. The Contribution of ant-plant protection studies to our understanding of mutualism. Biotropica 30(2): 15-161.

Brooks, T.M., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Gustavo A. B. da Fonseca, Rylands, A.B., Konstant, W.R., Flick, P.,Pilgrim, J., Oldfield, S., Magin, G. & Craig Hilton-Taylor. 2002. Habitat Loss and Extinction in the Hotspots of Biodiversity. Conservation Biology, 16(4), 909–923.

Brown, E.A. and K.O. Britton. 1986. *Botryosphaeria* diseases of apple and peach in the Southeastern United State, Plant Disease 70: 480-484.

Brunt, A.A., K. Crabtree, M.J. Dallwitz, A.J. Gibbs and L. Watson. 1995. Viruses of Plants: Discriptions and Lists from the VIDE Database. University Press, Cambridge, U.K. 1484 pp.

Buddenhagen, I.W. 1986. Bacterial wilt revisited. In: Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an International Workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines, 8-10 October 1985 (Ed. by Persley, G.J.), 126-143 pp. ACIAR Proceedings 13.

Buddenhagen, I.W and A. Kelman. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt
caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 2 : 203-230.

Buddenhagen, I.W., L. Sequeira, and A. Kelman. 1962. Designation of races of *Pseudomonas solanacearum.* Phytopathology 52 : 726.

Burgs, H.D. 1998. Formulation of Microbial Biopesticides. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherland.

CAB International. 1998. CABPEST CD (CD-rom). Oxon, UK.

CAB international. 2007. Crop Protection Compendium 2003 Edition. (Computer Program). CAB International. Wallingford, UK.

Caballero, P., Zuidema, D., Santiago-Alvares, C. and Vlak, J.M. 1992. Biochemical and biological characterization of four isolates of Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus. Biocontrol Science and Technology 2, 145-157.

Campos, V.P., and L. Villain. 2005. Nematode parasites of coffee and cocoa. PP. 529-579. in Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture, 2nd edition. M. Luc, R.A. Sikora and J. Bridge, eds. CAB International.

Carroll, P. D. 1980. Biological notes on the spiders of some citrus groves in central and southern California. Ent. News. 91: 147 - 154.

Cerovska, N., T. Moravec, P. Rosecka, P. Dedic and M. Filigarova. 2003. Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of Potato mop-top virus. Journal of Phytopathology 151 (4) : 195-200.

Chak, K.F., D.C. Chao, M.Y. Tseng, S.S. Kao, S.J.Tuan and T.Y.Feng. 1994. Determination and distribution of cry – type genes of Bacillus thuringiensis isolates from Taiwan. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2415-2420.

Chander, S. 2009. Mealybug status in offseason/weed host. Available Source: http:// www.ncpm.org.in

Chandrasrikul, A. 1962. A preliminary host list of plant diseases in Thailand. Tech. Bull. No. 9, Dept. of Agr., Bangkok. 14 pp.

Charles, A. T. and N. F. Johnson. 2005. Borror and Delong's Introduction to the Study of Insects. 7th ed. Brooks/Coles. USA. 864 pp.

Chase, A.R. 1998. Alternaria Diseases of Ornamentals *Western Connection turf & Ornamentals*, A Monthly publication 1(3). Available Sourc http://www.westernfarmservice.com/newsletters/turf/alternaria.pdf. August 24, 2009.

Chaweewan , H. , T. Nopachon and Chutima D. 2007. Checklists of Insects and Mites in Thailand. Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation Minisrty of Natural Resources and environment. 77-80.

Chaval *et al*. 2009 . A Multi – Approach Survey as the most Reliable Tool to Accurately Assess

Biodiversity : an Example of Thai Murine Rodents . Kasetsart J.(Nat.Sci) 44 : 590-603 (2010)

Cherry, H. R. and R. V. Dowell. 1979. Predators of citrus blackfly (Hom: Aleyrodidae). Entomophaga 24 : 385 - 391.

Christenson, L.O. and R.H. Forte. 1960. Biology of fruit flies. Ann. Rev. Eentomol. 5: 171-192.

Chu, Y. and C. Okuma. 1970. Preliminary survey on the spider fauna of the paddy fields in Taiwan. Mushi 44 (9) : 65 – 88.

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.

Chunram, C. 1972. A list of plant parasitic nematodes in Thailand. Plant Protection Service Technical Bulletin No.1 Pp. 23-26. The Plant Industry Division. Ministry of Agriculture, Thailand.

Clark, M.F and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. J .Gen. Virol. 34 : 475-483.

Common, I.F.B. 1990. Moths of Australia. Melbourne University, Australia . 535 pp.

Compere, H. 1940. Parasite of the Back Scale, *Saissetia oleae*, in Africa. Hilgardia 13: 387-425.

Cock,A.G. 1966. Genetical aspects of metrical growth and form in animals. Quart.Rev.Biol. 41:131-190.

Cook, D.R. and L. Sequeira. 1988. The use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in taxonomy and diagnosis. ACIAR Bacterial Wilt Newsletter 4(4).

_____. 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum* (Ed. by Hayward, A.C.; Hartman, G.L.), p. 77-93. CAB International, Wallingford, UK.

Cortes, I., I.C. Livieratos, A. Derks, D. Peters and R. Kormelink. 1998. Molecular and serological characterization of iris yellow spot virus, a new distint tospovirus species. Phytopathology 88: 1276-1282.

Creech, J.E. and W.G. Johnson. 2006. Survey of broadleaf winter weeds in Indiana production fields infested with soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) . Weed Technol. 20: 10966-1075.

Crous P.W., A. Aptroot, J-C Kang, U. Braun, M.J. Wingfield. 200. The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. Stud Mycol. 45: 107-121.

Cubero, J. and J.M. Graham. 2002. Genetic relationship among worldwide strains of Xanthomonas causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1257-1264.

Culik, M.P. and P. J. Gullan. 2005. A New Pest of Tomato and other Records of Mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) from Esp'rito Santo, Brazil. Zootaxa 964: 1-8.

Damm U., R. Baroncelli, L. Cai, Y. Kubo, R. O'Connell, B.Weir, K. Yoshino and P. F. Cannon. 2010. *Colletotrichum*: species, ecology and interactions. IMA Fungus 1 (2) : 161–165'

Dammerman. K. W. 1929. The agricultural zoology of the Malay Archipelago.

Darwin, C. 1859. On the Origin of Species. Facsimile of 1st ed. Harvard Univ. Press, Cambridge 513 p.

Das, G.M. 1959. Observations on the Association of Ants with Coccid of Tea. Bulletin of Entomological Research 50: 437-448.

Daxiang, S., Z. Mingsheng and C. Jun. 1999. The spiders of China. Hebei Science and Technology Publishing House. 640 pp.

De Barjac, H., and E. Frachon. 1990. Classification of Bacillus thuringiensis strains. Entomophaga 35:233-240.

De Boer, S. H. and A. Kelman. 2001. *Erwinia* Soft Rot Group. Pp. 59-72. *In* Laboratory guide for
identification of plant pathogenic bacteria third edition. Edited by Schaad, N.W., Jones J. B. and Chun, W. APS Press. Minnesota. 373 pp.

Denman, S., P.W. Crous, J.Z. (E) Groenewald, B. Slippers, B. D. Wingfield, and M.J. Winfield. 2003. Circumscription of *Botryosphaeria* species associated with Proteaceae based on morphology and DNA sequence data. Mycologia 95 (2): 294-307.

Department of Medical Sciences. 2002. Standard of Thai Herbal Medicine. *Senna alata* (L.) Roxb. E.T.O. Press, Bangkok. 80 pp.

Dha, A.K. 2007. Status of mealy bug in Punjab. Available Source:http://www.ncipm.org.in/mealybugPunjab.

Dilokkunanant, U., S. Kladpan, R. Prateepasen and U. Suwanwong. 1996. Pineapple wilt disease in Thailand. Thai. J. Agric. 29: 337-348.

Domsch, K.H., W. Gams and Traute-Heidi Anderson. 1993. Compendium of soil fungi Vol. 1st 2nd Ed. Academic Press, London. 859 p. ; Vol.2 405 p.

Drew, R.A.L. 1989. The Tropical fruit flies (Diptera : Tephritidae : Dacinae) of the Australasian and Oceanian Region. Memoirs of the Queenslan Museum 26. 521 pp.

Druka, A., T. Burns, S. Zhang and R. Hull. 1996. Immunological characterization of rice tungro spherical virus coat proteins and differentiation of isolates from the Philippines and India. J. Gen. Virology. 77: 1975-1983.

Duckett, J. E. and S., Karupiah. 1989. A guide to the planter in utilizing barn owls (*Tyto alba*) as a effective biological control of rats in mature oil palm plantations. Proceeding 1989 PORIM International palm oil, development conference 5 -9 September, 1989. Kuala Lumpur, Malaysia. 15 pp.

Duncan, L. W. and E. Cohn. 1990. Nematode parasites of citrus. p. 321-346 In M. Luc, R.A. Sikora, and J. Bridge, eds. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CAB International, Wallingford, U.K.

Dundee, D.S. and R.J Baerwald. 1984. Observations on a micropredator *Gulella bicolor* (Hutton) (gastropoda: pulmonata: streptaxidae). Nautilus 98: 63-68.

Echandi, E. 1991. Bacterial wilt. In: *Compendium of tobacco diseases* (Ed. by Shew, H.D.; Lucas, G.B.), p. 33-35. EPPO/CABI (1992) *Quarantine pests for Europe* (Ed. by Smith, I.M.; McNamara, D.G.; Scott, P.R.; Harris, K.M.). CAB International, Wallingford, UK.

Economou, E. 1999. Following the leader : Bacterial protein export to through the Sec pathway. Trends Microbiol. 7: 315-320.

Edwards. G. B. 2009. Orb Weavers, *Neoscona crucifera* (Lucas 1839) and *Neoscona H. domiciliorun* (Hentz) (Arachnidae: Araneae: Araneidae) Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville, FL.

Ehara , S. and T. Wongsiri. 1975. The spider mites of Thailand. Mushi. 48 (13) : 149 – 185.

Ellis, M. B. 1971. Dematecеous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 698 pp.

_____. 1976. More Dematecеous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 507 pp.

Errampalli, D. and J. Fletcher. 1993. Production of monospecific polyclonal antibodies against aster yellow mycoplasma-like organsism associated antigen. Phyto Path. 83 : 1279-1282.

Espinosa, A and A.C. Hodges.2009. Trioza erytreae. Available Source : http://riki.bugwood.org/Trioza_erytreae. August, 5, 2009

Evans, K., D.L. Trudgill, and J.M. Webster. 1993. Chapter 1. Extraction, Identification and Control of Plant Parasitic Nematodes. in Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture. CAB International, UK. 648 pp.

Everett, K.R., J. Ress-George. 2006a. Reclassification of an isolate of *Guignardia citricarpa* from New Zealand as *Guignardia mangiferae* by sequence analysis. Plant Pathology 55: 194-199.

Everett, K.R., J. Ress-George. 2006b. Species-specific PCR primers for *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae*. New Zealand Plant Protection 59: 141-145.

Fitzpatrick, E. G., H. R Cherry and R. V Dowell. 1979. Effect of Florida citrus pest control practices on the citrus blackfly (Homoptera: Aleyodidae) and its associated natural enemies. Can. Ent. 111: 731 - 735.

Fogain, R. 2000. Effect of *Radopholus similis* on plant growth and yield of plantains (*Musa*, AAB). Nematology 32: 129-133.

Ford, R., Banniza, S., Photita, W., and P.W.J. Taylor. 2004. Morphological and Molecular Discrimination of Anthracnose Caused by Colletotrichum truncatum from Canadian Lentil**.** *Australasian Plant Pathology,* 33:559-569.

Freeman, S., M. Pham, R.J. Rodriguez. 1993. Molecular genotuping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primered PCR, A +T-rich DNA, and nuclear DNA analyses. Exp. Mycol. 17:309-322

French, E.R., and L. Sequeira. (1968) Bacterial wilt or moko of plantain in Peru. *Fitopatologia* 3, 27-38.

Gabriel, D.W. 1999.. The Xanthomonas avr/pth gene family. Pages 39-55 in: Plant-Microbe Interactions, vol. 4. G. Stacey and N.T. Keen, eds. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.De Leon, C. 1984. Maize Diseases. A guide for field identification. Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo (CIMMYT). 3rd edition. 115 pp.

Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 365 pp.

German, T.L., D.E. Ullman and J.W. Moyer. 1992. Tospovirus: diagnosis, molecular biology, phylogeny and vector relationships. Annual Review of Phytopathology 30 :315-348.

German, T.L., D.E. Ullman and U.B. Gunashinghe. 1992. Mealybug Wilt of Pineapple. Chapter 7 In Advance in Disease Vector Besearch vol. 9. pp. 241-258 ed. by K.F. Harris. Springer-Verlag New York.

GhesquiFre. J. 1942. Catalogues raisonnes de la Faune Entomologique du Congo Belge, Lepidoptera, Microlepidoptera (2nd partie) Annales du Mus, e du Congo Belge C.Zoologie Ser.III(II), Tome VII, fasc.2, 121-240

Gillette,D. D. and J. D. Kimbrough. 1970. Chiropteran mortality. pp. 262-283. *In*. About bats: A Chiropteran bilogy symposium, eds. B. H. Slaughter and D. W. Walton, Dallas: Southern Methodist University Press.

Glaser, R.W. 1931. The cultivation of a nematode parasite of an insect. *Science* 614.

Glienke-Blanco, C., Carlos Ivan Aguilar-Vidoso, Maria LÚcia Carneiro Vieira, Paulo Augusto Vianna Barroso and João LÚcio Azevedo. 2002. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. Genetics and Molecular Biology, 25 (2): 251- 255.

Gonsalves, A.K. and S.A. Ferreira. 2009. *Stemphylium* Primer. Available Source:http://www.extento. hawaii.edu/Kbase/crop/Type/stem_prim.htm. July 2, 2009.

Govindan, R. T.K. Sarayanaswamy. M.R. Gururajarao and S.B. Satenahalli. 1989. Insects infesting wild mung *Vigna vexillata* in India. Environment and Ecology 7(2):513

Gowen, R.S., P. Quénéhervé, and R. Fogain. 2005. Nematode parasites of bananas and plantains. pp. 611-643. in Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture, 2nd edition. M. Luc, R.A. Sikora and J. Bridge, eds. CAB International.

Graham, J.H. and K.E. Zeiders. 1960. Pathogenicity and Morphology of Some Leguminicolous and related Species of *Stemphylium*. *Phytopathology* 50 : 757-761.

Grattidge, R. 1982. Occurrence of a third race of Fusarium wilt of tomatoes in Queensland. Plant Disease 66(2) :165-166. Available Source: http://contact.doae.go.th/cts/upload/1773/1968/733_โรคเน่าเละหรือหน่อเน่า.doc 30 August, 2009.

Greathead, D.J. (1986) Parasitoids in classical biological control. *In*: Waage, J. and Greathead, D.J. (Eds), *Insect Parasitoids.* Academic Press, London, pp. 289–318.

Grzimek, B., D. G. Kleiman, V. Geist, and M. C. McDade. 2004. *Grzimek's Animal Life Encyclopedia.* Detroit: Thomson-Gale

Gyeltshen. J. and A. Hodges. 2006. Fuller Rose Beetle, *Pantomorus cervinus* (Boheman) (Insecta:Coleoptera:Curculionidae), EDIS Publication EENY-375. Available source: http://edis.ifas.ufl.edu/IN678

Habeck, D.H. 1982. Caterpillas of *Parapoynx* in Relation to Aquatic Plants in Florida. Hyacinth Control J. 12:15-18.

Haber,S. and H.Knapen, 1989 . Filter paper sero-assay (FiPSA) : A rapid, sensitive technique for sero –diagnosis of plant viruses. Can. J. plant Pathol. 11:109-113.

Hadley, D. 2009. Habits and Traits of Fireflies, Family Lampyridae. Available source. http://insects.about.com/od/beetles/p/lampyridae.htm

Haefner and Frank. 1984. Host specificity and host range of the genus Sarcocystis in three snake-rodent life cycles. Zb1.Bak.Hyg., Orig. A 256, 296-299.

Hardy, D.E. 1973. The fruit flies (Tephritidae : Diptera) of Thailand and bordering Countries. Pacific Insect Monograph 31 : 355 pp.

Harnes, R.R., 2001. Alismataceae. Flora of Thailand. Vol 7 part 3.

Hartung, J. S., J. F. Daniel. and O. P .Pruvost. 1993. Detection of Xanthomonas campestris pv. citri by the polymerase chain reaction method. Appl Environ Microbiol ;59:1143-8

Hartung, J. S., O. P. Pruvost, , I. Villemot and A.Alvarez, 1996. Rapid and colorimetric detection of Xanthomonas axonopodis p.v. citri by immunocapture and nested – polymerase chain reaction assay. Phytopathology 86:95-101.

Hayward, A.C. 1994a. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (Ed. by Hayward, A.C.; Hartman, G.L.), p. 9-24. CAB International, Wallingford, UK.

Hayward, A.C. 1994b. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (Ed. By Hayward, A.C.; Hartman, G.L.), p. 123-135. CAB International, Wallingford, UK.

Heithaus, E.R. 1979. Community structure of neotropic flower visiting bees and wasps: diversity and phenology. Ecology. 60: 190-202.

Hochleitner,K. and Kraus, H. 2002. Introductory Workshop on Rapid Diagnostic Tests. BGM Company. Bangkok Thailand . 180 pp.

Hodgetts, J., N. Boonham, R. Mumford, N. Harrison and M. Dickson. 2008. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of secA and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma'. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58: 1826-1837.

Hodgson, C., G. Abbas, M.J. Arif, S. Saeed, and H. Karar. 2008. *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Sternorrhyncha: Coccoidea: Pseudococcidae),an Invasive Mealybug Damaging Cotton in Pakistan and India, with a Discussionon Seasonal Morphological Variation. Zootaxa 1913:1-35.

Hofte, H.and H.R. whiteley.1989. Insecticidal crystal protein of Bacillus thuringiensis . Microbial. Rev. 53 : 242-325.

Holm, L., Pancho, J.V., Herberger, J.P. and Plucknett, D.L. 1979. A Geographical Atlas of World Weeds. John Wiley & Sons, New York. 391pp.

Hollodobler, S. O. and E. O. Wilson. 1990 . Ants. Springer Verlage, Berlin. 732 pp.

Hooper, D. J. 1970. Extraction of nematodes from plant material, p. 34-38 in J.F. Southey, ed. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Ministry of Agriculture, Fishery, and Food Technology Bulletin 2, Her Majesty's Stationery Office, London.

Horticultural Research Institute, Department of Agriculture.2003. Amazing Thai Medicinal Plants. Bangkok Thailand, 32 pp.

Howard F.W., D. Moore, R.M. Giblin-Davis and R.G. Abad. 2001. Insect on Palms. CABI Publishing is a division of CAB International, USA. 381 p.

Hu, J.S., D.M. Sether and D.E. Ullman. 1996. Detection of pineapple closterovirus in pineapple plants and mealybugs using monoclonal antibodies. Plant Pathology . 45: 829-836.

Hutacharern, C., N. Tubtim and C. Dokmai.2007. Checklists of Insects and Mites in Thailand. Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Bangkok, Thailand, 319 pp.

IIE, 1995. Distribution Maps of Plant Pests, No. 91. Wallingford, UK: CAB International.

Ie, T.S. 1970. Tomato spotted wilt virus. C.M.I./A.A.B. Description of plant virus. No. 39.

International Council on Medicinal and Aromatic Plants. 2003. A Proceedings of WOCMAP III: The IIIrd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants. Chiang Mai, Thailand. February 3-7, 2003. 191 pp.

Isanont, P., T. Attathom, S. Attathom and W. Chongrattanameteekul. 1997. Comparative studies on the crytal proteins and their encoded genes of Bacillus thuringiensis isolate from Thailand. Thai J. Agric. Sci. 30 : 365 – 378.

Jesen, D.D. and A.H. Gold. 1951. A virus ringspot of odontoglossum orchid symptom, transmission, and electron microscopy. Phytopathology 41 : 648-653.

Jing *et al*. 2006 . Phylogenetic relationships in genus Niviventer (Rodentia : Muridae) in China inferred from complete mitochondrial cytochrome b gene . Molecular phylogenetics and evolution 44 (2007) 521-529

Jirasurat, M. 1994. ACIAR Project PN8919 : Biology and Control of Fruit Flies in Thailand and Malaysia. Final Review Report : Bangkok Activities. During 23-26 February 1994, Maruay Garden Hotel, Bangkok, Thailand. 40 pp.

Johnson, N. F. (2011) Hymenoptera *Online*. [05/05/2011]. < http://hol.osu.edu/>

Johnson, N.F., Masner, L., Musetti, L., Van Noort, S., Rajmohana, K., Darling, D.C., Guidotti, A.E., & Polaszek, A. (2008) Revision of world species of the genus *Heptascelio* Kieff er (Hymenoptera: Platygastroidea, Platygastridae). *Zootaxa*, 1776: 1–51.

Juangbhanich,P and N. Ubolbarn. 1978. Taxonomic Studies on the Causal Fungus of Tomato Leaf Blight and Pathogenicity Test. Kasetsart Journal 12(2): 130-142.

Juthayothin, T. 2004. Molecular Phylogenetics Study of Culicine Mosquitoes Using The Mitochondrial Cytochrome Oxidase I Gene and The Relationships with Mosquito-Borne Flaviviruses. A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of The Requirements The Degree of Master of Science (Environment Biology). Faculty of Graduate Studies. Mahidol University.

Kakizawa, S., K. Oshima, T. Kuboyama, H. Nishigawa, H.-Y. Jung, T. Sawayanagi, T. Tzuchizaki, S.

Miyata, M. Ugaki and S. Namba. 2001. Cloning and expression analysis of phytoplasma

protein traslocation genes. Mol. Plant-Microbe. Interact. 14: 1043-1050.

Kaper, J.M. and H.E. Waterworth. 1981. Chapter 11: Cucumoviruses. Pages 257-332. In : Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. E. Kurstak. ed. Elsevier/North-Holland

Biomedical Press, Amsterdam. 943 pp.

Kathy M. 2009. Fireflies in decline as natural habitats are destroyed. Available source. http://www.independent.co.uk/environment/nature/fireflies-in-decline-as-natural-habitats-are- destroyed-914472.html, 3 October 2009.

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 pp.

Keith, L. M. Sewake, K.T. and Zee. F.T. 2005. Isolation and characterization of Burkholderia gladioli from orchids in Hawaii. Plant Dis. 89: 1273-1278.

Keifer,H.H. E.W. Baker,T. Kono. M. Delfinado and W. E. Styer. 1982. An lllustrated Guide to Plant Abnormalities Caused by Eriophyid Mite in North America. U.S. Government Printing office Washington D.C. 178pp

Keifer H. H. and L. C. Knorr. 1978. Eriophyid mites of Thailand. Plant Protection Service Technical Bulletin. No. 38.

Keinath, A. P.,Farnham, M. W.., and Zitter, T. A. 1995. Morphological, pathological, and genetic

differentiation of *Didymella bryoniae* and *Phoma* spp. Isolated from cucurbits. Phytopathology 85: 364-369.

Kenmore, P.E. 1979. Limits of the brown planthopper problem : implications for integrated pest management. Saturday Seminar, June 30, 1979. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines. 78pp.

Kiely, T.B. 1949. Black spot of citrus in New South Wales coastal orchards. Agricultural Gazette of New South Wales 60: 17-20.

Kim, S. and Je-Kyun Park. 2004. Development of a Test Strip Reader for Lateral Flow Membrane-based Immunochromatographic Assay. Biotechnol. Bioprocess Eng. 9: 127-131.

Kimball, C.P. 1965. Lepidoptera of Folridae. Pl. Ind., Fla., Dep. Agr. Gainesville, 363 pp.

Kobayashi, N., T. Kamhangridthirong and U. Kueprakone. 1978. Studies on the soil borne diseases of economic plants in Thailand, with species reference to *Phytophthora* diseases. Plant Pathology and Microbiology Div., of Dept. of Agr., Thailand. 124 pp.

Kotzé, J., M., 2000. Black spot. Pages 23-25 in : Compendium of Citrus Diseases 2nd ed. L.W.Timmer, S. M. Garnsey, and J. H. Graham, eds. The American Phytopathological Society, St. Paul,MN.

Laemmlen, F. 2009. Alternaria Diseases. Publication 8040. Available Source: http://ucanr.org/freepubs/docs /8040.pdf. (Access date : August 24, 2009).

Larsen, K., 1992. Amanranthaceae. Flora of Thailand Vol.5 part 3.

LaSalle, J., & Gauld , I.D. (1993) Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. *In*: LaSalle J., Gauld I.D. (Eds), *Hymenoptera and Biodiversity*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 1–26.

Leamy, L. 1975. Component analysis of osteometric traits in randombred house mice. Syst. Zool. 24:176-190.

Lecompte *et al*. 2005. Confrontation of morphological and molecular data : The Praomys group (Rodentia ,Murinae) as a case of adaptive convergences and morphological stasis

Lekagul,B., and A.M. Jeffery. 1977. Mammal of Thailand. Printed at Kurusapha Ladprao Press by Nai kamthon Sathirakul, Bangkok. 758 p.

Lee, A.M., D.M. Persley and J.E. Thomas. 2002. A new tospovirus serogroup IV species infecting

capsicum and tomato in Queensland, Australasian Plant Pathology. 31 : 231-239.

Lekunze, L.M., A.U. Ezealor and T. Aken Ova. 2001. Prey groups in the pellets of the barn owls

Tyto alba (Scopoli) in the Nigerian savanna. East Africa wildlife society. Afr. J. Ecol. 39:38-44.

Le Pelley RH, 1968. Pests of Coffee. London and Harlow, UK: Longmans, Green and Co Ltd.

Levi, H. W. 1981. The American orb- weaver genera *Dolichognatha* and *Tetragnatha* north of Mexico (Araneae : Araneidae, Tetragnathidae). Bull. Mus. Comp. Zool., 149(5) : 271-318.

Li, W. B., J.S. Hartung and L. Levy. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of Candidatus Liberibacter species asscociated with citrus huanglongbing. J. Microbiol. Methods. 66: 104-115.

Li, W. B., J.S. Hartung and L. Levy. 2007. Evalution of DNA amplification methods for improved detection of “Candidatus Liberibacter species” asscociated with citrus huanglongbing. Plant Dis. 91: 51-58.

Lim, G.S., S.S. Sastroutomo, W.H. Loke.1999. Workshop on leafminers of vegetables in Southeast Asia. CABI-SEARC.

Lorenzen, J.H., L.M. Piche, N.C. Gudmestad, T. Meacham and P. Shiel. 2006. A multiplex PCR assay to characterize Potato virus Y isolates and identify strain mixtures. Plant Disease. 90 (7): 935-940.

Mahr, D. 1998. Excerpt from Midwest Bilogical Control. Bilogical Control News. 5(10)

Mansour, F., D. Rosen, A. Shulov, and H. N. Plaut. 1980. Evaluation of spiders as biological control agents of *Spodoptera littoralis* (Boisd) larvae on apple in Israel. Acta. Ecol., Appl. 1: 225 – 232.

Mansour, F. and W. H. Whitcomb. 1986. The spiders of a citrus grove in Israel and their role as biological agents of *Ceroplastes floridensis*. Entomophaga 31: 269 – 276.

Mansour, F., M. Wysorki and H. W. Whitcomb. 1985. Spiders inhabiting avocado orchards and their role as natural enemies of *Boarmia selenaria* Schriff (Lepidoptera: Geometridae) larvae in Israel. Acta. Ecol., Oecol Appl. 6: 315 – 321.

Mansour, F. 1987a. Spiders in sprayed and unsprayed cotton fields in Israel, their interactions with cotton pests and their importance as predators of the Egyptian cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis*. Phytoparacitica. 15: 43 – 50.

Mansour, F. 1987b. Effect of the pesticides on spiders occurring an apple and citrus in Israel. Phytoparacitica. 15(1): 43 – 50.

Marcone, C.,A. Ragozzino and E. Seemuller. 1997. Detection and identification of phytoplasmas in yellows-diseased weeds in Italy. Plant Path. 46 : 530-537.

Marlatt, M.L., J.C. Correll, P. Kaufmann and P.E. Cooper. 1996. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum*f.sp.*lycopersici* race3 in the United States. Plant Disease 80(12):1336-1342.

Martelli, G.P., S.A. Holland. 1987. Grapevine fanleaf nepovirus (GFLV). Available Source: http://www.agls.uidaho.edu/ebi/vdie//descr368.htm, September 2, 2009.

Martens,E.V. 1860. Die Preussische Expedition nach Ost-Asian. Zool. Theil. pp.66-68.

Martin *et al*. 1999 Molecular Phylogeny of European Muroid Rodents Based on Complete Cytochrome Sequences . Molecular Phylogenetics and Evolution Vol.16 No.1 July, pp 37-47 ,2000

Marttin,I.,T.Garcia,V.Fajardo, M.Ross,P.E. Hermandaze,I.Gonzalez and R.Martin, 2007. Detection of cat, dog,and rat or mouse tissues in food and animals feed using species-specific polymerease chain reaction.J. Anim Sci. 2007, 85: 2734-2739.

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.

Masner, L. .1993. Superfamily Platygastroidea, pp. 559-563. *In* Goulet H., and J.T. Huber [eds.], Hymenoptera of the World: An Identification Guide to Families. Ottawa, Agric. Canada.

Mavrodieva, V., Levy L. and D.W. Gabriel. 2004. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. Phytopathology 94:61-68.

McFayden, R.E. 1996. Siam weed: a new threat to Australia's north. Plant Prot. Q. 4:3-7.

McFayden, R.E. and N.A. Straus. 1996. Potential distribution of *Chromolaena odorata* (siam weed) in Australia, Africa and Oceania. Agric. Ecosyst. Environ. 59: 89-96.

Meenu K., R. Raja, A. A. Zaidi and I. D. Garg. 2002. Status of bean yellow mosaic virus on Gladiolus.

Menalled, F.D., K.L. Gross and M. Hammond. 2001. Weed aboveground and seed bank community response toagriculture management systems. Ecol. Appl. 11 :1586-1601.

Menzel, W., W. Jelkmann and E. Maiss. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. J. of Virol. Methods. 99 (1-2): 81-92.

Meyer, G. M., Sanders, R. Jacobs, and L. Korsten. 2006. A One-Day Sensitive Method to Detect and Distinguish Between the Citrus Black Spot Pathogen *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae*. Plant Dis. 90:97-101.

Meyer 2006. Molecular markers for some small mammals of southern Africa . Folia Zool. -55(4) :444-447 (2006). Molecular phyloganatics and evolution 37 (2005) 899-919

Michener, C.D. 2000. The Bees of the World. The Johns Hopkins University Press, Maryland. Preston-Mafham, K. 1990. Grasshoppers and Mantids of the World. Facts of File, New York. p. 32.

Michon, E. 1982. Virus, pollen, pollinia. Revue de Cytologie et de Biologie Vegetales, Le Botaniste, 5(1):31-40.

Mikó, I., Vilhelmsen, L., Johnson, N.F., Masner, L., & Pénzes, Z. (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. *In*: Consoli, F.L. et al. (Eds), *Egg parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*, Springer Science & Business Media B.V., US, pp. 389–409.

Minkenberg OPJM. 1988. Dispersal of *Liriomyza trifolii.* Bulletin of the European and Mediterranean Plant Protection Organisation 18 : 173–182.

Moody, L.M., and D.H. Les. 2002. Evidence of hybridity in invasive watermifoil (*Myriophyllum*) populations. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America (PNAS).Nov12,2002. Vol.99 no.23. 14867-14871. Available Source: http://www.pnas. org/cgi/ content/full/99/23/14867

Moon, B.C. and S.M. Oh. 2003. Current Status on Influx of Exotic Weeds in Korea. in Agro-Ecosystems in New Zealand: Environmental Impact and Risk Assessment. *In* Proceedings of International Seminar on "Biological Invasions: Environmental Impacts and the Development of a Database for the Asian-Pacific Region". National Institute for Agro-Environmental Sciences (NIAES) and Food and Fertilizer Technology Center for the Asian-Pacific Region. Nov. 13-15, 2003. Japan. 57-75 pp.

Moore, N. W. 1997. Dragonflies: Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Odonata Specialist Group. 27 pp.

Morrison *et al*. 2003. The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the coccidia (sporozoa),
International Journal for Parasitology 34(2004) 501-514

Mound, L. A. and A. A. Azidah. 2009. Species of the genus *Thrips* (Thysanoptera) from Peninsular Malaysia
with a checklist of recorded Thripidae. Zootaxa. 2023 : 55–68.

Mound, L. A. and Halsey, S. H. 1978. Whitefly of the World; A systemic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with Host Plant and natural Enemy Data. British Museum (Natural History) and John Wiley & Sons. Chichester. 340 pp.

Mound L.A. and K. Minaei. 2007. Australian thrips of the *Haplothrips* lineage (Insecta : Thysanoptera). Journal of Natural History. 41: 2919–2978.

Muenscher, W.C. 1980. Weeds 2nd. Cornell University Press. USA. 586 pp.

Mugridge 1999. Phylogenetic relationships of the genus Frenkelia : a review of its hiftory and new knowledge gained from camparison of large subunit

Munroc E. 1972. Fascicle I3.I.A. Pyraloidea (in part) *in* Dominick, R.B.,*et al.* 1972. The Moths of America Nroth of Mexioco. London, 134 pp.

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.

Namba, S., H. Oyaizu, S. Kato, S. Iwanami and T. Tsuchizaki. 1993. Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasma-like organisms. Int. J. Syst. Bacteriol. 43 : 461-467.

Nassar, A., A.Darrasse, M.Lemattre, A.Kotoujansky, C.Dervin, R.Vedel and Y.Bertheau. 1996. Characterization of Erwinia chrysanthemi by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of pel genes. Appl. Environ. Microbiol. 62:2228-2235.

Neergaard, P. 1945. Danish Species of *Alternaria* and *Stemphylium* Taxonomy, Parasitism, Economic Significance. Einar Munksgaard, Copenhagen, Denmark.

Nickel ,O.M., L.P.N. Targon, T. V.M. Fajardo, M. A. Machado and A. Trivilin. 2004. Polyclonal antibodies to the coat protein of Apple stem grooving virus expressed in Escherichia coli : production and use in immunodiagnosis. Fitopatologia Brasileira 29 (5) : 558-562.

Niekerk, J.M., P.W. Crous, P.H. Fourie and F. Halleen. 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. Mycologia: 96(4), pp. 781–798.

Nixon, G.E.J. 1951. The Association of Ants with Aphids and Coccids. Institutre of Entomology, London, 36 pp.

Noda, K., M. Teerawatsakul, C. Prakongvongs and L. Chaiwiratnukul. 1994. Major Weed in Thailand. National Weed Science Research Institute Project, Botany and Weed Science Division, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok Thailand.

Nunney, L. and D.R.Elam. 1994. Estimating the effective population size of conserved population conservation. Biology. 8:175-184.

O'Bannon, J.H. 1977. Worldwide dissemination of *Radopholus similis* and its importance in crop production. Journal of Nematology 9:16-25.

OEPP/EPPO. 2008. EPPO A1 and A2 lists of pests recommended for regulation as quarantine pests. 15 pp.

Okuma, C. 1968. Preliminary survery on the spider fauna of the paddy fields in Thailand. Mushi 42 (8) :89 – 118.

Okuma, C. and T. Wongsiri, 1973. Second report on the spider fauna of the paddy fields in Thailand. Mushi 47 (1) : 402 – 418.

Olufemi J., P. Alabi, Lava Kumar and R.A. Naidu. 2008. Multiplex PCR for the detection of African cassava mosaic virus and East African cassava mosaic Cameroon virus in cassava. J. of Virol. Methods. 154 (1-2): 111-120.

Ohno, I. 21992. Whiteflies Problem in the United States of America. JAPAN Pesticide Information no.60: 19-20.

Orr, D. B. (1988) Scelionid wasps as biological control agents: a review. *The Florida Entomologist,* 71(4): 506-528.

Pandey P.N. 1977. Host preference and selection of Diaphania indica Saunders (Lep., Pyralidae). Deutsche Entomologische Zeitschrift 24(1/3):159-173.

Panha, S. 1996. A Checklist and Classification of the Terrestrial Pulmonate Snails of Thailand. Walkerana 8 (19): 11-64. pp.

Parker, K.C. and T.B. Sutton. 1993. Susceptibility of apple fruit to *Botryosphaeria dothidea* and isolate variation. Plant Disease 77, 385-389.

Parrella M.P. 1987. Biology of *Liriomyza.* Ann. Rev. Entomol. 32: 201 – 224.

Parrella, M.P., C.B. Keil and J.G. Morse. 1984. Insecticide resistance in *Liriomyza trifolii.* California Agriculture 38, 22-33.

Parrella M.P., V.P. Jones., R.R.,Youngman and L.M. Lebeck. 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.

Patarakulpong, W. 1977. A preliminary survey of spider fauna and their predation in the paddy fields o Thailand. M.S. Thesis. Kasetsart University. 59 pp.

Patel R.C, and H.L,Kulkarny. 1956. Bionomics of the pumpkin caterpillar -Margaronia indica Saund. (Pyralidae: Lepidoptera). Journal of the Bombay Natural History Society 54:118-127.

Patterson, C.M. 1971. Taxonomic studies of the land snail family Succineidae. Malacological Reviews 4 : 131-202.

Phillips A.J., A.J.L., Alves, A., Correia, A. and Luque, J. (2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. Mycologia 97: 513-529.

Pichayayothin.,N. 2001. Pacific Biotech Co. Ltd. (Thailand). Available Source: Pacific-biotech.com.Pinese, B. and G. Dickinson. 1989. Banana growers enthusiastic about bunch injections. Queensland Fruit and Vegetable News 20:15-17.

Pitaksa, C., A. Chantarasuwan and A. Kongkanjana. 1988. Ant Control in Pineapple Field. The Third International Pineapple Symposium, November 17-20, Pattaya, Thailand.Pliansinchai, U., and A. Boonduang. 1978. A systematic study of plant parasitic nematodes of Black pepper in Thailand. Nematology Section Technical Bulletin. 2: 2-30. Plant Pathology Division, Department of Agriculture, Thailand.

Pliansinchai, U., and A. Boonduang. 1986. A systematic study of plant parasitic nematodes of Sugarcane in Thailand. Nematology Section Technical Bulletin. 5: 48-61. Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture, Thailand.

Polaszek, A., Agosti, D., Alonso-Zarazaga, M., Beccaloni, G., de Place Bjørn, P., Bouchet, P., Brothers, D.J., Earl of Cranbrook, Evenhuis, N.L., Godfray, H.C.J., Johnson, N.F., Krell, F-K, Lipscomb, D., Lyal,

C.H.C., Mace, G.M., Mawatari, S., Miller, S.E., Minelli, A., Morris, S., Ng, P.K.L., Patterson, D.J., Pyle, R.L., Robinson, N., Rogo, L., Taverne, J., Thompson, F.C., van Tol, J., Wheeler, Q.D., & Wilson, E.O. (2005) A universal register for animal names. *Nature*, 437: 477.

Pongsapich, P and P. Chiemsombat. 2002. Characterization of Tospovirus Infecting Tomatoes in Thailand Revaled the Presence of Serogroup IV-tospovirus But Not Serogroup I-tomato spotted wilt virus. 92 p. In the first International Conference on Tropical and Subtropical Plant Diseases. The Imperial Mae Ping Hotel Chiang Mai, Thailand.

Poonchaisri, S. 2004. Preservving Insect Specimens for Research. The Agpicul Tural Co-Operative Federation of Thailand., Limited Ngarnwongwan Road, Chatuchak, Bangkok. 32 pp.

Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. Fungal Diversity 39: 89-109.

Puckdeedindan, P. 1996. A supplementary host list of plant disease in Thailand. Tech. Bull. No. 7, Dept. of Agr., Bangkok. 24 pp.

Punithalingam, E. and P. Holliday. 1972. *Didymella bryoniae* . CMI Description of Pathogenic Fungi and bacteria. No. 332.

Punithalingam, E and Holliday, P. 1975. *Guignardia musae*. No. 467 *In:* CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institue. Ferry Lane, Kew, Surrey, UK.

Pusey, PL. 1993. Role of *Botryosphaeria* species in peach tree gummosis on the basis of differential isolation from outer and inner bark. Plant Disease 77, 170-174.

Pyle, R.L., Earle, J.L., & Greene, B.D. (2008) Five new species of the damselfish genus *Chromis* (Perciformes: Labroidei: Pomacentridae) from deep coral reefs in the tropical western Pacific. *Zootaxa,* 1671: 3–31.

Radosevich, S. and J. S. Holt. 1984. Weed Ecology Implications for Vegetation Management. John Wiley & Sons Inc., New York. 265 pp.

Raychaudhuri, S.P. and D.K. Mitra. 1993. Mollicute diseases of plants. International Science Publisher, New York. 113 pp.

Riechert, E.S. and T. Lockley. 1984. Spiders as biological control agents. A. Rev. Ent. 29:288-320.

Rishi, N. and C.T. Chen. 1989. Grassy shoot and white leaf disease. Pp. 289-300. In C. Ricaud, B.T. Egan, A.G. Gillaspie, Jr. and C.G. Hughes (eds.). Diseases of sugarcane: major diseases. Elsevier Science Publisher, Amsterdam.

Robert, M. T. and M. Losilla. 2007. Orb-weaving Spider, *Argiope savignyi* (Araneidae), Predation on the Proboscis Bat *Rhynchonycteris naso* (Emballonuridae). Caribbean Journal of Science, Vol. 43 (2) : 282-284.

Ronald F. L. and Stephan G. L. 1994. *Aculops lycopersici* (Massee). http://www.extento. hawaii.edu/kbase/crop/Type/a_lycope.htm

Rowell, H. and P. Flook. 2001. Caelifera. Shorthorned grasshoppers, locusts and relatives. *Tree of Life Web Project.* Retrieved April 8, 2007.David A. Kendall. 2009. Weevils. Insects and Other Arthopods. http://www.kendall-bioresearch.co.uk/weevil.html

Rubik, D. 1992. Loose niches in tropical communities: Why are there so few bees and so many trees. pp. 505. In M. D. Hunter, T. Ohgushi and P.W. Price, eds. Effects of Resource Ddistribution on Animal Plant Interactions. Academic Press, San Diego.

Salim Khan M., M. I. Hoque, R. H. Sarker and H.-P. Muehlbach. 2003. Detection of Important Plant Viruses in In vitro Regenerated Potato Plants by Double Antibody Sandwich Method of ELISA. Plant Tissue Cult. 13(1) : 21-29, 2003.

Savage, J. M. 1982. Ecological Aspects of Development in the Humid tropics. National Academy Press, Washington.

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.

Schoulties , C.B. , E.L. Civerolo , Miller , R.E. Stall , C. J. Krass , S.R. Poc and S.P. Oucharmo. 1987. Citrus canker in Florida. Plant Dis. 71: 388 – 395.

Schreiber, L.R. 1964. Stem canker and die-back of Rhododendron caused by *Botryosphaeria ribis* Gross. & Dugg. Plant Dis. Rep. 48: 207-210.

Schumacher, A. and W. G. Whitford. 1976. Spatial and temporal variation in Chihuahuan dersert ant faunas. Southwestern Naturalist 21: 1 – 8.

Seiji Ouchi, Motomu Hatamato, Hachiro Oku, Tomonori Shiraishi, Tatsuo Yakoyama, Michihiro Tateishi and Shintaro Fujii. 1976. Brown Spot of Grapes Caused by *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium herbarum.* Sci. Rep. Fac. Agr. Okayama Univ. (48):17-22.

Seinhorst, J. W. 1950. De tetekenis van de toestand van de grond voor het optreden van aantasting door het stengelaaltje (Ditylenchus dipsaci (Kuhn) Filipjev). Tijdschr. Plantenziekten 56 : 289-348.

Sether, D.M. and J.S Hu. 2002. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. Phytopathology. 92: 928-935.

Sharkey, M.J. 2007. Phylogeny and classification of Hymenoptera. *Zootaxa,* 1668: 521–548.

Sherriffs, W. Rae.1950. Some Oriental Spiders of the Genus *Oxyopes*. Proc. Zool. Soc. Lond. 120:651-677.

Sherriffs, W. Rae, M.A., D.Sc. 1954. More Oriental Spiders of the Genus *Oxyopes*. Proc. Zool. Soc. Lond. 125: 297- 308.

Shivas, YP Tan, PWJ Taylor, BS Weir, YL Yang, JZ Zhang. 2009. *Colletotrichum* – names in current use. Fungal Diversity 39: 147–182.

Simmons, E.G. 1967. Typification of *Alternaria*, *Stemphylium* and *Ulocladium*. *Mycologia* 59 : 67-92.

Sipes, B.S., D.P. Schmitt, and S.C. Nelson. 2001. Burrowing nematode, a major pest in the tropics. University of Hawaii, CTAHR Plant Disease Publication PD-21.

Sipes, B.S., and K. M. Delate. 1996. Potential of biologically-derived nematicides for control of anthurium decline. Nematropica 26 : 171-175.

Sipes, B.S., and J.S. Lichty. 2002. *Radopholus similis* damage to *Anthurium andraeanum*. Nematropica 32:77-81.

Sivanesan, A and P. Holliday. 1981. *Guignardia bidwelli*. No. 710 *In*: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institue. Ferry Lane, Kew, Surrey, U.K.

Slapeta *et al*.2002 . Phylogeny and sequence variability of the *Sarcocystis singaporensis* Zaman and Colly,(1975)1976 ssr DNA . ParasitoRes(2002) 88 : 810-815

Slapeta *et al*.2002. Evolutionary relationships among cyst-forming coccidia *Sarcosystis spp.* (Alveolata: Apicomplexa : Coccidia) in endemic of heteroxenous life cycle , Molecular phylogenetics and evolution 27(2003) . 464-475

Slippers B., G. Fourie,, P W. Crous, T A. Coutinho, B D. Wingfield, A J. Carnegie and M J. Wingfield. 2004. Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced Eucalyptus trees in Australia and South Africa. Studies in Mycology 50: 343–358.

Smal,C.M. 1990. Research on the use of barn owls *Tyto alba* for biological control of rats in oil palm plantation. Proceedings of 1989 International palm oil development conference agriculture. Palm oil research institute of Malaysia, Kuala Lumpur. 588 pp.

Smid, E.J., Jansen, A. H. J., and Gorris, L. G. M. 1995. Detection of Erwinia carotovora subsp.atroseptica and Erwinia chrysanthemi in potato tubers using polymerase chain reaction. Plant Pathol. 44:1058-1069.

Smith, C.O. 1934. Inoculations showing the wide host range of *Botryosphaeria ribis*. J. Agric. Res. (Washington, D.C.) 49: 467-476.

Solem, A. 1966.Some Non- Marine Mollusks from Thailand ,with Notes on Classification of the Helicarionidae. Spolia Zoologia Musei Hauniansis. 24 : 114 pp.

Spencer, K. A. 1973. Agromyzidae (Diptera) of Economic importance. Series Entomologica. Vol.9. (ed. Junk B. V.). Hague, Netherlands. 418 pp.

Srinivas, K. 1995. A phylogeny of cockroaches and related insects based on DNA sequence of mitochondrial ribosomal RNA genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92 : 2017-2020.

Stegmaier, C. E., Jr. 1966. Host plants and parasites of *Liriomyza trifolii* in Florida (Diptera:Agromyzidae). Florida Entomologist 49: 75-80.

Steiner, G. 1923. *Aplectana kraussei* n.sp. der Blattwespe *Lyda* sp. parasitierende Nematoden-form, nebst Bemerkungen uber das Steitenorgan der parasitischen Nematoden. Page 24. In : Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Stein A., A. Rosner and J. Hammond. 1994. Detection of Bean yellow mosaic virus in Gladioli Corms. Available Source: http://www.talaadthai.com/web/resource/

Sttate of Queenstand. Department of Primary Industries, and Horticultural Research and Development Corporation. 272 pp.

Sulyo, Y., A.S. Duriat, N. Gunaeni and E. Korilna. 1995. Confirmation of potentially important pepper viruses in Indonesia. pp. 174-180. In: Proceeding of the AVNET-II Midterm Workshop AVRDC, ADB and PCARRD, February 21-25, 1995. PCARD, Los Banos,Lagana,Philippines. Asia Vegetable Research and Development Center 327 pp.

Sutton, B.C.1980. *The Coelomycetes*. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute.

Sutton,B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotichum,* pp. 1-23. *In Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. Bailey, J.A. and M.J. Jeger (eds.) CAB International, Kew.

Sutton, B.C and J.M Waterson. 1966. *Guignardia citricarpa*. No. 85 *In*: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institue. Ferry Lane, Kew, Surrey, UK.

Swarup, S., De Feyter, R., Brlansky, R.H., and Gabriel, D. W. 1991. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. Phytopathology 81:802-809.

Swofford, D.L. (2002). PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimorny (* and other methods) ver 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Masschussetts, U.S.A.

Swofford, D.L. 2003. *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods) Version 4*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates

Symonson, W. O.C. 2004 . Coleoptera(Carabidae,Staphylinidae, Lampyridae, Drilidae and Silphidae) as Predators of Terrestrial Gastropods. Natural Enemies of Terrestrial Molluscs. Edited by G.M.Barker. CABI Publishing. UK. P. 37 – 64 .

Szychowski J.A., M.V. McKenry, M.A. Walker, J.A. Wolpert, R. Credi and J.S. Semancik 1995. The vein-banding disease syndrome: a synergistic reaction between grapevine viroids and fanleaf virus. Vitis, 34(4):229-232.

Taekul, C., N.F.Johnson, L. Masner, K. Rajmohana and C. Shu–pei. 2008. Revision of the world species of the genus *Fusicornia* Risbec (Hymenoptera: Platygastridae, Scelioninae). *Zootaxa,* 1966: 1–52.

Talamas, E.J., L. Masner and N.F. Johnson. 2011. Revision of the Malagasy genus *Trichoteleia* Kieffer (Hymenoptera, Platygastroidea, Platygastridae). *ZooKeys*, 80: 1–126.

Tatineni, S. U.S. Shankar, S. Gowda, C. J. Robertson, W.D. Dawson, T. Iwannami and N. Wang. 2008. In planta distribution of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real- time PCR. Phytopathology. 98: 592-599.

Themis, J.M. 1991. Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on Pistachio. Phytopathology 81 (5): 566-573.

Thieret, J.W. 1975. Hemigraphis reptans (Acanthaceae) a greenhouse weed in Louisiana. Journal of the Kentucky Academy of Science. Sida 6 : 115.

Thomas, A.G. 1985. Weed survey system used in Saskatchewan for cereal and oilseed crops. Weed Sci. 33:34-43.

Thomas, A. Z., L. H. Donald. and E. T. Claude. 1996. Compendium of Cucurbit Diseases. The America Phytopathological Society.St. Paul, Minnesota, USA. 87 pp.

Tigvattnanont, S. 1990. Studies on the bionics and local distribution of some lace bugs in Thailand*Urentius echinus* Distant (Hemiptera:Tingidae). Kaen Kaset = Khon Kaen Agriculture Journal. 18(5): 251-260.

Tom, K. and S. Norm. 1999. Gummy Stem Blight (GSB) of Cucurbits. Plant Pathology Fact Sheet. PP-27.

Tompa, A.S. 1984. Land Snails (Stylommatophora). In The Mollusca, Vol. 7: 48-140.

Tsuda, S., kameya-lwaki, M.,hanada, K., Kouda, Y., Hikata, M., and Tomaru, K. 1992. A novel detection and Identification technique for plant viruses; Rapid Immunofilter paper assay (RIPA), plant Dis. 76:466-469

Tsuda, S., kameya-lwaki, M.,hanada, K., Kouda, Y., Hikata, M., Fujisawa I and Tomaru, K. 1993. Simultaneous Diagnosis for Plants Infected with Multiple viruses Employing Rapid Immunefilter Paper Assay (RIPA) with Two-Step method' Multi-RIPA. Ann. phythopath. Soc. Japan 59:200-203.

Tsao. D. H. and A. Tummakate. 1977. The identify of a *Phytophthora* species from black pepper in Thailand. Mycologia 69:631-637.

Tucker *et al*. 2003 . Phylogetic relationships in the subgenus Mus (genus Mus , family Muridae, subfamily Murinae) : examining gene trees and species trees . Biology journal of the Linnean Society ,2005 ,84, 653-662. With 4 figures

Van der Aa HA. 1973. Studies in *Phyllosticta*. Studies in Mycology 5, 110pp.

Via, S. and R. Lande. 1985. Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. Evolution. 39: 505-522.

Vock, N.T. 1978. A handbook of plant diseases in colour. Plant Pathology Branch. Queensland Department of Primary Industry.

Wagner et al., 1999. A Lawn weed in Hawai' i. pp. 171-172.

Waterhouse, B. 1994. Discovery of *Chromolaena odorata* on northern Queensland. *Chromolaena odorata* Newsl. 9: 1-3.

Waterhouse, D. F. and K. Norris. 1987. Biological Control : pacific propects. Melbourne : Inkata Press. 454 pp.

Weaver, D.J., 1974. A gummosis dsisease of peach trees caused by *Botryosphaeria dothidea*. Phytopathology 64: 1429-1432.

Weber, G.F. 1930. Gray Leaf Spot of Tomato Caused by *Stemphylium solani*, sp. nov. *Phytopathology* 20 :
513-518.

Wei, W., S. Kakizawa, H-Y. Jung, S. Suzuki, M. Tanaka, H. Nishizawa, S. Miyata, K. Oshima, M. Ugaki, T. Hibi and S. Namba. 2004. An antibody against the SecA membrane protein of one phytoplasma reacts with those phylogenetically different phytoplasmas. The Am. Phytopath. Soc. 94 (7) : 683-686.

Wen HungChich, Hsu TungChing, Chen ChiouNan, 1994. Supplementary description and host plants of the spiralling whitefly, Aleurodicus dispersus Russell. Chinese Journal of Entomology, 14(2):147-161.

Whitby, P.W., Pope, L.C., Carter, K. B., Lipuma, J.J., and Stull, T.L. 2000. Species-specific PCR as a tool for the identification of Burkholderia gladioli. J. Clin. Microbiol. 38: 282-285.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols* (eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.H. Sninsky and T.J. White). Academic Press, San Diego, USA: 315-322.

Wilkie, L. 1994. Aspects of the biology, ecology and morphology of banana scab moth *Nacoliea octasema* (Meyrick) (Lepidoptera: Pyralidae) related to potential control strategies in northern Queensland, PhD Thesis. Townsville, Australia: James Cook University.

William, R.A., J.J. Rutledge and E.C. David. 1981. Genetic components of size and shape. II. Multivariate ovariance patterns in the rat and mouse skull. Evolution, 35(6). 1037-1055.

Wright, S. 1951. The genetical structure of population. Annals of Eugenics. 15:323-354

Xia, S.P., J.P Liu, C.J., Zhang and Y.N. Chen. 1988. A preliminary study on the bionomics of *Lamprosema indicata* Fabricius. Insect Knowledge 25(2):81-84.

Yang *et al*. 2001. Analysis of the 18S rRNA genes of Sarcocystis species sugguests that the morphologically similar organisms from cattle and water buffalo should be considered the same species. Molecular & Biochemical Parasitology 115 (2001) 283-288 .

Yee, W. L., P. A. Philips,; Rodgers, J. L. ; B. A., Faber. 2001. Phenology of arthropod pests and associatednatural predators on avocado leaves, fruit and in leaf litter in Southern California. Environmental Entomology, Lanham 30 (5) ; 892 – 898.