ระดับโครงการวิจัย

กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

รายงานผลสัมฤทธิ์สำหรับทุนสนับสนุนงานมูลฐาน (Fundamental Fund)

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2565

หน่วยงาน กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

อนุกรมวิธานเชิงลึกมุ่งแก้ปัญหาท้าทายด้านศัตรูพืชเพื่อสนับสนุน และเพิ่มศักยภาพการผลิตสินค้าเกษตร

New insights from taxonomy to overcome the challenges of pests and increase agricultural productivity

กรมวิชาการเกษตร

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวยุวรินทร์ บุญทบ

Misss Yuvarin Boontop

ปี 2565

บทสรุปผู้บริหาร

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

ปัญหาศัตรูพืช (แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช และวัชพืช) เป็นปัญหาสำคัญต่อการผลิตและคุณภาพสินค้าเกษตรทั้งการบริโภคภายในประเทศและการส่งออก และปัจจุบันพบว่ามีศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ หรือจำแนกชนิดผิดซึ่งก่อให้เกิดปัญหาตามมามากมาย เช่น การป้องกันกำจัดที่ไม่ตรงชนิดศัตรูพืชทำให้เกิดการใช้สารเคมีผิดประเภทส่งผลต่อผลผลิตทางการเกษตรและสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การจำแนกชนิดศัตรูพืชให้มีความถูกต้องนั้นจะช่วยสนับสนุนการผลิตสินค้าเกษตรภายในประเทศ และเพิ่มศักยภาพการแข่งขันสินค้าเกษตรระหว่างประเทศ แต่การจำแนกชนิดศัตรูพืชด้วยลักษณะทางสัณฐานเพียงอย่างเดียวนั้นพบข้อจำกัดมากมายนำไปสู่การจำแนกชนิดที่ไม่ถูกต้อง และในปัจจุบันนักวิจัยจากนานาประเทศได้นำการศึกษา “อนุกรมวิธานเชิงลึก” (New insights taxonomy หรือ Modern Taxonomy) ซึ่งเป็นการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีต่าง ๆ เข้ามาเป็นเครื่องมือในการจำแนกชนิดศัตรูพืช ทำให้มีการรายงานศัตรูพืชชนิดใหม่ ๆ รวมทั้งมีการปรับปรุงการแก้ไขชื่อชนิดศัตรูพืชให้มีความถูกต้องและมีความเป็นสากลดังนั้นกรมวิชาการเกษตรในฐานะองค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization; NPPO) ของประเทศไทยมีบทบาทหน้าที่ดำเนินการวิจัยและศึกษาชนิดศัตรูพืช เพื่อให้ได้ข้อมูลศัตรูพืชที่ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล สำหรับใช้สนับสนุนงานด้านการอารักขาพืชและแก้ปัญหาศัตรูพืชในประเทศไทยนั้น มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องจัดทำโครงงานวิจัย **“อนุกรมวิธานเชิงลึกมุ่งแก้ปัญหาท้าทายด้านศัตรูพืชเพื่อสนับสนุนและเพิ่มศักยภาพการผลิตสินค้าเกษตร”** และผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (pest list) และเอกสารวิชาการคู่มือ (Bulletin of National Guidelines for Plant Pest Identification) ของศัตรูพืชที่มีความสำคัญในประเทศไทย และสุดท้ายองค์ความรู้จากงานวิจัยภายใต้โครงวิจัยนี้จะสามารถพัฒนาเป็นฐานข้อมูลศัตรูพืช (big data) ของประเทศไทย ใช้เป็นฐานข้อมูลในการสร้างระบบเตือนภัยทางการเกษตร เพิ่มศักยภาพในการเข้าถึงข้อมูลของนักวิจัยให้สามารถตอบสนองและกำหนดแนวทางการป้องกันกำจัดอย่างทันท่วงที เพิ่มความมั่นคงทางของผลิตและเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับงานด้านกักกันพืชในเจรจาตอบโต้กับประเทศคู่ค้าและก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อภาคการเกษตรของประเทศไทยอย่างยั่งยืน

2. วัตถุประสงค์

1) เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่สำคัญทางการเกษตร โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุลในการจัดจำแนกชนิด

2) เพื่อศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยา ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่สำคัญทางการเกษตรใช้เป็นข้อมูลด้านอารักขาพืช

3) เพื่อเก็บรวบรวมหลักฐานอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์ (Voucher specimens) สำหรับศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่สำคัญทางการเกษตรของประเทศไทย

3. ระเบียบวิธีวิจัย

กรมวิชาการเกษตร

เป็นการศึกษาชนิดศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติ โดยการประยุกต์ใช้การศึกษาอนุกรมวิธานแบบดังเดิมร่วมกับข้อมูลและเทคนิคต่างๆ ได้แก่ เทคนิคทางชีวโมเลกุล ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ การศึกษาโครโมโซม และข้อมูลชีววิทยา มาใช้ประกอบเพื่อยืนยันชนิดศัตรูพืชให้มีความถูกต้อง แม่นยำ ทันสมัย และน่าเชื่อถือตามมาตรฐานสากลมากยิ่งขึ้น โดยมีการศึกษาดังนี้ 1) อนุกรมวิธาน ชีววิทยาแมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติ 2) การจำแนกชนิดแมลง สัตว์ศัตรูพืชที่สำคัญด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล 3) การจำแนกชนิดและคุณลักษณะชีวโมเลกุลของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชที่สำคัญ 4) การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชที่มีความซับซ้อน (complex species) 5) การศึกษาชนิดวัชพืชที่สำคัญเพื่อแก้ปัญหาท้าทายด้านวัชพืชและเพิ่มศักยภาพการผลิตสินค้าเกษตร และ 6) การศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของวัชพืชที่สำคัญเพื่อแก้ปัญหาท้าทายด้านวัชพืชและเพิ่มศักยภาพการผลิตสินค้าเกษตร

4. **งบประมาณที่ใช้ (ปี 2565) 3,950,026 บาท และระยะเวลาที่ดำเนินงาน (1 ต.ค.2564 - 31 มี.ค 2566)**

5. **ผลการวิจัย**

5.1อนุกรมวิธาน ชีววิทยาแมลง ไร สัตว์ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างด้วงที่พบในธัญพืช ทากศัตรูพืช เพลี้ยไฟในไม้ดอก และหนอนกระทู้สกุล *Spodoptera*ไรแดงอัญชัน แมลงช้างสีน้ำตาล แมลงช้างปีกแป้ง และมวนตัวห้ำสกุล *Nesidiocoris*ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย นั้นได้ทำการบันทึกรายละเอียดต่างๆเช่นรูปร่างลักษณะขนาดสีพืชอาศัยวันเดือนปีชื่อผู้เก็บสภาพแวดล้อมอุณหภูมิและพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) จากนั้นนำตัวอย่างแมลงและสัตว์ศัตรูพืชที่รวบรวมได้มาดำเนินการจัดรูปร่างและศึกษาชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อทราบลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อ จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิด ชีววิทยา วงจรชีวิต พืชอาศัยสามารถจแนกด้วงในธัญพืชได้ 6 ชนิดได้ตัวอย่างทาก 2 ชนิด เพลี้ยไฟได้ 5 ชนิดผีเสื้อหนอนกระทู้สกุล *Spodoptera* 2 ชนิด ได้ชีววิทยาของไรแดงอัญชันที่เลี้ยงบนถั่วเหลือง ถั่วพู และอัญชันและทราบข้อมูลเขตการแพร่กระจายและพืชอาหารของแมลงช้างปีกแป้ง *Semidalis aleyrodiformis*และมวนตัวห้ำ *Nesidiocoristenuis*จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดด้วงที่พบในธัญพืช เพลี้ยไฟในไม้ดอก และลักษณะสำคัญของทากศัตรูพืชและหนอนกระทู้สกุล *Spodoptera*เพื่อใช้เป็นแนวทางการวินิจฉัยชนิด

5.2 การจำแนกชนิดแมลง สัตว์ศัตรูพืชที่สำคัญด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

เก็บรวบรวมตัวอย่างและศึกษาเขตการแพร่กระจายของจักจั่นศัตรูอ้อยในแหล่งปลูกอ้อยที่สำคัญจำแนกได้ 1ชนิด ได้แก่ จักจั่น*Platypleura cespiticola* Boulard การเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดจากแหล่งปลูกพืชที่สำคัญจำแนกชนิดของแพลี้ยหอยเกล็ดสกุล *Pinnaspis* ได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลจากยีน *cox1* ได้จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ 1.*Pinnaspis aspidiatrae*และ 2. *Pinnaspis strachani* ในขณะที่การเก็บตัวอย่างทากเล็บมือนางจากจังหวัดต่าง ๆ ทำการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งยีน COI ได้สำเร็จทั้งสิ้น 20 และลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 20 ลำดับ และเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากแหล่งปลูกพืชที่สำคัญจำแนกชนิดด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล โดยใช้ไพรเมอร์จากยีน *cox1*สามารถจำแนกชนิด

กรมวิชาการเกษตร

เพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus*ได้จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ 1. *Planococcus lilacinus* 2. *Planococcus minor* และ 3. *Planococcus citri* และแมลงหวี่ขาวยาสูบในพื้นที่ปลูกพริกแบบอินทรีย์และแปลงปลูกพริกที่มีการใช้สารเคมี จำแนกโดยใช้ลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน mtCOI ได้ 2 ไบโอไทป์ ได้แก่AsiaI และ AsiaII_6 โดยในแปลงปลูกพริกแบบอินทรีย์ พบ 2 ไบโอไทป์ ได้แก่ Asia I และ Asia II_6 และเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบพืชที่มีความสำคัญทางการเกษตรและนำมาศึกษาผลดีเอ็นเอบาร์โค้ด และบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Liriomyza brassicae*, *L. chinensis*, *L. huidobrensis*, *L. sativae*และ *L. trifolii*

5.3 การจำแนกชนิดและคุณลักษณะชีวโมเลกุลของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชที่สำคัญ

จำแนกชนิดชนิดไส้เดือนฝอยด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างละเอียดสำหรับไส้เดือนฝอยในแต่ละสกุลที่แยกได้จากพืชและดินในบริเวณที่ปลูกพืช ได้สไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* สกุล *Xiphinema* และสกุล *Scutellonema*และได้ตัวอย่างแห้งโรคพืช จำนวน 10 ตัวอย่าง และเก็บรักษาตัวอย่างแห้งในพิพิธภัณฑ์โรคพืชและข้อมูลลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราน้ำค้างเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดในเบื้อง และได้ต้นดีเอ็นเอต้นแบบเชื้อราน้ำค้างที่แยกได้จากในพืชตระกูลแตงและตระกูลกะหล่ำ รวมทั้งได้สารพันธุกรรมและสายพันธุ์เชื้อไวรัสที่ติดเชื้อในมันเทศ จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) และ *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) และได้กำหนดสายพันธุ์และเก็บรวบรวมเชื้อไวรัสในต้นมันเทศในโรงเรือนกลุ่มวิจัยโรคพืช

5.4การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชที่มีความซับซ้อน (complex species)

เก็บตัวอย่างของโรคพืชเป้าหมายและนำมาศึกษา ได้ดีเอ็นเอ และต้นแบบของเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ *Candidatus* Phytoplasma ของมันสำปะหลังจากพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เชื้อรา *F. oxysporum* forma specialis *cubense*และเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ที่ก่อโรคกับพริกและมะเขือเทศ และจัดทำเป็นกระบวนการวิธีการในระดับห้องปฏิบัติการได้ 3 กระบวนการ ได้แก่ กระบวนการจำแนกชนิดด้วย ดีเอ็นเอ และต้นแบบของเชื้อ *Candidatus* Phytoplasma จากมันสำปะหลังจากพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือกระบวนการจำแนกชนิดด้วย ดีเอ็นเอ และต้นแบบของเชื้อรา *Fusarium oxysporum*ระดับ forma specialis และกระบวนการจำแนกชนิดด้วย ดีเอ็นเอ และต้นแบบของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ที่ก่อโรคกับพริกและมะเขือเทศ

5.5 การศึกษาชนิดวัชพืชที่สำคัญเพื่อแก้ปัญหาท้าทายด้านวัชพืชและเพิ่มศักยภาพการผลิตสินค้าเกษตร

สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดวัชพืชสกุล*Echinochloa* และสกุล *Fimbristylis*โดยใช้วิธีแบบการสืบพบในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อมในประเทศไทย ได้ตัวอย่างต้นและเมล็ดวัชพืชสกุล *Echinochloa*. 1 ชนิด ไดแก *Echinochloa crus-galli*และได้ตัวอย่างต้นและเมล็ดวัชพืชสกุล *Fimbristylis* Vahlจำนวน 5 ชนิด ได้แก่*F. quinquangularis*, *F. dichotoma, F. polytrichoides,F. gracilenta*และ*F. littoralis* Gaudich.จัดทำตัวอย่างแห้งสำหรับเก็บเข้าพิพิธภัณฑ์ได้ 6 ชนิด จำนวน 107 ตัวอย่างซึ่งเก็บตัวอย่างมาปลูกสำหรับใช้ในการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

5.6 การศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของวัชพืชที่สำคัญเพื่อแก้ปัญหาท้าทายด้านวัชพืชและเพิ่มศักยภาพการผลิตสินค้าเกษตร

ศึกษานิเวศวิทยาในด้านการแพร่กระจาย ลักษณะเมล็ด และการงอกของเมล็ดหรือหัว ของวัชพืช 4 ชนิด ได่แก่ผักกระฉูด*Neptunia plena*การสำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดผักกระฉูดโดยใช้วิธีแบบการสืบพบในพื้นที่ชุ่มน้ำทางการเกษตร และนิเวศเกษตร จำนวน 134 แหล่ง พบผักกระฉูด 80 แหล่ง ศึกษาขนาดและลักษณะเมล็ดผักกระฉูด และพบว่าเมล็ดผักกระฉูดงอกในห้องปฏิบัติการ 17.20 เปอร์เซ็นต์ และในสภาพเรือนทดลอง 53.20 เปอร์เซ็นต์ และในโทงเทงประดับ *Nicandra physalodes*พบจาก3แหล่ง และศึกษาการงอกของเมล็ดโทงเทงประดับในห้องปฏิบัติการและสภาพเรือนทดลอง บันทึกการงอกเป็นระยะเวลา 3เดือน ยังไม่พบการงอกทั้งในห้องปฏิบัติการ และในสภาพเรือนทดลองและวัชพืช *Oxalis debilis*สำรวจและเก็บตัวอย่าง จำนวน 54 แหล่ง 9 จังหวัด พบ *O. debilis*3 แหล่ง การศึกษาการงอกของหัวในสภาพเรือนทดลองหัวที่มีขนาดใหญ่และมีน้ำหนักมากมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงกว่าหัวที่มีขนาดเล็กและสำรวจวัชพืชจ้อล่อ*Conyza sumatrensis*ในพื้นที่ทำการเกษตร พื้นที่ที่ไม่ได้ทำการเกษตร และเขตป่าใกล้เคียงใน 3 ภาค คือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ พบว่าวัชพืช*C. sumantrensis*มีแพร่กระจายในทุกสภาพพื้นที่ พื้นที่ไม่ได้ทำการเกษตร การงอกในห้องปฏิบัติการงอก 91.00 เปอร์เซ็นต์ และในสภาพเรือนทดลองงอก 82.00 เปอร์เซ็นต์

6. ข้อเสนอแนะที่ได้จากงานวิจัย

1. ผู้เกี่ยวข้องสามารถนำแนวทางการวินิจฉัยชนิดถ่ายทอดแลกเปลี่ยนความรู้และประสบการณ์การทำงานในการตรวจสอบชนิดแมลงในสินค้าเกษตรได้ รวมถึงสร้างเครือข่ายการทำงานและความร่วมมือระหว่างนักวิชาการภายในหน่วยงานและระหว่างหน่วยงานได้ นอกจากนี้สามารถพัฒนาต่อยอดแมลงศัตรูธรรมชาติที่ศึกษาเป็นชีวภัณฑ์ชนิดใหม่ช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรให้มีคุณภาพและมีมูลค่าเพิ่มเพื่อสร้างรายได้แก่เกษตรกร

2. ผลของการงอกของเมล็ด และหัว ไปวิเคราะห์ ร่วมกับวิธีการทดลองในปีงบประมาณ 2566 และ 2567 เพื่อหาแนวทางในการจัดการในสภาพแปลงต่อไป

7. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

7.1 สามารถจำแนกชนิด ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันของศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางการเกษตรได้ แนวทางวินิจฉัย (dichotomous key) ทำให้การจัดจำแนกศัตรูพืชเข้าถึงได้ง่าย มีประสิทธิภาพ และมีความเหมาะสมในศัตรูพืชแต่ละชนิดและสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีความสำคัญยิ่งสำหรับพัฒนาวิธีการการตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชที่มีความจำเพาะต่อไป ได้ตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อเป็นแหล่งอ้างอิงที่สำคัญของประเทศเก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง พิพิธภัณฑ์โรคพืช และพิพิธภัณฑ์วัชพืชของกรมวิชาการเกษตร และได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ของศัตรูพืชเก็บไว้ในฐานข้อมูล Genbank เพื่อใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์ที่มีความน่าเชื่อถือของประเทศไทยและสากล

7.2 นำผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยในครั้งนี้ ไปจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (pest list)และเอกสารวิชาการ คู่มือ (Bulletin of National Guidelines for Plant Pest Identification) ของศัตรูพืชที่มีความ สำคัญ

กรมวิชาการเกษตร

ในประเทศไทย และจะจัดอบรมการจำแนกชนิดของศัตรูพืชในระดับชาติ โดยกำหนดขึ้นทุก 3 ปี เพื่อเป็นการเผยแพร่องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยภายใต้โครงการวิจัยนี้สู่นักวิชาการ และผู้ที่มีความสนใจ ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งต่อเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช นักวิชาการ นักวิจัยจากหน่วยงานภาครัฐและหน่วยงานเอกชนต่าง ๆ เช่น กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัย องค์กรการศึกษา ต่าง ๆ สามารถเพิ่มองค์ความรู้และใช้ประโยชน์จากการจำแนกชนิดศัตรูพืช

8. การเผยแพร่ผลงานวิจัย

8.1นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 15 ระหว่างวันที่ 22 – 24 พฤจิกายน2565 จำนวน 2 เรื่อง

- ภาคบรรยาย จำนวน 1 เรื่อง ได้แก่ เรื่อง ความหลากหลายของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 1 complex สาเหตุโรคตายพรายกล้วย

- ภาคแผ่นภาพจำนวน 1 เรื่อง ได้แก่ เรื่อง เชื้อไฟโตพลาสมาก่อโรคพุ่แจ้มันสำปะหลังในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

8.2 ต้นฉบับบทความวิจัย (Manuscript) 2.3 บทความในประเทศ ที่เผยแพร่ใน

https://www.doa.go.th/plprotect/?page_id=9179 จำนวน 19 เรื่อง

8.3 เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ8 กระบวนการ

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

ศัตรูพืช (แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช และวัชพืช) เป็นปัญหาหลักสร้างความเสียหายแก่ผลผลิตทางการเกษตรและเป็นปัญหาสำคัญในการส่งออกอย่างมหาศาล แต่ปัจจุบันพบว่าการจำแนกชนิดศัตรูพืชนั้นหลายชนิดไม่สามารถจำแนกชนิดได้ โครงการวิจัยนี้ ดำเนินงานระหว่างปี 2565-2567 มีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานศัตรูพืช (แมลง จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช และวัชพืช) และศัตรูธรรมชาติที่สำคัญทางการเกษตร โดยใชhลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุลในการจัดจำแนกชนิด (2) เพื่อศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่สำคัญทางการเกษตรใช้เป็นข้อมูลด้านอารักขาพืช (3) เพื่อเก็บรวบรวมหลักฐานอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์ (Voucher specimens) สำหรับศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่สำคัญทางการเกษตรของประเทศไทย โดยจัดทำต้นฉบับบทความในประเทศจำนวน 19 เรื่อง และกระบวนการใหม่จำนวน 8 เรื่อง โครงการวิจัยนี้ประกอบด้วย 6 โครงการย่อย (27 การทดลอง)

ซึ่งผลการดำเนินงานระหว่าเดือนตุลาคม 2564 - กันยายน 2565 ได้ดำเนินการเตรียมต้นฉบับบทความและทำการเผยแพร่ผลงานวิจัยในเว็ปไซต์ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จำนวน 19 เรื่อง ได้แก่ การจำแนกชนิดจาการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางการเกษตรและการส่งออก 4 ชนิด ได้แก่ ด้วงที่พบในธัญพืช เพลี้ยไฟในไม้ดอก ผีเสื้อหนอนกระทู้สกุล *Spodoptera* และทากศัตรูพืช และการจำแนกชนิดศัตรูพืชโดยการประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในอีก 5 ชนิด ได้แก่ จักจั่นอ้อย เพลี้ยหอยเกล็ดสกุล *Pinnaspis* เพลี้ยแป้ง แมลงหวี่ขาวยาสูบ และทากเล็บมือนางสกุล *Parmarion* และศึกษาชีววิทยาของแมลงศัตรูพืช (ไรแดงอัญชัน) แมลงศัตรูธรรมชาติ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ แมลงช้างปีกใส แมลงช้างปีกแป้ง มวนตัวห้ำสกุล *Nesidiocoris* รวมทั้งข้อมูลนิเวศวิทยา และชีววิทยาของวัชพืชที่มีความสำคัญ 6 ชนิด ได้ แก่วัชพืชสกุล *Echinochloa* วัชพืชสกุล *Fimbristylis* ผักกระฉูด โทงเทงประดับ วัชพืช *Oxalis debilis* และจ้อล่อ

นอกจากนี้ผลการศึกษาจากงานวิจัยภายใต้โครงการนี้ ยังได้กระบวนการใหม่จำนวน 8 เรื่อง ได้แก่ การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำนวน 3 สกุล (*Hirschmanniella, Xiphinema* และ *Scutellonema*) และเชื้อราน้ำค้างสกุล *Pseudoperonospora* และ *Peronospora* ในพืชตระกูลแตงและตระกูลกะหล่ำ เชื้อรา *Fusarium oxysporum* ระดับ forma specialis ไวรัสในมันเทศเชื้อ *Candidatus Phytoplasma* ในมันสำปะหลัง และแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ที่ก่อโรคกับพริกและมะเขือเทศ

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชและเอกสารวิชาการ คู่มือของศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติที่มีความสำคัญในประเทศไทย เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับอ้างอิงข้อมูลและใช้ในการตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติได้ อย่างรวดเร็ว และถูกต้อง เพื่อเป็นแนวทางการป้องการกำจัดให้ถูกวิธี และเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาแก้ไขปัญหาการค้าระหว่างประเทศ ก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อภาคการเกษตรของประเทศไทยอย่างยั่งยืน

คำสำคัญ: อนุกรมวิธาน ชีววิทยา ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ศัตรูพืช

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Pests (insects, mites, other animal pests, plant diseases, and weeds) are important problems for agriculture. Currently, many pests cannot be identified, and this problem cascades into other disciplines. The present research project spans the 2022–2025 period. Its objectives have been: (1) the taxonomic study of pests (insects, plant pathogens, and weeds) and natural enemies using morphology and molecular techniques; (2) the study of the biology and ecology of pests and natural enemies; and (3) the acquisition of voucher specimens of pests and natural enemies. The research project has provided 19 research articles and 8 new processes (techniques). The project consisted of 6 broad activities, comprising a total of 27 individual projects (experiments). The results from October 2022–September 2023 were used to prepare information for the Plant Protection Research and Development Office's website. A total of 19 experiments obtained information on the taxonomy and the biology of pests and their natural enemies. Taxonomic work of economic importance covered pests and natural enemies of pests, beetles found in import-export cereals, pest slugs, thrips in flowering plants, and armyworm moths in the genus *Spodoptera*. Identification of pests and natural enemies using molecular techniques, including the cicada pest from sugarcane, scale insects in the genus *Pinnaspis,* mealy bugs, whiteflies, and slugs in the genus *Parmarion.* The research also provided biological information on clitoria red mite, brown lacewings, dusty-wing and predatory bugs in the genus *Nesidiocoris*. Other investigations obtained information on the ecology and biology of several weeds: species of *Echinochloa* and *Fimbristylis, Neptunia plena* (L.) Benth), *Nicandra physalodes* (L.) Gaertn., *Oxalis debilis* Kunth and *Conyza sumatrensis* (S.F.Blake) Pruski & G.Sancho.

Moreover, this research project has provided eight new processes (techniques), including techniques for the identification of nematodes (3 genera; *Hirschmanniella, Xiphinema* and *Scutellonema*), fungi (*Pseudoperonospora, Peronospora*, *Fusarium oxysporum,* Virus from sweet potato; *Candidatus Phytoplasma* and *Xanthomonas* spp. The results obtained from this research project are used to prepare pest lists, academic documents, and handbooks for pests and natural enemies important in Thailand. The project provides scientific evidence on pest status, and reference data and enables timely and accurate diagnostics of pests and natural enemies. The results from this research project also provide guidelines for pest control. The project supports strategic decision-making to solve international trade problems and thus creates broad, sustainable benefits for the agricultural sector of Thailand.

Keywords: New insights, Taxonomy, Biology, DNA barcode, Pest, Agricultural productivity

กรมวิทยาศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยอนุกรมวิธานเชิงลึกมุ่งแก้ปัญหาท้าทายด้านศัตรูพืชเพื่อสนับสนุนและเพิ่มศักยภาพการผลิตสินค้าเกษตรได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรมรายงานผลสัมฤทธิ์สำหรับทุนสนับสนุนงานพื้นฐาน (Fundamental Fund) ปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 และ สิ้นสุด 2567 รวม 3 ปี กรมวิชาการเกษตรในฐานะองค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization; NPPO) ของประเทศไทยมีบทบาทหน้าที่ดำเนินการวิจัยและศึกษาชนิดศัตรูพืช เพื่อให้ได้ข้อมูลศัตรูพืชที่ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล สามารถนำผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยในครั้งนี้ไปใช้สนับสนุนงานด้านการอารักขาพืชและแก้ปัญหาศัตรูพืชในประเทศไทย เพิ่มความเชื่อมั่นและสร้างความน่าเชื่อถือในการเจรจาต่อรองเพื่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรของไทยไปสู่ตลาดโลก เกิดการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทยอย่างยั่งยืน

ความสำเร็จจากการดำเนินการทดลองต่าง ๆ ภายใต้โครงการวิจัยในครั้งนี้ เกิดขึ้นจากความอุตสาหะ และตั้งใจทำงานของนักวิจัยทุก ๆ ท่าน ส่งผลให้การทดลองต่าง ๆ สำเร็จ ลุล่วงด้วยดี ก่อให้เกิดประโยชน์ต่องานด้านอารักพืชเป็นอย่างยิ่ง นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม รายงานผลสัมฤทธิ์สำหรับทุนสนับสนุนงานพื้นฐาน ที่ได้จัดสรรงบประมาณเพื่อสนับสนุนโครงการวิจัยครั้งนี้ และกรมวิชาการเกษตร ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัย ทั้งครุภัณฑ์ทางด้านวิทยาศาสตร์ และสาธารณูปโภคตลอดในการดำเนินการวิจัยจนลุล่วงด้วยดี รวมทั้งคณะผู้ทรงคุณวุฒิและผู้เชี่ยวชาญทุกท่าน ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่าในการให้ข้อเสนอแนะ แนวทางปรับปรุงแก้ไข และข้อคิดเห็นที่ก่อประโยชน์จนสามารถดำเนินงานได้ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

ยุวรินทร์ บุญทบ และคณะ

มกราคม 2566

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	2
บทคัดย่อ	4
Abstract	5
กิตติกรรมประกาศ	6
สารบัญ	7
บทที่ 1 บทนำ	8
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน	12
บทที่ 3 ผลการศึกษา	70
บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล	83
บรรณานุกรม	90
ภาคผนวก	101

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 1 บทนำ

1. วิสัยทัศน์ และพันธกิจของหน่วยงาน

<u>วิสัยทัศน์</u>

กรมวิชาการเกษตรเป็นองค์กรที่เป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาด้านพืช เครื่องจักรกลการเกษตร และเป็นศูนย์กลางรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตรด้านพืชในระดับสากล บนพื้นฐานการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

<u>พันธกิจ</u>

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

2. ยุทธศาสตร์ชาติที่สอดคล้องกับแผนปฏิบัติงานด้าน ววน. ของหน่วยงาน

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 1 ด้านความมั่นคง

เพื่อบริหารจัดการสภาวะแวดล้อมของประเทศให้มีความมั่นคง ปลอดภัย และมีความสงบเรียบร้อยในทุกระดับและทุกมิติ

☑ ยุทธศาสตร์ที่ 2 ด้านการสร้างความสามารถในการแข่งขัน

เน้นการยกระดับศักยภาพในหลากหลายมิติควบคู่กับการขยายโอกาสของประเทศไทยในเวทีโลก

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 3 ด้านพัฒนาและเสริมสร้างศักยภาพทรัพยากรมนุษย์

คนไทยในอนาคต มีความพร้อมทั้งกาย ใจ สติปัญญา มีทักษะที่จำเป็นในศตวรรษที่ 21 มีทักษะสื่อสารภาษาอังกฤษ

และภาษาที่ 3 และมีคุณธรรม

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 4 ด้านการสร้างโอกาสและความเสมอภาคทางสังคม

สร้างความเป็นธรรม และลดความเหลื่อมล้ำในทุกมิติ กระจายศูนย์กลางความเจริญทางเศรษฐกิจและสังคม เพิ่มโอกาส

ให้ทุกภาคส่วนเข้ามาเป็นกำลังของการพัฒนาประเทศในทุกระดับ

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 5 ด้านการสร้างการเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

คำนึงถึงความยั่งยืนของฐานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของประชาชนให้เป็นมิตร

ต่อสิ่งแวดล้อม ผ่านมาตรการต่างๆ ที่มุ่งเน้นให้เกิดผลลัพธ์ต่อความยั่งยืน

กรมวิชาการเกษตร

❑ยุทธศาสตร์ที่ 6 ด้านการปรับสมดุลและพัฒนาระบบการบริหารจัดการภาครัฐ
การปรับเปลี่ยนภาครัฐ ยึดหลัก “ภาครัฐของประชาชนเพื่อประชาชนและประโยชน์ส่วนรวม”

3. วงเงินงบประมาณกองทุน ววน. ที่ได้รับจัดสรรในปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 จำนวน 3,950,026 บาท

4. รายละเอียดโครงการ

ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล

ปัจจุบันเกิดสภาวะการแข่งขันการค้าทั่วโลก ส่งผลกระทบต่อสินค้าเกษตรซึ่งเป็นรายได้หลักของประชาชนในประเทศไทยจึงต้องหาวิธีการพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร โดยผลักดันให้เกษตรกรเพิ่มศักยภาพการผลิตและส่งออกให้ได้มากขึ้น รวมทั้งสร้างความน่าเชื่อถือให้กับประเทศคู่ค้าและเปิดตลาดการค้ากับประเทศคู่ค้ารายใหม่ทั่วโลกซึ่งเป็นโจทย์ที่ท้าทายอย่างยิ่ง

ศัตรูพืช (แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช และวัชพืช) เป็นปัญหาหลักสร้างความเสียหายแก่ผลผลิตทางการเกษตรและเป็นปัญหาสำคัญในการส่งออกอย่างมหาศาล นอกจากนี้ประเทศปลายทางที่รับซื้อสินค้าเกษตรมักกำหนดเงื่อนไขในการเจรจาต่อรองทางการค้าซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเงื่อนไขและข้อบังคับอยู่ตลอดเวลา นอกจากนี้สภาพภูมิอากาศ และสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ส่งผลให้ศัตรูพืชมีความแปรผันทางด้านสันฐานวิทยาและพันธุกรรม มีแนวโน้มทำให้ศัตรูพืชปรับตัวให้เข้าทำลายพืชได้หลากหลายยิ่งขึ้น ดังนั้นข้อมูลของศัตรูพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ชื่อวิทยาศาสตร์ และข้อมูลทางชีววิทยาที่ถูกต้อง ทันสมัยจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

ดังนั้นกรมวิชาการเกษตรซึ่งทำหน้าที่เป็น National Plant Protection Organization มีหน้าที่รับผิดชอบงานวิจัยด้านอารักพืชของประเทศไทย มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการจัดทำแผนงานวิจัยเพื่อนำมาช่วยแก้ไขปัญหาศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดปัญหาการผลิต โดยนำองค์ความรู้จาก**โครงการวิจัยอนุกรมวิธานเชิงลึกมุ่งแก้ปัญหาท้าทายด้านศัตรูพืชเพื่อสนับสนุน และเพิ่มศักยภาพการผลิตสินค้าเกษตร** เนื่องจากในปัจจุบันพบว่าการจำแนกชนิดศัตรูพืชนั้นหลายชนิดไม่สามารถใช้เพียงลักษณะทางสัณฐานภายนอกในการระบุชนิด ชื่อวิทยาศาตร์ได้ ด้วยเหตุนี้เอง **“อนุกรมวิธานเชิงลึก”** (New insights taxonomy หรือ Modern Taxonomy) ซึ่งเป็นการบูรณาการงานด้านอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม (Traditional taxonomy) เปรียบเสมือนหัวใจของงานอารักขาพืชมาประยุกต์ร่วมกับข้อมูลและเทคนิคต่างๆ ได้แก่ เทคนิคทางชีวโมเลกุล ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ การศึกษาโครโมโซม และข้อมูลชีววิทยา มาใช้ประกอบเพื่อยืนยันชนิดศัตรูพืชให้มีความถูกต้องแม่นยำ ทันสมัย และน่าเชื่อถือตามมาตรฐานสากลมากยิ่งขึ้น

ผลลัพธ์จากงานอนุกรมวิธานนั้นเป็นรากฐานที่สำคัญของงานวิจัยต่างๆ มากมาย เช่น งานด้านกักกันพืช เนื่องจากชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและทันสมัย ข้อมูลชีววิทยา เขตการแพร่กระจาย แนวทางวินิจฉัย และวิธีการในการจำแนกชนิดศัตรูพืชนั้น สามารถสร้างความเชื่อมั่น และยอมรับในระดับสากล ใช้ประกอบในการสนับสนุนการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทยเพื่อใช้เจรจาต่อรองการส่งออกสินค้าทางการเกษตรกับต่างประเทศคู่ค้าที่ใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชมาเป็นเงื่อนไขในการกีดกันทางการค้า ส่งผลให้การเจราเปิดตลาดการค้ามีความ

กรมวิชาการเกษตร

น่าเชื่อเป็นที่ยอมรับทั่วโลก และลดข้อจำกัดในการกีดกันทางการค้า ดังนั้นผลลัพธ์ที่ได้จากแผนงานวิจัยในครั้งนี้ ก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งที่จะใช้เป็นข้อมูลในการสนับสนุน และเพิ่มศักยภาพการผลิตสินค้าเกษตร ทำให้สามารถส่งออกสินค้าเกษตรไปจำหน่ายยังต่างประเทศได้มากขึ้น เพิ่มความเชื่อมั่นและสร้างความ เกิดการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทย ส่งผลในองค์รวมต่อความเป็นอยู่ที่ดีขึ้นของประชาชนชาวไทย ซึ่งความสอดคล้องกับยุทธศาสตร์ของชาติ ที่มุ่งเน้นใช้ความรู้ การวิจัยและนวัตกรรมเพื่อจัดการกับศัตรูพืชซึ่งเป็นปัญหาท้าทายสำคัญของการผลิตสินค้าเกษตรของประเทศไทย ทำให้ประเทศไทยเกิดความมั่นคงทางเศรษฐกิจและอาหาร ส่งผลให้ประชากรชาวไทยสามารถดำรงชีวิตได้อย่างมีความสุขและมีคุณค่า

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1) เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่สำคัญทางการเกษตร โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุลในการจัดจำแนกชนิด

2) เพื่อศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยา ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่สำคัญทางการเกษตรใช้เป็นข้อมูลด้านอารักขาพืช

3) เพื่อเก็บรวบรวมหลักฐานอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์ (Voucher specimens) สำหรับศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่สำคัญทางการเกษตรของประเทศไทย

ขอบเขตการศึกษา

โครงการวิจัยอนุกรมวิธานเชิงลึกมุ่งแก้ปัญหาท้าทายศัตรูพืชเพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตสินค้าเกษตร ประกอบไปด้วย 6 โครงการย่อย ดังนี้

1. โครงการวิจัยย่อย อนุกรมวิธาน ชีววิทยาแมลง ไร สัตว์ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ
2. โครงการวิจัยย่อย การจำแนกชนิดแมลง สัตว์ศัตรูพืชที่สำคัญด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล
3. โครงการวิจัยย่อย การจำแนกชนิดและคุณลักษณะชีวโมเลกุลของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชที่สำคัญ
4. โครงการวิจัยย่อย การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชที่มีความซับซ้อน (complex species)
5. โครงการวิจัยย่อย การศึกษาชนิดวัชพืชที่สำคัญเพื่อแก้ปัญหาท้าทายด้านวัชพืชและเพิ่มศักยภาพการผลิตสินค้าเกษตร
6. โครงการวิจัยย่อย การศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของวัชพืชที่สำคัญเพื่อแก้ปัญหาท้าทายด้านวัชพืชและเพิ่มศักยภาพการผลิตสินค้าเกษตร

ดำเนินการวิจัยโดยศึกษาอนุกรมวิธาน การจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลด้านชีวโมเลกุล ชีววิทยา และเขตการแพร่กระจายของศัตรูพืชที่มีความสำคัญต่อพืชเศรษฐกิจเพื่อเพิ่มศักยภาพการส่งออก รวมทั้งศึกษาชีววิทยาของศัตรูธรรมชาติที่มีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาพัฒนาศักยภาพเพื่อเป็นตัวห้ำและสามารถต่อยอดผลิตเพื่อนำมาเป็นชีวภัณฑ์ทดแทนสารเคมีกำจัดศัตรูพืช

กรมวิชาการเกษตร

นิยามศัพท์

อนุกรมวิธานเชิงลึก (New insights taxonomy หรือ Modern Taxonomy) หมายถึง การข้อมูลและเทคนิคต่างๆ ได้แก่ เทคนิคทางชีวโมเลกุล ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ การศึกษาโครโมโซม และข้อมูลชีววิทยา มาประยุกต์ใช้เพื่อยืนยันชนิดศัตรูพืชให้มีความถูกต้อง

ชนิดที่ซับซ้อน (complex species) หมายถึง กลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่เกี่ยวข้องกันอย่างใกล้ชิดซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกันมากจนไม่สามารถหาความแตกต่างที่ชัดเจนได้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก (cryptic species) หมายถึง กลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมากจนถูกจัดเป็นชนิดเดียวกัน แต่เมื่อตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมนั้นมีความแตกต่างจนสามารถจำแนกเป็นคนละชนิด

แนวทางวินิจฉัย (key) หมายถึง เครื่องมืออย่างหนึ่ง ที่ใช้ในการจำแนกชนิดหรือสกุลของสิ่งมีชีวิตที่ได้จากการศึกษาตัวอย่างจากงานวิจัย โดยนำความแตกต่างทางสัณฐานวิทยามาแบ่งออกเป็นทีละคู่ของโครงสร้างลักษณะหนึ่งหรือมากกว่า โดยความแตกต่างนั้นมักจะแยกออกจากกัน

พิกัดภูมิศาสตร์ (Global Positioning System; GPS) หมายถึง การนำระบบดาวเทียมเพื่อระบุข้อมูลของตำแหน่งที่ได้เก็บรวบรวมตัวอย่างมาเพื่อทำการวิจัยและจัดทำฐานข้อมูล

มอร์โฟเมทริกส์ (Morphometrics) หมายถึง การประยุกต์เอาหลักการทางเรขาคณิตมาใช้ศึกษารูปร่างและขนาดแบบละเอียดโดยวัดรูปร่างของวัตถุหรือสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาโดยแปลค่าที่ได้ออกมาเป็นตัวเลข เป็นเทคนิคที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาด้านวิทยาศาสตร์ สามารถให้ข้อมูลที่มีความละเอียด ถูกต้องและแม่นยำมากกว่าการวัดขนาดแบบดั้งเดิม

อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม (traditional taxonomy) หมายถึง การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่สำคัญ เช่น สี ขนาดลำตัว เส้นปีก ลวดลายบนปีก จำนวนและขนาดของเส้นขนบริเวณอกและท้องมาเป็นเครื่องมือในการจำแนกชนิดสิ่งมีชีวิต

phylogeny หมายถึง การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลุ่มสิ่งมีชีวิต ความสัมพันธ์นี้ได้รับการตั้งสมมติฐานตามแนวคิดที่ว่าทุกชีวิตได้มาจากบรรพบุรุษร่วมกัน ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตถูกกำหนดโดยลักษณะร่วมกันตามที่ระบุไว้ผ่านการเปรียบเทียบทางพันธุกรรมและทางกายวิภาค

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน

1.วิธีการดำเนินการวิจัย

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 อนุกรมวิธาน ชีววิทยาแมลง ไร สัตว์ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

<u>กิจกรรมที่ 1</u> อนุกรมวิธานแมลง ไร สัตว์ศัตรูพืชเศรษฐกิจโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การทดลองที่ 1.1 อนุกรมวิธานด้วงที่พบในธัญพืชนำเข้าส่งออก (2565-2566)

1. ศึกษา สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงในกลุ่มด้วงที่พบในธัญพืช

ปี 2565 ภาคเหนือ (จังหวัดเชียงราย และพะเยา) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดร้อยเอ็ด) ภาคตะวันออก (ฉะเชิงเทรา ระยอง) และภาคกลาง (จังหวัดราชบุรี และกรุงเทพมหานคร)

ปี 2566 ภาคเหนือ (จังหวัดเชียงใหม่) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดอุดรธานี อุบลราชธานี ภาคตะวันออก (จังหวัดชลบุรี) ภาคตะวันตก (จังหวัดกาญจนบุรี) ภาคใต้ (จังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา)

ด้วย 4 วิธีการดังนี้

1.1 เก็บรวบรวมจากโรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์ธัญพืชโรงสีข้าวขนาดเล็กและขนาดใหญ่

1.2 เก็บรวบรวมจากด่านตรวจพืชที่ส่งตัวอย่างแมลงมาจำแนกชนิด

1.3 เก็บรวบรวมจากบริษัทเอกชนที่ส่งตัวอย่างแมลงมาจำแนกชนิด

1.4 ศึกษาเปรียบเทียบตัวอย่างชนิดแมลงศัตรูในโรงเก็บของกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตรที่ได้ดำเนินการเลี้ยงขยายพันธุ์เพื่อดำเนินการทดลองวิทยาการป้องกันกำจัดหลังการเก็บเกี่ยว

2. เก็บตัวอย่างโดยเก็บตัวเต็มวัยในหลอดบรรจุแอลกอฮอล์ 70% หรือในขวดฆ่าที่บรรจุสารเอทิลอะซิเตทหลังจากด้วงตายให้เก็บตัวเต็มวัยในกระดาษรูปสามเหลี่ยมโดยห่อแบบท๊อฟฟี่บันทึกรายละเอียดต่างๆเช่นรูปร่างลักษณะขนาดสีพืชอาศัยวันเดือนปีชื่อผู้เก็บสภาพแวดล้อมอุณหภูมิและพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) เป็นต้นจากนั้นนำแมลงที่รวบรวมได้มาดำเนินการจัดรูปร่างอบแห้งและศึกษาชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.ตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดของแมลงในกลุ่มด้วงที่พบในธัญพืชประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์

4.บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของตัวเต็มวัยได้แก่ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้วัน/เดือน/ปีสถานที่เก็บตัวอย่างและชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

5.จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุลและชนิดของแมลงในกลุ่มด้วงที่พบในธัญพืชที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

6. จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2 ศึกษาโครโมโซมและการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของทากศัตรูพืช (2565-2566) หัวหน้าการ

วิธีดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

1.สำรวจ/ เก็บตัวอย่างและจัดทำแผนที่การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์

โดยสำรวจทุกๆ 2 เดือนตามพื้นที่ป่าเขาหินปูนและพื้นที่ปลูกพืชเศรษฐกิจตามภาคต่างๆ

ปี 2565 ภาคกลาง (จังหวัดกรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี สมุทรสาคร อุทัยธานี และประจวบคีรีขันธ์) ภาคเหนือ (จังหวัดเชียงราย ลำปาง และตาก) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดชัยภูมิ หนองคาย และเลย) ภาคตะวันออก (จังหวัดระยอง) และภาคใต้ (จังหวัดสงขลา)

ปี 2566 ภาคกลาง (จังหวัดนครปฐม ราชบุรี และเพชรบุรี) ภาคเหนือ (จังหวัดเชียงใหม่) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดนครราชสีมา นครพนม หนองบัวลำภู และเพชรบูรณ์) ภาคตะวันออก (จังหวัดชลบุรี จันทบุรี และตราด) และภาคใต้ (จังหวัดนครศรีธรรมราช และสุราษฎร์ธานี)

เก็บตัวอย่างพื้นที่ละ 30 ตัวและบันทึกพิกัดด้วย GPS เพื่อจัดทำแผนที่การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของทากด้วยโปรแกรม ArcView หรือ ArcGis จากนั้นนำตัวอย่างมาพักในตู้กระจกขนาด 25x40x26 เซนติเมตรและอ่างซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง1เมตรเพื่อรอจำแนกชนิดจากลักษณะสัณฐานวิทยาในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตรโดยฉีดพ่นน้ำวันละ 1 ครั้งและให้ผักชนิดต่างๆเป็นอาหารสัปดาห์ละ2ครั้ง

2.ตรวจสอบและวิเคราะห์ชนิด

นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาชีววิทยาสัณฐานวิทยาและกายวิภาคศาสตร์ของระบบสืบพันธุ์โดยนำตัวอย่างหอยที่ยังมีชีวิตมาทำให้อวัยวะภายในยืดตัวโดยใช้ suffocation technique จนกระทั่งหอยมีการยืดตัวเต็มที่และไม่ตอบสนองต่อการสัมผัสจึงนำมาfix และdissection ด้วย 70% ethyl alcohol (criteria of Patterson, 1971) พร้อมสังเกตเปรียบเทียบถ่ายภาพและวาดภาพในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ชื่อตามระบบอนุกรมวิธานเปรียบเทียบกับเอกสารหอยทากทั้งในและต่างประเทศยึดตามเอกสารของ Abbott (1989), Hemmen and Hemmen (2002) , Laws (1973), Panha (1996), Patterson (1971) และ Vaught (1989) จากนั้นคัดเลือกเฉพาะตัวอย่างที่มียังไม่สามารถจำแนกได้ด้วยการศึกษาสัณฐานวิทยาและกายวิภาคศาสตร์ไปทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมและการจัดเรียงคาริโอไทป์ขั้นตอนต่อไป

3.ขั้นตอนการศึกษาคาริโอไทป์โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อovotestisดังนี้

3.1 Pre-treatment โดยการฉีด 0.01 - 0.02 % colchicines จำนวน1 - 2มิลลิลิตรเข้าไปในลำตัวหอยทากเป็นเวลา 3 – 4 ชั่วโมงเพื่อยับยั้งการทำงานของspindle fiber ในโครโมโซม

3.2 Hypotonic treatment โดยการนำเนื้อเยื่อ ovotestis ของหอยทากมาแช่ใน hypotonic solution (สารละลายKCl) ประมาณ 30 – 45 นาทีเพื่อให้เซลล์บวม (swelling)

3.3 Fixation โดยการนำเซลล์ไปปั่นด้วยเครื่องcentrifuge 1,000รอบ/นาทีเป็นเวลา5นาทีแล้วใช้หลอดดูดส่วนที่เป็นsupernatant ออกให้หมดแล้วเติมสารfixative (Carnoy solution) 3 - 4ครั้ง

กรมวิชาการเกษตร

3.4 Air dried slide ดูดตัวอย่าเซลล์ที่ผ่านขั้นตอนfixation ลงบนสไลด์จากนั้นทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.5 Staining ย้อมสไลด์ที่แห้งแล้วด้วย 20% Giemsa ที่มีส่วนผสมของstock Giemsa's Solution เป็นเวลา 30 นาทีจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นและทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องรอนำไปศึกษาต่อไป

3.6 Analysis นำสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงวิเคราะห์โครโมโซมโดยเลือกจากระยะเมทาเฟส (metaphase) ซึ่งมีการกระจายดีไม่ซ้อนทับกันนับจำนวนโครโมโซมจับคู่โครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome) มาจัดเรียงคาริโอไทป์ตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ถ่ายภาพเซลล์ที่เลือกไว้จากนั้นใช้ภาพถ่ายมาวิเคราะห์และคำนวณหาค่าrelative length (RL) และค่าcentromeric index (CI) เพื่อจัดชนิดโครโมโซมต่อไป

การทดลองที่ 3 อนุกรมวิธานเพลี้ยไฟที่พบในไม้ดอกของประเทศไทย (2565-2567)

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกไม้ดอก เช่น กุหลาบ เยอบีร่า เบญจมาศ มะลิ ดาวเรือง หน้าวัว กระเจียว บัวหลวง เป็นต้น

ปี 2565 ภาคเหนือ (จังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดหนองคาย ขอนแก่น) และภาคกลาง (นครปฐม กาญจนบุรี)

ปี 2566 ภาคเหนือ (จังหวัดเชียงราย) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดนครราชสีมา) และภาคกลาง (จังหวัดนนทบุรี)

ปี 2567 ภาคกลาง (จังหวัดราชบุรี) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดอุดรธานี) และภาคใต้ (จังหวัดสุราษฎร์ธานี พัทลุง และกระบี่)

สำรวจโดยการสุ่มจำนวน 20 ต้นต่อหนึ่งแปลงตามวิธีการของ Funderburk, *et. al*. (2019) และใช้วิธีการตีหรือเขย่าส่วนของพืชเช่นใบและดอกประมาณ 15 ครั้งเพื่อให้เพลี้ยไฟตกลงบนกระดาษขาวที่รองรับและใช้พู่กันเขี่ยเพลี้ยไฟแต่ละตัวลงในขวดที่บรรจุน้ำยา AGA (Alcohol 60%: Glycerine: Acetic acid อัตราส่วน 10:1:1) สำหรับศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาบันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟที่เก็บได้เช่นพืชที่เก็บส่วนของพืชที่เก็บสถานที่เก็บค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันที่เก็บและชื่อผู้เก็บลงในขวดดองเพลี้ยไฟ

2. นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการโดยนำตัวเต็มวัยในน้ำยา AGA ไปทำสไลด์ถาวรตามวิธีการของศิริณี (2544)

3. บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของขวดดองตัวอ่อนและตัวเต็มวัยได้แก่ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้วัน/เดือน/ปีสถานที่เก็บตัวอย่างและชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

4. จัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิด (key) ของเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้

5. จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลงโดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 4 อนุกรมวิธานของผีเสื้อหนอนกระทู้สกุล*Spodoptera* Guenée, 1852 (Lepidoptera: Noctuidae) ในประเทศไทย (2565-2567)

1. สำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างผีเสื้อและหนอนกระทู้สกุล *Spodoptera* จากแปลงปลูกพืช

ปี 2565 ภาคเหนือ (จังหวัดเชียงใหม่ น่าน) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดเพชรบูรณ์ ขอนแก่น นครราชสีมา) ภาคใต้ (จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี ตรัง)

ปี 2566 ภาคเหนือ (จังหวัดเชียงราย พิษณุโลก นครสวรรค์) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดอุบลราชธานี) ภาคกลาง (จังหวัดอ่างทอง สุพรรณบุรี นครปฐม และกรุงเทพมหานคร)

ปี 2567 ภาคกลาง (จังหวัดกาญจนบุรี เพชรบุรี) และภาคใต้ (จังหวัดระนอง นครศรีธรรมราช สงขลา)

หนอนกระทู้ชนิดต่างๆที่สำรวจพบส่วนหนึ่งนำไปดองรักษาสภาพโดยแช่ในสารรักษาสภาพตัวหนอนแล้วจึงย้ายตัวอย่างดองในเอธิลแอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol) อีกส่วนหนึ่งนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ดักแด้และตัวอย่างผีเสื้อที่มีสภาพสมบูรณ์บันทึกข้อมูลขณะเก็บตัวอย่าง ได้แก่ ชื่อพืชเศรษฐกิจในแปลงนั้น พันธุ์พืช อายุพืช ลักษณะการทำลายพืชที่พบ สถานที่ พิกัดภูมิศาสตร์ สถานที่ วัน/เดือน/ ปีชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ขนาดพื้นที่ และข้อมูลอื่นๆ เพื่อใช้จัดทำแผ่นป้ายบันทึกรายละเอียดของแมลงเมื่อเสร็จสิ้นการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิดและนำตัวอย่างแมลงนั้นเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์ต่อไป

2. ตัวอย่างผีเสื้อหนอนกระทู้ชนิดต่างๆ ที่พบในการสำรวจ และที่เพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการจับใส่ขวดฆ่า เมื่อตายแล้วนำตัวอย่างผีเสื้อไปจัดรูปร่าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบ นำตัวอย่างผีเสื้อบางส่วนทั้งเพศผู้และเพศเมีย แยกส่วนท้องออกแล้วนำไปผ่านกระบวนการแยกอวัยวะสืบพันธุ์และจัดทำสไลด์ถาวร

3. นำตัวอย่างทั้งผีเสื้อและหนอนที่ดองรักษาสภาพไว้ รวมทั้งสไลด์ถาวรของอวัยวะสืบพันธุ์ มาตรวจดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ ตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาที่สำคัญทางอนุกรมวิธานเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชนิดผีเสื้อหนอนกระทู้โดยใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยที่เตรียมไว้สรุปผลการศึกษาผีเสื้อหนอนกระทู้สกุล *Spodoptera* ในประเทศไทยว่าชนิดใดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาระหว่างชนิดนั้นๆ เป็นอย่างไร

4. จัดเก็บตัวอย่างผีเสื้อหนอนกระทู้สกุล *Spodoptera* ทุกชนิดที่จำแนกเรียบร้อยแล้วไว้ในพิพิธภัณฑ์โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลงเพื่อการตรวจสอบสืบค้นและอ้างอิงในภายหลัง

<u>กิจกรรมที่ 2</u> ชีววิทยาของแมลง ไรศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจและศัตรูธรรมชาติที่มีศักยภาพในการควบคุมศัตรูพืช

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาชีววิทยาไรแดงอัญชัน *Tetranychus piercei* McGrego (2565-2566)

1. การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไรแดงอัญชันในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวอย่างไรที่เก็บได้บนพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ มาเลี้ยงบนใบพืชอาศัย 5 ชนิด ดังนี้

- ปี 2565 เลี้ยงบนใบพืช 3 ชนิด ได้แก่ ถั่วพู ถั่วเหลือง และดาวเรือง
- ปี 2566 เลี้ยงบนใบพืช 2 ชนิด ได้แก่ กุหลาบ และอัญชัน

โดยนำตัวอย่างไรที่เก็บได้บนพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ มาเลี้ยงบนใบพืชอาศัย และวางอยู่บนสำลีชุ่มน้ำในถาดพลาสติก หล่อน้ำถาดเลี้ยงตลอดเวลา และวางบนชั้นใต้แสงไฟฟลูออเรสเซ็นต์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องปฏิบัติการอุณหภูมิ 27 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70-80 % RH.เพื่อให้ไรเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆจนมากเพียงพอ

2. การศึกษาชีววิทยาไรแดงอัญชัน โดยนำตัวเต็มวัยเพศเมียของไรที่เลี้ยงไว้จำนวน 40-50 ตัวลงบนใบกุหลาบ และอัญชัน ทิ้งไว้ให้วางไข่ 3-4 ชั่วโมง นำไข่ที่ได้มาแยกเลี้ยงเดี่ยวๆบนใบพืช ที่ตัดเป็นแผ่นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.7 เซนติเมตร วางบนแผ่นสำลีชุ่มน้ำในกล่องพลาสติกทำการทดลอง 100 ตัว ในแต่ละพืชอาศัย 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)

การทดลองที่ 2.2 ชีววิทยาของแมลงช้างสีน้ำตาล ชนิด *Micromus timidus* Hagen, 1853 (Neuroptera:Hemerobiidae) และแมลงช้างปีกแป้ง ชนิด *Semidalis aleyrodiformis* (Stephens, 1836) (Neuroptera: Coniopterygidae) (2565-2566)

1. เก็บรวบรวมแมลงช้างสีน้ำตาล ชนิด *M. timidus* และแมลงช้างปีกแป้ง ชนิด *S. aleyrodiformis* ทั้งระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัย รวมทั้งเหยื่อของแมลงช้าง ได้แก่ เพลี้ยแป้ง เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยไฟ และไรศัตรูพืช

ปี 2565 ภาคเหนือ (จังหวัดเชียงใหม่ น่าน) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เพชรบูรณ์ ขอนแก่น นครราชสีมา) และภาคใต้ (จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี และตรัง)

ปี 2566 ภาคเหนือ (จังหวัดเชียงราย พิษณุโลก นครสวรรค์) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดอุบลราชธานี) ภาคกลาง (จังหวัดอ่างทอง สุพรรณบุรี นครปฐม กาญจนบุรี เพชรบุรี) และภาคใต้ (จังหวัดระนอง นครศรีธรรมราช สงขลา)

แมลงช้างและเหยื่อชนิดต่างๆ ที่สำรวจพบ นำไปเพาะเลี้ยงในกล่องเลี้ยงแมลง ในห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิเฉลี่ย 25±2 องศาเซลเซียส เลี้ยงด้วยเหยื่อที่พบในธรรมชาติขณะเก็บตัวอย่าง จนได้แมลงช้างตัวเต็มวัย นำมาจับคู่ผสมพันธุ์ เพื่อได้จำนวนไข่และตัวอ่อนแมลงช้างสำหรับการทดลองขั้นต่อไป เมื่อได้ชนิดที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ และมีจำนวนเพียงพอสำหรับการทดลองแล้ว นำไปเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาชีววิทยาและการเลือกกินเหยื่อของแมลงช้าง โดยเลี้ยงด้วยเหยื่อ ได้แก่ เพลี้ยแป้ง เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยไฟ และไรศัตรูพืช จนกระทั่งได้ตัวเต็มวัย นำมาจับคู่ผสมพันธุ์และชักนำให้วางไข่ ตลอดการเพาะเลี้ยงบันทึกข้อมูลเพื่อศึกษาชีววิทยา ได้แก่ ขนาดของตัวอ่อนในแต่ละวัย จำนวนที่รอดชีวิตและตาย และระยะเวลาที่ใช้ในวงจรชีวิตของแมลงช้างระยะต่างๆ ได้แก่ ระยะไข่ ระยะหนอนวัยต่างๆ ระยะดักแด้ ระยะตัวเต็มวัย และจำนวนไข่ที่แมลงช้างเพศเมียรุ่นต่อมาวางไข่ได้ นำข้อมูลที่ได้ มาจัดทำตารางชีวิต (Biological life table) เพื่อวิเคราะห์การเจริญเติบโต ตามแนวทางของ อินทวัฒน์

กรมวิชาการเกษตร

(2548) และวิเคราะห์ชนิดของเหยื่อที่ตัวอ่อนแมลงช้างชนิดนั้นๆ ชอบ รวมทั้งระยะของแมลงช้างที่สามารถกินเหยื่อมากที่สุด

2. การทดสอบศักยภาพการกินเหยื่อของแมลงช้างที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ โดยเพาะเลี้ยงแมลงช้างที่ศึกษาและเหยื่อ เพื่อเพิ่มปริมาณสำหรับการทดสอบต่อไป เมื่อได้จำนวนเพียงพอสำหรับการทดลองแล้ว นำไปเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาศักยภาพการกินเหยื่อของแมลงช้าง โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 10 ซ้ำ มี 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เพาะเลี้ยงตัวอ่อนแมลงช้างด้วยเพลี้ยแป้ง

กรรมวิธีที่ 2 เพาะเลี้ยงตัวอ่อนแมลงช้างด้วยเพลี้ยอ่อน

กรรมวิธีที่ 3 เพาะเลี้ยงตัวอ่อนแมลงช้างด้วยแมลงหวี่ขาว

กรรมวิธีที่ 4 เพาะเลี้ยงตัวอ่อนแมลงช้างด้วยเพลี้ยไฟ

กรรมวิธีที่ 5 เพาะเลี้ยงตัวอ่อนแมลงช้างด้วยไรศัตรูพืช

นำเหยื่อแมลงช้างทั้ง 5 ชนิดๆ ละ 100 ตัว ใส่ลงบนใบพืชอาหารของเหยื่อชนิดนั้นๆ ที่มีขนาด 2×2 เซนติเมตร แล้วใส่ลงกล่องพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 3 เซนติเมตร ปล่อยตัวอ่อนแมลงช้างวัยที่สามารถกินเหยื่อได้มากที่สุดลงในกล่อง กล่องละ 1 ตัว ทิ้งไว้ให้กินเหยื่อนาน 48 ชั่วโมง บันทึกจำนวนของเหยื่อที่เหลืออยู่ทุกๆ 24 ชั่วโมง แล้วเติมเหยื่อใหม่ให้ครบ 100 ตัว เพื่อหาจำนวนที่ถูกกินไปเฉลี่ยต่อวัน ทำการทดลอง 10 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ด้วยวิธี Analysis of Variance เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3. สรุปผลการทดลอง ได้ชีววิทยาเพื่อประเมินศักยภาพการกินเหยื่อเบื้องต้นของแมลงช้างสีน้ำตาล ชนิด *M. timidus* และแมลงช้างปีกแป้ง ชนิด *S. aleyrodiformis* ที่จะสามารถนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีได้ในอนาคต บันทึกรายงานผลการทดลอง

การทดลองที่ 2.3 ชนิดและชีววิทยาของมวนตัวห้ำ สกุล *Nesidiocoris* (Hemiptera: Miridae) (2565-2567)

ปีงบประมาณ 2565 ดำเนินการจำแนกชนิดและเตรียมพืชอาศัยและแมลงศัตรูพืชที่ใช้เป็นเหยื่อของมวนตัวห้ำสกุล *Nesidiocoris*

การศึกษาชีววิทยาของมวนตัวห้ำสกุล *Nesidiocoris* (ปี 2566)

ดำเนินการในห้องปฏิบัติการที่อุณหูมิเฉลี่ย 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75±1 เปอร์เซ็นต์ ดังนี้ นำต้นมะเขือเทศใส่ในโหลพลาสติก พร้อมทั้งใส่แมลงที่มวนตัวห้ำกินเป็นอาหาร และปล่อยมวนตัวห้ำจำนวน 100 ตัว แล้วปิดฝาโหลโดยใช้ผ้ามุ้งครอบ จากนั้นทิ้งไว้ให้มวนตัวห้ำวางไข่ เมื่อพบไข่ แยกเลี้ยงในกล่องพลาสติกเพื่อให้ไข่ฟัก เมื่อไข่ฟักเป็นตัวอ่อน ทำการให้แมลงอาหารสำหรับมวนตัวห้ำ จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงวัยของมวนตัวห้ำ ทำการบันทึกลักษณะไข่ ตัวอ่อนแต่ละวัย ระยะเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงวัยโดยละเอียด

กรมวิชาการเกษตร

การศึกษาตารางชีวิต Life table (ปี 2567)

นำไข่มวนตัวห้ำที่ได้มาจากการศึกษาชีววิทยาแต่ใช้ไข่ทั้งหมดที่ได้ในวันนั้นรวม 100 ฟอง มาเลี้ยงในกล่องพลาสติก ทำการเลี้ยงเช่นเดียวกับการศึกษาชีววิทยา ทำการตรวจนับและเปลี่ยนแมลงอาหารทุกวัน ติดตามการเจริญเติบโตจนมวนตัวห้ำเป็นตัวเต็มวัย ตรวจนับตัวเต็มวัยที่เกิดขึ้น จากนั้นทำการแยกเลี้ยงตัวเต็มวัยต่อในกล่องพลาสติก (ตัวผู้และตัวเมีย 1 คู่) เมื่อวางไข่ทำการให้แมลงอาหาร ตรวจนับไข่ทุกวันจนตัวเมียหยุดวางไข่และตัวเต็มวัยตายหมด นำข้อมูลที่ได้มาสร้างตารางชีวิตแบบชีววิทยา และวิเคราะห์ค่าคุณลักษณะทางชีววิทยาต่างๆ เช่น อัตราส่วนทางเพศ (sex ratio) อัตราการขยายพันธุ์สูงสุด (intrinsic rate of increase, rc) อัตราการขยายพันธุ์สุทธิในชั่วอายุขัย (net reproductive rate, R0) ตามวิธีของ อินทวัฒน์ (2548) และ เรณู (2548)

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 การจำแนกชนิดแมลง สัตว์ศัตรูพืชเศรษฐกิจด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

การทดลองที่ 1 การจำแนกชนิดและเขตการแพร่กระจายจักจั่นศัตรูอ้อย (Hemiptera : Cicadidae) โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล (2565-2566)

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างและการศึกษาเขตการแพร่กระจาย (ดำเนินการปี 2565/2566)

เก็บรวบรวมตัวอย่างจักจั่นศัตรูอ้อยในพื้นที่ปลูกอ้อยที่สำคัญของประเทศไทย สำหรับวิธีการเก็บตัวอย่างจะใช้สวิงโฉบตัวเต็มวัยและตั้งกับดักแสงไฟ พร้อมทั้งถ่ายภาพจักจั่นแต่ละระยะ บันทึกรายละเอียด พืชอาหาร สถานที่เก็บตัวอย่าง วัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) ซึ่งประกอบด้วยค่าละติจูด (Latitude) ค่าลองติจูด (Longitude) ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (Altitude) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างและชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง สำหรับตัวเต็มวัยของจักจั่นจะทำการฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า (killing jar) ซึ่งบรรจุน้ำยา ethyl acetate หลังจากจักจั่นตายใช้ซองกระดาษรูปสามเหลี่ยมคลี่ออกเพื่อห่อในลักษณะคล้ายห่อทอฟฟี่นำไปเก็บไว้ในกล่องพลาสติกเพื่อป้องกันการเสียหาย และอีกส่วนจะเก็บในแอลกอฮอล์ 70 – 95 เปอร์เซ็นต์ และนำไปเก็บในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นอกจากตัวอย่างจักจั่นที่ได้จากสภาพธรรมชาติแล้ว มีตัวอย่างจักจั่นที่มีอยู่เดิมในพิพิธภัณฑ์กรมวิชาการเกษตร ตัวอย่างที่ได้จากนักวิชาการ และตัวอย่างจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้โดยมีแผนการปฏิบัติการเก็บตัวอย่างจักจั่นศัตรูอ้อยในพื้นที่ต่างๆ ดังนี้

ปี 2565 ภาคกลาง ได้แก่ นครปฐม สุพรรณบุรี กาญจนบุรี ราชบุรี ชัยนาท สระบุรี ลพบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี
ภาคเหนือ ได้แก่ นครสวรรค์ พิจิตร พิษณุโลก กำแพงเพชร ตาก เชียงใหม่ เชียงราย

ปี 2566 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ นครราชสีมา สุรินทร์ ขอนแก่น บุรีรัมย์ สกลนคร อุบลราชธานี เลย
ภาคตะวันออก ได้แก่ สระแก้ว ชลบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา จันทบุรี ระยอง

2. การศึกษาชีววิทยาเบื้องต้น (2565)

นำตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียของจักจั่นศัตรูอ้อยที่รวบรวมได้จากแปลงปลูก มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวเต็มวัย จำนวน 40 ตัว มาเพาะเลี้ยงรวมกันในตู้กระจกขนาด 30 x 65 x 40 เซนติเมตร และทำการปลูกต้นอ้อยให้เป็นอาหาร สังเกตการเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิต บันทึกข้อมูล ทำการวัดขนาดและถ่ายภาพแต่ละระยะการเจริญเติบโต

ศรีวิชาการเกษตร

3. การจัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ดำเนินการปี 2565 - 2566)

นำตัวอย่างจักจั่นที่เก็บรวบรวมได้มาจัดรูปร่าง โดยนำตัวเต็มวัยที่ฆ่าแล้วไปจัดรูปร่างบนไม้จัดรูปร่างตัวอย่างแมลง ใช้เข็มไร้สนิมปักส่วนของสคิวเทลลัม (scutellum) เยื้องไปทางขวาเล็กน้อย จัดขาทั้ง 3 คู่ ให้อยู่ในลักษณะเกาะหรือเดิน โดยใช้เข็มหมุดขนาดกลางเป็นตัวยึด นำไปอบให้แห้งในตู้อบ (oven) ปรับอุณหภูมิ องศา 50 วัน ขึ้นกับขนาดตัวอย่าง 30-เซลเซียส ใช้เวลา 15 นำมาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาดลำตัว รูปร่าง ลักษณะ และสี เป็นต้น นอกจากนี้ยังต้องตรวจลักษณะภายใน คือ อวัยวะเพศ (genitalia) ของทั้งเพศผู้และเพศเมียในการจำแนกชนิด เนื่องจากจักจั่นบางชนิดมีลักษณะภายนอกที่ใกล้เคียงกันมากไม่สามารถจำแนกได้ว่าเป็นชนิดไหน และตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดของ Boulard (2013) ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ ตัวอย่างจักจั่นที่มีการจัดจำแนกแล้ว จะทำการจัดเก็บลงในกล่องกระดาษสี่เหลี่ยมสีขาวจัดเรียงตามอักษรของลำดับชนิด นำจัดเข้าลิ้นชักในตู้เก็บแมลงจัดเก็บแมลงในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง เพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลังจัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุลและชนิดของจักจั่น ที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

4. การศึกษาลำดับพันธุกรรม (ดำเนินการปี 2565 - 2566)

นำตัวอย่างจักจั่นที่เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 95% มาสกัดสารพันธุกรรม (DNA Extraction) โดยใช้ชุดสกัด Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit ของบริษัท Favorgen Biotech Corp. ทำการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน mtCOI ของจักจั่น (LCO1490 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' และ
HCO2198 5'-TAAACTTCAGGGTGCCAAAAAATCA-3' (Folmer *et al*., 1994) และเพิ่มปริมาณชิ้น DNA เป้าหมาย โดยใช้ส่วนผสมของ MyTag HS Red DNA Polymerase (Bioline, Australia) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 25 ไมโครลิตร นำส่วนผสมของ MyTag HS Red DNA Polymerase ใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของสารพันธุกรรม (PCR machine) ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis) โดยหยอด PCR product ลงใน 2% agarose gel ใน 0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลล์, 400 mp (Voltage) เป็นเวลา 45 นาที ทำให้ PCR product มีความบริสุทธิ์ด้วย Isolate II PCR and Gel kit; Cat No. BIO-52060 ทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing) เพื่อตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยส่งตัวอย่างดีเอ็นเอเป้าหมายที่บริสุทธิ์ของจักจั่นไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประเทศเกาหลีใต้ นำข้อมูลของดีเอ็นเอที่ได้มาทำการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับเบสจักจั่นที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) เพื่อให้ได้ DNA barcoding ที่มีความถูกต้อง โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดทำรหัสดีเอ็นเอ (assemble) เช่น Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่า Barcode นำผลที่ได้มาเปรียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของจักจั่นที่อยู่ในฐานข้อมูล GeneBank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บรวบรวมฐานข้อมูล ทางพันธุกรรมศาสตร์จากทั่วโลกอีกครั้ง เพื่อยืนยันความถูกต้อง ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) ในการศึกษาจะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลง

ศรีนครินทรวิโรฒ

ศัตรูพืช และดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอที่ได้มาศึกษา

การทดลองที่ 2 การจำแนกชนิดเพลี้ยหอยเกล็ด สกุล *Pinnaspis* Cockerell, 1892 ด้วยสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุล (2565-2566)

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดสกุล *Pinnaspis* (2565-2566)

1.1 โดยสำรวจแหล่งปลูกพืชที่สำคัญตามภูมิภาคต่างๆ ดังต่อไปนี้

ปี 2565 ภาคกลาง: สระบุรี ชัยนาท อุทัยธานี กำแพงเพชร

ภาคเหนือ: เชียงใหม่ ลำปาง แพร่ น่าน พิษณุโลก

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ: นครราชสีมา มหาสารคาม มุกดาหาร หนองคาย อุบลราชธานี

ปี 2566 ภาคตะวันออก: ชลบุรี ระยอง จันทบุรี

ภาคตะวันตก: ราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี

ภาคใต้: ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎธานี สงขลา

เมื่อพบตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยหอยอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วใส่ในถุงพลาสติก บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์(GPS) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ สำหรับการเก็บตัวอย่างในแต่ละจุด จะเก็บให้ได้ตัวอย่างมากที่สุด เพื่อนำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการและจัดทำสไลด์ถาวรในการจำแนกชนิดต่อไป

1.2 นำตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพ บันทึกรายละเอียด ทำการดองตัวอย่างในแอลกอฮอล์ 95% โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 20 ตัวอย่างต่อ และเก็บตัวอย่างที่ได้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสนำไปศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม ส่วนไคติน (chitin) ที่เหลือนำมาทำสไลด์ถาวรเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเก็บรักษาเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ (Voucher specimen) ตัวอย่างบางส่วนนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาข้อมูลชีววิทยา เช่น ตัวห้ำ ตัวเบียน วงจรชีวิตเบื้องต้น

2. การจำแนกชนิดเพลี้ยหอยเกล็ดสกุล *Pinnaspis* ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (2565-2566)

2.1 นำตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดที่ดองในแอลกอฮอล์ 95% ที่ไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาทำการสกัดสารพันธุกรรม (DNA Extraction) ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป Isolate II Genomic DNA Kit MBL-BIO-52066 ซึ่งเป็นชุดสกัดสารพันธุกรรมที่ใช้สำหรับเนื้อเยื่อของมนุษย์และสัตว์ ดังวิธีการต่อไปนี้

1) นำตัวอย่างมาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml โดยไคตินเพลี้ยหอยที่เหลือนำไปทำสไลด์ถาวรเพื่อใช้ในการศึกษาสัณฐานวิทยาและเก็บไว้เป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ (Voucher specimen)

2) สลายผนังเซลล์ (Lysis): โดยการเติม Lysis Buffer GL ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และ Protinase K Solution ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ปิดหลอดให้สนิท พร้อมทั้งพันด้วย พาราฟีน (Paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 - 24 ชั่วโมง เขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม ATL Buffer ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และบ่มที่ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และเขย่าให้สม่ำเสมอ

กรมวิชาการเกษตร

3) จับสารพันธุกรรม (Bind DNA): เขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 100%) ปริมาณ 210 ไมโครลิตร และเขย่าให้สม่ำเสมอเขย่าอย่างเร็วประมาณ 15 วินาที เติมสารละลายบัฟเฟร์ AL ปริมาณ 200 ไมโครลิตร เขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 100%) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และเขย่าให้สม่ำเสมอ ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน tube และตกตะกอน ด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน)

4) ล้างตะกอน (Wash silica membrane): โดยการเติม Wash Buffer AW1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) จากนั้นเติม Wash Buffer AW2 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 20,000x g เป็นเวลา 3 นาที จากนั้น ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน

5) ตกตะกอนสารพันธุกรรมให้แห้ง (Dry silica membrane): ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 20,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายหลอดมาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก 1.5 ไมโครลิตร

6) ละลายสารพันธุกรรม (Elute DNA): โดยการเติม Elution Buffer AE ปริมาณ 200 ไมโครลิตร จากนั้น ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำ DNA ที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

2.2 ทำการเพิ่มปริมาณยีน mtCOI ด้วยวิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ C1J2195 และ TL2N3014 ในการเพิ่มปริมาณ DNA

Primer Name	Sequence	Base
C1J2195	TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT	24
TL2N3014	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	25

สังเคราะห์ยีน mtCOI ของเพลี้ยหอยเกล็ดจากดีเอ็นเอที่เตรียมได้ โดยใช้ส่วนผสมของ MyTaq HS Red DNA Polymerase (Bioline, Cat No. BIO-21114) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร

Nuclease free water	10.5	ไมโครลิตร
5x MyTaq Red Reaction Buffer	4	ไมโครลิตร
10 pmole CP-F	1	ไมโครลิตร
10 pmole CP-R	1	ไมโครลิตร
MyTaq HS DNA Polymerase	0.5	ไมโครลิตร
DNA template	3	ไมโครลิตร
Total	20	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

1) Predenaturation	94o C	5 นาที
2) Three step-cycling	35	cycles
Denaturation	94o C	30 วินาที
Annealing	50o C	30 วินาที
Extension	72o C	45 วินาที
3) Final extension	72o C	10 นาที

2.3 ตรวจสอบ PCR product โดยการตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมที่ต้องการ โดยการให้ประจุของสารที่มีประจุแยกออกจากกัน ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis) โดยหยด PCR product ลงในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 % (1% agarose gel) และให้ PCR product เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย TBE (Tris-borate, EDTA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลล์, 400 mp (Voltage) เป็นเวลา 30 นาที

2.4 ส่ง PCR product เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ มาทำการวิเคราะห์โดยทำการเปรียบเทียบลำดับเบสเพลี้ยหอยเกล็ดในสกุล *Pinnaspis* ที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) เพื่อให้ได้ DNA barcoding ที่มีความถูกต้อง โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดทำรหัสดีเอ็นเอ (assemble) เช่น Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และบันทึกข้อมูลในรูปแบบ FASTA ไฟล์

2.5 นำข้อมูล Barcode ที่ได้มาตรวจสอบชนิด กับ Gene Bank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บ รวบรวมฐานข้อมูล ทางพันธุกรรมศาสตร์จากทั่วโลกอีกครั้ง เพื่อยืนยันความถูกต้องข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) ในการศึกษาจะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืช และดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

3. การจำแนกชนิดเพลี้ยหอยเกล็ดสกุล *Pinnaspis* ด้วยสัณฐานวิทยา (2565-2566)

3.1 นำไคตินที่เหลือจากการศึกษาพันธุกรรมและดองในแอลกอฮอล์ 70% ที่ไปทำสไลด์ถาวรโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Williams and Watson (1988) นำตัวอย่างสไลด์ที่ทำเสร็จเรียบร้อยไปอบให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาอย่างน้อย 3 เดือน ขึ้นอยู่กับตัวอย่าง

3.2 ตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยหอยเกล็ดบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Williams and Watson (1988) Rosen (1990) Gill (1997) และ Miller and Devidson (2005) รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างสไลด์เพลี้ยหอยที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรและวาดรูปแสดงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกเพลี้ยหอยแต่ละชนิด และจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพลี้ยหอยเกล็ด สกุล Pinnaspis ซึ่งจะนำตัวอย่างสไลด์ที่นำไคตินที่เหลือจากการศึกษาพันธุกรรมมาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ได้แก่ ขนาดความยาวของลำตัว ลักษณะของส่วนหัวและอก ส่วนของ pygidium ในวงศ์ย่อยนี้จะมี 1-barred duct และบริเวณปลายส่วนของ pygidium จะมี lobe จำนวน 3 คู่ ซึ่งในแต่ละชนิดจะมีรูปทรงที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังต้องศึกษาลักษณะการเรียงตัวและจำนวนของ microduct ทั้งชนิดแบบสั้น และแบบยาว เพื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละ

กรมวิชาการเกษตร

ชนิด ในบางชนิดจำเป็นต้องยืมตัวอย่าง (voucher specimens) จากพิพิธภัณฑ์หรือหน่วยงานอื่นๆจากต่างประเทศเพื่อเปรียบเทียบโดยเฉพาะ หลังจากนั้นจึงนำข้อมูลต่างๆที่ได้รวบรวมจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยหอยเกล็ดในสกุลนี้ โดยในแนวทางวินิจฉัยจะมีทั้งข้อมูลสัณฐานวิทยาที่ใช้จำแนกเพลี้ยหอยเกล็ดจนถึงระดับชนิด และยังมีข้อมูลการแพร่กระจาย พืชอาศัย และแมลงศัตรูธรรมชาติที่พบจากการสำรวจ

3.3 จัดเก็บตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดในกล่องใส่สไลด์ถาวรและนำเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล และจัดทำหมายเลขของตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดแต่ละสไลด์เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์ต่อไป

การทดลองที่ 3 การจำแนกชนิดของทากเล็บมือนางสกุล *Parmarion* ด้วยสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุล (2565-2566)

1. การเก็บตัวอย่างทากเล็บมือนาง (2565-2566)

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างทากเล็บมือนางทั่วประเทศไทย จดบันทึกสถานที่ สภาพแวดล้อม ช่วงเวลาที่พบทากเล็บมือนาง โดยในปี 2565 สำรวจในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือและภาคภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในปี 2566 สำรวจในพื้นที่ตะวันออกและภาคใต้

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทาก (2565-2566)

ทำการสังเกต ถ่ายภาพตัวอย่างเปลือกทากเล็บมือนางในห้องปฏิบัติการ พร้อมกับวัดค่า shell length, shell width และ shell height ด้วยเวอร์เนีย นำข้อมูลที่วัดได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้ ANOVA จากโปรแกรม SPSS และทำการเปรียบเทียบข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทากกับเอกสารทางวิชาการทั้งภายในและต่างประเทศ

3. การศึกษาข้อมูลทางอณูชีววิทยาของทากเล็บมือนาง (2566-2566)

ทำการศึกษาข้อมูลทางอณูชีววิทยาของทากเล็บมือนาง โดยใช้ยีน Cytochrome C oxidase subunit I หรือยีน COI

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างทากเล็บมือนางโดยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอ จากเนื้อเยื่อของสัตว์ พร้อมกับตรวจวัดคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟริซิส การตรวจวัดคุณภาพของดีเอ็นเอสามารถทำได้ด้วยการนำสารละลายดีเอ็นเอจากตัวอย่างทากเล็บมือนางผสมกับสีย้อมในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 และนำไปหยอดลงในหลุมของอะกาโรสเจล ที่มีความเข้มข้นของเนื้อเจลที่ 1% ต่อความเข้มข้นทีบีอีบัฟเฟอร์ 99% ทำการจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักดิ์ 80 โวลต์ผ่านอะกาโรสเจลเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วยสารละลายเอทิเดียมโบรไมด์และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี เทียบกับขนาดดีเอ็นเอของทากเล็บมือนางกับดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ และเก็บรักษาดีเอ็นเอของทากไว้ที่ตู้แช่งแข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สนใจต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

3.2 การเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทำการเพิ่มปริมาณยีน COI ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ตามวิธีการของ Folmer *et al* (1994) โดยแต่ละไพร์เมอร์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ COI-1490 (5’ GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3’)

รีเวิร์สไพรเมอร์ COI-2198 (5’ TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 50 µl ประกอบด้วยสารเคมีต่อไปนี้

10x buffer	5 µl
10 mM dNTP mix	2 µl
10 µM COI-1490 forward primer	5 µl
10 µM COI-2198 reverse primer	5 µl
2 U/µl Taq polymerase	1 µl
template DNA (ดีเอ็นเอของทากเล็บมือนาง)	1 µl
น้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ	31 µl

นำสารทั้งหมดใส่ในหลอดพีซีอาร์และผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง thermocycler ภายใต้อุณหภูมิดังนี้

ช่วงเริ่มต้น

(1) 95°C เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ

ช่วงเพิ่มปริมาณ

(2) 95°C เป็นเวลา 1 นาที

(3) 55°C เป็นเวลา 1 นาที

(4) 72°C เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที

ทำซ้ำเรียงตามลำดับจาก (2) ถึง (4) 35 รอบ

ช่วงสุดท้าย

(5) 72°C เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ

ทำการตรวจสอบว่ามียีนที่เราต้องการเพิ่มขึ้นมาในผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เกิดขึ้นจากขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหรือไม่ โดยนำเอาผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปผสมกับสีย้อมในอัตราส่วน 1 ต่อ 6 จากนั้นนำไปหยอดลงในหลุมของอะกาโรสเจล ที่มีความเข้มข้นของเนื้อเจลที่ 1.8% ต่อความเข้มข้นทีบีอีบัฟเฟอร์ 98.2% ทำการจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักดิ์ 80 โวลต์ผ่านอะกาโรสเจลเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วยสารละลายเอทิเดียมโบรไมด์และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีเพื่อเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ ถ้ามียีน COI ที่เราต้องการเพิ่มขึ้นจะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ความยาวประมาณ 650 คู่เบสขึ้นมา ให้นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสรอการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

3.3 การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated sequencer ที่มีให้บริการโดยบริษัทเอกชนที่รับจ้างอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำไปวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอทากตัวอย่างอื่น ๆ รวมถึงดีเอ็นเอในฐานข้อมูลของ gen bank ต่อไป

4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (2566)

นำไฟล์ที่ได้จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated sequencer มาวิเคราะห์ และตัดบริเวณสัญญาณรบกวนออก เพื่อให้ได้ไฟล์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ทุกตัวอย่าง หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงด้วยโปรแกรม ClustalX2 (Larkin *et al*. 2007) ทำการวิเคราะห์ค่าความแปรผันทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 (Kumar et al., 2016) ทำการวิเคราะห์หาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม DNAsp version 5.10.01 (Librado and Rozas, 2009) ดูและทำการเปรียบเทียบกับยีน COI ของทากเล็บมือนางฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) จากเว็บไซต์ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=

การทดลองที่ 4 การจำแนกชนิดและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเพลี้ยแป้ง cryptic species สกุล *Planococcus* Ferris 1950 ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (2565-2567)

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus* (2565-2566)

1.1 โดยสำรวจแหล่งปลูกพืชที่สำคัญตามภูมิภาคต่างๆ ดังต่อไปนี้

ปี 2565 ภาคกลาง: สระบุรี ชัยนาท อุทัยธานี

ภาคเหนือ: เชียงใหม่ ลำปาง

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ: นครราชสีมา มหาสารคาม หนองคาย

ปี 2566 ภาคตะวันออก: ชลบุรี จันทบุรี

ภาคตะวันตก: ตาก เพชรบุรี

ภาคใต้: ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร

เมื่อพบตัวอย่างเพลี้ยแป้งตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยแป้งอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วใส่ในถุงพลาสติก บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์(GPS) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ สำหรับการเก็บตัวอย่างในแต่ละจุด จะเก็บให้ได้ตัวอย่างมากที่สุด เพื่อนำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการและจัดทำสไลด์ถาวรในการจำแนกชนิดต่อไป

1.2 นำตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพ บันทึกรายละเอียด ทำการดองตัวอย่างในแอลกอฮอล์ 95% โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 20 ตัวอย่างต่อ และเก็บตัวอย่างที่ได้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสนำไปศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม ส่วนไคติน (chitin) ที่เหลือนำมาทำสไลด์ถาวรเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเก็บรักษาเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ (Voucher specimen

กรมวิชาการเกษตร

2. ตรวจสอบชนิดเพลี้ยแป้งใน สกุล *Planococcus* ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (2565-2566)

2.1 นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่ดองในแอลกอฮอล์ 95% ที่ไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จำนวน 20 ตัวอย่าง ทำการสกัดสารพันธุกรรม (DNA Extraction) ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป Isolate II Genomic DNA Kit MBL-BIO-52066 ซึ่งเป็นชุดสกัดสารพันธุกรรมที่ใช้สำหรับเนื้อเยื่อของมนุษย์และสัตว์ ดังวิธีการต่อไปนี้

1) นำตัวอย่างมาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml โดยไคตินเพลี้ยแป้งที่เหลือนำไปทำสไลด์ถาวรเพื่อใช้ในการศึกษาสัณฐานวิทยาและเก็บไว้เป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ (Voucher specimen)

2) สลายผนังเซลล์ (Lysis): โดยการเติม Lysis Buffer GL ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และ Protinase K Solution ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ปิดหลอดให้สนิท พร้อมทั้งพันด้วย พาราฟิน (Paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 - 24 ชั่วโมง เขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม ATL Buffer ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และบ่มที่ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และเขย่าให้สม่ำเสมอ

3) จับสารพันธุกรรม (Bind DNA): เขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 100%) ปริมาณ 210 ไมโครลิตร และเขย่าให้สม่ำเสมอเขย่าอย่างเร็วประมาณ 15 วินาทีเติมสารละลายบัฟเฟร์ ALปริมาณ 200 ไมโครลิตร เขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 95%) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และเขย่าให้สม่ำเสมอ ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน tube และตกตะกอน ด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน)

4) ล้างตะกอน (Wash silica membrane): โดยการเติม Wash Buffer AW1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการ ตกตะกอน) จากนั้นเติม Wash Buffer AW2 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 20,000x g เป็นเวลา 3 นาที จากนั้น ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน

5) ตกตะกอนสารพันธุกรรมให้แห้ง (Dry silica membrane): ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 20,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายหลอดมาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก 1.5 ไมโครลิตร

6) ละลายสารพันธุกรรม (Elute DNA): โดยการเติม Elution Buffer AE ปริมาณ 200 ไมโครลิตร จากนั้น ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำ DNA ที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

2.2 ทำการเพิ่มปริมาณยีน mtCOI ด้วยวิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ PcoF1 และ LepR1ในการเพิ่มปริมาณ DNA

Primer Name	Sequence	Base
PcoF1	CCTTCAACTAATCATAAAAATATYAG	26
LepR1	TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA	26

ศรีวิชัยการเกษตร

สังเคราะห์ยีน mtCOI ของเพลี้ยแป้งจากดีเอ็นเอที่เตรียมได้ โดยใช้ส่วนผสมของ MyTaq HS Red DNA Polymerase (Bioline, Cat No. BIO-21114) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร

Nuclease free water	10.5	ไมโครลิตร
5x MyTaq Red Reaction Buffer	4	ไมโครลิตร
10 pmole CP-F	1	ไมโครลิตร
10 pmole CP-R	1	ไมโครลิตร
MyTaq HS DNA Polymerase	0.5	ไมโครลิตร
DNA template	3	ไมโครลิตร
Total	20	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดังนี้

1) Predenaturation	94° C	5 นาที
2) Three step-cycling	35 cycles	
Denaturation	94° C	30 วินาที
Annealing	50° C	30 วินาที
Extension	72° C	45 วินาที
3) Final extension	72° C	10 นาที

2.3 ตรวจสอบ PCR product โดยการตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมที่ต้องการ โดยการให้ประจุของสารที่มีประจุแยกออกจากกัน ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis) โดยหยด PCR product ลงในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 % (1% agarose gel) และให้ PCR product เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย TBE (Tris-borate, EDTA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลล์, 400 mp (Voltage) เป็นเวลา 30 นาที

2.4 ส่ง PCR product เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ มาทำการวิเคราะห์โดยทำการเปรียบเทียบลำดับเบสเพลี้ยแป้งในสกุล *Planococcus* ที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) เพื่อให้ได้ DNA barcoding ที่มีความถูกต้อง โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดทำรหัสดีเอ็นเอ (assemble) เช่น Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และบันทึกข้อมูลในรูปแบบ FASTA ไฟล์ ในการศึกษาจะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืช และดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

3. ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetics analysis) ของเพลี้ยแป้ง (2567)

3.1 นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่ตรวจสอบจากขั้นตอนที่ 2 ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยใช้ตัวอย่างชนิดละ 10 ตัวอย่างทำการสกัดสารพันธุกรรม (DNA Extraction) ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป Isolate II Genomic DNA Kit MBL-BIO-52066

กรมวิชาการเกษตร

3.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PcoF1 (CCTTCAACTAATCATAAAAATATYAG) และ LepR1 (TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA) ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร 10 µM ไพรเมอร์ LCO1490 1 ไมโครลิตร 10 µM ไพรเมอร์ HCO2198 1 ไมโครลิตร สารละลาย 2x Green master mix 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (Deionized water) เป็นปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยนำปฏิกิริยา PCR ใส่เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยกำหนดขั้นตอนและเวลาในปฏิกิริยา PCR cycle ดังนี้ 1) initial-denaturing 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จำนวน 1 รอบ 2) denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 3) annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที 4) extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที โดยในขั้นตอน 2-4 ทำซ้ำ 35 รอบ และ 5) final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีสที่อะกาโรสเจลความความเข้มข้น 1.5% ผสม RedSafe dye ในสารละลาย 1X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง ultraviolet (UV) บันทึกผลด้วยเครื่อง ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ (Gel documentation XR) รุ่น Universal Hood II (Biorad, USA) ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) using ABI BigDye terminator chemistry ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

3.3 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *cox1* ของเพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus* ที่นำมาศึกษาทั้งหมด ทำการวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence assembly) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ FASTA เปรียบเทียบกับ นิวคลีโอไทด์ของเพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus* ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยการ blastn เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) เพื่อยืนยันความถูกต้องลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันหนอนชอนใบ เก็บบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหนอนชอนใบไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank ในรูปแบบ accession number

3.4 ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus* จากยีน *cox1* ที่ศึกษาเปรียบเทียบความถูกต้องกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus* จากฐานข้อมูล Genbank จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าสู่ขั้นตอน alignment ด้วยโปรแกรม MEGAX (Kumar *et al*., 2018) ประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลใช้เกณฑ์มาตรฐาน 2 เกณฑ์ คือ Maximum Likelihood (ML) และ Bayesian Inference (BI) และเปรียบเทียบ topology ที่ได้จากทั้ง 2 เกณฑ์มาตรฐาน โดยมีรายละเอียดการวิเคราะห์ดังนี้ เตรียม dataset ของยีนตำแหน่ง *cox1* สำหรับ Maximum Likelihood (ML) โดยเตรียมไฟล์ .phy วิเคราะห์โดยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ซึ่งจำเพาะต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command –f a) เริ่มจาก random starting tree และ กำหนด maximum likelihood bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง และวิเคราะห์โดย Bayesian inference (BI) เตรียมไฟล์ .nexus ใช้โปรแกรม MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) ใช้วิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) ค่าตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้ Mcmc startingtree = user

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ngen = 10 000 000 temp = 0.25 nruns = 4 samplefreq = 1000 pintfreq = 1000 nchains = 4 savebrlens = yes stoprules = yes stopval = 0.01; ปรับค่า generation temperature substitution model parameters จำนวน generation และ burnin เพื่อให้ได้ consensus topology ตรวจสอบความเชื่อมั่นของผลวิเคราะห์ด้วย cumulative and compare functions โดย AWTY (Nylander *et al.*, 2008)

การทดลองที่ 5 การจำแนกไบโอไทป์ของแมลงหวี่ขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* ในแหล่งปลูกพริกอินทรีย์และแหล่งปลูกพริกใช้สารเคมี ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล (2565-2567)

1. เก็บตัวอย่างแมลงหวี่ขาวยาสูบ (2565-2567)

จากในแปลงปลูกพริกแบบอินทรีย์จังหวัดละ 3 แปลง และแปลงปลูกพริกที่มีการใช้สารเคมี จังหวัดละ 3 แปลง

- ปี 2565 จังหวัดบึงกาฬ และนครพนม
- ปี 2566 จังหวัดชัยภูมิ และขอนแก่น
- ปี 2567 จังหวัดกาฬสินธุ์ และมุกดาหาร

2. การตรวจสอบชนิดแมลงหวี่ขาวยาสูบ โดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล (2565-2567)

สกัดดีเอ็นเอจากแมลงหวี่ขาวที่เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 95% ตามวิธีการของ Walsh *et al.* (1991) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็นต้นแบบ (DNA template) ในการเพิ่มปริมาณยีน mtCOI ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ส่วนผสมของปฏิกิริยามีปริมาตร 22 ไมโครลิตร ประกอบด้วย nuclease free water 4.5 ไมโครลิตร master mix 12.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Bem-Bt-F (TGR TTT TTT GGT CAT CCR GAA GT) และ Bem-Bt-R (TTT ACT GCA CTT TCT GCC) (Shatters *et al.*, 2009) อย่างละ 1 ไมโครลิตร DNA template 3 ไมโครลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดังนี้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis จากนั้นสงผลผลิตดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้) การจำแนก Biotype จากลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน mtCOI และวิเคราะห์ Phylogenetic tree

ตรวจสอบข้อมูลลำดับนิวคลิโอไทด์ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากแมลงหวี่ขาว ด้วยโปรแกรม DNAStar (DNAStar package, USA) และใช้โปรแกรม Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) ตรวจสอบชนิดยีนและไบโอไทป์ จากลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ได้ นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน mtCOI ที่ได้จัดเป็นรูปแบบ Fasta file มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน mtCOI ของแมลงหวี่ขาว *B. tabaci* ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Megalign (DNAStar package, USA) สร้าง Phylogenetic tree ตามวิธี neighbour joining ด้วยโปรแกรม MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางวงวานวิวัฒนาการ

ศรีนครินทรวิโรฒ

การทดลองที่ 6 การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และมอร์โฟเมตริกส์ของแมลงวันหนอนชอนใบในพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย (2565-2567)

1. วิธีการดำเนินการวิจัยสาหรับการศึกษาลำดับพันธุกรรม (2565)

1.1 นำตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มาทำการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) โดยใช้วิธีการตาม Boontop *et al*., 2017 ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Bioline, Australia) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัท โดยนำขาด้านขวาจำนวนสามข้างของแมลงวันหนอนชอนใบ (25 mg) มาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml (ตัวอย่างแมลงที่เหลือเก็บไว้เพื่อเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ (Voucher specimen) จากนั้นเติม Lysis BufferGL ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และ Proteinase K Solution ปริมาณ 25 ไมโครลิตรปิดหลอดให้สนิท พร้อมทั้งพันด้วยพาราฟิน (Paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 - 20 ชั่วโมง แล้วเติม Lysis BufferG3 ปริมาณ 200 ไมโครลิตรและบ่มที่ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และเขย่าให้สม่ำเสมอ เติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute alcohol) ปริมาณ 210 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน ISOLATE II Genomic DNA tube ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที ปั่นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยง) เติม Wash Buffer GW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) จากนั้นเติม Wash Buffer GW2 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีอีกครั้ง ย้ายหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge) 1.5 ไมโครลิตร และเติม Elution Buffer G ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีจากนั้นนำ DNA ที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อให้ในวิธีการต่อไป

1.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ LCO1490 (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) และ HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) (Folmer et al., 1994) ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร 10 µM ไพรเมอร์ LCO1490 1 ไมโครลิตร 10 µM ไพรเมอร์ HCO2198 1 ไมโครลิตร สารละลาย 2x Green master mix 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (Deionized water) เป็นปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยนำปฏิกิริยา PCR ใส่เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยกำหนดขั้นตอนและเวลาในปฏิกิริยา PCR cycle ดังนี้ 1) initial-denaturing 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จำนวน 1 รอบ 2) denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 3) annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที 4) extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที โดยในขั้นตอน 2-4 ทำซ้ำ 35 รอบ และ 5) final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีสที่อะกาโรสเจลความความเข้มข้น 1.5% ผสม RedSafe dye ในสารละลาย 1X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง ultraviolet (UV) บันทึกผลด้วยเครื่อง ด้วย

กรมวิชาการเกษตร

เครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ (Gel documentation XR) รุ่น Universal Hood II (Biorad, USA) ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) using ABI BigDye terminator chemistry ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

1.3 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน cox1 ของแมลงวันหนอนชอนใบที่นำมาศึกษาทั้งหมด ทำการวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence assembly) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ FASTA เปรียบเทียบกับ นิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหนอนชอนใบที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยการ blastn เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) เพื่อยืนยันความถูกต้องลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันหนอนชอนใบ เก็บบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหนอนชอนใบไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank ในรูปแบบ accession number

2. ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetics analysis) ของแมลงวันหนอนชอนใบ (2566)

2.1 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหนอนชอนใบจากยีน *cox1* ที่ศึกษาเปรียบเทียบความถูกต้องกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันหนอนชอนใบจากฐานข้อมูล Genbank จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าสู่ขั้นตอน alignment ด้วยโปรแกรม MEGAX (Kumar *et al*., 2018) ประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลใช้เกณฑ์มาตรฐาน 2 เกณฑ์ คือ Maximum Likelihood (ML) และ Bayesian Inference (BI) และเปรียบเทียบ topology ที่ได้จากทั้ง 2 เกณฑ์มาตรฐาน โดยมีรายละเอียดการวิเคราะห์ดังนี้ เตรียม dataset ของยีนตำแหน่ง *cox1* สำหรับ Maximum Likelihood (ML) โดยเตรียมไฟล์ .phy วิเคราะห์โดยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ซึ่งจำเพาะต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command –f a) เริ่มจาก random starting tree และ กำหนด maximum likelihood bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง และวิเคราะห์โดย Bayesian inference (BI) เตรียมไฟล์ .nexus ใช้โปรแกรม MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) ใช้วิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) ค่าตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้ Mcmc startingtree = user ngen = 10 000 000 temp = 0.25 nruns = 4 samplefreq = 1000 pintfreq = 1000 nchains = 4 savebrlens = yes stoprules = yes stopval = 0.01; ปรับค่า generation temperature substitution model parameters จำนวน generation และ burnin เพื่อให้ได้ consensus topology ตรวจสอบความเชื่อมั่นของผลวิเคราะห์ด้วย cumulative and compare functions โดย AWTY (Nylander *et al*., 2008)

3. ศึกษารูปร่างปีกแมลงวันหนอนชอนใบด้วยเทคนิคมอร์โฟเมทริกส์ (2567)

3.1 เตรียมตัวอย่างปีกเพื่อศึกษารูปร่างของปีกโดยทำสไลด์ถาวร โดยใช้ปีกแมลงวันหนอนชอนใบจำนวน 20 ตัวอย่าง/ชนิด ตัดปีกด้านขวามาวางบนสไลด์ที่หยดน้ำยา canada balsam แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 40 - 45 องศาเซลเซียส ให้แห้ง ถ่ายภาพปีกแมลงวันหนอนชอนใบด้วยกล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อน (compound light microscope) Olympus รุ่น CX41RF (Olympus Co., Tokyo, Japan) และ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

กำหนดจุดสังเกต (landmark) บนปีกแมลงวันหนอนชอนใบ (Boontop *et al*., 2016) ด้วยโปรแกรม TPSDIG2 Version 2.17 (Rohlf, 2013) สร้างไฟล์ในรูปแบบ ของ TPS ไฟล์ ข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลพิกัดคาร์ทีเซียน (cartesian coordinate) ซึ่งเป็นข้อมูลที่อยู่ในระนาบสองมิติ (x, y) หรือสามมิติ (x, y, z) เป็นจุดที่แสดงถึงความสัมพันธ์เชิงหน้าที่ของโครงสร้างหรืออวัยวะที่เรียกว่า “โฮโมโลจี” (homology) มีลักษณะเป็นจุดคู่เหมือน (homologous point) คือ เป็นจุดที่มีตำแหน่งตรงกันทั้งในระดับภายในประชากร (intraspecies) และระหว่างประชากร (interspecies) ซึ่งใช้จุดสังเกตุดังกล่าวเป็นตัววิเคราะห์ความแตกต่างและความแปรผันทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างปีกแมลงวันหนอนชอนใบ

3.2 ศึกษาขนาดเซนทรอยด์ (centroid sizes) ของแมลงวันหนอนชอนใบด้วยโปรแกรม Morpho J version 1.06 (Klingenberg, 2011) ขนาดของเซนทรอย์นั้นมีความสัมพันธ์กับรูปร่างปีก สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบรูปร่างของปีกได้อย่างแม่นยำ (Schutze, *et al*., 2012) โดยขนาดเซนทรอยด์คำนวณจากการรวมระยะทางระหว่างจุดสังเกตแต่ละจุดกับจุดกึ่งกลางของจุดสังเกต (ตำแหน่งเฉลี่ยในพื้นที่สองมิติของพิกัดทั้งหมด) และถอดรากที่สองของผลรวมนี้ (Boontop *et al*., 2016) และเปรียบเทียบขนาดเซนทรอยด์ ของปีกแมลงวันหนอนชอนใบโดยหาค่าเฉลี่ย ค่าความคลาดเลื่อนด้วยการวิเคราะห์แบบ one-way ANOVA โดย Tukey post hoc test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 22 (IBM SPSS Statistics, IBM Corporations, New York, USA)

3.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงขนาดของลำตัวที่มีผลต่อรูปร่างของปีก (allometric effect) โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์สมการแบบถดถอย (regression analysis) จากรูปร่างปีก และขนาดเซนทรอยด์ ด้วยโปรแกรม Morpho J

3.4 วิเคราะห์ความแตกต่างของรูปร่างของปีก (wing shape) แมลงวันหนอนชอนใบตามหลัก Canonical Variate Analysis (CVA) (Zelditch *et al*., 2012) ด้วยโปรแกรม Morpho J

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยย่อยที่ 3 การจำแนกชนิดและคุณลักษณะชีวโมเลกุลของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชที่สำคัญ

การทดลองที่ 1 การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* (Nematoda: Pratylenchidae) ในพรรณไม้น้ำ (2565-2567)

1. เก็บตัวอย่างพืช ดิน วัสดุปลูกของพรรณไม้น้ำ (2565-2567)

เก็บตัวอย่างทั้งรากและต้นพืช โดยเก็บตัวอย่างพืชจำนวน 20 ชนิด จำนวน 5 ซ้ำ ตัวอย่างพืชและที่เก็บ ได้แก่ วัชพืชในนาข้าว และพรรณไม้น้ำ เช่น บัวบกน้ำ ต้อยติ่งไทย ไมยราบน้ำ หางนกยูงใบยาว ดาวกระจาย หญ้ากาบหอยตัวเมีย กระจับแก้ว บัวผัน หางนกยูง ดาวน้อย ผักกาดน้ำ สาหร่ายหางกระรอก สาหร่ายนา กกตุ้มหู ผักไผ่น้ำ จอก ดีปลีน้ำ บัวแดง ผักกูดเขากวาง เป็นต้น ตัวอย่างพืชเก็บอย่างน้อย 5-10 ต้น และเก็บตัวอย่างดินหรือวัสดุปลูก บริเวณทรงพุ่มของพืชที่เก็บตัวอย่าง ความลึกอยู่ในช่วงประมาณ 0-25 เซนติเมตร จำนวน 10 จุดต่อต้น รวมกันปริมาณ 500 กรัม ใส่ถุงพลาสติกแล้วนำกลับมาตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ บันทึกข้อมูลพิกัดทางภูมิศาสตร์ วันที่เก็บตัวอย่าง ชนิด/พันธุ์ของพืชที่เก็บตัวอย่าง โดยมีแผนการสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชดังนี้

ปี 2565 แปลงเกษตรกรในภาคตะวันออก ได้แก่ ปราจีนบุรี ชลบุรี จันทบุรี และระยอง

แปลงเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา อุบลราชธานี และชัยภูมิ

รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 200 ตัวอย่าง

ปี 2566 แปลงเกษตรกรในภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดพะเยา ลำพูน ลำปาง เชียงใหม่ และเชียงราย

รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 200 ตัวอย่าง

ปี 2567 แปลงเกษตรกรในภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดกรุงเทพมหานคร นนทบุรี ปทุมธานี ราชบุรี เพรชบุรี และนครปฐม

รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 200 ตัวอย่าง

2.การแยกเชื้อไส้เดือนฝอย (2565-2567)

2.1 แยกเชื้อไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างต้นพืช

แยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชจากต้นพืชและราก ด้วยเครื่องกำเนิดคลื่น เสียงอัลตร□าโซนิก (Ultrasonic Sonicator) ซึ่งประยุกต์จากการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชด้วยการใช้คลื่นเสียง (นุชนารถ, 2555)

1. นำตัวอย่างรากและต้นพืชที่ได้ ล้างให้สะอาด บรรจุในภาชนะแก้วแล้วเติมน้ำให้ท่วมระบบราก จากนั้นนำไปวางในอ่างของเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงอัลตร□าโซนิก ปรับระดับของน้ำในอ่าง และภาชนะแก้วที่บรรจุพืชให้อยู่ในระดับเดียวกัน โดยคำนึงถึงเหมาะสมกับของการเกิดคลื่นเสียงฯ

2. เปิดคลื่นเสียง ฯ เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำน้ำในภาชนะแก้วที่บรรจุราก และต้นพืชแต่ละตัวอย่าง กรองผ่านตะแกรงโลหะ ขนาด 20 mesh และ ขนาด 400 mesh ตามลำดับ จากนั้นเก็บน้ำที่อยู่บนตะแกรงโลหะ ขนาด 400 mesh ใส่ในภาชนะแก้ว

3. ในกรณีน้ำในภาชนะแก้ว มีความขุ่น ต้องนำน้ำของตัวอย่างดังกล่าวกรองผ่านกรวยโดยวิธี Baermann funnel method เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บน้ำที่ผ่านการกรองใส่ในภาชนะแก้ว

กรมวิชาการเกษตร

4. นำน้ำในภาชนะแก้ว ที่ได้จากข้อ 2 และ ข้อ 3 ของแต่ละตัวอย่าง ตั้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมงเป็นอย่างน้อย เพื่อให้ไส้เดือนฝอยตกลงด้านล่างของภาชนะ จากนั้นดูดน้ำส่วนบนทิ้งให้หลือน้ำในภาชนะแก้วประมาณ 10 -15 มิลลิลิตร หรือปริมาณที่เหมาะกับถ้วยนับตัวอย่าง

2.2 แยกเชื้อไส้เดือนฝอยจากรากพืช

การแยกเชื้อไส้เดือนฝอยจากรากพืชด้วยวิธี Maceration and filtration เป็นขั้นตอนและวิธีการตาม EPPO Standard PM 7/119 (1) Nematode extraction (EPPO, 2013) สามารถดำเนินการดังนี้

นำตัวอย่างรากพืชตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 0.5 มิลลิเมตร จำนวน 50 กรัม ในเครื่องปั่น แล้วเติมน้ำ 100 มิลลิลิตร แล้วปั่นที่ 12,000 รอบ นาน 30 วินาที เก็บสารละลาย ล้างผ่านชั้นตะแกรง 20 mesh 100 mesh และ 400 mesh ตามลำดับ เก็บตะกอนที่ได้ จากตะแกรง 400 mesh นำไปกรองด้วย Oostenbrink dish โดย วางลงในถาดที่มีใช้กระดาษกรองไส้เดือนฝอย หรือกระดาษเช็ดหน้า 2 ชั้น ในภาชนะที่มีช่องตะแกรง หรือ ถาดที่มีช่องให้น้ำผ่าน มีจานรองถาดซึ่งได้เติมน้ำไว้แล้ว ทิ้งไว้ประมาณ 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บน้ำไปตรวจ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง

2.3 แยกเชื้อไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและตัวอย่างวัสดุปลูก

แยกเชื้อไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและตัวอย่างวัสดุปลูก ด้วยวิธี Cobb sieving มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างดินปริมาณ 250 กรัม ใส่ในภาชนะพลาสติกเทน้ำลงไปแล้วขยี้ดินให้แตก เพื่อให้ไส้เดือนฝอยแยกตัวหลุดออกมาจากดิน ทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที เพื่อให้ดินนอนก้น แล้วเทน้ำลงในตะแกรง (sieve) ขนาด 20 mesh (ประมาณ 840 ไมครอน)

2. นำน้ำที่ผ่านตะแกรงแรกแล้ว มาเทลงในตะแกรงขนาด 100 mesh โดยมีภาชนะรองรับ ไส้เดือนฝอยที่มีขนาดเล็กจะผ่านตะแกรงลงสู่ภาชนะที่รองรับอยู่ด้านล่าง จะมีไส้เดือนฝอยบางชนิดที่มีขนาดใหญ่ค้างอยู่บนตะแกรง เอาน้ำฉีดบนตะแกรงจนน้ำใส แล้วใช้น้ำฉีดด้านหลังตะแกรง โดยมีภาชนะรองรับไส้เดือนฝอย

3. นำน้ำที่ผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh เทลงในตะแกรงขนาด 400 mesh โดยไม่ต้องมีภาชนะรองรับ เนื่องจากไส้เดือนฝอยเกือบทุกชนิดจะติดอยู่บนตะแกรงนี้ ใช้ฝอยน้ำฉีดเบาๆให้ทั่วตะแกรงเพื่อให้ตะกอนดินหลุดลงมา แล้วเก็บน้ำจากตะแกรงนี้เพื่อกรองต่อไป

4. นำน้ำที่กรองจากตะแกรงขนาด 400 mesh เทลงบนตะแกรงที่มีกระดาษกรองไส้เดือนฝอยวางอยู่ด้านบน แล้วนำตะแกรงวางบนกรวยที่มีท่อยางสวมไว้ ในกรวยบรรจุน้ำปลายท่อยางมีคลิปหนีบสายยางกันน้ำรั่ว ทิ้งไว้ประมาณ 24 - 48 ชั่วโมง เพื่อให้ไส้เดือนฝอยมาอยู่ที่ปลายก้านกรวย ในกรณีน้ำมีความขุ่น ต้องนำน้ำของตัวอย่างดังกล่าวกรองผ่านกรวยโดยวิธี Baermann funnel method หรือ Oostenbrink dish

5. นำน้ำที่มีไส้เดือนฝอยมาตรวจสอบ และจัดจำแนกชนิดด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง

3.การตรวจและวินิจฉัยไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (2565-2567)

ตรวจและวินิจฉัยไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและหรือกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง เทียบกับคู่มือการจำแนกสกุลของไส้เดือนฝอย Plant-parasitic nematodes; A

กรมวิชาการเกษตร

pictorial key to genera (Mai *et al.,* 1996) และ Manual of agricultural nematology (Nickle (ed), 1991)

4. การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* (2565-2567)

การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* โดยการเพาะเลี้ยงในพืชอาศัยเดิมหรือในต้นข้าว โดยการเพาะในกระถาง ที่มีลักษณะชุ่มน้ำ ตามนิเวศวิทยาเดิมของพืชอาศัย เพื่อใช้ในการเตรียมสไลด์ถาวร และการศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลของไส้เดือนฝอยสกุลด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

5. การทำสไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* (2565-2567)

เตรียมตัวอย่างไส้เดือนฝอยตามวิธีการของ De Grisse, 1969 ตามขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เขี่ยตัวไส้เดือนฝอยลงใน staining block เติมน้ำ 400 µl นำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตรวจดูไส้เดือนฝอยแล้วเติม Solution I ประมาณ 0.5 ml นำไปใส่ไว้ในขวดโหลที่บรรจุ Ethanol 96% นำเข้าตู้อบ อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 2 นำ staining block ออกจากตู้อบ เพื่อเติม Solution II เล็กน้อย และอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทุก 1 ชั่วโมง 30 นาที จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นเติม Solution III เล็กน้อยอีกครั้ง แล้วอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 3 นำ staining block ออกจากตู้อบ ตรวจดูไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จนกระทั่งไม่พบการหดตัวของผนังลำตัวไส้เดือนฝอย จึงจะสามารถนำไส้เดือนฝอยไปใช้ในการทำสไลด์ถาวรได้

6. การเก็บสไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* (2565-2567)

ตัวอย่างไส้เดือนฝอยที่ผ่านการเตรียมแล้ว นำมาวางลงในสไลด์โดยหยด anhydrous glycerin ลงบนสไลด์แก้ว เขี่ยไส้เดือนฝอยที่เตรียมไว้จัดเรียงเป็นแถว โดยใช้ไม้เขี่ยกดให้ทุกตัวติดกับผิวสไลด์ และไม่ให้ตัวไส้เดือนฝอยลอย จัดเรียงให้สวยงามเพื่อให้ง่ายต่อการดูรายละเอียดต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ปิดด้วย cover slip ยาแนวขอบด้วยน้ำยาทาเล็บสีใสให้สนิท แล้วเก็บในกล่องสไลด์ การเก็บสไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* ต้องมีข้อมูลประกอบ ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ของไส้เดือนฝอย พืชอาศัย สถานที่เก็บตัวอย่าง วันที่เก็บ และชื่อผู้เก็บ วันเดือนปีที่จำแนกชนิด ชื่อผู้จำแนกชนิด วันที่ทำการจำแนกยืนยัน และชื่อผู้จำแนกยืนยัน และข้อมูลอื่น ๆ ที่เป็นประโยชน์

7. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* (2565-2567)

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* โดยเปรียบเทียบกับเอกสารการจัดจำแนกชนิดของ EPPO PP 7/94 (1): *Hirschmanniella* spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง โดยมีลักษณะสำคัญที่ต้องบันทึก อาทิ ความยาวของลำตัว ลักษณะริมฝีปาก ความยาวของ stylet ความกว้างของฐานของ stylet ลักษณะหาง เส้นผ่านศูนย์กลางลำตัว ความยาวของ oesophagus ค่า De Man's ratios เช่น ค่า a (อัตราส่วนของความยาวลำตัวต่อเส้นผ่านศูนย์กลางลำตัว) ค่า b (อัตราส่วนของความยาวลำตัวต่อความยาวของ oesophagus) ค่า c (อัตราส่วนของความยาวลำตัวต่อความกว้างของหาง) ค่า c^0 (อัตราส่วนของความกว้างของหางต่อความกว้างลำตัว) เป็นต้น

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

8. บันทึกภาพ และวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* เพื่อจัดจำแนกชนิด (2565-2567)

บันทึกภาพถ่ายลักษณะทางสัณฐานและวัดขนาดของไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* ที่ สำคัญภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง รวมถึงการวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* เพื่อจัดจำแนกชนิด PP 7/94(1): *Hirschmanniella* spp. (OEPP / EPPO, 2009) และ Manual of agricultural nematology (Nickle (ed), 1991) และเอกสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

9.ศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลของไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella*

9.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Schizas *et al.,* 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ ดังนี้ เขี่ยไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงบนหยด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บนสไลด์แก้ว ตัดตัวไส้เดือนฝอยออกเป็น 2-3 ท่อน โดยใช่ส่วนปลายของ pipette tip ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 500 ไมโครลิตร นำหลอดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที เติม proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2ไมโครลิตร ลงในหลอดและบ่มที่ 55°C ใน water bath เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดใส่ใน heating block ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของ proteinase K ใส่ GeneReleaser® ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟ เป็นเวลา 6 นาที ถ้าเตาไมโครเวฟเป็นชนิด 750 วัตต์ (สามารถปรับเวลาตามกำลังไฟของเตาไมโครเวฟให้ได้ 4,500 วัตต์-นาที ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสม)

9.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction: PCR)

การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์และขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่รายงานโดย Subbotin *et al*. (2000) และ Habteweld *et al*. (2019)

เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ที่เติม Redsafe Nucleic Acid Straining Solution ใน 1X TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอผลผลิตในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad, USA)

9.3 การหาลำดับนิวคลิโอไทด์ (DNA sequencing)

นำดีเอ็นเอผลผลิต D2-D3 expansion region และ ITS1 regions ที่ได้จากข้อ 8.2 ที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วย Qiagen QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) หรือ ExoSAP-IT® For PCR Product Clean-Up (Affymetrix) โดยใช้วิธีการตามคำแนะนำที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ เตรียมตัวอย่างตามคำแนะนำและส่งตัวอย่างไปหาลำดับนิวคลิโอไทด์โดยตรง (direct sequencing)

9.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์กับฐานข้อมูล

วิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจาก Genbank ด้วยโปรแกรม Blastn และวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม Clustal Omega แล้วทำการจัดกลุ่มของไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* ด้วยโปรแกรม MEGA 10 (Kumar *et al*., 2018)

กรมวิชาการเกษตร

10. พิจารณาจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* จากทั้งสองวิธี

จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* อย่างสมบูรณ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับข้อมูลด้านชีวโมเลกุล

การทดลองที่ 2 การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Xiphinema* (Nematoda: Longidoridae) (2565-2567)

1. การสำรวจพื้นที่ระบาดของไส้เดือนฝอยสกุล *Xiphinema* (2565-2566)

1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

สำรวจพื้นที่และเก็บตัวอย่างพืชและดินที่เป็นแหล่งปลูกพริก ขิง และพืชเศรษฐกิจสำคัญในแปลงเกษตรกร โดยใช้พลั่วมือหรือแท่งเหล็กเก็บตัวอย่างดิน (auger) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้วเก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึก 25 – 30 ซม. หรือระดับเดียวกับความลึกของรากพืช โดยแต่ละตัวอย่างพืชจะสุ่มเก็บตามรูปแบบ zig zag pattern จำนวน 20 จุด/ไร่ เก็บดินรวมใส่ถุงพลาสติกให้มีน้ำหนักประมาณ 1 กก. ระบุวันที่ที่เก็บ พืชอาศัย ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง โดยมีแผนการสำรวจและเก็บตัวอย่าง ดังนี้

ปี 2565 แปลงเกษตรกรในภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย น่าน และตาก

แปลงเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี เพชรบูรณ์ และชัยภูมิ

จังหวัดละ 30 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 240 ตัวอย่าง

ปี 2566 แปลงเกษตรกรในภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดสระบุรี และอยุธยา

แปลงเกษตรกรในภาคตะวันออก ได้แก่ จันทบุรี และระยอง

แปลงเกษตรกรในภาคใต้ ได้แก่ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี

จังหวัดละ 30 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 180 ตัวอย่าง

1.2 การแยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดิน (2565-2566)

นำดินแต่ละตัวอย่างมาผสมให้เข้ากัน ชั่งน้ำหนัก 250 ก. จำนวน 2 ชุด นำไปแยกไส้เดือนฝอยด้วยวิธี decanting and sieving (Cobb, 1917) ตามด้วย Baermann's tray เทตัวอย่างน้ำที่ได้จาก tray ซึ่งมีไส้เดือนฝอยอยู่ใส่ขวดแก้วใส ทิ้งให้ไส้เดือนฝอยตกตะกอนที่ก้นขวดอย่างน้อย 6 ชม. ดูดน้ำที่เกินทิ้งให้เหลือประมาณ 20 มล. นำน้ำที่ได้ไปตรวจหาไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ หากพบไส้เดือนฝอยที่ต้องการศึกษานำน้ำจากการแยกตัวอย่างดินทั้ง 2 ชุด ไปดำเนินการต่อ

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Xiphinema* (2565-2566)

นำตัวอย่างน้ำจากข้อ 1.2 (ชุดที่ 1) มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ ใช้เข็มสำหรับตักไส้เดือนฝอยหรือไปเปตขนาด 10 ไมโครลิตร ตักหรือดูดเอาเฉพาะไส้เดือนฝอยที่ต้องการศึกษาไปใส่ใน embrio dish ขนาด 30 มม. ที่มีน้ำสะอาดอยู่ประมาณ 400 ไมโครลิตร แล้วจึงย้าย embrio dish ที่ได้ไปจุ่มใน water bath ที่มีน้ำร้อนอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที โดยระวังไม่ให้น้ำใน water bath เข้าไปผสมกับน้ำใน embryo dish และไม่ให้น้ำภายใน embrio dish แห้งเกินจนทำให้ไส้เดือนฝอยแห้งติดภาชนะที่ใส่ จากนั้นจึงทำการ fix ไส้เดือน

กรมวิชาการเกษตร

ฝอยตามวิธีของ De Grisse (1969) จากนั้นนำไส้เดือนฝอยที่ได้ไปทำสไลด์ถาวรด้วยวิธีประยุกต์จาก Cobb's method

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Xiphinema* ที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Olympus BX53 DIC Nomarski ถ่ายภาพลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกไส้เดือนฝอยชนิดดังกล่าว และบันทึกขนาดต่าง ๆ สำหรับศึกษา morphometric เพื่อประกอบการจำแนกไส้เดือนฝอยเทียบกับการศึกษาที่มีก่อนหน้า เช่น Zeng *et al*. (2016) และ Özturk *et al*. (2017)

3. การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยสกุล *Xiphinema* โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (2567)

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างน้ำจากข้อ 1.2 (ชุดที่ 2) มาดำเนินการตามขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 2. แต่เมื่อฆ่าไส้เดือนฝอยใน water bath 55 องศาเซลเซียส แล้ว ให้ดูดน้ำที่มีไส้เดือนฝอยที่ต้องการมาเก็บในหลอด eppendorf ขนาด 2 มล. และเติม DESS solution ปริมาตร 1 มล. ลงไปเพื่อเก็บรักษาไส้เดือนฝอยสำหรับสกัด DNA ต่อไป แต่ถ้าสามารถสกัด DNA จากตัวอย่างไส้เดือนฝอยที่มีชีวิตได้ทันที ให้ใช้เข็มตักไส้เดือนฝอยที่ต้องการศึกษาจำนวน 1 ตัว ไปใส่ในหลอด PCR ที่มีสารละลายของ 10M NaOH และ 0.45% Tween20 ในอัตราส่วน 10:1 ปริมาตร 12 ไมโครลิตร จากนั้นย้ายไปใส่ใน PCR Thermocycler ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน15 นาที แล้วเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อไปอีก 20 ไมโครลิตร จะได้ DNA templates ปริมาตร 35 ไมโครลิตร เก็บตัวอย่างที่ได้ในตู้ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย PCR ต่อไป

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายและตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

เพิ่มปริมาณ DNA ของตัวอย่างไส้เดือนฝอยจำเพาะตำแหน่ง 18S DNA และ 28S D2-D3 DNA ตาม การศึกษาของ Mullin *et al*. (2005) และ Nunn (1992) ตามลำดับ ใช้ DNA templates ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ใส่หลอด PCR เติม PCR master mixed ปริมาตร 23 ไมโครลิตร แล้วนำใส่เครื่อง Thermocycler โดยใช้ PCR condition ตามรายงานของ Ye *et al*. (2007) เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ที่เติม Redsafe Nucleic Acid Straining Solution ใน 1X TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอผลผลิตในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad, USA)

3.3 การวิเคราะห์และตรวจสอบลำดับนิวคลิโอไทด์

นำดีเอ็นเอผลผลิตของส่วน18S DNA และ 28S D2-D3 DNA ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลิโอไทด์ (sequencing) จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของไส้เดือนฝอยสกุล *Xiphinema* ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจาก Genbank ด้วยโปรแกรม Blastn และวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม Clustal Omega แล้วทำการจัดกลุ่มของไส้เดือนฝอยสกุล *Xiphinema* ด้วยโปรแกรม MEGA 10 (Kumar *et al.,* 2018) โดยเปรียบเทียบหาชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Xiphinema* ที่เคยมีผู้ศึกษาไว้ก่อนแล้ว เช่น Zeng *et al*. (2016) และ Özturk *et al*. (2017) หรือลงทะเบียนลำดับนิวคลิโอไทด์เพิ่มเข้าไปในฐานข้อมูล GeneBank หากพบว่าเป็นไส้เดือนฝอยชนิดใหม่

กรมวิชาการเกษตร

4. การกระจายตัวของไส้เดือนฝอยสกุล *Xiphinema* ในประเทศไทย (2567)

จัดทำเป็นระบบฐานข้อมูลที่ประกอบด้วยข้อมูลทางภูมิศาสตร์ (GPS coordinates) พืชอาศัย ระยะการเจริญเติบโต/อายุ ภาพถ่ายอาการพืช พื้นที่ปลูก สภาพดิน ฤดูปลูก และ/หรือ ข้อมูลอื่นที่เกี่ยวข้อง จากนั้นนำข้อมูล GPS ที่ได้มาจัดทำแผนที่การกระจายตัวของไส้เดือนฝอยพาหะนำไวรัสสาเหตุโรคพืชในประเทศไทย

การทดลองที่ 3 การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Scutellonema* (Nematoda: Hoplolaimidae) (2565-2567)

1. การสำรวจพื้นที่ระบาดของไส้เดือนฝอย *Scutellonema* species (2565-2566)

1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

สำรวจพื้นที่และเก็บตัวอย่างพืชเศรษฐกิจสำคัญเริ่มจากชนิดพืชที่เคยมีรายงานว่าพบ *Scutellonema* เช่น ข้าว และอ้อย ในแปลงเกษตรกร โดยใช้พลั่วมือหรือแท่งเหล็กเก็บตัวอย่างดิน (auger) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้วเก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึก 25 – 30 ซม. หรือระดับเดียวกับความลึกของรากพืช โดยแต่ละตัวอย่างพืชจะสุ่มเก็บตามรูปแบบ zig zag pattern จำนวน 20 จุด/ไร่ เก็บดินรวมใส่ถุงพลาสติกให้มีน้ำหนักประมาณ 1 กก. ระบุวันที่ที่เก็บ พืชอาศัย ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง โดยมีแผนการสำรวจและเก็บตัวอย่าง ดังนี้

ปี 2565 แปลงเกษตรกรในภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย น่าน และตาก แปลงเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี เพชรบูรณ์ และชัยภูมิ จังหวัดละ 30 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 240 ตัวอย่าง

ปี 2566 แปลงเกษตรกรในภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดสระบุรี และอยุธยา แปลงเกษตรกรในภาคตะวันออก ได้แก่ จันทบุรี และระยอง แปลงเกษตรกรในภาคใต้ ได้แก่ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี จังหวัดละ 30 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 180 ตัวอย่าง

1.2 การแยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดิน

นำดินแต่ละตัวอย่างมาผสมให้เข้ากัน ชั่งน้ำหนัก 250 ก. จำนวน 2 ชุด นำไปแยกไส้เดือนฝอยด้วยวิธี decanting and sieving (Cobb, 1917) ตามด้วย Baermann's tray จากนั้นนำ nematode suspension ที่ได้จาก tray ใส่ขวดแก้วใส ทิ้งให้ไส้เดือนฝอยตกตะกอนมาอยู่ก้นขวดอย่างน้อย 6 ชม. ดูดน้ำที่เกินทิ้งให้เหลือประมาณ 20 มล. นำน้ำที่ได้ไปตรวจหาไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ หากพบไส้เดือนฝอยที่ต้องการศึกษาให้นำน้ำจากการแยกตัวอย่างดินทั้ง 2 ชุด ไปดำเนินการต่อ

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Scutellonema* (2565-2567)

นำตัวอย่างน้ำจากข้อ 1.2 (ชุดที่ 1) มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ ใช้เข็มสำหรับตักไส้เดือนฝอยหรือไปเปตขนาด 10 ไมโครลิตร ตักหรือดูดเอาเฉพาะไส้เดือนฝอยที่ต้องการศึกษาไปใส่ใน embrio dish ขนาด 30 มม. ที่มีน้ำสะอาดอยู่ประมาณ 400 ไมโครลิตร แล้วจึงย้าย embrio dish ที่ได้ไปจุ่มใน water bath ที่มีน้ำร้อนอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที โดยระวังไม่ให้น้ำใน water bath เข้าไปผสมกับน้ำใน embryo dish และไม่ให้น้ำภายใน embrio dish แห้งเกินจนทำให้ไส้เดือนฝอยแห้งติดภาชนะที่ใส่ จากนั้นจึงทำการ fix ไส้เดือน

กรมวิชาการเกษตร

ฝอยตามวิธีของ De Grisse (1969) จากนั้นนำไส้เดือนฝอยที่ได้ไปทำสไลด์ถาวรด้วยวิธีประยุกต์จาก Cobb's method

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Scutellonema* ที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Olympus BX53 DIC Nomarski ถ่ายภาพลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกไส้เดือนฝอยชนิดดังกล่าว และบันทึกขนาดต่าง ๆ สำหรับศึกษา morphometric เพื่อประกอบการจำแนกไส้เดือนฝอยเทียบกับการศึกษาที่มีก่อนหน้า เช่น Kolombia *et al*. (2017)

3. การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอย *Scutellonema* species โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (2567)

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างน้ำจากข้อ 1.2 (ชุดที่ 2) มาดำเนินการตามขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 2. แต่หลังฆ่าไส้เดือนฝอยใน water bath 55 องศาเซลเซียส แล้ว ให้ดูดน้ำที่มีไส้เดือนฝอยที่ต้องการมาเก็บในหลอด eppendorf ขนาด 2 มล. และเติม DESS solution ปริมาตร 1 มล. ลงไปเพื่อเก็บรักษาไส้เดือนฝอยสำหรับสกัด DNA ต่อไป แต่ถ้าสามารถสกัด DNA จากตัวอย่างไส้เดือนฝอยที่มีชีวิตได้ทันที ให้ใช้เข็มตักไส้เดือนฝอยที่ต้องการศึกษาจำนวน 1 ตัว ใส่ในหลอด PCR ที่มีสารละลายของ 10M NaOH และ 0.45%Tween20 ในอัตราส่วน 10:1 ปริมาตร 12 ไมโครลิตร จากนั้นย้ายไปใส่ใน PCR Thermocycler ที่ 95 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อไปอีก 20 ไมโครลิตร จะได้ DNA templates ปริมาตร 35 ไมโครลิตร เก็บตัวอย่างที่ได้ในตู้ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย PCR ต่อไป

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายและตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

เพิ่มปริมาณ DNA ตำแหน่ง D2-D3 rDNA และ Cytochrome c oxidase subunits 1 (*COI*) ตามที่ศึกษาไว้โดย Kolombia *et al*. (2017) ใช้ DNA templates ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ใส่หลอด PCR จากนั้นเติม PCR master mixed ปริมาตร 23 ไมโครลิตร ปิดฝาและเขียนกำกับบนหลอดให้เรียบร้อย ย้ายไปใสเครื่อง PCR Thermocycler ตามวิธีการของ Van den Berg *et al*. (2013) เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ที่เติม Redsafe Nucleic Acid Straining Solution ใน 1X TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอผลผลิตในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad, USA)

3.3 การวิเคราะห์และตรวจสอบลำดับนิวคลิโอไทด์

นำดีเอ็นเอผลผลิตของส่วน D2-D3 rDNA และ *COI* ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลิโอไทด์ (sequencing) จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของไส้เดือนฝอยสกุล *Scutellonema* ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจาก Genbank ด้วยโปรแกรม Blastn และวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม Clustal Omega แล้วทำการจัดกลุ่มของไส้เดือนฝอยสกุล *Scutellonema* ด้วยโปรแกรม MEGA 10 (Kumar *et al.,* 2018) โดยเปรียบเทียบหาชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Scutellonema* ที่เคยมีผู้ศึกษาไว้ก่อนแล้ว เช่น Kolombia *et al*. (2017) หรือลงทะเบียนลำดับนิวคลิโอไทด์เพิ่มเข้าไปในฐานข้อมูล GeneBank หากพบว่าเป็นไส้เดือนฝอยชนิดใหม่

4. การกระจายตัวของไส้เดือนฝอย *Scutellonema* species ในประเทศไทย (2567)

กรมวิชาการเกษตร

จัดทำเป็นระบบฐานข้อมูลที่ประกอบด้วยข้อมูลทางภูมิศาสตร์ (GPS coordinates) พืชอาศัย ระยะการเจริญเติบโต/อายุ ภาพถ่ายอาการพืช พื้นที่ปลูก สภาพดิน ฤดูปลูก และ/หรือ ข้อมูลอื่นที่เกี่ยวข้อง จากนั้นนำข้อมูล GPS ที่ได้มาจัดทำแผนที่การกระจายตัวของไส้เดือนฝอยพาหะนำไวรัสสาเหตุโรคพืชในประเทศไทย

การทดลองที่ 4 การจำแนกชนิดของราน้ำค้างในพืชตระกูลแตงและตระกูลกะหล่ำ (2565-2567)

1. การเก็บตัวอย่างโรคราน้ำค้าง (2565-2566)

เก็บตัวอย่างโรคราน้ำค้างจากแปลงปลูกพืชตระกูลแตง เช่น แตงกวา บวบ แคนตาลูป เป็นต้น และพืชตระกูลกะหล่ำ เช่น กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก คะน้า เป็นต้น นำมาห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียดชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ ข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์ และแบ่งตัวอย่างโรคพืชมาอัดทับตัวอย่างแห้ง จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร มีแผนการดำเนินการสำรวจและเก็บตัวอย่าง ดังนี้

ปี 2565 แปลงปลูกของเกษตรกรในภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี แปลงปลูกของเกษตรกรในภาคกลาง ได้แก่ นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม และสุพรรณบุรี รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง

ปี 2566 แปลงของเกษตรกรในภาคกลาง ได้แก่ ชัยนาท นครสวรรค์ พิจิตร แปลงปลูกของเกษตรกรในภาคเหนือ ได้แก่ พิษณุโลก ลำพูน เชียงใหม่ พะเยา และเชียงราย รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง

2. ศึกษาและจำแนกชนิดของราราน้ำค้างโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (2565-2566)

2.1 ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 3-7 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือ conidium ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์

2.2 ตัดขวาง (cross section) เนื้อเยื่อพืช โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตรวจดูโครงสร้างของราน้ำค้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และตัดขวางเนื้อเยื่อบริเวณที่มีราน้ำค้างเจริญอยู่ วางบนแผ่นสไลด์หยดด้วย shear's solution ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ (cover slip) นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างต่าง ๆ ของราน้ำค้าง

2.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด และสี ลักษณะของสปอร์ และลักษณะของก้านชูสปอร์ สี และขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และจำแนกชนิดของราน้ำค้างโดยเปรียบเทียบลักษณะของราน้ำค้างที่ศึกษากับคู่มือการจัดจำแนกราน้ำค้าง โดยสามารถใช้ข้อมูลบางส่วนจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องซึ่งได้มีการศึกษาและจำแนกชนิดของราน้ำค้างเพื่อประกอบการวิเคราะห์ต่อไป

3. การจำแนกชนิดของราน้ำค้างโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม (2565-2566)

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยของราน้ำค้างประมาณ 0.2-0.5 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ ทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของคู่ไพร์เมอร์ของตำแหน่ง Large Subunit (LSU) และ *cox2* จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตำแหน่ง LSU และ *cox2* ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase และ Phusion High-Fidelity DNA Polymerase โดยใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ

3.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

4. การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (2565-2566)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ที่ได้จากการทดลองมาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2020 (http://www.geneious.com; Kearse *et al*., 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

5. การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (2567)

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consencus sequence ที่บันทึกไว้ในรูปแบบ fasta ไฟล์) ที่ได้จากการทดลองและจากการรวบรวมข้อมูล มาจัดเรียง (align) ด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Katoh and Toh, 2008) จากนั้นตรวจสอบการจัดเรียง (alignment) โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MEGA 10 (Kumar *et al*., 2018) จากนั้นใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) ทำการรวมชุดข้อมูลของดีเอ็นเอตำแหน่ง LSU และ *cox2* เป็น combined dataset บันทึกชุด alignment ในรูปแบบไฟล์ .nexus หรือ .nex โดยใช้โปรแกรม Mesquite

6. วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก (2567)

ประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูล ใช้สองเกณฑ์มาตรฐานคือ Maximum Likelihood และ Bayesian Inference เตรียมชุดของข้อมูลที่จะใช้ในการวิเคราะห์ในแต่ละวิธี ดังนี้ Maximum Likelihood (ML) เตรียมไฟล์ .phy ใช้โปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) ในการวิเคราะห์ กำหนดค่า model of evolution แบบ GTRGAMMA วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command –f a) เริ่มวิเคราะห์จาก random starting tree และ กำหนดค่า 1000 ซ้ำ สำหรับ maximum likelihood bootstrap

การเก็บรักษา

เก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA templates) ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 5 การจำแนกชนิดและคุณลักษณะชีวโมเลกุลของเชื้อไวรัสก่อโรคในมันเทศ (2565-2567)

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างมันเทศที่แสดงอาการของโรคไวรัส (2565-2566)

สำรวจและเก็บตัวอย่างมันเทศที่มีลักษณะอาการใบด่างหรือด่างประ เส้นใบและเนื้อใบม่วง เส้นใบใส ใบเสียรูปทรง ใบม้วนและหงิกงอ พร้อมบันทึกลักษณะอาการที่พบในแปลงปลูกและบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์และถ่ายภาพในแปลงปลูกมันเทศของเกษตรกร ดังนี้

ปี 2565 แปลงปลูกมันเทศในภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี

แปลงปลูกมันเทศในภาคกลาง ได้แก่ นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม และสุพรรณบุรี

รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง

ปี 2566 แปลงปลูกมันเทศในภาคกลาง ได้แก่ ชัยนาท นครสวรรค์ พิจิตร

แปลงปลูกมันเทศในภาคเหนือ ได้แก่ พิษณุโลก ลำพูน เชียงใหม่ พะเยา และเชียงราย

รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง

2. การสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในมันเทศ (2565-2566)

สกัดดีเอ็นเอด้วย Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN, Taiwan) และสกัดอาร์เอ็นเอด้วย Plant Total RNA Mini Kit (FAVORGEN, Taiwan) โดยชั่งตัวอย่างใบมันเทศปริมาณ 100 มิลลิกรัม และสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

3. ไพรเมอร์และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค One Step RT-PCR (2565-2566)

ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัสแต่ละชนิดในมันเทศตามรายงานของ Kwak *et al*. (2014) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสโดยใช้ส่วนผสมของ One step RT-PCR (QIAGEN) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 20 ไมโครลิตร ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler)

เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ที่เติม Redsafe Nucleic Acid Straining Solution ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอผลผลิตในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad, USA)

4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์บางส่วนและการจำแนกชนิดเชื้อไวรัส (2565-2566)

วิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR มาเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ ด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi. nlm.nih.gov/Blast) ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อจำแนกและจัดกลุ่มของไวรัสที่ก่อโรคในมันเทศด้วยวิธีการ Neighbour-Joining ด้วยโปรแกรม MEGA 10 (Kumar *et al*., 2018)

5. การวิเคราะห์จีโนมที่สมบูรณ์ของไวรัสแต่ละชนิดด้วยเทคนิค Whole Genome Sequencing (2567)

ทำการสกัดดีเอ็นเอรวมและอาร์เอ็นเอรวม ตามวิธีการข้อ 2.1 และ 2.2 ตามลำดับ จากนั้นนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วนำมาหาค่าความบริสุทธิ์ด้วยค่าสัดส่วน A260/A280 = 1.8 - 2.2 สำหรับความเข้มข้นต้อง ≥ 2 นาโนกรัม/

กรมวิชาการเกษตร

ไมโครลิตร สำหรับความเข้มข้นสำหรับการวิเคราะห์ต้อง ≥ 300 นาโนกรัม เมื่อเตรียมดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอได้ตามข้อกำหนดแล้ว จึงส่งไปทำการวิเคราะห์จีโนมด้วยเครื่อง Illuminar Hiseq 150 PE และวิเคราะห์ข้อมูลชีวสารสนเทศโดย บริษัท วิชูโอไบโอเมดิคอล (ไทยแลนด์) จำกัด เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของจีโนมที่สมบูรณ์ของเชื้อไวรัสแต่ละชนิดที่พบเข้าก่อโรคมันเทศแล้วจึงทำการฝากข้อมูลจีโนมเข้าสู่ฐานข้อมูลของ GenBank ต่อไป

6. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในมันเทศด้วยเทคนิค Multiplex RT-PCR (2567)

เนื่องจากโรคไวรัสของมันเทศอาจจะมีการเข้าก่อโรคได้มากกว่า 1 ชนิดนั้น จากข้อมูลการจำแนกชนิดตามข้อ 3 และข้อมูลจีโนมที่สมบูรณ์ของไวรัสแต่ละชนิดตามข้อ 5 นั้น สามารถนำมาพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่เข้าก่อโรคหลายชนิดจากการตรวจสอบในสภาวะและหลอดเดียวกันได้ด้วยเทคนิค Multiplex RT-PCR โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อชนิด (species) ในแต่ละวงศ์ (Family) เช่น ชนิดของไวรัสในวงศ์ *Potyviridae* หรือ วงศ์ *Closteroviridae* เป็นต้น ไพรเมอร์ที่ออกแบบจะต้องมีค่า Melting Temperature (Tm) ที่ใกล้เคียงกันเพื่อให้มีสภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอร่วมกันได้ ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ผลผลิตจากการทำปฏิกิริยานั้นจะต้องมีความแตกกันและสามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน

วิธีวิจัยของทุกการทดลอง ต้องเก็บตัวอย่างในเชิงปริมาณและคุณภาพ ต้องวิเคราะห์อย่างต่อเนื่อง เมื่อจำนวนและชนิดของตัวอย่างเปลี่ยนแปลงไป และต้องทดสอบผลการวิเคราะห์หรือจัดจำแนกซ้ำ ๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความแม่นยำและความเชื่อถือสูงสุด จึงต้องดำเนินการโดยใช้ระยะเวลา 3 ปี ตัวอย่างและข้อมูลจากงานวิจัย เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

โครงการวิจัยย่อยที่ 4 การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชที่มีความซับซ้อน (complex species)

การทดลองที่ 1 การจำแนกชนิดของเชื้อ *Candidatus* Phytoplasma complex ที่พบในมันสำปะหลัง (2565-2567)

1. สำรวจและเก็บตัวอย่าง (2565-2567)

เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการเหลือง ลำต้นแคระแกร็น หรือมันสำปะหลังที่เป็นโรคพุ่มแจ้ ระหว่างเดือน ตุลาคม ถึง มีนาคม ของแต่ละปี จากพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังของเกษตรกรจำนวน 23 จังหวัด จังหวัดละ 10 แปลง พื้นที่แปลงอย่างน้อยไม่ต่ำกว่า 5 ไร่ เดินสำรวจตามมาตรฐานของการสำรวจโรคใบด่าง เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวน 10 ตัวอย่าง ต่อ 1 แปลง นำตัวอย่างบรรจุลงในถุงพลาสติกใส บันทึกข้อมูลวันที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ สถานที่ พันธุ์ อายุ อาการที่พบ พิกัดทางภูมิศาสตร์ ปริมาณการพบโรค ภาพถ่าย เก็บตัวอย่างไว้ในตู้แช่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือ -30 องศาเซลเซียส ดังนี้

ปี 2565 จำนวน 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา บุรีรัมย์ อุบลราชธานี ขอนแก่น อุดรธานี ชัยภูมิ และกาฬสินธุ์

ปี 2566 จำนวน 10 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดลพบุรี นครสวรรค์ กำแพงเพชร ตาก พิษณุโลก เพชรบูรณ์ ลำปาง กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และอุทัยธานี

ปี 2567 จำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดระยอง ชลบุรี จันทบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา และสระแก้ว

ศรีวิชัยการเกษตร

2. การสกัดดีเอ็น (2565-2567)

สกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังที่เป็นโรคพุ่มแจ้ด้วย Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN, Taiwan) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต มีขั้นตอนดังนี้

2.1 ชั่งตัวอย่างใบมันสำปะหลังที่เป็นโรคพุ่มแจ้ ปริมาณ 100 มิลลิกรัม จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ย้ายมาใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วเติมบัฟเฟอร์ FAPG1 ปริมาตร 400 มิลลิลิตรและเติม RNase A ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

2.2 เติมบัฟเฟอร์ FAPG1 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางบนน้ำแข็ง 5 นาที ย้ายส่วนของพืชมาใส่ Filter Column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 3 นาที จากนั้นดูดทิ้งส่วนของเหลวใสใส่ใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.3 เติมบัฟเฟอร์ FAPG3 ปริมาตร 1.5 เท่าของทิ้งส่วนของเหลวใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันแล้วย้ายมาใส่ใน FAPG Column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที ทิ้งส่วนใส

2.4 เติมบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนของเหลวใสแล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ Wash Buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 3 นาที

2.5 นำ FAPG Column มาวางบนหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที เสร็จแล้วเก็บ DNA ที่ได้ไว้ใช้งานในขั้นตอนต่อไป

3. การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR (2565-2567)

3.1 ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมา

ไพรเมอร์	ลำดับเบสไพรเมอร์ (5'-----> 3')	ขนาดดีเอ็นเอผลผลิต (คู่เบส)
P1 (Deng and Hiruki, 1991)	AAGAATTTGATCCTGGCTCAGGATT	1,800
P7 (Schneider *et al*., 1995)	CGTCCTTCATCGGCTCTT	
R16mF2 (Gundersen and Lee, 1996)	CATGCAAGTCGAACGGA	1,400
R16mR1 (Gundersen and Lee, 1996)	CTTAACCCCAATCATCGAC	

3.2 การเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR

ปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 1 ใช้คู่ไพรเมอร์ P1 และ P7 โดยทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยกำหนด annealing temperature 50 °C นาน 2 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากครั้งที่ 1 มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่อัตรา 1/20 จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาครั้งที่ 2 ด้วยคู่ไพรเมอร์ R16mF2 และ R16mR1 โดยกำหนด annealing temperature 60 °C นาน 1 นาที เมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์นำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจสอบ

ศรีวิชัยกรุงเทพ

บน 1.5% agarose gel electrophoresis ที่ผสม Redsafe Nucleic Acid Straining Solution ใน 1X TAE buffer และใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ DNA ladder 100 bp เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อเปรียบเทียบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

4. การตรวจสอบความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sca*I (2565-2567)

ตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA จากผลิตภัณฑ์ PCR โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sca*I โดยมีองค์ประกอบของในปฏิกิริยาปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยผลิตภัณฑ์ PCR 10 ไมโครลิตร ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sca*I มาตรวจสอบบน 2% agarose gel electrophoresis ที่ผสม Redsafe Nucleic Acid Straining Solution ใน 1X TAE buffer และใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ DNA ladder 100 bp เป็นขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อเปรียบเทียบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมา

-การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (2565-2567)

เปรียบเทียบลำดับนิวคลิโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาบริเวณยีน 16S rRNA กับลำดับดีเอ็นเอที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูลนานาชาติ GenBank (NCBI) จัดเรียงลำดับนิวคลิโอไทด์ (alignment) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ MEGA –X เวอร์ชั่น 10.0.5

- วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก (2567)

นำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนภูมิต้นไม้ Phylogenetic tree จัดกลุ่มด้วยวิธี Maximum livelihood Neighbor-joining และ Minimum evaluation ทำการหาค่า bootstrap ด้วยโปรแกรมเดียวกันจำนวน 1,000 ซ้ำ และทำการเปรียบเทียบความเหมือนกันเปรียบเทียบลำดับนิวคลิโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาบริเวณยีน 16S rRNA กับลำดับดีเอ็นเอที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูลนานาชาติ GenBank (NCBI) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Sequence Demarcation Tool version 1.2 (SDT V1.2)

การทดลองที่ 2 การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 1 complex สาเหตุโรคตายพรายกล้วย (2565-2567)

1. เก็บตัวอย่าง (2565)

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อสีน้ำตาลที่แสดงอาการของโรคตายพราย จากแหล่งปลูกกล้วยที่สำคัญ ได้แก่ กาญจนบุรี จันทบุรี นครปฐม สุโขทัย อุตรดิตถ์ แพร่ น่าน เชียงใหม่ และเชียงราย ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ บันทึกข้อมูลพิกัดทางภูมิศาสตร์ วันที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บตัวอย่าง พันธุ์ของกล้วยที่เก็บตัวอย่าง โดยเขียนรายละเอียดกำกับให้ชัดเจน เพื่อนำมาตรวจแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช (2565-2566)

แยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชจากตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช

แยกเชื้อราโดยวิธี tissue transplanting นำตัวอย่างส่วนของท่อน้ำท่ออาหารของต้นกล้วยที่มีสีน้ำตาลแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบน

กรมวิชาการเกษตร

กระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง ตัดเป็นเส้นเล็ก ๆ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ ห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน แยกราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

แยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชจาก culture collection

เขี่ยเส้นใยของเชื้อรามาวางลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ ห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน

แยกเชื้อให้บริสุทธิ์

แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ โดยวิธี single spore isolation ย้ายสปอร์เดี่ยวของเชื้อรา เลี้ยงลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ ห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน หากไม่มีการปนเปื้อน สามารถดำเนินการสกัดดีเอ็นเอ เชื้อที่เจริญจากสปอร์เดี่ยว จะทำการแยกเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

3. จำแนกชนิดของราโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอ (2566)

ตักและย้ายเส้นใยของเชื้อรา *Fusarium* spp. ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ และทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง ไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย (2566)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของ *Fusarium* spp. ตำแหน่ง the RNA polymerase largest subunit gene (*rpb1*) ด้วยไพร์เมอร์ RPB1-Fa/RPB1-G2R (O'Donnell *et* al., 2010) ตำแหน่ง the RNA polymerase second largest subunit gene (*rpb2*) ด้วยไพร์เมอร์ RPB2-5f2/RPB2-7cr (O'Donnell *et al*., 2010) และ the translation elongation factor 1-alpha gene (*tef1*) (O'Donnell *et al*., 1998) กำหนด annealing temperature ของแต่ละตำแหน่งที่ 56 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR (2566)

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (2566)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2020 (http://www.geneious.com; Kearse *et al*., 2012) บันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ชนิด

ศรีวิชัยกรุงเทพ

fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น GenBank, Mycobank, Fusarium MLST DATABASE และ Fusarium-ID

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (2567)

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consencus sequence ที่บันทึกไว้ในรูปแบบ fasta ไฟล์) มาจัดเรียง (align) ด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Katoh and Toh, 2008) จากนั้นตรวจสอบการจัดเรียง (alignment) โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม the MEGA (Kumar *et al*., 2016) จากนั้นใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) ทำการรวมชุดข้อมูลของดีเอ็นเอตำแหน่ง *rpb1 rpb2* และ *tef1* เป็น combined dataset บันทึกชุด alignment ในรูปแบบไฟล์ nexus หรือ nex โดยใช้โปรแกรม Mesquite

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก (2567)

ประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูล ใช้สองเกณฑ์มาตรฐานคือ Maximum Likelihood ใช้โปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) และ Bayesian Inference ใช้โปรแกรม MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) ตรวจสอบความเชื่อมั่นของผลวิเคราะห์ด้วย cumulative and compare functions ด้วย AWTY (Nylander *et al*., 2008)

4. การบันทึกข้อมูล (2565-2567)

เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราใน Culture Collection ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA templates) ข้อมูลรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcodes หรือ consensus sequences) จะถูกเก็บบันทึกและใช้เป็นข้อมูลอ้างอิง รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป จัดเก็บดีเอ็นเอต้นแบบไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. สาเหตุโรคใบจุดของพริก และมะเขือเทศ (2565-2567)

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรค (2565)

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศจากแหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี ชัยภูมิ เลย เพชรบูรณ์ สระบุรี นครราชสีมา กาญจนบุรี น่าน เชียงใหม่ และเชียงราย เป็นต้น บันทึกข้อมูลลักษณะอาการของโรค ถ่ายภาพ วันที่เก็บ และแหล่งที่พบ จากนั้นนำตัวอย่างกลับมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ โดยตัดส่วนของพืชบริเวณรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคเป็นชิ้นเล็ก ๆ แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วนำมาบดในน้ำกลั่น และแยกเชื้อบนอาหาร PSA หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกเก็บเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนี กลมนูน ขอบเรียบ ผิวเป็นมันวาวสีเหลือง และทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อกลีเซอรอล 15% และ 50% ไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

2. ทดสอบการเกิดโรค (Pathogenicity test) (2565)

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่างและที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาทดสอบการเกิดโรคกับพริกและมะเขือเทศ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm

กรมวิชาการเกษตร

เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml พ่นเชื้อแบคทีเรียบนพืชทดสอบแล้วใช้ถุงพลาสติกคลุมไว้ให้มีความชื้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงเปิดถุงออก และสังเกตอาการต้นพืชเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นด้วยน้ำเปล่า และพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch's postulation)

3. ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ (2566)

ทำการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียบางประการตามวิธีการของ Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria Third Edition (Schaad *et al*., 2001)

4. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR (2566)

ตรวจสอบเชื้อโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR ตามรายงานของ Koenraadit *et al.* (2009) โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 100 ng/µl, One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK)

5. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยวิธี multilocus sequence analysis (MLSA) (2567)

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณ housekeeping gene จำนวน 4 ยีน ได้แก่ ยีน *atp*D, *dna*K, *ef*P และ *gyr*B ตามรายงานของ Roach *et al*. (2018) โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 100 ng/µl, One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.5 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) กำหนดอุณหภูมิและเวลาให้เริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบต่อที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 2% agarose ใน 0.5X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 25

กรมวิชาการเกษตร

นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK) ส่งผลผลิต PCR ที่มีขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย (sequence) โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรม Bioedit บันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ชนิด fasta

จัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

จัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ยีน ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MEGA X (Kumar *et al*., 2018) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อจัดจำแนกเชื้อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรีย type strain ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

วิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม RAxML v 8.1.15 (Stamatakis, 2014)

วิธีวิจัยของทุกการทดลอง ต้องเก็บตัวอย่างในเชิงปริมาณและคุณภาพ ต้องวิเคราะห์อย่างต่อเนื่อง เมื่อจำนวนและชนิดของตัวอย่างเปลี่ยนแปลงไป และต้องทดสอบผลการวิเคราะห์หรือจัดจำแนกซ้ำ ๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความแม่นยำและความเชื่อถือสูงสุด จึงต้องดำเนินการโดยใช้ระยะเวลา 3 ปี ตัวอย่างและข้อมูลจากงานวิจัยเก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยย่อยที่ 5 การศึกษาชนิดวัชพืชที่สำคัญเพื่อแก้ปัญหาท้าทายด้านวัชพืชและเพิ่มศักยภาพการผลิตสินค้าเกษตร

การทดลองที่ 1 ชนิดและสัณฐานวิทยาของวัชพืชสกุล *Echinochloa* P.Beauv. (ปี 2565-2566)

1. การศึกษานิเวศวิทยาและการแพร่กระจาย (ปี 2565-2566)

1) สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดวัชพืชสกุล *Echinochloa* P.Beauv. โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ดังนี้

ปี 2565 ภาคเหนือ (เช่น จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง แพร่) ภาคกลาง (เช่น จังหวัดนครสวรรค์ พิษณุโลก นครปฐม สุพรรณบุรี ชัยนาท) และภาคตะวันตก (เช่น จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์)

ปี 2566 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เช่น จังหวัดสกลนคร อุบลราชธานี นครราชสีมา) และภาคตะวันออก (เช่น จังหวัด ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา) และภาคใต้ (เช่น จังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา)

บันทึกข้อมูล สถานที่หรือพิกัดที่เก็บตัวอย่าง สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูกหลัก ลักษณะพืชเป้าหมาย การถูกทำลายโดยศัตรูธรรมชาติ วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ แมลง และศัตรูธรรมชาติ ที่พบในพื้นที่ที่สำรวจ

2) การจัดทำตัวอย่างแห้ง นำตัวอย่างต้นวัชพืชสกุล *Echinochloa* P.Beauv. มาอัดในแผงพรรณไม้ขนาดประมาณ 50 X 30 เซนติเมตร เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้ายระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืชและพิพิธภัณฑ์กรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช

3) เมล็ด นำเมล็ดที่เก็บได้ไปทำความสะอาด ผึ่งในที่ร่มให้แห้ง แบ่งเป็นสองส่วน คือ ส่วนที่ 1 นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ ส่วนที่ 2 เก็บใส่กล่องพลาสติก พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช

2. การตรวจสอบชนิด (ปี 2565-2566)

ตรวจสอบชนิด โดยเทียบกับตัวอย่างพันธุ์ไม้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืช สิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพรรณพืช พิพิธภัณฑ์พืชของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ และการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่าง ๆ

3. การศึกษาสัณฐานวิทยา (ปี 2566)

1) การศึกษาสัณฐานวิทยาของเมล็ด สุ่มเมล็ดที่เก็บได้มาใช้จำนวน 100 เมล็ด นำไปวัดขนาด และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ **บันทึกข้อมูล** ความกว้าง ความยาว รูปร่าง ลักษณะ และสีของเมล็ด องค์ประกอบของเมล็ด เช่น หาง ปีก หรือหนาม ที่เป็นปัจจัยในการแพร่กระจาย โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช

2) การศึกษาสัณฐานวิทยาของต้นสดที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง และต้นอ่อนที่ได้จากการนำเมล็ดที่เก็บได้มาปลูกเพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาต้นอ่อนของวัชพืชแต่ละชนิดในสกุล และศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมให้ครบ

กรมวิชาการเกษตร

สมบูรณ์หากตัวอย่างที่เก็บได้จากพื้นที่ต่าง ๆ ไม่ครบ โดยสุ่มเมล็ดที่แก่ และสมบูรณ์ ชนิดละ 50 เมล็ด ใส่ในกระถาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว ที่บรรจุดินผสม ชนิดละ 5 กระถาง นำไปวางในเรือนทดลอง **บันทึกข้อมูล** ลักษณะต่าง ๆ ตั้งแต่เริ่มงอก จนกระทั่งออกดอก และติดเมล็ด โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช

การทดลองที่ 2 ชนิดและสัณฐานวิทยาของวัชพืชสกุล *Fimbristylis* Vahl (ปี 2565-2567)

1. การศึกษานิเวศวิทยาและการแพร่กระจาย (ปี 2565-2567)

1) สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดวัชพืชสกุล *Fimbristylis* Vahl โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ดังนี้

ปี 2565 ภาคเหนือ (เช่น จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง แพร่) และภาคกลาง (เช่น จังหวัดสุโขทัย นครสวรรค์ พิษณุโลก สระบุรี ลพบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี ชัยนาท อ่างทอง)

ปี 2566 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เช่น จังหวัดสกลนคร อุบลราชธานี นครราชสีมา) และภาคตะวันออก (เช่น จังหวัด ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา)

ปี 2567 ภาคตะวันตก (เช่น จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์) และภาคใต้ (เช่น จังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา)

บันทึกข้อมูล สถานที่หรือพิกัดที่เก็บตัวอย่าง สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูกหลัก ลักษณะพืชเป้าหมาย การถูกทำลายโดยศัตรูธรรมชาติ วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ แมลง และศัตรูธรรมชาติ ที่พบในพื้นที่ที่สำรวจ

2) การจัดทำตัวอย่างแห้ง นำตัวอย่างต้นวัชพืชสกุล *Fimbristylis* Vahl มาอัดในแผงพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 X 30 เซนติเมตร เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์กรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช

3) เมล็ด นำเมล็ดที่เก็บได้ไปทำความสะอาด ผึ่งในที่ร่มให้แห้ง แบ่งเป็นสองส่วน คือ ส่วนที่ 1 นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ ส่วนที่ 2 เก็บใส่กล่องพลาสติก พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช โดยดำเนินการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

2. การตรวจสอบชนิด (ปี 2565-2567)

ตรวจสอบชนิด โดยเทียบกับตัวอย่างพันธุ์ไม้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืช สิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพรรณพืช พิพิธภัณฑ์พืชของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ และการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่าง ๆ

3. การศึกษาสัณฐานวิทยา (ปี 2566-2567)

1) การศึกษาสัณฐานวิทยาของเมล็ด สุ่มเมล็ดที่เก็บได้มาใช้จำนวน 100 เมล็ด นำไปวัดขนาด และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ **บันทึกข้อมูล** ความกว้าง ความยาว รูปร่าง ลักษณะ และสีของเมล็ด องค์ประกอบ

กรมวิชาการเกษตร

ของเมล็ด เช่น หาง ปีก หรือหนาม ที่เป็นปัจจัยในการแพร่กระจาย โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช

2) การศึกษาสัณฐานวิทยาของต้นสดที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง และต้นอ่อนที่ได้จากการนำเมล็ดที่เก็บได้มาปลูกเพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาต้นอ่อนของวัชพืชแต่ละชนิดในสกุล และศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมให้ครบสมบูรณ์หากตัวอย่างที่เก็บได้จากพื้นที่ต่าง ๆ ไม่ครบ โดยสุ่มเมล็ดที่แก่ และสมบูรณ์ ชนิดละ 50 เมล็ด ใส่ในกระถาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว ที่บรรจุดินผสม ชนิดละ 5 กระถาง นำไปวางในเรือนทดลอง **บันทึกข้อมูล** ลักษณะต่าง ๆ ตั้งแต่เริ่มงอก จนกระทั่งออกดอก และติดเมล็ด โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ และเรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช

การทดลองที่ 3 ชนิดและสัณฐานวิทยาของวัชพืชสกุล *Spilanthes* Jacq. (ปี 2566-2567)

1. การศึกษานิเวศวิทยาและการแพร่กระจาย

1) สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดวัชพืชสกุล *Spilanthes* Jacq. โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ดังนี้

ปี 2566 ภาคเหนือ (เช่น จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง แพร่) ภาคกลาง (เช่น จังหวัดนครสวรรค์ พิษณุโลก นครปฐม สุพรรณบุรี ชัยนาท) และภาคตะวันตก (เช่น จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์)

ปี 2567 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เช่น จังหวัดสกลนคร อุบลราชธานี นครราชสีมา) และภาคตะวันออก (เช่น จังหวัด ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา) และภาคใต้ (เช่น จังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา)

บันทึกข้อมูล สถานที่หรือพิกัดที่เก็บตัวอย่าง สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูกหลัก ลักษณะพืชเป้าหมาย การถูกทำลายโดยศัตรูธรรมชาติ วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ แมลง และศัตรูธรรมชาติ ที่พบในพื้นที่ที่สำรวจ

2) การจัดทำตัวอย่างแห้ง นำตัวอย่างต้นวัชพืชสกุล *Spilanthes* Jacq. มาอัดในแผงพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 X 30 เซนติเมตร เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์กรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช

3) เมล็ด นำเมล็ดที่เก็บได้ไปทำความสะอาด ผึ่งในที่ร่มให้แห้ง แบ่งเป็นสองส่วน คือ ส่วนที่ 1 นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ ส่วนที่ 2 เก็บใส่กล่องพลาสติก พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช โดยดำเนินการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

2. การตรวจสอบชนิด

ตรวจสอบชนิด โดยเทียบกับตัวอย่างพันธุ์ไม้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืช สิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพรรณพืช พิพิธภัณฑ์พืชของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ และการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่าง ๆ

กรมวิชาการเกษตร

3. การศึกษาสัณฐานวิทยา

1) การศึกษาสัณฐานวิทยาของเมล็ด สุ่มเมล็ดที่เก็บได้มาใช้จำนวน 100 เมล็ด นำไปวัดขนาด และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ **บันทึกข้อมูล** ความกว้าง ความยาว รูปร่าง ลักษณะ และสีของเมล็ด องค์ประกอบของเมล็ด เช่น หาง ปีก หรือหนาม ที่เป็นปัจจัยในการแพร่กระจาย โดยดำเนินการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

2) การศึกษาสัณฐานวิทยาของต้นสดที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง และต้นอ่อนที่ได้จากการนำเมล็ดที่เก็บได้มาปลูกเพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาต้นอ่อนของวัชพืชแต่ละชนิดในสกุล และศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมให้ครบสมบูรณ์หากตัวอย่างที่เก็บได้จากพื้นที่ต่าง ๆ ไม่ครบ โดยสุ่มเมล็ดที่แก่ และสมบูรณ์ ชนิดละ 50 เมล็ด ใส่ในกระถาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว ที่บรรจุดินผสม ชนิดละ 5 กระถาง นำไปวางในเรือนทดลอง **บันทึกข้อมูล** ลักษณะต่าง ๆ ตั้งแต่เริ่มงอก จนกระทั่งออกดอก และติดเมล็ด โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช

การทดลองที่ 4 ชนิดและสัณฐานวิทยาของวัชพืชสกุล *Merremia* Dennst. ex Endl. (ปี 2567)

1. การศึกษานิเวศวิทยาและการแพร่กระจาย

1) สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดวัชพืชสกุล *Merremia* Dennst. ex Endl. โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ดังนี้

ภาคเหนือ (เช่น จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่) ภาคกลาง (เช่น จังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี ชัยนาท) และภาคตะวันตก (เช่น จังหวัด กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เช่น นครราชสีมา) และภาคตะวันออก (เช่น จังหวัด ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา)

บันทึกข้อมูล สถานที่หรือพิกัดที่เก็บตัวอย่าง สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูกหลัก ลักษณะพืชเป้าหมาย การถูกทำลายโดยศัตรูธรรมชาติ วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ แมลง และศัตรูธรรมชาติ ที่พบในพื้นที่ที่สำรวจ

2) การจัดทำตัวอย่างแห้ง นำตัวอย่างต้นวัชพืชสกุล *Merremia* Dennst. ex Endl. มาอัดในแผงพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 X 30 เซนติเมตร เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์กรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช

3) เมล็ด นำเมล็ดที่เก็บได้ไปทำความสะอาด ผึ่งในที่ร่มให้แห้ง แบ่งเป็นสองส่วน คือ ส่วนที่ 1 นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ ส่วนที่ 2 เก็บใส่กล่องพลาสติก พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช โดยดำเนินการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

2. การตรวจสอบชนิด

ตรวจสอบชนิด โดยเทียบกับตัวอย่างพันธุ์ไม้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืช สิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพรรณพืช พิพิธภัณฑ์พืชของจุฬาลงกรณ์

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ และการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่าง ๆ

3. การศึกษาสัณฐานวิทยา

1) การศึกษาสัณฐานวิทยาของเมล็ด สุ่มเมล็ดที่เก็บได้มาใช้จำนวน 100 เมล็ด นำไปวัดขนาด และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ **บันทึกข้อมูล** ความกว้าง ความยาว รูปร่าง ลักษณะ และสีของเมล็ด องค์ประกอบของเมล็ด เช่น หาง ปีก หรือหนาม ที่เป็นปัจจัยในการแพร่กระจาย โดยดำเนินการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

2) การศึกษาสัณฐานวิทยาของต้นสดที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง และต้นอ่อนที่ได้จากการนำเมล็ดที่เก็บได้มาปลูกเพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาต้นอ่อนของวัชพืชแต่ละชนิดในสกุล และศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมให้ครบสมบูรณ์หากตัวอย่างที่เก็บได้จากพื้นที่ต่าง ๆ ไม่ครบ โดยสุ่มเมล็ดที่แก่ และสมบูรณ์ ชนิดละ 50 เมล็ด ใส่ในกระถาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว ที่บรรจุดินผสม ชนิดละ 5 กระถาง นำไปวางในเรือนทดลอง **บันทึกข้อมูล** ลักษณะต่าง ๆ ตั้งแต่เริ่มงอก จนกระทั่งออกดอก และติดเมล็ด โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช

กรมวิชาการเกษตร

โครงการย่อยที่ 6 การศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของวัชพืชที่สำคัญเพื่อแก้ปัญหาท้าทายด้านวัชพืชและเพิ่มศักยภาพการผลิตสินค้าเกษตร

การทดลองที่ 1 ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของผักกระฉูด (*Neptunia plena* (L.) Benth) วัชพืชแพร่ระบาดในพื้นที่ชุ่มน้ำทางการเกษตร (ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2567)

1) นิเวศวิทยา (ปี 2565-2566)

สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดผักกระฉูดโดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) โดยมีผักกระฉูดเป็นพืชเป้าหมาย ทำการสำรวจในพื้นที่ชุ่มน้ำทางการเกษตร และนิเวศเกษตร ในภาคต่างๆ โดยมีพื้นที่สำรวจในแต่ละภาคอย่างน้อย 20 แหล่ง โดยแบ่งพื้นที่สำรวจดังนี้

ปี 2565 ภาคเหนือ (เช่น จังหวัดเชียงราย พะเยา ลำปาง ลำพูน) ภาคกลาง (เช่น จังหวัดนครสวรรค์ ลพบุรี สระบุรี ชัยนาท สุพรรณบุรี กรุงเทพฯ) และภาคตะวันตก (เช่น จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์)

ปี 2566 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เช่น จังหวัดสกลนคร อุบลราชธานี นครราชสีมา) และภาคตะวันออก (เช่น จังหวัด ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา) และภาคใต้ (เช่น จังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา)

เมื่อพบพืชเป้าหมาย จะทำการสำรวจพื้นที่ใกล้เคียง เพื่อทราบขอบเขตการระบาดในแหล่งนั้น พร้อมเก็บตัวอย่างและถ่ายภาพเป็นหลักฐาน นำตัวอย่างต้นมาจัดทำตัวอย่างแห้ง ส่วนเมล็ดนำไปทำความสะอาด ผึ่งในที่ร่มให้แห้ง นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการทดลองต่อไป บันทึกข้อมูล สถานที่หรือพิกัดที่เก็บตัวอย่าง สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูกหลัก วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ร่องรอยการถูกทำลายโดยศัตรูธรรมชาติในพื้นที่สำรวจ

การจัดทำตัวอย่างแห้ง นำตัวอย่างต้นวัชพืชมาอัดในแผงพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 X 30 เซนติเมตร เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช กรมวิชาการเกษตร โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช

2) ศึกษาลักษณะเมล็ด (ปี 2565)

นำเมล็ดผักกระฉูดที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน แล้วเลือกเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด ศึกษาลักษณะ รูปร่าง ขนาด ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ บันทึกข้อมูล รูปร่าง ลักษณะ ลวดลายและสีของผิวเมล็ด ความกว้าง ความยาวของเมล็ด น้ำหนักต่อ 100 เมล็ด โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช

3) ศึกษาการงอกในห้องปฏิบัติการ และสภาพเรือนทดลอง (ปี 2565)

- การงอกในห้องปฏิบัติการ

นำเมล็ดผักกระฉูดที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน แล้วเลือกเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์ จำนวน 50 เมล็ด ใส่ในจานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร ที่บรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดฝา จำนวน 10 จาน นำไปวางในห้องปฏิบัติการ สภาพอุณหภูมิห้อง บันทึกข้อมูล จำนวนเมล็ดงอกทุกวัน นาน 1 เดือน หรือจนกว่าเมล็ดงอกหมด โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช

กรมวิชาการเกษตร

- การงอกในห้องสภาพเรือนทดลอง

นำเมล็ดผักกระฉูดที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน แล้วเลือกเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด โรยในกระถางเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร ที่บรรจุดินจนถึงขอบล่างของกระถาง จำนวน 10 กระถาง รดน้ำให้ความชื้นทุกวัน บันทึกข้อมูล จำนวนเมล็ดงอกทุกวัน นาน 1 เดือน หรือจนกว่าเมล็ดงอกหมด โดยดำเนินการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

4) การเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด (ปี 2566-2567)

นำเมล็ดที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน แล้วสุ่มเมล็ดมาใช้ในการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCB) จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ผักกระฉูด จำนวน 1 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 2 ผักกระฉูด จำนวน 3 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 3 ผักกระฉูด จำนวน 5 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 4 ผักกระฉูด ทั้งหมดที่งอก

หว่านเมล็ดผักกระฉูด จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1x1 เมตร เมื่อเมล็ดงอก 1 สัปดาห์ ถอนให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง จำนวนต้นตามกรรมวิธีต่างๆ ที่กำหนด สังเกตการเจริญเติบโต และบันทึกข้อมูล วันที่งอก หลังจากหว่าน ความสูง และขนาดทรงพุ่ม ทุก 7 วัน วันที่ออกดอก และวันที่ติดเมล็ด (นับจากวันที่งอก) จำนวนเมล็ดต่อผล จำนวนผลต่อต้น

เมื่อผักกระฉูดมีใบยอดเหลือง (พืชเริ่มตาย) หรือผักกระฉูดครบวงจรชีวิต 1 รอบ (ระยะเวลาที่พืชเริ่มงอกจนถึงสร้างเมล็ดแก่ที่จะใช้ขยายพันธุ์ต่อไป) ถอน ล้างทำความสะอาด บันทึกน้ำหนักสด จำนวนช่อดอก จำนวนผลต่อช่อ จำนวนเมล็ดต่อผล และนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้คำนวณหาค่าเฉลี่ยระยะเวลาการงอก การเจริญเติบโต การออกดอก การแก่ของเมล็ด เพื่อหาระยะเวลาที่พืชเริ่มงอกจนถึงสร้างเมล็ดแก่ ที่จะใช้ขยายพันธุ์ต่อไป คำนวณความสามารถในการผลิตเมล็ดพันธุ์ต่อต้น ความสามารถในการผลิตเมล็ดต่อพื้นที่ โดยดำเนินการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

5) ความสามารถในการขยายพันธุ์ด้วยกิ่ง (ปี 2566)

หว่านเมล็ดผักกระฉูด จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1x1 เมตร หลังงอก 1 สัปดาห์ ถอนออกให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง เมื่อมีอายุ 1 เดือน (หรือมีความสูงต้นมากพอสำหรับนำไปทดลอง) ถอนออกจากแปลง ทำการตัดแขนงบริเวณโคนต้น ให้แต่ละกิ่งมีความยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร (แต่ละกิ่งมี 5 ข้อ) นำไปปักชำ (วางแนวนอน แล้วกลบด้วยดิน) ในกระบะปูน จำนวน 10 กระถาง กระถางละ 10 กิ่ง บันทึกข้อมูล จำนวนหน่อที่เกิดขึ้นต่อกิ่ง ทุก 7 วัน นาน 2 เดือน โดยดำเนินการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

6) ศึกษาคุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิเบื้องต้น ในห้องปฏิบัติการ (ปี 2566)

ทดสอบฤทธิ์ทางอัลลิโลพาธิในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Sandwich method (Fujii *et al*., 2004) ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ไมยราบยักษ์เป็นพืชทดสอบ

วางแผนการทดลอง แบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ใบแห้งผักกระฉูด หนัก 0.01 กรัม

กรรมวิธีที่ 2 ใบแห้งผักกระฉูด หนัก 0.05 กรัม

กรรมวิธีที่ 3 ใบแห้งผักกระฉูด หนัก 0.1 กรัม

กรรมวิธีที่ 4 ใบแห้งผักกระฉูด หนัก 0.5 กรัม

กรรมวิธีที่ 5 ใบแห้งผักกระฉูด หนัก 0 กรัม (ชุดควบคุม)

นำใบแห้งผักกระฉูดที่ผ่านการอบแห้งที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ชั่งใบแห้งผักกระฉูดตามกรรมวิธีที่กำหนด ใส่ลงในหลอดแก้วก้นตัด เส้นผ่านศูนย์กลาง 29 มิลลิเมตร ความสูง 130 มิลลิเมตร ที่บรรจุสารละลายวุ้น 0.3% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เมื่อวุ้นชั้นล่างเย็น เติมลงไปอีก 10 มิลลิลิตร ให้ใบแห้งผักกระฉูดอยู่กึ่งกลางระหว่างชั้นของวุ้น เมื่อวุ้นชั้นบนเย็น นำต้นอ่อนไมยราบยักษ์ที่เริ่มงอก (มีรากยาวประมาณ 1-2 มิลลิเมตร) วางบนวุ้นหลอดละ 6 เมล็ด ปิดปากหลอดด้วยพลาสติกใส นำไปวางในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงตลอดเวลา นาน 7 วัน บันทึกข้อมูล ความยาวราก และความยาวต้นของไมยราบยักษ์ ชั่งน้ำหนักสดโดยรวมของไมยราบยักษ์ในแต่ละหลอด โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช

7) ผลของระดับความลึกของดินต่อการงอกของเมล็ด (2566)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) จำนวน 5 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 วางเมล็ดบนผิวดิน

กรรมวิธีที่ 2 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 3 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 10 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 4 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 5 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 20 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 6 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 25 เซนติเมตร

บรรจุดินใส่กระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร ให้ผิวดินห่างจากขอบบนของกระถาง 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 เซนติเมตร นำเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด หว่านให้ทั่วกระถาง (ใช้เมล็ดที่ได้จากการปลูกศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด) แล้วเติมดินจนถึงขอบบนของกระถาง รดน้ำเช้า และเย็น เพื่อให้มีความชื้น บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน นาน 1 เดือน เพื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยทำการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

8) ผลของวัสดุคลุมดินต่อการงอกของเมล็ด (2567)

วางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCB) จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 3 กระบะ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 พลาสติกคลุมแปลง

กรรมวิธีที่ 2 ฟางข้าว

กรรมวิธีที่ 3 แกลบดิบ

กรรมวิธีที่ 4 แกลบเผา

ศูนย์วิทยทรัพยากร

กรรมวิธีที่ 5 ใบและต้นธูปฤาษี

กรรมวิธีที่ 6 ไม่ใช้วัสดุคลุมดิน

เตรียมกระบะสี่เหลี่ยมขนาด 30 x 30 นิ้ว ใส่ดินร่วนเป็นวัสดุปลูก จากนั้นหยอดเมล็ด 100 เมล็ดต่อกระถาง (ใช้เมล็ดที่ได้จากการปลูกศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด ปี 2566) แล้วทำการคลุมด้วยวัสดุต่างๆ ตามกรรมวิธีที่กำหนด รดน้ำทุกวันเพื่อให้ความชื้น บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน จนเมล็ดงอกหมด แต่ไม่เกิน 1 เดือน นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยทำการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

9) ผลของอุณหภูมิต่อการงอกของเมล็ดในวัสดุปลูก (2567)

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการงอกโดยอ้างอิงจากกรรมวิธีของ Ruth *et al*, 2007 โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 3 กระบะ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 2 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 3 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 4 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 5 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 6 ไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช

นำเมล็ดที่แก่ และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด (ใช้เมล็ดที่ได้จากการปลูกศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด ปี 2566) ผสมในวัสดุปลูก 1 กิโลกรัม และนำไปอบที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืชที่อบเรียบร้อยแล้ว ใส่ในกระบะสี่เหลี่ยมขนาด 10 x 30 นิ้ว กระบะละ 1 กิโลกรัม จากนั้นรดน้ำเพื่อให้ความชื้น บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน เป็นระยะเวลานาน 1 เดือน นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยทำการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

10) ผลของอุณหภูมิน้ำต่อการงอกของเมล็ด (2567)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) จำนวน 4 ซ้ำ 7 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 แช่เมล็ดในน้ำที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 2 แช่เมล็ดในน้ำที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 3 แช่เมล็ดในน้ำที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 4 แช่เมล็ดในน้ำที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 5 แช่เมล็ดในน้ำที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 6 แช่เมล็ดในน้ำที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 7 ไม่แช่เมล็ด

นำเมล็ดที่แก่ และสมบูรณ์ ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร ใส่น้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 5, 4, 3, 2 และ 1 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด นำออกจาก

ตู้อบไฟฟ้าวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดใส่ในจานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร ที่บรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น จานละ 100 เมล็ด (จำนวน 2 จาน ต่อ 1 ซ้ำ) (ใช้เมล็ดที่ได้จากการปลูกศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด ปี 2566) และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดฝา นำไปวางในห้องปฏิบัติการ สภาพอุณหภูมิห้อง บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน เป็นระยะเวลานาน 1 เดือน หรือเมล็ดงอกหมด นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยทำการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

การทดลองที่ 2 ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของโทงเทงประดับ (*Nicandra physalodes* (L.) Gaertn) วัชพืชแพร่ระบาดในพื้นที่เกษตรภาคเหนือ (ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2567)

1) นิเวศวิทยา (ปี 2565)

สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดโทงเทงประดับโดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่เกษตรภาคเหนือ (เช่น จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ น่าน พะเยา แพร่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง ลำพูน) อย่างน้อยจังหวัดละ 5 แหล่ง โดยมีโทงเทงประดับเป็นพืชเป้าหมาย โดยการสุ่มเดินแบบซิกแซก รูปตัว W โดยมีพื้นที่ในการสุ่มไม่น้อยกว่า 10% ของพื้นที่สำรวจ เมื่อพบพืชเป้าหมาย จะทำการสำรวจพื้นที่ใกล้เคียง เพื่อทราบขอบเขตการระบาดในแหล่งนั้น พร้อมเก็บตัวอย่างและถ่ายภาพเป็นหลักฐาน นำตัวอย่างต้นมาจัดทำตัวอย่างแห้ง ส่วนเมล็ดนำไปทำความสะอาด ผึ่งให้แห้งในที่ร่ม นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ บันทึกข้อมูลสถานที่หรือพิกัดที่เก็บตัวอย่าง สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูกหลัก วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ร่องรอยการถูกทำลายโดยศัตรูธรรมชาติในพื้นที่สำรวจ

<u>การจัดทำตัวอย่างแห้ง</u> นำตัวอย่างต้นวัชพืชมาอัดในแผงพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 X 30 เซนติเมตร เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่างนิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช

2) ศึกษาลักษณะเมล็ด (ปี 2565)

นำเมล็ดโทงเทงประดับที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน แล้วเลือกเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด ศึกษาลักษณะ รูปร่าง ขนาด ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ บันทึกข้อมูล รูปร่าง ลักษณะ ลวดลายและสีของผิวเมล็ด ความกว้าง ความยาวของเมล็ด น้ำหนักต่อ 100 เมล็ด โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช

3) ศึกษาการงอกในห้องปฏิบัติการ และสภาพเรือนทดลอง (ปี 2565)

<u>- การงอกในห้องปฏิบัติการ</u>

นำเมล็ดโทงเทงประดับที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน แล้วเลือกเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์ จำนวน 50 เมล็ด ใส่ในจานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร ที่บรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดฝา จำนวน 10 จาน นำไปวางในห้องปฏิบัติการ สภาพอุณหภูมิห้อง บันทึกข้อมูล จำนวนเมล็ดงอกทุกวัน นาน 1 เดือน หรือจนกว่าเมล็ดงอกหมด โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช

<u>- การงอกในห้องสภาพเรือนทดลอง</u>

กรมวิชาการเกษตร

นำเมล็ดโทงเทงประดับที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน แล้วเลือกเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด โรยในกระถางเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร ที่บรรจุดินจนถึงขอบล่างของกระถาง จำนวน 10 กระถาง รดน้ำให้ความชื้นทุกวัน บันทึกข้อมูล จำนวนเมล็ดงอกทุกวัน นาน 1 เดือน หรือจนกว่าเมล็ดงอกหมด โดยดำเนินการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

4) การเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด (ปี 2566)

นำเมล็ดที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน แล้วสุ่มเมล็ดมาใช้ในการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCB) จำนวน 4 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 โทงเทงประดับ จำนวน 1 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 2 โทงเทงประดับจำนวน 3 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 3 โทงเทงประดับจำนวน 5 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 4 โทงเทงประดับทั้งหมดที่งอก

หว่านเมล็ดโทงเทงประดับจำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1x1 เมตร เมื่อเมล็ดงอก 1 สัปดาห์ ถอนให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง จำนวนต้นตามกรรมวิธีต่างๆ ที่กำหนด สังเกตการณ์เจริญเติบโต และบันทึกข้อมูล วันที่งอก หลังจากหว่าน ความสูง และขนาดทรงพุ่ม ทุก 7 วัน วันที่ออกดอก และวันที่ติดเมล็ด (นับจากวันที่งอก) จำนวนเมล็ดต่อผล จำนวนผลต่อต้น

เมื่อโทงเทงประดับมีใบยอดเหลือง (พืชเริ่มตาย) หรือครบวงจรชีวิต 1 รอบ (ระยะเวลาที่พืชเริ่มงอกจนถึงสร้างเมล็ดแก่ที่จะใช้ขยายพันธุ์ต่อไป) ถอน ล้างทำความสะอาด บันทึกน้ำหนักสด จำนวนช่อดอก จำนวนผลต่อช่อ จำนวนเมล็ดต่อผล และนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้คำนวณหาค่าเฉลี่ยระยะเวลาการงอก การเจริญเติบโต การออกดอก การแก่ของเมล็ด เพื่อหาระยะเวลาที่พืชเริ่มงอกจนถึงสร้างเมล็ดแก่ ที่จะใช้ขยายพันธุ์ต่อไป คำนวณความสามารถในการผลิตเมล็ดพันธุ์ต่อต้น ความสามารถในการผลิตเมล็ดต่อพื้นที่ โดยดำเนินการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่

5) ศึกษาคุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิเบื้องต้น ในห้องปฏิบัติการ (ปี 2566)

ทดสอบฤทธิ์ทางอัลลิโลพาธิในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Sandwich method (Fujii *et al*., 2004) ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ไมยราบยักษ์เป็นพืชทดสอบ

วางแผนการทดลอง แบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ใบแห้งโทงเทงประดับ หนัก 0.01 กรัม

กรรมวิธีที่ 2 ใบแห้งโทงเทงประดับ หนัก 0.05 กรัม

กรรมวิธีที่ 3 ใบแห้งโทงเทงประดับ หนัก 0.1 กรัม

กรรมวิธีที่ 4 ใบแห้งโทงเทงประดับ หนัก 0.5 กรัม

กรรมวิธีที่ 5 ใบแห้งโทงเทงประดับ หนัก 0 กรัม (ชุดควบคุม)

นำใบแห้งโทงเทงประดับที่ผ่านการอบแห้งที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ชั่งใบแห้งโทงเทงประดับตามกรรมวิธีที่กำหนด ใส่ลงในหลอดแก้วก้นตัด เส้นผ่านศูนย์กลาง 29 มิลลิเมตร ความสูง 130 มิลลิเมตร ที่บรรจุ

กรมวิชาการเกษตร

สารละลายวุ้น 0.3% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เมื่อวุ้นชั้นล่างเย็น เติมลงไปอีก 10 มิลลิลิตร ให้ใบแห้งโทงเทงประดับอยู่กึ่งกลางระหว่างชั้นของวุ้น เมื่อวุ้นชั้นบนเย็น นำต้นอ่อนไมยราบยักษ์ที่เริ่มงอก (มีรากยาวประมาณ 1-2 มิลลิเมตร) วางบนวุ้นหลอดละ 6 เมล็ด ปิดปากหลอดด้วยพลาสติกใส นำไปวางในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงตลอดเวลา นาน 7 วัน บันทึกข้อมูล ความยาวราก และความยาวต้นของไมยราบยักษ์ ชั่งน้ำหนักสดโดยรวมของไมยราบยักษ์ในแต่ละหลอด โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช

7) ผลของระดับความลึกของดินต่อการงอกของเมล็ด (2567)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) จำนวน 5 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 วางเมล็ดบนผิวดิน
กรรมวิธีที่ 2 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร
กรรมวิธีที่ 3 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 10 เซนติเมตร
กรรมวิธีที่ 4 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร
กรรมวิธีที่ 5 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 20 เซนติเมตร
กรรมวิธีที่ 6 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 25 เซนติเมตร

บรรจุดินใส่กระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร ให้ผิวดินห่างจากขอบบนของกระถาง 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 เซนติเมตร นำเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด (ใช้เมล็ดที่ได้จากการปลูกศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด ปี 2566) หว่านให้ทั่วกระถาง แล้วเติมดินจนถึงขอบบนของกระถาง รดน้ำเช้า และเย็น เพื่อให้มีความชื้น บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน เป็นระยะเวลานาน 1 เดือน เพื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยทำการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

8) ผลของวัสดุคลุมดินต่อการงอกของเมล็ด (2567)

วางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCB) จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 3 กระบะ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 พลาสติกคลุมแปลง
กรรมวิธีที่ 2 ฟางข้าว
กรรมวิธีที่ 3 แกลบดิบ
กรรมวิธีที่ 4 แกลบเผา
กรรมวิธีที่ 5 ใบและต้นธูปฤาษี
กรรมวิธีที่ 6 ไม่ใช้วัสดุคลุมดิน

เตรียมกระบะสี่เหลี่ยมขนาด 30 x 30 นิ้ว ใส่ดินร่วนเป็นวัสดุปลูก จากนั้นหยอดเมล็ด 100 เมล็ดต่อกระถาง (ใช้เมล็ดที่ได้จากการปลูกศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด ปี 2566) แล้วทำการคลุมด้วยวัสดุต่างๆ ตามกรรมวิธีที่กำหนด บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน เป็นระยะเวลานาน 1 เดือน นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยทำการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

9) ผลของอุณหภูมิต่อการงอกของเมล็ดในวัสดุปลูก (2567)

ศรีวิชัยการเกษตร

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการงอกโดยอ้างอิงจากกรรมวิธีของ Ruth *et al*, 2007 โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 3 กระบะ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 2 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 3 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 4 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 5 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 6 ไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช

นำเมล็ดที่แก่ และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด (ใช้เมล็ดที่ได้จากการปลูกศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด ปี 2566) ผสมในวัสดุปลูก 1 กิโลกรัม และนำไปอบที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืชที่อบเรียบร้อยแล้ว ใส่ในกระบะสี่เหลี่ยมขนาด 10 x 30 นิ้ว กระบะละ 1 กิโลกรัม จากนั้นรดน้ำเพื่อให้ความชื้น บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน เป็นระยะเวลานาน 1 เดือน นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยทำการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

การทดลองที่ 3 ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของ *Oxalis debilis* Kunth.) วัชพืชแพร่ระบาดในพื้นที่เกษตรภาคเหนือ (ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2567)

1) นิเวศวิทยา (ปี 2565)

สำรวจและเก็บตัวอย่างต้น เมล็ด และหัว *O. debilis* โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่เกษตรที่สูงในภาคเหนือ (เช่น จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ น่าน พะเยา แพร่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง ลำพูน) จังหวัดละ 5 แหล่ง โดยมี *O. debilis* เป็นพืชเป้าหมาย โดยการสุ่มเดินแบบซิกแซก รูปตัว W โดยมีพื้นที่ในการสุ่มไม่น้อยกว่า 10% ของพื้นที่สำรวจ เมื่อพบพืชเป้าหมาย จะทำการสำรวจพื้นที่ใกล้เคียง เพื่อทราบขอบเขตการระบาดในแหล่งนั้น พร้อมเก็บตัวอย่างและถ่ายภาพเป็นหลักฐาน นำตัวอย่างต้นมาจัดทำตัวอย่างแห้ง ส่วนเมล็ดนำไปทำความสะอาด ผึ่งในที่ร่มให้แห้ง นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการทดลองต่อไป บันทึกข้อมูล สถานที่หรือพิกัดที่เก็บตัวอย่าง สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูกหลัก วัน/เดือน/ปี ที่เก็บร่องรอยการถูกทำลายโดยศัตรูธรรมชาติในพื้นที่สำรวจ

<u>การจัดทำตัวอย่างแห้ง</u> นำตัวอย่างต้นวัชพืชมาอัดในแผงพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 X 30 เซนติเมตร เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช

2) ศึกษาการงอกของหัวในสภาพเรือนทดลอง (ปี 2565)

เก็บตัวอย่างต้น *O. debilis* ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน และอยู่ในระยะสร้างหัว จากพื้นที่สำรวจ นำมาคัดเลือกขนาดหัวที่เท่าๆ กัน นำมาปลูกในกระถางขนาด 12 นิ้ว จำนวน 10 กระถาง กระถางละ 20 หัว รดน้ำให้

กรมวิชาการเกษตร

ความชื้นทุกวัน บันทึกข้อมูล จำนวนหัวที่งอกทุกวัน นาน 1 เดือน หรือจนกว่าหัวจะงอกหมด นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การงอก โดยดำเนินการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

3) ศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการสร้างหน่วยขยายพันธุ์ (ปี 2566)

นำหัวที่เก็บได้มาเลือกหัวที่มีขนาดเท่ากันใช้ในการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCB) จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 3 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 *O. debilis* จำนวน 1 หัวต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 2 *O. debilis* จำนวน 3 หัวต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 3 *O. debilis* จำนวน 5 หัวต่อกระบะ

ปลูกหัวตามจำนวนในแต่ละกรรมวิธี ในกระบะสี่เหลี่ยมขนาด 30 x 30 นิ้ว เมื่อหัวงอกสังเกตการณ์เจริญเติบโต และบันทึกข้อมูล วันที่งอกหลังจากปลูก จำนวนใบ จำนวนหน่อ ทุก 7 วัน จนกระทั่งออกดอก จึงถอน ล้างทำความสะอาด บันทึกน้ำหนักสด จำนวนหัวต่อต้น และนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้คำนวณหาค่าเฉลี่ยระยะเวลาการงอก การเจริญเติบโต การออกดอก จำนวนหัว คำนวณความสามารถในการผลิตหัวต่อต้น ความสามารถในการผลิตหัวต่อพื้นที่ โดยดำเนินการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

4) ศึกษาคุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิเบื้องต้น ในห้องปฏิบัติการ (ปี 2566)

ทดสอบฤทธิ์ทางอัลลิโลพาธิในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Sandwich method (Fujii *et al*., 2004) ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ไมยราบยักษ์เป็นพืชทดสอบ

วางแผนการทดลอง แบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ใบแห้ง *O. debilis* หนัก 0.01 กรัม

กรรมวิธีที่ 2 ใบแห้ง *O. debilis* หนัก 0.05 กรัม

กรรมวิธีที่ 3 ใบแห้ง *O. debilis* หนัก 0.1 กรัม

กรรมวิธีที่ 4 ใบแห้ง *O. debilis* หนัก 0.5 กรัม

กรรมวิธีที่ 5 ใบแห้ง *O. debilis* หนัก 0 กรัม (ชุดควบคุม)

นำใบแห้ง *O. debilis* ที่ผ่านการอบแห้งที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ชั่งใบแห้ง *O. debilis* ตามกรรมวิธีที่กำหนด ใส่ลงในหลอดแก้วก้นตัด เส้นผ่านศูนย์กลาง 29 มิลลิเมตร ความสูง 130 มิลลิเมตร ที่บรรจุสารละลายวุ้น 0.3% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เมื่อวุ้นชั้นล่างเย็น เติมลงไปอีก 10 มิลลิลิตร ให้ใบแห้ง *O. debilis* อยู่กึ่งกลางระหว่างชั้นของวุ้น เมื่อวุ้นชั้นบนเย็น นำต้นอ่อนไมยราบยักษ์ที่เริ่มงอก (มีรากยาวประมาณ 1-2 มิลลิเมตร) วางบนวุ้นหลอดละ 6 เมล็ด ปิดปากหลอดด้วยพลาสติกใส นำไปวางในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงตลอดเวลา นาน 7 วัน บันทึกข้อมูล ความยาวราก และความยาวต้นของไมยราบยักษ์ ชั่งน้ำหนักสดโดยรวมของไมยราบยักษ์ในแต่ละหลอด โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัชพืช

5) ผลของระดับความลึกของดินต่อการงอกของหัว (2567)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) จำนวน 5 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 วางหัวบนผิวดิน

กรรมวิธีที่ 2 วางหัวที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 3 วางหัวที่ระดับความลึกจากผิวดิน 10 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 4 วางหัวที่ระดับความลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 5 วางหัวที่ระดับความลึกจากผิวดิน 20 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 6 วางหัวที่ระดับความลึกจากผิวดิน 25 เซนติเมตร

บรรจุดินใส่กระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร ให้ผิวดินห่างจากขอบบนของกระถาง 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 เซนติเมตร นำหัวที่สมบูรณ์ ขนาดเท่ากัน จำนวน 20 หัว (ใช้หัวที่ได้จากการปลูกศึกษาความสามารถในการสร้างหน่วยขยายพันธุ์ปี 2566) วางในกระถางแล้วเติมดินจนถึงขอบบนของกระถาง รดน้ำเช้า และเย็น เพื่อให้มีความชื้น บันทึกจำนวนหัวที่งอกทุกวัน เป็นระยะเวลานาน 1 เดือน เพื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยทำการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

6) ผลของวัสดุคลุมดินต่อการงอกของหัว (2567)

วางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCB) จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 3 กระบะ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 พลาสติกคลุมแปลง

กรรมวิธีที่ 2 ฟางข้าว

กรรมวิธีที่ 3 แกลบดิบ

กรรมวิธีที่ 4 แกลบเผา

กรรมวิธีที่ 5 ใบและต้นธูปฤาษี

กรรมวิธีที่ 6 ไม่ใช้วัสดุคลุมดิน

เตรียมกระบะสี่เหลี่ยมขนาด 30 x 30 นิ้ว ใส่ดินร่วนเป็นวัสดุปลูก จากนั้นเลือกหัวที่สมบูรณ์และขนาดเท่ากัน จำนวน 20 หัวต่อกระถาง (ใช้หัวที่ได้จากการปลูกศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด ปี 2566) แล้วทำการคลุมด้วยวัสดุต่างๆ ตามกรรมวิธีที่กำหนด บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน จนเมล็ดงอกหมด แต่ไม่เกิน 1 เดือน นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยทำการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

7) ผลของอุณหภูมิต่อการงอกของหัวในวัสดุปลูก (2567)

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการงอกโดยอ้างอิงจากกรรมวิธีของ Ruth *et al*, 2007 โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 3 กระบะ 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 อบวัสดุปลูกและหัว ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 2 อบวัสดุปลูกและหัว ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 3 อบวัสดุปลูกและหัว ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 4 อบวัสดุปลูกและหัว ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 5 อบวัสดุปลูกและหัว วัชพืช ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 6 ไม่อบวัสดุปลูกและหัว

นำหัวที่สมบูรณ์ ขนาดเท่ากัน จำนวน 20 หัว (ใช้หัวที่ได้จากการปลูกศึกษาความสามารถในการสร้างหน่วยขยายพันธุ์ ปี 2566) ผสมในวัสดุปลูก 1 กิโลกรัม และนำไปอบที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำวัสดุปลูกและหัวที่อบเรียบร้อยแล้ว ใส่ในกระบะสี่เหลี่ยมขนาด 10 x 30 นิ้ว กระบะละ 1 กิโลกรัม จากนั้นรดน้ำเพื่อให้ความชื้น บันทึกจำนวนหัวที่งอกทุกวัน จนหัวงอกหมด แต่ไม่เกิน 1 เดือน นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยทำการทดลอง ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

การทดลองที่ 4 ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของจ้อล่อ (*Conyza sumatrensis* (S.F.Blake) Pruski & G.Sancho) วัชพืชสำคัญในพื้นที่เกษตร (ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2567)

1) นิเวศวิทยา (ปี 2565-2566)

สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดจ้อล่อโดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) โดยมีจ้อล่อเป็นพืชเป้าหมาย ทำการสำรวจในพื้นที่เกษตร และนิเวศเกษตร ในภาคต่างๆ โดยมีพื้นที่สำรวจในแต่ละภาคอย่างน้อย 20 แหล่ง โดยแบ่งพื้นที่สำรวจดังนี้

ปี 2565 ภาคเหนือ (เช่น จังหวัดเชียงราย พะเยา ลำปาง ลำพูน) ภาคกลาง (เช่น จังหวัดนครสวรรค์ ลพบุรี สระบุรี ชัยนาท สุพรรณบุรี กรุงเทพฯ) และภาคใต้ (เช่น จังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา ชุมพร)

ปี 2566 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เช่น จังหวัดสกลนคร อุบลราชธานี นครราชสีมา) และภาคตะวันออก (เช่น จังหวัด ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา) และภาคตะวันตก (เช่น จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์)

เมื่อพบพืชเป้าหมาย จะทำการสำรวจพื้นที่ใกล้เคียง เพื่อทราบขอบเขตการระบาดในแหล่งนั้น พร้อมเก็บตัวอย่างและถ่ายภาพเป็นหลักฐาน นำตัวอย่างต้นมาจัดทำตัวอย่างแห้ง ส่วนเมล็ดนำไปทำความสะอาด ผึ่งในที่ร่มให้แห้ง นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการทดลองต่อไป บันทึกข้อมูล สถานที่หรือพิกัดที่เก็บตัวอย่าง สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูกหลัก วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ร่องรอยการถูกทำลายโดยศัตรูธรรมชาติในพื้นที่สำรวจ

การจัดทำตัวอย่างแห้ง นำตัวอย่างต้นวัชพืชมาอัดในแผงพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 X 30 เซนติเมตร เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช

2) ศึกษาลักษณะเมล็ด (ปี 2565)

นำเมล็ดจ้อล่อที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน แล้วเลือกเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด ศึกษาลักษณะ รูปร่าง ขนาด ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ บันทึกข้อมูล รูปร่าง ลักษณะ ลวดลายและสีของผิวเมล็ด ความกว้าง ความยาวของเมล็ด น้ำหนักต่อ 100 เมล็ด โดยดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัชพืช และสถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

3) ศึกษาการงอกในห้องปฏิบัติการ และสภาพเรือนทดลอง (ปี 2565)

กรมวิชาการเกษตร

- การงอกในห้องปฏิบัติการ

นำเมล็ดจ้อล่อที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน แล้วเลือกเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์ จำนวน 50 เมล็ด ใส่ในจานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร ที่บรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดฝา จำนวน 10 จาน นำไปวางในห้องปฏิบัติการ สภาพอุณหภูมิห้อง บันทึกข้อมูล จำนวนเมล็ดงอกทุกวัน นาน 1 เดือน หรือจนกว่าเมล็ดงอกหมด โดยดำเนินการทดลอง ณ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

- การงอกในห้องสภาพเรือนทดลอง

นำเมล็ดจ้อล่อที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน แล้วเลือกเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด โรยในกระถางเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร ที่บรรจุดินจนถึงขอบล่างของกระถาง จำนวน 10 กระถาง รดน้ำให้ความชื้นทุกวัน บันทึกข้อมูล จำนวนเมล็ดงอกทุกวัน นาน 1 เดือน หรือจนกว่าเมล็ดงอกหมด โดยดำเนินการทดลอง ณ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

4) การเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด (ปี 2566)

นำเมล็ดที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน แล้วสุ่มเมล็ดมาใช้ในการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCB) จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 จ้อล่อจำนวน 1 ต้นต่อกระบะ
กรรมวิธีที่ 2 จ้อล่อจำนวน 3 ต้นต่อกระบะ
กรรมวิธีที่ 3 จ้อล่อจำนวน 5 ต้นต่อกระบะ
กรรมวิธีที่ 4 จ้อล่อ ทั้งหมดที่งอก

หว่านเมล็ดจ้อล่อ จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1x1 เมตร เมื่อเมล็ดงอก 1 สัปดาห์ ถอนให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง จำนวนต้นตามกรรมวิธีต่างๆ ที่กำหนด สังเกตการณ์เจริญเติบโต และบันทึกข้อมูล วันที่งอก หลังจากหว่าน ความสูง และขนาดทรงพุ่ม ทุก 7 วัน วันที่ออกดอก และวันที่ติดเมล็ด (นับจากวันที่งอก) จำนวนเมล็ดต่อผล จำนวนผลต่อต้น

เมื่อจ้อล่อมีใบยอดเหลือง (พืชเริ่มตาย) หรือครบวงจรชีวิต 1 รอบ (ระยะเวลาที่พืชเริ่มงอกจนถึงสร้างเมล็ดแก่ที่จะใช้ขยายพันธุ์ต่อไป) ถอน ล้างทำความสะอาด บันทึกน้ำหนักสด จำนวนช่อดอก จำนวนผลต่อช่อ จำนวนเมล็ดต่อผล และนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้คำนวณหาค่าเฉลี่ยระยะเวลาการงอก การเจริญเติบโต การออกดอก การแก่ของเมล็ด เพื่อหาระยะเวลาที่พืชเริ่มงอกจนถึงสร้างเมล็ดแก่ ที่จะใช้ขยายพันธุ์ต่อไป คำนวณความสามารถในการผลิตเมล็ดพันธุ์ต่อต้น ความสามารถในการผลิตเมล็ดต่อพื้นที่ โดยดำเนินการทดลอง ณ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

5) ความสามารถในการขยายพันธุ์ด้วยกิ่ง (ปี 2566)

หว่านเมล็ดจ้อล่อ จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1x1 เมตร หลังงอก 1 สัปดาห์ ถอนออกให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง เมื่อมีอายุ 1 เดือน ถอนออกจากแปลงทำการตัดแขนงบริเวณโคนต้น ให้แต่ละกิ่งมีความยาวประมาณ 10 เซนติเมตร (แต่ละกิ่งมี 5 ข้อ) นำไปปักชำ (วางแนวนอน แล้วกลบด้วยดิน) ในกระบะปูน จำนวน 10 กระถาง กระถางละ 10 กิ่ง บันทึกข้อมูล จำนวนหน่อที่เกิดขึ้นต่อกิ่ง ทุก 7 วัน นาน 2 เดือน โดยดำเนินการทดลอง ณ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

กรมวิชาการเกษตร

6) ศึกษาคุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิเบื้องต้น ในห้องปฏิบัติการ (ปี 2566)

ทดสอบฤทธิ์ทางอัลลิโลพาธิในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Sandwich method (Fujii *et al*., 2004) ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ไมยราบยักษ์เป็นพืชทดสอบ

วางแผนการทดลอง แบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ใบแห้งจ้อล่อ หนัก 0.01 กรัม

กรรมวิธีที่ 2 ใบแห้งจ้อล่อ หนัก 0.05 กรัม

กรรมวิธีที่ 3 ใบแห้งจ้อล่อ หนัก 0.1 กรัม

กรรมวิธีที่ 4 ใบแห้งจ้อล่อ หนัก 0.5 กรัม

กรรมวิธีที่ 5 ใบแห้งจ้อล่อ หนัก 0 กรัม (ชุดควบคุม)

นำใบแห้งจ้อล่อที่ผ่านการอบแห้งที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ชั่งใบแห้งจ้อล่อตามกรรมวิธีที่กำหนดใส่ลงในหลอดแก้วก้นตัด เส้นผ่านศูนย์กลาง 29 มิลลิเมตร ความสูง 130 มิลลิเมตร ที่บรรจุสารละลายวุ้น 0.3% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เมื่อวุ้นชั้นล่างเย็น เติมลงไปอีก 10 มิลลิลิตร ให้ใบแห้งจ้อล่ออยู่กึ่งกลางระหว่างชั้นของวุ้น เมื่อวุ้นชั้นบนเย็น นำต้นอ่อนไมยราบยักษ์ที่เริ่มงอก (มีรากยาวประมาณ 1-2 มิลลิเมตร) วางบนวุ้นหลอดละ 6 เมล็ด ปิดปากหลอดด้วยพลาสติกใส นำไปวางในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงตลอดเวลา นาน 7 วัน บันทึกข้อมูล ความยาวราก และความยาวต้นของไมยราบยักษ์ ชั่งน้ำหนักสดโดยรวมของไมยราบยักษ์ในแต่ละหลอด โดยดำเนินการทดลอง ณ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

7) ผลของระดับความลึกของดินต่อการงอกของเมล็ด (2567)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) จำนวน 5 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 วางเมล็ดบนผิวดิน

กรรมวิธีที่ 2 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 3 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 10 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 4 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 5 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 20 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 6 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 25 เซนติเมตร

บรรจุดินใส่กระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร ให้ผิวดินห่างจากขอบบนของกระถาง 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 เซนติเมตร นำเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด (ใช้เมล็ดที่ได้จากการปลูกศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด ปี 2566) หว่านให้ทั่วกระถาง แล้วเติมดินจนถึงขอบบนของกระถาง รดน้ำเช้า และเย็น เพื่อให้มีความชื้น บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน เป็นระยะเวลานาน 1 เดือน เพื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยดำเนินการทดลอง ณ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

8) ผลของอุณหภูมิต่อการงอกของเมล็ดในวัสดุปลูก (2567)

กรมวิชาการเกษตร

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการงอกโดยอ้างอิงจากกรรมวิธีของ Ruth M. D. *et al*, 2007 โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 3 กระถาง 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 2 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 3 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 4 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 5 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 6 ไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช

นำเมล็ดที่แก่ และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด (ใช้เมล็ดที่ได้จากการปลูกศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด ปี 2566) ผสมในวัสดุปลูก 1 กิโลกรัม และนำไปอบที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืชที่อบเรียบร้อยแล้ว ใส่ในกระบะสี่เหลี่ยมขนาด 10 x 30 นิ้ว กระบะละ 1 กิโลกรัม จากนั้นรดน้ำเพื่อให้ความชื้น บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน เป็นระยะเวลานาน 1 เดือน นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยดำเนินการทดลอง ณ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

3. การปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

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

❑ เปลี่ยนแปลงงบประมาณ โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

❑ เปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์/ผลผลิต โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 3 ผลการศึกษา

3.1 ผลการดำเนินงานของโครงการ

สรุปผลการดำเนินงานที่ทำได้จริง โดยให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของโครงการ (สรุปภาพรวมของโครงการ)

1) การศึกษาอนุกรมวิธานศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่สำคัญทางการเกษตร โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุลในการจัดจำแนกชนิด โดยทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย รายละเอียดดังนี้

การศึกษาอนุกรมวิธานของแมลง ไร สัตว์ ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า เก็บรวบรวมตัวอย่างด้วงในธัญพืชจากด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ และโรงงานแปรรูปธัญพืชในกรุงเทพมหานคร จำแนกชนิดได้ 6 ชนิด ได้แก่ ด้วงงวงข้าว *Sitophilus oryzae* พบในข้าวสาลีนำเข้าจากประเทศออสเตรเลีย ด้วงเมล็ดพืชต่างประเทศ *Ahasverus advena* พบในถั่วลิสงนำเข้าจากประเทศอินเดีย มอดฟันเลื่อย *Oryzaephilus surinamensis* พบในข้าว มอดหนวดยาว *Cryptolestes ferrugineus* ด้วงดำ *Alphitobius diaperinus* พบในกากถั่วเหลือง มอดแป้ง *Tribolium castaneum* พบในข้าวสาลีนำเข้าจากประเทศออสเตรเลีย เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟจากแหล่งปลูกไม้ดอกในจังหวัดชัยภูมิ นครราชสีมา ตาก เชียงใหม่ และเชียงราย จำแนกชนิดเพลี้ยไฟได้ 5 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยไฟดอกไม้ตะวันตก *Frankliniella occidentalis* เพลี้ยไฟดอกไม้ *Frankliniella schultzei* สำรวจพบในเบญจมาศและกุหลาบ เพลี้ยไฟขอบปล้องหยัก *Microcephalothrips abdominalis* เพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย *Thrips hawaiiensis* สำรวจพบในดอกพิทูเนีย คอสมอส ผักเสี้ยนผี หงอนไก่ และเพลี้ยไฟดอกหน้าวัว *Chaetanaphothrips orchidii* เก็บรวบรวมตัวอย่าง ผีเสื้อหนอนกระทู้ สกุล *Spodoptera* จากแปลงปลูกพืชจำแนกชนิดได้ 2 ชนิด คือ ผีเสื้อหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) และผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) เก็บรวบรวมตัวอย่างทากศัตรูพืช จากแหล่งปลูกพืชเศรษฐกิจและพื้นที่ป่าจำแนกชนิดที่เป็นศัตรูพืชได้ 2 ชนิด ได้แก่ ทากเล็บมือนาง *Pamarion martensi* และ *Parmarion* sp.1 พร้อมจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การจำแนกชนิดของแมลง ไร สัตว์ ศัตรูพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่า การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจักจั่นศัตรูอ้อยในจังหวัดสุพรรณบุรี กาญจนบุรี นครปฐม ราชบุรี ชัยนาท สิงห์บุรี อ่างทอง และสระบุรี พบจักจั่นศัตรูอ้อย 1 ชนิด ได้แก่ *Platypleura cespiticola* Boulard และยังพบว่าจักจั่น *P. cespiticola* มีลักษณะคล้ายคลึงกับจักจั่น *P. arminops* แต่มีขนาดเล็กกว่า และที่ปีกมีสีสรรมากกว่า การเข้าทำลายกัดกินรากอ้อยของจักจั่นชนิดนี้ถือว่าเป็นการพบครั้งแรกในประเทศไทย ซึ่งก่อนหน้านี้ไม่เคยมีรายงานการเข้าทำลายมาก่อน เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดสกุล *Pinnaspis* จากจังหวัดสระบุรี ชัยนาทกำแพงเพชร อุทัยธานีและกรุงเทพมหานคร ภาคเหนือ เช่น จังหวัดลำปาง แพร่ น่าน และพิษณุโลก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดนครราชสีมา มหาสารคาม มุกดาหาร หนองคาย และอุบลราชธานี สามารถจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ C1J2195/TL2N3014 จากยีน cox1 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอได้ขนาด 650 - 700 คู่เบส เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบพบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100 % ในฐานข้อมูล GenBank พร้อมลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากไคตินที่นำมาทำสไลด์ถาวร พบเพลี้ย

กรมวิชาการเกษตร

หอยเกล็ด สกุล *Pinnaspis* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ 1. *Pinnaspis aspidiatrae* (Signoret, 1869) 2. *Pinnaspis strachani* (Cooley, 1899) การเก็บตัวอย่างทากเล็บมือนางสกุล *Parmarion* ในภูมิภาคต่าง ๆ นำมาศึกษาลักษณะทางสัญฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ทากเล็บมือนางสกุล *Parmarion* spp. ในประเทศไทยพบว่าเป็นแบบรวมเพศหรือมีสองเพศในตัวเดียวกัน (hermaphrodite) แต่ไม่สามารถผสมพันธุ์กับตัวเองได้ และนำมาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งยีน Cytochrome oxidase subunit I หรือยีน COI ความยาวประมาณ 650 คู่เบส สามารถจับกลุ่มร่วมกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน COI ของทากเล็บมือนาง จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ทากเล็บมือนางมาร์เทนส์ *Parmarion martensi* จากฐานข้อมูล GenBank โดยมีค่า Bootstrap support และค่า Bayesian posterior probability เท่ากับ 99 และ 0.99 ตามลำดับ และยังพบว่าทากเล็บมือนาง *Parmarion* spp. มีความเป็นไปได้ที่ทากเล็บมือนางที่อยู่ในเคลด A อาจเป็นคนละชนิดกับทากเล็บมือนางมาร์เทนส์ ทั้งนี้เพื่อตัดสินสมมุติฐานดังกล่าวจึงจำเป็นต้องศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และศึกษาลักษณะทางสัญฐานวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์จากทากเล็บมือนางตัวอย่างอื่นเพิ่มเติมต่อไป การเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus* เก็บรวบรวมจากแหล่งปลูกพืชที่สำคัญในเขตพื้นที่ภาคกลาง เช่น จังหวัดสระบุรี และกรุงเทพมหานคร ภาคเหนือ เช่น จังหวัดพิษณุโลกและเชียงใหม่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดนครราชสีมา มหาสารคาม และขอนแก่น จำแนกชนิดเพลี้ยแป้งใน สกุล *Planococcus* ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล สามารถจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ PcoF1/ LepR1 จากยีน cox1 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอได้ขนาด 650 - 700 คู่เบส เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบพบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100 % ในฐานข้อมูล GenBank สามารถจำแนกเพลี้ยแป้งสกุล Planococcus จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ 1. *Planococcus lilacinus* (Cockerell, 1905), 2. *Planococcus minor* (Maskell, 1897), และ 3. *Planococcus citri* (Risso, 1813) การจำแนกไบโอไทป์ของแมลงหวี่ขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* ในแหล่งปลูกพริกอินทรีย์และแหล่งปลูกพริกใช้สารเคมี ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI ขนาดประมาณ 850 นิวคลิโอทด์ จำแนกไบโอไทป์แมลงหวี่ขาวยาสูบจากแปลงปลูกพริกแบบอินทรีย์และแปลงปลูกพริกที่มีการใช้สารเคมี จากจังหวัดบึงกาฬ และจังหวัดนครพนม พบว่าแปลงปลูกพริกแบบอินทรีย์ พบ 2 ไบโอไทป์ ได้แก่ Asia I และAsia II_6 ในขณะที่แปลงปลูกพริกที่มีการใช้สารเคมีพบเฉพาะ Asia I จากนั้นสร้างแผนภูมิแบบ maximum likelihood phylogenetic tree โดยใช้ค่าความแตกต่าง (distance) ของข้อมูลยีน mtCOI ขนาด 685 นิวคลิโอไทด์ที่ได้จากการทำ multiple alignment คำนวณค่าความเชื่อมั่นจากการวิเคราะห์ bootstrap จำนวน 1000 replications ของแมลงหวี่ขาวยาสูบ 60 ตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างไบโอไทป์และพริกที่ปลูกแบบอินทรีย์ละพริกที่ปลูกแบบใช้สารเคมี พบว่า phylogenetic tree แยกได้ 2 กิ่ง (branch) โดยกิ่งที่ 1 เป็นไบโอไทป์ Asia I ทั้งหมด ซึ่งแยกเป็น 2 คลัสเตอร์ (cluster) คลัสเตอร์ที่ 1 พบไบโอไทป์ Asia I แบ่งเป็น 2 เคลด ซึ่งพบว่าเคลดที่ 1 แบ่งเป็นประชากรในแปลงปลูกพริกแบบอินทรีย์ 26 ตัวอย่าง พบว่าเป็นแมลงหวี่ขาวจากจังหวัดบึงกาฬ 13 ตัวอย่าง และจากจังหวัดบึงกาฬ 23 ตัวอย่าง ส่วนประชากรในแปลงปลูกพริกที่มีการใช้สารเคมีจำนวน 23 ตัวอย่าง พบว่าเป็นแมลงหวี่ขาวจากจังหวัดบึงกาฬ 11 ตัวอย่าง และจากจังหวัดบึงกาฬ 12 ตัวอย่าง คลัสเตอร์ที่ 2 พบไบโอไทป์ Asia I จำนวน 7 ตัวอย่าง แบ่งเป็นประชากรในแปลงปลูกพริกแบบอินทรีย์จากบึงกาฬ 2 ตัวอย่าง และประชากรในแปลงปลูกพริกที่มีการใช้สารเคมี

กรมวิชาการเกษตร

จากจังหวัดนครพนมทั้ง 5 ตัวอย่าง และกิ่งที่ 2 เป็นไบโอไทป์ Asia II_6 จาก แปลงปลูกพริกแบบอินทรีย์ จังหวัดนครพนมทั้ง 2 ตัวอย่าง การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันหนอนชอนใบ จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย และพบแมลงวันหนอนชอนใบ 5 ชนิด ได้แก่ ได้แก่ *Liriomyza brassicae* (Riley, 1884), *L. chinensis* (Kato, 1949), *L. huidobrensis* (Blanchard,1926), *L. sativae* Blanchard, 1938 และ *L. trifolii* (Burgess 1880) จากการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ LCO1490 / HCO2198 จากยีน cox1 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอได้ขนาด 650 - 700 คู่เบส เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบพบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100 % และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank และจากข้อมูลที่ถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวแสดงว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอมีความเหมาะสมสามารถนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นสามารถนำดีเอ็นเอจากวิธีการสกัดดังกล่าวมาทดสอบกับไพรเมอร์ที่ออกแบบได้

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอย เชื้อรา แบคทีเรียและไวรัส

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* (Nematoda: Pratylenchidae) ในพรรณไม้น้ำ จากจังหวัดนครราชสีมา ฉะเชิงเทรา พะเยา น่าน นครปฐม นนทบุรี อยุธยา ปทุมธานี และเชียงใหม่ ตรวจพบไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* จากพืชต่างๆประกอบด้วย *Oryza sativa* (ข้าว) *Vallisneria* spp. *Acorus* spp. *Hygrophila* spp. *Elodea najas* และ *Anubias barteri* var. barteri และได้ทำสไลด์ถาวรแล้วจำนวน 75 ตัวอย่าง และถ่ายภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชเพื่อจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยา การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยสกุล *Xiphinema* (Nematoda: Longidoridae) โดยเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กระเทียม กล้วย กะหล่ำ กาแฟ ข่า ข้าวฟ่าง เงาะ แตงกวา แตงโม ถั่วพู ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ทานตะวัน ทุเรียน ผักกาด ผักสลัด ผักหวานป่า ไผ่ ฝรั่ง พริก พริกไทย มะเขือเทศ มะเขือเปราะ มะเขือยาว มะพร้าว มะม่วง มังคุด มันแกว มัน ฝรั่ง ยางพารา ยาสูบ ยูคาลิปตัส สับปะรด หญ้ามาเลเซีย หม่อน หอมแดง หอมหัวใหญ่ หัวไชเท้า ตรวจพบไส้เดือนฝอยสกุล *Xiphinema* จากตัวอย่างดินจากแปลงยูคาลิปตัส 1 ตัวอย่าง และแปลงไผ่ 1 ตัวอย่าง และเตรียมสไลด์ถาวรและถ่ายภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชเพื่อจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยา และจัดทำแผนที่แสดงพิกัดการเก็บตัวอย่างดิน และพิกัดของตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยสกุล *Xiphinema* นอกจากนี้ยังตรวจพบไส้เดือนฝอยสกุลอื่น ๆ ได้แก่ *Meloidogyne* spp. *Pratylenchus* spp. *Tylenchorhynchus* spp. *Hirschmaniella* spp. *Helicotylenchus* spp. *Rotylenchulus* spp. *Heterodera* spp. *Criconemoides* spp. และการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Scutellonema* (Nematoda: Hoplolaimidae) โดยเก็บตัวอย่างดินจากแปลงมันสำปะหลัง แปลงอ้อย และแปลงข้าวโพด ตรวจพบไส้เดือนฝอยสกุล *Scuttellonema* จากตัวอย่างดินจากแปลงอ้อย และเตรียมสไลด์ถาวรและถ่ายภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชเพื่อจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยา และจัดทำแผนที่แสดงพิกัดการเก็บตัวอย่างดิน และพิกัดของตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยสกุล *Scuttellonema* นอกจากนี้ยังตรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูพืชอื่น ๆ รวม 9 สกุล คือ *Meloidogyne* spp. *Pratylenchus* spp. *Tylenchorhynchus* spp. *Hirschmaniella* spp. *Helicotylenchus* spp. *Rotylenchulus* spp. *Hoplolaimus* spp. *Heterodera* spp. *Criconemoides* spp. จำแนกชนิดของราน้ำค้างในพืชตระกูลแตงและตระกูลกะหล่ำ โดยเก็บตัวอย่างโรคพืชที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคราน้ำค้าง ในแตงกวา บวบ

กรมวิชาการเกษตร

แตงไทย คะน้า และผักกาดขาว จากนั้นนำมาแยกเชื้อและศึกษาลักษณะทางสัณฐาน เช่น ลักษณะรูปร่าง สี และขนาดของโคนิเดียของเชื้อราน้ำค้างในห้องปฏิบัติการ และได้ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อราน้ำค้างสำหรับศึกษาทางชีวโมเลกุล จำแนกชนิดและคุณลักษณะชีวโมเลกุลของเชื้อไวรัสก่อโรคในมันเทศ โดยเก็บตัวอย่างมันเทศที่แสดงอาการของโรคไวรัสในจังหวัดสุพรรณบุรี จำนวน 4 แปลง ตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR และ PCR ในห้องปฏิบัติการ ผลปรากฏว่าพบเชื้อไวรัสที่ติดเชื้อในมันเทศ จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) และ *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) โดยพบการติดเชื้อแบบเดี่ยว (single infection) ได้แก่ เชื้อไวรัส SPFMV คิดเป็น 16.33% และติดเชื้อร่วม (mixed infection) ระหว่างเชื้อไวรัส SPFMV + SPCSV คิดเป็น 83.67% และได้กำหนดสายพันธุ์และเก็บรวบรวมเชื้อไวรัส SPFMV และ SPCSV ในต้นมันเทศในโรงเรือนกลุ่มวิจัยโรคพืช จำแนกชนิดของเชื้อ *Candidatus* Phytoplasma ในมันสำปะหลังจากพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพุ่มแจ้มันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกจำนวน 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา บุรีรัมย์ อุบลราชธานี ชัยภูมิ ขอนแก่น อุดรธานี และกาฬสินธุ์ พบการเกิดโรคพุ่มแจ้มันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง80 CMR43-08-89 ระยอง72 และเกษตรศาสตร์72 เก็บตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคพุ่มแจ้มันสำปะหลัง และเมื่อตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาพบเชื้อในตัวอย่างแต่ไม่พบเชื้อไฟโตพลาสในตัวอย่างที่เก็บจากพื้นที่จังหวัดขอนแก่น อุดรธานี และกาฬสินธุ์ ผลการวินิจฉัยชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sca*I และวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมา ตำแหน่ง 16S rRNA พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมาในมันสำปะหลังที่พบจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI และ 16SrII จากการดำเนินงาน ได้ดีเอ็นเอและต้นแบบของเชื้อ *Candidatus* Phytoplasma ในมันสำปะหลังที่บริสุทธิ์และมีคุณภาพ จากพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เพื่อใช้เปรียบเทียบในการจำแนกชนิด และใช้อ้างอิงทางอนุกรมวิธานสำหรับจัดทำฐานพันธุกรรมความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อ *Candidatus* Phytoplasma ในมันสำปะหลังในประเทศไทย จำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 1 เก็บและรวบรวมตัวอย่างเนื้อเยื่อสีน้ำตาลจากต้นกล้วยที่แสดงอาการโรคตายพรายจากแปลงปลูกกล้วย จากพื้นที่ 28 จังหวัด นำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และจำแนกชนิดเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้เชื้อรา *Fusarium* จำนวน 49 ไอโซเลท สกัดดีเอ็นเอ และ PCR ได้ลำดับนิวคลิไทด์ของยีนตำแหน่ง *tef1* เมื่อตรวจสอบชนิดของ forma specialis พบว่าได้เชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* จำนวน 40 ไอโซเลท โดยอีก 9 ไอโซเลทพบว่าอยู่ในกลุ่มของเชื้อรา *F. sonali F. incarnatum-equiseti* และ *F. fujikuroi* complex จากการดำเนินงาน ได้ดีเอ็นเอ และต้นแบบของเชื้อรา *F. oxysporum* ระดับ forma specialis *cubense* ที่บริสุทธิ์ และมีคุณภาพเพื่อใช้เปรียบเทียบในการจำแนกชนิด และใช้อ้างอิงทางอนุกรมวิธานสำหรับจัดทำฐานพันธุกรรมความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อรา *F. oxysporum* ระดับ forma specialis ในประเทศไทย จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. สาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคใบจุดจากแปลงปลูกพริกและมะเขือเทศ จากจังหวัดเชียงราย น่าน ตาก พิษณุโลก หนองคาย สกลนคร ขอนแก่น และนครราชสีมา นำมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการได้เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท เมื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคกับพริกและมะเขือเทศ พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 20 ไอโซเลท สามารถก่อโรคต่อพริกและมะเขือเทศได้ นำเชื้อแบคทีเรียมาสกัดดีเอ็นเอ จากการดำเนินงาน ได้เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ก่อโรคกับพริกและมะเขือเทศ และได้ดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละไอโซเลท ที่บริสุทธิ์และมีคุณภาพ เพื่อใช้เปรียบเทียบในการจำแนกชนิด และใช้อ้างอิงทางอนุกรมวิธานสำหรับจัดทำ

กรมวิชาการเกษตร

ฐานพันธุกรรมความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ที่ก่อโรคกับพริกและมะเขือเทศ ในประเทศไทยต่อไป

การจำแนกชนิดของวัชพืช

วัชพืช สกุล *Echinochloa* P. Beauv. เป็นไม้ล้มลุกปีเดียวหรือหลายปี จากการสำรวจพบวัชพืชสกุล *Echinochloa* P. Beauv. จำนวน 2 ชนิด และสามารถระบุชนิดได้แล้ว 1 ชนิด คือ *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv โดยสามารถเก็บเมล็ดได้ทั้ง 2 ชนิด ลักษณะที่สามารถระบุชนิดของวัชพืชดังกล่าวได้คือ ปลายกาบลางของดอกยอยลางมีรยางคแข็ง และลักษณะการไมมีลิ้นใบ วัชพืชสกุล *Fimbristylis* Vahl จากการตรวจสอบชนิดพบ จำนวน 5 ชนิด ที่สำรวจพบ โดยตรวจสอบกับเอกสาร Flora of Thailand Volume Six Part Four สามารถระบุชนิดที่พบ ได้แก่ *Fimbristylis quinquangularis* (Vahl) Kunth; *Fimbristylis dichotoma* (L.) Vahl *Fimbristylis polytrichoides* (Retz.) Vahl; *Fimbristylis gracilenta* Hance และ *Fimbristylis littoralis* Gaudich.

2) เพื่อศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยา ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่สำคัญทางการเกษตรใช้เป็นข้อมูลด้านอารักขาพืช

แมลง ไร และศัตรูธรรมชาติ

การศึกษาชีววิทยาไรแดงอัญชันมีระยะการเจริญเติบโต 5 ระยะ ได้แก่ ระยะไข่ (egg) ตัวอ่อนวัย 1 (larva) ตัวอ่อนวัย 2 (protonymph) ตัวอ่อนวัย 3 (deutonymph) และตัวเต็มวัย (adult) ไข่มีลักษณะกลม ตัวอ่อนเมื่อฟักออกจากไข่ มีขา เพียง 3 คู่ ตัวอ่อนเจริญเติบโตโดยมีการลอกคราบ 3 ครั้ง ก่อนการลอกคราบแต่ละครั้งตัวอ่อนจะหยุดกินอาหาร ไม่เคลื่อนไหว หลังการลอกคราบครั้งที่ 1 ตัวอ่อนมีขาเพิ่มขึ้นเป็น 4 คู่ ไรแดงอัญชันเพศผู้ที่เลี้ยงบนใบถั่วเหลือง เพศผู้ใช้เวลาในการเจริญเติบโตจากไข่จนเป็น ตัวเต็มวัยเฉลี่ยนาน 10.14 ± 0.85 วัน เพศเมียใช้เวลาในการเจริญเติบโตจากไข่จนเป็น ตัวเต็มวัยเฉลี่ยนาน 10.00 ± 0.68 วัน หากเลี้ยงบนใบถั่วพู ใช้เวลาในการเจริญเติบโตจากไข่จนเป็น ตัวเต็มวัยเฉลี่ยนาน 11.00 ± 0.85 วัน เพศเมียใช้เวลาในการเจริญเติบโตจากไข่จนเป็น ตัวเต็มวัยเฉลี่ยนาน 11.00 ± 0.35 วัน และเมื่อเลี้ยงบนใบอัญชัน ใช้เวลาในการเจริญเติบโตจากไข่จนเป็น ตัวเต็มวัยเฉลี่ยนาน 11.03 ± 0.79 วัน เพศเมียใช้เวลาในการเจริญเติบโตจากไข่จนเป็น ตัวเต็มวัยเฉลี่ยนาน 10.54 ± 0.75 วัน การศึกษาตารางชีวิต (life table) ของไรแดงอัญชันเมื่อเลี้ยงด้วยพืชอาศัย ได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วพู และอัญชัน พบว่าไรแดงอัญชันที่เลี้ยงบนใบถั่วเหลือง มีอัตราการขยายพันธ์สุทธิ์ (R_0) มีค่า 49.35 ชั่วอายุไขของกลุ่ม (T_C) มีค่า 19.72 วัน ความสามารถในการขยายพันธุ์ทางกรรมพันธุ์ (r_C) มีค่า 0.20 และอัตราการเพิ่มที่แท้จริง (λ) มีค่า 1.22 ตัวต่อวัน ตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถวางไข่เฉลี่ยวันละ 3.91 ± 1.16 ฟอง สามารถวางไข่ได้ตลอดอายุขัยเฉลี่ย 75.92 ± 23.40 ฟอง และไข่ที่วางทั้งหมดของตัวเมียแต่ละตัวมีสัดส่วนของลูกที่ฟักเป็นเพศเมียเท่ากับ 0.57 ไรแดงอัญชัน เลี้ยงบนใบถั่วพู มีอัตราการขยายพันธ์สุทธิ์ (R_0) มีค่า 148.30 ชั่วอายุไขของกลุ่ม (T_C) มีค่า 21.2 วัน ความสามารถในการขยายพันธุ์ทางกรรมพันธุ์ (r_C) มีค่า 0.24 และอัตราการเพิ่มที่แท้จริง (λ) มีค่า 1.27 ตัวต่อวัน ตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถวางไข่เฉลี่ยวันละ 8.46±1.92 ฟอง สามารถวางไข่ได้ตลอดอายุขัยเฉลี่ย 174.47±52.29 ฟอง และไข่ที่วางทั้งหมดของตัวเมียแต่ละตัวมีสัดส่วนของลูกที่ฟักเป็นเพศเมียเท่ากับ 0.65 ไรแดงอัญชัน ที่เลี้ยงบนใบอัญชัน มีอัตราการขยายพันธ์สุทธิ์ (R_0) มีค่า 78.15 ชั่วอายุไขของกลุ่ม (T_C)

กรมวิชาการเกษตร

มีค่า 20.85 วัน ความสามารถในการขยายพันธุ์ทางกรรมพันธุ์ (r_c) มีค่า 0.21 และอัตราการเพิ่มที่แท้จริง (λ) มีค่า 1.23 ตัวต่อวัน ตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถวางไข่เฉลี่ยวันละ 6.04 ± 1.19 ฟอง สามารถวางไข่ได้ตลอดอายุขัยเฉลี่ย 120.23 ± 35.85 ฟอง และไข่ที่วางทั้งหมดของตัวเมียแต่ละตัวมีสัดส่วนของลูกที่ฟักเป็นเพศเมียเท่ากับ 0.63 การศึกษาแมลงช้างปีกแป้งชนิด *Semidalis aleyrodiformis* ทั้งตัวเต็มวัย หนอน และดักแด้ จำนวน 50 ตัวอย่าง จากเขตจตุจักร กรุงเทพมหานครฯ บนต้นขี้เหล็กเทศ ไทรใบเล็ก มะยม น้อยหน่า และการเวก และดำเนินการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ แต่ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ครบวงจรชีวิต การเก็บรวบรวมตัวอย่างมวนตัวห้ำ *Nesidiocoris tenuis* ทราบข้อมูลเขตการแพร่กระจายและพืชอาหารโดยพบตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของมวนตัวห้ำดูดกินหนอนชอนใบ แมลงหวี่ขาว และเพลี้ยอ่อน ที่พบทำลายต้นมะเขือเทศและยาสูบ และยังเป็นมวนศัตรูพืชดูดกินน้ำเลี้ยงต้นมะเขือเทศและยาสูบได้อีกด้วย

การศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยาและการแพร่กระจายของวัชพืช

วัชพืชสกุล *Echinochloa* P.Beauv. สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ด โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในภาคเหนือ จำนวน 15 แหล่ง 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ และน่าน พื้นที่ภาคกลาง 18 แหล่ง จำนวน 8 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดปทุมธานี ปราจีนบุรี พิษณุโลก ลพบุรี สระบุรี สุโขทัย สุพรรณบุรี และพระนครศรีอยุธยา พื้นที่ภาคตะวันออก 7 แหล่ง จำนวน 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา และนครนายก และพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 4 แหล่ง จำนวน 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาฬสินธุ์ มหาสารคาม และร้อยเอ็ด ภาคตะวันตก 22 แหล่ง จำนวน 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ รวมแหล่งสำรวจทั้งสิ้น 66 แหล่ง ได้ตัวอย่างต้นและเมล็ดวัชพืชสกุล *Echinochloa* P. Beauv. ทั้งหมด 66 ตัวอย่าง และเก็บรักษาเมล็ด ไว้ในตู้แช่เมล็ดอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส สำหรับการจัดทำตัวอย่างแห้ง วัชพืชสกุล *Fimbristylis* Vahl สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ด โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในภาคเหนือ จำนวน 23 แหล่ง 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ แพร่ พะเยา ลำปาง อุตรดิตถ์ และลำพูน และภาคกลาง จำนวน 22 แหล่ง 13 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกำแพงเพชร ชัยนาท นครสวรรค์ นนทบุรี พระนครศรีอยุธยา พิจิตร พิษณุโลก ลพบุรี สิงห์บุรี สุโขทัย สุพรรณบุรี นครปฐม และอ่างทอง รวม 45 แหล่ง โดยพบการแพร่กระจายทั้งในพื้นที่การเกษตร เช่น นาข้าว พืชผัก และไม้ผล และพื้นที่สิ่งแวดล้อมข้างเคียง เช่นบริเวณข้างพ้นที่เกษตร ข้างถนน ซึ่งทุกพื้นที่ล้วนเป็นพื้นที่ชุ่มน้ำ มีน้ำขัง และไม่มีน้ำขัง สำหรับการศึกษานิเวศวิทยาในด้านการแพร่กระจาย ลักษณะเมล็ด และการงอกของเมล็ดหรือหัว ของผักกระฉูด (*Neptunia plena* (L.) Benth) การสำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดผักกระฉูดโดยใช้วิธีแบบการสืบพบในพื้นที่ชุ่มน้ำทางการเกษตร และนิเวศเกษตร ในภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันตก จำนวน 134 แหล่ง พบผักกระฉูด 80 แหล่ง ใน 18 จังหวัด ได้แก่ พะเยา แพร่ อุตรดิตถ์ กำแพงเพชร ชัยนาท นครปฐม นครสวรรค์ นนทบุรี พระนครศรีอยุธยา พิจิตร พิษณุโลก ลพบุรี สิงห์บุรี สุพรรณบุรี กาญจนบุรี ตาก ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ลักษณะเมล็ดผักกระฉูดเป็นรูปไข่แบน ผิวเมล็ดเรียบมัน สีน้ำตาล บริเวณกลางเมล็ดมีเส้นสีดำลักษณะตัวยู เมล็ดกว้าง 0.26 - 0.43 เซนติเมตร ยาว 0.40 - 0.46 เซนติเมตร 100 เมล็ด หนัก 4.0641 กรัม เมล็ดผักกระฉูดงอกในห้องปฏิบัติการ 17.20 เปอร์เซ็นต์ และในสภาพเรือนทดลอง 53.20 เปอร์เซ็นต์ จากการสำรวจพบว่าผักกระฉูดผลิตเมล็ดได้เป็นจำนวนมาก แต่การทดสอบความงอกในห้องปฏิบัติการ และเรือนทดลองเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำ และทยอยงอก สาเหตุอาจมาจากสภาพแวดล้อมที่ยังไม่เหมาะสมต่อการงอกของ

กรมวิชาการเกษตร

เมล็ด ดังนั้นหากสามารถหาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดได้ จะสามารถกระตุ้นให้เมล็ดงอกพร้อมๆ กัน และวางแผนจัดการได้ง่ายขึ้น และเนื่องจากต้นมีเนื้อไม้ ดังนั้นนอกจากกำจัดต้นอ่อนที่งอกแล้ว ยังจำเป็นต้องหาวิธีกำจัดในระยะที่เป็นต้นโตด้วย และต้องหาวิธีการที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถกำจัดผักกระฉูดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โทงเทงประดับ (*Nicandra physalodes* (L.) Gaertn) ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดโทงเทงประดับโดยใช้วิธีแบบการสืบในพื้นที่เกษตรภาคเหนือ จำนวน 55 แหล่ง 9 จังหวัด พบโทงเทงประดับ 3 แหล่ง ในจังหวัดเชียงใหม่ โดยพบเป็นวัชพืชในแปลงมันฝรั่ง สตรอเบอรี่ กะหล่ำปลี ผักชี และมะเขือเทศ เมล็ดโทงเทงประดับมีลักษณะกลม แบน ผิวเมล็ดมีลายลักษณะรูปเหลี่ยมต่อกัน เมล็ดสีน้ำตาลแดง กว้าง 0.10 - 0.16 เซนติเมตร ยาว 0.10-0.18 เซนติเมตร 100 เมล็ด หนัก 0.203 กรัม และศึกษาการงอกของเมล็ดโทงเทงประดับในห้องปฏิบัติการและสภาพเรือนทดลอง บันทึกการงอกเป็นระยะเวลา 3 เดือน ยังไม่พบการงอกทั้งในห้องปฏิบัติการ และในสภาพเรือนทดลอง และได้ใช้หลายวิธีในการทำลายการพักตัวของเมล็ด แต่ยังไม่ประสพผลสำเร็จ อย่างไรก็ตามบริเวณที่พบการระบาดของโทงเทงประดับ พบมีต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดขึ้นหนาแน่น ดังนั้นการที่เมล็ดไม่งอกน่าจะมาจากสภาพแวดล้อมที่ยังไม่เหมาะสมต่อการงอก ซึ่งจำเป็นที่จะต้องศึกษาต่อไป เพื่อจะได้หาวิธีที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการป้องกันและกำจัดโทงเทงประดับต่อไปในอนาคต วัชพืช *Oxalis debilis* Kunth สำรวจและเก็บตัวอย่างต้น และหัว *O. debilis* โดยใช้วิธีแบบการแบบสืบพบในพื้นที่เกษตรที่สูงในภาคเหนือ จำนวน 54 แหล่ง 9 จังหวัด พบ *O. debilis* 3 แหล่ง ใน 2 จังหวัด คือ จังหวัดเชียงราย และเชียงใหม่ พบ *O. debilis* ขึ้นเป็นวัชพืชในแปลงสตรอเบอรี่ มันฝรั่ง กะหล่ำปลี และแปลงสวนย่อม และการศึกษาการงอกของหัวในสภาพเรือนทดลอง หัวที่มีขนาดใหญ่และมีน้ำหนักมากมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงกว่าหัวที่มีขนาดเล็ก โดยมีการงอก 91.50, 91.00, 82.50 และ 68.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าหัวทุกขนาดสามารถงอกเจริญเป็นต้นใหม่ได้ ไม่สามารถใช้วิธีคราดเก็บออกจากพื้นที่ได้ เนื่องจากหัวมีขนาดเล็ก และไหลเปราะหักง่าย ดังนั้นจึงต้องหาวิธีกระตุ้นให้หัวงอกพร้อมๆ กัน และใช้หลายวิธีร่วมกันในการกำ จัดเพื่อให้สามารถกำจัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ จ้อล่อ (*Conyza sumatrensis* (S.F.Blake) Pruski & G.Sancho) จากการสำรวจวัชพืช *Conyza sumatrensis* ในพื้นที่ทำการเกษตร พื้นที่ที่ไม่ได้ทำการเกษตร และเขตป่าใกล้เคียงใน 3 ภาค คือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ พบพืชเป้าหมาย 14 จังหวัด จังหวัดเชียงราย จังหวัดพะเยา จังหวัดแพร่ จังหวัดลำปาง จังหวัดลำพูน จังหวัดอุทัยธานี จังหวัดอุตรดิตถ์ จังหวัดกาญจนบุรี จังหวัดนครนายก จังหวัดสุพรรณบุรี จังหวัดชุมพร จังหวัดนครศรีธรรมราช จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดสุราษฎร์ธานี จากพื้นที่ ที่สำรวจพบว่าวัชพืช *C. sumantrensis* มีแพร่กระจายในทุกสภาพพื้นที่ พื้นที่ไม่ได้ทำการเกษตร เช่น บริเวณข้างริมร่องน้ำ ริมข้างทาง บริเวณรอบที่อยู่อาศัย แปลงปลูกพืชที่ทิ้งร้าง คันนาข้าว และบางพื้นที่เลี้ยงสัตว์ ส่วนพื้นที่ทำการเกษตร เช่น แปลงปลูกพืชสวน แปลงปลูกพืชไร่ แปลงผัก สวนผลไม้ พื้นที่ข้างสวนยางพารา สวนปาล์มน้ำมัน สวนมันสำปะหลัง เนื่องจากมีลักษณะเมล็ดเป็นตัวช่วยในการแพร่กระจายพันธุ์ได้ดี เมล็ดมีขนาดเบา และขนที่ปลายเมล็ดช่วยในการพยุงตัวไปกับกระแสลม ชอบสภาพดินที่มีความชื้นแต่ไม่ขึ้นพื้นที่น้ำท่วมขัง เช่น นาข้าว ในส่วนการงอกในห้องปฏิบัติการงอก 91.00 เปอร์เซ็นต์ และในสภาพเรือนทดลองงอก 82.00 เปอร์เซ็นต์ จากการสำรวจพบว่าจ้อล่อสามารถเจริญเติบโตได้ดีในหลายพืชปลูก เมล็ดมีการงอกดี อีกทั้งเมล็ดมีขนาดเล็กและมีรยางค์จึงเป็นปัจจัยที่ทำให้แพร่กระจายได้ดี ดังนั้นการกำจัดจ้อล่อจึงต้องกำจัดก่อนออกดอก และต้องเลือกใช้วิธีที่

กรมวิชาการเกษตร

เหมาะสมในการกำจัดจ้อล่อในแต่ละพืชปลูก เพื่อให้สามารถกำจัดจ้อล่อได้อย่างมีประสิทธิภาพและไม่กระทบต่อพืชปลูก ซึ่งจะได้ศึกษาต่อไปในอนาคต

3) เก็บรวบรวมหลักฐานอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์ (Voucher specimens) สำหรับศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่สำคัญทางการเกษตรของประเทศไทย

- เก็บรวมรวมตัวอย่างในรูปแบบของตัวอย่างแห้งและสไลด์ถาวรในพิพิธภัณฑ์แมลง แหล่งรวบรวมตัวอย่างด้านสัตววิทยา กลุ่มกีฏและสัตววิทยา พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช แหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืช แหล่งรวบรวมตัวอย่างวัชพืช กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จำนวน 1,384 ตัวอย่าง

- ตัวอย่างที่รวบรวมเพื่อทำการฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืช ได้จำนวน 10 ไอโซเลท เก็บรวบรวมเชื้อไวรัส SPFMV และ SPCSV ในต้นมันเทศในโรงเรือนกลุ่มวิจัยโรคพืช

- ดีเอ็นเอของจักจั่นศัตรูอ้อย เพลี้ยหอยเกล็ดสกุล *Pinnaspis* ทากเล็บมือนาง เพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus* ไบโอไทป์ของแมลงหวี่ขาวยาสูบ แมลงวันหนอนชอนใบ รวมทั้งดีเอ็นเอและต้นแบบ ของเชื้อ *Candidatus* Phytoplasma of cassava เชื้อรา *Fusarium oxysporum* ระดับ forma specialis เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp.

กรมวิชาการเกษตร

3.2 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง (Output)

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
2. ต้นฉบับบทความวิจัย (Manuscript) 2.3 บทความในประเทศ	19	เรื่อง	บทความในประเทศ	19	เรื่อง	บทความในประเทศที่เผยแพร่ในรูปแบบออนไลน์ผ่าน www.https://www.doa.go.th/plprotect/?page_id=9179 จำนวน 19 เรื่อง รายละเอียดดังนี้ 1. ชนิด ลักษณะสัณฐานวิทยาตัวอย่างแมลงและสัตว์ศัตรูพืชสำหรับใช้จำแนกเปรียบเทียบชนิดด้วงที่พบในธัญพืช 5 ชนิด 2. ชนิด ลักษณะสัณฐานวิทยาตัวอย่างแมลงและสัตว์ศัตรูพืชสำหรับใช้จำแนกเปรียบเทียบชนิดทากศัตรูพืช 1 ชนิด 3. ชนิด ลักษณะสัณฐานวิทยาตัวอย่างแมลงและสัตว์ศัตรูพืชสำหรับใช้จำแนกเปรียบเทียบชนิดเพลี้ยไฟในไม้ดอก 3 ชนิด 4. ชนิด ลักษณะสัณฐานวิทยาตัวอย่างแมลงและสัตว์ศัตรูพืชสำหรับใช้จำแนกเปรียบเทียบชนิดผีเสื้อหนอนกระทู้สกุล *Spodoptera* 2 ชนิด 5. ชีววิทยาของไรแดงอัญชันที่ศึกษาการเจริญเติบโตกับพืชเศรษฐกิจ 3 ชนิด 6. ชีววิทยาของเบื้องต้นของแมลงช้างปีกแป้ง 7. ชีววิทยาเบื้องต้นของชนิดมวนตัวห้ำสกุล *Nesidiocoris* และพืชอาหารของศัตรูพืชที่ใช้เป็นเหยื่อของมวนตัวห้ำสกุล *Nesidiocoris* 8. ชนิดของจักจั่นอ้อยจากการจำแนกด้วยสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลอย่างน้อย 1 ชนิด	ได้ต้นฉบับบทความในประเทศ จำนวน 19 เรื่อง เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบการจำแนกชนิด ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและอ้างอิงทางอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติในประเทศไทย และได้รายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย พร้อมตัวอย่างที่ใช้ทำการศึกษาจะถูกจัดเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และแหล่งอ้างอิง โดยเฉพาะข้อมูลด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา ยังสามารถนำไปใช้จัดทำฐานข้อมูลการระบาดวิทยาและใช้ในการบริหารจัดการศัตรูพืชในอนาคต นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาศักยภาพของศัตรูธรรมชาติต่อไปได้

กรมวิชาการเกษตร

						จากพื้นที่ภาคกลางและภาคเหนือ 9. ชนิดของเพลี้ยหอยเกล็ดสกุล *Pinnaspis* จากการจำแนกด้วยสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลอย่างน้อย 2 ชนิด จากพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 10. ชนิดของทากเล็บมือนางสกุล *Parmarion* จากการจำแนกด้วยสัณฐานวิทยอย่างน้อย 1 ชนิดจากพื้นที่ภาคกลางและภาคตะวันตก 11. ชนิดของเพลี้ยแป้งจากการจำแนกด้วยชีวโมเลกุลอย่างน้อย 3 ชนิดจากพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 12. biotype ของแมลงหวี่ขาวยาสูบจากการจำแนกด้วยชีวโมเลกุล อย่างน้อย 2 biotype จากพื้นที่จังหวัดบึงกาฬและนครพนม 13. ชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบ จากการจำแนกด้วยชีวโมเลกุล อย่างน้อย 5 ชนิด 14. ชนิดและการแพร่กระจายของวัชพืชสกุล *Echinochloa* P.Beauv อย่างน้อย 1 ชนิด ในพื้นที่ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันตก 15. ชนิดและการแพร่กระจายของวัชพืชสกุล *Fimbristylis* Vahl อย่างน้อย 5 ชนิด ในพื้นที่ภาคเหนือ และภาคกลาง 16. ข้อมูลนิเวศวิทยาและข้อมูลชีววิทยาของผักกระฉูดในพื้นที่ชุ่มน้ำทางการเกษตร	

กรมวิชาการเกษตร

						17. ข้อมูลนิเวศวิทยาและข้อมูลชีววิทยาของโทงเทงประดับในพื้นที่เกษตรภาคเหนือ 18. ข้อมูลนิเวศวิทยาและข้อมูลชีววิทยา ของ *O. debilis* ในพื้นที่เกษตรภาคเหนือ 19.ข้อมูลนิเวศวิทยาและนิเวศวิทยาของจ้อล่อ ในพื้นที่เกษตร	
1. เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ	8	กระบวนการ	เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ	8	กระบวนการ	1. สไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* จากการจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 2. สไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอยสกุล *Xiphinema* จากการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา 3. สไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอยสกุล *Scutellonema* จากการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา 4. หลักฐานอ้างอิงรูปแบบตัวอย่างแห้ง ลักษณะสัณฐานและดีเอ็นเอต้นแบบเชื้อราน้ำค้างสกุล *Pseudoperonospora* และ *Peronospora* ในพืชตระกูลแตงและตระกูลกะหล่ำ 5. สารพันธุกรรมต้นแบบเชื้อไวรัสในมันเทศและสายพันธุ์เชื้อไวรัสที่ติดเชื้อในมันเทศจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) และ *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) 6. ดีเอ็นเอ และต้นแบบของเชื้อ *Candidatus* Phytoplasma of	1. ได้วิธีการเตรียมสไลด์ถาวรสำหรับศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสาเหตุโรคพืช 2. ได้วิธีการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อราน้ำค้างสกุล *Pseudoperonospora* และ *Peronospora* ในพืชตระกูลแตงและตระกูลกะหล่ำ และสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส SPFMV และ SPCSV ในมันเทศที่มีประสิทธิภาพที่บริสุทธิ์และมีคุณภาพ เพื่อใช้เปรียบเทียบในการจำแนกชนิด และใช้อ้างอิงทางอนุกรมวิธาน สำหรับจัดทำฐานพันธุกรรมความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

						cassava จากพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 7. ดีเอ็นเอ และต้นแบบของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ระดับ forma specialis 8. ดีเอ็นเอ และต้นแบบของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ที่ก่อโรคกับพริกและมะเขือเทศ	3. ได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพ ดีเอ็นเอและต้นแบบที่บริสุทธิ์และมีคุณภาพ เพื่อใช้เปรียบเทียบในการจำแนกชนิด และใช้อ้างอิงทางอนุกรมวิธาน สำหรับจัดทำฐานพันธุกรรมความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในประเทศไทย

*** ใส่ผลผลิตที่ได้ตามคำรับรอง**

**** หลักฐานเชิงประจักษ์ของผลผลิตให้แสดงรายละเอียดในภาคผนวก และแนบไฟล์ เรียงตามลำดับผลผลิต**

กรมวิชาการเกษตร

3.3 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง (Outcome) (ถ้ามี)

ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลลัพธ์
นำเสนอผลงานภาคบรรยาย การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 15 (The 15th National Plant Protection Conference) วันที่ 22-24 พฤศจิกายน 2565 เรื่อง ความหลากหลายของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 1 สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยในประเทศไทย	2565
นำเสนอผลงานโปสเตอร์ การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 15 (The 15th National Plant Protection Conference) วันที่ 22-24 พฤศจิกายน 2565 เรื่อง เชื้อไฟโตพลาสมาก่อโรคพุ่มแจ้มันสำปะหลังในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้	2565

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

3.4 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง (Impact) (ถ้ามี)

ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลกระทบ
ด้านเศรษฐกิจ :	
ด้านสังคม :	
ด้านสิ่งแวดล้อม :	

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

3.5 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

วิธีการ/กระบวนการผลักดันงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ด้านวิชาการ นักวิชาการ และผู้ที่มีความสนใจ ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งต่อเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช นักวิชาการ นักวิจัยจากหน่วยงานภาครัฐและหน่วยงานเอกชนต่าง ๆ เช่น กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร มหาวิทยาลัย องค์กรการศึกษา ต่าง ๆ ได้รับความรู้จากผลงานวิจัย ทำให้สามารถจำแนกชนิด ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันของศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางการเกษตรได้แนวทางวินิจฉัย (dichotomous key) ทำให้การจัดจำแนกศัตรูพืชเข้าถึงได้ง่าย มีประสิทธิภาพ และสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีความสำคัญยิ่งสำหรับพัฒนาวิธีการการตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชที่มีความจำเพาะต่อไป

ซึ่งมีการเผยแพร่ความรู้จากผลงานวิจัย ดังนี้

1. การนำเสนอบทความวิจัย ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 15 ระหว่างวันที่ 22 – 24 เดือนพฤจิกายน 2565 จำนวน 2 เรื่อง ได้แก่

- ภาคบรรยาย จำนวน 1 เรื่อง ได้แก่ เรื่อง ความหลากหลายของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 1 complex สาเหตุโรคตายพรายกล้วย

- ภาคแผ่นภาพจำนวน 1 เรื่อง ได้แก่ เรื่อง เชื้อไฟโตพลาสมาก่อโรคพุ่มแจ้มันสำปะหลังในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

2. ต้นฉบับบทความวิจัย (Manuscript) 2.3 บทความในประเทศ ที่เผยแพร่ใน https://www.doa.go.th/plprotect/?page_id=9179 จำนวน 19 เรื่อง ได้แก่
บทความในประเทศที่เผยแพร่ในรูปแบบออนไลน์ผ่าน
www. https://www.doa.go.th/plprotect/?page_id=9179 จำนวน 19 เรื่อง รายละเอียดดังนี้

เรื่องที่ 1 อนุกรมวิธานด้วงที่พบในธัญพืชนำเข้าส่งออก

เรื่องที่ 2 อนุกรมวิธานและการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของทากศัตรูพืช

เรื่องที่ 3 อนุกรมวิธานเพลี้ยไฟที่พบในไม้ดอก

เรื่องที่ 4 อนุกรมวิธานของผีเสื้อหนอนกระทู้ สกุล *Spodoptera* Guenée, 1852 (Lepidoptera: Noctuidae)

เรื่องที่ 5 การศึกษาชีววิทยาไรแดงอัญชัน *Tetranychus piercei* McGrego

เรื่องที่ 6 ชีววิทยาและศักยภาพการกินเหยื่อของแมลงช้างสีน้ำตาล ชนิด *Micromus timidus* Hagen, 1853 (Neuroptera: Hemerobiidae) และแมลงช้างปีกแป้ง ชนิด *Semidalis aleyrodiformis* (Stephens, 1836) (Neuroptera: Coniopterygidae)

เรื่องที่ 7 การจำแนกชนิดและชีววิทยามวนตัวห้ำสกุล *Nesidiocoris* (Hemiptera: Miridae)

เรื่องที่ 8 การจำแนกชนิดและเขตการแพร่กระจายจักจั่นศัตรูอ้อย (Hemiptera: Cicadidae) ในประเทศไทย

เรื่องที่ 9 การจำแนกชนิดของเพลี้ยหอยเกล็ดสกุล *Pinnaspis* Cockerell, 1892 (Hemiptera: Diaspididae) ด้วย

กรมวิชาการเกษตร

สัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุล

เรื่องที่ 10 การจำแนกชนิดของทากเล็บมือนางสกุล *Parmarion* ในประเทศไทยด้วยสัณฐานวิทยาและ เทคนิคทางชีวโมเลกุล

เรื่องที่ 11 การจำแนกชนิดและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเพลี้ยแป้ง cryptic species สกุล *Planococcus* Ferris 1950 ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

เรื่องที่ 12 การจำแนกไบโอไทป์ของแมลงหวี่ขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* ในแหล่งปลูกพริกอินทรีย์และ แหล่งปลูกพริกใช้สารเคมี ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล

เรื่องที่ 13 การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันหนอนชอนใบในพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ของประเทศไทย

เรื่องที่ 14 ชนิดและสัณฐานวิทยาของวัชพืชสกุล *Echinochloa* P. Beauv.

เรื่องที่ 15 ชนิดและสัณฐานวิทยาของวัชพืชสกุล *Fimbristylis* Vahl

เรื่องที่ 16 ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของผักกระฉูด (*Neptunia plena* (L.) Benth) วัชพืชแพร่ระบาดในพื้นที่ชุ่มน้ำทางการเกษตร

เรื่องที่ 17 ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของโทงเทงประดับ (*Nicandra physalodes* (L.)Gaertn) วัชพืชแพร่ระบาดในพื้นที่เกษตรภาคเหนือ

เรื่องที่ 18 ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของ *Oxalis debilis* Kunth วัชพืชแพร่ระบาดในพื้นที่เกษตรภาคเหนือ

เรื่องที่ 19 ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของจ้อล่อ (*Conyza sumatrensis* (S.F.Blake) Pruski & G.Sancho) วัชพืชสำคัญในพื้นที่เกษตร

3. ได้ตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อเป็นแหล่งอ้างอิงที่สำคัญของประเทศเก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง พิพิธภัณฑ์โรคพืช และพิพิธภัณฑ์วัชพืชของกรมวิชาการเกษตร และได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ของศัตรูพืชเก็บไว้ในฐานข้อมูล Genbank เพื่อใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์ ที่มีความน่าเชื่อถือของประเทศไทยและสากล

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล

สรุปผลและอภิปรายผล

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 อนุกรมวิธาน ชีววิทยาแมลง ไร สัตว์ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

สรุปผล การศึกษาอนุกรมวิธานและชีววิทยาของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติที่มีความสำคัญเพื่อได้หลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับอ้างอิงข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทย โดยการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างด้วงที่พบในธัญพืช ทากศัตรูพืช เพลี้ยไฟในไม้ดอก และหนอนกระทู้สกุล *Spodoptera* ไรแดงอัญชัน แมลงช้างสีน้ำตาล แมลงช้างปีกแป้ง และมวนตัวห้ำสกุล *Nesidiocoris* ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2564 ถึงเดือนกันยายน 2565 บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น รูปร่าง ลักษณะ ขนาด สี พืชอาศัย วันเดือนปี ชื่อผู้เก็บ สภาพแวดล้อมอุณหภูมิและพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) จากนั้นนำตัวอย่างแมลงและสัตว์ศัตรูพืชที่รวบรวมได้มาดำเนินการจัดรูปร่างและศึกษาชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อทราบลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อจัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิด ชีววิทยา วงจรชีวิต พืชอาศัย สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างด้วงในธัญพืชได้ 110 ตัวอย่างจากด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ และโรงงานแปรรูปธัญพืชในกรุงเทพมหานคร จำแนกชนิดได้ 6 ชนิด ได้ตัวอย่างทากรวม 218 ตัวอย่างจากแหล่งปลูกพืชเศรษฐกิจและพื้นที่ป่าจำแนกชนิดที่เป็นศัตรูพืชได้ 2 ชนิด สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟได้ 140 ตัวอย่าง จากแหล่งปลูกไม้ดอกในจังหวัดชัยภูมิ นครราชสีมา ตาก เชียงใหม่ และเชียงราย จำแนกชนิดเพลี้ยไฟได้ 5 ชนิด เก็บรวบรวมตัวอย่างผีเสื้อหนอนกระทู้สกุล *Spodoptera* จากแปลงปลูกพืชได้ 200 ตัวอย่าง จำแนกชนิดได้ 2 ชนิด ได้ชีววิทยาของไรแดงอัญชันที่เลี้ยงบนถั่วเหลือง ถั่วพู และอัญชัน เก็บตัวอย่างแมลงช้างปีกแป้ง *Semidalis aleyrodiformis* ในกรุงเทพมหานครฯ สามารถเก็บได้ 50 ตัวอย่าง ทราบข้อมูลเขตการแพร่กระจายและพืชอาหาร เก็บรวบรวมตัวอย่างมวนตัวห้ำ *Nesidiocoris* tenuis ได้ 150 ตัวอย่าง ทราบข้อมูลเขตการแพร่กระจายและพืชอาหาร จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดด้วงที่พบในธัญพืช เพลี้ยไฟในไม้ดอก และลักษณะสำคัญของทากศัตรูพืชและหนอนกระทู้สกุล *Spodoptera* เพื่อใช้เป็นแนวทางการวินิจฉัยชนิด และชีววิทยาของศัตรูพืชที่สำรวจ เพื่อพบใช้เป็นข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืชของประเทศไทยและใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนงานด้านกักกันพืชและการเจรจาทางการค้าระหว่างประเทศ และใช้สำหรับเป็นข้อมูลในการวางแผนป้องกันกำจัดไรศัตรูพืชแก่นักวิชาการและเกษตรกร รวมถึงประสิทธิภาพของแมลงศัตรูธรรมชาติที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดแมลงได้ในอนาคต

อภิปรายผล การศึกษางานด้านอนุกรมวิธานแมลงทำให้ได้ชนิดศัตรูพืชที่เป็นปัจจุบัน (Validation) ซึ่งเป็นข้อมูลที่พร้อมใช้แก้ปัญหาการพบศัตรูพืชได้อย่างทันท่วงที ในทำนองเดียวกันการศึกษาชีววิทยาของแมลงศัตรูพืชและแมลงศัตรูธรรมชาติจะทำให้ทราบถึงวงจรชีวิต และอุปนิสัย ตลอดจนอัตราการขยายพันธุ์ของแมลงศัตรูพืชและประสิทธิภาพการกินเหยื่อของแมลงศัตรูธรรมชาติ เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์แมลงศัตรูธรรมชาติเพื่อการผลิตพืชอย่างมีสุขอนามัยและปลอดภัยต่อผู้บริโภค ทั้งนี้งานวิจัยที่ดำเนินการศึกษาทำให้ได้ข้อมูลชนิดศัตรูพืชที่มีรายละเอียดระดับชนิดที่เป็นปัจจุบัน ได้ความแตกต่างในการวินิจฉัยชนิดกับชนิดศัตรูพืชที่มักเกิดความสับสนในการจำแนกชนิด แนวทางการวินิจฉัยชนิด ศัตรูพืชที่ไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ชีววิทยาของไรศัตรูพืชที่สำคัญ และประสิทธิภาพของแมลงศัตรูธรรมชาติที่มีแนวโน้มในการใช้เป็นตัวเลือกในการป้องกันกำจัด

กรมวิชาการเกษตร

แมลงได้ในอนาคต ในลำดับสุดท้ายได้ข้อมูลครบทุกมิติทั้งด้านอนุกรมวิธาน ชีววิทยาของศัตรูพืช แมลงศัตรูธรรมชาติ สำหรับเป็นองค์ความรู้เพื่อเผยแพร่แก่เจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช เจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานด้านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช นักวิชาการเกษตรของกรมวิชาการเกษตรและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในลำดับต่อไป

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 การจำแนกชนิดแมลง สัตว์ศัตรูพืชที่สำคัญด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

สรุปผล การเก็บรวบรวมตัวอย่างเพื่อศึกษาอนุกรมวิธานเขตการแพร่กระจายของจักจั่นศัตรูอ้อยในแหล่งปลูกอ้อยที่สำคัญในจังหวัดสุพรรณบุรี กาญจนบุรี ชัยนาท นครปฐม ราชบุรี สิงห์บุรี อ่างทอง สระบุรี และลพบุรี สามารถจัดจำแนกได้ 1 ชนิด จากจำนวนตัวอย่าง 50 ตัวอย่าง ได้แก่ จักจั่น *Platypleura cespiticola* Boulard การเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดจากแหล่งปลูกพืชที่สำคัญในเขตพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 60 ตัวอย่าง สามารถจำแนกชนิดของแพลี้ยหอยเกล็ดสกุล *Pinnaspis* ได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลด้วยใช้ไพรเมอร์ C1J2195/TL2N3014 จากยีน *cox1* ได้จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ 1. *Pinnaspis aspidiatrae* (Signoret, 1869) และ 2. *Pinnaspis strachani* (Cooley, 1899) ในขณะที่การเก็บตัวอย่างทากเล็บมือนางจากจังหวัดต่าง ๆ ในภูมิภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ ตะวันออก ตะวันตก และภาคกลาง ทั้งหมด 95 ตัวอย่าง ทำการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งยีน Cytochrome oxidase subunit I หรือ COI ได้สำเร็จทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง หาค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (Pairwise distances) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 20 ลำดับ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของทากเล็บมือนางมาร์เทนส์จากฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.00000 ถึง 0.04228 และมีค่าเฉลี่ยหรือค่า Overall mean distance เท่ากับ 0.01874 จากการสร้างไฟโลเจเนติกทรีด้วยวิธีการ Maximum likelihood และวิธีการ Bayesian inference พบว่าเกิดการจับกลุ่มของตัวอย่างทากเล็บมือนางออกเป็นสองกลุ่ม ประกอบไปด้วยเคลด A ซึ่งมีสมาชิกทั้งหมด 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเคลด B ทั้งหมด 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของทากเล็บมือนางมาร์เทนส์จาก GenBank ได้ปรากฏขึ้นมาในเคลด B ทำให้มีสมาชิกภายในเคลดรวมเป็น 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้มีทากเล็บมือนางอย่างน้อย 2 ตัวอย่างที่น่าจะเป็นทากเล็บมือนางมาร์เทนส์ ได้แก่ ตัวอย่างจากจังหวัดเลย (NNLO12) และตัวอย่างจากนครนายก (KDNN01) เนื่องจากมีค่า Pairwise distance ของยีน COI เปรียบเทียบกับทากเล็บมือนางมาร์เทนส์ เท่ากับ 0.00000 เมื่อพิจารณาความยาวกิ่งของทั้งสองเคลดพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.032 หรือมีความแตกต่างทางพันธุกรรม (Genetic divergent) หรือ 3.2%

สำหรับการเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากแหล่งปลูกพืชที่สำคัญในเขตพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 30 ตัวอย่าง นำมาจำแนกชนิดด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล โดยใช้ไพรเมอร์ PcoF1/ LepR1 จากยีน *cox1* สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus* ได้จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ 1. *Planococcus lilacinus* 2. *Planococcus minor* และ 3. *Planococcus citri* และแมลงหวี่ขาวยาสูบในพื้นที่ปลูกพริกแบบอินทรีย์และแปลงปลูกพริกที่มีการใช้สารเคมี จากจังหวัดบึงกาฬ และจังหวัดนครพนม จำแนกโดยใช้ลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน mtCOI ขนาด 850 นิวคลิโอทด์ สามารถจำแนกแมลงหวี่ขาวยาสูบได้ 2 ไบโอไทป์ ได้แก่ AsiaI และ AsiaII_6 โดยในแปลงปลูกพริกแบบอินทรีย์ พบ 2 ไบโอไทป์ ได้แก่ Asia I จำนวน 28 ตัวอย่าง Asia II_6 จำนวน 2 ตัวอย่าง ในสัดส่วน 93.33 เปอร์เซ็นต์ และ 6.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่แปลงปลูก

พริกที่มีการใช้สารเคมีพบเฉพาะ Asia I มีแนวโน้มว่าในพริกไบโอไทป์ที่โดดเด่นคือ Asia I สอดคล้องกับ Monika and Stephan (2016) เมื่อนำแผนภูมิแบบ maximum likelihood phylogenetic tree ข้างต้น วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างไบโอไทป์กับพริกที่ปลูกแบบอินทรีย์และพริกที่ปลูกแบบใช้สารเคมี สำหรับการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบพืชที่มีความสำคัญทางการเกษตรและนำมาศึกษาผลดีเอ็นเอบาร์โค้ด การศึกษาครั้งนี้ได้ผลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันหนอนชอนใบและบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Liriomyza brassicae*, *L. chinensis*, *L. huidobrensis*, *L. sativae* และ *L. trifolii*

อภิปรายผล สำหรับจักจั่น *Platypleura cespiticola* Boulard ซึ่งถือเป็นการเข้าทำลายอ้อยเป็นครั้งแรกของจักจั่นชนิดนี้ในประเทศไทย ในขณะที่ข้อมูลของเพลี้ยหอยเกล็ด *Pinnaspis* ทากเล็บมือนาง และเพลี้ยแป้ง สกุล *Planococcus* หากมีการดำเนินการเก็บรวบรวมตัวอย่างที่ครอบคลุมทุกภูมิภาคของประเทศไทย จะสามารถแสดงข้อมูลที่มีความชัดเจนและสมบูรณ์ต่อไปได้ เช่นเดียวกับข้อมูลของ**แมลงวันหนอนชอนใบ *Liriomyza*** ซึ่งในอนาคตมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อยืนยันชี้แจงความแตกต่างระหว่างชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae ในประเทศไทยและประเทศใกล้เคียงในขณะที่เมื่อนำข้อมูลของแมลงหวี่ขาวมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างไบโอไทป์กับพริกที่ปลูกแบบอินทรีย์และพริกที่ปลูกแบบใช้สารเคมี พบว่ากลุ่มประชากรไบโอไทป์ Asia I ในพริกที่ปลูกแบบอินทรีย์และพริกที่ปลูกแบบใช้สารเคมีมีแนวโน้มแยกกลุ่มออกจากกัน และรวมถึงความสัมพันธ์ระหว่างประชากรในสภาพภูมิศาสตร์ของพื้นที่ด้วย

โครงการวิจัยย่อยที่ 3 การจำแนกชนิดและคุณลักษณะชีวโมเลกุลของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชที่สำคัญ

สรุปผล จากการดำเนินการวิจัยในปี 2565 ทุกการทดลองสามารถดำเนินการเป็นไปตามแผนที่ตั้งไว้ ดังนี้

1. ได้สไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* สกุล *Xiphinema* และสกุล *Scutellonema* เพื่อใช้สำหรับการศึกษาและจำแนกชนิดชนิดไส้เดือนฝอยด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างละเอียดสำหรับไส้เดือนฝอยในแต่ละสกุลที่แยกได้จากพืชและดินในบริเวณที่ปลูกพืช

2. ได้ตัวอย่างแห้งโรคพืช จำนวน 10 ตัวอย่าง และเก็บรักษาตัวอย่างแห้งในพิพิธภัณฑ์โรคพืช และข้อมูลลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราน้ำค้างเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดในเบื้อง และได้ต้นดีเอ็นเอต้นแบบเชื้อราน้ำค้างที่แยกได้จากในพืชตระกูลแตงและตระกูลกะหล่ำ

3. ได้สารพันธุกรรมและสายพันธุ์เชื้อไวรัสที่ติดเชื้อในมันเทศ จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) และ *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) และได้กำหนดสายพันธุ์และเก็บรวบรวมเชื้อไวรัสในต้นมันเทศในโรงเรือนกลุ่มวิจัยโรคพืช

อภิปรายผล ผลจากการศึกษาที่ได้ในปี 2565 เป็นการจำแนกชนิดเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชโดยอาศัยลักษณะอาการของโรคที่ปรากฏบนพืช ลักษณะสัณฐานวิทยา ลักษณะเส้นใยและรูปร่างสปอร์ซึ่งเป็นการจัดจำแนกในระดับเบื้องต้นเท่านั้น เพื่อให้ได้ข้อมูลรายละเอียดและวิธีการจำแนกที่มีความถูกต้องแม่นยำ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาในระดับชีวโมเลกุลเพื่อจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุแต่ละชนิดต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยย่อยที่ 4 การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชที่มีความซับซ้อน (complex species)

สรุปผล ผลการดำเนินงานของปี 2565 ทุกการทดลองสามารถดำเนินการได้ตามแผน เก็บตัวอย่างของโรคพืชเป้าหมายและนำมาศึกษา ซึ่งสามารถได้ผลผลิตเป้าหมายได้แก่ ดีเอ็นเอ และต้นแบบของเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ *Candidatus* Phytoplasma of cassava จากพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เชื้อรา *F. oxysporum* forma specialis *cubense* และเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ที่ก่อโรคกับพริกและมะเขือเทศ และจากการดำเนินงานสามารถจัดทำเป็นกระบวนการวิธีการในระดับห้องปฏิบัติการได้ 3 กระบวนการ ได้แก่ กระบวนการจำแนกชนิดด้วย ดีเอ็นเอ และต้นแบบของเชื้อ *Candidatus* Phytoplasma จากมันสำปะหลังจากพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ กระบวนการจำแนกชนิดด้วย ดีเอ็นเอ และต้นแบบของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ระดับ forma specialis และกระบวนการจำแนกชนิดด้วย ดีเอ็นเอ และต้นแบบของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ที่ก่อโรคกับพริกและมะเขือเทศ

อภิปรายผล จากผลการศึกษา ตัวอย่างของโรคพืชที่มีการเก็บ แยกเชื้อ สกัดดีเอ็นเอ เป็นตัวอย่างที่มีคุณภาพซึ่งผ่านการคัดกรองและจำแนกชนิดแม้จะยังอยู่ในระดับเบื้องต้น ซึ่งยังจะมีการศึกษาในระดับเชิงลึกซึ่งอยู่ในแผนงานที่จะต้องดำเนินการต่อไป อย่างไรก็ตามกระบวนการในระดับห้องปฏิบัติการที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ยังคงต้องได้รับการทวนสอบ ทดสอบซ้ำ และต้องมีการเพิ่มเติมรายละเอียดเพื่อให้เกิดวิธีการที่สามารถปฏิบัติตามได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ที่สนใจนำผลที่ได้จากการศึกษาไปใช้ต่อไป

โครงการวิจัยย่อย ที่ 5 การศึกษาชนิดวัชพืชที่สำคัญเพื่อแก้ปัญหาท้าทายด้านวัชพืชและเพิ่มศักยภาพการผลิตสินค้าเกษตร

สรุปผลและอภิปรายผล

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดวัชพืชสกุล *Echinochloa* P. Beauv. และสกุล *Fimbristylis* Vahl โดยใช้วิธีแบบการสืบพบในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อมในประเทศไทย ได้ตัวอย่างต้นและเมล็ดวัชพืชสกุล *Echinochloa* P. Beauv. ทั้งหมด 66 ตัวอย่าง สามารถระบุชนิดได้ 1 ชนิด ไดแก *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv และได้ตัวอย่างต้นและเมล็ดวัชพืชสกุล *Fimbristylis* Vahl จำนวน 65 ตัวอย่าง จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Fimbristylis quinquangularis* (Vahl) Kunth; *Fimbristylis dichotoma* (L.) Vahl *Fimbristylis polytrichoides* (Retz.) Vahl; *Fimbristylis gracilenta* Hance และ *Fimbristylis littoralis* Gaudich. จัดทำตัวอย่างแห้งสำหรับเก็บเข้าพิพิธภัณฑ์ได้ 6 ชนิด จำนวน 107 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บตัวอย่างมาปลูกสำหรับใช้ในการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาต่อไป

โครงการวิจัยย่อยที่ 6 การศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของวัชพืชที่สำคัญเพื่อแก้ปัญหาท้าทายด้านวัชพืชและเพิ่มศักยภาพการผลิตสินค้าเกษตร

สรุป จากการศึกษานิเวศวิทยาในด้านการแพร่กระจาย ลักษณะเมล็ด และการงอกของเมล็ดหรือหัว ของวัชพืช 4 ชนิด สรุปได้ดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

1) ผักกระฉูด (*Neptunia plena* (L.) Benth) การสำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดผักกระฉูดโดยใช้วิธีแบบการสืบพบในพื้นที่ชุ่มน้ำทางการเกษตร และนิเวศเกษตร ในภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันตก จำนวน 134 แหล่ง พบผักกระฉูด 80 แหล่ง ใน 18 จังหวัด ได้แก่ พะเยา แพร่ อุตรดิตถ์ กำแพงเพชร ชัยนาท นครปฐม นครสวรรค์ นนทบุรี พระนครศรีอยุธยา พิจิตร พิษณุโลก ลพบุรี สิงห์บุรี สุพรรณบุรี กาญจนบุรี ตาก ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ลักษณะเมล็ดผักกระฉูดเป็นรูปไข่แบน ผิวเมล็ดเรียบมัน สีน้ำตาล บริเวณกลางเมล็ดมีเส้นสีดำลักษณะตัวยู เมล็ดกว้าง 0.26 - 0.43 เซนติเมตร ยาว 0.40 - 0.46 เซนติเมตร 100 เมล็ด หนัก 4.0641 กรัม เมล็ดผักกระฉูดงอกในห้องปฏิบัติการ 17.20 เปอร์เซ็นต์ และในสภาพเรือนทดลอง 53.20 เปอร์เซ็นต์ จากการสำรวจพบว่าผักกระฉูดผลิตเมล็ดได้เป็นจำนวนมาก แต่การทดสอบความงอกในห้องปฏิบัติการ และเรือนทดลอง เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำ และทยอยงอก สาเหตุอาจมาจากสภาพแวดล้อมที่ยังไม่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ด ดังนั้นหากสามารถหาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดได้ จะสามารถกระตุ้นให้เมล็ดงอกพร้อมๆ กัน และวางแผนจัดการได้ง่ายขึ้น และเนื่องจากต้นมีเนื้อไม้ ดังนั้นนอกจากกำจัดต้นอ่อนที่งอกแล้วยังจำเป็นต้องหาวิธีกำจัดในระยะที่เป็นต้นโตด้วย และต้องหาวิธีการที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถกำจัดผักกระฉูดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2) โทงเทงประดับ (*Nicandra physalodes* (L.) Gaertn) ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดโทงเทงประดับโดยใช้วิธีแบบการสืบในพื้นที่เกษตรภาคเหนือ จำนวน 55 แหล่ง 9 จังหวัด พบโทงเทงประดับ 3 แหล่ง ในจังหวัดเชียงใหม่ โดยพบเป็นวัชพืชในแปลงมันฝรั่ง สตรอเบอรี่ กะหล่ำปลี ผักชี และมะเขือเทศ เมล็ดโทงเทงประดับมีลักษณะกลม แบน ผิวเมล็ดมีลายลักษณะรูปเหลี่ยมต่อกัน เมล็ดสีน้ำตาลแดง กว้าง 0.10 - 0.16 เซนติเมตร ยาว 0.10-0.18 เซนติเมตร 100 เมล็ด หนัก 0.203 กรัม และศึกษาการงอกของเมล็ดโทงเทงประดับในห้องปฏิบัติการและสภาพเรือนทดลอง บันทึกการงอกเป็นระยะเวลา 3 เดือน ยังไม่พบการงอกทั้งในห้องปฏิบัติการและในสภาพเรือนทดลอง และได้ใช้หลายวิธีในการทำลายการพักตัวของเมล็ด แต่ยังไม่ประสพผลสำเร็จ อย่างไรก็ตามบริเวณที่พบการระบาดของโทงเทงประดับ พบมีต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดขึ้นหนาแน่น ดังนั้นการที่เมล็ดไม่งอกน่าจะมาจากสภาพแวดล้อมที่ยังไม่เหมาะสมต่อการงอก ซึ่งจำเป็นที่จะต้องศึกษาต่อไป เพื่อจะได้หาวิธีที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการป้องกันและกำจัดโทงเทงประดับต่อไปในอนาคต

3) *Oxalis debilis* Kunth สำรวจและเก็บตัวอย่างต้น และหัว *O. debilis* โดยใช้วิธีแบบการแบบสืบพบในพื้นที่เกษตรที่สูงในภาคเหนือ จำนวน 54 แหล่ง 9 จังหวัด พบ *O. debilis* 3 แหล่ง ใน 2 จังหวัด คือ จังหวัดเชียงราย และเชียงใหม่ พบ *O. debilis* ขึ้นเป็นวัชพืชในแปลงสตรอเบอรี่ มันฝรั่ง กะหล่ำปลี และแปลงสวนย่อม และการศึกษาการงอกของหัวในสภาพเรือนทดลอง หัวที่มีขนาดใหญ่และมีน้ำหนักมากมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงกว่าหัวที่มีขนาดเล็ก โดยมีการงอก 91.50, 91.00, 82.50 และ 68.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าหัวทุกขนาดสามารถงอกเจริญเป็นต้นใหม่ได้ ไม่สามารถใช้วิธีคราดเก็บออกจากพื้นที่ได้ เนื่องจากหัวมีขนาดเล็ก และไหลเปราะหักง่าย ดังนั้นจึงต้องหาวิธีกระตุ้นให้หัวงอกพร้อมๆ กัน และใช้หลายวิธีร่วมกันในการกำจัดเพื่อให้สามารถกำจัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

4) จ้อล่อ (*Conyza sumatrensis* (S.F.Blake) Pruski & G.Sancho) จากการสำรวจวัชพืช *Conyza sumatrensis* ในพื้นที่ทำการเกษตร พื้นที่ที่ไม่ได้ทำการเกษตร และเขตป่าใกล้เคียงใน 3 ภาค คือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ พบพืชเป้าหมาย 14 จังหวัด จังหวัดเชียงราย จังหวัดพะเยา จังหวัดแพร่ จังหวัดลำปาง จังหวัด

กรมวิชาการเกษตร

ลำพูน จังหวัดอุทัยธานี จังหวัดอุตรดิตถ์ จังหวัดกาญจนบุรี จังหวัดนครนายก จังหวัดสุพรรณบุรี จังหวัดชุมพร จังหวัดนครศรีธรรมราช จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดสุราษฎร์ธานี จากพื้นที่ที่สำรวจพบว่าวัชพืช *C. sumantrensis* มีแพร่กระจายในทุกสภาพพื้นที่ พื้นที่ไม่ได้ทำการเกษตร เช่น บริเวณข้างริมร่องน้ำ ริมข้างทาง บริเวณรอบที่อยู่อาศัย แปลงปลูกพืชที่ทิ้งร้าง คันนาข้าว และบางพื้นที่เลี้ยงสัตว์ ส่วนพื้นที่ทำการเกษตร เช่น แปลงปลูกพืชสวน แปลงปลูกพืชไร่ แปลงผัก สวนผลไม้ พื้นที่ข้างสวนยางพารา สวนปาล์มน้ำมัน สวนมันสำปะหลัง เนื่องจากมีลักษณะเมล็ดเป็นตัวช่วยในการแพร่กระจายพันธุ์ได้ดี เมล็ดมีขนาดเบา และขนที่ปลายเมล็ดช่วยในการพยุงตัวไปกับกระแสลม ชอบสภาพดินที่มีความชื้นแต่ไม่ขึ้นพื้นที่น้ำท่วมขัง เช่น นาข้าว ในส่วนการงอกในห้องปฏิบัติการงอก 91.00 เปอร์เซ็นต์ และในสภาพเรือนทดลองงอก 82.00 เปอร์เซ็นต์ จากการสำรวจพบว่าจ้อล่อสามารถเจริญเติบโตได้ดีในหลายพืชปลูก เมล็ดมีการงอกดี อีกทั้งเมล็ดมีขนาดเล็กและมีรยางค์ จึงเป็นปัจจัยที่ทำให้แพร่กระจายได้ดี ดังนั้นการกำจัดจ้อล่อจึงต้องกำจัดก่อนออกดอก และต้องเลือกใช้วิธีที่เหมาะสมในการกำจัดจ้อล่อในแต่ละพืชปลูก เพื่อให้สามารถกำจัดจ้อล่อได้อย่างมีประสิทธิภาพและไม่กระทบต่อพืชปลูก ซึ่งจะได้ศึกษาต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะต่อผู้เกี่ยวข้องสำหรับการดำเนินงานในระยะต่อไป

1. ผู้เกี่ยวข้องสามารถนำแนวทางการวินิจฉัยชนิดถ่ายทอดแลกเปลี่ยนความรู้และประสบการณ์การทำงานในการตรวจสอบชนิดแมลงในสินค้าเกษตรได้ รวมถึงสร้างเครือข่ายการทำงานและความร่วมมือระหว่างนักวิชาการภายในหน่วยงานและระหว่างหน่วยงานได้ นอกจากนี้สามารถพัฒนาต่อยอดแมลงศัตรูธรรมชาติที่ศึกษาเป็นชีวภัณฑ์ชนิดใหม่ช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรให้มีคุณภาพและมีมูลค่าเพิ่มเพื่อสร้างรายได้แก่เกษตรกร

2. ผลของการงอกของเมล็ด และหัว ไปวิเคราะห์ ร่วมกับวิธีการทดลองในปีงบประมาณ 2566 และ 2567 เพื่อหาแนวทางในการจัดการในสภาพแปลงต่อไป

ปัญหาและอุปสรรคในการทำงาน

1. ไม่สามารถออกเดินทางไปเก็บตัวอย่างแมลงได้ตรงตามแผนการเดินทางเนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อโควิด 19 ประกอบกับสภาพอากาศที่มีฝนตกต่อเนื่องทำให้เก็บตัวอย่างศัตรูพืชได้น้อย

2. ยังไม่สามารถดำเนินการเลี้ยงแมลงศัตรูธรรมชาติบางชนิดในห้องปฏิบัติการได้ครบวงจรชีวิต เนื่องจากยังไม่เคยมีการศึกษาชนิดมาก่อน

3.เนื่องจากมีการพบเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายจำนวนน้อย ได้แก่ ไส้เดือนฝอยสกุล *Xiphinema* ในตัวอย่างดินเพียง 2 ตัวอย่าง จากตัวอย่างดินจากไผ่และยูคาลิปตัสจากตัวอย่างดินที่เก็บทั้งหมด 170 ตัวอย่าง และไส้เดือนฝอยสกุล *Scuttellonema* ในตัวอย่างดินเพียง 7 ตัวอย่าง จากตัวอย่างดินจากแปลงมันสำปะหลัง แปลงอ้อย และแปลงข้าวโพด รวมทั้งสิ้น 221 ตัวอย่าง ดังนั้นจึงต้องเก็บตัวอย่างดินจากไผ่ และยูคาลิปตัส เพิ่มมากขึ้น รวมทั้งพืชชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานว่าเป็นพืชอาศัยของไส้เดือนฝอยสกุล *Xiphinema* และสกุล *Scuttellonema*

กรมวิชาการเกษตร

4. ศึกษาการงอกของเมล็ดโทงเทงประดับในห้องปฏิบัติการและสภาพเรือนทดลอง บันทึกการงอกเป็นระยะเวลา 3 เดือน ยังไม่พบการงอกทั้งในห้องปฏิบัติการ และในสภาพเรือนทดลอง จึงหาวิธีทำลายการพักตัวของเมล็ด โดยนำเมล็ดไปแช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง แช่น้ำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แช่น้ำร้อน และตัดขอบเมล็ด ยังไม่สามารถทำลายการพักตัวของเมล็ดได้ ดังนั้นในการศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ดในปีงบประมาณ 2566 จึงต้องทดลองใช้ต้นอ่อนที่งอกในพื้นที่ที่ระบาดสำหรับทำการทดลองไปก่อน พร้อมกับหาวิธีทำลายการพักตัวของเมล็ดเพื่อทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2558. Family Mimosaceae วงศ์ไมยราบ: ผักกระฉูด. ออนไลน์. แหล่งที่มา: http://www.fisheries.go.th/if-suratthani/web2/images/download/179.pdf (29 มิถุนายน 2563).

กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์, ปิยรัตน์ เขียนมีสุข, สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น, อุทัย เกตุนุติ, ลักษณา วรรณภีร์, สังคม ประสมทอง และ นิรันดร์ ทองพันธุ์. 2540. การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพริกโดยวิธีผสมผสาน. ใน: เอกสารวิชาการเรื่องการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน. กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร เขตจัตุจักร, กรุงเทพฯ.

กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์ และอัมพร วิโนทัย. 2544. *การแกไขปญหาการระบาดของหนอนชอนใบบน พื้นที่สูงภาคเหนือ*. โรงพิมพคุรุสภาลาดพราว. กรุงเทพฯ. 42 หนา.

เกศรินทร ทิพย์เพ็ชร, ณรงค จัตุรัส, และนพวรรณ บุญชู. 2561. ดีเอ็นเอบาร์โค๊ดสำหรับการระบุชนิดแมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์ของประเทศไทย DNA Barcodes for Identification of Medically-Important Insects of Thailand. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ปีที่ 26 ฉบับที่ 2.

กลุ่มวิจัยวัชพืช. 2555. การควบคุมวัชพืชและการใช้สารกำจัดวัชพืช ปี 2554. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 149 หน้า.

จิราภา จอมไธสง. 2554. รายงานข้อมูลสถานการณ์การผลิต การตลาดสินค้าเกษตรชนิดสินค้าพริก. สำนักส่งเสริมและ จัดการสินค้าเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร

จันทร์เพ็ญ ประคองวงศ์ จรัญญา ปิ่นสุภา เบญจมาภรณ์ ลิ้มประเสริฐ และมัตติกา ทองรส. (2553). เฝ้าระวังการแพร่กระจายของ *Conyza canadensis* (L.) Cronq. ในประเทศไทย. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2552 เล่ม 2. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. 1144-1154 หน้า.

นายเกษตร. 2557. "ผักกระฉูด" ยอดอ่อนอร่อย. ออนไลน์. แหล่งที่มา : https://www.thairath.co.th/content/405967 (29 มิถุนายน 2563).

บุปผา เหล่าสินชัย และชลิดา อุณหวุฒิ. 2543. *เพลี้ยแป้งและเพลี้ยหอยศัตรูพืชที่สำคัญ*. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว , กรุงเทพฯ. 70 หน้า.

ปิยาณี หนูกาฬ ดาราพร รินทะรักษ์ เกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์ 2556. ศึกษาการป้องกันกำจัดทาก *Parmarion siamensis* ในสวน กล้วยไม้. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 1:315-319.

กรมวิชาการเกษตร

ปราสาททอง พรหมเกิด ปิยาณี หนูกาฬ ดาราพร รินทะรักษ์ สมเกียรติ กล้าแข็ง ทรงทัพ แก้วตา. ความหลากชนิดและประชากร ของหอยทากและทากในโรงเรือนปลูกพืช รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2554 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 1:1822-1828.

พรทิพย์ วิสารทานนท์ พรรณเพ็ญ ชโยภาส ใจทิพย์ อุไรชื่น รังสิมา เก่งการพานิช กรรณิการ์ เพ็งคุ้ม จิราภรณ์ ทองพันธ์ ดวงสมร สุทธิสุทธิ์ ลักขณา ร่มเย็น ภาวินี หนูชนะภัย และอัจฉรา เพชรโชติ. 2551. แมลงที่พบในผลิตผลเกษตรและการป้องกันกำจัด. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. 180 หน้า.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2540. วัชพืชศาสตร์. รั้วเขียว. 585 หน้า.

รัตนา นชะพงษ์ ศิริณี พูนไชยศรี สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี พรรณเพ็ญ ชโยภาส. 2551. *อนุกรมวิธานแมลงวันหนอนชอนใบสกุล Liriomyza และ Chromatomyia*. รายงานเรื่องเต็ม ผลการวิจัยที่สิ้นสุด ปงบประมาณ 2550. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพ.

วิชาญ วรรธนะไกวัล สมเกียรติ กล้าแข็ง ปราสาททอง พรหมเกิด ทรงทัพ แก้วตา. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่, *Rattus argentiventer* (Robinson and Kloss, 1916) ที่พบในประเทศไทย. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2558 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 3:2178-2211.

ศานิต รัตนภุมมะ. 2550. กีฏวิทยาแม่บท. ครั้งที่ 2 ห้างหุ้นส่วนจำกัดดีพริ้น เชียงใหม่. 571 หน้า.

ศูนย์การปรับปรุงพันธุ์อ้อยแห่งประเทศไทย. 2563. แมลงศัตรูอ้อยที่สำคัญ (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.thailand-sbc.org/2015/index.php/th/. (15 มค. 63).

ศิริณี พูนไชยศรี. 2544. เพลี้ยไฟ. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 75 หน้า.

ศิริณี พูนไชยศรี ชลิดา อุณหวุฒิ ลักขณา บำรุงศรี สุนัดดา เชาวลิต ชฎาภรณ์ เฉลิมวิเชียรพร เกศสุดา ปวนมณี. 2554. แมลงปากดูดชนิดที่สำคัญของประเทศไทย. เอกสารวิชาการประจำปี 2554. กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. 142 หน้า.

สุนัดดา เชาวลิต ภูวนาท มณีโชติ ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ ภานุวัฒน์ มูลจันะ วันเพ็ญ ศรีชาติ ศิริลักษณ์ ล้านแก้ว วาสนา รุ่งสว่าง วิจิตรา โชคบุญ. 2560. การจำแนกชนิดแมลงหวี่ขาวยาสูบ, *Bemisia tabaci* บนมันสำปะหลังในประเทศไทย โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล. การประชุมวิชาการ อารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 13 ณ โรงแรมเรือรัษฎา อำเภอเมือง จังหวัดตรัง. หน้า 183

สุเทพ สหายา และพวงผกา อ่างมณี. 2553. ทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดแมลงหวี่ขาวและหนอนชอนใบในผักสวนครัว (กะเพรา โหระพา และแมงลัก). กลุ่มกีฏและสตววิทยาและกลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. หน้า 1519 – 1531

กรมวิชาการเกษตร

สารานุกรมพืช. 2563. ผักกระเฉด (*Neptunia oleracea* Lour.). ออนไลน์. แหล่งที่มา : http://www.dnp.go.th/botany/mindexdictdetail.aspx?runno=3590 (29 มิถุนายน 2563).

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. ม.ป.ป. คู่มือการจัดการไร่อ้อยอย่างยั่งยืน. ออนไลน์. แหล่งที่มา: http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/144-4003.pdf (27 เมษายน 2563).

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร. 2559. บัญชีรายชื่อแมลง ไร และสัตว์ ศัตรูพืชของพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 199 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2562. ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร ปี 2557 – 2561. ออนไลน์. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/view/1/%E0%B8%9B%E0%B8%B1%E0%B8%88%E0%B8%88%E0%B8%B1%E0%B8%A2%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%9C%E0%B8%A5%E0%B8%B4%E0%B8%95/TH-TH# (1 มีนาคม 2563).

สำนักนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2561. โครงการศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อจัดทำรายงานแห่งชาติด้านความหลากหลายทางชีวภาพ. เอกสารประกอบการประชุม สถานภาพปัจจุบันด้านความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทย. 96 หน้า.

ส่วนจัดสรรน้ำและบำรุงรักษา สำนักชลประทานที่ 15. 2553. โครงการกำจัดวัชพืชในเขตพื้นที่ลุ่มน้ำ ปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ปีงบประมาณ 2552-2553. กรมชลประทาน. ออนไลน์. แหล่งที่มา: http://kmcenter.rid.go.th/kmc15/over8m/gk01.pdf (29 มิถุนายน 2563).

หอพรรณไม้. 2563. กระฉูด (*Neptunia plena* (L.) Benth.). กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ออนไลน์. แหล่งที่มา : https://www.facebook.com/ForestHerbarium/posts/5312785638747080/ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช (15 ธันวาคม 2565).

อังศุมาลย์ จันทราปัตย์. 2550. ไรการเกษตร. โรงพิมพ์สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ. 315 น.

อัณศยา พรมมา ศิริพร ซึงสนธิพร ธัญชนก จงรักไทย และเอกรัตน์ ธนูทอง. 2562. ศักยภาพการเป็นวัชพืชของไม้ประดับต่างถิ่น. ใน : รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2561 เล่ม 3 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

อุไร เพ่งพิศ สรัญญา วัชโรทัย ศิริพร บุญดาว และทิพากร สีวอ. 2565. วัชพืชสกุล *Neptunia* ที่แพร่ระบาดในพื้นที่ชลประทาน. การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 15 วันที่ 22 – 24 พฤศจิกายน 2565 ณ โรงแรมรามาการ์เด้นส์ กรุงเทพมหานคร. หน้า 69 -70.

อินทวัฒน์ บุรีคำ. 2548. นิเวศวิทยาวิเคราะห์ทางกีฏวิทยา. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม. 180 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร

Abbott, R.T. 1989. *Compendium of landshell*. Melbourne, Australia : American Malacologist,Inc.

Albrecht A. J. P., G. Thomazini, L. P. Albrecht, A. Pires, J. B. Lorenzetti, M. T. Y. Danilussi, A. F. M. Silva and F. S. Adegas. 2014. Conyza sumatrensis Resistant to Paraquat, Glyphosate and Chlorimuron: Confirmation and Monitoring the First Case of Multiple Resistance in Paraguay. Online. Available. http://www.mdpi.com/journal/agriculture (10 Januay 2020).

Albrecht A. J. P., V. G. C. Pereira, C. N. Z. Souza, L. H. S. Zobiole, L. P. Albrecht and F. S. Adegas. 2018. Multiple resistance of Conyza sumathensis to three mechannisms of action of herbicides. Acta scientiarum. Agronomy. V. 42. 2020.

Audzijonyte A., Krylova E. M., Sahling H., Vrijenhoek R. C., 2012. Molecular Taxonomy Reveals Broad Trans- Oceanic Distributions and High Species Diversity of Deep- Sea Clams (Bivalvia: Vesicomyidae: Pliocardiinae) in Chemosynthetic Environments. Syst. Biodivers., 10, 403–415.

Attasopa K., Ferrari R. R., Chantawannakul P., Banzinger H. 2021. Morphological description, DNA barcodes and phylogenetic placement of a new mite species: *Dinogamasus saengdaoae* sp. nov. (Mesostigmata: Laelapidae) found in the acarinarium of carpenter bees in Thailand. Systematic & Applied Acarology 26(2): 474–495.

Bajwa A. A., S. Sadia, H. H. Ali, K. Jabran, A. M. Peerzada and B. S. Chauhan. 2016. Biology and management of two important Conyza weeds: a global review. Online. Available. https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-016-7794-7 (10 Januay 2020).

Bedford, I.D., R.W. Briddon, J.K. Brown, R.C. Rosell & P.G. Markham.1994. Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. Ann Appl Biol. 125:311–325

Ben-Dov, Y., Miller, D.R. and Gibson, G.A.P. 2014. ScaleNet: a database of the scale insects (Hemiptera; Coccoidea) *of the world.* http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/htm accessed May 2014.

Bingpeng X, Heshan L, Zhilan Z, Chunguang W, Yanguo W, JianjunW. 2018. DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait. PLoS ONE 13(6): e0198109.

Blanford, W.T. 1904. The Fauna of British India, Ceylon and Burma, pp.17-19. Vol. II. Distant W. L., *Rhynchota (Heteroptera*). British Species. *Br. J. Ent. Nat. Hist*. 4(1991): 99-117.

Boulard, M. 2013. The Cicadas of Thailand Volume 2 (Taxonomy and sonic Ethology. Siri Scientific Press Manchester UK. 436 p.

Boykin, l.M. and P.J. De Barro. 2014. A practical guide to identifying members of the *Bemisia tabaci* species complex: and othermorphologically identical species. Front. Ecol. Evol. 2:1–5.

Brodie, G. & Barker, G.M. 2012. *Parmarion martensi* Simroth, 1893. Family Ariophantidae. 'USP Introduced Land Snails of the Fiji Islands Fact Sheet Series', No. 1.

Breure A. S. H. 2016. Caribbean *Bulimulus* Revisited: Physical Moves and Molecular Traces (Mollusca, Gastropoda, Bulimulidae). PeerJ, 4, e1836.

Burši´c M., Ivesa L., Jaklin A., Pijevac M. A., Ku˘cini´c M., Štifani´c M., Neal L., Mad¯aric B. B. 2021. DNA Barcoding of Marine Mollusks Associated with *Corallina officinalis* Turfs in Southern Istria (Adriatic Sea). Diversity. 13. 196.

CABI. 2019. *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm). (Online). Available: https://www.cabi.org/isc/datasheet/29810

CABI. 2021. *Nicandra physalodes* (apple of Peru). Online. Available. https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.36289 (15 December 2022).

Casida, J. E. & G. B. Quistad. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future Annu. Rev. Entomol. 43:1–16.

Centre for Agriculture and Biosciences International. 2022. *Conyza sumathensis* (tall fleabane) CABI compendium. Online. Available. https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.15252 (14 December 2022).

Cowie, R. H. 2018. *Parmarion martensi* Simroth, 1893 (Gastropoda: Ariophantidae), an intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* (rat lungworm), on Maui Bishop Museum occasional papers. 123(2018): 7-10.

De Barro, P. J., S. S. Liu, L. M. Boykin, and A. B. Dinsdale. 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. Annu. Rev. Entomol. 56:1–19.

Duangthip Kantha, Kosol Charernsom, Wiwat Suasa-ard and Oraphan Kern-asa. (2002). Annual symposium of The National Biological Control Research Center 2002. Survey and biology of mango scale, *Pseudaulacaspis cockerelli* (Homoptera: diaspididae) and of white

armoured scale, *Pinnaspis* sp. (Homoptera: Diaspididae) and natural enemies. (pp. 94). Ubon Ratchathani (Thailand): Ubon Rajathanee University, Ubon Ratchathani (Thailand).

FAO. 2017. Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*): Identification, Biology and Ecology. FAO, Rome, Italy.

Fernández, E., Grávalos, C., Haro, P. J., Cifuentes, D. and P. Bielza. 2009. Insecticide resistance status of *Bemisia tabaci* Q-biotype in southeastern Spain. Pest Manag. Sci. 65:885–891.

Florentine S., T. Humphries and B. S. Chauhan. 2021. Chapter 7 Erigeron bonariensis, Erigeron canadensis, and Erigeron sumathensis. Biology and Management of Problematic Crop Weed Species. Academic press. 132-149.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3(1994): 294-297.

Fuerst, E. P., H. Y. Nakatani, A. D. Dodge, D. Penner and C. J. Arntzen. 1985. Paraquat resistance in Conyza. Plant Physiology, 77(4), 984-989.

Funderburk, J., X. Martini, J. Freeman, I. Strzyzewski, E. Traczyk, T. Skarlinsky, and S. Adkins. 2019. Sampling for Estimating *Frankliniella* Species Flower Thrips and *Orius* Species Predators in Field Experiments. J. Vis. Exp. (149).

García, M. M., B.D. Denno, D.R. Miller, G.L. Miller, Y. Ben-Dov and N.B. Hardy. 2016. ScaleNet: A literature-based model of scale insect biology and systematics. Database. doi: 10.1093/database/bav118. http://scalenet.info. Accessed: February 12, 2022.

García Morales M, Denno BD, Miller DR, Miller GL, Ben-Dov Y, Hardy NB. 2016. ScaleNet: A literature-based model of scale insect biology and systematics. Database. doi: 10.1093/database/bav118. Accessed March 2020.

Gilligan, T.M. & S.C. Passoa. 2014. LepIntercept - An identification resource for intercepted Lepidoptera larvae. (Online). Available: http://idtools.org/id/leps/lepintercept/spodoptera.html

Gizelly S., R. S. JR Oliveira, J. Constantin, A. C. Francischini, M. F.P.S. Machado, C. A. Mangolin and J. N. Nakajima. 2014. *Conyza sumatrensis*: A new weed species resistant to glyphosate in the Americas Weed Biology and Management 14, 106–114

Goldman N. 1990. Maximum likelihood inference of phylogenetic trees, with special reference to a Poisson process model of DNA substitution and to parsimony analyses. Syst. Zool., 39(4):345-361.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

Gorman, K. 2010. Cross-resistance relationships between neonicotinoids and pymetrozine in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Pest Manag. Sci. 66:1186–1190.

Gutierrez, A. P., Ponti, L., Herren, H. R., Baumgärtner, J. and P. E, Kenmore. 2015. Deconstructing Indian cotton: weather, yields, and suicides. Environ. Sci. Eur. 27:1–17.

Haines, C.P. (Ed.) 1991. Insect and Arachnids of Tropical Stored Products; Their Biology and Identification. Natural Resources Institute: Chatham, Kent, UK.

Hajime Watanabe, Yoshino Kusagaya and Masahiko Saigusa. 2002. Environmental Factors Affecting Germination of Apple of Peru. Weed Science. Vol. 50, No. 2, p. 152-156.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41, 95-98.

Hemmen, J. and Hemmen, C. 2002. Akktualisierte liste der terrestrischen gastropoden Thailands. Schr. Malakozool. 18:53-70.

Holloway, J.D. 1989. The Moths of Borneo Part 12. The Malayan Nature Journal 42: 132-138.

Jeppson, L. R., H. H. Keifer and E. W. Baker. 1975. Mite injurious to economic plants. University of California press, Berkeley, London

Horowitz, A. R., Kontsedalov, S., Khasdan, V. and I. Ishaaya, 2005. Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. Arch. Insect Biochem. Physiol. 58:216–225.

Horowitz, R., Kontsedalov, S., Khasdan, V., Breslauer, H. and I. Ishaaya. 2008. The biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* in Israel-Distribution, resistance to insecticides and implications for pest management. J. Insect Sci. 8:23–24.

Huelsenbeck, J.P., and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics 17:754-755.

Iamsuwansuk A. 2011. Genetic diversity of shovel-nosed lobster of the Genus *Thenus* in Thailand using cytochrome C oxidase subunit I gene. Thesis for the Degree of Master of Science Program in Zoology. Department of Biology Faculty of Science Chulalongkorn University.

International Plant Protection Convention (IPPC). 2016. ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests DP 16: Genus *Liriomyza*. Available at: https://www.ippc.int/static/media/files/publication/en/2017/01/DP_16_2016_En_2017-01-30.pdf

Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M. and A. Elbert. 2010. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. J. Agric. Food Chem. 59:2897–2908.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Kranthi, K. R. 2002. Insecticide resistance in five major insect pests of cotton in India. Crop Prot. 21:449–460.

Krishna, V. V. and M. Qaim. 2012. Bt cotton and sustainability of pesticide reductions in India. Agric. Syst. 107:47–55.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. 2007. Bioinformatics 23: 2947-2948.

Laws, H.M. 1973 .The chromosome of some Australian camaenid land snails. *Cytologia*. 38:p.229-235.

Li, C. J., Wang Y.Q. and Liu. W. 2001. Progress on Study of Functional Genome of *Tribolium castaneum*. Chinese Journal of Applied Entomology. 48 (6): 1544-1552.

Liu J., Zhang H. 2018. DNA Barcoding for Species Identification in Deep-Sea Clams (Mollusca: Bivalvia: Vesicomyidae). Mitochondrial DNA Part. A 29, 1165–1173.

Lim G.S, S.S. Sastroutomo and W.H. Loke. 1999. Workshop on leafminers of vegetables in Southeast Asia. CABI-SEARC.

Malipatil, M. B., P.M. Ridland, A. Rauf, J. Watung and D. Kandowangko. 2004. New records of *Liriomyza* Mik (Agromyzidae: Diptera) leafminers from Indonesia. *Formosan Entomo*l. 24: 287-292.

Marambe B., S. P. Nissanka, L. Silva, A. Anandacoomaraswamy and M. G. D. L. Priyantha. 2002. Occurrance of paraquat-resistant *Erigeron sumathensis* (Retz.) in upcounty tea lands of Sri Lanka. Online. Available. https://www.researchgate.net/publication/236160284 (15 December 2022).

Meyer, C.P.; Paulay, G. 2005. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. PLoS Biol., 3, e422.

Miller, D.R. and Davidson, J.A. 2005. Armored Insect Pests of Trees and Shrubs (Hemiptera: Diaspididae). Cornell University Press, New York. 442 pp.

Minkenberg O.P. 1988. Dispersal of *Liriomyza trifolii*. *Bulletin of the. European and Mediterranean.* Plant Protection Organisation 18: 173-182.

Monika, G. and W. Stephan. 2016. Diversity of *Bemisia tabaci* in Thailand and Vietnam and indications of species replacement. J. Asia Pacific Entomol. 19:537–543

Naranjo, S. E., Castle, S. J., De Barro, P. J. and S.-S. Liu. 2010. Population Dynamics, Demography, Dispersal and Spread of *Bemisia tabaci* in *Bemisia*: Bionomics and Management of a Global Pest. 185–226.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Naveen, N. C., Rahul Chaubey, Dinesh Kumar, Rebijith, K. B., Raman Rajagopal, Subrahmanyam, B. and S. Subramanian. 2017. Insecticide resistance status in the whitefly, *Bemisia tabaci* genetic groups Asia-I, Asia-II-1 and Asia-II-7 on the Indian subcontinent. https://www.nature.com/articles/srep40634

Ngow, Z., R.J. Chynoweth, M. Gunnarsson, P. Rolstn and C.E. Buddenhagen. 2020. A herbicide resistance risk assessment for weed in wheat and barley cropping systems in New Zealand.Plos One.

OEPP/EPPO. 2005. Diagnostics Diagnostic PM 7/53. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 35: 271–273.

OEPP/EPPO. 2015. PM 7/124 *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera litura*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera eridania*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 45(3): 410 – 444.

Palmer, J. M., L. A. Mound and G. J. du Heaume. 1989. (ed.). CIE Guides to Insects of Importance to Man: 2. Thysanoptera. C.A.B International Institute of Entomology.

Panha, S. 1996. A Checklist and classification of the terrestrial Pulmonate snails of Thailand. *Walkerana*. 8 (19): 11-64.

Patterson, C. M. 1971. Taxonomic studies of the land snails family Succineidae. *Malacological Reeview*. Vol. 4: 131-202

Parrella, M.P., C.B. Keil and J.G. Morse. 1984. Insecticide resistance in *Liriomyza trifolii.* California Agriculture 38: 22-33.

Plant Protection Research and Development Office. 2559. List of insects, mite and other zoological pests of economic plant in Thailand. 1: 2-188.

Park, D.-S. Suh, S.-J., Oh, H.-W. and Hebert, P.D.N. 2010. Recovery of the mitochondrial COI barcode region in diverse Hexapoda through tRNA-based primers. BMC Genomics 11, 423.

Prakash, S. and S. J. Singh. 2006. Insect transmitted virus of pepper: Vegetation Science. 33:109-116

Quinlan, R.J. 1988. Use of fungi to control insects in glasshouses. In M.N. Burge, (ed). Fungi in Biocontrol Systems. Manchester University Press, Manchester, UK. pp 19 – 36.

Rees, D. 2004. Insects of Stored Products. CSIRO Publishing. Collingwood. Australia. 181 p.

Ronquist F., Huelsenbeck J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. 19(12):1572-4.

Sasakawa, M. 2013. Thailand Agromyzidae (Diptera) -2. *Zootaxa*. 3746(4): 501-28.

Sharma, K.P., T.I. Khan and N. Bhardwaj. 1984. Temperature-regulated seed germination in *Neptunia oleracea* Lour. and its ecological significance. Aquatic Botany. Volume 20, Issues 1–2, 185-188.

กรมวิชาการเกษตร

Shiao, S.F. 2004. Morphological diagnosis of six *Liriomyza* species (Diptera: Agromyzidae) of quarantine importance in Taiwan. *Applied Entomology and Zoology* 39(1): 27-39.

Shixiao Luo, Dianxiang Zhang and Susanne S. Renner. 2006. *Oxalis debilis* in China: Distribution of Flower Morphs, Sterile Pollen and Polyploidy. Annals of Botany. Vol. 98, p. 459-464.

Spencer, K.A. 1973. *Agromyzidae (Diptera) of economic importance.* The Hague. Netherlands. 418 p.

Stegmaier, C.E. 1966. Host plants and parasites of *Liriomyza trifolii* in Florida (Diptera: Agromyzidae). *Florida Entomologist* 49: 75-80.

Simon, C. 2013. Cicada central University of Connecticul. (Online). Available. http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/projects/cicada/cc.php (May 9 2014).

Shizhen, L. and Bencao, G. 2013. Section of Insect. (Online). Available. http://en.wikipedia.org/wiki/Cicada (May 11 2014).

Snell, T. W. 1978. Fecundity, developmental time and population growth rate. Oecologia. 32: 119-125.

Tamura K., Stecher G., and Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. Molecular Biology and Evolution 38:3022-3027.

The Flora of North America. 2020. *Oxalis debilis* Kunth. Online. Available. http://floranorthamerica.org/Oxalis_debilis (15 December 2022).

The plant list. 2013. *Neptunia plena* (L.) Benth. Online. Available. http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/ild-20259 (20 July 2020).

Thebaud C., C. A. Finzi, L. Affre, M. Debussche and J. Escarre. 1996. Assessing why two introduced Conyza differ in their ability to invade Mediterranean old fields. Ecology. V.77. 791-804.

Tolman, J.H., D.G.R. McLeod and C.R. Harris. 2004. Cost of crop losses in processing tomato and cabbage in southwestern Ontario due to insects, weeds and/or diseases. Canadian journal of plant science: 915-921.

Vaught, K.C. 1989. A classification of the living mollusca. U.S.A.: *American Malacologists*.

Wang. Y. J. 2015. Molecular Techinques for Identification of Stored *Tribolium*. China Agrucultual University.

Williams, D.J. and G.W. Watson. 1988. *The Scale Insects of the Tropical South Pacific Region Part I, the armored scale (Diaspididae).* CAB Intemational Institute of Entomology, Wallingford. 290 pp.

Williams, D.J. 2004. *Mealybug of Southern Asia.* The Natural History Museum, Kuala Lumpur: Southdene SDN. BHD, 896 pp.

Whalon, M. E., Mota-Sanchez, D., Hollingworth, R. M. and Gutierrez, R. Michigan. 2013. State University, Arthropod Pesticide Resistance Database (2013). http://www.pesticideresistance.com/Accessed January 5, 2016.

Wongruengpibool S. 2013. Genetic diversity of purple-legged shovel-nosed lobster *Thenus unimaculatus* in Thailand by Mitochondrial gene analysis. Thesis for the Degree of Master of Science Program in Zoology. Department of Biology Faculty of Science Chulalongkorn University.

Wrensch, D. L. 1985. Reproductive parameters. *In* Spider mite. Their Biology, Natural Enemies and Control, 1A (W. helle and M. Sabelis eds.). Elsevier Amsterdam. 165-170.

Yue L., Liu X., Hayashi F., Wang M., Yang D. 2015. Molecular systematics of the fishfly genus Anachauliodes Kimmins, 1954 (Megaloptera: Corydalidae: Chauliodinae). Zootaxa 3941(1): 091–103.

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก

ให้แยกเป็นแต่ละส่วนดังนี้

1. ภาคผนวก 1 สิ่งที่แสดงประกอบเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับเนื้อหาผลงานวิจัย
2. ภาคผนวก 2 หลักฐานเชิงประจักษ์ของผลผลิตที่ได้ จากข้อ 3.2 โดยให้เรียงข้อมูลหลักฐานตามผลผลิตที่แสดงในตาราง
3. ภาคผนวก 3 หลักฐานเชิงประจักษ์ของการนำผลงานไปใช้ประโยชน์
4. ภาคผนวก 4 หลักฐานการปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

*** การส่งรายงานให้แนบไฟล์หลักฐาน โดยตั้งชื่อเรียงลำดับมาให้ตรงกันกับรายละเอียดในภาคผนวก เพื่อสะดวกในการนำข้อมูลลงในระบบ NRIIS***

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก 1

สิ่งที่แสดงประกอบเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับเนื้อหาผลงานวิจัย

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก 2

หลักฐานเชิงประจักษ์ของผลผลิตที่ได้ จากข้อ 3.2 โดยให้เรียงข้อมูลหลักฐานตามผลผลิตที่แสดงในตาราง

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก 3

หลักฐานเชิงประจักษ์ของการนำผลงานไปใช้ประโยชน์

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก 4

หลักฐานการปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

กรมวิชาการเกษตร