



สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
Plant Protection Research and Development office

วารสาร

วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

JOURNAL OF PLANT PROTECTION RESEARCH AND DEVELOPMENT

ปีที่ 1 ฉบับที่ 1 กรกฎาคม - กันยายน 2568
Volume 1 No. 1 July - September 2025



คณะกรรมการวิจัยและพัฒนาอารักขาพืช

ที่ปรึกษา	ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	
บรรณาธิการ	นางสาวยุวรินทร์ บุญทบ	นักกีฏวิทยาชำนาญการพิเศษ
ผู้ช่วยบรรณาธิการ	นางสาวชมัยพร บัวมาศ	นักกีฏวิทยาชำนาญการพิเศษ
	นางธัญชนก ศรีเมือง	นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ
	นางสาวอมรรักษ์ คัดใจเดียว	นักวิชาการโรคพืชชำนาญการ
	นางสาวณัฐสุดา บรรเลงสวรรค์	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
	นางสาวณัฐวรรณ ชนะโชติ	นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ
กองบรรณาธิการ	ผู้ทรงคุณวุฒิด้านอารักขาพืช	ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช
	ผู้เชี่ยวชาญด้านศัตรูพืช	ผู้เชี่ยวชาญด้านกักกันพืช
	ผู้เชี่ยวชาญด้านวัชพืช	นายอุดร อุณหุติ
	นางสาวชมพูนุท จรรยาเพศ	นายเกรียงไกร จำเริญมา
	นางสาวมานิตา คงชื่นสิน	นายพิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์
	นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม	นางสาวศิริพร ชิงสนธิพร
	นายศรุต สุทธิอารมณ์	นางสาวชลธิชา รักใคร่
	นายพฤทธิชาติ ปุญวัฒน์	นักกีฏวิทยาชำนาญการพิเศษ
	นางศรีจันทร์ ศรีจันทร์	นักกีฏวิทยาชำนาญการพิเศษ
	นายไตรเดช ช่ายทอง	นักวิชาการโรคพืชชำนาญการพิเศษ
	นางสาวชนินทร ดวงสอาด	นักวิชาการโรคพืชชำนาญการพิเศษ
	นางสาวทิพวรรณ กันหาญาติ	นักวิชาการโรคพืชชำนาญการพิเศษ
	นายภูวนารถ มณีโชติ	นักวิชาการโรคพืชชำนาญการพิเศษ
	นางสาววาสนา ฤทธิ์ไธสง	นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ
	นายวิชาญ วรรณะไกว์	นักสัตววิทยาชำนาญการพิเศษ
	นายสาทิพย์ มาลี	นักกีฏวิทยาชำนาญการ
	นางสาววนาพร วงษ์นิค	นักกีฏวิทยาชำนาญการ
	นางสาวสุคนธ์ทิพย์ สมบัติ	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
	นายเทอดพงษ์ มหาวงศ์	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
ผู้จัดการ	ผู้อำนวยการกลุ่มบริหารโครงการวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	
วัตถุประสงค์	เพื่อเผยแพร่ความรู้และผลงานวิจัยด้านโรคพืช แมลงและสัตว์ศัตรูพืช วัชพืช และศัตรูพืชกักกัน รวมทั้งสนับสนุนให้นักวิชาการเผยแพร่ผลงานวิจัยนวัตกรรมและเทคโนโลยีด้านอารักขาพืชสู่สาธารณะ	
เจ้าของที่อยู่	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 50 ถนนพหลโยธิน จตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900	
โทรศัพท์	0 - 2579 - 5583	อีเมล j.ofplantprotect@gmail.com
เว็บไซต์	https://www.doa.go.th/plprotect/?page_id=14053	



วารสาร

วิจัยและพัฒนาอารักขาพืช

JOURNAL OF PLANT PROTECTION RESEARCH AND DEVELOPMENT

ปีที่ 1 ฉบับที่ 1 กรกฎาคม - กันยายน 2568
Volume 1 No. 1 July - September 2025



วารสารวิจัยและพัฒนาอารักขาพืชตีพิมพ์เผยแพร่ความรู้และผลงานวิจัยด้านอารักขาพืชเผยแพร่ในรูปแบบออนไลน์มีกำหนดออกปีละ 1 ฉบับ ประกอบด้วย ผลงานวิจัย (Research papers) กำหนดปีละไม่ต่ำกว่า 5 เรื่อง และไม่เกิน 12 เรื่องต่อปี บทความ (Articles) กำหนดปีละไม่เกิน 4 เรื่องต่อปี โดยผลงานวิจัยทุกเรื่องที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิจัยและพัฒนาอารักขาพืชได้ผ่านการพิจารณาจากกองบรรณาธิการซึ่งประกอบด้วยผู้ทรงคุณวุฒิ ผู้เชี่ยวชาญภายในหน่วยงานอย่างน้อย 2 ท่าน

สารบัญ

บทบรรณาธิการ

ผลงานวิจัย

- การจำแนกชนิดของเพลี้ยแป้ง สกุล *Planococcus* Ferris, 1950
(Hemiptera: Pseudococcidae) ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุล 1
ชมัยพร บัวมาศ ยุวรินทร์ บุญทบ จารุวัฒน์ แต้กุล สุนัดดา เชาวลิต
- การตรวจวินิจฉัยแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจด้วยเทคนิค Duplex และ Multiplex PCR เพื่อสนับสนุนการส่งออกสินค้าเกษตร 15
ยุวรินทร์ บุญทบ ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล ณัฐมน แก้วนัย ชุตติกาญจน์ ใจแล
- พัฒนาเทคนิค Polymerase Chain Reaction เพื่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อรา *Trichoderma asperellum* 30
ชนินทร์ ดวงสอาด มะโนรัตน์ สุดสงวน วันวิสาข์ เพ็ชรอำไพ สุณิรัตน์ สัมมะเตื้อ อมรรักษ์ คัดใจเดียว
สุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง
- การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากและทางผิวหนังของชีวภัณฑ์ป้องกันกำจัดโรคพืช *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 ในหนูแรท 42
ทศดาว เกตุเนตร วิชาญ วรธนะไกวล์ สมเกียรติ กล้าแข็ง ศุภกร วงษ์เรืองพิบูล
- ชนิดของแบคทีเรีย *Xanthomonas* สาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศและพริกในประเทศไทย 57
ทิพวรรณ กันหาญาติ ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล วันเพ็ญ ศรีชาติ บุณย์ พัวพงษ์แพทย์ รุ่งนภา ทองเครื่อง กาญจนา ศรีไม้
- ความสามารถสร้างและการทำลายด้วยความร้อนในหัวของผักแว่นดอกชมพู (*Oxalis latifolia* Kunth) 73
อณศยา พรหมมา วัชรระ สังข์ทอง ธัญชนก ศรีเมือง นิชากรณ์ ใจดี
- ประเมินความต้านทานต่อสารกำจัดแมลงในด้วงหมัดผักแถบลาย, *Phyllotreta sinuata* Stephens ที่ทำลายพืชผักตระกูลกะหล่ำ 84
ฐิติธิดา ไชยชนะ กรกฏ รัตนมหาณีกร จิราพัชร ทะสี ศรีจันทร์จรัส ศรีจันทร์

บทความ

- โรคเหี่ยวกล้วยหินและการจัดการแบบบูรณาการ 101
ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล ชลธิชา รักใคร่ ทิพวรรณ กันหาญาติ รุ่งนภา ทองเครื่อง
- กักกันพืชกับการกักด่านอารักขาพืชระหว่างประเทศ 109
อลงกต โพธิ์ดี วาสนา ฤทธิไธสง

บทบรรณาธิการ

วารสาร **วิจัยและพัฒนาอารักขาพืช** เป็นวารสารวิชาการที่มีบทบาทสำคัญในฐานะสื่อกลางสำหรับการเผยแพร่ผลงานวิจัย ข้อมูลทางวิชาการ และองค์ความรู้ด้านการอารักขาพืชของประเทศไทย ครอบคลุมทั้งด้านกีฏวิทยา โรคพืช การกักกันพืช วัชพืชและการบริหารจัดการศัตรูพืช โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อส่งเสริมการพัฒน่องค์ความรู้เชิงลึกที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปฏิบัติงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน แม้วารสารจะหยุดการจัดพิมพ์ไปเกือบสองทศวรรษ (17 ปี) เนื่องจากข้อจำกัดด้านงบประมาณ แต่ด้วยความสำคัญของการแลกเปลี่ยนข้อมูลวิชาการและการเผยแพร่ผลงาน สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จึงได้ฟื้นฟูวารสารขึ้นอีกครั้งในรูปแบบออนไลน์ เพื่อให้เข้าถึงผู้อ่านได้อย่างสะดวก รวดเร็ว และครอบคลุมสอดคล้องกับการสื่อสารทางวิชาการในยุคดิจิทัลที่ไร้พรมแดน

ในฉบับนี้ได้นำเสนอผลงานวิจัยที่มีความหลากหลายและคุณค่าทางวิชาการสูง เริ่มจากด้านกีฏและสัตววิทยา อาทิ การจำแนกชนิดเพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus* โดยใช้ทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคชีวโมเลกุล การพัฒนาเทคนิค Duplex และ Multiplex PCR เพื่อการตรวจวินิจฉัยแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ รองรับมาตรฐานการส่งออกสินค้าเกษตรของประเทศและการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันทั้งทางปากและทางผิวหนังของชีวภัณฑ์ *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 ในสัตว์ทดลองเพื่อประเมินความปลอดภัยต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม ด้านโรคพืช มีการสำรวจและจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xanthomonas* สาเหตุโรคใบจุดในมะเขือเทศและพริกในประเทศไทย เพื่อสนับสนุนการวินิจฉัยโรคที่แม่นยำและรวดเร็ว ตลอดจนการพัฒนาเทคนิค Polymerase Chain Reaction สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อรา *Trichoderma asperellum* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี ด้านวัชพืช มีการศึกษานิเวศวิทยาของ *Oxalis latifolia* เพื่อใช้ประกอบการจัดการแบบผสมผสาน โดยมีเป้าหมายฟื้นฟูความหลากหลายทางชีวภาพในระบบนิเวศการเกษตรและสิ่งแวดล้อม ซึ่งสอดคล้องกับแนวทางเกษตรยั่งยืน ในส่วนของการบริหารจัดการศัตรูพืช มีการประเมินความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงในด้วงหมัดผักซึ่งเป็นศัตรูสำคัญของพืชตระกูลกะหล่ำในพื้นที่ภาคเหนือเพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการวางแผนและกำหนดมาตรการควบคุมศัตรูพืชอย่างเหมาะสมและยั่งยืน

นอกจากนี้ วารสารยังนำเสนอบทความวิชาการที่ให้ภาพรวมองค์ความรู้ด้านอารักขาพืช ทั้งในมิติของโรคพืชและการจัดการแบบบูรณาการ รวมถึงบทความว่าด้วยความร่วมมือด้านอารักขาพืชระหว่างประเทศ ซึ่งตอกย้ำความสำคัญของการทำงานร่วมกันในระดับภูมิภาคและระดับโลกเพื่อป้องกันและควบคุมศัตรูพืชตามมาตรฐานสากล

ในนามของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ข้าพเจ้าขอขอบคุณคณะกรรมการวารสาร ผู้ทรงคุณวุฒิ นักวิจัย ผู้เขียนบทความ และเจ้าหน้าที่ทุกฝ่ายที่มีส่วนร่วมในการจัดทำวารสารฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วง และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวารสาร **วิจัยและพัฒนาอารักขาพืช** ฉบับนี้ จะเป็นแหล่งข้อมูลวิชาการที่ทรงคุณค่า สนับสนุนการทำงานด้านการอารักขาพืชของประเทศไทย และมีส่วนสำคัญในการขับเคลื่อนภาคการเกษตรไทยสู่ความมั่นคงและยั่งยืน

ด้วยความเคารพอย่างสูง



(นางช่อทิพย์ คัลยพงษ์)

ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
กรมวิชาการเกษตร

การจำแนกชนิดของเพลี้ยแป้ง สกุล *Planococcus* Ferris, 1950 (Hemiptera: Pseudococcidae)

ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุล

Species Identification of Mealybug Genus *Planococcus* Ferris, 1950 based on
Morphological Character and Molecular Techniques

ชัมัยพร บัวมาศ^{1/} ยูวรินทร์ บุญทบ^{1/} จารุวัตร แท้กุล^{1/} สุนัดดา เชาวลิต^{1/}

Chamaiporn Buamas^{1/} Yuvarin Boontop^{1/} Charuwat Taekul^{1/} Sunadda Chaovalit^{1/}

ABSTRACT

Mealybugs in the genus *Planococcus* Ferris, 1950, belonging to the family Pseudococcidae, are sucking insects capable of causing significant damage to a wide range of host plants. These insects are small in size, and many species exhibit similar morphological characteristics, making accurate species identification difficult. This study, conducted between 2022 and 2023, aimed to identify *Planococcus* species and their host plants in the Central, Northern, Northeastern, Eastern, Western, and Southern regions of Thailand using both morphological and molecular approaches. Specimens were collected from various agricultural crops and prepared as permanent slides for morphological identification. DNA was also extracted and amplified using primers targeting the cytochrome c oxidase subunit I (Cox1) gene. The obtained nucleotide sequences were compared with reference sequences from the GenBank database to confirm species identity. As a result, three *Planococcus* species were identified: *Planococcus lilacinus* (Cockerell, 1905), *Planococcus minor* (Maskell, 1897), and *Planococcus citri* (Risso, 1813). This study provides useful reference data and contributes to the development of clearer, more accurate, and standardized methods for the identification of *Planococcus* species in Thailand.

Keywords: mealybug, DNA barcoding, *Planococcus*

^{1/} กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 19000. Thailand

* Corresponding author: c.buamas@gmail.com

บทคัดย่อ

เพลี้ยแป้ง สกุล *Planococcus* Ferris, 1950 ในวงศ์ Pseudococcidae เป็นแมลงปากดูดที่สามารถสร้างความเสียหายให้กับพืชได้หลากหลายชนิด มีขนาดลำตัวเล็กและบางชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน ทำให้การจำแนกชนิดที่ถูกต้องทำได้ยาก การจำแนกชนิดของเพลี้ยแป้ง สกุล *Planococcus* Ferris, 1950 ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุล ดำเนินการระหว่าง ปี พ.ศ. 2565 - 2566 เพื่อทราบชนิดและพืชอาศัย ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ของประเทศไทย ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้ง จากแหล่งปลูกพืชต่าง ๆ นำมาทำสไลด์ถาวรเพื่อใช้จำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณจากส่วนของยีน cytochrome c oxidase subunit 1 (Cox1) มาใช้ในการยืนยันชนิดของเพลี้ยแป้ง เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานในฐานข้อมูล GenBank สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยแป้ง สกุล *Planococcus* ได้จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Planococcus lilacinus* (Cockerell, 1905) *Planococcus minor* (Maskell, 1897) และ *Planococcus citri* (Risso, 1813) ซึ่งทำให้การศึกษาในครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางและข้อมูลสนับสนุนในการจำแนกชนิดของเพลี้ยแป้ง ให้มีความชัดเจน มีความถูกต้องแม่นยำและเป็นมาตรฐานมากขึ้น

คำสำคัญ: เพลี้ยแป้ง ดีเอ็นเอบาร์โค้ด *Planococcus*

บทนำ

เพลี้ยแป้ง (mealybug) สกุล *Planococcus* Ferris, 1950 วงศ์ Pseudococcidae พบเข้าทำลายพืชต่าง ๆ ได้หลากหลาย เช่น พืชผัก ไม้ดอก ไม้ผล และพืชไร่ ทั่วโลกพบรายงานแล้ว 48 ชนิด สำหรับในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีรายงานแล้ว 15 ชนิด (García et al., 2016) ส่วนในประเทศไทยนั้น พบเพลี้ยแป้งสกุลนี้ จำนวน 2 ชนิด คือ *Planococcus lilacinus* (Cockerell) พบลงทำลายใน เงาะ ทุเรียน น้อยหน่า และสละ เป็นต้น และ *Planococcus minor* (Maskell) พบลงทำลายใน ทุเรียน กล้วยน้ำว้า น้อยหน่า เงาะ ลางสาด งอนไก่ มันฝรั่ง และมะม่วงหิมพานต์ (บุปผาและชลิตา, 2543) นอกจากนี้ Williams (2004) ได้รายงานไว้ว่า ประเทศไทยพบเพลี้ยแป้งชนิด *Planococcus citri* (Risso) ซึ่งเพลี้ยแป้งในสกุลนี้มีความคล้ายคลึงด้านสัณฐานวิทยาเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะชนิด *P. minor* และ *P. citri* เนื่องจากพืชอาศัยที่พบเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ความถูกต้องแม่นยำในการจำแนกชนิดจึงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะสำหรับผู้ที่ไม่มีความเชี่ยวชาญด้านอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้ง ถือเป็นสิ่งที่ยาก และหากตัวอย่างที่มีไม่สมบูรณ์ก็ทำให้การจำแนกชนิดนั้นเป็นไปได้ยาก ซึ่งในปัจจุบันมีเทคนิคด้านชีวโมเลกุลที่ถือเป็นเครื่องมือสำคัญ หากสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกชนิดให้มีความถูกต้องแม่นยำ ยอมรับในระดับสากล และยังสามารถพัฒนาต่อยอดสู่การวิจัยเพื่อพัฒนาการตรวจสอบให้รวดเร็ว ทันต่อสถานการณ์ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบศัตรูพืชในการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตรของไทย รวมทั้งการวางแผนในการป้องกันกำจัดที่ถูกต้องเหมาะสมในอนาคตต่อไปได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus*

เก็บรวบรวมตัวอย่างจากแหล่งปลูกพืชที่สำคัญตามภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วประเทศ เมื่อพบเพลี้ยแป้งให้ตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยแป้งอาศัยอยู่ใส่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วใส่ในถุงพลาสติก บันทึกข้อมูลรายละเอียด นำตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) ในห้องปฏิบัติการ บันทึกภาพถ่าย รายละเอียดที่เกี่ยวข้อง คัดเลือกตัวเต็มวัยเพศเมียหรือระยะอ่อนวัยที่ 3 ซึ่งมีวัยยะต่าง ๆ สมบูรณ์ ทำการดองตัวอย่างในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20°C. เพื่อดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

2. การจำแนกชนิดเพลี้ยแป้ง สกุล *Planococcus* ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เพลี้ยแป้งที่ดองในแอลกอฮอล์ 95% จากข้อ 1 นำเพลี้ยแป้งทั้งตัวใส่ในหลอดขนาด 1.5 mL แล้วดำเนินการสกัดด้วยชุดน้ำยาสกัด ISOLATE II Genomic DNA Kit (Bioline, Australia) เติม Lysis buffer GL 180 µL และ Proteinase K 25 µL เขย่าให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 62°C. นาน 20 - 24 ชม. จากนั้นเติม Lysis buffer G3 ปริมาตร 200 µL เขย่าให้เข้ากัน และบ่มต่อที่ 70°C. นาน 10 นาที นำไคติน (chitin) ของเพลี้ยแป้งออกมาดองในแอลกอฮอล์ 70% เพื่อนำไปทำสไลด์ถาวร และนำของเหลวในหลอดเติม absolute ethanol ปริมาตร 210 µL เขย่าให้เข้ากัน และนำไปใส่ในคอลัมน์กรองก่อนปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 g นาน 1 นาที ล้างคอลัมน์ด้วย Wash buffer GW1 ปริมาตร 500 µL และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 g นาน 1 นาที เทส่วนที่กรองได้ทิ้ง และล้างคอลัมน์ซ้ำด้วย Wash buffer GW2 ปริมาตร 600 µL ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 g นาน 1 นาที และปั่นซ้ำอีกครั้งโดยไม่เติมสารละลาย เพื่อกำจัด ethanol ที่ตกค้างต่อมาย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดใหม่ และชะล้างดีเอ็นเอด้วยการเติม Elution buffer G ที่อุณหภูมิ 70°C.

ปริมาณ 50 µL บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 g นาน 10 นาที ทำการเพิ่มปริมาณยีน mtCOI ด้วยวิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์สากลของเพลี้ยแป้ง mealybug universal primer) PcoF1-5' CCTTCAACTAATCATAAAAATATYAG 3' และ LepR1 5' TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA 3' (Park et al., 2010; Park et al., 2011) ในการเพิ่มปริมาณ DNA สังเคราะห์ยีน mtCOI ของเพลี้ยแป้งจากดีเอ็นเอที่เตรียมได้ โดยใช้ส่วนผสมของ MyTaq HS Red DNA Polymerase (Bioline, Cat No. BIO-21114) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 µL ประกอบไปด้วย Nuclease free water จำนวน 10.5 µL 5x MyTaq Red Reaction Buffer จำนวน 4 µL 10 µM CP-F จำนวน 1 µL 10 µM CP-R จำนวน 1 µL MyTaq HS DNA Polymerase จำนวน 0.5 µL DNA template จำนวน 3 µL รวมทั้งสิ้น 20 µL ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) ทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์โดย Predenaturation 95°C. 5 นาที Denaturation 95°C. 1 นาที Annealing 50°C. 1 นาที Extension 72°C. 2 นาที และ Final extension 72°C. 10 นาที และนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธีการอิเล็กโทรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1.5% และให้ PCR product เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย TBE (Tris-borate, EDTA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ส่ง PCR product เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ มาทำการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus* ที่นำมาศึกษาทั้งหมด (sequence assembly) เพื่อให้ได้ DNA barcoding ที่มีความถูกต้อง โดยโปรแกรมที่ Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และบันทึกข้อมูลในรูปแบบ FASTA ไฟล์ ในการศึกษาจะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืช และดีเอ็นเอที่สกัดได้จัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C. ณ พิพิธภัณฑ์แมลง

กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการ-
อารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

3. การจำแนกชนิดเพี้ยแป้ง สกุล *Planococcus* ด้วยสัณฐานวิทยา

นำไคตินที่ได้จากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ
จากข้อ 2 ไปทำสไลด์ถาวรโดยดัดแปลงจากวิธีการ
ของ Williams and Watson (1988) นำตัวอย่าง
สไลด์ที่ทำเสร็จเรียบร้อยแล้วไปอบให้แห้งในตู้อบ
ที่อุณหภูมิ 50°ซ. ใช้เวลาอย่างน้อย 2 เดือน ตรวจ
จำแนกชนิดเพี้ยแป้งบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (compound
microscope) ที่มีกำลังขยายสูง โดยใช้แนวทางการ
วินิจฉัยของ Cox (1989) Williams and Watson (1988)
Williams and Granara de Willink (1992) และ
Williams (2004) รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่าง
สไลด์เพี้ยแป้งที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง ของ
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
โดยเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่าง ๆ
ได้แก่ จำนวนปล้องหนวด (antennae) รูปร่างขน
(setae) เช่น ขนรูปกรวย (conical setae) ขนอ่อน
ขนาดเล็ก (auxiliary setae) ขนแข็งยาว (flagellate
setae) รูปแบบของรู (pores) เช่น รูกลมแบบ
หลายช่อง (multilocular dis pores) รูสามเหลี่ยม
(trilocular pores) รูโปร่งแสง (translucent pores)
รูกลม (discoidal pores) รูปแบบของท่อ (tubular
ducts) เช่น ท่อแผ่นแข็ง (oral collar tubular duct)
ท่อขอบแข็ง (oral rim tubular duct) จำนวนกลุ่ม
อวัยวะผลิตเส้นแบ่งด้านข้างลำตัว (cerarii) รูปร่าง
ของช่องเปิด (ostioles) ลักษณะวงแหวนปลายส่วน
ท้อง (anal ring) แถบปลายส่วนท้อง (anal bar)
ลักษณะของลอนปลายส่วนท้อง (anal lobes)
จากนั้นจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพี้ยแป้ง สกุล
Planococcus และจัดเก็บสไลด์ในกล่องใส่สไลด์ นำ
เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่
ตามหลักสากล และจัดทำหมายเลขของตัวอย่างแต่ละ
สไลด์เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการอ้างอิงทาง
วิทยาศาสตร์ต่อไป

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เก็บรวบรวมตัวอย่างเพี้ยแป้งสกุล
Planococcus จากแหล่งปลูกพืชที่สำคัญ (Figure 1)
ในเขตพื้นที่ภาคกลาง เช่น จังหวัดสระบุรี ชัยนาท
อุทัยธานี และกรุงเทพมหานคร ภาคเหนือ เช่น
จังหวัดเชียงใหม่ และลำปาง ภาคตะวันออกเฉียง
เหนือ เช่น จังหวัดนครราชสีมา หนองคาย และ
มหาสารคาม ภาคตะวันออก เช่น ชลบุรี และจันทบุรี
ภาคตะวันตก เช่น ตาก และเพชรบุรี ภาคใต้ เช่น
ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี เก็บ
รวบรวมตัวอย่างได้ทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง ดองใน
แอลกอฮอล์ 95% เก็บตัวอย่างที่ได้ในตู้เก็บรักษา
อุณหภูมิ -20°ซ.

จำแนกชนิดเพี้ยแป้งใน สกุล *Planococcus* ด้วยสัณฐานวิทยา

นำไคตินของเพี้ยแป้งที่ผ่านขั้นตอนการสกัด
ดีเอ็นเอมาทำสไลด์ถาวรเพื่อใช้จำแนกชนิด โดย
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญของเพี้ยแป้ง
สกุล *Planococcus* (Figure 2) มีรายละเอียดดังนี้

ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างกลมหรือรูปไข่
ส่วนใหญ่มีหนวด 8 ปล้อง ขาเจริญเติบโตดีมักพบ
รูโปร่งแสง (translucent pores) บนปล้องโคนขา
(coxa) หรือ หน้าแข้ง (tibia) ของขาคู่หลัง (hind leg)
ผิวหน้าเล็บเรียบ (claw) อวัยวะผลิตเส้นแบ่งด้านข้าง
ลำตัว (cerarii) จำนวน 18 คู่ หรือ 36 อัน แต่ละอัน
ประกอบด้วยขนรูปกรวย (conical setae) จำนวน
2 อัน รูสามเหลี่ยม (trilocular pores) กระจายบน
ผนังลำตัวอย่างสม่ำเสมอ ท่อแผ่นแข็ง (oral collar
tubular duct) มักพบบนผนังลำตัวด้านล่าง (venter)
โดยเฉพาะบริเวณส่วนท้อง อาจพบบ้างบริเวณส่วนหัว
และส่วนอก รูกลมแบบหลายช่อง (multilocular dis
pores) มีแถบปลายส่วนท้อง (anal bar) มักพบ
บริเวณส่วนท้องของผนังลำตัวด้านล่าง (venter)
แต่พบได้น้อยบนผนังลำตัวด้านบน (dorsum)

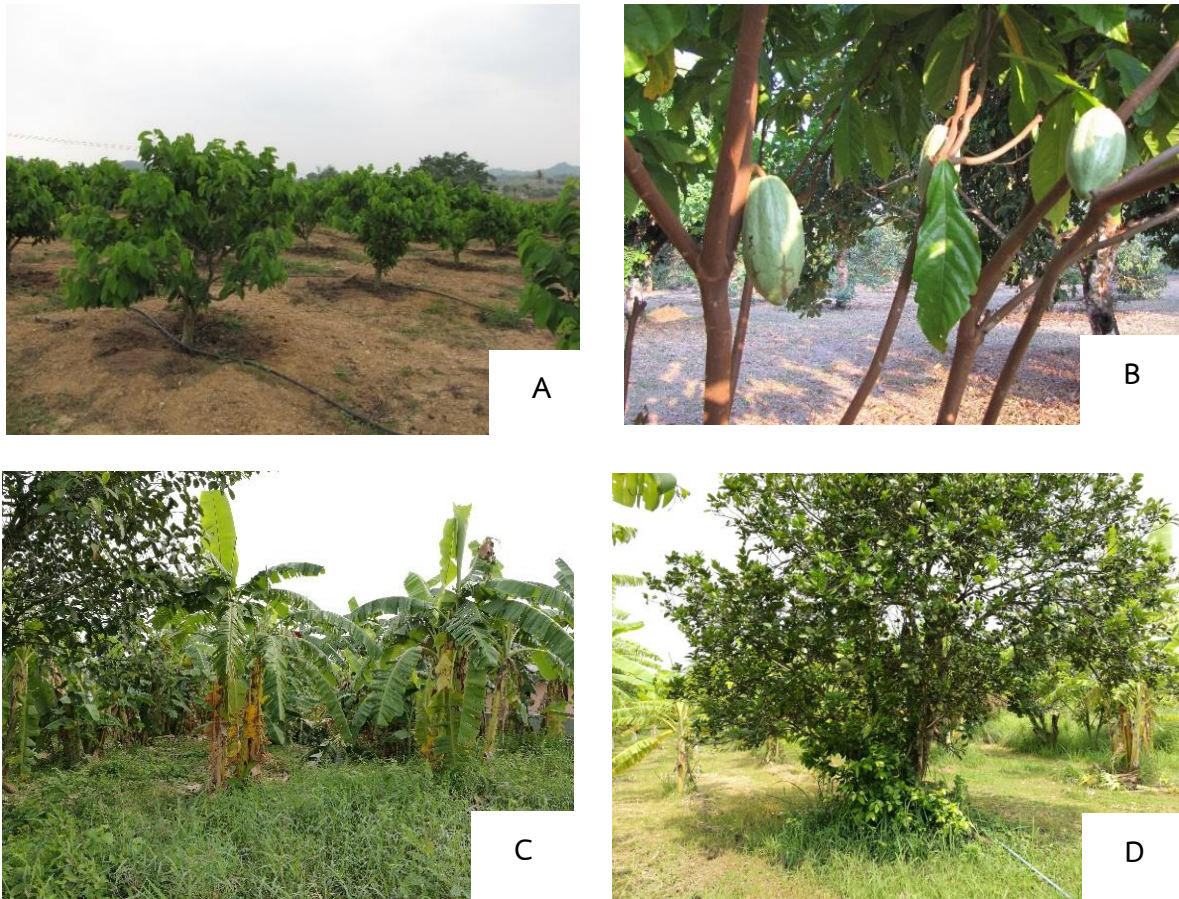


Figure 1 Field survey of mealybug in various agricultural areas in Thailand.

- A. Sugar apple orchard
- B. Cacao orchard
- C. Banana orchard
- D. Integrated Farming

จากสไลด์ถาวรสามารถจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ 3 ชนิด ดังนี้

1. *Planococcus lilacinus* (Cockerell, 1905)
2. *Planococcus minor* (Maskell, 1897) และ
3. *Planococcus citri* (Risso, 1813) ซึ่งจากรายงานของ บุพผาและชลิดา (2543) มีเพียง 2 ชนิดเท่านั้น แต่จากการศึกษาครั้งนี้ พบเพลี้ยแป้งเพิ่ม 1 ชนิด ได้แก่ *P. citri* อย่างไรก็ตามการพบเพลี้ยแป้ง *P. citri* สอดคล้องกับ Williams (2004) ที่รายงานไว้ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ เพลี้ยแป้ง *P. citri* ค่อนข้างพบได้น้อย มีพืชอาหารเพียง 2 ชนิดเท่านั้น

รายละเอียดและลักษณะที่สำคัญของเพลี้ยแป้งแต่ละชนิด

1. *Planococcus citri* (Risso, 1813)

เพลี้ยแป้งส้ม (citrus mealybug)

ลักษณะในธรรมชาติ (Figure 3)

ตัวเต็มวัยเพศเมีย รูปไข่ ลำตัวยาวประมาณ 3.0 - 3.3 มม. กว้าง 2.1 - 2.3 มม. หนวด 8 ปล้อง ผนังลำตัวสีน้ำตาลอมชมพูหรือสีส้ม ปกคลุมด้วยไข แป้งสีขาว ยกเว้นบริเวณกึ่งกลางตามยาวของลำตัว จึงสามารถมองเห็นเป็นแถบสีน้ำตาลแคบ ๆ รอบลำตัวมีเส้นแป้ง จำนวน 36 เส้น หรือ 18 คู่ เส้นแป้ง

ที่อยู่ด้านท้ายลำตัวมีความยาวมากกว่าเส้นแบ่งที่อยู่ด้านข้างเล็กน้อย มีขา 3 คู่

ระยะตัวอ่อน รูปร่าง ลำตัวยาวประมาณ 1.1 - 2.8 มม. หนวดมี 6 - 8 ปล้อง ผนังลำตัวสีน้ำตาลชมพูหรือสีส้ม ปกคลุมด้วยไขแบ่งสีขาว เส้นแบ่งรอบลำตัวมีขนาดค่อนข้างสั้นและไม่ชัดเจน แต่ปรากฏเส้นแบ่งด้านท้ายลำตัวชัดเจน มีขา 3 คู่ ตัวอ่อนวัยที่ 1 เคลื่อนตัวได้รวดเร็วกว่าตัวอ่อนวัยอื่น ๆ

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน (Figure 4)

ตัวเต็มวัยเพศเมีย รูปร่าง ลำตัวยาวประมาณ 3.0 - 3.3 มม. กว้าง 2.2 - 2.5 มม. หนวด 8 ปล้อง

ขาเจริญเติบโตดี มีรูกลมแบบหลายช่องบนผนังลำตัวด้านล่าง โดยปกติมักพบบริเวณท้องปล้องที่ 4 มีต่อแผ่นแข็งมากกว่า 5 ท่ออยู่ระหว่างหนวด 2 ข้าง ปล้องโคนขาคู่กลางมีต่อแผ่นแข็งจำนวน 6 ท่อหรือมากกว่า มีรูโปร่งแสงบริเวณโคนขาและหน้าแข้งมีต่อลักษณะคล้ายท่อขอบแข็ง จำนวน 1 รูหรือมากกว่า กลุ่มอวัยวะผลิตเส้นแบ่งด้านข้างลำตัว 18 คู่ หรือ 36 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีเส้นขนรูปกรวย จำนวน 2 เส้นหรือมากกว่าโดยเฉพาะบริเวณส่วนหัว และมีแถบปลายส่วนท้อง

พืชอาหาร โกโก้ และพจนมสวรรค์



Figure 2 Slide - mounted adult female of the genus *Planococcus*, showing key morphological characters used for species identification.

Key to species of genus *Planococcus*

1. Multilocular disc pore present on venter in medial area of abdomen, usually in single to double rows across abdominal segment IV and posterior segment.
.....*P. lilacinus* (Cockerell)
- Multilocular disc pore present on venter in row across abdominal segment IV and posterior segment or around vulva.....2
2. Venter of head with 6 oral collar tubular ducts or more than between antennae
.....*P. citri* (Risso)
- Venter of head with less than 5 oral collar tubular ducts or more than between antennae *P. minor* (Maskell)



Figure 3 Field observation of *Planococcus citri* (Risso, 1813), showing adults, immature stages, and ovisacs on *Clerodendrum* sp.

2. *Planococcus lilacinus* (Cockerell, 1905) เพลี้ยแป้งกาแฟ (coffee mealybug)

ลักษณะในธรรมชาติ (Figure 5)

ตัวเต็มวัยเพศเมีย รูปไข่หรือค่อนข้างกลม ลำตัวยาวประมาณ 2.6 - 3.1 มม. กว้าง 2.1 - 2.5 มม. หนวดมี 8 ปล้อง ผนังลำตัวสีน้ำตาลปกคลุมด้วยไข แป้งสีขาว ยกเว้นบริเวณกึ่งกลางตามยาวของลำตัวจึงสามารถมองเห็นเป็นแถบสีน้ำตาลค่อนข้างกว้างและชัดเจน รอบลำตัวมีเส้นแป้งสั้น ๆ จำนวน 36 เส้น หรือ 18 คู่ เส้นแป้งที่อยู่ด้านท้ายลำตัวมีความยาวมากกว่าเส้นแป้งที่อยู่ด้านข้างเล็กน้อย มีขา 3 คู่

ระยะตัวอ่อน รูปไข่ ลำตัวยาวประมาณ 1.0 - 2.5 มม. หนวดมี 6 - 8 ปล้อง ผนังลำตัวสีน้ำตาลอ่อนหรือสีส้ม ปกคลุมด้วยไขแป้งสีขาว เส้นแป้งรอบลำตัวมีขนาดค่อนข้างสั้นและไม่ชัดเจน แต่ปรากฏเส้นแป้งด้านท้ายลำตัวชัดเจน มีขา 3 คู่ ตัวอ่อนวัยที่ 1 เคลื่อนตัวได้รวดเร็วกว่าตัวอ่อนวัยอื่น ๆ

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน (Figure 6)

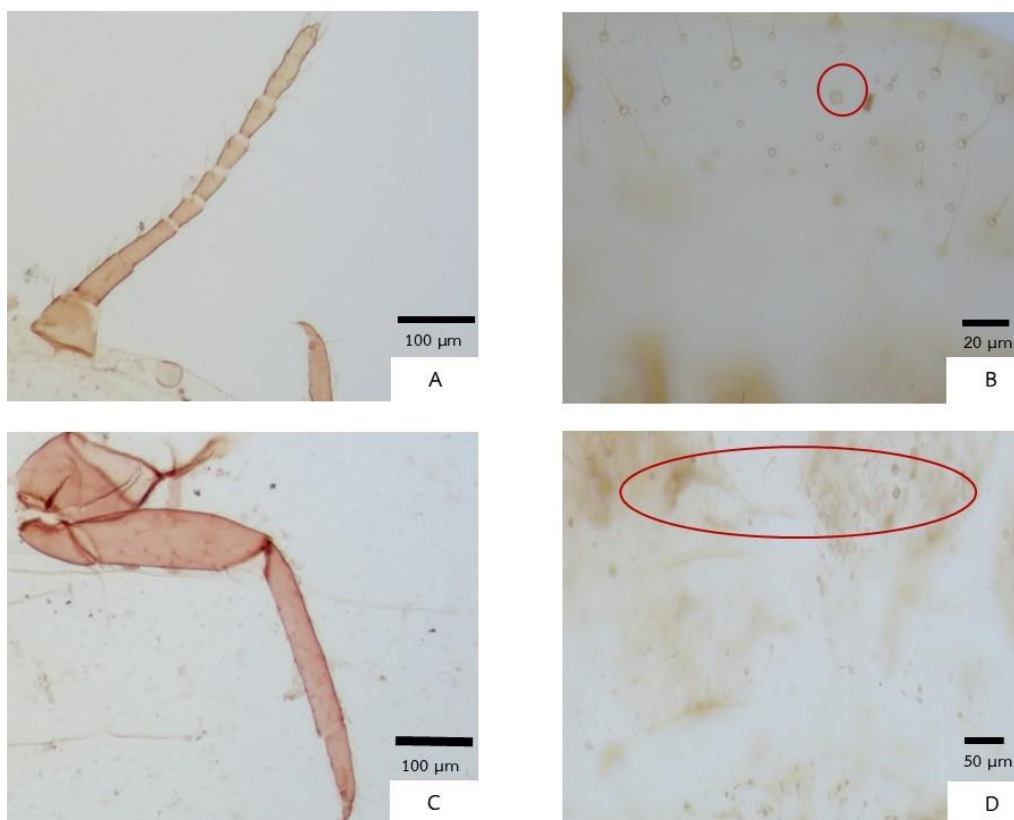


Figure 4 Microscopic view of *Planococcus citri* (Risso, 1813), showing key morphological characters.

A. Antenna.

B. Oral rim tubular ducts located between the antennae.

C. Translucent pores on the coxa and tibia of the hind leg.

D. Multilocular disc pores on abdominal segment VI.

ตัวเต็มวัยเพศเมีย รูปไข่ ลำตัวยาวประมาณ 2.6 - 3.1 มม. กว้าง 2.2 - 2.6 มม. หนวด 8 ปล้อง มีขนแข็งค่อนข้างยาวบนผนังลำตัวด้านบน ขาแข็งแรง ส่วนท้องของขาคู่หลังมีความยาวมากกว่าความกว้าง ประมาณ 2.1 - 2.8 เท่า มีรูโปร่งแสงบริเวณโคนขา และหน้าแข้ง มีรูกลมแบบหลายช่องบนด้านล่างของ ลำตัวบริเวณส่วนกลางของท้อง โดยปกติมักมี 1 แถว หรือ 2 แถว บริเวณท้องปล้องที่ 4 พบขนแข็งยาว บริเวณผนังลำตัวด้านบน มีท่อแผ่นแข็งระหว่างหนวด 2 ข้าง ปล้องโคนขาคู่กลางมีท่อแผ่นแข็ง มีท่อลักษณะ คล้ายท่อขอบแข็ง กลุ่มอวัยวะผลิตเส้นแบ่งด้านข้าง ลำตัว 18 คู่ หรือ 36 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีเส้นขนรูป กรวยจำนวน 2 เส้น โดยเฉพาะบริเวณส่วนหัวอาจ เป็นขนแข็งยาว และแถบปลายส่วนท้อง

พืชอาหาร ลำไย มังคุด น้อยหน่า ทุเรียน กล้วย ลองกอง และไทรประดับ

3. *Planococcus minor* (Maskell, 1981)

เพลี้ยแป้งแปซิฟิก/เพลี้ยแป้งเสาวรส (Pacific mealybug/passion fruit mealybug)

ลักษณะในธรรมชาติ (Figure 7)

ตัวเต็มวัยเพศเมีย รูปไข่ ลำตัวยาวประมาณ 3.0 - 3.3 มม. กว้าง 2.1 - 2.3 มม. หนวดมี 8 ปล้อง ผนังลำตัวสีน้ำตาลอ่อนหรือสีส้ม ปกคลุมด้วยไขแบ่งสี ขาว ยกเว้นบริเวณกึ่งกลางตามยาวของลำตัวจึง สามารถมองเห็นเป็นแถบสีน้ำตาลแคบ ๆ รอบลำตัวมี เส้นแบ่ง จำนวน 36 เส้น หรือ 18 คู่ เส้นแบ่งที่อยู่

ด้านท้ายลำตัวมีความยาวมากกว่าเส้นแบ่งที่อยู่ด้านข้างเล็กน้อย มีขา 3 คู่

ระยะตัวอ่อน รูปไข่ ลำตัวยาวประมาณ 1.1 - 2.8 มม. หนวดมี 6 - 8 ปล้อง ผนังลำตัวสีน้ำตาลอ่อนหรือสีส้ม ปกคลุมด้วยไขแบ่งสีขาว เส้นแบ่งรอบลำตัวมีขนาดค่อนข้างสั้นและไม่ชัดเจน แต่ปรากฏเส้นแบ่งด้านท้ายลำตัวชัดเจน มีขา 3 คู่ ตัวอ่อนวัยที่ 1 เคลื่อนตัวได้รวดเร็วกว่าตัวอ่อนวัยอื่น ๆ

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน (Figure 8)

ตัวเต็มวัยเพศเมีย รูปไข่ ลำตัวยาวประมาณ 3.0 - 3.3 มม. กว้าง 2.2 - 2.5 มม. หนวด

8 ปล้อง ขาเจริญเติบโตดี มีรูกลมแบบหลายช่องบนผนังลำตัวด้านล่าง โดยปกติมักพบบริเวณรอบอวัยวะสืบพันธุ์ ท่อแผ่นแข็งน้อยกว่า 5 ท่ออยู่ระหว่างหนวด 2 ข้าง ปล้องโคนขาคู่กลางมีท่อแผ่นแข็งน้อยกว่า 6 ท่อ มีรูโปร่งแสงบริเวณโคนขาและหน้าแข้ง มีท่อลักษณะคล้ายท่อขอบแข็ง จำนวน 1 รู หรือมากกว่า กลุ่มอวัยวะผลิตเส้นแบ่งด้านข้างลำตัว 18 คู่ หรือ 36 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมี เส้นขนรูปกรวยจำนวน 2 เส้น หรือมากกว่าโดยเฉพาะบริเวณส่วนหัว และมีแถบปลายส่วนท้อง

พืชอาหาร น้อยหน่า ทุเรียน กัลยาลีลาวดี และโกโก้



Figure 5 Field observation of *Planococcus lilacinus* (Cockerell, 1905).

- A. Adults and immature stages of *P. lilacinus* on *Ficus* sp. (twig).
- B. Adults and immature stages of *P. lilacinus* on sugar apple (*Annona squamosa*) (twig).

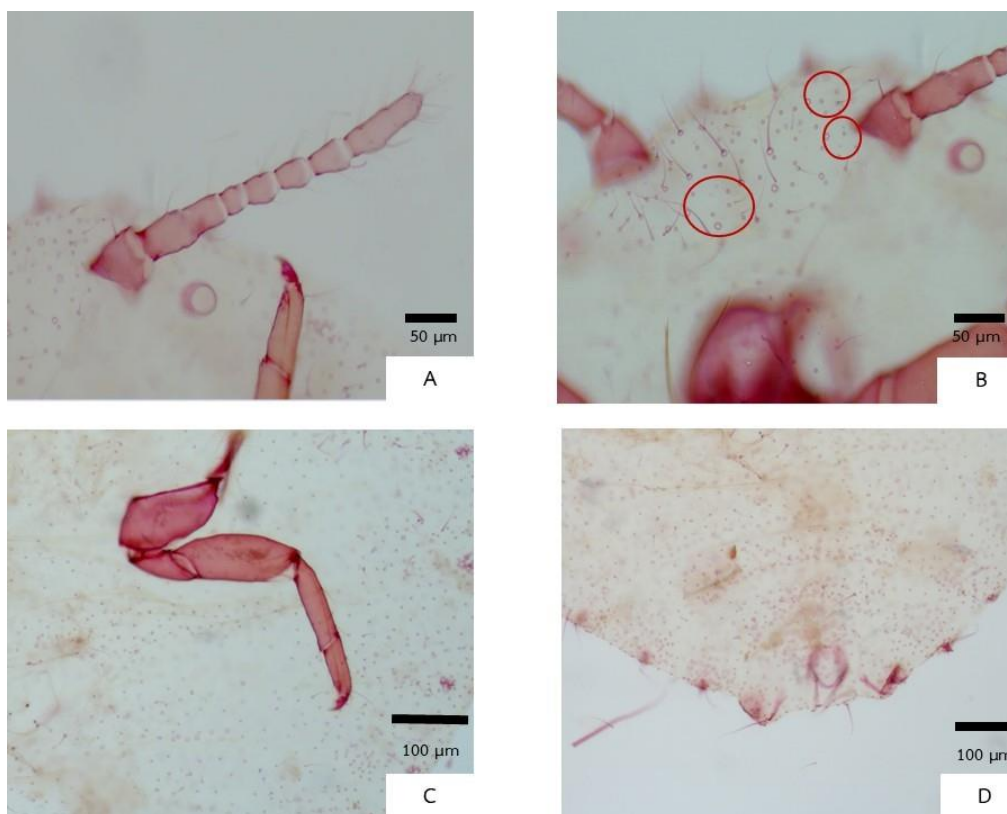


Figure 6 Microscopic view of *Planococcus lilacinus* (Cockerell, 1905), showing diagnostic morphological characters.

A. Antenna.

B. Oral rim tubular ducts located between the antennae.

C. Translucent pores on the coxa and tibia of the hind leg.

D. Multilocular disc pores on the ventral medial area of the abdomen.

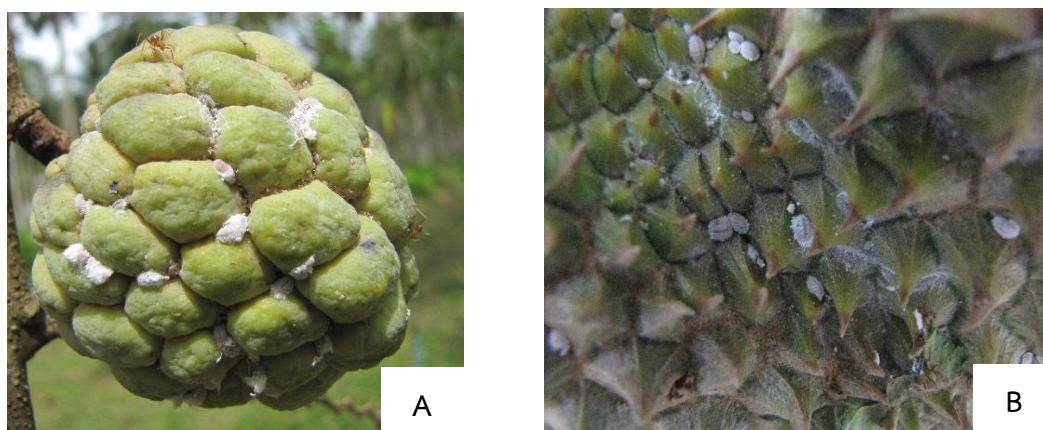


Figure 7 Field observation of *Planococcus minor* (Maskell, 1981)

A. Adults and immature stages of *P. minor* on sugar apple.

B. Adults and immature stages of *P. minor* on durian.

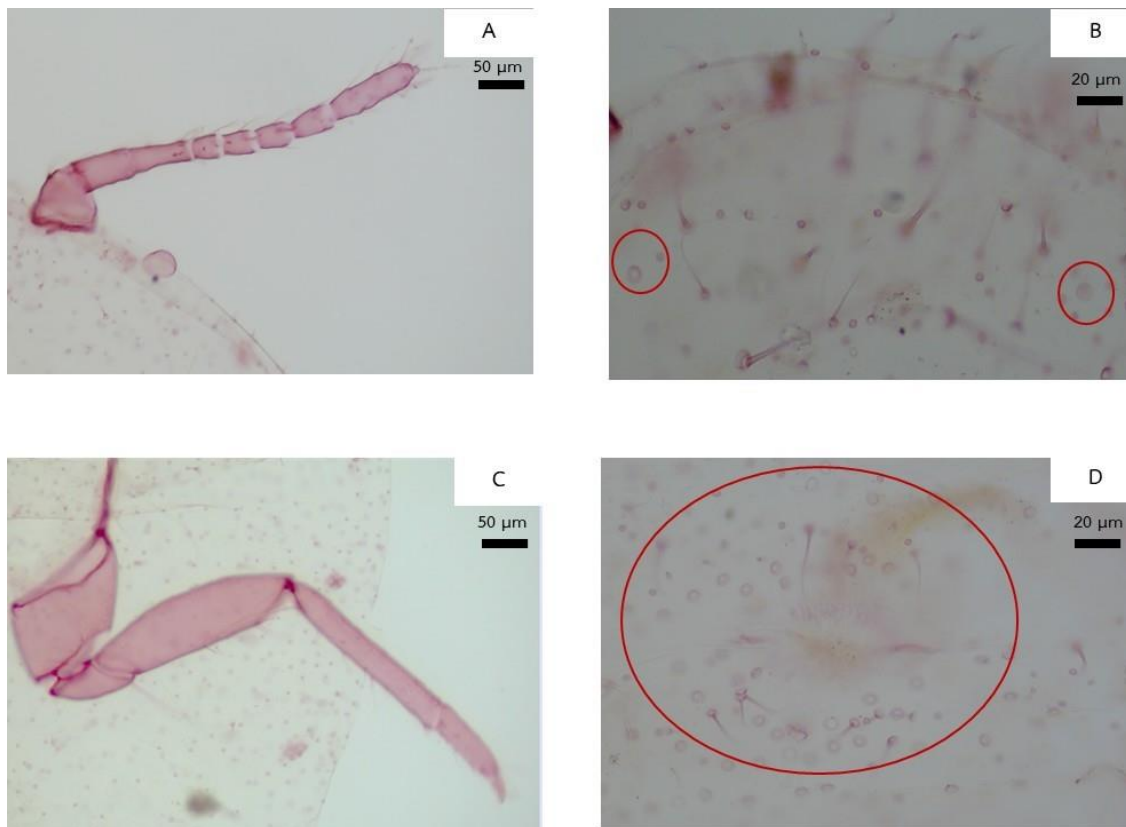


Figure 8 Microscope view of *Planococcus minor* (Maskell, 1981); morphological characters.

- A. Antennae.
- B. Oral rim tubular ducts between antennae.
- C. Translucent pores on coxa and tibia of hind leg.
- D. Multilocular disc pore around vulva.

อย่างไรก็ตามเนื่องจากเพลี้ยแป้ง *P. citri* กับ *P. minor* มีความคล้ายคลึงทางสัณฐานวิทยามาก และลักษณะที่ใช้ในการจำแนก คือจำนวนท่อแผ่นแข็ง ที่อยู่ระหว่างปล้องหมวด 2 ข้าง โดยหากมี 6 ท่อหรือมากกว่า เป็นเพลี้ยแป้ง *P. citri* และหากมีน้อยกว่า 5 เป็นลักษณะของ *P. minor* ซึ่งต้องอาศัยความชำนาญและประสบการณ์ของนักอนุกรมวิธานในการตรวจสอบ Cox (1989) จึงได้มีการประยุกต์ตารางการให้คะแนนตามลักษณะที่สำคัญ 6 อย่าง (Appendix 1) สำหรับการจำแนกความแตกต่างของเพลี้ยแป้งทั้ง 2 ชนิด หากนำคะแนนจากทั้ง 6 ลักษณะมารวมกัน โดยคะแนนที่ได้อยู่ระหว่าง 0 - 35 คะแนน เป็นเพลี้ยแป้ง *P. minor* และคะแนนรวมได้ 36 - 120 คะแนน เป็นเพลี้ยแป้ง *P. citri*

ซึ่งการให้คะแนนตาม Appendix 1 นั้น เมื่อนำมาทดสอบกับสไลด์เพลี้ยแป้ง พบว่าจำเป็นต้องอาศัยสไลด์ที่มีความชัดเจน และประสบการณ์ในการทำสไลด์ รวมทั้งความเชี่ยวชาญของนักอนุกรมวิธานในการดูลักษณะด้วยเช่นกัน

การจำแนกชนิดเพลี้ยแป้งใน สกุล *Planococcus* ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

จากการนำตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่รวบรวมได้จำนวน 60 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ PcoF1/ LepR1 จากยีน Cox1 ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ ได้ขนาด 650 - 700 คู่เบส (Figure 9) เมื่อนำผลลิตภัณฑ์ไปตรวจวิเคราะห์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Table 1) เปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank สามารถจำแนกเพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus* ได้จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ 1) *P. lilacinus* 2) *P. minor* และ 3) *P. citri* โดยมีความเหมือนที่ 98 - 100% ซึ่งแสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน *Cox1* นั้น มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Cox1* ของเพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus* ในแหล่งอื่น ๆ ที่มีการศึกษาและบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus* ของตัวอย่างที่พบในประเทศไทยเทียบกับแหล่งอื่นในฐานข้อมูล GenBank แสดงให้เห็นว่ากรรมวิธีการสกัดดีเอ็นเอมีความเหมาะสมและสามารถนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างเพลี้ยแป้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงสามารถใช้วิธีการสกัดดังกล่าวมาศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคดของเพลี้ยแป้งได้

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาค้างนี้เป็นการนำเทคนิคด้านชีวโมเลกุลเพื่อศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคดร่วมกับลักษณะ

ทางสัณฐานวิทยาเพื่อจำแนกชนิดของเพลี้ยแป้งสกุล *Planococcus* ซึ่งสามารถจำแนกได้ 3 ชนิด คือ *P. lilacinus* *P. minor* และ *P. citri* ผลที่ได้มีความสอดคล้องทั้งการใช้ดีเอ็นเอบาร์โคดและลักษณะทางสัณฐานวิทยา ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางและข้อมูลสนับสนุนในการจำแนกชนิดของเพลี้ยแป้งให้มีความชัดเจนมากขึ้น โดยเฉพาะนักวิจัยที่ไม่มีความเชี่ยวชาญด้านอนุกรมวิธานและหากสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการจัดจำแนกชนิดให้มีความถูกต้องแม่นยำ ยอมรับในระดับสากล และยังสามารถพัฒนาต่อยอดสู่การวิจัยเพื่อพัฒนาการตรวจสอบให้รวดเร็ว ทันต่อสถานการณ์ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบศัตรูพืชในการนำเข้าสินค้าเกษตรของไทย และการวางแผนในการป้องกันกำจัดที่ถูกต้องเหมาะสมในอนาคตต่อไปได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บและเตรียมตัวอย่างทั้งในภาคสนามและห้องปฏิบัติการ

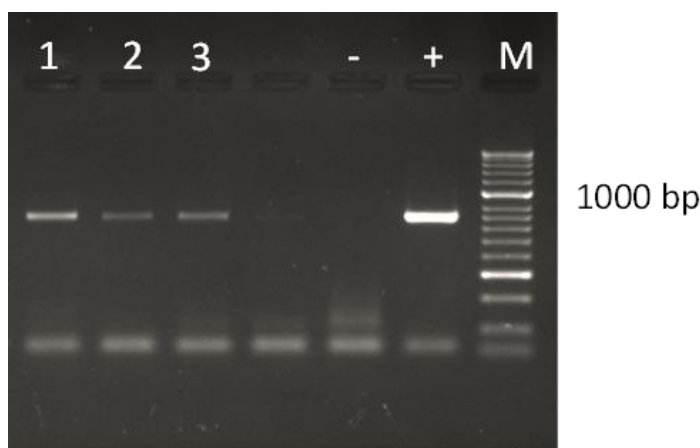


Figure 9 PCR amplification of *Planococcus* with PCoF/LepR1 (mealybug universal primer). M = 1 kb ladder, Lane 1 = *Planococcus lilacinus*, Lane 2 = *Planococcus citri*, Lane 3 = *Planococcus minor*, Negative control (-) was ddH₂O and Positive control (+) was *Dysmicoccus neobrevipes*.

Table 1 Nucleotide sequence analysis of *Planococcus* samples amplified using the mitochondrial *Cox1* gene with primer pair PcoF1/LepR1.

No.	Code	Scientific name	Nucleotide sequence
1	PM1	<i>Planococcus minor</i>	ATCATTAAATGAATATATTCAACTAATCATAAAAATATTAGATTAATATACCTATTATTGGATTTTGATC TGGATTAATAGGTTTATCAATAAGATTATTATTGCAATTGAACTAATAAAATTTAAATAAATTTTAATA ATAATATAATTTATTATATAATAATTACTATTTCATGCTTTTATTATAATTTTATACTATACCTATC ATTATTGGAAGATTAAAGAAATGACTCTTACCATTAAATTAATATCATCAGATTTAATTTTCCCTCGAT TAAATAATTTTAGATTTTGATTATTAATCCATCACTTATTTTAATAATAAAATATAATATTATCTAAT AATATTAATACGGTTGAACACTTTATCCCTCTTAATTAATCAAATTTTATTACATTAATTTTATTAT TTTTCTTTACATTTAAATGGGATTTCTCTATTTTTAGATCAATTAATTTTATTTCATCAATTTTATTAT TTAATAATAAATCTTTTAAATAATATTACTTTATATTTGATCCATTATTATTACAATCTTTTAA TTAATTATTTCTATTCCAATTTTATCAAGAGCAATTACTATAATTATTTAGATAATAATCTTAATATAAA TTTTTTAATCCATTAGGAAATGGTAATCCAATTTTATATCAACATTTATC
2	PC1	<i>Planococcus citri</i>	ATCATTAAATGAATATATTCAACTAATCATAAAAATATTAGATTAATATACCTTTTATTGGATTTTGATC TGGATTAATAGGTTTATCAATAAGATTATTATTGCAATTGAACTAATAAAATTTAAATAAATTTTAATA ACAATATAATTTATTATATAATAATTACTATTTCATGCTTTTATTATAATTTCTTTATACTATACCTATC ATTATTGGAAGATTAAAGAAATGACTTTTACCATTAAATTAATATCATCAGATTTAATTTTCCCTCGAT TAAATAATTTTAGATTTTGATTATTAATCCATCACTTATTTTAATAATAAAATATAATATTATCTAAT AATATTAATACAGGTTGAACACTTTACCTCTCTTAATTAATCAAATTTTATTACATTAATTTTATTAT TTTTCTTTACATTTAAATGGGATTTCTCTATTTTTAGATCAATTAATTTTATTTCATCAATTTTATTAT TCAATAATAAATTTTAAATAATATTACTTTATATTTGATCTATTATTATTACAATCTTTTAA TTAATTATTTCTATTCCAATTTTATCAAGAGCAATTACTATAATTATTTAGATAATAATCTTAATATAAA TTTTTTAATCCATTAGGAAATGGTAATCCAATTTTATATCAACATTTATTATTA
3	PL1	<i>Planococcus lilacinus</i>	ATTATTAATGAATATATTCAACTAATCATAAAAATATCAGTTAATATATTACTTTTGGATTTTGATC CGGTTTAATAGGATTATCAATGAGATTATTATTGCAATTGAATTAATAAAATTTAAATAAATCTTAAAT AATAATATAATTTATTATATAATAATTACTATTTCATGCTTTTATTATAATTTTATACTATACCAAT TATTATTGGAAGAAATAAGAAATGATTATTACCATTAAATTAATATCTTCAGATTTAATTTTCCCTCGAT TAAATAATTTTAGATTTTGATTATTAATCCTTCATTAATTTTAATAATATTAATATAATTTTAATAAAT AATATTAATACGGGTTGAACCTTTATACCTCCATTAATTAATCAAATTTTATTACATTAATTTTATTAT TTTTCTTTACATTTAAATGGGATTTCTCTATTTTTAGATCAATCAATTTTATTTCATCAATTTTATTAT TTAATAATAAATTTTAAATAATATTCTTTATATATTGATCAATTTATTACTACAATTTTAA TTAATTATTTCTATTCTATTATCAAGAGCAATTACTATAATCATTTTAGATAATAATTTAAATATAAA TTTTTTAATCCATTAGGAAATGGTAATCCAATTTTATATCAACATTTATTATTA

เอกสารอ้างอิง

- บุปผา เหล่าสินชัย และชลิดา อุณหวุฒิ. 2543. เพ็ลี่ยแป้งและเพ็ลี่ยหอยศัตรูพืชที่สำคัญ. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว กรุงเทพฯ. 70 หน้า.
- Cox, J.M. 1989. The mealybug genus *Planococcus* (Homoptera: Pseudococcidae). Bulletin British Museum (Natural History) Entomology 58(1): 1 - 78.
- 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. Available at: [https://academic.oup.com](https://academic.oup.com/database/article/doi/10.1093/database/bav118/2630093)
- /database/article/doi/10.1093/database/bav118/2630093. Accessed 20 March 2022.
- 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.
- Park, D.S., S.J. Suh, H.W. Oh and P.D.N. Hebert. 2010. Recovery of the mitochondrial COI barcode region in diverse Hexapoda through tRNA-based primers. BMC Genomics 11, 423.
- Park, D.S., S.J. Suh, P.D.N. Hebert, H.W. Oh and K.J. Hong. 2011. DNA barcodes for

- two scale insect families, mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) and armored scales (Hemiptera: Diaspididae) Bull. Entomol. Res., 101 (4): 429-434.
- Williams, D.J. and G.W. Watson. 1988. The Scale Insects of the Tropical South Pacific Region. Pt. 2: The Mealybugs (Pseudococcidae). CAB International Wallingford, U.K. 260 p.
- Williams, D.J. and M.C. Granara de Willink. 1992. Mealybugs of Central and South America. CAB International London. 635 p.
- Williams, D.J. 2004. Mealybug of Southern Asia. The Natural History Museum, Southdene SDN BHD Kuala Lumpur. 896 p.

Appendix 1 Diagnostic morphological characters separating *Planococcus citri* and *Planococcus minor*, based on six characters described by Cox (1989).

Character	Value	Score
1.Number of ventral oral - collar tubular ducts on head	0 - 3	0
	4 - 13	10
	14 - 35	40
2.Number of ventral oral - collar tubular ducts adjacent to 8 th pair of cerarii	0 - 2	0
	3 - 7	10
	8 - 30	40
3.Tubular ducts present between 2 nd and 3 rd cerarii on head on at least one side of the body	absent	0
	present	10
4.Number multilocular pores behind front coxae	0 - 6	5
	7 - 12	0
5.Ratio length hind = tibia + tarsus to length of trochanter + femur	1.00 - 1.07	0
	1.08 - 1.17	5
	1.18 - 1.30	10
6.Width of row of ventral multilocular disc pores on posterior margin segment of VI	Single row	15
	Intermediate	5
	Double row	0

Note: Character descriptions follow Cox (1989).

Value = number/ratio/absent/present and width of each character.

Score = rating at each level and character.

การตรวจวินิจฉัยแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจด้วยเทคนิค Duplex และ Multiplex PCR
เพื่อสนับสนุนการส่งออกสินค้าเกษตร

Accurate and Rapid Identification of Economically Important Fruit Flies
Using Duplex and Multiplex PCR Techniques

ยุวรินทร์ บุญทอป^{1/} ณัฐธิมา โขจิตเจริญกุล^{2/} ณฐมน แก้วนัย^{2/} ชุตিকাญจน์ ใจแล^{3/}
Yuvarin Boontop^{1/} Nuttima Kositcharoenkul^{2/} Nathamon Kaewnuy^{2/} Chutikarn Jailae^{3/}

ABSTRACT

The guava fruit fly (*Bactrocera correcta*) and the melon fly (*Zeugodacus cucurbitae*) are important agricultural pests in Thailand and are listed as quarantine pests by several trading partner countries due to their potential to cause significant damage to exported vegetables and fruits. The detection of larval stages in agricultural commodities can lead to serious trade implications. However, species identification based on larval morphology is challenging due to their high morphological similarity. This study aimed to develop a duplex PCR technique for the rapid and accurate identification of *B. correcta* and *Z. cucurbitae*. The results demonstrated that the developed technique effectively distinguished *B. correcta* and *Z. cucurbitae* from 20 other fruit fly species. Furthermore, when combined with species - specific primers from previous studies, the primer set for *Z. cucurbitae* was successfully adapted into a multiplex PCR system capable of simultaneously identifying four fruit fly species: *Z. cucurbitae*, *Z. cilifer*, *B. dorsalis*, and *B. tuberculata*. However, the *B. correcta* - specific primer could not be integrated into the multiplex system due to annealing temperature limitations. These findings highlight the high potential of the developed duplex and multiplex PCR techniques for rapid and accurate identification of fruit fly species, with reduced diagnostic costs. The approach is well - suited for applications in plant quarantine, inspection of export commodities, and could be further extended to the diagnosis of other pest species in the future.

Keywords: fruit fly, *Bactrocera correcta*, *Zeugodacus cucurbitae*, duplex PCR, multiplex PCR, molecular identification, plant quarantine, export inspection

^{1/} กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 19000. Thailand

^{2/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{2/} Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 19000. Thailand

^{3/} ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{3/} Suvarnabhumi Airport Plant Quarantine Station, Office of Agricultural Regulation, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 10900. Thailand

* Corresponding author: yuvarin9320@gmail.com

บทคัดย่อ

แมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* และแมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae* เป็นศัตรูพืชที่สำคัญของประเทศไทยและเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศคู่ค้าหลายประเทศเนื่องจากสามารถสร้างความเสียหายต่อพืชผักและผลไม้ส่งออก การตรวจพบระยะตัวหนอนในสินค้าเกษตรอาจส่งผลกระทบต่อ การส่งออกอย่างมาก แต่เนื่องจากลักษณะ สัณฐานของตัวหนอนแต่ละชนิดมีความคล้ายคลึงกัน การจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงทำได้ยาก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค duplex PCR สำหรับใช้ตรวจสอบและจำแนกชนิด แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* อย่างรวดเร็วและ แม่นยำ ผลการ ทดสอบพบว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถจำแนกชนิด แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* จากแมลงวันผลไม้จำนวน 20 ชนิด ได้อย่างมีประสิทธิภาพและเมื่อประยุกต์ใช้ร่วมกับ ไพรมอร์จำเพาะจากงานวิจัยอื่น พบว่าไพรมอร์ของ แมลงวันแตง *Z. cucurbitae* สามารถพัฒนาต่อเป็น เทคนิค multiplex PCR ที่ใช้จำแนกแมลงวันผลไม้ได้ พร้อมกันถึง 4 ชนิด ได้แก่ *Z. cucurbitae*, *Z. cilifer*, *B. dorsalis* และ *B. tuberculata* ขณะที่ไพรมอร์ ของ *B. correcta* ไม่สามารถพัฒนาเป็น multiplex PCR ได้เนื่องจากข้อจำกัดด้านอุณหภูมิการทำงาน ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค duplex PCR และ multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นมีศักยภาพสูง สำหรับการวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้ได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ ลดต้นทุนการตรวจสอบ เหมาะสำหรับ ประยุกต์ใช้ในงานกักกันพืช การตรวจสอบสินค้า เกษตรส่งออก และสามารถต่อยอดสู่ระบบการตรวจ วินิจฉัยแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นในอนาคต

คำสำคัญ: แมลงวันผลไม้ *Bactrocera correcta* *Zeugodacus cucurbitae* ดู ฟ เ ล กซ์ พี ซี อาร์ มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ การจำแนกชนิดระดับโมเลกุล กักกันพืช การตรวจสินค้าส่งออก

บทนำ

แมลงวันผลไม้ในสกุล *Bactrocera* และ *Zeugodacus* เป็นกลุ่มแมลงศัตรูพืชที่ก่อให้เกิด ความเสียหายต่อพืชผักและผลไม้หลากหลายชนิด (Drew and Romig, 2013) โดยเฉพาะพืชเศรษฐกิจ เพื่อการส่งออกของประเทศไทย ในจำนวนนี้ แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และ แมลงวันแตง *Z. cucurbitae* เป็นชนิดที่พบระบาดบ่อยและมีสถานะเป็นแมลงศัตรูพืชกักกัน (quarantine pests) ในหลายประเทศ เนื่องจากสามารถสร้างความเสียหายทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพของผลผลิต อีกทั้งการปนเปื้อนของตัวหนอนในสินค้าเกษตรยัง อาจส่งผลกระทบต่อ การรับรองด้านสุขอนามัยพืช และก่อให้เกิดการกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศ

ความคล้ายคลึงกันของลักษณะทางสัณฐาน วิทยาเป็นความท้าทายที่สำคัญในการวินิจฉัยชนิด แมลงวันผลไม้ โดยเฉพาะในระยะตัวหนอนหรือใน กรณีที่ตัวอย่างไม่สมบูรณ์ ซึ่งส่งผลให้การจำแนกชนิด โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาดำเนินได้ด้วยความ แม่นยำและใช้เวลานาน และในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา ประเทศไทยนั้นได้มีการพัฒนาเทคนิคทาง อนุชีววิทยา เช่น การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคด (DNA barcoding) และการออกแบบไพรมอร์จำเพาะ เจาะจงรายชนิด (species - specific primers) โดย ยุวรินทร์ และคณะ (2564; 2566) ได้มีการพัฒนา เทคนิคจนได้ไพรมอร์จำเพาะเจาะจงกับแมลงวันทอง ฝรั่ง *B. correcta* และ แมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ในการระบุชนิดแมลงวันผลไม้ได้อย่างรวดเร็วและ ถูกต้อง แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวยังมีข้อ จำกัดด้านต้นทุน และระยะเวลา เนื่องจากสามารถ ตรวจสอบได้เพียง 1 ชนิดต่อครั้ง ดังนั้นหนึ่งใน แนวทางที่ได้รับความสนใจในการเพิ่มประสิทธิภาพ การตรวจวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชคือ เทคนิค duplex PCR และ multiplex PCR ซึ่งสามารถตรวจสอบ แมลงศัตรูพืชได้มากกว่าหนึ่งชนิดภายในปฏิกิริยา เดียว ด้วยหลักการของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ เป้าหมายที่สนใจ โดยใช้ไพรมอร์หลายคู่พร้อมกัน ภายใต้ปฏิกิริยาเดียวกัน (จิราภรณ์ และนภสร, 2549)

ซึ่งช่วยลดขั้นตอน ค่าใช้จ่าย และเวลาเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค conventional PCR งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค duplex PCR สำหรับการจำแนกแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* รวมทั้งพัฒนาเทคนิค multiplex PCR จากการประยุกต์ใช้ไพรเมอร์ที่มีการออกแบบไว้ร่วมกับชุดไพรเมอร์จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Jiang, 2015; Afroz et al., 2022) เพื่อตรวจสอบชนิดแมลงวันผลไม้ได้หลากหลายชนิดพร้อมกันภายในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว เช่นเดียวกับที่เคยมีการใช้เทคนิค multiplex PCR ในการจำแนกแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในทวีปแอฟริกาใต้ (Andrews et al., 2022)

วิธีดำเนินการ

1. สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงวันผลไม้

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงวันผลไม้โดยใช้ขาขาว 3 ขาจากตัวเต็มวัยที่เก็บรวบรวม นำใส่ในหลอดขนาด 1.5 มล. แล้วดำเนินการสกัดด้วยชุดน้ำยาสกัด ISOLATE II Genomic DNA Kit (Bioline, Australia) เติม Lysis buffer GL 180 μ L และ Proteinase K 25 μ L เขย่าเบา ๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C. นานข้ามคืน จากนั้นเติม Lysis buffer G3 ปริมาตร 200 μ L เขย่าเบา ๆ และบ่มต่อที่ 70°C. นาน 10 นาที หลังจากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร 210 μ L เขย่าให้เข้ากัน และนำไปใส่ในคอลัมน์กรองก่อนปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที ล้างคอลัมน์ด้วย Wash buffer GW1 ปริมาตร 500 μ L และปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที เทส่วนที่กรองได้ทิ้ง และล้างคอลัมน์ซ้ำด้วย Wash buffer GW2 ปริมาตร 600 μ L ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที และปั่นซ้ำอีกครั้งโดยไม่เติมสารละลายเพื่อกำจัด ethanol ที่ตกค้าง ต่อมาย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดใหม่ และชะล้างดีเอ็นเอด้วยการเติม Elution buffer G ที่อุณหภูมิ 70°C. ปริมาตร 50 μ L บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 2 นาที ตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้ค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ A260/A280 และเจือจางให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อ μ L ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *cox1* โดยใช้ universal primer ได้แก่ LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') และ HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer et al., 1994) โดยกำหนดขั้นตอนและระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส ประยุกต์จากวิธีของ ยูวรินทร์ และคณะ (2565) นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันชนิดแมลงวันผลไม้ ก่อนนำไปใช้ในการทดสอบด้วยวิธีเทคนิค duplex PCR ต่อไป

2. ทดสอบความจำเพาะเจาะจงและประสิทธิภาพของคู่ไพรเมอร์ ในการทำปฏิกิริยา duplex PCR ต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae*

2.1 ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และทดสอบความใช้ได้ (Validation) ของไพรเมอร์จำเพาะชนิดต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (ยูวรินทร์ และคณะ, 2564; 2566) (Table 1) โดยทำการทดสอบกับตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่รวบรวมจากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย

2.2 ทาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (duplex condition optimization) เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยา duplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ภายในปฏิกิริยาเดียวกัน จากนั้นตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นที่มีรายงานพบในประเทศไทย

2.3 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 % ที่ผสม RedSafe™ dye (iNtRON Biotechnology, USA) ในน้ำยา 1X TAE buffer โดยผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ตรวจสอบ

แถบตีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และบันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล Gel Documentation XR รุ่น Universal Hood II (Bio-Rad, USA) พร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพถ่าย

Table 1 Nucleotide sequences and characteristics of primer sets used for screening *Bactrocera correcta* and *Zeugodacus cucurbitae* in this study.

No.	Primer name	Sequences	Position	No. of base pair	Tm	%GC	Size of PCR product
1	Bco-F1	CTAGGACACCCCGGAGCAC	85 - 103	19	54.2	68.4	141
2	Bco-R1	CAGTATTAGGGGACAAGTCAA	204 - 225	22	50.3	45.5	
1	Zcur-F1	TGAGCTGTAGTATTGACAGCTC TTC	518 - 542	25	52	44	83
2	Zcur-R1	AGCCGGGTCTGAAGAAAGAGGTG	580 - 601	22	60	59	

Noted: F= Forward primer, R= Reverse primer

3. ทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ร่วมกับคู่ไพรเมอร์อื่น ๆ ด้วยเทคนิค multiplex PCR

ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ จากงานวิจัย (Jiang, 2015; Afroz et al., 2022) ทดสอบร่วมกับไพรเมอร์จำเพาะของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* เพื่อพัฒนาเทคนิค multiplex PCR สำหรับการตรวจวินิจฉัยแมลงวันผลไม้หลายชนิดในปฏิกิริยาเดียว โดยพิจารณาคู่ไพรเมอร์ที่มีอุณหภูมิ annealing ใกล้เคียงกันและผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดต่างกันอย่างชัดเจน เพื่อให้สามารถแยกแถบตีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนหลังวิเคราะห์ผลด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส งานวิจัยนี้ทำการปรับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคมี และไพรเมอร์ ทดสอบความเหมาะสมของอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ของปฏิกิริยา multiplex PCR ตั้งแต่ 55 - 60°C เพื่อหาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรวจแมลงวันผลไม้หลายชนิดในปฏิกิริยาเดียวกัน และตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการโดย

ใช้ตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่มีรายงานในประเทศไทย วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2.5% ผสม RedSafe™ dye ในน้ำยา 1X TAE buffer โดยใช้สนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ตรวจสอบแถบตีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล Gel Documentation XR รุ่น Universal Hood II (Bio - Rad, USA) พร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพถ่าย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการสกัดตีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงวันผลไม้

การสกัดตีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงวันผลไม้ในครั้งนี้ให้ผลลัพธ์ที่มีคุณภาพดี โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่อัตราส่วน A260/A280 อยู่ในช่วง 1.7 - 1.9 (Table 2) แสดงว่าตีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ในระดับที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในเทคนิคการศึกษาทางอณูชีววิทยา (molecular biology) และผลจากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ LCO1490/HCO2198 ซึ่งเป็น universal primers ของยีน *cox1* (cytochrome c oxidase subunit I)

สามารถขยายชิ้นดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 650 - 700 คู่เบส ซึ่งเป็นช่วงขนาดที่เหมาะสมสำหรับการใช้ในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดแมลงวันผลไม้ (Hebert et al., 2003) นอกจากนี้ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้แสดงค่าความเหมือน (sequence identity) กับข้อมูลในฐานข้อมูลสากลในระดับ 99 - 100% ยืนยันว่าเทคนิคการสกัดและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีความถูกต้อง แม่นยำ สามารถจำแนกชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงาน

ก่อนหน้านี้ระบุว่ายีน *cox1* เป็นยีนที่มีความคงที่สูงในระดับ intra-species และมีความแตกต่างที่ชัดเจนระหว่างชนิด (inter-species divergence) จึงเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการใช้ในการจำแนกชนิดแมลงด้วยวิธี DNA barcoding หรือการพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะสำหรับการวินิจฉัยในเทคนิคต่าง ๆ เช่น conventional PCR, multiplex PCR หรือ LAMP (Folmer et al., 1994; Armstrong and Ball, 2005)

Table 2 Concentration of DNA of fruit flies for this study

No.	Sample	Purity (A260/A280)			Concentration (ng/μl)		
		1	2	Mean	1	2	Mean
1	<i>B. carambolae</i> (Adult)	1.89	1.84	1.87	37.26	39.28	38.27
2	<i>B. cilifera</i> (Adult)	2.07	2.12	2.10	287.84	268.99	278.41
3	<i>B. correcta</i> (Adult)	2.11	2.13	2.12	267.26	261.01	264.13
4	<i>B. dorsalis</i> (Adult)	2.07	2.04	2.06	548.13	537.45	542.79
5	<i>B. umbrosa</i> (Adult)	2.05	2.07	2.06	470.53	454.09	462.31
6	<i>B. zonata</i> (Adult)	2.00	2.01	2.00	226.88	214.09	220.48
7	<i>Z. caudata</i> (Adult)	2.15	2.09	2.12	284.18	279.66	281.92
8	<i>Z. cucurbitae</i> (Adult)	2.00	2.01	2.01	257.93	249.47	253.70
9	<i>Z. isolata</i> (Adult)	2.10	1.88	1.99	124.66	137.74	131.20
10	<i>Z. tau</i> (Adult)	2.11	2.11	2.11	273.99	274.28	274.13
11	<i>B. carambolae</i> (Larve)	2.00	2.07	2.04	790.05	777.55	783.80
12	<i>B. correcta</i> (Larve)	2.11	2.12	2.12	1438.03	1367.55	1402.79
13	<i>B. dorsalis</i> (Larve)	2.15	2.16	2.15	1517.88	1487.69	1502.79
14	<i>B. latifrons</i> (Larve)	2.04	2.11	2.07	1270.10	1165.48	1217.79
15	<i>Z. cucurbitae</i> (Larve)	2.16	2.17	2.17	1806.92	1744.42	1775.67
16	<i>Z. tau</i> (Larve)	2.04	2.07	2.06	679.62	677.50	678.56

2. ทดสอบความจำเพาะเจาะจงและประสิทธิภาพของคู่ไพรเมอร์ ในการทำปฏิกิริยา duplex PCR ต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae*

2.1 ทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อแมลงทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* จากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย

การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์จำเพาะสำหรับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และ

แมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ดำเนินการกับตัวอย่างจากประชากรทุกภูมิภาคของประเทศไทย ได้แก่ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคใต้ และภาคเหนือ โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับแต่ละชนิด ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ถูกวิเคราะห์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าไพรเมอร์จำเพาะสำหรับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 141 คู่เบส (Figure 1) ขณะที่ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับแมลงวันแตง

Z. cucurbitae ให้ผลลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 83 คู่เบส (Figure 2) โดยไม่เกิดแถบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific bands) ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะและ

ประสิทธิภาพในการตรวจสอบชนิดแมลงวันผลไม้จากกลุ่มประชากรต่างภูมิศาสตร์ได้อย่างชัดเจน

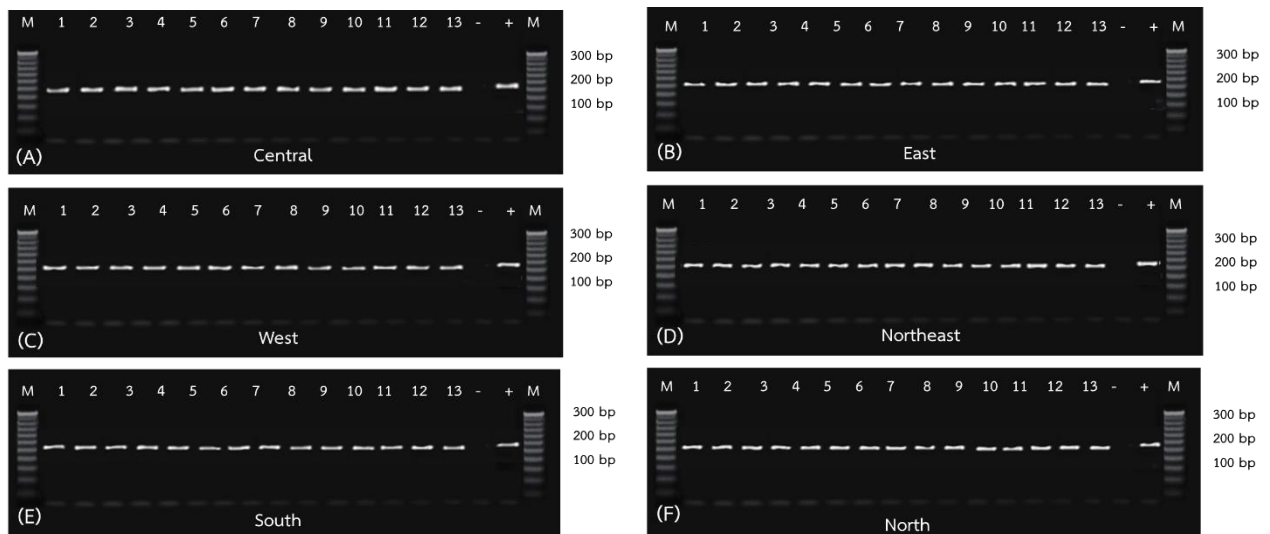


Figure 1 PCR product of *Bactrocera correcta* from six Thai biogeographical regions (Central, East, West, Northeast, South, and North) was amplified using the *B. correcta*-specific primer pair Bco-F1 and Bco-R1. Negative control was ddH₂O. Positive control sample was *B. correcta*. Lane M: D2000 Marker

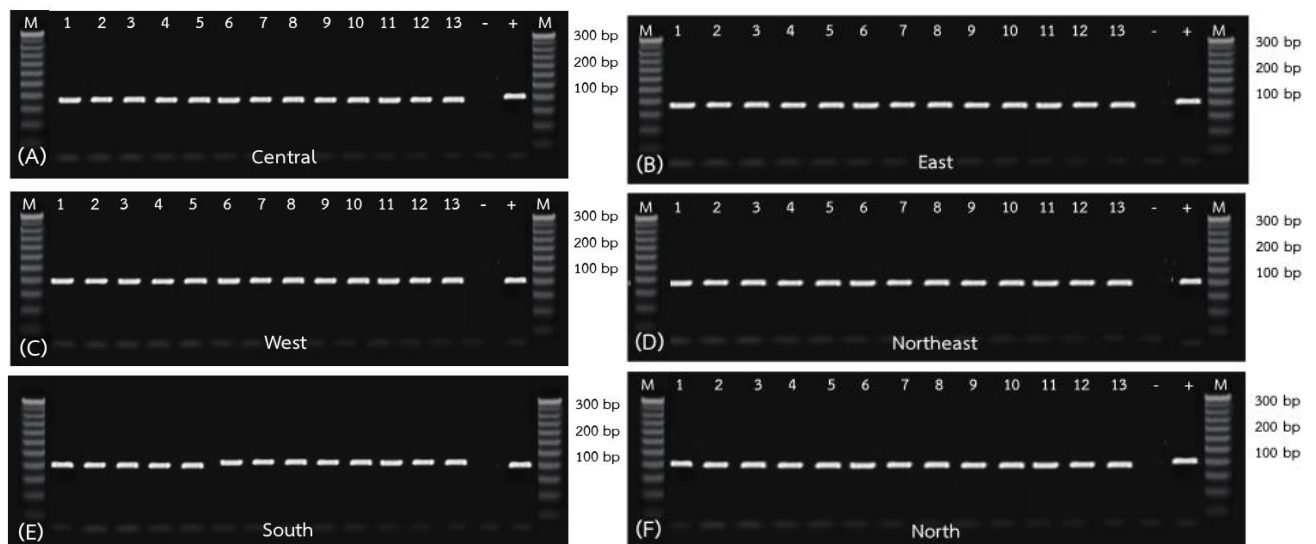


Figure 2 PCR product of *Zeugodacus cucurbitae* from six Thai biogeographical regions (Central, East, West, Northeast, South, and North) was amplified using the *Z. cucurbitae*-specific primer pair Zcu-F1 and Zcu-R1. Negative control was ddH₂O. Positive control sample was *Z. cucurbitae*. Lane M: D2000 Marker

ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* สามารถตรวจสอบตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากทุกภูมิภาคของประเทศไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ขนาด 141 คู่เบส สำหรับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และ 83 คู่เบส สำหรับแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ผลลัพธ์ดังกล่าวสะท้อนถึงความจำเพาะ (specificity) และความเสถียร (stability) ของไพรเมอร์ทั้งสองคู่ สถานะการเกิดปฏิกิริยามีความเหมาะสม แม้จะมีความแตกต่างทางภูมิศาสตร์และพันธุกรรมบางประการระหว่างประชากรแมลงแต่ละภูมิภาคก็ตาม ความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแมลงวันผลไม้จากประชากรในภูมิภาคต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบนั้นมีความจำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งยีนที่มีความคงที่สูง (highly conserved regions) ซึ่งเป็นหลักการสำคัญในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการวินิจฉัยในระดับชนิดซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Rogriguez et al. (2015) ที่กล่าวว่า การออกแบบไพรเมอร์และโพรบเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดสำหรับเทคนิค PCR นอกจากนี้การทดสอบความใช้ได้ของโพรบและไพรเมอร์ก่อนจะใช้ก็มีความสำคัญเช่นกันถึงแม้ว่าจะใช้โปรแกรมที่น่าเชื่อถือในการออกแบบก็ตาม

2.2 วิธีการที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบชนิดแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ด้วยเทคนิค duplex PCR ได้ดำเนินการโดยใช้ species-specific primers ของทั้งสองชนิดร่วมกันในการตรวจตัวอย่างแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่พบในประเทศไทย โดยมีการกำหนดส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Table 3) และสถานะปฏิกิริยาที่เหมาะสมสำหรับการทำ duplex PCR (Table 4) ผลการทดลองพบว่าวิธีดังกล่าวสามารถแยกชนิดแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ออกจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นได้อย่างชัดเจน โดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* มีขนาด 141 คู่เบส และผลิตภัณฑ์ของแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* มีขนาด 83 คู่เบส สำหรับแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยอีก 18 ชนิดที่ทดสอบ ได้แก่ *Bactrocera albistrigata*, *B. carambolae*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. limbifera*, *B. nigrotibialis*, *B. tuberculata*, *B. umbrosa*, *B. zonata*, *Dacus formosanus*, *Zeugodacus apicalis*, *Z. caudatus*, *Z. cilifer*, *Z. hochii*, *Z. incisus*, *Z. isolatus*, *Z. platamus* และ *Z. tau* ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคนี้ในการตรวจสอบชนิดแมลงวันผลไม้เป้าหมาย (Figure 3) โดยไม่เกิดผลการทดสอบลวงกับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ

Table 3 Preparation of the PCR Reaction Mixture with a Final Volume of 25 μ L.

Reagents	Volume (μ L) per reaction
dH ₂ O	6.5
2x Green PCR Master Mix Direct-load (Biotechrabbit)	12.5
10 μ M Bco-F1	1
10 μ M Bco-F1	1
10 μ M Zcu-F1	1
10 μ M Zcu-R1	1
DNA template	2
Final volume	25

Table 4 PCR amplification conditions used in this study, including temperatures, durations, and number of cycles for each step of the reaction.

PCR steps	Temperature	Time	Number of cycles
initial denaturation	94°C	4 min	1 cycle
denaturation	94°C	30 sec	
annealing	58°C	30 sec	35 cycles
extension	72°C	30 sec	
final extension	72°C	5 min	1 cycle

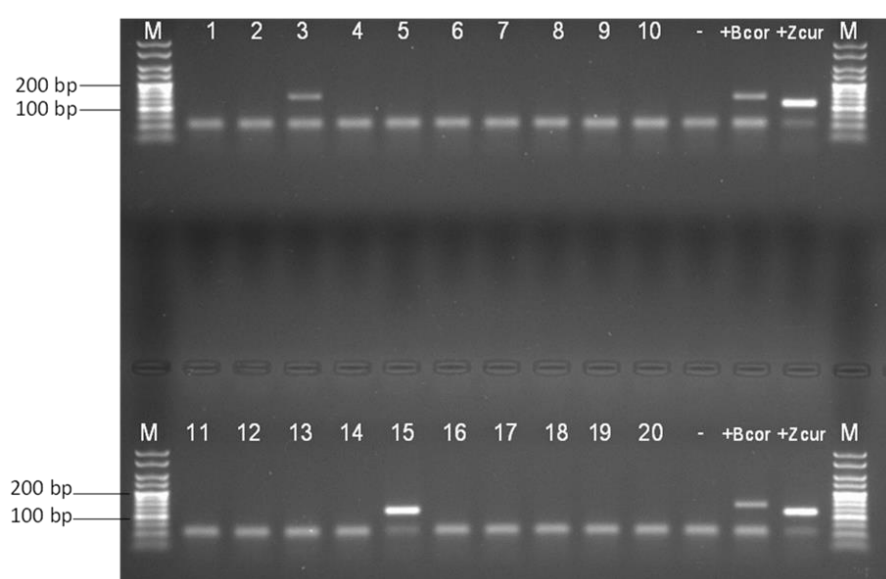


Figure 3 PCR amplification of *Bactrocera correcta* and *Zeugodacus cucurbitae* using the *B. correcta* - specific primer pair (Bco - F1 and Bco - R). Sterile distilled water (ddH₂O.) was used as the negative control (-). The positive controls included *B. correcta* (+Bcor) and *Z. cucurbitae* (+Zcur). Lane M: D2000 DNA marker. Lanes 1-20 represent the following fruit fly species:

- | | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 1. <i>Bactrocera albistrigata</i> | 2. <i>Bactrocera carambolae</i> | 3. <i>Bactrocera correcta</i> |
| 4. <i>Bactrocera dorsalis</i> | 5. <i>Bactrocera latifrons</i> | 6. <i>Bactrocera limbifera</i> |
| 7. <i>Bactrocera tuberculata</i> | 8. <i>Bactrocera umbrosa</i> | 9. <i>Bactrocera zonata</i> |
| 10. <i>Dacus longicornis</i> | 11. <i>Dacus spaeroidalis</i> | 12. <i>Zeugodacus apicalis</i> |
| 13. <i>Zeugodacus caudatus</i> | 14. <i>Zeugodacus cilifer</i> | 15. <i>Zeugodacus cucurbitae</i> |
| 16. <i>Zeugodacus hochii</i> | 17. <i>Zeugodacus incisus</i> | 18. <i>Zeugodacus isolatus</i> |
| 19. <i>Zeugodacus platamus</i> | 20. <i>Zeugodacus tau</i> | |

จากการพัฒนาและทดสอบเทคนิค duplex PCR ด้วยการนำไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงของ แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ดำเนินการในปฏิกิริยาเดียว ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ทั้งสองคู่สามารถทำงานร่วมกันได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะที่กำหนด โดยสามารถจำแนกแมลงวันทั้งสองชนิดได้พร้อมกันภายในปฏิกิริยาเดียว ซึ่งช่วยลดเวลาและทรัพยากรในการดำเนินการได้อย่าง มีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการทำ PCR แยกชนิด (singleplex PCR) (LabLife-Real-time PCR, 2015) และที่สำคัญผลการทดลองไม่พบแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ใด ๆ ในกลุ่มตัวอย่างแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นจำนวน 18 ชนิด การไม่พบผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นแม้อยู่ในสกุล (Genus) เดียวกันสะท้อนถึงความแม่นยำในการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถแยกชนิดเป้าหมายได้โดยไม่มีผลกระทบจากแมลงวันผลไม้ที่มีลำดับดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ทั้งสองคู่มีความจำเพาะต่อชนิด (species-specific) สูง และไม่มีการเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) กับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือพันธุกรรมใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ใช้ในงานด้านอนุกรมวิธาน งานกักกันพืชและการตรวจสอบสินค้าส่งออก

3. ผลการทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ร่วมกับคู่ไพรเมอร์อื่น ๆ ด้วยเทคนิค Multiplex PCR

จากการนำไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* มาประยุกต์ร่วมกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Jiang, 2015; Afroz et al., 2022) นั้น พบว่าไพรเมอร์ที่มีจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* (Zcur-F2 และ Zcur-R1) สามารถพัฒนาเทคนิค multiplex PCR ในการตรวจสอบแมลงวันผลไม้โดยคู่ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบสามารถทำงานร่วมกับไพรเมอร์ BBDF, *B. tuberculata* และ BZCIF (Table 5)

โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR (Table 6) และสภาวะปฏิกิริยา Multiplex PCR ที่เหมาะสมสำหรับจำแนกแมลงวันผลไม้ด้วยวิธี PCR พบว่าช่วงอุณหภูมิในขั้นตอนการ annealing ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cox1* ของแมลงวันผลไม้ทั้ง 4 ชนิด พร้อมกันที่อุณหภูมิ 60°C. กำหนดขั้นตอนและเวลาในปฏิกิริยา PCR cycle (Table 7) และเมื่อนำมาทดสอบกับแมลงวันผลไม้ที่มีรายงานในประเทศไทย 20 ชนิด ได้แก่ *B. albistrigata*, *B. carambolae*, *B. correcta*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. limbifera*, *B. tuberculata*, *B. umbrosa*, *B. zonata*, *D. longicomis*, *D. spaeroidalis*, *Z. apicalis*, *Z. caudatus*, *Z. cilifer*, *Z. cucurbitae*, *Z. hochii*, *Z. incisus*, *Z. isolatus*, *Z. platamus* และ *Z. tau* การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีการด้วยการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าได้ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 216, 225, 159 และ 113 คู่เบส (Figure 4) ซึ่งเป็นขนาดของแมลงวันผลไม้ 4 ชนิด ได้แก่ *B. dorsalis*, *B. tuberculata*, *Z. cilifer* และ *Z. cucurbitae* ตามลำดับ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ ถึงแม้ว่าขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* และ *B. tuberculata* จะมีขนาดที่ใกล้เคียงกันแต่อย่างไรก็ตามยังสามารถแยกความแตกต่างได้ด้วยสายตาเมื่อเปรียบเทียบกับตัวเปรียบเทียบบวก (positive control) ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค multiplex PCR นั้นสามารถยืนยันการตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันผลไม้ 4 ชนิด โดยสามารถใช้ตรวจสอบแมลงวันผลไม้ที่เข้าทำลายพืชผักเศรษฐกิจของไทย ได้แก่ *Z. cucurbitae*, *Z. cilifer*, *B. dorsalis* และ *B. tuberculata* และสอดคล้องกับผลที่ได้จากการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* นั้นไม่สามารถนำมาพัฒนาร่วมกับงานวิจัยอื่น ๆ เนื่องจากไม่สามารถหาอุณหภูมิที่เหมาะสมได้

Table 5 Nucleotide sequences and characteristics of primer sets used for screening *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera tuberculata*, *Zeugodacus cilifer*, and *Zeugodacus cucurbitae* in this study.

Primers name	Sequences	% CG	Tm (°C)	Size (bp)	Reference
BBDF-F	GCTATTTTTTCACTTCACTTAACG	33.33	55.34	216	Afroz et al., 2022
BBDF-R	AGTATTTAAGTTTCGGTCTGTTAG	33.33	54.68		
B. tuberculata-F	TTTTCACTCCACTTAGCCAGG	47.62	57.86	225	Jiang, 2015
B. tuberculata-R	GGGGTCAAAAAATGAAGTATTTAAG TTC	32.14	58.10		
BZCIF-F	GGCTGTAAATTTTATCACTACAGTC	56.27	56.27	159	Afroz et al., 2022
BZCIF-R	CGGTCTGTCAAAAGTATAGTAATG	55.40	55.40		
Zcur-F2	CTTCTATCTCTACCTGTGTTAGCCG	48	53	113	Boontop., 2021
Zcur-R1	AGCCGGGTCGAAGAAAAGAGGTG	59	60		

Table 6 Reagent composition used in the multiplex PCR assay described in this study, showing the final volume per 25 µl reaction.

Reagents	Volume (µl) per reaction
Multiplex PCR Master mix (2X, Biotech rabbit, Germany)	12.5
10 µM B. dorsalis-F	0.5
10 µM B. dorsalis-R	0.5
10 µM B. tuberculata-F	0.5
10 µM B. tuberculata-R	0.5
10 µM Z. cilifer-F	0.5
10 µM Z. cilifer-R	0.5
10 µM Zcur-F2	1.0
10 µM Zcur-R1	1.0
Template DNA	1
Nuclease free water	6.5
Final volume	25.0

Table 7 Thermal cycling conditions used for multiplex PCR amplification, including temperatures, durations, and number of cycles for each step of the reaction.

Step	Temperature (°C)	Time	Number of cycles
1. Pre-denaturation	95	3 min	1
2. Denaturation	95	30 sec	
3. Annealing	55 - 60	45 sec	30
4. Extension	72	45 sec	
5. Final - extension	72	5 min	1

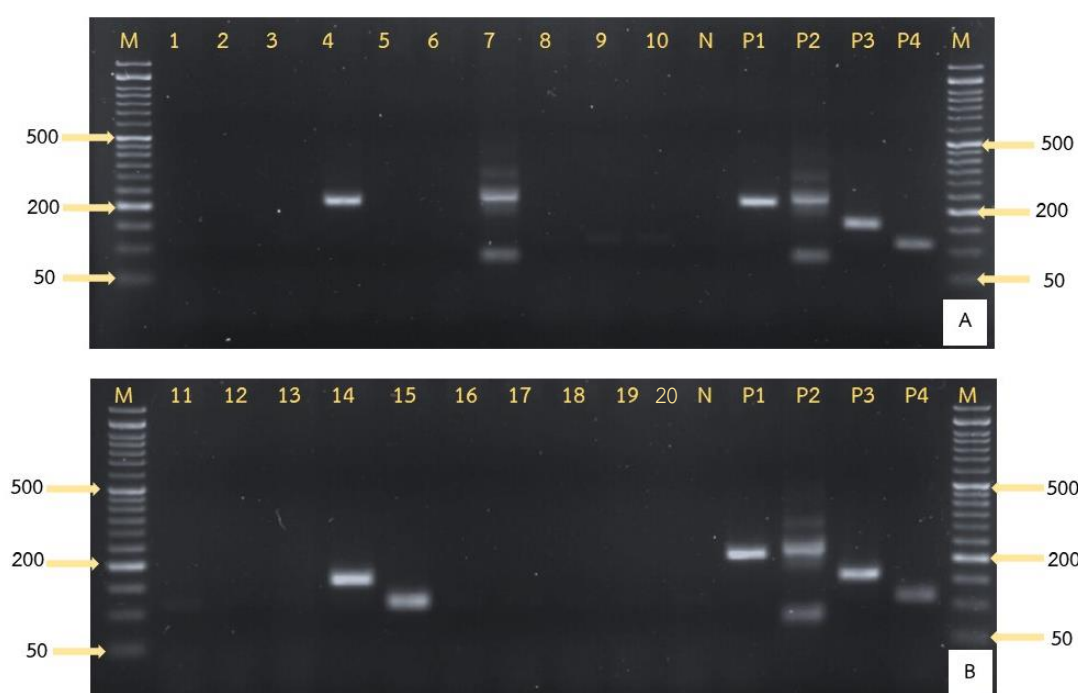


Figure 4 Multiplex PCR amplification of DNA from 19 fruit fly species using species - specific primers. Each lane represents the PCR product obtained from a different fruit fly species. Sterile distilled water (ddH₂O) was used as a negative control (N). Positive controls were as follows: P1 = *Bactrocera dorsalis*, P2 = *Bactrocera tuberculata*, P3 = *Zeugodacus cilifer*, and P4 = *Zeugodacus cucurbitae*. Lane M: D2000 DNA marker. (A) Lanes 1 - 10; (B) Lanes 11 - 20. Lanes 1 - 20 correspond to

- | | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 1. <i>Bactrocera albistrigata</i> | 2. <i>Bactrocera carambolae</i> | 3. <i>Bactrocera correcta</i> |
| 4. <i>Bactrocera dorsalis</i> | 5. <i>Bactrocera latifrons</i> | 6. <i>Bactrocera limbifera</i> |
| 7. <i>Bactrocera tuberculata</i> | 8. <i>Bactrocera umbrosa</i> | 9. <i>Bactrocera zonata</i> |
| 10. <i>Dacus longicornis</i> | 11. <i>Dacus spaeroidalis</i> | 12. <i>Zeugodacus apicalis</i> |
| 13. <i>Zeugodacus caudatus</i> | 14. <i>Zeugodacus cilifer</i> | 15. <i>Zeugodacus cucurbitae</i> |
| 16. <i>Zeugodacus hochii</i> | 17. <i>Zeugodacus incisus</i> | 18. <i>Zeugodacus isolatus</i> |
| 19. <i>Zeugodacus platamus</i> | 20. <i>Zeugodacus tau</i> | |

การศึกษาครั้งนี้ได้ประยุกต์ใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นเพื่อพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR ผลการทดสอบพบว่าไพรเมอร์ทั้ง 4 ชุดสามารถทำงานร่วมกันได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะ PCR ที่กำหนด โดยเฉพาะช่วงอุณหภูมิการจับคู่ของไพรเมอร์ (annealing) ที่ 60°C. และสามารถวินิจฉัยแมลงวันผลไม้ได้พร้อมกัน 4 ชนิด ได้แก่ *Z. cucurbitae*, *B. dorsalis*, *B. tuberculata* และ *Z. cilifer* ภายในการตรวจสอบเพียงครั้งเดียว ซึ่งแสดงถึงความเหมาะสมในการออกแบบลำดับไพรเมอร์และสภาวะปฏิกิริยา (PCR conditions) เทคนิค Multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถเพิ่มขยายผลิตภัณฑ์ DNA ได้อย่างชัดเจน โดยให้แถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 216 คู่เบส (*B. dorsalis*), 225 คู่เบส (*B. tuberculata*), 159 คู่เบส (*Z. cilifer*) และ 113 คู่เบส (*Z. cucurbitae*) ตามลำดับ และไม่มีการเกิดแถบที่ไม่จำเพาะกับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่นที่ทดสอบทั้ง 16 ชนิด ซึ่งรวมถึงชนิดที่อยู่ในสกุลเดียวกัน และชนิดใกล้เคียงทางพันธุกรรม ผลลัพธ์นี้แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่นำมาใช้มีความจำเพาะสูง (high specificity) และสามารถแยกชนิดแมลงวันผลไม้ได้อย่างแม่นยำ แม้ขนาดแถบบางชนิด เช่น *B. dorsalis* และ *B. tuberculata* จะอยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน (ยุวรินทร์และคณะ, 2566) แต่ยังสามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจนด้วยการเปรียบเทียบกับแถบของ positive control ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับหลักการของเทคนิค multiplex PCR ที่เน้นการใช้ไพรเมอร์ที่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกัน (no cross-reactivity) และมีความแตกต่างของขนาดผลิตภัณฑ์ที่มากพอสำหรับการตรวจแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส ความสำเร็จในการตรวจวินิจฉัยแมลงวันผลไม้ 4 ชนิดในครั้งเดียว เป็นประโยชน์ในทางปฏิบัติ โดยเฉพาะในบริบทของการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันที่ปะปนกับสินค้าพืชผักและผลไม้ของไทย เทคนิค multiplex PCR ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบแมลงวันผลไม้จากตัวอย่างที่อยู่ในระยะต่าง ๆ ได้

โดยไม่จำเป็นต้องเลี้ยงจนถึงระยะตัวเต็มวัยสอดคล้องกับ ยุวรินทร์และคณะ (2564, 2566) ซึ่งช่วยลดเวลาและเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยในภาคปฏิบัติได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ไม่สามารถนำมาพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้กับเทคนิค multiplex ร่วมกับไพรเมอร์อื่นได้ เนื่องจากไม่สามารถกำหนดอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานร่วมกันของไพรเมอร์ทุกชุดโดยไม่ลดทอนประสิทธิภาพการทำงาน ซึ่งถือเป็นข้อจำกัดสำคัญของการออกแบบไพรเมอร์ที่ต้องทำงานร่วมกันของเทคนิค multiplex PCR ที่ต้องคำนึงถึงความเหมาะสมของไพรเมอร์ทั้งในด้านความจำเพาะ ขนาดของไพรเมอร์ และอุณหภูมิในการทำงาน สาเหตุหนึ่งอาจมาจากความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสในยีน *COI* ของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ นั้นมีความใกล้เคียงกันทำให้การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสูงทำได้ยาก (Jiang et al., 2013) ซึ่งในอนาคตอาจประยุกต์ใช้เทคนิค real-time PCR แบบ probe-based เช่น TaqMan ซึ่งสามารถเพิ่มความจำเพาะและความไวได้ดีกว่า และถูกนำมาใช้จำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *Bactrocera* และ *Zeugodacus* ได้อย่างแม่นยำ (Kayattukandy et al., 2025) หรือการใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมจากยีนอื่น ๆ ที่มีความจำเพาะและความไวสูงกว่า และไม่มี การ cross-reaction เช่น ยีน *ATP6* และ *ND2* เพื่อเพิ่มความแม่นยำและความครอบคลุมในการตรวจจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ (Castellanos et al., 2025)

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่มีการประยุกต์ใช้เทคนิค multiplex PCR สำหรับการตรวจจำแนกยีน *cox1* ของแมลงวันผลไม้ทั้ง 4 ชนิด (*Z. cucurbitae*, *Z. cilifer*, *B. dorsalis* และ *B. tuberculata*) ได้พร้อมกันภายในการทดสอบเพียงครั้งเดียว โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสูงในสภาวะปฏิกิริยาที่เหมาะสม ผลการศึกษานี้ไม่เพียงแสดงให้เห็นว่าเทคนิคดังกล่าวสามารถแยกชนิดแมลงผลไม้ได้อย่างแม่นยำและจำเพาะ แต่ยังแสดงให้เห็น

ถึงศักยภาพในการพัฒนาเครื่องมือวินิจฉัยที่ประหยัดเวลาและต้นทุนมากกว่าการตรวจแบบ conventional PCR ที่ต้องแยกทำรายชนิด และปฏิบัติงานหลายครั้ง (Lab Life-Real-time PCR, 2015) นอกจากนี้ยังเป็นการลดขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่าง การรวมปฏิกิริยา PCR ให้สามารถตรวจสอบได้หลายชนิดในคราวเดียว และการใช้เทคนิค เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อแสดงผลได้อย่างชัดเจน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เทคนิค duplex PCR ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถตรวจสอบและจำแนกแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชที่สำคัญ ได้แก่ แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และ แมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ได้พร้อมกันภายในการทำปฏิกิริยาเดียว โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสูง ประกอบกับกระบวนการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และการวิเคราะห์ผลด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งให้ผลแม่นยำ รวดเร็ว และสามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจากทุกภูมิภาคของประเทศไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ยังสามารถใช้ร่วมกับไพรเมอร์จากงานวิจัยอื่นในการตรวจสอบแมลงวันผลไม้ 3 ชนิด (*B. dorsalis*, *B. tuberculata* และ *Z. cilifer*) ภายในปฏิกิริยาเดียว จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยศัตรูพืชในผลผลิตเพื่อการส่งออก เทคนิคดังกล่าวมีข้อได้เปรียบกว่า conventional PCR ในด้านการลดขั้นตอน เวลา และต้นทุนในการตรวจสอบ ทั้งยังสามารถนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยตัวอย่างที่อยู่ในระยะไข่ ตัวหนอน หรือดักแด้ ซึ่งไม่สามารถจำแนกชนิดได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว จึงเหมาะสำหรับประยุกต์ใช้ในงานอนุกรมวิธาน กักกันพืช การเฝ้าระวัง และการควบคุมคุณภาพสินค้าเกษตรก่อนการส่งออกอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้สอดคล้องกับมาตรฐานการค้าระหว่างประเทศ ในปัจจุบัน และสามารถต่อยอดเพื่อใช้กับแมลงศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ ในอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในอนาคตควรมุ่งเน้นการพัฒนาเทคนิค real-time PCR (qPCR) เพื่อเพิ่มความสามารถในการจำแนกชนิดเพื่อลดขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจาก real-time PCR สามารถตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ได้โดยไม่ต้องรอให้สิ้นสุดปฏิกิริยา หรือไม่ต้องตรวจสอบภายใต้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส หรือควรพัฒนาเทคนิค LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) ที่สามารถประยุกต์ใช้ในภาคสนามได้โดยไม่ต้องใช้เครื่อง thermal cycler รวมทั้งควรส่งเสริมการพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูปในรูปแบบ lateral flow หรือ chip-based ที่สามารถตรวจสอบแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดพร้อมกันโดยไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทาง ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชในระดับพื้นที่และด่านตรวจสินค้าเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และผลการศึกษาไม่เพียงมีความสำคัญเชิงวิชาการในการวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้อย่างแม่นยำ หากยังสามารถนำไปใช้จริงในงานกักกันพืช การเฝ้าระวัง การควบคุมคุณภาพสินค้าส่งออก และการสนับสนุนระบบการตรวจสอบด้านสุขอนามัยพืชของประเทศ ไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณข้าราชการ พนักงานราชการและลูกจ้าง กลุ่มงานอนุกรมวิธาน กลุ่มกัญและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชทุกท่านสำหรับความช่วยเหลือทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จ และลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

จิราภรณ์ เจริญทอง และ นภสร จรุงธนาภิบาล. 2549. การตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารโดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

- ยุวรินทร์ บุญทบ จารุวัตร ธำมรงค์ ชัยพร บัวมาศ เกศสุตา สนศิริ และ สุนัดดา เชาวลิท. 2565. การจำแนกชนิดและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ในประเทศไทย โดยยีน COX1. วารสารเกษตร. 38(2): 159-173.
- ยุวรินทร์ บุญทบ ญัฐริมา ไชยิตเจริญกุล ณัฐมน แก้วนัย นพรัตน์ บัวหอม และ ชุตติกาญจน์ ใจแล. 2566. การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera: Tephritidae) ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง. วารสารวิชาการเกษตร. 41(3): 236-250.
- ยุวรินทร์ บุญทบ ญัฐริมา ไชยิตเจริญกุล ณัฐมน แก้วนัย และ นพรัตน์ บัวหอม. 2564. การพัฒนาไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะจากยีน Cytochrome Oxidase I เพื่อตรวจวินิจฉัยแมลงวันแดง *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) เพื่อส่งเสริมการส่งออก. วารสารเกษตร. 37(3): 289-303.
- Afroz, S., S. Nomana, Y. Zhang, Y. Ali, R. Mahmud and Z. Li. 2022. Species identification of economic important adult fruit flies based on DNA Barcoding (MT DNA COI) and larvae based on species specific primers from Central and South part of Bangladesh. Malays. J. Sustain. Agric. 6: 103-109.
- Andrews, K. J., R. Bester, A. Manrakhan, and H. J. Maree. 2022. A multiplex PCR assay for the identification of fruit flies (Diptera: Tephritidae) of economic importance in South Africa. Scientific reports. 12(1): 13089. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17382-x>.
- Armstrong, K.F., C.M. Cameron and E.R. Frampton. 1997. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) species identification: A rapid diagnostic technique for quarantine application. Bulletin of Entomological Research. 87(2): 111-118.
- Castellanos, N. L., J. Yan, D. N. Gunawardana, B. McCarthy, S. George and D. Li. 2025. DNA barcodes for fruit fly species from Pacific Islands and development of multiplex real-time PCR assay for *Bactrocera facialis*, *B. passiflorae*, *B. kirki* and *B. distincta* (Tephritidae: Diptera). Applied Sciences. 15(16): 8889. <https://doi.org/10.3390/app15168889>
- Drew, R. A. I. and M. C. Romig. 2013. Tropical Fruit Flies (Tephritidae Dacinae) of South-East Asia: Indomalaya to North-West Australasia. CABI.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology. 3(5): 294-299.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball and J.R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences 270: 313-321.
- Jiang, F. 2015. Technique system for molecular identification of quarantine fruit flies in China. PhD dissertation, China Agricultural University, Beijing.
- Jiang, F., Q. Jin, L. Liang, A.B. Zhang, Z.H. Li, Z. Zhao, Z. and R. J. Zhang. 2013. Rapid diagnosis of the economically important fruit fly *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) based on a species-specific barcoding cytochrome oxidase I marker.

- Bulletin of Entomological Research.
103(3): 363-371. <https://doi.org/10.1017/LabLife-Real-time-PCR>. 2015. Compare and contrast: multiplex real vs singleplex PCR. Roche Life Science. Posted on September 19, 2015. Available at: https://www.lifescience.roche.com/en_th/blog/lab-life/real-time-pcr/compare-and-contrast-multiplexreal-vs-singleplex-pcr.html. Accessed: 12 August, 2019.
- Rodriguez, A., M. Rodriguez, J.J. Cordoba and M.J. Andrade. 2015. Design of primers and probes for quantitative Real-time PCR method. *Methods Mol Biol.* 1275: 31-56.

พัฒนาเทคนิค Polymerase Chain Reaction เพื่อการตรวจวินิจฉัย
เชื้อรา *Trichoderma asperellum*

Development Polymerase Chain Reaction technique for detection
of *Trichoderma asperellum*

ชนินทร์ ดวงอาด^{1/} มะโนรัตน์ สุดสงวน^{1/} วันวิสาข์ เพ็ชรอำไพ^{1/}

สุนิรัตน์ สีมะเดื่อ^{1/} อมรรักษ์ คัดใจเดียว^{1/} สุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง^{2/}

Chanintorn Doungsa-ard^{1/} Manorat Sudsanguan^{1/} Wanwisa Pet - amphai^{1/}

Suneerat Seemadua^{1/} Amonrat Kitjaideaw^{1/} Suttinee Likhitrakulrung^{2/}

ABSTRACT

The analysis and verification of *Trichoderma* biological products is a mission of the Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture. This task is part of the process for registering hazardous substances for agricultural use and includes verifying the species identity of samples collected by departmental officials. However, verifying the species using phylogenetic analysis is time - consuming and expensive. Therefore, a preliminary screening method is needed to reduce both the time and cost involved. This study was conducted to develop a rapid and accurate technique for detecting *Trichoderma* species using Polymerase Chain Reaction (PCR) - based technique and specific primers. The specific primers were designed based on the ITS and *tef1* gene loci. The primers were tested against the *Trichoderma* type sequences database. It was found that two pairs of primers based on the ITS region were found to be specific to the *T. asperellum* complex, as well as one pair of primers for the *tef1* region, which also presented specificity to the *T. asperellum* complex. All primers had the optimum annealing temperature at 60 °C. The results of testing the designed primers on the ITS locus with various DNA of fungal species showed that the primers were specific

Keywords: *Trichoderma asperellum*, detection

^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 19000. Thailand

^{2/} กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

^{2/} Division of Development of Inspection for Crops and Production Resources, Office of Agricultural Research and Development Region 1, Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives

* Corresponding author: Chanintorn Doungsa - ard; e - mail: chanintorn.dd@gmail.com

บทนำ

เชื้อราหลายสปีชีส์ในสกุล *Trichoderma* (Ascomycetes, Hypocreales) มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะทางด้านการเกษตรที่มีการใช้เชื้อรา ในสกุล *Trichoderma* เป็นสารชีวภัณฑ์ (biocontrol agent) (de los Santos-Villalobos et al., 2013; Kindermann et al., 1998; Mbarga et al., 2012) อันเนื่องมาจากคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเชื้อรา *Trichoderma* เป็นเชื้อราที่มีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วมักรวดเร็วกว่าเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการแย่งใช้สารอาหารและพื้นที่ในการเจริญ รวมถึงยังสามารถใช้สารอาหาร และเจริญในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (mycoparasite) นอกจากนี้ เชื้อรา *Trichoderma* ยังสร้างสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด และสารที่เชื้อรา *Trichoderma* สร้างขึ้นยังส่งผลดีต่อพืช โดยช่วยในการเจริญเติบโต (plant growth) รวมถึงกระตุ้นให้พืชมีความแข็งแรงต่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (plant defence responses) ดังนั้น เชื้อรา *Trichoderma* จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืช โดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียแก่พืชและสิ่งแวดล้อม และช่วยลดการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืช

Trichoderma asperellum เป็นเชื้อราที่เป็นที่รู้จักในสกุล *Trichoderma* และมีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยวิธีอย่างแพร่หลาย ซึ่งมีการส่งเสริมให้ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยทั้งทางภาครัฐและเอกชน รวมถึงมีการผลิตในเชิงการค้า การตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของเชื้อรา *T. asperellum* จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง หากมีการใช้ชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* ไม่ถูกต้องหรือไม่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ เช่น เกิดการปนเปื้อน หรือการผสมกันของเชื้อราปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด จะส่งผลกระทบต่อผลประสิทธิภาพและความยั่งยืนของการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช (Druzhinina et al., 2010) ในปัจจุบันมีหลายบริษัทมาขอขึ้นทะเบียนชีวภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์แต่เนื่องจากลักษณะความ

แตกต่างทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราในสกุล *Trichoderma* นั้นมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย จึงทำให้ยากต่อการจำแนกในระดับสปีชีส์

การจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* สามารถจำแนกได้ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา (Rifai, 1969; Bissett, 1984; Bissett, 1991a-c; Bissett, 1992) เช่น รูปร่างลักษณะและขนาดของ conidia สี ลักษณะผิว conidia (ornamentation) ลักษณะการแตกกิ่งก้าน การฟอร์มเส้นใยแบบ sterile หรือ fertile ความยาวที่ยื่นออกมาจากก้านชูสปอร์ แต่ทั้งนี้ ลักษณะความแตกต่างที่มีการรายงานหรือบันทึกไว้ดังกล่าวสามารถใช้แยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจนสำหรับบางสปีชีส์ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้หรือมีความคลุมเครือระหว่าง strain ของบางสปีชีส์ (Singh et al., 2014)

การจัดจำแนกและวิวัฒนาการของเชื้อรา *Trichoderma* โดยใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) มีการศึกษากันมากขึ้น โดยส่วนใหญ่ใช้ตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) (Dodd et al., 2000; Kindermann et al., 1998) แต่พบว่าการจำแนกด้วย ITS เพียงหนึ่งตำแหน่งไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* บางสปีชีส์ได้ เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* เหล่านี้มีวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน มักจะมีความคล้ายคลึงหรือมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมาก เช่น มีรายงานว่า *T. asperellum* เป็น complex species (มีมากกว่า 1 สปีชีส์ภายใต้ชื่อ *T. asperellum*) และลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะของ conidia ไม่สามารถใช้อ้างอิง หรือเปรียบเทียบเพื่อจำแนกชนิดได้ แต่เมื่อใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ the Internal Transcribed Spacer (ITS) translation elongation factor 1 (*tef1*) RNA polymerase subunit 2 (*rpb2*) และ actin (ACT) ในการจัดจำแนก (Samuels and Ismaiel, 2009) พบว่าเชื้อราชนิดนี้ประกอบไปด้วย *T. asperellum* และ *T. asperelloides* ซึ่งได้รับการบันทึกเป็นอีกสปีชีส์ของเชื้อรา *Trichoderma* (Samuels et al., 2010)

นอกจากนี้ยังพบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทั้งสองสปีชีส์นี้ มีความใกล้เคียงอย่างมากกับเชื้อรา *T. yunnanense* โดยสามารถแยกความแตกต่างได้โดยเปรียบเทียบข้อมูลของดีเอ็นเอเท่านั้น (Samuels et al., 2010) สำหรับเชื้อรา *T. harzianum* นั้น Chaverri et al. (2003) ทำการเปรียบเทียบลักษณะทางด้านพันธุกรรมจาก 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS *tef1* calmodulin และ actin เชื้อรา *Trichoderma* ที่พบในประเทศอินเดียจำนวนหลายไอโซเลทที่จัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาว่าเป็น *T. viride* แต่เมื่อใช้ข้อมูลของดีเอ็นเอจากตำแหน่ง ITS และ elongation factor พบว่าเชื้อราเหล่านี้คือเชื้อรา *T. asperellum* หรือ *T. asperelloides* (Sriram et al., 2013) จากการศึกษาลักษณะของ conidia ของเชื้อรา *T. harzianum* พบว่ามีความใกล้เคียงกับ conidia ของเชื้อรา *T. viride* โดยมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อยของลักษณะ ความหนาแน่น และเฉดสีของ conidia อีกทั้ง เชื้อรา *T. viride* ยังมีความใกล้เคียงกับ *T. asperellum* ดังนั้น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ไม่สามารถใช้อ้างอิงเพื่อจัดจำแนกอย่างชัดเจนได้ (Singh et al., 2014)

ปัจจุบันได้มีความพยายามพัฒนาเทคนิคที่มีความแม่นยำและรวดเร็วเพื่อตรวจสอบชนิดของ *Trichoderma* เช่น การใช้ isozymes การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน และ random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Zamir and Chet, 1985; Grondona et al., 1997; Miyazaki and Tsunoda, 2003) ทั้งนี้การตรวจสอบโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)-based และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะมีการนำมาใช้ในการตรวจสอบชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคพืชมากขึ้น (Devi et al., 2017; Mazzaglia et al., 2001; Konstantinova et al., 2002) ดังนั้นในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อรา *T. asperellum* ที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและมีความแม่นยำสูง เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเชื้อราดังกล่าวในสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร

อุปกรณ์และวิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Trichoderma*

1.1 รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Trichoderma* จากพิพิธภัณฑวัตถุโรคพืช และ culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รวบรวมตัวอย่างและแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

แยกเชื้อรา *T. asperellum* ที่ได้รับมาจากพิพิธภัณฑวัตถุโรคพืช และ culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชให้บริสุทธิ์ โดยวิธี single spore isolation ย้ายสปอร์เดี่ยวของเชื้อรา *T. asperellum* เลี้ยงลงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 7 - 21 วัน หากไม่มีการปนเปื้อนสามารถดำเนินการสกัดดีเอ็นเอ เชื้อที่เจริญจากสปอร์เดี่ยว จะทำการแยกเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ. เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

สกัดดีเอ็นเอ

เขียนเส้นใยของเชื้อรา *T. asperellum* ที่เจริญบนอาหาร PDA แล้วย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ เติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Meyer et al. (2012) และ Doungsa-ard et al. (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40°ซ.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตำแหน่ง the Internal Transcribed Spacer (ITS) และ the translation elongation factor 1- α (*tef1*) ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase (biotech rabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนดใช้ค่า annealing temperature 56°ซ. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ

ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยังบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี เพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทดลองมาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2020 (Kearse et al., 2012) บันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ FASTA ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

1.2 รวบรวมข้อมูลลำดับเบสของเชื้อราในสกุล *Trichoderma* จาก GenBank รวบรวมข้อมูลนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง ITS และ *tef1* ของเชื้อราในสกุล *Trichoderma* โดยเฉพาะกลุ่มของเชื้อรา *T. asperellum* complex ที่มีในฐานข้อมูล GenBank รวมถึง type sequence เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้จากข้อ 1.1

1.3 การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง ITS และ *tef1* ที่ได้จากการทดลองและจากการรวบรวมข้อมูลมาจัดเรียงด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Katoh and Toh, 2008) จากนั้นตรวจสอบการจัดเรียง (alignment) โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MEGA12: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 12 (Kumar et al., 2024)

2. ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อเชื้อรา *T. asperellum*

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา *T. asperellum* โดยการพิจารณาชุดข้อมูลของเชื้อราในสกุล *Trichoderma* และ ใช้โปรแกรม GPRIME ในการออกแบบ โดยออกแบบตำแหน่งจับอยู่ภายในตำแหน่ง ITS และ *tef1*

3. ทดสอบไพรเมอร์

3.1 ทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้กับดีเอ็นเอในฐานข้อมูล เช่น GenBank

3.2 ทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อรา *T. asperellum* และเชื้อราในสกุล *Trichoderma* จากพิพิธภัณฑ์โรคพืช และ culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยดำเนินการ ดังนี้

Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตำแหน่ง ITS และ *tef1* ด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 (White et al., 1990) และ EF1-728F/EF1-986R (Carbone and Kohn, 1999) EF1-728F (Carbone and Kohn, 1999)/EF-2 (O'Donnell et al., 1998) และไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบบนตำแหน่ง ITS และ *tef1* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ Taq DNA Polymerase (biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนดใช้ค่า annealing temperature ที่ 56°C.

Nested Polymerase Chain Reaction

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำ PCR ตำแหน่ง ITS ซึ่งใช้ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และ ตำแหน่ง *tef1* ซึ่งใช้ไพรเมอร์ EF1-728F/EF1-986R และ EF1-728F/EF-2 มาทำ Nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบโดยใช้ Taq DNA Polymerase (biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนดใช้ค่า annealing temperature 56°C. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยังบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

4. ตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* ที่ไพรเมอร์จำเพาะตรวจจับได้

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างจาก clean culture ที่ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อรา *T. Asperellum* มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบกับกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2020 (Kearse et al., 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบชนิด โดยวิธี phylogenetic reconstruction ของ combined dataset ที่ได้จากตำแหน่ง ITS และ *tef1* ด้วยเกณฑ์ Maximum Likelihood (ML) โดยเตรียมไฟล์ .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 วิเคราะห์ผลเพื่อตรวจสอบชนิดที่ถูกต้องที่ไพรเมอร์จำเพาะตรวจจับได้

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Trichoderma*

เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อรา *T. asperellum* ดำเนินการรวบรวมเชื้อรา *Trichoderma* มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ได้จำนวน 115 ไอโซเลท สกัดดีเอ็นเอและทำ PCR ตำแหน่ง ITS, *tef1* และ *rpb2* หลังจาก sequencing ได้ข้อมูล sequence ของเชื้อรา *T. asperellum* ทั้ง 115 ไอโซเลท จำนวน 3 ตำแหน่ง มาทำการตรวจสอบเพื่อจำแนกชนิดด้วยวิธี phylogenetic reconstruction เปรียบเทียบกับ สายพันธุ์ต้นแบบ (type sequence) ของเชื้อราในสกุล *Trichoderma* ซึ่งเป็นวิธีการที่ได้มาตรฐานและมีความแม่นยำสูง

ผลการจำแนกชนิด พบว่าได้ตัวอย่างของเชื้อราที่อยู่กลุ่มของ *T. harzianum* complex

T. asperellum complex และในกลุ่มของ Longibrachiatum ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างกลุ่มนี้มีความหลากหลายและเหมาะสมที่จะนำมาทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบ เพื่อตรวจสอบความจำเพาะต่อ DNA ของเชื้อราเป้าหมาย

2. ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อเชื้อรา *T. asperellum*

ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะบนยีนตำแหน่ง ITS และ *tef1* ของเชื้อรา *T. asperellum* voucher CBS 433.97 ซึ่งเป็น type isolate ของเชื้อรา *T. asperellum* ซึ่งการใช้ type isolate ที่เป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์เป็นวิธีการที่ถูกต้องตามหลักการทางอนุกรมวิธาน ทำให้มั่นใจได้ว่าไพรเมอร์ที่ได้จะจำเพาะเจาะจงกับเชื้อราเป้าหมาย ได้ไพรเมอร์จากตำแหน่ง ITS จำนวน 10 คู่ และตำแหน่ง *tef1* ได้จำนวน 6 คู่ (Table 1) จำนวนคู่ไพรเมอร์ที่ได้ทำให้มีตัวเลือกในการนำไปทดสอบประสิทธิภาพและเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ดีที่สุดสำหรับการพัฒนาวิธีการตรวจสอบต่อไป

Table 1 List of primers specific to *Trichoderma asperellum*/ *T. asperelloides*, designed based on the ITS and *tef1* gene region.

ITS					tef1				
		Sequence (5' - >3')	Tm	size			Sequence (5' - >3')	Tm	size
1	F	ACGTTACNNNCTGTTGCCT	57.95	269	1*	F	GGCTTTTAGTNNNGTGCAA	58.01	319
	R	CGCAATGTGCGTTCNNNGAT	58.03			R	TGCAATGTNNNCTGAAGTGT	57.76	
2	F	TCTGGCANNNATGAAGAACG	58.07	215	2	F	TTGGCTNNNAGTGGGGTGTC	58.01	320
	R	GACCGCCNNNGTATTTAGGG	58.05			R	GCAATGTCNNNTGAAGTGTC	57.14	
3	F	ACAACCCCNNNCCCAATGT	57.53	214	3	F	GCCCCGANNNTTCTGTTCTCA	58.19	426
	R	CATCGATGCCAGAACCAAGA	57.97			R	TGTCGACTNNNGTGTCCTCAA	57.03	
4*	F	CCTCGCGNNNGTATTTCTTT	58.36	223	4	F	TGCCCGACNNNTCTGTCTCTC	58.19	428
	R	GGGTTTCGNNNGTTGAAATGA	57.81			R	ATGTCGNNNGAAGTGTCCTCAA	56.8	
5	F	ATCTCTTNNNTCTGGCATCG	57.68	263	5	F	TTCCATNNNCCACCACATGC	58.23	257
	R	GAGTTGTGCNNNCTACTGCG	57.7			R	AATGTCGACTNNNGTGTCCTCAA	56.8	
6	F	TTACCNNTGTTGCCTCGG	58.4	430	6	F	TGTTTGCTNNNAGTGGGGT	57.54	319
	R	CGAGTTGTGCNNNCTACTGC	57.7			R	TGTCGACTGAANNNTCCAAAA	57.75	
7	F	TCCCNNTCCCAATGTGAACG	58.68	210					
	R	TCATCGATGNNNGAACCAAG	57.97						
8	F	ACTCCCNNTCCCAATGTGAA	57.23	214					
	R	CTTCATCGATNNNAGAACCA	57.97						
9	F	ATGAAGANNNCAGCGAAATG	57.47	286					
	R	AGTTGGGTGNNNTACGGACG	58.41						
10	F	AACTCCCNNTCCCAATGTGA	57.23	216					
	R	TCTTCATCNNNGCCAGAACC	57.68						

ITS: *4: Trias3 - F/Trias4R, *tef1*: Tritef1F/EF2

3. ทดสอบไพรเมอร์

ทำการทดสอบไพรเมอร์กับฐานข้อมูลเชื้อรา *Trichoderma* ในระดับของ type sequences ได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อรา *T. asperellum* ระดับของกลุ่ม complex บนตำแหน่ง ITS จำนวน 2 คู่ ได้แก่ Trias3-F/Trias4-R และ Trias3-F/ITS4 (Figure 1) และมีตำแหน่งจับของไพรเมอร์ Trias1-F Trias2-R Trias3-F และ Trias4-R บนตำแหน่ง ITS ของเชื้อรา *T. asperellum* CBS 433.97 (Figure 2) โดยไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ มี annealing temperature ที่เหมาะสมคือ 56 - 60°C. และตำแหน่ง *tef1* จำนวน 1 คู่ คือ Tritef1F/EF2 เมื่อทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบบนตำแหน่ง ITS และ *tef1* กับดีเอ็นเอของเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. asperelloides* โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จำนวน 20 µL ประกอบด้วย Taq DNA Polymerase (biotech rabbit™) จำนวน 10 µL ไพรเมอร์ความเข้มข้น 10 µM ทั้ง forward และ reverse อย่างละ

1 µL dH₂O จำนวน 7 µL และ DNA ทดสอบจำนวน 1 µL พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบจากตำแหน่ง ITS มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 56°C. และตำแหน่ง *tef1* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 60°C. อย่างไรก็ตามไพรเมอร์จากตำแหน่ง *tef1* มีความจำเพาะต่อ *T. asperellum* ระดับของกลุ่ม complex น้อยกว่าไพรเมอร์ออกแบบที่ได้จากตำแหน่ง ITS ซึ่งไม่สามารถแยกตรวจเชื้อรา *T. pseudoasperelloides* และ *T. yunnanense* ได้ ในขณะที่ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากตำแหน่ง ITS สามารถตรวจจับเชื้อรา *T. asperellum* ระดับของกลุ่ม complex ได้เฉพาะเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. asperelloides* งานวิจัยนี้สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่เจาะจงกับเชื้อรา *T. asperellum* ในระดับกลุ่ม complex ได้สำเร็จ และได้ระยะเวลาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR (Table 2) ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญเพื่อช่วยในการตรวจหาเชื้อชนิดนี้โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อราชนิดอื่น ๆ

ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งผลจากการใช้ฐานข้อมูล type sequences ของเชื้อรา *Trichoderma* เป็นพื้นฐานในการออกแบบ

ไพรเมอร์ ทำให้เกิดความเชื่อมั่นของความแม่นยำต่อเชื้อราเป้าหมายที่ต้องการตรวจสอบ

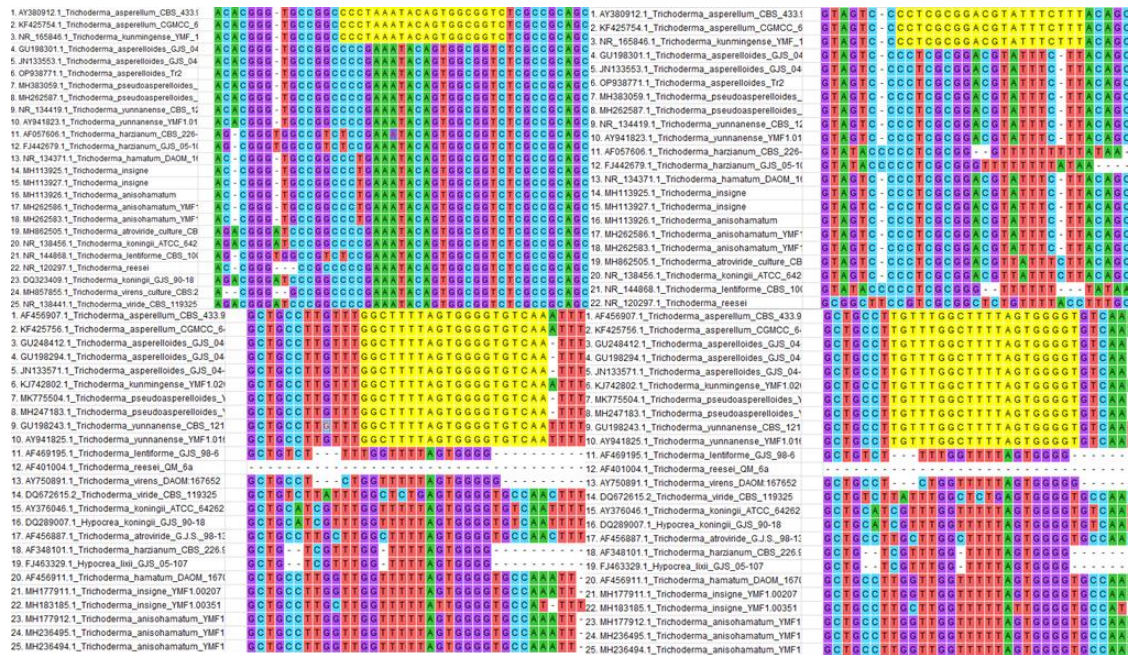


Figure 1 The specificity of the designed primers against *Trichoderma asperellum* CBS 433.97 (type)

Table 2 Thermocycle for Polymerase Chain Reaction (PCR) for specific primers to *Trichoderma asperellum*/ *T. asperelloides*

PCR steps	Temperature °C	Time	Cycle
Initial denaturation	95	5 mins	1 cycle
Denaturation	95	1 min	
Annealing (ITS/ <i>tef1</i>)	56/60	1 min	30 cycles
Extension	72	3 mins	
Final extension	72	5 mins	1 cycle



Figure 2 Binding sites of the Trias1 - F, Trias2 - R, Trias3 - F, and Trias4 - R primers on the ITS gene sequence of *Trichoderma asperellum* (CBS 433.97, type)

ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบบนตำแหน่ง ITS และ *tef1* กับดีเอ็นเอของเชื้อราที่รวบรวมเพื่อการทดสอบ ได้แก่ เชื้อรา *T. asperellum* จำนวน 50 ไอโซเลท เชื้อรา *T. asperelloides* จำนวน 48 ไอโซเลท เชื้อรา *T. parareesei* จำนวน 2 ไอโซเลท เชื้อรา *T. longibrachiatum* จำนวน 1 ไอโซเลท เชื้อรา *T. viride* complex จำนวน 5 ไอโซเลท เชื้อรา *T. lixii* จำนวน 2 ไอโซเลท เชื้อรา *T. harzianum* จำนวน 2 ไอโซเลท เชื้อรา *T. lentiforme* จำนวน 2 ไอโซเลท เชื้อรา *T. afroharzianum* จำนวน 2 ไอโซเลท และเชื้อรา *Gliocladium* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท พบว่าไพรเมอร์ Trias3 - F/Trias4 - R และ Trias3 - F/ITS4 มีความจำเพาะต่อเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. asperelloides* (Figure 3) ทั้งนี้เชื้อราทั้งสองชนิดมีความคล้ายคลึงกันมากโดยเป็น sister group ในการจำแนกระหว่างเชื้อราสองชนิดนี้ยังคงต้องใช้วิธี phylogenetic reconstruction ถึงแม้ว่าไพรเมอร์ที่ได้จะมีความจำเพาะต่อเชื้อรา *T. asperellum* ในระดับกลุ่ม complex แต่ไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถระบุชนิดหรือใช้แยกเชื้อรา

T. asperellum และ *T. asperelloides* ออกจากเชื้อรา *Trichoderma* กลุ่มอื่นได้อย่างชัดเจน พบว่ามีความพยายามในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อรา *T. asperellum* ซึ่งมีการออกแบบบนตำแหน่ง *rpb2* อย่างไรก็ตามจากรายงานไม่ได้บ่งชี้ว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถแยกเชื้อรา *T. asperellum* จาก *T. asperelloides* ได้ (Devi et al., 2017) ซึ่งอาจต้องพิจารณาการออกแบบไพรเมอร์ด้วยตำแหน่ง *rpb2* หรือตำแหน่งอื่นเพิ่มเติม เช่น *tub2* โดยใช้วิธีการจากการศึกษาครั้งนี้ เพื่อพัฒนาให้ได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชนิดของเชื้อรา *T. asperellum* มากขึ้น และผลจากการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ในการคัดกรองหรือตรวจสอบชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* ในตัวอย่างชีวภัณฑ์ สามารถลดระยะเวลาและงบประมาณในการดำเนินการได้มากกว่า 5 เท่า คือสามารถลดระยะเวลาในการตรวจสอบชนิดจาก 15 วัน เหลือระยะเวลาเพียง 3 วัน

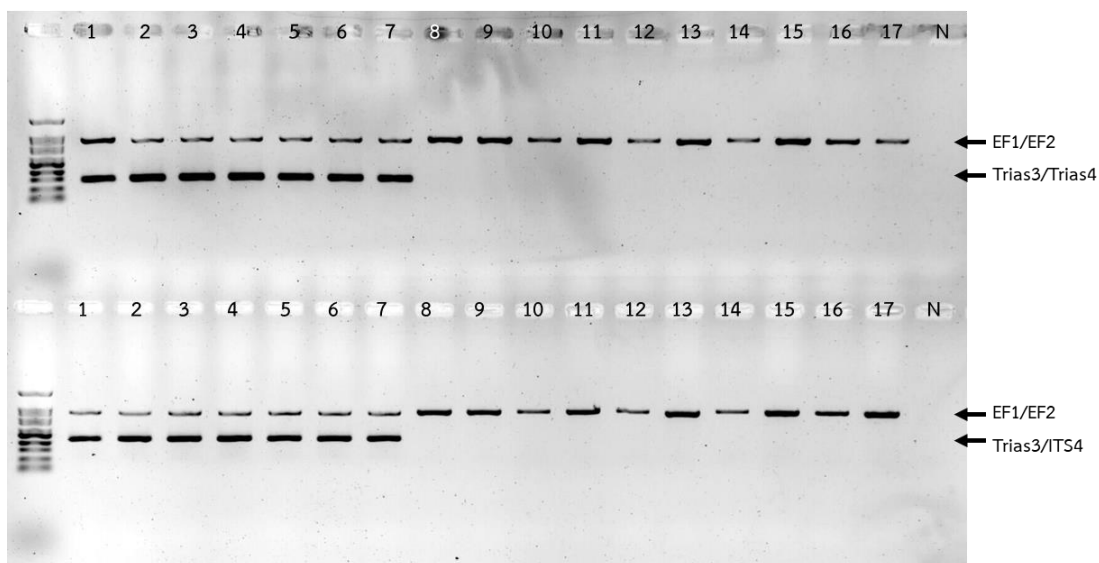


Figure 3 The results of specific primers tested with DNA templates of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* sp. The lower bands showed that Trias3/Trias4 and Trias3/ITS4 detected only *T. asperellum* and *T. asperelloides*. (Lane no.1 - 4= *T. asperellum*; 5 - 7= *T. asperelloides*; 8 - 9= *T. parareesei*; 10= *T. longibrachiatum*; 11 - 12= *T. viride* complex; 13= *T. lixii*; 14= *T. harzianum*; 15= *T. lentiforme*; 16= *T. afroharzianum*; 17= *Gliocladium* sp.)

สรุปผลการทดลอง

ผลจากการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิค Polymerase Chain Reaction เพื่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อรา *Trichoderma asperellum* ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความซับซ้อน (complex) ผลการดำเนินงาน ได้ไพรเมอร์ที่ออกแบบบนตำแหน่ง ITS ของเชื้อรา *T. asperellum* voucher CBS 433.97 ซึ่งเป็น type isolate โดยมีความจำเพาะต่อเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. asperelloides* ได้แก่ Trias3 - F/Trias4 - R และ Trias3 - F/ITS4 รวมถึงได้อุณหภูมิ ระยะเวลาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR จากขั้นตอนการดำเนินงานสามารถนำมาจัดทำเป็นเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัย อย่างไรก็ตามจากผลการดำเนินงานพบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบไม่สามารถแยก *T. asperelloides* จาก *T. asperellum* ได้ เนื่องจากทั้งสองชนิดมีความใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นไพรเมอร์ที่ออกแบบจึงสามารถตรวจจับได้ทั้งเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. asperelloides* โดยไม่จับกับกลุ่มอื่นของเชื้อรา *Trichoderma* เช่น เชื้อรา

T. harzianum, *T. parareesei*, *T. lixii* วิธีการตรวจสอบเชื้อรา *T. asperellum* ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ในการตรวจสอบเชื้อราดังกล่าวในสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร หรือในกระบวนการตรวจสอบความถูกต้องของชีวภัณฑ์ สามารถคัดกรองเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. asperelloides* ออกจาก *T. harzianum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็วและมีความแม่นยำสูง สามารถประหยัดเวลาและงบประมาณในการดำเนินการได้

เอกสารอ้างอิง

- Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. Canadian Journal of Botany. 62: 924-931.
- Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Canadian Journal of Botany. 69: 2357-2372.
- Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. Canadian Journal of Botany. 69: 2373-2417.
- Bissett, J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. Canadian Journal of Botany. 69: 2418-2420.
- Bissett, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. Canadian Journal of Botany. 70: 639-641.
- Carbone, I. and L.M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia. 91: 553-556.
- Chaverri, P., L.A. Castlebury, G.J. Samuels and D.M. Geiser. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. Molecular Phylogenetics and Evolution. 27: 302-313.
- de los Santos-Villalobos, S., D.A. Guzmán-Ortiz, M.A. Gómez-Lim, J.P. Délano-Frier, S. de-Folter, P. Sánchez-García and J.J. Peña-Cabriales. 2013. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8 a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). Biological Control. 64: 37-44.
- Devi, T.P., N. Prabhakaran and D. Kamil. 2017. Development of Species Specific Markers for the identification of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma harzianum*. Vegetos. 30: 94-100. Doi: 10.5958/2229-4473.2017.00177.X.
- Dodd, S.L., R.N. Crowhurst, A.G. Rodrigo, G.J. Samuels, R.A. Hill and A. Stewart. 2000. Examination of *Trichoderma* phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. Mycological Research. 104: 23-34.
- Doungsa-ard, C., A.R. McTaggart, A.D.W. Geering, T.U. Dalisay, J. Ray and R.G. Shivas. 2015. *Uromycladium falcatarium* sp. nov., the cause of gall rust on *Paraserianthes falcataria* in south-east Asia. Australasian Plant Pathology. 44: 25-30.
- Druzhinina, I.S., C.P. Kubicek, M. Komon-Zelazowska, T.B. Mulaw and J. Bissett. 2010. The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. BMC evolutionary biology. 10: 1-14.
- Grondona, R., R. Hermosa, M. Tejada, M.D. Gomis, P.D. Bridge, E. Monte and I. Garcia-Acha. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. Applied Environmental Microbiology. 63: 3189-3198.

- Katoh, K. and H. Toh. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*. 9: 286-298.
- Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Mentjies and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28: 1647-1649.
- Kindermann, J., Y. El-Ayouti, G.J. Samuels and C.P. Kubicek. 1998. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the Internal Transcribed Spacer region 1 of the rDNA cluster. *Fungal Genetics and Biology*. 24: 298-309.
- Konstantinova, P., P. Bonants, M. Gent-Pelzer, P. Zouwen and R. Bulk. 2002. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assay. *Mycological Research*. 106: 23-33.
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33: 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Mazzaglia, A., N. Anselmi, A. Gasbarri and A. Vannini. 2001. Development of a polymerase chain reaction (PCR) assay for the specific detection of *Biscogniauxia mediterranea* living as an endophyte in oak tissues. *Mycological Research*. 105: 952-956.
- Mbarga, J.B., G.M. Ten Hoopen, J. Kuate, A. Adiobo, M.E.L. Ngonkeu, Z. Ambang, A. Akoa, P.R. Tondje and B.A.D. Begoude. 2012. *Trichoderma asperellum*: A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. *Crop Protection*. 36: 18-22.
- Miyazaki, K and M. Tsunoda. 2003. Application of DNA markers to research on *Trichoderma* in mushroom facilities of Japan (1): RAPD, SSCP marker. *Mushroom Science Biotechnology*. 11: 65-70.
- Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*. 116: 1-116.
- Samuels, G.J., A. Ismaiel, M. Bon, S.D. Respinis, and O. Petrini. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia*. 102: 944 - 966.
- Singh, A., M. Shahid and M. Srivastava. 2014. Phylogenetic relationship of *Trichoderma asperellum* Tasp/8940 using Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences. *International Journal of Advanced Research*. 2: 979 - 986.
- Sriram, S., M.J. Savitha, H.S. Rohini and S.K. Jalali. 2013. The most widely used fungal antagonist for plant disease management in India, *Trichoderma viride* is *Trichoderma asperellum* as confirmed by oligonucleotide barcode and morphological characters. *Current Science*. 104: 1332 - 1340.

- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post - analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 30: 1312 - 1313.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315 - 322. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky and T. White, eds.), Academic Press.
- Zamir, D. and I. Chet. 1985. Application of enzyme electrophoresis for the identification of isolates in *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal Microbiology*. 31:578–580.

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากและทางผิวหนังของชีวภัณฑ์ป้องกันกำจัดโรคพืช

Trichoderma harzianum DOA-TH50 ในหนูแรท

Acute Oral Toxicity and Acute Dermal Toxicity Study of

Trichoderma harzianum DOA-TH50 in Rats

ทศดาว เกตุเนตร^{1/} วิชาญ วรธนะไกววัล^{1/} สมเกียรติ กล้าแข็ง^{1/} ศุภกร วงษ์เรืองพิบูล^{1/}

Thasdaw Katenate^{1/} Vichan Watthanakaiwan^{1/} Somkiat Klakhang^{1/}

Suphakorn Wongruenpibool^{1/}

ABSTRACT

Acute oral and dermal toxicity studies were conducted using a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 as the test material, at doses of 5,000 mg/kg body weight for oral administration and 2,000 mg/kg body weight for dermal exposure. Both studies were performed in accordance with OECD Test Guidelines 423 and 402. The results demonstrated that *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 produced no evidence of acute toxicity in rats by either the oral or dermal route during the 14-day observation period. No mortality, clinical signs of toxicity, or alterations in behavior were observed. Gross and histopathological examinations revealed no abnormalities in internal vital organs. Accordingly, *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 was classified under the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) as Category 5 (Unclassified). These findings indicate that *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 does not exert toxicological effects following acute oral or dermal exposure and may therefore be considered a safe biological control agent.

Keywords: Acute Oral Toxicity, Acute dermal Toxicity, Toxicology, Laboratory animals, *Trichoderma harzianum*

^{1/} กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 19000. Thailand

* Corresponding author: thasdaw.ka@gmail.com

บทคัดย่อ

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากและทางผิวหนังในหนูแรท โดยการใช้สารแขวนลอยสปอร์ *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ปริมาณความเข้มข้น 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู สำหรับป้อนทางปาก และที่ปริมาณความเข้มข้น 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู สำหรับแปะผิวหนัง ตามแนวปฏิบัติของ OECD Test Guideline 423 และ OECD Test Guideline 402 พบว่า เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลัน ในหนูทั้งทางปากและทางผิวหนัง และเมื่อสังเกตติดตามอาการเป็นเวลา 14 วัน ไม่พบอัตราการตาย ไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมและไม่พบลักษณะที่ผิดปกติของอวัยวะภายใน ดังนั้นเมื่อจัดระดับความเป็นพิษเฉียบพลันตามเกณฑ์จำแนกความปลอดภัยตามระบบการจัดกลุ่มสารเคมีและการติดฉลากของวัสดุทดสอบตามหลักเกณฑ์ของ Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) พบว่า เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 จัดอยู่ใน category 5 (Unclassified) ไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากและทางผิวหนังในหนูแรท จึงจัดเป็นชีวภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยสูง

คำสำคัญ: การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนัง พิษวิทยา สัตว์ทดลอง เชื้อราไตรโคเดอร์มา ฮาเซียนัม

บทนำ

กรมวิชาการเกษตร ได้พัฒนาชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืช มีความปลอดภัยสูง ต่อมนุษย์ สัตว์ พืช และสิ่งแวดล้อม เพื่อให้เกษตรกรใช้ทดแทนการใช้สารเคมีทางการเกษตร ชีวภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืช (Biological Control Agents; BCA) ประกอบไปด้วยสิ่งมีชีวิตและสารออกฤทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์กำจัดศัตรูพืช สิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่ สารสกัดจากพืช

ธรรมชาติ เป็นต้น (สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, 2563) ซึ่งชีวภัณฑ์ *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 เป็นส่วนหนึ่งในชีวภัณฑ์ที่นักวิจัยกรมวิชาการเกษตร นำมาศึกษาวิจัยและพัฒนาจนสามารถนำมาเพาะเลี้ยงขยายปริมาณและผลิตแจกจ่ายไปสู่มือเกษตรกร เพื่อนำไปใช้ขยายผลต่อยอดเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณ และใช้ในการควบคุมศัตรูพืช เพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ดังนั้นการทดสอบความเป็นพิษหรือความปลอดภัยของชีวภัณฑ์ *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 มีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อให้ได้ข้อมูลด้านความเป็นพิษต่อระบบต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องและมีการประเมินความเสี่ยงก่อนการนำชีวภัณฑ์นั้น ๆ มาใช้ การทดสอบความเป็นพิษนี้โดยปกติแล้วเป็นการทดสอบโดยใช้สัตว์ทดลอง ชนิดและจำนวนสัตว์ทดลองที่นำมาใช้จะถูกพิจารณากระบวนการขั้นตอนที่ถูกต้องทางวิทยาศาสตร์ และหลักจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง โดยคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง นอกจากนี้ ยังมีประกาศควบคุมการใช้สารด้วยระเบียบสารเคมีของสหภาพยุโรป REACH บังคับให้สารเคมีทุกชนิด ทั้งที่มีอยู่แล้วและผลิตขึ้นใหม่ ต้องมีข้อมูลทางพิษวิทยาด้วยเหตุนี้จึงมีวิธีทางเลือก (alternative methods) เกิดขึ้นเพื่อใช้ในการทดสอบ การทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีทางเลือก สามารถปฏิบัติตาม OECD Test Guidelines ซึ่งเป็นวิธีที่ผ่านกระบวนการทดสอบความใช้ได้ของวิธีและมีการยอมรับในระดับสากลแล้วเพื่อหาค่า LD₅₀ (Acute oral and dermal) คู่มือผลลัพธ์ คือ อัตราการตาย (mortality) และอาการความเป็นพิษที่บ่งชี้ชัดเจน (evident toxicity) ในสัตว์ทดลอง เป็นข้อมูลความปลอดภัยตามระบบการจัดกลุ่มสารเคมีและการติดฉลากของวัสดุทดสอบตามหลักเกณฑ์ของ Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) (United Nations, 2019) อีกทั้งตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 สารชีวภัณฑ์กำจัดศัตรูพืชจัดเป็นวัตถุอันตราย ชนิดที่ 2 ซึ่งจะต้องขึ้นทะเบียนและแจ้งการดำเนินการก่อนการประกอบกิจการ

ดังนั้นภาคเอกชนที่เข้ามารับการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตชีวภัณฑ์กำจัดศัตรูพืชของกรมวิชาการเกษตรต้องผ่านการขึ้นทะเบียนก่อน จึงสามารถดำเนินการผลิตเพื่อจำหน่ายเชิงการค้าได้ ซึ่งข้อมูลพิษวิทยาในสัตว์ทดลองตามมาตรฐานสากลนั้น อยู่ในข้อมูลเพื่อการขึ้นทะเบียนชีวภัณฑ์กำจัดศัตรูพืชด้วยเช่นกัน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก (Acute Oral Toxicity) และความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนัง (Acute dermal Toxicity) โดยการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก จะมีการให้สารทดสอบทางปาก (oral administration) กับหนู สามารถให้ครั้งเดียวหรือหลายครั้งก็ได้ภายใน 24 ชั่วโมง และดูผลภายใน 14 วัน โดยสังเกตอาการไม่พึงประสงค์ (adverse effects) ไปจนถึงรุนแรงถึงเสียชีวิต (OECD, 2000) เพื่อหาค่า LD₅₀ (Acute oral) โดยการปฏิบัติตาม OECD Test Guideline 423 (OECD, 2001) และการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนัง เป็นการทดสอบพิษที่อาจเกิดขึ้นในระยะสั้นจากการสัมผัสกับสารที่เป็นของแข็งหรือของเหลวโดยทางผิวหนัง โดยสังเกตอาการไม่พึงประสงค์ (adverse effects) ไปจนถึงรุนแรงถึงเสียชีวิต ภายในระยะเวลา 14 วัน เพื่อหาค่า LD₅₀ (Acute dermal) โดยการปฏิบัติตาม OECD Test Guideline 402 (OECD, 2017)

1. การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก (Acute Oral Toxicity)

ดำเนินการทดสอบตามแนวปฏิบัติของ OECD Test Guideline 423: Acute oral toxicity- Acute toxic class method of OECD guidelines for testing of chemicals (2001)

1.1 การเตรียมวัสดุทดสอบ

นำวัสดุทดสอบ *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่พร้อมใช้ให้เป็นสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ปริมาณ 5 ก. ผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 12.5 มล. เพื่อให้ได้สารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู เมื่อชีวภัณฑ์

ผสมเข้ากันแล้ว จะทำการผสมอีกครั้งด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) เพื่อให้ละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการทดสอบค่าความเป็นกรดต่าง ด้วยกระดาษสำหรับวัดค่าพีเอช (pH indicator strips) โดยสารแขวนลอยสปอร์ มีค่า pH = 6.0 การเตรียมวัสดุทดสอบต้องดำเนินการพร้อมกับการทดสอบความเป็นพิษในหนูแรทภายในวันเดียวกัน

1.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้หนูแรททดลองสายพันธุ์ Jcl:SD เพศเมีย 3 ตัว อายุ 8 สัปดาห์ ที่ไม่มีการตั้งท้องและไม่อยู่ในระยะให้นม สุขภาพแข็งแรง จากบริษัท โนมูระ สยาม อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด พร้อมทั้งได้ใบรับรองสุขภาพหนูแรท (Animal Health Certificate) นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อให้หนูปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม โดยมีการควบคุมอุณหภูมิอยู่ในช่วง 22±3°C. ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 50 - 60 % และมีระบบควบคุมแสงสว่างที่เหมาะสมในแต่ละวัน โดยเปิดไฟเป็นระยะเวลา 12 ชม. ปิดไฟเป็นระยะเวลา 12 ชม. หนูแรทได้รับอาหารเม็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล และน้ำกรอง Reverse Osmosis อย่างเต็มที่ ตลอดการทดลอง มีการใส่วัสดุรองนอนในกรง และมีการเปลี่ยนวัสดุรองนอนทุก 3 - 4 วัน หรือเปลี่ยนเมื่อพบว่ามีความชื้นแฉะภายในกรงทดลอง โดยดำเนินการตามแนวปฏิบัติของ Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition (National research council, 2011) ตามใบอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ เลขที่ U1-04925-2559 สถาบันพัฒนาการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (สพสว.) สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

1.3 การป้อนวัสดุทดสอบ

โดยก่อนวันทดสอบนำหนูแรททั้ง 3 ตัว ใส่ลงในกรงพลาสติกทดลองขนาด 23x52x22 ซม. แยกเลี้ยงหนูแรท 1 ตัวต่อกรง และอดอาหารแต่ไม่อดน้ำเป็นระยะเวลา 1 คืน (หนูแรท 1 ตัว/ 1 วัสดุทดสอบ)

เริ่มป้อนวัสดุทดสอบโดยดำเนินการให้สารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 โดยตรงทางปากกับหนูแรท (gavage feeding) ด้วย feeding tube ให้สารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู ปริมาณสารแขวนลอยสปอร์ที่ใช้ป้อนหนูแรทแต่ละตัวนั้น ขึ้นอยู่กับน้ำหนักตัวของหนู

โดยปริมาณการให้สารแต่ละครั้งมีขนาดไม่เกิน 2 มล./100 ก. น้ำหนักตัวหนู ภายหลังป้อนสารทดสอบครบ 4 ชม. ให้อาหารแก่หนูแรทตามปกติ (Figure 1) ปริมาณสารแขวนลอยสปอร์ที่ป้อนทางปากแก่หนูแรทแต่ละตัวเท่ากับ 3.94, 3.90 และ 3.41 มล. ตามลำดับ (Table 1)

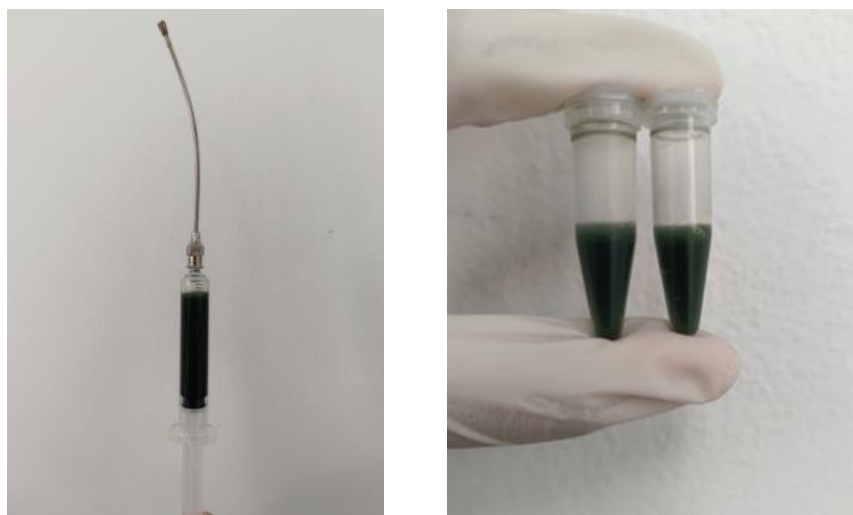


Figure 1 Oral administration of a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 at an acute dose of 5,000 mg/kg. body weight to rats.

Table 1 Oral administration of a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 to three rats.

No. of animal	Sex	Concentration of substance (mg/kg/day)	Body weight (g.)	Amount of substance (mL.)
1	female	5,000	315.00	3.94
2	female	5,000	312.00	3.90
3	female	5,000	273.10	3.41

1.4 การสังเกตผลการทดสอบ

สังเกตอาการทางคลินิกและพฤติกรรมของหนูแรท ได้แก่ อาการที่ผิดปกติ ความเจ็บปวด อาการสั่น (tremor) อาการชัก (convulsion) อาการท้องเสีย (diarrhea) อาการอ่อนเพลีย (lethargy) อาการน้ำลายไหล (salivation) และอาการหมดสติ (coma) ที่ระยะเวลา 30 นาที 1 และ 4 ชม. หลังจากนั้นเฝ้าดู

อาการทางคลินิกที่เกิดขึ้นในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. จากนั้นสังเกตอาการวันละครั้งทุกวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน บันทึกปริมาณอาหารและน้ำที่หนูแรทกินทุกวัน และบันทึกน้ำหนักตัวหนูแรทที่เวลา 1, 7 และ 14 วัน หลังจากได้รับวัสดุทดสอบ และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างข้อมูลเพื่อประเมินผลของวัสดุทดสอบต่ออัตราการเจริญเติบโตของหนู

ก่อนสิ้นสุดการทดสอบที่ระยะเวลา 14 วันหลังจากได้รับวัสดุทดสอบ ทำการอดอาหารหนูแรทที่ยังไม่ตายเป็นเวลา 1 คืน ก่อนการการุณยฆาต โดยการให้หนูแรทสูดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และผ่าช่องท้องและช่องอกเพื่อชันสูตรซาก ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของอวัยวะภายในด้วยตาเปล่า (gross examination)

2. การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนัง (Acute dermal Toxicity)

ดำเนินการทดสอบตามแนวปฏิบัติของ OECD Test Guideline 402: Acute dermal toxicity: fixed dose procedure of the OECD guidelines for testing of chemicals (2017)

2.1 การเตรียมวัสดุทดสอบ

นำวัสดุทดสอบ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่พร้อมใช้ให้เป็นสารแขวนลอยสปอร์ ปริมาณ 2 ก. ผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มล. เพื่อให้ได้สารแขวนลอยสปอร์ ความเข้มข้น 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู เมื่อชีวภัณฑ์ผสมเข้ากันแล้ว จะทำการผสมอีกครั้งด้วยเครื่องผสมสารละลาย เพื่อให้ละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการทดสอบค่าความเป็นกรดต่าง ด้วยกระดาษสำหรับวัดค่าพีเอช โดยสารแขวนลอยสปอร์ มีค่า pH = 6.0 การเตรียมวัสดุทดสอบต้องดำเนินการพร้อมกับการทดสอบความเป็นพิษในหนูแรทภายในวันเดียวกัน

2.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้หนูแรททดลองสายพันธุ์ Jcl:SD เพศเมีย 3 ตัว อายุ 8 สัปดาห์ ที่ไม่มีการตั้งท้องและไม่อยู่ในระยะให้นม สุขภาพแข็งแรง จากบริษัท โนมูระสยาม อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด พร้อมทั้งได้ใบรับรองสุขภาพหนูแรท (Animal Health Certificate) นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อให้หนูปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม โดยมีการควบคุมอุณหภูมิอยู่ในช่วง $22\pm 3^{\circ}\text{C}$. ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 50 - 60 % และมีระบบควบคุมแสงสว่างที่เหมาะสมในแต่ละวัน โดยเปิดไฟเป็นระยะเวลา 12 ชม. ปิดไฟเป็นระยะเวลา 12 ชม. หนูแรทได้รับอาหารเม็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล และน้ำ

กรอง Reverse Osmosis อย่างเต็มที่ตลอดการทดลอง มีการใส่วัสดุรองนอนในกรง และมีการเปลี่ยนวัสดุรองนอนทุก 3 - 4 วัน หรือเปลี่ยนเมื่อพบว่ามี ความชื้นและภายในกรงทดลอง โดยดำเนินการตามแนวปฏิบัติของ Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition (National research council, 2011) ตามใบอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ เลขที่ U1-04925-2559 สถาบันพัฒนาการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (สพสว.) สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

2.3 การแปะวัสดุทดสอบบนผิวหนัง

โดยก่อนทำการทดสอบ 24 ชม. โคนขนหนูแรทบริเวณด้านหลังระหว่างขาหน้าและขาหลัง (dorsal/flank area) ความกว้าง 7x5 ซม. หรือ 10 % ของพื้นที่ผิวบนลำตัวหนู โดยไม่ให้เกิดบาดแผลบนผิวหนัง และนำหนูแรททั้ง 3 ตัว ใส่ลงในกรงพลาสติกทดลองขนาด 23x52x22 ซม. แยกเลี้ยงหนูแรท 1 ตัวต่อกรง และอดอาหารแต่ไม่อดน้ำ เป็นระยะเวลา 1 คืน (หนูแรท 1 ตัว/ 1 วัสดุทดสอบ) หลังจากนั้นดำเนินการให้สารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 โดยให้สารเคลือบบนแผ่นผ้าก๊อชขนาด 6 ตร.ซม. วางบนผิวหนังหนูแรทตำแหน่งที่โคนขน หลังจากนั้นปิดทับแผ่นผ้าก๊อชด้วยพลาสติกปิดแผล และปิดทับด้วยผ้าพันแผลแบบยืดชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองซ้ำอีกครั้ง โดยใช้สารแขวนลอยสปอร์ ความเข้มข้น 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู (ปริมาตรของสารอยู่ในช่วงระหว่าง 0.5 - 1 มล.) ให้อาหารแก่หนูแรทตามปกติ ภายหลังจากทดสอบครบ 24 ชม. แกะแผ่นทดสอบออกและล้างทำความสะอาดผิวหนังหนูแรทด้วย 0.9 % Normal Saline (Figure 2) ปริมาณวัสดุทดสอบที่แปะบนผิวหนังแก่หนูแรทแต่ละตัวเท่ากับ 1 มล. (Table 2)

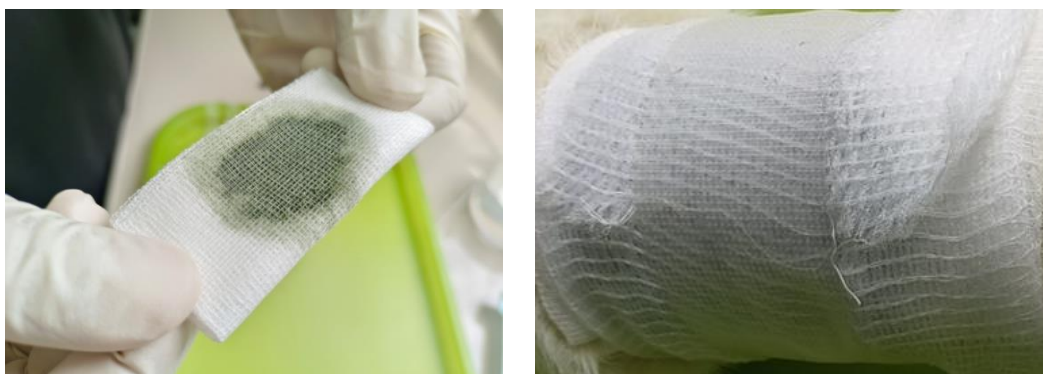


Figure 2 Dermal application of a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 at an acute dose of 2,000 mg/kg. body weight using a gauze pad applied to the skin of a rat.

Table 2 Dermal exposure of three rats to a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50.

No. of animal	Sex	Concentration of substance (mg/kg/day)	Body weight (g.)	Amount of substance (ml.)
1	female	2,000	225.00	1.0
2	female	2,000	226.70	1.0
3	female	2,000	228.50	1.0

2.4 การสังเกตผลการทดสอบ

สังเกตอาการทางคลินิก พฤติกรรม ได้แก่ อาการที่ผิดปกติ ความเจ็บปวด อาการคัน อาการชัก อาการท้องเสีย อาการอ่อนเพลีย อาการน้ำลายไหล และอาการหมดสติ โดยสังเกตลักษณะการบวมแดง และการเกิดแผลที่ผิวหนังของหนูแรทที่ระยะเวลา 30 นาที 1 และ 4 ชม. หลังจากนั้นประเมินลักษณะผิวหนังของหนูแรทที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. โดยมีหลักเกณฑ์การให้คะแนนอาการแดงและอาการบวมของผิวหนังตาม Draize et al. (1944) (Table 3) จากนั้นสังเกตอาการวันละครั้งทุกวันติดต่อกันเป็น

เวลา 14 วัน บันทึกปริมาณอาหารและน้ำที่หนูแรทกินทุกวัน และบันทึกน้ำหนักตัวหนูแรทที่เวลา 1, 7 และ 14 วัน หลังจากได้รับสารทดสอบ และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างข้อมูลเพื่อประเมินผลของสารทดสอบต่ออัตราการเจริญเติบโตของหนู ก่อนสิ้นสุดการทดสอบที่ระยะเวลา 14 วันหลังจากได้รับสารทดสอบ ทำการอดอาหารหนูแรทที่ยังไม่ตายเป็นเวลา 1 คืน ก่อนการการุณยฆาต โดยการให้หนูแรทสูดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และผ่าช่องท้องและช่องอกเพื่อชันสูตรซาก ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของอวัยวะภายในด้วยตาเปล่า

Table 3 Grading of dermal effects.

Erythema and eschar formation	Grade
No erythema	0
Very slight erythema (barely perceptible)	1
Well defined erythema	2
Moderate to severe erythema	3
Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth)	4
Edema formation	Grade
No edema	0
Very slight edema (barely perceptible)	1
Slight edema (edges of area well defined by definite raising)	2
Moderate edema (raised approximately 1 mm)	3
Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond the area of exposure)	4

Source: Draize et al. (1944)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก

การสังเกตอาการทางคลินิกและพฤติกรรม (Clinical signs observation and behavior)

อาการของหนูทดลองที่ได้รับการป้อนสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ความเข้มข้น 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู เพื่อใช้ทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก ในระยะเวลา 30 นาที 1 ชม. และ 4 ชม. หลังจากนั้นเฝ้าดูอาการทางคลินิกที่เกิดขึ้นในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. และสังเกตอาการวันละครั้งทุกวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน พบว่า หนูแรททั้ง 3 ตัว กินอาหารได้ตามปกติ ไม่มีอาการที่ผิดปกติ ไม่แสดง ความเจ็บปวด ไม่มีการแสดงอาการคัน อาการชัก อาการท้องเสีย อาการอ่อนเพลีย อาการน้ำลายไหล และอาการหมดสติ

อัตราการตาย (Mortality)

ภายหลังการป้อนสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ความเข้มข้น 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู เมื่อสังเกตอาการหนู แรทในระยะเวลา 30 นาที 1 ชม. และ 4 ชม. แรท ไม่พบการตายหรืออาการใกล้ตาย และในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. จนครบกำหนดระยะเวลา 14 วัน พบว่า หนูแรททั้ง 3 ตัว ไม่มีการตายเกิดขึ้น (Table 4)

Table 4 Mortality, morbidity, clinical observations, and behavior of rats orally administered a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50.

No. of animal	Concentration of substance (mg/kg/day)	Mortality and morbidity	Clinical signs observation and behavior
1	5,000	0	No toxic signs
2	5,000	0	No toxic signs
3	5,000	0	No toxic signs

ปริมาณอาหารและน้ำที่กิน และการเปลี่ยนแปลง น้ำหนักตัว (Food and water consumption and body weight change)

การกินอาหารและน้ำของหนูแรททุกตัวที่ได้รับแบบไม่จำกัด โดยมีการชั่งน้ำหนักอาหารและน้ำทุกวัน พบว่าหนูแรทที่ได้รับการป้อนสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ความเข้มข้น 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู สามารถกิน

อาหารและน้ำได้เป็นปกติ มีค่าเฉลี่ยการกินอาหารเท่ากับ 16.27, 16.11 และ 13.78 กรัม ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยการกินน้ำเท่ากับ 41.86, 35.53 และ 51.73 มล. ตามลำดับ โดยมีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยตลอดระยะเวลาทดสอบ 14 วัน เท่ากับ 24.30, 28.10 และ 25.70 ก./ตัว ตามลำดับ (ค่าเฉลี่ย 26.03 ก./ตัว) (Table 5) และพบว่าการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการเจริญเติบโต (Figure 3)

Table 5 Changes in body weights of rats orally administered a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50.

No. of animal	Sex	Body weight (g.)					Weight gain (g.)	Mean (g.)
		Day 0	Day 1	Day 2	Day 7	Day 14		
1	female	315.00	321.10	328.60	334.90	339.30	24.30	26.03
2	female	312.00	320.40	331.30	336.10	340.10	28.10	
3	female	273.10	276.00	278.80	285.90	298.80	25.70	

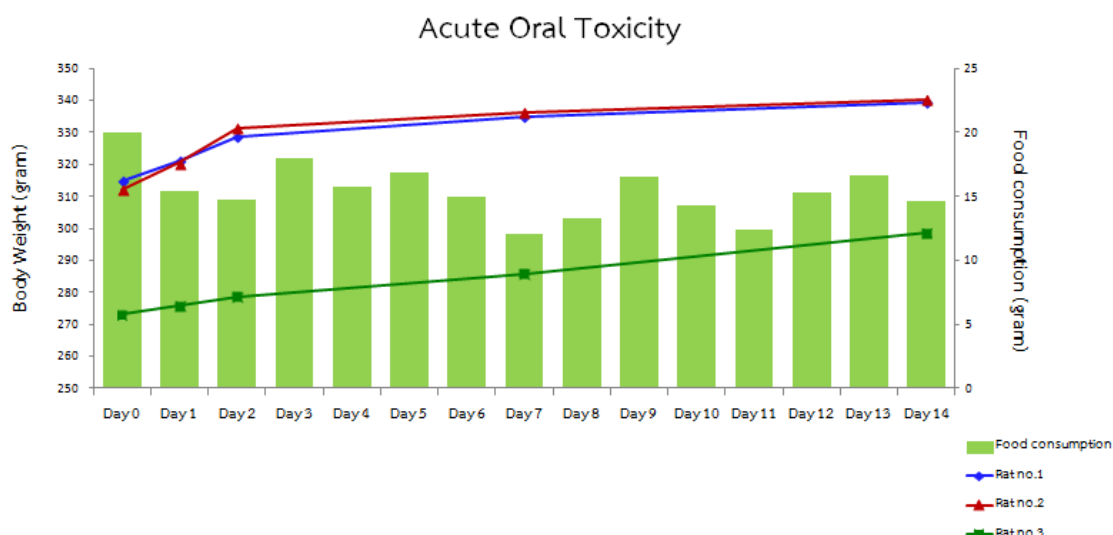


Figure 3 Changes in body weights of rats orally administered a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 in relation to food consumption.

การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของอวัยวะใน ด้วยตาเปล่า (Gross examination)

ในวันที่ 16 ของการทดสอบความเป็นพิษ
หนูแรททั้ง 3 ตัว จะถูกทำการอดอาหารเป็นเวลา
1 คืน และนำมาชั่งน้ำหนักก่อนทำการการุณยฆาต
โดยการให้หนูทดลองสูดดมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
(CO₂) ดำเนินการผ่าซากหนูทดลอง ผ่าช่องท้องและ
ช่องอกเพื่อชันสูตรซาก และดูความผิดปกติของ
อวัยวะภายใน ได้แก่ ปอด หัวใจ ตับ ม้าม กระเพาะ

อาหาร ลำไส้เล็กส่วนต้น ไต มดลูกและรังไข่ และ
สมอง ผลการผ่าซากหนูแรทที่ได้รับการป้อนสาร
แขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50
ที่ความเข้มข้น 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู พบว่า
อวัยวะภายในของหนูแรททุกตัว ไม่มีความผิดปกติ
ของลักษณะภายนอก ทั้งในด้านของตำแหน่งอวัยวะ
ภายใน ขนาดอวัยวะ และสีของอวัยวะ (Figure 4)

Organs : Acute Oral Toxicity								
Lung	Heart	Liver	Spleen	Gastric	Duodenum	Kidney	Uterus and ovaries	Brain
Results = Normal								

Figure 4 Pathogenicity of a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 in different organs after oral administration.

2. ผลทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนัง การสังเกตอาการทางคลินิกและพฤติกรรม (Clinical signs observation and behavior)

อาการของหนูทดลองที่ได้รับสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ความเข้มข้น 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู เพื่อใช้ทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนัง ในระยะเวลา 30 นาที 1 ชม. และ 4 ชม. หลังจากนั้นเฝ้าดูอาการทางคลินิกที่เกิดขึ้นในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. และสังเกตอาการวันละครั้งทุกวันติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน พบว่า หนูแรททั้ง 3 ตัว ในช่วง 30 นาทีแรก มีพฤติกรรมไม่คุ้นชินกับผ้าพันแผลที่พันตัวเอาไว้ พยายามกัดและดึงแผ่นผ้าก๊อซออก อยู่ไม่นิ่งแต่ไม่ยอมเดิน ใช้วิธีลากตัวไปรอบกรง อาจเนื่องมาจากการพันผ้าไว้รอบตัว ส่งผลให้หนูแรทไม่สามารถทรงตัวได้ดีเท่าที่ควร หลังจาก 4 ชม. หนูแรทกินอาหารได้ตามปกติ และไม่มีอาการที่ผิดปกติ ไม่แสดงอาการเจ็บปวด ไม่มีการแสดงอาการคัน อาการช้ำ อาการท้องเสีย อาการอ่อนเพลีย อาการน้ำลายไหล และอาการหมดสติ เมื่อครบ 24 ชม. หลังจากทีนำผ้าพันแผลและแผ่นผ้าก๊อซออก พบว่า ผิวหนังของหนูแรทไม่มีอาการบวมแดง ไม่มีอาการแพ้ ไม่มีผื่นหรือตุ่มใสขึ้น แต่ในวันที่ 5 พบว่าผิวหนังของหนูแรทเริ่มมี

สะเก็ดบางๆ บริเวณที่เป็นขอบมีรอยแดงเล็กน้อย ในวันที่ 7 ผิวหนังของหนูแรทเริ่มดีขึ้น สะเก็ดและรอยขอบหนังแห้งหายไป และในวันที่ 14 ผิวหนังได้มีการฟื้นฟูกลับมาในสภาพดีดังเดิม (recover) (Figure 5) และจากการประเมินอาการแดงและอาการบวมของผิวหนังหนูแรทที่ถูกแปะด้วยสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ไม่พบว่ามีอาการแดงหรืออาการบวม ซึ่งเมื่อคำนวณค่าดัชนีการแดงและการบวมของผิวหนังหนูแรทใน 72 ชม. แรก พบว่ามีค่าคะแนนการแดงและการบวมของผิวหนังเท่ากับ 0 ตามหลักเกณฑ์การให้คะแนนอาการแดงและอาการบวมของผิวหนังของ Draize et al. (1944) (Table 6)

อัตราการตาย (Mortality)

ภายหลังการใช้สารแขวนลอยสปอร์ที่ความเข้มข้น 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู แปะบนผิวหนังหนูแรท เมื่อสังเกตอาการหนูแรทในระยะเวลา 30 นาที 1 ชม. และ 4 ชม. แรก ไม่พบการตายหรืออาการใกล้ตาย และในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. จนครบกำหนดระยะเวลา 14 วัน พบว่า หนูแรททั้ง 3 ตัว ไม่มีการตายเกิดขึ้น (Table 7)

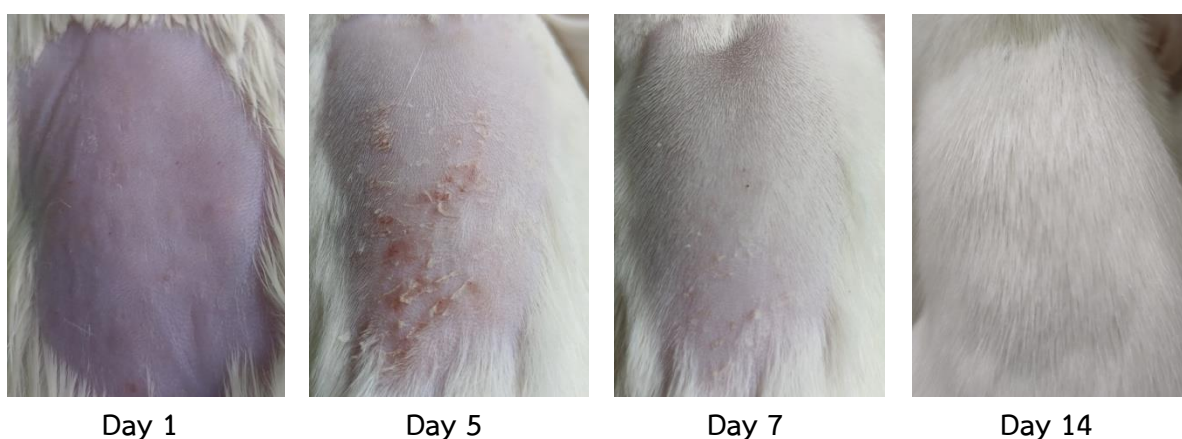


Figure 5 Dermal irritation in rats following administration of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50, with complete recovery observed after 7 days.

Table 6 Grading of erythema, eschar formation, and edema in rats.

No. of animal	Grading of dermal effects						Irritation level
	24 hrs		48 hrs		72 hrs		
	Erythema	Edema	Erythema	Edema	Erythema	Edema	
1	0	0	0	0	0	0	non-irritant
2	0	0	0	0	0	0	non-irritant
3	0	0	0	0	0	0	non-irritant

Table 7 Mortality, morbidity, clinical observations, and behavior of rats dermally administered a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50.

No. of animal	Concentration of substance (mg/kg/day)	Mortality and morbidity	Clinical signs observation and behavior
1	2,000	0	No toxic signs
2	2,000	0	No toxic signs
3	2,000	0	No toxic signs

ปริมาณอาหารและน้ำที่กิน และการเปลี่ยนแปลง น้ำหนักตัว (Food and water consumption and body weight change)

การกินอาหารและน้ำของหนูแรททุกตัวที่ได้รับแบบไม่จำกัด โดยมีการชั่งน้ำหนักอาหารและน้ำทุกวัน พบว่าหนูแรทที่ได้รับสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ความเข้มข้น 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู แปะบริเวณผิวหนังสามารถกินอาหารและน้ำได้เป็นปกติ มีค่าเฉลี่ยการ

กินอาหารเท่ากับ 15.55, 16.51 และ 16.65 ก. ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยการกินน้ำเท่ากับ 41.60, 46.40 และ 39.33 มล. ตามลำดับ โดยมีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยตลอดระยะเวลาทดสอบ 14 วัน เท่ากับ 52.60, 38.40 และ 57.00 ก./ตัว ตามลำดับ (ค่าเฉลี่ย 49.33 ก./ตัว) (Table 8) และพบว่าการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการเจริญเติบโต (Figure 6)

Table 8 Changes in body weights of rats dermally administered a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50.

No. of animal	Sex	Body weight (g.)					Weight gain (g.)	Mean (g.)
		Day 0	Day 1	Day 2	Day 7	Day 14		
1	female	225.00	232.10	235.50	258.40	277.60	52.60	49.33
2	female	226.70	231.10	234.30	247.30	265.10	38.40	
3	female	228.50	237.40	241.10	263.30	285.50	57.00	

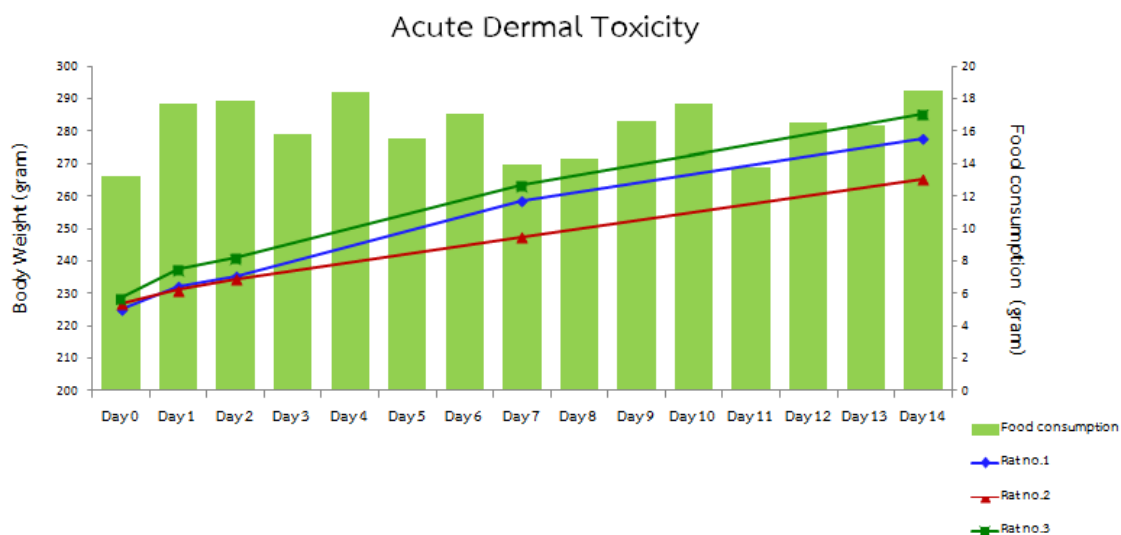


Figure 6 Changes in body weights of rats dermally administered a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 in relation to food consumption.

การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของอวัยวะภายในด้วยตาเปล่า (Gross examination)

ในวันที่ 16 ของการทดสอบความเป็นพิษของสารแขวนลอยสปอร์ หนูแรททั้ง 3 ตัว จะถูกทำการอดอาหารเป็นเวลา 1 คืน และนำมาชั่งน้ำหนักก่อนทำการการุณยฆาต โดยการให้หนูแรทสูดดมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ดำเนินการผ่าซากหนูแรทผ่าช่องท้องและช่องอกเพื่อชันสูตรซาก และดูความผิดปกติของอวัยวะภายใน ได้แก่ ปอด หัวใจ ตับ ม้าม

กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กส่วนต้น ไต มดลูกและรังไข่ และสมอง ผลการผ่าซากหนูแรทที่ได้รับการแปะสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 บริเวณผิวหนัง ที่ความเข้มข้น 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู พบว่า อวัยวะภายในของหนูแรททุกตัวในแต่ละการทดสอบ ไม่มีความผิดปกติของลักษณะภายนอก ทั้งในด้านของตำแหน่งอวัยวะภายใน ขนาดอวัยวะ และสีของอวัยวะ (Figure 7)

Organs : Acute dermal Toxicity								
Lung	Heart	Liver	Spleen	Gastric	Duodenum	Kidney	Uterus and ovaries	Brain
Results = Normal								

Figure 7 Pathogenicity of a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 in different organs after dermal exposure.

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ตลอดระยะเวลาการทดสอบความเป็นพิษ หนูแรททั้งหมดในแต่ละการทดสอบ มีการกินอาหารและน้ำอย่างสม่ำเสมอ อาจมีการกินอาหารและน้ำในบางวันที่น้อยกว่าปกติ แต่หลังจากนั้นในวันถัดมาพบว่าหนูแรทมีการกินอาหารและน้ำอยู่ในเกณฑ์ปกติ ส่งผลให้ค่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยสอดคล้องกับการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับการรายงานของ Colby et al. (2020) ที่รายงานว่า เกณฑ์ปกติในการกินอาหารของหนูแรทโตเต็มวัยอยู่ที่ปริมาณ 5 - 6 ก./100 ก. น้ำหนักตัวหนู/วัน และเกณฑ์ปกติในการกินน้ำของหนูแรทโตเต็มวัยอยู่ที่ปริมาณ 10 - 12 มล./100 ก. น้ำหนักตัวหนู/วัน ซึ่งการที่น้ำหนักตัวของหนูแรทเพิ่มขึ้นเฉลี่ยสอดคล้องกับการเจริญเติบโตนั้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ไม่มีผลต่อการกินอาหารและน้ำและไม่มีผลเสียต่อการเจริญเติบโตของหนูแรทสอดคล้องกับการรายงานของ Arteaga et al. (2014) ที่ได้รายงานว่า น้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองเป็นตัวชี้วัดอย่างหนึ่งที่ให้ข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารที่ใช้ทดสอบมากขึ้น การสูญเสียน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองอย่างมีนัยสำคัญ อาจเป็นหนึ่งในตัวบ่งชี้ความเสียหายต่อสัตว์มากที่สุด และในกรณีนี้อาจตีความได้ว่าสารที่ใช้ทดสอบมีสัญญาณของความเป็นพิษอย่างชัดเจน

ดังนั้นข้อมูลการทดสอบนี้จึงสามารถนำมาใช้ยืนยันความปลอดภัยของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ผลิตโดยกรมวิชาการเกษตรได้ ประกอบกับมีข้อมูลการจำแนกชนิดทางสัญญาณวิทยาและชีวโมเลกุล กล่าวคือ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 เป็นสายพันธุ์ที่มีความปลอดภัยเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *T.* สายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Román-Soto et al. (2019) ที่พบว่าเชื้อรา *T. longibrachiatum* เป็นสายพันธุ์ที่ถือเป็นเชื้อโรคอุบัติใหม่ ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในปอดและผิวหนังในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง และนอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ

Shahbazfar et al. (2023) ที่รายงานว่ามีการพบผู้ป่วยติดเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 3 ราย โดยพบรอยโรคบนผิวหนัง เนื่องจากการเกิดแผลเน่าเปื่อยแต่ทั้งนี้ผิวหนังของผู้ป่วยสามารถกลับมาฟื้นฟูได้ในภายหลัง ซึ่งสาเหตุของการติดเชื้อมาจากการสัมผัสอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อรา โดยทั่วไปแล้ว เชื้อรา *Trichoderma* spp. ถือว่าเป็นเชื้อราที่มีประโยชน์ต่อพืชและไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยง แม้ว่า *Trichoderma* spp. ส่วนใหญ่จะไม่เป็นอันตราย แต่ในบางกรณีอาจมีอาการแพ้ต่อเชื้อราทำให้เกิดอาการคัน ผื่นแดง หรืออาการทางผิวหนังอื่น ๆ ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสเชื้อราโดยตรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือมีประวัติแพ้เชื้อรา

ดังนั้นจากผลการทดสอบที่ได้ เมื่อจัดระดับความเป็นพิษเฉียบพลันตามเกณฑ์จำแนกความปลอดภัยตามระบบการจัดกลุ่มสารเคมีและการติดฉลากของวัสดุทดสอบตามหลักเกณฑ์ของ GHS พบว่าชีวภัณฑ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 จัดอยู่ใน category ที่ 5 (Unclassified) (United Nations, 2019) ไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากและทางผิวหนังในหนูแรท จึงจัดเป็นชีวภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยสูง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากในหนูแรท ของสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ ปริมาณความเข้มข้น 5,000 มล./กก. น้ำหนักตัวหนู และการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนังในหนูแรทของสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ปริมาณความเข้มข้น 2,000 มล./กก. น้ำหนักตัวหนู ตามแนวปฏิบัติของ OECD Test Guideline 423 และ OECD Test Guideline 402 ในช่วงระยะ 24, 48 และ 72 ชม. แรก และตลอดช่วงระยะเวลา 14 วันของการทดสอบ พบว่าหนูแรททุกตัวไม่แสดงอาการผิดปกติทางคลินิกและพฤติกรรม หรือมีการตาย ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษแบบเฉียบพลันทางปากและทางผิวหนังในหนูแรท

ทั้งนี้ นอกจากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากและทางผิวหนังในหนูแรทแล้ว ควรมีการทดสอบความเป็นพิษในด้านอื่นๆ เพิ่มเติม โดยเฉพาะในด้านการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางการสูดดม (Acute inhalation) เพื่อยืนยันถึงความปลอดภัยของชีวภัณฑ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ผลิตโดยกรมวิชาการเกษตร และยังสามารถเป็นต้นแบบหรือแนวทางในการทำการทดสอบความเป็นพิษของชีวภัณฑ์กำจัดศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณเกษมสุข อินสุธา คุณสุกฤษฎี ตั้งอิสรียะสกุล คุณนุสรา สุขคะตะ เจ้าหน้าที่กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลองดูแลและเลี้ยงสัตว์ทดลองตลอดระยะเวลาการเก็บข้อมูล และช่วยเก็บข้อมูลงานวิจัย จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. 2563. ชีวภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืช. เอกสารวิชาการ, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 240 หน้า.

Arteaga, M. E., A. Mancebo, T. Molier, D. Gómez, C. González, A. M. Bada, B. González, N. M. Rojas and G. Rodríguez. 2014. Dermal toxicity, eye and dermal irritation and skin sensitization evaluation of a new formulation of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* SH-14. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 68: 147-151.

Colby, L., M. H. Nowland, L. H. Kennedy and K. Hrapkiewicz. 2020. Clinical laboratory animal medicine: An introduction. Wiley-Blackwell.

Draize, J. H., G. Woodard and H. O. Calvery. 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 82(3): 377-390. Cited OECD (1999), Detailed Review Document on Classification Systems for Skin Irritation /Corrosion in OECD Member Countries. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.16.

National research council. 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition. National Academies Press: Washington DC, USA.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2000. Guidance Document on Acute Oral Toxicity: OECD Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 24. OECD. Paris.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2001. Guideline for Testing of Chemicals Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method No. 423. OECD. Paris.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2017. Guideline for Testing of Chemicals Acute Dermal Toxicity: Fixed Dose Procedure No. 402. OECD. Paris.

- Román-Soto, S., E. Álvarez-Rojas and J. García-Rodríguez. 2019. Skin infection due to *Trichoderma longibrachiatum* in a haematological paediatric patient. *Clinical Microbiology and Infection*. 25: 1383-1384.
- Shahbazfar, A. A., M. Heidarieh, S. Shahbazi and H. Askari. 2023. *Trichoderma harzianum* as fungicide and symbiont: is it safe for human and animals?. *Veterinary Research Forum*. 14(11): 607-614.
- United nations Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS) (2019). The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals.

ชนิดของแบคทีเรีย *Xanthomonas* สาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศและพริกในประเทศไทย
Xanthomonas Species Causing Bacterial Spot on Tomato and Chili in Thailand

ทิพวรรณ กันหาญาติ^{1/} ณัฐิมา โฆษิตเจริญกุล^{1/} วันเพ็ญ ศรีชาติ^{2/}
บุรณี พัววงศ์แพทย์^{1/} รุ่งนภา ทองเครื่อง^{1/} กาญจนา ศรีไม้^{1/}
Tippawan Kanhayart^{1/} Nuttima Kositcharoenkul^{1/} Wanpen Srichart^{2/}
Buranee Puawongphat^{1/} Rungnapha Thong kreng^{1/} Kanchana Srimai^{1/}

ABSTRACT

Bacterial spot disease in chili and tomato plants is a significant problem for producers worldwide, causing yield reductions and seed-borne transmission. The disease is caused by several *Xanthomonas* species, which exhibit similar symptoms and have undergone multiple taxonomic revisions. Thus, this study aims to identify *Xanthomonas* species associated with bacterial spot disease in chili and tomato plants in Thailand and to provide updated information on pathogen classification. The study was conducted from October 2022 to March 2025. During this period, *Xanthomonas* isolates were collected from diseased chili and tomato plants in cultivation areas across the country, as well as from the Plant Pathogen Microbial Collection Center. A total of 96 isolates were obtained, including 77 from chili and 19 from tomato. Isolates from tomato infected only tomato plants, whereas isolates from chili were capable of infecting both chili and tomato plants. Most isolates from tomato produced both amylolytic and pectolytic enzymes, whereas the majority of isolates from chili did not. PCR analysis revealed a 173 base pairs (bp) DNA band specific to *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* in chili isolates and a 300 bp band specific to *X. euvesicatoria* pv. *perforans* in tomato isolates. Maximum likelihood analysis of concatenated partial sequences of the *atpD*, *dnaK*, *efp*, and *gyrB* genes confirmed two major genetic groups closely related to type strains: *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, predominantly from chili, and *X. euvesicatoria* pv. *perforans*, exclusively from tomato. This study confirms that *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* and *X. euvesicatoria* pv. *perforans* are the primary causal agents of bacterial spot disease in Thailand. *X. euvesicatoria* pv. *perforans* was specific to tomato, while *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* primarily affected chili but was also able to infect tomato. The absence of *X. vesicatoria*, *X. hortorum* pv. *gardneri*, *X. campestris* pv. *raphani* and *X. arboricola* in Thailand was also noted.

Keywords: identification, leaf spot, chili, tomato

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร อ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 19000, Thailand

^{2/} สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 กรมวิชาการเกษตร อ.วังทอง จ.พิษณุโลก 65130

^{2/} Agricultural Research and Development Regional Office 2, Department of Agriculture, Wang Thong, Phitsanulok 65130, Thailand

* Corresponding author : t.kanhayart@gmail.com

บทคัดย่อ

โรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศเป็นปัญหาที่สำคัญของประเทศผู้ผลิตพริกและมะเขือเทศทั่วโลก เนื่องจากทำให้ปริมาณผลผลิตลดลงและสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ โดยโรคนี้นี้มีเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* หลายชนิดเป็นสาเหตุและก่อให้เกิดอาการของโรคคล้ายคลึงกัน อีกทั้งมีการจัดจำแนกและเปลี่ยนชื่อใหม่หลายครั้ง ด้วยเหตุนี้ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* สาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศที่พบระบาดในประเทศไทยให้ข้อมูลชนิดของเชื้อเป็นปัจจุบัน โดยดำเนินการทดลองตั้งแต่เดือนตุลาคม 2565 - มีนาคม 2568 รวบรวมเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* สาเหตุโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศที่ได้จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคจากพื้นที่ปลูกพริกและมะเขือเทศทั่วประเทศและศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์โรคพืช ได้ 96 ไอโซเลตจากพริก 77 ไอโซเลต และมะเขือเทศ 19 ไอโซเลต เชื้อไอโซเลตจากมะเขือเทศก่อโรคเฉพาะมะเขือเทศ ส่วนไอโซเลตจากพริกก่อโรคได้ทั้งพริกและมะเขือเทศ ไอโซเลตจากมะเขือเทศส่วนใหญ่สร้างเอนไซม์ amyolytic และ pectolytic ได้ ขณะที่ไอโซเลตจากพริกส่วนใหญ่ไม่สร้าง ตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่าไอโซเลตจากพริกให้แถบดีเอ็นเอขนาด 173 bp ซึ่งจำเพาะต่อ *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ส่วนไอโซเลตจากมะเขือเทศให้แถบดีเอ็นเอขนาด 300 bp ซึ่งจำเพาะต่อ *X. euvesicatoria* pv. *perforans* วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum likelihood โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *atpD*, *dnaK*, *efp* และ *gyrB* พบว่าประเทศไทยมีสาเหตุโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศใกล้เคียงกับเชื้อต้นแบบใน 2 กลุ่มหลัก คือ *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* พบในพริกทั้งหมดและไอโซเลตเดียวจากมะเขือเทศ และ *X. euvesicatoria* pv. *perforans* พบเฉพาะในมะเขือเทศ การศึกษานี้ยืนยันว่า *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* และ *X. euvesicatoria* pv. *perforans* เป็นเชื้อสาเหตุหลักของโรคใบจุดในพริก

และมะเขือเทศในประเทศไทย โดยพบว่า *X. euvesicatoria* pv. *perforans* มีความจำเพาะกับมะเขือเทศ ขณะที่ *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* พบได้ในพริกเป็นหลักแต่สามารถพบในมะเขือเทศได้เช่นกัน นอกจากนี้ ไม่พบการระบาดของ *X. vesicatoria*, *X. hortorum* pv. *gardneri*, *X. campestris* pv. *raphani* และ *X. arboricola* ในประเทศไทย

คำสำคัญ: จำแนกชนิด ใบจุด พริก มะเขือเทศ

บทนำ

โรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศที่เกิดจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Xanthomonas* เป็นปัญหาสำคัญของประเทศผู้ผลิตทั่วโลก โดยเฉพาะในเขตร้อนและกึ่งร้อนชื้น เนื่องจากสามารถทำให้ผลผลิตลดลงได้ถึง 50% (Pohronezny and Volin, 1983) ทั้งนี้แบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าวมีหลายชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุด และก่อให้เกิดอาการของโรคที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน โรคใบจุดของมะเขือเทศพบรายงานระบาดครั้งแรกในปี ค.ศ. 1914 ที่แอฟริกาใต้ โดยมีการจำแนกเชื้อสาเหตุเป็น *Bacterium vesicatorium* (Doidge, 1921) ขณะที่ในยูโกสลาเวีย Sutic (1957) ได้จำแนกเชื้อสาเหตุอาการจุดขอบสีเขียวบนผลมะเขือเทศว่าเกิดจากแบคทีเรีย *Pseudomonas gardneri* ในเวลาต่อมามีการจัดจำแนกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดที่เกิดจากแบคทีเรียของพริกและมะเขือเทศและเปลี่ยนชื่อใหม่อีกหลายครั้ง โดยเริ่มจาก *B. vesicatorium* เปลี่ยนชื่อเป็น *X. vesicatoria* และ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ตามลำดับ (Young et al., 1978) แต่เมื่อศึกษาข้อมูลการใช้แหล่งคาร์บอนและ DNA-DNA hybridization ทำให้แบ่งเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม A และ B โดยกลุ่ม A มีดีเอ็นเอคล้ายคลึงกับ *X. axonopodis* และได้เปลี่ยนชื่อเป็น *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* ในขณะที่กลุ่ม B ได้ชื่อใหม่เป็น *X. vesicatoria* (Stall et al., 1994; Vauterin et al., 1995) ต่อมา

ในปี 2000 Jones et al. ได้แบ่งเชื้อเพิ่มเติมอีก 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม C และ D โดยกลุ่ม C คือ *X. perforans* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดกลุ่มใหม่ที่พบรายงานที่รัฐฟลอริดา สหรัฐอเมริกา (Jones et al., 1995) และกลุ่ม D คือ *X. gardneri* ซึ่งมีชื่อเดิมคือ *P. gardneri* (Jones et al., 2000) ต่อมาในปี 2004 Jones et al. พบความแตกต่างภายในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศ และได้จำแนกเชื้อใหม่เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ *X. euvesicatoria* (กลุ่ม A เดิม), *X. perforans*, *X. vesicatoria* และ *X. gardneri* (Jones et al., 2004) โดยในปัจจุบันได้มีการเสนอเปลี่ยนชื่อเชื้อทั้ง 4 ชนิดใหม่อีกครั้ง เป็น *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* *X. euvesicatoria* pv. *perforans* *X. hortorum* pv. *gardneri* และ *X. vesicatoria* ตามลำดับ (Constantin et al., 2016; Morinière et al., 2020) สำหรับประเทศไทยมีรายงานเชื้อสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศเกิดจากเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Uematsu et al., 1983) และรายงานการจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หลายตำแหน่งพบเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ *X. euvesicatoria* และ *X. perforans* (สันติพงศ์และคณะ, 2563)

โรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ทั้ง 4 ชนิดจัดเป็นศัตรูพืชกักกันของหลายประเทศ และเป็นกลุ่ม complex species ซึ่งไม่สามารถจำแนกได้เบื้องต้นจากอาการของโรคเมื่อพบการระบาดในแปลงหรือข้อมูลทางสัญญาณวิทยาเพียงอย่างเดียว ด้วยเหตุนี้การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศที่พบระบาดในประเทศไทย เพื่อให้ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของเชื้อเป็นปัจจุบันและใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืชและเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. รวบรวมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดพริกและมะเขือเทศ

รวบรวมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดที่เก็บรักษาไว้ในศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืชและทำการสำรวจเก็บตัวอย่างที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศจากแหล่งปลูกที่สำคัญ บันทึกข้อมูลลักษณะอาการของโรค วันที่เก็บ และแหล่งที่พบ จากนั้นนำตัวอย่างกลับมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ โดยตัดส่วนของพืชบริเวณรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคเป็นชิ้นเล็ก ๆ แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วนำมาบดในน้ำกลั่น และแยกเชื้อบนอาหาร Potato Semisynthetic Agar (PSA) หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28°C. เป็นเวลา 48 ชม. เลือกเก็บเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนี กลมมน ขอบเรียบ ผิวเป็นมันวาวสีเหลือง เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในกลีเซอรอล 15% และ 50%

2. ทดสอบความสามารถในการก่อโรค (Pathogenicity test)

นำเชื้อแบคทีเรียที่รวบรวมได้ มาทดสอบการเกิดโรคกับพริกและมะเขือเทศ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28°C. เป็นเวลา 48 ชม. ปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml พ่นเชื้อแบคทีเรียบนพืชทดสอบแล้วใช้ถุงพลาสติกคลุมไว้ให้มีความชื้นเป็นเวลา 48 ชม. จึงเปิดถุงออก และสังเกตอาการต้นพืชเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นด้วยน้ำเปล่าและพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch's postulation)

3. ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ

ทำการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียบางประการ ตามวิธีการของ Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria Third Edition (Schaad et al., 2001) ได้แก่ การย้อมสีแกรม การเคลื่อนที่ (motility) ทดสอบ oxidation-fermentation การเจริญที่อุณหภูมิ 40°C. การสร้างสาร fluorescence การสร้าง levan การเจริญบนอาหาร TTC การสร้าง เอนไซม์ oxidase เอนไซม์ amylolytic และเอนไซม์ pectolytic

4. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของ พริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR

ตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR ตามรายงานของ Koenraadt et al. (2009) และ Ning (2012) โดยในการทำ PCR ใช้ปริมาตรรวม 20 µl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 10 ng/µl, 1X OnePCR Master Mix (GeneDireX Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra TAdvanced (Analytik Jena GmbH, Germany) กำหนดอุณหภูมิและเวลาให้ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 55°C. เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ ปริมาตรรวม 20 µl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 10 ng/µl, 1X OnePCR Master Mix (GeneDireX Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra TAdvanced (Analytik Jena GmbH, Germany) กำหนดอุณหภูมิและเวลาให้ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 55°C. เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72°C. เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

5. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ

การสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีน *atpD*, *dnaK*, *efp* และ *gyrB* ตามรายงานของ Roach et al. (2017) โดยในการทำ PCR ใช้ปริมาตรรวม 50 µl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 10 ng/µl, OnePCR Master Mix (GeneDirex Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra TAdvanced (Analytik Jena GmbH, Germany) กำหนดอุณหภูมิและเวลาให้เริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing) ที่อุณหภูมิ 95°C. เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบต่อที่อุณหภูมิ 94°C. เป็นเวลา 30 วินาที ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ดังแสดงใน Table 1 เป็นเวลา 15 วินาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72°C. เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 30 รอบ และสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72°C. เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

Table 1 PCR primers for *Xanthomonas* species - specific identification and MLSA assay

Primers	Sequence (5'–3')	Annealing Temperature	PCR product	Reference
BS-XeF	CATGAAGAACTCGGCGTATCG	66°C	173 bp	Koenraadt et al. (2009)
BS-XeR	GTCGGACATAGTGGACACATAC			
BS-XvF	CCATGTGCCGTTGAAATACTTG	66°C	138 bp	Koenraadt et al. (2009)
BS-XvR	ACAAGAGATGTTGCTATGATTTGC			
BS-XpF	GTCGTGTTGATGGAGCGTTC	66°C	197 bp	Koenraadt et al. (2009)
BS-XpR	GTGCGAGTCAATTATCAGAATGTGG			
BS-XgF	TCAGTGCTTAGTTCCTCATTGTC	66°C	154 bp	Koenraadt et al. (2009)
BS-XgR	TGACCGATAAAGACTGCGAAAG			
HpaF-f	GTGGCAGGCAGGCAATCGACG	65°C	300 bp	Ning (2012)
HpaF-r	CCGGCACGTCGACGCCTGGAAACC			
dnaK-F	TGGGCAAGATCATTGGTATT	67°C	765 bp	Roach et al. (2017)
dnaK-R	ACCTTCGGCATAACGGGTCTG			
atpD-F	GGGCAAGATCGTTCAGAT	66°C	768 bp	Roach et al. (2017)
atpD-R	GCTCTTGGTCGAGGTGAT			
gyrB-F	GCCGAGGTGATCCTCACCGT	69°C	774 bp	Roach et al. (2017)
gyrB-R	GGCCGAGCCACCTGCCGAGT			
efp-F	GTCAAGAACGGCATGAAGA	65°C	387 bp	Roach et al. (2017)
efp-R	TCGTCCTGGTTGACGAAC			

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 2% agarose ใน 0.5X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 25 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีดีเอ็นเอขนาดเป้าหมายไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้ ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยเปรียบเทียบกับโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) บันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ชนิด fasta และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อจำแนกชนิดแบคทีเรีย

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียใช้วิธี multilocus sequence analysis (MLSA) โดยจัด

เรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA 12 (Kumar et al., 2024) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อจัดจำแนกชนิดเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ต้นแบบ (type strain) ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม RAxML v 8.1.15 (Stamatakis, 2014) โดยกำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA และกำหนดค่า maximum likelihood bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. รวบรวมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดพริกและมะเขือเทศ

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศจากแหล่งปลูกที่สำคัญ ตั้งแต่ตุลาคม 2564 - มีนาคม 2568 นำมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการได้เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ซึ่งมีลักษณะโคโลนีกลมเรียบ สีเหลือง ขอบเรียบ ผิวเป็นมันวาว จำนวน 69 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัด

หนองคาย บึงกาฬ สกลนคร นครพนม มุกดาหาร
ขอนแก่น ร้อยเอ็ด มหาสารคาม อุบลราชธานี
ศรีสะเกษ ชัยภูมิ สุรินทร์ บุรีรัมย์ เลย เพชรบูรณ์
พิษณุโลก สระบุรี นครราชสีมา นครปฐม สุพรรณบุรี
นครสวรรค์ สุโขทัย กาญจนบุรี ตาก ราชบุรี เพชรบุรี
ประจวบคีรีขันธ์ แพร่ น่าน เชียงใหม่ และเชียงราย
รวมทั้งทำการฟื้นฟูเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดที่
เก็บรักษาไว้ในศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์กลุ่ม
วิจัยโรคพืช ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 - 2564 จำนวน
27 ไอโซเลต รวมแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยทั้งหมด
จำนวน 96 ไอโซเลต โดยเป็นไอโซเลตจากพริก

จำนวน 77 ไอโซเลต และจากมะเขือเทศ จำนวน
19 ไอโซเลต

2. ทดสอบความสามารถในการก่อโรค (Pathogenicity test)

นำเชื้อแบคทีเรียมาทดสอบความสามารถใน
การก่อโรคกับพริกและมะเขือเทศ พบว่าเชื้อ
แบคทีเรียทั้ง 96 ไอโซเลต สามารถก่อโรคในพริกขี้หนู
และมะเขือเทศพันธุ์สีดาได้ (Table 1, Figure 1)
โดยไอโซเลตจากมะเขือเทศก่อให้เกิดโรคเฉพาะ
มะเขือเทศ ในขณะที่ไอโซเลตจากพริกก่อให้เกิดโรค
ได้ทั้งในพริกและมะเขือเทศ

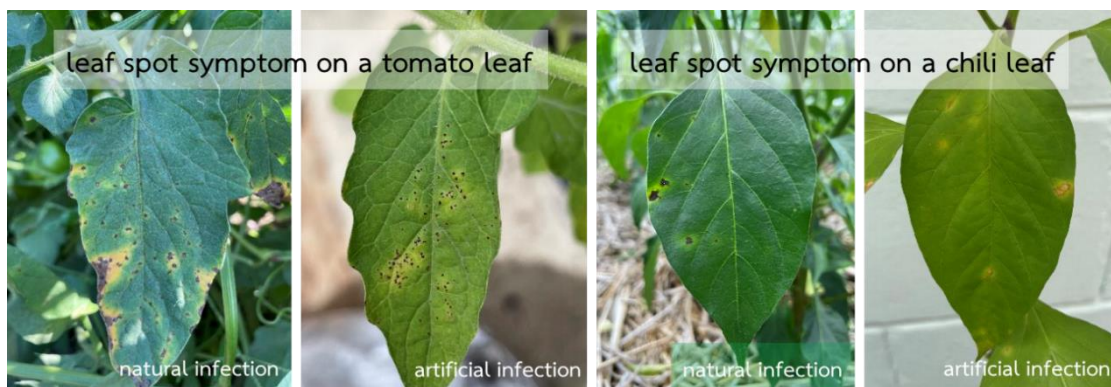


Figure 1 The pathogenicity test results of *Xanthomonas* spp. on chili and tomato plants

3. ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ

ทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา
สรีรวิทยา ชีวเคมี บางประการของแบคทีเรีย
Xanthomonas spp. สาเหตุโรคใบจุดของพริกและ
มะเขือเทศตามวิธีการของ Schaad et al. (2001)
พบว่าแบคทีเรีย *Xanthomonas* ก่อโรคกับพริกและ
มะเขือเทศมีคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา
ชีวเคมีของแบคทีเรียในสกุล *Xanthomonas* ซึ่งใช้แยก
ความแตกต่างจากแบคทีเรียที่มีโคลีนีสีเหลืองอื่น ๆ
คือ แบคทีเรียเป็นแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน เคลื่อนที่
ได้ เจริญโดยใช้ออกซิเจน สามารถสร้าง Levan และ
เจริญบนอาหาร 0.1% TTC ได้ แบคทีเรียไม่สามารถ
เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 40°C. ไม่สร้างสารเรืองแสง
(fluorescence) และไม่สร้างเอนไซม์ oxidase

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุด
โดยใช้คุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ amylolytic และ
pectolytic พบว่าสามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 3 กลุ่ม
คือ กลุ่มแรกเป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์ได้ทั้งสองชนิด
จำนวน 15 ไอโซเลต พบในมะเขือเทศ กลุ่มที่สองเป็น
เชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิด จำนวน 73 ไอโซเลต
พบในพริก โดยทั้งสองกลุ่มนี้สอดคล้องกับรายงาน
ของ Vauterin et al. (1990) และ Stall et al.
(1994) (Table 2) ส่วนกลุ่มที่สามเป็นเชื้อที่สร้าง
เอนไซม์ได้เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง จำนวน 8 ไอโซเลต
พบทั้งในพริกและมะเขือเทศ ซึ่งสอดคล้องกับ
การศึกษาของ Bouzar et al. (1994) ที่รายงานการ
จำแนกเชื้อออกเป็น 3 กลุ่มในลักษณะเดียวกัน

4. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR

การตรวจสอบด้วย PCR ตามรายงานของ Koenraad et al. (2009) พบว่าไอโซเลตจากพริกทั้งหมด และ DOAC-B2179 ซึ่งแยกได้จากมะเขือเทศปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 173 bp (Figure 2A) ซึ่งจำเพาะต่อแบคทีเรีย *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ส่วนไอโซเลตจากมะเขือเทศไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แต่เมื่อตรวจสอบแบคทีเรียไอโซเลตจากมะเขือเทศด้วยไพรเมอร์ HpaF-f/HpaF-r

ตามรายงานของ Ning (2012) พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 300 bp ซึ่งจำเพาะต่อแบคทีเรีย *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Table 2, Figure 2B) ปัญหาการตรวจสอบเชื้อด้วย PCR ตามรายงานของ Koenraad et al. (2009) ในการทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกับผลการทดสอบโดย Roach et al. (2017) ที่พบว่าไพรเมอร์ Bs-XpF/BS-XpR (Koenraad et al., 2009) ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *X. euvesicatoria* pv. *perforans* ในทุกสายพันธุ์ทดสอบ

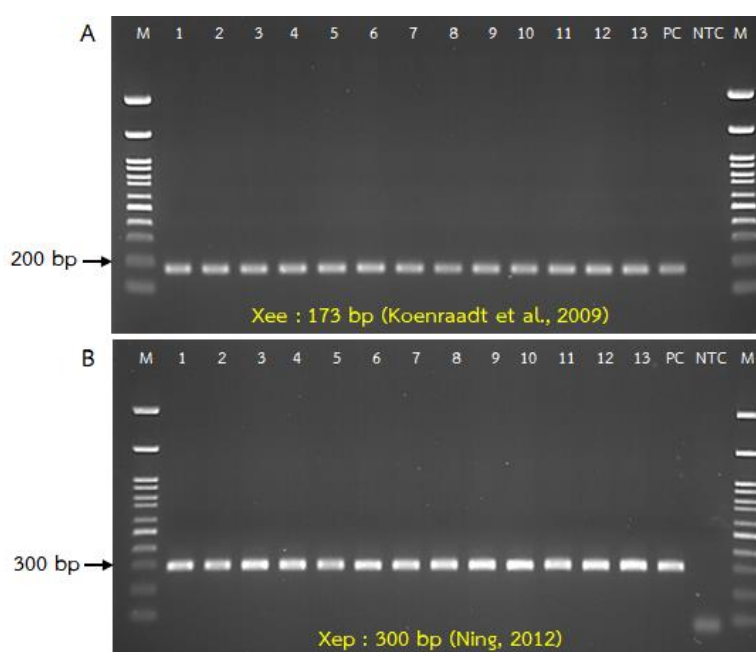


Figure 2 Polymerase chain reaction (PCR) amplicons of pathogenic bacteria causing leaf spot disease in chili and tomato. (A) Isolates from chili plants. (B) Isolates from tomato plants. PC: Positive control (type strain DNA); NTC: Non-template control; M: OneMark 100 DNA ladder (Bio-Helix Co., Ltd., Taiwan).

Table 2 Results of biochemical and PCR assays conducted in this study

Test	Chili isolates	Tomato isolates
Gram stain	Negative	Negative
Cell shape	Rod	Rod
Aerobic metabolism of glucose	+	+
Anaerobic metabolism of glucose	-	-
Motility test	+	+
Oxidase test	-	-
Levan from sucrose	+	+
Fluorescence	-	-
Growth on 0.1% TTC	+	+
Growth at 40°C	-	-
Amylolytic activity	- (99%)	+
Pectolytic activity	- (95%)	+
PCR	Xee ^{1/}	Xep ^{2/}

+ = Positive reaction, - = Negative reaction

^{1/} Positive reactions for *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (Xee) were detected (chili: 77 isolates; tomato: 1 isolate) using primers by Koenraad et al. (2009).

^{2/} Positive reactions for *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep) were detected (tomato: 18 isolates) using primers by Ning (2012).

5. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ

ทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Xanthomonas* สาเหตุโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศ จำนวน 96 ไอโซเลต โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *atpD*, *dnaK*, *efp* และ *gyrB* รวมความยาวทั้งสิ้น 2,251 bp จากนั้นสร้าง Phylogenetic tree ด้วยการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศสายพันธุ์ต้นแบบ ได้แก่ *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* NCPPB 2968^T, *X. euvesicatoria* pv. *perforans* NCPPB4321^T, *X. vesicatoria* LMG911^T และ *X. hortorum* pv. *gardneri* NCPPB881^T รวมถึงข้อมูลสายพันธุ์ที่มีรายงานในประเทศต่าง ๆ และเชื้อชนิดอื่น ๆ จากฐานข้อมูล GenBank (Hamza et al., 2010; Hamza et al., 2012; Roach et al., 2017)

ผลการศึกษา พบว่าเชื้อทั้ง 96 ไอโซเลต แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลัก (Figure 3) ดังนี้

1. กลุ่ม *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*

(Xee) จำนวน 78 ไอโซเลต ประกอบด้วยไอโซเลตจากพริกทั้งหมด และ DOAC-B2179 จากมะเขือเทศ กลุ่มนี้แบ่งย่อยออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

กลุ่มย่อยที่ 1 ไอโซเลตจากพริกและมะเขือเทศ โดยไอโซเลตจากพริกในไทยส่วนใหญ่และ DOAC-B2179 จากมะเขือเทศ จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับสายพันธุ์ต้นแบบ *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* NCPPB 2968^T (สหรัฐอเมริกา) และสายพันธุ์จากต่างประเทศ เช่น LMG909 (ไอวอรีโคสต์), ICMP9086 (ฮังการี), LA127-1 (เรอูนียง), LD128-2 (เซเชลส์), LE82-2 (มอริเชียส), ICMP5051 (นิวซีแลนด์), BRIP38997 (ออสเตรเลีย) และสายพันธุ์อื่น ๆ รวมถึงสายพันธุ์จากมะเขือเทศ เช่น CFBP5597 (French West Indies), LMG922 (สหรัฐอเมริกา), JW6 (เรอูนียง), LB226-1 (คอโมโรส), LMG914 (เซเนกัล) และ NCPPB1227 (พอร์โตริโก)

กลุ่มย่อยที่ 2 พบเฉพาะในพริก ได้แก่ ICMP3381 (อินเดีย), LMG918 (อินเดีย) และ LD53 (เกรเนดา) โดยมี DOAC-B1685 เพียงไอโซเลตเดียวจากไทยที่แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิด

กลุ่มย่อยของ Xee ที่พบในงานวิจัยนี้ สอดคล้องกับการศึกษาโดย Hamza et al. (2010) และ Roach et al. (2017) ซึ่งสายพันธุ์ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มเดียวกับสายพันธุ์ต้นแบบ ส่วนกลุ่มสายพันธุ์ที่มีต้นกำเนิดจากอินเดียและเกรเนดาที่แสดงความแตกต่างอย่างชัดเจนจากสายพันธุ์ต้นแบบนั้น พบว่าในยีน *atpD* ของกลุ่มนี้ไม่มีบริเวณที่เกิดการแลกเปลี่ยนพันธุกรรม (recombinant region) ในขณะที่สายพันธุ์ต้นแบบมีบริเวณดังกล่าว (Hamza et al., 2010; Hamza et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบว่ามีไอโซเลตจากพริกในประเทศไทยเพียงไอโซเลตเดียวจัดอยู่ในกลุ่มย่อยนี้ ซึ่งบ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ของการเคลื่อนย้ายเชื้อระหว่างประเทศผ่านการผลิตหรือการค้าเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากอินเดีย

2. กลุ่ม *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Xep)

จำนวน 18 ไอโซเลต ประกอบด้วย ไอโซเลตจากมะเขือเทศทั้งหมด โดยไอโซเลตจากมะเขือเทศในประเทศไทยส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับสายพันธุ์ต้นแบบ *X. euvesicatoria* pv. *perforans* NCPPB4321^T (สหรัฐอเมริกา) และสายพันธุ์จากต่างประเทศ เช่น BRIP62398 (ออสเตรเลีย), LB273-2 (มาเยอต), LB101-1 (เซเชลส์), LH3 (มอริเชียส) และสายพันธุ์อื่น ๆ สอดคล้องกับการศึกษา Roach et al. (2017) และกลุ่มย่อยซึ่งมีเฉพาะไอโซเลตจากประเทศไทย

การศึกษานี้พบว่าเชื้อ Xee และ Xep เป็นสาเหตุหลักของโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศในประเทศไทย โดยเชื้อ Xep พบเฉพาะในมะเขือเทศ ส่วนเชื้อ Xee พบระบาดในพริกเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้พบ DOAC-B2179 จากมะเขือเทศเพียงไอโซเลตเดียวที่จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อ Xee ซึ่งเชื้อชนิดนี้สามารถเข้าทำลายได้ทั้งพริกและมะเขือเทศ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Jones et al. (1998) พบว่ามีการ

เปลี่ยนแปลงชนิดของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศในฟลอริดา โดยเดิมเชื้อ Xee เป็นสาเหตุเพียงชนิดเดียว แต่ในช่วงปี 1991-1994 ซึ่งเป็นระยะเวลาเพียง 3 ปี พบว่าเชื้อ Xep กลายเป็นสาเหตุหลักแทนการเปลี่ยนแปลงนี้อาจเกิดจากความสามารถของเชื้อ Xep ในการผลิตแบคทีริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของ Xee ส่งผลให้ Xep มีความได้เปรียบในการแข่งขันเหนือเชื้อชนิดอื่น (Hert et al., 2005; Lue et al., 2010) นอกจากนี้ เชื้อ Xep ยังมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 30°C. (Araújo et al., 2011) ความสามารถในการปรับตัวเข้ากับอุณหภูมิสูงนี้จึงอาจช่วยสนับสนุนการแพร่ระบาดของเชื้อ Xep ได้ดีในพื้นที่เขตร้อน จากปัจจัยทั้งสองนี้อาจเป็นเหตุผลที่ทำให้พบเชื้อ Xee เพียงไอโซเลตเดียวที่ก่อโรคใบจุดมะเขือเทศในประเทศไทย

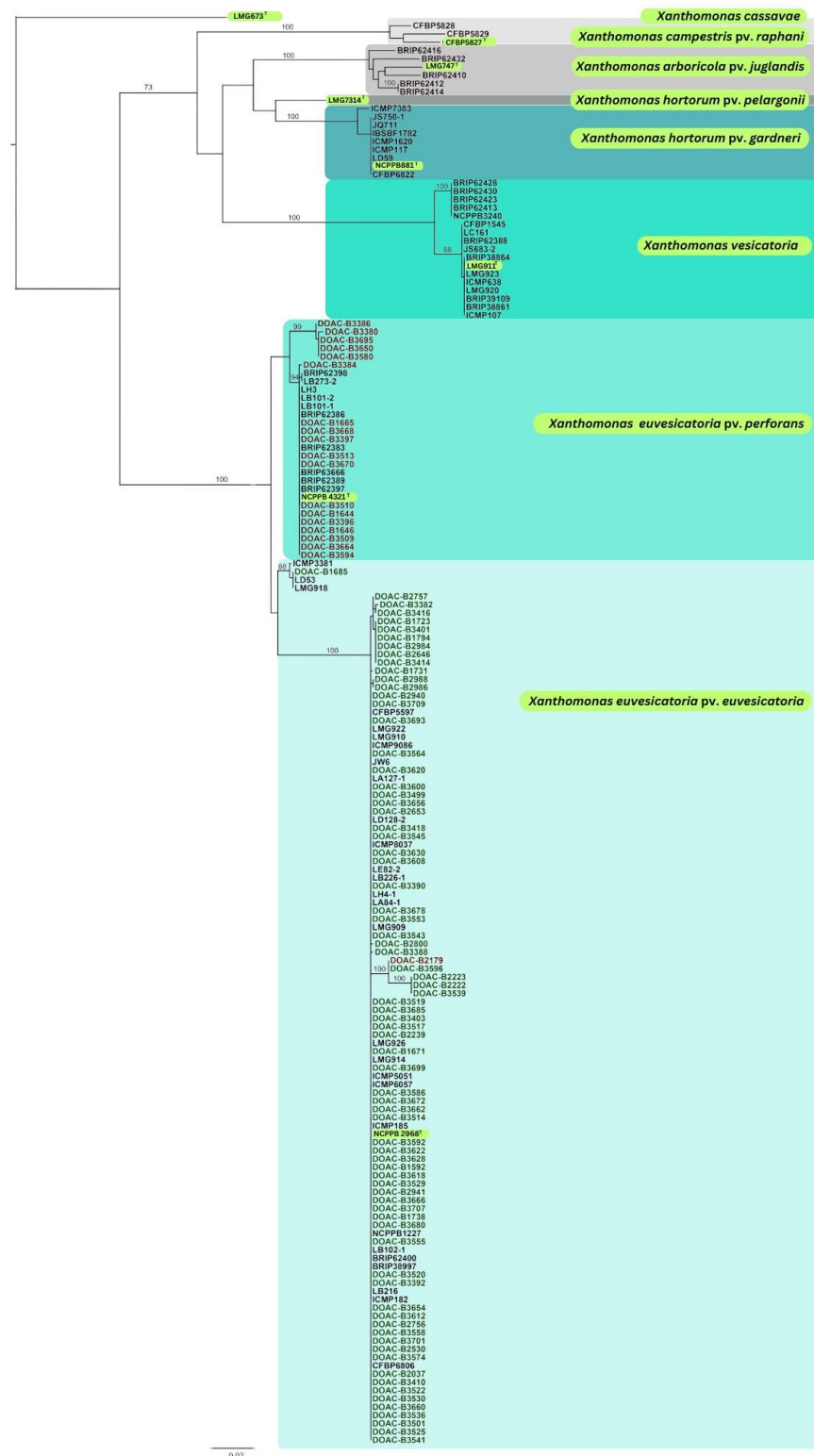


Figure 3 A maximum - likelihood tree, based on concatenated nucleotide sequences of *atpD*, *dnaK*, *efp*, and *gyrB*, illustrates the relationships among *Xanthomonas* spp. 96 isolates from Thailand and the type strains of various species. Bootstrap values, calculated from 1,000 replicates, are indicated at the branch nodes. The bacterial strains in this study from chili are represented by green text, while the strains from tomato are represented by red text.

เชื้อ Xep เป็นสาเหตุหลักของโรคใบจุดในมะเขือเทศ โดยมีรายงานครั้งแรกในรัฐฟลอริดา สหรัฐอเมริกา เมื่อปี 1991 และปัจจุบันได้แพร่กระจายไปทั่วโลก รวมถึงในพื้นที่ที่ไม่เคยพบโรคมาก่อนจากการศึกษาของ Timilsina et al. (2025) ได้ทำการวิเคราะห์จีโนมของเชื้อ Xep จำนวน 270 ไอโซเลต จาก 13 ประเทศ พบว่ามีการแบ่งกลุ่มเชื้อออกเป็นหลาย cluster โดยเชื้อ Xep จากพื้นที่ผลิตเมล็ดพันธุ์ในประเทศไทยจัดอยู่ใน cluster 10 ร่วมกับเชื้อจากไนจีเรีย สอดคล้องกับการศึกษาของ Preangtong et al. (2025) และยังพบใน cluster 5 (ซึ่งประกอบด้วยไอโซเลตจากไทย สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก และบราซิล) เชื้อใน cluster 10 มีความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic divergence) อย่างชัดเจน และมีการตรวจพบ effector xopAJ ซึ่งไม่พบใน cluster อื่น ๆ ลักษณะนี้ทำให้เชื้อกลุ่มนี้ต้องได้รับการเฝ้าระวังเป็นพิเศษ เนื่องจากอาจพัฒนาไปสู่สายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการก่อโรคสูงขึ้น หรือหลบเลี่ยงภูมิคุ้มกันต้านทานได้ทำให้การควบคุมโรคน่ายากขึ้น

อย่างไรก็ตาม พบข้อมูลการศึกษาของ Jibrin et al. (2022) ระบุเชื้อ Xep สายพันธุ์ NI1 ในไนจีเรียเป็น race T5 สายพันธุ์ใหม่ของ Xep โดยพบว่า LPS cluster ของสายพันธุ์ NI1 มีความคล้ายกับ *X. translucens* pv. *translucens* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในข้าวบาร์เลย์ และพบ effector ที่เดิมพบเฉพาะใน *X. hortorum* pv. *gardneri* เช่น AvrHah1 และ XopAQ ในสายพันธุ์ NI1 ซึ่งแบคทีเรียชนิดดังกล่าวไม่เคยพบระบาดในประเทศไทย การพบ effector ผสมลักษณะนี้ยืนยันการเกิด recombination หลายครั้งและมีการแลกเปลี่ยนกับหลายชนิดไม่ใช่แค่ Xep และ Xee แต่รวมถึง xanthomonads อื่น ๆ ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และก่อให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติแตกต่างจากสายพันธุ์เดิม

การพบเชื้อ Xep ในประเทศไทยบ่งชี้ว่าประเทศไทยอาจเป็นหนึ่งในแหล่งกำเนิด หรือเป็นแหล่งสะสมความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อกลุ่มนี้ เนื่องจาก cluster 10 ยังพบการกระจายตัวในวงจำกัด แต่มีความเสี่ยงที่จะแพร่กระจายไปยัง

ภูมิภาคอื่น ๆ ผ่านเมล็ดพันธุ์หรือการค้าระหว่างประเทศ การที่เชื้อจากประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง แสดงให้เห็นถึงความสำคัญในการเฝ้าระวังและตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้ออย่างต่อเนื่อง ทั้งในแปลงผลิตผลสดและแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ ควบคู่ไปกับการมาตรการควบคุมและตรวจสอบเมล็ดพันธุ์นำเข้า-ส่งออกอย่างเข้มงวด เพื่อป้องกันการแพร่กระจายข้ามทวีป อีกทั้งควรสนับสนุนการวิจัยด้านปรับปรุงพันธุ์ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์มะเขือเทศที่ต้านทานหรือทนทานต่อเชื้อในกลุ่มนี้

ทั้งนี้ ในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่พบการระบาดของเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *X. vesicatoria* และ *X. hortorum* pv. *gardneri* ในประเทศไทย โดยเชื้อ *X. vesicatoria* มีรายงานการกระจายตัวออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มสายพันธุ์ต้นแบบและสายพันธุ์จากนิวซีแลนด์และเอธิโอเปีย กลุ่มสายพันธุ์จากอเมริกาใต้และเอธิโอเปีย และกลุ่มสายพันธุ์จากมหาสมุทรอินเดียตะวันตกเฉียงใต้ (Timilsina et al., 2015) สำหรับเชื้อ *X. hortorum* pv. *gardneri* พบได้ในพื้นที่ที่มีความสูงกว่าระดับน้ำทะเล (Araújo et al., 2017) และมีความรุนแรงมากกว่าเชื้อสาเหตุโรคใบจุดชนิดอื่น ๆ ที่อุณหภูมิ 20°C. (Araújo et al., 2011) ปัจจุบันพบว่าเชื้อ *X. hortorum* pv. *gardneri* และ *X. vesicatoria* มีการแพร่กระจายเพิ่มขึ้นในภูมิภาคใกล้เคียง โดยเชื้อ *X. hortorum* pv. *gardneri* พบในแหล่งปลูกมะเขือเทศเพื่อการค้าในมาเลเซีย (Rashid et al., 2016) ขณะที่เชื้อ *X. vesicatoria* พบในไต้หวัน (Lue et al., 2010; Burlakoti et al., 2018) และออสเตรเลีย (Roach et al., 2017) นอกจากนี้ ยังไม่พบเชื้อในกลุ่ม *X. campestris* pv. *raphani* และ *X. arboricola* ซึ่งมีรายงานในต่างประเทศว่าสามารถก่อให้เกิดโรคในพริกและมะเขือเทศได้ (Punina et al., 2009; Myung et al., 2010; Roach et al., 2017)

ผลการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ amylolytic และ pectolytic ไม่สามารถใช้แยกชนิดของเชื้อได้อย่างชัดเจนตามรายงานของ Jones et al.

(2004) อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ MLSA โดยไอโซเลตจากมะเขือเทศส่วนใหญ่ตรวจพบแถบดีเอ็นเอจำเพาะของ Xep เมื่อใช้วิธีตามรายงานของ Ning (2012) ขณะที่ไอโซเลตจากพริก รวมทั้งไอโซเลต DOAC - B2179 จากมะเขือเทศ ตรวจพบแถบดีเอ็นเอจำเพาะของ Xee ตามวิธีการของ Koenraadt et al. (2009) ซึ่งทั้งสองวิธีให้ผลที่สอดคล้องกับการจำแนกชนิดด้วย MLSA แสดงให้เห็นว่า การตรวจสอบด้วย PCR ตามวิธีที่มีการรายงานดังกล่าวสามารถประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็วในการจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคน้ำเน่าในพริกและมะเขือเทศ

สรุปผลการทดลอง

จากการรวบรวมเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* สาเหตุโรคน้ำเน่าในพริกและมะเขือเทศ โดยการสำรวจพื้นที่ปลูกทั่วประเทศและจากศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2544 - 2568 พบเชื้อจำนวนทั้งสิ้น 96 ไอโซเลต แยกได้จากพริก 77 ไอโซเลต และจากมะเขือเทศ 19 ไอโซเลต เชื้อทั้งหมดสามารถก่อโรคในพืชได้ โดยไอโซเลตจากพริกสามารถก่อโรคได้ทั้งในพริกและมะเขือเทศ ขณะที่ไอโซเลตจากมะเขือเทศก่อโรคได้เฉพาะในมะเขือเทศ

การตรวจสอบคุณสมบัติด้านเอนไซม์พบว่า ไอโซเลตจากมะเขือเทศส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์ amylolytic และ pectolytic ได้ ส่วนไอโซเลตจากพริกส่วนใหญ่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่า ไอโซเลตจากมะเขือเทศให้แถบดีเอ็นเอขนาด 300 bp ซึ่งจำเพาะต่อ *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* ขณะที่ไอโซเลตจากพริกและ DOAC-B2179 จากมะเขือเทศ ให้แถบขนาด 173 bp ซึ่งจำเพาะต่อ *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ผลการจำแนกชนิดเชื้อด้วยการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) พบว่าเชื้อจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ *X. euvesicatoria* pv.

euvesicatoria จำนวน 78 ไอโซเลต พบในไอโซเลตจากพริกทั้งหมด และ 1 ไอโซเลตจากมะเขือเทศ และ *X. euvesicatoria* pv. *perforans* จำนวน 18 ไอโซเลต พบเฉพาะในมะเขือเทศ ไม่พบเชื้อในกลุ่ม *X. vesicatoria*, *X. hortorum* pv. *gardneri*, *X. campestris* pv. *raphani* และ *X. arboricola* ในประเทศไทย ดังนั้น เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคน้ำเน่าในพริกและมะเขือเทศที่พบในประเทศไทยในปัจจุบันสามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* และ *X. euvesicatoria* pv. *Perforans*

ข้อมูลจากการวิจัยครั้งนี้จะเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญในการสนับสนุนการปฏิบัติงานขององค์การอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization; NPPO) ที่เกี่ยวข้องกับการติดตามและเฝ้าระวังศัตรูพืช การวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืช การจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช และการปรับปรุงบัญชีศัตรูพืชกักกันของประเทศไทยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- สันติพงศ์ สิทธิชนสิน จุฑาทเทพ วุฒิชัยคุปต์ ชาญณานุช กอรั้งงาม ทิพวรรณ กันหาญาติ ญัฐริมา โฆษิตเจริญกุล วิชัย โฆสิตรัตน และ สุจินต์ ภัทรภูวดล. 2563. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคน้ำเน่าของมะเขือเทศในประเทศไทย. วารสารวิชาการเกษตร. 36: 80-88.
- Araújo, E.R., J.R. Costa, M.A.S.V. Ferreira and A.M. Quezado-Duval. 2017. Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. Plant Pathology. 66: 159-168. doi: 10.1111/ppa.12543.
- Araújo, E.R., R.C. Pereira, M.A.S.V. Ferreira, A.C. Café-Filho, A.W. Moita and A.M. Quezado-Duval. 2011. Effect of temperature on pathogenicity components of tomato

- bacterial spot and competition between *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri*. Acta Horticulturae. 914: 39-42.
- Bouzar, H., J.B. Jones, G.V. Minsavage, R.E. Stall and J.W. Scott. 1994. Proteins unique to phenotypically distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining. Phytopathology. 84(1): 39-43.
- Burlakoti, R.R., C.F. Hsu, J.R. Chen and J.F. Wang. 2018. Population dynamics of Xanthomonads associated with bacterial spot of tomato and pepper during 27 years across Taiwan. Plant Disease. 102: 1348-1356. doi: 10.1094/PDIS-04-17-0465-RE.
- Constantin, E.C., I. Cleenwerck, M. Maes, S. Baeyen, C. Van Malderghem and P. De Vos. 2016. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. Plant Pathology. 65: 792-806. doi: 10.1111/ppa. 12461.
- Doidge, E.M. 1921. A tomato canker. Ann. Appl. Biol. 7: 407-430.
- 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.
- Hamza, A.A., I. Robene-Soustrade, E. Jouen, L. Gagnevin, P. Lefeuvre, F. Chiroleu and O. Pruvost. 2010. Genetic and pathological diversity among *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot on tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region. Plant Disease. 94: 993-999. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-8-0993>.
- Hamza, A.A., I. Robene-Soustrade, E. Jouen, P. Lefeuvre, F. Chiroleu, M. Fisher- Le Saux, L. Gagnevin and O. Pruvost. 2012. Multilocus sequence analysis-and amplified fragment length polymorphism-based characterization of xanthomonads associated with bacterial spot of tomato and pepper and their relatedness to *Xanthomonas* species. Systematic and Applied Microbiology. 35: 183-190.
- Hert, A.P., P.D. Roberts, M.T. Momol, G.V. Minsavage, S.M. Tudor-Nelson, and J.B. Jones. 2005. Relative importance of bacteriocin-like genes in antagonism of *Xanthomonas perforans* tomato race 3 to *Xanthomonas euvesicatoria* Tomato race 1 strains. Applied and Environmental Microbiology Journal. 71: 3581-3588.
- Jibrin, M.O., S. Timilsina, G.V. Minsavage, G.E. Vallad, P.D. Roberts, E.M. Goss and J.B. Jones. 2022. Bacterial spot of tomato and pepper in Africa: diversity, emergence of T5 race, and management. Frontiers in Microbiology. 13: 835647. doi: 10.3389/ fmicb. 2022.835647.
- Jones, J.B., H. Bouzar, G.C. Somodi, R.E. Stall, K. Pernezny, G. El-Morsy and J.W. Scott. 1998. Evidence for the preemptive nature of tomato race 3 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida. Phytopathology. 88: 33-38.
- Jones, J.B., G.H. Lacy, H. Bouzar, R.E. Stall and N.W. Schaad. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and

- pepper Systematic and Applied Microbiology. 27: 755-762.
- Jones, J.B., H. Bouzar, R.E. Stall, E.C. Almira, P.D. Roberts, B.W. Bowen, J. Sudberry, P.M. Strickler and J. Chun. 2000. Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50: 1211-1219. doi: 10.1099/ 00207713-50-3-1211.
- Jones, J.B., R.E. Stall, J.W. Scott, G.C. Somodi, H. Bouzar and N.C. Hodge. 1995. A third tomato race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Plant Disease. 79: 395-398.
- Koenraad, H., B. Van Betteray, R. Germain, G. Hiddink, J.B. Jones, J. Oosterhof, A. Rijlaarsdam, P. Roorda and B. Woudt. 2009. Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato, pp. 99-102. In: II International Symposium on Tomato Diseases 808. International Society for Horticultural Science. Belgium.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Suleski, M. Sanderford, S. Sharma and K. Tamura. 2024. Molecular evolutionary genetics analysis version 12 for adaptive and green computing. Molecular Biology and Evolution. 41: 1-9.
- Lue, Y.S., W.L. Deng, Y.F. Wu, A.S. Cheng, S.T. Hsu and K.C. Tzeng. 2010. Characterization of *Xanthomonas* associated with bacterial spot of tomato and pepper in Taiwan. Plant Pathology Bulletin. 19: 181-190.
- Morinière, L., A. Burlet, E.R. Rosenthal, X. Nesme, P. Portier and C.T. Bull. 2020. Clarifying the taxonomy of the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce through a polyphasic approach reveals that *Xanthomonas cynarae* Trébaol *et al.* 2000 emend. Timilsina *et al.* 2019 is a later heterotypic synonym of *Xanthomonas hortorum* Vauterin *et al.* 1995. Systematic and Applied Microbiology. 43: 126087.
- Myung, I.-S., I.H. Jeong, S.Y. Moon, S.W. Lee and H.S. Shim. 2010. A new disease, Arboricola leaf spot of bell pepper, caused by *Xanthomonas arboricola*. Plant Disease. 94(2): 271.
- Ning, F.Y. 2012. Identification and detection of *Xanthomonas perforans* by the polymerase chain reaction technique and characterization of *X. perforans* strains in Taiwan by DNA polymorphism. Master's thesis, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taiwan.
- Pohronezny, K., and R.B. Volin. 1983. The effect of bacterial spot on yield and quality of fresh market tomatoes. Hort Science. 18: 69-70.
- Preangtong, Y., S. Patarapuwadol, P. Phiriyangkul, T. Kanhayart, N. Kositcharoenkul, W. Kositratana and J. Watcharachaiyakup. 2025. Characterisation and genomic diversity of *Xanthomonas* species causing bacterial spot disease of tomato and pepper in Thailand. Plant Pathology. 74: 1315-1334. <https://doi.org/10.1111/ppa.14094>.

- Punina, N.V., A.N. Ignatov, E.S. Pekhtereva, K.P. Kornev, E.V. Matveeva, V.A. Polityko, N.I. Budenkov and N.W. Schaad. 2009. Occurrence of *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* on tomato plants in the Russian federation. *Acta Horticulturae*. 808: 287-290.doi:10.17660/actahortic.2009.808.44.
- Rashid, T.S., S. Kamaruzaman, E. Golkhandan, A. Nasehi and H.K. Awla. 2016. First report of *Xanthomonas gardneri* causing bacterial spot of tomato in Malaysia. *Plant Disease*. 100: 854.
- Roach, R., R. Mann, C.G. Gambley, R.G. Shivas and B. Rodoni. 2017. Identification of *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot of tomato, capsicum and chilli crops in eastern Australia. *European Journal of Plant Pathology*. 150: 595-608.
- Schaad, N.W., J.B. Jones and G.H. Lacy. 2001. Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society. Minnesota 373 p.
- Stall, R.E., C. Beaulieu, D. Egel, N.C. Hodge, R.P. Leite, G.V. Minsavage, H. Bouzar, J.B. Jones, A.M. Alvarez and A.A. Benedict. 1994. Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *International journal of systematic bacteriology*. 44: 47-53.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies". *Bioinformatics*. 30: 1312-1313.
- Sutic, D. 1957. Bakterioze crvenog patlidzana (tomato bacteriosis). Posebna Izd. Inst. Zasht. Bilja Beograd (Spec. Edit. Inst. Plant Prot. Beograd) 6, 1-65. English summary. *Review of Applied Mycology*. 36: 734-735.
- Timilsina, S., F. Iruegas - Bocardo, M.O. Jibrin, A. Sharma, A. Subedi, A. Kaur, G.V. Minsavage, J.C. Huguet-Tapia, J. Klein-Gordon, P. Adhikari, T.B. Adhikari, G. Cirvilleri, L.B.T. de la Barrera, E. Bernal, T.C. Creswell, T.T.K. Doan, T.A. Coutinho, D.S. Egel, R. Félix-Gastélum, D.M. Francis, M. Kebede, M.L. Ivey, F.J. Louws, L. Luo, E.T. Maynard, S.A. Miller, N.T.T. Nguyen, E. Osdaghi, A.M. Quezado-Duval, R. Roach, F. Rotondo, G.E. Ruhl, V.M. Shutt, P. Thummabenjapone, C. Trueman, P.D. Roberts, J.B. Jones, G.E. Vallad and E.M. Goss. 2025. Diversification of an emerging bacterial plant pathogen; insights into the global spread of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. *PLoS Pathogens*. 21(4) : e1013036. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1013036>.
- Timilsina, S., M.O. Jibrin, N. Potnis, G.V. Minsavage, M. Kebede, A. Schwartz, R. Bart, B. Staskawicz, C. Boyer, G.E. Vallad, O. Pruvost, J.B. Jones and E.M. Goss. 2015. Multilocus sequence analysis of xanthomonads causing bacterial spot of tomato and pepper plants reveals strains generated by recombination among species and recent global spread of *Xanthomonas gardneri*. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 81: 1520-1529.

- Uematsu, T., S. Chuenchitt, S. Kanjanarat, S. Vitthajinda, N. Napheerong, S. Benjathikul, S. Nilmanee, W. Dhirabhava and D. Buangsuwon. 1983. Bacterial diseases on economic crops in Thailand. Tropical Agriculture Research Center, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan and Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives. Thailand. 266 p.
- Vauterin, L., J. Swings, L. Vauterin, J. Swings, K. Kersters, M. Gillis, T.W. Mew, M. N. Schroth, N.J. Palleroni, D.C. Hildebrand, D.E. Stead, E.L. Civerolo, A.C. Hayward, H. Maraite, R.E. Stall and J.F. Bradbury. 1990. Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. International journal of systematic bacteriology. 40: 312-316.
- Vauterin, L., B. Hoste, K. Kersters and J. Swings. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. International journal of systematic bacteriology. 45(3): 472-489.
- Young, J.M., D.W. Dye, J.F. Bradbury, C.G. Panagopoulos and C.F. Robbs. 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. New Zealand Journal of Agricultural Research. 21: 153-177.

ความสามารถสร้างและการทำลายด้วยความร้อนในหัวของผักแว่นดอกชมพู (*Oxalis latifolia* Kunth)

Production and Thermal Death of Bulbils of Fishtail Oxalis (*Oxalis latifolia* Kunth)

อัญญา พรหมมา^{1/} วชิระ สังข์ทอง^{2/} ัญชนก ศรีเมือง^{2/} นิชากรณ์ ใจดี^{2/}

Ansaya Promma^{1/} Watchara Sangthong^{2/} Tanchanok Sreemuang^{2/} Nichakon Jaidee^{2/}

ABSTRACT

Fishtail Oxalis (*Oxalis latifolia* Kunth) is a monocotyledon perennial herb which propagate by bulb and bulbils. The study on propagule production was conducted in nethouse, growing the plant in pots. One plant of fishtail oxalis can produce 15 bulbils from the mother bulb in 20 weeks duration. Base on the previous study, the vigor bulbils can germinate up to 91.5% and 20 weeks for a cycle, so the plant can produce 2.5 cycle a year or 5 cycle in 2 years. The plant can produce about 2,000 bulbils in first year, and the number of bulbil will be huge as 7,000,000 in the second year. A method of destroy the bulbils was consider as thermal death. An experiment of heat treatment at 40°C - 60°C, 5°C interval, 24 hours duration were treated to the bulbils and growing material (soil), then let the bulbils germination in net house for 35 days, comparing with the bulbil with no heat treatment (control). The result showed that the heat at 40°C, 45°C and 50°C effected by decreasing the germination to 75.0, 47.5 and 15.8% respectively, comparing to control 9.17%. The heat at 55°C - 60°C can completely kill the bulbils, no plant geminate from the treated bulbils.

Keywords: *Oxalis latifolia* Kunth, invasive alien plant, Garden Pink - sorrel, ornamental plant, weed

^{1/} ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุโขทัย สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 กรมวิชาการเกษตร

^{1/} Sukhothai Agricultural Research and Development Center, Agricultural Research and Development Regional Office 2, Department of Agriculture

^{2/} กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{2/} Weed Science Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 19000, Thailand

* Corresponding author : ansaya.su@gmail.com

บทคัดย่อ

ผักแว่นดอกชมพู หรือผักแว่นดอย (*Oxalis latifolia* Kunth) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว อายุหลายปี ขยายพันธุ์โดยหัวใต้ดิน พืชชนิดนี้ 1 ต้น ในเวลา 20 สัปดาห์ ในสภาพเรือนทดลองสามารถผลิตหัวได้ 15 หัว หัวใต้ดินเหล่านี้หากมีความสมบูรณ์สามารถงอกได้ 91.5% หากคำนวณโดยวงรอบ 1 วง ใน 1 ปี จะได้ประมาณ 2.5 รอบ หรือ 5 รอบในสองปี จำนวนหัวที่ผลิตได้ในปีแรกจะได้ประมาณ 2,000 หัว และเพิ่มขึ้นเป็น 7,000,000 หัว ในปีที่ 2 การศึกษาการทำลายการมีชีวิตของหัวผักแว่นดอกชมพูด้วยความร้อน โดยการอบหัวพร้อมวัสดุปลูก ที่อุณหภูมิ 40°C - 60°C. เป็นระยะเวลา 24 ชม. และปล่อยให้งอกในสภาพเรือนทดลองนาน 35 วัน ความร้อนที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50°C. สามารถทำให้หัวงอกได้ลดลง คืองอกได้ 75.0, 47.5 และ 15.8% ตามลำดับ เปรียบเทียบกับหัวที่ไม่ได้รับความร้อนเลยสามารถงอกได้ 91.7% และความร้อนที่ 55 - 60°C. สามารถทำลายการมีชีวิตของหัวใต้ดินได้สมบูรณ์ คือพืชไม่สามารถงอกได้เลย

คำสำคัญ: *Oxalis latifolia* Kunth พืชต่างถิ่นที่รุกราน ผักแว่นดอย ไม้ประดับ วัชพืช

บทนำ

ผักแว่นดอกชมพู หรือ ผักแว่นดอย หรือ ผีเสื้อราตรี หรือปทุมพา มีชื่อสามัญภาษาอังกฤษหลายชื่อ เช่น Garden Pink - sorrel, Broadleaf Woodsorrel, broadleaf wood - sorrel, fishtail oxalis, large - leaf wood - sorrel, pink shamrock, purple - flowered oxalis, shamrock จัดอยู่ในวงศ์ Oxalidaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ที่เป็นที่ยอมรับในปัจจุบัน คือ *Oxalis latifolia* Kunth มีชื่อพ้องหลายชื่อ เช่น *Acetosella violacea* subsp. *latifolia* (Kunth) Kuntze, *Ionoxalis latifolia* (Kunth), และ *Oxalis violacea* subsp. *latifolia* (Kunth) Kuntze มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนของอเมริกาเหนือ ถึงส่วนบนอเมริกาใต้ เช่น เอกวาดอร์ โคลัมเบีย เปรู ปัจจุบันพบในหลายประเทศ ทั้งเขตร้อนและเขตอบอุ่น ทุกทวีปทั่วโลก ยกเว้นแอนตาร์กติกา (GBIF, 2023; POWO, 2025; PIER, 2006) ผักแว่นดอกชมพูเป็นไม้เนื้ออ่อน อายุยาวหลายฤดู มีรากแก้วรูปร่างคล้ายแครอท มีหัวใต้ดิน (bulb) ที่ด้านบนของรากแก้ว หัวใต้ดินสร้างไหลยาวได้ถึง 10 ซม. ที่ปลายไหลมีหัวย่อย (bulbil) ใบเป็นใบประกอบ 3 ใบย่อย ใบย่อยรูปสามเหลี่ยม ไม่มีก้านใบย่อย ขอบใบเรียบ ปลายใบกว้าง (ประมาณ 2 เท่าของความยาว) เว้าเป็นหยักตื้นที่กึ่งกลางของความกว้าง โคนใบสอบ ทำให้เห็นใบย่อยแต่ละใบมีรูปร่างคล้ายหางปลา ก้านใบเรียวยาว 10 - 25 ซม. ดอกออกเป็นช่อกระจุก 5 - 12 ดอก บนก้านช่อดอกที่ยาวกว่าก้านใบ ทำให้เห็นช่อดอกเด่น ดอกมีก้านดอกยาวไม่เท่ากัน กลีบเลี้ยงสีเขียว จำนวน 5 กลีบ กลีบดอก 5 กลีบ สีชมพู - ม่วง โคนกลีบดอกสีเขียว เกสรเพศผู้ 10 แบ่งเป็น 2 ชุด พบอยู่ต่ำกว่า เสมอกัน หรือสูงกว่าเกสรเพศเมีย เกสรเพศเมีย 5 ผลพบได้น้อย เป็นแคปซูลสีเขียว แตกเมื่อแก่ สามารถติดเมล็ดออกไปได้ไกลถึง 40 ซม. เมล็ดรูปไข่ สีส้ม - เหลืองเข้ม มีสันตามยาว 2 เส้นและตามขวางจำนวนมาก (PIER, 2006) (Figure 1)

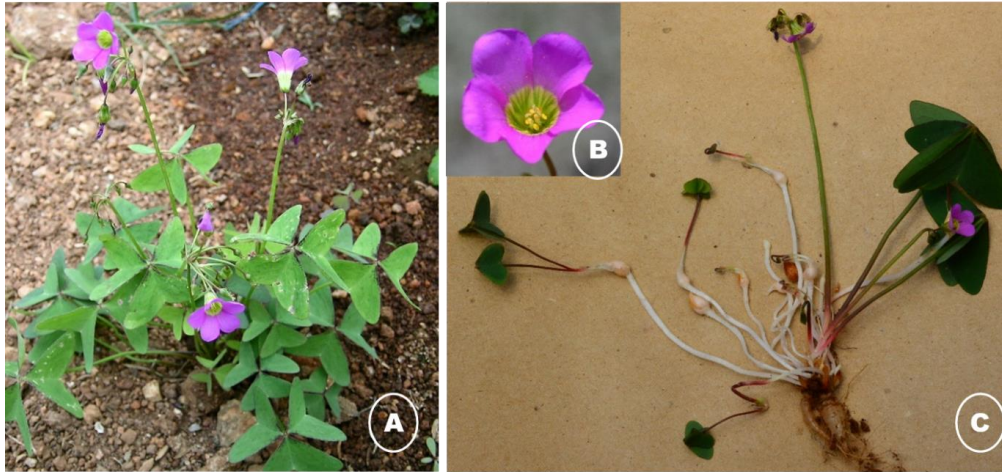


Figure 1 Habit of Fishtail oxalis: (A) above ground part, leaf shape and inflorescence: (B) flower and (C) underground part (young plant), bulb, runner with bulbils

การขยายพันธุ์ของผักแว่นดอกชมพูส่วนใหญ่เป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ทั้งที่พืชชนิดอื่นในสกุลเดียวกัน เช่น *Oxalis corniculata* L. ชื่อสามัญภาษาไทยคือ ส้มกบ ส้มสัง ผักแว่น หรือส้มสามตาชื่อสามัญอังกฤษมีหลายชื่อ เช่น creeping woodsorrel, procumbent yellow sorrel หรือ sleeping beauty สามารถสร้างเมล็ดจำนวนมากในผลแบบแก่แล้วแตก หรือแตกเมื่อสัมผัส เมล็ดจึงถูกดีดออกมา ทำให้เมล็ดติดไปกับเสื้อผ้า ขนสัตว์ หรือสัมภาระต่าง ๆ ได้ พบพืชชนิดนี้ขึ้นทั่วไป โดยเฉพาะดินที่มีความชื้น ในขณะที่ผักแว่นดอกชมพูที่พบในประเทศไทยไม่พบการสร้างผล ขยายพันธุ์ด้วยหัวใต้ดินและหัวย่อย โดยผักแว่นดอกชมพูถูกรายงานว่าเป็นพืชที่รุกรานในหลายประเทศ อย่างน้อย 37 ประเทศ เช่น ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ อินโดนีเซีย มาเลเซีย สิงคโปร์ สหรัฐอเมริกา (GBIF, 2003) Holm et al. (1997) รายงานว่าพืชชนิดนี้เป็นวัชพืชที่พบทั่วไปในที่เพาะปลูก แหล่งปลูกไม้ผล และแปลงต้นอ่อน เป็นปัญหาหลักในมันสำปะหลัง ข้าวโพด ข้าวไร่ มันฝรั่ง กาแฟ ธัญพืช อ้อย และพืชผักในยูแกนดา (Plantwise, 2016) สามารถเจริญเติบโตภายใต้ร่มเงาและในสภาพดินต่าง ๆ กัน แม้แต่ในดินที่มีความสมบูรณ์ต่ำ ถึงแม้ผักแว่นดอกชมพูเป็นวัชพืชในนิเวศน์เกษตร หากมีการระบาดเข้าในแหล่งพืชท้องถิ่นพืชชนิดนี้สามารถปกคลุมพืชท้องถิ่นได้

ด้วยกอที่แน่นหนาของมัน (Weber, 2003) ไม่พบประวัติและสาเหตุการนำผักแว่นดอกชมพูเข้ามาในประเทศไทย จากการสำรวจของศิริพร และคณะ (2559) พบส้มกบสองชนิดในพื้นที่เกษตรที่สูงในภาคเหนือ ได้แก่ *Oxalis corymbosa* DC. (ปัจจุบันเป็นชื่อพ้องของ *Oxalis debilis* Kunth) และ *Oxalis latifolia* Kunth อ้นศยา และคณะ (2562) รายงานพบผักแว่นดอกชมพูในแปลงปลูกมันฝรั่ง สตรอเบอร์รี่ พืชผัก และไม้ดอกในพื้นที่เกษตรที่สูงจังหวัดเชียงใหม่ และเชียงราย และพบจำหน่ายเป็นไม้ดอก - ไม้ประดับในแหล่งจำหน่ายพรรณไม้ในเขตกรุงเทพมหานคร และยังมีรายงานการแพร่กระจายเข้าไปยังพื้นที่ป่าอนุรักษ์ของไทยด้วย (สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช, 2562) และไม่พบรายงานศัตรูธรรมชาติของพืชชนิดนี้ในประเทศไทย ซึ่งยืนยันได้จากการสำรวจที่ไม่พบร่องรอยการทำลายจากแมลงเลย แต่พบเชื้อราสีส้ม *Puccinia* sp. อยู่ด้านล่างใบ ทำให้ใบเหี่ยวเฉาได้ ในธรรมชาติพบหัวผักแว่นดอกชมพูซึ่งเป็นส่วนขยายพันธุ์ที่สำคัญหลายขนาด โดยอ้นศยา และอ้นชนก (2562) สำรวจและรวบรวมหัวของผักแว่นดอกชมพูจากจังหวัดเชียงรายและเชียงใหม่ แยกหัวออกเป็น 4 กลุ่ม ตามขนาดความกว้างของหัว ได้แก่ A กว้างมากกว่า 9.0 มม. B กว้าง 6.1 - 9.0 มม. C กว้าง 5.0 - 6.0 มม. และ D กว้างน้อยกว่า 5.0 มม. ทดสอบความงอกในสภาพเรือนทดลอง โดยนำ 20

หัว ใสในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว ที่ระดับผิวดิน ขนาดละ 10 กระถาง นับจำนวนต้นออกทุกวัน ปรากฏว่า หัวขนาดใหญ่ (A, B และ C) เริ่มงอกเร็วกว่าขนาดเล็ก (D) โดยทั้งสามขนาดเริ่มงอกในวันที่ 4 หลังเริ่มทดลอง ขนาด A และ B ส่วนใหญ่งอกในช่วง 7 วันแรกหลังปลูก ส่วนขนาด C มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงในช่วง 14 และ 34 วันหลังปลูก ส่วนขนาดเล็กสุด (D) เริ่มงอกเมื่อ 7 วันหลังปลูก และมีการงอกสูงที่ 34 วันหลังปลูก เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (45 วันหลังปลูก) (Figure 2) วิชระและคณะ (2567) ทำการศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการสร้างหน่วยขยายพันธุ์ ในสภาพเรือนทดลอง โดยเลือกหัวที่มีขนาดเท่า ๆ กัน จำนวน 1, 3 และ 5 หัว ปลูกในกระบะขนาด 15 x 20 นิ้ว เมื่องอกแล้วสังเกตการเจริญเติบโต นับจำนวนใบและจำนวนหน่อทุก 7 วัน ปรากฏว่า ผักแว่นดอกชมพูมีจำนวนใบต่อต้นสูงสุดในช่วงระยะ สัปดาห์ที่ 11 - 13 หลังปลูก โดยมีจำนวนใบต่อต้นสูงสุดคือ 33 ใบ หลังจากนั้นใบบางส่วนจะเริ่มเหลืองและแห้งตาย ทำให้จำนวนใบลดลงจนเหลือเพียง 4, 1 และ 2 ใบ ต่อต้นในสัปดาห์ที่ 20 หลังเริ่มปลูก สำหรับพืชที่ปลูก 1, 3 และ 5 หัวต่อกระบะ ตามลำดับ สำหรับจำนวนหัวต่อต้น มีจำนวนต่อต้นเมื่อสิ้นสุดการทดลองเท่ากับ 5, 2 และ 2 หัว ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ทดสอบฤทธิ์ทางอัลลีโลพาธิของใบและก้านผักแว่นดอกชมพู โดยนำใบหรือก้านใบแห้ง หนัก 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.5 ก. ระหว่างชั้นของสารละลายวุ้น (0.3%) 10 มล. และใช้ไมยราบยักษ์ เริ่มงอกเป็นพืชทดสอบ เปรียบเทียบกับการเจริญของรากและต้นของไมยราบ

ยักษ์ที่ปลูกในสารละลายวุ้นอย่างเดียว (ชุดควบคุม) ปรากฏว่า การเจริญของรากและต้นไมยราบยักษ์ถูกยับยั้งมากขึ้นตามอัตราน้ำหนักรากผักแว่นดอกชมพูที่เพิ่มขึ้น โดยใบแห้งสามารถยับยั้งการเจริญของรากได้มากกว่าก้านใบที่น้ำหนักเท่ากัน และใบแห้ง 0.5 ก. สามารถยับยั้งการเจริญของรากและต้นไมยราบยักษ์ได้อย่างสมบูรณ์ และวิชระและคณะ (2568) ศึกษาการงอกของหัวผักแว่นดอกชมพูที่ระดับลึก 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 ซม. จากผิวดิน ในสภาพเรือนทดลองนาน 42 สัปดาห์ พบว่า ที่ระดับผิวดินพืชสามารถงอกได้มากที่สุด และการงอกลดลงเมื่อระดับความลึกเพิ่มขึ้น แต่ระยะเวลาที่ใบแรกโผล่พื้นดินใช้เวลานานขึ้นเมื่อระดับความลึกจากผิวดินเพิ่มขึ้น โดยหัวที่อยู่ระดับลึก 0 - 5 ซม. จากผิวดิน งอกพื้นดินในสัปดาห์แรก ส่วนที่อยู่ลึก 10, 15, 20 และ 25 ซม. งอกพื้นดินในสัปดาห์ที่ 2, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ โดยหัวที่อยู่ลึกจากผิวดิน 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 ซม. มีการงอกในสัปดาห์ที่ 6 เท่ากับ 100, 99, 94, 85, 70 และ 14% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ทดสอบการงอกของหัวผักแว่นดอกชมพูในสภาพเรือนทดลองภายใต้วัสดุคลุม 5 ชนิด ได้แก่ พลาสติกดำ ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา และใบธูปฤๅษีสับ เปรียบเทียบกับการงอกของหัวที่ไม่มีอะไรปกคลุม พบว่าหัวผักแว่นดอกชมพูที่ปิดด้วยพลาสติกดำไม่สามารถงอกขึ้นมาได้เลยจนสิ้นสุดการทดลอง แต่หัวที่อยู่ภายใต้วัสดุคลุมอื่นได้แก่ ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา ใบธูปฤๅษี และไม่ปกคลุม สามารถงอกได้ 63, 69, 64, 68, 64 และ 82% ตามลำดับ

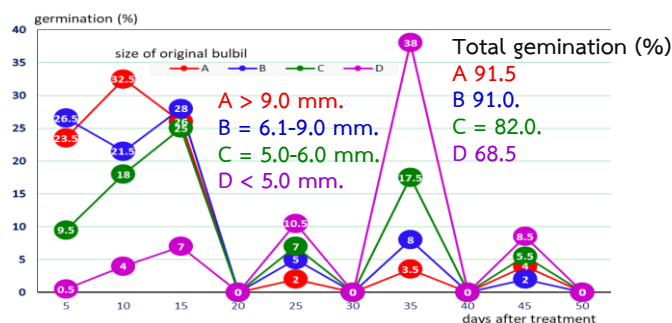


Figure 2 Germination of Fishtail oxalis in pots (%).

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาความสามารถในการผลิตหัวของผักแว่นดอกชมพูเพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลพื้นฐานสำหรับการประเมินการระบาดและแนวทางการควบคุม เพื่อเป็นคำแนะนำสำหรับการวางแผนป้องกัน ควบคุม และกำจัดที่เหมาะสมและปลอดภัยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ความสามารถในการผลิตหัวของผักแว่นดอกชมพูในสภาพเรือนทดลอง

เก็บรวบรวมหัวผักแว่นดอกชมพูจากแปลงมันฝรั่ง ของศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ (ขุนวาง) แยกขนาดหัวออกตามความกว้างของหัวด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ เป็น 4 ขนาด ได้แก่ กว้างมากกว่า 9.0 มล. (A) กว้าง 6.1 - 9.0 มล. (B) กว้าง 5.0 - 6.0 มล. (C) และน้อยกว่า 5.0 มล. (D) นำหัวผักแว่นดอกชมพู 1 หัว ปลูกในกระถาง ขนาดละ 100 กระถาง รดน้ำทุกวัน บันทึกผลทุกสัปดาห์ นาน 20 สัปดาห์ โดยนำกระถางออก 5 กระถาง ล้างดินออก นับจำนวนหัวใต้ดินทั้งหมดที่พบในกระถาง

2. ผลของความร้อนระดับต่าง ๆ ต่อการงอกของหัวผักแว่นดอกชมพู

นำตัวอย่างหัวผักแว่นดอกชมพูที่ได้ตรวจสอบการงอกแล้วไม่น้อยกว่า 90% และขนาดใกล้เคียงกัน ใส่ในกระบะขนาด 10 x 20 นิ้ว โดย 1 กระบะ บรรจุดินปลูก 1 กก. หัวผักแว่นดอกชมพู จำนวน 20 หัวต่อกระบะ วางให้หัวกระจายทั่วกระบะและโรยดินปิดด้านบน จำนวน 72 กระบะ นำกระบะที่ใส่ดินปลูกพร้อมหัวผักแว่นดอกชมพู จำนวน 12 กระบะ วางในตู้อบลมร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิ เป็นระยะเวลานาน 24 ชม. จากนั้นนำไปวางในเรือนทดลอง รดน้ำ บันทึกการงอกทุก 7 วัน เป็นเวลา 1 เดือน และนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก วางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCB) จำนวน 4 ซ้ำ (ซ้ำละ 3 กระบะ) จำนวน 6 กรรมวิธี ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 อุณหภูมิ 40°C.

กรรมวิธีที่ 2 อุณหภูมิ 45°C.

กรรมวิธีที่ 3 อุณหภูมิ 50°C.

กรรมวิธีที่ 4 อุณหภูมิ 55°C.

กรรมวิธีที่ 5 อุณหภูมิ 60°C.

กรรมวิธีที่ 6 ชุดควบคุม - อุณหภูมิเรือน

ทดลอง

ดำเนินการทดลอง ณ เรือนทดลอง กลุ่มวิจัยพืชผัก สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร ระหว่าง เดือน สิงหาคม 2565 - กันยายน 2567

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ความสามารถในการผลิตหัวของผักแว่นดอกชมพูในสภาพเรือนทดลอง

ผักแว่นดอกชมพูเริ่มงอกโดยแทงรากออกจากด้านล่างของหัวแม่ แล้วจึงงอกใบจากด้านบนของหัวแม่ ใบออกจากหัวหลักที่ใช้ปลูก ซึ่งหัวที่อุดมสมบูรณ์ (ขนาดใหญ่: A และ B) จะให้ต้นที่มีการสร้างรากและใบมากและเร็วกว่าหัวขนาดกลาง (C) และเล็กสุด (D) ในช่วง 1 - 5 สัปดาห์แรกเป็นการเจริญเติบโตโดยการสร้างใบ ยังไม่มีการสร้างหัวย่อย เริ่มพบหัวย่อยของหัวขนาดใหญ่และขนาดกลาง (A, B และ C) ในสัปดาห์ที่ 6 หลังปลูก ยกเว้นหัวที่มีขนาดเล็กสุด (D) เริ่มพบหัวย่อยในสัปดาห์ที่ 8 หลังปลูก และค่อยเพิ่มจำนวนขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น (Figure 3)

การสร้างหัวย่อยของผักแว่นดอกชมพูเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นในทุกขนาดของหัวแม่ที่เริ่มต้น แต่จำนวนหัวที่สร้างตลอดระยะเวลาทดสอบ (20 สัปดาห์) ของหัวแม่ที่มีขนาดใหญ่จะมากกว่าหัวแม่ที่มีขนาดเล็กกว่า (Figure 4) เนื่องจากการทดลองนี้เป็นการนำพืชออกเพื่อตรวจนับจำนวนหัว การนับแต่ละครั้งจึงเป็นการนับจากต้นใหม่เสมอ จำนวนหัวย่อยที่ปรากฏจึงมีค่าน้อยกว่าสัปดาห์ก่อนได้ จำนวนหัวย่อยต่อต้นสูงสุดที่พบในการศึกษานี้ แตกต่างกันตามขนาดหัวที่ใช้ปลูกหรือหัวแม่ หัวขนาดใหญ่ทั้งสองขนาด (A และ B) มีจำนวนหัวย่อย 15 และ 17 หัว

หัวขนาดกลาง (C) และขนาดเล็ก (D) เท่ากับ 6 และ 5 หัว ตามลำดับ (Figure 4) อนึ่งในการตรวจนับจำนวนหัวย่อยนี้พบว่าหัวย่อยที่เกิดขึ้นสามารถที่จะสร้างใบใหม่ (Figure 5) และหากหลุดหรือแตกหัก

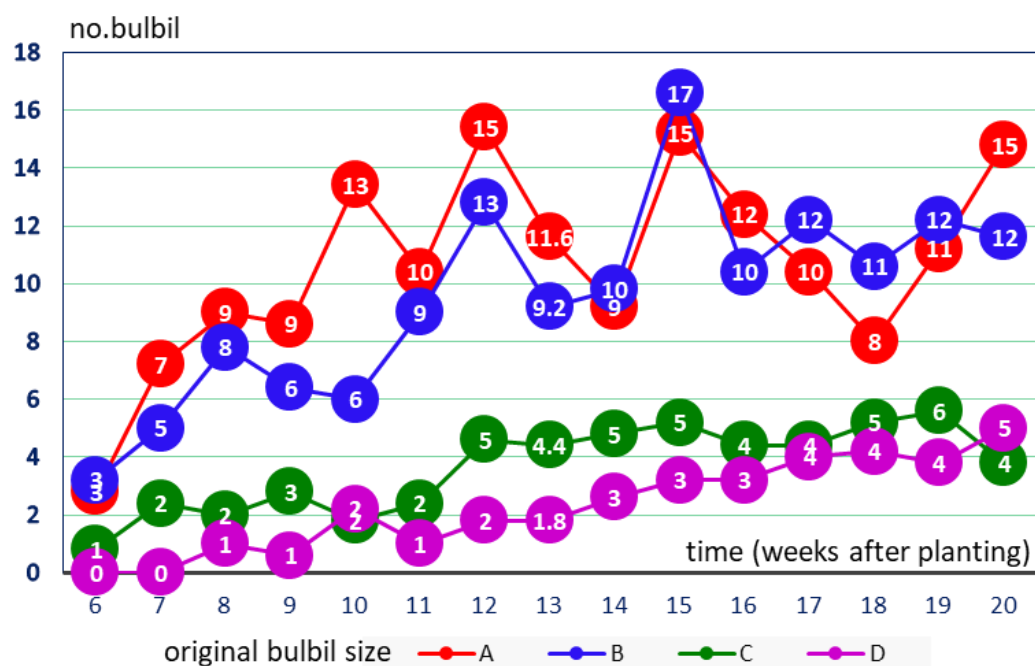
ออกจากต้นแม่ก็สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ทันที แต่หากไม่ถูกกระทบกระเทือน หรือถูกทำให้หลุดหรือแตกจากต้นแม่ ก็จะเจริญเติบโตต่อไป ทำให้เห็นเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ในสภาพธรรมชาติ



Figure 3 Bulbils formation of 4 sizes bulbs (original bulb or mother bulb) of fishtail oxalis at 3rd and 20th week after planting

การสร้างหัวย่อยของผักแว่นดอกชมพูเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นในทุกขนาดของหัวแม่ที่เริ่มต้น แต่จำนวนหัวที่สร้างตลอดระยะเวลาทดสอบ (20 สัปดาห์) ของหัวแม่ที่มีขนาดใหญ่จะมากกว่าหัวแม่ที่มีขนาดเล็กกว่า (Figure 4) เนื่องจากการทดลองนี้เป็นการนำพืชออกเพื่อตรวจนับจำนวนหัว การนับแต่ละครั้งจึงเป็นการนับจากต้นใหม่เสมอ จำนวนหัวย่อยที่ปรากฏจึงมีค่าน้อยกว่าสัปดาห์ก่อนได้ จำนวนหัวย่อยต่อต้นสูงสุดที่พบในการศึกษานี้ แตกต่างกันตามขนาดหัวที่ใช้ปลูกหรือหัวแม่ หัวขนาดใหญ่ทั้ง

สองขนาด (A และ B) มีจำนวนหัวย่อย 15 และ 17 หัว หัวขนาดกลาง (C) และขนาดเล็ก (D) เท่ากับ 6 และ 5 หัว ตามลำดับ (Figure 4) อนึ่งในการตรวจนับจำนวนหัวย่อยนี้พบว่าหัวย่อยที่เกิดขึ้นสามารถที่จะสร้างใบใหม่ (Figure 5) และหากหลุดหรือแตกหักออกจากต้นแม่ก็สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ทันที แต่หากไม่ถูกกระทบกระเทือน หรือถูกทำให้หลุดหรือแตกจากต้นแม่ ก็จะเจริญเติบโตต่อไป ทำให้เห็นเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ในสภาพธรรมชาติ



A > 9.0 mm. B = 6.1-9.0 mm. C = 5.0-6.0 mm. D < 5.0 mm.

Figure 4 Bulbils production from bulb of fishtail oxalis in pots during 20 weeks.



Figure 5 New leaf arise from bulbil while it still connected with the mother bulb.
(A and B in pot, C in field)

เนื่องจากธรรมชาติของผักแว่นดอกชมพู เป็นพืชอายุยาว หลายฤดู ถึงแม้ส่วนเหนือดินคือใบและดอกจะเหี่ยวแห้ง หลุดร่วงไป แต่ส่วนใต้ดินคือหัวและหัวย่อยจะสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในสภาพเรือนทดลอง ศึกษาถึงช่วงระยะเวลาประมาณ 20 สัปดาห์ ปรากฏว่า พืชหนึ่งต้นสามารถสร้างส่วนขยายพันธุ์ได้มากถึง 4 - 15 หัว ขึ้นกับขนาดหัวแม่ หากนำมาประเมินการผลิตหน่วยขยายพันธุ์ตามข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเกี่ยวกับผักแว่นดอกชมพู จะได้ปริมาณหัวที่ผลิตดังนี้ (Table 1)

จะเห็นว่า หากปล่อยให้ผักแว่นดอกชมพู เพียง 1 ต้น ขึ้นระบาดในปีแรก โดยไม่มีการควบคุมเลย (ประมาณ 2.5 รอบ) และหัวที่สร้างขึ้นเป็นหัวสมบูรณ์ (A) อาจมีการเพิ่มหัวพันธุ์ลงในดินได้สูงถึงประมาณ 13 เท่าของจำนวนเริ่มต้น หรือประมาณ 2,000 หัว ซึ่งจะทำให้มีการเพิ่มหัวพันธุ์อย่างรวดเร็วในปีถัดไป โดยในรอบที่ 6 หรือ 120 สัปดาห์ หรือ 2 ปี 4 เดือน จะมีหัวพันธุ์ลงในดินสูงถึง 7 ล้านหัว หรือ 1.8 ล้าน หรือ 5 พัน หรือ 600 หัว หากพืชสร้างหัวที่มีความสมบูรณ์ (A) และเปอร์เซ็นต์การลดลงเป็นขนาด B, C และ D ตามลำดับ (Table 1) ทั้งนี้ยังมีได้นับรวบต้นเดิมที่ยังสามารถเพิ่มได้อีกด้วย

Table 1 Predicted bulbil production of various size bulbs of *Fishtail oxalis*.

Cycle	Large bulb (A) Sprout 91.5%	Medium large (B) sprout 91%	medium © sprout 82%	small (D) sprout 68.5%
1 (20 weeks)	15	12	5	4
2 (40 weeks)	206	131	21	11
3 (60 weeks)	2,826	1,431	84	30
4 (80 weeks)	38,782	15,626	345	82
5 (100 weeks)	532,281	170,636	1,413	225
6 (120 weeks)	7,305,552	1,863,350	5,793	618

2. ผลของความร้อนระดับต่าง ๆ ต่อการงอกของหัวผักแว่นดอกชมพู

หัวของผักแว่นดอกชมพูที่ได้รับความร้อนระดับอุณหภูมิปกติ (ชุดควบคุม), 40, 45, 50, 55 และ 60°ซ. นาน 24 ชม. มีเปอร์เซ็นต์การงอกแตกต่างกัน โดยหัวที่ได้รับความร้อนที่สูงขึ้นมีการงอกน้อยลงและน้อยกว่าหัวในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ พบว่า หัวที่ได้รับความร้อนอุณหภูมิ 55 และ 60°ซ. ไม่สามารถงอกได้ (0%) หรือหัวถูกทำลายด้วยความร้อนสมบูรณ์ ส่วนหัวที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50°ซ. ทอยงอกเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลายาวขึ้น และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (35 วัน) มีการงอกรวมเท่ากับ 75.0, 47.5 และ 15.8% ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 Germination of fishtail oxalis after heat treated at various temperature for 24 hours.

Treated temperature	Germination (%) ^{1/}				
	7 DAP ^{2/}	14 DAP	21 DAP	28 DAP	35 DAP
40 °C	49.2 a	71.2 b	73.3 b	74.6 b	75.0 b
45 °C	22.1 b	44.6 c	46.7 c	46.7 c	47.5 c
50 °C	3.7 c	14.6 d	15.0 d	15.4 d	15.8 d
55 °C	0.0 c	0.0 e	0.0 e	0.0 e	0.0 e
60 °C	0.0 c	0.0 e	0.0 e	0.0 e	0.0 e
GHT 28 °C	52.1 a	89.2 a	91.3 a	91.7 a	91.7 a
C.V. %	27.6	20.1	21.0	19.7	19.3

^{1/}Means followed by a common letter are not significantly different at the 95% level by DMRT.

^{2/}DAP = days after planting.

GHT 28 °C = (Green house temperature 28 °C

ผักแว่นดอกชมพู มีดอกเป็นช่อเด่น ดอกทยอยบาน ด้วยรูปร่างใบที่แปลก ทำให้มีการปลูกเป็นไม้ประดับ มีการจำหน่ายในตลาดพรรณไม้ เป็นสาเหตุหนึ่งส่งเสริมให้มีการแพร่กระจายออกไปอย่างไร้ทิศทาง จากหนึ่งต้นอาจเพิ่มจำนวนหัวได้มากมายในเวลาเพียง 2 ปี ไม่พบศัตรูธรรมชาติที่สามารถทำลายหรือลดประชากรของผักแว่นดอกชมพูได้ ถึงแม้จะพบเชื้อราบางชนิด แต่ก็ไม่ได้ทำให้เกิดความเสียหายต่อหัวใต้ดิน พืชสามารถขยายพันธุ์ต่อไปได้ การป้องกันไม่ให้พืชชนิดนี้ระบาดเป็นวัชพืชคือไม่ปล่อยให้พืชเจริญเติบโตนอกพื้นที่ เช่น ปลูกในกระถาง หรือในแปลงสวนหย่อม เมื่อไม่ต้องการใช้งานแล้วควรนำหัวใต้ดินออกทำลาย โดยนำหัวตากแดดเป็นเวลาหลายวัน เพราะหัวผักแว่นดอกชมพูสามารถถูกทำลายได้ด้วยความร้อน โดยไม่สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้เมื่อผ่านความร้อน 55 - 60 °C. นาน 24 ชม. ส่วนที่อุณหภูมิต่ำกว่า (40 - 50 °C.) นั้นระยะเวลาเท่ากันก็สามารถลดจำนวนหัวที่งอกออกมาได้ เป็นการทำลายหัวด้วยความร้อน ซึ่งการใช้ความร้อนทำลายหน่วยขยายพันธุ์ของวัชพืชแต่ละชนิดต้องคำนึงถึงปริมาณ ระยะเวลา ของการได้รับความร้อน พืชแต่ละชนิดใช้ปริมาณความร้อนต่างกันขึ้นกับโครงสร้างและขนาดของหน่วยขยายพันธุ์นั้น ๆ

(Ruth et al., 2007; Hoyle and McElroy, 2012; Norsworthy et al., 2020)

การปลูกไม้ดอก ผัก รวมถึงการเตรียมแปลงเพื่อปลูกพืชอื่น ๆ ซึ่งต้องมีการเตรียมดิน การไถพรวนดินจะเป็นการช่วยให้หัวย่อยแตกออกจากต้นแม่ และแพร่กระจายไปทั่ว รวมถึงการกลับให้หัวที่อยู่ด้านบน กลับลงไปอยู่ลึกลงไป หัวที่อยู่ลึกลงไปหากน้อยกว่า 25 ซม. ก็ยังสามารถงอกได้ ขณะเดียวกันการไถพรวนเป็นการพลิกเอาหัวที่อยู่ใต้ดินขึ้นมาอยู่ด้านบน ทำให้หัวงอกได้มากขึ้น การควบคุมอาจต้องใช้การล่อให้วัชพืชงอกก่อนแล้วกำจัดด้วยสารเคมี การควบคุมควรทำตั้งแต่พืชเริ่มแทงยอดออกมา ก่อนที่จะสร้างหัวลงในดิน หรือหลังพืชงอกไม่เกิน 5 สัปดาห์ ส่วนในแปลงที่มีการระบาดแล้ว เช่น ในสวนไม้ผล อาจใช้วัสดุคลุมดิน จะช่วยลดการงอกของผักแว่นดอกชมพูได้บ้าง ขึ้นอยู่กับวัสดุที่ใช้ ซึ่งจากการศึกษาของวัชระและคณะ (2568) วัสดุที่ใช้คลุมและลดการงอกของผักแว่นดอกชมพูได้ดีที่สุดคือ พลาสติกดำ ซึ่งมีข้อดีคือนอกจากป้องกันไม่ให้ผักแว่นดอกชมพูงอกแล้ว ยังสามารถป้องกันไม่ให้วัชพืชอื่น ๆ งอกและเจริญเติบโตได้ด้วย เพราะพลาสติกดำจะทำให้พืชไม่ได้รับแสง ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ และยังเป็น การป้องกันการระเหยของน้ำในดินไปในตัวด้วย แต่การคลุมด้วยพลาสติกดำ เป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต

มากกว่าการใช้วัสดุอื่น ๆ เช่น ซากพืชที่มีในท้องถิ่น แกลบและเถาแกลบ ซึ่งเป็นวัสดุที่ช่วยชะลอการงอกของผักแว่นดอกชมพูได้ แต่เป็นการลดหรือชะลอการแข่งขันกับพืชปลูกได้ระยะหนึ่งเท่านั้น

สรุปผลการทดลอง

ผักแว่นดอกชมพูสามารถงอกและเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอุณหภูมิปกติของประเทศไทย แต่หากได้รับความร้อน 55 - 60°ซ. อย่างต่อเนื่องนาน 24 ชม. สามารถทำลายหัวไม่ให้งอกได้ หรือทำลายความมีชีวิตของหัวได้ ผักแว่นดอกชมพูหนึ่งต้นสามารถผลิตหัวใต้ดินในกระถางได้ 15 หัว ในเวลา 20 สัปดาห์ ดังนั้นหากพืชชนิดนี้เจริญเติบโตอิสระในธรรมชาติ พืชอาจสร้างหัวได้มากกว่านี้ เมื่อใช้ข้อมูลที่ได้ศึกษามาก่อน จะสามารถคำนวณได้ว่าในเวลา 1 ปี พืชจะสามารถสร้างหัวได้ประมาณ 2,000 หัว และในปีที่ 2 จะเพิ่มขึ้นเป็น 7,000,000 หัว ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ป้องกันและควบคุมวัชพืชชนิดนี้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

วัชร สักทอง อัญญา พรหมมา ธัญชนก ศรีเมือง และนิชากรณ์ ใจดี. 2567. รายงานความก้าวหน้า ชีววิทยาและการแพร่กระจายของ *Oxalis debilis* Kunth ในพื้นที่การเกษตรภาคเหนือของประเทศไทย. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2566. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 2055-2067.

วัชร สักทอง อัญญา พรหมมา และธัญชนก ศรีเมือง. 2568. ศึกษาวัชพืชมดดิน และความลึกของดินที่มีผลต่อการควบคุมวัชพืช *Oxalis debilis* Kunth. ใน: การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 16 วันที่ 18-20 กุมภาพันธ์ 2568. หน้า 245-246.

ศิริพร ชิงสนธิพร อัญญา สุริยะวงศ์ตระกูล ธัญชนก จงรักไทย และกาญจนา พฤษพันธ์. 2559. ศึกษาชนิดวัชพืชต่างถิ่นในพื้นที่เกษตรที่สูงภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ. ใน: ผลงานวิจัยประจำปี 2558. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 2531-2544.

สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช. 2562. พืชต่างถิ่นรุกรานในป่าอนุรักษ์. ห้างหุ้นส่วนจำกัด เอ็น.พี.จี. เอ็นเตอร์ไพรส์, กรุงเทพฯ. 128 หน้า.

อัญญา พรหมมา และธัญชนก จงรักไทย. 2562. ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของ *Oxalis debilis* Kunth วัชพืชแพร่ระบาดในพื้นที่เกษตรภาคเหนือ. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2561. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 26-42.

อัญญา พรหมมา ศิริพร ชิงสนธิพร ธัญชนก จงรักไทย และเอกรัตน์ ธนุทอง. 2562. ศักยภาพการเป็นวัชพืชของไม้ประดับต่างถิ่น. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2561. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 26-42.

Global Biodiversity Information Facility (GBIF). 2023. *Oxalis latifolia* Kunth in GBIF Secretariat (2023). GBIF Backbone Taxonomy. Available at: <https://doi.org/10.15468/39omei>. Accessed: September 11, 2025.

Holm, L., J. Doll, E. Holm, J.V. Pancho and J.P. Herberger. 1997. World Weeds: Natural Histories and Distribution. ed. John Wiley & Sons Inc. New York. 1129 p.

- Hoyle, J.A. and J.S. McElroy. 2012. Relationship between Temperature and Heat Duration on Large Crabgrass (*Digitaria sanguinalis*), Virginia Buttonweed (*Diodia virginiana*), and Cock's-Comb Kyllinga (*Kyllinga squamulata*) Seed Mortality. *Weed Technology*. 26(4): 800-806.
- Norsworthy, J.K., J.K. Green, T. Barber, T.L. Roberts and M.J. Walsh. 2020. Seed destruction of weeds in southern US crops using heat and narrow-windrow burning. *Weed Technology*. 34: 589-596.
- Pacific Island Ecosystems at Risk (PIER). 2006. *Oxalis latifolia* Kunth, Oxalidaceae. Available at: http://www.hear.org/pier/species/oxalis_latifolia.html. Accessed: September 9, 2025.
- Plantwise. 2016. Factsheets for farmers: *Oxalis latifolia*. CAB International. Edited by Plantwise. Available at: <https://plantwiseplusknowledgebank.org/doi/epdf/10.1079/pwkb.20167800558>. Accessed: September 9, 2025.
- POWO (Plant of the World Online) 2025. *Oxalis latifolia* Kunth. Available at: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:375051-1>. Accessed: September 9, 2025.
- Ruth, M.D., S.P. Timothy and J.S. James. 2007. Time and Temperature Requirements for Weed Seed Thermal Death. *Weed Science*. 55: 619-625.
- Weber, E. 2003. *Invasive Plant Species of the World: a Reference Guide to Environmental Weeds*. CAB International Publishing. Wallingford. 548 p.

ประเมินความต้านทานต่อสารกำจัดแมลงในตัวงหมัดผักแถบลาย, *Phyllotreta sinuata* Stephens

ที่ทำลายพืชผักตระกูลกะหล่ำ

Evaluation of Insecticide Resistance in Striped Flea Beetle, *Phyllotreta sinuata*

Stephens damaging Cruciferous Vegetables

ฐิตินิชา ไชยชนะ^{1/} กรกฏ รัตนมหาณีกร^{1/} จิราพัชร ทะสี^{1/} ศรีจันรวัจ ศรีจันทร^{1/}

Thitinicha Chaichana^{1/} Korakot Ratanamahamaneekorn^{1/} Jiraphat tasee^{1/} Srijumnun Srijuntra^{1/}

ABSTRACT

Insecticide resistance data for the striped flea beetle (*Phyllotreta sinuata* Stephens), a key pest of cruciferous vegetables, provide critical information for selecting suitable insecticides for rotation strategies aimed at reduce resistance problem. This experiment evaluated the effects of various insecticides on the mortality of flea beetles damaging cruciferous vegetables in farmers' fields in Kanchanaburi, Phetchabun, Nakhon Pathom, Chiang Mai, Chiang Rai, Nong Bua Lam Phu, and Khon Kaen Provinces. The experiments were conducted in the laboratory using young Chinese kale leaves dipped in various insecticides: profenofos (pro, group 1B), carbaryl (car, group 1A), fipronil (fip, group 2B), dinotefuran (din, group 4A), acetamiprid (ace, group 4A), and tolfeprad (tol, group 21A). Leaves were treated at the recommended dose and at 2-fold of their recommended dose and then fed to flea beetles collected from farmers's cruciferous vegetable fields. Mortality percentage was recorded after feeding for 48 hr. The results revealed that insecticides with low resistance, causing >60% mortality at their recommended dose were profenofos (pro) and fipronil (fip) for flea beetles from Ban Kao Subdistrict, Mueang Kanchanaburi District; pro, fip, dinotefuran (din), and acetamiprid (ace) from Wat Wang Khanai Subdistrict; fip from Thung Thong Subdistrict, Tha Muang District; fip, din, and pro from Ban Khok Subdistrict, Mueang Phetchabun District; fip, din, and pro from Wang Ban Subdistrict, Lom Kao District; fip, pro, din, and tolfeprad (tol) from Ban Kad and Pong Yaeng Subdistricts, Mae Wang and Mae Rim Districts, respectively; fip, pro, din, and ace from Mae Chedi Mai Subdistrict, Wiang Pa Pao District; fip, pro, and din from Pha Sam Yot Subdistrict, Na Wang District; and fip, pro, and din from Hin Tang Subdistrict, Ban Phai District. Moderate resistance was observed for pro in Nong Ngu Lueam Subdistrict, Mueang Nakhon Pathom District. Insecticides affecting low-moderate resistance could be used in rotation programs to retarding the development of resistance in flea beetles damaging cruciferous vegetables in each planting area.

Keywords: insecticide resistance, insect pest in cruciferous plants, insecticide rotation

^{1/} กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Plant Pest Management Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 19000, Thailand

* Corresponding author : c.thitinicha@gmail.com

บทคัดย่อ

การทราบข้อมูลความต้านทานต่อสารกำจัดแมลงในด้วงหมัดผักแถบลาย *Phyllotreta sinuata* Stephens ที่ทำลายพืชผักตระกูลกะหล่ำจะช่วยในการเลือกชนิดสารกำจัดแมลงที่เหมาะสมเพื่อใช้แบบหมุนเวียนเพื่อลดปัญหาความต้านทาน จึงทำการทดลองเพื่อทราบผลของสารกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ ต่อการตายของด้วงหมัดผักแถบลายที่ทำลายพืชผักตระกูลกะหล่ำในแปลงเกษตรกรจากแหล่งปลูกที่สำคัญ จังหวัดกาญจนบุรี เพชรบูรณ์ จังหวัดนครปฐม เชียงใหม่ เชียงราย นอนงบัวลำภู และขอนแก่น โดยนำด้วงหมัดผักมาประเมินความต้านทานในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ใบคะน้าชุบด้วยสารกำจัดแมลงกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ profenofos (pro กลุ่ม 1B), carbaryl (car กลุ่ม 1A), fipronil (fip กลุ่ม 2B), dinotefuran (din กลุ่ม 4A), acetamiprid (ace กลุ่ม 4A), และ toltenpyred (tol กลุ่ม 21A) แล้วให้ด้วงหมัดผักกัดกินที่ความเข้มข้นที่อัตราแนะนำและที่ความเข้มข้นที่อัตราสองเท่าของอัตราแนะนำของสารแต่ละชนิด ผลการทดลองพบว่า สารที่ด้วงหมัดผักมีความต้านทานต่ำ โดยพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตายมากกว่า 60% ที่ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำในพื้นที่ตำบลบ้านเก่า อำเภอเมืองกาญจนบุรี ได้แก่ pro, fip ตำบลวัดวังขนาย อำเภอท่าม่วง ได้แก่ pro, fip, din, ace ตำบลทุ่งทอง อำเภอท่าม่วง ได้แก่ fip ตำบลบ้านโคก อำเภอเมืองเพชรบูรณ์ ได้แก่ fip, din, pro ตำบลวังบาล อำเภอหล่มเก่า ได้แก่ fip, din, pro ตำบลบ้านกาด อำเภอแม่วาง ได้แก่ fip, pro, din, tol ตำบลโป่งแยง อำเภอแม่ริม ได้แก่ fip, pro, din, tol, ace ตำบลแม่เจดีย์ใหม่ อำเภอเวียงป่าเป้า ได้แก่ fip, pro, din, ace ตำบลผาสายยอด อำเภอนาวัง ได้แก่ fip, pro, din และ ตำบลหินตั้ง อำเภอบ้านไผ่ ได้แก่ fip, pro, din สำหรับพื้นที่ ตำบลหนองงูเหลือม อำเภอเมืองนครปฐม พบว่าด้วงหมัดผักมีความต้านทานปานกลาง ต่อสาร pro ดังนั้นจึงสามารถเลือกใช้ชนิดสารที่ ด้วงหมัดผักมีความต้านทานต่ำ - ปานกลางในแต่ละพื้นที่ มาใช้หมุนเวียน

ในพื้นที่นั้น ๆ เพื่อลดปัญหาความต้านทานในด้วงหมัดผักที่เข้าทำลายพืชตระกูลกะหล่ำ

คำสำคัญ: ความต้านทานสารกำจัดแมลง แมลงศัตรูพืชผักตระกูลกะหล่ำ การหมุนเวียนสารกำจัดแมลง

คำนำ

ด้วงหมัดผัก (flea beetle) เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญ โดยเฉพาะพืชตระกูลกะหล่ำ ในประเทศไทยมี 2 ชนิด คือ ชนิดแถบลาย *Phyllotreta sinuata* Stephens และชนิดสีน้ำเงินเข้ม *Phyllotreta chontanica* Duvivier แต่มากกว่า 80% เป็นชนิดแถบลาย (สิริวัฒน์, 2526) ก่อให้เกิดความเสียหายในแหล่งปลูกพืชผักตระกูลกะหล่ำเพื่อเป็นการค้าตัวอ่อนกัดกินหรือซ่อนไข่เข้าไปกินอยู่บริเวณโคนต้นหรือรากของผัก ทำให้พืชผักเหี่ยวเฉาและไม่เจริญเติบโต ตัวเต็มวัยชอบกัดกินผิวด้านล่างของใบทำให้เป็นรูพรุน ทำให้ไม่ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพตามที่ตลาดต้องการ และเนื่องจากพืชผักเป็นกลุ่มพืชที่มีอายุสั้นเกษตรกรจึงใช้สารเคมีกำจัดแมลงในกาป้องกันกำจัดอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ได้ผลในการป้องกันกำจัดที่รวดเร็ว ส่งผลให้เกิดปัญหาพิษตกค้างในผลผลิต ศรีจันทร์และพฤษชาติ (2566) แนะนำสารกำจัดแมลงและชีวภัณฑ์ที่ใช้ในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักแถบลาย ได้แก่ fipronil dinotefuran toltenpyrad profenofos prothiofos acetamiprid carbaryl และไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* การใช้สารกำจัดแมลงอย่างต่อเนื่องและบ่อยครั้งส่งผลให้เกิดการพัฒนาความต้านทานต่อสารกำจัดแมลงในแมลงศัตรูพืชจำนวนมาก รวมถึงด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta* spp.) ซึ่งเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบโดยตรงต่อประสิทธิภาพในการควบคุมศัตรูพืชและความมั่นคงด้านอาหาร (Sparks and Nauen, 2015; Bass et al., 2014) ในประเทศไทย จอมสุรางค์และคณะ (2550) รายงานว่าด้วงหมัดผักในแหล่งปลูกพืชตระกูลกะหล่ำจังหวัดพิษณุโลก เพชรบูรณ์ นครสวรรค์ อุตรดิตถ์ ตาก เชียงใหม่ และนนทบุรี พบว่าต้านทาน

ต่อสาร carbaryl มากที่สุด และสารที่แมลงต้านทานน้อยที่สุดคือ fipronil

เป็นที่ทราบกันดีว่าการแก้ปัญหาเพลี้ยไฟต้านทานต่อสารฆ่าแมลงที่ได้ผลจะต้องมีการใช้สารแบบหมุนเวียน (Immaraju et al., 1990; Gao et al., 2012) ในการวางแผนการใช้สารแบบหมุนเวียนนั้นจำเป็นต้องทราบความต้านทานของสารกำจัดแมลงหรือผลของสารฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ ต่อการตายของด้วงหมัดผักที่ทำลายพืชผักตระกูลกะหล่ำในแปลงเกษตรกรในแหล่งปลูกต่าง ๆ เพื่อสามารถเลือกชนิดสารกำจัดแมลงหรือกลุ่มสารที่มีผลต่อการตายมากที่สุด หรืออาจกล่าวได้ว่าไม่มีปัญหาความต้านทานหรือมีปัญหาเล็กน้อยเพื่อนำมาใช้ในการหมุนเวียน การใช้สารกำจัดแมลงแบบหมุนเวียนที่มีประสิทธิภาพในการลดหรือชะลอปัญหาความต้านทานจำเป็นต้องมีการใช้สารกำจัดแมลงหลายชนิดกลุ่มสารที่มีประสิทธิภาพเพื่อใช้หมุนเวียนกันในแต่ละช่วง (Denholm et al., 1977) อย่างไรก็ตามในขณะนี้ประเทศไทยขาดข้อมูลผลหรือประสิทธิภาพของสารกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ ต่อการตายของด้วงหมัดผักที่ทำลายพืชผักตระกูลกะหล่ำในหลาย ๆ พื้นที่ที่เป็นปัจจุบัน ทำให้ไม่สามารถเลือกชนิดสารกำจัดแมลงหรือกลุ่มสารที่เหมาะสมเพื่อสร้างแผนการใช้สารแบบหมุนเวียนเพื่อลดปัญหาความต้านทานในด้วงหมัดผักที่ทำลายพืชผักตระกูลกะหล่ำในพื้นที่ต่าง ๆ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบความต้านทานและการตายของด้วงหมัดผักที่ลงทำลายพืชผักตระกูลกะหล่ำในแปลงเกษตรกรในพื้นที่ปลูกทางภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เพื่อนำข้อมูลมาแนะนำเกษตรกรผู้ปลูกพืชผักตระกูลกะหล่ำเกษตรกรในการสร้างแผนการใช้สารกำจัดแมลงแบบหมุนเวียน ซึ่งสามารถลดหรือชะลอปัญหาความต้านทานในด้วงหมัดผักได้

วิธีดำเนินการ

การเตรียมแมลงทดลอง

ทำการทดลองโดยสุ่มเก็บด้วงหมัดผักแบบสุ่มกระจายทั่วแปลงของเกษตรกรที่มีการปลูกพืชตระกูลกะหล่ำโดยเก็บตัวอย่างด้วงหมัดผักจากพื้นที่เพาะปลูกพืชตระกูลกะหล่ำของเกษตรกรในพื้นที่ตำบลบ้านเก่า อำเภอมืองกาญจนบุรี ตำบลวัดวังขนาย ตำบลทุ่งทอง อำเภอนาทม จังหวัดกาญจนบุรี ตำบลบ้านโคก อำเภอมืองเพชรบูรณ์ ตำบลวังบาล อำเภอลำทะเมนชัย จังหวัดเพชรบูรณ์ ตำบลหนองสูงเหลื่อม อำเภอมืองนครปฐม จังหวัดนครปฐม ตำบลบ้านกาด อำเภอแม่วาง ตำบลโป่งแยง อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ ตำบลแม่เจดีย์ใหม่ อำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย ตำบลผาสามยอด อำเภอนาวัง จังหวัดหนองบัวลำภู และ ตำบลหินตั้ง อำเภอบ้านไผ่ จังหวัดขอนแก่น ในปี พ.ศ. 2568 (Figure 1) ก่อนทดลองทำการตรวจสอบชนิดด้วงหมัดผัก แล้วทำการแยกเอาด้วงหมัดผักชนิดเดียวกันที่มีความแข็งแรงโดยสังเกตจากการตอบสนองที่ว่องไวมาเพื่อใช้ในการทดลอง

การเตรียมสารกำจัดแมลงเพื่อใช้ในการทดลอง

เนื่องจากไม่มีข้อมูลค่าความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการแยกด้วงหมัดผักสายพันธุ์ต้านทานและสายพันธุ์อ่อนแอ (discriminating dose หรือ diagnostic dose) ในด้วงหมัดผักที่ทำลายพืชตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ค่าความเข้มข้นที่อัตราแนะนำ และที่อัตราสองเท่าของอัตราแนะนำของสารกำจัดแมลงแต่ละชนิด ในการศึกษาผลของสารกำจัดแมลงแต่ละชนิดต่อการตายของด้วงหมัดผักเพื่อประเมินความต้านทาน จึงทำการเตรียมสารกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ ที่อัตราแนะนำ และที่อัตราสองเท่าของอัตราแนะนำ โดยใช้ น้ำที่ผสมน้ำยาจับใบ (Triton X - 100) อัตรา 0.05 มล./ล. ดังนี้

1. สาร fipronil 5% SC (กลุ่ม 2B)
ที่อัตรา 50 และ 100 มล./น้ำ 20 ล.
2. สาร dinotefuran 10% WP (กลุ่ม 4A)
ที่อัตรา 40 และ 80 ก./น้ำ 20 ล.
3. สาร tolfepryd 16% EC (กลุ่ม 21A)
ที่อัตรา 30 และ 60 มล./น้ำ 20 ล.
4. สาร profenofos 50% EC (กลุ่ม 1B)
ที่อัตรา 50 และ 100 มล./น้ำ 20 ล.
5. สาร acetamiprid 20% SP (กลุ่ม 4A)
ที่อัตรา 30 และ 60 ก./น้ำ 20 ล.
6. สาร carbaryl 85% WP (กลุ่ม 1A)
ที่อัตรา 60 และ 120 ก./น้ำ 20 ล.
7. สารจับใบ (Triton X - 100) (control)
ที่อัตรา 0.05 มล./ล.

การทดสอบผลของสารกำจัดแมลงต่อการตายของ ด้วงหมัดผักในพืชตระกูลกะหล่ำเพื่อประเมินความ ต้านทาน

ทำการทดลองโดยใช้วิธีการจุ่มใบพืช (leaf dipping method) ดัดแปลงจากวิธีของ Tabashnik et al. (1987) ทำการเตรียมใบคะน้าที่ไม่มีการพ่นสารกำจัดแมลง ล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง แล้วนำใบคะน้ามาตัดเป็นรูปวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5 ซม. ทำการจุ่มใบคะน้าที่ถูกตัดเป็นชิ้น ๆ ลงไปในสารกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ ที่อัตราแนะนำและที่อัตราความเข้มข้นสองเท่าของอัตราการแนะนำ นาน 10 วินาที ส่วนชุดควบคุม (control) จุ่มใบคะน้าในน้ำที่ผสมสารจับใบ นำใบคะน้าที่ชุบสารกำจัดแมลงและผึ่งลมให้แห้งแล้ว ใส่ในกระปุกพลาสติกที่มีฝาปิดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. สูง 6 ซม. กระปุกละ 1 ชิ้น จากนั้นใส่ด้วงหมัดผักในแต่ละกระปุก ๆ ละ 10 ตัว ปิดฝากระปุกให้สนิทปล่อยด้วงหมัดผักกัดกินใบคะน้าชุบสารในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 48 ชม. แล้วทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์การตายของด้วงหมัดผักโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ด้วงหมัดผักที่ไม่ตอบสนองต่อการเชื้อของปลายพู่กันจะถูกพิจารณาว่าตาย

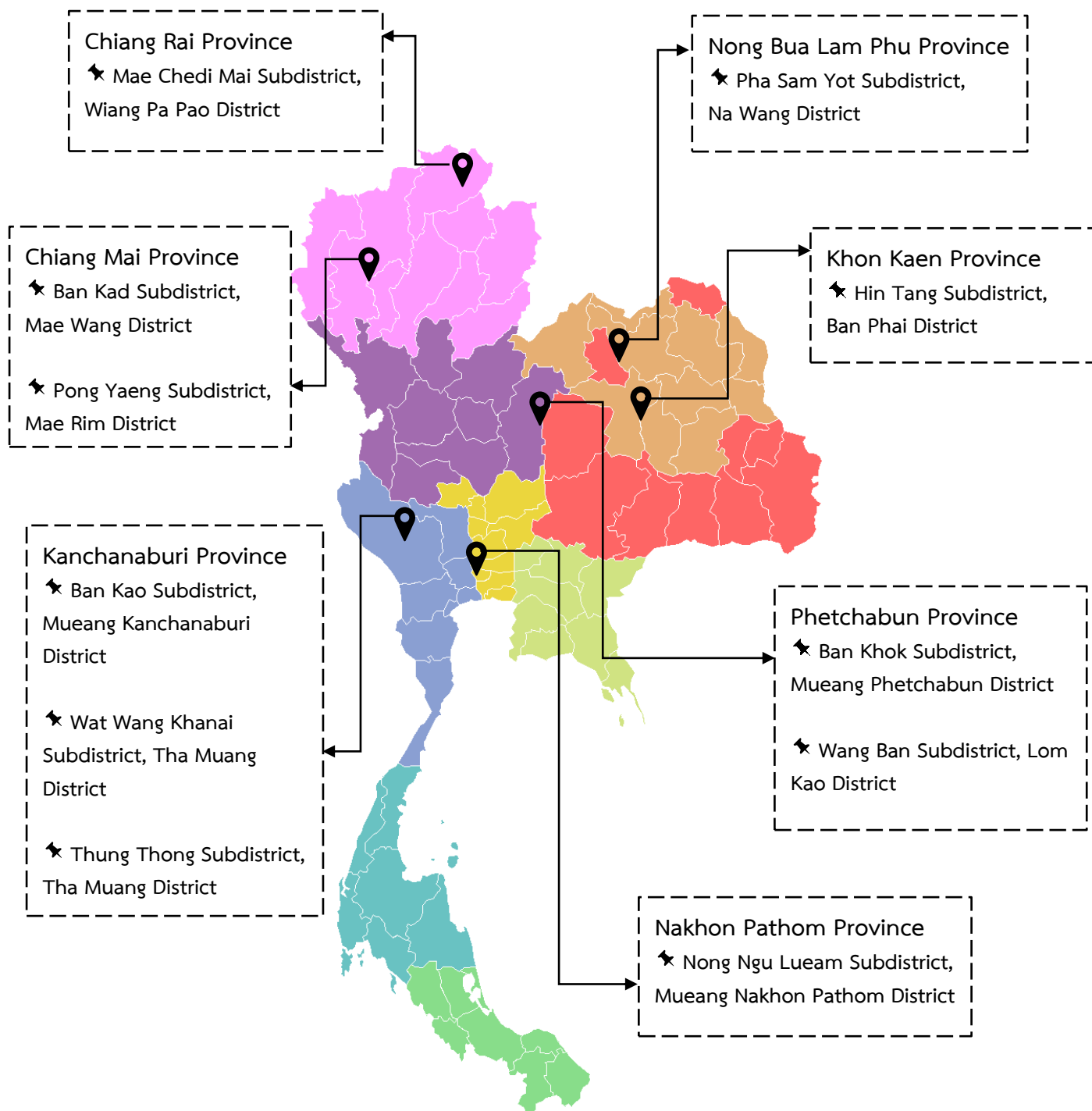


Figure 1 Cruciferous plantation collected striped flea beetle, *Phyllotreta sinuata* Stephens in Thailand in year 2025.

การบันทึกผลและวิเคราะห์

บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายของด้วงหมัดผัก และเมื่อพบว่าแมลงในชุดควบคุม (control) ตายต่ำกว่า 5% ไม่ทำการปรับค่า หากตาย 5 - 20% ทำการปรับค่าเปอร์เซ็นต์การตายโดยใช้ Abbott's formula (Abbott, 1925) แต่หากตายมากกว่า 20% ทำการทดลองใหม่

สูตร Abbott's formula :

$$\% \text{ Corrected Mortality} = \% \text{ test mortality} - \frac{\% \text{ control mortality} \times 100}{100 - \% \text{ control mortality}}$$

นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การตายของด้วงหมัดผักในแต่ละพื้นที่มาหาค่าเฉลี่ย และค่า standard deviation (SD)

การทดลองนี้ประเมินความต้านทานของด้วงหมัดผักในพืชตระกูลกะหล่ำโดยแบ่งเป็น 3 ระดับ ดังนี้

- เปอร์เซ็นต์การตายช่วง 60 - 100% จัดเป็นสารที่มีผลต่อการตายค่อนข้างสูง - สูงมาก หรือมีความต้านทานต่ำ (low resistance)

- เปอร์เซ็นต์การตายคาบเกี่ยวกันในช่วง 0 - 40%, 40 - 60% หรือ 60 - 100% จัดเป็นสารที่มีผลต่อการตายปานกลาง - ค่อนข้างต่ำหรือมีความต้านทานปานกลาง (moderate resistance)

- เปอร์เซ็นต์การตายช่วง 0 - 40% จัดเป็นสารที่มีผลต่อการตายต่ำ - ต่ำมาก หรือมีความต้านทานสูง (high resistance)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ปัญหาความต้านทานสารกำจัดแมลงของด้วงหมัดผักที่ทำลายพืชตระกูลกะหล่ำทำให้เกษตรกรต้องใช้สารกำจัดแมลงในอัตราที่สูงขึ้น และบ่อยครั้ง ส่งผลให้ต้นทุนเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งส่งผลเสียต่อสุขภาพของเกษตรกรและสิ่งแวดล้อม ปัญหาความต้านทานสารกำจัดแมลงสามารถแก้ไขได้ด้วยการนำสารที่แมลงไม่มีความต้านทานสูงมาใช้แบบหมุนเวียน การทราบข้อมูลความต้านทานต่อสารกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ จากการประเมินความต้านทานในปี พ.ศ. 2568 ทำให้ทราบว่าด้วงหมัดผักที่ทำลายพืชตระกูลกะหล่ำในแต่ละพื้นที่มีความต้านทานต่อสารกำจัดแมลงแต่ละชนิดแตกต่างกัน

ในพื้นที่ ตำบลบ้านเก่า อำเภอเมืองกาญจนบุรี จังหวัดกาญจนบุรี พบว่า สารที่ด้วงหมัดผักมีเปอร์เซ็นต์การตายปานกลาง - ต่ำ หรือ ความต้านทานปานกลาง ได้แก่ สาร fipronil (57.50 - 95.42%) สาร profenofos (58.72 - 68.24%) สาร dinotefuran (45.55 - 52.50%) และสาร tolfeprad (44.36 - 54.17%) สำหรับสารที่ ด้วงหมัดผักมีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำมาก หรือ ความต้านทานสูงมาก ได้แก่ สาร acetamiprid (5.24 - 8.02%) และสาร carbaryl (0 - 16.61%) (Figure 2)

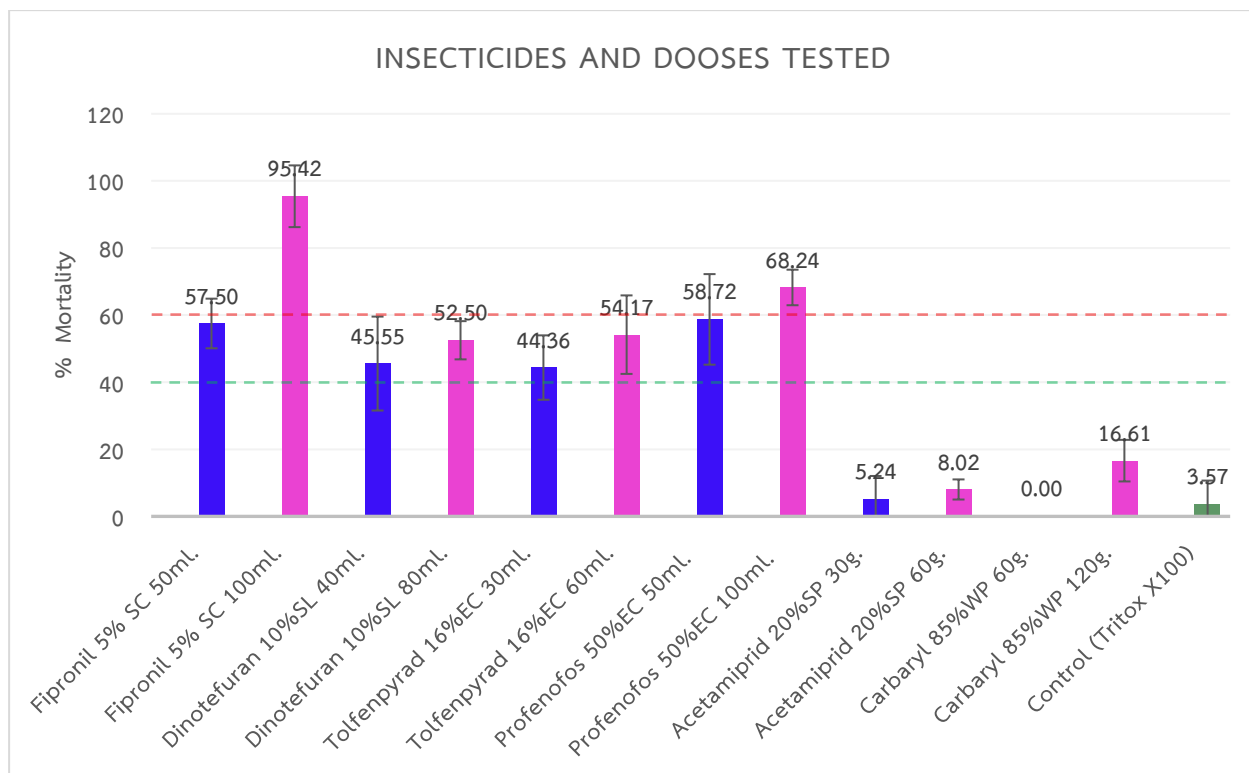


Figure 2 Mortality percentage of *Phyllotreta sinuata* in Brassica crops in Ban Kao Subdistrict, Mueang Kanchanaburi District, Kanchanaburi Province, after feeding with Chinese kale leaves dipped with insecticides in year 2025.

ในพื้นที่ ตำบลวัดวังขนาย อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี พบว่าสารที่ด้วงหมัดผักมีเปอร์เซ็นต์การตายสูง - สูงมาก หรือ ความต้านทานต่ำ - ต่ำมาก ได้แก่ สาร fipronil (100%) สาร profenofos (96.67 - 100%) สาร dinotefuran (89.15 - 89.64%) และ สาร acetamiprid (72.65 - 83.36%) สารที่ด้วงหมัดผักมีเปอร์เซ็นต์การตายปานกลาง หรือ ความต้านทานปานกลาง ได้แก่ สาร tolfenpyrad (43.64 - 46.15%) และสาร carbaryl (56.07 - 68.47%) (Figure 3)

ในพื้นที่ ตำบลทุ่งทอง อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี พบว่าสารที่ด้วงหมัดผักมีเปอร์เซ็นต์การตายสูง หรือ ความต้านทานต่ำ ได้แก่ สาร fipronil (69.17 - 81.51%) สารที่มีเปอร์เซ็นต์การตายปานกลาง หรือ ความต้านทานปานกลาง ได้แก่ สาร profenofos (49.33 - 60.36%) สำหรับสารที่ ด้วงหมัดผักมีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำ - ต่ำมาก หรือความต้านทานสูง - สูงมาก ได้แก่ สาร dinotefuran (27.38 - 42.09%) สาร tolfenpyrad (15.34 - 21.46%) สาร acetamiprid (0 - 6.67%) และ สาร carbaryl (1.39 - 11.90%) (Figure 4)



Figure 3 Mortality percentage of *Phyllotreta sinuata* in Brassica crops in Wat Wang Khanai Subdistrict, Tha Muang District, Kanchanaburi Province, after feeding with Chinese kale leaves dipped with insecticides in year 2025.

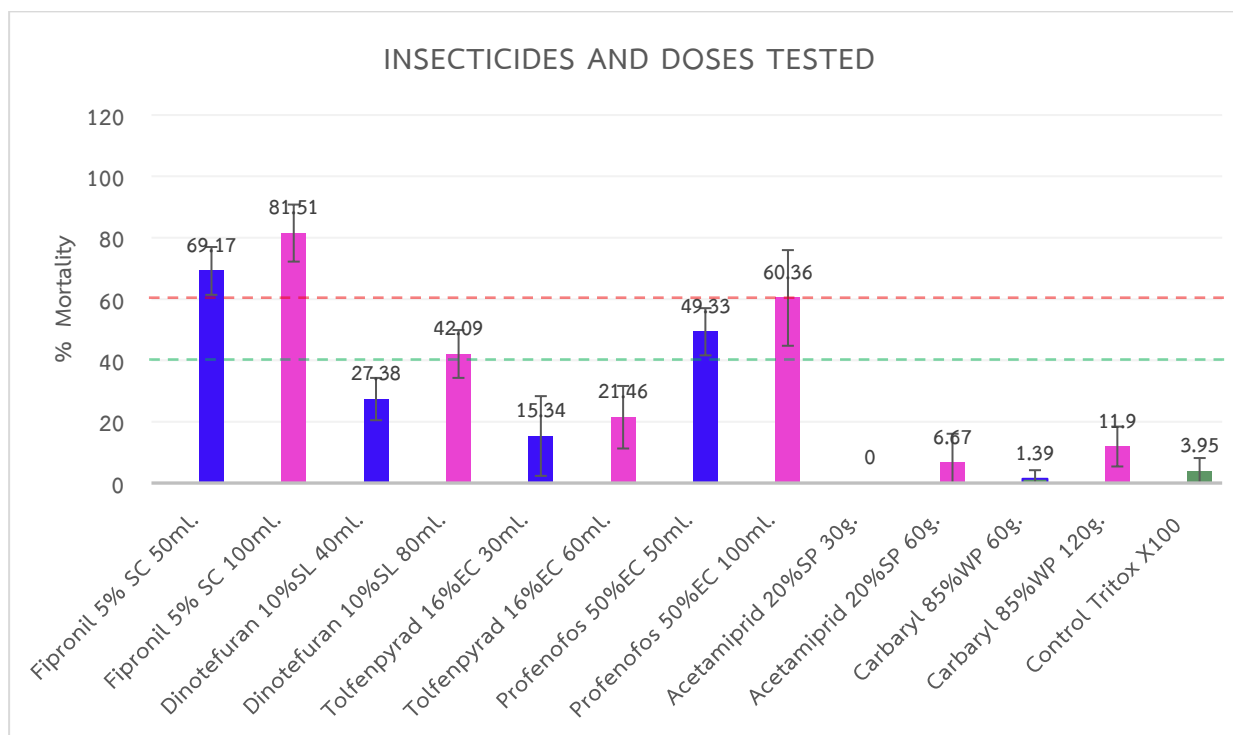


Figure 4 Mortality percentage of *Phyllotreta sinuata* in Brassica crops in Thung Thong Subdistrict, Tha Muang District, Kanchanaburi Province, after feeding with Chinese kale leaves dipped with insecticides in year 2025.

ในพื้นที่ ตำบลบ้านโคก อำเภอเมืองเพชรบูรณ์ จังหวัด เพชรบูรณ์ พบว่าสารที่ด้วงหมัดผักมีเปอร์เซ็นต์การตายสูง - สูงมาก หรือ มีความต้านทานต่ำ ได้แก่ สาร fipronil (97.73 - 100%) สาร dinotefuran (85.68 - 86.22%) และ สาร profenofos (97.73 - 97.50%) ส่วนสารที่มีเปอร์เซ็นต์การตายปานกลาง หรือ มีความต้านทานปานกลาง ได้แก่ สาร tolfeprad (57.69 - 75.68%) และ สาร acetamiprid (61.59- 65.91%) สารที่อัตราการตายต่ำ หรือ มีความต้านทานสูง ได้แก่ สาร carbaryl (19.32 - 30.69%) (Figure 5)

ในพื้นที่ ตำบลวังบาล อำเภอหล่มเก่า จังหวัด เพชรบูรณ์ พบว่าสารที่ด้วงหมัดผักมีเปอร์เซ็นต์การตายสูง - สูงมาก หรือ มีความต้านทานต่ำ ได้แก่ สาร fipronil (91.89 - 95.80%) สาร profenofos (96.41 - 97.92%) และ สาร dinotefuran (63.38 - 67.35%) ส่วนสารที่มีเปอร์เซ็นต์การตายปานกลาง หรือมีความต้านทานปานกลาง ได้แก่ สาร tolfeprad (43.08 - 43.49%) และ สารที่มีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำ หรือมีความต้านทานสูง ได้แก่ สาร acetamiprid (21.49 - 32.08%) และ สาร carbaryl (1.67 - 21.66%) (Figure 6)

ในพื้นที่ ตำบลหนองงูเห่า อำเภอเมือง นครปฐม จังหวัดนครปฐม พบว่าสารที่ด้วงหมัดผักมีเปอร์เซ็นต์การตายปานกลาง - ค่อนข้างต่ำ หรือมีความต้านทานปานกลาง ได้แก่ สาร profenofos (42.69 - 56.44%) สาร fipronil (30.34 - 56.40%) สำหรับสารที่ด้วงหมัดผักมีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำ - ต่ำมาก หรือ มีความต้านทานสูง ได้แก่ สาร dinotefuran (15.85 - 38.33%) และ สาร tolfeprad (24.20 - 36.24%) สาร acetamiprid (5.83 - 7.27%) และ สาร carbaryl (0 - 2.27%) (Figure 7)

ในพื้นที่ ตำบลบ้านกาด อำเภอแม่วาง จังหวัด เชียงใหม่ พบว่าสารที่ด้วงหมัดผักมีเปอร์เซ็นต์การตายสูง - สูงมาก หรือมีความต้านทานต่ำ ได้แก่ สาร fipronil (100%) สาร profenofos (100%) สาร dinotefuran (74.14 - 77.44%) และ สาร tolfeprad (74.04 - 88.14%) สำหรับสารที่มีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำถึงปานกลาง หรือมีความต้านทานปานกลาง ได้แก่ สาร acetamiprid (28.98 - 85.68%) และ สาร carbaryl (48.90 - 79.30%) (Figure 8)

ในพื้นที่ ตำบลโป่งแยง อำเภอแม่ริม จังหวัด เชียงใหม่ พบว่าสารที่ด้วงหมัดผักมีเปอร์เซ็นต์การตายสูง - สูงมาก หรือมีความต้านทานต่ำ ได้แก่ สาร fipronil (100%) สาร profenofos (100%) สาร dinotefuran (91.03 - 95.42%) สาร tolfeprad (97.50 - 100%) และ สาร acetamiprid (92.95 - 97.50%) สำหรับสารที่มีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำ หรือมีความต้านทานสูง ได้แก่ สาร carbaryl (22.50 - 51.82%) (Figure 9)

ในพื้นที่ ตำบลแม่เจดีย์ใหม่ อำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย พบว่าสารที่ด้วงหมัดผักมีเปอร์เซ็นต์การตายสูง - สูงมากหรือมีความต้านทานต่ำมาก ได้แก่ สาร tolfeprad (100%) สาร fipronil (97.92 - 100%) dinotefuran (95.42 - 100%) สาร profenofos (91.75 - 97.73%) และ สาร acetamiprid (87.08 - 95.45%) สารที่มีเปอร์เซ็นต์การตายปานกลาง หรือมีความต้านทานปานกลาง ได้แก่ สาร carbaryl (62.27 - 85.00%) (Figure 10)

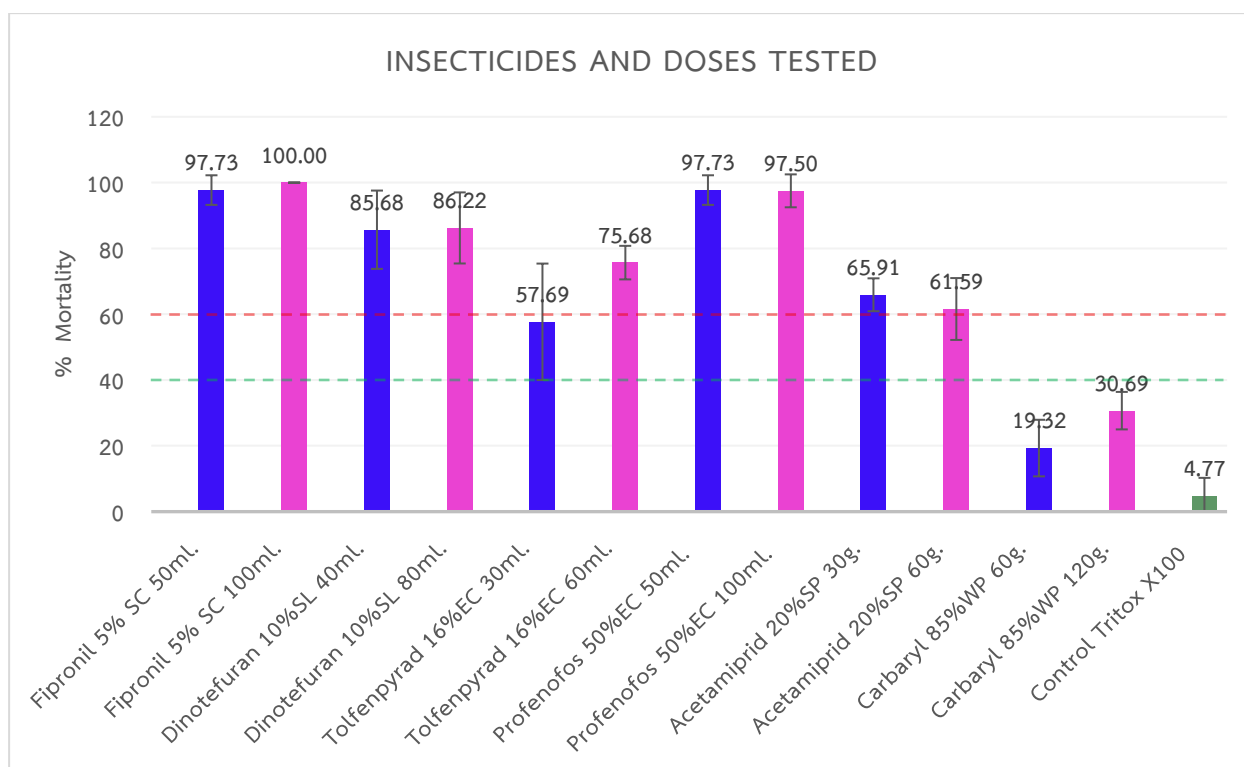


Figure 5 Mortality percentage of *Phyllotreta sinuata* in Brassica crops in Ban Khok Subdistrict, Mueang Phetchabun District, Phetchabun Province, after feeding with Chinese kale leaves dipped with insecticides in year 2025.

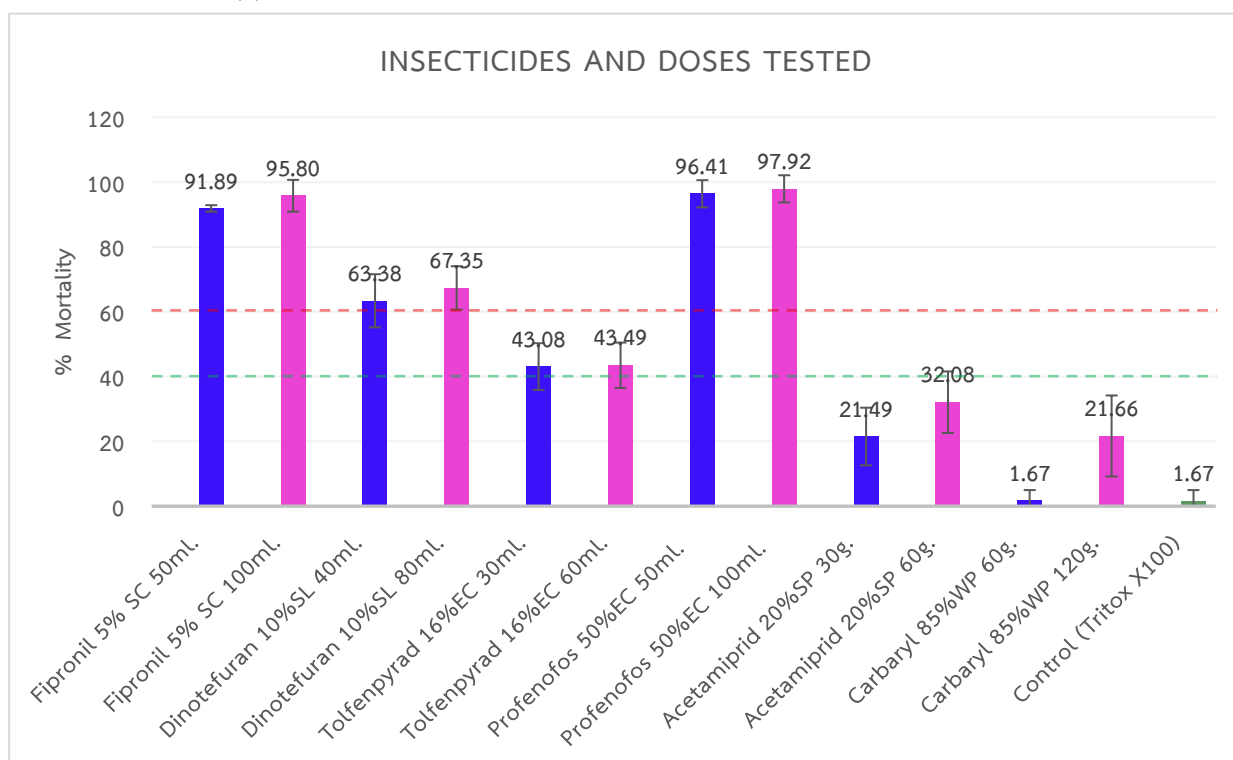


Figure 6 Mortality percentage of *Phyllotreta sinuata* in Brassica crops in Wang Ban Subdistrict, Lom Kao District, Phetchabun Province, after feeding with Chinese kale leaves dipped with insecticides in year 2025.

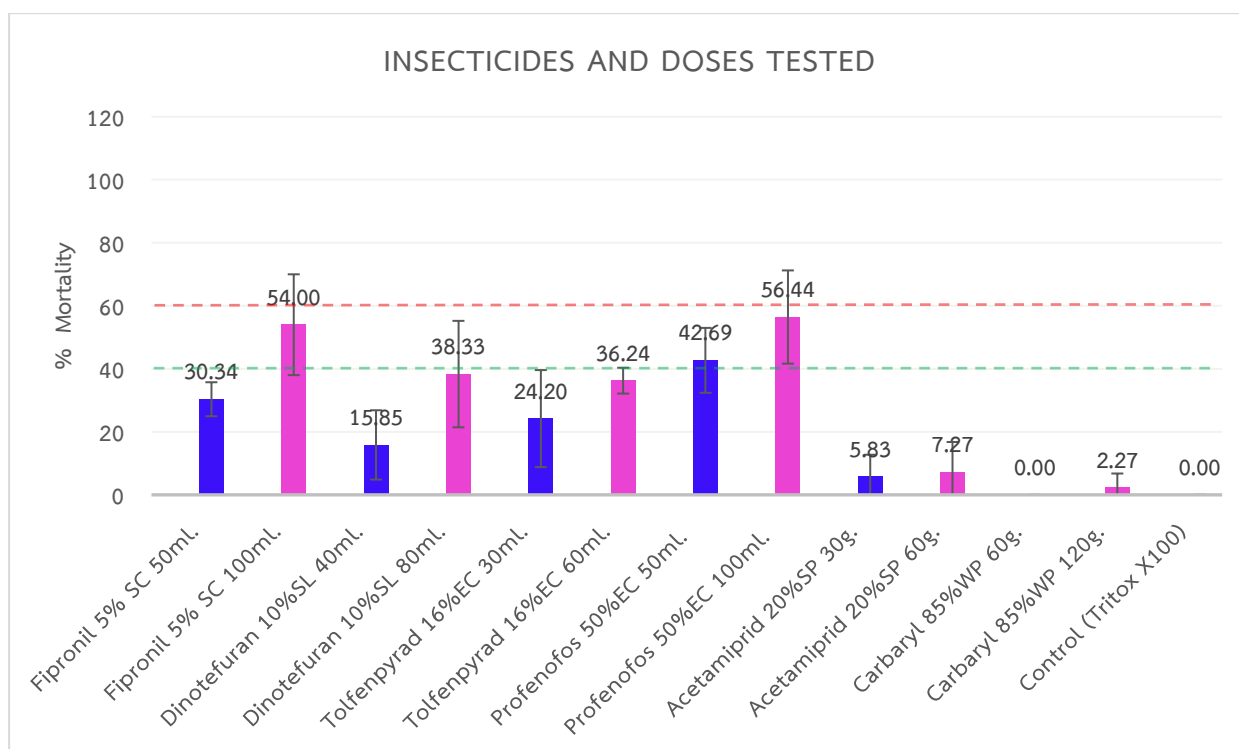


Figure 7 Mortality percentage of *Phyllotreta sinuata* in Brassica crops in Nong Ngu Lueam Subdistrict, Mueang Nakhon Pathom District, Nakhon Pathom Province, after feeding with Chinese kale leaves dipped with insecticides in year 2025.

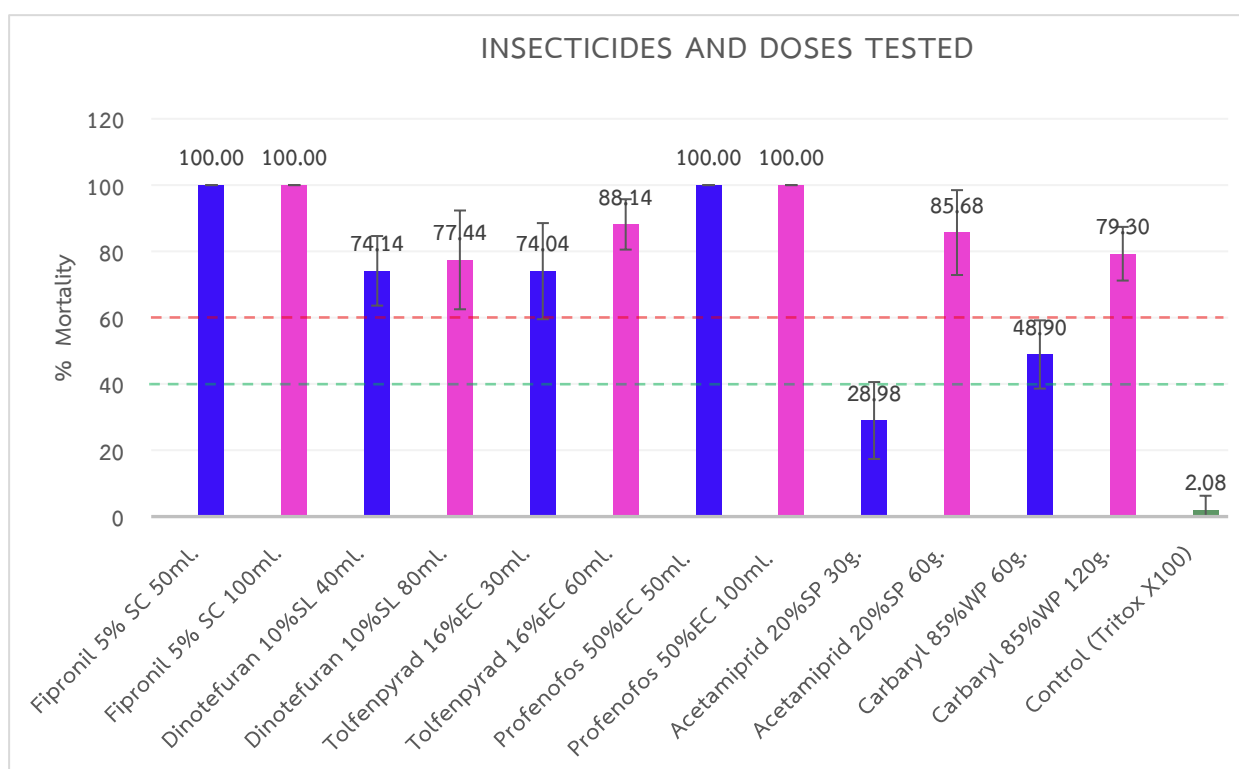


Figure 8 Mortality percentage of *Phyllotreta sinuata* in Brassica crops in Ban Kad Subdistrict, Mae Wang District, Chiang Mai Province, after feeding with Chinese kale leaves dipped with insecticides in year 2025.

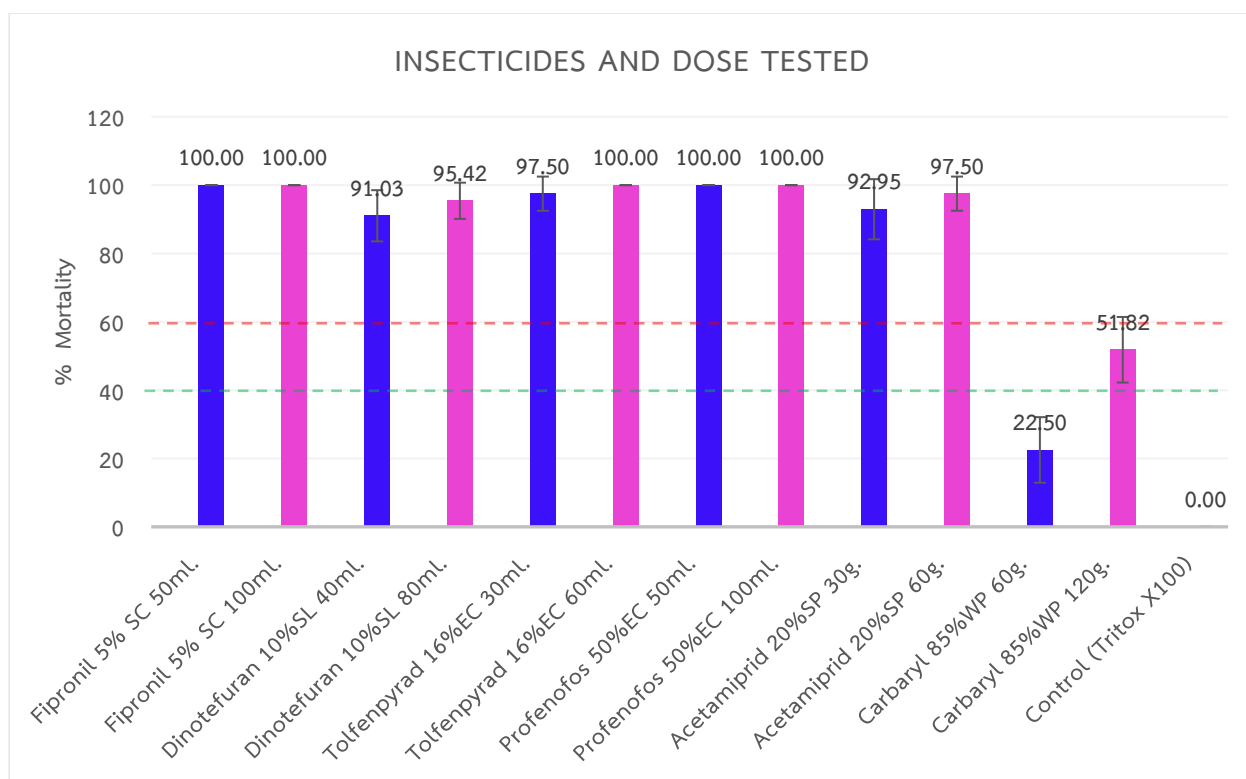


Figure 9 Mortality percentage of *Phyllotreta sinuata* in Brassica crops in Pong Yaeng Subdistrict, Mae Rim District, Chiang Mai Province, after feeding with Chinese kale leaves dipped with insecticides in year 2025.

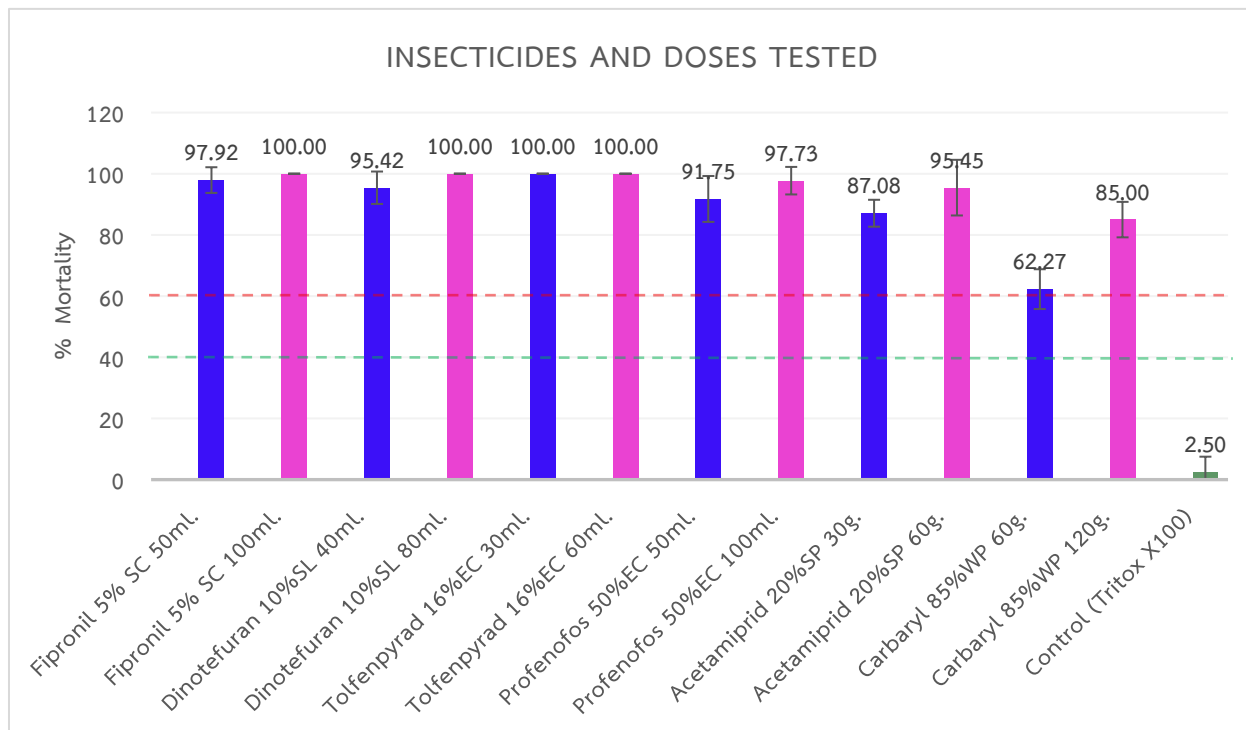


Figure 10 Mortality percentage of *Phyllotreta sinuata* in Brassica crops in Mae Chedi Mai Subdistrict, Wiang Pa Pao District, Chiang Rai Province, after feeding with Chinese kale leaves dipped with insecticides in year 2025.

ในพื้นที่ ตำบลผาสายยอด อำเภอนาวัง จังหวัด
หนองบัวลำภู พบว่าสารที่ด้วงหมัดผักมีเปอร์เซ็นต์
การตายสูง หรือมีความต้านทานต่ำ ได้แก่
สาร fipronil (80.00 - 95.00%) สาร dinotefuran
(65.91 - 80.68%) และสาร profenofos (80.55 -
95.23%) สารที่มีเปอร์เซ็นต์การตายปานกลาง หรือ

มีความต้านทานปานกลาง ได้แก่ สาร tolfeprad
(59.85 - 61.12%) และสาร acetamiprid (61.14 -
70.00%) สำหรับสารที่มีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำ หรือ
มีความต้านทานสูง ได้แก่ สาร carbaryl (17.05 -
25.83%) (Figure 11)

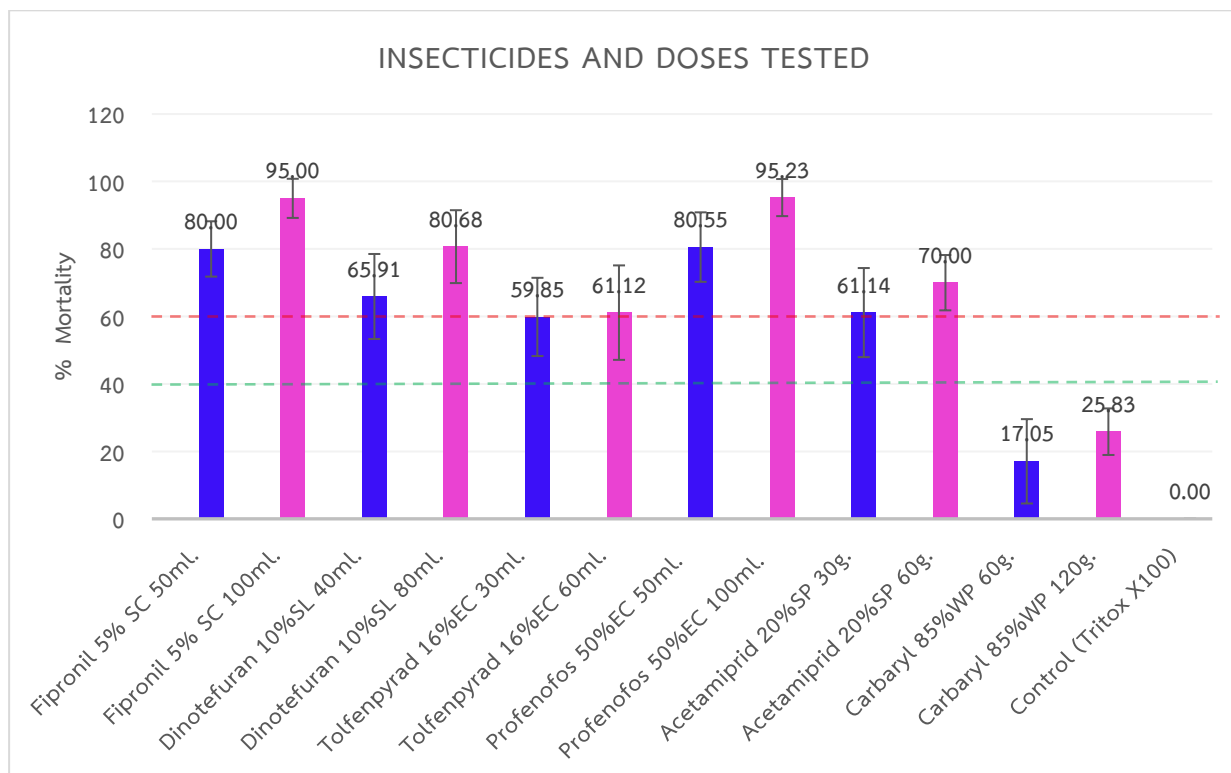


Figure 11 Mortality percentage of *Phyllotreta sinuata* in Brassica crops in Pha Sam Yot Subdistrict, Na Wang District, Nong Bua Lam Phu Province, after feeding with Chinese kale leaves dipped with insecticides in year 2025.

ในพื้นที่ ตำบลหินตั้ง อำเภอบ้านไผ่ จังหวัดขอนแก่น
พบว่าสารที่ด้วงหมัดผักมีเปอร์เซ็นต์การตายสูง - สูง
มากหรือมีความต้านทานต่ำ ได้แก่ สาร fipronil
(98.44 - 100%) สาร dinotefuran (67.61 -
79.02%) และ สาร profenofos (98.21 - 100%)
สารที่มีเปอร์เซ็นต์การตายปานกลาง หรือมีความ
ต้านทานปานกลาง ได้แก่ สาร tolfeprad (62.24
- 64.43%) ส่วนสารที่มีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำ หรือมี
ความต้านทานสูง ได้แก่ สาร acetamiprid (37.47 -
52.88%) และสาร carbaryl (15.83 - 21.86%)
(Figure 12)

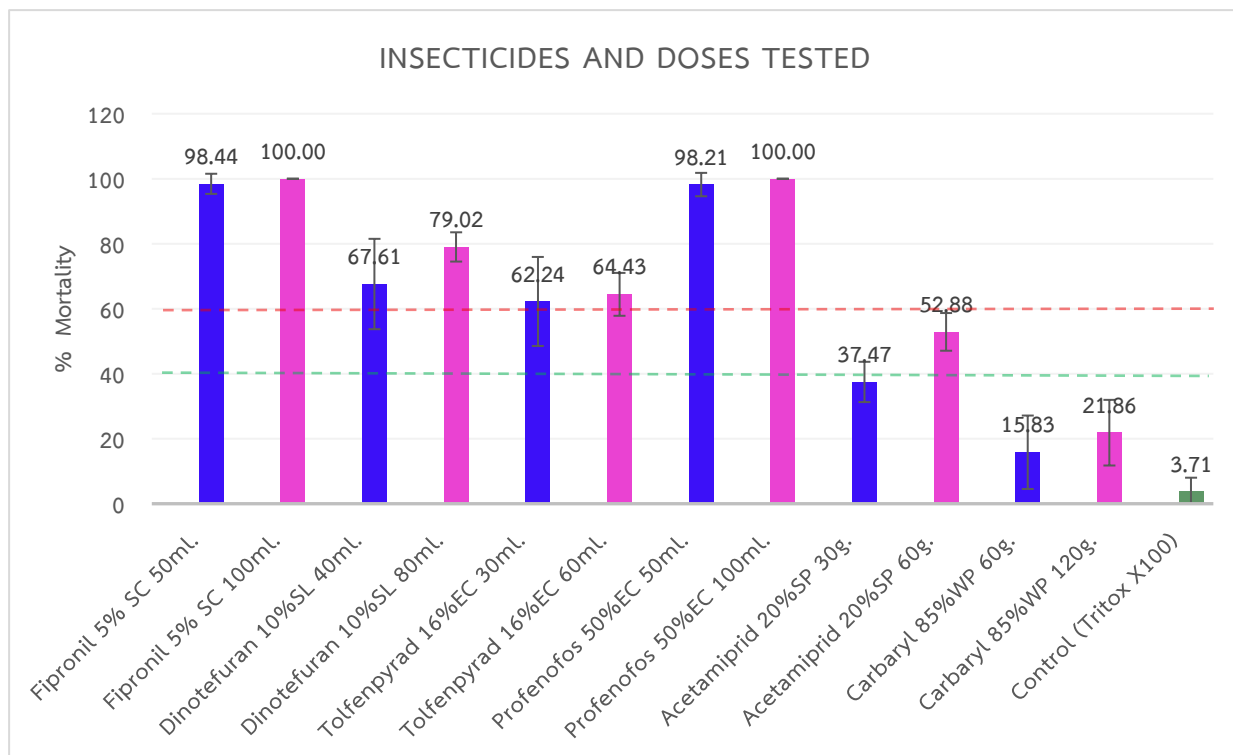


Figure 12 Mortality percentage of *Phyllotreta sinuata* in Brassica crops in Hin Tang Subdistrict, Ban Phai District, Khon Kaen Province, after feeding with Chinese kale leaves dipped with insecticides in year 2025.

จากภาพรวมทั้ง 11 พื้นที่ พบว่าสารกำจัดแมลงที่ด้วงหมัดผักทำลายพืชตระกูลกะหล่ำมีความต้านทานต่ำ อันดับแรก ๆ คือ สาร profenofos, fipronil และ dinotefuran โดยแสดงความต้านทานต่ำใน 9 พื้นที่ จาก 11 พื้นที่ (Figure 2 - 12) สอดคล้องกับรายงานของจอมสุรางค์และคณะ (2550) ที่พบว่าสาร profenofos ยังเป็นสารให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงในหลายพื้นที่ในเขตภาคเหนือตอนล่างเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าเกษตรกรยังไม่มีการใช้สารดังกล่าวมากนัก ทำให้ยังไม่เกิดปัญหาดังหมัดผักต้านทานต่อสารกำจัดแมลงในแต่ละพื้นที่ จึงสามารถใช้สารดังกล่าวมาใช้แบบหมุนเวียนสารเพื่อป้องกันปัญหาความต้านทานได้

ข้อมูลผลการทดลอง (Figure 2 - 12) ชี้ให้เห็นว่าสารกำจัดแมลงที่ด้วงหมัดผักมีความต้านทานต่ำ - ปานกลาง และสามารถนำมาสร้างรูปแบบการใช้สารแบบหมุนเวียนได้

แหล่งปลูกจังหวัดกาญจนบุรี ในพื้นที่ตำบลบ้านเก่า อำเภอมะกลายกาญจนบุรี ได้แก่ profenofos, fipronil, dinotefuran, tolfenpyrad ตำบลวังขนาย อำเภอดำรงวิทยะ ได้แก่ profenofos, fipronil, dinotefuran หรือ acetamiprid, tolfenpyrad และ carbaryl ตำบลทุ่งทอง อำเภอดำรงวิทยะ ได้แก่ fipronil และ profenofos

แหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ ในพื้นที่ตำบลบ้านโคก อำเภอมะกลายเพชรบูรณ์ ได้แก่ fipronil, dinotefuran หรือ acetamiprid, profenofos และ tolfenpyrad ตำบลวังบาล อำเภอหล่มเก่า ได้แก่ fipronil, profenofos และ tolfenpyrad

แหล่งปลูกจังหวัดเชียงใหม่ ในพื้นที่ตำบลบ้านกาด อำเภอแม่วาง ได้แก่ fipronil, profenofos, dinotefuran และ tolfenpyrad ตำบลโป่งแยง อำเภอแมริม ได้แก่ fipronil, profenofos, dinotefuran หรือ acetamiprid, tolfenpyrad และ carbaryl

แหล่งปลูกจังหวัดเชียงราย ในพื้นที่ตำบลแม่เจดีย์ใหม่ อำเภอเวียงป่าเป้า ได้แก่ fipronil, profenofos, dinotefuran หรือ acetamiprid

แหล่งปลูกจังหวัดหนองบัวลำภู ในพื้นที่ตำบลผาสามยอด อำเภอนาวัง ได้แก่ toltenpyrad, fipronil, profenofos, dinotefuran หรือ acetamiprid

แหล่งปลูกจังหวัดขอนแก่น ในพื้นที่ตำบลหินตั้ง อำเภอบ้านไผ่ ได้แก่ fipronil, profenofos และ toltenpyrad

ส่วนแหล่งปลูกจังหวัดนครปฐม ในพื้นที่ตำบลหนองงูเหลือม อำเภอเมืองนครปฐม พบว่าด้วงหมัดผักมีความต้านทานปานกลาง ได้แก่ profenofos เพียงชนิดเดียว ฉะนั้นต้องวิจัยหรือหาสารในกลุ่มกลไกการออกฤทธิ์อื่นนอกจากกลุ่ม 1B เพิ่มเติม เพื่อใช้ในการหมุนเวียนกลุ่มกลไกการออกฤทธิ์

อย่างไรก็ดี สารที่ ด้วงหมัดผักมีความต้านทานปานกลางสามารถนำมาใช้ได้หมุนเวียนเป็นครั้งคราว เพราะสารที่ด้วงหมัดผักมีความต้านทานปานกลางหากถูกนำมาใช้บ่อยครั้ง อาจทำให้ด้วงหมัดผักสร้างความต้านทานสูงขึ้นได้อย่างรวดเร็ว

สารกำจัดแมลงที่ด้วงหมัดผักทำลายพืชตระกูลกะหล่ำมีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำหรือมีความต้านทานสูงคือ สาร carbaryl (กลุ่ม 1A) แสดงความต้านทานสูงต่อด้วงหมัดผักใน 8 พื้นที่ จาก 11 พื้นที่ (Figure 1 - 12) สอดคล้องกับรายงานของจอมสุรางค์และคณะ (2550) ที่พบว่าด้วงหมัดผักในแหล่งปลูกพืชตระกูลกะหล่ำจังหวัดพิษณุโลก เพชรบูรณ์ นครสวรรค์ อุตรดิตถ์ ตาก เชียงใหม่ และนันทบุรี พบว่า ต้านทานต่อสาร carbaryl มากที่สุด จึงควรแนะนำเกษตรกรในพื้นที่ที่มีปัญหาด้วงหมัดผักต้านทานต่อสารดังกล่าวให้งดใช้หรือลดการใช้สาร carbaryl เพื่อไม่ให้เกิดความต้านทานเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างในระดับความตายของแมลงที่พบในแต่ละพื้นที่อาจสะท้อนถึงความหลากหลายด้านพันธุกรรมของแมลง หรือผลจากพฤติกรรมการใช้สารของเกษตรกรในพื้นที่นั้น ๆ ซึ่งสอดคล้องกับแนวคิดของ Sparks and Nauen (2015) กล่าวว่า การใช้สารเคมีอย่างไม่เหมาะสมและ

ขาดการหมุนเวียนกลุ่มสารเป็นปัจจัยหลักที่กระตุ้นให้เกิดการพัฒนาความต้านทานในประชากรแมลง

การใช้กลยุทธ์หมุนเวียนสาร (rotation) และหลีกเลี่ยงการใช้สารจากกลุ่มเดียวกันต่อเนื่องเป็นวิธีสำคัญในการชะลอการเกิดความต้านทานในแมลงศัตรูพืช ซึ่งสามารถนำมาเป็นแนวทางในการแนะนำการหมุนเวียนสาร profenofos fipronil dinotefuran toltenpyrad ร่วมกับแนวทางการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (Integrated Pest Management : IPM) เพื่อลดการพึ่งพาสารเคมีเพียงอย่างเดียวและส่งเสริมความยั่งยืนในการผลิตทางการเกษตรในระยะยาวอย่างยิ่งยั้ง (Zhou et al., 2024) แก่เกษตรกรผู้ปลูกพืชตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย

นอกจากนี้ผลการทดลองยังชี้ให้เห็นว่าด้วงหมัดผักทำลายพืชตระกูลกะหล่ำในแต่ละพื้นที่มีความต้านทานต่อสารกำจัดแมลงแตกต่างกัน การใช้สารแบบหมุนเวียนในแต่ละพื้นที่ควรมีรูปแบบที่ใช้สารแตกต่างกันตามระดับความต้านทานของด้วงหมัดผักในแต่ละพื้นที่ การให้คำแนะนำการใช้สารกำจัดแมลงแบบหมุนเวียนแก่เกษตรกรในพื้นที่ต่าง ๆ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการปรับคำแนะนำโดยให้เกษตรกรร่วมพิจารณาคำแนะนำนั้น ๆ ด้วยว่ามีข้อเสียด้านใดบ้าง เพื่อจะได้ปรับปรุงคำแนะนำใหม่ให้เหมาะสมเพื่อให้เกษตรกรในแต่ละพื้นที่สามารถปฏิบัติได้อย่างแท้จริง เช่น อาจจะต้องมีการใช้สารฆ่าแมลงที่อยู่ในกลุ่มอื่น ๆ เพิ่มเติมหรือทดแทนโดยไม่ก่อให้เกิดปัญหาความต้านทานเพิ่มมากขึ้น หรือมีการใช้สารฆ่าแมลงที่มีราคาสูงกว่าแต่มีประสิทธิภาพปานกลางในบางครั้งเพื่อให้เกษตรกรสามารถปฏิบัติได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่ายสูงมากนัก ซึ่งอาจเป็นการจูงใจให้เกษตรกรหันมาใช้สารฆ่าแมลงแบบหมุนเวียนเพิ่มมากขึ้น

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สารกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ มีผลแตกต่างกันต่อการตายของด้วงหมัดผักแถบลายที่ลงทำลายพืชผักตระกูลกะหล่ำในแต่ละแหล่งปลูก จากการประเมินความต้านทานต่อสารกำจัดแมลงในด้วงหมัดผักที่ทำลายพืชตระกูลกะหล่ำ ในช่วงปี 2567 - 2568 ทำให้ทราบชนิดกลุ่มสารกำจัดแมลงที่ด้วงหมัดผักแถบลายมีความต้านทานน้อยหรือมีพิษสูงจาก

- 1) อำเภอเมืองกาญจนบุรี จังหวัดกาญจนบุรี คือ สาร profenofos (กลุ่ม 1B) fipronil (กลุ่ม 2B)
- 2) อำเภอดำม่วง จังหวัดกาญจนบุรี คือ สาร fipronil (กลุ่ม 2B) profenofos (กลุ่ม 1B)
- 3) อำเภอเมืองเพชรบูรณ์ และอำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ คือ สาร fipronil (กลุ่ม 2B) dinotefuran (กลุ่ม 4A) profenofos (กลุ่ม 1B)
- 4) อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ คือ สาร fipronil (กลุ่ม 2B) profenofos (กลุ่ม 1B) dinotefuran (กลุ่ม 4A) tolfeprad (กลุ่ม 21A)
- 5) อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ คือ สาร fipronil (กลุ่ม 2B) profenofos (กลุ่ม 1B) dinotefuran และ acetamiprid (กลุ่ม 4A) tolfeprad (กลุ่ม 21A)
- 6) อำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย คือ สาร tolfeprad (กลุ่ม 21A) fipronil (กลุ่ม 2B) profenofos (กลุ่ม 1B) dinotefuran และ acetamiprid (กลุ่ม 4A)
- 7) อำเภอนาวัง จังหวัดหนองบัวลำภู คือ สาร fipronil (กลุ่ม 2B) profenofos (กลุ่ม 1B) dinotefuran (กลุ่ม 4A)
- 8) อำเภอบ้านไผ่ จังหวัดขอนแก่น คือ สาร fipronil (กลุ่ม 2B) profenofos (กลุ่ม 1B) dinotefuran (กลุ่ม 4A)

สารกำจัดแมลงต่าง ๆ เหล่านี้สามารถนำมาใช้แนะนำเกษตรกรในการพ่นสารแบบหมุนเวียนเพื่อแก้ปัญหาความต้านทานต่อสารกำจัดแมลงในด้วงหมัดผักที่ลงทำลายพืชผักตระกูลกะหล่ำในแต่ละพื้นที่ดังกล่าวได้ ส่วนพื้นที่ อำเภอเมืองนครปฐม จังหวัดนครปฐม พบว่าด้วงหมัดผักมีความต้านทานปานกลาง ได้แก่ profenofos ไม่พบกำจัดแมลงที่ด้วงหมัดผักแถบลายมีความต้านทานน้อยหรือมีพิษสูงเลย จึงควรศึกษาวิจัยสารกำจัดแมลงที่อยู่ในกลุ่มอื่น ๆ เพิ่มเติมเพื่อแก้ปัญหาความต้านทานในพื้นที่นี้ นอกจากนี้ควรแจ้งเตือนเกษตรกรให้งดการใช้สารที่ด้วงหมัดผักมีความต้านทานสูง เช่น สาร carbaryl เพื่อลดปัญหาความต้านทานเพิ่มมากขึ้นในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ดร.สุภรดา สุคนธาภิรมย์ ณ พัทลุง ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการจัดการความต้านทานต่อสารกำจัดแมลงและการทดสอบความต้านทานต่อสารกำจัดแมลงในด้วงหมัดผัก และขอขอบคุณเกษตรกรผู้ปลูกพืชตระกูลกะหล่ำในแหล่งพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม เพชรบูรณ์ เชียงใหม่ เชียงราย หนองบัวลำภู และขอนแก่น ที่อำนวยความสะดวกในการเข้าพื้นที่เพื่อเก็บแมลงมาทำงานทดสอบในห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณ นักวิชาการเกษตรกลุ่มบริหารศัตรูพืชที่เตรียมพืชสำหรับการทดลอง จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

จอมสุรางค์ ดวงธิสาร วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ ไสว
บุรณพานิชพันธุ์ และจิราพร ตยุดิวิกุล. 2550.
ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของด้วงหมัดผักแถบ
ลายในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย.
วิทยาสารกำแพงแสน 5(1): 20-29.
สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2526. แมลงศัตรูพืชทางการเกษตร
ของประเทศไทย. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.
424 หน้า

- ศรีจันทร์ ศรีจันทร์ และพฤษชาติ ปุณวัฒน์. 2566. เอกสารวิชาการ คำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลง - สัตว์ศัตรูพืชอย่างปลอดภัย...จากงานวิจัย ปี 2566. กลุ่มบริหารศัตรูพืช กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. 268 หน้า.
- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18: 265-267.
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S. and R. Nauen. 2014. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 78-87.
- Denholm, I, A.R. Horowitz, M. Cahill and I. Ishaaya. 1977. Management of Resistance to Novel Insecticides *In*: I. Ishaaya and D. Degheele (eds.) *Insecticides with Novel Modes of Action: Mechanisms and Application*. Springer.
- Gao, Y., Z. Lei and S.R. Reitz. 2012. Western flower thrips resistance to insecticides: detection, mechanisms and management strategies. *Pest Management Science*. 68: 1111-1121.
- Immaraju, J.A., J.G. Morse and R.F. Hobza. 1990. Field evaluation of insecticide rotation and mixtures as strategies for citrus thrips (Thysanoptera: Thripidae) resistance management in California. *Journal of Economic Entomology*. 83(2): 306-314.
- Sparks, T.C., and Nauen, R. 2015. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 121: 122-128.
- Tabashnik, B. E. and N. L. Cushing. 1987. Leaf residue vs. topical bioassays for assessing insecticide resistance in the diamond - back moth, *Plutella xylostella* L. *FAO Plant Protection Bulletin*. 35: 11-14.
- Zhou, W., Y. Arcot, R. F. Medina, J. Bernal, L. Cisneros - Zevallos and M.E.S Akbulut. 2024. Integrated Pest Management: An Update on the Sustainability Approach to Crop Protection. *ACS Omega*. 9(40): 41130-41147.

โรคเหี่ยวกล้วยหินและการจัดการแบบบูรณาการ

ณัฐธิมา โฆษิตเจริญกุล^{1/} ชลธิชา รักใคร่^{1/} ทิพวรรณ กันหาญาติ^{1/} รุ่งนภา ทองเคื่อง^{1/}

Nuttima Kositcharoenkul^{1/} Chonticha Rakkrai^{1/} Tippawan Kanhayart^{1/} Rungnapha Thong keng^{1/}

ABSTRACT

Banana cultivar *Kluai Hin* (*Musa* spp.) is an important economic crop of Yala Province in southern Thailand, particularly the “Kluai Hin Bannang Sata” which has been registered as a Geographical Indication (GI) product. Since 2015, the production of *Kluai Hin* has been severely threatened by a bacterial wilt disease known as banana blood disease, caused by *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis*. This disease is characterized by reddish - brown discoloration in vascular tissues, and has rapidly spread across several districts of Yala, resulting in a drastic reduction in banana yield from 1,588 kg/rai to 624 kg/rai in 2019, with disease incidence increasing to over 92%. To address this crisis, an integrated disease management strategy has been implemented, which includes the eradication of infected plants using triclopyr butoxyethyl ester, soil disinfection with a mixture of urea and lime, biological control using *Bacillus subtilis* strain BS-DOA 24, vector control through bunch covering and removal of male inflorescences, and strict agricultural sanitation practices. Complementary measures such as legal enforcement, farmer engagement, and the use of disease - free tissue - cultured plantlets have also been adopted. These integrated efforts, combined with active participation from local farmers and support from government agencies, have significantly reduced disease incidence to 25.29% by 2024 and improved average yields to 1,152 kg/rai. The outcomes highlight the effectiveness of technology - driven, community - based approaches in managing banana blood disease and underscore the importance of continued knowledge transfer and capacity building to ensure sustainable banana production in Thailand.

Keywords: Kluai Hin, Banana Wilt, banana blood disease, *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis*, Integrated Disease Management, BS-DOA 24, Yala Province

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 19000. Thailand

บทคัดย่อ

กล้วยหินเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของจังหวัดยะลา โดยเฉพาะพันธุ์กล้วยหินบันนังสตาที่ได้รับการขึ้นทะเบียนสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ (GI) อย่างไรก็ตาม นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558 เป็นต้นมา ได้เกิดการระบาดของโรคเหี่ยวในกล้วยหินอย่างรุนแรง ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* หรือที่เรียกว่า “โรคเลือดกล้วย” โดยมีลักษณะอาการเด่นคือการเปลี่ยนสีของท่อลำเลียงเป็นสีน้ำตาลแดงคล้ายเลือด การระบาดแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปยังหลายอำเภอของจังหวัดยะลา ส่งผลให้ผลผลิตกล้วยหินลดลงอย่างมาก โดยในปี พ.ศ. 2562 พบการระบาดในพื้นที่เพาะปลูกร้อยละ 92.03 และผลผลิตเฉลี่ยลดลงจาก 1,588 กก./ไร่ เหลือเพียง 624 กก./ไร่ การจัดการโรคดังกล่าวจึงจำเป็นต้องดำเนินการแบบบูรณาการ โดยประกอบด้วย การกำจัดต้นกล้วยที่ติดเชื้อมีสารเคมี การปรับปรุงดินด้วยยูเรียและปุณขาว การใช้ชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ควบคุมเชื้อแบคทีเรีย การควบคุมแมลงพาหะโดยการห่อเครือและตัดช่อดอกตัวผู้ ตลอดจนการจัดการสุขอนามัยทางการเกษตร เช่น การฆ่าเชื้อเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในแปลงปลูก นอกจากนี้ ยังมีมาตรการด้านนโยบาย เช่น การประกาศพื้นที่เฝ้าระวัง การรณรงค์ทำลายต้นเป็นโรค การควบคุมการเคลื่อนย้ายหน่อพันธุ์ และการส่งเสริมให้ใช้พันธุ์ปลอดโรคที่ผลิตจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากผลการดำเนินการของหน่วยงานในพื้นที่ และการมีส่วนร่วมของเกษตรกร พบว่าอัตราการระบาดของโรคลดลงเหลือร้อยละ 25.29 ในปี พ.ศ. 2567 และผลผลิตเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 1,152 กก./ไร่ แสดงให้เห็นว่าแนวทางการจัดการแบบบูรณาการ ร่วมกับการถ่ายทอดความรู้และสร้างความเข้าใจในระดับชุมชน เป็นปัจจัยสำคัญต่อความสำเร็จในการควบคุมโรคเหี่ยวกล้วยหิน และสามารถยกระดับการผลิตกล้วยหินให้มีความยั่งยืนและแข่งขันได้ในระยะยาว

คำสำคัญ: กล้วยหิน โรคเหี่ยว โรคเลือดกล้วย การจัดการแบบบูรณาการ แบคทีเรีย *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* ชีวภัณฑ์ BS-DOA 24 จังหวัดยะลา

บทนำ

กล้วยหินเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญที่มีบทบาทอย่างมากต่อจังหวัดยะลา ทั้งในด้านเศรษฐกิจ วัฒนธรรม และอัตลักษณ์ท้องถิ่น โดยในปี พ.ศ. 2554 “กล้วยหินบันนังสตา” ได้รับการขึ้นทะเบียนเป็นสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ (Geographical Indication: GI) แสดงถึงคุณภาพและความเชื่อมโยงกับพื้นที่ท้องถิ่น อย่างไรก็ตาม ตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2558 ได้มีการระบาดของโรคเหี่ยวในกล้วยหิน ซึ่งเกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* หรือที่รู้จักกันในชื่อ “โรคเลือดกล้วย” (banana blood disease) มีอาการเด่นชัดคือการเปลี่ยนสีของท่อลำเลียงเป็นสีน้ำตาลแดงคล้ายเลือด โรคนี้ได้กลายเป็นปัญหาสำคัญที่กระทบต่อการผลิตกล้วยหินของจังหวัดยะลาอย่างรุนแรง การระบาดครั้งแรกตรวจพบในพื้นที่อำเภอเบตง ก่อนจะขยายตัวอย่างรวดเร็วไปยังอำเภอธารโต และอำเภอบันนังสตา จังหวัดยะลา (กรมวิชาการเกษตร, 2561) ข้อมูลจากสำนักงานเกษตรจังหวัดยะลาระบุว่า การระบาดของโรคเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 12.72% ในปี 2559 เป็น 92.03% ในปี 2562 ส่งผลให้ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ลดลงจาก 1,588 กก./ไร่ เหลือเพียง 624 กก./ไร่ (สำนักงานเกษตรจังหวัดยะลา, 2568) ซึ่งทำให้ผลผลิตกล้วยหินลดลงอย่างมีนัยสำคัญและก่อให้เกิดผลกระทบต่อเกษตรกรในพื้นที่อย่างกว้างขวาง

ลักษณะและสาเหตุของโรค

เชื้อสาเหตุโรค

การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวกล้วยหินในจังหวัดยะลาด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ยืนยันว่าเป็น *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* (Phylotype IV) สาเหตุโรคเหี่ยว (Blood bacterial wilt of banana) หรือโรคเลือดกล้วย (banana blood

disease) มีรายงานการระบาดอย่างรุนแรงในประเทศอินโดนีเซีย และมาเลเซีย ซึ่งมีพรมแดนติดกับจังหวัดยะลา (Hadiwiyono, 2011) เป็นโรคที่สร้างความเสียหายร้ายแรงต่อการผลิตกล้วยในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยมีพืชอาศัยจำกัดเฉพาะกล้วย (*Musa* spp.) เท่านั้น การแพร่ระบาดของอาศัยพาหะและวัสดุปลูกเป็นสำคัญ สำหรับประเทศไทยพบแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebesensis* เป็นครั้งแรก จึงถูกจัดให้เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศที่ต้องดำเนินการกำจัดให้หมดสิ้น (eradication)

อาการของโรค

อาการของโรคเหี่ยวในกล้วยหิน มีลักษณะเฉพาะดังนี้ ขอบใบเหลือง จากนั้นจะเหลืองทั้งใบ ก้านใบหักพับลู่ลงรอบลำต้นเทียม แล้วเหี่ยวแห้งตาย ใบธงหรือใบอ่อนแสดงอาการเหี่ยว ใบเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองและใบแห้ง ดอกตัวผู้เหี่ยวแห้งเปลี่ยนเป็นสีดำ ส่วนเนื้อผลเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลแดงอาจมีลักษณะเป็นเมือกเยิ้มหรือแห้งเป็นสีดำ เมื่อตัดขวางลำต้นเทียมหรือก้านช่อดอกจะเห็นตรงกลางเป็นจุดสีน้ำตาลแดงโดยเฉพาะบริเวณท่อน้ำเลี้ยง



การแพร่ระบาดของโรค

การแพร่ระบาดของโรคเลือดในพื้นที่จังหวัดยะลาคาดว่าเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียไปกับเครื่องมือทำการเกษตรที่ใช้ตัดเครือกล้วยของผู้รับซื้อผลผลิตกล้วยหินตามแนวเขตชายแดน เมื่อต้นกล้วยติดเชื้อแสดงอาการของโรคจึงเป็นแหล่งแพร่เชื้อต่อหากมีการใช้หน่อพันธุ์จากต้นที่เป็นโรคไปปลูก เพราะในระยะแรกอาจยังไม่แสดงอาการ (Ray et al., 2021)

การแพร่กระจายในพื้นที่เกิดจากแมลง โดยเฉพาะแมลงผสมเกสรที่เข้าตอมทั้งดอกตัวเมีย ดอกตัวผู้หรือปลีกล้วยของต้นที่ติดเชื้อแพร่ต่อไปยังต้นอื่น แบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebesensis* สามารถกระจายตัวไปยังทุกส่วนของต้นกล้วยที่ติดเชื้อ และทำให้พืชที่ติดเชื้อสามารถเป็นแหล่งแพร่กระจายโรคได้ง่าย (Hadiwiyono, 2011)

มาตรการป้องกันกำจัดโรคเหี่ยวในกล้วยหิน

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้กำหนดมาตรการป้องกันกำจัดโรคเหี่ยวในกล้วยหิน ดำเนินการโดยกรมวิชาการเกษตรและกรมส่งเสริมการเกษตร เพื่อขับเคลื่อนการป้องกันกำจัดโรคเหี่ยวในกล้วยหิน 4 มาตรการหลัก ดังนี้

1. มาตรการด้านกฎหมาย

จังหวัดยะลาออกประกาศจังหวัดยะลา เรื่อง เตือนการระบาดและแนวทางการจัดการโรคเหี่ยวในกล้วยหินฉบับใหม่ให้สอดคล้องกับคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร (จังหวัดยะลา, 2561ก) ด้านตรวจพืชต้องเข้มงวดห้ามไม่ให้นำหน่อพันธุ์กล้วยจากนอกราชอาณาจักรเข้าประเทศ ซึ่งหน่อพันธุ์กล้วยเป็นสิ่งต้องห้าม ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม

2. มาตรการป้องกันกำจัดแบบมีส่วนร่วม

การรณรงค์กำจัดต้นกล้วยหินที่เป็นโรคออกจากพื้นที่ และถ่ายทอดความรู้ด้านเทคโนโลยีการจัดการโรคเหี่ยวกล้วยหินแบบบูรณาการให้แก่เจ้าหน้าที่และเกษตรกร และจังหวัดยะลาได้แต่งตั้งคณะทำงานขับเคลื่อนการแก้ปัญหาการระบาดของโรคเหี่ยวในกล้วยหิน เพื่อให้การสนับสนุนวิชาการ การควบคุมการแพร่ระบาดของโรค และการให้ความช่วยเหลือเกษตรกรผู้ได้รับผลกระทบ (จังหวัดยะลา, 2561ข)

3. มาตรการติดตามเฝ้าระวัง

เจ้าหน้าที่ของหน่วยงานในพื้นที่ร่วมกับเกษตรกร เฝ้าระวังและติดตามโรคเหี่ยวของกล้วย หากพบอาการต้องสงสัยให้แจ้งสำนักเกษตรอำเภอทันที

4. มาตรการสนับสนุนหน่อพันธุ์ปลอดโรค

การผลิตต้นพันธุ์ปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และแปลงพันธุ์ปลอดโรคโดยใช้ต้นพันธุ์ปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พร้อมมีการรับรองแปลงผลิตพันธุ์ปลอดโรคโดยกรมวิชาการเกษตร

เทคโนโลยีการจัดการโรคเหี่ยวกล้วยหินแบบบูรณาการประกอบไปด้วยวิธีการจัดการโรคทั้งหมด 5 วิธีการ ได้แก่

1. การกำจัดต้นกล้วยหินที่ติดเชื้อ

การใช้สารไตรโคโลเพอร์ บิวทอกซีเอทิล เอสเทอร์ 66.8% EC เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดต้นกล้วยหินที่เป็นโรค โดยใช้ไม้เสียบลูกชิ้นขนาดความยาวประมาณ 8 นิ้ว แซ้ในสารกำจัดวัชพืชข้ามคืน แล้วเสียบที่บริเวณโคนต้นกล้วยลึกประมาณ 5 นิ้ว ต้นกล้วยจะตายภายใน 20 - 30 วัน ขึ้นกับขนาดของต้นกล้วย

สารไตรโคโลเพอร์ บิวทอกซีเอทิล เอสเทอร์ เป็นสารกำจัดวัชพืชชนิดดูดซึมที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมวัชพืชใบกว้างและพืชไม้ยืนต้น เมื่อพืชดูดซึมสารนี้เข้าไปจะทำให้เกิดการเจริญเติบโตผิดปกติ

จนส่งผลให้เซลล์พืชเสียหายและตายในที่สุด (Senseman, 2007)

2. การปรับปรุงดินและฆ่าเชื้อ

หลังกำจัดต้นที่เป็นโรคแล้ว ต้องดำเนินการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในดิน โดยใช้วิธีการปรับปรุงดินด้วย ยูเรีย 0.5 กก. ผสมกับปูนขาว 5 กก./กอ (Michel and Mew, 1998; Vudhivanich, 2002) โรยส่วนผสมทั่วกอกล้วย กลบดินบริเวณกอกล้วยให้แน่น รดด้วยน้ำให้ชุ่ม ทิ้งไว้ 3 สัปดาห์

วิธีการนี้อาศัยกลไกการเพิ่มค่าความเป็นด่างของดินและการเกิดแอมโมเนีย (NH_3) และไนไตรท์ (NO_2^-) ซึ่งเป็นสารพิษที่สามารถทำลายเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียได้ จากการเก็บตัวอย่างดินจากแปลงทดสอบมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebesensis* เป็นประจำทุกเดือนด้วยวิธี PCR ตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรีย แสดงให้เห็นว่าการปรับปรุงดินตามวิธีการของ บุรณ์และคณะ (2560) สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในดินได้

3. การป้องกันด้วยชีววิธี

การใช้ชีวภัณฑ์แบคทีเรียบาซิลลัส ซับทีลิส สายพันธุ์ BS - DOA 24 ที่พัฒนาโดยกรมวิชาการเกษตร (ณัฐริมาและคณะ, 2557) มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวกล้วยหิน โดยใช้อัตรา 25 ก. ผสมน้ำ 10 ล./กอ รดรอบโคนต้นทุก 30 วัน

ชีวภัณฑ์นี้พัฒนาขึ้นเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในชิง ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม *R. solanacearum* species complex จากผลการทดลองพบว่าชีวภัณฑ์ BS - DOA 24 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวกล้วยหินได้ดี ไม่พบการเกิดโรคในแปลงทดสอบ และตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebesensis* สาเหตุโรคเหี่ยวกล้วยหิน

Dadrassia et al. (2020) พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของพืชและยับยั้ง

การเติบโตของเชื้อก่อโรค ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในประเทศไทยที่แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ในการป้องกันและควบคุมโรคเหี่ยวกล้วย

4. การควบคุมแมลงพาหะ

การแพร่ระบาดของโรคเหี่ยวกล้วยหิน นอกจากจะระบาดได้จากเชื้อสาเหตุโรคที่อยู่ในดินและหน่อกล้วยแล้ว ยังมีการแพร่ระบาดที่สำคัญโดยการแพร่กระจายผ่านแมลงพาหะ การห่อเครือกล้วยหินเป็นวิธีการจัดการที่มีประสิทธิภาพ เพื่อป้องกันไม่ให้แมลงในกลุ่มผีเสื้อกลางคืนและผึ้งซึ่งเป็นแมลงผสมเกสรและอาจมีเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวปนเปื้อนมาเมื่อมีการเข้าเก็บเกสรและน้ำหวานจากกล้วย

งานวิจัยของ Hermanto et al. (2013) ในการทดลองกับพันธุ์กล้วย Kepok Kuning และ Kepok Tanjung พบว่าการตัดช่อดอกตัวผู้สามารถลดการเกิดโรคได้ถึง 86% ขณะที่การตัดช่อดอกตัวผู้ร่วมกับการห่อเครือสามารถลดการติดเชื้อได้ถึง 94.3% ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของดอกตัวผู้ในการเป็นจุดเริ่มต้นของการติดเชื้อ

5. การจัดการสุขอนามัยทางการเกษตร

การทำความสะอาดเครื่องมือเกษตรเป็นมาตรการสำคัญในการควบคุมการแพร่กระจายของโรค Buddenhagen and Sequeira (1958) พบว่าฟอร์มาลดีไฮด์เป็นสารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูง อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันนิยมใช้โซเดียมไฮโปคลอไรด์ 2.5% ซึ่งสามารถฆ่าเชื้อได้ดีและมีต้นทุนต่ำ (Álvarez et al., 2015)

เกษตรกรต้องทำความสะอาดอุปกรณ์ทางการเกษตร เช่น มีดตัดผลกล้วย จอบ เสียม รองเท้า ด้วยการใช้น้ำยาฟอกขาว เช่น ไฮเตอร์ อัตรา 250 มล. ผสมน้ำ 3 ล. หรือปูนคลอรีน 100 ก./น้ำ 1 ล. ใส่ในขวดสเปรย์ นอกจากนี้ควรเปลี่ยนสารละลายที่ใช้ในการฆ่าเชื้อทุก 3 ชม. เพื่อรักษาประสิทธิภาพของ

สาร บริเวณทางเข้าออกควรมีอ่างแช่เท้าและอ่างล้างสำหรับยานพาหนะที่เข้ามาในแปลงพืชสำหรับฆ่าเชื้อ เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ

การบริหารจัดการการเข้าออกแปลงพืชของเกษตรกรในแปลงเป็นมาตรการสำคัญ ห้ามเกษตรกรเดินจากต้นที่เป็นโรคไปยังต้นที่ไม่เป็นโรค หากมีความจำเป็นต้องเดินไปยังต้นที่เป็นโรคควรเปลี่ยนรองเท้า เนื่องจากอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในดินที่อาจติดไปกับรองเท้าทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อโรคไปยังต้นที่ไม่เป็นโรคทำให้เกิดการระบาด

แนวทางการดำเนินการจัดการโรคเหี่ยวกล้วยหินแบบบูรณาการในพื้นที่

แนวทางการดำเนินการจัดการโรคเหี่ยวกล้วยหินแบบบูรณาการในพื้นที่แบ่งเป็น 3 แนวทางตามระดับการระบาดในแต่ละพื้นที่

1. การทำลายต้นเป็นโรคทั้งหมด

เป้าหมายในพื้นที่พบการระบาดน้อย ได้แก่ อำเภอกรงปินัง อำเภอรามัน และอำเภอยะหา โดยการใช้สารเคมีกำจัดวัชพืช ชื่อสามัญ ไตรโคลเพอร์ บิวทอกซีเอทิล เอสเตอ์ 66.8% อีซี แซ่ไม้เสียบลูกขึ้น เสียบบริเวณลำต้นกล้วย

2. การเก็บต้นหรือหน่อไว้เพื่อเก็บผลผลิต

เป้าหมายในพื้นที่ที่พบการระบาดเป็นบริเวณกว้าง ได้แก่ อำเภอเบตง อำเภอธารโต และอำเภอบันนังสตา และกรณีที่เกิดเกษตรกรไม่ยอมทำลายต้นทิ้ง โดยการทำลายต้นกล้วยที่แสดงอาการของโรคทิ้งและใช้ชีวภัณฑ์แบคทีเรียบาซิลลัส ซับทีลิส สายพันธุ์ BS - DOA 24 ควบคุมโรคต่อเนื่องสม่ำเสมอ

3. การจัดทำแปลงพันธุ์กล้วยหินปลอดโรค

จัดทำแปลงกล้วยหินปลอดโรคโดยใช้หน่อกล้วยหินจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือหน่อที่ผ่านการตรวจสอบว่าไม่ติดโรค เพื่อนำไปปลูกในพื้นที่ของ

หน่วยงานราชการและพื้นที่เกษตรกรที่ยังไม่พบการระบาดของ การใช้ต้นพันธุ์ที่ปราศจากเชื้อและได้รับการรับรองว่าสะอาดจากเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวกล้วยสามารถช่วยลดความเสี่ยงการเกิดโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ (Ray et al., 2022)

ความสำเร็จของการจัดการโรคเหี่ยวกล้วยหินแบบบูรณาการ

จากการติดตามสถานการณ์การระบาดของโรคเหี่ยวกล้วยหินของจังหวัดยะลา ตั้งแต่ปี 2556 - 2567 พบว่าหลังจากจังหวัดยะลาได้ดำเนินการออกประกาศจังหวัดยะลา เรื่อง เตือนการระบาดและแนวทางการจัดการโรคเหี่ยวในกล้วยหิน ลงวันที่ 20 กุมภาพันธ์ 2561 โดยใช้แนวทางการป้องกันกำจัดโรคเหี่ยวกล้วยหินของกรมวิชาการเกษตรนั้น ทำให้การระบาดของโรคลดลงจาก 92.03% ในปี 2562 เป็นร้อยละ 34.92% ในปี 2563 และต่อเนื่องลดลงเหลือ 25.29% ในปี 2567 พร้อมกับผลผลิตเฉลี่ยเพิ่มขึ้นจาก 624 กก./ไร่ เป็น 1,152 กก./ไร่ (สำนักงานเกษตรจังหวัดยะลา, 2568)

อย่างไรก็ตาม ในปี 2564 พบการระบาดไปยังพื้นที่ที่ยังไม่มีการระบาดและมีการระบาดน้อยเนื่องจากเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยหินยังไม่มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับโรคเหี่ยวกล้วยหินและเทคโนโลยีการจัดการโรคเหี่ยวกล้วยหิน แต่หลังจากที่หน่วยงานกรมวิชาการเกษตรและกรมส่งเสริมการเกษตรร่วมดำเนินการขยายผลเทคโนโลยีแบบบูรณาการโดยดำเนินการผ่านสำนักงานเกษตรจังหวัดและศูนย์จัดการศัตรูพืชชุมชน (ศจช.) ซึ่งผลการดำเนินการตั้งแต่ปี 2566 - 2567 นั้น ประสบความสำเร็จสามารถแก้ไขการระบาดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในปัจจุบันแม้ว่าสถานการณ์การระบาดจะลดลง แต่ยังคงพบการระบาดในบางพื้นที่ ซึ่งการควบคุมการระบาดของโรคเหี่ยวกล้วยหินให้ประสบความสำเร็จนั้นขึ้นอยู่กับบูรณาการเทคโนโลยีที่เหมาะสมและการมีส่วนร่วมของเกษตรกร

บทสรุป

โรคเหี่ยวกล้วยหินที่เกิดจากแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebesensis* เป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตกล้วยหินในประเทศไทย การจัดการโรคต้องใช้แนวทางบูรณาการที่ครอบคลุม การกำจัดต้นที่ติดเชื้อ การปรับปรุงดิน การใช้ชีวภัณฑ์ การควบคุมแมลงพาหะ และการจัดการสุขอนามัยทางการเกษตร

ผลสำเร็จจากการดำเนินงานในจังหวัดยะลาแสดงให้เห็นว่าการบูรณาการเทคโนโลยีที่เหมาะสมร่วมกับการมีส่วนร่วมของเกษตรกรสามารถลดการระบาดของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม ความสำเร็จในระยะยาวต้องอาศัยการถ่ายทอดความรู้ การสร้างความเข้าใจ และการปฏิบัติตามมาตรการป้องกันอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งการพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ ๆ และการวิจัยหาวิธีการจัดการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม พร้อมกับการสร้างระบบสนับสนุนที่เข้มแข็งจะเป็นกุญแจสำคัญในการรับมือกับความท้าทายของโรคเหี่ยวกล้วยหินในอนาคต เพื่อให้การผลิตกล้วยหินของไทยมีความยั่งยืนและสามารถแข่งขันในตลาดโลกได้อย่างต่อเนื่อง

บรรณานุกรม

- กรมวิชาการเกษตร. 2561. กล้วยกินได้ของกรมวิชาการเกษตร. เอกสารเนื่องในโอกาสครบรอบ 46 ปี การสถาปนากรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.
- จังหวัดยะลา. 2561ก. ประกาศจังหวัดยะลา เรื่อง เตือนการระบาดและแนวทางการจัดการโรคเหี่ยวในกล้วยหิน. ยะลา: สำนักงานเกษตรจังหวัดยะลา.
- จังหวัดยะลา. 2561ข. คำสั่งจังหวัดยะลา เรื่อง แต่งตั้งคณะทำงานขับเคลื่อนการแก้ปัญหาการระบาดของโรคเหี่ยวในกล้วยหิน จังหวัดยะลา. ยะลา: สำนักงานเกษตรจังหวัดยะลา.

- ณัฐริมา โฆสิตเจริญกุล บุรณี พัวพงษ์แพทย์ ทิพวรรณ กันหาญาติ และรุ่งนภา ทองเครื่อง. 2557. การพัฒนาชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BS - DOA 24 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพืชที่เกิดจาก *Ralstonia solanacearum*. วารสารวิชาการเกษตร. 32(3): 234 - 251.
- บุรณี พัวพงษ์แพทย์ ณัฐริมา โฆสิตเจริญกุล รุ่งนภา ทองเครื่อง ทิพวรรณ กันหาญาติ และกาญจนา ศรีไม้. 2560. การใช้วิธีการจัดการดินร่วมกับการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคเหี่ยวของปทุมมา. หน้า 207 - 219. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2560 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. สำนักงานเกษตรจังหวัดยะลา. 2568. ข้อมูลพื้นที่การระบาดของโรคเหี่ยวกล้วยหิน จังหวัดยะลา ปี 2568. จังหวัดยะลา: สำนักงานเกษตรจังหวัดยะลา.
- Álvarez, E., A. Pantoja, L. Gañan and G. Ceballos. 2015. Current status of Moko disease and black sigatoka in Latin America and the Caribbean, and options for managing them. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Buddenhagen, I.W. and L. Sequeira. 1958. Disinfectants and tool disinfection for prevention of spread of bacterial wilt of bananas. Plant Disease Reporter. 42: 1399 - 1404.
- Dadrasnia, A., M.M. Usman, R. Omar, S. Ismail and R. Abdullah. 2020. Potential use of *Bacillus* genus to control banana diseases: approaches toward high yield production and sustainable management. Journal of King Saud University - Science. 32(4): 2336 - 2342. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.03.011>
- Hadiwiyono. 2011. Blood bacterial wilt disease of banana: the distribution of pathogen in infected plant, symptoms, and potentiality of diseased tissues as source of infective inoculums. Nusantara Bioscience. 3: 112 - 117.
- Hermanto, C., E. Eliza and D. Emilda. 2013. Bunch management of banana to control blood disease. Australasian Plant Pathology. 42: 653 - 658. <https://doi.org/10.1007/s13313-013-0248-5>
- Michel, V.V. and T.W. Mew. 1998. Effect of a soil amendment on the survival of *Ralstonia solanacearum* in different soils. Phytopathology. 88: 300 - 305.
- Ray, J.D., S. Subandiyah, V.A. Rincón - Flórez, A.B. Prakoso, L.C. Carvalhais and A. Drenth. 2022. Susceptibility of the banana inflorescence to blood disease. Phytopathology, 112(4): 803 - 810. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-21-0311-R>
- Ray, J.D., S. Subandiyah, V.A. Rincón - Flórez, A.B. Prakoso, W.I. Mudita, L.C. Carvalhais, J.E.R. Markus, C.A. O'Dwyer and A. Drenth. 2021. Geographic expansion of banana blood disease in South Asia. Plant Disease. 105: 2792 - 2800.

- Senseman, S.A. 2007. Herbicide Handbook (9th ed.). Weed Science Society of America.
- Vudhivanich, S. 2002. Effect of soil amendment with urea and calcium oxide on survival of *Ralstonia solanacearum*, the causal agent of bacterial wilt or rhizome rot of ginger. Kasetsart Journal (Natural Science). 36: 242 - 247.

กักกันพืชกับการกิจด้านอารักขาพืชระหว่างประเทศ

อลงกต โพธิ์ดี^{1/} วาสนา ฤทธิไธสง^{1/}

Alongkot Phodee^{1/} Wasana Ridthaisong^{1/}

การเคลื่อนย้ายพืช และผลิตผลพืชระหว่างประเทศอาจทำให้เกิดความเสี่ยงในการนำเข้ามา (introduction) และการแพร่กระจาย (spread) ของศัตรูพืช การกักกันพืช (plant quarantine) และการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (international plant protection) จึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันและลดผลกระทบที่อาจเกิดขึ้น ทั้งนี้ จากความก้าวหน้าทางเศรษฐกิจและการค้าระหว่างประเทศในปัจจุบันมีการขยายตัวอย่างรวดเร็วทำให้การนำเข้าและส่งออกพืช ผลิตผลพืช และวัสดุการเกษตรมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นความเสี่ยงอย่างยิ่งต่อการแพร่กระจายของศัตรูพืชจากแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่ง รวมถึงส่งผลให้ความเสี่ยงในการแพร่กระจายของศัตรูพืชต่างถิ่นทวีความรุนแรงขึ้น ศัตรูพืชเหล่านี้สามารถสร้างความเสียหายต่อผลิตผลทางการเกษตร ความหลากหลายทางชีวภาพ และเศรษฐกิจของประเทศ หากไม่มีการควบคุมที่เหมาะสม ดังนั้น การกักกันพืช และการอารักขาพืชระหว่างประเทศจึงเป็นกลไกสำคัญในการรับมือ

ความหมายการกักกันพืช

คำว่า “กักกัน” หมายถึง ไม่ให้ล่องพ้นเขตที่กำหนดไว้ หรือกำหนดเขตให้อยู่ ส่วนคำว่า “quarantine” มาจากคำว่า “quadraginta” ซึ่งเป็นภาษาละติน และ “quaranta” ซึ่งเป็นภาษาอิตาเลียน โดยทั้งสองคำนี้ มีความหมายว่า “สี่สิบ” แรกเริ่มเดิมทีคำว่า quarantine ถูกนำไปใช้ในช่วงระยะเวลาที่กักกันเรือที่เดินทางมาจากประเทศที่มี

โรคภัยเรื้อรังกำลังระบาดอยู่ เช่น กาฬโรค อหิวาตกโรค ไข้เหลือง ลูกเรือและผู้โดยสารจะถูกบังคับให้อยู่บนเรือซึ่งจอดอยู่ห่างฝั่งเป็นระยะเวลาหนึ่ง นานพอที่โรคภัยที่อาจจะติดมากับลูกเรือหรือผู้โดยสารจะปรากฏให้เห็น จึงจะได้รับอนุญาตให้ขึ้นฝั่งได้ เรื่องดังกล่าวนี้มีรายงานว่าเริ่มมีในประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน ตั้งแต่ปลายศตวรรษที่ 14

ความหมายของคำว่า “กักกัน” ถูกนำมาใช้โดยเริ่มจากเรื่องราวของโรคมุขย์ มาเป็นเรื่องราวของโรคสัตว์ และต่อมาภายหลังครอบคลุมมาถึงศัตรูพืชด้วยโดยใช้คำว่า “กักกันพืช” ซึ่งตรงกับคำในภาษาอังกฤษว่า “plant quarantine” ซึ่ง “การกักกันพืช” หมายถึง กิจกรรมทั้งหมดที่มีรูปแบบเพื่อป้องกันการนำเข้า หรือการแพร่กระจายของศัตรูพืชกักกันชนิดต่าง ๆ หรือเพื่อทำให้มั่นใจในการควบคุมศัตรูพืชเหล่านั้นอย่างเป็นทางการ

การกักกันพืช: กลไกป้องกันการแพร่กระจายของศัตรูพืช

การกักกันพืชเป็นมาตรการที่มีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันการนำเข้า หรือการแพร่กระจายของศัตรูพืชกักกัน หรือเพื่อจำกัดผลกระทบทางเศรษฐกิจของศัตรูพืช โดยการนำตัวบทกฎหมาย ระเบียบ ข้อบังคับ หรือวิธีดำเนินการที่เป็นทางการใด ๆ มาใช้ ทั้งนี้ เพื่อป้องกันมิให้ศัตรูพืชแพร่กระจายจากแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่ง ไม่ว่าจะเป็นภายในประเทศ หรือระหว่างประเทศ

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 19000. Thailand

ประเทศไทยได้ประกาศใช้ตัวบทกฎหมาย เรียกว่า “พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507” ซึ่งมีผลใช้บังคับ เมื่อวันที่ 19 มิถุนายน 2507 จนถึงปัจจุบัน อย่างไรก็ตาม ได้มีการแก้ไขเพิ่มเติมบางมาตราโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 เพื่อให้เหมาะสมสอดคล้องกับสภาพการณ์ในเวลานั้น ๆ โดยกฎหมายว่าด้วยการกักพืชนี้จะมอบอำนาจหน้าที่ตามกฎหมายให้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และกรมวิชาการเกษตร ซึ่งจากกฎหมายนี้ สามารถยกเว้นระเบียบข้อบังคับสุขอนามัยพืชต่าง ๆ หรือหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขได้

การอารักขาพืชระหว่างประเทศ: กรอบความร่วมมือระดับโลก

การกักกันพืชของแต่ละประเทศจะดำเนินการภายใต้กรอบของ “อนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention)” ซึ่งเป็นอนุสัญญาที่อยู่ภายใต้ความรับผิดชอบขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) ปัจจุบันมี 185 ภาคิ์สัญญา โดยประเทศไทยได้เข้าร่วมเป็นภาคิ์สัญญาลงนามเมื่อวันที่ 6 ธันวาคม 2494 และให้สัตยาบันเมื่อวันที่ 16 สิงหาคม 2521 ทั้งนี้ อนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ ฉบับตัวบทแก้ไขใหม่ที่ได้รับการอนุมัติโดยที่ประชุมสมัชชาองค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ ในสมัยประชุมที่ 29 เมื่อเดือนพฤศจิกายน 2540 (ค.ศ. 1997) ซึ่งภาคิ์สัญญาต่าง ๆ

- *โดยการยอมรับ* ความจำเป็นสำหรับความร่วมมือระหว่างประเทศในการควบคุมศัตรูพืชและผลิตผลพืช และในการป้องกันการแพร่กระจายระหว่างประเทศ และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง การนำเข้ามาในพื้นที่ที่อยู่ในอันตราย

- *โดยการยอมรับ* ว่ามาตรการสุขอนามัยพืชควรมีการชี้แจงได้ตามหลักวิชาการ โปร่งใส และไม่ควรนำมาใช้ในรูปแบบที่ประกอบกันให้เป็นไม่ว่าวิธีการเลือกปฏิบัติตามอำเภอใจหรือปราศจากเหตุผล

หรือข้อจำกัดที่แอบแฝง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการค้าระหว่างประเทศ

- *โดยความปรารถนา* ที่จะให้มั่นใจการประสานงานอย่างใกล้ชิดของมาตรการที่มีการกำกับให้เข้าสู่ความมุ่งหมายเหล่านี้

- *โดยความปรารถนา* ที่จะจัดให้มีกรอบสำหรับการพัฒนาและการประยุกต์ใช้มาตรการสุขอนามัยพืชที่ปรับให้กลมกลืน และการขยายความมาตรฐานสากลถึงผลที่เกิดผลนั้น

- *โดยการคำนึงถึง* หลักการที่ได้รับการรับรองในระดับสากลที่ใช้ควบคุมการป้องกันสุขภาพของพืช มนุษย์ และสัตว์ และสิ่งแวดล้อม

- *โดยการสังเกต* ข้อตกลงที่ได้สรุปเป็นผลมาจากการเจรจาการค้าพหุภาคีรอบอุรุกวัย รวมถึงความตกลงว่าด้วยการใช้บังคับมาตรการสุขอนามัยและ สุข อนามัย พืช (Agreement on the Application

of Sanitary and Phytosanitary Measures) ได้ตกลงกัน ทั้งสิ้น 23 มาตรา (ARTICLE) ซึ่งมาตรา 4 (ARTICLE IV) “บทบัญญัติทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมการเกี่ยวกับองค์การสำหรับการอารักขาพืชแห่งชาติ” ได้ระบุไว้ โดยสรุปได้ดังนี้

1. ภาคิ์สัญญาจะต้องจัดเตรียมอย่างสุดความสามารถสำหรับองค์การอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization) อย่างเป็นทางการ โดยมีหน้าที่รับผิดชอบหลักที่กำหนดไว้ในมาตรานี้

2. ความรับผิดชอบขององค์การอารักขาพืชแห่งชาติอย่างเป็นทางการจะต้องรวมถึงสิ่งต่อไปนี้ เช่น การออกใบรับรองที่เกี่ยวข้องกับระเบียบข้อบังคับสุขอนามัยพืชของภาคิ์สัญญาผู้นำเข้า การเฝ้าระวัง โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับวัตถุประสงค์ของการรายงานการเกิดขึ้น การระบาด และการแพร่กระจายของศัตรูพืช และการควบคุมศัตรูพืชเหล่านั้น การตรวจสอบสินค้าที่ส่งมอบและการกำจัดการเข้าทำลายหรือการฆ่าเชื้อโรคในสินค้าที่ส่งมอบที่เป็นพืชและผลิตผลพืชที่เคลื่อนย้ายระหว่าง

ประเทศ การดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และการฝึกอบรมและการพัฒนาพนักงาน

3. ภาศึคู้สัญญาจะต้องจัดเตรียมอย่างสุดความสามารถเพื่อการกระจายข้อมูลภายในอาณาเขตของตนเกี่ยวกับศัตรูพืชควบคุมและวิธีการป้องกันและควบคุม การวิจัยและการสอบสวนในด้านการอารักขาพืช การออกระเบียบข้อบังคับสุขอนามัยพืช และการปฏิบัติหน้าที่อื่น ๆ ตามที่อาจจำเป็นสำหรับการปฏิบัติตามอนุสัญญานี้

นอกจากนี้ อนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศได้พัฒนา “มาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures)” ทั้งนี้ ข้อมูล ณ เดือนมีนาคม 2568 มีมาตรฐานที่ได้รับการรับรองแล้ว 46 ฉบับ (ฉบับที่ 30 กำลังถูกเพิกถอน) โดยมาตรฐานนี้บางฉบับมีภาคผนวก (Annex) ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ระเบียบวิธีการวินิจฉัย (Diagnostic Protocol) 34 ฉบับ การปฏิบัติหรือการบำบัดด้านสุขอนามัยพืช (Phytosanitary Treatment) 43 ฉบับ และมาตรฐานสินค้า (Commodity Standard) 1 ฉบับ ซึ่งมาตรฐานเหล่านี้ได้รับการยอมรับโดยคณะกรรมการมาตรการสุขอนามัยพืช (Commission on Phytosanitary Measures) ภายใต้กรอบขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ เพื่อเป็นมาตรฐานระหว่างประเทศในการปกป้องเกษตรกรรมยั่งยืนและเสริมสร้างความมั่นคงทางอาหารโลก ปกป้องสิ่งแวดล้อม ป่าไม้ และความหลากหลายทางชีวภาพ และส่งเสริมการพัฒนาเศรษฐกิจและการค้า

อนึ่ง “ความตกลงว่าด้วยการใช้บังคับมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช” ภายใต้องค์การการค้าโลก (WTO) ระบุไว้ว่าไม่มีการห้ามสมาชิกจากการนำมาใช้หรือการบังคับใช้มาตรการที่จำเป็นเพื่อป้องกันชีวิตหรือสุขภาพมนุษย์ สัตว์ หรือพืช ภายใต้ข้อกำหนดว่าจะต้องไม่นำมาตรการเหล่านั้นไปใช้ในลักษณะที่ก่อให้เกิดวิธีของการเลือกปฏิบัติตาม

อำเภอใจ หรือที่ไม่มีเหตุผลระหว่างสมาชิกในกรณีมีเงื่อนไขเดียวกันทั่วไป หรือข้อจำกัดทางการค้าระหว่างประเทศโดยแอบแฝง

บทบาทของกลุ่มวิจัยการกักกันพืชกับภารกิจด้านอารักขาพืชระหว่างประเทศ

กรมวิชาการเกษตรในฐานะองค์การอารักขาพืชแห่งชาติที่เป็นส่วนหนึ่งของยุทธศาสตร์การสร้างขีดความสามารถด้านสุขอนามัยพืชแห่งชาติของอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ และเป็นหน่วยงานรับผิดชอบในการควบคุมกำกับดูแลพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 และที่แก้ไขเพิ่มเติม และมีหน้าที่รับผิดชอบต่าง ๆ ตามที่กำหนดไว้ในอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ โดยแบ่งส่วนราชการซึ่งมีสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชที่มีภารกิจเกี่ยวกับการศึกษา ค้นคว้า วิจัย สำรวจ รวบรวม เฝ้าระวังและจำแนกเกี่ยวกับแมลง สัตว์ศัตรูพืช โรคพืช วัชพืช และการกักกันพืช รวมทั้งวิธีป้องกันและกำจัดที่เหมาะสม รวมถึงการให้บริการวิชาการ เตือนภัยศัตรูพืช และเทคโนโลยีด้านอารักขาพืชแก่เจ้าหน้าที่ เกษตรกร เอกชน และหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้อง

“กลุ่มวิจัยการกักกันพืช” เป็นกลุ่มวิจัยหนึ่งภายใต้สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งมีบทบาทหน้าที่ในแต่ละกลุ่มงานที่เกี่ยวข้องกับภารกิจด้านการอารักขาพืชระหว่างประเทศ ดังนี้

1. กลุ่มงานวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช มีหน้าที่ ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชต่าง ๆ รวมถึงข้อกำหนดการนำเข้าด้านสุขอนามัยพืช ซึ่งเป็นมาตรการสุขอนามัยพืชเฉพาะที่จัดทำขึ้นโดยประเทศไทยเกี่ยวกับสินค้าที่ส่งมอบซึ่งเคลื่อนย้ายเข้าสู่ประเทศ ที่ผ่านมาได้ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชและกำหนดข้อกำหนดการนำเข้าด้านสุขอนามัยพืช โดยออกเป็นประกาศกรมวิชาการเกษตรซึ่งอาศัยอำนาจตามความในมาตรา 8 (2) แห่งพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 เช่น เงื่อนไขการนำเข้าเมล็ด

พันธุ์พริก มะเขือ มะเขือเทศ และข้าวโพดจากทุกแหล่ง เงื่อนไขการนำเข้าผลแอปเปิลสดจากเกาหลีใต้ ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ เบลเยียม เยอรมนี โปแลนด์ ฝรั่งเศส อิตาลี ตุรกี แคนาดา อเมริกา ซิลิ แอฟริกาใต้ ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ นอกจากนี้ ยังมีผลไม้สดอื่น ๆ อาทิ ส้ม องุ่น อะโวคาโด แอปริคอต เชอร์รี่ กีวี เมล่อน เนคทารีน ท้อ สาลี่ พลัม พลับ ทับทิม สตรอเบอรี่ จากอีกหลายแหล่ง รวมถึงผลิตผลพืชอื่น เช่น มะพร้าว มันสำปะหลัง ข้าวโพด อ้อย ยาสูบ มันฝรั่ง เป็นต้น

นอกจากการดำเนินการที่เกี่ยวข้องกับการนำเข้าพืช และผลิตผลพืชแล้ว ยังดำเนินการเกี่ยวกับการจัดทำข้อมูลทางวิชาการ (technical information) เพื่อประกอบการยื่นขอการเข้าสู่ตลาด (market access) ของสินค้าเกษตรของไทย ส่งออกไปยังต่างประเทศ เช่น มะม่วง มังคุด ลำไยทุเรียน ส้มโอ

2. กลุ่มงานวินิจฉัยศัตรูพืชกักกัน มีหน้าที่ดำเนินการตรวจสอบ การทดสอบ การวินิจฉัยศัตรูพืชเกี่ยวกับศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางกักกันพืชของสินค้าเกษตรที่นำเข้าและส่งออก เพื่อเป็นการสกัดกั้น (interception) ศัตรูพืช ทั้งนี้ การวินิจฉัยศัตรูพืชหรือการบ่งชี้ชนิดของศัตรูพืชอาจเกี่ยวเนื่องถึงกลุ่มวิจัยต่าง ๆ ภายในสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เช่น กลุ่มกีฏและสัตววิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มวิจัยวัชพืช รวมถึง การปฏิบัติงานร่วมกับด่านตรวจพืชสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร ในการพิสูจน์ยืนยันการนำเข้าว่าสินค้าที่ส่งมอบเป็นไปตามข้อกำหนดการนำเข้าด้านสุขอนามัยพืชหรือไม่ เช่น การสุ่มตัวอย่างและการทดสอบ การตรวจสอบด้วยสายตา (การตรวจสอบทางกายภาพ) เพื่อหาศัตรูพืชและสิ่งปนเปื้อนที่ต้องห้ามอื่น ๆ การพิสูจน์ยืนยันการบำบัดด้วยความเย็นระหว่างการขนส่ง

สำหรับสินค้าเกษตรส่งออก ได้ดำเนินการพัฒนา ส่งเสริมและอำนวยความสะดวกการส่งออก เช่น การตรวจสอบแปลงพืชเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์และออกผลการตรวจสอบว่าในระหว่างฤดูการเจริญเติบโตปลอดจากศัตรูพืชควบคุมตามที่ประเทศ

คู่ค้ากำหนด การออกผลการทดสอบหรือการพิสูจน์ยืนยันผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการอื่นที่กรมวิชาการเกษตรให้การยอมรับ เพื่อประกอบการขอและออกใบรับรองสุขอนามัยพืช

3. กลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน มีหน้าที่ทดสอบวิธีการปฏิบัติหรือการบำบัดที่เกี่ยวข้องกับศัตรูพืชควบคุมต่าง ๆ ของประเทศผู้นำเข้า เพื่อเป็นวิธีดำเนินการสำหรับการฆ่า การหยุดยั้งการทำงานหรือการกำจัดศัตรูพืชออกไป หรือการทำให้ศัตรูพืชเป็นหมัน หรือการทำให้พ้นสภาพความมีชีวิต เช่น การบำบัดด้วยความร้อน การฉายรังสี การรมแก๊ส กับสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออก ตลอดจนการออกใบรับรองสุขอนามัยพืชกับสินค้าที่ประเทศผู้นำเข้ามีมาตรการสุขอนามัยพืชเฉพาะ เช่น การส่งออกมะม่วงมังคุด และส้มโอไปยังญี่ปุ่น

4. กลุ่มงานเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกัน มีหน้าที่ดำเนินการเฝ้าระวัง เพื่อรวบรวมและบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับการเกิดขึ้นหรือการไม่ปรากฏของศัตรูพืชโดยการสำรวจ การติดตาม หรือวิธีดำเนินการอื่น ๆ ซึ่งปฏิบัติงานร่วมกับกลุ่มวิจัยต่าง ๆ ภายในสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งที่ผ่านมาได้ดำเนินการสำรวจและติดตาม รวมถึงการรายงานการเกิดขึ้น การปรากฏ หรือการไม่ปรากฏของศัตรูพืช ตลอดจนการควบคุมไปยังอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ เช่น หนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด (*Spodoptera frugiperda*) หนอนใบมะเขือเทศ (*Phthorimaea absoluta*) ไวรัสสาเหตุโรคใบด่างมันสำปะหลัง (*Sri Lankan cassava mosaic virus*) นอกจากนี้ ยังได้ดำเนินการการสำรวจและติดตามสถานะของศัตรูพืชเพื่อเป็นข้อมูลประกอบการเข้าสู่ตลาดสินค้าเกษตรของไทย รวมถึงการเฝ้าระวังศัตรูพืชที่ยังไม่ปรากฏพบในประเทศไทย และศัตรูพืชที่เป็นข้อกังวลของคู่ค้า ซึ่งงานกักกันพืชถือเป็นเครื่องมือเชิงปฏิบัติหรือวิธีดำเนินการด้านสุขอนามัยพืช ส่วนการอารักขาพืชระหว่างประเทศเป็นแนวทางเชิงนโยบายและยุทธศาสตร์ โดยทั้งสองส่วนเสริมกัน ทั้งนี้ งานกักกันพืชช่วยในการสกัดกั้น การปฏิเสธสินค้าที่ส่งมอบที่

นำเข้า เนื่องจากความผิดพลาดที่ไม่ปฏิบัติตามระเบียบข้อบังคับสุขอนามัยพืช หรือการตรวจพบศัตรูพืช ในขณะที่ทำการตรวจสอบหรือทดสอบสินค้าที่ส่งมอบที่นำเข้า ในขณะที่การอารักขาพืช ระหว่างประเทศช่วยสร้างระบบป้องกันที่ครอบคลุมทั้งระดับชาติและนานาชาติ

แม้ว่างานกักกันพืชจะเป็นมาตรการสำคัญ แต่อาจไม่เพียงพอ เนื่องจากการค้าระหว่างประเทศมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว การพัฒนาระบบอารักขาพืชระหว่างประเทศจึงมีความจำเป็นเพื่อรองรับการเปลี่ยนแปลง เช่น การใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการตรวจสอบศัตรูพืช การใช้ฐานข้อมูลกลางในการแลกเปลี่ยนข้อมูล และการเสริมสร้างความร่วมมือระหว่างประเทศ ตลอดจนการพัฒนา ปรับปรุง แก้ไขตัวบทกฎหมายด้านการกักกันพืชให้เหมาะสมสอดคล้องกับสภาพการณ์และอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ

สุดท้ายนี้ จะเห็นได้ว่างานกักกันพืชและการอารักขาพืชระหว่างประเทศมีบทบาทสำคัญต่อความมั่นคงทางเกษตรของประเทศ โดยเฉพาะในยุคที่การค้าและการเคลื่อนย้ายสินค้าเกษตรเป็นไปอย่างรวดเร็วและไร้พรมแดน การผนวกทั้งสองแนวทางเข้าด้วยกัน จะช่วยให้ประเทศไทยสามารถป้องกัน ควบคุม และลดความเสี่ยงจากศัตรูพืชต่างถิ่นหรือศัตรูพืชกักกันได้ อย่างยั่งยืน

เอกสารประกอบการเรียบเรียง

- กรมวิชาการเกษตร. 2533. การกักกันพืชในประเทศไทย. เอกสารวิชาการ เล่มที่ 13 ฝ่ายวิชาการ กักกันพืช กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรุงเทพฯ. 83 หน้า.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2025. International Plant Protection Convention. Available at: [https:// www.ippc.int/en/](https://www.ippc.int/en/). Accessed: September 15, 2025.
- IPPC Secretariat. 2023. Glossary of phytosanitary terms. International Standard for Phytosanitary Measures No. 5. Rome, FAO on behalf of the Secretariat of the International Plant Protection Convention.
- IPPC Secretariat. 2024. International Plant Protection Convention (1997). Second edition. Rome, FAO on behalf of the Secretariat of the International Plant Protection Convention.
- Johanna, M. 2018. The Origin of the Word 'Quarantine'. Available at: [https:// www.sciencefriday.com/articles/the - origin - of - the - word - quarantine/](https://www.sciencefriday.com/articles/the-origin-of-the-word-quarantine/). Accessed: September 15, 2025.
- WTO (World Trade Organization). 2025. Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures. Available at: https://www.wto.org/english/docs_e/legal_e/sps_e.htm. Accessed: September 15, 2025.

คำแนะนำสำหรับผู้เขียนนี้ใช้กับบทความที่ตีพิมพ์

ในวารสารวิจัยและพัฒนาอารักขาพืช

ต้นฉบับ: พิมพ์ด้วยโปรแกรมพิมพ์เอกสารใช้ font TH SarabunPSK ขนาด 16 pts

พิมพ์บรรทัดห่าง 1 บรรทัด พิมพ์หน้าเดียว

มีความยาว 12 - 20 หน้า กระดาษขนาด A4 มีรูปแบบการเขียนและการวางหัวข้อตามรายละเอียดดังนี้

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย)

ชื่อเรื่อง(ภาษาอังกฤษ)

(ภาษาไทย) ชื่อ สกุล^{1/} (ผู้แต่งคนที่ 1) ชื่อ สกุล^{2/} (ผู้แต่งคนที่ 2)

(ภาษาอังกฤษ) ชื่อ สกุล^{1/} (ผู้แต่งคนที่ 1) ชื่อ สกุล^{2/} (ผู้แต่งคนที่ 2)

ABSTRACT

สรุปความสำคัญของเรื่องที่ทดลอง วัตถุประสงค์ วิธีการทดลอง สถานที่ เวลาทำการทดลอง ผลการทดลอง และสรุปสาระสำคัญที่ได้จากการทดลอง เป็นภาษาอังกฤษใช้สำนวนรัดกุมและให้รายละเอียดที่ชัดเจน มีความยาวไม่เกิน 300 คำ

Keywords: ไม่เกิน 5 คำ

บทคัดย่อ

มีเนื้อหาสาระเช่นเดียวกันกับบทคัดย่อภาษาอังกฤษ (ABSTRACT) ควรจะอยู่ในหน้าเดียวกันกับบทคัดย่อภาษาอังกฤษ (ถ้าเป็นไปได้)

คำสำคัญ: ไม่เกิน 5 คำ

^{1/} ที่อยู่ของหน่วยงานของผู้แต่งคนที่ 1 (ภาษาไทย)

^{1/} ที่อยู่ของหน่วยงานของผู้แต่งคนที่ 1 (ภาษาอังกฤษ)

^{2/} ที่อยู่ของหน่วยงานของผู้แต่งคนที่ 2 (ภาษาไทย)

^{2/} ที่อยู่ของหน่วยงานของผู้แต่งคนที่ 2 (ภาษาอังกฤษ)

* Corresponding author:

บทนำ

อธิบายถึงเหตุผล ความสำคัญ วัตถุประสงค์และเป้าหมายของงานวิจัยพร้อมทั้งเสนอข้อมูลสนับสนุน หรือโต้แย้งจากการตรวจเอกสาร

อุปกรณ์และวิธีการ

อธิบายการวางแผนการทดลอง ขนาดแปลงทดลอง และรายละเอียดของวิธีการดำเนินการทดลอง วัน เวลา และสถานที่ทดลอง วิธีการบันทึกข้อมูล ใช้สำนวนที่ไม่เินเยื่อ และให้รายละเอียดเป็นขั้นตอน ที่ชัดเจน

ผลการทดลองและวิจารณ์

อธิบายผลการทดลองที่สำคัญ อ้างอิงถึงตาราง กราฟ หรือรูปประกอบพร้อมเหตุผลสนับสนุน ผลการทดลอง และวิจารณ์เหตุผลที่ทำให้ผลการทดลองเป็นเช่นนั้น รวมทั้งอ้างอิงผลการทดลองของผู้อื่น (จากเอกสารอ้างอิงในบทนำ หรืออุปกรณ์และวิธีการ) เพื่อสนับสนุนหรือคัดค้านผลการทดลองนั้น ๆ

สรุปผลการทดลอง

สรุปสาระสำคัญของผลการทดลอง คำแนะนำในการนำไปใช้ประโยชน์ และข้อเสนอแนะในงานวิจัย เรื่องนั้น ๆ ในอนาคต (ถ้ามี)

คำขอบคุณ

กล่าวถึงบุคคลและหน่วยงานที่ช่วยเหลืองานวิจัยและทดลอง

เอกสารอ้างอิง หรือบรรณานุกรม

ตัวอย่างการเขียนเอกสารอ้างอิง ตามตัวอย่าง

ตาราง

ชื่อตารางและรายละเอียดเป็นภาษาอังกฤษ เรียงตั้งแต่ Table 1 เป็นต้นไป

ภาพประกอบ

ภาพขาวดำ หรือภาพสี หรือภาพลายเส้น (กราฟ) เป็นต้นฉบับที่ชัดเจน สะอาดและสวยงามพร้อม คำบรรยายเป็นภาษาอังกฤษเรียงตั้งแต่ Figure1 เป็นต้นไป

ตัวอย่างการเขียนเอกสารอ้างอิง

1. การตรวจเอกสาร ในเรื่องของคำนำหรือ อุปกรณ์และวิธีการ หรือ ผลการทดลอง

ตัวอย่างการเขียน

- โกศล (2523) หรือ (โกศล, 2523)
- อัมจิตและคณะ (2535) หรือ (อัมจิตและคณะ, 2535)
- Kreb (1978) หรือ (Kreb, 1978)
- Lekakul et al. (1977) หรือ (Lekakul et al., 1977)

ถ้าเอกสารไม่ปรากฏชื่อผู้เขียนให้ใช้

- นิรนาม (2529) หรือ (นิรนาม, 2529)

2. เอกสารอ้างอิงหรือบรรณานุกรม

รวมอยู่ในบัญชีเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง ดังนี้

2.1 การเรียงลำดับเอกสาร

- ให้เอกสารภาษาไทยอยู่ในส่วนแรกและเอกสารภาษาต่างประเทศอยู่ในส่วนที่สอง
- ให้เรียงชื่อผู้แต่งตามอักษรแต่ละภาษา
- ผู้แต่งชื่อเดียวกัน มีเอกสารมากกว่า 1 ฉบับ
- ถ้าตีพิมพ์ในปีต่าง ๆ กัน ให้เรียงปีที่พิมพ์จากน้อยไปหามาก
- ถ้าตีพิมพ์ในปีเดียว ให้ใส่อักษร ก, ข, ค หรือ a, b, c กำกับในเนื้อเรื่องที่อ้างถึงก่อนและหลังตามลำดับ

2.2 ประเภทของเอกสาร

ก. ตำรา

แบบการเขียน

ชื่อผู้แต่ง. ปี. ชื่อหนังสือ. ชื่อสำนักพิมพ์ จังหวัด. จำนวนหน้า.

ตัวอย่างการเขียน

โกศล เจริญสม. 2523. แตนเบียนคาซิดอยด์. เอกสารพิเศษ ฉบับที่ 3 ศูนย์วิจัยและควบคุมศัตรูพืช

โดยชีววินทรีย์แห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
กรุงเทพฯ. 301 หน้า.

สะอาด บุญเกิด จเร สดากกร และทิพย์พรรณ สดากกร. 2523. ชื่อพรรณไม้ในเมืองไทย. กองทุนจัดพิมพ์ตำรา
ป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 657 หน้า.

Holm, G.L., D.L. Plucknett, J.V. Pancho and J.P. Herberger. 1997. *Imperata cylindrical* (L.) Beauv.
pp. 62-71. In: The World 's Worst weeds, Distribution and Biology. Honolulu, University
Press of Hawaii.

Krebs, C.J, 1978. Ecology: The Experimental Analysis, Distribution and Abundance. 2nd Ed. H.A.
Harper and C.B. Row, (eds.) N.Y. 978 p.

ข. วารสาร Newsletter และ Bulletin

แบบการเขียน

ชื่อผู้แต่ง. ปี. ชื่อเรื่อง. ชื่อวารสารหรือชื่อ Newsletter หรือชื่อ Bulletin. ปีที่(เล่มที่): หน้า-หน้า.

ตัวอย่างการเขียน

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2524. วิธีการเขียนบทความทางวิชาการวิทยาศาสตร์. วารสารสงขลานครินทร์. 3(1): 27-43.
Sharwa, A.D. and C.I. Jandalk. 1986. Studies on Recycling of Pleurotus Waste. Mushroom Newsletter for the Tropics. 3: 13-15.
Yano, K. 1979. Effect of Vegetable Juice and Milk on Alkylating activity of n-methyl-n-nitrourea. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 27:2456-2458.

ค. รายงานประจำปี

แบบการเขียน

ชื่อผู้แต่ง. ปี. ชื่อเรื่อง. หน้า-หน้า. ชื่อรายงานประจำปี พ.ศ. หน่วยงาน.

ตัวอย่างการเขียน

กรองทอง จันทร อำนวย ทองดี และบรรจง สิกษะ มณฑล. 2522. การศึกษาหาวิธีการปลูกหอมแดงในภาคเหนือ. หน้า 5-20. ใน: รายงานสรุปผลการทดลองพืชสวน 2522. กองพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.
Lewanich, A. 1974. A Taxonomic Study on the Lipdopterous Pests of Sugar Cane. pp. 511- 513. In: Annual Research Report 1974. Div. of Entomol. Snd Zool, Dept. of Agric., Bangkok.

ง. รายงานการประชุม

แบบการเขียน

ชื่อผู้แต่ง. ปี. ชื่อเรื่อง. หน้า-หน้า. ชื่อรายงานการประชุมถ้ามีตัวย่อสากลให้พิมพ์ตัวย่อ ครั้งที่ (ถ้ามี) วัน เดือน ปีที่มีการประชุม สถานที่ประชุม.

ตัวอย่างการเขียน

พิสิษฐ์ เสพสวัสดิ์ ศรีสมร พิทักษ์ เตือนจิตต์ สัตยาวิรุทธิ์ และสาทร สิริสิงห์. 2523. ประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงบางชนิดกับหนอนเจาะฝักถั่วเหลือง. หน้า 492-523. ใน: รายงานการประชุมวิชาการแมลงและสัตว์ศัตรูพืช ครั้งที่ 2 กองกีฏและสัตววิทยา. 24-27 มิถุนายน 2532 ณ ศูนย์วิจัยการอารักขาข้าวกรุงเทพฯ.
Magee, P.N. 1992. The Future of Research on Chemical Carcinogenesis. pp 11. In : 2rd Princess Chulabhorn Science Congress. Nov. 2-6, 1992. Bangkok.

จ. เอกสารไม่ปรากฏชื่อผู้เขียน

แบบการเขียน

ให้ใช้คำว่า นิรนาม หรือ Anonymous แทนชื่อตามด้วยปี พ.ศ. หรือ ค.ศ. ที่ตีพิมพ์ และใช้วิธีการเขียนตามประเภทของเอกสารนั้นๆดังที่กล่าวมาข้างต้น

ตัวอย่างการเขียน

นิรนาม. 2520. สัตว์ศัตรูอ้อย. วารสารกสิกรรมไร้อ้อย. 1:445-449.

Anonymous. 1989. Krung Thai Bank Annual Report 1989. Bangkok. 80 p.

ฉ. สื่อวิชาการทาง Website

แบบการเขียน

ชื่อผู้แต่ง. ปีที่พิมพ์. (กรณีไม่ปรากฏให้ใช้ n.d. หรือ ม.ป.ป.) ชื่อเรื่องของเอกสาร. แหล่งข้อมูล: (ระบุ URL) สืบค้น: (วัน เดือน ปี).

ตัวอย่างการเขียน

นิรนาม. 2556. ชาน้ำมัน (*Camellia oleifera* Abel). ศูนย์วิจัยและพัฒนาชาน้ำมันและพืชน้ำมัน มูลนิธิชัยพัฒนา. แหล่งข้อมูล: <http://www.teaoilcenter.org/index.php/2013-12-01-03-05-52/2013-12-01-03-12-54/entry/camellia-oleifera-abel>. สืบค้น: 20 พฤษภาคม 2559.

FSANZ. 2007. Final assessment report. Application A565. Use of nisin in processed meat products .Food Standards Australia New Zealand. Available at: <http://www.foodstandards.gov.au/code/applications/documents/A565-FAR-Nissin-Final.pdf>. Accessed: March 22, 2015.

Journal of Plant Protection Research and Development

Advisors:	Director of Plant Protection Research and Development Office	
Editor:	Dr. Yuvarin Boontop	Entomologist, Senior Professional Level
Assistant Editor:	Dr. Chamaiporn Buamas	Entomologist, Senior Professional Level
	Tanchanok Sreemuang	Agricultural Research Officer, Senior Professional Level
	Amonrat Kitjaideaw	Plant Pathologist, Professional Level
	Natsuda Bandengsawan	Agricultural Research Officer, Professional Level
	Nathawan Chanachote	Agricultural Research Officer, Practitioner Level
Editorial Board:	Senior Expert in Plant Protection (Advisory Level)	
	Expert in Plant Diseases (Plant Pathologist, Expert Level)	
	Expert in Plant Pests (Entomologist, Expert Level)	
	Expert in Plant Quarantine (Agricultural Research Officer, Expert Level)	
	Expert in Weeds (Agricultural Research Officer, Expert Level)	
	Udon Unahawutti	
	Chompoonut Chanyapate	Kriengkrai Jumroenma
	Dr. Manita Kongchuensin	Pichate Chowattanawong
	Dr. Pornpimon Athipunyakom	Dr. Siriporn Zungsontiporn
	Sarute Sudhi-Aromna	Dr. Chonticha Rakkrai
	Dr. Pruettichat Punyawattoe	Entomologist, Senior Professional Level
	Srijumnun Srijuntra	Entomologist, Senior Professional Level
	Dr. Tridate Khaithong	Plant Pathologist, Senior Professional Level
	Dr. Chanintorn Doungsa-ard	Plant Pathologist, Senior Professional Level
	Tippawan Kanhayart	Plant Pathologist, Senior Professional Level
	Dr. Phoowanatth Maneechoat	Plant Pathologist, Senior Professional Level
	Wasana Ridthaisong	Agricultural Research Officer, Senior Professional Level
	Vichan Watthanakaiwan	Zoologist, Senior Professional Level
	Satip Malee	Entomologist, Professional Level
	Dr. Wanaporn Wongnikong	Entomologist, Professional Level
	Sukhontip Sombut	Agricultural Research Officer, Professional Level
	Terdphong Mahawong	Agricultural Research Officer, Professional Level
Manager:	Director of Research Project Administrative Group, PPRD	
Objective:	To disseminate knowledge and research on plant diseases, insect and animal pests, weeds, and quarantine pests, and to support agricultural researchers in publishing their innovative research and technological advancements in plant protection for the benefit of the public.	
Production:	Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture	
Office:	50 Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 19000, Thailand	
Telephone No:	0 - 2579 - 5583	Email: j.ofplantprotect@gmail.com
Website:	https://www.doa.go.th/plprotect/?page_id=14053	



ISSN XXXX-XXXX (Online)

JOURNAL OF PLANT PROTECTION RESEARCH AND DEVELOPMENT

Volume 1 No. 1 July - September 2025

CONTENTS

EDITORIAL

RESEARCH PAPERS

- Species Identification of Mealybug Genus *Planococcus* Ferris, 1950 based on Morphological Character and Molecular Techniques.....1
Chamaiporn Buamas Yuvarin Boontop Charuwat Taekul Sunadda Chaovalit
- Accurate and Rapid Identification of Economically Important Fruit Flies Using Duplex and Multiplex PCR Techniques.....16
Yuvarin Boontop Nuttima Kositcharoenkul Nathamon Kaewnuy Chutikarn Jailae
- Development Polymerase Chain Reaction technique for detection of *Trichoderma asperellum*.....31
Chanintorn Doungsa-ard Manorat Sudsanguan Wanwisa Pet-amphai Suneerat Seemadua Amonrat Kitjaideaw Suttinee Likhitrakulrung
- Acute Oral Toxicity and Acute Dermal Toxicity Study of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 in Rats.....43
Thasdaw Katenate Vichan Watthanakaiwan Somkiat Klakhang Suphakorn Wongruenpibool
- *Xanthomonas* Species Causing Bacterial Spot on Tomato and Chili in Thailand.....58
Tippawan Kanhayart Nuttima Kositcharoenkul Wanpen Srichart Buranee Puawongphat Rungnapha Thong kreng Kanchana Srimai
- Production and Thermal Death of Bulbils of Fishtail Oxalis (*Oxalis latifolia* Kunth).....74
Ansaya Promma Watchara Sangthong Tanchanok Sreemuang Nichakon Jaidee
- Evaluation of Insecticide Resistance in Striped Flea Beetle, *Phyllotreta sinuata* Stephens damaging Cruciferous Vegetables.....85
Thitinicha Chaichana Korakot Ratanamahamaneekorn Jiraphat tasee Srijumnun Srijuntra

ARTICLES

- Banana Wilt Disease and Integrated Management.....102
Nuttima Kositcharoenkul Chonticha Rakkrai Tippawan Kanhayart Rungnapha Thong kreng
- Plant Quarantine and International Plant Protection Missions.....110
Alongkot Phodee Wasana Ridthaisong