

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การติดเชื้อและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในประชากรไรศัตรูพืช (Acari: Tetranychidae) ที่พบในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญบางชนิดของประเทศไทย
Infection and distribution of *Wolbachia* bacteria in mite pest populations (Acari: Tetranychidae) in some important economic plants of Thailand

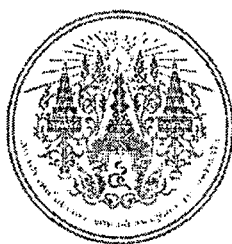
นายอิศนันท์ วิวัฒน์นบุตร

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การติดเชื้อและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในประชากรไรศัตรูพืช (Acari: Tetranychidae) ที่พบในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญบางชนิดของประเทศไทย
Infection and distribution of *Wolbachia* bacteria in mite pest populations (Acari: Tetranychidae) in some important economic plants of Thailand

นายอิศนันท์ วิวัฒน์รัตนบุตร

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

12845644

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การติดเชื้อและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *Wolbachia* ในประชากรไรศัตรูพืช (Acari: Tetranychidae) ที่พบในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญบางชนิดของประเทศไทย

แหล่งเงิน เงินรายได้ คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ประจำปีงบประมาณ 2557 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 100,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2556 ถึง 30 กันยายน 2557

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อิศนันท์ วิวัฒน์รัตนบุตร

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Wolbachia* เป็น endosymbiont ที่ติดเชื้อในกลุ่มสัตว์ขาปล้องหลายชนิด *Wolbachia* มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางระบบสืบพันธุ์ของโฮสต์หรือสัตว์ให้อาศัย งานวิจัยในโครงการนี้เป็นการสำรวจครั้งแรกของ endosymbionts เหล่านี้ในไรแมงมุมหรือไรแดง (Spider mites) (Acari: Tetranychidae) จาก 20 กลุ่มประชากรใน 16 จังหวัดรวม 4 ภูมิภาคของประเทศไทย การเก็บตัวอย่างได้ดำเนินการในช่วงเดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนมีนาคม 2557 ในประเทศไทย *Wolbachia* ได้ถูกตรวจพบในแมลงหลายชนิด แต่ไม่เคยมีรายงานว่าตรวจพบ *Wolbachia* ในประชากรตามธรรมชาติของไรแมงมุม ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยใช้วิธี Polymerase chain reaction โดยใช้ไพรเมอร์ *wsp*, 16S rRNA และ *FtsZ* เพื่อยืนยันสถานะการติดเชื้อ *Wolbachia* ในไรแมงมุม จากการศึกษาพบว่า *Wolbachia* สามารถตรวจพบได้ใน *Tetranychus urticae*, *T. truncatus*, *T. pueraricola*, *T. phaseolus* และ *T. kanzawai* ซึ่งเป็นศัตรูพืชของพืชที่สำคัญทางการเกษตรหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ, ถั่ว, พริกไทย และกุหลาบในหลายภาคของประเทศไทย ความชุกของการติดเชื้อ *Wolbachia* ในสายพันธุ์ไรเหล่านี้อยู่ในช่วงร้อยละ 47-100 การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า *Wolbachia* สามารถถูกตรวจพบในประชากรไรเหล่านี้เป็นครั้งแรกในประเทศไทย นอกจากนี้แล้ว ปริมาณความหนาแน่นของการติดเชื้อ *Wolbachia* ในไรแต่ละชนิดยังได้รับการศึกษาโดยใช้เทคนิค Real-time PCR และผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า *T. urticae* มีปริมาณความหนาแน่นของ *Wolbachia* สูงสุดเมื่อเทียบกับไรแมงมุมชนิดอื่นๆ ผลวิจัยที่ได้นี้สามารถบ่งชี้ได้ว่า การติดเชื้อ *Wolbachia* ในไรแมงมุมได้กระจายไปในภูมิภาคต่างๆ ซึ่งการติดเชื้อและการกระจายตัวของ *Wolbachia* ในธรรมชาติอาจได้รับผลกระทบจากปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมและระบบนิเวศบางประการ ผลวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า *Wolbachia* สามารถถูกถ่ายทอดไปได้ทั้งแบบ vertical และ horizontal ซึ่งอาจจะมีพืชเป็นโฮสต์ตัวกลาง ดังนั้น *Wolbachia* อาจจะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างมากในการควบคุมศัตรูพืช เช่น ไรแมงมุม ได้ในอนาคต

คำสำคัญ : การกระจายตัว พืชเศรษฐกิจ การติดเชื้อ ไรศัตรูพืช แบคทีเรีย *Wolbachia*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Infection and distribution of *Wolbachia* bacteria in mite pest populations (Acari: Tetranychidae) in some important economic plants of Thailand

Researcher: Asst. Prof. Dr. Itsanun Wiwatanaratnabutr

Faculty: Agricultural Technology **Department:** Plant Production Technology

ABSTRACT

Endosymbiotic bacteria of the genus *Wolbachia* infect a diverse range of arthropods. These symbionts have received attention as a reproductive manipulator of their hosts. The first survey of these endosymbionts in spider mites (Acari: Tetranychidae) from 20 populations of 16 provinces in 4 geographic regions of Thailand was carried out during October 2013 to March 2014. In Thailand, *Wolbachia* have been detected in many arthropod species but no report on natural populations of spider mites. Here, I used polymerase chain reaction with *wsp*, 16S rDNA and *ftsZ* primers to confirm *Wolbachia* infection status in mites. *Wolbachia* were mainly detected in five *Tetranychus* spp. including *Tetranychus truncatus*, *T. urticae*, *T. pueraricola*, *T. phaseolus* and *T. kanzawai* which are serious pests of various agricultural plants such as tomatoes, beans, peppers and rose in the Central and the North of Thailand. The prevalence of *Wolbachia* within these mite species ranged from 47 to 100 %. These studies indicate that *Wolbachia* were introduced to these mite populations on multiple separate times. The relative infection densities of *Wolbachia* within each individual were determined using quantitative real-time PCR and the result showed that *T. urticae* had the highest relative *Wolbachia* density. These results may imply that *Wolbachia* are distributed throughout spider mites from different regions, suggesting that the distribution of *Wolbachia* in nature may be affected by some environmental and ecological factors. These observations suggested that *Wolbachia* are transmitted both vertically and horizontally which may probably be mediated by the host plants. *Wolbachia* have been considered to be very useful in mite pest management in the future.

Keywords : Distribution, Economic plants, Infection, Mite pest, *Wolbachia*

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ที่ให้การช่วยเหลือและให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีในโครงการวิจัยทุกท่าน การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนเงินรายได้คณะฯ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อิศนันท์ วิวัฒน์รัตนบุตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

IV

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VI
สารบัญภาพ.....	VII
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	2
1.5 สมมุติฐานงานวิจัย.....	2
1.6 คำสำคัญของการวิจัย.....	3
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การเก็บตัวอย่างไรและการจำแนกชนิด.....	9
3.2 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA).....	9
3.3 การตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction.....	9
3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	10
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การเก็บตัวอย่างไร การจำแนกชนิด และการกระจายตัวของประชากรไรศัตรูพืช.....	11
4.2 การสกัดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิค PCR.....	11
4.3 ความชุกและปริมาณความหนาแน่นของการติดเชื้อ <i>Wolbachia</i>	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	15
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	15
บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย	
6.1 ผลงานวิจัยตีพิมพ์.....	16
บรรณานุกรม	17
ภาคผนวก	19
ประวัตินักวิจัย	20



VI

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงสถานะการติดเชื้อ <i>Wolbachia</i> ในไรแมงมุมที่พบในประเทศไทย โดยใช้ <i>wsp</i> , 16S rRNA และ <i>FtsZ</i> genes.....	12



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 แสดงภาพแบคทีเรีย <i>Wolbachia</i>	5
4.1 แสดงภาพผลผลิต PCR ที่ได้จาก gel electrophoresis บ่งชี้การติดเชื้อ <i>Wolbachia</i> ในไร.....	14



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียใน genus *Wolbachia* จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม alpha-Proteobacteria อาศัยอยู่ร่วมกันภายในเซลล์ (Endosymbiosis) ของสัตว์ขาปล้อง (Arthropods) ซึ่งจะพบการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้มากในไรและแมลง แบคทีเรียชนิดนี้จะพบมากบริเวณเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ (Reproductive tissues) ของสัตว์ให้อาศัย (Wiwatanaratnabutr and Kittayapong, 2006) การแพร่เชื้อของแบคทีเรีย *Wolbachia* จะถ่ายทอดผ่านทางระบบสืบพันธุ์จากแม่ไปสู่ลูก แบคทีเรียเหล่านี้สามารถชักนำให้เกิดความผิดปกติทางระบบสืบพันธุ์ในสัตว์ให้อาศัยได้หลายรูปแบบ ที่สำคัญที่สุดคือปรากฏการณ์การไม่เข้ากันของไซโทพลาซึม (Cytoplasmic Incompatibility) ซึ่งพบได้ในแมลงส่วนใหญ่ กล่าวคือเมื่อมีการผสมพันธุ์กันระหว่างตัวผู้ที่ติดเชื้อมีกับตัวเมียที่ไม่ติดเชื้อ ตัวอ่อนที่เกิดจากการผสมพันธุ์จะมีพัฒนาการที่ผิดปกติหรือไม่เจริญและตายไปในที่สุด (Wiwatanaratnabutr et al., 2009) ข้อดีของปรากฏการณ์ดังกล่าวคือช่วยให้ *Wolbachia* สามารถแพร่เชื้อเพื่อดำรงเผ่าพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วและกว้างขวาง นอกจากนี้แล้ว การติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ยังส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของแมลงในด้านต่างๆ เช่น พฤติกรรมการวางไข่ พฤติกรรมการหาโฮสต์ และพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของแมลงด้วยเช่นกัน (Wiwatanaratnabutr et al., 2010) ในปัจจุบัน นักวิจัยทั่วโลกกำลังมีความสนใจที่จะใช้แบคทีเรียใน genus *Wolbachia* เป็นพาหะนำพาชิ้นส่วนเชื้อก่อโรคในแมลงและไรแทนที่พลาสมิด (Plasmid) เนื่องจาก *Wolbachia* สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นต่อไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ไรแมงมุมหรือไรแดง จัดเป็นไรศัตรูพืชที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจหลายชนิดของประเทศไทย ไรแมงมุมเป็นสัตว์เล็ก ๆ จำพวกแมงไม่ไช่แมลง (แมลงมีขา 3 คู่ แมงมีขา 4 คู่) ไรเป็นสัตว์ที่พบอยู่ทั่วไปไม่ว่าที่ไหน ทุกแห่งในโลก ไม่ว่าจะเป็นในดินในน้ำ ในเศษซากอินทรีย์วัตถุต่างๆ ในอาหารในบ้านเรือนที่อยู่อาศัย บนพืช บนตัวสัตว์ และแม้กระทั่งบนร่างกายของมนุษย์ ไรที่เป็นตัวเบียนอาศัยอยู่บนตัวสัตว์ อาจทำให้เจ็บป่วยล้มตายได้ทำให้เกิดความเสียหายกับสัตว์เลี้ยง ไรบางชนิดที่อาศัยอยู่ในบ้านเรือน อาจทำลายอาหารที่เก็บไว้หรือปะปนอยู่ในฝุ่นละออง ข้าวของเครื่องใช้ เป็นสาเหตุให้เกิดความเจ็บป่วยของคน เช่น โรคภูมิแพ้ ไรหลายชนิดทำลายต้นพืชและผลผลิต และก่อให้เกิดปัญหาเรื่องการระบาดของไร โดยเฉพาะไรแมงมุมหรือไรแดง (Acari: Tetranychidae) ที่ระบาดและทำลายผลผลิตต่างๆทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก โดยในประเทศไทย ชนิดที่สำคัญได้แก่ ไรแดงหม่อน ไรแมงมุมคันซาว่า ไรแดงมะม่วง ไรสองจุด และไรแดงแอฟริกัน โดยพบว่ามีการระบาดมากในพืชตระกูลถั่ว มันสำปะหลัง หม่อน กระเจี๊ยบ มะม่วง และผักตระกูลแตง เช่น แตงกวา แตงไทย เป็นต้น ไรแมงมุมมีบทบาทสำคัญตั้งแต่การปลูก การติดดอก การออกผล จนถึงการรักษาผลผลิตทางการเกษตร ประเทศไทยมีการส่งออกสินค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก หลายชนิดต้องประสบปัญหาเนื่องจากตรวจพบไรศัตรูพืชติดไปกับผลผลิตที่ส่งออก ซึ่งไรได้เข้าทำลายผลผลิตทำให้เกิดความเสียหาย โดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากพืช เพราะไรมีขนาดเล็กจึงสังเกตเห็นได้ยากด้วยตาเปล่า เมื่อมีการระบาดของไรอย่างรุนแรงและผลผลิตเสียหายเป็นจำนวนมาก จึงทำให้มีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัด ไรในปริมาณมากและเกิดผลเสียตามมาทั้งด้านสุขภาพและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ในปัจจุบัน อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยยังไม่มี การศึกษาถึงความหลากหลายของไรกลุ่มนี้ในพืชชนิดต่างๆว่ามีชนิดใดบ้างที่มีการติดเชื้อด้วยแบคทีเรีย *Wolbachia* จึงเป็นที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัยในครั้งนี้ เพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุม ป้องกัน และกำจัดไรศัตรูพืชเหล่านี้ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นนอกเหนือจากการใช้สารเคมีและวิธีการอื่นๆ โดย การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นสำรวจการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ และการกระจายตัวของไรศัตรูพืชบางชนิดเช่น ไรแมงมุมที่พบในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการกระจายตัวของประชากรไรศัตรูพืชบางชนิดในวงศ์ Tetranychidae ในประเทศไทย
2. เพื่อตรวจหาการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในประชากรไรศัตรูพืชได้แก่ ไรแมงมุมในวงศ์ Tetranychidae ที่พบในพืชเศรษฐกิจบางชนิดที่สำคัญของประเทศไทย

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาวิจัยเพื่อหาการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* รวมถึงความหลากหลาย และการกระจายตัวของไรศัตรูพืชที่สำคัญเช่น ไรแดงมันสำปะหลัง ไรแมงมุมคันชวา ไรแดงมะม่วง ไรสองจุด และไรแดงแอฟริกัน ที่พบในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยได้แก่ มันสำปะหลัง มะม่วง กุหลาบ เป็นต้น ซึ่งจะทำการตรวจสอบจำนวนและชนิดของไรชนิดต่างๆโดยใช้หลักการจำแนกชนิดตามอนุกรมวิธาน เพื่อใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและกำจัดไรศัตรูพืชชนิดต่างๆที่พบในพืชเศรษฐกิจที่ทำการศึกษาในครั้งนี้

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

ใช้วิธีการเก็บตัวอย่างไรจากพืชบางชนิด แล้วนำมาศึกษาต่อทางอณูชีววิทยาในห้องปฏิบัติการวิจัย

1.5 สมมุติฐานงานวิจัย

ถ้าแบคทีเรียใน genus *Wolbachia* ติดเชื้อในกลุ่มสัตว์ขาปล้องแล้ว แบคทีเรียใน genus *Wolbachia* น่าจะติดเชื้อในไรศัตรูพืชด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.6 คำสำคัญของการวิจัย

การกระจายตัว พืชเศรษฐกิจ การติดเชื้อ ไรศัตรูพืช แบคทีเรีย *Wolbachia*

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

โครงการวิจัยนี้จะทำให้ทราบถึงความหลากหลายและการกระจายตัวของประชากรไรศัตรูพืชชนิดที่สำคัญเช่น ไรแมงมุมในวงศ์ Tetranychidae ที่พบในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และทำให้ทราบถึงสถานภาพของการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในประชากรไรศัตรูพืชดังกล่าว ซึ่งจะเป็นการศึกษาวิจัยครั้งแรกในประเทศไทย นอกจากนี้แล้ว ในอนาคตนักวิทยาศาสตร์อาจใช้แบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นเสมือนตัวพาหะนำพายีนต้านเชื้อก่อโรคเข้าไปสู่ไรศัตรูพืชแทนที่พลาสมิด (Plasmid) และลดความสูญเสียในพืชเศรษฐกิจจากการทำลายของไรได้



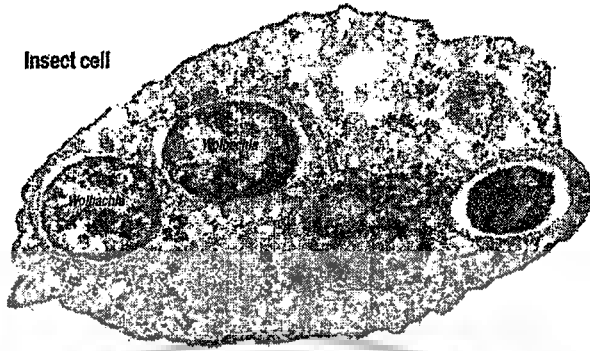
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แบคทีเรีย *Wolbachia* จัดเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายเชื้อริคเกตเซีย (*Rickettsia*-like bacteria) และจัดอยู่ในกลุ่มของ Alpha-Proteobacteria แบคทีเรีย *Wolbachia* (ภาพที่ 2.1) อาศัยอยู่ร่วมกัน (Endosymbionts) ภายในเซลล์ส่วนต่างๆของสัตว์ให้อาศัย ซึ่งเป็นกลุ่มของสัตว์ขาปล้อง (Arthropods) และหนอนตัวกลม (Filarial nematode) โดยจะพบมากบริเวณเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ (Reproductive tissues) ของสัตว์ให้อาศัยดังกล่าว (Wiwatanaratnabutr *et al.*, 2009) มีรายงานว่าพบการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มากที่สุดในแมลง โดยเฉพาะในยุงและไร การศึกษาการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในยุงลาย พาหะ พบว่าแบคทีเรียดังกล่าว ได้ส่งผลถึงพฤติกรรมของยุงลายพาหะในด้านต่างๆ เช่น พฤติกรรมการวางไข่ (Oviposition behavior) พฤติกรรมการหาโฮสต์ (Host-seeking behavior) และ พฤติกรรมการผสมพันธุ์ (Mating behavior) ของยุงพาหะ (Wiwatanaratnabutr *et al.*, 2010) การแพร่เชื้อของแบคทีเรีย *Wolbachia* จะถ่ายทอดผ่านทางระบบสืบพันธุ์จากแม่ไปสู่ลูก และสามารถชักนำให้เกิดความผิดปกติทางระบบสืบพันธุ์ในสัตว์ให้อาศัยได้หลายรูปแบบ ที่สำคัญคือปรากฏการณ์การไม่เข้ากันของไซโทพลาซึม (Cytoplasmic incompatibility) กล่าวคือเมื่อมีการผสมพันธุ์กันระหว่างตัวผู้ที่ติดเชื้อมีกับตัวเมียที่ไม่ติดเชื้อ ตัวอ่อนที่เกิดจากการผสมพันธุ์จะมีพัฒนาการที่ผิดปกติหรืออาจจะไม่เจริญและตายไปในที่สุด การติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ สามารถพบได้ในทุกๆระยะการเจริญเติบโตของแมลงต่างๆ ได้แก่ ระยะตัวอ่อน (Larva) ระยะดักแด้ (Pupa) และระยะตัวเต็มวัย (Adult) ซึ่งจะมีปริมาณการติดเชื้อที่แตกต่างกัน ขึ้นกับปัจจัยต่างๆทางสภาพแวดล้อมเช่น อุณหภูมิ และความหนาแน่นของการอยู่ร่วมกันของยุงลายพาหะ (Wiwatanaratnabutr and Kittayapong, 2009) นอกจากนี้แล้ว ยังมีรายงานการศึกษาการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในไรชนิดต่างๆที่พบได้ในแปลงปลูกพืชหลายชนิด เช่น การศึกษาการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในไรแมงมุม (genus *Tetranychus*) 5 ชนิดที่พบในพืชชนิดต่างๆในประเทศจีน ซึ่งได้รายงานว่า มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ในปริมาณที่สูงในไรทั้ง 5 ชนิด (31.4 ถึง 100 %) (Zhang *et al.*, 2013) และการศึกษาแบคทีเรีย *Wolbachia* ที่ติดเชื้อในประชากรไรสองจุด (*Tetranychus urticae*) ซึ่งพบในประเทศญี่ปุ่น ได้ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางการสืบพันธุ์แบบการไม่เข้ากันของไซโทพลาซึม (Cytoplasmic incompatibility) ในไรดังกล่าว (Tetsuo *et al.*, 2007) ในปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก กำลังมีความสนใจที่จะใช้แบคทีเรีย *Wolbachia* เป็นเสมือนตัวพาหะนำพายีนต้านเชื้อก่อโรคเข้าไปสู่ในไรหรือแมลงแทนที่พลาสมิด (Plasmid) เพราะแบคทีเรีย *Wolbachia* สามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกรุ่นต่อไปได้อย่างต่อเนื่อง

Insect cell



ภาพที่ 2.1 แบคทีเรีย *Wolbachia*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไรศัตรูพืช เป็นสัตว์มีขนาดเล็กมาก อาจมองไม่เห็นด้วยตาเปล่า ทำลายพืชโดยดูดน้ำเลี้ยงบนส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ใบ ดอก ลำต้น ผล และราก ก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชและผลผลิต ไร เห็บ และแมงมุมเป็นสัตว์ที่ถูกจำแนกอยู่ใน Phylum เดียวกันกับแมลง เนื่องจากมีขาเป็นปล้องๆ เรียงติดต่อกัน และมีผนังลำตัวแข็งห่อหุ้มร่างกาย แต่มีอวัยวะที่ทำหน้าที่เสมือนปาก ประกอบด้วย chelicera แทนที่จะเป็นฟันกราม (mandible) เช่นในแมลง และการที่ไรเป็นสัตว์ที่ไม่มีหนวด นักอนุกรมวิธานจึงจำแนกให้ไรและเห็บอยู่ใน Subphylum Chelicerata ในขณะที่จำแนกให้แมลงอยู่ใน Subphylum Mandibulata (มานิตา คงชื่นสินและคณะ 2547) ไรศัตรูพืชที่สำคัญจำแนกได้เป็น 4 จำพวก ได้แก่ ไรแมงมุมหรือไรแดง อยู่ในวงศ์ Tetranychidae ที่สำคัญมีหลายชนิด เช่น ไรแดงแอฟริกัน ไรแดงหมอนหรือไรแดงมันสำปะหลัง ไรแดงมะม่วง ไรแมงมุมคันชาวา และ ไรสองจุด เป็นต้น ระบาดมากในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ทูเรียน มันสำปะหลัง มะม่วง พืชตระกูลถั่ว และผักตระกูลแตง เป็นต้น ไรแดงเทียม อยู่ในวงศ์ Tenuipalpidae ชนิดที่สำคัญ คือ ไรแดงเทียมในกล้วยไม้ ไรขาว อยู่ในวงศ์ Tarsonemidae ที่สำคัญที่สุดคือ ไรขาวพริก; *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) เป็นศัตรูพืชรบาดมากในพริก พืชผักตระกูลถั่ว และพืชผักตระกูลแตง และไรสีขา อยู่ในวงศ์ Eriophyidae เป็นไรที่มีเพียงสีขา เช่น ไรกระเทียม; *Aceria tulipae* (Keifer) เป็นต้น

ไรแมงมุมหรือไรแดง (Acari: Tetranychidae) เป็นไรที่มีขนาดเล็กกว่าไรศัตรูพืชในวงศ์อื่น ๆ มองเห็นด้วยตาเปล่าเป็นจุดเล็ก ๆ สีแดง เคลื่อนไหวไปมาบนใบพืช เมื่อโตเต็มวัยมีขนาดเล็กกว่าหัวเข็มหมุดเล็กน้อย ตัวเมียขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ ลำตัวอ้วนกลมหรือรูปไข่ ส่วนตัวผู้มีลักษณะกว้างทางส่วนหน้าและค้อย ๆ เรียวแหลมมาทางส่วนท้ายของลำตัว ตัวเมียมีสีแดงหรือสีส้ม เมื่อโตเต็มที่ตัวผู้โดยทั่วไปมีสีอ่อนกว่าตัวเมีย ไรแดงหรือไรแมงมุมมักอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม สร้างเส้นใยปกคลุมไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย จากอันตรายต่างๆ หรือใช้ย้ายที่อยู่เมื่ออาหารหมด ด้วยลักษณะที่ลำตัวสีแดงและสร้างเส้นใยได้คล้ายแมงมุม ทำให้มีผู้นิยมเรียกไรนี้ว่า ไรแดงหรือไรแมงมุม

ไรแดงแอฟริกัน (African red mite) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Eutetranychus africanus* (Tucker) ตัวเมีย 1 ตัว วางไข่ได้ 13-56 ฟอง ตัวเมียลำตัวกลมแบน สีน้ำตาลเข้ม ตัวยาวประมาณ 417.67 ไมครอน กว้าง 3350.33 ไมครอน ขาทั้ง 4 คู่ สีเหลืองอ่อน ที่ปลายขาไม่มีอวัยวะระหว่างเล็บ 2 ข้าง (empodium) มีตาเป็นจุดสีแดงเล็ก อยู่บริเวณ 2 ข้างของลำตัวตอนหน้า ขนบนหลังสั้น ปลายขนบานออกคล้ายกระบองหรือไม้พาย ขนที่ส่วนท้องเป็นเส้นเล็ก ๆ ปลายเรียวแหลม ที่ฐานของปล้องแรกของขาที่ติดกับลำตัว (coxa) คู่ที่ 2 จะมีขนจำนวน 2 เส้นตัวผู้ลำตัวเรียวแคบ ก้นแหลม ขาขาว ขนบนหลังเรียวเล็กและสั้นกว่าขนบนหลังของตัวเมีย อวัยวะเพศผู้มีส่วนโคนใหญ่ ปลายเรียวเล็กและโค้งงอขึ้น ขนาดลำตัวเล็กกว่าตัวเมีย ปัจจุบันเป็นศัตรูที่สำคัญชนิดหนึ่งของทูเรียน ไรแดงแอฟริกัน ดูดกินน้ำเลี้ยงอยู่บริเวณผิวใบทูเรียน ทำให้เกิดเป็นจุดประสีขาวกระจายอยู่ทั่วบนใบ ต่อมาจุดประสีขาวจะแผ่ขยายออกไปเป็นบริเวณกว้างจนใบมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า ใบอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า, อากาศหนาวชื้นและมีคราบสีขาวเกาะติดเป็นผงขาว ๆ คล้ายฝุ่นจับ ถ้าหากมีไรแดงทำลายใบเป็นปริมาณไม่มากนักใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากและต่อเนื่อง จะทำให้ใบร่วงและมีผลกระทบต่ออาการออกดอกและติดผล นอกจากทุเรียนแล้ว ไรแดงแอฟริกันยังเป็นศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจอีกหลายชนิด เช่น มะละกอ ส้มเขียวหวาน มะนาว ส้มโอ มะนาว มันสำปะหลัง ฝ้าย ถั่วเหลือง แดงโม คำลิ่ง ผักบุ้ง เป็นต้น

ไรแดงมันสำปะหลังหรือไรแดงหม่อน (Mulberry red mite) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tetranychus truncatus* Ehara ตัวเมียมีรูปร่างลักษณะกลมเป็นรูปไข่ โดยมีด้านหน้าของลำตัวกว้างกว่าทางด้านท้าย ความยาวของลำตัวโดยเฉลี่ย 503.66 ไมครอน กว้างโดยเฉลี่ย 377.33 ไมครอน ลำตัวมีสีแดงสด 2 ข้าง ลำตัวมีแถบสีแดงเข้ม และมีตาเป็นจุดสีแดง อยู่บริเวณบ่าทั้ง 2 ข้าง อวัยวะเพศผู้หึ่งงอขึ้นด้านหลัง ส่วนปลาย (knob) เบนเข้าหาลำตัวเล็กน้อย ด้านหน้าของ knob ของอวัยวะเพศผู้มีลักษณะกลมมน ด้านบนของ knob เว้าลงเป็นแอ่งเล็กน้อย ส่วนด้านหลังของ knob ยื่นแหลม ไรชนิดนี้เป็นศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด พืชที่มักจะมีไรชนิดนี้ระบาดและทำลายเสียหายอย่างรุนแรง ได้แก่ มันสำปะหลัง และหม่อน (ภาพที่ 3) การทำลายของไรมีผลต่อการเจริญเติบโตของมันสำปะหลัง (Navajas *et al.*, 1994) โดยเฉพาะหากมีการระบาดของไรในช่วงที่มันสำปะหลังยังเล็กจะมีผลต่อการสร้างหัวจนบางพื้นที่เกษตรกรไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ นอกจากนี้ ยังเป็นศัตรูที่สำคัญของพืชอื่น ๆ อีกหลายชนิด เช่น บวบ แคน ถั่วพู ถั่วฝักยาว มะรุม ถั่วลิสง ละหุ่ง มันเทศ กระเจี๊ยบ ถั่วเขียว โสน ดาวเรือง กล้ายไม้ ทานตะวัน และเทียน เป็นต้น

ไรแดงมะม่วง (Mango red mite) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oligonychus mangiferus* (Rahman and Sapra) ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของไรจะดูดและเข้าทำลายหน้าใบของมะม่วงซึ่งส่วนใหญ่เป็นใบที่แก่เต็มที่ ในกรณีของมะม่วงที่อายุประมาณ 2-3 ปี มักพบการระบาดของไรบนใบในระยะเพลลาด โดยจะดูดทำลายตามแนวเส้นกลางใบและปลายใบ พบการทำลายอย่างรุนแรงในบางท้องที่ หากมีการระบาดของไรอย่างรุนแรงและต่อเนื่องเป็นเวลานาน อาจมีผลให้มะม่วงหยุดการเจริญเติบโตได้

ไรแมงมุมคันซาว่า (Kanzawa spider mite หรือ Cassava spider mite) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tetranychus kanzawai* Kishida ไรชนิดนี้แต่เดิมพบว่าเป็นศัตรูที่สำคัญของกุหลาบ โดยจำแนกชนิดไว้ภายใต้ชื่อ *Tetranychus hydrangeae* Pritchard and Baker นอกจากนั้นยังพบว่าเป็นศัตรูสำคัญของฝ้ายและพืชเศรษฐกิจอีกหลายชนิด ต่อมาเมื่อได้มีการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของไร โดยละเอียดแล้วพบว่า *T. hydrangeae* นี้ น่าจะเป็นชนิดเดียวกันกับไรแมงมุมคันซาว่า *Tetranychus kanzawai* Kishida ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของไรชอบดูดทำลายอยู่บริเวณใต้ใบ โดยจะสร้างใยขึ้นปกคลุมผิวใบบริเวณที่ไรอาศัยอยู่ร่วมกัน กุหลาบที่ถูกไรชนิดนี้ดูดทำลาย ในระยะแรกจะมีรอยประสีขาวเป็นจุดเล็ก ๆ ปรากฏขึ้นที่บริเวณหน้าใบ ต่อมาจุดประสีขาวนี้จะค่อยๆ แผ่ขยายออกเป็นบริเวณกว้าง จนทำให้กุหลาบทั้งใบมีอาการขาวซีด ใบจะค่อยๆ เหลือง และแห้งหลุดร่วงไป ในไร่ฝ้ายมักพบไรชนิดนี้ระบาดเป็นหย่อม ๆ ในบางท้องที่โดยจะสังเกตเห็นใบฝ้ายในบริเวณที่ถูกไรชนิดนี้ดูดทำลาย มีลักษณะเป็นปื้นสีแดงที่บริเวณหน้าใบ บางครั้งการระบาดของไรรุนแรงมากจนทำให้ฝ้ายบางพันธุ์ใบร่วง และสมอแตกเร็วกว่าฝ้ายพันธุ์อื่น ๆ ที่ปลูกอยู่ในบริเวณเดียวกัน ไรแมงมุมคันซาว่ามีเขตแพร่กระจายอยู่แทบทุกภาคของประเทศไทย โดยจะไม่จำกัดอยู่เพียงใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำใบใช้

ดูดทำลายพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ทั้งในบริเวณที่ราบที่มีอากาศค่อนข้างร้อน และในที่สูงตามไหล่เขาที่มีอากาศหนาวเย็น ในต่างประเทศมีรายงานว่าโรชนิดนี้เป็นศัตรูที่สำคัญของ ชา หม่อน ถั่วเหลือง สาธี่ องุ่น ส้ม คาเลีย ท้อ เวอบีน่า และ ไฮเดรนเยีย โดยพบในญี่ปุ่น ฟิลิปปีนส์ และ อินเดีย ในประเทศไทยพบทำลายกุหลาบ ผ้าย มะละกอ สตรอเบอรี่ ท้อ องุ่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่วลิสงละหุ่ง กระเทียม แดงไทย ถั่วฝักยาว มะเขือ แกลดิโอลัส คาวเรือง โป๊ยเซียน และ ข้าว เป็นต้น

ไรสองจุด (Two spotted spider mite หรือ Glass house spider mite) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tetranychus urticae* Koch ไรสองจุดเป็นศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจหลายชนิดในอเมริกา ยุโรป และ ในประเทศแถบที่มีอากาศอบอุ่น (temperate) สำหรับในประเทศที่มีอากาศร้อน (tropical) เช่น ประเทศไทย จะพบไรสองจุดได้เฉพาะในแถบที่ราบเชิงเขา หรือเทือกเขาซึ่งมีภูมิอากาศหนาวเย็น เช่น คอยอินทนนท์ อ่างขาง โดยจะพบระบาดอย่างรุนแรงในแปลงสตรอเบอรี่ ท้อ และไม้ดอกไม้ประดับต่าง ๆ ที่นำพันธุ์เข้ามาจากต่างประเทศ ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของโรชนิดนี้ จะดูดกินน้ำเลี้ยงอยู่บริเวณใต้ใบสตรอเบอรี่ ทำให้ผิวใบบริเวณที่ไรดูดทำลายอยู่จะมีลักษณะกร้านได้ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง ผิวใบด้านบนเหนือบริเวณที่ไรดูดทำลายอยู่จะเห็นเป็นจุดค่างขาวเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไป เมื่อการทำลายรุนแรงขึ้น จุดค่างขาวเล็ก ๆ เหล่านี้จะค่อย ๆ แผ่ขยายติดต่อกันเป็นบริเวณกว้าง จนทำให้ทั่วทั้งใบ มีลักษณะเหลืองซีด ใบร่วง และอาจเป็นผลทำให้สตรอเบอรี่หยุดชะงักการเจริญเติบโตและผลผลิตลดลงได้ ไรที่ทำลายอยู่บริเวณใต้ใบนี้ เมื่อประชากรหนาแน่นมากจะสร้างใยสาน โยงไปมาระหว่างใบและยอดของต้นพืชที่มันอาศัยอยู่ เพื่อรอจังหวะให้ลมพัดพาตัวไรที่เกาะอยู่ตามเส้นใย ลอยไปตกยังใบหรือยอดพืชต้นอื่นๆ ที่มีอาหารอุดมสมบูรณ์กว่าต่อไป ไรสองจุดเป็นศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจ อีกหลายชนิด เช่น กุหลาบ หน้าวัว ชวนชม ลั่นมังกิ ถั่วฝักยาว วัชพืช และพืชแซมในแปลงสตรอเบอรี่ เช่น กระเทียม คื่นฉ่าย และ ไม้ดอกไม้ประดับอีกหลายชนิด (มานิตา คงชื่นสิน 2544)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างไรและการจำแนกชนิด

ทำการเก็บตัวอย่างไรแมงมุมรวม 5 ชนิดที่ระบาดและทำลายพืชเศรษฐกิจอยู่ในปัจจุบัน ได้แก่ ไรแดงแอฟริกัน ไรแดงมันสำปะหลัง ไรแดงมะม่วง ไรแมงมุมคันชวา และ ไรสองจุด ที่พบในแหล่งปลูกพืชต่างๆในประเทศไทย โดยในแต่ละบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างไร ประชากรไรจะถูกเก็บตัวอย่างแบบสุ่ม โดยจะเก็บตัวเต็มวัยของไรจำนวน 20–40 ตัวในพืชตัวอย่าง จากนั้นทำการจำแนกชนิดของไรที่จับได้ดังกล่าวโดยใช้วิธีทางสัตววิทยา ทำการนับจำนวนและแยกเพศของไร จากนั้นจึงนำไรมาใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยาต่อไป

3.2 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA)

สกัดแยกดีเอ็นเอ (DNA) จากตัวเต็มวัยของไรชนิดต่างๆเพื่อใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* โดยใช้วิธีการทางอณูชีววิทยา ซึ่งจะใช้ชุด Kit สำเร็จรูปหรือวิธีการอื่นๆในการสกัดแยกสารพันธุกรรมดังกล่าว จากนั้นจะใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้มากขึ้น โดยใช้ Specific primers ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* ได้แก่ Specific *wsp* primers ซึ่งจำเพาะต่อยีน *wsp* ของ *Wolbachia* และ *groE* primers ซึ่งจำเพาะต่อยีน *groE* ของ *Wolbachia* เป็นต้น สำหรับการสกัดแยกดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* จะใช้ไรตัวเต็มวัยเพศเมียทั้งตัว ดีเอ็นเอจะถูกสกัดแยกโดยการบดเนื้อเยื่อทั้งหมดในสารละลายบัฟเฟอร์ Salt-Tris-EDTA (STE buffer ประกอบด้วย 100 mM NaCl, 10 mM tris HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) 30 ไมโครลิตรในหลอด 1.5 ml. (Baldo *et al.*, 2006) โดยใช้เครื่องมือที่ได้รับการ Sterile แล้วซึ่งมีความสะอาดสูง จากนั้น ส่วนผสมทั้งหมดจะถูก incubated ด้วย proteinase K (10 mg/ml) จำนวน 2 μ l ที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วตามด้วยอุณหภูมิที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ต่อมาจึง centrifuge ส่วนผสมทั้งหมดแล้วนำไปใช้ทันที โดยจะใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้ประมาณ 1-2 μ l เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (Template) หรือ เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C ในการทำ PCR ต่อไป

3.3 การตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction

นำตัวเต็มวัยของประชากรไรแต่ละกลุ่ม จำนวน 20–40 ตัวมาตรวจสอบการติดเชื้อ *Wolbachia* โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งจะทำในเครื่อง Thermal Cycler โดยจะใช้ดีเอ็นเอของแมลง เช่น ยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) ที่รู้แน่นอนว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* เป็น Positive control และใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการ Autoclaved แล้วเป็น Negative control เพื่อตรวจสอบสิ่งเจือปน (Contamination) อื่นๆที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างทำการทดลอง ในแต่ละปฏิกิริยา PCR จะใช้ปริมาณ 20 ไมโครลิตรต่อ 1 หลอดในการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Wolbachia* รวมถึงเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยโดยใช้ Specific primers ที่เหมาะสม ซึ่งยีนที่จะนำมาใช้ในที่นี้จะเรียกว่า *Wolbachia* Outer Surface Protein gene (*wsp*) ซึ่งลำดับเบสของ Forward primer (81F) และ Reverse primer (691R) มีดังนี้ 81F: 5'-TCGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3', 691R: 5'-AAAAATTAACGCTACTCCA-3' ในแต่ละปฏิกิริยา PCR จะประกอบด้วยน้ำกลั่น 13.5 ไมโครลิตร สารละลาย PCR บัฟเฟอร์ 2 ไมโครลิตร, MgCl₂ 25 มิลลิโมลาร์ 2 ไมโครลิตร, dNTPs 10 มิลลิโมลาร์ 0.5 ไมโครลิตร, Specific primers 20 มิลลิโมลาร์ 0.5 ไมโครลิตร และ *Taq* DNA polymerase 1 หน่วย (unit) สำหรับจำนวนรอบและอุณหภูมิที่ใช้จะขึ้นอยู่กับประเภทของ Specific primers ที่ใช้ในกรณีของ Specific *wsp* primers นั้น จะมีจำนวนรอบและอุณหภูมิที่ใช้ดังต่อไปนี้ Initial denaturation ที่ 95°C จำนวน 1 รอบเป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย Denaturation ที่ 95°C เป็นเวลา 1 นาที, Annealing ที่ 55°C เป็นเวลา 1 นาที และ Extension ที่ 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบและ Final extension ที่ 72°C จำนวน 1 รอบเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์และตรวจสอบด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ประมาณ 1-2% gel เพื่อตรวจสอบการปรากฏและความถูกต้องของขนาดดีเอ็นเอที่ได้ โดยจะให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 600 bp ไร่จำนวน 10 ตัวอย่างจากแต่ละกลุ่มประชากรที่ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดดีเอ็นเอถูกต้องและเป็นไปตามที่คาดไว้ ซึ่งถือว่ามีกรดดีเอ็นเอและให้ผลเป็นบวก จะถูกนำไปหาลำดับเบส โดยวิธี direct sequencing ต่อไป

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติแบบต่างๆจะถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง การทดสอบแบบ One-way ANOVA จะใช้ในการประเมิน วิเคราะห์ และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างจำนวน ชนิดของไรที่พบ ข้อมูลที่เกี่ยวข้องจะถูก Normalized และวิเคราะห์โดยใช้ Independent samples *t*-tests

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างไร การจำแนกชนิด และการกระจายตัวของประชากรไรศัตรูพืช

งานวิจัยในโครงการนี้เป็นการสำรวจการกระจายตัวของประชากรไรศัตรูพืชบางชนิดในวงศ์ Tetranychidae ที่พบในประเทศไทย โดยเฉพาะไรแมงมุมหรือไรแดง (Spider mites) ใน order Acari, family Tetranychidae จาก 20 กลุ่มประชากรใน 16 จังหวัดจากทั้ง 4 ภูมิภาคของประเทศไทย การเก็บตัวอย่างได้ดำเนินการในช่วงเดือนตุลาคม 2013 ถึงเดือนมีนาคม 2014 จาก 16 จังหวัดในประเทศไทย ไรเป็นศัตรูพืชของพืชที่สำคัญทางการเกษตรหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ, ถั่ว, พริกไทย และกุหลาบ โดยเฉพาะในภาคกลางและภาคเหนือของประเทศไทย ใน *Tetranychus urticae*, *Tetranychus truncates*, *Tetranychus pueraricola*, *Tetranychus phaselus* และ *Tetranychus kanzawai* ผลวิจัยที่ได้นี้สามารถบอกได้ว่าการติดเชื้อ *Wolbachia* ในไรแมงมุมได้กระจายไปในภูมิภาคต่างๆ ซึ่งการติดเชื้อและการกระจายตัวของ *Wolbachia* ในธรรมชาติอาจได้รับผลกระทบจากปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมและระบบนิเวศบางประการ ผลวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า *Wolbachia* สามารถถูกถ่ายทอดไปได้ทั้งแบบ vertical และ horizontal ซึ่งอาจจะมีพืชเป็นตัวกลาง

4.2 การสกัดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิค PCR

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการสกัดดีเอ็นเอจากไรตัวอย่างและใช้วิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ *wsp*, 16S rRNA และ *FisZ* เพื่อตรวจสอบสถานะการติดเชื้อ *Wolbachia* ในไรแมงมุม จากการศึกษาพบว่า *Wolbachia* ถูกตรวจพบได้ใน *Tetranychus urticae*, *T. truncates*, *T. pueraricola*, *T. phaselus* และ *T. kanzawai* ซึ่งเป็นศัตรูพืชของพืชที่สำคัญทางการเกษตรหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ, ถั่ว, พริกไทย และกุหลาบในหลายภาคของประเทศไทย

4.3 ความชุกและปริมาณความหนาแน่นของการติดเชื้อ *Wolbachia*

ความชุกของการติดเชื้อ *Wolbachia* ในสายพันธุ์ไรเหล่านี้ *Wolbachia* สามารถถูกตรวจพบอยู่ในช่วงร้อยละ 47-100 การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า *Wolbachia* สามารถถูกตรวจพบในประชากรไรเหล่านี้เป็นครั้งแรกในประเทศไทย นอกจากนี้แล้ว ปริมาณความหนาแน่นของการติดเชื้อ *Wolbachia* ในไรแต่ละชนิดยังได้รับการศึกษาโดยใช้เทคนิค Real-time PCR และผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า *T. urticae* มีปริมาณความหนาแน่นของ *Wolbachia* สูงสุดเมื่อเทียบกับไรแมงมุมชนิดอื่นๆ ผลวิจัยที่ได้นี้สามารถบอกได้ว่า การติดเชื้อ *Wolbachia* ในไรแมงมุมได้กระจายไปในภูมิภาคต่างๆทั่วประเทศไทย

ตารางที่ 4.1 แสดงสถานะการติดเชื้อ *Wolbachia* ในไรแมงมุมที่พบประเทศไทยโดยใช้ *wsp*, 16S rRNA และ *FtsZ* genes (C = Central, N = Northern, NE = Northeastern, S = Southern)

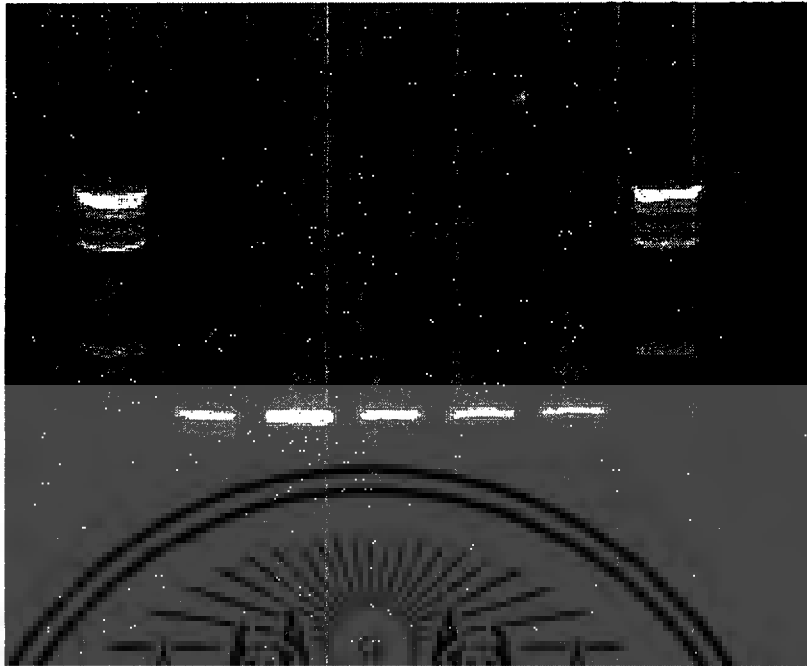
Species name	Location (Province)	Geographic regions	Host Plants	No. of samples tested	No. of positive samples
<i>Eotetranychus cendanai</i> Rimando	Suphan Buri	C	Taro	25	0
	Khon Kaen	NE	Sesbania	12	0
<i>Eutetranychus africanus</i> (Tucker)	Nakhon Pathom	C	Water melon,	9	0
	Khon Kaen	NE	Ivy gourd	6	0
<i>Oligonychus bikarensis</i> (Hirst)	Nakhon Pathom	C	Garlic	30	0
	Chiang Rai	N	Sesbania	18	0
<i>Oligonychus mangiferus</i> Rahman and Supra	Nakhon Pathom	C	long bean	7	0
	Chiang Mai	N	Taro	4	0
<i>Schizotetranychus colocasiae</i> Ehara	Nakhon Pathom	C	Taro	17	0
<i>Schizotetranychus leguminosus</i> Ehara	Suphan Buri	C	Sesbania	22	0
<i>Tetranychus fijiensis</i> (Hirst)	Nakhon Pathom	C	Taro	39	0
	Suphan Buri	C	Garlic	13	0
	Udon Thani	NE	Muskmelon	5	0
	Khon Kaen	NE	long bean	11	0
<i>Tetranychus kanzawai</i> Kishida	Nakhon Pathom	C	Okra, Yard	35	33
	Khon Kaen	NE	long bean	58	54
	Suphan Buri	C	Cucumber	26	23
<i>Tetranychus macfarlanei</i> Baker and Pritchard	Khon Kaen	NE	Soybean	12	0
<i>Tetranychus piercei</i> McGregor	Nakhon Pathom	C	Eggplant	6	0
<i>Tetranychus phaseus</i> Ehara	Khon Kaen	NE	long bean	35	34
<i>Tetranychus pueraricola</i> Ehara and Gotoh	Khon Kaen	NE	Garlic	22	21
<i>Tetranychus truncatus</i> Ehara	Ayutthaya	C	Okra,	12	8
	Suphan Buri	C	Muskmelon	26	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<i>Tetranychus tumidus</i> Banks	Songkla	S	Morning glory	5	0
<i>Tetranychus urticae</i> Koch	Suphan Buri	C	Peppers	13	13
	Udon Thani	NE	Tomatoes	21	21
	Nakhon Pathom	C	Corn	5	5
	Chai Nat	C	Potatoes	31	31
	Suphan Buri	C	Garlic	18	18
	Buriram	NE	Taro	9	9
	Lampang	N	Muskmelon	5	5
	Nakhon Sawan	C	Potatoes	27	27
	Chaityaphum	NE	Potatoes	15	15



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 แสดงภาพผลผลิต PCR ที่ได้จาก gel electrophoresis บ่งชี้การติดเชื้อ *Wolbachia* ในไร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาเรื่องแบคทีเรีย *Wolbachia* ซึ่งเป็น endosymbiont ที่ติดเชื้อในกลุ่มสัตว์ขาปล้องหลายชนิดนั้น นับว่ามีความสำคัญเป็นอย่างมากในงานวิจัยในปัจจุบัน เนื่องจาก *Wolbachia* มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางระบบสืบพันธุ์ของโฮสต์หรือสัตว์ให้อาศัย งานวิจัยในโครงการนี้เป็นการสำรวจครั้งแรกของ endosymbionts เหล่านี้ในไรแมงมุมหรือไรแดง (Spider mites) (Acari: Tetranychidae) จาก 20 กลุ่มประชากรใน 16 จังหวัดรวม 4 ภูมิภาคของประเทศไทย การเก็บตัวอย่างได้ดำเนินการในช่วงเดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนมีนาคม 2557 ในประเทศไทย *Wolbachia* ได้ถูกตรวจพบในแมลงหลายชนิดแต่ไม่เคยมีรายงานว่าตรวจพบ *Wolbachia* ในประชากรตามธรรมชาติของไรแมงมุม ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยใช้วิธี Polymerase chain reaction โดยใช้ไพรเมอร์ *wsp*, 16S rRNA และ *FtsZ* เพื่อยืนยันสถานะการติดเชื้อ *Wolbachia* ในไรแมงมุม จากการศึกษาพบว่า *Wolbachia* สามารถตรวจพบได้ใน *Tetranychus urticae*, *T. truncatus*, *T. pueraricola*, *T. phaseolus* และ *T. kanzawai* ซึ่งเป็นศัตรูพืชของพืชที่สำคัญทางการเกษตรหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ, ถั่ว, พริกไทย และกุหลาบในหลายภาคของประเทศไทย ความชุกของการติดเชื้อ *Wolbachia* ในสายพันธุ์ไรเหล่านี้อยู่ในช่วงร้อยละ 47-100 การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า *Wolbachia* สามารถถูกตรวจพบในประชากรไรเหล่านี้เป็นครั้งแรกในประเทศไทย นอกจากนี้แล้วปริมาณความหนาแน่นของการติดเชื้อ *Wolbachia* ในไรแต่ละชนิดยังได้รับการศึกษาโดยใช้เทคนิค Real-time PCR และผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า *T. urticae* มีปริมาณความหนาแน่นของ *Wolbachia* สูงสุดเมื่อเทียบกับไรแมงมุมชนิดอื่นๆ ผลวิจัยที่ได้นี้สามารถบอกได้ว่า การติดเชื้อ *Wolbachia* ในไรแมงมุมได้กระจายไปในภูมิภาคต่างๆ ซึ่งการติดเชื้อและการกระจายตัวของ *Wolbachia* ในธรรมชาติอาจได้รับผลกระทบจากปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมและระบบนิเวศบางประการ ผลวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า *Wolbachia* สามารถถูกถ่ายทอดไปได้ทั้งแบบ vertical และ horizontal ซึ่งอาจจะมีพืชเป็นโฮสต์ตัวกลาง ดังนั้น *Wolbachia* อาจจะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างมากในการควบคุมศัตรูพืช เช่น ไรแมงมุม ได้ในอนาคต

5.2 ข้อเสนอแนะ

ไม่มี

บทที่ 6
สรุปผลผลิตงานวิจัย

6.1 ผลงานวิจัยตีพิมพ์

Wolbachia infection in the spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) from Thailand.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

มานิตา คงชื่นสิน 2544 ศัตรูธรรมชาติของไรและการควบคุมไรศัตรูพืชโดยชีววิธี ใน เอกสารวิชาการ
ไรศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กองกีฏและสัตววิทยา กรม
วิชาการเกษตร:กรุงเทพฯ

มานิตา คงชื่นสิน พิเชฐ เขาวนั้วฒนาวงศ์ พลอยชมพู กรวิภาศเรือง สิทธิศิริโรดม แก้วสวัสดิ์ 2547 ไรศัตรู
มันสำปะหลัง กองกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

Baldo L, Dunning Hottopp JC, Jolley KA. 2006. Multilocus sequence typing system for the
endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7098–7110.

Navajas, M., Gutierrez, J., Bonato, O., Bolland, H.R. and Mapangou-Divassa, S. 1994. Intraspecific
diversity of the Cassava Green Mite *Mononycheltus progresivus* (Acari: Tetranychidae) using
comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding.
Experimental & Applied Acarology 18: 351-360.

Tetsuo G, Jun S, Hiroaki N, Yasuki K. 2007. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in
Japanese populations of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Experimental & Applied
Acarology* 42: 1–16.

Wiwatanaratnabutr I, Allan S, Linthicum K, Kittayapong P. 2010. Strain-specific differences in
mating, oviposition and host-seeking behavior of *Wolbachia*-infected and uninfected *Aedes
albopictus* mosquitoes. *The Journal of the American Mosquito Control Association* 26(3):
265-273.

Wiwatanaratnabutr I, Kittayapong P, Caubet Y, Bouchon D. 2009. Molecular phylogeny of
Wolbachia strains in arthropod hosts based on *groE*-homologous gene sequences. *Zoological
Science* 26: 171-177.

Wiwatanaratnabutr I, Kittayapong P. 2009. Effects of crowding and temperature on *Wolbachia*
infection density among life cycle stages of *Aedes albopictus*. *Journal of Invertebrate
Pathology* 102(3): 220-224.

Wiwatanaratnabutr S, Kittayapong P. 2006. Effects of temephos and temperature on *Wolbachia* load
and life history traits of *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology* 20: 300-307.

Zhang YK, Zhang KJ, Sun JT, Yang XM, Ge C, Hong XY. 2013. Diversity of *Wolbachia* in Natural Populations of Spider Mites (genus *Tetranychus*): Evidence for Complex Infection History and Disequilibrium Distribution. *Microbial Ecology* 65: 731–739.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย

หมวดค่าใช้จ่าย	งบประมาณรวม ทั้งโครงการ (บาท)	ค่าใช้จ่าย (บาท)	คงเหลือ (บาท)
งบบุคลากร : ค่าจ้างชั่วคราว	40,000	40,000	-
งบดำเนินงาน			
ค่าตอบแทน	-	-	-
ค่าใช้สอย	15,000	15,000	-
ค่าวัสดุ	45,000	45,000	-
ค่าสาธารณูปโภค	-	-	-
งบลงทุน: ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
รวม	100,000	100,000	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติผู้วิจัย

Name: Itsanun Wiwatanaratanabutr

Sex: Male

Date of Birth: November 9th, 1977

Age: 38 years

Place of Birth: Bangkok, Thailand

Nationality: Thai

Marriage Status: Single

E-mail: itsanun_w@yahoo.com, itsanun.wi@kmitl.ac.th

EDUCATION

2000-2006 **Ph.D. (Biology) (International Program)**, Center of Excellence for Vectors and Vector-Borne Diseases, and Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand. **Dissertation topic: *Wolbachia* Bacteria of Arthropods: Phylogenetic Relationship, Relative Density and Host Effects**

Major-advisor: Assoc. Prof. Dr. Pattamaporn Kittayapong

Co-advisors: Prof. Dr. Didier Bouchon (Université de Poitiers, France), Prof. Dr. Visut Baimai, Assist. Prof. Dr. John Milne (Mahidol University) and Dr. Sandra Allan (United States Department of Agriculture, Florida, USA)

External committee:

Prof. Dr. John Werren (University of Rochester, USA)

(*The study was supported by The Royal Golden Jubilee Scholarship from The Thailand Research Fund)

1996-2000 **B.Sc. (Biology) (Class Honors)**, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand. **Project topic: Cloning of Dihydrofolate Reductase from Malaria Parasite, *Plasmodium falciparum*.** Advisor: Assist. Prof. Dr. Pongchai Harnyuthanakorn

(*The study was supported by The Development and Promotion of Science and Technology Talents Project Scholarship from The Institute for the Promotion of Teaching Science and Technology)

RESEARCH, TEACHING & PROFESSIONAL EXPERIENCES

- 2015-2016 Visiting researcher (6 months) at Bio21 Institute, School of BioSciences, Faculty of Science, The University of Melbourne, Australia
- 2015 Visiting researcher (6 months) at Department of Genetics, The University of Cambridge, England, United Kingdom
- 2015 Visiting scientist at Northern Mountainous Agriculture and Forestry Science Institute, Vietnam
- 2014 Invited speaker for the International Training Workshop on Major Communicable Diseases in Developing Countries at Jinan, Shandong, China sponsored by the Chinese Ministry of Science and Technology and the School of Medicine and Life Sciences of the Shandong Academy of Medical Sciences, China
- 2014 Visiting researcher (2 months) at Department of Forest & Soil Sciences, The University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Austria
- 2013-present Assistant Professor at Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand
- 2013-present Secretary of International Graduated Studies and Research Support, Head of Public Relations and International Affairs, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
- 2012 Academic committee of The 13th National Academic Conference of Public Health, Bangkok, Thailand
- 2011 Committee for science project competition (Thailand section) for the 18th International Conference of Young Scientists (ICYS), Russia
- 2010-present Reviewer of international journals: Annals of the Entomological Society of America, Journal of Vector Ecology, Insect Physiology, Infection and Drug Resistance, Research and Reports in Tropical Medicine, Research and Reports in Biology
- 2010-present Editor and translator of the textbook, Essentials of Biology by Sylvia S. Mader to Thai in collaboration with The McGraw-Hill Companies
- 2010 Secretary of Faculty Senate and Head of Public and International Relations Office, Faculty of Public Health, Mahidol University
- 2009-2012 Lecturer at Department of Parasitology and Entomology, Faculty of Public Health, Mahidol University

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ภายนอก

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2009 Guest lecturer in Biology and English courses for Saint Louis School, Chachoengsao, Thailand
- 2009 Guest lecturer for Host-Microbe Interactions at Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University
- 2009 Guest lecturer for Insects, Animal, Plant Pests and Their Control at School of Crop Production Technology, Suranaree University of Technology, Thailand
- 2008 Guest lecturer in Biology course for Assumption Samutprakan School
- 2008 Guest lecturer for Molecular Biology Application in Pest Management at Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University
- 2008 Committee in the Science Fair Project and Competitions of Robocop 2008 organized by Saint Gabriel's College, Thailand
- 2007 Guest speaker at Laboratory of Animal Physiology, University of Neuchatel, Switzerland
- 2006-2008 Researcher at Center of Excellence for Molecular Biology and Biotechnology, Mahidol University, Thailand
- 2005 Guest speaker at Department of Molecular Biology and Biochemistry, University of California, Irvine, USA
- 2005 Visiting Researcher (6 months) at Center for Medical, Agricultural and Veterinary Entomology, USDA, Florida, USA
- 2005 Visiting Scientist at Department of Entomology, Cornell University, Ithaca, USA
- 2005 Organizing staff for 16th Annual Biology of Disease Vectors Course organized by Colorado State University, USA and Mahidol University
- 2004 Guest lecturer for English course for nurses at Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University
- 2003-2007 Teacher of English course at Siam Computer and Language School and ECC Language School, Thailand
- 2002-2003 Visiting Researcher (1 year) at Laboratory of Ecology, Evolution, Symbiosis, University of Poitiers, CNRS UMR 6556, Poitiers, France
- 2000-2004 Representative of host lab in Open House Academic Fair for teaching PCR, real-time quantitative PCR and other molecular biology techniques for undergraduate, graduate and international students organized by Faculty of Science, Mahidol University

- 2000 Organizing staff in the Chulalongkorn Academic Day at Faculty of Science, Chulalongkorn University
- 2000 Organizing staff in the International Bee Academic Conference 2000 and Bee World Expo 2000 at Chiangmai, Thailand
- 1998-2004 Organizing staff in the science summer camp organized by The Institute for the Promotion of Teaching Science and Technology, Thailand
- 1998 Special lecturer for the General Biology course for 1st year students from the Faculty of Veterinarian Science, Chulalongkorn University
- 1998 Training in Medical Entomology at Armed Forces Research Institute of Medical Science, Bangkok, Thailand
- 1997 Representative of the Faculty of Science, Chulalongkorn University for organizing the science camp for Cement Thai Group Co., Ltd, Thailand
- Expertise:** Molecular Biology, Biology, Genetics, Microbiology, Entomology, Vector and Pest Control

RESEARCH SUPPORT AND AWARDS

- 2015 Newton Fund: Researcher Links Travel Grant from the British Council, United Kingdom
- 2015 Endeavour Research Fellowship from Australian government, Australia
- 2015 Joint Research and Development Project Under the twenty first Session of the Sino-Thai Scientific and Technical Cooperation from Thai government and Chinese government
- 2014 Awards for the International Training Workshop on Major Communicable Diseases in Developing Countries at Jinan, Shandong, China from the Chinese Ministry of Science and Technology and the School of Medicine and Life Sciences of the Shandong Academy of Medical Sciences, China
- 2013 ASEA-UNINET Staff Exchange scholarship from The Office of the Higher Education Commission, Thailand and Austrian government, Austria
- 2013 Research grant from King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
- 2010-2012 Research grant for new scholar from Thailand Research Fund
- 2009 China Medical Board grant co-funded from Mahidol University, Thailand
- 2005 Winning second award in the C.C. Burkhardt Graduate Student Paper Competition from the 76th Rocky Mountain Conference of Entomologists, Woodland Park, Colorado, USA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2005 International travel award from Faculty of Graduate Studies, Mahidol University
- 2000-2006 Scholarship in the Royal Golden Jubilee Program (RGJ/PHD/0036/2543) from Thailand Research Fund
- 2003-2005 Research grant from Biodiversity Research and Training Program, Thailand
- 2002-2003 Research grant from Centre National de la Recherche Scientifique, France
- 1999-2000 Senior project award from Faculty of Science, Chulalongkorn University
- 1996-2000 Scholarship in the Development and Promotion of Science and Technology Talents Project from the Institute for the Promotion of Teaching Science and Technology, Thailand

SELECTED SEMINARS AND SYMPOSIA

- 2015 Giving a seminar: Biology of *Wolbachia* bacteria in arthropod hosts at Department of Genetics, The University of Cambridge, England, United Kingdom
- 2015 Giving a seminar: *Wolbachia* bacteria of arthropods: Phylogenetic relationships, relative density and host effects at Department of Biomedical & Forensic Sciences, Faculty of Science & Technology, Anglia Ruskin University, Cambridge, England, United Kingdom
- 2014 Invited speaker in the International Training Workshop on Major Communicable Diseases in Developing Countries at Jinan, Shandong, China
- 2013 Participant in the 12th National Horticultural Congress, Bangkok, Thailand
- 2010 Committee of poster presentation competition in the 5th Science and Technology Academic Conference of Thailand organized by The Institute for the Promotion of Teaching Science and Technology, Bangkok, Thailand
- 2009 Participant in the workshop on Microbial Fuel Cell - Concept to Application at National University of Singapore, Singapore
- 2009 Academic committee in the International Conference on Psychosocial Factors at Work: Job Stress Prevention and Work Ability Promotion organized by Faculty of Public Health, Mahidol University, Bangkok, Thailand
- 2009 Academic committee in the 5th Annual SEAPHEIN Meeting: Reducing health inequities through the strengthening of health systems and ICT Applications in public health

- education and practice in primary health care organized by South-East Asia Public Health Education Institutes Network, Bangkok, Thailand
- 2009 Giving a seminar: *Wolbachia* bacteria of insects: Phylogenetic relationships, relative density and host effects at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand
- 2007 Giving a seminar: *Wolbachia* infection in arthropods at Laboratory of Animal Physiology, University of Neuchatel, Switzerland
- 2006 Giving a seminar: *Wolbachia* bacteria of arthropods: Phylogenetic relationships, relative density and host effects at Faculty of Science, Mahidol University, Thailand
- 2005 Giving a seminar: Comparison of *Wolbachia* strains causing different phenotypes in arthropod hosts at Department of Molecular Biology and Biochemistry, University of California, Irvine, USA
- 2005 Giving a seminar: Comparison of *Wolbachia* strains causing different phenotypes in arthropod hosts at Arthropod-borne and Infectious Diseases Laboratory, Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, USA
- 2005 Giving an oral presentation: Effects of organophosphate insecticide exposure and temperature stress on *Wolbachia* infection and life history traits in the mosquito, *Aedes albopictus* and its copepod predators, *Mesocyclops aspericornis* at The Annual Meeting of Florida Entomological Society, Fort Myers, Florida, USA
- 2005 Giving an oral presentation: Comparison of *Wolbachia* strains causing different phenotypes in arthropod hosts at the 76th Rocky Mountain Conference of Entomologists, Woodland Park, Colorado, USA
- 2005 Giving a seminar: Comparison of *Wolbachia* strains causing different phenotypes in arthropod hosts at the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, USA
- 2005 Poster presentation in the RGJ-PhD Congress VI at Chonburi, Thailand
- 2004 Poster presentation in the 8th Biodiversity Research and Training Program conference at Suraj Thani, Thailand
- 2000 Poster presentation in the 2nd *Wolbachia* International Conference at Crete, Greece
- 2000 Participant in the International Bee Academic Conference 2000 and Bee World Expo 2000 at Chiangmai, Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม้อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ขออนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2000 Participant in Science and Technology Conference of undergraduate student and giving an oral presentation of senior project at Faculty of Science, Khonkaen University, Thailand
- 1999 Participant in the Science and Technology Academic Conference of Thailand at Phitsanulok, Thailand
- 1996 Participant in Science and Technology Conference of undergraduate student at Faculty of Science, Mahidol University

SELECTED PUBLICATIONS

1. **Itsanun Wiwatanaratanabutr** and Chongxing Zhang. *Wolbachia* infections in mosquitoes and their predators inhabiting rice field communities in Thailand and China. *Acta Tropica* (2016) 159: 153-160. Impact Factor (2014): 2.270
2. Chongxing Zhang, Guihong Shi, Yuqiang Zhao, Dongmei Yan, Huaiju Li, Hongmei Liu, **Itsanun Wiwatanaratanabutr** and Maoqing Gong. Evaluation of Isotope ^{32}P Method to Mark *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in a Laboratory. *Journal of Arthropod-Borne Diseases* (2016) 10: 211-221. Impact Factor (2014): 0.682
3. **Itsanun Wiwatanaratanabutr**. *Wolbachia* infection in leafhoppers and planthoppers: Diversity, density and geographic distribution in tropical rice agroecosystems. *Journal of Asia-Pacific Entomology* (2015) 18: 277-282. Impact Factor (2014): 0.946
4. **Itsanun Wiwatanaratanabutr**. Geographic distribution of wolbachial infections in mosquitoes from Thailand. *Journal of Invertebrate Pathology* (2013) 114: 337-340. Impact Factor (2012): 2.669
5. **Itsanun Wiwatanaratanabutr**. Distribution, diversity and density of wolbachial infections in cladocerans and copepods from Thailand. *Journal of Invertebrate Pathology* (2013) 114: 341-345. Impact Factor (2012): 2.669
6. **Itsanun Wiwatanaratanabutr**, Sandra Allan, Kenneth Linthicum and Pattamaporn Kittayapong. Strain-specific differences in mating, oviposition and host-seeking behavior of *Wolbachia*-infected and uninfected *Aedes albopictus* mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* (2010) 26: 265-273. Impact Factor (2009): 0.906

7. **Itsanun Wiwatanaratanabutr** and Pattamaporn Kittayapong. Effects of crowding and temperature on *Wolbachia* infection density among life cycle stages of *Aedes albopictus*. *Journal of Invertebrate Pathology* (2009) 102: 220-224. Impact Factor (2008): 2.005
8. **Itsanun Wiwatanaratanabutr**, Pattamaporn Kittayapong, Yves Caubet and Didier Bouchon. Molecular phylogeny of *Wolbachia* strains in arthropod hosts based on *groE*-homologous gene sequences. *Zoological Science* (2009) 26: 171-177. Impact Factor (2008): 1.100
9. **Itsanun Wiwatanaratanabutr** and Pattamaporn Kittayapong. Effects of temperature and crowding on *Wolbachia* load and life history traits of *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology* (2006) 20: 300-307. Impact Factor (2005): 1.488
10. **Itsanun Wiwatanaratanabutr** and Frederic Grandjean. Impacts of temperature and crowding on sex ratio, fecundity and *Wolbachia* density in the copepod, *Mesocyclops thermocyclopoidea*. (Submitted)
11. **Itsanun Wiwatanaratanabutr**. Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in mites from Thailand. (In Manuscript)
12. **Itsanun Wiwatanaratanabutr** and Chongxing Zhang. New Mosquito control method using combination of biocontrol and chemical in Thailand and China. (In Manuscript)
13. Chongxing zhang, **Itsanun Wiwatanaratanabutr**, Jingxuan Kou, Haifang Wang, Guihong Shi, Peng Cheng, Huaiwei Wang and Maoqing Gong. Reassess artificial infection of three main mosquito species to *Plasmodium vivax* in Shandong Province, China. (Submitted)