รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การวินิจฉัยทางชีวโมเลกุลและวิธีกำจัดเพลี้ยไฟในบัวหลวงเพื่อการส่งออก

Molecular Diagnosis and Phytosanitary Treatment of Thrips on Lotus for Export

โดย

รศ. ดร. สุวรินทร์ บำรุงสุข

RCH
QL
598.3
.T4
ส875ก

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....120293
วัน, เดือน, ปี13 ก.ค. 2555

b.12337745
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวินิจฉัยทางชีวโมเลกุลและวิธีกำจัดเพลี้ยไฟในบัวหลวงเพื่อการส่งออก

Molecular Diagnosis and Phytosanitary Treatment of Thrips on Lotus for Export

Abstract

Molecular identification of *Frankliniella schultzei*(Trybom) and *Scirtothrips dorsalis* Hood were studied by ITS-RFLP analysis. The primer 28Z 5' AGACTCCTTGGTCCGTGTTTC 3' and P1 5' ATCACTCGGCTCGTGGATCG 3' amplified rDNA which contained ITS2 and fragment size for *F. schultzei* and *S. dorsalis* were 1361 and 1403 bp, respectively. Moreover, the different pattern of RFLP could be observed by using *Alu*I, *Hae*III, *MSP*I and *Hinf*I.

The ITS2 region of *F. schultzei* and *S. dorsalis* were analyzed by using BioEdit program version 7.0.5.3 to reveal the phylogenetic relationship among *F. schultzei* and *S. dorsalis* and the other described thrips species in the GenBank/EMBI. The results show that both thrips had evolved from the same ancestor, however *F. schultzei* was earlier developed before *S. dorsalis*.

The postharvest treatment for thrips on lotus flowers var. Sattabongkot by insecticidal dipping with different concentrations of acetamiprid and imidacloprid were conducted, and 100 percent mortality of thrips was found after dipping 12 hours with acetamiprid at 10 gm/20 l. or with imidacloprid at 30 ml/20 l. Whereas, lotus flowers under carbondioxide fumigation and stored at 25°C showed that carbondioxide at the concentration of 4.67 kg/cm^{2}was the best treatment and caused 100 percent of thrips mortality three hours after the experiment.

บทคัดย่อ

การจำแนกชนิดของ *Frankliniella schultzei* และ *Scirtothrips dorsalis* ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยเทคนิคITS-RFLP การเพิ่มปริมาณไรโบโซมอลดีเอ็นเอซึ่งมีส่วนของITS2ของเพลี้ยไฟทั้งสองชนิดด้วยไพรเมอร์ 28Z 5' AGACTCCTTGGTCCGTGTTTC 3' and P1 5' ATCACTCGGCTCGTGGATCG 3'และขนาดของดีเอ็นเอผลผลิตของ *F. schultzei* และ *S.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

dorsalis เท่ากับ 1361และ 1403 bp ตามลำดับ เมื่อใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิดได้แก่ *Alu*I, *Hae*III, *MSP*I และ *Hinf*I ทำให้เกิดรูปแบบโพลิมอร์ฟิซึมที่แตกต่างกัน

เมื่อทำการเปรียบเทียบบริเวณITS2ของ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* กับเพลี้ยไฟชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานใน GenBank/EMBIด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.0.5.3 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเพลี้ยไฟพบว่าเพลี้ยไฟทั้งสองชนิดมีประวัติทางวิวัฒนาการของบรรพบรุษร่วมกัน และ *F. schultzei* มีกำเนิดมาก่อน *S. dorsalis*

การกำจัดเพลี้ยไฟหลังการเก็บเกี่ยวโดยการจุ่มดอกบัวหลวงพันธุ์สัตบงกชด้วยสารฆ่าแมลงอิมิดาคลอพริดและอะเซทรามิพริดที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าการจุ่มด้วยอิมิดาคลอพริด อัตรา 30 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร และอะเซทรามิพริด อัตรา 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตรเป็นเวลา 1 นาที ทิ้งไว้นาน 12 ชั่วโมงให้ผลดีที่สุด ทำให้เพลี้ยไฟตาย 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการรมดอกบัวด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนั้น พบว่าคาร์บอนไดออกไซด์ที่อัตรา ความเข้มข้น 4.67 กิโลกรัมต่อตา-รางเซนติเมตร เป็นวิธีการที่ดีที่สุดเนื่องจากเพลี้ยไฟตาย 100 เปอร์เซ็นต์ 3 ชั่วโมงหลังการรม

คำนำ

บัวหลวง (Lotus) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Nelumbo nucifera* Gaertn อยู่ในวงศ์ Nymphaeceae ถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบเอเชีย เช่นในประเทศจีน อินเดีย และไทย เป็นพืชที่ใช้ประโยชน์ได้หลากหลายและนำส่วนต่างๆมาใช้ได้เกือบทั้งหมด นอกจากจะใช้ประโยชน์ในแง่ไม้ตัดดอกแล้ว ยังสามารถปลูกบัวเพื่อวัตถุประสงค์อื่น เช่น เก็บเมล็ด ขายฝักอ่อน ขายใบสดหรือใบแห้ง ขายไหลหรือรากบัว (สุปราณี, 2540) ส่วนอื่นๆของบัวหลวงยังมีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพรได้อีกด้วย เช่น ดีบัว มีสรรพคุณช่วยขยายหลอดเลือด แก้ความดันโลหิตสูง เมล็ดบัวช่วยบำรุงกำลัง แก้กษัยท้องร่วง สมานแผล แก้ร้อนใน เจริญอาหาร แก้พุพอง ฝักบัวช่วยขับลมสมานแผลแก้พิษเบื่อเมา แก้ท้องเสีย ก้านบัวรักษาโรคลมออกหู และแก้ท้องเดิน เหง้าบัว แก้ท้องเสีย แก้พิษ ฝีปวดบวม รักษาแผลไฟลวก ช่วยขับปัสสาวะ ใบบัว บำรุงร่างกาย แก้ไข้ ห้ามเลือด แก้ปวดฝี ปวดศีรษะ ดอกบัว แก้ท้องเสีย คลื่นไส้ แก้ไข้ เกสรตัวผู้ รักษาอาการเกี่ยวกับเลือดลมบำรุงกำลัง แก้ไข้ ขับเสมหะ ช่วยในการขับถ่าย แก้ท้องร่วง ขับปัสสาวะ บำรุงตับ(พรรณนีย์, 2546) ในด้านอาหารนั้นได้มีการนำรากบัวหลวง (rhizomes)มาใช้ประกอบอาหารซึ่งเป็นที่นิยมบริโภคอย่างมากในประเทศจีนและประเทศญี่ปุ่นมีการจำหน่ายทั้งในรูปแบบของทั้งราก หรือตัดเป็นชิ้น สด แช่แข็งหรือบรรจุกระป๋องเพราะนิยมใช้บริโภคแทนผัก โดยทั่วไปนำไปทอดหรือใส่ในซุป ในประเทศญี่ปุ่นนั้นบริโภครากบัวคิดเป็นปริมาณ1%ของผักทั้งหมดที่บริโภคภายในประเทศ ถึงแม้จะมีการผลิตได้เองภายในประเทศแต่ก็ยัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องนำเข้าจำนวนถึง 18,000 ตันต่อปี ขณะที่ ประเทศจีนผลิตได้เพียง 15,000 ตัน ซึ่งเป็นแนวทางที่เกษตรกรไทยสามารถเพิ่มการผลิตเพื่อรองรับตลาดส่งออกที่ยังขาดแคลนผลิตภัณฑ์บัวเป็นจำนวนมาก ด้านประเทศจีนตอนใต้เป็นแหล่งผลิตเมล็ดบัวที่สำคัญโดยผลิตในรูปแบบของเมล็ดแห้งซึ่งมีปริมาณประมาณพันตัน การบริโภคเมล็ดบัวแห้งนั้นส่วนมากใช้ประกอบในการทำขนม ในด้านการแพทย์ส่วนต้นอ่อนหรือดีบัวนั้นมีรสขม ซึ่งสารที่ทำให้เกิดรสนี้คือ isoquinoline allkaloid ซึ่งสามารถใช้เป็นยาซึ่งมีผลในการรักษาคือ antispasmodic effect ในใบบัวซึ่งมีรสขมก็มีสาร allkaloid เช่นกัน ในเกสรบัวมีรสหวานมีสาร flavanoids และ alkaloids เล็กน้อย(Dharmanda, 2002) มีการศึกษาสารที่อยู่ในบัวหลวงพบว่าเมื่อนำสารสกัดเมล็ดบัวมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี และยังพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของตับเนื่องจาก carbon tetrachloride และ อัฟลาทอกซิน B1 โดยมีผลทำให้ทั้งการทำลายเซลล์และระดับเอนไซม์ลดลง(Sohn *et al.*, 2003)

เนื่องจากบัวมีประโยชน์หลากหลายดังกล่าวจึงมีแนวโน้มที่จะนำมาพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจได้ในอนาคต เพราะนอกจากจะจำหน่ายในประเทศแล้วยังสามารถส่งออกไปยังต่างประเทศได้อีกด้วย ปี 2547 ประเทศไทยมีการส่งออกในรูปของดอกบัว 0.69 ล้านบาท ในรูปเมล็ด 4.3 ล้านบาท ในรูปใบสดและใบแห้ง 0.44 ล้านบาท (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2549) แต่ในการผลิตบัวเป็นการค้านั้นเกษตรกรผู้ปลูกบัวมักประสบปัญหาการป้องกันกำจัดศัตรูพืชเช่นเดียวกับพืชอื่นทั่วไป แมลงที่เป็นศัตรูสำคัญของบัวได้แก่ เพลี้ยไฟที่ทำลายดอก (*Frankliniella* sp.) เข้าทำลายดอกทำให้กลีบดอกไหม้ เพลี้ยไฟที่ทำลายใบ (*Selenothrips rubrocintus* Giard) ทำลายเนื้อเยื่อของใบ ผีเสื้อหนอนกระทู้ผัก(*Spodoptera litura* Fabricius) และผีเสื้อหนอนบุ้งกินบัว(*Simyra conspersa* Moore) โดยหนอนผีเสื้อทั้งสองชนิดจะเข้าทำลายใบ และหนอนวัยที่ 3 และที่ 4 จะเป็นระยะที่ทำลายใบบัวมากที่สุด (สุวรินทร์ และธรรมทิพย์, 2546) สำหรับเพลี้ยไฟนั้นจัดเป็นแมลงที่ป้องกันกำจัดได้ยากที่สุดเนื่องจากมีขนาดเล็กและหลบอาศัยอยู่ในดอกบัวและใต้ใบบัว และเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะระบาดได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งปัจจุบันเกษตรกรใช้วิธีฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นหลักในการป้องกันกำจัด แต่เป็นไปอย่างไม่มีประสิทธิผลและทำให้ต้นทุนการผลิตสูงและก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจึงมีความจำเป็นต้องกำจัดเพลี้ยไฟในดอกบัวก่อนการส่งออก เนื่องจากเพลี้ยไฟเป็นแมลงศัตรูพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอันดับหนึ่งของบัวหลวง แต่ข้อมูลที่เกี่ยวข้องมีน้อยมาก จึงสมควรมีการศึกษาด้านชีววิทยาและการจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟศัตรูบัวโดยวิธี ITS-RFLP (restriction fragment length polymorphism of the amplified internal transcribed spacer region of ribosomal DNA) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานนำไปพัฒนาวิธีการป้องกันกำจัดและกระบวนการในการวินิจฉัยและการจำแนกชนิดของศัตรูพืชแบบใหม่ที่นอกเหนือจากวิธีทางสัณฐานวิทยา ตลอดจนวิธีการกำจัดเพลี้ยไฟในดอกบัวหลวงเพื่อการส่งออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อจำแนกชนิดของ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* โดยวิธี ITS- RFLP
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์กับชีวประวัติทางวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ *F. schultzei* และ *S. dorsalis*
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพสารอิมิดาคลอพริด และอะเซทดามิพริดในการกำจัดเพลี้ยไฟที่ดอกด้วยวิธีการจุ่มและผลต่อคุณภาพและอายุการใช้งานของดอกบัวหลวง ตลอดจนปริมาณสารตกค้างของอิมิดาคลอพริด และอะเซทดามิพริดที่พบในดอกบัว
4. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในการกำจัดเพลี้ยไฟในดอกบัวหลวง *F. schultzei* และผลต่อคุณภาพและอายุการใช้งานของดอกบัวหลวง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟในระดับโมเลกุล

อุปกรณ์

1. หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร (eppendorf tube)
2. หลอดพีซีอาร์ (PCR tube)
3. ไมโครปิเปต และไมโครปิเปตทิปขนาด 2, 20, 200 และ 1000 µl
4. เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง (Ohaus รุ่น Explorer และ Precisa รุ่น XT220A)
5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (Fisher Scientific รุ่น AR 15)
6. เตาไมโครเวฟ (Sharp รุ่น R251)
7. ตู้เย็น และตู้แช่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส (Sanyo รุ่น SR-F208A และ รุ่น SF- C99-GR)
8. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ (HIRAYAMA รุ่น HVE-50)
9. เครื่องผสมสาร (Scientific Industries รุ่น Vortex-Genies2-G560E)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hermle รุ่น Z323)
11. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Ultrospec รุ่น 1100*pro*)
12. เครื่องพีซีอาร์ (MJ Research รุ่น PTC-100)
13. เครื่องอิเล็คโตรโฟเรซีส (Toyobo รุ่น Gelmate 2000)
14. กล้องถ่ายภาพและบันทึกแถบข้อมูลดีเอ็นเอพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Syngene รุ่น Gene genius)

สารเคมี

1. DNA extraction buffer (0.2 M Sucrose, 0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.05 M EDTA 0.5% SDS pH 9.2)
2. Potassium acetate (8 M)
3. Isopropanol
4. Ethyl alcohol 70%
5. Distilled water
6. DNA size markers (100 bp ladder)
7. Taq DNA polymerase(5 unit/ µl)
8. $MgCl_2$ (25 mM)
9. ไพรเมอร์สำหรับการสังเคราะห์ยีนITS2 ประกอบด้วยไพรเมอร์ 28Z 5′ AGACTCCTTGTCCGTGTTTC 3′ (Hillis and Dixon.1991)และP15′ ATCACTCGGCTCGTGTGGGATCG 3′(Severini *et al.* 1996)
10. สารละลาย dNTP mix (10 mM each)
11. Restriction enzymes (*Msp*I, *Alu*I, *Hinf*I และ *Hae*III)
12. Agarose
13. TBE buffer (1X)
14. Gel star

วิธีการ

การสกัดดีเอ็นเอของเพลี้ยไฟดัดแปลงมาจากวิธีของ Moritz *et al.* (2000)

1.บดเพลี้ยไฟ 1 ตัวให้ละเอียดในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ด้วย micropestle

2. เติม extraction buffer ในปริมาณ 40 ไมโครลิตร

3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C ทิ้งไว้ 30 นาที

4. เติมสารละลาย 8 M potassium acetate จำนวน 6 ไมโครลิตร

5. นำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที

6. นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนเก็บไว้

7. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol จำนวน 46 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนทิ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 70% จำนวน 100 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอ12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนทิ้ง ทำขั้นตอนนี้ซ้ำสองครั้ง

9. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เอธิลแอลกอฮอล์ระเหยจนแห้ง หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นจำนวน 16 ไมโครลิตรละลายตะกอนดีเอ็นเอเพื่อนำไปใช้ในการนำไปทำ PCR ในลำดับต่อไป

การทำ PCR (Polymerase chain reaction) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Moritz *et al.* (2000)

1. เตรียมส่วนผสม master mix ที่ประกอบด้วย buffer, $MgCl_2$, dNTP, ไพรเมอร์ 28 Z และ ไพรเมอร์P1, Taq DNA polymerase และ น้ำกลั่น

2. แบ่ง master mix ใส่หลอดทดลองขนาด 1.2 มิลลิลิตร โดยแต่ละหลอดมีความเข้มข้นของสารที่ปริมาตรสุดท้าย 25 ไมโครลิตร ดังนี้ dNTP 400 μM, buffer 1X, primer 400 pmol, $MgCl_2$ 2.5 mM และ Taq DNA polymerase 0.04 unit

3. ใส่ดีเอ็นเอของเพลี้ยไฟแต่ละชนิดลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่เตรียม master mix เรียบร้อย

4. ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ลงในเครื่อง พีซีอาร์ ตามเงื่อนไขดังนี้

95 องศาเซลเซียส	3 นาที	1 รอบ
95 องศาเซลเซียส	45 วินาที	29 รอบ
57 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
72 องศาเซลเซียส	4 นาที	1 รอบ

การทำอาร์เอฟแอลพี

นำ PCR product ที่ได้ซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 630 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรจำนวน 5 μl ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Msp*I, *Alu*I, Hinf I และ *Hae*III เพื่อดูการเกิดอาร์เอฟแอลพีของเพลี้ยไฟแต่ละชนิด โดยมีส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาในปริมาตรทั้งหมด 10 μl ได้แก่ ดีเอ็นเอ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ สารละลายบัฟเฟอร์ 10x และ เอ็นไซม์ 5 Unit และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนี้ไปตรวจด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสเพื่อทำการบันทึกภาพและนำไปวิเคราะห์ผล

2. การศึกษาความสัมพันธ์และประวัติการวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ ในบัวหลวง

อุปกรณ์

1. เครื่อง Automated DNA Sequencer (GMI, Inc.รุ่นABI 377)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เครื่องประมวลผลพร้อมโปรแกรม Clustal W Multiple alignmentและ โปรแกรม DNADIST(BioEdit version 7.0.5.3)
3. ไพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์ M13Fและไพรเมอร์ M13R
4. พลาสมิดสำหรับการโคลนยีน พลาสมิด pGEM-Teasy
5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางอณูชีววิทยาบนเครือข่ายอินเตอร์เนต

5.1 โปรแกรม Blast จาก website http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/ สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างสายดีเอ็นเอที่สนใจกับฐานข้อมูล

5.2 โปรแกรมClustal W Multiple Alignmentและ โปรแกรมDNADISTใน BioEdit version 7.0.5.

วิธีการ

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเพลี้ยไฟ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* ทำการโคลนด้วยเวคเตอร์ pGEM-T Easy และเลือกโคลนที่บรรจุยีนไปวิเคราะห์ลำดับเบสโดยนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้บางส่วนวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีนที่มีรายงานในต่างประเทศด้วย website http://www.ncbi.nlm.nih.gov/chi-bin/Blast และออกแบบไพรเมอร์ใหม่จากลำดับเบสของดีเอ็นเอเพลี้ยไฟทั้งสองชนิดที่ได้เพื่อสังเคราะห์ส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ครบทั้งโคลน จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับส่วนของยีน ITS2 ของเพลี้ยไฟชนิดอื่นๆที่มีในEMBI/GenBank ทำการเปรียบเทียบความเหมือน (identity) หรือความคล้ายด้วยโปรแกรมClustal W Multiple alignment ใน BioEdit version 7.0.5.3 กับยีนที่มีอยู่ใน EMBI/GenBank เพื่อนำไปหาความสัมพันธ์ phylogenetic tree ของเพลี้ยไฟศัตรูบัวหลวงต่อไป

3. การป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟหลังการเก็บเกี่ยวโดยจุ่มสารอิมิดาคลอพริด และอะเซทรามิพริด

3.1 การจุ่มดอกบัวด้วยสารอิมิดาคลอพริด และอะเซทรามิพริด

จุ่มดอกบัวหลวงในสารฆ่าแมลงอิมิดาคลอพริด และอะเซทรามิพริด เพื่อกำจัดเพลี้ยไฟในระยะไข่ ตัวอ่อนและตัวเต็มวัย คัดเลือกดอกบัวหลวงที่เก็บจากแปลงปลูกที่ไม่มีการใช้สารกำจัดแมลงโดยให้มีมาตรฐาน เช่นเดียวกับการส่งออก มาหุ้มก้านดอกด้วยสำลีชุ่มน้ำภายหลังจุ่มด้วยสาร อิมิดาคลอพริดและ อะเซทรามิพริด นำไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 และ 25 องศาเซลเซียส การวางแผนการทดลองเป็นแบบ completely randomized design ซึ่งมี 8 วิธีๆ ละ 25 ซ้ำ

วิธีการที่ 1 จุ่มในน้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

วิธีการที่ 2 จุ่มด้วยอิมิดาคลอพริด อัตรา 10 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร

วิธีการที่ 3 จุ่มด้วยอิมิดาคลอพริด อัตรา 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร

วิธีการที่ 4 จุ่มด้วยอิมิดาคลอพริดอัตรา 30 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร

วิธีการที่ 5 จุ่มด้วยอะเซทรามิพริด อัตรา 2.5 กรัม/ น้ำ 20 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการที่ 6 จุ่มด้วยอะเซทรามิพริด อัตรา 5.0 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

วิธีการที่ 7 จุ่มด้วยอะเซทรามิพริด อัตรา 7.5 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

วิธีการที่ 8 จุ่มด้วยอะเซทรามิพริด อัตรา 10.0 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

ตรวจนับเพลี้ยไฟที่พบทั้งหมด นับจำนวนตัวตายและที่รอดชีวิต ที่เวลา 3, 6, 9, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงภายหลังการรมด้วยก๊าซ นำจำนวนแมลงที่พบในแต่ละกรรมวิธีมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การตาย บันทึกคุณภาพของดอก การเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอก วัดลักษณะสีกลีบดอกกับแผ่นเทียบสี R.H.S. Colour Chart ก่อน และหลังรม ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่ทดสอบเป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน บันทึกการเปลี่ยนแปลงของสีกลีบดอก ในระบบ Yxy colour space อ่านค่าเป็น co-ordinates ของ x, y และ z สำหรับค่า z หาได้จาก 1-x-y และนำค่าที่ได้แปลงค่าจากระบบ Yxy colour space เป็นระบบ L a b colour space โดยมีสูตรคำนวณหาค่า L, a และ b ดังนี้

$L = 10\sqrt{Y}$

(L คือความสว่าง มีค่า 0(สีดำ)-100 (สีขาว))

$a = \frac{17.5Z1.02(x-y)}{\sqrt{Y}}$ (a คือค่าสีในตำแหน่งที่อยู่บนแกน x ค่า a(+)= สีแดง a(-) = สีเขียว)

$b = 7.0(y-0.847z)$ (b คือค่าสีในตำแหน่งที่อยู่บนแกน y ค่า b(+)= สีเหลือง b(-)= สีน้ำเงิน)

อาการผิดปกติของดอก และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี Duncan's Multiple Rang Test หากพบการตายของของแมลงในกรรมวิธีควบคุม นำข้อมูลคำนวณหา corrected% โดยใช้ Schneider-Orelli's formula (Püntener W., 1981)

3.2 การตรวจสอบปริมาณสารพิษตกค้างจากการจุ่มสารอิมิดาคลอพริด และอะเซทรามิพริด

วิธีการ

นำดอกบัวระยะเก็บเกี่ยวจากแปลงทดสอบที่ไม่มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชมาทำการจุ่มดังนี้

วิธีการที่ 1 น้ำกลั่น(control)

วิธีการที่ 2 จุ่มอิมิดาคลอพริดอัตรา 30 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร

วิธีการที่ 3 อะเซทรามิพริด อัตรา 10.0 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

แล้วบรรจุลงในกล่องลูกฟูกเก็บรักษาเลียนแบบการขนส่งไปประเทศญี่ปุ่นโดยไว้ที่เก็บที่

อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

25 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง

7 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง

25 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20 องศาเซลเซียส 1–4 วัน

แล้วสุ่มตัวอย่างดอกบัวไปทำการหาการปนเปื้อนของสารดังกล่าวในวันที่ 0, 2 และ 3

การสกัดอิมิดาคลอพริดและอะเซทรามิพริดในดอกบัว นำตัวอย่างดอกบัว 10 กรัม ใส่ใน centrifuge tube เติมน้ำ 8 มิลลิลิตร ethylacetate 10 มิลลิลิตร NaCl 1 กรัม และ $MgSO_4$ 4 กรัม เขย่านาน 1 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 3500 rpm นำของเหลวที่ได้ชั้นบน 1.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดcentrifuge แล้วเติมPSA 25 มิลลิกรัม และ $MgSO_4$ 150 มิลลิกรัม ตั้งทิ้งไว้นาน 20 วินาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3500 rpm เป็นเวลา 1 นาที แบ่งของเหลวใสที่ได้ชั้นบน 1มิลลิลิตรไปทำเป่าแห้งด้วยไนโตรเจน ปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตรด้วยmobile phase(5 mM ammonium formate in water/acetonitrile อัตรา 1:1) แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณสารพิษตกค้างด้วยเครื่อง LC/MSD SL

4. การป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟโดยการรมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

วิธีการ

1. หาระดับความเข้มข้นของก๊าซที่เหมาะสมเพื่อกำจัดเพลี้ยไฟดอกบัว โดยแผนการทดลองเป็นแบบ completely randomized design ทำ 4 กรรมวิธีๆ ละ 25 ซ้ำ ดังนี้ บรรจุดอกบัวจากแปลงที่ไม่ใช้สารฆ่าแมลง ที่หุ้มก้านด้วยสำลีชุ่มน้ำ และอลูมิเนียมฟลอยด์ลงในถุงพลาสติกชนิด polypropylene ขนาด 10 x 15 นิ้ว แล้วนำเข้าเครื่องบรรจุสุญญากาศ เพื่อดูดอากาศในถุง และเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอัตรา 1.17, 2.33, 3.50 และ 4.67 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2. การบันทึกข้อมูล เพลี้ยไฟที่พบทั้งหมด โดยนับจำนวนตัวตายและตัวที่รอดชีวิต ที่เวลา 3, 6, 9, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงภายหลังการรม นำจำนวนแมลงที่พบในแต่ละกรรมวิธีมาหาเปอร์เซ็นต์การตาย บันทึกคุณภาพดอก การเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอก วัดลักษณะสีกลีบดอกกับแผ่นเทียบสี R.H.S. Colour Chart ก่อน และหลังรม ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่ทดสอบ เป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน บันทึกการเปลี่ยนแปลงของสีกลีบดอก ในระบบ Yxy colour space อ่านค่าเป็น co-ordinates ของ x, y และ z สำหรับค่า z หาได้จาก 1-x-y และนำค่าที่ได้แปลงค่าจากระบบ Yxy colour space เป็นระบบ L a b colour space โดยมีสูตรคำนวณหาค่า L, a และ b ดังนี้

$L = 10\sqrt{Y}$ (L คือความสว่าง มีค่า 0(สีดำ)-100 (สีขาว))

$a = \frac{17.5Z1.02(x-y)}{\sqrt{Y}}$ (a คือค่าสีในตำแหน่งที่อยู่บนแกน x ค่า a(+)= สีแดง a(-) = สีเขียว)

$b = 7.0(y-0.847z)$ (b คือค่าสีในตำแหน่งที่อยู่บนแกน y ค่า b(+)= สีเหลือง b(-)= สีน้ำเงิน)

หากพบการตายของกรรมวิธีควบคุม นำข้อมูลคำนวณหา corrected% โดยใช้ Schneider-Orelli's formula (Püntener, 1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

1. การจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟในระดับโมเลกุล

สกัดดีเอ็นเอตัวอย่างเพลี้ยไฟ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* ด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Moritz *et al.* (2000) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ใช้ primer 28Z(5′AGACTCCTTGGTCCGTGTTTC3′) และ P1(5′ATCACTCGGCTCGTGGATCG3′) นำ PCR product ที่ตรวจสอบโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิส ถ่ายภาพและวิเคราะห์ผลด้วย Gel Documentation System พบว่าได้ดีเอ็นเอผลผลิตของ *F. schultzei* 1361 bp และ *S. dorsalis* Hood 1403bp ตามลำดับ(ภาพที่ 1)

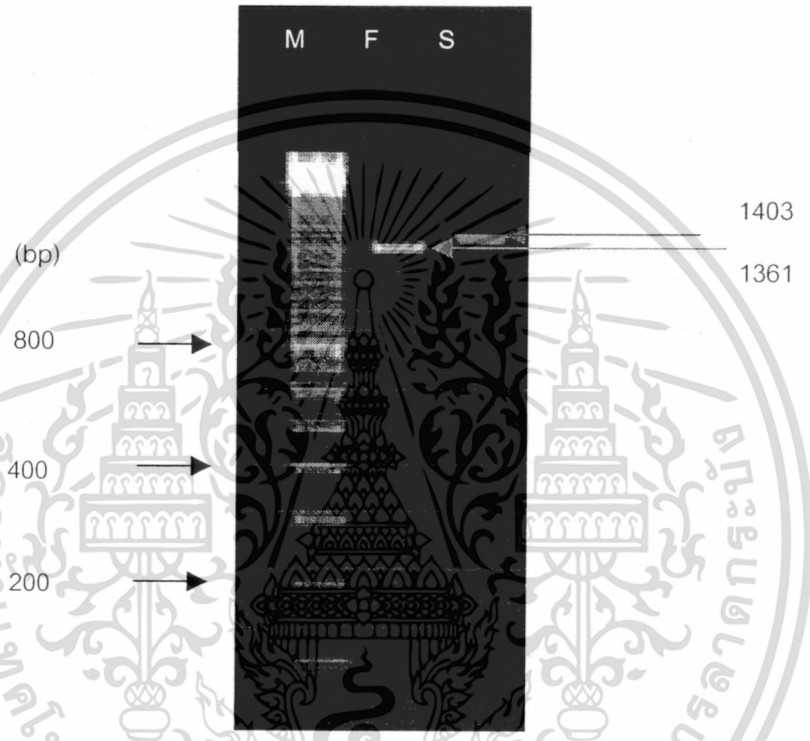
เมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอผลผลิตของเพลี้ยไฟทั้งสองชนิดดังกล่าวไปศึกษาการเกิดโพลีมอร์ฟีซึมโดยการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิดได้แก่ เอนไซม์ *Alu*I, *Hae*III, *Msp*I, และ *Hinf*I ตามลำดับ พบว่าเพลี้ยไฟทั้งสองชนิดดังกล่าว มีรูปแบบการเกิดโพลีมอร์ฟีซึมที่แตกต่าง(ภาพที่ 2)

2. ความสัมพันธ์และประวัติการวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟในบัวหลวง

การเรียงลำดับเบสของยีน

จากการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอผลผลิตของเพลี้ยไฟของ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* Hood ซึ่งมีขนาด 1361และ 1403 bp ตามลำดับ ทำการโคลนด้วยเวคเตอร์ pGEM-T Easy และเลือกโคลนที่บรรจุยีนไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencer นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้บางส่วนวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีนที่มีรายงานในต่างประเทศด้วยโปรแกรมBlast บน website http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/ พบว่า เพลี้ยไฟทั้งสองชนิดมีลำดับเบสบางส่วนที่คล้ายคลึงกับข้อมูลของลำดับเบสของเพลี้ยไฟที่มีรายงานในต่างประเทศแต่มีลำดับเบสบางส่วนที่ยังขาดหายไปจากการอ่านลำดับเบสในครั้งแรกจึงต้องออกแบบไพรเมอร์ใหม่เพื่อให้สามารถจับยีนจากลำดับเบสของดีเอ็นเอเพลี้ยไฟทั้งสองชนิดที่ได้เพื่อสังเคราะห์ส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ครบทั้งโคลน โดยได้ผลลำดับเบสบางส่วนของ rDNA ซึ่งประกอบด้วยส่วน 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 และ 28S ส่วนITS เป็นส่วนที่มีความอนุรักษ์สูง (hightly conserved sequencs) ส่วนของ ITS2 ที่อยู่ระหว่าง28 S กับ 5.8 S จะเป็นส่วนที่จะนำไปหาหาความสัมพันธ์ phylogenetic tree ของเพลี้ยไฟศัตรูบัวหลวงต่อไป บริเวณITS2 ของ *F. schultzei* อยู่ลำดับเบสที่ 858-1236 bp (ภาพที่ 3) และ *S. dorsalis* Hood อยู่ลำดับเบสที่ 864-1278 bp (ภาพที่ 4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



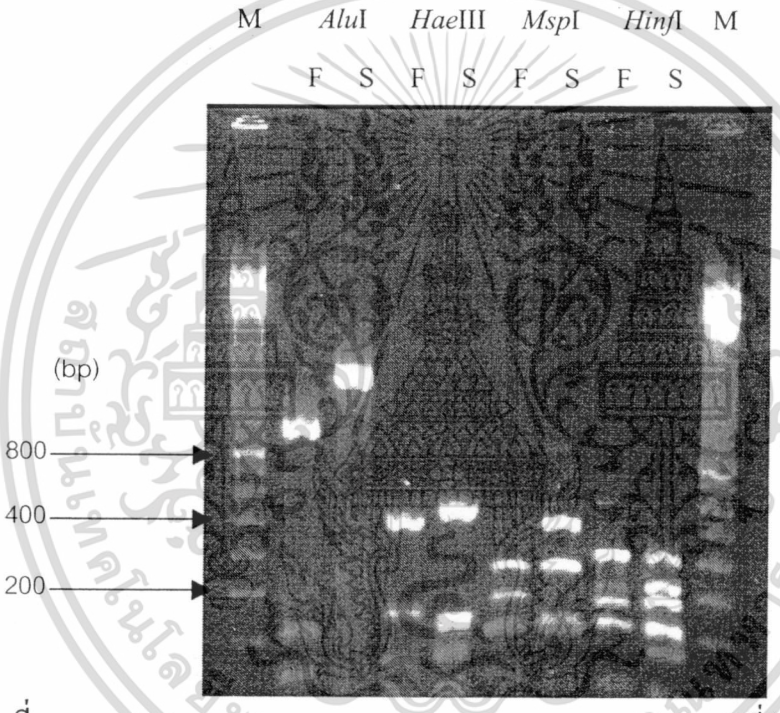
ภาพที่ 1. ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณโดยวิธีPCR ของเพลี้ยไฟ ศัตรูบัว

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

F = PCR product ของ *F. schultzei*

S = PCR product ของ *S. dorsalis* Hood

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2. ITS-RFLP pattern ของ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* Hood ที่ตัดด้วย *Alu*I, *Hae*III, *Msp*I, และ *Hinf*I

M = DNA marker

F = *F. schultzei*

S = *S. dorsalis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Primer 28Z

AGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTCGGACGAGTATCGAAAGCAGAAGCGCCGC
TGACCGGGTGCAGGCCTGTCCGAGTATAGCCCGAAACGGGCATCGAACGCATCCTCTGT
GCGGCCTCTTCCCAAGCTTTGATACCGTCGGGCGCCGATCAGGTCACCCCGGGTCCGTGC
AAACAGCAACGCGGCACGAGGCCACGCTCCGGCACGGGCTCCACCGAGGGCCAATGAA
CGGAACGATCCCAACGGGTCGCGACGTCCTACTAGGCGAGAAGTGCAGCCCACCGCACC
AGACAGATACCCCCAGGGACGAGTGACGCCGTATGACCCGAACCGAAGCCCGAGCTGA
CGACGCCATCTGAACCCGAGGGCCACCGGCGCGGTAAGCTTGAATCTCGCCATTCGGAC
TTTTCGAACTCGTCCGTTTACACCACTTCAGTTTCACGTACTCTTGAACTCTCTCTTCAAA
GTTCTTTTCACCTTTCCCTCACGGTACTTGTGTGCTATCGGTCTCGTGGTCATATTTAGCC
TTAGATGGAGTTTACCACCCACTTAAGTCTGCACTCTCAAGCAAACCGACTCTAAGGAGA
GACCCACACGACAACCGCTCCTGCTCTACGGGCCTGTCACCCTCTGTGTGGCCCCATTCA
AGTTGGACTTGAACCAGTGAGCGAGTCGCCGTGTTGACGGGCCCTCCCAAAAGTTACAT
TTCCCGCCAAGCGAGGCCCGGGGGATTCAGCGCTGGGCTCTTCCCTGTTCGCTCGCCGCT
ACTAGGGGAATCCTTGTTAGTTTTTTTTCCTCGGCTTAGTAATATGCTTAAATTCAGCGGG
TAATCTCACCTGAACTGAGGTCGTGAAAGGCGAATCGCGCGGAGGCGAAACGCAAGAG
CGAGAAATTTTGTTGCACACTTTTCCGGAACGGTTGCTCTTTATAAGGCATACCCTCAAG
TCTTCAAGACGGGCGCTGCGACGTCGAGTACGAGGACAAGAAACGTCACACACCCGCCA
ACTTTTGGCAGAACGTCTGAGGGCTGTTTAGCGCGCGGGGGCGCTCTCTGGGCATCCTTT
ATAAGACGTACCGCTTTGTACCGGCAGAGTGCTTTCTCTATACGGGATGTGACTCCCTGA
GGATTTTAAGAGTACCACGCTCGCGCGCGGAGACCCCAACCTCGCTCCAGAGATTTCTCT
CGGAACAGTCTGGTCTTTGAGTTTGGTCAACCGACCCTCAGTCAGGTGTGGCCCAGGAAC
AAGTCCTAGGGCCGCAATGTGCGTTCGAATTGTCAATGTTCATGTGTCCTGCAGTTCACA
TGGCAACGCGCAATTAGCTGCGTTCTTCATCGATCCACGAGCCGAGTGAT

Primer P1

ภาพที่ 3. ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของ *F. schultzei* 1361 bp ส่วนของดีเอ็นเอที่แรเงาสีชมพูแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์28Z และP1 ตามลำดับ ส่วนของดีเอ็นเอที่แรเงาสีน้ำเงินแสดงตำแหน่งของ Internal transcribed spacer (ITS2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Primer 28Z

AGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTCGGACGAGTATCGAAAGCAGTAGCGCCGC
TGACCGGGTACGAACCTGTCCGAGAACAGCCCGAAACGGGCATCGGACGCAACCTCTGT
GCGGTCCCTTCCCAATGCTTTGATACCGTCGAGCGCCGATCAGGTCACCCCGGGTCCGTG
CACAGCAACAGCGAGCAAGCCCACTGCCCCGGCACGGGCTCCACCAGGGGCCACGATCG
GAACAATCCCAACGGGTCGCGACGTCCTACTAGGGGAGAAGTGCAGCCCACCGCACCAG
ACAGTTACCGTCGAGTCGAGTGAATACGGAGCAAACAGCGCAGCCCGAGAGCCCGCTGC
CGACCGCACCATCTGAACCCGCCGGCCACCGGCACGGATAGGCCTGAATCTCCCCATTC
GGACTTTTCGATCTCGTCCGTTTACACCACCTCAGTTTCACGTACTCTTGAACTCTCTCTT
CAAAGTTCTTTTCACCTTTCCCTCACGGTACTTGTGTGCTATCGGTCTCGTGGTTATATTT
AGCCTTAGATGGAGTTTACCACCCACTTAGGTCTGCACTCTCAAGCAAACCGACTCTAAG
GAGAGGCCCACACGGCGAACGCTTCTGCTCTACGGGCCTGTCACCCTCTGTGTGGCCCCA
TTCAAGTTGGACTTGAGCGAGCCGCGATGCGCCGTGTTGACGGACCCTCCCAAACGCTA
CATTTCCCGCCGAGCGAGGCCCGGGGGATTCAGCGCTGGGCTTTTACCCTGTTCGCTCGC
CGCTACTGAGGGAATCCTTGTTAGTTTCTTTTCCCTCCCCTTAGTAAGAAATTAAATTCAG
GGGGTAGTCTCACCTGAACTGAGGTCGTGATAGCGAATCGCCCTGGAAGACGAAGCGCT
GCTCACTGCACAGAATAAAGAGTATTTCACAATAGCCTCGAGACTCGTGCACGCGCCGC
CCGCCTGGATCTTTGTCCCGAGGGGACCACTGTGCTCAAGCAAACTAGTCCGCGGCGCC
GCGTTTATCGAAATCGAAAACGAGCGCACGGGACCAATGTTGCCATCAGATCCAAGCGA
ACGAGACGAGCCTACTCGGTTGTGAGACCGTGTGAAAACCCACTCGATTGCCTTCCGTGC
AGCGATATCGGTGAGACGACGCGAACGCCGAGCCCACACTCACTTTATTTAAGGGTACC
ACGCCGAGACGCGGAGACTCCAATCTCGTCCGGGTTGTAAAGCCGGACAGTCTGGTCGT
TGAGTTTGGTCAACCGACCCTCAGTCAGGTGTGGCCCAGGAACAAGTCCTAGGGCCGCA
ATGTGCGTTCGAAATGTCGATGTTCATGTGTCCTGCAGTTCACATGTCAACGCGCAATTA
GCTGCGTTNTTCATCGATCCACGAGCCGAGTGAT

Primer P1

ภาพที่ 4. ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของ *S. dorsalis* 1403 bp ส่วนของดีเอ็นเอที่แรเงาสีชมพูแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์28Z และP1 ตามลำดับ ส่วนของดีเอ็นเอที่แรเงาสีน้ำเงินแสดงตำแหน่ง ของ Internal transcribed spacer (ITS2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ

การเปรียบเทียบยีน ITS2 ของเพลี้ยไฟ *F .schultzei* และ *S. dorsalis* กับเพลี้ยไฟชนิดอื่นๆที่มีใน EMBI/GenBank ด้วยโปรแกรม Clustal W(1.81) ได้แก่เพลี้ยไฟ

Echinothrips americanus (Accession No Aj303091) วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยPanchaetothripinae

Franklinella occidentalis (Accession No Aj308591) วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae

Franklinella tenuicornis (Accession No Aj308592) วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae

Hercinothrips femoralis (Accession No Aj308596) วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยPanchaetothripinae

Limothrips denticornis(Accession No Aj308594) วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae

Limothrips cerealium(Accession No Aj308593) วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae

Parthenothrips dracaenae(Accession No Aj308595) วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae

Thrips hawaiiensis(Accession No AB063337) วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae

Thrips coloratus(Accession No AB063338) วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae

Thrips flavas(Accession No AB063339) วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae

Thrips setosus(Accession No AB063342) วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae

Thrips tabaci(Accession No AB063340) วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae

Thrips palmi (Accession No AB063341) วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae

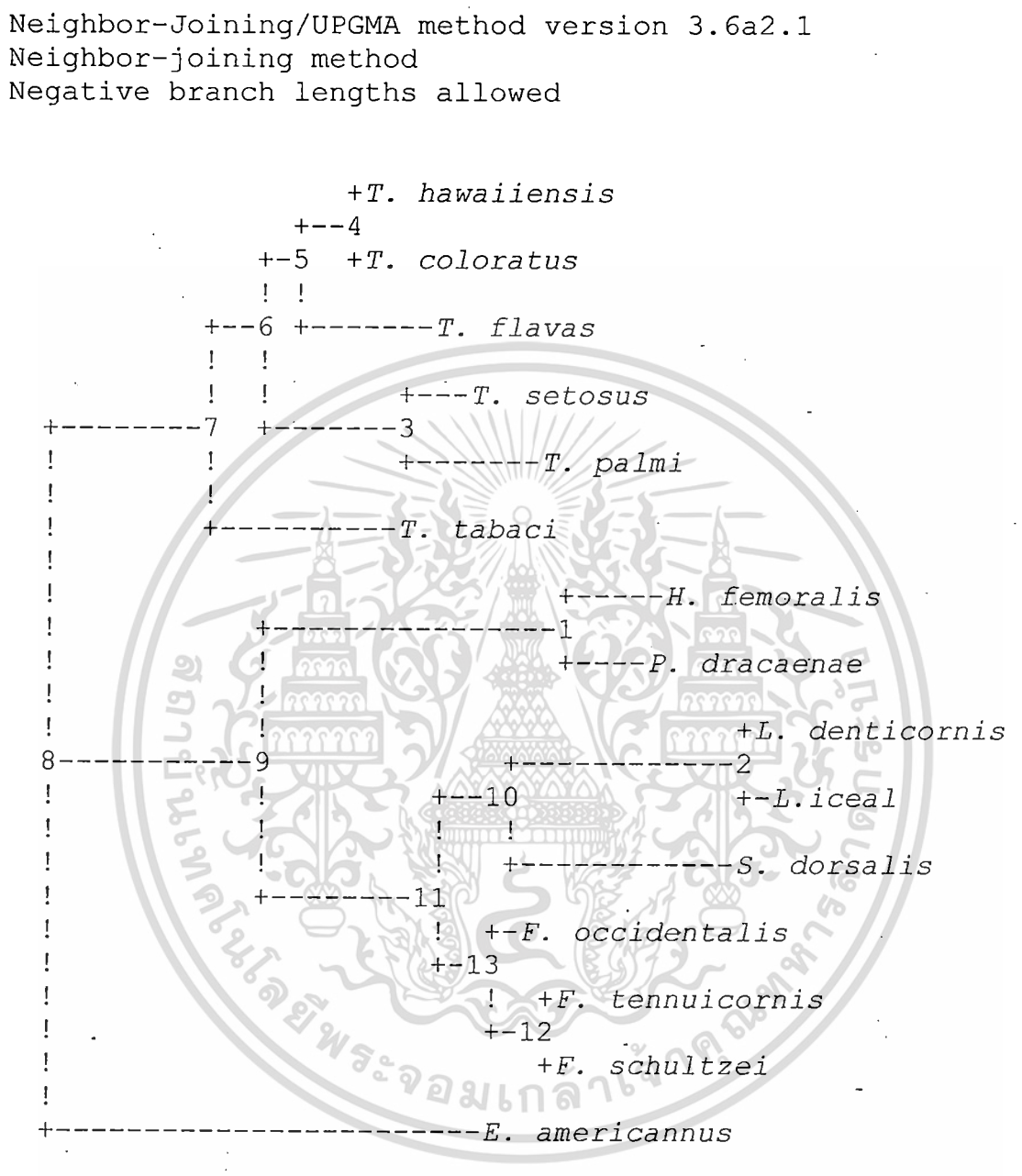
และคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ด้วยโปรแกรม neighbor joining/ UPGMA version 3.6a2.1 เพื่อนำไปสร้าง phylogenetic tree ซึ่งตัวเลขค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้จะแปรผันตามความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ตัวเลขที่มีค่ามากคือมีวิวัฒนาการห่างไกลกันมากและตัวเลขที่น้อยแสดงถึงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกัน(ภาพที่ 5) การวิเคราะห์ phylogenetic tree ที่ได้พบว่า *F. schultzei* มีลำดับวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับเพลี้ยไฟสกุล *Frankliniella* โดยมีความใกล้ชิดกับ *F. tenuicornis* มากที่สุดรองลงมาคือ *F. occidentalis* (ภาพที่ 6) และมีบรรพบุรุษสายเดียวกับ *S. dorsalis* แต่ *F. schultzei* มีวิวัฒนาการมาก่อน นอกจากนี้ยังพบว่าเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* มีวิวัฒนาการที่แยกออกไปต่างหากอีก 1 สาย ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับสายพันธุ์เพลี้ยไฟชนิดอื่นที่นำมาเปรียบเทียบกันนี้ ถึงแม้จะอยู่ในวงศ์ Thripidae วงศ์ย่อย Thripinae เหมือนกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1	Aj303091	0.0000													
2	Aj308591	2.4938	0.0000												
3	Aj308592	2.5204	0.1475	0.0000											
4	***F. schultzei***	2.4040	0.1730	0.1069	0.0000										
5	Aj308596	2.4731	1.8875	1.8889	1.8483	0.0000									
6	Aj308594	2.9355	1.0232	1.0859	1.1445	2.3305	0.0000								
7	Aj308593	2.9648	1.0963	1.2025	1.2806	2.5176	0.0990	0.0000							
8	Aj308595	3.3954	1.8458	1.7616	1.6201	0.5834	2.0227	2.2810	0.0000						
9	***S. dorsalis***	3.6192	0.9662	0.9095	0.8884	2.7033	1.2596	1.4426	2.3975	0.0000					
10	AB063337	1.8800	2.2615	2.3697	2.3788	2.6709	2.4993	2.4664	2.7066	2.7218	0.0000				
11	AB063338	1.9534	2.2239	2.4124	2.4535	2.9622	2.3358	2.3123	2.9670	2.8029	0.1091	0.0000			
12	AB063339	2.7764	2.4335	2.2313	2.0988	2.6641	2.0686	2.1482	2.8752	3.7893	0.5875	0.6111	0.0000		
13	AB063342	2.4447	2.3016	2.5246	2.5744	3.4134	2.8952	2.9621	3.1817	2.5670	0.9984	1.0132	1.1299	0.0000	
14	AB063340	2.1950	2.0099	2.1268	2.1928	2.8105	2.8135	2.8897	2.6431	3.4783	0.9106	0.9718	1.1610	1.4854	0.0000
15	AB063341	2.3936	3.0033	3.1241	3.0667	3.0236	3.1445	3.2162	2.9291	3.2087	0.9501	0.9482	1.1475	0.5701	1.4316	0.0000
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

ภาพที่ 5. ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (sequence divergence หรือ genetic distance)1. *E. americanus* (Aj303091), 2. *F. occidentalis* (Aj308591), 3. *F. tenuicornis* (Aj308592), 4. *F. schultzei*, 5. *H. femoralis* (Aj308596), 6. *L. denticornis* (Aj308594), 7. *L. cerealium* (Aj308593), 8. *P. dracaenae*(Aj308595), 9. *S. dorsalis10. T. hawaiiensis* (AB063337), 11. *T. coloratus*(AB063338), 12. *T. flavas*(AB063339), 13. *T. setosus*(AB063342), 14. *T. tabaci*(AB063340), 15. *T . palmi* (AB063341)

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



ภาพที่ 6 Phylogenetic tree แสดงระดับความสัมพันธ์ระหว่างยีน ITS2 ในเพลี้ยไฟ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* กับยีนในเพลี้ยไฟชนิดอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
120293

Between	And	Length
8	7	0.42745
7	6	0.17752
6	5	0.06564
5	4	0.15458
4	*T. hawaiiensis*	0.03242
4	*T. coloratus*	0.07668
5	*T. flavas*	0.39017
6	3	0.40774
3	*T. setosus*	0.18664
3	*T. palmi*	0.38346
7	*T. tabaci*	0.54824
8	9	0.62379
9	1	0.83076
1	*H. femoralis*	0.31351
1	*P. dracaenae*	0.26989
9	11	0.48357
11	10	0.18046
10	2	0.65383
2	*L. denticornis*	0.00788
2	*L. iceal*	0.09112
10	*S. dorsalis*	0.64777
11	13	0.09393
13	*F. occidentalis*	0.08004
13	12	0.02676
12	*F. tennuicornis*	0.05287
12	*F. schultzei*	0.05403
8	*E. americannus*	1.23408

ภาพที่ 6 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟหลังการเก็บเกี่ยวโดยจุ่มสารอิมิดาคลอพริด และอะเซทรามิพริด

การจุ่มดอกบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกช ในสารฆ่าแมลงอิมิดาคลอพริด และอะเซทรามิพริด

การจุ่มดอกบัวด้วยสารดังกล่าวข้างต้นที่ความเข้มข้น ต่าง ๆ และเก็บรักษาในอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบว่า การจุ่มดอกบัวในอะเซทรามิพริดอัตรา 10.0 และ 7.5 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ส่วนอิมิดาคลอพริดที่ อัตรา 30 และ 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีที่สุดภายหลังจากการจุ่ม 3 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับวิธีควบคุม คือพบอัตราการตายของแมลง 99.24, 93.24, 93.69 และ 91.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง พบอัตราการตายของแมลง 100 เปอร์เซ็นต์ ในวิธีที่จุ่มด้วยอะเซทรามิพริดอัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ส่วนสารอิมิดาคลอพริด อัตราที่ทำแมลงตาย 100 เปอร์เซ็นต์ได้แก่ อิมิดาคลอพริดอัตรา 30 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร ทำให้เพลี้ยไฟตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการจุ่ม 9 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่าภายหลังการจุ่มด้วย สารฆ่าแมลงทุกชนิดทุกอัตราเป็นเวลา 3 ชั่วโมงพบว่าทำให้แมลงมีเปอร์เซ็นต์การตายแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ กับวิธีควบคุม (ตารางที่ 1.)เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของสีของกลีบดอก พบว่า ภายหลังการจุ่มด้วยสารฆ่าแมลง 24, 48 และ 72 ชั่วโมงพบทุกวิธีการมีการเปลี่ยนแปลงของสีเมื่อเทียบกับเมื่อเริ่มทดลอง โดยพบว่าค่า L ในทุกกรรมวิธี มีค่าเท่ากับ 55.0 และค่า a (+) มีค่าเท่ากับ 0.017 (ตารางที่ 2.) แสดงให้เห็นว่าการจุ่มอิมิดาคลอพริด และอะเซทรามิพริดไม่มีผลต่อสีของดอกบัว

การจุ่มดอกบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกช ในสารฆ่าแมลงอิมิดาคลอพริด และอะเซทรามิพริด ความเข้มข้น ต่าง ๆ และเก็บรักษาในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า การจุ่มดอกบัวในอะเซทรามิพริดอัตรา 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีที่สุดภายหลังจากการจุ่ม 3 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับวิธีควบคุม คือพบอัตราการตายของเพลี้ยไฟ 91.59 เปอร์เซ็นต์ สำหรับวิธีที่ได้ผลรองลงมาคือ การจุ่มด้วยอะเซทรามิพริด อัตรา 7.5 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร พบแมลงตายคือ 82.77 เปอร์เซ็นต์ แต่ในทุกกรรมวิธีที่จุ่มด้วยสารฆ่าแมลง พบว่ามีการตายของแมลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับวิธีควบคุม และเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง พบการตายของแมลง 100 เปอร์เซ็นต์ ในกรรมวิธี จุ่มด้วย อิมิดาคลอพริด อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร อะเซทรามิพริดอัตรา10.0, 7.5 และ 5.0 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (ตารางที่ 3.) เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของสีของกลีบดอก พบว่า ภายหลังการจุ่มด้วยสารฆ่าแมลง 24 ชั่วโมงไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอก ในทุกวิธีการ แต่จะพบมีการเปลี่ยนแปลงของสีของกลีบดอกภายหลังการจุ่มด้วยสารฆ่าแมลงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยพบว่าค่า L ในทุกกรรมวิธี มีค่าเท่ากับ 55.0 และค่า a(+) มีค่าเท่ากับ 0.017 (ตารางที่ 4.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1. เปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยไฟหลังการจุ่มดอกด้วยสารอิมิดาคลอพริด และอะเซทรามิพริดเก็บไว้ในอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 3, 6, 9, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

สาร (ปริมาณ/น้ำ 20 ลิตร)	เปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยไฟภายหลังการจุ่ม[1]							ชม.
	3	6	9	12	24	48	72	
น้ำ (control)	0.00c	0.00c	0.00c	0.00c	0.00b	0.00b	0.00b	
อิมิดาคลอพริด 10 ml	72.50b	91.53a	89.87a	98.36a	100.00a	100.00a	100.00a	
อิมิดาคลอพริด 20 ml	91.59a	98.19a	96.06a	99.84a	100.00a	100.00a	100.00a	
อิมิดาคลอพริด 30 ml	93.69a	99.93a	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a	
อะเซทรามิพริด 2.5g	7.29c	47.88b	69.57b	83.65b	99.91a	100.00a	100.00a	
อะเซทรามิพริด 5.0g	67.26b	89.61a	92.44a	93.96a	100.00a	100.00a	100.00a	
อะเซทรามิพริด 7.5g	93.24a	93.75a	94.45a	95.56a	100.00a	100.00a	100.00a	
อะเซทรามิพริด 10.0 g	99.24a	100.00a	100.00a	99.29a	100.00a	100.00a	100.00a	
CV(%)	32.33	27.97	18.37	2.50	0.19	0.39	0.39	

[1] เปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยไฟต่อดอกที่มีอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 2. การเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอกบัวหลวง พันธุ์สัตตบงกช ก่อน และหลังการจุ่มด้วยสารอิมิดาคลอพริด และอะเซทรามิพริด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

สาร (ปริมาณ/น้ำ 20 ลิตร)	ก่อนการรม		24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	L	a(+)	L	a(+)	L	a(+)	L	a(+)
น้ำ (control)	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017	55.0	0.017
อิมิดาคลอพริด 10 ml	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017	55.0	0.017
อิมิดาคลอพริด 20 ml	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017	55.0	0.017
อิมิดาคลอพริด 30 ml	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017	55.0	0.017
อะเซทรามิพริด 2.5g	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017	55.0	0.017
อะเซทรามิพริด 5.0g	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017	55.0	0.017
อะเซทรามิพริด 7.5g	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017	55.0	0.017
อะเซทรามิพริด 10.0 g	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017	55.0	0.017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3. เปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยไฟหลังการจุ่มดอกด้วยสารอิมิดาคลอพริด และอะเซทรามิพริดเก็บไว้ในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 3, 6, 9, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

สาร (ปริมาณ/น้ำ 20 ลิตร)	เปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยไฟภายหลังการจุ่ม[1]							ชม.
	3	6	9	12	24	48	72	
น้ำ (control)	0.00e	0.00e	0.00d	0.00c	0.00c	0.00c	0.00b	
อิมิดาคลอพริด 10 ml	43.01cd	69.78d	70.23c	99.69a	100.00a	100.00a	100.00a	
อิมิดาคลอพริด 20 ml	50.76c	97.56a	99.34a	99.93a	100.00a	100.00a	100.00a	
อิมิดาคลอพริด 30 ml	70.19b	99.72a	99.95a	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a	
อะเซทรามิพริด 2.5g	35.70cd	75.08cd	88.60b	95.97b	99.50a	97.00b	100.00a	
อะเซทรามิพริด 5.0g	31.38d	83.37bc	90.47ab	100.00a	97.41b	100.00a	100.00a	
อะเซทรามิพริด 7.5g	82.77ab	92.68ab	97.29ab	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a	
อะเซทรามิพริด 10.0 g	91.59a	97.33a	99.20a	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a	
CV(%)	67.62	33.13	22.54	5.36	3.02	4.46	0.39	

[1] เปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยไฟต่อดอกที่มีอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4. การเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอกบัวหลวง พันธุ์สัตตบงกช ก่อน และหลังการจุ่มด้วยสารอิมิดาคลอพริด และอะเซทรามิพริด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

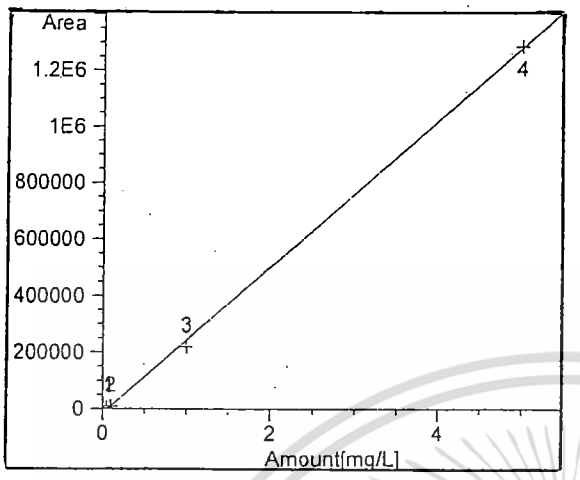
สาร (ปริมาณ/น้ำ 20 ลิตร)	ก่อนการรม		24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	L	a(+)	L	a(+)	L	a(+)	L	a(+)
น้ำ (control)	58.2	0.016	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017
อิมิดาคลอพริด 10 ml	58.2	0.016	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017
อิมิดาคลอพริด 20 ml	58.2	0.016	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017
อิมิดาคลอพริด 30 ml	58.2	-0.016	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017
อะเซทรามิพริด 2.5g	58.2	0.016	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017
อะเซทรามิพริด 5.0g	58.2	0.016	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017
อะเซทรามิพริด 7.5g	58.2	0.016	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017
อะเซทรามิพริด 10.0 g	58.2	0.016	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

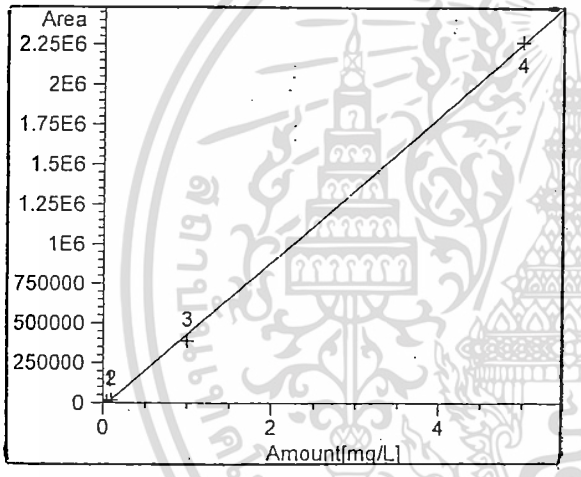
การตรวจสอบปริมาณสารพิษตกค้างจากการจุ่มสารอิมิดาคลอพริด และอะเซทรามิริด

ในการตรวจวิเคราะห์สร้างstandard curveของอิมิดาคลอพริด และอะเซทรามิริดเพื่อหาความสัมพันธ์ correlation ระหว่างพื้นที่ใต้curveและปริมาณสาร(ภาพที่ 7-8) ได้chromatogramของการวิเคราะห์อิมิดาคลอพริดและอะเซทรามิริด(ภาพที่ 9-10) จากข้อมูลการวิเคราะห์พบปริมาณสารตกค้างพบว่าอิมิดาคลอพริดในดอกบัวเมื่อในวันที่ 0, 2 และ 3 อยู่ที่ 2.23, 1.96 และ 1.28 มิลลิกรัม/กิโลกรัม(ตารางที่ 5) ตามลำดับ โดยในวันที่ 2 พบการสลายตัวของอิมิดาคลอพริด 12.10 % ในวันที่ 3 ของการทดสอบมีการสลายตัวสูงถึง 42.60% แสดงว่าสารชนิดนี้มีการสลายตัวเกิดขึ้นระหว่างเวลาที่เก็บรักษา ส่วนปริมาณอะเซทรามิพริด อยู่ที่ 1.90, 1.90 และ 3.02 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งผลแตกต่างจากอิมิดาคลอพริดเพราะนอกจากจะไม่มีการสลายตัวของสารแล้วยังพบในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ซึ่งในวันที่ 2 ของการทดสอบปริมาณเท่าเดิมขณะเริ่มการทดสอบ และในวันที่ 3 พบในปริมาณที่มากขึ้นกว่าเดิม สาเหตุคาดว่าน่าจะเกิดจากการdrian สารอะเซทรามิพริดออกจากตัวอย่างไม่หมด

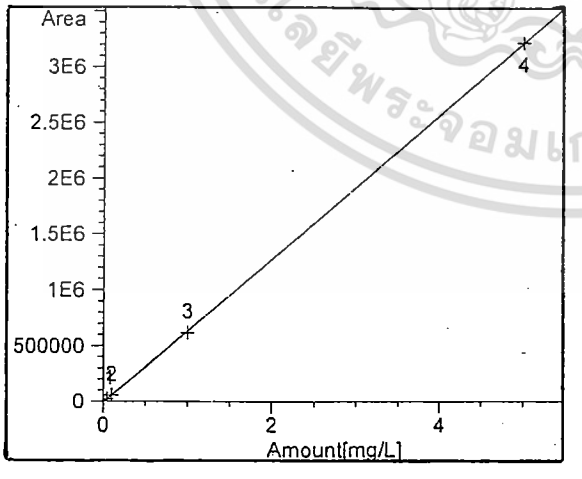
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Confirm Ion 1 at exp. RT: 4.278
MSD1 209, EIC=208.8:209.8
Correlation: 0.99964
Residual Std. Dev.: 17261.19713
Formula: y = mx + b
m: 259150.27713
b: -15680.82271
x: Amount[mg/L]
y: Area



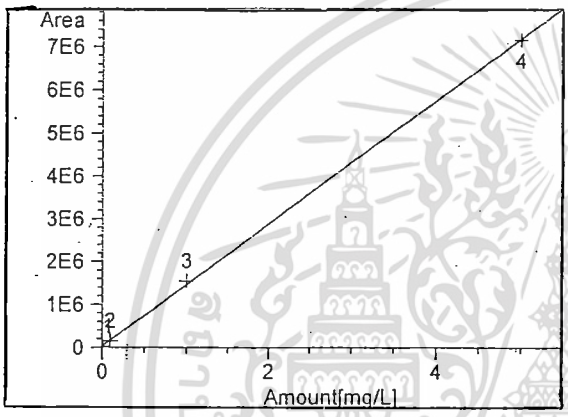
Confirm Ion 2 at exp. RT: 4.278
MSD1 175, EIC=174.8:175.8
Correlation: 0.99967
Residual Std. Dev.: 28964.22889
Formula: y = mx + b
m: 455458.38900
b: -25110.99552
x: Amount[mg/L]
y: Area



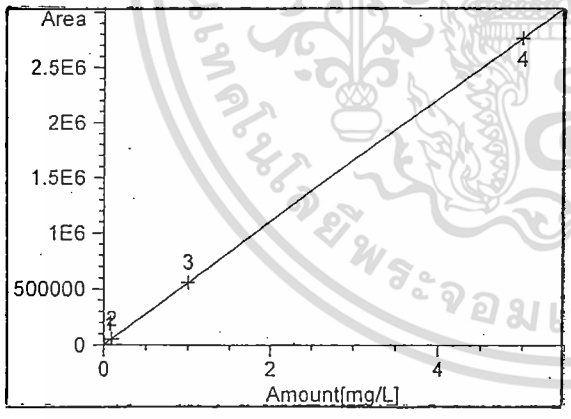
Imidacloprid at exp. RT: 4.291
MSD1 256, EIC=255.8:256.8
Correlation: 0.99998
Residual Std. Dev.: 11195.02976
Formula: y = mx + b
m: 645268.01199
b: -11870.02975
x: Amount[mg/L]
y: Area

ภาพที่ 7. Standard curveของอิมิดาคลอพริดที่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 209, 175 และ 256 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



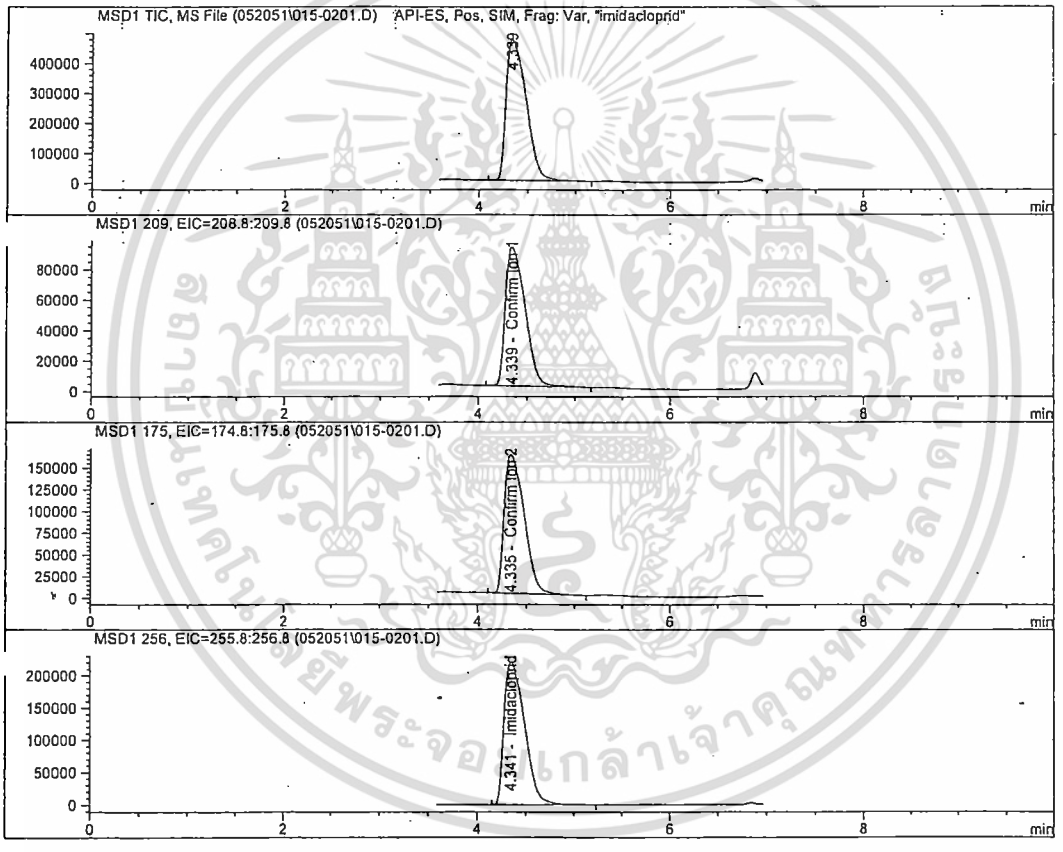
Acetamiprid at exp. RT: 9.166
MSD1 223, EIC=222.7:223.7
Correlation: 0.99988
Residual Std. Dev.: 55716.41847
Formula: y = mx + b
m: 1.43029e6
b: 24748.56848
x: Amount[mg/L]
y: Area



confirm Ion at exp. RT: 9.168
MSD1 126, EIC=125.7:126.7
Correlation: 1.00000
Residual Std. Dev.: 3297.90095
Formula: y = mx + b
m: 554465.06548
b: 203.18413
x: Amount[mg/L]
y: Area

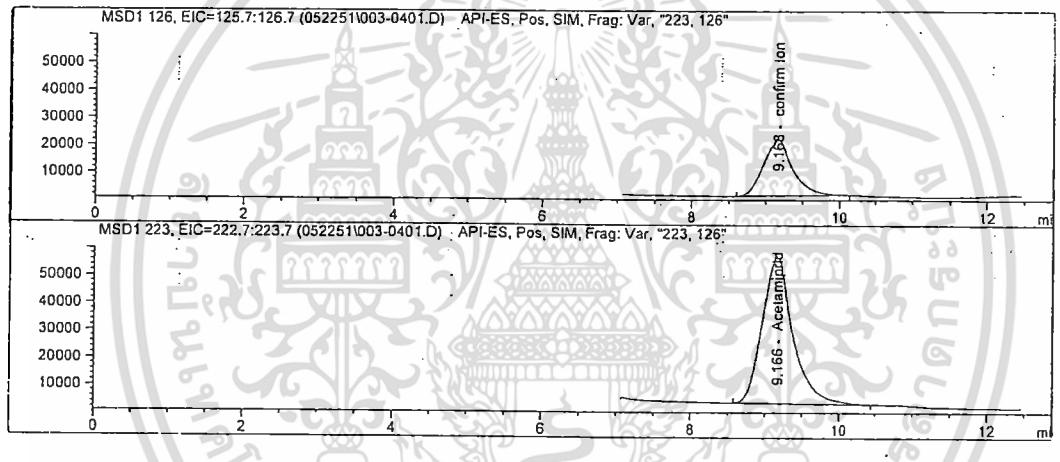
ภาพที่ 8. Standard curve ของอะเซทรามิริดที่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 126 และ 223 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 8. chromatogram ของอิมิดาคลอพริด เมื่อวิเคราะห์โดยสัดส่วนของmobile phase 5mM ammonium formate in water:acetronitrile เป็น 1:1 อัตราการไหล 0.25 มล./นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 209, 175 และ 256 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 9. chromatogram ของอะเซทรามิพริดเมื่อวิเคราะห์โดยสัดส่วนของmobile phase 5mM 0.2% acetic acid in water:acetronitrile เป็น 1:1 อัตราการไหล 0.20 มล./นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 126 และ 223 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5. ปริมาณสารอิมิดาคลอพริดและอะเซทรามิพริด(mg/kg)ที่พบในดอกบัววันที่ 0, 2และ 3 หลังการจุ่ม

ระยะเวลา (วัน)	0	2	3
อิมิดาคลอพริด	2.23	1.96	1.28
SD	0.57	0.15	0.74
%CV	25.6	7.80	57.88
อะเซทรามิพริด	1.90	1.90	3.02
SD	0.74	0.61	0.54
%CV	39.10	32.10	17.8
Control[1]	ND	ND	ND

[1] ND หมายถึง non detectable

4. การป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟโดยการรมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

การกำจัดเพลี้ยไฟหลังการเก็บเกี่ยวโดยการรมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่อัตราต่างๆ ร่วมกับการเก็บรักษาในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสพบว่า ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อัตรา 1.17 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร พบการตายของแมลง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง การรมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อัตรา 2.33 และ 3.5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร พบอัตราการตายของแมลง 100 เปอร์เซ็นต์ภายหลังการรม 9 ชั่วโมง การรมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อัตรา 4.67กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตรทำให้แมลงตาย 100 เปอร์เซ็นต์ หลังการรม 3 ชั่วโมง ดังนั้นกรรมวิธีที่ดีที่สุดคือ คือ การรมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 4.67 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร(ตารางที่ 6) เมื่อพิจารณาร่วมกับการเปลี่ยนสีของกลีบดอก แทบไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอก โดยมีแนวโน้มของสีกลีบดอกมีค่า L อยู่ที่ 55.0 และค่า a(+) เท่ากับ 0.017 ภายหลังการรมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าคุณภาพของดอกไม่มีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากการรมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ตารางที่ 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6. เปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยไฟหลังการรมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่อัตรา ต่างๆ และเก็บไว้ในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

อัตราก๊าซ	เปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยไฟภายหลังการรม [1]							
(กก./ซม^2)	3	6	9	12	24	48	72	ชม.
control	0.00c	0.00b	0.68c	8.32b	60.00b	98.12a	100.00 [ns]	
1.17	26.03b	97.33a	86.67b	98.00a	100.00a	100.00a	100.00	
2.33	27.10b	97.79a	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a	100.00	
3.50	79.47a	99.50a	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a	100.00	
4.67	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a	100.00	
CV(%)	52.68	22.81	27.46	23.98	23.61	15.26	12.61	

[1] เปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยไฟต่อดอกที่มีอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยวิธี DMRT

[ns] = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 7. การเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอกบัวหลวง พันธุ์สัตบงกช ก่อน และในระหว่างการรมด้วยการรมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

วิธีการ	ก่อนการรม		24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
(กก./ซม^2)	L	a(+)	L	a(+)	L	a(+)	L	a(+)
control	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017	55.0	0.017
1.17	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017	55.0	0.017
2.33	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017	55.0	0.017
3.50	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017	55.0	0.017
4.67	58.2	0.016	55.0	0.017	55.0	0.017	55.0	0.017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์ผลการทดลอง

การจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟในระดับโมเลกุล

การศึกษาทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* Hood โดยวิธี PCR-RFLP โดยการใช้ไพรเมอร์ 28Z และP 1 พบว่าไพรเมอร์ทั้งสองชนิดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้โดยได้ขนาดดีเอ็นเอผลผลิตของ *F. schultzei* 1361 bp และ *S. dorsalis* Hood 1403 bp และเมื่อนำไปตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดเฉพาะ 4 ชนิด คือ *Alu*I, *Hae*III, *Msp*I และ *Hinf*I พบว่าเพลี้ยไฟทั้งสองชนิดมีรูปแบบการเกิดโพลีมอร์ฟิซึมที่แตกต่างกัน ซึ่งคล้ายกับการรายงานของ Moritz *et al.* (2000 และ 2002) และ Toda and Komazaki (2002) ซึ่งสามารถนำวิธีการดังกล่าวนี้ไปใช้ในการจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟได้นอกเหนือจากการใช้การจำแนกแบบสัณฐานวิทยาแบบเดิมที่ต้องใช้ผู้ชำนาญการที่มีประสบการณ์สูงในการวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟ

นอกจากนี้การศึกษาทางชีวโมเลกุลยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการศึกษาต่อเนื่องในการศึกษาการเกิดวิวัฒนาการของเพลี้ยไฟชนิดอื่นๆได้อีกด้วย โดยการนำข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลยีนITS 2 ของเพลี้ยไฟชนิดอื่นๆที่มีใน GenBank/EMBI

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ *F.schultzei* และ *S. dorsalis* โดยการเปรียบเทียบยีนส่วนITS2 กับข้อมูลของเพลี้ยไฟชนิดอื่นๆที่มีรายงานใน GenBank/EMBI ได้แก่เพลี้ยไฟ *Echinothrips americanus* (Accession No Aj303091), *Frankliniella occidentalis* (Accession No Aj308591), *Frankliniella tenuicornis* (Accession No Aj308592), *Hercinothrips femoralis* (Accession No Aj308596), *Limothrips cerealium* (Accession No Aj308593), *Limothrips denticornis* (Accession No Aj308594), *Parthenothrips dracaenae* (Accession No Aj308595), *Thrips hawaiiensis* (Accession No AB063337), *Thrips coloratus* (Accession No AB063338), *Thrips flavas* (Accession No AB063339), *Thrips setosus* (Accession No AB063342), *Thrips tabaci* (Accession No AB063340), *Thrips palmi* (Accession No AB063341)

พบว่า *F. schultzei* มีวิวัฒนาการมาก่อน *S. dorsalis* และเพลี้ยไฟสกุล *Frankliniella* กับเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* ไม่มีสายบรรพบุรุษร่วมกัน ซึ่งข้อมูลที่ได้สนับสนุนรายงานของ Mound (1983) ที่รายงานในการศึกษาการเปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาของเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* และ สกุล *Frankliniella* พบว่าเพลี้ยไฟทั้งสองชนิดนี้ไม่มีสายบรรพบุรุษร่วมกัน หลักฐานทางสัญฐานวิทยาและทางธรณีชีววิทยา สนับสนุนว่า *Thrips* มีกำเนิดเป็นอิสระในโลกเก่าหลังจากการแยกของอาฟริกาจากอเมริกาใต้ แต่ก่อนยุคอีโอซีนของอเมริกาเหนือและทวีปยุโรป ขณะที่ *Frankliniella* มีอายุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เก่าแก่กว่า อาจจะอยู่ในช่วงกำเนิด Gondwana ตามด้วยการแยกเป็นซีกโลกด้านเหนือ ตลอดแนวตะวันออกและตะวันตกแต่ไม่ปรากฏเกี่ยวเนื่องทางอัฟริกา นอกจากนี้ข้อมูลที่สนับสนุนว่า *Frankliniella* มีความเก่าแก่คือข้อมูลจากการพบซากฟอสซิล *Frankliniella* จำนวนมากที่สุดในจำนวนสิ่งมีชีวิตที่ใช้ศึกษายุค Devonian ตอนปลายในส่วนกลางของภูเขา Holy cross บริเวณ Palmatolepis triangularis conodont (Olempska, 2002) จากหลักฐานดังกล่าว จึงสอดคล้องกับการกล่าวถึงวิวัฒนาการของเพลี้ยไฟของ Mound *et al.* (1980) และ Heming (1993) ว่าเพลี้ยไฟรุ่นแรกๆ น่าจะอยู่อาศัยในใบที่เน่าเปื่อยซึ่งสามารถกินเส้นใยเชื้อราได้ จากนั้นจะเริ่มเคลื่อนย้ายไปยังดอกและถึงใบซึ่งแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่าง *F. schultzei* ซึ่งเป็นเพลี้ยไฟในกลุ่มของเพลี้ยไฟดอกไม้ (flower dweller) และพบเฉพาะที่ส่วนดอกของบัวหลวงเท่านั้นกับ *S. dorsalis* Hood ที่เข้าทำลายส่วนซึ่งพบมากในใบอ่อนของบัวหลวงได้ชัดเจนว่า *F. schultzei* มีวิวัฒนาการมาก่อน *S. dorsalis* Hood

การป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟหลังการเก็บเกี่ยวโดยจุ่มสารฆ่าแมลง

การจุ่มดอกบัวหลวงพันธุ์สัตบงกช ในสารฆ่าแมลงอิมิดาคลอพริด และอะเซทรามิพริดความเข้มข้น ต่าง ๆ และเก็บรักษาในอุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่า การจุ่มดอกบัวใน อะเซทรามิพริดอัตรา 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร อิมิดาคลอพริดอัตรา 30 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีที่สุดภายหลังจากการจุ่ม 3 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงทำให้เพลี้ยไฟตาย 100 เปอร์เซ็นต์ การจุ่มด้วยสารฆ่าแมลงอิมิดาคลอพริด อะเซทรามิพริดซึ่งเป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มchloronicotinyl จับกับ nicotinic acetylcholine receptor มีความเป็นพิษต่อสัตว์ชนิดอื่นน้อย(Buffin, 2003และ EPA, 2002) นั้นเป็นทางเลือกเพื่อให้เกษตรกรนำไปปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อส่งออกดอกบัวหลวงไปยังต่างประเทศในอนาคตหากมีการห้ามใช้สารเมทธิลโบรไมด์อย่างเป็นทางการเนื่องจากปัจจุบันเกษตรกรใช้วิธีการรมดอกบัวด้วยสารเมทธิลโบรไมด์เพื่อกำจัดเพลี้ยไฟวิธีการเดียวกับการส่งออกกล้วยไม้ไปยังต่างประเทศ

การจุ่มดอกบัวหลวงพันธุ์สัตบงกช ในสารฆ่าแมลงอิมิดาคลอพริด และอะเซทรามิพริดความเข้มข้น ต่าง ๆ และเก็บรักษาในอุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่า การจุ่มดอกบัวในอะเซทรามิพริดอัตรา 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร อิมิดาคลอพริดอัตรา 30 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีที่สุดภายหลังจากการจุ่ม 3 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงทำให้เพลี้ยไฟตาย 100 เปอร์เซ็นต์ การใช้สารฆ่าแมลง อิมิดาคลอพริด และอะเซทรามิพริดจุ่มดอกบัวหลังการเก็บเกี่ยว เป็นวิธีการที่ได้ผลดี ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ปิยรัตน์และคณะ (2543) ที่ศึกษาถึงประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟฝ้ายโดยวิธีการจุ่มดอกกล้วยไม้ ใน สารอะบาเม็กติน อิมิดาคลอพริด อะเซทรามิพริด และฟิโปรนิล เป็นเวลา 5 วินาที มีประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยไฟดอกกล้วยไม้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่การจุ่มดอกบัวในสารฆ่าแมลงต้องใช้เวลาในการจุ่มนานกว่าในดอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล้วยไม้เนื่องจากลักษณะของกลีบดอกที่มีกลีบดอกที่ซ้อนกว่า ดอกกล้วยไม้ ซึ่งจากการทดลองทำการจุ่มด้วยสารฆ่าแมลงนาน 1 นาที เพื่อให้สารฆ่าแมลงแทรกเข้าไปในกลีบดอกให้ทั่วถึง และเมื่อจุ่มดอกด้วยสารฆ่าแมลงแล้วต้องผึ่งดอกให้แห้งก่อนทำการบรรจุ เพื่อป้องกันความเสียหายของกลีบดอกที่เกิดจากความชื้นที่สูงเกินไป ซึ่งจะทำให้เกิดการทำลายของเชื้อรา เกิดการเน่าของกลีบดอก นอกจากนี้ยังพบการสลายตัวของอิมิดาคลอพริดสูงถึง 43% ในวันที่ 3 ของการทดลองโดยปริมาณสารอยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายเพราะปริมาณสารปนเปื้อนของในระดับที่ยอมรับได้ในอาหารอยู่ที่ 0.02 mg/kgในไข่ และ3.0mg/kgในหมู(Wikipedia, 2009) ส่วนอะเซทรามิพริดพบการสลายตัวน้อยมากอาจเป็นเพราะตอนจุ่มสารนั้น อะเซทรามิพริดอาจตกค้างตามซอกกลีบดอกบัวดังนั้นซึ่งGupta *et al.*(2007)พบว่าfilmของสารละลายอะเซทรามิพริดเมื่อได้รับแสงUVจะสลายตัวถึง 95%ภายในเวลา 24 ชั่งโมง Tolerance ของการปนเปื้อนในพืชผักที่เป็นหัวอยู่ที่ 5 mg/kg ถั่วลันเตาและพืชตระกูลถั่ว 0.5 mg/kg(EPA, 2007) ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการลดการปนเปื้อนของสารดังกล่าวโดยการผ่านแสง UV หรือการจุ่มน้ำอีกครั้งก่อนการบรรจุ

การป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟโดยการรมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

การกำจัดเพลี้ยไฟหลังการเก็บเกี่ยวโดยการรมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อนำดอกบัวมาทำการรมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยการบรรจุดอกบัวในถุงพลาสติกใสชนิด polypropylene ภายใต้สภาพสุญญากาศและเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณต่างๆ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เมื่อตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยไฟ พบว่าการเติมก๊าซอัตรา 4.67 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นวิธีการที่ดีที่สุดเนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยไฟ 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง พบมีการเปลี่ยนแปลงของกลีบดอกน้อย ดังนั้นการกำจัดเพลี้ยไฟหลังการเก็บเกี่ยวด้วยการรมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จึงเป็นแนวทางปฏิบัติให้เกษตรกรนำไปพัฒนาวิธีการควบคุมเพลี้ยไฟเพื่อการส่งออกบัวหลวง รวมถึงควรมีการศึกษาร่วมกับการเก็บรักษา และคุณภาพ การเปลี่ยนแปลงลักษณะของดอก และอายุการปักแจกัน รวมไปวิธีการในการเก็บรักษาและบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมในการส่งออกบัวหลวงไปยังต่างประเทศ เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าในการผลิตบัวหลวงตัดดอกให้เกษตรกร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

การจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* โดยเทคนิค PCR-RFLPใช้ ไพรเมอร์28Z และ P1 พบว่า ได้ PCR product - ขนาด 1361 และ 1403 bp ตามลำดับ และมีรูปแบบการเกิดโพลิมอร์ฟีซึมที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดเของเพลี้ยไฟได้นอกเหนือจากการการวินิจฉัยทางสัณฐานวิทยาแบบเดิมซึ่งต้องใช้ผู้ชำนาญการในการวินิจฉัย เนื่องจากเพลี้ยไฟมีขนาดตัวเล็กมาก และมีจำนวนถึง 5,000 ชนิดที่ได้รับการวินิจฉัยชื่อแล้ว การ บูรณาการเทคนิคทางการวินิจฉัยแบบสัณฐานวิทยาร่วมกับการวินิจฉัยโดยวิธีทางชีวโมเลกุลจึงน่าจะเป็นแนวทางที่ควรจะนำมาใช้เพื่อการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับเพลี้ยไฟของประเทศไทย เพื่อให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเพลี้ยไฟโดยการนำข้อมูลลำดับเบสส่วน ITS2 ซึ่งถือว่ามีความอนุรักษ์สูงมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของเพลี้ยไฟชนิดอื่นที่มีใน GenBank/EMBI ช่วยทำให้ทราบถึงสายพันธุ์วิวัฒนาการของเพลี้ยไฟศัตรูบัวได้ชัดเจนมากขึ้น ซึ่งจากผลการศึกษาที่ได้พบว่าเพลี้ยไฟทั้งสองชนิดที่อยู่ในวงศ์ Thripidae เหมือนกันแต่มีลำดับการวิวัฒนาการที่แตกต่างกันโดยที่ *F. schultzei* มีลำดับการวิวัฒนาการมาก่อน *S. dorsalis* แต่อย่างไรก็ตามวิธีการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลโดยใช้ข้อมูลลำดับเบสเพื่อนำไปสร้าง phylogenetic treeยังคงมีข้อจำกัดในแง่ของเครื่องมือและเวลาที่ใช้ในการที่ใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งใช้เวลานานและค่าใช้จ่ายสูง จึงอาจทำให้การศึกษายังอยู่ในวงจำกัด

สำหรับการจุ่มดอกบัวหลวงพันธุ์สัตบงกช ในสารฆ่าแมลงอิมิดาคลอพริด และอะเซทรามิพริดความเข้มข้น ต่าง ๆ และเก็บรักษาในอุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่า การจุ่มดอกบัวใน อะเซทรามิพริดอัตรา 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร อิมิดาคลอพริดอัตรา 30 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีที่สุดภายหลังจากการจุ่ม 3 ชั่วโมง และเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงทำให้เพลี้ยไฟตาย 100 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ทดแทนเมทธิลโบร์ไมด์ในการกำจัดเพลี้ยไฟในดอกบัวก่อนการส่งออกและเป็นวิธีการแบบง่ายที่เกษตรกรสามารถดำเนินการได้เอง

ส่วนการกำจัดเพลี้ยไฟหลังการเก็บเกี่ยวโดยการรมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่อัตรา 4.67 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นวิธีการที่ดีที่สุดวิธีหนึ่งเนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยไฟสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง และพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสีกลีบดอกบัวน้อยมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2549. จดหมายข่าว. ปีที่3 ฉบับที่11 เดือนมกราคม ส่วนส่งเสริมการผลิตผักไม้ดอกไม้ประดับและสมุนไพร สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร [Online]. เข้าถึงได้จาก http: www2.doae.go.th/floridade/06year/11pdf.

ปิยรัตน์ เจียนมีสุข ศิริณี พูนไชยศรี ศรีสุดา โท้ทอง สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น ลัดดาวัลย์ อินทร์สังข์ ศรีจำนรรจ์ พิชิตสุวรรณชัย และ สุวิมล เลิศวีระศิริกุล. 2543. ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟฝ้าย โดยวิธีการจุ่มดอกกล้วยไม้. วารสารกีฏและสัตววิทยา 22(1): 17-27.

พรรณีย์ วิชชาชู. 2546. บัวเส้นทางสู่พืชเศรษกิจ. หนังสือพิมพ์กสิกร 76(3): 30-41.

สุปราณี วนิชชานนท์. 2540. บัวประดับ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์เพื่อนเกษตร.

สุวรินทร์ บำรุงสุข และธรรมทิพย์ ทิพยางค์. 2546. แมลงศัตรูที่สำคัญของบัว. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 34: 112-114.

Buffin, D. 2003. Imidacloprid. Pesticide News 62:22-23.

Dharmananda, S. 2002. Lotus seed:Food and Medicine. [Online]. Available : http://www.itmonline.org/arts/lotus.htm.

EPA. 2002. Acetamiprid. [Online]. Available :http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/acetamiprid.pdf.

EPA. 2007. Acetamiprid; pesticide tolerance. Federal Register72(228): 67256-67262.

Gupta , S., V. T. Gajbhiye and R. K. Gupta . 2008. Effect of light on the degradation of two neonicotinoids viz acetamiprid and thiacloprid in soil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 81(2):185-189.

Heming, B.S. 1993. Structure, function, ontogeny and evolution of feeding in thrips (Thysanoptera). p 3-41. in: Schacfer, C.W. and leschen, R.A.B. (eds) Functional Morphology Of Insect Feeding. Marryland: Thomus Say Publications in Entomology: Proceedings Entomological Society of America.

Moritz, G., C. Delker, M. Paulsen, L.A. Mound, and W. Burgermeister. 2000. Modern method in thrips identificaton and information (Insecta: Thysanoptera). [Online]. Available: http//entomology. Ucdavis. edu/ faculty parrella/ cheryle thrips/ Molecular. html.

Moritz, G., M. Paulsen, C. Delker, S. Picl, and S. Kumm. 2002. Identification of thrips

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

using ITS-RFLP analysis. [Online]. Available: http// entomology. Ucdavis. edu/ faculty/ parrella/ cheryle_thrips/ Molecular. html.

Mound, L.A. 1983. Natural and disrupted pattern of geographical distribution in Thysanoptera (Insecta). J. Biogeo. 10 : 119-133.

Mound, L.A., B.S. Heming, and J.M. Palmer. 1980. Phylogenetic reletionships between the families of recent Thysanoptera (Insecta). Zoological Journal of the Linnean Society 69 : 111-142.

Olempska, E. 2002. The late Devonian Upper Kellwasser event and entomozoacean ostracods in the Holy Cross Mountain, Poland. Acta Palaeontologica Polonica 47(2): 247-266.

Püntener, W. 1981.Manual for Field Trials in Plant Protection 2 nd. Agricultural Division, Ciba-Geigy Limited.

Sohn, D. H., Y.C. Kim, S. H. Oh, E. J. Park, X. Li, and B.H. Lee. 2003. Hepatoprotecttive and free radical scavenging effects of *Nelumbo nucifera*. Phytomedicine 10: 165-169.

Toda. S. and S. Komazaki. 2002. Identification of Thrips Species (Thysanoptera: Thripidae) on Japanease Fruit Tree by Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism of the Ribosomal ITS2 Region. Bulletin of Entomological Research 92: 359-363.

Wikipedia. 2009. Imidacloprid. [Online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Imidacloprid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้