

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
2. โครงการวิจัย วิจัยการกักกันพืช
กิจกรรม การศึกษาศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับพืชนำเข้า
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การศึกษาชนิดของศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวที่นำเข้าจากต่างประเทศ
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Interception of Quarantine Pests in Imported Chinese mustard Seed Consignments
4. คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง นางพร มาอยู่ดี สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน ชลธิชา รักใคร่ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ทัศนีย์ ศรีโสภากา สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร
5. บทคัดย่อ

การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียว (Chinese mustard : *Brassica juncea* Coss.) วงศ์ Brassicaceae นำเข้าจากต่างประเทศที่กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ระหว่างตุลาคม 2555 ถึง กันยายน 2557 โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน อิตาลี เม็กซิโก และนิวซีแลนด์ จำนวน 32 ตัวอย่าง ได้ทำการตรวจและจำแนกชนิดศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาวิธีวินิจฉัยเชื้อโรคศัตรูพืชขั้นละเอียดด้วยวิธี Visual inspection, Blotter method, และตัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพพร้อมทั้งปลูกทดสอบแสดงอาการผิดปกติในโรงเรือนปลูกพืช ผลการตรวจพบเชื้อรา 7 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria raphani*, *Cladosporium* sp., *Stachybotrys* sp., *Streptomyces* sp. และ *Ulocladium* sp. ซึ่งเป็นเชื้อโรคที่ไม่สำคัญทางด้านกักกันพืช พบเมล็ดวัชพืชจำนวน 6 ชนิด เป็นวัชพืชกักกันที่สำคัญด้านกักกันพืช 2 ชนิด ได้แก่ *Galium aparine*, *Polygonum aviculare* ส่วนวัชพืชที่ไม่มีความสำคัญด้านกักกันพืชจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Amaranthus hybridus*, *Polygonum persicaria*, *Rumex crispus* และ *Phalaris* spp. ได้ทำการควบคุมวัชพืชกักกันภายใต้พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 เพื่อป้องกันมิให้วัชพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศไทย โดยติดตามตรวจสอบวัชพืชในแปลงปลูกพืชหลังการนำเข้า เข้มงวดในการตรวจสอบศัตรูพืช ณ ด่านตรวจพืชที่นำเข้า กำหนดมาตรการทางกักกันพืชในการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวจากต่างประเทศ จะต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชระบุว่ามีปลอดวัชพืชดังกล่าวกำกับมาด้วย

6. คำนำ

ผักกาดเขียว (Chinese mustard: *Brassica juncea* Coss. L. เป็นพืชผักที่อยู่ในวงศ์กะหล่ำ (Brassicaceae) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศจีน สถิติการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ปี 2555 ปริมาณ 157,909 กิโลกรัม มูลค่า 8,194,557 บาท (กลุ่มควบคุมพันธุ์พืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร ผักกาดเขียวเป็นผักประเภทอายุปีเดียว ใบเลี้ยงคูมี ใบไม่มีขน ใบยาวประมาณ 15-50 ซม. ระบบรากแก้ว กว้าง 5-40 ซม. ใบที่อยู่ด้านบน มีขนาดใหญ่ ส่วนใบที่อยู่ถัดเข้าไปจะค่อยๆ เล็กลง ลำต้นตรงทรงพุ่มแคบตันและใบสีเขียว อ่อน โคนก้านยึดติดกับราก และพื้นดิน สีเขียวอ่อนมีใบหุ้มอยู่โดยรอบช่อดอกแบบกระจะ (Raceame) ดอกเกิดที่ยอด ประกอบด้วย กลีบรองดอกสีเขียวอมเหลือง หรือเขียวอ่อน ผลสามารถแตกเองได้เมื่อฝักแก่โดยจะแตกเป็นสองแฉกแยกจากข้างล่างขึ้นข้างบน เมล็ดกลมสีน้ำตาลและสีดำ มีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 55-75 วันสามารถปลูกได้ตลอดปี แหล่งปลูกที่สำคัญทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แถบจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง ตาก น่าน แพร่ นครราชสีมา มหาสารคาม เขตตะวันตก กาญจนบุรี การปลูกผักกาดเขียวสามารถขึ้นได้ในดินแทบทุกชนิด แต่ที่เหมาะสมคือดินร่วนซุย สภาพเป็นกลาง อุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส

พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 กำหนดให้เมล็ดพันธุ์พืชผักต่าง ๆ ไม้ดอกหรือไม้ประดับหลายชนิดจัดเป็นสิ่งต้องห้าม (Prohibited material) สิ่งจำกัด (Restricted material) และสิ่งไม่ต้องห้าม (Unprohibited materials) ในการนำเข้ามายังประเทศไทยต้องแจ้งการนำเข้า และมีใบรับรองสุขอนามัยพืชจากประเทศต้นทางกำกับมาพร้อมกับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า โดยไม่มีมาตรการสุขอนามัยกำหนดไว้แต่อย่างใด การนำเข้าสินค้าเกษตรจากต่างประเทศ มีโอกาสที่ศัตรูพืชหลายชนิดที่อาจเป็นศัตรูพืชกักกันที่ร้ายแรงหรือศัตรูพืชที่สำคัญที่ก่อความเสียหายกับผลิตผลทางการเกษตรติดเข้ามาพร้อมกับเมล็ดพืชด้วย โดยอาจเป็นศัตรูพืชร้ายแรงที่ไม่มีปรากฏในประเทศไทย โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ติดมากับผักกาดเขียว ซึ่งมีการนำเข้ามาเพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์หรือเป็นต้นพันธุ์ในการส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูกกระจายทั่วประเทศไทย โดยในแต่ละปีมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์เหล่านี้ในปริมาณมาก หากศัตรูพืชที่ร้ายแรงซึ่งยังไม่มีรายงานในประเทศไทยติดมากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวสามารถเข้ามาเจริญและแพร่พันธุ์ได้ในประเทศไทย จะก่อให้เกิดผลกระทบทำความเสียหายต่อการเกษตรในประเทศและกระทบต่อการส่งออกพืชผักผลไม้ไทยไปยังต่างประเทศที่มีความเข้มงวดด้านกักกันพืช ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทำการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับพืชนำเข้า เพื่อให้ทราบชนิด แหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้า และเส้นทางการเข้ามาของศัตรูพืช ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นฐานข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืช มีประโยชน์ใช้อ้างอิงทางวิชาการ นำมาพิจารณาหามาตรการเพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชชนิดนั้น ๆ และกำหนดเป็นมาตรการทางด้านกฎหมายและทางวิชาการในการควบคุมการนำเข้า หรือเปลี่ยนแปลงสถานภาพของพืชตามพระราชบัญญัติกักพืชต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ฝักกาดเขียว นำเข้าจากต่างประเทศ
2. กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope และ compound microscope
3. วัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
4. สารเคมีตรวจสอบเชื้อโรคพืช
5. ภาชนะเก็บตัวอย่างพืช
6. ชุดตรวจสอบศัตรูพืช (ELISA Kit)
7. หนังสือ และวารสารทั้งในประเทศและต่างประเทศ

- วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของฝักกาดเขียว และข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

ทำการสืบค้นข้อมูลจากเอกสาร วารสาร รายงานการประชุมทางวิชาการ อินเทอร์เน็ต เพื่อค้นหาข้อมูลของฝักกาดเขียว ลักษณะทั่วไปของพืช สายพันธุ์ พื้นที่การเพาะปลูก รายชื่อของประเทศที่ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ ปริมาณการนำเข้า ข้อมูลชนิดของศัตรูพืชทั้งนอกประเทศและในประเทศ

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชชั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ฝักกาดเขียวนำเข้าในห้องปฏิบัติการ

ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ฝักกาดเขียว ที่นำเข้าจากต่างประเทศจำนวน 32 ตัวอย่าง โดยแยกเป็นเมล็ดพันธุ์บริสุทธิ์ เมล็ดพืชอื่น สิ่งเจือปน และเมล็ดวัชพืช มาทำการตรวจวินิจฉัยโรคและศัตรูพืชชั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อตรวจหาตัวอ่อน หนอน แมลง เมล็ดวัชพืช หรือลักษณะเมล็ดต่าง มีสีดำ บิดงอ ขนาดเล็ก ที่มีสาเหตุจากเชื้อโรค

2.2 การสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association, 2010) และตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชชั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้า

2.2.1 การตรวจสอบเชื้อรา

1) การตรวจสอบสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะยังไม่งอก (Dry seed examination)

โดยตรวจสอบลักษณะอาการโรคและส่วนขยายพันธุ์เชื้อราหรือศัตรูพืชอื่นๆ ซึ่งปะปนมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยตาเปล่าหรือตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Stereo microscope เช่นเมล็ดพันธุ์มีรูปร่าง

ผิปกติ หรืออาจติดมา ภายในเมล็ดพันธุ์โดยไม่แสดงอาการ รวมทั้งอาจติดมากับเศษพืชในลักษณะเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์เช่น Pycnidia เป็นต้น

2) การตรวจสอบสภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะเมล็ดงอก

สุ่มตัวอย่างเมล็ดตามวิธีการมาตรฐาน ในปริมาณที่เหมาะสมวิเคราะห์โดยสุ่มแยกตามสายพันธุ์ มาทดสอบด้วยวิธี Blotter method โดยวางเมล็ดลงบนกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่นที่ชุ่มน้ำซึ่งวางอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางเมล็ดพันธุ์ฝักกาดเขียว 25 เมล็ดต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 200 เมล็ด จากนั้นนำจานเพาะเมล็ดไปบ่มเชื้อ (Incubate) ใต้แสง near ultraviolet (NUV) สลับกับความมืด 12/12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงนำเมล็ดพันธุ์มาตรวจและจำแนกชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (Stereo microscope) และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (Compound microscope)

2.2.2 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย

1) แยกเชื้อสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงหรือด้วยวิธี Dilution plate

ในกรณีที่เชื้อติดมาในปริมาณมากจะสามารถแยกเชื้อจากเมล็ดโดยตรงหลังจากทำการแยกเชื้อด้วยวิธี Blotter method ได้ หรือทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงด้วยวิธี Dilution plate โดยสุ่มเมล็ดตามมาตรฐาน นำมาแช่ในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เชื้อ เมื่อได้เมล็ดพันธุ์จึงนำไปบดละเอียดด้วยเครื่องบด 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 ใช้ไปแปดต์ดูด Suspension แต่ละความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วใช้แท่งแก้วลนไฟฆ่าเชื้อ spread ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน จึงนำมาตรวจหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปจำแนกชนิดต่อไป

2) แยกเชื้อจากต้นกล้าซึ่งเพาะจากเมล็ดผิปกติ

โดยการเพาะเมล็ดในดินนิ่งฆ่าเชื้อ โดยเพาะ 25-50 เมล็ดต่อถาด และเก็บถาดเพาะที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส รดน้ำเข้าเย็นในโรงเรือนกักกันพืช ของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช เมื่อดันกล้าออกใบจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิปกติบนพืช หรืออาจใช้ถุงพลาสติกที่ฉีดพ่นน้ำคลุมให้ความชุ่มชื้นเป็นเวลา

3-5 วัน สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนใบ กิ่ง ลำต้น โคนต้น และราก เก็บส่วนของพืชที่ส่งส่ายไปแยกเชื้อด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

2.1) วิธี Dilution plate ตัดใบพืชที่เป็นโรคเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมแล้วฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 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 ภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อแล้ววางชิ้นพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA หรืออาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะเจาะจง (Semiselective media) นำจานเลี้ยงเชื้อไปเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาตรวจสอบหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรียเก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจนครบ 3-5 วัน เพื่อตรวจหาโคโลนีของแบคทีเรียชนิดอื่นจากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และนำไปศึกษาคุณลักษณะเพื่อจำแนกชนิดต่อไป

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 ก็จะไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป
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 การใช้อุณหภูมิ การย่อยเจลาติน การย่อยเอสคูลิน และแป้ง reduce ไนเตรต ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นต้น
5. ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการทำให้เกิดโรคนพืชอาศัย (Pathogenicity test) โดยเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ปลูกเชื้อตามอาการของโรคของเชื้อที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุโรค เช่นปลูกเชื้อโดยฉีดเข้าในลำต้น ใบเลี้ยงหรือเนื้อใบของต้นฟักทอง สควิวชและแว๊กกราวด์ อายุ 2-3 สัปดาห์ ฉีดพ่นน้ำให้ความชุ่มชื้นคลุมด้วยถุงพลาสติกและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส

ตรวจลักษณะอาการโรคหลังปลูกเชื้อ 3-5 วัน จากนั้นนำไปเป็นโรคมายกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อสาเหตุที่ทำให้พืชเป็นโรคเป็นชนิดเดียวกับที่แยกได้ในครั้งแรกหรือไม่

6. การตรวจสอบด้วยวิธี ELISA เป็นวิธีการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา ปัจจุบันใช้ชุดตรวจสอบของ Agdia นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวและนำมาทำการตรวจสอบตามขั้นตอนที่แนะนำ

2.2.3 การตรวจสอบเชื้อไวรัส

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

2) ปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ (Infectivity test) เตรียมน้ำคั้นพืชสำหรับทดสอบโดยบดใบพืชที่แสดงอาการผิดปกติในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ตรวจสอบเชื้อไวรัสใช้ 0.1 M Phosphate buffer pH 7.0) โดยใช้ใบพืชหนัก 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร ในสภาพเย็น จากนั้นใช้สำลีหรือนิวที่สะอาดจุ่มน้ำคั้นพืชทาลงบนใบพืชทดสอบ ซึ่งโรยด้วยผงคาร์โบรันดัม (Carborundum ขนาด 600 mesh) หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 5 นาที ล้างใบพืชและนำพืชทดสอบไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 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 แนนอน และยังสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก วิธีการที่นำมาใช้เป็นแบบ Indirect ELISA ทำการบันทึกผล

3. การตรวจสอบวัชพืชโดยการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพืชตามวิธีมาตรฐาน ISTA (International Seed Testing Association, 2010)

ทำการคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพ โดยแยกออกเป็นเมล็ดพืชบริสุทธิ์ สิ่งเจือปน เมล็ดพืชอื่น และเมล็ดวัชพืช

4. การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์นำเข้าในพื้นที่ของเกษตรกร

ทำการติดตามตรวจสอบต้นพืชที่มีการนำเมล็ดพันธุ์นำเข้าไปเพาะปลูกในแปลงปลูกของเกษตรกรตามจังหวัดต่างๆ ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง เพชรบูรณ์ และกาญจนบุรี โดยสังเกตอาการความผิดปกติ

ของต้นพืชทั้ง โคนต้น ราก ลำต้น ใบและผลของพืช และทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาการดังกล่าว นำมาตรวจดูภายใต้ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง แยกเชื้อ จัดจำแนกชนิดของเชื้อ และทดสอบการ เกิดโรคกับพืชในห้องปฏิบัติการเพื่อทำการวินิจฉัยเชื้อโรคศัตรูพืชอย่างละเอียด เช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 2

- เวลาและสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2555 - กันยายน 2557 (2 ปี)

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงปลูก ของเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง เพชรบูรณ์ กาญจนบุรี อุตรธานี และหนองคาย

8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การรวบรวมข้อมูลทั่วไปของผักกาดเขียวและข้อมูลศัตรูพืชที่มีระบบงานในต่างประเทศ เปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

การรวบรวมข้อมูลทั่วไปของผักกาดเขียวและข้อมูลศัตรูพืชที่มีระบบงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับ ศัตรูพืชในประเทศ ผักกาดเขียว (Chinese mustard : *Brassica juncea* Coss.) เป็นพืชผักอยู่ในวงศ์กะหล่ำ (Brassicaceae) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบประเทศจีน สถิติการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ปี 2555 ปริมาณ 157,909 กิโลกรัม มูลค่า 8,194,557 บาท (กลุ่มควบคุมพันธุ์พืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร) ผักกาดเขียวมีอายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 55-75 วัน มีแหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง เพชรบูรณ์ อุตรธานี กาญจนบุรี และหนองคาย

ข้อมูลศัตรูพืชที่พบเข้าทำลายผักกาดเขียว การศึกษาเบื้องต้นในการวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยง ศัตรูพืช พบว่า ขั้นตอนการจัดกลุ่มศัตรูพืช (Pest categorization) มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 32 ชนิด คือ เชื้อรา 5 ชนิด แบคทีเรีย 3 ชนิด ไวรัส 2 ชนิด ไล้เดือนฝอย 1 ชนิด แมลง 18 ชนิด และวัชพืช 3 ชนิด

2. ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชชั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียว นำเข้าจาก ต่างประเทศในห้องปฏิบัติการ

2.1 ผลการตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

จากการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากทุกประเทศในเบื้องต้น พบว่าลักษณะของเมล็ดมีสี ขาว เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืชเมล็ด พันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด ซึ่งจากการตรวจเอกสารและการสังเกตเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากบางประเทศ มีการคลุกสารเคมีฆ่าเชื้อรา ได้แก่ Thiram หรือ Captan หรือ คลุกสารเคมีทั้ง 2 ชนิดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้า

2.2 การสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association, 2010) และการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชชั้นละเยียดเมล็ดพันธุ์นำเข้าในห้องปฏิบัติการ และการปลูกทดสอบในโรงเรือน

เมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวที่นำเข้าจาก 4 ประเทศ ได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีน อิตาลี เม็กซิโก และ นิวซีแลนด์ มาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียว มีสีขาว เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชชั้นละเยียดที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียว ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบ เชื้อรา จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria raphani*, *Cladosporium* sp., *Stachybotrys* sp., *Streptomyces* sp. และ *Ulocladium* sp. แต่จากการนำเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียว มาตรวจด้วยวิธี Dilution technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญด้านกักกันพืช และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นผักกาดเขียว ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ไม่แสดงอาการโรคพืช และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นผักกาดเขียว ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ไม่แสดงอาการโรคพืช พบเมล็ดวัชพืช 6 ชนิด ได้แก่ *Galium aparine*, *Polygonum aviculare*, *Amaranthus hybridus*, *Polygonum persicaria*, *Rumex crispus* และ *Phalaris* spp.

3. การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกผักกาดเขียวที่นำเข้าจากต่างประเทศ ในจังหวัดเชียงใหม่

เชียงราย ลำพูน ลำปาง เพชรบูรณ์ อุตรดิตถ์ กาญจนบุรี และหนองคาย ไม่พบเชื้อสาเหตุโรคพืชในแปลงปลูก แต่พบวัชพืชได้แก่ แห้วหมู หญ้านกสีชมพู เทียนนา กระชับ กะเม็ง โทงเทง ลูกใต้ใบ ผักเบี้ยใหญ่ น้ำนมราชสีห์ ผักโขม ผักปราบใบกว้าง สาบแร้งสาบกา ตีนตุ๊กแก ผักยาง และ ผักเสี้ยนผี ซึ่งไม่ใช่ศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผักกาดเขียว (Chinese mustard : *Brassica juncea* Coss.) เป็นผักประเภทอายุปีเดียว ใบเลี้ยงคู่ ใบไม่มีขน ใบยาวประมาณ 15-50 ซม. ระบบรากแก้ว กว้าง 5-40 ซม. ใบที่อยู่ด้านบน มีขนาดใหญ่ส่วนใบที่อยู่ถัดเข้าไปจะค่อยๆเล็กลง ลำต้นตรงทรงพุ่มแคบตันและใบสีเขียว อ่อน โคนก้านยึดติดกับรากและพื้นดิน สีเขียวอ่อนมีใบหุ้มอยู่โดยรอบช่อดอกแบบกระจจะ (Raceame) ดอกเกิดที่ยอด ประกอบด้วย กลีบรองดอกสีเขียวอมเหลืองหรือเขียวอ่อน ผลสามารถแตกเองได้เมื่อฝักแก่โดยจะแตกเป็นสองแฉกแยกจากข้างล่างขึ้นข้างบน เมล็ดกลมสีน้ำตาลและสีดำ มีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 55-75 วัน สามารถปลูกได้ตลอดปี สถิติการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ปี 2555 ปริมาณ 157,909 กิโลกรัม มูลค่า 8,194,557 ข้อมูลศัตรูพืชที่เข้าทำลายส่วนต่างๆ ของผักกาดเขียว มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 32 ชนิด คือเชื้อรา 5 ชนิด แบคทีเรีย 3 ชนิด ไวรัส 2 ชนิด ไล่เดือนฝอย 1 ชนิด แมลง 18 ชนิด และวัชพืช 3 ชนิด และจากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียว ที่นำเข้าจาก 4 ประเทศ ได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีน อิตาลี เม็กซิโก และ นิวซีแลนด์ มาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า

ลักษณะเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียว มีสีขาว เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือ ร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและ ศัตรูพืชชั้นละเอียดที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียว ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบเชื้อรา จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria raphani*, *Cladosporium* sp., *Stachybotrys* sp., *Streptomyces* sp. และ *Ulocladium* sp. แต่จากการนำเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียว มาตรวจด้วยวิธี Dilution technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญด้านกักกันพืช และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบน ต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นผักกาดเขียว ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ไม่แสดง อาการโรคพืช พบเมล็ดวัชพืช 6 ชนิด ได้แก่ *Galium aparine*, *Polygonum aviculare*, *Amaranthus hydrides*, *Polygonum persicaria*, *Rumex erispus* และ *Phalaris* spp. เป็นวัชพืชกักกันที่มีความสำคัญด้าน กักกันพืช 2 ชนิด ได้แก่ *Galium aparine* และ *Polygonum aviculare* สำหรับวัชพืชกักกันได้ทำการควบคุม วัชพืชภายใต้พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และ พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 เพื่อป้องกันมิให้วัชพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศไทย และได้ทำ การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกผักกาดเขียวที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง เพชรบูรณ์ กาญจนบุรี อุตรธานี และหนองคาย ไม่พบเชื้อสาเหตุโรคพืชในแปลงปลูก แต่พบวัชพืชได้แก่ หัว หมู หญ้านกสีชมพู เทียนนา กระชับ กะเม็ง โทงเทง ลูกใต้ใบ ผักเบี้ยใหญ่ น้ำนมราชสีห์ ผักโขม ผักปราบใบกว้าง สาบแร้งสาบกา ตีนตุ๊กแก ผักยาง และ ผักเสี้ยนผี ซึ่งไม่ใช่ศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย

10. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

- 10.1 ได้ข้อมูลศัตรูพืชที่เก็บไว้เป็นหลักฐานทางวิชาการ
- 10.2 สามารถเผยแพร่ข้อมูลศัตรูพืชและศัตรูพืชกักกันที่สำคัญของพืชนำเข้าให้กับเจ้าหน้าที่ของรัฐและ ภาคเอกชนที่เกี่ยวข้อง
- 10.3 ทำให้การปฏิบัติงานกักกันพืชรัดกุมมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นสามารถป้องกันศัตรูพืชร้ายแรงและรุกราน ชนิดใหม่จากต่างประเทศมิให้ระบาดเข้ามาทำลายการเกษตรของประเทศไทย
- 10.4 สามารถกำหนดมาตรการกักกันพืชได้อย่างรัดกุมมีประสิทธิภาพและโปร่งใสสอดคล้องกับข้อตกลง ระหว่างประเทศ
- 10.5 นำผลการวิจัยมาดำเนินการปรับปรุงแก้ไขกฎหมายกักกันพืช โดยจัดทำปรับปรุงข้อแก้ไข ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ฯ และประกาศกรมวิชาการเกษตร เวียนแจ้งให้ทราบทั้งในและนอกประเทศ

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณวิชาญ สมาธิ คุณวิภา เกิดพิพัฒน์ คุณอรนุช นาคะโร ช่วยสนับสนุนและเตรียมตัวอย่างพืช และเตรียมงานในห้องปฏิบัติการ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการที่ช่วยสนับสนุนในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2547. เอกสารวิชาการ ศัตรูพืชกักกันที่สำคัญของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ
- นिरนาม. 2542. พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 12 หน้า.
- ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. โรคของผักและการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ 198 น.
- สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2553. ข้อมูลสถิตินำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ปี 2555 - 2557. สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ.
- Anonymous. 2006. Phytosanitary Principles for the protection of plants and the application of phytosanitary measures in international trade.
- Anonymous. 2007. International rules for seed testing. Seed Science and Technology. Rules, Vol. 21 supplement. 287 pp.
- Crop Protection Compendium. 2007. ed. Wallingford, UK: CPC. (online). Available. <http://www.cabicompendium.org/cpc> (December 15, 2014)
- FAO . 2004. Pest Risk Analysis for Quarantine Pests Including Analysis of Environmental Risks
Pest risk Analysis for Quarantine Pests. ISPM No. 11, Rome.
- Schaad N.W., J.B. Jones and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd edition, APS Press, St Paul, Minnesota, USA.

Table 1. Pests intercepted from imported Chinese mustard Seed Consignments

Pests	Sources	Number of interceptions
Diseases		
<i>Alternaria tenuis</i>	People's Republic of China	4
	New Zealand	
<i>Alternaria brassicicola</i>	People's Republic of China	3
<i>Alternaria raphani</i>	New Zealand	1
<i>Cladosporium</i> sp.	People's Republic of China	2
	New Zealand	
<i>Stachybotry</i> sp.	New Zealand	1
<i>Streptomyces</i> sp.	People's Republic of China	1
<i>Ulocladium</i> sp.	People's Republic of China	3
	New Zealand	
Weeds		
<i>Amaranthus hybridus</i>	United States	1
<i>Galium aparine</i>	New Zealand	2
<i>Polygonum aviculare</i>	New Zealand	2
<i>Polygonum persicaria</i>	New Zealand	2
<i>Rumex crispus</i>	New Zealand	1
<i>Phalaris</i> spp.	New Zealand	1

Quarantine weeds intercepted from imported soybean seed consignments

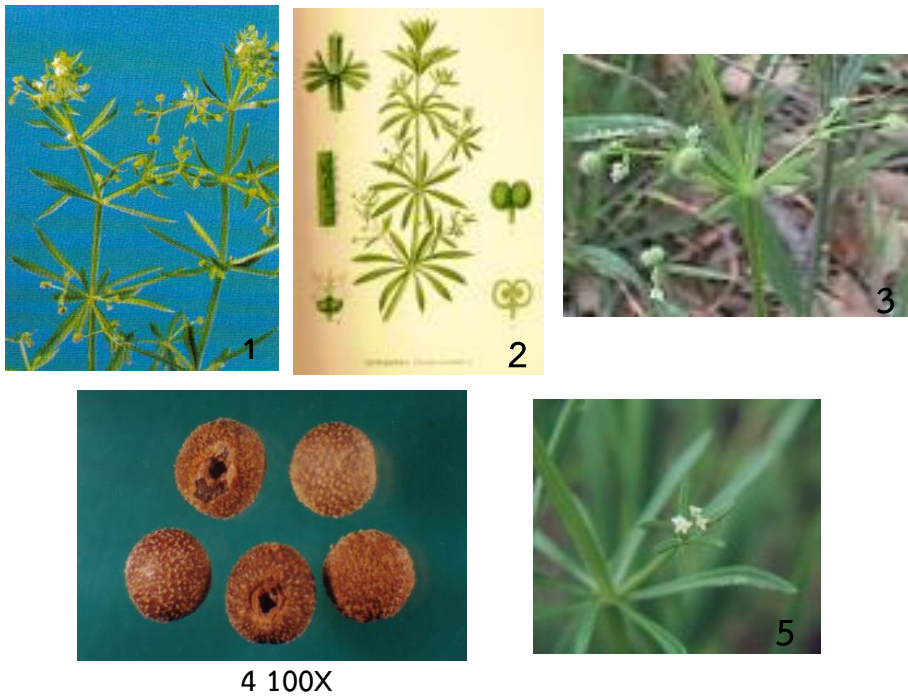


Figure 1. *Galium aparine* L. (F. Rubiaceae)

- 1) Upper part of the stem
- 2) Part of an inflorescence (<http://www.runeberg.org/nordflor/pics/68.jpg>)
- 3) Stem and capsule (www.csupomona.edu/.../galium-aporine.html)
- 4) Seeds
- 5) Flowers (www.missouriplants.com/whiteopp/Galium-aporin)



Figure 2. *Polygonum aviculare* L. (F. Polygonaceae)

- 1) Upper part of stem (http://www.themor to ncentre.net/digital_herbarium/ima...)
- 2) Part of an inflorescence and flower (<http://www.linnaeus.nrm.se/.../po/ygna/po/ys/po/yavi1.jpg>)
- 3-4) Habit (Hanf, 1983), (<http://www.bio.by.ac.yu/herbar/129.htm>)
- 5) Seeds and seeds with perianth