บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ สำนักงานเกษตรจังหวัดลำปาง กลุ่มอารักขาพืช โทร. ๐-๕๔๘๒-๘๖๙๘

ที่ ลป ๐๐๐๙.๕/ ๑๐๔๔ **วันที่** ๒๙ มิถุนายน ๒๕๖๖

เรื่อง ขอให้ประสานงานพื้นที่เพื่อให้นิสิตเข้าเก็บตัวอย่างแมลงศัตรูพืชเพื่อใช้ในการทำวิจัย

เรียน เกษตรอำเภองาว

ด้วยนายชิษณุพงศ์ พานเทียน นิสิตในหลักสูตรวิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาสัตววิทยา สังกัดภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีรองศาสตราจารย์ ดร.ชัชวาล ใจซื่อกุล เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา หัวข้อดุษฎีนิพนธ์ในส่วนของการศึกษา "พันธุศาสตร์ประชากรและความต้านทานสารเคมีกำจัดศัตรูพืชของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด *Spodoptera frugiperda (J.E.Smith,1917)* ในประทศไทย" ขอความอนุเคราะห์ประสานนงานพื้นที่เพื่อให้นิสิตเข้าเก็บตัวอย่างแมลงศัตรูพืช โดยเฉพาะตัวอ่อนของศัตรูพืชในกลุ่มของผีเสื้อกลางคืนหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด ภายในพื้นที่อำเภองาว โดยจะเก็บตัวอย่างในแปลงข้าวโพดที่มีอายุประมาณ ๓๐-๔๐ วัน เพื่อนำตัวอย่างผีเสื้อที่ได้ไปศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและความต้านทานสารเคมีกำจัดศัตรูพืช

สำนักงานเกษตรจังหวัดลำปางพิจารณาแล้ว จึงขอให้เกษตรอำเภอมอบหมายเจ้าหน้าที่ผู้รับผิดชอบงานด้านอารักขาพืช ประสานงานกับนายชิษณุพงศ์ พานเทียน เบอร์โทรศัพท์ หมายเลข ๐๘๓-๐๑๕-๕๕๔๔ และจัดเตรียมข้อมูลที่เกี่ยวข้อง พร้อมทั้งนัดหมายเกษตรกรเพื่อสำรวจแปลง รายละเอียดตามสิ่งที่แนบมาพร้อมนี้

จึงเรียนมาเพื่อทราบ และดำเนินการต่อไป

(นายธีระพงศ์ ฤทธิโชติ)
เกษตรจังหวัดลำปาง

ที่ อว 64.1ค.2.03/1020/2566

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพญาไท กรุงเทพฯ 10330

12 มิถุนายน 2566

เรื่อง ขอความอนุเคราะห์ประสานงานพื้นที่เพื่อให้นิสิตเข้าเก็บตัวอย่างแมลงศัตรูพืชเพื่อใช้ในการทำวิจัย (นายชิษณุพงศ์ พานเทียน)

เรียน เกษตรจังหวัดลำปาง

สิ่งที่ส่งมาด้วย 1. ข้อมูลติดต่อของนิสิตผู้ทำการศึกษาโครงการและอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ จำนวน 1 ชุด
2. โครงร่างดุษฎีนิพนธ์ฉบับสมบูรณ์ของนิสิตที่ได้รับการอนุมัติจากคณะฯแล้ว จำนวน 1 ชุด

ด้วยนายชิษณุพงศ์ พานเทียน นิสิตในหลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาสัตววิทยา สังกัดภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีรองศาสตราจารย์ ดร. ชัชวาล ใจซื่อกุล เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ขณะนี้นิสิตกำลังทำการศึกษาหัวข้อดุษฎีนิพนธ์ในส่วนของการศึกษา “พันธุศาสตร์ประชากรและความต้านทานสารเคมีกำจัดศัตรูพืชของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1917) ในประเทศไทย” จึงใคร่ขอความอนุเคราะห์ประสานงานพื้นที่เพื่อให้นิสิตเข้าเก็บตัวอย่างแมลงศัตรูพืช โดยเฉพาะตัวอ่อนของศัตรูพืชในกลุ่มของผีเสื้อกลางคืนหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด ภายในพื้นที่การดูแลของสำนักงานเกษตรจังหวัดลำปาง โดยเฉพาะในพื้นที่อำเภองาวและอำเภอข้างเคียง

โดยนิสิตมีความต้องการที่จะเก็บตัวอย่างในแปลงข้าวโพดที่มีอายุประมาณ 30-40 วัน เพื่อนำตัวอย่างผีเสื้อที่ได้ไปศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและความต้านทานสารเคมีกำจัดศัตรูพืชตามวิธีการในโครงร่างดุษฎีนิพนธ์ของนิสิตที่ได้ทำการแนบมาด้วย โดยขออนุญาตให้นิสิตเก็บตัวอย่างแมลงในพื้นที่ด้วยอุปกรณ์ที่นิสิตได้เตรียมไปเอง รวมถึงขอความอนุเคราะห์ข้อมูลของชนิดพันธุ์พืชที่ได้ทำการเพาะปลูกและสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ได้มีการแนะนำให้เกษตรกรในพื้นที่ใช้ในการกำจัดศัตรูพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด ซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำไปประกอบงานค้นคว้าวิจัยของนิสิตให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ทั้งนี้ได้ทำการแนบโครงร่างดุษฎีนิพนธ์ของนิสิตมาด้วย ซึ่งนิสิตจะขอทำการเข้าเก็บตัวอย่างแมลงในระหว่างช่วงเดือน มิถุนายน 2566 ถึงกันยายน 2566 โดยสามารถติดต่อกลับได้ที่เบอร์โทรศัพท์ของนิสิต หมายเลข 083-015-5544 พร้อมกันนี้จะอ้างถึงสำนักงานเกษตรจังหวัดลำปาง ในดุษฎีนิพนธ์ของนิสิตในส่วนของพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างเป็นลำดับต่อไป และนิสิตมีความยินดียิ่งที่จะแบ่งปันข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างของนิสิต เพื่อความก้าวหน้าในการศึกษาแมลงศัตรูพืชกลุ่มนี้ในภายภาคหน้า

จึงเรียนมาเพื่อพิจารณาและขอความอนุเคราะห์ จักขอบพระคุณยิ่ง

ขอแสดงความนับถือ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ชัชวาล ใจซื่อกุล)
หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา

โทรศัพท์ 0-2218-5373-6
โทรสาร 0-2218-5386

ข้อมูลติดต่อของนิสิตผู้ทำการศึกษาโครงการและอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

1. **<u>นิสิตผู้ดำเนินโครงการ</u>**

ชื่อและนามสกุล	ชิษณุพงศ์ พานเทียน		
ระดับ	ปริญญาเอก	**สาขาวิชา**	สัตววิทยา
สถาบัน	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	**รหัสนิสิต**	6371002023
สาขาวิจัยที่ชำนาญ	นิเวศวิทยาและชีววิทยาของแมลง		
ที่อยู่ที่ติดต่อได้	พิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารชีววิทยา 1 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 254 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330		
โทรศัพท์	083-015-5544		
อีเมล	c.phanthian@gmail.com หรือ 6371002023@student.chula.ac.th		

2. **<u>อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ</u>**

ชื่อและนามสกุล	ชัชวาล ใจซื่อกุล
ตำแหน่งทางวิชาการ	รองศาสตราจารย์ ดร. (หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา)
สาขาวิจัยที่ชำนาญ	นิเวศวิทยาและชีววิทยาของแมลง
ที่อยู่ที่ติดต่อได้	ห้องธุรการภาควิชาชีววิทยา อาคารคลุ้ม วัชโรบล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 254 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์	02-218-5255, 086-667-3085
อีเมล	plawan111@yahoo.com หรือ chatchawan.c@chula.ac.th

ภาคผนวก (ฉบับภาษาไทย)

โครงร่างดุษฎีนิพนธ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อ **นายชิษณุพงศ์ พานเทียน** รหัสประจำตัวนิสิต **6371002023**

ภาควิชา **ชีววิทยา** สาขาวิชา **สัตววิทยา** หน่วยกิตดุษฎีนิพนธ์ **60**

หัวข้อดุษฎีนิพนธ์ (ภาษาไทย)

พันธุศาสตร์ประชากรและความต้านทานสารกำจัดศัตรูพืชของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1917) ในประเทศไทย

หัวข้อดุษฎีนิพนธ์ (ภาษาอังกฤษ – ตัวพิมพ์ใหญ่)

POPULATION GENETICS AND PESTICIDE RESISTANCE OF FALL ARMYWORM *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1917) IN THAILAND

อาจารย์ที่ปรึกษาดุษฎีนิพนธ์ **รองศาสตราจารย์ ดร. ชัชวาล ใจซื่อกุล** เบอร์โทรศัพท์ **02-218-5255**

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม **ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นนทิวิชญ ตัณฑวณิช** เบอร์โทรศัพท์ **02-218-5375**

วัตถุประสงค์

1. **เพื่อจำแนก strain และ haplotype ของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในประเทศไทยด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยา (molecular analyses)**
2. **เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านทานสารเคมีกำจัดศัตรูพืชของประชากรผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในประเทศไทยต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืชชนิด lambda-cyhalothrin และ chlorantraniliprole**

ที่มาและความสำคัญ

แมลงศัตรูพืชจัดว่าเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการลดลงของผลผลิตทางการเกษตร (Hughes and McKinlay 1988) สำหรับผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1917) ถูกจัดว่าเป็นหนึ่งในศัตรูพืชรุกรานที่ร้ายแรงชนิดใหม่เมื่อไม่นานมานี้ โดยเฉพาะข้าวโพดในภูมิภาคโลกเก่า (old-world region) ซึ่งรวมถึงประเทศไทยด้วย (Prasanna et al. 2018, Rukkasikorn et al. 2019)

โดยในแถบอเมริกาซึ่งเป็นถิ่นกำเนิดของผีเสื้อชนิดนี้นั้น สามารถทำการแบ่งประชากรของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดออกได้เป็น corn-strain และ rice-strain ซึ่งสามารถจำแนกได้จากความแตกต่างกันของสรีรวิทยา พันธุกรรม และพืชอาหาร (Lima and McNeil 2009, Schöfl et al. 2009, Groot et al. 2010) ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าประชากรของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดที่มี strains หรือ haplotypes ที่แตกต่างกัน มีแนวโน้มที่จะมีความทนทานต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่แตกต่างกันทั้งในด้านของชนิดและความเข้มข้นของสารเคมีกำจัดศัตรูพืช (Carvalho et al. 2013, Arias et al. 2019) ดังนั้นประชากรที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันอาจส่งผลให้ประชากรเหล่านั้นมีความสามารถในการต้านทางสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่แตกต่างกัน เพราะฉะนั้นการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรจึงมีความสำคัญและเป็นการศึกษาเร่งด่วน เพื่อที่จะสามารถควบคุมศัตรูพืชรุกรานชนิดนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดตามวิธีการของการจัดการศัตรูพืชแบบบูรณาการ (Integrated Pest Management programs, IPMs) (Barzman et al. 2015) ยิ่งไปกว่านั้น วิธีการศึกษาทางพันธุศาสตร์ประชากรสามารถใช้ในการติดตามและสืบหาต้นกำเนิดของประชากรที่กระจายตัวในพื้นที่ต่าง ๆ ได้ รวมถึงเส้นทางการกระจายพันธุ์ของประชากรเหล่านั้น (Nagoshi et al. 2018) อีกทั้งการศึกษาความต้านทานสารเคมีกำจัดศัตรูพืชร่วมกับการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรจะชี้ให้เห็นถึงสถานการณ์ที่แท้จริงของผีเสื้อชนิดนี้ในพื้นที่ได้อย่างแม่นยำมากยิ่งขึ้น (Arias et al. 2019) ซึ่งสำหรับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในกลุ่ม pyrethroid นั้นเป็นสารเคมีที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในการควบคุมศัตรูพืชทั้งในทางการเกษตรและในครัวเรือน โดยเฉพาะสารชนิด lambda-cyhalothrin (Rodrigues et al. 2013) และสำหรับสารในกลุ่ม ryanoid เป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่สามารถใช้ควบคุมผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดได้อย่างมีประสิทธิภาพ อาทิ สารชนิด chlotantraniliprole (Prasanna et al. 2018) เพราะฉะนั้นการศึกษานี้จึงมีเป้าหมายเพื่อจำแนกพันธุศาสตร์ประชากรของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในประเทศไทย ทั้งในส่วนของ strain และ haplotype ร่วมกับการศึกษาความต้านทานสารเคมีกำจัดศัตรูพืชด้วยวิธีการทดลองทาง bioassay กับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชทั้งสองกลุ่มที่ได้กล่าวไปในข้างต้น

ทบทวนวรรณกรรม

การมีอยู่ของแมลงศัตรูพืชทางการเกษตรในพื้นที่นับว่าเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อการลดลงของผลผลิตทางการเกษตรอย่างมีนัยสำคัญ (Hughes and McKinlay 1988) และเมื่อไม่นานมานี้ ผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด (fall armyworm, FAW) *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1917) ถูกจัดว่าเป็นหนึ่งในแมลงศัตรูพืชรุกรานที่มีความรุนแรงทั่วโลกโดยคณะกรรมการองค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (Prasanna et al. 2018) โดยปกติผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดนั้น มีถิ่นกำเนิดอยู่ในบริเวณแถบทวีปอเมริกาเหนือและใต้ ซึ่งภายใน

ประชากรมรดิ่นกำเนิดเดิมนั้นสามารถแบ่งได้เป็นสองสายพันธุ์คือ สายพันธุ์ข้าว (rice-strain) และสายพันธุ์ข้าวโพด (corn-strain) โดยขึ้นอยู่กับชนิดของพืชอาหารที่ลงใช้และคุณลักษณะทางสรีรวิทยา อย่างไรก็ตามทั้งสองสายพันธุ์นี้ไม่สามารถจำแนกได้โดยลักษณะภายนอก (Nagoshi and Meagher 2008) ดังนั้นการจำแนกสายพันธุ์ของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดจึงจำเป็นต้องใช้การจำแนกความแตกต่างของคุณลักษณะทางทางสรีรวิทยา อาทิ โครงสร้างทางเคมีของฟีโรโมนของผีเสื้อตัวเมีย และพฤติกรรมการสืบพันธุ์ รวมถึงการจำแนกความแตกต่างของ molecular marker ด้วยการใช้วิธีการทางอณูชีววิทยาของยีนต่าง ๆ อาทิ *Cytochrome C oxidase subunit I* (COI) ซึ่งเป็น mitochondrial gene และ *Triosephosphate isomerase* (Tpi) ซึ่งเป็น nuclear gene (Groot et al. 2008, Nagoshi et al. 2017) โดยวิธีการทางอณูชีววิทยาที่ใช้ในการจำแนกนั้นจะทำการเปรียบเทียบลำดับ nitrogenous base ของ molecular marker ที่ได้จากการสกัด DNA ของผีเสื้อ แบบ single nucleotide polymorphisms (SNPs) (Nagoshi et al. 2017, Nagoshi et al. 2019a) ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่า haplotype ที่แตกต่างกันของแต่ละสายพันธุ์นั้น มีแนวโน้มที่จะเกิดความต้านทานสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในระดับที่แตกต่างกัน ดังนั้นการจำแนกสายพันธุ์โดยการใช้วิธีการทางอณูชีววิทยาจึงสามารถบูรณาการกับการตรวจสอบและติดตามการต้านทานสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในประชากรของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดที่แตกต่างกันได้ (Carvalho et al. 2013, Arias et al. 2019) โดยการศึกษาก่อนหน้าได้เผยว่าผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา สามารถต้านทานสารเคมีกำจัดศัตรูพืชได้หลายชนิดในหลายกลุ่ม อาทิ Bt toxins, organophosphates, carbamates, และ pyrethroids โดยพิจารณาจากการกลายพันธุ์ของการเข้าจับกับเอนไซม์ (target-site mutation) เพื่อหลีกเลี่ยงการจับกับอนุภาคของสารเคมีกำจัดศัตรูพืช และการหลั่งเอนไซม์ออกมาเป็นจำนวนมาก (enzyme overstimulation) เพื่อกำจัดอนุภาคของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่เข้ามาในร่างกาย (Yu et al. 2003, Gutiérrez-Moreno et al. 2018) ถึงแม้ว่าผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดจะเป็นแมลงศัตรูพืชท้องถิ่นของแถบอเมริกามาเป็นระยะเวลานาน แต่ในปี 2016 ผีเสื้อชนิดนี้ได้ถูกพบนอกทวีปอเมริกาเป็นครั้งแรกในประเทศแถบชายฝั่งและนอกชายทางฝั่งตะวันตกของทวีปแอฟริกาหลายประเทศ (Day et al. 2017) และจากการศึกษาพบว่าประชากรตั้งต้นนอกทวีปอเมริกานี้มีต้นกำเนิดมาจากประชากรในรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา (Nagoshi et al. 2017) หลังจากนั้นประชากรนี้ได้เติบโตและแพร่ขยายไปยังบริเวณต่าง ๆ ของทวีปแอฟริกาและเอเชีย โดยได้มาถึงประเทศไทยในปี 2018 (Nagoshi et al. 2019b, Rukkasikorn et al. 2019, Nagoshi et al. 2020) และมีรายงานว่ามีการพบผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดที่ทวีปออสเตรเลียและประเทศในภูมิภาคโอเชียเนียในปี 2020 (Deshmukh et al. 2021) จากการศึกษาก่อนหน้า การแพร่กระจายของผีเสื้อชนิดนี้สามารถอธิบายได้ด้วยทฤษฎีต่าง ๆ ได้ อาทิ จากสมมติฐานของ enemy-free space hypothesis แมลงศัตรูพืชรุกรานสามารถขยายประชากรได้อย่างรวดเร็วในพื้นที่รุกรานแห่งใหม่ เนื่องจากในพื้นที่ใหม่นั้น มักไม่มีผู้ล่าที่จำเพาะกับแมลงศัตรูพืชดังเช่นในถิ่นที่อยู่เดิม จึงทำให้การ

ควบคุมประชากรของศัตรูพืชไม่สามารถทำได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ อีกทั้งการรุกรานในพื้นที่ใหม่ อาจทำให้ศัตรูพืชรุกรานมีโอกาสได้พบกับพืชอาหารชนิดใหม่ที่สามารถลงใช้ได้ ซึ่งทำให้ความเสียหายที่เกิดจากศัตรูพืชนั้นขยายวงกว้างขึ้นได้ (Allen et al. 2020) หรือในอีกกรณีหนึ่ง ถึงแม้ว่าจะมีผู้ล่าที่จำเพาะกับศัตรูพืชนั้น ๆ อยู่ในพื้นที่เดียวกัน แต่ด้วยผลจากการเกิด evolutionary arms race ในบางครั้งผู้ล่าอาจไม่สามารถควบคุมศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยปัจจัยแวดล้อมหลายประการ (Olson and Rieske 2019) สำหรับในทวีปแอฟริกา ซึ่งเป็นพื้นที่รุกรานแห่งแรกของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดนั้น ประชากรที่รุกรานสามารถลงหลักปักฐานได้สำเร็จและสามารถสร้างความเสียหายให้กับพืชผลทางการเกษตรได้ทันที ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อความมั่นคงทางอาหารและรายได้ของผู้คนในพื้นที่ โดยเฉพาะพื้นที่ที่มีความยากจนสูง (Prasanna et al. 2018, Tambo et al. 2020a) อย่างไรก็ตาม ปัจจัยแวดล้อมหลายอย่างสามารถส่งผลให้ผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดกลายเป็นศัตรูพืชร้ายแรงที่มีความสำคัญกว่าศัตรูพืชรุกรานชนิดอื่น อาทิ ความสามารถในการลงใช้พืชอาหารได้หลากหลาย (polyphagous ability) ความสามารถในการกระจายประชากร (dispersal ability) และความเหมาะสมของถิ่นที่อยู่อาศัยของพื้นที่ในแถบโซนร้อน (tropical zone) ที่ได้ทำการรุกราน (habitat suitability) โดยผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดมีรายงานการลงใช้พืชอาหารมากกว่า 300 ชนิด โดยเฉพาะพืชในวงศ์ Poaceae, Asteraceae, และ Fabaceae (Casmuz et al. 2010, Montezano et al. 2018) และผีเสื้อชนิดนี้เป็นสาเหตุของการลดลงของผลผลิตข้าวโพดในประเทศฮอนดูรัสและอาร์เจนตินาถึงประมาณ 40% และ 72% ตามลำดับ (Murúa et al. 2006, Wyckhuys and O'Neil 2006) ในส่วนของการกระจายพันธุ์ ผีเสื้อชนิดนี้มีพฤติกรรมการเคลื่อนย้ายประชากรทั้งระยะสั้น (short distance) และระยะยาว (long distance) ด้วยทั้งวิธีการแบบ active และ passive transportation (Westbrook et al. 2016, Cock et al. 2017) จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า ประชากรรุกรานตั้งต้นในภูมิภาคนี้อาจจะมีการกระจายพันธุ์ข้ามมหาสมุทรแอตแลนติคมาจากทวีปอเมริกาเหนือด้วยการติดมากับผลผลิตนำเข้าทางการเกษตร (Early et al. 2018) อีกทั้งสภาพอากาศก็เป็นปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลต่อการกระจายพันธุ์ของประชากรของผีเสื้อชนิดนี้ (Rose et al. 1975) โดยสภาพอากาศของเขตโซนร้อนนั้น เอื้อให้ผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดสามารถระบาดได้ตลอดทั้งปี ด้วยสภาพอากาศที่มีฝนตกตลอดทั้งปีและมีการเพาะปลูกอยู่ตลอดเวลา ทำให้พืชอาหารของผีเสื้อชนิดนี้มีมากพอที่จะสามารถอยู่รอดและขยายประชากรได้ทุกฤดู (Early et al. 2018, Prasanna et al. 2018, Liu et al. 2020)

โดยทั่วไปวิธีการเบื้องต้นในการควบคุมศัตรูพืชคือ การใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช เนื่องจากสามารถใช้ได้ง่าย เห็นผลได้รวดเร็วและมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการควบคุมด้วยวิธีอื่น เช่นเดียวกับในกรณีของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด ในตอนเริ่มแรกนั้นการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชสามารถใช้ในการควบคุมประชากรของผีเสื้อหนอนกระทู้ลายจุดได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kansiime et al. 2019, Tambo et al. 2020b, Tambo et al. 2020a) ซึ่งสารเคมีชนิด lambda-cyhalothrin และ chlorantraniliprole เป็นสารเคมีกำจัดแมลงที่มีการใช้

อย่างแพร่หลายในทวีปแอฟริกาในการควบคุมผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดและแมลงศัตรูพืชหลายชนิด (Prasanna et al. 2018) อย่างไรก็ตาม การใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในปริมาณมากจะทำให้แมลงมีประโยชน์และสัตว์ขาข้อผู้ล่าในพื้นที่อาจลดจำนวนลงอย่างมีนัยสำคัญจนหายไปจากพื้นที่ (Pekár 2012, Beers et al. 2016) อีกทั้งการปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในสิ่งแวดล้อมสามารถส่งผลต่อสุขภาพของมนุษย์ได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม (Moses et al. 1993, Asghar et al. 2016) สำหรับปัญหาที่อาจเกิดขึ้นกับผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชคือ สารเคมีจะกำจัดประชากรของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดที่อ่อนแอต่อสารเคมีนั้น ๆ ออกไปจากประชากร และคงไว้เฉพาะประชากรที่สามารถต้านทานสารเคมีกำจัดศัตรูพืชชนิดนั้น ๆ ได้ หรือในอีกทางหนึ่ง สารเคมีกำจัดศัตรูพืชจะกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาความต้านทานสารเคมีชนิดนั้น ๆ ขึ้นมาในประชากร (Hawkins et al. 2019) ดังนั้นเกษตรกรจำเป็นจะต้องใช้สารเคมีกำจัดศัตรูที่มีความหลากหลายและมีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้วงจรของการเกิดความต้านทานนี้จะดำเนินต่อไปเรื่อย ๆ จนเกิดการดื้อยาขึ้นในประชากรของศัตรูพืชในที่สุด อีกทั้งประชากรที่เกิดความต้านทานจะสามารถอยู่รอดและแพร่กระจายออกไปได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากกว่าประชากรที่อ่อนแอ ทำให้เกิดความเสียหายต่อพืชผลทางการเกษตรในบริเวณกว้างกว่าประชากรปกติ (Kliot and Ghanim 2012) และเนื่องจากประชากรของสิ่งมีชีวิตประชากรหนึ่งนั้น จะมีการอพยพเข้า (immigration) และอพยพออก (emigration) อยู่ตลอดเวลา ทำให้สารพันธุกรรมหรือยีนเกิดการถ่ายเท (gene flow) ระหว่างประชากร ดังนั้นหากประชากรที่มีความต้านทานมีการอพยพเข้าไปในประชากรปกติ จะทำให้อัตราการเกิดความต้านทานของประชากรปกติสูงขึ้นได้ (Miller and Sappington 2017) และเพื่อป้องกันการเกิดความต้านสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในศัตรูพืชตามคำแนะนำของคณะกรรมการดำเนินการต้านทานสารเคมีกำจัดแมลง (Insecticide Resistance Action Committee, IRAC) สารเคมีกำจัดศัตรูพืชควรมีการใช้ให้มีการออกฤทธิ์ที่หลากหลายมากที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ (pesticide treadmills) ในปริมาณที่เหมาะสม ในทางกลับกันหากใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่มีความหลากหลายน้อยในปริมาณมาก อาจทำให้แมลงศัตรูพืชเกิดการพัฒนาความต้านทานได้ จนไม่สามารถใช้สารเคมีกลุ่มนั้นกำจัดได้อีก (pesticide ratchet) (IRAC 2020)

สำหรับในประเทศไทย มีการรายงานว่าผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดมีการลงใช้ข้าวโพดเป็นพืชอาหารหลัก (CABI, 2021) อย่างไรก็ตาม การเพาะปลูกข้าวโพดในประเทศไทยนั้นมีการกระจุกตัวอยู่บริเวณประเทศไทยตอนบน โดยเฉพาะที่ราบหุบเขาและภูเขาทางตอนเหนือ ซึ่งอาจเป็นพื้นที่ที่ไม่ค่อยเหมาะสมในการเพาะปลูกข้าวโพด (Kredungkom 2014) และสำหรับทางด้านเศรษฐกิจ ข้าวโพดที่ปลูกในประเทศไทยส่วนมาก เป็นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ เป็นการเพาะปลูกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ แต่ทว่าก็ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการในการผลิต เกินกว่าครึ่งหนึ่งของข้าวโพดที่ต้องการใช้ในอุตสาหกรรมนี้จำเป็นต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศ และส่งออกในรูปของผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ที่ได้ทำการแปรรูปแล้ว (Kredungkom 2014) ดังนั้นการระบาดของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในประเทศไทยจะส่งผลต่อเศรษฐกิจและความ

หลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทยอย่างแน่นอน เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีรายได้หลักทางเศรษฐกิจจากการส่งออกผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร โดยในปี 2018 ซึ่งเป็นปีแรกที่มีการค้นพบการระบาดของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในประเทศไทย มีรายงานว่า 21 จังหวัดของประเทศไทยมีการระบาด โดยในจังหวัดเหล่านี้มี 13 จังหวัดที่มีการระบาดรุนแรงมากกว่า 10,000 ไร่ และในปัจจุบันมีรายงานว่าผีเสื้อชนิดนี้สามารถลงใช้พืชอาหารในประเทศไทยได้ถึง 28 ชนิด โดยสามารถอยู่รอดได้เกิน 70% ของประชากรตั้งต้น ซึ่งส่วนมากเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญ อาทิ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ขิง ปอเทือง ถั่วลิสง และผักชี (Rukkasikorn et al. 2019) เนื่องจากผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดเพิ่งเริ่มต้นในการรุกรานประเทศไทยในช่วงเวลาไม่กี่ปีที่ผ่านมา ทำให้มีความจำกัดในด้านของการติดตามและตรวจสอบการกระจายของประชากรผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในประเทศไทย กอปรกับการใช้สารเคมีชนิดเดิมอย่างต่อเนื่องในหลายพื้นที่ในประเทศไทย อาจส่งผลต่อการพัฒนาความต้านทานสารเคมีกำจัดศัตรูพืชของ haplotype ของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในประเทศไทยที่ไม่เท่ากันในแต่ละพื้นที่ การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและความต้านทานสารเคมีกำจัดศัตรูพืชของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในประเทศไทยจึงมีความสำคัญและเป็นงานที่เร่งด่วน เพื่อบรรเทาความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับพืชผลทางการเกษตร เพราะฉะนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นไปที่การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในแง่ของ strain และ haplotype ด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา พร้อมด้วยการศึกษาความต้านทานของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชชนิด lambda-cyhalothrin และ chlorantraniliprole ซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ใช้อย่างแพร่หลายในประเทศไทย

แผนและวิธีดำเนินการวิจัย

1. การทบทวนวรรณกรรม
2. การทดสอบอุปกรณ์และเทคนิคเบื้องต้น
3. การเก็บตัวอย่างมอธหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด

ปัจจัยแวดล้อมที่ได้มาจากข้อมูลทุติยภูมิ (secondary data) หลายประเภทที่อาจเกี่ยวข้องกับการกระจายของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดจะถูกพิจารณาเพื่อกำหนดพื้นที่เก็บตัวอย่างให้ครอบคลุมทั่วประเทศ อาทิ ความรุนแรงของการระบาด ภูมิอากาศ การใช้พื้นที่โดยมนุษย์ และชนิดของพืชผลทางเกษตรที่มีการเพาะปลูกในแต่ละพื้นที่

สำหรับความรุนแรงของการระบาดจะถูกแบ่งออกเป็น 4 ระดับตามการรายงานของกรมวิชาการเกษตร ได้แก่ ไม่มีการระบาด มีการระบาดต่ำ มีการระบาดปานกลาง และมีการระบาดสูง

สำหรับภูมิอากาศ ข้อมูลสภาพอากาศปัจจุบันจากฐานข้อมูล WorldClim ที่ความละเอียด 2.5 นาที จะถูกใช้ในการวิเคราะห์พื้นที่ เพื่อกำหนดจุดเก็บตัวอย่าง

ข้อมูลทุติยภูมิทั้งหมดจะถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม QGIS ด้วยวิธี K-means clustering ในการจัดกลุ่มพื้นที่ที่มีลักษณะเหมือนกันออกเป็น 5 ภาค (regionalization) และเนื่องจากการระบาดของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดโดยส่วนมากจะจำกัดอยู่เฉพาะในพื้นที่การเกษตรเท่านั้น ดังนั้นการกำหนดจุดเก็บตัวอย่างจึงทำการพิจารณาประกอบจากแผนที่การใช้พื้นที่ของมนุษย์ (land use mapping) ร่วมด้วย และจากการทำ regionalization สามารถแบ่งจุดเก็บตัวอย่างให้ครอบคลุมพื้นที่มากที่สุดโดยใช้จุดเก็บตัวอย่างน้อยที่สุดด้วยการแบ่งเส้นทางการเก็บตัวอย่างออกเป็น 6 เส้นทาง ประกอบด้วย 1) เส้นทางใต้ ได้แก่ สงขลา กระบี่ และชุมพร 2) เส้นทางตะวันออก ได้แก่ นครราชสีมา ปราจีนบุรี ชลบุรี และจันทบุรี 3) เส้นทางตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ ร้อยเอ็ด อุบลราชธานี และสกลนคร 4) เส้นทางตะวันตก ได้แก่ นครสวรรค์ กาญจนบุรี และเพชรบุรี 5) เส้นทางตะวันตกเฉียงเหนือ ได้แก่ ตาก (แม่สอด) ลำปาง และเชียงใหม่ และ 6) เส้นทางเหนือ ได้แก่ เพชรบูรณ์ พิษณุโลก น่าน และขอนแก่น (ชุมแพ)

การเก็บตัวอย่างจะดำเนินการในช่วงเดือนสิงหาคม 2565 และมีนาคม 2566 ซึ่งเป็นฤดูเพาะปลูกและฤดูแล้งตามลำดับ ตัวอย่างผีเสื้อจะถูกเก็บด้วยกับดักแสงไฟประยุกต์แบบถัง ซึ่งพัฒนาและดัดแปลงมาจากวิธีการของ White et al. (2016) และ Gunnar and Jan (2006) โดยภายในถังประกอบด้วยแผงไข่กระดาษที่ใส่แทนสารฆ่าแมลงเพื่อทำการจับเป็น และในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง ภาพถ่ายดาวเทียมของจุดเก็บตัวอย่างจะถูกตีกรอบขนาด 10 x 10 ตารางเมตรต่อกันด้วยโปรแกรม QGIS โดยกรอบดังกล่าวจะถูกสุ่มเลือกขึ้นมา 4 กรอบ เพื่อทำการวางกับดักแสงไฟในบริเวณนั้น (1 กับดักต่อ 1 กรอบ) กับดักดังกล่าวจะถูกวางข้ามคืน หลังจากแมลงที่เก็บได้ในกับดักจะถูกจำแนกชนิดด้วย dichotomous key และ pictorial key และทำการนับจำนวนตัวของแมลงในกับดัก โดยเฉพาะผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด ผีเสื้อในสกุลเดียวกัน (Genus *Spodoptera*) และผีเสื้อศัตรูข้าวโพดอื่น ๆ เพื่อนำจำนวนที่ได้ไปคำนวณดัชนีทางนิเวศวิทยาต่าง ๆ ในลำดับถัดไป

ข้อมูลสภาพแวดล้อมของแต่ละจุดเก็บตัวอย่างจะถูกเก็บในช่วงเวลาเดียวกับที่ทำการวางกับดัก อาทิ ข้อมูลอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และจุดน้ำค้าง จะทำการเก็บด้วย data locker และข้อมูลสภาพแวดล้อมอื่น ๆ จะทำการเก็บด้วยการประยุกต์ใช้ข้อมูล GIS

ผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดอย่างน้อย 5 คู่ของแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง จะถูกเก็บไว้เพื่อเป็นประชากรตั้งต้นเพื่อใช้ในการทดลองในห้องปฏิบัติการ ในขณะที่ตัวอย่างผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดที่เหลือจะถูกเด็ดขาข้างขวาที่ติดเนื้อเยื่อออกมา ก่อนจะทำการการุณยฆาตด้วย ethyl acetate โดยตัวอย่างขาจะถูกเก็บไว้ใน 99.9% ethanol เพื่อใช้ในการศึกษา molecular analyses ในลำดับถัดไป ส่วนตัวอย่างผีเสื้อที่ทำการการุณยฆาตแล้ว จะทำการเก็บเป็นตัวอย่างแห้งเพื่อใช้ในการศึกษาในภายภาคหน้า โดยชิ้นส่วนตัวอย่างทั้งหมดที่มาตัวอย่างเดียวกัน จะถูกติดป้ายกำกับที่มีเลขรหัสเดียวกันไว้ เพื่อใช้ในการอ้างอิงในอนาคต

4. การศึกษาความเป็นพิษของสารเคมีกำจัดแมลง

4.1.1 พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนของตัวอย่างผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในห้องปฏิบัติการ

ประชากรตั้งต้นของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดไม่เกิน 50 ตัว (ขั้นต่ำสุด 10 ตัว (5 คู่)) จะถูกนำมาปล่อยในมุ้งโครงเหล็กขนาด 2 x 2 x 2 ลูกบาศก์เมตร ทำการควบคุมอุณหภูมิแวดล้อมให้อยู่ที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 75% ทำการให้แสงสว่างเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ต่อวัน สำลีชุบน้ำผึ้งจะถูกใช้เป็นอาหารสำหรับตัวเต็มวัยภายในมุ้ง และต้นอ่อนข้าวโพดกับกระดาษไข จะถูกใช้เพื่อเป็นพื้นที่วางไข่ให้กับตัวเต็มวัยภายในมุ้ง ไข่ที่ถูกวางในมุ้งจะถูกเก็บมาฟักในห้องปฏิบัติการ เพื่อนำหนอนที่ฟักออกมานี้ไปใช้ในการทดสอบ bioassay ในการศึกษาความต้านทานของประชากร โดยตัวหนอนที่ฟักออกมานี้ จะทำการเลี้ยงด้วยอาหารเทียมตามสูตรและการเตรียมของ CIMMYT (Prasanna et al., 2018; Tefera, 2010) สำลีชุบน้ำผึ้งจะทำการเปลี่ยนทุกวัน ในขณะที่อาหารเทียมจะทำการเปลี่ยนทุกสัปดาห์ และหนอนเหล่านี้จะถูกทดสอบกับสารชนิด lambda-cyhalothrin และ chlorantraniliprole

4.1.2 การทดสอบ bioassay เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านทานสารเคมีกำจัดศัตรูพืช

สารเคมีกำจัดศัตรูพืช 2 ชนิด ได้แก่ lambda-cyhalothrin 2.5% w/v EC และ chlorantraniliprole 5.17% w/v SC จะถูกใช้ในการทดสอบ bioassay กับหนอนของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด โดยสารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นตามที่ฉลากแนะนำในการใช้คือ สารเคมีกำจัดแมลง 30 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 20 ลิตร ซึ่งในการทดลองนี้จะทำการทดลองทั้งหมด 8 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้นที่ฉลากแนะนำ (1X), ความเข้มข้นที่สูงกว่าฉลากแนะนำ 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 10 เท่า (10X) 100 เท่า (100X) และ 1000 เท่า (1000X), ความเข้มข้นที่ต่ำกว่าฉลากแนะนำ 3 ความเข้มข้น ได้ 10 เท่า (1/10X) 100 เท่า (1/100X) และ 1000 เท่า (1/1000X), และความเข้มข้นควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น (0X) ซึ่งหนอนที่ฟักในห้องปฏิบัติการของแต่ละจุดเก็บตัวอย่างจะถูกเลี้ยงจนถึงวัย 4 (4^{th} instar) ก่อนนำมาทดสอบ bioassay

โดยหนอนวัย 4 จะถูกย้ายลงใน petri-dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่มีอาหารเทียม CIMMYT อยู่ petri-dish ละ 10 ตัว

สารเคมีปริมาณ 20 ไมโครลิตรจะถูกหยดลงบนส่วนอก (thorax) ของหนอนโดยการใช้ micropipette แต่ละการทดลองของความเข้มข้น จะถูกทำซ้ำทั้งหมด 6 ครั้ง หลังจากนั้นทำการบันทึกจำนวนหนอนที่ตายลงในแต่ละ petri-dish เป็นเวลา 7 วัน โดยข้อมูลจำนวนหนอนที่ตายนี้จะถูกนำไปคำนวณหา mortality rate และคำนวณอัตราความต้านทานโดยใช้ Abbott's formula และ probit analysis

5. การจำแนกสายพันธุ์ของผีเสื้อหนอนกระทู้ลายจุดด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยา

การทำ molecular analyses จะทำการประยุกต์จากวิธีของ Nagoshi et al. (2019a) เพื่อเปรียบเทียบ strain และ haplotype ของประชากรผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดจากพื้นที่ที่แตกต่างกัน ตัวอย่างขาจากขั้นตอนการเก็บตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้ใน 99.9% ethanol จะถูกใช้ในการทดลองนี้ โดย DNA ที่

สกัดได้จากตัวอย่างขาจะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยยีน 2 ยีนคือ *Cytochrome C oxidase subunit I* (COI) ซึ่งเป็น mitochondrial gene และ *Triosephosphate isomerase* (Tpi) ซึ่งเป็น nuclear gene

a. การสกัด DNA

ตัวอย่างขาแต่ละตัวอย่างจะถูกบดร่วมกับ phosphate-buffered saline (PBS) ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตรและ genomic lysis buffer ปริมาณ 800 ไมโครลิตร ใน Dounce homogenizer ขนาด 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายนี้ไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 – 30 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อสกัดตะกอนเนื้อเยื่อออก หลังจากนั้นจะนำสารแขวนลอยที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงใส่ลงใน Zymo-Spin III column และปฏิบัติตามวิธีการของผลิตภัณฑ์ ปริมาณสุดท้ายของสารละลายจะถูกปรับให้เป็น 100 ไมโครลิตรด้วย ddH_2O

b. การทำ polymerase chain reaction (PCR) และการทำ DNA sequencing

การทำ PCR amplification จะถูกดำเนินการด้วย reaction master mix ปริมาณ 30 ไมโครลิตร ที่มี 10X reaction buffer ปริมาณ 3 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, 20 mM primer mix ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร, DNA ต้นแบบปริมาณ 1 ไมโครลิตร, และ Taq DNA polymerase 0.5 หน่วย

การตั้งค่าโปรแกรม thermocycling จะทำการตั้งค่าตามวิธีการของ Nagoshi et al. (2019) การวิเคราะห์ COI gene จะการแบ่งออกเป็นการวิเคราะห์ช่วง COIA และช่วง COIB ในขณะที่การวิเคราะห์ Tpi gene จะทำการออกเป็นช่วง Tpi intron 4 (TpiI4) และ Tpi exon 4 (TpiE4) โดยแต่ละช่วงจะถูกทำการ amplification ด้วยเทคนิค PCR พร้อมกันทั้งหมด โดยใช้ primer ที่แตกต่างกัน ซึ่งช่วง COIA จะทำการใช้ primer c101F และ 678R เพื่อสร้างชิ้นส่วน DNA ความยาว 596 base pair สำหรับช่วง COIB จะทำการใช้ primer 891F และ c1427R เพื่อสร้างชิ้นส่วน DNA ความยาว 603 base pair ในขณะที่ช่วง TpiI4 และ TpiE4 จะถูกทำการ amplification ด้วย primer t412F และ t1140R

หลังจากนั้น PCR product จะถูกนำเข้ากระบวนการ DNA sequencing ด้วยวิธี Sanger sequencing แต่ละจุดของ SNPs ที่สนใจจะถูกทำการเปรียบเทียบในแต่ละ DNA sequence ซึ่งความแตกต่างของจุด SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) แต่ละจุดนี้ จะใช้ในการจำแนก strain และ haplotype ของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด อาทิ จุด mCOI602Y บนส่วน COIA จะใช้ในการจำแนก species และ strain ในขณะที่จุด SNPs บนช่วง COIB อาทิ mCOI1164Y และ mCOI1287R จะใช้ในการจำแนก strain และ haplotype เช่นเดียวกับจุด SNPs บน TpiI4 และ TpiE4 อาทิ gTpi183Y, gTpi102Y, gTpi198Y, และช่วงของ TpiI4

c. การทำ DNA alignment และการวิเคราะห์ phylogenetic

DNA sequence ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษานี้จะถูกนำมาจัดเรียงด้วยวิธี MUSCLE (multiple sequence comparison by log-expectation) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทาง phylogeny และทำการคำนวณแบบจำลองและรูปแบบของ phylogenetic tree ที่ดีที่สุด อีกทั้งลำดับ DNA sequence ในการศึกษานี้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับ DNA sequence ของผีเสื้อหนอนกระทู้ลายจุดในฐานข้อมูลต่าง ๆ อาทิ GenBank เพื่อทำการเปรียบเทียบผลการศึกษาในด้านของ strain และ haplotype หลังจากนั้นจำนวน strain และ haplotype ของตัวอย่างในการศึกษานี้จะถูกคำนวณให้อยู่ในรูปแบบของความถี่ (frequency) เพื่อสร้าง haplotype gradient ของผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในประเทศไทย และหาความสัมพันธ์ร่วมกับความต้านทานสารเคมีกำจัดศัตรูพืชของประชากรนั้น ๆ ที่ได้ผลการศึกษามาจากการทดลองก่อนหน้า

6. การเขียนเอกสารเผยแพร่ (manuscript) และดุษฎีนิพนธ์ (dissertation)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาและปรับปรุงวิธีการในการควบคุมแมลงศัตรูพืชต่อไปในอนาคต โดยเฉพาะผีเสื้อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด ซึ่งถือว่าเป็นแมลงศัตรูพืชรุกรานที่มีความรุนแรงและสร้างความเสียหายต่อพืชผลทางการเกษตรเป็นวงกว้าง

เอกสารอ้างอิง

Allen, P. E., L. Laforest, S. I. Diyaljee, H. M. Smith, D. X. Tran, A. M. Winsor, and A. G. Dale. 2020. Long-term changes in mole cricket body size associated with enemy-free space and a novel range. Biological Invasions 22: 773-782.

Arias, O., E. Cordeiro, A. S. Corrêa, F. A. Domingues, A. S. Guidolin, and C. Omoto. 2019. Population genetic structure and demographic history of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): implications for insect resistance management programs. Pest Management Science 75: 2948-2957.

Asghar, U., M. F. Malik, and A. Javed. 2016. Pesticide exposure and human health: a review. Journal of Ecosystem and Ecography S5: 1-4.

Barzman, M., P. Bàrberi, A. N. E. Birch, P. Boonekamp, S. Dachbrodt-Saaydeh, B. Graf, B. Hommel, J. E. Jensen, J. Kiss, P. Kudsk, J. R. Lamichhane, A. Messéan, A.-C. Moonen, A. Ratnadass, P. Ricci, J.-L. Sarah, and M. Sattin. 2015. Eight principles of integrated pest management. Agronomy for Sustainable Development 35: 1199-1215.

Beers, E. H., N. J. Mills, P. W. Shearer, D. R. Horton, E. R. Milickzy, K. G. Amarasekare, and L. M. Gontijo. 2016. Nontarget effects of orchard pesticides on natural enemies: Lessons from the field and laboratory. Biological Control 102: 44-52.

Carvalho, R. A., C. Omoto, L. M. Field, M. S. Williamson, and C. Bass. 2013. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. PloS one 8: 1-11.

Casmuz, A., M. L. Juárez, M. G. Socías, M. G. Murúa, S. Prieto, S. Medina, E. Willink, and G. Gastaminza. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Revista de la Sociedad Entomológica Argentina 69: 209-231.

Cock, M. J. W., P. K. Beseh, A. G. Buddie, G. Cafá, and J. Crozier. 2017. Molecular methods to detect *Spodoptera frugiperda* in Ghana, and implications for monitoring the spread of invasive species in developing countries. Scientific Reports 7: 4103.

Day, R., P. Abrahams, M. Bateman, T. Beale, V. Clottey, M. Cock, Y. Colmenarez, N. Corniani, R. Early, J. Godwin, J. Gomez, P. G. Moreno, S. T. Murphy, B. Oppong-Mensah, N. Phiri, C. Pratt, S. Silvestri, and A. Witt. 2017. Fall Armyworm: Impacts and Implications for Africa. Outlooks on Pest Management 28: 196-201.

Deshmukh, S. S., B. M. Prasanna, C. M. Kalleshwaraswamy, J. Jaba, and B. Choudhary. 2021. Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*), pp. 349-372. In Omkar (ed.), Polyphagous Pests of Crops. Springer Singapore, Singapore.

Early, R., P. González-Moreno, S. T. Murphy, and R. Day. 2018. Forecasting the global extent of invasion of the cereal pest *Spodoptera frugiperda*, the fall armyworm. NeoBiota 40: 25-50.

Groot, A. T., M. Marr, D. G. Heckel, and G. Schöfl. 2010. The roles and interactions of reproductive isolation mechanisms in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. Ecological Entomology 35: 105-118.

Groot, A. T., M. Marr, G. Schöfl, S. Lorenz, A. Svatos, and D. G. Heckel. 2008. Host strain specific sex pheromone variation in *Spodoptera frugiperda*. Frontiers in Zoology 5: 1-13.

Gunnar, B., and C. A. Jan. 2006. A Comparison of Manual and Automatic Moth Sampling Methods (Lepidoptera: Arctiidae, Geometridae) in a Rain Forest in Costa Rica. Environmental Entomology 35: 757-764.

Gutiérrez-Moreno, R., D. Mota-Sanchez, C. A. Blanco, M. E. Whalon, H. Terán-Santofimio, J. C. Rodriguez-Maciel, and C. DiFonzo. 2018. Field-Evolved Resistance of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Synthetic Insecticides in Puerto Rico and Mexico. Journal of Economic Entomology 112: 792-802.

Hawkins, N. J., C. Bass, A. Dixon, and P. Neve. 2019. The evolutionary origins of pesticide resistance. Biological Reviews 94: 135-155.

Hughes, G., and R. McKinlay. 1988. Spatial heterogeneity in yield-pest relationships for crop loss assessment. Ecological modelling 41: 67-73.

IRAC. 2020. IRAC Mode of Action Classification Scheme (Version 9.4). *In* I. Executive [ed.]. Insecticide Resistance Action Committee (IRAC).

Kansiime, M. K., I. Mugambi, I. Rwomushana, W. Nunda, J. Lamontagne-Godwin, H. Rware, N. A. Phiri, G. Chipabika, M. Ndlovu, and R. Day. 2019. Farmer perception of fall armyworm (*Spodoptera frugiderda* J.E. Smith) and farm-level management practices in Zambia. Pest Management Science 75: 2840-2850.

Kliot, A., and M. Ghanim. 2012. Fitness costs associated with insecticide resistance. Pest Management Science 68: 1431-1437.

Kredungkom, A. 2014. Ability of Maize Production in Thailand for Import Substitution. Master of Science, Chiang Mai University Chiang Mai, Thailand.

Lima, E. R., and J. N. McNeil. 2009. Female sex pheromones in the host races and hybrids of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Chemoecology 19: 29-36.

Liu, T., J. Wang, X. Hu, and J. Feng. 2020. Land-use change drives present and future distributions of Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Science of The Total Environment 706: 1-11.

Miller, N. J., and T. W. Sappington. 2017. Role of dispersal in resistance evolution and spread. Current Opinion in Insect Science 21: 68-74.

Montezano, D. G., A. Specht, D. R. Sosa-Gómez, V. F. Roque-Specht, J. C. Sousa-Silva, S. V. Paula-Moraes, J. A. Peterson, and T. E. Hunt. 2018. Host Plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. African Entomology 26: 286-300.

Moses, M., E. S. Johnson, W. K. Anger, V. W. Burse, S. W. Horstman, R. J. Jackson, R. G. Lewis, K. T. Maddy, R. McConnell, W. J. Meggs, and S. H. Zahm. 1993. Environmental Equity and Pesticide Exposure. Toxicology and Industrial Health 9: 913-959.

Murúa, G., J. Molina-Ochoa, and C. Coviella. 2006. Population dynamics of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its parasitoids in northwestern Argentina. Florida Entomologist 89: 175-182.

Nagoshi, R. N., and R. L. Meagher. 2008. Review of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Genetic Complexity and Migration. Florida Entomologist 91: 546-554.

Nagoshi, R. N., G. Goergen, H. D. Plessis, J. van den Berg, and R. Meagher. 2019**a.** Genetic comparisons of fall armyworm populations from 11 countries spanning sub-Saharan Africa provide insights into strain composition and migratory behaviors. Scientific Reports 9: 1-11.

Nagoshi, R. N., G. Goergen, K. A. Tounou, K. Agboka, D. Koffi, and R. L. Meagher. 2018. Analysis of strain distribution, migratory potential, and invasion history of fall armyworm populations in northern Sub-Saharan Africa. Scientific Reports 8: 1-10.

Nagoshi, R. N., D. Koffi, K. Agboka, K. A. Tounou, R. Banerjee, J. L. Jurat-Fuentes, and R. L. Meagher. 2017. Comparative molecular analyses of invasive fall armyworm in Togo reveal strong similarities to populations from the eastern United States and the Greater Antilles. PLOS ONE 12: 1-15.

Nagoshi, R. N., I. Dhanani, R. Asokan, H. M. Mahadevaswamy, C. M. Kalleshwaraswamy, Sharanabasappa, and R. L. Meagher. 2019 **b.** Genetic characterization of fall armyworm infesting South Africa and India indicate recent introduction from a common source population. PLOS ONE 14: 1-16.

Nagoshi, R. N., N. N. Htain, D. Boughton, L. Zhang, Y. Xiao, B. Y. Nagoshi, and D. Mota-Sanchez. 2020. Southeastern Asia fall armyworms are closely related to populations in Africa and India, consistent with common origin and recent migration. Scientific reports 10: 1-10.

Olson, D. G., and L. K. Rieske. 2019. Host range expansion may provide enemy free space for the highly invasive emerald ash borer. Biological Invasions 21: 625-635.

Pekár, S. 2012. Spiders (Araneae) in the pesticide world: an ecotoxicological review. Pest Management Science 68: 1438-1446.

Prasanna, B., J. Huesing, R. Eddy, and V. Peschke. 2018. Fall armyworm in Africa: a guide for integrated pest management, USAID, CIMMYT, Mexico.

Rodrigues, A. R. S., A. F. Spindola, J. B. Torres, H. A. A. Siqueira, and F. Colares. 2013. Response of different populations of seven lady beetle species to lambda-cyhalothrin with record of resistance. Ecotoxicology and Environmental Safety 96: 53-60.

Rose, A. H., R. H. Silversides, and O. H. Lindquist. 1975. Migration Flight by an Aphid, *Rhopalosiphum maidis* (Hemiptera: Aphididae), and a Noctuid, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). The Canadian Entomologist 107: 567-576.

Rukkasikorn, A., S. Chaovalit, D. Chaireunkaew, A. Pongmee, K. Boonsanga, and J. Chaiwong. Year. Published. The Morphological Differences Between Economically Important Species of Armyworm Moths, Genus *Spodoptera* Guenée, 1852 (Lepidoptera: Noctuidae), in Thailand, pp. 1-15. *In*, The 14th National Plant Protection Conference, 2019, Dusit Thani Huahin, Prachuap Khiri Khan. Thai Crop Protection Association.

Schöfl, G., D. G. Heckel, and A. T. Groot. 2009. Time-shifted reproductive behaviours among fall armyworm (Noctuidae: *Spodoptera frugiperda*) host strains: evidence for differing modes of inheritance. Journal of Evolutionary Biology 22: 1447-1459.

Tambo, J. A., M. K. Kansiime, I. Mugambi, I. Rwomushana, M. Kenis, R. K. Day, and J. Lamontagne-Godwin. 2020 **a.** Understanding smallholders' responses to fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) invasion: Evidence from five African countries. Science of The Total Environment 740: 1-11.

Tambo, J. A., R. K. Day, J. Lamontagne-Godwin, S. Silvestri, P. K. Beseh, B. Oppong-Mensah, N. A. Phiri, and M. Matimelo. 2020**b.** Tackling fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) outbreak in Africa: an analysis of farmers' control actions. International Journal of Pest Management 66: 298-310.

Westbrook, J. K., R. N. Nagoshi, R. L. Meagher, S. J. Fleischer, and S. Jairam. 2016. Modeling seasonal migration of fall armyworm moths. International Journal of Biometeorology 60: 255-267.

White, P. J. T., K. Glover, J. Stewart, and A. Rice. 2016. The Technical and Performance Characteristics of a Low-Cost, Simply Constructed, Black Light Moth Trap. Journal of insect science 16: 1-9.

Wyckhuys, K. A. G., and R. J. O'Neil. 2006. Population dynamics of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) and associated arthropod natural enemies in Honduran subsistence maize. Crop Protection 25: 1180-1190.

Yu, S. J., S. N. Nguyen, and G. E. Abo-Elghar. 2003. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Pesticide Biochemistry and Physiology 77: 1-11.