

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2. โครงการวิจัย : วิจัยการกักกันพืช
กิจกรรม : การศึกษาศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับพืชนำเข้า
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การศึกษาชนิดของศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดวงศ์
กะหล่ำนำเข้าจากต่างประเทศ

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : (Interception of Quarantine Pest in Imported Brassica Seeds Consignments)

4. คณะผู้ดำเนินงาน

- หัวหน้าการทดลอง : ศรีวิเศษ เกษสังข์^{1/}
- ผู้ร่วมงาน : วันเพ็ญ ศรีชาติ^{1/} วานิช คำพานิช^{1/}
ชลธิชา รักใคร่^{1/} โสภามีอำนาจ^{1/}

5. บทคัดย่อ: กะหล่ำดอก (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) กะหล่ำปลี (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) และกวางตุ้ง (*Brassica chinensis* var. *parachinensis*) จัดอยู่ในวงศ์กะหล่ำ (Family Brassicaceae) จากสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชที่เข้าทำลายกะหล่ำดอก มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 104 ชนิด จัดเป็นแมลง 47 ชนิด โปรโตซัว 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 6 ชนิด เชื้อรา 25 ชนิด แบคทีเรีย 12 ชนิด ไวรัส 4 ชนิด และ วัชพืช 9 ชนิด กะหล่ำปลี มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 143 ชนิด จัดเป็นแมลง 73 ชนิด โปรโตซัว 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 14 ชนิด หอยทาก 1 ชนิด เชื้อรา 24 ชนิด แบคทีเรีย 13 ชนิด ไวรัส 3 ชนิด และ วัชพืช 9 ชนิด และกวางตุ้ง มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 48 ชนิด จัดเป็นแมลง 19 ชนิด โปรโตซัว 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 2 ชนิด เชื้อรา 12 ชนิด แบคทีเรีย 9 ชนิด ไวรัส 4 ชนิด และจากการตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ โดยการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์พืชทั้ง 3 ชนิด ที่นำเข้าจากต่างประเทศระหว่างเดือนตุลาคม 2553 – กันยายน 2555 และดำเนินการตรวจสอบเชื้อโรคและศัตรูพืช โดยวิธีตรวจสอบด้วยตาเปล่า (Visual inspection) Blotter method Dilution plate method และปลูกสังเกตอาการ (Seedling symptom test) ในสถานกักกัน พบว่าเมล็ดพันธุ์กะหล่ำดอก ที่นำเข้าจาก 12 ประเทศ ได้แก่ ไต้หวัน ญี่ปุ่น สาธารณรัฐประชาชนจีน สหรัฐอเมริกา อิตาลี เกาหลีใต้ อินเดีย ซิลิ เนเธอร์แลนด์ ฝรั่งเศส เม็กซิโก และอาร์เจนตินา จำนวน 143 ตัวอย่าง นำหนักนำเข้า 17.023 ตัน ตรวจพบเชื้อ *Alternaria brassicicola*, *A. tenuis*, *A. raphani*, *A. rhadina*, *Cladosporium* sp., *Curvularia lunata*, *C. pallens*, *Drechslera rostrata*, *Fusarium semitectum*, *F. solani*, *Stemphylium solani*

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

และ *Ulocladium* sp. เมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลี นำเข้าจาก 12 ประเทศ ได้แก่ ญี่ปุ่น ซิลี สาธารณรัฐประชาชนจีน สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย ไต้หวัน เกาหลีใต้ เนเธอร์แลนด์ นิวซีแลนด์ อินเดีย อิตาลี ฝรั่งเศส จำนวน 146 ตัวอย่าง น้ำหนัก 59.601 ตัน ตรวจพบเชื้อ *Alternaria brassicicola*, *A. tenuis*, *Cladosporium* sp., *Curvularia lunata*, *Fusarium semitectum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *Phoma* sp., *Ulocladium* sp. และ *Stachybotrys* sp. และเมล็ดพันธุ์กวาดำ นำเข้าจาก 9 ประเทศ ได้แก่ นิวซีแลนด์ สาธารณรัฐประชาชนจีน เดนมาร์ก อิตาลี อินเดีย ไต้หวัน ญี่ปุ่น มาเลเซียและฮ่องกง จำนวน 136 ตัวอย่าง น้ำหนัก 782.651 ตัน ตรวจพบเชื้อ *Alternaria brassicicola*, *A. tenuis*, *Fusarium semitectum* *F. solani* และ *Ulocladium* sp. และจากการนำเมล็ดพันธุ์ไปปลูกสังเกตอาการของโรค (Seedling symptom test) ในสถานกักกันพืช ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นพืชวงศ์กะหล่ำทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าว และได้ติดตามตรวจสอบโรคในแปลงปลูกกะหล่ำดอกในท้องที่จังหวัดราชบุรี ตรวจพบโรคราน้ำค้าง (Downy mildew) ที่เกิดจากเชื้อรา *Peronospora parasitica* โรคเน่าและ (soft rot) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* ในแปลงปลูกกะหล่ำปลีในท้องที่จังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย ตรวจพบ โรคราน้ำค้าง (Downy mildew) ที่เกิดจากเชื้อรา *Peronospora parasitica* โรคเน่าและ (soft rot) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* อาการใบด่างของกะหล่ำปลีและการทำลายของเพลี้ยอ่อน หนอนใยผัก และหอยทาก และแปลงปลูกกวาดำในท้องที่จังหวัดสุพรรณบุรี และนครปฐม ตรวจไม่พบการทำลายของโรคและศัตรูพืชจากการติดตามตรวจสอบโรคในแปลงปลูกของพืชวงศ์กะหล่ำทั้ง 3 ชนิด ไม่พบเชื้อโรคและศัตรูพืชที่ร้ายแรงทางกักกันพืช

6. คำนำ : พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 กำหนดให้เมล็ดพันธุ์พืชผักต่าง ๆ ไม้ดอกและไม้ประดับหลายชนิดจัดเป็นสิ่งต้องห้าม (Prohibited material) สิ่งกักต (Restricted material) และสิ่งไม่ต้องห้าม (unprohibited material) การนำเข้าเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวจะต้องแจ้งการนำเข้า มีใบรับรองสุขอนามัยพืชและหนังสือรับรองว่าไม่เป็นพืชที่ได้จากการตัดต่อสารพันธุกรรมจากประเทศต้นทางกำกับมาด้วย ในการนำเข้าสินค้าเกษตรจากต่างประเทศโอกาสที่ศัตรูพืชที่ร้ายแรงหรือเป็นศัตรูพืชที่สำคัญที่ก่อความเสียหายกับผลิตผลทางการเกษตรติดเข้ามากับเมล็ดพืชด้วย โดยอาจเป็นศัตรูพืชร้ายแรงที่ไม่มีปรากฏในประเทศ โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ติดมากับพืชวงศ์กะหล่ำ ซึ่งมีการนำเข้ามาเพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ให้เกษตรกรเพาะปลูกกระจายทั่วประเทศไทย โดยในแต่ละปีมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์เหล่านี้ในปริมาณมาก ปี 2554 มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์กะหล่ำดอก กะหล่ำปลีและกวาดำ ปริมาณ 230.30 ตัน คิดเป็นมูลค่า 140.73 ล้านบาทและในปี 2555 มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว 520.28 ตัน มูลค่า 151.21 ล้านบาท (ข้อมูล: สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร) หากศัตรูพืชที่ร้ายแรงซึ่งยังไม่มีรายงานในประเทศไทยติดมากับเมล็ดพันธุ์พืชดังกล่าว และสามารถเข้ามาเจริญและแพร่พันธุ์ได้ในประเทศไทย จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อเกษตรกรในประเทศและกระทบต่อการส่งออกพืชผักผลไม้ไทยไปยังต่างประเทศเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการตรวจสอบศัตรูพืชที่อาจติดมา

กับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้ามา เพื่อให้ทราบชนิดและแหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้า และเส้นทางการเข้ามาของศัตรูพืช ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นฐานข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืช จะเป็นประโยชน์ในการใช้อ้างอิงทางวิชาการ นำมาพิจารณากำหนดมาตรการเพื่อลดความเสี่ยงศัตรูพืชชนิดนั้น ๆ และกำหนดเป็นมาตรการทางด้านกฎหมายและทางวิชาการในการควบคุมการนำเข้า หรือเพื่อกำหนดสถานภาพของพืชนำเข้าให้เป็นสิ่งต้องห้ามหรือสิ่งจำกัดตามพระราชบัญญัติกักพืชต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์กะหล่ำ 3 ชนิด ได้แก่ กะหล่ำดอก กะหล่ำปลี และกวางตุ้งที่นำเข้ามาจากประเทศต่างๆ
2. กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope และ Compound microscope
3. วัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
4. สารเคมีตรวจสอบเชื้อโรคพืช
5. ภาพขณะเก็บตัวอย่างพืช
6. ชุดตรวจสอบศัตรูพืช (ELISA Kit)
7. หนังสือ และวารสารทั้งในประเทศและต่างประเทศ
8. Diagnostic protocol
9. โรงเรือนปลูกพืชเพื่อการสังเกตอาการผิดปกติ

- วิธีการ

1.รวบรวมข้อมูลทั่วไปของกะหล่ำดอก กะหล่ำปลี กวางตุ้งและข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

ทำการสืบค้นข้อมูลจากเอกสาร วารสาร รายงานการประชุมทางวิชาการ อินเทอร์เน็ต เพื่อค้นหาข้อมูลของกะหล่ำดอก กะหล่ำปลี กวางตุ้ง ลักษณะทั่วไปของพืช รายชื่อของประเทศที่ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ ปริมาณการนำเข้า ปริมาณการนำเข้า ข้อมูลชนิดของศัตรูพืชทั้งนอกประเทศและในประเทศ

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขึ้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำดอก กะหล่ำปลี กวางตุ้งนำเข้าในห้องปฏิบัติการ

การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขึ้นละเอียดบนเมล็ดพันธุ์กะหล่ำดอก กะหล่ำปลี กวางตุ้งที่นำเข้ามาจากต่างประเทศทางด้านตรวจพืช เจ้าหน้าที่จะทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์พืชมาทำการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขึ้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อตรวจหาตัวอ่อน หนอน แมลงหรือเมล็ดวัชพืช

2.2 การสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association, 1999) และตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชชั้นละเอียดยเมล็ดพันธุ์นำเข้า

2.2.1 การตรวจสอบเชื้อรา

1) การตรวจสอบสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะยังไม่งอก (Dry seed examination)

โดยตรวจสอบลักษณะอาการโรคและส่วนขยายพันธุ์เชื้อราหรือศัตรูพืชอื่น ๆ ซึ่งปะปนมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยตาเปล่าหรือตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Stereo microscope เช่นเมล็ดพันธุ์มีรูปร่างผิดปกติ หรืออาจติดมา ภายในเมล็ดพันธุ์โดยไม่แสดงอาการ รวมทั้งอาจติดมากับเศษพืชในลักษณะเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์เช่น Pycnidia เป็นต้น

2) การตรวจสอบสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะเมล็ดงอก

สุ่มตัวอย่างเมล็ดตามวิธีการมาตรฐาน ในปริมาณที่เหมาะสมวิเคราะห์โดยสุ่มแยกตามสายพันธุ์ มาทดสอบด้วยวิธี Blotter method โดยวางเมล็ดลงบนกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่นที่ชุ่มน้ำซึ่งวางอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางเมล็ดพันธุ์กะหล่ำดอก กะหล่ำปลี กวางตุ้ง จำนวน 25 เมล็ดต่อจานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 16 จานเลี้ยงเชื้อ (400 เมล็ด) จากนั้นนำจานเพาะเมล็ดไปบ่มเชื้อ (incubate) ใต้แสง near ultraviolet (NUV) สลับกับความมืด 12/12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงนำเมล็ดพันธุ์มาตรวจและจำแนกชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สเตอริโอไมโครสโคป (Stereo microscope) และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (Compound microscope)

2.2.2 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย

1) แยกเชื้อสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงหรือด้วยวิธี Dilution plate

ในกรณีที่เชื้อติดมาในปริมาณมากจะสามารถแยกเชื้อจากเมล็ดโดยตรง หลังจากทำการแยกเชื้อด้วยวิธี Blotter method ได้ หรือทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงด้วยวิธี Dilution plate โดยสุ่มเมล็ดตามมาตรฐาน นำมาแช่ในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เย็นเชื้อ แล้วจึงนำไปบดละเอียดด้วยเครื่องบด แล้วนำผงของเมล็ดใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (0.85% NaCl) หรือบัฟเฟอร์ จำนวน 100 มิลลิลิตร บรรจุใน flask แล้วบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยวางบนเครื่องเขย่า จากนั้นนำมาทำให้เจือจางในอาหารเหลว Nutrient broth ให้มีความเจือจางเป็น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ ใช้ไปเปดต์ดูต suspension แต่ละความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วใช้แท่งแก้ว spread ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน จึงนำมาตรวจหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปจำแนกชนิดต่อไป

2) แยกเชื้อจากต้นกล้าซึ่งเพาะจากเมล็ดที่แสดงอาการผิดปกติบนใบพืชหรือต้น

พืช

โดยการเพาะเมล็ดในดินนิ่งฆ่าเชื้อ โดยเพาะในสภาพเพาะเมล็ด 100 เมล็ดต่อตัวอย่าง และเก็บสภาพเพาะเมล็ดที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เมื่อต้นกล้าออกใบจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนพืช หรืออาจใช้ถุงพลาสติกที่ฉีดพ่นน้ำคลุมให้ความชุ่มชื้นเป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนใบพืช เก็บใบพืชที่สงสัยไปแยกเชื้อด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

2.1) วิธี Dilution plate ตัดใบพืชบริเวณรอยต่อใบที่เป็นโรคและบริเวณปกติ แล้วฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2-3 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อ แล้วบดชิ้นส่วนในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาทำให้เจือจางเป็นลำดับจาก 10^{-1} ถึง 10^{-5} และดำเนินการเช่นเดียวกับ ขั้นตอนในข้อ (1)

2.2) วิธี Tissue transplanting ตัดใบพืชเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2-3 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรอง ภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อแล้ววางพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA หรืออาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะเจาะจง (semiselective media) นำจานเลี้ยงเชื้อไปเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วันจึงนำมาตรวจสอบหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรียเก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจนครบ 3-5 วัน เพื่อตรวจหาโคโลนีของแบคทีเรียชนิดอื่น จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และนำไปศึกษาคุณลักษณะเพื่อจำแนกชนิดต่อไป

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

1. ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย โดยบันทึกลักษณะและสีของโคโลนี ตรวจสอบรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2. ทดสอบแกรม (Gram reaction) โดยใช้สารละลายโปรแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (3%KOH) ที่เตรียมใหม่ใช้ภายใน 2 สัปดาห์ หากตรวจพบเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) และแกรมบวก (Gram positive) รูปร่างแบบ Coryneform rod ก็จะนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3. ทดสอบ Hypersensitivity reaction บนยาสูบ โดยการฉีดสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เข้าไปในใบยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.) บริเวณใต้ใบโดยฉีดเข้าเนื้อใบระหว่างเส้นใบ สังเกตลักษณะอาการเซลล์ตายตรงเนื้อใบหลังการฉีดเชื้อ 24-48 ชั่วโมง หากพบอาการเซลล์ตายแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตดังกล่าวเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช

4. ทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Physiological and biochemical properties) เช่น การใช้ยูเรีย การย่อยเจลาติน การย่อยเอสคูลิน และแป้ง reduce ไนเตรต ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นต้น

5. ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัย (Pathogenicity test) โดยเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

ปลูกเชื้อตามอาการของโรคของเชื้อที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุโรค เช่นปลูกเชื้อโดยฉีดเข้าในลำต้น ใบเลี้ยง หรือเนื้อใบของต้นกะหล่ำดอก กะหล่ำปลี กวางตุ้งอายุ 2-3 สัปดาห์ ฉีดพ่นน้ำให้ความชุ่มชื้นคลุมด้วย ฟิล์มพลาสติกและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบลักษณะอาการโรคหลังปลูกเชื้อ 3-5 วัน จากนั้นนำใบเป็นโรคมายกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อสาเหตุที่ทำให้พืชเป็นโรคเป็นชนิดเดียวกับที่แยก ได้ในครั้งแรกหรือไม่

6. การตรวจสอบด้วยวิธี ELISA เป็นวิธีการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่ม วิทยา ปัจจุบันใช้ชุดตรวจสอบของ Agdia นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหาร เหลวและนำมาทำการตรวจสอบตามขั้นตอนที่แนะนำ

2.2.3 การตรวจสอบเชื้อไวรัส

1) ปลูกสังเกตลักษณะอาการโรคบนต้นกล้า (Seedling symptom test)

โดยเฉพาะเมล็ดพันธุ์ในดินอบฆ่าเชื้อ ตัวอย่างละ 100 เมล็ด เก็บรักษาไว้ในโรงปลูกพืชกันแมลงเมื่อต้นพืช ออกใบจริง 1-2 ใบ จึงตรวจสอบลักษณะอาการโรค ต้นกล้าที่แสดงอาการผิดปกติ สงสัยว่ามีสาเหตุจาก เชื้อไวรัสจะนำไปอ่อนไปตรวจสอบด้วยวิธีการอื่นเพื่อจำแนกชนิดต่อไป

2) ปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ (Infectivity test) เตรียมน้ำคั้นพืชสำหรับ ทดสอบโดยบดใบพืชที่แสดงอาการผิดปกติในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ตรวจสอบเชื้อไวรัสใช้ 0.1 M phosphate buffer pH 7.0) โดยใช้ใบพืชหนัก 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร ในสภาพเย็น จากนั้นใช้ สำลีหรือผ้าที่สะอาดจุ่มน้ำคั้นพืชทาลงบนใบพืชทดสอบ ซึ่งโรยด้วยผงคาร์โบรันดัม (carborundum ขนาด 600 mesh) หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 5 นาที ล้างใบพืชและนำพืชทดสอบไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส สังเกตลักษณะอาการบนพืชทดสอบหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 1-4 สัปดาห์ โดยพืชทดสอบจะ แสดงอาการแผลเฉพาะแห่ง (local lesion) หรืออาการแบบกระจายทั่วลำต้น (systemic infection)

3) การตรวจสอบด้วยวิธีทางเซรุ่มวิทยา (Serological techniques) การ ตรวจสอบด้วยวิธี Enzyme – linked Immunosorbent Assay : ELISA เป็นวิธีตรวจสอบเชื้อไวรัสที่มีความไวสูง แม้จะมีเชื้อไวรัสปริมาณต่ำหรืออนุภาคแตกหักก็สามารถตรวจได้ ให้ผลรวดเร็ว แม่นยำ และ ยังสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก วิธีการที่นำมาใช้เป็นแบบ Indirect ELISA ทำการ บันทึกรูปผล

3. การติดตามตรวจสอบโรคและศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ

โดยสังเกตอาการผิดปกติของต้นพืชทั้งต้น ทำการเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการผิดปกติมาทำการ แยกเชื้อและทดสอบการเกิดโรคในห้องปฏิบัติการ

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2553 – กันยายน 2555 (2 ปี)

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ด่านตรวจพืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร และแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การรวบรวมข้อมูลทั่วไปของกะหล่ำดอก กะหล่ำปลี กวางตุ้งและข้อมูลศัตรูพืชที่มี
รายงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

Domain: Eukaryota

Kingdom: Viridiplantae

Phylum: Spermatophyta

Class: angiospermae

Subclass: Dicotyledeonae

Order: Papaverales

Family: Brassicaceae

กะหล่ำดอก (Cauliflower) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Brassica oleracea* var. *botrytis* L. กะหล่ำปลี (Cabbage) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Brassica oleracea* var. *capitata* L. กวางตุ้ง (Pakchoi, Mustard) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Brassica chinensis* var. *parachinensis*

ปริมาณการนำเข้าเมล็ดพันธุ์กะหล่ำดอก กะหล่ำปลี และกวางตุ้ง ระหว่างเดือนตุลาคม
2553- กันยายน 2555

ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์กะหล่ำดอก จากต่างประเทศระหว่างเดือน ตุลาคม 2553 – กันยายน 2555 เป็นปริมาณ 17.023 ตัน โดยนำเข้าจาก 12 ประเทศ ได้แก่ ไต้หวัน 10.08 ตัน ญี่ปุ่น 3.70 ตัน สาธารณรัฐประชาชนจีน 2.87 ตัน สหรัฐอเมริกา 0.338 กิโลกรัม อิตาลี 130.61 กิโลกรัม อินเดีย 50.03 กิโลกรัม ซิลี 171.274 กิโลกรัม เนเธอร์แลนด์ 0.279 กิโลกรัม ฝรั่งเศส 0.09 กิโลกรัม เม็กซิโก 0.036 กิโลกรัม อาร์เจนตินา 0.09 กิโลกรัม และเกาหลีใต้ 24 กิโลกรัม จำนวน 143 ตัวอย่าง เมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลี นำเข้าจาก 12 ประเทศ น้ำหนัก 59.601 ตัน โดยนำเข้าจาก ญี่ปุ่น 52.37 ตัน ซิลี 0.74 ตัน สาธารณรัฐ-ประชาชนจีน 0.645 ตัน สหรัฐอเมริกา 0.41 ตัน ออสเตรเลีย 5.15 ตัน ไต้หวัน 0.135 ตัน เกาหลีใต้ 0.125 ตัน เนเธอร์แลนด์ 0.02 ตัน อินเดีย 0.009 ตัน อิตาลี 0.4 ตัน ฝรั่งเศส 0.09 ตัน นิวซีแลนด์ 100 กรัม จำนวน 146 ตัวอย่าง และเมล็ดพันธุ์กวางตุ้ง นำเข้าจาก 9 ประเทศ น้ำหนัก 782.651 ตัน โดยนำเข้าจาก นิวซีแลนด์ 691.31 ตัน สาธารณรัฐประชาชนจีน 53.72 ตัน เดนมาร์ก 16.78 ตัน อิตาลี 5.5 ตัน ไต้หวัน 4.48 ตัน ญี่ปุ่น 3.00 ตัน และฮ่องกง 1 ตัน จำนวน 136 ตัวอย่าง

ศัตรูพืชที่พบเข้าทำลายกะหล่ำดอก กะหล่ำปลี และกวางตุ้ง

จากสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชที่เข้าทำลายพืชวงศ์กะหล่ำ พบว่า กะหล่ำดอก มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 104 ชนิด จัดเป็นแมลง 47 ชนิด โปรโตซัว 1 ชนิด ไล้เดือนฝอย 6 ชนิด เชื้อรา 25 ชนิด แบคทีเรีย 12 ชนิด ไวรัส 4 ชนิด และ วัชพืช 9 ชนิด กะหล่ำปลี มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 143 ชนิด จัดเป็นแมลง 73 ชนิด โปรโตซัว 1 ชนิด ไล้เดือนฝอย 14 ชนิด หอยทาก 1 ชนิด เชื้อรา 24 ชนิด แบคทีเรีย 13 ชนิด ไวรัส 3 ชนิด และ

วัชพืช 9 ชนิด กวางตุ้ง มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 48 ชนิด จัดเป็นแมลง 19 ชนิด โปรโตซัว 1 ชนิด ไร 1 ชนิด
ไส้เดือนฝอย 2 ชนิด เชื้อรา 12 ชนิด แบคทีเรีย 9 ชนิด ไวรัส 4 ชนิด

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชชั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำดอก กะหล่ำปลี กวางตุ้งนำเข้าในห้วงปฏิบัติการ

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

จากการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากทุกประเทศในเบื้องต้น พบว่า เมล็ดสมบูรณ์
สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือการปนเปื้อนของเมล็ดวัชพืช

2.2 การสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association, 1999) และการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชชั้นละเอียดเมล็ดพันธุ์ นำเข้าในห้วงปฏิบัติการ

จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์เพื่อดำเนินการตรวจสอบเชื้อโรคและศัตรูพืช ด้วยวิธี
ตรวจสอบด้วยตาเปล่า (Visual inspection) Blotter method และ Dilution plate method พบว่า
เมล็ดพันธุ์กะหล่ำดอก ที่นำเข้าจาก 12 ประเทศ ได้แก่ ไต้หวัน ญี่ปุ่น สาธารณรัฐประชาชนจีน
สหรัฐอเมริกา อิตาลี เกาหลีใต้ อินเดีย ซิลี เนเธอร์แลนด์ ฝรั่งเศส เม็กซิโก และอาร์เจนตินา จำนวน
143 ตัวอย่าง ปริมาณนำเข้า 17.023 ตัน ตรวจพบเชื้อ *Alternaria brassicicola*, *A. tenuis*, *A.*
raphani, *A. rhadina*, *Cladosporium* sp., *Curvularia lunata*, *C. pallescens*, *Drechslera*
rostrata, *Fusarium semitectum*, *F. solani*, *Stemphylium solani* และ *Ulocladium* sp. เมล็ด
พันธุ์กะหล่ำปลี นำเข้าจาก 12 ประเทศ ได้แก่ ญี่ปุ่น ซิลี สาธารณรัฐประชาชนจีน สหรัฐอเมริกา
ออสเตรเลีย ไต้หวัน เกาหลีใต้ เนเธอร์แลนด์ นิวซีแลนด์ อินเดีย อิตาลี ฝรั่งเศส จำนวน 146 ตัวอย่าง
น้ำหนัก 59.601 ตัน ตรวจพบเชื้อ *Alternaria brassicicola*, *A. tenuis*, *Cladosporium* sp.,
Curvularia lunata, *Fusarium semitectum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *Phoma* sp.,
Ulocladium sp. และ *Stachybotrys* sp. และเมล็ดพันธุ์กวางตุ้ง นำเข้าจาก 9 ประเทศ ได้แก่
นิวซีแลนด์ สาธารณรัฐประชาชนจีน เดนมาร์ก อิตาลี อินเดีย ไต้หวัน ญี่ปุ่น มาเลเซียและฮ่องกง จำนวน
136 ตัวอย่าง น้ำหนัก 782.651 ตัน ตรวจพบเชื้อ *Alternaria brassicicola*, *A. tenuis*, *Fusarium*
semitectum *F. solani* และ *Ulocladium* sp. และจากการนำเมล็ดพันธุ์ไปปลูกสังเกตอาการของโรค
(Seedling symptom test) ในสถานกักกันพืช ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นพืชวงศ์กะหล่ำทั้ง 3 ชนิด
ดังกล่าว และจากการนำเมล็ดพันธุ์ไปปลูกสังเกตอาการของโรค (Seedling symptom test) ในสถาน
กักกันพืช ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นพืชวงศ์กะหล่ำทั้ง 3 ชนิด

3. การติดตามตรวจสอบโรคและศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

จากการติดตามตรวจสอบโรคและศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศกับ
เมล็ดพันธุ์กะหล่ำดอกในท้องที่จังหวัดราชบุรี ตรวจพบโรคราน้ำค้างที่เกิดจากเชื้อรา *Peronospora*
parasitica โรคเน่าและ เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* แปลงปลูก
กะหล่ำปลีในท้องที่จังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย ตรวจพบโรคราน้ำค้าง *P. parasitica* โรคเน่าและ *E.*

carotovora pv. *carotovora* และอาการใบด่าง และการทำลายของเพลี้ยอ่อน หนอนใยผัก และหอยทาก และแปลงปลูกกวาดต้ง ในท้องที่จังหวัดสุพรรณบุรี และนครปฐม ไม่พบการทำลายของโรคและศัตรูพืช จากการติดตามตรวจสอบโรคและศัตรูพืชในแปลงปลูก และพืชวงศ์กะหล่ำทั้ง 3 ชนิด ไม่พบเชื้อโรคและศัตรูพืชที่ร้ายแรงทางกักกันพืช

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

เมล็ดพันธุ์วงศ์กะหล่ำ ได้แก่ กะหล่ำดอก กะหล่ำปลี และกวาดต้ง จากสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชที่เข้าทำลายกะหล่ำดอก มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 104 ชนิด จัดเป็นแมลง 47 ชนิด โปรโตซัว 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 6 ชนิด เชื้อรา 25 ชนิด แบคทีเรีย 12 ชนิด ไวรัส 4 ชนิด และ วัชพืช 9 ชนิด กะหล่ำปลี มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 143 ชนิด จัดเป็นแมลง 73 ชนิด โปรโตซัว 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 14 ชนิด หอยทาก 1 ชนิด เชื้อรา 24 ชนิด แบคทีเรีย 13 ชนิด ไวรัส 3 ชนิด และ วัชพืช 9 ชนิด กวาดต้ง มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 48 ชนิด จัดเป็นแมลง 19 ชนิด โปรโตซัว 1 ชนิด ไร 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 2 ชนิด เชื้อรา 12 ชนิด แบคทีเรีย 9 ชนิด ไวรัส 4 ชนิด และจากการตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ โดยการส่องตัวอย่างเมล็ดพันธุ์พืชทั้ง 3 ชนิด ที่นำเข้าจากต่างประเทศระหว่างเดือนตุลาคม 2553 – กันยายน 2555 และดำเนินการตรวจสอบเชื้อโรคและศัตรูพืช ด้วยวิธีตรวจสอบด้วยตาเปล่า (Visual inspection) Blotter method และ Dilution plate method พบว่าเมล็ดพันธุ์เมล็ดพันธุ์กะหล่ำดอก ที่นำเข้าจาก 12 ประเทศ ได้แก่ ไต้หวัน ญี่ปุ่น สาธารณรัฐประชาชนจีน สหรัฐอเมริกา อิตาลี เกาหลีใต้ อินเดีย ซิลี เนเธอร์แลนด์ ฝรั่งเศส และเม็กซิโก อาร์เจนตินา จำนวน 143 ตัวอย่าง ปริมาณนำเข้า 17.023 ตัน ตรวจพบเชื้อ *Alternaria brassicicola*, *A. tenuis*, *A. raphani*, *A. rhadina*, *Cladosporium* sp., *Curvularia lunata*, *C. pallescens*, *Drechslera rostrata*, *Fusarium semitectum*, *F. solani*, *Stemphylium solani* และ *Ulocladium* sp. เมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลี นำเข้าจาก 12 ประเทศ ได้แก่ ญี่ปุ่น ซิลี สาธารณรัฐประชาชนจีน สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย ไต้หวัน เกาหลีใต้ เนเธอร์แลนด์ นิวซีแลนด์ อินเดีย อิตาลี ฝรั่งเศส จำนวน 146 ตัวอย่าง น้ำหนัก 59.601 ตัน ตรวจพบเชื้อ *Alternaria brassicicola*, *A. tenuis*, *Cladosporium* sp., *Curvularia lunata*, *Fusarium semitectum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *Phoma* sp., *Ulocladium* sp. และ *Stachybotrys* sp. และเมล็ดพันธุ์กวาดต้ง นำเข้าจาก 9 ประเทศ ได้แก่ นิวซีแลนด์ สาธารณรัฐประชาชนจีน เดนมาร์ก อิตาลี อินเดีย ไต้หวัน ญี่ปุ่น มาเลเซียและฮ่องกง จำนวน 136 ตัวอย่าง น้ำหนัก 782.651 ตัน ตรวจพบเชื้อ *Alternaria brassicicola*, *A. tenuis*, *Fusarium semitectum* *F. solani* และ *Ulocladium* sp. และจากการนำเมล็ดพันธุ์ไปปลูกสังเกตอาการของโรค (Seedling symptom test) ในสถานกักกันพืช ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นพืชวงศ์กะหล่ำทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าว และดำเนินการติดตามตรวจสอบโรคและศัตรูพืชในแปลงปลูกของพืชวงศ์กะหล่ำทั้ง 3 ชนิด ไม่พบเชื้อโรคและศัตรูพืชที่ร้ายแรงทางกักกันพืช

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

- ได้ข้อมูลศัตรูพืช และตัวอย่างศัตรูพืชที่เก็บไว้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

- ได้ข้อมูลชนิดและตัวอย่างพืช ที่ถูกต้อง ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้สามารถนำไปเป็นแนวทางการป้องกันการแพร่ระบาดของศัตรูพืชได้ และการจัดทำรายชื่อพืชศัตรูพืชของประเทศไทยที่ถูกต้อง โดยกรมวิชาการเกษตรสามารถนำข้อมูลไปใช้ในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในสินค้าเกษตรนำเข้า การกำหนดชนิดพืชห้ามนำเข้าเพื่อป้องกัน มิให้มีการนำเข้าพืชที่อาจก่อให้เกิดความเสียหายกับประเทศไทยต่อไป

11. คำขอบคุณ :

ขอขอบคุณ คุณชัยรัตน์ หมั่นการ คุณยุทธนา ประมาณ คุณวิชาญ สมานิต คุณวิภา เกิดพิพัฒน์ คุณอรนุช นาคะโร คุณสุธรรม คงเอียด คุณจิรวัดน์ ไกรนรา และคุณอัญชลี ราศี ที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี ตลอดจนเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร ที่ให้ความร่วมมือในการส่งตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ เพื่อตรวจสอบในห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช

12. เอกสารอ้างอิง

เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์ และ วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2545. โรคไวรัสที่สำคัญของพืชผักและพืชน้ำมัน. โรง

พิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 88 หน้า.

Babadoost, M. and Gabrielson, R.L. 1979. Pathogens causing *Alternaria* diseases of *Brassica* seed crops in Western Washington. Plant Disease Reporter, 63:815-820.

Crop Protection Compendium. 2007. ed. Wallingford, UK: CPC.

(<http://www.cabicompendium.org/cpc>)

Denis, P. 1994. Diseases of vegetable crops. Department of Primary Industries. Australia 164 pp.

Hutchins, J.D. and Reeves, J.C. 1997. Seed Health Testing Progress Towards the 21st Century. CAB International. UK 263 pp.