รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2. **โครงการวิจัย** : วิจัยการกักกันพืช

   กิจกรรม : การศึกษาศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับพืชนำเข้า
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การศึกษาชนิดของศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดข้าวสาลีที่นำเข้าจากต่างประเทศ

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : **Interception of Quarantine Pest in Imported Wheat Grain Consignments**

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นงพร มาอยู่ดี[1/]

ผู้ร่วมงาน : ชลธิชา รักใคร่[1/] จรรยา มณีโชติ[2/]

ธีระ รัตนพันธ์ [3/] สุทัศน์ แก้วสะอาด[4/]

5. บทคัดย่อ: การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) วงศ์ Poaceae นำเข้าจากต่างประเทศที่กลุ่มวิจัยการกักกันพืช และด่านตรวจพืชแหลมฉบังระหว่างตุลาคม 2553 ถึง กันยายน 2555 โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวสาลีที่นำเข้าจากเครือรัฐออสเตรเลีย อังกฤษ สหรัฐอเมริกา และ แคนาดา จำนวน 32 ตัวอย่าง ได้ทำการตรวจและจำแนกชนิดศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการและทำการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชจากประเทศต่างๆทั่วโลก ผลการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชที่เข้าทำลายข้าวสาลี พบศัตรูพืชทั้งสิ้น 659 ชนิด จัดเป็น แมลง 440 ชนิด ไร 16 ชนิด เชื้อรา 49 ชนิด แบคทีเรีย 25 ชนิด ไวรัส 20 ชนิด ไส้เดือนฝอย 38 ชนิด หอยทาก 3 ชนิด และ วัชพืช 67 ชนิด จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคศัตรูพืชขั้นละเอียดด้วยวิธี Visual inspection , Blotter method, Dilution plate method พร้อมทั้งปลูกทดสอบแสดงอาการผิดปกติในโรงเรือนปลูกพืช ผลการตรวจพบเชื้อรา 5 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis, Aspergillus flavus, Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Septonema chaetospira* ซึ่งเป็นโรคที่ไม่สำคัญด้านกักกันพืช พบเมล็ดวัชพืชจำนวน 17 ชนิด เป็นวัชพืชกักกันที่สำคัญด้านกักกันพืช 5 ชนิด ได้แก่ *Avena fatua, Chenopodium album, Galium aparine, Polygonum convolvulus* และ *Thlaspi arvense* ส่วนวัชพืชที่ไม่มีความสำคัญด้านกักกันพืชจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ *Ambrosia sp.*, *Amaranthus* sp., *Brassica* sp., *Kochia scoparia*, *Lithospermum arvense Lolium* sp., *Polygonum persicaria*, *Setaria viridis*, *Setaria* sp., *Silene dioica*, *Tragus australianus* และ *Rumex crispus* ได้ทำการควบคุมวัชพืชกักกันภายใต้พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่3) พ.ศ. 2551 เพื่อป้องกันมิให้วัชพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศไทย

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/] สำนักผู้เชี่ยวชาญ กรมวิชาการเกษตร

[3/] สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

6. คำนำ : ข้าวสาลี (Wheat: Triticum aestivum L) วงศ์ Poaceae พืชพวกหญ้าไม้ล้มลุกอายุหนึ่งปี ลำต้นสูงประมาณ 40-150 เซนติเมตร มีการแตกกอเป็นกระจุกหนาแน่น มีข้อและปล้อง 4- 7 ปล้อง ลำต้นรูปทรงกระบอกกลวง บริเวณโคนใหญ่ส่วนปลายเรียว มีรากแขนงจำนวนมาก ใบเป็นใบเดี่ยว การเรียงใบแบบสลับ ใบเจริญออกจากข้อของลำต้นโดยเรียงออกไปทางด้านข้างเป็น 2 แถว แผ่นใบแบนเรียบรูปแถบยาว 15-40 เซนติเมตร กว้าง 1-3 เซนติเมตร ช่อดอกแบบเชิงลาดยาว 5-15 เซนติเมตร เป็นดอกแบบสมบูรณ์เพศ ผลแบบธัญพืชมีลักษณะรี มีร่องตรงกลาง สีน้ำตาลแดง เหลือง ขาว ข้าวสาลี จะแก่จัดพร้อมเก็บเกี่ยวภายใน 30-45 วัน หลังจากออกรวง ได้มีการนำเข้าข้าวสาลีจากประเทศอังกฤษ ออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา และแคนาดา ประมาณ 42,302,678 กิโลกรัม มูลค่า 511,190,512 บาท พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 กำหนดให้เมล็ดพันธุ์ข้าวสาลีจัดเป็นสิ่งกำกัด (Restricted material) ในการนำเข้ามายังประเทศไทยต้องแจ้งการนำเข้า และมีใบรับรองสุขอนามัยพืชจากประเทศต้นทางกำกับมาเท่านั้น โดยไม่มีมาตรการสุขอนามัยกำหนดไว้แต่อย่างใด การนำเข้าสินค้าเกษตรจากต่างประเทศ มีโอกาสที่ศัตรูพืชหลายชนิดที่อาจเป็นศัตรูพืชกักกันที่ร้ายแรงหรือศัตรูพืชที่สำคัญที่ก่อความเสียหายกับผลิตผลทางการเกษตรติดเข้ามากับเมล็ดพืชด้วย โดยอาจเป็นศัตรูพืชร้ายแรงที่ไม่มีปรากฏในประเทศไทย โดยเฉพาะในกลุ่มของเมล็ดวัชพืชร้ายแรง ซึ่งมีการนำเข้ามาเพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์หรือเป็นต้นพันธุ์ในการส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูกกระจายทั่วประเทศไทย โดยใน แต่ละปีมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์เหล่านี้ในปริมาณมาก หากศัตรูพืชที่ร้ายแรงซึ่งยังไม่มีรายงานในประเทศไทยติดมากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวสามารถเข้ามาเจริญและแพร่พันธุ์ได้ในประเทศไทย จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อการเกษตรในประเทศและกระทบต่อการการเกษตรของประเทศไทย รวมทั้งกระทบต่อการส่งออกเมล็ดพันธุ์เพื่อการค้าไปยังประเทศที่มีความเข้มงวดด้านกักกันพืช ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทำการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับพืชนำเข้า โดยต้องเพื่อทราบชนิดแหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้า และเส้นทางการเข้ามาของศัตรูพืช ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นฐานข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืช มีประโยชน์ใช้อ้างอิงทางวิชาการ นำมาพิจารณาหามาตรการเพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชชนิดนั้น ๆ และกำหนดเป็นมาตรการทางด้านกฎหมายและทางวิชาการในการควบคุมการนำเข้า หรือเปลี่ยนแปลงสถานภาพของพืชนำเข้าให้เป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืชต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวสาลี
2. กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope และ compound microscope
3. วัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
4. สารเคมีตรวจสอบเชื้อโรคพืช
5. ภาชนะเก็บตัวอย่างพืช
6. หนังสือ และวารสารทั้งในประเทศและต่างประเทศ

7. มาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกันรวมทั้งการวิเคราะห์ความเสี่ยงทางสภาพแวดล้อม” (ISPM No. 11 : Pest risk analysis for quarantine pest including analysis of environmental risk)

- วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของข้าวสาลีและข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

ทำการสืบค้นข้อมูลจากเอกสาร วารสาร รายงานการประชุมทางวิชาการ อินเตอร์เน็ต เพื่อค้นหาข้อมูลของแตงกวา ลักษณะทั่วไปของพืช สายพันธุ์ พื้นที่การเพาะปลูก รายชื่อของประเทศที่ประเทศไทยมีการการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ ปริมาณการนำเข้า ปริมาณการนำเข้า ข้อมูลชนิดของศัตรูพืชทั้งนอกประเทศและในประเทศ

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ข้าวสาลีนำเข้าในห้องปฏิบัติการ

การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดบนเมล็ดพันธุ์ข้าวสาลีที่นำเข้าจากต่างประเทศ เจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช จะทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวสาลี มาทำการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ที่กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อตรวจหาตัวอ่อนหนอน แมลงหรือเมล็ดวัชพืช

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

2.2.1 การตรวจสอบเชื้อรา โดยตรวจสอบลักษณะอาการโรคและส่วนขยายพันธุ์เชื้อราหรือศัตรูพืชอื่นๆ ซึ่งปะปนมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยตาเปล่าหรือตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope เช่น เมล็ดพันธุ์มีรูปร่างผิดปกติ หรืออาจติดมา ภายในเมล็ดพันธุ์โดยไม่แสดงอาการ รวมทั้งอาจติดมากับเศษพืชในลักษณะเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์เช่น Pycnidia เป็นต้น สุ่มตัวอย่างเมล็ดตามวิธีการมาตรฐาน ในปริมาณที่เหมาะสมวิเคราะห์โดยสุ่มแยกตามสายพันธุ์ มาทดสอบด้วยวิธี Blotter method โดยวางเมล็ดลงบนกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่นที่ชุ่มน้ำซึ่งวางอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางเมล็ดพันธุ์ 25 เมล็ดต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำจานเพาะเมล็ดไปบ่มเชื้อ (incubate) ใต้แสง near ultraviolet (NUV) สลับกับความมืด 12/12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงนำเมล็ดพันธุ์มาตรวจและจำแนกชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สเตอริโอ-ไมโครสโคป (stereo microscope) และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (compound microscope)

2.2.2 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย

1) แยกเชื้อสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงหรือด้วยวิธี Dilution plate

ในกรณีที่เชื้อติดมาในปริมาณมากจะสามารถแยกเชื้อจากเมล็ดโดยตรงหลังจากทำการแยกเชื้อด้วยวิธี Blotter method ได้ หรือทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงด้วยวิธี Dilution plate โดยสุ่มเมล็ดตามมาตรฐาน นำมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อ เมื่อได้เมล็ดพันธุ์จึงนำไปบดละเอียดด้วยเครื่อง

บด แล้วนำผงของเมล็ดใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (0.85% NaCl) หรือบัฟเฟอร์ จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยวางบนเครื่องเขย่า จากนั้นนำมาทำให้เจือจางในอาหารเหลว Nutrient broth ให้มีความเจือจางเป็น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ ใช้ไปเปตต์ดูด suspension แต่ละความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วใช้แท่งแก้ว spread ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน จึงนำมาตรวจหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปจำแนกชนิดต่อไป

2) แยกเชื้อจากต้นกล้าซึ่งเพาะจากเมล็ดผิดปกติบนใบพืชหรือต้นพืช โดยการเพาะเมล็ดในดินนึ่งฆ่าเชื้อที่มีอยู่จริง โดยเพาะ 25-50 เมล็ดต่อถุง และเก็บถุงเพาะที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เมื่อต้นกล้าออกใบจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนพืช หรืออาจใช้ถุงพลาสติกที่ฉีดพ่นน้ำคลุมให้ความชุ่มชื้นเป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนใบพืช เก็บใบพืชที่สงสัยไปแยกเชื้อด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

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

2.2) วิธี Tissue transplanting ตัดใบพืชเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2-3 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรอง ภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อแล้ววางพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA หรืออาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะเจาะจง (semiselective media) นำจานเลี้ยงเชื้อไปเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาตรวจสอบหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรียเก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจนครบ 3-5 วัน เพื่อตรวจหาโคโลนีของแบคทีเรียชนิดอื่นจากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และนำไปศึกษาคุณลักษณะเพื่อจำแนกชนิดต่อไป

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

1. ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย โดยบันทึกลักษณะและสีของโคโลนี ตรวจสอบรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

2. ทดสอบแกรม (Gram reaction) โดยใช้สารละลายโปรแตสเซียม-ไฮดรอกไซด์ 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 หากพบอาการเซลล์ตายแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช

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 ใบเลี้ยงหรือเนื้อใบของต้นแตงกวาอายุ 2-3 สัปดาห์ ฉีดพ่นน้ำให้ความชุ่มชื้นคลุมด้วยถุงพลาสติกและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ตรวจลักษณะอาการโรคหลังปลูกเชื้อ 3-5 วัน จากนั้นนำใบเป็นโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อสาเหตุที่ทำให้พืชเป็นโรคเป็นชนิดเดียวกับที่แยกได้ในครั้งแรกหรือไม่

6. การตรวจสอบด้วยวิธี ELISA เป็นวิธีการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา ปัจจุบันใช้ชุดตรวจสอบของ Agdia นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวและนำมาทำการตรวจสอบตามขั้นตอนที่แนะนำ

2.2.3 การตรวจสอบเชื้อไวรัส

1) ปลูกสังเกตลักษณะอาการโรคบนต้นกล้า (Seedling symptom test) โดยเพาะเมล็ดพันธุ์ในดินอบฆ่าเชื้อ ตัวอย่าง 50-200 เมล็ด เก็บรักษาไว้ในโรงปลูกพืชกันแมลงเมื่อต้นพืชออกใบจริง 1-2 ใบ จึงตรวจสอบลักษณะอาการโรค ต้นกล้าที่แสดงอาการผิดปกติ สงสัยว่ามีสาเหตุจากเชื้อไวรัสจะนำใบอ่อนไปตรวจสอบด้วยวิธีการอื่นเพื่อจำแนกชนิดต่อไป

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

3) การตรวจสอบด้วยวิธีทางเซรุ่มวิทยา (Serological techniques) การตรวจสอบด้วยวิธี Enzyme – linked Immunosorbent Assay : ELISA เป็นวิธีตรวจสอบเชื้อไวรัสที่มีความไวสูง แม้จะมีเชื้อไวรัสปริมาณต่ำหรืออนุภาคแตกหักก็สามารถตรวจได้ ให้ผลรวดเร็ว แน่นอน และยังสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก วิธีการที่นำมาใช้เป็นแบบ Indirect ELISA ทำการบันทึกผล

2.2.4 การตรวจเมล็ดวัชพืชขั้นละเอียดโดยทำการคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพได้แก่ เมล็ดพืชบริสุทธิ์ สิ่งเจือปน เมล็ดพืชอื่น นำเมล็ดวัชพืชที่ตรวจพบมาทำการจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้คู่มือจำแนกเมล็ดพืช

3. การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ข้าวสาลีนำเข้าในพื้นที่ของเกษตรกร โดยติดตามตรวจสอบในแปลงปลูกที่มีการนำเมล็ดพันธุ์นำเข้า ให้สังเกตอาการความผิดปกติของต้นพืชทั้ง โคนต้น ราก ลำต้น

ใบและผลของพืช และทำการเก็บตัวอย่างนำมาแยกเชื้อและทดสอบการเกิดโรคกับพืชในห้องปฏิบัติการเพื่อทำการวินิจฉัยเชื้อโรคศัตรูพืชอย่างละเอียด

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. จากการรวบรวมข้อมูลทั่วไปของข้าวสาลีและข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานทั้งในประเทศและต่างประเทศ พบว่าประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดข้าวสาลีเป็นปริมาณมาก และจากการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชของข้าวสาลี พบว่าศัตรูพืช สามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของข้าวสาลี เช่น ใบ ผล ลำต้น ราก และเมล็ด เป็นต้น ข้าวสาลีมีศัตรูพืชจำนวนทั้งสิ้น 659 ชนิด จัดเป็นแมลง 440 ชนิด ไร 16 ชนิด เชื้อรา 49 ชนิด แบคทีเรีย 25 ชนิด ไวรัส 20 ชนิดไส้เดือนฝอย 38 ชนิด หอยทาก 3 ชนิด และวัชพืช 67 ชนิด

2. ตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ข้าวสาลีในห้องปฏิบัติการ

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

จากการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากทุกประเทศในเบื้องต้น พบว่าลักษณะของเมล็ดมีสีเมล็ดสมบูรณ์ พบสิ่งเจือปนเล็กน้อยสงสัยอาจจะเป็นเมล็ดวัชพืช ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช

2.2 การสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association, 1999) และการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดเมล็ดพันธุ์นำเข้าในห้องปฏิบัติการ จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวสาลี ที่นำเข้าจากเครือรัฐออสเตรเลีย อังกฤษ สหรัฐอเมริกา และแคนาดา จำนวน 32 ตัวอย่าง จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคพืชกับเมล็ดพันธุ์ข้าวสาลี ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method และ Dilution technique พบเชื้อรา 5 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. และ *Septonema chaetospira* ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่น่าสงสัยจะเป็นเชื้อก่อโรคกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว และพบเมล็ดวัชพืช 17 ชนิด ซึ่งจัดเป็นวัชพืชที่สำคัญด้านกักกันพืชจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Avena fatua, Chenopodium album, Galium aparine, Polygonum convolvulus* และ *Thlaspi arvense* ส่วนวัชพืชที่ไม่มีความสำคัญด้านกักกันพืชจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ *Ambrosia* sp., *Amaranthus* sp., *Brassica* sp., *Kochia scoparia*, *Lithospermum arvense*, *Lolium* sp., *Polygonum persicaria*, *Setaria viridis*, *Setaria* sp., *Silene dioica*, *Tragus australianus* และ *Rumex crispus* ได้ทำการควบคุมวัชพืชกักกันภายใต้พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่3) พ.ศ. 2551

9. **สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ**

การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) วงศ์ Poaeae นำเข้าจากต่างประเทศ โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวสาลีนำเข้าตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 ถึง กันยายน 2554 จาก 4 ประเทศ ได้แก่ เครือรัฐออสเตรเลีย อังกฤษ สหรัฐอเมริกา และแคนาดา จำนวน 32 ตัวอย่าง ผลการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชที่เข้าทำลายเมล็ดพันธุ์ข้าวสาลี มีศัตรูพืชจำนวน 659 ชนิด จัดเป็นแมลง 440 ชนิด ไร 16 ชนิด เชื้อรา 49 ชนิด แบคทีเรีย 25 ชนิด ไวรัส 20 ชนิดไส้เดือนฝอย 38 ชนิด หอยทาก 3 ชนิด และวัชพืช 67 ชนิด และจากตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Visual

inspection, Blotter method, Dilution plate method และปลูกทดสอบแสดงอาการผิดปกติในโรงเรือน ผลการตรวจพบเชื้อรา 5 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., และ *Septonema chaetospira* ซึ่งเป็นเชื้อโรคพืชที่ไม่สำคัญด้านกักกันพืช พบเมล็ดวัชพืชพบเมล็ดวัชพืชจำนวน 17 ชนิดเป็นวัชพืชกักกันที่สำคัญด้านกักกันพืช 5 ชนิด ได้แก่ *Avena fatua, Chenopodium album, Galium aparine, Polygonum convolvulus* และ *Thlaspi arvense* ส่วนวัชพืชที่ไม่มีความสำคัญด้านกักกันพืชจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ *Ambrosia* sp., *Amaranthus* sp., *Brassica* sp., *Kochia scoparia*, *Lithospermum arvense*, *Lolium* sp., *Polygonum persicaria*, *Setaria viridis*, *Setaria* sp., *Silene dioica*, *Tragus australianus* และ *Rumex crispus* เนื่องจากสินค้าข้าวสาลี ล๊อตที่ตรวจพบเมล็ดวัชพืชเป็นข้าวสาลีที่นำเข้ามาผลิตแป้งไม่ได้นำไปปลูก เจ้าหน้าที่กักกันพืชได้ให้ทำความสะอาดและควบคุมให้นำไปเข้าโรงงานแปรรูปเป็นแป้ง และควบคุมวัชพืชกักกันภายใต้พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่3) พ.ศ. 2551 **เพื่อป้องกันมิให้วัชพืชจากต่างประเทศเข้ามาแพร่ระบาดภายในประเทศไทย**

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : ได้ข้อมูลศัตรูพืช และตัวอย่างศัตรูพืชที่เก็บไว้เป็นหลักฐานทางวิชาการ ได้ข้อมูลชนิดและตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อการจัดทำรายชื่อพืชศัตรูพืชที่ถูกต้องเพื่อการปรับปรุงกฎระเบียบในการควบคุมการนำเข้าต่อไป

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณวิชาญ สมาธิ คุณวิภา เกิดพิพัฒน์ คุณสุธรรม คงเอียด คุณชัยรัตน์ หมั่นการ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการที่ช่วยสนับสนุนในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

CAB INTERNATIONAL (2007). Crop Protection Compendium. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK.

CABI. 2005. Crop Protection Compendium [CD-ROM]. CAB International. Wallingford, UK.

CISRO. 2004. Taxon Attribute Profiles *Marsilea drummondii* A.Braun. http://www.anbg.gov.au/cpbr/WfHC/ *Marsilea -drummondii*/index.html.

Extension Plant Pathology. 2010 . Diseases of melon (Cucumis melo) in Arizona. The University of Arizona. USA. (http://cals.arizona.edu/PLP/plpext/diseases/vegetables/melon/melon.html)

Friend, E. 1983. Queensland Weed Seeds. Queensland Department of Primary Industries,Brisbane.206p.

Holm, G.L.,D.L. Plucknett,J.V. Pancho and J.P. Herberger. 1977. The World's Worst Weeds, Distribution and Biology. The University Press of Hawaii, Honolulu 609 pp.

Holm, G.L.,J.V. Pancho, J.P. herberger and D.L. Plucknett. 1979. A Geographical Atlas of World Weeds. John Wiley & sons., Inc., New York. 391 pp.

Horlock, C. and McGrath, M. T. 2004. Powdery mildew of melons (watermelon, rockmelon and honeydew). Department of Primary Industries. Queensland government. Australia. (http://www2.dpi.qld.gov.au/horticulture/11644.html)

NIAB. 2004. Seed Indentification Handbook.Official seed Testing station for England and Wales. Huntingdon road, Cambridge,UK. 94 pp.

Singh, S. 2001. Interception of weeds in imported wheat grain consignments. Journal Annals of Agricultural Research, Vol. 22, No. 1, pp. 83-87.