

ชีววิทยาและการจำแนกชนิดในระดัปลำเลียงของเพลี้ยไฟศัตรูบัวหลวง

BIOLOGY AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF THRIPS ON LOTUS

ศศิมา มั่งนิมิตร
SASIMA MUNGNIMITR

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยาและสิ่งแวดล้อม

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2516-9

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ชีววิทยาและการจำแนกชนิดในระดับโมเลกุลของเพลี้ยไฟศัตรูบัวหลวง

BIOLOGY AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF THRIPS ON LOTUS



ศศิมา มั่งนิมิตร

SASIMA MUNGNIMITR

ฉน.
6294 25
2549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน **63342**
วันเดือนปี **25 ส.ค. 2549**

b. 11634571
i.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชากีฏวิทยาและสิ่งแวดล้อม

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2516-8

BIOLOGY AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF THRIPS ON LOTUS

SASIMA MUNGNIMITR

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN ENTOMOLOGY AND ENVIRONMENT
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2006
ISBN 974-15-2516-8**

COPYRIGHT 2006

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ชีววิทยาและการจำแนกชนิดในระดับโมเลกุลของเพลี้ยไฟศัตรูบัวหลวง
ชื่อนักศึกษา	นางสาวศศิมา มั่งนิมิตร
รหัสประจำตัว	46067301
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา	กีฏวิทยาและสิ่งแวดล้อม
พ.ศ.	2549
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. สุวรินทร์ บำรุงสุข

บทคัดย่อ

การศึกษาชีววิทยาของเพลี้ยไฟ *Frankliniella schultzei* (Trybom) และ *Scirtothrips dorsalis* Hood ในดอกและใบบัวหลวง พบว่า เพลี้ยไฟทั้งสองชนิดมีการเติบโต 6 ระยะ คือ ระยะไข่ ตัวอ่อนวัยที่ 1 ตัวอ่อนวัยที่ 2 ก่อนเข้าดักแด้ ดักแด้ และตัวเต็มวัย เพลี้ยไฟ *F. schultzei* เพศเมีย จะวางไข่ได้เนื้อเยื่อของกลีบดอก ไข่ของเพลี้ยไฟจะฟักเป็นตัวอ่อนภายในระยะเวลา 2.5 ± 0.53 วัน ตัวอ่อนระยะที่ 1 และ 2 ใช้เวลา 1.6 ± 0.52 วัน และ 1.2 ± 0.42 วันตามลำดับ ระยะก่อนเข้าดักแด้ใช้เวลา 1.1 ± 0.32 วัน และระยะดักแด้ประมาณ 2.3 ± 0.67 วัน ตัวเต็มวัยมีอายุ 13.6 ± 1.07 วัน ขณะที่เพลี้ยไฟ *S. dorsalis* เพศเมียวางไข่ได้เนื้อเยื่อใบอ่อนของพืช ไข่ของเพลี้ยไฟจะฟักเป็นตัวอ่อนภายในระยะเวลา 5.5 ± 0.53 วัน ตัวอ่อนระยะที่ 1 ใช้เวลา 1.6 ± 0.52 วัน ตัวอ่อนระยะที่ 2 ใช้เวลา 2.3 ± 0.48 วัน ระยะก่อนเข้าดักแด้ใช้เวลา 1.2 ± 0.42 วัน และระยะดักแด้ประมาณ 2.4 ± 0.52 วัน ตัวเต็มวัยมีอายุ 10 ± 0.94 วัน

ส่วนการจำแนกชนิดโดยวิธีทางชีวโมเลกุลของ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* ใช้เทคนิค ITS-RFLP ไพรเมอร์ 28Z 5' AGACTCCTTGGTCCGTGTTTC 3' และ P1 5' ATCACTCGGCTCGTGGATCG3' พบว่าไพรเมอร์ทั้งสองชนิดใช้เพิ่มปริมาณโรโบโซมอลดีเอ็นเอซึ่งมีส่วนของ ITS2 ของเพลี้ยไฟทั้งสองชนิดดังกล่าวได้ โดยได้ขนาดดีเอ็นเอผลผลิตของ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* เท่ากับ 1361 และ 1403 bp ตามลำดับ การใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด ได้แก่ *AluI*, *HaeIII*, *MspI* และ *HinfI* ทำให้มีรูปแบบการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมที่แตกต่างกัน

เมื่อทำการเปรียบเทียบบริเวณ ITS2 ของเพลี้ยไฟทั้งสองชนิดกับเพลี้ยไฟชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานใน GenBank/EMBI โดยโปรแกรม BioEdit V.7.0.5.3 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเพลี้ยไฟพบว่า เพลี้ยไฟทั้งสองมีประวัติทางวิวัฒนาการของบรรพบุรุษร่วมกันและ *F. schultzei* มีกำเนิดวิวัฒนาการมาก่อน *S. dorsalis*

Thesis Title	Biology and Molecular Identification of Thrips on Lotus
Student	Miss Sasima Mungnimitr
Student ID	46067301
Degree	Master of Science
Programme	Entomology and Environment
Year	2006
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Suvarin Bumroongsook

ABSTRACT

Biological of Thrips on Lotus, *Frankliniella schultzei* (Trybom) and *Scirtothrips dorsalis* Hood were studied on Lotus flowers and leaves. It was found that these two species have six stages in their life cycle: the egg, two laval stages, prepupa, pupa and adult. *F. schultzei* females insert their eggs beneath the epidermis of floret and hatch within 2.5 ± 0.53 days. Duration of the first and the second larvae were 1.6 ± 0.52 days and 1.2 ± 0.42 days, respectively. While the prepupa and pupa stage were 1.1 ± 0.32 days and 2.3 ± 0.67 days, respectively. The life span of the adult was 13.6 ± 1.07 days. Whereas, *S. dorsalis* females deposited their eggs within the young leave tissues. Its incubation period was 5.5 ± 0.53 days. Duration of the first and the second larvae were 1.6 ± 0.52 days and 2.3 ± 0.48 days, respectively. While the prepupal and pupal stage were 1.2 ± 0.42 days and 2.4 ± 0.52 days, respectively. The life span of the adult was 10 ± 0.94 days.

Molecular identification of *F. schultzei* and *S. dorsalis* were investigated by ITS-RFLP analysis. The primer 28Z 5' AGACTCCTTGGTCCGTTGTTTC 3' and P1 5' ATCACTCGGCTC GTGGATCG 3' amplified rDNA which contained ITS2 successfully and the 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 *AluI*, *HaeIII*, *MspI* and *HinI*.

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

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.สุวรินทร์ บำรุงสุข อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์และ รศ.ดร. วรเดช จันทรสร ที่ได้กรุณาชี้แนะให้คำปรึกษา และการตรวจทานแก้ไข จนวิทยานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะต่างๆที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาด้านชีวโมเลกุล

ขอขอบคุณ โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่สนับสนุนให้งบประมาณในการทำวิจัยเรื่องนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเครื่องมือกีฏวิทยาและสิ่งแวดล้อมและห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่อำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์จำแนกชนิดเพลี้ยไฟ

ขอขอบพระคุณ คุณแม่ ญาติพี่น้อง เพื่อนสนิททุกคนที่ให้ความรัก กำลังใจ และช่วยเหลือด้วยดีเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ผู้วิจัยขอบอกแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ศศิมา มั่งนิมิตร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VI
สารบัญภาพ.....	VII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สมมุติฐานการวิจัย.....	2
1.4 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย.....	2
1.5 ขอบเขตการวิจัย.....	3
1.5.1 สถานที่และกลุ่มตัวอย่าง.....	3
1.5.2 ระยะเวลาในการทำวิจัย.....	3
1.6 นิยามศัพท์เฉพาะที่ใช้ในการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ชีววิทยาของเพลิงไฟ.....	4
2.2 การจำแนกชนิดของเพลิงไฟโดยวิธีทางชีวโมเลกุล.....	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	10
3.1 การศึกษาทางชีววิทยาของเพลิงไฟ.....	10
3.1.1 อุปกรณ์.....	10
3.1.2 วิธีการ.....	10
3.2 การจำแนกชนิดของเพลิงไฟในระดับโมเลกุล.....	11
3.2.1 อุปกรณ์.....	11
3.2.2 สารเคมี.....	11
3.2.3 วิธีการ.....	12

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.3.1 การสกัดดีเอ็นเอของเพลี้ยไฟ.....	12
3.2.3.2 การทำพีซีอาร์.....	12
3.2.3.3 การทำอาร์เอฟแอลพี.....	13
3.3 การศึกษาความสัมพันธ์และประวัติการวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟในบัวหลวง.....	13
3.3.1 อุปกรณ์.....	13
3.3.2 วิธีการ.....	14
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	15
4.1 ชีวิตวิทยาของเพลี้ยไฟศัตรูบัวหลวง.....	15
4.2 การจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟในระดับโมเลกุล.....	31
4.2.1 การเกิดโพลิมอร์ฟิซึม.....	32
4.3 ความสัมพันธ์และประวัติการวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟศัตรูบัวหลวง.....	33
4.3.1 การเรียงลำดับเบสของยีน.....	33
4.3.2 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ.....	36
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	40
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	44
บรรณานุกรม.....	46
ภาคผนวก ก.....	52
ภาคผนวก ข.....	53
ภาคผนวก ค.....	56
ประวัติผู้เขียน.....	62

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ขนาดของลำตัวและระยะในการเจริญเติบโตของเพร็ลีย์ไฟ <i>F. Schultzei</i>	17
4.2 ขนาดของลำตัวและระยะในการเติบโตของเพร็ลีย์ไฟ <i>S. dorsalis</i>	23

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ส่วนประกอบของ Internal transcribed spacer ของ rDNA.....	6
4.1 ไข่ของเพลี้ยไฟ <i>F. schultzei</i>	16
4.2 ตัวอ่อน ของเพลี้ยไฟ <i>F. schultzei</i> ขณะกำลังฟักจากไข่.....	16
4.3 ตัวอ่อนระยะที่ 1 ของเพลี้ยไฟ <i>F. schultzei</i>	19
4.4 ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของเพลี้ยไฟ <i>F. schultzei</i>	19
4.5 ระยะก่อนเข้าดักแด้ของเพลี้ยไฟ <i>F. schultzei</i>	20
4.6 ระยะดักแด้ ของเพลี้ยไฟ <i>F. schultzei</i>	20
4.7 ตัวเต็มวัยของเพลี้ยไฟ <i>F. schultzei</i>	21
4.8 ตัวเต็มวัยของเพลี้ยไฟ <i>F. schultzei</i> เมื่อกางปีก.....	21
4.9 ลักษณะการทำลายของ <i>F. schultzei</i> บนกลีบดอกบัว.....	22
4.10 ไข่ของเพลี้ยไฟ <i>S. dorsalis</i>	25
4.11 ตัวอ่อนระยะที่ 1 ของ เพลี้ยไฟ <i>S. dorsalis</i>	25
4.12 ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของ เพลี้ยไฟ <i>S. dorsalis</i>	26
4.13 ระยะก่อนเข้าดักแด้ของเพลี้ยไฟ <i>S. dorsalis</i>	26
4.14 ระยะดักแด้ ของเพลี้ยไฟ <i>S. dorsalis</i>	27
4.15 ตัวเต็มวัยของเพลี้ยไฟ <i>S. dorsalis</i>	27
4.16 ตัวเต็มวัยของเพลี้ยไฟ <i>S. dorsalis</i> เมื่อกางปีก.....	28
4.17 ใบบัวอ่อนที่ถูกทำลายโดย <i>S. dorsalis</i>	28
4.18 ใบบัวที่ถูกทำลายโดย <i>S. dorsalis</i> จนมีลักษณะใบห่อ.....	29
4.19 ด้านหน้าของใบบัวลักษณะปกติ	29
4.20 ด้านหลังของใบบัวลักษณะปกติ	30
4.21 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอผลผลิตจากวิธีพีซีอาร์ของเพลี้ยไฟ <i>F. schultzei</i> และ <i>S. dorsalis</i>	31
4.22 ITS-RFLP pattern ของ <i>F. schultzei</i> และ <i>S. dorsalis</i> Hood ที่ตัดด้วย <i>AluI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>MspI</i> , และ <i>HinfI</i>	32
4.23 ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของ <i>F. schultzei</i>	34
4.24 ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของ <i>S. dorsalis</i>	35
4.25 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม.....	37

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.26 Phylogenetic tree แสดงระดับความสัมพันธ์ระหว่างยีน ITS2 ในเพลี้ยไฟ <i>F. schultzei</i> และ <i>S. dorsalis</i> กับยีน ITS2 ในเพลี้ยไฟชนิดอื่น.....	38
ค. 1 Restriction Map และ เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 4 เบสที่ สามารถตัดลำดับเบสของ <i>Frankliniella schultzei</i> ได้	56
ค. 2 Restriction Map และ เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 4 เบสที่ สามารถตัดลำดับเบสของ <i>Scirtothrips dorsalis</i> Hood ได้	59

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

บัวหลวง (Lotus) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Nelumbo nucifera* Gaertn. อยู่ในวงศ์ Nymphaeaceae ถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบเอเชีย เช่นในประเทศจีน อินเดีย และไทย เป็นพืชที่ใช้ประโยชน์ได้หลากหลายและนำส่วนต่าง ๆ มาใช้ได้เกือบทั้งหมด นอกจากจะใช้ประโยชน์ในแง่ไม้ตัดดอกแล้ว ยังสามารถปลูกบัวเพื่อวัตถุประสงค์อื่น เช่น เก็บเมล็ด ขยายฝักอ่อน ขยายใบสดหรือใบแห้ง ขยายไหลหรือรากบัว (สุปราณี วนิชชานนท์, 2540) ส่วนอื่นๆของบัวหลวงยังมีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพร ได้อีกด้วย เช่น คีบัว มีสรรพคุณช่วยขยายหลอดเลือด แก้ความดันโลหิตสูง เมล็ดบัวช่วยบำรุงกำลัง แก้กษัยท้องร่วง สมานแผล แก้ก้อนใน เจริญอาหาร แก่พุพอง ฝักบัวช่วยขับลมสมานแผล แก้พิษเบื่อเมา แก้ท้องเสีย ก้านบัวรักษาโรคลมออกหู และแก้ท้องเดิน เหง้าบัว แก้ท้องเสีย แก้พิษ ฝักบัวคั่ว รักษากลากไพลวก ช่วยขับปัสสาวะ ใบบัว บำรุงร่างกาย แก้ไข้ ห้ามเลือด แก้ปวดฝี ปวดศีรษะ ดอกบัว แก้ท้องเสีย คลื่นไส้ แก้ไข้ เภสัชตำผู้ รักษาอาการเกี่ยวกับเลือดลมบำรุงกำลัง แก้ไข้ ขับเสมหะ ช่วยในการขับถ่าย แก้ท้องร่วง ขับปัสสาวะ บำรุงตับ (พรรณนีย์ วิชชาชู, 2546) ในด้านอาหารนั้น ได้มีการนำรากบัวหลวง (rhizomes) มาใช้ประกอบอาหาร โดยเฉพาะเป็นที่นิยมบริโภคอย่างมากในประเทศจีนและประเทศญี่ปุ่น มีการจำหน่ายทั้งในรูปแบบของทั้งราก หรือตัดเป็นชิ้น สด แช่แข็งหรือบรรจุกระป๋อง เพราะนิยมใช้บริโภคแทนผัก โดยทั่วไปนำไปทอดหรือใส่ในซุ๊ป ในประเทศญี่ปุ่นนั้นบริโภค รากบัวคิดเป็นปริมาณ 1% ของผักทั้งหมดที่บริโภคภายในประเทศ ถึงแม้จะมีการผลิตได้เองภายในประเทศแต่ก็ยังคงต้องนำเข้าจำนวนถึง 18,000 ตันต่อปี ขณะที่ ประเทศจีนผลิตได้เพียง 15,000 ตัน ประเทศจีนตอนใต้เป็นแหล่งผลิตเมล็ดบัวที่สำคัญ โดยผลิตในรูปแบบของเมล็ดแห้งซึ่งมีปริมาณประมาณพันตัน การบริโภคเมล็ดบัวแห้งนั้นส่วนมากใช้ประกอบในการทำขนม ในด้านการแพทย์ส่วนต้นอ่อนหรือคีบัวนั้นมีรสขม ซึ่งสารที่ทำให้เกิดรสขมนี้คือ isoquinoline alkaloid ซึ่งสามารถใช้เป็นยาซึ่งมีผลในการรักษา คือ antispasmodic effect ในใบบัวซึ่งมีรสขมก็มีสาร alkaloid เช่นกัน ในเกสรบัวมีรสหวานมีสาร flavanoids และ alkaloids เล็กน้อย (Dharmanda, 2002) มีการศึกษาสารที่อยู่ในบัวหลวงพบว่าเมื่อนำสารสกัดเมล็ดบัวมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี และยังพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของตับเนื่องจาก carbon tetrachloride และ อีฟลาทอกซิน B1 โดยมีผลทำให้ทั้งการทำลายเซลล์และระดับเอนไซม์ลดลง (Sohn et al. 2003)

เนื่องจากบัวมีประโยชน์หลากหลายดังกล่าวจึงมีแนวโน้มที่จะนำมาพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจได้ในอนาคต เพราะนอกจากจะจำหน่ายในประเทศแล้วยังสามารถส่งออกไปยังต่างประเทศได้อีกด้วย ปี 2547 ประเทศไทยมีการส่งออกในรูปของดอกบัว 0.69 ล้านบาท ในรูปเมล็ด 4.3 ล้านบาท ในรูปใบสด

และใบแห้ง 0.44 ล้านบาท (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2549) แต่ในการผลิตบัวเป็นการค้ำน้นเกษตรกรผู้ปลูกบัวมักประสบปัญหาการป้องกันกำจัดศัตรูพืชเช่นเดียวกับพืชอื่นทั่วไป แมลงที่เป็นศัตรูสำคัญของบัวได้แก่ เพลี้ยไฟที่ทำลายดอก (*Frankliniella* sp.) เข้าทำลายดอก ทำให้กลีบดอกไหม้ เพลี้ยไฟที่ทำลายใบ (*Selenothrips rubrocintus* Giard) ทำลายเนื้อเยื่อของใบ ผีเสื้อหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* Fabricius) และผีเสื้อหนอนบุ้งกินบัว (*Simyra conspersa* Moore) โดยหนอนผีเสื้อทั้งสองชนิดจะเข้าทำลายใบ และหนอนวัยที่ 3 และที่ 4 จะเป็นระยะที่ทำลายใบบัวมากที่สุด (สุวรรณทร์ บำรุงสุข และธรรมทิพย์ ทิพยางค์. 2546) สำหรับเพลี้ยไฟนั้นจัดเป็นแมลงที่ป้องกันกำจัดได้ยากที่สุดเนื่องจากมีขนาดเล็กและหลบอาศัยอยู่ในดอกบัวและใต้ใบบัว และเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะระบาดได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งปัจจุบันเกษตรกรใช้วิธีฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นหลักในการป้องกันกำจัด แต่เป็นไปอย่างไม่มีประสิทธิผลและทำให้ต้นทุนการผลิตสูงและก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเพลี้ยไฟเป็นแมลงศัตรูพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอันดับหนึ่งของบัวหลวง แต่ข้อมูลที่เกี่ยวข้องมีน้อยมาก จึงสมควรมีการศึกษาด้านชีววิทยาและการจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟศัตรูบัวโดยวิธี ITS-RFLP (Restriction fragment length polymorphism of the amplified internal transcribed spacer region of ribosomal DNA) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานนำไปพัฒนาวิธีการป้องกันกำจัดและกระบวนการในการวินิจฉัยและการจำแนกชนิดของศัตรูพืชแบบใหม่ที่นอกเหนือจากวิธีทางสัตววิทยา โดยเฉพาะเพลี้ยไฟที่มีผลต่อการค้าระหว่างประเทศ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวงจรชีวิตและลักษณะการเข้าทำลายของ *Frankliniella schultzei* และ *Scirtothrips dorsalis* Hood ในบัวหลวง
2. เพื่อจำแนกชนิดของ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* โดยวิธี ITS-RFLP
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์กับชีวประวัติทางวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ *F. schultzei* และ *S. dorsalis*

1.3 สมมุติฐานการวิจัย

ทราบระยะเวลาการเจริญเติบโตของเพลี้ยไฟศัตรูบัวหลวงและสามารถจำแนกชนิดโดยวิธีทางชีวโมเลกุลเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

1.4 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้นำเนื้อหาผลการศึกษาด้านชีววิทยาและชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟที่ศึกษาทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศเป็นกรอบแนวคิดในการวิจัย

1.5 ขอบเขตการวิจัย

1.5.1 สถานที่ และกลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างพืชไฟคัทรูบัวหลวงที่เก็บจากแปลงบัวหลวงที่ไม่มีการใช้สารเคมีของคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.5.2 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย 2 ปี 4 เดือน(ธันวาคม 2547 – มีนาคม 2549)

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะที่ใช้ในการวิจัย

เพื่อความเข้าใจที่ถูกต้องตามวัตถุประสงค์ของการวิจัย จึงกำหนดความหมายของคำต่างๆที่ใช้ในการวิจัยที่สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล(2545)ได้ระบุไว้ดังนี้

ชีวโมเลกุล คือ ยีนลักษณะสารพันธุกรรมทั้งหมดที่มีความสำคัญในการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต เป็นการตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ

อาร์เอฟแอลพี (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) หมายถึงความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ(restriction enzyme)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีวิตวิทยาของเพลี้ยไฟ

ชีวิตวิทยาของเพลี้ยไฟ เพลี้ยไฟเป็นแมลงที่มีขนาดเล็ก จัดอยู่ในอันดับไทแซนโนพเทร่า (Thysanoptera) ลักษณะเฉพาะที่สำคัญของแมลงในอันดับนี้คือมีกราม (mandible) ข้างซ้ายเพียงข้างเดียวเพราะกรามข้างขวาหดหายไปขณะที่เป็นตัวอ่อน มีทั้งชนิดที่มีปีกและไม่มีปีก ถ้ามีปีกบริเวณรอบๆขอบปีกมักปรากฏขนยาว ๆ ซึ่งเรียกว่า fringe และบริเวณตอนปลายของ tarsi โป่งออกคล้ายถุง ปัจจุบันคาดว่ามีความถี่ของเพลี้ยไฟมากกว่า 5000 ชนิดที่ได้รับการตั้งชื่อแล้ว โดยจัดอยู่ใน 2 อันดับย่อยคือ Terebrantia และ Tubulifera ซึ่ง Terebrantia แบ่งออกเป็น 7 วงศ์ คือ Merothripidae Uzerothripidae Fauriellidae Adiheterothripidae Heterothripidae Aeolothripidae และ Thripidae ส่วน Tubulifera มีเพียง 1 วงศ์ คือ Phalaeothripidae พบว่า ร้อยละ 93 ของเพลี้ยไฟอยู่ในวงศ์ Thripidae และ Phalaeothripidae ซึ่ง Terebrantia และ Tubulifera สามารถแยกออกจากกันได้ง่ายโดยในพวก Terebrantia จะพบอวัยวะวางไข่มีลักษณะคล้ายพินเลื่อยยื่นออกมาทางด้านล่างของส่วนท้อง ปล้องท้องปล้องที่ 10 มีลักษณะเป็นรูปกรวยปลายแหลม (cone) วางไข่ฟองเดี่ยวๆ สอดไว้ใต้เนื้อเยื่อพืช ส่วนใน Tubulifera เพศเมียอวัยวะวางไข่มีลักษณะคล้ายรางน้ำและหดเข้าไปภายในส่วนท้อง ปล้องท้องปล้องที่ 10 มีลักษณะเป็นรูปท่อ (tube) มีการวางไข่ฟองเดี่ยวๆหรือกลุ่มตามผิวหน้าของพืช (ศิริณี พูนไชยศรี. 2544)

เพลี้ยไฟเป็นศัตรูสำคัญของพืชหลายชนิด โดยดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืช ในส่วนของยอดอ่อน ดอก ใบ ดอก และผล ทำให้เกิดรอยค่าง สีขีด หรือทำให้ขอบใบแห้ง ดอกอ่อนชะงักการเจริญเติบโต กลีบดอกมีสีขีด เพลี้ยไฟที่เข้าทำลายดอกทำให้ลดการติดผลของพืชที่ถูกทำลาย หรือเมื่อผลอ่อนเจริญเติบโตจะพบว่าสีของผลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ผิวมีความกระด้าง นอกจากนี้ความเสียหายจากเพลี้ยไฟยังเกิดจากสิ่งขับถ่ายที่เพลี้ยไฟ ถ่ายออกมา มีลักษณะคล้ายหยดน้ำเล็กๆติดอยู่ตามส่วนต่างๆของพืช หยดน้ำนี้เมื่อแห้งจะทำให้พืชเกิดรอยดำหม่นเป็นจุดดำ เพลี้ยไฟมีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ นอกจากจะเป็นศัตรูพืชแล้วยังมีการรายงานว่าเพลี้ยไฟเป็นพาหะสำคัญในการนำเชื้อไวรัสได้แก่ Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) และ Peanut Yellow Spot Virus (YSV) การถ่ายทอดเชื้อไวรัสเกิดจากเพลี้ยไฟระยะตัวอ่อนรับเชื้อไวรัสและเมื่อเป็นตัวเต็มวัยจะถ่ายทอดเชื้อนี้ให้กับพืชทางน้ำลาย ในด้านที่มีประโยชน์พบว่าเพลี้ยไฟบางชนิดเป็นตัวห้ำ เช่น *Frankliniella occidentalis* เป็นตัวห้ำที่ช่วยกำจัดไรในไร่อ้อยที่ประเทศสหรัฐอเมริกา (ศิริณี พูนไชยศรี. 2544) เพลี้ยไฟถึงแม้จะมีขนาดเล็กแต่มีความสำคัญในการผลิตพืชผลเกษตรเพราะสามารถเพิ่มจำนวนประชากรได้จำนวนมากในสภาพอบอุ่น เพลี้ยไฟทั้งที่มีปีกและไม่มีปีกสามารถแพร่กระจายได้รวดเร็วโดยอาศัยลม มีรายงานว่าเพลี้ยไฟชนิดที่พบในประเทศออสเตรเลียสามารถข้ามจากทะเล Tasman ไปยังไปยังประเทศนิวซีแลนด์ได้ (Mound. 1983)

สำหรับเพลี้ยไฟศัตรูบัวนั้นที่จังหวัดลำปางพบ 2 ชนิด ได้แก่ *Scirtothrips dorsalis* Hood และ *Scirtothrips oligocactus* Kany ทำให้ใบแห้งตาย (ศิริณี พูนไชยศรี และ เพชรวิ เสงี่ยม. 2536) ส่วนในเขตกรุงเทพฯ และปริมณฑลพบเพลี้ยไฟ 2 ชนิด ชนิดที่ทำลายดอกคือ *Frankliniella schultzei* และชนิดที่ทำลายใบคือ *Selenothrips rubrocinctus* (Giard) (สุวรรณทร์ บำรุงสุข และธรรมทิพย์ ทิพยางค์. 2546)

F. schultzei เป็นศัตรูพืชที่สำคัญเพราะทำลายพืชเศรษฐกิจที่สำคัญทั้งจากการเข้าดูดกินน้ำเลี้ยงโดยตรง (Vierbergen and Mantel. 1991) และโดยอ้อมโดยการเป็นพาหะนำเชื้อ tomato spotted wilt virus (Sakimura 1969; Cho et al. 1988; Mound and Houston 1987) เพลี้ยไฟชนิดนี้ส่วนใหญ่พบในดอก (Kirk. 1984; 1987; Yudin et al. 1988; Palmer et al. 1989; Vierbergen and Mantel. 1991; Milne et al. 1996) แต่สามารถพบได้บนส่วนอื่นของพืชได้ เช่น ตาของฝ้าย *Gossypium hirsutum* L. (Wilson and Bauer. 1993) ใบของ *Achranthes aspera* L. (Ananthakrisnan et al. 1982) ใบและผลของมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill) (Davidson and Bald. 1930) ยอดอ่อน ใบ และดอกของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*) (ศิริณี พูนไชยศรี. 2537)

S. dorsalis เป็นศัตรูที่สำคัญของ พริก มะนาว ละหุ่ง ฝ้าย หอม และพืชอื่นๆ ในเขตอบอุ่น เอเชีย แอฟริกา ยุโรป ตะวันออก และญี่ปุ่น (Ananthakrisnan 1993; CABI/EPPO 1997; CAB 2003) ในประเทศไทยพบใน พริก ถั่วลิสง เงาะ มะม่วง (Bansididhi and Poonchisri. 1991) เพลี้ยไฟชนิดนี้ชอบกินพืชที่มีปริมาณไนโตรเจนสูง (Lingeri et al. 1998)

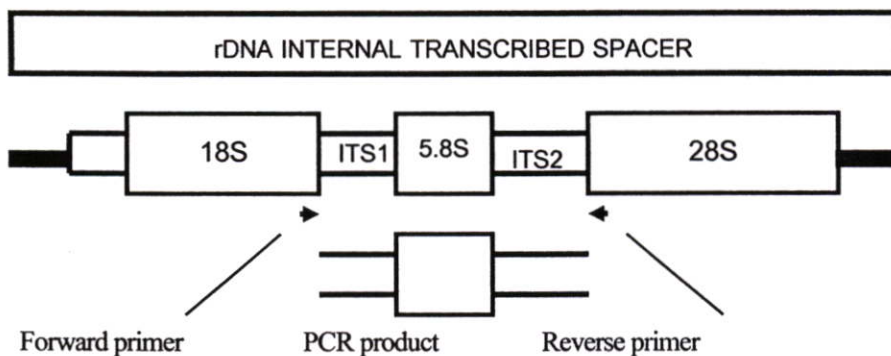
2.2 การจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟโดยวิธีทางชีวโมเลกุล

เดิมการศึกษางานด้านกีฏวิทยาใช้การจำแนกชนิดของแมลงหรือการศึกษาด้านสัตววิทยาเป็นหลัก แต่ในปัจจุบันความก้าวหน้าทางการศึกษาด้านชีวโมเลกุลได้พัฒนาไปมากมีการนำมาประยุกต์ใช้กับงานด้านกีฏวิทยามากขึ้นทั้งงานด้านระบบนิเวศน์ของแมลงและด้านอนุกรมวิธานซึ่งเทคนิคที่นำมาใช้ได้แก่

1. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)
2. Microsatellites simple sequence repeat (SSR)
3. Randomly amplifies fragment length polymorphic DNA (RAPD)
4. Amplifies fragment length polymorphism (AFLP)
5. Direct amplification of length polymorphism (DLP)
6. Florescent in situ hybridisation (FISH)
7. Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)
8. Enzyme-linked immuno-absorbent assay (PCR-ELISA)
9. Allozyme electrophoresis

10. Single and multilocus (minisatellite) DNA fingerprinting using various core sequence probes. (Loxdale, H.D. and Lushai, G. 1998)

การจำแนกเพลี้ยไฟโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล สามารถจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟได้สะดวกและรวดเร็วขึ้นเพราะสามารถใช้ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเป็นตัวอย่างในการจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟได้ข้อดีอีกประการหนึ่งของวิธีการนี้คือสามารถใช้ตัวอย่างเพลี้ยไฟที่มีรูปร่างไม่สมบูรณ์ เช่น หนวดหรือปีกชำรุดขาดหายก็ยังสามารถนำมาจัดจำแนกได้ ซึ่งต่างจากการจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟในวิธีการแบบเดิมต้องใช้ในการตรวจวิเคราะห์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงและนักอนุกรมวิธานต้องมีประสบการณ์สูงจึงสามารถจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟได้ถูกต้อง ได้มีการพัฒนาการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ร่วมกับการใช้วิธีทางชีวโมเลกุลโดยการใช้โปรแกรม Lucid (Lucid software) ช่วยให้สามารถจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟได้เป็นอย่างดี โดยโปรแกรมจะมีรูปประกอบการวินิจฉัยที่ถ่ายโดยกล้อง photomicrograph แสดงลักษณะเฉพาะของเพลี้ยไฟแต่ละชนิดเป็นชุดๆ ประกอบด้วยคำอธิบาย สำหรับเพลี้ยไฟที่มีความสำคัญและวินิจฉัยได้ยากนั้นจะมีข้อมูลทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟในระยะตัวอ่อนหรือตัวเต็มวัยซึ่งจะใช้ LucID (Thrips-ID) วิเคราะห์จาก ITS-RFLP (Restriction fragment length polymorphism of the amplified internal transcribed spacer region of ribosomal DNA) ซึ่งคือการนำวิธีทางชีวโมเลกุลจากการศึกษาการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมโดยใช้เอนไซม์ตัดเฉพาะร่วมกับการวิเคราะห์ส่วนของ Internal transcribed spacer (ITS) ของ rDNA ซึ่งประกอบด้วยส่วนของ 18S, 28S และ 5.8S rDNA ภาพที่ (2.1)



ภาพที่ 2.1 rDNA Internal transcribed spacer

ซึ่งส่วนของ ITS นี้ถือว่าเป็นส่วนที่มีความอนุรักษ์สูง (highly conserved) หรือมีความแปรปรวนต่ำในสิ่งมีชีวิตในกลุ่มอนุกรมวิธาน (taxa) เดียวกัน มีการศึกษาโดยใช้ความแปรปรวนในส่วนของ ribosomal internal transcribed spacer นำมาเปรียบเทียบระหว่างตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของเพลี้ยไฟ *Frankliniella occidentalis* และ *Echinothrips americanus* พบว่า ส่วนของผลผลิต ITS ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI*, *HaeIII*, *MspI*, *HinfI* และ *AluI* ให้แถบลักษณะเฉพาะของเพลี้ยไฟที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว (Moritz *et al.* 2000)

เนื่องจากส่วนของ ITS เป็นส่วนที่แสดงลำดับอนุกรมวิธานในระดับสปีชีส์ คือ จะแสดงความแปรปรวนเฉพาะระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างชนิด (interspecific variability) สูงมากแต่มีความแปรปรวนภายในชนิดเดียวกัน (intraspecific variability) ต่ำมาก จึงสามารถนำวิธีวิเคราะห์ ITS-RFLP มาใช้ศึกษาความแปรปรวนภายในกลุ่มของเพลี้ยไฟได้ด้วย Moritz *et al.* 2002 ใช้วิธีวิเคราะห์ ITS-RFLP ในการศึกษาการจำแนกเพลี้ยไฟ 19 ชนิด ได้แก่ *Echinothrips americanus*, *Frankliniella occidentalis*, *Frankliniella tenuicornis*, *Helionothrips spinosus*, *Helionothrips aino*, *Helionothrips haemorrhoidalis*, *Helionothrips femoralis*, *Limothrips cerealium*, *Limothrips denticornis*, *Moundothrips apterygus*, *Parthenothrips dracaenae*, *Pseudanaphothrips sachaeus*, *Rhipiphorothrips cruentatus*, *Selenothrips rubrocintus*, *Sigmothrips aotearoana*, *Suocerathrips linguis*, *Thrips nigrophosus*, *Thrips physapus* และ *Thrips tabaci* โดยใช้ primer 28Z และ P1 แล้วใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด ได้แก่ *RsaI*, *HaeIII*, *MspI*, *HinfI* และ *AluI* แยกขนาดแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Gel electrophoresis แล้ววิเคราะห์ผลโดยโปรแกรม Image Master ID Elite v 3.01 พบว่ารูปแบบของขนาดแถบดีเอ็นเอมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดโดยมีขนาดตั้งแต่ 1322 bp ถึง 2433 bp ซึ่ง Toda and Komazaki. (2002) ได้นำวิธี ITS RFLP มาใช้ในการจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟ 9 ชนิดที่พบในไม้ผลของประเทศญี่ปุ่น เช่นเดียวกัน โดยใช้ไพรเมอร์ 5'-CGAGTATCGATGAAGAACGCAGC-3' และ 5'-AATGCTTAAATTTAGGGGGTA-3' ในการเพิ่มปริมาณ DNA ส่วน ITS2 แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* พบว่าขนาดของชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ 475 (*F. occidentalis*) ถึง 720 bp (*T. setosus*) และรูปแบบการเกิด RFLP บางชนิดมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างจากเพลี้ยไฟชนิดอื่น เช่น *T. palmi* และ *T. setosus* ขณะที่กลุ่มของ *F. occidentalis*, *F. intonsa*, *T. hawaiiensis* และ *T. coloratus* และกลุ่มของ *T. flavus*, *T. Tabaci* และ *S. dorsalis* มีขนาดของชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่คล้ายคลึงกันและยากต่อการจำแนกได้ ซึ่งฉัตรชัย สุภิมารส (2547) ได้ใช้วิธีวิเคราะห์ ITS-RFLP เช่นเดียวกันในการจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟ 2 ชนิดในส้มโอ คือ *Thrips hawaiiensis* (Morgan) และ *Scirtothrips dorsalis* Hood โดยใช้ไพรเมอร์ 28Z และ P1 และตัดด้วยเอนไซม์ *HaeIII*, *MspI*, และ *AluI* ได้ขนาดแถบดีเอ็นเอ 1330 bp และ 1337 bp ตามลำดับ

การใช้เทคนิควิเคราะห์ ITS-RFLP ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นได้เช่นศึกษา phylogenetic โดยใช้การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) ร่วมกับการตรวจสอบเปรียบเทียบข้อมูลของ rDNA sequence ของเพลี้ยไฟชนิดอื่นๆ ในข้อมูลของ Gene Bank

ซึ่ง phylogenetic คือการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับกรดนิวคลีอิกหรือลำดับของโปรตีนเพื่อศึกษาถึงการเกิดวิวัฒนาการ โดยใช้กราฟที่เรียกว่าต้นไม้ (Tree) ประกอบด้วย nodes และ branches ซึ่งมีลักษณะเป็น binary-tree คือ 1 node จะแตกออกเป็น 2 กิ่ง โดย nodes จะแสดงสิ่งที่ต้องการศึกษา (taxonomic units) และ branches แสดงถึงความสัมพันธ์ของสิ่งที่ทำการศึกษาในเชิงบรรพบุรุษและลูกหลาน ลักษณะของ tree เรียกว่า topology โดยความยาวของ branches แสดงจำนวนการเปลี่ยนแปลง

หรือแสดงระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นใน branch นั้น (Mount. 2004; ศิราวุธ กลิ่นบุหงา. 2544)

การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอเป็นสิ่งสำคัญอย่างหนึ่งสำหรับงานวิจัยทางอนุชีววิทยา เพราะจะทำให้ทราบถึงบริเวณที่มีรหัสสำหรับการสร้างโปรตีน (coding region) บริเวณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอใหม่กับลำดับเบสของดีเอ็นเอสายอื่น จะทำให้ทราบถึงบริเวณที่เป็น homologous sequence ซึ่งเป็น sequence ที่มีความคล้ายคลึงกัน (ซิเน ชำรงค์ธรรม และ ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์. 2544) เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ phylogenetic ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาในลำดับต่อไป

ในปัจจุบันแผนภูมิลำดับการวิวัฒนาการ (Evolution tree) ได้ถูกสร้างขึ้นจากข้อมูล DNA ร่วมกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา หลักฐานที่จะแสดงว่าสิ่งมีชีวิต 2 ชนิดมีความเกี่ยวข้องกันแต่ไม่เหมือนกัน คือการเปรียบเทียบลำดับ ดีเอ็นเอ (DNA sequence) โดยที่สิ่งมีชีวิตที่มีความเกี่ยวข้องกันอาจมีความเหมือนกันใน ส่วนเฉพาะของลำดับดีเอ็นเอประมาณ 50 % และหากมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดมากขึ้นอาจถึง 90 % (Gurney *et al.* 2000) ในการจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟศัตรูพืชสำคัญของค่านตรวจพืช เช่น ในไต้หวันได้นำวิธีการดังกล่าวนี้มาใช้ในการจำแนก *Frankliniella occidentalis* (Pergande) โดยการใช้โปรแกรมวิเคราะห์ Phylip เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ Phylogenetic ของ *F. Occidentalis* กับเพลี้ยไฟชนิดอื่นๆที่มีอธิบายไว้ เช่น เพลี้ยไฟที่อยู่ใน genus *Frankliniella* ได้แก่ *F. occidentalis* (Pergande), *F. intonsa* (Tymbom) และ *F. Tenuicornis* จะมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *F. intonsa* (Tymbom) จากนั้น alignment และเปรียบเทียบลำดับของ ITS1 และ ITS2 ร่วมกับการออกแบบ species-specific primer 2 ชนิดสำหรับ *F. occidentalis* คือ FO1 และ FO2 เพื่อใช้ยืนยันชนิดของ *F. occidentalis* หลังจากผ่านการตรวจวัดโดยการใช้ primer CS249/CS250 พบว่าเมื่อใช้ primer CS249/CS250 จะได้ขนาดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ ประมาณ 1400 bp และเมื่อนำมายืนยันด้วย species-specific primer FO1/FO2 จะได้ขนาดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ ประมาณ 900 bp โดยที่มีความไวในการตรวจวัด (sensitivity) ที่ระดับ 1 pg ต่อ 1 ปฏิกริยา ซึ่งวิธีการดังกล่าวเป็นวิธีที่รวดเร็ว ง่ายและสามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดเพลี้ยไฟสำหรับค่านักกันแมลงโดยเฉพาะกับเพลี้ยไฟ *F. occidentalis* (Liu. 2004) การศึกษาของฉัตรชัย สุภิมา รส (2547) พบว่าความสัมพันธ์กับประวัติการวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟที่พบในส้มโอ 2 ชนิดคือ *T. hawaiiensis* และ *S. dorsalis* จากการนำลำดับเบสส่วนของ ITS2 เปรียบเทียบความเหมือนของสาย ดีเอ็นเอกับสายพันธุ์ที่มีรายงานในข้อมูล EMBI/GenBank ร่วมกับเพลี้ยไฟที่มีรายงานจากต่างประเทศพบว่าเพลี้ยไฟส้มโอ *T. hawaiiensis* และ *S. dorsalis* อยู่กลุ่มเดียวกันและมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันในกลุ่มเพลี้ยไฟ วงศ์ Thripidae และวงศ์ย่อย Thripinae รวมทั้งแยกกลุ่มจากเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Panchaethripinae ถึงแม้ว่าจะเป็นเพลี้ยไฟที่อยู่ในวงศ์เดียวกันคือ Thripidae ในประเทศออสเตรเลีย Morris and Mound. (2004) ศึกษาความสัมพันธ์ของประชากรเพลี้ยไฟ South African citrus thrips

(*Scirtothrips aurantii* Faure) ในแอฟริกาตอนใต้และในรัฐควีนส์แลนด์ ประเทศออสเตรเลียโดยวิเคราะห์ส่วนของ mitochondrial และ ITS2 จากข้อมูล DNA sequence โดยการขยายส่วนของ ITS2 ด้วย primer 5'-CGAGTATCGATGAAGAACGCAGC-3' และ 5'AATGCTTAAATTTAGGGGTA-3' และขยายส่วนของ mitochondrial gene cytochrome oxidase 1 (COI) ด้วย primer C1-j-2183 และ A2735 และวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม PAUP4.0 พบว่าจากข้อมูล DNA sequence ที่ได้ประชากรของ *S. aurantii* ในรัฐควีนส์แลนด์และในแอฟริกาตอนใต้ไม่มีวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน ซึ่งสันนิษฐานว่าอาจเกิดจากการเคลื่อนย้ายพืชอาศัยของ *S. aurantii* ของพืช Bryophyllum ในแอฟริกาตอนใต้ และทำให้เกิดการพัฒนาสายพันธุ์แข็งแรงที่ชอบ Bryophyllum ในรัฐควีนส์แลนด์ด้วยเนื่องจากมีการกำจัด *B. delagoense* ซึ่งเป็นวัชพืชที่แมลงชอบอาศัยโดยแมลงไม่ได้มีการลดจำนวนลง

นอกจากนี้การใช้วิธีทางชีวโมเลกุล เช่น RAPD-PCR (Randomly amplified polymorphic - Polymerase chain reaction) ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ดีเอ็นเออีกวิธีหนึ่งซึ่งไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายก็สามารถนำมาใช้ในการศึกษาความแปรปรวนเฉพาะภายในของประชากรเพลี้ยไฟได้ Kraus *et al.* (1998) กล่าวในการศึกษาการวิเคราะห์ความแตกต่างส่วนของ mitochondrial และ ITS2 จากข้อมูล DNA sequence ของประชากรเพลี้ยไฟที่ต่างชนิดกัน 3 ชนิดคือ *Frankliniella occidentalis* จากสวิสเซอร์แลนด์และออสเตรเลีย *Thrips tabaci* และ *Hercinothrips femoralis* จากเยอรมันนี โดยการใช้ primer R11 พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของลักษณะแถบ DNA ของเพลี้ยไฟนี้ได้ โดยเฉพาะ *T. tabaci* ยังสามารถแยกลักษณะภายในเฉพาะของเพลี้ยไฟที่เก็บมาจากแต่ละสถานที่อย่างชัดเจนแต่ลักษณะดังกล่าวไม่พบใน *F. occidentalis* ซึ่งเมื่อใช้ primer OPA-07 พบว่าสามารถตรวจพบลักษณะแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของ *F. occidentalis* ได้โดยพบว่า *F. occidentalis* จากสวิสเซอร์แลนด์มีแถบดีเอ็นเอขนาด 1750 bp ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่พบได้ในทุกตัวอย่างประชากร แต่จะไม่พบใน *F. occidentalis* จากออสเตรเลีย เช่นเดียวกับ Gyulai *et al.* (2002) ที่ใช้วิธี RAPD-PCR ศึกษาความหลากหลายทางชีวโมเลกุลเพลี้ยไฟ *Frankliniella intonsa* (Trybom) 5 กลุ่มตัวอย่างโดยแยกเพลี้ยไฟเพศผู้และเพศเมียที่เก็บมาจากพืชอาศัยที่ต่างกัน คือ *Medicago sativa* และ *Trifolium pratense* จากสถานที่ 5 แห่งรอบบริเวณเมือง Valko และ Nagykovacs ประเทศฮังการี ใช้ primer 15 ชนิด พบว่าแถบดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ได้มีความแตกต่างกันตั้งแต่จำนวน 2 แถบจนถึง 15 แถบขึ้นอยู่กับชนิดของ primer นอกจากนี้ขนาดที่ได้มีความหลากหลายตั้งแต่ 100 bp ถึง 1500 bp โดยที่ primer OPQ14 แสดงให้เห็นว่าของ *F. intonsa* มีความหลากหลายทางชีวโมเลกุลในแต่ละเพศหรือสถานที่พบ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาทางชีววิทยาของเพลี่ยไฟต์ดรูบัวหลวง

3.1.1 อุปกรณ์

3.1.1.1 พาราฟิล์ม

3.1.1.2 น้ำกลั่น

3.1.1.3 สารละลายน้ำฟุ้งเจือจาง

3.1.1.4 ฟู่กันและเข็มเย็บ

3.1.1.5 ถ้วยพลาสติกใสและจานเลี้ยงเชื้อ

3.1.1.6 สำลี

3.1.1.7 กลีบดอก เกสรดอกบัวและใบบัว

3.1.1.8 กระจกยิบยิบ

3.1.1.9 กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอไมโครสโคป (Nikon รุ่น C-PS)

3.1.1.10 กล้องถ่ายรูปแบบดิจิทัล (Nikon รุ่น Coolpix 5000)

3.1.1.11 ใบและดอกบัวหลวงพันธุ์ตัดบงกช (*Nelumbo nucifera* Gaertn)

3.1.2 วิธีการ

3.1.2.1 การเลี้ยงเพลี่ยไฟต์ที่ทำลายใบบัว เก็บรวบรวมเพลี่ยไฟต์ที่ทำลายใบบัวหลวงจากแหล่งที่ไม่มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช เลือกเก็บเพลี่ยไฟต์ตัวเต็มวัย *S. dorsalis* โดยใช้ฟู่กันเย็บเพลี่ยไฟต์ดังกล่าวประมาณ 200 ตัว ลงในถ้วยพลาสติกที่ภายในมีใบบัวอ่อนขนาดเล็กบรรจุอยู่ ปิดด้วยด้วยแผ่นพาราฟิล์มที่ดึงให้บางและหยอดน้ำกลั่นตรงกลางด้วยและวางก้อนสำลีที่ซับน้ำฟุ้งบริเวณขอบบนของถ้วย ทิ้งไว้ 1 คืนเพื่อให้เพลี่ยไฟต์วางไข่ จากนั้นนำตัวเต็มวัยออก แล้วนำใบบัววางลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีกระจกยิบยิบที่พรมน้ำไว้เล็กน้อย ปิดฝาแล้วนำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอจนไข่ฟักเป็นตัวอ่อน จากนั้นจึงย้ายตัวอ่อนลงในจานเลี้ยงเชื้ออันใหม่ซึ่งมีใบบัวอ่อนขนาดเล็กวางอยู่ เปลี่ยนใบบัวใหม่ทุก 2 วัน บันทึกการเจริญเติบโตของเพลี่ยไฟต์โดยวัดขนาดของเพลี่ยไฟต์และจดบันทึกทุกกระยะการเจริญเติบโตของเพลี่ยไฟต์และลักษณะการเข้าทำลายของเพลี่ยไฟต์

3.1.2.2 การเลี้ยงเพลี่ยไฟต์ที่ทำลายดอกบัว เก็บเพลี่ยไฟต์ตัวเต็มวัยของ *F. schultzei* ที่อาศัยอยู่ในดอกบัวหลวงจากแหล่งที่ไม่มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช โดยใช้ฟู่กันเย็บเพลี่ยไฟต์ดังกล่าวลงในถ้วยพลาสติกประมาณ 200 ตัว ภายในถ้วยบรรจุกลีบดอกและเกสรดอกบัวเพื่อให้ตัวเต็มวัยเพศเมียของ *F. schultzei* วางไข่ ปิดด้วยด้วยแผ่นพาราฟิล์มที่ดึงให้บางแล้วนำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอจนไข่ฟัก

เป็นตัวอ่อน จากนั้นจึงย้ายตัวอ่อนลงในถ้วยพลาสติกอันใหม่ซึ่งมีกลีบดอกใหม่วางอยู่ เปลี่ยนกลีบดอกใหม่ทุก 2 วัน วัดขนาดบันทึกการเจริญเติบโตและลักษณะการเข้าทำลายของเพลี้ยไฟชนิดนี้

3.2 การจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟในระดับโมเลกุล

3.2.1 อุปกรณ์

- 3.2.1.1 หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ependorf tube)
- 3.2.1.2 หลอดพีซีอาร์ (PCR tube)
- 3.2.1.3 ไมโครปิเปต และไมโครปิเปตทิปขนาด 2, 20, 200 และ 1000 μ l
- 3.2.1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง (Ohaus รุ่น Explorer และ Precisa รุ่น XT220A)
- 3.2.1.5 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (Fisher Scientific รุ่น AR 15)
- 3.2.1.6 เต้าไมโครเวฟ (Sharp รุ่น R251)
- 3.2.1.7 ตู้เย็น และตู้แช่อุณหภูมิต่ำ - 20 องศาเซลเซียส (Sanyo รุ่น SR-F208A และ รุ่น SF-C99-GR)
- 3.2.1.8 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ (HIRAYAMA รุ่น HVE-50)
- 3.2.1.9 เครื่องผสมสาร (Scientific Industries รุ่น Vortex-Genies2-G560E)
- 3.2.1.10 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hermle รุ่น Z323)
- 3.2.1.11 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Ultraspec รุ่น 1100pro)
- 3.2.1.12 เครื่องพีซีอาร์ (MJ Research รุ่น PTC-100)
- 3.2.1.13 เครื่องอิเล็กโตรโฟเรซิส (Toyobo รุ่น Gelmate 2000)
- 3.2.1.14 กล้องถ่ายภาพและบันทึกแถบข้อมูลดีเอ็นเอพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ (Syngene รุ่น Gene genius)

3.2.2 สารเคมี

- 3.2.2.1 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)
- 3.2.2.2 Potassium acetate (8 M)
- 3.2.2.3 Isopropanol
- 3.2.2.4 Ethyl alcohol 70%
- 3.2.2.5 Distilled water
- 3.2.2.6 DNA size markers (100 bp ladder)
- 3.2.2.7 Taq DNA polymerase(5 unit/ μ l)
- 3.2.2.8 $MgCl_2$ (25 mM)

3.2.2.9 ไพรเมอร์สำหรับการสังเคราะห์ชิ้นITS2 ประกอบด้วยไพรเมอร์ 28Z 5'AGACTCC TTGTCCGTGTTTC 3' (Hillis and Dixon.1991)และP15'ATCACTCGGCTCGTG TGGGATCG 3'(Severini *et al.* 1996)

3.2.2.10 สารละลาย dNTP mix (10 mM each)

3.2.2.11 Restriction enzymes (*MspI*, *AluI*, *HinfI* และ *HaeIII*)

3.2.2.12 Agarose

3.2.2.13 TBE buffer (1X)

3.2.2.14 Gel star

3.2.3 วิธีการ

3.2.3.1 การสกัดดีเอ็นเอของเพลี่ยไฟตัดแปลงมาจากวิธีของ Moritz *et al.* (2000)

1. บดเพลี่ยไฟ 1 ตัวให้ละเอียดในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ด้วย micro pestle
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 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใส่ส่วนบนเก็บไว้
7. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol จำนวน 46 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใส่ส่วนบนทิ้ง
8. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70% จำนวน 100 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใส่ส่วนบนทิ้ง ทำขั้นตอนนี้ซ้ำสองครั้ง
9. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เอทิลแอลกอฮอล์ระเหยจนแห้ง หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นจำนวน 16 ไมโครลิตรละลายตะกอนดีเอ็นเอเพื่อนำไปใช้ในการนำไปทำ PCR ในลำดับต่อไป

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

1. เตรียมส่วนผสม master mix ที่ประกอบด้วย buffer, MgCl₂, dNTP, ไพรเมอร์ 28 Z และ ไพรเมอร์ P1, 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, MgCl₂ 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		

3.2.3.3 การทำอาร์เอฟแอลพี

นำ PCR product ที่ได้ซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 630 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรจำนวน 5 μ l ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MspI*, *AluI*, *HinfI* และ *HaeIII* เพื่อดูการเกิดอาร์เอฟแอลพีของเพลี้ยไฟแต่ละชนิด โดยมีส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาในปริมาตรทั้งหมด 10 μ l ได้แก่ ดีเอ็นเอ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ สารละลายบัฟเฟอร์ 10x และ เอนไซม์ 5 Unit และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนี้ไปตรวจด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อทำการบันทึกภาพและนำไปวิเคราะห์ผล

3.3 การศึกษาความสัมพันธ์และประวัติการวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟในบัวหลวง

3.3.1 อุปกรณ์

1. เครื่อง Automated DNA Sequencer (GMI, Inc. รุ่นABI 377)
2. เครื่องประมวลผลพร้อมโปรแกรม Clustal W Multiple alignment และ โปรแกรม DNADIST (BioEdit version 7.0.5.3)
3. ไพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์ M13F และ ไพรเมอร์ M13R
4. พลาสมิดสำหรับการโคลนยีน พลาสมิด pGEM-Teasy
5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางอณูชีววิทยาบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

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

5.2 โปรแกรม Clustal W Multiple alignment และ โปรแกรม DNADIST ใน BioEdit version 7.0.5.3

3.3.2 วิธีการ

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเพรียไฟ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* ทำการโคลนด้วยเวกเตอร์ pGEM-T Easy และเลือกโคลนที่บรรจุชิ้นไปวิเคราะห์ลำดับเบสโดยนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้บางส่วนวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีนที่มีรายงานในต่างประเทศด้วย website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/chi-bin/Blast> และออกแบบไพรเมอร์ใหม่จากลำดับเบสของดีเอ็นเอเพรียไฟทั้งสองชนิดที่ได้เพื่อสังเคราะห์ส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ครบทั้งโคลน จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับส่วนของยีน ITS2 ของเพรียไฟชนิดอื่นๆที่มีใน EMBI/GenBank ทำการเปรียบเทียบความเหมือน (identity) หรือความคล้ายด้วยโปรแกรม Clustal W Multiple alignment ใน BioEdit version 7.0.5.3 กับยีนที่มีอยู่ใน EMBI/GenBank เพื่อนำไปหาความสัมพันธ์ phylogenetic tree ของเพรียไฟศัตรูบัวหลวงต่อไป

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การศึกษาชีววิทยาและชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟศัตรูบัวหลวง 2 ชนิด ได้แก่ *Frankliniella schultzei* และ *Scirtothrips dorsalis* Hood จากแปลงปลูกบัวหลวงที่ไม่มีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชของคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พบว่าเพลี้ยไฟทั้งสองชนิดนี้อยู่ในอันดับย่อย Terebrantia วงศ์ Thripidae วงศ์ย่อย Thripinae โดยมีรายละเอียดดังนี้

4.1 ชีววิทยาของเพลี้ยไฟศัตรูบัวหลวง

Frankliniella schultzei (Trybom)

ชื่อสามัญ	Flower Thrips
ชื่อพ้อง	<i>Frankliniella trybomi</i> Karny
	<i>Frankliniella aeschlyi</i> Girault
	<i>Frankliniella nigerripes</i> Girault
	<i>Frankliniella kelyana</i> Kelly et Mayne
	<i>Frankliniella lycopersici</i> Andrewartha

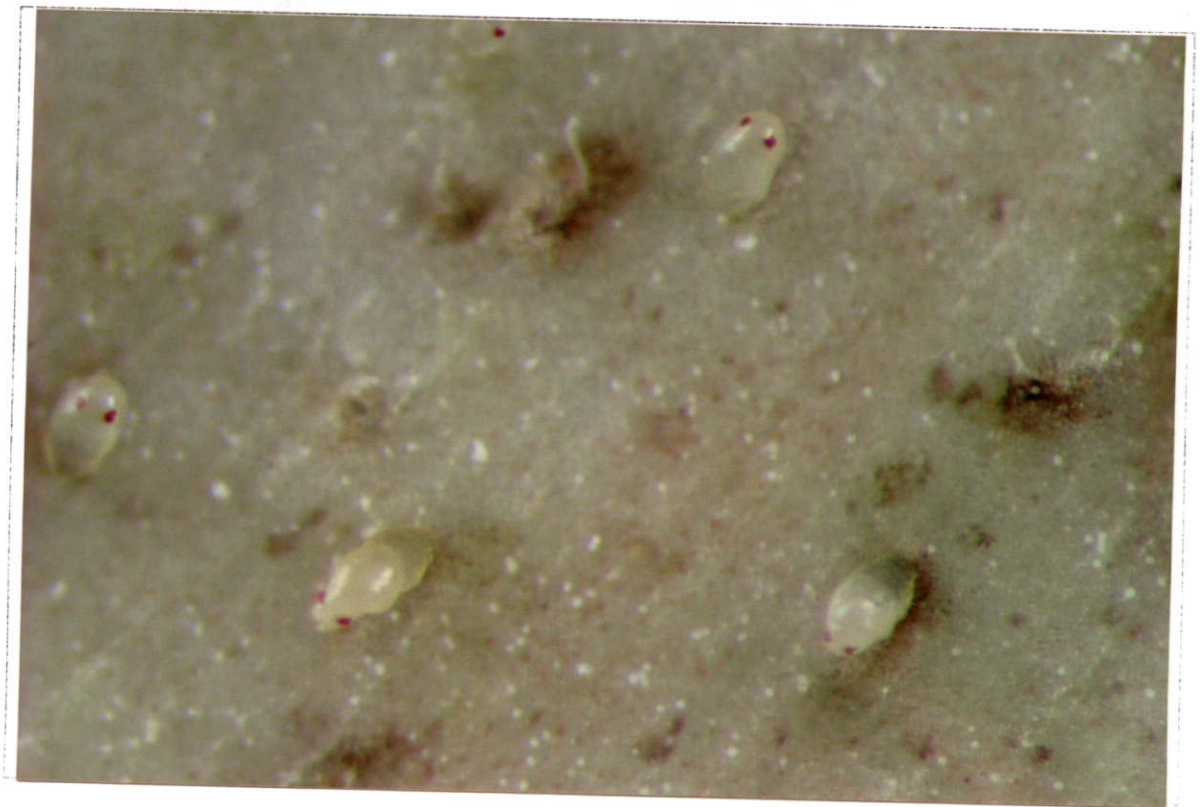
เพลี้ยไฟชนิดนี้เข้าทำลายส่วนกลีบดอกและเกสรดอกบัว พบเฉพาะในส่วนของดอกบัวเท่านั้น ไม่ปรากฏว่าเข้าทำลายในส่วนอื่นของบัวหลวงเลย โดยมักอยู่ในส่วนของโคนกลีบดอก และคูคกนน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัย มีรายละเอียดของแต่ละระยะการเจริญเติบโตดังนี้

ระยะไข่

ไข่ของเพลี้ยไฟ *F. schultzei* มีสีขาวใส รูปร่างคล้ายเมล็ดถั่วเปลือกไข่เกลี้ยงและอ่อนนุ่ม (ภาพที่ 4.1) และมีขนาดค่อนข้างใหญ่เมื่อเทียบกับส่วนปลายท้องของอวัยวะวางไข่เพศเมีย เพลี้ยไฟชนิดนี้จะวางไข่ฟองเดี่ยวๆ สอดไว้ได้เนื้อเยื่อของกลีบดอกหรือเกสรดอกบัว เมื่อนำส่วนของดอกบัวที่เพลี้ยไฟวางไข่แล้วไปส่องดูด้วยกล้องสองตาจะพบว่าบริเวณดังกล่าวมีลักษณะนูน เมื่อไข่ใกล้ฟักออกเป็นตัว ตัวอ่อนจะมีการพัฒนาจนเห็นตาแดง 2 จุดได้อย่างชัดเจน จากนั้นตัวอ่อนจะดันส่วนหัวผ่านช่องเปลือกไข่ออกมา (ภาพที่ 4.2) และบิดตัวจนกระทั่งลำตัวผ่านออกมาทั้งหมดและหยุดนิ่งระยะหนึ่งจึงเริ่มเคลื่อนไหว บริเวณกลีบบัวที่ตัวอ่อนฟักออกมานั้นจะเห็นรอยจุดสีน้ำตาลกระจายอยู่ทั่วไป ระยะเวลาจากไข่จนถึงตัวอ่อนระยะที่ 1 ใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน (ตารางที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 ไข่ของเพร็ลีย์ไฟ *F. schultzei*



ภาพที่ 4.2 ตัวอ่อนระยะที่ 1 ของเพร็ลีย์ไฟ *F. schultzei* กำลังฟักจากไข่

ตารางที่ 4.1 ขนาดของลำตัว และระยะเวลาในการเจริญเติบโตของเพลี้ยไฟ *F. schultzei* ที่เลี้ยงใน
ห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 30 ± 2 °C

ระยะเวลาต่างๆ	ความยาวของลำตัว (มิลลิเมตร)		จำนวนวันที่ใช้ในการเจริญเติบโต	
	ค่าเฉลี่ย \pm S.D.	พิสัย	ค่าเฉลี่ย \pm S.D.	พิสัย
ระยะไข่ ¹	0.29 \pm 0.02	0.27-0.31	2.5 \pm 0.53	2-3
ตัวอ่อนระยะที่1	0.56 \pm 0.03	0.53-0.59	1.6 \pm 0.52	1-2
ตัวอ่อนระยะที่2	0.93 \pm 0.06	0.87-0.99	1.2 \pm 0.42	1-2
ระยะก่อนเข้าดักแด้	1.12 \pm 0.12	1.00-1.24	1.1 \pm 0.32	1-2
ระยะดักแด้	1.15 \pm 0.10	1.05-1.25	2.3 \pm 0.67	2-3
ระยะตัวเต็มวัย	1.19 \pm 0.08	1.11-1.27	13.6 \pm 1.07	13-15

¹ระยะไข่วัดขนาดความยาวของไข่

ตัวอ่อนระยะที่1

ตัวอ่อนที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆจะมีสีลำตัวขาวหรือเกือบขาวใสตัวเล็กเรียว ปลายท้องแหลม ตารวมสีแดง หนวดมี 7 ปล้อง มีโครงร่างที่คล้ายขา 3 คู่ (ภาพที่ 4.3) เคลื่อนไหวช้าในช่วงแรก จากนั้นเมื่อเพลี้ยไฟเริ่มดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชสีของลำตัวจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนๆและเคลื่อนไหวตลอดเวลา ตัวอ่อนวัยนี้ประมาณ 1-2 วัน

ตัวอ่อนระยะที่2

เพลี้ยไฟจะมีขนาดลำตัวใหญ่ขึ้น มีสีเหลืองเข้มมากขึ้น ส่วนหัวมีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับความกว้างของลำตัว มีลักษณะเรียวยาว (ภาพที่4.4) การเคลื่อนไหวรวดเร็วองไว เมื่อใกล้เข้าสู่ระยะก่อนเข้าดักแด้ ตัวจะใหญ่มากขึ้น ส่วนปลายท้องเริ่มมีลักษณะกลมมน ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 1-2 วัน

ตัวอ่อนระยะที่3(ระยะก่อนเข้าดักแด้)

ตัวอ่อนช่วงนี้จะมีสีของลำตัวสีเหลืองเข้มมากขึ้น เคลื่อนไหวช้า ขนาดของปล้องหนวดยาวขึ้น และชี้ตรงไปข้างหน้า ปุ่มปีกซึ่งเป็นช่วงแรกของการพัฒนาปีกเริ่มโตชัดเจนมากขึ้น(ภาพที่ 4.5) เพลี้ยไฟในระยะนี้จะไม่กินอาหารและไม่เคลื่อนไหวถ้าไม่ถูกรบกวน ระยะนี้ใช้เวลาอยู่ประมาณ 1-2วัน

ระยะดักแด้

เพลี้ยไฟในระยะนี้จะพัฒนาหนวดที่มีชี้ไปด้านหลังเหนือหัว ตารวมมีขนาดใหญ่สีแดง แผ่นปีกจะพัฒนายาวขึ้นเกือบถึงปลายส่วนท้อง มีขาและลำตัวมีขนาดใกล้เคียงตัวเต็มวัย(ภาพที่ 4.6) ลักษณะของเพลี้ยไฟในช่วงนี้สามารถใช้แยกเพศตัวเต็มวัยได้ โดยดูจากลักษณะของลำตัวซึ่งเพลี้ยไฟตัวเมียจะมีลักษณะอ้วนป้อมและตัวใหญ่กว่า แต่ตัวผู้จะมีขนาดลำตัวเล็กและเรียวกว่า ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ2-3 วัน

ระยะตัวเต็มวัย

ระยะนี้เพลี้ยไฟจะมีสีของลำตัวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองปนน้ำตาล สีน้ำตาลแดงหรือน้ำตาลดำ หัวและ pronotum สีน้ำตาลเหลือง ออก ส่วนของปลายท้องสีน้ำตาลเข้ม มีขนาดลำตัวยาว ประมาณ1.1-1.2-มิลลิเมตร ตารวมมีขนาดใหญ่สีแดง ตาเดี่ยว 3 ตา สีแดงเช่นกัน(ภาพที่4.7) ปีกคู่แรกสีน้ำตาลเข้มถึงเหลืองน้ำตาล ปีกหลังสีเหลืองใส ขนตามลำตัวสีน้ำตาล(ภาพที่4.8) เมื่อออกเป็นตัวเต็มวัยแล้วเพลี้ยไฟจะมีชีวิตอยู่ต่อได้ประมาณ 13-15 วัน วงจรชีวิตของเพลี้ยไฟ *F. schultzei* ประมาณ 22-27 วัน

ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจะดูดกินน้ำเลี้ยงจากกลีบดอกและเกสรบัว ทำให้เกิดเป็นรอยจุดสีน้ำตาลเล็กๆกระจายทั่วไป (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.3 ตัวอ่อนระยะที่ 1 ของ *F. schultzei*



ภาพที่ 4.4 ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของ *F. schultzei*



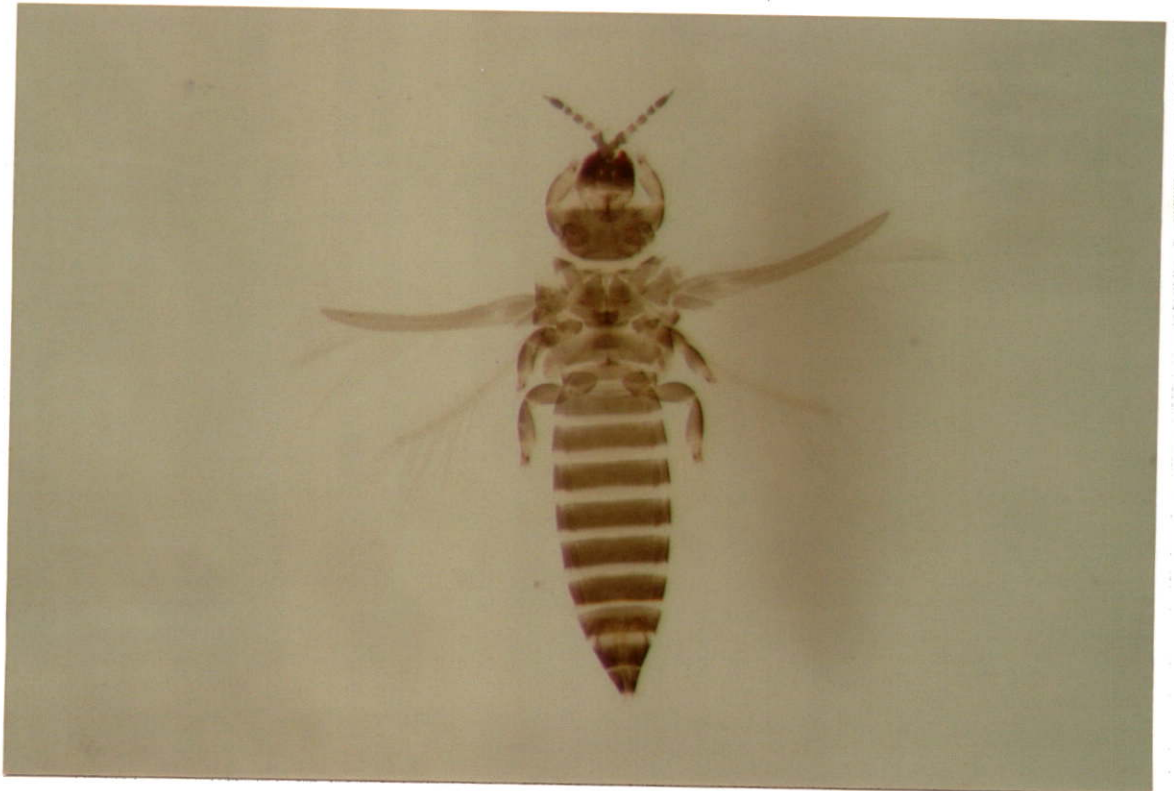
ภาพที่ 4.5 ระยะก่อนเข้าดักแด้ ของ *F. schultzei*



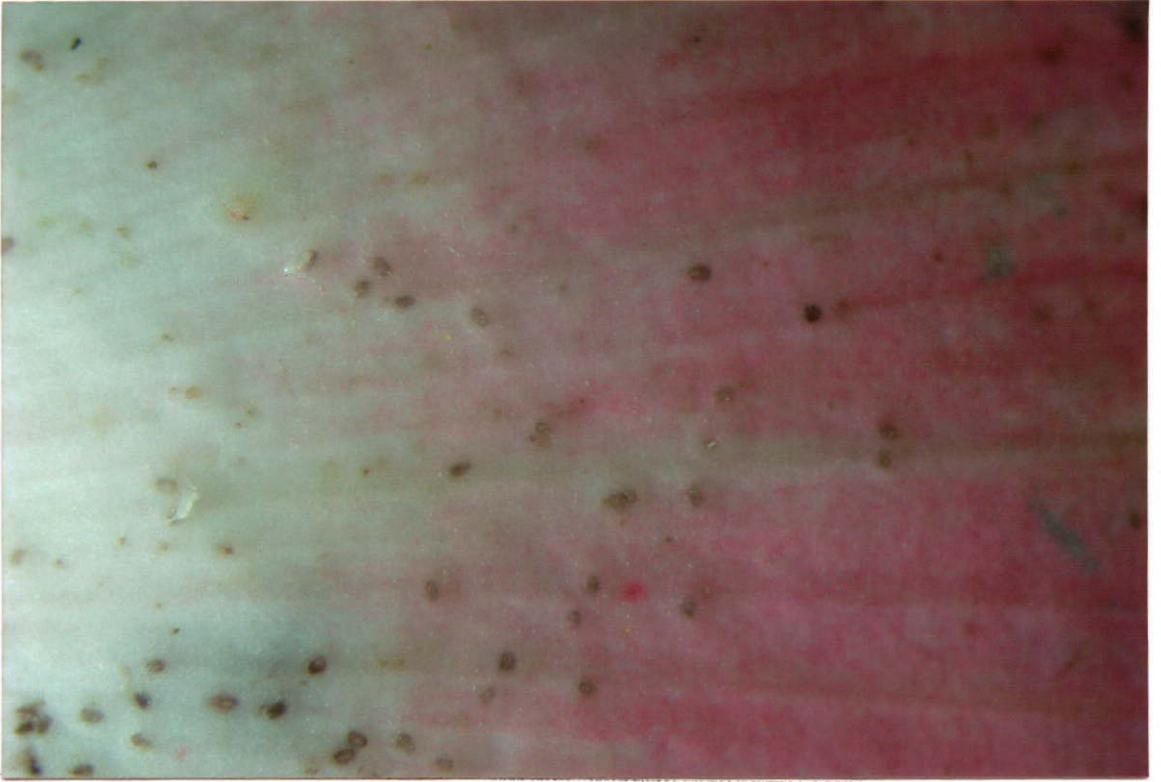
ภาพที่ 4.6 ระยะดักแด้ ของ *F. schultzei*



ภาพที่ 4.7 ตัวเต็มวัย ของ *F. schultzei*



ภาพที่ 4.8 ตัวเต็มวัย ของ *F. schultzei* เมื่อจัดกางปีก



ภาพที่ 4.9 ลักษณะการทำลายของ *F. schultzei* บนกลีบคอกบัว

Scirtothrips dorsalis Hood

ชื่อสามัญ Chilli Thrips, Yellow Tea Thrips

ชื่อพ้อง *Heliothrips minutissimus* Bagnall

ในธรรมชาติเพลี้ยไฟชนิดนี้เข้าทำลายส่วนใบของบัวหลวง โดยพบในใบอ่อนมากกว่าใบแก่ มักอาศัยอยู่ด้านหลังใบ มีรายละเอียดของแต่ละระยะการเจริญเติบโตดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ขนาดของลำตัว และระยะในการเจริญเติบโตของเพลี้ยไฟ *S. dorsalis* ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 30 ± 2 °C

ระยะเวลาต่างๆ	ความยาวของลำตัว (มิลลิเมตร)		จำนวนวันที่ใช้ในการเจริญเติบโต	
	ค่าเฉลี่ย \pm S.D.	พิสัย	ค่าเฉลี่ย \pm S.D.	พิสัย
ระยะไข่ ¹⁾	0.17 \pm 0.01	0.16-0.18	5.5 \pm 0.53	5-6
ตัวอ่อนระยะที่1	0.30 \pm 0.03	0.27-0.33	1.6 \pm 0.52	1-2
ตัวอ่อนระยะที่2	0.46 \pm 0.05	0.41-0.51	2.3 \pm 0.48	2-3
ระยะก่อนเข้าดักแด้	0.47 \pm 0.01	0.46-0.48	1.2 \pm 0.42	1-2
ระยะดักแด้	0.60 \pm 0.01	0.59-0.61	2.4 \pm 0.52	2-3
ระยะตัวเต็มวัย	0.66 \pm 0.05	0.61-0.71	10 \pm 0.94	9-11

1/ระยะไข่วัดขนาดความยาวของไข่

ระยะไข่

ไข่ของเพลี้ยไฟ *S. dorsalis* มีสีขาวใส รูปร่างคล้ายเมล็ดถั่วเปลือกไข่เกลี้ยงและอ่อนนุ่ม(ภาพที่ 4.10) เพลี้ยไฟชนิดนี้จะวางไข่ฟองเดี่ยวๆสอดไว้ใต้เนื้อเยื่อของใบบัวกระจายอยู่ทั่วไป ส่วนของใบบัวที่ตัวอ่อนเจาะผ่านออกมานั้นจะเป็นจุดเล็กๆ และเนื้อเยื่อบริเวณนั้นจะมีสีน้ำตาล ตัวอ่อนจะหยุดนิ่งระยะหนึ่งจึงเริ่มเคลื่อนไหว เวลาจากไข่จนถึงตัวอ่อนระยะที่1 ใช้เวลาประมาณ 5-6 วัน

ตัวอ่อนระยะที่1

ตัวอ่อนที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆจะมีสีลำตัวขาวหรือเกือบขาวใสตัวเล็กเรียวยาว ปลายท้องแหลม คารวมสีแดง ส่วนหัวใหญ่เมื่อเทียบกับลำตัว หนวดมี 7 ปล้อง มีโครงร่างที่คล้ายขา 3 คู่และไม่มีปมปีก(ภาพที่ 4.11) เคลื่อนไหวช้าในช่วงแรก จากนั้นเมื่อเพลี้ยไฟเริ่มดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชของลำตัวจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนๆและเคลื่อนไหวตลอดเวลา ระยะตัวอ่อนวัยนี้ประมาณ 1-2 วัน

ตัวอ่อนระยะที่ 2

เปลือกไข่จะมีขนาดลำตัวใหญ่ขึ้น มีสีเหลืองเข้มมากขึ้น ส่วนหัวมีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับความกว้างของลำตัว หนวดมี 7 ปล้อง มีลักษณะเรียวยาว (ภาพที่ 4.12) การเคลื่อนไหวรวดเร็ว่องไว เมื่อใกล้เข้าสู่ระยะก่อนเข้าดักแด้ ตัวจะใหญ่มากขึ้น ส่วนปลายท้องเริ่มมีลักษณะกลมมน ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน

ระยะก่อนเข้าดักแด้

ตัวอ่อนช่วงนี้จะมีสีของลำตัวสีเหลืองเข้มมากขึ้น เคลื่อนไหวช้า ขนาดของปล้องหนวดยาวขึ้น และชี้ตรงไปข้างหน้า ปุ่มปีกซึ่งเป็นช่วงแรกของการพัฒนาปีกเริ่มโตชัดเจนมากขึ้น (ภาพที่ 4.13) เปลือกไข่ในระยะนี้จะไม่กินอาหารและไม่เคลื่อนไหวถ้าไม่ถูกรบกวน ระยะนี้ใช้เวลาอยู่ประมาณ 1-2 วัน

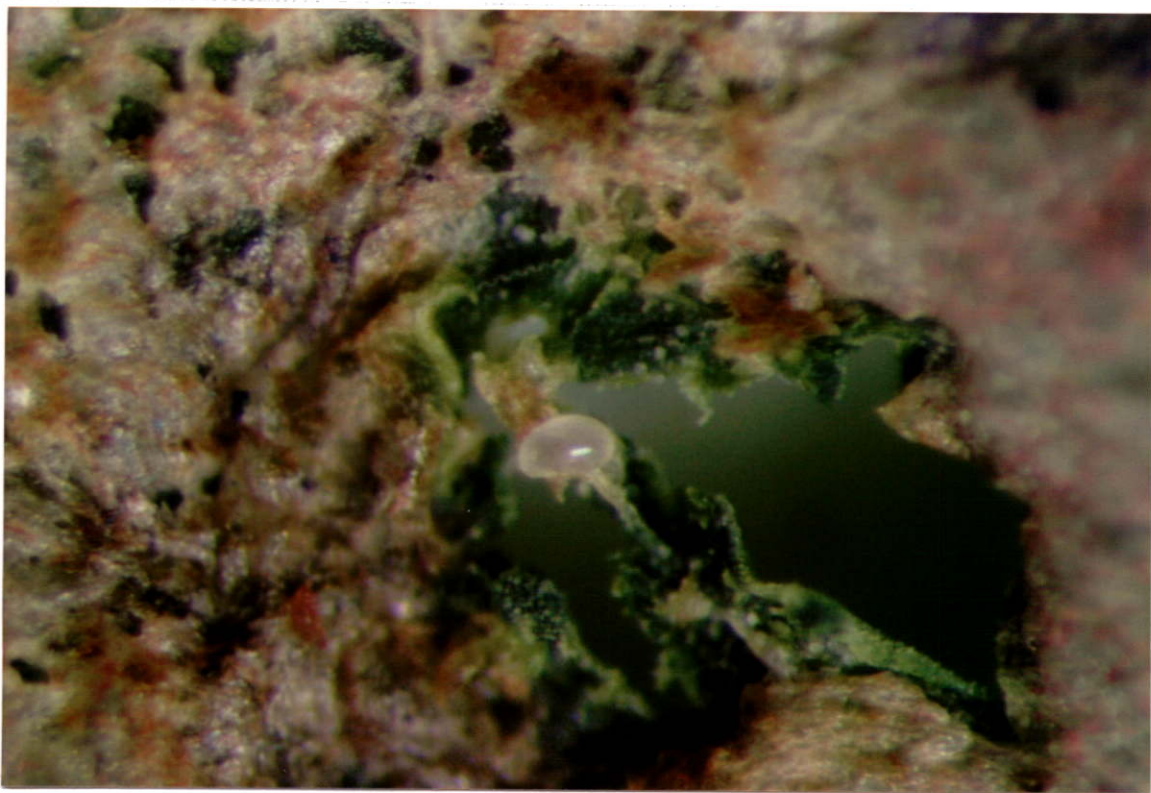
ระยะดักแด้

เปลือกไข่ในระยะนี้หนวดจะชี้ไปด้านหลังเหนือหัว แผ่นปีกจะพัฒนาขึ้นเกือบถึงปลายส่วนท้องมีขาและลำตัวมีขนาดใกล้เคียงตัวเต็มวัย (ภาพที่ 4.14) ลักษณะของเปลือกไข่ในช่วงนี้สามารถใช้แยกเพศตัวเต็มวัยได้ โดยดูจากลักษณะของลำตัวซึ่งเปลือกไข่ตัวเมียจะมีลักษณะอ้วนป้อมและตัวใหญ่กว่า แต่ตัวผู้จะมีขนาดลำตัวเล็กและเรียวกว่า ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน

ระยะตัวเต็มวัย

ระยะนี้เปลือกไข่จะมีสีของลำตัวเป็นสีเหลืองมากขึ้น หัวกว้างกว่าความยาว ตารวมสีแดงขนาดใหญ่และค่อนข้างโปนออกมา ตาเดี่ยวสีแดง 3 ตา หนวดมี 8 ปล้อง ปีกสีเทา ส่วนท้องมีแถบสีดำคาด (ภาพที่ 4.15 - 4.16) ลำตัวยาวประมาณ 0.61-0.71 มิลลิเมตร เมื่อออกเป็นตัวเต็มวัยแล้วเปลือกไข่จะมีชีวิตอยู่ต่อไปได้ประมาณ 9-11 วัน วงจรชีวิตของเปลือกไข่ประมาณ 20-25 วัน

ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจะดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบบัวอ่อนทำให้เกิดรอยแผลสีน้ำตาลปนเขียวเริ่มเข้าทำลายตั้งแต่ใบบัวยังไม่คลี่ (ภาพที่ 4.17) หากถูกทำลายมากทำให้ใบห่อ (ภาพที่ 4.18) ต่างจากใบบัวปกติ (ภาพที่ 4.19 - 4.20)



ภาพที่ 4.10 ไข่ของ *S. dorsalis*



ภาพที่ 4.11 ตัวอ่อนระยะที่ 1 ของ *S. dorsalis*



ภาพที่ 4.12 ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของ *S. dorsalis*



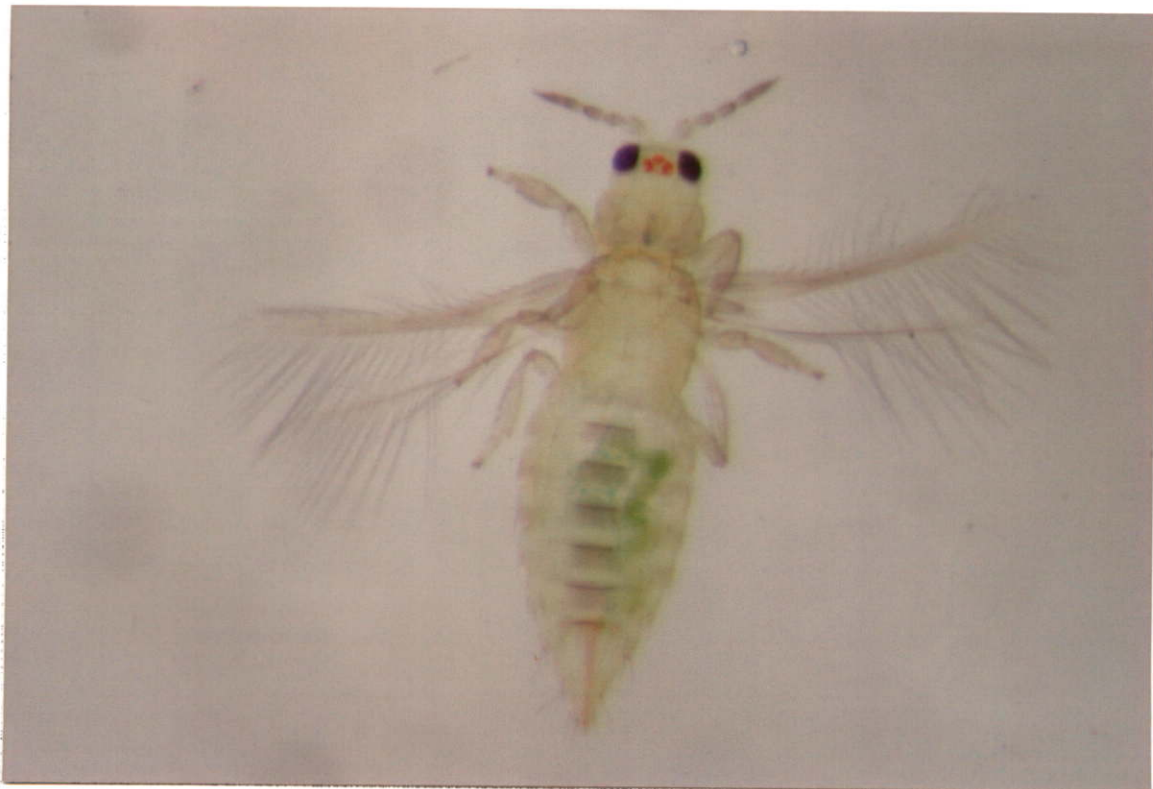
ภาพที่ 4.13 ระยะก่อนดักแด้ของ *S. dorsalis*



ภาพที่ 4.14 ระยะดักแด้ของ *S. dorsalis*



ภาพที่ 4.15 ระยะตัวเต็มวัย *S. dorsalis*



ภาพที่ 4.16 ตัวเต็มวัย *S. dorsalis* เมื่อจัดกางปีก



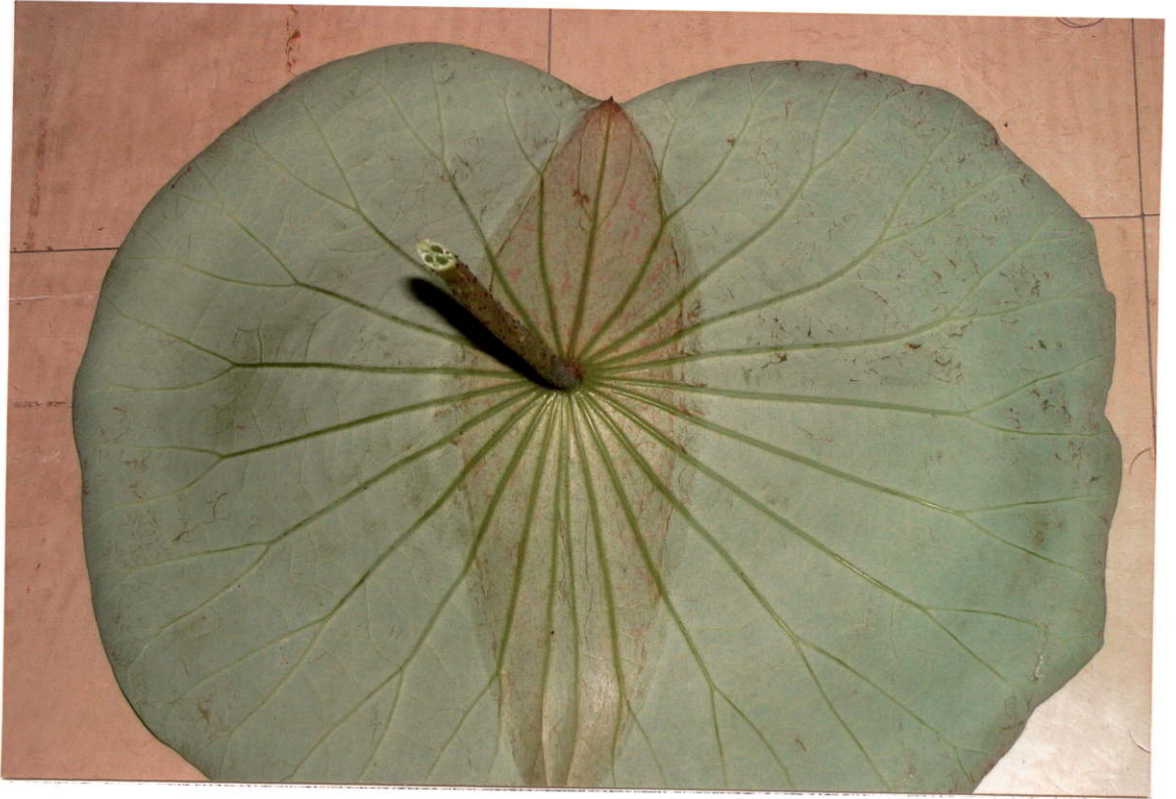
ภาพที่ 4.17 ใบบัวอ่อนที่ถูกทำลายโดย *S. dorsalis*



ภาพที่ 4.18 ใบบัวที่ถูกทำลายโดย *S. dorsalis* จะมีลักษณะใบเหี่ยว



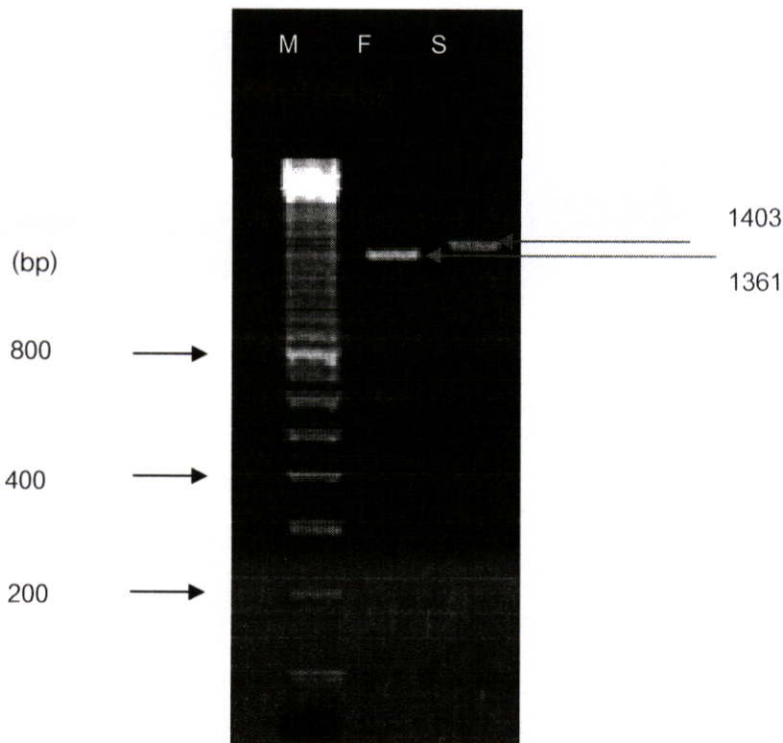
ภาพที่ 4.19 ด้านหน้าของใบบัวลักษณะปกติ



ภาพที่ 4.20 ด้านหลังของใบบัวลักษณะปกติ

4.2 การจำแนกชนิดของเพี้ยไฟในระดับโมเลกุล

สกัดดีเอ็นเอตัวอย่างเพี้ยไฟ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* ด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Moritz *et al.* (2000) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ใช้ primer 28Z (5' AGACTCCTTGGTCCGTGTTTC3') และ P1 (5' ATCACTCGGCTCGTGGATCG3') นำ PCR product ที่ได้ตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ถ่ายภาพและวิเคราะห์ผลด้วย Gel Documentation System พบว่าได้ดีเอ็นเอผลผลิตของ *F. schultzei* 1361 bp และ *S. dorsalis* Hood 1403bp ตามลำดับ(ภาพที่4.21)



ภาพที่ 4.21 ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณโดยวิธีPCR ของเพี้ยไฟ
ศัตรูบัว

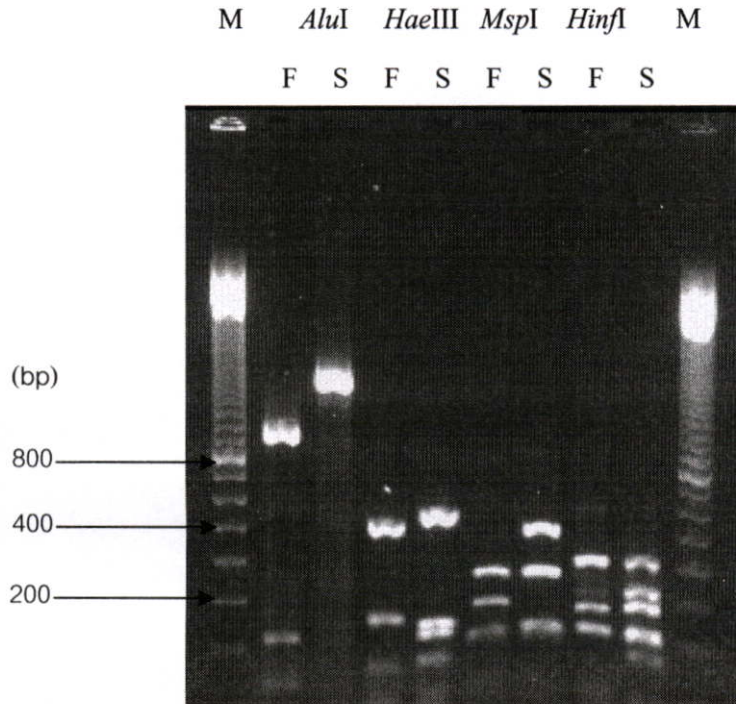
M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

F = PCR product ของ *F. schultzei*

S = PCR product ของ *S. dorsalis* Hood

4.2.1 การเกิดโพลิมอร์ฟิซึม

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอผลผลิตของเชื้อไฟทั้งสองชนิดดังกล่าวไปศึกษาการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมโดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิดได้แก่ เอนไซม์ *AluI*, *HaeIII*, *MspI*, และ *HinI* ตามลำดับ พบว่าเชื้อไฟทั้งสองชนิดดังกล่าว มีรูปแบบการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมที่แตกต่าง (ภาพที่ 4.22)



ภาพที่ 4.22 ITS-RFLP pattern ของ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* Hood ที่ตัดด้วย *AluI*, *HaeIII*,

MspI, และ *HinI*

M = DNA marker

F = *F. schultzei*

S = *S. dorsalis*

4.3 ความสัมพันธ์และประวัติการวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพี้ยไฟในบัวหลวง

4.3.1 การเรียงลำดับเบสของยีน

จากการนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอผลผลิตของเพี้ยไฟของ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* Hood ซึ่งมีขนาด 1361 และ 1403 bp ตามลำดับ ทำการโคลนด้วยเวกเตอร์ pGEM-T Easy และเลือกโคลนที่บรรจุยีนไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencer นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้บางส่วนวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีนที่มีรายงานในต่างประเทศด้วยโปรแกรม Blast บน website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/> พบว่า เพี้ยไฟทั้งสองชนิดมีลำดับเบสบางส่วนที่คล้ายคลึงกับข้อมูลของลำดับเบสของเพี้ยไฟที่มีรายงานในต่างประเทศแต่มีลำดับเบสบางส่วนที่ยังขาดหายไปจากการอ่านลำดับเบสในครั้งแรก จึงต้องออกแบบไพรเมอร์ใหม่เพื่อให้สามารถจับยีนจากลำดับเบสของดีเอ็นเอเพี้ยไฟทั้งสองชนิดที่ได้ เพื่อสังเคราะห์ส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ครบทั้งโคลน โดยได้ผลลำดับเบสบางส่วนของ rDNA ซึ่งประกอบด้วยส่วน 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 และ 28S ส่วน ITS เป็นส่วนที่มีความอนุรักษ์สูง (highly conserved sequencs) ส่วนของ ITS2 ที่อยู่ระหว่าง 28 S กับ 5.8 S จะเป็นส่วนที่จะนำไปหาหาความสัมพันธ์ phylogenetic tree ของเพี้ยไฟศัตรูบัวหลวงต่อไป บริเวณ ITS2 ของ *F. schultzei* อยู่ลำดับเบสที่ 858-1236 bp (ภาพที่ 4.23) และ *S. dorsalis* Hood อยู่ลำดับเบสที่ 864-1278 bp (ภาพที่ 4.24)

Primer 28Z

AGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTTCGGACGAGTATCGAAAGCAGAAGCGCCGC
 TGACCGGGTGCAGGCCTGTCCGAGTATAGCCCGAAACGGGCATCGAACGCATCCTCTGT
 GCGGCCTCTTCCCAAGCTTTGATACCGTCGGGGCGCCGATCAGGTCACCCCGGGTCCGTGC
 AAACAGCAACGCGGCACGAGGCCACGCTCCGGCACGGGCTCCACCGAGGGCCAATGAA
 CGGAACGATCCCAACGGGTTCGCGACGTCTACTAGGCGAGAAGTGCAGCCCACCGCACC
 AGACAGATAACCCCAAGGACGAGTGACGCCGTATGACCCGAACCGAAGCCCGAGCTGAC
 GACGCCATCTGAACCCGAGGGCCACCGGCGCGGTAAGCTTGAATCTCGCCATTCGGACTT
 TTCGAACTCGTCCGTTTACACCACTTCAGTTTCACGTA CTCTTGA ACTCTCTCTTCAAAGT
 TCTTTTACCTTTCCCTCACGGTACTTGTGTGCTATCGGTCTCGTGGTCATATTTAGCCTTA
 GATGGAGTTTACCACCCACTTAAGTCTGCACTCTCAAGCAAACCGACTCTAAGGAGAGAC
 CCACACGACAACCGCTCCTGCTCTACGGGCCTGTCACCCTCTGTGTGGCCCCATTCAAGT
 TGGACTTGAACCAGTGAGCGAGTCGCCGTGTTGACGGGCCCTCCCAAAGTTACATTTCC
 CGCCAAGCGAGGCCCGGGGGATTTCAGCGCTGGGCTCTTCCCTGTTTCGCTCGCCGCTACTA
 GGGGAATCCTTGTTAGTTTTTTTTTCTCGGCTTAGTAATATGCTTAAATTCAGCCGGTAAT
 CTCACCTGAACTGAGGTTCGTGAAAGGGCGAATCGCGCGGAGGGCGAAACGCAAGAGCGAG
 AAATTTGTTGCACACTTTTCCGGAACGGTTGCTCTTTATAAGGCATACCCTCAAGTCTTC
 AAGACGGGCGCTGCGACGTCGAGTACGAGGACAAGAAACGTCACACACCCGCCAACTTT
 TGGCAGAACGTCTGAGGGCTGTTTAGCGCGCGGGGGCGCTCTCTGGGCATCCTTTATAAG
 ACGTACCGCTTTGTACCGGCAGAGTGCTTTCTCTATACGGGATGTGACTCCCTGAGGATT
 TTAAGAGTACCACGCTCGCGCGCGGAGACCCCAACCTCGCTCCAGAGATTTCTCTCGGAA
 CAGTCTGGTCTTTGAGTTTGGTCAACCGACCCTCAGTCAGGTGTGGCCAGGAACAAGTC
 CTAGGGCCGCAATGTGCGTTCGAATTGTCAATGTTTCATGTGTCTGCAAGTTCACATGGCA
 ACGCGCAATTAGCTGCGTTCTTCATCGATCCACGAGCCGAGTGAT

Primer P1

ภาพที่ 4.23 ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของ *F. schultzei* 1361 bp ส่วนของดีเอ็นเอที่เรจนาสีชมพูแสดง
 ตำแหน่งของไพรเมอร์ 28Z และ P1 ตามลำดับ ส่วนของดีเอ็นเอที่เรจนาสีน้ำเงินแสดง
 ตำแหน่งของ Internal transcribed spacer (ITS2)

Primer 28Z

AGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTTCGGACGAGTATCGAAAGCAGTAGCGCCGC
 TGACCGGGTACGAACCTGTCCGAGAACAGCCCAGAACGGGCATCGGACGCAACCTCTGT
 GCGGTCCCTTCCCAATGCTTTGATACCGTCGAGCGCCGATCAGGTACCCCCGGGTCCGTG
 CACAGCAACAGCGAGCAAGCCCCTGCCCCGGCACGGGCTCCACCAGGGGCCACGATCG
 GAACAATCCCAACGGGTTCGCGACGTCTACTAGGGGAGAAGTGCAGCCCACCGCACCAG
 ACAGTTACCGTCGAGTCGAGTGAATACGGAGCAAACAGCGCAGCCCGAGAGCCCGCTGC
 CGACCGCACCATCTGAACCCGCCGGCCACCGGCACGGATAGGCCTGAATCTCCCCATTCC
 GACTTTTCGATCTCGTCCGTTTACACCACCTCAGTTTCACGTACTCTTGAACTCTCTCTTC
 AAAGTTCTTTTCACCTTTCCCTCACGGTACTTGTGTGCTATCGGTCTCGTGGTTATATTTA
 GCCTTAGATGGAGTTTACCACCCACTTAGGTCTGCACTCTCAAGCAAACCGACTCTAAGG
 AGAGGCCACACGGCGAACGCTTCTGCTCTACGGGCCTGTCACCCTCTGTGTGGCCCCAT
 TCAAGTTGGACTTGAGCGAGCCGCGATGCGCCGTGTTGACGGACCCTCCCAAACGCTAC
 ATTTCCCGCCGAGCGAGGCCCGGGGATTACAGCGCTGGGCTTTTACCCTGTTTCGCTCGCC
 GCTACTGAGGGAATCCTTGTTAGTTTCTTTTCCCTCCCCTTAGTAAGAAATTAATTCAGG
 GGGTAGTCTCACCTGAACTGAGGTCGTGATAGCGAATCGCCCTGGAAGACGAAGCGCTG
 CTCACTGCACAGAATAAAGAGTATTTACAATAGCCTCGAGACTCGTGCACGCGCCGCC
 GCCTGGATCTTTGTCCCGAGGGGACCACTGTGCTCAAGCAAACCTAGTCCGCGGGCCGCG
 TTTATCGAAATCGAAAACGAGCGCACGGGACCAATGTTGCCATCAGATCCAAGCGAACG
 AGACGAGCCTACTCGGTTGTGAGACCGTGTGAAAACCCACTCGATTGCCTTCCGTGCAGC
 GATATCGGTGAGACGACGCGAACGCCGAGCCCACTCACTTTATTTAAGGGTACCACG
 CCGAGACGCGGAGACTCCAATCTCGTCCGGGTTGTAAAGCCGGACAGTCTGGTCGTTGA
 GTTTGGTCAACCGACCCTCAGTCAGGTGTGGCCAGGAACAAGTCCTAGGGCCGCAATG
 TCGGTTTCGAAATGTCGATGTTTCATGTGTCCTGCAGTTCACATGTCAACGCGCAATTAGCT
 GCGTTNTTCATCGATCCACGAGCCGAGTGAT

Primer P1

ภาพที่ 4.24 ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของ *S. dorsalis* 1403 bp ส่วนของดีเอ็นเอที่แรงาสีชมพูแสดง
 ตำแหน่งของไพรเมอร์ 28Z และ P1 ตามลำดับ ส่วนของดีเอ็นเอที่แรงาสีน้ำเงินแสดง
 ตำแหน่ง ของ Internal transcribed spacer (ITS2)

4.3.2 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ

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

<i>Echinothrips americanus</i> (Accession No Aj303091)	วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยPanchaetothripinae
<i>Franklinella occidentalis</i> (Accession No Aj308591)	วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae
<i>Franklinella tenuicornis</i> (Accession No Aj308592)	วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae
<i>Hercinothrips femoralis</i> (Accession No Aj308596)	วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยPanchaetothripinae
<i>Limothrips denticornis</i> (Accession No Aj308594)	วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae
<i>Limothrips cerealium</i> (Accession No Aj308593)	วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae
<i>Parthenothrips dracaenae</i> (Accession No Aj308595)	วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae
<i>Thrips hawaiiensis</i> (Accession No AB063337)	วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae
<i>Thrips coloratus</i> (Accession No AB063338)	วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae
<i>Thrips flavas</i> (Accession No AB063339)	วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae
<i>Thrips setosus</i> (Accession No AB063342)	วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae
<i>Thrips tabaci</i> (Accession No AB063340)	วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae
<i>Thrips palmi</i> (Accession No AB063341)	วงศ์Thripidae:วงศ์ย่อยThripinae

และคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ด้วยโปรแกรม neighbor joining/UPGMA version 3.6a.2.1 เพื่อนำไปสร้าง phylogenetic tree ซึ่งตัวเลขค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้จะแปรผันตามความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ตัวเลขที่มีค่ามากคือมีวิวัฒนาการห่างไกลกันมากและตัวเลขที่น้อยแสดงถึงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกัน การวิเคราะห์ phylogenetic tree ที่ได้พบว่า *F. schultzei* มีลำดับวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับเพลี้ยไฟสกุล *Frankliniella* โดยมีความใกล้ชิดกับ *F. tenuicornis* มากที่สุด รองลงมาคือ *F. occidentalis* (ภาพที่ 4.25 และ ภาพที่ 4.26) และมีบรรพบุรุษสายเดียวกับ *S. dorsalis* แต่ *F. schultzei* มีวิวัฒนาการมาก่อน นอกจากนี้ยังพบว่าเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* มีวิวัฒนาการที่แยกออกไปต่างหากอีก 1 สาย ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับสายพันธุ์เพลี้ยไฟชนิดอื่นที่นำมาเปรียบเทียบกันนี้ ถึงแม้จะอยู่ในวงศ์ Thripidae วงศ์ย่อย Thripinae เหมือนกัน

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 4. 25 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. dorsalis*, 10. *T. hawaiiensis* (AB063337),
 11. *T. coloratus*(AB063338), 12. *T. flavas*(AB063339), 13. *T. setosus*(AB063342), 14. *T. tabaci*(AB063340), 15. *T. palmi* (AB063341)

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

ภาพที่ 4.26 (ต่อ)

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ชีวิตวิทยาของเพลี้ยไฟศัตรูบัวหลวง

5.1.1 *Frankliniella schultzei* พบว่า *F. schultzei* มีระยะเวลาตั้งแต่เป็นไข่จนถึงตัวเต็มวัยประมาณ 7-12 วันและสามารถอยู่ต่อได้อีก 13-15 วัน รวมระยะวงจรชีวิต 20-27 วัน ซึ่งคล้ายกับที่มีรายงานวงจรชีวิตของเพลี้ยไฟ *F. schultzei* ของ Bajhau *et al.* (2002) และในเพลี้ยไฟสกุล *Frankliniella* อื่น เช่น *F. occidentalis* ที่มีระยะไข่ 2-4 วัน ตัวอ่อนระยะที่ 1 1-2 วัน ตัวอ่อนระยะที่ 2 2-4 วัน ระยะก่อนเข้าคักแค้ 1-2 วัน ระยะคักแค้ 1-3 วัน ตัวเต็มวัยมีอายุยาวนาน 30-45 วัน เวลาการพัฒนาเติบโตของเพลี้ยไฟขึ้นกับอุณหภูมิ เช่นระยะการพัฒนาจากไข่เป็นตัวเต็มวัยอาจเป็นได้ตั้งแต่ 7-15 วันขึ้นกับอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง(Oetting and Steward. 2004)

นอกจากนี้ยังพบว่าทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจะคุ้ยกินน้ำเลี้ยงจากกลีบดอกและเกสรดอกบัว ทำให้เกิดรอยแผลสีน้ำตาลจุดเล็กๆและพบเข้าทำลายและอาศัยอยู่เฉพาะในส่วนดอกบัวหลวงเท่านั้นไม่ปรากฏว่าพบในส่วนของใบบัวเลย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Milne (1997) ที่รายงานว่าพบ *F. schultzei* ตัวเต็มวัยเพศเมียและตัวอ่อนเฉพาะในส่วนดอกของพืช 8 ชนิดที่ได้สำรวจในเมือง Brisbane รัฐ Queensland ประเทศออสเตรเลีย ไม่ปรากฏว่าพบบนส่วนใบเลย โดยพบมากที่สุดที่ *Malvaviscus arboreus* (wax mallow) มากกว่าดอกชนิดอื่นซึ่งได้แก่ *Hibiscus rosasinensis* L. (rose of china), *Vigna carracalla* L. (snail creeper), *Erythrina crista-galli* L. (coral tree), *Bauhinia galpinii* N.E. Brown (red bauhinia), *Bauhinia variegata* L. (purple bauhinia), *Ipomoea cairica* Sweet (morning glory) และ *Jacaranda mimosifolia* D. Don (jacaranda) นอกจากนี้การทดลองในห้องปฏิบัติการเมื่อให้ *F. schultzei* ตัวเต็มวัยเพศเมียกินเกสรใบพืช และกลีบดอก พบว่าในตอนแรกไม่มีความแตกต่างแต่เมื่อผ่านไประยะหนึ่งจะพบว่า *F. schultzei* ชอบอยู่ที่กลีบดอกมากกว่าใบและเกสร (Milne *et al.* 1996)

สกุล *Frankliniella* จัดว่าเป็นเพลี้ยไฟที่อยู่ในกลุ่มของเพลี้ยไฟดอกไม้ (flower dweller) เช่นเดียวกับสกุล *Haplothrips*, *Megalurothrips* และ *Odontothrips* (Kirk 1997) ดังนั้นลักษณะการแพร่กระจายจึงมักพบอยู่ที่ส่วนดอกของพืช ซึ่งโดยส่วนใหญ่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สี และกลิ่นของดอกไม้มีส่วนในการดึงดูดแมลงเพื่อเข้าไปช่วยในการผสมพันธุ์ มีรายงานว่า *F. schultzei* มีส่วนช่วยในการผสมพันธุ์พืชตระกูล Solanum เช่นเดียวกับ *Isothrips orientalis* กับ ดอกมะลิ หรือ *Microcephalothrips abdominalis* กับ ดอกแอสเทอรั (Ananthakrishnan. 1993) ดังนั้น *F. schultzei* จึงอาจจะมีส่วนช่วยในการผสมพันธุ์บัวหลวงด้วยเช่นกันเพราะในธรรมชาติจะพบตัวเต็มวัยเพศเมียในดอกบัวที่กลีบเริ่มบาน แต่จะไม่พบในดอกบัวหลวงที่ยังไม่บาน

5.1.2 *Scirtothrips dorsalis* จากการศึกษาขนาดและระยะการเจริญเติบโตของ *S. dorsalis* พบว่ามีความแตกต่างกับสุวรรณา (2517) และอัญชลี (2528) คือตัวเต็มวัยมีขนาด 1.116 และ 1.145 มิลลิเมตรตามลำดับ แต่การศึกษานี้พบว่าตัวเต็มวัยมีขนาด 0.66 มิลลิเมตรซึ่งค่อนข้างจะเล็กกว่า แต่ยังไม่ใกล้เคียงกับศิริณี (2538) ที่รายงานว่าตัวเต็มวัยมีขนาด 0.7 - 0.9 มิลลิเมตร ระยะเวลาตั้งแต่เป็นไข่จนถึงตัวเต็มวัยประมาณ 11-16 วันและสามารถอยู่ต่อได้อีก 9-11 วัน รวมระยะวงจรชีวิต 20-25 วัน ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของสุวรรณา(2517) อัญชลี(2528) และศิริณี (2536) แต่ต่างกันคืออายุเฉลี่ยของตัวเต็มวัยที่มีระยะสั้นกว่า ซึ่งปัจจัยหนึ่งอาจมาจากอุณหภูมิ อัญชลี (2528) กล่าวว่าอุณหภูมิจะมีความสัมพันธ์มากกับอายุและจำนวนวันที่ใช้ในการฟัก เมื่ออุณหภูมิสูง อายุและจำนวนวันที่ใช้ในการฟักจะลดลง ซึ่ง Lewis (1962) ก็พบว่า เพลี้ยไฟตัวเต็มวัย *Limothrips cerealium* Haliday จะมีอายุยืนมากเมื่ออุณหภูมิต่ำ และจะตายอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเช่นกัน

สาเหตุอีกประการหนึ่งที่อาจทำให้เพลี้ยไฟ *S. dorsalis* ที่ศึกษาวงจรชีวิตในบัวหลวงมีอายุสั้น อาจเนื่องจากใบบัวที่ตัดมาทดลองมีบาดแผล และอาจปล่อยสารระเหยที่แมลงไม่ชอบเพื่อป้องกันตัว ซึ่งสารระเหยที่เกิดจากบาดแผลมีส่วนสำคัญในการเพิ่มการต้านทานในเนื้อเยื่อพืช (Beck and Maxwell 1976; Farmer and Ryan 1990) นอกจากนี้ยังอาจมาจากการระเหยน้ำของพืชที่ใช้ทดลองซึ่งถึงแม้จะมีการรองใบบัวด้วยกระดาษซึ่งพรมน้ำไว้เพื่อให้ความชุ่มชื้นและยืดอายุใบให้เหี่ยวช้าลง แต่เนื่องจากโดยธรรมชาติบัวเป็นพืชที่เจริญเติบโตในน้ำ การให้น้ำดังกล่าวจึงอาจไม่เพียงพอต่อการระเหยและทำให้สารเคมีที่มีในใบบัวมีความเข้มข้นมากขึ้น จากการรายงานของ Dharmanda. (2002) ที่กล่าวว่าในใบบัวซึ่งมีรสขมมีสารอัลคาลอยด์ จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารนี้อาจมีผลกับการเข้าทำลายของเพลี้ยไฟซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตและอายุของเพลี้ยไฟได้

ในธรรมชาติพบว่าทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจะคูดกินน้ำเลี้ยงจากบัวส่วนที่พื้นน้ำขึ้นมาทั้งส่วนของก้านดอก ก้านใบ ใบ และ ดอก แต่จะพบตัวเต็มวัยจำนวนมากในส่วนของใบอ่อนบัวที่ยังไม่คลี่ ส่วนตัวอ่อนจะพบในทั้งใบแก่และอ่อน ทำให้เกิดรอยแผลสีน้ำตาลปนเขียว หากใบบัวถูกทำลายมากจะทำให้ใบหงิกห่อเข้าหากันคล้ายรูปถ้วย ส่วนของดอกหากถูกทำลายมากจะทำให้กลีบดอกมีสีน้ำตาลแห้งและเหี่ยว ดอกที่ถูกทำลายแล้วยังเป็นดอกตูมดอกจะมีสีน้ำตาลไม่คลี่บาน

ซึ่งการเข้าทำลายใบพืชตั้งแต่สภาพใบอ่อนนี้คล้ายกับ Ananthkrishnan (1971) และ Lewis (1973) ที่กล่าวว่า *S. dorsalis* กินส่วนที่เพิ่งเจริญเติบโตของพืชเกือบทุกส่วนทั้งตา ดอก ใบและผลอ่อนและทำให้พืชเกิดรอยแผลสีน้ำตาลเหลืองหรือสีเงิน มีรายงานว่า *S. dorsalis* เป็นศัตรูพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งของกุหลาบในประเทศอินเดีย เพราะเพลี้ยไฟชนิดนี้จะเข้าทำลายใบ ตาและดอกทำให้ผลผลิตเกิดความเสียหายสภาพไม่เหมาะสมที่จะส่งขายตลาด (Gahukar. 1999)

5.2 การจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟในระดับโมเลกุล

การศึกษาทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* Hood โดยวิธี PCR-RFLP โดยการใช้ไพรเมอร์ 28Z และ P 1 พบว่าไพรเมอร์ทั้งสองชนิดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยได้ขนาดดีเอ็นเอผลผลิตของ *F. schultzei* 1361 bp และ *S. dorsalis* Hood 1403 bp และเมื่อนำไปตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดเฉพาะ 4 ชนิด คือ *AluI*, *HaeIII*, *MspI* และ *HinfI* พบว่าเพลี้ยไฟทั้งสองชนิดมีรูปแบบการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมที่แตกต่างกัน ซึ่งคล้ายกับการรายงานของ Moritz *et al.* (2000), (2002); Toda and Komazaki. (2002) ซึ่งสามารถนำวิธีการดังกล่าวนี้ไปใช้ในการจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟได้นอกเหนือจากการใช้การจำแนกแบบสัณฐานวิทยาแบบเดิมที่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญการที่มีประสบการณ์สูงในการวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟ

นอกจากนี้การศึกษาทางชีวโมเลกุลยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการศึกษาต่อเนื่องในการศึกษาการเกิดวิวัฒนาการของเพลี้ยไฟชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย โดยการนำข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลยีน ITS 2 ของเพลี้ยไฟชนิดอื่นๆ ที่มีใน GenBank/EMBI

5.3 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* โดยการเปรียบเทียบยีนส่วน ITS2 กับข้อมูลของเพลี้ยไฟชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานใน 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 (2002) ที่รายงานในการศึกษาการเปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาของเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* และ สกุล *Frankliniella* พบว่าเพลี้ยไฟทั้งสองชนิดนี้ไม่มีสายบรรพบุรุษร่วมกัน หลักฐานทางสัณฐานวิทยาและทางธรณีชีววิทยา สนับสนุนว่า *Thrips* มีกำเนิดเป็นอิสระในโลกเก่าหลังจากการแยกของอาฟริกาจากอเมริกาใต้ แต่ก่อนยุครอยเลื่อนของอเมริกาเหนือและทวีปยุโรป ขณะที่ *Frankliniella* มีอายุเก่าแก่กว่า อาจจะอยู่ในช่วงกำเนิด Gondwana ตามด้วยการแยกเป็นซีกโลกด้านเหนือ ตลอดแนวตะวันออกและตะวันตกแต่ไม่ปรากฏเกี่ยวเนื่องทางอาฟริกา นอกจากนี้ข้อมูลที่สนับสนุนว่า

Frankliniella มีความเก่าแก่คือข้อมูลจากการพบซากฟอสซิล *Frankliniella* จำนวนมากที่สุด ในจำนวนสิ่งมีชีวิตที่ใช้ศึกษายุค Devonian ตอนปลายในส่วนของภูเขา Holy cross บริเวณ Palmatolepis triangularis conodont (Olempska. 2002) จากหลักฐานดังกล่าว จึงสอดคล้องกับการกล่าวถึงวิวัฒนาการของเพร็ลีย์ไฟของ Mound *et al.* (1980) และ Heming (1993) ว่าเพร็ลีย์ไฟรุ่นแรกๆ น่าจะอยู่อาศัยในใบที่เน่าเปื่อยซึ่งสามารถกินเส้นใยเชื้อราได้ จากนั้นจะเริ่มเคลื่อนย้ายไปยังดอก และถึงใบซึ่งแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่าง *F. schultzei* ซึ่งเป็นเพร็ลีย์ไฟในกลุ่มของเพร็ลีย์ไฟดอกไม้ (flower dweller) และพบเฉพาะที่ส่วนดอกของบัวหลวงเท่านั้นกับ *S. dorsalis* Hood ที่เข้าทำลายส่วนซึ่งพบมากในใบอ่อนของบัวหลวงได้ชัดเจนว่า *F. schultzei* มีวิวัฒนาการมาก่อน *S. dorsalis* Hood

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาชีววิทยาของเพลี้ยไฟศัตรูบัวหลวง 2 ชนิด ได้แก่ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* Hood พบว่าเพลี้ยไฟทั้งสองชนิดดังกล่าวมีรูปร่างลักษณะและวงจรชีวิตที่ต่างกันไปดังนี้

เพลี้ยไฟ *F. schultzei* มีระยะการเจริญเติบโต 6 ระยะ คือ ระยะไข่ 2-3 วัน ความยาว 0.27-0.31 มิลลิเมตร ตัวอ่อนระยะที่ 1 ระยะเวลาประมาณ 1-2 วัน ความยาวของลำตัว 0.53-0.59 มิลลิเมตร ตัวอ่อนระยะที่ 2 ระยะเวลาประมาณ 1-2 วัน ความยาวของลำตัว 0.87-0.99 มิลลิเมตร ตัวอ่อนระยะที่ 3 หรือระยะก่อนเข้าดักแด้ ระยะเวลาประมาณ 1-2 วัน ความยาวของลำตัว 1.00-1.24 มิลลิเมตร ตัวอ่อนระยะที่ 4 หรือระยะดักแด้ ระยะเวลาประมาณ 2-3 วัน ความยาวของลำตัว 1.05-1.24 มิลลิเมตร และระยะตัวเต็มวัย ความยาวของตัวเต็มวัยประมาณ 1.11-1.27 มิลลิเมตร ตัวเต็มวัยมีอายุ 13-15 วัน รวมวงจรชีวิต 20-27 วัน

ไข่ของเพลี้ยไฟ *F. schultzei* มีสีขาวใส รูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว ตัวอ่อนระยะที่ 1 มีสีลำตัวขาวหรือเกือบขาวใส ต่อมาจะมีสีเหลืองอ่อนๆ เคลื่อนไหวว่องไว ต่อมาระยะที่ 2 มีสีเหลืองเข้มมากขึ้น การเคลื่อนไหวรวดเร็วว่องไว ตัวอ่อนระยะที่ 3 หรือระยะก่อนเข้าดักแด้ สีของลำตัวสีเหลืองเข้มมากขึ้น เคลื่อนไหวช้า ระยะดักแด้ ลำตัวมีขนาดใกล้เคียงตัวเต็มวัย หนวดจะชี้ไปด้านหลังเหนือหัว แผ่นปีกยาวเกือบถึงปลายท้อง ต่อมาจะเจริญเป็นตัวเต็มวัย มีสีของลำตัวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองปนน้ำตาล สีนํ้าตาลแดงหรือนํ้าตาลดำ

เพลี้ยไฟ *S. dorsalis* มีระยะการเจริญเติบโต 6 ระยะ คือ ระยะไข่ 5-6 วัน ความยาว 0.16-0.18 มิลลิเมตร ตัวอ่อนระยะที่ 1 ระยะเวลาประมาณ 1-2 วัน ความยาวของลำตัว 0.27-0.33 มิลลิเมตร ตัวอ่อนระยะที่ 2 ระยะเวลาประมาณ 2-3 วัน ความยาวของลำตัว 0.41-0.51 มิลลิเมตร ตัวอ่อนระยะที่ 3 หรือระยะก่อนเข้าดักแด้ ระยะเวลาประมาณ 1-2 วัน ความยาวของลำตัว 0.46-0.48 มิลลิเมตร ตัวอ่อนระยะที่ 4 หรือระยะดักแด้ ระยะเวลาประมาณ 2-3 วัน ความยาวของลำตัว 0.59-0.61 มิลลิเมตร ความยาวของตัวเต็มวัยประมาณ 0.61-0.71 มิลลิเมตร ตัวเต็มวัยมีอายุ 9-11 วัน รวมวงจรชีวิต 20-25 วัน

ไข่ของเพลี้ยไฟ *S. dorsalis* มีสีขาวใส รูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว ตัวอ่อนระยะที่ 1 มีสีลำตัวขาวหรือเกือบขาวใส ต่อมาจะมีสีเหลืองอ่อนๆ เคลื่อนไหวว่องไว ต่อมาตัวอ่อนระยะที่ 2 มีสีเหลืองเข้มมากขึ้น การเคลื่อนไหวรวดเร็วว่องไว ตัวอ่อนระยะที่ 3 หรือระยะก่อนเข้าดักแด้ ลำตัวสีเหลืองเข้มมากขึ้น เคลื่อนไหวช้า จากนั้นจะเข้าสู่ระยะดักแด้ ลำตัวมีขนาดใกล้เคียงตัวเต็มวัย หนวดจะชี้ไปด้านหลังเหนือหัว แผ่นปีกยาวเกือบถึงปลายท้อง ต่อมาจะเจริญเป็นตัวเต็มวัย มีสีของลำตัวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองมะนาว มีแถบสีดำคาดบริเวณปลายท้อง

การจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟ *F. schultzei* และ *S. dorsalis* โดยเทคนิค PCR-RFLP ใช้ไพรเมอร์ 28Z และ P1 พบว่า ได้ PCR product - ขนาด 1361 และ 1403 bp ตามลำดับ และมีรูปแบบการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟได้นอกเหนือจากการการวินิจฉัยทางสัณฐานวิทยาแบบเดิมซึ่งต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวินิจฉัย เนื่องจากเพลี้ยไฟมีขนาดตัวเล็กมาก และมีจำนวนถึง 5,000 ชนิดที่ได้รับการวินิจฉัยชื่อแล้ว การบูรณาการเทคนิคทางการวินิจฉัยแบบสัณฐานวิทยาร่วมกับการวินิจฉัยโดยวิธีทางชีวโมเลกุลจึงน่าจะเป็นแนวทางที่ควรจะนำมาใช้เพื่อการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับเพลี้ยไฟของประเทศไทย เพื่อให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

การศึกษความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเพลี้ยไฟโดยการนำข้อมูลลำดับเบสส่วน ITS2 ซึ่งถือว่ามีความอนุรักษ์สูงมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของเพลี้ยไฟชนิดอื่นที่มีใน GenBank/EMBI ช่วยทำให้ทราบถึงสายพันธุ์วิวัฒนาการของเพลี้ยไฟศัตรูบัวได้ชัดเจนมากขึ้น ซึ่งจากผลการศึกษาที่ได้พบว่าเพลี้ยไฟทั้งสองชนิดที่อยู่ในวงศ์ Thripidae เหมือนกันแต่มีลำดับการวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน โดยที่ *F. schultzei* มีลำดับการวิวัฒนาการมาก่อน *S. dorsalis* แต่อย่างไรก็ตามวิธีการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลโดยใช้ข้อมูลลำดับเบสเพื่อนำไปสร้าง phylogenetic tree ยังคงมีข้อจำกัดในแง่ของเครื่องมือและเวลาที่ใช้ในการที่ใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งใช้เวลานานและค่าใช้จ่ายสูง จึงอาจทำให้การศึกษายังอยู่ในวงจำกัด

บรรณานุกรม

- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2549. "จดหมายข่าวปีที่3 ฉบับที่11 เดือนมกราคม": ส่วนส่งเสริมการผลิต ผักไม้ดอกไม้ประดับและสมุนไพร สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร [Online]. เข้าถึงได้จาก <http://www2.doae.go.th/floridade/06year/11.pdf>.
- ฉัตรชัย สุภิมาธ. 2547. "การจำแนกทางสัณฐานวิทยาและทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟส้มโอ". วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากีฏวิทยาและสิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ชินะ ชำรงค์ธรรม และ ประสทธิ ผลิตผลการพิมพ์. 2544. "การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ (DNA Sequence Analysis)" หน้า57-69. **ชีวสารสนเทศศาสตร์ BIOINFOMATICS**. กรุงเทพฯ.สถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- พรณีย์ วิชชาชู. 2546. "บัวเส้นทางสู่พืชเศรษฐกิจ". **หนังสือพิมพ์กสิกร**. 76(3): 30-41.
- สุปราณี วณิชชานนท์. 2540. **บัวประดับ**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์เพื่อนเกษตร. 134 หน้า.
- สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี**. กรุงเทพฯ.สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุวรรณ สุวรรณประทีป. 2517. "การศึกษาชีววิทยาและความสัมพันธ์ของอนุหภูมิ ปริมาณน้ำฝน กับปริมาณของเพลี้ยไฟกุหลาบ *Scirtothrips dorsalis* Hood ในรอบปี".วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุรินทร์ บำรุงสุข และธรรมทิพย์ ทิพยางค์. 2546. "แมลงศัตรูที่สำคัญของบัว." **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**. 34: 112-114.
- ศิริวราภรณ์ กลิ่นนุหงา. 2544. "Phylogenetics และ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต"หน้า 149-172. **ชีวสารสนเทศศาสตร์ BIOINFOMATICS**. กรุงเทพฯ. สถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- ศิริณี พูนไชยศรี และเพชร แซ่จิ้ม. 2436. "เพลี้ยไฟกับบัวหลวง" **ว.กสิ.สัตว**. 15(3): 163-164.
- ศิริณี พูนไชยศรี. 2537. "อนุกรมวิธานของเพลี้ยไฟที่พบในหน่อไม้ฝรั่ง". **ว.กสิ.สัตว**. 16(4): 197-216
- ศิริณี พูนไชยศรี. 2538. "ชีววิทยาของเพลี้ยไฟศัตรูมะม่วง *Scirtothrips dorsalis* Hood". **ว.กสิ.สัตว**. 17(3): 160-165
- ศิริณี พูนไชยศรี. 2544. **เพลี้ยไฟ Terebratia**. กองกสิกรรมและสัตววิทยา. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. 76 หน้า.

- อัญชลี สวาสดิ์ธรรม. 2528. "การศึกษาชีววิทยาและการใช้กับดักแบบกาวเหนียวกับเพลี้ยไฟมะม่วง *Scirtothrips dorsalis* Hood (Thysanoptera: Thripidae)". วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Ananthkrishnan, T.N. 1971. "Thrips (Thysanoptera) in agriculture, horticulture and forestry diagnosis, bionomics and control". **J. Sci. Ind. Res.** 30: 113-146.
- Ananthkrishnan, T.N., Daniel, A.M. and Kumar, N.S. 1982. "Spatial and seasonal distribution pattern of some phytophagous thrips (Thysanoptera:Insecta) infesting *Rieinus communis* Linn. (Euphobiaceae) and *Achyranthes aspera* Linn. (Amaranthaceae)". **Proceeding of the Indian National Science Academy.** B48 : 183-189.
- Ananthkrishnan, T.N. 1993. "Bionomic of thrips". **Annu. Rev. Entomol.** 38: 71-92.
- Bansiddhi, K. and Poonchaisri, S. 1991. "Thrips of vegetable and other commercially important crops in Thailand". **AVRDC Publication.** 91-342 : 34-39.
- Bajhau, H., Baker I. and Smith, S. 2002. "**Pest Diseases and Disorder of Mango in the Northern Territory**". 1st ed. The Publication Section. The Development of Business, Industry and Resource Development.
- Beck, S.D. and Maxwell, F.G. 1976. "Use of Plant Resistance". 615-636. in: **Theory and Practice of Biological Control.** Eds.C.B. Huffaker and P.S. Messenger. New York: Academic Press.
- CABI/EPPO. 1997. **Quarantine Pests for Europe.** 2nd ed. Wallingford: CAB International, CAB. 2003. **Crop protection compendium: global module.** Wallingford: Commonwealth Agricultural Baureau International.
- Cho, J. J., Mao, R.F.L., Hamasaki, R.T. and Gonsalves, D. Z. 1988. "Detection of tomato spotted with individual thrips by enzyme linked Immunosobent assay". **Phytopathology.** 78: 1348-1351.
- Davidson, J. and Bald, J.G. 1930. "Description and Bionomic of *Frankliniella insularis* Franklin (Thysanoptera)". **Bull. Entomol. Res.** 21: 365-385
- Dharmananda, S. 2002. "**Lotus seed:Food and Medicine**". [Online]. Available : <http://www.itmonline.org/arts/lotus.htm>.

- Farmer, E.E. and Ryan, C.A. 1990. "Interplant Communication: Airborne Methyl Jasmonate Induce Synthesis of Proteinase Inhibitors in Plant Leaves". **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 87: 7713-7716.
- Gahukar, R.T. 1999. "New Record of thrips attacking roes in central India." **J. Insect Sci. Ind..** 12 : 89.
- Gurney, T., Elbel, J. R., Ratnapradipa, D. 2000. "**Introduction to the Molecular Phylogeny of Insect**". [Online]. Available: <http://www.zoo.utoronto.ca/able/volume/vol-21/3-gurney.pdf>.
- Gyulai, G., Bayar, K., Torjek, O., Kiss, J., Kiss, E., Szabo, Z. and Hesky, I. 2002. "Molecular Polymorphism Among Populations of *Frankliniella intonsa*". Thrips and Topoviruses. p373- 375 in **Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera**. Tukey.
- 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.
- Hillis, D.M and Dixon, T.1991. " Ribosomal DNA: Molecular evolution and Phylogenetic Interference". **Q. Rev. Biol.** 66: 441-453.
- Kirk, W.D.J. 1984. "Ecological studies on thrips imaginis Bangnall (Thysanoptera) in flower of *Echium plantagineum* L. In Australia". **Aust. J. Ecol.** 9(9): 18.
- Kirk, W.D.J. 1987. "A key to the larvae of some common Australian flower thrips (Thysanoptera)." **Ecol. Entomol.** 10 : 281-289.
- Kraus, M., Schreiter, G. and Moritz, G. 1998. "Molecular genetic Studies of Thrips Species". p77-80 in **Proceedings of the 6th International Symposium on Thysanoptera**. Antalya.
- Lewis, T. 1962. "The effect of Temperature and relation humidity on mortality in *Limothrips ceregium* Haliday (Thysanoptera) overwintering in bark". **Ann. Apply Biol.** 50: 313-326.
- Lewis, T. 1973. **Thrips, their biology, ecology and economic importance**. New York: Academic Press.

- Liu, Y.C. 2004. "Molecular identification of plant quarantine pest (*Frankliniella occidentalis*) by onetube nest PCR target ribosomal DNA internal transcribed spacer regions". **Plant Prot. Bull.** 6: 24-76.
- Lingeri, M.S., Awaknavar, J.S., Lingappa, S. and Kukarni, K.A. 1998. "Seasonal occurrence of chilli mites (*Polyphagotarsonemus latus* Banks) and thrips (*Scitothrips dorsalis* Hood). Karnataka". **Indian. J. Agri. Sci.** 11 : 380-385.
- Loxdale, H.D. and Lushai, G. 1998. "Molecular marker in entomology". **Bull. Entomol. Res.** 88: 577-560.
- Milne, J .R., Walter, G. H., Kaonga, D. and Sabio, G. C. 1996. "The Importance of non-pollen plant as food sources for the common blossom thrips, *Frankliniella schultzei* " **Entomol. Exp. Appl.** 78: 271-287.
- Milne, M. 1997. ."Host plant relationship and significance of pray in the diet of two phytophagous thrips species, *Frankliniella schultzei* and *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae)". Ph D thesis. University of Queensland, Australia.
- Moritz, G., Delker, C., Paulsen, M., Mound, L.A. and Burgermeister, W. 2000. "**Modern Method in Thrips Identificaton and Information (Insecta: Thysanoptera)**". [Online]. Available: <http://entomology.ucdavis.edu/faculty/parrella/cheryle/thrips/Molecular.html>.
- Moritz, G., Paulsen, M., Delker, C., Picl, S. and Kumm, S. 2002. "**Identification of Thrips Using ITS-RFLP Analysis**". [Online]. Available: http://entomology.ucdavis.edu/faculty/parrella/cheryle_thrips/Molecular.html.
- Morris, D. C. and Mound, L. A. 2004. " **Molecular relationships between populations of South african citrus thrips (*Scirtothrips aurantii* Faure) in south Africa and Queenlands Austrtalia**". [Online]. Available : <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1111/j1326-6756.200437.x/full/html>.
- Mound, L.A. 1983. "Natural and disrupted pattern of geographical distribution in Thysanoptera (Insecta)". **J. Biogeo.** 10 : 119-133.
- Mound, L.A., Heming, B.S. and Palmer, J.M. 1980. "Phylogenetic relationships between the families of recent Thysanoptera (Insecta) Zoological". **J. Linn. Soc. Lond. Zool.** 69 : 111-142.

- Mound, L.A. and Houston, K. J. 1987. **An Annotated Check-List of Thysanoptera from Australia**. London: British Museum (Natural History).
- Mount, D.W. 2004. "Phylogenetic Prediction" 281-322 in **Bioinformatic Sequence and Genome Analysis**. 2nd. ed. London: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Oetting, R. and Steward, B. 2004. "**Thrips Management in Greenhouses**." [Online]. Available: <http://www.agnr.umd.edu/MCE/Publications/Publication.cfm?ID=143>
- Olempska, E. 2002. "The late Devonian Upper Kellwasser Event and entomozocean ostracods in the Holy Cross Mountain, Poland". **Acta Palaeontol. Pol.** 47(2): 247-266.
- Palmer, J.M., Mound, Z.A. and du Haeume, G. J. 1989 **CIE Guides to Insects of Importance to Man. Thysanoptera**. London: CAB International Institute of Entomology. British Museum of Natural history.
- Sakimura, K. 1969. "A comment on the color forms of *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera:Thripidae) in relation to transmission of the tomato spotted wilt virus". **Pacific Insects**. 11: 761-762.
- Severini, C., Severini, F., Mancini, P., La Rosa, G. and Marinucci, M. 1996. " Sequence and Secondary structure of The rDNA Second Internal Transcribed Spacer in The Sibling Species *Culex pipiens* L. and *CX. Quinquifasciatus* Say (Diptera: Culicidae)". **Insect Mol. Biol.** 5: 181-186.
- Sohn, D.H., Kim, Y.C., Oh, S.H., Park, E.J., Li, X. and Lee, B.H. 2003 "Hepatoprotective and free radical scavenging effects of *Nelumbo nucifera*". **Phytomedicine**. 10: 165-169.
- Toda. S. And Komazaki, S. 2002. "Identification of Thrips Species (Thysanoptera: Thripidae) on Japanese Fruit Tree by Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism of the Ribosomal ITS2 Region". **Bull. Entomol. Res.** 92: 359-363.
- Vierbergen, G. and Mantel, W. P. 1991. "Contribution to the knowledge of *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera:Thripidae)". **Entomologische Berichten (Amsterdam)**. 51: 7-12.

- Wilson, L.J. and Bauer, L.R. 1993. "Speies composition and seasonal abudance of thrips(Thysanoptera) on the cotton in the Namoi Valley". **J. Aus. Entomol. Soc.** 32: 187- 192.
- Yudin, L.S., Tabashnik, B.E., Cho, J.J. and Mitchell, W.C. 1988. "Colonization of weeds and lecttuce by thrips (Thysanoptera:thripidae)". **Envion. Entomol.** 17: 522-526.

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. DNA extraction buffer (100 ml)

0.2 M Sucrose = 6.8460 g

0.1 M Trisbase = 1.2114 g

0.1 M NaCl = 0.5844 g

0.05 M EDTA = 1.8612 g

ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นให้เข้ากันแล้วปรับ pH 9.2 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml

2. 8 M KoAc (50 ml)

Potassium acetate 39.256 g ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ml

3. TBE buffer (10 X) 500 ml

Trisebase 54.00 g

Boric acid 27.50 g

Na₂EDTA·2H₂O 3.72 g

4. การเตรียม reaction mixture

10 X PCR buffer = 2.5 µl

25mM MgCl₂ = 2.5 µl

10 mM dNTP = 1.0 µl

20 µ m primer 28Z = 1.0 µl

20 µ m primer P1 = 1.0 µl

Taq DNA polymerase(5unit/µl) = 0.2 µl

DNA template = 16.0 µl

เติมน้ำให้ครบ = 25.0 µl

ภาคผนวก ข

การเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับเบสของ *Frankliniella schultzei* และ *Scirtothrips dorsalis* Hood โดยโปรแกรม Clustal W Multiple alignment ใน BioEdit version 7.0.5.3 1998, Tom Hall

Alignment: Untitled

```

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50
F.schultzei AGACTCCTTG GTCCGTGTTT CAAGACGGGT CCGACGAGTA TCGAAAGCAG
S.dorsalis  AGACTCCTTG GTCCGTGTTT CAAGACGGGT CCGACGAGTA TCGAAAGCAG

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      60      70      80      90     100
F.schultzei AAGCGCCGCT GACCGGGTGC AGGCCTGTCC GAGTATAGCC CGAAACGGGC
S.dorsalis  TAGCGCCGCT GACCGGGTAC GAACCTGTCC GAGAACAGCC CGAAACGGGC

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      110     120     130     140     150
F.schultzei ATCGAACGCA TCCTCTGTGC GGCCTCTTCC CAA-GCTTTG ATACCGTCGG
S.dorsalis  ATCGGACGCA ACCTCTGTGC GGTCCCTTCC CAATGCTTTG ATACCGTCGA

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      160     170     180     190     200
F.schultzei GCGCCGATCA GGTACACCCG GGTCCGTGCA AACAGCAACG CGGCACGAGG
S.dorsalis  GCGCCGATCA GGTACACCCG GGTCCGTGCA -ACAGCAACA GCGAGCAAGC

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      210     220     230     240     250
F.schultzei CCAC-GCTCC GGCACGGGCT CCACCGAGGG CCAATGAACG GAACGATCCC
S.dorsalis  CCACTGCCCC GGCACGGGCT CCACCAGGGG CCA-CGATCG GAACAATCCC

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      260     270     280     290     300
F.schultzei AACGGGTCGC GACGTCTTAC TAGGGGAGAA GTGCAGCCCA CCGCACCAGA
S.dorsalis  AACGGGTCGC GACGTCTTAC TAGGGGAGAA GTGCAGCCCA CCGCACCAGA

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      310     320     330     340     350
F.schultzei CAGATACCCC CAGGGACGAG TGACGCCGTA -----TGACC CGAACC GA-A
S.dorsalis  CAGTTACCGT C-GAGTCGAG TGAATACGGA GCAAACAGCG CAGCCCCGAGA

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      360     370     380     390     400
F.schultzei GCCCGA-GCT GACGACGCCA TCTGAACCCG AGGGCCACCG GCGCGG-TAA
S.dorsalis  GCCCGCTGCC GACCGCACCA TCTGAACCCG CCGGCCACCG GCACGGATAG

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      410     420     430     440     450
F.schultzei GCTTGAATCT CGCCATTCGG ACTTTTCGAA CTCGTCCGTT TACACCACTT
S.dorsalis  GCCTGAATCT CCCCATTCGG ACTTTTCGAT CTCGTCCGTT TACACCACTT

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      460     470     480     490     500
F.schultzei CAGTTTCACG TACTCTTGAA CTCTCTCTTC AAAGTTCTTT TCACCTTTCC
S.dorsalis  CAGTTTCACG TACTCTTGAA CTCTCTCTTC AAAGTTCTTT TCACCTTTCC

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          510      520      530      540      550
F.schultzei CTCACGGTAC TTGTGTGCTA TCGGTCTCGT GGTCATATTT AGCCTTAGAT
S.dorsalis CTCACGGTAC TTGTGTGCTA TCGGTCTCGT GGTATATTT AGCCTTAGAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          560      570      580      590      600
F.schultzei GGAGTTTACC ACCCACTTAA GTCTGCACTC TCAAGCAAAC CGACTCTAAG
S.dorsalis GGAGTTTACC ACCCACTTAG GTCTGCACTC TCAAGCAAAC CGACTCTAAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          610      620      630      640      650
F.schultzei GAGAGACCCA CACGACAACC GCTCCTGCTC TACGGGCTG TCACCCTCTG
S.dorsalis GAGAGGCCCA CACGGCGAAC GCTTCTGCTC TACGGGCTG TCACCCTCTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          660      670      680      690      700
F.schultzei TGTGGCCCCA TTCAAGTTGG ACTTGAACCA GTGAGCGAGT CGCCGTGTTG
S.dorsalis TGTGGCCCCA TTCAAGTTGG ACTTGAACCA GCC-GCGATG CGCCGTGTTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          710      720      730      740      750
F.schultzei ACGGGCCCTC CAAAAGTTA CATTCCCCTC CAAGCGAGGC CCGGGGGATT
S.dorsalis ACGGACCCTC CAAAACGCTA CATTCCCCTC CGAGCGAGGC CCGGGGGATT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          760      770      780      790      800
F.schultzei CAGCGCTGGG CTCTT-CCCT GTTCGCTCGC CGCTACTAGG GGAATCCTTG
S.dorsalis CAGCGCTGGG CTTTACCCT GTTCGCTCGC CGCTACTGAG GGAATCCTTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          810      820      830      840      850
F.schultzei TTAGTTTTTT TTCC-TCGGC TTAGTAATAT GCTTAAATTC AGCCGGTAAT
S.dorsalis TTAGTTTCTT TTCCCTCCCC TTAGTAAGAA A-TTAAATTC AGGGGGTAGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          860      870      880      890      900
F.schultzei CTCACCTGAA CTGAGGTCGT GAAAGGCGAA TCGCGC--GG AGGCGAAACG
S.dorsalis CTCACCTGAA CTGAGGTCGT GATAG-CGAA TCGCCCTGGA AGACGAAGCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          910      920      930      940      950
F.schultzei CA----- ---AGAGCGA GAAATTTTGT -----T
S.dorsalis CTGCTCACTG CACAGAATAA AGAGTATTTT ACAATAGCCT CGAGACTCGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          960      970      980      990      1000
F.schultzei GCACACTTTT CCGGAACGGT TGCTCTTTAT AAGGCA---- -TACCCTCAA
S.dorsalis GCACGCGCCG CCCGCCTGGA TCTTTGTCCG GAGGGGACCA CTGTGCTCAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1010     1020     1030     1040     1050
F.schultzei GTCTTCAAGA CGG--GCGCT GCGAC-GTCG AGTACGAGGA CAAGAAACGT
S.dorsalis GCAAAC TAGT CCGCGGCGCC GCGTTTATCG AAATCGAAAA CGAGCG-CAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1060     1070     1080     1090     1100
F.schultzei CACACACCCG CCAACTTTTG G-CAGAACGT CTGAGGGCTG TTTAGCGCGC
S.dorsalis GGGACCAATG TTGCCATCAG ATCCAAGCGA ACGAGACGAG CCTACTCGGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1110     1120     1130     1140     1150
F.schultzei GGGGGCGCTC TCTGGGCATC CTTTATAAGA CGTACCGCTT TGTACCGGCA
S.dorsalis TGTGAGACCG TGTGAAAACC CACTCGATTG CTTCCGTGC AGCGATATCG

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1160      1170      1180      1190      1200
F.schultzei GAGTGCTTTC TCTATACGGG ATGTGACTCC CTGAGGATTT TAAGAGTACC
S.dorsalis  GTGAGACGAC GCGA-ACGCC GAGCCCACAC TCACTTTATT TAAGGGTACC

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1210      1220      1230      1240      1250
F.schultzei ACGCTCGCGC GCGGAGACCC CAACCTCGCT CCAGAGATTT CTCTCGGAAC
S.dorsalis  ACGCCGAGAC GCGGAGACTC CAATCTCGTC C--GGTTGT AAAGCCGGAC

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1260      1270      1280      1290      1300
F.schultzei AGTCTGGTCT TTGAGTTTGG TCAACCGACC CTCAGTCAGG TGTGGCCCAG
S.dorsalis  AGTCTGGTCG TTGAGTTTGG TCAACCGACC CTCAGTCAGG TGTGGCCCAG

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1310      1320      1330      1340      1350
F.schultzei GAACAAGTCC TAGGGCCGCA ATGTGCGTTC GAATTGTCAA TGTTTCATGTG
S.dorsalis  GAACAAGTCC TAGGGCCGCA ATGTGCGTTC GAAATGTCAA TGTTTCATGTG

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1360      1370      1380      1390      1400
F.schultzei TCCTGCAGTT CACATGGCAA CGCGCAATTA GCTGCGTTCT TCATCGATCC
S.dorsalis  TCCTGCAGTT CACATGTCAA CGCGCAATTA GCTGCGTTNT TCATCGATCC

```

```

      ....|....| ....
      1410
F.schultzei ACGAGCCGAG TGAT
S.dorsalis  ACGAGCCGAG TGAT

```


401	CGCCATTTCGGACTTTTCGAACTCGTCCGTTTACACCACTTCAGTTTCACGTACTCTTGAACCTCTCTCTCAAAGTTCTTT	480			
401	GCGGTAAGCCTGAAAAGCTTGAGCAGGCAAATGTGGTGAAGTCAAAGTGCATGAGAACTTGAGAGAGAAGTTTCAAGAAA	480			
	TaqI	HpyCH4IV Csp6I TaiI RsaI			
481	TCACCTTTCCTCACGGTACTTGTGTGCTATCGGTCTCGTGGTCATATTTAGCCTTAGATGGAGTTTACCACCCACTTAA	560			
481	AGTGAAAGGGAGTGCCATGAACACACGATAGCCAGAGCACCAGTATAAATCGGAATCTACCTCAAATGGTGGTGAATT	560			
	Csp6I RsaI	MseI			
561	GTCTGCACTCTCAAGCAAACCGACTCTAAGGAGAGACCCACACGACAACCGTCTCTGCTCTACGGGCCTGTCACCCCTCTG	640			
561	CAGACGTGAGAGTTCGTTTGGCTGAGATTCCCTCTCTGGGTGTGCTGTTGGCGAGGACGAGATGCCCGACAGTGGGAGAC	640			
	HpyCH4V	AciI	HaeIII		
641	TGTGGCCCATTCAAAGTTGACTTGAACCAGTGAGCGAGTCGCCGTGTTGACGGGCCCTCCCAAAGTTACATTTCCCGC	720			
641	ACACCGGGTAAAGTTCAACCTGAACCTGGTCACTCGCTCAGCGGCACAACCTGCCCGGAGGGTTTTCAATGTAAGGGCG	720			
	HaeIII	HaeIII	AciI		
721	CAAGCGAGGCCCGGGGATTTCAGCGCTGGGCTCTCCCTGTTTCGCTCGCCGCTACTAGGGGAATCCTTGTTAGTTTTTTT	800			
721	GTTTCGCTCCGGGCCCCCTAAGTCGCGACCCGAGAAGGGACAAGCGAGCGCGATGATCCCTTAGGAACAATCAAAAAA	800			
	HaeIII	HinPII	AciI	BfaI	
	HpaII	HhaI			
801	TCCTCGGCTTAGTAATATGCTTAAATTCAGCCGTAATCTCACCTGAACTGAGGTCTGAAAGGCGAATCGCGCGGAGGC	880			
801	AGGAGCCGAATCATTATACGAATTTAAGTCGGCATTAGAGTGGACTTGACTCCAGCACTTCCGCTTAGCGCGCTCCG	880			
	MseI	HpaII	BstUI HinPII HhaI BstUI AciI		
	Tsp509I				
881	GAAACGCAAGAGCGAGAAATTTGTGTCACACTTTTCCGGAACGGTGTCTTTATAAGGCATACCCTCAAGTCTTCAAG	960			
881	CTTTGCGTTCGCTCTTTAAAACAACGTGTGAAAAGGCCTTGCCAACGAGAAATATTCCGTATGGGAGTTCAGAAGTTC	960			
	Tsp509I	HpyCH4V	HpaII		
961	ACGGGCGTTCGACGTCGAGTACGAGGACAAGAAACGTACACACCCGCCAATTTTGGCAGAACGTCTGAGGGTGTGTT	1040			
961	TGCCCGCAGCGTGCAGCTCATGCTCCTGTTCTTTGCAGTGTGTGGCGGTTGAAAACCGTCTGCAGACTCCCGACAAA	1040			
	HinPII	HpyCH4IV	HpyCH4IV	AciI	HpyCH4IV
	HhaI	TaiI	TaiI	TaiI	
	TaqI	Csp6I			
	RsaI				
1041	AGCGCGCGGGGCGCTCTCTGGGCATCCTTTATAAGACGTACCGCTTTGTACCGGCAGAGTGCCTTCTCTATACGGGATG	1120			
1041	TCGCGCGCCCCCGGAGAGACCCGTAGGAAATATTCTGCATGGCGAAACATGGCCGTCTCACGAAAGAGATATGCCCTAC	1120			
	HinPII	HinPII	HpyCH4IV	Csp6I	
	HhaI	HhaI	Csp6I	RsaI	
	BstUI		TaiI	HpaII	
	HinPII		RsaI		
	HhaI		AciI		
	BstUI				
	AciI				

1121	TGACTCCCTGAGGATTTTAAAGAGTACCACGCTCGCGCGGAGACCCCAACCTCGTCCAGAGATTCTCTCGGAACAGT	1200
1121	ACTGAGGGACTCCTAAAATTCATGGTGCAGCGCGCCCTCTGGGGTTGGAGCGAGGTCTCTAAAGAGACCTTGCTCA	1200
	MseI Csp6I BstUI	
	RsaI HinPII	
	HhaI	
	BstUI	
	HinPII	
	HhaI	
	BstUI	
	AciI	
1201	CTGGTCTTTGAGTTTGGTCAACCGACCCCTCAGTCAGGTGTGGCCAGGAACAAGTCTAGGGCCGCAATGTGCGTTCGAA	1280
1201	GACCAGAAACTCAAACCAGTTGGCTGGGAGTCAGTCCACACCGGGTCTTGTTCAGGATCCCGGCTTACACGCAAGCTT	1280
	HaeIII BfaI AciI TaqI	
	HaeIII	Tsp509I
1281	TTGTCAATGTTTCATGTGTCCTGCAGTTCACATGGC AACGCGCAATTAGCTGCGTTCTTCATCGATCCACGAGCCGAGTGA	1360
1281	AACAGTTACAAGTACACAGGACGTCAAGTGTACCGTTGCGCGTAAATCGACGCAAGAAGTAGCTAGGTGCTCGGCTCACT	1360
	FatI HpyCH4V NlaIII HhaI AluI TaqI	
	NlaIII FatI BstUI MboI	
	HinPII DpnI	
	Tsp509I BstKTI	
1361	T 1361	
1361	A 1361	

Restriction table:

Enzyme	Recognition	frequency	Positions
AciI	C'CG_C	14	57, 120, 190, 290, 385, 610, 718 770, 874, 1007, 1047, 1083, 1159 1264
AluI	AG'CT	4	135, 350, 392, 1329
BfaI	C'TA_G	3	269, 776, 1258
BstKTI	G_AT'C	3	158, 246, 1346
BstUI	CG'CG	11	190, 258, 385, 872, 874, 1045 1047, 1155, 1157, 1159, 1320
Csp6I	G'TA_C	6	451, 498, 981, 1080, 1090, 1144
DpnI	GA'TC	3	157, 245, 1345
FatI	'CATG_	2	1292, 1310
HaeIII	GG'CC	11	74, 123, 200, 229, 376, 627, 646 696, 730, 1243, 1263
HhaI	G_CG'C	12	56, 153, 385, 746, 874, 968, 1045 1047, 1055, 1157, 1159, 1322
HinPII	G'CG_C	12	54, 151, 383, 744, 872, 966, 1043 1045, 1053, 1155, 1157, 1320
HpaII	C'CG_G	8	64, 168, 208, 380, 732, 832, 918 1093
HpyCH4IV	A'CG_T	6	261, 449, 974, 996, 1025, 1078
HpyCH4V	TG'CA	6	70, 178, 282, 566, 908, 1303
MboI	'GATC	3	155, 243, 1343
MseI	T'TA_A	3	558, 822, 1138
NlaIII	_CATG'	2	1296, 1314
RsaI	GT'AC	6	452, 499, 982, 1081, 1091, 1145
TaiI	_ACGT'	6	264, 452, 977, 999, 1028, 1081
TaqI	T'CG_A	6	42, 103, 417, 977, 1277, 1342
Tsp509I	'AATT_	4	824, 898, 1279, 1323

Restriction table:

Enzyme	Recognition	frequency	Positions
AciI	C'CG_C	16	57,120,289,350,360,375,679 723,776,952,956,1005,1007 1013,1203,1306
AluI	AG'CT	1	1371
BfaI	C'TA_G	3	268,1000,1300
BstKTI	G_AT'C	6	159,236,427,965,1065,1388
BstUI	CG'CG	8	257,681,949,1007,1015,1154 1203,1362
Csp6I	G'TA_C	4	68,457,504,1188
DpnI	GA'TC	6	158,235,426,964,1064,1387
FatI	'CATG_	2	1334,1352
HaeIII	GG'CC_	9	229,381,398,603,633,652,735 1285,1305
HhaI	G_CG'C	10	56,154,337,688,751,894,951 1012,1040,1364
HinPII	G'CG_C	10	54,152,335,686,749,892,949 1010,1038,1362
HpaII	C'CG_G	8	64,169,208,378,385,737,1222 1235
HpyCH4IV	A'CG_T	2	260,455
HpyCH4V	TG'CA	7	179,281,572,904,945,1132 1345
MboI	'GATC_	6	156,233,424,962,1062,1385
MseI	T'TA_A	2	828,1182
NlaIII	_CATG'	2	1338,1356
RsaI	GT'AC	4	69,458,505,1189
TaiI	_ACGT'	2	263,458
TaqI	T'CG_A	12	42,148,308,313,423,934,1022 1028,1117,1319,1327,1384
Tsp509I	'AATT_	3	825,830,1365

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล	นางสาวศศิมา มั่งนิมิตร
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต(เกษตรศาสตร์) สาขาปฐพีวิทยา จาก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ประวัติการทำงาน	ปัจจุบันรับราชการในตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ 6ว. สังกัดกลุ่มวิจัยวัตภูมิพิษ การเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร