Report 2014 Annual Report 2014 Annual Report 2014 Annual Report 2014 Annual Report 2014

เล่ม ๓
ผลงานวิจัย
ประจำปี ๒๕๕๗

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Plant Protection Research and Development Office

เอกสารวิชาการเลขที่ ๑/๒๕๕๘

กรมวิชาการเกษตร
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

รายงาน
ผลงานวิจัยประจำปี ๒๕๕๗
เล่ม ๓

เอกสารวิชาการเลขที่ ๑/๒๕๕๘

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

คำนำ

“รายงานผลงานวิจัย ประจำปี ๒๕๕๗” เป็นเอกสารวิชาการที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชจัดทำต่อเนื่องติดต่อกัน ๑๒ ปี จากผลงานวิจัยของนักวิจัย กลุ่มกีฏและสัตววิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มวิจัยวัชพืช กลุ่มวิจัยการกักกันพืช และกลุ่มบริหารศัตรูพืช ที่ดำเนินงานด้วยงบประมาณ ภายใต้ **แผนงานวิจัยและพัฒนากรมวิชาการเกษตร ปี ๒๕๕๔ - ๒๕๕๘** ประกอบด้วยผลงานวิจัยชุดโครงการวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชที่ครอบคลุม ๖ โครงการวิจัย ได้แก่ วิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี การศึกษาและพัฒนาประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช วิจัยการกักกันพืช อนุกรมวิธาน ชีววิทยาและเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ วิจัยมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้าสินค้าเกษตร และวิจัยมาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออกสินค้าเกษตร และชุดโครงการวิจัยอื่น ๆ ได้แก่ อ้อย มันสำปะหลัง ปาล์มน้ำมัน ข้าวโพด ถั่วเหลือง ข้าวฟ่าง ทุเรียน มะม่วง กาแฟ กล้วยไม้ ส้มเปลือกล่อน มันฝรั่ง ขิง พืชหัว เห็ด พืชผัก องุ่น พืชเศรษฐกิจเฉพาะพื้นที่ เกษตรอินทรีย์ การคุ้มครองพันธุ์พืช และโครงการวิจัยเร่งด่วน เป็นการรวมการดำเนินงานจาก ๒๘ ชุดโครงการวิจัย ๔๗ โครงการวิจัย ๕๘ กิจกรรม ที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชต้องรับผิดชอบในฐานะหัวหน้าการทดลอง รวมจำนวนการทดลองทั้งสิ้น ๒๖๒ การทดลอง เป็นการทดลองร่วม ๘ การทดลอง

การจัดทำรายงานผลงานวิจัยเล่มนี้ เสร็จสมบูรณ์ เพราะนักวิจัยทุกท่าน จากกลุ่มวิชาการของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช มุ่งหวังจะเผยแพร่ผลงานด้านอารักขาพืชที่ตนได้วิจัยด้วยความพากเพียร และมุ่งมั่น ให้ผู้สนใจได้นำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ ทั้งการอ้างอิง การประยุกต์เพื่อขยายผล ตลอดจนการต่อยอดผลงานวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จึงขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกท่านไว้ในโอกาสนี้

(นางสาวมานิตา คงชื่นสิน)
ผู้เชี่ยวชาญด้านศัตรูพืช
รักษาราชการแทนผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
มิถุนายน ๒๕๕๘

สารบัญ

หน้า

รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2557 เล่มที่ 1..... 1 - 332
รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2557 เล่มที่ 2..... 333 - 1282
รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2557 เล่มที่ 3..... 1283 - 2215
รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2557 เล่มที่ 4..... 2216 - 2801

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการเพิ่มผลผลิตอ้อย
โครงการวิจัย การบริหารจัดการศัตรูอ้อย 01-05-54-02
กิจกรรม การเพิ่มประสิทธิภาพการจัดการวัชพืชในอ้อยเพื่อลดต้นทุนการผลิต
กิจกรรมย่อย -

การทดลอง
➢ทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืช..... 1
ของสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก
(pre-emergence) ในอ้อยปลูกใหม่
01-05-54-02-01-00-01-54
❖ สิริชัย สาธุวิจารณ์ และคณะ
➢ทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืช..... 8
ของสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก
(post-emergence) ในอ้อยปลูกใหม่และอ้อยตอ
01-05-54-02-01-00-02-54
❖ สิริชัย สาธุวิจารณ์ และคณะ
➢ศึกษาการจัดการวัชพืชประเภทเถาเลื้อยในอ้อย..... 19
01-05-54-02-01-00-03-54
❖ สิริชัย สาธุวิจารณ์ และคณะ
➢ศึกษาสถานการณ์การระบาดของและการจัดการ..... 26
ปัญหาวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชในอ้อย
01-05-54-02-01-00-06-55
❖ จรรยา มณีโชติ และคณะ

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนามันสำปะหลัง

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืชในมันสำปะหลัง 01-07-54-03

กิจกรรม วิจัยและพัฒนาวิธีการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูมันสำปะหลัง

กิจกรรมย่อย การศึกษาอนุกรมวิธาน นิเวศวิทยาของแมลงและไรศัตรูมันสำปะหลัง

การทดลอง ➢อนุกรมวิธาน และเขตแพร่กระจายของ ✪ 32
ไรศัตรูมันสำปะหลังในประเทศไทย
01-07-54-03-01-01-04-56

❖ พลอยชมพู กรวิภาสเรือง และคณะ

กิจกรรมย่อย การจัดการแมลงและไรศัตรูมันสำปะหลัง

การทดลอง ➢ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงประเภทพ่นทางใบป้องกันกำจัดแมลงหวี่ขาวในมันสำปะหลัง
01-07-54-03-01-02-04-56

❖ สุเทพ สหายา และคณะ

➢ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงป้องกันกำจัดเพลี้ยแป้งด้วยวิธีป้ายบริเวณยอดมันสำปะหลัง
01-07-54-03-01-02-05-57

❖ สุเทพ สหายา และคณะ

กิจกรรมย่อย การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูมันสำปะหลังโดยชีววิธี

การทดลอง ➢การใช้แมลงช้างปีกใส *Plesiochrysa ramburi*..... 2717
ในการควบคุมเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังในสภาพไร่
01-07-54-03-01-05-01-55

❖ ประภัสสร เชยคำแหง และคณะ

➢การควบคุมไรศัตรูมันสำปะหลังโดยชีววิธี..... 2729
01-07-54-03-01-05-02-55

❖ มานิตา คงชื่นสิน

กิจกรรม วิจัยและพัฒนาการป้องกันกำจัดวัชพืชมันสำปะหลัง

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢การทดสอบเทคโนโลยีแบบผสมผสานใน..... 41
การจัดการวัชพืชในมันสำปะหลัง
01-07-54-03-03-00-03-56

❖ จรรยา มณีโชติ และคณะ

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาปาล์มน้ำมัน

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปาล์มน้ำมัน 01-09-54-02

กิจกรรม วิจัยด้านอารักขาปาล์มน้ำมัน

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยชีววิธี..... 48

01-09-54-02-02-00-01-54

❖ * ชนินทร ดวงสอาด และคณะ

ชุดโครงการวิจัย การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในสภาพแห้งแล้ง

โครงการวิจัย วิจัยเทคโนโลยีการผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่เหมาะสมในสภาพแห้งแล้ง 01-10-54-02

กิจกรรม การลดความสูญเสียผลผลิตจากศัตรูข้าวโพด

กิจกรรมย่อย การลดความสูญเสียผลผลิตจากแมลงศัตรูพืช

การทดลอง ➢ทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงประเภทพ่นทางใบในการป้องกันกำจัดหนอนเจาะลำต้นข้าวโพดในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

01-10-54-02-04-02-05-57

❖ สุเทพ สหายา และคณะ

➢ทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงประเภทพ่นทางใบในการป้องกันกำจัดหนอนเจาะฝักข้าวโพดในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

01-10-54-02-04-02-06-57

❖ สุเทพ สหายา และคณะ

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาข้าวโพดฝักสด

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตข้าวโพดหวาน 01-11-54-01

กิจกรรม การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตข้าวโพดหวาน

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢ทดลองประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงป้องกันกำจัดแมลงศัตรูปากดูดในข้าวโพดหวานด้วยวิธีคลุกเมล็ดและรองก้นหลุม

01-11-54-01-02-00-20-57

❖ สุเทพ สหายา และคณะ

➢ทดลองประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงป้องกัน
กำจัดแมลงศัตรูปากดูดในข้าวโพดหวาน
ด้วยวิธีการพ่นทางใบ
01-11-54-01-02-00-21-57
❖ สุเทพ สหายา และคณะ
➢ทดลองประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงป้องกัน
กำจัดหนอนเจาะลำต้นและหนอนเจาะฝัก
ในข้าวโพดหวานด้วยวิธีการพ่นทางใบ
01-11-54-01-02-00-22-57
❖ สุเทพ สหายา และคณะ

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาถั่วเหลือง

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการผลิตถั่วเหลืองฝักสดเพื่อการส่งออก 01-12-54-02

กิจกรรม เทคโนโลยีการผลิตถั่วเหลืองฝักสด

กิจกรรมย่อย เทคโนโลยีการผลิตถั่วเหลืองฝักสด

การทดลอง ➢การจัดการวัชพืชและผลของสารกำจัด..... 66
วัชพืชตกค้างในถั่วเหลืองฝักสด
01-12-54-02-02-01-13-55
❖ * ภัทร์พิชชา รุจิระพงศ์ชัย และคณะ

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาทุเรียน

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาพันธุ์ทุเรียน 01-21-54-01

กิจกรรม วิจัยการปรับปรุงพันธุ์ทุเรียนลูกผสม

กิจกรรมย่อย ศึกษาความสามารถในการทนทานต่อโรครากเน่าโคนเน่าของ ทุเรียนลูกผสมที่คัดเลือกแล้ว

การทดลอง ➢ศึกษาปฏิกิริยาของทุเรียนพันธุ์ลูกผสม ✪..... 76
ต่อเชื้อรา *Phytopthora palmivora*
01-21-54-01-02-05-01-54
❖ นลินี ศิวากรณ์ และคณะ

โครงการวิจัย การเพิ่มประสิทธิภาพด้านการผลิตทุเรียนคุณภาพและการกระจายการผลิต

01-21-54-02

กิจกรรม วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการด้านเขตกรรมและการอารักขาพืช เพื่อเสริมประสิทธิภาพการผลิตทุเรียนคุณภาพ

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢การควบคุมโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียน ✪..... 84
โดยใช้ชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis*
01-21-54-02-03-00-03-54
❖ นลินี ศิวากรณ์ และคณะ

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการผลิตมะม่วง

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการป้องกันกำจัดโรคแมลงศัตรูมะม่วงอย่างเหมาะสม

01-25-54-02

กิจกรรม -

กิจกรรมย่อย –

การทดลอง ➢การจัดการด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วง..... 103
และการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด
จากพืชต่อเพลี้ยแป้งในแปลงมะม่วงอินทรีย์
01-25-54-02-00-00-01-54
❖ สราญจิต ไกรฤกษ์ และคณะ

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนากาแฟ

โครงการวิจัย เทคโนโลยีการผลิตกาแฟเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดต้นทุนการผลิต

01-27-54-02

กิจกรรม วิจัยด้านการจัดการศัตรูพืชและการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢สำรวจ รวบรวมและจำแนกชนิดโรคกาแฟ..... 114
อาราบิก้าในประเทศไทย
01-27-54-02-01-00-03-57
❖ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และคณะ

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนากล้วยไม้

โครงการวิจัย การจัดการคุณภาพกล้วยไม้สกุลหวายเพื่อการส่งออก 01-29-54-01

กิจกรรม การวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืชในกล้วยไม้สกุลหวาย

กิจกรรมย่อย –

การทดลอง

➢ การป้องกันกำจัดสัตว์ศัตรูพืช ✪ 119
01-29-54-01-01-00-04-54

● การควบคุมหอยซัคซิเนีย *Succinea* sp. ในสวนกล้วยไม้โดยวิธีผสมผสาน

❖ ปราสาททอง พรหมเกิด และคณะ

➢ การป้องกันกำจัดโรคดอกจุดสนิมของ ✪ 132
กล้วยไม้ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Curvularia eragrostidis* โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และสารเคมี
01-29-54-01-01-00-05-54

❖ พีระวรรณ พัฒนวิภาส และคณะ

➢ การศึกษาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *Fusarium* spp. สาเหตุโรคในกล้วยไม้ที่ปลูกเป็นการค้าโดยใช้สารสกัดจากพืช *Bacillus subtilis* และสารเคมี
01-29-54-01-01-00-06-54

❖ อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และคณะ

➢ ศึกษาการป้องกันกำจัดทาก *Parmarion* 152
siamensis ในสวนกล้วยไม้
01-29-54-01-01-00-07-55

❖ ปิยาณี หนูกาฬ และคณะ

➢ การทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกัน..... 158
กำจัดโรคพืชในการควบคุมโรคปื้นเหลือง
ของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อรา
Pseudocercospora dendrobii Deighton
01-29-54-01-01-00-08-55

❖ วรางคนา แซ่อ้วง และคณะ

➢ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกัน..... 163
กำจัดเพลี้ยไฟฝ้าย (cotton thrips); *Thrips palmi* (Karny) ในกล้วยไม้สกุลหวาย
01-29-54-01-01-00-09-56
❖ ศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา และคณะ
➢การบริหารศัตรูกล้วยไม้แบบผสมผสาน..... 195
01-29-54-01-01-00-10-57
❖ ศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนากล้วยไม้สกุลแวนด้าเพื่อการค้า 01-29-54-02

กิจกรรม การอารักขาพืชในกล้วยไม้

กิจกรรมย่อย การป้องกันกำจัดโรคที่เกิดจากแบคทีเรียของกล้วยไม้

การทดลอง ➢การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพ ✪..... 213
สารเคมีควบคุมโรคกล้วยไม้สกุลแวนด้า
ที่เกิดจากแบคทีเรีย
01-29-54-02-03-01-02-54
● การจัดการสารเคมีควบคุมโรคกล้วยไม้
สกุลแวนด้าที่เกิดจากแบคทีเรีย
❖ วรางคนา แซ่อ้วง และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยเพื่อแก้ปัญหาการผลิตในกล้วยไม้การค้าสกุลอื่นๆ 01-29-54-05

กิจกรรม การเพิ่มประสิทธิภาพผลผลิต

กิจกรรมย่อย การจัดการศัตรูพืช

การทดลอง ➢การป้องกันกำจัดโรคกลีบดอกไหม้ใน..... 218
กล้วยไม้สกุลมอคคาร่า โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์
ปฏิปักษ์และสารเคมี
01-29-54-05-01-02-02-54
❖ ทัศนาพร ทัศคร และคณะ

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนามันฝรั่ง

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการจัดการศัตรูที่สำคัญของมันฝรั่ง 01-36-54-03

กิจกรรม การจัดการไส้เดือนฝอยรากปมในมันฝรั่ง

กิจกรรมย่อย –

การทดลอง ➢การพัฒนาเทคนิคการใช้เชื้อแบคทีเรีย..... 237
ปฏิปักษ์ควบคุมโรคเหี่ยวเขียวของมันฝรั่ง
ในระดับเกษตรกร
01-36-54-03-01-00-04-55
❖ บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ และคณะ

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขิงคุณภาพ (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขิงคุณภาพ 01-37-54-01

กิจกรรม ศึกษาเทคโนโลยีการจัดการผลิตขิงคุณภาพ

กิจกรรมย่อย –

การทดลอง ➢การจัดการโรคเหี่ยวของขิงที่เกิดจากแบคทีเรีย..... 253
Ralstonia solanacearum แบบผสมผสาน
01-37-54-01-00-00-01-54
❖ บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ และคณะ

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการผลิตพืชหัว

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการผลิตมันเทศ 01-38-54-01

กิจกรรม การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิต และการแปรรูปผลผลิตมันเทศ เพื่อเพิ่มมูลค่าผลผลิต

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกัน..... 261
กำจัดด้วงงวงมันเทศ (sweet potato weevil ;
Cylas formicarius Fabricius) ในมันเทศ
เพื่อทดแทนการใช้ฟูราดาน
01-38-54-01-02-00-04-55
❖ อุราพร หนูนารถ และคณะ

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเห็ด

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการอารักขาเห็ด 01-39-54-02

กิจกรรม วิจัยเทคโนโลยีการจัดการแมลงและไรศัตรูเห็ด

กิจกรรมย่อย –

การทดลอง ➢การบริหารจัดการศัตรูเห็ดโดยวิธีผสมผสาน..... 275
01-39-54-02-02-00-07-56
❖ พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์ และคณะ
➢ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตและ..... 280
การมีชีวิตอยู่รอดของไรไข่ปลา
01-39-54-02-02-00-08-56
❖ พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์ และคณะ
➢การศึกษาความผันแปรจำนวนประชากร..... 285
ไรขาวใหญ่ในเห็ดหูหนู
01-39-54-02-02-00-09-56
❖ พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์ และคณะ

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตองุ่น (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตองุ่น 01-43-54-01

กิจกรรม วิจัยและพัฒนาพันธุ์องุ่น

กิจกรรมย่อย –

การทดลอง ➢สำรวจ รวบรวมและจำแนกเชื้อราสาเหตุ..... 290
โรคองุ่นสายพันธุ์องุ่นจากต่างประเทศ
เพื่อการปลูกในประเทศเขตร้อน
01-43-54-01-01-00-04-57
❖ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และคณะ

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการผลิตพืชเศรษฐกิจเฉพาะพื้นที่อย่างมีคุณภาพในเขตภาคกลาง

โครงการวิจัย การพัฒนาและทดสอบเทคโนโลยีการผลิตชมพู่ 02-05-54-02

กิจกรรม การป้องกันกำจัดโรคแมลงกำจัดศัตรูชมพู่

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢การใช้สารป้องกันกำจัดโรคผลเน่าในชมพู่..... 294
02-05-54-02-02-00-02-57
❖ พจนา ตระกูลสุขรัตน์

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาพืชเศรษฐกิจเฉพาะพื้นที่ภาคตะวันออก

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตแก้วมังกร 02-06-55-02

กิจกรรม การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูสำคัญในแก้วมังกร

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูแก้วมังกร..... 302
02-06-55-02-01-00-03-57
❖ ศรุต สุทธิอารมณ์ และคณะ

กิจกรรม การป้องกันกำจัดโรคสำคัญในแก้วมังกร

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢การศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัด..... 307
โรคลำต้นแผลจุดสีน้ำตาลและผลเน่าของแก้วมังกร
02-06-55-02-02-00-01-55
❖ พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาระบบการผลิตเกษตรอินทรีย์

โครงการวิจัย การศึกษาระบบการปลูกพืชร่วมเพื่อจัดการระบบสมดุลในห่วงโซ่อาหาร ในระบบเกษตรอินทรีย์ 03-02-54-02

กิจกรรม การศึกษารูปแบบของการนำพืชกับดักไปใช้ในระบบการปลูกพืชอินทรีย์

กิจกรรมย่อย การศึกษารูปแบบของการนำพืชกับดักไปใช้ในระบบการปลูกพืชอินทรีย์

การทดลอง ➢ทดสอบรูปแบบการปลูกพืชร่วมในการปลูก..... 320
คะน้าอินทรีย์ เพื่อป้องกันกำจัดด้วงหมัดผัก
ในจังหวัดสุพรรณบุรี
03-02-54-02-03-01-01-56
❖ พัชรีวรรณ มณีสาคร และคณะ

กิจกรรม ศึกษารูปแบบการป้องกันกำจัดศัตรูพืชแบบผสมผสานในระบบการ ปลูกพืชอินทรีย์

กิจกรรมย่อย ศึกษารูปแบบการป้องกันกำจัดศัตรูพืชแบบผสมผสานใน ระบบการปลูกพืชอินทรีย์

การทดลอง ➢ศึกษารูปแบบการป้องกันกำจัดศัตรูพืชแบบ..... 325
ผสมผสานในระบบการผลิตพืชผักอินทรีย์พื้นที่ภาคกลาง
03-02-54-02-02-01-01-54
❖ พัชรีวรรณ มณีสาคร และคณะ

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี 03-04-54-01

กิจกรรม การผลิตและการใช้แมลงและไรควบคุมศัตรูพืช

กิจกรรมย่อย การควบคุมแมลงหวี่ขาวโดยชีววิธี

การทดลอง ➢เทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ ✪ 333
แตนเบียนสกุล *Encarsia* เพื่อควบคุมแมลงหวี่ขาว
03-04-54-01-01-01-02-54
❖ รจนา ไวยเจริญ และคณะ

กิจกรรมย่อย การผลิตและการใช้แมลงและไรควบคุมศัตรูพืช

การทดลอง ➢พัฒนาการผลิตมวนเพชฌฆาต *Sycanus* 343
versicolor Dohrn
03-04-54-01-01-02-01-54
❖ รัตนา นชะพงษ์ และคณะ
➢พัฒนาการเพาะเลี้ยงด้วงเต่า ✪ 361
Cryptolaemus montrouzieri Mulsant
เป็นปริมาณมากเพื่อควบคุมเพลี้ยแป้ง
03-04-54-01-01-02-04-55
❖ รจนา ไวยเจริญ และคณะ
➢ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของ ✪ 371
ระยะไข่และระยะดักแด้ของแมลงช้างปีกใส
03-04-54-01-01-02-05-57
❖ ประภัสสร เชยคำแหง และคณะ
➢ผลของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* 376
และเชื้อราบิวเวอเรีย *Beauveria bassiana*
ต่อแมลงช้างปีกใส *Plesiochrysa ramburi*
03-04-54-01-01-02-06-57
❖ ประภัสสร เชยคำแหง และคณะ

กิจกรรม การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์และไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช

กิจกรรมย่อย การผลิตและการใช้ไวรัส NPV ควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลอง ➢การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ✪..... 381
สูตรต่างๆ ที่ผลิตด้วยวิธี Encapsulation
03-04-54-01-02-01-04-54
❖ สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี และคณะ

➢การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี..... 386
สำเร็จรูปเพื่อกำจัดหนอนกระทู้หอม
03-04-54-01-02-01-05-54
❖ สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี และคณะ

กิจกรรมย่อย การผลิตและการใช้แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลอง ➢การศึกษาถึงระดับความเป็นพิษของเชื้อ
แบคทีเรีย*Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ต่างๆ
ต่อหนอนผีเสื้อศัตรูพืช
03-04-54-01-02-02-03-57
❖ อิสเรส เทียนทัด และคณะ

➢การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *Bacillus*..... 396
thuringiensis ไอโซเลทต่างๆ ในการควบคุม
หนอนผีเสื้อศัตรูพืช
03-04-54-01-02-02-04-57
❖ ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ และคณะ

กิจกรรมย่อย การผลิตและการใช้เชื้อราควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลอง ➢การศึกษาวิธีการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อรา ✪..... 401
Beauveria bassiana (Balsamo) สายพันธุ์ชุมพร
03-04-54-01-02-03-03-57
❖ เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ และคณะ

➢ประสิทธิภาพของราสาเหตุโรคแมลง ✪..... 411
บางชนิดในการควบคุมแมลงหวี่ขาว (white fly)
03-04-54-01-02-03-04-57
❖ เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ และคณะ

กิจกรรมย่อย การผลิตและการใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลอง ➢เทคนิคการผลิตขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง..... 417
Steinernema riobrave
03-04-54-01-02-04-01-54
❖ วิไลวรรณ เวชยันต์ และคณะ
➢วิจัยและพัฒนาการผลิตขยายไส้เดือนฝอย..... 427
Steinernema glaseri เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช
03-04-54-01-02-04-03-54
❖ สาทิพย์ มาลี และคณะ
➢การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ 440
ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae*
สูตรผงในการควบคุมแมลงศัตรูพืช
03-04-54-01-02-04-04-54
❖ สาทิพย์ มาลี และคณะ
➢ปัจจัยที่มีผลต่อการมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพ..... 449
ของผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอย *Steinernema*
carpocapsae ชนิดผง
03-04-54-01-02-04-05-55
❖ วิไลวรรณ เวชยันต์ และคณะ
➢เทคนิคการเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอย..... 454
ศัตรูแมลงและแบคทีเรียร่วมอาศัยด้วยการ
ประยุกต์ใช้วิธีการ Cryopreservation
03-04-54-01-02-04-06-56
❖ พัชรีวรรณ มณีสาคร และคณะ

กิจกรรม การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช

กิจกรรมย่อย การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้ควบคุมโรคพืช

การทดลอง ➢การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* 461
สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงเพื่อควบคุม
โรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของมันฝรั่ง
03-04-54-01-03-01-01-54
❖ บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ และคณะ

➢การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* 471
สายพันธุ์ดินรากยาสูบ No. 4 แบบเม็ด
เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของขิง
03-04-54-01-03-01-02-54
❖ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และคณะ
➢การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ *Bacillus*..... 477
subtilis (BS) เพื่อใช้ควบคุมเชื้อรา *Alternaria*
brassicicola
03-04-54-01-03-01-11-57
❖ บุษราคัม อุดมศักดิ์ และคณะ

กิจกรรมย่อย การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย
***Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคพืช**

การทดลอง
➢คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพใน..... 486
การควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora*
subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi*
สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้
03-04-54-01-03-01-03-54
❖ สุรีย์พร บัวอาจ และคณะ
➢การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย *Bacillus* 516
subtilis ในการควบคุมโรคเหี่ยวพืชตระกูลแตง
ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium solani*
03-04-54-01-03-01-09-56
❖ อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และคณะ
➢การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp..... 532
ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริก สาเหตุ
จากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*
03-04-54-01-03-01-12-57
❖ บุษราคัม อุดมศักดิ์ และคณะ

➢การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย *Bacillus* 540
subtilis ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา
Colletotrichum capsici (Syd. & P.Syd.)
Bult. & Bisby สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก
03-04-54-01-03-01-13-57
❖ ธารทิพย ภาสบุตร และคณะ
➢การควบคุมโรคเหี่ยวเขียวของพริกโดยแบคทีเรีย..... 547
Bacillus subtilis
03-04-54-01-03-01-14-57
❖ บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ และคณะ

กิจกรรมย่อย การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย ในการควบคุมโรคพืช

การทดลอง
➢การคัดเลือกและทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์..... 557
ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Didymella*
bryoniae สาเหตุโรคยางไหลในสภาพแปลงทดลอง
03-04-54-01-03-01-08-56
❖ ทัศนาพร ทัศคร และคณะ
➢การทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุม..... 565
เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละของมันฝรั่ง
03-04-54-01-03-01-10-56
❖ รุ่งนภา คงสุวรรณ์ และคณะ
➢การศึกษาการป้องกันกำจัดเชื้อ *Rhizoctonia*..... 573
solani โดยชีววิธี
03-04-54-01-03-01-15-57
❖ พีระวรรณ พัฒนวิภาส และคณะ
➢การควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้..... 578
ด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์
03-04-54-01-03-01-16-57
❖ รุ่งนภา ทองเครั่ง และคณะ

➢การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของ..... 582
แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมแบคทีเรีย
Burkholderia gladioli สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาล
ของกล้วยไม้
03-04-54-01-03-01-17-57
❖ ทิพวรรณ กันหาญาติ และคณะ

กิจกรรมย่อย การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยโรคพืช

การทดลอง ➢การคัดเลือกแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* 586
ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม
Meloidogyne spp.
03-04-54-01-03-01-07-54
❖ ไตรเดช ข่ายทอง และคณะ
➢การคัดเลือกแบคทีเรีย *Pasteuria* spp. ที่มี ✪..... 595
ศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์ม
Rotylenchulus spp.
03-04-54-01-03-01-18-57
❖ ไตรเดช ข่ายทอง และคณะ

กิจกรรมย่อย การผลิตและการใช้เชื้อราควบคุมโรคพืช

การทดลอง ➢การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการ..... 600
ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม
03-04-54-01-03-02-03-54
❖ ธิติยา สารพัฒน์ และคณะ
➢การคัดเลือกและทดสอบศักยภาพของเชื้อรา..... 615
Fusarium oxysporum สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิด
โรคพืช (non-pathogenic *Fusarium*)
ในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum*
สาเหตุโรคพืช
03-04-54-01-03-02-04-55
❖ อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และคณะ

➢การคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma harzianum*..... 632
ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า
สาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola*
03-04-54-01-03-02-05-56
❖ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และคณะ
➢การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา *Trichoderma* 637
harzianum ในการควบคุมโรคตายพรายของ
กล้วยน้ำว้าที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium*
oxysporum f. sp. *cubense* ในสภาพแปลงปลูก
03-04-54-01-03-02-06-56
❖ อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และคณะ
➢ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจาก ✪..... 650
Oudermansiella spp. ต่อการเจริญของรา
Alternaria spp.
03-04-54-01-03-02-07-57
❖ พจนา ตระกูลสุขรัตน์ และคณะ

กิจกรรม การควบคุมสัตว์ศัตรูพืช และวัชพืชโดยชีววิธี

กิจกรรมย่อย การควบคุมสัตว์ศัตรูพืชโดยชีววิธี

การทดลอง ➢การผลิตและการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของ ✪..... 656
ค็อคซิเดียนโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis*
เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตสารชีวินทรีย์กำจัดหนู
03-04-54-01-04-01-01-54
❖ วิชาญ วรรธนะไกวัล และคณะ
➢ศึกษาการเพาะเลี้ยงหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae..... 672
เพื่อกำจัดหอยศัตรูพืชโดยชีววิธี
03-04-54-01-04-01-02-57
❖ ดาราพร รินทะรักษ์ และคณะ

กิจกรรม ศูนย์ต้นแบบการผลิตขยายศัตรูธรรมชาติเป็นปริมาณมาก

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง

➢ศูนย์ต้นแบบการผลิตขยายศัตรูธรรมชาติเป็นปริมาณมาก

03-04-54-01-05-00-01-56

❖ พัชรีวรรณ มณีสาคร และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยการศึกษาและพัฒนาประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช

03-04-54-02

กิจกรรม การศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อหาสารทดแทนสารเฉ้าระวังและสารที่มีพิษตกค้าง

กิจกรรมย่อย การศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดแมลงไรและสัตว์ศัตรูพืช

การทดลอง

➢การคัดเลือกสารฆ่าแมลงกลุ่มต่างๆ ✪ 690
ในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก

03-04-54-02-01-01-01-54

❖ สุภางคนา ถิรวุธ และคณะ

➢การคัดเลือกสารฆ่าแมลงและสารสกัด ✪ 710
จากสะเดาในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟ
Thrips tabaci Lindeman และแมลงหวี่ขาว
Bemisia tabaci Gennadius

03-04-54-02-01-01-02-54

❖ อุราพร หนูนารถ และคณะ

➢การทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 721
เพลี้ยหอย; *Aulacaspis* sp. ในทุเรียน

03-04-54-02-01-01-17-56

❖ ศรุต สุทธิอารมณ์ และคณะ

➢ประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส ✪ 726
และสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด
หนอนเจาะสมอฝ้าย, *Helicoverpa armigera*
(Hübner) ในมะเขือเทศ

03-04-54-02-01-01-18-56

❖ ธีราทัย บุญญะประภา และคณะ

➢การทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 739
เพลี้ยแป้ง; *Exallomochlus hispidus*
(Morrison) ในลองกอง
03-04-54-02-01-01-19-56
❖ วนาพร วงษ์นิคง และคณะ
➢ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเพลี้ยแป้ง..... 749
และเพลี้ยหอยศัตรูเงาะ
03-04-54-02-01-01-14-55
❖ ยุทธนา แสงโชติ และคณะ
➢ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกัน ✪..... 761
กำจัดหนอนแมลงวันชอนใบ เพลี้ยไฟ
และหนอนผีเสื้อในดาวเรือง
03-04-54-02-01-01-15-55
❖ อุราพร หนูนารถ และคณะ
➢ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกัน ✪..... 774
กำจัดเพลี้ยไฟกุหลาบและหนอนผีเสื้อศัตรูกุหลาบ
03-04-54-02-01-01-16-55
❖ ศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา และคณะ
➢ทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด ✪..... 806
หนอนเจาะขั้วผล (Fruit borer);
Conopomorpha sinensis Bradley
03-04-54-02-01-01-20-56
❖ บุษบง มนัสมั่นคง และคณะ
➢การคัดเลือกสารป้องกันกำจัดเพลี้ยแป้ง ✪..... 810
และเพลี้ยหอยในมะละกอ
03-04-54-02-01-01-21-56
❖ พวงผกา อ่างมณี และคณะ
➢ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงใน ✪..... 815
การป้องกันกำจัดเพลี้ยหอยสีแดงแคลิฟอร์เนีย,
Aonidiella aurantii (Maskell) ในพืชตระกูลส้ม
03-04-54-02-01-01-22-56
❖ ศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา และคณะ

➢การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลง..... 828
ร่วมกับวิธีห่อผลเพื่อป้องกันเพลี้ยแป้งในมะม่วง
03-04-54-02-01-01-24-57
❖ สราญจิต ไกรฤกษ์ และคณะ
➢ทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 846
เพลี้ยแป้งในลำไย
03-04-54-02-01-01-25-57
❖ บุษบง มนัสมั่นคง และคณะ
➢ทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด ✪..... 854
ด้วงหมัดผักแถบลาย, *Phyllotreta sinuata*
Stephens ในคะน้า
03-04-54-02-01-01-26-57
❖ วิภาดา ปลอดครบุรี และคณะ
➢ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลง..... 862
ชนิดต่างๆ ในการป้องกันกำจัดหนอนเจาะ
ฝักถั่วลายจุด *(Maruca testulalis* Hubner)
ในถั่วฝักยาว
03-04-54-02-01-01-27-57
❖ สิริกัญญา ขุนวิเศษ และคณะ
➢การคัดเลือกสารฆ่าแมลงในการป้องกัน..... 867
กำจัดแมลงหวี่ขาวยาสูบ (Tobacco whitefly),
Bemisia tabaci Gennadius ในพริก
03-04-54-02-01-01-28-57
❖ สุภางคนา ถิรวุธ และคณะ
➢การควบคุมหอยและทากศัตรูพืชใน..... 874
โรงเรือนปลูกพืช
03-04-54-02-01-01-29-57
❖ ปราสาททอง พรหมเกิด และคณะ
➢ประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดหนอนกออ้อย..... 880
และผลกระทบต่อศัตรูธรรมชาติในอ้อย
03-04-54-02-01-01-30-57
❖ วรวิช สุดจริตธรรมจริยางกูร และคณะ

กิจกรรมย่อย การศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคพืช

การทดลอง

➢การทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด ✪..... 889
โรคพืชในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm. สาเหตุโรคยางไหล
03-04-54-02-01-02-05-56
❖ ทัศนาพร ทัศคร และคณะ

➢การศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัด ✪..... 903
โรคพืชในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *Exserohilum turcicum* สาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่ข้าวโพด
03-04-54-02-01-02-06-56
❖ พีระวรรณ พัฒนวิภาส และคณะ

➢ศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคพืช..... 914
ในการป้องกันกำจัดราสกุล *Choanephora*
03-04-54-02-01-02-07-56
❖ ธารทิพย ภาสบุตร และคณะ

➢การศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัด..... 923
โรคพืชในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในแปลงทดลอง
03-04-54-02-01-02-08-57
❖ พีระวรรณ พัฒนวิภาส และคณะ

➢การศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกัน..... 929
กำจัดโรคพืชในการป้องกันจำกัดโรคแอนแทรคโนส ของหอมแดง
03-04-54-02-01-02-09-57
❖ สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และคณะ

➢การทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกัน ✪..... 938
กำจัดไส้เดือนฝอยในการควบคุมสาเหตุโรคเหลือง ของพริกไทย
03-04-54-02-01-02-10-57
❖ ธิติยา สารพัฒน์ และคณะ

➢การศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัด..... 951
โรคพืชในการป้องกันกำจัดโรคราแป้งถั่วลันเตา
สาเหตุจากเชื้อรา *Oidium* sp.
03-04-54-02-01-02-11-57
❖ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และคณะ
➢การศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัด ✪..... 957
โรคพืชในการป้องกันกำจัดโรคราน้ำค้าง
03-04-54-02-01-02-12-57
❖ ณิชกานต์ นเรวุฒิกุล และคณะ

กิจกรรมย่อย การศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดวัชพืช

การทดลอง ➢การทดสอบประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืช..... 972
ในปทุมมา
03-04-54-02-01-03-08-56
❖ ภัทร์พิชชา รุจิระพงศ์ชัย และคณะ
➢ศึกษาประสิทธิภาพคู่ผสมสารกำจัดวัชพืช ✪..... 990
ประเภทก่อนงอกในข้าวโพด
03-04-54-02-01-03-10-57
❖ จรัญญา ปิ่นสุภา และคณะ
➢ทดสอบประสิทธิภาพสาร glyphosate..... 999
ผสมกับสารกำจัดวัชพืชประเภทใช้ก่อน
วัชพืชงอกในสวนมะม่วง
03-04-54-02-01-03-11-57
❖ ภัทร์พิชชา รุจิระพงศ์ชัย และคณะ
➢การเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืช..... 1009
โดยการผสมสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อน
และหลังวัชพืชงอกในข้าวนาหว่านน้ำตม
03-04-54-02-01-03-12-57
❖ * ภัทร์พิชชา รุจิระพงศ์ชัย และคณะ

กิจกรรม การศึกษาความต้านทานของศัตรูพืชต่อสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

กิจกรรมย่อย การศึกษาความต้านทานของแมลงและไรศัตรูพืชต่อสารป้องกันกำจัด

การทดลอง

➢ความผันแปรของความต้านทานต่อสาร..... 1021
ฆ่าแมลงในหนอนใยผัก (diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.)) จากพื้นที่ปลูกต่างๆ
03-04-54-02-02-01-01-54
❖ สุภราดา สุคนธาภิรมย์ ณ พัทลุง และคณะ

➢กลไกความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงใน..... 1039
หนอนใยผัก (diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.))
03-04-54-02-02-01-02-54
❖ สุภราดา สุคนธาภิรมย์ ณ พัทลุง และคณะ

➢ความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงในเพลี้ยไฟฝ้าย..... 1053
(cotton thrips, *Thrips palmi* Karny)
03-04-54-02-02-01-03-54
❖ สุภราดา สุคนธาภิรมย์ ณ พัทลุง และคณะ

➢กลไกความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงใน..... 1065
เพลี้ยไฟฝ้าย (cotton thrips, *Thrips palmi* Karny)
03-04-54-02-02-01-04-54
❖ สุภราดา สุคนธาภิรมย์ ณ พัทลุง และคณะ

➢การศึกษาการพัฒนาความต้านทานของ..... 1077
เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*
ของหนอนกระทู้หอม
03-04-54-02-02-01-06-55
❖ อิสเรส เทียนทัด และคณะ

กิจกรรมย่อย การศึกษาความต้านทานของวัชพืชต่อสารป้องกันกำจัด

การทดลอง

➢สถานการณ์การระบาดของวัชพืชต้านทาน..... 1085
สารกำจัดวัชพืชกลุ่มยับยั้งการทำงานของเอมไซม์ acetolactate synthase (ALS)
03-04-54-02-02-03-01-57
❖ ยุรวรรณ อนันตนมณี และคณะ

กิจกรรม การศึกษาผลกระทบของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อศัตรูธรรมชาติและสัตว์น้ำ

กิจกรรมย่อย การศึกษาผลกระทบของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อศัตรูธรรมชาติ

การทดลอง ➢ทดสอบผลของสารป้องกันกำจัดศัตรู..... 1091
มันสำปะหลังต่อแมลงศัตรูธรรมชาติ
03-04-54-02-03-01-06-56

❖ รจนา ไวยเจริญ และคณะ

กิจกรรมย่อย การศึกษาผลกระทบของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อสัตว์น้ำ

การทดลอง ➢การศึกษาผลกระทบของสารเคมีป้องกันกำจัด..... 1099
แมลงศัตรูพืชในไม้น้ำต่อสัตว์น้ำ
03-04-54-02-03-02-03-56

❖ วนาพร วงษ์นิคง และคณะ

กิจกรรม เทคนิคการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

กิจกรรมย่อย เทคนิคการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

การทดลอง ➢ผลิตและพัฒนาเหยื่อโปรตีนในการป้องกัน..... 1106
กำจัดแมลงวันผลไม้
03-04-54-02-04-01-06-56

❖ สัญญาณี ศรีคชา และคณะ

➢เทคนิคการพ่นสารป้องกันกำจัดเพลี้ย..... 1111
กระโดดสีน้ำตาล (Brown planthopper);
Nilaparvata lugens Stål ในนาข้าว
03-04-54-02-04-01-07-56

❖ พฤทธิชาติ ปุญวัฒโท และคณะ

➢ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงบางชนิด ✪..... 1169
ในการป้องกันกำจัดเพลี้ยจักจั่นฝ้ายและ
เพลี้ยไฟพริกโดยวิธีการราดโคน
03-04-54-02-04-01-05-54

❖ สมรวย รวมชัยอภิกุล และคณะ

กิจกรรมย่อย ประสิทธิภาพของเครื่องพ่นสารในการใช้กับลักษณะพืชแบบต่างๆ

การทดลอง

➢การศึกษาอัตราการพ่นสารที่เหมาะสมด้วย..... 1184
เครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงดันน้ำ
ในข้าวโพดตามระยะการเจริญเติบโต
03-04-54-02-04-04-01-57
❖ วรวิช สุดจริตธรรมจริยางกูร และคณะ

➢การศึกษาอัตราการพ่นสารที่เหมาะสมด้วย ✪..... 1196
เครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงดันน้ำ
ในกลุ่มพืชเถาเลื้อย
03-04-54-02-04-04-02-57
❖ สุภางคนา ถิรวุธ และคณะ

➢การศึกษาอัตราการพ่นสารที่เหมาะสมด้วย ✪..... 1207
เครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบแรงดันน้ำ
ในกลุ่มไม้เถาเลื้อยขึ้นค้าง
03-04-54-02-04-04-03-57
❖ นลินา พรมเกษา และคณะ

➢การศึกษาอัตราการพ่นสารที่เหมาะสมด้วย ✪..... 1217
เครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบแรงดันน้ำ
ในกลุ่มไม้พุ่มขนาดเล็ก
03-04-54-02-04-04-04-57
❖ นลินา พรมเกษา และคณะ

➢การศึกษาอัตราการพ่นสารที่เหมาะสมด้วย..... 1230
เครื่องยนต์พ่นสารแบบใช้แรงดันน้ำ
ในกลุ่มไม้พุ่มขนาดกลาง
03-04-54-02-04-04-05-57
❖ สุชาดา สุพรศิลป์ และคณะ

กิจกรรม การศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดใหม่เพื่อคำแนะนำในพืชส่งออก

กิจกรรมย่อย การศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อคำแนะนำในพืชผักสวนครัว

การทดลอง ➢การคัดเลือกสารเคมีและสารสกัดจากพืชใน..... 1242
การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูที่สำคัญในมะเขือเปราะ
03-04-54-02-05-01-02-54
❖ สัญญาณี ศรีคชา และคณะ
➢การศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด ✪..... 1264
แมลงศัตรูพืชในขึ้นฉ่าย
03-04-54-02-05-01-07-56
❖ วิภาดา ปลอดครบุรี และคณะ

กิจกรรมย่อย การศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อคำแนะนำในไม้ดอกไม้ประดับ

การทดลอง ➢ศึกษาชนิดและการป้องกันกำจัดแมลงศัตรู..... 1272
สำคัญในไผ่กวนอิมเพื่อการส่งออก
03-04-54-02-05-02-06-56
❖ บุษบง มนัสมั่นคง และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยการกักกันพืช 03-04-54-03

กิจกรรม การศึกษาศัตรูพืชในประเทศเพื่อการค้าระหว่างประเทศ

กิจกรรมย่อย –

การทดลอง ➢การศึกษาชนิดแมลงศัตรูพืชส่งออก ได้แก่ ✪..... 1283
เผือกและฟักทอง พืชนำเข้า ได้แก่
มันสำปะหลัง และยาสูบ
03-04-54-03-01-00-07-57
❖ เกศสุดา สนศิริ และคณะ
➢การศึกษาชนิดของ โรคพืชของพืชส่งออก..... 1293
ได้แก่ เผือกและฟักทอง พืชนำเข้า ได้แก่
มันสำปะหลังและยาสูบ
03-04-54-03-01-00-08-57
❖ พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ

➢การศึกษาชนิดของวัชพืชของพืชส่งออก..... 1307
ได้แก่ เผือกและฟักทอง พืชนำเข้า ได้แก่
มันสำปะหลังและยาสูบ
03-04-54-03-01-00-09-57
❖ ศิริพร ซึงสนธิพร และคณะ

กิจกรรม การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

กิจกรรมย่อย การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของพืชตามบทเฉพาะกาล

การทดลอง ➢การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยง
ศัตรูพืชของข้าวฟ่างนำเข้าจากอินเดีย
03-04-54-03-02-02-01-56
❖ สุรพล ยินอัศวพรรณ และคณะ
➢การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยง ✪..... 1319
ศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ
จากสาธารณรัฐประชาชนจีน
03-04-54-03-02-02-02-56
❖ สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ และคณะ
➢การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยง..... 1334
ศัตรูพืชของผลแอปเปิลสดนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา
03-04-54-03-02-02-03-56
❖ อลงกต โพธิ์ดี และคณะ
➢การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยง..... 1355
ศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา
03-04-54-03-02-02-04-56
❖ วาสนา ฤทธิ์ไธสง และคณะ
➢การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยง..... 1425
ศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากอิตาลี
03-04-54-03-02-02-05-57
❖ สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ และคณะ
➢การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยง..... 1437
ศัตรูพืชของผลมะเดื่อฝรั่งสดนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา
03-04-54-03-02-02-06-57
❖ อลงกต โพธิ์ดี และคณะ

➢การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยง
ศัตรูพืชของข้าวฟ่างนำเข้าจากออสเตรเลีย
03-04-54-03-02-02-07-57

❖ สุรพล ยินอัศวพรรณ และคณะ

กิจกรรมย่อย การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของพืชตาม
พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ.2551

การทดลอง

➢การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยง..... 1443
ศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปนำเข้าจาก
สหรัฐอเมริกา
03-04-54-03-02-01-10-56

❖ คมศร แสงจินดา และคณะ

➢การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยง..... 1470
ศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากญี่ปุ่น
03-04-54-03-02-01-11-57

❖ วาสนา ฤทธิ์ไธสง และคณะ

➢การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยง..... 1486
ศัตรูพืชของหัวมันฝรั่งเพื่อการแปรรูปนำเข้า
จากอินเดียและอียิปต์
03-04-54-03-02-01-12-57

❖ ปรียพรรณ พงศาพิชญ์ และคณะ

➢การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยง..... 1495
ศัตรูพืชของผลพลับสดนำเข้าจากรัฐอิสราเอล
03-04-54-03-02-01-13-57

❖ วรัญญา มาลี และคณะ

➢การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยง..... 1505
ศัตรูพืชของผลองุ่นสดนำเข้าจากสหรัฐเม็กซิโก
03-04-54-03-02-01-14-57

❖ อลงกต โพธิ์ดี และคณะ

กิจกรรม การศึกษาศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับพืชนำเข้า

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง

➢การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวฟ่างนำเข้าจากต่างประเทศ 03-04-54-03-03-00-13-56

❖ ศรีวิเศษ เกษสังข์ และคณะ

➢การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับ..... 1511
เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ 03-04-54-03-03-00-14-56

❖ ชลธิชา รักใคร่ และคณะ

➢การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับ..... 1520
เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้าจากต่างประเทศ 03-04-54-03-03-00-15-56

❖ ชลธิชา รักใคร่ และคณะ

➢การศึกษาชนิดของศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับ..... 1529
เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่นำเข้าจากต่างประเทศ 03-04-54-03-03-00-17-56

❖ นงพร มาอยู่ดี และคณะ

➢การศึกษาชนิดของศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับ..... 1542
เมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวที่นำเข้าจากต่างประเทศ 03-04-54-03-03-00-18-56

❖ นงพร มาอยู่ดี และคณะ

➢การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับ..... 1556
เมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตาที่นำเข้าจากต่างประเทศ 03-04-54-03-03-00-19-56

❖ โสภา มีอำนาจ และคณะ

➢การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับ..... 1576
เมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวนำเข้าจากต่างประเทศ 03-04-54-03-03-00-20-56

❖ โสภา มีอำนาจ และคณะ

➢การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับ
เมล็ดพันธุ์มะระนำเข้าจากต่างประเทศ
03-04-54-03-03-00-21-57

❖ ศรีวิเศษ เกษสังข์ และคณะ

➢การศึกษาชนิดศัตรูพืชที่ติดมากับหอมแดง..... 1595
และหอมหัวใหญ่นำเข้าจากต่างประเทศ
03-04-54-03-03-00-22-57

❖ วานิช คำพานิช และคณะ

➢การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับ..... 1610
เมล็ดพันธุ์แครอทที่นำเข้าจากต่างประเทศ
03-04-54-03-03-00-23-57

❖ วันเพ็ญ ศรีชาติ และคณะ

กิจกรรม วิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชกักกัน

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส..... 1628
Potato virus A
03-04-54-03-04-00-01-56

❖ สิทธิศักดิ์ แสไพศาล และคณะ

➢การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อ..... 1637
Acidovorax avenae subsp. *citrulli*
ด้วยวิธี PCR-ELISA
03-04-54-03-04-00-02-56

❖ วันเพ็ญ ศรีชาติ และคณะ

กิจกรรม วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดศัตรูพืชกักกันเพื่อการส่งออก

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อน
สำหรับกำจัดแมลงวันทองในผลแก้วมังกร
เพื่อการส่งออก
03-04-54-03-05-00-01-54

❖ ชุติมา อ้อมกิ่ง และคณะ

➢วิจัยและพัฒนาสถานภาพการเป็นพืชอาศัย
และวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัด
แมลงวันทองในผลมะนาวเพื่อการส่งออก
03-04-54-03-05-00-03-54
❖ สลักจิต พานคำ และคณะ
➢ศึกษาอิทธิพลของความชื้นสัมพัทธ์ต่อการตาย ✪..... 1659
ของแมลงวันผลไม้ oriental fruit fly (Diptera :
Tephritidae) หนอนวัยที่ 1 ในผลมะละกอต่อ
วิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์
03-04-54-03-05-00-04-54
❖ มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ และคณะ

กิจกรรม การเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกัน

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢การเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อ ✪..... 1671
แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp.
michiganensis (Smith) Davis. ในพื้นที่ปลูก
มะเขือเทศในประเทศไทย
03-04-54-03-06-00-11-56
❖ ณัฏฐพร อุทัยมงคล และคณะ
➢การสำรวจสถานภาพของไร *Tyrophagus* 1709
similis Volgnin และ *Sancassania*
mycophagus (Megnin) ไรศัตรูพืชกักกัน
ของหอมแดง หอมหัวใหญ่และกระเทียมนำเข้า
03-04-54-03-06-00-12-57
❖ พลอยชมพู กรวิภาสเรือง และคณะ
➢การสำรวจสถานภาพของราสนิม..... 1716
(Tropical Corn Rust) : *Physopella zeae*
(Mains) Cummins & Ramachar และ
(Common Corn Rust) : *Puccinia sorghi*
Schwein. ในข้าวโพด
03-04-54-03-06-00-13-57
❖ สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และคณะ

➢การสำรวจสถานภาพของราน้ำค้าง..... 1723
(Graminicola Downy Mildew) :
Sclerospora graminicola (Sacc.) J. Schröt.
และ (Philippine Downy Mildew) :
Peronosclerospora philippinensis
(W. Weston) C.G. Shaw ในข้าวโพด
03-04-54-03-06-00-14-57
❖ สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และคณะ
➢การสำรวจสถานภาพของรา *Claviceps*..... 1730
ในประเทศไทย
03-04-54-03-06-00-15-57
❖ พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ
➢การสำรวจสถานภาพของแบคทีเรีย..... 1742
Pseudomonas syringae pv. *lachrymans*
ในพืชตระกูลแตงในประเทศไทย
03-04-54-03-06-00-16-57
❖ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และคณะ
➢การสำรวจสถานภาพของแบคทีเรีย..... 1747
Pseudomonas syringae pv. *syringae*
ในพื้นที่ปลูกข้าวโพดในประเทศไทย
03-04-54-03-06-00-17-57
❖ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และคณะ

โครงการวิจัย อนุกรมวิธาน ชีววิทยาและเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ
03-04-54-04

กิจกรรม อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมย่อย อนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศวิทยาของแมลง ไร สัตว์ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

การทดลอง ➢อนุกรมวิธานแมงมุมวงศ์ Tetragnathidae
03-04-54-04-01-01-21-55
❖ วิมลวรรณ โชติวงศ์ และคณะ

➢การแพร่กระจายและความหลากหลาย..... 1753
ทางชีวภาพของหนูนาใหญ่, *Rattus argentiventer*
(Robinson and Kloss,1916) ในประเทศไทย
03-04-54-04-01-01-23-55
❖ สมเกียรติ กล้าแข็ง และคณะ
➢อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยสกุล *Coccus* 1763
03-04-54-04-01-01-24-56
❖ ชมัยพร บัวมาศ และคณะ
➢อนุกรมวิธานแมลงหวี่ขาวในวงศ์ย่อย ✪..... 1768
Aleyrodinae ในประเทศไทย
03-04-54-04-01-01-25-56
❖ สุนัดดา เชาวลิต และคณะ
➢อนุกรมวิธานเพลี้ยไฟสกุล *Haplothrips*..... 1794
03-04-54-04-01-01-26-56
❖ เกศสุดา สนศิริ และคณะ
➢อนุกรมวิธานมวนปีกแก้วสกุล ✪..... 1801
Stephanitis Stål ที่พบในประเทศไทย
03-04-54-04-01-01-27-56
❖ เกศสุดา สนศิริ และคณะ
➢อนุกรมวิธานผีเสื้อกลางคืนสกุล ✪..... 1817
Parapoynx ในประเทศไทย
03-04-54-04-01-01-28-56
❖ สุนัดดา เชาวลิต และคณะ
➢อนุกรมวิธานของแตนเบียนไข่วงศ์ใหญ่..... 1828
Platygastroidea ที่เข้าทำลายหนอนกอข้าว
มวนเขียวข้าว และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล
03-04-54-04-01-01-29-56
❖ จารุวัตถ์ แต้กุล และคณะ

➢สัณฐานวิทยาและลำดับพันธุกรรมของ..... 1841
เพลี้ยไฟดอกไม้ Common Blossom Thrips;
Frankliniella schultzei (Trybom)
03-04-54-04-01-01-30-56
❖ อิทธิพล บรรณาการ และคณะ
➢อนุกรมวิธานไรสี่ขาวงศ์ Eriophyidae..... 1854
ของประเทศไทย
03-04-54-04-01-01-31-56
❖ พลอยชมพู กรวิภาสเรือง และคณะ
➢ชีววิทยา การเข้าทำลาย ฤดูกาลระบาด..... 1864
ของแมลงวันทองชนิด *Bactrocera tau* (Walker)
03-04-54-04-01-01-32-56
❖ สัญญาณี ศรีคชา และคณะ
➢ศึกษาโครโมโซมและเขตการกระจายของ..... 1871
หอยสกุล *Pomacea* ในประเทศไทย
03-04-54-04-01-01-33-56
❖ ดาราพร รินทะรักษ์ และคณะ
➢ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ ✪..... 1886
หนูนาใหญ่ (*Rattus argentiventor*, Robinson
and Kloss 1916) ที่พบในประเทศไทย
03-04-54-04-01-01-34-56
❖ วิชาญ วรรธนะไกวัล และคณะ
➢ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์และลักษณะทาง ✪..... 1894
พันธุกรรมของปรสิตโปรโตซัว, *Sarcocystis*
singaporensis โดยวิธีทางอณูชีววิทยา
03-04-54-04-01-01-35-56
❖ วิชาญ วรรธนะไกวัล และคณะ
➢อนุกรมวิธานด้วงงวงสกุล *Rhynchophorus*..... 1901
03-04-54-04-01-01-36-57
❖ อิทธิพล บรรณาการ และคณะ

➢สัณฐานวิทยาและลำดับพันธุกรรมของ..... 1906
เพลี้ยไฟสกุล *Thrips* และ *Bathrips*
03-04-54-04-01-01-37-57
❖ อิทธิพล บรรณาการ และคณะ
➢อนุกรมวิธานแมงมุมวงศ์ Clubionidae..... 1912
03-04-54-04-01-01-38-57
❖ วิมลวรรณ โชติวงศ์ และคณะ
➢ลักษณะทางอนุกรมวิธานและชีววิทยาของ..... 1917
เพลี้ยแป้ง *Phenacoccus solenopsis* Tinsley
03-04-54-04-01-01-39-57
❖ ชมัยพร บัวมาศ และคณะ
➢ชนิดมดที่พบในแหล่งผลิตและโรงคัดบรรจุ..... 1924
ไม้ผลเพื่อการส่งออก
03-04-54-04-01-01-40-57
❖ ชมัยพร บัวมาศ และคณะ
➢ชีววิทยา นิเวศวิทยาของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม, ✪..... 1930
Diaphorina citri Kuwayama ในพืชตระกูลส้ม
03-04-54-04-01-01-41-57
❖ ธีราทัย บุญญะประภา และคณะ
➢ชีววิทยาและเขตการแพร่กระจายของ..... 1939
ไรแมงมุมคันซาวา *Tetranychus kanzawai* Kishida
03-04-54-04-01-01-42-57
❖ อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล และคณะ
➢ชีววิทยา นิเวศวิทยาและการแพร่..... 1951
กระจายของหอยศัตรูพืชสกุล *Bradybeana*
03-04-54-04-01-01-43-57
❖ ดาราพร รินทะรักษ์ และคณะ

กิจกรรมย่อย อนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช

การทดลอง

➢การจำแนกชนิดของราสกุล *Botryosphaeria* ✪..... 1959
สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
และลักษณะทางพันธุกรรม
03-04-54-04-01-02-04-54

❖ พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ

➢การศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา ✪..... 1971
Didymella bryoniae (Auersw.) Rehm.
03-04-54-04-01-02-06-54

❖ ทัศนาพร ทัศคร และคณะ

➢การจำแนกชนิดและเอกลักษณ์ทาง..... 1985
พันธุกรรมของ Race แบคทีเรีย *Ralsonia*
solanacearum ที่พบในประเทศไทย
03-04-54-04-01-02-07-54

❖ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และคณะ

➢การจำแนกชนิดแบคทีเรีย *Erwinia* สาเหตุ..... 1993
โรคเน่าเละโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม
03-04-54-04-01-02-08-54

❖ รุ่งนภา คงสุวรรณ์ และคณะ

➢อนุกรมวิธานและความสามารถในการ ✪..... 2000
ทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย migratory
endoparasitic nematodes
03-04-54-04-01-02-09-54

❖ ไตรเดช ข่ายทอง และคณะ

➢การจำแนกชนิดของราสกุล *Colletotrichum* ✪..... 2007
สาเหตุโรคพืช โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
และลักษณะทางพันธุกรรม
03-04-54-04-01-02-12-54

❖ พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ

➢ลักษณะของเชื้อ *Pectobacterium* spp..... 2017
และ*Dickeya* spp. สาเหตุโรคเน่าดำและเน่าเละ
ของมันฝรั่งในประเทศไทย
03-04-54-04-01-02-13-56
❖ รุ่งนภา คงสุวรรณ์ และคณะ
➢การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้..... 2027
และใบจุดของกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าและแวนด้า
03-04-54-04-01-02-14-56
❖ ทิพวรรรณ กันหาญาติ และคณะ
➢การจำแนกชนิดของราสกุล *Phyllosticta* ✪..... 2032
สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
และลักษณะทางพันธุกรรม
03-04-54-04-01-02-16-56
❖ พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ
➢การจำแนกกลุ่ม Race ของเชื้อรา *Fusarium*
oxysporum f. sp. *lycopersici* ในประเทศไทย
03-04-54-04-01-02-17-57
❖ อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และคณะ
➢อนุกรมวิธานและพืชอาศัยของรา *Stemphylium*..... 2041
และ *Alternaria* สาเหตุโรคพืช
03-04-54-04-01-02-18-57
❖ สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และคณะ

กิจกรรมย่อย อนุกรมวิธาน ชีววิทยา นิเวศวิทยาของวัชพืช

การทดลอง ➢สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชวงศ์หญ้า..... 2051
งวงช้าง Boraginaceae
03-04-54-04-01-03-09-56
❖ ศิริพร ซึงสนธิพร และคณะ
➢สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชสกุลลูกใต้ใบ..... 2062
Phyllanthus L.
03-04-54-04-01-03-10-56
❖ ธัญชนก จงรักไทย และคณะ

➢ชีววิทยา นิเวศวิทยา และการแพร่กระจาย..... 2068
ของวัชพืชสกุลกะเม็ง *Eclipta* L.
03-04-54-04-01-03-11-57
❖ ธัญชนก จงรักไทย และคณะ
➢ชีววิทยา และการแพร่กระจายของผักเบี้ยเล็ก ✪..... 2074
(*Portulaca quadrifida* L.)
03-04-54-04-01-03-12-57
❖ จรัญญา ปิ่นสุภา และคณะ
➢สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชวงศ์หญ้า Poaceae..... 2082
03-04-54-04-01-03-13-57
❖ ศิริพร ซึงสนธิพร และคณะ
➢ชีววิทยา นิเวศวิทยา และการแพร่กระจาย..... 2088
ของวัชพืชสกุล *Boerhavia* L.
03-04-54-04-01-03-14-57
❖ * ปิยนันท์ พวงจันทร์ และคณะ
➢ชีววิทยา การแพร่ระบาดของวัชพืชวงศ์..... 2095
ทานตะวันสองชนิด: หญ้าหน้าแมวและทานตะวันหนู
03-04-54-04-01-03-15-57
❖ * อัณศยา สุริยะวงศ์ตระการ และคณะ
➢ศึกษาชนิดวัชพืชต่างถิ่นในพื้นที่เกษตรที่สูง..... 2103
ภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ
03-04-54-04-01-03-16-57
❖ * อัณศยา สุริยะวงศ์ตระการ และคณะ

กิจกรรม วิจัยความหลากชนิดของแมลงเพื่อเก็บ - รักษาในพิพิธภัณฑ์

กิจกรรมย่อย –

การทดลอง ➢ชนิดของแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ใน..... 2113
พื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย
03-04-54-04-02-00-02-54
❖ สุนัดดา เชาวลิต และคณะ

➢ความหลากชนิดของแมลงปออันดับ..... 2124
โอโดนาทา (Odonata) ในภาคเหนือของประเทศไทย
03-04-54-04-02-00-03-54
❖ อิทธิพล บรรณาการ และคณะ

กิจกรรม วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมย่อย การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูพืชโดยเซรุ่มวิทยา

การทดลอง

➢การวิจัยและพัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบ
GLIFT Kit (Gold labeling IgG flow test)
สำหรับตรวจไวรัสในกลุ่ม Tospovirus
03-04-54-04-03-01-06-56
❖ เยาวภา ตันติวานิช และคณะ
➢การผลิตชุดตรวจสอบ *Bean yellow* 2129
mosaic virus สำเร็จรูปโดยเทคนิค
Gold labeling IgG flow test
03-04-54-04-03-01-07-56
❖ สิทธิศักดิ์ แสไพศาล และคณะ
➢การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัส PVY PVX PVS..... 2138
ในมันฝรั่ง
03-04-54-04-03-01-08-56
❖ สิทธิศักดิ์ แสไพศาล และคณะ
➢การโคลนและสังเคราะห์โปรตีน Sec A gene..... 2146
ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย
ในระบบเซลล์แบคทีเรีย
03-04-54-04-03-01-09-57
❖ กาญจนา วาระวิชะนี และคณะ
➢การผลิตแอนติซีรัมของไวรัส *Citrus tristeza*..... 2153
virus (CTV) สาเหตุโรคทริสเทซ่าของพืช
ตระกูลส้มใช้ระบบเซลล์แบคทีเรีย
03-04-54-04-03-01-10-57
❖ แสนชัย คำหล้า และคณะ

➢การพัฒนาชุดตรวจสอบแบบ Immuno-Strip..... 2159
เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ในกล้วยไม้
03-04-54-04-03-01-11-57
❖ รุ่งนภา ทองเครั่ง และคณะ

กิจกรรมย่อย การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูพืชโดยอณูชีววิธี

การทดลอง ➢การตรวจสอบเชื้อไวรัส *Watermelon*..... 2165
silver mottle virus (WSMoV) ที่เป็นสาเหตุ
โรคของพืชตระกูลแตงด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา
03-04-54-04-03-02-08-56
❖ กาญจนา วาระวิชะนี และคณะ

➢การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas*..... 2169
oryzae pv. *oryzae* และ *Xanthomonas*
oryzae pv. *oryzicola* โดยเทคนิค multiplex PCR
03-04-54-04-03-02-09-57
❖ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และคณะ

➢การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia*..... 2176
solanacearum ในหัวพันธุ์ปทุมมาด้วยเทคนิค
Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)
03-04-54-04-03-02-10-57
❖ ทิพวรรณ กันหาญาติ และคณะ

➢การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Grapevine*..... 2180
yellow speckle viroid (GYSVd) เชื้อสาเหตุโรค
ในองุ่นด้วยวิธีอณูชีววิทยา
03-04-54-04-03-02-11-57
❖ ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ และคณะ

➢การจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi*..... 2200
Karny ในประเทศไทย โดยเทคนิค Real-time PCR
03-04-54-04-03-02-12-57
❖ จารุวัตถ์ แต้กุล และคณะ

กิจกรรมย่อย การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูธรรมชาติโดยอณูชีววิธี

การทดลอง ➢การจำแนกสายพันธุ์ Nucleopolyhedrovirus..... 2722
ที่พบในประเทศไทยโดยเทคนิค PCR
03-04-54-04-03-03-02-56
❖ ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้าสินค้าเกษตร 03-04-55-01

กิจกรรม การศึกษาการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าสินค้าเกษตร

กิจกรรมย่อย ศึกษาการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าสินค้าเกษตร จากประเทศในทวีปอเมริกาใต้

การทดลอง ➢ศึกษาการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืช..... 2216
สำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พริกจากสหพันธ
สาธารณรัฐบราซิล
03-04-55-01-01-03-01-57
❖ วาสนา ฤทธิ์ไธสง และคณะ

➢ศึกษาการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืช..... 2230
สำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจาก
สหพันธ์สาธารณรัฐบราซิล
03-04-55-01-01-03-02-57
❖ สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ และคณะ

กิจกรรมย่อย ศึกษาการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศในทวีปยุโรป

การทดลอง ➢ศึกษาการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืช..... 2242
สำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ส้มจากสาธารณรัฐฝรั่งเศส
03-04-55-01-01-04-01-57
❖ คมศร แสงจินดา และคณะ

กิจกรรมย่อย ศึกษาการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศในทวีปเอเชีย

การทดลอง ➢ศึกษาการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืช..... 2251
สำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสมจาก
สาธารณรัฐฟิลิปปินส์
03-04-55-01-01-06-01-57
❖ ณัฏฐพร อุทัยมงคล และคณะ

➢ศึกษาการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืช..... 2427
สำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปจากญี่ปุ่น
03-04-55-01-01-06-02-57

❖ คมศร แสงจินดา และคณะ

กิจกรรม ศึกษาประสิทธิภาพมาตรการสุขอนามัยพืชกับสินค้าเกษตรที่นำเข้า

กิจกรรมย่อย ศึกษาประสิทธิภาพมาตรการสุขอนามัยพืชกับสินค้าเกษตรนำเข้าจากประเทศในทวีปแอฟริกา

การทดลอง ➢ศึกษาประสิทธิภาพมาตรการทางสุขอนามัย
พืชกับผลส้มสดนำเข้าจากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้
03-04-55-01-02-03-01-57

❖ วลัยกร รัตนเดชากุล และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยมาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออกสินค้าเกษตร 03-04-56-01

กิจกรรม การศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออกสินค้าเกษตรที่มีศักยภาพ

กิจกรรมย่อย ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออกผักและเมล็ดพันธุ์

การทดลอง ➢ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออก..... 2435
หน่อไม้ฝรั่ง
03-04-56-01-01-01-01-56

❖ ณัฏฐพร อุทัยมงคล และคณะ

กิจกรรมย่อย ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออกผลไม้

การทดลอง ➢ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออก..... 2504
ผลส้มโอ
03-04-56-01-01-02-02-56

❖ วรัญญา มาลี และคณะ

➢ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออก..... 2516
ผลมะพร้าวอ่อน
03-04-56-01-01-02-03-56

❖ สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ และคณะ

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการคุ้มครองพันธุ์พืช

โครงการวิจัย วิจัยการศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์เพื่อบันทึกลักษณะเพื่อประโยชน์ในการคุ้มครองพันธุ์พืชตามกฎหมายคุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ. 2542 03-11-54-02

กิจกรรม -

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢สำรวจ รวบรวม พรรณไม้น้ำเพื่อการปกป้อง ✪..... 2531
ไม้ท้องถิ่น
03-11-54-02-00-03-03-54
❖ ศิริพร ซึงสนธิพร และคณะ

➢ศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการ ✪..... 2546
จำแนกเมล็ดวัชพืชสกุลกก (*Cyperus* L.)
03-11-54-02-00-01-03-54
❖ ศิริพร ซึงสนธิพร และคณะ

โครงการวิจัยเร่งด่วน

โครงการวิจัย ศึกษาคุณภาพประสิทธิภาพ และการใช้กากชาน้ำมันเพื่อกำจัดศัตรูพืช

กิจกรรม ศึกษาประสิทธิภาพกากชาน้ำมันเพื่อการควบคุมศัตรูพืช

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢การทดสอบประสิทธิภาพกากเมล็ดชาน้ำมัน..... 2572
(*Camellia sp.*) เพื่อกำจัดหอยเชอรี่
00-00-57-28-02-00-01-57
❖ ปราสาททอง พรหมเกิด และคณะ

โครงการวิจัย การประเมินสถานการณ์การนำเข้าพืช ชนิดศัตรูพืช และสารพิษตกค้างในพืชนำเข้าสำคัญจากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนและประเทศในกลุ่มอาเซียน

กิจกรรม ชนิดของศัตรูพืชและสารพิษตกค้างที่พบบนพืชนำเข้าสำคัญ

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢ชนิดของศัตรูพืชในส้มและมะนาวนำเข้าจากประเทศ..... 2740
สาธารณรัฐประชาชนจีนและประเทศในกลุ่มอาเซียน
❖ มานิตา คงชื่นสิน และคณะ

โครงการวิจัย การจัดการระบบการผลิตลองกองแบบใหม่เพื่อเพิ่มศักยภาพการส่งออก

กิจกรรม การศึกษาและพัฒนาประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢การควบคุมหอยและทากศัตรูพืชใน..... 2584
สวนลองกอง
00-00-57-10-02-00-01-57
❖ ปราสาททอง พรหมเกิด และคณะ

โครงการวิจัย การประเมินผลการใช้สารปฏิชีวนะเพื่อป้องกันกำจัดโรคกรีนนิ่ง

กิจกรรม การใช้ยาปฏิชีวนะในสวนส้มของเกษตรกรในเขตจังหวัดเชียงใหม่

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢ผลของการใช้สารปฏิชีวนะในการกำจัดเชื้อ..... 2592
แบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่ง
❖ แสนชัย คำหล้า และคณะ

โครงการวิจัย การทดลองหาสารทดแทนสารป้องกันกำจัดแมลงที่ถูกห้ามใช้

กิจกรรม การทดลองหาสารทดแทนสารป้องกันกำจัดแมลงที่ถูกห้ามใช้

กิจกรรมย่อย การหาสารทดแทนสาร methomyl

การทดลอง ➢ทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 2605
แมลงชนิดต่างๆ เพื่อทดแทนสารเฝ้าระวัง
ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูมะม่วง
00-00-57-17-01-01-01-57
❖ พฤทธิชาติ ปุญวัฒโท และคณะ

กิจกรรมย่อย การหาสารทดแทนสาร carbofuran

การทดลอง ➢ทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 2613
แมลงชนิดต่างๆ เพื่อทดแทนสารเฝ้าระวังใน
การป้องกันจำกัดแมลงศัตรูแตงโม
00-00-57-17-01-02-01-57
❖ สุภางคณา ถิรวุธ และคณะ

➢ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงเพื่อทดแทนสาร..... 2620
ประกาศห้ามใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูถั่วฝักยาว
❖ สิริกัญญา ขุนวิเศษ และคณะ

➢ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลง ✪ 2626
เพื่อทดแทนสารประกาศห้ามใช้ในการป้องกัน
กำจัดแมลงศัตรูมะเขือเทศ
00-00-57-17-01-02-03-57
❖ นลินา พรมเกษา และคณะ
➢ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลง ✪ 2636
เพื่อทดแทนสารประกาศห้ามใช้ในการ
ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูมะเขือเปราะ
00-00-57-17-01-02-04-57
❖ สุชาดา สุพรศิลป์ และคณะ
➢ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลง ✪ 2647
เพื่อทดแทนสารประกาศห้ามใช้ในการ
ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูมะระ
00-00-57-17-01-02-05-57
❖ อุราพร หนูนารถ และคณะ
➢ทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด
แมลงชนิดต่างๆ เพื่อทดแทนสารเฝ้าระวังใน
การป้องกันแมลงและไรศัตรูพืช
❖ สุเทพ สหายา

โครงการวิจัย ชีววิทยาและศักยภาพของมวนตัวห้ำ *Cardiastethus exiguus* Poppius (Hemiptera: Anthocoridae) ในการกำจัดแมลงและไรศัตรูพืช

กิจกรรม -

กิจกรรมย่อย –

การทดลอง ➢ชีววิทยาและศักยภาพของมวนตัวห้ำ 2654
Cardiastethus exiguus Poppius (Hemiptera:
Anthocoridae) ในการกำจัดแมลงและไรศัตรูพืช
00-00-57-18-00-00-01-57
❖ อทิติยา แก้วประดิษฐ์ และคณะ

โครงการวิจัย การศึกษาชีววิทยาและประสิทธิภาพของมวนตัวห้ำบางชนิดในสกุล *Orius* sp. เพื่อควบคุมเพลี้ยไฟศัตรูพืช

กิจกรรม -

กิจกรรมย่อย –

การทดลอง ➢การศึกษาชีววิทยาและประสิทธิภาพของ..... 2665
มวนตัวห้ำบางชนิดในสกุล *Orius* sp.
เพื่อควบคุมเพลี้ยไฟศัตรูพืช
00-00-57-19-00-00-01-57
❖ สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี และคณะ

โครงการวิจัย อุณหภูมิและสภาพที่เหมาะสมต่อการกำจัดแมลงศัตรูในพิพิธภัณฑ์

กิจกรรม -

กิจกรรมย่อย –

การทดลอง ➢อุณหภูมิและสภาพที่เหมาะสมต่อ ✪..... 2670
การกำจัดแมลงศัตรูในพิพิธภัณฑ์
00-00-57-20-00-00-01-57
❖ อาทิตย์ รักกสิกร และคณะ

โครงการวิจัย ความหลากชนิดและการป้องกันกำจัดหอยศัตรูพรรณไม้น้ำประดับ

กิจกรรม -

กิจกรรมย่อย –

การทดลอง ➢ความหลากชนิดของหอยศัตรูพรรณไม้น้ำส่งออก
❖ อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข
➢ความหลากชนิดและการป้องกันกำจัด ✪..... 2682
หอยศัตรูพรรณไม้น้ำประดับ
❖ อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข และคณะ

โครงการวิจัย การศึกษาชีววิทยาและการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) ในพุทรา และน้อยหน่า

กิจกรรม -

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢การศึกษาชีววิทยาและการเข้าทำลาย ✪..... 2694
ของแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera dorsalis*
(Hendel) (Diptera: Tephritidae)
ในพุทรา และน้อยหน่า
❖ กรกต ดำรักษ์ และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ด้วยการแช่น้ำร้อนสำหรับมะม่วงเพื่อการส่งออก

กิจกรรม วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดศัตรูพืชกักกันเพื่อการส่งออก

กิจกรรมย่อย -

การทดลอง ➢วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงวันผลไม้ชนิด ✪..... 2708
Bactrocera dorsalis (Hendel) ด้วยการ
แช่น้ำร้อนสำหรับมะม่วงเพื่อการส่งออก
00-00-57-23-01-00-01-57
❖ สัญญาณี ศรีคชา และคณะ

หมายเหตุ : ✪ ชื่อการทดลองที่นักวิจัยแจ้งไม่ตรงกับชื่อการทดลองจากกองแผนงาน
⌘ มีเพียงการทดลองเดียวแต่นักวิจัยส่งรายงานผลงานวิจัยซ้ำกันสองเรื่อง จึงกำหนดเพิ่มเติมการทดลองในรหัส 8 คู่ด้วยตัวเลข (1) และ (2)
* ชื่อหัวหน้าการทดลองไม่ตรงกับกองแผนงาน

การศึกษาชนิดแมลงศัตรูพืชส่งออก ได้แก่ เผือก และฟักทอง พืชนำเข้า ได้แก่ มันสำปะหลัง และยาสูบ

Insect Pest Species of Imported and Exported Crops

เกศสุดา สนศิริ จารุวัตถ์ แต้กุล สุนัดดา เชาวลิต
ชมัยพร บัวมาศ อิทธิพล บรรณาการ
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จากการสำรวจรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูพืชทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจากพืชนำเข้า 2 พืช ได้แก่ มันสำปะหลัง และยาสูบ และพืชส่งออก 2 พืช ได้แก่ เผือก และฟักทอง ระหว่างเดือนตุลาคม 2556 – เดือกันยายน 2557 จากแหล่งปลูกพืชในจังหวัดสุโขทัย เชียงราย เชียงใหม่ แพร่ พะเยา นครปฐม เพชรบุรี สระบุรี กาญจนบุรี ลพบุรี นครราชสีมา เพชรบูรณ์ พิษณุโลก และนครสวรรค์ นำตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์ชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน รวมทั้งตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน ในการศึกษาครั้งนี้พบแมลงศัตรูพืช 4 อันดับ 7 วงศ์ 12 ชนิด โดยพบใน มันสำปะหลัง 1 อันดับ 2 วงศ์ 5 ชนิด ได้แก่ อันดับ Hemiptera 2 วงศ์ 5 ชนิด ยาสูบ 3 อันดับ 4 วงศ์ 4 ชนิด ได้แก่ อันดับ Hemiptera 2 วงศ์ 2 ชนิด Lepidoptera 1 วงศ์ 1 ชนิด และอันดับ Thysanoptera 1 วงศ์ 1 ชนิด เผือก 2 อันดับ 3 วงศ์ 3 ชนิด ได้แก่ อันดับ Hemiptera 2 วงศ์ 2 ชนิด และอันดับ Thysanoptera 1 วงศ์ 1 ชนิด ฟักทอง 3 อันดับ 3 วงศ์ 4 ชนิด ได้แก่ อันดับ Coleoptera 2 วงศ์ 2 ชนิด อันดับ Diptera 1 วงศ์ 1 ชนิด และอันดับ Lepidoptera 1 วงศ์ 1 ชนิด

คำสำคัญ : แมลงศัตรูพืช พืชนำเข้า พืชส่งออก เผือก ฟักทอง มันสำปะหลัง ยาสูบ

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-01-00-07-57

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม รายได้จากการส่งออกของประเทศส่วนใหญ่มาจากสินค้าเกษตร เช่น ไม้ดอก พืชผัก และไม้ผล จากการเปิดเสรีทางการค้าทำให้ประเทศไทยในฐานะประเทศสมาชิกองค์การค้าโลก (World Trade Organization) ต้องปฏิบัติตามกฎเกณฑ์เกี่ยวกับการค้าสินค้าเกษตร ภายใต้ความตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการด้านสุขอนามัย และสุขอนามัยพืช (Agreement on Application of Sanitary and Phytosanitary Measure หรือ SPS) ซึ่งระบุไว้ชัดเจนว่า ประเทศสมาชิกมีสิทธิ์และพันธกรณีพื้นฐาน (right and obligation) ในการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชจากต่างประเทศ มิให้เข้าไปเป็นอันตรายหรือเกิดความเสียหายต่อสุขภาพมนุษย์ สัตว์ พืชและสิ่งแวดล้อม (อรุณี, 2543) วิธีการปฏิบัติคือประเทศผู้นำเข้าสินค้าเกษตรต้องมีการตรวจสอบศัตรูพืช โดยวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis : PRA) อาจจะเป็นโรคพืช แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช หรือวัชพืชที่ติดมากับสินค้าเกษตรที่นำเข้า โดยประเทศผู้นำเข้าจะขอบัญชีรายชื่อและข้อมูลศัตรูพืชแต่ละชนิดของสินค้าเกษตรที่จะนำเข้านั้น ๆ ซึ่งประเทศผู้ส่งออกจะต้องเป็นผู้จัดทำ หากประเทศผู้ส่งออกไม่มีบัญชีรายชื่อศัตรูพืชพร้อมข้อมูลที่สมบูรณ์ครบถ้วนตามความต้องการของผู้นำเข้า ทำให้ประเทศผู้นำเข้าไม่มีข้อมูลเพียงพอเพื่อนำไปประกอบในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช อาจมีผลทำให้เกิดปัญหาต่อการอนุญาตให้นำเข้าสินค้าเกษตรนั้น ซึ่งปัจจุบันนับว่าเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างมากสำหรับประเทศที่ต้องการส่งออกหรือนำเข้าสินค้าเกษตร ซึ่งหลายประเทศมีความตื่นตัวและเร่งดำเนินการจัดทำบัญชีข้อมูลรายละเอียดศัตรูพืชเพื่อพร้อมในการเจรจาการค้าระหว่างประเทศ

การศึกษาชนิดแมลงศัตรูพืชนำเข้า ได้แก่ มันสำปะหลัง (Cassava; *Manihot esculenta* (L.)) และยาสูบ (Tobacco; *Nicotiana tabacum* L. และพืชส่งออก 2 พืช ได้แก่ เผือก (Taro; *Colocasia esculenta* (L.) และฟักทอง (Pumpkin; *Cucurbia moschata* Decne.) (เริ่มตุลาคม 2556 ถึงกันยายน 2557) ซึ่งประเทศไทยกำลังเตรียมข้อมูลเพื่อส่งออกไปยังประเทศเครือรัฐออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา อิหร่าน นิวซีแลนด์ ก็มีความจำเป็นต้องเร่งดำเนินการเช่นกัน เพื่อได้ข้อมูลบัญชีรายชื่อที่พร้อมให้ประเทศคู่ค้าได้นำไปวิเคราะห์ความเสี่ยง เพื่อประกอบการพิจารณาการนำเข้าพืชเหล่านี้จากประเทศไทย ซึ่งงานลักษณะนี้เป็นงานที่มีวัตถุประสงค์หลัก เพื่อจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืช ที่ถูกต้องตามหลักวิทยาศาสตร์ สำหรับเป็นข้อมูลในการสนับสนุนการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างแมลงศัตรูพืช
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บรวบรวมแมลงศัตรูพืช ได้แก่ สวิงจับแมลง ขวดฆ่าแมลงที่บรรจุสารเอทธิลอะซีเตท กระดาษแข็งขนาด A4 ขวดดองแมลงพร้อมแอลกอฮอล์ 70-80% ขวดพร้อมน้ำยา

เก็บรักษาตัวอย่างเพลี้ยไฟเอจีเอ (AGA) ซึ่งเป็นส่วนผสมของแอลกอฮอล์ 60% 10 ส่วน กลีเซอรีน 1 ส่วน และกรดน้ำส้ม 1 ส่วน ปากคีบ ซองกระดาษสามเหลี่ยม พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก กล่องรักษาความเย็น ถังแช่ตัวอย่างแมลง ไม้จัดรูปร่างตัวอย่างแมลง เข็มไร้สนิม ตู้อบตัวอย่างแมลง หีบไม้/ตู้เก็บตัวอย่างแมลง การบูร โหลชี้น

3. อุปกรณ์และสารเคมีทำสไลด์ถาวร

3.1 อุปกรณ์ แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ (Cover glass) เข็มเขี่ย หลอดดูด กระจกนาฬิกา บีคเกอร์ หลอดแก้วทดลอง เตาไฟฟ้า ตู้อบแผ่นสไลด์

3.2 สารเคมี น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ 60-100% โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 5% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% คาร์บอลไซลีน (Carbol xylene) ซึ่งเป็นสารละลายของไซลีน 3 ส่วนและผลึกกรดคาร์โบลิค (Carbolic acid crystal) 1 ส่วน กรดเกลือ (Hydrochlorlic acid) 10% สารละลายเอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alcohol) น้ำยาย้อมสีซึ่งเป็นสารละลายของแอซิดฟุชชิน (Acid fuchsin) 0.5 กรัม และกรดเกลือ 10% 25 มิลลิลิตร สารละลายคาร์บอนไซลอล (Carbon-xylol) ซึ่งมีส่วนผสมของไซลีน 90 ส่วน กับฟีนอล 10 ส่วน แลคติกแอซิด (Lactic acid) โคลฟออย (Clove oil) แคนาดาบัลซัม (Canada balsum)

4. อุปกรณ์ในการวาดภาพ กล้องถ่ายรูป กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo microscope และชนิด Compound microscope

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของแมลงศัตรูพืชนำเข้า ได้แก่ มันสำปะหลัง และยาสูบ ในพืชส่งออก 2 พืช ได้แก่ เผือก และฟักทอง จากเอกสารที่มีรายงานเกี่ยวกับแมลงศัตรูพืชทั้งในและต่างประเทศ

2. สำรวจ รวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูพืชโดยวางแผนการสำรวจ อย่างมีระบบ สำรวจแบบเฉพาะเจาะจง โดยทำการสำรวจแบบตรวจหา กำหนดพื้นที่ ทำการสุ่มตรวจโดยเดินเป็นแถว เว้น 2 แถว และแต่ละแถวสุ่มตรวจต้นห่างกัน 5 ต้น จากแหล่งปลูกพืชทั้ง 2 พืช โดยใช้สวิงโฉบ/เคาะหรือเขย่ากิ่ง ต้น หรือดอกของพืชเพื่อให้แมลงศัตรูพืชตกลงบนอุปกรณ์ที่รองรับ หรือตัดใบ/กิ่ง/ยอดของพืชที่มีแมลงศัตรูพืชเกาะอาศัยด้วยกรรไกรตัดกิ่ง ใช้พู่กันเขี่ยแมลงศัตรูพืชที่พบใส่ขวดที่บรรจุน้ำยาดอง หรือนำตัวอย่างแมลงศัตรูพืชพร้อมพืชใส่ถุงพลาสติก กล่องพลาสติก หรือถุงกระดาษ เก็บตัวอย่างดังกล่าวในกล่องรักษาความเย็น ภายในบรรจุน้ำแข็งแห้งเพื่อรักษาตัวอย่างให้สดอยู่เสมอ หากตัวอย่างที่รวบรวมได้อยู่ในระยะตัวอ่อน เช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยแป้ง เพลี้ยหอย เพลี้ยอ่อน หนอนผีเสื้อ หนอนแมลงวันผลไม้ ฯลฯ ต้องนำตัวอย่างไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนเป็นตัวเต็มวัย

3. บันทึกรายละเอียดของแมลงศัตรูพืช และข้อมูลอื่นที่สำคัญ ได้แก่ ชนิดของพืช ส่วนของพืชที่พบตัวอย่าง ลักษณะการทำลาย วัน/เดือน/ปี สถานที่ และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง รวมทั้งบันทึกโดยการถ่ายภาพ

4. นำตัวอย่างที่บันทึกรายละเอียดไปจัดเตรียมตัวอย่างแมลง เพื่อวิเคราะห์ชนิดโดยการจัดรูปร่างหรือทำสไลด์ถาวรแมลงแต่ละชนิด

5. นำตัวอย่างจากข้อ 4 ไปตรวจวิเคราะห์ชนิด โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดแมลงศัตรูพืชและเอกสารรายงานถึงชนิดศัตรูพืชที่พบในประเทศไทยจาก CABI (2003), CABI (2007), Flint (1991), Pholboon (1965) และWongsiri (1991) ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง

6. จัดทำป้ายและบันทึกข้อมูลรายละเอียดบนป้ายบันทึกกำกับตัวอย่างแมลง ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ พืชอาหาร วัน/เดือน/ ปี สถานที่ และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง รวมทั้ง วัน/เดือน/ปี และชื่อผู้วิเคราะห์ชนิด

7. นำตัวอย่างแมลงศัตรูพืชที่ได้ศึกษาวิจัยทั้งหมด เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของพิพิธภัณฑ์สิ่งสำคัญของการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List) จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีตัวอย่างจริงของแมลงศัตรูพืชทุกชนิดที่ได้รายงาน เก็บรักษาไว้เพื่อการตรวจสอบ/สืบค้น/อ้างอิง

การบันทึกข้อมูล

บันทึกรายละเอียดของแมลงศัตรูพืช ส่วนของพืชที่พบตัวอย่าง ลักษณะการทำลาย วัน/เดือน/ปี สถานที่ แหล่งที่พบ พิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง รวมทั้งบันทึกโดยการถ่ายภาพ

เวลาและสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2556 ถึง เดือนกันยายน 2557

สถานที่ 1. แปลงปลูก มันสำปะหลัง ยาสูบ เผือก และฟักทอง ในจังหวัดต่างๆ ทุกภาคของประเทศไทย

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาชนิดแมลงศัตรูพืชเพื่อการนำเข้าและส่งออก ระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนกันยายน 2557 ในพืชนำเข้า 2 พืช ได้แก่ มันสำปะหลัง และยาสูบ พืชส่งออก 2 พืช ได้แก่ เผือก และฟักทอง โดยสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลง จากแหล่งปลูกจังหวัด สุโขทัย เชียงราย เชียงใหม่ แพร่ พะเยา นครปฐม เพชรบุรี สระบุรี กาญจนบุรี ลพบุรี นครราชสีมา เพชรบูรณ์ พิษณุโลก และนครสวรรค์ พบแมลงศัตรู ดังนี้ **มันสำปะหลัง** พบแมลงศัตรูพืช 5 ชนิด อยู่ในอันดับ Hemiptera 5 ชนิด ได้แก่ แมลงหวี่ขาวใยเกลียว *Aleurodicus dispersus* Russell แมลงหวี่ขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius) เพลี้ยแป้งลาย *Ferrisia virgate* (Cockerell) เพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีเทา *Pseudococcus jackbeardleyi* Gimple เพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *Phenacoccus manihoti*

Matile-Ferrero **ยาสูบ** พบแมลงศัตรูพืช 4 ชนิด อยู่ในอันดับ Hemiptera 2 ชนิด ได้แก่ แมลงหวี่ขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius) เพลี้ยอ่อนยาสูบ *Myzus persicae* (Sulzer) อันดับ Lepidoptera 1 ชนิด ได้แก่ หนอกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (F.) อันดับ Thysanoptera 1 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยไฟ *Thrips tabaci* Lindeman **เผือก** พบแมลงศัตรูพืช 3 ชนิด อยู่ในอันดับ Hemiptera 2 ชนิด ได้แก่ แมลงหวี่ขาวใยเกลียว *Aleurodicus dispersus* Russell และเพลี้ยอ่อนฝ้าย *Aphis gossipii* Glover อันดับ Lepidoptera 1 ชนิด ได้แก่ หนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (F.) **ฟักทอง** พบแมลงศัตรูพืช 4 ชนิด อยู่ในอันดับ Coleoptera 2 ชนิด ได้แก่ ด้วงเต่าแตงดำ *Aulacophora frontalis* Baly ด้วงเต่าแตงแดง *Aulacophora indica* (Gmelin) อันดับ Diptera 1 ชนิด ได้แก่ แมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae* Coquillett อันดับ Lepidoptera 1 ชนิด ได้แก่ หนอกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (F.) และมีแมลงศัตรูพืชบางส่วนอยู่ในกระบวนการอบแห้ง เพื่อทำการจำแนกชนิดต่อไป นำตัวอย่างแมลงศัตรูพืชที่ได้รวบรวมได้ทั้งหมด เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลงเพื่อรอการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการศึกษาชนิดแมลงศัตรูพืชเพื่อการนำเข้าและส่งออก ระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนกันยายน 2557 พบแมลงศัตรูพืชทั้งหมด 4 อันดับ 7 วงศ์ 12 ชนิด โดยพบใน มันสำปะหลัง 1 อันดับ 2 วงศ์ 5 ชนิด ได้แก่ อันดับ Hemiptera 2 วงศ์ 5 ชนิด ยาสูบ 3 อันดับ 4 วงศ์ 4 ชนิด ได้แก่ อันดับ Hemiptera 2 วงศ์ 2 ชนิด Lepidoptera 1 วงศ์ 1 ชนิด และอันดับ Thysanoptera 1 วงศ์ 1 ชนิด เผือก 2 อันดับ 3 วงศ์ 3 ชนิด ได้แก่ อันดับ Hemiptera 2 วงศ์ 2 ชนิด และอันดับ Thysanoptera 1 วงศ์ 1 ชนิด ฟักทอง 3 อันดับ 3 วงศ์ 4 ชนิด ได้แก่ อันดับ Coleoptera 2 วงศ์ 2 ชนิด อันดับ Diptera 1 วงศ์ 1 ชนิด และอันดับ Lepidoptera 1 วงศ์ 1 ชนิด

การศึกษาในครั้งนี้นอกจากจะเป็นการสำรวจศัตรูพืชในพืชทั้ง 4 ชนิดแล้ว ยังนำตัวอย่างแมลงศัตรูพืชที่พบมาศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานโดยการตรวจวิเคราะห์ชนิดและสืบค้นข้อมูลที่เป็นปัจจุบัน รวมทั้งได้จัดเก็บตัวอย่างแมลงทั้งหมดไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อการยืนยัน ตรวจสอบ และอ้างอิง ซึ่งจะเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืชนำเข้าและส่งออก และสามารถนำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชที่ได้ไปใช้ในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชนำเข้าทั้ง 2 พืช ตลอดจนสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประกอบในการพิจารณาเพื่อกำหนดแมลงศัตรูพืชกักกัน อีกทั้งยังใช้เป็นหลักฐานในการเจรจาต่อรองทางการค้า และกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าพืชตามพระราชบัญญัติกักพืช ซึ่งการศึกษาเกี่ยวกับชนิดของศัตรูพืชเพื่อประโยชน์ทางการค้าจำเป็นอย่างยิ่งจะต้องศึกษาอย่างต่อเนื่องและเตรียมพร้อมข้อมูลให้เป็นปัจจุบันตลอดเวลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้องประสานกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อกำหนดลำดับความสำคัญของพืชหรือสินค้าเกษตร ที่ต้องการนำเข้าหรือส่งออก นอกจากนี้ควรมีการรวบรวมรายชื่อแมลงศัตรูพืชทั้งหมดที่ได้ศึกษา จัดพิมพ์เป็นเอกสารให้

สมบูรณ์ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นหลักฐานทางเอกสารวิชาการที่เป็นปัจจุบันต่อไป ทั้งนี้เพื่อประโยชน์สูงสุดของประเทศไทยในการเจรจาต่อรองการค้ากับประเทศคู่ค้า

เอกสารอ้างอิง

อรุณี วงษ์กอบรัษฎ์. 2543. การจัดทำบัญชีรายชื่อแมลง ไร และสัตว์ศัตรูพืช. เอกสารประกอบการบรรยายพิเศษการประชุมสัมมนา เรื่อง “การจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List) และการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis) เพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร” วันที่ 26 กันยายน 2543 ณ โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ.

Abbott, R.T. 1989. Compendium of landshell. Melbourne,Australia : American Malacologist,Inc.

CABI. 2003. Crop Protection Compendium. CAB International. Wallingford, UK.

CABI. 2007. The 2007 Edition of The Crop Protection Compendium. CD-ROM. CAB International, Wallingford, UK. CD-ROM.

Flint, M.L. 1991. Integrated Pest Management for Citrus (Second edition). University of California Statewide Integrated Pest Management Project, Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 3303.

Laws,H.M.1973.The chromosome of some Australian camaenidland snails. Cytologia. 38:p. 229-235

Panha, S. 1996. A Checklist and classification of the terrestrial Pulmonate snails of Thailand. Walkerana. 8 (19): 11-64.

Pholboon, P. 1965. A Host List of The Insects of Thailand. Department of Agriculture. Thailand.

Vaught, K.C. 1989. A classification of the living mollusca. U.S.A. : *American Malacologists*.

Wongsiri, N. 1991. List of Insect, Mite and Other Zoological Pests of Economic Plants in Thailand. Entomology and Zoology Division. Department of Agriculture. Bangkok. Thailand.

ภาคผนวก

Table 1 Lists of Insect Pests of Cassava (*Manihot esculenta* (L.))
(October 2013 – September 2014)

Order	Family	Common Name	Scientific Name	Distribution	Affected plant parth
Hemiptera	Aleyrodidae	Spiralling Whitefly	*Aleurodicus disperses* Russell	Nakhon Ratchasima, Phitsanulok, Phetchabun	leaf
Hemiptera	Aleyrodidae	Tobacco Whitefly	*Bemisia tabaci* (Gennadius)	Nakhon Ratchasima, Phayao Phetchabun, Phrae, Phitsanulok,	leaf
Hemiptera	Pseudococcidae	Stripe mealybug	*Ferrisia virgata* (Cockerell)	Sukhothai, Phrae, Nakhon Ratchasima, Kanchanaburi, Phitsanulok	all parts
Hemiptera	Pseudococcidae	*Jackbeardsley mealybug*	*Pseudococcus jackbeardleyi* Gimple & Miller	Nakhon Ratchasima, Saraburi, Phetchabun, Phitsanulok	all parts
Hemiptera	Pseudococcidae	Pink cassava mealybug	*Phenacoccus manihoti* Matile Ferrero	Kanchanaburi, Phrae, Nakhon Ratchasima, Saraburi	all parts

Table 2 Lists of Insect Pests of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)
(October 2013 – September 2014)

Order	Family	Common Name	Scientific Name	Distribution	Affected plant parth
Hemiptera	Aleyrodidae	Tobacco Whitefly	*Bemisia tabaci* (Gennadius)	Nakhon Ratchasima, Phayao, Phetchabun, Phrae, Phitsanulok	leaf
Hemiptera	Aphididae	Peach-potato aphid	*Myzus persicae* Sulzer	Sukhothai, Phayao, Chiang Mai, Chiang rai	leaf shoot flower
Lepidoptera	Noctuidae	Common cutworm	*Spodoptera litura* (Fabricius)	Sukhothai, Phayao, Chiang Mai, Chiang rai	leaf shoot flower
Thysanoptera	Thripidae	Onion Thrips	*Thrips tabaci* Lindeman	Sukhothai, Phayao, Chiang Mai, Chiang rai	leaf

Table 3 Lists of Insect Pests of Taro (*Colocasia esculenta* (L.)
(October 2013 – September 2014)

Order	Family	Common Name	Scientific Name	Distribution	Affected plant parth
Hemiptera	Aleyrodidae	Spiralling Whitefly	*Aleurodicus disperses* Russell	Phetchaburi	leaf
Hemiptera	Aphididae	Cotton aphid	*Aphis gossipii Glover*	Chiang Mai, Nakhon Pathom, Saraburi, Phetchaburi Kanchanaburi,	leaf
Lepidoptera	Noctuidae	Common cutworm	*Spodoptera litura* (Fabricius)	Chiang Mai, Nakhon Pathom, Kanchanaburi, Phetchaburi	leaf

Table 4 Lists of Insect Pests of Pumpkin (*Cucurbita moschata* Decne)
(October 2013 – September 2014)

Order	Family	Common Name	Scientific Name	Distribution	Affected plant parth
Coleoptera	Chrysomelidae	Black cucurbit beetle	*Aulacophora frontalis* Baly	Phayao, Chiang rai, Sukhothai, Nakhon Ratchasima, Lopburi	leaf shoot
Coleoptera	Chrysomelidae	Cucurbit Leaf Beetle	*Aulacophora indica* (Gmelin)	Phayao, Chiang rai, Nakhon Ratchasima, Lop buri	leaf shoot
Diptera	Tephritidae	Melon fly	*Bactrocera cucurbitae* Coquillett	Nakhon Ratchasima, Lop buri	leaf shoot

การศึกษาชนิดของ โรคพืชของพืชส่งออก ได้แก่ เผือก และ ฟักทอง พืชนำเข้า ได้แก่ มันสำปะหลังและยาสูบ

Diseases Survey and Diagnosis for Exported Plant: Taro and Pumpkin, Imported plant: Cassava and Tobacco

พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ ชนินทร ดวงสอาด
ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ธิติยา สารพัฒน์ เยาวภา ตันติวานิช
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สืบค้นข้อมูลโรคพืชของพืชส่งออก ได้แก่ เผือก และ ฟักทอง พืชนำเข้า มันสำปะหลัง และยาสูบ ที่เกิดในประเทศไทย

จากผลการสำรวจ โรคพืชของพืชส่งออก ได้แก่ เผือก และ ฟักทอง พืชนำเข้าได้แก่ มันสำปะหลังและยาสูบ ในช่วงเดือนตุลาคม 2556 – เดือนกันยายน 2557 จำนวน 8 ครั้ง .ในจังหวัดกาญจนบุรี ชลบุรี เชียงใหม่ นครปฐม นครราชสีมา นครสารรค์ ตาก มหาสารคาม บึงกาฬ เพชรบุรี เพชรบูรณ์ แพร่ ระยอง ร้อยเอ็ด ราชบุรี ลพบุรี ลำปาง สระบุรี หนองคาย ได้ทำการสำรวจโรคของเผือก จำนวน 59 แปลง ศึกษาชนิดของเชื้อสาเหตุพบโรคใบจุดตาเสือ โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคใบจุด โรคหัวเน่า และโรคเน่าและสาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย สำรวจโรคของฟักทอง จำนวน 21 แปลง ศึกษาชนิดของเชื้อสาเหตุพบโรคเน่าเปียก โรคราน้ำค้าง โรคราแป้ง โรคใบจุด และโรคไวรัส สำรวจโรคของมันสำปะหลัง จำนวน 99 แปลง ศึกษาชนิดของเชื้อสาเหตุพบโรคใบจุด โรคแอนแทรคโนส โรคใบไหม้ อาการพุ่มแจ้ และ สำรวจโรคของยาสูบ จำนวน 164 แปลง ศึกษาชนิดของเชื้อสาเหตุพบโรคใบจุดสีน้ำตาล โรคราแป้ง โรคเหี่ยวด้านเดียว โรคตากบ โรคใบจุด โรคไวรัส ได้แก่ โรคใบหด โรคใบด่าง โรคใบด่างแตง โรคแผลละเอียด และอาการขาดธาตุโบรอน

เก็บรักษาตัวอย่างแห้งโรคในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จำนวน 535 ตัวอย่าง

คำสำคัญ: โรคพืชส่งออก โรคพืชนำเข้า เผือก ฟักทอง มันสำปะหลัง ยาสูบ

Key words: Diagnosis for Exported Plant, Taro, Pumpkin, Cassava, Tobacco

---

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-01-00-08-57

คำนำ

ในปัจจุบันการนำสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออกและนำเข้านั้นจะต้องมีข้อมูลการระบาดของศัตรูพืชของประเทศที่จะส่งสินค้าออกและประเทศคู่ค้า และประเทศไทยเป็นสมาชิกขององค์การการค้าโลก โดยสมาชิกมีพันธกรณีต้องปฏิบัติภายใต้ข้อตกลงด้วยการใช้บังคับมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement of Application of Sanitary and Phytosanitary Measures, SPS Agreement) สำหรับพืชส่งออก ได้แก่ เผือกและฟักทอง ประเทศไทยมีการส่งออกพืชทั้งสองชนิดไปยังหลายประเทศ ประเทศผู้นำเข้าต้องมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูของสินค้าเกษตร ในขณะเดียวกันการนำเข้าสินค้าเกษตร ได้แก่ มันสำปะหลังและยาสูบ ซึ่งประเทศไทยก็ต้องทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ดังนั้นการสำรวจ การประเมินความรุนแรง และการจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุของโรคเผือก ฟักทอง มันสำปะหลัง และยาสูบ จึงมีความสำคัญ เนื่องจากได้บัญชีรายชื่อโรคของพืชทั้งสองชนิดซึ่งเป็นข้อมูลการระบาด และความรุนแรงของโรคในปัจจุบัน ตลอดจนทราบชนิดสาเหตุของโรค เพื่อนำข้อมูลเหล่านี้ไปวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืชต่อไป โดยการนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาอนุกรมวิธานทั้งหมดไปจัดทำข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List) ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญอย่างยิ่งที่ต้องส่งให้ประเทศคู่ค้าได้นำไปพิจารณาก่อนนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศไทย ในขณะเดียวกันข้อมูลด้านอนุกรมวิธานก็ใช้เป็นข้อมูลสำคัญของประเทศ สำหรับเปรียบเทียบกับข้อมูลบัญชีรายชื่อของประเทศคู่ค้าที่ส่งมา เพื่อประกอบในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis) ก่อนนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศคู่ค้านอกจากนี้ข้อมูลด้านอนุกรมวิธานยังเป็นประโยชน์ในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืชกักกัน (Quarantine Pest) เพื่อการควบคุมศัตรูพืชจากต่างประเทศไม่ให้เข้ามาแพร่กระจายในประเทศ การจัดตั้งองค์การการค้าโลก (World Trade Organization, WTO) ซึ่งทุกประเทศเห็นพ้องต้องกันในการลดกำแพงภาษีสำหรับสินค้าเกษตร เพื่อสนับสนุนให้เกิดการค้าเสรี เพื่อป้องกันมิให้มีการใช้มาตรการกีดกันไม่ใช่ภาษี (non tariff barrier, NTB) อันจะก่อให้เกิดปัญหาอุปสรรคต่อการค้าระหว่างประเทศ จึงมีความตกลงว่าด้วยการใช้บังคับมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures, SPS Agreement) ประเทศสมาชิก WTO รวมทั้งประเทศไทยจะใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชได้เท่าที่จำเป็นในการปกป้องสุขภาพของมนุษย์ สัตว์ และพืช (อนันต์, 2543) ดังนั้นประเทศผู้นำเข้าจะต้องมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis) ของพืชนำเข้าและสามารถกำหนดการห้ามนำเข้าโดยมีเหตุผลสนับสนุนเพียงพอและพิสูจน์ได้ตามหลักวิทยาศาสตร์ (อรุณี, 2543) การที่ประเทศไทยมีเขตการค้าเสรี (Free Trade Area, FTA) กับประเทศต่างๆ เพิ่มขึ้น สินค้าที่เคยมีการนำเข้าแล้วจะมีปริมาณนำเข้าเพิ่มขึ้น และยังเปิดโอกาสให้มีการนำเข้าสินค้าชนิดใหม่จากต่างประเทศอีกด้วย หากประเทศไทยไม่มีมาตรการสุขอนามัยพืชที่เข้มงวดนอกจากจะเสียเปรียบต่อประเทศคู่ค้าแล้วอาจก่อให้เกิดปัญศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่เคยพบในประเทศติดเข้ามากับสินค้าได้ซึ่งจะแพร่กระจายและเพิ่มปริมาณจนเกิดเป็นการระบาดของศัตรูพืชชนิดใหม่ขึ้น ส่งผลเสียต่อเศรษฐกิจของประเทศอย่างโดยเฉพาะการเกษตรกรรม จึงจำเป็นจะต้องมีมาตรการสุขอนามัยพืชกับพืชที่มีการนำเข้าทั้งหมด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสินค้าที่มีปริมาณนำเข้ามากมาจากแหล่งที่มีความเสี่ยงศัตรูพืชสูง จะ

มีศัตรูพืชเล็ดลอดติดเข้ามาโดยต้องเร่งทำการวิจัยเกี่ยวกับด้านชนิด จำนวนของศัตรูพืช เพื่อที่จะได้จัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชที่พบในพืชนำเข้า 2 ชนิด และพืชส่งออก 2 ชนิด เพื่อไว้ตรวจสอบกับบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืชที่ประเทศคู่ค้าส่งมา รวมทั้งนำไปเป็นข้อมูลสำคัญของฝ่ายกักกันพืชในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สารเคมีได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ : สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75%

2. อาหารวุ้นสังเคราะห์ potato dextrose agar (PDA), half strength potato dextrose agar (1/2 PDA), corn meal agar (CMA), V8 juice agar, RNV เป็นต้น

3. กล้องจุลทรรศน์ชนิด Light microscope (LM) และ Stereo microscope พร้อมกล้องถ่ายภาพ

4. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย ได้แก่ เครื่องแก้ว กระบอกพลาสติก กรวยแก้ว จานเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. และกระดาษกรอง (Whatman #2) เป็นต้น

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลโรคของเผือก ฟักทอง มันสำปะหลัง และยาสูบ ในประเทศไทย

สืบค้นข้อมูลโรคของเผือก ฟักทอง มันสำปะหลัง และยาสูบ ที่พบระบาดในประเทศไทยจากเอกสารต่างๆ หรือจากข้อมูลอิเลคโทรนิค

2. การสำรวจรวบรวม และศึกษาโรคของเผือก ฟักทอง มันสำปะหลัง และยาสูบ

เก็บตัวอย่างเผือก ฟักทอง มันสำปะหลัง และยาสูบ แสดงอาการโรคที่ใบ ดอก ผล กิ่ง ลำต้น และราก โดยเก็บตัวอย่างจากแหล่งปลูกต่างๆ ในประเทศไทย ห่อตัวอย่างพืชที่เก็บมาด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติค บันทึกข้อมูลสถานที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ และข้อมูลภูมิศาสตร์ พร้อมทั้งบันทึกภาพลักษณะอาการของโรค นำตัวอย่างมาศึกษาลักษณะอาการในห้องปฏิบัติการ จัดเก็บโรคพืชโดยการอัดทับเป็นตัวอย่างแห้งเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพ ฯ

3. การศึกษาสาเหตุโรคพืช

3.1 การศึกษาสาเหตุจากตัวอย่างพืชเป็นโรคโดยตรง

ศึกษาสาเหตุจากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เขี่ยเชื้อจากตัวอย่างดอก ใบ ผล กิ่ง ลำต้น ราก ที่เป็นโรคลงบนแผ่นสไลด์ (slide) แล้วตรวจเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2 การแยกราสาเหตุโรคพืช

แยกเชื้อจากส่วนที่เป็นโรคของเผือก ฟักทอง มันสำปะหลัง และยาสูบ ตัดตัวอย่างโรคพืชบริเวณเป็นรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติขนาดประมาณ 2x2 มิลลิเมตร ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวพืช

โดยแช่ชิ้นส่วนพืชลงในสารละลายโซเดียมไฮโปร์คลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้งสนิท นำชิ้นส่วนพืชมาวางบนอาหาร half strength Potato Dextrose Agar (1/2 PDA) แล้วบ่มไว้ในห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน ตรวจดูเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ตัด hyphal tip ของราที่เจริญออกมาจากชิ้นตัวอย่างพืช วางลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปศึกษารายละเอียดของราเพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุต่อไป

3.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

แยกจากส่วนของพืชที่มีอาการของโรค ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 4 ตร.มม. ระหว่างรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งแล้ว 3 ครั้ง หลังจาก surface sterilize แล้วนำมาบดในน้ำกลั่น ใช้ loop จุ่มในพืชที่บดนำมา streak บนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PSA (Potato semisynthetic agar) หลังจากนั้นเก็บจานเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 280 ซ. นาน 72 ชั่วโมง แล้วเก็บโคโลนี ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี streak plate หลาย ๆ ครั้ง เก็บ single colony เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

4. การจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคพืช

4.1 จำแนกลักษณะราสาเหตุโรคพืช

ศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophores และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่นๆ ของเชื้อรา โดยการ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ

4.2 จำแนกลักษณะแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

- จำแนกแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชตามลักษณะทาง สรีรวิทยา และสัณฐานวิทยา ศึกษาลักษณะบนอาหารสังเคราะห์ ลักษณะและสีของโคโลนี ของแบคทีเรีย
- จำแนกลักษณะสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชตามคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์

4.3 การตรวจสอบโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส

- ตรวจดูจากลักษณะอาการภายนอก

ส่วนใหญ่พืชที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายจะมีการเจริญที่ผิดปกติในส่วนต่างๆ ของพืชที่มีการเจริญเติบโต โดยเฉพาะบริเวณใบอ่อนหรือยอดอ่อน อาการผิดปกติรวมไปถึงรูปร่างและสีของใบ ดอก ผล เช่น อาการใบด่าง ดอกด่าง ผลบิดเบี้ยว ต้นพืชเตี้ยแคระแกร็นกว่าปกติ

- **การถ่ายทอดโรคโดยวิธีกล**

เป็นการทดสอบโดยการบดใบพืชที่สงสัยว่าจะมีเชื้อไวรัสในสารละลายบัฟเฟอร์ และนำน้ำคั้นไปทาลงบนพืชทดสอบที่ทำให้เกิดบาดแผลขนาดเล็กบนใบด้วยผงคาร์บอรันดัม เก็บพืชที่ปลูกเชื้อไว้ในโรงเรือนเพื่อตรวจสอบอาการของโรค

- **การถ่ายทอดโรคโดยวิธีติดตาหรือทาบกิ่ง**

เหมาะสำหรับการตรวจสอบวินิจฉัยไวรัสในพืชยืนต้น และเป็นไม้เนื้อแข็ง โดยตัดส่วนตา หรือกิ่งจากต้นพืชที่ต้องการตรวจหาเชื้อไวรัส นำมาติกตาหรือทาบกิ่งลงบนต้นกล้าของพืชชนิดเดียวกันหรือสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันที่ปราศจากโรค ถ้าต้นที่นำมาทดสอบมีเชื้อไวรัส อาการก็จะปรากที่บริเวณยอดอ่อนหรือใบอ่อนของต้นตอ

- **การถ่ายทอดโดยแมลงพาหะ**

นิยมใช้ในพืชตระกูลหญ้า หรือพืชผัก ที่ไม่สามารถใช้วิธีกลหรือติดตาได้ โดยใช้แมลงพาหะเป็นตัวนำเชื้อไวรัสจากต้นเป็นโรคไปสู่พืชทดสอบ ซึ่งอาจเป็นพืชชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันก็ได้ แมลงพาหะที่นิยมใช้ เช่น เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยกระโดด ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อไวรัส โดยการให้แมลงดูดกินต้นพืชหรือชิ้นส่วนพืชที่ต้องการตรวจสอบ ประมาณ 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้ายแมลงไปให้ดูดกินพืชทดสอบนาน 48 ชั่วโมงหรือมากกว่า และจึงกำจัดแมลงบนต้นพืชทดสอบ แล้วตรวจสอบอาการโรคภายในระยะเวลา 7-10 วัน

- **การตรวจสอบด้วยวิธีทางเซรุ่มวิทยา**

โดยอาศัยปฏิกิริยาจำเพาะที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี วิธีที่นิยมใช้ ได้แก่ Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) อาศัยหลักการพ่วงเอนไซม์บางชนิดเข้ากับแอนติบอดี เมื่อเกิดปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนจิเจน (ไวรัส) และแอนติบอดี สามารถเติมสับสเตรทลงไป เอนไซม์ที่พ่วงติดอยู่กับแอนติบอดีจะเปลี่ยนสับสเตรทให้เป็นสารประกอบที่มีสี มองเห็นได้ง่าย แสดงว่ามีเชื้อไวรัสในตัวอย่างนั้นๆ

- **การตรวจหากรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัส**

ซึ่งวิธีการที่นิยมใช้ในการตรวจมี 2 วิธีหลัก คือ

Molecular hybridization อาศัยหลักการจับคู่กันของเบสตรงกันข้ามบนเส้นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอสายเดี่ยว จึงมีการใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอสั้นๆ ที่สามารถจับคู่กับยีนหรือยีนบางส่วนของไวรัส ดีเอ็นเอจะถูกติดฉลากด้วยสารเคมี เมื่อยีนของไวรัสจับคู่กับดีเอ็นตัวตรวจ ก็สามารถติดตามดีเอ็นเอตัวตรวจด้วยวิธีการที่เหมาะสม ที่ทำให้เกิดสี ซึ่งก็แสดงว่าตัวอย่างที่ตรวจนั้นมีเชื้อไวรัส

Polymerase chain reaction (PCR) อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายคู่ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase โดยอาศัยไพรเมอร์ ซึ่งจะมีความจำเพาะเจาะจงในการจับคู่กับดีเอ็นเอแต่ละสาย โดยการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องในเครื่อง Thermocycler หรือที่เรียกกันทั่วไปว่าเครื่อง PCR เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้ดีเอ็นที่ถูกสร้างขึ้นมาจำนวนมาก สามารถตรวจดูได้โดยอาศัย gel

electrophoresis และย้อมสีด้วย ethidium bromide ซึ่งถ้าพบว่ามีปริมาณดีเอ็นจำนวนมากก็แสดงว่าตัวอย่างที่นำมาตรวจนั้นเป็นโรคไวรัส

- **วิธีการตรวจหาอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน** เพื่อตรวจลักษณะ รูปร่าง และขนาดของอนุภาคไวรัส

4.4 การแยกเชื้อไส้เดือนฝอยสาเหตุ โรคพืช

การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย โดยใช้ท่อเก็บตัวอย่างดินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 นิ้ว เก็บดินลึกประมาณ 20 เซนติเมตร โดยสุ่มเก็บจำนวน 20 จุดต่อ 1 ตัวอย่าง บันทึกวันที่เก็บตัวอย่าง ชนิดพืช ชนิดดิน อุณหภูมิของดินในขณะเก็บตัวอย่าง บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์โดยใช้เครื่อง GPS

แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและจัดจำแนก

แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดินโดยวิธีการรินผ่านตะแกรง ร่วมกับการใช้ถาดแยกตัวอย่าง (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) คงสภาพไส้เดือนฝอยใน Glycerol และทำสไลด์ถาวร (Cob's Slide) จัดจำแนกไส้เดือนฝอยโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา บันทึกภาพ

5. การทดสอบการเกิดโรค

สำหรับโรคที่พบใหม่นั้นให้ทำการพิสูจน์การเกิดโรค โดยทำการปลูกเชื้อส่วนของเผือก ฟักทอง มันสำปะหลัง และ ยาสูบ โดยทำแผลและไม่ทำแผล เปรียบเทียบกับการเกิดโรคบนส่วนที่ไม่ปลูกเชื้อด้วยวิธีเดียวกันแยกเชื้อสาเหตุจากต้นที่แสดงอาการโรค เปรียบเทียบชนิดของราสาเหตุโรคใช้ในการปลูกเชื้อ

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2556 – สิ้นสุด กันยายน 2558 **รวม** 2 **ปี**

สถานที่ - แหล่งปลูกเผือก ฟักทอง มันสำปะหลัง และยาสูบ

- ห้องปฏิบัติการโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูลโรคของเผือก ฟักทอง มันสำปะหลัง และยาสูบ

ตรวจค้นเอกสารและรวบรวมรายชื่อโรคพืชของโรคของเผือก ฟักทอง มันสำปะหลัง และยาสูบ ที่เกิดในประเทศไทยและจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืชของเผือก (Table 1) ฟักทอง (Table 2) มันสำปะหลัง (Table 3) และยาสูบ (Table 4) ที่มีรายงานในประเทศไทย พบโรคพืชเกิดจากรา แบคทีเรีย ไวรัสและไส้เดือนฝอย

2. การสำรวจรวบรวม และศึกษาโรคของเผือก ฟักทอง มันสำปะหลัง และยาสูบ

สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคชนิดต่าง ๆ ของเผือก ฟักทอง มันสำปะหลัง และยาสูบ ระหว่างเดือนกันยายน 2556 – เดือนตุลาคม 2557 จากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ได้แก่

จากผลการสำรวจ โรคพืชของพืชส่งออก ได้แก่ เผือก และ ฟักทอง พืชนำเข้าได้แก่ มัน สำปะหลังและยาสูบ ในช่วงเดือนตุลาคม 2556 – เดือนกันยายน 2557 จำนวน 8 ครั้ง .ในจังหวัด กาญจนบุรี ชลบุรี เชียงใหม่ นครปฐม นครราชสีมา นครสารรค์ ตาก มหาสารคาม บึงกาฬ เพชรบุรี เพชรบูรณ์ แพร่ ระยอง ร้อยเอ็ด ราชบุรี ลพบุรี ลำปาง สระบุรี หนอยคาย ได้ทำการสำรวจโรคของเผือก จำนวน 59 แปลง ศึกษาชนิดของเชื้อสาเหตุพบโรคใบจุดตาเสือสาเหตุเกิดจากรา *Phytophthora colocasiae* โรคใบจุดสีน้ำตาลสาเหตุเกิดจาก *Cladosporium colocasiae* โรคจุดสาเหตุเกิดจากรา *Leptosphaerulina trifolii* และ *Pseudocercospora* และ *Cercospora* โรคหัวเน่าสาเหตุเกิดจากรา *Sclerotium rolfsii* และโรคเน่าเละสาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย สำรวจโรคของฟักทอง จำนวน 21 แปลง ศึกษาชนิดของเชื้อสาเหตุพบโรคเน่าเปียกสาเหตุเกิดจาก *Choanephora cucurbitarum* โรคราน้ำค้างสาเหตุเกิดจากรา *Pseudoperospora cubensis* โรคราแป้งสาเหตุเกิดจากรา *Oidium* sp. โรคใบจุดสาเหตุเกิดจากรา *Pseudocercospora* และโรคไวรัส สำรวจโรคของมันสำปะหลัง จำนวน 99 แปลง ศึกษาชนิดของเชื้อสาเหตุพบโรคใบจุดสาเหตุเกิดจากรา *Cercospora*, *Passalora* โรคแอนแทรคโนสสาเหตุเกิดจากรา *Colletotrichum gloeosporioides* โรคใบไหม้สาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย โรคพุ่มแจ้สาเหตุเกิดจากราไฟโตพลาสมา และ สำรวจโรคของยาสูบ จำนวน 164 แปลง ศึกษาชนิดของเชื้อสาเหตุพบโรคใบจุดสีน้ำตาลสาเหตุเกิดจากรา Alternaria โรคราแป้ง โรคเหี่ยวด้านเดียวสาเหตุเกิดจากรา *Fusarium* โรคตากบสาเหตุเกิดจากรา *Cercospora nicotonae* โรคใบจุดสาเหตุเกิดจากรา *Pseudocercospora, Cladosporium* โรคไวรัส ได้แก่ โรคใบหด โรคใบด่าง โรคใบด่างแตง โรคแผลละเอียด และอาการขาดธาตุโบรอน

เก็บรักษาตัวอย่างแห้งโรคในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จำนวน 535 ตัวอย่าง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สืบค้นข้อมูลโรคพืชของพืชส่งออก ได้แก่ เผือก และ ฟักทอง พืชนำเข้า มันสำปะหลัง และยาสูบ ที่เกิดในประเทศไทย

จากผลการสำรวจ โรคพืชของพืชส่งออก ได้แก่ เผือก และ ฟักทอง พืชนำเข้าได้แก่ มัน สำปะหลังและยาสูบ ในช่วงเดือนตุลาคม 2556 – เดือนกันยายน 2557 จำนวน 8 ครั้ง .ในจังหวัด กาญจนบุรี ชลบุรี เชียงใหม่ นครปฐม นครราชสีมา นครสารรค์ ตาก มหาสารคาม บึงกาฬ เพชรบุรี เพชรบูรณ์ แพร่ ระยอง ร้อยเอ็ด ราชบุรี ลพบุรี ลำปาง สระบุรี หนองคาย ได้ทำการสำรวจโรคของเผือก จำนวน 59 แปลง ศึกษาชนิดของเชื้อสาเหตุพบโรคใบจุดตาเสือ โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคใบจุด โรคหัวเน่า และโรคเน่าเละสาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย สำรวจโรคของฟักทอง จำนวน 21 แปลง ศึกษาชนิดของเชื้อสาเหตุพบโรคเน่าเปียก โรคราน้ำค้าง โรคราแป้ง โรคใบจุด และโรคไวรัส สำรวจโรคของมันสำปะหลัง จำนวน 99 แปลง ศึกษาชนิดของเชื้อสาเหตุพบโรคใบจุด โรคแอนแทรคโนส โรคใบไหม้

อาการพุ่มแจ้ และ สำรวจโรคของยาสูบ จำนวน 164 แปลง ศึกษาชนิดของเชื้อสาเหตุพบโรคใบจุดสีน้ำตาล โรคราแป้ง โรคเหี่ยวด้านเดียว โรคตากบ โรคใบจุด โรคไวรัส ได้แก่ โรคใบหด โรคใบด่าง โรคใบด่างแตง โรคแผลละเอียด และอาการขาดธาตุโบรอน

เก็บรักษาตัวอย่างแห้งโรคในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จำนวน 535 ตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เล่มที่ 15. 2534.. โรคของยาสูบ http://kanchanapisek.or.th/kp6/New/sub/book/book.php?book=15&chap=3&page=t15-3-nfodetail10.html (27 มีนาคม 2556)

กองโรควิทยา. 2555. *คู่มือโรคยาสูบ.* กองโรควิทยา สถานีทดลองยาสูบแม่โจ้ ฝ่ายใบยา โรงงานยาสูบ กระทรวงการคลัง. 58 หน้า.

จงกิจ มาศิริ และประสาทพร สมิตะมาน. 2544. การสร้างพันธุ์ยาสูบลูกผสมที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างโดยวิธีการทางโปรโตพลาสต์เทคโนโลยี. หน้า 166-173. *ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39.* สาขาพืช สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร 5-7 กุมภาพันธ์ 2544.

จงรักษ์ จารุเนตร และประพิศ วงเทียม. 2549ก. การตอบสนองของพันธุ์มันสำปะหลังต่อโรคใบไหม้ อำเภอแก่งหางแมว จังหวัดจันทบุรี. หน้า 466-470. ใน: เอกสารผลงานวิจัยมันสำปะหลัง ปี 2544-2546: ชุดโครงการวิจัยการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและการใช้ประโยชน์มันสำปะหลัง กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

จงรักษ์ จารุเนตร และประพิศ วงเทียม. 2549ข. การศึกษาปฏิกิริยาของมันสำปะหลังลูกผสมชุดปี 2541-2543 ต่อการเกิดโรคจุดสีน้ำตาลและใบไหม้. หน้า 188-195. ใน: เอกสารผลงานวิจัยมันสำปะหลัง ปี 2544-2546: ชุดโครงการวิจัยการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและการใช้ประโยชน์มันสำปะหลัง กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

นรินทร์ พูลเพิ่ม. การปลูกเผือก เอกสาร เอกสารวิชาการ. ศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร สถาบันวิจัยพืชสวน. กรมวิชาการเกษตร. 23 หน้า.

บัญชา ชิณศรี. 2555. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในมันสำปะหลัง. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* (ม.ค.-เม.ย. 2555). 43(1) : 7-14

พัฒนา สนธิรัตน ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประโคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ภิญโญ จักรอิศราพงศ์ ณรงค์ นันทพันธ์ กาหร่าย พลัง และปรีชา ตรีเพชร. 2523. การสำรวจโรคไวรัสยาสูบประเภทบ่มไอร้อนในเขตปลูกจังหวัดเชียงใหม่ปี 2520-2521. หน้า 58-58(1). *ใน: เรื่องย่อการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 18 สาขาพืช.* 28-30 มกราคม 2523. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

โสพิศ ใจปาละ. 2552. การสำรวจโรคใบไหม้มันสำปะหลังในจังหวัดอุบลราชธานี. *กสิกร.* มี.ค.-เม.ย. 2552 82(2) : 88-90

อุดมศักดิ์ เลิศสุชาตวนิช. 2554. โรครากปม อีกหนึ่งศัตรูสำคัญในไร่มันสำปะหลัง. *เคหการเกษตร* 35(10) : 99-101.

อุทิศ เกตุทัศ. 2513. ปุ๋ย N P K มีอิทธิพลต่อการจำแนกเพศของไส้เดือนฝอยรากปม. หน้า 391-397. *ใน: รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยา ครั้งที่ 9 สาขาพืช.* 4-6 กุมภาพันธ์ 2513. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Table 1 List of taro diseases were recorded in Thailand.

Plant Diseases	Causal agents	Reference
FUNGI		
Wilt	*Fusarium* sp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Leaf blight	*Phytphthora colocasiae*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Root rot	*Phytphthora* sp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Stem rot, Root rot	*Sclerotium rolfsii* Sac.	Sonhtiratana *et al.* (1991)

Table 2 List of pumpkin diseases were recorded in Thailand.

Plant Diseases	Causal agents	Reference
FUNGI		
Leaf blight	*Alternaria cucurbitae*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Blossom rot, Wet rot	*Choanepphora cucurbitarum*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Powdery mildew	*Oidium erysiphoides*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Powdery mildew	*Oidium* sp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Fruit rot	*Pythium* sp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Blossom and leaf rot	*Rhizoctonia solani*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Soft rot	*Rhizopus nigricans*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
NEMATODE		Sonhtiratana *et al.* (1991)
Root knot	*Meloidogyne incognita*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Root knot	*M. javanica*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
VIRUS		
Mosaic		Sonhtiratana *et al.* (1991)
Zacchini Yellow Mosaic	Zacchini Yellow Mosaic Virus : ZYMV	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Watermelon Mosaic	Watermelon Mosaic Virus: WMA	Sonhtiratana *et al.* (1991)

Table 3 List of cassava diseases were recorded in Thailand.

Plant Diseases	Causal agents	Reference
BACTERIAL		
Leaf spot	*Erwinia cassavae*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Bacterial leaf blight	*Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*	Jarunate and Wongthuem (2006a, 2006b); Sonhtiratana *et al.* (1991); Chaipala (2009)
FUNGI		
Leaf spot	*Alternaria* sp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Stem rot, Die-back	*Botryodiplodia* sp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Leaf spot	*Cercospora cassvae*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Leaf spot	*Cercospora henningsii*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Leaf spot	*Choancphora* sp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Anthracnose	*Colletotrichum manihotis*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Peduncle rot	*Diplodia manihotis*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Peduncle rot	*Fusarium* sp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Die-back	*Macrophomina sp.*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Die-back	*Phoma* sp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Die-back	*Phyllosticta* sp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Soft rot	*Rhizopus nigricans*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
NEMATODE		
Root parasite	*Criconemoides* sp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Root parasite	*Hirschmanniella* spp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Root parasite	*Hoplolaimus* spp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Root knot	*Meloidogyne incognita*	Sonhtiratana *et al.* (1991); Lertsuchatwanit (2011)
Root knot	*Meloidogyne* spp.	Chinnasri (2012)
Root parasite	*Pratylenchus* spp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Root parasite	*Tylenchorhynchus* spp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Mycoplasma		
Witches'broom	*Mycoplasma*	Sonhtiratana *et al.* (1991)

Table 4 List of tobacco diseases were recorded in Thailand.

Plant Diseases	Causal agents	Reference
BACTERIA		
Hollow stalk rot	*Erwinia aroideae*	Plant Pathology Divission (2012); Sonhtiratana *et al.* (1991)
Angular leaf spot	*Pseudomonas angulate*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Bacterial wilt	*P. solanacearum*	Plant Pathology Divission (2012); Sonhtiratana *et al.* (1991)
Wildfire	*P. tabaci*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
FUNGI		
Leaf spot	*Alternaria* sp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Brown spot	*A. alternate*	Plant Pathology Divission (2012); Sonhtiratana *et al.* (1991)
Frogeye leaf spot	*Cercospora nicotianae*	Plant Pathology Divission (2012); Sonhtiratana *et al.* (1991)
Flower rot	*Choanephora* sp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Anthracnose	*Colletotrichum* sp.	Plant Pathology Divission (2012); Sonhtiratana *et al.* (1991)
Leaf spot	*Corynespora cassicola*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Associated with stem rot	*Diplodia* sp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Powdery mildew	*Erysiphe cichoracearum*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Powdery mildew	*Erysiphe* sp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Fusarium wilt	*Fusarium oxysporum* f.sp. *nicotianae*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Fusarium wilt	*Fusarium oxysporum*	Plant Pathology Divission (2012);
Leaf spot	*Phoma tabaci*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Black shank	*Phytophthora nicotianae*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Black shank	*P. nicotianae* var. *parasitica*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Black shank	*P. parasitica*	Plant Pathology Divission (2012); Sonhtiratana *et al.* (1991)
Damping off	*Pythium debaryanum*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Seddling damping off	*P. aphanidermatum*	Plant Pathology Divission (2012); Sonhtiratana *et al.* (1991)

Table 4 List of tobacco diseases were recorded in Thailand. (continue)

Plant Diseases	Causal agents	Reference
FUNGI		
Damping off	*Rhizoctonia* spp.	Plant Pathology Divission (2012); Sonhtiratana *et al.* (1991)
Root rot	*Sclerotium rolfsii*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
NEMATODE		
Root knot	*Meloidogyne javanica*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Root knot	*M. hapla*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Root knot	*M. incognita*	Katuch (1970); Sonhtiratana *et al.* (1991)
Brown rot	*Pratylenchus* sp.	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Root parasite	*Rotylenchulus reniformis*	Sonhtiratana *et al.* (1991)
VIRUS		
Big bud, Aster yellow	Mycoplasma	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Mosaic	Cucumber Mosaic Virus:CMV	Chukitsarapong *et al.* (1980); Plant Pathology Divission (2012); Sonhtiratana *et al.* (1991)
Tobacco streak	Tobacco Streak Virus:TSV	Chukitsarapong *et al.* (1980); Plant Pathology Divission (2012); Sonhtiratana *et al.* (1991)
Mosaic	Tobacco Mosaic Virus: TMV	Chukitsarapong *et al.* (1980); Masiri and Samittamane (2001); Plant Pathology Divission (2012); Sonhtiratana *et al.* (1991)
Mosaic	Tobacco Mosaic Virus-Orchid strajn	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Tobacco etch	Tobacco Etch virus :TEV	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Tobacco vein bending	Tobacco Vein Bending:TVB	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Kraepock	Virus	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Leaf curl	Tobacco Leaf Curl Virus :TLCV	Chukitsarapong *et al.* (1980); Plant Pathology Divission (2012); Sonhtiratana *et al.* (1991)
Streak virus	Virus	Sonhtiratana *et al.* (1991)
Big bud, Stolbur	Virus	Sonhtiratana *et al.* (1991)

Table 4 List of tobacco diseases were recorded in Thailand. (continue)

Plant Diseases	Causal agents	Reference
VIRUS		
Tobacco Vein-banding Virus:PVY	Potato Virus Y :PVY	Plant Pathology Divission (2012)
Tomato Spotted Wilt	Tomato Spotted Wilt Virus :TSWV	Plant Pathology Divission (2012)
Bud necrosis	Groundnut Bud Necrosis Virus : GBNV	Sonhtiratana *et al.* (1991)

การศึกษาชนิดของวัชพืชของพืชส่งออก ได้แก่ เผือก และ ฟักทอง พืชนำเข้า ได้แก่ มันสำปะหลัง และยาสูบ

Weeds in Exporting Crop (Taro and Pumpkin) and Importing Crop Cassava and Tobacco)

ศิริพร ซึงสนธิพร ธัญชนก จงรักไทย อัณศยา สุริยะวงศ์ตระการ

กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การสำรวจวัชพืชในพืชพืชส่งออก ได้แก่ เผือก และ ฟักทอง พืชนำเข้า ได้แก่ มันสำปะหลัง และยาสูบ มีวัตถุประสงค์ เพื่อให้ได้ข้อมูลวัชพืช ของพืชปลูก 4 ชนิด ได้แก่ เผือก ฟักทอง มันสำปะหลัง และยาสูบ และรวบรวมตัวอย่างศัตรูพืช เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นหลักฐานสำหรับสืบค้นและอ้างอิงทางวิชาการที่เชื่อถือได้ ทำโดยการสำรวจแบบสืบพบ ในพื้นที่แปลงที่สามารถเข้าถึงได้ด้วยรถยนต์ หรืออยู่ในระยะที่สามารถเดินถึงได้ จดบันทึกชนิดวัชพืชที่พบ หากไม่สามารถระบุชนิดได้ทันทีเก็บตัวอย่างเพื่อการพิสูจน์ทราบชนิดต่อไป หากไม่มีส่วนที่ใช้สำหรับตรวจสอบชนิดได้ นำมาปลูกที่กลุ่มวิจัยวัชพืช ต่อไป ในช่วงปีงบประมาณ 2557 ทำการสำรวจในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ สระบุรี ลพบุรี ชัยภูมิ นครราชสีมา สุพรรณบุรี กาญจนบุรี นครปฐม ตาก ขอนแก่น อุดรธานี นครพนม สุราษฎร์ธานี ชุมพร ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี ได้จำนวนแปลงที่สำรวจทั้งสิ้น 102 แปลง พบวัชพืช 104 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นวัชพืชที่พบทั่วไป แต่บางชนิดพบในพื้นที่เท่านั้น เช่น หญ้าหน้าแมว ทานตะวันหนู และต้นเอดส์ เป็นวัชพืชที่พบระบาดในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา สระบุรี ลพบุรี และเพชรบูรณ์ แต่ไม่พบในพื้นที่อื่นแต่อย่างใด

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-01-00-09-57

คำนำ

การค้าสินค้าเกษตรในปัจจุบัน จำเป็นต้องคำนึงถึงมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช ซึ่งผู้ส่งออกจำเป็นต้องเสนอข้อมูลศัตรูพืชในสินค้าเกษตรนั้นให้ผู้นำเข้า เพื่อวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ซึ่งเป็นมาตรการในการกีดกันทางการค้าผลผลิตการเกษตรของประเทศผู้นำเข้า แต่อีกนัยหนึ่งก็คือการปกป้องไม่ให้มีการนำศัตรูพืชชนิดใหม่เข้าไป ประเทศไทยในฐานะประเทศเกษตรกรรม ซึ่งมีทั้งการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตรหลายชนิด จำเป็นอย่างยิ่งจะต้องมีฐานข้อมูลศัตรูพืช ที่เป็นปัจจุบัน สามารถตรวจสอบได้ เพื่อสามารถใช้ข้อมูลเพื่อส่งเสริมการส่งออก และป้องกันการนำเข้าศัตรูพืชชนิดใหม่ ไม่ให้เข้ามาทำลายการผลิตสินค้าเกษตรของไทย จึงจำเป็นทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างศัตรูพืชในสินค้าเกษตรอย่างเป็นทางการ

พืชเศรษฐกิจที่ประเทศไทยมีการค้าขายกับต่างประเทศ ได้แก่ เผือก และฟักทอง และพืชนำเข้า ได้แก่ มันสำปะหลัง และยาสูบ มีศัตรูพืชสำคัญคือแมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช โรคพืชและวัชพืช บางชนิดเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศนำเข้า ซึ่งต้องมีการเร่งรัดงานวิจัยและพัฒนา เพื่อแก้ปัญหาศัตรูพืชเหล่านั้น พร้อม ไปกับการวิจัย เพื่อรวบรวมชนิดศัตรูพืช อันเป็นการเตรียมความพร้อมด้านข้อมูลส่งให้ประเทศผู้นำเข้าเมื่อมีการร้องขอ ซึ่งจะช่วยให้เกิดความสะดวก และรวดเร็วในการเจรจาต่อรองทางการค้ากับประเทศคู่ค้าเดิม และเป็นการเพิ่มโอกาสในการเปิดตลาดการค้ากับประเทศผู้นำเข้ารายอื่นๆ ต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของพืชนำเข้าจากต่างประเทศได้ จากการตรวจเอกสารเบื้องต้นพบว่ามีการศึกษาแมลง ไร และสัตว์ศัตรูพืชของพืชเพื่อการค้าระหว่างประเทศ

เผือก (*Colocacia esculenta* (L) Schott) เป็นสมาชิกของวงศ์ Aracea เป็นพืชมีอายุอยู่ได้หลายฤดู ลำต้นใต้ดินเจริญเติบโตกลายเป็นหัว และมีหัวเล็กๆ ล้อมรอบ หัวมีขนาดและรูปร่างต่างกันออกไป ปกติต้นสูง 0.4-2 เมตร ใบใหญ่เป็นรูปหัวใจ มีขนาดสีต่างๆ กัน ใบเกิดจากใต้ดิน ดอกปกติประกอบด้วย 2-5 ช่อดอก อยู่ในก้านใบ ช่อดอกมีก้านยาว 15-30 เซนติเมตร ดอกบานทยอยกันเรื่อยๆ ดอกตัวเมียมักจะไม่มี ดอกตัวผู้หนึ่งดอกมีก้านเกสรตัวผู้ 2-3 อัน ผลมีสีเขียว เปลือกบาง ไม่ค่อยมีเมล็ด แต่เผือกที่ปลูกในฮาวาย นิวกินี และโดมินิกัน สามารถติดเมล็ดได้ (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ, 2523)

เผือกเป็นพืชเศรษฐกิจระดับท้องถิ่นที่สำคัญอีกพืชหนึ่ง คนไทยนิยมบริโภคเผือกเพราะมีกลิ่นหอมและรสชาติดี เป็นพืชหัวที่เป็นพืชอาหารที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง หัวเผือกจะมีส่วนประกอบเป็นพวกแป้งและแร่ธาตุต่าง ๆ ส่วนใบประกอบไปด้วยโปรตีนและแร่ธาตุ ซึ่งใบเผือกสามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้อีกด้วย และมีเผือกบางประเภทที่ใช้ใบสำหรับบริโภคซึ่งหัวจะมีขนาดเล็ก ไม่เหมาะต่อการบริโภค ปัจจุบันเผือกกำลังเป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศ เช่น ออสเตรเลีย ฮ่องกง ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ และมาเลเซีย ประเทศไทยมีการปลูกเผือกอยู่ทั่วไปทุกภาคของประเทศ มีพื้นที่ปลูกเผือกทั้งประเทศปีละ ประมาณ 25,000-30,000 ไร่ ผลผลิตประมาณ 45,000-65,000 ตัน ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 2-2.5 ตันต่อไร่ ส่วนจังหวัดที่เป็นแหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่

นครสวรรค์ พิษณุโลก นครราชสีมา สุรินทร์ สระบุรี อยุธยา สิงห์บุรี ปราจีนบุรี นครนายก นครปฐม ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี สุพรรณบุรี ชุมพร และสุราษฎร์ธานี (มาลินี และคณะ, ไม่ระบุปี)

ฟักทองเป็นพืชผักที่มีลำต้นทอดและเลื้อยไปตามพื้นดิน เช่นเดียวกับแตงโม มีดอกสีเหลือง ทั้งตัวผู้และตัวเมียจะแยกกันแต่อยู่ในต้นเดียวกัน ดังนั้น จึงต้องการช่วยผสมเกสร โดยวิธีธรรมชาติ เช่น ลมพัด หรือมีแมลงผสมเกสร หรือผู้ปลูกช่วยผสมเกสรเพื่อการติดผล เป็นไม้เถาอ่อน มีขนสากมือ มีหนวดสำหรับเกี่ยวพันทอดไปตามพื้นดิน จึงต้องการเนื้อที่ปลูกมากกว่าพืชผักอื่นๆ เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ที่มีอายุปีเดียว (ฤดูเดียว) เมื่อให้ผลแล้วก็ตายไป มีหลายพันธุ์ทั้งแบบต้นเลื้อยและเป็นพุ่มเตี้ย พันธุ์เบามีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 50-60 วัน ส่วนพันธุ์หนักมีอายุตั้งแต่หยอดเมล็ดจนติดผลอ่อน 45-60 วันและให้ผลแก่เมื่อ 120-180 วัน โดยทยอยเก็บผลได้หลายครั้งจนหมดผล แหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ ศรีษะเกษ, สกลนคร, ขอนแก่น, กาญจนบุรี, ชุมพร และฉะเชิงเทรา (เกตุอร, ไม่ระบุปี)

มันสำปะหลังจัดเป็นพืชหัว มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Manihot esculenta* Crantz มีชื่อสามัญเรียกหลายชื่อตามภาษาต่างๆ ที่ได้ยินกันมากได้แก่ Cassava, Yuca, Mandioa, Manioc, Tapioca มันสำปะหลังมีแหล่งกำเนิดแถบที่ลุ่มเขตร้อน (Lowland tropics) มีหลักฐานแสดงว่าปลูกกันในโคลัมเบียและเวเนซูเอลา มานานกว่า 3,000 – 7,000 ปีมาแล้ว ในทวีปเอเชียมีการนำมันสำปะหลังมาปลูกครั้งแรกที่ประเทศฟิลิปปินส์ในคริสตศตวรรษที่ 17 โดยชาวสเปนได้นำมาจากเม็กซิโกและในเวลาต่อมาก็มีการปลูกที่ อินโดนีเซีย และเมื่อ พ.ศ. 2337 ได้มีการนำมันสำปะหลังจาก อัฟริกามาปลูกที่อินเดียเพื่อใช้ในการทดลอง

สำหรับประเทศไทยไม่มีหลักฐานที่แน่นอนว่ามีการนำมันสำปะหลังเข้ามาปลูกเมื่อใด คาดว่าคงเข้ามาในระยะเดียวกันกับการเข้าสู่ศรีลังกาและฟิลิปปินส์คือประมาณ พ.ศ. 2329–2383 มันสำปะหลังเดิมเรียกกันว่ามันสำโรง มันไม้ ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่ามันต้นเตี้ย ทางภาคใต้เรียกว่ามันเทศ (แต่เรียกมันเทศว่ามันหลา) มันสำปะหลังเป็นพืชอาหารที่สำคัญเป็นอันดับ 5 ของโลก รองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว และมันฝรั่ง เป็นพืชอาหารที่สำคัญของประเทศในเขตร้อน โดยเฉพาะประเทศต่างๆ ในทวีปอัฟริกาและทวีปอเมริกาใต้ ในทวีปเอเชียประเทศอินโดนีเซียและอินเดียมีการบริโภคมันสำปะหลังกันเป็นจำนวนมาก ปริมาณผลผลิตที่ได้ในแต่ละปีร้อยละ 60 ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ ร้อยละ 27.5 ใช้ทำเป็นอาหารสัตว์ และร้อยละ 12.5 ใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ มันสำปะหลังเป็นพืชที่ทำรายได้ให้เกษตรกรมากเป็นอันดับที่ 4 รองจากยางพารา อ้อย และข้าว ผลผลิตมันสำปะหลัง ภายในประเทศนำไปใช้ทำมันเส้นและมันอัดเม็ดร้อยละ 45-50 ใช้แปรรูปเป็นแป้งร้อยละ 50-55 ประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังออกมากที่สุดในโลก ประเทศที่ไทยส่งผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังในรูปของมันอัดเม็ดไปขายมากที่สุดคือ ประเทศในกลุ่มประชาคมยุโรป (เนเธอร์แลนด์ สเปน เยอรมัน โปรตุเกส) เกาหลีใต้และญี่ปุ่น ส่วนในรูปของแป้งมันสำปะหลัง ประเทศญี่ปุ่นสั่งซื้อ มากที่สุด รองลงมาคือฮ่องกง สหรัฐอเมริกา มาเลเซีย สิงคโปร์ และไต้หวัน (ระบบข้อมูลทางวิชาการ กรมวิชาการเกษตร, 2552)

ยาสูบเป็นพืชในวงศ์เดียวกับมะเขือเทศ พริก มันฝรั่ง คือ Solanaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Nicotiana tabacum ธรรมชาติของยาสูบแตกต่างจากพืชอื่น ใบของยาสูบมีสารประกอบไนโตรเจนหมู่หนึ่งที่เรียกว่า "แอลคาลอยด์" ซึ่งมีนิโคตินเป็นส่วนใหญ่ นิโคตินเป็นองค์ประกอบที่ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะตัวของยาสูบ หรืออาจกล่าวได้ว่า นิโคตินคือ ยาสูบ ต้นยาสูบจะผลิตสารนิโคตินที่รากแล้วส่งไปเก็บไว้ที่ใบ ดังนั้นถ้าต้นยาสูบมีรากมาก ก็มีแนวโน้มที่จะผลิตสารนิโคตินได้มากตามไปด้วย ใบยาเหล่านี้ เมื่อเกิดการเผาไหม้ จะทำให้เกิดสารประกอบต่างๆ อีกจำนวนมาก ทำให้เกิดกลิ่น สี และรสต่างๆ ความหอม และความฉุน ซึ่งแตกต่างกันไปตามประเภทของยาสูบ ใบยาแต่ละประเภทจะมีปริมาณสารประกอบเคมี ที่ทำให้เป็นลักษณะเด่นแตกต่างกันเช่น ใบยาบ่มไอร้อน (เวอร์ยิเนีย) มีปริมาณน้ำตาลสูง นิโคตินปานกลาง ใบยาเบอร์เลย์ มีปริมาณไนโตรเจนและนิโคตินสูง น้ำตาลต่ำ ใบยาเตอร์กิช มีปริมาณสารหอมระเหยสูง จากความแตกต่างของปริมาณสารประกอบ เป็นเหตุผลหนึ่งที่อุตสาหกรรมผลิตบุหรี่ จำเป็นต้องผสมใบยาประเภทต่างๆ เข้าด้วยกัน ตามสัดส่วน เพื่อให้ได้กลิ่นและรสเป็นที่พอใจของผู้สูบ อย่างไรก็ดี ใบยาสูบทุกประเภท หากนำมาสังเคราะห์องค์ประกอบเคมีต่างๆ จะได้เหมือนกันหมด เพียงแต่มีปริมาณแตกต่างกันเท่านั้น นอกจากนี้ระดับความแก่สุกของใบยา และตำแหน่งของใบบนลำต้น เช่น ใบยาส่วนยอด ส่วนกลาง และส่วนล่าง ก็มีส่วนทำให้องค์ประกอบทางเคมี และคุณสมบัติอื่นๆ เช่น กลิ่นและรสแตกต่างกัน (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน, 2534 พันธุ์ที่นิยมปลูกได้แก่ เวอร์จิเนีย เบอร์เลย์ เตอร์กิช และยาสูบพื้นเมือง แหล่งปลูกที่สำคัญของพันธุ์เวอร์จิเนีย คือ เชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง แพร่ น่าน หนองคาย และนครพนม พันธุ์เบอร์เลย์ ปลูกมากในจังหวัดสุโขทัย และเพชรบูรณ์ พันธุ์เตอร์กิช นิยมปลูกในจังหวัด ขอนแก่น มหาสารคาม ร้อยเอ็ด และนครพนม ส่วนยาสูบพื้นเมืองปลูกในจังหวัด ขอนแก่น หนองคาย นครพนม เชียงราย แพร่ เพชรบูรณ์ ลพบุรี สุพรรณบุรี และกาญจนบุรี (วิภาวรรณ, 2548) ไทยส่งออกน้ำตาลที่ได้จากมันสำปะหลัง มีมูลค่าถึง 7,731 และ 7,859 ล้านบาทในปี ในปี 2551 และ 2552 ตามลำดับ และส่งกากมันสำปะหลังและหากหัวบีท เพื่อเป็นอาหารสัตว์ มีมูลค่าถึง 79 และ 60 ล้านบาท ตามลำดับ โดย 2553 ทั่วประเทศมีพื้นที่ปลูกมากถึง 6.3 ล้านไร่ โดยปลูกในภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง 1.9, 2.3 และ 2.2 ล้านไร่ ตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553)

อย่างไรก็ตามไม่พบเอกสารการสำรวจวัชพืช หรือรายชื่อวัชพืชที่แปลงพืชปลูกทั้งสี่นี้

ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อให้ได้ข้อมูลวัชพืช ของพืชปลูก 4 ชนิด ได้แก่ เผือก ฟักทอง มันสำปะหลัง และยาสูบ และรวบรวมตัวอย่างศัตรูพืช เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นหลักฐานสำหรับสืบค้น และอ้างอิงทางวิชาการที่เชื่อถือได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1) กล้องถ่ายรูปแบบดิจิตอล
2) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
3) เลนส์ขยาย 10 เท่า สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นในภาคสนาม
4) กรรไกร มีด เสียม หรือพั่ว สำหรับตัด/ขุด ตัวอย่างพืช
5) แผงอัดตัวอย่างพรรณไม้พร้อมกระดาษฟูก ฟองน้ำและหนังสือพิมพ์ พร้อมเชือกไส้ตะเกียงและป้ายชื่อสำหรับผูกตัวอย่างพืช
6) กระดาษติดตัวอย่างพืช
7) กล่องใส่เมล็ดพืช
8) ขวดแก้ว และน้ำยาสำหรับดองตัวอย่างพืช (หากจำเป็น)
9) น้ำยาชุบตัวอย่างวัชพืช ประกอบด้วย ฟินอล เมอคิวริคคลอไรด์
10) สารกันแมลง ได้แก่ การะบูน
11) อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น เช่น ถุงพลาสติกขนาดต่างๆ กระถางขนาดต่างๆ พร้อมดินและป้ายปัก สำหรับปลูกพืชตัวอย่างเพื่อเก็บเมล็ด และศึกษารายละเอียดของพืชเพิ่มเติม
12) สมุดบันทึก

วิธีการ

การสำรวจแบบสืบพบ โดยการเดินสำรวจแปลงปลูกที่อยู่ในพื้นที่ที่สามารถเข้าถึงด้วยรถยนต์หรืออยู่ในระยะที่เดินเข้าได้ โดยมีวิธีปฏิบัติการทดลอง

1) ตรวจสอบสืบค้น ข้อมูล เอกสาร งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2) กำหนดพื้นที่ วางแผนการสำรวจเก็บตัวอย่าง ในแหล่งปลูกพืชทั้งสี่ชนิด ในภาคกลางตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ
3) ดำเนินการสำรวจวัชพืชในแปลงปลูกเผือก ฟักทอง มันสำปะหลัง และยาสูบ ตามภาคต่างๆ ของประเทศ โดยการเดินเป็นแนวเส้นตรงตั้งฉากกับขอบแปลงอย่างน้อย 3 แนว และเดินตามขอบแปลง หรือเส้นทแยงมุม หากแปลงขนาดใหญ่มาก บันทึกชื่อวัชพืชทุกชนิดที่พบ หากไม่สามารถระบุชื่อได้ เก็บตัวอย่างพืช ทั้งสดและแห้ง เพื่อศึกษารายละเอียดเพิ่มเติม และตรวจสอบชนิดวัชพืชต่อไป
4) การบันทึกข้อมูล ทำการบันทึก พื้นที่ – ที่ตั้ง สภาพพื้นที่ สภาพนิเวศ อายุหรือระยะพืชปลูก ชนิดลักษณะวัชพืชที่พบ และข้อมูลอื่นๆ ที่จำเป็น
5) การจัดทำตัวอย่างแห้ง เก็บวัชพืชที่มีใบและดอกสมบูรณ์ ไม่ถูกแมลงทำลาย หากพืชมีขนาดเล็ก ควรมีราก ต้น ใบ –ดอก ครบ หากเป็นพืชไร้ดอก ควรมีส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ หรือลักษณะอื่นที่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดได้ อัดในแผงอัด

พรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 x30 เซนติเมตร อย่างน้อยชนิดละ 2 ตัวอย่าง เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่ – นิเวศน์ พืชอาศัย วัน-เวลา ชื่อผู้เก็บ เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

6) การตรวจสอบชนิดพืช ทำโดยการเทียบตัวอย่างพืชในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช พิพิธภัณฑ์พืชของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่นและองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ ของแต่ละวงศ์หรือสกุลของพืชนั้น ๆ ตลอดจนการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่างๆ

- การบันทึกข้อมูล
  1) ชื่อพืชปลูกและวัชพืช
  2) สถานที่
  3) สภาพนิเวศ
  4) วัน เดือนปี ที่ทำการสำรวจ

ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี (2557-2558)

เวลาและสถานที่

สถานที่ทำการทดลอง จังหวัดที่ทำการสำรวจ และกลุ่มวิจัยวัชพืชในปี 2557

ผลการทดลอง

การดำเนินการในปีงบประมาณ 2557 ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างวัชพืช ในแปลงมันสำปะหลัง เผือก ฟักทอง และยาสูบ ในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ สระบุรี ลพบุรี ชัยภูมิ นครราชสีมา สุพรรณบุรี กาญจนบุรี นครปฐม ตาก ขอนแก่น อุดรธานี นครพนม สุราษฎร์ธานี ชุมพร ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี ได้จำนวนแปลงที่สำรวจทั้งสิ้น 102 แปลง โดยมีรายละเอียดในตารางที่ 1

วัชพืชที่พบส่วนใหญ่เป็นวัชพืชที่พบทั่วไป (ตารางที่ 2) และมีบางชนิดที่ไม่พบรายงานการเป็นวัชพืชมาก่อน เช่น ในมันสำปะหลังในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา ลพบุรี พบ *Trichodesma zeylanica* พบหญ้าหน้าแมว *Cyanthillium patulum* (Dryand. ex Dryand.) H.Rob. ในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ แปลงมันสำปะหลังในจังหวัดลพบุรี และสระบุรี พบทานตะวันหนู ซึ่งยังไม่สามารถระบุชื่อวิทยาศาสตร์ได้ และในยาสูบพบ *Trichodesma indicum* (L.) Lehm.

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจวัชพืชในแปลงพืชส่งออก ได้แก่ เผือก และ ฟักทอง พืชนำเข้า ได้แก่ มันสำปะหลัง และยาสูบ ทั้งหมดจำนวน 102 แปลง ในช่วง 1 ปีงบประมาณ 2557 พบวัชพืชแล้ว 104 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นวัชพืชที่พบทั่วไป มีบางชนิดที่ยังไม่เคยพบรายงานการเป็นวัชพืชในพืชของประเทศไทยมาก่อน ได้แก่ *Trichodesma indicum* (L.) Lehm. ส่วนหญ้าหน้าแมว ทานตะวันหนู และต้นเอดส์ เป็นวัชพืชที่พบระบาดในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา สระบุรี ลพบุรี และเพชรบูรณ์ แต่ไม่พบในพื้นทีอื่นแต่อย่างใด

เอกสารอ้างอิง

เกตุอร ทองเครือ. ไม่ระบุปี. ฟักทอง เอกสารแนะนำที่ 176 กรมส่งเสริมการเกษตร. http://www.doae.go.th/library/html/detail/pumpkin/index.htm (1 มีนาคม 2556)

มาลินี พิทักษ์.สมศรี บุญเรือง.รังสิมันต์ สัมฤทธิ์. (ไม่ระบุปี) การปลูกเผือก. http://www.doae.go.th/library/html/detail/peak/index.htm. (1 มีนาคม 2556)

ระบบข้อมูลทางวิชาการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 2552. มันสำปะหลัง. http://it.doa.go.th/vichakan/news.php. (1 มีนาคม 2556)

วิภาวรรณ กิติวัชระเจริญ. 2548. เอกสารวิชาการเรื่องยาสูบพืชเศรษฐกิจของไทย. http://aglib.doa.go.th/lib/images/Downloads/2551/EB00010.pdf (1 มีนาคม 2556)

สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เล่มที่ 5. 2523. พืชหัว. http://kanchanapisek.or.th/kp6/New/sub/book/book.php?book=5&chap=5&page=t5-5-infodetail04.html (1 มีนาคม 2556)

สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เล่มที่ 15. 2534. ยาสูบhttp://kanchanapisek.or.th/kp6/New/sub/book/book.php?book=15&chap=3&page=t15-3-infodetail02.html (1 มีนาคม 2556)

ภาคผนวก

Table 1 The survey conducted in fiscal year 2014

Crop	No. of surveyed farm	Province	No. weeds found	No. collected weed samle
Exported				
Taro	24	Kanjanaburi, Supanburi, Nakornpathom, Petchburi	50	100
Pumkin	14	Lopbui, Chaiyaphume,SakolNakorn, NakornPhanom, Chumorn, Prajuab Kirikhan	60	250
Imported				
Casava	29	Kanjanaburi, Saraburi, Lopburi, Petchboon, Chaiyaphume, Tak, , NakornRachasima, KhonKaen, UdornThani and sakol Nakorn	85	270
Tobacco	35	Kanjanaburi, Petchaboon, Chaingmai, Nongkai, Nakorn Phanom	42	123

Table 2 List of weed detected during 2014.

Weed species			Family
Acalypha	*indica*	L.	Euphorbiaceae
Acalypha	*lanceolata*	Willd.	Euphorbiaceae
Achyranthes	*aspera*	L.	Amaranthaceae
Acrachne	*racemosa*	(Heyne ex Roth) Ohwi	Poaceae
Aeschynomene	*americana*	L.	Fabaceae/Leguminosae
Aeschynomene	*indica*	L.	Fabaceae/Leguminosae
Ageratum	*conyzoides*	L.	Asteraceae
Alternanthera	*sessilis*	(L.) DC.	Amaranthaceae
Amaranthus	*hybridus*	L.	Amaranthaceae
Amaranthus	*lividus*	L.	Amaranthaceae
Amaranthus	*spinosus*	L.	Amaranthaceae
Amaranthus	*viridis*	L.	Amaranthaceae
Ammannia	*baccifera*	L.	Lythraceae
Blumea	*mollis*	(D.Don) Merr.	Asteraceae
Boerhavia	*diffusa*	L.	Nyctaginaceae
Boerhavia	*erecta*	L.	Nyctaginaceae
Boerhavia	*sp.*		Nyctaginaceae
Brachiaria	*mutica*	(Forssk.) Stapf	Poaceae
Brachiaria	*reptans*	(L.) C.A.Gardner & C.E.Hubb.	Poaceae
Cardiospermum	*halicacabum*	L.	Sapindaceae
Celosia	*argentea*	L.	Amaranthaceae
Cenchrus	*brownii*	Roem. & Schult.	Poaceae
Cenchrus	*echinatus*	L.	Poaceae
Chloris	*barbata*	Sw.	Poaceae
Chromolaena	*odoratum*	(L.) R.M.King & H.Rob.	Asteraceae
Cleome	*rutidosperma*	DC.	Capparaceae
Cleome	*viscosa*	L.	Capparaceae
Coccinia	*grandis*	(L.) Voigt	Cucurbitaceae
Commelina	*benghalensis*	L.	Commelinaceae
Commelina	*diffusa*	Burm.f.	Commelinaceae

Weed species			Family
Conyza	*sumatrensis*	(Retz.) Walker	Asteraceae
Corchorus	*aestuans*	L.	Tiliaceae
Corchorus	*olitorius*	L.	Tiliaceae
Crassocephalum	*crepidioides*	(Benth.) S.Moore	Asteraceae
Cynodon	*dactylon*	Vanderyst	Poaceae
Cyperus	*compressus*	L.	Cyperaceae
Cyperus	*distans*	L.	Cyperaceae
Cyperus	*rotundus*	(L.) P.Beauv.	Cyperaceae
Dactyloctenium	*aegyptium*	(L.) P.Beauv.	Poaceae
Desmodium	*gangeticum*	(L.) DC.	Fabaceae/Leguminosae
Desmodium	*triflorum*	(L.) DC.	Fabaceae/Leguminosae
Dichanthium	*annulatum*	(Forssk.) Stapf	Poaceae
Dichanthium	*caricosum*	A.Camus	Poaceae
Digera	*muricata*	(L.) Mart.	Amaranthaceae
Digitaria	*ciliaris*	(Retz.) Koel.	Poaceae
Echinochloa	*colona*	(L.) Link	Poaceae
Echinochloa	*crus-galli*	(L.) P.Beauv.	Poaceae
Eclipta	*prostrata*	(L.) L.	Asteraceae
Eleusine	*indica*	(L.) Gaertn.	Poaceae
Eleutheranthera	*ruderalis*	(Swartz) Sch.-Bip.	Asteraceae
Emilia	*sonchifolia*	(L.) DC.	Asteraceae
Euphorbia	*bifida*	Hook. & Arn.	Euphorbiaceae
Euphorbia	*heterophylla*	L.	Euphorbiaceae
Euphorbia	*hirta*	L.	Euphorbiaceae
Fimbristylis	*miliacea*	(L.) Vahl	Cyperaceae
Glinus	*oppositifolius*	(L.) A.DC.	Molluginaceae
Gomphrena	*celosioides*	Mart.	Amaranthaceae
Heliotropium	*indicum*	L.	Boraginaceae
Heteropogon	*contortus*	(L.) Roem. & Schult.	Poaceae
Hyptis	*suaveolens*	(L.) Poit.	Lamiaceaea
Imperata	*cylindrica*	(L.) P.Beauv.	Poaceae
Ipomoea	*aquatica*	Forssk.	Convolvulaceae

Weed species			Family
Ipomoea	*triloba*	L.	Convolvulaceae
Ischaemum	*rugosum*	Salisb.	Poaceae
Kyllinga	*brevifolia*	Rottb.	Cyperaceae
Lagascea	*mollis*	Cav.	Asteraceae
Leptochloa	*chinensis*	(L.) Nees	Poaceae
Lindernia	*crustacea*	(L.) F.Muell.	Scrophularaiceae
Melochia	*corchorifolia*	L.	Sterculiaceae
Merremia	*emarginata*	(Burm.f.) Hallier f.	Convolvulaceae
Mikania	*micrantha*	H.B.K.	Asteraceae
Mimosa	*diplotricha*	C.Wright ex Sauvalle	Leguminosae/ Fabaceae
Mimosa	*pudica*	L.	Leguminosae/ Fabaceae
Momordica	*charantia*	L.	Cucurbitaceae
Mucuna	*pruriens*	(L.) DC.	Leguminosae-Fabaceae
Paederia	*foetida*	L.	Rubiaceae
Panicum	*maximum*	Jacq.	Poaceae
Panicum	*repens*	L.	Poaceae
Pentapetes	*phoenicea*	L.	Sterculiaceae
Phaseolus	*lathyroides*	(L.) Greene	Leguminosae/Fabaceae
Phyllanthus	*amarus*	Schumach ex Thonn.	Euphorbiaceae
Phyllanthus	*caroliniensis*	Walter	Euphorbiaceae
Phyllanthus	*urinaria*	L.	Euphorbiaceae
Phyllanthus	*virgatus*	G.Forst.	Euphorbiaceae
Physalis	*minima*	L.	Solanaceae
Portulaca	*oleracea*	L.	Portulacaeae
Praxelis	*clematide*	(L.) Kuhn	Asteraceae
Richardia	*brasiliensis*	Gomes	Rubiaceae
Rottboellia	*exaltata*	L.f.	Poaceae
Ruellia	*tuberosa*	L.	Acanthaceae
Sauropus	*bacciformis*	(L.) Airy Shaw	Euphorbiaceae
Scoparia	*dulcis*	L.	Scrophulariaceae
Sida	*acuta*	Burm.f.	Malvaceae

Weed species			Family
Sida	*cordifolia*	L.	Malvaceae
Sorghum	*sp.*		Poaceae
Spilanthes	*paniculata*	Wall. Ex DC.	Asteraceae
Synedrella	*nodiflora*	(L.) Gaertn.	Asteraceae
Trianthema	*portulacastrum*	L.	Aizoaceae
Tribulus	*terrestris*	L.	Zygophyllaceae
Trichodesma	*zeylanica*	(Burm.f.) R.Br.	Boraginaceae
Tridax	*procumbens*	(L.) Schott	Asteraceae
Vernonia	*cinerea*	(L.) Less.	Asteraceae
Vernonia	*patula*	(Dryand) Merr.	Asteraceae
unknow			Asteraceae

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากสาธารณรัฐประชาชนจีน

Study on Pest Risk Analysis for Importation of Tomato Seeds from China

สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ[1/] ณัฏฐพร อุทัยมงคล[1/] วาสนา ฤทธิ์ไธสง[1/] สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ (Tomato seed, *Solanum lycopersicum*) เป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้ามข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 ปัจจุบันการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พันธุ์มะเขือเทศจากสาธารณรัฐประชาชนจีนได้รับการผ่อนผันให้นำเข้าได้ตามบทเฉพาะกาล ผลการสุ่มตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการจากตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากจีน พบเชื้อรา *Alternaria raphini*, *Alternaria tenuis*, *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp. ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากสาธารณรัฐประชาชนจีน พบว่าศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันได้แก่แบคทีเรีย 3 ชนิด ไวรัส 8 ชนิด เชื้อรา 2 ชนิด และไวรอยด์ 1 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นศัตรูพืชกักกันความเสี่ยงสูง 3 ชนิด ได้แก่ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Potato spindle tuber viroid* และ *Pepino mosaic virus* จำเป็นต้องมีมาตรการเฉพาะสำหรับจัดการความเสี่ยงก่อนการส่งออก ได้แก่ เมล็ดมะเขือเทศต้องมาจากพื้นที่หรือแหล่งผลิตที่ปลอดศัตรูพืช (pest free area or pest free place of production) หรือเมล็ดต้องผ่านการตรวจสอบและรับรองว่าปลอดศัตรูพืชด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่เหมาะสม (seed testing) สำหรับมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันชนิดอื่น ได้แก่ การใช้มาตรการหลายอย่างร่วมกันอย่างเป็นระบบ (system approach) และกำจัดเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ติดมากับเมล็ด(seed treatment) เช่น การแช่เมล็ดใน 1% โซเดียม ไฮโปคลอไรด์ นาน 5-20 นาที และการคลุกเมล็ดด้วยสารกำจัดเชื้อรา เช่น ไธแรม 75 WP ในอัตรา 1 ช้อนชาต่อเมล็ด 500 กรัมหรือแช่ในน้ำร้อน 50°c นาน 25 นาที นอกจากนี้เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศต้องตรวจสอบก่อนการส่งออกและพบว่าปราศจากแมลงที่มีชีวิต ดิน อาการของโรค วัชพืช หรือสิ่งอื่นใดที่มีศักยภาพนำพาศัตรูพืชกักกันได้

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-02-02-02-56

Abstract

Tomato seeds are the prohibited plant under the Notification of Ministry of Agriculture and Cooperatives Re: specification of plants and carriers from certain sources as prohibited articles, of exceptions and conditions under the Plant Quarantine Act. B.E. 2507 (No.5) B.E. 2550.Recent importation of tomato seed from China are subjected to exemption to be imported under the transitory provisions. The result of seed testing in the laboratory for the importation of tomato seeds from China and found four fungi, *Alternaria raphini*, *Alternaria tenuis*, *Cladosporium* sp. and *Chaetomium* sp. The result of pest risk analysis for the importation of tomato seed from China has identified three bacteria, eight viruses, two fungi and one viroid species of potential quarantine pest. Three species, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Potato spindle tuber viroid* and *Pepino mosaic virus* were assessed to be high risk quarantine pest. They are required specific risk management to reduce the risk before export i.e. the tomato seeds have been sourced from a pest free area or pest free place of production or must be tested by the appropriate genetic method. The options of pest risk management for another potential quarantine pest are system approach, seed treatment with 1% sodium hypochloride for 5-10 minutes subsequently mixed with Thiram 75 WP at the rate of 1 teaspoon per 500 seeds or hot water treatment at 50 $^{\circ}$C for 25 minutes. Furthermore, tomato seed must be pre-export inspection and found to be free from live insects, soil, disease symptoms, weed and any other extraneous contamination of quarantine concern.

Keywords: วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช การนำเข้า เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ
pest risk analysis, importation, tomato seed

คำนำ

จากการที่ประเทศไทยเข้าเป็นสมาชิกขององค์การการค้าโลก (World Trade organization, WTO) ทำให้ประเทศสมาชิกต้องปฏิบัติตามข้อตกลงว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement of Application of Sanitary and Phytosanitary Measures, SPS Agreement) ซึ่งเป็นมาตรการในการปกป้องชีวิตมนุษย์ สัตว์และพืช จากสิ่งปนเปื้อน สารพิษ หรือเชื้อโรคที่มีพืชหรือสัตว์เป็นตัวนำ ดังนั้นประเทศผู้นำเข้าจึงจำเป็นต้องมีการใช้เทคนิคและวิธีการที่เหมาะสม ซึ่งได้พัฒนาโดยองค์กรระหว่างประเทศ และเป็นที่ยอมรับตามสากลประเทศ โดยต้องมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของสินค้าเกษตรนำเข้า เพื่อป้องกันหรือจำกัดความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นเนื่องจากศัตรูพืชที่อาจติดมากับสินค้าเกษตรนำเข้า สามารถเจริญเติบโต และแพร่กระจายและก่อความเสียหายทางเศรษฐกิจ

มะเขือเทศ (Tomato, *Solanum lycopersicum*) เป็นพืชผักที่อยู่ในวงศ์โซลานาซีอี้ที่มีแหล่ง ผลิตเป็นอันดับหนึ่งของโลก คือ สาธารณรัฐประชาชนจีน โดยเฉพาะในมณฑลซินเจียง และมองโกเลียใน นอกจากนั้นในรัฐแคลิฟอร์เนียสหรัฐอเมริกา ประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน เป็นต้น มะเขือเทศเป็นพืชที่ใช้เมล็ดในการเพาะปลูก ทำให้มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเพื่อนำมาจำหน่าย หรือปลูกเพื่อปรับปรุงพันธุ์ หรือใช้เป็นพ่อแม่เพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมส่งกลับไปจำหน่ายในประเทศทั่วโลก และจากการศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากประเทศต่างๆ พบว่ามีศัตรูพืชร้ายแรงหลายชนิดที่ยังไม่มีรายงานในประเทศไทย และมีโอกาสติดเข้ามากับส่วนเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ เช่น แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ไวรัส *Pepino mosaic virus* ไวรอยด์ *Potato spindle tuber viroid* เป็นต้น (CABI online, 2015) ซึ่งมาตรการกักกันพืชที่ใช้ควบคุมการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศของประเทศไทยในปัจจุบันได้อาศัยอำนาจตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 มะเขือเทศจัดอยู่ในประเภทสิ่งต้องห้าม ที่อยู่ในรายการผ่อนผันให้นำเข้าได้โดยมีใบรับรองปลอดจากศัตรูพืชเท่านั้น ยังไม่ได้ระบุชนิดศัตรูพืชกักกันและมาตรการจัดการความเสี่ยง ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาของศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่เคยพบในประเทศติดมากับสินค้าที่นำเข้าเกิดการแพร่กระจายและเพิ่มปริมาณจนเกิดเป็นการระบาดของศัตรูพืชชนิดใหม่ขึ้น จะส่งผลให้เกิดผลเสียต่อเศรษฐกิจของประเทศอย่างใหญ่หลวง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการดำเนินการศึกษาวิจัยเพื่อทราบชนิดศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันและนำไปกำหนดมาตรการทางวิชาการด้านสุขอนามัยพืชที่เหมาะสมสอดคล้องกับสถานการณ์ปัจจุบันและอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ โดยอยู่บนพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ และปรับปรุงแก้ไขกฎระเบียบด้านกักกันพืช มาตรการทางสุขอนามัยพืชเพื่อป้องกันควบคุมการเข้ามาแพร่ระบาดของศัตรูพืชให้มีประสิทธิภาพต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. วัสดุคอมพิวเตอร์ เช่น หมึกพิมพ์ และแผ่นบันทึกข้อมูล เป็นต้น

2. วัสดุและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ได้แก่ อาหารสำหรับแยกเชื้อ สารเคมี และอุปกรณ์ในการทำสไลด์ กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope

3. อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างศัตรูพืช เช่นถุงพลาสติก กล่องพลาสติก กล่องรักษาความเย็น เป็นต้น

4. หนังสือ ตำรา วารสาร ฐานข้อมูลออนไลน์ รายงานการประชุม และสัมมนาทางวิชาการ ข้อมูลการประชุมอภิปรายจากแหล่งต่างๆ ทั่วโลก

5. ผู้เชี่ยวชาญ และนักวิจัยด้านโรคพืชและแมลงศัตรูพืชทั้งในประเทศและต่างประเทศ

วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของพืชมะเขือเทศนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน เช่น ชื่อ ชนิด สายพันธุ์ แหล่งกำเนิด ปริมาณการนำเข้า ผลผลิต เป็นต้น

2. รวบรวมข้อมูลทั่วไป และการจัดกลุ่มศัตรูพืชของมะเขือเทศนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน เช่น ชื่อ ชนิด สายพันธุ์ พืชอาศัย ลักษณะการทำลาย การแพร่ระบาด ความเสียหายในประเทศไทย ประเทศผู้ส่งออก และ/หรือ ประเทศอื่นๆ จัดทำลงในตาราง

3. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีนและตรวจสอบศัตรูพืช โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีนตามมาตรฐานของ International Seed Testing Association (ISTA) หรือตามความเหมาะสมของปริมาณเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า ณ จุดนำเข้าที่ด่านตรวจพืช หรือกลุ่มวิจัยการกักกันพืช เพื่อตรวจสอบศัตรูพืชที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส ไวรอยด์ ไส้เดือนฝอย วัชพืช โดยการทำ Blotter method, Dilution plate method, Seedling symptom test, Pathogenicity test และจำแนกชนิดตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและสูง การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่นวิธีการ ELISA, PCR

4. ทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช (ISPM) ฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงสำหรับศัตรูพืชกักกัน (Pest risk analysis for quarantine pests) (FAO, 2014) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ขั้นตอนที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (การจัดประเภทศัตรูพืช การประเมินโอกาสการการเข้ามา การตั้งรกรากอย่างถาวร และการแพร่กระจาย รวมถึงผลกระทบทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้นภายหลังการเข้ามาของศัตรูพืชในประเทศไทย)

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช

5. กำหนดมาตรการทางวิชาการสำหรับจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันสำหรับนำไปใช้ในการกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าตาม พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และ พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551

เวลาและสถานที่

เวลา: ตุลาคม 2555 - กันยายน 2557

สถานที่: กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1 รวบรวมข้อมูลทั่วไปของพืชมะเขือเทศนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน

มะเขือเทศ (Tomato) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Solanum lycopersicum L.* (*Lycopersicon esculentum* Mill) จัดอยู่ในวงศ์โซลานาซีอี้ (Solanaceae) เช่นเดียวกับพริก มะเขือ มันฝรั่ง ยาสูบ

และพิทูเนีย มีแหล่งกำเนิดอยู่ในแถบตอนกลางของทวีปอเมริกาและแถบภูเขาแอนดีสในอเมริกาใต้ แถบประเทศเปรู ชิลี และเอกวาดอร์ มะเขือเทศเป็นพืชผักเศรษฐกิจที่สำคัญอันดับต้นๆ ของประเทศไทย ทั้งในแง่ผักอุตสาหกรรม และบริโภคสด โดยปลูกกันแพร่หลายทางภาคเหนือ และตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมะเขือเทศอุตสาหกรรม มีพื้นที่เหมาะสมเชิงธุรกิจในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย หนองคาย สกลนคร นครพนม กาฬสินธุ์ มะเขือเทศรับประทานสด มีพื้นที่ปลูกเชิงธุรกิจที่สำคัญจังหวัด นครปฐมราชบุรี กาญจนบุรี เชียงใหม่ เชียงราย นครราชสีมา มะเขือเทศอุตสาหกรรม พื้นที่ปลูกที่สำคัญจังหวัดบุรีรัมย์ อุดรธานี สุรินทร์ ตาก มะเขือเทศรับประทานสดพื้นที่ปลูกที่สำคัญจังหวัดลำปาง ลพบุรี

การปลูกมะเขือเทศ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนเหนียวและดินร่วนปนทราย หน้าดินลึก 30–120 ซม. อินทรียวัตถุ 2-4% pH 6.5-6.8 ต้องการน้ำในการเจริญเติบโต 500-1,500 ลูกบาศก์เมตร/รอบการผลิต/ไร่ความสูงจากระดับน้ำทะเลไม่เกิน 800 เมตร ความลาดชันของพื้นที่ที่เหมาะสม 5-15% อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการงอกของ เมล็ด 20-21 ˚C การเจริญเติบโตของต้นกล้า 25˚C และการออกดอกและติดผล 18-24 ˚C ความชื้นสัมพัทธ์ 60-70% ต้องการแสงแดด 8-16 ชั่วโมง/วัน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต ระหว่าง 21-24 องศาเซลเซียส การเก็บเกี่ยวขึ้นอยู่กับพันธุ์ แต่โดยเฉลี่ยแล้วเมื่อปลูกได้ ประมาณ 30-45 วัน มะเขือเทศจะเริ่มออกดอก และจะเริ่มเก็บเกี่ยวได้เมื่ออายุประมาณ 70-90 วัน และจากเริ่มปลูกถึงเก็บเกี่ยวหมดประมาณ 4-5 เดือน

สถานการณ์การผลิตมะเขือเทศในต่างประเทศทั่วโลก พบว่าประเทศที่มีการผลิตมะเขือเทศสูงสุด คือ สาธารณรัฐประชาชนจีน รองลงมาคือ อินเดีย สหรัฐอเมริกา ตุรกี และอียิปต์ (FAOSTAT, 2011) จากสถิติการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศพบว่าประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนมีปริมาณการนำเข้าสูงสุดในปี 2554 จำนวน 3,101 กิโลกรัม เป็นมูลค่า 25. 8 ล้านบาท (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2557) อาทิเช่น สายพันธุ์ลูกผสม (Hybrid) โดยเฉพาะในแถบมณฑลซินเจียง และมองโกเลียใน

เส้นทางของการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศมายังประเทศไทยจากทุกประเทศ รวมถึงประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน พบว่ามีเส้นทางการนำเข้ามาหลายลักษณะแตกต่างกันและด้วยวัตถุประสงค์ที่หลากหลาย ในขณะที่เส้นทางของศัตรูพืชที่จะปรากฏในประเทศไทยภายหลังการนำเข้าพบว่าเมล็ดพันธุ์ที่เข้ามาโดยเฉพาะการผลิตเมล็ดเพื่อส่งออกไปยังต่างประเทศ ส่วนใหญ่ต้นกล้าจะผ่านขั้นตอนการทาบกิ่งในโรงเพาะกล้า (Nursery) ก่อนการย้ายต้นกล้าลงปลูกทั้งในสภาพโรงเรือน และแปลงปลูกสภาพธรรมชาติของประเทศไทยดังแสดงใน Figure 1 โดยการนำเข้ามีทั้งที่เป็นเมล็ดพันธุ์พ่อแม่พันธุ์ (stock seed) และเมล็ดพันธุ์ลูกผสม (Hybrid seed) เพื่อใช้ในประเทศและส่งออกไปยังต่างประเทศ

2. รวบรวมข้อมูลทั่วไป และการจัดกลุ่มศัตรูพืชของมะเขือเทศนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน

ผลการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชของมะเขือเทศจากทุกแหล่งทั่วโลก พบว่ามีจำนวนทั้งสิ้น 557 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นศัตรูพืชที่มีรายงานในสาธารณรัฐประชาชนจีน มีจำนวนทั้งสิ้น 242 ชนิด (CABI online, 2015) แบ่งออกเป็นดังนี้

แมลง 78 ชนิด ได้แก่ *Leptinotarsa decemlineata*, *Chromatomyia horticola, Liriomyza bryoniae, Liriomyza trifolii, Liriomyza huidobrensis, Liriomyza sativa, Ceratitis capitata, Bactrocera dorsalis species complex, Bactrocera cucurbitae, Bactrocera latifrons, Bemisia tabaci, Trialeurodes vaporariorum, Aphis craccivora, Aphis fabae, Aphis gossypii, Aphis spiraecola, Aulacorthum solani, Brachycaudus helichrysi, Macrosiphum euphorbiae, Myzus persicae, Nezara viridula, Planococcus citri, Piezodorus hybneri, Acanthocoris scabrator, Phthorimaea operculella, Agrotis ipsilon, Agrotis segetum, Mamestra brassicae, Ostrinia nubilalis, Pseudaletia punctulata, Chrysodeixis eriosoma, Spodoptera exigua, Spodoptera mauritia acronyctoides, Spodoptera littoralis, Frankliniella occidentalis, Frankliniella intonsa, Thrips tabaci, Thrips palmi, Aspidiotus destructor, Earias vittella, Epilachna vigintioctopunctata, Achaea janat, Leucinodes orbonalis, Haritalodes derogate, Acherontia styx, Parabemisia myricae, Helicoverpa assulta, Helicoverpa armigera, Helicoverpa zea, Rhopalosiphum rufiabdominale, Amrasca biguttula biguttula, Nesidiocoris tenui, Meligethes aeneus, Icerya aegyptiaca, Icerya seychellarum, Philaenus spumarius, Hadula trifolii, Trialeurodes ricini, Aphelenchoides ritzemabosi, Xestia c-nigrum, Thysanoplusia orichalcea, Eudocima fullonia, Adelphocoris lineolatus, Scirtothrips dorsalis, Stegobium paniceum, Aleurodicus disperses, Solenopsis geminate, Pentalonia nigronervosa, Atherigona orientalis, Gryllotalpa gryllotalpa, Orthezia insignis, Ferrisia virgate, Pinnaspis strachani, Phenacoccus solenopsis, Trichoplusia ni, Maconellicoccus hirsutus, Peridroma saucia, Paracoccus marginatus,*

ไร 4 ชนิด *Aculops lycopersici, Tetranychus urticae, Tetranychus cinnabarinus, Polyphagotarsonemus latus*

ไส้เดือนฝอย 19 ชนิด ได้แก่ *Hirschmanniella oryzae*, *Meloidogyne mayaguensis, Meloidogyne hapla, Meloidogyne arenaria, Meloidogyne incognita, Meloidogyne javanica, Heterodera glycines, Paratrichodorus minor, Hoplolaimus seinhorsti, Hoplolaimus indicus, Ditylenchus destructor, Scutellonema brachyurus, Helicotylenchus pseudorobustus, Helicotylenchus dihystera, Tylenchorhynchus claytoni, Xiphinema americanum, Pratylenchus penetrans, Rotylenchulus reniformis, Globodera tabacum*

ไฟโตพลาสมา 1 ชนิด ได้แก่ Aster yellows phytoplasma group

เชื้อรา 52 ชนิด ได้แก่ *Alternaria japonica, Alternaria da0uci, Alternaria brassicae, Alternaria brassicicola, Botryotinia fuckeliana, Colletotrichum gleosporioides,*

Colletotrichum capsici, Colletotrichum dematium, Didymella lycopersici, Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici, Fusarium oxysporum, Gibberella avenacea, Gibberella fujikuroi* var. *fujikuroi, Leveillula taurica, Macrophomina phaseolina, Penicillium italicum, Penicillium digitatum, Penicillium expansum, Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina, Phomopsis longicolla, Phytophthora capsici, Phytophthora cryptogea, Phytophthora infestans, Phytophthora megasperma, Phytophthora nicotianae, Phytophthora cactorum, Pythium aphanidermatum, Pythium debaryanum, Pythium vexans, Pythium irregular, Pythium oligandrum, Pythium myriotylum, Chalara elegans, Stemphylium vesicarium, Sclerotinia sclerotiu, Sclerotium rolfsii, Verticillium albo-atrum, Verticillium dahlia, Pectobacterium ananatis* pv. *ananatis, Oidium neolycopersici, Pseudocercospora fuligena, Passalora fulva, Golovinomyces orontii, Monilinia fructigena, Plasmodiophora brassicae, Diaporthe phaseolorum* var. *sojae, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Cochliobolus lunatus, Haematonectria haematococca, Thanatephorus cucumeris, Sarocladium strictum*

แบคทีเรีย 18 ชนิด ได้แก่ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis, Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus, Pseudomonas cepacia, Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis, Pseudomonas syringae* pv. *tabaci, Pseudomonas cichorii, Pseudomonas syringae* pv. *tomato, Pseudomonas syringae, Pseudomonas viridiflava, Ralstonia solanacearum* race 1, *Ralstonia solanacearum* race 3, *Dickeya zeae*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya chrysanthemi*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium radiobacter*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*,

ไวรัส 6 ชนิด *Alfalfa mosaic virus*, *Cucumber mosaic virus, Peanut stunt virus, Tobacco streak virus, Tomato spotted wilt virus, Potato leafroll virus, Potato virus Y, Tobacco mosaic virus, Tomato mosaic virus, Tomato yellow leaf curl virus, Tobacco ringspot virus, Tomato ringspot virus, Pepino mosaic virus, Potato virus X, Tobacco etch virus, Broad bean wilt virus, Tobacco leaf curl virus, Eggplant mottled dwarf virus, Impatiens necrotic spot virus, Tobacco necrosis virus, Pepper mild mottle virus*

ไวรอยด์ 2 ชนิด *Citrus exocortis viroid*, *Potato spindle tuber viroid*

และวัชพืช 64 ชนิด ได้แก่ *Brassica rapa*, *Orobanche cernua, Setaria faberi, Solanum carolinense, Celosia argentea, Sida acuta, Benincasa hispida, Amaranthus albus, Conyza sumatrensis, Synedrella nodiflora, Cedrus deodara, Plantago major, Ambrosia artemisiifolia, Cenchrus echinatus, Commelina benghalensis, Eragrostis*

cilianensis, Orobanche ramose, Drymaria cordata, Acroptilon repens, Pimpinella anisum, Nicandra physalodes, Orobanche, Plantago lanceolata, Sambucus nigra, Veronica persica, Emilia sonchifolia, Cuscuta campestris, Mimosa pudica, Polygonum aviculare, Datura stramonium, Sonchus arvensis, Bidens pilosa, Abutilon theophrasti, Mimosa diplotricha, Parthenium hysterophorus, Vicia sativa, Scutellonema clathricaudatum, Echinochloa crus-galli, Heliotropium europaeum, Lamium amplexicaule, Senecio vulgaris, Amaranthus retroflexus, Cyperus esculentus, Lolium temulentum, Tridax procumbens, Ageratum conyzoides, Stellaria media, Conyza Canadensis, Cyperus rotundus, Euphorbia pulcherrima, Hibiscus trionum, Solanum nigrum, Portulaca oleracea, Convolvulus arvensis, Capsella bursa-pastoris, Sonchus oleraceus, Echinochloa colona, Digitaria ciliaris, Cirsium arvense, Taraxacum officinale complex, Setaria viridis, Tribulus terrestris, Lens culinaris ssp. culinaris, Poa annua

3. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีนและตรวจสอบศัตรูพืช

ผลการสุ่มตรวจศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน ในปี 2556 โดยวิธี Blotter method พบเชื้อราจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Alternaria raphini*, *Alternaria tenuis*, *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp.

4. การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Initiation of pest risk analysis)

จุดเริ่มต้นของการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากสาธารณรัฐประชาชนจีนเข้ามาในประเทศไทยเกิดขึ้นจากการทบทวนด้านนโยบายเพื่อปรับปรุงมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากสาธารณรัฐประชาชนจีนให้รัดกุมยิ่งขึ้น (PRA initiated by the review or revision of a policy) เนื่องจากมาตรการควบคุมการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากสาธารณรัฐประชาชนจีนปัจจุบันอาศัยอำนาจตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติม พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 การนำเข้ามีเพียงใบรับรองสุขอนามัยพืช แต่ที่มิได้มีการระบุว่ามีศัตรูพืชชนิดใดบ้างเป็นศัตรูพืชกักกันตลอดจนมาตรการทางกักกันพืชกำกับมาด้วย จึงทำให้นำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากสาธารณรัฐประชาชนจีนยังมีความเสี่ยงที่ศัตรูพืชจะติดเข้ามาจึงจำเป็นต้องวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อทราบว่ามีศัตรูพืชชนิดใดบ้างเป็นศัตรูพืชกักกัน โดยพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Identification of PRA area) ที่กำหนดในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากสาธารณรัฐประชาชนจีนคือ “ประเทศไทย”

พื้นที่ที่อยู่ในอันตราย (Endangered area) ได้แก่ พื้นที่หนึ่งพื้นที่ใดในประเทศไทย ซึ่งมีปรากฏอยู่ของพืชอาศัยที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของศัตรูพืช และมีปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่

เหมาะสมต่อการเจริญแพร่พันธุ์อย่างถาวรของศัตรูพืชซึ่งอาจจะติดเข้ามากับการนำเข้า โดยเส้นทาง (Pathway) ที่ศัตรูพืชจะติดเข้ามา คือเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ที่ปลูกเป็นการค้านำเข้ามาจากสาธารณรัฐประชาชนจีนเพื่อการเพาะปลูก (Seed for sowing)

จากการสืบค้นข้อมูลของประเทศที่เคยดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศมาก่อนแล้ว ได้แก่ เครือรัฐออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ เกาหลีใต้ และญี่ปุ่น พบว่าศัตรูพืชกักกันที่สามารถติดมากับส่วนเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าเพื่อการค้า ได้แก่ ไวรัส *Pepino mosaic virus* และ *Pelargonium spot virus* ไวรอยด์ *Potoato spindle tuber viroid, Tomato Chlorotic dwarf viroid, Tomato apical stunt viroid*, *Pepper chat fruit viroid, Columnea latent viroid*, *Mexican papita viroid*, *Tomato planta macho viroid* เป็นต้น ซึ่งข้อกำหนดด้านสุขอนามัยพืชที่เข็มงวดสำหรับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากทุกประเทศที่เป็นแหล่งกำเนิดของไวรัสและไวรอด์ ต้องผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่เหมาะสม หรือเมล็ดต้องมาจากพื้นที่หรือแหล่งผลิตที่ปลอดไวรัสและไวรอยด์ เป็นต้น (DAFF, 2013, EFSA Panel on Plant Health, 2011; MPI, 2012; MAFF, 2013) แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* พบว่าวิธีตรวจสอบสามารถใช้ได้ทั้งพืชที่ไม่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ หรือการตรวจสอบเมล็ด (seed testing) เป็นวิธีควบคุมโรคได้ดีเพื่อกำจัดเมล็ดที่มีการปนเปื้อนเนื่องจากเมล็ดปนเปื้อนเพียงเล็กน้อยก็ยังสามารถทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคได้ (EFSA Panel on Plant Health, 2014)

ขั้นตอนที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest risk assessment)

การจำแนกประเภทศัตรูพืช (Pest categorization) ของมะเขือเทศในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนพบว่ามีจำนวนทั้งสิ้น 242 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นศัตรูพืชที่ไม่มีรายงานพบในประเทศไทยและมีโอกาสติดมากับเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน จำนวน 14 ชนิด ซึ่งมีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน ผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันโดยพิจารณาโอกาสการเข้ามา การตั้งรกราก การแพร่กระจาย และศักยภาพในการก่อให้เกิดผลกระทบตามมาทางเศรษฐกิจ พบว่าศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงสูง ได้แก่แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ไวรัส *Pepino mosaic virus* และไวรอยด์ *Potato spindle tuber viroid* เนื่องจากมีการตรวจพบในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเพื่อการค้าทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศอย่างแพร่หลาย (Verhoeven *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 2012;) โดยเชื้ออาศัยอยู่ทั้งส่วนผิวและภายในเมล็ดและสามารถถ่ายทอดจากเมล็ดสู่ต้นกล้าแล้วแพร่กระจายได้ง่ายโดยวิธีกล ละอองเกสร แมลงพาหะ อีกทั้งศัตรูพืชดังกล่าวมีพืชอาศัยกว้างในประเทศไทย โดยเชื้อดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย และยังพบว่าพืชบางชนิดเป็นแหล่งสะสมของเชื้อที่ไม่แสดงอาการ ทำให้ยากต่อการตรวจสอบและกำจัด ทำให้หลายประเทศใช้มาตรการสุขอนามัยพืชเข้มงวด เพื่อป้องกันการเข้ามาของศัตรูพืชกักกันดังกล่าวจากพืชอาศัยที่เป็นแหล่งกำเนิด ส่วนศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงปานกลาง ได้แก่ *Pseudomonas viridiflava*, *Alfalfa mosaic virus*, *Tobacco ringspot virus* และ*Tomato streak virus* และศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงต่ำ ได้แก่ เชื้อรา *Verticillium albo-atrum* แบคทีเรีย

Pseudomonas cichorii, *Tomato spotted wilt virus*, *Tomato ringspot virus*, *Didymella lycopersici*, *Tobacco etch virus* และ *Tomato mosaic virus*

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest management)

ผลการศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากสาธารณรัฐประชาชนจีนจำเป็นอย่างยิ่งต้องปรับเปลี่ยนมาตรการสุขอนามัยพืชที่ใช้ควบคุมการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากสาธารณรัฐประชาชนจีนในปัจจุบัน เนื่องจากพบมีศัตรูพืชกักกัน 14 ชนิดซึ่งจำเป็นต้องมีมาตรการสุขอนามัยพืชเพื่อลดความเสี่ยง เพื่อมิให้ศัตรูพืชกักกันมีโอกาสติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากสาธารณรัฐประชาชนจีน และแพร่กระจายในประเทศไทยได้ ซึ่งมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันดังแสดงใน Table 1

5. กำหนดมาตรการทางวิชาการสำหรับจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกัน

การนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยอาศัยอำนาจตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติม พระราชบัญญัติ (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 ต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชจากประเทศต้นทาง ซึ่งระบุข้อความเพิ่มเติม เพื่อรับรองว่า “เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากสาธารณรัฐประชาชนจีนเป็นไปตามข้อกำหนดสำหรับการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันของราชอาณาจักรไทย” ดังต่อไปนี้

1. การจัดการในแหล่งผลิตก่อนการเก็บเกี่ยว ได้แก่ เมล็ดมะเขือเทศต้องมาจากพื้นที่หรือแหล่งผลิตที่ปลอดศัตรูพืช (pest free area or pest free place of production) หรือการใช้มาตรการหลายอย่างร่วมกันอย่างเป็นระบบ (system approach)

2. การจัดการหลังการเก็บเกี่ยว และก่อนส่งออก ได้แก่ 1) เมล็ดต้องผ่านการตรวจสอบและรับรองว่าปลอดศัตรูพืชด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่เหมาะสม (seed testing) 2) กำจัดเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ติดมากับเมล็ด (seed treatment) เช่น การแช่เมล็ดใน 1% โซเดียม ไฮโปคลอไรด์ นาน 5-20 นาที และการคลุกเมล็ดด้วยสารกำจัดเชื้อรา เช่น ไธแรม 75 WP ในอัตรา 1 ช้อนชาต่อเมล็ด 500 กรัมหรือแช่ในน้ำร้อน 50°c นาน 25 นาที และ3) ต้องตรวจสอบด้วยสายตา (visual inspection) พบว่าปลอดจากแมลงที่มีชีวิต ดิน วัชพืช หรือสิ่งอื่นใดที่มีศักยภาพนำพาศัตรูพืชกักกันได้

3. การจัดการเมื่อนำเข้า ได้แก่ 1) ต้องมีการสุ่มตรวจสอบศัตรูพืชกักกัน และพบว่าปลอดจากศัตรูพืชกักกัน 2) หากตรวจพบศัตรูพืชกักกันจะถูกทำลายหรือให้ส่งกลับ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

มะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) เป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 ปัจจุบันการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พันธุ์มะเขือเทศจากสาธารณรัฐประชาชนจีนได้รับการผ่อนผันให้นำเข้าได้ตามบทเฉพาะกาล โดยแหล่งผลิตมะเขือเทศของประเทศสาธารณารัฐประชาชนจีนที่สำคัญได้แก่ มณฑลซินเจียง และมองโกเลียใน สำหรับ

ประเทศไทยมะเขือเทศเป็นพืชเศรษฐกิจทั้งด้านผลิตผลสดเพื่อการบริโภค อุตสาหกรรมการแปรรูปและการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อการส่งออก อย่างไรก็ตามปัจจุบันประเทศไทยเริ่มประสบปัญหาการอุบัติของศัตรูพืชมะเขือเทศชนิดใหม่ อาจสาเหตุมาจากการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ที่เป็นแหล่งกำเนิดศัตรูพืชร้ายแรงจากต่างประเทศต่อเนื่องเป็นประจำทุกปี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการตรวจพบกับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศทั้งในและต่างประเทศจากประเทศไทย (ปริเชษฐ์ และคณะ, 2556; Reanwarakorn *et al.*, 2011; Chambers *et al.*, 2013) อีกทั้งสภาวะโลกร้อนอาจทำให้เชื้อสาเหตุโรคพืชเกิดการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดสามารถตั้งรกรากบนพืชอาศัยชนิดอื่นที่ไม่สำคัญทางเศรษฐกิจมากขึ้น เช่น วัชพืช ไม้ดอกไม้ประดับ ซึ่งบางชนิดพืชอาศัยไม่แสดงอาการ อีกทั้งการแพร่กระจายหลากหลายวิธี และการเข้าทำลายร่วมกันของหลายชนิดศัตรูพืช (mixed infection) ทำให้ยากต่อการตรวจสอบ และส่งผลกระทบต่อความเสียหายทางเศรษฐกิจทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยเฉพาะผลกระทบภาคธุรกิจและการค้าเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ

จากการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชมะเขือเทศในสาธารณรัฐประชาชนจีน พบว่ามีทั้งสิ้น 242 ชนิด ผลการสุ่มตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการจากตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากจีน พบเชื้อรา *Alternaria raphini*, *Alternaria tenuis*, *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp. ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนการจำแนกประเภทศัตรูพืช พบศัตรูพืชที่ไม่มีรายงานในประเทศไทยและมีโอกาสติดมากับเมล็ด 14 ชนิด ซึ่งมีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน เมื่อประเมินความเสี่ยงโอกาสเข้ามา ตั้งรกราก และแพร่กระจายจนก่อให้เกิดความเสียหายถึงระดับเศรษฐกิจ พบว่าศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงสูง 3 ชนิด ความเสี่ยงปานกลาง-ต่ำ 11 ชนิด จำเป็นต้องมีมาตรการจัดการความเสี่ยงก่อนการส่งออก โดยเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชที่ระบุการจัดการความเสี่ยงสำหรับศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงสูงได้แก่ เมล็ดมะเขือเทศต้องมาจากพื้นที่หรือแหล่งผลิตที่ปลอดศัตรูพืช (pest free area or pest free place of production) หรือเมล็ดต้องผ่านการตรวจสอบและรับรองว่าปลอดศัตรูพืชด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่เหมาะสม (seed testing) สำหรับมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันชนิดอื่น ได้แก่ การใช้มาตรการหลายอย่างร่วมกันอย่างเป็นระบบ (system approach) และกำจัดเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ติดมากับเมล็ด(seed treatment) เช่น การแช่เมล็ดใน 1% โซเดียม ไฮโปคลอไรด์ นาน 5-20 นาที และการคลุกเมล็ดด้วยสารกำจัดเชื้อรา เช่น ไธแรม 75 WP ในอัตรา 1 ช้อนชาต่อเมล็ด 500 กรัมหรือแช่ในน้ำร้อน 50°c นาน 25 นาที นอกจากนี้เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศต้องตรวจสอบก่อนการส่งออก (visual inspection) และพบว่าปราศจากแมลงที่มีชีวิต ดิน วัชพืช หรือสิ่งอื่นใดที่มีศักยภาพนำพาศัตรูพืชกักกันได้

เอกสารอ้างอิง

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ คะนึงนิตย์ เหรียญวรากร และวิภา เกิดพิพัฒน์. 2556. การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) และ *Pepperchat fruit viroid* (PCFVd) ในพืชวงศ์โซลานาซีอี้. **วารสารวิชาการเกษตร**. 31(2): 108-122.

สำนักควบคุมพืช และวัสดุการเกษตร. 2557. **สถิติการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ.** สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ.

CABI (CAB International). 2015. **Crop Protection Compendium. (Online).** CAB International. Wallingford, U.K.

Chambers, G. A., A. M. Seyb, J. Mackie, F. E. Constable, B. C. Rodoni, D. Letham, K. Davis, and M.J. Gibbs. 2013. First Report of *Pepper chat fruit viroid* in Traded Tomato Seed, an Interception by Australian Biosecurity**. Plant Disease: Disease Notes** 97: 1386.

DAFF (Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. 2014. **Import condition search.** (Online). Available. http://www.aqis.gov.au/icon32/asp/ex_ querycontent.asp (August 4, 2014)

EFSA Panel on Plant Health (PLH). 2011. **Scientific Opinion on the assessment of the risk of solanaceous pospiviroids for the EU territory and the identification and evaluation of risk management options**. 133 pp.

EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), 2014. Scientific Opinion on the pest categorisation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al*. 29 pp.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nation). 2014. **International Standards for Phytosanitary Measures no. 11 : Pest Risk Analysis for Quarantine Pests.** FAO, Rome.

FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nation). 2011. **Tomato Production.** (Online). Available. http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx (June 8, 2013).

Ling, K. S. and R. Li. 2012. First report of Potato spindle tuber viroid naturally infecting greenhouse tomatoes in North Carolina. **Plant disease** 97: 148.

MAFF (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries). 2013. **Summary of proposed Revisions to the Enforcement Ordinance of the Plant Protection Law and Concerned Public Notices**. [Online]. Avialable. http://members.wto.org/ crnattachments/2013/sps/JPN/13_2446_00_e.pdf. (June 28, 2013)

MPI (Ministry for Primary Industries). 2012. **Risk Mangement proposal: *Solanum lycopersicum* (tomato) seed for sowing from all countries**. The National Plant Protection Organization of New Zealand. 17 p.

Reanwarakorn K, S. Klinkong and J. Porsoongnurn. 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. **New Disease Reports** 24: 6.

Verhoeven, J. Th. J., C. C. C. Jansen, T. M. Willemen, L. F. F. Kox, R. A. Owens and J. W. Roenhorst. 2004. Natural infection of tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. **Eur J Plant Pathol**. 110: 823-831.

Table 1 Risk management options to reduce the introduction of quarantine pests of tomato seeds from China

Pathogens	Quarantine pest	Risk Management Options
Fungi	*Didymella lycopersici, Verticillium albo-atrum*	- Pest Free area or Pest Free place of production - Seed testing and certified - Seed treatment
Bacteria	*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganens, Pseudomonas viridiflava, Pseudomonas cichorii,*	- Pest Free area or Pest Free place of production - Seed testing and certified - Seed treatment
Virus	*Pepino mosaic virus, Alfalfa mosaic virus, Tobacco ringspot virus, Tomato streak virus, Tomato spotted wilt virus, Tomato ringspot virus, Tobacco etch virus, Tomato mosaic virus*	- Pest free area or pest free place of production - Seed testing and certified - Seed treatment
Viroid	*Potato spindle tuber viroid*	- Pest free area or pest free place of production - Seed testing and certified

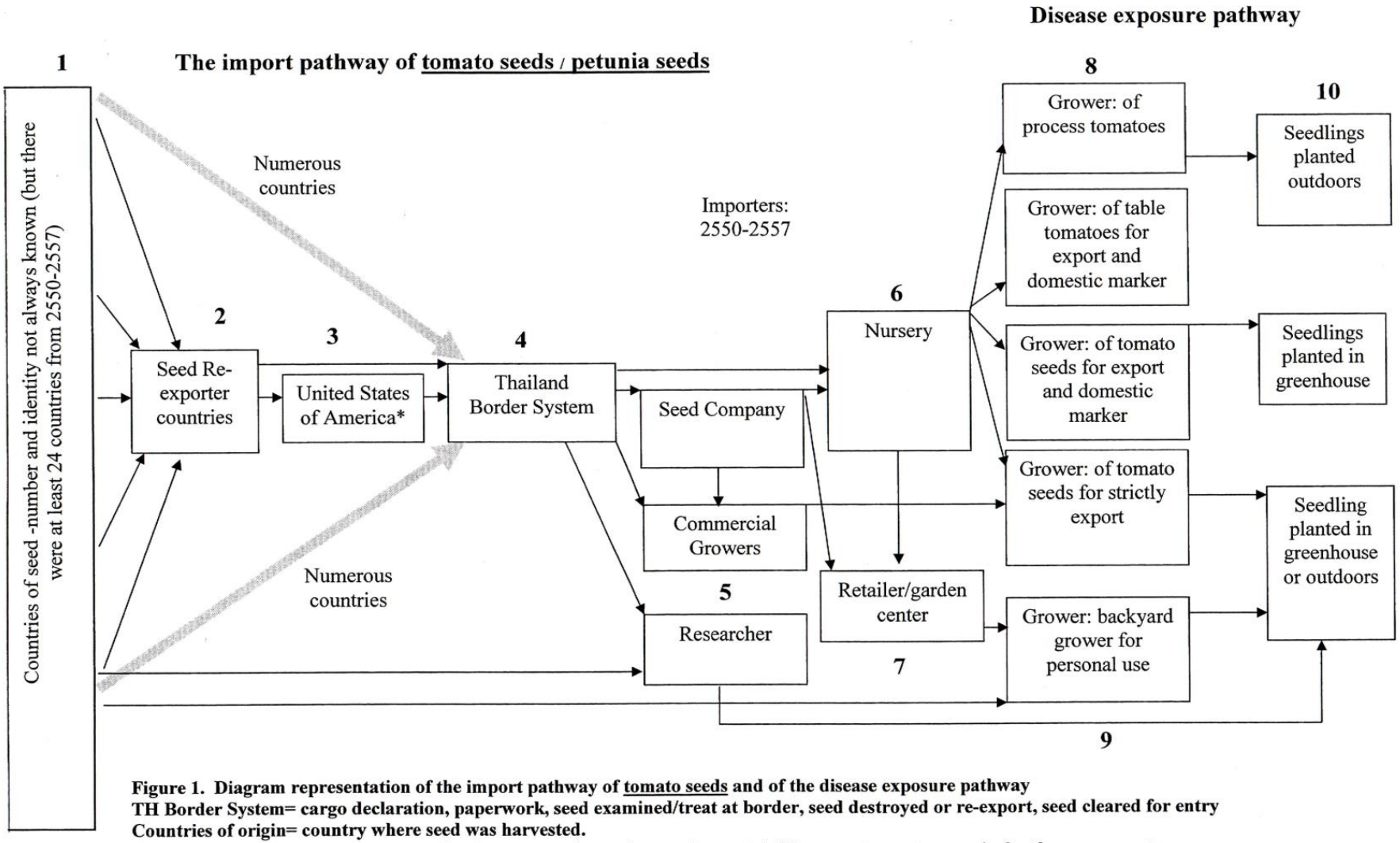


Figure 1. Diagram representation of the import pathway of tomato seeds and of the disease exposure pathway
TH Border System= cargo declaration, paperwork, seed examined/treat at border, seed destroyed or re-export, seed cleared for entry
Countries of origin= country where seed was harvested.
Exporting countries= may or may not be the country the seeds were harvested. The export country may in fact be a re-exporter.
Seed Re-exporter countries=countries into which seeds have been imported from around the world, repackaged & labeled, and from where seeds are re-exported
*** = for example, a country which seeds have been imported from seed re-exporter countries**

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของผลแอปเปิลสดนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา

Study on Pest Risk Analysis for the Importation of Fresh Apple Fruit from the United States of America

อลงกต โพธิ์ดี วรัญญา มาลี ณัฏฐพร อุทัยมงคล วาสนา ฤทธิ์ไธสง
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ผลสดของพืชสกุล *Malus* จากทุกแหล่งจัดเป็นสิ่งต้องห้าม ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 ซึ่งประเทศสหรัฐอเมริกาได้ขอผ่อนผันนำเข้าผลแอปเปิลสดตามบทเฉพาะกาล ในปี พ.ศ. 2555 ประเทศไทยมีการนำเข้าผลแอปเปิลสด ปริมาณ 133,090 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 4,983 ล้านบาท จากการศึกษารวบรวมข้อมูลศัตรูพืชพบมีศัตรูพืชของแอปเปิลรวมทั้งสิ้น 388 ชนิด และมีศัตรูพืชหลายชนิดที่ยังไม่มีรายงานในประเทศไทย โดยศัตรูพืชเหล่านี้มีโอกาสที่จะติดเข้ามากับผลแอปเปิลสดนำเข้าได้ จึงได้ดำเนินการศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของผลแอปเปิลสดนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกาเพื่อให้ได้รายชื่อศัตรูพืชที่เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทยและกำหนดมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชที่เหมาะสม ผลการดำเนินการ พบว่ามีรายงานพบศัตรูพืชของแอปเปิลในประเทศสหรัฐอเมริกาจำนวนทั้งสิ้น 214 ชนิด และพบในประเทศไทย จำนวน 35 ชนิด โดยเป็นศัตรูพืชกักกันของผลแอปเปิลสดที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา 12 ชนิด ได้แก่ แมลงวันผลไม้ *Anastrepha fraterculus*, *A. ludens*, *A. serpentina*, *A. suspensa*, *Ceratitis capitata*, ผีเสื้อ *Cydia pomonella*, *Epiphyas postvittana*, *Grapholita molesta*, *G. prunivora* เพลี้ยหอย *Epidiaspis leperii* ด้วง *Conotrachelus nenuphar* และแมลง *Rhagoletis pomonella* โดยมีศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงสูง คือ แมลงวันผลไม้ 5 ชนิด เป็นศัตรูพืชกักกันที่ต้องมีมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชก่อนการส่งออกมายังประเทศไทย คือ ต้องกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลแอปเปิลสดด้วยวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้วยความเย็นก่อนการส่งออกหรือระหว่างการขนส่ง อย่างไรก็ตาม ประเทศสหรัฐอเมริการ้องขอส่งออกผลแอปเปิลสดจากรัฐแคลิฟอร์เนีย ไอดาโฮ ออริกอน และ วอชิงตัน ซึ่งไม่มีรายงานพบแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย การนำเข้าผลแอปเปิลสดจากรัฐ แคลิฟอร์เนีย ไอดาโฮ ออริกอน และ วอชิงตัน จึงไม่มีความจำเป็นต้องกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลแอปเปิลสดด้วยวิธีการกำจัดศัตรูพืช นอกจากนี้ สำหรับ

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-02-02-03-56

ศัตรูพืชกักกันอื่นควรมีมาตรการจัดการที่เหมาะสมในประเทศผู้ส่งออก เพื่อลดความเสี่ยงศัตรูพืชที่อาจจะเกิดขึ้น คือ ผลแอปเปิลสดต้องมาจากสวนแอปเปิลและโรงคัดบรรจุที่ขึ้นทะเบียน มาจากแหล่งปลอดศัตรูพืช บรรจุภัณฑ์ต้องใหม่ สะอาด และสามารถป้องกันการเข้าทำลายซ้ำของศัตรูพืชได้ ต้องสุ่มตรวจผลแอปเปิลสดก่อนส่งออกตามกระบวนการที่เหมาะสมอย่างเป็นทางการ และต้องปราศจากศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย ไม่มีการปะปนของ ดิน ทราย และชิ้นส่วนของพืชนอกเหนือจากผลแอปเปิลสด หรือสิ่งอื่นใดที่มีศักยภาพในการนำพาศัตรูพืชกักกันได้ รวมทั้งการบริหารจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช ณ จุดนำเข้า โดยการสุ่มตรวจผลแอปเปิลสด หากมีการตรวจพบศัตรูพืชกักกัน หรือศัตรูพืชชนิดอื่นที่ไม่ใช่ศัตรูพืชกักกัน หรือการนำเข้าไม่เป็นไปตามมาตรการสุขอนามัยพืชที่กำหนด ควรส่งกลับ ทำลาย หรือกำจัดศัตรูพืชด้วยวิธีการที่เหมาะสม (ถ้ามี) ทั้งนี้ต้องมีใบอนุญาตนำเข้า และใบรับรองสุขอนามัยพืชกำกับมาพร้อมกับสินค้าทุกครั้งที่มีการนำเข้า

Abstracts

Fresh fruits of the plants in genus *Malus* from any source are considered as prohibited articles under Notification of Ministry of Agriculture and Cooperatives Re : Specification of plants and carriers from certain sources as prohibited articles, of exceptions and conditions under the Plant Quarantine Act B.E. 2507 (No. 5) B.E. 2550. USA requested an importation for apples from USA into Thailand under transitory provisions of this notification.

In this study, there were 388 species of pest associated with apple. Many species has not reported in Thailand. These pests can associate with the pathway and its introduction into Thailand. In 2012, Thailand imported 133,090 metric tons of apples worth the value of 4,983 million baht. The objectives of study on pest risk analysis for importation of apples from USA were to get the quarantine pests of concern to Thailand and determined risk management measures for those pests. The result of pest risk analysis for the Importation of apples from USA showed that 214 species of pests associated with apple are reported in USA and 35 species of pests are reported in Thailand. A total of 12 species of quarantine pest were identified, including *Anastrepha fraterculus*, *A. ludens*, *A. serpentina*, *A. suspensa*, *Ceratitis capitata*, *Cydia pomonella*, *Epiphyas postvittana*, *Grapholita molesta*, *G. prunivora Epidiaspis leperii*, *Conotrachelus nenuphar* and *Rhagoletis pomonella*. Tephritid fruit flies are high risk of quarantine pests and required specific risk management measures to reduce the risk before exportation. Risk managements of the high risk quarantine pests associated with apples i.e. must be subjected to pre-shipment or in-transit cold

disinfestations treatment to eliminate fruit flies. However, USA requested exportation for apples from California, Idaho, Oregon and Washington State which fruit flies are quarantine pests of concern to Thailand are absent or eradicated. There is no need to disinfestation of fruit flies for apples exported from California, Idaho, Oregon and Washington State. In addition, other quarantine pests should have appropriate pest management measures in the exporting country to reduce the risk i.e. apples must be imported from registered orchards and packinghouses, from pest free areas, packing must be new and clean, and packed in approved insect-proof boxes to prevent the entry of pests, must be inspected in accordance with appropriate official procedures and found to be free from quarantine pests of concern to Thailand, must be free from soil, sand and contaminating plant materials e.g. leaves, twigs, plant debris or other potential carriers of quarantine pests. In addition, when the consignments arrive at the point of entry in Thailand, the import inspection must be conducted. In case of quarantine pests of concern, pests, any live organisms of potential quarantine, or importation does not comply with a phytosanitary measures are stipulated are found during import inspection, the consignment must be treated with appropriated treatment (if available), re-exported or destroyed. However, import permit and a PC are required. The original copy of a PC must accompany every consignment to Thailand.

Keywords: วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช นำเข้า แอปเปิล สหรัฐอเมริกา
Pest Risk Analysis, Importation, Apple, USA

คำนำ

จากการที่ประเทศไทยเข้าเป็นสมาชิกขององค์การการค้าโลก (World trade organization: WTO) ทำให้ประเทศไทยต้องปฏิบัติตามความตกลงว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement of Application of Sanitary and Phytosanitary Measures: SPS Agreement) ซึ่งเป็นมาตรการในการปกป้องชีวิตหรือสุขภาพของมนุษย์ สัตว์ และพืช ซึ่งการนำมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชไปใช้ จะต้องอยู่ในระดับเพื่อการปกป้องชีวิตหรือสุขภาพของมนุษย์ สัตว์ หรือพืชเท่านั้น โดยจะต้องอยู่บนพื้นฐานของหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ ดังนั้นการกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าสินค้าเกษตรโดยไม่ก่อให้เกิดการกีดกันทางการค้าแอบแฝง ประเทศไทยจำเป็นต้องมีการทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของสินค้าเกษตรที่นำเข้าเพื่อกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าในการป้องกันหรือจัดการความเสี่ยงของศัตรูพืชที่อาจเกิดขึ้น ซึ่งกระบวนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช อาจเริ่มในสถานการณ์ต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ มีการร้องขอให้พิจารณาเส้นทางผ่านเส้นใดเส้นหนึ่งที่อาจต้องมี

มาตรการสุขอนามัยพืช มีการตรวจพบศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่งที่อาจเป็นเหตุผลให้มีมาตรการสุขอนามัยพืช มีการศึกษาทบทวนหรือปรับปรุงมาตรการหรือนโยบายสุขอนามัยพืชต่าง ๆ หรือ มีการขอร้องให้มีการกำหนดชี้ชัดว่าสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งเป็นศัตรูพืชหรือไม่ โดยใช้กรอบ มาตรฐานแนวปฏิบัติ ซึ่งพัฒนาขึ้นมาโดยองค์การระหว่างประเทศ คือ อนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention: IPPC)

แอปเปิล (apple) จัดอยู่ในวงศ์ Rosaceae ซึ่งปัจจุบันผลสดของพืชสกุลมาลัส (*Malus* spp.) จากทุกแหล่งจัดเป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 การนำเข้าหรือนำผ่านเพื่อการค้า จะต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชกำกับมาด้วย และต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช รวมทั้งต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขที่อธิบดีกรมวิชาการเกษตรกำหนด จึงจะสามารถนำเข้าหรือนำผ่านราชอาณาจักรได้ ในปี พ.ศ. 2555 ประเทศไทยนำเข้าสินค้าเกษตรและผลิตภัณฑ์เป็นมูลค่า 433,732 ล้านบาท โดยเป็นผลไม้และผลิตภัณฑ์ มูลค่า 24,663 ล้านบาท ซึ่งมูลค่านำเข้ามากที่สุด คือ แอปเปิลสด มูลค่า 4,983 ล้านบาท มีปริมาณ 133,090 ตัน โดยนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา ปริมาณ 19,002 ตัน คิดเป็นมูลค่า 640 ล้านบาท (ศูนย์สารสนเทศเกษตร, 2556) จากการศึกษารวบรวมข้อมูลศัตรูพืชพบว่า มีศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่มีรายงานพบในประเทศไทย ซึ่งศัตรูพืชเหล่านี้มีโอกาสที่จะติดเข้ามากับผลแอปเปิลสดนำเข้าได้ ดังนั้นหากประเทศไทยไม่มีมาตรการสุขอนามัยพืชที่เหมาะสมแล้ว อาจก่อให้เกิดปัญหาของศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่เคยพบในประเทศติดมากับผลแอปเปิลสดที่นำเข้า เกิดการแพร่กระจายและเพิ่มปริมาณจนเกิดเป็นการระบาดของศัตรูพืชชนิดใหม่ขึ้นได้ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดผลเสียหายต่อเศรษฐกิจของประเทศอย่างใหญ่หลวง ดังนั้นจึงได้ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของแอปเปิลนำเข้า (เฉพาะผลสดเพื่อบริโภค) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้รายชื่อศัตรูพืชกักกัน และกำหนดมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชที่เหมาะสมสำหรับการนำเข้าผลแอปเปิลสดจากประเทศสหรัฐอเมริกา และใช้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนในการประกาศทบทวนมาตรการทางสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าผลสดของแอปเปิลจากประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เอกสารงานวิจัยทั้งในและต่างประเทศ ตำราวิชาการ วารสารวิชาการ รายงานการประชุมและสัมมนาทางวิชาการ

2. มาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures: ISPM) ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Framework for Pest Risk Analysis) (FAO, 2011)

3. มาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน (Pest risk analysis for quarantine pests) (FAO, 2014)

วิธีการ

1 การศึกษาข้อมูลพืชและข้อมูลศัตรูพืชของแอปเปิล

ศึกษาข้อมูลพืชและข้อมูลศัตรูพืชของแอปเปิล โดยค้นคว้ารวบรวมข้อมูลจาก ตำรา วิชาการ วารสารวิชาการ เอกสารเผยแพร่ รายงานการประชุมและสัมมนาทางวิชาการ ที่มีรายงานทั้งในและต่างประเทศ เพื่อให้ได้ข้อมูล ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง ชื่อสามัญ ชีววิทยา แหล่งแพร่กระจาย ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย การป้องกันกำจัด และมาตรการทางสุขอนามัยพืช

2 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชกับผลแอปเปิลสดนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน โดยมีขั้นตอน ดังนี้

2.1 การเริ่มต้น (Stage 1: Initiation)

โดยการจำแนกชนิดสิ่งมีชีวิตและเส้นทางผ่านต่าง ๆ ที่จะมีการพิจารณาสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่เกี่ยวข้องกับพื้นที่การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่ได้มีการระบุจำแนกไว้ และการกำหนดพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชรวมทั้งการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่ผ่านมา

2.2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest Risk Assessment)

การจัดประเภทศัตรูพืช (Pest Categorization)

ดำเนินการโดยการค้นคว้ารวบรวมรายชื่อสิ่งมีชีวิตที่มีรายงานว่าเป็นศัตรูของแอปเปิล โดยจัดแบ่งออกเป็นกลุ่ม เช่น แมลง ไร ไวรัส ไวรอยด์ แบคทีเรีย รา ไส้เดือนฝอย เป็นต้น พร้อมทั้งบันทึกรายละเอียดของศัตรูแอปเปิลแต่ละชนิด ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ แหล่งแพร่กระจาย ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย/อาศัย พบหรือไม่พบในประเทศไทย พิจารณาคัดเลือกเฉพาะศัตรูพืชที่ไม่พบในประเทศไทย มีโอกาสติดเข้ามากับผลแอปเปิลสดและอาจจะก่อให้เกิดความเสียหายได้ นำมาประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนต่อไป

การประเมินความเสี่ยง (Risk Assessment)

โดยการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของแอปเปิลที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ไม่พบในประเทศไทย มีโอกาสติดเข้ามากับผลแอปเปิลสด ตั้งรกรากอย่างถาวร และแพร่ระบาดในประเทศ ตลอดจนประเมินศักยภาพที่จะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจรวมทั้งผลกระทบทางตรงและทางอ้อมหากติดเข้ามา ปัจจัยที่พิจารณา คือ

1. การประเมินศักยภาพในการที่ศัตรูจะเข้ามาเจริญพันธุ์ตั้งรกรากอย่างถาวร และการแพร่กระจาย ในพื้นที่ที่ทำการวิเคราะห์ (Assessment of entry, establishment

and spread) โดยพิจารณาปัจจัยต่าง ๆ ที่สามารถทำให้ศัตรูพืชเข้ามาเจริญแพร่พันธุ์ได้ โดยมีหลักฐานสนับสนุนผลการวิเคราะห์ เช่น สภาพแวดล้อมและสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญแพร่พันธุ์และแพร่ระบาดของศัตรูพืช พืชอาศัย เครื่องกีดกั้นตามธรรมชาติ การเคลื่อนย้ายของศัตรูพืช และพาหะของศัตรูพืชที่มีปรากฏในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยง เป็นต้น

2. การประเมินศักยภาพที่จะเกิดผลตามมาทางเศรษฐกิจในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Potential economic consequence) ความเป็นไปได้สูงที่ศัตรูพืชจะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจ ซึ่งอาจมีผลกระทบทางตรงต่อพืช สัตว์ มนุษย์ และสิ่งแวดล้อม หรือมีผลกระทบทางอ้อม เช่น การป้องกันกำจัด การค้าภายในประเทศและระหว่างประเทศ ผลกระทบทางสังคม เป็นต้น โดยพิจารณาว่ามีผลกระทบจนถึงระดับที่ยอมรับไม่ได้ ในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

2.3 การบริหารจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest Risk Management)

การบริหารจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อปกป้องพื้นที่เสี่ยงภัย (Endangered area) โดยเป็นสัดส่วนกับความเสี่ยงที่จำแนกได้ในการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช อยู่บนพื้นฐานของข้อมูลที่รวบรวมได้ในการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช มาตรการสุขอนามัยพืชต้องมีประสิทธิภาพและใช้เท่าที่จำเป็นเพื่อประสิทธิภาพในการป้องกันของพื้นที่เสี่ยงภัย

เวลาและสถานที่

เวลา: เดือนตุลาคม 2555 - เดือนกันยายน 2557

สถานที่: กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาข้อมูลพืชและข้อมูลศัตรูพืชของแอปเปิล

แอปเปิลเป็นพืชอยู่ในวงศ์ Rosaceae สกุลมาลัส (*Malus*) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Malus* x *domestica* Borkh. หรือ *M. domestica* Borkh. ชื่อพ้อง *Pyrus malus* L., *M. malus* Britt., *M. pumila* Mill. และ *M. sylvestris* Mill. (Luby, 2003) แอปเปิลที่ปลูกเป็นการค้าในประเทศสหรัฐอเมริกามีเกือบ 100 สายพันธุ์ แต่มีเพียง 15 สายพันธุ์ ที่ได้รับความนิยม และผลิตได้มากถึงร้อยละ 90 ในปี 2551 ได้แก่ Braeburn, Cortland, Empire, Fuji, Gala, Ginger Gold, Golden Delicious, Granny Smith, Honeycrisp, Idared, Jonagold, Jonathan, McIntosh, Red Delicious และ Rome (U.S. Apple Association, 2012)

ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไข ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 กำหนดให้ผลสดของพืชสกุล *Malus* เป็นสิ่งต้องห้าม ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 และที่แก้ไขเพิ่มเติม โดยผลแอปเปิลสดจากประเทศสหรัฐอเมริกาได้รับการผ่อนผันให้นำเข้าประเทศไทยได้ตามบทเฉพาะกาลของประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ฉบับดังกล่าว จนกว่าการวิเคราะห์ความ

เสี่ยงศัตรูพืชจะเสร็จสิ้น ทั้งนี้ การนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการค้า ต้องได้รับอนุญาตจากอธิบดีกรมวิชาการเกษตร ต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชกำกับมาด้วย ต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขที่อธิบดีกรมวิชาการเกษตรกำหนด และต้องนำเข้าทางด่านตรวจพืชเพื่อให้พนักงานเจ้าหน้าที่ตรวจ

กรมวิชาการเกษตรได้ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชและกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าผลแอปเปิลสดจากประเทศ ฝรั่งเศส แคนาดา ออสเตรเลีย และชิลี เสร็จสิ้นแล้ว ตามประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าผลแอปเปิลสดจากสาธารณรัฐฝรั่งเศส พ.ศ. 2555 ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าผลแอปเปิลสดจากแคนาดา พ.ศ. 2555 ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าผลแอปเปิลสดจากเครือรัฐออสเตรเลีย พ.ศ. 2556 และประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าผลแอปเปิลสดจากสาธารณรัฐชิลี พ.ศ. 2556 โดยมีสาระสำคัญ คือ ต้องมีใบอนุญาตนำเข้าซึ่งออกให้โดยกรมวิชาการเกษตร ต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชโดยต้นฉบับใบรับรองสุขอนามัยพืชต้องแนบมาพร้อมกับสินค้าทุกครั้ง ผลแอปเปิลสดต้องมาจากสวนและโรงบรรจุสินค้าที่ขึ้นทะเบียน ต้องสุ่มตรวจผลแอปเปิลสดก่อนส่งออกตามกระบวนการที่เหมาะสมอย่างเป็นทางการและต้องปราศจากศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย และการส่งออกผลแอปเปิลสดจะเริ่มดำเนินการได้หลังจากที่กรมวิชาการเกษตรได้ทำการประเมินกระบวนการตรวจรับรองส่งออกแล้วเท่านั้น โดยมีเงื่อนไขสำหรับการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกัน คือ ผลแอปเปิลสดนำเข้าจากประเทศฝรั่งเศสต้องกำจัดแมลงวันผลไม้ Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) ด้วยวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านสุขอนามัยพืชด้วยความเย็น ดังต่อไปนี้ 1.11 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน หรือ 1.67 องศาเซลเซียส นาน 16 วัน หรือ 2.22 องศาเซลเซียส นาน 18 วัน ส่วนผลแอปเปิลสดนำเข้าจากประเทศแคนาดาอนุญาตให้นำเข้ามาได้เฉพาะรัฐบริติชโคลัมเบีย สำหรับผลแอปเปิลสดนำเข้าจากประเทศออสเตรเลียต้องมาจากแปลงปลูกในพื้นที่ปลอดแมลงวันผลไม้ หรือผลแอปเปิลสดจากแปลงปลูกซึ่งอยู่นอกพื้นที่ปลอดแมลงวันผลไม้ในรัฐนิวเซาท์เวลส์ เซาท์ออสเตรเลีย วิกตอเรีย และควีนส์แลนด์ ต้องกำจัดแมลงวันผลไม้ Jarvis' fruit fly (*Bactrocera jarvisi*), lesser Queensland fruit fly (*B. neohumeralis*), Queensland fruit fly (*B. tryoni*) ด้วยวิธีกำจัดศัตรูพืชด้วยความเย็น ดังต่อไปนี้ 0 องศาเซลเซียส นาน 13 วัน หรือ 0.56 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน หรือ 1.11 องศาเซลเซียส นาน 18 วัน หรือ 1.67 องศาเซลเซียส นาน 20 วัน หรือ 2.22 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน และผลแอปเปิลสดจากแปลงปลูกซึ่งอยู่นอกพื้นที่ปลอดแมลงวันผลไม้ในรัฐเวสเทิร์นออสเตรเลียต้องกำจัดแมลงวันผลไม้แมลงวันผลไม้ *C. capitata* ด้วยวิธีกำจัดศัตรูพืชด้วยความเย็น ดังต่อไปนี้ 1.11 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน หรือ 1.67 องศาเซลเซียส นาน 16 วัน หรือ 2.22 องศาเซลเซียส นาน 18 วัน และผลแอปเปิลสดนำเข้าจากประเทศชิลีจะเป็นไปโดยการให้การรับรองพื้นที่ปลอดแมลงวันผลไม้ซึ่งปัจจุบันประเทศชิลีได้รับการยอมรับว่าเป็นพื้นที่ปลอดศัตรูพืชสำหรับแมลงวันผลไม้ (*C. capitata*) ซึ่งเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย หากตรวจพบศัตรูพืชกักกันอื่นนอกเหนือจากแมลงวันผลไม้ต้อง

รมผลแอปเปิลสดด้วยสารรมเมทิลโบรไมด์ที่อัตราความเข้มข้นที่กำหนด เพื่อกำจัดแมลงและไรซึ่งทำลายบริเวณภายนอกผลก่อนส่งออกมายังประเทศไทย

ประเทศไทยมีการนำเข้าผลแอปเปิลสดตลอดทั้งปี ในปี 2555 มีการนำเข้า ทั้งหมด 133,090 ตัน มูลค่า 4,982,914,000 บาท โดยนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา 19,002 ตัน มูลค่า 639,925,000 บาท ซึ่งเป็นอันดับที่ 3 รองจาก ประเทศจีนและนิวซีแลนด์ (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2556)

ศัตรูพืชของแอปเปิล จากการศึกษาพบศัตรูแอปเปิลรวมทั้งสิ้น 388 ชนิด เป็นแมลง 236 ชนิด ไร 17 ชนิด ไส้เดือนฝอย 12 ชนิด หนู 1 ชนิด รา 74 ชนิด แบคทีเรียและไฟโตพลาสมา 13 ชนิด ไวรัสและไวรอยด์ 15 ชนิด วัชพืช 19 ชนิด และไม่ทราบสาเหตุ 1 ชนิด

2 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

2.1 การเริ่มต้น (Stage 1: Initiation)

ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 และที่แก้ไขเพิ่มเติม แบ่งสิ่งที่อยู่ภายใต้การควบคุมออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ สิ่งต้องห้าม สิ่งกำกัด และสิ่งไม่ต้องห้าม ซึ่งการนำเข้าหรือนำผ่านสิ่งต้องห้ามเพื่อการค้า ต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชกำกับมาด้วย และต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช การนำเข้าต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขที่อธิบดีกรมวิชาการเกษตรกำหนดโดยคำแนะนำของคณะกรรมการกักพืชโดยประกาศลงในราชกิจจานุเบกษา จึงจะสามารถนำเข้าหรือนำผ่านราชอาณาจักรได้ ซึ่งผลสดของพืชสกุล *Malus* จากทุกแหล่งเป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้ามข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 ลงวันที่ 26 เมษายน 2550 ทั้งนี้ ตามบทเฉพาะกาลของประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ฉบับดังกล่าวสิ่งต้องห้ามตามท้ายประกาศที่เคยมีการนำเข้ามาในราชอาณาจักรแล้วในลักษณะทางการค้าก่อนที่ประกาศนี้มีผลใช้บังคับ จะได้รับการผ่อนผันให้นำเข้าได้ต่อไปจนกว่าการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของสิ่งต้องห้ามนั้นเสร็จสิ้น ซึ่งประเทศสหรัฐอเมริกาได้ร้องขอนำเข้าผลแอปเปิลสดมายังประเทศไทยเพื่อบริโภค โดยพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่กำหนดในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าผลแอปเปิลสด คือ ประเทศไทย ซึ่งเป็นพื้นที่ที่อยู่ในอันตราย (endangered area) ที่ศัตรูพืชอาจจะติดเข้ามาพร้อมกับการนำเข้าผลแอปเปิลสดที่จัดเป็นเส้นทางศัตรูพืช (pathway) และประเทศไทยยังไม่เคยมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของผลแอปเปิลสดนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกาเพื่อการบริโภค

2.2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest Risk Assessment)

การจัดประเภทศัตรูพืช (Pest Categorization)

ผลการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืช พบว่าศัตรูแอปเปิลที่มีรายงานพบในประเทศสหรัฐอเมริกามีจำนวน 214 ชนิด เป็นแมลง 102 ชนิด ได้แก่ *Acrosternum hilare, Agrotis ipsilon, Ametastegia, Anastrepha fraterculus, Anastrepha ludens, Anastrepha serpentina, Anastrepha suspensa, Anoplophora chinensis, Anthonomus quadrigibbus,*

Aphis gossypii, Aphis pomi, Aphis spiraecola, Archips argyrospilus, Archips fuscocupreanus, Archips rosana, Argyrotaenia citrana, Argyrotaenia velutinana, Bactrocera dorsalis, Caliroa cerasi, Carpophilus humeralis, Carpophilus mutilatus, Ceratitis capitata, Ceresa alta, Chaetocnema confinis, Choreutis pariana, Choristoneura rosaceana, Chrysomphalus aonidum, Chymomyza amoena, Conotrachelus nenuphar, Cotinis nitida, Cydia pomonella, Dasineura mali, Diaspidiotus perniciosus, Drosophila immigrans, Drosophila simulans, Dysaphis plantaginea, Dysmicoccus brevipes, Edwardsiana rosae, Empoasca fabae, Enarmonia formosana, Epidiaspis leperii, Epiphyas postvittana, Eriosoma lanigerum, Eulecanium tiliae, Euproctis chrysorrhoea, Frankliniella, Frankliniella occidentalis, Grapholita molesta, Grapholita packardi, Grapholita prunivora, Gryllotalpa gryllotalpa, Halyomorpha halys, Harmonia axyridis, Hedya nubiferana, Hoplocampa, Hyalophora cecropia, Hyalopterus pruni, Hyphantria cunea, Lepidosaphes ulmi, Lopholeucaspis japonica, Lymantria dispar, Lyonetia prunifoliella, Magicicada septendecim, Malacosoma americanum, Metcalfa pruinosa, Myzus persicae, Operophtera brumata, Orgyia antiqua, Orgyia leucostigma, Ostrinia nubilalis, Otiorhynchus cribricollis, Pandemis pyrusana, Pantomorus cervinus, Parlatoria oleae, Parlatoria pergandii, Parthenolecanium corni, Peridroma saucia, Phyllonorycter blancardella, Phyllonorycter crataegella, Phyllonorycter elmaella, Phyllonorycter mespilella, Platynota flavedana, Platynota idaeusalis, Pseudococcus calceolariae, Pseudococcus comstocki, Pseudococcus longispinus, Pseudococcus maritimus, Retithrips syriacus, Rhagoletis pomonella, Rhopalosiphum insertum, Scolytus rugulosus, Spilonota ocellana, Spodoptera frugiperda, Spodoptera litura, Synanthedon scitula, Typhlocyba pomaria, Xestia c-nigrum, Xyleborinus saxesenii, Xyleborus dispar, Xylosandrus germanus, Yponomeuta malinellus, และ *Zeuzera pyrina* ไร 9 ชนิด ได้แก่ *Aculus schlechtendali, Brevipalpus obovatus, Brevipalpus phoenicis, Bryobia rubrioculus, Panonychus citri, Panonychus ulmi, Petrobia latens, Tetranychus cinnabarinus,* และ *Tetranychus urticae* ไส้เดือนฝอย 10 ชนิด ได้แก่ *Helicotylenchus dihystera, Longidorus elongatus, Paratrichodorus porosus, Pratylenchus penetrans, Pratylenchus scribneri, Trichodorus, Trichodorus viruliferus, Xiphinema americanum, Xiphinema index,* และ *Xiphinema rivesi* หนู 1 ชนิด ได้แก่ *Rattus rattus* รา 51 ชนิด ได้แก่ *Alternaria alternata, Alternaria mali, Armillaria tabescens, Aspergillus flavus, Botryosphaeria dothidea, Botryosphaeria obtusa, Botryosphaeria ribis, Botryosphaeria stevensii, Botryotinia fuckeliana, Chondrostereum purpureum, Colletotrichum*

acutatum, Corticium koleroga, Cryphonectria parasitica, Diaporthe eres, Eutypa lata, Fomitopsis pinicola, Fusarium oxysporum, Gibberella acuminata, Gibberella avenacea, Glomerella cingulata, Gymnosporangium clavipes, Gymnosporangium globosum, Gymnosporangium juniperi-virginianae, Monilinia laxa, Mucor piriformis, Nattrassia mangiferae, Nectria cinnabarina, Nectria radicicola, Neonectria galligena, Penicillium digitatum, Penicillium expansum, Pezicula malicorticis, Phyllachora pomigena, Phyllactinia mali, Phyllosticta solitaria, Phymatotrichopsis omnivora, Phytophthora cactorum, Phytophthora cambivora, Phytophthora cryptogea, Phytophthora drechsleri, Phytophthora megasperma, Pleospora herbarum, Podosphaera leucotricha, Pythium irregulare, Pythium ultimum, Rhizopus stolonifer, Rosellinia necatrix, Schizothyrium pomi, Sclerotinia sclerotiorum, Valsa ceratosperma, และ *Venturia inaequalis* แบคทีเรียและไฟโตพลาสมา 10 ชนิด ได้แก่ *Acetobacter pasteurianus, Apple rubbery wood phytoplasma, Candidatus phytoplasma pyri, Erwinia amylovora, Pantoea agglomerans, Pseudomonas cichorii, Pseudomonas syringae, Pseudomonas syringae* pv. *papulans, Pseudomonas syringae* pv. *syringae,* และ *Rhizobium radiobacter* ไวรัสและไวรอยด์ 12 ชนิด ได้แก่ *Apple chlorotic leaf spot virus, Apple green crinkle disease, Apple mosaic virus, Apple scar skin viroid, Apple star crack agent, Apple stem grooving virus, Apple stem pitting virus, Cherry rasp leaf virus, Prunus necrotic ringspot virus, Tobacco mosaic virus, Tobacco necrosis virus,* และ *Tomato ringspot virus* วัชพืช 18 ชนิด ได้แก่ *Cirsium arvense, Conyza bonariensis, Conyza canadensis, Emex australis, Emex spinosa, Galinsoga parviflora, Lepidium draba, Lonicera japonica, Oxalis pes-caprae, Pennisetum clandestinum, Poa annua, Polygonum aviculare, Richardia brasiliensis, Rubus ellipticus, Senecio vulgaris, Solanum carolinense, Stellaria media,* และ *Taraxacum officinale* และไม่ทราบสาเหตุ 1 ชนิด ได้แก่ Apple chat fruit disease

สำหรับศัตรูแอปเปิลที่มีรายงานพบในประเทศไทยมีจำนวน 35 ชนิด เป็นแมลง 16 ชนิด ได้แก่ *Agrotis ipsilon, Aphis gossypii, Aphis spiraecola, Bactrocera dorsalis, Bactrocera zonata, Calliteara horsfieldii, Chaetocnema confinis, Chrysomphalus aonidum, Conogethes punctiferalis, Diaspidiotus perniciosus, Icerya aegyptiaca, Myzus persicae, Parlatoria pergandii, Pseudococcus comstocki, Spodoptera litura,* และ *Zeuzera coffeae* ไร 4 ชนิด ได้แก่ *Brevipalpus phoenicis, Tetranychus cinnabarinus, Tetranychus kanzawai,* และ *Tetranychus urticae* ไส้เดือนฝอย 1 ชนิด ได้แก่ *Helicotylenchus dihystera* รา 8 ชนิด ได้แก่ *Alternaria alternata, Aspergillus flavus, Botryosphaeria ribis, Colletotrichum acutatum, Fomitopsis pinicola, Glomerella*

cingulata, Nectria cinnabarina, และ *Sclerotinia sclerotiorum* แบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *Pantoea agglomerans,* และ *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* และวัชพืช 4 ชนิด ได้แก่ *Conyza canadensis, Galinsoga parviflora, Richardia brasiliensis,* และ *Rubus ellipticus*

การประเมินความเสี่ยง (Risk Assessment)

จากการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของแอปเปิลที่มีรายงานพบในประเทศสหรัฐอเมริกา และไม่พบในประเทศไทย ซึ่งมีโอกาสติดเข้ามากับผลแอปเปิลสด ตั้งรกรากอย่างถาวรและแพร่ระบาดในประเทศ ตลอดจนศักยภาพที่จะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจ พบว่า มีจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ แมลงวันผลไม้ *Anastrepha fraterculus*, *A. ludens*, *A. serpentina*, *A. suspensa*, *C. capitata*, ผีเสื้อ *Cydia pomonella*, *Epiphyas postvittana*, *Grapholita molesta*, *G. prunivora* เพลี้ยหอย *Epidiaspis leperii* ด้วง *Conotrachelus nenuphar* และแมลง *Rhagoletis pomonella* ดังแสดงใน table 1 โดยเป็นศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงสูง ได้แก่ แมลงวันผลไม้ ทั้ง 5 ชนิด เนื่องจากมีโอกาสติดเข้ามากับผลแอปเปิลสดนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกาโดยตัวหนอนอาศัยและเจริญเติบโตอยู่ภายในผล ไม่สามารถสังเกตลักษณะการทำลายภายนอกได้ด้วยตาเปล่า นอกจากนี้ยังมีโอกาสที่จะเจริญและแพร่พันธุ์ได้ในประเทศไทยเนื่องจากปัจจัยทางด้านภูมิอากาศที่เหมาะสม สามารถวางไข่ได้ครั้งละเป็นจำนวนมากและบินได้ระยะทางไกล มีพืชอาหารหลายชนิดที่เป็นไม้ผลพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ก่อให้เกิดผลกระทบต่อการผลิตผักผลไม้รวมทั้งการส่งออกผักผลไม้ไปยังประเทศที่ไม่มีการระบาดของแมลงผลไม้นี้ เช่น แมลงวันผลไม้ *C. capitata* เป็นที่แพร่หลายในทวีปแอฟริกาและมีถิ่นที่มากที่สุดในประเทศแถบทะเลทรายซาฮาราและแพร่ระบาดไปยังยุโรป อียิปต์ ตะวันออกกลาง อนุภูมิภาคมาดากัสการ์ ออสเตรเลีย และอเมริกา มีพืชอาหารกว้าง พืชอาหารหลายชนิดที่เป็นไม้ผลพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย เช่น พริก กาแฟ ฝรั่ง มะละกอ ส้ม มังคุด ลิ้นจี่ มะม่วง ชมพู่ และองุ่น เป็นต้น ตัวหนอนกินอาหารและเจริญเติบโตประมาณ 6-11 วัน (ที่อุณหภูมิ 13-28 องศาเซลเซียส) เข้าดักแด้ในดินประมาณ 6-11 วัน (ที่อุณหภูมิ 24-26 องศาเซลเซียส) ตัวเต็มวัยมีชีวิตอยู่ได้ 2 เดือน สำหรับศัตรูพืชกักกันอีก 7 ชนิด นั้นเป็นศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงต่ำ ดังนั้นถ้ามีระบบการจัดการที่ดีภายในแหล่งปลูก โรงบรรจุสินค้า และระบบการจัดการก่อนการส่งออกสามารถที่จะขจัดศัตรูพืชเหล่านี้ออกไปได้ ตลอดจนสามารถจนสามารถตรวจสอบการนำเข้าได้ด้วยตาเปล่า การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน

2.3 การบริหารจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest Risk Management)

จากผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของผลแอปเปิลสดนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกาจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าหรือมาตรการทางสุขอนามัยพืช เนื่องจากมีศัตรูพืชหลายชนิดที่เป็นศัตรูพืชกักกันและบางชนิดมีความเสี่ยงสูงซึ่งมีโอกาสติดเข้ามากับผลแอปเปิลสดนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกาเข้ามาตั้งรกราก และแพร่ระบาดในประเทศไทยและมีผลกระทบทางเศรษฐกิจทั้งทางตรงและทางอ้อมได้ โดยการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชควรกำหนดมาตรการ ดังนี้

1. การกำจัดศัตรูพืช ต้องมีมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับแมลงวันผลไม้ ได้แก่ *A. fraterculus*, *A. ludens*, *A. serpentina*, *A. suspensa* และ *C. capitata* ต้องกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลแอปเปิลสดด้วยวิธีการกำจัดศัตรูพืช เช่น วิธีการกำจัดศัตรูพืชด้วยความเย็นก่อนส่งออกหรือระหว่างการขนส่ง ตามอุณหภูมิและระยะเวลาที่กำหนด ได้แก่ (1) ที่อุณหภูมิ 1.11 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน หรือ 1.67 องศาเซลเซียส นาน 16 วัน หรือ 2.22 องศาเซลเซียส นาน 18 วัน สำหรับแมลงวันผลไม้ *C. capitata* (2) ที่อุณหภูมิ 1.11 องศาเซลเซียส นาน 15 วัน หรือ 1.67 องศาเซลเซียส นาน 17 วัน สำหรับแมลงวันผลไม้ *C. capitata* และแมลงวันผลไม้ *Anastrepha* (นอกเหนือจาก *A. ludens*) (3) ที่อุณหภูมิ 0.56 องศาเซลเซียส นาน 18 วัน หรือ 1.11 องศาเซลเซียส นาน 20 วัน หรือ 1.67 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน สำหรับแมลงวันผลไม้ *A. ludens* และ (4) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 11 วัน หรือ 0.56 องศาเซลเซียส นาน 13 วัน หรือ 1.11 องศาเซลเซียส นาน 15 วัน หรือ 1.67 องศาเซลเซียส นาน 17 วัน สำหรับแมลงวันผลไม้ *Anastrepha* (นอกเหนือจาก *A. ludens*) (PPQ, 2012) ก่อนการส่งออกหรือระหว่างการขนส่งมายังประเทศไทย สำหรับศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ ต้องมีการบริหารจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชด้วยวิธีการที่เหมาะสม เช่น ต้องปลูกแอปเปิลภายใต้การจัดการเชิงระบบ หรือผลแอปเปิลสดต้องมาจากแหล่งปลอดศัตรูพืช หรือแหล่งควบคุมศัตรูพืช หรือการบริหารจัดการภายหลังการเก็บเกี่ยว เช่น การคัดผลแอปเปิลสด การล้างทำความสะอาด เป็นต้น

2. ผลแอปเปิลสดต้องเป็นผลผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกาและมาจากสวนแอปเปิลที่ปลูกเพื่อการค้าซึ่งได้จดทะเบียนไว้กับองค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization, NPPO) หรือหน่วยงานที่รับผิดชอบของประเทศสหรัฐอเมริกา หรือภายใต้ระบบที่หน่วยงานที่รับผิดชอบของประเทศสหรัฐอเมริกาให้การรับรอง โดยที่หน่วยงานที่รับผิดชอบของประเทศสหรัฐอเมริกากำหนดให้เป็นแหล่งปลูกแอปเปิลสำหรับส่งออกไปยังประเทศไทยและผ่านการรับรองจากกรมวิชาการเกษตรซึ่งเป็นหน่วยงานที่รับผิดชอบของประเทศไทยก่อนที่จะส่งออก และสวนแอปเปิลทุกสวนในแหล่งปลูกแอปเปิลที่กำหนดไว้สำหรับส่งออกไปยังประเทศไทยต้องจดทะเบียนกับหน่วยงานที่รับผิดชอบของประเทศสหรัฐอเมริกา และต้องดำเนินการจดทะเบียนสวนแอปเปิลส่งออกให้เสร็จสิ้นก่อนเริ่มการส่งออก

3. เกษตรกรเจ้าของสวนแอปเปิลที่จดทะเบียนต้องมีการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี (good agricultural practices; GAP) ในสวนแอปเปิล โดยต้องรักษาความสะอาดสวนแอปเปิล และต้องมีการบริหารจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน หรือมีมาตรการอื่น ๆ ในการควบคุมศัตรูพืช ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าศัตรูพืชกักกันได้รับการจัดการอย่างเหมาะสม เกษตรกรเจ้าของสวนแอปเปิลต้องมีการดำเนินการต่าง ๆ เพื่อกำจัดศัตรูพืชครบถ้วนแล้วภายในสวนแอปเปิล

4. โรงคัดบรรจุแอปเปิลต้องได้รับการรับรองมาตรฐาน ได้รับการขึ้นทะเบียนจากหน่วยงานที่รับผิดชอบของประเทศสหรัฐอเมริกาก่อนที่จะส่งผลแอปเปิลสดไปยังประเทศไทย มีการคัดเลือกผลผลิตหรือแอปเปิลสดให้ได้มาตรฐานโดยต้องนำผลแอปเปิลสดมาจากสวนแอปเปิลที่จด

ทะเบียนซึ่งปลูกเพื่อการค้าจากแหล่งปลูกที่กำหนดเท่านั้น ทั้งนี้ เพื่อให้สามารถดำเนินการตรวจสอบย้อนกลับแหล่งที่มาของผลแอปเปิลสดที่ส่งออกได้ ผลแอปเปิลสดต้องไม่มีรอยทำลายของแมลงหรือศัตรูพืช หรือลักษณะอาการของโรค ผลสมบูรณ์ ไม่มีรอยแตก สำหรับภาชนะบรรจุหรือบรรจุภัณฑ์ต้องใหม่ สะอาด และสามารถป้องกันการเข้าทำลายซ้ำของศัตรูพืชได้ ซึ่งต้องไม่มีการปะปนของ ดิน ทราย และชิ้นส่วนของพืชนอกเหนือจากผลแอปเปิลสด เช่น ใบ กิ่ง วัชพืช เศษซากพืช เป็นต้น หรือสิ่งอื่นใดที่มีศักยภาพนำพาศัตรูพืชกักกันได้ รวมทั้งต้องแสดงข้อมูลที่จำเป็นบนบรรจุภัณฑ์เพื่อให้การตรวจสอบย้อนกลับเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว เช่น Produce of USA, Name of exporting company, Name of fruit (common name), Packinghouse registration number และ Orchard registration number เป็นต้น นอกจากนี้หากผลแอปเปิลสดที่ส่งมายังประเทศไทยมีการใช้บรรจุภัณฑ์ที่ทำจากไม้ต้องเป็นไปตามข้อกำหนดในมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 15 เรื่อง แนวทางปฏิบัติสำหรับระเบียบควบคุมวัสดุบรรจุหีบห่อที่เป็นเนื้อไม้ในการค้าระหว่างประเทศ (Guidelines for regulating wood packaging material in international trade)

5. ต้องสุ่มตรวจผลแอปเปิลสดก่อนส่งออกตามกระบวนการที่เหมาะสมอย่างเป็นทางการ และต้องปราศจากศัตรูพืชกักกัน หรือหากมีการตรวจพบศัตรูพืชกักกัน ผลแอปเปิลสดทั้งหมดจะส่งออกไปยังประเทศไทยได้ต่อเมื่อได้ดำเนินการกำจัดศัตรูพืชหรือขจัดศัตรูพืชเหล่านั้นให้หมดสิ้นแล้ว

6. การบริหารจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช ณ จุดนำเข้า หรือด่านตรวจพืชในประเทศไทย ควรมีการสุ่มตรวจผลแอปเปิลสด โดยมีจำนวนผลแอปเปิลสดที่สุ่ม คือ ในกรณีการนำเข้ามีจำนวนน้อยกว่า 1,000 ผล สุ่มตัวอย่างผลแอปเปิลสดจำนวน 450 ผล หรือทั้งหมด หรือในกรณีการนำเข้ามีจำนวนเท่ากับหรือมากกว่า 1,000 ผล สุ่มตัวอย่างผลแอปเปิลสดจำนวน 600 ผล (Whyte, 2009) หากมีการตรวจพบศัตรูพืชกักกัน หรือศัตรูพืชชนิดอื่นที่ไม่ใช่ศัตรูพืชกักกันหรือสิ่งอื่นใดที่มีศักยภาพในการนำพาศัตรูพืชกักกันได้ ควรส่งกลับ ทำลาย หรือกำจัดศัตรูพืชด้วยวิธีการที่เหมาะสม เช่น การรมด้วยสารรมเมทิลโบรไมด์

อย่างไรก็ตามผลแอปเปิลสดต้องไม่มีการปะปนของ ดิน ทราย และชิ้นส่วนของพืชนอกเหนือจากผลแอปเปิลสด หรือสิ่งอื่นใดที่มีศักยภาพในการนำพาศัตรูพืชกักกันได้ และหากการนำเข้าผลแอปเปิลสดมีการตรวจพบศัตรูพืชกักกันหรือสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีชีวิต ควรมีมาตรการระงับการนำเข้าและให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องของประเทศสหรัฐอเมริกาหรือผู้ส่งออกชี้แจงสาเหตุที่เกิดขึ้นอย่างชัดเจนและเสนอมาตรการแก้ไข รวมทั้งได้ดำเนินมาตรการแก้ไข จึงจะยกเลิกมาตรการระงับการนำเข้าผลแอปเปิลสด

นอกจากนี้ผลแอปเปิลสดนั้นเป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไข ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 ซึ่งการนำเข้าสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 และที่แก้ไขเพิ่มเติม กำหนดให้ต้องนำเข้าทางด่านตรวจพืชเพื่อให้พนักงาน

เจ้าหน้าที่ตรวจ ต้องมีใบอนุญาตนำเข้า และใบรับรองสุขอนามัยพืชกำกับมาพร้อมกับสินค้าทุกครั้งที่มีการนำเข้า ซึ่งใบรับรองสุขอนามัยพืชควรระบุหมายเลขตู้ขนส่งสินค้าและหมายเลขผนึกปิดตู้ขนส่งสินค้า (สำหรับการขนส่งทางน้ำ) ด้วย

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลสดของแอปเปิลจากทุกแหล่งจัดเป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 ซึ่งการนำเข้าหรือนำผ่านเพื่อการค้านั้น ต้องมีใบอนุญาตนำเข้าหรือนำผ่าน ต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชกำกับมาด้วย และต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขที่อธิบดีกรมวิชาการเกษตรกำหนด ทั้งนี้ ผลแอปเปิลสดจากประเทศสหรัฐอเมริกาได้รับผ่อนผันให้นำเข้าได้จนกว่าการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชจะเสร็จสิ้น ซึ่งประเทศไทยยังไม่เคยมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของผลแอปเปิลสดที่นำเข้าเพื่อการค้าสำหรับการบริโภคจากประเทศสหรัฐอเมริกา จากการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของผลแอปเปิลสดสดนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา พบศัตรูพืชของแอปเปิล จำนวน 388 ชนิด ซึ่งมีรายงานพบในประเทศสหรัฐอเมริกา 214 ชนิด และมีรายงานพบในประเทศไทย 35 ชนิด โดยมีจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ แมลงวันผลไม้ *Anastrepha fraterculus*, *A. ludens*, *A. serpentina*, *A. suspensa*, *Ceratitis capitata*, ผีเสื้อ *Cydia pomonella*, *Epiphyas postvittana*, *Grapholita molesta*, *G. prunivora* เพลี้ยหอย *Epidiaspis leperii* ด้วง *Conotrachelus nenuphar* และแมลง *Rhagoletis pomonella* ที่มีโอกาสติดเข้ามากับผลแอปเปิลสด ตั้งรกรากอย่างถาวร และแพร่ระบาดในประเทศ ตลอดจนมีศักยภาพที่จะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจ ซึ่งแมลงวันผลไม้ ทั้ง 5 ชนิด เป็นศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงศัตรูพืชสูงเนื่องจากตัวหนอนอาศัยและเจริญเติบโตอยู่ภายในผล ไม่สามารถสังเกตลักษณะการทำลายภายนอกได้ด้วยตาเปล่า นอกจากนี้ยังมีโอกาสที่จะเจริญและแพร่พันธุ์ได้ในประเทศไทยเนื่องจากปัจจัยทางด้านภูมิอากาศที่เหมาะสม มีพืชอาหารหลายชนิดและเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ต้องมีการกำจัดศัตรูพืชด้วยวิธีการกำจัดศัตรูพืช เช่น วิธีการกำจัดศัตรูพืชด้วยความเย็นก่อนส่งออกหรือระหว่างการขนส่งมายังประเทศไทยด้วยอุณหภูมิและระยะเวลาที่กำหนด ทั้งนี้ ประเทศสหรัฐอเมริกาขอส่งออกผลแอปเปิลสดจากรัฐ แคลิฟอร์เนีย ไอดาโฮ ออริกอน และ วอชิงตัน ซึ่งไม่มีแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย (EPPO, undated datasheet) จึงไม่มีความจำเป็นต้องผ่านการกำจัดศัตรูพืชสำหรับแมลงวันผลไม้ แต่อย่างไรก็ตาม หน่วยงานที่รับผิดชอบของประเทศสหรัฐอเมริกาต้องดำเนินการสำรวจแบบติดตามอย่างสม่ำเสมอสำหรับแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย และต้องแจ้งให้กรมวิชาการเกษตรทราบโดยทันทีถ้ามีการยืนยันว่าพบการแพร่ระบาดของแมลงวันผลไม้ชนิดใดชนิดหนึ่งในพื้นที่ใดพื้นที่หนึ่งในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยต้องระงับการให้การรับรองการส่งออกผลแอปเปิลสดที่ไม่ผ่านการกำจัดศัตรูพืชจากพื้นที่นั้นมายังประเทศไทย นอกจากนี้ ต้องกำหนดในเงื่อนไขการนำเข้า

ว่าอนุญาตให้นำเข้าผลแอปเปิลสดจากประเทศสหรัฐอเมริกาเฉพาะจากรัฐ ดังนี้ แคลิฟอร์เนีย ไอดาโฮ ออริกอน และ วอชิงตัน สำหรับศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ ต้องมีการบริหารจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชด้วยวิธีการที่เหมาะสมในประเทศผู้ส่งออกเพื่อลดความเสี่ยงศัตรูพืชที่อาจจะเกิดขึ้น รวมทั้งต้องมีการตรวจรับรองว่าปลอดจากศัตรูพืชกักกันของประเทศไทยก่อนการส่งออก

เอกสารอ้างอิง

“**ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าผลแอปเปิลสดจากเครือรัฐออสเตรเลีย พ.ศ. 2556**” (2556, 17 เมษายน). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 130 ตอนพิเศษ 48 ง. หน้า 31-40.

“**ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าผลแอปเปิลสดจากแคนาดา พ.ศ. 2555**” (2555, 18 มิถุนายน). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 129 ตอนพิเศษ 95 ง. หน้า 6-9.

“**ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าผลแอปเปิลสดจากสาธารณรัฐฝรั่งเศส พ.ศ. 2555**” (2555, 6 มิถุนายน). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 129 ตอนพิเศษ 89 ง. หน้า 28-34.

“**ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าผลแอปเปิลสดจากสาธารณรัฐชิลี พ.ศ. 2556**” (2556, 19 เมษายน). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 130 ตอนพิเศษ 49 ง. หน้า 22-29.

“**ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และ เงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550**” (2550, 1 มิถุนายน). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 124 ตอนพิเศษ 66 ง. หน้า 1-3.

“**พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542**” (2542, 18 พฤษภาคม) ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 116 ตอนที่ 39 ก. หน้า 1-9.

“**พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551**” (2551, 1 มีนาคม). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 125 ตอนที่ 40 ก. หน้า 28-37.

“**พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507**” (2507, 21 มีนาคม) ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 81 ตอนที่ 27 ฉบับพิเศษ หน้า 1-12.

ศูนย์สารสนเทศเกษตร. 2556. **สถิติการค้าสินค้าเกษตรไทยกับต่างประเทศ ปี 2555**. ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

APHIS. 2008. **Summary of pests of exported fruit to Thailand from California, Idaho, Oregon, Washington State**. APHIS, USDA.

CAB International. 2007. **Crop Protection Compendium 2007 Edition**. (Computer Program). CAB International. Wallingford, UK.

FAO. 2011. **ISPM 02: 2007 Framework for pest risk analysis**. Rome, IPPC, FAO.

FAO. 2014. **ISPM 11: 2013 Pest risk analysis for quarantine pests**. Rome, IPPC, FAO.

Luby, J.J. 2003. **Taxonomic classification and brief history**, pp. 1-14. *In* Ferree, D.C., and I.J. Warrington (eds.), **Apples: botany, production and uses**. CABI Publishing: Wallingford.

PPQ (Plant Protection and Quarantine). 2012. **Treatment manual**. Animal and Plant Health Inspection Service. United States Department of Agriculture. Washington, DC, USA.

U.S. Apple Association. 2012. **Apple varieties, industry stats, FAQs and more**. (Online). Available. http://www. usapple.org (December 1, 2012)

Whyte, C.F. 2009. **Explanatory Document on International Standard for Phytosanitary Measures No.31 (Methodologies for Sampling of Consignments)**. (Online). Available. http://www.ippc.int/file_uploaded/1252507962732_ISPM31_ED_in_format.pdf (September 1, 2010)

Table 1 Pests associated with fresh apple fruit from USA - absence in Thailand, potential for establishment or spread

Pest	Common name	Associated with fresh fruit/ Presence in USA	Potential for establishment or spread
Anastrepha fraterculus [Diptera: Tephritidae]	South American fruit fly	restricted distribution; southern Texas	*A. fraterculus* has been recorded incidentally on a wider range of fruits, both tropical and temperate. *Anastrepha* spp. are the most serious fruit fly pests in the tropical Americas. *A. fraterculus* is an important pest of guavas and mangoes, and also to some extent of *Citrus* and *Prunus* spp.. (CABI, 2007)
Anastrepha ludens [Diptera: Tephritidae]	Mexican fruit fly	Texas; found but not established in Arizona and California; intercepted in Florida	The native wild host of *A. ludens* in its area of origin in north-eastern Mexico is *Sargentia greggii*. *Citrus* spp. are the most important introduced hosts, and also mangoes, on which the pest has spread southwards through Mexico. *A. ludens* has been recorded incidentally on a wider

Table 1 (Cont.)

Pest	Common name	Associated with fresh fruit/ Presence in USA	Potential for establishment or spread
			range of fruits, both tropical and temperate. (CABI, 2007)
Anastrepha serpentina [Diptera: Tephritidae]	sapodilla fruit fly	few occurrences Florida; absent, intercepted only California/Texas; present, few occurrences	*Anastrepha* spp. are the most serious fruit fly pests in the tropical Americas. wider range of fruits (CABI, 2007)
Anastrepha suspensa [Diptera: Tephritidae]	caribbean fruit fly	restricted distribution/ found but not established in California; Florida	*A. suspensa* has been recorded on a wider range of fruits, both tropical and temperate. There is evidence that adults of *Anastrepha* spp. can fly up to 135 km and therefore natural movement is an important means of spread. *A. suspensa*, like the other *Anastrepha* spp., derives from tropical wet forest habitats and could potentially become established in many areas of Asia, Australia or Africa. (CABI, 2007)

Table 1 (Cont.)

Pest	Common name	Associated with fresh fruit/ Presence in USA	Potential for establishment or spread
Ceratitis capitata [Diptera: Tephritidae]	Mediterranean fruit fly	only Hawaii; introduced and eradicated several times in California during 1980s and 1990s; introduced, eradicated and still absent in Florida and Texas	Polyphagous, with a wide host rang. The transport of infested fruits is the major means of movement and dispersal to previously uninfested areas (CABI, 2007).
Cydia pomonella [Lepidoptera: Tortricidae]	codling moth	present	Host; apple and pear and *Prunus* spp. The number of generations per year varies from 1 to 4 depending on the climate, and sometimes the host plant. (CABI, 2007)
Epiphyas postvittana [Lepidoptera: Tortricidae]	light brown apple moth	restricted distribution California and Hawaii; present	*E. postvittana* has a very wide host range, with 73 listed from Australia and a larger number from New Zealand. (CABI, 2007)

Table 1 (Cont.)

Pest	Common name	Associated with fresh fruit/ Presence in USA	Potential for establishment or spread
Grapholita molesta [Lepidoptera: Tortricidae]	oriental fruit moth	present	*C. molesta* is a serious pest of economic importance to commercial orchards of peaches, nectarines and apricots, and can also attack and cause economic damage on other commercial fruits. In severe attacks, young trees can suffer distortion of growing shoots and stems. Attacks on fruits considerably reduce their quality and, therefore, their market value. (CABI, 2007)
Grapholita prunivora [Lepidoptera: Tortricidae]	plum moth	present	Plum, apple and cherry fruit are the preferred hosts. *G. prunivora* was reported as a major pest of stone fruits in eastern Oregon, USA. (CABI, 2007)
Epidiaspis leperii [Hemiptera: Diaspididae]	European pear scale	present	*E. leperii* has been recorded from hosts belonging to eight plant families, particularly Rosaceae. (CABI, 2007)

Table 1 (Cont.)

Pest	Common name	Associated with fresh fruit/ Presence in USA	Potential for establishment or spread
Conotrachelus nenuphar [Coleoptera: Curculionidae]	plum curculio	present Does not occur in states of California, Idaho, Oregon and Washington	Next to the codling moth (*C. pomonella*), *C. nenuphar* is regarded as the most serious pest of pome and stone fruit in eastern North America. Peaches, apricots and nectarines are the preferred hosts of *C. nenuphar* but apples are also widely affected. (CABI, 2007)
Rhagoletis pomonella [Diptera: Tephritidae]	apple maggot	present	The main commercial host of *R. pomonella* is apple. *Prunus* spp. are minor hosts. (CABI, 2007). Apple maggot has limited host range and suitable hosts are of limited distribution in Thailand.

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา

Study on Pest Risk Analysis for the Importation of Capsicum Seeds from the United States of America

วาสนา ฤทธิ์ไธสง[1/] ณัฏฐพร อุทัยมงคล[1/] สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ[1/]
คมศร แสงจินดา[1/] ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาส[2/] ชมัยพร บัวมาศ[3/]

[1/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[3/]กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พริก ประมาณ 10.60 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 37 ล้านบาท โดยนำเข้าจากหลายประเทศ รวมถึงสหรัฐอเมริกาที่ปัจจุบันสามารถนำเข้ามาในราชอาณาจักรโดยมีใบรับรองสุขอนามัยพืชที่ไม่มีการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชใดๆ กำกับมาด้วย ในการนำเข้าจึงมีความเสี่ยงที่ศัตรูพืชจะติดมาได้ ผลจากการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชของพริกที่พบในไทยและสหรัฐอเมริกาพบศัตรูพืชรวม 288 ชนิด โดยเป็นศัตรูพืชที่พบในสหรัฐอเมริกา จำนวน 267 ชนิด เป็นแมลง 101 ชนิด ไร 9 ชนิด หอยทาก 1 ชนิด แบคทีเรีย 22 ชนิด ไฟโตพลาสมา 3 ชนิด โปรโตซัว 1 ชนิด รา 52 ชนิด ไวรัส 30 ชนิด ไส้เดือนฝอย 20 ชนิด และวัชพืช 28 ชนิด จากการจัดกลุ่มศัตรูพืชพบว่ามีศัตรูพืชที่ไม่มีในไทยแต่มีในสหรัฐอเมริกาและสามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกที่จะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจ จำนวน 27 ชนิด และนำมาประเมินโอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร แพร่ระบาด และก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจทั้งทางตรงและทางอ้อม ซึ่งอาจเกิดผลกระทบต่อผลิตผลทางการเกษตรของประเทศ รวมทั้งการส่งออกพืชผักไปยังประเทศที่ไม่มีการระบาดของเชื้อสาเหตุโรคเหล่านี้ จากผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากสหรัฐอเมริกาพบศัตรูพืชกักกัน 14 ชนิด คือ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *Pseudomonas viridifla*, *Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina*, *Verticillium dahlia*, *Alfalfa mosaic virus*, *Tobacco ringspot virus*, *Tobacco streak virus*, *Tomato aspermy virus*, *Tomato black ring virus*, *Tomato bushy stunt virus*, *Tomato mosaic virus* และ *Tomato torrado virus* ที่ต้องมีมาตรการจัดการความเสี่ยง โดยเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชที่ระบุข้อความเพิ่มเติมว่า

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-02-02-04-56

เมล็ดพันธุ์พริกต้องมาจากแหล่งที่ปลอดจากศัตรูพืชกักกัน หรือเมล็ดพันธุ์พริกต้องมาจากต้นพ่อแม่ที่ได้รับการตรวจสอบในระยะการเจริญเติบโตหรือได้รับการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการว่าปลอดจาก *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae, Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *Pseudomonas viridifla*, *Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina, Verticillium dahlia*, *Alfalfa mosaic virus, Tobacco ringspot virus*, *Tobacco streak virus*, *Tomato aspermy virus, Tomato black ring virus*, *Tomato bushy stunt virus, Tomato mosaic virus* และ *Tomato torrado virus* นอกจากนี้การนำเข้าต้องปราศจากแมลงที่มีชีวิต ดิน ทราย วัชพืช ชิ้นส่วนของพืช เช่น ใบ ก้าน เศษซากพืช และสิ่งอื่นใดที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน และเมล็ดพันธุ์พริกต้องแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

Abstract

Thailand imported capsicum seeds about 10.6 metric tons worth more than 37 million baht which Imported from several countries including the United States of America. In present, capsicum seeds form USA can be imported into the Kingdom of Thailand by a phytosanitary certificate without requirements for any phytosanitary measures. So that, it's had been the risk from the quarantine pests into the pathway. The results from the data collections of capsicum pests found in Thailand and USA including 288 species of pests and found in USA 267 species which classified as 101 species of insects, 9 species of mites, 1 species of snail, 22 species of bacteria, 3 species of phytoplasmas, 1 species of protozoa, 52 species of fungi, 30 species of virus, 20 species of nematodes and 28 species of weeds. 27 species of these pests were pest categorization that not found in Thailand and associated with the pathway which caused ecomomic impact. These species were assessment for probability of entry, establishment, spread and economic consequence both direct and indirect which may affect to agricultural product in the country and exporting other vegetables to countries where no outbreaks of these diseases. The results from risk assessment for importation of capsicum seeds from USA found 14 species of quarantine pests were *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae, Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *Pseudomonas viridifla*, *Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina, Verticillium dahlia*, *Alfalfa mosaic virus, Tobacco ringspot virus*, *Tobacco streak virus*, *Tomato aspermy virus, Tomato black ring virus*, *Tomato bushy stunt virus, Tomato mosaic virus* and *Tomato torrado virus* that required quarantine pest risk management measures. The importing seed has to be

the phytosanitary certificate must bear the following additional declaration; Capsicum seeds must be originated from pest free area or were inspected during growing or laboratory tested that found free from *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae, Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *Pseudomonas viridifla*, *Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina, Verticillium dahlia*, *Alfalfa mosaic virus, Tobacco ringspot virus*, *Tobacco streak virus*, *Tomato aspermy virus, Tomato black ring virus*, *Tomato bushy stunt virus, Tomato mosaic virus* and *Tomato torrado virus*. Further more, capsicum seeds must free of live insects, soil, sand, weed and contaminating plant materials e.g. leaves, twigs, plant debris and other potential carriers of the quarantine pests and must be soaked in hot water at temperature 51 degree Celsius for 30 minutes.

Keywords: การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช, นำเข้า, เมล็ดพันธุ์, พริก, สหรัฐอเมริกา, ศัตรูพืชกักกัน, มาตรการจัดการความเสี่ยง
plant pest risk analysis, import, seed, capsicum, USA, quarantine pest, pest risk management measures

คำนำ

พริกเป็นพืชสวนเศรษฐกิจที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทยและเป็นพืชที่นิยมปลูกหลายประเทศทั่วโลก ในปี 2555 ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พริก ประมาณ 10.60 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 37 ล้านบาท (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2556) ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 กำหนดให้ส่วนหนึ่งส่วนใดของพืชในวงศ์ Solanaceae เป็นสิ่งต้องห้าม ซึ่งตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 การนำเข้าซึ่งสิ่งต้องห้ามต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขที่อธิบดีกำหนด โดยเมล็ดพันธุ์พริกจากสหรัฐอเมริกาได้รับการผ่อนผันให้มีการนำเข้าเพื่อการค้า โดยการนำเข้าไม่มีมาตรการสุขอนามัยพืชใดๆ กำหนด และสามารถนำเข้ามาได้จนกว่าการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชจะแล้วเสร็จ จากเอกสารวิชาการหลายๆ เล่ม พบว่ามีศัตรูพืชหลายชนิดที่ยังไม่มีรายงานในประเทศไทย และมีโอกาสที่จะติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าได้ หากประเทศไทยไม่มีมาตรการสุขอนามัยพืชที่เหมาะสมอาจเกิดปัญหาของศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่เคยพบในประเทศไทยติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกที่นำเข้า เกิดการแพร่กระจายและเพิ่มปริมาณจนเกิดเป็นการระบาดของศัตรูพืชชนิดใหม่ขึ้นได้ จะส่งผลให้เกิดผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้า โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้รายชื่อศัตรูพืชกักกัน และกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืช

เพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชที่เหมาะสม และใช้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เพื่อสนับสนุนในการกำหนดมาตรการทางสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พริกจากสหรัฐอเมริกา

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. มาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Framework for Pest Risk Analysis (2007)) (FAO, 2011)
2. มาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน (Pest Risk Analysis for Quarantine Pests (2013)) (FAO, 2014)
3. คู่มือสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ตามแนวทางของอนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ (IPPC: International Plant Protection Convention)
4. หนังสือ เอกสารและวารสารทางวิชาการที่เกี่ยวข้อง Crop Protection Compendium 2007 (CABI, 2007) และ 2014 (CABI, 2014) ข้อมูลทางอิเล็กทรอนิกส์ และเว็บไซต์ต่างๆ
5. วัสดุสำนักงาน เช่น กระดาษ แผ่นบันทึกข้อมูล
6. วัสดุคอมพิวเตอร์ เช่น แผ่นจัดเก็บข้อมูล (ซีดี) และหมึกพิมพ์ เป็นต้น
7. วัสดุวิทยาศาสตร์ สารเคมีและอุปกรณ์ในการทำสไลด์ถาวร
8. กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope
9. กล้องถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของพริกและศัตรูพืชที่จะดำเนินการวิเคราะห์

รวบรวมข้อมูลพืชและข้อมูลศัตรูพืชของพริก โดยค้นคว้ารวบรวมข้อมูลจากตำรา หนังสือวิชาการ วารสารวิชาการ เอกสารเผยแพร่ รายงานการประชุมและสัมมนาทางวิชาการ ข้อมูลทางอิเล็กทรอนิกส์ และเว็บไซต์ต่างๆ ที่มีรายงานทั้งในและต่างประเทศ เพื่อให้ได้ข้อมูล ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง ชื่อสามัญ ชีววิทยา แหล่งแพร่กระจาย ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย การป้องกันกำจัด และมาตรการทางสุขอนามัยพืช

2. การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา โดยใช้หลักเกณฑ์การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชตามมาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures: ISPM) ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Framework for Pest Risk Analysis (2007)) (FAO, 2011) และฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกันรวมถึงการวิเคราะห์ความเสี่ยงต่อ

สภาพแวดล้อม และสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม (Pest Risk Analysis for Quarantine Pests (2013)) (FAO, 2014) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน สัมพันธ์กัน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1: การเริ่มต้นการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 1: Initiation of pest risk analysis)

ขั้นตอนที่ 2: การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest risk assessment)

ขั้นตอนที่ 3: การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest risk management)

ขั้นตอนที่ 1: การเริ่มต้นการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 1: Initiation of pest risk analysis)

การเริ่มขบวนการวิเคราะห์ก็เพื่อจำแนกศัตรูพืช (pest) และเส้นทางศัตรูพืช (pest pathway) ที่เกี่ยวข้องกับกักกันพืชและควรได้รับการพิจารณา โดยวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่เกี่ยวข้องกับพื้นที่หนึ่งที่กำหนด คือ

1.1 จุดเริ่มต้นการวิเคราะห์ (Initiation point) พิจารณาเหตุผลการดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงว่าเริ่มต้นด้วยเหตุผลใด ดังนี้

1.1.1 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเริ่มต้นโดยการจำแนกเส้นทางศัตรูพืช (PRA initiated by the identification of a pathway) มีความจำเป็นต้องวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขึ้นมาใหม่หรือเพื่อทบทวนของเดิมที่เคยวิเคราะห์ไว้แล้วกับเส้นทางศัตรูพืชเส้นทางหนึ่งโดยเฉพาะที่อาจเกิดขึ้นได้เพราะสถานการณ์ดังนี้

- การค้าขายระหว่างประเทศเริ่มมีสินค้าชนิดหนึ่งที่ไม่เคยมีการนำเข้ามาในประเทศมาก่อน หรือสินค้าชนิดหนึ่งมาจากพื้นที่ใหม่หรือจากแหล่งกำเนิดใหม่
- พืชชนิดใหม่ถูกนำเข้าเพื่อการคัดเลือกพันธุ์และวัตถุประสงค์เพื่อการวิจัย
- พบเส้นทางศัตรูพืชอื่นนอกเหนือจากการนำเข้าสินค้า เช่น การแพร่กระจายโดยธรรมชาติ วัสดุหีบห่อ ไปรษณีย์ภัณฑ์ เศษอาหาร สัมภาระของผู้โดยสาร เป็นต้น

การจัดทำรายชื่อศัตรูพืชซึ่งมีโอกาสปะปนมาในเส้นทางศัตรูพืชนี้ อาจดำเนินการได้โดยรวบรวมจากแหล่งข้อมูลของส่วนราชการ ฐานข้อมูล เอกสารอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์อื่นๆ หรือโดยการปรึกษากับผู้เชี่ยวชาญ กรณีจำแนกพบว่าไม่มีศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันมีโอกาสปะปนมากับเส้นทางศัตรูพืช การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชอาจยุติ ณ จุดนี้

1.1.2 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเริ่มต้นโดยการจำแนกศัตรูพืช (PRA initiated by the identification of a pest) มีความจำเป็นต้องวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขึ้นใหม่หรือทบทวนของเดิมที่ได้เคยวิเคราะห์ไว้แล้วกับศัตรูพืชชนิดหนึ่งโดยเฉพาะ อาจเกิดได้เพราะสถานการณ์ ดังนี้

- เกิดภาวะฉุกเฉินมีการตรวจพบการเข้าทำลายหรือการระบาดของศัตรูพืชชนิดใหม่ภายในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

- เกิดภาวะฉุกเฉินจากการตรวจพบศัตรูพืชชนิดใหม่ติดมากับสินค้านำเข้าชนิดหนึ่ง
- การวิจัยทางวิทยาศาสตร์ค้นพบความเสี่ยงจากศัตรูพืชชนิดใหม่
- มีการจำแนกพบสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งเป็นพาหะของศัตรูพืชชนิดอื่นเพิ่มขึ้นอีก
- สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมในลักษณะซึ่งสามารถจำแนกได้อย่างชัดเจนว่ามีศักยภาพที่จะเป็นศัตรูพืชได้

1.1.3 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเริ่มต้นโดยการทบทวนหรือการปรับปรุงนโยบาย (PRA initiated by the review or revision of a policy) มีความจำเป็นต้องวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขึ้นใหม่ หรือทบทวนของเดิมที่ได้เคยวิเคราะห์ไว้แล้ว ส่วนมากแล้วจะเกิดขึ้นเนื่องจากสถานการณ์ ดังนี้

- ได้มีการตัดสินใจในระดับชาติเพื่อทบทวนกฎระเบียบสุขอนามัยพืช ข้อกำหนด หรือการปฏิบัติการ
- ข้อเสนอจากประเทศหนึ่งหรือโดยหน่วยงานอารักขาพืชนานาชาติ (หน่วยงานอารักขาพืชระดับภูมิภาค องค์อาหารแห่งสหประชาชาติ) ให้มีการทบทวนหรือปรับปรุง
- มีวิธีการกำจัดศัตรูพืชใหม่ หรือการสูญเสียระบบการกำจัดศัตรูพืช มีกระบวนการใหม่ หรือข้อมูลใหม่ที่มีผลกระทบต่อการตัดสินใจก่อนหน้านี้
- ข้อโต้แย้งเกิดขึ้นกับมาตรการสุขอนามัยพืช
- สถานการณ์ทางสุขอนามัยพืชในประเทศหนึ่งเปลี่ยนแปลงไป มีประเทศใหม่เกิดขึ้นหรือ ขอบเขตทางการปกครองเปลี่ยนแปลงไป

1.2 การจำแนกพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Identification of PRA area)

ต้องกำหนดพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชให้ชัดเจนเพื่อประโยชน์ในการพิจารณาหาข้อมูลที่ต้องการได้เหมาะสมถูกต้องกับพื้นที่

1.3 รวบรวมข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

การรวบรวมข้อมูลเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชทุกขั้นตอน โดยเฉพาะการวิเคราะห์ในระยะเริ่มต้นเพื่อให้เกิดความชัดเจนเกี่ยวกับสถานภาพการแพร่ระบาดของศัตรูพืชในปัจจุบัน ตลอดจนโอกาสที่ศัตรูพืชจะติดมากับพืชอาศัยและสินค้า สำหรับข้อมูลอื่นๆ จะรวบรวมตามที่มีความต้องการใช้ประกอบเมื่อถึงจุดที่ต้องตัดสินใจ ขณะที่การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชดำเนินต่อไป

ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชอาจมาจากแหล่งที่หลากหลาย ซึ่งตามบทบัญญัติภายใต้อนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ (มาตรา 18 ข้อซี) ประเทศภาคีสมาชิกต้องมีจุดประสานงานเป็นทางการ เพื่ออำนวยความสะดวกในการให้ข้อมูลของทางราชการ

1.4 ตรวจสอบการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่มีการดำเนินการแล้ว

ก่อนเริ่มขบวนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช จะต้องตรวจสอบว่าได้เคยมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชมาแล้วหรือไม่ ทั้งกรณีวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชโดยศัตรูพืช หรือเส้นทางศัตรูพืช หรือโดยนโยบายของรัฐทั้งภายในและต่างประเทศ กรณีที่มีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชมาแล้วจะต้องตรวจสอบว่ายังมีความเหมาะสมหรือไม่ หรือยังสามารถนำมาใช้ได้หรือไม่เนื่องจากสภาพอาจเปลี่ยนแปลงไป โดยอาจจะนำมาใช้เพียงบางส่วนหรือทั้งหมด ทั้งนี้เพื่อว่าอาจจะสามารถทดแทนความต้องการที่จะต้องการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชใหม่ได้

1.5 ข้อสรุปของขั้นตอนการเริ่มกระบวนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนที่ 1 สามารถดำเนินการจำแนกศัตรูพืชและเส้นทางที่เกี่ยวกับศัตรูพืชที่เกี่ยวข้องและพื้นที่วิเคราะห์ศัตรูพืช รวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ประกอบการวิเคราะห์ รวมทั้งจำแนกและคัดเลือกศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชที่จะต้องดำเนินมาตรการสุขอนามัยพืช โดยอาจเป็นศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่งที่เฉพาะเจาะจง หรือศัตรูพืชที่มีโอกาสปะปนมากับเส้นทางศัตรูพืช

ขั้นตอนที่ 2: การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest risk assessment)

จุดมุ่งหมายเพื่อให้จัดลำดับความสำคัญศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงประกอบ ด้วย 3 ขั้นตอน ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันคือ ขั้นตอนที่ 1) การจัดประเภทศัตรูพืช (Pest categorization) เพื่อพิจารณาว่าศัตรูพืชชนิดใดมีคุณสมบัติจัดเป็นศัตรูพืชกักกัน (quarantine pest) โดยการพิจารณาตามคำนิยามของศัตรูพืชกักกันตามคำนิยามในมาตรฐานระหว่างประเทศสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช Glossary of Phytosanitary Terms ISPM No. 5 ขั้นตอนที่ 2) ประเมินโอกาสที่ศัตรูพืชชนิดนั้นจะเข้ามา ตั้งรกรากอย่างถาวร และแพร่ระบาด (Assessment for probability of entry and establishment and spread) ในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชได้ ขั้นตอนที่ 3) ประเมินผลกระทบทางเศรษฐกิจที่เกิดจากศัตรูพืช (Assessment of potential consequences) ในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยรายละเอียดขั้นตอนการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชที่ใช้ดำเนินการตามอนุสัญญาอารักขาพืชแห่งชาติ (International Plant Protection Convention, IPPC) มีดังนี้

2.1 การจัดกลุ่มศัตรูพืช (Pest categorization)

เพื่อพิจารณาว่าศัตรูพืชชนิดใดมีคุณสมบัติจัดเป็นศัตรูพืชกักกัน (quarantine pest) โดยพิจารณาตามคำนิยามของศัตรูพืชกักกัน ในมาตรฐานระหว่างประเทศสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 5 ซึ่ง “ศัตรูพืชกักกัน” (Quarantine pest) หมายถึง ศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่มีศักยภาพต่อพื้นที่ที่อยู่ในอันตรายนั้น และยังไม่มีอยู่ในที่นั้น หรือมีอยู่แต่ไม่แพร่กระจายอย่างกว้างขวางและกำลังมีการควบคุมอยู่อย่างเป็นทางการ (Anonymous, 2006)

2.2 การประเมินโอกาสการเข้ามาและแพร่ระบาด (Assessment of the probability of introduction and spread)

การเข้ามาของศัตรูพืชประกอบด้วยกระบวนการเคลื่อนย้ายของศัตรูพืชเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร และแพร่ระบาดในพื้นที่ได้ ในการประเมินโอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชจะต้องวิเคราะห์เส้นทาง แต่ละเส้นทางซึ่งศัตรูพืชอาจปะปนร่วมมากับเส้นทางจากแหล่งกำเนิดจนเข้ามาเจริญตั้งรกรากและแพร่ระบาดในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชซึ่งเริ่มต้นจากเส้นทางศัตรูพืชหนึ่งที่เฉพาะเจาะจง (โดยทั่วไปเป็นการนำเข้าสินค้าเกษตรชนิดหนึ่ง) โอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชจะประเมินจากเส้นทางที่สงสัย นอกจากนี้จำเป็นที่จะต้องตรวจสอบโอกาสที่เป็นไปได้ที่ศัตรูพืชจะเข้ามาในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชจะสัมพันธ์กับเส้นทางศัตรูพืชอื่นๆ ด้วยเช่นเดียวกัน

สำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชซึ่งเริ่มจากชนิดศัตรูพืชชนิดหนึ่ง โดยไม่มีการพิจารณาเกี่ยวกับสินค้านำเข้าหรือเส้นทางศัตรูพืช ควรนำเส้นทางศัตรูพืชทุกเส้นทางที่มีศักยภาพในการนำศัตรูพืชเข้ามาในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชมาร่วมพิจารณาด้วย

การประเมินโอกาสความเป็นไปได้ของการแพร่ระบาดในเบื้องต้นจะอยู่บนพื้นฐานการพิจารณาทางด้านชีววิทยาเหมือนกับการประเมินโอกาสความเป็นไปได้ของศัตรูพืชที่จะเข้ามาและตั้งรกรากอย่างถาวร

2.2.1 โอกาสการเข้ามาของศัตรูพืช (Probability of entry of a pest)

โอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชชนิดหนึ่งขึ้นอยู่กับเส้นทางศัตรูพืชจากประเทศส่งออกสินค้าไปยังประเทศปลายทาง ความถี่การนำเข้าและปริมาณศัตรูพืชที่มีโอกาสติดมากับสินค้า จำนวนเส้นทางศัตรูพืชยิ่งมีมากขึ้นโอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชจะยิ่งสูงขึ้นตามไปด้วย ควรจะมีการสังเกตเส้นทางศัตรูพืชที่ได้มีการบันทึกไว้สำหรับศัตรูพืชที่จะเข้าไปในพื้นที่ใหม่เส้นทางศัตรูพืชที่มีศักยภาพซึ่งยังไม่ปรากฏในปัจจุบันควรนำมาประเมินร่วมด้วย อีกทั้งข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืชกับสินค้านำเข้าอาจเป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่ศัตรูพืชชนิดหนึ่งอาจจะติดปะปนมากับเส้นทางศัตรูพืชหนึ่งและมีชีวิตรอดในขณะขนส่งและเก็บรักษา

2.2.2 โอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร (Probability of establishment)

การประเมินโอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร ควรมีข้อมูลด้านชีววิทยาของศัตรูพืชที่เชื่อถือได้ (วงจรชีวิต พืชอาศัย การแพร่ระบาด การอยู่รอด เป็นต้น) จากพื้นที่ซึ่งศัตรูพืชนั้นปรากฏอยู่ในปัจจุบัน สถานการณ์ในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสามารถนำมาเปรียบเทียบกับสภาพในพื้นที่ที่ศัตรูพืชนั้นปรากฏอยู่ในปัจจุบัน และใช้คำตัดสินใจของผู้เชี่ยวชาญมาประเมินโอกาสเข้ามาเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ของศัตรูพืช กรณีที่เคยเกิดมาแล้วในอดีตที่เกี่ยวข้องกันศัตรูพืชที่คล้ายคลึงกันสามารถนำมาพิจารณาด้วยเช่นเดียวกัน ตัวอย่างของปัจจัยที่ควรนำมาพิจารณา ได้แก่

- การมีพืชอาศัย จำนวนพืชอาศัยและการแพร่กระจายของพืชอาศัยในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

- ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช
- ศักยภาพความสามารถในการปรับตัวของศัตรูพืช
- วิธีการมีชีวิตอยู่รอดของศัตรูพืช
- การปฏิบัติทางการเกษตรและมาตรการป้องกันกำจัด

ในการพิจารณาโอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวรและแพร่ขยายพันธุ์ของศัตรูพืชนั้นควรบันทึกไว้ด้วยว่าศัตรูพืชบางชนิดอาจปรากฏอยู่ในชั่วขณะหนึ่ง (ดู ISPM No.8 Determination of pest status in an area) แต่อาจจะไม่สามารถเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงได้ (เนื่องจากสภาพอากาศไม่เหมาะสม) แต่ว่าสามารถมีผลกระทบทางเศรษฐกิจในระดับที่ยอมรับไม่ได้ในภายหลังได้

2.2.3 โอกาสการแพร่ระบาดของศัตรูพืชหลังจากเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร (Probability of spread after establishment)

ศัตรูพืชชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการแพร่ระบาดอาจมีศักยภาพสูงในการเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ ดังนั้นความเป็นไปได้ในการควบคุมศัตรูพืชให้อยู่ในขอบเขตจำกัด และ/หรือ กำจัดให้หมดสิ้นจึงค่อนข้างยากมาก และการตัดสินใจของผู้เชี่ยวชาญจะนำมาใช้ประเมินโอกาสการแพร่ระบาด กรณีตัวอย่างที่เคยเกิดมาแล้วกับศัตรูพืชที่คล้ายคลึงกันสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการพิจารณา ตัวอย่างของปัจจัยที่พิจารณา ได้แก่

- ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมในสภาพธรรมชาติและ/หรือ สภาพแวดล้อมที่จัดการสำหรับการแพร่ระบาดของศัตรูพืชโดยธรรมชาติ
- มีสิ่งกีดขวางโดยธรรมชาติ
- ศักยภาพสำหรับการเคลื่อนย้ายไปกับสินค้าหรือพาหนะขนส่ง
- ความตั้งใจที่จะนำสินค้าไปใช้ประโยชน์
- พาหะที่มีศักยภาพของศัตรูพืชในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช
- ศัตรูธรรมชาติที่มีศักยภาพของศัตรูพืชในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ข้อมูลเกี่ยวกับโอกาสการแพร่ระบาดของศัตรูพืช จะถูกนำมาใช้ประเมินศักยภาพความสำคัญทางเศรษฐกิจของศัตรูพืชที่อาจแสดงออกในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยง ศัตรูพืช ซึ่งนับว่ามีความสำคัญ หากศัตรูพืชชนิดนั้นเข้ามาและเจริญตั้งรกรากอย่างถาวรในพื้นที่ที่มีศักยภาพทางความสำคัญทางเศรษฐกิจต่ำและแพร่ระบาดไปในพื้นที่มีศักยภาพทางความสำคัญทางเศรษฐกิจสูงยิ่งกว่านั้นอาจมีความสำคัญในขั้นตอนการจัดการความเสี่ยงเมื่อพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการควบคุมให้อยู่ภายใต้ขอบเขตหรือจำกัดศัตรูพืชให้หมดสิ้นไป

2.2.4 ข้อสรุปเกี่ยวกับโอกาสการเข้ามาเจริญตั้งรกรากอย่างถาวรและแพร่ระบาดของศัตรูพืช (Conclusion on the probability of introduction and spread)

ภาพรวมของโอกาสเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวรอาจแสดงข้อมูลในลักษณะเชิงปริมาณหรือเชิงคุณภาพ เนื่องจากผลลัพธ์ที่ออกมาในกรณีใดก็ตามเป็นการผสมผสานกันของข้อมูลเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ โอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชอาจแสดงในเชิงเปรียบเทียบกับข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชกับศัตรูพืชชนิดอื่น

2.3 การประเมินผลทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้น (Assessment of potential economic consequence)

ในขั้นตอนนี้ระบุว่าข้อมูลต่างๆ ที่สัมพันธ์กันของศัตรูพืชและพืชที่มีศักยภาพเป็นพืชอาศัยต้องเอามารวมกัน และระดับการวิเคราะห์ผลกระทบทางเศรษฐกิจทั้งทางตรงและทางอ้อม ซึ่งอาจดำเนินการโดยใช้ข้อมูลนั้นเพื่อประเมินผลกระทบทุกด้านของศัตรูพืช เช่น ศักยภาพของผลที่ตามมาทางเศรษฐกิจ ควรจะมีข้อมูลเชิงปริมาณซึ่งจะให้รายละเอียดมูลค่าที่เป็นเงิน สำหรับข้อมูลเชิงคุณภาพอาจจะใช้ได้เช่นเดียวกัน การปรึกษาหารือกับนักเศรษฐศาสตร์อาจจะเป็นประโยชน์อย่างมาก มีหลายกรณีที่การวิเคราะห์ในรายละเอียดเกี่ยวกับการประเมินผลที่เกิดขึ้นตามมาทางเศรษฐกิจซึ่งคาดว่าจะเกิดขึ้นอาจไม่มีความจำเป็นถ้ามีหลักฐานเพียงพอหรือเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางทั่วไปแล้วว่าการเข้ามาของศัตรูพืชชนิดหนึ่งนั้นจะก่อให้เกิดผลทางเศรษฐกิจตามมาในระดับที่ไม่สามารถยอมรับได้ ในเบื้องต้นจะมุ่งเน้นพิจารณาเกี่ยวกับโอกาสการเข้ามาเจริญตั้งรกรากอย่างถาวรและแพร่ระบาด อย่างไรก็ตามมีความจำเป็นต้องตรวจสอบปัจจัยทางเศรษฐกิจด้วยเมื่อระดับของผลที่จะเกิดขึ้นตามมาทางเศรษฐกิจยังเป็นที่สงสัย หรือเมื่อระดับของผลที่ตามมาทางเศรษฐกิจทำให้ต้องประเมินความเข้มแข็งของมาตรการที่ใช้ในการจัดการกับความเสี่ยง หรือในการประเมินต้นทุนกำไรในการกำจัดหรือการควบคุมศัตรูพืชไม่ให้เข้ามา

2.4 ระดับความไม่แน่นอน (degree of uncertainly)

การประเมินโอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชและผลที่ตามมาทางด้านเศรษฐกิจจะมีปัจจัยที่ไม่แน่นอนเข้ามาเกี่ยวข้องจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นการประเมินที่นอกเหนือจากสภาพซึ่งศัตรูพืชเกิดระบาดตามสภาพทางทฤษฎีในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช จึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องบันทึกไว้เป็นหลักฐานเกี่ยวกับปัจจัยที่ไม่แน่นอนและระดับของความไม่แน่นอนที่เข้ามาเกี่ยวข้องในการประเมินและเพื่อแสดงให้เห็นถึงการนำคำตัดสินของผู้เชี่ยวชาญมาใช้ ทั้งนี้เป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้เกิดความโปร่งใสและอาจจะมีประโยชน์สำหรับการจำแนกและการจัดลำดับความต้องการในการวิจัยต่อไป

2.5 ข้อสรุปของการประเมินความเสี่ยงของศัตรูพืช (Conclusion of the pest risk assessment stage)

ผลที่ได้จากการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชจะได้ชนิดของศัตรูพืชที่จำแนกประเภทแล้วบางชนิดหรือทั้งหมด และอาจจะถูกนำมาพิจารณาเกี่ยวกับการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชให้

เหมาะสม รวมทั้งพื้นที่บางส่วนหรือทั้งหมดของพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชอาจกำหนดเป็นพื้นที่ที่มีปัจจัยสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ของศัตรูพืชจนทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่สำคัญ การประเมินโอกาสเชิงคุณภาพหรือเชิงปริมาณของการนำเข้ามาของศัตรูพืชชนิดหนึ่งหรือหลายชนิด และการประเมินผลที่ตามมาทางเศรษฐกิจ (รวมทั้งผลต่อสภาพแวดล้อม) จะต้องจัดทำไว้เป็นหลักฐานเอกสาร รวมทั้งความไม่แน่นอนที่เกิดร่วมอยู่ด้วย จะต้องนำมาใช้ในขั้นตอนการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช

ขั้นตอนที่ 3: การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest risk management)

ขั้นตอนนี้เกี่ยวข้องกับการกำหนดมาตรการทางเลือกสำหรับการจัดการความเสี่ยงทั้งนี้เพื่อลดความเสี่ยงที่ระบุในขั้นตอนที่ 2 โดยที่ข้อสรุปจากการประเมินความเสี่ยงจะถูกนำมาใช้ประกอบการตัดสินใจว่าจำเป็นหรือไม่ที่ต้องจัดการความเสี่ยงและมาตรการที่ใช้จัดการความเสี่ยงจะมีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะใช้หรือไม่ หลักการจัดการความเสี่ยงนั้นจะต้องคำนึงถึงประเด็น ดังนี้

3.1 ระดับความเสี่ยง (Level of risk) จะใช้หลักการจัดการความเสี่ยงให้อยู่ในระดับที่มีระดับที่เหมาะสมซึ่งสามารถยอมรับได้ (Appropriate Level of acceptable; ALOP) หรือระดับความเสี่ยงที่สามารถยอมรับได้ (acceptable)

3.2 ข้อมูลวิชาการประกอบการพิจารณาจัดการความเสี่ยง โดยดูจากข้อมูลที่รวบรวมได้

3.3 การยอมรับความเสี่ยง (Acceptable of risk) นำผลของการประเมินความเสี่ยงนับตั้งแต่การเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร การแพร่ระบาด และผลกระทบต่อเศรษฐกิจที่แสดงความเสี่ยงว่าไม่สามารถยอมรับได้นั้นมาจัดการจำแนกมาตรการสุขอนามัยพืชเพื่อลดความเสี่ยงลงให้ถึงระดับต่ำสุดที่ยอมรับได้

3.4 จำแนกและคัดเลือกวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการลดโอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวรและแพร่ระบาดของศัตรูพืชที่เหมาะสม มีเหตุผลภายใต้ข้อจำกัดเกี่ยวกับวิธีการที่สามารถดำเนินการได้ในการจัดการความเสี่ยง มาตรการสุขอนามัยพืชที่นำมาใช้ควรให้ผลแน่นอนและมีความเป็นไปได้ในทางปฏิบัติเหมาะสมกับรูปแบบและแหล่งกำเนิดสินค้าที่เป็นพืชอาศัยหรือพาหะ โดยไม่เป็นอุปสรรคขัดขวางการค้าในแง่จำกัดการนำเข้าสินค้าโดยไม่มีเหตุผล บางกรณีอาจต้องนำมาตรการสุขอนามัยพืชมากกว่าสองมาตรการมาใช้เพื่อลดความเสี่ยงจนถึงระดับที่ยอมรับได้ มาตรการสุขอนามัยพืชที่มีการนำมาใช้ในปัจจุบัน สามารถแบ่งได้ตามสถานภาพของศัตรูพืชในเส้นทางศัตรูพืช ณ ประเทศต้นทาง ประกอบด้วยมาตรการ ดังต่อไปนี้

- มาตรการที่ใช้กับสินค้าโดยตรง
- มาตรการที่ใช้เพื่อป้องกันหรือลดปริมาณการเข้าทำลายของศัตรูพืชในแหล่งผลิต
- มาตรการที่ใช้เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นว่าในพื้นที่ผลิตหรือแหล่งผลิตปราศจากศัตรูพืช
- มาตรการห้ามนำเข้าสินค้า

มาตรการทางเลือกอื่นอาจเกิดขึ้นจากพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (จำกัดการใช้ประโยชน์จากสินค้า) มาตรการป้องกันกำจัด การนำเข้าชีวินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช การกำจัดให้หมดสิ้นไป และการควบคุมการระบาดให้อยู่ในขอบเขตจำกัด มาตรการเหล่านี้จะถูกประเมินและนำมาใช้เฉพาะกรณีที่ศัตรูพืชพบระบาดอยู่ก่อนแล้วในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชแต่ระบาดอยู่ในขอบเขตจำกัด

3.5 การรับรองสุขอนามัยพืช (Phytosanitary certificate) โดยการรับรองสุขอนามัยพืชว่าสินค้าปราศจากศัตรูพืชกักกันซึ่งกำหนดโดยประเทศผู้นำเข้า และเป็นไปตามข้อกำหนดด้านสุขอนามัยพืชของประเทศนำเข้า ซึ่งเป็นการยืนยันว่าได้มีการจัดการความเสี่ยงตามที่กำหนด รวมทั้งอาจกำหนดให้ระบุข้อความเพิ่มเติม (additional declaration) เพื่อแสดงให้เห็นว่าได้มีการดำเนินมาตรการสุขอนามัยพืชเป็นการเฉพาะ นอกจากนี้มาตรการอื่นอาจนำมาใช้ร่วมกันตามที่ได้มีการทำความตกลงแบบทวิภาคี หรือพหุภาคี (bilateral or multilateral agreement)

3.6 บทสรุปการจัดการความเสี่ยง

ผลที่ได้รับจากขบวนการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช อาจจะพบว่าไม่มีมาตรการซึ่งได้รับการพิจารณาแล้วว่าเหมาะสม หรือมีการเลือกวิธีการจัดการความเสี่ยงวิธีหนึ่งหรือหลายวิธีการซึ่งพบว่าสามารถทำให้ความเสี่ยงซึ่งเกิดร่วมกับศัตรูพืชลดต่ำจนอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ วิธีการจัดการความเสี่ยงเหล่านี้จะอยู่บนพื้นฐานของกฎระเบียบหรือข้อกำหนดด้านสุขอนามัยพืช

เวลาและสถานที่

เวลา: เดือนตุลาคม 2555 - กันยายน 2557

สถานที่: กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของพริกและศัตรูพืชที่จะดำเนินการวิเคราะห์

พริกเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Solanaceae เช่นเดียวกับมะเขือเทศ มะเขือ มันฝรั่ง ยาสูบ และพิทูเนีย จัดอยู่ในสกุล *Capsicum* มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมในทวีปอเมริกาใต้ และใช้ประโยชน์มานานนับหลายพันปี ถูกนำเข้ามาเผยแพร่ในยุโรปในชื่อของพริกแดง (red pepper: *Capsicum* spp.) ตามลักษณะสีของผล พริกมีประมาณ 25 ชนิด ที่นิยมปลูกกันมีเพียง 5 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ *C. annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinensis* Jacq., *C. frutescens* L. และ *C. pubescens* R. & P. นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ที่ถูกพัฒนาขึ้นอีกมากมาย โดยมีชื่อที่ใช้เรียกกันอยู่หลายคำ ได้แก่ pepper, chili, chilli, chile และ capsicum ปัจจุบันพริกมีอนุกรมวิธาน ดังนี้

Phylum: Spermatophyta

Subphylum: Angiospermae

Class: Dicotyledonae

Order: Solanales

Family: Solanaceae

Genus: *Capsicum*

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น พริกเป็นพืชที่มีการเจริญของกิ่ง กล่าวคือกิ่งจะเจริญจากลำต้นเพียง 1 กิ่ง แล้วแตกเป็น 2 กิ่ง และเพิ่มเป็น 4 เป็น 8 ไปเรื่อยๆ จึงมักพบว่า ต้นพริกที่สมบูรณ์จะมีกิ่งแตกขึ้นมาจากต้นที่ระดับดินหลายกิ่ง จนดูคล้ายกับว่ามีหลายต้นอยู่รวมในที่เดียวกัน

ใบ เป็นแบบใบเดี่ยว เรียบ มีขนบ้างเล็กน้อย มีรูปร่างตั้งแต่รูปไข่ไปจนกระทั่งเรียวยาว ขนาดใบมีต่าง ๆ กัน ใบพริกหวาน มีขนาดค่อนข้างใหญ่ ส่วนใบพริกขี้หนูโดยทั่วไปมีขนาดเล็ก

ดอก เกิดเป็นดอกเดี่ยวที่ข้อตรงมุมที่เกิดใบที่กิ่ง ดอกประกอบด้วยกลีบรองดอกมีลักษณะเป็นพู 5 พู มีกลีบดอกสีขาวหรือสีม่วง 5 กลีบ เกสรตัวผู้ 5 อัน (เท่าจำนวนกลีบดอก) แตกออกมาจากโคนของกลีบดอก อับเกสรตัวผู้มักมีสีน้ำเงินแยกตัวเป็นกระเปาะเล็ก ๆ ยาว ๆ ส่วนเกสรตัวเมียมีรูปร่างเหมือนกระบองหัวมน รังไข่จะมี 3 พู หรืออาจมี 2 หรือ 4 พู ก็ได้ โดยทั่วไปมักจะออกดอกและติดผลในสภาพที่มีช่วงวันสั้น

ผล มีลักษณะเป็นกระเปาะ โดยทั่วไปผลอ่อนมักชี้ขึ้น เมื่อเป็นผลแก่พันธุ์ที่มีลักษณะขั้วผลอ่อนจะให้ผลที่ห้อยลง ผลมีหลายลักษณะ เช่น แบน กลมยาว จนถึง พอง อ้วน สั้น ขนาดผลมีตั้งแต่ขนาดผลเล็กไปจนถึงผลขนาดใหญ่ขึ้นอยู่กับพันธุ์ เมื่อผลแก่อาจเปลี่ยนสีจากเขียวเป็นแดงหรือเหลืองพร้อมๆ กับการแก่ของเมล็ดในผลควบคู่กันไป ในระหว่างการเจริญเติบโตของผล หากอุณหภูมิในเวลากลางวันสูงและความชื้นในบรรยากาศต่ำจะทำให้ผลพริกมีการเจริญผิดปกติ (off-type) อาจมีรูปร่างบิดเบี้ยวและมีขนาดเล็ก การติดเมล็ดต่ำกว่าปกติ

เมล็ด มีลักษณะกลม-แบน สีเหลืองไปจนถึงสีน้ำตาลมีขนาดค่อนข้างใหญ่กว่าเมล็ดมะเขือเทศ แต่ผิวเมล็ดพริกไม่ค่อยมีขนเหมือนเมล็ดมะเขือเทศ

ราก ต้นที่โตเต็มที่ รากฝอยจะแผ่ออกไปหากินด้านข้าง รัศมีเกินกว่า 1 เมตร และหยั่งลึกลงไปในดินเกินกว่า 1.20 เมตร ตรงบริเวณรอบๆ ต้นจะพบว่ามีรากฝอยสานกันอยู่อย่างหนาแน่น

พันธุ์พริก

การจัดจำแนกพันธุ์พริกในประเทศไทยนิยมจำแนกตามความเผ็ด และตามขนาดผล โดยการแบ่งตามความเผ็ด ส่วนการแบ่งตามขนาดของผลจะแบ่งเป็น 2 ประเภท เช่นเดียวกัน คือ พริกขนาดใหญ่หรือพริกใหญ่ และพริกเล็กหรือพริกขี้หนู

การค้าระหว่างประเทศ

ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พริก ประมาณ 10.60 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 37 ล้านบาท โดยนำเข้าจากหลายประเทศ เช่น เครือรัฐออสเตรเลีย สาธารณรัฐประชาชนจีน สาธารณรัฐอินเดีย สาธารณรัฐอินโดนีเซีย อิสราเอล ญี่ปุ่น สาธารณรัฐเกาหลี ราชอาณาจักรเนเธอร์แลนด์ สาธารณรัฐฟิลิปปินส์ ไต้หวัน และสหรัฐอเมริกา เป็นต้น (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2556) ซึ่งพริกที่นิยมปลูกในสหรัฐอเมริกามีหลายสายพันธุ์ เช่น *C. annuum* (Anaheim, New Mexico, Peter pepper, Pequin pepper) และ *C. chinensis* (Bird's eye, Datil) เป็นต้น

2. การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ขั้นตอนที่ 1: การเริ่มต้นการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 1: Initiation of pest risk analysis)

เมล็ดพันธุ์พริกจัดเป็นสิ่งไม่ต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 ต่อมาเมื่อมีการแก้ไขปรับปรุงเป็นพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติม โดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) 2551 ทำให้พืชในวงศ์ Solanaceae เปลี่ยนแปลงมาเป็นสิ่งต้องห้าม ในการนำเข้าต้องดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเพื่อให้ทราบชนิดของศัตรูพืชที่อาจติดมาเพื่อกำหนดมาตรการทางสุขอนามัยพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งสินค้าที่มีการนำเข้ามาเพื่อการปรับปรุงพันธุ์จะมีความเสี่ยงสูงที่จะมีศัตรูพืชเล็ดลอดติดเข้ามา เนื่องจากเมล็ดพันธุ์พริกจากสหรัฐอเมริกาได้รับการผ่อนผันให้มีการนำเข้าเพื่อการค้าโดยไม่มีมาตรการสุขอนามัยพืชใดๆ กำกับ และสามารถนำเข้ามาได้จนกว่าการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชจะแล้วเสร็จ ดังนั้นการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชจึงเกิดจากการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงกฎระเบียบการนำเข้าของประเทศไทยทำให้ต้องมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

การจำแนกพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Identification of PRA area)

พื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช คือ ประเทศไทย โดยกำหนดพื้นที่ที่อยู่ในอันตราย ได้แก่ พื้นที่หนึ่งพื้นที่ใดของประเทศไทย ซึ่งมีพืชอาศัยที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของศัตรูพืชและมีปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวรและแพร่กระจายได้

ขั้นตอนที่ 2: การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest risk assessment)

<u>การจัดกลุ่มศัตรูพืช (Pest Categorization)</u>

ผลการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชของพริกที่พบในไทยและสหรัฐอเมริกาพบศัตรูพืชรวม 288 ชนิด แบ่งเป็นแมลง 116 ชนิด ได้แก่ *Agrotis ipsilon, Agrotis segetum, Aleurodicus disperses, Anastrepha suspensa, Anthonomus eugenii, Aphidoletes aphidimyza, Aphis craccivora, Aphis fabae, Aphis gossypii, Aphis spiraecola, Aspidiotus destructor, Atherigona orientalis, Aulacorthum solani, Bactrocera carambolae, Bactrocera cucurbitae, Bactrocera dorsalis, Bactrocera dorsalis species complex, Bactrocera latifrons, Bactrocera papayae, Bactrocera*

passiflorae, Bactrocera tau, Bactrocera tryoni, Bemisia tabaci, Callosobruchus maculatus, Ceratitis capitata, Chrysodeixis chalcites, Chrysodeixis eriosoma, Chrysodeixis includens, Coccus hesperidum, Corcyra cephalonica, Dacus dorsalis, Diabrotica speciosa, Diaprepes abbreviates, Dociostaurus maroccanus, Dysmicoccus brevipes, Ephestia kuehniella, Epitrix cucumeris, Epitrix tuberis, Eudocima fullonia, Euproctis scintillans, Feltia subterranea, Frankliniella bispinosa, Frankliniella fusca, Frankliniella intonsa, Frankliniella occidentalis, Frankliniella schultzei, Gonocephalum, Gryllotalpa gryllotalpa, Helicoverpa armigera, Helicoverpa assulta, Helicoverpa zea, Heliothis peltigera, Heliothis virescens, Holotrichia serrata, Icerya aegyptiaca, Icerya seychellarum, Lasioderma serricorne, Liriomyza bryoniae, Liriomyza huidobrensis, Liriomyza sativae, Liriomyza trifolii, Listroderes costirostris, Maconellicoccus hirsutus, Macrosiphum euphorbiae, Macrosiphum rosae, Mamestra brassicae, Manduca quinquemaculata, Manduca sexta, Melanotus communis, Microtermes obesi, Myzus persicae, Nezara viridula, Opogona sacchari, Orthezia insignis, Ostrinia furnacalis, Ostrinia nubilalis, Paracoccus marginatus, Parasaissetia nigra, Peridroma saucia, Phenacoccus madeirensis, Phenacoccus solenopsis, Phthorimaea operculella, Phyllophaga, Piezodorus guildinii, Piezodorus hybneri, Pinnaspis strachani, Platynota stultana, Pseudaulacaspis pentagona, Pseudococcus jackbeardsleyi, Rhopalosiphum maidis, Rhyzopertha dominica, Saissetia coffeae, Scapteriscus, Scirtothrips dorsalis, Sitophilus oryzae, Sitophilus zeamais, Sitotroga cerealella, Spodoptera eridania, Spodoptera exempta, Spodoptera exigua, Spodoptera frugiperda, Spodoptera litura, Spodoptera ornithogalli, Symmetrischema capsicum, Thaumatotibia leucotreta, Thrips hawaiiensis, Thrips palmi, Thrips parvispinus, Tiracola plagiata, Toxoptera aurantii, Trialeurodes abutiloneus, Trialeurodes vaporariorum, Tribolium castaneum, Trichoplusia ni, Typophorus nigritus และ *Unaspis citri* ไร 9 ชนิด ได้แก่ *Aculops lycopersici, Calacarus carinatus, Halotydeus destructor, Phytonemus pallidus, Polyphagotarsonemus latus, Tetranychus cinnabarinus, Tetranychus marianae, Tetranychus turkestani* และ *Tetranychus urticae* หอยทาก 1 ชนิด ได้แก่ *Helix aspersa* แบคทีเรีย 22 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas celebensis, Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis, Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica, Erwinia carotovora* subsp. *carotovora, Erwinia chrysanthemi, Erwinia chrysanthemi* pv. *chrysanthemi, Pseudomonas cichorii, Pseudomonas corrugata, Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis, Pseudomonas syringae, Pseudomonas syringae* pv. *aptata, Pseudomonas syringae* pv. *syringae, Pseudomonas syringae* pv. *tabaci, Pseudomonas viridiflava, Ralstonia solanacearum, Ralstonia solanacearum* race 1, *Rhizobium radiobacter, Rhizobium*

rhizogenes, Rhodococcus fascians, Xanthomonas axonopodis pv.*vesicatoria, Xanthomonas campestris* และ *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* ไฟโตพลาสมา 3 ชนิด ได้แก่ *Phytoplasma aurantifolia*, *Grapevine yellows phytoplasmas* และ *Aster yellows phytoplasma group* โปรโตซัว 1 ชนิด ได้แก่ *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* รา 54 ชนิด *Alternaria alternate, Alternaria solani, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Athelia rolfsii, Botryotinia fuckeliana, Cercospora apii, Cercospora capsici, Chalara elegans, Choanephora cucurbitarum, Cochliobolus lunatus, Colletotrichum acutatum, Colletotrichum capsici, Colletotrichum coccodes, Colletotrichum dematium, Colletotrichum truncatum, Corticium rolfsii, Diaporthe phaseolorum, Diaporthe phaseolorum* var. *sojae, Didymella lycopersici, Fusarium oxysporum, Fusarium oxysporum* f.sp.*capsici, Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum, Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum, Fusarium solani, Gibberella intricans, Glomerella cingulate, Golovinomyces orontii, Lasiodiplodia theobromae, Leveillula taurica, Macrophomina phaseolina, Monilinia fructigena, Nectria haematococca, Olpidium brassicae, Passalora fulva, Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina, Phomopsis longicolla, Phytophthora capsici, Phytophthora citrophthora, Phytophthora cryptogea, Phytophthora infestans, Phytophthora nicotianae, Phytophthora vignae, Pseudocercospora fuligena, Pythium aphanidermatum, Pythium debaryanum, Pythium irregulare, Pythium ultimum, Rhizopus arrhizus, Sclerotinia sclerotiorum, Setosphaeria rostrata, Stereum sanguinolentum, Thanatephorus cucumeris* และ *Verticillium dahliae* ไวรัส 32 ชนิด ได้แก่ *Alfalfa mosaic virus, Beet curly top virus, Broad bean wilt virus, Cherry leaf roll virus, Chilli veinal mottle virus, Cucumber green mottle mosaic virus, Cucumber mosaic virus, Impatiens necrotic spot virus, Iris yellow spot virus, Pepper golden mosaic virus, Pepper mild mottle virus, Pepper mottle virus, Pepper yellow leaf curl virus, Potato leaf roll virus, Potato virus X, Potato virus Y, Sweet potato feathery mottle virus, Tobacco etch virus, Tobacco leaf curl virus, Tobacco mosaic virus, Tobacco rattle virus, Tobacco ringspot virus, Tobacco streak virus, Tobacco vein mottling virus, Tomato aspermy virus, Tomato black ring virus, Tomato bushy stunt virus, Tomato chlorosis virus, Tomato mosaic virus, Tomato ringspot virus, Tomato spotted wilt virus* และ *Tomato torrado virus* ไส้เดือนฝอย 21 ชนิด ได้แก่ *Aphelenchoides besseyi, Belonolaimus longicaudatus, Ditylenchus destructor, Helicotylenchus dihystera, Hemicycliophora arenaria, Hoplolaimus seinhorsti, Longidorus, Meloidogyne arenaria, Meloidogyne chitwoodi, Meloidogyne exigua, Meloidogyne graminicola, Meloidogyne hapla, Meloidogyne incognita, Meloidogyne javanica, Meloidogyne mayaguensis, Nacobbus*

aberrans, Pratylenchus penetrans, Pratylenchus zeae, Rotylenchulus reniformis, Xiphinema index และ *Zygotylenchus guevarai* วัชพืช 28 ชนิด ได้แก่ *Amaranthus blitoides, Amaranthus hybridus, Amaranthus retroflexus, Amaranthus viridis, Ambrosia artemisiifolia, Anagallis arvensis, Cirsium arvense, Commelina benghalensis, Cuscuta campestris, Cyperus rotundus, Dactyloctenium aegyptium, Digitaria ciliaris, Echinochloa crus-galli, Galinsoga parviflora, Hibiscus trionum, Murdannia nudiflora, Orobanche, Orobanche aegyptiaca, Orobanche cernua, Orobanche ramose, Panicum repens, Parthenium hysterophorus, Phyllanthus urinaria, Polygonum aviculare, Richardia brasiliensis, Senna obtusifolia, Solanum nigrum* และ *Tridax procumbens* และสัตว์ฟันแทะ 1 ชนิด ได้แก่ *Rattus argentiventer* (CABI, 2007; 2014; EPPO-PQR, 2014) โดยพบศัตรูพืชที่มีในสหรัฐอเมริกา จำนวน 267 ชนิด เป็น แมลง 101 ชนิด ไร 9 ชนิด หอยทาก 1 ชนิด แบคทีเรีย 22 ชนิด ไฟโตพลาสมา 3 ชนิด โปรโตซัว 1 ชนิด รา 52 ชนิด ไวรัส 30 ชนิด ไส้เดือนฝอย 20 ชนิด และวัชพืช 28 ชนิด (Table 1) ซึ่งการจัดกลุ่มศัตรูพืช เมื่อพิจารณาตามคำนิยามของศัตรูพืช พบว่ามีศัตรูพืชที่ไม่มีในไทยแต่มีในสหรัฐอเมริกาและสามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกที่จะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจ ได้ 27 ชนิด เป็น แบคทีเรีย 6 ชนิด ได้แก่ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis, Pseudomonas corrugata, Pseudomonas syringae* pv. *syringae, Pseudomonas syringae* pv. *tabaci, Pseudomonas viridiflava, Rhodococcus fascians* รา 9 ชนิด ได้แก่ *Botryotinia fuckeliana, Diaporthe phaseolorum, Didymella lycopersici, Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum, Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina, Phomopsis longicolla, Phytophthora vignae, Setosphaeria rostrata, Verticillium dahlia* และไวรัส 12 ชนิด ได้แก่ *Alfalfa mosaic virus, Broad bean wilt virus, Cherry leaf roll virus, Cucumber green mottle mosaic virus, Tobacco ringspot virus, Tobacco streak virus, Tomato aspermy virus, Tomato black ring virus, Tomato bushy stunt virus, Tomato mosaic virus, Tomato ringspot virus* และ *Tomato torrado virus* (Table 2)

<u>การสุ่มเมล็ดพันธุ์พริกเพื่อตรวจสอบศัตรูพืช ณ ด่านตรวจพืช หรือสถานกักพืช</u>

ผลจากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์พริก ณ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช เพื่อตรวจสอบศัตรูพืชที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา จำนวน 16 ตัวอย่าง โดยการทำ Blotter method พบเชื้อรา จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* และ *Rhizopus* sp. (Table 3)

<u>การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Risk Assessment)</u>

นำศัตรูพืชทั้ง 27 ชนิด ที่ได้จากการจัดกลุ่มศัตรูพืชมาประเมินโอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร แพร่ระบาด และก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจทั้งทางตรงและทางอ้อม เนื่องจากศัตรูพืชมีโอกาสติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากสหรัฐอเมริกาโดยการปนเปื้อนเข้ามากับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า ซึ่งไม่สามารถสังเกตลักษณะอาการผิดปกติจากภายนอกได้ด้วยตาเปล่า ทั้งยังมีพืชอาศัยหลาย

ชนิดที่เป็นพืชเศรษฐกิจของไทย ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อผลิตผลทางการเกษตร รวมทั้งการส่งออกพืชผักไปยังประเทศที่ไม่มีการระบาดของเชื้อสาเหตุโรคเหล่านี้ จากผลการวิเคราะห์โอกาสการเข้ามา ตั้งรกรากอย่างถาวร และแพร่กระจายของศัตรูพืชที่มีโอกาสติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา สามารถจัดลำดับความเสี่ยง ได้ดังนี้

ความเสี่ยงต่ำ: ได้แก่ แบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Pseudomonas corrugata, Rhodococcus fascians* รา 7 ชนิด คือ *Botryotinia fuckeliana, Diaporthe phaseolorum, Didymella lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*, *Phomopsis longicolla*, *Phytophthora vignae, Setosphaeria rostrata* และไวรัส 4 ชนิด คือ *Broad bean wilt virus*, *Cherry leaf roll virus*, *Cucumber green mottle mosaic virus*, *Tomato ringspot virus*

ความเสี่ยงปานกลาง: ได้แก่ แบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *Pseudomonas syringae* pv. *syringae, Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *Pseudomonas viridifla* รา 2 ชนิด คือ *Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina, Verticillium dahliae* ไวรัส 5 ชนิด คือ *Tobacco ringspot virus*, *Tobacco streak virus*, *Tomato aspermy virus, Tomato black ring virus*, *Tomato bushy stunt virus*

ความเสี่ยงสูง: ได้แก่ แบคทีเรีย 1 ชนิด คือ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ไวรัส 3 ชนิด คือ *Alfalfa mosaic virus, Tomato mosaic virus* และ *Tomato torrado virus*

ขั้นตอนที่ 3: การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest risk management)

ศึกษาข้อมูลและกำหนดมาตรการทางวิชาการเพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกัน

จากผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากสหรัฐอเมริกาพบศัตรูพืชกักกัน 14 ชนิดที่ต้องมีมาตรการจัดการความเสี่ยง โดยเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชที่ระบุข้อความเพิ่มเติมว่า เมล็ดพันธุ์พริกต้องมาจากแหล่งที่ปลอดจากศัตรูพืชกักกัน (pest free area หรือ pest free production site) หรือเมล็ดพันธุ์พริกต้องมาจากต้นพ่อแม่ที่ได้รับการตรวจสอบในระยะการเจริญเติบโตหรือได้รับการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการว่าปลอดจาก *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae, Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *Pseudomonas viridifla*, *Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina, Verticillium dahlia*, *Alfalfa mosaic virus, Tobacco ringspot virus*, *Tobacco streak virus*, *Tomato aspermy virus, Tomato black ring virus*, *Tomato bushy stunt virus* *Tomato mosaic virus* และ *Tomato torrado virus* นอกจากนี้การนำเข้าต้องปราศจากแมลงที่มีชีวิต ดิน ทราย วัชพืช ชิ้นส่วนของพืช เช่น ใบ ก้าน เศษซากพืช และสิ่งอื่นใดที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน และเมล็ดพันธุ์พริกต้องแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (Table 4)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

พริกเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Solanaceae จัดอยู่ในสกุล *Capsicum* มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมในทวีปอเมริกาใต้ ในปี 2555 ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พริก ประมาณ 10.60 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 37 ล้านบาท โดยนำเข้าจากหลายประเทศรวมถึงสหรัฐอเมริกา ซึ่งพริกที่นิยมปลูกในสหรัฐอเมริกามีหลายสายพันธุ์ เช่น *C. annuum* (Anaheim, New Mexico, Peter pepper, Pequin pepper) และ *C. chinensis* (Bird's eye, Datil) เป็นต้น ผลการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชของพริกที่พบในไทยและสหรัฐอเมริกาพบศัตรูพืชรวม 288 ชนิด แบ่งเป็นแมลง 116 ชนิด ไร 9 ชนิด หอยทาก 1 ชนิด แบคทีเรีย 22 ชนิด ไฟโตพลาสมา 3 ชนิด โปรโตซัว 1 ชนิด รา 54 ชนิด ไวรัส 32 ชนิด ไส้เดือนฝอย 21 ชนิด วัชพืช 28 ชนิด และสัตว์ฟันแทะ 1 ชนิด โดยพบศัตรูพืชที่มีในสหรัฐอเมริกา จำนวน 267 ชนิด เป็นแมลง 101 ชนิด ไร 9 ชนิด หอยทาก 1 ชนิด แบคทีเรีย 22 ชนิด ไฟโตพลาสมา 3 ชนิด โปรโตซัว 1 ชนิด รา 52 ชนิด ไวรัส 30 ชนิด ไส้เดือนฝอย 20 ชนิด และวัชพืช 28 ชนิด ซึ่งการจัดกลุ่มศัตรูพืชเมื่อพิจารณาตามคำนิยามของศัตรูพืช พบว่ามีศัตรูพืชที่ไม่มีในไทยแต่มีในสหรัฐอเมริกาและสามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกที่จะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจ ได้ 27 ชนิด เป็น แบคทีเรีย 6 ชนิด ได้แก่ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis, Pseudomonas corrugata, Pseudomonas syringae* pv. *syringae, Pseudomonas syringae* pv. *tabaci, Pseudomonas viridiflava, Rhodococcus fascians* รา 9 ชนิด ได้แก่ *Botryotinia fuckeliana, Diaporthe phaseolorum, Didymella lycopersici, Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum, Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina, Phomopsis longicolla, Phytophthora vignae, Setosphaeria rostrata, Verticillium dahlia* และไวรัส 12 ชนิด ได้แก่ *Alfalfa mosaic virus, Broad bean wilt virus, Cherry leaf roll virus, Cucumber green mottle mosaic virus, Tobacco ringspot virus, Tobacco streak virus, Tomato aspermy virus, Tomato black ring virus, Tomato bushy stunt virus, Tomato mosaic virus, Tomato ringspot virus* และ *Tomato torrado virus*

พบศัตรูพืชกักกัน 13 ชนิดที่ต้องมีมาตรการจัดการความเสี่ยง โดยเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชที่ระบุข้อความเพิ่มเติมว่า เมล็ดพันธุ์พริกต้องมาจากแหล่งที่ปลอดจากศัตรูพืช หรือเมล็ดพันธุ์พริกต้องมาจากต้นพ่อแม่ที่ได้รับการตรวจสอบในระยะการเจริญเติบโตหรือได้รับการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการว่าปลอดจาก *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae, Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *Pseudomonas viridifla*, *Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina, Verticillium dahlia*, *Alfalfa mosaic virus, Tobacco ringspot virus*, *Tobacco streak virus*, *Tomato aspermy virus, Tomato black ring virus*, *Tomato bushy stunt virus*, *Tomato mosaic virus* และ *Tomato torrado virus* นอกจากนี้การนำเข้าต้องปราศจากแมลงที่มีชีวิต ดิน ทราย วัชพืช ชิ้นส่วนของพืช เช่น ใบ ก้าน เศษซากพืช และสิ่งอื่นใดที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน และเมล็ดพันธุ์พริกต้องแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

เนื่องจากพริกเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Solanaceae เช่นเดียวกับมะเขือเทศ มะเขือ มันฝรั่ง ยาสูบ พิทูเนีย และวัชพืชหลายชนิดที่มีลักษณะของเมล็ดคล้ายกับพืชในวงศ์ Solanaceae ในการตรวจสอบเมล็ดที่นำเข้าควรตรวจสอบเมล็ดพันธุ์พริกให้ละเอียดเพราะอาจมีการปะปนของเมล็ดวัชพืชก่อนนำไปจำหน่ายหรือปลูก เนื่องจากวัชพืชหลายชนิดมีขนาดเล็กและคล้ายเมล็ดพันธุ์พริก ซึ่งหากหลุดรอดไปโครงสร้างของรากที่มีความแข็งแรงและสามารถแผ่ขยายไปรอบบริเวณได้ เมื่อเข้าไปอยู่ในแปลงปลูกจะแย่งอาหารและพื้นที่การเจริญเติบโตของพริกทำให้ผลผลิตของพริกที่ได้ลดลง รวมถึงสามารถเป็นพาหะนำโรคได้เช่นเดียวกับพืชในวงศ์ Solanaceae

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนางณัฏฐพร อุทัยมงคล หัวหน้ากลุ่มงานวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช สำหรับคำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการปฏิบัติงาน ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ กลุ่มงานวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือต่างๆ และขอขอบคุณบิดา-มารดาผู้เป็นกำลังใจสำคัญให้ลูกเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

ชวนพิศ อรุณรังสิกุล. มปป. พริก: พืชน่าพิศวง. **งานเทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์พืช**. ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน. นครปฐม. แหล่งข้อมูล: http://clgc.rdi.ku.ac.th/article/seed/chilli/chilli.html

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2556. **ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ควบคุม ประจำปี 2555**. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: www.doa.go.th/ard/FileUpload/พันธุ์พืช/สถิติ/ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าฯรายเมล็ดพันธุ์%202555 (8 มีนาคม 2556).

Anonymous. 2006. Phytosanitary Principles for the protection of plants and the application of phytosanitary measures in international trade.

CABI (CAB International). 2007. **Crop Protection Compendium**. CAB INTERNATIONAL, Walling ford, U.K.

CABI (CAB International). 2014. **Crop Protection Compendium (2014 edition)**. Copyright © 2014 CABI. CABI is a registered EU trademark. Available. http://www.cabi.org/cpc/ (February 20, 2014).

Chandrasrikul, A. and P. Patrakosol. 1986. Virus diseases of horticultural crops in Thailand. **Plant virus diseases of horticultural crops in the tropics and subtropics.** 7-11.

Chuntharusmi, W., C. Premasthira, T. Sangtong, C. Prakongvongs, C. Supatanakul, M. Na-nakorn, S. Benyasuta, S. Suwannawongsa and Zungsontiporn. 2002. **Common Weeds of Central Thailand. Weed Science Society of Thailand**. 135 pp.

Damayanti, T.A. and T. Katerina. 2008. Protection of hot pepper against multiple infection of viruses by utilizing root colonizing bacteria. **J. ISSAAS**. 14(1): 92-100.

Disthaporn, S., K. Kesavayuth, S. Thongdeethae and K. Phomphunjai. 1998. Survey and analysis of rice seed cleaning from several farms in Thailand. Pages 36-40. *In* **Integrating science and people in rice pest management: proceedings of the rice integrated pest management (IPM) conference.** Kuala Lumpar, Malaysia. 18-21 November 1996..

Drew, R.A.I and D.L. Hancock. 1994. The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in Asia. **Bulletin of Entomological Research**, 84(2(SUP)): 68 pp.

Ek-amnuay, P. 2010. **Plant Diseases and Insect Pests of Economic Importance**. Siam Insect-Zoo & Museum. Amarin Printing & Publishing Public Co., Ltd. 592 pp.

FAO. 2011. **INTERNATIONAL STANDARDS FOR PHYTOSANITARY MEASURES (ISPM) 2: Framework for Pest Risk Analysis (2007)**. Produced by the Secretariat of the International Plant Protection Convention. Rome, FAO.

FAO. 2014. **INTERNATIONAL STANDARDS FOR PHYTOSANITARY MEASURES (ISPM) 11: Pest Risk Analysis for Quarantine Pests (2013).** Produced by the Secretariat of the International Plant Protection Convention. Rome, FAO.

Hyun, I.H., N.Y. Heo and Y.H. Lee. 2004. **Illustrated Manual on Identification of Seed-borne Fungi**. National Plant Quarantine Service. Anyang, Korea.

Keinmeesuke, P., K. Bansiddhi, N. Kitbumroong, J. Piriyapol, S. Thothong, S. Siriphontongmun, L. Insung, U. Jaipet, S. Pichidsuwanchai, S. Rungrattanavaree and S. Prasongsap. 1999. **Insect Pests of Vegetables**. Entomology and Zoology Division. Department of Agriculture. Bangkok. Thailand. 97 pp. (In Thai)

Kittipakorn, K. and W. Srithongchi. 2002. **Important viral disease of vegetable and oil crops.** Plant Pathology and Microbiology Division. Department of Agriculture. Bangkok. Thailand. (In Thai)

Lewvanich, A. 2001. **Lepidopterous Adults and Larvae**. Entomology and Zoology Division. Department of Agriculture. Bangkok. Thailand. 230 pp. (In Thai)

Poonchaisri,S. 2001. **Terebratia**. Entomology and Zoology Division. Department of Agriculture. Bangkok. Thailand. 75 pp. (In Thai)

Richardson, M.J. 1990. **An Annotated List of Seed-Borne Disease**. Fourth Edition. The International Seed Testing Association, Switzerland.

Roberts, R.G. and J.P. Snow. 1990. Morphological and pathological studies of *Colletotrichum capsici* and *C. indicum*. **Mycol**. 82(1): 82-90.

Rushtapakornchai, W., P. Petchwichit. 1996. Efficiency of some insecticides for controlling tobacco whitefly *Bemisia tabaci* and leaf miner *Liriomyza trifolii* on tomato. **Kaen Kaset, Khon Kaen Agri. J.** 24(4): 184-189.

Sangchote, S. and P. Juangbhanich. 1984. Seed transmission of *Colletotrichum capsici* on pepper (*Capsicum* spp.). **Kasetsart J. Nat. Sci.** 18(1): 7-13.

Sonthirat, P., P. Pitakpaivan, T. Kamhangridthirong, W. Choobamroong and U. Kueprakone. 1994. **Host Index of Plant Diseases in Thailand.** Mycology Section. Plant Pathology and Microbiology Division. Department of Agriculture. Bangkok. Thailand. (In Thai)

Sonthirat, S. 1995. **Plant Parasitic Nematodes of Thailand**. Department of Plant Pathology, Department of Agriculture, Kasetsart University. 275 pp. (In Thai)

Waterhouse, D.F. 1993. **The Major Arthropod Pests and Weeds of Agriculture in Southeast Asia**. ACIAR Monograph No. 21. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), 141 pp.

Wongsiri, N. 1991. **List of Insect, mite and Other Zoological Pests of economic plants in Thailand**. Department of Agriculture, Bangkok, Thailand. Tech. Bull. 168 pp.

Table 1 Pests associated with capsicum (*Capsicum* spp.) in Thailand and United States of America.

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
INSECTS									
Insect	Coccoidea	Pseudococcidae	*Maconellicoccus hirsutus* (Green)	pink hibiscus mealybug	flower, fruit, growing point, leaf, stem	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; CABI, 2007; 2014	No
Insect	Coleoptera	Anobiidae	*Lasioderma serricorne* Fabricius	cigarette beetle	leaf, root, **seed**	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; CABI, 2007	No
Insect	Coleoptera	Bostrichidae	*Rhyzopertha dominica* (Fabricius)	lesser grain borer	**seed**	Yes	Yes	Sukprakarn, 1985; Wongsiri, 1991; CABI, 2007	No
Insect	Coleoptera	Bruchidae	*Callosobruchus maculatus* (Fabricius)	cowpea weevil	**seed**	No	Yes	CABI, 2014	Yes
Insect	Coleoptera	Chrysomelidae	*Diabrotica speciosa* (Germar)	cucurbit beetle	flower, fruit, growing point, leaf, root, stem, vegetative organ	No	Yes	CABI, 2014	No
Insect	Coleoptera	Chrysomelidae	*Epitrix cucumeris* (Harris)	potato flea beetle	leaf, root	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Insect	Coleoptera	Chrysomelidae	*Epitrix tuberis* Gentner	tuber flea beetle	flower, leaf, root, **seed**, stem, vegetative organ	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Coleoptera	Chrysomelidae	*Typophorus nigritus* (Fabricius)	black sweet potato beetle		No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Coleoptera	Curculionidae	*Anthonomus eugenii* Cano	pepper weevil	flower, fruit, leaf	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Coleoptera	Curculionidae	*Diaprepes abbreviatus* (Linnaeus)	citrus weevil	flower, leaf, root	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Coleoptera	Curculionidae	*Listroderes costirostris* Schönherr	vegetable weevil	leaf, root, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Coleoptera	Dryophthoridae	*Sitophilus oryzae* (Linnaeus)	lesser grain weevil	seed	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Coleoptera	Dryophthoridae	*Sitophilus zeamais* Motschulsky	greater grain weevil	seed	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Coleoptera	Elateridae	*Melanotus communis* Gyllenhal	common wireworm	growing point, leaf, root, **seed**, vegetative organ	No	Yes	CABI, 2007; 2014	Yes
Insect	Coleoptera	Scarabaeidae	*Holotrichia serrata* (Fabricius)	white grub	leaf, root	No	Yes	CABI, 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Insect	Coleoptera	Scarabaeidae	*Phyllophaga* Harris	white grubs	flower, fruit, leaf, root	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Coleoptera	Tenebrionidae	*Gonocephalum*	false wireworm	fruit, growing point, leaf, seed, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	Yes
Insect	Coleoptera	Tenebrionidae	*Tribolium castaneum* Herbst	red flour beetle	fruit, vegetative organ	Yes	Yes	Hill, 1975; CABI, 2007; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	Diptera	Agromyzidae	*Liriomyza bryoniae* Kaltenbach	miner, tomato leaf	leaf	No	Yes	CABI, 2014	No
Insect	Diptera	Agromyzidae	*Liriomyza huidobrensis* (Blanchard)	serpentine leafminer	fruit, leaf, stem	Yes	Yes	CABI, 2014	No
Insect	Diptera	Agromyzidae	*Liriomyza sativae* Blanchard	vegetable leaf miner	fruit, leaf	Yes	Yes	Martinez, 1994; CABI, 2014	No
Insect	Diptera	Agromyzidae	*Liriomyza trifolii* Burgess	American serpentine leafminer	leaf	Yes	Yes	Rushtapakornchai *et al.*, 1996; CABI, 2007; 2014	No
Insect	Diptera	Cecidomyiidae	*Aphidoletes aphidimyza* (Rondani)	aphid midge	leaf, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Diptera	Muscidae	*Atherigona orientalis* Schiner	pepper fruit fly	fruit, growing point, leaf, root, stem, vegetative organ	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Insect	Diptera	Tephritidae	*Anastrepha suspensa* Loew	caribbean fruit fly	fruit	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Diptera	Tephritidae	*Bactrocera carambolae* Drew & Hancock	carambola fruit fly	fruit	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Diptera	Tephritidae	*Bactrocera cucurbitae* (Coquillett)	melon fruit fly	flower, fruit, leaf, root, stem	Yes	No	Waterhouse, 1993; CABI, 2007; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	Diptera	Tephritidae	*Bactrocera dorsalis* (Hendel)	Oriental fruit fly	fruit	Yes	Yes	Waterhouse, 1993; Drew & Hancock, 1994; CABI, 2007; 2014	No
Insect	Diptera	Tephritidae	*Bactrocera dorsalis species complex*	Oriental fruit fly species complex	fruit	Yes	Yes	Waterhouse, 1993; CABI, 2007	No
Insect	Diptera	Tephritidae	*Bactrocera latifrons* (Hendel)	Solanum fruit fly	fruit	Yes	Yes	Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014	No
Insect	Diptera	Tephritidae	*Bactrocera papayae* Drew & Hancock	papaya fruit fly	fruit	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Diptera	Tephritidae	*Bactrocera passiflorae* (Froggatt)	Fijian fruit fly	fruit	No	Yes	CABI, 2014	No
Insect	Diptera	Tephritidae	*Bactrocera tau* Walker		fruit	Yes	No	CABI, 2007	No
Insect	Diptera	Tephritidae	*Bactrocera tryoni* (Froggatt)	Queensland fruit fly	fruit	Yes	Yes	CABI, 2014	No
Insect	Diptera	Tephritidae	*Ceratitis capitata* (Wiedemann)	mediterranean fruit fly	fruit	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Insect	Diptera	Tephritidae	*Dacus dorsalis* (Hendel)	Oriental fruitfly	fruit	Yes	No	Wongsiri, 1991; Keinmeesuke *et al.*, 1999	No
Insect	Hemiptera	Aleyrodidae	*Aleurodicus dispersus* Russell	whitefly	fruit, leaf	Yes	Yes	Waterhouse, 1993; EPPO, 2006; CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	Hemiptera	Aleyrodidae	*Bemisia tabaci* (Gennadius)	tobacco whitefly	leaf	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; Waterhouse, 1993; Keinmeesuke *et al.*, 1999; CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	Hemiptera	Aleyrodidae	*Trialeurodes abutiloneus* Haldeman	whitefly, bandedwing		No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Hemiptera	Aleyrodidae	*Trialeurodes vaporariorum* Westwood	whitefly, greenhouse	flower, fruit, leaf, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Hemiptera	Aphididae	*Aphis craccivora* Koch	groundnut aphid	flower, growing point, leaf	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014; Hutacharern *et al.*, 2007; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	Hemiptera	Aphididae	*Aphis fabae* Scopoli	black bean aphid	flower, growing point, leaf	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Insect	Hemiptera	Aphididae	*Aphis gossypii* Glover	cotton aphid	flower, fruit, growing point, leaf, stem	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; Waterhouse, 1993; Keinmeesuke *et al.*, 1999; CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	Hemiptera	Aphididae	*Aphis spiraecola* Patch Syn.= *Aphis citricola* van der Goot	spirea aphid	flower, fruit, growing point, leaf, stem	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	Hemiptera	Aphididae	*Aulacorthum solani* Kaltenbach	foxglove aphid	growing point, leaf, stem	No	Yes	CABI, 2014	No
Insect	Hemiptera	Aphididae	*Macrosiphum euphorbiae* Thomas	potato aphid	flower, fruit, leaf, stem	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Hemiptera	Aphididae	*Macrosiphum rosae* Linnaeus	rose aphid	flower, growing point, leaf, stem	No	Yes	CABI, 2014	No
Insect	Hemiptera	Aphididae	*Myzus persicae* Sulzer	green peach aphid	flower, growing point, leaf, stem	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Insect	Hemiptera	Aphididae	*Rhopalosiphum maidis* (Fitch)	corn leaf aphid	growing point, leaf, stem	Yes	No	Wongsiri, 1991; Waterhouse, 1993; CABI, 2007; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	Hemiptera	Coccidae	*Coccus hesperidum* Linnaeus	brown soft scale	leaf, stem	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; Ben-Dov, 1993; Ek-amnuay, 2010; CABI, 2007	No
Insect	Hemiptera	Coccidae	*Parasaissetia nigra* (Nietner)	pomegranate scale	leaf, stem	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; Ben-Dov, 1993; CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	Hemiptera	Coccidae	*Saissetia coffeae* (Walker)	hemispherical scale	fruit, leaf, stem	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; Ben-Dov, 1993; Waterhouse, 1993; CABI, 2007	No
Insect	Hemiptera	Diaspididae	*Aspidiotus destructor* Signoret	coconut scale	fruit, leaf, stem	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	Hemiptera	Diaspididae	*Pinnaspis strachani* (Cooley)	lesser snow scale	fruit, leaf, stem	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Hemiptera	Diaspididae	*Pseudaulacaspis pentagona* (Targioni Tozzetti) MacGillivray	mulberry scale	leaf, root, stem	Yes	Yes	Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Insect	Hemiptera	Diaspididae	*Unaspis citri* (Comstock)	citrus snow scale	fruit, leaf, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Hemiptera	Margarodidae	*Icerya aegyptiaca* Douglas	breadfruit mealybug	leaf, stem	Yes	No	BNZ, 2007; CABI, 2007	No
Insect	Hemiptera	Margarodidae	*Icerya seychellarum* (Westwood)	Seychelles scale	leaf, stem	Yes	No	Waterhouse, 1993; CABI, 2007	No
Insect	Hemiptera	Ortheziidae	*Orthezia insignis* Browne	greenhouse orthezia	flower, growing point, leaf, stem	No	Yes	CABI, 2007	No
Insect	Hemiptera	Pentatomidae	*Nezara viridula* (Linnaeus)	green stink bug	flower, fruit, growing point, leaf, **seed**, stem	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014	No
Insect	Hemiptera	Pentatomidae	*Piezodorus guildinii*	stink bug	flower, leaf, **seed**	No	Yes	CABI, 2007; 2014	Yes
Insect	Hemiptera	Pentatomidae	*Piezodorus hybneri* (Gmelin)	legume stink bug	growing point, leaf, stem	Yes	No	Waterhouse, 1993; CABI, 2007; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	Hemiptera	Pseudococcidae	*Dysmicoccus brevipes* (Cockerell)	pineapple mealybug	fruit, growing point, leaf, root, stem	Yes	Yes	Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Insect	Hemiptera	Pseudococcidae	*Paracoccus marginatus* Williams & Granara de Willink	papaya mealybug	fruit, growing point, flower, leaf, stem	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Hemiptera	Pseudococcidae	*Phenacoccus madeirensis* Green	cassava mealybug	leaf, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Hemiptera	Pseudococcidae	*Phenacoccus solenopsis* Tinsley	cotton mealybug	leaf, stem	Yes	No	CABI, 2014	No
Insect	Hemiptera	Pseudococcidae	*Pseudococcus jackbeardsleyi* Gimpel and Miller	Jack Beardsley mealybug	fruit, leaf	Yes	Yes	Williams, 1988; CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	Hemiptera	Pseudococcidae	*Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe	camellia aphid	flower, fruit, growing point, leaf, root, stem	Yes	Yes	CABI, 2014	No
Insect	Isoptera	Termitidae	*Microtermes obesi* Holmgren			Yes	No	Wongsiri, 1991; CABI, 2007	No
Insect	Lepidoptera	Crambidae	*Ostrinia furnacalis* Guenée	Asian corn borer	fruit, leaf, stem	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; Waterhouse, 1993; CABI, 2007; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	Lepidoptera	Crambidae	*Ostrinia nubilalis* (Hübner)	European maize borer	fruit, leaf, **seed**, stem	Yes	Yes	Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014	No
Insect	Lepidoptera	Gelechiidae	*Phthorimaea operculella* (Zeller)	potato tuber moth	leaf, root, stem	Yes	Yes	Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Insect	Lepidoptera	Gelechiidae	*Sitotroga cerealella* (Olivier)	grain moth	**seed**	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Lepidoptera	Gelechiidae	*Symmetrischema capsicum* (Bradley & Povolny)	pepper bud moth		No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Lepidoptera	Lymantriidae	*Euproctis scintillans* (Walker)		flower, fruit, leaf	Yes	No	USDA, 2005; CABI, 2007	No
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Agrotis ipsilon* (Hufnagel)	black cutworm	fruit, leaf, stem	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014	No
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Agrotis segetum* Denis & Schiffermüller	turnip moth	leaf, root, stem	Yes	Yes	CABI, 2014	No
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Chrysodeixis chalcites* (Esper)	golden twin-spot moth	fruit, leaf	Yes	Yes	CABI, 2014	No
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Chrysodeixis eriosoma* Doubleday	green looper caterpillar	fruit, leaf	Yes	Yes	Waterhouse, 1993; Lewvanich, 2001; CABI, 2007	No
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Chrysodeixis includens* (Walker)	soybean looper	flower, fruit, growing point, leaf, **seed**	No	Yes	CABI, 2007; 2014	Yes
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Eudocima fullonia* (Clerck)	fruit-piercing moth	fruit	Yes	Yes	Banziger, 1982; Lewvanich, 2001; CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Feltia subterranea* (Fabricius)	granulate cutworm	fruit	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Helicoverpa armigera* (Hübner)	cotton bollworm	flower, fruit, growing point, leaf, stem	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; Waterhouse, 1993; Keinmeesuke *et al.*, 1999; Lewvanich, 2001; CABI, 2007; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Helicoverpa assulta* (Guenée)	cape gooseberry budworm	flower, fruit, growing point, leaf, **seed**, stem, vegetative organ	Yes	No	Wongsiri, 1991; Waterhouse, 1993; Lewvanich, 2001; CABI, 2007	No
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Helicoverpa zea* (Boddie)	American cotton bollworm	flower, fruit, growing point, leaf, **seed**	No	Yes	CABI, 2007; 2014	Yes
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Heliothis peltigera* Denis & Schiffermüller	Bilsenkraut-Eule, yesil kurt	flower, fruit	No	Yes	CABI, 2014	No
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Heliothis virescens* (Fabricius)	tobacco budworm	flower, fruit, leaf, **seed**	No	Yes	CABI, 2007; 2014	Yes

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Mamestra brassicae* (Linnaeus)	cabbage moth	flower, fruit, growing point, leaf, root, stem	Yes	No	CABI, 2014	No
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Peridroma saucia* (Hübner)	pearly underwing moth	flower, fruit, growing point, leaf, seed, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	Yes
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Spodoptera eridania* Stoll in Cramer	southern armyworm	fruit, leaf	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	*Lepidoptera*	Noctuidae	*Spodoptera exempta* Walker	black armyworm	growing point, leaf, stem	No	Yes	CABI, 2014	No
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Spodoptera exigua* (Hübner)	beet armyworm	flower, fruit, growing point, leaf	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; Waterhouse, 1993; CABI, 2007; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	*Lepidoptera*	Noctuidae	*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith	fall armyworm	flower, fruit, growing point, leaf, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Spodoptera litura* (Fabricius)	taro caterpillar	fruit, leaf	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; Waterhouse, 1993; Keinmeesuke *et al.*, 1999; Lewvanich, 2001; CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Spodoptera ornithogalli* (Guenée)	yellow striped armyworm		No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Tiracola plagiata* (Walker)	plague caterpillar		Yes	No	Waterhouse, 1993; CABI, 2007	No
Insect	Lepidoptera	Noctuidae	*Trichoplusia ni* (Hübner)	cabbage looper	leaf	Yes	Yes	Waterhouse, 1993; CABI, 2007; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	Lepidoptera	Pyralidae	*Corcyra cephalonica* (Stainton)	rice meal moth	**seed**	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; CABI, 2007; 2014	No
Insect	Lepidoptera	Pyralidae	*Ephestia kuehniella* Zeller	Mediterranean flour moth	flower, fruit, root, **seed**	No	Yes	CABI, 2014	Yes
Insect	Lepidoptera	Sphingidae	*Manduca quinquemaculata* (Haworth)	tomato hornworm	growing point, leaf	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Lepidoptera	Sphingidae	*Manduca sexta* (Linnaeus)	tobacco hornworm	leaf	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Insect	Lepidoptera	Tineidae	*Opogona sacchari* Bojer	banana moth	flower, leaf, stem, vegetative organ	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Lepidoptera	Tortricidae	*Platynota stultana*	omnivorous leaf roller	flower, fruit, leaf	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Lepidoptera	Tortricidae	*Thaumatotibia leucotreta* Meyrick	false codling moth	fruit, leaf, seed	No	Yes	CABI, 2014	No
Insect	Orthoptera	Acrididae	*Dociostaurus maroccanus* (Thunberg)	Moroccan locust	growing point, leaf, stem	No	Yes	CABI, 2014	No
Insect	Orthoptera	Gryllotalpidae	*Gryllotalpa gryllotalpa* (Linnaeus)	European mole cricket	root, stem, vegetative organ	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Orthoptera	Gryllotalpidae	*Scapteriscus* Scudder	mole crickets	root, seedling	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Thysanoptera	Thripidae	*Frankliniella bispinosa* (Morgan)		flower, fruit, leaf	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Thysanoptera	Thripidae	*Frankliniella fusca* (Hinds)		flower, fruit, growing point, leaf, stem, vegetative organ	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Insect	Thysanoptera	Thripidae	*Frankliniella intonsa* (Trybom)	thrips, flower	flower, fruit	Yes	Yes	Nakahara, 1997; USDA, 2005; CABI, 2007; Wang *et al.*, 2010	No
Insect	Thysanoptera	Thripidae	*Frankliniella occidentalis* (Pergande)	western flower thrips	flower, leaf	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Insect	Thysanoptera	Thripidae	*Frankliniella schultzei* (Trybom)	cotton bud thrips	flower, fruit, growing point, leaf	Yes	No	Keinmeesuke *et al.*, 1999; Poonchaisri, 2001; CABI, 2007; Wang *et al.*, 2010	No
Insect	Thysanoptera	Thripidae	*Scirtothrips dorsalis* Hood	chilli thrips	growing point, flower, leaf	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; Waterhouse, 1993; Keinmeesuke *et al.*, 1999; Poonchaisri, 2001; CABI, 2007; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	Thysanoptera	Thripidae	*Thrips hawaiiensis* (Morgan)	Hawaiian flower thrips	flower, fruit, leaf	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; Nakahara, 1994; Poonchaisri, 2001; CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Insect	Thysanoptera	Thripidae	*Thrips palmi* Karny	melon thrips	fruit, growing point, leaf	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; Waterhouse, 1993; Keinmeesuke *et al.*, 1999; Poonchaisri, 2001; CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No
Insect	Thysanoptera	Thripidae	*Thrips parvispinus* Karny	tobacco thrips	flower	Yes	No	Wongsiri, 1991; Waterhouse, 1993; Keinmeesuke *et al.*, 1999; Poonchaisri, 2001; CABI, 2007	No
MITES									
Mite	Prostigmata	Eriophyidae	*Aculops lycopersici* (Tryon)	tomato russet mite	fruit, leaf	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Mite	Prostigmata	Eriophyidae	*Calacarus carinatus* Green	purple mite		No	Yes	CABI, 2007	No
Mite	Prostigmata	Penthaleidae	*Halotydeus destructor* (Tucker)	redlegged earth mite	flower, leaf	No	Yes	CABI, 2014	No
Mite	Prostigmata	Tarsonemidae	*Phytonemus pallidus* (Banks)	strawberry mite	flower, leaf	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Mite	Prostigmata	Tarsonemidae	*Polyphagotarsonemus latus* Banks	broad mite	flower, fruit, growing point, leaf, stem	Yes	Yes	Wongsiri, 1991; Waterhouse, 1993; Keinmeesuke *et al.*, 1999; CABI, 2007; Ek-amnuay, 2010	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Mite	Prostigmata	Tetranychidae	*Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval)	carmine spider mite	leaf	Yes	Yes	Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014	No
Mite	Prostigmata	Tetranychidae	*Tetranychus marianae* McGregor			No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Mite	Prostigmata	Tetranychidae	*Tetranychus turkestani* Ugarov & Nikol'skii	strawberry, spider mite		No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Mite	Prostigmata	Tetranychidae	*Tetranychus urticae* Koch	two-spotted spider mite	leaf	Yes	Yes	Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No
SNAIL									
Snail		Helicidae	*Helix aspersa* Muller	common snail	flower, fruit, leaf, root, stem	No	Yes	CABI, 2007	No
PROTOZOA									
Protozoa	Plasmodiophorales	Plasmodiophoraceae	*Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* J.A. Toml.	powdery scab	leaf, root, stem, vegetative organ	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
NEMATODES									
Nematode	Aphelenchida	Aphelenchoididae	*Aphelenchoides besseyi* Christie	rice leaf nematode	flower, leaf, **seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2014	Yes
Nematode		Belonolaimidae	*Belonolaimus longicaudatus* Rau	sting nematode	root	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Nematode		Anguinidae	*Ditylenchus destructor* Thorne	potato tuber nematode	seedling, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Nematode		Hoplolaimidae	*Helicotylenchus dihystera* (Cobb) Sher	spiral nematode	root, vegetative organ	Yes	Yes	Sonthirat *et al.*, 1994; Sontirat, 1995; CABI, 2007; 2014	No
Nematode		Criconematidae	*Hemicycliophora arenaria* Raski	sheath nematode	root, seedling	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Nematode		Hoplolaimidae	*Hoplolaimus seinhorsti* Luc	lance nematode	root	Yes	No	CABI, 2007; 2014	No
Nematode		Longidoridae	*Longidorus* Micoletzky (Filipjev)	peanut root-knot nematode	root	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Nematode		Meloidogynidae	*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood	peanut root-knot nematode	root	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Nematode		Meloidogynidae	*Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley	columbia root-knot nematode	root, seedling	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Nematode		Meloidogynidae	*Meloidogyne exigua* Goeldi	coffee root-knot nematode	root, seedling, stem	No	Yes	CABI, 2014	No
Nematode		Meloidogynidae	*Meloidogyne graminicola* Golden & Birchfield	rice root knot nematode	root, seedling	Yes	Yes	CABI, 2014	No
Nematode		Meloidogynidae	*Meloidogyne hapla* Chitwood	root knot nematode	leaf, root	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Nematode		Meloidogynidae	*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood	root-knot nematode	leaf, root	Yes	Yes	Sonthirat *et al.*, 1994; Sontirat, 1995; CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No
Nematode		Meloidogynidae	*Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood	root-knot nematode	root	Yes	Yes	Sonthirat *et al.*, 1994; Sontirat, 1995; CABI, 2007; 2014	No
Nematode		Meloidogynidae	*Meloidogyne mayaguensis* Rammah & Hirschmann		root	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Nematode		Pratylenchidae	*Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne & Allen	false root-knot nematode	root, seedling	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Nematode		Pratylenchidae	*Pratylenchus penetrans* (Cobb) Filipjev & Schuurmans Stekhoven	nematode, northern root lesion	root, seedling, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Nematode		Pratylenchidae	*Pratylenchus zeae* Graham	root lesion nematode	leaf, root, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Nematode		Hoplolaimidae	*Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira	reniform nematode	root	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Nematode	Dorylaimida	Xiphinematidae	*Xiphinema index* Thorne & Allen	fan-leaf virus nematode	root, seedling	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Nematode		Pratylenchidae	*Zygotylenchus guevarai* (Tobar Jiménez) Braun & Loof		root, seedling	No	Yes	CABI, 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
PHYTOPLASMAS									
Phytoplasma	Acholeplasmatales	Acholeplasmataceae	*Aster yellows phytoplasma group*	yellow disease phytoplasmas	flower, fruit, growing point, leaf, root, stem	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Phytoplasma	Acholeplasmatales	Acholeplasmataceae	*Grapevine yellows phytoplasmas* Seemüller *et al.*	flavescencia dorada	flower, fruit, growing point, leaf, root, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Phytoplasma	Acholeplasmatales	Acholeplasmataceae	*Phytoplasma aurantifolia*	lime witches' broom phytoplasma	growing point, leaf, stem	No	Yes	CABI, 2014	No
BACTERIA									
Bacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	*Pseudomonas celebensis* Gäumann syn. = *Xanthomonas arboricola* pv. *celebensis* (Gaumann) Vauterin *et al.*	blood disease bacterium	flower, fruit, leaf, root, stem, vegetative organ	No	Yes	CABI, 2014	No
Bacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis	bacterial canker of tomato	flower, fruit, leaf, root, **seed**, seedling, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	Yes

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Bacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (van Hall) Dye	potato blackleg disease	leaf, root, stem, vegetative organ	No	Yes	CABI, 2014	No
Bacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey syn. = *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* (Jones) Hauben *et al.* emend. Gardan *et al.*	bacterial root rot of sweet potato	growing point, leaf, root, stem, vegetative organ	Yes	Yes	Benjathikul *et al.*, 1987; Sonthirat *et al.*, 1994; CABI, 2007; 2014	No
Bacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	*Erwinia chrysanthemi* (Burkh.) Young *et al.*	bacterial wilt of dahlia	flower, fruit, growing point, leaf, root, seedling, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Bacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	*Erwinia chrysanthemi* pv. *chrysanthemi* (Burkholder *et al.*) Dye	bacterial wilt of Dahlia spp.	leaf, root, seedling, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Bacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp	bacterial blight of endive	flower, leaf, root, seedling, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Bacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas corrugata* Roberts & Scarlett, emend. Sutra *et al.*	pith necrosis of tomato	fruit, leaf, root, **seed**, seedling, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014	Yes
Bacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (Brown) Stevens	lettuce marginal leaf blight	flower, fruit, leaf, root, seedling, stem, vegetative organ	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Bacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas syringae* van Hall		leaf	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Bacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (Brown & Jamieson) Young *et al.*	leaf spot: sugarbeet	leaf	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Bacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall	bacterial canker or blast stone and pom	flower, fruit, leaf, root, **seed**, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	Yes
Bacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wolf & Foster) Young	wildfire	leaf, **seed**	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014	Yes

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Bacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson	bacterial leaf blight of tomato	flower, fruit, leaf, **seed**, seedling, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014	Yes
Bacteria	Burkholderiales	Ralstoniaceae	*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi	bacterial wilt of potato	flower, fruit, growing point, leaf, root, stem, vegetative organ	Yes	Yes	Richardson, 1990; Sonthirat *et al.*, 1994; CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No
Bacteria	Burkholderiales	Ralstoniaceae	*Ralstonia solanacearum* race 1 (Smith) Yabuuchi	bacterial wilt of solanaceous crops	**seed**	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Bacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	*Rhizobium radiobacter* (Beijerinck & van Delden) Young syn. = *Agrobacterium tumefaciens*	crown gall	fruit, root, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Bacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	*Rhizobium rhizogenes* (Riker) Young	gall	root, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Bacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	*Rhodococcus fascians* (Tilford) Goodfellow	fasciation: leafy gall	leaf, root, **seed**, seedling, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	Yes

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Bacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	*Xanthomonas axonopodis* pv.*vesicatoria* (Doidge) Vauterin syn. = *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Dowson	bacterial spot	flower, fruit, leaf, **seed**, stem	Yes	Yes	Richardson, 1990; Sonthirat *et al.*, 1994; CABI, 2007; 2014	No
Bacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	*Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson	black rot of crucifers	leaf	Yes	Yes	CABI, 2007; Ek-amnuay, 2010	No
Bacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	*Xanthomonas campestris* pv. *raphani* (White) Dye	leaf spot	leaf	No	Yes	CABI, 2014	No
FUNGI									
Fungi	Anamorphic fungi		*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler	alternaria leaf spot	fruit, leaf, **seed**	Yes	Yes	Richardson, 1990; Hyun *et al.*, 2004; CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No
Fungi	Anamorphic fungi		*Alternaria solani* Sorauer	leaf blight, fruit rot	fruit, leaf, **seed**	Yes	Yes	Richardson, 1990; Sonthirat *et al.*, 1994; CABI, 2007; Ek-amnuay, 2010	No
Fungi	Anamorphic fungi		*Aspergillus flavus* Link	Aspergillus ear rot	flower, fruit, seed	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Fungi	Anamorphic fungi		*Aspergillus niger* Tiegh.	collar rot	flower, fruit, leaf, root, seed, stem, vegetative organ	Yes	Yes	Johnson *et al.*, 1989; Hyun *et al.*, 2004; CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Polyporales	Corticiaceae	*Athelia rolfsii* (Curzi) C. C. Tu & Kimbr.	sclerotium rot	flower, fruit, leaf, root, seed, stem, vegetative organ	Yes	Yes	CABI, 2014	No
Fungi	Helotiales	Sclerotiniaceae	*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel	grey mould-rot	flower, fruit, leaf, **seed**, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	Yes
Fungi	Anamorphic fungi		*Cercospora apii* Fresen.	early blight: celery	leaf	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Anamorphic fungi		*Cercospora capsici* Heald & F.A. Wolf	frog-eye, leaf spot	leaf, stem, **seed**	Yes	No	Richardson, 1990; Sonthirat *et al.*, 1994; CABI, 2007; Ek-amnuay, 2010	No
Fungi	Anamorphic fungi		*Chalara elegans* Nag Raj & W.B. Kendr	black root rot	fruit, leaf, root, **seed**, vegetative organ	No	Yes	CABI, 2007; 2014	Yes

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Fungi	Mucorales	Choanephoraceae	*Choanephora cucurbitarum* (Berk. & Ravenel) Thaxt.	Choanephora fruit rot, wet rot	flower, fruits, growing point, leaf, seed, stem	Yes	Yes	Sonthirat *et al.*, 1994; Hyun *et al.*, 2004; CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No
Fungi	Pleosporales	Pleosporaceae	*Cochliobolus lunatus* R.R. Nelson & Haasis	head mould of grasses, rice and sorghum	flower, leaf, seed	Yes	Yes	Disthaporn *et al.*, 1998; Hyun *et al.*, 2004; CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Ascomycetes		*Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds	black spot of strawberry	flower, fruit, leaf, root, stem	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Ascomycetes		*Colletotrichum capsici* (Syd.) E.J. Butler & Bisby	leaf spot of peppers	flower, fruit, leaf, seed, stem	Yes	Yes	Sangchote & Juangbhanich, 1984; Richardson, 1990; Roberts & Snow, 1990; Sonthirat *et al.*, 1994; CABI, 2007; AVRDC, 2009; Ek-amnuay, 2010	No
Fungi	Ascomycetes		*Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes	anthracnose	fruit, leaf, root	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Ascomycetes		*Colletotrichum dematium* (Pers.) Grove	leaf spot	leaf	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Ascomycetes		*Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & W.D. Moore	soyabean anthracnose	flower, fruit, leaf, **seed**, stem	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Fungi	Polyporales	Corticiaceae	*Corticium rolfsii* Curzi Syn. = *Sclerotium rolfsii* Sacc. (teleomorph)	sclerotium rot	flower, fruit, leaf, root, seed, stem, vegetative organ	Yes	Yes	Reddy *et al.*, 1992; Sonthirat *et al.*, 1994; CABI, 2007; Ek-amnuay, 2010	No
Fungi	Diaporthales	Valsaceae	*Diaporthe phaseolorum* (Cooke & Ell.) Sacc.	lima bean pod blight	leaf, **seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014	Yes
Fungi	Diaporthales	Valsaceae	*Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (Lehman) Wehm.	pod blight: soyabean	fruit, growing point, leaf, root, **seed**, stem	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Pleosporales		*Didymella lycopersici* Kleb.	canker of tomato	fruit, leaf, **seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007	Yes
Fungi	Hypocreales		*Fusarium oxysporum* Schlechtendahl	basal rot	leaf, root, stem	Yes	Yes	Sonthirat *et al.*, 1994; CABI, 2007	No
Fungi	Hypocreales		*Fusarium oxysporum* f.sp.*capsici*	Fusarium wilt	leaf, root, stem	Yes	Yes	CABI, 2014; Ek-amnuay, 2010	No
Fungi	Hypocreales		*Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* (E.F. Sm.) Snyder & H.N. Hansen	Fusarium wilt of watermelon	fruit, leaf, root, **seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2014	Yes
Fungi	Hypocreales		*Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (G.F. Atk.) W.C. Snyder & H.N. Hansen	Fusarium wilt	leaf, root, stem	Yes	Yes	Sonthirat *et al.*, 1994; CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Fungi	Hypocreales		*Fusarium solani* (Martius) Sacc.	Fusarium stem rot	fruit, stem, **seed**	Yes	No	Richardson, 1990; Hyun *et al.*, 2004; CABI, 2007	No
Fungi	Hypocreales	Nectriaceae	*Gibberella intricans* Wollenw.	damping-off of safflower	root, stem	No	Yes	CABI, 2007	No
Fungi		Glomerellaceae	*Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenk Syn. = *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (anamorph)	anthracnose	flower, fruit, leaf, **seed**, stem	Yes	Yes	Sangchote, 1987; Richardson, 1990; Sonthirat *et al.*, 1994; CABI, 2007; 2014; AVRDC, 2009; Ek-amnuay, 2010	No
Fungi	Erysiphales	Erysiphaceae	*Golovinomyces orontii* (Castagne) V.P. Heluta	powdery mildew	flower, fruit, growing point, leaf, seedling, stem	No	Yes	CABI, 2007	No
Fungi	Anamorphic fungi		*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffiths & Maubl. Syn. = *Botryodiplodia theobromae* Pat.	diplodia pod rot of cocoa	flower, fruit, growing point, leaf, root, **seed**, stem	Yes	Yes	Sonthirat *et al.*, 1994; CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Fungi	Erysiphales	Erysiphaceae	*Leveillula taurica* (Lév.) G. Arnaud	powdery mildew of cotton	flower, fruit, growing point, leaf, stem	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Anamorphic fungi		*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid	Charcoal rot	flower, fruit, leaf, root, **seed,** stem	Yes	Yes	Richardson, 1990; Sonthirat *et al.*, 1994; Hyun *et al.*, 2004; CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No
Fungi	Helotiales	Sclerotiniaceae	*Monilinia fructigena* Honey	brown rot	flower, fruit, growing point, leaf, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Hypocreales	Nectriaceae	*Nectria haematococca* (Wollenw.) Gerlach syn. =*Fusarium solani* (Martius) Sacc.	dry rot of potato	leaf, root, stem, vegetative organ	Yes	Yes	Sonthirat *et al.*, 1994; CABI, 2007	No
Fungi	Spizellomycetales	Olpidiaceae	*Olpidium brassicae* (Woronin) P.A. Dang.	big vein: lettuce	root	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Anamorphic fungi		*Passalora fulva* (Cooke) U. Braun & Crous	tomato leaf mould	flower, fruit, leaf, **seed**	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Peronosporales	Peronosporaceae	*Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina* (D.B. Adam) Skalicky	blue mould of tobacco	growing point, leaf, root, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Fungi	Anamorphic fungi		*Phomopsis longicolla* Hobbs	pod and stem blight	flower, fruit, leaf, **seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014	Yes
Fungi	Pythiales	Pythiaceae	*Phytophthora capsici* Leonian	stem and fruit rot of Capsicum	fruit, leaf, root, stem	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Pythiales	Pythiaceae	*Phytophthora citrophthora* (R.H. Sm. & E. Sm.) Leonian	brown rot of citrus fruit	fruit, leaf, root, seed, stem	Yes	Yes	CABI, 2014	No
Fungi	Pythiales	Pythiaceae	*Phytophthora cryptogea* Pethybr. & Laff.	tomato foot rot	leaf, root, stem, vegetative organ	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Pythiales	Pythiaceae	*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary	Phytophthora blight	flower, fruit, leaf, **seed**, stem, vegetative organ	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No
Fungi	Pythiales	Pythiaceae	*Phytophthora nicotianae* Breda de Haan	black shank	fruit, growing point, leaf, root, **seed**, stem	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Pythiales	Pythiaceae	*Phytophthora vignae* Purss	Phytophthora stem rot of cowpea	leaf, root, **seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2014	Yes

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Fungi		Anamorphic fungi	*Pseudocercospora fuligena* (Roldan) Deighton	black leaf mould of tomato	flower, leaf, stem	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No
Fungi	Saprolegniales		*Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp.	damping-off	fruit, root, **seed**, stem, vegetative organ	Yes	Yes	Richardson, 1990; Sonthirat *et al.*, 1994; CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Saprolegniales		*Pythium debaryanum* Hesse	damping-off	root	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Saprolegniales		*Pythium irregulare* Buisman	dieback: carrot	root, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Saprolegniales		*Pythium ultimum* Trow	black-leg of seedlings	fruit, root, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Mucorales	Mucoraceae	*Rhizopus arrhizus* A. Fischer	barn rot of tobacco	fruit	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Helotiales	Sclerotiniaceae	*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary	cottony soft rot	flower, fruit, leaf, root, **seed**, stem	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Fungi	Pleosporales	Pleosporaceae	*Setosphaeria rostrata* Leonard	leaf spot of grasses	leaf	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007	No
Fungi	Russulales	Stereaceae	*Stereum sanguinolentum* Fr.	bleeding conk fungus		No	Yes	CABI, 2007	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Fungi	Ceratobasidiales	Ceratobasidiaceae	*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk Syn. = *Rhizoctonia solani* (anamorph)	many names, depending on host	flower, fruit, growing point, leaf, root, seed, stem	Yes	Yes	Richardson, 1990; Sonthirat *et al.*, 1994; CABI, 2007; 2014; Ek-amnuay, 2010	No
Fungi	Anamorphic fungi		*Verticillium dahliae* Kleb.	verticillium wilt	flower, fruit, leaf, root, seed, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014	Yes
VIRUS									
Virus		Bromoviridae	*Alfalfa mosaic virus*	alfalfa yellow spot	flower, fruit, leaf, root, **seed**, seedling, stem, vegetative organ	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014	Yes
Virus		Geminiviridae	*Beet curly top virus*	curly top	flower, fruit, growing point, leaf, root, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Virus		Comoviridae	*Broad bean wilt virus*	lamium mild mosaic	fruit, leaf, **seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014	Yes
Virus		Comoviridae	*Cherry leaf roll virus*	walnut ringspot	leaf, **seed**	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014	Yes

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Virus		Potyviridae	*Chilli veinal mottle virus*	CVbMV, veinal mottle	flower, fruit, leaf, stem	Yes	No	Brunt *et al.*, 1996; Kittipakorn and Srithongchi, 2002; Damayanti and Katerina, 2008; CABI, 2007; 2014	No
Virus		Tobamovirus	*Cucumber green mottle mosaic virus*	white break mosaic	fruit, leaf, root, **seed**	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2014	Yes
Virus		Bromoviridae	*Cucumber mosaic virus*	cucumber mosaic	fruit, leaf, pollen, seed	Yes	Yes	Chandrasrikul & Patrakosol, 1986; Richardson, 1990; Sonthirat *et al.*, 1994; Kittipakorn and Srithongchi, 2002; CABI, 2007; Damayanti and Katerina, 2008; Ek-amnuay, 2010	No
Virus		Bunyaviridae	*Impatiens necrotic spot virus*	TSWV-I	leaf	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Virus		Tospoviridae	*Iris yellow spot virus*	iris yellow spot	leaf	No	Yes	CABI, 2014; http://aces.nmsu.edu/pubs/_h/H-255.pdf	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Virus		Geminiviridae	*Pepper golden mosaic virus*		leaf	No	Yes	CABI, 2007; 2014; Trejo-Saavedra *et al.*, 2013	No
Virus		Potyviridae	*Pepper mild mottle virus*	PMMV	fruit, leaf, **seed**, stem	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014; Koohapitagtam, 2011	No
Virus		Potyviridae	*Pepper mottle virus*		leaf, seedling, stem	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014; PVO, 2014	No
Virus		Geminiviridae (Begomovirus)	*Pepper yellow leaf curl virus*	yellow leaf curl	flower, fruit, leaf, stem	Yes	No	Sonthirat *et al.*, 1994; Kittipakorn and Srithongchi, 2002; Trisno *et al.*, 2009; Ek-amnuay, 2010	No
Virus		Luteoviridae	*Potato leaf roll virus*		flower, fruit, leaf, seedling, stem, vegetative organ	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Virus		Flexiviridae	*Potato virus X*	potato interveinal mosaic	leaf	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Virus		Potyviridae	*Potato virus Y*	potato mottle	flower, fruit, leaf, root, seedling, stem, vegetative organ	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014; Koohapitagtam, 2011	No
Virus		Potyviridae	*Sweet potato feathery mottle virus*	internal cork disease of sweet potato	flower, fruit, leaf, root, seedling, stem	No	Yes	CABI, 2014	No
Virus		Potyviridae	*Tobacco etch virus*	tobacco streak	flower, fruit, leaf, root, seedling, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Virus		Geminiviridae (Begomovirus)	*Tobacco leaf curl virus*	TLCV	flower, fruit, leaf, root, stem	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Virus		Tobamovirus	*Tobacco mosaic virus*	tobacco mosaic	flower, fruit, leaf, seed, stem	Yes	Yes	Kittipakorn and Srithongchai, 2002; CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Virus		Unassigned virus family	*Tobacco rattle virus*	spraing of potato	growing point, leaf, stem, vegetative organ	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Virus		Comoviridae	*Tobacco ringspot virus*	annulus tabaci	fruit, growing point, leaf, root, **seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014	Yes
Virus		Bromoviridae	*Tobacco streak virus*	stunt of asparagus	flower, fruit, leaf, root, **seed**, seedling, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014	Yes
Virus		Potyviridae	*Tobacco vein mottling virus*		leaf	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Virus		Bromoviridae	*Tomato aspermy virus*		**seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014	Yes
Virus		Comoviridae	*Tomato black ring virus*	ring spot of beet	fruit, leaf, **seed**	No	Yes	Richardson, 199; 0CABI, 2014	Yes
Virus		Tombusviridae	*Tomato bushy stunt virus*	Lycopersicon virus 4	fruit, leaf, **seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014	Yes
Virus		Closteroviridae	*Tomato chlorosis virus*	yellow leaf disorder of tomato	seedling	No	Yes	CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Virus		Unassigned virus family	*Tomato mosaic virus*	tomato mosaic, pepper mosaic	leaf, **seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014	Yes
Virus		Comoviridae	*Tomato ringspot virus*	annulus tabaci	fruit, leaf, **seed**	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014	Yes
Virus		Bunyaviridae (Tospovirus)	*Tomato spotted wilt virus*	tomato spotted wilt	fruit, leaf	Yes	Yes	Kittipakorn and Srithongchi, 2002; CABI, 2007; 2014	No
Virus		(Torradovirus)	*Tomato torrado virus*	ToTV, tomato torrado disease	fruit, leaf, **seed**	No	Yes	http://aciar.gov.au/files/mn-157/pdf/TECCIPM-14-%2820Nov13%29-viral-diseases.pdf; http://www.mpmi2014rhodes-hellas.gr/bookOfAbstracts/Posters/P168.pdf	Yes
WEEDS									
Plant	Asterales	Asteraceae	*Ambrosia artemisiifolia* L.	common ragweed	**seed**	No	Yes	CABI, 2007; 2014	Yes
Plant	Asterales	Asteraceae	*Cirsium arvense* (L.) Scop.	creeping thistle		No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Plant	Asterales	Asteraceae	*Galinsoga parviflora* Cav.	gallant soldier	**seed**	Yes	Yes	Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014	No
Plant	Asterales	Asteraceae	*Parthenium hysterophorus* L.	Parthenium weed	**seed**, stem	No	Yes	CABI, 2014	Yes
Plant	Asterales	Asteraceae	*Tridax procumbens* L.	coat buttons		Yes	Yes	Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Plant	Caryophyllales	Amaranthaceae	*Amaranthus blitoides* S. Wats.	spreading amaranth		No	Yes	CABI, 2014	No
Plant	Caryophyllales	Amaranthaceae	*Amaranthus hybridus* L.	smooth pigweed	pollen, **seed**	Yes	Yes	Holm *et al.*, 1991; CABI, 2007; 2014	No
Plant	Caryophyllales	Amaranthaceae	*Amaranthus retroflexus* L.	redroot pigweed		No	Yes	CABI, 2007	No
Plant	Caryophyllales	Amaranthaceae	*Amaranthus viridis* L.	slender amaranth		Yes	Yes	CABI, 2014	No
Plant	Commelinales	Commelinaceae	*Commelina benghalensis* L.	wandering jew		Yes	Yes	Holm *et al.*, 1977; Waterhouse, 1993; Chuntharusmi *et al.*, 2002; CABI, 2007; 2014	No
Plant	Commelinales	Commelinaceae	*Murdannia nudiflora* (L.) Brenan	doveweed		Yes	Yes	Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014	No
Plant	Cyperales	Cyperaceae	*Cyperus rotundus* Linnaeus	purple nutsedge		Yes	Yes	Holm *et al.*, 1979; Waterhouse, 1993; Chuntharusmi *et al.*, 2002; CABI, 2007; 2014	No
Plant	Cyperales	Poaceae	*Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd.	crowfoot grass	**seed**	Yes	Yes	Noda *et al.*, 1985; Waterhouse, 1993; Chuntharusmi *et al.*, 2002; CABI, 2007	No
Plant	Cyperales	Poaceae	*Digitaria ciliaris* (Retz.) Koel. (Hoz)	southern crabgrass	**seed**	Yes	Yes	Holm *et al.*, 1979; Waterhouse, 1993; Chuntharusmi *et al.*, 2002; CABI, 2007; 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Plant	Cyperales	Poaceae	*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.	barnyard grass		Yes	Yes	Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014	No
Plant	Cyperales	Poaceae	*Panicum repens* L.	torpedo grass	**seed**	Yes	Yes	Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014	No
Plant	Euphorbiales	Euphorbiaceae	*Phyllanthus urinaria* L.	leafflower	**seed**	Yes	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Plant	Fabales	Fabaceae	*Senna obtusifolia* (L.) Irwin & Barneby	sicklepod	**seed**	Yes	Yes	Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014	No
Plant	Gentianales	Rubiaceae	*Richardia brasiliensis* Gomes	white-eye (Australia)		Yes	Yes	Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014	No
Plant	Malvales	Malvaceae	*Hibiscus trionum*	Venice mallow		No	Yes	CABI, 2007	No
Plant	Polygonales	Polygonaceae	*Polygonum aviculare* L.	prostrate knotweed		No	Yes	CABI, 2007; 2014	No
Plant	Primulales	Primulaceae	*Anagallis arvensis* L.	scarlet pimpernel		No	Yes	CABI, 2007	No
Plant	Scrophulariales	Orobanchaceae	*Orobanche*	broomrape	leaf, root	No	Yes	CABI, 2007	No
Plant	Scrophulariales	Orobanchaceae	*Orobanche aegyptiaca* Pers.	Egyptian broomrape	flower, fruit, leaf, root, **seed**	No	Yes	CABI, 2014	Yes
Plant	Scrophulariales	Orobanchaceae	*Orobanche cernua* Loefl.	nodding broomrape	flower, fruit, leaf, root	No	Yes	CABI, 2014	No
Plant	Scrophulariales	Orobanchaceae	*Orobanche ramosa* L.	branched broomrape	flower, fruit, leaf, root, **seed**	No	Yes	CABI, 2007; 2014	Yes
Plant	Solanales	Cuscutaceae	*Cuscuta campestris* Yuncker	field dodder	fruit, leaf	No	Yes	CABI, 2014	No

Class	Order/Suborder	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References	Consider further
						TH	US		
Plant	Solanales	Solanaceae	*Solanum nigrum* L.	black nightshade		Yes	Yes	Waterhouse, 1993; CABI, 2007; 2014	No
VERTEBRATE									
Vertebrate	Rodentia	Muridae	*Rattus argentiventer* Robinson & Kloss	rice field rat	fruit, growing point, flower, **seed**, stem	Yes	No	Shuyler & Ratanaworabhan, 1970; CABI, 2007	No

TH = Thailand US = United States of America Yes = present in the country No = not found in the country

Table 2 Pests associated with capsicum seeds (*Capsicum* spp.) in United States of America but not found in Thailand.

Class	Order	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References
						TH	US	
BACTERIA								
Bacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis	bacterial canker of tomato	flower, fruit, leaf, root, **seed**, seedling, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014
Bacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas corrugata* Roberts & Scarlett, emend. Sutra *et al.*	pith necrosis of tomato	fruit, leaf, root, **seed**, seedling, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014
Bacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall	bacterial canker or blast stone and pom	flower, fruit, leaf, root, **seed**, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014
Bacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wolf &	wildfire	leaf, **seed**	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014

Class	Order	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References
						TH	US	
			Foster) Young					
Bacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson	bacterial leaf blight of tomato	flower, fruit, leaf, **seed**, seedling, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014
Bacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	*Rhodococcus fascians* (Tilford) Goodfellow	fasciation: leafy gall	leaf, root, **seed**, seedling, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014
FUNGI								
Fungi	Helotiales	Sclerotiniaceae	*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel	grey mould-rot	flower, fruit, leaf, **seed**, stem	No	Yes	CABI, 2007; 2014
Fungi	Diaporthales	Valsaceae	*Diaporthe phaseolorum* (Cooke & Ell.) Sacc.	lima bean pod blight	leaf, **seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014
Fungi	Pleosporales		*Didymella lycopersici* Kleb.	canker of tomato	fruit, leaf, **seed**, stem	No	Yes	CABI, 2007; Richardson, 1990

Class	Order	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References
						TH	US	
Fungi	Hypocreales		*Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* (E.F. Sm.) Snyder & H.N. Hansen	Fusarium wilt of watermelon	fruit, leaf, root, **seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2014
Fungi	Peronosporales	Peronosporaceae	*Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina* (D.B. Adam) Skalicky	blue mould of tobacco	growing point, leaf, root, **seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014
Fungi	Anamorphic fungi		*Phomopsis longicolla* Hobbs	pod and stem blight	flower, fruit, leaf, **seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014
Fungi	Pythiales	Pythiaceae	*Phytophthora vignae* Purss	Phytophthora stem rot of cowpea	leaf, root, **seed**, stem	No	Yes	CABI, 2014
Fungi	Pleosporales	Pleosporaceae	*Setosphaeria rostrata* Leonard	leaf spot of grasses	leaf, **seed**	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007
Fungi	Anamorphic fungi		*Verticillium dahliae* Kleb.	verticillium wilt	flower, fruit, leaf, root, **seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014

Class	Order	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References
						TH	US	
VIRUS								
Virus		Bromoviridae	*Alfalfa mosaic virus*	alfalfa yellow spot	flower, fruit, leaf, root, **seed**, seedling, stem, vegetative organ	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014
Virus		Comoviridae	*Broad bean wilt virus*	lamium mild mosaic	fruit, leaf, **seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014
Virus		Comoviridae	*Cherry leaf roll virus*	walnut ringspot	leaf, **seed**	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014
Virus		Tobamovirus	*Cucumber green mottle mosaic virus*	white break mosaic	fruit, leaf, root, **seed**	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2014
Virus		Comoviridae	*Tobacco ringspot virus*	annulus tabaci	fruit, growing point, leaf, root, **seed**,	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014

Class	Order	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References
						TH	US	
Virus		Bromoviridae	*Tobacco streak virus*	stunt of asparagus	stem flower, fruit, leaf, root, **seed**, seedling, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014
Virus		Bromoviridae	*Tomato aspermy virus*		**seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014
Virus		Comoviridae	*Tomato black ring virus*	ring spot of beet	fruit, leaf, **seed**	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2014
Virus		Tombusviridae	*Tomato bushy stunt virus*	Lycopersicon virus 4	fruit, leaf, **seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014
Virus		Unassigned virus family	*Tomato mosaic virus*	tomato mosaic, pepper mosaic	leaf, **seed**, stem	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014
Virus		Comoviridae	*Tomato ringspot virus*	annulus tabaci	fruit, leaf, **seed**	No	Yes	Richardson, 1990; CABI, 2007; 2014
Virus		(Torradovirus)	*Tomato torrado virus*	ToTV, tomato torrado disease	fruit, leaf, **seed**	No	Yes	http://aciar.gov.au/files/mn-157/pdf/TECCIPM-14-%2820Nov13%29-viral-

Class	Order	Family	Scientific name	Common name	Plant parts affected	Geographic distribution		References
						TH	US	
								diseases.pdf; http://www.mpmi2014rhodes-hellas.gr/bookOfAbstracts/Posters/P168.pdf

TH = Thailand, US = United States of America

Yes = present in the country, No = not found in the country

Table 3 Diagnosis results by Blotter method of parent capsicum seeds from the United States of America

No.	Sample No.	Diagnosis results
1	971/1-212991 (F)*	-
2	971/2-212991 (M)**	*Aspergillus flavus*, *A. niger*
3	982/1-2235 (F)	*Aspergillus flavus*, *Rhizopus* sp.
4	982/2-2236 (M)	*Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp.
5	982/3-2237 (F)	*Rhizopus* sp.
6	982/5-2239 (F)	*Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp.
7	982/6-2240 (M)	*Fusarium oxysporum*, *Rhizopus* sp.
8	982/7-2243A (F)	-
9	982/8-2244 (M)	-
10	982/10-2251 (F)	*Alternaria solani*, *Aspergillus flavus*,
11	982/11-2252 (M)	*Alternaria solani*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*
12	982/13-2254 (M)	*Fusarium oxysporum*, *Rhizopus* sp.
13	983/1-212927 (F)	*Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Rhizopus* sp.
14	983/2-212927 (M)	*Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*
15	983/3-212924 (F)	*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp.
16	983/4-212924 (M)	*Alternaria alternata*, *Alternaria solani*

*(F) = Female (parent lines)

**(M) = Male (parent lines)

Table 4 Risk management measures for reduce likely follow pathway of quarantine pests associated with capsicum seeds imported from the United States of America.

Quarantine pest	Common name	Risk management measures
Bacteria		
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Smith) Davis	bacterial canker	1) must be originated from pest free area or were inspected during growing or laboratory tested that found free from quarantine pests and 2) must be soaked in hot water at temperature 51 degree Celsius for 30 minutes
Pseudomonas syringae pv. *syringae* van Hall	bacterial canker	
Pseudomonas syringae pv. *tabaci* (Wolf & Foster) Young	wildfire	
Pseudomonas viridiflava (Burkholder) Dowson	bacterial leaf blight of tomato	
Fungi		
Peronospora hyoscyami f.sp. *tabacina* (D.B. Adam) Skalicky	blue mould of tobacco	1) must be originated from pest free area or were inspected during growing or laboratory tested that found free from quarantine pests and 2) must be soaked in hot water at temperature 51 degree Celsius for 30 minutes and 3) must be dipped for 1 min in a suspension of 10 g of Benomyl/L of water
Verticillium dahlia Kleb.	verticillium wilt	
Virus		
Alfalfa mosaic virus	AMV, alfalfa yellow spot TRSV	1) must be originated from pest free area or 2) were inspected during growing or laboratory tested that found free from quarantine pests
Tobacco ringspot virus	TSV, tobacco streak	
Tobacco streak virus	TBRV, tomato black ring nepovirus	
Tomato black ring virus		
Tomato aspermy virus		
Tomato bushy stunt virus	TBSV, Lycopersicon virus 4	
Tomato mosaic virus	tomato mosaic	
Tomato torrado virus	ToTV, tomato torrado diseas	

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากอิตาลี

Study on Pest Risk Analysis for Importก Tomato Seeds from Italy

สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ[1/] ณัฏฐพร อุทัยมงคล[1/] วาสนา ฤทธิ์ไธสง[1/]
อลงกต โพธิ์ดี[1/] กาญจนา วาระวิชะนี[2/]
[1/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ (Tomato seed, *Solanum lycopersicum)* เป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้ามข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 ปัจจุบันการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พันธุ์มะเขือเทศจากอิตาลีได้รับการผ่อนผันให้นำเข้าได้ตามบทเฉพาะกาล เป็นเมล็ดพันธุ์พ่อแม่โดยนำเข้ามาเพาะปลูกในประเทศไทย เพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมแล้วส่งออกไปขายยังต่างประเทศ จากสถิติการนำเข้าในปี 2555-2556 รวมทั้งสิ้น จำนวน 1.08 กิโลกรัม ผลการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากอิตาลี และตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ยังไม่พบศัตรูพืช ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากอิตาลี พบศัตรูพืช จำนวน 20 ชนิด แบ่งเป็นแบคทีเรีย 6 ชนิด เชื้อรา 2 ชนิด ไวรัส 10 ชนิด และ ไวรอยด์ 2 ชนิด มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน ในจำนวนนี้เป็นศัตรูพืชกักกันที่มีโอกาสการเข้ามา การตั้งรกรากแพร่กระจาย และมีศักยภาพในการก่อให้เกิดผลกระทบตามมาทางเศรษฐกิจในประเทศไทย พบศัตรูพืชที่มีความเสี่ยงสูง ได้แก่ *Pepino mosaic virus* ความเสี่ยงปานกลาง ได้แก่ ไวรัส *Tomato bushy stunt virus* จำเป็นต้องมีมาตรการเฉพาะสำหรับจัดการความเสี่ยงก่อนการส่งออก

Keywords: วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช การนำเข้า เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ
pest risk analysis, importation, tomato seed

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-02-02-05-57

คำนำ

จากการที่ประเทศไทยเข้าเป็นสมาชิกขององค์การการค้าโลก (World Trade organization, WTO) ทำให้ประเทศสมาชิกต้องปฏิบัติตามข้อตกลงว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement of Application of Sanitary and Phytosanitary Measures, SPS Agreement) ซึ่งเป็นมาตรการในการปกป้องชีวิตมนุษย์ สัตว์และพืช จากสิ่งปนเปื้อน สารพิษ หรือเชื้อโรคที่มีพืชหรือสัตว์เป็นตัวนำ ดังนั้นประเทศผู้นำเข้าจึงจำเป็นต้องมีการใช้เทคนิคและวิธีการที่เหมาะสม ซึ่งได้พัฒนาโดยองค์กรระหว่างประเทศ และเป็นที่ยอมรับตามสากลประเทศ โดยต้องมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของสินค้าเกษตรนำเข้า เพื่อป้องกันหรือจำกัดความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นเนื่องจากศัตรูพืชที่อาจติดมากับสินค้าเกษตรนำเข้า สามารถเจริญเติบโต และแพร่กระจายและก่อความเสียหายทางเศรษฐกิจ

มะเขือเทศ (Tomato, *Solanum lycopersicum*) เป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 การนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากอิตาลี เพื่อใช้เป็นพ่อแม่เพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมส่งกลับไปจำหน่ายในประเทศทั่วโลก แหล่งผลิตมะเขือเทศของประเทศอิตาลีใหญ่เป็นอัน 7 ของโลก และจากการศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากประเทศต่างๆ พบว่ามีศัตรูพืชที่ไม่มีรายงานในประเทศไทย และมีโอกาสติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากอิตาลี เช่น แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ไวรัส *Pepino mosaic virus, Parietaria mottle virus, Tomato bushy stunt virus* ไวรอยด์ *Potato spindle tuber viroid* เป็นต้น (CABI online, 2015) ซึ่งมาตรการควบคุมการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ มีเพียงใบรับรองสุขอนามัยพืชเท่านั้น ยังไม่ได้ระบุชนิดศัตรูพืชกักกันและมาตรการจัดการความเสี่ยง ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาของศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่เคยพบในประเทศติดมากับสินค้าที่นำเข้าเกิดการแพร่กระจายและเพิ่มปริมาณจนเกิดเป็นการระบาดของศัตรูพืชชนิดใหม่ขึ้น จะส่งผลให้เกิดผลเสียต่อเศรษฐกิจของประเทศอย่างใหญ่หลวง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการดำเนินการศึกษาวิจัยเพื่อทราบชนิดศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันและนำไปกำหนดมาตรการทางวิชาการด้านสุขอนามัยพืชที่เหมาะสมสอดคล้องกับสถานการณ์ปัจจุบันและอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ โดยอยู่บนพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ และปรับปรุงแก้ไขกฎระเบียบด้านกักกันพืช มาตรการทางสุขอนามัยพืชเพื่อป้องกันควบคุมการเข้ามาแพร่ระบาดของศัตรูพืชให้มีประสิทธิภาพต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. วัสดุคอมพิวเตอร์ เช่น หมึกพิมพ์ และแผ่นบันทึกข้อมูล เป็นต้น

2. วัสดุและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ได้แก่ อาหารสำหรับแยกเชื้อ สารเคมี และอุปกรณ์ในการทำสไลด์ กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope

3. อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างศัตรูพืช เช่นถุงพลาสติก กล่องพลาสติก กล่องรักษาความเย็น เป็นต้น

4. หนังสือ ตำรา วารสาร และเอกสารที่เกี่ยวข้องเพิ่มเติม

วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของพืชนำเข้า เช่น ชื่อ ชนิด สายพันธุ์ แหล่งกำเนิด ปริมาณการนำเข้า ผลผลิต เป็นต้น

2. รวบรวมข้อมูลทั่วไป และการจัดกลุ่มศัตรูพืชของพืชนำเข้า เช่น ชื่อ ชนิด สายพันธุ์ พืชอาศัย ลักษณะการทำลาย การแพร่ระบาด ความเสียหายในประเทศไทย ประเทศผู้ส่งออก และ/หรือ ประเทศอื่นๆ จัดทำลงในตาราง

3. สุ่มตัวอย่างพืชที่นำเข้าและตรวจสอบศัตรูพืช (เฉพาะพืชที่มีการนำเข้าในปัจจุบัน)

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากอิตาลีและตรวจสอบศัตรูพืช(เฉพาะพืชที่มีการนำเข้าในปัจจุบัน) โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศตามมาตรฐานของ International Seed Testing Association (ISTA) หรือตามความเหมาะสมของปริมาณเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า ณ จุดนำเข้าที่ด่านตรวจพืช หรือกลุ่มวิจัยการกักกันพืช เพื่อตรวจสอบศัตรูพืชที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส ไวรอยด์ ไส้เดือนฝอย วัชพืช โดยการทำ Blotter method, Dilution plate method, Seedling symptom test, Pathogenicity test และจำแนกชนิดตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและสูง การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่นวิธีการ ELISA, PCR

4. ทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชตามมาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช (ISPM) ฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงสำหรับศัตรูพืชกักกัน (Pest risk analysis for quarantine pests) (FAO, 2014) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ขั้นตอนที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (การจัดประเภทศัตรูพืช การประเมินโอกาสการการเข้ามา การตั้งรกรากอย่างถาวร และการแพร่กระจาย รวมถึงผลกระทบทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้นภายหลังการเข้ามาของศัตรูพืชในประเทศไทย)

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช

5. กำหนดมาตรการทางวิชาการสำหรับจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันสำหรับนำไปใช้ในการกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าตาม พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551

6. สรุปผลและเขียนรายงาน

เวลาและสถานที่

เวลา: ตุลาคม 2556 - กันยายน 2557

สถานที่: กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของพืชมะเขือเทศนำเข้าจากอิตาลี

มะเขือเทศ (Tomato) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Solanum lycopersicum* L. (*Lycopersicon esculentum* Mill) จัดอยู่ในวงศ์โซลานาซีอี้ (Solanaceae) เช่นเดียวกับพริก มะเขือ มันฝรั่ง ยาสูบ และพิทูเนีย มีแหล่งกำเนิดอยู่ในแถบตอนกลางของทวีปอเมริกาและแถบภูเขาแอนดีสในอเมริกาใต้แถบประเทศเปรู ชิลี และเอกวาดอร์ เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากอิตาลี เป็นเมล็ดพันธุ์พ่อแม่โดยนำเข้ามาเพาะปลูกในประเทศไทย เพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมแล้วส่งออกไปขายยังต่างประเทศ จากสถิติการนำเข้าในปี 2555-2556 รวมทั้งสิ้น จำนวน 1.08 กิโลกรัม (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2557) การผลิตมะเขือเทศในประเทศอิตาลี แหล่งผลิตที่สำคัญได้แก่ Emilia-Romagna, Apulia, Lombardy, Campania, Calbria และ Sicily มีสภาพดินฟ้าอากาศเหมาะสมจึงปลูกมะเขือเทศได้จำนวนมาก และมีรสชาติดี โดยประเทศที่มีการผลิตมะเขือเทศสูงสุด คือ สาธารณรัฐประชาชนจีน รองลงมาคือ อินเดีย สหรัฐอเมริกา ตุรกี อียิปต์ อิหร่าน อิตาลี สเปน บราซิล และเม็กซิโก (FAOSTAT, 2014) ซึ่งอิตาลีอยู่ในอันดับ 7 ของโลก จากสถิติการผลิตมะเขือเทศของอิตาลีในปี 2511/2512 จำนวน 6 ล้านเมตริตันต่อปี (USDA-FAS, 2011) โดยอิตาลีเป็นแหล่งใหญ่ผลิตมะเขือเทศส่งออกไปยังประเทศในแถบยุโรปและทั่วโลก

มะเขือเทศเป็นพืชผักเศรษฐกิจที่สำคัญอันดับต้นๆ ของประเทศไทย ทั้งในแง่ผักอุตสาหกรรม และบริโภคสด โดยปลูกกันแพร่หลายทางภาคเหนือ และตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมะเขือเทศอุตสาหกรรม มีพื้นที่เหมาะสมเชิงธุรกิจในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย หนองคาย สกลนคร นครพนม กาฬสินธุ์ มะเขือเทศรับประทานสด มีพื้นที่ปลูกเชิงธุรกิจที่สำคัญจังหวัด นครปฐมราชบุรี กาญจนบุรี เชียงใหม่ เชียงราย นครราชสีมา มะเขือเทศอุตสาหกรรมพื้นที่ปลูกที่สำคัญจังหวัดบุรีรัมย์ อุดรธานี สุรินทร์ ตาก มะเขือเทศรับประทานสดพื้นที่ปลูกที่สำคัญ จังหวัดลำปาง ลพบุรี

การปลูกมะเขือเทศ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนเหนียวและดินร่วนปนทราย หน้าดินลึก 30–120 ซม. อินทรียวัตถุ 2-4% pH 6.5-6.8 ต้องการน้ำในการเจริญเติบโต 500-1,500 ลูกบาศก์เมตร/รอบการผลิต/ไร่ความสูงจากระดับน้ำทะเลไม่เกิน 800 เมตร ความลาดชันของพื้นที่ที่เหมาะสม 5-15% อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการงอกของ เมล็ด 20-21 ˚C การเจริญเติบโตของต้นกล้า 25 ˚C และการออกดอกและติดผล 18-24 ˚C ความชื้นสัมพัทธ์ 60-70% ต้องการแสงแดด 8-16 ชั่วโมง/วัน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต ระหว่าง 21-24 องศาเซลเซียส การเก็บเกี่ยวขึ้นอยู่กับพันธุ์ แต่โดยเฉลี่ยแล้วเมื่อปลูกได้ ประมาณ 30-45 วัน มะเขือเทศจะเริ่มออกดอก และจะเริ่มเก็บเกี่ยวได้เมื่ออายุประมาณ 70-90 วัน และจากเริ่มปลูกถึงเก็บเกี่ยวหมดประมาณ 4-5 เดือน

เส้นทางของการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศมายังประเทศไทยจากทุกประเทศ รวมถึงประเทศอิตาลี พบว่ามีเส้นทางการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พ่อแม่มาโดยมีวัตถุประสงค์หลัก เพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อส่งออกไปยังต่างประเทศ ส่วนใหญ่ต้นกล้าจะผ่านขั้นตอนการทาบกิ่งในโรงเพาะกล้า

(Nursery) ก่อนการย้ายต้นกล้าลงปลูกทั้งในสภาพโรงเรือน และแปลงปลูกสภาพธรรมชาติของประเทศไทย ดังแสดงใน Figure 1

2. รวบรวมข้อมูลทั่วไป และการจัดกลุ่มศัตรูพืชของมะเขือเทศนำเข้าจากอิตาลี

ผลการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชของมะเขือเทศจากทุกแหล่งทั่วโลก พบว่ามีจำนวนทั้งสิ้น 557 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นศัตรูพืชที่มีรายงานในอิตาลี มีจำนวนทั้งสิ้น 267 ชนิด (CABI online, 2015) แบ่งออกเป็นดังนี้

แมลง 72 ชนิด ได้แก่ *Leptinotarsa decemlineata, Chromatomyia horticola, Liriomyza trifolii, Liriomyza huidobrensis, Ceratitis capitata, Bactrocera cucurbita, Bemisia tabaci , Trialeurodes vaporariorum, Aphis craccivora, Aphis fabae Scopoli , Aphis gossypii, Aulacorthum solani, Brachycaudus helichrysi, Myzus persicae, Nezara viridula, Planococcus citri, Phthorimaea operculella, Agrotis ipsilon, Agrotis segetum, Lacanobia oleracea, Mamestra brassicae, Ostrinia nubilalis, Pseudaletia punctulata, Peridroma saucia, Chrysodeixis chalcites, Spodoptera exigua, Spodoptera litura, Spodoptera littoralis, Frankliniella occidentalis, Frankliniella schultzei, Frankliniella intonsa, Thrips tabaci Linneman, Thrips palmi, Aspidiotus destructor, Earias vittella, Parabemisia myricae, Helicoverpa armigera, Helicoverpa zea, Rhopalosiphum rufiabdominale, Nesidiocoris tenuis, Meligethes aeneus, Philaenus spumarius, Trialeurodes ricini, Aphelenchoides ritzemabosi, Xestia c-nigrum, Thysanoplusia orichalce, Adelphocoris lineolatus, Scirtothrips dorsalis, Stegobium paniceum, Aleurodicus disperses, Pentalonia nigronervosa, Gryllotalpa gryllotalp, Orthezia insignis, Trichoplusia ni, Maconellicoccus hirsutus, Paracoccus marginatus, Tuta absoluta, Liriomyza sativae, Phenacoccus solenopsis, Hyalesthes obsoletus, Agriotes lineatus, Keiferia lycopersicella, Cacoecimorpha pronubana, Empoasca fabae, Agrotis exclamationis, Murgantia histrionica, Heliothis virescens, Dacus ciliates, Circulifer tenellus, Dociostaurus maroccanus, Bactrocera invadens, Hadula trifolii*

ไร 5 ชนิด ได้แก่ *Aculops lycopersici, Tetranychus urticae, Tetranychus cinnabarinus, Mononychellus tanajoa, Polyphagotarsonemus latus*

แบคทีเรีย 31 ชนิด ได้แก่ *Rhodococcus fascians*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis, Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus, Pseudomonas cepacia* , *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci, Pseudomonas cichorii , Pseudomonas corrugate, Pseudomonas syringae* pv. *tomato, Pseudomonas viridiflava, Ralstonia solanacearum* race 1, *Ralstonia solanacearum* race 3, *Dickeya zeae, Xanthomonas vesicatory, Pectobacterium*

atrosepticum, Dickeya chrysanthemi, Rhizobium radiobacter, Pantoea ananatis pv. *ananatis, Erwinia rhapontici, Bacillus subtilis, Dickeya dianthicola, Ralstonia solanacearum, Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum, Erwinia carotovora subsp. atroseptica, Pseudomonas syringae* pv. *mellea, Xanthomonas campestris, Rhizobium rhizogenes, Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis, Pectobacterium rhapontici, Pantoea agglomerans*

เชื้อรา 62 ชนิด ได้แก่ *Alternaria alternata*, *Alternaria japonica, Alternaria dauci* , *Alternaria brassicae, Alternaria brassicicola*, *Botryotinia fuckeliana*, *Colletotrichum gleosporioides*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* , *Fusarium oxysporum*, *Gibberella avenacea*, *Gibberella fujikuroi* var. *fujikuroi, Leveillula taurica*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Phomopsis longicolla*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, *Phytophthora erythroseptica* var. *erythroseptica*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora megasperma*, *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora cactorum*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium debaryanum*, *Pythium irregular*, *Chalara elegans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahlia*, *Passalora fulva*, *Golovinomyces orontii, Monilinia fructigena*, *Plasmodiophora brassicae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cochliobolus lunatus*, *Haematonectria haematococca*, *Thanatephorus cucumeris*, *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma harzianum*, *Phoma destructive*, *Phomopsis vexans*, *Didymella lycopersici*, *Olpidium brassicae*, *Oidium neolycopersici*, *Cochliobolus spicifer*, *Pleospora herbarum*, *Mycosphaerella tassiana*, *Sarocladium strictum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici, Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Septoria lycopersici, Pythium ultimum, Rhizopus arrhizus, Stemphylium vesicarium, Plectosphaerella cucumerina*

ไส้เดือนฝอย 22 ชนิด ได้แก่ *Meloidogyne hapla, Meloidogyne arenaria, Meloidogyne incognita, Meloidogyne javanica, Meloidogyne exigua, Heterodera glycines, Paratrichodorus minor, Scutellonema brachyurus, Helicotylenchus pseudorobustus, Xiphinema americanum, Pratylenchus penetrans, Globodera rostochiensis, Globodera tabacum, Globodera pallida, Zygotylenchus guevarai, Nacobbus aberrans, Meloidogyne chitwoodi, Ditylenchus destructor, Longidorus elongates, Xiphinema index, Xiphinema diversicaudatum, Radopholus similis*

ไฟโตรพลาสมา 1 ชนิด ได้แก่ *Grapevine yellows phytoplasmas*

โปรโตซัว 1 ชนิด ได้แก่ *Plasmodiophora brassicae*

ไวรัส 31 ชนิด ได้แก่ *Alfalfa mosaic virus, Cucumber mosaic virus, Beet curly top virus, Peanut stunt virus, Tobacco streak virus, Tomato spotted wilt virus, Potato leafroll virus, Potato virus Y, Tomato bushy stunt virus, Tobacco mosaic virus, Tomato mosaic virus, Tomato yellow leaf curl virus, Tomato yellow leaf curl Sardinia virus, Tobacco ringspot virus, Tomato black ring virus, Tomato ringspot virus, Pepino mosaic virus, Potato virus X, Broad bean wilt virus, Impatiens necrotic spot virus, Tobacco necrosis virus, Chrysanthemum stem necrosis virus, Tomato chlorosis virus, Tomato infectious chlorosis virus, Eggplant mottled dwarf virus, Potato yellow dwarf virus, Pepper mild mottle virus, Tomato infectious virus, Parietaria mottle virus, Tomato torrado virus, Pelargonium zonate spot virus*

ไวรอยด์ 3 ชนิด ได้แก่ *Citrus exocortis viroid, Potato spindle tuber viroid, Tomato apical stunt viroid*

วัชพืช 38 ชนิด ได้แก่ *Drymaria cordata, Solanum carolinense, Orobanche aegyptiaca, Eragrostis cilianensis, Amaranthus albus, Salsola vermiculata, Cuscuta campestris, Heliotropium europaeum, Orobanche cernua, Orobanche crenata, Abutilon theophrasti, Amaranthus blitoides, Ambrosia artemisiifolia, Chamomilla recutita, Chenopodium album, Chenopodium murale, Cirsium arvense, Conyza canadensis, Cyperus esculentus, Cyperus rotundus, Digitaria ciliaris, Echinochloa colona, Echinochloa crus-galli, Emex spinosa, Fumaria officinalis, Galinsoga parviflora, Hibiscus trionum ,Lolium temulentum, Orobanche cernua ,Orobanche crenata, Orobanche ramosa, Portulaca oleracea, Setaria viridis, Solanum elaeagnifolium, Solanum nigrum, Tribulus terrestris, Tridax procumbens, Vicia sativa*

3. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากอิตาลีและตรวจสอบ

จากสุ่มตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการจากตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากอิตาลี ยังไม่พบศัตรูพืช

4. การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากอิตาลี

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Initiation of pest risk analysis)

จุดเริ่มต้นของการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากอิตาลีเข้ามาในประเทศไทยเกิดขึ้นจากการทบทวนด้านนโยบายเพื่อปรับปรุงมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากอิตาลีให้รัดกุมยิ่งขึ้น (PRA initiated by the review or revision of a policy) เนื่องจากมาตรการควบคุมการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากอิตาลีปัจจุบันอาศัย

อำนาจตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติม พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 การนำเข้ามีเพียงใบรับรองสุขอนามัยพืช แต่ที่มิได้มีการระบุว่ามีศัตรูพืชชนิดใดบ้างเป็นศัตรูพืชกักกันตลอดจนมาตรการทางกักกันพืชกำกับมาด้วย จึงทำให้นำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากอิตาลียังมีความเสี่ยงที่ศัตรูพืชจะติดเข้ามาจึงจำเป็นต้องวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อทราบว่ามีศัตรูพืชชนิดใดบ้างเป็นศัตรูพืชกักกัน โดยพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Identification of PRA area) ที่กำหนดในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากอิตาลีคือ “ประเทศไทย”

พื้นที่ที่อยู่ในอันตราย (Endangered area) ได้แก่ พื้นที่หนึ่งพื้นที่ใดในประเทศไทย ซึ่งมีปรากฏอยู่ของพืชอาศัยที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของศัตรูพืช และมีปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญแพร่พันธุ์อย่างถาวรของศัตรูพืชซึ่งอาจจะติดเข้ามากับการนำเข้า โดยเส้นทาง (Pathway) ที่ศัตรูพืชจะติดเข้ามา คือเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ที่ปลูกเป็นการค้านำเข้ามาจากอิตาลีเพื่อการเพาะปลูก (seed for sowing)

จากการสืบค้นข้อมูลของประเทศที่เคยดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศมาก่อนแล้ว ได้แก่ เครือรัฐออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ เกาหลีใต้ และญี่ปุ่น พบว่าศัตรูพืชกักกันที่สามารถติดมากับส่วนเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าเพื่อการค้า ได้แก่ ไวรัส *Pepino mosaic virus* และ *Pelargonium spot virus* และไวรอยด์ *Potoato spindle tuber viroid, Tomato Chlorotic dwarf viroid, Tomato apical stunt viroid, Pepper chat fruit viroid, Columnea latent viroid, Mexican papita viroid*, *Tomato planta macho viroid* ซึ่งประเทศเหล่านี้มีข้อกำหนดด้านมาตรการสุขอนามัยพืชที่เข็มงวดสำหรับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากทุกประเทศที่เป็นแหล่งกำเนิดของไวรัสและไวรอด์ดังกล่าว ต้องผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่เหมาะสม หรือเมล็ดต้องมาจากพื้นที่หรือแหล่งผลิตที่ปลอดไวรัสและไวรอยด์ เป็นต้น (DAFF, 2013, EFSA Panel on Plant Health, 2011; MPI, 2012; MAFF, 2013; สุคนธ์ทิพย์ และคณะ, 2554) สำหรับแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* พบว่าวิธีตรวจสอบสามารถใช้ได้ทั้งพืชที่ไม่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ หรือการตรวจสอบเมล็ด (seed testing) เป็นวิธีควบคุมโรคได้ดีเพื่อกำจัดเมล็ดที่มีการปนเปื้อนเนื่องจากเมล็ดปนเปื้อนเพียงเล็กน้อยก็ยังสามารถทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคได้ (EFSA Panel on Plant Health, 2014)

ขั้นตอนที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest risk assessment)

การจำแนกประเภทศัตรูพืช (Pest categorization) ของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในอิตาลี พบว่าศัตรูพืชที่มีรายงานในอิตาลี มีจำนวนทั้งสิ้น 267 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นศัตรูพืชที่ไม่มีรายงานพบในประเทศไทย และมีโอกาสติดมากับเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากอิตาลี จำนวน 20 ชนิด ซึ่งมีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน แบคทีเรีย 6 ชนิด ได้แก่ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis, Pseudomonas syringae pv. tabaci, Pseudomonas cichorii, Pseudomonas corrugate, Pseudomonas syringae pv. tomato, Pseudomonas viridiflava* เชื้อรา 2 ชนิดได้แก่

Verticillium albo-atrum, *Didymella lycopersici* ไวรัส 10 ชนิด ได้แก่ *Alfalfa mosaic virus, Tobacco streak virus, Tomato spotted wilt virus, Tomato bushy stunt virus, Tobacco ringspot virus, Tomato black ring virus, Tomato ringspot virus, Pepino mosaic virus, Parietaria mottle virus ,Tomato torrado virus* ไวรอยด์ 2 ชนิด ได้แก่ *Potato spindle tuber viroid, Tomato apical stunt viroid*

ผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันโดยพิจารณาโอกาสการเข้ามา การตั้งรกราก การแพร่กระจาย และศักยภาพในการก่อให้เกิดผลกระทบตามมาทางเศรษฐกิจ ได้แก่ ไวรัส *Tomato bushy stunt virus* พบว่ามีความเสี่ยงปานกลาง และ *Pepino mosaic virus* มีความเสี่ยงสูง โอกาสติดเข้ามาโดยอาศัยอยู่ภายในเมล็ด (seed transmission)สามารถตั้งรกรากและก่อความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest management)

อยู่ระหว่างดำเนินการ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

มะเขือเทศ (Tomato, *Solanum lycopersicum*) เป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 ปัจจุบันการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พันธุ์มะเขือเทศจากอิตาลีได้รับการผ่อนผันให้นำเข้าได้ตามบทเฉพาะกาล ซึ่งการนำเข้ามีเพียงใบรับรองสุขอนามัยพืชที่มิได้ระบุชนิดศัตรูพืชกักกันและมาตรการสุขอนามัยพืชแต่อย่างใด

สำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากอิตาลี ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเมล็ดพันธุ์พ่อแม่ซึ่งปริมาณการนำเข้าเพียงเล็กน้อย จากสถิติการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากอิตาลี ในปี 2555-2556 รวมทั้งสิ้น จำนวน 1.08 กิโลกรัม (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2557) ส่วนผลการสุ่มตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการจากตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากอิตาลี ยังไม่พบศัตรูพืช แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันประเทศไทยเริ่มประสบปัญหาการอุบัติของศัตรูพืชมะเขือเทศชนิดใหม่ อาจสาเหตุมาจากการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ที่เป็นแหล่งกำเนิดศัตรูพืชร้ายแรงจากต่างประเทศต่อเนื่องเป็นประจำทุกปี โดยเฉพาะเชื้อไวรัสและไวรอยด์ที่อาศัยอยู่ภายในเมล็ด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการตรวจพบกับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในประเทศไทยและต่างประเทศ (ปริเชษฐ์ และคณะ, 2556; Reanwarakorn *et al*., 2011; Chambers *et al*., 2013)

จากการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชมะเขือเทศในอิตาลี พบว่ามีทั้งสิ้น 247 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นศัตรูพืชที่ไม่มีรายงานในประเทศไทยและมีโอกาสติดมากับเมล็ด จำนวน 20 ชนิด ซึ่งมีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน แบคทีเรีย 6 ชนิด เชื้อรา 2 ชนิด ไวรัส 10 ชนิดและไวรอยด์ 2 ชนิดซึ่งมีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน ผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันโดยพิจารณาโอกาสการเข้ามา การตั้งรกราก การแพร่กระจาย และศักยภาพในการก่อให้เกิดผลกระทบตามมาทางเศรษฐกิจ ได้แก่ ไวรัส *Tomato*

bushy stunt virus พบว่ามีความเสี่ยงปานกลาง และ *Pepino mosaic virus* มีความเสี่ยงสูง โอกาสติดเข้ามาโดยอาศัยอยู่ทั้งภายนอกและภายในเมล็ด (seed transmission) สามารถตั้งรกราก และแพร่กระจายก่อความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ คะนึงนิตย์ เหรียญวรากร และวิภา เกิดพิพัฒน์. 2556. การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) และ *Pepperchat fruit viroid* (PCFVd) ในพืชวงศ์โซลานาซีอี้. **วารสารวิชาการเกษตร** 31(2): 108-122.

สำนักควบคุมพืช และวัสดุการเกษตร. 2557. **สถิติการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ.** สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ.

สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ อลงกต โพธิ์ดี วาสนา ฤทธิ์ไธสง และคมศร แสงจินดา. 2554. **การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา.** รายงานวิจัยเรื่องเต็ม กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 10 หน้า.

CABI (CAB International). Online. 2015. **Crop Protection Compendium**. CAB International. Wallingford, U.K.

Chambers, G. A., A. M. Seyb, J. Mackie, F. E. Constable, B. C. Rodoni, D. Letham, K. Davis, and M.J. Gibbs. 2013. First Report of *Pepper chat fruit viroid* in Traded Tomato Seed, an Interception by Australian Biosecurity. **Plant Disease: Disease Notes** 97: 1386.

DAFF (Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. 2013. **Import condition search**. (Online). Available. http://www.aqis.gov.au/icon32/asp/ex querycontent.asp (April 15, 2013)

EFSA Panel on Plant Health (PLH). 2011. **Scientific Opinion on the assessment of the risk of solanaceous pospiviroids for the EU territory and the identification and evaluation of risk management options**. 133 pp.

EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), 2014. Scientific Opinion on the pest categorisation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.* 29 pp.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nation). 2014. **International Standards for Phytosanitary Measures no. 11: Pest Risk Analysis for Quarantine Pests.** FAO, Rome.

FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nation). 2014. **Tomato Production**. (Online). Available. http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx (June 8, 2013).

MAFF (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries). 2013. **Summary of proposed Revisions to the Enforcement Ordinance of the Plant Protection Law and Concerned Public Notices.** (Online). Avialable. http://members.wto.org/crnattachments/2013/sps/JPN/13_2446_00_e.pdf. (June 28, 2013).

MPI (Ministry for Primary Industries). 2012. **Risk Mangement proposal: *Solanum lycopersicum* (tomato) seed for sowing from all countries**. The National Plant Protection Organization of New Zealand. 17 pp.

Reanwarakorn K, Klinkong S, Porsoongnurn J, 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. **New Disease Reports**. 24: 6.

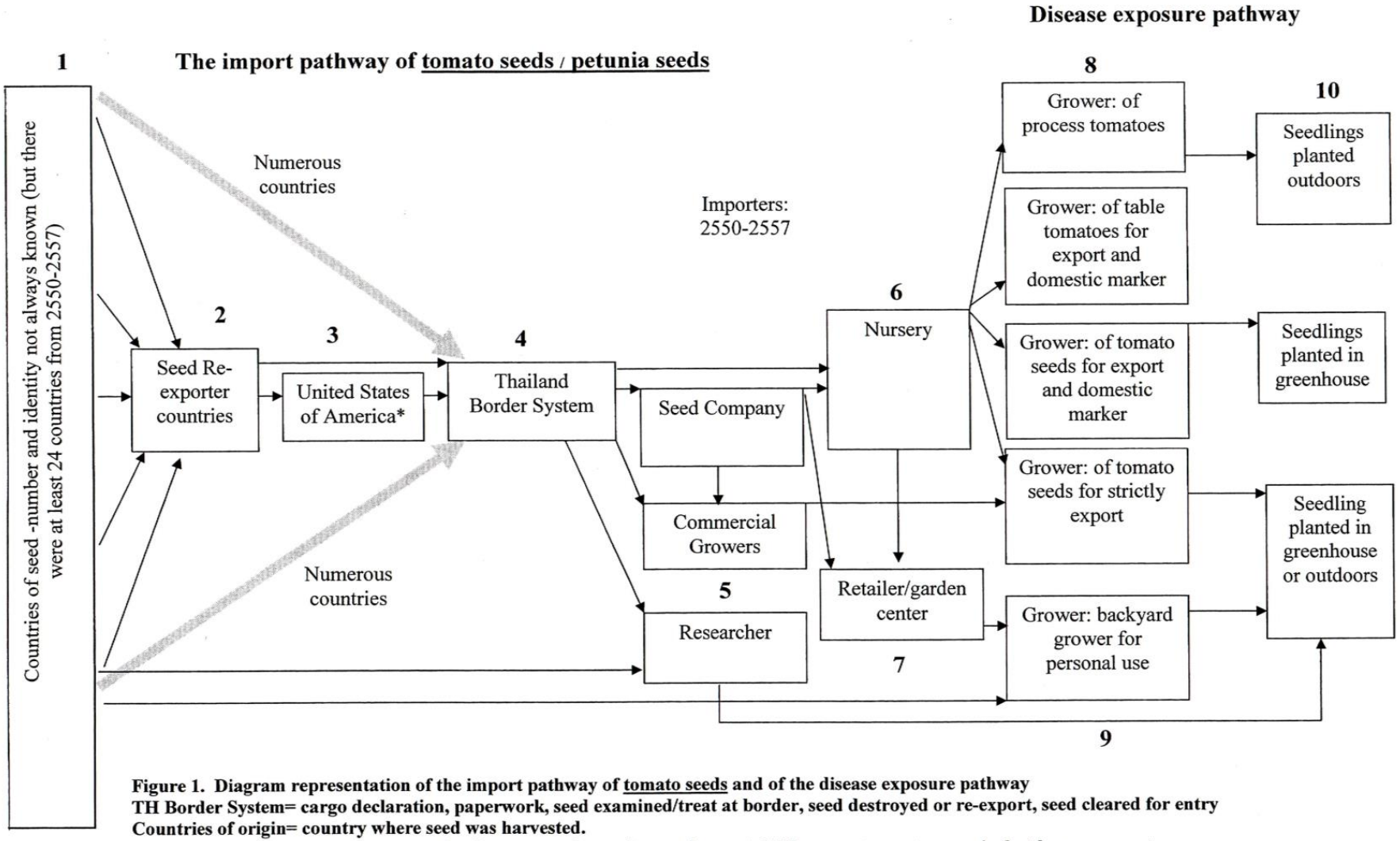


Figure 1. Diagram representation of the import pathway of tomato seeds and of the disease exposure pathway
TH Border System= cargo declaration, paperwork, seed examined/treat at border, seed destroyed or re-export, seed cleared for entry
Countries of origin= country where seed was harvested.
Exporting countries= may or may not be the country the seeds were harvested. The export country may in fact be a re-exporter.
Seed Re-exporter countries=countries into which seeds have been imported from around the world, repackaged & labeled, and from where seeds are re-exported
*** = for example, a country which seeds have been imported from seed re-exporter countries**

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของผลมะเดื่อฝรั่งสด นำเข้าจากสหรัฐอเมริกา

Study on Pest Risk Analysis for the Importation of Fresh Fig Fruit from the United States of America

อลงกต โพธิ์ดี วลัยกร รัตนเดชากุล สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ คมศร แสงจินดา

กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของมะเดื่อฝรั่งสดนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2556 - กันยายน 2557 ณ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งมะเดื่อฝรั่ง (fig) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Ficus carica* อยู่ในวงศ์ Moraceae มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันตก ปัจจุบันการปลูกมะเดื่อฝรั่งได้ขยายออกไปอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในประเทศสเปน ตุรกี และอิตาลี บางพันธุ์สามารถปลูกได้ในรัฐแคลิฟอร์เนียทางใต้และพื้นที่แห้งแล้งของสหรัฐอเมริกา ซึ่งตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไข ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 กำหนดให้ผลสดของพืชสกุล *Ficus* เป็นสิ่งต้องห้าม ซึ่งผลสดของมะเดื่อฝรั่งจากประเทศสหรัฐอเมริกาได้รับการผ่อนผันให้นำเข้าประเทศไทยได้ตามบทเฉพาะกาลของประกาศดังกล่าว จนกว่าการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชจะเสร็จสิ้น ผลการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืช พบว่าศัตรูมะเดื่อฝรั่งที่มีรายงานพบในประเทศสหรัฐอเมริกามีจำนวน 65 ชนิด ในประเทศไทยมีจำนวน 33 ชนิด ซึ่งจะนำไปดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนต่อไป

Keywords: วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช นำเข้า มะเดื่อฝรั่ง สหรัฐอเมริกา
Pest Risk Analysis, Importation, Fig, USA

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-02-02-06-57

คำนำ

จากการที่ประเทศไทยเข้าเป็นสมาชิกขององค์การการค้าโลก (World trade organization: WTO) ทำให้ประเทศไทยต้องปฏิบัติตามความตกลงว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement of Application of Sanitary and Phytosanitary Measures: SPS Agreement) ซึ่งเป็นมาตรการในการปกป้องชีวิตหรือสุขภาพของมนุษย์ สัตว์ และพืช ซึ่งการนำมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชไปใช้ จะต้องอยู่ในระดับเพื่อการปกป้องชีวิตหรือสุขภาพของมนุษย์ สัตว์ หรือพืชเท่านั้น โดยจะต้องอยู่บนพื้นฐานของหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ ดังนั้นการกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าสินค้าเกษตรโดยไม่ก่อให้เกิดการกีดกันทางการค้าแอบแฝง ประเทศไทยจำเป็นต้องมีการทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของสินค้าเกษตรที่นำเข้าเพื่อกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าในการป้องกันหรือจัดการความเสี่ยงของศัตรูพืชที่อาจเกิดขึ้น ซึ่งกระบวนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช อาจเริ่มในสถานการณ์ต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ มีการร้องขอให้พิจารณาเส้นทางผ่านเส้นใดเส้นหนึ่งที่อาจต้องมีมาตรการสุขอนามัยพืช มีการตรวจพบศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่งที่อาจเป็นเหตุผลให้มีมาตรการสุขอนามัยพืช มีการศึกษาทบทวนหรือปรับปรุงมาตรการหรือนโยบายสุขอนามัยพืชต่าง ๆ หรือ มีการขอร้องให้มีการกำหนดชี้ชัดว่าสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งเป็นศัตรูพืชหรือไม่ โดยใช้กรอบ มาตรฐานแนวปฏิบัติ ซึ่งพัฒนาขึ้นมาโดยองค์การระหว่างประเทศ คือ อนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention: IPPC)

มะเดื่อฝรั่ง (fig) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Ficus carica* ซึ่งปัจจุบันผลสดของพืชสกุลฟิคัส (*Ficus* spp.) จากทุกแหล่งจัดเป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 การนำเข้าหรือนำผ่านเพื่อการค้า จะต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชกำกับมาด้วย และต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช รวมทั้งต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขที่อธิบดีกรมวิชาการเกษตรกำหนด จึงจะสามารถนำเข้าหรือนำผ่านราชอาณาจักรได้ ในปี พ.ศ. 2555 ประเทศไทยนำเข้าสินค้าเกษตรและผลิตภัณฑ์เป็นมูลค่า 433,732 ล้านบาท โดยเป็นผลไม้และผลิตภัณฑ์ มูลค่า 24,663 ล้านบาท (ศูนย์สารสนเทศเกษตร, 2556) จากการศึกษารวบรวมข้อมูลศัตรูพืชพบว่า มีศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่มีรายงานพบในประเทศไทย ซึ่งศัตรูพืชเหล่านี้มีโอกาสที่จะติดเข้ามากับผลมะเดื่อฝรั่งสดนำเข้าได้ ดังนั้นหากประเทศไทยไม่มีมาตรการสุขอนามัยพืชที่เหมาะสมแล้วอาจก่อให้เกิดปัญหาของศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่เคยพบในประเทศติดมากับผลมะเดื่อฝรั่งสดที่นำเข้าเกิดการแพร่กระจายและเพิ่มปริมาณจนเกิดเป็นการระบาดของศัตรูพืชชนิดใหม่ขึ้นได้ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดผลเสียหายต่อเศรษฐกิจของประเทศอย่างใหญ่หลวง ดังนั้นจึงได้ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของมะเดื่อฝรั่งนำเข้า (เฉพาะผลสดเพื่อบริโภค) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้รายชื่อศัตรูพืชกักกัน และกำหนดมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชที่เหมาะสมสำหรับการนำเข้าผลมะเดื่อฝรั่งสดจากประเทศสหรัฐอเมริกา และใช้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนในการประกาศทบทวนมาตรการทางสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าผลสดของมะเดื่อฝรั่งจากประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เอกสารงานวิจัยทั้งในและต่างประเทศ ตำราวิชาการ วารสารวิชาการ รายงานการประชุมและสัมมนาทางวิชาการ

2. มาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures: ISPM) ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Framework for Pest Risk Analysis) (FAO, 2011)

3. มาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน (Pest risk analysis for quarantine pests) (FAO, 2014)

วิธีการ

1 การศึกษาข้อมูลพืชและข้อมูลศัตรูพืชของมะเดื่อฝรั่ง

ศึกษาข้อมูลพืชและข้อมูลศัตรูพืชของมะเดื่อฝรั่ง โดยค้นคว้ารวบรวมข้อมูลจากตำราวิชาการ วารสารวิชาการ เอกสารเผยแพร่ รายงานการประชุมและสัมมนาทางวิชาการ ที่มีรายงานทั้งในและต่างประเทศ เพื่อให้ได้ข้อมูล ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง ชื่อสามัญ ชีววิทยา แหล่งแพร่กระจาย ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย การป้องกันกำจัด และมาตรการทางสุขอนามัยพืช

2 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชกับผลมะเดื่อฝรั่งสดนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน โดยมีขั้นตอน ดังนี้

2.1 การเริ่มต้น (Stage 1: Initiation)

โดยการจำแนกชนิดสิ่งมีชีวิตและเส้นทางผ่านต่าง ๆ ที่จะมีการพิจารณาสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่เกี่ยวข้องกับพื้นที่การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่ได้มีการระบุจำแนกไว้ และการกำหนดพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชรวมทั้งการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่ผ่านมา

2.2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest Risk Assessment)

การจัดประเภทศัตรูพืช (Pest Categorization)

ดำเนินการโดยการค้นคว้ารวบรวมรายชื่อสิ่งมีชีวิตที่มีรายงานว่าเป็นศัตรูของมะเดื่อฝรั่ง โดยจัดแบ่งออกเป็นกลุ่ม เช่น แมลง ไร ไวรัส ไวรอยด์ แบคทีเรีย รา ไส้เดือนฝอย เป็นต้น พร้อมทั้งบันทึกรายละเอียดของศัตรูมะเดื่อฝรั่งแต่ละชนิด ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ แหล่งแพร่กระจาย ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย/อาศัย พบหรือไม่พบในประเทศไทย พิจารณาคัดเลือกเฉพาะ

ศัตรูพืชที่ไม่พบในประเทศไทย มีโอกาสติดเข้ามากับผลมะเดื่อฝรั่งสดและอาจจะก่อให้เกิดความเสียหายได้ นำมาประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนต่อไป

การประเมินความเสี่ยง (Risk Assessment)

โดยการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของมะเดื่อฝรั่งที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ไม่พบในประเทศไทย มีโอกาสติดเข้ามากับผลมะเดื่อฝรั่งสด ตั้งรกรากอย่างถาวร และแพร่ระบาดในประเทศ ตลอดจนประเมินศักยภาพที่จะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจรวมทั้งผลกระทบทางตรงและทางอ้อมหากติดเข้ามา ปัจจัยที่พิจารณา คือ

1. การประเมินศักยภาพในการที่ศัตรูจะเข้ามาเจริญพันธุ์ตั้งรกรากอย่างถาวร และการแพร่กระจาย ในพื้นที่ที่ทำการวิเคราะห์ (Assessment of entry, establishment and spread) โดยพิจารณาปัจจัยต่าง ๆ ที่สามารถทำให้ศัตรูพืชเข้ามาเจริญแพร่พันธุ์ได้ โดยมีหลักฐานสนับสนุนผลการวิเคราะห์ เช่น สภาพแวดล้อมและสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญแพร่พันธุ์และแพร่ระบาดของศัตรูพืช พืชอาศัย เครื่องกีดกั้นตามธรรมชาติ การเคลื่อนย้ายของศัตรูพืช และพาหะของศัตรูพืชที่มีปรากฏในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยง เป็นต้น

2. การประเมินศักยภาพที่จะเกิดผลตามมาทางเศรษฐกิจในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Potential economic consequence) ความเป็นไปได้สูงที่ศัตรูพืชจะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจ ซึ่งอาจมีผลกระทบทางตรงต่อพืช สัตว์ มนุษย์ และสิ่งแวดล้อม หรือมีผลกระทบทางอ้อม เช่น การป้องกันกำจัด การค้าภายในประเทศและระหว่างประเทศ ผลกระทบทางสังคม เป็นต้น โดยพิจารณาว่ามีผลกระทบจนถึงระดับที่ยอมรับไม่ได้ ในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

2.3 การบริหารจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest Risk Management)

การบริหารจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อปกป้องพื้นที่เสี่ยงภัย (Endangered area) โดยเป็นสัดส่วนกับความเสี่ยงที่จำแนกได้ในการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช อยู่บนพื้นฐานของข้อมูลที่รวบรวมได้ในการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช มาตรการสุขอนามัยพืชต้องมีประสิทธิภาพและใช้เท่าที่จำเป็นเพื่อประสิทธิภาพในการป้องกันของพื้นที่เสี่ยงภัย

เวลาและสถานที่

เวลา: เดือนตุลาคม 2556 - เดือนกันยายน 2557

สถานที่: กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1 การศึกษาข้อมูลพืชและข้อมูลศัตรูพืชของมะเดื่อฝรั่ง

มะเดื่อฝรั่ง (fig) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Ficus carica* อยู่ในวงศ์ Moraceae มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันตก ปัจจุบันการปลูกมะเดื่อฝรั่งได้ขยายออกไปอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในประเทศสเปน ตุรกี และอิตาลี บางพันธุ์สามารถปลูกได้ในรัฐแคลิฟอร์เนียทางใต้และพื้นที่แห้งแล้งของสหรัฐอเมริกา ซึ่ง

ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไข ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 กำหนดให้ผลสดของพืชสกุล *Ficus* เป็นสิ่งต้องห้าม ซึ่งผลสดของมะเดื่อฝรั่งจากประเทศสหรัฐอเมริกาได้รับการผ่อนผันให้นำเข้าประเทศไทยได้ตามบทเฉพาะกาลของประกาศดังกล่าว ซึ่งในปี 2556 ประเทศไทยนำเข้ามะเดื่อฝรั่ง (สดหรือแห้ง) ตามพิกัดศุลกากร 0804.2000 คิดเป็นมูลค่า 9,277,864 บาท ซึ่งนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา ทั้งหมด 23,542 กิโลกรัม เป็นมูลค่า 3,099,648 บาท (กรมศุลกากร, 2557)

มะเดื่อฝรั่งมีหลายสายพันธุ์ เช่น Brown Turkey, Celeste, Deanna, Galbun

ผลการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืช พบว่าศัตรูมะเดื่อฝรั่งที่มีรายงานพบในประเทศสหรัฐอเมริกามีจำนวน 65 ชนิด สำหรับศัตรูมะเดื่อฝรั่งที่มีรายงานพบในประเทศไทยมีจำนวน 33 ชนิด

2 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

2.1 การเริ่มต้น (Stage 1: Initiation)

ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แบ่งสิ่งควบคุมออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ สิ่งต้องห้าม สิ่งกำกัด และสิ่งไม่ต้องห้าม ซึ่งการนำเข้าหรือนำผ่านซึ่งสิ่งต้องห้ามเพื่อการค้า ต้องได้รับอนุญาตจากอธิบดีกรมวิชาการเกษตร ต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชกำกับมาด้วย ต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ต้องนำเข้าหรือนำผ่านทางด่านตรวจพืชเพื่อให้พนักงานเจ้าหน้าที่ตรวจและต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขที่อธิบดีกรมวิชาการเกษตรกำหนดโดยคำแนะนำของคณะกรรมการกักพืชโดยประกาศลงในราชกิจจานุเบกษา จึงจะสามารถนำเข้าหรือนำผ่านราชอาณาจักรได้ ซึ่งผลสดของพืชสกุล *Ficus* จากทุกแหล่งเป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 ลงวันที่ 26 เมษายน 2550 ซึ่งตามบทเฉพาะกาลของประกาศดังกล่าวสิ่งต้องห้ามตามท้ายประกาศที่เคยมีการนำเข้ามาในราชอาณาจักรแล้วในลักษณะทางการค้าก่อนที่ประกาศนี้มีผลใช้บังคับ จะได้รับการผ่อนผันให้นำเข้าได้ต่อไปจนกว่าการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของสิ่งต้องห้ามนั้นเสร็จสิ้น ซึ่งประเทศสหรัฐอเมริกาได้ร้องขอนำเข้าผลมะเดื่อฝรั่งสด (*F. carica*) มายังประเทศไทยเพื่อบริโภค โดยพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่กำหนดในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าผลมะเดื่อฝรั่งสด คือ ประเทศไทย ซึ่งเป็นพื้นที่ที่อยู่ในอันตราย (endangered area) ที่ศัตรูพืชอาจจะติดเข้ามาพร้อมกับการนำเข้าผลมะเดื่อฝรั่งสดที่จัดเป็นเส้นทางศัตรูพืช (pathway) และประเทศไทยยังไม่เคยมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของผลมะเดื่อฝรั่งสดนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest Risk Assessment)

การจัดประเภทศัตรูพืช (Pest Categorization)

ผลการจัดกลุ่มศัตรูพืชสำหรับผลมะเดื่อฝรั่งสดจากประเทศสหรัฐอเมริกาที่ไม่พบในประเทศไทย ได้แก่ ไร *Tetranychus pacificus* (CABI, 2007)

สำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของมะเดื่อฝรั่งนำเข้าจากประเทศอเมริกาในขั้นตอนการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest Risk Assessment) และขั้นตอนต่อไป จะดำเนินการในปีต่อไป (2557-2558)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของมะเดื่อฝรั่งสดนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2556 - กันยายน 2557 ณ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งมะเดื่อฝรั่ง (fig) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Ficus carica* อยู่ในวงศ์ Moraceae มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันตก ปัจจุบันการปลูกมะเดื่อฝรั่งได้ขยายออกไปอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในประเทศสเปน ตุรกี และอิตาลี บางพันธุ์สามารถปลูกได้ในรัฐแคลิฟอร์เนียทางใต้และพื้นที่แห้งแล้งของสหรัฐอเมริกา ซึ่งตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไข ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 กำหนดให้ผลสดของพืชสกุล *Ficus* เป็นสิ่งต้องห้าม ซึ่งผลสดของมะเดื่อฝรั่งจากประเทศสหรัฐอเมริกาได้รับการผ่อนผันให้นำเข้าประเทศไทยได้ตามบทเฉพาะกาลของประกาศดังกล่าว จนกว่าการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชจะเสร็จสิ้น ผลการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืช พบว่าศัตรูมะเดื่อฝรั่งที่มีรายงานพบในประเทศสหรัฐอเมริกามีจำนวน 65 ชนิด ในประเทศไทยมีจำนวน 33 ชนิด ซึ่งจะนำไปดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กรมศุลกากร. 2557. **รายงานสถิตินำเข้า-ส่งออก** (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://internet1.customs.go.th/ext/Statistic/StatisticIndex2550.jsp (20 กุมภาพันธ์ 2557)

ศูนย์สารสนเทศเกษตร. 2556. **สถิติการค้าสินค้าเกษตรไทยกับต่างประเทศ ปี 2555**. ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

CAB International. 2007. **Crop Protection Compendium 2007 Edition**. (Computer Program). CAB International. Wallingford, UK.

FAO. 2011. **ISPM 02: 2007 Framework for pest risk analysis**. Rome, IPPC, FAO.

FAO. 2014. **ISPM 11: 2013 Pest risk analysis for quarantine pests**. Rome, IPPC, FAO.

Whyte, C.F. 2009. **Explanatory Document on International Standard for Phytosanitary Measures No.31 (Methodologies for Sampling of Consignments)**. (Online). Available. http://www.ippc.int/file_uploaded/1252507962732_ISPM31_ED_in_format.pdf (September 1, 2010)

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา

Study on Pest Risk Analysis for the Importation of Cantaloupe Seeds from USA

คมศร แสงจินดา ณัฏฐพร อุทัยมงคล สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ วาสนา ฤทธิ์ไธสง

กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปนำเข้าจากสหรัฐอเมริกาดำเนินการทดลอง ระหว่างเดือนตุลาคม 2555 – กันยายน 2557 ผลจากการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชของแคนตาลูปมีทั้งหมด 73 ชนิด โดยมีศัตรูพืชจัดเป็นแมลง 26 ชนิด ไร 3 ชนิด หอย 1 ชนิด แบคทีเรีย 4 ชนิด รา 24 ชนิด ไวรัส 4 ชนิด ไมโครพลาสมา 1 ชนิดไส้เดือนฝอย 8 ชนิด วัชพืช 2 ชนิด และพบศัตรูพืชของ แคนตาลูปที่มีในสหรัฐอเมริกา จำนวน 136 ชนิด โดยจัดเป็นแมลง 42 ชนิด ไร 4 ชนิด หอย 1 ชนิด แบคทีเรีย 13 ชนิด รา 40 ชนิด ไวรัส 18 ชนิด ไมโครพลาสมา 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 10 ชนิด วัชพืช 6 ชนิด สัตว์มีกระดูกสันหลัง 1 ชนิด ทำการจัดลำดับศัตรูพืชของแคนตาลูปที่จะวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest categorization) พบว่ามีศัตรูพืชกักกันที่มีโอกาสติดมากับเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปนำเข้าจากสหรัฐอเมริกาได้แก่ ไวรัส *Alfalfa mosaic virus*, *Cucumber green mottle mosaic virus*, *Melon necrotic spot virus*, *Squash mosaic virus* และ *Tobacco ringspot virus*

ดังนั้นการนำเข้าเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปจากสหรัฐอเมริกาต้องมีมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกัน โดยเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าต้องปราศจากแมลงที่มีชีวิต ดิน ทราย วัชพืช ชิ้นส่วนของพืช เช่น ใบ ก้าน เศษซากพืช และสิ่งอื่นใดที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน ต้องมาจากแหล่งที่ปลอดจากศัตรูพืชกักกัน และต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชที่ระบุข้อความเพิ่มเติมว่าเมล็ดพันธุ์ต้องมาจากต้นพ่อแม่ที่ได้รับการตรวจสอบในระยะการเจริญเติบโตหรือได้รับการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการว่าปลอดจากศัตรูพืชกักกัน

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-02-01-10-56

Abstract

Study on Pest Risk Analysis for the Importation of Cantaloupe Seeds from USA was conducted during October 2012 to September 2014. Result of pest categorization of cantaloupe seeds showed that 73 species are present in Thailand, which is 26 insects, 3 mites, 1 snail, 4 bacteria, 24 fungi, 4 viruses, 1 phytoplasma, 8 nematodes and 2 weeds, respectively. The numbers of pests associated with cantaloupe seeds from USA are 136 species and identified as 42 insects, 4 mites, 1 snail, 13 bacteria, 40 fungi, 18 viruses, 1 phytoplasma 10 nematodes, 6 weeds, 1 vertebrates respectively. Following pests are contaminated with seeds and categorized as quarantine pests; *Alfalfa mosaic virus, Cucumber green mottle mosaic virus, Melon necrotic spot virus, Squash mosaic virus* and *Tobacco ringspot virus.* The result of pest risk assessment of cantaloupe seeds imported from the USA showed that many high risk quarantine pests could entry and spread in Thailand. The risk mitigation measure for quarantine pests should be required. The seeds imported from the USA shall be free from live insect, soil, and, weed or other plant part such as leaf, branch and potential quarantine pest, produced in pest free area. The Phytosanitary certificate is required and certified that cantaloupe seeds were derived from the plants those were inspected during growing season and verified by laboratory test that are found free from quarantine pest

Keywords: แคนตาลูป ศัตรูพืช
Cantaloupe, pest

คำนำ

เมล็ดพันธุ์แคนตาลูปจัดเป็นสิ่งกำกัดตาม ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชจากแหล่งที่กำหนด เป็นสิ่งกำกัด ข้อยกเว้นและเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. ๒๕๐๗ พ.ศ. ๒๕๕๐ ซึ่งปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดแคนตาลูปจากหลายๆแหล่งจากต่างประเทศ รวมถึง สหรัฐอเมริกา โดยการนำเข้าเพื่อการค้ามีเงื่อนไขเพียงแนบใบรับรองสุขอนามัยพืช และเข้าทางด่านตรวจพืชเท่านั้น โดยมีการนำเข้ามาปริมาณมากจากหลายประเทศเพื่อการขยายพันธุ์ เช่น เมล็ดพันธุ์แคนตาลูป ซึ่งมีการนำเข้าจากสหรัฐอเมริกาในปี 2554 ปริมาณ 119.55 กิโลกรัม มูลค่าประมาณ 1,723,910.25 บาท (สมาคมการค้าเมล็ดพันธุ์, 2554) โดยปัจจุบันมีรายงานศัตรูพืชรายแรงหลายชนิดที่ปรากฏใน แคนตาลูปที่ประเทศสหรัฐอเมริกา การนำเข้าเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปดังกล่าวอาจมีศัตรูพืชร้ายแรงหลายชนิดเช่น Alfalfa mosaic virus, Melon necrotic spot virus, Squash mosaic virus และ Tobacco ringspot virus ที่ไม่มีรายงานการปรากฏในประเทศไทย และศัตรูพืชบางชนิด

เป็นศัตรูพืชกักกัน มีโอกาสติดมากับเมล็ดพันธุ์ แต่เนื่องจากประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พ่อแม่ของแคนตาลูปเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปเพื่อการส่งออก หากเกิดการแพร่ระบาดของศัตรูพืชดังกล่าวจะทำให้เกิดปัญหาในการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก และอาจเกิดปัญหากับพืชชนิดอื่นที่เป็นพืชอาศัยของศัตรูดังกล่าวได้

ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชหรือเงื่อนไขสำหรับการนำเข้าสินค้าเกษตรที่เป็นพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งสินค้าที่มีปริมาณนำเข้ามาก และมีความเสี่ยงสูงที่จะมีศัตรูพืชติดเข้ามาหรือมาจากแหล่งที่มีศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. หนังสือ เอกสารและวารสารทางวิชาการที่เกี่ยวข้อง Crop Protection Compendium 2013 (CPC, 2013) ข้อมูลทางอิเล็กทรอนิกส์ และเว็บไซต์ต่างๆ
2. วัสดุสำนักงาน เช่น กระดาษ แผ่นบันทึกข้อมูล
3. วัสดุทางการเกษตร เช่น เมล็ดพันธุ์แคนตาลูป
4. วัสดุวิทยาศาสตร์และสารเคมี เช่น กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope สารเคมีและอุปกรณ์ในการทำสไลด์ถาวร

วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของแคนตาลูปและศัตรูพืชของแคนตาลูปที่จะดำเนินการวิเคราะห์

รวบรวมข้อมูลพืชและข้อมูลศัตรูพืชของแคนตาลูป โดยค้นคว้ารวบรวมข้อมูลจากตำรา หนังสือวิชาการ วารสารวิชาการ เอกสารเผยแพร่ รายงานการประชุมและสัมมนาทางวิชาการ ข้อมูลทางอิเล็กทรอนิกส์ และเว็บไซต์ต่างๆ ที่มีรายงานทั้งในและต่างประเทศ เพื่อให้ได้ข้อมูลพืชได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ สายพันธุ์ แหล่งปลูก ในสหรัฐอเมริกา การนำเข้า การส่งออก และข้อมูลศัตรูพืชได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง ชื่อสามัญ ชีววิทยา แหล่งแพร่กระจาย ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย การป้องกันกำจัด และมาตรการทางสุขอนามัยพืช

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืช

การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปนำเข้าจากสหรัฐอเมริกาที่นำเข้าทางด่านตรวจพืช เจ้าหน้าที่ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปมาทำการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อตรวจหาตัวอ่อนหนอน แมลงหรือเมล็ดวัชพืชที่อาจปะปนมา

2.2 การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคพืชจะทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ โดยต้องปฏิบัติตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association, 1999) แล้วนำตัวอย่างมาตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งอาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ตามขั้นตอนและวิธีการ ดังต่อไปนี้

2.2.1 การตรวจสอบเชื้อรา

1) การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะยังไม่งอก โดยตรวจสอบลักษณะอาการโรคและส่วนขยายพันธุ์เชื้อราหรือศัตรูพืชอื่นๆ ซึ่งปะปนมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยตาเปล่าหรือตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) เช่น เมล็ดพันธุ์มีรูปร่างผิดปกติหรืออาจติดมาภายในเมล็ดพันธุ์โดยไม่แสดงอาการ รวมทั้งอาจติดมากับเศษพืชในลักษณะเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์ เป็นต้น

2) การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะเมล็ดงอก โดยวิธีวางบนกระดาษชื้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สุ่มตัวอย่างเมล็ดตามวิธีการมาตรฐาน ในปริมาณที่เหมาะสมตรวจวินิจฉัยโดยสุ่มแยกตามสายพันธุ์ โดยวางเมล็ดพันธุ์แคนตาลูป 10 เมล็ดในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่นที่ชุ่มน้ำ จากนั้นนำจานเพาะเมล็ดไปบ่มเชื้อ (incubate) ใต้แสง near ultraviolet (NUV) 12 ชั่วโมง สลับกับความมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำมาตรวจและจำแนกชนิดเชื้อราใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (compound microscope)

2.2.2 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย

1) การแยกเชื้อสาเหตุโรคจากเมล็ดพันธุ์โดยตรง ด้วยวิธี Dilution plate โดยสุ่มเมล็ดตามมาตรฐานของ ISTA นำมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที ล้างด้วย น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อ เมื่อเมล็ดพันธุ์แห้งแล้วจึงนำไปบดละเอียดใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (NaCl 0.85%) หรือบัฟเฟอร์ จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยวางบนเครื่องเขย่า จากนั้นนำมาทำให้เจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเจือจางเป็น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ ใช้ไปเปตต์ดูดสารละลายแต่ละความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร NA แล้วใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน จึงนำมาตรวจหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย แยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปจำแนกชนิดต่อไป

2.2.3. การตรวจสอบเชื้อไวรัส

1) การปลูกสังเกตลักษณะอาการโรคบนต้นกล้า (Seedling symptom test) โดยเพาะเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปในดินอบฆ่าเชื้อ ตัวอย่าง 50-200 เมล็ด เก็บรักษาไว้ในโรงปลูกพืชกันแมลงเมื่อต้นพืชออกใบจริง 1-2 ใบ จึงตรวจสอบลักษณะอาการโรคบนต้นกล้าที่แสดงอาการผิดปกติ ที่สงสัยว่ามีสาเหตุจากเชื้อไวรัส และนำใบอ่อนไปตรวจสอบด้วยวิธีการอื่นเพื่อจำแนกชนิดต่อไป

2) การปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ (Infectivity test) เตรียมน้ำคั้นพืชสำหรับทดสอบเช่น แตงกวา แตงโม เป็นต้น โดยบดใบพืชที่แสดงอาการผิดปกติในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ตรวจสอบเชื้อไวรัสใช้ 0.1 M phosphate buffer pH 7.0) โดยใช้ใบพืชหนัก 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร ในสภาพเย็น จากนั้นใช้สำลีหรือนิ้วที่สะอาดจุ่มน้ำคั้นพืชทาลงบนใบพืชทดสอบที่ร อยผงคาร์โบรันดัม (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 ELISA เป็นวิธีตรวจสอบเชื้อไวรัสที่มีความไวสูง แม้จะมีเชื้อไวรัสปริมาณต่ำหรืออนุภาคแตกหักก็สามารถตรวจได้ ให้ผลรวดเร็ว แน่นอน และยังสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก วิธีการที่นำมาใช้เป็นแบบ Indirect ELISA

2.3. การติดตามตรวจสอบโรคและศัตรูพืชในพื้นที่ปลูกที่ใช้เมล็ดพันธุ์นำเข้า

การติดตามสำรวจศัตรูพืชในพื้นที่ปลูกที่ใช้เมล็ดพันธุ์แคนตาลูปที่นำเข้าในท้องที่ภาคะวันออกเฉียงเหนือ โดยเก็บตัวอย่างแคนตาลูปที่แสดงอาการโรคที่สงสัยในแปลงปลูกที่ใช้เมล็ดพันธุ์แคนตาลูปนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา แล้วนำมาตรวจวินิจฉัยอย่างละเอียดในห้องปฏิบัติการ

3. การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา โดยใช้หลักเกณฑ์การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชตามมาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures: ISPM) ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Framework for Pest Risk Analysis (2007)) และฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน (Pest Risk Analysis for Quarantine Pests (2013)) (FAO, 2014) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก สัมพันธ์กัน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1: การเริ่มต้นการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 1: Initiation of pest risk analysis)

ขั้นตอนที่ 2: การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest risk assessment)

ขั้นตอนที่ 3: การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest risk management)

ขั้นตอนที่ 1: การเริ่มต้นการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 1: Initiation of pest risk analysis)

การเริ่มขบวนการวิเคราะห์ก็เพื่อจำแนกศัตรูพืช (pest) และเส้นทางศัตรูพืช (pest pathway) ที่เกี่ยวข้องกับกักกันพืชและควรได้รับการพิจารณา โดยวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่เกี่ยวข้องกับพื้นที่หนึ่งที่กำหนด คือ

1.1 จุดเริ่มต้นการวิเคราะห์ (Initiation point) พิจารณาเหตุผลการดำเนินการวิเคราะห์

ความเสี่ยงว่าเริ่มต้นด้วยเหตุผลใด ดังนี้

1.1.1 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเริ่มต้นโดยการจำแนกเส้นทางศัตรูพืช (PRA initiated by the identification of a pathway) มีความจำเป็นต้องวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขึ้นมาใหม่หรือเพื่อทบทวนของเดิมที่เคยวิเคราะห์ไว้แล้วกับเส้นทางศัตรูพืชเส้นทางหนึ่งโดยเฉพาะที่อาจเกิดขึ้นได้เพราะสถานการณ์ดังนี้

- การค้าขายระหว่างประเทศเริ่มมีสินค้าชนิดหนึ่งที่ไม่เคยมีการนำเข้ามาในประเทศมาก่อน หรือสินค้าชนิดหนึ่งมาจากพื้นที่ใหม่หรือจากแหล่งกำเนิดใหม่
- พืชชนิดใหม่ถูกนำเข้าเพื่อการคัดเลือกพันธุ์และวัตถุประสงค์เพื่อการวิจัย
- พบเส้นทางศัตรูพืชอื่นนอกเหนือจากการนำเข้าสินค้า เช่น การแพร่กระจายโดยธรรมชาติ วัสดุหีบห่อ ไปรษณียภัณฑ์ เศษอาหาร สัมภาระของผู้โดยสาร เป็นต้น

การจัดทำรายชื่อศัตรูพืชซึ่งมีโอกาสปะปนมาในเส้นทางศัตรูพืชนี้ อาจดำเนินการได้โดยรวบรวมจากแหล่งข้อมูลของส่วนราชการ ฐานข้อมูล เอกสารอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์อื่นๆ หรือโดยการปรึกษากับผู้เชี่ยวชาญ กรณีจำแนกพบว่าไม่มีศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันมีโอกาสปะปนมากับเส้นทางศัตรูพืช การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชอาจยุติ ณ จุดนี้

1.1.2 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเริ่มต้นโดยการจำแนกศัตรูพืช (PRA initiated by the identification of a pest) มีความจำเป็นต้องวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขึ้นใหม่หรือทบทวนของเดิมที่ได้เคยวิเคราะห์ไว้แล้วกับศัตรูพืชชนิดหนึ่งโดยเฉพาะ อาจเกิดได้เพราะสถานการณ์ ดังนี้

- เกิดภาวะฉุกเฉินมีการตรวจพบการเข้าทำลายหรือการระบาดของศัตรูพืชชนิดใหม่ภายในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช
- เกิดภาวะฉุกเฉินจากการตรวจพบศัตรูพืชชนิดใหม่ติดมากับสินค้านำเข้าชนิดหนึ่ง
- การวิจัยทางวิทยาศาสตร์ค้นพบความเสี่ยงจากศัตรูพืชชนิดใหม่
- มีการจำแนกพบสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งเป็นพาหะของศัตรูพืชชนิดอื่นเพิ่มขึ้นอีก
- สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมในลักษณะซึ่งสามารถจำแนกได้อย่างชัดเจนว่ามีศักยภาพที่จะเป็นศัตรูพืชได้

1.1.3 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเริ่มต้นโดยการทบทวนหรือการปรับปรุงนโยบาย (PRA initiated by the review or revision of a policy) มีความจำเป็นต้องวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขึ้นใหม่ หรือทบทวนของเดิมที่ได้เคยวิเคราะห์ไว้แล้ว ส่วนมากแล้วจะเกิดขึ้นเนื่องจากสถานการณ์ ดังนี้

- ได้มีการตัดสินใจในระดับชาติเพื่อทบทวนกฎระเบียบสุขอนามัยพืชข้อกำหนด หรือการปฏิบัติการ
- ข้อเสนอจากประเทศหนึ่งหรือโดยหน่วยงานอารักขาพืชนานาชาติ (หน่วยงาน

อารักขาพืชระดับภูมิภาค องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ) ให้มีการทบทวนหรือปรับปรุง

- มีวิธีการกำจัดศัตรูพืชใหม่ หรือการสูญเสียระบบการกำจัดศัตรูพืช มีกระบวนการใหม่ หรือข้อมูลใหม่ที่มีผลกระทบต่อการตัดสินใจก่อนหน้านี้

-.ข้อโต้แย้งเกิดขึ้นกับมาตรการสุขอนามัยพืช

-.สถานการณ์ทางสุขอนามัยพืชในประเทศหนึ่งเปลี่ยนแปลงไป มีประเทศใหม่เกิดขึ้นหรือขอบเขตทางการปกครองเปลี่ยนแปลงไป

1.2 การจำแนกพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Identification of PRA area)

การกำหนดพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชให้ชัดเจนเพื่อประโยชน์ในการพิจารณาหาข้อมูลที่ต้องการได้เหมาะสมถูกต้องกับพื้นที่

1.3 รวบรวมข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

การรวบรวมข้อมูลเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชทุกขั้นตอน โดยเฉพาะการวิเคราะห์ในระยะเริ่มต้นเพื่อให้เกิดความชัดเจนเกี่ยวกับสถานภาพการแพร่ระบาดของศัตรูพืชในปัจจุบัน ตลอดจนโอกาสที่ศัตรูพืชจะติดมากับพืชอาศัยและสินค้า สำหรับข้อมูลอื่นๆ จะรวบรวมตามที่มีความต้องการใช้ประกอบเมื่อถึงจุดที่ต้องตัดสินใจ ขณะที่การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชดำเนินต่อไป

ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชอาจมาจากแหล่งที่หลากหลาย ซึ่งตามบทบัญญัติภายใต้อนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ (มาตรา 18 ข้อซี) ประเทศภาคีสมาชิกต้องมีจุดประสานงานเป็นทางการ เพื่ออำนวยความสะดวกในการให้ข้อมูลของทางราชการ

1.4 ตรวจสอบการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่มีการดำเนินการแล้วก่อนเริ่มขบวนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช จะต้องตรวจสอบว่าได้เคยมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชมาแล้วหรือไม่ ทั้งกรณีวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชโดยศัตรูพืช หรือเส้นทางศัตรูพืช หรือโดยนโยบายของรัฐทั้งภายในและต่างประเทศ กรณีที่มีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชมาแล้วจะต้องตรวจสอบว่ายังมีความเหมาะสมหรือไม่ หรือยังสามารถนำมาใช้ได้หรือ ไม่เนื่องจากสภาพอาจเปลี่ยนแปลงไป โดยอาจจะนำมาใช้เพียงบางส่วนหรือทั้งหมด ทั้งนี้เพื่อว่าอาจจะสามารถทดแทนความต้องการที่จะต้องการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชใหม่ได้

1.5 ข้อสรุปของขั้นตอนการเริ่มกระบวนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนที่ 1 สามารถดำเนินการจำแนกศัตรูพืชและเส้นทางที่เกี่ยวกับศัตรูพืชที่เกี่ยวข้องและพื้นที่วิเคราะห์ศัตรูพืช รวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ประกอบการวิเคราะห์รวมทั้งจำแนกและคัดเลือกศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชที่จะต้องดำเนินมาตรการสุขอนามัยพืช โดยอาจเป็นศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่งที่เฉพาะเจาะจง หรือศัตรูพืชที่มีโอกาสปะปนมากับเส้นทางศัตรูพืช

ขั้นตอนที่ 2: การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest risk assessment)

จุดมุ่งหมายเพื่อให้จัดลำดับความสำคัญศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงประกอบ ด้วย 3 ขั้นตอน ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันคือ ขั้นตอนที่ 1) การจัดประเภทศัตรูพืช (Pest categorization)

เพื่อพิจารณาว่าศัตรูพืชชนิดใดมีคุณสมบัติจัดเป็นศัตรูพืชกักกัน (quarantine pest) โดยการพิจารณาตามคำนิยามของศัตรูพืชกักกันตามคำนิยามในมาตรฐานระหว่างประเทศสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช Glossary of Phytosanitary Terms ISPM No. 5 ขั้นตอนที่ 2) ประเมินโอกาสที่ศัตรูพืชชนิดนั้นจะเข้ามา ตั้งรกรากอย่างถาวร และแพร่ระบาด (Assessment for probability of entry and establishment and spread) ในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชได้ ขั้นตอนที่ 3) ประเมินผลกระทบทางเศรษฐกิจที่เกิดจากศัตรูพืช (Assessment of potential consequences) ในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยรายละเอียดขั้นตอนการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชที่ใช้ดำเนินการตามอนุสัญญาอารักขาพืชแห่งชาติ (International Plant Protection Convention, IPPC) มีดังนี้

2.1 การจัดกลุ่มศัตรูพืช (Pest categorization)

เพื่อพิจารณาว่าศัตรูพืชชนิดใดมีคุณสมบัติจัดเป็นศัตรูพืชกักกัน (quarantine pest) โดยพิจารณาตามคำนิยามของศัตรูพืชกักกัน ในมาตรฐานระหว่างประเทศสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 5 ซึ่ง “ศัตรูพืชกักกัน” (Quarantine pest) หมายถึง ศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่มีศักยภาพต่อพื้นที่ที่อยู่ในอันตรายนั้น และยังไม่มีอยู่ในที่นั้น หรือมีอยู่แต่ไม่แพร่กระจายอย่างกว้างขวางและกำลังมีการควบคุมอยู่อย่างเป็นทางการ (Anonymous, 2006)

2.2 การประเมินโอกาสการเข้ามาและแพร่ระบาด (Assessment of the probability of introduction and spread)

การเข้ามาของศัตรูพืชประกอบด้วยกระบวนการเคลื่อนย้ายของศัตรูพืชเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร และแพร่ระบาดในพื้นที่ได้ ในการประเมินโอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชจะ ต้องวิเคราะห์เส้นทาง แต่ละเส้นทางซึ่งศัตรูพืชอาจปะปนร่วมมากับเส้นทางจากแหล่งกำเนิดจนเข้ามาเจริญตั้งรกรากและแพร่ระบาดในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชซึ่งเริ่มต้นจากเส้นทางศัตรูพืชหนึ่งที่เฉพาะเจาะจง (โดยทั่วไปเป็นการนำเข้าสินค้าเกษตรชนิดหนึ่ง) โอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชจะประเมินจากเส้นทางที่สงสัย นอกจากนี้จำเป็นที่จะต้องตรวจสอบโอกาสที่เป็นไปได้ที่ศัตรูพืชจะเข้ามาในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชจะสัมพันธ์กับเส้นทางศัตรูพืชอื่นๆ ด้วยเช่นเดียวกัน

สำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชซึ่งเริ่มจากชนิดศัตรูพืชชนิดหนึ่ง โดยไม่มีการพิจารณาเกี่ยวกับสินค้านำเข้าหรือเส้นทางศัตรูพืช ควรนำเส้นทางศัตรูพืชทุกเส้นทางที่มีศักยภาพในการนำศัตรูพืชเข้ามาในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชมาร่วมพิจารณาด้วย

การประเมินโอกาสความเป็นไปได้ของการแพร่ระบาดในเบื้องต้นจะอยู่บนพื้นฐานการพิจารณาทางด้านชีววิทยาเหมือนกับการประเมินโอกาสความเป็นไปได้ของศัตรูพืชที่จะเข้ามาและตั้งรกรากอย่างถาวร

2.2.1 โอกาสการเข้ามาของศัตรูพืช (Probability of entry of a pest)

โอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชชนิดหนึ่งขึ้นอยู่กับเส้นทางศัตรูพืชจากประเทศส่งออก

สินค้าไปยังประเทศปลายทาง ความถี่การนำเข้าและปริมาณศัตรูพืชที่มีโอกาสติดมากับสินค้า จำนวนเส้นทางศัตรูพืชยิ่งมีมากขึ้นโอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชจะยิ่งสูงขึ้นตามไปด้วย ควรจะมีการสังเกตเส้นทางศัตรูพืชที่ได้มีการบันทึกไว้สำหรับศัตรูพืชที่จะเข้าไปในพื้นที่ใหม่เส้นทางศัตรูพืชที่มีศักยภาพซึ่งยังไม่ปรากฏในปัจจุบันควรนำมาประเมินร่วมด้วย อีกทั้งข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืชกับสินค้านำเข้าอาจเป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่ศัตรูพืชชนิดหนึ่งอาจจะติดปะปนมากับเส้นทางศัตรูพืชหนึ่งและมีชีวิตรอดในขณะขนส่งและเก็บรักษา

2.2.2 โอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร (Probability of establishment)

การประเมินโอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร ควรมีข้อมูลด้านชีววิทยาของศัตรูพืชที่เชื่อ ถือได้ (วงจรชีวิต พืชอาศัย การแพร่ระบาด การอยู่รอด เป็นต้น) จากพื้นที่ซึ่งศัตรูพืชนั้นปรากฏอยู่ในปัจจุบัน สถานการณ์ในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสามารถนำมาเปรียบเทียบกับสภาพในพื้นที่ที่ศัตรูพืชนั้นปรากฏอยู่ในปัจจุบัน และใช้คำตัดสินใจของผู้เชี่ยวชาญมาประเมินโอกาสเข้ามาเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ของศัตรูพืช กรณีที่เคยเกิดมาแล้วในอดีตที่เกี่ยวข้องกันศัตรูพืชที่คล้ายคลึงกันสามารถนำมาพิจารณาด้วยเช่นเดียวกัน ตัวอย่างของปัจจัยที่ควรนำมาพิจารณา ได้แก่

- การมีพืชอาศัย จำนวนพืชอาศัยและการแพร่กระจายของพืชอาศัยในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช
- ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช
- ศักยภาพความสามารถในการปรับตัวของศัตรูพืช
- วิธีการมีชีวิตอยู่รอดของศัตรูพืช
- การปฏิบัติทางการเกษตรและมาตรการป้องกันกำจัด

ในการพิจารณาโอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวรและแพร่ขยายพันธุ์ของศัตรูพืชนั้นควรบันทึกไว้ด้วยว่าศัตรูพืชบางชนิดอาจปรากฏอยู่ในชั่วขณะหนึ่ง (ดู ISPM No.8 Determination of pest status in an area) แต่อาจจะไม่สามารถเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงได้ (เนื่องจากสภาพอากาศไม่เหมาะสม) แต่ว่าสามารถมีผลกระทบทางเศรษฐกิจในระดับที่ยอมรับไม่ได้ในภายหลังได้

2.2.3 โอกาสการแพร่ระบาดของศัตรูพืชหลังจากเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร (Probability of spread after establishment)

ศัตรูพืชชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการแพร่ระบาดอาจมีศักยภาพสูงในการเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ ดังนั้นความเป็นไปได้ในการควบคุมศัตรูพืชให้อยู่ในขอบเขตจำกัด และ/หรือกำจัดให้หมดสิ้นจึงค่อนข้างยากมาก และการตัดสินใจของผู้เชี่ยวชาญจะนำมาใช้ประเมินโอกาสการแพร่ระบาด กรณีตัวอย่างที่เคยเกิดมาแล้วกับศัตรูพืชที่คล้ายคลึงกันสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการพิจารณา ตัวอย่างของปัจจัยที่พิจารณา ได้แก่

- ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมในสภาพธรรมชาติและ/หรือ สภาพแวดล้อมที่จัดการสำหรับการแพร่ระบาดของศัตรูพืชโดยธรรมชาติ

- มีสิ่งกีดขวางโดยธรรมชาติ
- ศักยภาพสำหรับการเคลื่อนย้ายไปกับสินค้าหรือพาหนะขนส่ง
- ความตั้งใจที่จะนำสินค้าไปใช้ประโยชน์
- พาหะที่มีศักยภาพของศัตรูพืชในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช
- ศัตรูธรรมชาติที่มีศักยภาพของศัตรูพืชในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ข้อมูลเกี่ยวกับโอกาสการแพร่ระบาดของศัตรูพืช จะถูกนำมาใช้ประเมินศักยภาพความสำคัญทางเศรษฐกิจของศัตรูพืชที่อาจแสดงออกในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยง ศัตรูพืช ซึ่งนับว่ามีความสำคัญ หากศัตรูพืชชนิดนั้นเข้ามาและเจริญตั้งรกรากอย่างถาวรในพื้นที่ที่มีศักยภาพทางความสำคัญทางเศรษฐกิจต่ำและแพร่ระบาดไปในพื้นที่มีศักยภาพทางความสำคัญทางเศรษฐกิจสูง ยิ่งกว่านั้นอาจมีความสำคัญในขั้นตอนการจัดการความเสี่ยงเมื่อพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการควบคุมให้อยู่ภายใต้ขอบเขตหรือจำกัดศัตรูพืชให้หมดสิ้นไป

2.2.4 ข้อสรุปเกี่ยวกับโอกาสการเข้ามาเจริญตั้งรกรากอย่างถาวรและแพร่ระบาดของศัตรูพืช (Conclusion on the probability of introduction and spread)

ภาพรวมของโอกาสเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวรอาจแสดงข้อมูลในลักษณะเชิงปริมาณหรือเชิงคุณภาพ เนื่องจากผลลัพธ์ที่ออกมาในกรณีใดก็ตามเป็นการผสมผสานกันของข้อมูลเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ โอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชอาจแสดงในเชิงเปรียบเทียบกับข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชกับศัตรูพืชชนิดอื่น

2.3 การประเมินผลทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้น (Assessment of potential economic consequence)

ในขั้นตอนนี้ระบุว่าข้อมูลต่างๆ ที่สัมพันธ์กันของศัตรูพืชและพืชที่มีศักยภาพเป็นพืชอาศัยต้องเอามารวมกัน และระดับการวิเคราะห์ผลกระทบทางเศรษฐกิจทั้งทางตรงและทางอ้อม ซึ่งอาจดำเนินการโดยใช้ข้อมูลนั้นเพื่อประเมินผลกระทบทุกด้านของศัตรูพืช เช่น ศักยภาพของผลที่ตามมาทางเศรษฐกิจ ควรจะมีข้อมูลเชิงปริมาณซึ่งจะให้รายละเอียดมูลค่าที่เป็นเงิน สำหรับข้อมูลเชิงคุณภาพอาจจะใช้ได้เช่นเดียวกัน การปรึกษาหารือกับนักเศรษฐศาสตร์อาจจะเป็นประโยชน์อย่างมาก มีหลายกรณีที่การวิเคราะห์ในรายละเอียดเกี่ยวกับการประเมินผลที่เกิดขึ้นตามมาทางเศรษฐกิจซึ่งคาดว่าจะเกิดขึ้นอาจไม่มีความจำเป็นถ้ามีหลักฐานเพียงพอหรือเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางทั่วไปแล้วว่าการเข้ามาของศัตรูพืชชนิดหนึ่งนั้นจะก่อให้เกิดผลทางเศรษฐกิจตามมาในระดับที่ไม่สามารถยอมรับได้ ในเบื้องต้นจะมุ่งเน้นพิจารณาเกี่ยวกับโอกาสการเข้ามาเจริญตั้งรกรากอย่างถาวรและแพร่ระบาด อย่างไรก็ตามมีความจำเป็นต้องตรวจสอบปัจจัยทางเศรษฐกิจด้วยเมื่อระดับของผลที่จะเกิดขึ้นตามมาทางเศรษฐกิจยังเป็นที่สงสัย หรือเมื่อระดับของผลที่ตามมาทางเศรษฐกิจทำให้ต้องประเมินความเข้มแข็งของมาตรการที่ใช้ในการจัดการกับความเสี่ยง หรือในการประเมินต้นทุนกำไรในการกำจัดหรือการควบคุมศัตรูพืชไม่ให้เข้ามา

2.4 ระดับความไม่แน่นอน (degree of uncertainly)

การประเมินโอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชและผลที่ตามมาทางด้านเศรษฐกิจจะมีปัจจัยที่ไม่แน่นอนเข้ามาเกี่ยวข้องจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นการประเมินที่นอกเหนือจากสภาพซึ่งศัตรูพืชเกิดระบาดตามสภาพทางทฤษฎีในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช จึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องบันทึกไว้เป็นหลักฐานเกี่ยวกับปัจจัยที่ไม่แน่นอนและระดับของความไม่แน่นอนที่เข้ามาเกี่ยวข้องในการประเมินและเพื่อแสดงให้เห็นถึงการนำคำตัดสินของผู้เชี่ยวชาญมาใช้ ทั้งนี้เป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้เกิดความโปร่งใสและอาจจะมีประโยชน์สำหรับการจำแนกและการจัดลำดับความต้องการในการวิจัยต่อไป

2.5 ข้อสรุปของการประเมินความเสี่ยงของศัตรูพืช (Conclusion of the pest risk assessment stage)

ผลที่ได้จากการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชจะได้ชนิดของศัตรูพืชที่จำแนกประเภทแล้วบางชนิดหรือทั้งหมด และอาจจะถูกนำมาพิจารณาเกี่ยวกับการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชให้เหมาะสม รวมทั้งพื้นที่บางส่วนหรือทั้งหมดของพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชอาจกำหนดเป็นพื้นที่ที่มีปัจจัยสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ของศัตรูพืชจนทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่สำคัญ การประเมินโอกาสเชิงคุณภาพหรือเชิงปริมาณของการนำเข้ามาของศัตรูพืชชนิดหนึ่งหรือหลายชนิด และการประเมินผลที่ตามมาทางเศรษฐกิจ (รวมทั้งผลต่อสภาพแวดล้อม) จะต้องจัดทำไว้เป็นหลักฐานเอกสาร รวมทั้งความไม่แน่นอนที่เกิดร่วมอยู่ด้วย จะต้องนำมาใช้ในขั้นตอนการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช

ขั้นตอนที่ 3: การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest risk management)

ขั้นตอนนี้เกี่ยวข้องกับการกำหนดมาตรการทางเลือกสำหรับการจัดการความเสี่ยง ทั้งนี้เพื่อลดความเสี่ยงที่ระบุในขั้นตอนที่ 2 โดยที่ข้อสรุปจากการประเมินความเสี่ยงจะถูกนำมาใช้ประกอบการตัดสินใจว่าจำเป็นหรือไม่ที่ต้องจัดการความเสี่ยงและมาตรการที่ใช้จัดการความเสี่ยงจะมีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะใช้หรือไม่ หลักการจัดการความเสี่ยงนั้นจะต้องคำนึงถึงประเด็น ดังนี้

3.1.ระดับความเสี่ยง (Level of risk) จะใช้หลักการจัดการความเสี่ยงให้อยู่ในระดับที่มีระดับที่เหมาะสมซึ่งสามารถยอมรับได้ (Appropriate Level of acceptable; ALOP) หรือระดับความเสี่ยงที่สามารถยอมรับได้ (acceptable)

3.2.ข้อมูลวิชาการประกอบการพิจารณาจัดการความเสี่ยง โดยดูจากข้อมูลที่รวบรวมได้

3.3.การยอมรับความเสี่ยง (Acceptable of risk) นำผลของการประเมินความเสี่ยงนับตั้งแต่การเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร การแพร่ระบาด และผลกระทบต่อเศรษฐกิจที่แสดงความเสี่ยงว่าไม่สามารถยอมรับได้นั้นมาจัดการจำแนกมาตรการสุขอนามัยพืชเพื่อลดความเสี่ยงลงให้ถึงระดับต่ำสุดที่ยอมรับได้

3.4.จำแนกและคัดเลือกวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการลดโอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร และแพร่ระบาดของศัตรูพืชที่เหมาะสม มีเหตุผลภายใต้ข้อจำกัดเกี่ยวกับวิธีการที่สามารถดำเนินการได้ในการจัดการความเสี่ยง มาตรการสุขอนามัยพืชที่นำมาใช้ควรให้ผลแน่นอนและมีความเป็นไปได้ในทางปฏิบัติเหมาะสมกับรูปแบบและแหล่งกำเนิดสินค้าที่เป็นพืชอาศัยหรือพาหะ โดยไม่เป็นอุปสรรคขัดขวางการค้าในแง่จำกัดการนำเข้าสินค้าโดยไม่มีเหตุผล บางกรณีอาจต้องนำมาตรการสุขอนามัยพืชมากกว่าสองมาตรการมาใช้เพื่อลดความเสี่ยงจนถึงระดับที่ยอมรับได้ มาตรการสุขอนามัยพืชที่มีการนำมาใช้ในปัจจุบัน สามารถแบ่งได้ตามสถานภาพของศัตรูพืชในเส้นทางศัตรูพืช ณ ประเทศต้นทาง ประกอบด้วยมาตรการ ดังต่อไปนี้

- มาตรการที่ใช้กับสินค้าโดยตรง
- มาตรการที่ใช้เพื่อป้องกันหรือลดปริมาณการเข้าทำลายของศัตรูพืชในแหล่งผลิต
- มาตรการที่ใช้เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นว่าในพื้นที่ผลิตหรือแหล่งผลิตปราศจากศัตรูพืช
- มาตรการห้ามนำเข้าสินค้า

มาตรการทางเลือกอื่นอาจเกิดขึ้นจากพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (จำกัดการใช้ประโยชน์จากสินค้า) มาตรการป้องกันกำจัด การนำเข้าชีวินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช การกำจัดให้หมดสิ้นไป และการควบคุมการระบาดให้อยู่ในขอบเขตจำกัด มาตรการเหล่านี้จะถูกประเมินและนำมาใช้เฉพาะกรณีที่ศัตรูพืชพบระบาดอยู่ก่อนแล้วในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชแต่ระบาดอยู่ในขอบเขตจำกัด

3.5.การรับรองสุขอนามัยพืช (Phytosanitary certificate) โดยการรับรองสุขอนามัยพืช ว่าสินค้าปราศจากศัตรูพืชกักกันซึ่งกำหนดโดยประเทศผู้นำเข้า และเป็นไปตามข้อกำหนดด้านสุขอนามัยพืชของประเทศนำเข้า ซึ่งเป็นการยืนยันว่าได้มีการจัดการความเสี่ยงตามที่กำหนด รวมทั้งอาจกำหนดให้ระบุข้อความเพิ่มเติม (additional declaration) เพื่อแสดงให้เห็นว่าได้มีการดำเนินมาตรการสุขอนามัยพืชเป็นการเฉพาะ นอกจากนี้มาตรการอื่นอาจนำมาใช้ร่วมกันตามที่ได้มีการทำความตกลงแบบทวิภาคี หรือพหุภาคี (bilateral or multilateral agreement)

3.6 .บทสรุปการจัดการความเสี่ยง

ผลที่ได้รับจากขบวนการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช อาจจะพบว่าไม่มีมาตรการซึ่งได้รับการพิจารณาแล้วว่าเหมาะสม หรือมีการเลือกวิธีการจัดการความเสี่ยงวิธีหนึ่งหรือหลายวิธีการซึ่งพบว่าสามารถทำให้ความเสี่ยงซึ่งเกิดร่วมกับศัตรูพืชลดต่ำจนอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ วิธีการจัดการความเสี่ยงเหล่านี้จะอยู่บนพื้นฐานของกฎระเบียบหรือข้อกำหนดด้านสุขอนามัยพืช

เวลาและสถานที่

เวลา: ตุลาคม 2555 - กันยายน 2557

สถานที่: กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของแคนตาลูปและศัตรูพืชของแคนตาลูปที่จะดำเนินการวิเคราะห์

แคนตาลูป(Cantaloupe) มีอนุกรมวิธาน ดังนี้

Phylum: Spermatophyta

Subphylum: Angiospermae

Class: Dicotyledonae

Order: Violales

Family: Cucurbitaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

แคนตาลูป (Cantaloupe) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า ชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cucumis melo* var. *cantalupensis* (Syn. *Cucumis melo* var. *reticulotus Naudin*.) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae แตงเช่นเดียวกับ แตงกวา แตงโท มะระ แคนตาลูปหรือที่เรียกกันในชื่ออื่น เช่น แตงฝรั่ง แตงเทศ มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา ชนิดที่ปลูกกันมากและเป็นที่รู้จักกันดี แบ่งออกตามลักษณะการมีร่างแหหรือขึ้นลายที่ผิวของผลได้ 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีร่างแหที่ผิวของผล และชนิดที่มีผิวเรียบ

ราก : เป็นระบบรากแก้ว อาจจะเจริญในแนวดิ่งลึก 1 เมตร รากแขนงจะเจริญในแนวนอนอยู่อย่างหนาแน่นในระดับ 30 เซนติเมตรจากผิวดิน ปกติรากจะยาวมากกว่าเถา รากแขนงบางส่วนอาจ จะเจริญในแนวดิ่ง ซึ่งจะช่วยทดแทนรากแก้วเมื่อพืชเริ่มแก่ ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมรากพิเศษจะเจริญจากข้อ ที่สัมผัสดินและมีความชื้นสูง

ลำต้น : เป็นไม้เนื้ออ่อน มีขนอ่อนที่ผิวของลำ ต้น ผิวเรียบหรือเป็นเหลี่ยม เถายาวประมาณ 3.0 เมตร แตกแขนงตามมุมระหว่างก้านใบและลำ ต้น ส่วนข้อจะมีมือเกาะ

ใบ : เป็นแบบใบเดี่ยวอยู่สลับกัน ใบหยักแบบใบปาล์มยาว 6 - 20 ซม. โดยทั่วไปจะมี 5 หยัก แต่ในบางพันธุ์จะมีหยักตื้น ๆ 3 - 7 หยัก ใบมีขน ผิวใบหยาบ กว้าง 7 - 30 ซม.

ดอก : อาจจะเป็นดอกสมบูรณ์ (perfect or complete flower) หรือ ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกกันแต่อยู่บนต้นเดียวกัน (monoecious) หรือ มีดอกตัวผู้ และดอกกระเทย แยกกันแต่อยู่บนต้นเดียวกัน (andromonoecious) ดอกกว้าง 1.5 - 2.0 เซนติเมตร ประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 5 กลีบ และกลีบดอกสีเหลือง 5 กลีบ ดอกตัวเมียส่วนใหญ่จะเจริญในข้อแรกของกิ่งแขนง สายพันธุ์ที่มีผลทรงกลมยาว ส่วนใหญ่จะมีดอกตัวเมียและดอกตัวผู้แยกกัน แต่อยู่บนต้นเดียวกัน (monoecious) สายพันธุ์ที่มีผลทรงกลม มีดอกตัวผู้และดอกกระเทยแยกกันแต่อยู่บนต้นเดียวกัน (andromonoecious) ดอกจะบานตอนเช้าและปิดตอนบ่าย

ผล : มีขนาดใหญ่ รูปร่างกลมหรือกลมรี ผิวผลมี สีเหลือง หรือขาว หรือเขียว เปลือกค่อนข้างแข็งไม่เรียบ เนื้อใยสีขาวนวลหรือสี เหลืองอมส้ม รสหวานหอม มีเมล็ดแบน ๆ ขนาดเล็กจำนวนมาก

การจำแนกแตงหอม (นิพนธ์, 2557)

1. *C. melo* var. *cantaloupensis* เรียกว่า Cantaloupe ผลมีขนาดปานกลาง ผิวแข็ง ขรุขระ มีพูลึกชัดเจน ผิวมีลายแตก เนื้อสีส้มหรือเขียว เช่น พันธุ์ SHALANTE

2. *C. Melo* var. *reticulatus* Naudin เรียกว่า Muskmelon, aromatic melon, persian melon หรือ netted melon ผลมีขนาดเล็ก ผิวขรุขระมีลายนูนขึ้นมาแบบตาข่ายแต่จะนูนขึ้นมาเพียงเล็กน้อย สีเขียวหรือเขียวปนเหลือง ปลูกมากในสหรัฐอเมริกา และญี่ปุ่น เช่นพันธุ์ Bonus, Sky rocket, Delicate, PMR 45, PMR 5, PMR 6 SR 91, Hale's Best 36, Hale's best 936

3. *C. melo* var. *inodorus* Naudin เรียกว่า white skinned melons , Casaba melon, Crenchaws หรือ Honey dew ผิวเรียบ อายุการเก็บเกี่ยวช้า สามารถเก็บรักษาได้นาน 1 เดือน หรือนานกว่าทนทานต่อการขนส่ง เช่น พันธุ์ Honey Dew, Honey Ball, Honey Drip, Sister Star.

4. *C. melo* var. *flexuosus* Naudin เรียกว่า Snake melon ผลจะเล็กเรียบขาว เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 - 2 นิ้ว ผลอาจจะตรง หรือโค้งยาว 13.5 นิ้ว ผิวเรียบ สามารถเก็บเกี่ยวผลอ่อนเพื่อใช้แทนแตงกวาหรือใช้ดอง

5. *C. melo* var. *conomon* (Thunb.) Makino. เรียกว่า Pickling melon ผลมีขนาดเล็ก ค่อนข้างยาว ผิวเรียบมีหลายสี ผลนิ่ม เนื้อสีขาว หรือสีน้ำตาลปนขาว เมื่อสุก เถาขนาดใหญ่ ใบสีเขียวเข้มเช่นพันธุ์ White Skin,Green Skin, Black Skin, Katsura Giant, Green Strip, Numame Early

6. *C. melo* var. *chito* Naudin เรียกว่า mango melon ผลมีขนาดเล็ก ผิวเรียบ มีหลายสี เนื้อมี รสเปรี้ยวส่วนมากจะใช้สำหรับประดับ ในบางแห่งจะใช้ดอง

7. *C. molo* var. *dudaim* Naudin เรียกว่า Pomegranate melon ผลขนาดเล็กเท่าผลส้ม เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 นิ้วลักษณะผลกลมหรือรูปไข่ อายุเก็บเกี่ยวสั้น กลิ่นคล้ายโคลน เถามีขนาดเล็ก ปลูกมากใน Louisiana และ Texas พันธุ์ Golden Crispy, Golden Beauty, Golden Charm.

สภาพอากาศ

สภาพอากาศที่เหมาะสมสำ หรับแตงเทศ คือ สภาพอากาศอบอุ่น มีแสงพอเพียง ความชื้นสัมพัทธ์ต่ำติดต่อกัน 80-120 วัน การปลูกในสภาพที่มีแสงไม่พอเพียง มีเมฆปกคลุม หรือมีฝนตกติดต่อกันหลายๆ วัน จะทำ ให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับโรคทางใบ การเจริญของดอกและการติดผล อุณหภูมิที่ต่ำเกินไป จะทำ ให้ชะงักการเจริญเติบโต อุณหภูมิสูง จะทำให้ดอกตัวเมียไม่เจริญหรือมีปัญหาในการผสม ดอกจะเหลือง และร่วง อุณหภูมิที่เหมาะสมสำ หรับการงอกของเมล็ดคือ 28- 30 องศาเซลเซียส ควรรักษาอุณหภูมิให้คงที่เพื่อให้เมล็ดงอกสม่ำเสมอ อุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของต้นกล้าในเวลากลางวันอยู่ระหว่าง 21.1 - 23.9 องศาเซลเซียส และกลางคืน 15.6 - 18.3 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสำหรับการเจริญเติบโตที่เหมาะสมคือ 15.6 - 18.3 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการเจริญคือ 15.6 องศาเซลเซียส ส่วนสูงที่สุดคือ 32.2 องศาเซลเซียส

แคนตาลูปดินที่ใช้ปลูกควรเป็นดินร่วนปนทรายซึ่งระบายน้ำได้ดี มีความเป็นกรด-ด่าง อยู่ระหว่าง 6.0-6.8 ซึ่งอยู่ในตระกูลเดียวกันกับแตงไทย เป็นพืชล้มลุกประเภทไม้เลื้อย จัดเป็นผลไม้ชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยม และมีเสน่ห์อยู่ไม่น้อยสำหรับคนไทย แม้ว่าจะเพิ่งเข้ามาในเมืองไทยเมื่อประมาณ 20 กว่าปีที่ผ่านมา เนื่องจากมีเนื้อหนา เนื้อมีสีส้มสวย มีกลิ่นหอม และมีรสหวาน ชนิดที่ปลูกกันมากและเป็นที่รู้จักกันดี แบ่งออกตามลักษณะการมีร่างแหหรือขึ้นลายที่ผิวของผลได้ 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีร่างแหที่ผิวของผล และชนิดที่มีผิวเรียบ

ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปหรือแตงเทศจากต่างประเทศ ได้แก่ กัวเตมาลา จีน ญี่ปุ่น ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ เม็กซิโก สหรัฐอเมริกา อินเดีย อินโดนีเซีย อิสราเอล ฮ่องกง ฮอนแลนด์ และในปี 2554 มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปจากสหรัฐอเมริกาปริมาณ 119.55 กิโลกรัม มูลค่าประมาณ 1,723,910.25 บาท (สมาคมการค้าเมล็ดพันธุ์, 2554) ในสหรัฐอเมริกามีการปลูกแคนตาลูปมากกว่า 7,500 ราย พื้นที่มากกว่า 100,000 เอเคอร์ มีการผลิตแคนตาลูปตลอดทั้งปี ส่วนใหญ่ผลิตในแคลิฟอร์เนีย, แอริโซนา, เท็กซัส แคนตาลูปมีด้วยกันหลายพันธุ์ที่นิยมปลูก ได้แก่ Gold star, Burpee hybrid, Summet, Santa claus, Honeydews

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืช

การสุ่มเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา จำนวน 21 ครั้ง ไม่ปรากฏพบศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์แคนตาลูป และการสำรวจศัตรูพืชในแปลงปลูกขยายเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปที่นำเข้าจากอเมริกา ของบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ ในจังหวัดมหาสารคาม อำเภอเชียงยืน จำนวน 4 แปลง ไม่ปรากฏลักษณะอาการผิดปกติ

3. การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

3.1 การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 1: Initiating the PRA Process)

ปัจจุบันตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติม โดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) 2551 ทำให้สถานะของพืชมีการเปลี่ยนแปลง เป็นสิ่งต้องห้ามสิ่งกำกัด และสิ่งไม่ต้องห้ามในการนำเข้า การควบคุมให้เป็นสิ่งต้องห้ามสิ่งกำกัด หรือสิ่งไม่ต้องห้ามนั้นต้องอาศัยการวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชเช่นกัน ซึ่งการดำเนินงานด้านกักกันพืชมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อป้องกันหรือลดโอกาสไม่ให้ศัตรูพืชหรือศัตรูพืชกักกันเข้ามา ตั้งรกราก และแพร่กระจายในแหล่งใหม่ การกำจัดให้หมดสิ้นไป หรือควบคุมถ้าศัตรูพืชนั้นก่อให้เกิดความเสียหาย

ดังนั้นจึงต้องดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเพื่อให้ทราบชนิดของศัตรูพืชที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์แคนตาลูป เพื่อวางมาตรการทางสุขอนามัยพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งสินค้าที่มีปริมาณนำเข้ามากและมีความเสี่ยงสูงที่จะมีศัตรูพืชเล็ดลอดติดเข้ามา เนื่องจากเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปจากสหรัฐอเมริกาจัดเป็นสิ่งกำกัด การนำเข้าต้องนำเข้าทางด่านตรวจพืช ต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชเท่านั้น ในการศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปนำเข้าจากสหรัฐอเมริกาก็

เพื่อกำหนดชนิดของศัตรูพืชกักกัน และมาตรการสุขอนามัยพืชให้เหมาะสม ซึ่งนำไปสู่การแก้ไขปรับปรุงกฎระเบียบต่างๆให้รัดกุมยิ่งขึ้น โดยไม่ขัดแย้งกับข้อตกลงระหว่างประเทศ

3.2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest Risk Assessment)

การจัดกลุ่มศัตรูพืช (Pest Categorization)

ผลจากการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชของแคนตาลูปที่พบในไทย รวม 73 ชนิด สามารถจัดลำดับศัตรูพืชได้ดังนี้คือ เป็นแมลง 26 ชนิด ไร 3 ชนิด หอยทาก 1 ชนิด แบคทีเรีย 4 ชนิด รา 24 ชนิด ไวรัส 4 ชนิด ไมโครพลาสมา 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 8 ชนิด วัชพืช 2 ชนิด และพบศัตรูพืชของแคนตาลูปที่มีในสหรัฐอเมริกา จำนวน 136 ชนิด สามารถจัดลำดับศัตรูพืชได้ดังนี้คือ เป็นแมลง 42 ชนิด ได้แก่ *Acalymma vittatum*, *Aleurodicus disperses*, *Anasa tristis*, *Aphis fabae*, *Aphis gossypii*, *Atherigona orientalis*, *Bactrocera cucurbitae*, *Bactrocera dorsalis*, *Chrysodeixis eriosoma*, *Diabrotica balteata*, *Diabrotica barberi*, *Diabrotica undecimpunctata*, *Diaphania hyalinata*, *Diaphania indica*, *Diaphania nitidalis*, *Empoasca abrupt*, *Empoasca fabae*, *Eudocima fullonia*, *Frankliniella occidentalis*, *Hercinothrips femoralis*, *Helicoverpa zea*, *Leptoglossus gonagra*, *Liriomyza huidobrensis*, *Liriomyza bryoniae*, *Liriomyza sativae*, *Liriomyza trifolii*, *Myzus persicae*, *Nesidiocoris tenuis*, *Nezara viridula*, *Oryzaephilus Mercator*, *Pantomorus cervinus*, *Peridroma saucia*, *Parabemisia myricae*, *Phyllophaga*, *Pseudococcus jackbeardsleyi*, *Spodoptera exigua*, *Spoladea recurvalis*, *Thrips palmi*, *Thrips tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Trichoplusia ni*, *Uroleucon ambrosiae*, หอยทาก 1 ชนิด ได้แก่ *Lissachatina fulica* ไร 4 ชนิด ได้แก่ *Petrobia lateens*, *Tetranychus cinnabarinus*, *Tetranychus pacificus*, *Tetranychus urticae* แบคทีเรีย 13 ชนิด ได้แก่ *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli*, *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia chrysanthemi* pv. *Chrysanthemi*, *Erwinia tracheiphila*, *Pantoea ananatis*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*, *Pseudomonas viridiflava*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhodococcus fascians*, *Xanthomonas cucurbitae* รา 40 ชนิด ได้แก่ *Acremonium cucurbitacearum*, *Alternaria alternate*, *Alternaria brassicae*, Alternaria brassicicola, Alternaria cucumerina, Aspergillus niger, *Cercospora melonis*, *Chalara elegans*, *Choanephora ucurbitarum*, *Cladosporium cucumerinum*, *Cochliobolus lunatus*, *Colletotrichum orbiculare*, *Corynespora cassiicola*, *Curvularia lunata*, *Didymella bryoniae*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, *Fusarium pallidoroseum*, *Gibberella intricans*, *Gibberella pulicaris*, *Glomerella cingulata*, *Golovinomyces orontii*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Leveillula taurica*, *Macrophomina phaseolina*, *Monosporascus cannonballus*, *Myrothecium roridum*, *Nectria*

haematococca, *Peronospora parasitica*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora cryptogea*, *Podosphaera xanthii*, *Pseudoperonospora cubensis*, *Pythium splendens*, *Rhizopus stolonifer*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Thanatephorus cucumeris*, *Verticillium dahlia* ไวรัส 18 ชนิด ได้แก่ *Alfalfa mosaic virus*, *Beet curly top virus*, *Clover yellow vein virus*, *Cucurbit aphid born yellows virus*, *Cucumber green mottle mosaic virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Cucumber yellow stunting disorder virus*, *Lettuce infectious yellows virus*, *Melon necrotic spot virus*, *Papaya ringspot virus*, *Squash leaf curl virus*, *Squash mosaic virus*, *Squash vein yellowing virus*, *Tobacco ringspot virus*, *Tomato ringspot virus*, *Watermelon mosaic virus*, *Zucchini yellow mosaic virus*, *Zucchini green mottle mosaic virus* ไมโครพลาสมา 1 ชนิด ได้แก่ *Aster yellow mycoplasma* ไส้เดือนฝอย 10 ชนิด ได้แก่ *Belonolaimus longicaudatus*, *Ditylenchus dipsaci*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Helicotylenchus pseudorobustus*, *Longidorus*, *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Pratylenchus coffeae*, *Rotylenchulus reniformis* วัชพืช 6 ชนิด ได้แก่ *Cirsium arvense*, *Digitaria ciliaris*, *Heliotropium europaeum*, *Orobanche ramose*, *Passiflora foetida*, *Salsola vermiculata* และสัตว์มีกระดูกสันหลัง 1 ชนิด ได้แก่ *Sigmodon hispidus*

การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Risk Assessment)

การจัดประเภทศัตรูพืชของแคนตาลูปที่จะวิเคราะห์ พบว่ามีศัตรูพืชกักกันที่มีโอกาสติดมากับเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา ได้แก่ ไวรัส *Alfalfa mosaic virus*, *Cucumber green mottle mosaic virus*, *Melon necrotic spot virus*, *Squash mosaic virus* และ *Tobacco ringspot virus*

3.3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest Risk Management)

จากผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา ต้องมีมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกัน โดยเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าต้องปราศจากแมลงที่มีชีวิต ดิน ทราย วัชพืช ชิ้นส่วนของพืช เช่น ใบ ก้าน เศษซากพืช และสิ่งอื่นใดที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน ต้องมาจากแหล่งที่ปลอดจากศัตรูพืชกักกัน และต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชที่ระบุข้อความเพิ่มเติมว่าเมล็ดพันธุ์ต้องมาจากต้นพ่อแม่ที่ได้รับการตรวจสอบในระยะการเจริญเติบโตหรือได้รับการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการว่าปลอดจากศัตรูพืชกักกัน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เมล็ดพันธุ์แคนตาลูปที่นำเข้าในปี 2554 จากสหรัฐอเมริกามีปริมาณ 119.55 กิโลกรัม มูลค่าประมาณ 1,723,910.25 บาท ในสหรัฐอเมริกามีการปลูกแคนตาลูปมากกว่า 7,500 ราย พื้นที่มากกว่า 100,000 เอเคอร์ มีการผลิตแคนตาลูปตลอดทั้งปี ส่วนใหญ่ผลิตใน แคลิฟอร์เนีย, แอริโซนา, เท็กซัส แคนตาลูปมีด้วยกันหลายพันธุ์ที่นิยมปลูก ได้แก่ Gold star, Burpee hybrid, Summet, Santa claus, Honeydews

การรวบรวมข้อมูลศัตรูพืช ได้รายชื่อศัตรูแคนตาลูปที่มีรายงานศัตรูพืชที่มีในสหรัฐอเมริกา จำนวน 136 ชนิด สามารถจัดลำดับศัตรูพืชได้ดังนี้คือ เป็นแมลง 42 ชนิด หอย 1 ชนิด ไร 4 ชนิด แบคทีเรีย 13 ชนิด รา 40 ชนิด ไวรัส 18 ชนิด ไมโครพลาสมา 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 10 ชนิด วัชพืช 6 ชนิด สัตว์มีกระดูกสันหลัง 1 ชนิด

การจัดประเภทศัตรูพืชของแคนตาลูปที่จะวิเคราะห์ พบว่ามีศัตรูพืชกักกันที่มีโอกาสติดมากับเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา ได้แก่ ไวรัส *Alfalfa mosaic virus*, *Cucumber green mottle mosaic virus*, *Melon necrotic spot virus*, *Squash mosaic virus* และ *Tobacco ringspot virus* ซึ่งศัตรูพืชมีโอกาสติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปโดยการปนเปื้อนเข้ามากับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อผลิตผลทางการเกษตร รวมทั้งการส่งออกพืชผักไปยังประเทศที่ไม่มีการระบาดของเชื้อสาเหตุโรคเหล่านี้ ดังนั้นการนำเข้าเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปจากสหรัฐอเมริกาต้องมีมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกัน โดยเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าต้องปราศจากแมลงที่มีชีวิต ดิน ทราย วัชพืช ชิ้นส่วนของพืช เช่น ใบ ก้าน เศษซากพืช และสิ่งอื่นใดที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน ต้องมาจากแหล่งที่ปลอดจากศัตรูพืชกักกัน และต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชที่ระบุข้อความเพิ่มเติมว่าเมล็ดพันธุ์ต้องมาจากต้นพ่อแม่ที่ได้รับการตรวจสอบในระยะการเจริญเติบโตหรือได้รับการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการว่าปลอดจากศัตรูพืชกักกัน

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2543. **คู่มือ พืชสวนเศรษฐกิจ.** กองส่งเสริมพืชสวน. กรมส่งเสริมการเกษตร กรุงเทพฯ. 314 หน้า.

นิพนธ์ ไชยมงคล. 2557. **แตงหอม.** (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.agric-prod.mju.ac.th/vegetable/File_link/melon.pdf

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2553. **ข้อมูลสถิติ 2550-2553**. สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://as.doa.go.th/ard/stat2.php?cat=4

สมาคมการค้าเมล็ดพันธุ์. 2554. **ปริมาณและมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุม ประจำปี 2553.** (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.thasta.com/statistics.asp

Anonymous. 2006. Phytosanitary Principles for the protection of plants and the application of phytosanitary measures in international trade.

Ali, A., O. Abdalla, B. Bruton, W. Fish, W. Sikora, S. Zhang, and M. Taylor. 2012. **Occurrence of viruses infecting watermelon, other cucurbits, and weeds in the parts of southern United States.** Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2012-0824-01-RS. (Online). Available. http://www.nationalwatermelonassociation.com/pdfs/Occurrence%20Of%20Viruses%20Infecting%20Watermelon.pdf

Alvarez, M. and R.N. Campbell. 1978. Transmission and distribution of *Squash mosaic virus* in seeds of cantaloupe. **Phytopathology** 68(3): 257-263. (Online). Available. http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/19 78 Articles/Phyto68n03_257.pdf

Antignus, Y., M. Pearlsman, R. Ben-Yoseph and S. Cohen.1990. Occurrence of a variant of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Israel. **Phytoparasitica** 18(1): 50-56.

Blancard, D., H. Lecoq and M. Pitrat. 1994. **A colour Atlas of Cucurbit Diseases : observation, Identification and Control**. Manson publishing, France. 229 pp.

Babadoost, M. 1999. **Mosaic Diseases of Cucurbits. Report on Plant Disease**. Extension Specialist in Fruit and Vegetable Pathology, Department of Crop Sciences, University of Illinois, Urbana-Champaign. (Online). Available. web.aces.uiuc.edu/vista /pdf_pubs/926.pdf

CABI (CAB International). 2007. **Crop Protection Compendium** (CD-ROM). CAB International, Walling ford, UK.

CABI (CAB International). 2014. **Crop Protection Compendium**. (Online). Available. http://www.cabi.org/cpc/ (May 11, 2012)

Campbell, R.N., C. Wipf-Scheibel and H. Lecoq. 1996. Vector-assisted seed transmission of *Melon necrotic spot virus* in melon. **Phytopathology** 86 (12): 1294-1298.

Chu, P.G.W. 1984. **Plant Viruses Online**. ***Tobacco ringspot nepovirus.*** (Online). Available. http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr809.htm

Duffus, J.E. and S. Molyneux. 1986. **Plant Viruses Online**. ***Lettuce infectious yellows virus.*** (Online). Available. http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr439.htm

EPPO/CABI. (1996). *Lettuce infectious yellows closterovirus*. In Quarantine pests for Europe (Second Edition). Smith, I. M., McNamara, D.G.,Scott, P.R. and Holderness, M. (Eds). CAB International: Wallingford (UK).

FAO. 2014. **ISPM 11: Pest risk analysis for quarantine pests (2013).** FAO, Rome.

Fletcher, J.T., A.J. George and D. E. Green. 1969. *Cucumber green mottle mosaic virus*, its effect on yield and its control in the Lea valley, England. **Plant Pathology** 18(1): 16-22.

Francki, R.I.B. 1988. **Plant Viruses Online. *Cucumber green mottle mosaic tobamovirus*.** (Online). Available. http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr265.htm

Gonzales-Garza, R., D.J. Gumpf, A.N. Kishaba and G.W. Bohn. 1979. Identification, seed transmission and host range pathogenicity of a California isolate of *Melon necrotic spot virus*. **Phytopathology** 69(4): 340-345.

Herrera-Vasquez. A, M.C.Córdoba-Sellés, M.C. Cebrián, A. Alfaro-Fernández and C. Jordá. 2009. Seed transmission of *Melon necrotic spot virus* and efficacy of Seed - disinfection treatments. **Plant Pathology** 58(3): 436-442.

Hollings, M., Y. Komuro and H. Tochihara. 1975. ***Cucumber green mottle mosaic virus***. Descriptions of Plant Viruses, No. 154, October 1975. (Online). Available. http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=154. (April 6, 2014)

Lecoq, H., J.P. Piquemal, M.J. Michel and D. Blancard. 1988. Virus de la mosaique de la courge: une nouvelle menace pour les cultures de melon en France? [*Squash Mosaic Virus*: SqMV].[*Squash mosaic virus*: a new threat to melon crops in France? [*Squash Mosaic Virus*: SqMV]].PHM Revue Horticole, INRA: Paris, 289, 25-30.

ShiMing, L., L. FuRong, C. Qing and C. 2012. **Plant Quarantine (Shanghai)**. pp. 52-61.

Messiaen, C. M., D. Blancard, R. Rouxel and R. Lafon (Eds). 1991. **Les Maladies des Plantes Maraîchères.** (3ème édition). INRA: Paris,France. 552 pp.

Reuveni, R., A. Nachmias and J. Krikun. 1983. The role of seedborne inoculum on The development of *Macrophomina phaseolina* on melon. **Plant Disease** 67(3): 280-281.

Shila S.J., M.R. Islam, N.N. Ahmed, K.M.G. Dastogeer and M.B. Meah. 2013. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* associated with the seeds of Cucurbits. **Universal Journal of Agricultural Research** 1(1): 1-8.

Sontirat, P., P. Phitakpaiwan, T. Kamhangridthirong, W. Choobumroong and U. Kueprakone. 1999. **Host Idex of Plant Diseases in Thailand**.

Thummabenjapone, P. 2009. **Important Plant Diseases in Seed production Field for Export: Cucurbitaceae Plant Diseases**. (Online). Available. http://library.stks. or.th:8080/ dspace/handle/123456789/12462 (February 23, 2011)

Tian, T.; K. Posis, C. J. Maroon-Lango, V. Mavrodieva, S. Haymes, T. L. Pitman, B.W.Falk. 2014. American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul, USA. **Plant Disease** 98(8): 1163-1164.

Ugaki, M., M. Tomiyama, T. Kakutani, S. Hidaka, T. Kiguchi, R.Nagata, T.Sato, F. Motoyoshi and M.Nishiguchi. 1991. The complete nucleotide sequence of *Cucumber green mottle mosaic virus* (SH strain) genomic RNA. **Journal of General Virology** 72: 1487-1495. (Online). Available. http://vir.sgmjournals.org/content/72/7/1487.full.pdf)

Zitter, T.A., D.L. Hopkins and C.E. Thomas (Eds). 1996. **Compendium of Cucurbit Diseases**. American Phytopathological Society (APS Press): St. Paul, Minnesota (USA). 120 pp.

Table 1 Pests associated with cantaloupe seeds (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*) in Thailand and USA (Cont.)

Order	Family	Scientific name	Common name	Plant part attacked	TH	USA	References	Consider further
MITES AND SPIDERS								
Acariformes	Tetranychidae	*Petrobia latens*	brown wheat mite, stone mite	leaf, inflorescence, **seed**	No	Yes	CABI,2014	Yes
INSECTA								
Lepidoptera	Noctuidae	*Helicoverpa zea*	American cotton bollworm	fruit, growing points, inflorescence, leaf, **seed**	No	Yes	CABI, 2014	Yes
Hemiptera	Pentatomidae	*Nezara viridula*	green stink bug	fruit, Growing point, inflorescence, leaf, **seed**, stem, whole plant	Yes	Yes	CABI,2014	Yes
Coleoptera	Silvanidae	*Oryzaephilus mercator*	merchant grain beetle	**Seed**	Yes	Yes	CABI, 2014	Yes
Lepidoptera	Noctuidae	*Peridroma saucia*	pearly underwing	fruits, growing points, inflorescence, leaf,	No	Yes	CABI, 2012	Yes

Order	Family	Scientific name	Common name	Plant part attacked	TH	USA	References	Consider further
			moth	**seed**, stems, whole plant				
VERTEBRATES								
Rodentia	Muridae	*Sigmodon hispidus*	hispid cotton rat	fruit, leaf, root, **seed**, stem, whole plant	No	Yes	CABI, 2014	Yes
FUNGI								
		Alternaria brassicae	dark spot of crucifers	fruit, inflorescence, leaf, **seed**, stem, whole plant	Yes	Yes	CABI, 2014	Yes
		Alternaria brassicicola	dark leaf spot of cabbage	fruit, inflorescence, leaf, **seed**, stems whole plant	Yes	Yes	CABI, 2014	Yes
		Cochliobolus lunatus	head mould of grasses, rice and sorghum	Inflorescence, leaf, **seed**	Yes	Yes	CABI, 2014	Yes
		Curvularia lunata	head mould of grasses, rice and sorghum	Inflorescence, leaf, **seed**	Yes	Yes	Sontirat *et al.*, 1994; CABI, 2007	No

Order	Family	Scientific name	Common name	Plant part attacked	TH	USA	References	Consider further
		Golovinomyces orontii	powdery mildew	growing points, leaf, stem, whole plant **seed**	No	Yes	CABI, 2012	Yes
		Lasiodiplodia theobromae	diplodia pod rot of cocoa	fruit, growing points, inflorescence, leaf, root, **seed**, stem	Yes	Yes	CABI, 2012	Yes
		Macrophomina phaseolina	charcoal rot of bean/ tobacco	leaf, root, **seed**, stem, whole plant	Yes	Yes	Reuveni, *et. al.* 1983; CABI, 2012	Yes
		Rhizopus stolonifer	bulb rot	flowering, **seed**	Yes	Yes	CABI, 2012	Yes
		Sclerotinia sclerotiorum		fruit, inflorescence, leaf, root, **seed**, stems, whole plant	Yes	Yes	CABI, 2012	Yes
		Sclerotium rolfsii	sclerotium rot	fruit, inflorescence, leaf, root, **seed**, stems vegetative organs, whole plant	Yes	Yes	Sontirat *et al.*, 1994; CABI, 2007	Yes

Order	Family	Scientific name	Common name	Plant part attacked	TH	USA	References	Consider further
		Thanatephorus cucumeris	many names, depending on host	fruit, inflorescence, leaf, root, **seed**, stem, vegetative organs, whole plant	Yes	Yes	CABI, 2007	Yes
BACTERIA								
Burkholderiales	Comamonadaceae	*Acidovorax avenae subsp. citrulli*	fruit blotch	fruit, leaf, whole plant, **seed**	Yes	Yes	Thummabenjapone, 2009; CABI, 2014;	Yes
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas syringae*	bacterial canker or blast (stone and pome fruits)	fruit, inflorescence, leaf, root, **seed**, stem, whole plant	No	Yes	CABI, 2014	Yes
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas syringae pv. lachrymans*	cucurbit angular leaf spot	fruit, leaf, stems, **seed**	Yes	Yes	Messiaen, *et al.*, 1991; Zitter, 1996; Shila, 2013; CABI, 2014	Yes
VIRUSES								
Nidovirales	Bromoviridae	*Alfalfa mosaic virus*	alfalfa yellow spot	leaf, root, stem, vegetative organs,	No	Yes	Alvarez and Campbell, 1978;	Yes

Order	Family	Scientific name	Common name	Plant part attacked	TH	USA	References	Consider further
				whole plant, **seed**			Lecoq, 1988; CABI, 2014	
	Virgoviridae	*Cucumber green mottle mosaic virus*	white break mosaic	**seed**, pollen leaf, whole plant	No	Yes	Fletcher *et al.*, 1969; Hollings *et al.*, 1975; Francki, 1988; Antignus *et al.*, 1990; Ugaki *et al.*, 1991; Blancard et al., 1994; Ali *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2012; CABI, 2014; Tian *et al.*, 2014	Yes
	Tombusviridae	*Melon necrotic spot virus*	MNSV	leaf, stems, fruit, **seed**	No	Yes	Gonzales-Garza *et al.*, 1979; Hibi, 1986; Blancard *et al.*, 1994; Campbell *et al.*, 1996; Herrera-	Yes

Order	Family	Scientific name	Common name	Plant part attacked	TH	USA	References	Consider further
							Vasquez *et al.*, 2000; Herrera, 2006; Ali *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2012; CABI, 2014	
	Comoviridae	*Squash mosaic virus*	squash mosaic	fruit, leaf, **seed**, whole plant	No	Yes	Ali *et al.*, 2012; CABI, 2014;	Yes
	Comoviridae	*Tobacco ringspot virus*	annulus tabaci	fruit, growing points, leaf, root, stem, whole plant **seed**	No	Yes	Chu, 1984; Babadoost, 1999; Ali *et al.*, 2012; CABI, 2014	Yes

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากญี่ปุ่น

Study on Pest Risk Analysis for the Importation of Watermelon Seeds from Japan

วาสนา ฤทธิ์ไธสง[1/] ณัฏฐพร อุทัยมงคล[1/]
สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ[1/] วันเพ็ญ ศรีชาติ[1/] กาญจนา วาระวิชะนี[2/]
[1/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

เมล็ดพันธุ์แตงโม *Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf จัดเป็นสิ่งกำกัด ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชจากแหล่งที่กำหนด เป็นสิ่งกำกัด ข้อยกเว้นและเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 ซึ่งการนำเข้าเมล็ดพันธุ์แตงโมเพื่อการค้ามีเงื่อนไขเพียงแค่แนบใบรับรองสุขอนามัยพืชเท่านั้น แต่เนื่องจากมีการนำเมล็ดพันธุ์แตงโมเข้ามาปริมาณมากจากหลายประเทศเพื่อการขยายพันธุ์ ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์แตงโม ประมาณ 10.63 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 18.99 ล้านบาท ซึ่งการนำเข้าพืชดังกล่าวอาจมีศัตรูพืชร้ายแรงหลายชนิดที่ไม่มีรายงานการปรากฏในประเทศไทย และศัตรูพืชบางชนิดเป็นศัตรูพืชกักกันมีโอกาสติดมากับเมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้า จึงจำเป็นต้องดำเนินการวิจัยเพื่อกำหนดชนิดศัตรูพืชกักกันและมาตรการสุขอนามัยพืชที่เหมาะสม นำไปปรับปรุงแก้ไขกฎระเบียบด้านกักกันพืชเพื่อควบคุมการนำเข้าให้มีประสิทธิภาพ

จากผลการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชของแตงโมที่พบในไทยและญี่ปุ่นพบศัตรูพืชรวม 91 ชนิด เป็นแมลง 27 ชนิด ไร 3 ชนิด ไส้เดือนฝอย 8 ชนิด รา 30 ชนิด แบคทีเรีย 8 ชนิด ไวรัส 10 ชนิด และวัชพืช 5 ชนิด พบว่ามีศัตรูพืชที่ไม่มีในไทยแต่มีในญี่ปุ่นและสามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์แตงโมที่จะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจ ได้ 13 ชนิด เป็น แบคทีเรีย 3 ชนิด รา 4 ชนิด และไวรัส 6 ชนิด ซึ่งจะต้องนำมาประเมินโอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร แพร่ระบาด และก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อไป

Keywords: การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช, นำเข้า, เมล็ดพันธุ์, แตงโม, ญี่ปุ่น, ศัตรูพืชกักกัน, มาตรการจัดการความเสี่ยง
plant pest risk analysis, import, seed, watermelon, Japan, quarantine pest, pest risk management measures

---

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-02-01-11-57

คำนำ

ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชจากแหล่งที่กำหนด เป็นสิ่งกำกัด ข้อยกเว้นและเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 กำหนดให้เมล็ดพันธุ์พืชผักต่าง ๆ ไม้ดอก หรือไม้ประดับหลายชนิดจัดเป็นสิ่งกำกัด (Restricted material) และสิ่งไม่ต้องห้าม (unprohibited materials) ในการนำเข้าต้องแจ้งการนำเข้า และมีใบรับรองปลอดศัตรูพืชจากประเทศต้นทางกำกับมาโดยไม่มีมาตรการสุขอนามัยกำหนดไว้แต่อย่างใด จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องตรวจสอบศัตรูพืชที่อาจติดมากับสินค้าเกษตรนั้นด้วย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงพืชที่มีศัตรูพืชร้ายแรงเป็นพืชอาศัยอยู่ที่มีการนำเข้ามาในประเทศจำนวนมาก และบ่อยครั้ง โดยเฉพาะเป็นศัตรูของพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยที่ใช้ภายในประเทศและส่งออกทำรายได้แก่ประเทศจำนวนมหาศาล

การนำเข้าสินค้าเกษตรจากต่างประเทศ มีโอกาสที่ศัตรูพืชหลายชนิดจะติดเข้ามากับพืช โดยอาจเป็นศัตรูพืชร้ายแรงที่ไม่มีปรากฏในประเทศไทย โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์แตง ซึ่งพืชเหล่านี้มีการนำเข้ามาเพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ในการส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูกกระจายทั่วประเทศไทย โดยในแต่ละปีมีการนำเข้าพืชเหล่านี้เป็นปริมาณมาก หากศัตรูพืชที่ร้ายแรงซึ่งยังไม่มีรายงานในประเทศไทยติดมากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวสามารถเข้ามาเจริญและแพร่พันธุ์ได้ในประเทศไทย จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อการเกษตรในประเทศและการส่งออกพืชผักผลไม้ไทยไปยังต่างประเทศที่เข้มงวดด้านกักกันพืช ดังนั้นจึงทำการศึกษาศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับพืชนำเข้า เพื่อให้ทราบชนิดแหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้า และเส้นทางการเข้ามาของศัตรูพืช ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะเป็นฐานข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืช มีประโยชน์ใช้อ้างอิงทางวิชาการและวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อกำหนดมาตรการควบคุมการนำเข้า เป็นการป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชกักกันเข้ามาและแพร่ระบาดในประเทศ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. มาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Framework for Pest Risk Analysis (2007)) (FAO, 2011)
2. มาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน (Pest Risk Analysis for Quarantine Pests (2013)) (FAO, 2014)
3. คู่มือสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ตามแนวทางของอนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ (IPPC: International Plant Protection Convention)
4. หนังสือ เอกสารและวารสารทางวิชาการที่เกี่ยวข้อง Crop Protection Compendium 2007 (CABI, 2007) และ 2014 (CABI, 2014) ข้อมูลทางอิเล็กทรอนิกส์ และเว็บไซต์ต่างๆ

5. วัสดุสำนักงาน เช่น กระดาษ แผ่นบันทึกข้อมูล
6. วัสดุคอมพิวเตอร์ เช่น แผ่นจัดเก็บข้อมูล (ซีดี) และหมึกพิมพ์ เป็นต้น
7. วัสดุวิทยาศาสตร์ สารเคมีและอุปกรณ์ในการทำสไลด์ถาวร
8. กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope
9. กล้องถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของแตงโมและศัตรูพืชที่จะดำเนินการวิเคราะห์

รวบรวมข้อมูลพืชและข้อมูลศัตรูพืชของแตงโม โดยค้นคว้ารวบรวมข้อมูลจากตำรา หนังสือวิชาการ วารสารวิชาการ เอกสารเผยแพร่ รายงานการประชุมและสัมมนาทางวิชาการ ข้อมูลทางอิเล็กทรอนิกส์ และเว็บไซต์ต่างๆ ที่มีรายงานทั้งในและต่างประเทศ เพื่อให้ได้ข้อมูล ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง ชื่อสามัญ ชีววิทยา แหล่งแพร่กระจาย ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย การป้องกันกำจัด และมาตรการทางสุขอนามัยพืช

2. การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากญี่ปุ่น โดยใช้หลักเกณฑ์การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชตามมาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures: ISPM) ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Framework for Pest Risk Analysis (2007)) (FAO, 2011) และฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกันรวมถึงการวิเคราะห์ความเสี่ยงต่อสภาพแวดล้อม และสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม (Pest Risk Analysis for Quarantine Pests (2013)) (FAO, 2014) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน สัมพันธ์กัน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1: การเริ่มต้นการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 1: Initiation of pest risk analysis)

ขั้นตอนที่ 2: การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest risk assessment)

ขั้นตอนที่ 3: การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest risk management)

ขั้นตอนที่ 1: การเริ่มต้นการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 1: Initiation of pest risk analysis)

การเริ่มขบวนการวิเคราะห์ก็เพื่อจำแนกศัตรูพืช (pest) และเส้นทางศัตรูพืช (pest pathway) ที่เกี่ยวข้องกับกักกันพืชและควรได้รับการพิจารณา โดยวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่เกี่ยวข้องกับพื้นที่หนึ่งที่กำหนด คือ

1.1 จุดเริ่มต้นการวิเคราะห์ (Initiation point) พิจารณาเหตุผลการดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงว่าเริ่มต้นด้วยเหตุผลใด ดังนี้

1.1.1 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเริ่มต้นโดยการจำแนกเส้นทางศัตรูพืช (PRA initiated by the identification of a pathway) มีความจำเป็นต้องวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขึ้นมาใหม่หรือเพื่อทบทวนของเดิมที่เคยวิเคราะห์ไว้แล้วกับเส้นทางศัตรูพืชเส้นทางหนึ่งโดยเฉพาะที่อาจเกิดขึ้นได้เพราะสถานการณ์ดังนี้

- การค้าขายระหว่างประเทศเริ่มมีสินค้าชนิดหนึ่งที่ไม่เคยมีการนำเข้ามาในประเทศมาก่อน หรือสินค้าชนิดหนึ่งมาจากพื้นที่ใหม่หรือจากแหล่งกำเนิดใหม่
- พืชชนิดใหม่ถูกนำเข้าเพื่อการคัดเลือกพันธุ์และวัตถุประสงค์เพื่อการวิจัย
- พบเส้นทางศัตรูพืชอื่นนอกเหนือจากการนำเข้าสินค้า เช่น การแพร่กระจายโดยธรรมชาติ วัสดุหีบห่อ ไปรษณีย์ภัณฑ์ เศษอาหาร สัมภาระของผู้โดยสาร เป็นต้น

การจัดทำรายชื่อศัตรูพืชซึ่งมีโอกาสปะปนมาในเส้นทางศัตรูพืชนี้ อาจดำเนินการได้โดยรวบรวมจากแหล่งข้อมูลของส่วนราชการ ฐานข้อมูล เอกสารอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์อื่นๆ หรือโดยการปรึกษากับผู้เชี่ยวชาญ กรณีจำแนกพบว่าไม่มีศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันมีโอกาสปะปนมากับเส้นทางศัตรูพืช การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชอาจยุติ ณ จุดนี้

1.1.2 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเริ่มต้นโดยการจำแนกศัตรูพืช (PRA initiated by the identification of a pest) มีความจำเป็นต้องวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขึ้นใหม่หรือทบทวนของเดิมที่ได้เคยวิเคราะห์ไว้แล้วกับศัตรูพืชชนิดหนึ่งโดยเฉพาะ อาจเกิดได้เพราะสถานการณ์ ดังนี้

- เกิดภาวะฉุกเฉินมีการตรวจพบการเข้าทำลายหรือการระบาดของศัตรูพืชชนิดใหม่ภายในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช
- เกิดภาวะฉุกเฉินจากการตรวจพบศัตรูพืชชนิดใหม่ติดมากับสินค้านำเข้าชนิดหนึ่ง
- การวิจัยทางวิทยาศาสตร์ค้นพบความเสี่ยงจากศัตรูพืชชนิดใหม่
- มีการจำแนกพบสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งเป็นพาหะของศัตรูพืชชนิดอื่นเพิ่มขึ้นอีก
- สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมในลักษณะซึ่งสามารถจำแนกได้อย่างชัดเจนว่ามีศักยภาพที่จะเป็นศัตรูพืชได้

1.1.3 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเริ่มต้นโดยการทบทวนหรือการปรับปรุงนโยบาย (PRA initiated by the review or revision of a policy) มีความจำเป็นต้องวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขึ้นใหม่ หรือทบทวนของเดิมที่ได้เคยวิเคราะห์ไว้แล้ว ส่วนมากแล้วจะเกิดขึ้นเนื่องจากสถานการณ์ ดังนี้

- ได้มีการตัดสินใจในระดับชาติเพื่อทบทวนกฎระเบียบสุขอนามัยพืช ข้อกำหนด หรือการปฏิบัติการ
- ข้อเสนอจากประเทศหนึ่งหรือโดยหน่วยงานอารักขาพืชนานาชาติ (หน่วยงานอารักขาพืชระดับภูมิภาค องค์อาหารแห่งสหประชาชาติ) ให้มีการทบทวนหรือปรับปรุง

- มีวิธีการกำจัดศัตรูพืชใหม่ หรือการสูญเสียระบบการกำจัดศัตรูพืช มีกระบวนการใหม่ หรือข้อมูลใหม่ที่มีผลกระทบต่อการตัดสินใจก่อนหน้านี้
- ข้อโต้แย้งเกิดขึ้นกับมาตรการสุขอนามัยพืช
- สถานการณ์ทางสุขอนามัยพืชในประเทศหนึ่งเปลี่ยนแปลงไป มีประเทศใหม่เกิดขึ้นหรือ ขอบเขตทางการปกครองเปลี่ยนแปลงไป

1.2 การจำแนกพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Identification of PRA area)

ต้องกำหนดพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชให้ชัดเจนเพื่อประโยชน์ในการพิจารณาหาข้อมูลที่ต้องการได้เหมาะสมถูกต้องกับพื้นที่

1.3 รวบรวมข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

การรวบรวมข้อมูลเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชทุกขั้นตอน โดยเฉพาะการวิเคราะห์ในระยะเริ่มต้นเพื่อให้เกิดความชัดเจนเกี่ยวกับสถานภาพการแพร่ระบาดของศัตรูพืชในปัจจุบัน ตลอดจนโอกาสที่ศัตรูพืชจะติดมากับพืชอาศัยและสินค้า สำหรับข้อมูลอื่นๆ จะรวบรวมตามที่มีความต้องการใช้ประกอบเมื่อถึงจุดที่ต้องตัดสินใจ ขณะที่การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชดำเนินต่อไป

ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชอาจมาจากแหล่งที่หลากหลาย ซึ่งตามบทบัญญัติภายใต้อนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ (มาตรา 18 ข้อซี) ประเทศภาคีสมาชิกต้องมีจุดประสานงานเป็นทางการ เพื่ออำนวยความสะดวกในการให้ข้อมูลของทางราชการ

1.4 ตรวจสอบการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่มีการดำเนินการแล้ว

ก่อนเริ่มขบวนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช จะต้องตรวจสอบว่าได้เคยมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชมาแล้วหรือไม่ ทั้งกรณีวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชโดยศัตรูพืช หรือเส้นทางศัตรูพืช หรือโดยนโยบายของรัฐทั้งภายในและต่างประเทศ กรณีที่มีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชมาแล้วจะต้องตรวจสอบว่ายังมีความเหมาะสมหรือไม่ หรือยังสามารถนำมาใช้ได้หรือไม่เนื่องจากสภาพอาจเปลี่ยนแปลงไป โดยอาจจะนำมาใช้เพียงบางส่วนหรือทั้งหมด ทั้งนี้เพื่อว่าอาจจะสามารถทดแทนความต้องการที่จะต้องการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชใหม่ได้

1.5 ข้อสรุปของขั้นตอนการเริ่มกระบวนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนที่ 1 สามารถดำเนินการจำแนกศัตรูพืชและเส้นทางที่เกี่ยวกับศัตรูพืชที่เกี่ยวข้องและพื้นที่วิเคราะห์ศัตรูพืช รวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ประกอบการวิเคราะห์ รวมทั้งจำแนกและคัดเลือกศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชที่จะต้องดำเนินมาตรการสุขอนามัยพืช โดยอาจเป็นศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่งที่เฉพาะเจาะจง หรือศัตรูพืชที่มีโอกาสปะปนมากับเส้นทางศัตรูพืช

ขั้นตอนที่ 2: การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest risk assessment)

จุดมุ่งหมายเพื่อให้จัดลำดับความสำคัญศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงประกอบ ด้วย 3 ขั้นตอน ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันคือ ขั้นตอนที่ 1) การจัดประเภทศัตรูพืช (Pest categorization) เพื่อพิจารณาว่าศัตรูพืชชนิดใดมีคุณสมบัติจัดเป็นศัตรูพืชกักกัน (quarantine pest) โดยการพิจารณา

ตามคำนิยามของศัตรูพืชกักกันตามคำนิยามในมาตรฐานระหว่างประเทศสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช Glossary of Phytosanitary Terms ISPM No. 5 ขั้นตอนที่ 2) ประเมินโอกาสที่ศัตรูพืชชนิดนั้นจะเข้ามา ตั้งรกรากอย่างถาวร และแพร่ระบาด (Assessment for probability of entry and establishment and spread) ในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชได้ ขั้นตอนที่ 3) ประเมินผลกระทบทางเศรษฐกิจที่เกิดจากศัตรูพืช (Assessment of potential consequences) ในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยรายละเอียดขั้นตอนการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชที่ใช้ดำเนินการตามอนุสัญญาอารักขาพืชแห่งชาติ (International Plant Protection Convention, IPPC) มีดังนี้

2.1 การจัดกลุ่มศัตรูพืช (Pest categorization)

เพื่อพิจารณาว่าศัตรูพืชชนิดใดมีคุณสมบัติจัดเป็นศัตรูพืชกักกัน (quarantine pest) โดยพิจารณาตามคำนิยามของศัตรูพืชกักกัน ในมาตรฐานระหว่างประเทศสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 5 ซึ่ง “ศัตรูพืชกักกัน” (Quarantine pest) หมายถึง ศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่มีศักยภาพต่อพื้นที่ที่อยู่ในอันตรายนั้น และยังไม่มีอยู่ในที่นั้น หรือมีอยู่แต่ไม่แพร่กระจายอย่างกว้างขวางและกำลังมีการควบคุมอยู่อย่างเป็นทางการ (Anonymous, 2006)

2.2 การประเมินโอกาสการเข้ามาและแพร่ระบาด (Assessment of the probability of introduction and spread)

การเข้ามาของศัตรูพืชประกอบด้วยกระบวนการเคลื่อนย้ายของศัตรูพืชเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร และแพร่ระบาดในพื้นที่ได้ ในการประเมินโอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชจะต้องวิเคราะห์เส้นทาง แต่ละเส้นทางซึ่งศัตรูพืชอาจปะปนร่วมมากับเส้นทางจากแหล่งกำเนิดจนเข้ามาเจริญตั้งรกรากและแพร่ระบาดในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชซึ่งเริ่มต้นจากเส้นทางศัตรูพืชหนึ่งที่เฉพาะเจาะจง (โดยทั่วไปเป็นการนำเข้าสินค้าเกษตรชนิดหนึ่ง) โอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชจะประเมินจากเส้นทางที่สงสัย นอกจากนี้จำเป็นที่จะต้องตรวจสอบโอกาสที่เป็นไปได้ที่ศัตรูพืชจะเข้ามาในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชจะสัมพันธ์กับเส้นทางศัตรูพืชอื่นๆ ด้วยเช่นเดียวกัน

สำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชซึ่งเริ่มจากชนิดศัตรูพืชชนิดหนึ่ง โดยไม่มีการพิจารณาเกี่ยวกับสินค้านำเข้าหรือเส้นทางศัตรูพืช ควรนำเส้นทางศัตรูพืชทุกเส้นทางที่มีศักยภาพในการนำศัตรูพืชเข้ามาในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชมาร่วมพิจารณาด้วย

การประเมินโอกาสความเป็นไปได้ของการแพร่ระบาดในเบื้องต้นจะอยู่บนพื้นฐานการพิจารณาทางด้านชีววิทยาเหมือนกับการประเมินโอกาสความเป็นไปได้ของศัตรูพืชที่จะเข้ามาและตั้งรกรากอย่างถาวร

2.2.1 โอกาสการเข้ามาของศัตรูพืช (Probability of entry of a pest)

โอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชชนิดหนึ่งขึ้นอยู่กับเส้นทางศัตรูพืชจากประเทศส่งออกสินค้าไปยังประเทศปลายทาง ความถี่การนำเข้าและปริมาณศัตรูพืชที่มีโอกาสติดมากับ

สินค้า จำนวนเส้นทางศัตรูพืชยิ่งมีมากขึ้นโอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชจะยิ่งสูงขึ้นตามไปด้วย ควรจะมีการสังเกตเส้นทางศัตรูพืชที่ได้มีการบันทึกไว้สำหรับศัตรูพืชที่จะเข้าไปในพื้นที่ใหม่เส้นทางศัตรูพืชที่มีศักยภาพซึ่งยังไม่ปรากฏในปัจจุบันควรนำมาประเมินร่วมด้วย อีกทั้งข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืชกับสินค้านำเข้าอาจเป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่ศัตรูพืชชนิดหนึ่งอาจจะติดปะปนมากับเส้นทางศัตรูพืชหนึ่งและมีชีวิตรอดในขณะขนส่งและเก็บรักษา

2.2.2 โอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร (Probability of establishment)

การประเมินโอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร ควรมีข้อมูลด้านชีววิทยาของศัตรูพืชที่เชื่อถือได้ (วงจรชีวิต พืชอาศัย การแพร่ระบาด การอยู่รอด เป็นต้น) จากพื้นที่ซึ่งศัตรูพืชนั้นปรากฏอยู่ในปัจจุบัน สถานการณ์ในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสามารถนำมาเปรียบเทียบกับสภาพในพื้นที่ที่ศัตรูพืชนั้นปรากฏอยู่ในปัจจุบัน และใช้คำตัดสินใจของผู้เชี่ยวชาญมาประเมินโอกาสเข้ามาเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ของศัตรูพืช กรณีที่เคยเกิดมาแล้วในอดีตที่เกี่ยวข้องกันศัตรูพืชที่คล้ายคลึงกันสามารถนำมาพิจารณาด้วยเช่นเดียวกัน ตัวอย่างของปัจจัยที่ควรนำมาพิจารณา ได้แก่

- การมีพืชอาศัย จำนวนพืชอาศัยและการแพร่กระจายของพืชอาศัยในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช
- ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช
- ศักยภาพความสามารถในการปรับตัวของศัตรูพืช
- วิธีการมีชีวิตอยู่รอดของศัตรูพืช
- การปฏิบัติทางการเกษตรและมาตรการป้องกันกำจัด

ในการพิจารณาโอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวรและแพร่ขยายพันธุ์ของศัตรูพืชนั้นควรบันทึกไว้ด้วยว่าศัตรูพืชบางชนิดอาจปรากฏอยู่ในชั่วขณะหนึ่ง (ดู ISPM No.8 Determination of pest status in an area) แต่อาจจะไม่สามารถเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงได้ (เนื่องจากสภาพอากาศไม่เหมาะสม) แต่ว่าสามารถมีผลกระทบทางเศรษฐกิจในระดับที่ยอมรับไม่ได้ในภายหลังได้

2.2.3 โอกาสการแพร่ระบาดของศัตรูพืชหลังจากเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร (Probability of spread after establishment)

ศัตรูพืชชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการแพร่ระบาดอาจมีศักยภาพสูงในการเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ ดังนั้นความเป็นไปได้ในการควบคุมศัตรูพืชให้อยู่ในขอบเขตจำกัด และ/หรือกำจัดให้หมดสิ้นจึงค่อนข้างยากมาก และการตัดสินใจของผู้เชี่ยวชาญจะนำมาใช้ประเมินโอกาสการแพร่ระบาด กรณีตัวอย่างที่เคยเกิดมาแล้วกับศัตรูพืชที่คล้ายคลึงกันสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการพิจารณา ตัวอย่างของปัจจัยที่พิจารณา ได้แก่

- ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมในสภาพธรรมชาติและ/หรือสภาพแวดล้อมที่จัดการสำหรับการแพร่ระบาดของศัตรูพืชโดยธรรมชาติ
- มีสิ่งกีดขวางโดยธรรมชาติ

- ศักยภาพสำหรับการเคลื่อนย้ายไปกับสินค้าหรือพาหนะขนส่ง
- ความตั้งใจที่จะนำสินค้าไปใช้ประโยชน์
- พาหะที่มีศักยภาพของศัตรูพืชในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช
- ศัตรูธรรมชาติที่มีศักยภาพของศัตรูพืชในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ข้อมูลเกี่ยวกับโอกาสการแพร่ระบาดของศัตรูพืช จะถูกนำมาใช้ประเมินศักยภาพความสำคัญทางเศรษฐกิจของศัตรูพืชที่อาจแสดงออกในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยง ศัตรูพืช ซึ่งนับว่ามีความสำคัญ หากศัตรูพืชชนิดนั้นเข้ามาและเจริญตั้งรกรากอย่างถาวรในพื้นที่ที่มีศักยภาพทางความสำคัญทางเศรษฐกิจต่ำและแพร่ระบาดไปในพื้นที่มีศักยภาพทางความสำคัญทางเศรษฐกิจสูงยิ่งกว่านั้นอาจมีความสำคัญในขั้นตอนการจัดการความเสี่ยงเมื่อพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการควบคุมให้อยู่ภายใต้ขอบเขตหรือจำกัดศัตรูพืชให้หมดสิ้นไป

2.2.4 ข้อสรุปเกี่ยวกับโอกาสการเข้ามาเจริญตั้งรกรากอย่างถาวรและแพร่ระบาดของศัตรูพืช (Conclusion on the probability of introduction and spread)

ภาพรวมของโอกาสเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวรอาจแสดงข้อมูลในลักษณะเชิงปริมาณหรือเชิงคุณภาพ เนื่องจากผลลัพธ์ที่ออกมาในกรณีใดก็ตามเป็นการผสมผสานกันของข้อมูลเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ โอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชอาจแสดงในเชิงเปรียบเทียบกับข้อมูลจากการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชกับศัตรูพืชชนิดอื่น

2.3 การประเมินผลทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้น (Assessment of potential economic consequence)

ในขั้นตอนนี้ระบุว่าข้อมูลต่างๆ ที่สัมพันธ์กันของศัตรูพืชและพืชที่มีศักยภาพเป็นพืชอาศัยต้องเอามารวมกัน และระดับการวิเคราะห์ผลกระทบทางเศรษฐกิจทั้งทางตรงและทางอ้อม ซึ่งอาจดำเนินการโดยใช้ข้อมูลนั้นเพื่อประเมินผลกระทบทุกด้านของศัตรูพืช เช่น ศักยภาพของผลที่ตามมาทางเศรษฐกิจ ควรจะมีข้อมูลเชิงปริมาณซึ่งจะให้รายละเอียดมูลค่าที่เป็นเงิน สำหรับข้อมูลเชิงคุณภาพอาจจะใช้ได้เช่นเดียวกัน การปรึกษาหารือกับนักเศรษฐศาสตร์อาจจะเป็นประโยชน์อย่างมาก มีหลายกรณีที่การวิเคราะห์ในรายละเอียดเกี่ยวกับการประเมินผลที่เกิดขึ้นตามมาทางเศรษฐกิจซึ่งคาดว่าจะเกิดขึ้นอาจไม่มีความจำเป็นถ้ามีหลักฐานเพียงพอหรือเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางทั่วไปแล้วว่าการเข้ามาของศัตรูพืชชนิดหนึ่งนั้นจะก่อให้เกิดผลทางเศรษฐกิจตามมาในระดับที่ไม่สามารถยอมรับได้ ในเบื้องต้นจะมุ่งเน้นพิจารณาเกี่ยวกับโอกาสการเข้ามาเจริญตั้งรกรากอย่างถาวรและแพร่ระบาด อย่างไรก็ตามมีความจำเป็นต้องตรวจสอบปัจจัยทางเศรษฐกิจด้วยเมื่อระดับของผลที่จะเกิดขึ้นตามมาทางเศรษฐกิจยังเป็นที่สงสัย หรือเมื่อระดับของผลที่ตามมาทางเศรษฐกิจทำให้ต้องประเมินความเข้มแข็งของมาตรการที่ใช้ในการจัดการกับความเสี่ยง หรือในการประเมินต้นทุนกำไรในการกำจัดหรือการควบคุมศัตรูพืชไม่ให้เข้ามา

2.4 ระดับความไม่แน่นอน (degree of uncertainly)

การประเมินโอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชและผลที่ตามมาทางด้านเศรษฐกิจจะมีปัจจัยที่ไม่แน่นอนเข้ามาเกี่ยวข้องจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นการประเมินที่นอกเหนือจากสภาพซึ่งศัตรูพืชเกิดระบาดตามสภาพทางทฤษฎีในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช จึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องบันทึกไว้เป็นหลักฐานเกี่ยวกับปัจจัยที่ไม่แน่นอนและระดับของความไม่แน่นอนที่เข้ามาเกี่ยวข้องในการประเมินและเพื่อแสดงให้เห็นถึงการนำคำตัดสินของผู้เชี่ยวชาญมาใช้ ทั้งนี้เป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้เกิดความโปร่งใสและอาจจะมีประโยชน์สำหรับการจำแนกและการจัดลำดับความต้องการในการวิจัยต่อไป

2.5 ข้อสรุปของการประเมินความเสี่ยงของศัตรูพืช (Conclusion of the pest risk assessment stage)

ผลที่ได้จากการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชจะได้ชนิดของศัตรูพืชที่จำแนกประเภทแล้วบางชนิดหรือทั้งหมด และอาจจะถูกนำมาพิจารณาเกี่ยวกับการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชให้เหมาะสม รวมทั้งพื้นที่บางส่วนหรือทั้งหมดของพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชอาจกำหนดเป็นพื้นที่ที่มีปัจจัยสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ของศัตรูพืชจนทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่สำคัญ การประเมินโอกาสเชิงคุณภาพหรือเชิงปริมาณของการนำเข้ามาของศัตรูพืชชนิดหนึ่งหรือหลายชนิด และการประเมินผลที่ตามมาทางเศรษฐกิจ (รวมทั้งผลต่อสภาพแวดล้อม) จะต้องจัดทำไว้เป็นหลักฐานเอกสาร รวมทั้งความไม่แน่นอนที่เกิดร่วมอยู่ด้วย จะต้องนำมาใช้ในขั้นตอนการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช

ขั้นตอนที่ 3: การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest risk management)

ขั้นตอนนี้เกี่ยวข้องกับการกำหนดมาตรการทางเลือกสำหรับการจัดการความเสี่ยงทั้งนี้เพื่อลดความเสี่ยงที่ระบุในขั้นตอนที่ 2 โดยที่ข้อสรุปจากการประเมินความเสี่ยงจะถูกนำมาใช้ประกอบการตัดสินใจว่าจำเป็นหรือไม่ที่ต้องจัดการความเสี่ยงและมาตรการที่ใช้จัดการความเสี่ยงจะมีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะใช้หรือไม่ หลักการจัดการความเสี่ยงนั้นจะต้องคำนึงถึงประเด็น ดังนี้

3.1 ระดับความเสี่ยง (Level of risk) จะใช้หลักการจัดการความเสี่ยงให้อยู่ในระดับที่มีระดับที่เหมาะสมซึ่งสามารถยอมรับได้ (Appropriate Level of acceptable; ALOP) หรือระดับความเสี่ยงที่สามารถยอมรับได้ (acceptable)

3.2 ข้อมูลวิชาการประกอบการพิจารณาจัดการความเสี่ยง โดยดูจากข้อมูลที่รวบรวมได้

3.3 การยอมรับความเสี่ยง (Acceptable of risk) นำผลของการประเมินความเสี่ยงนับตั้งแต่การเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร การแพร่ระบาด และผลกระทบต่อเศรษฐกิจที่แสดงความเสี่ยงว่าไม่สามารถยอมรับได้นั้นมาจัดการจำแนกมาตรการสุขอนามัยพืชเพื่อลดความเสี่ยงลงให้ถึงระดับต่ำสุดที่ยอมรับได้

3.4 จำแนกและคัดเลือกวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการลดโอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวรและแพร่ระบาดของศัตรูพืชที่เหมาะสม มีเหตุผลภายใต้ข้อจำกัดเกี่ยวกับวิธีการที่สามารถ

ดำเนินการได้ในการจัดการความเสี่ยง มาตรการสุขอนามัยพืชที่นำมาใช้ควรให้ผลแน่นอนและมีความเป็นไปได้ในทางปฏิบัติเหมาะสมกับรูปแบบและแหล่งกำเนิดสินค้าที่เป็นพืชอาศัยหรือพาหะ โดยไม่เป็นอุปสรรคขัดขวางการค้าในแง่จำกัดการนำเข้าสินค้าโดยไม่มีเหตุผล บางกรณีอาจต้องนำมาตรการสุขอนามัยพืชมากกว่าสองมาตรการมาใช้เพื่อลดความเสี่ยงจนถึงระดับที่ยอมรับได้ มาตรการสุขอนามัยพืชที่มีการนำมาใช้ในปัจจุบัน สามารถแบ่งได้ตามสถานภาพของศัตรูพืชในเส้นทางศัตรูพืช ณ ประเทศต้นทาง ประกอบด้วยมาตรการ ดังต่อไปนี้

- มาตรการที่ใช้กับสินค้าโดยตรง
- มาตรการที่ใช้เพื่อป้องกันหรือลดปริมาณการเข้าทำลายของศัตรูพืชในแหล่งผลิต
- มาตรการที่ใช้เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นว่าในพื้นที่ผลิตหรือแหล่งผลิตปราศจากศัตรูพืช
- มาตรการห้ามนำเข้าสินค้า

มาตรการทางเลือกอื่นอาจเกิดขึ้นจากพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (จำกัดการใช้ประโยชน์จากสินค้า) มาตรการป้องกันกำจัด การนำเข้าชีวินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช การกำจัดให้หมดสิ้นไป และการควบคุมการระบาดให้อยู่ในขอบเขตจำกัด มาตรการเหล่านี้จะถูกประเมินและนำมาใช้เฉพาะกรณีที่ศัตรูพืชพบระบาดอยู่ก่อนแล้วในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชแต่ระบาดอยู่ในขอบเขตจำกัด

3.5 การรับรองสุขอนามัยพืช (Phytosanitary certificate) โดยการรับรองสุขอนามัยพืชว่าสินค้าปราศจากศัตรูพืชกักกันซึ่งกำหนดโดยประเทศผู้นำเข้า และเป็นไปตามข้อกำหนดด้านสุขอนามัยพืชของประเทศนำเข้า ซึ่งเป็นการยืนยันว่าได้มีการจัดการความเสี่ยงตามที่กำหนด รวมทั้งอาจกำหนดให้ระบุข้อความเพิ่มเติม (additional declaration) เพื่อแสดงให้เห็นว่าได้มีการดำเนินมาตรการสุขอนามัยพืชเป็นการเฉพาะ นอกจากนี้มาตรการอื่นอาจนำมาใช้ร่วมกันตามที่ได้มีการทำความตกลงแบบทวิภาคี หรือพหุภาคี (bilateral or multilateral agreement)

3.6 บทสรุปการจัดการความเสี่ยง

ผลที่ได้รับจากขบวนการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช อาจจะพบว่าไม่มีมาตรการซึ่งได้รับการพิจารณาแล้วว่าเหมาะสม หรือมีการเลือกวิธีการจัดการความเสี่ยงวิธีหนึ่งหรือหลายวิธีการซึ่งพบว่าสามารถทำให้ความเสี่ยงซึ่งเกิดร่วมกับศัตรูพืชลดต่ำจนอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ วิธีการจัดการความเสี่ยงเหล่านี้จะอยู่บนพื้นฐานของกฎระเบียบหรือข้อกำหนดด้านสุขอนามัยพืช

เวลาและสถานที่

เวลา: เดือนตุลาคม 2556 - กันยายน 2557

สถานที่: กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของแตงโมและศัตรูพืชที่จะดำเนินการวิเคราะห์

แตงโม (watermelon) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae จัดเป็นพืชเมืองร้อน มีถิ่นกำเนิดในแอฟริกาตอนเหนือและตะวันออกกลาง ต่อมาได้แพร่ขยายออกไปในอเมริกา เอเชีย และยุโรป (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2538) พื้นที่ปลูกแตงในประเทศไทยมีประมาณ 440,000 ไร่ หรือ 15% ของพื้นที่ปลูกผักทั้งหมด โดยแตงโมเป็นพืชวงศ์แตงที่มีพื้นที่ปลูกมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ แตงกวา ฟักทอง แตงร้าน บวบ ฟักเขียว มะระจีน และแคนตาลูป (กรมวิชาการเกษตร, 2549) ปัจจุบันแตงโมมีอนุกรมวิธาน ดังนี้

Phylum: Spermatophyta

Subphylum: Angiospermae

Class: Dicotyledonae

Order: Violales

Family: Cucurbitaceae

Genus: *Citrullus*

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น แตงโมเป็นไม้ล้มลุกประเภทเถาเลื้อย มีอายุสั้น ลักษณะต้นเป็นเถาเลื้อยไปตามดิน ลำต้นเป็นสีเขียว

ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกตามข้อ โคนใบกว้าง ปลายใบแหลมเล็กๆ ขอบใบเว้าลึก แผ่นใบมีสีเขียว มีปลายสีขาวกระจายไปทั่ว

ดอก สีเหลือง ออกตามส่วนยอด

ผล มีทั้งชนิดกลมและชนิดยา สีอ่อนหรือเขียวเข้ม เนื้อผลแดง เมล็ดแบน มีสีน้ำตาล ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดปลูก

สรรพคุณทางยา

เกือบทุกส่วนของแตงโมมีสรรพคุณทางยามากมาย เช่น ใบแตงโมนำมาต้มชงเป็นยาลดไข้ เปลือกนำไปต้มน้ำให้เดือดเติมน้ำตาลทรายพอให้หวานใช้ดื่มแทนน้ำ ทำให้รู้สึกชุ่มคอ ลดอาการคอแห้ง เจ็บคอ แก้กระหายน้ำ และขับปัสสาวะ เป็นต้น

พันธุ์แตงโม ที่นิยมปลูกโดยทั่วไปมี 3 พันธุ์ คือ

1. **พันธุ์ธรรมดา** มีเมล็ดขนาดเล็ก รสหวาน แบ่งย่อยได้อีกหลายพันธุ์ เช่น
   - แตงโมจินตหรา ผลยาวรี เปลือกเขียวเข้ม มีลาย เนื้อสีแดง
   - แตงโมตอร์ปิโด ลูกรีกว่าพันธุ์จินตหรา
   - แตงโมกินรี ผลกลม เนื้อแดง
   - แตงโมน้ำผึ้ง ผลกลม เนื้อเหลือง
   - แตงโมไดอานา เปลือกเหลือง เนื้อสีแดง

- แตงโมจิ๋ว ผลขนาดเท่ากำปั้น เนื้อเหลือง เป็นต้น

2. พันธุ์ไม่มีเมล็ด เป็นพันธุ์ผสมเพื่อใช้ในการส่งออก ไม่มีเมล็ดแก่สีดำภายใน ในญี่ปุ่นมีการทำแตงโมให้เป็นทรงสี่เหลี่ยมโดยให้ผลเจริญในกล่อง เพื่อความสะดวกในการขนส่ง

3. พันธุ์กินเมล็ด ปลูกเพื่อนำเมล็ดมาคั่วเป็นเม็ดก๋วยจี๊ พันธุ์นี้มีเนื้อน้อย เมล็ดขนาดใหญ่

การค้าระหว่างประเทศ

ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์แตงโม ประมาณ 10.63 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 18.99 ล้านบาท (สมาคมการค้าเมล็ดพันธุ์ไทย, 2556) โดยนำเข้าจากหลายประเทศ เช่น สาธารณรัฐประชาชนจีน ไต้หวัน ญี่ปุ่น เครือรัฐออสเตรเลีย และสหรัฐอเมริกา เป็นต้น

2. การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ขั้นตอนที่ 1: การเริ่มต้นการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 1: Initiation of pest risk analysis)

ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชจากแหล่งที่กำหนด เป็นสิ่งกำกัด ข้อยกเว้นและเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 กำหนดให้ส่วนหนึ่งส่วนใดของพืชในวงศ์คูเคอร์บิตาซีอี้ Cucurbitaceae (ไม่รวมถึง ผล) ได้แก่ แตงโม *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai เป็นสิ่งกำกัด การนำเข้าเพื่อการค้ามีเงื่อนไขเพียงแค่แนบใบรับรองสุขอนามัยพืชเท่านั้น แต่เนื่องจากมีการนำเมล็ดพันธุ์แตงโมเข้ามาปริมาณมากจากหลายประเทศเพื่อการขยายพันธุ์ ซึ่งการนำเข้าพืชดังกล่าวอาจมีศัตรูพืชร้ายแรงหลายชนิดที่ไม่มีรายงานการปรากฏในประเทศไทย และศัตรูพืชบางชนิดเป็นศัตรูพืชกักกัน มีโอกาสติดมากับเมล็ดพันธุ์ เช่น แบคทีเรีย (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) เชื้อรา (*Chalara elegans*, *Verticillium dahliae*) และไวรัส (*Tobacco ringspot virus, Squash mosaic virus*) เป็นต้น ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นจึงจำเป็นต้องดำเนินการวิจัยเพื่อกำหนดชนิดศัตรูพืชกักกันและมาตรการสุขอนามัยพืชที่เหมาะสม นำไปปรับปรุงแก้ไขกฎระเบียบด้านกักกันพืชเพื่อควบคุมการนำเข้าให้มีประสิทธิภาพต่อไป

การจำแนกพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Identification of PRA area)

พื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช คือ ประเทศไทย โดยกำหนดพื้นที่ที่อยู่ในอันตราย ได้แก่ พื้นที่หนึ่งพื้นที่ใดของประเทศไทย ซึ่งมีพืชอาศัยที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของศัตรูพืชและมีปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวรและแพร่กระจายได้

ขั้นตอนที่ 2: การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest risk assessment)

<u>การจัดกลุ่มศัตรูพืช (Pest Categorization)</u>

ผลการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชของแตงโมที่พบในไทยและญี่ปุ่นพบศัตรูพืชรวม 91 ชนิด เป็นแมลง 27 ชนิด ไร 3 ชนิด ไส้เดือนฝอย 8 ชนิด รา 30 ชนิด แบคทีเรีย 8 ชนิด ไวรัส 10 ชนิด และวัชพืช 5 ชนิด (Table 1) โดยพบเป็นศัตรูพืชที่มีในญี่ปุ่น จำนวน 84 ชนิด เป็นแมลง 22 ชนิด ไร 3 ชนิด ไส้เดือนฝอย 7 ชนิด รา 30 ชนิด แบคทีเรีย 8 ชนิด ไวรัส 10 ชนิด และวัชพืช 4 ชนิด (CABI, 2007; 2014; EPPO-PQR, 2014) ซึ่งการจัดกลุ่มศัตรูพืชเมื่อพิจารณาตามคำนิยามของศัตรูพืช พบว่ามีศัตรูพืชที่

ไม่มีในไทยแต่มีในญี่ปุ่นและสามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์แตงโมที่จะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจ ได้ 13 ชนิด เป็น แบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas cichorii, Pseudomonas viridiflava, Xanthomonas cucurbitae* รา 4 ชนิด ได้แก่ *Chalara elegans, Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum, Phytophthora drechsleri, Verticillium dahlia* และไวรัส 6 ชนิด ได้แก่ *Cucumber green mottle mosaic virus, Melon necrotic spot virus, Squash mosaic virus, Tobacco ringspot virus, Watermelon mosaic virus* และ *Zucchini yellow mosaic virus* (Table 2)

การสุ่มเมล็ดพันธุ์แตงโมเพื่อตรวจสอบศัตรูพืช ณ ด่านตรวจพืช หรือสถานกักพืช

จากผลการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์แตงโม ณ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช เพื่อตรวจสอบศัตรูพืชที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากญี่ปุ่น จากการนำเข้า 2 ครั้ง จำนวน 8 ตัวอย่าง รวมน้ำหนัก 8,320 กรัม โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์แตงโมเพื่อตรวจสอบศัตรูพืชด้วยวิธีการทำ Blotter method รวม 350 เมล็ด ไม่พบศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากญี่ปุ่น (Table 3)

การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Risk Assessment)

นำศัตรูพืชทั้ง 13 ชนิด ที่ได้จากการจัดกลุ่มศัตรูพืชมาประเมินโอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร แพร่ระบาด และก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจทั้งทางตรงและทางอ้อม เนื่องจากศัตรูพืชมีโอกาสติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากญี่ปุ่นโดยการปนเปื้อนเข้ามากับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า โดยเริ่มประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชจากแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *Pseudomonas cichorii, Pseudomonas viridiflava, Xanthomonas cucurbitae*

ขั้นตอนที่ 3: การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest risk management)

อยู่ระหว่างดำเนินการ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เมล็ดพันธุ์แตงโม *Citrullus lanatus* จัดเป็นสิ่งกำกัด การนำเข้าเพื่อการค้ามีเงื่อนไขเพียงแค่แนบใบรับรองสุขอนามัยพืชเท่านั้น แต่เนื่องจากมีการนำเมล็ดพันธุ์แตงโมเข้ามาปริมาณมากจากหลายประเทศเพื่อการขยายพันธุ์ ซึ่งการนำเข้าพืชดังกล่าวอาจมีศัตรูพืชร้ายแรงหลายชนิดที่ไม่มีรายงานการปรากฏในประเทศไทย และศัตรูพืชบางชนิดเป็นศัตรูพืชกักกัน มีโอกาสติดมากับเมล็ดพันธุ์ จึงจำเป็นต้องดำเนินการวิจัยเพื่อกำหนดชนิดศัตรูพืชกักกันและมาตรการสุขอนามัยพืชที่เหมาะสม นำไปปรับปรุงแก้ไขกฎระเบียบด้านกักกันพืชเพื่อควบคุมการนำเข้าให้มีประสิทธิภาพ

ผลการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชของแตงโมที่พบในไทยและญี่ปุ่นพบศัตรูพืชรวม 91 ชนิด เป็นแมลง 27 ชนิด ไร 3 ชนิด ไส้เดือนฝอย 8 ชนิด รา 30 ชนิด แบคทีเรีย 8 ชนิด ไวรัส 10 ชนิด และวัชพืช 5 ชนิด พบว่ามีศัตรูพืชที่ไม่มีในไทยแต่มีในญี่ปุ่นและสามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์แตงโมที่จะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจ ได้ 13 ชนิด เป็น แบคทีเรีย 3 ชนิด รา 4 ชนิด และไวรัส 6 ชนิด ซึ่งจะต้องนำมาประเมินโอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร แพร่ระบาด และก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนางณัฏฐพร อุทัยมงคล หัวหน้ากลุ่มงานวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช สำหรับคำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการปฏิบัติงาน ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้อง ๆ กลุ่มงานวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือต่าง ๆ และขอขอบคุณบิดา-มารดาผู้เป็นกำลังใจสำคัญให้ลูกเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2538. **แตงโม.** เอกสารวิชาการ. กองส่งเสริมพืชสวน. กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ. 41 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร. 2549. พืชผักและเห็ด. เอกสารวิชาการ. *ใน* **ราชพฤกษ์** 2549. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 28 หน้า.

สมาคมการค้าเมล็ดพันธุ์ไทย. 2556. **ปริมาณการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ควบคุม ประจำปี 2556**. แหล่งสืบค้น: www.thasta.com/statistics.asp (วันที่สืบค้น: 15 ธันวาคม 2556).

Anonymous. 2006. Phytosanitary Principles for the protection of plants and the application of phytosanitary measures in international trade.

CABI (CAB International). 2007. **Crop Protection Compendium (2007 edition)**. Wallingford, UK: CAB International.

CABI (CAB International). 2014. **Crop Protection Compendium (2014 edition)**. Copyright © 2014 CABI. CABI is a registered EU trademark. Available source: http://www.cabi.org/cpc/ (site date: August 10, 2014).

EPPO-PQR (European and Mediterranean Plant Protection Organization -Plant Quarantine data Retrieval system). 2014. (Online). Available. http://www.eppo.org (August 15, 2014).

FAO. 2011. **INTERNATIONAL STANDARDS FOR PHYTOSANITARY MEASURES (ISPM) 2: Framework for Pest Risk Analysis (2007).** Produced by the Secretariat of the International Plant Protection Convention. Rome, FAO.

FAO. 2014. **INTERNATIONAL STANDARDS FOR PHYTOSANITARY MEASURES (ISPM) 11: Pest Risk Analysis for Quarantine Pests (2013).** Produced by the Secretariat of the International Plant Protection Convention. Rome, FAO.

Table 1 Pests associated with watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf) in Thailand and Japan.

Organism type	Scientific name
Insect	27 species were *Agrotis ipsilon*, *Aphis gossypii*, *Aulacophora foveicollis*, *Aulacophora indica*, *Bactrocera cucurbitae*, *Bactrocera dorsalis* species complex, *Bactrocera latifrons*, *Bactrocera tau*, *Chrysodeixis eriosoma*, *Delia platura*, *Diaphania indica*, *Lepidiota stigma*, *Liriomyza bryoniae*, *Liriomyza sativae*, *Liriomyza trifolii*, *Megalurothrips usitatus*, *Melanitis leda ismene*, *Myzus persicae*, *Peridroma saucia*, *Phenacoccus solenopsis*, *Scirtothrips dorsalis*, *Spodoptera exigua*, *Spoladea recurvalis*, *Thrips flavus*, *Thrips parvispinus*, *Trialeurodes vaporariorum* and *Trichoplusia ni*
Mite	3 species were *Tarsonemus bilobatus, Tetranychus cinnabarinus* and *Tetranychus urticae*
Nematode	8 species were *Helicotylenchus dihystera*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne javanica*, *Pratylenchus penetrans*, *Pratylenchus thornei*, *Rotylenchulus reniformis* and *Xiphinema*
Bacteria	8 species were *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Erwinia tracheiphila*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Pseudomonas viridiflava*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium rhizogenes* and *Xanthomonas cucurbitae*
Fungi	30 species were *Alternaria alternata*, *Athelia rolfsii*, *Chalara elegans*, *Choanephora cucurbitarum*, *Cladosporium cucumerinum*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Colletotrichum orbiculare*, *Didymella bryoniae*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*, *Glomerella cingulata*, *Golovinomyces cichoracearum*, *Haematonectria haematococca, Macrophomina phaseolina, Monosporascus cannonballus, Olpidium brassicae, Phytophthora cactorum, Phytophthora capsici, Phytophthora citrophthora, Phytophthora cryptogea, Phytophthora drechsleri, Podosphaera xanthii, Pseudoperonospora cubensis, Pythium aphanidermatum, Pythium debaryanum, Pythium irregulare*, *Pythium myriotylum*, *Pythium vexans*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Verticillium dahliae*

Table 1 (Cont.)

Organism type	Scientific name
Virus	10 species were *Cucumber green mottle mosaic virus, Cucumber mosaic virus, Melon necrotic spot virus, Squash mosaic virus, Tobacco mosaic virus, Tobacco ringspot virus, Tomato spotted wilt virus, Watermelon mosaic virus, Watermelon silver mottle virus* and *Zucchini yellow mosaic virus*
Plant (Weed)	5 species were *Cirsium arvense*, *Digitaria ciliaris*, *Lolium temulentum, Parthenium hysterophorus* and *Richardia brasiliensis*

Source: CABI, 2007; 2014; EPPO-PQR, 2014

Table 2 Pests associated with watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf) seeds in Japan.

Scientific name	Common name
Bacteria	
Pseudomonas cichorii (Swingle) Stapp	bacterial blight of endive
Pseudomonas viridiflava (Burkholder) Dowson	bacterial leaf blight of tomato (USA)
Xanthomonas cucurbitae (Bryan) Vauterin *et al.*	bacterial: pumpkin spot
Fungi	
Chalara elegans Nag Raj & W.B. Kendr.	black root rot
Fusarium oxysporum f.sp. *niveum* (E.F. Sm.) Snyder & H.N. Hansen	Fusarium wilt of watermelon
Phytophthora drechsleri Tucker	watermelon fruit rot
Verticillium dahliae Kleb.	verticillium wilt
Virus	
Cucumber green mottle mosaic virus	CGMMV, white break mosaic
Melon necrotic spot virus	MNSV
Squash mosaic virus	SqMV, squash mosaic
Tobacco ringspot virus	TRSV, annulus tabaci
Watermelon mosaic virus	WMV, watermelon mosaic
Zucchini yellow mosaic virus	ZYMV

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของหัวมันฝรั่งเพื่อการแปรรูปนำเข้าจากอินเดียและอียิปต์

Study on Pest Risk Analysis for the Importation of Potato for Processing from India and Egypt

ปรียพรรณ พงศาพิชญ์ วรัญญา มาลี วานิช คำพานิช
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของหัวมันฝรั่งเพื่อการแปรรูปนำเข้าจากอินเดียและอียิปต์ ปฏิบัติตามขั้นตอนวิธีการดำเนินการตามมาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกันรวมถึงการวิเคราะห์ความเสี่ยงต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อกำหนดมาตรการทางวิชาการด้านสุขอนามัยพืชสำหรับจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชของของหัวมันฝรั่ง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อกำหนดมาตรการทางวิชาการด้านสุขอนามัยพืชสำหรับจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชของมันฝรั่ง

ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนจัดลำดับศัตรูพืช (Pest caterogorization) พบศัตรูพืชกักกันที่สามารถติดมากับหัวมันฝรั่งจากอินเดียและมีศักยภาพในการก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจทั้งสิ้น 12 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา 7 ชนิด *Boeremia foveata, Fusarium culmorum, megasperma, Synchytrium endobioticum, Verticillium albo-atrum* ไส้เดือนฝอย 4 ชนิด *Globodera pallida, G. rostochiensis, Pratylenchus loosi, Tylenchorhynchus claytoni* และโปรโตซัว 1 ชนิด *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranean* และศัตรูพืชกักกันที่สามารถติดมากับหัวมันฝรั่งจากอียิปต์ ทั้งสิ้น 9 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา 5 *ชนิด B. foveata, F. culmorum, P. cryptogea, P. erythroseptica* var. *erythroseptica, V.albo-atrum* ไส้เดือนฝอย 3 ชนิด *G. rostochiensis. Nacobbus aberrans, Pratylenchus goodeyi,* และโปรโตซัว 1 ชนิด *S. subterranea* f. sp. *subterranean*

Keywords: วิเคราะห์ความเสี่ยง มันฝรั่ง อินเดีย อียิปต์
pest risk analysis, potato, India, Egypt

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-02-01-12-57

คำนำ

พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และ พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 ที่มีผลใช้บังคับตั้งแต่ 28 สิงหาคม 2551 ได้แบ่งประเภทของพืชออกเป็น 3 ชนิดคือ สิ่งต้องห้าม สิ่งกำกัด และสิ่งไม่ต้องห้าม โดยให้สิ่งต้องห้ามสามารถนำเข้ามาในราชอาณาจักรได้ตามวัตถุประสงค์ 3 ประการ คือ 1. เพื่อทำการวิจัย 2. เพื่อการค้า และ 3. เพื่อกิจการอื่น ซึ่งในการนำเข้าเพื่อการค้าจะต้องดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชก่อนจึงจะได้รับการอนุญาตจากอธิบดีกรมวิชาการเกษตร และต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์วิธีการที่อธิบดีกำหนด ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชและพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 กำหนดให้พืชในวงศ์ *Solanaceae* จากทุกแหล่งเป็นสิ่งต้องห้าม มันฝรั่งซึ่งเป็นพืชในวงศ์ *Solanaceae* เปลี่ยนสถานภาพจากเดิมเป็นสิ่งกำกัดมาเป็นสิ่งต้องห้าม ประกอบกับประเทศอียิปต์ได้ยื่นขอเปิดตลาดส่งออกหัวมันฝรั่งเพื่อการแปรรูปมายังประเทศไทย จากข้อมูลศัตรูพืชของมันฝรั่งในประเทศอินเดียและอียิปต์มีรายงานศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่มีรายงานพบในประเทศไทย เช่น *Globodera pallida*, *G. rostochiensis*, *Synchytrium endobioticum*, และ *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* และ Potato spindle tuber viroid เป็นต้น ศัตรูพืชเหล่านี้ มีรายงานทำความเสียหายให้กับพืชผลเกษตรของหลายๆประเทศ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เนื่องจากการนำเข้าอาจมีศัตรูพืชกักกันที่สำคัญสามารถติดมากับหัวมันฝรั่ง ซึ่งยากต่อการตรวจสอบด้วยตาเปล่า และอาจจะสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย และไม่สามารถกำจัดให้หมดไป หรือต้องเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดและอาจมีผลกระทบต่อการส่งออกสินค้าเกษตร จึงจำเป็นต้องกำหนดมาตรการการนำเข้าที่สามารถจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชที่เหมาะสมต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. มาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (FAO, 2011)

2. มาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกันฯ (FAO, 2014)

3. คู่มือสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ตามแนวทางของอนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ (IPPC: International Plant Protection Convention) (FAO, 2007)

วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของพืชและศัตรูพืช

1.1 รวบรวมข้อมูลทั่วไปของพืชและศัตรูพืชที่จะดำเนินการวิเคราะห์ โดยสืบค้นและรวบรวมข้อมูลจากเอกสารวิชาการ ด่านตรวจพืชนำเข้า ศุลกากร กระทรวงพาณิชย์ ข้อมูลจากองค์กรอารักขาพืชของประเทศผู้ส่งออก หรือจากเว็บไซต์ที่เกี่ยวข้อง

1.2 ศึกษารวบรวมรายชื่อศัตรูพืชที่มีศักยภาพติดเข้ามากับหัวมันฝรั่งนำเข้าจากอินเดียและอียิปต์ โดยค้นคว้ารวบรวมจากเอกสาร ข้อมูลจากองค์กรอารักขาพืชของประเทศผู้ส่งออกหรือจากเว็บไซต์ที่เกี่ยวข้อง และรายงานจากทั่วโลก

2. ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชตามมาตรฐานระหว่างประเทศสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures, ISPM) ฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันรวมถึงการวิเคราะห์ความเสี่ยงทางสภาพแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตที่ได้รับการตัดต่อสารพันธุกรรม (Pest risk analysis for quarantine pests including analysis of environmental risks and living modified organism) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ขั้นตอนที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (การจัดประเภทศัตรูพืช การประเมินโอกาสการการเข้ามา การตั้งรกรากอย่างถาวร และการแพร่กระจาย รวมถึงผลกระทบทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้นภายหลังการเข้ามาของศัตรูพืชในประเทศไทย)

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

1.1 กำหนดจุดเริ่มต้นของการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช อาจเป็นศัตรูพืช เส้นทางที่ศัตรูพืชจะติดเข้ามา หรือการทบทวนโยบายของประเทศ ซึ่งเกี่ยวข้องกับทางกักกันพืช

1.2 กำหนดพื้นที่ที่จะทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

1.3 ตรวจสอบว่าเคยมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงโดยศัตรูพืช เส้นทางศัตรูพืช หรือนโยบายของรัฐมาก่อนหรือไม่ ทั้งภายในประเทศและในต่างประเทศ กรณีที่มีการดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชมาแล้ว ตรวจสอบดูว่ายังมีความเหมาะสมสามารถนำมาใช้ได้หรือไม่ เนื่องจากสภาพอาจเปลี่ยนแปลงไป พิจารณาความเป็นไปได้ในการนำเอาการวิเคราะห์ความเสี่ยงจากเส้นทางศัตรูพืชที่เหมือนกัน หรือศัตรูพืชที่เหมือนกัน มาใช้เพียงบางส่วนหรือทั้งหมด

ขั้นตอนที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช

กระบวนการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช สามารถแบ่งออกได้อย่างกว้างเป็น 3 ขั้นตอน ตามที่ IPPC กำหนด ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องสัมพันธ์กัน คือ

2.1 การจัดประเภทศัตรูพืช (Pest Categorization) ที่พบบนมันฝรั่ง

2.1.1 พิจารณาจัดกลุ่มศัตรูพืช เช่น แมลง ไร ไวรัส แบคทีเรีย และ รา เป็นต้น

2.1.2 บันทึกรายละเอียดของศัตรูมันฝรั่งแต่ละชนิด ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ แหล่งแพร่กระจาย ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย/อาศัย และเป็นพาหะของศัตรูพืชชนิดอื่นหรือไม่

2.1.3 ตรวจสอบว่าเป็นศัตรูพืชที่พบในประเทศไทยหรือไม่ รวมถึงสถานภาพการควบคุมศัตรูพืชดังกล่าวในประเทศไทย

2.1.4 พิจารณาคัดเลือกเฉพาะศัตรูพืชที่ไม่พบในประเทศไทย หรือพบแต่มีการควบคุมอย่างเป็นทางการ มีศักยภาพในการเข้ามา ตั้งรกราก และแพร่กระจายในประเทศไทย ตลอดจนอาจก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจหากศัตรูเข้ามาในประเทศไทย

2.2 การประเมินโอกาสการเข้ามาและการแพร่กระจาย (Assessment for probability of introduction and spread) ของศัตรูมันฝรั่งในประเทศไทย

นำรายชื่อศัตรูพืชที่ได้จากข้อ 2.1.4 มาประเมินโอกาสของศัตรูพืชในการนำเข้า (การเข้ามาและตั้งรกราก) และแพร่กระจายในประเทศไทย โดยพิจารณาปัจจัยต่างๆ ที่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เชื่อถือได้

2.2.1 การประเมินโอกาสการเข้ามา เป็นการประเมินโอกาสที่ศัตรูพืชจะปะปนมากับเส้นทางศัตรูพืชเข้ามาในประเทศไทย ปัจจัยที่นำมาพิจารณา ได้แก่ ระยะการเจริญเติบโตที่มีความเสี่ยงติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์ยาสูบนำเข้า ลักษณะการติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์ยาสูบ ความยากง่ายในการตรวจพบ การมีชีวิตรอดระหว่างขนส่ง การเล็ดรอดจากการตรวจที่จุดนำเข้า การเคลื่อนย้ายไปยังพืชอาศัย/พืชอาหารที่เหมาะสม

2.2.2 การประเมินโอกาสการตั้งรกราก เป็นการประเมินโอกาสที่ศัตรูพืชสามารถมีชีวิตอยู่รอดในประเทศไทยได้ ปัจจัยที่นำมาพิจารณาคือ ข้อมูลชีววิทยาของศัตรูพืช เช่น วงจรชีวิต จำนวนรุ่นต่อปี พืชอาหาร/พืชอาศัย จำนวนและการกระจายตัวของพืชอาหาร/พืชอาศัย พาหะ การแพร่ขยายพันธุ์ ความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตและแพร่พันธุ์ เป็นต้น

2.2.3 การประเมินโอกาสการแพร่กระจาย เป็นการประเมินโอกาสที่ศัตรูสามารถแพร่กระจายในพื้นที่ของประเทศไทย ปัจจัยที่นำมาพิจารณา ได้แก่ การเคลื่อนย้ายของศัตรูพืชไปกับผลิตผลเกษตร สินค้า หรือพาหนะขนส่ง ความสามารถในการเคลื่อนย้ายหาพืชอาหารโดยศัตรูพืชเองหรือต้องอาศัยพาหะ ซึ่งต้องพิจารณาต่อว่าพาหะดังกล่าวมีปรากฏในประเทศไทยหรือไม่ ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมในสภาพธรรมชาติ สิ่งกีดขวางโดยธรรมชาติ และพืชอาหาร/พืชอาศัย (รวมทั้งพืชที่มีความใกล้เคียงกับพืชอาหาร/พืชอาศัย)

2.3 การประเมินผลทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้นภายหลังการเข้ามาของศัตรูพืช (Potential economic consequence) ในประเทศไทย

นำรายชื่อศัตรูพืชที่ได้จากข้อ 2.1.4 มาพิจารณาความเป็นไปได้ที่ศัตรูพืชจะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจ ซึ่งอาจมีผลกระทบโดยตรงต่อพืช สัตว์ มนุษย์ และสิ่งแวดล้อม เช่น

ทำให้พืชสูญเสียผลผลิต หรือมีผลกระทบทางอ้อม เช่น ต้องเพิ่มต้นทุนในการป้องกันกำจัด กระทบต่อระบบการผลิตพืชภายในประเทศ กระทบต่อการค้าภายในประเทศและระหว่างประเทศ เป็นต้น โดยพิจารณาว่ามีผลกระทบจนถึงระดับที่ยอมรับไม่ได้ในพื้นที่ประเทศไทย

2.4 สรุปการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช

สรุปผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช ได้แก่ การประเมินโอกาสการเข้ามาและการแพร่กระจาย ตลอดจนศักยภาพในการเกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจภายหลังการเข้ามาของศัตรูพืช โดยใช้แนวทางการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของอนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช

การจำแนกและคัดเลือกวิธีการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชให้เหมาะสม (Identification and selection of appropriate risk management options) เพื่อลดความเสี่ยงของศัตรูพืช จากการประเมินในขั้นตอนที่ 2 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชเพื่อปกป้องพื้นที่เสี่ยงภัยควรอยู่บนพื้นฐานของข้อมูลที่รวบรวมได้ในการประเมินความเสี่ยง ซึ่งจะถูกนำมาใช้ประกอบการตัดสินใจว่ามีความจำเป็นหรือไม่ที่ต้องจัดการความเสี่ยง และมาตรการที่ใช้จะต้องมีความเหมาะสมกับศัตรูพืช มีประสิทธิภาพ และใช้ตามความจำเป็น ให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้

เวลาและสถานที่

เวลา: เดือนตุลาคม 2556- กันยายน 2557

สถานที่: กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของพืชและศัตรูพืช

1.1 ข้อมูลการปลูกมันฝรั่ง

พื้นที่ปลูก พื้นที่ปลูกมันฝรั่งส่วนใหญ่อยู่ในเขตภาคเหนือตอนบน ในจังหวัด เชียงใหม่ ตาก เชียงราย ลำพูน ปี 2556 มีพื้นที่ปลูกมันฝรั่งทั้งหมด 45,227 ไร่ ผลผลิตรวม 105,160 ตัน ประมาณ 90% ของผลผลิตใช้เป็นวัตถุดิบในโรงงานแปรรูป อีก 10% ใช้บริโภคสด (ตารางที่ 1)

ฤดูปลูก การปลูกมันฝรั่งในประเทศไทยแบ่งเป็น 2 ฤดู คือ

ฤดูแล้ง : เริ่มตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน – ธันวาคม และเก็บเกี่ยวประมาณเดือนกุมภาพันธ์ - มีนาคม เป็นการปลูกในเขตพื้นที่ราบ ส่วนใหญ่จะปลูกในนาข้าว

ฤดูฝน : เป็นการปลูกในเขตพื้นที่ราบบนเขาซึ่งมีอุณหภูมิต่ำ การปลูกแบ่งเป็น 2 รุ่น คือ รุ่นแรก ปลูกเดือนมีนาคม - เมษายน เก็บเกี่ยวเดือนมิถุนายน – กรกฎาคม รุ่นสอง ปลูกเดือนกรกฎาคม – สิงหาคม เก็บเกี่ยวเดือนตุลาคม – พฤศจิกายน

พันธุ์ ปัจจุบันมันฝรั่งที่ปลูกในประเทศไทยมี 2 พันธุ์ตามลักษณะการใช้งาน คือพันธุ์ที่ใช้บริโภคสด ได้แก่ พันธุ์สปุนตา และพันธุ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูป ได้แก่ พันธุ์แอตแลนติค ประมาณ 90% ของหัวพันธุ์ที่ใช้นำเข้าจากต่างประเทศ ที่เหลือเกษตรกรจะเก็บพันธุ์ไว้ใช้เองหรือซื้อหัวพันธุ์ที่ปลูกในประเทศ

การนำเข้า แม้ว่าจะมีการเพิ่มพื้นที่ปลูก แต่ผลผลิตมันฝรั่งในประเทศยังไม่เพียงพอ ประเทศไทยจึงต้องนำเข้ามันฝรั่งทุกปี ในปี 2554 - 2556 มีการนำเข้าหัวมันฝรั่งเพื่อบริโภคจากต่างประเทศเฉลี่ย 39,000 ตัน มูลค่า 605 ล้านบาท ประเทศที่มีการนำเข้าสูงสุด ได้แก่ แคนาดา เยอรมัน และ ออสเตรเลีย (ตารางที่ 2)

1.2 ข้อมูลศัตรูของมันฝรั่ง

จากการสืบค้นข้อมูล ศัตรูพืชในมันฝรั่งที่มีรายงานในประเทศไทย ทั้งหมด 88 ชนิด เป็น แมลง 38 ชนิด ไร 2 ชนิด ไส้เดือนฝอย 14 ชนิด เชื้อรา 22 ชนิด แบคทีเรีย 4 ชนิด ไวรัส 7 ชนิด ไวรอยด์ 1 ชนิด พบศัตรูพืชในมันฝรั่งจากอินเดีย ทั้งหมด 155 ชนิด เป็น แมลง 63 ชนิด ไร 2 ชนิด ไส้เดือนฝอย 25 ชนิด เชื้อรา 33 ชนิด แบคทีเรีย 14 ชนิด ไวรัส 16 ชนิด ไวรอยด์ 2 ชนิด ศัตรูพืชในมันฝรั่งจากอียิปต์ พบศัตรูพืชทั้งหมด 119 ชนิด เป็น แมลง 45 ชนิด ไร 2 ชนิด ไส้เดือนฝอย 18 ชนิด เชื้อรา 29 ชนิด แบคทีเรีย 11 ชนิด ไวรัส 12 ชนิด ไวรอยด์ 2 ชนิด (ตารางที่ 3)

2. การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

1.1 การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของมันฝรั่ง เนื่องมาจากการปรับปรุงแก้ไขกฎหมายด้านกักกันพืช ดังปรากฏในประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 ได้กำหนดทุกส่วนของพืชในวงศ์ *Solanaceae* เป็นสิ่งต้องห้าม การนำเข้าเพื่อการค้าต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชและปฏิบัติตามเงื่อนไขตามที่อธิบดีกำหนดเสียก่อน จึงจำเป็นต้องดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับควบคุมการนำเข้าหัวมันฝรั่งเพื่อบริโภคให้มีประสิทธิภาพ

1.2 กำหนดพื้นที่ที่จะการวิเคราะห์ความเสี่ยง คือ ประเทศไทย

1.3 การวิเคราะห์ความเสี่ยงหัวมันฝรั่งเพื่อแปรรูปและกำหนดเงื่อนไขที่ผ่านมาได้เคยมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงและกำหนดเงื่อนไขการนำเข้ามันฝรั่งเพื่อแปรรูปจาก

ขั้นตอนที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช

2.1 การจัดประเภทศัตรูพืช (Pest Categorization) ที่พบบนมันฝรั่ง

ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนจัดลำดับศัตรูพืช (Pest caterogorization) พบศัตรูพืชกักกันที่สามารถติดมากับหัวมันฝรั่งจากอินเดียและมีศักยภาพในการก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจทั้งสิ้น 12 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา 7 ชนิด ; *Boeremia foveata, Fusarium culmorum, Helminthosporuim solani, Phytophthora erythroseptica* var. *erythroseptica*, *P.*

megasperma, Synchytrium endobioticum, Verticillium albo-atrum ไส้เดือนฝอย 4 ชนิด ; *Globodera pallida, G. rostochiensis, Pratylenchus loosi, Tylenchorhynchus claytoni* และโปรโตซัว 1 ชนิด ; *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranean* ศัตรูพืชกักกันที่สามารถติดมากับหัวมันฝรั่งจากอียิปต์ และมีศักยภาพในการก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจพบทั้งสิ้น 9 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา 5 ชนิด ; *B. foveata, F. culmorum, P. cryptogea, P. erythroseptica* var. *erythroseptica, V.albo-atrum* ไส้เดือนฝอย 3 ชนิด ; *G. rostochiensis. Nacobbus aberrans, Pratylenchus goodeyi,* และโปรโตซัว 1 ชนิด ; *S. subterranea* f. sp. *subterranea*

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของหัวมันฝรั่งจากอินเดียและอียิปต์ เนื่องมาจากการปรับปรุงแก้ไขกฎหมายด้านกักกันพืช ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช พบศัตรูพืชกักกันที่สามารถติดมากับหัวมันฝรั่งจากอินเดียและอียิปต์ ที่มีศักยภาพในการก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจหลายชนิด ทั้งเชื้อรา ไส้เดือนฝอย และโปรโตซัว ซึ่งในขั้นตอนต่อไปจะต้องประเมินโอกาสการเข้ามาและแพร่กระจายของศัตรูพืชเหล่านี้ในประเทศไทย รวมถึงผลกระทบที่อาจเกิดขึ้น เพื่อกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชเพื่อลดความเสี่ยงที่ศัตรูพืชจะติดเข้ามา

เอกสารอ้างอิง

กรมศุลกากร.2557. **สถิติการนำเข้า-ส่งออก.** (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.customs.go.th/StatisticResult.jsp. (15 ตุลาคม 2557)

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2557. **ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร.** (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.oae.go.th/download/prcai/vegetable/potato.pdf (30 ตุลาคม 2557)

“**ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และ เงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550**” (2550, 1 มิถุนายน). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 124 ตอนพิเศษ 66 ง. หน้า 1-3.

พัฒนา สนธิรัตน ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2537. **ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย**. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร สหมิตรพริ้นติ้ง อ.บางใหญ่ จ.นนทบุรี. 285 หน้า.

มาโนช ทองเจียม .2541. มันฝรั่ง ,น.1-10. *ใน* **มันฝรั่งและศัตรูที่สำคัญ**, เอกสารวิชาการฉบับที่ 22 สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

สืบศักดิ์ สนธิรัตน. 2538. **ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในประเทศไทย.** สำนักพิมพ์รั้วเขียว กรุงเทพ 275 หน้า.

CABI (CAB International). 2014. **Crop Protection Compendium**. Wallingford, UK:CAB International. (Online). Available. www.cabi.org/cpc/ (May 12, 2014)

Braithwaite, M., Falloon, R.E., Genet, R.A., Wallace, A.R., Fletcher, J.D., Braam, W.F.1994. Control of powdery scab of potatoes with chemical seed tuber treatments. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**. 22: 121-128.

De Boer, R. 2000. Research into the biological and control of powdery scab of potato in Australia. pp. 79 – 83. *In:* **Proceeding of the First European Powdery Scab Workshop.** 20 - 22 July 2000. Aberdeen, Scotland.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2007. **Pest Risk Analysis Training: Participant Manual.** FAO, International Plant Protection Convention, Standards and Trade Development Facility and Canadian Food Inspection. Rome. Italy.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2011. **International Standards for Phytosanitary Measures no. 2: Framework for pest risk analysis (2007)**. (online). Available. http://www.ippc.int/publications/framework-pest-risk-analysis (May 14, 2014)

FAO (Food and Agriculture Organization). 2014. **International Standards for Phytosanitary Measures no. 11: Pest Risk Analysis for Quarantine Pests (2013)**. (online). Available. http://www.ippc.int/publications/pest-risk-analysis-quarantine-pests (May 14, 2014)

IPPC (International Plant Protection Convention). **Who we are.** (online). Available. http://www.ippc.int/about (May 2, 2014).

Merz, U. 2000. Experiments on direct control and yield loss made in New Zealand *In* **U. Merz and A.K. Lee, eds. Proceedings of the First European Powdery scab Workshop**. Scottish Agricultural College, Aberdeen.

Stevenson, W.R., Loria, R., Franc, G.D. and Weingartner, D.P. 2004. **Compendium of Potato Diseases**. The American Phytopathologal Society. Minnesota.106 p.

Table 1 Potato production area in Thailand 2012-2013

province	production area (rai)			Production (tons)		
	2011	2012	2013	2011	2012	2013
Chiang Mai	27,819	22,786	14,096	62,111	53,776	29,963
Tak	17,517	18,245	18,134	36,944	39,996	46,611
Lamphun	4,193	4,747	4,842	10,617	11,635	8,895
Chiang Rai	3,508	4,261	4,396	8,560	10,857	10,814
Phayao	4,097	3,927	1,671	13,803	12,920	4,010
others	5,387	4,168	2,088	13,863	9,976	4,867
total	**62,521**	**58,134**	**45,227**	**145,898**	**139,160**	**105,160**

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557

Table 2 Imports of potatoes for consumption to Thailand in 2011 - 2013

country	2011		2012		2013	
	volume (tons)	value (million baht)	volume (tons)	value (million baht)	volume (tons)	value (million baht)
Canada	12,010	229	9,200	178	10,300	195
China	9,540	68	5,400	65	7,310	30
USA	8,730	131	11,100	164	6,500	98
German	7,410	125	9,180	142	10,420	164
Others	1,590	38	1,530	34	7,760	154
total	**39,280**	**591**	**36,410**	**583**	**42,290**	**641**

กรมศุลกากร, 2557

Table 3 The number of species of potato pests in Thailand, India and Egypt

Pest	Thailand	India	Egypt
Insect	38	63	45
Mite	2	2	2
Nematode	14	25	18
Fungi	22	33	29
Bacteria	4	14	11
Virus	7	16	12
Viroid	1	2	2
Total	**88**	**155**	**119**

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของผลพลับสดนำเข้าจากรัฐอิสราเอล

Study on Pest Risk Analysis of Fresh Persimmon Fruit Imported from State of Israel

วรัญญา มาลี[1/] ภัทรา อุปดิษฐ์[1/] คมศร แสงจินดา[1/]
ณัฏฐพร อุทัยมงคล[1/] พรพิมล อธิปัญญาคม[2/]
[1/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของผลพลับสดนำเข้าจากรัฐอิสราเอล ดำเนินการที่กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ระหว่างเดือนตุลาคม 2556-กันยายน 2557 มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบชนิดศัตรูพืชกักกันและแนวทางการกำหนดมาตรการทางวิชาการด้านสุขอนามัยพืชสำหรับจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชในการนำเข้าผลพลับสดนำเข้าจากรัฐอิสราเอล โดยดำเนินการตามมาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน ผลการศึกษาได้ข้อมูลทั่วไปของพลับที่ปลูกในอิสราเอล การส่งออกและการรับรองสุขอนามัยพืชสำหรับการส่งออกผลพลับของอิสราเอล ได้ข้อมูลศัตรูพลับที่มีรายงานพบในอิสราเอล ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ลักษณะการทำลายวงจรชีวิต พืชอาหาร และเขตแพร่กระจายของศัตรูพลับ ศัตรูพลับจำนวน 67 ชนิด ดังนี้ แมลง 36 ชนิด ไร 4 ชนิด รา 21 ชนิด แบคทีเรีย 2 ชนิด และไส้เดือนฝอย 4 ชนิด ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงแมลงและไรศัตรูพืช จำนวน 40 ชนิด ในขั้นตอนการจัดประเภทศัตรูพืช (Pest categorization) พบว่าแมลงและไรศัตรูพืชที่มีโอกาสติดมากับผลพลับสดนำเข้าจากอิสราเอลที่ไม่มีในประเทศไทยมีจำนวน 6 ชนิด จัดเป็นแมลง 5 ชนิด ได้แก่ *Abgrallaspis cyanophylli, Ceratitis capitata, Lobesia botrana, Parlatoria oleae, Pseusococcus viburni* และ *Sesamia nonagrioides* และไร 1 ชนิด ได้แก่ *Colomerus vitis* การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชชนิดอื่นในขั้นตอนการจัดประเภทศัตรูพืช การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช และการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช จะดำเนินการในปีต่อไป

Keywords: วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช พลับ นำเข้า อิสราเอล
pest risk analysis, persimmon, import, Israel

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-02-01-13-57

คำนำ

พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และ พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 ซึ่งมีผลบังคับใช้ในปัจจุบัน ได้แบ่งประเภทของพืชออกเป็น3 ชนิดคือ สิ่งต้องห้าม สิ่งกำกัด และสิ่งไม่ต้องห้าม การนำเข้าสิ่งต้องห้ามเข้ามาในราชอาณาจักรสามารถกระทำได้ตามวัตถุประสงค์ 3 ประการ คือ (1) เพื่อทำการวิจัย (2) เพื่อการค้า และ (3) เพื่อกิจการอื่น ในพระราชบัญญัติกักพืชดังกล่าว มาตรา 8 (2) ได้ระบุไว้ว่า การนำเข้าหรือนำผ่านสิ่งต้องห้ามเพื่อการค้าต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขที่อธิบดีกำหนด ซึ่งหลังจากพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 มีผลใช้บังคับตั้งแต่ 28 สิงหาคม 2551 ประเทศใดที่ประสงค์ส่งออกพืชหรือผลผลิตพืชที่เป็นสิ่งต้องห้ามเข้ามายังราชอาณาจักรไทยเพื่อการค้า จะต้องแสดงความประสงค์โดยมีหนังสือเป็นทางการมายังกรมวิชาการเกษตรซึ่งเป็นหน่วยงานองค์กรอารักขาพืชของประเทศไทยเพื่อพิจารณา และดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชให้เสร็จสิ้น รวมถึงกำหนดเงื่อนไขการนำเข้า สินค้านั้นจึงจะสามารถนำเข้ามาในราชอาณาจักรได้โดยต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขตามที่กำหนด

พลับ (persimmon) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Diospyros kaki* Thunb. จัดอยู่ในอันดับ Ebenales วงศ์ Ebenaceae เป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 รัฐอิสราเอลแจ้งความประสงค์ส่งออกผลพลับสดมายังประเทศไทย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของผลพลับสดนำเข้าจากรัฐอิสราเอล โดยใช้แนวทางการวิเคราะห์ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures: ISPM) กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Framework for Pest Risk Analysis (2007)) (FAO, 2011) และมาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน (Pest Risk Analysis for Quarantine Pests (2013)) เพื่อทราบชนิดของศัตรูพืชกักกันและมาตรการทางวิชาการด้านสุขอนามัยพืชสำหรับจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชที่เหมาะสม ใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการออกกฎระเบียบ/กฎหมายเพื่อควบคุมการนำเข้าพลับจากรัฐอิสราเอล ซึ่งเป็นมาตรการป้องกันมิให้ศัตรูพืชร้ายแรงจากต่างประเทศเข้ามาในประเทศไทยต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. มาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Framework for Pest Risk Analysis (2007)) (FAO, 2011)
2. มาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน (Pest Risk Analysis for Quarantine Pests (2013)) (FAO, 2014)

3. คู่มือสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ตามแนวทางของอนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ (IPPC: International Plant Protection Convention) (FAO, 2007)

วิธีการ

1. สืบค้นและรวบรวมข้อมูลทั่วไปของพลับที่ปลูกในอิสราเอล เช่น พันธุ์ และแหล่งปลูก ตลอดจนการส่งออกและการรับรองสุขอนามัยพืชสำหรับการส่งออกผลพลับของอิสราเอล เป็นต้น

2. ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชโดยใช้หลักเกณฑ์การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชตามมาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกัก คู่มือสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ตามแนวทางของอนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ และแนวทางการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของอิสราเอล ซึ่งมีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช
(Stage 1: Initiation of Pest Risk Analysis)

ขั้นตอนที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช
(Stage 2: Pest Risk Assessment)

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช
(Stage 3: Pest risk management)

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

1.1 กำหนดจุดเริ่มต้นของการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช อาจเป็นศัตรูพืช เส้นทางที่ศัตรูพืชจะติดเข้ามา หรือการทบทวนโยบายของประเทศ ซึ่งเกี่ยวข้องกับทางกักกันพืช

1.2 กำหนดพื้นที่ที่จะทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

1.3 ตรวจสอบว่าเคยมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงโดยศัตรูพืช เส้นทางศัตรูพืช หรือนโยบายของรัฐมาก่อนหรือไม่ ทั้งภายในประเทศและในต่างประเทศ กรณีที่มีการดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชมาแล้ว ตรวจสอบดูว่ายังมีความเหมาะสมสามารถนำมาใช้ได้หรือไม่ เนื่องจากสภาพอาจเปลี่ยนแปลงไป พิจารณาความเป็นไปได้ในการนำเอาการวิเคราะห์ความเสี่ยงจากเส้นทางศัตรูพืชที่เหมือนกัน หรือศัตรูพืชที่เหมือนกัน มาใช้เพียงบางส่วนหรือทั้งหมด

ขั้นตอนที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช

กระบวนการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช สามารถแบ่งออกได้อย่างกว้างเป็น 3 ขั้นตอน ตามที่ IPPC กำหนด ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องสัมพันธ์กัน คือ

2.1 <u>การจัดประเภทศัตรูพืช (Pest Categorization) ของผลพลับสดนำเข้าจากอิสราเอล</u>

2.1.1 ค้นคว้ารวบรวมรายชื่อของสิ่งมีชีวิตที่มีรายงานว่าเป็นศัตรูพลับในอิสราเอล จากผลงานวิจัย ฐานข้อมูลศัตรูพืช ตำรา หรือเอกสารวิชาการต่าง ๆ ที่น่าเชื่อถือ

2.1.2 พิจารณาจัดกลุ่มศัตรูพืช เช่น แมลง ไร ไวรัส แบคทีเรีย และ รา เป็นต้น

2.1.3 บันทึกรายละเอียดของศัตรูพลับแต่ละชนิด ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ แหล่งแพร่กระจาย ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย/อาศัย และเป็นพาหะของศัตรูพืชชนิดอื่นหรือไม่

2.1.4 ตรวจสอบว่าเป็นศัตรูพืชที่พบในประเทศไทยหรือไม่ รวมถึงสถานภาพการควบคุมศัตรูพืชดังกล่าวในประเทศไทย

2.1.5 พิจารณาคัดเลือกเฉพาะศัตรูพืชที่ไม่พบในประเทศไทย หรือพบแต่มีการควบคุมอย่างเป็นทางการ อาจติดเข้ามากับผลพลับนำเข้า มีศักยภาพตั้งรกราก และแพร่กระจายในประเทศไทย ตลอดจนมีศักยภาพก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจหากศัตรูเข้ามาได้ในประเทศไทย

2.2 <u>การประเมินโอกาสการนำเข้าและการแพร่กระจาย (Assessment for probability of introduction and spread) ของศัตรูพลับในประเทศไทย</u>

นำรายชื่อศัตรูพืชที่ได้จากข้อ 2.1.5 มาประเมินโอกาสของศัตรูพืชในการนำเข้า (การเข้ามาและตั้งรกราก) และแพร่กระจายในประเทศไทย โดยพิจารณาปัจจัยต่างๆ ที่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เชื่อถือได้

2.2.1 การประเมินโอกาสการเข้ามา เป็นการประเมินโอกาสที่ศัตรูพืชจะปะปนมากับเส้นทางศัตรูพืชเข้ามาในประเทศไทย ปัจจัยที่นำมาพิจารณา ได้แก่ ระยะการเจริญเติบโตที่มีความเสี่ยงติดเข้ามากับผลสดพลับนำเข้า ลักษณะการติดเข้ามากับผลพลับ ความยากง่ายในการสังเกตเห็นร่องรอยจากภายนอกผล การมีชีวิตรอดระหว่างขนส่ง การเล็ดรอดจากการตรวจที่จุดนำเข้า การเคลื่อนย้ายไปยังพืชอาศัย/พืชอาหารที่เหมาะสม และเจตนาการนำผลพลับไปใช้ประโยชน์ในกรณีนี้เป็นการนำเข้าเพื่อการบริโภค

2.2.2 การประเมินโอกาสการตั้งรกราก เป็นการประเมินโอกาสที่ศัตรูพืชสามารถมีชีวิตอยู่รอดในประเทศไทยได้ ปัจจัยที่นำมาพิจารณาคือ ข้อมูลชีววิทยาของศัตรูพืช เช่น วงจรชีวิต จำนวนรุ่นต่อปี พืชอาหาร/พืชอาศัย จำนวนและการกระจายตัวของพืชอาหาร/พืชอาศัย พาหะ การแพร่ขยายพันธุ์ ความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตและแพร่พันธุ์ เป็นต้น

2.2.3 การประเมินโอกาสการแพร่กระจาย เป็นการประเมินโอกาสที่ศัตรูสามารถแพร่กระจายในพื้นที่ของประเทศไทย ปัจจัยที่นำมาพิจารณา ได้แก่ การเคลื่อนย้ายของศัตรูพืชไปกับผลิตผลเกษตร สินค้า หรือพาหนะขนส่ง ความสามารถในการเคลื่อนย้ายหาพืชอาหารโดยศัตรูพืชเอง หรือต้องอาศัยพาหะ ซึ่งต้องพิจารณาต่อว่าพาหะดังกล่าวมีปรากฏในประเทศไทยหรือไม่ ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมในสภาพธรรมชาติ สิ่งกีดขวางโดยธรรมชาติ และพืชอาหาร/พืชอาศัย (รวมทั้งพืชที่มีความใกล้เคียงกับพืชอาหาร/พืชอาศัย)

2.3 การประเมินผลทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้นภายหลังการเข้ามาของศัตรูพืช (Potential economic consequence) ในประเทศไทย

นำรายชื่อศัตรูพืชที่ได้จากข้อ 2.1.5 มาพิจารณาความเป็นไปได้ที่ศัตรูพืชจะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจ ซึ่งอาจมีผลกระทบทางตรงต่อพืช สัตว์ มนุษย์ และสิ่งแวดล้อม เช่น ทำให้พืชสูญเสียผลผลิต หรือมีผลกระทบทางอ้อม เช่น ต้องเพิ่มต้นทุนในการป้องกันกำจัด กระทบต่อระบบการผลิตพืชภายในประเทศ กระทบต่อการค้าภายในประเทศและระหว่างประเทศ เป็นต้น โดยพิจารณาว่ามีผลกระทบจนถึงระดับที่ยอมรับไม่ได้ในพื้นที่ประเทศไทย

2.4 สรุปการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช

สรุปผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช ได้แก่ การประเมินโอกาสการนำเข้าและการแพร่กระจายตลอดจนศักยภาพในการเกิดผลทางเศรษฐกิจภายหลังการเข้ามาของศัตรูพืช โดยใช้แนวทางการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของอนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ และองค์การความมั่นคงทางชีวภาพออสเตรเลีย

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช

การจำแนกและคัดเลือกวิธีการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชให้เหมาะสม (Identification and selection of appropriate risk management options) เพื่อลดความเสี่ยงของศัตรูพืช จากการประเมินในขั้นตอนที่ 2 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชเพื่อปกป้องพื้นที่เสี่ยงภัยควรอยู่บนพื้นฐานของข้อมูลที่รวบรวมได้ในการประเมินความเสี่ยง ซึ่งจะถูกนำมาใช้ประกอบการตัดสินใจว่ามีความจำเป็นหรือไม่ที่ต้องจัดการความเสี่ยง และมาตรการที่ใช้จะต้องมีความเหมาะสมกับศัตรูพืช มีประสิทธิภาพและใช้ตามความจำเป็น ให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้

เวลาและสถานที่

เวลา: เดือนตุลาคม 2556-กันยายน 2557

สถานที่: กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ข้อมูลทั่วไปของพลับที่ปลูกในอิสราเอล การส่งออกและการรับรองสุขอนามัยพืชสำหรับการส่งออกผลพลับของอิสราเอล

- **พื้นที่ปลูกพลับ** อิสราเอลปลูกมีพื้นที่ปลูกพลับมากกว่า 1,750 เฮกเตอร์ และผลผลิตในแต่ละปีประมาณ 35,000 ตัน พื้นที่ปลูกพลับเพื่อการค้าปรากฏทั่วประเทศ พื้นที่ผลิตหลักได้แก่ Northern and Western Galilee, หุบเขาฮูลา (Hula Valley), ชายฝั่งทะเล (coastal plain) และ northern Negev (PPIS, 2008)

- **สภาพภูมิอากาศ** Northern and Western Galilee และ Hula Valley มีปริมาณฝนตก 500-1,300 มิลลิเมตรต่อปี อุณหภูมิเฉลี่ยในฤดูร้อน 25-30 องศาเซลเซียส และในฤดูหนาว 10-14 องศาเซลเซียส สำหรับในเขตชายฝั่งทะละ และ Northern Negev ซึ่งเป็นพื้นที่แห้งแล้งมีอุณหภูมิ

เฉลี่ยในฤดูร้อน 25-32 องศาเซลเซียส และในฤดูหนาว 10-18 องศาเซลเซียส ปริมาณฝนตกบริเวณชายฝั่งทะเล 250-700 มิลลิเมตรต่อปี และทางตอนเหนือของ Negev 100-350 มิลลิเมตรต่อปี (PPIS, 2008)

- **ฤดูการผลิตและการเก็บเกี่ยว** การเก็บเกี่ยวผลพลับอยู่ในช่วงเดือนตุลาคมถึงต้นเดือนธันวาคม ส่วนการส่งออกอยู่ในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนมีนาคมในปีถัดไป วิธีเก็บจะเก็บด้วยมือ โดยคนงานจะปีนบันไดหรือบันไดที่มีกลไกขึ้นไปเก็บลูกพลับ (PPIS, 2008)

- **การจัดการหลังเก็บเกี่ยว** เกษตรกรที่ปลูกพลับและโรงคัดบรรจุจะได้รับการรับรองโดยหน่วยงานของรัฐ (Ministry of Agriculture and Rural Development) และการปฏิบัติเป็นไปตามมาตรฐานต่างๆ เช่น ISO BRC และ EUREPGAP เป็นต้น ภายหลังจากเก็บเกี่ยวในสวน ผลพลับจะถูกนำมายังโรงคัดบรรจุ และมีการคัดผลที่เน่าและเสียหายทิ้ง ขั้นตอนการปฏิบัติในโรงคัดบรรจุประกอบด้วย การล้างด้วยน้ำ เป่าให้แห้ง คัดขนาด ตรวจสอบว่าปราศจากศัตรูพืช และบรรจุลงในบรรจุภัณฑ์ที่ใหม่ สะอาด มีขนาดแตกต่างกันไป ขึ้นกับความต้องการของตลาด) ขนาดกล่องสามารถบรรจุผลพลับได้ 1-5 กิโลกรัม การเก็บรักษาจะเก็บที่อุณหภูมิ -1.5 ถึง -0.5 องศาเซลเซียส ในระบบปิด (PPIS, 2008)

- **การขนส่ง** (ภายในประเทศและระหว่างประเทศ) ขนส่งทางอากาศ ขนส่งทางน้ำโดยบรรจุในตู้คอนเทนเนอร์แบบห้องเย็น ขนส่งทางบกโดยรถบรรทุกห้องเย็น (PPIS, 2008)

- **การส่งออกผลพลับของอิสราเอล** อิสราเอลส่งออกผลพลับไปยังประเทศต่าง ๆ ประเทศในแถบเอเชีย ได้แก่ สิงคโปร์ ฮ่องกง มาเลเซีย และ ญี่ปุ่น ประเทศในแถบยุโรป ได้แก่ อังกฤษ สแกนดิเนเวีย เนเธอร์แลนด์ เบลเยี่ยม ฝรั่งเศส เยอรมนี สวิตเซอร์แลนด์เลนด์ และออสเตรีย และประเทศอื่น ๆ ได้แก่ บราซิล อเมริกา ออสเตรเลีย แคนาดา และแอฟริกาใต้ โดยมีผลผลิตพลับที่ส่งออกในแต่ละปี ประมาณ 16,000 ตัน (PPIS, 2008)

- **ปริมาณพลับที่อิสราเอลต้องการส่งออก**มายังประเทศไทยประมาณ 100 ตันต่อปี (PPIS, 2008)

- **การรับรองสุขอนามัยพืช** (PPIS, 2008)

(1) ภายหลังจากการขั้นตอนคัดเลือกผลพลับที่เสียหายหรือถูกศัตรูพืชทำลายทิ้งและคัดขนาดในโรงคัดบรรจุ เจ้าหน้าที่จากหน่วยงาน Plant Protection and Inspection Services จะสุ่มผลพลับ 2 เปอร์เซ็นต์ ในแต่ละ consignment เพื่อตรวจสอบศัตรูพืช (inspection) และออกใบรับรองสุขอนามัยพืช

(2) การส่งออกไปยังอเมริกา ออสเตรเลีย และญี่ปุ่น ต้องมีมาตรการสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้เมดิเตอร์เรเนียน (Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*) ด้วยความเย็น (Cold treatment) ดังนี้

อุณหภูมิตรงบริเวณกึ่งกลางผล	ระยะเวลา (จำนวนวันติดต่อกัน)
1.11 องศาเซลเซียส (๓๔ องศาฟาเรนไฮต์) หรือต่ำกว่า	14 วัน
1.67 องศาเซลเซียส (35 องศาฟาเรนไฮต์) หรือต่ำกว่า	16 วัน
2.22 องศาเซลเซียส (36 องศาฟาเรนไฮต์) หรือต่ำกว่า	18 วัน

- **สถิติการนำเข้าผลพลับของไทย** ประเทศไทยนำเข้าผลพลับสดจากต่างประเทศ เช่น จีน ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ เพื่อบริโภคเป็นจำนวนมากในแต่ละปี ในปี 2555 และ 2556 ประเทศไทยนำเข้าผลพลับสดจากประเทศต่างๆ มีปริมาณการนำเข้าประมาณ 454 และ 700 ตัน คิดเป็นมูลค่า 137 และ 162 ล้านบาท ตามลำดับ โดยประเทศที่นำเข้ามากที่สุดคือ จีน ญี่ปุ่น และ เกาหลีใต้ (กรมศุลกากร, 2557)

การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

1.1 การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของผลพลับสดนำเข้าเพื่อบริโภค เนื่องมาจากการปรับปรุงแก้ไขกฎหมายด้านกักกันพืช ดังปรากฏในประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 ได้กำหนดให้ผลสดของพืชในสกุล *Dyospyros* ซึ่งรวมถึงผลพลับสดจากทุกแหล่ง เป็นสิ่งต้องห้าม การนำเข้าเพื่อการค้าจำเป็นต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และกำหนดเงื่อนไขตามที่อธิดีกำหนดเสียก่อน การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของผลพลับสดนำเข้าจากอิสราเอลเป็นการวิเคราะห์เส้นทางศัตรูพืช (pathway)ที่จะเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศไทย

ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงจำเป็นต้องดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับควบคุมการนำเข้าผลพลับสดนำเข้าจากอิสราเอลให้มีประสิทธิภาพ

1.2 พื้นที่ที่จะทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชคือ “ประเทศไทย”

1.3 จากการตรวจสอบจากเอกสารและข้อมูลต่างๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ พบว่ามีเอกสาร รายงานผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของพลับนำเข้าจากญี่ปุ่น เกาหลีใต้ และอิสราเอล โดยองค์การความมั่นคงทางชีวภาพออสเตรเลีย พบว่ามีศัตรูพืชกักกันจำนวน 20 ชนิด ได้แก่ แมลงวันผลไม้ *Ceratitis capitata* เพลี้ยหอย *Ceroplastes floridensis, Lepidosaphes conchiformis, Lopholeucaspis japonica, Parlatoria pergandii, Pseudaonidia duplex, Pseudaulacaspis pentagona* เพลี้ยแป้ง *Phenacoccus pergandei, Planococcus kraunhiae, Pseudococcus cryptus* หนอนผีเสื้อทำลายผล *Adris tyrannus amurensis, Lagoptera juno, Stathmopoda masinissa, Cryptoblabes gnidiella, Grapholita molesta, Homona magnanima, Lobesia botrana* เพลี้ยไฟ *Ponticulothrips diospyrosi, Retithrips syriacus* และเชื้อรา *Monilinia fructigena* ซึ่งกำหนดมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช ดังนี้ แมลงวันผลไม้ใช้มาตรการเขตปลอดแมลงวันผลไม้หรือการกำจัดด้วยความเย็น หนอนเจาะผลใช้มาตรการ เขตปลอดศัตรูพืชหรือแหล่งผลิตปลอดศัตรูพืช หรือ การควบคุมศัตรูพืชในสวนและการตรวจสอบศัตรูพืชด้วยสายตา หรือรมด้วยเมทิลโบรไมด์ และเชื้อราใช้มาตรการการเฝ้าระวัง เป็นต้น (BA, 2004)

นอกจากนี้เอกสารรายงานผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของผลพลับสดจากสเปนและแอฟริกาใต้ นำเข้าสหรัฐอเมริกา โดยกระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา รายงานว่าการนำเข้าพลับจากสเปน มีศัตรูพืชกักกันจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ แมลงวันผลไม้ *Ceratitis capitata* และเชื้อรา *Monilinia*

fructigena (USDA, 2000) และการนำเข้าพลับจากแอฟริกาใต้มีศัตรูพืชกักกัน จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ แมลงวันผลไม้ *Ceratitis capitata, Ceratitis rosa Karsch,* เพลี้ยหอย *Ceroplastes destructor, Ceroplastes rubens, Icerya seychellarum* เพลี้ยแป้ง *Delottococcus elisabethae, Paracoccus burnerae* หนอนผีเสื้อ *Cryptoblabes gnidiella* และ *Thaumatotibia leucotreta* ซึ่งกำหนดมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชโดยผลพลับนำเข้าต้องได้รับการฉายรังสีที่ปริมาณรังสีดูดกลืนต่ำสุด 400 เกรย์ (USDA, 2010)

ข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้ประกอบการพิจารณาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชได้เพียงบางส่วน เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์เส้นทางศัตรูพืชเหมือนกัน อย่างไรก็ตามยังคงมีความจำเป็นต้องศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของการนำเข้าผลพลับสดจากอิสราเอลมายังประเทศไทย เนื่องจากชนิดศัตรูพลับในอิสราเอลที่จะวิเคราะห์ มีความแตกต่างกับศัตรูพลับที่พบในญี่ปุ่น เกาหลีใต้ และแอฟริกาใต้ และแม้ว่าชนิดศัตรูพืชจะเหมือนกันแต่ปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศ และปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องของประเทศไทย มีความแตกต่างจากประเทศนำเข้าที่ได้วิเคราะห์ไว้

ขั้นตอนที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช

2.1 <u>การจัดประเภทศัตรูพืช (Pest Categorization) ของผลพลับสดนำเข้าจากอิสราเอล</u>

2.1.1-2.1.4 ผลการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชจากแหล่งสืบค้นข้อมูลต่างๆ และข้อมูลจาก Plant Protection and Inspection Services, Israel ได้ข้อมูลศัตรูพลับที่มีรายงานพบในอิสราเอล ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ลักษณะการทำลายวงจรชีวิต พืชอาหาร และเขตแพร่กระจายของศัตรูพลับ ศัตรูพลับจำนวน 67 ชนิด ดังนี้

แมลง 36 ชนิด ได้แก่ *Abgrallaspis cyanophylli, Aleurothrixus floccosus, Apate monachus, Aphis gossypii, Aphis spiraecola, Ascotisselenaria, Bemisia tabaci, Ceratitis capitata, Ceroplastes floridensis, Coccus hesperidum, Cryptoblabes gnidiella, Dialeurodes citri, Euzopherodes vapidella, Frankliniella occidentalis, Gymnoscelis rufifasciata, Heliothrips haemorrhoidalis, Hemiberlesia lataniae, Lobesia botrana, Maladera matrida, Milviscutulus mangiferae, Oceanaspidiotus spinosus, Oxycarenus hyalinipennis, Parabemisia myricae, Parasaissetia nigra, Parlatoria oleae, Parthenolecanium persicae, Planococcus citri, Pseudococcus cryptus, Pseudococcus longispinus, Pseudococcus viburni, Retithrips syriacus, Scirtothrips dorsalis, Sesamia nonagrioides, Stenozygum coloratum, Trialeurodes vaporariorum* และ *Zeuzera pyrina*

ไร 4 ชนิด ได้แก่ *Colomerus vitis, Eutetranychus orientalis, Polyphagotarsenmus latus* และ *Tetranychus cinnabarinus*

รา 21 ชนิด ได้แก่ *Alternaria alternata, Botrytis cinerea, Cladosporium* sp., *Colletotrichum coccodes, Cylindrocladium* sp., *Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Ganoderma* sp., *Lasiodiplodia theobromae, Macrophomina phaseolina, Monilinia*

fructigena, Penicillium expansum, Pestalotiopsis sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Phytophthora citrophthora, Pythium* sp., *Rhizobium radiobacter, Rhizoctonia solani, Rosellinia necatrix* `และ*Scierotinia scierotiorum*

แบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *Agrobacterium tumefaciens* และ *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, ไส้เดือนฝอย 4 ชนิด ได้แก่ *Helicotylenchus pseudorobustus, Meloidogyne javanica, Trichodorus* sp. และ *Tylenchulus semipenetrans*

2.1.5 ศัตรูพืชที่มีโอกาสติดมากับผลพลับสดนำเข้าจากอิสราเอลที่ไม่มีในประเทศไทย

ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงแมลงและไรศัตรูพืช จำนวน 40 ชนิด ในขั้นตอนการจัดประเภทศัตรูพืช พบว่าแมลงและไรศัตรูพืชที่มีโอกาสติดมากับผลพลับสดนำเข้าจากอิสราเอลที่ไม่มีในประเทศไทยมีจำนวน 6 ชนิด ดังนี้

แมลง 5 ชนิด ได้แก่ *Abgrallaspis cyanophylli, Ceratitis capitata, Lobesia botrana, Parlatoria oleae, Pseusococcus viburni* และ *Sesamia nonagrioides*

ไร 1 ชนิด ได้แก่ *Colomerus vitis*

**การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชชนิดอื่นในขั้นตอนการจัดประเภทศัตรูพืช การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช และการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช จะดำเนินการต่อในปีต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของพลับนำเข้าจากอิสราเอล ได้ข้อมูลทั่วไปของพลับที่ปลูกในอิสราเอล การส่งออกและการรับรองสุขอนามัยพืชสำหรับการส่งออก รวมถึงข้อมูลศัตรูพืชของพลับที่มีรายงานพบในอิสราเอล ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ลักษณะการทำลายวงจรชีวิต พืชอาหาร และเขตแพร่กระจายของศัตรูพลับ จำนวน 67 ชนิด เป็นแมลง 36 ชนิด ไร 4 ชนิด รา 21 ชนิด แบคทีเรีย 2 ชนิด และไส้เดือนฝอย 4 ชนิด ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงแมลงและไรศัตรูพืช จำนวน 40 ชนิด ในขั้นตอนการจัดประเภทศัตรูพืช พบว่าแมลงและไรศัตรูพืชที่มีโอกาสติดมากับผลพลับสดนำเข้าจากอิสราเอลที่ไม่มีในประเทศไทยมีจำนวน 6 ชนิด จัดเป็นแมลง 5 ชนิด ได้แก่ *Abgrallaspis cyanophylli, Ceratitis capitata, Lobesia botrana, Parlatoria oleae, Pseusococcus viburni* และ *Sesamia nonagrioides* และไร 1 ชนิด ได้แก่ *Colomerus vitis* การศึกษายังไม่แล้วเสร็จจึงจะดำเนินการต่อในปีต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กรมศุลกากร. 2556. สถิติการนำเข้า-ส่งออก. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.customs.go.th/statisticResult.jsp (November 12, 2013)

“ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และ เงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550” (2550, 1 มิถุนายน). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 124 ตอนพิเศษ 66 ง. หน้า 1-3.

BA (Biosecurity Australia). 2004. **Persimmon fruit (*Diospyros kaki* L.) fromJapan, Korea and Israel: Final Import Policy**. Biosecurity Australia, Canberra.

CABI (CAB International). 2014**. Crop Protection Compendium**. Wallingford, UK:CAB International. (Online). Available. www.cabi.org/cpc/ (February 12, 2014)

FAO (Food and Agriculture Organization). 2007. **Pest Risk Analysis Training: Participant Manual**. FAO, International Plant Protection Convention, Standards and Trade Development Facility and Canadian Food Inspection. Rome. Italy.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2011. **International Standards for Phytosanitary Measures no. 2: Framework for pest risk analysis (2007)**. (Online). Available. http://www.ippc.int/publications/framework-pest-risk-analysis (May 14, 2014)

FAO (Food and Agriculture Organization). 2014. **International Standards for Phytosanitary Measures no. 11: Pest Risk Analysis for Quarantine Pests (2013).** (Online). Available. http://www.ippc.int/publications/pest-risk-analysis-quarantine-pests (May 14, 2014)

PPIS (Plant Protection and Inspection Services). 2008. **Information for the PRA regarding the importation of Israel fresh persimmon fruit to Thailand**. Plant Protection and Inspection Services, Ministry of Agriculture and Rural Development, State of Israel.

USDA (United States Department of Agriculture). 2000. **Importation of Persimmons, *Diospyros kaki* from Spain into the United States**: A Qualitative, Pathway-Initiated Pest Risk Assessment. Animal and Plant Health Inspection Service, United States Department of Agriculture, USA.

USDA (United States Department of Agriculture). 2010. **Importation of fresh persimmon (*Diospyros kaki*) fruit from South Africa into the continental United States**: Risk Management Document. Animal and Plant Health Inspection Service, United States Department of Agriculture, USA.

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของผลองุ่นสด นำเข้าจากสหรัฐเม็กซิโก

Study on Pest Risk Analysis for the Importation of Fresh Fig Fruit from the United States of America

อลงกต โพธิ์ดี วรัญญา มาลี ณัฏฐพร อุทัยมงคล คมศร แสงจินดา
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขององุ่นสดนำเข้าจากประเทศสหรัฐเม็กซิโก ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2556 - กันยายน 2557 ณ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งองุ่นเป็นพืชอยู่ในวงศ์ Vitaceae สกุล *Vitis* ชื่อวิทยาศาสตร์ *Vitis vinifera* L. ซึ่งตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไข ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 กำหนดให้ผลสดของพืชสกุล Vitis เป็นสิ่งต้องห้าม ซึ่งการนำเข้าหรือนำผ่านซึ่งสิ่งต้องห้ามเพื่อการค้าต้องได้รับอนุญาตจากอธิบดีกรมวิชาการเกษตร ต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชกำกับมาด้วย ต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ต้องนำเข้าหรือนำผ่านทางด่านตรวจพืชเพื่อให้พนักงานเจ้าหน้าที่ตรวจ และต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขที่อธิบดีกรมวิชาการเกษตรกำหนดโดยคำแนะนำของคณะกรรมการกักพืชโดยประกาศลงในราชกิจจานุเบกษา กรมวิชาการเกษตรยังไม่อนุญาตให้นำเข้าผลองุ่นสดจากสหรัฐเม็กซิโกเพื่อการค้าสำหรับบริโภคสด ผลการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืช พบว่าศัตรูองุ่นที่มีรายงานพบในประเทศสหรัฐเม็กซิโกมีจำนวน 124 ชนิด ประเทศไทยมีจำนวน 80 ชนิด ซึ่งจะนำไปดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนต่อไป

Keywords: วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช นำเข้า องุ่น สหรัฐเม็กซิโก
Pest Risk Analysis, Importation, Grape, Mexico

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-02-01-14-57

คำนำ

จากการที่ประเทศไทยเข้าเป็นสมาชิกขององค์การการค้าโลก (World trade organization: WTO) ทำให้ประเทศไทยต้องปฏิบัติตามความตกลงว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement of Application of Sanitary and Phytosanitary Measures: SPS Agreement) ซึ่งเป็นมาตรการในการปกป้องชีวิตหรือสุขภาพของมนุษย์ สัตว์ และพืช ซึ่งการนำมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชไปใช้ จะต้องอยู่ในระดับเพื่อการปกป้องชีวิตหรือสุขภาพของมนุษย์ สัตว์ หรือพืชเท่านั้น โดยจะต้องอยู่บนพื้นฐานของหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ ดังนั้นการกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าสินค้าเกษตรโดยไม่ก่อให้เกิดการกีดกันทางการค้าแอบแฝง ประเทศไทยจำเป็นต้องมีการทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของสินค้าเกษตรที่นำเข้าเพื่อกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าในการป้องกันหรือจัดการความเสี่ยงของศัตรูพืชที่อาจเกิดขึ้น ซึ่งกระบวนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช อาจเริ่มในสถานการณ์ต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ มีการร้องขอให้พิจารณาเส้นทางผ่านเส้นใดเส้นหนึ่งที่อาจต้องมีมาตรการสุขอนามัยพืช มีการตรวจพบศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่งที่อาจเป็นเหตุผลให้มีมาตรการสุขอนามัยพืช มีการศึกษาทบทวนหรือปรับปรุงมาตรการหรือนโยบายสุขอนามัยพืชต่าง ๆ หรือ มีการขอร้องให้มีการกำหนดชี้ชัดว่าสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งเป็นศัตรูพืชหรือไม่ โดยใช้กรอบ มาตรฐานแนวปฏิบัติ ซึ่งพัฒนาขึ้นมาโดยองค์การระหว่างประเทศ คือ อนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention: IPPC)

องุ่นพืชอยู่ในวงศ์ Vitaceae สกุล *Vitis* ชื่อวิทยาศาสตร์ *Vitis vinifera* L. ซึ่งปัจจุบันผลสดของพืชสกุลวีติส (*Vitis* spp.) จากทุกแหล่งจัดเป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 การนำเข้าหรือนำผ่านเพื่อการค้า จะต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชกำกับมาด้วย และต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช รวมทั้งต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขที่อธิบดีกรมวิชาการเกษตรกำหนด จึงจะสามารถนำเข้าหรือนำผ่านราชอาณาจักรได้ ในปี พ.ศ. 2555 ประเทศไทยนำเข้าสินค้าเกษตรและผลิตภัณฑ์เป็นมูลค่า 433,732 ล้านบาท โดยเป็นผลไม้และผลิตภัณฑ์ มูลค่า 24,663 ล้านบาท (ศูนย์สารสนเทศเกษตร, 2556) จากการศึกษารวบรวมข้อมูลศัตรูพืชพบว่า มีศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่มีรายงานพบในประเทศไทย ซึ่งศัตรูพืชเหล่านี้มีโอกาสที่จะติดเข้ามากับผลองุ่นสดนำเข้าได้ ดังนั้นหากประเทศไทยไม่มีมาตรการสุขอนามัยพืชที่เหมาะสมแล้ว อาจก่อให้เกิดปัญหาของศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่เคยพบในประเทศติดมากับผลองุ่นสดที่นำเข้า เกิดการแพร่กระจายและเพิ่มปริมาณจนเกิดเป็นการระบาดของศัตรูพืชชนิดใหม่ขึ้นได้ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดผลเสียหายต่อเศรษฐกิจของประเทศอย่างใหญ่หลวง ดังนั้นจึงได้ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขององุ่นนำเข้า (เฉพาะผลสดเพื่อบริโภค) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้รายชื่อศัตรูพืชกักกัน และกำหนดมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชที่เหมาะสมสำหรับการนำเข้าผลองุ่นสดจากประเทศสหรัฐเม็กซิโก และใช้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนในการประกาศทบทวนมาตรการทางสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าผลสดขององุ่นจากประเทศสหรัฐเม็กซิโก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เอกสารงานวิจัยทั้งในและต่างประเทศ ตำราวิชาการ วารสารวิชาการ รายงานการประชุมและสัมมนาทางวิชาการ

2. มาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures: ISPM) ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Framework for Pest Risk Analysis) (FAO, 2011)

3. มาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน (Pest risk analysis for quarantine pests) (FAO, 2014)

วิธีการ

1 การศึกษาข้อมูลพืชและข้อมูลศัตรูพืชขององุ่น

ศึกษาข้อมูลพืชและข้อมูลศัตรูพืชขององุ่น โดยค้นคว้ารวบรวมข้อมูลจาก ตำราวิชาการ วารสารวิชาการ เอกสารเผยแพร่ รายงานการประชุมและสัมมนาทางวิชาการ ที่มีรายงานทั้งในและต่างประเทศ เพื่อให้ได้ข้อมูล ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง ชื่อสามัญ ชีววิทยา แหล่งแพร่กระจาย ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย การป้องกันกำจัด และมาตรการทางสุขอนามัยพืช

2 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชกับผลองุ่นสดนำเข้าจากประเทศสหรัฐเม็กซิโก โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน โดยมีขั้นตอน ดังนี้

2.1 การเริ่มต้น (Stage 1: Initiation)

โดยการจำแนกชนิดสิ่งมีชีวิตและเส้นทางผ่านต่าง ๆ ที่จะมีการพิจารณาสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่เกี่ยวข้องกับพื้นที่การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่ได้มีการระบุจำแนกไว้ และการกำหนดพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชรวมทั้งการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่ผ่านมา

2.2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest Risk Assessment)

การจัดประเภทศัตรูพืช (Pest Categorization)

ดำเนินการโดยการค้นคว้ารวบรวมรายชื่อสิ่งมีชีวิตที่มีรายงานว่าเป็นศัตรูขององุ่น โดยจัดแบ่งออกเป็นกลุ่ม เช่น แมลง ไร ไวรัส ไวรอยด์ แบคทีเรีย รา ไส้เดือนฝอย เป็นต้น พร้อมทั้งบันทึกรายละเอียดของศัตรูองุ่นแต่ละชนิด ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ แหล่งแพร่กระจาย ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย/อาศัย พบหรือไม่พบในประเทศไทย พิจารณาคัดเลือกเฉพาะ

ศัตรูพืชที่ไม่พบในประเทศไทย มีโอกาสติดเข้ามากับผลอุ่นสดและอาจจะก่อให้เกิดความเสียหายได้ นำมาประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนต่อไป

การประเมินความเสี่ยง (Risk Assessment)

โดยการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของอุ่นที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐเม็กซิโก ที่ไม่พบในประเทศไทย มีโอกาสติดเข้ามากับผลอุ่นสด ตั้งรกรากอย่างถาวร และแพร่ระบาดในประเทศ ตลอดจนประเมินศักยภาพที่จะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจรวมทั้งผลกระทบทางตรงและทางอ้อมหากติดเข้ามา ปัจจัยที่พิจารณา คือ

1. การประเมินศักยภาพในการที่ศัตรูจะเข้ามาเจริญพันธุ์ตั้งรกรากอย่างถาวร และการแพร่กระจาย ในพื้นที่ที่ทำการวิเคราะห์ (Assessment of entry, establishment and spread) โดยพิจารณาปัจจัยต่าง ๆ ที่สามารถทำให้ศัตรูพืชเข้ามาเจริญแพร่พันธุ์ได้ โดยมีหลักฐานสนับสนุนผลการวิเคราะห์ เช่น สภาพแวดล้อมและสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญแพร่พันธุ์และแพร่ระบาดของศัตรูพืช พืชอาศัย เครื่องกีดกั้นตามธรรมชาติ การเคลื่อนย้ายของศัตรูพืชและพาหะของศัตรูพืชที่มีปรากฏในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยง เป็นต้น

2. การประเมินศักยภาพที่จะเกิดผลตามมาทางเศรษฐกิจในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Potential economic consequence) ความเป็นไปได้สูงที่ศัตรูพืชจะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจ ซึ่งอาจมีผลกระทบทางตรงต่อพืช สัตว์ มนุษย์ และสิ่งแวดล้อม หรือมีผลกระทบทางอ้อม เช่น การป้องกันกำจัด การค้าภายในประเทศและระหว่างประเทศ ผลกระทบทางสังคม เป็นต้น โดยพิจารณาว่ามีผลกระทบจนถึงระดับที่ยอมรับไม่ได้ ในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

2.3 การบริหารจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest Risk Management)

การบริหารจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อปกป้องพื้นที่เสี่ยงภัย (Endangered area) โดยเป็นสัดส่วนกับความเสี่ยงที่จำแนกได้ในการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช อยู่บนพื้นฐานของข้อมูลที่รวบรวมได้ในการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช มาตรการสุขอนามัยพืชต้องมีประสิทธิภาพและใช้เท่าที่จำเป็นเพื่อประสิทธิภาพในการป้องกันของพื้นที่เสี่ยงภัย

เวลาและสถานที่

เวลา: เดือนตุลาคม 2556 - เดือนกันยายน 2557

สถานที่: กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาข้อมูลพืชและข้อมูลศัตรูพืชของอุ่น

อุ่นเป็นไม้ผลที่มีการกระจายพันธุ์มากที่สุดชนิดหนึ่ง แต่ละพันธุ์มีลักษณะแตกต่างกันออกไป ซึ่งเป็นพืชอยู่ในวงศ์ Vitaceae สกุล Vitis ชื่อวิทยาศาสตร์ *Vitis vinifera* L. ซึ่งตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และ

เงื่อนไข ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 กำหนดให้ผลสดของพืชสกุล *Vitis* เป็นสิ่งต้องห้าม ซึ่งการนำเข้าหรือนำผ่านซึ่งสิ่งต้องห้ามเพื่อการค้าต้องได้รับอนุญาตจากอธิบดีกรมวิชาการเกษตร ต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชกำกับมาด้วย ต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ต้องนำเข้าหรือนำผ่านทางด่านตรวจพืชเพื่อให้พนักงานเจ้าหน้าที่ตรวจ และต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขที่อธิบดีกรมวิชาการเกษตรกำหนดโดยคำแนะนำของคณะกรรมการกักพืชโดยประกาศลงในราชกิจจานุเบกษา

กรมวิชาการเกษตรยังไม่อนุญาตให้นำเข้าผลองุ่นสดจากสหรัฐเม็กซิโกเพื่อการค้าสำหรับบริโภคสด

องุ่นมีหลายสายพันธุ์ ซึ่งพันธุ์ที่สหรัฐเม็กซิโกประสงค์จะส่งมายังประเทศไทยได้แก่ Perlette, Flame, Sugraone, Red Globe, Crimson และ Black Seedless พื้นที่ปลูกหลักในรัฐ Sonora, Baja California, Zacatecas, Aguascalientes และ Coahuila มีระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวผลผลิตระหว่างเดือน พฤษภาคม-กรกฎาคม (SAGARPA, 2011)

ผลการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืช พบว่าศัตรูองุ่นที่มีรายงานพบในประเทศสหรัฐเม็กซิโกมีจำนวน 124 ชนิด ในประเทศไทยมีจำนวน 80 ชนิด

2. การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

2.1 การเริ่มต้น (Stage 1: Initiation)

ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แบ่งสิ่งควบคุมออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ สิ่งต้องห้าม สิ่งกำกัด และสิ่งไม่ต้องห้าม ซึ่งการนำเข้าหรือนำผ่านซึ่งสิ่งต้องห้ามเพื่อการค้า ต้องได้รับอนุญาตจากอธิบดีกรมวิชาการเกษตร ต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชกำกับมาด้วย ต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ต้องนำเข้าหรือนำผ่านทางด่านตรวจพืชเพื่อให้พนักงานเจ้าหน้าที่ตรวจ และต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขที่อธิบดีกรมวิชาการเกษตรกำหนดโดยคำแนะนำของคณะกรรมการกักพืชโดยประกาศลงในราชกิจจานุเบกษา จึงจะสามารถนำเข้าหรือนำผ่านราชอาณาจักรได้ ซึ่งผลสดของพืชสกุล *Vitis* จากทุกแหล่งเป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 ลงวันที่ 26 เมษายน 2550 ประเทศเม็กซิโกได้ร้องขอนำเข้าผลองุ่นสด (*V. vinifera*) มายังประเทศไทยเพื่อบริโภค โดยพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่กำหนดในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าผลองุ่นสด คือ ประเทศไทย ซึ่งเป็นพื้นที่ที่อยู่ในอันตราย (endangered area) ที่ศัตรูพืชอาจจะติดเข้ามาพร้อมกับการนำเข้าผลองุ่นสดที่จัดเป็นเส้นทางศัตรูพืช (pathway) และประเทศไทยยังไม่เคยมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของผลองุ่นสดนำเข้าจากประเทศเม็กซิโก ทั้งนี้ผลองุ่นสดจากประเทศเม็กซิโกยังไม่สามารถนำเข้าประเทศไทยได้จนกว่าการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชจะเสร็จสิ้น

2.2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest Risk Assessment)

การจัดประเภทศัตรูพืช (Pest Categorization)

ผลการจัดกลุ่มศัตรูพืชสำหรับผลองุ่นสดจากประเทศเม็กซิโกที่ไม่พบในประเทศไทย ได้แก่ แมลงวันผลไม้ *Anastrepha fraterculus* (CABI, 2007)

สำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขององุ่นนำเข้าจากประเทศเม็กซิโกในขั้นตอนการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest Risk Assessment) และขั้นตอนต่อไป จะดำเนินการในปีต่อไป (2557-2558)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

องุ่นเป็นพืชอยู่ในวงศ์ Vitaceae สกุล *Vitis* ชื่อวิทยาศาสตร์ *Vitis vinifera* L. ซึ่งตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไข ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 กำหนดให้ผลสดของพืชสกุล *Vitis* เป็นสิ่งต้องห้าม ซึ่งการนำเข้าหรือนำผ่านซึ่งสิ่งต้องห้ามเพื่อการค้าต้องได้รับอนุญาตจากอธิบดีกรมวิชาการเกษตร ต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชกำกับมาด้วย ต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ต้องนำเข้าหรือนำผ่านทางด่านตรวจพืชเพื่อให้พนักงานเจ้าหน้าที่ตรวจ และต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขที่อธิบดีกรมวิชาการเกษตรกำหนดโดยคำแนะนำของคณะกรรมการกักพืชโดยประกาศลงในราชกิจจานุเบกษา กรมวิชาการเกษตรยังไม่อนุญาตให้นำเข้าผลองุ่นสดจากสหรัฐเม็กซิโกเพื่อการค้าสำหรับบริโภคสด ผลการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืช พบว่าศัตรูองุ่นที่มีรายงานพบในประเทศสหรัฐเม็กซิโกมีจำนวน 124 ชนิด ประเทศไทยมีจำนวน 80 ชนิด ซึ่งจะนำไปดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนต่อไป

เอกสารอ้างอิง

CAB International. 2007. **Crop Protection Compendium 2007 Edition**. (Computer Program). CAB International. Wallingford, UK.

FAO. 2011. **ISPM 02: 2007 Framework for pest risk analysis**. Rome, IPPC, FAO.

FAO. 2014. **ISPM 11: 2013 Pest risk analysis for quarantine pests**. Rome, IPPC, FAO.

SAGARPA. 2011. **Technical information on the products proposed for export to Thailand**. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Mexico.

การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ

Interception of Quarantine Pest in Imported Tomato Seeds Consignments

ชลธิชา รักใคร่ ศรีวิเศษ เกษสังข์ วันเพ็ญ ศรีชาติ วานิช คำพานิช โสภา มีอำนาจ
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้า ซึ่งในปี 2556-2557 มีการนำเข้ารวม 14,212 กิโลกรัม จากญี่ปุ่น สาธารณรัฐประชาชนจีน สหรัฐอเมริกา ชิลี ฝรั่งเศส เม็กซิโก อิตาลี อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ แอฟริกาใต้ เนเธอร์แลนด์ อิสราเอล สเปน เปรู เกาหลีใต้ เมียนมาร์ ลาว และ ไต้หวัน สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศทุกครั้งที่มีการนำเข้า ได้ตัวอย่างจำนวน 95 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบสุขภาพเมล็ดพันธุ์ โดยตรวจสอบเบื้องต้นด้วยตาเปล่า ตรวจสอบด้วยแว่นขยาย ตรวจสอบโดยวิธี Blotter test, Dilution plate technique และ seedlings symptom test ผลการตรวจพบเชื้อรา จำนวน 12 ชนิด ได้แก่ *Alternaria raphini, Alternaria tenuis, Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp., *Curvularia lunata, Curvularia pallescens, Dreshlera halodes, Fusarium semitectum, Fusarium solani*, *Ulocladium* sp., *Macrophomina* sp. และ *Phoma* sp. ผลการตรวจตรวจด้วยวิธี Dilution plate technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญด้านกักกันพืช และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นมะเขือเทศ ซึ่งศัตรูพืชที่พบทั้งในเมล็ดพันธุ์นำเข้าและตรวจสอบในสถานกักพืชแล้วไม่ใช่ศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย

Abstract

A study on the interception of quarantine pests in imported tomato seed with consignments imported into Thailand during B.E. 2556-2557. A total of 2,161,574.41 kilograms of tomato seed were imported from Japan, China, USA, Chile, France, Italy, India, Indonesia, Philippines, South Africa, Netherlands, Mexico, Israel, Spain, Peru, Korea, Lao, Myanmar and Taiwan. Samples of imported tomato seed (50 samples) were collected for inspection and test. A preliminary investigation has been done by visual

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-03-00-14-56

inspection and using a magnifying glass. Seed health test by blotter test, dilution plate technique and seedlings symptom test have been done in laboratory and glass house. As the laboratory result, *Alternaria raphini, Alternaria tenuis, Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp., *Curvularia lunata, Curvularia pallescens, Dreshlera halodes, Fusarium semitectum, Fusarium solani*, *Ulocladium* sp., *Macrophomina* sp. and *Phoma* sp. have been found. Quarantine pest has not been observed in laboratory test. No sign or any symptoms from seedling symptom test.

Keyword : ศัตรูพืช ศัตรูพืชกักกัน เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ นำเข้า พระราชบัญญัติกักพืช
Pests, Quarantine Pest, Seed Consignment, Interception, Tomato seed, Import, Plant Quarantine Act.

คำนำ

ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 ภายใต้พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2 507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 กำหนดให้มะเขือเทศเป็นสิ่งต้องห้าม (Prohibited material) การนำเข้าต้องแจ้งการนำเข้า และมีใบรับรองสุขอนามัยพืชจากประเทศต้นทางกำกับมาพร้อมกับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า โดยไม่มีมาตรการสุขอนามัยกำหนดไว้แต่อย่างใด การนำเข้าสินค้าเกษตรจากต่างประเทศจึง มีโอกาสที่ศัตรูพืชหลายชนิดที่อาจเป็นศัตรูพืชกักกันที่ร้ายแรงหรือศัตรูพืชที่สำคัญที่ก่อความเสียหายกับผลิตผลทางการเกษตรติดเข้ามากับเมล็ดพืชผัก (ศักดิ์, 2537) ที่ให้เกษตรกรเพาะปลูกกระจายทั่วประเทศไทย โดยในแต่ละปีมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์เหล่านี้ในปริมาณมาก หากศัตรูพืชที่ร้ายแรงซึ่งยังไม่มีรายงานในประเทศไทยติดมากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวสามารถเข้ามาเจริญและแพร่พันธุ์ได้ในประเทศไทย จะก่อให้เกิดผลกระทบทำความเสียหายต่อการเกษตรในประเทศและกระทบต่อการส่งออกสินค้าเกษตรด้านพืชของไทยไปยังประเทศที่มีความเข้มงวดด้านกักกันพืช ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทำการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับพืชนำเข้า เพื่อให้ทราบชนิด แหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้า และเส้นทางการเข้ามาของศัตรูพืช ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นฐานข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืช มีประโยชน์ใช้อ้างอิงทางวิชาการ นำมาพิจารณาหามาตรการเพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชชนิดนั้น ๆ (FAO,2004) และกำหนดเป็นมาตรการทางด้านกฎหมายและทางวิชาการในการควบคุมการนำเข้า ตามพระราชบัญญัติกักพืชต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

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

วิธีการ

1.รวบรวมข้อมูลทั่วไปของมะเขือเทศ และข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

ทำการสืบค้นข้อมูลจากเอกสาร วารสาร รายงานการประชุมทางวิชาการ อินเตอร์เน็ต เพื่อค้นหาข้อมูลของมะเขือเทศ ลักษณะทั่วไปของพืช สายพันธุ์ พื้นที่การเพาะปลูก รายชื่อของประเทศที่ประเทศไทยมีการการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ ปริมาณการนำเข้า ข้อมูลชนิดของศัตรูพืชทั้งนอกประเทศและในประเทศ

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าในห้องปฏิบัติการ

ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ที่นำเข้าจากต่างประเทศมาทำการตรวจวินิจฉัยโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่า(Visual inspection)และภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อตรวจหาตัวอ่อน หนอน แมลง เมล็ดวัชพืช หรือลักษณะเมล็ดด่าง มีสีดำ บิดงอขนาดเล็ก ที่มีสาเหตุจากเชื้อโรค

2.2 การสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association, 2007) และตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ นำเข้า

2.2.1 การตรวจสอบเชื้อรา

1) การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะยังไม่งอก (Dry seed examination)

โดยตรวจสอบลักษณะอาการโรคและส่วนขยายพันธุ์เชื้อราหรือศัตรูพืชอื่นๆ ซึ่งปะปนมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยตาเปล่าหรือตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope

เช่นเมล็ดพันธุ์มีรูปร่างผิดปกติ หรืออาจติดมา ภายในเมล็ดพันธุ์โดยไม่แสดงอาการ รวมทั้งอาจติดมากับเศษพืชในลักษณะเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์เช่น Pycnidia เป็นต้น

2) การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะเมล็ดงอก

สุ่มตัวอย่างเมล็ดตามวิธีการมาตรฐาน ในปริมาณที่เหมาะสมวิเคราะห์โดยสุ่มแยกตามสายพันธุ์ มาทดสอบด้วยวิธี Blotter method โดยวางเมล็ดลงบนกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่นที่ชุ่มน้ำซึ่งวางอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ 10 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 นำมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อ 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 ใช้ไปเปตต์ดูด suspension แต่ละความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วใช้แท่งแก้วลนไฟฆ่าเชื้อ spread ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน จึงนำมาตรวจหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปจำแนกชนิดต่อไป

2) แยกเชื้อจากต้นกล้าซึ่งเพาะจากเมล็ดผิดปกติ

โดยการเพาะเมล็ดในดินนึ่งฆ่าเชื้อ โดยเพาะ 25-50 เมล็ดต่อถุง และเก็บถุงเพาะที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส รดน้ำเช้าเย็นในโรงเรือนกักกันพืช ของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช เมื่อต้นกล้าออกใบจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนพืช หรืออาจใช้ถุงพลาสติกที่ฉีดพ่นน้ำคลุมให้ความชุ่มชื้นเป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนใบ กิ่ง ลำต้น โค่นต้น และราก เก็บส่วนของพืชที่สงสัยไปแยกเชื้อด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

2.1) วิธี Dilution plate ตัดใบพืชที่เป็นโรคเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมแล้วฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2-3 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรอง

ภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อ แล้วบดชิ้นส่วนในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาทำให้เจือจางเป็นลำดับจาก 10^{-1} ถึง 10^{-5} และดำเนินการเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ (1)

2.2) วิธี Tissue transplanting ตัดใบพืชเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 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 ตรวจสอบรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

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 หากพบอาการเซลล์ตายแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช

4. ทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Physiological and biochemical properties)เช่นการใช้ยูเรีย การย่อยเจลาตินการย่อยเอสคูลินและแป้งreduceไนเตรต ความการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ (Schaad *et al.,* 2001) เป็นต้น

5. ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัย (Pathogenicity test) โดยเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้น10^{8} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ปลูกเชื้อตามอาการของโรคของเชื้อที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุโรค เช่นปลูกเชื้อโดยฉีดเข้าในลำต้น ใบเลี้ยง หรือเนื้อใบของต้นมะเขือเทศ อายุ 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

3. การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์นำเข้าในพื้นที่ของเกษตรกร

ทำการติดตามตรวจสอบต้นพืชที่มีการนำเมล็ดพันธุ์นำเข้าไปเพาะปลูกในแปลงปลูกของเกษตรกรตามภาคต่างๆ โดยสังเกตอาการความผิดปกติของต้นพืชทั้ง โคนต้น ราก ลำต้น ใบและผลของพืช และทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาการดังกล่าว นำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง แยกเชื้อ จัดจำแนกชนิดของเชื้อ และทดสอบการเกิดโรคกับพืชในห้องปฏิบัติการเพื่อทำการวินิจฉัยเชื้อโรคศัตรูพืชอย่างละเอียด เช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 2

เวลาและสถานที่

เวลา: เดือนตุลาคม 2555 – กันยายน 2557 (2 ปี)

สถานที่: ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช ด่านตรวจพืช และและแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. มะเขือเทศ จัดเป็นพืชผักที่จัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae (Solannaceae) ซึ่งได้แก่ พริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง และยาสูบ ฯลฯมีแหล่งกำเนิดอยู่ในแถบตอนกลางของทวีปอเมริกาและแถบภูเขาแอนดีสในอเมริกาใต้แถบประเทศเปรู ชิลี และเอกวาดอร์ประเทศที่มีการผลิตมะเขือเทศสูงสุดในโลก คือ สาธารณรัฐประชาชนจีน รองลงมาคือ อินเดีย และสหรัฐอเมริกา เป็นต้น แหล่งปลูกมะเขือเทศที่นำเข้าที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่ สกลนคร, ขอนแก่น, อุดรธานี และกาฬสินธุ์ ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากต่างประเทศ ในปี 2556-2557 ปริมาณ 14,212 กิโลกรัม คิดเป็นมูลค่า 826.72 ล้านบาท (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร,2555-2557)

ศัตรูพืชที่พบเข้าทำลาย มีสิ่งมีชีวิตที่เป็นศัตรูพืชรวม ทั้งสิ้น 490 ชนิด คือเชื้อรา 96 ชนิด แบคทีเรีย 30 ชนิด ไวรัส 46 ชนิด ไส้เดือนฝอย 40 ชนิด โปรโตรซัว 2 ชนิด แมลง 212 ชนิด ไร 10 ชนิด หอย 1 ชนิด และวัชพืช 53 ชนิดชนิดที่จัดเป็นศัตรูพืชกักกัน(Anonymous, 2006) และยังไม่มีรายงานในประเทศไทยเช่น *Pseudomonas corrugate, Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis Potato spindle tuber viroid , Citrus exocortis viroid,* (CABI, 2007)

2.การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ นำเข้าจากต่างประเทศในห้องปฏิบัติการ

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

จากการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากทุกประเทศในเบื้องต้น พบว่าลักษณะของเมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด ซึ่งจากการตรวจเอกสารและการสังเกตเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากบางประเทศ มีการคลุกสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์พืชที่นำเข้ามาด้วย

2.2 ได้สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศจำนวน 19 ประเทศ ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา ชิลี ฝรั่งเศส เม็กซิโก อิตาลี อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ แอฟริกาใต้ สาธารณรัฐประชาชนจีน เนเธอร์แลนด์ อิสรเอลแอฟริกาใต้ สเปน เปรู ลาว พม่า และไต้หวัน ผลการตรวจพบ**เชื้อราที่ติดกับมะเขือเทศ** ที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Alternaria raphini, Alternaria tenuis, Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp จาก **อินเดีย** พบเชื้อรา จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Dreshlera halodes, Fusarium semitectum, Fusarium solani*, *Ulocladium* sp., *Macrophomina* sp. และ *Phoma* sp เมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากอินโดนีเซีย พบ เชื้อรา จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Curvularia lunata, Curvularia pallescen* ไม่พบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับพืชที่ปลูกสังเกตุอาการ

3. การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์นำเข้าในพื้นที่ของเกษตรกร

จากการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากต่างประเทศ ในภาคเหนือ 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสกลนคร อุดรธานี และขอนแก่น พบอาการโรคบนใบของมะเขือเทศ

ได้แก่ จำนวน 3 โรค ได้แก่ โรค เหี่ยวเขียว จากเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* โรคใบจุดจากเชื้อสาเหตุ *Xanthomonas camprestis* pv. *vesicatoria* และโรคใบด่าง เชื้อสาเหตุ *Cucumber mosaic* virus ซึ่งศัตรูพืชที่พบทั้งในเมล็ดพันธุ์นำเข้าและตรวจสอบโรคในแปลงปลูก **ไม่ใช่ศัตรูพืชด้านกักกันพืช**ของประเทศไทย

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ พบว่าลักษณะของเมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด ซึ่งจากการตรวจเอกสารและการสังเกตเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากบางประเทศ มีการคลุกสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์พืชที่นำเข้ามาด้วย

ได้สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ ผลการตรวจพบ**เชื้อราที่ติดกับมะเขือเทศ** ที่นำเข้าจากสาธารณรัฐ-ประชาชนจีน จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Alternaria raphini, Alternaria tenuis, Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp จากอินเดีย พบเชื้อรา จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Dreshlera halodes, Fusarium semitectum, Fusarium solani*, *Ulocladium* sp., *Macrophomina* sp. และ *Phoma* sp เมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากอินโดนีเซีย พบเชื้อรา จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Curvularia lunata* และ *Curvularia pallescens* ไม่พบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับพืชที่ปลูกสังเกตุอาการในสถานกักพืช จากการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากต่างประเทศ ในภาคเหนือ 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสกลนคร อุดรธานี และขอนแก่น พบอาการโรคบนใบของมะเขือเทศ ได้แก่ จำนวน 3 โรค ได้แก่ โรค เหี่ยวเขียว จากเชื้อ *Pseudomonas solannacearum* โรคใบจุดจากเชื้อสาเหตุ *Xanthomonas camprestis* pv. *vesicatoria* และโรคใบด่าง เชื้อสาเหตุ *Cucumber mosaic* virus ซึ่งศัตรูพืชที่พบทั้งในเมล็ดพันธุ์นำเข้าและตรวจสอบโรคในแปลงปลูก **ไม่ใช่ศัตรูพืชด้านกักกันพืช**ของประเทศไทย

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณสุรพล ยินอัศวพรรณ ที่ช่วยแนะนำแนวทางการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ คุณวันเพ็ญ ศรีชาติ คุณยุทธนา ประมาณ คุณวิชาญ สมาธิ คุณวิภา เกิดพิพัฒน์ คุณอรนุช นาคะโร คุณสุธรรม คงเอียด คุณจิรวัฒน์ ไกรนรา และ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการที่ช่วยสนับสนุนในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2547. เอกสารวิชาการ ศัตรูพืชกักกันที่สำคัญของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ

นิรนาม. 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. ข้อมูลสถิตินำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด 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.

การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้าจากต่างประเทศ

Interception of Quarantine Pest in Imported Corn Seeds Consignments

ชลธิชา รักใคร่ นงพร มาอยู่ดี ศรีวิเศษ เกษสังข์ วันเพ็ญ ศรีชาติ
วานิช คำพานิช โสภา มีอำนาจ
กลุ่มวิจัยการักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้าซึ่งในปี 2556-2557 มีการนำเข้ารวม 2,161,574.41 กิโลกรัม จาก ประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา อาร์เจนตินา บราซิล ออสเตรเลีย อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ เวียดนาม และ ไต้หวัน สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดทุกครั้งที่มีการนำเข้า ได้ตัวอย่างจำนวน 50 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบสุขภาพเมล็ดพันธุ์ โดยตรวจสอบเบื้องต้นด้วยตาเปล่า ตรวจสอบด้วยแว่นขยาย ตรวจสอบโดยวิธี Blotter test, Dilution plate technique และ seedlings symptom test ผลการตรวจพบเชื้อรา จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *Acremonium* sp., *Cephaosporium acremonium*, *Drechslera turcicum*, *Drechslera sorghicola, Drechslera maydis, Curvularia lunata, Curvularia lpallescens, Fusarium moniliforme, Fusarium solani* และ *Fusarium semitectum* ผลการตรวจตรวจด้วยวิธี Dilution plate technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญด้านกักกันพืช และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นข้าวโพด ซึ่งศัตรูพืชที่พบทั้งในเมล็ดพันธุ์นำเข้าและตรวจสอบในสถานกักพืชแล้วไม่ใช่ศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย

Abstract

A study on the interception of quarantine pests in imported corn seed with consignments imported into Thailand during B.E. 2556-2557. A total of 2,161,574.41 kilograms of corn seed were imported from Japan, USA, Argentina, Brazil, Australia, India, Indonesia, Philippines, Vietnam and Taiwan. Samples of imported corn seed (50 samples) were collected for inspection and test. A preliminary investigation has been done by visual inspection and using a magnifying glass. Seed health test by blotter test, dilution plate technique and seedlings symptom test have been done in laboratory and glass house. As the laboratory result *Acremonium* sp., *Cephaosporium acremonium, Drechslera*

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-03-00-15-56

turcicum, *Drechslera sorghicola, Drechslera maydis, Curvularia lunata, Curvularia pallescens, Fusarium moniliforme, Fusarium solani*, and *Fusarium semitectum* have been found. Quarantine pest has not been observed in laboratory test. No sign or any symptoms from seedling symptom test.

Keyword: ศัตรูพืช ศัตรูพืชกักกัน เมล็ดพันธุ์ข้าวโพด นำเข้า พระราชบัญญัติกักพืช
Pests, Quarantine Pest, Seed Consignment, Interception, corn seed, Import, Plant Quarantine Act.

คำนำ

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 ภายใต้พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 กำหนดให้เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจัดเป็นสิ่งต้องห้าม (Prohibited material) การนำเข้ามายังประเทศไทยต้องแจ้งการนำเข้า และมีใบรับรองสุขอนามัยพืชจากประเทศต้นทางกำกับมาพร้อมกับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า โดยไม่มีมาตรการสุขอนามัยกำหนดไว้แต่อย่างใด ในการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดสินค้าเกษตรจากต่างประเทศจึง มีโอกาสที่ศัตรูพืชหลายชนิดที่อาจเป็นศัตรูพืชกักกัน (กรมวิชาการเกษตร, 2547) ที่ร้ายแรงหรือศัตรูพืชที่สำคัญที่ก่อความเสียหายกับผลิตผลทางการเกษตรติดเข้ามากับเมล็ดพืชด้วย โดยอาจเป็นศัตรูพืชร้ายแรงที่ไม่มีปรากฏในประเทศไทย โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดพืช ซึ่งมีการนำเข้ามาเพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ในการส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูกกระจายทั่วประเทศไทย โดยในแต่ละปีมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์เหล่านี้ในปริมาณมาก หากศัตรูพืชที่ร้ายแรงซึ่งยังไม่มีรายงานในประเทศไทย เช่น *Cercospora zeae-maydis*, *Pantoea stewartii, Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* ติดมากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวสามารถเข้ามาเจริญและแพร่พันธุ์ได้ในประเทศไทย จะก่อให้เกิดผลกระทบทำความเสียหายต่อการเกษตรในประเทศและกระทบต่อการส่งออกไปยังต่างประเทศที่มีความเข้มงวดด้านกักกันพืช ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทำการ ตรวจสอบศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับพืชนำเข้า เพื่อให้ทราบชนิด แหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้าและเส้นทางการเข้ามาของศัตรูพืช ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นฐานข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืช มีประโยชน์ใช้อ้างอิงทางวิชาการ นำมาพิจารณาหามาตรการเพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชชนิดนั้น ๆ และกำหนดเป็นมาตรการทางด้านกฎหมายและทางวิชาการในการควบคุมการนำเข้า ตามพระราชบัญญัติกักพืชต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

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

วิธีการ

1.รวบรวมข้อมูลทั่วไปของข้าวโพดและข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

ทำการสืบค้นข้อมูลจากเอกสาร วารสาร รายงานการประชุมทางวิชาการ อินเตอร์เน็ต เพื่อค้นหาข้อมูลของข้าวโพด ลักษณะทั่วไปของพืช สายพันธุ์ พื้นที่การเพาะปลูก รายชื่อของประเทศที่ประเทศไทยมีการการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ ปริมาณการนำเข้า ข้อมูลชนิดของศัตรูพืชทั้งนอกประเทศและในประเทศ

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดนำเข้าในห้องปฏิบัติการ

ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้าจากต่างประเทศมาทำการตรวจวินิจฉัยโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อตรวจหาตัวอ่อน หนอน แมลง เมล็ดวัชพืช หรือลักษณะเมล็ดด่าง มีสีดำ บิดงอ ขนาดเล็ก ที่มีสาเหตุจากเชื้อโรค

2.2 การสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association, 2007) และตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้า

2.2.1 การตรวจสอบเชื้อรา

1) การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะยังไม่งอก (Dry seed examination)

โดยตรวจสอบลักษณะอาการโรคและส่วนขยายพันธุ์เชื้อราหรือศัตรูพืชอื่นๆ ซึ่งปะปนมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยตาเปล่าหรือตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope เช่นเมล็ดพันธุ์มีรูปร่างผิดปกติ หรืออาจติดมา ภายในเมล็ดพันธุ์โดยไม่แสดงอาการ รวมทั้งอาจติดมากับเศษพืชในลักษณะเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์เช่น Pycnidia เป็นต้น

2) การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะเมล็ดงอก

สุ่มตัวอย่างเมล็ดตามวิธีการมาตรฐาน ในปริมาณที่เหมาะสมวิเคราะห์โดยสุ่มแยกตามสายพันธุ์ มาทดสอบด้วยวิธี Blotter method โดยวางเมล็ดลงบนกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่นที่ชุ่มน้ำซึ่งวางอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางเมล็ดพันธุ์ 10 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 นำมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อ 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 ใช้ไปเปตต์ดูด suspension แต่ละความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วใช้แท่งแก้วลนไฟฆ่าเชื้อ spread ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน จึงนำมาตรวจหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปจำแนกชนิดต่อไป

2) แยกเชื้อจากต้นกล้าซึ่งเพาะจากเมล็ดผิดปกติ

โดยการเพาะเมล็ดในดินนึ่งฆ่าเชื้อ โดยเพาะ 25-50 เมล็ดต่อถุง และเก็บถุงเพาะที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส รดน้ำเช้าเย็นในโรงเรือนกักกันพืช ของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช เมื่อต้นกล้าออกใบจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนพืช หรืออาจใช้ถุงพลาสติกที่ฉีดพ่นน้ำคลุมให้ความชุ่มชื้นเป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนใบ กิ่ง ลำต้น โค่นต้น และราก เก็บส่วนของพืชที่สงสัยไปแยกเชื้อด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

2.1) วิธี Dilution plate ตัดใบพืชที่เป็นโรคเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมแล้วฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2-3 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อ แล้วบดชิ้นส่วนในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85

เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาทำให้เจือจางเป็นลำดับจาก 10^{-1} ถึง 10^{-5} และดำเนินการเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ (1)

2.2) วิธี Tissue transplanting ตัดใบพืชเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 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 ตรวจสอบรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

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 หากพบอาการเซลล์ตายแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช

4. ทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Physiological and biochemical properties) เช่น การใช้ยูเรีย การย่อยเจลาติน การย่อยเอสคูลิน และแป้ง reduce ไนเตรต ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ (Schaad *et al.,* 2001) เป็นต้น

5. ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัย (Pathogenicity test) โดยเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้น 10^{8} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ปลูกเชื้อตามอาการของโรคของเชื้อที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุโรค เช่นปลูกเชื้อโดยฉีดเข้าในลำต้น ใบเลี้ยง หรือเนื้อใบของต้นข้าวโพด อายุ 2-3 สัปดาห์ ฉีดพ่นน้ำให้ความชุ่มชื้นคลุมด้วยถุงพลาสติกและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ตรวจลักษณะอาการโรคหลังปลูกเชื้อ 3-5 วัน จากนั้นนำใบเป็นโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อสาเหตุที่ทำให้พืชเป็นโรคเป็นชนิดเดียวกับที่แยกได้ในครั้งแรกหรือไม่

6. การตรวจสอบด้วยวิธี ELISA เป็นวิธีการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา ปัจจุบันใช้ชุดตรวจสอบที่สั่งนำเข้าจากต่างประเทศโดย นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวและนำมาทำการตรวจสอบตามขั้นตอนที่แนะนำ

2.2.3 การตรวจสอบเชื้อไวรัส

1) ปลูกสังเกตลักษณะอาการโรคบนต้นกล้า (Seedling symptom test) โดยเพาะ เมล็ดพันธุ์ในดินอบฆ่าเชื้อ 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

3. การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์นำเข้าในพื้นที่ของเกษตรกร

ทำการติดตามตรวจสอบต้นพืชที่มีการนำเมล็ดพันธุ์นำเข้าไปเพาะปลูกในแปลงปลูกของเกษตรกรตามภาคต่างๆ โดยสังเกตอาการความผิดปกติของต้นพืชทั้ง โคนต้น ราก ลำต้น ใบและผลของพืช และทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาการดังกล่าว นำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง แยกเชื้อ จัดจำแนกชนิดของเชื้อ และทดสอบการเกิดโรคกับพืชในห้องปฏิบัติการเพื่อทำการวินิจฉัยเชื้อโรคศัตรูพืชอย่างละเอียด เช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 2

เวลาและสถานที่

เวลา: เดือนตุลาคม 2555 – กันยายน 2557(2ปี)

สถานที่: ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช ด่านตรวจพืช และและแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ประเทศไทยมีการนำเข้าข้าวโพดเพื่อการบริโภค เพื่อการอุตสาหกรรม หรือใช้เป็นอาหารสัตว์โดยนำเข้าจาก10 ประเทศ ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา อาร์เจนตินา บราซิล ออสเตรเลีย อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ เวียดนาม และ ไต้หวัน และประเทศไทยยังเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม(Hybrid corn)ที่ใหญ่แห่งหนึ่งในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้แหล่งปลูกข้าวโพดของประเทศจะอยู่เขตภาคกลางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในปี 2554/2555 ประเทศไทย มีพื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ประมาณ 8.87 ล้านไร่ ให้ผลผลิต 5.45 ล้านตัน ส่งออก 1.28 ล้านตัน ไปยังประเทศเวียดนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย สิงคโปร์ ฯลฯ มูลค่าประมาณ 4,315 ล้านบาท ข้าวโพดมีศัตรูพืชจำนวนทั้งหมดรวม 597 ชนิด เป็นไร 12 ชนิด แมลง 212 ชนิด รา 127 ชนิด แบคทีเรีย 23 ชนิด ไวรัส 15 ชนิด ไฟโตพลาสมา 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 58 ชนิด สัตว์ 4 ชนิด หอย/ทาก 1 ชนิด วัชพืช 144 ชนิด ชนิดที่จัดเป็นศัตรูพืชกักกัน (Anonymous, 2006) และยังไม่มีรายงานในประเทศไทยแต่มีรายงานในประเทศสหรัฐอเมริกา (CPC,2007;MAF,2005) ได้แก่ *Peronosclerospora sorghi*, *Cercospora zeae-maydis*, *Pantoea stewartii, Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis, Maize dwarf mosaic potyvirus, Wheat streak mosaic rymovirus* และ *Maize chlorotic mottle machlovirus* เป็นต้น สำหรับเชื้อ *Pantoea stewartii* มีรายงานแพร่ระบาดครั้งแรกในสหรัฐอเมริกาและต่อมาเข้าไปแพร่ระบาดในอิตาลีโดยติดไปกับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากสหรัฐอเมริกา (FAO,1983; CMI,1987) ซึ่งเชื้อดังกล่าวจัดเป็นศัตรูพืชกักกันในหลายๆประเทศรวมทั้งประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป (OEPP/EPPO, 1978) ในประเทศไทย เตือนใจและคณะ (2539) เคยมีการรายงานเชื้อสาเหตุ ลักษณะอาการ และการแพร่ระบาดของโรคใบจุดข้าวโพดที่พบใหม่ในประเทศไทยเช่นกัน

2.การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดนำเข้าจากต่างประเทศในห้องปฏิบัติการ

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

จากการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากทุกประเทศในเบื้องต้น พบว่าลักษณะของเมล็ดมีสีเหลือง เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด

2.2 จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด นำเข้าจาก 10 ประเทศ ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา อาร์เจนตินา บราซิล ออสเตรเลีย อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ เวียดนาม และ ไต้หวัน และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดในห้องปฏิบัติการ ผลการตรวจพบเชื้อรา จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *Acremonium sp, Cephaosporium acremonium.*, *Drechslera turcicum.*, *Drechslera sorghicola, Drechslera maydis, Curvularia lunata, Curvularia lpallescens , Fusarium moniliforme, Fusarium solani*, และ *Fusarium*

semitectum ไม่พบศัตรูพืชเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และวัชพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นข้าวโพด

3. การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์นำเข้าในพื้นที่ของเกษตรกร

จากการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดนำเข้าจากต่างประเทศ ในภาคเหนือ 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดตาก ลำปาง เชียงใหม่และเชียงราย และในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 3 จังหวัดได้แก่ อุดรธานี ชัยภูมิ และขอนแก่น พบอาการผิดปกติในข้าวโพดที่ จังหวัดตาก เชียงใหม่และเชียงราย และในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่จังหวัด ชัยภูมิ และขอนแก่น พบเชื้อ**โรคบนใบของข้าวโพด**จำนวน 5 โรค ได้แก่ *Drechslera turcicum*, *Drechslera maydis*, *Fusarium moniliforme, Cephaosporium acremonium และ Drechslera sorghicola* ซึ่งศัตรูพืชที่พบทั้งในเมล็ดพันธุ์นำเข้าและตรวจสอบโรคในแปลงปลูก **ไม่ใช่ศัตรูพืชด้านกักกันพืช**ของประเทศไทย

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ข้าวโพด มีศัตรูพืชที่เข้าทำลายส่วนต่างๆ ของข้าวโพด จำนวนทั้งหมดรวม 597 ชนิด เป็นไร 12 ชนิด แมลง 212 ชนิด รา 127 ชนิด แบคทีเรีย 23 ชนิด ไวรัส 15 ชนิด ไฟโตพลาสมา 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 58 ชนิด สัตว์ 4 ชนิด หอย/ทาก 1 ชนิด วัชพืช 144 ชนิดได้สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้าจากต่างประเทศจำนวน10 ประเทศ ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา อาร์เจนตินา บราซิล ออสเตรเลีย อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ เวียดนาม และ ไต้หวัน มาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วย ตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะเมล็ดข้าวโพดมีสีเหลือง เมล็ดสมบูรณ์สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดในห้องปฏิบัติการพบเชื้อรา จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *Acremonium* sp., *Cephaosporium acremonium*, *Drechslera turcicum*, *Drechslera sorghicola, Drechslera maydis, Curvularia lunata, Curvularia lpallescens, Fusarium moniliforme, Fusarium solani* และ *Fusarium semitectum* ผลการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดข้าวโพดเข้าจากต่างประเทศ ในภาคเหนือ 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดตาก เชียงใหม่และเชียงราย และในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 2 จังหวัด ได้แก่ ชัยภูมิ และขอนแก่น พบเชื้อราสาเหตุ**โรคพืชบนใบของข้าวโพด**จำนวน 5 โรค ได้แก่ *Drechslera turcicum*, *Drechslera maydis*, *Fusarium moniliforme, Cephaosporium acremonium และ Drechslera sorghicola* ซึ่งศัตรูพืชที่พบทั้งในเมล็ดพันธุ์นำเข้าและตรวจสอบโรคในแปลงปลูก **ไม่ใช่ศัตรูพืชที่สำคัญด้านด้านกักกันพืช**ของประเทศไทย

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณสุรพล ยินอัศวพรรณ ที่ช่วยแนะนำแนวทางการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ วันเพ็ญ ศรีชาติ คุณยุทธนา ประมาณ คุณวิชาญ สมาธิ คุณวิภา เกิดพิพัฒน์ ช่วยสนับสนุนและเตรียมงานในห้องปฏิบัติการ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการที่ช่วยสนับสนุนในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2547. เอกสารวิชาการ ศัตรูพืชกักกันที่สำคัญของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ

นิรนาม. 2542. พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 12 หน้า.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2553. ข้อมูลสถิตินำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด 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.

CMI (1987) Distribution Maps of Plant Diseases No. 41 (edition 4). CAB International, Wallingford, UK.

Crop Protection Compendium. 2007. ed. Wallingford, UK: CPC. (http://www.cabicompendium.org/cpc)

FAO (1983) Reappearance of Erwinia stewartii in the Po Valley. FAO Plant Protection Bulletin 31, 96.

MAF BIOSECURITY NEW ZEALAND. 2005. Maize pest. Available source: http://www.biosecurity.govt.nz/pest/search

OEPP/EPPO (1978) Data sheets on quarantine organisms No. 54, *Erwinia stewartii*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 8 (2).

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.

การศึกษาชนิดของศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่นำเข้าจากต่างประเทศ

Interception of Quarantine Pests in Imported Soybean Seed Consignments

นงพร มาอยู่ดี[1/] จินตนา สุมขุนทด[2/] ชลธิชา รักใคร่[1/] ชาญชัย แสงหิรัญ[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]ด่านตรวจพืชลาดกระบัง สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

บทคัดย่อ

การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง (Soybean: *Glycine max* (L.) Merr.); วงศ์ถั่ว (Leguminosae) นำเข้าจากต่างประเทศที่กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และด่านตรวจพืชลาดกระบัง สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร ระหว่างตุลาคม 2555-กันยายน 2557 โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกาและสาธารณรัฐประชาชนจีน จำนวน 20 ตัวอย่าง ได้ทำการตรวจและจำแนกชนิดศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดด้วยวิธี Visual inspection, Blotter method และคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพพร้อมทั้งปลูกทดสอบแสดงอาการผิดปกติในโรงเรือนปลูกพืช ผลการตรวจพบเชื้อรา 8 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *Curvularia lunata*, *Collectotrichum dematium*, *Fusarium semitectum, Fusarium solani*, *Chaetomium* sp., *Cladosporium* sp. และ *Nigrospora* sp. ซึ่งเป็นเชื้อโรคที่ไม่มีความสำคัญด้านกักกันพืช พบเมล็ดวัชพืช 9 ชนิด เป็นวัชพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช 1 ชนิด คือ *Polygonum convolvulus* ส่วนวัชพืชที่ไม่มีความสำคัญด้านกักกันพืชจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *Ambrosia* spp., *Amaranthus* spp., *Chenopodium* spp., *Echinochloa colonum*, *Helianthus annuus*, *Kochia scoparia*, *Polygonum persicaria* และ *Staria lutescens* ได้ทำการควบคุมวัชพืชกักกันภายใต้พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 เพื่อป้องกันมิให้วัชพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศไทย โดยติดตามตรวจสอบวัชพืชในแปลงปลูกพืชหลังการนำเข้า เข้มงวดในการตรวจสอบศัตรูพืช ณ ด่านตรวจพืชที่นำเข้า กำหนดมาตรการทางกักกันพืชในการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองจากต่างประเทศจะต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืช ระบุว่าปลอดวัชพืชดังกล่าวกำกับมาด้วย

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-03-00-17-56

Abstract

A study on the interception of quarantine pests in soybean seed consignments imported from the People's Republic of China and the United States was carrying out by taking samples of the imported soybean seeds, intercepting and identifying the pests. Twenty samples were collected from seed consignments imported from the two countries in 2013 and 2014. Seventeen pests were found. There are eight diseases namely *Alternaria tenuis*, *Curvularia lunata*, *Collectotrichum dematium*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium solani*, *Chaetomium* sp., *Cladosporium* sp., *Nigrospora* sp. and nine weed species with *Ambrosia* spp., *Amaranthus* spp., *Chenopodium* spp., *Echinochloa colonum*, *Helianthus annuus*, *Kochia scoparia*, *Polygonum convolvulus*, *Polygonum persicaria and Staria lutescens.* Only one of these pests is considered as a pest of quarantine importance. It is a weed named *Polygonum convolvulus* imported from the People's Republic of China and the entry of this weed is prohibited. To prevent the introduction and spread of this noxious weed may need to monitor the seeds after importations, intensify the inspection at the port of entry and specify stricter phytosanitary measures and quarantine regulations for importation of the seeds under Plant Quarantine Act B.E. 2507 amended by Plant Quarantine Act (No. 2) B.E. 2542 and Plant Quarantine Act (No. 3) B.E. 2551.

Keywords : ศัตรูพืช ศัตรูพืชกักกัน เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง นำเข้า พระราชบัญญัติกักพืช
Pest, Quarantine Pest, Seed Consignment Interception, Soybean, Import, Plant Quarantine Act.

คำนำ

ถั่วเหลือง (Soybean: *Glycine max* (L.) Merr.) จัดอยู่ในวงศ์ถั่ว (Leguminosae) สถิติในการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ปี 2555 ปริมาณ 78,000 กิโลกรัม มูลค่า 9,513892 บาท (กลุ่มควบคุมพันธุ์พืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร) ถั่วเหลืองเป็นพืชล้มลุกอายุฤดูเดียว มีระบบรากแก้ว ลำต้นแบบเป็นพุ่มขึ้นตรงและเลื้อยพันค้างมีการแตกกิ่ง ความสูงและจำนวนข้อขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของดินและสภาพแวดล้อมในแต่ละฤดูปลูก ใบเกิดแบบสลับบนต้นยกเว้นใบเลี้ยง (Cotyledon) และใบจริงคู่แรก (Primary leaf) ของต้นอ่อน ใบที่เกิดต่อมาเป็นใบรวมมีใบย่อย 3 ใบ (Trifoliate) แต่บางพันธุ์อาจจะมีจำนวนใบย่อย 4-7 ก้านใบ มีก้านใบรวม (Petiole) ยาว 5-10 ซ.ม. รูปร่างของใบสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิดได้แก่ ใบแคบเรียวยาว (Lanceotate) ใบค่อนข้างแคบ (Triangular) และใบกว้าง (Ovate) ดอกถั่วเหลืองออกดอกเป็นช่อ (inflorescence) แบบดอกสมบูรณ์ (Perfect flower) มีช่อ

ดอกแบบกระจะ (Raceme) ดอกมีสีขาวหรือม่วงเมื่อดอกบานเต็มที่จะมีขนาดประมาณ 3-8 เซนติเมตร ช่อดอกหนึ่งๆมีดอกตั้งแต่ 3-15 ดอกช่อดอกที่เกิดบนยอดของลำต้นมักจะมีจำนวนดอกในช่อมากกว่าช่อดอกที่เกิดตามมุมใบแขนงเมล็ดเกิดในฝักฝักเกิดเป็นกลุ่มๆละ 2-10 ฝักมีขนสีเทาหรือน้ำตาลปกคลุมทั่วไปฝักยาวประมาณ 2-7 เซนติเมตรแต่ละฝักมีเมล็ด 1-4 เมล็ด แต่ส่วนมากมี 2-3 เมล็ด เมื่อฝักแก่จะมีสีน้ำตาลอ่อน น้ำตาลเข้ม สีเทา และดำลักษณะมีรูปร่างแตกต่างกันตั้งแต่กลมแบนและสีของเมล็ดที่พบได้แก่ สีเขียว สีน้ำตาล สีน้ำตาลอมแดง สีเทา สีดำ หรือเมล็ดมีสองสี ถั่วเหลืองพันธุ์อายุสั้นเก็บเกี่ยว 75-85 วัน พันธุ์อายุปานกลางอายุเก็บเกี่ยว 86-112 วัน แหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ ภาคเหนือ และภาคกลาง เช่น เชียงใหม่ สุโขทัย พิจิตร พิษณุโลก แพร่ ลำปาง ตาก กำแพงเพชร ลพบุรี สระบุรี ชัยนาท สิงห์บุรี อ่างทอง กาญจนบุรี ฉะเชิงเทรา ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ เลย นครราชสีมา ขอนแก่น อุดรธานี อุบลราชธานี มหาสารคาม หนองคาย

พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 กำหนดให้เมล็ดพันธุ์พืชผักต่าง ๆ ไม้ดอกหรือไม้ประดับหลายชนิดจัดเป็นสิ่งต้องห้าม (Prohibited material) สิ่งกำกัด (Restricted material) และสิ่งไม่ต้องห้าม (Unprohibited materials) ในการนำเข้ามายังประเทศไทยต้องแจ้งการนำเข้าและมีใบรับรองสุขอนามัยพืชจากประเทศต้นทางกำกับมาพร้อมกับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า โดยไม่มีมาตรการสุขอนามัยพืชกำหนดไว้แต่อย่างใด การนำเข้าสินค้าเกษตรจากต่างประเทศ มีโอกาสที่ศัตรูพืชหลายชนิดที่อาจเป็นศัตรูพืชกักกันที่ร้ายแรงหรือศัตรูพืชที่สำคัญที่ก่อความเสียหายกับผลิตผลทางการเกษตรติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์พืชด้วย โดยอาจเป็นศัตรูพืชร้ายแรงที่ไม่มีปรากฏในประเทศไทย โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อสาเหตุโรคพืชและเมล็ดวัชพืชที่ติดปะปนมากับถั่วเหลือง ซึ่งมีการนำเข้ามาเพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์หรือเป็นต้นพันธุ์ในการส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูกกระจายอยู่ทั่วประเทศไทย โดยในแต่ละปีมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์เหล่านี้ในปริมาณมาก หากศัตรูพืชที่ร้ายแรงซึ่งยังไม่มีรายงานในประเทศไทยติดมากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว สามารถเข้ามาเจริญและแพร่พันธุ์ได้ในประเทศไทย จะก่อให้เกิดผลกระทบ ทำความเสียหายต่อการเกษตรในประเทศและกระทบต่อการส่งออกพืชผักผลไม้ไทยไปยังต่างประเทศที่มีความเข้มงวดด้านกักกันพืช ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทำการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับพืชนำเข้า เพื่อให้ทราบชนิด แหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้าและเส้นทางการเข้ามาของศัตรูพืช ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นฐานข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืชมีประโยชน์ใช้อ้างอิงทางวิชาการ นำมาพิจารณาหามาตรการเพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชชนิดนั้น ๆ และกำหนดเป็นมาตรการทางด้านกฎหมายและทางวิชาการในการควบคุมการนำเข้า หรือเปลี่ยนแปลงสถานภาพของพืชตามพระราชบัญญัติกักพืชต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์**ถั่วเหลือง**นำเข้าจากต่างประเทศ

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

วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของถั่วเหลือง และข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

ทำการสืบค้นข้อมูลจากเอกสาร วารสาร รายงานการประชุมทางวิชาการ อินเตอร์เน็ต เพื่อค้นหาข้อมูลของ**ถั่วเหลือง** ลักษณะทั่วไปของพืช สายพันธุ์ พื้นที่การเพาะปลูก รายชื่อของประเทศที่ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ ปริมาณการนำเข้า ข้อมูลชนิดของศัตรูพืชทั้งนอกประเทศและในประเทศ

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง นำเข้าในห้องปฏิบัติการ

ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์**ถั่วเหลือง** ที่นำเข้าจากต่างประเทศมาทำการตรวจวินิจฉัยโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อตรวจหาตัวอ่อน หนอน แมลง เมล็ดวัชพืช หรือลักษณะเมล็ดด่าง มีสีดำ บิดงอ ขนาดเล็ก ที่มีสาเหตุจากเชื้อโรค

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

2.2.1 การตรวจสอบเชื้อรา

1) การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะยังไม่งอก (Dry seed examination)

โดยตรวจสอบลักษณะอาการโรคและส่วนขยายพันธุ์เชื้อราหรือศัตรูพืชอื่นๆ ซึ่งปะปนมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยตาเปล่าหรือตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope เช่นเมล็ดพันธุ์มีรูปร่างผิดปกติ หรืออาจติดมา ภายในเมล็ดพันธุ์โดยไม่แสดงอาการ รวมทั้งอาจติดมากับเศษพืชในลักษณะเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์เช่น Pycnidia เป็นต้น

2) การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะเมล็ดงอก

สุ่มตัวอย่างเมล็ดตามวิธีการมาตรฐาน ในปริมาณที่เหมาะสมวิเคราะห์โดยสุ่มแยกตามสายพันธุ์ มาทดสอบด้วยวิธี Blotter method โดยวางเมล็ดลงบนกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่น ที่ชุ่มน้ำซึ่งวางอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง 10 เมล็ดต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 200 เมล็ด จากนั้น

นำจานเพาะเมล็ดไปบ่มเชื้อ (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

ในกรณีที่เชื้อติดมาในปริมาณมากจะสามารถแยกเชื้อจากเมล็ดโดยตรง หลังจากทำการแยกเชื้อด้วยวิธี Blotter method ได้ หรือทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงด้วยวิธี Dilution plate โดยสุ่มเมล็ดตามมาตรฐาน นำมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อ 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 ใช้ไปเปตต์ดูด suspension แต่ละความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วใช้แท่งแก้วลนไฟฆ่าเชื้อ spread ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน จึงนำมาตรวจหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปจำแนกชนิดต่อไป

2) แยกเชื้อจากต้นกล้าซึ่งเพาะจากเมล็ดผิดปกติ

โดยการเพาะเมล็ดในดินนึ่งฆ่าเชื้อ โดยเพาะ 25-50 เมล็ดต่อถุง และเก็บถุงเพาะที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส รดน้ำเช้าเย็นในโรงเรือนกักกันพืช ของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช เมื่อต้นกล้าออกใบจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนพืช หรืออาจใช้ถุงพลาสติกที่ฉีดพ่นน้ำคลุมให้ความชุ่มชื้นเป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนใบ กิ่ง ลำต้น โค่นต้น และราก เก็บส่วนของพืชที่สงสัยไปแยกเชื้อด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

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

2.2) วิธี Tissue transplanting ตัดใบพืชเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 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 ตรวจสอบรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

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 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 ใบเลี้ยงหรือเนื้อใบของต้น อายุ 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

3. การตรวจสอบวัชพืชโดยการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association, 2010) แล้วทำการคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพ โดยแยกออกเป็นเมล็ดพืชบริสุทธิ์ สิ่งเจือปน เมล็ดพืชอื่น และเมล็ดวัชพืช

4. การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์นำเข้าในพื้นที่ของเกษตรกร

ทำการติดตามตรวจสอบต้นพืชที่มีการนำเมล็ดพันธุ์นำเข้าไปเพาะปลูกในแปลงปลูกของเกษตรกรตามจังหวัดต่างๆ โดยสังเกตอาการความผิดปกติของต้นพืชทั้ง โคนต้น ราก ลำต้น ใบและผลของพืช และทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาการดังกล่าว นำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง แยกเชื้อ จัดจำแนกชนิดของเชื้อ และทดสอบการเกิดโรคกับพืชในห้องปฏิบัติการเพื่อทำการวินิจฉัยเชื้อโรคศัตรูพืชอย่างละเอียด เช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 2

เวลาและสถานที่

เวลา: เดือนตุลาคม 2555 – กันยายน 2557

สถานที่: ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช แปลงปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน เพชรบูรณ์ อุดรธานี ชัยภูมิ และขอนแก่น

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การรวบรวมข้อมูลทั่วไปของถั่วเหลืองและข้อมูลศัตรูพืชที่มีระบบงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

ถั่วเหลือง (Soybean : *Glycine max* (L.) Merr.) เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ถั่ว ปริมาณนำเข้าจากต่างประเทศในปี 2555-2556 ประมาณ 79,562 กิโลกรัม มูลค่า 13,463,213 บาท (กลุ่มควบคุมพันธุ์พืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ถั่วเหลืองเป็นพืชฤดูเดียว มี

ระบบรากแก้ว ลำต้นแบบเป็นพุ่มขึ้นตรงและเลื้อยพันค้าง ใบเกิดแบบสลับบนต้น รูปร่างของใบแบ่งได้ 3 ชนิด ได้แก่ ใบแคบเรียวยาว (Laneeolate) ใบค่อนข้างแคบ (Triangular) และใบกว้าง (Ovate) ดอกถั่วเหลืองออกดอกเป็นช่อ (Infloresence) แบบดอกสมบูรณ์ (Perfect flower) มีช่อดอกกระจะ (Raceme) ดอกมีสีขาวหรือสีม่วง ช่อดอกหนึ่งๆมีดอกตั้งแต่ 3-15 ดอก เมล็ดเกิดในฝัก ฝักเป็นกลุ่มๆ ละ 2-10 ฝัก ฝักยาว 2-7 เซนติเมตร แต่ละฝักมีเมล็ด 1-4 เมล็ด แต่ส่วนมากมี 2-3 เมล็ด ฝักแก่มีสีน้ำตาลอ่อน สีน้ำตาลเข้ม สีเทา และสีดำ เมล็ดมีรูปร่างกลมแบน ค่อนข้างกลมและยาว สีเขียว สีน้ำตาล สีน้ำตาลอมแดง สีเทาหรือมีสองสี ถั่วเหลืองพันธุ์อายุสั้น อายุเก็บเกี่ยว 75-85 วัน พันธุ์อายุปานกลาง อายุเก็บเกี่ยว 80-112 วัน ได้ติดตามตรวจสอบศัตรูพืชแหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน เพชรบูรณ์ อุดรธานี ชัยภูมิ และขอนแก่น

ข้อมูลศัตรูพืชที่พบเข้าทำลายถั่วเหลือง การศึกษาเบื้องต้นในการวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช พบว่า ขั้นตอนการจัดกลุ่มศัตรูพืช (Pest categorization) ถั่วเหลืองมีศัตรูพืชทั้งสิ้น 507 ชนิด คือแมลง 249 ชนิด เชื้อรา 78 ชนิด แบคทีเรีย 18 ชนิด ไวรัส 32 ชนิด ไส้เดือนฝอย 29 ชนิด ไร 9 ชนิด ทาก 2 ชนิด และวัชพืช 90 ชนิดจากการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเบื้องต้นสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง จากต่างประเทศเข้ามาในราชอาณาจักร พบศัตรูพืชที่ไม่มีรายงานในประเทศไทย และเป็นศัตรูพืชที่มีความเสี่ยงสูงที่อาจติดเข้ามาและก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชผลในประเทศ ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันการระบาดของศัตรูพืชดังกล่าว หรือศัตรูชนิดใหม่จึงทำการตรวจสอบหาศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์เป็นข้อมูลในการหามาตรการที่เหมาะสมกับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง จากต่างประเทศเข้ามาในราชอาณาจักร

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง นำเข้าจากต่างประเทศในห้องปฏิบัติการ

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

จากการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากทุกประเทศในเบื้องต้น พบว่าลักษณะของเมล็ดมีสีขาว เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด ซึ่งจากการตรวจเอกสารและการสังเกตเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากบางประเทศ มีการคลุกสารเคมีฆ่าเชื้อรา ได้แก่ Thiram หรือ Captan หรือคลุกสารเคมีทั้ง 2 ชนิดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้า

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

เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่นำเข้าจาก 2 ประเทศ ได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีนและสหรัฐอเมริกา จำนวน 20 ตัวอย่าง มาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะเมล็ดพันธุ์**ถั่วเหลือง** มีสีขาว เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด

และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพันธุ์**ถั่วเหลือง** ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบเชื้อรา จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis, Chaetomium* sp, *Cladosporium* sp., *Curvularia lunata, Colletotrichum dematium, Fusarium semitectum, Fusarium solani*, และ Nigrospora sp., ซึ่งเป็นเชื้อราที่ไม่สำคัญด้านกักกันพืช มีอยู่ในประเทศไทยแล้ว พบวัชพืช 9 ชนิด ได้แก่ *Ambrosia spp., Amaranthus spp., Chenopodium spp.,Echinochloa colonum, Helianthus annuus, Kochia scoparia, Polygonum convolvulus, Polygonum persicaria, Staria lutescens* พบวัชพืชกักกัน 1 ชนิด คือ *Polygonum convolvulus* แต่จากการนำเมล็ดพันธุ์**ถั่วเหลือง** มาตรวจด้วยวิธี Dilution technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่น่าสงสัยจะเป็นเชื้อก่อโรคกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นถั่วเหลือง ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ไม่แสดงอาการโรคพืช ซึ่งจากการตรวจเอกสารและการสังเกตเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากบางประเทศ มีการคลุกสารเคมีฆ่าเชื้อรา ได้แก่ Thiram หรือ Captan หรือ คลุกสารเคมีทั้ง 2 ชนิดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้า

3. การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองนำเข้าจากต่างประเทศ

ได้ติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง จำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน เพชรบูรณ์ อุดรธานี ชัยภูมิ และ ขอนแก่น พบอาการโรคบนใบของถั่วเหลือง ได้แก่ เชื้อราสนิม แอนแทรกโนส และวัชพืช ได้แก่ กระชับ หญ้านกสีชมพู โทงเทง หญ้าปล้องละมาน ลูกใต้ใบ สาบม่วง หญ้ายาง หญ้าปากควาย หญ้าขจรจบ หญ้าดอกแดง แห้วหมู ผักโขมหนาม กะเม็ง หญ้าตีนกา หญ้าละออง ผักเสี้ยนผี หญ้าตีนนก เทียนนา กกทราย น้ำนมราชสีห์ ตีนตุ๊กแก ผักเป็ดหญ้างวงช้าง บานไม่รู้โรย ซึ่งศัตรูพืชที่พบในแปลงปลูก ไม่ใช่ศัตรูพืชด้านกักกันพืชของประเทศไทย

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ถั่วเหลือง (Soybean : *Glycine max* (L.) Merr.) เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ถั่ว ปริมาณนำเข้าจากต่างประเทศในปี 2555-2556 ประมาณ 79,562 กิโลกรัม มูลค่า 13,463,213 บาท (กลุ่มควบคุมพันธุ์พืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ถั่วเหลืองเป็นพืชฤดูเดียว มีระบบรากแก้ว ลำต้นแบบเป็นพุ่มขึ้นตรงและเลื้อยพันค้าง ใบเกิดแบบสลับบนต้น รูปร่างของใบแบ่งได้ 3 ชนิด ได้แก่ ใบแคบเรียวยาว (Laneeolate) ใบค่อนข้างแคบ (Triangular) และใบกว้าง (Ovate) ดอกถั่วเหลืองออกดอกเป็นช่อ (Inflorescence) แบบดอกสมบูรณ์ (Perfect flower) มีช่อดอกกระจะ (Raceme) ดอกมีสีขาวหรือสีม่วง ช่อดอกหนึ่งๆมีดอกตั้งแต่ 3-15 ดอก เมล็ดเกิดในฝัก ฝักเป็นกลุ่มๆ ละ 2-10 ฝัก ฝักยาว 2-7 เซนติเมตร แต่ละฝักมีเมล็ด 1-4 เมล็ด แต่ส่วนใหญ่มี 2-3 เมล็ด ฝักแก่มีสีน้ำตาลอ่อน สีน้ำตาลเข้ม สีเทา และสีดำ เมล็ดมีรูปร่างกลมแบน ค่อนข้างกลมและยาว สีเขียว สีน้ำตาล สีน้ำตาลอมแดง สีเทาหรือมีสองสี ถั่วเหลืองพันธุ์อายุสั้น อายุเก็บเกี่ยว 75-85 วัน พันธุ์อายุปานกลาง อายุเก็บเกี่ยว 86-112 วัน แหล่งปลูกที่สำคัญใน 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน เพชรบูรณ์ อุดรธานี ชัยภูมิ และ ขอนแก่น

จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ที่นำเข้าจาก 2 ประเทศ ได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีนและสหรัฐอเมริกา มาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าลักษณะเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง มีสีขาว เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาดปิดมิดชิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบเชื้อรา จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis, Chaetomium* sp, *Cladosporium* sp., *Curvularia lunata, Colletotrichum dematium, Fusarium semitectum, Fusarium solani*, และ Nigrospora sp., การตรวจวัชพืชโดยการคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพของ ISTA 2010 พบวัชพืช 9 ชนิด เป็นวัชพืชกักกัน 1 ชนิด คือ *Polygonum convolvulus* ส่วนวัชพืช 8 ชนิด ได้แก่ *Ambrosia spp., Amaranthus spp., Chenopodium spp.,Echinochloa colonum, Helianthus annuus, Kochia scoparia, Polygonum persicaria, Staria lutescens* (นงพรและสมบูรณ์, 2539) แต่จากการนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง มาตรวจด้วยวิธี Dilution technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่น่าสงสัยจะเป็นเชื้อก่อโรคกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นถั่วเหลือง ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ไม่แสดงอาการโรคพืช ซึ่งจากการตรวจเอกสารและการสังเกตเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากบางประเทศ มีการคลุกสารเคมีฆ่าเชื้อรา ได้แก่ Thiram หรือ Captan หรือ คลุกสารเคมีทั้ง 2 ชนิดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้าอัตราการใช้

ได้ติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง จำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน เพชรบูรณ์ อุดรธานี ชัยภูมิ และ ขอนแก่น พบอาการโรคบนใบของถั่วเหลือง ได้แก่ เชื้อราสนิม แอนแทรกโนนส และวัชพืช ได้แก่ กระชับ หญ้านกสีชมพู โทงเทง หญ้าปล้องละมาน ลูกใต้ใบ สาบม่วง หญ้ายาง หญ้าปากควาย หญ้าขจรจบ หญ้าดอกแดง แห้วหมู ผักโขมหนาม กะเม็ง หญ้าตีนกา หญ้าละออง ผักเสี้ยนผี หญ้าตีนนก เทียนนา กกทราย น้ำนมราชสีห์ ตีนตุ๊กแก ผักเป็ด หญ้างวงช้าง และบานไม่รู้โรย ซึ่งศัตรูพืชที่พบในแปลงปลูก ไม่ใช่ศัตรูพืชด้านกักกันพืชของประเทศไทย

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณวิชาญ สมาธิ คุณวิภา เกิดพิพัฒน์ คุณอรนุช นาคะโร ช่วยสนับสนุนและเตรียมตัวอย่างพืชและเตรียมงานในห้องปฏิบัติการ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการที่ช่วยสนับสนุนในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์ และ วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2545. โรคไวรัสที่สำคัญของพืชผักและพืชน้ำมัน. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 88 หน้า.

นงพร มาอยู่ดี และ สมบูรณ์ เจริญฤทธิ์. 2539. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชจากต่างประเทศ, รายงานผลการทดลองและวิจัยปี 2529, กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, กรมวิชาการเกษตร. 10 หน้า.

เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2550. ฐานข้อมูลโรคพืชที่สำคัญในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก: โรคพืชวงศ์แตง. ศูนย์พันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 81 หน้า.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2550. สถิติการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พืชจากต่างประเทศ, สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ.

CABI. (CABI International). 2007. Crop Protection Compendium. 2007. Wallingford, UK.

Chancellor, R,I. 1981. The Identification of Weed Seedling of Farm and Garden, Great Britain. Billing & sons Ltd. Guildford. P. 44-45

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

Delorit, R.T. 1970. An Illustrated Taxonomy Manual Of Weed Seeds. Agronomy Pub. River Falls, Wisconsin 175 pp.

Hanf, M. 1983. The Arable Weeds of Europe with Their Seedling and Seeds, UK : BASF United Kingdom Ltd., Suflok, UK. 494 pp.

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

Holm, G.L.,,I.V. Pancho, I,P. Herberger. and D.L. Plucknett. 1979. A Geographical Altas Of World Weeds. John Wiley Sons., New York . 391 pp.

Neergaard, P. 1977b. Method for detection of seed-borne fungi and bacteria, pp. 33-38. In Plant Health and Quarantine in International Transfer of Genetic Resources (Eds., W.B. Hewitt and L. Chiarappa) CRC Press, Cleveland USA.

Noda, K.M. Teerawatsakul, C. Prakongvong and L. Chaiwiratnukul. 1986. Major Weeds in Thailand. NWSRI Project Manual No.1, Mass Medias Co, Ltd, Bangkok, Thailand. 164 pp.

Radananchaless, T. and JF. Maxwell. 1994. Weeds of Soybean fields in Thailand. Faculty of Agriculture, Chiengmai University, Chiengmai , Thailand. 408 pp.

Sastroutomo,s.s. and K.G. Singh. 1988. Weed as Contaminants in Cover Crop and Grass Seeds In Press1, The Second Tropical Weed Science Conference, Dec 6-10, 1988 Phuket, Thailand. 159-166 pp.

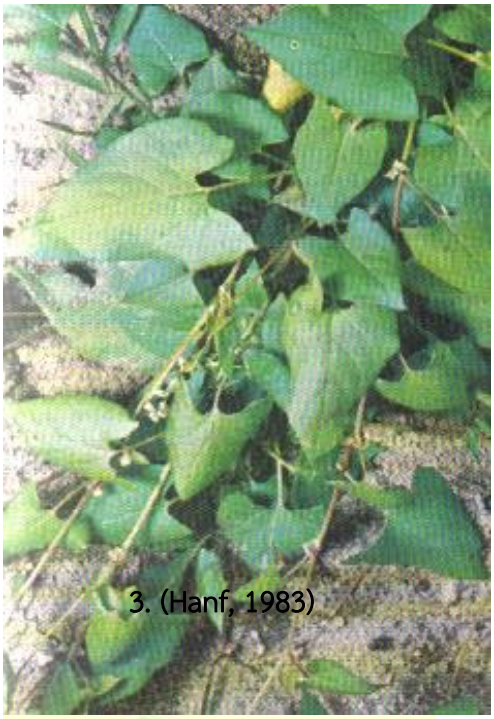
Zakaria, N. and J. Nair. 1985. Weed Seeds and other Contaminants in cover Crop Seeds imported into Penninsuler Malaysia and their Quarantine Implication. J. Plant Protection Tropics, 2 (1): 53-59

http.// www.doa.go.th/fcri/images/files/Soybean/chapter,2,3,4 pdf.

Table 1. Pests intercepted from imported soybean Seed Consignments

Pests	Sources	Number of interceptions
Deseases		
Alternaria tenuis	People's Republic of China	2
Curvularia lunata	People's Republic of China	1
Collectotrichum dematium	People's Republic of China	1
Fusarium semitectum	People's Republic of China	1
Fusarium solani	People's Republic of China	2
Chaetomium sp.	People's Republic of China	2
Cladosporium sp.	People's Republic of China	2
Nigrospora sp.	People's Republic of China	1
Weeds		
Ambrosia spp.	United States	2
Amaranthus spp.	United States	1
Chenopodium spp.	United States	2
Echinochloa colonum	United States, People's Republic of China	2
Helianthus annuus	People's Republic of China	1
Kochia scoparia	People's Republic of China	2
Polygonum convolvulus	People's Republic of China	1
Polygonum persicaria	People's Republic of China	2
Staria lutescens	People's Republic of China	1

Quarantine weeds intercepted from imported soybean seed consignments



3. (Hanf, 1983)

4.

5.

1

2.

Figure 1. *Polygonum convolvulus* L. (F. Polygonaceae)

1. Seedling

(http://www. criba ecuar/.../malezas/figuras/foto 1. htm

(http://www. agr.gouv.gc.ca/.../po/co/po/cu 15 dd. Jpg , www.aga.gouv ac.ca)

2. Upper part of seedling
3. Habit
4. Infloresence flower

(http://www. erso.wanadoo.fr/.../fallopia_convo/vu/us.2 htm)

5. Seeds and seeds with perianth

การศึกษาชนิดของศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียว ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

Interception of Quarantine Pests in Imported Chinese mustard Seed Consignments

นงพร มาอยู่ดี[1/] ชลธิชา รักใคร่[1/] ทัศนีย์ ศรีโสภา[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]กลุ่มควบคุมพันธุ์พืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

บทคัดย่อ

การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียว (Chinese mustard : *Brassica juncea* Coss.) วงศ์ Brassicaceae นำเข้าจากต่างประเทศที่กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ระหว่างตุลาคม 2555 ถึง กันยายน 2557 โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน อิตาลี เม็กซิโก และนิวซีแลนด์ จำนวน 32 ตัวอย่าง ได้ทำการตรวจและจำแนกชนิดศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคศัตรูพืชขั้นละเอียดด้วยวิธี Visual inspection, Blotter method, และคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพพร้อมทั้งปลูกทดสอบแสดงอาการผิดปกติในโรงเรือนปลูกพืช ผลการตรวจพบเชื้อรา 7 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis, Alternaria brassicicola, Alternaria raphani, Cladosporium* sp., *Stachybotry* sp., *Streptomyces* sp. และ *Ulocladium* sp. ซึ่งเป็นเชื้อโรคที่ไม่สำคัญทางด้านกักกันพืช พบเมล็ดวัชพืชจำนวน 6 ชนิด เป็นวัชพืชกักกันที่สำคัญด้านกักกันพืช 2 ชนิด ได้แก่ *Galium aparine*, *Polygonum av*iculare ส่วนวัชพืชที่ไม่มีความสำคัญด้านกักกันพืชจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Amaranthus hydridus, 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 จะต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชระบุว่าปลอดวัชพืชดังกล่าวกำกับมาด้วย

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-03-00-18-56

Abstract

A study on the interception of quarantine pests in Chinese mustard seed consignments imported from the People's Republic of China, Italy, Mexico and New Zealand was carrying out by taking samples from Chinese mustard seeds intercepting and identifying the pests. Thirty two samples were collected from seed consignments imported from the four countries in 2013 and 2014. Thirteen pests were found. There are seven diseases namely *Alternaria tenuis, Alternaria brassicicola, Alternaria raphani, Cladosporium* sp., *Stachybotry* sp., *Streptomyces* sp. and *Ulocladium* sp. and six weed species with *Amaranthus hybridus, Galium aparine, Polygonum av*iculare, *Polygonum persicaria, Rumex crispus* and *Phalaris* spp.. Two of these pests are considered as a pest of quarantine importance. They are weed named *Galium aparine, Polygonum av*iculare imported from New Zealand and the entry of these weeds are prohibited. To prevent the introduction and these spread of noxious weeds may need to monitor the seeds after importation at the port of entry and specify stricter phytosanitary measures and quarantine regulations for importation of the seeds under Plant quarantine Act. B.E. 2507 amended by Plant Quarantine Act (No. 2) B.E. 2542 and Plant Quarantine Act (No. 3) B.E. 2551.

Keyword : ศัตรูพืช ศัตรูพืชกักกัน เมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียว นำเข้า พระราชบัญญัติกักพืช
Pests, Quarantine Pest, Seed Consignment, Interception, Chinese mustard, Import, Plant Quarantine Act.

คำนำ

ผักกาดเขียว (Chinese mustard: *Brassica juncea* Coss. L. เป็นพืชผักที่อยู่ในวงศ์กะหล่ำ (Brassicaceae) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศจีน สถิติการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ปี 2555 ปริมาณ 157,909 กิโลกรัม มูลค่า 8,194,557บาท (กลุ่มควบคุมพันธุ์พืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร ผักกาดเขียวเป็นผักประเภทอายุปีเดียว ใบเลี้ยงคู่มี ใบไม่มีขน ใบยาวประมาณ 15-50 ซม. ระบบรากแก้ว กว้าง 5-40 ซม. ใบที่อยู่ด้านบน มีขนาดใหญ่ส่วนใบที่อยู่ถัดเข้าไปจะค่อยๆเล็กลง ลำต้นตรงทรงพุ่ม แคบต้นและใบสีเขียว อ่อน โคนก้านยึดติดกับราก และพื้น ดิน 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) สิ่งกำกัด (Restricted material) และสิ่งไม่ต้องห้าม (Unprohibited materials) ในการนำเข้ามายังประเทศไทยต้องแจ้งการนำเข้าและมีใบรับรองสุขอนามัยพืชจากประเทศต้นทางกำกับมาพร้อมกับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า โดยไม่มีมาตรการสุขอนามัยกำหนดไว้แต่อย่างใด การนำเข้าสินค้าเกษตรจากต่างประเทศ มีโอกาสที่ศัตรูพืชหลายชนิดที่อาจเป็นศัตรูพืชกักกันที่ร้ายแรงหรือศัตรูพืชที่สำคัญที่ก่อความเสียหายกับผลิตผลทางการเกษตรติดเข้ามากับเมล็ดพืชด้วย โดยอาจเป็นศัตรูพืชร้ายแรงที่ไม่มีปรากฏในประเทศไทย โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ติดมากับผักกาดเขียว ซึ่งมีการนำเข้ามาเพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์หรือเป็นต้นพันธุ์ในการส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูกกระจายทั่วประเทศไทย โดยในแต่ละปีมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์เหล่านี้ในปริมาณมาก หากศัตรูพืชที่ร้ายแรงซึ่งยังไม่มีรายงานในประเทศไทยติดมากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวสามารถเข้ามาเจริญและแพร่พันธุ์ได้ในประเทศไทย จะก่อให้เกิดผลกระทบทำความเสียหายต่อการเกษตรในประเทศและกระทบต่อการส่งออกพืชผักผลไม้ไทยไปยังต่างประเทศที่มีความเข้มงวดด้านกักกันพืช ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทำการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับพืชนำเข้าเพื่อให้ทราบชนิด แหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้า และเส้นทางการเข้ามาของศัตรูพืช ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นฐานข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืช มีประโยชน์ใช้อ้างอิงทางวิชาการ นำมาพิจารณาหามาตรการเพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชชนิดนั้น ๆ และกำหนดเป็นมาตรการทางด้านกฎหมายและทางวิชาการในการควบคุมการนำเข้า หรือเปลี่ยนแปลงสถานภาพของพืชตามพระราชบัญญัติกักพืชต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

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

วิธีการ

1.รวบรวมข้อมูลทั่วไปของผักกาดเขียว และข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

ทำการสืบค้นข้อมูลจากเอกสาร วารสาร รายงานการประชุมทางวิชาการ อินเตอร์เน็ต เพื่อค้นหาข้อมูลของผักกาดเขียว ลักษณะทั่วไปของพืช สายพันธุ์ พื้นที่การเพาะปลูก รายชื่อของประเทศที่ประเทศไทยมีการการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ ปริมาณการนำเข้า ข้อมูลชนิดของศัตรูพืชทั้งนอกประเทศและในประเทศ

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวนำเข้าในห้องปฏิบัติการ

ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียว ที่นำเข้าจากต่างประเทศจำนวน 32 ตัวอย่าง โดยแยกเป็นเมล็ดพันธุ์บริสุทธิ์ เมล็ดพืชอื่น สิ่งเจือปน และเมล็ดวัชพืช มาทำการตรวจวินิจฉัยโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อตรวจหาตัวอ่อน หนอน แมลง เมล็ดวัชพืช หรือลักษณะเมล็ดด่าง มีสีดำ บิดงอ ขนาดเล็ก ที่มีสาเหตุจากเชื้อโรค

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

2.2.1 การตรวจสอบเชื้อรา

1) การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะยังไม่งอก (Dry seed examination)

โดยตรวจสอบลักษณะอาการโรคและส่วนขยายพันธุ์เชื้อราหรือศัตรูพืชอื่นๆ ซึ่งปะปนมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยตาเปล่าหรือตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Stereo microscope เช่นเมล็ดพันธุ์มีรูปร่างผิดปกติ หรืออาจติดมา ภายในเมล็ดพันธุ์โดยไม่แสดงอาการ รวมทั้งอาจติดมากับเศษพืชในลักษณะเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์เช่น Pycnidia เป็นต้น

2) การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะเมล็ดงอก

สุ่มตัวอย่างเมล็ดตามวิธีการมาตรฐาน ในปริมาณที่เหมาะสมวิเคราะห์โดยสุ่มแยกตามสายพันธุ์ มาทดสอบด้วยวิธี Blotter method โดยวางเมล็ดลงบนกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่นที่ชุ่มน้ำซึ่งวางอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียว 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

ในกรณีที่เชื้อติดมาในปริมาณมากจะสามารถแยกเชื้อจากเมล็ดโดยตรง หลังจากทำการแยกเชื้อด้วยวิธี Blotter method ได้ หรือทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงด้วยวิธี Dilution plate โดยสุ่มเมล็ดตามมาตรฐาน นำมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อ 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 ใช้ไปเปตต์ดูด Suspension แต่ละความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วใช้แท่งแก้วลนไฟฆ่าเชื้อ spread ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน จึงนำมาตรวจหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปจำแนกชนิดต่อไป

2) แยกเชื้อจากต้นกล้าซึ่งเพาะจากเมล็ดผิดปกติ

โดยการเพาะเมล็ดในดินนึ่งฆ่าเชื้อ โดยเพาะ 25-50 เมล็ดต่อถุง และเก็บถุงเพาะที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส รดน้ำเช้าเย็นในโรงเรือนกักกันพืช ของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช เมื่อต้นกล้าออกใบจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนพืช หรืออาจใช้ถุงพลาสติกที่ฉีดพ่นน้ำคลุมให้ความชุ่มชื้นเป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนใบ กิ่ง ลำต้น โค่นต้น และราก เก็บส่วนของพืชที่สงสัยไปแยกเชื้อด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

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

2.2) วิธี Tissue transplanting ตัดใบพืชเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 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 ตรวจสอบรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

2. ทดสอบแกรม (Gram reaction) โดยใช้สารละลายโปรแตสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 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 ใบเลี้ยง หรือเนื้อใบของต้นฟักทอง สควัอชและแว๊กกราวด์ อายุ 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) โดยเพาะเมล็ดพันธุ์ในดินนอบฆ่าเชื้อ 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

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

ทำการคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพ โดยแยกออกเป็นเมล็ดพืชบริสุทธิ์ สิ่งเจือปน เมล็ดพืชอื่น และเมล็ดวัชพืช

4. การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์นำเข้าในพื้นที่ของเกษตรกร

ทำการติดตามตรวจสอบต้นพืชที่มีการนำเมล็ดพันธุ์นำเข้าไปเพาะปลูกในแปลงปลูกของเกษตรกรตามจังหวัดต่างๆ ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง เพชรบูรณ์ และกาญจนบุรี โดยสังเกตอาการความผิดปกติของต้นพืชทั้ง โคนต้น ราก ลำต้น ใบและผลของพืช และทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาการดังกล่าว นำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง แยกเชื้อ จัดจำแนกชนิดของเชื้อ และทดสอบการเกิดโรคกับพืชในห้องปฏิบัติการเพื่อทำการวินิจฉัยเชื้อโรคศัตรูพืชอย่างละเอียด เช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 2

เวลาและสถานที่

เวลา : เดือนตุลาคม 2555 – กันยายน 2557

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงปลูกของเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง เพชรบูรณ์ กาญจนบุรี อุดรธานี และหนองคาย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การรวบรวมข้อมูลทั่วไปของผักกาดเขียวและข้อมูลศัตรูพืชที่มีระบบงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ ผักกาดเขียว (Chinese mustard : *Brassica juneca* 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 อุดรธานี กาญจนบุรี และหนองคาย

ข้อมูลศัตรูพืชที่พบเข้าทำลาย**ผักกาดเขียว** การศึกษาเบื้องต้นในการวิเคราะห์และประเมิน

ความเสี่ยงศัตรูพืช พบว่า ขั้นตอนการจัดกลุ่มศัตรูพืช (Pest categorization) มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 32 ชนิด คือ เชื้อรา 5 ชนิด แบคทีเรีย 3 ชนิด ไวรัส 2 ชนิด ไส้เดือนฝอย 1 ชนิด แมลง 18 ชนิด และวัชพืช 3 ชนิด

2. ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียว นำเข้าจากต่างประเทศในห้องปฏิบัติการ

2.1 ผลการตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

จากการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากทุกประเทศในเบื้องต้น พบว่าลักษณะของเมล็ดมีสีขาว เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืชเมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด ซึ่งจากการตรวจเอกสารและการสังเกตเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากบางประเทศ มีการคลุกสารเคมีฆ่าเชื้อรา ได้แก่ Thiram หรือ Captan หรือคลุกสารเคมีทั้ง 2 ชนิดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้า

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

เมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวที่นำเข้าจาก 4 ประเทศ ได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีน อิตาลี เม็กซิโก และ นิวซีแลนด์ มาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะเมล็ดพันธุ์**ผักกาดเขียว** มีสีขาว เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพันธุ์**ผักกาดเขียว** ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบ เชื้อรา จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis, Alternaria brassicicola, Alternaria raphani, Cladosporium* sp., *Stachybotry* sp., *Streptomyces* sp. และ *Ulocladium* sp. แต่จากการนำเมล็ดพันธุ์**ผักกาดเขียว** มาตรวจด้วยวิธี Dilution technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญด้านกักกันพืช และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้น**ผักกาดเขียว** ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ไม่แสดงอาการโรคพืช และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้น**ผักกาดเขียว** ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ไม่แสดงอาการโรคพืช พบเมล็ดวัชพืช 6 ชนิด ได้แก่ *Galium aparine*, *Polygonum aviculare*, *Amaranthus hydrides, Polygonum persicaria, Rumex erispus* และ *Phalaris* spp.

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

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผักกาดเขียว (Chinese mustard : *Brassica juneca* Coss.) เป็นผักประเภทอายุปีเดียว ใบเลี้ยงคู่ ใบไม่มีขน ใบยาวประมาณ 15-50 ซม. ระบบรากแก้ว กว้าง 5-40 ซม. ใบที่อยู่ด้านบน มีขนาดใหญ่ส่วนใบที่อยู่ถัดเข้าไปจะค่อยๆเล็กลง ลำต้นตรงทรงพุ่มแคบต้นและใบสีเขียว อ่อน โคนก้านยึดติดกับรากและพื้นดิน สีเขียวอ่อนมีใบหุ้มอยู่โดยรอบช่อดอกแบบกระจะ (Raceame) ดอกเกิดที่ยอด ประกอบด้วย กลีบรองดอกสีเขียวอมเหลือง หรือเขียวอ่อน ผลสามารถแตกเองได้เมื่อฝักแก่โดยจะแตกเป็นสองแฉกแยกจากข้างล่างขึ้นข้างบน เมล็ดกลมสีน้ำตาลและสีดำ มีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 55-75 วัน สามารถปลูกได้ตลอดปี สถิติการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ปี 2555 ปริมาณ 157,909 กิโลกรัม มูลค่า 8,194,557 ข้อมูลศัตรูพืชที่เข้าทำลายส่วนต่างๆ ของผักกาดเขียว มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 32 ชนิด คือ เชื้อรา 5 ชนิด แบคทีเรีย 3 ชนิด ไวรัส 2 ชนิด ไส้เดือนฝอย 1 ชนิด แมลง 18 ชนิด และวัชพืช 3 ชนิด และจากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียว ที่นำเข้าจาก 4 ประเทศ ได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีน อิตาลี เม็กซิโก และ นิวซีแลนด์ มาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียว มีสีขาว เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียว ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบเชื้อรา จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis, Alternaria brassicicola, Alternaria raphani, Cladosporium* sp., *Stachybotry* sp., *Streptomyces* sp. และ *Ulocladium* sp. แต่จากการนำเมล็ดพันธุ์**ผักกาดเขียว** มาตรวจด้วยวิธี Dilution technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญด้านกักกันพืช และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้น**ผักกาดเขียว** ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ไม่แสดงอาการโรคพืช พบเมล็ดวัชพืช 6 ชนิด ได้แก่ *Galium aparine*, *Polygonum aviculare*, *Amaranthus hydrides, Polygonum persicaria, Rumex erispus* และ *Phalaris* spp. เป็นวัชพืชกักกันที่มีความสำคัญด้านกักกันพืช 2 ชนิด ได้แก่ *Galium aparine* และ *Polygonum aviculare* สำหรับวัชพืชกักกันได้ทำการควบคุมวัชพืชภายใต้พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 เพื่อป้องกันมิให้วัชพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศไทย และได้ทำการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกผักกาดเขียวที่นำเข้าจากต่างประเทศ ในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง เพชรบูรณ์ กาญจนบุรี อุดรธานี และหนองคาย ไม่พบเชื้อสาเหตุโรคพืชในแปลงปลูก แต่พบวัชพืชได้แก่ แห้วหมู หญ้านกสีชมพู เทียนนา กระชับ กะเม็ง โทงเทง ลูกใต้ใบ ผักเบี้ยใหญ่ น้ำนมราชสีห์ ผักโขม ผักปราบใบกว้าง สาบแร้งสาบกา ตีนตุ๊กแก ผักยาง และ ผักเสี้ยนผี ซึ่งไม่ใช่ศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณวิชาญ สมาธิ คุณวิภา เกิดพิพัฒน์ คุณอรนุช นาคะโร ช่วยสนับสนุนและเตรียมตัวอย่างพืชและเตรียมงานในห้องปฏิบัติการ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการที่ช่วยสนับสนุนในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์ และ วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2545. โรคไวรัสที่สำคัญองพืชผักและพืชน้ำมัน. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 88 หน้า.

นงพร มาอยู่ดี และ สมบูรณ์ เจริญฤทธ์. 2539. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชจากต่างประเทศ รายงานผลการทดลองและวิจัยปี 2539. กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตรกรมวิชาการเกษตร. 10 หน้า.

เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2550. ฐานข้อมูลโรคพืชที่สำคัญในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก: โรคพืชวงศ์แตง. ศูนย์พันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 81 หน้า.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2555. สถิติการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พืชจากต่างประเทศ, สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ.

Anonymous. 2010. International Rules for Seed Testing Edition 2010, Basserdorf; Switzerland : The International Seed Testing Association (ISTA).

CABI. (CABI International). 2007. Crop Protection Compendium. 2007. Wallingford, UK.

Chancellor, R,I. 1981. The Identification of Weed Seedling of Farm and Garden, Great Britain. Billing & sons Ltd. Guildford. P. 44-45

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

Delorit, R.T. 1970. An IIlustrated Taxonomy Manual Of Weed Seeds. Agronomy Pub. River Falls, Wisconsin 175 pp.

Hanf, M. 1983. The Arable Weeds of Europe with Their Seedling and Seeds, UK : BASF United Kingdom Ltd., Suflok, UK. 494 pp.

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

Holm, G.L.,,I.V. Pancho, I,P. Herberger. and D.L. Plucknett. 1979. A Geographical Altas Of World Weeds. John Wiley Sons., New York . 391 pp.

Neergaard, P. 1977b. Method for detection of seed-borne fungi and bacteria, pp. 33-38. In Plant Health and Quarantine in International Transfer of Genetic Resources (Eds., W.B. Hewitt and L. Chiarappa) CRC Press, Cleveland USA.

Noda, K.M. Teerawatsakul, C. Prakongvong and L. Chaiwiratnukul. 1986. Major Weeds in Thailand. NWSRI Project Manual No.1, Mass Medias Co, Ltd, Bangkok, Thailand. 164 pp.

Radananchaless, T. and JF. Maxwell. 1994. Weeds of Soybean fields in Thailand. Faculty of Agriculture, Chiengmai University, Chiengmai , Thailand. 408 pp.

Sastroutomo,s.s. and K.G. Singh. 1988. Weed as Contaminants in Cover Crop and Grass Seeds In Press1, The Second Tropical Weed Science Conference, Dec 6-10, 1988 Phuket, Thailand. 159-166 pp.

Zakaria, N. and J. Nair. 1985. Weed Seeds and other Contaminants in cover Crop Seeds imported into Penninsuler Malaysia and their Quarantine Implication. J. Plant Protection Tropics, 2 (1): 53-59

http.// www.doa.go.th/fcri/images/files/Soybean/chapter,2,3,4 pdf.

Table 1. Pests intercepted from imported Chinese mustard Seed Consignments

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

Quarantine weeds intercepted from imported soybean seed consignments

1.

2.

3.

4. 100X

5.

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-aparine.html)
4. Seeds
5. Flowers (www.missouriplants.com/whiteopp/Galium-aparin)

1.

2.

3. (Hanf, 1983)

4.

5.

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 (http://www. bio.by.ac.yu/herbar/129.htm)

5. Seeds and seeds with perianth

การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตาที่นำเข้าจากต่างประเทศ

Study on Quarantine Pest Associated with Pea Seed

โสภา มีอำนาจ ศรีวิเศษ เกษสังข์ ปรียพรรณ พงศาพิชญ์ ชลธิชา รักใคร่ วันเพ็ญ ศรีชาติ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ถั่วลันเตา (*Pisum sativum,* Pea) จากสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชที่เข้าทำลายถั่วลันเตา มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 300 ชนิด จัดเป็นแมลง 105 ชนิด ไร 4 ชนิด วัชพืช 51 ชนิด ไส้เดือนฝอย 30 ชนิด เชื้อรา 69 ชนิด แบคทีเรีย 14 ชนิด และไวรัส 21 ชนิด เป็นศัตรูพืชกักกันตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืชพ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) และ (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2550 ทั้งสิ้น 35 ชนิด จัดเป็นแมลง 1 ชนิด วัชพืช 18 ชนิด ไส้เดือนฝอย 8 ชนิด เชื้อรา 5 ชนิด และไวรัส 3 ชนิด จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตานำเข้า ในห้องปฏิบัติการ โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตานำเข้าจาก 9 ประเทศ ได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีน ประเทศบัลแกเรีย ไต้หวัน อินเดีย สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น นิวซีแลนด์ อิตาลี และออสเตรเลีย จำนวน 13 ตัวอย่าง น้ำหนัก 30,962.46 กิโลกรัม ทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตานำเข้ามีเมล็ดที่สมบูรณ์สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคพืชกับเมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตาในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method และ Dilution technique พบเชื้อรา 2 ชนิด บนเมล็ดถั่วลันเตา ได้แก่ เชื้อรา *Alternaria tenuis curvularia pallescens* และ *Cladosporium* sp. เป็นเมล็ดนำเข้าจากประเทศไต้หวัน แต่ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่น่าสงสัยจะเป็นเชื้อก่อโรคกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว และจากการนำเมล็ดพันธุ์ไปปลูกสังเกตอาการของโรคในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นถั่วลันเตา ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ และจากการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแหล่งปลูกของเกษตรกร ไม่พบศัตรูพืชกักกันเป้าหมาย

Abstract

The total of 30,962.46 Kgs. of pea (*Pisum sativum*) seed has been imported into Thailand between 2013-2014. According to relevant references there are 300 pests associated with pea including 105 insects, 4 mites, 51 weeds, 30 nematodes, 69 fungi, 14 bacteria and 21 viruses . There are 35 quarantine pests associated with pea

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-03-00-19-56

including 1 insect, 18 weed, 8 nematodes, 5 fungi and 3 virus. Visual inspection has been done for consignment on arrival. Thirteen samples of seeds imported from China, Bulgaria, Taiwan, India, USA, Japan, New zeland, Italy, Australia and Philippines was collected and table to plant quarantine laboratory for thoroughly inspection by blotter method, dilution method and ELISA method. Laboratory result showed the interception of *Alternaria tenuis curvularia pallescens* and *Cladosporium* sp. No sign or symptoms from seedling symptom test have been observed and no quarantine pest present in imported okra plantation.

Keywords: เมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตา, ศัตรูพืช, พืชนำเข้า
pea seed, pest, imported plant

คำนำ

พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 กำหนดให้เมล็ดพันธุ์พืชผักต่าง ๆ ดอกไม้หรือไม้ประดับหลายชนิดจัดเป็นสิ่งกำกัด (Restricted material) และสิ่งไม่ต้องห้าม (unprohibited materials) ในการนำเข้ามายังประเทศไทยต้องแจ้งการนำเข้า และมีใบรับรองสุขอนามัยพืชจากประเทศต้นทางกำกับมาด้วยพร้อมกับเมล็ดพันธุ์นำเข้า โดยไม่มีมาตรการสุขอนามัยกำหนดไว้แต่อย่างใด การนำเข้าสินค้าเกษตรจากต่างประเทศ มีโอกาสที่ศัตรูพืชหลายชนิดที่อาจเป็นศัตรูพืชกักกันที่ร้ายแรงหรือศัตรูพืชที่สำคัญที่ก่อความเสียหายกับผลิตผลทางการเกษตรติดเข้ามากับเมล็ดพืชด้วย โดยอาจเป็นศัตรูพืชร้ายแรงที่ไม่มีปรากฏในประเทศไทย ในกลุ่มของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตา ซึ่งมีการนำเข้ามาเพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ในการส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูกกระจายทั่วประเทศไทย โดยในแต่ละปีมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์เหล่านี้ในปริมาณมาก หากศัตรูพืชที่ร้ายแรงซึ่งยังไม่มีรายงานในประเทศไทยติดมากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวสามารถเข้ามาเจริญและแพร่พันธุ์ได้ในประเทศไทย จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อการเกษตรในประเทศและกระทบต่อการส่งออกพืชผักผลไม้ไทยไปยังต่างประเทศที่มีความเข้มงวดด้านกักกันพืช ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทำการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับพืชนำเข้า เพื่อทราบชนิดแหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้า และเส้นทางการเข้ามาของศัตรูพืช ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นฐานข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืช มีประโยชน์ใช้อ้างอิงทางวิชาการ นำมาพิจารณาหามาตรการเพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชชนิดนั้น ๆ และกำหนดเป็นมาตรการทางด้านกฎหมายและทางวิชาการในการควบคุมการนำเข้า หรือเปลี่ยนแปลงสถานภาพของพืชนำเข้าให้เป็นสิ่งต้องห้ามหรือสิ่งกำกัดตามพระราชบัญญัติกักพืชต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตานำเข้า
2. แว่นขยาย กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope และ compound microscope
3. วัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
4. สารเคมีตรวจสอบเชื้อโรคพืช
5. วัสดุอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างพืช
6. หนังสือ และวารสารทั้งในประเทศและต่างประเทศ
7. พื้นที่แปลงปลูกกระเจี๊ยบเขียวของเกษตรกร

วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของถั่วลันเตาและข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

ทำการสืบค้นข้อมูลจากเอกสาร วารสาร รายงานการประชุมทางวิชาการ อินเตอร์เน็ต เพื่อค้นหาข้อมูลของถั่วลันเตา ลักษณะทั่วไปของพืช สายพันธุ์ พื้นที่การเพาะปลูก รายชื่อของประเทศที่ประเทศไทยมีการการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ ปริมาณการนำเข้า ข้อมูลชนิดของศัตรูพืชทั้งนอกประเทศและในประเทศ

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตานำเข้าในห้องปฏิบัติการ

การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดบนเมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตาที่นำเข้าจากต่างประเทศทางด่านตรวจพืช เจ้าหน้าที่จะทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพืชมาทำการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อตรวจหาตัวอ่อน หนอน แมลง (Borror, 1981) หรือเมล็ดวัชพืช (Linda, 1993)

2.2 การสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (Mathur, 2003) และตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้า

2.2.1 การตรวจสอบเชื้อรา

1) การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะยังไม่งอก (Dry seed examination)

โดยตรวจสอบลักษณะอาการโรคและส่วนขยายพันธุ์เชื้อราหรือศัตรูพืชอื่นๆ ซึ่งปะปนมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยตาเปล่าหรือตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope เช่นเมล็ดพันธุ์มีรูปร่างผิดปกติ หรืออาจติดมา ภายในเมล็ดพันธุ์โดยไม่แสดงอาการ รวมทั้งอาจติดมากับเศษพืชในลักษณะเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์เช่น Pycnidia เป็นต้น

2) การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะเมล็ดงอก

สุ่มตัวอย่างเมล็ดตามวิธีการมาตรฐาน ในปริมาณที่เหมาะสมวิเคราะห์โดยสุ่มแยกตามสายพันธุ์ มาทดสอบด้วยวิธี Blotter method โดยวางเมล็ดลงบนกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่นที่ชุ่มน้ำซึ่งวางอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางเมล็ดพันธุ์เมลอน 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 นำมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อ 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 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} และดำเนินการเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ (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 เข้าไปใน ใบยาสูบ *(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 ใบเลี้ยงหรือเนื้อใบของต้นถั่วลันเตาอายุ 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

3. ติดตาม ตรวจสอบและวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชในแหล่งปลูกที่ใช้เมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตานำเข้า

ทำการติดตาม ตรวจสอบและวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชในแหล่งปลูกที่ใช้เมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตานำเข้าในเขตพื้นที่ภาคเหนือ จำนวน 8 แปลง ได้แก่ จังหวัดตาก 3 แปลง และจังหวัดน่าน 5 แปลง โดยทำการเก็บตัวอย่างส่วนต่างๆ เช่น ใบ ฟักถั่วลันเตา และลำต้นของถั่วลันเตาที่พบลักษณะอาการผิดปกติหรือน่าสงสัย เพื่อนำตัวอย่างที่ได้มาตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชตามขั้นตอนข้อที่2

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2555 – กันยายน 2557 (2 ปี)

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช ด่านตรวจพืช และแปลงปลูกเกษตรกรในเขตจังหวัดน่านและจังหวัดตาก

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การรวบรวมข้อมูลทั่วไปของถั่วลันเตาและข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

การจำแนกพืช

Domain: Eukaryota

Kingdom: Viridiplantae

Phylum: Spermatophyta

Subphylum: Angiospermae

Class: Dicotyledonae

Order: Fabales

Family: Fabaceae

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pisum sativum* L.

ชื่ออื่น ๆ ถั่วลันเตา sugar pea, garden pea

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ถั่วลันเตาเป็นพืชผักที่มีเถาเลื้อย สูงได้ถึง ๒ เมตร เป็นพืชที่ชอบอากาศเย็นจึงปลูกได้ดีในช่วงฤดูหนาวถั่วลันเตาสามารถขึ้นได้ในดินแทบทุกชนิโดยเฉพาะดินร่วนปนเหนียว ควรเป็นดินที่ค่อนข้างมีความเป็นกรดเล็กน้อย ผลเป็นฝักแบบถั่ว แต่ละฝักจะมีเมล็ด ๓–๑๐ เมล็ดขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด อายุการเก็บเกี่ยวแต่ละพันธุ์ไม่เหมือนกัน โดยทั่วไปจะเก็บเกี่ยวหลังการปลูก ๖๐ – ๙๐ วัน

พันธุ์และแหล่งพันธุ์ถั่วลันเตา

ถั่วลันเตาเป็นไม้เลื้อยมีถิ่นกำเนิดอยู่เอธิโอเปีย ปัจจุบันเป็นที่รู้จักและแผ่ขยายไปทั่วโลก แหล่งปลูกแหล่งใหญ่ของโลกอยู่ในเขตอบอุ่นจนถึงเขตกึ่งร้อน เช่น อินเดีย พม่า โมร็อกโก และแถบอเมริกาใต้

ถั่วลันเตาแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ แบบกินฝักและกินเมล็ด แบบกินเมล็ดมีเมล็ดค่อนข้างใหญ่เจริบเติบโตได้ดีในดินทุกชนิด โดยเฉพาะในดินร่วนปนเหนียว ชอบความชื้นแต่ไม่แฉะ ชอบแสงแดด เติบโตได้ดีในช่วงฤดูหนาว (วราภรณ์, 2548)

แหล่งปลูก

ในประเทศไทยนิยมปลูกถั่วลันเตากันมากในทุกภาค ส่วนใหญ่ปลูกในแถบที่มีอากาศเย็นและชุมชื้น เช่น จังหวัดเพชรบูรณ์ ลำปาง เชียงใหม่ ตาก นครสวรรค์ นครราชสีมา ปราจีนบุรี กาญจนบุรี นครปฐม สุราษฎร์ธานี (วราภรณ์, 2548)

ปริมาณการนำเข้า

ประเทศไทยมีการนำเข้าจาก 9 ประเทศ ได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีน ประเทศบัลแกเรีย ไต้หวัน อินเดีย สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น นิวซีแลนด์ อิตาลี และออสเตรเลีย จำนวน 13 ตัวอย่าง น้ำหนัก 21,883.75 กิโลกรัม (กลุ่มวิจัยการกักกันพืช, 2556)

ศัตรูพืชที่พบเข้าทำลายถั่วลันเตา

จากการสืบค้นข้อมูล พบว่า ศัตรูพืชที่ทำลายทุกส่วนของถั่วลันเตา เช่น ใบ ผล ลำต้น ราก และเมล็ด เป็นต้น มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 300 ชนิด จัดเป็น**แมลง** 105 ชนิด ได้แก่ *Acyrthosiphon pisum* (pea aphid), *Adelphocoris lineolatus* (lucerne bug), *Agrotis ipsilon* (black cutworm), *Bruchus pisorum* (pea weevil), *Chrysodeixis eriosoma* (green looper caterpillar), *Diabolocatantops axillaris* (devil grasshopper), *Frankliniella intonsa* (thrips, flower), Frankliniella occidentalis (western flower thrips), *Halyomorpha halys* (brown marmorated stink bug), *Helicoverpa armigera* (cotton bollworm), *Helicoverpa punctigera* (native budworm), *Lampides boeticus* (pea blue butterfly), *Liriomyza sativae* (vegetable leaf miner), *Liriomyza trifolii* (American serpentine leafminer), *Loxostege sticticalis* (beet webworm), *Mamestra brassicae* (cabbage moth), *Megalurothrips usitatus* (bean flower thrips), *Ophiomyia centrosematis* (stemfly), *Pseudococcus calceolariae* (scarlet mealybug), *Riptortus clavatus* (bean bug), *Sitona lineatus* (pea leaf weevil), *Spodoptera albula* (costa Rican armyworm), *Spodoptera exigua* (beet armyworm), *Spodoptera littoralis* (cotton leafworm), *Thrips angusticeps* (field thrips), *Thrips flavus* (honeysuckle thrips), *Tribolium castaneum* (red flour beetle), *Acrosternum hilare* (green stink bug), *Aphis fabae* (black bean aphid), *Autographa nigrisigna* (beet worm), *Callosobruchus analis* (weevil, bean), *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil), *Crocidosema aporema* (bud borer), *Delia platura* (bean seed fly), *Diabrotica speciosa* (cucurbit beetle), *Edessa meditabunda* (green and brown stink bug), *Ephestia kuehniella* (Mediterranean flour moth), Heliothis virescens (tobacco budworm), *Liriomyza bryoniae* (miner, tomato leaf), *Mamestra configurata* (bertha armyworm), *Megalurothrips distalis*, *Megalurothrips sjostedti* (bean flower thrips), *Melanagromyza sojae* (soyabean stem miner), *Melanoplus sanguinipes* (lesser migratory grasshopper), *Mythimna separata* (paddy armyworm), *Myzus persicae* (green peach aphid), *Ophiomyia phaseoli* (bean fly), *Peridroma saucia* (pearly underwing moth), *Phyllophaga smithi* (white grub), *Piezodorus guildinii* (stink bug), *Sitona humeralis*, *Sitophilus oryzae* (lesser grain weevil), *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm), *Thrips imaginis* (plague thrips), *Thysanoplusia orichalcea* (slender burnished brass moth), *Tipula paludosa* (European crane fly), *Trichoplusia ni* (cabbage looper), *Xestia c-nigrum* (spotted cutworm), *Acronicta rumicis* (knotgrass moth), *Pyrilla perpusilla* (sugarcane planthopper), *Acanthoscelides obtectus* (bean bruchid), *Agriotes lineatus* (wireworm), *Agriotes ustulatus*, *Agrotis biconica*, *Bruchidius incarnates*,

Callosobruchus chinensis (Chinese bruchid), *Callosobruchus theobromae*, *Chrysodeixis includens* (soybean looper), *Contarinia pisi* (midge, pea), *Cydia nigricana* (pea moth), *Euchrysops cnejus* (bean blue), *Heliothis peltigera*, *Kakothrips pisivorus* (bean thrips), *Lacanobia oleracea* (bright-line brown-eye moth), *Sitona macularius* (weevil, spotted bean), *Spilarctia obliqua* (hairy, caterpillar, common), *Spodoptera ornithogalli* (yellow striped armyworm), *Tychius quinquepunctatus*, *Chromatomyia horticola* (pea leaf miner), *Amphimallon majalis* (European chafer), *Aphis craccivora* (groundnut aphid), *Apogonia destructor*, *Bemisia tabaci* (tobacco whitefly), *Bemisia tabaci* (B biotype) (silverleaf whitefly), *Caliothrips indicus* (onion thrips), *Ceresa alta* (buffalo treehopper), *Chromatomyia horticola* (pea leaf miner), *Diabrotica virgifera* (western corn rootworm), *Empoasca fabae* (potato leafhopper), *Etiella zinckenella* (pea pod borer), *Gonocephalum macleayi* (southern false wireworm), *Hadula trifolii* (clover cutworm), *Heliothis viriplaca* (flax, budworm), *Maruca vitrata* (lima bean pod borer), *Melanagromyza dolichostigma* (miner, soybean root), *Omiodes diemenalis* (soybean leaf folder), *Omiodes indicata* (soyabean webworm), *Phenacoccus madeirensis* (cassava mealybug), *Piezodorus hybneri* (legume stink bug), *Planococcoides njalensis* (west African cocoa mealybug), *Riptortus linearis*, *Sphenarches caffer* (pod borer), *Spodoptera litura* (taro caterpillar), *Tenebrio molitor* (European meal worm), *Thrips palmi* (melon thrips) **ไร** 4 ชนิด ได้แก่ *Halotydeus destructor* (redlegged earth mite), *Acarus siro* (flour mite), *Polyphagotarsonemus latus* (broad mite), *Tetranychus urticae* (two-spotted spider mite) **วัชพืช** 51 ชนิด ได้แก่ *Amaranthus blitoides* (spreading amaranth), *Asphodelus tenuifolius* (onionweed), *Anthemis cotula* (dog fennel), *Capsella bursa-pastoris* (shepherd's purse), *Cirsium arvense* (creeping thistle), *Datura stramonium* (jimsonweed), *Digitaria sanguinalis* (large crabgrass), *Elymus repens* (quackgrass), *Emex australis* (Doublegee), *Fumaria officinalis* (common fumitory), *Galinsoga parviflora* (gallant soldier), *Lolium temulentum* (darnel), *Melilotus indica* (Indian sweetclover), *Orobanche* (broomrape), *Phalaris minor* (littleseed canarygrass) *Polygonum aviculare* (prostrate knotweed), *Polygonum hydropiper* (marsh pepper), *Raphanus raphanistrum* (wild radish), *Senecio vulgaris* (Grinning (or Grundie)-swallow), *Setaria viridis* (green foxtail), *Solanum nigrum* (black nightshade), *Spergula arvensis* (corn spurry), *Stellaria media* (common chickweed), *Tagetes minuta* (stinking Roger), *Thlaspi arvense* (field pennycress), *Acanthospermum hispidum* (bristly starbur), *Amaranthus hybridus* (smooth pigweed), *Anagallis arvensis* (scarlet pimpernel), *Avena*

fatua (wild oat), *Cirsium vulgare* (spear thistle), *Lolium multiflorum* (Italian ryegrass), *Nicandra physalodes* (apple of Peru), *Orobanche aegyptiaca* (Egyptian broomrape), *Orobanche crenata* (crenate broomrape), *Orobanche ramosa* (branched broomrape), *Phalaris paradoxa* (awned canary-grass), *Polygonum convolvulus* (black bindweed), *Polygonum persicaria* (redshank), *Rumex crispus* (curled dock), *Sonchus arvensis* (perennial sowthistle), *Echinochloa crus-galli* (barnyard grass), *Poa annua* (annual meadowgrass), *Polygonum lapathifolium* (pale persicaria), *Convolvulus arvensis* (bindweed), *Corchorus aestuans* (east Indian jew's-mallow (USA)), *Fimbristylis littoralis*, *Lindernia ciliate*, *Trianthema portulacastrum* (horse purslane) **ไส้เดือนฝอย** 30 ชนิด ได้แก่ *Ditylenchus dipsaci* (stem and bulb nematode), *Helicotylenchus dihystera* (common spiral nematode), *Heterodera cajani* (pigeon pea cyst nematode), *Heterodera goettingiana* (pea cyst eelworm), *Heterodera schachtii* (beet cyst eelworm), *Longidorus* (longidorids), *Meloidogyne arenaria* (peanut root-knot nematode), *Pratylenchus penetrans* (nematode, northern root lesion), *Pratylenchus vulnus* (walnut root lesion nematode), *Trichodorus* (stubby root nematodes), *Trichodorus primitives*, *Trichodorus viruliferus* (stubby root nematode), *Tylenchorhynchus claytoni* (stunt nematode), *Zygotylenchus guevarai*, *Belonolaimus longicaudatus* (sting nematode), *Ditylenchus africanus* (peanut pod nematode), *Helicotylenchus multicinctus* (banana spiral nematode), *Helicotylenchus pseudorobustus* (spiral nematode), *Heterodera ciceri* (chickpea cyst nematode), *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode), *Hoplolaimus indicus* (lance nematode), *Meloidogyne chitwoodi* (columbia root-knot nematode), *Pratylenchus loosi* (root lesion nematode), *Pratylenchus thornei, Rotylenchulus reniformis* (reniform nematode), *Xiphinema diversicaudatum* (dagger nematode), *Hoplolaimus seinhorsti* (lance nematode), *Meloidogyne hapla* (root knot nematode), *Meloidogyne incognita* (root-knot nematode), *Meloidogyne javanica* (sugarcane eelworm) **เชื้อรา** 69 ชนิด ได้แก่ *Alternaria brassicae* (dark spot), *Ascochyta pisi* (blight), *Aphanomyces euteiches* (Aphanomyces root rot), *Botryotinia fuckeliana* (grey mould-rot), *Chalara elegans* (black root rot), *Choanephora cucurbitarum* (Choanephora fruit rot), *Colletotrichum truncatum* (soyabean anthracnose), *Corticium rolfsii* (sclerotium rot), *Didymella pinodes* (foot rot: pea), *Erysiphe diffusa* (soybean powdery mildew), *Erysiphe pisi* var. *pisi* (powdery mildew of pea), *Gibberella avenacea* (Fusarium blight), *Golovinomyces orontii* (powdery mildew), *Macrophomina phaseolina* (charcoal rot), *Peronospora viciae* (downy mildew: legumes), *Peronospora viciae* f.sp. *pisi* (downy

mildew of pea), *Phoma pinodella* (leaf spot), *Pythium aphanidermatum* (damping-off), *Pythium ultimum* (black-leg of seedlings), *Sclerotinia sclerotiorum* (cottony soft rot), *Uromyces viciae-fabae* (rust of broad bean), *Aspergillus flavus* (Aspergillus ear rot), *Aspergillus niger* (collar rot), *Botrytis fabae* (chocolate spot: broad bean), *Cochliobolus lunatus* (head mould), *Cochliobolus sativus* (root and foot rot), *Colletotrichum lindemuthianum* (anthracnose of bean), *Didymella rabiei* (chick pea blight), *Fusarium sporotrichioides* (kernel rot), *Glomerella cingulata* (anthracnose), *Nectria haematococca* (dry rot), *Phakopsora meibomiae* (soybean rust), *Phomopsis longicolla* (pod and stem blight), *Phytophthora cambivora* (root rot), *Pythium irregulare* (dieback: carrot), *Pythium myriotylum* (brown rot), *Verticillium dahliae* (verticillium wilt), *Acremonium strictum* (acremonium wilt), *Clonostachys rosea*, Fusarium oxysporum f.sp. ciceris (Fusarium wilt), *Gliocladium catenulatum*, *Hypocrea rufa* (green mould), *Pythium oligandrum*, *Trichoderma harzianum*, *Alternaria alternata* (alternaria leaf spot), *Alternaria tenuissima*, *Aphanomyces euteiches* f.sp. *pisi*, *Fusarium oxysporum* (basal rot), *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (fusarium wilt), *Fusarium poae*, *Fusarium redolens* (root rot), *Fusarium solani* f.sp. *pisi* (root rot), *Gibberella intricans* (damping-off), *Gibberella pulicaris* (basal canker), *Gibberella tricincta* (blight), *Myrothecium roridum* (blight), Nectria haematococca (dry rot), *Nectria radicicola* (black root), *Penicillium notatum* (storage rot), *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Sclerotinia minor*, *Uromyces minor*, *Uromyces pisi*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Gibberella zeae*, *Pythium graminicola*, *Pythium splendens*, Phymatotrichopsis omnivore, *Thanatephorus cucumeris* **แบคทีเรีย** 14 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (bacterial blight), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (bacterial canker or blast), *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (wildfire), *Rhizobium radiobacter* (crown gall), *Rhizobium rhizogenes* (gall), *Xanthomonas axonopodis* pv. *alfalfae* (bacterial alfalfa leaf spot), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (bean blight), *Pectobacterium rhapontici* (rhubarb crown rot), *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (halo blight), *Pseudomonas viridiflava* (bacterial leaf blight), *Rhodococcus fascians* (fasciation: leafy gall), *Burkholderia cepacia* (sour skin), *Pseudomonas fluorescens* (pink eye), *Pseudomonas syringae* และ**ไวรัส** 27 ชนิด ได้แก่ *Bean leafroll virus, Broad bean wilt virus, Clover yellow mosaic virus, Cucumber mosaic virus, Milk vetch dwarf luteovirus, Pea early-browning virus, Pea enation mosaic virus-1, Pea seed-borne mosaic virus, Pea streak virus, Peanut mottle virus, Peanut stunt virus, Soybean dwarf virus,*

Tobacco streak virus, Tomato spotted wilt virus, Beet western yellows virus, Alfalfa mosaic virus, Clover yellow vein virus, Cowpea Moroccan aphid-borne mosaic virus, Faba bean necrotic yellows virus, Lettuce mosaic virus, Tobacco necrosis virus, Turnip mosaic virus, Watermelon mosaic virus, Broad bean mottle virus, Red clover vein mosaic virus, Bean common mosaic necrosis virus, Bean pod mottle virus (กิตติพงษ์, 2531) (นิรนาม, 2502) (ประไพศรี และคณะ, 2527) (วิรัช และคณะ, 2525) (สมศิริ, 2532) (สุดฤดี และกิตติ, 2528) (สุรภี และดวงใจ, 2525) (อนงค์, 2528) (CABI, 2014) (Chandrasrikul, 1968)เป็นศัตรูพืชกักกันตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืชพ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) และ (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2550 ทั้งสิ้น 35 ชนิด จัดเป็นแมลง 1 ชนิด วัชพืช 18 ชนิด ไส้เดือนฝอย 8 ชนิด เชื้อรา 5 ชนิด และไวรัส 3 ชนิด ได้แก่ แมลง 1 ชนิด คือ *Liriomyza bryoniae* วัชพืช 18 ชนิด ได้แก่ *Amaranthus blitoides, Asphodelus tenuifolius, Avena fatua, Capsella bursa pastoris, Cirsium arvense, Cirsium vulgare, Lolium temulentum, Orobanche aegyptiaca, Orobanche crenata, Orobanche ramose, Phalaris minor, Polygonum aviculare, Polygonum convolvulus, Senecio vulgaris, Spergula arvensis, Stellaria media, Thlaspi arvense* และ *Vicia sativa* ไส้เดือนฝอย 8 ชนิด ได้แก่ *Belonolaimus longicaudatus, Heterodera glycines, Ditylenchus dipsaci, Hoplolaimus indicus, Pratylenchus loosi, Trichodorus viruliferus* และ *Xiphinema diversicaudatum* เชื้อรา 5 ชนิด ได้แก่ *Chalara elegans, Fusarium graminearum, Phomopsis longicolla, Phytophthora cryptogea* และ *Verticillium ahlia* เชื้อไวรัส 3 ชนิด ได้แก่ *Alfalfa mosaic virus , Tomato streak virus* และ *Tomato spotted wilt virus* (CABI , 2014)

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตานำเข้าในห้องปฏิบัติการ

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

จากการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากทุกประเทศในเบื้องต้น พบว่าลักษณะของเมล็ดปกติ เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด(ภาพที่1)

2.2 การสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association, 1999) (Mathur, 2003) และการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดเมล็ดพันธุ์นำเข้าในห้องปฏิบัติการ

จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตาที่นำเข้าจาก 9 ประเทศ ได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีน ประเทศบัลแกเรีย ไต้หวัน อินเดีย สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น นิวซีแลนด์ อิตาลี และออสเตรเลีย จำนวน 13 ตัวอย่าง น้ำหนัก 21,883.75 กิโลกรัม ซึ่งจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคพืชกับเมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตาในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method (ภาพที่2) และ พบเชื้อรา 2 ชนิด บนเมล็ดถั่วลันเตา ได้แก่ เชื้อรา *Alternaria tenuis* และ เชื้อรา *curvularia pallescens* เป็นเมล็ด

นำเข้าจากประเทศไต้หวันส่วนการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคพืชกับเมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตาในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Dilution technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่น่าสงสัยจะเป็นเชื้อก่อโรคกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว (ภาพที่ 3) และจากการนำเมล็ดพันธุ์ไปปลูกสังเกตอาการของโรคในโรงเรือน (Seedling symptom) (ภาพที่ 4) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นถั่วลันเตา ต้นเจริญสมบูรณ์

3. การติดตาม ตรวจสอบและวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชในแหล่งปลูกที่ใช้เมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตานำเข้า

ทำการติดตาม ตรวจสอบและวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชในแหล่งปลูกที่ใช้เมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตานำเข้าในเขตพื้นที่ภาคเหนือ จำนวน 8 แปลง ได้แก่ จังหวัดตาก 3 แปลง และจังหวัดน่าน 5 แปลง (ภาพที่5) ตรวจพบศัตรูพืชทั่วไป 5 ชนิด เป็นเชื้อรา 1 ชนิด คือ ราแป้ง แมลง 1 ชนิด คือ หนอนชอนใบ และวัชพืช 3 ชนิด ได้แก่ สาบแรงสาบกา หญ้ายาง และโทงเทง (ภาพที่ 6) ระหว่างทำการศึกษาไม่พบศัตรูพืชกักกันเป้าหมาย

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ :

ถั่วลันเตา (*Pisum sativum,* Pea) จากสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชที่เข้าทำลายถั่วลันเตา มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 304 ชนิด จัดเป็นแมลง 107 ชนิด ไร 4 ชนิด วัชพืช 52 ชนิด ไส้เดือนฝอย 30 ชนิด เชื้อรา 69 ชนิด แบคทีเรีย 14 ชนิด และไวรัส 28 ชนิด เป็นศัตรูพืชกักกันตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืชพ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) และ (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2550 ทั้งสิ้น 35 ชนิด จัดเป็นแมลง 1 ชนิด วัชพืช 18 ชนิด ไส้เดือนฝอย 8 ชนิด เชื้อรา 5 ชนิด และไวรัส 3 ชนิด จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตานำเข้า ในห้องปฏิบัติการ โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตานำเข้าจาก 10 ประเทศ ได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีน ประเทศบัลแกเรีย ไต้หวัน อินเดีย สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น นิวซีแลนด์ อิตาลี ออสเตรเลีย และ ฟิลิปปินส์ จำนวน 16 ตัวอย่าง น้ำหนัก 30,962.46 กิโลกรัม ทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตานำเข้ามีเมล็ดที่สมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช ไม่พบสิ่งปนเปื้อน เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคพืชกับเมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตาในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method และ Dilution technique พบเชื้อรา 2 ชนิด บนเมล็ดถั่วลันเตา ได้แก่ เชื้อรา *Alternaria tenuis* และ เชื้อรา *curvularia pallescens* เป็นเมล็ดนำเข้าจากประเทศไต้หวัน แต่ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่น่าสงสัยจะเป็นเชื้อก่อโรคกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว และจากการนำเมล็ดพันธุ์ไปปลูกสังเกตอาการของโรคในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นถั่วลันเตา ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ และจากการติดตามตรวจสอบและวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชในแหล่งปลูกในเขตพื้นที่ภาคเหนือ จังหวัดตาก และจังหวัดน่าน จำนวน 8 แปลง ตรวจพบศัตรูพืชทั่วไป 5 ชนิด เป็นเชื้อรา 1 ชนิด คือ ราแป้ง แมลง 1 ชนิด คือ หนอนชอนใบ และวัชพืช 3 ชนิด ได้แก่ สาบแรงสาบกา หญ้ายาง และโทงเทง ระหว่างทำการศึกษาไม่พบศัตรูพืชกักกันเป้าหมาย ข้อมูลเบื้องต้นนี้จะนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างฐานข้อมูล

ศัตรูพืชจากต่างประเทศ จัดทำคู่มือการวินิจฉัยศัตรูพืชเบื้องต้น รวมทั้งเตรียมความพร้อมในการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช การติดตามเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันเป้าหมายของถั่วลันเตา ตลอดจนเป็นภารกิจสำคัญด้านกักกันพืชและอารักขาพืชเพื่อป้องกันศัตรูพืชแปลกใหม่รุกรานเข้ามาในประเทศไทย

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ผู้เชี่ยวชาญอุดร อุณหวุฒิ คุณสุรพล ยินอัศวพรรณ คุณศรีวิเศษ เกษสังข์ คุณชลธิชา รักใคร่ คุณปรียพรรณ พงศาพิชณ์ ที่ช่วยแนะนำแนวทางการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ คุณวานิช คำพานิช และคุณวันเพ็ญ ศรีชาติ คุณชัยรัตน์ หมั่นการ คุณยุทธนา ประมาณ คุณวิชาญ สมาธิ คุณวิภา เกิดพิพัฒน์ คุณอรนุช นาคะโร คุณสุธรรม คงเอียด คุณจิรวัฒน์ ไกรนรา และคุณอัญชลี ราศี และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการที่ช่วยสนับสนุนในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2531. การสำรวจโรคของถั่วลันเตาและการศึกษาโรคใบจุดของถั่วลันเตาที่เกิดจาก *Ascochyta pinnodes* Jones. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ 189 น.

กลุ่มวิจัยการกักกันพืช. 2556. สมุดลงรับหนังสือนำส่งพืช/ผลผลิตพืชนำเข้าจากด่าน เล่ม 6-7.

นิรนาม. 2502. การตรวจโรคพืชให้แก่ประชาชนและหน่วยราชการ. หน้า 208-215. ใน รายงานประจำปี แผนกโรคพืช.กองพืชพันธุ์.กรมกสิกรรม.

ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน, ศิริพงษ์ คุ้มภัยวิรัช ชูบำรุง และพัฒนา สนธิรัตน.2527. ศึกษาเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกับถั่วใช้รับประทานฝักสด, น.39-49. ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2527 เล่มที่3. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร.

วราภรณ์ วิชญรัฐ. 2548. เพื่อนร่วมวิถีชีวิตเศรษฐกิจพอเพียง : ไม้เลื่อยกินได้. น. 77-79.

วิรัช ชูบำรุง, ประไพรศรี พิทักไพรวัน, พัฒนา สนธิรัตน และปิยเกียรติก้อง. 2525. การศึกษาเชื้อราในตระกูลราแป้ง ERYSIPHACRAE, ไม่มีเลขหน้า. ใน รายงานผลการทดลอง พ.ศ.2525 เล่มที่ 1. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร.

สมศิริ แสงโชติ. 2532. โรคพืชเศรษฐกิจ พืชผัก. บริษัทประชาชนจำกัด. 74 น.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์ และ กิตติ ศิริวานิชกุล.2528. โรคของถั่วลันเตาในท้องที่ภาคเหนือของประเทศไทยหน้า 386-402. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 23 สาขาพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

สุรภี กีรติยะอังกูร และ ดวงใจ ชูปัญญา. 2525. โรคใบจุดวงแหวนของมะละกอในประเทศไทย. วารสารโรคพืช 2(2): 17-21.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2528. โรคและศัตรูบางชนิดของผักและการป้องกันกำจัด. สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด กรุงเทพฯ. 141 น.

Blancard, D, H. Lot. and B. Maisonneuve. 2006. A Color Atlas of Disease of Lettuceand Related Salad Crops Observation, Biology and Control. Academic Press, San Diego. 375 pp.

Borror, D.J. 1981. An Introduction to the Study of Insects 827 pages with 672 figures and 12 tables. 827 p.

CABI. 2014. Crop Protection Compendium (2014 edition). Copyright © 2014 CABI. CAB International is a registered EU trademark. Available source: http://www.cabi.org/CABI/ (site date: April 20, 2014).

Chandrasrikul, A. 1962. A suppreliminary host of plant diseases in Thailand. Tech. Bull. No. 9, Dept. of Agr., Bangkok. 14pp.

Crop Protection Compendium. 2007. ed. Wallingford, UK: CABI . (http://www.cabicompendium.org/CABI)

Linda, W. Davis. 1993. Weed Seeds of the Great Plains A Handbook for Indentification. 208 p.

Mathur, S.B. and O. Kongdal. 2003. Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi. First Edition. ISTA, Rome.

Puckdeedindan, P.1966. A supplementary host list of plant diseases in Thailand. Tech. Bull. No. 7, Dept. of Agr., Bangkok.24 p.

Richardson, M.J. 1990. An Annotated List of Seed-Borne Diseases. 4 th Ed. International Seed Testing Association, Zurich.

Xu, Z.G, A.J. Cockbain, R.D. Woods and D.A. Govier. 1988. The selogical relationships are some other properties of isolates of broad bean wilt virus from faba bean and pea in China. Annals of Applied Biology. 113(2):287-296.

Table 1 Pest associated with pea seeds

Country	Consignment (time)	Quantity (kg)	Pest
Australia	2	21,065	*Cladosporium* sp. 0.5%
Balgaria	1	2,680	-
China	4	3,939.1	-
India	1	820	-
Japan	2	20.9	-
New Zealand	1	0.24	-
Taiwan	1	300	*Alternaria tenuis 1%, Curvularia pallescens 1%*
USA	2	27.22	-
Italy	1	2,110	-
Philippines	1	4	-
10 country	16 time	30,962.46 kg	3 genus

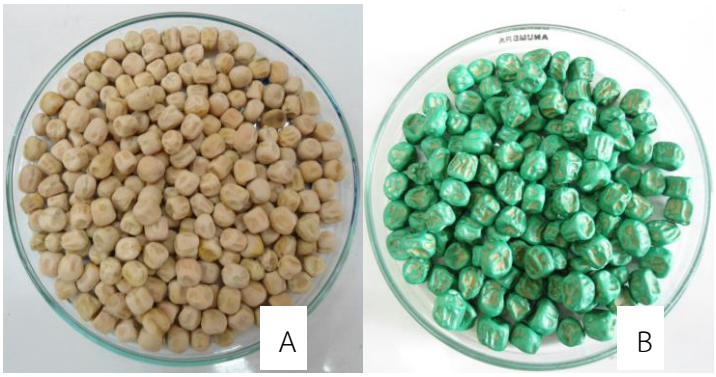


Figure 1 Seed of pea from China (A) and Italy (B)

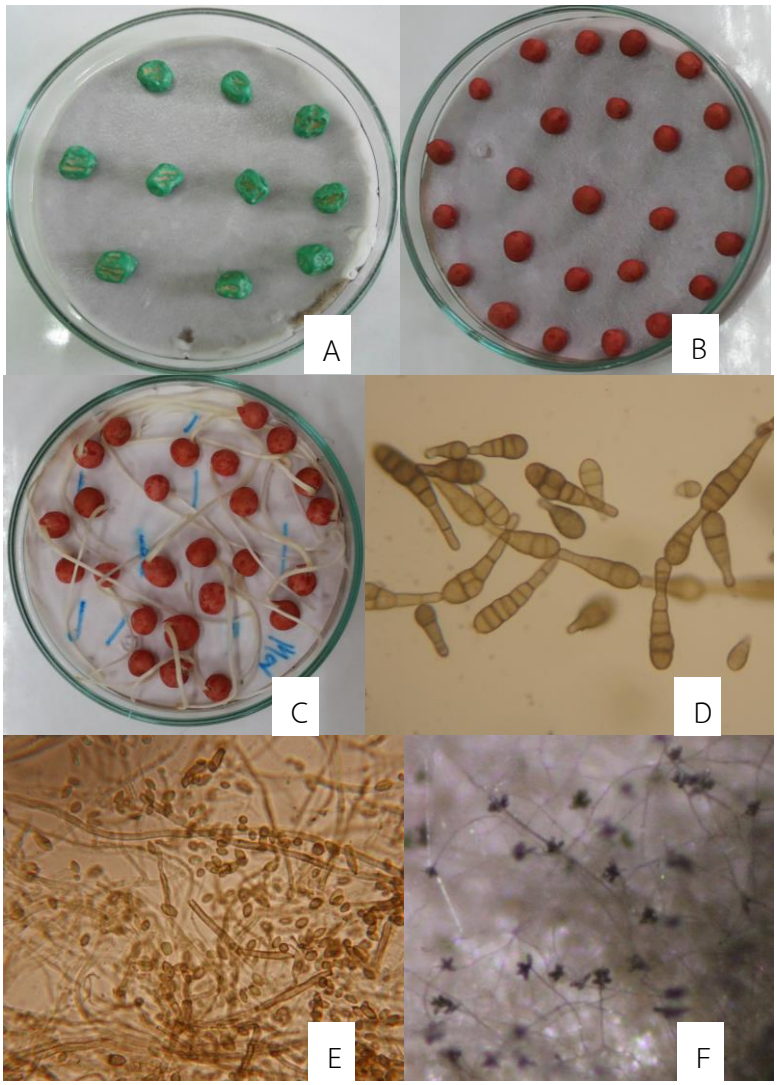


Figure 2 Seed testing for fungi by blotter method (A-C), conidia of *Alternaria tenuis* (40×) (D), conidia of *Cladosporium* sp. (40×) (E) and *Curvularia pallescense,* Habit characters on pea seed (5×) (F)

Figure 3 Seed testing for bacterial by dilution technique (A-F)

Figure 4 Seedling Symptom Test (A-D)

Figure 5 Field of pea in northern of Thailand

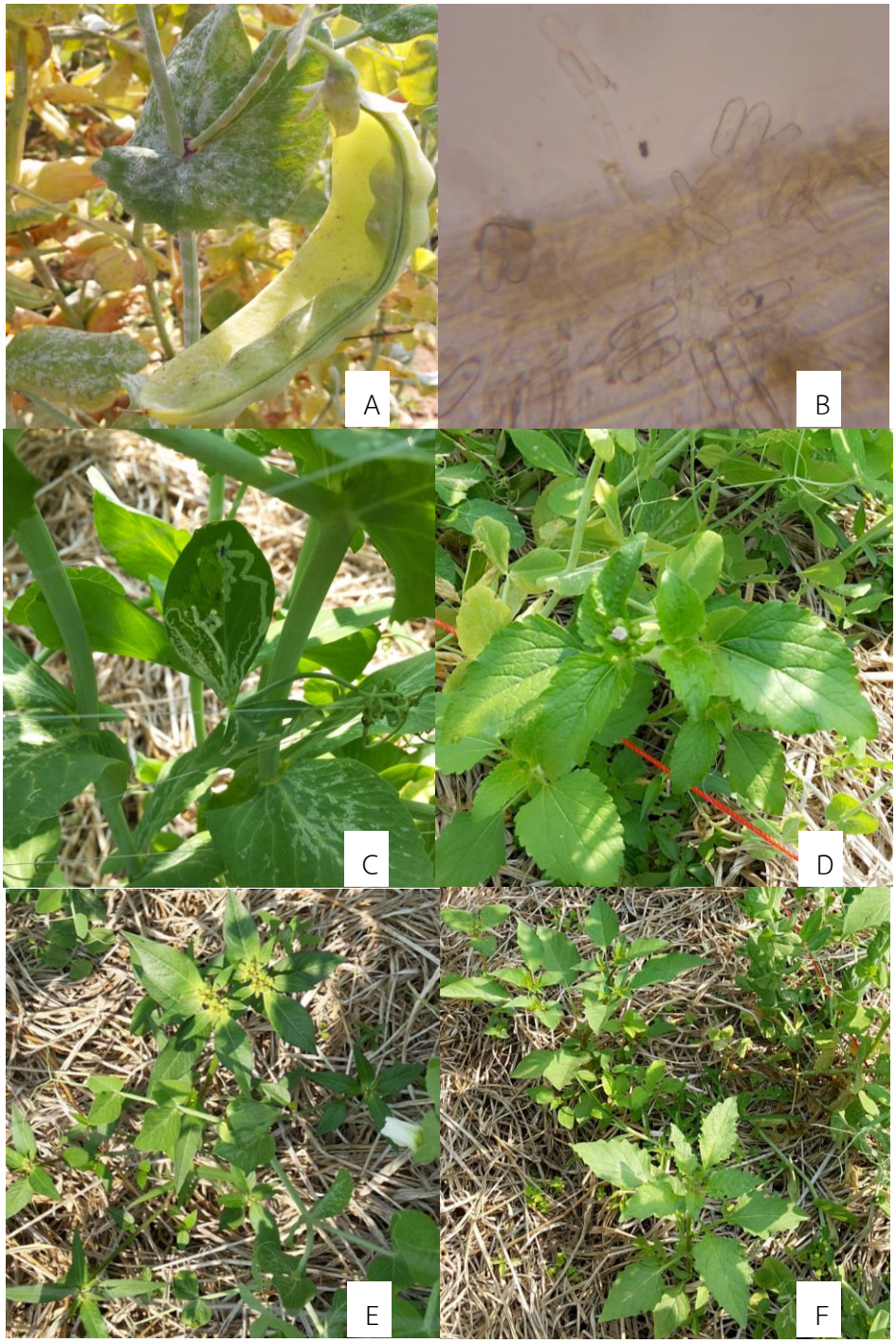


Figure 6 Surveillance in field pea, powdery mildew on field pea pod, leaf and stem (A), conidia of *Erysiphe polygoni* (B) and insect and weed in field pea (C-F)

การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวนำเข้าจากต่างประเทศ

Study on Quarantine Pest Associated with Okra Seed

โสภา มีอำนาจ ศรีวิเศษ เกษสังข์ ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ ชลธิชา รักใคร่ วันเพ็ญ ศรีชาติ

กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ประเทศไทยมีการนำเข้ากระเจี๊ยบเขียว (*Abelmoschus esculentum,* Okra) เพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ ในปี 2556-2557 มีปริมาณนำเข้า 14,370.05 กิโลกรัม จากการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชที่เข้าทำลายกระเจี๊ยบเขียว มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 163 ชนิด ในจัดเป็นแมลง 87 ชนิด ไร 11 ชนิด วัชพืช 5 ชนิด ไส้เดือนฝอย 16 ชนิด เชื้อรา 32 ชนิด แบคทีเรีย 5 ชนิด ไวรัส 6 ชนิด และหนู 1 ชนิด เป็นศัตรูกักกันของกระเจี๊ยบเขียวทั้งสิ้น 13 ชนิด จัดเป็นแมลง 1 ชนิด วัชพืช 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 5 ชนิด เชื้อรา 3 ชนิด แบคทีเรีย 2 ชนิด และไวรัส 1 ชนิด จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวนำเข้า ในห้องปฏิบัติการ โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวนำเข้าจำนวน 30 ตัวอย่าง จาก 5 ประเทศ ได้แก่ ประเทศฟิลิปปินส์ อินเดีย สหรัฐอเมริกา ทานซาเนีย และญี่ปุ่น เพื่อตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าหรือแว่นขยาย พบว่า เมล็ดพันธุ์กรเจี๊ยบเขียวนำเข้ามีเมล็ดที่สมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืชหรือการปนเปื้อนของวัชพืช เมื่อนำมาตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method, Dilution method และ ELISA ผลการตรวจสอบพบเชื้อรา 7 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Fusarium solani, Fusarium semitectum, Fusarium moniliform, Alternaria tenuis, Chaetomium* sp., *Graphium* sp. และ *Verticillium* sp. เชื้อแบคทีเรีย 1 ชนิด คือ *Streptomyces* sp. เมื่อนำเมล็ดพันธุ์ไปปลูกสังเกตอาการของโรคในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติที่เกิดจากเชื้อโรคศัตรูพืช และจากการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแหล่งปลูกของเกษตรกร ไม่พบศัตรูพืชกักกันเป้าหมาย

ABSTRACT

The total of 14,370.05 Kgs. of okra (*Abelmoschus esculentum*) seed has been imported into Thailand between 2013-2014. According to relevant references there are 163 pests associated with okra including 87 insects, 11 mites, 5 weeds, 16 nematodes, 32 fungi, 5 bacteria, 6 viruses and 1 rat. There are 13 quarantine pests

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-03-00-20-56

associated with okra including 1 insect, 1 weed, 5 nematodes, 3 fungi, 2 bacteria and 1 virus. Visual inspection has been done for consignment on arrival. Thirty samples of seeds imported from Philippines, India, USA, Tanzania and Japan was collected and table to plant quarantine laboratory for thoroughly inspection by blotter method, dilution method and ELISA method. Laboratory result showed the interception of *Fusarium solani, Fusarium semitectum, Fusarium moniliform, Alternaria tenuis, Chaetomium* sp., *Graphium* sp. *Streptomyces* sp. and *Verticillium* sp. No sign or symptoms from seedling symptom test have been observed and no quarantine pest present in imported okra plantation.

Keyword : เมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียว, ศัตรูพืช, พืชนำเข้า
Okra seed, pest, imported plant

คำนำ

กระเจี๊ยบเขียวจัดเป็นสิ่งกำกัด ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งกำกัด ข้อยกเว้นและเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 พ.ศ. 2550 ซึ่งกำหนดให้ส่วนหนึ่งส่วนใดของพืชในวงศ์ *Mulvaceae* เป็นสิ่งกำกัด และตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 มาตรา 10 ได้ระบุไว้ว่า การนำเข้าหรือนำผ่านสิ่งต้องห้ามหรือสิ่งกำกัดจะต้องนำผ่านทางด่านตรวจพืชเพื่อให้พนักงานเจ้าหน้าที่ตรวจ และต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการและเงื่อนไขที่อธิบดีกำหนด แต่เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีการกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียว จึงมีความเสี่ยงสูงที่จะมีศัตรูพืชติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศได้

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตกระเจี๊ยบเขียวเพื่อบริโภค และจำหน่ายในรูปฝักสด ซึ่งทำรายได้แก่เกษตรกรจำนวนมาก มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวจากหลายประเทศ เช่น อินเดีย สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ และทานซาเนีย ในปี พ.ศ. 2554 ถึง ปี พ.ศ. 2555 มีปริมาณการนำเข้าเฉลี่ยปีละ 10,311.48 กิโลกรัม นำเข้ามาบ่อยครั้งเฉลี่ย 20 ครั้งต่อปี มีการนำเข้ามาทุกเดือนเพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ในการเพาะปลูก การนำเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวเข้ามา มีการนำเข้ามาหลายเส้นทาง ได้แก่ เรือ และเครื่องบิน โดยผ่านด่านตรวจพืชด่านใดด่านหนึ่ง ดังนี้ ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ด่านตรวจพืชไปรษณีย์ ด่านตรวจพืชลาดกระบัง เมล็ดกระเจี๊ยบเขียวเป็นพาหะของศัตรูพืชร้ายแรงหลายชนิดที่ยังไม่มีรายงานพบในประเทศไทยโดยเฉพาะเชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น เชื้อรา *Verticillium dahliae* *Phymatotrichopsis omnivore* และ *Phomopsis longicolla* เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas cichorii* และ *Pantoea agglomerans* ไวรัส *Cotton anthocyanosis virus* แมลง *Sacadodes pyralis* ไส้เดือนฝอย *Scutellonema*

bradys, *Hoplolaimus indicus*, *Paratrichodorus porosus*, *Pratylenchus loosi* และ *Belonolaimus longicaudatus* วัชพืช*Parthenium hysterophorus* (CABI, 2014) จึงมีความเสี่ยงที่ศัตรูพืชเหล่านี้จะติดเข้ามาและสามารถแพร่กระจายในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย ซึ่งจะก่อให้เกิดผลกระทบต่อการเกษตรในประเทศและการส่งออกเมล็ดพันธุ์ไปยังต่างประเทศ การศึกษาชนิดศัตรูพืชที่ติดมากับพืชนำเข้ามีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบชนิดของศัตรูพืช แหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้า และเส้นทางการเข้ามาของศัตรูพืช ข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้เป็นฐานข้อมูล สำหรับอ้างอิงทางวิชาการ เพื่อกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชให้เหมาะสมรัดกุม และป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวนำเข้า
2. แว่นขยาย กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope และ compound microscope
3. วัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
4. สารเคมีตรวจสอบเชื้อโรคพืช
5. วัสดุอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างพืช
6. หนังสือ และวารสารทั้งในประเทศและต่างประเทศ
7. พื้นที่แปลงปลูกกระเจี๊ยบเขียวของเกษตรกร

วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของกระเจี๊ยบเขียวและข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

ทำการสืบค้นข้อมูลจากเอกสาร วารสาร รายงานการประชุมทางวิชาการ อินเตอร์เน็ต เพื่อค้นหาข้อมูลของกระเจี๊ยบเขียว ลักษณะทั่วไปของพืช สายพันธุ์ พื้นที่การเพาะปลูก รายชื่อของประเทศที่ประเทศไทยมีการการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ ปริมาณการนำเข้า ข้อมูลชนิดของศัตรูพืชทั้งนอกประเทศและในประเทศ

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวนำเข้าในห้องปฏิบัติการ

การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดบนเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวที่นำเข้าจากต่างประเทศทางด่านตรวจพืช เจ้าหน้าที่จะทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพืชมาทำการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อตรวจหาตัวอ่อน หนอน แมลง (Borror, 1981) หรือเมล็ดวัชพืช (Linda, 1993) (ภาพที่ 1)

2.2 การสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (Mathur, 2003) และตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้า

2.2.1 การตรวจสอบเชื้อรา

1) การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะยังไม่งอก (Dry seed examination)

โดยตรวจสอบลักษณะอาการโรคและส่วนขยายพันธุ์เชื้อราหรือศัตรูพืชอื่นๆ ซึ่งปะปนมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยตาเปล่าหรือตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope เช่นเมล็ดพันธุ์มีรูปร่างผิดปกติ หรืออาจติดมา ภายในเมล็ดพันธุ์โดยไม่แสดงอาการ รวมทั้งอาจติดมากับเศษพืชในลักษณะเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์เช่น Pycnidia เป็นต้น

2) การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะเมล็ดงอก

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)(ภาพที่ 2)

2.2.2 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย

1) แยกเชื้อสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงหรือด้วยวิธี Dilution plate

ในกรณีที่เชื้อติดมาในปริมาณมากจะสามารถแยกเชื้อจากเมล็ดโดยตรงหลังจากทำการแยกเชื้อด้วยวิธี Blotter method ได้ หรือทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงด้วยวิธี Dilution plate โดยสุ่มเมล็ดตามมาตรฐาน นำมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อ 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 ใช้ไปเปตต์ดูด suspension แต่ละความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วใช้แท่งแก้ว spread ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน จึงนำมาตรวจหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปจำแนกชนิดต่อไป (ภาพที่ 3)

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} และดำเนินการเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ (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) 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 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 ใบเลี้ยง หรือเนื้อใบของต้นกระเจี๊ยบเขียวอายุ 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 (ภาพที่ 4)

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

3. ติดตาม ตรวจสอบและวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชในแหล่งปลูกที่ใช้เมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวนำเข้า

ทำการติดตามตรวจสอบและวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชในแหล่งปลูกที่ใช้เมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวนำเข้าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดอุดรธานี 3 แปลง และจังหวัดอุบลราชธานี 2 แปลง ในเขตพื้นที่ภาคเหนือ จำนวน 4 แปลง ได้แก่ จังหวัดลำพูน 2 แปลง และจังหวัดตาก 2 แปลง ในเขตพื้นที่ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดราชบุรี 6 แปลง จังหวัดกาญจนบุรี 8 แปลง และจังหวัดสุพรรณบุรี 3 แปลง โดยทำการเก็บตัวอย่างส่วนต่างๆ เช่น ใบ ฝักกระเจี๊ยบเขียว และลำต้นของกระเจี๊ยบเขียวที่

พบลักษณะอาการผิดปกติ หรือน่าสงสัย เพื่อนำตัวอย่างที่ได้มาตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชตามขั้นตอนข้อที่ 2

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2555 – กันยายน 2557 (2 ปี)

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช ด่านตรวจพืช และแปลงปลูกเกษตรกร ในจังหวัดอุดรธานี จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดลำพูน จังหวัดตาก จังหวัดน่าน จังหวัดราชบุรี จังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดสุพรรณบุรี

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การรวบรวมข้อมูลทั่วไปของกระเจี๊ยบเขียวและข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

การจำแนกพืช

Domain: Eukaryota

Kingdom: Viridiplantae

Phylum: Spermatophyta

Subphylum: Angiospermae

Class: Dicotyledonae

Order: Malvales

Family: Malvaceae

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Abelmoschus esculentus* L. Moench

ชื่ออื่น ๆ กระเจี๊ยบเขียว Okra, Gumbo, Lady's finger, Quimbamto (อัฟริกา)

ชื่อท้องถิ่น กระเจี๊ยบเขียว กระต้าด (แถบจังหวัดสมุทรสาคร, สมุทรปราการ), มะเขือมอญ (ภาคกลาง), มะเขือมื่น (ภาคเหนือ), ถั่วเละ (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กระเจี๊ยบเขียวเป็นพืชผักยืนต้น อายุประมาณ 1 ปี มีความสูง 40 เซนติเมตร ถึง 2 เมตร ลำต้น มีขนสั้น ๆ มีหลายสี แตกต่างตามพันธุ์ ใบกระเจี๊ยบเขียว มีลักษณะกว้างเป็นแฉกคล้ายใบละหุ่ง แต่ก้านใบจะสั้นกว่า ดอกมีสีเหลือง โคนดอกด้านในสีม่วง เมื่อบานคล้ายดอกฝ้าย มีเกสรตัวผู้ตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกันฝักกระเจี๊ยบเขียวเขียวมีรูปเรียวยาว ปลายฝักแหลม มีทั้งชนิด ฝักกลมและฝักเหลี่ยม ซึ่งมีเหลี่ยม 5-10 เหลี่ยม ขึ้นกับพันธุ์ในแต่ละฝักมีเมล็ด 80-200 เมล็ด เมล็ดมีลักษณะกลมรีขนาดเดียวกับถั่วเขียว เมล็ดอ่อนมีสีขาว เมื่อแก่มีสีเทา ฝักแก่สีฝักจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และจะแตกออกตามแนวรอยสันเหลี่ยมทำให้เห็นเมล็ดที่อยู่ข้างใน เป็นพืชผักที่เจริญเติบโตได้ดีในเขตกึ่งร้อนโดย

อุณหภูมิสูงสุดประมาณ 35 องศาเซลเซียล และอุนหภูมิต่ำสุดไม่ต่ำกว่า 18 องศาเซลเซียล (กองส่งเสริมพืชสวน, 2543)

พันธุ์และแหล่งพันธุ์กระเจี๊ยบเขียว

กระเจี๊ยบเขียวมีหลายสายพันธุ์ซึ่งมีความแตกต่างกันทั้งความสูงของต้น ความยาวของฝักและสีฝัก พันธุ์พื้นเมืองเดิมจะมีเหลี่ยมบนฝักมากประมาณ 7-10 เหลี่ยม พันธุ์กระเจี๊ยบเขียวที่ใช้ปลูกเพื่อการส่งออกฝักสด และแช่แข็ง จะต้องเป็นพันธุ์ที่มีฝัก 5เหลี่ยม สีฝักเขียวเข้ม มีเส้นใยน้อย ลำต้นเตี้ย ผิวฝักมีขนละเอียด ฝักดกให้ผลผลิตสูง ซึ่งพันธุ์ที่ใช้ปัจจุบันได้แก่

1. พันธุ์ของประเทศไทยปรับปรุงโดยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ลักษณะฝักมีสีเขียวปานกลาง ฝักเมื่อตัดตามขวางเป็นรูปห้าเหลี่ยม ต้นแข็งแรง ผลผลิตสูง ราคาเมล็ดพันธุ์ 50-80 บาทต่อกิโลกรัม พันธุ์เหล่านี้ผู้ส่งออกและแปรรูปสามารถนำไปทดสอบตลาดได้ โดยเฉพาะตลาดยุโรป หรืออื่น ๆ (ศรานนท์ และคณะ, 2548)

2. พันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่ง จากประเทศญี่ปุ่น เป็นพันธุ์ที่มีคุณสมบัติฝักอ่อนที่ตลาดญี่ปุ่นนิยมมาก ลักษณะฝักสีเขียวเข้มมาก ปลายฝักไม่มีจงอยยาว เมื่อตัดตามขวางของฝักเป็นรูป 5 เหลี่ยม ซึ่งมีเหลี่ยมเห็นได้ชัดเจน ต้นแข็งแรง ผลผลิตสูง ราคาเมล็ดพันธุ์แพงมากประมาณ 2,000-5,000 บาทต่อกิโลกรัม (ศรานนท์ และคณะ, 2548)

3. พันธุ์ผสมเปิดจากต่างประเทศ ได้แก่ เคลมสัน สปายน์เลส ซึ่งฝักกลมป้อมและพันธุ์ดวอร์ฟกรีน สปายน์เลส ซึ่งมีฝักเรียวยาว เป็นพันธุ์ที่มี 8 เหลี่ยม สีเขียวปานกลางใช้ในการแปรรูปบรรจุกระป๋อง (ศรานนท์ และคณะ, 2548)

4. พันธุ์ที่เกษตรกรเก็บพันธุ์เอง ซึ่งต้องทำอย่างถูกวิธีจะมีผลต่อคุณภาพฝักมาก อย่างไรก็ตามพันธุ์ที่จะใช้ขึ้นอยู่กับผู้ซื้อกำหนดเป็นประการสำคัญ ซึ่งผู้ปลูกต้องทำการตกลงกับผู้ซื้อก่อนปลูก

แหล่งปลูก

ในประเทศไทยนั้นพื้นที่ที่มีการปลูกกระเจี๊ยบเขียวมาก ส่วนใหญ่อยู่ในภาคกลาง เช่น จังหวัดนครปฐม ปทุมธานี นนทบุรี สุพรรณบุรี สมุทรสาคร พิจิตร กาญจนบุรี ราชบุรี ระยอง และจังหวัดนครนายก เป็นต้น

ปริมาณการนำเข้า

ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากต่างประเทศ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ ทานซาเนีย และอินเดีย ปี 2556-2557 ปริมาณ 14,370.05 กิโลกรัม (กลุ่มวิจัยการกักกันพืช, 2557)

ศัตรูพืชที่พบเข้าทำลายกระเจี๊ยบเขียว

จากการสืบค้นข้อมูล พบว่า ศัตรูพืชที่ทำลายทุกส่วนของกระเจี๊ยบเขียว เช่น ใบ ผล ลำต้น ราก และเมล็ด เป็นต้น มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 163 ชนิด จัดเป็น**แมลง** 87 ชนิด ได้แก่ *Acrosternum marginatum* (stink bug), *Agrotis ipsilon* (black cutworm), *Agrotis segetum* (turnip moth),

Alabama argillacea (cotton leaf worm), *Amrasca biguttula* (Indian cotton jassid), *Anomis flava* (cotton semi-looper), *Anomis illita* (okra leafworm), *Argyrogramma signata* (green semi-looper), *Aspisoma ignitum*, *Bemisia tabaci* (tobacco whitefly), *Chrysodeixis eriosoma* (green looper caterpillar), *Chrysodeixis includens* (soybean looper), *Corizus vicenti*, *Corythuca gossypii* (cotton lacebug), *Crocidosema plebejana* (cotton tipworm), *Diabolocatantops axillaris* (devil grasshopper), *Diabrotica graminea* (beetle, green), *Dysdercus andreae* (cotton stainer), *Dysdercus cingulatus* (red cotton stainer), *Dysdercus fulvoniger discolor* (cotton stainer), *Earias biplaga* (spiny bollworm), *Edessa meditabunda* (green and brown stink bug), *Ferrisia virgata* (striped mealybug), *Frankliniella intonsa* (thrips, flower), *Haritalodes derogata* (cotton leaf roller), *Helicoverpa armigera* (cotton bollworm), *Helicoverpa zea* (American cotton bollworm), *Heliothis virescens* (tobacco budworm), *Homalodisca coagulata* (glassy winged sharpshooter), *Liriomyza sativae* (vegetable leaf miner), *Liriomyza trifolii* (American serpentine leafminer), *Maconellicoccus hirsutus* (pink hibiscus mealybug), *Nezara viridula* (green stink bug), *Omolicna cubana*, *Pectinophora gossypiella* (pink bollworm), *Phyllophaga* (white grubs), *Pseudaulacaspis pentagona* (mulberry scale), *Saissetia coffeae* (hemispherical scale), *Spodoptera littoralis* (cotton leafworm), *Spodoptera litura* (taro caterpillar), *Tarachidia flavibasis*, *Xanthodes transversa*, *Zeuzera coffeae* (coffee carpenter), *Acrosternum hilare* (green stink bug), *Aonidiella aurantii* (red scale), *Aphis gossypii* (cotton aphid), *Atherigona orientalis* (pepper fruit fly), *Bemisia tabaci* (B biotype) (silverleaf whitefly), *Eutinobothrus brasiliensis* (cotton root borer), *Hilda patruelis*, *Horcias nobilellus* (cotton bug), *Megalurothrips usitatus* (bean flower thrips), *Murgantia histrionica* (harlequin bug), *Myzus persicae* (green peach aphid), *Pachnoda interrupta* (chafer beetle), *Piezodorus hybneri* (legume stink bug), *Sacadodes pyralis* (Trinidad bollworm), *Solenopsis invicta* (red imported fire ant), *Spodoptera exigua* (beet armyworm), *Trichoplusia ni* (cabbage looper), *Coleomegilla maculata* (beetle, Spotted ladybird), *Cricula trifenestrata* (tea flush worm), *Solenopsis geminata* (tropical fire ant), *Zelus longipes, Desmidophorus hebes, Dysdercus cardinalis, Dysdercus koenigii, Earias cupreoviridis* (cotton green moth), *Empoasca decipiens* (leafhopper, cotton), *Epilachna ocellata*, *Lohita grandis*, *Melanagromyza hibisci, Nisotra sjostedti, Ochropleura flammatra* (Indian cutworm), *Podagrica uniformis, Trachys herilla, Chromatomyia horticola* (pea leaf miner), *Euproctis minor, Euproctis virguncula, Euproctis xanthorrhoea, Phenacoccus madeirensis* (cassava

mealybug) **ไร** 11 ชนิด ได้แก่ *Eriophyes hibisci* (Hibiscus mite), *Eutetranychus orientalis* (Citrus brown mite), *Tetranychus cinnabarinus* (carmine spider mite), *Tetranychus marianae*, *Tetranychus urticae* (two-spotted spider mite), *Brevipalpus californicus* (citrus flat mite), *Bakerdania gracilis, Bakerdania mesembrinae* (mushroom red pepper mite), *Oligonychus biharensis, Tetranychus macfarlanei, Tetranychus neocaledonicus* (spider mite) **วัชพืช** 5 ชนิด Murdannia nudiflora (doveweed), Parthenium hysterophorus (Parthenium weed), Acanthospermum hispidum (bristly starbur), Dactyloctenium aegyptium (crowfoot grass), Phyllanthus urinaria (leafflower) ได้แก่ **ไส้เดือนฝอย** 16 ชนิด ได้แก่ *Helicotylenchus dihystera* (common spiral nematode), *Meloidogyne arenaria* (peanut root-knot nematode), *Meloidogyne incognita* (root-knot nematode), *Pratylenchus penetrans* (nematode, northern root lesion), *Rotylenchulus reniformis* (reniform nematode), *Belonolaimus longicaudatus* (sting nematode), *Hirschmanniella oryzae* (rice root nematode), *Hoplolaimus indicus* (lance nematode), *Meloidogyne javanica* (sugarcane eelworm), *Paratrichodorus porosus, Pratylenchus brachyurus* (root-lesion nematode), *Pratylenchus loosi* (root lesion nematode), *Scutellonema bradys* (yam nematode), *Scutellonema bradys* (yam nematode), *Xiphinema ifacolum* (dagger nematode), *Paecilomyces lilacinus* **เชื้อรา** 32 ชนิด ได้แก่ *Alternaria brassicae* (dark spot of crucifers), *Ascochyta abelmoschi* (pod spot of okra), *Cercospora malayensis*, *Choanephora cucurbitarum* (Choanephora fruit rot), *Colletotrichum coccodes* (anthracnose), *Colletotrichum dematium* (leaf spot), *Golovinomyces cichoracearum* (powdery mildew), *Macrophomina phaseolina* (charcoal rot of bean/tobacco), *Phoma exigua* var. *exigua* (leaf spot), *Phymatotrichopsis omnivora* (cotton root rot), *Pseudocercospora abelmoschi* (leaf spot of okra), *Pseudocercospora brachypoda*, *Pythium aphanidermatum* (damping-off), *Sclerotinia sclerotiorum* (cottony soft rot), Aspergillus flavus (Aspergillus ear rot), Aspergillus niger (collar rot), *Chalara elegans* (black root rot), *Cochliobolus lunatus*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* , *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (vascular cotton wilt), *Leveillula taurica* (powdery mildew of cotton), *Nectria haematococca* (dry rot of potato), *Penicillium digitatum* (green mould), *Phomopsis longicolla* (pod and stem blight), *Verticillium dahliae* (verticillium wilt), *Nectria ventricosa*, *Verticillium chlamydosporium* (nematode egg parasite), *Alternaria alternat*a (alternaria leaf spot), *Alternaria zinniae* (leaf spot of zinnia), *Fusarium oxysporum* (basal rot), *Lasiodiplodia theobromae* (diplodia pod rot of cocoa), *Rhizopus stolonifer* (bulb rot) แบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ Pantoea agglomerans

(bacterial grapevine blight), Pseudomonas syringae pv. syringae (bacterial canker or blast (stone and pom), Xanthomonas campestris pv. esculenti (leaf spot), Pseudomonas cichorii (bacterial blight of endive) ไวรัส 6 ชนิด ได้แก่ *Cotton Yellow Mosaic* (yellow mosaic of cotton), *Cucumber mosaic virus* (cucumber mosaic), *Hibiscus yellow vein mosaic disease*, *Cotton anthocyanosis virus* (vermelhao disease), *Turnip mosaic virus* (cabbage A virus mosaic), *Okra mosaic virus* และหนู 1 ชนิด คือ *Rattus argentiventer* (rice field rat) เป็นศัตรูพืชที่พบในประเทศไทยทั้งสิ้น 68 ชนิด (Chandrasrikul, 1962; พิพัฒน์ เซี่ยงหลิว, 2528; นิยมรัฐ และคณะ, 2531; วสันณ์ และมานะ, 2532; นิยมรัฐ และลักษณา, 2533; พัฒนา และคณะ, 2542; CABI, 2014) เป็นศัตรูกักกันของกระเจี๊ยบเขียวทั้งสิ้น 13 ชนิด จัดเป็นแมลง 1 ชนิด วัชพืช 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 5 ชนิด เชื้อรา 3 ชนิด แบคทีเรีย 2 ชนิด และไวรัส 1 ชนิด ดังนี้ แมลง 1 ชนิด คือ *Sacadodes pyralis* วัชพืช 1 ชนิด คือ *Parthenium hysterophorus* ไส้เดือนฝอย 5 ชนิด ได้แก่ *Belonolaimus longicaudatus, Hoplolaimus indicus, Paratrichodorus porosus, Pratylenchus loosi* และ *Scutellonema bradys* เชื้อรา 3 ชนิด ได้แก่ *Phomopsis longicolla, Phymatotrichopsis omnivore* และ *Verticillium ahlia* แบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *Pantoea agglomerans* และ*Pseudomonas cichorii* และไวรัส 1 ชนิด คือ *Cotton anthocyanosis virus* (CABI , 2014)

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบนำเข้าในห้องปฏิบัติการ

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

จากการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากทุกประเทศในเบื้องต้น พบว่าลักษณะของเมล็ดปกติ เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด (ภาพที่ 1)

2.2 การสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (Mathur, 2003) และการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดเมล็ดพันธุ์นำเข้าในห้องปฏิบัติการ

จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวที่นำเข้าจาก 5 ประเทศ ได้แก่ ประเทศฟิลิปปินส์ อินเดีย สหรัฐอเมริกา ทานซาเนีย และญี่ปุ่น จำนวน 30 ตัวอย่าง น้ำหนักรวม 14,370.05 กิโลกรัม ซึ่งจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคพืชกับเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method และ Dilution method พบเชื้อรา 7 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Fusarium solani, Fusarium semitectum, Fusarium moniliform, Alternaria tenuis, Chaetomium* sp., *Graphium* sp. และ *Verticillium* sp. และเชื้อแบคทีเรีย 1 ชนิด คือ *Streptomyces* sp. และจากการนำเมล็ดพันธุ์ไปปลูกสังเกตอาการของโรคในโรงเรือน (Seedling symptom test) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นกระเจี๊ยบเขียว ต้นเจริญสมบูรณ์ (ตารางที่ 1)

3. การติดตาม ตรวจสอบและวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชในแหล่งปลูกที่ใช้เมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวนำเข้า

ทำการติดตาม ตรวจสอบและวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชในแหล่งปลูกที่ใช้เมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวนำเข้าในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดอุดรธานี 3 แปลง และจังหวัดอุบลราชธานี 2 แปลง ในเขตพื้นที่ภาคเหนือ จำนวน 4 แปลง ได้แก่ จังหวัดลำพูน 2 แปลง และจังหวัดตาก 2 แปลง ในเขตพื้นที่ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดราชบุรี 6 แปลง จังหวัดกาญจนบุรี 8 แปลง จังหวัดสุพรรณบุรี 3 แปลง รวมทั้งหมด 30 แปลง (ภาพที่ 5) ตรวจพบศัตรูพืชทั่วไป 33 ชนิด เป็นเชื้อรา 5 ชนิด ไวรัส 1 ชนิด แมลง 8 ชนิด วัชพืช 18 ชนิด ไส้เดือนฝอย 1 ชนิด ระหว่างทำการศึกษาไม่พบศัตรูพืชกักกันเป้าหมาย

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

กระเจี๊ยบเขียว (*Abelmoschus esculentum,* Okra) จากสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชที่เข้าทำลายกระเจี๊ยบเขียวมีศัตรูพืชทั้งสิ้น 163 ชนิด จัดเป็นแมลง 87 ชนิด ไร 11 ชนิด วัชพืช 5 ชนิด ไส้เดือนฝอย 16 ชนิด เชื้อรา 32 ชนิด แบคทีเรีย 5 ชนิด ไวรัส 6 ชนิด และหนู 1 ชนิด เป็นศัตรูพืชกักกันตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) และ (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2550 ทั้งสิ้น 13 ชนิด จัดเป็นแมลง 1 ชนิด วัชพืช 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 5 ชนิด เชื้อรา 3 ชนิด แบคทีเรีย 2 ชนิด และไวรัส 1 ชนิด จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวนำเข้า ในห้องปฏิบัติการ โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวนำเข้าจาก 5 ประเทศ ได้แก่ ประเทศฟิลิปปินส์ อินเดีย สหรัฐอเมริกา ทานซาเนีย และญี่ปุ่น จำนวน 30 ตัวอย่าง น้ำหนักรวม 14,370.05 กิโลกรัม ทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เมล็ดพันธุ์กรเจี๊ยบนำเข้ามีเมล็ดที่สมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช ไม่พบสิ่งปนเปื้อน เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคพืชกับเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบเชื้อรา 7 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Fusarium solani, Fusarium semitectum, Fusarium moniliform, Alternaria tenuis, Chaetomium* sp., *Graphium* sp. และ *Verticillium* sp. และเชื้อแบคทีเรีย 1 ชนิด คือ เชื้อ *Streptomyces* sp. การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี Dilution technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่น่าสงสัยจะเป็นเชื้อก่อโรคกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว และจากการนำเมล็ดพันธุ์ไปปลูกสังเกตอาการของโรคในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นกระเจี๊ยบเขียว ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ และจากการติดตาม ตรวจสอบและวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชในแหล่งปลูกในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลาง จำนวน 30 แปลง ตรวจพบศัตรูพืชทั่วไป 33 ชนิด เป็นเชื้อรา 5 ชนิด ไวรัส 1 ชนิด แมลง 8 ชนิด วัชพืช 18 ชนิด ไส้เดือนฝอย 1 ชนิด ระหว่างทำการศึกษาไม่พบศัตรูพืชกักกันเป้าหมาย ข้อมูลเบื้องต้นนี้จะนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างฐานข้อมูล

ศัตรูพืชจากต่างประเทศ จัดทำคู่มือการวินิจฉัยศัตรูพืชเบื้องต้น รวมทั้งเตรียมความพร้อมในการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช การติดตามเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันเป้าหมายของกระเจี๊ยบเขียว ตลอดจนเป็นภารกิจสำคัญด้านกักกันพืชและอารักขาพืชเพื่อป้องกันศัตรูพืชแปลกใหม่รุกรานเข้ามาในประเทศไทย

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ผู้เชี่ยวชาญ อุดร อุณหวุฒิ คุณสุรพล ยินอัศวพรรณ คุณศรีวิเศษ เกษสังข์ คุณชลธิชา รักใคร่ คุณปรียพรรณ พงศาพิชณ์ คุณนงพร มาอยู่ดี คุณวลัยกร รัตนเดชากุล คุณวานิช คำพานิช และคุณวันเพ็ญ ศรีชาติ ที่ช่วยแนะนำแนวทางการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ คุณชัยรัตน์ หมั่นการ คุณยุทธนา ประมาณ คุณวิชาญ สมาธิ คุณวิภา เกิดพิพัฒน์ คุณอรนุช นาคะโร คุณสุธรรม คงเอียด คุณจิรวัฒน์ ไกรนรา และคุณอัญชลี ราศี และพี่ๆน้องๆ ในห้องปฏิบัติการที่ช่วยสนับสนุนในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยการกักกันพืช. 2557. สมุดลงรับหนังสือนำส่งพืช/ผลผลิตพืชนำเข้าจากด่าน.

กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร. 2543. คู่มือพืชสวนเศรษฐกิจ. น. 183-186.

พัฒนา สนธิรัตน, ประไพศรี พิทักไพรวัน, ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์, วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2542. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. กลุ่มงานโรคพืช กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืช กรมส่งเสริมการเกษตร.

พิพัฒน์ เซี่ยงหลิว. 2528. โรคราแป้งขาว. วารสารโรคพืช 5(3) : 71-94

นิยมรัฐ ไตรศรี และ ลักษณา วรรณภีร์. 2533. โรคที่สำคัญของกระเจี๊ยบเขียวเพื่อการ ส่งออก. น. 53-56. *ใน* เอกสารประกอบการสัมมนาปัญหาโรคพืช. สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

นิยมรัฐ ไตรศรี, ลักษณา วรรณภีร์,สิริลักษณ์ โล่ห์สวัสดิ์ และ พัฒนา สนธิรัตน. 2531. ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคใบจุดกระเจี๊ยบเขียว, น. 112-116. ใน รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2531. กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ. กองโรคพืชและ จุลชีววิทยา.กรมวิชาการเกษตร.

วสันณ์ เพชรรัตน์ และ มานะ กาญจณนเสถียร. 2532. เชื้อรา *Cercospora* สาเหตุโรคพืชในภาคใต้ของประเทศไทย. วารสารโรคพืช 9 (1) : 15-22.

ศรานนท์ เจริญสุข, ผดุงศักดิ์ เกตุแก้วสุวรรณ และธันวา อินทรโยธิน. 2548. ผักสวนครัว. น. 128-137

Blancard, D, H. Lot. and B. Maisonneuve. 2006. A Color Atlas of Disease of Lettuce and Related Salad Crops Observation, Biology and Control. Academic Press, San Diego. 375 pp.

Borror, D.J. 1981. An Introduction to the Study of Insects 827 pages with 672 figures and 12 tables. 827 p.

CABI. 2014. Crop Protection Compendium (2014 edition). Copyright © 2014 CABI. CAB International is a registered EU trademark. Available source: http://www.cabi.org/CABI/ (site date: April 20, 2014).

Chandrasrikul, A. 1962. A suppreliminary host of plant diseases in Thailand. Tech. Bull. No. 9, Dept. of Agr., Bangkok. 14pp.

Crop Protection Compendium. 2007. ed. Wallingford, UK: CABI . (http://www.cabicompendium.org/CABI)

Linda, W. Davis. 1993. Weed Seeds of the Great Plains A Handbook for Indentification. 208 p.

Mathur, S.B. and O. Kongdal. 2003. Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi. First Edition. ISTA, Rome.

Puckdeedindan, P.1966. A supplementary host list of plant diseases in Thailand. Tech. Bull. No. 7, Dept. of Agr., Bangkok.24 p.

Richardson, M.J. 1990. An Annotated List of Seed-Borne Diseases. 4 th Ed. International Seed Testing Association, Zurich.

Xu, Z.G, A.J. Cockbain, R.D. Woods and D.A. Govier. 1988. The selogical relationships are some other properties of isolates of broad bean wilt virus from faba bean and pea in China. Annals of Applied Biology. 113(2): 287-296.

Table 1 Pest associated with okra seeds

Country	Consignment (Time)	Quantity (Kg)	Pest
India	19	11,753.25	*Alternaria tenuis* *Fusarium moniliform* *Fusarium solani* *Graphium* sp. *Verticillium* sp. *Chaetomium* sp.
Japan	4	62.396	*Alternaria tenuis* *Fusarium semitectum* *Streptomyces* sp.
Philippines	4	354.4	-
USA	2	2,050	*Alternaria tenuis*
Tanzania	1	150	-
5 country	30 time	14,370.05 Kg	8 Genus

Figure 1 Package of okra seed (A-D) and Seed of okra (E-G)

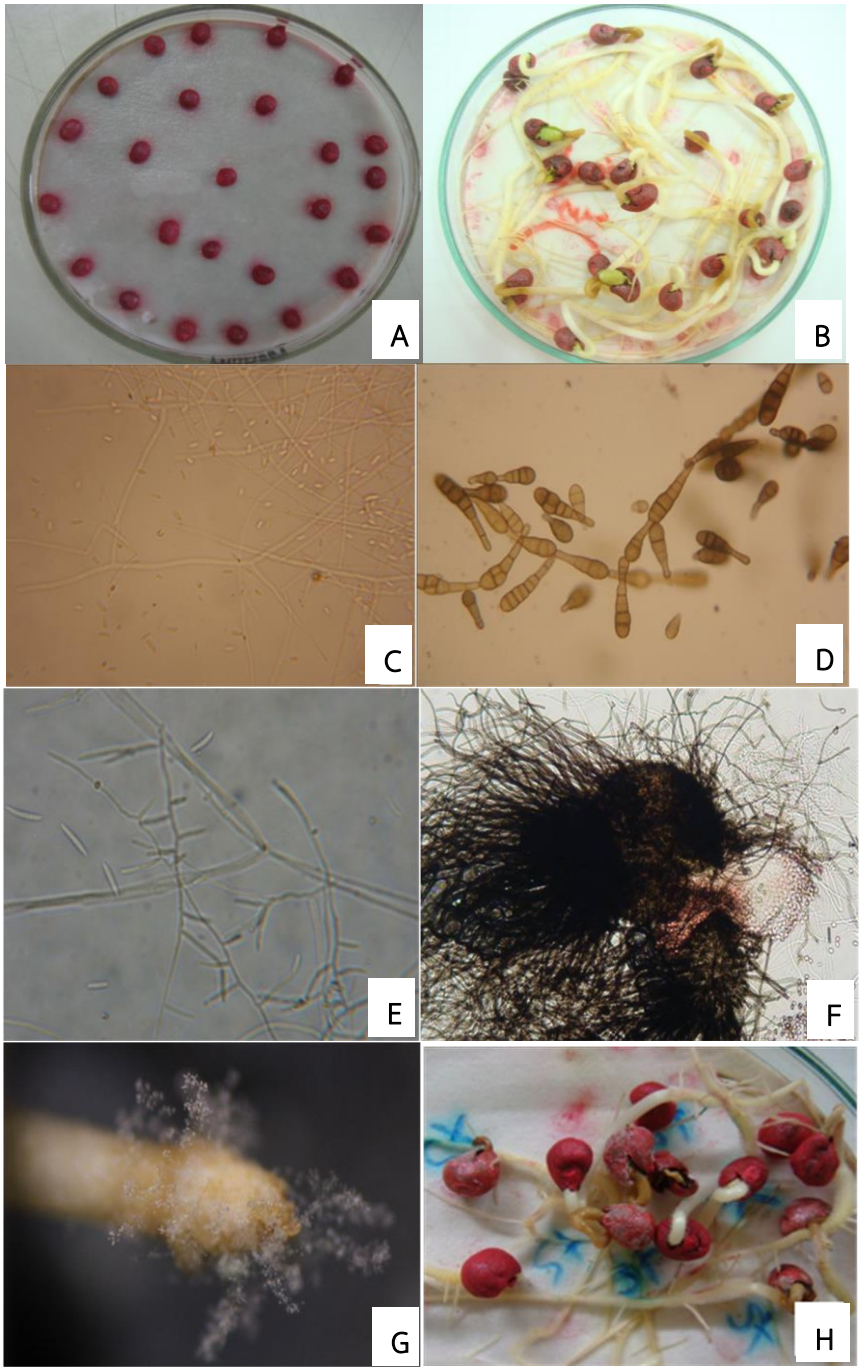


Figure 2 Seed testing by blotter method (A-B), conidia of *Fusarium solani* (40×) (C), conidia of *Alternaria tenuis* (40×) (D), conidiophore and conidia of *Fusarium semitectum* (40×) (E), perithicium with hairs and mature ascospores of *Chaetomium* sp. (20×) (F), *Verticillium* sp., Habit characters on okra seed (5×) (G) and *Streptomyces* sp., Habit characters on okra seed (H)

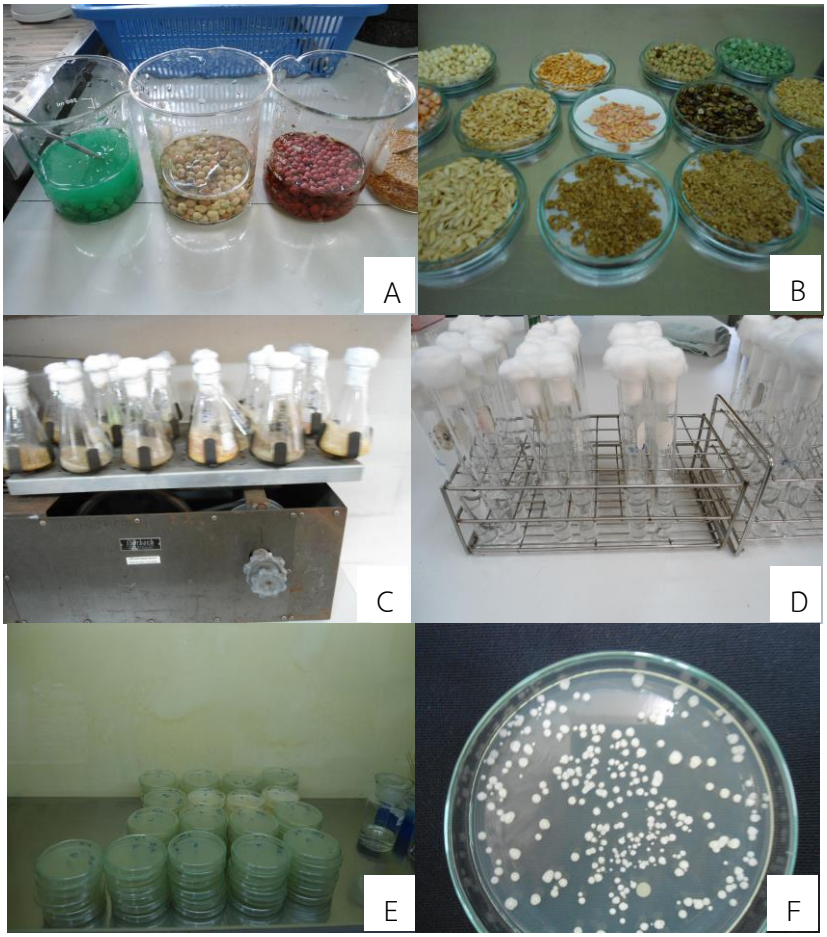


Figure 3 Seed testing for bacterial by dilution technique (A-F)

Figure 4 Seedling symptom test (A-D)

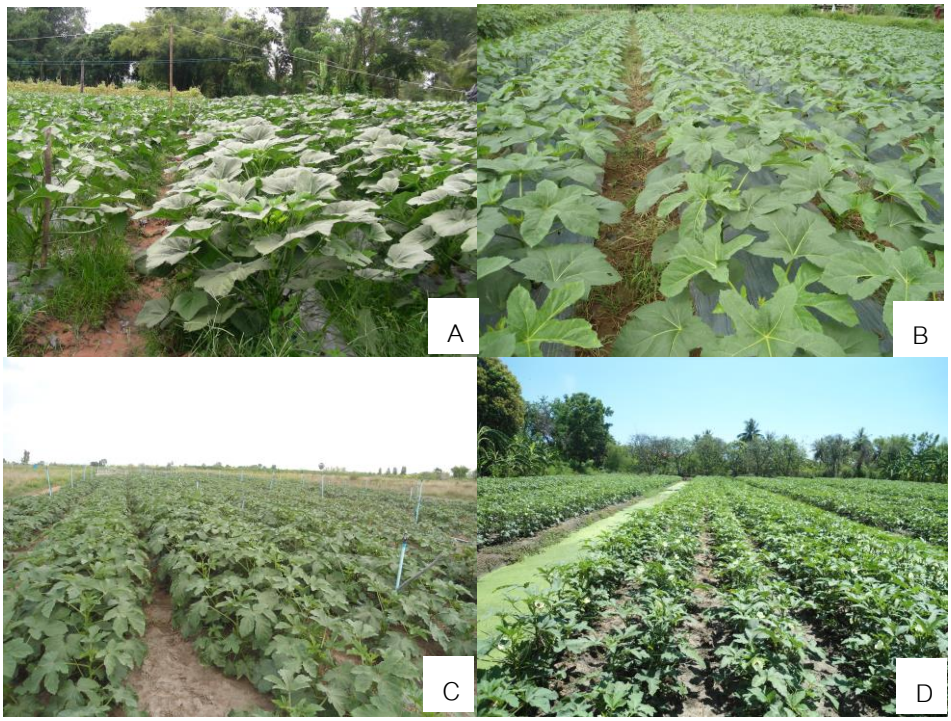


Figure 5 Surveillance in field okra, Udonthani province (A), Nan province (B), Kanchanaburi province (C) and Suphanburi province (D)

การศึกษาชนิดศัตรูพืชที่ติดมากับหอมแดงและหอมหัวใหญ่นำเข้าจากต่างประเทศ

Study on Quarantine Pest Associated with Imported Shallot and Onion

วานิช คำพานิช[1/] ศรีวิเศษ เกษสังข์[1/] ชลธิชา รักใคร่[1/]
วันเพ็ญ ศรีชาติ[1/] นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด[2/] ปรียพรรณ พงศาพิชญ์[1/]
[1/] กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/] ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

รายงานความก้าวหน้า

หอมแดง (shallot; *Allium cepa* var. *aggregatum*) มีศัตรูพืชที่เข้าทำลายส่วนต่างๆ จำนวนทั้งสิ้น 161 ชนิด จัดเป็นแมลง 29 ชนิด ไร 11 ชนิด เชื้อรา 30 ชนิด แบคทีเรีย 8 ชนิด ไวรัส 7 ชนิด ไส้เดือนฝอย 21 ชนิด และวัชพืช 55 ชนิด **หอมหัวใหญ่** (onion; *Allium cepa* L.) มีศัตรูพืชที่เข้าทำลายส่วนต่างๆ จำนวนทั้งสิ้น 247 ชนิด จัดเป็นแมลง 75 ชนิด ไร 11 ชนิด เชื้อรา 59 ชนิด แบคทีเรีย 19 ชนิด ไวรัส 6 ชนิด ไส้เดือนฝอย 21 ชนิด หอยศัตรูพืช 1 ชนิด และวัชพืช 55 ชนิด และจากการสุ่มหอมแดงและหอมหัวใหญ่ จำนวน 21 ตัวอย่าง จากต่างประเทศทางด่านตรวจพืชไปรษณีย์ ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ และด่านตรวจพืชท่าเรือแหลมฉบัง สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร ระหว่างเดือนตุลาคม 2556 - กันยายน 2557 เมื่อนำมาแยกและตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการที่เหมาะสม ตรวจพบศัตรูพืชกับหัวหอมแดง 2 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus niger* และเชื้อรา *Fusarium oxysporum* และหัวหอมหัวใหญ่ 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus niger*, *Cladosporium cucumerinum* และเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ส่วนเมล็ดพันธุ์หอมแดงและหอมหัวใหญ่ตรวจแล้วไม่พบศัตรูพืช เมื่อนำหอมแดงและหอมหัวใหญ่ไปปลูกสังเกตอาการของโรคในโรงเรือนตรวจแล้วไม่พบศัตรูพืช ส่วนการติดตาม ตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกหอมแดงและหอมหัวใหญ่นำเข้าจากต่างประเทศ จำนวน 18 แปลง ตรวจพบศัตรูพืชกับหอมแดง 4 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Alternaria porri*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Stemphylium vesicarium* และแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ส่วนหอมหัวใหญ่ตรวจพบศัตรูพืช 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *Stemphylium vesicarium* และเชื้อรา *Aspergillus niger* ระหว่างทำการศึกษาไม่พบศัตรูพืชกักกันที่สำคัญของประเทศไทย

Keyword: **หอมแดง หอมหัวใหญ่ นำเข้า ศัตรูพืชกักกัน**
Shallot, Onion, Import, Quarantine Pest

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-03-00-22-57

คำนำ

หอมแดง (Shallot; *Allium cepa* var. *aggregatum*) และหอมหัวใหญ่ (Onion; *Allium cepa* L.) จัดเป็นสิ่งต้องกำกัดตามพระราชบัญญัติกักพืชพ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 (นิรนาม, 2552) ในประเทศไทยมีการนำเข้าหอมแดงและหอมหัวใหญ่ (Onion; *Allium cepa* L.) เป็นปริมาณมากเพื่อการบริโภค และปลูกขยายพันธุ์ และภายใต้ข้อตกลงที่ว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on Application of Sanitary and Phytosanitary Measures หรือ SPS Agreement) ซึ่งเป็นมาตรการในการป้องกันมิให้ศัตรูพืชติดมากับพืชและผลิตผลพืชเข้ามาเป็นอันตรายหรือก่อให้เกิดความเสียหายต่อสุขภาพมนุษย์ สัตว์ พืช และสิ่งแวดล้อม ประเทศไทยจะต้องเปิดเสรีในฐานะที่เป็นประเทศสมาชิกองค์การการค้าโลก และจะต้องปฏิบัติตามกฎเกณฑ์เกี่ยวกับการค้าสินค้าเกษตร ต้องมีการตรวจสอบศัตรูพืช โดยทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis : PRA) ซึ่งอาจจะเป็นโรคพืช แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช และวัชพืช ชนิดใดชนิดหนึ่ง ซึ่งอาจจะติดมากับสินค้าเกษตรหรือแม้แต่หอมแดง และหอมหัวใหญ่ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ

ปัญหาการนำเข้านอกจากจะมีดินติดมากับหอมแดง และหอมหัวใหญ่ แล้วยังมีเชื้อโรคพืชได้แก่เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส ไส้เดือนฝอย ไร และแมลง รวมทั้งอาจจะมีศัตรูพืชกักกัน และศัตรูพืชที่ไม่มีรายงานในประเทศไทย เช่น *Botryotinia porri*, *Phytophthora cryptogea* , *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*, *Ditylenchus dipsaci, D. destructor* และ *Petrobia latens* เป็นต้น (CAB, 2007; CABI, 2014) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการตรวจสอบและศึกษาชนิดศัตรูพืชที่ติดมากับหอมแดง และหอมหัวใหญ่นำเข้าจากต่างประเทศ รวมทั้งมีการสำรวจ ติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกหอมแดง และหอมหัวใหญ่ที่นำเข้าจากต่างประเทศเพื่อกำหนดมาตรการในการควบคุมการนำเข้า และลดความเสี่ยงศัตรูพืชอันเนื่องมาจากศัตรูพืชซึ่งอาจจะติดมากับหอมแดง และหอมหัวใหญ่ ซึ่งอาจจะเข้ามาระบาดในประเทศไทยได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างหัวพันธุ์และเมล็ดพันธุ์หอมแดง หอมหัวใหญ่ และพืชทดสอบ เช่นยาสูบ

2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ กล่องพลาสติก พู่กันเบอร์ 0, ขวดดองตัวอย่างไร และแมลง ขนาด 1 แดรม บรรจุแอลกอฮอล์ 70% พู่กัน กล่องพลาสติกรักษาความเย็น แว่นขยาย (กำลังขยาย 20x) เป็นต้น

3. อุปกรณ์การเตรียมตัวอย่างหอมแดงและหอมหัวใหญ่ ได้แก่ มีด กรรไกร เครื่องปั่น

4. อุปกรณ์ในการทำสไลด์ และกล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และแบบ compound

5. อุปกรณ์แยกไส้เดือนฝอย ได้แก่ เครื่องชั่ง ตะแกรง (sieve) ขนาด 60 200 และ 325 mesh กรวยแก้ว (funnel) พร้อมสายยาง คลิ๊ปหนีบสายยาง ถังกะละมัง เครื่องพ่นหมอก (mist chamber) และ เครื่อง Ultrasonic

6. อุปกรณ์ในการแยกเชื้อสาเหตุโรคพืช และตู้ปลอดเชื้อ

7. วัสดุวิทยาศาสตร์ และสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบศัตรูพืช

8. วัสดุการเกษตรต่าง ๆ

9. ชุดตรวจสอบศัตรูพืช

10. หนังสือ และเอกสารทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับศัตรูพืช

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

12. คู่มือจำแนกชนิดศัตรูพืช

วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของหอมแดงและหอมหัวใหญ่และข้อมูลศัตรูพืชทั้งที่มีรายงานในประเทศ และต่างประเทศ

ทำการสืบค้นข้อมูลของหอมแดง หอมหัวใหญ่และข้อมูลศัตรูพืช เช่นลักษณะทางชีววิทยา พืชอาศัย และการควบคุมศัตรูพืชจากฐานข้อมูล ตำราวิชาการ วารสารทางวิชาการ ประกาศกรมวิชาการเกษตร รายชื่อศัตรูพืชกักกัน และจากกฎระเบียบด้านกักกันพืชสำหรับการนำเข้า และส่งออกของต่างประเทศ จาก Crop protection compendium 2007 และจากข้อมูลทางอิเลคโทรนิค เว็บไซท์ต่างๆ

2. การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดกับหอมแดงและหอมหัวใหญ่ที่นำเข้าจากต่างประเทศในห้องปฏิบัติการ

ทำการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดกับหัวและเมล็ดพันธุ์หอมแดง และหอมหัวใหญ่ที่นำเข้าจากต่างประเทศทางด่านตรวจพืชฯ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร เจ้าหน้าที่จะทำการสุ่มตัวอย่างหัวและเมล็ดพันธุ์มาทำการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ หรือกล้องจุลทรรศน์แบบ stereo เพื่อตรวจหาเส้นใย ส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อรา อาการฉ่ำน้ำของแบคทีเรีย อาการจากไวรัส อาการรากปม และ cyst จากไส้เดือนฝอย อาการจากไฟโตพลาสมา ร่องรอยการทำลายของแมลงและไรศัตรูพืช ตัวอ่อน ไข่ ดักแด้ หนอน (Borror, 1981) ตลอดจนเมล็ดวัชพืช (Linda, 1993)

2.2 สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าตามมาตรฐาน International Seed Testing Association; ISTA (Mathur and Kongdal, 2003) และหัวนำเข้าตามมาตรฐาน ISPM No. 31 หรือสุ่มตัวอย่างตามวิธีการที่เหมาะสม ณ จุดนำเข้า โดยทำการสุ่มตัวอย่างจากด่านตรวจพืชต่างๆ ที่มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ และหัวหอมแดง และหอมหัวใหญ่ และทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดย

ตรวจสอบด้วยตาเปล่า สังเกตลักษณะสี ผิว และรูปร่างว่ามีอะไรผิดปกติหรือไม่ มีรอยเจาะ หรือแตกกะเทาะของหัวหรือไม่ และจึงนำหัว และเมล็ดพันธุ์ที่สุ่มได้นำไปตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

2.2.1 ตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อราในขั้นละเอียด

หากพืชแสดงอาการผิดปกติหรือถูกทำลายด้วยเชื้อรา ให้นำส่วนที่แสดงอาการมาตรวจสอบโดยวิธี moist chamber หรือวิธี tissue transplanting ซึ่งทำได้โดยการตัดใบพืชเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2-3 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรอง ภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อแล้ววางพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) (Dhingra and Sinclair, 1985) และวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะเจาะจง (semi selective media) หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน นำไปทำให้บริสุทธิ์แล้วเก็บเชื้อรา เพื่อตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อราต่อไป

2.2.2 ตรวจวินิจฉัยชนิดของแบคทีเรียในขั้นละเอียด มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย โดยบันทึกลักษณะและสีของโคโลนี ตรวจสอบรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

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 หากพบอาการเซลล์ตายแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช

4. ทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Physiological and biochemical properties) เช่น การใช้ยูเรีย การย่อยเจลาติน การย่อยเอสคูลิน การย่อยแป้ง และความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นต้น (Bradbury and Sadler, 1997; Schaad *et al.,* 2001) ต่อไป

5. ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัย (Pathogenicity test) โดยเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ปลูกเชื้อตามอาการของโรคของเชื้อที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุโรค เช่นปลูกเชื้อโดยฉีดเข้าในลำต้น ใบเลี้ยง ตรวจลักษณะอาการของโรค ภายหลังการปลูกเชื้อ 3-5 วัน จากนั้นนำใบเป็นโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ เพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อสาเหตุที่ทำให้พืชเป็นโรคเป็นชนิดเดียวกับที่แยกได้ในครั้งแรกหรือไม่

6. การตรวจสอบด้วยวิธี ELISA เป็นวิธีการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา ปัจจุบันใช้ชุดตรวจสอบของ Agdia นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวและนำมาทำการตรวจสอบตามขั้นตอนที่แนะนำ

2.2.3 การตรวจวินิจฉัยชนิดของไวรัสด้วยวิธีที่เหมาะสม เช่นการนำหัวพันธุ์ ลำต้นและใบของหอมแดงและหอมหัวใหญ่ที่สงสัย หรือแสดงอาการผิดปกติ มาตรวจสอบและวินิจฉัยด้วยวิธีการเซรุ่มวิทยา (Serology) เช่นการใช้ชุดตรวจสอบศัตรูพืช (ELISA Kit) เช่น ชุดตรวจสอบของ Agdia และชุดตรวจสอบไวรัสบางชนิดในกลุ่ม Potyvirus เช่น Gift kit เป็นต้น

2.2.4 การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชขั้นละเอียด สามารถทำได้โดยนำหัวหอมแดง และหอมหัวใหญ่มาทำตามขั้นตอนดังนี้

วิธีการของ Cobb's sieving & Baermann funnel (นุชนารถ, 2546; Zuckerman *et al.,* 1990) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำตัวอย่างหัวหอมแดงและหอมหัวใหญ่ไปหั่นเป็นชิ้นๆ หรือปั่นด้วยเครื่องปั่น และนำมาใส่ในภาชนะพลาสติก แล้วเทน้ำลงไปปริมาณที่เท่ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 30 วินาที เพื่อให้นอนก้น แล้วเทน้ำลงในตะแกรงขนาด 60 mesh (ความยาว 1 นิ้วมี 60 ช่อง) โดยมีภาชนะรองรับ เศษพืช เศษไม้ จะติดอยู่บนตะแกรง

2. นำน้ำที่ผ่านตะแกรงแรกมาเทลงในตะแกรงขนาด 200 mesh โดยมีภาชนะรองรับไส้เดือนฝอยที่มีขนาดเล็กจะผ่านตะแกรงลงสู่ภาชนะที่รองรับอยู่ด้านล่าง จะมีไส้เดือนฝอยบางชนิด ที่มีขนาดใหญ่ค้างอยู่บนตะแกรง เอาน้ำฉีดบนตะแกรงจนน้ำใส แล้วใช้น้ำฉีดด้านหลังตะแกรง โดยมีภาชนะรองรับไส้เดือนฝอย

3. นำน้ำที่ผ่านตะแกรงขนาด 200 mesh เทลงในตะแกรงขนาด 325 mesh โดยไม่ต้องมีภาชนะรองรับ เนื่องจากไส้เดือนฝอยเกือบทุกชนิดจะติดอยู่บนตะแกรงนี้ ใช้ฝอยน้ำฉีดเบาๆให้ทั่วตะแกรงเพื่อให้ตะกอนหลุดลงมา หลังจากนั้นเก็บน้ำจากตะแกรงนี้ไว้เพื่อกรองต่อไป

4. นำน้ำที่กรองจากตะแกรงขนาด 325 mesh เทลงบนตะแกรงลวดที่มีกระดาษกรองวางอยู่ด้านบน (ใช้กระดาษกรองไส้เดือนฝอย หรือกระดาษเช็ดหน้า 2 ชั้น) แล้วนำตะแกรงลวดวางบนกรวยที่มีท่อยางสวมไว้ ในกรวยบรรจุน้ำปลายท่อยางมีคลิ๊ปหนีบสายยางกันน้ำรั่ว ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง ไส้เดือนฝอยจะว่ายน้ำไชผ่านกระดาษกรองมาอยู่ที่ปลายก้านกรวย

5. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ไขน้ำจากกรวยตัวอย่างทั้งหมดไปตรวจวินิจฉัยและจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และแบบ compound ในห้องปฏิบัติการ โดยเทียบจากคู่มือการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอย ทั้งที่มีรายงานในประเทศไทย (สืบศักดิ์, 2538; 2541) และต่างประเทศ (Anon, 2005; Bell, 2004; Hunt, 1993; Nickle, 1991; Siddiqi, 2000)

วิธีพ่นหมอก (mist chamber) (นุชนารถ และวานิช, 2551) เป็นวิธีแยกไส้เดือนฝอยออกจากหัวและรากพืชด้วยการพ่นน้ำเป็นฝอยลงบนหัวและรากพืช ความชื้นของละอองน้ำทำให้ไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ออกจากหัวและรากพืชลงสู่ปลายกรวย วิธีพ่นหมอก มีขั้นตอนดังต่อไปนี้ ทำการเตรียมตัวอย่างหัวพันธุ์หอมแดง และหอมหัวใหญ่ โดยการตัดราก กลีบหัว และย่อยให้เป็นชิ้นเล็กๆ นำไปใส่ในถุงผ้ากรองชนิดเนื้อผ้าละเอียด น้ำหนักรากประมาณ 10 กรัม ต่อ 1 ตัวอย่าง ต่อ 1 ถุง ไปใส่กรวยแยก ที่เตรียมไว้ นำกรวยแก้วต่อสายยางที่ก้านกรวยและใช้คลิ๊ปหนีบสายยาง เทน้ำสะอาดใส่ลงไปในกรวย นำไปตั้งวางในเครื่อง mist chamber จากนั้นนำตัวอย่างรากที่อยู่ในถุงผ้าวางบนตะแกรงลวดที่อยู่บนกรวยพลาสติก นำไปซ้อนบนกรวยแก้ว เปิดเครื่อง mist chamber ปล่อยน้ำตามท่อสายยางผ่านหัวพ่นฝอย ที่ติดตั้งไว้ด้านบนของกรวย เปิดเครื่อง mist chamber ตลอด 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นไขน้ำจากปลายสายยางกรวยแก้ว ใส่ภาชนะแก้วใสหรือบีกเกอร์ ในปริมาตรน้ำ 50 มิลลิลิตร นำไปตรวจวินิจฉัยและจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และแบบ compound ในห้องปฏิบัติการ โดยเทียบจากคู่มือการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอย ทั้งที่มีรายงานในประเทศไทย และต่างประเทศ

วิธีการใช้คลื่นเสียง (ultasonic) เป็นการแยกไส้เดือนฝอยให้ออกจากรากและหัวหอมแดง และหอมหัวใหญ่ โดยใช้คลื่นความถี่เหนือเสียง ชนิด ultasonic ที่มีความถี่อย่างน้อย 50 กิโลเฮิร์ท (kHz.) เป็นตัวผลักดันให้ไส้เดือนฝอยที่อยู่ในรากและหัวเคลื่อนที่ออกมาโดยมีน้ำเป็นตัวกลางส่งคลื่นความถี่สู่รากและหัวพันธุ์ มีผลทำให้โมเลกุลของของเหลวเกิดการบีบอัดและคลายตัวเป็นจังหวะ ส่งผลให้เกิดฟองอากาศขนาดเล็กๆ จำนวนมากที่มีพลังแฝง ซึ่งสามารถเข้าซอกซอนในระบบราก และหัวพันธุ์ รวมทั้งรบกวนหรือขับไล่ให้ไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ออกมาสู่น้ำ หลังจากนั้นนำน้ำที่ได้จากการทำ ultrasonic ปริมาตรน้ำ 50 มิลลิลิตร นำไปตรวจวินิจฉัยชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และแบบ compound ในห้องปฏิบัติการ โดยเทียบจากคู่มือการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอย ทั้งที่มีรายงานในประเทศไทย และต่างประเทศ

3. ปลูกเพื่อสังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนต้นในโรงเรือนปลูกพืช

ทำการปลูกหอมแดง และหอมหัวใหญ่เพื่อสังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนต้น และใบโดยนำหัว หรือเมล็ดพันธุ์ไปปลูก ในดินอบฆ่าเชื้อ และเก็บรักษาไว้ในโรงเรือนปลูกพืช ของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช เมื่อต้นพืชออกใบจริง 1-2 ใบ จึงเริ่มตรวจวินิจฉัย และสังเกตลักษณะอาการ นำต้นกล้าที่แสดงอาการผิดปกติ หรือสงสัยว่ามีโรค และศัตรูพืช ไปตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดต่อไป

4. ติดตาม ตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกของหอมแดงและหอมหัวใหญ่นำเข้าจากต่างประเทศ

ทำการติดตาม ตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกของหอมแดงนำเข้าจากต่างประเทศ จำนวน 13 แปลง ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ 3 แปลง เชียงราย 5 แปลง ตาก 3 แปลง และจังหวัดสุพรรณบุรีอีก 2 แปลง นอกจากนี้ยังมีแปลงปลูกของหอมหัวใหญ่นำเข้าอีก 5 แปลงจากจังหวัดเชียงใหม่ 2 แปลง และจังหวัดเชียงรายอีก 3 แปลง โดยทำการเก็บตัวอย่างส่วนต่างๆของพืชนี้ เช่น ใบ ลำต้น ราก และหัวของ

พืชที่พบลักษณะอาการผิดปกติ หรือน่าสงสัย ตลอดจนสุ่มเก็บตัวอย่างดิน เพื่อนำตัวอย่างที่ได้มาตรวจวินิจฉัยศัตรูพืช ตามขั้นตอนข้อที่ 2

5. จัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบและสรุปผลการศึกษาการเป็นศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2557 – กันยายน 2558 (2 ปี)

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- ด่านตรวจพืชฯ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร
- แปลงปลูกภายหลังการนำเข้า

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของหอมแดงและหอมหัวใหญ่และข้อมูลศัตรูพืชทั้งที่มีรายงานในประเทศ และต่างประเทศ

จากการสืบค้นและรวบรวมข้อมูลหอมแดงและหอมหัวใหญ่ พบข้อมูลดังต่อไปนี้ หอมแดง (Shallot; *Allium cepa* var. *aggregatum*) เป็นพืชผักที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางอาหาร ใช้เป็นเครื่องตกแต่งกลิ่นและรสอาหารอื่นๆ นอกจากนี้ยังเป็นพืชสมุนไพร ที่นำมาประกอบเป็นยารักษาโรคบางชนิดได้ เนื่องจากมีสารฟาโวนอยด์ (flovonoid) ใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และป้องกันโรคหัวใจ ซึ่งในทางการแพทย์ยอมรับว่าสามารถรักษาโรคโลหิตคลั่งในเส้นเลือด และช่วยป้องกันการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อที่ทำลายโปรตีน สาเหตุโลหิตคลั่งได้ หอมแดงมีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศซีเรีย เริ่มมีการปลูกที่สาธารณรัฐประชาชนจีน อินเดีย อียิปต์ ก่อนที่จะมีการปลูกแพร่กระจายไปทั่วโลก ได้แก่ มาเลเซีย ศรีลังกา อินโดนเซีย กานา ไนจีเรีย โทโก ไอโวรีโคท อัฟริกากลางและตะวันออก เป็นต้น หอมแดงมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ดังนี้จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว อยู่ในวงศ์ Liliaceae มีจำนวนโครโมโซม 2n เท่ากับ 16 จัดเป็นพืชปีเดียว (annual) หัวมีรูปร่างและสีแตกต่างกันไป เปลือกนอกมีสีแดงไม่ปิดสนิทและผลิตหัวข้าง (bulbilis) และต้นจำนวนมากเพิ่มปริมาณได้อย่างอิสระ มักนำไปขยายพันธุ์ ต้นหอมจะสร้างกระจุก 4-8 หัว หลังปลูกหัวอ่อนที่ใบยังเขียวนำมาบริโภคสด เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 60-100 วันหลังปลูก เมื่อใบเริ่มเหลืองหัวแก่ที่เก็บทำพันธุ์จะต้องปล่อยให้แห้งอย่างน้อย 6 สัปดาห์ โดยเก็บในที่อากาศระบายถ่ายเทดี ลักษณะอื่นๆของหอมแดง รากเป็นแบบรากฝอย (adventicious root) ใบกลมและกลวง ด้านใบและขอบใบค่อนข้างแบน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7-20 มิลลิเมตร และใบมีความยาวประมาณ 40 มิลลิเมตร ส่วนดอก ช่อดอกเจริญมาจากการยืดตัวของข้อ ก้านดอกยาวประมาณ 25 เซนติเมตร ส่วนใหญ่แตกเป็นกระจุกกลมเป็นจำนวนมาก ดอกมีสีเขียวออกขาว กลีบดอกแยกเป็น 6 แฉก ยาวประมาณ 4-6 มิลลิเมตร รังไข่แต่ละดอกแบ่งออกเป็น 3 ช่อง และเมล็ดมีสีดำ ผิวย่นเมื่อแก่ มีขนาดประมาณ 6X4 มิลลิเมตร ต้นอ่อนรูปเคียว มีส่วนน้อยที่นำมาขยายพันธุ์ และมีอนุวิธานวิทยาดังนี้ Phylum: Spermatophyta, Subphylum: Angiospermae, Class: Monocotyledonae, Order: Liliales, Family: Liliaceae, Genus: Allium, Species*: Allium cepa* var. *aggregatum*

สภาพแวดล้อม อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 20-24 องศาเซลเซียส มีความทนต่อสภาพที่อุณหภูมิสูงได้ถึง 30 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียสจะไม่สร้างหัว และเมื่ออากาศร้อนหรืออยู่ในช่วงวันสั้นจะไม่สร้างดอก ในประเทศไทยสามารถปลูกหอมแดงได้ตลอดทั้งปีแต่ช่วงที่ให้ผลที่ดีที่สุดคือ ฤดูหนาว จะได้มีหัวที่มีคุณภาพและเก็บรักษาได้นาน การปลูกหอมแดงโดยทั่วไปทำได้ 2 แบบคือ แบบอาศัยเพศ โดยการใช้เมล็ดพันธุ์ที่แก่จัด แห้งสนิทและเก็บรักษาให้พักตัวอยู่ระยะหนึ่ง มาทำการเพาะโดยหว่านหรือโรยเป็นแถว คอยดูแลรักษาต้นกล้าหอมที่งอกจากเมล็ดจนขนาดลำต้น 0.5 เซนติเมตร จึงนำไปปลูกลงแปลงที่เตรียมไว้ ต้นกล้าหอมแดงอายุ 40-50 วันจึงย้ายปลูกได้ ส่วนแบบไม่อาศัยเพศ เป็นวิธีปลูกโดยใช้หัวหอมแดงที่แก่จัด แห้งสนิท เก็บรักษาไว้อย่างน้อย 2 เดือน แต่ไม่เกิน 6 เดือน

ในปีพ.ศ.2555-56 ประเทศไทยมีการนำเข้าหอมแดงปริมาณมากเพื่อบริโภคและปลูกขยายพันธุ์ โดยนำเข้าหัวหอมแดงจากอินโดนีเซีย อินเดีย สาธารณรัฐประชาชนจีน เวียดนาม เมียนมาร์ สหรัฐอเมริกา และออสเตรเลีย ปริมาณ 18,837,784 กิโลกรัม คิดเป็นมูลค่าประมาณ 268.18 ล้านบาท และนำเข้าเมล็ดพันธุ์หอมแดงจากเนเธอร์แลนด์ ฟิลิปปินส์ สาธารณรัฐประชาชนจีน และฮ่องกง ปริมาณ 144.95 กิโลกรัม คิดเป็นมูลค่าประมาณ 3.67 ล้านบาท (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2555; 2556) และจากรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชของหอมแดง พบว่ามีศัตรูพืชที่เข้าทำลายส่วนต่างๆ จำนวนทั้งหมด 161 ชนิด จัดเป็นแมลง 29 ชนิด ไร 11 ชนิด เชื้อรา 30 ชนิด แบคทีเรีย 8 ชนิด ไวรัส 7 ชนิด ไส้เดือนฝอย 21 ชนิด วัชพืช 55 ชนิด และเป็นศัตรูพืชกักกันตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) และ (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2550 จำนวน 27 ชนิด ได้แก่ ไร *Caloglyphus mycophagus*, ไส้เดือนฝอย *Aphelenchoides besseyi*, *Belonolaimus longicaudatus*, *Ditylenchus destructor*, *Ditylenchus dipsaci*, *Paratrichodorus porosus* เชื้อรา *Botryotinia porri*, *Botrytis aclada*, *Colletotrichum circinans*, *Phytophthora porri*, *Sclerotium cepivorum* แบคทีเรีย *Pantoea ananatis*, *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*, *Pseudomonas viridiflava* วัชพืช *Capsella bursa-pastoris*, *Cirsium arvense*, *Cirsium vulgare*, *Lolium temulentum*, *Orobanche ramosa*, *Parthenium hysterophorus*, *Phalaris minor*, *Polygonum aviculare*, *Polygonum convolvulus*, *Raphanus raphanistrum*, *Senecio vulgaris*, *Spergula arvensis* และ *Thlaspi arvense* (CPC, 2007, CABI, 2014) และยังมีศัตรูพืชที่เฝ้าระวัง เช่น *Urocystis cepulae* (พรพิมล และคณะ, 2556) และ *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (ทิพวรรณ และคณะ, 2556)

หอมหัวใหญ่ (onion; *Allium cepa* L.) จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีจำนวนโครโมโซม 2n เท่ากับ 16 จัดเป็นพืชสองปี แต่นิยมปลูกเป็นพืชปีเดียวโดยใช้ส่วนของเมล็ด ทุกส่วนของลำต้นมีกลิ่นฉุนเมื่อถูกขยี้ รากเป็นรากพิเศษยาว 30 เซนติเมตร เจริญจากลำต้นใต้ดิน ลำต้นมีลักษณะสั้นและแบนอยู่บริเวณส่วนโคนของกาบใบ ใบมี 3-8 ใบ เรียงกันแบบสลับระนาบเดียว มีนวลจับที่ผิวใบ ส่วนยอด

แผ่กว้าง กาบใบยาวแผ่กว้างคล้ายหลอดหุ้มใบที่อยู่ภายในไว้ แผ่นใบมีลักษณะเป็นทรงกระบอก ตรง กลางกลวง ยาว 50 เซนติเมตร ปลายเรียวแหลม ยาว 30-100 เซนติเมตร หัวเกิดจากกาบใบที่มีการเก็บสะสมอาหารมาเรียงซ้อนกัน อยู่ทางด้านบนของลำต้น กาบใบด้านนอกสุดมีลักษณะเป็นแผ่นแบนและแห้ง ทำหน้าที่ห่อหุ้มส่วนต่างๆ ของหัวไว้ภายใน มีสีขาว ส้ม และแสด หัวมีลักษณะกลมจนถึงรูปไข่อาจมีเส้นผ่าศูนย์กลางถึง 15 เซนติเมตร มีขนาด สีสัน รูปร่าง และน้ำหนักแตกต่างกันไปตามพันธุ์ มีช่อดอก 1 ช่อถึงหลายช่อ ช่อดอกแบบซี่ร่ม รูปกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-8 เซนติเมตร มีดอกย่อย 50-2,000 ดอกย่อย ช่อดอกถูกหุ้มด้วยกาบซึ่งแตกออกเมื่อช่อดอกบานเป็น 2-4 แฉก ก้านดอกย่อยยาว 1-4 เซนติเมตร ดอกรูปทรงระฆัง หรือ รูปคนโท กลีบเลี้ยงและกลีบดอกเชื่อมติดกันเป็น 6 กลีบ เรียงซ้อนกันเป็น 2 วง กลีบเลี้ยงและกลีบดอกเชื่อมรวมกันเป็นกลีบรวมยาว 3-5 มิลลิเมตร สีขาวปนเขียวจนถึงม่วง เกสรเพศผู้ 6 อัน เกสรเพศเมีย 3 อัน ก้านเกสรเพศเมียติดกัน มีลักษณะสั้นกว่าเกสรเพศผู้เมื่อดอกบาน ผลแบบแคปซูลรูปกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 4-6 มิลลิเมตร ผลแก่แตกกลางพู มี 6 เมล็ด สีดำ ผิวย่น ขนาดกว้าง 6 มิลลิเมตร ยาว 4 มิลลิเมตร มีอนุวิธานวิทยาดังนี้ Phylum: Spermatophyta, Subphylum: Angiospermae, Class: Monocotyledonae, Order: Liliales, Family: Liliaceae, Genus: Allium, Species*: Allium cepa* L.

หอมหัวใหญ่สามารถเจริญเติบโตและขยายขนาดของหัว ซึ่งเป็นลำต้นใต้ดินได้ดีในสภาพช่วงวันยาวและความเข้มแสงสูง ในเขตอากาศแบบร้อนชื้นสามารถปลูกหอมหัวใหญ่ได้ตั้งแต่บริเวณพื้นราบจนถึงที่ความสูง 1,000 เมตร จากระดับน้ำทะเล โดยนิยมปลูกกันในช่วงฤดูหนาวเนื่องจากการปลูกในฤดูฝนนั้นจะทำให้มีการเน่าเสียของใบและลำต้นเกิดขึ้นได้ง่าย หัวพันธุ์ที่นำมาปลูกนั้นต้องการอุณหภูมิต่ำ 5-10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 เดือน เพื่อกระตุ้นการงอกของยอดอ่อน ส่วนการเพาะเมล็ดให้ได้ต้นกล้าสำหรับปลูกนั้นต้องการอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 70 เปอร์เซ็นต์ ดินปลูกควรมีค่าธาตุอาหารในปริมาณที่มากเพียงพอ มีค่าความเป็นกรด-ด่างช่วง 6.0–6.8 และมีความเค็มของดินปานกลาง ส่วนการปลูกเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์นั้น จะสามารถทำได้ในพื้นที่เฉพาะบางแห่งในเขตอากาศแบบกึ่งร้อนเท่านั้น การใช้ประโยชน์ รับประทานสดร่วมกับผักอื่นๆ ในอาหารประเภทสลัดและยำชนิดต่างๆ นำมาต้มเป็นซุปหรือทอด มีสรรพคุณช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด นอกจากนี้ยังมีการแปรรูปโดยนำมาทำเป็นผง แช่แข็ง ผสมในอาหารสำเร็จรูป และทำซอสพริก ส่วนใหญ่สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศหรือใช้เมล็ดในการปลูก

ในปีพ.ศ.2555-56 ประเทศไทยมีการนำเข้าหอมหัวใหญ่ปริมาณมากเพื่อบริโภคและปลูกขยายพันธุ์ โดยนำเข้าหัวหอมหัวใหญ่จากสาธารณรัฐประชาชนจีน อินเดีย เนเธอร์แลนด์ อินโดนีเซีย เมียนมาร์ นิวซีแลนด์ ออสเตรเลีย เวียดนาม สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และฝรั่งเศส ปริมาณ 29,762,741 กิโลกรัม คิดเป็นมูลค่าประมาณ 179.26 ล้านบาท และนำเข้าเมล็ดพันธุ์หอมหัวใหญ่จากเนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา และอาร์เจนตินา ปริมาณ 6,524.15 กิโลกรัม คิดเป็นมูลค่าประมาณ 32.70 ล้านบาท (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2555; 2556) และจากการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชของหอมหัวใหญ่ พบว่ามีศัตรูพืชที่ทำลายส่วนต่างๆของหอมหัวใหญ่ จำนวนทั้งหมด 247 ชนิด จัดเป็น

แมลง 75 ชนิด ไร 11 ชนิด เชื้อรา 59 ชนิด แบคทีเรีย 19 ชนิด ไวรัส 6 ชนิด ไส้เดือนฝอย 21 ชนิด หอยศัตรูพืช 1 ชนิด วัชพืช 55 ชนิด และจัดเป็นศัตรูพืชกักกันตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืชพ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) และ (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2550 จำนวน 34 ชนิด ได้แก่ ไร *Caloglyphus mycophagus*, ไส้เดือนฝอย *Aphelenchoides besseyi*, *Belonolaimus longicaudatus*, *Ditylenchus destructor*, *Ditylenchus dipsaci*, *Paratrichodorus porosus* เชื้อรา *Botryotinia allii*, *Botryotinia fuckeliana*, *Botryotinia porri*, *Botrytis aclada*, *Chalara elegans*, *Colletotrichum circinans*, *Phomopsis longicolla*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora porri*, *Sclerotium cepivorum* แบคทีเรีย *Pantoea ananatis*, *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*, *Pseudomonas viridiflava* ไวรัส; *Tobacco rattle virus*, *Tomato black ring virus* วัชพืช *Capsella bursa-pastoris*, *Cirsium arvense*, *Cirsium vulgare*, *Lolium temulentum*, *Orobanche ramosa*, *Parthenium hysterophorus*, *Phalaris minor*, *Polygonum aviculare*, *Polygonum convolvulus*, *Raphanus raphanistrum*, *Senecio vulgaris*, *Spergula arvensis* และ *Thlaspi arvense* (CPC, 2007, CABI, 2014) และยังมีศัตรูพืชที่เฝ้าระวัง เช่น *Urocystis cepulae* (พรพิมล และคณะ, 2556) และ *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (ทิพวรรณ และคณะ, 2556)

2. การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดกับหอมแดงและหอมหัวใหญ่ที่นำเข้าจากต่างประเทศในห้องปฏิบัติการ

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

จากการตรวจสอบศัตรพืชกับหัวหอมแดงและหอมหัวใหญ่ในเบื้องต้น โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ หรือกล้องจุลทรรศน์แบบ stereo ตรวจพบอาการหัวเน่า เป็นแผล จุด มีเส้นใยของเชื้อราปกคลุมบางหัวพันธุ์ ส่วนเมล็ดพันธุ์อยู่สภาพปกติ ไม่พบ cyst ของไส้เดือนฝอย ร่องรอยการเข้าทำลายของแมลง และไรศัตรูพืช หรือการปนเปื้อนของเมล็ดวัชพืช

2.2 การสุ่มตัวอย่างและการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

ผลการสุ่มตัวอย่างหอมแดงและหอมหัวใหญ่ที่นำเข้าจากต่างประเทศ จำนวนทั้งหมด 21 ตัวอย่าง ณ ด่านตรวจพืชไปรษณีย์ ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ และด่านตรวจพืชท่าเรือแหลมฉบัง เมื่อได้ทำแยกและตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีการที่เหมาะสม ตรวจพบศัตรูพืชกับหัวหอมแดงจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Fusarium oxysporum* และหัวหอมหัวใหญ่ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus niger*, *Cladosporium cucumerinum* และเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ส่วนเมล็ดพันธุ์หอมแดงและหอมหัวใหญ่ตรวจแล้วไม่พบศัตรูพืช (**Table 1 และ Table 2**) และระหว่างทำการศึกษาไม่พบศัตรูพืชกักกันที่สำคัญของประเทศไทย

3. ปลูกเพื่อสังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนต้นในโรงเรือนปลูกพืช

เมื่อนำหอมแดงและหอมหัวใหญ่ไปปลูกสังเกตอาการของโรคในโรงเรือนปลูกพืชตรวจแล้วไม่พบศัตรูพืช

4. การติดตาม ตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกหอมแดงและหอมหัวใหญ่นำเข้าจากต่างประเทศ

การติดตาม ตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกหอมแดงและหอมหัวใหญ่ จำนวนทั้งหมด 18 แปลง แบ่งพื้นที่ปลูกหอมแดง จำนวน 13 แปลง ได้แก่ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่ จำนวน 3 แปลง ตรวจพบเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* อ.เวียงป่าเป้า และอ.แม่ลาว จ.เชียงราย จำนวน 5 แปลง ตรวจพบเชื้อรา *Stemphylium vesicarium* อ.พบพระ จ.ตาก จำนวน 3 แปลง ตรวจพบเชื้อรา *Alternaria porri* และเชื้อรา *Stemphylium vesicarium* อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี จำนวน 2 แปลง ตรวจพบเชื้อรา *Alternaria porri* และแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* พื้นที่ปลูกหอมหัวใหญ่ จำนวน 5 แปลง ได้แก่ อ.จอมทอง และอ.แม่วาง จำนวน 2 แปลง ตรวจพบเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และอ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย อีกจำนวน 3 แปลง ตรวจพบเชื้อรา *Stemphylium vesicarium* และเชื้อรา *Aspergillus niger* ซึ่งศัตรูพืชที่พบมีลักษณะทั่วไปดังนี้

1. *Alternaria porri* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดสีม่วง อาการเริ่มแรกเป็นจุดฉ่ำน้ำขนาดกลมหรือรี ซึ่งเมื่อแห้งจะเปลี่ยนเป็นจุดสีขาว ต่อมาแผลขยายวงกว้างออกไปตามความยาวของใบ เกิดเป็นแผลรูปไข่สีน้ำตาลอ่อน ขอบแผลเป็นสีน้ำตาลอมม่วง (นิตยา, 2545)

2. *Aspergillus niger* หรือราสีดำขึ้นเป็นกลุ่มระหว่างกาบของหัวหอม เส้นใยของเชื้อรามีสีดำซึ่งอาจจะฟุ้งกระจายได้ง่ายเมื่อถูกกระทบกระเทือน เนื้อเยื่อบริเวณที่ราขึ้นจะเน่าเปื่อย ยุ่ย กินลึกเข้าไปทีละน้อยเป็นบริเวณกว้าง (นิตยา, 2545; พรพิมล และคณะ, 2556)

3. *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นเชื้อราสาเหตุของโรคหอมเลื้อย เป็นลักษณะอาการที่บ่งบอกถึงอาการเลื้อยไม่ลงหัว มีลักษณะแคระแกร็นไม่ลงหัว หัวลีบยาวบิดโค้งงอใบบิดเป็นเกลียว ส่วนคอมักยืดยาว มีระบบรากสั้นกว่าปกติทำให้รากขาดหลุดจากดินได้ง่าย จึงเกิดการเน่าก่อนถึงเวลาเก็บเกี่ยว หรือเน่าหลังเก็บเกี่ยวอย่างรวดเร็ว ใบของพบแผลเป็นรูปรี เนื้อเยื่อของแผลยุบตัวต่ำกว่าระดับเดิมเล็กน้อย บนแผลจะพบสปอร์ของเชื้อราเป็นของเหลวข้นสีส้มอมชมพู ซึ่งเมื่อแห้งแล้วจะกลายเป็นตุ่มสีดำเล็กๆ เรียงซ้อนกันเป็นวงหลายชั้น ที่บริเวณใบ โคนกาบ ใบ คอ หรือส่วนหัว เกิดร่วมกับอาการแคระแกร็น เลื้อยไม่ลงหัวเสมอ (นิตยา, 2545)

4. *Stemphylium vesicarium* เป็นเชื้อราสาเหตุ ของโรคใบไหม้ อาการเริ่มแรกเป็นจุดขนาดเล็กบนใบสีเหลืองอ่อน หรือน้ำตาลอ่อน มีลักษณะฉ่ำน้ำ ตอมาแผลขนาดเล็กจะขยายเป็นรูปยาวรี หัวแหลม ท้ายแหลมสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม ต่อมาเมื่อหอมมีความชื้นสูง แผลจะลุกลาม ขยายขนาดจนแสดงอาการใบไหม้ (นิตยา, 2545)

5. แบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* อาการเริ่มแรกเกิดเป็นจุดช้ำน้ำเล็กๆ จากนั้นเชื้อเจริญเติบโตขยายเข้าไปในไส้กลางต้น หัวหอมจะแสดงอาการนิ่มภายใน เมื่อผ่าดูจะเห็นเนื้อเยื่อตรงกลางหัวเน่า มีกลิ่นเหม็น ใบหอมซีดสีขาวครีม หักพับลงทั้งต้นและฟุบติดดิน การเกิดโรคในแปลงปลูกมักเกิดในระยะที่พืชลงหัวโตเต็มที่ใกล้เก็บเกี่ยวแล้ว ระบาดทำความเสียหายรุนแรงในฤดูฝนหรือในช่วงที่มีความชื้นและอุณหภูมิสูง (นิตยา, 2545; ทิพวรรณ กันหาญาติ, 2556) ในระหว่างทำการศึกษาติดตาม ตรวจสอบและวินิจฉัยศัตรูพืชในแปลงปลูกหอมแดงและหอมหัวใหญ่นำเข้านี้ไม่พบศัตรูพืชกักกันที่สำคัญของประเทศไทย

5. จัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบและสรุปผลการศึกษาการเป็นศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช

เมื่อทำรายชื่อศัตรูพืชหลังจากการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชของหอมแดง และหอมหัวใหญ่นำข้าในห้องปฏิบัติการ จำนวนทั้งหมด 21 ตัวอย่าง พบว่า หัวหอมแดง มีศัตรูพืช 2 ชนิด จัดเป็นเชื้อรา 2 ชนิด และหัวหอมหัวใหญ่ มีศัตรูพืช 3 ชนิด จัดเป็นเชื้อรา 3 ชนิด ส่วนเมล็ดพันธุ์หอมแดงและหอมหัวใหญ่ ไม่พบศัตรูพืช การปลูกสังเกตอาการในโรงเรือนปลูกพืช ไม่พบศัตรูพืช ส่วนการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกหอมแดงและหอมหัวใหญ่นำเข้า จำนวนทั้งหมด 18 แปลง พบว่า หัวหอมแดง มีศัตรูพืช 4 ชนิด จัดเป็นเชื้อรา 3 ชนิด และแบคทีเรีย 1 ชนิด ระหว่างทำการศึกษาไม่พบศัตรูพืชกักกันที่สำคัญของประเทศไทย อย่างไรก็ตามยังมีความจำเป็นที่ต้องตรวจตรวจวินิจฉัย ณ จุดนำเข้า เช่นด่านตรวจพืชต่อไป รวมทั้งมีการติดตาม ตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกหอมแดงและหอมหัวใหญ่นำเข้า ในทุกๆแหล่งมีการผลิตเพื่อบริโภคและขยายพันธุ์ เพื่อป้องกันมิให้ศัตรูพืชชนิดที่ร้ายแรงและไม่มีรายงานในประเทศไทยติดมากับหัวและเมล็ดพันธุ์ ซึ่งอาจจะแพร่ระบาดทำความเสียหายต่อการผลิตหอมแดงและหอมหัวใหญ่ในประเทศไทย ซึ่งจำเป็นต้องใช้มาตรการทางกฎหมายตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 มาควบคุมกำกับดูแล เพื่อลดความเสี่ยงศัตรูพืชซึ่งอาจจะติดเข้ามาในประเทศไทยได้

สรุปผลการทดลองและคำเสนอแนะ

1. จากการรวบรวมข้อมูลทั่วไป พบว่าหอมแดง มีศัตรูพืชที่เข้าทำลายส่วนต่างๆ จำนวนทั้งหมด 161 ชนิด จัดเป็นแมลง 29 ชนิด ไร 11 ชนิด เชื้อรา 30 ชนิด แบคทีเรีย 8 ชนิด ไวรัส 7 ชนิด ไส้เดือนฝอย 21 ชนิด และวัชพืช 55 ชนิด ส่วนหอมหัวใหญ่มีศัตรูพืชที่เข้าทำลายส่วนต่างๆ 247 ชนิด จัดเป็นแมลง 75 ชนิด ไร 11 ชนิด เชื้อรา 59 ชนิด แบคทีเรีย 19 ชนิด ไวรัส 6 ชนิด ไส้เดือนฝอย 21 ชนิด หอยศัตรูพืช 1 ชนิด และวัชพืช 55 ชนิด

2. จากการสุ่มตัวอย่างหอมแดงและหอมหัวใหญ่นำเข้าจากต่างประเทศ จำนวนทั้งหมด 21 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ ตรวจพบศัตรูพืชกับหัวหอมแดงจำนวน 2 ชนิด และหัวหอมหัวใหญ่ จำนวน 3 ชนิด ส่วนเมล็ดพันธุ์หอมแดงและหอมหัวใหญ่ตรวจแล้วไม่พบศัตรูพืช

3. จากการปลูกหอมแดงและหอมหัวใหญ่เพื่อสังเกตอาการของโรคในโรงเรือนปลูกพืช ตรวจแล้วไม่พบศัตรูพืช

4. จากการติดตาม ตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกหอมแดงและหอมหัวใหญ่นำเข้าจากต่างประเทศ จำนวนทั้งหมด 18 แปลง ตรวจพบศัตรูพืชกับหอมแดง จำนวน 4 ชนิด ส่วนหอมหัวใหญ่ตรวจพบศัตรูพืช 3 ชนิด

5. จากการจัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบศัตรูพืชกักกันที่สำคัญของประเทศไทย

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณข้าราชการ พนักงานราชการของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช คุณชัยศักดิ์ รินเกลื่อน นักวิชาการ เจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชท่าเรือแหลมฉบัง ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ และด่านตรวจพืชไปรษณีย์ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร รวมทั้งเจ้าหน้าที่จากสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1 และเขตที่ 5 ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านการเก็บตัวอย่าง และเอื้ออำนวยในเรื่องสถานที่ ตลอดจนกลุ่มวิจัยกีฏและสัตววิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช และกลุ่มวิจัยวัชพืชที่ช่วยจัดจำแนกชนิดศัตรูพืชบางชนิด ทำให้งานสำเร็จลุล่วงได้ดี

เอกสารอ้างอิง

นิรนาม. 2552. **พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช(ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551.** กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 12 หน้า.

นิตยา กันหลง. 2545. **สมุดภาพโรคสำคัญของพืชสกุลหอมกระเทียมในประเทศไทย.** เอกสารวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยาปี 2545. 33 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2546. **ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช.** กลุ่มงานไส้เดือนฝอย. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 39 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ วานิช คำพานิช. 2551. **การพัฒนาเครื่องมือและเทคนิคการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ติดมากับพืชนำเข้าและส่งออก**. *ใน* รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 26 น.

ทิพวรรณ กันหาญาติ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล รุ่งนภา ทองเครื่ง และพรพิมล อธิปัญญาคม. 2556. **การเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ในพื้นที่ปลูกหอม กระเทียม เพื่อการส่งออก.** น. 1823 - 1902. *ใน* รายงานผลงานวิจัยประจำปีพ.ศ. 2556. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ ชนินทร ดวงสะอาด และ ทิพวรรณ กันหาญาติ. 2556. **การเฝ้าระวังราเขม่าดำ *Urocystis cepulae* Frost ในพื้นที่ปลูกหอมแดง.** 1805 - 1822. *ใน* รายงานผลงานวิจัยประจำปีพ.ศ. 2556. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

สืบศักดิ์ สนธิรัตน. 2538. **ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในประเทศไทย.** วี.บี. บุ๊คเซ็นเตอร์, กรุงเทพฯ. 275 น.

สืบศักดิ์ สนธิรัตน. 2541. **ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช: โรคและการจัดการ.** วี.บี. บุ๊คเซ็นเตอร์, กรุงเทพฯ. 204 น.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2555. **รายงานนำเข้าหอมแดงและหอมหัวใหญ่.** สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 1 น.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2556. **รายงานนำเข้าหอมแดงและหอมหัวใหญ่.** สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 1 น.

Anon. 2005. **Interactive diagnostic key to plant parasitic, free living and predaceous nematodes**. University of Nebraska - Lincoln Nematology Laboratory. USA.

Bell, M. 2004. **Plant parasitic nematodes: Lucid key to 30 genera of plant parasitic nematodes.** http://www.lucidcentral.com/keys/nematodes/.

Borror, D.J. 1981. **An Introduction to the Study of Insects 827 pages with 672 figures and 12 tables.** 827 p.

Linda, W. Davis. 1993. **Weed Seeds of the Great Plains A Handbook for Identification.** 208 p.

Bradbury J.F. and G.S. Sadler. 1997. **Guide to Plant Pathogenic Bacteria, 2nd edition**. CAB International Mycological Institute, Surrey, U.K.

CAB INTERNATIONAL (CPC). 2007. **Crop Protection Compendium 2007 Edition**. Wallingford, UK. [CD-ROM].

CABI. 2014. **Crop Protection Compendium (2014 edition).** Copyright © 2014 CABI. CAB International is a registered EU trademark. Available source: http://www.cabi.org/cpc/ (site date: April 20, 2014).

Dhingra, O.D. and J.B. Sinclair. 1985. **Basic Plant Pathology Methods.** CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. USA.

Hunt, D.J. 1993. **Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae : their systematics and bionomics.** CAB International, Wallingford, UK.

Mathur, S.B. and O. Kongdal. 2003. **Common Laboratory Seed Health Testing Method for Detecting Fungi.** Copehagen. Denmark. 425 pp.

Nickle, W.R. 1991. **Manual of agricultural nematology.** New York, U.S.A.

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.

Siddiqi, M.R. 2000. **Tylenchida: parasites of plants and insects.** CABI Publications, Wallingford, UK.

Zuckerman, B. M., W. F. Mai and L R. Krusberg. 1990. **Plant Nematode Laboratory Manual**. The University of Massachusetts Agricultural Experiment Station Amherts, Massachusetts. USA.

Table1. Pests intercepted from imported shallot.

Part of plants	Pests	Country of origin	Number of interceptions
Bulbs	**Diseases**		
	Aspergillus niger	China	1
		Indonesia	2
	Fusarium oxysporum	Myanmar	1
Seeds	**Non - pests**	Philippines	-

Table2. Pests intercepted from imported onion.

Part of plants	Pests	Country of origin	Number of interceptions
Bulbs	**Diseases**		
	Aspergillus niger	People's Replublic of China	10
		South Korea	1
		India	1
	Cladosporium cucumerinum	China	1
	Fusarium oxysporum	China	1
Seeds	**Non - pests**	Chile	1
		USA	1
		South Africa	1

การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์แครอทที่นำเข้าจากต่างประเทศ

Study on Quarantine Pests Associated with the Imported Carrot Seeds

วันเพ็ญ ศรีชาติ ศรีวิเศษ เกษสังข์ ชลธิชา รักใคร่ วานิช คำพานิช โสภา มีอำนาจ

กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จากการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชของแครอท พบศัตรูพืชทั้งสิ้นจำนวน 296 ชนิด เป็นแมลง 72 ชนิด ไร 4 ชนิด ไส้เดือนฝอย 35 ชนิด หอยทาก 2 ชนิด เชื้อรา 112 ชนิด แบคทีเรีย 16 ชนิด ไวรัส 19 ชนิด ไวรอยด์ 1 ชนิด ไฟโตพลาสมา 1 ชนิด และวัชพืช 36 ชนิด จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์แครอทนำเข้าจาก 3 ประเทศ ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และอิตาลี นำมาตรวจสอบเบื้องต้น ไม่พบลักษณะอาการผิดปกติ เมล็ดพันธุ์สมบูรณ์ ไม่มีร่องรอยการทำลายของแมลงศัตรูพืช และไม่มีวัชพืชติดมากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์แครอท ในห้องปฏิบัติการ พบเชื้อรา 1 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis* กับเมล็ดพันธุ์แครอทนำเข้าจากอิตาลี ในส่วนการตรวจเมล็ดพันธุ์แครอทด้วยวิธี Dilution technique และการนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่น่าสงสัยจะเป็นเชื้อก่อโรคและไม่พบอาการผิดปกติกับต้นแครอท ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ ซึ่งเมล็ดพันธุ์ส่วนใหญ่มีการเคลือบสารเคมี ได้แก่ Thiram, Iprodione และ Metalaxyl รวมทั้งในบางตัวอย่างมีการคลุกด้วยสารเคมี 2 ชนิดร่วมกัน ซึ่งทำให้ไม่พบเชื้อปนเปื้อนกับเมล็ดพันธุ์แครอทนำเข้า และผลการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์แครอทนำเข้าจากต่างประเทศ ในภาคเหนือ 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงรายและเชียงใหม่ จำนวน 7 แปลง พบ **โรคที่เกิดอาการบนใบ**ของแครอท จำนวน 1 โรค ได้แก่ โรคราแป้ง เชื้อสาเหตุ *Oidium* sp. **และอาการที่พบบนโค่นและหัวของแครอท** จำนวน 4 โรค ได้แก่ 1) โรคก้านใบเน่าเชื้อสาเหตุจาก *Sclerotium rolfsii* 2) โรคเน่าแห้ง เชื้อสาเหตุจาก *Fusarium solani* 3) โรคเน่าบูด เชื้อสาเหตุจากเชื้อ *Geotrichum candidum* 4) โรคเน่าจากแบคทีเรีย เชื้อสาเหตุจาก *Erwinia carotovora* ซึ่งเชื้อโรคที่แยกได้จากเมล็ดพันธุ์และอาการของโรคที่พบในแปลงปลูก**ไม่เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย**

Keyword: แครอท ชนิดศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์นำเข้า

Carrot, Quarantine Pest, Imported seed

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-03-00-23-57

คำนำ

ตามรายชื่อพืช แนบท้ายประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชจากแหล่งที่กำหนด เป็นสิ่งกำกัด ข้อยกเว้นและเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 พ.ศ. 2550 ภายใต้พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 กำหนดให้ส่วนหนึ่งส่วนใดของพืชในวงศ์เอเปียซีอี้ Apiaceae ได้แก่ แครอท (*Daucus carota* L.) จัดเป็นสิ่งกำกัด โดยในการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวเข้ามายังประเทศไทยต้องแจ้งการนำเข้า และมีใบรับรองสุขอนามัยพืชจากประเทศต้นทางกำกับมาพร้อมกับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า ซึ่งการนำเข้าสินค้าเกษตรจากต่างประเทศ มีโอกาสที่ศัตรูพืชหลายชนิดที่อาจเป็นศัตรูพืชกักกันที่ร้ายแรงหรือศัตรูพืชที่สำคัญที่ก่อความเสียหายกับผลิตผลทางการเกษตรติดเข้ามากับเมล็ดพืชด้วย โดยอาจเป็นศัตรูพืชร้ายแรงที่ไม่มีปรากฏในประเทศไทย โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ ซึ่งมีการนำเข้ามาเพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์หรือเป็นต้นพันธุ์ในการส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูกกระจายทั่วประเทศไทย โดยในแต่ละปีมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์เหล่านี้ในปริมาณมาก หากศัตรูพืชที่ร้ายแรงซึ่งยังไม่มีรายงานในประเทศไทยติดมากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวสามารถเข้ามาเจริญและแพร่พันธุ์ได้ในประเทศไทย จะก่อให้เกิดผลกระทบทำความเสียหายต่อการเกษตรในประเทศและกระทบต่อการส่งออกพืชผักผลไม้ไทยไปยังต่างประเทศที่มีความเข้มงวดด้านกักกันพืช ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทำการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับพืชนำเข้าเพื่อให้ทราบชนิด แหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้า และเส้นทางการเข้ามาของศัตรูพืช ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นฐานข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืช มีประโยชน์ใช้อ้างอิงทางวิชาการ นำมาพิจารณาหามาตรการเพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชชนิดนั้น ๆ และกำหนดเป็นมาตรการทางด้านกฎหมายและทางวิชาการในการควบคุมการนำเข้า หรือเปลี่ยนแปลงสถานรูปของพืชนำเข้าให้เป็นสิ่งต้องห้ามหรือสิ่งกำกัดตามพระราชบัญญัติกักพืชต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

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

วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของแครอท และข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

ทำการสืบค้นข้อมูลจากเอกสาร วารสาร รายงานการประชุมทางวิชาการ อินเตอร์เน็ต เพื่อค้นหาข้อมูลของแครอท ลักษณะทั่วไปของพืช สายพันธุ์ พื้นที่การเพาะปลูก รายชื่อของประเทศที่ประเทศไทยมีการการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ ปริมาณการนำเข้า ข้อมูลชนิดของศัตรูพืชทั้งนอกประเทศและในประเทศ

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์แครอทนำเข้าจากต่างประเทศในห้องปฏิบัติการ

ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์แครอทที่นำเข้าจากต่างประเทศมาทำการตรวจวินิจฉัยโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อตรวจหาตัวอ่อน หนอน แมลง เมล็ดวัชพืช หรือลักษณะเมล็ดด่าง มีสีดำ บิดงอ ขนาดเล็ก ที่มีสาเหตุจากเชื้อโรค

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

2.2.1 การตรวจสอบเชื้อรา

1) การตรวจสอบเมล็ดพันธุ์พืชขณะยังไม่งอก (Dry seed examination)

โดยตรวจสอบลักษณะอาการโรคและส่วนขยายพันธุ์เชื้อราหรือศัตรูพืชอื่นๆ ซึ่งปะปนมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยตาเปล่าหรือตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope เช่น เมล็ดพันธุ์มีรูปร่างผิดปกติ หรืออาจมีการติดภายในเมล็ดพันธุ์โดยไม่แสดงอาการ รวมทั้งอาจติดมากับเศษพืชในลักษณะเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์ เช่น Pycnidia เป็นต้น

2) การตรวจสอบเมล็ดพันธุ์พืชขณะเมล็ดงอก

สุ่มตัวอย่างเมล็ดตามวิธีการมาตรฐาน ในปริมาณที่เหมาะสมวิเคราะห์โดยสุ่มแยกตามสายพันธุ์ มาทดสอบด้วยวิธี Blotter method โดยวางเมล็ดลงบนกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่นที่ชุ่มน้ำซึ่งวางอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางเมล็ดพันธุ์แครอท 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

ในกรณีที่เชื้อติดมาในปริมาณมากจะสามารถแยกเชื้อจากเมล็ดโดยตรง หลังจากทำการแยกเชื้อด้วยวิธี Blotter method ได้ หรือทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงด้วยวิธี Dilution plate โดยสุ่มเมล็ดตามมาตรฐาน นำมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อ เมื่อได้เมล็ดพันธุ์จึงนำไปบดละเอียดด้วยเครื่องบด แล้วนำผงของเมล็ดใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (0.85% NaCl) หรือบัฟเฟอร์จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยวางบนเครื่องเขย่า จากนั้นนำมาทำให้เจือจางในโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ หลอดละ 9 มิลลิลิตร ให้มีความเจือจางเป็น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ ใช้ไปเปตต์ดูดสารละลายแต่ละความเข้มข้น ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) จำนวน 2 จานอาหาร แล้วใช้แท่งแก้วลนไฟฆ่าเชื้อเกลี่ยสารละลายให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน จึงนำมาตรวจหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปจำแนกชนิดต่อไป

2) แยกเชื้อจากต้นกล้าซึ่งเพาะจากเมล็ดผิดปกติ

โดยการเพาะเมล็ดในดินนึ่งฆ่าเชื้อ โดยเพาะ 25-50 เมล็ดต่อถุง และเก็บถุงเพาะที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส รดน้ำเช้าเย็นในโรงเรือนกักกันพืช ของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช เมื่อต้นกล้าออกใบจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนพืช หรืออาจใช้ถุงพลาสติกที่ฉีดพ่นน้ำคลุมให้ความชุ่มชื้นเป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนใบ กิ่ง ลำต้น โค่นต้น และราก เก็บส่วนของพืชที่สงสัยไปแยกเชื้อด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

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

2.2) วิธี Tissue transplanting ตัดใบพืชเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 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 ตรวจสอบรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

2. ทดสอบแกรม (Gram reaction) โดยใช้สารละลายโปรแตสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 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 ใบเลี้ยง หรือเนื้อใบของต้นแครอท อายุ 2-3 สัปดาห์ ฉีดพ่นน้ำให้ความชุ่มชื้นคลุมด้วยถุงพลาสติกและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ตรวจลักษณะอาการโรคหลังปลูกเชื้อ 3-5 วัน จากนั้นนำใบเป็นโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อสาเหตุที่ทำให้พืชเป็นโรคเป็นชนิดเดียวกับที่แยกได้ในครั้งแรกหรือไม่

6. การตรวจสอบด้วยวิธี ELISA เป็นวิธีการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา ปัจจุบันใช้ชุดตรวจสอบของบริษัท Agdia นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวและนำมาทำการตรวจสอบตามขั้นตอนที่แนะนำ

2.2.3 การตรวจสอบเชื้อไวรัส

1) ปลูกสังเกตลักษณะอาการโรคบนต้นกล้า (Seedling symptom test) โดยเพาะ เมล็ดพันธุ์ในดินอบฆ่าเชื้อ 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 ในสรูปเย็น 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 แม้จะมีเชื้อไวรัสปริมาณต่ำหรืออนุภาคแตกหักก็สามารถตรวจได้ให้ผลรวดเร็ว แน่นอน และยังสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก วิธีการที่นำมาใช้เป็นแบบ Indirect ELISA ทำการบันทึกผล

3. การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์นำเข้าในพื้นที่ของเกษตรกร

ทำการติดตามตรวจสอบต้นพืชที่มีการนำเมล็ดพันธุ์นำเข้าไปเพาะปลูกในแปลงปลูกของเกษตรกรตามภาคต่างๆ โดยสังเกตอาการความผิดปกติของต้นพืชทั้ง โคนต้น ราก ลำต้น ใบและหัวของพืช และทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาการดังกล่าว นำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง ทำการแยกเชื้อจากอาการที่พบให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จัดจำแนกชนิดของเชื้อ และทดสอบการเกิดโรคกับพืชในห้องปฏิบัติการเพื่อทำการวินิจฉัยเชื้อโรคศัตรูพืชอย่างละเอียด เช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 2

4. การจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบในเมล็ดพันธุ์นำเข้าและศัตรูพืชที่ติดตามตรวจสอบในแปลงปลูก และสรุปผลการศึกษาการเป็นศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช

โดยการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบในห้องปฏิบัติการจากเมล็ดพันธุ์นำเข้าและศัตรูพืชที่ติดตามตรวจสอบในแปลงปลูกของเกษตรกรและสรุปผลการศึกษาการเป็นศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช

เวลาและสถานที่

เวลา: เดือนตุลาคม 2556 – กันยายน 2557

สถานที่: ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช ด่านตรวจพืช และและแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์นำเข้าในพื้นที่ภาคเหนือ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การรวบรวมข้อมูลทั่วไปของแครอท และข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

- การจัดจำแนกแครอท

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Apiales

Family: Apiaceae

Genus: *Daucus*

Species: *D. carota*

แครอท จัดอยู่ในวงศ์ Apiaceae (Umbelliferae) มีถิ่นกำเนิด อยู่แถบเอเชียกลาง จนถึงทางตะวันออก ต่อมาได้เผยแพร่เข้าไปใน ยุโรป และสาธารณรัฐประชาชนจีน แครอทเป็นพืชสองฤดู โดยฤดูแรกเจริญทางต้น ใบ และราก ฤดูที่สองจะเจริญทางดอก และเมล็ด ลักษณะลำต้นเป็นแผ่นใบ จะเจริญจากลำต้น เป็นกลุ่มมีก้านใบยาว ประกอบด้วย เปลือกบาง (periderm) และส่วนของเนื้อ (cortex) ซึ่งประกอบด้วยท่ออาหาร และเป็นแหล่งเก็บ อาหารสำรอง ส่วนใหญ่อยู่ในรูป ของน้ำตาล เป็นส่วนประกอบ 45-65% ของหัว เนื้อสีขาว เหลือง ส้ม แดง ม่วงและดำ ส่วนของแกน (inner core) ประกอบด้วย ท่อน้ำ (xylem) และแกน (pith) แครอท สายพันธุ์ที่มีคุณภาพสูง จะมีแกนขนาดเล็กและมีสีเดียว กับเนื้อหรือมีส่วนของเนื้อ มากกว่าส่วนของแกน การปลูกฤดูที่สองเพื่อผลผลิตเมล็ดพันธุ์ ลำต้นจะยืดตัว สร้างก้านดอกยาว 2-4 ฟุต บนยอดมีช่อดอก ซึ่งช่อแรกจะเจริญ จากส่วนกลางของลำต้น ต่อจากนั้นช่ออื่นๆ จะเจริญตาม การผสมเกสรจะเป็น แบบผสมข้าม ส่วนใหญ่ แมลงเป็นตัวช่วยผสมเกสร

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

- เมล็ดจะงอกได้ดีในอุณหภูมิ 15-25 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิที่เหมาะสำ หรับการเจริญเติบโตจะอยู่ระหว่าง 25-28 องศาเซลเซียส
- ในกรณีที่อุณหภูมิสูงกว่า 28 องศาเซลเซียส การเจริญของใบจะลดลง
- อุณหภูมิที่เหมาะสำ หรับการเจริญของหัวอยู่ระหว่าง 18-21 องศาเซลเซียส

ในสภาพอุณหภูมิสูง สายพันธุ์ Red Core Chantenay จะมีหัวสั้น แต่ในสภาพอุณหภูมิต่ำจะมีหัวยาวและปลายแหลม (นิพนธ์, 2545) หากมีความแตกต่างของอุณหภูมิ ระหว่างผิวดิน และระดับดินที่ลึกลงไป 10-15 เซนติเมตรมาก จะทำให้รูปทรงของหัว ไม่สม่ำเสมอ แครอทเป็นพืชที่ต้องการแสงมาก โดยเฉลี่ยประมาณ 9-14 ชั่วโมง/วัน

ลักษณะดินที่ใช้ปลูกแครอท

แครอทเจริญได้ดีในดินละเอียด และร่วนซุย หน้าดินลึก มีอินทรีย์วัตถุสูง ระบายน้ำได้ดี ความเป็นกรด-ด่าง ของดิน 6.5-7.5 การปลูกในดินเหนียว หรือโครงสร้างดินแข็งจะทำให้หัวแตก มีรูปทรงผิดปกติ หากแปลงปลูกมีความชื้นสูง หัวจะมีแผลสีดำ

การปฏิบัติดูแลรักษาแครอทในระยะต่างๆของการเจริญเติบโต

การเตรียมดิน ขุดดินตากแดด และโรยปูนขาวอัตรา 100 กรัม/ตารางเมตร ไว้อย่างน้อย 14 วัน กำจัดวัชพืช ขึ้นแปลงกว้าง 1 เมตร

การเตรียมกล้า ปลูกโดยหยอดเมล็ด

การเตรียมแปลงปลูก

1. ก่อนปลูกใส่ปุ๋ยสูตร 12-24-12 อัตรา 20-30 กรัม/ตารางเมตร ลงในดิน ปรับหน้าแปลงให้เรียบ
2. ขีดร่องลึก 1 เซนติเมตร ขวางแปลงห่างกันร่องละ 15 เซนติเมตร
3. หยอดเมล็ดทีละเมล็ดระยะห่าง 1 เซนติเมตร กลบเมล็ดแล้วรดน้ำให้ชุ่ม
4. ทำการถอนแยก

ครั้งที่ 1 หลังหยอดเมล็ด 15-20 วัน (มีใบจริง 3-5 ใบ) เหลือระยะปลูก 3 เซนติเมตร
ครั้งที่ 2 หลังหยอดเมล็ด 30-35 วัน (มีใบจริง 8-9 ใบ) เหลือระยะปลูก 5-8 ใบ

การเพาะกล้า

ใส่ปูนขาวและปุ๋ยเคมีสูตรเสมอ คลุกเคล้าให้เข้ากัน ทำการยกร่องแบบร่องผักแล้วทำแนวแถวห่างกัน 10 เซนติเมตร โรยเมล็ดบางๆ ตามแนว เกลี่ยดินกลบบางๆใช้ฟางข้าวคลุมรดน้ำให้ชุ่มเช้า-เย็น จนกว่าต้นกล้าจะงอก

การปลูกและการดูแล

วิธีการปลูก เมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 15-20 วัน หรือมีใบจริงประมาณ 3-5 ใบ ถอนกล้านำไปปลูกในร่องที่เตรียมไว้ ระยะปลูก (ต้น x แถว) ประมาณ 10 x 15 เซนติเมตร หรือทำการหว่านเมล็ดพันธุ์แครอทลงในแปลงปลูกเลย แล้วใช้วิธีถอนแยกต้นกล้าที่แน่นให้ได้ระยะประมาณ 10 x 15 เซนติเมตร ก็ได้

การให้น้ำ หลังปลูกรดน้ำให้ชุ่ม และให้น้ำทุกวันสม่ำเสมอ แต่อย่าให้น้ำขัง หัวจะเน่า

การให้ปุ๋ย

1. หลังถอนแยกครั้งที่ 1 ใส่ปุ๋ย 15-15-15 อัตรา 30-50 กรัม/ตารางเมตร พร้อมกำจัดวัชพืช
2. หลังการใส่ปุ๋ยครั้งแรก 15-20 วัน ใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 ใช้สูตร 13-13-21 อัตรา 30-50 กรัม/ตารางเมตร โรยในร่องลึก 2-3 เซนติเมตร ระหว่างแถวปลูก

การเก็บเกี่ยว

1. เมื่อมีอายุได้ 100-120 วัน
2. เก็บเกี่ยวโดยการขุดเมื่ออายุและขนาดเหมาะสม
3. ล้างรากให้สะอาด ผึ่งให้แห้งระวังอย่าให้ผิวถลอก

ข้อควรระวัง

1. การหยอดเมล็ดอย่าให้เมล็ดที่หยอดติดกัน ระยะห่างประมาณ 1 เซนติเมตร
2. ควรให้น้ำสม่ำเสมออย่าให้แฉะเกินไป

โรคแมลงศัตรูที่สำคัญของแครอทในระยะต่างๆของการเจริญเติบโต

ระยะหยอดเมล็ด-ถอนแยก ครั้งที่ 1 อายุ 15-20 วัน โรคใบจุด, โรคราแป้ง, โรครากปม
ระยะถอนแยก ครั้งที่ 2 อายุ 30-35 วัน โรคใบจุด, โรคราแป้ง, โรครากปม, เสี้ยนดิน
ระยะลงหัว 35-100 วัน โรคใบจุด, โรคราแป้ง, โรครากปม, เสี้ยนดิน, โรคหัวเน่า
ระยะเก็บเกี่ยว 100-120 วัน โรคใบจุด, โรคราแป้ง, โรครากปม, เสี้ยนดิน, โรคหัวเน่า

การกำจัดวัชพืชในแปลง

ใช้การถอนแต่ต้องระวังไม่ควรให้ไปกระทบกระเทือนกับรากแครอทเพราะอาจจะทำให้หัวของแครอทที่โตขึ้นมาอาจจะมีรูปทรงไม่สวย ส่วนบริเวณรอบๆแปลงก็อาจใช้จอบถากหรือขุดก็ได้

วัชพืชที่พบในแปลง

ส่วนมากจะเป็นผักเบี้ยหิน และผักโขมหนาม

มีชื่อเรียกตามท้องถิ่นซึ่งแตกต่างกันไป เช่น ผักกาดหัวเหลือง ผักชีหัว

พันธุ์ที่นิยมปลูก คือ New Kurada, Imperater, Nantes, หงส์แดง เจริญได้ดีในเขตหนาวอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตอยู่ ระหว่าง 18-21 องศาเซลเซียส แครอทเจริญได้ดีในดินละเอียดมีอินทรีย์วัตถุสูงและร่วนซุยระบายน้ำได้ดี ความเป็นกรด-ด่างของดินประมาณ 6.5-7.5 แครอทนั้นเป็นพืชที่ต้องการแสงมากโดยเฉลี่ยประมาณ 9-14 ชั่วโมง/วัน

ผลการศึกษาข้อมูลศัตรูพืชของแครอท รวมทั้งสิ้นจำนวน 296 ชนิด เป็นแมลง 72 ชนิด ไร 4 ชนิด ไส้เดือนฝอย 35 ชนิด หอยทาก 2 ชนิด เชื้อรา 112 ชนิด แบคทีเรีย 16 ชนิด ไวรัส 19 ชนิด ไวรอยด์ 1 ชนิด ไฟโตพลาสมา 1 ชนิด และวัชพืช 36 ชนิด

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์แครอทนำเข้าจากต่างประเทศในห้องปฏิบัติการ

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์แครอทนำเข้าจาก 3 ด่านตรวจพืช ได้แก่ ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ด่านตรวจพืชสุวรรณภูมิ และด่านตรวจพืชไปรษณีย์ จำนวน 9 ตัวอย่าง ซึ่งมีการนำเข้าจาก 3 ประเทศ ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น จำนวน 5 ตัวอย่าง สหรัฐอเมริกา จำนวน 2 ตัวอย่าง และอิตาลี จำนวน 2 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบเบื้องต้น ไม่พบลักษณะอาการผิดปกติ เมล็ดพันธุ์สมบูรณ์ ไม่มีร่องรอยการทำลายของแมลงศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาดปิดมิดชิด และบางตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มีการเคลือบเมล็ดด้วยสารเคมี (Figure 1)

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

จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์แครอทที่นำเข้าจากต่างประเทศในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี Blotter method โดยแยกตามสายพันธุ์ พบว่า พบเชื้อรา จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis* กับเมล็ดพันธุ์แครอทนำเข้าจากอิตาลี (Figure 2) ในส่วนที่มีการนำเมล็ดพันธุ์แครอทตรวจด้วยวิธี Dilution technique ในทุกตัวอย่างไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่น่าสงสัยจะเป็นเชื้อก่อโรคกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ไปปลูกสังเกตอาการในโรงเรือนกักกันพืช (Seedling symptom) ไม่พบอาการของโรคหรือศัตรูพืชกับต้นแครอทจากเมล็ดพันธุ์นำเข้าทั้งสามประเทศ (Figure 3)

3. การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์นำเข้าในพื้นที่ของเกษตรกร

จากการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชที่อาจติดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้าในแปลงปลูกในพื้นที่ของเกษตรกรใน อ. เวียงป่าเป้า จ. เชียงราย จำนวน 4 แปลง และ อ. แม่แจ่ม จ. เชียงใหม่ จำนวน 3 แปลง พบอาการโรคกับต้นแครอทนำเข้าจากประเทศญี่ปุ่น โรคที่**พบบนใบของต้นแครอท** จำนวน

1 โรค ได้แก่ ราแป้ง เชื้อสาเหตุ *Oidium* sp. (Figure 4) **โรคที่พบที่โค่นและหัวของแครอท** จำนวน 4 โรค ได้แก่ โรคที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา จำนวน 3 โรค คือ 1) โรคก้านใบเน่าเชื้อสาเหตุจาก *Sclerotium rolfsii* (Figure 5) 2) โรคเน่าแห้ง เชื้อสาเหตุจาก *Fusarium solani* (Figure 6) 3) โรคเน่าบูด เชื้อสาเหตุจากเชื้อ *Geotrichum candidum* (Figure 7) และโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 1 โรค ได้แก่ โรคเน่าจากแบคทีเรีย เชื้อสาเหตุจาก *Erwinia carotovora* (Figure 8) ซึ่งอาการของโรคที่พบ**ไม่เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย**

4. การจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบในเมล็ดพันธุ์นำเข้าและศัตรูพืชที่ติดตามตรวจสอบในแปลงปลูก และสรุปผลการศึกษาการเป็นศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช

การจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจสอบเมล็ดพันธุ์แครอทที่นำเข้าจากต่างประเทศในห้องปฏิบัติการ พบศัตรูพืชสรุปได้ดัง Table 1 และจากการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์แครอทที่นำเข้าจากต่างประเทศ สรุปได้ดัง Table 2

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ข้อมูลศัตรูพืชของแครอท รวมทั้งสิ้นจำนวน 296 ชนิด เป็นแมลง 72 ชนิด ไร 4 ชนิด ไส้เดือนฝอย 35 ชนิด หอยทาก 2 ชนิด เชื้อรา 112 ชนิด แบคทีเรีย 16 ชนิด ไวรัส 19 ชนิด ไวรอยด์ 1 ชนิด ไฟโตพลาสมา 1 ชนิด วัชพืช 36 ชนิด และจากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์แครอทนำเข้าจาก 3 ด่านตรวจพืช ได้แก่ ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ด่านตรวจพืชสุวรรณภูมิ และด่านตรวจพืชไปรษณีย์ จำนวน 9 ตัวอย่าง ซึ่งมีการนำเข้าจาก 3 ประเทศ ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และอิตาลี นำมาตรวจสอบเบื้องต้น ไม่พบลักษณะอาการผิดปกติ เมล็ดพันธุ์สมบูรณ์ ไม่มีร่องรอยการทำลายของแมลงศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์แครอทในห้องปฏิบัติการ พบเชื้อรา 1 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis* กับเมล็ดพันธุ์แครอทนำเข้าจากประเทศอิตาลี ในส่วนการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์แครอทด้วยวิธี Dilution technique และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่น่าสงสัยจะเป็นเชื้อก่อโรคและไม่พบอาการผิดปกติกับต้นแครอท ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ ซึ่งเมล็ดพันธุ์ส่วนใหญ่มีการเคลือบสารเคมี ได้แก่ Thiram, Iprodione และ Metalaxyl และในบางตัวอย่างมีการคลุกสารเคมี 2 ชนิดร่วมกัน ซึ่งทำให้ไม่พบเชื้อปนเปื้อนกับเมล็ดพันธุ์แครอทนำเข้า และผลการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์แครอทนำเข้าจากต่างประเทศ ในภาคเหนือ 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงรายและเชียงใหม่ จำนวน 7 แปลง พบว่า **โรคที่เกิดอาการบนใบ**ของแครอท จำนวน 1 โรค ได้แก่ โรคราแป้ง เชื้อสาเหตุ *Oidium* sp. **และอาการที่พบบนโค่นและหัวของแครอท** จำนวน 4 โรค ได้แก่ โรคที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา จำนวน 3 โรค คือ 1) โรคก้านใบเน่าเชื้อสาเหตุจาก *Sclerotium rolfsii* 2) โรคเน่าแห้ง เชื้อสาเหตุจาก *Fusarium solani* 3) โรคเน่าบูด เชื้อสาเหตุจากเชื้อ *Geotrichum candidum* และโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อ

แบคทีเรีย จำนวน 1 โรค ได้แก่ โรคเน่าจากแบคทีเรีย เชื้อสาเหตุจาก *Erwinia carotovora* ซึ่งเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดพันธุ์และอาการของโรคที่พบในแปลงปลูก**ไม่เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย**

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ผู้เชี่ยวชาญ อุดร อุณหวุฒิ คุณศรีวิเศษ เกษสังข์ คุณชลธิชา รักใคร่ คุณปรียพรรณ พงศาพิชญ์ ที่ช่วยแนะนำแนวทางการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ คุณวานิช คำพานิช คุณโสภา มีอำนาจ คุณยุทธนา ประมาณ คุณวิชาญ สมาธิ คุณวิภา เกิดพิพัฒน์ คุณอรนุช นาคะโร คุณสุธรรม คงเอียด คุณจิรวัฒน์ ไกรนรา และคุณอัญชลี ราศี (ช่วยสนับสนุนตัวอย่างพืชและเตรียมงานในห้องปฏิบัติการ) คุณชัยรัตน์ หมั่นการ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการที่ช่วยสนับสนุนในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

นิพนธ์ ไชยมงคล. 2545. **แครอท.** (ระบบออนไลน์.) แหล่งข้อมูล : http://www.agric-prod.mju.ac.th/vegetable/ File_link/carrot.pdf (25 กันยายน 2545)

Crop Protection Compendium. 2007. ed. Wallingford, UK: CPC. (online). Available. http://www.cabicompendium.org/cpc

Davis, R. M. and R.N. Raid. 2001. **Compendium of Umbelliferous Crop Diseases.** American Phytopathological Society. USA. 110 pp.

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

Vilmorin. 2014. **Carrot handbook**. 63 หน้า. (online). Available. http://www.vilmorin.ru/upload/iblock/03d/03d12627df663a24d9ed4f2440f491ae.pdf (December 15, 2014)

Washington state university. 2015. **Carrot.** Photo Gallery of Vegetable Problems. Washington state University, USA. (online). Available. http://mtvernon.wsu.edu/path_team/carrot.htm (January 20, 2015)

ภาคผนวก

Figure 1. The packaging and carrot seeds are imported from foreign countries.

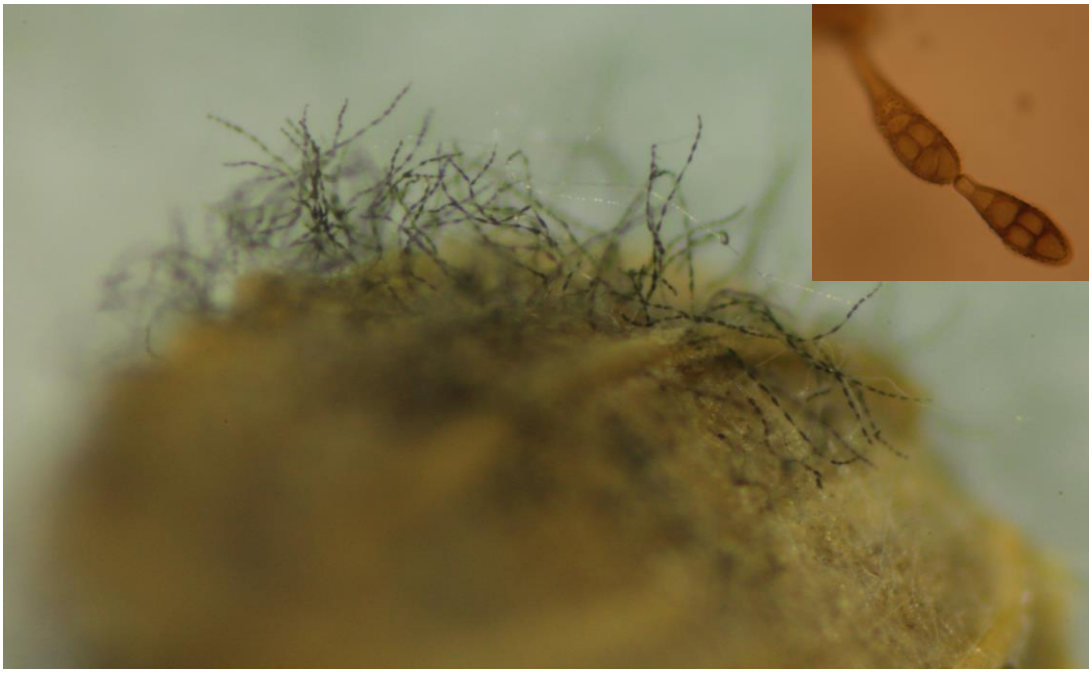


Figure 2. *Alternaria tenuis* on seeds of Low magnification (5x) and conidia structure of high magnification (100x).

Figure 3. The normal seedling plant from carrot seeds are imported from foreign countries by Seedling symptom test.

Figure 4. Powdery mildew on carrot leaves in field and conidia, conidiophores of *Oidium* sp. of high magnification (40x).

Figure 5. Browning and softening of petiole bases of carrot plant caused by sclerotia of *Sclerotium rolfsii*.

Figure 6. Fusarium dry rot of carrot roots is caused by *Fusarium solani* from field in Chiang Mai province.

Figure 7. *Geotrichum candidum* on carrot from field in Chiang Mai province and hyphae and conidia of high magnification (40x).

Figure 8. Bacterial soft rot caused by (Erwinia carotovora var. carotovora) on carrot from field in Chiang Mai province.

Table 1. The detection of seedborne pathogen of carrot seeds from imported countries.

No.	Imported countries	frequency	weight (kg.)	Plant Quarantine station	Pathogen
1	Italy	2	2,438.60	- Port of Bangkok Plant Quarantine Station	*Alternaria tenuis*
2	Japan	5	352.288	- Bangkok Seaport Plant Quarantine Station - Suvarnabhumi International Airport Plant Quarantine Station - Bangkok Post Office Plant Quarantine Station	-
3	USA	2	5.04	- Suvarnabhumi International Airport Plant Quarantine Station	-
	รวม		2,795.928		

Table 2. The surveillance of carrot field in Chiang Mai and Chiang Rai province.

No.	disease	pathogen	Plant part	Province
Symptom caused by fungi				
1	Powdery mildew	*Oidium* sp.	leaf	Chiang Mai and Chiang Rai
2	Petiole rot	*Sclerotium rolfsii*	Petiole Root	Chiang Mai
3	Crown rot	*Fusarium solani*	Root	Chiang Mai
4	Sour rot	*Geotrichum candidum*	Root	Chiang Mai
Symptom caused by bacteria				
5	Bacterial soft rot	*Erwinia carotovora*	Root	Chiang Mai and Chiang Rai

การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส *Potato virus* A

Antiserum Production of *Potato virus* A

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[1/] ชลธิชา รักใคร่[1/] ศรีเมฆ ชาวโพงพาง[2/]

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

[2/] มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

รายงานความก้าวหน้า

การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส *potato virus* A (PVA) ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วน coat protein gene (CP) ของ *Potato virus* A ขนาด 789 คู่เบส (bp) และต่อเชื่อม (ligation) PCR product เข้าสู่พลาสมิดพาหะ (plasmid vector) โดยนำดีเอ็นเอสังเคราะห์ผสมกับเวคเตอร์ pET 101/D-TOPO® (Invitrogen) และทำการคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอส่วนของ CP gene ที่ใส่เข้าไปใน vector นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี miniprep และส่งไปตรวจสอบหาลำดับเบส พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 789 bp หลังจากนั้น subclone ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PVA-CP เข้าสู่ protein expression vector (pET 200/D-TOPO) และ transform เข้า *E. coli* Top 10 และขณะนี้กำลังดำเนินการคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* BL21 ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร และชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนด้วย Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้สูงสุดที่มีขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน จึงทำการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้วนำโปรตีนที่แยกได้นั้นจำนวน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณสะโพกของกระต่าย โดยผสมกับ Freund's adjuvant ทุก 2 สัปดาห์ รวม 5-6 ครั้ง และเจาะเลือดเพื่อแยกแอนติบอดีออกมาจากเม็ดเลือดแดง ทดสอบไตเตอร์ของแอนติบอดีซึ่งครั้งที่ 5-7 ของแอนติซีรัมที่เจาะได้มีไตเตอร์สูงสุด จึงได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพแอนติซีรัมต่อไป ซึ่งยังอยู่ในระหว่างดำเนินการทดสอบ

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-04-00-01-56

คำนำ

จากการที่ประเทศไทยได้เปิดเขตการค้าเสรีกับหลายประเทศภายใต้หลักเกณฑ์ขององค์การการค้าโลก (World Trade Organization: WTO) ในการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ประเทศไทยจำเป็นต้องยึดหลักการตามความตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures: SPS Agreement) มาตรการ SPS Agreement นี้ยึดหลักการทางวิทยาศาสตร์ และการประเมินความเสี่ยงเพื่อปกป้องสินค้าเกษตรจากศัตรูพืชที่ไม่เคยมีมาก่อน ซึ่งประเทศไทยมีการนำเข้าพืชจำนวนมากจากทั่วโลกในแต่ละปีและปัจจุบันประเทศไทยได้มีข้อตกลงเปิดการค้าเสรีกับหลายประเทศ มีการวางข้อกำหนดด้านคุณภาพของสินค้า ความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมาเป็นข้อกำหนดการนำเข้าสินค้า ดังนั้นแต่ละประเทศจำเป็นต้องมีข้อมูลด้านวิชาการที่ชัดเจนเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการเจรจาตกลงในเรื่องข้อกำหนดในแต่ละเรื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลด้านศัตรูพืชและการวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืช ที่จะถูกหยิบยกขึ้นมาเป็นเรื่องการกีดกันทางการนำเข้าได้เป็นอย่างดี ในระยะเวลาที่ผ่านมาประเทศไทยได้มีการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งมากกว่าปีละ 8,000-12,000 ตัน จากหลายประเทศ ทั้งจากประเทศออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา สก๊อตแลนด์ เป็นต้น เนื่องจากประเทศไทยไม่สามารถผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้ปลูก แต่จากการนำเข้าหัวพันธุ์จากต่างประเทศมีปัญหาการติดเชื้อไวรัสเข้ามา โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคของไวรัสที่ไม่เคยพบว่ามีรายงานในประเทศไทยมาก่อน จากที่มีการสั่งหัวพันธุ์เข้ามาเป็นจำนวนมากทำให้งานการตรวจจึงมีปริมาณมาก ทำให้การตรวจมีปัญหา ล่าช้า ซึ่งเกิดจากปริมาณตัวอย่างมีมาก และความล่าช้าจากการที่มันฝรั่งพักตัวนานจึงไม่มีหน่ออ่อนไปตรวจ และควรพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่สามารถตรวจไวรัสจากหัวพันธุ์โดยตรง รวมทั้งจากต้นที่ปลูกอยู่ในแปลงของเกษตรกร และเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจที่แม่นยำ สะดวกและรวดเร็ว จึงมีส่วนสำคัญมาก เพื่อเป็นการป้องกันการนำเข้าเชื้อไวรัสจากต่างประเทศเข้ามาภายในประเทศไทย ดังนั้นการตรวจสอบเชื้อไวรัสจึง จัดว่ามีความจำเป็นเพื่อป้องกันการระบาด และเพื่อสนับสนุนการตรวจวินิจฉัยโรคการจำแนกเชื้อสาเหตุอาจใช้วิธีการทางสรีรวิทยา สัญฐานวิทยา ซึ่งต้องใช้เวลาในการตรวจสอบ

สุรภีและคณะ(2533) ใช้วิธีและขั้นตอนการศึกษาจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสของกล้วยไม้และทำการแยกให้ได้ไวรัสที่บริสุทธิ์ นำไปผลิตแอนติซีรัมที่มีคุณภาพที่ดีแล้วทดลองนำวิธีการตรวจสอบแบบ NCM ELISA มาปรับใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่รวดเร็ว Gray *et.al.* (2003) สำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบด่างจากต้นมันฝรั่ง จำนวน 1,330 ต้น จาก 90 ฟาร์ม 300 ตัวอย่าง เก็บจากต้นมีอาการด่างอย่างชัดเจน และ 1,030 ตัวอย่าง สุ่มจากต้นทั่วๆ ไป และทำการตรวจทางเซรุ่มวิทยากับแอนติซีรัมของไวรัส 6 ชนิด ได้แก่ PVA, PVS, PVX, PVY, PVM และ PLRV ซึ่งในโปรแกรมการผลิตหัวพันธุ์รับรองได้ทำการตรวจสอบไวรัสทั้ง 6 ชนิด เพราะไวรัสทั้ง 6 ชนิดนี้ เป็นเชื้อไวรัสที่พบเสมอในแหล่งปลูกมันฝรั่งในสหรัฐอเมริกา ผลจากการสำรวจพบว่ามีการเข้าทำลาย

ของเชื้อ PVY สูงที่สุดมีการเข้าทำลายถึง 68% และ PVS 61% ส่วน PVX มีเพียง 10 % ส่วนไวรัสอื่นๆ มีน้อยกว่า 1% Salim Khan *at al.* (2003) ได้พัฒนาวิธีจำแนกไวรัสที่รวดเร็ว ในห้องทดลองกับมันฝรั่ง 6 พันธุ์คือ Cardinal, Diamant, Dhera, Multa, Cilena and Sieglinde โดยการปลูกเชื้อไวรัส PVA, PVY, PVV, PVM, PVS, PVX และ PLRV บนต้นมันฝรั่ง แล้วจำแนกด้วยวิธี DAS-ELISA เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ปลูกเชื้อ Tsuda *at al.*(1993) ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสหลายๆชนิดด้วยวิธีรวดเร็ว (multi RIPA) และตรวจสอบอย่างรวดเร็วเพียง 2 ขั้นตอน บนแผ่นรองรับ แบบ Lateral flow test Hochleitner and Kraus (2002) ได้พัฒนาวิธี Lateral flow test ใช้ Colloidal Gold เป็นวัสดุแสดงปฏิกิริยาในการทำ dipstick ตรวจสอบไวรัสโดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา

เพราะฉะนั้นวิธีการทางเซรุ่มวิทยาจึงเป็นวิธีที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะการผลิตแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงกับเชื้อ จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง เพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ และสามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจไวรัสต่อเชื้อนั้นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงหัวพันธุ์มันฝรั่งเพื่อให้ได้ต้นพันธุ์หรือหัวพันธุ์ที่มีคุณภาพและปลอดโรค และเพื่อเป็นการพัฒนาคุณภาพการผลิตในประเทศไทยให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- ยีนสังเคราะห์ ในส่วน coat protein gene (CP) ของ Potato virus A
- พลาสมิดพาหะ (cloning และ expression vectors)
- อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนของการโคลนยีน
- กระต่าย อุปกรณ์และสารเคมีในการผลิตแอนติซีรัม
- อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจสอบเชื้อ โดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา

วิธีการ

1. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene, CP)

1.1 สังเคราะห์ดีเอ็นเอและต่อเชื่อม (ligation) PCR product เข้าสู่ พลาสมิดพาหะ (plasmid vector)

ดำเนินการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วนของ coat protein gene (CP) ของ Potato virus A ขนาด 825 คู่เบส (bp) และทำการต่อเชื่อม (ligation) PCR product เข้าสู่พลาสมิดพาหะ (plasmid vector) โดยนำดีเอ็นเอสังเคราะห์ผสมกับโคลนนิ่งเวคเตอร์ pUC57 plasmid DNA GenScript, ขนาด 2710 bp 1 ไมโครลิตร และ salt solution 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2

ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นเติม competent cell 50 ไมโครลิตร (*E. coli*, DH5α) แช่ในน้ำแข็ง นาน 30 นาที แล้วทำการ heat shock cell โดยการแช่หลอดในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42 °ซ นาน 90 วินาที ก่อนย้ายไปแช่บนน้ำแข็งทันที อีก 5 นาที เติมอาหาร 2XYT ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่ 37 °ซ นาน 60 นาที ดูดมา 5 ไมโครลิตร และเทแผ่ (spread) ลงบนอาหารแข็ง 2XYT Agar (ที่มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร) บ่มที่ 37 °ซ ข้ามคืน

1.2 การสกัดโคลนของพลาสมิด และการเพิ่มจำนวนยีนโดยเทคนิค PCR

คัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง 2XYT โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT (มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมอยู่) เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่ 37 °ซ ข้ามคืน นำเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลว 1 มิลลิลิตร มาหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บตะกอนที่ได้มาละลายใน Solution I (25 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM glucose และ 10 mM EDTA) 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) 400 ไมโครลิตร เขย่าหลอดก่อนที่จะเติม Solution III (3 M potassium acetate pH 5.2) 3000 ไมโครลิตร และ chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 200 ไมโครลิตร เขย่าและแช่บนน้ำแข็ง 10 นาที แล้วนาไปหมุนเหวี่ยง ที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนของน้ำใสมาเติมด้วยหนึ่งเท่าโดยปริมาตรของ isopropanol และนาไปหมุนเหวี่ยง ที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol และหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม แล้วละลายตะกอนพลาสมิดด้วยน้ำ (มี RNase 2% ผสมอยู่) 50 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่ 37 °ซ นาน 30 นาที แล้วจึงนำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งตรวจเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การเพิ่มจำนวนยีนโดยเทคนิค PCR โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้ PCR Profile 25 µl /Reaction ด้วยเครื่อง Thermal cycler เพื่อสังเคราะห์ DNA ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ท ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที

1.3 การ subclone เข้าสู่ protein expression vector

นำ PCR produc ที่ได้จากข้อ 1.5 นำมาเชื่อมต่อ (ligation) เข้าสู่ expression vector pET200/D-TOPO (Invitrogen) และถ่ายเข้าสู่ (transformation) เข้า *E. coli* Top10 โดยใช้ $CaCl_2$ ที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที และแช่บนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนบนอาหาร 2XYT ที่มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมอยู่ (ขั้นตอนเหมือนข้อ 1.5) ตรวจสอบโคลนด้วยเทคนิค PCR และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง จากนั้น transform เข้า competent cell ของ *E. coli* BL21 (DES 3) โดยใช้ $CaCl_2$ ที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที และแช่บนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที คัดเลือกโคโลนีของพลาสมิดบนอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อนำไปสังเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนต่อไป

2. การวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนาการสังเคราะห์ recombinant proteinในเซลล์แบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DES 3) ที่มีพลาสมิดสายผสม pET200/D-TOPO (Invitrogen) ในอาหารเหลว 2XYT 100 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เขย่า 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น starter จากนั้นแบ่งใส่ในอาหารเหลว 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในอัตราส่วนของเชื้อ 10% ของอาหาร เขย่าต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงเชื้อต่อโดยการเขย่าบนเครื่อง shaker และเก็บตัวอย่างเซลล์หลังการเติม IPTG ที่ 2 4 6 8 และ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร นามาปั่นตกตะกอน ที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้าที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 50 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่ -20 °ซ จากนั้นแล้วเติม 2xSDS-PAGE sample buffer (0.125 Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 0.02% bromophenol blue R250, 5% β-Mercaptoethanol) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

3. การแยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

นำแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DES 3) ที่มีพลาสมิดสายผสม pET200/D-TOPO (Invitrogen) หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ที่เวลาอันเหมาะสมในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน มาปั่นตกตะกอนที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที (4 °ซ) นำตะกอนมาผสมกับน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ตะกอน 1 กรัม/น้ำ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นเติม lysozyme เพียงเล็กน้อยประมาณเท่าหัวไม้ขีดไฟ (ต่ออาหารเหลว 1 ลิตร) และกวนให้เข้ากันจนเหนียว เก็บที่ -20 °ซ ข้ามคืน จากนั้นนำมาเติมด้วย lysis buffer (Buffer B:50 mM NaH2PO4·H2O, 10 mM Tris-HCl (MW=121.1) และ 8 M Urea, pH 8.0) ในอัตรา 50 มิลลิลิตร/อาหารเหลว 1 ลิตร และนำมาทาให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator แบบ probe (power 45-50, cycle 50%) ครั้งละ 5 นาที จนกว่าเซลล์จะหายหนืดและใส แล้วนำไปปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที (4 °ซ) เก็บน้ำใสไปแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column (อัตรา 2 มิลลิลิตร/อาหารเหลว 1 ลิตร) เริ่มจากการล้าง column หลังแพ็คแล้ว ด้วย buffer B จากนั้นเทส่วนน้ำใสให้ผ่าน column และล้าง column ด้วย buffer C (pH 6.3) และ buffer D (pH 5.9) ก่อนที่จะใส่ buffer E (pH 3.9) เพื่อแยกโปรตีนออกจากเจลใน column เก็บเป็น fraction หลอดละ 500 ไมโครลิตร เพื่อนาไปตรวจสอบขนาดของโปรตีนว่าอยู่ใน fraction ใด โดยเทคนิค SDS-PAGE และคำนวณปริมาณโปรตีนที่ผ่าน column โดยใช้สูตรของ Bradford's

4. การผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง

ผสมโปรตีนของเชื้อที่บริสุทธิ์ (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) กับ complete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 ให้เข้ากันเป็น emulsion สำหรับการฉีดกระต่ายครั้งแรก และใช้ incomplete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 สำหรับการฉีดครั้งต่อๆ ไปอีก 4 ครั้ง การฉีดทุกครั้งเป็นการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บริเวณคอ ประมาณ 4-5 จุดต่อการฉีดแต่ละครั้ง ทำการฉีดทุก 2 สัปดาห์ เริ่มทำการเจาะเลือดที่เส้นเลือดบริเวณใบหู หลังจากการฉีดครั้งที่ 2 และดำเนินการเจาะเลือดทุก 1 สัปดาห์ อีก 6 ครั้ง น้ำเลือดที่เจาะได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บที่ 4 °ซ อีก 24 ชั่วโมง รินส่วนน้ำใสมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 g นาน 10 นาที เก็บน้ำใสที่เป็นส่วนของแอนติบอดีไว้ที่ -80 °ซ จากนั้นทำการทดสอบและหาค่าไทเทอร์ (titer) ของแอนติซีรัม โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากการหยอดแอนติเจน (recombinant protein 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS-T buffer (PBS + 0.05% Tween 20) 3 ครั้ง แล้วนำมาเติมด้วย Blocking buffer (1% BSA ใน PBS-T) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างอีก 3 ครั้ง ใส่แอนติบอดีที่ได้จากการเจาะเลือดกระต่าย 6 ครั้ง โดยทำการเจือจางจาก 1:10 ถึง 1:1,000,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทอีก 3 ครั้งก่อนนำมาหยอดด้วย Goat anti-rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase เจือจาง 1:2000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทอีก 3 ครั้งก่อนนำมาซับสเตรท p-nitrophenyl phosphstase หลุมละ 100 ไมโครลิตร อ่านผลด้วยเครื่องอ่าน ELISA ที่ค่าความดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร

5. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้

5.1 การตรวจสอบโรค *Potato virus* A โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากนำ positive ของ PVA มาบดใน coating buffer ในอัตรา 1 กรัม : 5, 10, 15 มิลลิลิตร แล้วหยอดลงในหลุมของไมโครเพลท (microplate) 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1-2 ชั่วโมง แล้วนำไมโครเพลทมาล้างด้วย phosphate buffer saline ที่มี tween 20 ผสมอยู่ (PBS-Tween 20) 3 ครั้งๆละ 3 นาที หยอดแอนติซีรัมจากการเลือดครั้งที่ 5 ที่เจือจางใน conjugate buffer 1:100 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย PBS-Tween 20 จานวน 3 ครั้งๆละ 3 นาที แล้วหยอด Goat-Anti Rabbit อัตรา 1: 2,000 ใน conjugate buffer 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง นำเพลทมาล้างอีก 3 ครั้งใน PBS-Tween 20 แล้วหยอด p-nitrophenyl phosphatase substrate (5 มิลลิกรัม/ substrate buffer 10 มิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร และอ่านผลด้วยเครื่องอ่านอิไลซา (ELISA Reader) โดยใช้เพลทชนิด polysorp microplate ของ Nunc

5.2 การตรวจสอบโรคใบด่างของมะเขือ โดยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA)

นำตัวอย่างใบมะเขือที่มีอาการใบด่างที่เป็นโรคและใบมะเขือปกติใส่ในถุงพลาสติก เติม Extraction buffer (0.02 M Tris, 0.2 M NaN3, 0.2% Na2SO3, pH 7.5) ในอัตราส่วน (ใบพืช : บัฟเฟอร์= 1:5) แล้วบดตัวอย่างให้ละเอียด ทำการวางรูปแบบของแผ่น Nitrocellulose membrane (NCM) ขนาด 0.45 µm ชนิด High bone N+ ด้วยการตีเป็นช่องตารางสี่เหลี่ยม (ขนาด 1X1 ตารางเซนติเมตร) ทำเครื่องหมายที่ตารางของตัวแผ่น NCM หัวท้ายเพื่อเรียงลำดับตัวอย่างจาก 1 ถึงตัวอย่างสุดท้าย นำแผ่น NCM พร้อมกับวางกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่ตัดให้มีขนาดพอดีกับแผ่น NCM แช่ใน TBS (0.02M Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.5) ประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นคีบแผ่นกระดาษกรองเบอร์ 1 ขึ้นมาพร้อมกับแผ่น NCM ที่แช่ไว้ด้วยกัน วางลงบนแผ่นกระดาษกรองแผ่นใหม่ที่แห้งและมีขนาดใหญ่กว่า โดยใช้ pasteur pipette ที่สะอาดรีดแผ่น NCM ให้แนบติดกับกระดาษกรอง ทำการหยดตัวอย่างน้ำคั้นพืช 1 หยด หรือประมาณ 20-25 ไมโครลิตร ลงในช่องตารางบนแผ่น NCM ตามรูปแบบที่วางไว้ เมื่อหยดตัวอย่างเสร็จแล้วคีบแผ่น NCM ออกมาวางบนกระดาษสะอาดผึ่งไว้ประมาณ 10-20 นาที นำแผ่นตัวอย่างที่แห้งแล้วแช่ลงในกล่องสี่เหลี่ยมที่มี blocking buffer (2% non fat milk ใน TBS pH 7.5) อยู่ 10 มิลลิลิตร + 0.8 มิลลิลิตร ของ 25% titonX100 แช่นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องหรือประมาณ 27-30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเท blocking buffer ออก ใส่ส่วนผสมของ IgG ของ EYMV-CP ที่ละลายอยู่ใน blocking buffer ใหม่ ในอัตรา 1:500 แช่แผ่น NCM นั้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องหรือประมาณ 27-30 องศาเซลเซียส แล้วจึงล้างแผ่น NCM ด้วย TBS-Tween 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที เทส่วนผสม Goat anti-rabbit conjugated Alkaline phosphatase (SIGMA A7778) ที่เจือจางเป็น 1:3000 ในสารละลาย blocking buffer จำนวน 10 มิลลิลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย TBS-Tween 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที แล้วเทส่วนผสม substrate (ละลาย 0.25% AS-MX จำนวน 1 มิลลิลิตร ใน 5 มิลลิลิตร ของ 0.2 M Tris HCl, pH 8.2 และละลายสาร Fast red TR-salt (FR-TR) ใน 6 มิลลิลิตร ของ 0.2 M Tris HCl, pH 8.2 เทส่วนผสมทั้ง 2 รวมกัน แล้วเทลงในกล่องแช่แผ่น NCM เขย่าเบาๆ) รอดูผลของปฏิกิริยาประมาณ 5-30 นาที เมื่อเกิดปฏิกิริยาเห็นสีชมพูชัดเจนแล้วเท substrate ออกแล้วเทน้ำกลั่นลงแทนเพื่อเป็นการล้างและหยุดปฏิกิริยา

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2556 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2558

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene, CP)

สังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วนของ coat protein gene (CP) ของ Potato virus A ได้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ ขนาด 825 คู่เบส (bp) และทำการต่อเชื่อม (ligation) ดีเอ็นเอสังเคราะห์เข้าสู่ expression vector pET200/D-TOPO (Invitrogen), ขนาด 5741 bp การตรวจสอบโคลนต่างๆ ของพลาสมิด หลังต่อเชื่อมกับดีเอ็นเอสังเคราะห์โดยการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส ด้วยเครื่อง Sequencer พบว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PVA-CP

2. การวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนาการสังเคราะห์ recombinant protein ในเซลล์แบคทีเรีย

หลังจากการเติมสาร IPTG เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ที่ 2 4 6 8 และ 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาตรวจหาระยะเวลาที่เริ่มมีการสังเคราะห์โปรตีนตั้งแต่ 4 ชั่วโมง และพบมากที่สุดที่ 8 ชั่วโมง โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE พบ band ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 กิโลดาลตัน

3. การแยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

จากการตรวจปริมาณโปรตีนหลังการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏว่า เริ่มพบ band ขนาด 25 กิโลดาลตัน ตั้งแต่ fraction ที่ 2-13 (F2-F13) แต่มีปริมาณโปรตีนสูงตั้งแต่ F3-F6 และจากการคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่สังเคราะห์ได้ พบว่ามีปริมาณ 1.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งนำไปผสมกับ Freund's adjuvant ครั้งละ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

4. การผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง

ดำเนินการฉีดกระต่าย จำนวน 5-6 ครั้ง และเจาะเลือดครั้งละประมาณ 30-40 มิลลิลิตร เพื่อ นำไปปั่น และเก็บน้ำใส ได้แอนติบอดีครั้งละ 10-15 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -80 °ซ ผลการตรวจสอบ คุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือด จำนวน 7 ครั้ง โดยวิธี indirect ELISA โดยทำการเจือ จางแอนติซีรัมจาก 1:10 ถึง 1:1,000,000 พบว่า แอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 5-7 มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยทำปฏิกิริยาได้จนถึง 1:10,000 ฉะนั้นเมื่อนำไปใช้ในการ ตรวจสอบ ต้องทำให้เจือจาง 1: 500 และ 1: 1,000

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การผลิตแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส *potato virus* A (PVA) โดยทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วน coat protein gene (CP) ของ *Potato virus* A ขนาด 825 คู่เบส (bp) และทำการต่อเชื่อม (ligation) PCR product เข้าสู่พลาสมิดพาหะ (plasmid vector) โดยนำดีเอ็นเอสังเคราะห์

ผสมกับเวคเตอร์ pET200/D-TOPO® (Invitrogen) และทำการคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอส่วนของ CP gene ที่ใส่เข้าไปใน vector นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี miniprep และส่งไปตรวจสอบลำดับเบส พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 825 bp หลังจากนั้น subclone ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PVA-CP เข้าสู่ protein expression vector (pET 200/D-TOPO) และ transform เข้า *E. coli* Top 10 และขณะนี้กำลังดำเนินการคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* BL21 ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร โดยทำการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนด้วย Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) พบว่าที่ระยะเวลาที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้สูงสุด คือ 24 ชั่วโมง โดยให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน จากการตรวจปริมาณโปรตีนหลังการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏว่า เริ่มพบ band ขนาด 28 กิโลดาลตันทุก fraction (fraction 2-9) จึงนำโปรตีนที่แยกได้นั้นจำนวน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไปฉีดเข้าใต้ผิวหนัง บริเวณสะโพกของกระต่าย โดยผสมกับ Freund's adjuvant ทุก 2 สัปดาห์ รวม 5-6 ครั้ง และเจาะเลือดเพื่อแยกแอนติบอดีออกมาจากเม็ดเลือดแดง ทดสอบไตเตอร์ของแอนติบอดีจากการเจาะเลือดแต่ละครั้ง พบว่า แอนติซีรัมที่เจาะครั้งที่ 5-7 มีไตเตอร์สูงสุด สามารถทำปฏิกิริยากับ recombinant protein (10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) ที่ใช้ฉีดสัตว์ทดลองได้จนถึง 1:10,000 จึงได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพแอนติซีรัมต่อไป ซึ่งยังอยู่ในระหว่างดำเนินการทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

สุรภี กีรติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร นวลจันทร์ ดีมา. 2533. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบโรค Cymbidium mosaic virus ของหวายลูกผสมและสาวน้อยเต้นระบำ. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2532. กองโรคพืชและ จุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 115-122.

Gray, S., K. Perry and P. Baldauf. 2003. Report of 2003 Research activities funded by the Maine Potato Board. Hochleitner,K. and Kraus, H. (2002) Introductory Workshop on Rapid Diagnostic Tests. BGM Company. Bangkok Thailand. 180 pp.

Salim Khan M., M. I. Hoque, R. H. Sarker and H.-P. Muehlbach. 2003. Detection of Important Plant Viruses in In vitro Regenerated Potato Plants by Double Antibody Sandwich Method of ELISA. Plant Tissue Cult. 13(1) : 21-29, 2003.

Tsuda,S.,Kameya-Iwaki,M.,Hanada,K.,Fujisawa,I. And Tomaru,K. 1993. Simultaneous Diagnosis for Plant Infected with Multiple Viruses Employing Rapid Immunofilter Paper Assay (RIPA) with two step Method; Multi RIPA. Annaul Phytopathology

การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ด้วยวิธี PCR-ELISA

Development of PCR-ELISA for detecting *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

วันเพ็ญ ศรีชาติ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ กาญจนา วาระวิชะนี
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

จากการพัฒนาเทคนิคการการตรวจสอบเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac.) ที่แยกได้จากผลแตงโม ด้วยวิธี PCR-ELISA และ วิธี direct-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ WFBA (F)/WFBA (R) พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 1 cfu/ml ซึ่งการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR-ELISA แสดงผลเป็นสีน้ำเงินชัดเจน แต่ส่วนการตรวจสอบด้วยวิธี direct PCR พบว่าแถบ ดีเอ็นเอเกิดบางๆ และการตรวจสอบเชื้อ Aac. ด้วยเทคนิค DAS-ELISA พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 10^2 cfu/ml และการตรวจสอบเชื้อทั้ง 3 วิธีข้างต้น สามารถตรวจเชื้อได้ที่ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 10^7 cfu/ml และไม่สามารถตรวจสอบเชื้อ Aac. ด้วยชุดตรวจวินิจฉัยโรคผลเน่าแบคทีเรีย ของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติได้ เมื่อเปรียบเทียบการตรวจสอบทั้ง 4 วิธีเบื้องต้น พบว่าเทคนิค PCR-ELISA สามารถตรวจเชื้อ Aac. ในปริมาณที่ต่ำได้ดีและให้ผลชัดเจนที่สุด ซึ่งเทคนิคนี้สามารถนำไปพัฒนาในการตรวจสอบเชื้อ Aac. ที่อาจปนเปื้อนในเมล็ดพันธุ์ในปริมาณที่ต่ำต่อไป

Abstract

The development for detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac.), isolated from watermelon fruits by the PCR-ELISA method and direct PCR method, the minimum detection sensitivity of WFBA (F)/WFBA (R) primers was approximately 1 cfu/ml which PCR-ELISA showed blue colour as clear result but direct PCR method showed as faint detect Aac. by Immunochromatographic strip test by the National Science and Technology Development Agency. The comparison of detection of Aac. by 4 prior methods showed band. The DAS-ELISA method detected the minimum concentration about 10^2 cfu/ml. The maximum detection concentration by 3 prior method were

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-04-00-02-56

about 10^7 cfu/ml and did not PCR-ELISA method is efficiently the best minimum detection and clear result. This method develope to detect low contamination of Aac. on seed.

Keyword: การตรวจวินิจฉัย พีซีอาร์-อีไลซ่า *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*
Detection, PCR-ELISA, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

คำนำ

โรคผลเน่า (Bacterial fruit blotch) ของพืชวงศ์แตง สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac.) เดิมคือเชื้อ *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* ซึ่งเชื้อนี้สามารถถ่ายทอดโรคทางเมล็ดพันธุ์ได้ ในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบโรคนี้ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2534 ในพื้นที่ปลูกแตงโมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ที่สำคัญเพื่อส่งออกไปจำหน่ายยังหลายประเทศ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ไต้หวันและญี่ปุ่น เป็นต้น ในการส่งออกต้องมีการรับรองการปลอดเชื้อโรคและศัตรูพืชที่สำคัญตามเงื่อนไขของประเทศปลายทาง โรคนี้เป็นปัญหาสำคัญในการผลิตและส่งออกเมล็ดพันธุ์ของพืชวงศ์แตงไปยังต่างประเทศ จากการศึกษาวิธีการตรวจสอบเชื้อ Aac. ใน เมล็ดพันธุ์แตงโมด้วยวิธี Immunomagnetic separation ร่วมกับ Polymerase Chain Reaction (PCR) (IMS-PCR) โดยการสังเคราะห์ ไพรเมอร์จากยีน 16S rRNA ซึ่งเทคนิคการตรวจสอบด้วยวิธีนี้สามารถตรวจจากน้ำล้างเมล็ดแตงโมที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 10 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร (Colony form unit/milliliter, cfu/ml) และตรวจสอบกับเมล็ดที่มีการปนเปื้อนเชื้อ 0.1% ได้ (Walcott, *et al.*, 2000) ซึ่งการตรวจสอบเชื้อสาเหตุเพื่อให้มั่นใจและสามารถตรวจกับตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของเชื้อในปริมาณที่น้อย เช่น การปนเปื้อนในเมล็ดพันธุ์ การใช้เทคนิค PCR ร่วมกับ ELISA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction-enzyme linked immunosorbent assay (PCR-ELISA) เป็นการพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความสามารถในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าที่ปนเปื้อนกับเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์แตงในปริมาณที่ต่ำๆ ได้ และเป็นการยืนยันการรับรองเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกได้ อีกทั้งสามารถ นำเทคนิคการตรวจสอบดังกล่าวไปปรับใช้กับการตรวจสอบเชื้อโรคที่เป็นศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์อื่นๆ ให้มีประสิทธิภาพต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ชุดสารเคมี พีซีอาร์ อีไลซ่า ดิกเลเบลลิ่ง
2. สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ ไพรเมอร์ และดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe)
3. ตัวอย่างเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

5. วัสดุและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ เช่น เครื่องแก้ว ไปเปรตดูดสาร อีไลซ่ารีดเดอร์ เป็นต้น

6. ชุดตรวจสอบ ELISA Kit สำหรับตรวจเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ของ Agdia

7. ชุดตรวจสอบของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

วิธีการ

1. การเตรียมเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli*

1.1 ไอโซเลทเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli*

ทำการขอความอนุเคราะห์เชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และจากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

1.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อ และการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli*

ทำการเพิ่มปริมาณ เชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* โดยทำการเกลี่ยขยายเชื้อบนอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วทำการบ่มเชื้อในอุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวบรวมสารแขวนลอยแบคทีเรียใส่ในบีกเกอร์ฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในจานหลุมอิไลซ่าแล้วนำไปตรวจด้วยเครื่องอ่าน อิไลซ่า ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ให้ได้ค่า 0.6 ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของสารแขวนลอยแบคทีเรียเท่ากับ 10^8 cfu/ml หลังจากนั้น ดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียใส่ในหลอด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วจึงนำหลอดที่ได้ใส่ใน Digestion heat block อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีแล้วนำหลอดแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 10 นาที หลังจากนั้นเก็บหลอดสารแขวนลอยแบคทีเรียในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำสารเขวนลอยแบคทีเรียใช้เป็น DNA template ทดสอบ ไพรเมอร์ต่อไป

2. การออกแบบและสังเคราะห์ลำดับเบสของไพรเมอร์ (primers) และการหาลำดับดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe) ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค PCR-ELISA

2.1 การคัดเลือกลำดับเบสของไพรเมอร์ (primers) และลำดับเบสดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe)

ทำการสืบค้นข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* แล้วนำไปทำการ Blast ใน เว็ปไซท์ (http://ncbi.nlm.nih.gov.) เพื่อหาลำดับเบสในตำแหน่ง PCR Product แล้วทำการเลือกลำดับเบสตรงกลางของ PCR Product เพื่อนำไปออกแบบดีเอ็นเอตัวตรวจสำหรับใช้ตรวจสอบในขั้นตอน ELISA และทำการสั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์และดีเอ็นเอตัวตรวจกับบริษัท

2.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ (primers)

2.2.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์กับเชื้อ Aac.

ทำการทดสอบประสิทธิภาพความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ ที่ได้จากข้อ 2.1กับเชื้อ Aac. ที่ได้จากข้อ 1.1 โดยทำการเตรียม PCR Mixer จำนวน 1 reaction ต่อตัวอย่าง

ดังนี้ 10x Taq buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 2mM dNTP mix ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 25mM $MgCl_2$ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, 10 µM forward primer ปริมาตร 0.63 ไมโครลิตร, 10 µM reverse primer ปริมาตร 0.63 ไมโครลิตร, nuclease-free water ปริมาตร 16.04 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase 5u/µl ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร, DNA template ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ซึ่งปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร) และทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามขั้นตอนดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95 องศาเซลเซียส	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	95 องศาเซลเซียส	30 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	65 องศาเซลเซียส	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72 องศาเซลเซียส	30 วินาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72 องศาเซลเซียส	5 นาที

โดยทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 72 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Eppendorf รุ่น Mastercycler ep) แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว นำ PCR product มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตโฟรซีสบน agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb เป็นตัวเปรียบเทียบ ทำการ run ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ (V) นาน 40 นาที แล้วจึงตรวจสอบแผ่นเจล โดยนำไปส่องดูภายใต้เครื่อง UV transilluminators (Bio-Rad รุ่น Gel doc XR system) ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร พร้อมทำการบันทึกภาพ และคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลชัดเจนนำไปทดสอบต่อ ข้อ 2.2.2

2.2.2 การปรับค่าของ Annealing temperature ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ที่คัดเลือกจาก 2.2.1

ทำการทดสอบปรับค่า Annealing temperature ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ที่ได้จากข้อ 2.1 กับเชื้อ Aac. ที่ได้จากข้อ 1.1 โดยการเตรียม PCR Mixer จำนวน 1 reactio ต่อตัวอย่าง ดังนี้ 10x Taq buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร , 2mM dNTP mix ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร , 25mM $MgCl_2$ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, 10 µM forward primer ปริมาตร 0.63 ไมโครลิตร, 10 µM reverse primer ปริมาตร 0.63 ไมโครลิตร, nuclease-free water ปริมาตร 16.04 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase 5u/µl ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร, DNA template ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ซึ่งปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร และนำสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามขั้นตอนดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95 องศาเซลเซียส	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	95 องศาเซลเซียส	30 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	อุณหภูมิต่างๆ	30 วินาที

4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72 องศาเซลเซียส	30 วินาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72 องศาเซลเซียส	5 นาที

โดยทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 72 องศาเซลเซียส ซึ่งในขั้นตอน annealing ปรับค่าให้เครื่องทำ gradient ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 61.1, 62.3, 63.2, 64.2, 65.2, 66.3, 67.2, 66.3 และ 68.9 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Eppendorf รุ่น Mastercycler ep) หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว นำ PCR product มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตโฟรซีสบน agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb เป็นตัวเปรียบเทียบ ทำการ run ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ (V) นาน 40 นาที แล้วจึงตรวจสอบแผ่นเจล โดยนำไปส่องดูภายใต้เครื่อง UV transilluminators (Bio-Rad รุ่น Gel doc XR system) ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร พร้อมทำการบันทึกภาพ

2.2.3 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์กับเชื้อต่างๆ

เมื่อได้อุณหภูมิที่เหมาะสมกับไพรเมอร์จาก ข้อ 2.2.2 ทำการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์กับเชื้อต่างๆ ได้แก่ Aac. (ไอโซเลท PSA1228), *Comamonas acidovorans*, *Fluorescent pseudomonas*, *Stenophotomonas* spp. และ Aac. (ไอโซเลทที่ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) โดยการเตรียม PCR Mixer จำนวน 1 reaction ต่อตัวอย่าง ดังนี้ 10x Taq buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 2mM dNTP mix ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 25mM $MgCl_2$ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, 10 µM forward primer ปริมาตร 0.63 ไมโครลิตร, 10 µM reverse primer ปริมาตร 0.63 ไมโครลิตร, nuclease-free water ปริมาตร 16.04 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase 5u/µl ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร, DNA template ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ซึ่งปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร และนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามขั้นตอนดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95 องศาเซลเซียส	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	95 องศาเซลเซียส	30 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	62 องศาเซลเซียส	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72 องศาเซลเซียส	30 วินาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72 องศาเซลเซียส	5 นาที

โดยทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 72 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Eppendorf รุ่น Mastercycler ep) หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว นำ PCR product มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตโฟรซีสบน agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb เป็นตัวเปรียบเทียบ ทำการ run ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ (V) นาน 40 นาที แล้วจึงตรวจสอบแผ่นเจล โดยนำไปส่องดูภายใต้เครื่อง UV

transilluminators (Bio-Rad รุ่น Gel doc XR system) ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร พร้อมทำการบันทึกภาพ

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค PCR-ELISA กับเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli*

3.1 การเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli*

ทำการเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Aac. (ไอโซเลท PSA1228) จำนวน 9 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 และ 10^8 cfu/ml โดยเตรียมหลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วจึงนำหลอดของสารแขวนลอยแบคทีเรียที่ได้ใส่ใน Digestion heat block อุณหภูมิ 95 องศา-เซลเซียส นาน 10 นาที แล้วย้ายหลอดแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 10 นาที หลังจากนั้นเก็บหลอดสารแขวนลอยแบคทีเรียในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น DNA template ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และชุดควบคุม (control) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

3.2.1 การติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทำการเตรียมตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.1 ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ส่วนหลอดที่เป็น Negative control ให้เติม nuclease-free water รวมทั้งหมด 10 ตัวอย่าง โดยการเตรียม PCR Mixer จำนวน 1 reaction ต่อตัวอย่าง ดังนี้ 10x PCR reaction buffer without $MgCl_2$ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 6 ไมโครลิตร, 2mM PCR DIG labeling mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, 10 µM forward primer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 10 µM reverse primer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, nuclease-free water ปริมาตร 64.5 ไมโครลิตร, Taq polymerase 5 u/µl ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, DNA template ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ซึ่งปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 100 ไมโครลิตร และทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามขั้นตอนดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95 องศาเซลเซียส	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	95 องศาเซลเซียส	30 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	62 องศาเซลเซียส	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72 องศาเซลเซียส	30 วินาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72 องศาเซลเซียส	5 นาที

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 72 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Eppendorf รุ่น Mastercycler ep) เก็บ PCR product ที่ได้ไปทดสอบในขั้นตอนที่ 3.3 ต่อไป

3.2.2 การติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์ในชุดควบคุม (control) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทำการเตรียมตัวอย่าง จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ positive control (Human control DNA 3 ng/µl) และ negative control (nuclease-free water) โดยการเตรียม PCR Mixer จำนวน 1 reaction ต่อตัวอย่าง ดังนี้ 10x PCR reaction buffer without $MgCl_2$ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, 2mM PCR DIG labeling mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, 125 pmol Control primer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, nuclease-free water ปริมาตร 55.5 ไมโครลิตร, Taq polymerase 5 u/µl ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, DNA template หรือ nuclease-free water ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ซึ่งปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 100 ไมโครลิตร และทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามขั้นตอนดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95 องศาเซลเซียส	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	95 องศาเซลเซียส	45 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	60 องศาเซลเซียส	1 นาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72 องศาเซลเซียส	2 นาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72 องศาเซลเซียส	10 นาที

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 72 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Eppendorf รุ่น Mastercycler ep) ทำการเก็บตัวอย่างสำหรับทดสอบในขั้นตอน 3.3 ต่อไป

3.3 การตรวจสอบ PCR product ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และชุดควบคุม (control) ด้วยเทคนิค ELISA

นำ PCR product ที่ได้จากข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 รวมทั้งหมด 12 ตัวอย่างนำมาตรวจสอบกับจานหลุม ELISA ที่มีการเคลือบสาร streptavidin แล้วทำ hybridization เชื่อมต่อ probe ที่ติดด้วยสารไบโอติน โดยทดสอบตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.3.1 เตรียมหลอด PCR product ได้แก่ ชุดควบคุม เชื้อทดสอบ และ Negative control ดูดสารละลายจากหลอด PCR ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสาร Denaturation solution หลอดละ 20 ไมโครลิตร และทำการผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงพอให้สารละลายผสมกัน หลังจากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 10-25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3.3.2 เติมสาร Hybridization solution ในหลอดข้อที่ 3.3.1 หลอดละ 225 ไมโครลิตร แล้วทำการผสมสารละลายด้วยเครื่อง vortex

3.3.3 ทำการดูดสารละลายที่เตรียมไว้แต่ละหลอดลงในจานหลุม ELISA (MTP strip) หลุมละ 200 ไมโครลิตร ปิดปากจานหลุมด้วยเทปกาว แล้วนำไปบ่มไว้ใน water bath shaker อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 70 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง

3.3.4 ทำการเตรียมสาร Anti-DIG-POD working solution : Conjugate dilution buffer เท่ากับ 1 vol : 99 vol. โดยเก็บไว้ที่มืด

3.3.5 เทสารละลายในข้อ 3.3.3 ทิ้งในอ่างล้าง และทำการล้างหลุม MTP strip ด้วย washing solution 3-5 ครั้ง ครั้งละ 250 ไมโครลิตร ต่อหลุม ครั้งสุดท้ายของการล้างให้ตบจานหลุมให้แห้งบนกระดาษ

3.3.6 เติมสารละลายในข้อ 3.3.4 ที่เตรียมไว้ หลุมละ 200 ไมโครลิตร และปิดปากจานหลุมด้วยเทปกาว แล้วห่อจานหลุมด้วยฟอยด์ และบ่มไว้ที่ water bath shaker อุณหภูมิ 37 องศา-เซลเซียส ความเร็ว 70 รอบต่อนาที นาน 30 นาที

3.3.7 เตรียมสารละลาย ABTS substrate solution ใช้ 1 เม็ด ของ ABTS ต่อ substrate buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเก็บสารละลายไว้ในที่มืด

3.3.8 ล้างจานหลุมเหมือนในข้อ 3.3.5

3.3.9 เติมสารละลาย ABTS ในข้อ 3.3.7 ใส่ในจานหลุมหลุมละ 200 ไมโครลิตร ปิดปากจานหลุมด้วยเทปกาว และห่อด้วยฟอยด์ บ่มไว้ที่ water bath shaker อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 70 รอบต่อนาที นาน 30 นาที

3.3.10 นำจานหลุม วัดค่าด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ค่าความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ทำการบันทึกผล

4. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบ เชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิคอื่นๆ ที่ระดับความเจือจางต่างๆ

ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิคอื่นๆ ที่ระดับความเจือจางต่างๆ ดังต่อไปนี้

4.1 การตรวจสอบเชื้อ *A.avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค direct-PCR

ทำการตรวจสอบตัวอย่างเชื้อที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.1 โดยทำการเตรียม PCR Mixer จำนวน 1 reaction ต่อตัวอย่าง ดังนี้ 10x Taq buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 2mMdNTP mix ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 25mM $MgCl_2$ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, 10 µM forward primer ปริมาตร 0.63 ไมโครลิตร, 10 µM reverse primer ปริมาตร 0.63 ไมโครลิตร, nuclease-free water ปริมาตร 16.04 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase 5u/µl ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร, DNA template ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ซึ่งปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร และทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามขั้นตอนดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ	เวลา
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95 องศาเซลเซียส	5 นาที
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	95 องศาเซลเซียส	30 วินาที
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	65 องศาเซลเซียส	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	72 องศาเซลเซียส	30 วินาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72 องศาเซลเซียส	5 นาที

โดยทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 72 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Eppendorf รุ่น Mastercycler ep) และทำการตรวจวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโตโฟรซีสบน agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb เป็นตัวเปรียบเทียบ ทำการ run ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ นาน 40 นาที แล้วจึงตรวจสอบแผ่นเจล โดยนำไปส่องดูภายใต้เครื่อง UV transilluminators (Bio Rad รุ่น Gel doc XR system) ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร พร้อมทำการบันทึกภาพ

4.2 การตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยชุดตรวจวินิจฉัยโรค ผลเน่าแบคทีเรีย ของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ โดยมีขั้นตอนดังนี้

4.2.1 ทำการเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 9 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 และ 10^8 cfu/ml โดยละลายสารแขวนลอยกับบัฟเฟอร์ของ ชุดตรวจหลอดละ 1 มิลลิลิตร

4.2.2 ใช้หลอดดูดสารละลายที่ได้หยดลงในช่องหยอดตัวอย่างบนชุดตรวจ โดยระวังอย่าให้ปริมาณของน้ำคั้นเกินขีดขาวของชุดตรวจ

4.2.3 ทำการอ่านผลหากเกิดแถบสีทั้ง test line และ control line แสดงว่ามีเชื้อ Aac. หรือถ้าเกิดแถบสีที่ control line อย่างเดียว แสดงว่าไม่มีเชื้อ Aac. ในตัวอย่าง ทำการบันทึกผลและบันทึกภาพ

4.3 การตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค DAS-ELISA (ชุดตรวจสอบของบริษัท Agdia) โดยมีขั้นตอน ดังนี้

4.3.1 ทำการเตรียม capture antibody เจือจางด้วย carbonate coating อัตรา 1:200 โดยหยอด capture antibody ในถาดหลุม ELISA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อหลุม

4.3.2 บ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

4.3.3 ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST 2 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

4.3.4 ทำการหยอดเชื้อสารแขวนลอยของเชื้อ Aac. ที่ความเข้มข้นต่างๆ รวมถึง negative control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

4.3.5 ทำการล้างจานหลุมด้วย 1xPBST จำนวน 7 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

4.3.6 ทำการเตรียมสาร alkaline phosphatase enzyme conjugate เจือจางด้วย RUB3 buffer อัตรา 1:200 โดยหยอดหลุมละ 100 ไมโครลิตร (ควรเตรียม 10 นาทีก่อนใช้งาน) แล้วบ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4.3.7 ทำการล้างจานหลุมด้วย 1xPBST 7 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

4.3.8 ทำการเตรียมสาร p-nitrophenyl phosphate (PNP) tablet จำนวน 1 เม็ด เจือจางด้วย PNP buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเก็บสารละลายไว้ในที่มืด จน PNP tablet ละลายหมด แล้วจึงหยอดสาร PNP solution หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มจานหลุมในอุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวัดเครื่องอ่านอิไลซ่า (Tecan Sunrise) ที่ความยาวคลื่น 405 (OD_{405}) และทำการบันทึกผล

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา (เริ่มต้น-สิ้นสุด) ตุลาคม 2555 – กันยายน 2557 (2 ปี)

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเตรียมเชื้อ *A. avenae subsp. citrulli*

ได้ขอความอนุเคราะห์เชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* จำนวน 2 ไอโซเลท คือ เชื้อที่ได้จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 1 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผลเมลอน (Aac001) และจากกลุ่มงานแบคทีเรีย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จำนวน 1 ไอโซเลท ที่แยกได้จากผลแตงโม (PSA1228)

2. การออกแบบและสังเคราะห์ลำดับเบสของไพรเมอร์ (primers) และการหาลำดับดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe) ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค PCR-ELISA

2.1 การคัดเลือกลำดับเบสของไพรเมอร์ (primers) และลำดับเบสดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe)

- **ไพรเมอร์ (primers)** ที่ได้จากการสืบค้นข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ได้แก่

คู่ที่ 1 สืบค้นจากรายงานของ Walcott and Gitaitis (2000)

WFB1 (F) 5'-GAC CAG CCA CAC TGG GAC-3'

WEB2 (R) 5'-CTG CCG TAC TCC AGC GAT-3'

PCR product size มีค่าเท่ากับ 360 bp

คู่ที่ 2 ได้จากการปรับไพรเมอร์ของ Walcott and Gitaitis (2000) หลังจากนำไป Blast ใน เว็ปไซท์ (http://ncbi.nlm.nih.gov.) เพื่อหาลำดับเบสในตำแหน่ง PCR Product

WFBA (F) 5'-CGA CCA GCC ACA CTG GGA -3'

WFBA (R) 5'- CCT CTG CCG TAC TCC AGC G-3'

PCR product size มีค่าเท่ากับ 364 bp

- ลำดับเบสดีเอ็นเอตัวตรวจ (probe)

Probe 5'-BIO-CCG TAA GAA TAA GCA CCG GC-3'

2.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ (primers)

2.2.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์กับเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli*

ทำการตรวจสอบเชื้อ Aac.จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ Aac001 และ PSA1228 ไอโซเลทละ 2 ความเข้มข้น ได้แก่ 10^7 และ 10^8 cfu/ml ทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 2 คู่ ได้แก่ WFB1(F)/WEB2(R) และ WFBA(F)/WFBA(R) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า ไพรเมอร์คู่ WFB1(F)/WEB2(R) สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท ของสารแขวนลอยแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml ได้อย่างชัดเจน ส่วนเชื้อ Aac. ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml พบว่า เชื้อไอโซเลท Aac001 เห็นแถบดีเอ็นเอบางๆ ส่วน ไอโซเลท PSA1228 ไม่เห็นแถบดีเอ็นเอ

ส่วนไพรเมอร์คู่ WFBA(F)/WFBA(R) พบว่า สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท ที่ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml ได้อย่างชัดเจน เช่นเดียวกับไพรเมอร์คู่แรก แต่เชื้อที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml เห็นแถบดีเอ็นเอของไอโซเลท Aac001 ชัดเจน ส่วนไอโซเลท PSA1228 สามารถเห็นได้บางๆ (Figure 1)

2.2.2 การปรับค่าของ Annealing temperature ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ที่คัดเลือกจาก 2.2.1

จากการทดสอบปรับค่าของ Annealing temperature อุณหภูมิที่ระดับต่างๆ กับไพรเมอร์ จำนวน 2 คู่ ได้แก่ WFB1(F)/WEB2(R) และ WFBA(F)/WFBA(R) ในการตรวจสอบเชื้อ Aac. (ไอโซเลท PSA1228 ที่สารแขวนลอยแบคทีเรียเข้มข้น 10^7 cfu/ml) ผลปรากฏว่า การทดสอบไพรเมอร์ WFB1(F)/WEB2(R) สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอของเชื้อทุกอุณหภูมิที่ทดสอบ ส่วนไพรเมอร์ WFBA(F)/WFBA(R) พบว่า แถบดีเอ็นเอที่เกิดชัดเจนที่สุด ได้แก่ Annealing temperature ที่อุณหภูมิ 62.3 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับไพรเมอร์คู่นี้ (Figure 2) ดังนั้น จึงใช้อุณหภูมินี้ในขั้นตอนต่อไป

2.2.3 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์กับเชื้อต่างๆ

จากการตรวจสอบไพรเมอร์ 2 คู่ ได้แก่ WFB1(F)/WEB2(R) และ WFBA(F)/WFBA(R) ในระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในข้อ 2.2.2 คือ 62 องศาเซลเซียส กับเชื้อทดสอบต่างๆ พบว่า ไพรเมอร์ WFB1(F)/WEB2(R) พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ Aac. ทั้งสองไอโซเลท คือ PSA1228 และ ไอโซเลทที่ได้จากได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 360 bp และเชื้อ *Comamonas acidovorans* ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าประมาณ 400 bp ส่วนการทดสอบไพรเมอร์ WFBA(F)/WFBA(R) พบเกิดแถบดีเอ็นเอของเชื้อ Aac. ทั้งสองไอโซเลท คือ PSA1228 และ ไอโซเลทที่ได้จากได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ซึ่งมีขนาดประมาณ 364 bp ส่วนเชื้ออื่นๆ ไม่พบแถบดีเอ็นเอบน agarose gel แสดงว่าไพรเมอร์ทั้งสองคู่สามารถตรวจหาเชื้อ Aac. ได้ดี แต่ไพรเมอร์คู่ WFB1(F)/WEB2(R) อาจตรวจพบเชื้อ *Comamonas acidovorans* ได้ ซึ่งจะมีขนาดที่ต่างกับเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ได้ (Figure 3)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค PCR-ELISA กับเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli*

3.1 การเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli*

ได้สารแขวนลอยเชื้อ Aac. (ไอโซเลท PSA1228) จำนวน 9 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 และ 10^8 cfu/ml จำนวน 9 ตัวอย่าง

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และชุดควบคุม (control) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

3.2.1 การติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ได้ PCR product จำนวน 10 ตัวอย่าง ของสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท PSA1228 จำนวน 9 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 และ 10^8 cfu/ml และ 1 ตัวอย่าง ที่เป็น Negative control เพื่อใช้ตรวจสอบต่อในขั้นตอน 3.3 ต่อไป

3.2.2 การติดฉลากด้วยสาร digoxigenin (DIG) กับไพรเมอร์ในชุดควบคุม (control) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ได้ PCR product ของชุดควบคุม จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ positive control และ negative control เพื่อใช้ตรวจสอบต่อในขั้นตอน 3.3 ต่อไป

3.3 การตรวจสอบ PCR product ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* และชุดควบคุม (control) ด้วยเทคนิค ELISA

จากการตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค ELISA พบว่า ในหลุมที่ใส่ตัวอย่างของสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 8 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 และ 10^7 cfu/ml รวมถึงหลุมที่เป็น positive control แสดงผลบวกชัดเจน (แสดงสีน้ำเงินม่วง) ส่วนหลุมที่ใส่ตัวอย่างของสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml, ตัวอย่าง negative (ที่ได้

จากข้อ 3.2.1) และ negative control (ที่ได้จากข้อ 3.2.2) แสดงผลเป็นลบ (แสดงสีใส) แสดงว่าการตรวจด้วยเทคนิค PCR-ELISA สามารถตรวจเชื้อนี้ได้ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 1 cfu/ml และความเข้มข้นสูงสุดที่ตรวจได้คือ 10^7 cfu/ml (Figure 4) ซึ่งการตรวจสอบเชื้อด้วยวิธีการนี้สามารถตรวจเชื้อได้ในความเข้มข้นต่ำกว่ารายงานของ Ha *et al.* (2009) ที่ทำการตรวจสอบเชื้อนี้ด้วยเทคนิค Magnetic Capture Hybridization multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction (MCH multiplex real-time PCR assay) ซึ่งตรวจเชื้อได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 10 cfu/ml

4. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบ เชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค PCR-ELISA กับเทคนิคอื่นๆ

ผลจากการตรวจสอบเชื้อ Aac. ด้วยเทคนิคอื่นๆ กับสารแขวนลอยแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังต่อไปนี้

4.1 การตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค direct-PCR

จากการตรวจสอบเชื้อ Aac. (ไอโซเลท PSA1228) โดยใช้ไพรเมอร์ WFBA(F)/WFBA(R) ด้วยเทคนิค direct-PCR พบว่า สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาร 364 bp ของสารแขวนลอยแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น คือ 1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 และ 10^7 cfu/ml ซึ่งที่ความเข้มข้น 1 cfu/ml ของเชื้อเห็นแถบดีเอ็นเอแบบจางๆ แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ Aac. ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml และ Negative Control แสดงว่าการตรวจด้วยเทคนิคนี้สามารถตรวจเชื้อ Aac. ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 1 cfu/ml และความเข้มข้นสูงสุดที่ตรวจได้ คือ 10^7 cfu/ml (Figure 5)

4.2 การตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยชุดตรวจวินิจฉัยโรคผลเน่าแบคทีเรีย ของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

จากการตรวจสอบสารแขวนลอยของเชื้อ Aac. (ไอโซเลท PSA1228) จำนวน 9 ความเข้มข้น ด้วยชุดตรวจวินิจฉัยโรคผลเน่าแบคทีเรียของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ พบว่าแถบ Test line ไม่เกิด Positive กับทุกความเข้มข้นของเชื้อที่ทดสอบ ส่วนแถบ Control line ขึ้นแถบปกติ แสดงว่า ชุดตรวจวินิจฉัยโรคผลเน่าแบคทีเรีย อาจไม่สามารถตรวจเชื้อที่ความเข้มข้นที่ทดสอบได้ (Figure 6) ซึ่งไม่ตรงกับในเอกสารประกอบ ซึ่งชุดตรวจนี้สามารถตรวจเชื้อนี้ได้ที่ความเข้มข้น $5x10^5$ cfu/ml (อรประไพ, 2557)

4.3 การตรวจสอบเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ด้วยเทคนิค DAS-ELISA (ชุดตรวจสอบของบริษัท Agdia)

จากการตรวจสอบสารแขวนลอยเชื้อ Aac. (ไอโซเลท PSA1228) ด้วยเทคนิค DAS-ELISA (ชุดตรวจสอบของบริษัท Agdia) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลปรากฏว่า สารแขวนลอยแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 และ 10^7 cfu/ml ให้ผลบวก (เกิด

สารละลายเป็นสีเหลือง) แต่ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 10^8 cfu/ml และ Negative control ให้ผลลบ (สารละลายสีใส) แสดงว่าการตรวจด้วยเทคนิคนี้สามารถตรวจกับเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 10^2 cfu/ml และความเข้มข้นสูงสุดที่ตรวจได้ คือ 10^7 cfu/ml ได้ (Figure 7)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการพัฒนาเทคนิคการการตรวจสอบเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac.) แยกได้จากผลแตงโม ด้วยวิธี PCR-ELISA โดยใช้ไพรเมอร์ WFBA (F)/WFBA (R) (WFBA (F) 5'-CGA CCA GCC ACA CTG GGA -3'/ WFBA (R) 5'- CCT CTG CCG TAC TCC AGC G-3') และ Probe จำนวน 1 เส้น คือ 5'-BIO-CCG TAA GAA TAA GCA CCG GC-3' พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ Aac. ได้อย่าง จำเพาะเจาะจง ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 1 cfu/ml ซึ่งแสดงผลสีน้ำเงินชัดเจน และเมื่อตรวจสอบเชื้อ Aac. ด้วยวิธี direct-PCR สามารถตรวจสอบเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 1 cfu/ml เช่นกันแต่พบว่า แถบดีเอ็นเอที่เกิดเป็นแถบจางๆ ส่วนการตรวจสอบเชื้อ Aac. ด้วยเทคนิค DAS-ELISA พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 10^2 cfu/ml ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบทั้ง 3 เทคนิคเบื้องต้น พบว่าเทคนิค PCR-ELISA สามารถตรวจเชื้อ Aac. ได้ที่ความเข้มข้นของเชื้อต่ำสุดและให้ผลชัดเจนที่สุด รองลงมาคือ เทคนิค direct-PCR และจากการตรวจสอบเชื้อ Aac. ทั้ง 3 เทคนิคข้างต้นสามารถตรวจสอบเชื้อได้ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10^7 cfu/ml ในส่วนการตรวจสอบเชื้อ Aac. ด้วยชุดตรวจวินิจฉัยโรคผลเน่าแบคทีเรีย ของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ไม่พบเชื้อ Aac. กับชุดตรวจ

เอกสารอ้างอิง

ประภาษ กาวิชา เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และ พิศาล ศิริธร . 2545. **ความหลากหลายของเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ในเขตผลิตแตงของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ**. หน้า 415-430. *ใน* การสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2545, วันที่ 28-29 มกราคม 2545 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

พยอม พินยพงค์. 2537. **รายงานครั้งแรกของโรคผลเน่า (Bacterial fruit blotch) ของแตงโมในประเทศไทย**. แก่นเกษตร 22 : 55-57.

เพชรรัตน์ ศิริวงศ์ และประภาษ กาวิชา. 2541. **โรคผลเน่าแตงโมของพืชวงศ์แตงในประเทศไทย**. หน้า 34-45. *ใน* รายงานการสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2543. วันที่ 24-25 มกราคม 2543 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

อรประไพ คชนันทน์. 2557. **ชุดตรวจแบบง่ายที่ใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) สำหรับพืชตระกูลแตง.** สำนักงานจัดการสิทธิเทคโนโลยี. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล :

http://www.nstda.or.th/tlo/inside.php?option=view_technology&id=12 (25 ธันวาคม 2557)

Babadoost, M., and N. Pataky. 2002. **First Report of Bacterial Fruit of Watermelon Caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Illinois**. Plant Dis. 86:443.

Evans, T.A., and R. P. Mulrooney. 1991. **First report of watermelon fruit blotch in Delaware**. Plant Dis. 73: 1074.

Feng, J.J., J.Q. Li., R.R. Walcott, G.M. Zhang, L.X. Luo, L. Kang, Y. Zheng and N.W. Schaad. 2013. **Advances in detection of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbits**. Seed Sci. & Technol., 41, 1-15.

Frankle, W.G., D.L. Hopkins and R.E. Stall. 1993. **Ingress of the watermelon fruit blotch bacterium into fruit**. Plant Dis. 77: 1090-1092.

Ha Y., A. Fessehaie, K. S. Ling, W. P. Wechter, A. P. Keinath, and R. R. Walcott. 2009. **Simultaneous Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Didymella bryoniae* in Cucurbit Seedlots Using Magnetic Capture Hybridization and Real-Time Polymerase Chain Reaction.** The American Phytopathological Society. (online) . Available. http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-99-6-0666 (March 20, 2015).

Isakeit, T., M.C. Black, L.W. Barnes and J.B. Jones. 1997. **First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*.** Plant Dis. 81: 694.

Oya, H.I, H.I. Nakagawa, N.I. Saito, H.I. Uematsu and T.I. OHARA. 2008. **Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from seed using LAMP method**. Jpn. J. Phytopathol. 74: 304–310.

Pinyapong, P.S. 1994. **Etiology and factors affecting the development of fruit blotch of watermelon (*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum&Nakai) in Northeastern Thailand**. M.S. Thesis. University of the Philippines at Los Banos. 99 pp.

Rane, K.K. and R.X. Latin 1992. **Bacterial fruit blotch of watermelon : association of the pathogen with seed**. Plant Dis. 76: 509-512.

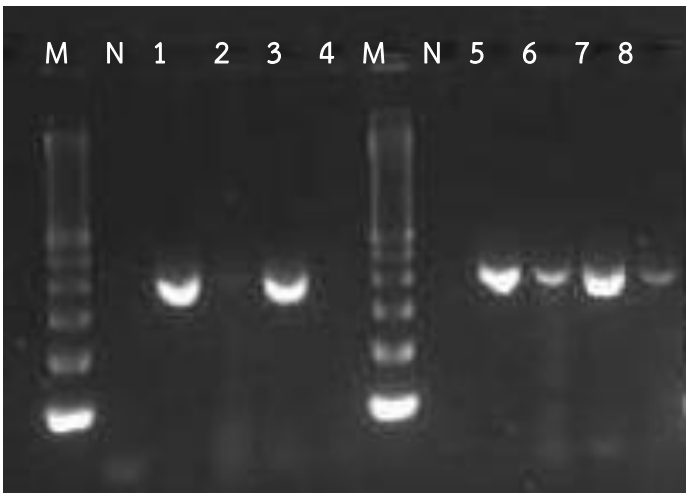
Somodi, G.C., J.B. Jones, D.L. Hopkins, R.E. Stall, T.A. Kucharek, N.C. Hodge and J.C. Watterson. 1991. **Occurrence of bacterial watermelon fruit blotch in Florida**. Plant Dis. 75: 1053-1056.

Walcott, R. R., and R. D. Gitaitis. 2000. **Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction.** Plant Dis. 84:470-474.

Walcott, R.R., A.C. Castro, A.C. Fessehaie and K. Ling. 2006. **Progress towards a commercial PCR-based seed assay for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli***. Seed Science and Technology, 34, 101-106.

Zitter, T.A., D.L. Hopkins and C.E. Thomas. 1996. **Bacterial fruit blotch in Compendium of Cucurbit Disease**. The America Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota . 34-35 p.

ภาคผนวก



M = Marker 1-kb ladder

N = Negative control (distill water)

1 = Aac001 isolate, cell suspensions containing 10^7 cfu/ml, WFB1 (F) / WEB2 (R) primers

2 = Aac001 isolate, cell suspensions containing 10^8 cfu/ml, WFB1 (F) / WEB2 (R) primers

3 = PSA1228 isolate, cell suspensions containing 10^7 cfu/ml, WFB1 (F) / WEB2 (R) primers

4 = PSA1228 isolate, cell suspensions containing 10^8 cfu/ml, WFB1 (F) / WEB2 (R) primers

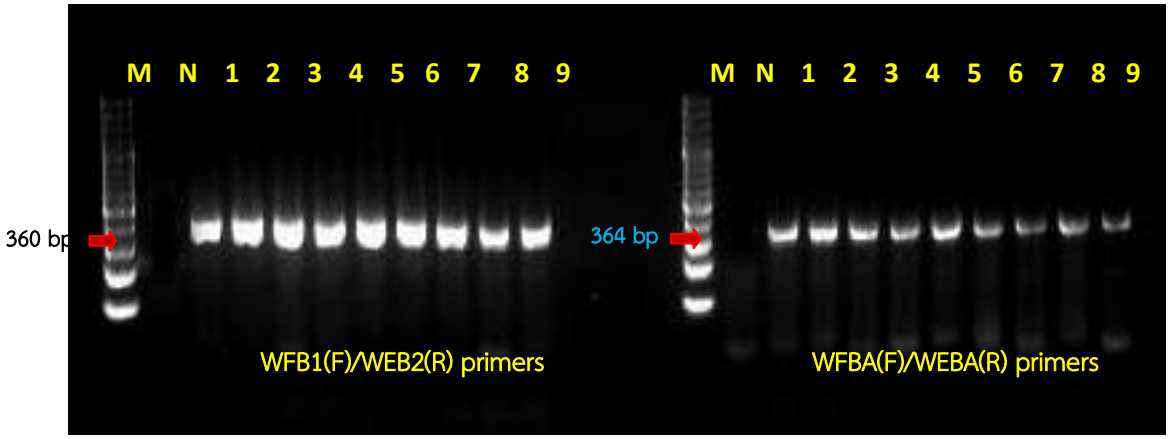
5 = Aac001 isolate, cell suspensions containing 10^7 cfu/ml, WFBA (F)/WFBA (R) primers

6 = Aac001 isolate, cell suspensions containing 10^8 cfu/ml, WFBA (F)/WFBA (R) primers

7 = PSA1228 isolate, cell suspensions containing 10^7 cfu/ml, WFBA (F)/WFBA (R) primers

8 = PSA1228 isolate, cell suspensions containing 10^8 cfu/ml, WFBA (F)/WFBA (R) primers

Figure 1. Comparison of detection among 2 primers sets and 2 concentrations with 2 isolates of *A. avenae* subsp. *citrulli* for direct polymerase chain reaction (PCR).



M : Marker

N : negative control (distill water)

1 : Annealing temperature 61.1 degree celsius

2 : Annealing temperature 62.3 degree celsius

3 : Annealing temperature 63.2 degree celsius

4 : Annealing temperature 64.2 degree celsius

5 : Annealing temperature 65.2 degree celsius

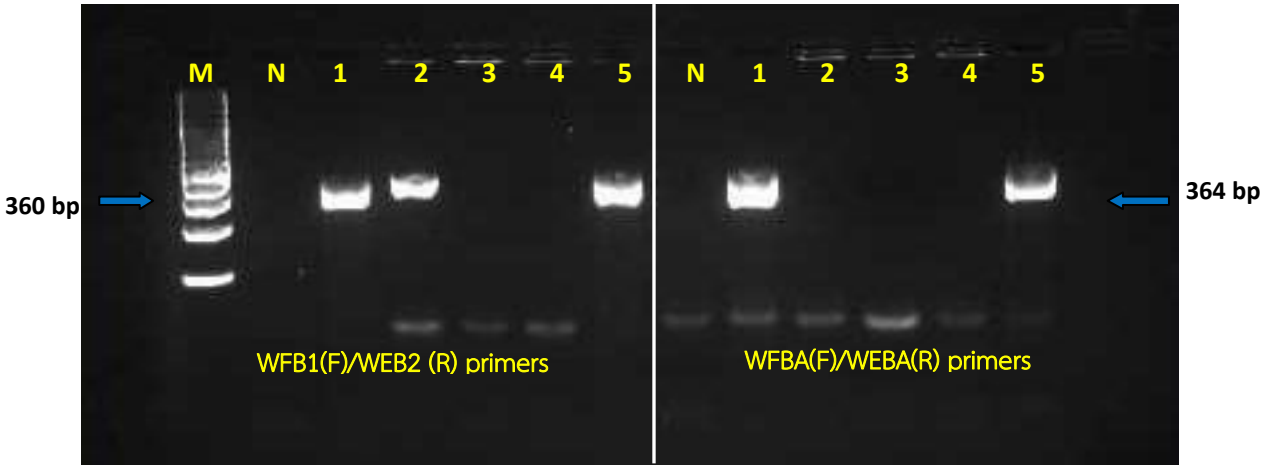
6 : Annealing temperature 66.3 degree celsius

7 : Annealing temperature 67.2 degree celsius

8 : Annealing temperature 66.3 degree celsius

9 : Annealing temperature 68.9 degree celsius

Figure 2. Comparison of gradient annealing temperatures among 2 primer sets with Aac. (PSA1228 isolate) cell suspensions containing 10^7 cfu/ml for direct polymerase chain reaction (direct-PCR).



M : Marker

N : negative control (distill water)

1 : *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (PSA1228 isolate)

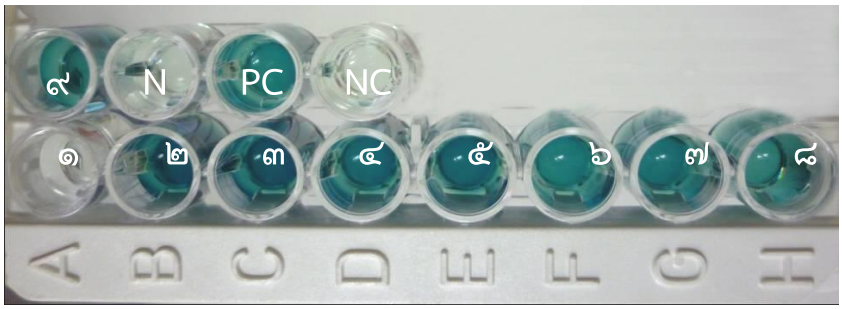
2 : *Comamonas acidovorans*

3 : *Fluorescent pseudomonas*

4 : *Stenophotomonas* spp.

5 : *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (isolate of National Center for Genetic Engineering and Biotechnology)

Figure 3. Comparison of detection of among 2 primer sets with Aac. (PSA1228 isolate) for direct polymerase chain reaction (direct-PCR) of various pathogen.



1 : Cell suspensions containing 10^8 cfu/ml of PSA1228 isolate

2: Cell suspensions containing 10^7 cfu/ml of PSA1228 isolate

3 : Cell suspensions containing 10^6 cfu/ml of PSA1228 isolate

4 : Cell suspensions containing 10^5 cfu/ml of PSA1228 isolate

5 : Cell suspensions containing 10^4 cfu/ml of PSA1228 isolate

6 : Cell suspensions containing 10^3 cfu/ml of PSA1228 isolate

7 : Cell suspensions containing 10^2 cfu/ml of PSA1228 isolate

8 : Cell suspensions containing 10 cfu/ml of PSA1228 isolate

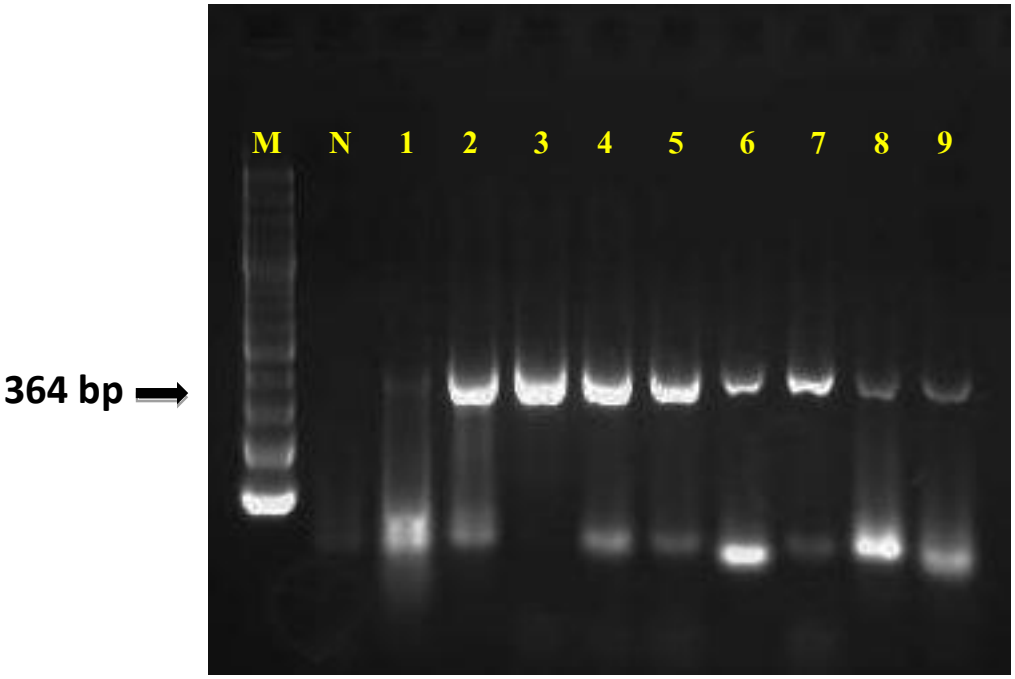
9 : Cell suspensions containing 1 cfu/ml of PSA1228 isolate

N : Negative control (distill water)

PC: Positive control of PCR product control

NC: Negative control (distill water) of PCR product control

Figure 4. Comparison of the ability of PCR-ELISA method to detect of Aac. (PSA1228 isolate) concentration.



1 : Cell suspensions containing 10^8 cfu/ml of PSA1228 isolate

2: Cell suspensions containing 10^7 cfu/ml of PSA1228 isolate

3 : Cell suspensions containing 10^6 cfu/ml of PSA1228 isolate

4 : Cell suspensions containing 10^5 cfu/ml of PSA1228 isolate

5 : Cell suspensions containing 10^4 cfu/ml of PSA1228 isolate

6 : Cell suspensions containing 10^3 cfu/ml of PSA1228 isolate

7 : Cell suspensions containing 10^2 cfu/ml of PSA1228 isolate

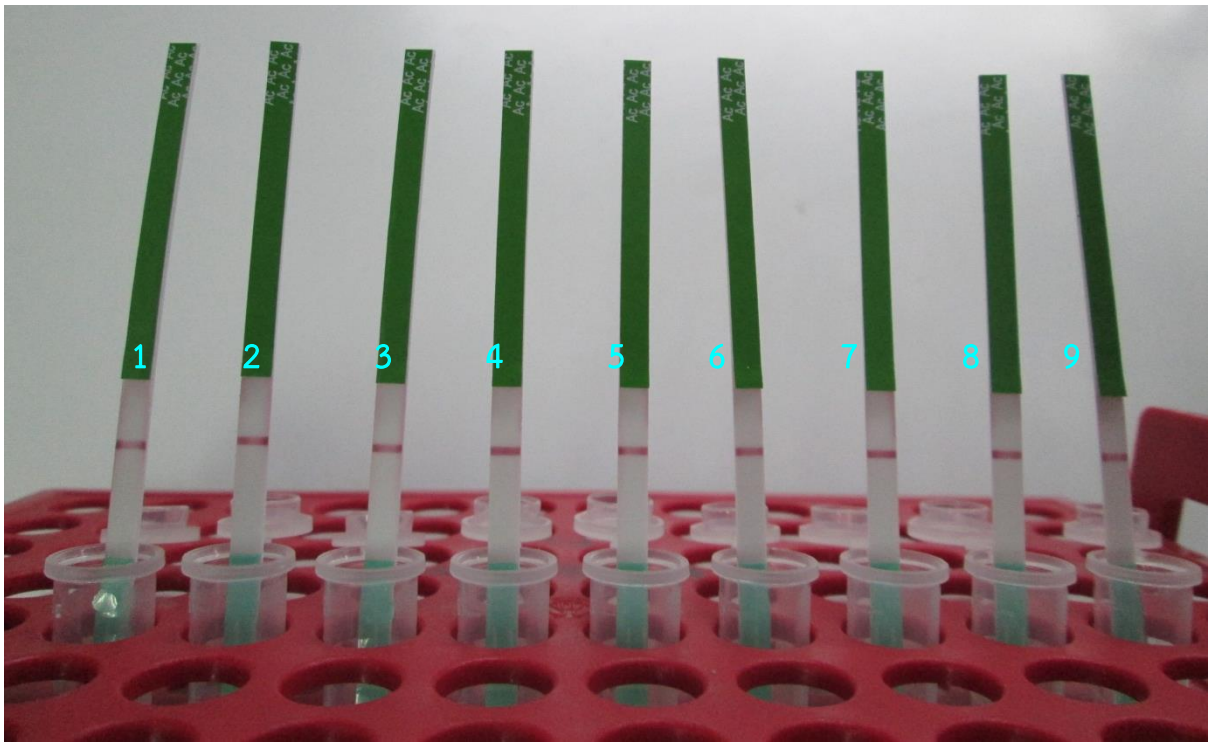
8 : Cell suspensions containing 10 cfu/ml of PSA1228 isolate

9 : Cell suspensions containing 1 cfu/ml of PSA1228 isolate

M : Marker

N: Buffer

Figure 5. Comparison of the ability of direct-PCR method to detect of Aac. (PSA1228 isolate) concentration.



1 : Cell suspensions containing 10^8 cfu/ml of PSA1228 isolate

2: Cell suspensions containing 10^7 cfu/ml of PSA1228 isolate

3 : Cell suspensions containing 10^6 cfu/ml of PSA1228 isolate

4 : Cell suspensions containing 10^5 cfu/ml of PSA1228 isolate

5 : Cell suspensions containing 10^4 cfu/ml of PSA1228 isolate

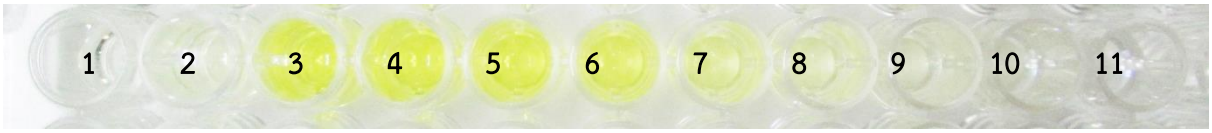
6 : Cell suspensions containing 10^3 cfu/ml of PSA1228 isolate

7 : Cell suspensions containing 10^2 cfu/ml of PSA1228 isolate

8 : Cell suspensions containing 10 cfu/ml of PSA1228 isolate

9 : Cell suspensions containing 1 cfu/ml of PSA1228 isolate

Figure 6. Comparison of the ability of Immunochromatographic Strip Test by the National Science and Technology Development Agency to detect of Aac. (PSA1228 isolate) concentration.



1 : Buffer

2 : Negative control (distill water)

3 : Cell suspensions containing 10^8 cfu/ml of PSA1228 isolate

4 : Cell suspensions containing 10^7 cfu/ml of PSA1228 isolate

5 : Cell suspensions containing 10^6 cfu/ml of PSA1228 isolate

6 : Cell suspensions containing 10^5 cfu/ml of PSA1228 isolate

7 : Cell suspensions containing 10^4 cfu/ml of PSA1228 isolate

8 : Cell suspensions containing 10^3 cfu/ml of PSA1228 isolate

9 : Cell suspensions containing 10^2 cfu/ml of PSA1228 isolate

10 : Cell suspensions containing 10 cfu/ml of PSA1228 isolate

11 : Cell suspensions containing 1 cfu/ml of PSA1228 isolate

Figure 7. Comparison of the ability of DAS-ELISA method (Agdia) to detect of Aac. (PSA1228 isolate) concentration.

ศึกษาอิทธิพลของความชื้นสัมพัทธ์ต่อการตายของแมลงวันผลไม้ oriental fruit fly (Diptera : Tephritidae) หนอนวัยที่ 1 ในผลมะละกอต่อวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์

Influence of Relative Humidity on Mortality of Oriental Fruit Fly, (Diptera : Tephritidae) First instar Larvae in Papaya Subjected to Modified Vapor Heat Treatment

มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์[1/] วลัยกร รัตนเดชากุล[1/] ชัยณรัตน์ สนศิริ[1/]
สลักจิต พานคำ[1/] ชุติมา อ้อมกิ่ง[1/] และอุดร อุณหวุฒิ[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
[2/]สำนักผู้เชี่ยวชาญ กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

หลังจากประเทศไทยได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) เป็นวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช (quarantine treatment) เพื่อใช้กำจัดแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* species complex ในผลมะม่วง, มังคุด และส้มโอ ก่อนส่งออกโดยไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของผลไม้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราการตายของแมลงวันผลไม้ oriental fruit fly, *B. dorsalis* (Hendel) ระยะหนอนวัยที่ 1 ในผลมะละกอ *Carica papaya* L. *พันธุ์ฮอลแลนด์* โดยการอบมะละกอด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ด้วยอุณหภูมิภายในสุดผลคงอยู่ที่ 45, 46.5 และ 47^{0}ซ. ทำการเปรียบเทียบระดับความชื้นสัมพัทธ์ในช่วงแรกของการเพิ่มอุณหภูมิผลจากอุณหภูมิห้องถึง 43^{0}ซ. ด้วยระดับความชื้นสัมพัทธ์ 2 กรรมวิธี ที่ 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ และภายหลังอุณหภูมิผลถึง 43^{0}ซ ทั้ง 2 กรรมวิธี จะมีความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในระดับเดียวกัน ผลการทดลองพบว่า หนอนวัยที่ 1 รอดชีวิตที่อุณหภูมิ 47^{0}ซ. เมื่อแมลงอยู่ภายใต้สภาพความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ หนอนวัยที่ 1 ตายทั้งหมดที่อุณหภูมิ 47^{0}ซ จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าระดับความชื้นสัมพัทธ์ในช่วงแรกของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการตายของหนอนวัยที่ 1 โดยอัตราการตายของหนอนวัยที่ 1 มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อระดับความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศร้อนช่วงก่อนที่อุณหภูมิผลจะถึง 43^{0}ซ. เพิ่มสูงขึ้น จากผลงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะหนอนวัยที่ 1 จำนวนไม่น้อยกว่า 3,000 ตัว ในผลมะละกอให้ตายทั้งหมดต่อไป

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-05-00-04-54

Abstract

Thailand had successfully developed modified vapor heat treatment to disinfest mango, mangosteen and pummelo of *Bactrocera dorsalis* species complex before export without damaging fruit quality. The objective of this research was to determine the influence of relative humidity (RH) on mortality of the most heat tolerant stage of oriental fruit fly (OFF). The mortality of OFF, *B. dorsalis* (Hendel) in papaya (*Carica papaya* L.) of "Holland" cultivar was assessed after exposure to modified vapor heat treatment (MVHT) in two conditions of RH. Papaya fruits infested with OFF 1st larvae were heated with hot air at 50 and 80 % from ambient temperature to 43^{0}C and the fruits were heated to 45^{0}C, 46.5^{0}C and 47^{0}C with air saturated water vapor. The Mortality rates were corrected by Abbott's formula. The results found that the 1st larvae still survived at 47^{0}C when test fruits were heated with hot air at 50 % RH, whereas no survivors were found in the same temperature at 80 % RH. The results indicated that the mortality trended to increase when 1st larvae were subjected to MVHT of higher RH during dry pre-heating period. Time for center of treated papaya fruits in two conditions was included. Future studies were demonstrated treatment schedule for standard quarantine treatment required a minimum of 3,000 individuals of the most heat tolerant stage of the OFF for complete treatment development.

Keyword : แมลงวันผลไม้, วิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช, วิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ และมะละกอ
Bactrocera dorsalis species complex, quarantine treatment, modified vapor heat treatment and papaya (*Carica papaya* L.)

คำนำ

มะละกอ *Carica papaya* L. วงศ์ Caricaceae เป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญและนิยมปลูกทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศไทย มีพื้นที่ปลูกมะละกอประมาณ 154,000 ไร่ ปลูกมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช, 2553) พันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน คือ พันธุ์แขกนวล แขกดำ แขกดำท่าพระ ฮอลแลนด์ เรดเลดี้ และปากช่อง สำหรับฤดูปลูกมะละกอมีตลอดทั้งปี (Department of Agricultural Extension, 1993) มะละกอได้รับความสนใจจากตลาดต่างประเทศเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะฮ่องกงนิยมบริโภคผลโตและสุก แถบยุโรปนิยมบริโภคผลเล็กและสุกโดยนำไปแปรรูปเป็นฟรุ๊ตสลัด จากสถิติส่งออกมะละกอไปตลาดต่างประเทศ ปี

2555/56 มีปริมาณส่งออกรวม 549,343 และ 332,142 กิโลกรัม มูลค่าส่งออก 29,443,819 และ 21,439,057 บาท ตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2556)

แต่อย่างไรก็ดีการส่งออกมะละกอไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศ ประเทศไทยจำเป็นต้องปฏิบัติตามข้อตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัย และสุขอนามัยพืช เนื่องจากได้จัดทำข้อตกลงเขตการค้าเสรีกับหลายประเทศ ที่มีความเข้มงวดด้านกักกันพืช อาทิเช่น ประเทศญี่ปุ่น ตามประกาศของกระทรวงเกษตรป่าไม้และประมงญี่ปุ่น (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, MAFF) ได้ระบุว่าประเทศไทยมีศัตรูพืชด้านกักกันพืชในกลุ่มแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* species complex 4 ชนิด ได้แก่ carambolae fruit fly, *B. carambolae* Drew and Hancock; oriental fruit fly, *B. dorsalis* (Hendel); papaya fruit fly, *B. papaya* Drew and Hancock และ guava fruit fly, *B. pyrifoliae* Drew and Hancock (อุดร และคณะ, 2549; CABI, 2013)

ประเทศไทยจำเป็นต้องดำเนินการตามมาตรฐานขั้นตอนของการยกเลิกห้ามนำเข้าสิ่งต้องห้ามที่เป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ (Standard procedure for lifting import ban of prohibited host plants of fruit flies) ของ MAFF โดยมีขั้นตอนที่สำคัญ คือ ต้องยื่นเสนอแผนการศึกษาวิจัยการกำจัดแมลงวันผลไม้ก่อนการส่งออกให้กับ MAFF พิจารณาตรวจสอบก่อน ซึ่งต้องเป็นไปตามขั้นตอนที่กำหนด และมีประสิทธิภาพตามมาตรฐานของวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช (Miyazaki, 2010) สำหรับวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชก่อนส่งออกมีหลายวิธี อาทิเช่น การใช้ความร้อน ความเย็น การรมควัน และการฉายรังสี เป็นต้น

งานวิจัยในด้านกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยความร้อนมีรายงานในหลายประเทศ ในสหรัฐอเมริกา Armstrong et al., (1989) พบว่าวิธีอบอากาศร้อน (Hot air treatment, HAT) ที่อุณหภูมิ 47.2^{0}ซ มีประสิทธิภาพกำจัดไข่ และหนอนแมลงวันผลไม้ในผลมะละกอพันธุ์ “Solo” Jones (1939) พบว่าการอบมะละกอพันธุ์ “Solo” ด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ที่อุณหภูมิ 43.3 ^{0}ซ ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ทำให้มะละกอเสียหายเพียงเล็กน้อย จากผลงานวิจัยดังกล่าว กระทรวงเกษตรฯสหรัฐอเมริกาได้อนุมัติให้ใช้เป็นวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในมะละกอก่อนส่งออกจากรัฐฮาวายไปยังสหรัฐอเมริกา ในประเทศไต้หวัน Dong et al., (2011) รายงานว่า MAFF ได้อนุญาตนำเข้ามะละกอพันธุ์ “Tainung” ด้วยวิธีอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 47.2 ^{0}ซ

ในประเทศไทย มลนิภา และคณะ (2555) ได้ศึกษาด้านความเสียหายของมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์ด้วยวิธีอบไอน้ำ (Vapor Heat Treatment, VHT) เปรียบเทียบกับวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) พบว่ามะละกอที่ผ่านความร้อนด้วยวิธีอบไอน้ำ (VHT) ที่อุณหภูมิ 46 ^{0}ซ นาน 2 ชั่วโมง จะแสดงความเสียหายภายนอกที่ผิว โดยเกิดรอยบุ๋ม (pitting) และภายในผลเกิดอาการช้ำ และนิ่ม (flesh softening) เนื่องจากความร้อนอย่างเด่นชัด ในขณะที่มะละกอที่ผ่านความร้อนด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ที่อุณหภูมิ และระยะเวลาดังกล่าว พบการเปลี่ยนแปลงของสีผิวที่ผลจากสีเขียวเป็นสีเหลือง (skin yellowing) ใกล้เคียงกับมะละกอที่ไม่ผ่าน

ความร้อน วิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นวิธีกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์มากกว่าวิธีอบไอน้ำ (VHT)

มลนิภา และคณะ (2555) ได้ศึกษาความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ในระยะไข่และหนอนวัยต่าง ๆ ในมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์ด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) เพื่อกำหนดระยะการเจริญเติบโตที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุด พบว่าหนอนวัยที่ 1 เป็นวัยที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุด โดยที่หนอนวัยที่ 1 ตายทั้งหมดที่อุณหภูมิ 46.5 ^{0}ซ นาน 30 นาที นอกจากนี้ปัจจัยในด้านความชื้นสัมพัทธ์ยังส่งผลต่ออัตราการตายของแมลงเช่นเดียวกัน Unhawutti *et al.* (2006) รายงานว่าระดับความชื้นสัมพัทธ์ในช่วงแรกของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการตายของหนอนวัยที่ 1 ซึ่งอัตราการตายจะมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อระดับความชื้นสัมพัทธ์ในช่วงแรกเพิ่มขึ้น

วิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) นอกจากมีประสิทธิภาพกำจัดแมลงวันผลไม้ได้แล้ว ยังมีข้อดีในแง่ของความปลอดภัยจากสารพิษตกค้างภายในผลไม้ จึงผ่านการยอมรับได้โดยง่ายจากประเทศผู้นำเข้า ปัจจุบันประเทศไทยได้มีการสร้างโรงงานกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยความร้อนระดับการค้ากันอย่างแพร่หลาย โดยใช้กรรมวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ในการอบผลมะม่วง, มังคุด และส้มโอ เพื่อการส่งออกไปประเทศญี่ปุ่น เกาหลี และนิวซีแลนด์ โดยยึดหลักการตามเงื่อนไขและข้อกำหนดของแต่ละประเทศ (มลนิภา, 2552; 2556) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาอิทธิพลของความชื้นสัมพัทธ์ที่มีต่อการตายของแมลงวันผลไม้ในผลมะละกอด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) และเพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นในการกำจัดแมลงได้อย่างมีประสิทธิภาพก่อนที่จะทำการประเมินประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ในการกำจัดแมลงจำนวนไม่น้อยกว่า 3,000 ตัว ต่อไป

วิธีดำเนินการ

ดำเนินการโดยใช้ตู้อบไอน้ำกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง (Sanshu vapor heat treatment system : differential pressure type รุ่น EHK 1000 D จำนวน 2 เครื่อง) ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช **(Figure 1)** แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* (Hendel) ที่ใช้ทดลองได้มาจากผลมะละกอ ที่เก็บรวบรวมจากอำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี ขยายพันธุ์ประชากรแมลงให้เพิ่มขึ้น และมีความแข็งแรง โดยการเลี้ยงแมลงด้วยอาหารเทียม (artificial diet) สูตรข้าวโพดป่น (Watanabe et al., 1973) การเตรียมแมลงวันผลไม้โดยการเลี้ยงในกรงใหญ่ จำนวน 20,000 ตัว/กรง และในกรงเล็ก จำนวน 2,000 ตัว/กรง เพื่อขยายประชากรแมลงให้เพียงพอต่องานทดลอง การเลี้ยงแมลงแต่ละรุ่น (generation) จำเป็นต้องตรวจสอบอัตราการฟักไข่ (hatching rate) การออกเป็นตัวเต็มวัย (emerging rate) น้ำหนักดักแด้ (pupae weight) และอัตราส่วนเพศผู้ และเพศเมีย (sex ratio) เพื่อควบคุมคุณภาพของแมลงก่อนการทดลอง

มะละกอที่ใช้ทดลองเป็นพันธุ์ฮอลแลนด์ ผลขนาดกลาง น้ำหนัก 450-650 กรัม/ผล เตรียมมะละกอให้มีหนอนวัย 1 อยู่ภายในผล ตามวิธีการของ มลนิภา และคณะ (2555) **(Figure 2)** ในการทดลองแต่ละครั้งเตรียมมะละกอจำนวน 45 ผล ใส่หนอนวัย 1 ในผลจำนวน 100 ตัว/ผล จากนั้นนำมะละกอทดลองจำนวน 30 ผล ใส่ในตู้อบไอน้ำกำจัดแมลงวันผลไม้ จำนวน 15 ผล/ตู้ โดยจัดเรียงมะละกอในถาดบรรจุผลไม้จำนวน 5 ผล/ถาด สำหรับมะละกอที่เหลืออีก 15 ผล ใช้สำหรับวิธีการไม่ผ่านความร้อน (control)

อบมะละกอด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ โดยช่วงแรกของการเพิ่มอุณหภูมิผลจากอุณหภูมิห้องจนถึงอุณหภูมิ 43 ^{0}ซ. *อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์แตกต่างกัน* 2 *ระดับ คือ* 50 *และ* 80 *เปอร์เซ็นต์ หลังจากมะละกออุณหภูมิ* 43^{0}ซ. *ความชื้นสัมพัทธ์จะถูกปรับให้เพิ่มสูงขึ้นให้อยู่ในระดับเดียวกันคือ มากกว่า* 90 *เปอร์เซ็นต์ ดำเนินการทดลองโดยแยกอบมะละกอในแต่ละระดับความชื้นสัมพัทธ์ในตู้อบไอน้ำคนละตู้* เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนวัยที่ 1 ในผลมะละกอเมื่ออุณหภูมิภายในสุดผลเพิ่มขึ้นถึง 45, 46.5 *และ* 47^{0}ซ.

การวัดอุณหภูมิผลมะละกอทดลองวัดจากเซ็นเซอร์วัดอุณหภูมิผล (sensor fruit) จำนวน 3 ผล น้ำหนัก 550±15 กรัม/ผล วางในถาดบรรจุผลไม้ชั้นล่างสุด เมื่อ sensor fruit จำนวน 2 ผล อุณหภูมิขึ้นถึง 45, 46.5 *และ* 47^{0}ซ. *ซึ่งเป็นระยะเวลาที่กำหนด นำมะละกอออกจากตู้อบไอน้ำ และลดอุณหภูมิผลมะละกอทันที* โดยการเป่าด้วยลมนาน 1 ชั่วโมง ในตู้ลดอุณหภูมิผลไม้ “Sanshu” shower cooling system (Differential pressure type) (model : SHS-12, Sanshu sangyo co., ltd., Kagoshima, Japan) เก็บมะละกอทดลองตามวิธีของ มลนิภา และคณะ (2555) ตรวจผลการทดลองหลังจากอบมะละกอ 5 วัน บันทึกจำนวนแมลงรอดชีวิต โดยคำนวณอัตราการตายที่แท้จริง (corrected mortality) โดยใช้สูตรของ Abbott (Abbott, 1925) ดำเนินการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น กันยายน 2554 **สิ้นสุด** ตุลาคม 2558

จังหวัดนครปฐม, สมุทรสงคราม, นครราชสีมา, นครนายก, กาญจนบุรี, ราชบุรี, ปราจีนบุรี, แพร่, เชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ระยะเวลาที่ใช้อบมะละกอที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ แสดงใน **(Table 1)** เมื่อพิจารณาจากอุณหภูมิภายในสุดผลมะละกอคงอยู่ที่ 45, 46.5 และ 47^{0}ซ. พบว่าระดับความชื้นสัมพัทธ์ที่ 80 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาอบมะละกอทั้ง 3 อุณหภูมิ น้อยกว่าระดับความชื้นสัมพัทธ์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 45, 46.5 และ 47^{0}ซ. (rep 1) ใช้เวลาอบมะละกอ 2:29, 2:54 และ 3:15 ชั่วโมง และ (rep 2) ใช้เวลาอบมะละกอ 2:33, 2:53 และ 3:08

ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 45, 46.5 และ 47^{0}ซ. (rep 1) ใช้เวลาอบมะละกอ 2:07, 2:22 และ 2:30 ชั่วโมง และ (rep 2) ใช้เวลาอบมะละกอ 2:09, 2:25 และ 2:33 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการอบมะละกอด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ถ้าได้รับความชื้นสัมพัทธ์ที่สูงขึ้นในช่วงแรกของการอบมะละกอ (ก่อนอุณหภูมิผลเพิ่มขึ้นถึง 43^{0}ซ.) เวลาที่ใช้ในการอบมะละกอจะสั้นลง

สอดคล้องกับงานวิจัยในส้มโอพันธุ์ทองดี อุดร และคณะ (2550) รายงานว่า ที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์สูงขึ้น ระยะเวลาที่ใช้อบส้มโอให้อุณหภูมิผลถึงระดับอุณหภูมิเป้าหมาย จะสั้นลง นอกจากนี้เมื่อพิจารณาข้อมูล (rep 1 คือ ตู้อบไอน้ำตู้ที่ 1) และ (rep 2 คือ ตู้อบไอน้ำตู้ที่ 2) จะเห็นได้ว่าตู้อบไอน้ำทั้ง 2 ตู้ มีประสิทธิภาพการทำงานใกล้เคียงกัน เมื่ออบมะละกอที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์เดียวกัน ระยะเวลาที่ใช้ในการอบมะละกอไม่แตกต่างกัน ซึ่งงานทดลองนี้สามารถทราบถึงประสิทธิภาพของการทำงานของตู้อบไอน้ำ รวมทั้งเซ็นเซอร์วัดอุณหภูมิผลว่ายังมีความคงที่ของการทำงานอยู่ในระดับดี

อัตราการตายเฉลี่ยของหนอนแมลงวันผลไม้วัยที่ 1 แสดงใน **(Table 2)** ผลการตรวจนับแมลงที่อุณหภูมิผล 45, 46.5 และ 47^{0}ซ. พบว่า การอบมะละกอที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ แมลงมีอัตราการตายเฉลี่ย 78.70, 92.41 และ 99.80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการอบ มะละกอที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์ แมลงมีอัตราการตายเฉลี่ย 84.04, 97.13 และ 100.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากอัตราการตายของแมลง พบว่าที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์ แมลงมีอัตราการตายเฉลี่ยสูงกว่าที่ความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ การอบมะละกอที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถกำจัดแมลงตายทั้งหมดที่อุณหภูมิผล 47^{0}ซ. ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าระดับความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศร้อนในช่วงแรก (ช่วงอุณหภูมิผลก่อนถึง 43^{0}ซ.) เป็นปัจจัยสำคัญต่อการตายของแมลง สอดคล้องกับงานวิจัยในมะม่วง มังคุด และส้มโอ (อุดร และคณะ, 2549; Dohino et. *al*, 2014)

นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยในส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง มลนิภา และคณะ (2553) ได้ศึกษาวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ระยะหนอนวัย 1 ในส้มโอขาวน้ำผึ้งเปรียบเทียบกับทองดี พบว่าการอบส้มโอทั้ง 2 พันธุ์ ที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 50-80 เปอร์เซ็นต์ (ช่วงแรกของการเพิ่มอุณหภูมิผลก่อนถึง 43^{0}ซ.) และที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (ช่วงหลังอุณหภูมิผล 43^{0}ซ. จนถึงอุณหภูมิเป้าหมาย) มีประสิทธิภาพสามารถกำจัดแมลงให้ตายทั้งหมดที่อุณหภูมิ 45^{0}ซ. นาน 50 นาที จากผลงานทดลองนี้ทำให้ทราบว่าระดับความชื้นสัมพัทธ์มีส่วนสำคัญ และมีอิทธิพลต่อระยะเวลาในการอบมะละกอ รวมทั้งประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง ผลงานทดลองนี้สามารถนำไปใช้ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ในการกำจัดแมลงจำนวนไม่น้อยกว่า 3,000 ตัว ต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ศึกษาอิทธิพลของความชื้นสัมพัทธ์ในช่วงก่อนอุณหภูมิผลเพิ่มถึง 43^{0}ซ. ต่ออัตราการตายของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในระยะหนอนวัยที่ 1 ในผลมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์ ด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ โดยอบมะละกอกำจัดหนอนวัย 1 ที่อุณหภูมิ 45, 46.5 และ 47^{0}ซ. โดยช่วงแรกก่อนที่อุณหภูมิผลเพิ่มถึง 43^{0}ซ. อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์แตกต่างกัน 2 ระดับ คือ 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการอบมะละกอภายใต้สภาพอากาศร้อนที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 50 แมลงยังคงมีชีวิตรอด ที่อุณหภูมิ 47^{0}ซ. ในขณะที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์ แมลงตายทั้งหมดที่อุณหภูมิ 47^{0}ซ. โดยที่อัตราการตายของหนอนวัยที่ 1 จะมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อระดับความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้น

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้จะสำเร็จลุล่วงด้วยดีไม่ได้ หากขาดความช่วยเหลือจากนักวิชาการ และพนักงานของกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช ในการเตรียมอุปกรณ์ รวมถึงการเช็คผลการทดลอง ผู้วิจัยขอขอบคุณทุกท่าน ดังมีรายนามต่อไปนี้ คุณปวีณา บูชาเทียน, คุณพุฒิพงษ์ เพ็งฤกษ์, คุณพงษ์ศักดิ์ จิณฤทธิ์, คุณกัลยา คูห์วัฒนศิลป์, คุณประชุม นุ้ยจำนัล, คุณนวลนิสา ตั้งสัจจะกุล, คุณมีนา จริงจิต และคุณสมิทธิ์ อยู่เอี่ยม

การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

1. เพื่อสามารถพัฒนาวิธีกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์(MVHT 50-80% RH) ในผลมะละกอ และผลไม้ชนิดอื่น ๆ ทีมีศักยภาพในการส่งออก ในเชิงพาณิชย์ได้ เช่นเดียวกับการพัฒนาวิธีกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ในผลมะม่วง มังคุด และส้มโอที่ประสบความสำเร็จสามารถส่งออกไปประเทศญี่ปุ่น นิวซีแลนด์ และสาธารณรัฐเกาหลีได้แล้วในปัจจุบัน
2. เกษตรกรชาวสวนมะละกอ ผู้ประกอบการโรงงานอบไอน้ำ และผู้ส่งออกในประเทศไทย ได้รับทราบข้อมูลวิชาการในเชิงลึก ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตู้อบไอน้ำในระดับการค้าตามมาตรฐานด้านกักกันพืช เพื่อเพิ่มศักยภาพในการส่งออกผลไม้อบไอน้ำไปตลาดต่างประเทศได้เพิ่มขึ้น
3. ได้ฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับวิธีการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูทางด้านกักกันพืชโดยเฉพาะแมลงวันผลไม้ ด้วยวิธีการอบไอน้ำให้ผู้ที่เกี่ยวข้องและผู้ที่สนใจได้รับทราบข้อมูลอย่างถูกต้อง รวมถึงการสร้างเครือข่ายที่เกี่ยวข้องให้เพิ่มมากขึ้นทั้งในและต่างประเทศ

เอกสารอ้างอิง

มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์. 2552. การกำจัดแมลงในผลไม้เพื่อการส่งออกด้วยวิธีอบไอน้ำ. ใน ประชุมเชิงปฏิบัติการเทคโนโลยีการผลิตและจัดการหลังการเก็บเกี่ยวมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองนอกฤดูเพื่อการส่งออก โดยภารกิจโครงการและประสานงานวิจัย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ อุดร อุณหวุฒิ ชัยณรัตน์ สนศิริ จารุวรรณ จันทรา สลักจิต พานคำ และรัชฎา อินทรกำแหง. 2553. วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยความร้อนในผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งเพื่อการส่งออก. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ ชัยณรัตน์ สนศิริ สลักจิต พานคำ รัชฎา อินทรกำแหง และอุดร อุณหวุฒิ. 2555. วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยความร้อนในผลมะละกอเพื่อการส่งออก. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์. 2556. การป้องกันกำจัดแมลงในผลมะม่วงเพื่อการส่งออกด้วยวิธีอบไอน้ำและฉายรังสี. ในประชุมเชิงปฏิบัติการโครงการผลิตมะม่วง 52 สัปดาห์เพื่อการส่งออก. 27-28 เมษายน 2556. ณ ห้องประชุมเกษตรศาสตร์ สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร. จ.พิษณุโลก.

สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช กรมวิชาการเกษตร. 2553. มะละกอ: ในระบบงานรับรองแหล่งผลิตพืช (GAP DOA Online). สืบค้นจาก: http://gap.doa.go.th/gap/[มี.ค 2558].

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2556. สถิติการค้าสินค้าเกษตรไทยกับต่างประเทศ ปี 2556.

อุดร อุณหวุฒิ. 2549. ความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ oriental fruit fly (Diptera : Tephritidae) ระยะไข่และหนอนในผลส้มโอต่อวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์. รายงานผลงานวิจัยฉบับเต็ม. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

อุดร อุณหวุฒิ สลักจิต พานคำ ชัยณรัตน์ สนศิริ มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ ชุติมา อ้อมกิ่ง และ จารุวรรณ จันทรา และรัชฎา อินทรกำแหง 2550. การวิจัยพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในส้มโอเพื่อส่งออก. ผลงานวิจัยดีเด่น ประจำปี 2549 ประเภทงานวิจัยประยุกต์ กรมวิชาการเกษตร: กรุงเทพฯ.

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.

Armstrong, J.W., J.D. Hansen, B.K.S. Hu and S.A. Brown. 1989. High-temperature, forced-air quarantine treatment for papayas infested with teprhitid fruit flies (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 82: 1667-1674.

CAB International. 2013. *Bactrocera dorsalis*. [Distribution map]. Distribution maps of plant pests. Wallingford, UK: CABI, Map 109 (4th revision).

Dohino, T., T. Mizuno, S. Mizuniwa, M. Yoneda and I. Miyazaki. 2014. Heat and Cold Tolerance of Various Aged Eggs of *Bactrocera dorsalis* and *B. cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). Res. Bull. Pl. Prot. Japan. 50: 63-69.

Department of Agricultural Extension. 1st ed. Bangkok, Mitkaset Advertising and Marketing, 1993.

Dong, Y., C. Song, Y. Chuang, K. Chiang, W. Wu, L. Cheng and C. Chen. 2011. Degree of fruit ripeness affecting infestation of papaya by two species of fruit flies (Diptera : Tephritidae). J. Taiwan. Agric. Res. 60(4): 253-262.

Jones, W. 1939. The influence of relative humidity on the respiration of papaya at high temperatures. Proceeding of the American Society for Horticultural Science. 37: 700-705.

Miyazaki, I. 2010. How to prepare the technical report on vapor heat disinfestations test. *In*: Report of the thermal treatment for the disinfestations of fruit flies. Naha Plant Protection Station, Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, Okinawa International Centre. Japan International Cooperation Agency, Japan. 30 p.

Unahawutti, U., S. Phankum, M. Srimartpirom, C. Ormking, C. Sonsiri, J. Chantra and R. Intarakumheng. 2006. Development of Heated-Air Quarantine Treatment for Pummelo Infested with Oriental fruit fly (Diptera : Tephritidae). A report submitted to the Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF) for approval of a quarantine treatment on Thai pummel to be exported to Japan, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Chattuchak, Bangkok. 143 p.

Watanabe, N., F. Ichinohe and M. Sonda. 1973. Improvement of corn flour medium for larvae culture of oriental fruit fly. Research Bullentine of Plant Protection Service Japan. 11: 57-58.

Table 1 Time for center of papaya to attain 45, 46.5 and 47^{0}C during modified vapor heat treatment of 50% and 80 % RH.

Method	Rep	Loading (Kg/cum.)	Sensor fruit weight (g)	Time for fruit center to reach 45^{0}C (h)	Time for fruit center to reach 46.5^{0}C (h)	Time for fruit center to reach 47^{0}C (h)
50% MVHT	1	12	556.57	2:29	2:54	3:15
			557.44			
			557.68			
	2	12	557.12	2:33	2:53	3:08
			561.20			
			558.40			
80% MVHT	1	12	558.05	2:07	2:22	2:30
			571.12			
			560.14			
	2	12	555.07	2:09	2:25	2:33
			562.14			
			557.45			

[1]Time for center of 2 sensor fruits to attain target temperature

Table 2 Mortality of 1st instar larvae of *Bactrocera dorsalis* in papaya treated with modified vapor heat treatment of 50% and 80 % RH.

Method	Treatment[1]	Number treated	Number dead	Corrected Mortality[2] (%)
50% RH MVHT	Control	3,000	418	0.00
	45.0°C	1,000	450	78.70
	46.5°C	1,000	804	92.41
	47.0°C	1,000	994	99.80
80% RH MVHT	Control	3,000	418	0.00
	45.0°C	1,000	588	84.04
	46.5°C	1,000	926	97.13
	47.0°C	1,000	1,000	100.00

Combined data of 2 replicates
[1]Treatment : 5 fruits infested with 100 individuals/fruit
Control : 15 fruits infested with 100 individuals/fruit
[2]Corrected Mortality (CM %) is corrected by using Abbott's formula (Abbott, 1925)

Fig. 1 Sanshu vapor heat treatment system (differential pressure type : model EHK 1000 D) used for experiment of Plant Quarantine Research Group.

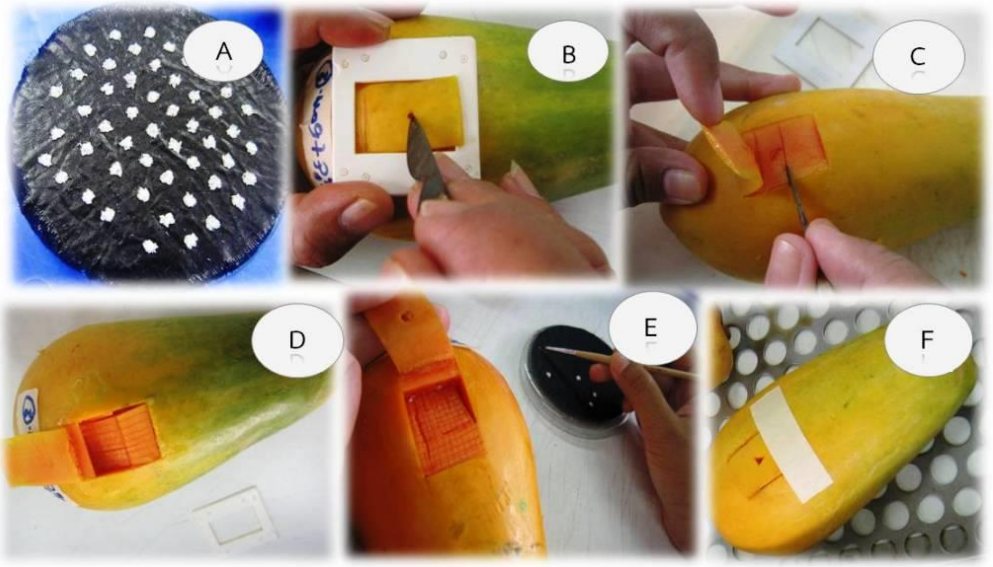


Fig. 2 Preparation of infested papaya fruits were carried out by artificial inoculation method.

การเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis.ในพื้นที่ปลูกมะเขือเทศในประเทศไทย

Surveillance of Bacterial Canker: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis. in Seed Production Areas for Export

ณัฏฐพร อุทัยมงคล[1/] ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[3/] ศรีวิเศษ เกษสังข์ [2/] ชลธิชา รักใคร่[2/]
วาสนา ฤทธิ์ไธสง [1/] ทิพวรรณ กันหาญาติ[3/] วันเพ็ญ ศรีชาติ[2/] วารีรัตน์ สมประทุม[1/]
[1/] กลุ่มงานวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/] กลุ่มงานศัตรูพืชกักกัน สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[3/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

รวบรวมข้อมูลมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) เช่น อนุกรมวิธาน ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ แหล่งปลูกมะเขือเทศ การเก็บเกี่ยว ข้อมูลการนำเข้า รวบรวมข้อมูลเชื้อ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) ได้ข้อมูลลักษณะทางอนุกรมวิธาน ชื่อสามัญ พืชอาศัย การเกิดโรค การเข้าทำลาย การตรวจสอบ ความเสียหาย วิธีการตรวจสอบ การถ่ายทอดโรค มาตรการสุขอนามัยพืช ข้อมูลประเทศที่มีการพบเชื้อ รวมถึงสภาพภูมิอากาศในแหล่งปลูกมะเขือเทศของประเทศไทย ผลการตรวจสอบเชื้อ *Cmm* จากเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าในปี 2556 จำนวน 17 ครั้ง จาก 9 ประเทศ รวม 20 ตัวอย่าง และผลการสุ่มตรวจสอบจากแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า 4 บริษัท รวม 10 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อ *Cmm* ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้า จากนั้นนำข้อมูลเข้าสู่กระบวนการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช พบว่าจุดเริ่มต้น (Initiation) ของการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเริ่มจากการที่ประเทศฝรั่งเศสแจ้งให้ทราบว่ามีการตรวจพบเชื้อ *Cmm* จากเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ส่งออกจากประเทศไทย ซึ่งไม่เคยมีรายงานการปรากฏเชื้อนี้ในประเทศไทย และประเทศไทยประกาศให้เชื้อ *Cmm* เป็นศัตรูพืชกักกัน บนพื้นฐานการวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงเพียงเบื้องต้นเท่านั้น จึงต้องดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงตามหลักการของ ISPM No.12 และตามคำนิยามของคำว่า “ศัตรูพืชกักกัน” โดยการจำแนกชนิดของเชื้อ *Cmm* ตามหลักอนุกรมวิธาน การไม่ปรากฏพบในประเทศไทย โดยพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในที่นี้ คือ ประเทศไทยทั้งประเทศ เนื่องจากประเทศไทยมีการปลูกมะเขือเทศได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ และการควบคุมทางกฎระเบียบพบว่าประเทศไทยได้ออกประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็น

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-06-00-11-56

สิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 โดยแนบท้ายประกาศนั้นได้กำหนดให้ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* เป็นศัตรูพืชกักกัน เช่นเดียวกับหลายประเทศที่มีการปลูก มะเขือเทศจึงกำหนดให้การนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศปลอดจากเชื้อ *Cmm* ที่เป็นศัตรูพืชกักกัน เช่น สหภาพยุโรป จีน เวียดนาม เป็นต้น เมื่อพิจารณาศักยภาพในการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวรของเชื้อ *Cmm* พบว่าเชื้อสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้ เชื้อจึงสามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์จากแหล่งปลูกที่พบการระบาดของเชื้อได้ โดยเชื้อจะมีชีวิตอยู่รอดในระหว่างการขนส่งและไม่สามารถตรวจสอบด้วยสายตาได้ ณ จุดนำเข้า จึงมีโอกาสเข้ามาในประเทศไทยได้ ซึ่งข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศของประเทศไทยพบว่ามีการนำเข้าจากประเทศที่พบการแพร่ระบาดของเชื้อนี้ สำหรับศักยภาพในการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวรและแพร่กระจายในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงพบว่าเชื้อ *Cmm* มีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 23.33-32.22 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับช่วงอุณหภูมิของแหล่งปลูกมะเขือเทศในประเทศไทยหลายพื้นที่ทั้งในสภาพโรงเรือนและสภาพแปลงปลูก เชื้อ *Cmm* มีพืชอาศัยหลายชนิดที่ปลูกในประเทศไทย เช่น พริก มะเขือเทศ มะเขือ เป็นต้น โดยการปลูกมะเขือเทศของประเทศไทยจะปลูกเพื่อบริโภคผลสดหรือนำเมล็ดพันธุ์พ่อแม่ที่นำเข้าจากต่างประเทศไปปลูกในหลายพื้นที่เพื่อผลิตเป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสม จึงมีความเสี่ยงที่เชื้อจะเข้ามาแพร่กระจายสู่แหล่งปลูกได้ในบริเวณกว้าง ซึ่งจากข้อมูลสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยและพืชอาศัยของเชื้อ *Cmm* แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีโอกาสเข้ามาตั้งรกรากอยู่ได้ นอกจากนี้เชื้อ *Cmm* มีโอกาสแพร่กระจายไปกับเมล็ดพันธุ์ ส่วนต่าง ๆ ของพืชที่มีการเข้าทำลายของเชื้อรวมถึงเครื่องมือ อุปกรณ์การเกษตรด้วย จึงสรุปว่ามีความเสี่ยงสูงที่เชื้อจะติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าและสามารถตั้งรกรากได้อย่างถาวรและแพร่กระจายไปได้อย่างกว้างขวางในประเทศไทย สำหรับผลกระทบที่เกิดจากเชื้อ *Cmm* ในเบื้องต้นของประเทศต่าง ๆ เช่น ประเทศอินโดนีเซียจะมีปริมาณผลผลิตมะเขือเทศลดลง 80 เปอร์เซ็นต์เมื่อเชื้อนี้เข้าทำลาย ประเทศฝรั่งเศสมีการทดสอบความเสียหายของเชื้อ *Cmm* พบว่าเชื้อนี้ทำให้ผลผลิตลดลง 20-30 เปอร์เซ็นต์ ข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ว่าเชื้อ *Cmm* มีศักยภาพที่จะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจของประเทศไทยทั้งทางตรงและทางอ้อม

ในปีงบประมาณ 2557 ได้ดำเนินการสำรวจแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน แพร่ ตาก นครราชสีมา สระบุรี และลพบุรี ได้เก็บตัวอย่างมาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการผลการตรวจยังไม่พบเชื้อ CMMในประเทศไทย สำหรับเทคนิคการตรวจสอบเชื้อดังกล่าวพบว่าเทคนิคด้านชีวโมเลกุลสามารถตรวจสอบได้แม่นยำรวดเร็ว กว่าวิธีอื่นๆ

Keyword: วิเคราะห์และประเมินความเสี่ยง *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* *Cmm* เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ การเฝ้าระวัง ศัตรูพืชกักกัน กักกันพืช

pest risk analysis, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Cmm*, Quarantine pest, Surveillance, Interception, tomato seed, Detection

คำนำ

เชื้อ *Cmm* ถูกประกาศให้เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทยตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ.2550 ซึ่งมีพืชหลายชนิดที่ปลูกในประเทศไทยเป็นพืชอาศัยของเชื้อชนิดนี้ เช่น มะเขือเทศ พริก มะเขือม่วง เป็นต้น ปัจจุบันประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์พืชผักที่สำคัญในกลุ่มประเทศอาเซียน โดยเฉพาะมะเขือเทศ พริก และมะเขือม่วง เป็นต้น ต่อมาเกิดปัญหากับเมล็ดมะเขือเทศที่ส่งออก เนื่องจากประเทศฝรั่งเศสแจ้งว่ามีการตรวจพบเชื้อ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* จากเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ส่งออกไปจากประเทศไทย จึงมีความจำเป็นที่จะต้องยืนยันสถานภาพการเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย เนื่องจากเชื้อ *Cmm* เป็นเชื้อที่สร้างความเสียหายให้กับการผลิตมะเขือเทศทั้งในสภาพแปลงปลูกและโรงเรือน ทำให้ต้นกล้าตายและผลผลิตไม่เป็นที่ต้องการของตลาด (CABI, 2014) สามารถทำความเสียหายถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ในโรงเรือน อย่างไรก็ตามประเทศไทยไม่มีรายงานการปรากฏเชื้อนี้ในประเทศมาก่อน แต่อย่างไรก็ตามในการกำหนดเป็นศัตรูพืชกักกันนั้นยังไม่มีเอกสารวิชาการยืนยันการเป็นศัตรูพืชกักกัน ดังนั้นเพื่อให้ทราบถึงร้ายแรงของเชื้อที่สามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์ และยืนยันการคงสถานภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทยต่อไป จึงจำเป็นต้องศึกษาว่าเชื้อ *Cmm* เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทยที่มีโอกาสติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศได้หรือไม่ได้โดยการสำรวจในแปลงผลิตมะเขือเทศเพื่อให้ทราบข้อมูลการปรากฏ/ไม่ปรากฏและการแพร่กระจายของ เชื้อดังกล่าวประกอบกับต้องพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบเชื้อ CMM เพื่อใช้รับรองการส่งออกและการนำเข้าต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. หนังสือ และวารสารทางวิชาการของมะเขือเทศและเชื้อ *Cmm* ที่เกี่ยวข้องในประเทศและต่างประเทศ
2. CAB INTERNATIONAL(2007 และ 2014 online) และข้อมูลทางอิเล็กทรอนิกส์
3. เครื่องคอมพิวเตอร์ เครื่องพิมพ์ กระดาษ ฯลฯ
4. เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ
5. กล้องจุลทรรศน์ ตู้ปลอดเชื้อ
6. น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และสารเคมีในการแยกและเลี้ยงเชื้อ
7. กระถางปลูกพืช ดิน โรงเรือนปลูกพืช
8. ชุดตรวจสอบเชื้อ CMM ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

9. คู่มือการตรวจสอบเชื้อ
10. พู่กัน, เข็มเขี่ย, ถุงกระดาษเก็บตัวอย่าง
11. เครื่องหาพิกัด (GPS)
12. อุปกรณ์บันทึกข้อมูล

วิธีดำเนินการ

การทดลองย่อยที่ 6.1.1 การสำรวจสถานภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis. ในพื้นที่ปลูกมะเขือเทศในประเทศไทย(2557)

- การสำรวจ กำหนดพื้นที่สำรวจโดยเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่สำคัญของประเทศ จำนวน 12 แหล่งปลูก ใน 8 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน แพร่ ตาก นครราชสีมา สระบุรี และลพบุรี วางแผนการสำรวจในพื้นที่อย่างน้อย 20 ไร่ แบ่งพื้นที่ออกเป็น 4 ส่วนๆละประมาณ 5 ไร่ แต่ละส่วนทำการสุ่มสำรวจจำนวน 10 จุดขนาดพื้นที่จุดละ 2x2 เมตร สุ่มตรวจ จุดละ 20 ตัวอย่าง ตรวจแบบตัวอักษร W ซ้าย ตามวิธีของ Delp *et.al.* (1986) ทำการสุ่มตรวจทุกเดือน วิธีการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ในแปลงเมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างห่อกระดาษและใส่ถุงนำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ

- การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ การตรวจสอบโดยการนำตัวอย่างที่เก็บมาหรือสุ่มใบหรือลำต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการคล้ายกับรูปภาพนำมาแยกเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* บนอาหาร คัดเฉพาะโคโลนีที่สงสัยแล้วนำมาตรวจจำแนกชนิด โดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และใช้วิธี Polymerase chain reaction (PCR) เก็บข้อมูลที่ได้ในรูปdatasheetเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติจัดทำรายงาน ผลการวิจัย

การทดลองย่อยที่ 6.1.2 วิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบเชื้อ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis. ในมะเขือเทศ(2557)

-. ดำเนินการทดลองโดยการตรวจสอบเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ตามวิธีทางด้านชีวโมเลกุล และ ELISA

- ดำเนินการตรวจสอบเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* กับตัวอย่างพืช และเมล็ดพันธุ์

- บันทึกข้อมูลผลการตรวจสอบ เชื้อ CMMกับตัวอย่างพืช และ เมล็ดพันธุ์

การทดลองย่อยที่ 6.1.3 การศึกษาชนิดศัตรูพืชกักกันของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ (2557)

- สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าตามมาตรฐาน ISTA ทำการสุ่มตัวอย่าง ณ จุดนำเข้า โดยทำการสุ่มตัวอย่างจากด่านตรวจพืชต่างๆ ที่มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ และทำการตรวจสอบศัตรูพืช

เบื้องต้น โดยตรวจสอบเมล็ดด้วยตาเปล่า สังเกตลักษณะสี ผิว และรูปร่างว่ามีอะไรผิดปกติหรือไม่ มีรอยเจาะ หรือแตกกะเทาะของเมล็ดหรือไม่ และจึงนำเมล็ดพันธุ์ที่สุ่มได้นำไปตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

- ตรวจสอบและจำแนกชนิดของเชื้อโรคพืชในห้อง ปฏิบัติการ ทำการแยกเชื้อหรือตรวจสอบศัตรูพืชที่พบด้วยวิธีการมาตรฐานในการตรวจหาศัตรูพืชและศัตรูพืชกักกันชนิดต่างๆ เช่น การตรวจสอบด้วยเทคนิค เช่น Dilution plate method, Seedling symptom test, ELISA

การทดลองย่อยที่ 6.1.4 การวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* กับเมล็ดมะเขือเทศ(2557)

1. การรวบรวมข้อมูลมะเขือเทศและเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*)

สืบค้นรวบรวมข้อมูลมะเขือเทศ เช่น อนุกรมวิธาน ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ แหล่งปลูกมะเขือเทศ ชนิดมะเขือเทศ การนำเข้าส่งออกเมล็ด การเก็บรักษา การบรรจุ สืบค้นรวบรวมข้อมูลเชื้อ *Cmm* เช่น อนุกรมวิธาน พืชอาศัย การเกิดโรค เป็นต้น จากฐานข้อมูล เอกสารวิชาการ วารสาร รายงานการประชุม สัมมนาทางวิชาการและหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้องทั้งในและต่างประเทศ ข้อมูลจาก CAB INTERNATIONAL (2007 และ 2014 online) และข้อมูลทางอิเล็กทรอนิกส์ เว็บไซต์ต่าง ๆ รวมถึงข้อมูลที่ประเทศอื่น ๆ เคยวิเคราะห์ความเสี่ยงกับเชื้อ *Cmm* มาก่อน

2. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* จากเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้า

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association, 2012) หรือตามความเหมาะสมของปริมาณนำเข้าแต่ละสายพันธุ์เพื่อตรวจหาเชื้อ *Cmm* จากเมล็ดมะเขือเทศหรือตัวอย่างที่เก็บจากแปลงเพาะกล้ามะเขือเทศที่เพาะจากเมล็ดนำเข้าแล้วนำมาตรวจสอบ ในห้องปฏิบัติการโดย 1) บดเมล็ดหรือตัวอย่างมะเขือเทศแล้วเติมสารละลายนึ่งฆ่าเชื้อแล้วของ 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 1-10 มิลลิลิตร (ตามปริมาณของเมล็ดหรือตัวอย่างพืช) ทำ Dilution plate ที่ค่าการเจือจาง 10^{-1}-10^{-9} โดยหยดสารละลายจำนวน 0. 1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) หรืออาหาร bud-containing tissue (BCT) (selective medium) จากนั้นบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 3-5 วัน ตรวจหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรียหลัง 3 วันแล้ว แยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปจำแนกชนิดต่อไปหรือ 2) เพาะเมล็ดให้งอกแล้วสังเกตลักษณะอาการโรค โดยนำใบพืชที่แสดงอาการผิดปกติเป็นจุดฉ่ำน้ำ นำไปแยกเชื้อโดยทำ Dilution plate หรือ วิธี Tissue transplanting เมื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์จากวิธี 1 หรือ 2 แล้ว นำเชื้อที่ได้ไปทดสอบแกรม (Gram's reaction) โดยใช้ 3 เปอร์เซ็นต์ โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ หรือย้อมสีแบบแกรม ถ้าให้ผลปฏิกิริยาเป็นบวก นำมาตรวจลักษณะและสีของโคโลนี รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียและพิสูจน์

เชื้อตามหลักการ Kotch's postulate บนต้นมะเขือเทศ หรือจำแนกชนิดโดยการตรวจสอบด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) หรือปฏิกิริยาชีวเคมี เป็นต้น

3. การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช

การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเป็นไปตามมาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช (ISPM) ฉบับที่ 11 เรื่อง คำแนะนำสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชกักกัน รวมถึงการวิเคราะห์ความเสี่ยงทางสภาพแวดล้อม (Pest risk analysis for quarantine pests including analysis of environmental risks) (FAO, 2007) เพื่อประเมินเชื้อ *Cmm* ว่ามีความเสี่ยงมากน้อยเพียงใดที่เชื้อจะติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ โดยกระบวนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ที่มีส่วนสัมพันธ์กัน ได้แก่

ขั้นตอนที่1: การเริ่มต้นการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage1: Initiation of pest risk analysis) เพื่อทราบสาเหตุและที่มาของการดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ขั้นตอนที่ 2: การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest risk assessment) เพื่อให้ทราบชนิดศัตรูพืชกักกัน

ขั้นตอนที่ 3: การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest risk management) เพื่อหามาตรการที่เหมาะสมสำหรับการจัดการศัตรูพืชกักกัน

ขั้นตอนที่ 1: การเริ่มขบวนการวิเคราะห์ (Initiation)

การเริ่มขบวนการวิเคราะห์เพื่อจำแนกศัตรูพืช (pest) และเส้นทางศัตรูพืช (pest pathway) ที่เกี่ยวข้องกับกักกันพืชในพื้นที่หนึ่งหรือพื้นที่ที่กำหนด คือ

1.1 จุดเริ่มต้นการวิเคราะห์ (Initiation point) ต้องการทราบว่าการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชหรือทบทวนของเดิมเริ่มต้นขึ้นเป็นผลมาจากเหตุใด ดังนี้

1.1.1 การจำแนกศัตรูพืช (PRA initiated by the identification of a pest) เช่น มีการตรวจพบการเข้าทำลายหรือการระบาดของศัตรูพืชชนิดใหม่ภายในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช การตรวจพบศัตรูพืชชนิดใหม่ติดมากับสินค้านำเข้า มีการวิจัยทางวิทยาศาสตร์พบความเสี่ยงจากศัตรูพืชชนิดใหม่ หรือมีศัตรูพืชชนิดหนึ่งเข้ามาในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงแล้วให้พิจารณาว่า 1) มีรายงานว่าศัตรูพืชชนิดหนึ่งเข้าทำลายพืชและก่อให้เกิดความเสียหายรุนแรงในพื้นที่ใหม่มากกว่าพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาดเดิม 2) ตรวจพบศัตรูพืชชนิดหนึ่งบนสินค้านำเข้าหลายครั้ง 3) มีผู้ยื่นคำขออนุญาตนำเข้าสิ่งมีชีวิตเพื่อการทดลองวิจัย 4) มีการจำแนกพบสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งเป็นพาหะของศัตรูพืชชนิดอื่นเพิ่มขึ้น 5) สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่ได้รับการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมในลักษณะซึ่งมีศักยภาพที่จะเป็นศัตรูพืชได้

1.1.2 การจำแนกเส้นทางศัตรูพืช (PRA initiated by the identification of a pathway) เช่น เริ่มมีสินค้าชนิดใหม่ที่ไม่เคยนำเข้ามาก่อน หรือสินค้ามาจากพื้นที่ใหม่หรือจากแหล่งกำเนิดใหม่ พืชชนิดใหม่ถูกนำเข้าเพื่อการคัดเลือกพันธุ์หรือเพื่อการวิจัย มีเส้นทางศัตรูพืชอื่น

นอกเหนือจากการนำเข้าสินค้า เช่น การแพร่กระจายโดยธรรมชาติ วัสดุหีบห่อ ไปรษณียภัณฑ์ เศษอาหาร สัมภาระของผู้โดยสาร เป็นต้น

1.1.3 การทบทวนหรือการปรับปรุงนโยบาย (PRA initiated by the review or revision of a policy) เป็นการดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขึ้นใหม่ หรือทบทวนของเดิมที่ได้เคยวิเคราะห์ไว้แล้ว เนื่องจากมีการทบทวนกฎระเบียบสุขอนามัยพืช ข้อกำหนด การปฏิบัติ หรือมีข้อเสนอจากประเทศหนึ่งหรือโดยหน่วยงานอารักขาพืชแห่งชาติ (หน่วยงานอารักขาพืชระดับภูมิภาค องค์การอาหารแห่งสหประชาชาติ) เช่น ให้มีการทบทวนหรือปรับปรุง หรือมีวิธีการกำจัดศัตรูพืชใหม่ หรือระบบการกำจัดศัตรูพืชเดิมใช้ไม่ได้ มีกระบวนการใหม่หรือข้อมูลใหม่ที่มีผลกระทบต่อการตัดสินใจก่อนหน้านี้ หรือมีข้อโต้แย้งเกิดขึ้นกับมาตรการสุขอนามัยพืช หรือสถานการณ์ทางสุขอนามัยพืชในประเทศหนึ่งเปลี่ยนแปลงไป มีประเทศใหม่เกิดขึ้นหรือขอบเขตทางการปกครองเปลี่ยนแปลงไป

1.2 การจำแนกพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Identification of PRA area)

กำหนดพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชให้ชัดเจน

1.3 รวบรวมข้อมูลของเชื้อ *Cmm* ที่ต้องการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

รวบรวมข้อมูลที่จำเป็นสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช โดยเฉพาะการวิเคราะห์ในระยะเริ่มต้นเพื่อให้เกิดความชัดเจนเกี่ยวกับสถานภาพการแพร่ระบาดของแบคทีเรีย *Cmm* ในปัจจุบัน ตลอดจนโอกาสที่ศัตรูพืชจะติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ และเส้นทางอื่น ๆ ที่จะเข้ามาในประเทศไทย

ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชอาจมาจากแหล่งที่หลากหลาย รวมถึงตามอนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ (มาตรา 18 ข้อซี) ที่เคยส่งข้อมูลศัตรูพืชนี้ประกอบการขอเปิดตลาด

1.4 ตรวจสอบการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่มีการดำเนินการแล้ว

ตรวจสอบว่าได้เคยวิเคราะห์ความเสี่ยงแบคทีเรีย *Cmm* นี้มาก่อนแล้วหรือไม่ ถ้าเคยมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชมาแล้วให้ตรวจสอบว่ายังมีความเหมาะสมหรือไม่ ยังสามารถนำมาใช้ได้หรือไม่ หรืออาจเปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลง อาจจะนำมาใช้เพียงบางส่วนหรือทั้งหมด

1.5 ข้อสรุปของขั้นตอนการเริ่มกระบวนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

จะทราบเหตุผลของการดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงว่าเป็นเพราะเหตุใด ข้อมูลของศัตรูพืช เส้นทางที่เกี่ยวข้องกับศัตรูพืชและพื้นที่วิเคราะห์ศัตรูพืช รวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ประกอบการวิเคราะห์ รวมทั้งสามารถจำแนกได้ว่าเมล็ดมะเขือเทศจะเป็นเส้นทางศัตรูพืชเข้ามาในประเทศไทย ศัตรูพืชนี้ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศ หรือถ้ามีปรากฏก็พบในขอบเขตจำกัดภายใต้การควบคุมของพนักงานเจ้าหน้าที่

ขั้นตอนที่ 2: การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest risk assessment)

การประเมินความเสี่ยงสำหรับศัตรูพืชกักกัน จะประเมินความน่าจะเป็นในการจะเข้ามา การตั้งรกรากอย่างถาวร (Introduction) และการแพร่กระจาย (Spread) ของเชื้อ *Cmm* และโอกาสที่เชื้อจะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยการประเมินความเสี่ยงจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กัน คือ

2.1 การจัดประเภทศัตรูพืช (Pest categorization) พิจารณาว่าเชื้อแบคทีเรีย *Cmm* มีคุณสมบัติจัดเป็นศัตรูพืชกักกัน (Quarantine pest) ตามคำนิยามของศัตรูพืชกักกันในมาตรฐานระหว่างประเทศสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืชฉบับที่ 5 (Glossary of Phytosanitary Terms) (FAO, 2007) ที่ว่า“ศัตรูพืชกักกัน (Quarantine pest) หมายถึง ศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่มีศักยภาพต่อพื้นที่ที่อยู่ในอันตรายนั้นและยังไม่มีอยู่ในที่นั่นหรือมีอยู่แต่ไม่แพร่กระจายอย่างกว้างขวางและกำลังมีการควบคุมอยู่อย่างเป็นทางการ (FAO, 2007) โดยพิจารณาจากหลักการ ดังนี้ 1) ชนิดของศัตรูพืช 2) การปรากฏหรือไม่ปรากฏในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยง 3) การควบคุมทางกฎระเบียบ 4) ศักยภาพที่จะตั้งรกรากและแพร่กระจายในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยง และ 5) ศักยภาพที่จะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจและทางสิ่งแวดล้อมในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

2.2. การประเมินโอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวรและแพร่กระจาย (Assessment of the probability of introduction and spread) โดยการประเมินโอกาสการเข้ามา (Probability of entry) รวมกับการประเมินโอกาสการตั้งรกรากอย่างถาวร (Probability of establishment) และการประเมินโอกาสการแพร่กระจาย (Probability of spread) โดยเฉพาะเมื่อมีการนำเข้าเมล็ดมาเพื่อปลูกขยายพันธุ์ กระจายไปปลูกยังแหล่งต่าง ๆ หากมีการปนเปื้อนของเชื้อ *Cmm* กับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและนำไปปลูกในสภาพอากาศและช่วงเวลาที่เหมาะสม เชื้อจะมีชีวิตอยู่รอดครบวงจรชีวิตหรือไม่ในพืชอาศัย นอกจากนี้การเก็บรักษาเมล็ดและขบวนการขนส่งมีอุณหภูมิและความชื้นที่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียที่อาจติดมาหรือไม่ และการประเมินโอกาสความเป็นไปได้ของการแพร่กระจายโดยพิจารณาทางด้านชีววิทยาของเชื้อ *Cmm* ในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ในการประเมินความเสี่ยงเชื้อ *Cmm* จากเมล็ดมะเขือเทศจะถูกตั้งสมมุติฐานว่ามาจากแหล่งที่มีเชื้อ *Cmm* ปรากฏและไม่มีมาตรการสุขอนามัยพืชกำกับ ซึ่งการเคลื่อนย้ายเชื้อ *Cmm* ที่ติดมากับเมล็ดมะเขือเทศจากโรงเรือนหรือแหล่งปลูกที่ผลิตเป็นการค้าจะถือว่าเป็นเส้นทางหลักของการแพร่กระจายที่สามารถทำความเสียหายแก่พืชในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยง

2.2.1 โอกาสการเข้ามาของศัตรูพืช (Probability of entry of a pest) ขึ้นอยู่กับเส้นทางของเชื้อ *Cmm* ที่จะติดมากับมะเขือเทศว่าสามารถติดมากับส่วนใดของพืช สามารถมีชีวิตรอดในระหว่างขนส่งและเก็บรักษาได้หรือไม่ ความถี่และปริมาณศัตรูพืชที่อาจติดมากับมะเขือเทศที่นำเข้า หากจำนวนเส้นทางศัตรูพืชมากโอกาสการเข้ามาของศัตรูพืชในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชจะสูงขึ้นตามด้วย สามารถมองเห็นหรือมีวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Cmm* ที่เหมาะสมหรือไม่ เป็นต้น

2.2.2 โอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร (Probability of establishment) ประเมินศักยภาพในการปรับตัวของเชื้อ *Cmm* ในสภาพภูมิอากาศประเทศไทย โดยใช้ข้อมูลด้านชีววิทยาของศัตรูพืชที่เชื่อถือได้ (วงจรชีวิต พืชอาศัย การแพร่ระบาด การอยู่รอด เป็นต้น) จากพื้นที่ที่เชื้อ *Cmm* นั้นปรากฏอยู่ นำมาเปรียบเทียบกับสภาพในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยง จุดประสงค์ของการนำเข้ามาที่เป็นเหตุผลในการช่วยกระจายเชื้อ ความสามารถมีชีวิตรอดในสภาพที่เหมาะสมหรือไม่ จำนวนพืชอาศัย ศักยภาพความสามารถในการปรับตัวของศัตรูพืช วิธีการมีชีวิตอยู่รอดของศัตรูพืช การปฏิบัติทางการเกษตรและมาตรการป้องกันกำจัด ในการพิจารณาโอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวรของศัตรูพืชนั้นควรบันทึกไว้ด้วยว่าศัตรูพืชบางชนิดอาจปรากฏอยู่ในชั่วขณะหนึ่ง (ดู ISPM No.8 Determination of pest status in an area) แต่อาจจะไม่สามารถเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงได้ (เนื่องจากสภาพอากาศไม่เหมาะสม) แต่สามารถมีผลกระทบทางเศรษฐกิจในระดับที่ยอมรับไม่ได้ในภายหลัง (IPPC Art. VII.3)

2.2.3 โอกาสการแพร่กระจายของศัตรูพืชหลังจากเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร (Probability of spread after establishment) โดยใช้ข้อมูลทางชีววิทยาที่เชื่อถือได้จากแหล่งที่มีศัตรูพืชมาเปรียบเทียบกับสถานการณ์ในพื้นที่ที่ศัตรูพืชนั้นอาจจะระบาดในปัจจุบัน และกรณีตัวอย่างที่เคยเกิดมาแล้วกับศัตรูพืชที่คล้ายคลึงกันสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการพิจารณา โดยพิจารณาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมในสภาพธรรมชาติและ/หรือสภาพแวดล้อมที่ถูกจัดการสำหรับการแพร่กระจายของศัตรูพืชโดยธรรมชาติ สิ่งกีดขวางทางธรรมชาติ ศักยภาพการเคลื่อนย้ายของศัตรูพืชไปกับสินค้าหรือพาหนะขนส่ง จุดประสงค์ของการนำสินค้าไปใช้ประโยชน์ พาหะที่มีศักยภาพของศัตรูพืชในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ศัตรูธรรมชาติที่มีศักยภาพของศัตรูพืชในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ช่วงเวลาของวงจรชีวิต จำนวนรุ่นต่อปี ระยะฟักตัวและอื่น ๆ

2.2.4 ข้อสรุปเกี่ยวกับโอกาสการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร เจริญแพร่ขยายพันธุ์และแพร่กระจายของศัตรูพืช (Conclusion on the probability of introduction and spread) ภาพรวมของโอกาสเข้ามาเจริญแพร่ขยายพันธุ์ของ *Cmm* ในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยง

2.3 การประเมินผลทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้น (Assessment of potential economic consequence) นำข้อมูลต่าง ๆ ที่สัมพันธ์ของเชื้อ *Cmm* กับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศมารวมกัน และวิเคราะห์การสูญเสียทางเศรษฐกิจทั้งทางตรงและทางอ้อม เพื่อประเมินผลกระทบทุกด้านของศัตรูพืช

2.4 ระดับความไม่แน่นอน (degree of uncertainly) การประเมินโอกาสการเข้ามาของเชื้อ *Cmm* และผลที่ตามมาทางด้านเศรษฐกิจจะมีปัจจัยที่ไม่แน่นอนเข้ามาเกี่ยวข้องจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นการประเมินที่นอกเหนือจากสภาพ ซึ่งศัตรูพืชเกิดระบาดตามสภาพทางทฤษฎีในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช จำเป็นที่จะต้องบันทึกไว้เป็นหลักฐานเกี่ยวกับปัจจัยที่ไม่แน่นอนและระดับของความไม่แน่นอนที่เข้ามาเกี่ยวข้อง

2.5 ข้อสรุปของการประเมินความเสี่ยงของศัตรูพืช (Conclusion of the pest risk assessment stage) ผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชจะทราบว่าเชื้อ *Cmm* เป็นศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงมากน้อยระดับใดที่จะติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากแหล่งที่มีโรคระบาดอยู่ และจะถูกนำมาพิจารณาเกี่ยวกับการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชให้เหมาะสม อาจเป็นพื้นที่บางส่วนหรือทั้งหมดของพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชก็ได้

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest risk management)

กำหนดมาตรการทางเลือกสำหรับการจัดการความเสี่ยงเพื่อลดความเสี่ยงที่ได้จากการประเมินในขั้นตอนที่ 2 ดังนี้

3.1 ระดับความเสี่ยง (Level of risks) ใช้หลักการจัดการความเสี่ยงให้อยู่ในระดับที่มีระดับความเหมาะสม ซึ่งสามารถยอมรับได้ (Appropriate Level of acceptable; ALOP) หรือระดับความเสี่ยงที่สามารถยอมรับได้ (acceptable)

3.2 ข้อมูลวิชาการประกอบการพิจารณาการจัดการความเสี่ยง โดยดูจากข้อมูลที่รวบรวมได้

3.3 การยอมรับความเสี่ยง (Acceptable of risk) นำผลของการประเมินความเสี่ยงนับตั้งแต่การเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวรและการแพร่ระบาดและผลกระทบต่อเศรษฐกิจที่แสดงความเสี่ยงว่าไม่สามารถยอมรับได้นั้นมาจัดการจำแนกมาตรการสุขอนามัยพืช เพื่อลดความเสี่ยงลงให้ถึงระดับต่ำสุดที่ยอมรับได้

3.4 จำแนกและคัดเลือกวิธีการที่เหมาะสมที่มีประสิทธิภาพในการลดโอกาสการเข้ามาเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ของศัตรูพืชที่เหมาะสม ควรให้ผลที่แน่นอนและมีความเป็นไปได้ในทางปฏิบัติ อาจใช้มากกว่าสองมาตรการเพื่อลดความเสี่ยงจนถึงระดับที่ยอมรับ

3.5 การรับรองสุขอนามัยพืช (Phytosanitary certificate) โดยการรับรองสุขอนามัยพืชว่าสินค้าปราศจากศัตรูพืชกักกัน ซึ่งกำหนดโดยประเทศผู้นำเข้าและเป็นไปตามข้อกำหนดด้านสุขอนามัยพืชของประเทศนำเข้า เพื่อเป็นการยืนยันว่าได้มีการจัดการความเสี่ยงตามที่กำหนด

3.6 บทสรุปการจัดการความเสี่ยง ผลที่ได้จากขบวนการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช อาจมีมาตรการซึ่งได้รับการพิจารณาแล้วว่าเหมาะสม หรือมีการเลือกวิธีการจัดการความเสี่ยงวิธีหนึ่งหรือหลายวิธีการว่าสามารถทำให้ความเสี่ยงของศัตรูพืชลดต่ำจนอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ วิธีการจัดการความเสี่ยงเหล่านี้จะอยู่บนพื้นฐานของกฎระเบียบหรือข้อกำหนดด้านสุขอนามัยพืช

การจัดทำเอกสารการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Documentation of Pest Risk Anslysis) เพื่อใช้ประโยชน์เมื่อต้องการทบทวนมาตรการหรือเกิดกรณีโต้แย้ง

4. การสรุปผลและเขียนรายงาน

เวลาและสถานที่

ระยะ: ตุลาคม 2555 – กันยายน 2557

สถานที่: 1. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. ด่านตรวจพืชฯ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

3. โรงเรือนและแปลงปลูกมะเขือเทศของเอกชนหรือเกษตรกร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในปี 2557ได้ดำเนินการสำรวจแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในจังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน แพร่ ตาก นครราชสีมา สระบุรี และลพบุรี ได้เก็บตัวอย่างมาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการแล้วผลการตรวจยังไม่พบเชื้อ CMM ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในประเทศไทย ผลการศึกษาเปรียบเทียบเทคนิควิธีการตรวจเชื้อ CMM พบว่าเทคนิคการตรวจสอบเชื้อCMM นั้นพบว่าเทคนิคด้านชีวโมเลกุลสามารถตรวจสอบได้แม่นยำ รวดเร็ว กว่าวิธีอื่นๆ แต่มีราคาแพงกว่าวิธีอื่นๆ สำหรับผลการวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* กับเมล็ดมะเขือเทศในปีงบประมาณ 2557 นี้ ได้ผลต่อไปนี้

1.การรวบรวมข้อมูลมะเขือเทศและเชื้อ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

1.1 การรวบรวมข้อมูลมะเขือเทศ

มะเขือเทศเป็นพืชในวงศ์ Solanaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lycopersicon esculentum* Mill หรือ *L. lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw หรือ *Solanum lycopersicum* เป็นพืชในวงศ์เดียวกับพริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง ยาสูบ พิทูเนีย มีถิ่นกำเนิดอยู่ชายฝั่งตะวันตกของทวีปอเมริกาใต้แถบประเทศเปรู ชิลี และแถบอิเควเตอร์ ปลูกใช้รับประทานผลสด ประกอบอาหารหรือส่งเข้าโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานทำซอสมะเขือเทศ ซอสในโรงงานผลิตปลากระป๋อง ทำน้ำมะเขือเทศ ผลดิบสีเขียวดองในน้ำเกลือ เป็นต้น

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นพืชที่มีรากแก้วแต่หากถูกทำลายจะสร้างรากแขนงและรากฝอยขึ้นมาทดแทนเป็นจำนวนมาก เจริญในดินได้ลึกถึง 2-3 ฟุต และเจริญตามแนวนอนได้ถึง 4-5 ฟุต ลำต้นกลม อ่อนเปราะ เมื่อแก่ลำต้นจะแข็งเป็นเหลี่ยม มีกิ่งก้านแขนงสลับกันเป็นจำนวนมาก ใบมีสีเขียวปนเทา เรียว เป็นใบประกอบรูปคล้ายขนนก ใบเจริญสลับกันเป็นใบประกอบ ใบมะเขือเทศตั้งแต่ใบที่ 1-7 จะสร้างอาหารสำหรับการเจริญของราก ส่วนอื่นๆที่อยู่ใกล้ผลจะสร้างอาหารไปเลี้ยงผลและรากจะชะงักการเจริญเมื่อติดผลชุดแรก ดอกเกิดเป็นช่อบนลำต้นระหว่างข้อมะเขือเทศ ดอกออกเป็นช่อ ช่อดอกเป็นแบบ raceme มีดอกย่อย 4-50 ดอก ดอกมีกลีบเลี้ยง 5-7 กลีบ ซึ่งดอกมี 5 กลีบ เป็นดอกสมบูรณ์เพศโดยปกติก้านชูเกสรตัวเมียสั้นกว่าอับละอองเกสร ดังนั้นมะเขือเทศจะมีอัตราการผสม

ตัวเองสูง จะผสมข้าม 2-5 เปอร์เซ็นต์ ผลเป็นแบบเดี่ยวมีเนื้ออ่อนนุ่ม เมล็ดมีลักษณะรูปไข่ แบนเปลือกหุ้มเมล็ดมีขนเล็ก ๆ ปกคลุมอยู่

การเจริญเติบโต มี 3 ลักษณะคือ 1) แบบทอดยอดหรือการเจริญแบบเลื้อย ทรงพุ่มหลวม ต้นสูงต้องขึ้นค้างให้ผลผลิตช้าเก็บเกี่ยวยาวนาน 2) แบบไม่ทอดยอด ทรงพุ่มแน่นไม่ต้องขึ้นค้างให้ผลผลิตเร็วอายุสั้น มักใช้กับมะเขือเทศส่งโรงงาน 3) กึ่งทอดยอดกึ่งเลื้อย ลำต้นมักสูง อาจขึ้นค้างหรือไม่ก็ได้ ช่วงเวลาเก็บเกี่ยวนานกว่าเจริญเติบโตแบบไม่ทอดยอด

การเก็บเกี่ยว ผลอ่อนมีสีขาว เริ่มเปลี่ยนเป็นสีชมพูเข้มถึงแดงประมาณ 60-75 วันหลังปลูก ควรเก็บในระยะที่เริ่มสุกหรือห่าม หรือเมื่อผลเริ่มมีสีชมพู ปัจจุบันมีการปรับปรุงพันธุ์ใหม่ ๆ ให้มีรูปร่างแตกต่างกัน เช่น กลม รี สีผลนอกจากชมพูแล้วยังมีสีเหลือง เหลืองอมเขียวแล้วแต่ความต้องการของตลาด

แหล่งปลูก ประเทศไทยมีการปลูกมะเขือเทศที่สำคัญอยู่ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยปลูกผลิตผลสด เข้าโรงงาน หรือผลิตเป็นเมล็ดพันธุ์เพื่อส่งออกต่างประเทศ พื้นที่ปลูกมะเขือเทศมากที่สุดประมาณ 34,600 ไร่ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่จังหวัดหนองคาย สกลนคร และนครพนม ส่วนภาคเหนือมีพื้นที่ปลูกมากที่สุดที่จังหวัดเชียงใหม่ รองลงมาคือ ตาก ลำปาง และเชียงราย และภาคกลางมีพื้นที่ปลูกมากที่สุดที่จังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และกาญจนบุรี (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2557; สศก., 2557)

ข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากต่างประเทศ

ข้อมูลการนำเข้า ระหว่างปี 2551-2555 ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดมะเขือเทศจากประเทศเกาหลีใต้ จีน ญี่ปุ่น ไต้หวัน เวียดนาม สหรัฐอเมริกา อินเดีย อินโดนีเซีย ฮอลแลนด์ ฟิลิปปินส์ อิสราเอล ฮ่องกง เปรู ฝรั่งเศส พม่า สเปน (สมาคมการค้าเมล็ดพันธุ์ไทย) (ตารางผนวกที่ 1) โดยในปี 2553 มีปริมาณนำเข้าจำนวน 6,089.28 กิโลกรัม เป็นเงิน 48.06 ล้านบาท ปี 2554 จำนวน 2,925.15 กิโลกรัม เป็นเงิน 22.40 ล้านบาท และปี 2555 จำนวน 4,585.06 กิโลกรัม เป็นเงิน 53.74 ล้านบาท โดยมีบริษัทที่นำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ได้แก่ มอนซานโต้ ซินเจนทา ซากาตะ และเจียไต๋ ทั้งนี้เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากต่างประเทศที่นำเข้ามานั้นมาจากแหล่งที่พบการแพร่ระบาดของเชื้อ *Cmm*

ข้อมูลปริมาณน้ำฝนและอุณหภูมิเฉลี่ยรายปีของแหล่งปลูกมะเขือเทศในประเทศไทย จากข้อมูลของกรมอุตุนิยมวิทยาระหว่างประเทศปี 2553-2557 แบ่งตามจังหวัดที่มีพื้นที่ปลูกมะเขือเทศที่นำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศมาจากต่างประเทศเพื่อปลูก หรือเพื่อผลิตเป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมในประเทศไทย (Figure 1-3)

1.2 การรวบรวมข้อมูลทั่วไปของเชื้อ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

Domain: Bacteria

Class: Actinobacteria

Subclass:Actinobacteridae

Order: Actinomycetales

Suborder: Micrococcineae

Family: Microbacteriaceae

สาเหตุโรค ผลสะเก็ด (Bacterial canker)

ชื่อวิทยาศาสตร์อื่น ๆ ของเชื้อ :

Aplanobacter michiganensis (Smith) Smith

Bacterium michiganense Smith

Corynebacterium michiganense (Smith) Jensen

Corynebacterium michiganense pv. *michiganense* (Smith) Dye & Kemp

Corynebacterium michiganense subsp. *michiganense* (Smith) Carlson &Vidaver

Erwinia michiganensis (=michiganense) (Smith) Jensen

Mycobacterium michiganense (Smith) Krasil'nikov

Phytomonas michiganensis (Smith) Bergey et al.

Pseudomonas michiganense (Smith) Stevens

ชื่อสามัญ

Bacterial canker of tomato (English)

Bird's eye of tomato fruit (English)

Vascular tomato wilt (English)

Marchitamiento bacteriano del tomate (Spanish)

Cancer bacteriano del tomate (Spanish)

Chancre bactérien (French)

Bakterien-Tomate Krebs (Germany)

Cancro batterico (Italy)

พืชอาศัย

เชื้อ *Cmm* มีรายงานพืชอาศัยหลายชนิด ได้แก่ มะเขือเทศ (*S. lycopersicum*) พริก (*Capsicum annuum*) และมะแว้งนก (*S. nigrum*) นอกจากนี้ Stamova และ Sotirova (1987) รายงานว่าสามารถปลูกเชื้อ *C. michiganensis* ด้วยวิธีการแทงเข็มที่จุ่มสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงบนต้นพืชโดยตรง (stem inoculation) กับข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวโพด ถั่ว และทานตะวัน พืชจะแสดงอาการเหี่ยว ลำต้นเป็นแคงเกอร์

และพืชเกิดการเปลี่ยนสี (discoloration) ซึ่งจะปรากฏอาการดังกล่าวบนพืชทดสอบภายหลังการปลูกเชื้อประมาณ 5 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ในสภาพโรงเรือน เมื่อแยกเชื้อจากพืช และเมื่อนำแบคทีเรียทุกโคโลนีที่มีลักษณะคล้าย *C. michiganensis* ทดสอบบนต้นกล้ามะเขือเทศสายพันธุ์ Manalucic ที่อ่อนแอต่อโรค พบเชื้อ *C. michiganensis* แต่ไม่มีการระบุ subspecies ของเชื้อ *C. michiganensis*

ข้อมูลประเทศที่มีรายงานการพบเชื้อ *Cmm* โดยแบ่งตามพื้นที่ต่าง ๆ (Figure 4) (CABI, 2014) ดังนี้

- **ทวีปเอเชีย** ได้แก่ อาเซอร์ไบจาน อาร์เมเนีย จีน อินเดีย อินโดนีเซีย (เมืองจาวาและสุมาตรา (Aprizalzain, 2008)) อิหร่าน ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ในเมืองซูวอน (Cheorwon) และเมืองอิคซาน (Iksan) (Myung and Kim, 2008)) เลบานอน ซีเรีย ตุรกี และอุซเบกิสถาน
- **ทวีปแอฟริกา** ได้แก่ อียิปต์ เคนยา มาดากัสการ์ โมร็อกโก แอฟริกาใต้ สเปน ตูนิเซีย ยูกันดา แซมเบีย และซิมบับเว
- **ทวีปอเมริกาเหนือ** ได้แก่ แคนาดา เม็กซิโก และสหรัฐอเมริกา
- **เขตอเมริกากลางและแคริบเบียน** ได้แก่ เบลีซ คอสตาริกา คิวบา โดมินิกา เกรเนดา กัวเดอลุป และปานามา
- **ทวีปอเมริกาใต้** ได้แก่ อาร์เจนตินา บราซิล ชิลี โคลอมเบีย เอกวาดอร์ เปรู และอุรุกวัย
- **ทวีปยุโรป** ได้แก่ ออสเตรีย เบลารุส บัลแกเรีย ไซปรัส สาธารณรัฐเช็ก ฝรั่งเศส เยอรมนี กรีซ ฮังการี ไอร์แลนด์ ไอซ์แลนด์ อิตาลี ลิทัวเนีย เนเธอร์แลนด์ นอร์เวย์ โปแลนด์ โปรตุเกส โรมาเนีย รัสเซีย เซอร์เบีย สโลวีเนีย สเปน สวิตเซอร์แลนด์ ยูเครน และยูโกสลาเวีย
- เขตโอเชียเนีย ได้แก่ กวม ฟิจิ นิวซีแลนด์ ตองกา และนิวแคลิโดเนีย

ลักษณะของเชื้อ *Cmm* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) เซลล์มีลักษณะเป็นแท่งสั้น ๆ ปลายด้านหนึ่งโตกว่าอีกด้านหนึ่ง คล้ายกระบองอาจตรงหรือโค้งเล็กน้อย ขนาดประมาณ 0.6-0.7x1.0-1.2 ไมครอน เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องทดลองจะเจริญอย่างช้าๆ เชื้อสามารถเจริญบนอาหาร Nutrient glucose agar หรือ Yeast peptone glucose agar (Lelliott and Stead, 1987) ให้โคโลนีกลม ผิวเรียบเป็นมัน สีเหลืองส้ม บางครั้งอาจมีสีขาว สีชมพู และสีแดงถ้าเชื้อมีการกลายพันธุ์ (mutant) (Bradbury, 1986) โดยธรรมชาติของเชื้อนี้จะแสดงอาการของโรคใกล้เคียงกับเชื้อ *Verticillium* หรือ *Fusarium* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยว (EPPO, n.d.)

อาการ เกิดได้กับมะเขือเทศทุกระยะการเจริญเติบโต ระยะแรกจะสังเกตเห็นใบที่อยู่ส่วนล่างเฉพาะด้านหรือซีกใดซีกหนึ่งของต้นหรือกิ่งเฉาอ่อนตัวลง ขอบใบม้วนงอขึ้นด้านบน ต่อมาพืชจะมีอาการเหี่ยวและแห้งในที่สุด อาการดังกล่าวจะค่อย ๆ ลามจากส่วนล่างของต้นสูงขึ้นมาเรื่อยๆ แต่จะเป็นเพียงด้านหนึ่งหรือซีกหนึ่งของต้นเท่านั้นเหมือนระยะเริ่มแรก เมื่อพืชเริ่มอาการเหี่ยวขึ้น หาก

พิจารณาอย่างใกล้ชิดจะพบว่าบริเวณรอยต่อระหว่างก้านใบที่เหี่ยวกับกิ่งหรือต้นเกิดเป็นแผลขีดเส้นยาวสีซีดขึ้น ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีดำแล้วแตกออกเป็นแผลสะเก็ดยาว ๆ ก้านของใบหรือกิ่งที่แสดงอาการเหล่านี้หากนำมาตัดหรือผ่าออกดูจะพบว่าส่วนที่เป็นท่ออาหารจะมีสีคล้ำ เมื่อปล่อยทิ้งไว้สักครู่จะมีเมือกสีเหลืองของเชื้อแบคทีเรียไหลเยิ้มออกมา อาการระยะสุดท้ายคือต้นมะเขือเทศจะชะงักงันหยุดการเจริญเติบโต ใบส่วนที่เหี่ยวจะหดย่นแล้วแห้งตาย หากเชื้อเข้าทำลายแขนงอ่อนที่เพิ่งแตกออกจะมีผลทำให้ความยาวระหว่างข้อของกิ่งหรือก้านของแขนงดังกล่าวหดสั้น อ้วนหนาขึ้นกว่าปกติ และหากการทำลายเกิดขึ้นในระยะที่ต้นโตเต็มที่แล้วบางครั้งอาจไม่แสดงอาการเหี่ยว แต่จะเกิดอาการแห้งตายของใบขึ้นแทน โดยเริ่มจากขอบใบที่อยู่ส่วนบนๆ ของต้นลงมา แล้วค่อยกระจายออกไปทั่วทั้งต้นทำให้พืชตายในที่สุด หากเกิดโรคหลังจากที่มะเขือเทศออกผลแล้ว อาการอาจไปแสดงให้เห็นที่ผลด้วยคือถ้าเป็นผลอ่อนจะขาวซีด ต่อมาจะแห้งแล้วร่วงหลุดจากต้น สำหรับผลที่โตแต่ยังไม่สุกจะเกิดแผลสะเก็ดนูนสูงขึ้นมาจากผิวเล็กน้อย ส่วนใหญ่จะมีขนาดประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ตรงกลางแผลจะแตกเป็นสีน้ำตาล ลักษณะขรุขระ บริเวณรอบ ๆ แผลจะมีขอบสีขาวล้อมอยู่โดยรอบลักษณะคล้ายตานก (bird's eye) หากเกิดโรคนี้ขึ้นที่ผล เชื้อแบคทีเรียจะไปอาศัยเคลือบเกาะติดอยู่ทั้งที่ผิวนอกและใต้เปลือกของเมล็ด เพื่ออยู่ข้ามฤดูและแพร่ระบาดต่อไป (ศักดิ์, 2537; CABI,2014) ทั้งนี้อาการที่ปรากฏบนพืชนั้นยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ อีก เช่น อายุพืช สายพันธุ์พืช และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค เป็นต้น (Gleason *et al*., 1993; Strider, 1969) (Figure 5-6)

มาตรการสุขอนามัยพืช มีการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศอย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายวิธีร่วมกัน เช่น

- การตรวจสอบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศว่าปลอดจากเชื้อ *Cmm*
- การแช่เมล็ดลงในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที (NPPO, 2013)
- การนำเมล็ดพึ่งลมร้อน (Dry heat) ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Miller and Ivey, 2005)
- การแช่เมล็ดใน 5 เปอร์เซ็นต์ Hydrochloric acid (HCl) หรือ 0.05 เปอร์เซ็นต์ o-phenylphenol เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงล้างออกด้วยน้ำเปล่า เป็นการกำจัดเชื้อ *Cmm* ที่ติดมากับเมล็ดจากการเข้าทำลายในสภาพธรรมชาติ (NPPO, 2013)
- การกำหนดให้ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการตรวจสอบ เช่น เทคนิค Real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจงไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น โอกาสในการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นต่ำ มีความไวในการตรวจสอบที่ระดับ 10 CFU หรือเมล็ดที่มีการปนเปื้อนของเชื้อเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ ก็สามารถตรวจสอบได้ ไม่จำเป็นต้องมีการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ ประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลา ซึ่งมีการนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *Cmm* ที่ติดมากับเมล็ดของมะเขือเทศในประเทศจีน (Zhao *et al*., 2007)

2. การสุ่มตรวจสอบเชื้อ *Cmm* จากเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากต่างประเทศ

ในปี 2555-2556 ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดมะเขือเทศจาก 14 ประเทศ โดยพบว่ามีการนำเข้าจากประเทศที่มีรายงานการพบเชื้อ *Cmm* เช่น เกาหลี ชิลี เนเธอร์แลนด์ เปรู ฝรั่งเศส อเมริกา อิสราเอล อินโดนีเซีย อินเดีย จีน เม็กซิโก ญี่ปุ่น แอฟริกาใต้ (กลุ่มงานศัตรูพืชกักกัน, 2557; CABI, 2014) (ตารางผนวกที่ 1)

ผลการตรวจสอบเชื้อ *Cmm* จากเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าในเดือนมกราคม 2557 จำนวน 17 ครั้ง รวม 20 ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ โดยมาจาก 9 ประเทศ ได้แก่ ประเทศเปรู เนเธอร์แลนด์ ฝรั่งเศส อินเดีย จีน แอฟริกาใต้ ลาว สหรัฐอเมริกาและฟิลิปปินส์ เมื่อตรวจด้วยวิธีการ dilution plate บ่มที่อุณหภูมิห้อง และคัดเลือกโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่สงสัยจากตัวอย่างมาตรวจสอบ ผลปรากฏว่าไม่พบ *Cmm* ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้า และผลการสุ่มตรวจสอบจากแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้า 4 บริษัท ได้แก่ บริษัทมอนซานโต้ บริษัทซาคะตะ บริษัทอดัมส์ และบริษัทซีนส์เมล็ดพันธุ์ ในจังหวัดขอนแก่น รวม 10 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อ *Cmm* สาเหตุโรคเช่นกัน

3. ผลการศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Risk Assessment)

ขั้นตอนที่ 1: การเริ่มขบวนการวิเคราะห์ (Initiation)

เนื่องจากมีรายงานแจ้งจากประเทศฝรั่งเศสว่ามีการตรวจพบเชื้อ *Cmm* จากเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากประเทศไทย โดยพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยง ได้แก่ ประเทศไทย เนื่องจากประเทศไทยเป็นแหล่งปลูกมะเขือเทศที่ปลูกกระจายทั่วทุกภูมิภาค (ศูนย์สารสนเทศการผลิตทางด้านการเกษตร, 2557) เพื่อการค้า การบริโภค และตามวัฒนธรรมที่จะปลูกพืชผักสวนครัวในแหล่งที่อยู่อาศัยของตนเอง ซึ่งถ้ามีการเล็ดลอดของเชื้อ *Cmm* เข้ามาตั้งรกรากได้และอาจมีการแพร่กระจายในพื้นที่ต่าง ๆ ทั่วประเทศได้ โดยเส้นทางศัตรูพืชที่เชื้อจะเข้ามาในประเทศ ได้แก่ เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีการควบคุมทางกฎหมาย คือ ถูกประกาศให้เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทยตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 บนพื้นฐานจากการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในเบื้องต้นเท่านั้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องยืนยันสถานภาพของเชื้อ *Cmm* ในประเทศไทย ทั้งนี้ประเทศไทยไม่มีข้อมูลทางวิชาการที่สนับสนุนถึงความเสี่ยงที่เชื้อจะมีโอกาสติดเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร แพร่ระบาดทำความเสียหาย และส่งผลกระทบทางเศรษฐกิจทั้งทางตรงและทางอ้อมจากเชื้อนี้ ตามหลักการประกาศเป็นศัตรูพืชกักกัน

ขั้นตอนที่ 2: การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest risk assessment)

2.1.การจัดประเภทศัตรูพืช (Pest categorization) โดยพิจารณาจาก

2.1.1 การจัดจำแนกชนิด (Identify) และชีววิทยาของเชื้อ

อนุกรมวิธานของเชื้อ *Cmm* มีชื่อเริ่มแรกว่า Bacterium เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยว (Bacterial wilt) และโรคแคงเกอร์ (Canker) ต่อมามีการเปลี่ยนชื่ออีกหลายชื่อ Davis และคณะ (1984) กำหนดให้ในจีนัส *Clavibacter* ประกอบด้วย *C. michiganensis* และอื่น ๆ อีก 4 ชนิด

หลังจากนั้นมีการจัดจำแนกเชื้อทั้ง 4 ชนิด ใหม่พบว่า *C. michiganensis* คือ *michiganense* จากการศึกษาข้อมูลลักษณะของเชื้อ (phenotypic) การทดสอบทางชีวเคมี เครื่องหมายโมเลกุลและความเฉพาะเจาะจงของพืชอาศัย (Saddler and Kerr, 2012; Smith, 1910) นอกจากนี้สามารถจัดแบ่งเชื้อ *C. michiganensis* ออกเป็น 6 subspecies โดยทุก subspecies ของเชื้อ *C. michiganensis* ที่เข้าทำลายมะเขือเทศจะจัดอยู่ในกลุ่ม subspecies *michiganensis* โดย Yim และคณะ (2012) พบว่าเชื้อ *Cmm* ที่เข้าทำลายพริกจะแตกต่างจากชนิดที่เข้าทำลายมะเขือเทศ เมื่อใช้ลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี การก่อโรค และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rRNA และ Its (Internal transcribed spacer) ของเชื้อในการจัดจำแนกชนิด

วงจรชีวิต

แหล่งที่มาของเชื้อ คือ เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีเชื้อ *Cmm* (Strider, 1969; Fatmi *et al.*,1988; EPPO, 2013a) และต้นอ่อนที่ปนเปื้อนเชื้อ *Cmm* ขณะที่ย้ายปลูก (Ricker and Riedel, 1993) โดยปริมาณเชื้อ *Cmm* ในสภาพธรรมชาติที่สามารถเข้าทำลายเมล็ดพันธุ์ได้ คือที่ 10^2-10^4 จำนวนโคโลนีต่อกรัม (เมล็ด) (Colony forming unite/กรัม, CFU/กรัม) (Fatmi and Schaad, 1988; Hadas *et al.*, 2005) และสามารถถ่ายทอดโรคได้ที่ 10^2 จำนวนโคโลนีต่อกรัม (เมล็ด) (Kaneshiro, 2003) และยังพบว่าเมล็ดที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *Cmm* ที่อัตรา 0.01 เปอร์เซ็นต์ เพียงพอที่จะก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อ *Cmm* ในสภาพแปลงปลูกได้ (Chang *et al.*, 1991; Gitaitis *et al.*, 1991) เชื้อจะมีชีวิตรอดอยู่ในเมล็ดได้เป็นเวลานาน (Strider, 1969) ส่วนการมีชีวิตรอดในเศษซากพืชในดินขึ้นกับชนิดของดิน (Moffett and Wood, 1984) แต่จะอยู่ได้ถึง 2 ปี ในเศษซากพืชที่อยู่บริเวณผิวหน้าดิน (Gleason *et al.*, 1991) โดยปัจจัยของสภาพแวดล้อมและระบบการจัดการในการปลูกจะมีผลต่อแหล่งของเชื้อ *Cmm* โดยตรง (Figure 7-8)

การเข้าทำลาย เชื้อสามารถเข้าทำลายส่วนของผล ใบ ลำต้น เมล็ด และส่วนอื่น ๆ ทั่วทั้งต้น เชื้อจะเข้าไปสู่ภายในพืชได้ดี โดยผ่านทางแผลที่ใบเลี้ยง ใบ กิ่งก้าน ต้นหรือช่องเปิดธรรมชาติ เช่น ปากใบ หรือบริเวณรากขนอ่อนที่มีรอยแตก (Kontaxis, 1962; Layne, 1967) แผลจากการพรวนดิน (Carlton *et al.*, 1994) จากนั้นเชื้อ *Cmm* จะเข้าไปเจริญในท่อส่งน้ำในลำต้นและเพิ่มปริมาณเชื้อ ทำให้เกิดการอุดตันของท่อส่งน้ำในลำต้น เชื้อจะเคลื่อนที่จากท่อลำเลียงน้ำเข้าสู่ผนังรังไข่หรือส่วนของดอกทำให้เชื้อสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ (Medina-Mora *et al.*, 2001; Tancos *et al.*, 2013) นอกจากนี้เชื้อมีการสร้างสารพิษ (toxic lycopeptide) ทำให้พืชแสดงอาการผิดปกติ (Miura *et al.*, 1986) ช่วงระยะเวลาระหว่างที่เชื้อเข้าทำลายจนกระทั่งพืชแสดงอาการใช้เวลาประมาณ 7- 84 วัน โดยขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น อายุพืช ระยะการเจริญเติบโตของพืช อุณหภูมิ ลักษณะของดินและสารอาหารของพืช (Gleason *et al.*, 1993) พืชจะแสดงอาการเมื่อปริมาณเชื้อมากกว่า 10^7 CFU/ เมล็ด (Chang *et al.*, 1992) นอกจากนี้ช่วงเวลาการพักตัวของเชื้อก่อนจะแสดงอาการโรคอาจใช้เวลานานขึ้น ถ้าเมล็ดเป็นสายพันธุ์ที่มีความต้านทาน เชื้อมีปริมาณน้อยและอุณหภูมิ

ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ แต่ถ้าสภาพต่าง ๆ เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อก็จะเพิ่มความรุนแรงของโรคมากขึ้น (Gleason *et al.*, 1993)

อาการโรค อาการโรคที่เกิดจากเชื้อ *Cmm* บนพืชอาศัยจะปรากฏได้ 2 ลักษณะ ขึ้นกับว่าการเข้าทำลายนั้นเป็นแบบ เข้าทำลายทุกส่วนของพืช หรือเข้าทำลายเฉพาะบางส่วนของพืช ในบางครั้งจะมีความสับสนของโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Cmm* หรือเชื้อ *Ralstonia solanacearum*, *Fusarium* spp หรือ *Verticillium* spp. การพบอาการของโรคจะพบได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช โดยระยะแรกจะสังเกตเห็นใบที่อยู่ส่วนล่าง ๆ เฉพาะด้านหรือซีกใดซีกหนึ่งของต้นหรือกิ่งเฉาอ่อนตัวลง ขอบใบม้วนงอขึ้นด้านบน ติดตามด้วยอาการเหี่ยวแล้วแห้ง อาการดังกล่าวจะค่อยๆ ลามจากส่วนล่างของต้นสูงขึ้นมาเรื่อย ๆ แต่ก็จะเป็นเพียงด้านหนึ่งหรือซีกหนึ่งของต้นเท่านั้น เหมือนเมื่อตอนเริ่มเกิด เมื่อเริ่มอาการเหี่ยวขึ้นนั้นหากพิจารณาให้ใกล้ชิดจะพบว่าตรงรอยต่อระหว่างก้านใบที่เหี่ยวกับกิ่งหรือต้นเกิดเป็นแผลขีดเส้นยาวสีซีดขึ้น ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีดำแล้วแตกออกเป็นแผลสะเก็ดยาว ๆ ก้านของใบหรือกิ่งที่แสดงอาการเหล่านี้หากนำมาตัดหรือผ่าออกดูจะพบว่าส่วนที่เป็นท่อส่งอาหารมีสีคล้ำ เมื่อปล่อยทิ้งไว้สักครู่จะมีเมือกสีเหลืองของเชื้อแบคทีเรียไหลเยิ้มออกมา อาการระยะสุดท้ายคือต้นมะเขือเทศจะชะงักงันหยุดการเจริญเติบโต ใบส่วนที่เหี่ยวจะหดย่นแล้วแห้งตาย หากเชื้อเข้าทำลายแขนงอ่อนที่เพิ่งแตกออกมาจะมีผลทำให้ความยาวระหว่างข้อของกิ่งหรือก้านของแขนงดังกล่าวหดสั้นอ้วนหนาขึ้นกว่าปกติ และหากการทำลายเกิดขึ้นในระยะที่ต้นโตเต็มที่แล้วบางครั้งอาจไม่แสดงอาการเหี่ยว แต่จะเกิดอาการแห้งตายของใบขึ้นแทน โดยเริ่มจากขอบใบที่อยู่ส่วนบนๆ ของต้นลงมาแล้วค่อยกระจายออกไปทั่วทั้งต้นทำให้พืชตายในที่สุด หากเกิดโรคหลังจากที่มะเขือเทศออกผลแล้วอาการอาจไปแสดงให้เห็นที่ผลด้วยคือถ้าเป็นผลอ่อนจะขาวซีด ต่อมาจะแห้งแล้วร่วงหลุดจากต้น สำหรับผลที่โตแต่ยังไม่สุกจะเกิดแผลสะเก็ดนูนสูงขึ้นมาจากผิวเล็กน้อย ส่วนใหญ่จะมีขนาดประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ตรงกลางแผลจะแตกเป็นสีน้ำตาล ลักษณะขรุขระ สังเกตที่ได้ชัดเจนคือ รอบ ๆ แผลจะมีขอบสีขาวล้อมอยู่โดยรอบ ลักษณะคล้ายตานก (Bird's eye) ในกรณีที่เกิดโรคนี้ขึ้นที่ผลเชื้อแบคทีเรียจะไปอาศัยเคลือบเกาะติดอยู่ทั้งที่ผิวนอกและใต้เปลือกของเมล็ด เพื่ออยู่ข้ามฤดูและแพร่ระบาดต่อไป (ศักดิ, 2537; CABI,2014) ทั้งนี้อาการที่ปรากฏบนพืชยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ อีก เช่น อายุพืช สายพันธุ์พืช และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค เป็นต้น (Gleason *et al.*, 1993; Strider 1969) เชื้อจะเข้าทำลายพืชในระยะเมล็ดงอก ระยะออกดอก ระยะติดผล และระยะให้ผลผลิต โดยส่วนของพืชที่เชื้อเข้าทำลาย คือ ส่วนผล ส่วนใบ ส่วนลำต้น เมล็ด และส่วนอื่น ๆ ทั่วทั้งลำต้น เชื้อจะเข้าไปสู่ภายในพืชได้ดี โดยผ่านทางแผลที่ต้น ใบ กิ่งก้าน หรือ cotyledon หรือช่องเปิดธรรมชาติ เช่น ปากใบ หรือบริเวณราก จากนั้นก็จะเข้าไปอยู่ในท่อส่งน้ำในลำต้นแล้วเจริญเติบโตก่อให้เกิดการทำลายและอุดตันท่อส่งน้ำในลำต้นดังกล่าว นอกจากนี้เชื้อมีกาสร้างสารพิษ (toxic lycopeptide) ซึ่งทั้งหมดนี้จะเป็นสาเหตุที่ส่งผลให้พืชแสดงอาการของโรคขึ้นในที่สุด (Miura *et al.*, 1986)

2.1.2 การตรวจสอบและจำแนกชนิด เชื้อ *Cmm* เป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่เป็น แกรมบวก (gram positive) เซลล์มีลักษณะเป็นแท่งสั้น ๆ ปลายด้านหนึ่งโตกว่าอีกด้านหนึ่ง คล้ายกระบองอาจตรงหรือโค้งเล็กน้อย ขนาดประมาณ 0.6-0.7x1.0-1.2 ไมครอน เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องทดลองจะเจริญอย่างช้า ๆ เชื้อสามารถเจริญบนอาหาร Nutrient glucose agar หรือ Yeast peptone glucose agar (Lelliott and Stead, 1987) ให้โคโลนีกลม ผิวเรียบเป็นมัน สีเหลืองส้ม บางครั้งอาจมีสีขาว สีชมพู และสีแดง ถ้าเชื้อมีการกลายพันธุ์ (mutant) (Bradbury, 1986) โดยธรรมชาติของเชื้อนี้จะมีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *Verticillium* หรือ *Fusarium* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยว (EPPO, n.d.)

วิธีการตรวจสอบ เชื้อ *Cmm* จากตัวอย่างเมล็ดพืช มีดังนี้

1.การใช้อาหารกึ่งคัดเลือก (semi selective media) สำหรับแยกเชื้อที่ได้จากการใช้สารสกัดเมล็ด โดยปกติวิธีการนี้มีความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบไม่เพียงพอ เพราะเชื้อชนิดอื่นที่แฝงอยู่ (saprophyte) จะเจริญได้เร็วกว่าจึงยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Cmm* (Fatmi and Schaad, 1988; Shirakawa and Sasaki, 1988) จึงมีการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่ชื่อ bud-containing tissue (BCT) ที่สามารถคัดแยกเชื้อได้ภายใน 7 วัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้สามารถใช้ในการตรวจสอบเชื้อจากเมล็ดพืชและพืชที่แสดงอาการเพียงเล็กน้อยได้ (Radwan *et al.*, 2011)

2.เทคนิคทางเซรุ่มวิทยามีความจำเป็นต้องใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงของเชื้อเพียงพอสำหรับใช้ตรวจสอบเชื้อ *Cmm* (Rat, 1984)

3.เทคนิคทางอณูชีววิทยา เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจง รวดเร็วในการตรวจสอบ แต่มีค่าใช้จ่ายสูงและบางเทคนิคต้องใช้เวลาในการตรวจสอบ ซึ่งเทคนิคใหม่ ๆ ที่มีรายงานและเป็นที่ยอมรับในการตรวจสอบ เช่น Fatty acid profile (Gitaitis and Beaver, 1990), molecular hybridization (Thompson *et al.*, 1989) Bio-PCR (Burokiene, 2006) และ protein profiles (Bruyne *et al.*, 1987)

2.1.3 การแพร่ระบาดของเชื้อในปัจจุบัน

แหล่งการแพร่กระจาย *Cmm* มีการแพร่กระจายหลายแหล่งทั่วโลก โดยพบการแพร่ระบาดทั่วทุกภูมิภาค (ภาพผนวกที่ 1)

2.1.4 การปรากฏหรือไม่ปรากฏในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยง

ประเทศไทยเป็นแหล่งปลูกมะเขือเทศผลสดและผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมที่ใหญ่ในกลุ่มประเทศอาเซียนและมีการเพาะปลูกพืชอื่นในวงศ์โซลานาซิอี้ (Solanaceae) เช่น พริก มะเขือ ที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อนี้ด้วย อาจปลูกเป็นการค้าหรือเป็นผักสวนครัวกระจายทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ แต่ยังไม่เคยมีรายงานการปรากฏพบเชื้อนี้ในประเทศไทย

2.1.5 การควบคุมทางกฎระเบียบ

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ออก เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้าม ตามพระราชบัญญัติพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 กำหนดให้ *Clavibacter michiganensis*

subsp. *michiganensis* เป็นสิ่งต้องห้าม และประกาศให้มะเขือเทศ ซึ่งเป็นพืชอาศัยของเชื้อ *Cmm* จัดเป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชและพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้นและเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 ที่กำหนดให้ส่วนหนึ่งส่วนใดของพืชในวงศ์โซลานาซิอี้ (Solanaceae) (ไม่รวมถึง บุหรี่ ยาเส้น ซิการ์) เป็นสิ่งต้องห้าม การนำเข้าพืชในวงศ์นี้ต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ก่อนการนำเข้า และการนำเข้าต้องปฏิบัติตามที่อธิบดีกรมวิชาการเกษตรกำหนด ปัจจุบันการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พืชในวงศ์นี้มีเพียงใบรับรองสุขอนามัยพืชที่ยังไม่มีการระบุชนิดของศัตรูพืชกักกันและมาตรการทางสุขอนามัยพืชใดๆกำกับ แม้จะมาจากแหล่งที่มีรายงานของเชื้อนี้แพร่ระบาดก็ตาม

การควบคุมเชื้อ *Cmm* ของต่างประเทศ เช่น ประเทศสมาชิกของสหภาพยุโรป (EU) ได้แก่ ออสเตรีย เบลเยียม บัลแกเรีย โครเอเชีย ไซปรัส สาธารณรัฐเช็ก เดนมาร์ก เอสโตเนีย ฟินแลนด์ ฝรั่งเศส เยอรมนี กรีซ ฮังการี ไอซ์แลนด์ อิตาลี ลัตเวีย ลิทัวเนีย ลักเซมเบิร์ก มอลตา เนเธอร์แลนด์ โปแลนด์ โปรตุเกส โรมาเนีย สโลวาเกีย สโลวีเนีย สเปน สวีเดน และสหราชอาณาจักร จัดให้เชื้อ *Cmm* เป็นศัตรูพืชกักกัน (A2 quarantine pest) กำหนดให้การนำเข้าเมล็ดพันธุ์ต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชและใบอนุญาตนำเข้า โดยเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่จะนำเข้าจากต่างประเทศจะต้องมาจากประเทศที่มีการสำรวจ ตรวจสอบ ติดตามขบวนการผลิตเมล็ดพันธุ์ รับรองการปลอดจากการแพร่กระจายของเชื้อ *Cmm* ในแหล่งปลูก และมีการสุ่มตรวจสอบเชื้อตลอดฤดูการปลูกพืช

ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน กำหนดให้การนำเข้าเมล็ดพันธุ์ต้องมีใบอนุญาตนำเข้าใบรับรองสุขอนามัยพืชและและเมล็ดพันธุ์ทั้งหมดต้องปราศจากเมล็ด *Brassica* spp. และให้รับรองด้วยว่าปราศจากเชื้อ *Cmm* (Ministry for Primary Industries, n.d.)

นอกจากนี้มีประเทศที่ประกาศว่าเชื้อ *Cmm* เป็นศัตรูพืชกักกัน เช่น ซีเรีย (Radwan *et al*., 2011) เวียดนาม (Minister of Agriculture and Rural Development, 2005) สำหรับ European Plant Protection Organization (EPPO), Asia and Pacific Plant Protection Commission (APPPC), The Caribbean Plant Protection Commission (CPPC) และ The Inter-African Phytosanitary Council (IAPSC) พิจารณาให้เชื้อนี้เป็นเชื้อศัตรูพืชกักกันประเภท A2 คือ พบว่าเป็นศัตรูพืชกักกันในบางพื้นที่ (Present in some parts of the region) (Leandro *et al*., 2011)

สรุปได้ว่าในการจัดประเภทศัตรูพืชนั้น เชื้อ *Cmm* เป็นสาเหตุโรคพืชที่มีวงจรชีวิตที่เข้าทำลายพืชในวงศ์ Solanaceae และมีชีวิตอยู่รอดในเมล็ดได้ โดยที่ประเทศไทยซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีความเสี่ยง ไม่เคยมีปรากฏเชื้อนี้มาก่อน และยังมีกฎระเบียบในการควบคุมโดยประกาศเป็นศัตรูพืชกักกัน เช่นเดียวกับหลาย ๆ ประเทศ แต่จำเป็นต้องศึกษาศักยภาพของ *Cmm* ว่าจะเข้ามาตั้งรกรากและแพร่กระจายในประเทศไทยและก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจหรือไม่ เพื่อคงความเป็นศัตรูพืชกักกันต่อไปหรือไม่

2.2. ศักยภาพที่เชื้อ *Cmm* จะเข้ามาตั้งรกรากและแพร่กระจายในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยง

2.2.1 ศักยภาพการเข้ามา เชื้อ *Cmm* เป็นโรคเมล็ดพันธุ์และสามารถถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ได้ โดยเชื้อจะอาศัยอยู่ภายใต้เปลือกของเมล็ด (CABI, 2014) ปริมาณเชื้อ *Cmm* ในสภาพธรรมชาติที่สามารถเข้าทำลายเมล็ดพันธุ์ได้คือ 10^2-10^4 CFU/ เมล็ด (Fatmi and Schaad, 1988; Hadas *et al.*, 2005) และสามารถถ่ายทอดโรคได้ที่ 10^2 CFU/ เมล็ด (Kaneshiro, 2003) และยังพบว่าเมล็ดที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *Cmm* ที่ อัตรา 0.01 เปอร์เซ็นต์ ก็เป็นปริมาณที่เพียงพอในการแพร่กระจายเชื้อสาเหตุโรคในแปลงปลูกได้ ซึ่งระดับการเกิดโรคจากเมล็ดที่มีเชื้อจะผันแปรไปตั้งแต่ 1 เปอร์เซ็นต์, 24-53 เปอร์เซ็นต์, 80-90 เปอร์เซ็นต์ โดยขึ้นอยู่กับสัดส่วนของเมล็ดที่ติดเชื้อในแต่ละถาด (batch) และสภาพในการเก็บรักษาเมล็ด (Chang *et al.*, 1991; Gitaitis *et al.*, 1991) เชื้อ *Cmm* สามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดได้ตั้งแต่ 1-97 เปอร์เซ็นต์ โดยความผันแปรของการถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดนั้น อาจเกิดจากอายุของเมล็ดที่เก็บและสภาพของการเก็บเมล็ด พบว่าการเก็บเมล็ดที่อุณหภูมิห้องจะทำให้การถ่ายทอดโรคทางเมล็ดลดลงไปจากเมล็ดที่ถูกเชื้อเข้าทำลายในสภาพธรรมชาติ 82 เปอร์เซ็นต์ เป็น 4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บเมล็ดเป็นเวลา 18 เดือน ถ้าเก็บถึง 2 ปี พบว่าเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดโรคทางเมล็ดจะลดลงเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเก็บเมล็ดที่ 4 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพโรงเก็บทั่วไปจะทำให้เชื้อที่ติดมากับเมล็ดเสื่อมลงได้ตั้งแต่ 100 เปอร์เซ็นต์ ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บนาน 3 ปี 6 เดือน จึงเป็นเหตุผลว่าในบางครั้งไม่มีการถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดหรือมีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดโรคเพียงเล็กน้อย (Chang *et al.*, 1991; Dhanvantari, 1993; Gitaitis *et al.*, 1991) เชื้อสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดพันธุ์ ส่วนอื่น ๆ ของพืชที่เชื้อเข้าทำลายและเศษซากพืชได้ประกอบกับข้อมูลวงจรชีวิตของเชื้อ *Cmm* สำหรับประเทศไทยซึ่งเป็นพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชนั้น พบว่ามีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากแหล่งที่มีการแพร่ระบาดของเชื้อ *Cmm* เช่น จีน ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา อิตาลี เป็นต้น (ตารางผนวกที่ 1) ซึ่งโรคนี้จัดเป็นโรคเมล็ดพันธุ์ที่รุนแรง โดยเชื้อสามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าและถ่ายทอดโรคสู่เมล็ดพันธุ์ได้อีกด้วย ซึ่งจากข้อมูลของเชื้อ *Cmm* ที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดที่อัตรา 0.01 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเพียงพอที่จะก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อนี้ในสภาพแปลงปลูกได้ตามข้อมูลวงจรชีวิต (Figure 7-8) เมื่อมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ทางเครื่องบินหรือทางไปรษณีย์ ซึ่งจะถูกจัดเก็บในสภาพห้องเย็นที่มีอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส จึงคงสภาพความมีชีวิตของเชื้อในเมล็ดพันธุ์ได้ และใช้เวลาเดินทางเพียง 24 ชั่วโมง ก็สามารถเข้ามาถึงจุดนำเข้า ซึ่งมีการนำเข้าหลายครั้งเฉพาะเดือนมกราคมปี 2557 มีการนำเข้าถึง 17 ครั้ง จาก 9 ประเทศ เมื่อมีการสุ่มตรวจจะไม่สามารถสังเกตอาการเชื้อ *Cmm* ได้ด้วยตาเปล่า จึงนับว่ามีโอกาสที่เชื้อจะเข้ามาได้สูง

2.2.1 ศักยภาพการตั้งรกราก

ลักษณะภูมิประเทศ ประเทศไทยตั้งอยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในบริเวณที่เรียกว่า “คาบสมุทรอินโดจีน” ซึ่งเป็นดินแดนที่เชื่อมระหว่างกลางของอินเดียทางตะวันตกและจีนทางตะวันออก ประเทศไทยอยู่ติดกับทะเล 2 ฝั่ง คือ ฝั่งอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน เมื่อ

พิจารณาเกี่ยวกับทำเลที่ตั้งของประเทศไทย จะพบว่าประเทศไทยตั้งอยู่ในวงล้อมของภูเขารูปเกือกม้า ซึ่งเป็นแนวธรรมชาติที่ช่วยป้องกันประเทศพอสมควร มีพรมแดนทางทิศตะวันออกติดประเทศลาว และกัมพูชา ทิศใต้ติดประเทศมาเลเซีย ทิศตะวันตกติดประเทศเมียนมาร์ และทิศเหนือติดกับประเทศเมียนมาร์และประเทศลาว (ก.พ., มปป.)

ประเทศไทยมีพื้นที่ประมาณ 513,120 ตารางกิโลเมตร หรือประมาณ 320.7 ล้านไร่ เป็นพื้นดิน 510,890 ตารางกิโลเมตร เป็นพื้นน้ำ 2,230 ตารางกิโลเมตร มีเนื้อที่มากเป็นอันดับ 51 ของโลก เป็นพื้นที่การเกษตรจำนวน 122.2 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 38.2 ของพื้นที่ทั้งประเทศ โดยภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ทางการเกษตร 57.7 ล้านไร่ หรือประมาณร้อยละ 44 ของพื้นที่การเกษตรทั้งประเทศ จึงเป็นภาคที่มีพื้นที่การเพาะปลูกมากที่สุดของประเทศไทย ส่วนใหญ่ปลูกข้าวและพืชไร่ เช่น มันสำปะหลัง อ้อย ข้าวโพด (ก.พ., มปป.; อนันต์, มปป.) สำหรับพืชผักที่สำคัญ เช่น หอม กระเทียม ข้าวโพดฝักอ่อน หน่อไม้ฝรั่ง มันฝรั่ง มะเขือเทศ และ พริก เป็นต้น

ลักษณะภูมิอากาศ ประเทศไทยมีลักษณะอากาศแบบเขตร้อน แบ่งออกได้เป็น 3 ฤดู คือ 1) ฤดูร้อน 2) ฤดูฝน 3) ฤดูหนาว ยกเว้นภาคใต้ที่มีแค่สองฤดู คือ ฤดูร้อนกับฤดูฝน ประเทศจะมีฤดูร้อนในช่วงระหว่างเดือนเมษายน-เดือนพฤษภาคม ฤดูฝนจะอยู่ในช่วงกลางเดือนพฤษภาคม-เดือนตุลาคม และฤดูหนาวจะอยู่ในเดือนพฤศจิกายน-กลางเดือนมีนาคม (ก.พ., มปป.)

ชีววิทยาของเชื้อ *Cmm* และสภาพแวดล้อม สภาพแวดล้อมที่ส่งเสริมความรุนแรงของเชื้อ คือ อุณหภูมิประมาณ 23.33-32.22 องศาเซลเซียส (75-90 องศาฟาเรนไฮต์) และมีความชื้นสูงเป็นระยะเวลานาน แต่ถ้าสภาพอากาศไม่เหมาะสม เช่น อากาศเย็นมาก หรืออบอุ่นขึ้นประมาณ 25 องศาเซลเซียส และมีปริมาณเชื้อก่อโรคในระดับต่ำ อัตราการเกิดโรคจะลดลง (Chang *et al.*, 1992) เชื้อมีการเจริญเติบโตและการก่อโรคได้ดีที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 33 องศาเซลเซียส ความรุนแรงของโรคจะลดลง สำหรับความชื้นเชื้อต้องการในระดับปานกลางไม่ชอบดินที่แฉะหรือแห้งเกินไป (ศักดิ์, 2537) เชื้อสามารถมีชีวิตแฝงอยู่ในพืชได้ประมาณ 3 ปี และติดกับอุปกรณ์ทางการเกษตรได้มากกว่า 7 เดือน (CABI, 2014) เชื้อสามารถอยู่รอดในเศษซากพืช โดยเชื้อที่ตั้งรกรากอยู่นี้จะพักตัวเพื่อรอเข้าทำลายต้นกล้าพืชที่ปลูกใหม่ในฤดูกาลถัดไป การเข้าทำลายของเชื้ออาจเกิดจากหนาม (trichromes) ที่แตกหักจากต้นที่เป็นโรคร่วงลงบนใบเกิดเป็นบาดแผลหรือบาดแผลที่เกิดจากการพ่นสารเคมีก็เป็นได้

พืชอาศัย เชื้อ *Cmm* มีศักยภาพที่จะเข้ามาตั้งรกรากในประเทศไทยได้ เนื่องจากพืชอาศัยของเชื้อมีหลายชนิดที่ปลูกในประเทศไทย เช่น พริก มะเขือเทศ มะเขือ พิทูเนีย เป็นต้น มีการปลูกทั่วไปทั้งในสวน โรงเรือน แปลงเกษตรกร ทั้งที่สูงหรือที่ราบลุ่มที่มีน้ำได้ทั่วทั้งประเทศ สภาพภูมิอากาศของประเทศไทยมีความคล้ายคลึงกับแหล่งที่มีรายงานการแพร่ระบาดของเชื้อนี้

เมื่อศึกษาข้อมูลแหล่งปลูกมะเขือเทศในประเทศไทย (Table 2) พบว่าอุณหภูมิโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วงที่เชื้อ *Cmm* จะเข้ามาตั้งรกรากและก่อโรคได้ในระดับสูง สภาพความชื้นที่เชื้อนี้ต้องการอยู่ในระดับปานกลางแต่ประเทศไทยค่อนข้างชื้น โดยบางพื้นที่ที่เพาะปลูกมะเขือเทศจะปล่อย

น้ำขังในแปลงทำให้เชื้อนี้อาจมีชีวิตและเจริญได้ไม่ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อพิจารณาจากพืชอาศัยที่มีหลายชนิดและปลูกซ้ำๆ ในพื้นที่เดิมจึงมีความเสี่ยงที่เชื้อจะตั้งรกรากได้ หากเชื้อมีโอกาสเข้ามาก็จะสามารถตั้งรกรากได้ในระดับปานกลางถึงสูง

2.2.3 ศักยภาพการแพร่กระจาย การแพร่ระบาดของเชื้อมีได้หลายวิธี เช่น ติดอยู่กับเมล็ดในลักษณะของ seed-borne สามารถติดไปกับเศษซากพืช หัว ไหล ดอก ผล ใบ ราก ต้นกล้า ลำต้น และพักตัวอยู่ในดินได้ (CABI, 2014) มีรายงานของ Dhanvantari (1993) ทดสอบการอยู่รอดของเชื้อบนเมล็ดพันธุ์พบว่าถ้าเก็บเมล็ดที่มีเชื้อ *Cmm* ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 18 เดือน นอกจากนี้เชื้อสามารถแพร่กระจายไปยังพืชต้นอื่น ๆ ด้วยน้ำฝน ระบบน้ำ และเครื่องมือต่าง ๆ ในการทำเขตกรรม หรือโดยการจับต้องสัมผัส เช่น การถอนย้ายกล้า การผูกมัดต้นกับไม้ค้ำยัน การตัดแต่งพืชตลอดจนการเก็บเกี่ยวผล ถึงแม้ว่ามะเขือเทศจะเป็นพืชที่อ่อนแอต่อเชื้อ *Cmm* ในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ (Rat *et al.*, 1991) แต่หลังจากมีการเข้าทำลายมะเขือเทศด้วยเชื้อนี้พบว่าเชื้อจะมีระยะการพักตัวที่ยาวนานในต้นพืชก่อนที่พืชจะแสดงอาการ จึงอาจเป็นการเพิ่มโอกาสในการแพร่กระจายของเชื้อได้อีกทางหนึ่ง (Strider, 1969) ซึ่งการปลูกมะเขือเทศในประเทศไทยจะมีทั้งการย้ายกล้า การค้ำยัน และการตกแต่งกิ่ง และการที่นำเมล็ดไปปลูกในแหล่งต่าง ๆ ทั่วประเทศเป็นการกระจายแหล่งของเชื้อด้วย ดังนั้นการแพร่กระจายจึงมีโอกาสสูง

2.3. ศักยภาพที่จะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจและทางสิ่งแวดล้อมในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชด้วย

เชื้อ *Cmm* เป็นเชื้อที่สร้างความเสียหายให้กับการผลิตมะเขือเทศทั้งในสภาพแปลงปลูกและโรงเรือนและสร้างความกังวลในการเพาะปลูกให้กับเกษตรกรอย่างมากเพราะเชื้อนี้ทำให้ต้นกล้าตายและผลผลิตไม่เป็นที่ต้องการของตลาด (CABI, 2014) เมื่อเกิดการแพร่ระบาดของเชื้อนี้ในโรงเรือนทำให้ผลผลิตของมะเขือเทศได้รับความเสียหายถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ในประเทศลิทัวเนีย (Burokiene, 2006) พบความเสียหายของผลผลิตมะเขือเทศในรัฐนอร์ทแคโรไลนาของสหรัฐอเมริกา 70 เปอร์เซ็นต์ ในบางฤดูกาลเพาะปลูก ส่วนพันธุ์การค้าที่มีการเพาะปลูกและพันธุ์ที่ถูกควบคุม (controlled studies) พบว่าผลผลิตได้รับความเสียหายสูงถึง 84 เปอร์เซ็นต์ และ 93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Poysa, 1993) ประเทศฝรั่งเศสมีการทดสอบความเสียหายของเชื้อ *Cmm* พบว่าเชื้อนี้ทำให้ผลผลิตลดลง 20-30 เปอร์เซ็นต์ (Rat *et al.*, 1991) ปี ค.ศ. 1909 พบว่ามะเขือเทศที่ปลูกในโรงเรือนของรัฐมิชิแกนได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของเชื้อนี้คิดเป็นมูลค่า 300,000 ดอลลาร์ต่อการปลูกในหนึ่งปี ในประเทศเกาหลีใต้ที่เมืองชูวอนและเมืองอิคซานพบว่าเชื้อนี้ทำให้ใบมะเขือเทศมีอาการที่ผิดปกติ ม้วนงอ ผิดรูปร่าง ในประเทศอินโดนีเซียพบว่าเชื้อนี้ทำให้ผลผลิตมะเขือเทศลดลง 80 เปอร์เซ็นต์ พื้นที่ในประเทศไทยที่ปลูกมะเขือเทศซึ่งเป็นพืชอาศัยหลักของเชื้อนี้พบว่าในปี 2557 ผลผลิตมะเขือเทศในรูปผลสดประมาณ 112,900 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 1,500 ล้านบาท (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2558; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558) ในการผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเพื่อส่งออกหากพบการเข้าทำลายของเชื้อ *Cmm* ซึ่งจะทำลายผลผลิตพืชที่ปลูกเป็นผลสด ทำให้ผลผลิต

ลดลงได้เช่นประเทศอื่น ๆ และก่อให้เกิดความเสียหายต่อธุรกิจเมล็ดพันธุ์ลูกผสมที่ประเทศไทยผลิตเพื่อส่งออก อาจทำให้สูญเสียรายได้ไปมากกว่าครึ่ง โดยเฉพาะประเทศไทยจะต้องถูกกำหนดให้มีการตรวจสอบและรับรองว่าเมล็ดที่ส่งออกต้องปลอดจากศัตรูพืชชนิดนี้อีกด้วย เนื่องจากเป็นศัตรูพืชกักกันของหลาย ๆ ประเทศ ดังนั้นเชื้อ *Cmm* จึงมีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจในระดับสูง (Economic Importance High) (EPPO, n.d.) ดังนั้นจึงควรมีมาตรการสุขอนามัยพืชในการควบคุมเชื้อที่ติดไปกับเมล็ด เพื่อลดโอกาสการเป็นแหล่งของโรคในการแพร่ระบาดต่อไปด้วยการทำ seed treatment และเนื่องจากเชื้อ *Cmm* มีพืชอาศัยหลายชนิดและมีการปลูกอย่างแพร่หลายในทวีปต่าง ๆ เมื่อเกิดการแพร่ระบาดของโรคจากเมล็ดที่มีการปนเปื้อนเชื้อจะส่งผลกระทบต่อการผลิตพืชในบริเวณกว้างและสร้างความเสียต่อระบบเศรษฐกิจตามมา แต่ยังคงต้องหาข้อมูลเพิ่มเติมต่อไป

สรุปผลการวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช

ในปี 2557ได้ดำเนินการสำรวจแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในจังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน แพร่ ตาก นครราชสีมา สระบุรี และลพบุรี ได้เก็บตัวอย่างมาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการแล้วผลการตรวจยังไม่พบเชื้อ CMM ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในประเทศไทย ผลการศึกษาเปรียบเทียบเทคนิควิธีการตรวจเชื้อ CMM พบว่าเทคนิคการตรวจสอบเชื้อCMM นั้นพบว่าเทคนิคด้านชีวโมเลกุลสามารถตรวจสอบได้แม่นยำ รวดเร็ว กว่าวิธีอื่นๆ แต่มีราคาแพงกว่าวิธีอื่นๆ สำหรับผลการวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงเชื้อแบคทีเรีย CMM กับเมล็ดมะเขือเทศในปีงบประมาณ 2557 นี้ได้รวบรวมข้อมูลมะเขือเทศ เช่น อนุกรมวิธาน ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ แหล่งปลูกมะเขือเทศ การเก็บเกี่ยว ข้อมูลการนำเข้า รวบรวมข้อมูลเชื้อ *Cmm* ได้ข้อมูลลักษณะทางอนุกรมวิธาน ชื่อสามัญ พืชอาศัย การเกิดโรค การเข้าทำลาย การตรวจสอบ ความเสียหาย วิธีการตรวจสอบ การถ่ายทอดโรค มาตรการสุขอนามัยพืช ข้อมูลประเทศที่มีการพบเชื้อ รวมถึงสภาพภูมิอากาศในแหล่งปลูกมะเขือเทศของประเทศไทย ผลการตรวจสอบเชื้อ *Cmm* จากเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าในปี 2556 จำนวน 17 ครั้ง จาก 9 ประเทศ รวม 20 ตัวอย่าง และผลการสุ่มตรวจสอบจากแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า 4 บริษัท รวม 10 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อ *Cmm* ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้า จากนั้นนำข้อมูลเข้าสู่กระบวนการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช พบว่าจุดเริ่มต้น (Initiation) ของการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเริ่มจากการที่ประเทศฝรั่งเศสแจ้งให้ทราบว่ามีการตรวจพบเชื้อ *Cmm* จากเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ส่งออกจากประเทศไทย ซึ่งไม่มีรายงานการปรากฏของเชื้อนี้และประเทศไทยประกาศให้เชื้อ *Cmm* เป็นศัตรูพืชกักกัน บนพื้นฐานการวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงของเชื้อนี้เพียงเบื้องต้นเท่านั้น จึงต้องดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงโดยการจำแนกชนิดของเชื้อ *Cmm* ตามหลักอนุกรมวิธาน การไม่ปรากฏพบในประเทศไทย โดยพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในที่นี้ คือ ประเทศไทยทั้งประเทศ เนื่องจากประเทศไทยมีการปลูกมะเขือเทศได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ สำหรับการควบคุมทางกฎระเบียบพบว่าประเทศไทยได้ออกประกาศ

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 โดยแนบท้ายประกาศนั้นได้กำหนดให้ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* เป็นศัตรูพืชกักกัน ซึ่งมีอีกหลายประเทศที่การนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจะกำหนดให้เชื้อ *Cmm* เป็นศัตรูพืชกักกัน เช่น สหภาพยุโรป จีน เวียดนาม เป็นต้น เมื่อพิจารณาศักยภาพในการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวรของเชื้อ *Cmm* พบว่าเชื้อ *Cmm* สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้ เชื้อจึงสามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์จากแหล่งปลูกที่พบการระบาดของเชื้อได้ โดยมีชีวิตอยู่รอดในระหว่างการขนส่งและไม่สามารถตรวจสอบด้วยสายตาได้ ณ จุดนำเข้า จึงมีโอกาสเข้ามาในประเทศไทยได้ และข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศของประเทศไทยพบว่ามีการนำเข้าจากประเทศที่พบการแพร่ระบาดของเชื้อและบ่อยครั้ง สำหรับศักยภาพในการเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวรและแพร่กระจายในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงพบว่าเชื้อ *Cmm* มีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 23.33-32.22 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับช่วงอุณหภูมิของแหล่งปลูกมะเขือเทศในประเทศไทยหลายพื้นที่ทั้งในสภาพโรงเรือนและสภาพแปลงปลูก เชื้อ *Cmm* มีพืชอาศัยหลายชนิดที่ปลูกในประเทศไทย เช่น พริก มะเขือเทศ มะเขือ เป็นต้น จึงสรุปว่ามีความเสี่ยงสูงที่เชื้อจะติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าและสามารถตั้งรกรากได้อย่างถาวร โดยการปลูกมะเขือเทศของประเทศไทยจะนำเมล็ดพันธุ์ลูกผสมที่นำเข้าจากต่างประเทศไปปลูกในหลายพื้นที่ นอกจากนี้เชื้อ *Cmm* มีโอกาสแพร่กระจายไปกับเมล็ดพันธุ์และวิธีการดำเนินการปลูกเช่นย้ายกล้า ตัดแต่งกิ่ง ส่วนต่าง ๆ ของพืชที่มีการเข้าทำลายของเชื้อ เครื่องมือ อุปกรณ์การเกษตรได้ จึงมีความเสี่ยงที่เชื้อจะแพร่กระจายสู่แหล่งปลูกได้ในบริเวณกว้าง จากข้อมูลสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยและพืชอาศัยของเชื้อ *Cmm* แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีโอกาสเข้ามาตั้งรกรากอยู่ได้ จากการสืบค้นข้อมูลผลกระทบของเชื้อ *Cmm* ในเบื้องต้นจากประเทศต่าง ๆ เช่น ประเทศอินโดนีเซียมีปริมาณผลผลิตมะเขือเทศลดลง 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเชื้อนี้เข้าทำลาย ประเทศฝรั่งเศสมีการทดสอบความเสียหายของเชื้อ *Cmm* พบว่าเชื้อนี้ทำให้ผลผลิตลดลง 20-30 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น ข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ว่าเชื้อ *Cmm* มีศักยภาพที่จะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจของประเทศไทยทั้งทางตรงและทางอ้อมได้และจะดำเนินการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ก.พ. มมป. **ระบบบริหารราชการของราชอาณาจักรไทย.** กรกนกการพิมพ์. สำนักงานคณะกรรมการข้าราชการพลเรือนนนทบุรี. 200 หน้า. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.dp-t.go.th/foreign/images/stories/file_pdf/ASEAN_GURU/manage_thai.pdf. (21 มีนาคม 2558).

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2557. **รายงานข้อมูลภาวะการผลิตพืช แบบรายปี**. ศูนย์สารสนเทศ กรมส่งเสริมการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. (ออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://production.doae.go.th (21 ธันวาคม 2557).

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2558. **รายงานข้อมูลภาวะการผลิตพืช แบบรายปี**. ศูนย์สารสนเทศ กรมส่งเสริมการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. (ออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://production.doae.go.th (21 มีนาคม 2558).

กรมอุตุนิยมวิทยา. 2557. **ข้อมูลสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยในปี 2556.** จากการขอข้อมูลโดยตรงที่กรมอุตุนิยมวิทยา.

กลุ่มศัตรูพืชกักกัน. 2557. **ข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากต่างประเทศระหว่างปี 2556-2557.** กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ศักดิ์ สุทรสิงห์. 2537. **โรคของผักและการป้องกันกำจัด.** ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ 198 น.

ศูนย์สารสนเทศการผลิตทางด้านการเกษตร. 2557. **รายงานข้อมูลภาวะการผลิตพืช (รต.01) แบบรายปี 2556/2557**. กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://production.doae.go.th/report/report_main2.php?report_type=1. (24 มิถุนายน 2557).

สศก. (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร). 2556. **สถิติการเกษตรของประเทศไทย.** ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 199 หน้า. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://www.oae.go.th/download/download_journal/yearbook55.pdf (21 มีนาคม 2558).

_____. 2557. **มะเขือเทศ: เนื้อที่เพาะปลูก เนื้อที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ พันธุ์โรงงานและบริโภค ปี 2554-2556**. ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://www.oae.go.th/ewtadmin/ewt/oae_web/download/prca-i/vegetable/tomato.pdf. (21 มีนาคม 2558).

_____. 2558. **มันฝรั่ง: เนื้อที่เพาะปลูก เนื้อที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ปี 2556-2558.** ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://www.oae.go.th/download/prcai/vegetable/potato.pdf (21 มีนาคม 2558).

_____. 2558. **สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2557.** โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ , กรุงเทพฯ. 215 น.

อนันต์ ดาโลดม. มปป. **พื้นที่การเพาะปลูกกับความเป็นประเทศเกษตรกรรม. สมาคมพืชสวนแห่งประเทศไทย.** (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://www.foodresources.org-/news/16/09/10/6743 (21 มีนาคม 2558).

Aprizalzainal, Aswaldianwar, Ujangkhairul and Sudarsono. 2008. Distribution of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nichiganensis* in Various Tomato Production Centers in Sumatra and Java. **Microbiology**. 2: 63–68.

Bradbury, J.F. 1986. **Guide to plant pathogenic bacteria**. CAB International, Wallingford, UK. 332 pp.

Bruyne, E. de, R. Vantomme and J. de Ley. 1987. **Enzymatic features and SDS gel electrophoretic protein patterns of *Corynebacterium michiganense*.** Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen. RijksuniversiteitGent. 52: 1095-1100.

Burokiene, D. 2006. Early detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seedlings**. Agronomy Research**. 4: 151-154.

CABI. 2014 ***Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*** . (Online). Available. http://www.cabi.org/cpc/?compid=1&dsid=15338&loadmodule=datasheet&-page=868&site=161 (Febuary 21, 2014).

Carlton, WM., M.L. Gleason and E.J. Braun. 1994. Effects of pruning on tomato plants supporting epiphytic populations of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis.* **Plant Disease**. 78: 742-745.

Chang, R.J., S.M. Ries and J.K. Pataky. 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. **Phytopathology**. 81: 1276-1281.

Chang, R.J., S.M. Ries and J.K. Pataky. 1992. Effects of temperature, plant age, inoculum concentration, and cultivar on the incubation period and severity of bacterial canker of tomato. **Plant Disease**. 76: 1150-1155.

Chang, R.J., S.M. Ries and J.K. Pataky. 1992. Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. **Phytopathology**. 82: 553-560.

Davis, M.J., A.G. Gillaspie, A.K. Vidaver and R.W. Harris. 1984. *Clavibacter* a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 34: 107-117.

Dhanvantari, B.N. 1993. Seed-borne infection in tomato bacterial canker. *In* **Proceedings of the 9th**. Annual Tomato Disease Workshop 33-36 p.

Eichenlaub, R., K.H. Gartemann and A. Burger. 2006. *Clavibacter michiganensis*, a group of gram-positive phytopathogenic bacteria. Pages 385-421 In**: Plant-Associated Bacteria.** S. S. Gnanamanickam, ed. Springer, The Netherlands.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013a. EPPO Standards Diagnostic PM 7/42 (2) *Calvibacter michiganensis* subsp. *michiganensis.* **EPPO Bulletin**. 43: 46-67.

EPPO. n.d. **Data Sheets on Quarantine Pests; *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.** Prepared by CABI and EPPO for the EU under Contract 90/399003.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). n.d. **EPPO-PQR (Plant Quarantine Data Retrieval system).** (Online). Available. www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm (March 1, 2015).

FAO. 2007. **International Standards for Phytosanitary Measures no. 5: Glossary of Phytosanitary Terms (2007)**. (Online). Available. http://agriculture.gouv.fr/-IMG/pdf/ispm_05_version_2007_ang.pdf (March 16, 2015).

Fatmi, M. and N.W. Schaad. 1988. Semi selective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. **Phytopathology**. 78; 121-126.

Gitaitis, R.D. and R.W. Beaver. 1990. Characterization of fatty acid methyl ester content of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Phytopathology**. 80: 318-321.

Gitaitis, R.D., R.W. Beaver and A.E. Voloudakis. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. **Plant Disease**. 75: 834-838.

Gleason, M.L. E.J. Braun, W.M. Carlton and R.H. Peterson. 1991. Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. P**hytopathology**. 81: 1519-1523.

Gleason, M.L., R.D. Gitaitis and M.D. Ricker. 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. **Plant Disease**. 77: 1069-1076.

Hadas, R., G. Kritzman, F. Klietman, T. Gefen and S. Manulis. 2005. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. **Plant Pathology**. 54: 643-649.

ISTA (International Seed Testing Association). 2012. **ISTA Annual Meeting 2012**. (Online). Available. https://www.seedtest.org/en/event-detail---0--0--0--20.html. (March 16, 2015).

Kaneshiro, W.S. and A.M. Alvarez. 2003. Variability and survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) in seed. **Phytopathology**. 93: 43.

Kontaxis, D.G. 1962. Leaf trichomes as avenues for infection by *Corynebacterium michiganense*. **Phytopathology**. 52: 1306-1307.

Layne, R.E.C. 1967. Foliar trichomes and their importance as infection sites for *Corynebacterium michiganense* on tomato. **Phytopathology**. 57: 981-985.

Leandro, L., F. Siverio, M.M. Lopez and A. Rodriguez. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne Tomato pathogen: Healthy seeds are still the goal. **Plant Disease**. 95: 1328-1339.

Lelliott, R.A. and D.E. Stead. 1987. **Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.

Medina-Mora, C.M., M.K. Hausbeck and D.W. Fulbright. 2001. Bird's eye lesions of tomato fruit produced by aerosol and direct application of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Plant Disease**. 85: 88-91.

Miller, S. A., and M. L. Ivey. 2005. **Hot water and chlorine treatment of vegetable seeds to eradicate bacterial plant pathogens**. The Ohio State University Extension. HYG-3085-05.

Minister of Agriculture and Rural Development. 2005. **The list of plant quarantine pests of socialist republic of Vietnam.** (Online). Available. http://pflanzenges-undheit.jki.bund.de/dokumente/upload/6d45d_vn3-qso.pdf. (Febuary 24, 2014).

Ministry for Primary Industries. n.d. **China General Requirements**. (Online). Available. http://www.biosecurity.govt.nz/regs/exports/plants/icpr/cn. (Febuary 28, 2014).

Miura, L., R. da S. Romeiro and J.C. Gomes. 1986. Production, purification and biological activity of an exotoxin produced in vitroby *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*. **Fitopatologia Brasileira**. 11; 789-794.

Moffett, M.L. and B.A. Wood. 1984. Survival of *Corynebacterium michiganense* subsp. *michiganense* within host debris in soil. **Australian Plant Pathology**. 13: 1-3.

Myung, L.S. and D.G. Kim. 2008. First Report of Bacterial Canker of Tomato Caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Korea. Korea. **Plant Dis**. 92: 1472.

NPPO. 2013. **NAPPO Regional Standard for Phytosanitary Measures (RSPM); RSPM 36 Phytosanitary Guidelines for the Movement of Seed**. Ottawa, Canada.

Poysa, V. 1993. Evaluation of tomato breeding lines resistant to bacterial canker. **Canadian Journal of Plant Pathology**. 15: 301-304.

Radwan, F., A. von Tiedemann, B. Koopmann, M. Abu-Ghorrah and K. Rudolph. 2011. Occurrence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis,* the causal agent of bacterial canker of tomato, in Syria. **Phytopathol. Mediterr**. 49: 172–178.

Rat, B. 1984. *Corynebacterium michiganense*. Technique de detection dans les semences de tomato. In : **Ist International Workshop on Seed Bacteriology**.

Rat, B., J. Poissonnier, M.J. Goisque and A. Burgaud. 1991. Le point sur le chancre bactérien. **Fruit et Légumes**. 86: 38-40.

Ricker, M.D. and R.M. Riedel. 1993. Effect of secondary spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on yield of northern processing tomatoes. **Plant Disease**. 77: 364-366.

Saddler, G.S. and E.M. Kerr. 2012. "Genus V. *Clavibacter*." In : **Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed. Vol.5**: The Actinobacteria, Part A. Eds Goodfellow M., P. Kampfer, H.J. Busse, M.E. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig and W.B. Whitman. Springer, New York, 877-883 p.

Shirakawa, T. and T. Sasaki. 1988. A selective medium for isolation of *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*, the pathogen of tomato bacterial canker disease. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**. 54; 540-543.

Smith, E.F. 1910. A new tomato disease of economic importance. Science 803: 794-796.

Stamova, L. and V. Sotirova. 1987. Reaction of different crops to artificial inoculation with *Corynebacterium michiganense*. **Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz**. 23: 211-216.

Strider, D.L. 1969. **Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*:** A literature review and bibliography. Technical Bulletin North Carolina Agricultural Experiment Station, No. 193. 110 p.

Tancos, M.A., L. Chalupowicz, I. Barash, S. Manulis-Sasson and C.D. Smart. 2013. Tomato fruit and seed colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through external and internal routes. **Applied and Environmental Microbiology**. 79: 6948-6957.

Thompson, E., J.V. Leary and W.W.C. Chun. 1989. Specific detection of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* by homologous DNA probe. **Phytopathology**. 79: 311-314.

Yim, K.O., H.I. Lee, J.H. Kim, S.D. Lee, Cho J.H. and J.S. 2012. Characterization of phenotypic variants of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolated from *Capsicum annuum*. **European Journal of Plant Pathology**. 133: 559-575.

Zhao, W.J., H.Y. Chen, S.F. Zhu and M.X. Xia. 2007. **One-step detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato seeds using a taqman probe**. (Online). Available. http://www.researchgate.net/publication/238792706_onestep_detection_of_clavibacter_michiganensis_subsp._michiganensis_in_symptomless_tomato_seeds_using_a_taqman_probe. (March 23, 2015).

ภาคผนวก

Table 1 Tomato seed importation into Thailand, company name, imported country and important planting areas (Plant Quarantine Research Group, 2014)

Company	Imported countries	Important planting areas
Monsanto	Guatemala, South Korea*, Chile*, Netherlands*, Peru*, France*, USA*, China*, Israel *, Indonesia*, India*, Mexico*	Khon Kaen, Kalasin, Sakon Nakhon, Lampang, Lamphun, Nan, Chiang Rai
Syngenta	USA*, China*, Israel*, India*	Khon Kaen
Sakata	France*, Japan*, USA*, China*, India*, South Africa*	Khon Kaen
Chia Tai	China*, India*, Japan*	Khon Kaen, Sakon Nakhon

* Distribution report of *Cmm* (CABI, 2014)

Table 2 Production areas of Tomato in Thailand (Department of Agricultural Extension, 2014)

Province	Area (rai)	Province	Area (rai)
Sakon Nakhon	6,419.00	Lop Buri	927.00
Bueng Kan	2,989.75	Phayao	810.00
Nong Khai	2,784.00	Khon Kaen	731.50
Chiang Mai	2,548.50	Lampang	600.00
Nakhon Phanom	2,197.25	Nakhon Ratchasima	591.00
Tak	1,730.00	Saraburi	558.00
Phetchaburi	1,651.50	Ubon Ratchathani	429.50
Mae Hong Son	1,316.50	Chaiyaphum	399.50
Prachuap Khiri Khan	1,265.00	Nakhon Pathom	349.00
Chiang Rai	1,107.50		

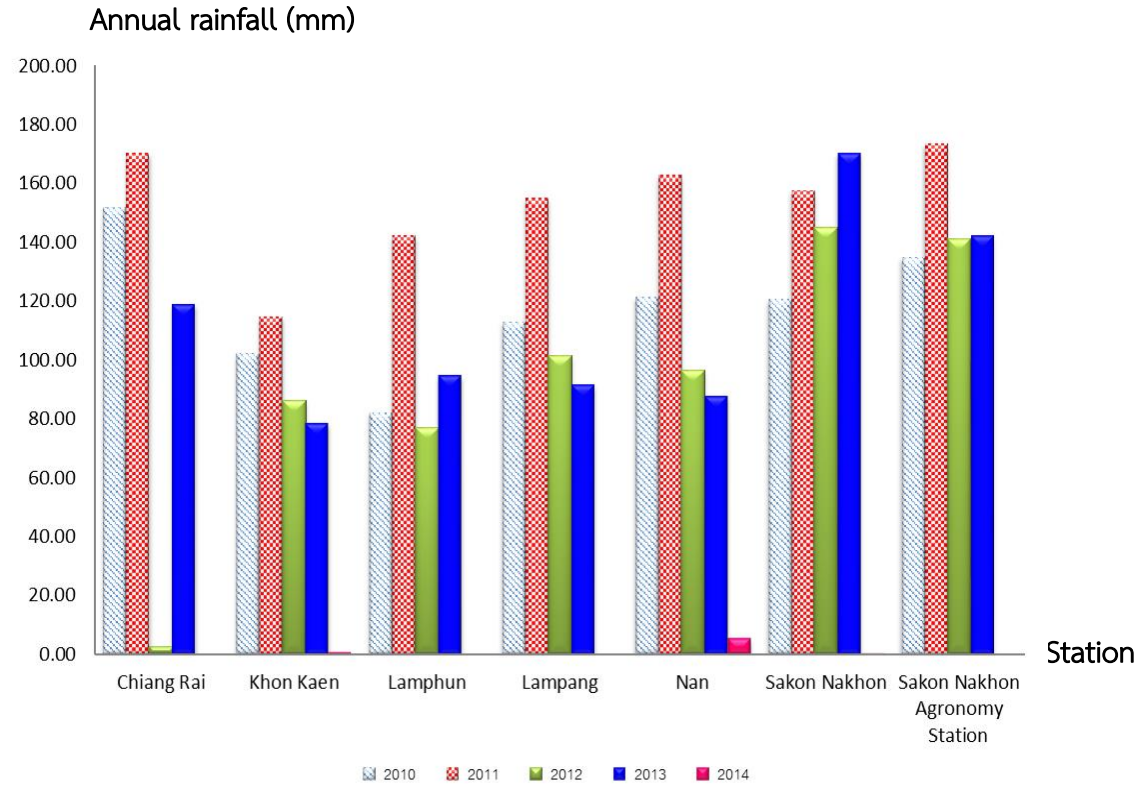


Figure 1 Average annual rainfall (2010-2014) (Meteorological Department, 2014)

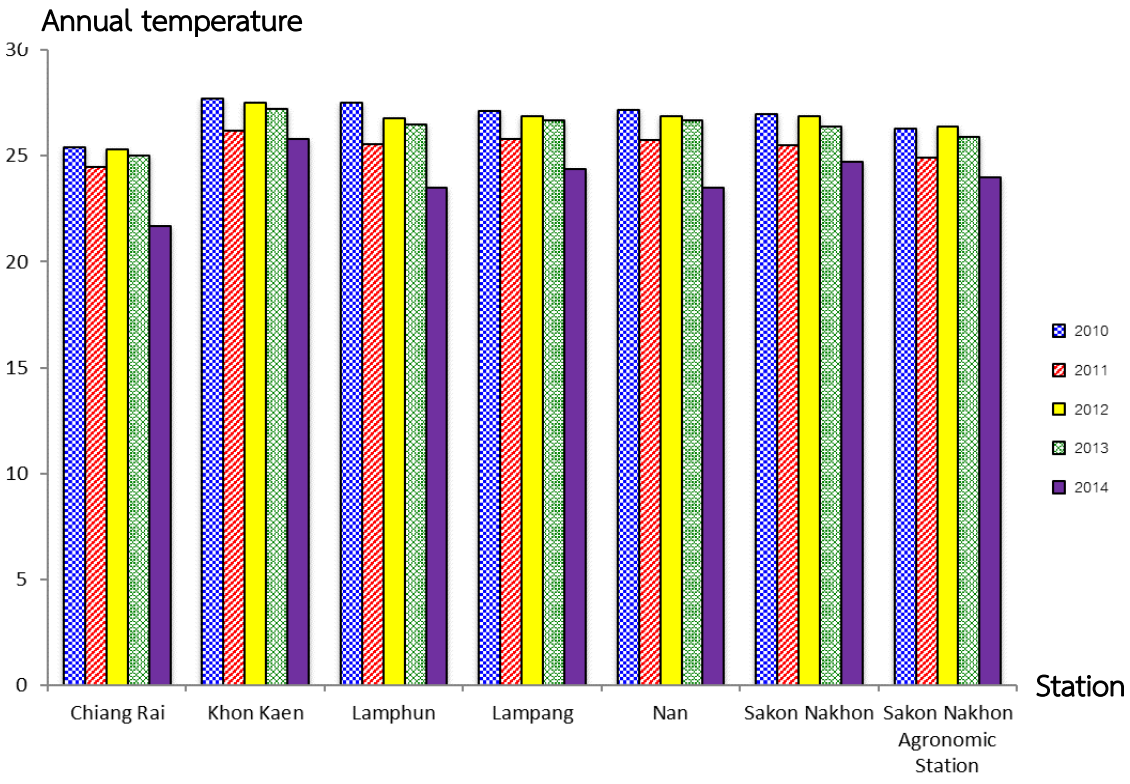


Chart 2 Average annual temperature (2010-2014) (Meteorological Department, 2014)

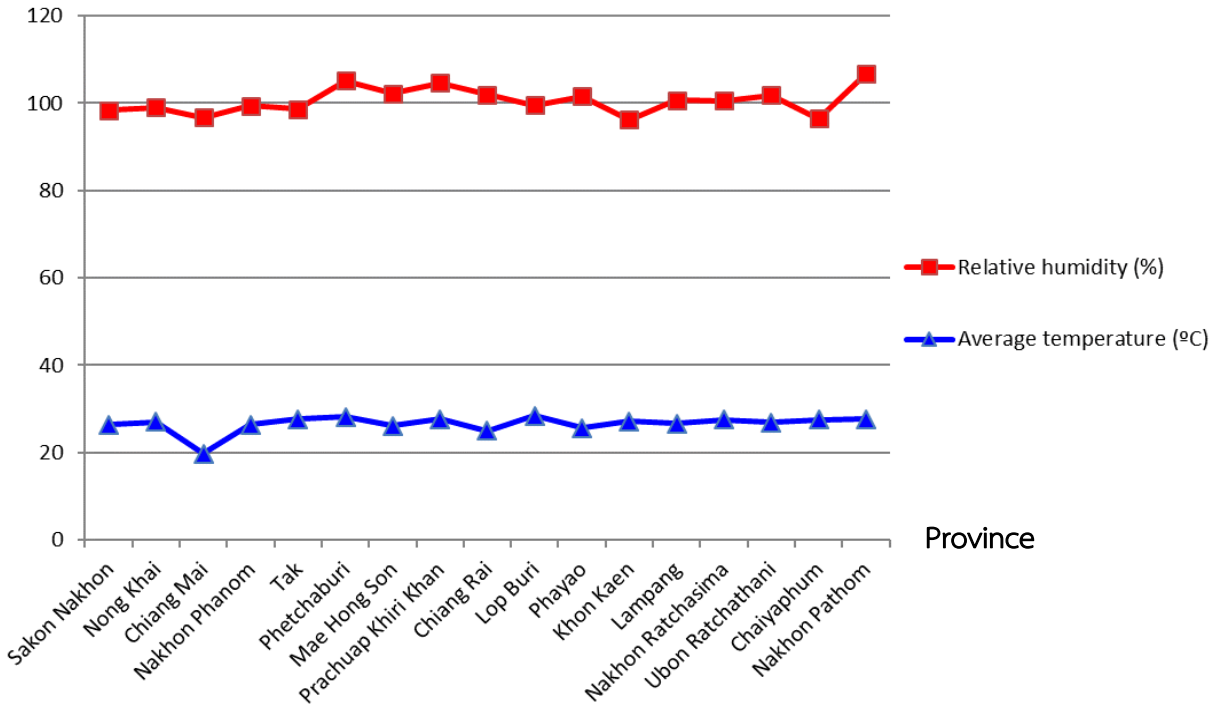


Figure 3 Average temperature and relative humidity of important planting areas of tomato in Thailand (Meteorological Department, 2014)

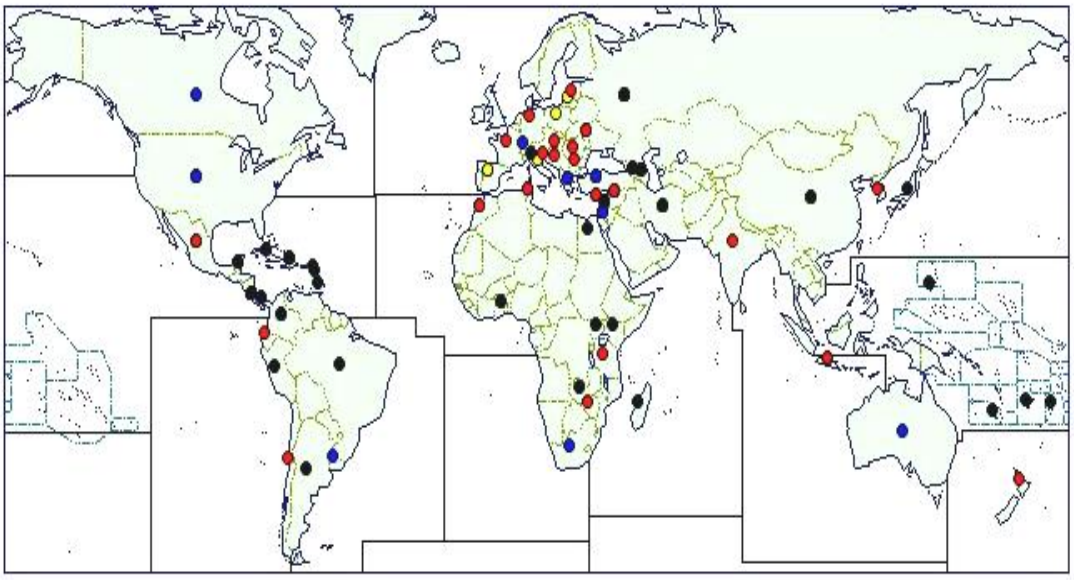


Figure 4 Distribution map of *Cmm*; Black spot is present/no further details, Red spot is localized, Blue spot is widespread, Yellow spot is occasional or few reports (CABI, 2014).

Figure 5 Systemic infection on tomato plants by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis.* **A)** Generalized wilting, **B)** unilateral leaflet wilt and necrosis, **C)** part of the vascular system invaded by the pathogen causing yellow-brown discoloration, **D)** cankers on stems in later stages of disease development, **E)** droplets of bacterial ooze observed when the stem splits open at the beginning of canker formation, **F)** pathogen reaching the fruit and infecting the seeds through the vascular tissues (Leandro *et al.,* 2011).

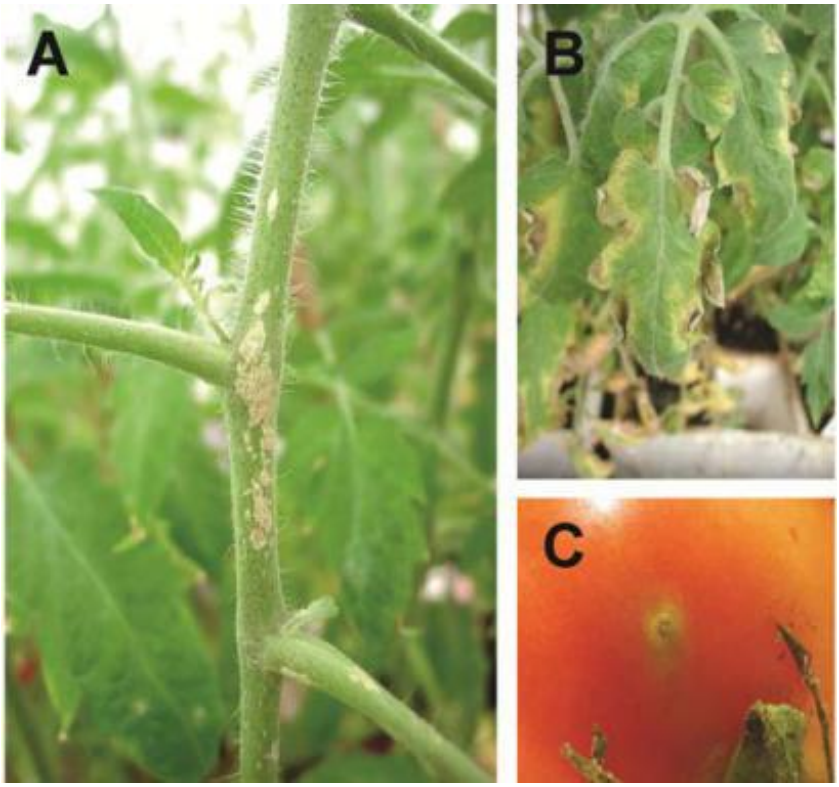


Figure 6 Localized infection by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis.* **A)** Small white blisterlike lesions in stem and petiole, **B)** marginal necrosis of leaflets, and **C)** typical spots with whitish halos on fruits, also called “bird’s-eye spots”(Leandro *et al.,* 2011).

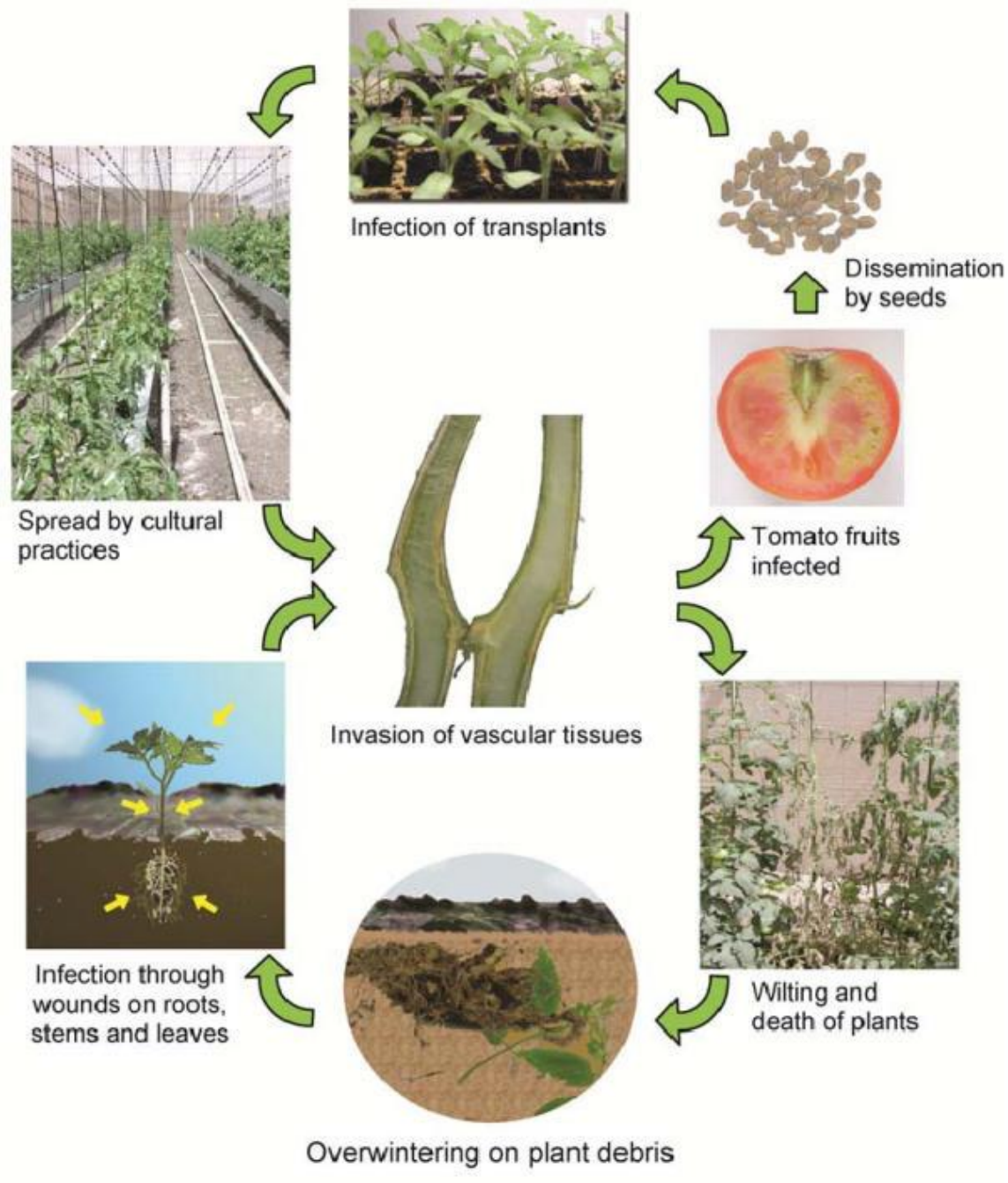


Figure 7 Disease cycle of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Eichenlaub *et al.,* 2006)

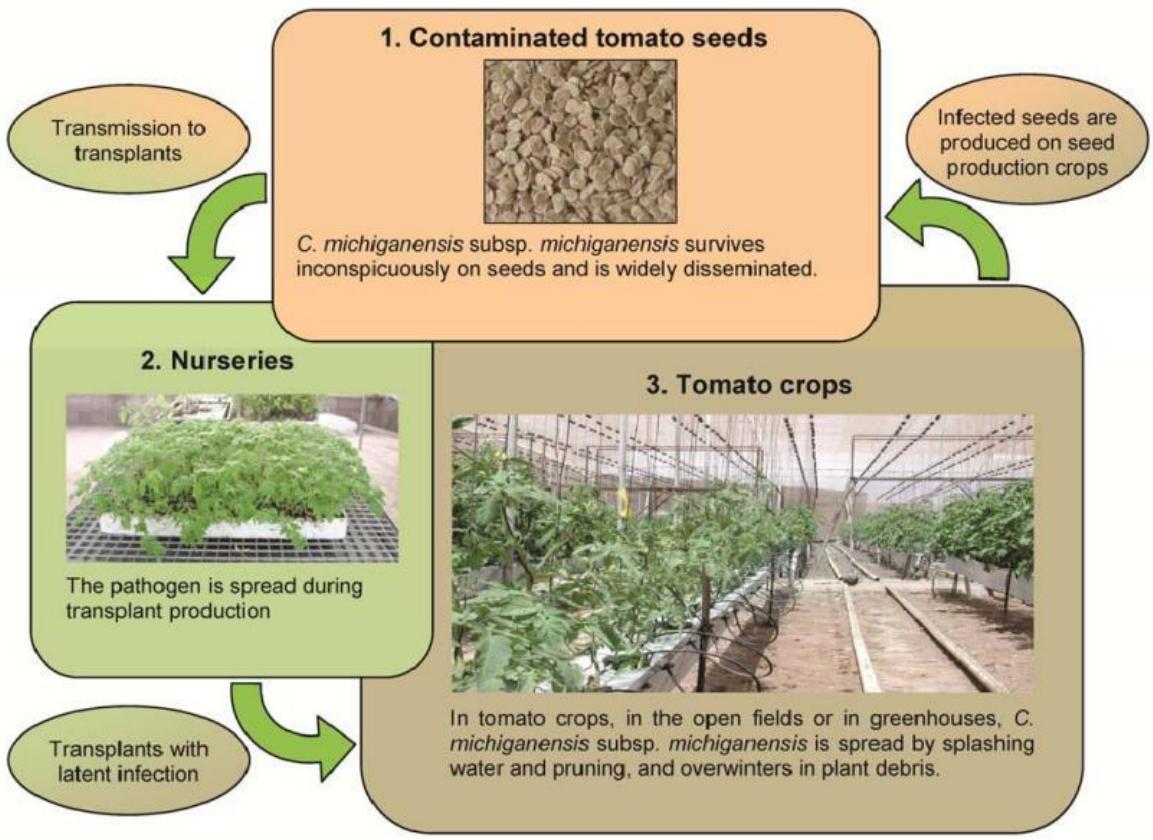


Figure 8 Tomato bacterial canker feature and environments in which *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is present: **1**, contaminated tomato seeds; **2**, nurseries; and **3**, tomato crops (Leandro *et al.,* 2011).

การสำรวจสถานภาพของไร *Tyrophagus similis* Volgnin และ *Sancassania mycophagus* (Megnin) ไรศัตรูพืชกักกันของหอมแดง หอมหัวใหญ่และกระเทียมนำเข้า

Pest status survey of *Tyrophagus similis* Volgnin and *Sancassania mycophagus* (Megnin) quarantine mite pests of imported shallot onion and garlic.

พลอยชมพู กรวิภาสเรือง มานิตา คงชื่นสิน พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์
วิมลวรรณ โชติวงศ์ อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จากการสำรวจและจำแนกไรในหอมแดง และกระเทียม บนพื้นที่ทั้งหมด 9 อำเภอ 8 จังหวัด เพื่อสำรวจหาไร *Tyrophagus similis* Volgnin และ *Sancassania mycophagus* (Megnin) ซึ่งเป็นศัตรูพืชกักกัน เพื่อเฝ้าระวังไม่ให้ไรทั้ง 2 ชนิดเข้ามาระบาดในประเทศ โดยจากการสำรวจในประเทศไม่พบไรทั้ง 2 ชนิดนี้ แต่พบไรชนิดอื่น รวมทั้งสิ้น 2 วงศ์ 6 ชนิด โดยเป็นไรศัตรูที่พบบนกระเทียม 2 วงศ์ 4 ชนิดคือ วงศ์ Eriophyidae 1 ชนิดได้แก่ *Aceria tulipae* (Keifer) วงศ์ Acaridae ได้แก่ *Cosmoglyphus sp., Sancasania berlesei* (Michael) และ *Tyrophagus communis* Fan and Zhang สำหรับไรที่พบบนหอมแดงพบ 2 วงศ์ 6 ชนิด คือ วงศ์ Eriophyidae 1 ชนิดได้แก่ *Aceria tulipae* (Keifer) วงศ์ Acaridae 5 ชนิดได้แก่ *Cosmoglyphus sp., Sancasania berlesei* (Michael) *Sancasania oudemansi* (Zachvatkin), *Tyrophagus javensis* (Oudemans) และ *Tyrophagus communis* Fan and Zhang

---

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-06-00-12-57

คำนำ

ปัจจุบันประเทศไทยเปิดการค้าเสรีกับต่างประเทศในหลาย ๆ ประเทศด้วยกันเช่น ประเทศจีน ออสเตรเลีย อินเดีย เปรู และมีแนวโน้มที่จะเปิดการค้าเสรีกับต่างประเทศเพิ่มขึ้นอีกหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น นิวซีแลนด์ กลุ่มประเทศ EFTA เกาหลี (กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ, 2549) สำหรับพืชผักนำเข้าที่สำคัญได้แก่ พริกแห้ง กระเทียมสด หัวหอมใหญ่ และหอมแดง โดยมีปริมาณการนำเข้าในปี 2551 เท่ากับ 465, 284, 276.5 และ 4 ล้านบาทตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551) ถึงจะมีการนำเข้าสินค้าเกษตรที่มีมูลค่าสูงก็ตาม ประเทศไทยก็ยังเป็นประเทศเกษตรกรรมมีการปลูกพืชหลากหลายชนิดทั่วทุกภาคของประเทศ ดังนั้นหากสินค้าเกษตรที่นำเข้ามาในประเทศมีศัตรูพืชที่สำคัญติดเข้ามาภายในประเทศ จะสร้างความเสียหายอย่างร้ายแรงให้กับการเกษตรของไทย ซึ่งไรนับเป็นศัตรูที่สำคัญเนื่องจากมีขนาดเล็กทำให้ยากแก่การสังเกตเห็น โดยเฉพาะไรศัตรูพืชกักกันที่ประกาศในพระราชบัญญัติกักพืชฉบับที่ 3 ปี 2551 ที่มีการติดเข้ามากับพืชผักที่นำเข้าได้แก่ไร *Tyrophagus similis* Volgnin และไร *Sancassania mycophagus* (Megnin) ที่มีการตรวจพบบนกระเทียมนำเข้าตามด่านตรวจศัตรูพืชต่าง ๆ ดังนั้นการเฝ้าระวังการแพร่กระจายของไร *Tyrophagus similis* Volgnin และ *Sancassania mycophagus* (Megnin) ไรศัตรูพืชกักกันของหัวหอมและกระเทียมนำเข้า นับว่ามีประโยชน์อย่างยิ่งที่จะช่วยป้องกันการแพร่กระจายไม่ให้มีไรศัตรูพืชกักกันที่สำคัญติดเข้ามาแพร่ระบาดทำความเสียหายให้กับพืชปลูกในประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่มีอยู่แล้ว

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างไร: ได้แก่ ถุงพลาสติกใสขนาดต่างๆ กล่องพลาสติก พู่กันเบอร์ 0, ขวดดองตัวอย่างไร ขนาด 1 แดรม บรรจุแอลกอฮอล์ 70% พู่กัน กล่องพลาสติกรักษาความเย็นขนาด 68 ควอทซ์ แว่นขยาย (กำลังขยาย 20x) และกรวยแยกไร (Berlese Tullgren funnel)

2. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างไร เพื่อการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน: ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ (stereo microscope) ตะเกียงแอลกอฮอล์ โคมไฟ พู่กันเบอร์ 0 เข็มเขี่ยปลายแหลมและปลายงอ สำลี ตู้อบ/เครื่องอุ่นสไลด์ ตั้งอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส แป้นหมุนสำหรับผนึกขอบสไลด์ น้ำยาผนึกขอบสไลด์

3. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการตรวจจำแนกชนิดของไร: ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ติดอุปกรณ์วาดภาพ (camera lucida) คู่มือการจำแนก (key) สำหรับใช้จำแนกชนิดของไรศัตรูในโรงเก็บ และไรตัวห้ำในวงศ์ต่าง ๆ

อุปกรณ์การวิจัยที่ต้องการเพิ่มเติม

1. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเก็บตัวอย่างไร ได้แก่ ถุงกระดาษ ถุงพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ แอลกอฮอล์ 95% และสารเคมีสำหรับดองตัวอย่าง

2. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างไร เพื่อการศึกษาลักษณะชนิดของไรศัตรูพืช ได้แก่ แผ่นสไลด์ coverglass กล่องใส่สไลด์ สารเคมีสำหรับใช้เตรียมน้ำยาเมาท์สไลด์ สำลี น้ำยาสำหรับผนึกขอบสไลด์ แผ่นพลาสติกเจาะรู จานแก้ว

วิธีการ

1. แบบฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจได้แก่ ชื่อที่อยู่ที่ตั้งของแปลง วันและเวลาสภาพ ดินฟ้าอากาศ ตำแหน่งที่ตั้งพิกัดภูมิศาสตร์
2. เก็บตัวอย่างหอมแดง หอมหัวใหญ่ จากพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกสูงสุด ตั้งแต่ก่อนปลูก ในระยะที่เก็บเกี่ยวผลผลิตและรอเก็บในโรงเก็บ เพื่อรอจำหน่ายและทำพันธุ์ การสุ่มตรวจครั้งละ 10 จุด จุดละ 5 ตัวอย่าง
3. เก็บกระเทียมที่เป็นหัวพันธุ์สำหรับใช้เพาะปลูก จากพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกสูงสุดตั้งแต่ก่อนปลูก ในระยะที่เก็บเกี่ยวผลผลิตและรอเก็บในโรงเก็บเช่นเดียวกัน ทำการสุ่มตรวจครั้งละ 10 จุด จุดละ 5 ตัวอย่าง
4. นำตัวอย่างไรศัตรูในหัวหอมและกระเทียมที่รวบรวมได้ใส่ถุงกระดาษและห่อด้วถุงพลาสติกอีกชั้นหนึ่ง แล้วรัดปากถุงให้สนิท
5. บันทึกข้อมูลจากตัวอย่างไรที่เก็บได้ เช่นชื่อพืช ชื่อผู้เก็บ สถานที่ บันทึกข้อมูลพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันที่เก็บ นำตัวอย่างที่ได้ทั้งหมดกลับมาทำสไลด์ถาวรที่ห้องปฏิบัติการ
6. ทำสไลด์ถาวรด้วยน้ำยา Hoyer's solution ด้วยการหยดน้ำยา Hoyer's solution ลงบนสไลด์ ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงในน้ำยา จากนั้นกดตัวไรให้จม
7. จัดตัวไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน ด้วยเข็มเขี่ยขนาดเล็ก ปิดตัวอย่างด้วย แผ่นแก้วปิดสไลด์ (coverglass) นำสไลด์ไปอังบนตะเกียงแอลกอฮอล์พอร้อน เพื่อให้อวัยวะส่วนต่าง ๆ ของไรยืดออกเต็มที่ และไล่ฟองอากาศ
8. เขียนหมายเลขรหัสของตัวอย่างที่ทำเสร็จเรียบร้อยลงบนสไลด์ บันทึกรายละเอียดที่สำคัญของตัวไรลงบนสมุดบันทึก จากนั้นนำตัวอย่างที่ทำเสร็จแล้วเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน จากนั้นนำสไลด์ที่ได้มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 สัปดาห์ จึงผนึกขอบสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บ
9. นำสไลด์ถาวรที่เสร็จเรียบร้อยแล้วมาจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ปิดป้ายบันทึกรายละเอียดเกี่ยวกับสถานที่ วันที่ที่เก็บตัวอย่าง ชื่อผู้เก็บและชื่อพืชไว้ด้านซ้ายของแผ่นสไลด์ ส่วนชื่อวิทยาศาสตร์ไรที่จำแนกได้ไว้ด้านขวาของสไลด์
10. นำสไลด์เก็บในกล่องเก็บสไลด์และเรียงในพิพิธภัณฑ์ตามระบบสากลต่อไป

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2556 - กันยายน 2558

จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน จังหวัดอุตรดิษถ์ นครสวรรค์ สุโขทัย เพชรบูรณ์ จังหวัดศรีสะเกษ และเลย

กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ10900

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจและจำแนกไรในหอมแดง และกระเทียม บนพื้นที่ทั้งหมด 9 อำเภอ 8 จังหวัด เพื่อสำรวจหาไร *Tyrophagus similis* Volgnin และ *Sancassania mycophagus* (Megnin) ซึ่งเป็นศัตรูพืชกักกัน เพื่อเฝ้าระวังไม่ให้ไรทั้ง 2 ชนิดเข้ามาระบาดในประเทศ โดยจากการสำรวจในประเทศไม่พบไรทั้ง 2 ชนิดนี้ แต่พบไรชนิดอื่น รวมทั้งสิ้น 2 วงศ์ 6 ชนิด โดยเป็นไรศัตรูที่พบบนกระเทียม 2 วงศ์ 4 ชนิดคือ วงศ์ Eriophyidae 1 ชนิดได้แก่ *Aceria tulipae* (Keifer) วงศ์ Acaridae ได้แก่ *Cosmoglyphus sp., Sancasania berlesei* (Michael) และ *Tyrophagus communis* Fan and Zhang (ตารางที่ 1) สำหรับไรที่พบบนหอมแดงพบ 2 วงศ์ 6 ชนิด คือ วงศ์ Eriophyidae 1 ชนิด ได้แก่ *Aceria tulipae* (Keifer) วงศ์ Acaridae 5 ชนิดได้แก่ *Cosmoglyphus sp., Sancasania berlesei* (Michael) *Sancasania oudemansi* (Zachvatkin), *Tyrophagus javensis* (Oudemans) และ *Tyrophagus communis* Fan and Zhang (ตารางที่ 2) จากการจำแนกชนิดไรพบว่ามีไรบางชนิดที่ยังไม่สามารถจำแนกได้ถึงระดับชนิด เนื่องจากมีการเปลี่ยนคู่มือการจำแนกให้ทันสมัยขึ้นจากเดิมที่ใช้คู่มือการจำแนกของ Houses ปี 1976 มาเป็นคู่มือการจำแนกระดับสกุลซึ่งละเอียดขึ้นโดยได้รับคู่มือนี้จากการที่ไปฝึกอบรมที่มหาวิทยาลัย Ohio state ประเทศสหรัฐอเมริกา หลังจากใช้คู่มือนี้จำแนกระดับสกุลแล้วทำให้ได้สกุลใหม่คือ *Cosmoglyphus* นอกจากนี้ ดร. Pavel Klimov ได้อนุเคราะห์ ส่งคู่มือการจำแนกชนิดของไรในสกุล *Cosmoglyphus* ให้แต่ไม่สามารถใช้ได้เนื่องจากเป็นภาษาที่ไม่สามารถอ่านออกได้ ดังนั้นขณะนี้จึงอยู่ระหว่างการส่งตัวอย่างไรชนิดนี้ไปจำแนกชนิดให้กับผู้เชียวชาญจากต่างประเทศ สำหรับกระเทียมจากการสำรวจประสบปัญหาพื้นที่ปลูกกระเทียมมีพื้นที่ปลูกน้อยลง เนื่องจากมีระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวนานกว่า การดูแลรักษายากขาดแรงงานในการเพาะปลูก และผู้บริโภค เปลี่ยนไปรับประทานกระเทียมที่นำเข้าจากประเทศจีน เกษตรกรจึงปลูกพืชชนิดอื่นแทน หรือหากมีการปลูกกระเทียมก็จะปลูกเป็นแปลงเล็ก ๆ เพื่อใช้บริโภคภายในครอบครัว จำนวนแปลงทดลองที่ต้องใช้ในการสำรวจจึงอาจไม่ได้ตามเป้าหมายที่วางไว้ และปัญหาที่พบบ่อยอีกปัญหาคือ ตัวอย่างไรไม่ใสมีสีขุ่นทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ เนื่องจากไรบางชนิดกินเชื้อรา ทำให้ลำตัวมีเชื้อราสีดำปกคลุมอยู่ภายในจึงไม่สามารถเห็นลักษณะอวัยวะอื่นๆ ที่สำคัญในการจำแนกชนิดได้

Table 1. Mite pests found on garlic from Thailand.

Scientific name of mite	Location	GPS
Aceria tulipae (Keifer)	Ban Hong, Lumphun	18° 16'47.53" N 098°49'58.75" E
	Ban Hong, Lumphun	18° 16'43.68" N 098°49'55.74" E
	Ban Hong, Lumphun	18° 16'51.09" N 098°49'53.11" E
	Chiang Dao, Chiang Mai	19° 29'316" N 098°58'69" E
	Lumphun	18° 15'906" N 098°49'536" E
	Nam Pat, Uttaradit	17° 44'21.02" N 100°41'46.21" E
	Nam Pat, Uttaradit	17° 44'36.40" N 100°42'20.80" E
	Si Satchanalai, Sukhothai	17°24'38.4156" N 99°48'20.9298"E
Cosmoglyphus sp.	Nong Phai, Phetchabun	15°55'43.117"N 100°59'132"E
	Nong Phai, Phetchabun	15°55'046"N 100°59'173"E
Sancasania berlesei (Michael)	Mueang, Nakhon Sawan	15°42'40.752"N 100° 6'41.7132"E
Tyrophagus communis Fan&Zhang	Nam Pat, Uttaradit	17° 44'22.92" N 100°41'45.09" E

Table 2. Mite pests found on shallot from Thailand.

Scientific name of mite	Location	GPS
Aceria tulipae (Keifer)	Nong Phai, Phetchabun	15°54'736"N 101°05'436"E
	Nong Phai, Phetchabun	15°55'261"N 100°59'125"E
	Ban Hong, Lumphun	18° 16'43.72" N 098°49'55.02" E
Sancasania berlesei (Michael)	Ban Hong, Lumphun	18° 16'47.53" N 098°49'58.75" E
	Ban Hong, Lumphun	18° 16'36.43" N 098°49'53.61" E
	Nong Phai, Phetchabun	15°55'117"N 100°59'132"E
Sancasania oudemansi (Zachvatkin)	Ban Hong, Lumphun	18° 16'47.53" N 098°49'58.75" E
	Ban Hong, Lumphun	18° 16'36.43" N 098°49'53.61"E
Cosmoglyphus sp.	Yang Chum Noi, Si Sa Ket	15°16'031"N 104°23'779"E
	Nong Phai, Phetchabun	15°54'43.726"N 101°00'133"E
	Nong Phai, Phetchabun	15°55'046"N 100°59'173"E
	Nong Phai, Phetchabun	15°54'826"N 100°59'051"E
	Nong Phai, Phetchabun	15°54'760"N 101°00'337"E
	Nong Phai, Phetchabun	15°54'760"N 101°00'337"E
	Nong Phai, Phetchabun	15°54'736"N 101°05'436"E
	Nong Phai, Phetchabun	15°54'732"N 101°00'451"E
	Nong Phai, Phetchabun	15°54'767"N 100°59'100"E
	Nong Phai, Phetchabun	15°54'766"N 101°00'248"E
	Mueang, Phetachabun	16°36'064"N 101°09'878"E
	Mueang, Phetachabun	16°36'156"N 101°09'864"E
	Yang Chum Noi, S iSa Ket	15°16'010"N 104°23'764"E
	Phu Ruea, Loei	17°24'47.7138"N 101°22' 52.881"E
Tyrophagus communis Fan&Zhang	Mueang, Phetachabun	16°36'064"N 101°09'878"E
	Nong Phai, Phetchabun	15°54'785"N 100°59'115"E
Tyrophagus javensis (Oudemans)	Nong Phai, Phetchabun	15°54'785"N 100°59'115"E

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจและจำแนกไรบนพื้นที่ทั้งหมด 9 อำเภอ 8 จังหวัด พบไรบนหอมแดง และกระเทียม เพื่อสำรวจหาไร *Tyrophagus similis* Volgnin และ *Sancassania mycophagus* (Megnin) ไม่พบไรทั้ง 2 ชนิด ซึ่งเป็นไรศัตรูกักกัน แต่พบไรชนิดอื่น รวมทั้งสิ้น 2 วงศ์ 6 ชนิด โดยเป็นไรศัตรูที่พบบนกระเทียม 2 วงศ์ 4 ชนิดคือ วงศ์ Eriophyidae 1 ชนิดได้แก่ *Aceria tulipae* (Keifer) วงศ์ Acaridae ได้แก่ *Cosmoglyphus sp., Sancasania berlesei* (Michael) และ *Tyrophagus communis* Fan and Zhang สำหรับไรที่พบบนหอมแดงพบ 2 วงศ์ 6 ชนิด คือ วงศ์ Eriophyidae 1 ชนิดได้แก่ *Aceria tulipae* (Keifer) วงศ์ Acaridae 5 ชนิดได้แก่ *Cosmoglyphus sp., Sancasania berlesei* (Michael) *Sancasania oudemansi* (Zachvatkin), *Tyrophagus javensis* (Oudemans) และ *Tyrophagus communis* Fan and Zhang

เอกสารอ้างอิง

กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ. 2549. ความคืบหน้า/สถานะการเจรจา. [Online].Available:http://www.thaifta.com/ThaiFTA/HOME/NegoLastestStatus/tabid/117/Default.aspx [2006, May 17]

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2551. ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตร. ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเษตร. 100 หน้า

Hughes, A. M. 1976. The Mites of Stored Food and Housed. Ministry of Agriculture Fisheries and Food Technical Bulletin no. 9. (Second edition) (Her Mijesty's Stationery Office), London. 400 pp.

การสำรวจสถานภาพของราสนิม (Tropical Corn Rust) : *Physopella zeae* (Mains) Cummins & Ramachar และ (Common Corn Rust) : *Puccinia sorghi* Schwein. ในข้าวโพด

Pest Status Survey of Tropical Corn Rust : *Physopella zeae* (Mains) Cummins & Ramachar and Common Corn Rust : *Puccinia sorghi* Schwein. on Corn

สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ พรพิมล อธิปัญญาคม ชนินทร ดวงสอาด
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สำรวจการเกิดโรคราสนิมข้าวโพดในแหล่งปลูกข้าวโพด ระหว่าง ธันวาคม 2556 ถึง กันยายน 2557 เพื่อทราบสถานภาพของราสนิม 2 ชนิด คือ (Tropical Corn Rust) : *Physopella zeae* และ (Common Corn Rust) : *Puccinia sorghi* ในข้าวโพดในประเทศไทย จากพื้นที่ปลูกข้าวโพด รวม 59 ตำบล จาก 22 จังหวัด ได้แก่ จ.สุโขทัย จ.เชียงใหม่ จ.แพร่ จ.ตาก จ.เพชรบูรณ์ จ.นครสวรรค์ จ.ลพบุรี จ.พระนครศรีอยุธยา จ.นครปฐม จ.กาญจนบุรี จ.สุพรรณบุรี จ.เพรชบุรี จ.สุราษฎร์ธานี จ.กระบี่ จ.ชุมพร จ.ระยอง จ.ขอนแก่น จ.ร้อยเอ็ด จ.นครพนม จ.หนองคาย จ.นครราชสีมา จ.บุรีรัมย์ ผลจากการสำรวจการเกิดโรคราสนิมข้าวโพด และนำตัวอย่างโรค มาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ ไม่ปรากฏราสนิม (Tropical Corn Rust) : *Physopella zeae* และ (Common Corn Rust) : *Puccinia sorghi* ในข้าวโพด พบแต่ราสนิม (Southern Corn Rust) : *Puccinia polysora* และได้จัดทำและเก็บตัวอย่างแห้งโรคราสนิม Southern Corn Rust ที่เกิดจาก *P. polysora* จำนวน 30 ตัวอย่าง ส่งเข้าพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ เพื่อเป็นหลักฐานสำหรับการตรวจสอบยืนยันการปรากฏของโรค

Keywords : การสำรวจสถานภาพ, ราสนิม, Pest Status Survey, Tropical Corn Rust, *Physopella zeae*, Common Corn Rust, *Puccinia sorghi*

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-06-00-13-57

คำนำ

ระบบการค้ายุคใหม่ภายใต้กรอบกติกาขององค์การการค้าโลก (World Trade Organization : WTO) เปลี่ยนแปลงไปในลักษณะที่มีการแข่งขันทางการค้าที่เสรีและเป็นธรรมมากขึ้น การดำเนินการค้าระหว่างประเทศต้องเป็นไปตามกฎเกณฑ์และความตกลงที่เกี่ยวข้องภายใต้องค์การการค้าโลก ความตกลงที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการค้าสินค้าเกษตร ได้แก่ ความตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement of Application of Sanitary and Phytosanitary Measures: SPS) ซึ่งให้สิทธิพื้นฐานแก่ประเทศในการกำหนดมาตรการสุขอนามัยเพื่อปกป้องสุขอนามัยของมนุษย์ พืช และสัตว์ของแต่ละประเทศนั้น โดยอาศัยมาตรฐานระหว่างประเทศสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures : ISPM) ในอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention: IPPC) ภายใต้องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ กรณีที่ไม่มีมาตรฐานระหว่างประเทศที่เกี่ยวข้อง การกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชสามารถทำได้โดยใช้การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest risk assessment) จากข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ โดยเฉพาะข้อมูลสถานภาพศัตรูพืชทั้งภายในประเทศและประเทศคู่ค้า โดยใช้วิธีการประเมินซึ่งพัฒนาภายใต้อนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention) จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ทำให้ทุกประเทศที่เกี่ยวข้องในการค้าสินค้าเกษตร จำเป็นต้องเตรียมข้อมูลสถานภาพศัตรูพืชที่ถูกต้องและเชื่อถือได้ไว้ให้พร้อม ในการเปิดตลาดใหม่ ประเทศผู้นำเข้าอาจร้องขอข้อมูลศัตรูพืชของประเทศผู้ส่งออก เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความเสี่ยง ถ้าประเทศผู้ส่งออกมีข้อมูลศัตรูพืชของประเทศตนพร้อมจัดหาได้ง่าย การเปิดตลาดใหม่ของสินค้าเกษตรในต่างประเทศก็จะเป็นไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการส่งออกของประเทศ กรณีของการนำเข้าสินค้าเกษตร การมีข้อมูลศัตรูพืชที่ถูกต้อง จะช่วยให้ฝ่ายกักกันพืช สามารถวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของสินค้าเกษตรนำเข้าได้อย่างถูกต้อง ช่วยให้การเกษตรของประเทศไม่เสี่ยงต่อศัตรูพืชที่ไม่พึงประสงค์ เมื่อสินค้าดังกล่าวได้รับการอนุญาตให้นำเข้า และช่วยให้ฝ่ายกักกันสามารถชี้แจงการตัดสินใจด้านการกักกันพืชต่อต่างประเทศที่พยายามส่งออกสินค้าเกษตรเข้ามาในประเทศไทยได้ดียิ่งขึ้น จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น จำเป็นที่ทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้องต้องเตรียมความพร้อมของข้อมูลศัตรูพืช รวมทั้งโรคพืช สำหรับข้าวโพด เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีการปลูกเพื่อบริโภคภายในประเทศ และส่งออกต่างประเทศ ในปี พ.ศ. 2553 มีพื้นที่ปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ รวมทั้งประเทศ 7,115,511 ไร่ ให้ผลผลิต 4,454,445 ตัน ใช้ภายในประเทศ ปริมาณ 4.28 ล้านตัน ปริมาณการส่งออกรวม 393,319 ตัน มูลค่า 2,267.21 ล้านบาท มีปริมาณการนำเข้า 366,747 ตัน มูลค่า 1,339.58 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) แหล่งปลูกข้าวโพดมีเกือบทั่วประเทศ แหล่งผลิตในประเทศที่สำคัญ ภาคเหนือ ได้แก่ เพชรบูรณ์ นครสวรรค์ พิษณุโลก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ นครราชสีมา ศรีสะเกษ ชัยภูมิ ภาคกลาง ได้แก่ สระบุรี ลพบุรี สุพรรณบุรี ภาคตะวันตก ได้แก่ กาญจนบุรี และภาคตะวันออก ได้แก่

สระแก้ว จันทบุรี ในเรื่องของศัตรูพืช โรคราสนิมเป็นโรคที่สำคัญของข้าวโพด เกิดจากเชื้อสาเหตุ 3 ชนิด คือ *Puccinia sorghi* Schw. (common rust) *P. polysora* Underw. (southern rust) และ *Physopella zeae* (Mains) Cummins & Ramachar (tropical rust) (Melching, 1975; Renfro, 1998; Dolezal, 2010) สำหรับประเทศไทยมีรายงานพบ 2 ชนิด คือ *P. sorghi* และ *P. polysora* ส่วน *Physopella zeae* ยังไม่มีรายงานการพบโรค แต่ที่พบมากและมีรายงานว่าพบเสมอ คือ *P. polysora* ส่วน *P. sorghi* เคยมีรายงานพบในอดีต แต่ปัจจุบันไม่พบรายงานถึงเชื้อนี้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากไม่มีการระบาดของโรค หรือ เนื่องมาจากไม่มีการศึกษา ถึงชนิดของเชื้อ อย่างจริงจัง ส่วน *Physopella zeae* ยังไม่มีรายงานการพบโรค ดังนั้นเพื่อการเตรียมข้อมูลสถานภาพศัตรูพืชที่ถูกต้อง จึงควรสำรวจสถานภาพการปรากฏ/ไม่ปรากฏ และแพร่ระบาดของราสนิม *P. zeae* และ *P. sorghi* ในพื้นที่ปลูกข้าวโพดในประเทศไทย เพื่อให้ได้ข้อมูลสถานภาพของราสนิม *P. zeae* และ *P. sorghi* ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการกักกันพืช และสนับสนุนการส่งออก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างโรคราสนิมข้าวโพด จากแหล่งปลูกพืชของประเทศไทย ระหว่างธันวาคม 2556 ถึง กันยายน 2557
2. อุ ปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างโรคพืช เช่น กรรไกร คัตเตอร์ ถุงพลาสติก กระดาษหนังสือพิมพ์ กล่องเก็บความเย็น ปากกา กระดาษบันทึกข้อมูล
3. เครื่องวัดพิกัด
4. คู่มือ และแบบฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจโรคราสนิมข้าวโพด
5. แผงไม้อัดตัวอย่างโรคพืช กระดาษฟาง และกระดาษหนังสือพิมพ์
6. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเชื้อรา เช่น จานเลี้ยงเชื้อ หลอดแก้ว เข็มเขี่ย มีดโกน มีดผ่าตัด แผ่นแก้วสไลด์พร้อมแผ่นปิดสไลด์ และตะเกียงแอลกอฮอล์
7. สารเคมี ได้แก่ KOH shear's solution และ oil immersion
8. กล้องจุลทรรศน์ พร้อมกล้องถ่ายภาพ
9. ตำราสำหรับใช้ในการจัดจำแนกราสนิม

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูล

สืบค้นข้อมูลที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ข้อมูลพืช เช่น แหล่งปลูกข้าวโพด ขนาดพื้นที่ปลูก ประวัติการเกิดโรคในแต่ละพื้นที่ ข้อมูลเชื้อรา *Physopella zeae* เช่น รูปร่างลักษณะของเชื้อ และลักษณะอาการโรค และข้อมูลราสนิมชนิดอื่นของข้าวโพด

2. จัดทำคู่มือการสำรวจ

จัดทำคู่มือการสำรวจ เพื่อใช้ในการตรวจสอบอ้างอิงขณะทำการสำรวจ โดยการรวบรวมตัวอย่างอ้างอิงและรูปภาพของโรคราสนิมที่เกิดจาก *P. zeae* และจัดทำข้อมูลของเชื้อรา ได้แก่ ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพืชอาศัย อาการของโรค รูปภาพสีของโรค และแหล่งอาศัยของรา รวมทั้งข้อมูลราสนิมชนิดอื่นของข้าวโพด

3. จัดทำแบบฟอร์มบันทึกข้อมูลในการสำรวจ

จัดทำแบบฟอร์มบันทึกข้อมูลในการสำรวจ ซึ่งประกอบด้วย วันที่ สถานที่ ตำแหน่งที่ตั้ง (พิกัด GPS) พันธุ์พืช ระยะการเจริญของพืช ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย ลักษณะอาการโรค เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ระดับความรุนแรงของโรค การแพร่กระจายในไร่ สภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศ เป็นต้น

4. สำรวจการเกิดโรคราสนิมของข้าวโพด

- สำรวจการเกิดโรคราสนิมข้าวโพดในแหล่งปลูกข้าวโพดของประเทศไทย ระหว่าง ธันวาคม 2556 ถึง กันยายน 2557 สำรวจ 5-10 เปอร์เซ็นต์ของแต่ละพื้นที่ปลูก แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบโดยเดินตามเส้นทแยงมุม ทุกๆ 10 ก้าว ตรวจโรคจุดละ 10 ต้น จำนวน 10 จุดต่อแปลง
- ตรวจโรคราสนิมในแปลง โดยดูลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูล ตามแบบฟอร์ม และถ่ายรูปลักษณะอาการโรค
- เก็บตัวอย่างโรคราสนิม โดยเลือกเก็บส่วนของพืชที่แสดงอาการโรค ห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ใส่ในถุงพลาสติก พร้อมแนบกระดาษบันทึกรายละเอียด ชื่อพืช สถานที่เก็บ วันที่เก็บ และลักษณะอาการของโรค บรรจุห่อตัวอย่างโรคพืชลงในกล่องเก็บความเย็น เพื่อนำมาจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการ

5. จำแนกชนิดของราสนิมในห้องปฏิบัติการ

โดยตรวจลักษณะราสนิมของข้าวโพดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

- ตัดขวาง (cross section) เนื้อเยื่อพืช โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตรวจดูลักษณะอาการ และโครงสร้างของราสนิมภายใต้กล้อง stereo microscope จากนั้นนำส่วนที่แสดงลักษณะอาการที่มีราสนิมเจริญอยู่ มาตัดขวางเนื้อเยื่อ เมื่อได้ชิ้นส่วนที่แสดงลักษณะโครงสร้างของราสนิมชัดเจน จึงหยด shear's solution ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ (cover slip) นำไปตรวจดูภายใต้กล้อง compound microscope เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของราสนิม
- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ โดยเขี่ยสปอร์จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคราสนิม ลงบนแผ่นกระจกสไลด์ แล้วหยด shear's solution ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ ตรวจดูลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ ใต้กล้อง compound microscope สุ่มวัดขนาดสปอร์ จำนวน 50 สปอร์ และโครงสร้างอื่นๆที่สำคัญ โดยใช้ calibrated micrometer บันทึกขนาด รูปร่าง ลักษณะผนังของสปอร์ และสี แล้วบันทึกภาพ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของขนาดสปอร์ และโครงสร้างของราสนิมที่วัดขนาดไว้

- จำแนกชนิดราสนิม โดยเปรียบเทียบลักษณะของราสนิมที่ศึกษากับคู่มือการจัดจำแนกราสนิม ได้แก่ The Rust Fungi of Cereals Grasses and Bamboos (Cummins, 1971) และ Illustrated Genera of Rust Fungi. Third Edition (Cummins *et al*., 2003)

6. จัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืช

โดยตัดส่วนของพืชบริเวณที่แสดงอาการโรค วางบนกระดาษฟาง พร้อมแนบกระดาษบันทึกข้อมูลพืช แล้วปิดทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ อัดทับด้วยแผงไม้อัดตัวอย่างโรคพืช นำไปวางผึ่งลมไม่ให้ถูกแดด เปลี่ยนกระดาษทุกวัน จนกระทั่งตัวอย่างพืชแห้ง จึงนำมาเก็บในถุงกระดาษสำหรับเก็บตัวอย่างแห้ง พร้อมลงรายละเอียดข้อมูลตัวอย่างตามระบบสากล (Anonymous, 2005) ได้แก่ ชื่อพืช ลักษณะอาการโรค สถานที่เก็บ ชนิดของราสาเหตุโรคพืช วันที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ และชื่อผู้จัดจำแนกชนิดรา เป็นต้น แล้วส่งเก็บในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

7. วิเคราะห์สถานภาพของราสนิม (Tropical Corn Rust) : *Physopella zeae* และ (Common Corn Rust) : *Puccinia sorghi* ในข้าวโพด

โดยรวบรวมข้อมูลสถานภาพการปรากฏ/ไม่ปรากฏ และแพร่กระจายของราสนิม *Physopella zeae* และ *Puccinia sorghi* ในข้าวโพดที่ได้จากการสำรวจ นำมาวิเคราะห์ สรุปผล และจัดทำรายงาน

เวลาและสถานที่

เวลา **เริ่มต้น** ตุลาคม 2556 **สิ้นสุด** กันยายน 2557

สถานที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงปลูกข้าวโพดในประเทศไทย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูล

ได้ข้อมูลพื้นที่ปลูกข้าวโพด ประวัติการเกิดโรคในแต่ละพื้นที่ ได้ข้อมูลเชื้อรา *P. zeae* และ *P. sorghi* เช่น รูปร่างลักษณะของเชื้อ และลักษณะอาการโรค และข้อมูลราสนิมชนิดอื่นของข้าวโพด

2. จัดทำคู่มือการสำรวจ

ได้คู่มือการสำรวจ ซึ่งประกอบด้วย รูปภาพของเชื้อรา และอาการโรคราสนิมของข้าวโพดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *P. zeae* *P. sorghi* และ *P. polysora*

3. จัดทำแบบฟอร์มบันทึกข้อมูลในการสำรวจ

ได้แบบฟอร์มบันทึกข้อมูลในการสำรวจ ซึ่งประกอบด้วย วันที่ สถานที่ ตำแหน่งที่ตั้ง (พิกัด GPS) พันธุ์พืช ระยะการเจริญของพืช ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย ลักษณะอาการโรค เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ระดับความรุนแรงของโรค การแพร่กระจายในไร่ สภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศ เป็นต้น

4. สำรวจการเกิดโรคราสนิมของข้าวโพด

สำรวจการเกิดโรคราสนิมข้าวโพดในแหล่งปลูกข้าวโพดของประเทศไทย ระหว่าง ธันวาคม 2556 ถึง กันยายน 2557 ในพื้นที่ปลูกข้าวโพด รวม 59 ตำบล จาก 22 จังหวัด ในภาคเหนือ ได้แก่ ต.หนองกลับ อ.สวรรคโลก ต.ทับผึ้ง อ.ศรีสำโรง จ.สุโขทัย ต.แม่แตง อ.แม่แตง ต.ออนใต้ และ ต.ห้วยใต้ อ.สันกำแพง ต.เมืองนะ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ ต.แม่ยางร้อง อ.ร้องกวาง ต.แดนชุมพล อ.สอง ต.แม่คำมี และ ต.แม่หล่าย อ.เมือง และ ต.ดอนมูล และ ต.บ้านเหล่า อ.สูงเม่น จ.แพร่ ต.พระธาตุผาแดง ต.แม่กุ ต.มหาวัน ต.แม่กาษา อ.แม่สอด ต.ช่องแคบ อ.พบพระ ต.แม่จะเรา ต.แม่ระมาด ต.ขะเนจื๊อ อ.แม่ระมาด จ.ตาก ต.หินฮาว อ.หล่มเก่า จ.เพชรบูรณ์ ภาคกลาง ได้แก่ ต.ตากฟ้า ต.พุนกยูง ต.อุดมธัญญา อ.ตากฟ้า จ.นครสวรรค์ ต.หนองแขม อ.โคกสำโรง ต.ชอนสารเดช ต.บ่อทอง อ.หนองม่วง จ.ลพบุรี ต.บางหลวง ต.บางหลวงโดด และ ต.วัดตะกู อ.บางบาล จ.พระนครศรีอยุธยา ต.ทุ่งลูกนก อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม ต.บ้านกร่าง ต.ดอนพลู อ.ศรีประจันต์ จ.สุพรรณบุรี ต.ท่ายาง อ.ท่ายาง จ.เพรชบุรี ภาคใต้ ได้แก่ ต.ป่าร่อน ต.บ้านกรูด และ ต.ช้างซ้าย อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี ต.เขาคราม อ.เมือง จ.กระบี่ ต.ละแม อ.ละแม และต.สลุย อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร ภาคตะวันตก ได้แก่ ต.ทุ่งทอง อ.ท่าม่วง ต.เกาะสำโรง และ ต.หนองหญ้า อ.เมือง จ.กาญจนบุรี ภาคตะวันออก ได้แก่ ต.บ้านฉาง อ.บ้านฉาง จ.ระยอง และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ ต.หนองกุงเซิล และ ต.กุดขอนแก่น อ.ภูเวียง จ.ขอนแก่น ต.ขอนแก่น อ.เมือง ต.โพธิ์ทอง อ.ศรีสมเด็จ จ.ร้อยเอ็ด ต.ดอนนางหงส์ อ.ธาตุพนม ต.บ้านกลาง อ.เมือง ต.โพนทอง อ.บ้านแพง จ.นครพนม ต.บ้านเดื่อ ต.สีกาย ต.กวนวัน อ.เมือง ต.โพนสา อ.ท่าบ่อ จ.หนองคาย ต.ทองหลาง อ.จักราช ต.สูงเนิน อ.สูงเนิน ต.ลาดบัวหลวง อ.สี้คิ้ว จ.นครราชสีมา ต.ลำทะเมนชัย อ.ลำปลายมาศ จ.บุรีรัมย์ พบโรคราสนิม จำนวน 30 ตัวอย่าง จาก ต.หนองแขม อ.โคกสำโรง ต.ชอนสารเดช ต.บ่อทอง อ.หนองม่วง จ.ลพบุรี ต.ตากฟ้า ต.พุนกยูง ต.อุดมธัญญา อ.ตากฟ้า จ.นครสวรรค์ ต.พระธาตุผาแดง ต.แม่กุ ต.มหาวัน ต.แม่กาษา อ.แม่สอด ต.ช่องแคบ อ.พบพระ ต.แม่จะเรา ต.แม่ระมาด ต.ขะเนจื๊อ อ.แม่ระมาด จ.ตาก ต.เมืองนะ อ.เชียงดาว และ ต.ออนใต้ อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่

5. จำแนกชนิดของราสนิมในห้องปฏิบัติการ

จากการจำแนกชนิดของราสนิมทุกตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ ไม่พบโรคราสนิมที่เกิดจากเชื้อ *Physopella zeae* และ *Puccinia sorghi* พบแต่ราสนิมที่เกิดจากเชื้อ *Puccinia polysora*

6. จัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืช

จัดทำและเก็บตัวอย่างแห้งโรคราสนิมที่เกิดจาก *P. polysora* จำนวน 30 ตัวอย่าง เพื่อเป็นหลักฐานสำหรับการตรวจสอบยืนยันการปรากฏของโรค ส่งเข้าพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช

7. วิเคราะห์สถานภาพของราสนิม (Tropical Corn Rust) : *Physopella zeae* และ (Common Corn Rust) : *Puccinia sorghi* ในข้าวโพด

จากการสำรวจโรคราสนิมข้าวโพด ระหว่าง ธันวาคม 2556 ถึง กันยายน 2557 ไม่ปรากฏราสนิม (Tropical Corn Rust) : *Physopella zeae* และ (Common Corn Rust) : *Puccinia sorghi* ในข้าวโพด

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจการเกิดโรคราสนิมข้าวโพดในแหล่งปลูกข้าวโพดของประเทศไทย ระหว่างธันวาคม 2556 ถึง กันยายน 2557 ในพื้นที่ปลูกข้าวโพด รวม 59 ตำบล จาก 22 จังหวัด ได้แก่ จ.สุโขทัย จ.เชียงใหม่ จ.แพร่ จ.ตาก จ.เพชรบูรณ์ จ.นครสวรรค์ จ.ลพบุรี จ.พระนครศรีอยุธยา จ.นครปฐม จ.กาญจนบุรี จ.สุพรรณบุรี จ.เพรชบุรี จ.สุราษฎร์ธานี จ.กระบี่ จ.ชุมพร จ.ระยอง จ.ขอนแก่น จ.ร้อยเอ็ด จ.นครพนม จ.หนองคาย จ.นครราชสีมา จ.บุรีรัมย์ ไม่ปรากฏราสนิม (Tropical Corn Rust) : *Physopella zeae* และ (Common Corn Rust) : *Puccinia sorghi* ในข้าวโพด พบแต่ราสนิม (Southern Corn Rust) : *Puccinia polysora* และได้จัดทำและเก็บตัวอย่างแห้งโรคราสนิม Southern Corn Rust ที่เกิดจาก *P. polysora* จำนวน 30 ตัวอย่าง ส่งเข้าพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช เพื่อเป็นหลักฐานสำหรับการตรวจสอบยืนยันการปรากฏของโรค

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. **ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2553.** เอกสารสถิติการเกษตร เลขที่ 416. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. 93 หน้า.

Anonymous. 2005. **Management of Plant Pathogen Collections**. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Commonwealth of Australia. 82 pp.

Cummins, G.B. 1971. **The Rust Fungi of Cereals, Grasses and Bamboos**. Springer-Verlag, New York. 570 pp.

Cummins, G.B. and Y. Hiratsuka. 2003. **Illustrated Genera of Rust Fungi.** 3rd Ed., The American Phytopathological Society, Minnesota. 225 pp.

Melching, J.S. 1975. Corn Rusts: Types, Races and Destructive Potential. **Proceedings of the 13th Annual Corn and Sorghum Research Conference.** Publication No. 30. American Seed Trade Association. 24 pp.

Dolezal, Wm. E. 2010. **Corn Rust Identification.** Pioneer Hi-Bred International, Inc., *Johnston, IA, USA. 31 pp.* (Online). Available. http://www.nappfast.org/meetings/SCR%202010/pdfs/Dolezal%20Identifying_SouRst_020910_r2.pdf (July 7, 2010).

Renfro, R. 1998. Maize Rusts. Pages. 8-14. *In*: C. Casela, R. Renfro and A.F. Krattiger ,eds. **Diagnosing Maize Diseases in Latin America**. ISAA Briefs No. 9 ISAA : Ithaca, NY and EMBRAPA, Brasilia.

การสำรวจสถานภาพของราน้ำค้าง (Graminicola Downy Mildew) : *Sclerospora graminicola* (Sacc.) J. Schröt. และ (Philippine Downy Mildew) : *Peronosclerospora philippinensis* (W. Weston) C.G. Shaw ในข้าวโพด

Pest Status Survey of Graminicola Downy Mildew : *Sclerospora graminicola* (Sacc.) J. Schröt. and Philippine Downy Mildew : *Peronosclerospora philippinensis* (W. Weston) C.G. Shaw on Corn

สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ พรพิมล อธิปัญญาคม ชนินทร ดวงสอาด
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สำรวจการเกิดโรคราน้ำค้างข้าวโพดในแหล่งปลูกข้าวโพด ระหว่าง ธันวาคม 2556 ถึง กันยายน 2557 เพื่อทราบสถานภาพของราน้ำค้าง 2 ชนิด คือ (Graminicola Downy Mildew) : *Sclerospora graminicola* และ (Philippine Downy Mildew) : *Peronosclerospora philippinensis* ในข้าวโพดในประเทศไทย จากพื้นที่ปลูกข้าวโพด รวม 59 ตำบล จาก 22 จังหวัด ได้แก่ จ.สุโขทัย จ.เชียงใหม่ จ.แพร่ จ.ตาก จ.เพชรบูรณ์ จ.นครสวรรค์ จ.ลพบุรี จ.พระนครศรีอยุธยา จ.นครปฐม จ.กาญจนบุรี จ.สุพรรณบุรี จ.เพรชบุรี จ.สุราษฎร์ธานี จ.กระบี่ จ.ชุมพร จ.ระยอง จ.ขอนแก่น จ.ร้อยเอ็ด จ.นครพนม จ.หนองคาย จ.นครราชสีมา จ.บุรีรัมย์ ผลจากการสำรวจการเกิดโรคราน้ำค้างข้าวโพด ไม่ปรากฏราน้ำค้าง (Graminicola Downy Mildew) : *Sclerospora graminicola* และ (Philippine Downy Mildew) : *Peronosclerospora philippinensis* ในข้าวโพด และไม่พบโรคราน้ำค้างชนิดอื่นของข้าวโพด

Keywords : การสำรวจสถานภาพ, ราน้ำค้าง, Pest Status Survey, Graminicola Downy Mildew, *Sclerospora graminicola*, Philippine Downy Mildew, *Peronosclerospora philippinensis*

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-06-00-14-57

คำนำ

ระบบการค้ายุคใหม่ภายใต้กรอบกติกาขององค์การการค้าโลก (World Trade Organization: WTO) เปลี่ยนแปลงไปในลักษณะที่มีการแข่งขันทางการค้าที่เสรีและเป็นธรรมมากขึ้น การดำเนินการค้าระหว่างประเทศต้องเป็นไปตามกฎเกณฑ์และความตกลงที่เกี่ยวข้องภายใต้องค์การการค้าโลก ความตกลงที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการค้าสินค้าเกษตร ได้แก่ ความตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement of Application of Sanitary and Phytosanitary Measures: SPS) ซึ่งให้สิทธิพื้นฐานแก่ประเทศในการกำหนดมาตรการสุขอนามัยเพื่อปกป้องสุขอนามัยของมนุษย์ พืช และสัตว์ของแต่ละประเทศนั้น โดยอาศัยมาตรฐานระหว่างประเทศสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures: ISPM) ในอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention: IPPC) ภายใต้องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ กรณีที่ไม่มีมาตรฐานระหว่างประเทศที่เกี่ยวข้อง การกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชสามารถทำได้โดยใช้การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest risk assessment) จากข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ โดยเฉพาะข้อมูลสถานภาพศัตรูพืชทั้งภายในประเทศและประเทศคู่ค้า โดยใช้วิธีการประเมินซึ่งพัฒนาภายใต้อนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention) จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ทำให้ทุกประเทศที่เกี่ยวข้องในการค้าสินค้าเกษตร จำเป็นต้องเตรียมข้อมูลสถานภาพศัตรูพืชที่ถูกต้องและเชื่อถือได้ไว้ให้พร้อม ในการเปิดตลาดใหม่ ประเทศผู้นำเข้าอาจร้องขอข้อมูลศัตรูพืชของประเทศผู้ส่งออก เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความเสี่ยง ถ้าประเทศผู้ส่งออกมีข้อมูลศัตรูพืชของประเทศตนพร้อม จัดหาได้ง่าย การเปิดตลาดใหม่ของสินค้าเกษตรในต่างประเทศก็จะเป็นไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการส่งออกของประเทศ กรณีของการนำเข้าสินค้าเกษตร การมีข้อมูลศัตรูพืชที่ถูกต้อง จะช่วยให้ฝ่ายกักกันพืช สามารถวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของสินค้าเกษตรนำเข้าได้อย่างถูกต้อง ช่วยให้การเกษตรของประเทศไม่เสี่ยงต่อศัตรูพืชที่ไม่พึงประสงค์ เมื่อสินค้าดังกล่าวได้รับการอนุญาตให้นำเข้า และช่วยให้ฝ่ายกักกันสามารถชี้แจงการตัดสินใจด้านการกักกันพืชต่อต่างประเทศที่พยายามส่งออกสินค้าเกษตรเข้ามาในประเทศไทยได้ดียิ่งขึ้น จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น จำเป็นที่ทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้องต้องเตรียมความพร้อมของข้อมูลศัตรูพืช รวมทั้งโรคพืช สำหรับข้าวโพด เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีการปลูกเพื่อบริโภคภายในประเทศ และส่งออกต่างประเทศ ในปี พ.ศ. 2553 มีพื้นที่ปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ รวมทั้งประเทศ 7,115,511 ไร่ ให้ผลผลิต 4,454,445 ตัน ใช้ภายในประเทศ ปริมาณ 4.28 ล้านตัน ปริมาณการส่งออกรวม 393,319 ตัน มูลค่า 2,267.21 ล้านบาท มีปริมาณการนำเข้า 366,747 ตัน มูลค่า 1,339.58 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) แหล่งปลูกข้าวโพดมีเกือบทั่วประเทศ แหล่งผลิตในประเทศที่สำคัญ ภาคเหนือ ได้แก่ เพชรบูรณ์ นครสวรรค์ พิษณุโลก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ นครราชสีมา ศรีสะเกษ ชัยภูมิ ภาคกลาง ได้แก่ สระบุรี ลพบุรี สุพรรณบุรี ภาคตะวันตก ได้แก่ กาญจนบุรี และภาคตะวันออก ได้แก่ สระแก้ว จันทบุรี ในเรื่องของศัตรูพืช โรคราน้ำค้างเป็นโรคที่สำคัญของข้าวโพด มีสาเหตุจากเชื้อรา 3 genus 8 species ได้แก่ *Peronosclerospora sorghi* (W. Weston &

Uppal) C.G. Shaw สาเหตุโรค Sorghum downy mildew *P. maydis* (Racib.) C.G. Shaw สาเหตุโรค Java downy mildew *P. philippinensis* (W. Weston) C.G. Shaw สาเหตุโรค Philippine downy mildew เชื้อรา *P. sacchari* (T. Miyake) Shirai & Hara สาเหตุโรค Sugarcane downy mildew *P. spontanea* (W. Weston) C.G. Shaw สาเหตุโรค Spontaneum downy mildew *Sclerospora graminicola* (Sacc.) J. Schröt. สาเหตุโรค Graminicola downy mildew หรือ Green ear downy mildew *Sclerophthora macrospora* (Sacc.) Thirumalachar *et al.*สาเหตุโรค Crazy top downy mildew *S.* rayssiae Kenneth *et al.* var. *zeae* Payak & Renfro สาเหตุโรค Brown stripe downy mildew (Donald, 2000; Shurtleff, 2012) ซึ่งราน้ำค้างเป็นปัญหาสำคัญในการส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด สำหรับราน้ำค้าง *Sclerospora graminicola* และ *Peronosclerospora philippinensis* เป็นเชื้อกักกันในการส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด ไปยังหลายประเทศ และ *S. graminicola* ยังไม่มีรายงานการพบโรคในประเทศไทย ดังนั้นเพื่อการเตรียมข้อมูลสถานภาพศัตรูพืชที่ถูกต้อง จึงควรสำรวจสถานภาพการปรากฏ/ไม่ปรากฏ และแพร่ระบาดของราน้ำค้าง *S. graminicola* และ *P. philippinensis* ในพื้นที่ปลูกข้าวโพดในประเทศไทย เพื่อให้ได้ข้อมูลสถานภาพของราน้ำค้าง *S. graminicola* และ *P. philippinensis* ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการกักกันพืช และสนับสนุนการส่งออก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างโรคราน้ำค้างข้าวโพด จากแหล่งปลูกพืชของประเทศไทย ระหว่างธันวาคม 2556 ถึง กันยายน 2557
2. อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างโรคพืช เช่น กรรไกร คัตเตอร์ ถุงพลาสติก กระดาษหนังสือพิมพ์ กล่องเก็บความเย็น ปากกา กระดาษบันทึกข้อมูล
3. เครื่องวัดพิกัด
4. คู่มือ และแบบฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจโรคราน้ำค้างข้าวโพด
5. แผงไม้อัดตัวอย่างโรคพืช กระดาษฟาง และกระดาษหนังสือพิมพ์
6. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเชื้อรา เช่น จานเลี้ยงเชื้อ หลอดแก้ว เข็มเขี่ย มีดโกน มีดผ่าตัด แผ่นแก้วสไลด์พร้อมแผ่นปิดสไลด์ และตะเกียงแอลกอฮอล์
7. สารเคมี ได้แก่ KOH shear's solution และ oil immersion
8. กล้องจุลทรรศน์ พร้อมกล้องถ่ายภาพ
9. ตำราสำหรับใช้ในการจัดจำแนกราน้ำค้าง

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูล

สืบค้นข้อมูลที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ข้อมูลพืช เช่น แหล่งปลูกข้าวโพด ขนาดพื้นที่ปลูก ประวัติการเกิดโรคในแต่ละพื้นที่ ข้อมูลเชื้อรา *Sclerospora graminicola* และ *Peronosclerospora philippinensis* เช่น รูปร่างลักษณะของเชื้อ และลักษณะอาการโรค และข้อมูลราน้ำค้างชนิดอื่นของข้าวโพด

2. จัดทำคู่มือการสำรวจ

จัดทำคู่มือการสำรวจ เพื่อใช้ในการตรวจสอบอ้างอิงขณะทำการสำรวจ โดยการรวบรวมตัวอย่างอ้างอิงและรูปภาพของโรคราน้ำค้างที่เกิดจาก *S. graminicola* และ *P. philippinensis* และจัดทำข้อมูลของเชื้อรา ได้แก่ ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพืชอาศัย อาการของโรค รูปภาพสีของโรค และแหล่งอาศัยของรา รวมทั้งข้อมูลราน้ำค้างชนิดอื่นของข้าวโพด

3. จัดทำแบบฟอร์มบันทึกข้อมูลในการสำรวจ

จัดทำแบบฟอร์มบันทึกข้อมูลในการสำรวจ ซึ่งประกอบด้วย วันที่ สถานที่ ตำแหน่งที่ตั้ง (พิกัด GPS) พันธุ์พืช ระยะการเจริญของพืช ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย ลักษณะอาการโรค เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ระดับความรุนแรงของโรค การแพร่กระจายในไร่ สภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศ เป็นต้น

4. สำรวจการเกิดโรคราน้ำค้างของข้าวโพด

- สำรวจการเกิดโรคราน้ำค้างข้าวโพดในแหล่งปลูกข้าวโพดของประเทศไทย ระหว่าง ธันวาคม 2556 ถึง กันยายน 2557 สำรวจ 5-10 เปอร์เซ็นต์ของแต่ละพื้นที่ปลูก แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบโดยเดินตามเส้นทแยงมุม ทุกๆ 10 ก้าว ตรวจโรคจุดละ 10 ต้น จำนวน 10 จุดต่อแปลง
- ตรวจโรคราน้ำค้างในแปลง โดยดูลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูล ตามแบบฟอร์ม และถ่ายรูปลักษณะอาการโรค
- เก็บตัวอย่างโรคราน้ำค้าง โดยเลือกเก็บส่วนของพืชที่แสดงอาการโรค ห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ใส่ในถุงพลาสติก พร้อมแนบกระดาษบันทึกรายละเอียด ชื่อพืช สถานที่เก็บ วันที่เก็บ และลักษณะอาการของโรค บรรจุห่อตัวอย่างโรคพืชลงในกล่องเก็บความเย็น เพื่อนำมาจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการ

5. จำแนกชนิดของราน้ำค้างในห้องปฏิบัติการ

โดยตรวจลักษณะราน้ำค้างของข้าวโพดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

- ตัดขวาง (cross section) เนื้อเยื่อพืช โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตรวจดูลักษณะอาการ และโครงสร้างของราน้ำค้างภายใต้กล้อง stereo microscope จากนั้นนำส่วนที่แสดงลักษณะอาการที่มีราน้ำค้างเจริญอยู่ มาตัดขวางเนื้อเยื่อ เมื่อได้ชิ้นส่วนที่แสดงลักษณะโครงสร้างของราน้ำค้างชัดเจน จึงหยด shear's solution ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ (cover slip) นำไปตรวจดูภายใต้กล้อง compound microscope เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของราน้ำค้าง
- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของสปอร์ โดยเขี่ยสปอร์จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคราน้ำค้าง ลงบนแผ่นกระจกสไลด์ แล้วหยด shear's solution ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ ตรวจดูลักษณะทางสัณฐาน

ของสปอร์ ใต้กล้อง compound microscope สุ่มวัดขนาดสปอร์ และโครงสร้างอื่นๆที่สำคัญ โดยใช้ calibrated micrometer บันทึกขนาด รูปร่าง ลักษณะผนังของสปอร์ และสี แล้วบันทึกภาพ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของขนาดสปอร์ และโครงสร้างของราน้ำค้างที่วัดขนาดไว้

- จำแนกชนิดราน้ำค้าง โดยเปรียบเทียบลักษณะของราน้ำค้างที่ศึกษากับคู่มือการจัดจำแนกราน้ำค้าง

6. จัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืช

โดยตัดส่วนของพืชบริเวณที่แสดงอาการโรค วางบนกระดาษฟาง พร้อมแนบกระดาษบันทึกข้อมูลพืช แล้วปิดทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ อัดทับด้วยแผงไม้อัดตัวอย่างโรคพืช นำไปวางผึ่งลมไม่ให้ถูกแดด เปลี่ยนกระดาษทุกวัน จนกระทั่งตัวอย่างพืชแห้ง จึงนำมาเก็บในถุงกระดาษสำหรับเก็บตัวอย่างแห้ง พร้อมลงรายละเอียดข้อมูลตัวอย่างตามระบบสากล (Anonymous, 2005) ได้แก่ ชื่อพืช ลักษณะอาการโรค สถานที่เก็บ ชนิดของราสาเหตุโรคพืช วันที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ และชื่อผู้จัดจำแนกชนิดรา เป็นต้น แล้วส่งเก็บในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

7. วิเคราะห์สถานภาพของราน้ำค้าง (Graminicola Downy Mildew) : *Sclerospora graminicola* และ (Philippine Downy Mildew) : *Peronosclerospora philippinensis* ในข้าวโพด

โดยรวบรวมข้อมูลสถานภาพการปรากฏ/ไม่ปรากฏ และแพร่กระจายของราน้ำค้าง *Sclerospora graminicola* และ *Peronosclerospora philippinensis* ในข้าวโพด ที่ได้จากการสำรวจ นำมาวิเคราะห์ สรุปผล และจัดทำรายงาน

เวลาและสถานที่

เวลา **เริ่มต้น** ตุลาคม 2556 **สิ้นสุด** กันยายน 2557

สถานที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงปลูกข้าวโพดในประเทศไทย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูล

ได้ข้อมูลพื้นที่ปลูกข้าวโพด ประวัติการเกิดโรคในแต่ละพื้นที่ ได้ข้อมูลเชื้อรา *S. graminicola* และ *P. philippinensis* เช่น รูปร่างลักษณะของเชื้อ และลักษณะอาการโรค และข้อมูลราน้ำค้างชนิดอื่นของข้าวโพด

2. จัดทำคู่มือการสำรวจ

ได้คู่มือการสำรวจ ซึ่งประกอบด้วย รูปภาพของเชื้อรา และอาการโรคราน้ำค้างของข้าวโพดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *S. graminicola* และ *P. philippinensis*

3. จัดทำแบบฟอร์มบันทึกข้อมูลในการสำรวจ

ได้แบบฟอร์มบันทึกข้อมูลในการสำรวจ ซึ่งประกอบด้วย วันที่ สถานที่ ตำแหน่งที่ตั้ง (พิกัด GPS) พันธุ์พืช ระยะการเจริญของพืช ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย ลักษณะอาการโรค เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ระดับความรุนแรงของโรค การแพร่กระจายในไร่ สภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศ เป็นต้น

4. สำรวจการเกิดโรคราน้ำค้างของข้าวโพด

สำรวจการเกิดโรคราน้ำค้างข้าวโพดในแหล่งปลูกข้าวโพดของประเทศไทย ระหว่าง ธันวาคม 2556 ถึง กันยายน 2557 ในพื้นที่ปลูกข้าวโพด รวม 59 ตำบล จาก 22 จังหวัด ในภาคเหนือ ได้แก่ ต.หนองกลับ อ.สวรรคโลก ต.ทับผึ้ง อ.ศรีสำโรง จ.สุโขทัย ต.แม่แตง อ.แม่แตง ต.ออนใต้ และ ต.ห้วยใต้ อ.สันกำแพง ต.เมืองนะ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ ต.แม่ยางร้อง อ.ร้องกวาง ต.แดนชุมพล อ.สอง ต.แม่คำมี และ ต.แม่หล่าย อ.เมือง และ ต.ดอนมูล และ ต.บ้านเหล่า อ.สูงเม่น จ.แพร่ ต.พระธาตุผาแดง ต.แม่กุ ต.มหาวัน ต.แม่กาษา อ.แม่สอด ต.ช่องแคบ อ.พบพระ ต.แม่จะเรา ต.แม่ระมาด ต.ขะเนจื้อ อ.แม่ระมาด จ.ตาก ต.หินฮาว อ.หล่มเก่า จ.เพชรบูรณ์ ภาคกลาง ได้แก่ ต.ตากฟ้า ต.พุนกยูง ต.อุดมธัญญา อ.ตากฟ้า จ.นครสวรรค์ ต.หนองแขม อ.โคกสำโรง ต.ชอนสารเดช ต.บ่อทอง อ.หนองม่วง จ.ลพบุรี ต.บางหลวง ต.บางหลวงโดด และ ต.วัดตะกู อ.บางบาล จ.พระนครศรีอยุธยา ต.ทุ่งลูกนก อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม ต.บ้านกร่าง ต.ดอนพลู อ.ศรีประจันต์ จ.สุพรรณบุรี ต.ท่ายาง อ.ท่ายาง จ.เพรชบุรี ภาคใต้ ได้แก่ ต.ป่าร่อน ต.บ้านกรูด และ ต.ช้างซ้าย อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี ต.เขาคราม อ.เมือง จ.กระบี่ ต.ละแม อ.ละแม และต.สลุย อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร ภาคตะวันตก ได้แก่ ต.ทุ่งทอง อ.ท่าม่วง ต.เกาะสำโรง และ ต.หนองหญ้า อ.เมือง จ.กาญจนบุรี ภาคตะวันออก ได้แก่ ต.บ้านฉาง อ.บ้านฉาง จ.ระยอง และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ ต.หนองกุงเซิล และ ต.กุดขอนแก่น อ.ภูเวียง จ.ขอนแก่น ต.ขอนแก่น อ.เมือง ต.โพธิ์ทอง อ.ศรีสมเด็จ จ.ร้อยเอ็ด ต.ดอนนางหงส์ อ.ธาตุพนม ต.บ้านกลาง อ.เมือง ต.โพนทอง อ.บ้านแพง จ.นครพนม ต.บ้านเดื่อ ต.สีกาย ต.กวนวัน อ.เมือง ต.โพนสา อ.ท่าบ่อ จ.หนองคาย ต.ทองหลาง อ.จักราช ต.สูงเนิน อ.สูงเนิน ต.ลาดบัวหลวง อ.สี้คิ้ว จ.นครราชสีมา ต.ทะเมนชัย อ.ลำปลายมาศ จ.บุรีรัมย์ ไม่พบโรคราน้ำค้างข้าวโพด

5. วิเคราะห์สถานภาพของราน้ำค้าง (Graminicola Downy Mildew) : *Sclerospora graminicola* และ (Philippine Downy Mildew) : *Peronosclerospora philippinensis* ในข้าวโพด

จากการสำรวจระหว่าง ธันวาคม 2556 ถึง กันยายน 2557 ไม่ปรากฏราน้ำค้าง (Graminicola Downy Mildew) : *Sclerospora graminicola* และ (Philippine Downy Mildew) : *Peronosclerospora philippinensis* ในข้าวโพด และไม่พบโรคราน้ำค้างชนิดอื่นของข้าวโพด

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจการเกิดโรคราน้ำค้างข้าวโพดในแหล่งปลูกข้าวโพดของประเทศไทย ระหว่าง ธันวาคม 2556 ถึง กันยายน 2557 ในพื้นที่ปลูกข้าวโพด รวม 59 ตำบล จาก 22 จังหวัด ได้แก่ จ.สุโขทัย จ.เชียงใหม่ จ.แพร่ จ.ตาก จ.เพชรบูรณ์ จ.นครสวรรค์ จ.ลพบุรี จ.พระนครศรีอยุธยา จ.นครปฐม จ.กาญจนบุรี จ.สุพรรณบุรี จ.เพรชบุรี จ.สุราษฎร์ธานี จ.กระบี่ จ.ชุมพร จ.ระยอง จ.ขอนแก่น จ.ร้อยเอ็ด จ.นครพนม จ.หนองคาย จ.นครราชสีมา จ.บุรีรัมย์ ไม่ปรากฏราน้ำค้าง (Graminicola Downy Mildew) : *Sclerospora graminicola* และ (Philippine Downy Mildew) : *Peronosclerospora philippinensis* ในข้าวโพด และไม่พบโรคราน้ำค้างชนิดอื่นของข้าวโพด

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. **ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2553.** เอกสารสถิติการเกษตรเลขที่ 416. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. 93 หน้า.

Anonymous. 2005. **Management of Plant Pathogen Collections**. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Commonwealth of Australia. 82 pp.

Shurtleff, M. C., D. I. Edwards, G. R. Noel, W. L. Pedersen, and D. G. White. 2012. **Diseases of Corn or Maize (Zea mays L.).** The American Phytopathological Society. (last update 4 March 1993). (Online). Available. http://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/CornorMaize.aspx (June 3, 2012).

Donald, G. W. 2000. **Compendium of Corn Disease**. APS Press. The American Phytopathological Society. 78p.

การสำรวจสถานภาพของรา *Claviceps* ในประเทศไทย

Pest status survey of *Claviceps* in Thailand

พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ ชนินทร ดวงสอาด พจนา ตระกูลสุขรัตน์

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สืบค้นข้อมูลรา *Claviceps* ที่มีรายงานพบในประเทศไทย ตลอดจนรวบรวมลักษณะอาการของรา *Claviceps* บนพืชอาศัยต่างๆ ในต่างประเทศ และสำรวจโรคที่เกิดจากรา *Claviceps* ในแปลงปลูกข้าวฟ่าง ข้าว พืชวงศ์กก พืชวงศ์หญ้า จังหวัดนครราชสีมา สระบุรี ลำพูน ชลบุรี ระยอง สุราษฎร์ธานี พังงา กระบี่ ชุมพร เพชรบุรี ตาก และเชียงใหม่ โดยเก็บตัวอย่างช่อดอกข้าวฟ่าง ข้าว พืชวงศ์กก พืชวงศ์หญ้า จำนวน 122 ตัวอย่าง มาตรวจหารา *Claviceps* ในห้องปฏิบัติการ ผลจากการศึกษาไม่พบรา *Claviceps* จากตัวอย่างทั้งหมด

คำสำคัญ : การสำรวจสถานภาพ Claviceps ประเทศไทย

Key words: Pest status survey, *Claviceps*, Thailand

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-06-00-15-57

คำนำ

เนื่องจากในปัจจุบันการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตรจะต้องมีความตกลงทั่วไปว่าด้วย ภาษีศุลกากรและการค้า (General Agreement on Tariff and Trade: GATT) ซึ่งต่อมาได้เปลี่ยนเป็นองค์การการค้าโลก (World Trade Organization: WTO) ได้กำหนดกฎเกณฑ์และระเบียบเพื่อให้เกิดการค้าเสรีและเป็นธรรม โดยทุกประเทศสมาชิกของ WTO จะต้องปรับลดอัตราอากรขาเข้าลงมาเป็นอันดับแรกสุดของการเปิดการค้าเสรี ในปัจจุบันมาตรการกีดกันด้านภาษีศุลกากรมีแนวโน้มที่จะลดลงเนื่องจากการเปิดเสรีทางการค้าภายใต้เขตการค้าเสรีต่างๆ มีเพิ่มขึ้น แต่ในขณะเดียวกันมาตรการกีดกันทางการค้าที่มิใช่ภาษีศุลกากร (non tariff barrier, NTB) จะเริ่มมีบทบาทและมีรูปแบบใหม่ๆ เพิ่มขึ้น ซึ่งมาตรการที่สำคัญในด้านการเกษตรได้แก่ มาตรการด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Sanitary and Phytosanitary Measures : SPS) มาตรการด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช มีวัตถุประสงค์เพื่อปกป้องชีวิต และสุขภาพมนุษย์ สัตว์ และพืช เพื่อสร้างความมั่นใจต่อความปลอดภัยด้านอาหาร แต่ต้องไม่ใช้สิทธินั้นในทางที่เป็นการสร้างข้อจำกัดทางการค้า หรือเลือกปฏิบัติระหว่างประเทศสมาชิกตามอำเภอใจ ซึ่งการนำมาตรการ SPS มาใช้ควรสอดคล้องกับมาตรฐานตามที่องค์กรมาตรฐานระหว่างประเทศกำหนดขึ้นซึ่งต้องมีเหตุผลและหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เพียงพอมีการประเมินความเสี่ยง (Risk Assessment) ที่เชื่อถือได้ ซึ่งประเทศคู่ค้ามักนำมาตรการ SPS มาใช้เป็นเครื่องมือในการกีดกันทางการค้ากับสินค้าอาหารประเภทปศุสัตว์ ประมง และพืชผักผลไม้ โดยอ้างการตรวจพบเชื้อโรค โรคแมลง และอื่นๆ ซึ่งส่งผลกระทบต่อภาพลักษณ์ทางการค้าของประเทศ และเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต

ประเทศเกือบทุกประเทศที่เป็นสมาชิกขององค์การการค้าโลก (WTO) ได้นำมาตรการสุขอนามัยพืชมาใช้เป็นข้อต่อรองในการส่งออกและนำเข้า โดยที่ประเทศผู้ส่งออกต้องส่งบัญชีรายชื่อศัตรูพืชของพืชส่งออกใและข้อมูลของศัตรูพืชแต่ละชนิดตามความต้องการของประเทศผู้นำเข้า เพื่อทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ก่อนที่จะอนุญาตให้สินค้าเกษตรนั้นๆเข้าประเทศ ขณะเดียวกันประเทศผู้นำเข้าจำเป็นต้องมีข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูของพืชที่นำเข้าด้วย การจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูโดยการศึกษาและการสำรวจแบบติดตามข้อมูลศัตรูพืชในแหล่งปลูกเพื่อเป็นการเฝ้าระวัง (Surveillance) เป็นกระบวนการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่งในพื้นที่ ซึ่งการรวบรวมข้อมูลนั้นสามารถทำได้ 2 แบบ ได้แก่การเฝ้าระวังโดยทั่วไป (general surveillance) โดยการค้นคว้าข้อมูลจากแหล่งข้อมูล ได้แก่ ข้อมูลข่าวสารศัตรูพืชที่มีรายงานในประเทศ เช่นจาก หน่วยงานภาครัฐ มหาวิทยาลัย ภาคเอกชน ตลอดจนข่าวสารจากแหล่งข้อมูลขององค์กรระหว่างประเทศ เช่น องค์การอาหารและเกษตรแห่งชาติ (Food and Agriculture Organization, FAO) องค์การอารักขาพืชระดับภูมิภาค (Regional Plant Protection Organzation, RPPOs) และอื่น ๆ การเฝ้าระวังโดยการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific surveys) สามารถดำเนินการโดยการสำรวจแบบตรวจหา (detection surveys) และการสำรวจแบบมีขอบเขต (delimiting surveys) (McMaugh, 2005) ประโยชน์ของการสำรวจแบบ

เฉพาะเจาะจงทั้ง 2 วิธีนี้นอกจากจะสามารถบอกถึงสถานการณ์ของศัตรูพืชในพื้นที่แล้วยังสามารถใช้ข้อมูลที่ได้เป็นการรับรองพื้นที่ปลอดศัตรูพืชในกรณีที่ไม่พบศัตรูพืชในพื้นที่นั้น ๆ เมื่อมีการรับรองพื้นที่ปลอดศัตรูพืชแล้ว การที่จะคงสภาพพื้นที่ปลอดศัตรูพืชจะต้องมีการสำรวจแบบตรวจหาอย่างเป็นระบบข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้จากการสำรวจติดตามศัตรูพืชเพื่อการเฝ้าระวังนี้จะส่งให้องค์การอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization, NPPO) นำไปใช้ประโยชน์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการเฝ้าระวังนี้สามารถนำไปใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น ใช้ในการสนับสนุนการออกประกาศเรื่องการปลอดศัตรูพืช ตลอดจนที่ดำเนินการโดย NPPO เป็นกระบวนการช่วยตรวจหาศัตรูพืชชนิดใหม่ได้ทันเวลา การให้การรับรองพื้นที่ปลอดศัตรูพืช เป็นต้น การสำรวจ ติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชเป็นงานพื้นฐานที่มีความจำเป็นสำหรับใช้ในการดำเนินการด้านอื่นๆ อีก เช่น Pest Risk Analysis, Establishment for pest free area, Pest list, Pest report เป็นต้น ซึ่งแนวทางการดำเนินงานจะสอดคล้องกับ ISPMs (International Standard for Phytosanitary Measures) ฉบับที่ 6 (Guidelines for Surveillance)

ในปัจจุบันมีการประกาศกำหนดศัตรูพืชกักกันของสินค้าเกษตรขึ้นในแต่ละประเทศที่มีการส่งออกและนำเข้า เช่นเดียวกันประเทศไทยสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยกลุ่มวิจัยการกักกันพืชได้ยกร่าง “ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง การกำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักกันพืช พ.ศ. 2507” พ.ศ. 2549 และได้แจ้งให้ประเทศสมาชิกภายใต้องค์กรการค้าทราบเพื่อให้ข้อคิดเห็น ซึ่งข้อคิดเห็นที่จะเกิดขึ้นคือมีศัตรูพืชบางชนิดจะต้องมีการตรวจสอบและยืนยันการปรากฏหรือไม่มี การตรวจสอบและยืนยันที่อย่างถูกต้องจะต้องมีข้อมูลที่มีหลักฐานที่จะสามารถยืนยันการปรากฏหรือไม่มีของศัตรูพืชนั้น ๆ การสำรวจการปรากฏหรือไม่มีของศัตรูพืชนั้น ๆ ในประเทศต้องดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจงจะเป็นข้อมูลศัตรูพืชที่ NPPO สามารถนำไปใช้ในการเจรจาการค้าหรือปลดชื่อศัตรูพืชที่ไม่มีปรากฏในประเทศออกจากบัญชีรายชื่อได้ อนึ่งข้อมูลที่สำคัญที่จะนำมาพิจารณาร่วมในการเฝ้าระวังศัตรูคือรายละเอียดด้านชีววิทยาและนิเวศวิทยาของศัตรูพืช ได้แก่ วงจรชีวิตศัตรูพืช ประวัติและลักษณะการและข้อมูลต่าง ๆ เหล่านี้จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องเพื่อได้มาซึ่งข้อมูลที่เป็นปัจจุบันที่ NPPO สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

Claviceps เป็นราใน Class Ascomycetes, Order Hypocreales, Family Clavicipitaceae มี Anamorphic state หลายชนิด ได้แก่ *Acremonium, Aschersonia, Ephelis, Hirsutella, Paecilomyces, Sphacelia* เป็นสาเหตุโรคเออร์กอท (Ergot) ของพืชไร่และพืชวงศ์หญ้า (Hawksworth, et al., 1995) รานี้สร้างสารพิษ เออร์กอท อัลคาลอย (Ergot Alkaloids) เป็นอันตรายต่อสัตว์ โดยสารพิษทำให้มีการเปลี่ยนแปลงใน ตับ ใต ลำไส้เล็ก หัวใจ และปอด ตามประกาศกำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้าม ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 ได้กำหนด รา *Claviceps elegans, C. gigantean, C. purpurea* และ *C. gigantean* เป็นศัตรูพืชกักกัน แต่ในประเทศไทยมีรายงานพบรา *Sphacelia sorghi* (Teleomorphic state: *Claviceps* sp.) บนข้าวฟ่าง ที่อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และหญ้ากินนี (เตือนใจ และคณะ, 2527; โกมิ

นทร์ และคณะ, 2536) และ คุณพิมพาพร พลเสน และ ดร.นิวัฒน์ เสนาะเมือง ศึกษาพบรา *Sphacelia africana* (Teleomorphic state: *Claviceps* sp.) บนหญ้ากินนีสีม่วง ที่แปลงเมล็ดพันธุ์คัดของศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ขอนแก่น (นิรนาม, 2554) เพราะฉะนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่สำรวจสถานภาพของรา *Claviceps* ที่แพร่กระจายในประเทศไทยให้เป็นข้อมูลปัจจุบัน โดยศึกษารายละเอียดการจำแนกชนิดและการแพร่กระจายของราอย่างละเอียด เพื่อได้มาซึ่งข้อมูลที่เป็นปัจจุบันที่ NPPO สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างได้แก่ ถุงพลาสติก กระดาษบันทึก ปากกาเคมี เครื่องระบุพิกัด กระดาษหนังสือพิมพ์
2. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อ
3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวดดูแรน บิกเกอร์ สไลด์ และแผ่นแก้วปิดสไลด์ กระบอกตวง แท่งแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. เข็มเขี่ยปลายแหลม ห่วงถ่ายเชื้อ ปากคีบ ใบมีดผ่าตัด มีด
5. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound, stereo, camera lucida พร้อมกล้องถ่ายภาพ
6. อาหารแยกและเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ water agar (WA) potato dextrose agar (PDA) และ T2 medium
7. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ และ เอธิลแอลกอฮอล์ 75%
8. อุปกรณ์ทำตัวอย่างแห้ง เช่น กระดาษหนังสือพิมพ์ ไม้อัดตัวอย่าง กระดาษฟาง ซองกระดาษสำหรับใส่ตัวอย่าง

วิธีการ

1. **สืบค้นข้อมูลลักษณะของรา** *Claviceps* ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง และรวบรวมตัวอย่างอ้างอิงและรูปภาพของโรครา *Claviceps* เพื่อใช้ในการตรวจสอบอ้างอิง ขณะทำการสำรวจและจัดทำข้อมูลศัตรูพืช ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพืชอาศัย อาการของโรค รูปภาพสีของโรค แหล่งอาศัยของรา และรายละเอียดของศัตรูพืชชนิดอื่นที่คล้ายคลึงกับศัตรูพืชเป้าหมาย และศึกษาลักษณะอาการที่ใช้ในการวินิจฉัย
2. **จัดทำแบบฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ** พร้อมบันทึกข้อมูลชื่อพืช สถานที่ วันที่เก็บ และตำแหน่งที่ตั้งพิกัดภูมิศาสตร์ เก็บตัวอย่างโรคไว้ในกล่องเก็บความเย็น นำตัวอย่างมาศึกษาลักษณะอาการในห้องปฏิบัติการ จัดเก็บโรคพืชที่แสดงอาการที่ใบอัดทับเป็นตัวอย่างแห้งและเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพ ฯ

3. การสำรวจ เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ในข้อ 2 บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างห่อกระดาษและใส่ถุง นำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ

วางแผนการสำรวจในพื้นที่อย่างน้อย 10 แปลง ต่อพื้นที่ แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบ สุ่มตรวจโรค 5 แถวต่อแปลง กำหนดการตรวจแบบแถวเว้นแถว วางแผนการสำรวจอย่างมีระบบ สำรวจแบบเฉพาะเจาะจง ในพื้นที่อย่างน้อย 20 ไร่ แบ่งพื้นที่ออกเป็น 4 ส่วนๆละประมาณ 5 ไร่ แต่ละพื้นที่สุ่มเก็บตัวอย่าง 20 จุด แต่ละแปลงเดินตามเส้นทแยงมุม ทุกๆ 10 ก้าว

4. การศึกษารา *Claviceps*

4.1 ศึกษารา *Claviceps* โดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช (Direct observation)

ศึกษาลักษณะของราเขม่าดำบนส่วนต่าง ๆ ของพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo บันทึกลักษณะต่าง ๆ ใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยส่วนของรา ได้แก่ สปอร์ หรือส่วนขยายพันธุ์ของรา มาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ หยดน้ำหรือสีย้อม และปิดทับด้วย cover slip และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope)

4.2 การจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุ

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ สี ขนาด ชนิดของ fruiting body ลักษณะของ sclerotia และถ่ายภาพราจากกล้องจุลทรรศน์ ศึกษาลักษณะผิวของสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน แบบส่องกราด นำลักษณะของราดังกล่าวเปรียบเทียบกับคู่มือการจัดจำแนกชนิด ที่ใช้กันทั่วไปได้แก่ Cunfer (1976) Alderman *et al.* (1999) Komolong *et al.* (2002) Van der Linde E and F.C. Wehner (2007)

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2556– สิ้นสุด กันยายน 2558 **รวม** 2 **ปี**

สถานที่ - แหล่งพืชธรรมชาติและแหล่งปลูกข้าวฟ่าง
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช
- สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูลลักษณะของราเขม่าดำ *U. cepulae*

สืบค้นข้อมูลลักษณะของรา *Claviceps* ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง และลักษณะอาการของโรค พร้อมรูปภาพรูปภาพสีของโรค และรายละเอียดของศัตรูพืชชนิดอื่นที่คล้ายคลึงกับศัตรูพืชเป้าหมาย (Figure 1, 2)

รายละเอียดของรา *Claviceps* ดังนี้

Common name and scientific name

Kingdom	Fungi
Division	Ascomycota
Class	Sordariomycetes
Subclass	Hypocreomycetidae
Order	Hypocreales
Family	Clavicipitaceae
Genus	Claviceps
Imperfect state	*Acremonium, Aschersonia, Ephelis, Paecilomyces, Hersutella, Sphacelia*

ลักษณะของราสกุล *Claviceps*

ราสกุล *Claviceps* สร้างส่วนขยายพันธุ์ (fruiting body) เรียกว่า perithecium ฝังอยู่ในเนื้อเยื่อของ stroma ซึ่งเป็นส่วนของเส้นใยอัดรวมตัวกันคล้ายหมอน (cushion) เกิดจาก sclerotium สีดำ มีลักษณะแข็ง ประกอบด้วยส่วนเนื้อเยื่อของราทั้งหมด ราสร้าง ascus รูปร่างยาว ทรงกระบอก ผนังที่ปลายหนามีลักษณะเป็น cap และสร้างช่องเปิดเป็นท่อผ่านส่วนหนาของปลาย ascus สร้าง paraphysis อยู่ติดกับผนังด้านข้างของ ascocarp ซึ่งเมื่อ ascus แก่ ก็จะรวมไปเป็นส่วนของผนัง perithecium จึงไม่พบ paraphysis แทรกในระหว่างกลุ่มของ ascus ส่วน ascospore ไม่มีสี รูปร่างคล้ายเส้นด้าย มีเส้นแบ่งกั้นเซลล์หลายเส้น แต่ละ ascus มี 8 ascospore ราสกุลนี้เป็นปรสิตของพืชวงศ์หญ้า ราที่สำคัญในสกุลนี้ได้แก่ รา *Claviceps purpurea*

พืชอาศัย ข้าวสาลี ข้าว ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวฟ่าง ข้าวโอ๊ต ข้าวไรน์ มิลเล็ต พืชวงศ์กก และหญ้าอีกหลายชนิด

Claviceps purpurea มีรายละเอียดดังนี้

ราสกุล *C. purpurea* สร้าง ascospore รูปร่างคล้ายเส้นด้าย เข้าทำลายข้าวไรน์ ในระยะที่ต้นข้าวออกดอก โดย ascospore ไปตกบน sterigma ของดอกข้าวงอกเป็นเส้นใยเจริญผ่านเข้าไปทำลายรังไข่ของเมล็ดข้าวและราสร้างเส้นใยเข้าไปแทนที่ ทำให้เนื้อเยื่อของรังไข่เน่าเปื่อย ระยะต่อมาเส้นใยที่อยู่บริเวณส่วนผิวของรังไข่สร้าง conidium บนก้านชูสปอร์ (conidiophore) (*Sphacelia* state) conidium ที่สร้างนี้ปะปนอยู่กับสารเหนียวที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำตาลสูง เกิดจากเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายซึ่งช่วยล่อแมลงแล้วพาเอา conidium ของราไปยังดอกข้าวอื่นที่ไม่เป็นโรค ทำให้โรคแพร่ระบาด ในระยะหลังของการเข้าทำลาย ราเปลี่ยนส่วนของรังไข่ไปเป็น sclerotium มีลักษณะแข็งประกอบด้วยเส้นใยราและเศษเหลือของเนื้อเยื่อปนกัน ระยะนี้สามารถเห็นเมล็ดข้าวที่เป็นโรคได้ง่ายเพราะมีสีดำและแข็ง เมล็ดข้าวที่เป็นโรคมีชื่อเรียกทั่วไปว่าเออร์กอท

พืชอาศัย ข้าวสาลี ข้าว ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวฟ่าง ข้าวโอ๊ต ข้าวไรน์ มิลเล็ต พืชวงศ์กก และหญ้าอีกหลายชนิด

เขตแพร่กระจาย

2. จัดทำแบบฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ

จัดทำแบบฟอร์มเพื่อใช้ในการสำรวจ ซึ่งจะต้องมีข้อมูลดังต่อไปนี้ ข้อมูลเกษตรกรได้แก่ ชื่อที่อยู่ของเกษตรกร ข้อมูลภูมิศาสตร์ ข้อมูลพืชได้แก่ ชนิด และอายุของพืช ข้อมูลโรคที่พบได้แก่ ลักษณะอาการ ส่วนของพืชที่แสดงอาการ การวินิจฉัยโรคเบื้องต้นในแปลง และได้นำข้อมูลเหล่านี้มาจัดทำเป็นแบบฟอร์มในการสำรวจได้ 1 แบบฟอร์ม (Figure 3)

จากข้อมูลภาพโรครา *Claviceps* ที่ได้จากการสืบค้น จัดทำเป็นคู่มือการสำรวจได้ 1 ชุด

3. การสำรวจ

จากผลการสำรวจสถานภาพของรา *Claviceps* ในช่วงเดือนตุลาคม 2556 – เดือนกันยายน 2557 ในแปลงปลูกข้าวฟ่าง ข้าว พืชวงศ์กก และพืชวงศ์หญ้า ใน 12 จังหวัด ดังนี้ จังหวัดนครราชสีมา สระบุรี ลำพูน ชลบุรี ระยอง สุราษฎร์ธานี พังงา กระบี่ ชุมพร เพชรบุรี ตาก และเชียงใหม่ (Figure 4) โดยเก็บตัวอย่างช่อดอกข้าวฟ่าง ข้าว พืชวงศ์กก พืชวงศ์หญ้า จำนวน 122

4. วิธีการตรวจของรา *Claviceps*

เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างห่อกระดาษ และมาตรวจดูโดยตรงด้วยตาเปล่าเพื่อแยกลักษณะอาการที่เป็นโรคต่าง ๆ แล้วนำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักพืช

ผลการสำรวจและตรวจหารา *Claviceps* จากการสุ่มเก็บตัวอย่างพืชที่มีลักษณคล้ายโรคเออร์กอท จำนวน 122 ตัวอย่าง บนช่อดอกข้าวฟ่างซึ่งตัวอย่างที่เก็บมามีลักษณะคล้ายกับมีสารเหนียวที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำตาลสูงปะปนอยู่ในช่อดอกข้าวฟ่าง ลักษณะนี้คล้ายกับสารเหนียวที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำตาลสูงเกิดจากเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายบนข้าวฟ่างที่เป็นโรคเออร์กอท แต่เมื่อนำมาศึกษาแล้วไม่พบรา *Claviceps*

5. การศึกษารา *Claviceps*

จากการศึกษาตัวอย่างพืชที่เก็บมาจำนวน 122 ตัวอย่าง นั้นพบว่าไม่ปรากฏรา *Claviceps* แต่ในการสำรวจครั้งนี้พบรา *Fusarium* ช่อดอกข้าวฟ่างที่มีลักษณะเหนียวๆคล้ายสารเหนียวที่อยู่บนพืชที่เป็นโรคเออร์กอท

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการสำรวจสถานภาพของรา *Claviceps* ในช่วงเดือนตุลาคม 2556 – เดือนกันยายน 2557 โดยทำการสืบค้นข้อมูลรา *Claviceps* ค้นข้อมูลรา *Claviceps* ที่มีรายงานพบในประเทศไทย และรวบรวมลักษณะอาการของรา *Claviceps* บนพืชอาศัยต่าง ๆ และสำรวจโรคที่เกิดจากรา

Claviceps ในแปลงปลูกข้าวฟ่าง ข้าว พืชวงศ์กก พืชวงศ์หญ้า ในจังหวัดนครราชสีมา สระบุรี ลำพูน ชลบุรี ระยอง สุราษฎร์ธานี พังงา กระบี่ ชุมพร เพชรบุรี ตาก และเชียงใหม่ โดยเก็บตัวอย่างช่อดอกข้าวฟ่าง ข้าว พืชวงศ์กก พืชวงศ์หญ้า จำนวน 122 ตัวอย่าง มาตรวจหารา *Claviceps* ในห้องปฏิบัติการ ผลจากการศึกษาไม่พบรา *Claviceps* จากตัวอย่างทั้งหมด

เอกสารอ้างอิง

นิรนาม. 2554. โรคเออร์กอท (Ergot) ที่ช่อดอกหญ้ากินนีสีม่วง. กรมปศุสัตว์. http:www.dld.go.th/feedingstandard/index.php/the-news/3-newsflash/16.

ธนาคร จารุพัฒน์ วิชัย ก่อประดิษฐ์กุล นิพนธ์ ทวีชัย และ ศศินาฏ แสงวงศ์. 2526. *โรคอ้อยในประเทศไทย*. สมาคมนักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย. 180 น.

เตือนใจ บุญ-หลง. 2526. โรคเออร์กอทของซูแดกซ์. *วารสารโรคพืช*. 3: 219-221.

เตือนใจ บุญ-หลง และ โกมินทร์ วิโรจน์วัฒนกุล. 2530. การศึกษาพืชอาศัยของโรคเออร์กอทของข้าวฟ่าง. น. 32-36. *ใน: รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2530*. กลุ่มงานวิจัยโรคพืชไร่. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา.กรมวิชาการเกษตร.

เตือนใจ บุญ-หลง ธีรยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และ อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2527. เออร์กอทโรคใหม่ของข้าวฟ่างในประเทศไทย. *วารสารการเกษตร* 2 (2): 146-150.

Alderman, S., D. Frederickson, G. Milbrath, N. Montes, J. Narro-Sanchez, and G. Odvody. 1999. A Laboratory Guide to the Identification of *Claviceps purpurea and Claviceps africana* in Grass and Sorghum Seed Samples. website: http://www.oda.state.or.us

Alderman, S., D. Frederickson, G. Milbrath, N. Montes, J. Narro-Sanchez, M.Sc. and G. Odvody. 1999. A Laboratory Guide to the Identification of *Claviceps purpurea* and *Claviceps africana* in Grass and Sorghum Seed Samples. https://www.erowid.org/archive/rhodium/pdf/claviceps.identification.pdf

Cunfer, B.M. 1976. Inhibition of conidial germination by *Claviceps purpurea* honeydew fluid Komolong Birte, S. Chakraborty, M. Ryley, and D. Yates.2006. Identity and genetic diversity of the sorghum ergot pathogen in Australia. *Aus. J. Agric. Res.*(53): 621-628.

McMaugh, T. 2005. Guidelines for surveillance for plant pests in Asia and the Pacifi c. ACIAR Monograph No. 119, Printing by Union Offset, Canberra . 192p

Van der Linde E and F.C. Wehner. 2007. Symptomatology and morphology *of Claviceps cyperi* on yellow nut sedge in South Africa. *Mycologia*. 99(4), pp. 586–591.

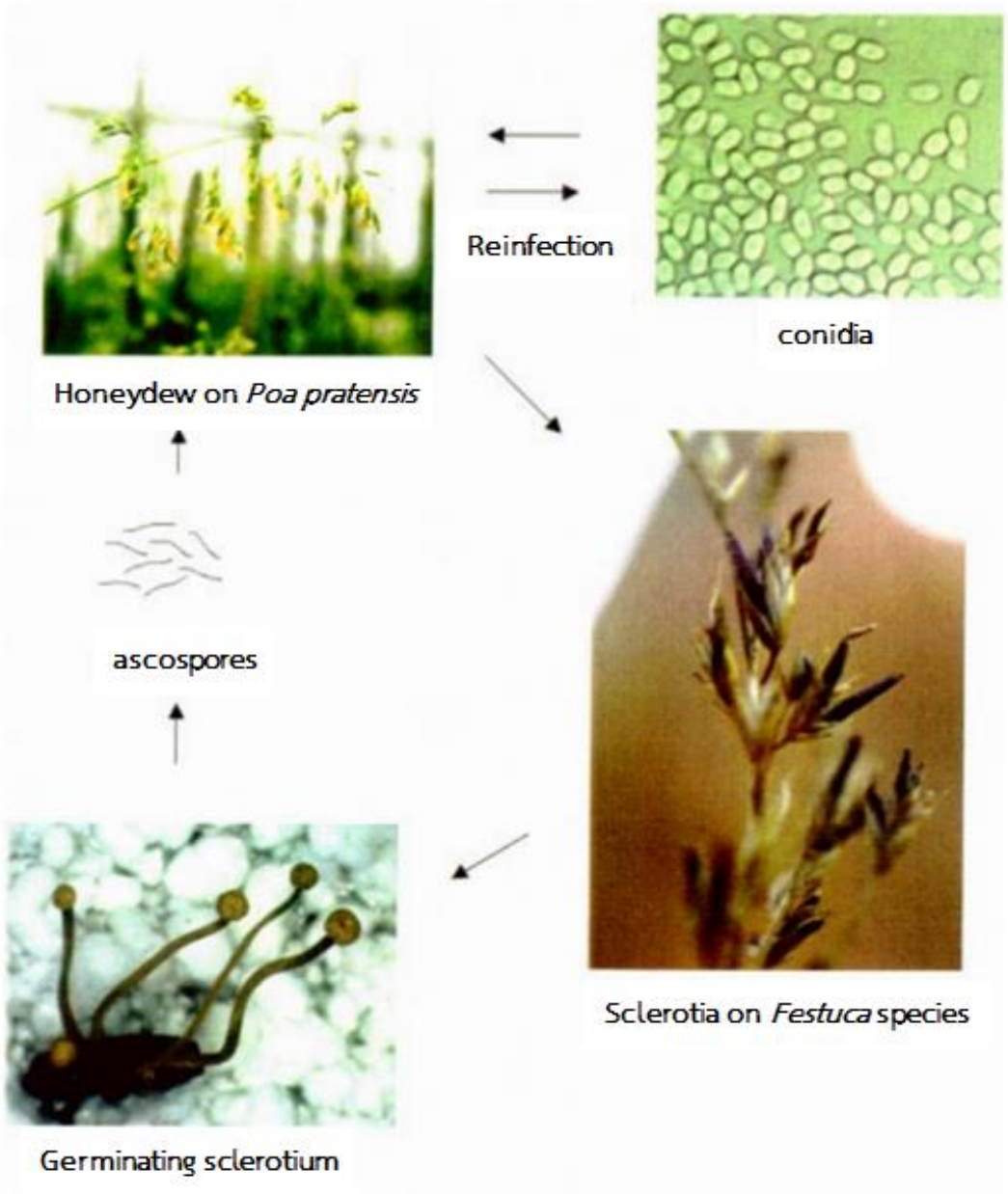


Figure 1 General life cycle of *Claviceps purpurae*. (Alderman et al., 1999)

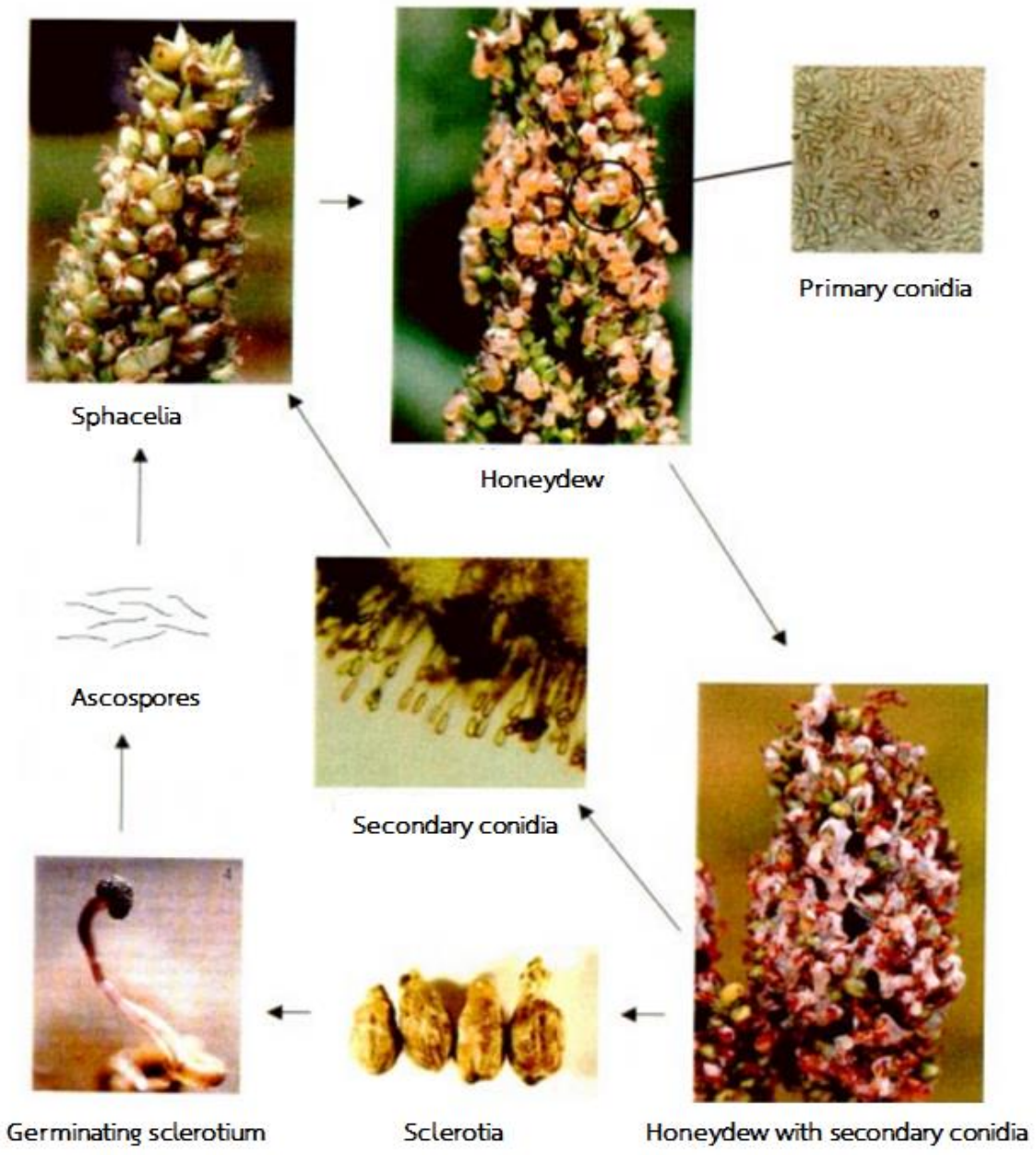


Figure 2 General life cycle of *Claviceps africana* on Sorghum. (Alderman *et al.*, 1999)

แบบฟอร์มการสำรวจรา *Claviceps*

ตัวอย่างที่.....**วันที่**.....

ชื่อเกษตรกร.....

ที่อยู่

.....

.....

พืช (ชื่อสามัญ).....**ชื่อวิทยาศาสตร์**.....

อายุพืช.....**พันธุ์พืช**.....

สถานที่ปลูก

.....

พิกัดภูมิศาสตร์

เส้นรุ้ง.....**เส้นแวง**.....

ความสูงเหนือระดับน้ำทะเล

(เมตร).....

ส่วนที่เก็บตัวอย่างลักษณะคล้ายรา *Claviceps*

(.....) ต้น (.....) หัว

(.....) รังไข่ (.....) เมล็ด

(.....) อื่นๆ

โรคอื่นๆ ที่พบ

1.....

2.....

3.....

4.....

5.....

ผู้เก็บตัวอย่าง

.....

Figure 3 Survey form of *Claviceps*.

Figure 4 Map of Thailand indicating the collection sites from 12 provinces.

การสำรวจสถานภาพของแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* ในพืชตระกูลแตง ในประเทศไทย

Pest status survey of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucurbit production in Thailand

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1/] ทิพวรรณ กันหาญาติ[1/] รุ่งนภา ทองเครั่ง[1/] ชลธิชา รักใคร่[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

แบคทีเรีย *Pseudomonas syringae pv. lachrymans* สาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมแตง (Angular Leaf Spot) เป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางกักกันพืช จากการที่ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตงทำให้มีความเสี่ยงในการเป็นส้นทาง(pathway) ของเชื้อนี้ที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ เนื่องจากเป็นโรคที่ถ่ายทอดได้ทางเมล็ดพันธุ์(seed transmission) จึงจำเป็นต้องมีการสำรวจติดตามและเฝ้าระวังโรคใบจุดเหลี่ยมแตงอย่างเป็นระบบ เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และการกำหนดพื้นที่ปลอดศัตรูพืช จากการสำรวจแหล่งปลูกพืชตระกูลแตง 5 แหล่งปลูก ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2556- กันยายน 2557 จำนวน 45 แปลง ได้แก่ เชียงราย จำนวน 5 แปลง เชียงใหม่ จำนวน 10 แปลง สระแก้ว จำนวน 10 แปลง ปราจีนบุรี จำนวน 5 แปลง ขอนแก่น จำนวน 15 แปลง ไม่พบอาการโรคใบจุดเหลี่ยมแตง

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-06-00-16-57

คำนำ

ปัจจุบันประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกเมล็ดพันธุ์รายใหญ่ในภูมิภาคเอเชียเป็นอันดับ 3 รองจากจีนและญี่ปุ่น และมีแนวโน้มเติบโตเพิ่มขึ้น โดยข้าวโพดเป็นพืชที่ส่งออกมากที่สุด รองลงมาเป็นพืชตระกูลแตง พริก มะเขือ เป็นต้น ปริมาณ และจากมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุมประจำปี 2554 พบว่าไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พืชตระกลูแตง ประมาณ 90 ล้านบาท และมีการส่งออกเมล็ดพันธุ์แตงโม แตงกวา แคนตาลูป มะระ บวบเหลี่ยม ฟักทอง มีมูลค่าประมาณ 330, 300 ,135, 113, 35 และ 5 ล้านบาทตามลำดับ โดยมีการส่งออกไปทั่วโลก ทั้งในสหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส สเปน โดยผู้นำเข้ารายใหญ่มาจากประเทศในเอเชีย ได้แก่ ญี่ปุ่น จีน อินเดีย เวียดนาม อินโดนีเซีย สิงคโปร์ เป็นต้น โดยมีเกษตรกรอยู่ในธุรกิจนี้หลายหมื่นครัวเรือน มีพื้นที่ปลูกนับแสนไร่ ปัญหาและอุปสรรคสำคัญในการผลิตและส่งออกเมล็ดพันธุ์แตงคือการระบาดของศัตรูพืชทั้งโรคพืชและแมลงที่เข้าทำลายผลผลิต และเชื้อสาเหตุโรคบางชนิดยังติดไปกับเมล็ดพันธุ์ ทำให้ไม่สามารถส่งออกไปขายยังต่างประเทศได้ ด้วยมาตรการด้านสุขอนามัยพืชของประเทศต่างๆ ที่ส่งกระทบต่อการส่งออกของสินค้าเกษตรของไทย

เชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* เป็นสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมแตง (Angular Leaf Spot) ซึ่งถือเป็นศัตรูพืชกักกัน ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. ๒๕๐๗ (ฉบับที่ ๖) พ.ศ. ๒๕๕๐ โรคนี้พบครั้งแรกในสหรัฐอเมริกาและทำให้ผลผลิตแตงลดลง 40 เปอร์เซ็นต์เป็นเงินกว่า 5 แสนเหรียญสหรัฐ เชื้อนี้สามารถเข้าทำลายพืชตระกลูแตงหลายชนิดทั้งแตงโม แคนตาลูป ฟักทอง แตงกวา เป็นต้น ต่อมาพบรายงานการระบาดไปในหลายประเทศทั่วโลกรวมทั้งจีน ญี่ปุ่นและอินเดีย โดยเชื้อนี้สามารถติดไปกับเมล็ดได้ และยังสามารถอยู่ในดินและซากพืชที่เป็นโรคได้เป็นเวลานาน (Nazir et al 2010)

ประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อ *P. syringae* pv. *lachrymans* ครั้งแรกในปี 2545 ในแตงที่ปลูกในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เพชรรัตน์ และพิศาล, 2545) ในงานทดลองนี้จึงมุ่งเน้นการสำรวจสถานภาพการพบเชื้อนี้ในพืชตระกูลแตง ในเขตพื้นที่ปลูกต่างๆ ของประเทศไทย เพื่อเป็นการศึกษาสถานภาพของแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *lachrymans* ในประเทศไทย เป็นการติดตามสถานการณ์ของโรคนี้ว่ามีในประเทศไทยจริงหรือไม่ เพื่อที่จะรายงานและตีพิมพ์ผลงานเพื่อเป็นการปลดโรคชนิดนี้ออกจากบัญชีรายชื่อโรคในประเทศไทย เพื่อเป็นข้อมูลในการเจรจาการค้าเพื่อประโยชน์ต่อการส่งออกและนำเข้าเมล็ดพันธุ์แตงในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย

2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) เครื่อง Thermocycler (Biometra ®)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการ

การสำรวจแบคทีเรีย *P. syringae pv. lachrymans* ในพื้นที่ปลูกข้าวโพด ดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลแบคทีเรีย *P. syringae pv. lachrymans* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด

ขั้นตอนและวิธีในการวิจัย ดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. จัดทำคู่มือการสำรวจ โดยการรวบรวมตัวอย่างอ้างอิงและรูปภาพของโรคของพืชตระกูลแตง ที่เกิดจากแบคทีเรีย *P. syringae pv. lachrymans* เพื่อใช้ในการตรวจสอบอ้างอิงขณะทำการสำรวจและจัดทำข้อมูลศัตรูพืช ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพืชอาศัย อาการของโรค รูปภาพสีของโรค และรายละเอียดของศัตรูพืชชนิดอื่นที่คล้ายคลึงกับศัตรูพืชเป้าหมาย
2. จัดทำฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจได้แก่ ชื่อที่อยู่ที่ตั้งของแปลง วัน และเวลา สภาพดินฟ้าอากาศ ตำแหน่งที่ตั้ง (พิกัด GPS) เป็นต้น
3. การสำรวจ กำหนดพื้นที่สำรวจโดยเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตงและแหล่งปลูกแตงที่สำคัญของประเทศ จำนวนอย่างน้อย 8 แหล่งปลูก ใน 8 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง นครราชสีมา ขอนแก่น ชัยภูมิ ปราจีนบุรี และสระแก้ว ดำเนินการสำรวจตาม ISPM No. 6 (Guidelines for surveillance) วางแผนการสำรวจอย่างน้อย 10 แปลง ต่อพื้นที่ แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบ โดยเดินตามเส้นทแยงมุม ทุกๆ 10 ก้าว ตรวจโรคจุดละ 10 ต้น จำนวน 10 จุดต่อแปลง หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แปลง
4. วางแผนการสำรวจในพื้นที่อย่างน้อย 20 ไร่ แบ่งพื้นที่ออกเป็น 4 ส่วนๆละประมาณ 5 ไร่ แต่ละส่วนทำการสุ่มสำรวจโดยวิธี completely randomized design (CRD) . จำนวน 10 จุดขนาดพื้นที่จุดละ 2x2 เมตร สุ่มตรวจ จุดละ 20 ตัวอย่าง ตรวจแบบตัวอักษร W ซ้าย ตามวิธีของ Delp et.al. (1986) ทำการสุ่มตรวจทุกเดือน
5. วิธีการตรวจแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *lachrymans* ในแปลง เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างห่อกระดาษและใส่ถุง นำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ

6. การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ การตรวจสอบโดยการนำตัวอย่างใบที่มีอาการใบจุดเหลี่ยมคล้ายกับรูปภาพนำมาแยกเชื้อ *P. syringae* pv. *lachrymans* บนอาหาร King medium B คัดเฉพาะโคโลนีที่สร้าง fluorescent pigment นำมาทดสอบยืนยันเชื้อ *P. syringae* pv. *lachrymans* ด้วย เทคนิค Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ร่วมกับเทคนิคทางชีวเคมีและสรีรวิทยา และ เทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ไพร์เมอร์จำเพาะต่อยีน syringomycin toxin *(syrB)* (Sorensen *et al.*, 1998) บันทึกลักษณะโคโลนีบนอาหาร King medium B และ ผลของ ELISA และ PCR

7. เก็บข้อมูลที่ได้ในรูป data sheet เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติ จัดทำรายงานผลการวิจัย

เวลาและสถานที่

ต.ค.56 – ก.ย.58 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจแหล่งปลูกพืชตระกูลแตง 5 แหล่งปลูก ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2556- กันยายน 2557 จำนวน 45 แปลง ได้แก่ เชียงราย จำนวน 5 แปลง เชียงใหม่ จำนวน 10 แปลง สระแก้ว จำนวน 10 แปลง ปราจีนบุรี จำนวน 5 แปลง ขอนแก่น จำนวน 15 แปลง ไม่พบอาการโรคใบจุดเหลี่ยมแตง เก็บตัวอย่างใบของพืชตระกูลแตงที่แสดงอาการจุดต่างๆ จำนวน 25 ตัวอย่างมาแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ ผลการแยกเชื้อพบว่าทุกตัวอย่างไม่ใช่แบคทีเรีย *P. syringae* pv. *lachrymans* ส่วนใหญ่เป็นเชื้อรา

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจแหล่งปลูกพืชตระกูลแตง 5 แหล่งปลูก ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2556- กันยายน 2557 จำนวน 45 แปลง ได้แก่ เชียงราย จำนวน 5 แปลง เชียงใหม่ จำนวน 10 แปลง สระแก้ว จำนวน 10 แปลง ปราจีนบุรี จำนวน 5 แปลง ขอนแก่น จำนวน 15 แปลง ไม่พบอาการโรคใบจุดเหลี่ยมแตง

เอกสารอ้างอิง

เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และพิศาล ศิริธร . 2545. การตรวจวินิจฉัยโรคใบจุดเหลี่ยมของแตงด้วยเทคนิค ELISA. หน้า 361-375. ใน การสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2545 วันที่ 28-29 มกราคม 2545 ณ ห้องประชุมกวี จุติกุล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Fogliano, V., M. Gallo, F. Vinale, A. Ritieni, G. Randazzo, M. Greco, R Lops and A. Graniti. 1999. Immunological detection of syringopeptins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Physiological and Molecular Plant Pathology 55(5): 255-261.

Hampton, R., E. Ball and S. De Boer. 1989. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: A laboratory manual. APS Press, St. Paul.

Masny A, and Pluciennicz ak A, 2003. Ligation mediated PCR performed at low denaturation temperatures – PCR melting profiles. Nucleic Acids Research 31, 114–9.

Mohamed, Z. K., El-Hindawy, H. H. and Fayed, O. S. 2000. Physiological and biochemical studies on phytopathogenic bacteria isolated from cucumber in Egypt. Egyptian Journal of Microbiology 35: 1-20.

Nazir A., Bhat, K. A., Bhat, M. Y., Zargar, M. A., Teli, Muslima Nazir, and Sajad M. Zargar. 2010. Current status of angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) of cucumber: a review. International Journal of Current Research V.8, 1-11.

Quigley, N. B., and Gross, D. C. 1994. Syringomycin production among strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: conservation of the syrB and syrD genes and activation of phytotoxin production by plant signal molecules. Molecular Plant-Microbe Interaction 7:78–90.

Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, Minnesota, USA

Sorensen KN, Kim K-H, Takemoto JY, 1998. PCR detection ofcyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. Applied and environmental microbiology 64, 226–30.

Watanabe, Y. and Ohuchi, A. 1983. Angular leaf spot of cucumber in Japan. Journal of Agricultural Research Quarterly 17: 112-119.

Wiles, A. B. and Walker, J. C. 1951. The relation of *Pseudomonas lachrymans* to cucumber fruits and seeds. Phytopathology 41: 1059-1064.

Yakrus, M. and N. Schaad. 1979. Serological relationships among strains of *Erwinia chrysanthemi*. Phytopathology 69: 225-552.

การสำรวจสถานภาพของแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae pv. syringae* ในพื้นที่ปลูกข้าวโพดในประเทศไทย

Pest status survey of *Pseudomonas syringae pv. syringae* in corn production in Thailand

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1/] ทิพวรรณ กันหาญาติ[1/] รุ่งนภา ทองเครั่ง[1/] ชลธิชา รักใคร่[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตข้าวโพดที่สำคัญของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปัจจุบันประเทศไทยประสบปัญหาการส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเนื่องจากประเทศปลายทางตรวจพบแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae pv. syringae* ศัตรูกักกันพืชของประเทศปลายทาง จากการสืบค้นข้อมูลบัญชีรายชื่อโรคพืชที่พบในประเทศไทย ไม่พบรายงานการพบแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae* ในข้าวโพดในประเทศไทย แต่เมื่อสืบค้นข้อมูลต่างประเทศ พบว่ามีรายงานพบแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae* ในประเทศไทย โดยพบในพืชหลายชนิดได้แก่ มะเขือเทศ พริก พริกไทย ส้มโอ หอมกระเทียม เป็นต้น จากข้อมูลที่สืบค้นดังกล่าวที่ไม่สอดคล้องกัน จึงมีความจำเป็นต้องทำการสำรวจ ติดตามและเฝ้าระวังแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae* อย่างเป็นระบบในพื้นที่ปลูกข้าวโพด เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และเป็นข้อมูลในการเจรจาการค้าเพื่อประโยชน์ต่อการส่งออกและนำเข้าข้าวโพดในอนาคต จากการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพด 5 แหล่งปลูก ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2556- กันยายน 2557 จำนวน 50 แปลง ได้แก่ เชียงราย จำนวน 5 แปลง เชียงใหม่ จำนวน 10 แปลง ตาก จำนวน 10 แปลง นครสวรรค์ จำนวน 15 แปลง นครราชสีมา จำนวน 10 แปลง ไม่พบแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae*

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-06-00-17-57

คำนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตข้าวโพดที่สำคัญของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีพื้นทีปลูกประมาณ 7ล้านไร่ ในปี 2547 มีปริมาณการส่งออกข้าวโพด 871,791 ตันต่อปี มูลค่าการส่งออกประมาณ 4,651 ล้านบาท(ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร) ปัจจุบันประเทศไทยประสบปัญหาการส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเนื่องจากประเทศปลายทางตรวจพบ แบคทีเรีย *Pseudomonas syringae pv. syringae* ศัตรูกักกันพืชของประเทศปลายทาง แต่จากการสืบค้นข้อมูลบัญชีรายชื่อโรคพืชที่พบในประเทศไทย พบว่า ไม่พบรายงานการพบแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae* ในข้าวโพดในประเทศไทย แต่มีรายงานของ พัฒนา *et al.* (2537) พบแบคทีเรีย *P. syringae* ในพริกไทย เมื่อสืบค้นข้อมูลต่างประเทศ พบว่า CABI (2007) ได้รายงานว่าในประเทศไทยพบแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae* ในพืชหลายชนิดได้แก่ มะเขือเทศ พริก พริกไทย ส้มโอ หอม กระเทียม เป็นต้น จากข้อมูลที่สืบค้นดังกล่าวที่ไม่สอดคล้องกันทำให้ไม่ทราบสถานการณ์ในปัจจุบันของแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae* ในข้าวโพด ดังนั้น จึงมีความจำเป็นต้องทำการสำรวจในพื้นที่ปลูกข้าวโพด เพื่อติดตามสถานการณ์ของโรคนี้ว่ามีในประเทศไทยหรือไม่ ซึ่งเป็นการศึกษาสถานภาพของแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae*ในพื้นที่ข้าวโพด เพื่อที่จะรายงานและตีพิมพ์ผลงานเพื่อเป็นการปลดโรคชนิดนี้ออกจากบัญชีรายชื่อโรคในประเทศไทย เพื่อเป็นข้อมูลในการเจรจาการค้าเพื่อประโยชน์ต่อการส่งออกและนำเข้าข้าวโพดในอนาคต

โรคใบจุดโฮลคัส (holcus spot) ในข้าวโพด เกิดจากเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* มีลักษณะอาการของโรค เริ่มจากแผลจุดสีเขียวเข้ม ฉ่ำน้ำ และพัฒนาเป็นจุดทรงกลม หรือ รี สีน้ำตาลอ่อน ถึงเกือบขาว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 2-10 มิลิลิเมตร ต่อมาแผลพัฒนาเป็นจุดตายขอบสีแดงถึงน้ำตาล และอาจมีวงสีเหลืองล้อมรอบ และเชื่อมต่อกันจนลักษณะใบขีดเนื้อเยื่อตาย จนในที่สุดแผลจะแห้ง เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เนื้อใบแห้งคล้ายกระดาษ แผลมักเกิดบริเวณปลายใบของใบล่าง อย่างไรก็ตามลักษณะอาการมักสับสนกับอาหารใบที่โดนทำลายด้วยสารเคมีกำจัดวัชพืช และบางครั้งมีความสับสนกับอาการใบจุดรูปตา (Eyespot) ที่เกิดจากเชื้อรา *Aureobasidium zeae* ซึ่งมีจุดสังเกตที่ขอบแผลจะมีสีน้ำตาลเข้มและมีวงสีเหลืองล้อมรอบแผล อาการของโรค holcus spot เกิดได้ดีในสภาพอุณหภูมิระหว่าง 23-30 องศาเซลเซียส ภายหลังจากมีสภาพฝนและลมแรง อาการของโรคมักปรากฏภายหลังช่วงที่มีฝนตกหนัก แต่จะไม่ลุกลามหรือถ่ายทอดไปยังใบใหม่ โดยเชื้อโรคสามารถแพร่กระจายผ่านทางดินที่กระเด็น หรือลม เชื้อโรคสามารถอยู่อาศัยข้ามฤดูในเศษซากพืช และเข้าทำลายพืชใหม่ผ่านทางช่องเปิดทางธรรมชาติ เช่น ปากใบ หรือบาดแผล ความเสียหายที่เกิดจากโรคนี้ ในกรณีที่ใบเป็นแผลและเชื่อมต่อกันทำให้ใบแห้งตายได้ และเชื้อราสามารถเจริญได้หลังจากแผลแห้ง แต่ไม่มีรายงานความสำคัญของโรคนี้ต่อความเสียหายทางเศรษฐกิจของผลผลิต และอาการของโรคนี้อาจทำให้เกิดความสับสนกับอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อรา ทำให้การจัดการโรคผิดวิธี (Robertson, 2004)

เชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* เป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยกว้างมากกว่า 180 สปีชีส์ (Bradbury, 1986) มีคุณสมบัติเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเซลล์เป็นท่อน มีหางหลายหางที่ส่วนปลายด้านหนึ่งของเซลล์ (multi polar flagella) ทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้ การเจริญบนอาหาร NA ให้โคโลยีกลม, นูนต่ำ, สีขาว ขนาดโคโลนีประมาณ 2-3 มิลิลิเมตร, ผลการทดสอบปฏิกริยา LOPAT (levan production, oxidase reaction, potato soft rot, arginine dihydrolase และ tobacco hypersensitivity) ให้ผลเป็น +---+ เจริญในสภาพที่มีอากาศเท่านั้น (aerobic bacteria) สามารถสร้างสารเรืองแสง pyoverdin บนอาหาร King's B, ผลการทดสอบเป็นปฏิกิริยาบวก เมื่อทดสอบ Catalase, การย่อย Tween 80, Aescolin, Urease, เจริญในอาหารที่มี 3% NaCl, สามารถเจริญที่ 4^{O}C แต่ไม่เจริญที่ 41^{O}C, การใช้ L-lysine, citrateสร้างกรดจากการใช้น้ำตาล Glucose, sucrose, glycerin, sorbitol, inositol, galactose ให้ผลการทดสอบเป็นลบเมื่อทดสอบ Oxidative/Fermentative, การสร้าง Acetoin, Indole, H_2S, การย่อย starch, gelatin, lecithine, การเจริญบนอาหารที่มี 5% NaCl, การสร้างเม็ดสีชมพูบนอาหาร YDC, การใช้ lecithinase, การรีดิวส์ไนเตรท (nitrate reduction), ไม่สร้างกรดจาการใช้น้ำตาล raffinose, maltose, lactose, arabinose, trehalose, mellibiose, rhamnose, salicin, cellobiose ไม่สามารถใช้ adonitol, benzoate, propionate, tartrate และ ethanol (Karimi-Kurdistani and Harighi, 2008, Brenner, et.al., 2005, Sands et.al., 1970, Ashorpour, et al., 2008) การสร้าง syringomycin และหรือ syringopeptin แต่จากการตรวจสอบพบ *P. syringae* pv. *syringae* เพียง 11 สายพันธุ์จากเชื้อทดสอบ 16 สายพันธุ์ที่สามารถสร้าง syringomycin (Kaluzna et al, 2010) และการแผลจุดตายอย่างเฉียบพลัน (hypersensitive response) บนพืชที่ไม่ใช่พืชอาศัย (Ashorpour, et al., 2008)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) เครื่อง Thermocycler (Biometra ®)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการ

การสำรวจแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae* ในพื้นที่ปลูกข้าวโพด ดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด

ขั้นตอนและวิธีในการวิจัย ดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. คู่มือการสำรวจ โดยการรวบรวมตัวอย่างอ้างอิงและรูปภาพของโรคของข้าวโพด ที่เกิดจากแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae* เพื่อใช้ในการตรวจสอบอ้างอิงขณะทำการสำรวจและจัดทำข้อมูลศัตรูพืช ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพืชอาศัย อาการของโรค รูปภาพสีของโรค และรายละเอียดของศัตรูพืชชนิดอื่นที่คล้ายคลึงกับศัตรูพืชเป้าหมาย

2. จัดทำฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจได้แก่ ชื่อที่อยู่ที่ตั้งของแปลง วัน และเวลา สภาพดินฟ้าอากาศ ตำแหน่งที่ตั้ง (พิกัด GPS) เป็นต้น

3. การสำรวจ กำหนดพื้นที่สำรวจโดยเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่สำคัญของประเทศ จำนวน 12 แหล่งปลูก ใน 8 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน แพร่ ตาก นครราชสีมา สระบุรี และลพบุรี ดำเนินการสำรวจตาม ISPM No. 6 (Guidelines for surveillance) วางแผนการสำรวจอย่างน้อย 10 แปลง ต่อพื้นที่ แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบ โดยเดินตามเส้นทแยงมุม ทุกๆ 10 ก้าว ตรวจโรคจุดละ 10 ต้น จำนวน 10 จุดต่อแปลง หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แปลง

4. วิธีการตรวจแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *syringae* ในแปลง เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างห่อกระดาษและใส่ถุง นำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ

5. การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ การตรวจสอบโดยการนำตัวอย่างที่เก็บมาหรือสุ่มใบข้าวโพดที่แสดงอาการคล้ายกับรูปภาพนำมาแยกเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* บนอาหาร King medium B คัดเฉพาะโคโลนีที่สร้าง fluorescent pigment นำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ Arginine dihydrolase test ถ้าเป็นเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae* จะสร้าง fluorescent pigment และไม่สามารถใช้สาร Arginine ได้ ยืนยันโดยใช้ specific primer โดยใช้วิธี Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งจากการตรวจยังไม่พบเชื้อ *P. syringae* pv. *syringae*

6. เก็บข้อมูลที่ได้ในรูป data sheet เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติ จัดทำรายงานผลการวิจัย

เวลาและสถานที่

ต.ค.56 – ก.ย.58 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพด 5 แหล่งปลูก ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2556- กันยายน 2557 จำนวน 50 แปลง ได้แก่ เชียงราย จำนวน 5 แปลง เชียงใหม่ จำนวน 10 แปลง ตาก จำนวน 10 แปลง นครสวรรค์ จำนวน 15 แปลง นครราชสีมา จำนวน 10 แปลง ไม่พบใบข้าวโพดแสดงลักษณะอาการของโรคใบจุดโฮลคัส (holcus spot) ในแปลงปลูกข้าวโพดทั้ง 50 แปลง จึงยังไม่พบแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae*

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพด 5 แหล่งปลูก ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2556- กันยายน 2557 จำนวน 50 แปลง ได้แก่ เชียงราย จำนวน 5 แปลง เชียงใหม่ จำนวน 10 แปลง ตาก จำนวน 10 แปลง นครสวรรค์ จำนวน 15 แปลง นครราชสีมา จำนวน 10 แปลง ไม่พบโรคใบจุดโฮลคัส (holcus spot) ในแปลงปลูกข้าวโพดทั้ง 50 แปลง จึงยังไม่พบแบคทีเรีย *P. syringae pv. syringae*

เอกสารอ้างอิง

กรมอุตุนิยมวิทยา. 2554. สภาวะอากาศของประเทศไทย ในปีพ.ศ. 2554. ที่มา: http://www.tmd.go.th/programs/uploads/yearlySummary/สภาวะอากาศ2554_up.pdf.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1994). Current Protocols in Molecular Biology. New York City, NY: John Wiley & Sons Inc.

Allen, T. 2012. Corn Holcus Leaf Spot Occurring in the Central Delta. Mississippi crop situation report April,12 2012.

Ashorpour, M., Kazempour, M.N. and Ramezanie, M. 2008. Occurrence of Pseudomonas syringae pv. syringae the causal agent of bacterial canker on olives (Olea europaea) in Iran. SciencAsia 34: 323-326.

Bradbury, J.F. 1986. Pseudomonas syringae pv. syringae, p. 175-177. In Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB International Mycological Institute, Kew, England.

Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., 2005. Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. Springer, New York, NY, USA.

Kaluzna, M., Ferrante, P., Sobiczewski, P. and Scortichini, M. 2010. Characterization and genetic diversity of Pseudomonas syringae from stone fruits and hazelnut using repetitive-PCR and MLST. Journal of Plant Pathology 92: 781-787.

Karimi-Kurdistani, G. and Harighi, B. 2008. Phenotypic and molecular properties of Pseudomonas syringae pv. syringae the causal agent of bacterial canker of stone fruit trees in Kurdistan province. Journal of plant pathology 90: 81-86.

Kendrick, J.B. 1926. Holcus bacterial spot on species of Holcus and Zea mays. Phytopathology 16:236-237.

Lenz, O., Beran, P., Fousek, J. and Mraz, I. 2010. A microarray for screening the variability of 16-23s rRNA internal transcribed spacer in Pseudomonas syringae. Journal of microbiological methods 82: 90-94.

Little, E.L., Bostock, R.M. andKirkpatrick, B.C. 1998. Genetic characterization of Pseudomonas syringae pv. syringae strains from stone fruits in California. Applied and environmental microbiology 64: 3818-3823.

Quigley, N. B., and Gross, D. C. 1994. Syringomycin production among strains of Pseudomonas syringae pv. syringae: conservation of the syrB and syrD genes and activation of phytotoxin production by plant signal molecules. Molecular Plant-Microbe Interaction 7:78–90.

Robertson, A. 2004. Holcus leaf spot being found on corn. Intergrated crop management news 492(14) : 81

Sands D.C., Schroth M.N., Hildebrand D.C., 1970. Taxonomy of phytopathogenic Pseudomonads. Journal of bacteriology 101: 9-23.

Sorensen, K.N., Kim, K. and Takemoto, J.M. 1998. PCR detectin of cyclic lipodepsinonapeptide producing Pseudomonas syringae pv. syringae and similarity of strains. Applied and environmental microbiology 64: 226-230.

Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, Minnesota, USA

การแพร่กระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของหนูนาใหญ่, *Rattus argentiventer* (Robinson and Kloss, 1916) ในประเทศไทย

Distribution and Biodiversity of Rice-field Rat, *Rattus argentiventer* (Robinson and Kloss, 1916) in Thailand.

สมเกียรติ กล้าแข็ง เกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์

วิชาญ วรรธนะไกวัล ปราสาททอง พรหมเกิด ทรงทัพ แก้วตา

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาการแพร่กระจายและความหลากหลายทางชีวภาพของหนูนาใหญ่ Rice-field Rat, *Rattus argentiventer* (Robinson and Kloss, 1916) ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยการใช้กรงดักจับเป็นและบ่วงลวดดักหนู จากการศึกษา พบว่า หนูนาใหญ่ตัวเต็มวัยจะมีขนลำตัวด้านบนสีน้ำตาลเหลืองปนดำ มีขนแข็งมีสีขาวขึ้นแทรกอยู่กลางหลังลำตัว ขนบริเวณท้องเป็นสีขาวเงิน บางตัวมีแถบสีดำจนถึงน้ำตาลอ่อนกลางอก ตีนหลังมีแถบดำพาด ตัวเมียจะมีนม 3 คู่ ที่บริเวณส่วนอก และ 3 คู่ ที่บริเวณส่วนท้อง ลูกหนูจะมีขนสีส้มบริเวณโคนหูทั้งสองข้าง จะขุดรูอาศัยอยู่ตามคันนาที่ใหญ่ที่มีวัชพืชปกคลุม หนูนาใหญ่เพศผู้จะมีขนาดและน้ำหนักมากกว่าเพศเมีย และมีน้ำหนัก (Wt.) เฉลี่ย 217.05±31.87 กรัม ความยาวหัวลำตัว (HB) เฉลี่ย 201.87±14.52 มิลลิเมตร ความยาวหาง (T) เฉลี่ย 178.73±12.66 มิลลิเมตร ความยาวตีนหลัง (HF) เฉลี่ย 35.15±1.91 มิลลิเมตร ความยาวหู (E) เฉลี่ย 23.47±1.55 มิลลิเมตร และศึกษาลักษณะสัณฐานของกะโหลกและกระดูกรยางค์ ทั้ง 24 ลักษณะ มีค่าเฉลี่ย ดังนี้ BR 8.11, LR 13.40, ONL 41.96, IB 5.71, BBC 16.62, ZB 19.48, BIF 2.71, BM1 2.04, LD 11.70, LIF 7.98, LBP 8.37, PPL 14.78, LB 7.54, BMF 3.31, BBP 3.88, CLM1-3 7.32, HBC 12.38, BZP 4.90, LM 22.51, HM 13.01, LLM 6.72, HL 25.58, FL 34.12, TL 36.43 มิลลิเมตร ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้ยังไม่เสร็จสิ้น ยังต้องศึกษาและเก็บตัวอย่างและนำมาวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบกับหนูนาใหญ่ในแต่ละภูมิภาค ต่อไป

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-23-55

คำนำ

หนูนาใหญ่ Ricefield Rat; *Rattus argentiventer* (Robinson and Kloss, 1916) จัดเป็นหนูศัตรูพืชที่สำคัญในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ข้าว อ้อย ข้าวโพด เป็นต้น และมีเขตการแพร่กระจายตั้งแต่ เวียดนาม กัมพูชา ไทย ลาว มาเลเซีย หมู่เกาะสุมาตรา กาลิมันตัน สุลาเวสี อินโดนีเซีย ชวา ฟิลิปปินส์ ตลอดจนถึงนิวกินี (Suyanto *et al.*, 1998) ในประเทศไทยมีรายงานว่าหนูนาใหญ่ พบเฉพาะในแหล่งปลูกพืชในภาคกลางและภาคใต้ และส่วนใหญ่พบในนาข้าว ได้แก่ สุพรรณบุรี นครปฐม ลพบุรี สิงห์บุรี อ่างทอง อยุธยา ปทุมธานี ชุมพร นครศรีธรรมราช ปัตตานี ฯลฯ (Lekagul and McNeely, 1977) แต่จากรายงานข่าวหนูที่เข้าทำลายข้าวและธัญพืชอื่นๆ ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2552 เป็นต้นมา โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในพื้นที่ที่มีการทำนาปรัง ในจังหวัดแถบลุ่มน้ำชี เช่น จังหวัดร้อยเอ็ด มหาสารคาม กาฬสินธุ์ (วัชรินทร์, 2553) พบว่า ส่วนใหญ่เป็นหนูนาใหญ่ แต่ลักษณะภายนอกและขนาดของตัวหนูนั้น มีความแตกต่างกัน จึงอาจเป็นไปได้ว่า ในแต่ละสภาพแวดล้อมและภูมิประเทศที่แตกต่างกันนั้น อาจทำให้ลักษณะภายนอกของหนูนาใหญ่เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ โดยหนูนาใหญ่เป็นหนูขนาดกลาง มีความยาวหาง สั้นกว่าความยาวหัวรวมกับลำตัว สีขนลำตัวด้านบนมีน้ำตาลเหลืองปนดำ มีขนแข็งสีขาวแทรก ด้านท้องสีขาวเงินและบางตัวมีสีเทาจนถึงสีน้ำตาลเป็นแถบเล็ก ๆ สั้น ๆ จากใต้คอลงมาจนถึงท้อง การขยายพันธุ์ค่อนข้างรวดเร็วและมีจำนวนลูกต่อครอกมากกว่าหนูนาชนิดอื่นๆ ประมาณ 8-13 ตัว/ครอก (เสริมศักดิ์, 2543) และประเทศไทย จัดได้ว่าเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง และเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีการปลูกพืชหลายชนิด เพื่อบริโภคภายในประเทศและเพื่อส่งออกทำรายได้ให้แก่ประเทศ เช่น ข้าว พืชไร่ ไม้ผล เป็นต้น เนื่องจากมีลักษณะทางภูมิประเทศและภูมิอากาศที่หลากหลาย การศึกษาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตหลาย ๆ ชนิด โดยเฉพาะหนูนาใหญ่ ยังมีน้อย พบว่าข้อมูลทั้งด้านชนิดย่อย อนุกรมวิธาน ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของหนูนาใหญ่ รวมถึงการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพทางด้านอนุกรมวิธาน ขอบเขตการแพร่กระจายยังมีไม่เพียงพอเช่นกัน ทั้งที่หนูชนิดนี้อาศัยอยู่ร่วมกับมนุษย์มายาวนาน และยังทำลายพืชผลเกษตรกรรมทุกครั้ง ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษา เพื่อให้รู้ถึงข้อมูลพื้นฐานด้านนิเวศวิทยา เช่น การแพร่กระจาย พฤติกรรมการดำรงชีวิต ตลอดจนความหลากหลายทางชีวภาพทางด้านอนุกรมวิธานของหนูนาใหญ่ เพื่อประโยชน์ในการเป็นแหล่งสืบค้นข้อมูลด้านนิเวศวิทยา และอนุกรมวิธาน ตลอดจนการป้องกันกำจัดอย่างถูกต้องและเหมาะสม ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

กรงดักหนูชนิดจับเป็น บ่วงลวดดักหนู กรงเลี้ยงหนูสเตนเลส ถังหรือขวดดองตัวอย่างหนู ขวดพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างกะโหลกหนู ถุงพลาสติกขนาดต่าง ๆ เครื่องชั่งน้ำหนัก เครื่องมือผ่าตัด เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์ ไม้บรรทัด ไฟฉายและแบตเตอรี่ ถุงผ้าดิบสำหรับจับหนู หม้อสเตนเลสสำหรับต้มกะโหลกหนู สารเคมี เช่น ไดเอธิลอีเทอร์ โซเดียมไฮดร็อกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแอลกอฮอล์ 70 % เครื่องวัดพิกัดตำแหน่งภูมิประเทศ (GPS) และแผนที่จังหวัดที่ทำการสำรวจ อาหารเลี้ยงหนู เช่น อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ด แตงกวา มันแกว และเหยื่อดักหนู เช่น ปลาช่อนสด ขี้ไต้ ข้าวโพดหวานสด เป็นต้น

วิธีการ

สำรวจและดักจับหนูนาใหญ่ ด้วยกรงดักชนิดจับเป็น (Life trap) และบ่วงลวดดักหนู จากแปลงนาข้าวเกษตรกรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ที่สำรวจเก็บตัวอย่างหนูนาใหญ่ ในจังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น ร้อยเอ็ด มหาสารคาม ศรีสะเกษ กาฬสินธุ์ บุรีรัมย์ หนองบัวลำภู อุบลราชธานี เป็นต้น คัดเลือกหนูนาใหญ่ที่โตเต็มวัยแล้ว ไม่น้อยกว่า 50 ตัว นำตัวอย่างหนูนาใหญ่ตัวเต็มวัย มาทำให้สลบและตายด้วยไดเอธิลอีเทอร์ บันทึกลักษณะของสีขน นำมาชั่งน้ำหนัก วัดขนาด ความยาวหัวลำตัว (Head Body Length : HB) โดยวัดตั้งแต่ปลายสุดของหัว คือ ตั้งแต่ปลายจมูกถึงช่องอวัยวะขับถ่าย ความยาวหาง (Tail Length : T) วัดตั้งแต่ช่องเปิดของอวัยวะขับถ่ายจนถึงปลายสุดของหาง ความยาวตีนหลัง (Hind Foot Length : HF) วัดตั้งแต่ปลายสุดของตีนหลังจนถึงเนื้อปลายของนิ้วที่ยาวที่สุดไม่รวมเล็บ ความยาวหู (Ear Length : E) วัดตั้งแต่ขอบหูล่างถึงปลายสุดของหู หน่วยการวัดเป็นมิลลิเมตร

การเก็บชิ้นส่วนกะโหลกและกระดูกรยางค์หนูนาใหญ่ โดยการนำส่วนลำตัวมาตัดเอากระดูกรยางค์ คือ กระดูกท่อนบนของขาหน้า (Humerus) กระดูกขาหลังท่อนบน (Femur) และท่อนล่าง (Tibia) ตัดส่วนของกะโหลกมาชำแหละเอาเนื้อออก แล้วนำไปต้มน้ำกับโซเดียมไฮดร็อกไซด์ จนได้ชิ้นส่วนของกระดูกที่ขาวสะอาด นำไปอบจนแห้ง แล้วนำไปศึกษาลักษณะสัณฐานของกะโหลกและกระดูกรยางค์ โดยวัดทั้งความยาวและความกว้างของกะโหลกและกระดูกรยางค์ รวมทั้งสิ้น 24 ลักษณะ ด้วยเวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์ โดยมีหน่วยวัดเป็นมิลลิเมตร (millimeter) ตามวิธีการของ Musser *et. al.* (2006) และ Lin and Shiraishi (1992) ดังนี้

วัดขนาดกระดูกรยางค์ (Appendage bone)

1. ความยาวกระดูกขาหน้าท่อนบน (Humerus length ; HL.)
2. ความยาวกระดูกขาหลังท่อนบน (Femur length ; FL.)

3. ความยาวกระดูกขาหลังท่อนล่าง (Tibia length ; TL.)

ศึกษาลักษณะสัณฐานของกะโหลก (Skull bone) 21 ลักษณะ

1. Breadth of Rostrum (BR) 2. Length of Rostrum (LR)
3. Occipitonasal Length (ONL) 4. Interorbital Breadth (IB)
5. Breadth of Brain Case (BBC) 6. Zygomatic Breadth (ZB)
7. Breadth of Incisive Foramina (BIF)
8. Breadth of First Upper Molar (BM1) 9. Length of Diastema (LD)
10. Length of Incisive Foramina (LIF). 11. Length of Bony Palate (LBP).
12. Postpalatal Length (PPL) 13. Length of Auditory Bulla (LB)
14. Breadth of Mesopterygoid Fossa (BMF)
15. Breadth of Bony Palate at First Molars (BBP)
16. Crown Length of Maxillary Molar Row (CLM1-3)
17. Height of Brain Case (HBC) 18. Breadth of Zygomatic (BZP)
19. Length of Mandible (LM). 20. Height of Mandible (HM)
21. Length of Lower Molar Series (LLM)

เวลาและสถานที่ เริ่ม ตุลาคม 2556 ถึง กันยายน 2557

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงนาเกษตรกร ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สำรวจและเก็บตัวอย่างหนูนาใหญ่ พื้นที่ทำนาของเกษตรกรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในจังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น ร้อยเอ็ด มหาสารคาม ศรีสะเกษ กาฬสินธุ์ หนองบัวลำภูบุรีรัมย์ อุบลราชธานี เป็นต้น (ภาพที่ 1) ทำการบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ ลักษณะภายนอกของหนูที่โตเต็มวัย และศึกษาลักษณะสัณฐานของกะโหลกและกระดูกรยางค์ต่อไป

จากการศึกษา พบว่า หนูนาใหญ่ ตัวเต็มวัยจะมีขนลำตัวด้านบนสีน้ำตาลเหลืองปนดำ เมื่อใช้มือลูบขนย้อนขึ้นบริเวณกลางหลังตัวหนูจะรู้สึกเจ็บมือ เนื่องจากมีขนแข็งมีสีขาวขึ้นแทรกอยู่ ขนบริเวณท้องเป็นสีขาวเงิน บางตัวมีแถบสีดำจนถึงน้ำตาลอ่อนกลางอก ตีนหลังมีแถบดำพาด โดยมีความยาวของหัวและลำตัว (HB) จะยาวกว่าความยาวของหาง (T) ตัวเมียจะมีนม 3 คู่ ที่บริเวณส่วนอก และ 3 คู่ ที่บริเวณส่วนท้อง ลูกหนูจะมีขนสีส้มบริเวณโคนหูทั้งสองข้าง ซึ่งสอดคล้องกับ เสริมศักดิ์ (2543) ที่กล่าวว่า ลักษณะสีขนของหนูนาใหญ่ ลำตัวด้านบนสีน้ำตาลเหลืองปนดำ มีขนแข็งสีขาวแทรก ด้านท้องสีขาวเงินและบางตัวมีสีเทาจนถึงสีน้ำตาลเป็นแถบเล็ก ๆ สั้น ๆ จากใต้คอลงมาจนถึง

ท้อง จากการเก็บตัวอย่าง พบว่า หนูนาใหญ่มีน้ำหนัก (Wt.) เฉลี่ย 217.05±31.87 กรัม ความยาวหัวลำตัว (HB) เฉลี่ย 201.87±14.52 มิลลิเมตร ความยาวหาง (T) เฉลี่ย 178.73±12.66 มิลลิเมตร ความยาวตีนหลัง (HF) เฉลี่ย 35.15±1.91 มิลลิเมตร ความยาวหู (E) เฉลี่ย 23.47±1.55 มิลลิเมตร

หนูนาใหญ่เพศผู้ น้ำหนัก (Wt.) เฉลี่ย 229.39±25.45 กรัม ความยาวหัวลำตัว (HB) เฉลี่ย 207.55±12.46 มิลลิเมตร ความยาวหาง (T) เฉลี่ย 181.27±13.53 มิลลิเมตร ความยาวตีนหลัง (HF) เฉลี่ย 35.82±1.72 มิลลิเมตร ความยาวหู (E) เฉลี่ย 23.91±1.58 มิลลิเมตร

หนูนาใหญ่เพศเมีย น้ำหนัก (Wt.) เฉลี่ย 183.10±22.05 กรัม ความยาวหัวลำตัว (HB) เฉลี่ย 186.25±4.79 มิลลิเมตร ความยาวหาง (T) เฉลี่ย 171.75±6.99 มิลลิเมตร ความยาวตีนหลัง (HF) เฉลี่ย 33.31±1.02 มิลลิเมตร ความยาวหู (E) เฉลี่ย 22.25±0.50 มิลลิเมตร

การศึกษาครั้งนี้ยังสอดคล้องกับ Lekagul and McNeely (1977) ที่รายงานว่า หนูนาใหญ่มีน้ำหนัก (Wt.) เฉลี่ย 212 กรัม มีขนาดความยาวหัวลำตัว (HB) เฉลี่ย 204 มิลลิเมตร ความยาวหาง (T) เฉลี่ย 187 มิลลิเมตร ความยาวตีนหลัง (HF) เฉลี่ย 39 มิลลิเมตร ความยาวหู (E) เฉลี่ย 22 มิลลิเมตร และศึกษาลักษณะสัณฐานของกะโหลกและกระดูกรยางค์ ได้ผลดังตาราง ที่ 1, 2 และตาราง ที่ 3

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

-

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นายชาติศักดิ์ สังขวัฒน์และนายโยฆินทร์ โพธิ์ศรี ที่ช่วยเลี้ยงดูแลหนูนาใหญ่ในห้องปฏิบัติการ และคุณบรรจง บุญครอบ ช่างซ่อมบำรุงระดับ ช4 ที่ช่วยขับรถและเก็บตัวอย่าง รวมทั้งพนักงานและเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ของกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

วัชรินทร์ เขจรวงศ์. 2553. การป้องกันกำจัดหนูในนาข้าวได้ผลเกือบร้อยเปอร์เซ็นต์โดยวิธีล้อมหนูตกถังที่ร้อยเอ็ด. [ออนไลน์]. แหล่งข้อมูล :http://76.nationchannel.com/playvideo.php?id=82404 (1 มีนาคม 2553)

เสริมศักดิ์ หงส์นาค. 2543. ประวัติการป้องกันกำจัดหนูในประเทศไทย. หน้า 1-35. *ใน* เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาเรื่องหนูศัตรูพืชและมนุษย์ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

Lekagul, B. and J. A. McNeely. 1977. Mammal of Thailand. Printed at Kurusapha Ladprao Press by Nai kamthon Sathirakul, Bangkok. 758 p.

Lin, L. and S. Shiraishi. 1992. Skull Growth and Variation in the Formosan Wood Mouse, *Apodemus semotus* . J. fac. Agr., Kyushu Univ., 37(I), 51-69 p.

Musser, G. G., D. P. Lunde and N. T. Son. 2006. Description of a New Genus and Species of Rodent (Murinae, Muridae, Rodentia) from the Tower Karst Region of Northeastern Vietnam. American Museum Novitates. 1-41.

Suyanto, A., M. Yoneda, I. Maryanto, Maharadatunkamsi. and J. Sugarjito. (1998). Chechlist of the Mammals of Indonesia. Scitific name and Distribution area table in Indonesia including CITES, IUCN and Indonesia category for conservation. LIPI-JICA 34 p.

ภาคผนวก

Table 1 : Measurements of cranial (In Millimeters) in Ricefield Rat; *Rattus argentiventer* in Northeast Region of Thailand

Characters	Max.	Min.	Mean	SD.
Breadth of Rostrum (BR)	9.30	6.71	8.11	0.80
Length of Rostrum (LR)	15.27	10.33	13.40	1.36
Occipitonasal Length (ONL)	46.24	36.73	41.96	2.64
Interorbital Breadth (IB)	8.34	5.32	5.71	0.61
Breadth of Brain Case (BBC)	17.77	15.55	16.62	0.54
Zygomatic Breadth (ZB)	21.40	16.92	19.48	1.35
Breadth of Incisive Foramina (BIF)	3.52	2.15	2.71	0.41
Breadth of First Upper Molar (BM1)	2.18	1.82	2.04	0.10
Length of Diastema (LD)	13.41	9.68	11.70	1.06
Length of Incisive Foramina (LIF)	8.78	6.74	7.98	0.56
Length of Bony Palate (LBP)	9.56	7.35	8.37	0.57
Postpalatal Length (PPL)	16.67	12.28	14.78	1.19
Length of Auditory Bulla (LB)	8.62	6.55	7.54	0.57
Breadth of Mesopterygoid Fossa (BMF)	3.89	2.72	3.31	0.26
Breadth of Bony Palate at First Molars (BBP)	4.51	3.14	3.88	0.38
Crown Length of Maxillary Molar Row (CLM1-3)	7.63	7.06	7.32	0.14
Hight of Brain Case (HBC)	13.38	11.67	12.38	0.47
Breadth of Zygomatic (BZP)	5.52	3.96	4.90	0.46
Length of Mandible (LM)	24.35	19.79	22.51	1.41
Hight of Mandible (HM)	14.64	10.81	13.01	0.96
Length of Lower Molar Series (LLM)	7.05	6.30	6.72	0.19
Humerous Length (HL)	27.97	22.84	25.58	1.68
Femur Length (FL)	37.02	30.56	34.12	1.99
Tibia Length (TL)	39.60	33.62	36.43	1.79

Table 2 : Measurements of cranial (In Millimeters) in Ricefield Rat; *Rattus argentiventer* (♂) in Northeast Region of Thailand

Characters	Max.	Min.	Mean	SD.
Breadth of Rostrum (BR)	9.30	6.71	8.23	0.82
Length of Rostrum (LR)	15.27	11.71	13.70	1.30
Occipitonasal Length (ONL)	46.24	37.52	42.42	2.61
Interorbital Breadth (IB)	8.34	5.38	5.78	0.71
Breadth of Brain Case (BBC)	17.44	15.75	16.67	0.45
Zygomatic Breadth (ZB)	21.40	17.08	19.64	1.31
Breadth of Incisive Foramina (BIF)	3.52	2.15	2.73	0.41
Breadth of First Upper Molar (BM1)	2.18	1.89	2.04	0.09
Length of Diastema (LD)	13.41	9.95	11.85	1.08
Length of Incisive Foramina (LIF)	8.78	6.88	8.01	0.57
Length of Bony Palate (LBP)	9.56	7.83	8.54	0.46
Postpalatal Length (PPL)	16.51	13.15	14.92	1.09
Length of Auditory Bulla (LB)	8.62	6.74	7.65	0.58
Breadth of Mesopterygoid Fossa (BMF)	3.89	2.88	3.33	0.27
Breadth of Bony Palate at First Molars (BBP)	4.51	3.33	3.95	0.37
Crown Length of Maxillary Molar Row (CLM1-3)	7.55	7.15	7.31	0.09
Hight of Brain Case (HBC)	13.38	11.67	12.36	0.52
Breadth of Zygomatic (BZP)	5.52	3.96	4.93	0.49
Length of Mandible (LM)	24.35	20.13	22.67	1.40
Hight of Mandible (HM)	14.64	11.71	13.07	0.88
Length of Lower Molar Series (LLM)	7.05	6.30	6.71	0.21
Humerous Length (HL)	27.97	23.42	26.15	1.27
Femur Length (FL)	37.02	31.77	34.90	1.49
Tibia Length (TL)	39.60	34.10	36.92	1.59

Table 3 : Measurements of cranial (In Millimeters) in Ricefield Rat; *Rattus argentiventer* (♀) in Northeast Region of Thailand

Characters	Max.	Min.	Mean	SD.
Breadth of Rostrum (BR)	201.00	154.10	183.10	22.05
Length of Rostrum (LR)	190.00	180.00	186.25	4.79
Occipitonasal Length (ONL)	180.00	165.00	171.75	6.99
Interorbital Breadth (IB)	34.23	32.00	33.31	1.02
Breadth of Brain Case (BBC)	23.00	22.00	22.25	0.50
Zygomatic Breadth (ZB)	8.91	6.75	7.81	0.74
Breadth of Incisive Foramina (BIF)	13.95	10.33	12.70	1.32
Breadth of First Upper Molar (BM1)	43.50	36.73	40.91	2.59
Length of Diastema (LD)	5.83	5.32	5.53	0.19
Length of Incisive Foramina (LIF)	17.77	15.55	16.51	0.72
Length of Bony Palate (LBP)	20.58	16.92	19.11	1.47
Postpalatal Length (PPL)	3.41	2.23	2.66	0.44
Length of Auditory Bulla (LB)	2.17	1.82	2.05	0.14
Breadth of Mesopterygoid Fossa (BMF)	12.31	9.68	11.35	1.01
Breadth of Bony Palate at First Molars (BBP)	8.58	6.74	7.94	0.60
Crown Length of Maxillary Molar Row (CLM1-3)	8.92	7.35	7.99	0.63
Hight of Brain Case (HBC)	16.67	12.28	14.46	1.43
Breadth of Zygomatic (BZP)	7.78	6.55	7.28	0.49
Length of Mandible (LM)	3.51	2.72	3.27	0.26
Hight of Mandible (HM)	4.29	3.14	3.72	0.37
Length of Lower Molar Series (LLM)	7.63	7.06	7.35	0.22
Humerous Length (HL)	12.93	12.03	12.44	0.38
Femur Length (FL)	5.26	4.24	4.83	0.43
Tibia Length (TL)	23.53	19.79	22.16	1.48

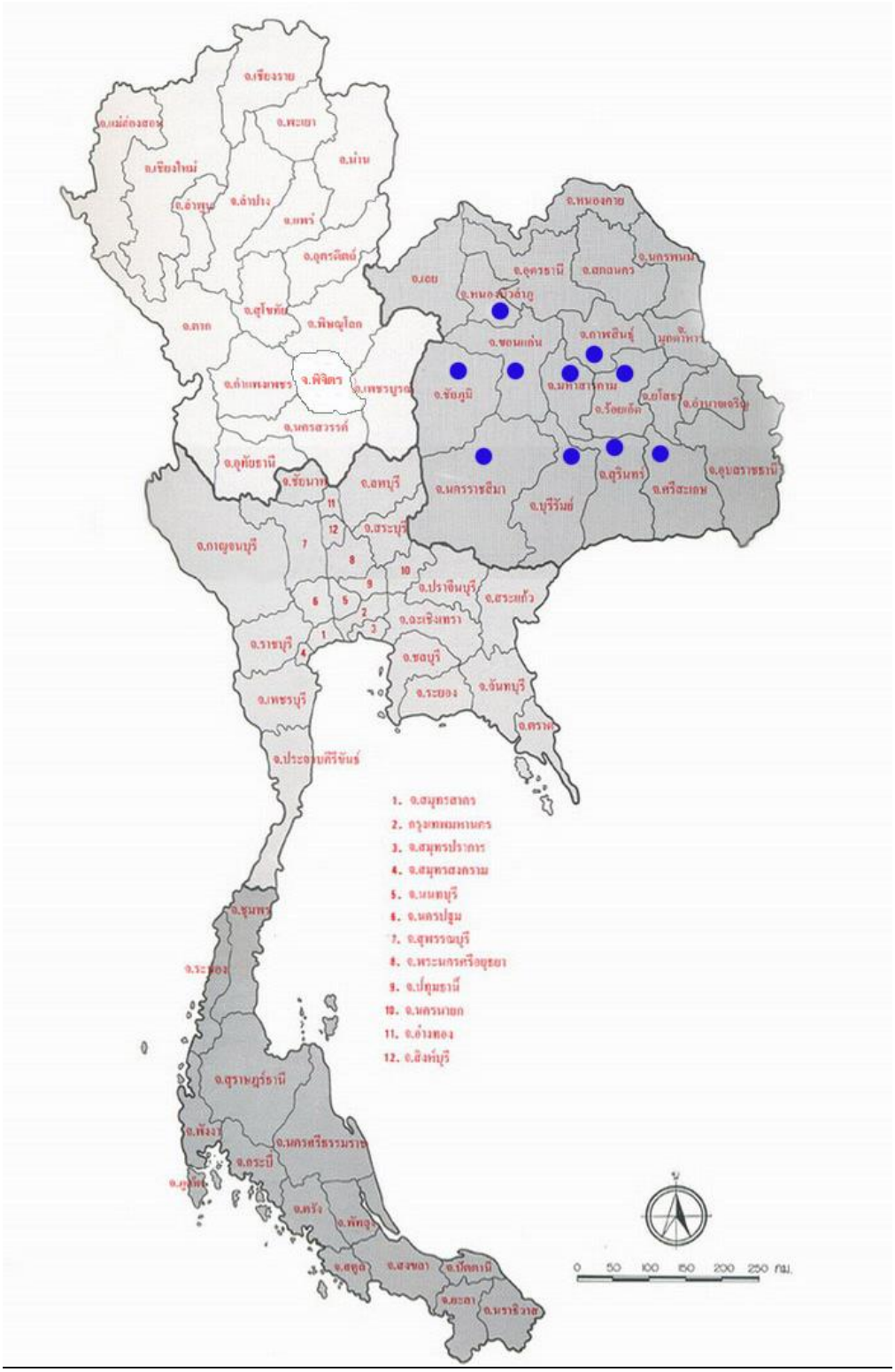


Figure 1 Distribution of the Ricefield Rat; *Rattus argentiventer* in Northeast Region of Thailand.

อนุกรมวิธานเพลี้ยหอย สกุล *Coccus*

Taxonomy of Scale Insect in Genus *Coccus*

ชมัยพร บัวมาศ จารุวัตถ์ แต้กุล สุนัดดา เชาวลิต
อิทธิพล บรรณาการ เกศสุดา สนศิริ สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยสกุล *Coccus* ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนกันยายน 2557 เพื่อทราบชนิด พืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย ของเพลี้ยหอยสกุล *Coccus* ที่มีอยู่ในประเทศไทย ได้เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในเขตภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จากการตรวจจำแนกชนิด พบเพลี้ยหอยสกุล *Coccus* จำนวน 3 ชนิด 60 ตัวอย่าง คือ เพลี้ยหอยกาแฟสีเขียว *Coccus viridis* (Green) พบใน หว้า เอื้องหมายนา เดหลี เพลี้ยหอยสีน้ำตาล *Coccus hesperidum* Linnaeus พบในมะม่วง และ *Coccus* sp.1 พบในมะม่วง การศึกษานี้ยังไม่สิ้นสุดจะต้องดำเนินการต่อไปในปี 2558

คำสำคัญ : อนุกรมวิธาน, เพลี้ยหอย , สกุล *Coccus*
Taxonomy, Scale insect, *Coccus*

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-24-56

คำนำ

เพลี้ยหอยเป็นแมลงปากดูด ที่ทำความเสียหายให้กับพืชได้หลายชนิด ทั้งพืชสวนและพืชไร่ โดยดูดน้ำเลี้ยงจากส่วนต่าง ๆ ของพืช ทำให้บริเวณที่ถูกทำลายมีลักษณะผิดปกติ นอกจากนี้เพลี้ยหอยยังขับถ่ายของเหลว มีลักษณะเป็นน้ำเหนียวๆ เรียกว่า มูลน้ำหวาน (honeydew) ซึ่งเป็นอาหารของราดำ ทำให้ราดำเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และพืชสังเคราะห์แสงได้น้อยลง ส่งผลให้ผลผลิตลดลง สำหรับผลิตผลที่ได้ยังด้อยคุณภาพ กระทบต่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตร ดังเช่นการทำลายของเพลี้ยหอยสกุล *Coccus* ปัจจุบันเพลี้ยหอยสกุล *Coccus* มีเขตการแพร่กระจายเกือบทั่วโลก เพลี้ยหอยสกุลนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิอากาศค่อนข้างอบอุ่น พื้นที่การเกษตรที่มีสภาพภูมิอากาศดังกล่าว มักจะประสบปัญหาการระบาดของเพลี้ยหอยสกุล *Coccus* มีหลายชนิด สร้างความเสียหายอย่างรุนแรงให้กับพืชที่เพลี้ยหอยอาศัยอยู่ ดังในกรณีเพลี้ยหอย *Coccus pseudomagnoliarum* (Kuwana) เข้าทำลายต้นส้ม (citrus) ในมลรัฐแคลิฟอร์เนียสร้างความเสียหายอย่างรุนแรง เมื่อ ค.ศ.1945 และยังพบเพลี้ยหอยชนิดนี้เป็นศัตรูของกล้วยไม้อีกด้วย (Gill, 1988)บางประเทศพบเพลี้ยหอยหลายชนิดที่ไม่เคยมีรายงานในประเทศมาก่อน ทำให้ไม่สามารถหาแนวทางในการป้องกันกำจัดได้ทันเวลา สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีข้อมูล รายละเอียดต่าง ๆ ของเพลี้ยหอยสกุลนี้ ดังนั้นการศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยสกุล *Coccus* จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อทราบชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ พืชอาหาร และเขตแพร่กระจายของเพลี้ยหอยสกุล *Coccus* แต่ละชนิด นำตัวอย่างที่ได้เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลงเพื่อเป็นหลักฐานอ้างอิง และ สำหรับเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาแนวทางการป้องกันกำจัดเพลี้ยหอยดังกล่าว

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเพลี้ยหอยสกุล *Coccus*

2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างเพลี้ยหอย ได้แก่ แอลกอฮอล์ 70 – 80% ขวดดองตัวอย่างแมลง คัตเตอร์ กรรไกรตัดกิ่ง กล่องพลาสติก ถุงกระดาษและถุงพลาสติก

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวรเพลี้ยหอย ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น alcohol 70 %, potassium hydroxide 10%, hydrochloric acid, glacial acetic acid, xylene, carbolic acid, acid fuchsin, N-butyl alcohol, clove oil และ Canada balsam เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องใส่สไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร

4. กล้องจุลทรรศน์ compound microscope และ stereo microscope และ กล้องถ่ายภาพ

5. อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา rotting และกระดาษไขเขียนแบบ

6. เอกสารประกอบการจำแนกชนิดเพลี้ยหอย

วิธีการ

1.สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยจากแหล่งปลูกพืชทุกภาคของประเทศ ตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยหอยอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วใส่ในถุงพลาสติก บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง ชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ

2. นำตัวอย่างเพลี้ยหอยที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพ บันทึกรายละเอียด เช่น ขนาด รูปร่างลักษณะและสีของเพลี้ยหอย ก่อนทำสไลด์ถาวรแล้วดองในแอลกอฮอล์ 80%

3. สำหรับตัวอย่างอีกส่วนหนึ่งโดยเฉพาะตัวอ่อนจะถูกกนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยใส่ตัวอย่างพร้อมพืชอาหารในกล่องพลาสติกใสที่มีฝากล่องเป็นตาข่าย พร้อมบันทึกรายละเอียดตามข้อ 1 เพื่อศึกษาแมลงศัตรูธรรมชาติและวงจรชีวิตต่อไป

4. นำตัวอย่างเพลี้ยหอยจากขวดดองตัวอย่างในข้อ 2 มาทำสไลด์ถาวร โดยดัดแปลงวิธีการของ Williams and Watson (1990) มีขั้นตอนดังนี้

4.1 ใช้เข็มเขี่ยเจาะบริเวณกลางส่วนอกด้านบนของตัวอย่างเพลี้ยหอย นำไปใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% จากนั้นนำหลอดทดลองไปต้มด้วยวิธีวอเตอร์บาท ใช้เวลาประมาณ 15 นาที (เริ่มนับตั้งแต่น้ำในบีคเกอร์เดือด) โดยระวังไม่ให้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่อยู่ในหลอดทดลองเดือด เพราะจะทำให้ตัวอย่างเกิดความเสียหายได้

4.2 นำตัวอย่างเพลี้ยหอยที่ต้มแล้วมาล้างในน้ำกลั่น กดเบา ๆ บนลำตัวด้วยเข็มดัดปลายโค้ง เพื่อทำให้ไข่ ตัวอ่อน และของเหลวที่อยู่ในลำตัวหลุดออกมาทางรอยที่เจาะไว้ ถ้ายังมีก้อนไขมันตกค้างอยู่ให้นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 2 – 3 นาที

4.3 ย้ายลงในคาร์บอลไซลีน (carbol xylene)แช่ทิ้งไว้ 10 นาทีจนกระทั่งตัวอย่างใส นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95%

4.4 ย้ายลงในกรดแอลกอฮอล์ (acid alcohol) ซึ่งเป็นสารละลายของ กรดแกลเซียลอะซิติก 1 ส่วน และแอลกอฮอล์ 50% 4 ส่วน แช่ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที

4.5 ย้อมสีตัวอย่างโดยแช่ในน้ำยาย้อมสี ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิดฟุชซิน (acid fuchsin) กรดเกลือ (hydrochloric acid) และน้ำกลั่น แช่ทิ้งไว้นาน 30 - 60 นาที

4.6 ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95% แช่ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที เพื่อกำจัดสีส่วนเกิน

4.7 ย้ายลงในสารละลายเอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alcohol) กับ แอลกอฮอล์ 95 % ในอัตราส่วน 1:1 แช่ทิ้งไว้ 10 นาที

4.8 ย้ายลงในเอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ แช่ทิ้งไว้ 10 นาที

4.9 ย้ายลงในโคล์ฟออย (clove oil) แช่ทิ้งไว้ 20 นาที

4.10 นำตัวอย่างเพลี้ยหอยวางบนแผ่นสไลด์แก้ว ใช้กระดาษกรองซับโคล์ฟออยส่วนที่

เกินออก หยดแคนาดาบัลซัม (canada balsam) 1 หยดบนตัวอย่างแมลงจัดรูปร่าง ให้สวยงามไม่บิดเบี้ยวหรือทับซ้อนกัน ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

4.11 นำไปอบให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 40 - 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 1-2 เดือน

5. ตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยหอยบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง ตรวจดูลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก ได้แก่ หนวด (antennae) ขน (setae) รู (pores) ท่อ (tubular ducts) และแผ่นแข็งที่อยู่บริเวณปลายส่วนท้อ (anal plate)

6. วาดรูปแสดงลักษณะทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยแต่ละชนิด โดยวาดลงบนกระดาษกราฟและลอกลงบนกระดาษไขเขียนแบบและจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพลี้ยหอยสกุล *Coccus*

7. การบันทึกรายละเอียดบนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้วโดยวางแผ่นสไลด์หันด้านหัวของเพลี้ยหอยเข้าหาตัว ด้านขวาเขียนรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ด้านซ้ายมือเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ เพศ วันเดือนปี ที่ทำสไลด์และชื่อผู้จำแนก ควรลงรายละเอียดดังกล่าวเป็นภาษาอังกฤษ

8. จัดเก็บตัวอย่างเพลี้ยหอยในกล่องใส่สไลด์ถาวรและนำเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล

เวลาและสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2556 **ถึง** เดือนกันยายน 2557

สถานที่ 1. แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่างๆ

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยจากแหล่งปลูกพืชๆต่างๆ ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศระหว่าง เดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนกันยายน 2557 พบเพลี้ยหอยสกุล *Coccus* เพศเมีย จำนวน 3 ชนิด 60 ตัวอย่าง ได้แก่ เพลี้ยหอยกาแฟสีเขียว: Green coffee scale; *Coccus viridis* (Green) ซึ่งพบใน หว้า เอื้องหมายนา เดหลี มะนาว มะม่วง กาแฟ ที่ จ. นครราชสีมา กรุงเทพมหานคร เชียงใหม่ เพลี้ยหอยสีน้ำตาล *Coccus hesperidum* Linnaeus พบในมะม่วง ที่ จ.นคราชสีมา และกรุงเทพมหานคร และเพลี้ยหอย *Coccus* sp.1 พบในมะม่วง ที่ จ.กรุงเทพมหานคร นอกจากนี้ยังพบแมลงตัวห้ำและตัวเบียน ในตัวอย่างที่เก็บมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและอยู่ในขั้นตอนจำแนกชนิด การศึกษานี้จะต้องดำเนินต่อไปในปี 2558 โดยสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยสกุล *Coccus* จากแหล่งปลูกพืชอื่นๆ ทั้ง ผัก ไม้ดอกไม้ประดับ พืชไร่ และไม้ผลให้ครอบคลุมทุกภูมิภาคของประเทศ และจัดทำแนวทางวินิจฉัยเพลี้ยหอยสกุล *Coccus* พร้อมบันทึกรายละเอียดของเพลี้ยหอยแต่ละชนิด และจัดเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยสกุล *Coccus* ระหว่างเดือนตุลาคม 2555 ถึงกันยายน 2556 พบเพลี้ยหอยสกุล *Coccus* เพศเมีย จำนวน 3 ชนิด 60 ตัวอย่าง ได้แก่ เพลี้ยหอยกาแฟสีเขียว: Green coffee scale; *Coccus viridis* (Green) ซึ่งพบใน หว้า เอื้องหมายนา เดหลี มะนาว มะม่วง กาแฟ เพลี้ยหอยสีน้ำตาล *Coccus hesperidum* Linnaeus พบในมะม่วง และ *Coccus* sp.1 พบในมะม่วง การศึกษานี้ยังไม่สิ้นสุดจะต้องดำเนินการต่อไปในปี 2558

เอกสารอ้างอิง

บุปผา เหล่าสินชัย. 2540. การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยศัตรูมะม่วง. **วารสารกีฏและสัตว-วิทยา** 19 (4): 196 -211.

Gill, R.J. 1988. **The Scales Insect of California Part 1, The Soft Scales (Homoptera: Coccoidea: Coccidae).** California Department of Food and Agriculture, California. 132 pp.

Smith, D., G.A.C. Beettie and R. Broadley (eds.). 1997. **Citrus pests and their natural enemies**. Sttate of Queenstand. Department of Primary Industries, and Horticultural Research and Development Corporation. 272 pp.

Williams, D.J. and G.W. Watson. 1990. **The Scale Insects of the Tropical South Pacific Region Part 3, the Soft Scales (Coccidae) and Other Families**. CAB Intemational Institute of Entomology, Wallingford. 267 pp.

อนุกรมวิธานแมลงหวี่ขาวในวงศ์ย่อย Aleyrodinae ในประเทศไทย

Taxonomic Study Whitefly Subfamily Aleyrodinae in Thailand

สุนัดดา เชาวลิต ชมัยพร บัวมาศ อิทธิพล บรรณาการ

เกศสุดา สนศิริ สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาอนุกรมวิธานแมลงหวี่ขาววงศ์ย่อย Aleyrodinae เพื่อให้ทราบชนิด พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจาย พร้อมจัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิด เพื่อเป็นข้อมูลจัดทำรายชื่อแมลงศัตรูพืช และวิเคราะห์ความเสี่ยงแมลงศัตรูพืช ในการนำเข้าและส่งออกผลผลิตทางการเกษตร รวมทั้งเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาด้านกีฏวิทยาทุกสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2555 ถึงเดือนกันยายน 2557 ในแหล่งปลูกพืชทั่วประเทศไทย นำตัวอย่างที่สำรวจได้มาจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างแมลงหวี่ขาววงศ์ย่อย Aleyrodinae ที่ได้จากการสำรวจและตัวอย่างเดิมที่มีในพิพิธภัณฑ์แมลงกรมวิชาการเกษตร จำนวน 235 ตัวอย่าง ตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธานโดยใช้ลักษณะดักแด้สามารถจำแนก ได้ 5 ชนิด ได้แก่ แมลงหวี่ขาวส้ม , *Aleurocanthus woglumi* Ashby; แมลงหวี่ขาวหนามส้ม , *Aleurocanthus spiniferus* Quaintance; แมลงหวี่ขาวอ้อย, *Aleurolobus barodensis* (Maskell); แมลงหวี่ขาวยาสูบ, *Bemisia tabaci* (Gennadius); และแมลงหวี่ขาวอ้อยปีกลาย, *Neomaskellia bergii* (Singnoret) ตัวอย่างแมลงหวี่ขาวทั้งหมดนำเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

คำสำคัญ : แมลงหวี่ขาว อนุกรมวิธาน วงศ์ Aleyrodidae วงศ์ย่อย Aleyrodinae ประเทศไทย

Whitefly Taxonomy Aleyrodidae Aleyrodinae Thailand

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-25-56

คำนำ

แมลงหวี่ขาว (Whitefly) เป็นแมลงปากดูดที่สำคัญชนิดหนึ่งในอันดับ Hemiptera อันดับย่อย Sternorrhyncha แมลงหวี่ขาวมีวิวัฒนาการร่วมกับ เพลี้ยหอย (วงศ์ Coccidae) เพลี้ยแป้ง (วงศ์ Margarodidae และวงศ์ Pseudococcidae) และมีวิวัฒนาการใกล้ชิดกับเพลี้ยไก่แจ้ (วงศ์ Psylloidae) (Martin, 1999) แมลงหวี่ขาวจัดอยู่ในวงศ์ Aleyrodidae ทั่วโลกมีแมลงหวี่ขาวประมาณ 161 สกุล ไม่น้อยกว่า 1,556 ชนิด แบ่งเป็น 3 วงศ์ย่อย คือ วงศ์ย่อย Aleurodicinae ซึ่งมีการแพร่กระจายในเขตทวีปอเมริกาใต้ (Neotropical Region) วงศ์ย่อย Aleyrodinae เป็นกลุ่มใหญ่ที่มีจำนวนชนิดมากที่สุด พบแพรกระจายในทั่วโลก และวงศ์ย่อย Udamoselinae จัดเป็นวงศ์ย่อยที่มีจำนวนชนิดค่อนข้างน้อยและไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ พบแพร่กระจายในเขตทวีปอเมริกาใต้ (Watson, 2007; Martin and Mound, 2007) สำหรับประเทศไทย Mound และ Halsey (1978) ได้รายงานชนิดแมลงหวี่ขาวที่เป็นศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจว่ามีไม่น้อยกว่า 50 ชนิด Hutacharern *et. al.* (2007) ได้รวบรวมรายชื่อแมลงหวี่ขาวมีทั้งหมด 93 ชนิด ซึ่งข้อมูลที่ได้มาจากการตรวจเอกสารการรายงานชนิดแมลงหวี่ขาวที่พบในประเทศไทย ต่อมา สมชัย (2550) รายงานแมลงหวี่ขาวศัตรูพืชบางชนิดในประเทศไทย จำนวน 9 ชนิด สุนัดดา (2554) รายงานแมลงหวี่ขาวศัตรูพืชจำนวน 10 ชนิด สุนัดดา (2556) รายงานเพิ่มอีก 1 ชนิด

แมลงหวี่ขาวนับเป็นแมลงศัตรูพืชขนาดเล็กที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง มีการระบาดรุนแรงไปทั่วโลก อาศัยอยู่กับพืชมากมายหลายชนิด สร้างปัญหาให้กับวงการเกษตรกรรมของเมืองไทยได้อย่างมาก เนื่องจากทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจะดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพืชแล้วถ่ายมูลเหนียวที่เป็นน้ำหวาน (Honey dew) ออกมา ติดอยู่ตามใบ ดอก กิ่ง ก้าน หรือลำต้นของพืช ซึ่งมูลเหนียวนี้เป็นอาหารของราดำ ทำให้ใบหรือส่วนต่างๆของพืชสกปรก ใบพืชที่มีราดำปกคลุมจะมาสามารถสังเคราะห์แสงได้ ส่งผลให้ทั้งคุณภาพและผลผลิตลดลง หรือสุดท้ายพืชอาจจะตายได้ นอกจากนี้ยังมีแมลงหวี่ขาวบางชนิดที่มีความสามารถในการเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากพืชต้นหนึ่งสู่พืชอีกต้นหนึ่งได้ Mound และ Halsey (1978) รายงานว่าแมลงหวี่ขาว *Bemisia* spp. ไว้ 38 ชนิด ชนิดที่มีความสำคัญได้แก่ แมลงหวี่ขาว *Bemisia tabaci* (Gennadius) เป็นพาหะของเชื้อไวรัสใบหด (tabacco leaf curl virus) ซึ่งเป็นโรคสำคัญของใบยาสูบ และยังพบว่าแมลงหวี่ขาวชนิดนี้ก่อให้เกิดความเสียหายในฝ้าย ทำให้ใบและปุยฝ้ายเสียหาย ผลผลิตของฝ้ายลดลง และยังพบในพืชอาหารหลายชนิด ได้แก่ มะเขือ พืชตระกูลแตง มะเขือเทศ มันฝรั่ง และพืชผักต่างๆ รวมถึงวัชพืชหลายชนิด เป็นต้น (สิริวัฒน์, 2526; Ohno, 1992) แมลงหวี่ขาว *Aleurocanthus woglumi* มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากนั้นแพร่ระบาดไปยังประเทศต่างๆทั่วโลก (CIE, 1995) เป็นศัตรูสำคัญของส้ม ในเม็กซิโกรายงานพืชที่แมลงหวี่ขาวชนิดนี้เข้าทำลาย 75 ชนิด ใน 38 วงศ์ (Shaw, 1950) และเป็นศัตรูสำคัญที่เพิ่งสำรวจพบในกาแฟ Le Pelley (1968) นอกจากนี้แมลงหวี่ขาวอ้อย เป็นอีกชนิดที่สร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรปีละไม่น้อย พบระบาดในประเทศไทยครั้งแรกในปี 2522 ในหลายจังหวัดทั่ว

ทุกภาค ผลจากการเข้าทำลายนอกจากจะทำให้ปริมาณน้ำตาลในอ้อยลดลงแล้ว ยังมีผลทำให้อ้อยชะงักการเจริญเติบโต ซึ่งอาจจะทำให้ผลผลิตของอ้อยลดลงอีกด้วย (ณัฐกฤต, 2544)

สำหรับประเทศไทยได้มีการศึกษาข้อมูลด้านอนุกรมวิธานของวงศ์ย่อย Aleurodicinae ไว้แล้ว ยังขาดข้อมูลแมลงหวี่ขาววงศ์ย่อย Aleyrodinae ดังนั้น ในเบื้องต้นจึงจำเป็นต้องศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อได้ทราบชนิด ลักษณะความแตกต่าง พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจายของแมลงหวี่ขาวในวงศ์ย่อยนี้ ซึ่งถ้าการศึกษาครั้งนี้แล้วเสร็จ จะได้ข้อมูลอนุกรมวิธานแมลงหวี่ขาวในประเทศไทยอย่างครบถ้วน ข้อมูลเหล่านี้จักเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ในการสนับสนุนงานที่เกี่ยวกับแมลงหวี่ขาว ทั้งในแง่ของการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเพื่อการนำเข้าส่งออกผลผลิตการเกษตร การบริหารจัดการแมลงศัตรูพืช หรืองานวิจัยอื่นในลำดับต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1) ตัวอย่างแมลงหวี่ขาวที่รวบรวมได้จากแหล่งปลูกพืช ทั่วทุกภาคของประเทศไทย

2) อุปกรณ์เก็บตัวอย่างได้แก่ ขวดดองแมลงซึ่งบรรจุแอลกอฮอล์ 80% ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ถังรักษาความเย็นและเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) สมุดจดบันทึก

3) อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 %, (potassium hydroxide), แอลกอฮอล์ (alcohol) 70-95 %, กรดแกลเซียลอะซิติก (acetic acid gacial), คลอรอล-ฟีนอล (chloral-phenol), แอมโมเนีย (ammonia), ไฮโดรเยนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide), แอซิกฟุชซินสเตน (acid fuchsin strain), โคลฟออย (clove oil), คานาดาบาซัม (canada balsam) แผ่นสไลด์แก้วและแผ่นแก้วปิดสไลด์ ตู้อบสไลด์ถาวร

4) กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo ,compound และกล้องถ่ายภาพ

5) อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ชุดสะท้อนภาพคาเมร่าลูซิดา (camera lucida) ดินสอ กราษสีขาวขนาด A3 ปากกา roting และกระดาษไขเขียนแบบ คอมพิวเตอร์ เครื่องสแกนภาพ

6) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของแมลงหวี่ขาว

วิธีการ

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงหวี่ขาวในแหล่งปลูกพืชทั่วไป ทั้งพื้นที่เกษตร และพื้นที่ป่าทั่วประเทศไทย ตัดส่วนของพืชที่มีตัวอ่อน ดักแด้ หรือตัวเต็มวัยแมลงหวี่ขาวเกาะอยู่ด้วยกรรไกรตัดกิ่ง นำตัวอย่างแมลงหวี่ขาวที่เก็บรวบรวมได้พร้อมพืชอาหารห่อกระดาษแล้วนำใส่ถุงพลาสติก หรือกล่องพลาสติก แล้วใส่ในถังรักษาความเย็นอีกชั้นเพื่อป้องกันการเหี่ยวของพืชอาหาร หากตัวอย่างแมลงหวี่ขาวที่รวบรวมได้อยู่ในระยะตัวอ่อน ต้องนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนเป็นดักแด้ บันทึกข้อมูลเบื้องต้น เช่น พืชอาหาร สถานที่ พิกัดภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง

2) นำตัวอย่างดักแด้และตัวเต็มวัยแมลงหวี่ขาวที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo บันทึกรายละเอียดลักษณะสำคัญต่างๆ เช่น ขนาดลำตัว รูปร่างลักษณะ สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพแมลงหวี่ขาวแต่ละระยะ

3) นำตัวอย่างดักแด้ที่สำรวจได้ในข้อ 2) บางส่วนมาทำสไลด์ถาวร โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Martin (1987) และ Watson (2007) โดยตัดชิ้นส่วนของพืชเฉพาะที่มีดักแด้ติดอยู่ แช่ในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 % ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หรือแช่ในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 % ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-20 นาที จะช่วยให้แยกดักแด้ออกจากพืชอาศัยได้ง่าย โดยไม่ทำให้ตัวอย่างเสียหาย (ขั้นตอนนี้ระวังไม่ให้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เดือด เพราะความร้อนที่สูงเกินไปจะทำให้ผนังลำตัวฉีกขาดได้ง่าย) ดูดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ออก เติมกรดแกลเซียลอะซิติก แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วดูดกรดแกลเซียลอะซิติกออก เติมสารละลายคลอรอล-ฟีนอล แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาทีเช่นกัน แล้วดูดสารผสมนี้ออก วิธีนี้นอกจากจะช่วยกำจัดคราบไขมันที่ห่อหุ้มดักแด้แล้ว ยังช่วยในการย้อมสีทำให้ตัวอย่างติดสีได้ดีขึ้น การย้อมสีแมลงหวี่ขาวปฏิบัติตามขั้นตอนดังนี

- ดักแด้ที่มีสีเข้มหรือสีดำ ให้ล้างตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ 95% แล้วย้ายตัวอย่างลงในสารละลายที่เป็นส่วนผสมของแอมโมเนีย กับไฮโดรเยนเปอร์ออกไซด์ ในอัตราส่วน 80: 20 โดยปริมาตร แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที สารละลายนี้จะช่วยทำให้ตัวอย่างที่มีสีเข้มใสขึ้น

- ดักแด้ที่มีสีจางหรือสีซีด ให้ล้างตัวอย่างด้วยกรดแกลเซียลอะซิติก ย้ายตัวอย่างลงในสารละลายแอซิกฟุชซินสเตน ใช้เพียง 2-3 หยดเพื่อย้อมสีตัวอย่าง แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที ดูดสารละลาย หรือสีย้อมออก ล้างด้วยกรดแกลเซียลอะซิติก และแช่ในกรดแกลเซียลอะซิติก ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วดูดสารละลายนี้ออก เติมโคลฟอออยหรือไซลีน แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที เมาท์ตัวอย่างบนแผ่นสไลด์ด้วยคานาดาบาซัม แล้วนำไปอบให้แห้งใช้เวลา 5 สัปดาห์

4) นำสไลด์ที่ผ่านการอบจนแห้งแล้วมาตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดใต้กล้องจุลทรรศน์ ชนิด compound ตรวจสอบลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดแมลงหวี่ขาว (Fig.1) ด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดของแมลงหวี่ขาว ลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกชนิดได้แก่

ช่องเปิดชนิดต่างๆบนลำตัว (Pores) (Fig.1) ทำหน้าที่ขับไขลักษณะเป็นเส้นใย (wax) ออกจากร่างกาย พบกระจายอยู่ทั่วไปบนลำตัวของดักแด้แมลงหวี่ขาว โดยช่องเปิดของแมลงหวี่ขาวใน วงศ์ย่อย Aleyrodinae (Fig.3) จะเป็นช่องเปิดขนาดกลาง เรียกว่า simple pore และอาจพบช่องเปิดเล็กๆบนหลังซึ่งเรียกว่า discoidal pore ส่วนแมลงหวี่ขาวใน วงศ์ย่อย Aleurodicinae (Fig.4) พบว่า discoidal pore จะพบปะปนกับช่องเปิดที่มีขนาดเล็กกว่า โดยทั่วไปแมลงหวี่ขาวใน วงศ์ย่อย Aleurodicinae จะมี discoidal pore ใหญ่กว่าในพวก วงศ์ย่อย Aleyrodinae นอกจากนี้ยังพบช่องเปิดแบบ compound pore ที่เป็นช่องเปิดขนาดใหญ่อีกชนิดหนึ่ง พบเฉพาะส่วนหัวและท้องของแมลงหวี่ขาวใน วงศ์ย่อย Aleurodicinae ดังนั้นจำนวน ตำแหน่งของช่องเปิด หรือการพบหรือไม่พบ

อวัยวะที่ใช้ในการขับสารต่างๆหรือขับไขออกจากช่องเปิดแบบ compound pore จะเป็นลักษณะสำคัญมาก ในการจำแนกชนิดของแมลงหวี่ขาวใน วงศ์ย่อย Aleyrodinae

ขอบลำตัว (Margin) (Fig. 2) บริเวณขอบลำตัวของดักแด้แมลงหวี่ขาว จะมีความผันแปรตามชนิดของแมลงหวี่ขาว มีทั้งขอบเรียบไปจนถึงขอบเป็นลอน หรือหยักแบบฟันเลื่อย เช่น ขอบเป็นแบบ undulate, lobulate, truncate-lobulate, crenate, dentate, serrate และ serratulate

ช่องเปิดของท่ออากาศ (Tracheal pore area) เป็นที่ตั้งของท่ออากาศ ตั้งอยู่ที่บริเวณขอบของลำตัว ระหว่างส่วนหัวและอกของดักแด้แมลงหวี่ขาว บริเวณนี้ประกอบด้วยขอบด้านนอกของอก (marginal throracic) และ ช่องเปิดของท่ออากาศที่ส่วนท้อง (abdominal tracheal pore) อยู่ปะปนกับส่วนปลายของท่ออากาศด้านล่างและรอยพับตรงท่ออากาศด้านท้อง ตามลำดับ โดยร่องของท่ออากาศ (tracheal folds) จะคลุมพื้นที่ตั้งแต่ช่องเปิดที่อก (spiracle) ไปที่ขอบของลำตัว ซึ่งเป็นทางผ่านของอากาศ ระหว่างท่ออากาศกับสภาพแวดล้อมรอบๆ โดยทั่วไป tracheal pore area จะค่อยๆโค้งลงตรงขอบลำตัว และอาจพบเซลล์ที่มีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ หรือคล้ายซี่ฟัน หรือเป็นแบบลอนเล็กๆ หรืออาจพบลักษณะเป็นซี่ฟันที่ใหญ่ขึ้น เรียกว่า tracheal combs ดังนั้น tracheal comb หรือ pore area รวมทั้งลักษณะที่มีหรือไม่มีของขนชนิดต่างๆที่ tracheal fold โดยเฉพาะในส่วนที่อยู่ใกล้กับขาก็เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกสกุลและชนิดของแมลงหวี่ขาวเช่นกัน

ขน (setae) ขนของดักแด้แมลงหวี่ขาว สามารถพบได้ทั่วไปทั้งด้านบนและด้านล่างของลำตัว รวมถึงบริเวณตรง cephalic mesothoracic metathoracic ปล้องท้องที่ 1 ปล้องท้องที่ 8 และบริเวณส่วนหาง (caudal) โดยทั่วไปขนขนาดเล็ก (microsetae) มักพบที่ปล้องขา แต่จำนวน รูปร่าง และตำแหน่งที่พบอาจแตกต่างกันไปตามชนิดของแมลงหวี่ขาว แม้ว่าบริเวณที่ตั้งของขน และการพบหรือไม่พบของขนจะมีความสำคัญมากในการจำแนก แต่ขนาดและรูปร่างของขนแต่ละเส้น ก็มีความสำคัญในการจำแนกชนิดเช่นกัน

Vasiform orifice, Operculum และ Lingula อวัยวะทั้ง 3 ชนิด อยู่ในบริเวณเดียวกัน คือส่วนท้ายของลำตัว โดย vasiform orifice จะอยู่ล่างสุด มีลักษณะคล้ายรูปสามเหลี่ยมหรือรูปหัวใจถัดขึ้นมาเป็น lingula มีลัษณะเป็นแผ่นเล็กๆเรียวยาวคล้ายลิ้น และบนสุดมีลักษณะเป็นแผ่นคล้ายฝาปิด เรียกว่า operculum การจำแนกชนิดของแมลงหวี่ขาวนอกจากขนที่พบแล้ว ยังพิจารณาจากลักษณะรูปร่างของ vasiform orifice ฝาปิด และ Lingula ด้วย โดยเฉพาะ vasiform orifice ซึ่งตั้งอยู่ที่บริเวณส่วนท้ายของลำตัว ส่วนใหญ่มี 2 แบบ แบบแรก vasiform orifice ถูกปิดด้วย operculum ทั้งหมดหรือเกือบทั้งหมด ทำให้ไม่สามารถมองเห็น lingula ได้จากด้านบน ส่วนแบบที่สอง vasiform orifice ถูกปิดด้วย operculum บางส่วน สามารถเห็น lingula ได้ชัดเจน

5) บันทึกรายละเอียดของแมลงหวี่ขาวชนิดต่างๆที่สำรวจพบ และข้อมูลอื่นที่สำคัญ ถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงบันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายที่ต้องติดไว้กับสไลด์แมลงหวี่ขาวแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่จับ และ วัน/เดือน/ปีที่ทำสไลด์ถาวร ชื่อน้ำยาที่ใช้เมาท์ (mount) สไลด์

6) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษา โดยนำตัวอย่างแมลงหวี่ขาวพร้อมตัวอย่างพืชที่มีดักแด้เกาะอยู่และสไลด์ถาวรที่จำแนกชนิดเรียบร้อยแล้ว เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล เพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น เดือนตุลาคม 2553 – **สิ้นสุด** เดือนกันยายน 2555

สถานที่ แหล่งปลูกพืชทั่วทุกภาคของประเทศไทย และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงกลุ่มกีฏและสัตวิวทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาอนุกรมวิธานแมลงหวี่ขาว วงศ์ย่อย Aleyrodinae ในแหล่งปลูกพืชทั่วประเทศไทย ได้ตัวอย่างแมลงหวี่ขาววงศ์ย่อย Aleyrodinae จำนวน 235 ตัวอย่าง ผลการตรวจวิเคราะห์โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยปรับปรุงจาก Martin, 1999, 2004; Watson, 2007 รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างแมลงหวี่ขาวที่มีในพิพิธภัณฑ์แมลงของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร สามารถจำแนก ได้ 5 ชนิด โดยมีรายละเอียด ดังนี้

สกุล *Aleurocanthus* Quaintance & Baker

Aleurocanthus Quaintance & Baker, 1914: 102; Martin, 1999: 23. Type species *Aleurodes spinifera* Quaintance, 1903: 63-64, by original designation.

1. *Aleurocanthus woglumi* Ashby 1915 (Fig. 5, 10 A-B)

Aleurocanthus woglumi Ashby, 1915: 321-322. Lectotype, Jamaica (USNM); Martin, 1999: 31

Aleurocanthus punjabensis Corbett, 1935: 8. Pakistan. [Synonymised by Husain & Khan, 1945: 1]

Aleurocanthus formosana Takahashi, 1935: 281. (*Aleurocanthus woglumi var. formosana* Takahashi, 1935). Taiwan. [Synonymised by Mound & Halsey, 1987: 24]

ชื่อสามัญ แมลงหวี่ขาวส้ม (Citrus blackfly)

รูปร่างลักษณะ

ลักษณะดักแด้บนแผ่นสไลด์ (Fig. 5 A-C) ลำตัวลักษณะกลมรีรูปไข่ ส่วนหัวค่อนข้างแหลม ขอบลำตัวมีลักษณะคล้ายฟันที่เรียงอย่างสม่ำเสมอเห็นได้ชัดเจน ฟันที่ขอบมีลักษณะทู่ ขอบเป็นแบบ truncate-lobulate ความถี่ของรอยหยักบริเณขอบลำตัวต่อความยาวเส้นรอบตัวเท่ากับ 3.5-5 รอยต่อความยาว 0.1 มิลลิเมตร ขนยาวลักษณะคล้ายหนามยาวทั่วลำตัว ตรงกลางหลังส่วนนูนของ

ปล้องท้องปล้องที่ 2 และ 3 มีขนแข็งปล้องละ 1 คู่ vasiform orifice มีลักษณะคล้ายวงกลม (subcircular) และถูกคลุมโดยฝาปิด บริเวณขอบลำตัวพบขนแข็งคล้ายหนาม 11 คู่

ลักษณะที่พบในธรรมชาติ (Fig. 10 A-B) แมลงหวี่ขาวชนิดนี้ ทั้งตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัย มีสีดำ วางไข่เป็นรูปวงกลมบนใบหรือใต้พืช ลักษณะเป็นวงเกลียว ไข่สีเหลือง อ่อน และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มเมื่อใกล้ฟัก ระยะไข่ 11-12 วัน ตัวอ่อนวัย 1-2 มีผนังลำตัวมีสีดำเป็นมัน ขอบของลำตัวมีลักษณะคล้ายผงแป้งสีขาวปกคลุม ตัวอ่อนวัย 1-2 ใช้เวลา 7-16 วัน ตัวอ่อนวัย 2-3 ใช้เวลา 5-30 วัน ตัวอ่อนวัย 3-4 ลักษณะโค้งนูนชัดเจนผนังลำตัวมีสีดำเป็นมัน มีขนแข็งสีดำกระจายทั่วลำตัว ตัว ขอบของลำตัวมีลักษณะคล้ายผงแป้งสีขาวปกคลุม ตัวอ่อนวัย 3-4 ใช้เวลา 6-20 วัน ดักแด้ มีความยาว 0.82 มิลลิเมตร กว้าง 0.67 มิลลิเมตร ใช้เวลา 16-80 วัน ตัวเต็มวัยมีชีวิตอยู่ได้ 6-12 วัน

ความสำคัญและพืชอาหาร

ส้ม ส้มโอ มะนาว มะม่วง ไผ่ อาโวกาโด และเข็ม นอกจากนี้ Mound & Halsey (1978) พบว่าแมลงหวี่ขาวชนิดนี้มีพืชอาหารมากกว่า 60 ชนิด ในพืชทั้ง 35 ตระกูล ได้แก่ ละมุด น้อยหน่า น้อยหน่าออสเตรเลีย ทุเรียนเทศหรือทุเรียนน้ำ มะม่วงหิมพานต์ พวงชมพู มะม่วงหัวแมงวัน ส้มกุ้ง มะละกอ ทิวา ราตรี ลูกน้ำนมหรือสตาร์แอปเปิ้ล มะนาว ส้มซ่า ส้มเลม่อน ส้มเขียวหวาน ส้มเช้ง มะไฟจีน กาแฟอาราบิก้า น้ำเต้าต้น เปล้าดิน ชมพู่น้ำดอกไม้ ชมพู่มะเหมี่ยว แก้วเจ้าจอม ชบา พู่ระหง ยี่เข่ง กระวาน เชอรี่ไทย มะม่วง ยอ หอมแขก กล้วย กล้วยน้ำว้า เสาวรส ตะเคียนสามพอน ลีลาวดี ฝรั่ง ทับทิม พุด Winson (2007) รายงานใน หม่อน กล้วย อะโวคาโด ชบา ปาล์มน้ำมัน เสาวรส ละมุด

เขตการแพร่กระจาย

ประเทศไทย (จังหวัดกรุงเทพฯ, เพชรบุรี, ตาก, อุทัยธานี กำแพงเพชรและเชียงใหม่) จากรายงานของ Mound & Halsey (1978) แมลงหวี่ขาวชนิดนี้มีการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในหลายประเทศ ได้แก่ อิหร่าน เอเดน เคนยา อาฟริกาใต้ แทนซาเนีย ยูกานดา เซเชลส์ เนปาล ปากีสถาน จีน ไต้หวัน พม่า ศรีลังกา มาเลเซีย สิงคโปร์ เกาะสุมาตรา อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ฮาวาย สหรัฐอเมริกา บาฮามาส เกาะเครแมน เมอร์มิวด้า คิวบา จาไมก้า ไฮติ สาธารณรัฐโดมินิกัน เม็กซิโก นิคารากัว คอสตาริก้า ปานามา เอกัวดอร์ หมู่เกาะบาบาโดส Winson (2007) ฮ่องกง เวียดนาม สหรัฐอเมริกา อินเดีย

2. ***Aleurocanthus spiniferus*** **Quaintance 1903** (Fig. 6, 10 C-D)

Aleurodes spiniferus Quaintance, 1903: 63. Java. [Quaintance & Baker, 1914: 102.]

Aleurodes citricola Newstead, 1911: 173. Tanzania. [Synonymised by Silvestri, 1972: 2]

Aleurocanthus spiniferus var. *intermedius* Silvestri, 1927: 2. Chaina. [Synonymised by Mound & Halsey, 1978: 22]

Aleurocanthus rosae Singh, 1931: 79. India, Maharashtra. [Synonymised by Takahashi, 1932: 47]

ชื่อสามัญ : แมลงหวี่ขาวหนามส้ม (orange spiny whitefly)

รูปร่างลักษณะ

ลักษณะดักแด้บนแผ่นสไลด์ (Fig. 6 A-C) ดักแด้มีลักษณะคล้ายกับ ***A. woglumi*** มาก คือ ลำตัวลักษณะกลมรีรูปไข่ ส่วนหัวค่อนข้างแหลม ขอบลำตัวมีลักษณะคล้ายฟันที่เรียงอย่างสม่ำเสมอ เห็นได้ชัดเจน ขอบของรอยหยักมีลักษณะทู่ เป็นแบบ truncate-lobulate ความถี่ของรอยหยักบริเณขอบลำตัวต่อความยาวเส้นรอบตัวเท่ากับ 3-5 รอยต่อความยาว 0.1 มิลลิเมตร ขนยาวลักษณะคล้ายหนามยาวทั่วลำตัว ตรงกลางหลังส่วนนูนของปล้องท้องปล้องที่ 2 และ 3 มีขนแข็งปล้องละ 1 คู่ ขนาดความยาวใกล้เคียงกัน แตกต่างจาก *A. woglumi* ที่ความยาวของเส้นขนสองคู่บริเวณนี้มีขนาดแตกต่างกัน vasiform orifice มีลักษณะคล้ายวงกลม (subcircular) และถูกคลุมโดยฝาปิด และอยู่ติดกับขอบด้านล่างของลำตัวค่อนข้างมาก บริเวณขอบลำตัวพบขนแข็งคล้ายหนาม 11 คู่

ลักษณะที่พบในธรรมชาติ (Fig. 10 C-D) ไข่มีขนาดเล็กประมาณ 0.1- 0.2 มิลลิเมตร สีเหลือง และค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อใกล้ฟัก ลักษณะโค้งมนคล้ายเมล็ดถั่ว ก้านไข่ (stalk) สั้น ใช้สำหรับยึดไข่ติดกับใบพืช มักวางไข่ใต้ใบพืช ตัวอ่อนรูปไข่ มีสีน้ำตาลเข้า-ดำ มีแถบเล็กๆสีขาวล้อมรอบลำตัว ตัวอ่อนวัยที่สองและสามมีขนาดประมาณ 0.4 x 0.3 มิลลิเมตร ขอบสีขาวรอบลำตัวค่อยๆขยายใหญ่ขึ้นเห็นได้ชัดเจน และมีขนแข็งขึ้นปกคลุมทั่วลำตัว ดักแด้รูปไข่ ขนาดประมาณ 1.23 มิลลิเมตรยาว และกว้าง 1.88 มิลลิเมตร มีความโค้งนูนมากขึ้นเห็นได้ชัดเจน ด้านหลังปกคุมด้วยหนาม ทั้งตัวอ่อนและดักแด้มีความคล้ายคลึงกับแมลงหวี่ขาวส้ม *A. Woglumi* มากสังเกตุข้อแตกต่างได้จากขอบขาวรอบลำตัวของแมลงหวี่ขาว *A. Spiniferus* มีขนาดกว้างกว่า *A. Woglumi* สำหรับตัวเต็มวัยของแลงหวี่ขาวทั้งสองชนิดนี้มีความคล้ายคลึงกันมากจนไม่สามารถแยกด้วยตาเปล่าได้

ความสำคัญและพืชอาหาร

พบดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบส้ม มะนาว มะกรูด ส้มโอ Peterson (1995) รายงานใน กุหลาบ องุ่น ท้อ แพร์ และฝรั่ง

เขตการแพร่กระจาย

ประเทศไทย (เพชรบุรี) Nguyen et al. (1993) รายงานว่าแมลงหวี่ขาวหนามส้มได้แพร่กระจายไปยังแอฟริกา, ออสเตรเลีย, แคริบเบียนและหมู่เกาะแปซิฟิก และในหมู่เกาะแคริบเบียน Gowdey (1922) รายงานในจาไมก้า

แมลงหวี่ขาวหนามส้ม เป็นศัตรูพืชพื้นถิ่นของส้มในประเทศแถบภูมิภาคเอเชีย วงจรชีวิตประกอบด้วย 6 ช่วงการเจริญเติบโต คือ ระยะไข่ ระยะตัวอ่อน (วัย1-3) ระยะดักแด้ และระยะตัวเต็มวัย จากการศึกษาของ Kuwana et al. (1927) พบว่า แมลงหวี่ขาวชนิดนี้สามารถขยายพันธ์ได้ 4 รุ่นใน 1 ปี ในขณะที่ Peterson (1955) รายงานว่าสามารถขยายพันธ์ได้ 5-6 รุ่นใน 1 ปี ปัจจัยสภาพอากาศมีอิทธิพลอย่างมากต่อจำนวนประชากรและระยะเวลาการเจริญเติบโตของแต่ละวัยในช่วงวงจรชีวิต การ

สร้างความเสียหายต่อพืชนอกจากเกิดจากการดูดน้ำเลี้ยงทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโตแล้ว ผลกระทบทางอ้อมคือ การถ่ายมูลหวานของแมลงหวี่ขาวทำให้ราดำเจริญเติบโตคลุมพื้นผิวใบ พืชไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ทำให้ผลผลิตของพืชลดลง

สกุล *Aleurolobus* Quaintance & Baker

Aleurolobus Quaintance & Baker, 1914: 108-109. Type species: *Aleurodes marlatti* Quaintance, 1903: 61-63, by original designation; Martin & Mound, 2007: 13

Neoaleurolobus Takahashi, 1951: 5 Type species: Aleurolobus musae, by monotype

Rositaleyrodes Meganathan & David, 1994: 48. Type species: Aleurolobus oplismeni, by monotype. [Synonymised by Manzari & Quicke, 2006: 2471]

3. *Aleurolobus barodensis* (Maskell, 1896) (Fig. 7, 10 E-H)

Aleurodes barodensis Maskell, 1895: 424-425. India, Gujarat. [Quaintance & Baker 1914: 109] ; Martin & Mound, 2007: 13

Aleurodes longicornis Zehntner 1897: 381. Java [Synonymised by Quaintance & Baker 1917: 359]

ชื่อสามัญ แมลงหวี่ขาวอ้อย : sugarcane whitefly, sugarcane, mealywing, whitefly

รูปร่างลักษณะ

ลักษณะดักแด้บนแผ่นสไลด์ (ภาพที่ 7 A-D) ลำตัวเรียวยาวรีรูปไข่ ลักษณะเด่นชัดของดักแด้แมลงหวี่ขาวชนิดนี้คือ บริเวณขอบลำตัวกว้างแยกออกจากส่วนของแผ่นกลมบนหลังชัดเจน ขอบลำตัวเป็นแบบ crenate มีลักษณะเป็นลอนตื้นส่วนปลายโค้งมน พบขนเล็ก ๆ ด้านในขอบลำตัว อยู่ใกล้กับรอยพับตรง subdorsum ขอบและท่ออากาศบริเวณอกเปิดออก มีการดัดแปลงไปเป็นซี่ๆคล้ายหวี submargin เป็นรอยพับจีบเล็กๆ abdominal depression ปรากฏชัดเจนตั้งแต่ปล้องท้องที่ 1 ถึง 7 ปล้องละ 1 คู่ และ vasiform orifice มีลักษณะคล้ายรูปหัวใจค่อนข้างยาว ฝาปิดปกคลุมลิ้นไว้บางส่วน ส่วนท้ายของลำตัวถัดจากลิ้นมีลักษณะเป็นรอนย่น

ลักษณะที่พบในธรรมชาติ (ภาพที่ 10 E-H) **ไข่**เป็นรูปสามเหลี่ยมหน้าจั่ว สีเหลือง มักวางเป็นแถวตรงติด ๆ กันใต้ใบพืช ตั้งแต่ 1-120 ฟอง ส่วนใหญ่พบ 2-20 ฟองต่อแถว เฉลี่ยแถวละ 17 ฟอง ขนาดประมาณ 0.1 x 0.2 มิลลิเมตร ระยะไข่ 8-10 วัน ตัวอ่อนออกจากไข่ใหม่ ๆ สีขาวใส เดินอยู่ตามใต้ใบ ตัวอ่อนจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีดำภายใน 40-60 นาที แล้วก็หยุดอยู่กับที่และใช้ปากดูดกินน้ำเลี้ยงใต้ใบพืช ตัวอ่อนมีการลอกคราบ 4 ครั้งจึงเข้าดักแด้ การลอกคราบแต่ละครั้งใช้เวลา 7-10 นาที หลังจากลอกคราบครั้งที่ 1 จนถึงระยะดักแด้มีรูปร่างคล้ายเกล็ดเพลี้ยหอย รอบ ๆ ตัวตามขอบจะล้อมรอบด้วยเส้นใยสีขาว ซึ่งเรียงติดกันเป็นแผ่นตลอดลำตัว ฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ มีขนาดเฉลี่ย 0.23 x 0.38 มิลลิเมตร ตัวอ่อนวัยที่ 4 มีขนาดประมาณ 1.0 x 2.0 มิลลิเมตร ในการลอกคราบแต่ละครั้งตัว

อ่อนจะเริ่มจากสีขาวใสลำตัวอ่อนนุ่มแล้วจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีดำ ผงขาวคล้ายแป้งทางด้านบนของลำตัวจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามวัย และจะมีมากที่สุดเมื่อเข้าดักแด้ รวมระยะเวลาของตัวอ่อนจากวัย 1 ถึงวัย 3 ใช้เวลา 10-12 วัน ส่วนวัย 4 รวมกับระยะดักแด้ใช้เวลา 9-10 วัน ดักแด้มีรูปร่างคล้ายระยะตัวอ่อน เปลือกแข็ง และเห็นเส้นสีขาวใสรอบ ๆ ตัวเด่นชัด ขนาดประมาณ 1.2 x 2.5 มิลลิเมตร ตัวเต็มวัยขนาดเล็ก ปีกบางใส 2 คู่ และคลุมเลยส่วนท้องออกไปประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ตาสีแดง ด้านใต้ส่วนท้องสีเหลือง ด้านบนจากส่วนหัว อก และท้อง เป็นพื้นสีเหลือง แต่มีรอยแต้มสีดำจางตลอดลำตัว เพศเมียใหญ่กว่าเพศผู้คือ ยาวจากหัวถึงของปีกประมาณ 2 มิลลิเมตร ตัวเต็มวัยมีชีวิตอยู่ได้ 2 วัน เคลื่อนไหวช้า บินไม่ไกลและค่อนข้างอ่อนแอ เมื่อตัวเต็มออกจากดักแด้มักเกาะอยู่ตามใต้ใบพืชที่เข้าดักแด้ ตัวเมีย 1 ตัว สามารถวางไข่ได้สูงสุด 120 ฟอง ส่วนใหญ่วางไข่ได้ตั้งแต่ 7-50 ฟอง หรือเฉลี่ย 25 ฟองต่อตัว

ความสำคัญและพืชอาหาร

พบดูดกินน้ำเลี้ยงจากอ้อย มักวางไข่ตามใต้ใบอ้อย ตั้งแต่ใบที่ยังม้วนอยู่ลงมาถึงใบที่ 5 ในกรณีระบาดมากอาจพบอยู่ด้านบนใบด้วย จากรายงานพบว่าแมลงหวี่ขาวชนิดนี้มีพืชอาหารไม่กี่ชนิด โดยพืชทั้งหมดอยู่ในวงศ์ Gramineae (Mound & Halsey.1978)

เขตการแพร่กระจาย

ประเทศไทย (จังหวัดสุพรรณบุรีนครปฐม กาญจนบุรีนครราชสีมา อุดรธานี และเชียงใหม่) จากรายงานของ Mound & Halsey (1978) แมลงหวี่ขาวชนิดนี้มีการแพร่ระบาดในหลายประเทศ เช่น อินเดีย ปากีสถาน ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย และอินโดนีเซีย

สกุล *Bemisia* Quintance & Baker

Bemisia Quintance & Baker 1914: 99. Type species *Aleurodes inconspicua* by original designation; Martin, 1999: 54-55; Martin & Mound, 24

Roucasia Goux, 1940: 45. Type species: *Roucasia ovate*, by monotype. [Synonymised by Danzig, 1964: 326.]

Cortesiana Goux, 1988: 63 Type species *Cortesiana restonicae*, by monotypey. [Synonymised by Martin, 1999: 54.]

4 . *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Fig. 8, 11 A-D)

Aleurodes tabaci Gennadius, 1889: 1. Greece [Takahashi, 1963: 110.]

Aleurodes inconspicua Quaintance, 1900: 28. USA, Florida. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia emiliae Corbett, 1926: 273. Sri Lanka. [Synonymised by Mound & Halsey, 1987: 118.]

Bemisia costalimai Bondar, 1928: 27. Brazil. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia signata Bondar, 1928: 29. Brazil. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia bahiana Bondar, 1928: 30. Brazil. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia gossypiperda Misra & Lamba, 1929: 1. India, Bihar. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia achyranthes Singh, 1931: 82. India, Bihar. [Synonymised with *gossypiperda* by Corbett, 1935: 783.]

Bemisia hibisci Takahashi, 1933: 17. Taiwan. [Synonymised by Takahashi, 1936: 110.]

Bemisia longispina Priesner & Hosny, 1934: 6. Egypt. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia gossypiperda var. *mosaicivectura* Ghesquéire in Mayné & Ghesquiére, 1934: 30. Congo. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia goldingi Corbett, 1935: 249. Nigeria. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia nigeriensis Corbett, 1935: 250. Nigeria. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia rhodesiansis Corbett, 1936: 22. Nigeria. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia manihotis Frappa, 1938: 30. Madagascar. [Synonymised by Takahashi & Mamet, 1952: 125.]

Bemisia vayssierei Frappa, 1939: 255. Madagascar. [Synonymised by Takahashi & Mamet, 1952: 125.]

Bemisia lonicerae Takahashi, 1957: 16, Japan. [Synonymised by Mound & Halsey, 1987: 118.]

Bemisia minima Danzig, 1964: 638. Georgia (Republic of). [Synonymised by Danzig, 1966: 372.]

Bemisia miniscula Danzig, 1964: Georgia (Republic of). [Synonymised by Danzig, 1966: 372.]

Cortesiana restonicae Goux, 1988: 64. Corsica. [Synonymised by Martin, 1999: 59.]

Bemisia argentifolii Bellows & Perring in Belloes, Perring, Gill & Headrick, 1994: 196. USA, California. [Synonymised by De Barro, Trueman & Frohlich, 2005: 201.]

Bemisia tuberculata Bondar, 1923: 123. Brazil.

ชื่อสามัญ แมลงหวี่ขาวยาสูบ : tobacco whitefly, cotton whitefly, sweetpotato whitefly, silverleaf whitefly

รูปร่างลักษณะ

ลักษณะดักแด้บนแผ่นสไลด์ (Fig. 8 A-C) ลำตัวเรียวกลม ส่วนหัวโค้งมน ส่วนท้องเรียวแหลม ขอบของลำตัวหยักเป็นคลื่นเล็กน้อย abdominal tracheal pore กว้างแบ่งขอบและส่วนลำตัวออกชัดเจน โดยปกติปล้องท้องจะปรากฏเห็นชัดเพียง 7 ปล้อง vasiform orifice มีรูปร่างค่อนข้างเป็นรูปสามเหลี่ยมเรียวยาวด้านข้างตรง ขนที่ caudal ยาวหนา และยาวกว่า vesiform orifice ขนที่ dorsum ยาวและปลายขนแหลม พบขนที่บริเวณนี้ 7 คู่ ส่วนด้านท้ายของดักแด้จะพบลักษณะเป็นร่องเล็กๆ (caudal furrow) มีขนาดใกล้เคียงกับ vasiform orifice

ลักษณะที่พบในธรรมชาติ (Fig. 11 A-D) วางไข่ด้านล่างของใบไม้เป็นฟองเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มไม่แน่นอน ไข่มีรูปร่างยาวเรียว มีขนาดเล็กกว่า 0.2 มิลลิเมตร และมีก้านสั้นๆ ยึดไข่ให้ติดกับผิวใบ หลังจากนั้นไข่จะเริ่มเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีน้ำตาล ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนภายใน 6-7 วัน ตัวอ่อนระยะนี้เรียกว่า “Crawler”เมื่อฟักออกมาจะเคลื่อนไหวเพียงเล็กน้อยเพื่อหาบริเวณที่เป็นแหล่งอาหาร และเมื่อหยุดนิ่งจะใช้ปากที่มีลักษณะคล้ายเข็ม (needle-like form) ดูดน้ำเลี้ยงจากพืช จากนั้นตัวอ่อนจะลอกคราบครั้งแรกเข้าสู่ระยะที่ 2 ขายังพัฒนาไม่เต็มที่ ลอกคราบครั้งที่ 2 เพื่อเข้าสู่ระยะที่ 3 ตัวอ่อนจะมีขนาด 0.4-0.8 มิลลิเมตร ลอกคราบครั้งที่ 3 ตัวอ่อนจะมีลักษณะแบนราบติดกับผิวใบ สีเหลืองอมเขียวใส สามารถมองเห็นส่วนต่างๆ ที่อยู่ภายในได้ รวมระยะเป็นตัวอ่อนประมาณ 9 วัน หลังจากลอกคราบครั้งที่ 4 ตัวอ่อนจะมีลักษณะตัวนูนสีเหลืองเข้มขึ้น เรียกว่าระยะก่อนเข้าดักแด้ สังเกตความแตกต่างของระยะก่อนเข้าดักแด้กับระยะเข้าดักแด้โดยระยะเข้าดักแด้จะมีตารวมสีแดง เรียกว่า “red-eyed nymph” ปรากฏให้เห็นชัดเจนและตัวจะนูนมากขึ้น ระยะตัวเต็มวัย ตัวยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร ปีกปกคลุมด้วยผงสีขาว เพศเมียสามารถวางไข่ได้มากกว่า 100 ฟองและมีอายุเฉลี่ย 6.11 วัน ส่วนเพศผู้มีอายุเฉลี่ย 3.35 วัน

ความสำคัญและพืชอาหาร

พบอาศัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบพืช ได้แก่ กะเพรา โหรพา ผักชีฝรั่ง กุหลาบ มะเขือเปราะ ยาสูบ มันฝรั่ง ฝ้าย และพืชตระกูลถั่ว จากรายงานพบว่าแมลงหวี่ขาวชนิดนี้มีพืชอาหารมากกว่า 150 ชนิด อยู่ใน 63 วงศ์ (Mound & Halsey.1978) จัดเป็นแมลงศัตรูพืชที่มีพืชอาหารมากชนิดหนึ่ง โดยทั่วไปแมลงชนิดนี้นอกจากจะสร้างความเสียหายโดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบพืชแล้ว ยังเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสเข้าสู่พืชมากกว่า 100 ชนิด เช่น โรค Cassava mosaic (CMD) และโรค Cassava Mosaic Geminiviruses (CMGs) ที่เกิดจากพืชได้รับเชื้อไวรัส เป็นต้น

เขตการแพร่กระจาย

ประเทศไทย (พบแพร่กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย) และจากรายงานของ Mound & Halsey (1978) พบว่า แมลงหวี่ขาวชนิดนี้มีการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในหลายประเทศ เช่น แถบภูมิภาคพาเลอาคติก –อังกฤษ สเปน โมร็อกโค อียิปต์ ไซปรัส อิสราเอล จอร์แดน ซาอุดิอาราเบีย อิหร่าน รัสเซีย และญี่ปุ่น แถบภูมิภาคเอธิโอเปีย – แกมเบีย ไอเวอรี่ กานา คาเมรูน ซูดาน เอเดน คองโก เคนยา แทนซาเนีย ยูกานดา และแองโกลา แถบภูมิภาคมาดากัสแคน- มาดากัสการ์ เมอร์ริ

เชียส แถบภูมิภาคโอเรียนตอล – ปากีสถาน อินเดีย จีน ไต้หวัน พม่า ศรีลังกา และไทย แถบภูมิภาคออสโต-โอเรียนตอล –มาเลเซีย สิงคโปร์ เกาะสุมาตรา อินโดนีเซีย นิวกีนี และฟิลิปปินส์ แถบภูมิภาคออสเตรลาเซียน – ออสเตรเลีย แถบภูมิภาคแปซิฟิก- ฟิจิ แถบภูมิภาคนีอาร์กติก – สหรัฐอเมริกา แถบภูมิภาคนีโอโทรปิคอล–จาไมก้า บาบาโดส เปอโตริโก้ บราซิลและอาเจนตินา

สกุล *Neomaskellia* Quaintance & Baker

Neomaskellia Quaintance & Baker, 1913: 91. Type species: Aleurodes comate, by monotypy.

5. *Neomaskellia bergii* (Signoret, 1868) (Fig. 9, 11 E-H)

Aleurodes bergii Signoret, 1868: 395. Mauritius. [Quaintance & Baker, 1914: 104.]

Aleurodes sacchari Maskell, 1890: 171. Fiji. [Synonymised by Quaintance & Baker, 1914: 104.]

Aleurodes comata Maskell, 1896: 426. [Synonymised by Martin, 1999: 85.]

ชื่อสามัญ แมลงหวี่ขาวอ้อยปีกลาย (sugarcane Whitefly)

รูปร่างลักษณะ

ลักษณะดักแด้บนแผ่นสไลด์ (ภาพที่ 9 A-C) ลำตัวลักษณะกลมรีรูปไข่ ส่วนหัวและส่วยท้ายมน ความยาวของลำตัวประมาณ 1.5 เท่าของความกว้างลำตัว ขอบลำตัวมีลักษณะคล้ายฟันขนาดเล็กที่เรียงอย่างสม่ำเสมอ เส้นขนยาวบริเวณหัว 1 คู่ ท้องปล้องแรก ใกล้กับโคนขาคู่ที่สามพบขนสั้น 1 คู่ vasiform orifice มีลักษณะคล้ายวงกลม (subcircular) และถูกคลุมโดยฝาปิด พบขนยาวด้านข้างของ vasiform orifice 1 คู่ บริเวณขอบลำตัวพบขนยาว 16 คู่

ลักษณะที่พบในธรรมชาติ (ภาพที่ 11 E-H) เพศเมียมักวางไข่เป็นวงใต้ใบพืชหรือบางครั้งอาจพบวางไข่กระจายทั่วใบพืช ไข่มีขนาดเล็กลักษณะเป็นวงรีสีเหลืองและค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อใกล้ฟัก ตัวอ่อนระยะแรกมีสีเหลืองอ่อน รูปร่างแบน ลำตัวค่อนข้างเรียวมน มีขอบสีขาวข้างลำตัว ตัวอ่อนวัย 2 และ 3 ลำตัวหนาขึ้นมองเห็นขอบด้านข้างลำตัวชัดเจน ด้านบนมีขอบสีขาวล้อมรอบ กลางลำตัว มีแถบสีน้ำตาลอ่อน บริเวณส่วนท้ายลำตัวมีจุดกลมสีน้ำตาลเข้ม ระยะนี้สามารถมองเห็นขนขนาดเล็กรอบลำตัว เมื่อเข้าสู่ระยะดักแด้จะมีสีเข้มขึ้นและขอบรอบลำตัวมีแถบสีขาวปกคลุมมากขึ้น คัวเต็มวัยลำตัวสีเหลืองอ่อน หัวสีดำ ปีกมีสีเหลืองสลับสีดำ ท้องปล้งสุดท้ายสีน้ำตาลเข้ม เพศเมียมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้สองเท่า เพศผู้ลำตัวสีเหลืองเข้ม-สีส้มอ่อนๆ

ความสำคัญและพืชอาศัย

พบอาศัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบอ้อย แมลงหวี่ขาวชนิดนี้เป็นศัตรูสำคัญของอ้อย (Takahashi, 1956; Mound & Halseyม 1978)

เขตการแพร่กระจาย

ประเทศไทย (นครราชสีมา) พบแพร่กระจายในเขตร้อน และกึ่งร้อน (Takahashi, 1956; Mound & Halseyม 1978) Kurosut (1992) รายงานในใต้หวัน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาอนุกรมวิธานแมลงหวี่ขาว วงศ์ย่อย Aleyrodinae ในแหล่งปลูกพืชทั่วไป ทั้งพื้นที่เกษตร และพื้นที่ป่า ทั่วประเทศไทย ผลการตรวจจำแนกชนิด โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยตามหลักอนุกรมวิธานแมลง รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างแมลงหวี่ขาวที่มีในพิพิธภัณฑ์แมลงของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างแมลงหวี่ขาว วงศ์ย่อย Aleyrodinae จำนวน 235 ตัวอย่าง สามารถวิเคราะห์ชนิด ได้ 5 ชนิด ได้แก่ แมลงหวี่ขาวส้ม, *Aleurocanthus woglumi* Ashby จำนวน 16 ตัวอย่าง เป็นศัตรูสำคัญของพืชสกุลส้ม; แมลงหวี่ขาวหนามส้ม, *Aleurocanthus spiniferus* Quaintance จำนวน 15 ตัวอย่าง เป็นศัตรูสำคัญของพืชสกุลส้ม; แมลงหวี่ขาวอ้อย, *Aleurolobus barodensis* (Maskell) จำนวน 50 ตัวอย่าง เป็นศัตรูสำคัญของอ้อย; แมลงหวี่ขาวยาสูบ, จำนวน 118 ตัวอย่าง พบแพร่กระจายทั่วประเทศ และเป็นศัตรูสำคัญของพืชหลากหลายชนิด และแมลงหวี่ขาวอ้อยปีกลาย, *Neomaskellia bergii* (Singnoret) จำนวน 36 ตัวอย่าง เป็นศัตรูสำคัญของอ้อย ตัวอย่างแมลงหวี่ขาวที่ได้จากการสำรวจ เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลงกรมวิชาการเกษตร เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง พร้อมจัดทำฐานข้อมูล นำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาด้านอื่นๆ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืชเพื่อประกอบในงานสำคัญด้านการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร

เอกสารอ้างอิง

ณัฐกฤต พิทักษ์ และ อนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ. 2544. แมลงศัตรูอ้อยโรงงาน อ้อยค้ยว อ้อยน้ำคั้น และการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูข้าวโพดและพืชไร่อื่นๆ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 102 หน้า

สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2526. แมลงศัตรูพืชทางการเกษตรของประเทศไทย. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ กรุงเทพฯ. 424 หน้า.

สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี. 2550” แมลงหวี่ขาว. *ใน* เอกสารวิชาการ ประกอบการอบรมหลักสูตร การเก็บและจำแนกตัวอย่างแมลงจำพวกปากดูดและไรศัตรูพืชนำเข้าและส่งออก. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 24 หน้า

สุนัดดา เชาวลิต. 2554. แมลงหวี่ขาว *ใน* แมลงปากดูด ชนิดที่สำคัญของประเทศไทย. กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพ. หน้า 65-83

สุนัดดา เชาวลิต. 2556. การเก็บตัวอย่างและการจำแนกแมลงหวี่ขาว. *ใน* เอกสารประกอบการอบรมหลักสูตร การเก็บและจำแนกตัวอย่างแมลงจำพวกปากดูด ศัตรูสำคัญของพืชนำเข้าและส่งออก ครั้งที่ 4. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพ. 34 หน้า

Ashby, S. F. 1915. Notes on diseases of cultivated crops observed in 1913 – 1914. *Bull. Dep. Agric.* Jamaica 2 : 299 – 327.

Corbett, G. H. 1935. Three new aleurodids (Hem.). *Stylops* 4 : 8 – 10.

Gennadius, P. 1889. Disease of tobacco plantations in the Trikonia. The aleurodid of tobacco. [In Greek]. *Ellenike Georgia* 5 : 1 – 3.

Goux, L. 1987. Aleurodes de France-VII. Description de deux espe'ces nouvelles constituant des genres nouveaux. *Bulletin de la Socie'te' Linn e'enne de Provence 39: 63-66*

Gowdey CC, 1922. Annual Report of the Government Entomologist. Review of Applied Entomology 11:3, 1923.

Hutacharern, C. *et. al.* 2007. Checklists of Insects and Mites in Thailand. Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation Ministry of Natural Resources and environment. 77-80.

Kurosut U., 1992. Parenta lCare of the Whitefi yNeomtzskeli ibaergii (Homoptera) .lpn .J. Ent. ,60 (2):396-400.

Kuwana I, Ishii T. 1927. On *Prospaltella smithi* Silv., and *Cryptognatha* sp., the enemies of *Aleurocanthus spiniferus* Quaintance, imported from Canton, China. Review of Applied Entomology 15: 463.

Martin, J. H. 1987. An Identification Guide to Common Whitefly Pest Species of the World (Homoptera: Aleyrodidae). *Tropical Pest Management*. 33(4) : 298-322.

Martin, J. H. 1999. The Whitefly fauna of Australia (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). A taxonomic account and identification guide. CSIRO Entomology Technical Paper No. 38, CSIRO, Melbourne, 197pp

Martin, J.H. 2001. Description of an invasive new species of Neotropical aleurodicine whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) - a case of complete or partial misidentification. *Bulletin of Entomological Research* 91: 101-107

Martin, J. H. 2003. Whiteflies (Hemiptera : Aleyrodidae)- their systematic history and the resulting problems of conventional taxonomy, with special reference to descriptions of *Aleyrodes proletella* (Linnaeus, 1758) and *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) Entomologist ' s Gazette 54 : 125-136.

Martin, J.H. 2004. Witeflies of Belize (Hemiptera : Aleyrodidae). Part 1- introduction and account of the subfamily Aleurodicinae Quaintance & Baker. Zootaxa 618: 18

Martin, J.H. & Mound, L. A. 2007. An annotated check list of the world's whiteflies (Insecta: Hemiptera: Aleyrodidae). Zootaxa. 1492: 49-50

Maskell, W. M. 1895. Contributions towards a monograph of the Aleurodidae, a family of Hemiptera – Homoptera. *Trans. Proc. N.Z. Inst.* 28 : 411 – 449.

Mound, L.A. and Halsey , S.H. 1978. Whitefly of the World; A systemic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with Host Plant and natural Enemy Data. Britsh Museum (Natural History) and John Wiley&Sons. Chichester. 340 pp.

Nguyen R, Sailer RI, Hamon AB. 1993. Catalog of Aleyrodidae on Citrus and their Natural Enemies (Homoptera-Aleyrodidae). Florida Department of Agriculture & Consumer Services, Division of Plant Industry. Occasional papers of the Florida State Collection of Arthopods. Contribution No. 730, Bureau of Entomology.

Ohno, I. 1992. Whiteflies Problem in the United States of America. JAPAN Pesticide Information no. 60 : 19-20.

Quaintance, A. L. and Baker, A. C. 1914. Classification of the Aleyrodidae Part II. *Tech. Ser. Bur. Ent. U. S.* 27 : 95 – 109.

Quaintance, A. L. and Baker, A. C. 1915. Classification of the Aleyrodidae – Contents and Index. *Tech. Ser. Bur. Ent. U.S.* 27 : 111 – 114.

Peterson GD. 1955. Biological control of the orange spiny whitefly. Guam Journal of Economic Entomology 48: 681-683.

Watson, G. W. 2007. Identification of whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae). APEC Re-entry Workshop on Whiteflies and Mealybugs, Institute of Biological Sciences, Universiti Malaya Kuala Lumpur, Malaysia. 64 pp.

Takahashi, R. 1935. Notes on the Aleyrodidae of Japan (Homoptera) III. (With Formosan Species). *Kontyu* 9 : 279 – 283.

Takahashi, R. 1936. Some Aleyrodidae, Aphididae, Coccidae (Homoptera) and Thysanoptera form Micronesia. *Tenthredo* 1: 109-120.

Zehntner, L. 1897. Mededeelingen uit en voor de Praktijk. Voorloopige Mededeeling over Ees Luizenplaag. Meded. V. H. Proefstation Oost. Java en Archief Java Suikerindustrie 5 : 381

ภาคผนวก

Table 1. Data of whitefly subfamily Aleyrodinae in Thailand

Scientific name	Common name	Host	Distribution	Number Of specimens
Aleurocanthus woglumi Ashby	citrus blackfly	citrus, pommelo, common lime, mango, bamboo, avocado and west indian jasmine	Bangkok, Phetchaburi, Tak, Uthai Thani, Kamphaeng Phet and Chiang Mai	16
Aleurocanthus spiniferus Quaintance	orange spiny whitefly	citrus, pommelo, common lime and leech lime	Phetchaburi	15
Aleurolobus barodensis (Maskell)	sugarcane whitefly	sugarcane	Suphan buri, Nakhon Pathom, Kanchanaburi, Nakhon Ratchasima, Udon Thani and Chiang Mai	40
Bemisia tabaci (Gennadius)	tobacco whitefly	Holy basil, Sweet Basil, culantro, rose, tobacco, potato, cotton, Solanum, Cucumber, and Soybean	Bangkok, Rayong, Sa Kaeo, Chachoengsao, Prachin Buri, Buri Ram, Surin, Nakhon Ratchasima, Nakhon Phanom	118
Neomaskellia bergii (Singnoret)	sugarcane whitefly	sugarcane	Nakhon Ratchasima, Prachuap Khiri Khan, Kalasin and Roi Et	36

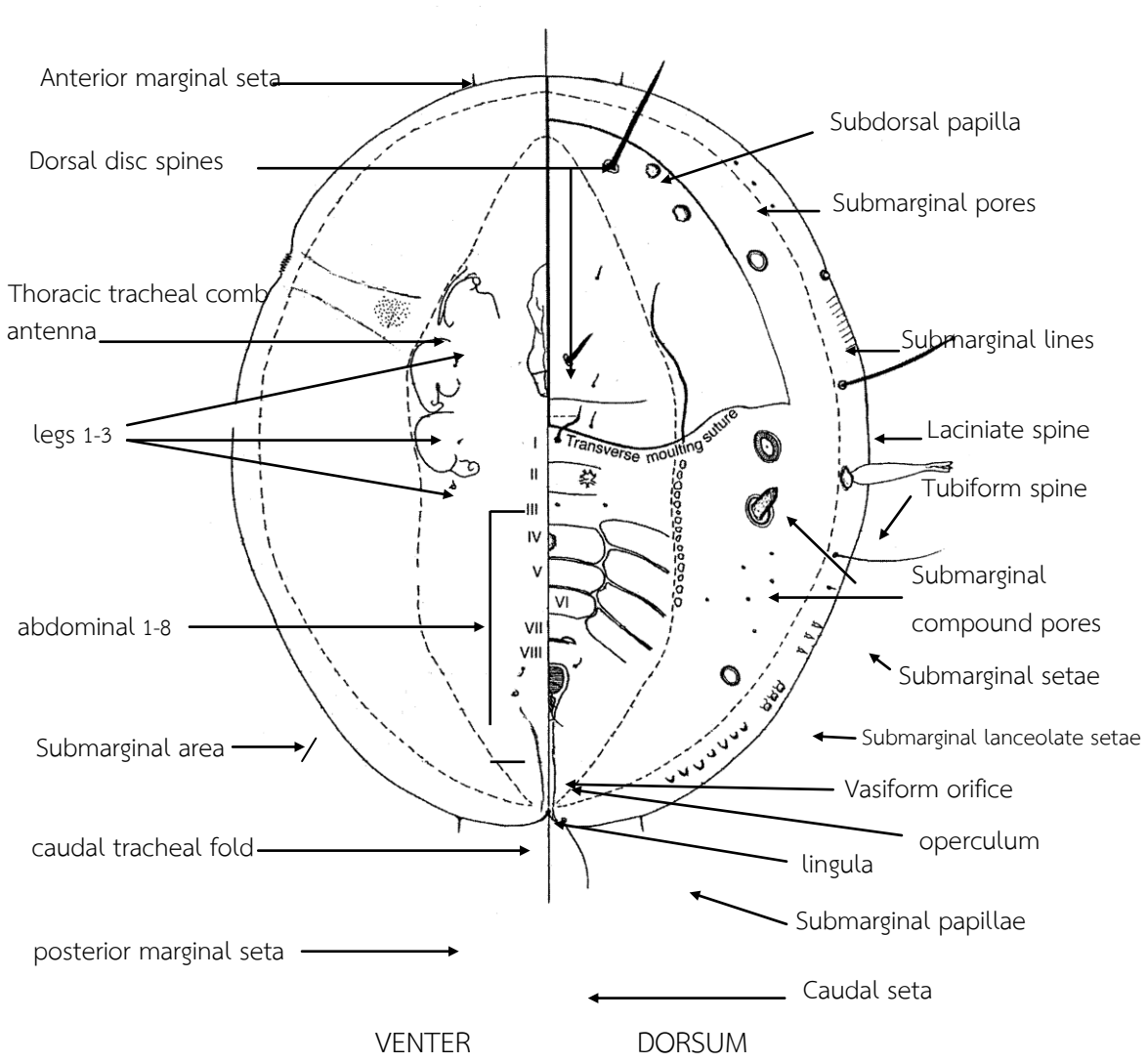


Figure 1 General morphology of whitefly pupal case (Martin, 1999)

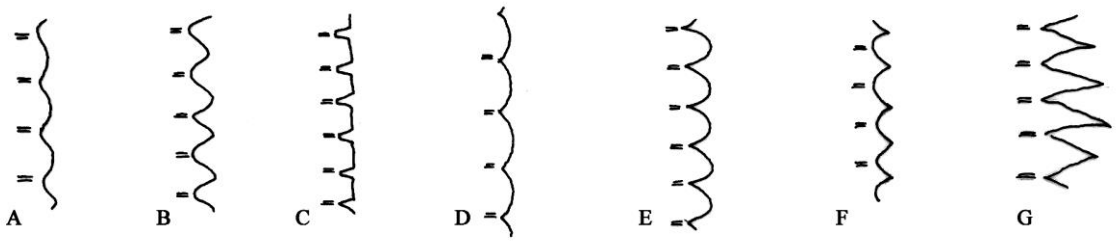


Figure 2 Submarginal character of whitefly (Somchai, 2550)

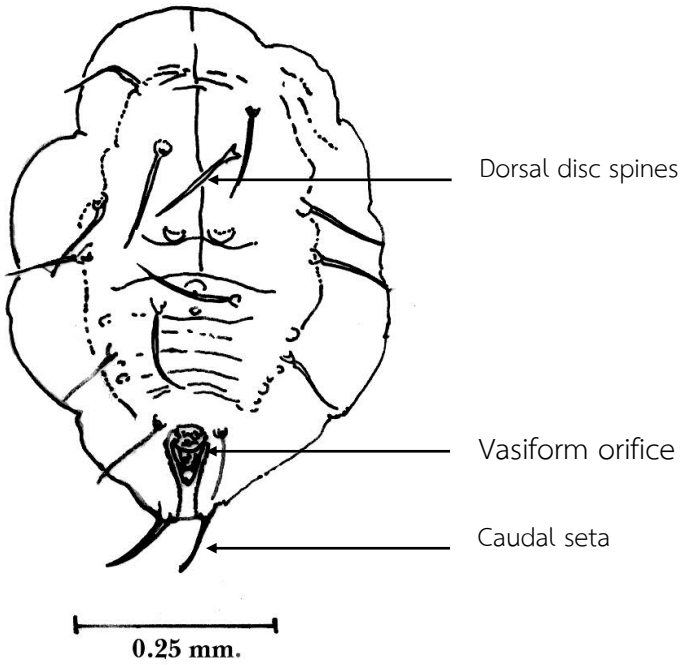


Figure 3 General morphology of Subfamily Aleyrodinae (Martin, 1987)

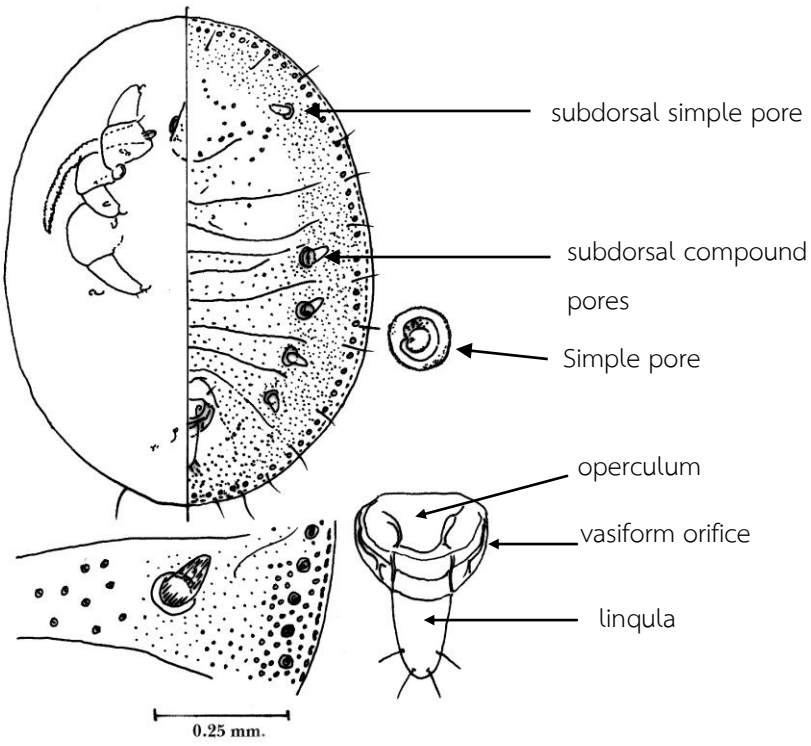
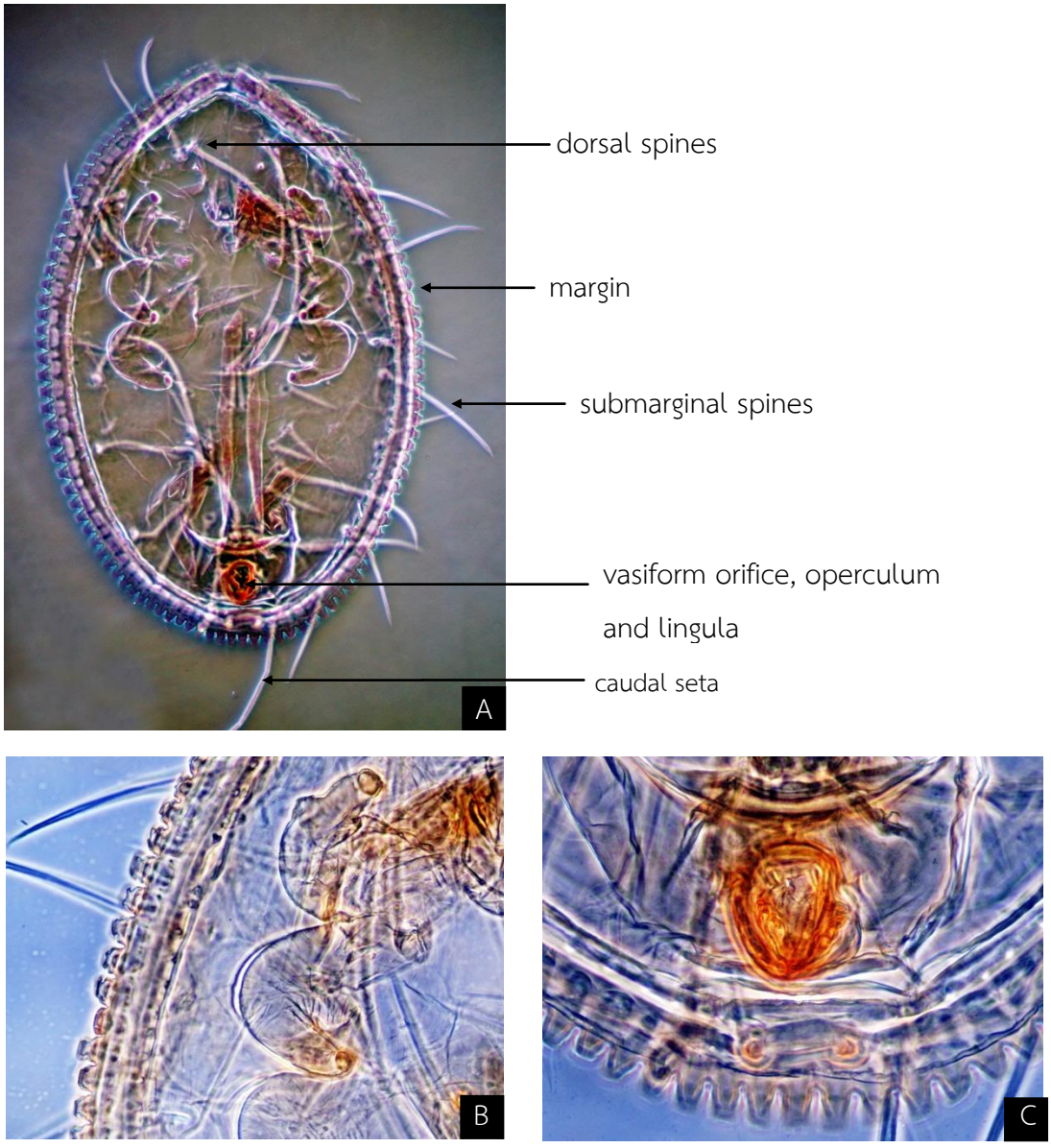


Figure 4 General morphology of Subfamily Subfamily Aleurodicinae (Martin, 1987)



b

Figure 5 *Aleurocanthus woglumi*

A. *A. woglumi*, puparium with detail (10x)

B. margin (40x)

C. vasiform orifice, operculum และ lingual (40x)

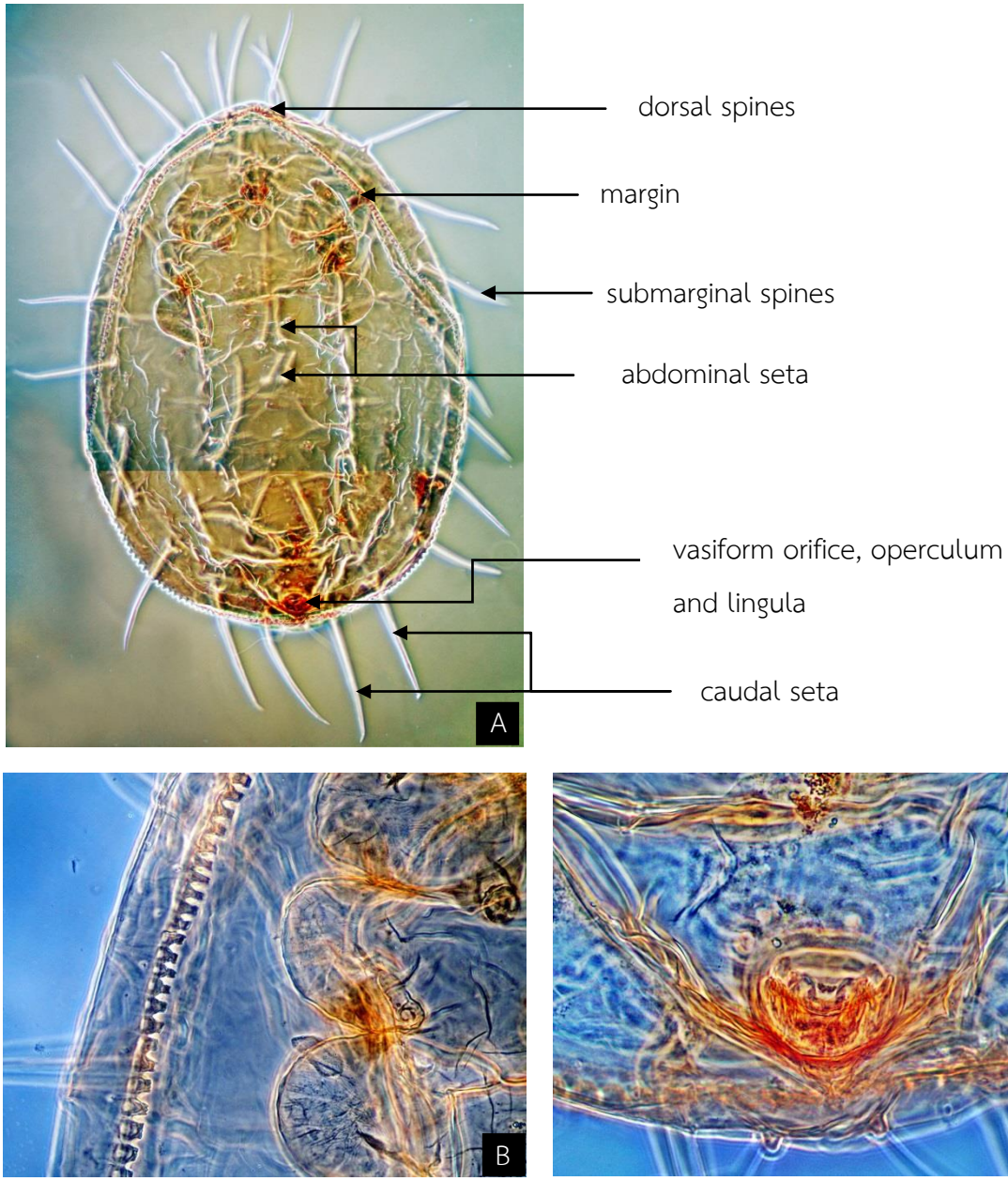


Figure 6 *Aleurocanthus spiniferus* Quaintance

ก. *A. spiniferu*, puparium with detail (10x)

ข. margin (40x)

ค. vasiform orifice, operculum และ lingual (40x)

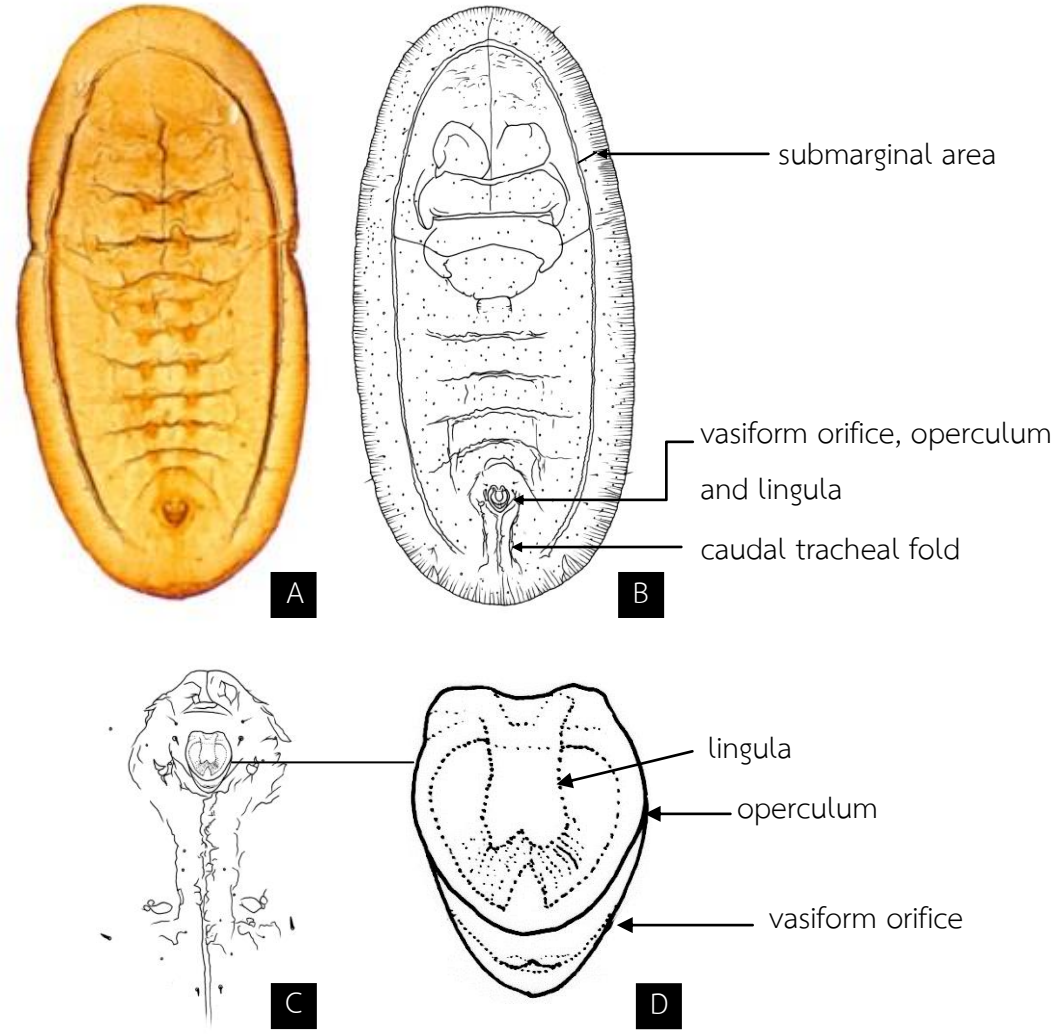


Figure 7 *Aleurolobus barodensis* (Maskell)

A., B. *A. spiniferu*, puparium with detail (10x)

C. caudal tracheal fold (20x)

D. vasiform orifice, operculum and lingual (20x)

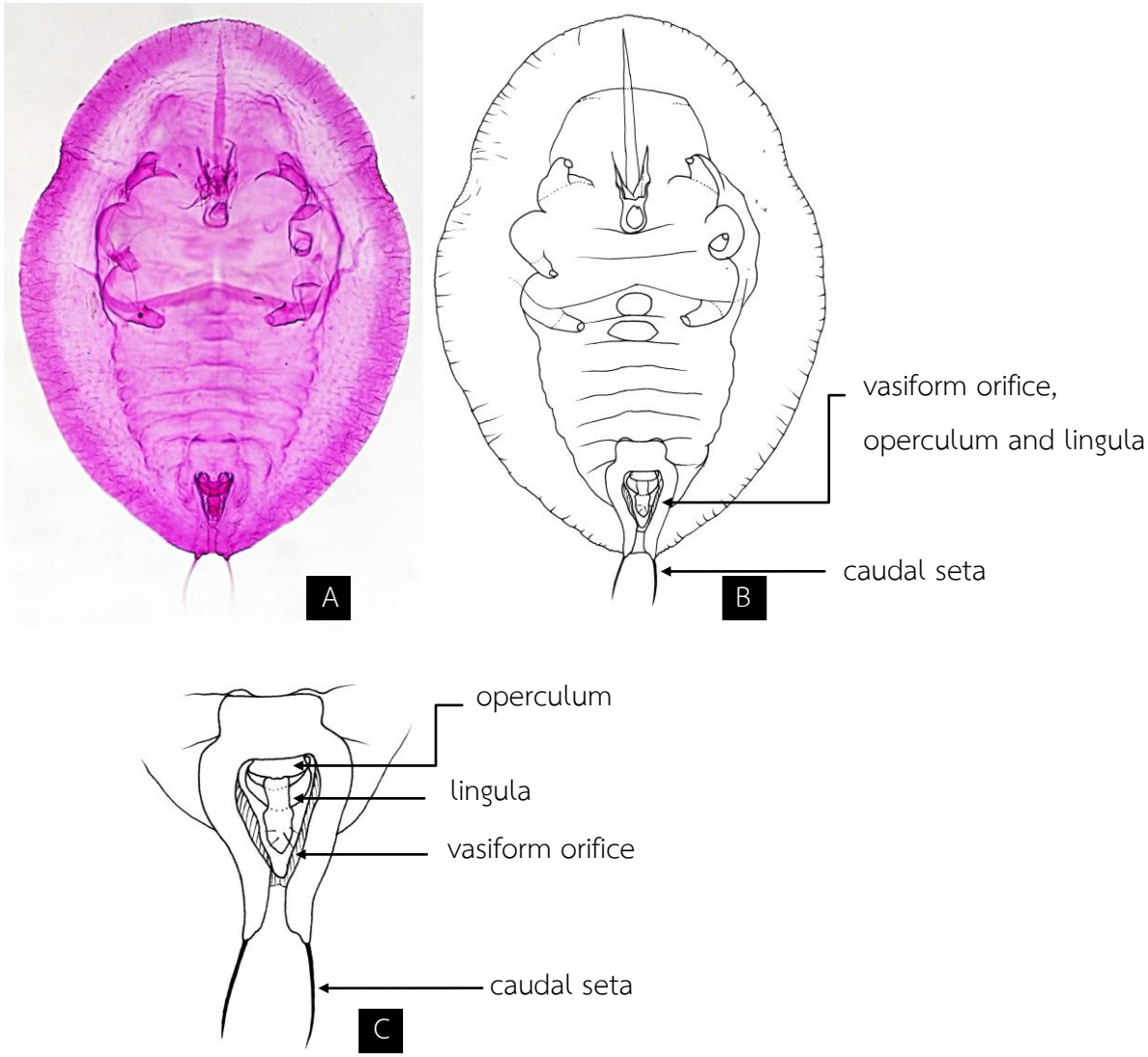
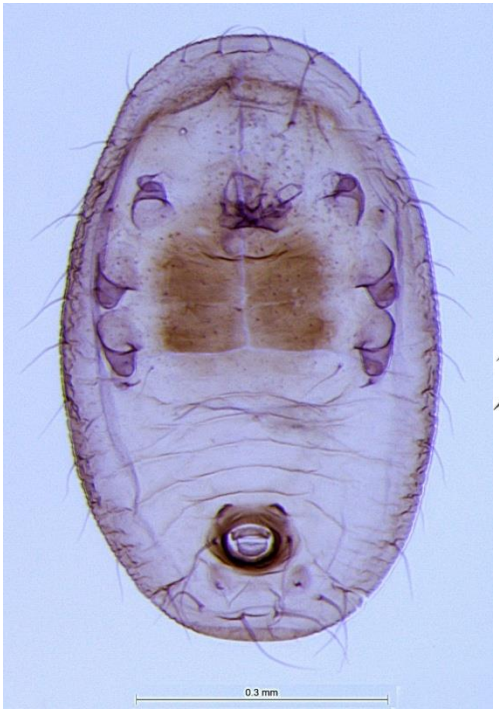


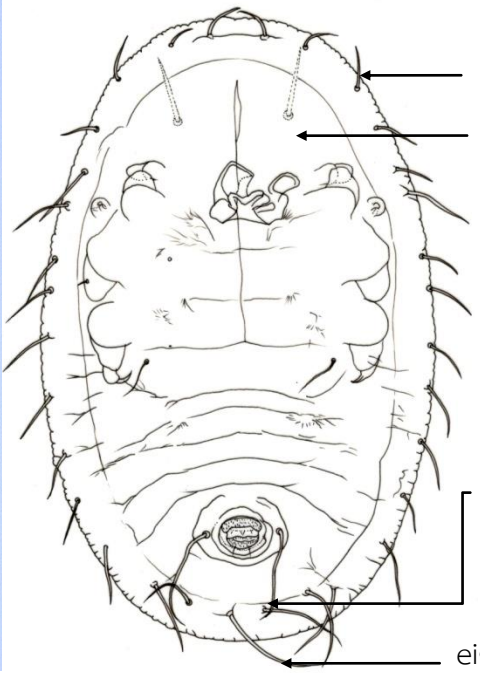
Figure 8 *Bemisia tabaci* (Gennadius)

A., B. *B. tabaci* puparium with detail (10x)

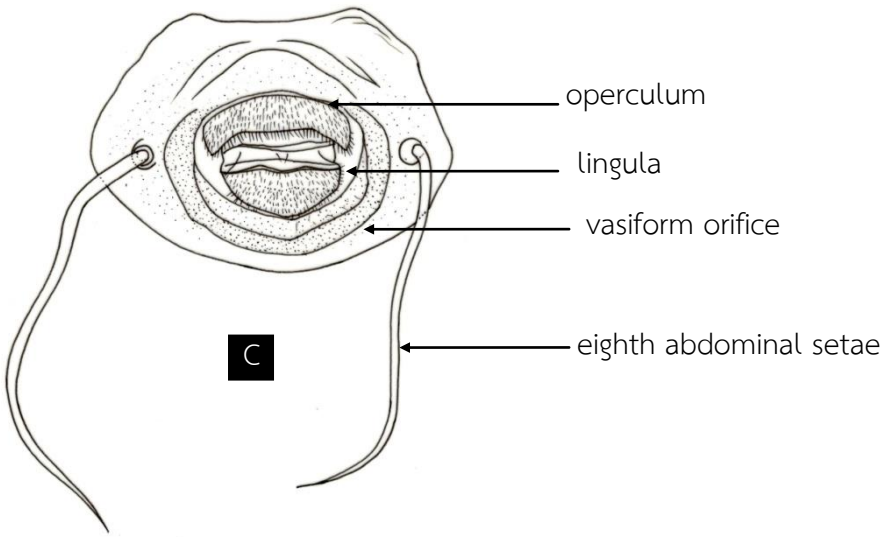
C. vasiform orifice, operculum และ lingula



A



B



C

Figure 9 *Neomaskellia bergii* Signoret

A. B., *N. bergii* puparium with detail (10x)

C. vasiform orifice, operculum และ lingula

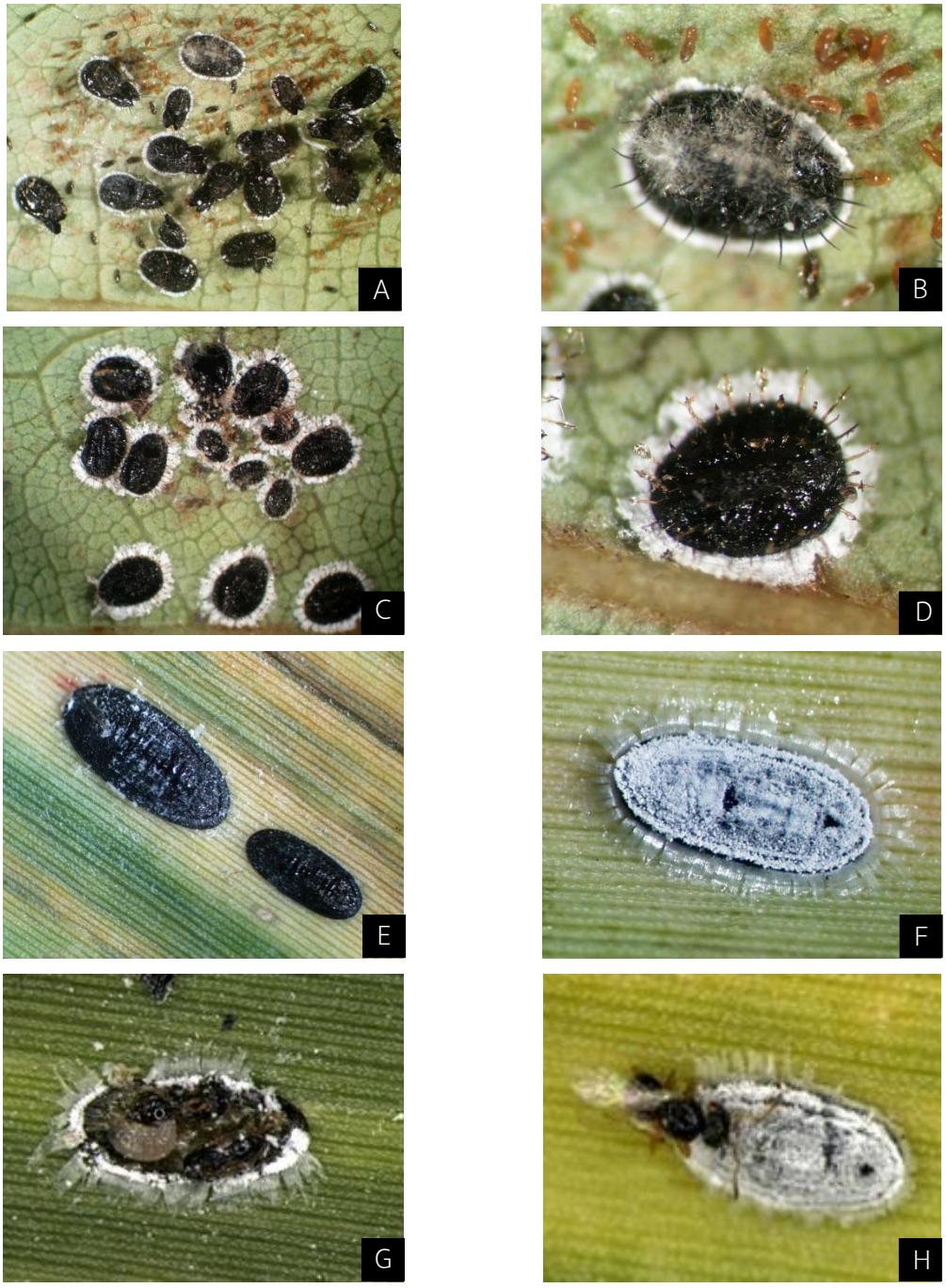


Figure 10 Habitus photographs of whitefly

A. B. *Aleurocanthus woglumi* Ashby

C. D. *Aleurocanthus spiniferus* Quaintance

E. F. *Aleurolobus barodensis* (Maskell)

G. H. *A. barodensis* paraside

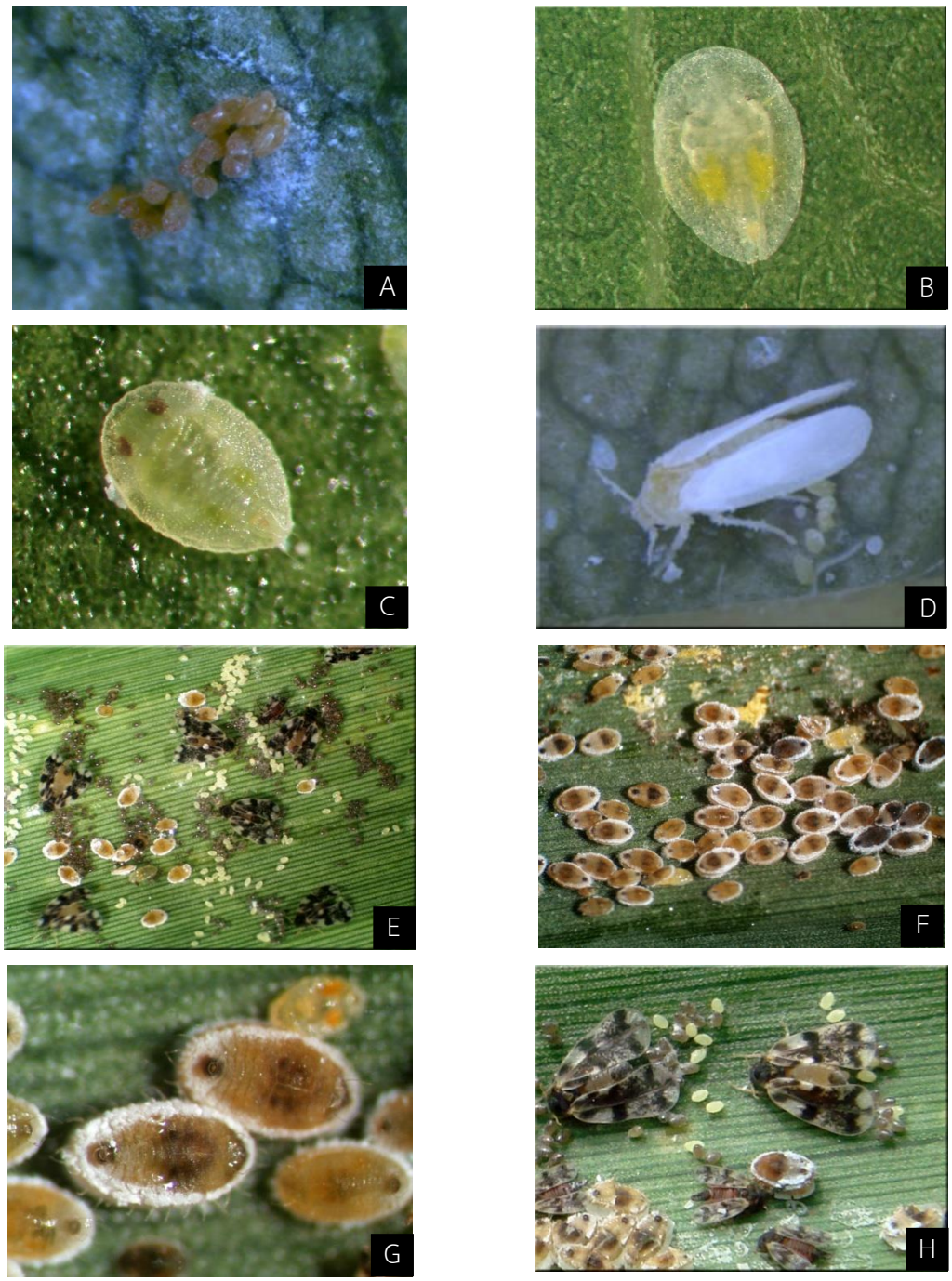


Figure 11 Habitus photographs of whitefly

A- D. *Bemisia tabaci* (Gennadius), A. egg, B. Larva, C. puparium, D. adult

C- H. *Neomaskellia bergii* Signoret, E. egg, F. Larva, G. puparium, H. adult

อนุกรมวิธานเพลี้ยไฟ สกุล *Haplothrips*

Taxonomy of Thrips in Genus *Haplothrips*

เกศสุดา สนศิริ สุนัดดา เชาวลิต ชมัยพร บัวมาศ
อิทธิพล บรรณาการ สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาอนุกรมวิธานเพลี้ยไฟสกุล *Haplothrips* ให้ทราบชนิด พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจาย เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับงานศึกษาวิจัย การวินิจฉัยชนิดแมลงศัตรูพืช รวมถึงการจัดทำรายชื่อแมลงศัตรูพืช ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2555 ถึงเดือนกันยายน 2557 โดยสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างในพื้นที่เกษตรและพื้นที่ป่าของประเทศ นำตัวอย่างที่สำรวจได้นำมาจัดรูปร่างและทำสไลด์ถาวร จำแนกชนิด และวิเคราะห์ชนิดตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Compound microscope และ Stereo microscope ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟทั้งหมด 525 ตัวอย่าง พบเป็นเพลี้ยไฟในสกุล *Haplothrips* จำนวน 57 ตัวอย่าง พบว่า เป็นเพลี้ยไฟชนิด *Haplothrip gowdeyi* (Franklin, 1908) จำนวน 49 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นศัตรูของข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวบาร์เล่ย์ และ ดาวเรือง พบแพร่กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย และเพลี้ยไฟชนิด *Haplothrips aculeatus* (F.) จำนวน 8 ตัวอย่าง พืชอาหารคือ ข้าวโพด พบที่จังหวัดนครปฐม

คำสำคัญ : อนุกรมวิธาน เพลี้ยไฟ *Haplothrips*

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-26-56

คำนำ

เพลี้ยไฟเป็นศัตรูสำคัญของพืชหลายชนิด ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยสามารถทำลายพืชได้ โดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชในส่วนยอดอ่อน ตาอ่อน ใบ ดอก และผล ทำให้ใบเกิดรอยด่าง สีซีด หรือทำให้ขอบใบแห้ง ตาอ่อนชะงักการเจริญเติบโต เพลี้ยไฟแบ่งเป็น 2 อันดับย่อย (suborder) คือ Terebrantia และTubulifera ซึ่ง Terebrantia แบ่งออกเป็น 7 วงศ์ พวกที่เป็นศัตรูพืชเกือบทั้งหมดอยู่ในวงศ์ Thripidae มีเขตแพร่กระจายทั่วโลก และTubulifera ซึ่งมีเพียง 1 วงศ์ คือ Phlaeothripidea ซึ่งพบว่าบางชนิดเป็นศัตรูของไม้ยืนต้นและไม้พุ่ม โดยทำให้เกิดปุ่มปม บางชนิดลงทำลายพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น เพลี้ยไฟในสกุล *Haplothrips* เป็นเพลี้ยไฟอีกสกุลหนึ่งที่จัดอยู่ในอันดับย่อย Tubulifera เป็นศัตรูพืชที่สำคัญของพืชหลายชนิด เช่น พืชในวงศ์ Poaceae ได้แก่ ข้าว อ้อย ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ฯลฯ และในไม้ดอกในวงศ์ Asteraceae ได้แก่ ดาวเรือง ดาวกระจาย เบญจมาศ เบญจมาศสวน ทานตะวัน เยอรบีรา บานชื่น ฯลฯ (Mound and Minael, 2007) เพลี้ยไฟในสกุล *Haplothrips* มีประมาณ 250 ชนิด เพลี้ยไฟในสกุลนี้ส่วนมากจะทำลายในส่วนดอกของพืช สร้างความเสียหายให้กับพืชโดยการดูดกินโดยตรงและสร้างความเสียหายทางอ้อมจากสิ่งขับถ่ายที่เพลี้ยไฟถ่ายออกมา ซึ่งมีลักษณะคล้ายหยดน้ำเล็กๆ ติดอยู่ตามส่วนต่างๆของพืช หยดน้ำเหล่านี้เมื่อแห้งจะทำให้พืชเกิดรอยตำหนิเป็นจุดดำ (ศิริณี, 2544) การศึกษาอนุกรมวิธานเพลี้ยไฟในสกุล *Haplothrips* นั้น จะได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์อย่างมาก ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการจัดการเพลี้ยไฟในสกุล *Haplothrips* ที่ถูกต้องและเหมาะสมต่อไป

วิธีดำเนินการ

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟจากแหล่งปลูกพืชทั่วไป ทั้งพื้นที่เกษตร และพื้นที่ป่าทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย โดยใช้วิธีการตีหรือเขย่าส่วนของพืชให้เพลี้ยไฟตกลงบนกระดาษขาวที่รองรับ และใช้พู่กันเขี่ยเพลี้ยไฟแต่ละตัวลงในขวดที่บรรจุน้ำยา AGA ซึ่งเป็นส่วนผสมของแอลกอฮอล 60% 10 ส่วน กลีเซอรีน(glycerine) 1 ส่วน และกรดน้ำส้ม(glacial acetic acid) 1 ส่วน รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่มีชีวิตด้วย บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟที่เก็บได้ เช่น พืชที่เก็บ ส่วนของพืชที่เก็บสถานที่เก็บตัวอย่าง พิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ลงในขวดที่ใช้ดองเพลี้ยไฟ นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก นอกจากตัวอย่างเพลี้ยไฟที่ได้จากสภาพธรรมชาติแล้ว มีตัวอย่างเพลี้ยไฟอยู่เดิมในพิพิธภัณฑ์ กรมวิชาการเกษตร ตัวอย่างที่ได้รับจากนักวิชาการ และตัวอย่างจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

2) นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope และนำเพลี้ยไฟบางส่วนไปทำสไลด์ถาวรเพื่อการจำแนกชนิด

วิธีการทำสไลด์ถาวรของเพลี้ยไฟ

- ย้ายตัวอย่างเพลี้ยไฟจากขวดลงเก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 60 % แช่ทิ้งไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง

- ย้ายลงในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) 5% เพื่อทำให้สีของเพลี้ยไฟจางลง เวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างเพลี้ยไฟ เจาะส่วนท้องของเพลี้ยไฟบริเวณต้นขาของขาหลังด้วยเข็มแหลมขนาดเล็ก เพื่อให้ของเหลวภายในออกจากตัวเพลี้ยไฟ

- ย้ายเพลี้ยไฟที่เจาะแล้วลงในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 50 %ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที

- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 60 % อีกครั้ง ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 70 % อีกครั้ง ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 80 % อีกครั้ง ทิ้งไว้ 20 นาที

- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95 % อีกครั้ง ทิ้งไว้ 10 นาที

- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 100 % อีกครั้ง ทิ้งไว้ 5 นาที ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

- ย้ายลงในโคลฟออย (clove oil) เพื่อให้ตัวอย่างของเพลี้ยไฟใส แช่ทิ้งไว้ 20 – 30 นาที

- หยดแคนาดาบัลซัม (Canada balsam) ซึ่งเป็นน้ำยาเมาท์สไลด์ (mounting media) เพียงเล็กน้อยลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ ป้ายเพลี้ยไฟลงในหยดแคนาดาบัลซัมลงบนกึ่งกลางของแผ่นสไลด์แก้ว ค่อยๆคว่ำแผ่นสไลด์ช้าๆ จนกระทั่งจรดแผ่นแก้วปิดสไลด์ รีบพลิกแผ่นสไลด์แก้วให้ด้านแผ่นแก้วปิดสไลด์กลับขึ้นด้านบน นำไปอบให้แห้ง

3) นำสไลด์ที่ผ่านการอบจนแห้งแล้วมาตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง ตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟ ลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกชนิดได้แก่ ลักษณะของปีก การเรียงตัวของเส้นปีก ลักษณะของอวัยวะรับความรู้สึกที่ปล้องหนวด(sense cone) จำนวน sense cone เป็นต้น และจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพลี้ยไฟสกุล *Haplothrips*

4) บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟชนิดต่างๆ ที่สำรวจพบ และข้อมูลอื่นที่สำคัญ ถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงบันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายที่ต้องติดไว้กับสไลด์เพลี้ยไฟแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่พบ และวัน/เดือน/ปีที่ทำสไลด์ถาวร ชื่อน้ำยาที่ใช้เมาท์ (mound) สไลด์

5) จับเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาในกล่องสไลด์ถาวรและเก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล เพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

การบันทึกข้อมูล

บันทึกรายละเอียดของแมลง/ ไร/ หอยศัตรูพืช ส่วนของพืชที่พบตัวอย่าง ลักษณะการทำลาย วัน /เดือน /ปี สถานที่ แหล่งที่พบ พิกัดภูมิศาสตร์(GPS) และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง รวมทั้งบันทึกโดยการถ่ายภาพ

เวลาและสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2555 ถึง เดือนกันยายน 2557

สถานที่ 1. แหล่งปลูกพืชทั่วไป ทั้งพื้นที่เกษตร และพื้นที่ป่า ทั่วทุกภาคของประเทศไทย

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจาร*ณ์ผล*การทดลอง

สำรวจและเก็บรวบรวมเพลี้ยไฟสกุล *Haplothrips* จากแปลงปลูกพืชต่างๆ ได้แก่ ข้าวโพด ข้าว ยาสูบ มะม่วง กะเพรา มะเขือ โหระพา และพริก นครปฐม สุพรรณบุรี กำแพงเพชร ตาก สุโขทัย พิษณุโลก พิจิตร แพร่ เชียงราย ลพบุรี บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี เพชรบุรี ชุมพร สุราษฎร์ธานี ลำพูน เชียงใหม่ พิษณุโลก นครนายก ปราจีนบุรี สระแก้ว จันทบุรี ระยอง ระนอง นครราชสีมา ขอนแก่น อุดรธานี และหนองคาย เก็บรวบรวมเพลี้ยไฟจำนวน 525 ตัวอย่าง นำตัวอย่างเพลี้ยไฟมาจัดรูปร่าง ทำสไลด์ถาวร (Figure 1) อบแห้ง และทำการจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช พบเพลี้ยไฟในสกุล *Haplothrips* จำนวน 57 ตัวอย่าง สามารถจำแนกได้ 2 ชนิด คือ *Haplothrips gowdeyi* (Franklin) (Figure 2) และ *Haplothrips aculeatus* (F.) (Figure 3)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาอนุกรมวิธานเพลี้ยไฟสกุล *Haplothrips* ในแหล่งปลูกพืชทั่วภูมิภาคของประเทศไทย ผลการตรวจสอบจำแนกชนิด โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยตามหลักอนุกรมวิธานแมลง รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีในพิพิธภัณฑ์แมลงของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร สามารถวิเคราะห์ชนิดได้ 2 ชนิด จากจำนวน 525 ตัวอย่าง ได้แก่ เพลี้ยไฟชนิด *Haplothrips gowdeyi (Franklin*, 1908) จำนวน 49 ตัวอย่าง มีพืชอาหาร 8 ชนิด ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวบาร์เล่ย์ พริก มะม่วง ลำไย เยอบีร่า และดาวเรือง พบแพร่กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย และเพลี้ยไฟชนิด *Haplothrips aculeatus* (F.) จำนวน 8 ตัวอย่าง พืชอาหารคือ ข้าวโพด พบที่จังหวัดนครปฐม

เอกสารอ้างอิง

ศิริณี พูนไชยศรี. 2548. แมลง การจำแนกและการเก็บตัวอย่าง. กลุ่มกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

อรุณี วงษ์กอบรัษฎ์. 2543. การจัดทำบัญชีรายชื่อแมลง ไร และสัตว์ศัตรูพืช. เอกสารประกอบการบรรยายพิเศษการประชุมสัมมนา เรื่อง “การจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List) และการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช(Pest Risk Analysis) เพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร” วันที่ 26 กันยายน 2543 ณ โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ.

Abbott, R.T. 1989. Compendium of landshell. Melbourne,Australia : American Malacologist,Inc.

CABI. 2003. Crop Protection Compendium. CAB International. Wallingford, UK.

CABI. 2007. The 2007 Edition of The Crop Protection Compendium. CD-ROM. CAB International, Wallingford, UK. CD-ROM.

Flint, M.L. 1991. Integrated Pest Management for Citrus (Second edition). University of California Statewide Integrated Pest Management Project, Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 3303.

Laws,H.M.1973.The chromosome of some Australian camaenidland snails. Cytologia. 38:p. 229-235

Panha, S. 1996. A Checklist and classification of the terrestrial Pulmonate snails of Thailand. Walkerana. 8 (19): 11-64.

Pholboon, P. 1965. A Host List of The Insects of Thailand. Department of Agriculture. Thailand.

Vaught, K.C. 1989. A classification of the living mollusca. U.S.A. : *American Malacologists*.

Wongsiri, N. 1991. List of Insect, Mite and Other Zoological Pests of Economic Plants in Thailand. Entomology and Zoology Division. Department of Agriculture. Bangkok. Thailand.

ภาคผนวก

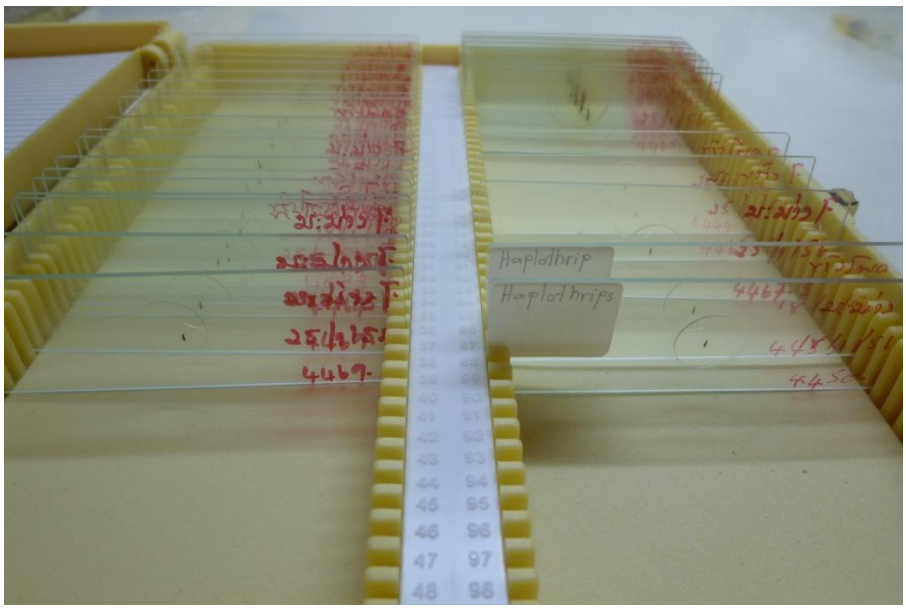


Figure 1 Permanent slide of *Haplothrips*

Figure 2 *Haplothrips gowdeyi* (Franklin)

Figure 3 *Haplothrips aculeatus* (F.)

อนุกรมวิธานมวนปีกแก้วสกุล *Stephanitis* Stål ที่พบในประเทศไทย

Taxonomy of Lace bugs in Genus *Stephanitis* Stål (Hemiptera: Heteroptera, Tingidae) in Thailand

เกศสุดา สนศิริ จารุวัตถ์ แต้กุล สุนัดดา เชาวลิต
ชมัยพร บัวมาศ อิทธิพล บรรณาการ สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

มวนปีกแก้ว (lace bugs) จัดอยู่ในอันดับ Hemiptera อันดับย่อย Heteroptera และวงศ์ Tingidae ประกอบด้วย 250 สกุล จำนวน 2000 ชนิด มวนปีกแก้วในสกุล *Stephanitis* ได้ถูกค้นพบและบรรยายครั้งแรกโดย Stål ในปี คศ. 1873 ปัจจุบันพบจำนวน 68 ชนิด มีเขตการแพร่กระจายทั่วโลก สำหรับในประเทศไทยมีรายงานแล้วว่ามีการค้นพบ 1 ชนิด ได้แก่ *Stephanitis typica* (Distant, 1903) มวนปีกแก้วในสกุลนี้พบเข้าทำลายในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เช่น พืชในวงศ์ปาล์ม (Palmae) กุหลาบ (Rosaceae) ขิง ข่า (Zingiberaceae) กล้วย (Musaceae) กุหลาบพันปี (Ericaceae) และขนุน (Moraceae) เป็นต้น นอกจากนี้มวนในสกุลนี้มีความสำคัญโดยเป็นพาหะนำโรคมาสู่พืช เช่น *Stephanitis typica* (Distant, 1903) เป็นพาหะนำเชื้อไวรัส และไมโครพลาสมาก่อให้เกิดโรครากเหี่ยวในมะพร้าว (coconut root wilt) ทั้งนี้ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน และเขตการแพร่กระจายของมวนในสกุลนี้ วัตถุประสงค์ของการศึกษา เพื่อให้ทราบชนิดพืชอาหาร และเขตการแพร่กระจาย พร้อมจัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิด นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษายังสามารถนำไปใช้ในการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืชและวิเคราะห์ความเสี่ยงแมลงศัตรูพืช ในการนำเข้าและส่งออกผลผลิตทางการเกษตร จากการศึกษาโดยการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างมวนปีกแก้วในสกุลนี้จากแปลงปลูกพืชทั่วภูมิภาคของประเทศไทย ระหว่างเดือน ตุลาคม 2555 ถึง กันยายน 2557 พบมวนปีกแก้วในสกุล *Stephanitis* 2 ชนิด คือ *Stephanitis typica* (Distant, 1903) จำนวน 1,591 ตัวอย่าง มีพืชอาหาร 6 ชนิด ได้แก่ กล้วย มะพร้าว ข่า คล้าน้ำ อบเชย และปทุมมา พบแพร่กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย และ *Stephanitis suffusa* (Distant, 1903) จำนวน 64 ตัวอย่าง มีพืชอาหาร 2 ชนิด ได้แก่ ยอ และอะโวคาโด สำรวจพบในพื้นที่จังหวัดตาก ซึ่ง *Stephanitis suffusa* (Distant, 1903) ถือว่าเป็นมวนปีกแก้วที่พบครั้งแรกในประเทศไทย (new record) ซึ่งได้ทำการบรรยายถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาตลอดถึงเสนอแนวทางการวินิจฉัยจำแนกชนิด(Key to species)ของมวนปีกแก้วในสกุล *Stephanitis* Stål ที่ได้สำรวจพบในการศึกษาครั้งนี้

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-27-56

Abstract

The genus *Stephanitis* (Hemiptera: Heteroptera, Tingidae) was originally described by Stål in 1873, consisting of 4 subgenera: *Stephanitis* Stål, 1873; *Menodora* Hovath,1912; *Norba* Horvath, 1912 and *Omoplax* Horvath, 1912. This lace genus comprises 68 species distributed throughout the world. Only single known species was found in Thailand, *Stephanitis typica* (Distant, 1903). *Stephanitis* is one of the important insect pests in Thailand, feeding on Palmae (palms, coconuts), Rosaceae (roses), Zingiberaceae (gingers), Musaceae (bananas), Ericaceae (rhododendrons) and Moraceae (jackfruits). Considered as a minor pest of coconut foliage, *S. typica* may pose the serious impact as a vector of coconut root wilt disease. The study of species richness and distribution of this genus in Thailand is still unclear. The objective of this study is to gain better insight in the identification at species level as well as distribution of the genus in Thailand. Survey and specimen collecting were carried out from October 2012 – September 2013 from plantation crops across the country. After identification, two known species were found: *Stephanitis typica* (Distant, 1903) in total 1,591 specimens, feeding bananas, coconuts, gingers, water canna, cinanamon tree and siam tulip (throughout the country), and *Stephanitis suffusa* (Distant, 1903) in total 64 specimens, feeding great morinda and avocado, (North). *Stephanitis suffusa* (Distant, 1903) is considered new to the species records of this genus in Thailand. The species descriptions and the key to species are presented.

คำสำคัญ : มวนปีกแก้ว, อนุกรมวิธาน, Tingidae, Heteroptera,

Keywords lace bugs, Tingidae, Heteroptera, Taxonomy

คำนำ

มวนปีกแก้ว (lace bugs) จัดอยู่ในวงศ์ (family) Tingidae (Hemiptera: Heteroptera) ประกอบด้วย 250 สกุล (genus) จำนวน 2000 ชนิด (species) (Stonedahlt *et al.*, 1992) มวนปีกแก้วในสกุล *Stephanitis* เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญชนิดหนึ่ง ได้ถูกค้นพบและบรรยายครั้งแรกโดย Stål ในปี คศ. 1873 ประกอบด้วย 4 สกุลย่อย (sub genus) ได้แก่ *Stephanitis* Stål, 1873 : *Menodora* Hovath, 1912 : *Norba* Horvath, 1912 และ *Omoplax* Horvath, 1912 มวนปีกแก้วในสกุลนี้ปัจจุบันพบจำนวน 68 ชนิด (Guilbert, 2012) มีเขตการแพร่กระจายทั่วโลก (Drake and Ruhoff, 1965) ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจะดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เช่น พืชในวงศ์ปาล์ม (Palmae) เช่น มะพร้าว ปาล์มน้ำมัน อินทผาลัม หวายชนิดต่างๆ กุหลาบ

(Rosaceae) ขิง ข่า กระชาย ดาหลา (Zingiberaceae) กล้วย (Musaceae) กุหลาบพันปี (Ericaceae) และขนุน (Moraceae) เป็นต้น ทำให้ใบพืชที่ถูกทำลายเกิดจุดสีขาวขนาดเล็กปรากฏให้เห็นชัดทางด้านหลังใบ ต่อมาทำให้ใบเหี่ยวและตาย ทำให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตลดลง เนื่องจากใบไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (Tigvattnanont, 1990) นอกจากนี้มวนปีกแก้วในสกุลนี้ เช่น มวนปีกแก้วชนิด *S. typica* เป็นพาหะนำเชื้อไวรัสและไมโครพลาสมา ก่อให้เกิดโรครากเหี่ยวในมะพร้าว (coconut root wilt) (Nagaraj and Menon, 1956) (Shanta and Menon, 1960) (Shanta *et al*., 1960) ซึ่งทำให้ผลผลิตของมะพร้าวลดลงอย่างมาก และทำให้เกิดความเสียหาย ถึง 80 ล้านบาท (Mathen ,1973) และ Sunil (1992) ประมาณค่าความเสียหายของมะพร้าว ที่เกิดจากสาเหตุโรคเหี่ยวมะพร้าว ถึง 1 พันล้านผล (คิดเป็น 1.13 % ของน้ำมันมะพร้าวที่ต้องสูญเสียไปต่อผล) ซึ่งทำให้ต้องสูญเสียเงินเป็นจำนวนถึง 3 พันล้านบาทต่อปี มวนปีกแก้วในสกุล *Stephanitis* มีมากกว่า 60 ชนิด ที่เป็นศัตรูพืชสำคัญในเขตร้อน (Howard *et al*., 2001) สำหรับในประเทศไทยข้อมูลของมวนในสกุล *Stephanitis* นี้ยังมีน้อยมาก ดังนั้น การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อได้ทราบชนิด ลักษณะความแตกต่างของพืชอาหาร และเขตการแพร่กระจายของมวนในสกุลนี้ได้อย่างถูกต้อง พร้อมจัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิด และข้อมูลที่ได้ยังสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืชและวิเคราะห์ความเสี่ยงแมลงศัตรูพืช ในการนำเข้าและส่งออกผลผลิตทางการเกษตร รวมทั้งเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาด้านกีฏวิทยาสาขาอื่นๆ ในลำดับต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1) ตัวอย่างมวนปีกแก้ว ที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช
2) อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ขวดฆ่า ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง และถังรักษาความเย็น ฯลฯ
3) อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง ได้แก่ เข็มไร้สนิม เข็มหมุดหัวกลม ไม้จัดรูปร่างแมลง ปากคีบ โหลชื้น ตู้อบแมลง ฯลฯ
4) สารเคมีต่าง ๆ เช่น เอทิลอะซีเตท แอลกอฮอล์ 80%
5) กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope
6) กล้องถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์
7) อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา roting และกระดาษไขเขียนแบบ
8) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดมวนปีกแก้ว

วิธีการ

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างมวนปีกแก้วในแปลงเพาะปลูกพืชที่มีรายงานว่าเป็นพืชอาหารของมวนปีกแก้วทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยตัดส่วนของพืชที่มีตัวอ่อน หรือตัวเต็มวัยมวนปีกแก้ว นำตัวอย่างที่เก็บรวบรวมพร้อมพืชอาศัยห่อกระดาษแล้วนำใส่ถุงพลาสติก หรือกล่องพลาสติก

หากตัวอย่างมวนปีกแก้วที่รวบรวมได้อยู่ในระยะตัวอ่อน ต้องนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนเป็นตัวเต็มวัย พร้อมทั้งถ่ายภาพมวนปีกแก้วแต่ละระยะ บันทึกรายละเอียด พืชอาหาร สถานที่เก็บตัวอย่าง วัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) ซึ่งประกอบด้วยค่าละติจูด (Latitude) ค่าลองติจูด (Longitude) ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (Altitude) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างและชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง สำหรับตัวเต็มวัยของมวนปีกแก้วจะทำการฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า (killing jar) ซึ่งบรรจุน้ำยา ethyl acetate หลังจากมวนปีกแก้วตายให้เก็บตัวเต็มวัยในกระดาษรูปสามเหลี่ยมใส่ในกล่องพลาสติกเพื่อป้องกันการเสียหาย นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ นอกจากตัวอย่างมวนปีกแก้วที่ได้จากสภาพธรรมชาติแล้ว มีตัวอย่างมวนปีกแก้วที่มีอยู่เดิมในพิพิธภัณฑ์ กรมวิชาการเกษตร ตัวอย่างที่ได้จากนักวิชาการ และตัวอย่างจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

2) นำตัวอย่างมวนปีกแก้วที่ได้จากการสำรวจ มาจัดรูปร่างโดยนำไปติดบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง หรือวางตะแคงข้างให้ส่วนอกติดอยู่บนปลายแหลมของกระดาษแข็งรูปสามเหลี่ยม นำไปอบแห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15-30 วัน

3) นำตัวอย่างของมวนปีกแก้วที่รวบรวมได้มาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาดลำตัว รูปร่าง ลักษณะ และสี เป็นต้น โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดมวนปีกแก้วที่เป็นศัตรูพืชสำคัญของโลก ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์

4) จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุลและชนิดของมวนปีกแก้วสกุล *Stephanitis* ที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

5) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษา เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง เพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น เดือนตุลาคม 2555 – สิ้นสุด เดือนกันยายน 2557

สถานที่ แหล่งปลูกพืชทั่วทุกภาคของประเทศไทย และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาอนุกรมวิธานมวนปีกแก้ว ในสกุล *Stephanitis* Stål ในแหล่งปลูกพืชที่มีรายงานว่าเป็นพืชอาหารของมวนปีกแก้วในสกุล *Stephanitis* ได้แก่ จังหวัด เชียงราย พะเยา แพร่ ลำพูน เชียงใหม่ ตาก กำแพงเพชร นครสวรรค์ พิจิตร พิษณุโลก เพชรบูรณ์ สุโขทัย กรุงเทพฯ สุพรรณบุรี ลพบุรี สระบุรี อ่างทอง ราชบุรี นครปฐม กาญจนบุรี ปทุมธานี นครนายก นนทบุรี จันทบุรี ระยอง

ปราจีน บุรีรัมย์ ศรีษะเกษ สุรินทร์ อุบลราชธานี บึงกาฬ สกลนคร ร้อยเอ็ด หนองบัวลำภู หนองคาย กาฬสินธ์ เพชรบุรี ระนอง ชุมพร ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช กระบี่ วิเคราะห์ชนิดโดยใช้แนวทางการวินิจฉัยจาก Distant, 1904 และ Stonedahlt *et. al.*, 1992 รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างมวนปีกแก้วที่มีในพิพิธภัณฑ์แมลงของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร สามารถจำแนกมวนปีกแก้วในสกุล *Stephanitis* ได้ 2 ชนิด ได้แก่ *Stephanitis typica* (Distant, 1903) จำนวน 1,591 ตัวอย่าง และ *Stephanitis suffusa* (Distant, 1903) จำนวน 64 ตัวอย่าง ซึ่ง *S. suffusa* ถือว่าเป็นมวนปีกแก้วที่พบครั้งแรกในประเทศไทย (new record) โดยมีรายละเอียดดังนี้

สกุล (Genus) *Stephanitis* Stål, 1873 (Figure 1)

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic History)

Tingis Lap. Ess. Hém. p. 48. (1832), nec Fabr.; *Stephanitis*, Stål, En. Hem. III. pp. 119&123. (1873); id. Ofv. Vet.-Ak. Förh. 1874, p53; Horv. Ent. Month, Mag. Hung. IV. P. 14. (1906).; *Cadamustus* Dist. Ann. Soc. Ent. Belg. Xlvii, p.47. (1903).; *Maecenas* Kirk. Entomologist, Xxxvii. P. 280. (1904).; *Mokanna* Dist. Faun. Brit. Ind. Rhynch. V. p. 111. (1901).

Type species : *Stephanitis typical* (Distant, 1903)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological Description)

เป็นมวนที่มีขนาดเล็ก บอบบาง เมื่อมองทางด้านสันหลังเห็นเป็นมันเงาสะท้อนแสง มีสีขาวใส คล้ายกระจก ปากและหนวดมี 4 ปล้อง ทาร์ไซ 2 ปล้อง ด้านบนของสันหลังอกปล้องแรกมีส่วนที่ขยายขึ้นมาเป็นกระเปราะยาวรีภายในกลวง เรียกว่า hood มีลักษณะสูงและโค้งนูน แหลมไปทางด้านหน้าจนปิดส่วนหัว ถัดจาก hood มีสันเป็นแนวยาวตรงกลาง (medial carina) 1 สัน และสันด้านข้าง (lateral carina) อีกด้านละสัน ด้านข้างของสันหลังอกปล้องแรก จะขยายเป็นแผ่น (paranotum) มีลักษณะกว้าง และโค้งขึ้น ปีกมีลักษณะยาวรี ยาวกว่าลำตัวประมาณสองเท่าของส่วนท้อง ลักษณะกว้างและปลายโค้งมน ประกอบด้วยเส้นปีกที่มาประสานกันเป็นร่างแหหรือตาข่าย ทำให้เกิดเป็นเซลล์ขึ้นเป็นจำนวนมาก

แนวทางการวินิจฉัยในระดับวงศ์ย่อย สกุล และชนิด

1 ก. แผ่นแข็งทางตอนท้ายของด้านสันหลังของปล้องอก(Scutellum) ส่วนใหญ่เปิดออก ไม่ถูกคลุมโดยส่วนหลังของสันหลังอกปล้องแรกที่ขยายขึ้นมา (hood).....Subfamily Cantacarinae

ข. แผ่นแข็งทางตอนท้ายของด้านสันหลังของปล้องอก(Scutellum) ถูกคลุมอยู่ใต้ส่วนหลังของสันหลังอกปล้องแรกที่ขยายขึ้นมา (hood).....Subfamily Tinginae (2)

2 ก. ด้านบนของแผ่นแข็งสันหลังอกปล้องแรกที่ขยายขึ้นมา(hood) มีลักษณะยื่นยาวออกไปทางด้านหน้า ยาวมากกว่ากว้าง 4-5 เท่า (เมื่อมองทางด้านสันหลัง), สันแนวยาวทางด้านข้าง (lateral carinae) ขยายยาว เริ่มจากขอบด้านหน้าของแผ่น (disc) ถึงขอบหลัง.....Genus Leptocysta

ข. ด้านบนของแผ่นแข็งสันหลังอกปล้องแรกที่ขยายขึ้นมา(hood) มีลักษณะเป็นรูปไข่ ยาวไม่เกิน 2 เท่า ของความกว้าง สันแนวยาวทางด้านข้าง (lateral carinae) สั้น ขยายยาวเริ่มจากขอบด้านหลังของ hood และต่อเนื่องเป็นระยะทางสั้นๆ ถึงขอบหลังของแผ่น (disc).....Genus *Stephanitis* (3)

3 ก. สันหลังอกปล้องแรก(pronotum) มีสันเป็นแนวยาวเพียงสันเดียว (unicarinate).....*Stephanitis* (*Norba*) (4ก)

ข. สันหลังอกปล้องแรก(pronotum) มีสันเป็นแนวยาวจำนวน 3 สัน (tricarinate).....*Stephanitis* (*Stephanitis*) (4ข)

4 ก. เส้นปีกที่มาประสานกันเป็นร่างแหหรือตาข่าย(areolate) มีสีน้ำตาลอมทอง ปีกมีแถบน้ำตาลเข้มจำนวน 2 แถบ ได้แก่แถบที่หนึ่งเกิดขึ้นบนเส้น Costal เริ่มจากฐานปีกมาถึงกึ่งกลางของปีก และแถบที่สองเริ่มจากเส้นปีกที่ต่อจากบริเวณ Discoidal area ลงมาถึงปลายปีก สันแนวยาวตรงกลาง(medial carina) ของสันหลังอกปล้องแรก มี 3 เซลล์ปีก (areolae) ในส่วนที่กว้างที่สุด รูปร่างลักษณะของปีกคู่หน้าบริเวณขอบปีกตรงกลางเว้าและส่วนหลังขยายกว้าง.....*Stephanitis suffusa* (Distant)

ข. ขอบส่วนหน้าของด้านข้างสันหลังอกปล้องแรก (paranotum) ขยายออกไปด้านหน้าของตา ส่วนฐานของปีก (corium) ด้านหน้าและปลายมีสีน้ำตาลเล็กน้อยเมื่อมองทางด้านสันหลัง สันแนวยาวตรงกลาง (medial carina) ของสันหลังอกปล้องแรก มี 2 เซลล์ปีก (areolae) ในส่วนที่กว้างที่สุด.....*Stephanitis typica* (Distant)

***Stephanitis typica* (Distant, 1903)** (Figure 2)

Cadamustus typicus, Distant, Ann. Soc. Ent. Belg. XLVII. p.47 (1903) Faun. Brit. Ind. Rhynch. II. p. 132. 895. fig. 95. (1903).; *Stephanitis typicus*: Distant 1910a, p.108

(India; Luzon).; *Stephanitis typica* Horvath, 1912, Mus. Nat Hung., Ann, 10: 320, 325; Takeya, 1951, Kurume Univ. Jour. (Nat. Sci), 4:8, Drake and Maa, 1953. Taiwan Mus, Quart Jour.6: 10.

ลำตัว (Body) ขนาดเล็ก เมื่อมองทางด้านสันหลังเห็นเป็นมันเงาสะท้อนแสง มีสีขาวใสคล้ายกระจก ขอบของเซลล์ปีกมีสีน้ำตาลเข้มประปรายแต่ไม่มีแถบสี ลำตัวด้านใต้ปีกมีสีน้ำตาล ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.91±0.14 มม. (n=20) (วัดจากปลายสุดของหัวถึงปลายสุดของท้อง) กว้างเฉลี่ย 0.76±0.05 มม. (n=20) (วัดจากส่วนที่กว้างที่สุดของลำตัว) ด้านบนของสันหลังอกปล้องแรกมีส่วนที่ขยายขึ้นมาเป็นกระเปราะยาวรีภายในกลวง (hood) และถัดจาก hood มีสันเป็นแนวยาวตรงกลาง (medial carina) 1 สัน ประกอบด้วยเซลล์ (areolae) จำนวน 2 เซลล์ ในส่วนที่กว้างที่สุด และสันด้านข้าง (lateral carina) อีกด้านละสัน สีขาวครีม ยาวเฉลี่ย 0.11±0.1 มม. (n=20)

หัว (Head) สั้น มีสีเหลืองอมน้ำตาล ตามีสีน้ำตาลเข้ม เมื่อมองทางด้านสันหลัง (dorsal view) บางครั้งอาจจะเห็นส่วนของตาและปล้องที่ 1 ของหนวด เนื่องจาก hood ขยายไปคลุมส่วนหน้าของหัวไม่มิด ปากอยู่ใต้ส่วนหัวและอก ชี้โน้มลงด้านล่าง ขยายยาวถึงระหว่างขาคู่ที่สอง (mesosternum) ปาก (rostrum) มีสีเหลือง ยกเว้นปลายปากมีสีดำ ปากยาวเฉลี่ย 0.77±0.01 มม. (n=20)

หนวด (Antennae) มีลักษณะเรียวยาว มีสีเหลืองอ่อน ประกอบด้วย 4 ปล้อง แต่ละปล้องยาวเฉลี่ย 0.31, 0.11, 1.14 และ 0.58 มม. (n=20) ตามลำดับ โดยปล้องที่สามมีลักษณะแบบปล้องไฝ่ (pilose) เนื่องจากมีขนละเอียดสั้นๆแทรกอยู่ระหว่างปล้อง หนวดปล้องที่สี่มีลักษณะแบบกระบอง (clavate) โดยส่วนปลายหนวดค่อย ๆ ขยายใหญ่ และมีขนละเอียดสั้นๆ สีใสขึ้นปกคลุม

อกปล้องแรก (Pronotum) แผ่นแข็งด้านบน (disc) มีลักษณะเป็นจุดหรือหลุมของขนขนาดเล็ก (punctuate) สีน้ำตาลมันเงา มีขนสีใส ขนาดสั้นขึ้นปกคลุมประปราย มีสันแนวยาวตรงกลาง (medial carina) หนึ่งสัน และสันด้านข้าง (lateral carina) อีกด้านละสัน ซึ่ง medial carina มีลักษณะยาวและสูง ประกอบด้วย 2 เซลล์ปีก (areolae) ในส่วนที่กว้างที่สุด hood มีขนาดปานกลาง มีรูปร่างยาวรี สูงเท่า medial carina ประกอบด้วยเซลล์ปีก (areolae) ขนาดใหญ่ ด้านข้างของสันหลังอกปล้องแรก จะขยายเป็นแผ่น เรียก พาราโนตัม (paranotum) มีลักษณะกว้าง โค้งขึ้น ขอบด้านข้างกลม ประกอบด้วยเซลล์ปีกจำนวน 3 แถว

ปีก (Hemelytra) ปีกคู่ที่หนึ่งมีลักษณะยาวรี ส่วนปลายโค้งมน ประกอบด้วยเส้นปีกที่มาประสานกันเป็นร่างแหหรือตาข่าย ทำให้เกิดเป็นเซลล์ขึ้นเป็นจำนวนมาก เรียก areolate เส้นปีกมีสีน้ำตาล มีลักษณะยาวและกว้างกว่าส่วนท้อง ปีกแต่ละข้างยาวเฉลี่ย 2.63±0.10 มม. (n=20) costal area ส่วนที่กว้างที่สุดมี 4 เซลล์ subcostal area ประกอบด้วยเซลล์ 1 แถว มีลักษณะลาดเอียงลงเล็กน้อย discoidal area สั้น มีลักษณะยกสูงขึ้นเล็กน้อยประกอบด้วย 3 แถว ขอบด้านนอกของปีก, paranotum, เส้นขอบด้านบนของ hood และ medial carina มีลักษณะเป็นซี่ฟันปลา

ละเอียด และมีขนขนาดสั้นสีเหลืองอ่อน ปีกคู่ที่สองสั้นมาก มีลักษณะเป็นแผ่นบางใสไม่มีเซลล์ที่ปีก ยาวเฉลี่ย 1.68 มม. (n=20)

ขา (Leg) มีลักษณะเรียวยาว สีเหลืองอ่อน ยกเว้นส่วนปลาย (tarsi) มีสีน้ำตาล

ความสำคัญและพืชอาหาร : ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบพืช เช่น กล้วย มะพร้าว ข่า ปทุมมา อบเชย และคล้าน้ำ (Figure 4)

แหล่งที่สำรวจพบ : ทุกภูมิภาคของประเทศไทย

การตรวจวินิจฉัย (Diagnosis) : *Stephanitis typica* (Distant, 1903) ด้านบนของสันหลังอกปล้องแรกมีสันแนวยาวตรงกลาง (medial carina) 1 สัน และสันด้านข้าง (lateral carina) 2 สัน (tricarinate) ปีกไม่มีแถบสี

เขตการแพร่กระจาย : จีน ญี่ปุ่น อินเดีย อินโดนีเซีย มาเลเซีย มองโกเลีย เกาหลี ปาปัว นิวกินี หมู่เกาะสุมาตรา พม่า ฮ่องกง เนปาล และไทย

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material examined) Chiang Rai: 6 males, 4 females, EMBT.Hem. 000071-0000073, 000076, 000079-000080. Nakhon Pathom: 3 males, 7 females EMBT.Hem. 000456-000457, 000460, 000458-000459, 000461-000465

***Stephanitis suffusa* (Distant, 1903)** (Figure 3)

Cadamustus suffusus, Distant (1903a, p47 (Ceylon;1903b,p133(Berma)); *Stephanitis suffusa*: Horvath 1912 b, p.338; *Stephanitis* (*Norba*) *bankana* Drake 1948b, pp. 46,47,54 (Bangka; China; Per Sea gratissima; *Stephanitis* (*Stephanitis*) *suffusa*: Drake and Maa 1953, p101. *Stephanitis* (*Norba*) *suffusa*: Drake and Maa 1954, p.116. type: sex unknown; Matale, Ceylon; British Mus.

ลำตัว (Body) ขนาดเล็ก เมื่อมองทางด้านสันหลังเห็นเป็นมันเงาสะท้อนแสง มีสีเหลืองอมทอง ปีกมีแถบสีน้ำตาลเข้มจำนวน 2 แถบ คือบนเส้น Costal เริ่มจากฐานปีกมาถึงกึ่งกลางของปีก และเส้นปีกที่ต่อจากบริเวณ Discoidal area ลงมาถึงปลายปีก ลำตัวด้านใต้ปีกมีสีน้ำตาลเข้ม ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 2.26±0.12 มม. (n=20) (วัดจากปลายสุดของหัวถึงปลายสุดของท้อง) กว้างเฉลี่ย 0.96±0.02 มม. (n=20) (วัดจากส่วนที่กว้างที่สุดของลำตัว) hood มีลักษณะยาวรี ปลายแหลม ภายในกลวง ผิวของ hood ประกอบด้วยเซลล์ขนาดใหญ่จำนวนมาก และมี median carina เพียงสันเดียวสีน้ำตาล

หัว (Head) สั้น มีสีเหลืองอมน้ำตาล ตามีสีน้ำตาลเข้ม เมื่อมองทางด้านสันหลัง (dorsal view) จะมองไม่เห็นส่วนของหัวและตา เนื่องจากด้านบนของแผ่นแข็งสันหลังอกปล้องแรกขยายไปทางด้านหน้า (hood) คลุมส่วนหัว ปากอยู่ใต้ส่วนหัวและอก ชี้โน้มลงด้านล่าง ขยายยาวถึงระหว่างขาคู่ที่สอง (mesosternum) ปากมีสีน้ำตาล ยกเว้นปลายปากมีสีดำ ปากยาวเฉลี่ย 0.84±0.05 มม. (n=20)

หนวด (Antennae) มีลักษณะเรียวยาว มีสีเหลืองอ่อนอมเขียว ประกอบด้วย 4 ปล้อง แต่ละปล้องยาวเฉลี่ย 0.54, 0.13, 1.69 และ 0.62 มม. (n=20) ตามลำดับ โดยปล้องที่สามมีลักษณะแบบปล้องไฝ่ (pilose) เนื่องจากมีขนละเอียดสั้นๆแทรกอยู่ระหว่างปล้อง หนวดปล้องที่สี่มีลักษณะแบบกระบอง (clavate) โดยส่วนปลายหนวดค่อย ๆ ขยายใหญ่ มีสีน้ำตาล และมีขนสีใสขึ้นปกคลุม

อกปล้องแรก (Pronotum) แผ่นแข็งด้านบน (disc) มีลักษณะเป็นจุดหรือหลุมของขนขนาดเล็ก (punctuate) มีสีน้ำตาลเข้ม มันเงา มีขนสีใส ขนาดสั้น ขึ้นปกคลุมประปราย (นอกจากนี้ยังมีขนขึ้นในส่วนของ medial carina และด้านบนของ hood) สันแนวยาวตรงกลาง (medial carina) มีเพียงสันเดียว (unicarinate) ซึ่งมีลักษณะยาวและสูง ในส่วนที่กว้างที่สุดมี 3 เซลล์ปีก (areolae) hood มีขนาดใหญ่ รูปร่างยาวรีปลายส่วนหน้าแหลม สูงเท่า medial carina ประกอบด้วยเซลล์ปีกขนาดใหญ่ ด้านข้างของสันหลังอกปล้องแรก (paranotum) กว้าง โค้งขึ้น ขอบด้านข้างกลมประกอบด้วย 4 เซลล์แถว (areolae)

ปีก (Hemelytra) ปีกคู่ที่หนึ่งมีขนาดกว้าง เส้นปีกมีสีน้ำตาลอมทอง ลักษณะของปีกตรงกลางเว้า และส่วนหลังกว้าง คลุมส่วนท้อง ปีกคู่หน้าแต่ละข้างยาวเฉลี่ย 3.29$\pm$0.05 มม. (n=20) costal area ส่วนที่กว้างที่สุดมี 4 เซลล์ปีก (areolae) subcostal area ประกอบด้วยเซลล์ปีกจำนวน 1 แถว ซึ่งเซลล์ปีกค่อนข้างใหญ่ และลาดเอียงลงเล็กน้อย discoidal area สั้น มีลักษณะยกสูงขึ้นเล็กน้อยประกอบด้วยเซลล์ปีกจำนวน 3 แถว ขอบด้านนอกของปีก paranotum เส้นขอบด้านบนของ hood และ medial carina มีลักษณะเป็นซี่ฟันปลาละเอียด และมีขนขนาดสั้น ปีกคู่ที่สองสั้นมาก มีลักษณะเป็นแผ่นบางใสไม่มีเซลล์ปีก ยาวเฉลี่ย 1.92$\pm$0.96 มม. (n=20)

ขา (Leg) มีลักษณะเรียวยาว สีเหลืองอ่อน ยกเว้นส่วนปลาย (tarsi) มีสีน้ำตาลเข้ม

ความสำคัญและพืชอาหาร : ตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบพืช คือ อะโวคาโด และยอ (Figure 5) ในต่างประเทศมีรายงานเฉพาะอะโวคาโด (Drake and Maa, 1954)

แหล่งที่สำรวจพบ : สำหรับประเทศไทยไม่เคยมีรายงานการสำรวจพบมาก่อน จากการศึกษาครั้งนี้สำรวจพบที่อำเภอเมือง จังหวัดตาก

การตรวจวินิจฉัย (Diagnosis) : *Stephanitis suffusa* (Distant, 1903) แตกต่างจาก *Stephanitis typica* (Distant, 1903) คือ *S. suffusa* ด้านบนของสันหลังอกปล้องแรก มีสันแนวยาวตรงกลาง (medial carina) เพียง 1 สัน (unicarinate) ส่วนมวนปีกแก้วชนิด *S. typica* 3 สันคือ medial carina 1 สัน และสันด้านข้าง (lateral carina) 2 สัน (tricarinate)

เขตการแพร่กระจาย : อินเดีย จีน อินโดนีเซีย พม่า และศรีลังกา สำหรับประเทศไทยถือว่าเป็นการค้นพบครั้งแรก (new record)

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material examined) TAK: 8 males, 12 females, EMBT.Hem. 000002, 000005, 000007, 000023, 000024, 000028, 000030, 000032, 000001, 000003, 000004, 000006, 000008-000010

วิจารณ์ผล มวนปีกแก้ว *S. suffusa* มีรายงานว่า เป็นศัตรูของอะโวคาโด แต่ในประเทศไทยพบเข้าทำลายอะโวคาโด และยอ จากการสำรวจพบมวนชนิดนี้ที่จังหวัดตากเท่านั้น ในพื้นที่จังหวัดอื่นยังไม่พบการเข้าทำลาย ดังนั้นจึงต้องมีการติดตามและสำรวจเพิ่มในพื้นที่อื่นๆต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาอนุกรมวิธานมวนปีกแก้วสกุล *Stephanitis* ในแหล่งปลูกพืชที่มีรายงานว่าเป็นพืชอาหารของมวนปีกแก้วสกุลนี้ทั่วภูมิภาคของประเทศไทย ผลการตรวจสอบจำแนกชนิด โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยตามหลักอนุกรมวิธานแมลง รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีในพิพิธภัณฑ์แมลงของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร สามารถวิเคราะห์ชนิดได้ 2 ชนิด จากจำนวน 1,655 ตัวอย่าง ได้แก่ มวนปีกแก้ว *Stephanitis typica* (Distant, 1903) จำนวน 1,591 ตัวอย่าง มีพืชอาหาร 6 ชนิด ได้แก่ กล้วย มะพร้าว ข่า คล้าน้ำ อบเชย และปทุมมา พบแพร่กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย และ *Stephanitis suffusa* (Distant, 1903) จำนวน 64 ตัวอย่าง มีพืชอาหาร 2 ชนิด ได้แก่ ยอ และอะโวคาโด สำรวจพบเฉพาะในพื้นที่จังหวัดตากเท่านั้น มวนปีกแก้วชนิดนี้ยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทยมาก่อน ถือว่าเป็นมวนปีกแก้วที่พบครั้งแรกในประเทศไทย(new record) ซึ่งทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของมวนปีกแก้วทั้ง 2 ชนิด ดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบพืช ทำให้ใบพืชที่ถูกทำลายเกิดจุดสีเหลืองขนาดเล็กปรากฏให้เห็นชัดทางด้านหลังใบ ต่อมาใบเหี่ยวและตาย ทำให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตลดลง ตัวอย่างที่ได้จากการสำรวจ เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลงกรมวิชาการเกษตรเพื่อตรวจสอบความถูกต้อง พร้อมจัดทำฐานข้อมูล นำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาด้านอื่นๆ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ Dr. Eric Guilbert จาก National Museum of Natural History in Paris, France ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการจำแนกชนิดมวนปีกแก้ว, *Stephanitis suffusa* (Distant) และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานอนุกรมวิธานทุกท่านที่มีส่วนร่วมในทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Distant, W.L. 1904. The fauna of British India, Including Ceylon and Burma. Rhyncota-Vol. II (Heteroptera). Taylor and Francis, London.

Drake, C.J. & T. C. Maa. 1954. Chinese and other Oriental Tingoideae (Hemiptera) Part II Quart J. Taiwan Mus. 7(1-2) 118-119.

Drake, C. J., and F. A. Ruhoff. 1965. Lacebugs of the World, a Catalog (Hemiptera: Tingidae). U.S. Nat. Mus. Bull. 243., Smithsonian Institution, Washington, D.C., U.S.A. 634 pp.

Guilbert E. 2013. Lace Bugs database Museum National D'History Naturelly. Available Source: http://hemipteradatabases.org/cgin/Tingidae.pl?lang=en, September 9, 2013.

Howard, F.W. 2001. Insects on palm. CABI Pub. New york, NY.

Mathen, K. 1973. The lace-winged enemy of coconut. Coconut Bull. 4: 2-4.

Nagaraj, A.N., and K.V. Menon. 1956. Note on the etiology of the wilt (root) disease of coconut palms in Travancore-Cochin. Indian Coconut J. 9: 161-165.

Stonedahlt G.M., W.R.Dolling and G.J. duHEAUME. 1992. Identification Guide to Common Tingid Pests of the World (Heteroptera: Tingidae). Trop. Pest Manage. 38(4): 438-449

Sunil, K. P. 1992. Coconut root wilt management: focus turns to in-vitro culture, 1992. Indian Coconut J. 22: 10.

Shanta, P., K. P. V. Menon, and K. P. Pillai. 1960. Aetiology of the wilt (root) disease: investigation on its virological nature. Indian Coconut J. 13: 56-66.

Tigvattnanont, S. 1990. Studies on the bionics and local distribution of some lace bugs in Thailand *Urentius echinus* Distant (Hemiptera:Tingidae). Kaen Kaset Khon Kaen Agriculture Journal. 18(5): 251-260.

ภาคผนวก

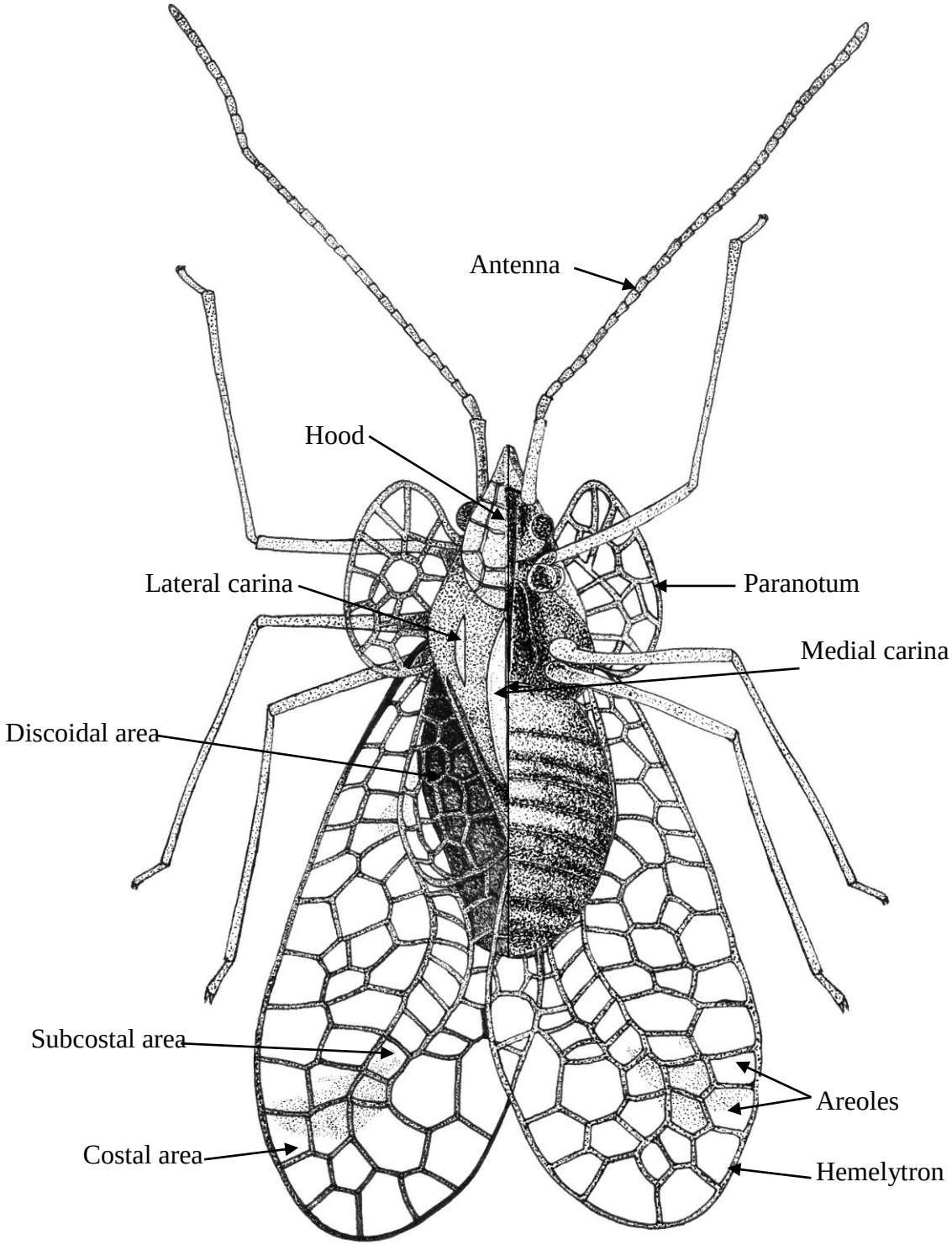


Figure 1 Morphology of lace bug in genus *Stephanitis* Stål

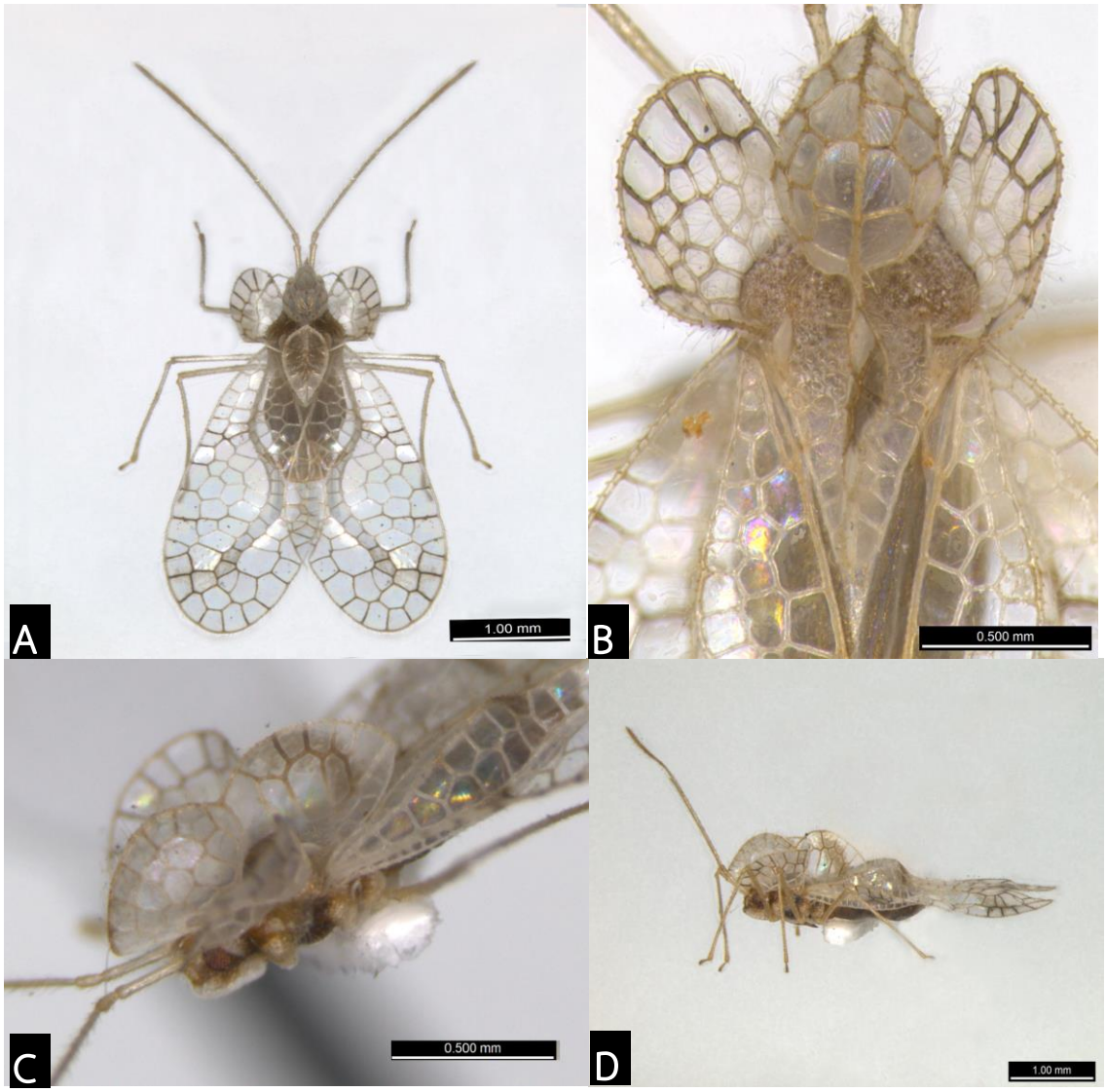


Figure 2 *Stephanitis typica* (Distant) female (EMBT.Hem.000070)

A. dorsal habitus

B. head and pronotum, dorsal view

C. head and pronotum, lateral view

D. lateral habitus

Figure 3 *Stephanitis suffusa* (Distant) new record, female (EMBT.Hem.000001)

A. dorsal habitus

B. lateral habitus

C. head and pronotum, lateral view

D. head and pronotum, dorsal view

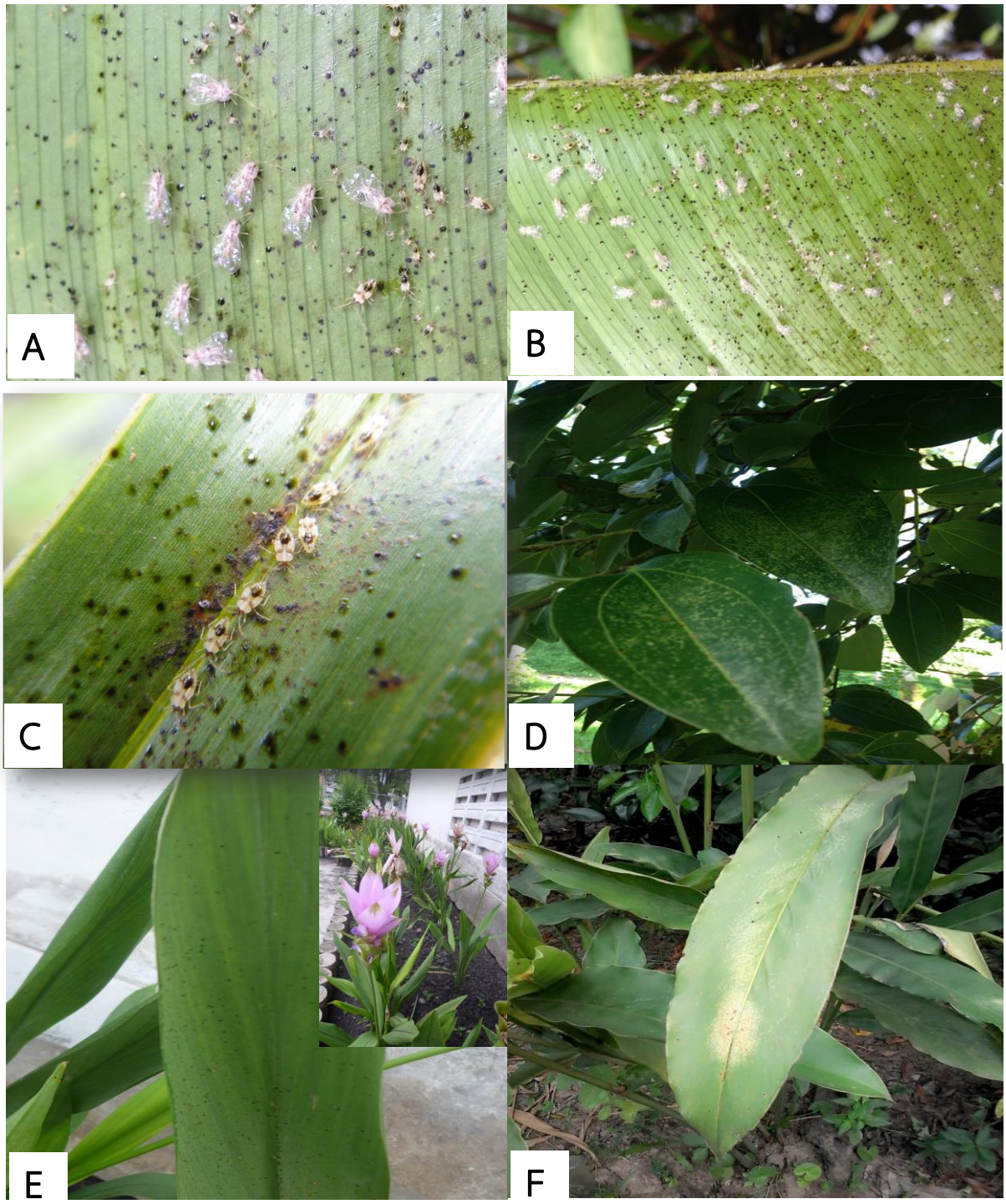


Figure 4 Damage caused by *Stephanitis typica* (Distant), feeding and excrement spots

A. Banana, *Musa sapientum* L.

B. Water canna, *Thalia geniculeta* L.

C. Coconut, *Cocos nucifera* L.

D. Cinnamon, *Cinnamomum cassia* J.S. Presl

E. Siam Tulip, *Curcuma alismatifolia* Gagnep.

F. Galanga, Alpinia galangal (L.)

A

B

Figure 5 Damage cause by *Stephanitis suffusa* (Distant), feeding

A. Avocado, *Persea a*mericana Miller

B. Indian Mulberry, *Morinda citrifolia* L.

อนุกรมวิธานผีเสื้อกลางคืนสกุล *Parapoynx* ในประเทศไทย

Taxonomy of Moth in Genus *Parapoynx* in Thailand

สุนัดดา เชาวลิต ชมัยพร บัวมาศ

อิทธิพล บรรณาการ เกศสุดา สนศิริ สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาอนุกรมวิธานผีเสื้อกลางคืนสกุล *Parapoynx* ให้ทราบชนิด พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจาย เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับงานศึกษาวิจัย การวินิจฉัยชนิดแมลงศัตรูพืช รวมถึงการจำทำรายชื่อแมลงศัตรูพืชในประเทศไทย ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนกันยายน 2558 จากพื้นที่เกษตรและพื้นที่ป่าของประเทศ นำตัวอย่างที่สำรวจได้มาจำแนกชนิด ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ Stereo microscope ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช การศึกษาครั้งนี้ใช้ผีเสื้อกลางคืนสกุล *Parapoynx* จำนวน 124 ตัวอย่าง จำแนกได้ 3 ชนิด ได้แก่ ผีเสื้อกินใบสาหร่ายหางกระรอก, *Parapoynx diminutalis* Snellen เป็นศัตรูสำคัญของสาหร่ายหางกระรอก; ผีเสื้อหนอนห่อใบข้าวปีกลายขวาง, *Parapoynx fluctuosalis* (Zeller 1899); ผีเสื้อหนอนห่อใบข้าว, *Parapoynx stagnalis* (Zeller, 1852) ตัวอย่างผีเสื้อกลางคืนสกุล *Parapoynx* ทั้งหมดที่จำแนกชนิดแล้วนำเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

คำสำคัญ : ผีเสื้อกลางคืน อนุกรมวิธาน สกุล *Parapoynx* ประเทศไทย

Moth Taxonomy Genus *Parapoynx* Thailand

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-28-56

คำนำ

ผีเสื้อในสกุล *Parapoynx* เป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก จัดอยู่ใน วงศ์ Pyralidae วงศ์ย่อย Nymphulinae เป็นแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญของข้าวและไม้น้ำหลายชนิด หนอนกัดกินส่วนต่างๆ ของพืชที่เจริญเติบโตอยู่ในน้ำ เช่น เหง้า ลำต้น ใบและดอก ทำให้ปริมาณและคุณภาพการผลิตลดลง ส่งผลกระทบต่อเกษตรกรที่ประกอบอาชีพเลี้ยงไม้น้ำเพื่อการค้าในประเทศ รวมถึงการส่งออกไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศ Habeck (1982) รายงานไว้ว่าหนอนในสกุลนี้สามารถกัดกินทำลายไม้น้ำได้ 25 ชนิด ใน 17 วงศ์ เช่น ตาลปัตรฤาษี (Alismataceae) บัวบา (Menyanthaceae) บัวชนิดต่าง ๆ (Nymphaceae) สาหร่าย (Hydrocharitaceae) ผักไผ่น้ำ (Polygonaceae) ฯลฯ ซึ่งเป็นพรรณไม้น้ำที่นิยมเลี้ยงเพื่อการค้าและเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ การแพร่ระบาดของผีเสื้อสกุลนี้เป็นไปอย่างกว้างขวางไปทั่วโลก เนื่องจากทั้งตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ติดไปกับไม้น้ำที่มีการขนส่งเพื่อการค้าระหว่างประเทศ โดยหนอนสามารถอาศัยและเจริญเติบโตได้ทั้งในพืชที่อยู่ในน้ำนิ่งและน้ำไหล (McGaha,1972) เนื่องจากระยะหนอนมีการพัฒนาโครงสร้างลำตัวให้มีอวัยวะช่วยในการหายใจ (gill) จึงสามารถอาศัยและเจริญเติบโตในน้ำได้ดี Habeck (1982) ได้รายงานว่า *Parapoynx allionealis* และ *P. obscuralis* ทำลายพืชน้ำได้หลายชนิด ในขณะที่ *P. maculalis* ทำลายเฉพาะพืชในวงศ์ Nymphaceae และ *P. seminealis* ทำลายเฉพาะพืชในวงศ์ Nymphoides ผีเสื้อชนิดนี้พบว่ามีการแพร่ระบาดไปในพื้นที่ที่มีการปลูกข้าวทั่วโลก (Agassiz, 1982) ในออสเตรเลีย พบผีเสื้อในสกุลนี้ 13 ชนิด (Common, 1990) ในรัฐฟลอริดา สหรัฐอเมริกา พบผีเสื้อสกุลนี้ 4 ชนิดที่พบได้บ่อย และอีก 6 ชนิดค่อนข้างหายาก (Munroc, 1972 และ Kimball, 1965) ส่วนในภูมิภาคเอเชีย สำรวจพบที่ จีน ญี่ปุ่น ไต้หวัน บังคลาเทศ ภูฏาน เนปาล ปากีสถาน ศรีลังกากัมพูชา อินเดีย อินโดนีเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ สิงคโปร์ เวียดนามและประเทศไทย (CABI, 2007)

ดังนั้น ในเบื้องต้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อได้ทราบชนิด ลักษณะความแตกต่าง พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจายของผีเสื้อในวงศ์ย่อยนี้ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นด้านกีฏวิทยานำไปสู่การหาวิธีป้องกันกำจัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นพื้นฐานในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเพื่อการนำเข้า ส่งออกผลผลิตการเกษตรต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1) ตัวอย่างผีเสื้อกลางคืน ที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช

2) อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง ขวดฆ่า ขวดดอง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง ถังรักษาความเย็นและเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)

3) สารเคมีต่างที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง เช่น เอทิลอะซีเตท แอลกอฮอล์ 80%

4) อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง ได้แก่ เข็มไร้สนิม เข็มหมุดหัวกลม ไม้จัดรูปร่างแมลง ปากคีบโหลชี้น ตู้อบแมลง ฯลฯ

5) อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น alcohol 50-100%, sodium hydroxide 10%, clove oil และ canabalsam เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องสไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร

6) กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereomicroscope ,compound microscope และกล้องถ่ายภาพ

7) อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา roting และกระดาษไขเขียนแบบ

8) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของผีเสื้อกลางคืนในสกุล Parapoynx

วิธีการ

1) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างผีเสื้อจากแหล่งปลูกพืชทั่วไป ทั้งพื้นที่เกษตร และพื้นที่ป่าทั่วทุกภาคของประเทศไทย ใช้สวิงจับแมลง (insect net) โฉบ เพื่อเก็บตัวอย่างผีเสื้อในช่วงเวลากลางวัน และติดตั้งกับดักแสงไฟ (light trap) เพื่อดึงดูดผีเสื้อช่วงเวลากลางคืน ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า (killing jar) ซึ่งบรรจุน้ำยา ethyl acetate หลังจากผีเสื้อตายแล้ว ใช้เข็มไร้สนิม (stainless steel) ปักกลางอกด้านบนเพื่อรักษาตัวอย่างไม่ให้เสียหาย บันทึกรายละเอียด พืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่เก็บตัวอย่างวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง นำตัวอย่างใส่กล่อง เก็บรวมไว้ในกล่องรักษาความเย็นเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเน่าเสีย นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ นอกจากตัวอย่างผีเสื้อที่ได้จากสภาพธรรมชาติแล้ว มีตัวอย่างผีเสื้อที่มีอยู่เดิมในพิพิธภัณฑ์ กรมวิชาการเกษตร ตัวอย่างที่ได้รับจากนักวิชาการ และตัวอย่างจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

2) นำตัวอย่างผีเสื้อที่ได้จากการสำรวจ มาจัดรูปร่าง บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) จัดปีกให้กางออกโดยให้ขอบล่างของปีกคู่หน้าตั้งฉากกับลำตัว ขอบบนของปีกคู่หลังอยู่ใต้ขอบล่างของปีกคู่หน้า นำไปอบให้แห้งในตู้อบ (oven) ปรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15-30 วัน ขึ้นกับขนาดตัวอย่าง

3) นำตัวอย่างผีเสื้อที่รวบรวมได้มาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาดลำตัว รูปร่าง ลักษณะและสี เป็นต้น โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิด ผีเสื้อกลางคืนสกุล Parapoynx ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ ในผีเสื้อบางชนิดซึ่งมีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมากต้องใช้อวัยวะสืบพันธุ์เพศในการจำแนก ซึ่งมีขั้นตอนการทำสไลด์ดังนี้

- ตัดส่วนท้องของผีเสื้อ แช่ในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 % ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หรือต้มในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 % ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 – 20 นาที

- ดูดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ออก เติมน้ำกลั่นเพื่อล้างโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่ยังหลงเหลืออยู่ออกให้หมด ทำซ้ำอีก 1-2 ครั้ง ย้อมสีด้วยเกจส์สเตน (Gage's stain) ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิตฟุซซิน 0.5 กรัม กรดเกลือ 10% 25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ นาน 2-3 นาทีหรือนานถึง 12 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์ของตัวอย่างผีเสื้อที่จะติดสีได้ง่ายหรือยาก

- ย้ายตัวอย่างลงในน้ำกลั่นเพื่อทำการผ่าเอาอวัยวะสืบพันธุ์ออกจากท้อง ถ้าเป็นเพศผู้ใช้ปากคีบปลายแหลมดึงอวัยวะสืบพันธุ์ออกจากท้องได้เลย แต่ถ้าเป็นเพศเมียใช้มีดผ่าตัดผ่าผนังลำตัวด้านข้างออกเพื่อป้องกันการเสียหายของอวัยวะสืบพันธุ์ ใช้พู่กันและปากคีบปลายแหลมทำความสะอาดไขมันส่วนเกินออกให้หมด

- ย้ายตัวอย่างลงแอลกอฮอล์ 30% จัดรูปร่างอวัยวะสืบพันธุ์ ให้ได้ตามลักษณะที่ต้องการ ย้ายตัวอย่างแช่ในแอลกฮอล์ 100% กำจัดน้ำออกให้หมด

- เมาท์ลงบนแผ่นสไลด์แก้ว โดยนำอวัยวะสืบพันธุ์ วางบนสไลด์ที่หยดน้ำยา canada balsam แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 4 - 6 สัปดาห์ จึงนำออกมาศึกษา

4) บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาพร้อมทั้งถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound วาดรูปโดยใช้เครื่องมือ camera lucida ช่วยทำให้ทราบสัดส่วนที่แท้จริงได้ บันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของผีเสื้อ แต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ วัน/เดือน/ปี สถานที่พบตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

5) จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุลและชนิดของผีเสื้อกลางคืนสกุล Parapoynx ที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

6) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง (ผีเสื้อกลางคืนสกุล Parapoynx ทุกชนิดที่รายงานไว้ต้องเก็บรักษาตัวอย่างจริงไว้เพื่อการตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง)

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น เดือนตุลาคม 2556 – สิ้นสุด เดือนกันยายน 2558

สถานที่ แหล่งปลูกพืชสำรวจจากพื้นที่เกษตรและพื้นที่ป่า ของประเทศไทย และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงกลุ่มกีฏและสัตวิวทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาอนุกรมวิธานผีเสื้อกลางคืนสกุล *Parapoynx* ในพื้นที่เกษตรและพื้นที่ป่าของประเทศ โดย พ.ศ. 2556 มีพื้นที่การสำรวจ ทั้งหมด 26 จังหวัด ได้แก่กรุงเทพฯ สุพรรณบุรี สิงห์บุรี ลพบุรี อุทัยธานี ชลบุรี จันทบุรี ระยอง สระแก้ว ฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี ราชบุรี กาญจนบุรี บุรีรัมย์ สุรินทร์ อุบลราชธานี ร้อยเอ็ด กระบี่ ระนอง ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี กำแพงเพชร สุโขทัย ตาก พิษณุโลก และเชียงใหม่ พ.ศ. 2557 มีพื้นที่การสำรวจ ทั้งหมด 12 จังหวัด ได้แก่ กรุงเทพฯ ปทุมธานี กำแพงเพชร ตาก ระนอง ชุมพร เพชรบุรี สมุทรสงคราม เพชรบูรณ์ พิษณุโลก เชียงใหม่ และแม่ฮ่องสอน) การศึกษาครั้งนี้ใช้ผีเสื้อกลางคืนสกุล *Parapoynx* จำนวน 124 ตัวอย่าง จากการตรวจวิเคราะห์ตามหลักอนุกรมวิธาน รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีในพิพิธภัณฑ์แมลงของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร สามารถจำแนกได้ 3 ชนิด ได้แก่ ผีเสื้อกินใบสาหร่ายหางกระรอก, *Parapoynx diminutalis* Snellen; ผีเสื้อหนอนห่อใบข้าวปีกลายขวาง, *Parapoynx fluctuosalis* (Zeller 1899); และผีเสื้อหนอนห่อใบข้าว, *Parapoynx stagnalis* (Zeller, 1852) รายละเอียดดังนี้

Genus *Parapoynx* Hübner

Parapoynx Hübner, 1825, bek. Schmett., 1825: 362 (type species: *Phalaena Pyralis straliotalis* [Denis et Shiffermüller], 1775); Yoshiyasu, 1987: 137

Eustales Clemens, 1861, Acad. Nat. Sci. Philadelphia, Proc., (1860): 216

Nymphuaeela Grote, 1880, North Amer. Entomologist, 1: 97.

1. *Parapoynx diminutalis* Snellen (Figure 1 A B)

Parapoynx longialata Yoshiyasu, 1983, Tinea 11: 120 (type loc.: Chumphon, Thailand)

ชื่อสามัญ ผีเสื้อกินใบสาหร่ายหางกระรอก (Hydrilla leafcutter moth)

รูปร่างลักษณะ

ตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างของปีก (วัดจากโคนปีกถึงปลายปีก) 8.5 มิลลิเมตร (n=9) ริมฝีปากล่างสีขาวชี้ไปด้านหน้า ปล้องที่สองขยายใหญ่มีสีขาวสลับน้ำตาลอ่อน ปล้องที่สามสีขาวมีขนาดเล็ก ริมฝีกปากบนมีนาดค่อนข้างใหญ่ มองเห็นได้ชัดเจน ปล้องที่ 1 สีน้ำตาลอ่อน ปล้องที่สองและสามสีขาว โคนปากปกคลุมด้วยเกล็ดขนสีขาว หัวหน้าสีขาว หนวดเป็นแบบเส้นด้ายโคนหนวดปกคลุมด้วยเกล็ดขนสีขาว ปล้องอกสีขาวสลับดวยสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าเรียวเป็น

รูปสามเหลี่ยมและคู่หลังพื้นปีกสีขาวมีแถบสีน้ำตาลกระจายทั้งทั่วปีก มุมปีกด้านบนมีแถบขนาดใหญ่สีน้ำตาล ขนปลายปีกสีขาวมีแถบสีน้ำตาลบริเวณโคนขน ปีกคู่หลังขนาดเล็กลวดลายคล้ายปีกคู่หน้า ท้องสีน้ำตาลอ่อน สลับสีขาว ขาทั้งสามคู่สีขาว

พืชอาหารและความสำคัญ

หนอนผีเสื้อชนิดนี้นอกจากเป็นศัตรูสำคัญในข้าวแล้วยังเป็นศตรูของไม้น้ำหลายชนิด โดยเฉพาะสาหร่ายหางกระรอก ตัวหนอนเจริญเติบโตและอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืดต่างๆ ในอินเดียและปากีสถานใช้หนอนในการควบคุมวัชพืชในน้ำ (Baloch *et al.* 1980)

เขตการแพร่กระจาย

ประเทศไทย (กรุงเทพฯ) หนอนผีเสื้อชนิดมีถิ่นกำเนิดในส่วนของเอเชียแอฟริกาและออสเตรเลีย (Buckingham and Bennett 1996). Yoshiyasu (1987) รายงานการแพร่กระจายในจังหวัด ชุมพรและตราด ของประเทศไทย Baloch et al. (1980) รายงานในอินเดีย ปากีสถาน สหรัฐอเมริกา

2. ***Parapoynx fluctuosalis*** **(Meyrick, 1899)** (Figure 1 C D)

Nymphula fluctuosalis Zeller, 1852, Lep. Micropt. Caffr., 1852: 27 (Type loc.: South Africa); Tams, 1924: 284

Parapoynx fluctuosalis: Zimmerman, 1958: 267; Yoshiyasu, 1983: 120; Yoshiyasu, 1987: 137

ชื่อสามัญ ผีเสื้อหนอนห่อใบข้าวปีกลายขวาง (rice caseworm)

รูปร่างลักษณะ ความกว้างของปีก (วัดจากโคนปีกถึงปลายปีก) 9.5 มิลลิเมตร (n=20)

ตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างของปีก (วัดจากโคนปีกถึงปลายปีก) 9.5 มิลลิเมตร (n=20) ริมฝีปากล่างสีขาวชี้ไปด้านหน้า ค่อนข้างสั้นเมื่อเทียบกับ *P. stagnalis* ปล้องที่สองขยายใหญ่มีสีขาวสลับน้ำตาลอ่อนด้านในส่วนที่ติดกับหัวสีน้ำตาลเข้ม ปล้องที่สามสีขาวมีขนาดเล็กและสั้น ริมฝีกปากบนมีนาดค่อนข้างใหญ่มองเห็นได้ชัดเจน แบ่งเป็น 4 ปล้อง ปล้องที่ 1 ขนาดเล็กสีขาวสลับน้ำตาลอ่อน ปล้องที่ 2 สีน้ำตาลอ่อน ปล้องที่ 3 และ 4 ขนาดเล็กสีขาว โคนปากปกคลุมด้วยเกล็ดขนสีขาว ส่วนหน้าและหน้าผากสีน้ำตาล หนวดเป็นแบบเส้นด้ายโคนหนวดปกคลุมด้วยเกล็ดขนสีขาวสลับสีน้ำตาล ปล้องอกสีขาวสลับดวยสีน้ำตาลเข้ม ปีกคู่หน้าเรียวเป็นรูปสามเหลี่ยม พื้นปีกสีขาว โคนปีกสีขาวสลับน้ำตาล ปลายปีกมีแถบสีน้ำตาลตัดขวางปีก ขนปลายปีกสีขาวมีแถบสีน้ำตาลเข้มบริเวณโคนขน ปีกคู่หลังขนาดเล็กลวดลายคล้ายปีกคู่หน้า ท้องสีขาว สลับสีน้ำตาลอ่อนและน้ำตาลเข้ม ขาทั้งสามคู่สีขาว

พืชอาหารและความสำคัญ

ม้วนกินใบข้าว

เขตการแพร่กระจาย

ประเทศไทย (กรุงเทพฯ ปทุมธานี ชัยนาท ฉะเชิงเทรา นครนายก ชลบุรี จันทบุรี กาญจนบุรี นครราชสีมา เชียงใหม่ ภูเก็ต) Yoshiyasu (1987) รายงานว่าผีเสื้อชนิดนี้แพร่กระจายได้ทั่วโลก โดยเฉพาะในภูมิภาคแถบร้อนและกึ่งร้อน Robinson (1994) รายงานในมาเลเซีย สิงคโปร์ เกาะสุมาตรา ชวา บาหลี บรูไน รัฐซาบาห์ รัฐซาราวัก ฟิลิปปินส์

3. ***Parapoynx stagnalis* (Zeller, 1852)** (Figure 1 E F)

Nymphula stagnalis Zeller, 1852, Lepid. Micropt. Caffr., p.27 (type loc.: South Africa); Guenée , 1854

Parapoynx stagnalis : Inoue, 1982, Moth of Japan, 1: 372, 2: 243, pl. 44, figs. 46, 47; Yoshiyasu, 1983, Tinea, 11: 123.

Hydrocampa depunctalis Guenée, 1854, Hist. nat. Insectes Lepidop., 8: 274 (type loc.: India).

ชื่อสามัญ หนอนห่อใบข้าว (rice case bearer or rice caseworm)

รูปร่างลักษณะ

ตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างของปีก (วัดจากโคนปีกถึงปลายปีก) 9.1 มิลลิเมตร (n=20)

ตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ความกว้างของปีก (วัดจากโคนปีกถึงปลายปีก) 9.5 มิลลิเมตร (n=20) ริมฝีปากล่างสีขาวชี้ไปด้านหน้า ขนาดยาวเมื่อเทียบกับ *P. diminutalis* และ *P. fluctuosalis* ปล้องที่หนึ่งและสองสีขาวสลับน้ำตาล ปลายปล้องที่สองสีขาว ปล้องที่สามเรียงแหลมมีสีขาว ริมฝีกปากบนมีนาดค่อนข้างใหญ่มองเห็นได้ชัดเจน แบ่งเป็น 4 ปล้อง ปล้องที่ 1 ขนาดเล็กสีขาวสลับน้ำตาลอ่อน ปล้องที่ 2 สีน้ำตาลอ่อน ปล้องที่ 3 และ 4 ขนาดเล็กสีขาว โคนปากปกคลุมด้วยเกล็ดขนสีน้ำตาล ส่วนหน้าและหน้าผากสีขาว หนวดเป็นแบบเส้นด้ายโคนหนวดปกคลุมด้วยเกล็ดสีขาว ปล้องอกสีขาวสลับด้วยสีน้ำตาลอ่อน ปีกคู่หน้าเรียวเป็นรูปสามเหลี่ยม พื้นปีกสีขาว มีจุดสีน้ำตาลเข้ม 2 จุดบริเวณกลางปีก กลางปีกเยื้องไปทางปลายปีกแถบสีน้ำตาล ขนปลายปีกสีขาวมีแถบสีน้ำตาลอ่อนบริเวณโคนขน ปีกคู่หลังขนาดเล็กมีแถบสีน้ำตาลอ่อนกระจายทั่วปีก ท้องสีน้ำตาล สลับสีขาว ขาทั้งสามคู่สีขาว

พืชอาหารและความสำคัญ

หนอนม้วนกัดกินใบข้าว จอกหูหนู

เขตการแพร่กระจาย

ประเทศไทย (กรุงเทพฯ, ฉะเชิงเทรา,เชียงใหม่, ชลบุรี, กาญจนบุรี, จันทบุรี เชียงใหม่) Yoshiyasu (1987) รายงานว่าพบในจังหวัด กาญจนบุรี ตราด จันทบุรี ของประเทศไทย และแพร่กระจายได้อย่างกว้างในภูมิภาคแถบร้อน นอกจากนี้ Robinson (1994) รายงานว่าพบในพม่า มาเลเซีย สิงคโปร์ เกาะสุมาตรา ชวา บาหลี บรูไน รัฐซาบาห์ รัฐซาราวัก ฟิลิปปินส์

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาอนุกรมวิธานผีเสื้อกลางคืนสกุล *Parapoynx* จากพื้นที่เกษตรและพื้นที่ป่าของประเทศ โดยมีพื้นที่การสำรวจ พ.ศ. 2556 ทั้งหมด 26 จังหวัด ได้แก่กรุงเทพฯ สุพรรณบุรี สิงห์บุรี ลพบุรี อุทัยธานี ชลบุรี จันทบุรี ระยอง สระแก้ว ฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี ราชบุรี กาญจนบุรี บุรีรัมย์ สุรินทร์ อุบลราชธานี ร้อยเอ็ด กระบี่ ระนอง ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี กำแพงเพชร สุโขทัย ตาก พิษณุโลก และเชียงใหม่ พื้นที่การสำรวจ พ.ศ. 2557 ทั้งหมด 12 จังหวัด ได้แก่ กรุงเทพฯ ปทุมธานี กำแพงเพชร ตาก ระนอง ชุมพร เพชรบุรี สมุทรสงคราม เพชรบูรณ์ พิษณุโลก เชียงใหม่ และแม่ฮ่องสอน) การศึกษาครั้งนี้ใช้ผีเสื้อกลางคืนสกุล *Parapoynx* จำนวน 124 ตัวอย่าง ผลการตรวจวิเคราะห์ตามหลักอนุกรมวิธาน รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีในพิพิธภัณฑ์แมลงของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จำแนกได้ชนิด ได้แก่ ผีเสื้อกินใบสาก่ายหางกระรอก, *Parapoynx diminutalis* Snellen เป็นศัตรูสำคัญของสาหร่ายหางกระรอก; หนอนห่อใบข้าวปีกลายขวาง, *Parapoynx fluctuosalis* (Zeller 1899); หนอนห่อใบข้าว, *Parapoynx stagnalis* (Zeller, 1852) ตัวอย่างแมลงที่จำแนกชนิดแล้วนำเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

Agassiz D., 1982. Parapoynx stagnalis (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae): acorrection. Entomologist' Gaztte, 33(2): 122. View Abstract

Baloch GM, Sana-Ullah, Ghani MA. 1980. Some promising insects for the biological control of *Hydrilla verticillata* in Pakistan. *Tropical Pest Management* 26: 194-200.

Buckingham GR, Bennett CA. 1996. Laboratory biology of an immigrant Asian moth, *Parapoynx diminutalis* (Lepidotera: Pyralidae), on *Hydrilla verticillata* (Hydrocharitaceae). Florida Entomologist 79: 353-363.

CABI . 2007. The 2007 Edition of the Crop Protection Compendium. CD-ROM. CAB International, Wallingford, UK. CD-ROM.

Common,I.F.B. 1990. Moths of Australia. Melbourne University, Australia . 535 pp.

Habeck D.H., 1982. Caterpillas Of Parapoynx In Relation To Aquatic Plants In Florida. Hyacinth Control J. 12:15-18

Kimball, C.P. 1965. Lepidoptera of Floridae. Pl. Ind., Fla., Dep. Agr. Gainesville, 363 pp.

Magaha,Y.J. 1954. The Contribution to the biology of some Lepidoptera wich feed on certain aquatic flowering plants, Trans. Amer. Micr. Soc. 73: 167-177

Munroc E. 1972. Fascicle I3.I.A. Pyraloidea (in part) in Dominick, R.B.,et al. 1972. The Moths of America Nroth of Mexioco. London, 134 pp.

Robinson, G. S., K. R. Tuck and M. Shaffer, 1994. *A field Guide to the Smaller Moths of South-east Asia.* 308 pp., 32 col. Pls. Malaysia Nature Society, Kuala Lumpur.

Yutaka Yoshiyasu. 1987. The Nymphulinae (Lepidoptera: Pyralidae) from Thailand, with Descriptions of a New Genus and Six New Species. *In* MicroLepidoptera of Thailand. Entomological Laboratory, University of Osaka Prefecture. Japan. 133-184.

ภาคผนวก

Table 1 Data of Genus *Parapoynx* in Thailand

Scientific name	Common name	Host	Affected Plant Parts	Distribution	Number Of specimens
Parapoynx diminutalis Snellen	Hydrilla leafcutter moth)	Florida elodea	leaf	Bangkok	9
Parapoynx fluctuosalis (Zeller 1899)	Casewor)	rice	leaf	Bangkok Pathum Thani Kanchanaburi Roi Et	46
Parapoynx stagnalis (Zeller, 1852) (Figure 1)	Rice Case Bearer or Rice Caseworm	rice	leaf	Bangkok Pathum Thani Chainat Chachoengsao Chon Buri Chanthaburi Kanchanaburi Nakhon Ratchasima Chiang Mai	69

Figure 1 Genus *Parapoynx*

A-B *P. diminutalis*, A. Head structure B. Wing color and pattern

C-D *P. fluctuosalis*, C. Head structure D. Wing color and pattern

E-F *P. stagnalis*, E. Head structure F. Wing color and pattern

อนุกรมวิธานของแตนเบียนไข่วงศ์ใหญ่ Platygastroidea ที่เข้าทำลายหนอนกอข้าว มวนเขียวข้าว และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

Taxonomy and Identification of the Superfamily Platygastroidea (Hymenoptera, Platygastroidea) Attacking Rice Stem Borers, Rice Stink Bugs, and Brown Plant Hoppers

จารุวัตถ์ แต้กุล[1/] ชมัยพร บัวมาศ[1/] เกศสุดา สนศิริ[1/]
อาทิตย์ รักกสิกร[1/] สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์[1/]
จินตนา ไชยวงค์[2/] วันทนา ศรีรัตนศักดิ์[2/]
[1/]กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว

รายงานความก้าวหน้า

ข้าวเป็นพืชเศษฐกิจหลักที่สำคัญของประเทศ ทั้งในแง่การส่งออกและบริโภคภายในประเทศ ปัญหาหลักในระบบการปลูกข้าวในปัจจุบันคือ การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชอย่างกว้างขวาง ซึ่งส่งผลกระทบหลายประการ อาทิความปลอดภัยด้านอาหาร การสร้างความต้านทานของแมลงศัตรูข้าวที่เพิ่มสูงขึ้น การใช้แตนเบียนไข่ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าว ถือเป็นควบคุมแมลงศัตรูข้าวโดยชีววิธีที่สำคัญและมีประโยชน์ ทั้งในแง่ความปลอดภัยและการรักษาสมดุลในระบบนิเวศเกษตร การทราบถึงชนิดของแตนเบียนไข่สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการนำมาใช้ประโยชน์ในอนาคต อาทิการลดการนำเข้าแตนเบียนมาจากต่างประเทศ แต่ทั้งนี้งานอนุกรมวิธานแมลงเพื่อระบุชนิดของแตนเบียนไข่ในแปลงปลูกข้าวในประเทศไทยค่อนข้างน้อย กรมการข้าวศึกษาเพียงระดับสกุลและการนำไปใช้ประโยชน์โดยตรงต่อเกษตรกร ส่วนการแนวทางการวินิจฉัยชนิดศึกษาจากเอกสารวิชาการจากต่างประเทศ ไม่มีข้อมูลพื้นฐานโดยตรงจากในประเทศ แตนเบียนไข่วงศ์ใหญ่ Platygastroidea เป็นแตนเบียนที่มีความสำคัญเข้าทำลายแมลงอาศัยได้สูงถึง 9 อันดับแต่ยังไม่มีการวิจัยในระดับชนิดของแมลงในกลุ่มนี้ในประเทศไทยอย่างจริงจัง แนวทางการวินิจฉัยในระดับชนิดถือว่าสำคัญยิ่ง เป็นการขยายขอบเขตงานวิจัยในสาขาอื่น ทั้งนี้ความก้าวหน้าของผลการทดลองในระยะเวลา 2 ปี ประกอบด้วยการได้ตัวอย่างแตนเบียนในกลุ่ม Platygastroidea จำนวน 300 ตัวอย่าง แตนเบียนนอกเหนือจากกลุ่ม Platygastroidea จำนวน 250 ตัวอย่าง นำตัวอย่างที่เก็บทั้งหมด มาทำการจัดจำแนกในระดับ วงศ์ วงศ์ย่อย พบว่า วงศ์ย่อย Selioninae จำนวน 120 ตัวอย่าง สกุล *Gryon*

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-29-56

จำนวน 35 ตัวอย่าง วงศ์ย่อย Telenominae พบจำนวนสูงถึง 255 ตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่แล้วเป็นแตนเบียนไข่ในสกุล *Telenomus* และ *Trissolcus* ดำเนินการหาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญเพื่อจัดทำแนวทางการวินิจฉัยได้ลักษณะของวงศ์ย่อยจำนวน 3 วงศ์ย่อย จัดทำบาร์โค้ดและแทคป้ายชื่อรายละเอียดของแต่ละตัวอย่างเพื่อจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลง (local database)

คำนำ

แมลงในกลุ่ม ผึ้ง ต่อ และแตน (Hymenoptera) จัดว่าเป็นแมลงกลุ่มที่มีความสำคัญมากที่สุดในแง่แมลงที่มีประโยชน์ ความหลากชนิดของแมลงในกลุ่มนี้มีมากกว่า 115,000 ชนิด (LaSalle and Gauld, 1993) จากการศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic position) พบว่า Hymenoptera มีวิวัฒนาการความสัมพันธ์ใกล้เคียงมากที่สุด (sister group) ต่อกลุ่มแมลงที่มีการเจริญเติบโตแบบครบวงจรหรือ Holometabola (Sharkey, 2007; Savard *et al*., 2006) โดยทั่วไปแล้วแมลงในกลุ่มผึ้ง ต่อ แตน แบ่งเป็น 2 กลุ่มหลักได้แก่ กลุ่มกินพืช paraphyletic Symphyta (sawflies, woodwasps) และแมลงผสมเกสร มด และ แตน monophyletic Apocrita ซึ่งประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย monophyletic Aculeata และ polyphyletic Parasitica กลุ่มย่อย Aculeata และ Parasitica เป็นแมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในแง่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มแตนเบียน (parasitoids wasps) พบว่าการนำเข้าแตนเบียนเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช (classical biological control) ประสบความสำเร็จสูงถึง 87% จากการนำเข้าแมลงศัตรูธรรมชาติทั้งหมด(Greathead, 1986; Lasalle and Gauld, 1993)แมลงในกลุ่มแตนเบียนมีความน่าสนใจมากที่สุดในกลุ่มแมลงศัตรูธรรมชาติในแง่ของชีววิทยา แมลงในกลุ่มนี้สามารถอาศัยบริโภคอาหารทั้งในตัวเหยื่อ (endoparasitoids) และบนตัวเหยื่อ (ectoparasitoids) แตนเบียนแตกต่างจาก ตัวห้ำและตัวเบียนกล่าวคือ ตัวห้ำ (predator) เข้าทำลายและฆ่าเหยื่อโดยทางตรงและครั้งละหลายตัว ตัวเบียน (parasite) สร้างความรำคาญหรือบาดเจ็บให้กับเหยื่อแต่จะไม่ฆ่าเหยื่อในทางกลับกันแตนเบียน (parasitoids) เข้าทำลายเหยื่อครั้งละ 1 ตัว ตัวอ่อนกัดกินอวัยวะภายในเหยื่อและทำให้เหยื่อตายในที่สุด จำนวนของแตนเบียนภายในเหยื่ออาจแตกต่างกัน มีเพียงแค่ 1 ตัว (solitary) หรือหลายตัว (gregarious)

ความสำคัญของแตนเบียนประกอบไปด้วย 1) ช่วยรักษาสมดุลของระบบนิเวศ แตนเบียนเข้าทำลายเหยื่อจัดเป็นการรักษาระดับการระบาดของแมลง 2) สามารถใช้ในการวัดระดับการแพร่กระจายของแมลง พบว่าหากมีแตนเบียนชนิดใดอยู่เป็นจำนวนมาก อาจมีผลมาจากความอุดมสมบูรณ์ของเหยื่อ 3) การใช้แตนเบียนควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี พบว่าเป็นวิธีการที่ประสบความสำเร็จทั้งแมลงศัตรูทางการเกษตร ป่าไม้ และทางการแพทย์ และยังช่วยลดระดับการใช้สารเคมีควบคุมแมลงศัตรูพืช 4) แมลงศัตรูพืชลดระดับความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลง และในที่สุดแล้ว 5) ช่วยส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม

แตนแบนไข่ คือแตนเบียนที่เข้าทำลายไข่ของเหยื่อ พบว่ามีการใช้แตนเบียนไข่ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีถึง 7 วงศ์ และมี 1 ชนิด ผลิตเพื่อเป็นการค้าและประสบความสำเร็จในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ได้แก่ *Trichogramma* (Mills, 2010) ทั้งนี้จากแตนเบียนไข่ที่ถูกค้นพบ แต่ยังมีแตนเบียนไข่อีกหลายชนิดที่อยู่ในธรรมชาติที่ยังไม่มีการค้นพบและศึกษา เห็นได้ชัดจากการค้นพบแตนเบียนไข่ชนิดใหม่ในกลุ่ม Platygastroidea พบว่ามีสูงกว่าเดิมประมาณ 2-20 เท่าของที่มีการค้นพบมาก่อน ตัวอย่างเช่น ในกลุ่ม *Trichoteleia* Kieffer ค้นพบ 42 ชนิดจากเดิมมีรายงานแค่ 2 ชนิด (Talamas *et al.*, 2011), ในgenus *Fusicornia* Risbec รายงานว่ามีแมลงชนิดใหม่ถึง 14 ชนิด จากเดิมมีการค้นพบ 6 ชนิด (Taekul *et al.*, 2008) จากจำนวนแตนเบียนไข่ที่เพิ่มขึ้นนี้ อาจมีกลุ่มที่มีศักยภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชที่ยังไม่มีการศึกษาอยู่

แตนเบียนวงศ์ใหญ่ Platygastroidea จัดเป็นแตนเบียนไข่ที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง มีการจัดจำแนกสายบรรพบุรุษในกลุ่มเดียวกันกับวงศ์ใหญ่ Prototrupoidea และ Cynipoidea สร้างเครือข่ายความสัมพันธ์ชนิด monophyly (Sharkey, 2007) ระดับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน มีการรวบรวมข้อมูลปัจจุบันใน Hymenoptera On-line database โดย Johnson (2011) มีเพียง 1 วงศ์ได้แก่ Platygastridae ประกอบด้วย 5 วงศ์ย่อยและมีความหลากชนิดดังต่อไปนี้ Platygastrinae (43 genera, 1,491 species), Sceliotrachelinae (28 genera, 119 species), Scelioninae (152 genera, 2,308 species), Teleasinae (12 genera, 504 species), และ Telenominae (20 genera, 886 species) มีเขตการแพร่กระจายครอบคลุมทั่วโลก จากรายงานการศึกษาแมลงในกลุ่มนี้เขตร้อนชื้นเป็นเขตที่ได้มีการศึกษาน้อยที่สุด (Austin *et al.*, 2005) แตนเบียนไข่ Platygastroidea มีศักยภาพสูงในการเข้าทำลายแมลงเหยื่อ พบว่าสามารถเข้าทำลายแมลงถึง 9 อันดับ (Austin *et al.*, 2005) เป็นแตนเบียนไข่กลุ่มที่มีความสำคัญกลุ่มหนึ่งที่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีอย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะในวงศ์ย่อย Telenominae สามารถใช้ในการควบคุมแมลงทางชีววิธีในทุกกรรมวิธี (classical, augmentation และ conservation biological control) มีการนำเข้าแตนเบียนไข่ Telenomines มากกว่า 30 ชนิด (classical biological control) และประสบความสำเร็จในการควบคุมแมลงศัตรูพืช (Orr, 1988)

ปัญหาหลักที่ต้องทำการวิจัยนอกจากปัญหาโดยตรงของแมลงศัตรูข้าว ซึ่งนับว่าเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของประเทศแล้ว ยังมีปัญหาด้านความหลากชนิดของแมลงในกลุ่มนี้ จากการศึกษาวิจัยในระยะเวลา 5 ปีที่ผ่านมา มีการค้นพบแมลงชนิดใหม่ในวงศ์ Platygastridae มากกว่า 1,000 ชนิด โดยประมาณ โดยเฉพาะจากภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ถึงแม้ว่าศัตรูหลักของแตนเบียนไข่ชนิดนี้คือมวนและเพลี้ยจักจั่น แต่ยังไม่มีรายงานความหลากชนิดทางอนุกรมวิธานในเชิงลึก ของแมลงศัตรูธรรมชาติในกลุ่ม Platygastroidea ในนาข้าวในประเทศไทยมาก่อน

ผลของงานวิจัยนี้ทำให้มีข้อมูลของแตนเบียนศัตรูธรรมชาติ ของแมลงศัตรูข้าว ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อ ประกอบเป็นแนวทางในการควบคุมการระบาดของแมลงศัตรูข้าวในอนาคต ทั้งยังช่วยลดการนำเข้าแตนเบียนจากต่างประเทศเมื่อพบการระบาด นักวิจัยที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการควบคุมแมลง

ศัตรูข้าวโดยชีววิธี สามารถจัดจำแนกชนิดของแตนเบียนไข่ ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญ และพัฒนาเพื่อลดการใช้สารเคมีควบคุมแมลงศัตรูข้าว ทั้งยังส่งผลในการลดความต้านทานต่อสารเคมีของแมลงศัตรูข้าว นอกจากนี้ทำให้เกษตรกรตระหนักถึงแมลงที่มีประโยชน์ที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติในแปลงปลูกข้าว ทั้งนี้หากมีการค้นพบแตนเบียนไข่ของแมลงศัตรูข้าวคาดว่าจะนำประโยชน์อย่างใหญ่หลวงมาสู่ประเทศไทย

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้คือ เพื่อทราบชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ ลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา ของแตนเบียนไข่วงศ์ใหญ่ Platygastroidea รวมทั้งการได้ตัวอย่างแตนเบียนไข่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กับดักแมลงประกอบไปด้วย Yellow pan trap, Malaise trap, Slam trap, สวิง
2. ethanol ความเข้มข้น 95% เพื่อใช้ในการจัดเก็บตัวอย่างสดของแมลง
3. กระดาษคุณภาพสูงเพื่อการจดบันทึก specimens
4. อุปกรณ์บันทึกเขตการแพร่กระจายในระดับละเอียด (GPS)
5. Forceps ขนาดเล็ก
6. ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับตัวอย่างสด
7. กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope แว่นขยายขนาด 10 เท่าขึ้นไป
8. สารเคมีในการทำแห้งตัวอย่างแมลง
9. พัดลมดูดอากาศ (Laminar Flow Clean Air Bench)
10. โรงเรือนด้านข้างเป็นตาข่ายตาถี่ หลังคาคลุมพลาสติก สำหรับเพาะเลี้ยงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และมวนเขียวข้าว
11. โรงเรือนทดลอง
12. กล้องจุลทรรศน์สเตริโอแบบกำลังขยายสูงสำหรับงานทางอนุกรมวิธานแมลง Leica M205 C พร้อมเลนซ์ Planapo Objective 1.0x

วิธีการ

<u>การเก็บและรักษาตัวอย่างแตนเบียนไข่ (Acquisition of research material)</u>

ตัวอย่างแมลงจะถูกเก็บโดย 2 กรรมวิธีประกอบไปด้วย การเก็บตัวอย่างแห้งและการเก็บตัวอย่างสดเพื่องานวิจัยทางชีวโมเลกุล ใช้ 4 วิธีพื้นฐานทางกีฏวิทยาในการเก็บตัวอย่างได้แก่ สวิงโฉบแมลง yellow pan traps, Malaise trap และ Slam trap. การใช้ yellow pan trap จะทำการเก็บแมลงทุกวัน สำหรับ Malaise trap และ Slam trap สามารถเว้นระยะเวลา 5-10 วัน นำแมลงออกจากกับดักโดยใช้ ตาข่ายความละเอียดพิเศษ (fine-mesh aquarium net) เก็บใน 95% ethanol

หลังจากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส รอเพื่อเตรียมตัวอย่างแห้ง หรือทั้งนี้สำหรับตัวอย่างบางส่วน สามารถนำมาสกัด ดี เอ็น เอ ต่อไป

การจัดจำแนกโดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงที่เก็บได้จากแปลงปลูกข้าวทั้งในและนอกฤดูปลูก จะถูกจัดจำแนกในระดับอันดับ (order) นับจำนวนของแมลงในแต่ละอันดับในแต่ละครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่าง ทั้งนี้เพื่อศึกษาถึงศักยภาพของกับดัก วิธีการเก็บแมลง แมลงในกลุ่มเป้าหมาย Hymenoptera จะถูกแยกกลุ่มในระดับ Superfamily การจัดแบ่งในหมวด วงศ์และสกุล (Family และ genus) ดำเนินการเฉพาะในกลุ่มที่ต้องการศึกษา Chalcidoidea (Trichogrammatidae) และ Platygastroidea (Platygastridae) เอกสารหลักที่ใช้ในการจัดจำแนกได้แก่ “Hymenoptera of the world: an identification guide to families” (Masner 1993) และความร่วมมือจากนักวิจัยจากประเทศแคนนาดา (*CNCI:Canadian* National *Collection* of *Insects)* การศึกษาภายใต้กล้อง stereo microscope ใช้โปรแกรมการถ่ายภาพ AutoMontage หรือ Cartograph extended-focus โดยใช้ JVC KY-F75U digital camera, Leica Z16 APOA สำหรับการถ่ายภาพและการวัดระยะโดยได้รับความร่วมมือจาก Platygastroid PBI project ประเทศ สหรัฐอเมริกา

ลักษณะทางสันฐานวิทยาที่ใช้ในการทดลอง

ลักษณะและคำศัพท์ทางสันฐานวิทยาที่ใช้ในการทดลอง: A1, A2, ... A12: antennomere 1, 2, ...12; claval formula (ลักษณะเฉพาะของแมลงในกลุ่มนี้คือ multiporous basiconic sensilla ส่วนล่างหนวดของแมลงเพศเมีย (Bin, 1982); POL: posterior ocellar line, ระยะที่สั้นที่สุดระหว่าง inner margins of posterior ocelli; OOL: ocular ocellar line, ระยะที่สั้นที่สุดจาก inner orbit และ outer margin ของ lateral ocellus (Masner, 1980); T1, T2, ... T7: metasomal tergite 1, 2, ... 7. ลักษณะทาสัณฐานวิทยานอกเหนือจากนี้อ้างอิงจาก Masner (1980) และ Mikó *et al*. (2007).

การลงทะเบียนและระบบฐานข้อมูลแตนเบียนไข่ในประเทศไทย

หากมีการค้นพบชื่อวิทยาศาสตร์ชนิดใหม่ของโลกจะมีการตีพิมพ์และขึ้นทะเบียนกับ IZCN-Zoobank (Polaszek et al. 2005) รวมถึงสถานที่ ที่ค้นพบ รูปแบบการเขียนตีพิมพ์ผลงานวิจัย (taxonomic description) ดำเนินการตามแบบมาตรฐานของ Pyle *et al*. (2008) และ Johnson *et al*. (2008) ตัวอย่างแมลงทั้งหมดจะถูกเก็บรวบรวม พร้อมทั้ง ลงบันทึกเขตการแพร่กระจาย แหล่งที่เก็บ แมลงอาศัย ณ พิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

เวลาและสถานที่

เริ่มดำเนินการตั้งแต่ ตุลาคม 2555 – กันยายน 2556 โดยทำการเก็บตัวอย่าง ณ พื้นที่ปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทยอาทิ จังหวัดสุพรรณบุรี สิงห์บุรี ชัยนาท ทั้งฤดูที่มีการปลูกข้าวและไม่มีการปลูกข้าว ทั้งนี้ในนอกฤดูจะทำการเก็บตัวอย่าวจากพื้นที่ใกล้เคียงแปลงปลูก เพื่อศึกษาถึง alternative hosts ของแตนเบียน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ได้เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย เกี่ยวกับแตนเบียนศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแตนเบียนในกลุ่ม Ichneumonoidea (Braconidae และ Ichneumonidae) ส่วนในวงศ์ใหญ่ Platygastroidea มีรายงานเพียง 2 ชนิดคือ แตนเบียนไข่และดักแด้ของแมลงบั่ว *Platygaster oryzae* Cameron และ แตนเบียนไข่แมลงหล่า *Psix* sp.

นอกจากนี้ได้ทำการทดลองใช้กับดักแตนเบียนเพื่อศึกษาถึง ลักษณะการนำไปใช้และความเหมาะสมต่อพื้นที่เก็บ พบว่ากับดักแตนเบียนชนิด Malaise trap มีศักยภาพในการดักจับแตนเบียนมากกว่าชนิดอื่น เหมาะสำหรับการติดตั้งตลอดฤดูการปลูกข้าว แต่มีข้อจำกัดในแง่ของการติดตั้งและดูแลรักษาจึงทำให้ไม่เหมาะสมในแง่การสำรวจแตนเบียนไข่ในระยะเวลาสั้น ทั้งนี้กับดักสีเหลือง (yellow pan trap) มีความเหมาะสมในการสำรวจแตนเบียนในระยะเวลาสั้น และครอบคลุมพื้นที่การแพร่กระจายมากกว่า Malaise trap เพื่อทราบถึงระยะเวลาที่เหมาะสมของการปลูกข้าว ในการสำรวจแตนเบียน ทำการติดตั้ง Malaise trap ณ แปลงปลูกข้าวอินทรีย์ สวนเฉลิมพระเกียรติ กรมวิชาการเกษตร ตลอดระยะเวลาปลูก ทำการเก็บแตนเบียน 2 วันต่อสัปดาห์ พบว่าระยะที่ข้าวตั้งท้องเป็นระยะที่มีการระบาดของแมลงศัตรูข้าวสูงและพบปริมาณของแตนเบียนกลุ่ม Platygastroidea สูงเช่นกัน จึงใช้ระยะการปลูกข้าวระยะนี้เป็นระยะมาตรฐานในการสำรวจต่อไป

ดำเนินการเก็บตัวอย่างในแปลงปลูกข้าวระยะตั้งท้อง เขตจังหวัด สุพรรณบุรี ชัยนาท อยุทธยา อ่างทอง โดยใช้กับดักสีเหลือง Yellow Pan Trap ดำเนินการ 20 จุด จุดละ 10-15 กับดัก จาก เดือน มีนาคม – มิถุนายน 56 พบว่าส่วนใหญ่เป็นแตนเบียนในวงศ์ย่อย Scelioninae และแตนเบียนไข่ในวงศ์ใหญ่ Chalcidoidea แตนเบียนส่วนใหญ่พบในแหล่งปลูกข้าวที่ไม่ใช้สารเคมีควบคุมศัตรูพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแหล่งปลูกข้าวติดกับพื้นที่ป่าดิบชื้น

วาง Malaise Trap ในแปลงเฝ้าระวังศัตรูพืช ในระยะก่อนฤดูปลูกข้าวจำนวน 1 จุด และในแปลงทดลองปลูกปกติจำนวน 1 จุด ดำเนินการ ณ ศูนย์วิจัยข้าว กรมการข้าว จังหวัดชัยนาท พบว่าแตนเบียนส่วนใหญ่อยู่ในวงศ์ย่อย Telenominae ทั้งนี้ยังพบแตนเบียนวงศ์ใหญ่ Evanoidea ซึ่งเป็นแตนเบียนไข่ของแมลงในกลุ่มแมลงสาบ (Orthoptera) ซึ่งตรงกับแมลงแกลบซึ่งเป็นแมลงส่วนใหญ่ที่พบในกับดัก

ความก้าวหน้าผลการทดลองกล่าวคือ ได้ตัวอย่างแตนเบียนในกลุ่ม Platygastroidea จำนวน 300 ตัวอย่างแตนเบียนนอกเหนือจากกลุ่ม Platygastroidea จำนวน 250 ตัวอย่าง นำตัวอย่างที่เก็บทั้งหมด มาทำการจัดจำแนกในระดับสูง (Higher level Classification) ประกอบด้วยระดับ วงศ์ วงศ์ย่อย ได้ผลการทดลองกล่าวคือ วงศ์ย่อย Selioninae จำนวน 98 ตัวอย่าง สกุล *Gryon* จำนวน 35 ตัวอย่าง และสกุลอื่นๆ เช่น *Calliscelio*, *Idris*, *Calloteleia*, *Triteleia* ในวงศ์ย่อย Telenominae จำนวน 255 ตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่แล้วเป็นแตนเบียนไข่ในสกุล *Telenomus* และ *Trissolcus* พบแตนเบียนซึ่งส่วนใหญ่เป็นศัตรูพืชในวงศ์ใหญ่ Cynipoidea จำนวน 26 ตัวอย่าง ขณะนี้กำลังดำเนินการจัดจำแนกในระดับ สกุลและชนิดต่อไป จัดทำบาร์โค้ดและแทคป้ายชื่อรายละเอียดของแต่

ละตัวอย่างเพื่อจัดเก็บในระบบฐานข้อมูลท้องถิ่นของพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร (local database)

จากรายงานโดย Yasumatsu *et al.* (1975) เกี่ยวกับการสำรวจแมลงศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญและพบว่าในวงศ์ใหญ่ Platygastroidea รายงานการพบแตนเบียนกลุ่มนี้ถึง 5 ชนิดได้แก่ *Telenomus rowani* Gahan, *Telenomus dignoides* Nixon, *Platyscelio abnormis* Crawford, *Gryon nixoni* Masner, และ *Platygaster oryzae* (Cameron) ทั้งนี้จากการสำรวจและเก็บรวมแตนเบียนไข่ พบว่ามีสกุลและชนิดที่ไม่เคยมีการค้นพบมาก่อนในประเทศไทย อาทิเช่น *Calliscelio* sp. Ashmead, *Trissolcus* sp. Ashmead, *Psix* sp. Kozlov ขณะนี้กำลังศึกษาเกี่ยวกับอนุกรมวิธานของแตนเบียนไข่ในสกุลที่สำคัญในแปลงปลูกข้าว ซึ่งประกอบไปด้วย *Gryon*, *Telenomus*, และ *Trissolcus* ได้ลักษณะเฉพาะของสกุลโดยสรุปดังนี้

Gryon ลักษณะโดยรวมใบหน้าหรือ Frons ส่วนใหญ่ไม่มีรอยกดยุบลงไป (depression) ในบางตัวอย่างพบรอยนูนตรงกลางใบหน้า Palpal furmula 2-1 หรือ 2-2 ปล้องหนวดทั้งเพศผู้และเพศเมียมีทั้งสิ้น 12 ปล้อง ไม่มี Prepectus และ Skaphion เส้น submarginal vein ในปีกคู่หลังสมบูรณ์บรรจบส่วนที่เรียกว่า frenal hooks ลักษณะลำตัวใหญ่ หนา มีขนาดโดยเฉลี่ย 5 มิลลิเมตร ส่วนท้องปล้องที่ 2 (T2) มีขนาดยาวกว่าท้องปล้องที่ 3 (T3) ส่วนท้งทั้งหมดสั้นป้อม ปล้องท้องด้านข้างลำตัว (laterotergites) สั้นและฝังลงไปในส่วนของปล้องท้องด้านล่าง (sternites) ตาเดี่ยวด้านข้าง 1 คู่ (lateral ocelli) ตั้งอยู่ไกล้หรือแนบชิดติดกับขอบด้านนอกของตารวม (inner orbits) scutellum มีลักษระมนไม่มีส่วนยื่น (unarmed) mesoscutellum มีหลายรูปร่างลักษณะ

สกุล *Telenomus* และ *Trissolcus* เป็นสกุลหลักในวงศ์ย่อย Telenominae ซึ่งสามารถแยกออกจากสกุลย่อยอื่นได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญคือ ปล้องท้องด้านข้าง metasomal laterotergites เกาะยึดติดกับปล้องท้องส่วนล่าง sternite อย่างหลวมหลวม ดังนั้นจึงทำให้ไม่มีสันด้านข้างลำตัวเหมือนกับวงศ์ย่อยอื่นๆ ปล้องท้องปล้องที่ 2 (T2) มีขนาดใหญ่และยาวที่สุดของปล้องท้องทั้งหมด ปล้องหนวดเพศเมียมี 11 ปล้อง มีน้อยชนิดมากที่มี 10 ปล้อง เพศผู้มีปล้องหนวดทั้งสิ้น 12 ปล้อง

Telenomus ลักษณะพื้นผิวผนังบนส่วนหน้า Frons ส่วนใหญ่เรียบและสะท้อนแสง ปราศจากผิวขรุขระ มีขนแซมอยู่ในตารวม เส้น parapsidal line บางหรือบางครั้งมองไม่เห็น ส่วนของปล้องท้องมีมากกว่า 3 ปล้อง ปล้องท้องปล้องที่ 3 (T3) คอดเข้าตามแนวขวาง ส่วนหัวป้อม

Trissolcus ลักษณะพื้นผิวผนังบนส่วนหน้า Frons ส่วนใหญ่แล้วขรุขระอาจมีขนหรือไม่มีขน ตารวมเรียบไม่มีขนในตา เส้น parapsidal line เป็นร่องลึกเห็นได้อย่างชัดเจน ส่วนท้องส่วนใหญ่เป็นสีดำเกือบทั้งหมด เพศผู้ส่วน scape ของปล้องหนวดขนาดปกติไม่แผ่ขยายออก

ลักษณะที่สำคัญของในแต่ละวงศ์ย่อยเพื่อจัดทำแนวทางการวินิจฉัย

Subfamily Telenominae: Metasoma with wide laterotergites loosely attached to sternites, therefore no impressed submarginal ridge; T2 the largest of all metasomatic tergites: female antennae 11 segments rarely 10 segments, male antennae 12 segments

Subfamily Teleasinae: Metasoma with narrow laterotergites closely attached to sternites to form an impressed submarginal ridge; Lateral ocelli much closer to median ocellus than to inner orbits; T3 the largest of all metasomatic tergites; maginalis several times longer than stigmatlis, postmarginalis absent

Subfamily Scelioninae: Metasoma with narrow laterotergites closely attached to sternites to form an impressed submarginal ridge; Lateral ocelli usually closer to inner orbits than to median ocellus if closer to median ocellus then either T3 is not the largest or marginalis shorter than stigmalis and postmarginalis long, or wings veinless

Key to subfamily of Platygastridae

(1) T2 at most slightly longer or as long as T3 , almost always distinctly shorter than subsequent terga combined; fore wing with stigmal vein and usually postmarginal vein present, the veins rarely indistinct or absent; antennae usually with 11-12 segments, very rarely with 10 or fewer segments; male flagellomere 3 modified.....2

- T2 several times longer than T3, usually as long as or longer than subsequent terga combined;fore wing without stigmal and postmarginal veins, usually veinless; Antennae usually with 10 segments,rarely with fewer segments; male flagellomere 2 or rarely 1 modified.....4

(2) Metasoma with wide laterotergites loosely attached to sternites, therefore no impressed submarginal ridge; T2 the largest of all metasomatic tergites; female antennae 11 rarely 10 segments; male antennae 12-segmented.....Telenominae(Fig.xxx..)

- Metasoma with narrow laterotergites closely attached to sternites to form an impressed submarginal ridge; if ridge absent (rarely) and laterotergites rather wide; T2 rarely the largest; metasoma usually more or less segmented; female antennae usually 12 segments, rarely with fewer segments 3

(3) Lateral ocelli much closer to median ocellus than to inner orbits; T3 the largest of all metasomatic tergites; marginalis several times longer than stigmalis, postmarginalis absent .....Teleasinae (Fig.XXX.)
- Lateral ocelli usually closer to inner orbits than to median ocellus; if closer to median ocllus then T3 not the largest or marginalis shorter than stigmalis and postmarginalis long, wings veinless .....Scelioninae (Fig. XXX)

(4) Body shape mostly selender to very elongate; laterotergites usually narrow and tightly appressed against the sternites, making metasoma more compact; clavomeres in female 4-5 segments and clearly separated; submarginal vein on fore wing mostly absent, sometimes present in primitive species.....Platygastrinae
- Body shape mostly squat to plump; laterotergites relatively wide more or less Telenominae-like ; clavomferes in female 3-segmented completely fused forming a solid single clavomeres; submarignal vien on fore wing tubular, knobbed apically..
..... Sceliotrachelinae

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

งานวิจัยในระดับพื้นฐานถึงชนิด ของแตนเบียนในแปลงปลูกข้าวในประเทศไทยค่อนข้างน้อย ถึงแม้ข้าวจะเป็นพืชเศษฐกิจส่งออกที่สำคัญของประเทศ และมีการรณรงค์ลดการใช้สารเคมีในแปลงปลูกข้าวอย่างกว้างขวาง งานอนุกรมวิธานในระดับชนิดของแตนเบียนไข่ในแปลงปลูกข้าวในประเทศไทย ถูกสำรวจและวิจัยโดย Yasumatsu *et al.* (1975) พบว่าศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญในวงศ์ใหญ่ Platygastroidea มีถึง 5 ชนิดได้แก่ *Telenomus rowani* Gahan, *Telenomus dignoides* Nixon, *Platyscelio abnormis* Crawford, *Gryon nixoni* Masner, และ *Platygaster oryzae* (Cameron) ส่วนกรมการข้าวศึกษาเพียงระดับสกุลและการนำไปใช้ประโยชน์ ศึกษาจากงานวิจัยและแนวทางการวินิจฉัยจากเอกสารวิชาการจากต่างประเทศ ผลการทดลองในครั้งนี้ถือว่ามีบทบาทที่สำคัญยิ่ง ในการขยายและสนับสนุนขอบเขตงานวิจัย ทั้งนี้ความก้าวหน้าผลการทดลองในระยะเวลา 1 ปี ประกอบด้วยการได้ตัวอย่างแตนเบียนในกลุ่ม Platygastroidea จำนวน 300 ตัวอย่าง แตนเบียนนอกเหนือจากกลุ่ม Platygastroidea จำนวน 250 ตัวอย่าง นำตัวอย่างที่เก็บทั้งหมด มาทำการจัดจำแนกในระดับสูง (Higher level Classification) ประกอบด้วยระดับ วงศ์ วงศ์ย่อย พบว่า วงศ์ย่อย Selioninae จำนวน 98 ตัวอย่าง สกุล *Gryon* จำนวน 35 ตัวอย่าง และสกุลอื่นๆ เช่น *Calliscelio*, *Idris*, *Calloteleia*, *Triteleia* อย่างละ 2 – 3 ตัวอย่าง ส่วนในวงศ์ย่อย Telenominae พบจำนวนสูงถึง 255 ตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่แล้วเป็นแตนเบียนไข่ในสกุล *Telenomus* และ *Trissolcus* พบแตนเบียนซึ่งส่วนใหญ่เป็นศัตรูพืชในวงศ์ใหญ่ Cynipoidea จำนวน 26 ตัวอย่าง

ขณะนี้กำลังดำเนินการจัดจำแนกในระดับ สกุลและชนิดต่อไป จัดทำบาร์โค้ดและแทคป้ายชื่อ รายละเอียดของแต่ละตัวอย่างเพื่อจัดเก็บในระบบฐานข้อมูลท้องถิ่นของพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร (local database)

เอกสารอ้างอิง

Austin, A. D., N. F. Johnson, and M. Dowton. 2005. Systematics, evolution, and biology of scelionid and platygastrid wasp (Hymenoptera). Annual Review of Entomology. 50: 553–582.

Bin, F. and N.F. Johnson. 1982. Potential of Telenominae in biocontrol with egg parasitoids (Hym.,Scelionidae). pp. 275–287. *In*: Institut National de la Recherche Agronomique. 1982. Les trichogrammes. Ier symposium international, Antibes, 20–23 avril 1982. Les Colloques de l'INRA.

Greathead, D.J. 1986. Parasitoids in classical biological control. pp. 289–318. *In*: Waage, J. and Greathead, D.J. (Eds), *Insect Parasitoids.* Academic Press, London.

Johnson, N. F. 2011. Hymenoptera (Online). Available. http://hol.osu.edu/ (5 May, 2011).

Johnson, N.F., L. Masner, L. Musetti, L., S. Van Noort, K. Rajmohana, D.C. Darling, A.E. Guidotti and A. Polaszek. 2008. Revision of world species of the genus *Heptascelio* Kieffer (Hymenoptera: Platygastroidea, Platygastridae). Zootaxa. 1776: 1–51.

LaSalle, J. and I.D. Gauld 1993. Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. pp. 1–26. *In*: LaSalle J., Gauld I.D. (Eds), Hymenoptera and Biodiversity. CAB International, Wallingford, UK.

Masner, L. 1980. Key to genera of Scelionidae of the Holarctic region, with descriptions of new genera and species (Hymenoptera: Proctotrupoidea). Memoirs of the Entomological Society of Canada. 1(13): 1–54.

Masner, L. 1993. Superfamily Platygastroidea, pp. 559-563. *In*: Goulet H., and J.T. Huber [eds.], Hymenoptera of the World: An Identification Guide to Families. Ottawa, Agric. Canada.

Mikó, I., L. Vilhelmsen, N.F. Johnson, L. Masner and Z. Pénzes 2007. Skeletomusculature of Scelionidae (Hymenoptera: Platygastroidea): head and mesosoma. Zootaxa. 1571: 1–78.

Mills, N. 2010. Egg parasitoids in biological control and integrated pest management. pp. 389–409. *In*: Consoli, F.L. et al. (Eds), Egg parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma*. Springer Science & Business Media B.V. US.

Orr, D. B. 1988. Scelionid wasps as biological control agents: a review. The Florida Entomologist. 71(4): 506-528.

Polaszek, A., D. Agosti, M. Alonso-Zarazaga, G. Beccaloni, P. de Place Bjørn, P. Bouchet, D.J. Brothers Earl of Cranbrook, N.L. Evenhuis, H.C.J. Godfray, N.F. Johnson, F-K Krell, D. Lipscomb, C.H.C. Lyal, G.M. Mace, S. Mawatari, S.E. Miller, A. Minelli, S. Morris, P.K.L. Ng, D.J. Patterson, R.L. Pyle, N. Robinson, L. Rogo, J. Taverne, F.C. Thompson, J. van Tol, Q.D. Wheeler and E.O. Wilson. 2005. A universal register for animal names. Nature 437: 477.

Pyle, R.L., J.L. Earle and B.D. Greene. 2008. Five new species of the damselfish genus *Chromis* (Perciform es: Labroidei: Pomacentridae) from deep coral reefs in the tropical western Pacific. Zootaxa. 1671: 3–31.

Savard, J., T. Diethard, S. Richards, G.M. Weinstock, R.A. Gibbs, J.H. Werren, H. Tettelin and M.J. Lercher. 2006. Phylogenetic analysis reveals bees and wasps (Hymenoptera) at the base of the radiation of holometabolous insects. Genome Research. 16:1334–1338.

Sharkey, M.J. 2007. Phylogeny and classification of Hymenoptera. Zootaxa. 1668: 521–548.

Taekul, C., N.F. Johnson, L. Masner, K. Rajmohana, and C. Shu–pei. 2008. Revision of the world species of the genus *Fusicornia* Risbec (Hymenoptera: Platygastridae, Scelioninae). Zootaxa. 1966: 1–52.

Talamas, E.J., L. Masner, and N.F. Johnson. 2011. Revision of the Malagasy genus *Trichoteleia* Kieffer (Hymenoptera, Platygastroidea, Platygastridae). ZooKeys. 80: 1–126.

Yasumatsu, K., T. Wongsiri, S. Navavichit, and C. Tirawat. 1975. Approach toward an integrated control of rice pests; Part 1: Survey of natural enemies of important rice pests in Thailand. Plant Protection Service Technical Bulletin No. 24. 22 pp.

ภาคผนวก

Trissolcus sp. Ashmead

Telenomus sp. Haliday

Gryon sp. Haliday

Calliscelio sp. Ashmead

Psix sp. Kozlov

Figure 1 The genera of Platygastroidea, likely to use at biological control program

Figure 2 The Yellow Pan Trap (YPT) setup at the rice paddy at Suphanburi and Chai Nat province

Figure 3 Malaise Trap setup on rice paddy at Rice center, Chai Nat province

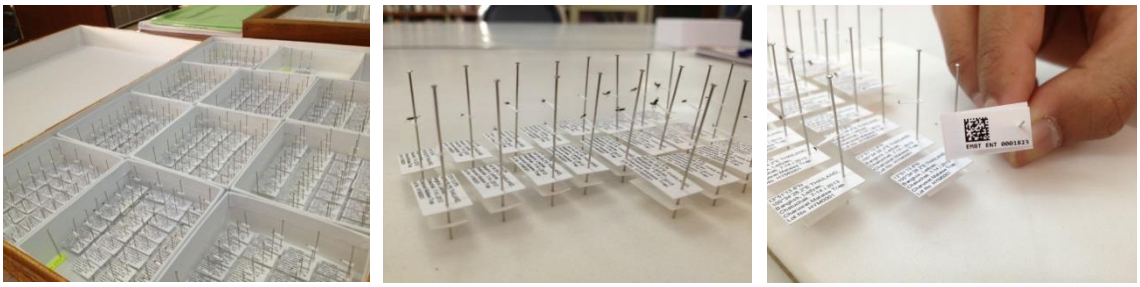


Figure 4 Higher level classification generating using barcode management;
All determination kept in the insect museum local database

สัณฐานวิทยาและลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟดอกไม้ Common Blossom Thrips; *Frankliniella schultzei* (Trybom)

Morphology and DNA Sequence of Common Blossom Thrips; *Frankliniella schultzei* (Trybom)

อิทธิพล บรรณาการ จารุวัตถ์ แต้กุล สุนัดดา เชาวลิต
ชมัยพร บัวมาศ เกศสุดา สนศิริ สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาสัณฐานวิทยาและลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟดอกไม้ *Frankliniella schultzei* (Trybom) โดยการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชต่างๆ เช่น มะเขือ ข้าวโพด หอม พืชตระกูลแตง และ ไม้ดอกไม้ประดับ ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ระหว่างเดือนตุลาคม 2555 ถึง เดือนกันยายน 2557 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน เพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟดอกไม้ได้ 275 ตัวอย่าง ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae ชื่อวิทยาศาสตร์ *Frankliniella schultzei* (Trybom) ทำให้ทราบถึงชนิด ลักษณะการทำลาย พืชอาศัย เขตการแพร่กระจายโดยเพลี้ยไฟดอกไม้จะเข้าทำลายทั้งยอดอ่อน ดอก และใบพืช รวมถึงได้วิธีการ เทคนิคที่เหมาะสม และเรียนรู้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับการหาลำดับพันธุกรรมของยีน COI (Cytochrome Oxidaes subunit I) ของเพลี้ยไฟดอกไม้มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมกับเพลี้ยไฟดอกไม้ตะวันตกที่ 0.07568 และ 0.0844 ตามลำดับ จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดและถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยไฟดอกไม้ นำตัวอย่างเพลี้ยไฟจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลงพร้อมนำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดทำรายชื่อชนิดแมลงศัตรูพืชรองรับปัญหาด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

Abstract

Taxonomy and DNA sequence of common blossom thrips; *Frankliniella schultzei* (Trybom) were studied by surveying and collecting other crops such as eggplant, corn, cucubits and flowers in the Middle, Northeast and Northern part of Thailand during October 2012 and September 2014. Thrips was taken to Entomology

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-30-56

and Zoology Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture for detecting by study the taxonomy and morphology from permanent slides including compared with the specimens of Thirps in DOA Insect Museum. The result from detecting Thrips, 275 were found Thrips in Order Thysanoptera Family Thripidae subfamily Thripinae showed that are common blossom thrips; *Frankliniella schultzei* (Trybom). Some specimens that preserved in 95% alcohol were analyzed by using PCR technique with mitochondrial COI gene in order to reveal lineage. The results of Neighbor Joining/UPGMA showed the closely relation between *Frankliniella schultzei* and *Frankliniella occidentalis* by 0.07568 and 0.0844 respectively. Key and photographic taxonomic characters of *Frankliniella schultzei* (Trybom) were provided.

คำสำคัญ : เพลี้ยไฟดอกไม้ อนุกรมวิธาน อณูชีววิทยา

Keyword *Frankliniella schultzei* Taxonomy Molecular Biology

คำนำ

เพลี้ยไฟเป็นแมลงที่มีขนาดเล็ก ลำตัวยาวประมาณ 0.5-2.0 มิลลิเมตร จัดอยู่ในอันดับ Thysanoptera แบ่งออกเป็น 2 อันดับย่อย (Suborder) คือ Tubulifera และ Terebrantia เพลี้ยไฟมีชื่อสามัญในภาษาอังกฤษคือ thrips ซึ่งเป็นทั้งเอกพจน์และพหูพจน์ เช่นเดียวกันกับคำว่า prey, sheep, swan หรือ moose และถ้าหากเขียนเป็น thrip ไม่มีตัว s ถือว่าไม่ถูกต้อง (Zimmerman, 1948) เพลี้ยไฟมีส่วนปากเป็นแบบเขี่ยดูด (rasping-sucking type) ที่มีกรามซ้ายเพียงข้างเดียว ส่วนกรามข้างขวาหายไปตั้งแต่ระยะตัวอ่อน (Lewis, 1997) อกปล้องแรก (pronotum) ขนาดใหญ่และมีขนที่มีขนาดแตกต่างกันบริเวณขอบปล้อง การเจริญเติบโต (metamorphosis) ของเพลี้ยไฟเป็นแบบกึ่งกลางระหว่างแบบเปลี่ยนแปลงรูปร่างทีละน้อย (gradual metamorphosis) กับแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) ตัวอ่อนในวัยที่ 1 และวัยที่ 2 จะไม่มีปีก เรียกเป็น ตัวอ่อน (nymph) ตัวอ่อนในวัยที่ 3 จะเรียกเป็น ตัวก่อนดักแด้ (prepupa) (Moritz, 1997; Gordh & Headrick, 2001) และ ในระยะที่ 4 เรียกเป็น ดักแด้ (pupa) ก่อนเป็นระยะตัวเต็มวัย (adult) เพลี้ยไฟทั้งสองเพศมีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่เพศผู้มักจะมีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย เพลี้ยไฟหลายชนิดมีการสืบพันธุ์แบบไม่ต้องมีการผสมพันธุ์กับเพศผู้ (parthenogenesis) (Triplehorn and Johnson, 2005) โดยเพลี้ยไฟกลุ่มที่เป็นศัตรูสำคัญของพืชเกือบทั้งหมดอยู่ในวงศ์ Thripidae มีประมาณ 1,700 ชนิด แบ่งเป็น 6 วงศ์ย่อย วงศ์ย่อยที่สำคัญคือวงศ์ย่อย Panchaetothripinae และ Thripinae ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยสามารถทำลายพืชได้ โดยการดูดกลืนน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชในส่วนยอดอ่อน ตาอ่อน ใบ ดอก และผล ทำให้ใบเกิดรอยด่าง สีซีด หรือทำให้ขอบใบแห้ง ตาอ่อนชะงักการเจริญเติบโต เช่น เพลี้ยไฟดอกไม้ เข้าทำลายพืชได้หลายชนิด อาทิ ข้าวฟ่าง ถั่วลิสง ฝ้าย พริก หอมใหญ่ และไม้ดอกหลายชนิด

โดยจะทำลายใบอ่อนและดอก ตั้งแต่ระยะยังเป็นตุ่มตา นอกจากนี้ยังเป็นพาหะนำโรคมาสู่พืชตระกูลถั่ว (Palmer *et al.*, 1989) เพลี้ยไฟดอกไม้ (Common Blossom Thrips) เป็นเพลี้ยไฟชนิดที่เป็นศัตรูพืชสำคัญของพืชหลายชนิด อาทิ ข้าวฟ่าง ถั่วลิสง ฝ้าย พริก หอมใหญ่ และไม้ดอกหลายชนิด บางชนิดเป็นพาหะนำโรค TSWV มาสู่พืชจำพวกถั่วเหลือง (ศิริณี, 2544) แต่จากการเก็บสำรวจรวบตัวอย่างเพลี้ยไฟชนิดนี้ พบว่า เพลี้ยไฟดอกไม้ในเขตภาคเหนือจะมีลำตัวสีเข้ม ในขณะที่เพลี้ยไฟดอกไม้ในเขตภาคกลางจะมีลำตัวสีเหลือง แต่เมื่อนำมาทำสไลด์ถาวรเพื่อจำแนกชนิดแล้วพบว่าเป็นชนิดเดียวกัน ทั้งนี้ปัจจุบันความรู้ทางด้านอณูชีววิทยาได้ก้าวหน้าไปอย่างมาก และมีบทบาทสำคัญในการวินิจฉัยด้านต่างๆ มากขึ้นเรื่อยๆ ให้ผลการวินิจฉัยที่รวดเร็วและถูกต้องกว่า ทำให้เทคนิคทางอณูชีววิทยาได้ถูกพัฒนานำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมาย รวมทั้งด้านการหาลำดับพันธุกรรม (DNA Sequencing) ของแมลง และ Phylogeny ของแมลง เช่น แมลงสาบ ตั๊กแตน และปลวก (Srinivas, 1995) การศึกษาลำดับพันธุกรรมจะทำให้ทราบถึงความแปรปรวนของลำดับยีนของเพลี้ยไฟดอกไม้ในแต่ละพื้นที่ ฉะนั้นการศึกษาลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟดอกไม้จึงมีบทบาทสำคัญในการช่วยวินิจฉัยชนิด และให้ผลการจำแนกชนิดถูกต้องแม่นยำ มีความสะดวกรวดเร็ว อีกทั้งผลการศึกษายังเป็นที่ยอมรับในระดับสากล การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ควบคู่กับการศึกษาลำดับพันธุกรรม จะช่วยแก้ปัญหาในการตรวจวินิจฉัยชนิดเพลี้ยไฟดอกไม้ที่มีสีของลำตัวแตกต่างกันและมีข้อได้เปรียบเรื่องการได้มาของข้อมูลซึ่งไม่มีหน่วยงานอื่นในประเทศทำวิจัยเชิงลึกเช่นนี้ อีกทั้งยังเป็นการริเริ่มการวิเคราะห์ชนิดศัตรูพืชโดยวิธีใหม่ที่ทันสมัย สามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษาให้กับเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงทั้งในระยะไข่และตัวอ่อนได้อย่างทันต่อเหตุการณ์ ช่วยลดระยะเวลาการกักเก็บสินค้าเพื่อตรวจสอบ สร้างความน่าเชื่อถือและไม่ส่งผลเสียในภาพรวม ทั้งนี้การหาลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟดอกไม้ ที่วิเคราะห์ได้นี้สามารถนำมาศึกษา phylogeny กับเพลี้ยไฟชนิดอื่นๆ ได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

ตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง ปากคีบ พู่กัน ขวดดอง กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ถังรักษาความเย็น ฯลฯ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ 50-100%, AGA, โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10%, โคลฟออย และ แคนาดาบัลซัม เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องสไลด์ถาว ตู้อบสไลด์ถาวร กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope ที่ติด camera lucida เป็นอุปกรณ์เสริมช่วยในการวาดภาพแมลงที่พบ อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาลำดับพันธุกรรม ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์ 99% ไอโซโพรพานอล กรดอะซิติก dNTP mixtures, 10X PCR buffer, Automatic pipette อะกาโรสเจล สารละลายเอทิเดียมโบรไมด์บีกเกอร์ หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ หลอดพีซีอาร์ เครื่องปั่นเหวี่ยง เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง DNA

Thermal Cycle เครื่อง Electrophoresis, Gel Documentary, Gene Amp PCR อุปกรณ์ในการบันทึกภาพ ได้แก่ กล้องถ่ายภาพ ปากกา rotring กระดาษไขเขียนแบบ และเอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟ

วิธีการ

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชต่างๆ ทุกภูมิภาคของประเทศไทย เพื่อศึกษาความแปรปรวนของลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟดอกไม้ ในพื้นที่ภูมิภาคเดียวกันและระหว่างภูมิภาค โดยใช้วิธีการตีหรือเขย่าส่วนของพืชเช่น ใบ และดอก ให้เพลี้ยไฟตกลงบนกระดาษขาวที่รองรับ และใช้พู่กันเขี่ยเพลี้ยไฟแต่ละตัวลงในขวดที่บรรจุน้ำยา AGA สำหรับศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และแอลกอฮอล์ 95% สำหรับศึกษาลำดับพันธุกรรม รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่มีชีวิตด้วย บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟที่เก็บได้ เช่น พืชที่เก็บ ส่วนของพืชที่เก็บ สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) และชื่อผู้เก็บ ลงในขวดดองเพลี้ยไฟ นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาพฤติกรรมและการเจริญเติบโต และนำตัวเต็มวัยไปทำสไลด์ถาวร

วิธีการทำสไลด์ถาวรของเพลี้ยไฟ มีขั้นตอนดังนี้

- ย้ายตัวอย่างเพลี้ยไฟจากขวดลงเก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 60 % แช่ทิ้งไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง
- ย้ายลงในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) 5% เพื่อทำให้สีของเพลี้ยไฟจางลง เวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างเพลี้ยไฟ เจาะส่วนท้องของเพลี้ยไฟบริเวณต้นขาของขาหลังด้วยเข็มแหลมขนาดเล็ก เพื่อให้ของเหลวภายในออกจากตัวเพลี้ยไฟ
- ย้ายเพลี้ยไฟที่เจาะแล้วลงในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 50 % ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที
- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 60 % ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 70 % ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 80 % ทิ้งไว้ 20 นาที
- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95 % ทิ้งไว้ 10 นาที
- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 100 % ทิ้งไว้ 5 นาที ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง
- ย้ายลงในโคลฟออย (clove oil) เพื่อให้ตัวอย่างของเพลี้ยไฟใส แช่ทิ้งไว้ 20 – 30 นาที
- หยดแคนาดาบัลซัม (Canada balsam) ซึ่งเป็นน้ำยาเมาท์สไลด์ (Mounting media) เพียงเล็กน้อยลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ ป้ายเพลี้ยไฟลงในหยดแคนาดาบัลซัมลงบนกึ่งกลางของแผ่นสไลด์แก้ว ค่อยๆคว่ำแผ่นสไลด์ช้าๆ จนกระทั่งจรดแผ่นแก้วปิดสไลด์ รีบพลิกแผ่นสไลด์แก้วให้ด้านแผ่นแก้วปิดสไลด์กลับขึ้นด้านบน นำไปอบให้แห้ง วาดภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของแมลงที่ได้ศึกษา

การศึกษาลำดับพันธุกรรม

นำตัวอย่างเพลี้ยไฟดอกไม้ที่เก็บในสารละลายแอลกอฮอล์ 95% (ตัวอย่างกลุ่มเดียวกับตัวอย่างที่ใช้ทำสไลด์ถาวร) ที่ผ่านการจำแนกชนิดเบื้องต้นภายใต้ stereo microscope เข้าสู่กระบวนการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) เพื่อศึกษายีน COI โดยดัดแปลงวิธีของ Moritz et. al., (2000) และ Juthayothin (2004)

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ มีดังนี้

- บดตัวอย่างเพลี้ยไฟ 1 ตัวอย่างใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ด้วย sterilized polypropylene pestle ในสารละลาย STE buffer [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)] 100 ไมโครลิตร
- นำสารละลายที่ได้ incubated ใน water bath ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 14,000 รอบ/นาที เวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายส่วนใสเก็บไว้
- เติม isopropanol จำนวน 5 ส่วนต่อสารละลายส่วนใส 3 ส่วน (5:3) และนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 13500 รอบต่อนาที เวลา 15 นาที ที่อุณภูมิห้อง ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งและทำซ้ำอีกรอบ
- ตั้งทิ้งไว้ให้ isopropanol ระเหยจนแห้ง หลังจากนั้นเติม TE buffer 30 ไมโครลิตร เพื่อนำไป วิเคราะห์หาในขั้นตอน PCR (polymerase chain reaction) ต่อไป

<u>การศึกษายีน COI โดยเทคนิค PCR</u>

- ศึกษายีน COI (cytochrome oxidase subunit I) ซึ่งมีขนาด 642 bp และเป็น Conserved region ของแมลงทุกชนิด (บาร์โค้ด) โดยใช้ primer UEA 7 และ UEA 10 ลำดับของ primer คือ

UEA 7	5’-TACAGTTGGAATAGACGTTGATAC-3’
UEA 10	5’-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3’

- นำสารละลายส่วนใสที่ได้ 2 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ 20 µl reaction volumes 12.5 µl ddH20, 2 µl 10X PCR buffer (Promega), 2 µl 25 mM MgCl2, 0.5 µl dNTP (10 mM each), 0.5 µl 20 mM forward and reverse primers และ Tag DNA polymerase 1 unit (Promega)

ขั้นตอนและอุณหภูมิของการทำ PCR คือ

Initial denaturation	ที่ 95 °C	10 นาที	
Denaturation	ที่ 95 °C	30 วินาที	35 cycles
Annealing	ที่ 55 °C	40 วินาที	
Extension	ที่ 72 °C	45 วินาที	
Final extension	ที่ 72 °C	6 นาที	

- หลังจากขั้นตอน PCR นำสารที่ได้ 10 ไมโครลิตรทดสอบใน 1% w/v agarose gel Tris-borate-EDTA

โดยผสมกับ Loading dye อัตราส่วน 5:1 หยดลงบนหลุม agarose gel ที่เตรียมไว้ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เวลา 30 นาที แล้วนำเจลไปแช่ใน เอทิเดียมโบรไมด์ ก่อนนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตด้วยเครื่อง Gel Photodocumentation System บันทึกภาพและวิเคราะห์ผล

- วิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบส นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ยีนของ NCBI

-การบันทึกข้อมูล

พืชอาศัย สถานที่ วันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง

เวลาและสถานที่ : เดือน ตุลาคม 2555 ถึง เดือน กันยายน 2557

1. แหล่งปลูกพืชทั่วทุกภาคของประเทศไทย
2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง และกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
3. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาสัณฐานวิทยาและลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟดอกไม้ โดยการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชทั่วทุกภาคของประเทศไทย นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาตรวจวิเคราะห์ตามหลักอนุกรมวิธาน โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยซึ่งปรับปรุงมาจาก (Palmer *et al.*, 1989) และ (ศิริณี, 2544) รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างแมลงในพิพิธภัณฑ์แมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร สามารถวิเคราะห์ชนิดเพลี้ยไฟดอกไม้ ได้ 275 ตัวอย่าง ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae วงศ์ย่อย Thripinae ชื่อวิทยาศาสตร์ *Frankliniella schultzei* (Trybom, 1910) โดยมีรายละเอียดดังนี้

สกุล (Genus) *Frankliniella* Karny

Type species: *Thrips intonsa* Trybom, 1914

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological Description)

เป็นเพลี้ยไฟชนิดที่มีปีก หนวดมี 8 ปล้อง ปล้องหนวดปล้องที่ 3 และ 4 มีอวัยวะรับความรู้สึก (sense cone) รูปส้อม ส่วนหัวกว้างกว่าความยาว มีขนที่บริเวณตาเดี่ยว (ocellar setae) หรืออาจมีขนอยู่ภายในตาเดี่ยว (interocellar setae) 1 คู่ และมีขนอยู่ด้านหลังตาเดี่ยว (postocular setae) 4-5 คู่ อกปล้องแรก (pronotum) มีขนยาว 2 คู่ที่ขอบบนของส่วนอก (anterior margin) และมีขนยาว 2 คู่ที่มุมล่างของอก (posteroangulars) และ มีขน 1 คู่ขอบล่างของส่วนอก (posterior

margin) ยาวครึ่งหนึ่งของขนที่มุมล่าง อกปล้องที่สาม (metanotum) มีเส้นขนยาวบนขอบแผ่นแข็งของส่วนอก (sclerite) ปีกมีขนาดใหญ่ (macropterous) เส้นขนบนปีกเรียงตัวสมบูรณ์ ส่วนของปลายขา (tarsi) มี 2 ปล้อง ท้องปล้องที่ 3 มีขนที่ปลายของส่วนท้อง มีขนที่บริเวณแผ่นแข็งด้านข้างของลำตัว (pleurotergite) ส่วนท้องด้านบนของลำตัว (tergite) ปล้องที่ 5-8 มีกลุ่มของเส้นขน (ctenidia) เรียงตัวกันอยู่เหนือรูหายใจ ส่วนท้องด้านล่างของลำตัว (sternite) ปล้องที่ 1 มีเส้นขนขนาดเล็กตรงกลาง 3 เส้น ส่วนท้องด้านล่างของลำตัวปล้องที่ 3-7 ไม่มีเส้นขนตรงกลาง (discal setae) เพศผู้มีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย ส่วนใหญ่ลำตัวสีเหลืองมากกว่าสีเข้ม

แนวทางการวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟสกุล *Frankliniella* Karny

1 – อกปล้องแรกมีขนตั้งอยู่บริเวณขอบล่างของอกปล้องแรก 3-4 คู่ ขนที่บริเวณมุมล่างมีขนาดยาวกว่าตรงกลางอก กลุ่มขนบริเวณด้านล่างของปล้องท้องปล้องที่ 8 ปรากฏในตำแหน่งใต้รูหายใจ ไม่มีขนตาเดี่ยวคู่ที่ 1 ขอบปลายท้องทุกปล้องไม่มีลักษณะพิเศษ...Genus *Thrips*

– อกปล้องแรกปรากฏขนขนาดยาว 5 คู่ ตั้งอยู่บนขอบด้านบนและด้านล่างส่วนละ 2 คู่ ขนที่บริเวณมุมล่างมีขนาดยาวกว่าตรงกลางอก กลุ่มขนบริเวณด้านล่างของปล้องท้องปล้องที่ 8 ปรากฏในตำแหน่งเหนือรูหายใจ มีขนตาเดี่ยว 1 ขอบปลายท้องมีลักษณพิเศษคล้ายปมหรือฟัน.....Genus *Frankliniella* 2

2 – ขนตาเดี่ยวคู่ที่สามตั้งอยู่ภายในตาเดี่ยว 3 ตาที่เรียงกันเป็นรูปสามเหลี่ยม โดยอยู่ระหว่างตาเดี่ยว 2 ตาบริเวณฐานล่าง..... *Frankliniella schultzei* (Trybom)

- ขนตาเดี่ยวคู่ที่สามตั้งอยู่ภายนอกตาเดี่ยว 3 ตาที่เรียงกันเป็นรูปสามเหลี่ยม.....**3**

3 - ฟันที่ขอบด้านล่างของปล้องท้องที่ 8 มีลักษณะยาวและแหลม..... .....*Frankliniella williamsi* Hood

- ฟันที่ขอบด้านล่างของปล้องท้องที่ 8 มีลักษณะคล้ายฐานสามเหลี่ยม ขนที่ขอบอกปล้องแรกมีความยาวเท่ากับขนตาเดี่ยวคู่ที่ 3.....*Frankliniella occidentalis* (Pergande)

Frankliniella schultzei (Trybom, 1910)

Physopus schultzei Trybom 1910: 151., *Euthrips gossypii* Shiraki 1912: 56., *Frankliniella schultzei* Karny 1912: 334., *Frankliniella sulphurea* Schmutz 1913: 1018-1019.

ลำตัว (Body) ขนาดเล็ก มีทั้งสีเหลืองอ่อนและสีน้ำตาลเข้ม (figure 1-A, 1-B) เพศผู้ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.05 – 1.15 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.15 – 1.45 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียมีปีกขนาดใหญ่

หัว (Head) ส่วนหัวกว้างกว่าความยาว มีหนวด 8 ปล้อง ปล้องหนวดปล้องที่ 3 และ 4 มีสีเทาอ่อนที่บริเวณตอนต้น มีสีเทาเข้มที่ตอนปลาย และเป็นที่ตั้งของอวัยวะรับความรู้สึกรูปส้อม ปล้องหนวดปล้องที่ 6 ถึง 8 มีสีน้ำตาล ปล้องหนวดปล้องที่ 8 ยาวกว่าปล้องที่ 7 มีขนบริเวณตาเดี่ยว 3 คู่

ขนตาเดี่ยวคู่ที่ 3 อยู่ด้านในของตาเดี่ยวที่เรียงตัวเป็นรูปสามเหลี่ยม (figure 1-C) และยาวเท่ากับระยะห่างของตาเดี่ยวทั้ง 3 ขนตาเดี่ยวด้านข้างอกปล้องแรกยาวเท่ากับความห่างของตาเดี่ยวที่ในส่วนฐาน

อก (Thorax) ส่วนของอกปล้องแรกมีขนาดใหญ่ มีขนยาวตั้งอยู่บริเวณขอบบนและล่างของอกปล้องแรกรวม 5 คู่ ขนที่บริเวณมุมขอบบนยาวกว่าขนที่อยู่ถัดเข้ามาตรงกลาง ปรากฏขนสั้น 1 คู่ที่บริเวณส่วนกลางของ ขอบอก (figure 1-D) สันหลังอกปล้องสุดท้ายมีขนยาวสองเส้นอยู่ที่ขอบด้านบน ไม่มีรูรับความรู้สึก (campaniform sensilla) (figure 1-E) ปีกคู่หน้าขาว โปร่งแสง และมีการเรียงตัวของเส้นขนกันอย่างสมบูรณ์ ขามีสีเดียวกับลำตัว ส่วนของปลายขามี 2 ปล้อง

ท้อง (Abdomen) ส่วนท้องด้านบนของลำตัวปล้องที่ 6 ถึง 8 มีกลุ่มขนเรียงตัวกันเป็นเส้นปล้องละ 1 คู่ ตำแหน่งการเรียงตัวอยู่บนรูหายใจที่บริเวณขอบด้านนอกของส่วนท้อง ลักษณะพิเศษรูปฟันที่ด้านล่างของขอบท้องปล้องที่ 8 ไม่พัฒนามาก (figure 1-F) ส่วนท้องปล้องที่ 3 มีขนที่ปลายของส่วนท้อง และส่วนท้องด้านล่างของลำตัวปล้องที่ 3 ถึง 7 ไม่มีเส้นขนที่ตั้งอยู่ตรงการส่วนท้อง และมีเส้นขนละเอียด (microtrichia) อยู่ที่บริเวณด้านล่างของปล้องท้องเล็กน้อย

ความสำคัญ เพลี้ยไฟดอกไม้ (common blossom thrips) เข้าทำลายพืชได้หลายชนิด อาทิ ข้าวฟ่าง ถั่วลิสง ฝ้าย พริก หอมใหญ่ และไม้ดอกหลายชนิด โดยจะทำลายใบอ่อนและดอก ตั้งแต่ระยะยังเป็นตุ่มตา นอกจากนี้ยังเป็นพาหะนำโรคมาสู่พืชตระกูลถั่ว ทั้งนี้สามารถพบได้ในมีการระบาดของเพลี้ยไฟฝ้าย (*Thrips palmi* Karny) และ เพลี้ยไฟพริก (*Scirtothrips dorsalis* Hood) (Palmer *et al*., 1989)

พืชอาหาร ทานตะวัน พู่ม่วง พุดแอฟริกัน มะลิ บัว ดาวเรือง กล้วยไม้ กุหลาบ โป๊ยเซียน จำปา งวงช้าง ถั่วลิสง หน่อไม้ฝรั่ง ข้าวโพด พริก หอมหัวใหญ่ มะเขือยาว แตงไทย ฟักทอง กะเพรา มะเขือเทศ แฟง มะระ แตงกวา กวางตุ้ง กระเจี๊ยบ งา แตงเทศ ผักชีลาว โหระพา มะม่วง องุ่น แตงโม มะม่วงหิมพานต์ มังคุด

เขตการแพร่กระจาย ทวีปเอเชีย บังกลาเทศ อินเดีย อินโดนีเซีย อิสราเอล อิหร่าน อิรัก มาเลเซีย ปากีสถาน ฟิลิปปินส์ ศรีลังกา ไต้หวัน ไทย เยเมน ทวีปแอฟริกา แคมารูน อียิปต์ เอทิโอเปีย แกมเบีย กานา เคนยา มาดากัสกา โมรอคโค นามิเบีย ไนจีเรีย ทวีปยุโรป อิตาลี เนเธอแลนด์ ออสเตรีย ทวีปอเมริกาใต้ บราซิล อาร์เจนตินา ชิลี

เพลี้ยไฟสกุล *Frankliniella* มีลักษณะเด่นของสกุลคือ มีขนหนึ่งคู่ด้านหน้าตาเดี่ยวคู่ที่หนึ่ง เส้นขนเรียงตัวบนปีกหน้าอย่างสมบูรณ์ และกลุ่มของเส้นขน ctenidia เรียงตัวเป็นเส้นอยู่บนรูหายใจ มีการรายงานว่า เพลี้ยไฟกว่า 180 ชนิดถูกพบในเขตร้อน แต่เพลี้ยไฟดอกไม้ *F. Schultzei* เพลี้ยไฟดอกไม้ตะวันตก *F. occidentalis* และเพลี้ยไฟข้าวโพด *F. williamsi* สามารถพบได้ทั่วโลก (Kirk and Terry, 2003) ทั้งนี้เพลี้ยไฟดอกไม้สามารถจำแนกชนิดออกจากเพลี้ยไฟดอกไม้ตะวันตกและเพลี้ยไฟข้าวโพดได้โดยใช้ลักษณะสำคัญ คือ ที่ตั้งของขนตาเดี่ยวที่อยู่ภายในกรอบสามเหลี่ยมของตาเดี่ยว และส่วนท้องด้านบนซึ่งไม่มีกลุ่มเส้นขน ctenidia เรียงตัวกันบนปล้องท้องปล้องที่ 5 เพลี้ยไฟดอกไม้มีทั้งชนิดสีอ่อนและสีเข้ม ทั้งนี้ชนิดที่มีสีเข้มมีรายงานว่าเป็นพาหะนำโรค Tosopovirus ในพืชตระกูลแตง (Wang *et al*., 2010)

ผลการหาลำดับพันธุกรรมของยีน COI (Cytochrome Oxidaes subunit I) ของเพลี้ยไฟดอกไม้ โดยนำสารละลายที่ได้จากการทำ PCR มาดำเนินการโคลนด้วยเวคเตอร์ pGEM-T Easy และเลือกโคลนที่บรรจุยีนไปวิเคราะห์ลำดับเบส ด้วยเครื่อง automate sequencer ทำให้ทราบว่ายีน COI มีขนาด 556 bp (figure 2) หลังจากนั้นดำเนินการเปรียบเทียบลำดับเบสของเพลี้ยไฟดอกไม้ กับเพลี้ยไฟชนิดอื่นๆ ด้วยโปรแกรม ClustalW Multiple alignment เพื่อหาความแตกต่างหรือความคล้ายคลึงกันของเพลี้ยไฟแต่ละชนิด นอกจากนี้ยังสามารถหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ Phylogenetic tree โดยการเปรียบเทียบกับเพลี้ยไฟชนิดอื่นที่มีในฐานข้อมูล EMBI/GenBank ได้แก่

หมายเลข	ชนิด	วงศ์	วงศ์ย่อย
AB587604	เพลี้ยไฟฝ้าย; *Thrips palmi*	Thripidae	Thripinae
KF840096	เพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย; *Thrips hawaiiensis*	Thripidae	Thripinae
KF778768	เพลี้ยไฟหอม; *Thrips tabaci*	Thripidae	Thripinae
GU570440	เพลี้ยไฟพริก; *Scirtothrips dorsalis*	Thripidae	Thripinae
AB276376	เพลี้ยไฟดอกไม้ตะวันตก; *Frankliniella occidentalis*	Thripidae	Thripinae
KF840091	เพลี้ยไฟโกโก้; *Selenothrips rubrocinctus*	Thripidae	Panchaetothripinae
JQ609600	เพลี้ยไฟถั่ว; *Caliothrips fasciatus*	Thripidae	Panchaetothripinae
KF840085	เพลี้ยไฟไทร; *Gynaicothrips* sp.	Phlaeothripidae	Phlaeothripinae
	เพลี้ยไฟดอกไม้; *Frankliniella schul*tzei	Thripidae	Thripinae

จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของเพลี้ยไฟดอกไม้; *Frankliniella schultzei* โดยการศึกษาความสัมพันธ์กับประวัติการวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ (Molecular phylogenetics of Thysanoptera) และใช้โปรแกรม neighbor joining/UPGMA แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (sequence divergence) พบว่า เพลี้ยไฟดอกไม้; *Frankliniella schultzei* กับเพลี้ยไฟดอกไม้ตะวันตก; *Frankliniella occidentalis* มีความใกล้ชิดกันที่ 0.07568 และ 0.0844 ตามลำดับ และอยู่ในกลุ่มเดียวกับเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae วงศ์ย่อย Thripinae (figure 3) โดยตัวเลขที่มีค่าน้อยระยะห่างจะน้อยแสดงว่า มีวิวัฒนาการใกล้ชิดกัน ตัวเลขยิ่งมีค่ามากระยะห่างยิ่งห่างกันแสดงว่ามีวิวัฒนาการห่างไกลกัน ทั้งนี้ยีน COI ของตัวอย่าง เพลี้ยไฟดอกไม้ชนิดที่มีสีอ่อนและสีเข้มไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลที่สอดคล้องกันกับ (Sakimura, 1946) ที่รายงานว่าลักษณะสีของลำตัวที่แตกต่างกันเกิดจากพืชอาหารและเขตการแพร่กระจาย ทั้งนี้เพลี้ยไฟดอกไม้ที่สีเข้มสามารถเป็นพาหะนำโรคไวรัสได้ ในขณะที่เพลี้ยไฟดอกไม้สีอ่อนไม่เป็นพาหะนำโรค อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเชิงลึก ในลำดับต่อไป เพื่อเป็นการพัฒนาวิธีการดำเนินการและผลการศึกษาที่ได้ ซึ่งจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาวิธีการจำแนกชนิดเพลี้ยไฟหรือแมลงชนิดอื่นๆ โดยมีข้อได้เปรียบที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างแมลงได้ทุกระยะทั้งระยะไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วโดยไม่ต้องอาศัยเวลาในการเลี้ยงตัวอย่างแมลงนั้นๆ ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ตัวเต็มวัยใน

การจำแนกชนิด อีกทั้งยังสามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษาให้กับเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงทั้งในระยะไข่และตัวอ่อนได้อย่างทันต่อเหตุการณ์ ช่วยลดระยะเวลาการกักเก็บสินค้าเพื่อตรวจสอบ และสามารถป้องกันชนิดแมลงศัตรูพืชสำคัญที่ติดมากับสินค้านำเข้าได้ทันต่อเหตุการณ์

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาสัณฐานวิทยาและลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟดอกไม้ *Frankliniella schultzei* (Trybom) โดยการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชต่างๆ เช่น มะเขือ ข้าวโพด หอม พืชตระกูลแตง และ ไม้ดอกไม้ประดับ ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ระหว่างเดือนตุลาคม 2555 ถึง เดือนกันยายน 2557 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน เพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟดอกไม้ได้ 275 ตัวอย่าง ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae ชื่อวิทยาศาสตร์ *Frankliniella schultzei* (Trybom) ทำให้ทราบถึงชนิด ลักษณะการทำลาย พืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย และได้วิธีการ รวมถึงเทคนิคที่เหมาะสม และเรียนรู้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับการหาลำดับพันธุกรรมของยีน COI (Cytochrome Oxidaes subunit I) ของเพลี้ยไฟดอกไม้ จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดและถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยไฟดอกไม้ สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดทำรายชื่อชนิดแมลงศัตรูพืชรองรับปัญหาด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร นำตัวอย่างเพลี้ยไฟดอกไม้จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลงพร้อมนำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อใช้ตรวจสอบความถูกต้อง นำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาด้านอื่นๆ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูเพื่อประกอบในงานสำคัญด้านการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร ตลอดจนใช้ในด้านการกักกันพืช ซึ่งเป็นไปตามมาตรการด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measure: SPS Agreement) ขององค์การการค้าโลก (WTO) ที่ประเทศสมาชิกรวมทั้งประเทศไทยจะต้องใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชเพื่อปกป้องสุขภาพมนุษย์ สัตว์ พืชและสิ่งแวดล้อม (อรุณี, 2543) ทั้งนี้สามารถใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ได้เรียนรู้จากการศึกษาทดลองจำแนกชนิดแมลงต่างๆ ได้ และสามารถถ่ายทอดเทคนิคให้กับบุคลากรที่เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติงานได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

ศิริณี พูนไชยศรี. 2544. เพลี้ยไฟ. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 75 หน้า.

อรุณี วงษ์กอบรัษฎ์. 2543. การจัดทำบัญชีรายชื่อแมลง ไร และสัตว์ศัตรูพืช เอกสารประกอบการบรรยายพิเศษการประชุมสัมมนา เรื่อง “การจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List) และการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis) เพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร” วันที่ 26 กันยายน 2543 ณ โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ.

Gordh, G. and D. Headrick. 2001. A dictionary of entomology. CABI Publishing, CABI International, Wallingford, Oxon. 1032 pp.

Juthayothin, T. 2004. Molecular phylogenetic study of Culicine mosquitoes using the mitochondrial cytochrome oxidase I gene and the relationships with mosquito-borne flaviviruses. Bangkok : Mahidol University,. 258 p.

Kirk, W.D.J. and L.I. Terry. 2003. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). Agricultural and Forest Entomology, vol. 5(4): 301-310.

Lewis. T. 1997. Thrips as crop pests. CAB International. USA. 740 p.

Moritz, G. 1997. Structure, growth and development, pp. 15-63. In: Thrips as crop pests. T. Lewis. ed. CAB Publishing, CAB International, Wallingford, Oxon.

Palmer, J. M., L. A. Mound and G. J. du Heaume. 1989. (ed.). CIE Guides to Insects of Importance to Man: 2. Thysanoptera. C.A.B International Institute of entomology.

Sakimura, K. 1969. A comment of the color forms of *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera: Thripidae) in relation to transmission ot the tomato-spotted wilt virus. Pacific Insect. (11): 3-4

Srinivas, K. 1995. A phylogeny of cockroaches and related insects based on DNA sequence of mitochondrial ribosomal RNA genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92 : 2017-2020.

Triplehorn, C.A. and N.F Johnson. 2005. 7th ed. Borror and DeLong’s Introduction to the study of insects. Thomson Brooks/Cole, Belmont, CA. 864 pp.

Wang, C.L., F.C. Lin., Y.-C. Chiu and H. T. Shih. 2010. Species of *Frankliniella* Trybom (Thysanoptera: Thripidae) from the Asian-Pacific Area. Zoological Studies 49(6): 824-838

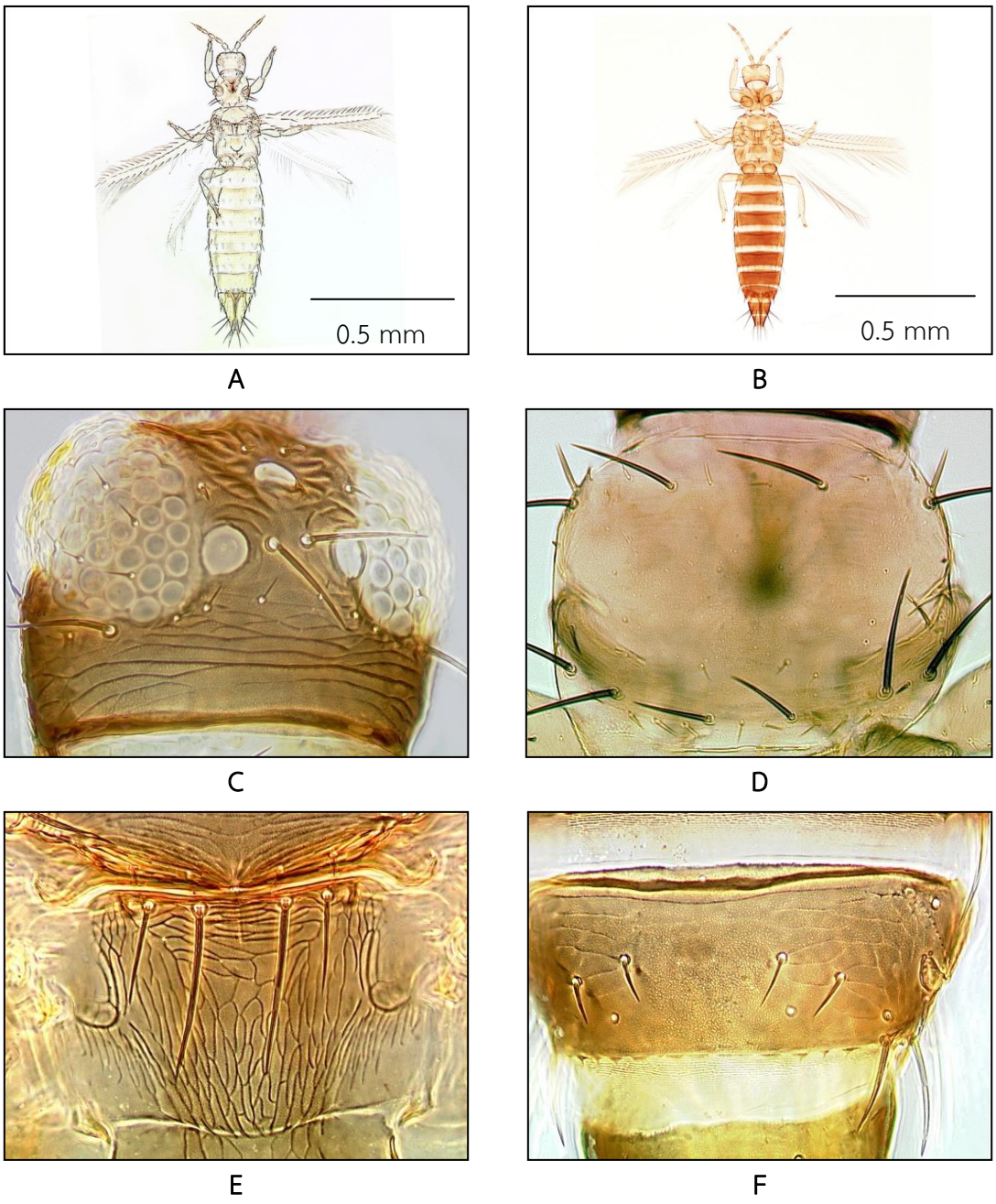


Figure 1 Morphology of common blossom thrips; *Frankliniella schultzei* (Trybom)

A. Female pale form B. Female dark form

C. Head D. Pronotum

F. Metanotum G. Abdominal tergite VIII

Primer UEA 7

TACAGTTGGAATAGACGTTGATACGACTAAACAATATAAGATTTTGACTTCTTCCACCTTCAATA
ACTTTACTTATTATAGGTTTAAGAAAAGAAGGAGCAGGAACAGGATGAACAGTTTATCCACCTTT
ATCAACATTTTATCATTCAGGTATATCAGTAGATTTAACTATTTTTTCCCTTCATTTAGCAGGTAT
TTCTTCAATTTTAGGAGCACTAAATTTTATTACTACCATCTTAAATTTAAAGTTAAAAAATTTATC
TAACGATAAAATCTCTTTATTTATTTGATCAGTTATTTTAACTGCTATTTTACTACTTTTATCTTT
ACCAGTCTTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACTGATCGAAATTTAAACACTTCATTTTTTGA
CCCTAGAGGGGGAGGTGATCCAGTTCTTTATCAACACCTATATTGATTTTTTGGTCATGCAGAAG
TTTACATTTTAATTTTACCAGGATTTGGACTAATTTCTCATATTATTACACAAGAAACAAATAAAA
AATCTACATTTGGTTTATTAGGAATAATTTATGCAATAATAGCTATTGGATTTTTTAATATGGCAG
ATTAGTGTGCATTGGA

Primer UEA 10

Figure 2 Sequences of Cytochrome oxidase subunit I (COI) of common blossom thrips; *Frankliniella schultzei* (Trybom), DNA shaded showed primer UEA 7 and UEA 10 respectively.

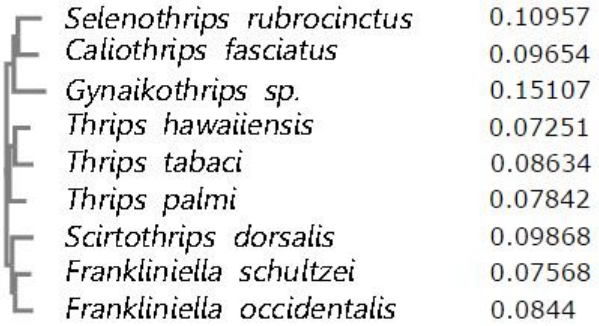


Figure 3 Cluster dendrogram showing the relationship among nine thrips populations and sequence divergence by using neighbor joining/UPGMA

อนุกรมวิธานไรสี่ขาวงศ์ Eriophyidae ของประเทศไทย

Taxonomic Study of Mite Family Eriophyidae in Thailand.

พลอยชมพู กรวิภาสเรือง มานิตา คงชื่นสิน พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์
วิมลวรรณ โชติวงศ์ อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จากการสำรวจไรสี่ขาบนพื้นที่ 25 อำเภอ 19 จังหวัด พบไรสี่ขาในวงศ์ Eriophyidae จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *Aceria neopaederiae* Konvipasruang, Chandrapatya, Amrine, Ochoa, Bauchan and Pratt., *Aceria sandorici* Nalepa, *Aceria litchi* (Keifer), *Aceria longana* Boczek & Knihinicki, *Aceria aloinis* Keifer, *Aculops caricae* Keifer, *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) และ *Colomerus novahebridensis* Keifer, ไรสี่ขาทั้ง 8 ชนิด เป็นไรที่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในแบบต่าง ๆ บนพืชอาศัย โดยชนิดที่มีความสำคัญสร้างความเสียหายให้กับพืชเศรษฐกิจได้แก่ *Aceria longana* Boczek & Knihinicki ทำให้เกิดอาการพุ่มไม้กวาดบนลำไย และแพร่ระบาดมากทางภาคเหนือที่เป็นแหล่งปลูกลำไยของประเทศ *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) ทำให้เกิดอาการสนิมบนผลส้ม *Aceria litchi* (Keifer) ทำให้เกิดอาการใบกำมะหยี่บนใบลิ้นจี่ *Colomerus novahebridensis* Keifer พบเข้าทำลายภายในกลีบเลี้ยงของผลอ่อน และทำให้เกิดแผลบนผลอ่อน จนเป็นแผลขนาดใหญ่บนผิวของผลมะพร้าว และทำให้ผลมะพร้าวร่วงหล่น นอกจากนี้ยังพบไรที่พบใหม่ในประเทศ (new record) ได้แก่ *Aceria aloinis* Keifer เข้าทำลายตาดอก และบริเวณใบอ่อน ของว่านหางจระเข้ และพบไรชนิดใหม่ (new species) คือ *Aceria neopaederiae* Konvipasruang, Chandrapatya, Amrine, Ochoa, Bauchan and Pratt เข้าทำลายวัชพืช *Paederi foetida* L. หรือที่เรียกว่าวัชพืชตดหมูตดตดหมา ทำให้ใบวัชพืชเป็นปุ่มปม

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-31-56

คำนำ

พืชเศรษฐกิจของประเทศไทยหลายชนิดเช่น ลำไย ลิ้นจี่ มะม่วง ส้ม กระท้อน องุ่น อ้อย มะละกอ ถั่วพู ฯลฯ ประสบปัญหาทั้งโรค แมลง และไรเข้าทำลาย โดยส่วนใหญ่การทำลายของโรคและแมลง จะเห็นได้อย่างชัดเจน แต่สำหรับไรในไม้ผลเศรษฐกิจบางชนิด ไม่สามารถทราบได้ หรือเห็นได้อย่างชัดเจนว่าเกิดจากการเข้าทำลายของไร ไรศัตรูพืชที่เป็นศัตรูสำคัญทางเศรษฐกิจพบได้หลายวงศ์ เช่น วงศ์ Tetranychidae วงศ์ Tarsonemidae Tenuipalpidae Eupodidae and Eriophyidae (Meyer, 1981) โดยเฉพาะไรสี่ขาซึ่งมีขนาดเล็กมากไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าต้องใช้กล้องที่มีกำลังขยายสูงจึงจะมองเห็น ไรสี่ขา Eriophyoid mites เป็นไรที่อยู่ในอันดับ (Order) Trombidiformes อันดับย่อย (Suborder) Prostigmata วงศ์ใหญ่ (Superfamily) Eriophyoidea (Lindquist *et al*, 2009) ไรสี่ขามีเขตแพร่กระจายทั่วโลกประมาณ 5,000 ชนิด 250 สกุล ประกอบด้วย 3 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Eriophyidae, Phytoptidae และ Diptilomiopidae (Amrine and Satasny, 1994; Zhand, 2009) สำหรับในประเทศไทยพบไรสี่ขาอยู่ 2 วงศ์ คือ วงศ์ Eriophyidae และ Diptilomiopidae ส่วนไรในวงศ์ Phytoptidae ยังไม่เคยมีรายงานว่าพบในประเทศไทยมาก่อน ไรสี่ขาพบทั้งไรที่มีชีวิตอยู่อย่างอิสระไม่กระตุ้นให้พืชสร้างอาการผิดปกติ และไรสี่ขาที่กระตุ้นให้พืชตอบสนองต่อการดูดกินของไรโดยสร้างความผิดปกติให้เกิดกับพืชเช่น อาการใบม้วนหยิกบนสตอเบอรี่และทับทิม ที่เกิดจาการเข้าทำลายของไร *Phyllocoptes triacis* Keifer และ *Eriophyes granati* Canestrini & Massalongo ตามลำดับ (Keifer *et al*., 1982) อาการพุ่มแจ้ในลำไย ที่เกิดจากการเข้าทำลายของไร *Aceria longana* Boczek & Knihinicki (Boczek and Knihinicki, 1998) ที่เกิดจากการเข้าทำลายของไร อาการใบเป็นกำมะหยี่ในลิ้นจี่ ที่เกิดจากการเข้าทำลายของไร *Aceria litchii* (Keifer) อาการสนิมที่เกิดในส้ม *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) ซึ่งเมื่อไรเข้าทำลายไม้ผลต่างๆ จะทำให้เกิดอาการผิดปกติต่างๆ ที่ตามมาคือทำให้ใบพืชที่เกิดการผิดปกติของใบ ผล และผลผลิตลดลง นอกจากนี้ไรสี่ขาอีกหลายชนิดยังนำโรคมาสู่พืชและแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว สร้างความเสียหายให้กับพืชเศรษฐกิจอย่างมาก เช่น ไร *Acaria guerronis* Keifer เป็นไรที่สำคัญในมะพร้าวนำโรคไวรอยด์ที่มีชื่อว่า Cadang Cadang และไร *Aculops lycopersici* (Massee) เป็นไรศัตรูที่สำคัญในมะเขือเทศ มะเขือม่วง มันฝรั่ง ยาสูบ แบ็คเบอรี่ และพืชอื่นๆ อีกหลายชนิด (Ronald and Stephan, 1994) ไร *Aceria tosichella* (Keifer) เป็นไรที่สำคัญที่ทำให้เกิดโมเสคไวรัส (Wheat streak mosaic virus) บนข้าวสาลี และ ข้าวโพด (Stenger *et al*., 2005) โดยไรสี่ขาทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นไรศัตรูพืชกักกันที่เป็นสิ่งต้องห้าม ตามพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 (อุดร, 2551) อีกด้วย ดังนั้นการศึกษาอนุกรมวิธานไรสี่ขาในครั้งนี้จึงสามารถทำให้ทราบชื่อวิทยาศาสตร์ของไรสี่ขาในพืชเศรษฐกิจต่าง ๆ ที่อยู่ในวงศ์ Eriophyidae เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านอนุกรมวิธานของไรและมีประโยชน์ในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และการป้องกันกำจัดในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่มีอยู่แล้ว

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างไร: ได้แก่ ถุงพลาสติกใสขนาดต่างๆ กล่องพลาสติก พู่กันเบอร์ 0, ขวดดองตัวอย่างไร ขนาด 1 แดรม บรรจุแอลกอฮอล์ 70% พู่กัน กล่องพลาสติกรักษาความเย็นขนาด 68 ควอทซ์ แว่นขยาย (กำลังขยาย 20x)

2. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างไร เพื่อการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน: ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ (stereo microscope), โคมไฟ พู่กันเบอร์ 0 เข็มเขี่ยปลายแหลม และปลายงอ สำลี ตู้อบ/เครื่องอุ่นสไลด์ ตั้งอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส แป้นหมุนสำหรับผนึกขอบสไลด์ น้ำยาผนึกขอบสไลด์

3. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการตรวจจำแนกชนิดของไร: ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope สำหรับใช้จำแนกชนิดของไรสี่ขา

อุปกรณ์การวิจัยที่ต้องการเพิ่มเติม

1. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเก็บตัวอย่างไร ได้แก่ ถุงกระดาษ ถุงพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ แอลกอฮอล์ 95% และสารเคมีสำหรับดองตัวอย่าง

2. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างไร เพื่อการศึกษาลักษณะชนิดของไรศัตรูพืช ได้แก่ แผ่นslide, coverglass, กล่องใส่สไลด์, สารเคมี สำหรับใช้เตรียมน้ำยาเมาท์สไลด์ สำลี น้ำยาสำหรับผนึกขอบสไลด์แผ่นพลาสติกเจาะรู จานแก้ว

วิธีการ

การเก็บตัวอย่างไร

1. โดยเก็บใบ กิ่ง ผล หรือส่วนต่าง ๆ ของพืช ที่แสดงอาการผิดปกติ ลงในกล่องพลาสติกหรือถุงกระดาษพับปากถุง บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับตัวอย่างไร เช่น ชื่อพืช ผู้เก็บ สถานที่ที่เก็บตัวอย่างไร บันทึกข้อมูลพิกัด จากนั้นนำตัวอย่างแช่ลงในกระติกน้ำแข็งก่อนนำกลับมายังห้องปฏิบัติการ

2. การทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereomicroscope หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่างๆ ได้ชัดเจน โดยจัดท่าทางของไรสี่ขาให้อยู่ในท่าคว่ำ และท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย coverglass ใช้ปากกาเขียนแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ coverglass ด้วยน้ำยา ทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บและพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

การศึกษาอนุกรมวิธาน

นำตัวอย่างไรที่ทำสไลด์ถาวรแล้วมาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานภายใต้กล้อง compound microscope จำแนก ชนิด จากคู่มือการจำแนกของ Amrine *et al.*, 2003 ตำราต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง

วาดรูปแสดงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดพร้อมทั้งทำ dichotomous key สำหรับใช้ในการจำแนกชนิดของไรสี่ขาในในวงศ์ Eriophyidae ในพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยปิดป้ายบันทึกผลการจำแนกไว้ด้านซ้ายมือของแผ่นสไลด์ก่อนที่จะนำเข้าเก็บในพิพิธภัณฑ์

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2555 - กันยายน 2558

นนทบุรี กรุงเทพฯ นครปฐม สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ตราด ชลบุรี เพชรบุรี อ่างทอง กาญจนบุรี ราชบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สงขลา นครราชสีมา ขอนแก่น ชุมพร เชียงราย ลำพูน สุโขทัย

กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ10900

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจไรสี่ขาบนพื้นที่ 25 อำเภอ 19 จังหวัด พบไรสี่ขาในวงศ์ Eriophyidae จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *Aceria neopaederiae* Konvipasruang, Chandrapatya, Amrine, Ochoa, Bauchan and Pratt., *Aceria sandorici* Nalepa, *Aceria litchi* (Keifer), *Aceria longana* Boczek & Knihinicki, *Aceria aloinis* Keifer, *Aculops caricae* Keifer, *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) และ *Colomerus novahebridensis* Keifer, ไรสี่ขาทั้ง 8 ชนิด เป็นไรที่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในแบบต่างบนพืชอาศัย (Table 1) โดยชนิดที่มีความสำคัญสร้างความเสียหายให้กับพืชเศรษฐกิจได้แก่ *A. longana* ทำให้เกิดอาการพุ่มไม้กวาดบนลำไย และแพร่ระบาดมากทางภาคเหนือที่เป็นแหล่งปลูกลำไยของประเทศ *P. oleivora* ทำให้เกิดอาการสนิมบนผลส้ม *A. litchi* ทำให้เกิดอาการใบกำมะหยี่บนใบลิ้นจี่ *C. novahebridensis* พบเข้าทำลายภายในกลีบเลี้ยงของผลอ่อน และทำให้เกิดแผลบนผลอ่อน จนเป็นแผลขนาดใหญ่บนผิวของผลมะพร้าว และทำให้ผลมะพร้าวร่วงหล่น นอกจากนี้ยังพบไรที่พบใหม่ในประเทศ (new record) ได้แก่ *A. aloinis* เข้าทำลายตาดอก และบริเวณใบอ่อน ของว่านหางจระเข้ และพบไรชนิดใหม่ (new species) คือ *A. neopaederiae* เข้าทำลายวัชพืช *Paederi foetida* L. หรือที่เรียกว่าวัชพืชตดหมูตดตดหมา ทำให้ใบวัชพืชเป็นปุ่มปม

Table 1. Host plants and symptoms of eriophyid mites in Thailand.

Scientific name of mite	Host plant		Location	GPS	Symptom of injury
	Scientific name	common name			
Aceria neopaederiae Konvipasruang, Chandrapatya, Amrine, Ochoa, Bauchan and Pratt	*Paederi foetida* L	Phang Hom	Mueang, Nakhon Si Thammarat	08° 31.80' N 99°56.930' E	causing irregular leaf gall, the inner surfaces of galls are smooth. Leaves often severely deformed.
Aceria sandorici Nalepa	*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr	Santol	Thawi Wattana, Bangkok Hat Yai, Songkhla Cha-am, Phetchaburi Si Satchanalai, Sukhothai	13° 47'9" N 100°27'39" E 13°46'55.2324"N 100°37'31.0296"E 13°44'673"N 99°47'135"E 17°24'38.4156"N 99°48'20.9298"E	causing pouch gall, erineum inside, upper side as a rounded outpocketing with irregular puckered domes
Aceria litchi (Keifer)	*Litchi chinensis* Sonn.	Lichii	Mueang, Chiang Rai	19°53'43.8108"N 99°51'4.5534"E	Underleaf erineum and Swelling

Table 1. Host plants and symptoms of eriophyid mites mites in Thailand. (Continued)

Scientific name of mite	Host plant		Location	GPS	Symptom of injury
	Scientific name	common name			
Aceria longana Boczek & Knihinicki	Dimocarpus longan *Lour.* ssp. *longan var. longan*	Longan	Ban Hong, Lamphun	18°15'385"N 098°49'583"E	Causes curling of leaves, brooming of twigs and bud proliferation.
			Ban Hong, Lamphun	18°14'960"N 098°49'435"E	
			Saraphi, Chiang Mai	18°40'410"N 098°59'091"E	
			Wang Nam Khia, Nakhon Ratchasima	14°25'51.9"N 101°40'45.6"E	
Aceria aloinis Keifer	*Aloe vera* (L.) Burm.f	Aloe	Sattahip, Chon Buri	12°48'306"N 100°54'807"E	Leaf and inflorescence gall
Aculops caricae Keifer	*Carica papaya* L.	Papaya	Wiset Chai Chan, Ang Thong	14°33'51.7392"N 100°18'26.64"E	Rust
			Mueang, Khon Kaen	16°27'55.1952"N 102°49'11.8374"E	

Table 1. Host plants and symptoms of eriophyid mites mites in Thailand.. (Continued)

Scientific name of mite	Host plant		Location	GPS	Symptom of injury
	Scientific name	common name			
Aculops caricae Keifer	*Carica papaya* L.	Papaya	Khet Bang Khen, Bangkok	13°51'2.6166"N 100°34'10.3578"E	Rust
			Dan Makham tia, Kanchanaburi	13°50'10.3578"N 99°20'32.9058"E	
			Khao Saming, Trat	12°25'30.9504"N 102°25'21.846"E	
			Mueang, Pathum Thani	13°59'55.0386"N 100°31'48.2694"E	
Phyllocoptruta oleivora (Ashmead)	*Citrus reticulata* Blanco	Tangerine	Bang Yai, Nonthaburi	13°51'44.1498"N 100°22'22.0434"E	Leaf rusting, wilvering, bronzing and blackenig
	Citrus sinensis (L.) Osbeck	Orange	Khao Saming, Trat	12°25'30.9504"N 102°25'21.846"E	
	Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle	Common lime	Khet Bang Khen, Bangkok	13°51'2.6166"N 100°34'10.3578"E	

Table 1. Host plants and symptoms of eriophyid mites mites in Thailand.. (Continued)

Scientific name of mite	Host plant		Location	GPS	Symptom of injury
	Scientific name	common name			
Phyllocoptruta oleivora (Ashmead)	*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle	Common lime	Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom	14°1'24.9702"N 99°58'29.6358"E	Leaf rusting, wilvering, bronzing and blackenig
	Citrus hystrix DC.	Leech lime	Phutthamonthon, Nakhon Pathom	13°47'40.7178"N 100°19'23.9658"E	
Colomerus novahebridensis Keifer	*Cocos nucifera* L. var. Nucifera	Coconut	Muang, Samutsongkram	13° 24' 13.197" 100° 0' 9.0972"	Under bracts of fallen nuts; causes nut drop and deformed coconuts
			Sawi, Chumphon	13° 47' 40.7178" 100° 19' 23.9658"	
			Ban Phaeo, Samut Sakhon	13° 41' 31.8618" 100° 6' 27.054"	
			Kanchanadit, Surat Thani	13° 41' 31.8618" 100° 6' 27.054"	
			Pran Buri, Prachuap Khiri Khan	12°20'130"N 099°59'953"E	Under bracts of fallen nuts; causes nut drop and deformed coconuts
			Damnoen Saduak, Ratchaburi	13° 33' 45.3594" 99° 57' 46.44"	

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจไรสี่ขาบนพื้นที่ 25 อำเภอ 19 จังหวัด พบไรสี่ขาในวงศ์ Eriophyidae จำนวน 8 ชนิด ที่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในแบบต่างบนพืชอาศัย

ได้แก่ *Aceria neopaederiae* Konvipasruang, Chandrapatya, Amrine, Ochoa, Bauchan and Pratt., *Aceria sandorici* Nalepa, *Aceria litchi* (Keifer), *Aceria longana* Boczek & Knihinicki, *Aceria aloinis* Keifer, *Aculops caricae* Keifer, *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) และ *Colomerus novahebridensis* Keifer

เอกสารอ้างอิง

อุดร อุณหวุฒิ. 2551. การควบคุมการนำเข้าพืชเข้ามาในราชอาณาจักร ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551. *ใน*: เอกสารประกอบการสัมมนา “พระราชบัญญัติกักพืชและแนวปฏิบัติที่ใช้ในปัจจุบัน” 6-8 พฤษภาคม 2551 ณ โรงแรมมารวยการ์เด้น กรุงเทพฯ.

Amrine, J.W Jr. and T.A. Stasny. 1994. Catalog of the Eriophyoidea (Acarina: Prostigmata) of the world. Indira Publishing House, West Bloomfield, Michigan, USA

Amrine, J.W, T.A.H. Stasny and C.H.W. Flechtmann. 2003. Revised keys to word genera of eriophyoidea (Acari: Prostigmata). Indira publishing house, Michigan, U.S.A.

Boczek, J. and D. Knihinicki. 1998. Studies on Eriophyoid Mites. XXVII. Bull. Polish Acad. Sci, Boiol. Sci. 46(3-4): 141-143.

Keifer, H.H., E.W. Baker, T. Kono, M. Delfinado and W.E. Styer. 1982. An lllustrated Guide to Plant Abnormalities caused by Eriophyid mite in North America. U. S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook No 573.

Lindquist, E.E., G.W. Krantz and D.E. Walter. 2009. Chapter thirteen Order Trombidiformes, pp. 97-103. .*In* G. W. Krantz and D. E. Walter. eds. A manual of Acarology. 3 rd. ed. Taxa Tech University Press. The United States of America.

Mayer, M.K.P. (Smith). 1981. Mite pests of crops in Southern Africa. Sci. Bull. Dep. Agric, Fish. Repub. S. Afr. No. 397: 1-92.

Ronald F.L. and Stephan G.L. 1994. *Aculops lycopersici* (Massee). http://www.extento. hawaii.edu/kbase/crop/Type/a_lycope.htm

Stenger, D.C., G.L. Hein, F.E. Gildow, K.M. Horken and R. French. 2005. Plant virus HC-Pro is a determinant of eriophyoid mite transmission. J. Virol. 79 (14): 9054-9061.

Zhang, Z.Q. 2003. Mites of greenhouses: Identification, biology and control. CABI Publishing.

Xue, X-F and Z.Q, Zhang. 2009. Eriophyoid mtie (Acari: Prostigmata) in Southeast Asia: a synopsis of 104 genera, with and illustrated key to genera and checklist of species. **Zootaxa** 2257:1-128.

ชีววิทยา การเข้าทำลาย ฤดูกาลระบาดของแมลงวันทองชนิด *Bactrocera tau* (Walker)

Biology Infestation and Season Abandons of *Bactrocera tau* (Walker)

สัญญาณี ศรีคชา[1/] **กรกต ดำรักษ์**[1/] **ยุวรินทร์ บุญทบ**[2/]

[1/]**กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

[2/]**กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

รายงานความก้าวหน้า

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมผลพืชตระกูลแตงที่ถูกแมลงวันทองเข้าทำลาย ในจังหวัดกาญจนบุรี นครราชสีมา และสุพรรณบุรี พบแมลงวันทอง 2 ชนิด ลงทำลาย คือ *B. cucurbitae* และ *B. tau* การศึกษาวงจรชีวิตของแมลงวันทองชนิด *Bactrocera tau* (Walker) ในห้องปฏิบัติการ โดยมีอุณหภูมิเฉลี่ย 23.50±1.02 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพันธ์เฉลี่ย 89.04±0.25 เปอร์เซ็นต์ พบว่าตัวเต็มวัยเพศเมียจะเริ่มจับคู่ผสมพันธุ์เมื่ออายุ 16 วัน โดยวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ หรือกลุ่มๆ ละ 2-3 ฟอง ตัวเมีย 1 ตัว สามารถวางไข่ได้ 397-533 ฟอง มีเปอร์เซ็นต์การฟัก 75% ระยะไข่ 2-3 วัน หนอนมี 3 ระยะ ระยะหนอน 8-9 วัน ระยะดักแด้ 7-8 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมียอายุ 115-145 วัน และตัวเต็มวัยเพศผู้มีอายุ 75-135 วัน จากการสำรวจและเก็บรวบรวมผลแตงร้าน แตงกวา มะระหวาน ฟักทอง บวบหอม ที่ถูกแมลงวันทองเข้าทำลายในแหล่งปลูกจังหวัดกาญจนบุรี นครราชสีมา และสุพรรณบุรี พบว่า *B. tau* ลงทำลายแตงกวา ฟักทอง มะระหวาน และบวบหอม ในการศึกษาช่วงฤดูการระบาดของแมลงวันทองชนิด *B.tau* ในแปลงปลูกแตงกวา และบวบหอม โดยใช้สารล่อชนิด Cur-lure ในกับดักแบบ Steiner พบว่าแมลงวันทองชนิด *B. tau* เข้าทำลายในแตงกวา และบวบหอม

Keywords : biology, Infestation, Season abandons , *Bactrocera tau* (Walker)

คำหลัก: ชีววิทยา การเข้าทำลาย ฤดูกาลระบาด แมลงวันทองชนิด *Bactrocera tau* (Walker)

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-32-56

คำนำ

แมลงวันทองเป็นศัตรูพืชที่สำคัญของไม้ผลและพืชผักหลายชนิด โดยเฉพาะพวกที่ผลมีเปลือกบางและเนื้ออ่อนนุ่มซึ่งในประเทศไทยมีผลไม้และพืชผักอยู่หลายชนิดออกผลสลับสับเปลี่ยนหมุนเวียนตลอดทั้งปี และมักประสบปัญหาถูกแมลงวันทองเข้าทำลาย ทำให้ผลผลิตเสียหาย และคุณภาพต่ำ ถ้าไม่มีการป้องกันกำจัดจะทำให้ผลผลิตเสียหาย 100% เกษตรกรจึงทำการป้องกันกำจัดทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิต จากการที่เกษตรกรทำการป้องกันกำจัดแมลงวันทองโดยใช้สารฆ่าแมลงอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ติดผลจนถึงเก็บเกี่ยว ส่งผลให้เกิดปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิตและสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ยังถูกใช้เป็นเครื่องมือกีดกันทางการค้าจากต่างประเทศ เช่น ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา กลุ่มสหภาพยุโรป ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ เกาหลีใต้ ไต้หวัน และจีน จะเห็นได้ว่าแมลงวันผลไม้เป็นปัญหาในระดับประเทศที่ต้องให้ความสำคัญ เนื่องจากแมลงชนิดนี้มีพืชอาศัยกว้าง จากการสำรวจของแสน (2529) พบว่าแมลงวันทองมีพืชอาศัยถึง 34 ชนิด ส่วนมนตรี (2536) พบว่าแมลงวันทองมีพืชอาศัย 93 ชนิด และ Jirasurat (1994) รายงานเพิ่มเติมว่า แมลงวันทองมีพืชอาศัยมากถึง 129 ชนิด มนตรี (2536, 2541) รายงานชนิดแมลงวันทองที่เป็นศัตรูสำคัญในผลไม้และพืชผักในประเทศไทย มีจำนวนกว่า 10 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera dorsalis* (Hendel), *B. correcta* (Bezzi), *B.curcubitae* (Coquillett), *B. tau* (Walker), *B. umbrosa* (Fabricius), *B. latifrons* (Hendel), *B. zonata* (Saunders), *B. carambolae* (Drew & Handcock), *B. papayae* (Drew & Handcock), และ *B. tuberculata* (Bezzi) โดยชนิดที่ทำลายพืชตระกลูแตง ได้แก่ *B. curcubitae* (Coquillett), *B. tau* (Walker) และ *B. dorsalis* (Hendel) (กองกีฏและสัตววิทยา, 2544)

B. tau (Walker) เป็นแมลงวันทองที่มีขนาดใหญ่กว่าแมลงวันทองชนิด *B. dorsalis* (Hendel) ลำตัวมีสีดำคล้ำ มีแถบสีเหลืองบนอกด้านสันหลังจำนวน 3 แถบ ด้านข้างอก 2 แถบ และตรงกลางอก 1 แถบ ปีกใสไม่มีแถบสีดำตามแนวขวางของปีก ปลายปีกมีแถบสีดำหนาจนดูเป็นจุดที่ปลายปีก พืชอาหารได้แก่แตงกวา บวบเหลี่ยม บวบกลม มะระขี้นก แสลงใจ ขี้กา ขี้กาแดง ขี้กาดิน ตำลึง (กองกีฏและสัตววิทยา, 2544) แมลงวันทองชนิด *B. tau* เป็นศัตรูพืชที่สำคัญของพืชผักหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชตระกูลแตง (Family Cucurbitaceae) ซึ่งเป็นพืชผักที่สำคัญทางเศรษฐกิจ มีพื้นที่ปลูกประมาณ 534,000 ไร่ พืชที่สำคัญได้แก่ แตงโม แตงกวา มะระ ฟักทอง ฟักเขียว บวบ และแคนตาลูป ในแต่ละปีมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์แตงโมคิดเป็นมูลค่ากว่า 340 ล้านบาท การผลิตพืชผักตระกูลนี้มีทั้งเพื่อบริโภคเองภายในประเทศ และเพื่อการส่งออก เช่น แตงกวามีทั้งการผลิตเพื่อบริโภคผลสด และแปรรูปเป็นผักดองส่งขายต่างประเทศ เช่นญี่ปุ่น นอกจากนี้ยังมีมะระที่ผลิตสำหรับการส่งออก จะเห็นได้ว่าพืชตระกูลแตงเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญทำรายได้ดี และมีศักยภาพในการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ แต่เนื่องจากการปลูกพืชตระกูลแตงในประเทศไทย มักประสบกับปัญหาจากการทำลายของแมลงวันทอง ทำให้ผลผลิตเสียหาย และคุณภาพต่ำ เกษตรกรต้องทำการป้องกันกำจัดทั้งก่อนและหลังเก็บเกี่ยว ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต และการป้องกันกำจัดแมลงวันทองโดยใช้สารฆ่าแมลงอย่างต่อเนื่องจนเก็บเกี่ยว ก่อให้เกิดปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิตและสภาพแวดล้อม

นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดปัญหาด้านกักกันพืช และถูกใช้เป็นเครื่องมือกีดกันทางการค้าของต่างประเทศ เช่น ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา กลุ่มสหภาพยุโรป ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ เกาหลีใต้ ไต้หวัน และจีน จะเห็นได้ว่าแมลงวันทองเป็นปัญหาในระดับประเทศที่ต้องให้ความสำคัญในการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับแมลงวันทอง ทั้งทางด้านชีววิทยา นิเวศนวิทยา ช่วงฤดูการแพร่ระบาด และการเข้าทำลายของแมลงวันทอง เพื่อจะได้ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับหาทางป้องกันกำจัดเป็นการช่วยลดความเสียหายของผลผลิต และให้ผลผลิตมีคุณภาพตรงตามความต้องการของตลาด

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สำรวจชนิดแมลงวันผลไม้ที่ลงพืชตระกูลแตง

โดยเก็บรวบรวมผลพืชตระกูลแตงเช่น ฟัก ฟักทอง แตงกวา มะระ แตงโม เมล่อน ที่ถูกแมลงวันผลไม้ทำลายจากแหล่งปลูกต่างๆ โดยนำมาชั่งน้ำหนัก และนับจำนวน บันทึกวัน/เดือน/ปี ระยะพืช และสถานที่เก็บตัวอย่าง จากนั้นนำมาเลี้ยงต่อในห้องปฏิบัติการ โดยนำผลใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 22x29x10 เซนติเมตร ที่รองก้นกล่องด้วยขี้เลื่อยที่มีความชื้น สูงประมาณ 1 นิ้ว รอจนหนอนแมลงวันผลไม้ออกมาเข้าดักแด้ในขี้เลื่อยประมาณ 10 วัน จากนั้นใช้ตะแกรงรอนเบอร์ 20 ร่อนแยกดักแด้ออกจากขี้เลื่อย แล้วนำดักแด้ใส่ในกล่องพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร คลุมทับด้วยขี้เลื่อยที่มีความชื้น สูงประมาณ ½ นิ้ว จากนั้นนำไปไว้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 0.35x0.35x0.50 เมตร ที่ภายในมีน้ำและอาหารสำหรับตัวเต็มวัย (Brewer's yeast และน้ำตาลไอซ์ซิ่ง อัตรา 1:4) เมื่อตัวเต็มวัยมีอายุประมาณ 7-10 วัน ทำการฆ่าโดยนำตัวเต็มวัยใส่ในหลอดแก้วแช่ในช่องทำน้ำแข็ง (freezer) นาน 4-5 ชั่วโมง แล้วนำไปจำแนกชนิดและตรวจนับจำนวน

2. การศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau*

ทำการเก็บรวบรวมผลพืชตระกูลแตงที่ถูกแมลงวันผลไม้เข้าทำลายจากแหล่งปลูก จากนั้นนำมาเลี้ยงต่อในห้องปฏิบัติการ เมื่อได้แมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* จึงนำมาเลี้ยงขยายพันธุ์ต่อจนได้รุ่นที่ 1 (F1) จากนั้นทำการศึกษา

2.1 วงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* โดยดำเนินการศึกษาวงจรชีวิตในระยะต่างๆ ดังนี้

ระยะไข่ ศึกษาอายุของไข่ด้วยการทำ Hatching Rate โดยเขี่ยไข่ลงบนกระดาษกรองเบอร์ 91 ที่ให้ความชื้นตลอดเวลา แล้วเก็บไว้ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จากนั้นตรวจนับและบันทึกจำนวนหนอนที่ฟักออกจากไข่ทุก 6 ชั่วโมง ทำ 5 ซ้ำๆ ละ 100 ฟอง

ระยะหนอน ศึกษาอายุและลักษณะของหนอนวัยต่างๆ โดยเลี้ยงหนอนในผลแตงกวา บันทึกขนาด ลักษณะ และการตายของหนอนวัยต่างๆ โดยศึกษาจากหนอน 100 ตัว

ระยะดักแด้ ศึกษาอายุและลักษณะของดักแด้ โดยทำการบันทึกขนาด และลักษณะของดักแด้ โดยศึกษาจากดักแด้ 100 ดักแด้

ระยะตัวเต็มวัย ศึกษาอายุขัย การผสมพันธุ์ การวางไข่ และลักษณะของตัวเต็มวัย โดยเลี้ยงแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* เพศผู้ 1 ตัวและเพศเมีย 1 ตัว ในกล่องพลาสติกขนาด 21x15x8 เซนติเมตร ที่ภายในมีน้ำ อาหาร และกระบอกพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร สูง 4.5 เซนติเมตร เจาะรูขนาดเล็กจำนวน 20 รู ภายในกระบอกใส่ชิ้นฟักเพื่อล่อให้แมลงวางไข่ บันทึกปริมาณการวางไข่ทุกวันจนตัวเต็มวัยเพศเมียตาย นอกจากนี้ทำการบันทึกลักษณะตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย ลักษณะการจับคู่ผสมพันธุ์ และการตายของตัวเต็มวัย โดยศึกษาจากแมลงวันผลไม้จำนวน 10 คู่

2.2 ตารางชีวิต (Life table) ของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* ทำการศึกษาโดยเจาะรูขนาด 1x1x1 เซนติเมตร บนผลแตงกวา จากนั้นนำกระดาษสีดำขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตรวางในช่องที่เจาะไว้ แล้วจึงนำไข่ของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* วางในกระดาษจำนวน 100 ฟองต่อผล ทำ 3 ซ้ำ จากนั้นทำการปิดช่องที่เจาะไว้ด้วย parafilm บันทึกจำนวนไข่ที่ฟัก หนอนวัยต่างๆ ดักแด้ และตัวเต็มวัย แล้วนำมาคำนวณตามวิธีของ Southwood (1966)

3. การศึกษานิเวศนวิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau*

3.1 การศึกษาช่วงฤดูการระบาดของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* ทำการติดตั้งกับดักแมลงวันผลไม้แบบ Steiner ซึ่งภายในแขวนก้อนสำลีชุบสาร Cur-lure ผสมสารฆ่าแมลง malathion (ไดมาร์ค 83% EC) ในอัตรา 4:1 โดยปริมาตร จำนวน 8 กับดักต่อพื้นที่ 1 ไร่ โดยนำไปแขวนในแปลงปลูก เก็บแมลงวันผลไม้ในกับดักออกทุกสัปดาห์ หลังจากนั้นทำการจำแนกชนิดและบันทึกจำนวนที่พบ

3.2 การศึกษาระยะการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้ในผลพืชตระกูลแตง โดยทำการเก็บผลแตงกวาในระยะต่างๆ จากแปลงปลูกมาผ่าเพื่อตรวจสอบการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้ทุกสัปดาห์ บันทึกชนิด จำนวน สัดส่วนเพศเมียและเพศผู้ของแมลงวันผลไม้ที่พบ ปริมาณน้ำฝน อุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์

3.3 สำรวจศัตรูธรรมชาติที่ทำลายแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau* ในแหล่งปลูก โดยทำการสำรวจและเก็บรวบรวมศัตรูธรรมชาติจากแปลงปลูกพืชตระกูลแตง จากนั้นจำแนกชนิดและบันทึกจำนวนที่พบ

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2555 – กันยายน 2558

ห้องปฏิบัติการกลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

แปลงปลูกพืชตระกูลแตง จังหวัดกาญจนบุรี นครราชสีมา และสุพรรณบุรี

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สำรวจชนิดแมลงวันทองที่ลงทำลายพืชตระกูลแตง

สำรวจชนิดแมลงวันทองที่ลงทำลายในพืชตระกูลแตง จากการสำรวจและเก็บรวบรวมผลแตงร้าน แตงกวา มะระหวาน ฟักทอง บวบหอม ที่ถูกแมลงวันทองเข้าทำลายในแหล่งปลูกจังหวัดกาญจนบุรี นครราชสีมา และสุพรรณบุรี พบว่ามีแมลงวันทอง 2 ชนิดลงทำลายพืชตระกูลแตง คือ *B. cucurbitae* และ *B. tau* (Table 1) โดยพบ *B. tau* ลงทำลายแตงกวา ฟักทอง มะระหวาน และบวบหอม สำหรับในฟักทองนอกจากพบตัวหนอนของ *B. tau* ที่ผลฟักทองแล้วยังพบตัวหนอนในดอกฟักทองด้วย

2. การศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. tau*

วงจรชีวิตของแมลงวันทอง *B. tau* ดำเนินการศึกษาในปี พ.ศ. 2556 ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรุงเทพมหานคร โดยมีอุณหภูมิเฉลี่ย 23.50$\pm$1.02 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพันธ์เฉลี่ย 89.04$\pm$0.25 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาชีววิทยาของ *B. tau* บนผลฟักทองสด พบว่าการเจริญเติบโตของแมลงชนิดนี้แบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ

ระยะไข่ ตัวเต็มวัยเพศเมียจะวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่มๆ ละ 2-3 ฟอง บนผลฟักทอง ไข่มีสีขาวผิวเป็นมันสะท้อนแสง รูปร่างคล้ายผลกล้วย มีขนาดเล็ก เมื่อใกล้ฟักจะมีสีขาวขุ่น ระยะไข่ 2-3 วัน ไข่มีเปอร์เซ็นต์การฟักสูงถึง 75% (Table 2)

ระยะหนอน หนอนมีลักษณะหัวแหลม ท้ายป้าน ไม่มีขา ส่วนหัวมีลักษณะเป็นตะขอแข็งสีดำ เมื่อฟักออกจากไข่ใหม่ๆ ลำตัวใสส่วนหัวที่เป็นตะขอมีสีน้ำตาล ตัวหนอนเคลื่อนที่โดยการยืดหดลำตัว หนอนมี 3 วัย ระยะหนอน 8-9 วัน (Table 2)

ระยะดักแด้ ดักแด้มีลักษณะกลมรีคล้ายถังเบียร์ ลำตัวเป็นปล้องๆ ตามแนวขวาง ดักแด้ในระยะแรกมีสีขาวและค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนแล้วสีจะค่อยๆ เข้มขึ้นเมื่อดักแด้ใกล้ฟัก ระยะนี้แมลงไม่มีการเคลื่อนไหว ดักแด้อาศัยในดินลึกประมาณ 2.0-5.0 เซนติเมตร ระยะดักแด้ 7-8 วัน (Table 2)

ระยะตัวเต็มวัย ตัวเต็มวัยเป็นแมลงวันมีสีน้ำตาลแดงทั้งลำตัวและขา มีแถบสีเหลืองที่ส่วนอก ปีกบางใสสะท้อนแสงที่ปลายปีกมีจุด ระยะนี้จะไม่ทำลายพืช กินน้ำหวาน โปรตีน และวิตามิน ที่ได้จากสิ่งขับถ่ายจากแมลง นก น้ำยางจากแผลของต้นไม้ น้ำหวานจากพืช และเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นดิน ตัวเต็มวัยหลังจากออกจากดักแด้ประมาณ 16 วัน จึงเริ่มจับคู่ผสมพันธุ์และเริ่มวางไข่ โดยวางไข่ในผลของพืชอาศัย ตัวเต็มวัยเพศเมียมีความสามารถในการวางไข่ตลอดอายุขัยได้ 397-533 ฟอง ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุ 115-145 วัน ตัวเต็มวัยเพศผู้มีอายุ 75-132 วัน (Table 2)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาวงจรชีวิตในห้องปฏิบัติการโดยมีอุณหภูมิเฉลี่ย 23.50$\pm$1.02 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพันธ์เฉลี่ย 89.04$\pm$0.25 เปอร์เซ็นต์ พบว่าตัวเต็มวัยเพศเมียจะเริ่มจับคู่ผสมพันธุ์เมื่ออายุ

16 วัน โดยวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ หรือกลุ่มๆ ละ 2-3 ฟอง ตัวเมีย 1 ตัว สามารถวางไข่ได้ 397-533 ฟอง มีเปอร์เซ็นต์การฟัก 75% ระยะไข่ 2-3 วัน หนอนมี 3 ระยะ ระยะหนอน 8-9 วัน ระยะดักแด้ 7-8 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมียอายุ 115-145 วัน และตัวเต็มวัยเพศผู้มีอายุ 75-135 วัน

การสำรวจและเก็บรวบรวมผลพืชตระกลูแตง ได้แก่ แตงร้าน แตงกวา มะระหวาน ฟักทอง บวบหอม ที่ถูกแมลงวันทองเข้าทำลายในแหล่งปลูกจังหวัดกาญจนบุรี นครราชสีมา และสุพรรณบุรี พบมีแมลงวันทอง 2 ชนิด ลงทำลาย คือ *B. cucurbitae* และ *B. tau* แต่พบ *B. tau* ลงทำลายแตงกวา ฟักทอง มะระหวาน และบวบหอม สำหรับในฟักทองนอกจากพบตัวหนอนของ *B. tau* ที่ผลฟักทองแล้วยังพบตัวหนอนในดอกฟักทองด้วย

เอกสารอ้างอิง

กองกีฏและสัตววิทยา. 2544. แมลงวันทองในประเทศไทย. เอกสารวิชาการกองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 244 หน้า.

มนตรี จิรสุรัตน์ 2536. โครงการวิจัยชีววิทยาและการป้องกันกำจัดแมลงวันทอง. รายงานผลการทดลองปี 2535 กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

มนตรี จิรสุรัตน์ และ โอชาประจวบเหมาะ. 2541. แนวทางการป้องกันกำจัดแมลงวันทองในแปลงมะม่วงเพื่อการส่งออก. กีฏและสัตววิทยา. 20(3): 201-204.

แสน ติกวัฒนานนท์. 2529. พืชอาหารของแมลงวันทองชนิดต่างๆในประเทศไทย. วารสารเกษตรพระจอมเล้า ปีที่ 4 ฉบับที่ 1 มกราคม – เมษายน 2529. หน้า 1-15

Jirasurat, Montree. 1994. ACIAR Project PN8919 : Biology and Control of Fruit Flies in Thailand and Malaysia. Final Review Report : Bangkok Activities. During 23 - 26 February 1994, Maruay Garden Hotel, Bangkok, Thailand. 40 pp.

Table 1. Number and species of fruit fly on Cucurbitae

Location	Plants	No. of fruits	No. of pupae	Emergence (%)	Adult (%)	
					B. cucurbitae	*B. tau*
Nakhon Ratchasima	แตงร้าน, *Cucumis sativus*	15	314	97.45	100	0
Kanchnaburi	แตงกวา, cucumber *Cucumis sativus*	42	696	51.15	34.83	65.17
	ฟักทอง, pumpkin *Cucurbita moschata*	32	23,420	87.54	0	100
	มะระหวาน,	44	99	68.31	0	100
	บวบหอม,sponge gourd: *Luffa aegypiaca*	11	44	90.91	95.24	4.76
Suphan Buri	มะระจีน, balsam pear; *Momordica charantia*	26	44	93.18	100	0

Table 2 Developmental stages of *Bactrocera tau* (Walker) under laboratory condition (23.50±1.02 ^{0}C and 89.04±0.25 % RH)

Stages of *B. tau*	n [1/]	Range(days)	Mean ± SD (days)
Egg incubation	500	2 - 3	1.30 ± 0.41
Larva period	100	8 - 9	5.09 ± 0.56
Pupal period	90	7 - 8	6.90 ± 1.84
Adult longevity			
Female	20	115 - 145	130.33 ± 14.18
Male	20	75 - 135	104.66 ± 31.21
Total development period From egg to adult (day)		63 - 161	116.20 ± 32.00

[1/] = number of observations

ศึกษาโครโมโซมและเขตการกระจายของหอยสกุล *Pomacea* ในประเทศไทย

Chromosomal Studies and the Distribution of Snail Genus *Pomacea* In Thailand

ดาราพร รินทะรักษ์ **อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข**
ณัฐฐิญา กาญจนนิธิพัฒน์ **ปราสาททอง พรหมเกิด**
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

รายงานความก้าวหน้า

ดำเนินการสำรวจการระบาด/เก็บตัวอย่างและบันทึกพิกัดภูมิศาสตร์พื้นที่ๆเก็บตัวอย่างตามแผนการสำรวจ พบว่าหอยเชอรี่สกุล *Pomacea* มีเขตการกระจายอยู่ทุกภาคของประเทศไทย เมื่อศึกษา feeding behavior พบว่าหอยเชอรี่สามารถกินได้ตลอดเวลา คิดเป็นน้ำหนักอาหารที่กินโดยเฉลี่ย 49.66 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว/ วัน (n=30) หอยเชอรี่จะวางไข่สีชมพูไว้ตามต้นพืชหรือวัสดุที่อยู่เหนือน้ำ ขนาดของกลุ่มไข่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.11 - 22.20 ม.ม. ยาว 15.32 - 55.92 ม.ม. เส้นผ่านศูนย์กลางของไข่ 1.65 - 2.49 ม.ม. ไข่หอยเชอรี่มีจำนวน 286 - 4,303 ฟอง เมื่อนำค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่มาคำนวณค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย ANOVA พบว่ามีอย่างน้อย 1 ตัวอย่างที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, 99% และ 99.9% และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Tukey's HSD และ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.9% พบว่ามีการแบ่งกลุ่มออกเป็นอย่างน้อย 2 กลุ่ม

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยเชอรี่ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้เทคนิค morphometrics ซึ่งขณะนี้กำลังศึกษาจากตัวอย่างหอยบางส่วนที่เก็บจากพื้นที่ภาคต่างๆของประเทศไทย โดยวัดค่า shell length, shell width, last whorl height, aperture length และ aperture width วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้ ANOVA จากโปรแกรม SPSS จากนั้นนำข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยที่วิเคราะห์แล้วมาเปรียบเทียบเพื่อ*คัดเลือกตัวอย่างที่มีความแตกต่างกัน*ไปศึกษาจำนวนโครโมโซมและการจัดเรียงคาริโอไทป์ในปีต่อไป

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-33-56

คำนำ

งานทางด้านอนุกรมวิธานของสัตว์ในกลุ่มหอยทาก เดิมจะใช้ข้อมูลเกี่ยวกับสัณฐานวิทยาของเปลือกในการจำแนกเป็นหลัก เช่น รูปทรงเปลือก ทิศของการขดวน ขนาดเปลือก สีสัน และลวดลาย เป็นต้น ซึ่งในบางครั้งทำให้เกิดปัญหาในการจำแนก เนื่องจากเปลือกของหอยทากแต่ละชนิดมีความผันแปรมาก ทำให้การจำแนกชนิดโดยใช้สัณฐานวิทยาของเปลือกเพียงอย่างเดียวมีความซับซ้อนสับสน และขาดความชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งหอยทากที่มีรูปทรงและขนาดของเปลือกใกล้เคียงกัน เช่น หอยสาลิกา (*Sarika* sp.) และหอย *Macrochlamys* sp. หรือแม้กระทั่งหอยเจดีย์เล็ก, *Lamellaxis gracilis* (Hutton, 1834) และหอยทากกินเนื้อสีชมพู, *Gulella bicolor* (Hutton, 1843) (Dundee and Baerwald, 1984) เป็นต้น ดังนั้นการใช้ลักษณะอื่นๆ อาทิ เช่น การศึกษาระดับโครโมโซม การใช้เทคนิคทางด้านมอร์โฟเมตริก หรือลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ จะช่วยให้การจำแนก มีความชัดเจนและแม่นยำมากยิ่งขึ้น ซึ่งการนำวิธีอื่นๆ มาใช้ในการจำแนก มีผู้ทำการศึกษาไว้ดังนี้

พงษ์รัตน์ และคณะ (2550) ศึกษา spermatogonial metaphase ของหอยทากบก 4 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Ariophantidae , Succineidae, Heliocarionidae และ Achatinidae พบว่าเมื่อพิจารณาถึงจำนวนโครโมโซมของหอยทากบกที่ทำการศึกษาใน 4 วงศ์ ดังกล่าว มีค่าแฮพพลอยด์ (haploid) อยู่ในช่วง n = 24 ถึง n = 33 และข้อมูลเกี่ยวกับจำนวนโครโมโซมสามารถนำมาใช้ในการจำแนกหอยทากบกได้ในระดับวงศ์เท่านั้น โดยแต่ละวงศ์จะมีจำนวนโครโมโซมคงที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งหากจะจำแนกให้ได้ถึงระดับชนิด จะต้องมีการศึกษารูปแบบของคาริโอไทป์ และข้อมูลด้านอื่นๆ สนับสนุน

Robert and Kenneth (2004) รายงานว่า หอยเชอรี่จัดอยู่ในวงศ์ Ampullariidae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศแถบอเมริกาใต้ และแพร่ระบาดเข้ามาในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้หลายประเทศ รวมทั้งประเทศไทย ปัจจุบันยังมีความสับสนเกี่ยวกับข้อมูลทางด้านอนุกรมวิธาน ซึ่งการใช้สัณฐานวิทยาเพื่อการจำแนกชนิด เพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอ จึงจำแนกโดยใช้ลำดับเบสของ DNA และสามารถระบุได้ว่าหอยเชอรี่ที่พบในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีอย่างน้อย 2 ชนิด คือ *Pomacea canaliculata* และ *Pomacea* sp. และรายงานว่า *P. bridgesii* เป็นชนิดที่พบในประเทศศรีลังกา นอกจากนี้ Brand *et.* al (1990) ได้ศึกษาโครโมโซมของหอยเชอรี่ *P. canaliculata* พบว่าจำนวนโครโมโซมที่เป็นค่าดิพลอยด์ (diploids) ของหอยเชอรี่มีจำนวน 2n=28

Wen and Yen (2004) ศึกษาชีววิทยา และวิเคราะห์จำนวนประชากรของหอยเชอรี่ที่ระบาดและทำความเสียหายต่อระบบเกษตรกรรมในประเทศไต้หวัน พบว่าเป็นหอยเชอรี่ชนิด *P. canaliculata* โดยสันนิษฐานว่าเริ่มมีการระบาดเมื่อ 20 กว่าปีที่ผ่านมา

จากข้อมูลงานวิจัยทางด้านโครโมโซมข้างต้น จะเห็นได้ว่าจำนวนโครโมโซมของหอยทากสามารถนำมาใช้ในการจำแนกหอยทากได้ในระดับวงศ์ (family) เท่านั้น โดยแต่ละวงศ์จะมีจำนวน

โครโมโซมคงที่และมีลักษณะเป็นแบบเชิงอนุรักษ์ (conservatism) กล่าวคือหอยที่อยู่ในวงศ์เดียวกันจะมีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน ซึ่งหากจะจำแนกให้ได้ถึงระดับชนิด (species) จะต้องมีการศึกษารูปแบบของการจัดเรียงโครโมโซมหรือคาริโอไทป์ และข้อมูลด้านอื่นๆ สนับสนุน โดยอาศัยหลักทางอนุกรมวิธานที่ว่า “คาริโอไทป์ (karyotype) ของสิ่งมีชีวิตเดียวกันจะเหมือนกันและจะแตกต่างกันกับคาริโอไทป์ของสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน” (Nakamura, 1985)

ปัจจุบัน ในประเทศไทยมีการศึกษาข้อมูลในระดับกายวิภาคและระดับโครโมโซมของหอยทากน้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของหอยสกุล *Pamacea* ซึ่งจัดเป็นหอยศัตรูพืชที่สำคัญ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงมุ่งเน้นศึกษาอนุกรมวิธานในระดับโครโมโซม ตลอดจนข้อมูลสนับสนุนทางด้านสัณฐานวิทยาของเปลือก และเขตการแพร่กระจายของหอยสกุล *Pamacea* ที่พบในประเทศไทย เพื่อให้ฐานข้อมูลทางด้านอนุกรมวิธานของหอยสกุล *Pamacea* มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล่องพลาสติกขนาดต่างๆ /กระดาษเอนกประสงค์ /ไฟฉายและแบตเตอรี่ ตาข่ายกั้นหอยและสวิง สำหรับเก็บตัวอย่างหอย อาหารชนิดเม็ด และผักสด สำหรับเลี้ยงหอย
- เครื่องมือวัดขนาดเปลือกหอย ได้แก่ เวอร์เนียร์
- เครื่องมือวัดอุณหภูมิและค่า pH ของน้ำ
- กล้องถ่ายรูปดิจิทัล และภาพถ่ายโครโมโซมขนาดขยาย 4x6 นิ้ว
- อุปกรณ์สำหรับเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษากายวิภาคและโครโมโซม ได้แก่ ชุด Jar ย้อมสี
- สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมโครโมโซม ได้แก่ 0.01 % Colchicin, Giemsa’s Solution และ Carnoy Fixative Solution

วิธีการ

การดำเนินการทดลองแบ่งเป็น 3 หัวข้อ ดังนี้

1. <u>สำรวจ/ เก็บตัวอย่าง และจัดทำแผนที่การกระจายพันธุ์ของหอยสกุล *Pomacea* .</u>

โดยสำรวจทุกๆ 2 เดือน ตามแหล่งน้ำธรรมชาติ หรือพื้นที่ทำการเกษตร ตามภาคต่างๆของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างพื้นที่ละ 30 ตัว และบันทึกพิกัดด้วย GPS เพื่อจัดทำแผนที่การกระจายพันธุ์ของหอยสกุล *Pomacea* ด้วยโปรแกรม ArcView หรือ ArcGis จากนั้นนำตัวอย่างมาพักในตู้กระจกขนาด 25x40x26 เซนติเมตร และอ่างซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เมตร เพื่อรอจำแนกชนิดจากลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร โดยให้ผักชนิดต่างๆเป็นอาหาร และเปลี่ยนถ่ายน้ำ สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

2. ตรวจสอบชนิดจากสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยสกุล *Pomacea*

นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือก ด้วยเทคนิคมอร์โฟเมตริก โดยการถ่ายภาพ วาดภาพ และวัดค่า shell length, shell width, last whorl height, aperture length และ aperture width ด้วยเวอร์เนีย จากนั้นจึงเข้าสู่การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้ ANOVA จากโปรแกรม SPSS และวิเคราะห์ชื่อตามระบบอนุกรมวิธานของหอย เปรียบเทียบกับเอกสารหอยทากทั้งในและต่างประเทศ ยึดตามเอกสารของ Abbott (1989), Brand *et.*al (1990) และ Robert and Kenneth (2004) จากนั้นนำข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยเชอรี่ที่วิเคราะห์แล้ว มาเปรียบเทียบเพื่อคัดเลือกเฉพาะตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันไปศึกษาจำนวนโครโมโซมและการจัดเรียงคาริโอไทป์ในขั้นตอนต่อไป

3. ขั้นตอนการศึกษาคาริโอไทป์ โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อ gill ดังนี้

3.1 Pre-treatment โดยการฉีด 0.01 -0.02 % colchicines จำนวน 1-2 มล. เข้าไปในหอยเชอรี่ เป็นเวลา 3-4 ชม. เพื่อยับยั้งการทำงานของ spindle fiber ในโครโมโซม

3.2 Hypotonic treatment โดยการนำเนื้อเยื่อ gill ของหอย มาแช่ใน hypotonic solution (สารละลาย KCl) ประมาณ 30- 45 นาที เพื่อให้เซลล์บวม

3.3 Fixation โดยการนำเซลล์ไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วใช้หลอดดูดส่วนที่เป็น supernatant ออกให้หมด แล้วเติมสาร fixative (Carnoy solution) 3 - 4 ครั้ง

3.4 Air dried slide ดูดตัวอย่าเซลล์ที่ผ่านขั้นตอน fixation ลงบนสไลด์ และทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.5 Staining ย้อมสไลด์ที่แห้งแล้วด้วย 20% Giemsa ที่มีส่วนผสมของ stock Giemsa's Solution เป็นเวลา 30 นาที จึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นและทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง รอนำไปศึกษาต่อไป

3.6 Analization นำสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 100 X วิเคราะห์โครโมโซมโดยเลือกจากระยะเมทาเฟส (metaphase) ซึ่งมีการกระจายดี ไม่ซ้อนทับกัน นับจำนวนโครโมโซม จับคู่โครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome) มาจัดเรียงคาริโอไทป์ตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ ถ่ายภาพเซลล์ที่เลือกไว้ จากนั้นใช้ภาพถ่ายมาวิเคราะห์และคำนวณหาค่า relative length (RL) และค่า centromeric index (CI) เพื่อจัดชนิดโครโมโซม ต่อไป

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม พ.ศ. 2555 – กันยายน พ.ศ. 2557 (รวม 2 ปี)

สถานที่ : พื้นที่เกษตรกรรมและแหล่งน้ำ ภาคต่างๆของประเทศไทย

: ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ดำเนินการสำรวจการระบาด/เก็บตัวอย่างและบันทึกพิกัดภูมิศาสตร์พื้นที่ๆเก็บตัวอย่างตามแผนการสำรวจ ซึ่งจากการสำรวจพบว่าหอยเชอรี่เป็นหอยที่มีการระบาดทั่วประเทศไทย มีรายงานการระบาดในภูมิภาคเอเชียหลายประเทศ เช่น ลาว กัมพูชา มาเลเซีย ไต้หวัน เป็นต้น (Figure 1) ในช่วงฤดูฝนที่มีฝนตกติดต่อกันหลายวัน เป็นปัจจัยที่เอื้อให้เกิดการระบาดโดยเฉพาะพื้นที่นาข้าว โดยหอยจะมาตามกระแสน้ำ หอยเชอรี่จะวางไข่สีชมพูไว้ตามกิ่งไม้ ต้นหญ้า โคนต้นไม้หรือวัสดุที่อยู่เหนือน้ำ (Figure 2) ไข่หอยเชอรี่มี incubation periods 7-14 วัน หลังจากนั้นจะฟักเป็นตัวได้ในระยะเวลา 15 -25 วัน และเจริญเป็นตัวเต็มวัย สามารถผสมพันธุ์/ วางไข่ได้เมื่อหอยมีอายุ 45 -59 วัน (Figure 3) เมื่อศึกษา feeding behavior พบว่าหอยเชอรี่สามารถกินได้ตลอดเวลา คิดเป็นน้ำหนักอาหารที่กินเฉลี่ย 49.66 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว/ วัน (n=30) (Table 1) โดยดำเนินการสำรวจในพื้นที่ภาคต่างๆ ดังนี้

ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง กำแพงเพชร และนครสวรรค์ ได้ตัวอย่างหอยเชอรี่สกุล *Pomacea* รวมทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง นำมาเลี้ยงในโรงเรือนเลี้ยงหอย ของกลุ่มงานสัตวิทยาการเกษตร เพื่อรอศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือก

ภาคกลางและภาคตะวันตก ได้แก่ ได้แก่ จังหวัดนครปฐม นครนายก ปทุมธานี อยุธยา สุพรรณบุรี อุทัยธานี ราชบุรี กาญจนบุรี และตาก ได้ตัวอย่างหอยเชอรี่จำนวน 30 ตัว /พื้นที่ นำมาเลี้ยงในโรงเรือนเลี้ยงหอยของกลุ่มงานฯ และเพื่อรอศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือก

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น บุรีรัมย์ ชัยภูมิ ศรีสะเกศ อุบลราชธานี และนครราชสีมา ได้ตัวอย่างหอยเชอรี่ จำนวน 30 ตัว /พื้นที่ นำมาเลี้ยงในโรงเรือนของกลุ่มงานฯ

ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ระยอง จันทบุรี ปราจีนบุรี ตราดและฉะเชิงเทรา ได้ตัวอย่างหอยเชอรี่ จำนวนรวม 90 ตัวอย่าง นำมาเลี้ยงในโรงเรือนเลี้ยงหอยของกลุ่มงานฯ

ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดกระบี่ เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และชุมพร ได้ตัวอย่างหอยเชอรี่สกุล *Pomacea* 30 - 35 ตัวอย่าง/ พื้นที่ นำมาเลี้ยงในโรงเรือนเลี้ยงหอยของกลุ่มงานฯ เพื่อรอศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือก

ขณะนี้อยู่ระหว่างนำข้อมูลที่เก็บตัวอย่างหอยเชอรี่ทั้งหมดในปี 2556 /2557 เตรียมจัดทำแผนที่การกระจายพันธุ์ของหอยสกุล *Pomacea* ด้วยโปรแกรม ArcView หรือ ArcGis

การศึกษาขนาดกลุ่มไข่และไข่ โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง และวัดความยาวของกลุ่มไข่และไข่ พบว่ากลุ่มไข่ที่เก็บตัวอย่างได้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.11 - 22.20 ม.ม. และความยาว 15.32 - 55.92 ม.ม. เส้นผ่านศูนย์กลางของไข่ 1.65 - 2.49 ม.ม. และประมาณจำนวนไข่ต่อกลุ่มจากปริมาตรของกลุ่มไข่หารด้วยปริมาตรโดยเฉลี่ยของไข่ โดยคำนวณ ตามสูตร ดังนี้

ปริมาตรของกลุ่มไข่ (รูปทรงกระบอก, ลูกบาศก์มิลลิเมตร) = $\pi R^2 h$

เมื่อ π เป็นค่าคงตัว มีค่าประมาณ 3.14

R คือเส้นผ่านศูนย์กลางของกลุ่มไข่ (ม.ม.)

h คือ ความยาวของกลุ่มไข่ (ม.ม.)

ผลการศึกษาพบว่า ไข่หอยเชอรี่แต่ละกลุ่มมีจำนวน 286 - 4,303 ฟอง เมื่อนำค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่มาคำนวณค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย ANOVA พบว่ามีอย่างน้อย 1 ตัวอย่างที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, 99% และ 99.9% และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Tukey's HSD และ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.9% แล้วพบว่ามีการแบ่งกลุ่มออกเป็นอย่างน้อย 2 กลุ่ม (Table 2,3 และ Table 4)

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยเชอรี่ จะต้องวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยเชอรี่ทั้งหมดที่เก็บในปี 2556 -2557 โดยใช้เทคนิค morphometrics ซึ่งขณะนี้กำลังศึกษาจากตัวอย่างหอยบางส่วนที่เก็บจากพื้นที่ภาคต่างๆ โดยวัดค่า shell length, shell width, last whorl height, aperture length และ aperture width ด้วยเวอร์เนีย วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ ANOVA จากโปรแกรม SPSS จากนั้นนำข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยที่วิเคราะห์แล้วมาเปรียบเทียบเพื่อ*คัดเลือกเฉพาะตัวอย่างที่มีความแตกต่างกัน*ไปศึกษาจำนวนโครโมโซมและการจัดเรียงคาริโอไทป์ในปีต่อไป

Taxonomic Hierarchy of *Pomacea canaliculata*

Kingdom Animalia -- Animal,

Phylum Mollusca -- mollusk

Class Gastropoda Cuvier, 1797

Subclass Prosobranchia Milne-Edwards, 1848

Super Order : Caenogastropoda;

Order Architaenioglossa Ampullariidae

SuperFamily: Ampullarioidea

Family: Ampullariidae

Subfamily: Ampullariinae

Tribe: Ampullariini

Genus : Pomacea Perry, 1811

Species Pomacea canaliculata (Lamarck, 1828)

Bar Scale = 3 C.M.

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การทราบจำนวนและ รูปแบบการจัดเรียงโครโมโซม จะเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ ที่ช่วยสนับสนุนงานทางด้านการจำแนกชนิดและระบุชื่อวิทยาศาสตร์ได้แม่นยำยิ่งขึ้น ทั้งนี้เพื่อเป็นฐานข้อมูลทางอนุกรมวิธานหอยทากศัตรูพืช รวมไปถึงการสำรวจการแพร่กระจายของหอยสกุล *Pomacea* ที่พบในประเทศไทยในปัจจุบัน สามารถนำข้อมูลไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆ เช่น การป้องกันกำจัด ซึ่งหอยดังกล่าวเป็นศัตรูสำคัญในพืชหลายชนิด รวมทั้งยังมีตัวอย่างหอยสกุล *Pomacea* ที่วิเคราะห์ชนิดแล้ว เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นแหล่งค้นคว้าอ้างอิง และสามารถจัดทำเป็นคู่มือ เพื่อการถ่ายทอดแก่เกษตรกรและผู้สนใจ ต่อไป

ข้อสังเกตเพิ่มเติม

มีรายงานการศึกษาการกินพืชน้ำในหอยเชอรี่ *Pomacea canaliculata* โดยศึกษากับพืชน้ำ 21 ชนิดพบว่าอัตราการกินมีค่าตั้งแต่ 1.1 ถึง 22% ของน้ำหนักตัวและมีความแตกต่างกันในพืชน้ำแต่ละชนิด หอยจะชอบกินพืชที่มีไนโตรเจนสูง และหลีกเลี่ยงพืชที่มีส่วนประกอบแห้ง (dry matter content) สูง และพืชบางชนิดที่มีสารเคมีที่หอยไม่ชอบเช่น สารประกอบฟีนอลิก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในหอยชนิดอื่น เช่น *P. insularum* และ *Lymnaea stagnalis* (Wong *et al.*, 2010; Elger and Barrat-Segretain, 2002)

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนางสาวฤทัย นรินทร นักวิทยาศาสตร์ และนางทัศวรรณ พุ่มกาหลง นักวิชาการเกษตร กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ที่ช่วยปฏิบัติงานภาคสนามและช่วยดูแลให้อาหารหอยทดลองในโรงเรือน และบันทึกข้อมูลที่จำเป็นตลอดการทดลอง จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

พงษ์รัตน์ ดำรงโรจน์วัฒนา ชัดนารี มีสุขโข และชุตาภา คุณสุข. 2550. การศึกษาจำนวนโครโมโซมของหอยทากบก จำนวน 14 ชนิดของประเทศไทย. วารสารวิจัย มข. 12:(2) หน้า 102-108.

Abbott, R.T. 1989. Compendium of landshell. Melbourne,Australia : American Malacologist,Inc.

Brand, E.V., Yokosawa, T. and Fujio, Y. 1990. Chromosome analysis of apple snail *Pomacea canaliculata*. Tohoku Journal of Agricultural Research. 40 (3-4) : 81-89.

Dundee, D.S. and Baerwald, R.J. 1984. Observations on a micropredator *Gulella bicolor* (Hutton) (gastropoda: pulmonata: streptaxidae). Nautilus 98: 63-68.

Elger, A. and Barrat-Segretain, M. H. 2002. Use of the Pond Snail *Lymnaea stagnalis* (L.) in laboratory experiments for evaluating Macrophyte palatability. Archiv Fur Hydrobiologie 153(4): 669-683.

Laws, H.M. 1973. The chromosome of some Australian camaenid land snails. Cytologia. 38 : p.229-235.

Nakamura, H.K. 1985.A review of molluscan cytologenetic information based on the CISMOCH : Computerized index system for molluscan chromosomes, bivalvia, polyplacophora and cephalopoda . Venus 44 (3):" 199-225.

Robert, H.C. and Kenneth, A.H. 2004. Invasive Ampullariid snails : taxonomic confusion and some preliminary resolution based on DNA sequences. APEC symposium on the management of the golden apple snail. 24 pp.

Vaught, K.C. 1989. A classification of the living mollusca. U.S.A.: American malacologists.

Wen, L.W. and Yen, C.L. 2004. The biology and population analysis of the golden apple snail in Taiwan. APEC symposium on the management of the golden apple snail.18 pp.

Wong, P. K., Liang, Y., Liu, N. Y., and Qiu, J. W. 2010. Palatability of Macrophytes to the Invasive Freshwater Snail *Pomacea canaliculata*: Differential Effects of mMultiple Plant Traits. Freshwater Biology 55(10): 2023-2031.

ภาคผนวก

Figure 1 : The distribution of golden apple snail (GAS), *Pomacea* sp.

Figure 2 : Egg cluster of GAS on plant or other surface

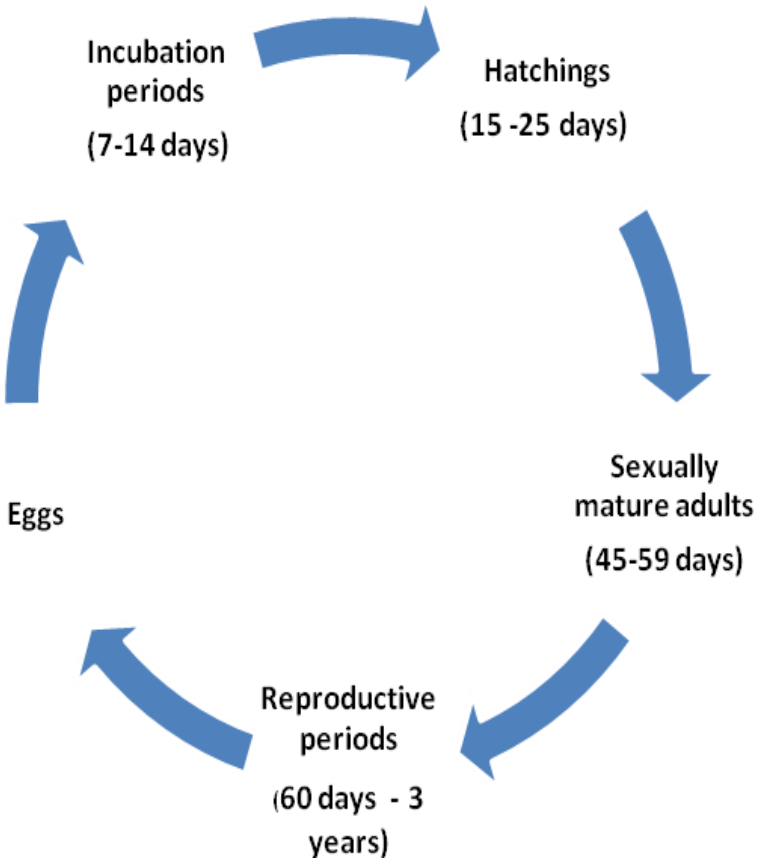


Figure 3 : Life cycle of GAS

Table 1: GAS consumption for one day

Apple snails samples	snail weight (g)	Food weight (g)	% consumption
A1	12.2	6.4	52.459016
A2	21	15.4	73.333333
A3	21	6.5	30.952381
A4	11	3.4	30.909091
A5	12	6.4	53.333333
A6	11	4.5	40.909091
A7	21	10.3	49.047619
A8	16	8.6	53.75
A9	17	9	52.941176
A10	14	7.5	53.571429
A11	15.3	6	39.215686
A12	12.2	6	49.180328
A13	14.5	7.6	52.413793
A14	16.6	4	24.096386
A15	17.7	6.8	38.418079
A16	22.3	11.4	51.121076
A17	18.4	10	54.347826
A18	19.3	11	56.994819
A19	16.3	9	55.214724
A20	16.3	9	55.214724
A21	13.2	7.6	57.575758
A22	13.5	7.5	55.555556
A23	18.4	8	43.478261
A24	10.3	6.6	64.07767
A25	10.4	6	57.692308
A26	21.4	11	51.401869
A27	23.5	12	51.06383
A28	31.2	11	35.25641
A29	21.4	11	51.401869
A30	27.2	15	55.147059
			AVG = 49.66915

Table 2: The characteristic of GAS's egg and egg cluster from North region of Thailand

Sampling site	code	Color of eggs	Egg cluster (m.m.)		number (egg)	Avg. Ø (m.m.)
			ø	length		
Chiangmai	PcCMN	white	11.85	26.31	853	1.87±0.08
Lampang	PcLPN	white	19.08	28.86	2416	1.87±0.10
Tak	PcTkN	pinkish	17.34	55.08	4303	1.79±0.13
Kampheangphet	PcKPN	pink	16.07	25.44	1943	1.72±0.10
Nakornsawarn	PcNSN	pink	10.22	23.92	587	1.86±0.16

Table 3: The characteristic of GAS's egg and egg cluster from North Eastern region of Thailand

Sampling site	code	Color of eggs	Egg cluster (m.m.)		number (egg)	Avg. Ø (m.m.)
			ø	length		
Nakornratchasima	PcNSNe	pinkish	11.85	26.31	1255	1.94±0.05
Bureerum	PcBRNe	pink	19.08	28.86	985	1.80±0.08
Khonkean	PcKKNe	pinkish	17.34	55.08	3204	1.79±0.13
Srisaket	PcSKNe	pink	16.07	25.44	4233	1.84±0.09
Chaiyaphum	PcCPNe	pink	10.22	23.92	1544	1.86±0.10

Table 4: The statistic data of GAS's egg clusters from 10 sampling sites from North region of Thailand

Parameter	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
	1.83	1.95	1.75	1.75	1.85	1.79	1.79	1.65	1.61	3.13
	1.75	1.90	1.67	1.75	1.79	1.67	1.75	1.80	2.00	2.95
	1.72	1.98	1.79	1.69	1.53	1.67	1.71	1.83	1.88	3.59
	1.91	2.22	1.74	1.71	1.72	1.63	1.70	2.08	2.01	2.24
	1.90	2.27	1.87	1.93	1.56	2.06	1.69	1.90	1.92	2.83
	1.88	1.97	1.96	1.81	1.62	1.61	1.64	1.97	1.67	2.64
	1.82	1.84	1.98	1.70	1.82	1.78	1.85	1.85	2.01	2.21
	1.89	2.05	2.02	1.80	1.84	1.86	1.92	1.80	1.97	2.52
	1.94	1.95	1.82	1.87	1.95	1.82	1.69	1.97	1.92	2.75
	1.95	1.95	1.84	1.87	1.94	1.55	1.80	1.75	1.79	2.29
	1.91	2.06	1.86	1.69	1.80	1.62	1.70	1.69	1.60	2.40
	1.80	1.88	1.82	1.67	1.95	1.73	1.54	1.90	1.76	1.93
	1.88	1.92	1.99	1.62	1.95	1.79	1.81	1.98	1.64	2.88
	1.86	1.98	1.91	1.64	2.08	1.87	1.86	1.94	1.80	2.34
	1.88	1.86	1.96	1.74	1.76	1.79	1.76	1.87	1.97	1.99
	1.86	1.96	1.85	1.73	1.85	1.77	1.63	2.04	1.80	2.13
	1.86	1.87	1.92	1.70	1.86	1.67	1.67	1.91	1.58	2.55
	1.95	2.04	1.87	1.82	1.79	1.65	1.58	2.00	2.08	1.96
	1.81	2.00	1.74	1.64	1.76	1.46	1.78	2.03	1.98	1.98
	1.91	1.74	2.01	1.71	1.76	1.65	1.74	1.93	2.12	2.30
	1.70	1.93			1.75		1.55			

Parameter	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
	2.01	1.84			1.64		1.62			
	1.94	1.78			1.69		1.74			
	1.91	1.85								
	1.87	1.70								
	1.65	1.89								
	1.99	1.96								
Average egg size	1.87	1.94	1.87	1.74	1.79	1.72	1.72	1.89	1.86	2.48
SD	0.08	0.12	0.10	0.08	0.13	0.13	0.10	0.11	0.16	0.43
R(egg clutch)										
h(egg clutch)										
Volume (Overall)	2900.20	9364.65	8247.51	790.99	13000.55	6879.92	5157.25	4559.77	1961.25	2862.91
Volume (one egg)	3.40	3.81	3.41	2.77	3.02	2.67	2.65	3.56	3.34	7.99
Number of eggs	853.03	2456.42	2415.82	285.92	4303.08	2574.58	1942.55	1281.39	586.64	358.44

Volume (Overall) = ¶ x R(egg clutch)^2 x h(egg clutch)

Volume (one egg) = ¶ x r(average egg size)^3

Number of eggs or clutch size = Volume (Overall)/Volume (one egg)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ (*Rattus argentiventer* , Robinson and Kloss 1916) ที่พบใน ประเทศไทย

Genetic Variation of Rice-field Rat (*Rattus argentiventer* , Robinson and Kloss 1916) in Thailand

วิชาญ วรรธนะไกวัล ปราสาททอง พรหมเกิด เกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์
สมเกียรติ กล้าแข็ง ทรงทัพ แก้วตา
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ ออกแบบ ไพรเมอร์จำนวน 2 ชุด โดยชุดแรกเป็นไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกชนิดของหนูนาใหญ่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ประกอบไปด้วยไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ด้วยวิธี Multiplex PCR ได้แก่ R.a outer F- R.a outer R และ R.a Inner F- R.a Inner R ซึ่งหนูนาใหญ่จะให้ผลเป็นแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 439 และ 179 คู่เบส ขณะที่หนูสปีชีส์อื่นๆ จะมีแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ ขนาด 439 คู่เบส เท่านั้น ในขณะที่ไพรเมอร์ชุดที่สอง ได้แก่ Ra cytb F – Ra cytbR และ Ra D-loop F – Ra D-loop R ออกแบบให้ครอบคลุมลำดับเบสของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ บริเวณอนุรักษ์ เพื่อนำมาใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรม จากผลการทดลองพบว่าสามารถแบ่งหนูนาใหญ่ที่พบในประเทศไทย ในเขตภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ออกเป็น 5 Haplotypes จากความแตกต่างกัน 10 ตำแหน่ง บนความยาว 439 คู่เบส ของยีนที่นำมาใช้ในการเปรียบเทียบครั้งนี้ ซึ่งยีนบริเวณที่นำมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกกลุ่มหนูนาใหญ่ออกจากกลุ่มหนูชนิดอื่นๆและสามารถจัดกลุ่มหนูนาใหญ่จาก 3 ภูมิภาคของประเทศไทยได้เป็น 2 กลุ่ม แต่เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ยังไม่สิ้นสุด ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยทำการเก็บตัวอย่างเพิ่มเพื่อเป็นตัวแทนของหนูนาใหญ่ทุกภูมิภาคในประเทศไทยและวิเคราะห์ลำดับเบสจากยีนตำแหน่งอื่นเพิ่มเติม เพื่อสามารถให้ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ชัดเจนและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-34-56

คำนำ

หนูเป็นศัตรูสำคัญในกระบวนการผลิตพืช-สัตว์และทางการแพทย์ในประเทศไทย หนูสร้างความเสียหายให้กับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ตั้งแต่ระยะปลูก ตลอดจนหลังการเก็บเกี่ยวแล้ว เช่น ข้าว ข้าวโพด อ้อย ถั่วเหลือง โกโก้ ปาล์มน้ำมัน เป็นต้น ความเสียหายที่เกิดขึ้นคิดเป็นมูลค่าหลายพันล้านบาทต่อปี นอกจากการทำลายพืชทางการเกษตรแล้ว หนูยังเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญที่ถ่ายทอดสู่มนุษย์ และสัตว์เลี้ยงอีกด้วย เช่น กาฬโรค โรคเลปโตสไปโรซีสหรือโรคไข้ฉี่หนู โรค Scrup Thyphus เป็นต้น ด้วยเหตุนี้เองจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยา นิเวศวิทยาและอนุกรมวิธานของหนูเพื่อศึกษาเรียนรู้พฤติกรรมของมันเพื่อนำไปสู่การป้องกันและกำจัด หนูมีการจัดลำดับชั้นดังนี้

Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Class	Mammalia
Order	Rodentia
Family	Muridae (Rat and Mice)

โดยทั่วไปสัตว์ในวงศ์ Muridae จะมีรูปร่างแบบหนู คือ รูปร่างทรงกระบอกและด้านหัวมีทรงแหลม มีสี่ขา หางยาว สูตรของฟันโดยทั่วไป คือ 1/1 ,0/0 , 0/0 , 3/3 = 16 หนูเป็นสัตว์ที่มีวิวัฒนาการมาช้านาน และสามารถแข่งขันกับสัตว์ชนิดอื่นๆในโลกนี้ในการหาอาหารได้เป็นอย่างดี ด้วยเหตุที่ว่า หนูเป็นสัตว์ที่มีสามารถในการปรับตัวเข้ากับถิ่นที่อยู่ (habitat) ที่หลากหลายได้เป็นอย่างดี สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในวงศ์นี้ จึงมีจำนวนชนิดที่มากที่สุดในโลกคิดเป็นร้อยละ 65 ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในอันดับสัตว์ฟันแทะทั้งหมด

ลักษณะที่ใช้จำแนกชนิดของหนูที่ใช้กันทั่วๆไป คือ ลักษณะภายนอก(external characters) เช่น ขนาด น้ำหนัก ลักษณะของขน สี จำนวนเต้านม(เพศเมีย) และอื่นๆ ลักษณะเหล่านี้จะต้องดูจากหนูที่โตเต็มวัยแล้ว เมื่อนำเอาลักษณะต่างๆมาประกอบกันทำให้สามารถจำแนกจำแนกหนูได้ถึงสกุล (genus) หรือชนิด (species) ส่วนการจำแนกชนิดของหนูที่มีลักษณะใกล้เคียงกันในสกุลเดียวกันทำได้ยาก เช่น หนูในสกุล *Rattus* ทำได้ยากต้องอาศัยลักษณะอื่นๆประกอบ เช่น สัณฐานวิทยาของกะโหลกศีรษะ ลักษณะและขนาดของฟันแทะและฟันกราม เป็นต้น

หนูนาใหญ่ (*Rattus argentiventer*) เป็นศัตรูสำคัญที่สุดในแหล่งปลูกข้าวและธัญพืชอื่นๆ ทางภาคกลางและภาคใต้รวมถึงแหล่งปลูกข้าวในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Lekagul, 1977) แต่เนื่องจากในสภาพตามธรรมชาติในปัจจุบันพบว่า หนูนาใหญ่ในธรรมชาตินั้นมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างและสังคมชีวิตที่พบ ในแหล่งทำการเกษตร หรือในธรรมชาติ ซึ่งลักษณะที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมด้านรูปร่างลักษณะ อันเป็นลักษณะที่เกิดจากความแปรปรวนทางอนุกรมวิธานของหนู

ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาหาวิธีการจำแนกชนิดของหนูนาใหญ่ในระดับพันธุกรรมโดยวิธีทางชีวโมเลกุลเพื่อนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของหนูนาใหญ่ร่วมกับการจำแนกจากสัณฐานวิทยาของหนูเพื่อเป็นการยืนยันให้เกิดความถูกต้องเพื่อนำไปเป็นแหล่งข้อมูลพื้นฐานประยุกต์ใช้ในการป้องกันกำจัดหนูนาใหญ่ที่สร้างความเสียหายให้แก่นาข้าว พืชผลทางการเกษตร รวมถึงด้านอนุกรมวิธานและงานวิจัยต่อยอดในด้านอื่นๆต่อไป

ในสภาพตามธรรมชาติในปัจจุบันพบว่า หนูนาใหญ่ในธรรมชาตินั้นมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างและสังคมชีวิตที่พบ ในแหล่งทำการเกษตร หรือในธรรมชาติ ซึ่งลักษณะที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมด้านรูปร่างลักษณะ อันเป็นลักษณะที่เกิดจากความแปรปรวนทางอนุกรมวิธานของหนู ความแปรปรวนของลักษณะภายนอกในประชากรหนูนาใหญ่อยู่ภายใต้อิทธิพลของยีน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาหาวิธีการจำแนกชนิดของหนูนาใหญ่ในระดับพันธุกรรมโดยวิธีทางชีวโมเลกุล เพื่อนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของหนูนาใหญ่ร่วมกับการจำแนกจากสัณฐานวิทยาของหนูเพื่อเป็นการยืนยันให้เกิดความถูกต้องเพื่อนำไปเป็นแหล่งข้อมูลพื้นฐานประยุกต์ใช้ในการป้องกันกำจัดหนูนาใหญ่ที่สร้างความเสียหายให้แก่นาข้าว พืชผลทางการเกษตร รวมถึงด้านอนุกรมวิธานและงานวิจัยต่อยอดในด้านอื่นๆต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กรงดักและกรงเลี้ยงเดี่ยวสำหรับหนูนาใหญ่ อาหารหนูและน้ำ
2. ชุดสกัดดีเอ็นเอ , Hot start taq DNA polymerase , ชุด Kit Pure gel
3. อุปกรณ์ Run gel electrophoresis , ชุดถ่ายรูป Gel electrophoresis
4. สารเคมีเตรียม TAE/TBE buffer , Agarose gel , Nucleic acid stain (gel star)
5. หม้อนึ่ง Autoclave
6. เครื่อง Spindown , Microcentrifuge , Autopipette
7. กระดาษทิชชูแบบอเนกประสงค์ ถุงมือยางสำหรับแพทย์ ชุดเครื่องมือผ่าตัด

วิธีการ

การเก็บตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างหนูนาใหญ่จากนาข้าว จำนวน 61 ตัวอย่าง จากจังหวัดกรุงเทพฯ สุพรรณบุรี นครสวรรค์อยุธยา และลพบุรี (ภาคกลาง) จังหวัดร้อยเอ็ด (ภาคอีสาน) จังหวัดกระบี่ สงขลา และพัทลุง (ภาคใต้) เพื่อเป็นตัวแทนของหนูในภูมิภาคนั้นๆ

การวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการชั่งน้ำหนัก (หน่วยเป็นกรัม) และวัดลักษณะภายนอกของตัวอย่างหนูที่ดักได้ (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) ดังนี้

1. ความยาวของหัวและลำตัว (HB) โดยทำการวัดจากปลายจมูกถึงรูทวาร
2. ความยาวของหาง (T) โดยทำการวัดจากรูทวารถึงปลายหาง
3. ความยาวของตีนหลัง (HF) โดยทำการวัดจากปลายนิ้วที่ยาวที่สุดจนถึงส้นของตีนหลัง
4. ความยาวของหู (E) โดยทำการวัด จากโคนหูจนถึงปลายของใบหู
5. ในกรณีเป็นเพศเมีย นับจำนวนเต้านมและบันทึกลักษณะการเรียงตัวของเต้านม

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างชิ้นเนื้อหรืออวัยวะต่างๆ เช่น หัวใจ ปอด ไต และตับ เป็นต้น โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAGEN extraction kit ละลายดีเอ็นเอด้วย TE Buffer 30 ul หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกริยาพีซีอาร์

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR)

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของหนูนาใหญ่ ออกแบบ ไพรเมอร์จำนวน 2 ชุด โดยชุดแรกเป็นไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกชนิดของหนูนาใหญ่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ประกอบไปด้วยไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ บริเวณยีนไซโตโครม บี (Cytochrome b) ในไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Multiplex PCR ได้แก่ R.a outer F (5’ ACA GCA TTC TCA TCA GTT ACT C) R.a outer R (5’ GTT GTT TGA TCC TGT TTC GTG) R.a Inner F (5’ GAT ATT TAC ACG CCA ACG GG) และ R.a Inner R (5’ GAT TAC GGT GGC TCC TCA A) ซึ่งไพรเมอร์คู่แรกออกแบบให้จำเพาะกับหนูนาใหญ่เท่านั้น ส่วนไพรเมอร์คู่ที่สองออกแบบให้ครอบคลุมลำดับเบสของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ บริเวณอนุรักษ์ของหนูทุกชนิด ในขณะที่ ไพรเมอร์ชุดที่สองประกอบด้วย ไพรเมอร์บริเวณยีนไซโตโครม บี และ D-loop ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ อย่างละ 1 คู่ ได้แก่ Ra cytb F (5’ ACA GCA TTC TCA TCA GTT ACT CAC ATC) – Ra cytbR (5’ GAT TGG TAT TAG AAT GAG GAT AAT C) และ Ra D-loop F (5’ CCA ATC TCT GGA ATC ATT GAA GAC) – Ra D-loop R (5’ GCT GAC CTT CAT GCC TTG ACG GC) ตามลำดับ โดยออกแบบให้ครอบคลุมลำดับเบสของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ บริเวณอนุรักษ์ เพื่อนำมาใช้ในการถอดรหัสพันธุกรรม

หลังจากนั้น ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวม 20 ul ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอของหนูนาใหญ่ 2 ul ผสมกับ 10x PCR buffer , 10mM dNTPs , เอนไซม์ Hot start Taq DNA polymerase 1 ยูนิต และไพร์เมอร์ชนิดละ 10 mM แล้วเติมน้ำกลั่น จนครบปริมาตร 20 ul ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) ภายใต้อุณหภูมิ Pre Denature 95 $^{\circ}$c เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบของการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ Denature 95 $^{\circ}$c เป็นเวลา 30 วินาที, Annealing 55 $^{\circ}$c เป็นเวลา 30 วินาที, Extension 72 $^{\circ}$c เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 40 รอบ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน Final Extension) 72 $^{\circ}$c เป็นเวลา 5 นาที PCR product ที่ได้ทำการตรวจสอบด้วย 2% Agarose gel electrophoresis

การถอดรหัสพันธุกรรม (Nucleotide sequencing)

ตรวจลำดับเบสของแถบ ดีเอ็นเอขนาดตรงกับที่คำนวณไว้ (439 bp) ทำการส่งหาลำดับเบสที่ 1st BASE ณ ประเทศมาเลเซีย ลำดับเบสที่ได้มาทำการตรวจสอบความถูกต้องและวิเคราะห์ผลลำดับเบส ที่ได้ โดยวิเคราะห์จากค่าความแตกต่างในลำดับเบส (Number of variation site) ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Nucleotide diversity) ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) โดยใช้ Kimura 2-parameter และจัดทำแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) โดยใช้วิธีวิเคราะห์ 3 วิธี คือ Neighbour joining (NJ), Maximum parsimony (MP) และ Maximum likelihood (ML)

เวลาและสถานที่

เก็บตัวอย่างหนูนาใหญ่จากธรรมชาติระหว่างเดือนตุลาคม 2555 - กันยายน 2557 บริเวณภาคกลาง ภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และปฏิบัติการทางชีวโมเลกุลภายในกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการออกแบบไพร์เมอร์ ที่ใช้จำแนกชนิดของหนูนาใหญ่ ให้ต่างจากหนูชนิดอื่นๆใช้ไพร์เมอร์จำนวน 2 คู่ Multiplex (2 plex) PCR คือ R.a outer F- R.a outer R และ R.a Inner F - R.a Inner R ซึ่งหนูนาใหญ่จะให้ผลเป็นแถบ DNA 2 แถบ ขนาด 439 และ 179 เบส ขณะที่หนูสปีชีส์อื่นๆ จะมีแถบ ดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ ขนาด 439 เบส เท่านั้น ซึ่งจากการทดสอบไพร์เมอร์จำแนกชนิดกับหนูนาใหญ่จากธรรมชาติ ที่ทำการตรวจวัด ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วคาดว่าเป็นหนูนาใหญ่ จำนวน 61 ตัวอย่าง จาก 3 ภูมิภาคในประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้) พบว่าทุกตัวอย่างเป็นหนูนาใหญ่ ซึ่งผลการทดสอบทางชีวโมเลกุลและลักษณะทางสัณฐานวิทยา ให้ผลสอดคล้องกันทุกตัวอย่าง และเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณ ไซโตโครมบีของหนูนาใหญ่ในประเทศไทยและจากฐานข้อมูล GenBank ร่วมกับการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) และการสร้างเนตเวิร์ค (Network) พบว่าสามารถแบ่งหนูนาใหญ่ที่พบในประเทศไทยจาก 3 ภูมิภาค ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือกลุ่มทางภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Central clade) และกลุ่มทางภาคใต้ (Southern clade) สามารถแบ่งหนูนาใหญ่ที่พบในประเทศไทยได้ 5 Haplotypes ซึ่งหากนับรวมหนูนาใหญ่ที่มีทั้งหมดจากฐานข้อมูล GenBank สามารถแบ่งหนูนาใหญ่ที่มีทั้งหมดได้ 8 Haplotypes โดยพบว่ากลุ่มภาคกลาง (Central clade) ซึ่งประกอบด้วย Haplotypes A และ B เป็นรูปแบบที่พบในประชากรหนูนาใหญ่ทางภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดย Haplotype B เป็นรูปแบบที่พบในประชากรหนูนาใหญ่มากที่สุด อีกทั้งเป็นกลุ่มที่มีการกระจายตัวของประชากรในบริเวณภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยหนูนา

ใหญ่จากประเทศกัมพูชา เวียดนาม ซึ่งอยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้แผ่นดินใหญ่ หรืออินโดจีน และประเทศออสเตรเลีย ซึ่งอยู่ทางทิศใต้ของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

ในขณะที่กลุ่มภาคใต้ (Southern clade) ซึ่งประกอบไปด้วย Haplotypes C, D และ E เป็นรูปแบบที่พบในประชากรหนูนาใหญ่ทางภาคใต้ของประเทศไทยเท่านั้น ส่วน Haplotypes F, G และ H เป็นหนูนาใหญ่ที่พบในกลุ่มประเทศ ญี่ปุ่น ออสเตรเลียและเวียดนาม ซึ่งหลังจากการแปลรหัสทางพันธุกรรมเป็นกรดอะมิโนพบว่าสามารถแบ่งหนูนาใหญ่ในประเทศไทยได้เป็นสองกลุ่มเช่นกัน โดยหนูนาใหญ่จากภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 68 เป็นไทโรซีน เช่นเดียวกับหนูนาใหญ่จากกัมพูชา (Accesion number HM217362-HM217364) ส่วนหนูนาใหญ่ทางภาคใต้มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 68 เป็นฮีสทีดีน เช่นเดียวกับ หนูนาใหญ่จากญี่ปุ่น (Accesion number AB033701) ในขณะที่หนูนาใหญ่จากเวียดนาม (Accesion number FR775875-FR775882) และออสเตรเลีย (Accesion number 675488-JN675494) มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนทั้ง ไทโรซีนและฮีสทีดีน อีกทั้งพบว่า Haplotypes A และ B ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบในประชากรหนูนาใหญ่ทางภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย รวมถึงหนูนาใหญ่จากกัมพูชา และหนูนาใหญ่จากเวียดนามและออสเตรเลียบางตัวอย่างนั้น เป็นกลุ่มที่มีความอนุรักษ์ค่อนข้างสูง มีประชากรหนูนาใหญ่มากกว่า Haplotypes อื่นๆ มีความผันแปรทางพันธุกรรมน้อยกว่า Haplotypes C, D และ E และยังพบว่า Haplotypes C, D และ E ซึ่งเป็นกลุ่มหนูนาใหญ่ทางภาคใต้ของประเทศไทย มีความใกล้เคียงกับ Haplotypes F, G และ H ซึ่งเป็นหนูนาใหญ่ที่พบในประเทศ ญี่ปุ่น รวมถึงบางตัวอย่างของประเทศออสเตรเลียและเวียดนาม มากกว่า Haplotypes A และ B เนื่องมาจากการที่กลุ่มหนูนาใหญ่ทางภาคใต้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส ในตำแหน่งที่ 204 bp ทำให้แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน ฮีสทีดีน (ตารางที่ 1) เช่นเดียวกับ Haplotypes F, G และ H ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่ากลุ่มหนูนาใหญ่ทางภาคใต้ของประเทศไทยกับหนูนาใหญ่จากประเทศญี่ปุ่น รวมถึงบางตัวอย่างของประเทศออสเตรเลียและเวียดนามนั้นมีที่มาจากกลุ่มเดียวกัน ในขณะเดียวกันก็มีความเป็นไปได้เช่นเดียวกันว่า หนูนาใหญ่บางตัวอย่างของประเทศออสเตรเลียและเวียดนามที่อยู่ใน Haplotype B ซึ่งอยู่ในกลุ่มภาคกลางกับหนูนาใหญ่ใน Haplotype F, G และ H ที่พบในกลุ่มประเทศ ญี่ปุ่น ออสเตรเลียและเวียดนาม ซึ่งมีในฐานข้อมูล GenBank นั้นมีที่มาจากกลุ่มประชากรที่ต่างกัน

แต่เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ยังไม่สิ้นสุด ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณอื่นเพิ่มเติมซึ่งได้ออกแบบไพรเมอร์ไว้แล้ว และทำการเก็บตัวอย่างเพิ่มเพื่อเป็นตัวแทนของหนูนาใหญ่ทุกภูมิภาคในประเทศไทย เพื่อสามารถให้ข้อมูลที่ชัดเจนและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

-

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นายสมเกียรติ กล้าแข็ง นักสัตววิทยาปฏิบัติการ กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ที่ช่วยเก็บตัวอย่างหนูนาใหญ่จากธรรมชาติเพื่อใช้ในงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

ปราสาททอง พรหมเกิด กรแก้ว เสือสะอาด ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ ทรงทัพ แก้วตา , 2553 ศึกษาความแปรปรวนของลักษณะภายนอกในประชากรหนูนาใหญ่ *Rattus argentiventer.* ใน เอกสารการประชุมสัมมนาวิชาการอารักขาพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร. หน้า 80-83

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค กรแก้ว เสือสะอาด เกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์ ปิยาณี หนูกาฬ และพวงทอง บุญทรง. 2544. หนูและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

Aplin K.P., P.R. Brown, J. Jacob, C.J. Krebs and G.R. Singleton. 2003. Fields method for rodent studies in Asia and the Indo-Pacific. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Austalia.

Balakirev A.E. and V.V. Rozhnov. 2012. Contribution to the species composition and taxonomic status of some *Rattus* inhabiting Southern Vietnam and Sundaland. Russian Journal of Theriology. 11: 33-45.

Chaval, Y., M. Pages, V. Herbreteau, S. Waengsothorn, J.F. Cosson, J.P. Hugot, S. Morand and J. Michaux. 2009. A Multi – Approach Survey as the most Reliable Tool to Accurately Assess Biodiversity : an Example of Thai Murine Rodents . Kasetsart Journal. 44: 590-603.

Jing, M., H.T. Yu, S.H. Wu, W. Wang and X. Zheng. 2006. Phylogenetic relationships in genus Niviventer (Rodentia : Muridae) in China inferred from complete mitochondrial cytochrome b gene . Molecular phylogenetics and evolution. 44: 521-529.

Lecompte , E. , K. Aplin, C. Denys, F. Catzeflis, M. Chades and P. Chevret. 2005. Confrontation of morphological and molecular data : The Praomys group (Rodentia ,Murinae) as a case of adaptive convergences and morphological stasis. Molecular Phylogenetics and Evolution. 37: 899-919.

Lekagul, B. and A.M.Jeffery. 1977. Mammal of Thailand. Printed at Kurusapha Ladprao Press by Nai kamthon Sathirakul, Bangkok. 758 p.

Martin, Y. 1999 Molecular Phylogeny of European Muroid Rodents Based on Complete Cytochrome b Sequences . Molecular Phylogenetics and Evolution. 16: 37-47.

Martin, M., G. Gerlach, C. Schlotterer and A. Meyer. 2007. Detection of cat, dog and rat or mouse tissues in food and animals feed using species-specific polymerease chain reaction. Journal of Anim Science. 85: 2734-2739.

Meyer, J., A. Kohnen, R. Harf, G. Froeschke and R. Brandl. 2006. Molecular markers for some small mammals of southern Africa . Folia Zoology. 55: 444 - 447.

Musser, G.G. 1973. Zoogeographical significance of the Rice field rat, *Rattus argentiventer*, on Celebes and New Guinea and the Identity of *Rattus pesticulus*. The American Museum of Natural History. 2511: 1-30.

Pages M., Y. Chaval, V. Herbreteau, S. Waengsothorn, J.F. Cosson, J.P. Hugot, S. Morand and J. Michaux. 2010. Revisiting the taxonomy of the Rattini tribe: a phylogeny-based delimitation of species boundaries. BMC Evolutionary Biology. 10: 184-212.

Rad, S.A., R. Jalal, J. Darvish and M.M. Matin. 2008. Identification of three Iranian species of the genus *Rattus* (Rodentia , Muridae) using a PCR-RFLP technique on mitochondrial DNA. The Italian Journal of Mammalogy 20: 69-77.

Suzuki H., K. Tsuchiya and N. Takezaki. 2000. A molecular phylogenetic framework for the *Ryukyu* endemic rodents *Tokudaia osimensis* and *Diplothrix legata*. Molecular Phylogenetics and Evolution. 15: 15-24.

Tucker, P.K., S.A. Sandstedt and B.L. Lundrigan. 2003 . Phylogetic relationships in the subgenus *Mus* (genus *Mus* , family Muridae ,subfamily Murinae) : examining gene trees and species trees . Biology journal of the Linnean Society. 84, 653-662.

Wright, S. 1951. The genetical structure of population. Annals of Eugenics. 15: 323-354.

ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์และลักษณะทางพันธุกรรมของปรสิตโปรโตซัว, *Sarcocystis singaporensis* โดยวิธีทางอณูชีววิทยา

Study on Method for Identification of *Sarcocystis singaporensis* by Molecular Biology Method

วิชาญ วรรธนะไกวัล **ดาราพร รินทะรักษ์**
สมเกียรติ กล้าแข็ง **ทรงทัพ แก้วตา**
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

รายงานความก้าวหน้า

สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของ *Sarcocystis singaporensis* ที่นำมาใช้ในการทดลองมีการปนเปื้อนจากปรสิตโปรโตซัวชนิดอื่นและเชื้อต่างๆจำนวนมากแม้ว่าจะผ่านการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์มาแล้วก็ตาม ดังนั้นจึงต้องทำการโคลนนิ่งเพื่อถอดรหัสพันธุกรรมเชื้อแต่ละชนิดที่ปนกันอยู่ให้สามารถแยกจากกันได้ก่อนแล้วจึงนำรหัสพันธุกรรมที่ได้นำมาใช้ออกแบบไพร์เมอร์ให้จำเพาะต่อ *S. singaporensis* เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมต่อไป ซึ่งผลจากการทดลองที่ได้ในขณะนี้สามารถทราบลำดับเบสของ *S. singaporensis* ระยะซาร์โคซีสต์ที่ได้จากการโคลนนิ่งแล้ว และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิดและหาลำดับเบสของ *S. singaporensis* ทั้งในระยะซาร์โคซีสต์จากกล้ามเนื้อลำตัวหนูและระยะสปอร์โรซีสต์ จากมูลงูเหลือมได้โดยไม่ต้องโคลนนิ่งอีกต่อไป แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้ยังมีจำนวนตัวอย่างที่นำไปวิเคราะห์ลำดับเบสไม่มากพอ จึงต้องทำการทดลองกับตัวอย่างเพิ่มเติม เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้องและมีความสมบูรณ์มากขึ้น

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-35-56

คำนำ

Sarcocystis singaporensis Zamen & Colley (1976) เป็นปรสิตโปรโตซัวที่มีความจำเพาะต่อสัตว์อาศัย(หนูและงูเหลือม) พบแพร่ระบาดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งค้นพบโดยศาสตราจารย์ Zamen เป็นครั้งแรกในประเทศสิงคโปร์ การขยายพันธุ์แบบมีเพศของปรสิตชนิดนี้ในสัตว์อาศัยสุดท้าย เกิดขึ้นภายในเซลล์บุผิวลำไส้ของงูเหลือมและสปอร์โรซีสต์ (Sporocysts) ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของการเจริญเติบโตจะปะปนออกมาพร้อมมูลงูสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก และสู่สัตว์อาศัยตัวกลางโดยทางน้ำและอาหาร คือ หนูในสกุลท้องขาว (*Rattus* spp.) และสกุลพุก (*Bandicota* spp.) ที่ซึ่งโปรโตซัวชนิดนี้จะขยายพันธุ์แบบไม่มีเพศในเซลล์บุผิวหลอดเลือดในอวัยวะสำคัญเช่น ปอด หัวใจ ตับ ไต เป็นต้น และสุดท้ายเจริญพัฒนาเป็นแบรดิซ้อยต์ (Bradyzoites) ซึ่งปรากฏในถุงฝังตามกล้ามเนื้อลำตัวหนู (Sarcocysts)

ระยะสปอร์โรซีสต์เท่านั้น ที่มีศักยภาพสูงมากในการทำให้หนูป่วยตายได้ จึงมีการวิจัยและพัฒนาโปรโตซัวชนิดนี้ เป็นสารชีวินทรีย์กำจัดหนู (Bio-rodenticide) ซึ่งเป็นที่ยอมรับของทั้งภาคเอกชนและเกษตรกร โดยมีงูเหลือม (*Python reticulates*) เป็นแหล่งผลิตขยายสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวชนิดนี้ได้ดีที่สุด แต่งูเหลือมยังสามารถผลิตสปอร์โรซีสต์ของโปโตซัวสกุล *Sarcocystis* ชนิดอื่นๆ ได้แก่ *S. zamani* และ *S. villvilosi* ซึ่งการจำแนกชนิดปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในปัจจุบันนั้น จำแนกโดยอาศัยลักษณะรูปร่างและขนาดของสปอร์โรซีสต์ และลักษณะรูปร่างของเชื้อระยะซาร์โคซีสต์ในกล้ามเนื้อของหนูที่ติดเชื้อ ซึ่งอาจจำแนกผิดพลาดได้ เพราะเกิดการปนเปื้อนของค็อคซิเดียโปรโตซัวหลายชนิดได้ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ความรุนแรงของการเกิดโรคในหนูลดลงได้ ดังนั้นจึงควรที่จะมีการยืนยันชนิดที่แน่นอนและเชื่อถือได้ร่วมกับการจำแนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *S. singaporensis* นอกจากนี้ยังไม่สามารถตรวจสอบสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* ในสารแขวนลอยที่บรรจุในเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงได้ ดังนั้นการศึกษารหัสทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดของ *S. singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์โดยวิธีทางอณูชีววิทยา เพื่อที่จะพัฒนางานวิจัยการจำแนกปรสิต โปรโตซัวชนิดนี้เพื่อตรวจสอบ *S. singaporensis* ในเหยื่อโปรโตซัวที่ผลิตโดยภาคเอกชน ในอนาคต

ในการทดลองนี้ใช้วิธีทางอณูชีววิทยาในการจำแนกชนิดและใช้ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในระยะสปอร์โรซีสต์ จากตัวอย่างในห้องปฏิบัติการกลุ่มงาน สัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรและภูมิภาคต่างๆในประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กรงเลี้ยงงูเหลือมและงูเหลือม กรงเลี้ยงเดี่ยวสำหรับหนูท้องขาว อาหารหนูและน้ำ
2. ชุดสกัดดีเอ็นเอ , Hot start taq DNA polymerase , ชุด Kit Pure gel

3. อุปกรณ์ Run gel electrophoresis , ชุดถ่ายรูป Gel electrophoresis

4. สารเคมีเตรียม TAE/TBE buffer, Agarose gel, Nucleic acid stain (gel star)

5. หม้อนึ่ง Autoclave

6. เครื่อง Spindown, Microcentrifuge, Auto pipette

7. กระดาษทิชชูแบบอเนกประสงค์ ถุงมือยางสำหรับแพทย์ ชุดเครื่องมือผ่าตัด

วิธีการ

ทำการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อโดยวิธีทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) เพื่อเป็นการสนับสนุนผลที่ได้จากสัณฐานวิทยาและยืนยันชนิดของเชื้อ รวมถึงการถอดรหัสทางพันธุกรรมของเชื้อโดยวิธีทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิค sequencing มีรายละเอียดดังนี้

1.สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อศึกษาเป็นแนวทาง

2.สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของยีนต่างๆที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank (data base ของ NCBI) ของ *S. singaporensis* และกลุ่มอื่นที่ใกล้เคียงกันเพื่อนาใช้เปรียบเทียบอ้างอิง

3.ออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้ลำดับเบสของ *S. singaporensis* ที่มีในฐานข้อมูล Genbank Accession number AF 434050-59, AF 237617 เพื่อนำมาใช้ในการโคลนนิ่งและถอดรหัสพันธุกรรมด้วยเทคนิค Sequencing

4.เก็บตัวอย่างโปรโตซัว *S. singaporensis* ระยะซาร์โคซีสต์จากกล้ามเนื้อลำตัวหนูและระยะสปอร์โรซีสต์ จากมูลงูเหลือมโดยดูผ่านกล้องสเตอริโอสโคปและกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 10, 40 และ 100 เท่า ตามลำดับ

5.สกัดดีเอ็นเอของโปรโตซัว *S. singaporensis* ด้วยเทคนิค Phenol extraction/Alcohol precipitation DNA แล้วเก็บ ดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่ อุณหภูมิ -20 หรือ -70°C

6.ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของโปรโตซัว *S. singaporensis* ด้วยวิธีโคลนนิ่ง โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นส่วนของ ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ จำนวน 5 สาย มีลำดับเบส ดังนี้

<u>18s rDNA primer</u>

1LF edit	5’- AGC CAT GCA TGT CTA AGT ATA AG
1 hr	5’- TAT CCC CAT CAC GAT GCA TAC

<u>28s rDNA primer</u>

KL 1F	5’- AAA GAT TAA GCC ATG CA
IdenLSUF	5’- TTG GTT TTC GGA CTG GAC TTG AA
IdenLSUR	5’- TCA CCA TCT TTC GGG TCC TAA TAC

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 50 ul ในหลอดทดลองขนาด 0.2 ml โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของโปรโตซัว *S. singaporensis* 5 ul ผสมกับ 5x

PCR buffer , 10mM dNTPs , เอนไซม์ Hot start taq DNA polymerase 1 ยูนิต และไพร์เมอร์ชนิดละ 10 mM แล้วเติมน้ำกลั่น จนครบปริมาตร 50 ul ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ(^{o}c)	เวลา(นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (Initial Denaturing)	98	30 วินาที
2. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ (Denaturing)	98	30 วินาที
3. ไพร์เมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing)	55/64	30 วินาที
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Extension)	72	1 นาที
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ รอบสุดท้าย (Final Extension)	72	5 นาที

ทำปฏิกิริยาซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 40 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่ 4 ^{o}c นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ทั้งหมดมาผสมกับ loading dye ปริมาณ 10 ul จากนั้นทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (Agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5% อะกาโรสใน 0.5xTAE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักดิ์ 135 โวลต์ นาน 45 นาที ย้อมดีเอ็นด้วย เอธิเดียมโบรไมด์หรือ สีย้อม Syber green dye ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จากนั้นทำการตัดแถบดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์แล้วทำการ Ligation , Transformation , Sequencing ตามลำดับ

7.วิเคราะห์ผลลักษณะทางพันธุกรรมที่ได้จากโปรโตซัว *S. singaporensis* แต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MEGA 6 วิเคราะห์ค่า Bootstrap และนำมาเปรียบเทียบวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในห้องปฏิบัติการกับค็อคซิเดียนโปรโตซัวและโปรโตซัวชนิดอื่นๆที่มีในฐานข้อมูล Genbank แล้วจัดทำแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีอยู่ภายในห้องปฏิบัติการที่ได้มาจากแหล่งต่างๆในประเทศไทย

เวลาและสถานที่ เก็บรวบรวมข้อมูลระหว่างเดือนตุลาคม 2555 - กันยายน 2557
ภายในกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การจำแนกสายพันธุ์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในระยะสปอร์โรซีสต์ จากตัวอย่างในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ซึ่งผลการทดลองที่ผ่านมาในปี 2557 นั้น พบว่าสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* ที่นำมาใช้ในการทดลองมีการปนเปื้อนจากปรสิตโปรโตซัวชนิดอื่นและเชื้อต่างๆจำนวนมากแม้ว่าจะผ่านการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์มาแล้วก็ตาม แต่เชื้อเริ่มต้นของ *S. singaporensis* ในระยะสปอร์โรซีสต์นั้นไม่ได้มาจากเชื้อเพียงหนึ่งซีสต์ (1 sarcocyst) ดังนั้นต้องเริ่มทำการศึกษาปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในระยะซาร์โคซีสต์ 1 ซีสต์ก่อน ซึ่งสามารถทำได้ง่าย

กว่า อย่างไรก็ดีหลังจากได้ทำการถอดรหัสพันธุกรรมของ *S. singaporensis* ในระยะซาร์โคซีสต์พบว่ามีเชื้อปรสิตโปรโตซัวในกลุ่มค็อคซิเดียโปรโตซัวชนิดอื่นปนอยู่ในกล้ามเนื้อลำตัวหนูประมาณ 2-3 ชนิด ดังนั้นจึงต้องทำการโคลนนิ่งเพื่อถอดรหัสพันธุกรรมเชื้อแต่ละชนิดที่ปนกันอยู่ให้สามารถแยกจากกันได้ก่อนแล้วจึงนำรหัสพันธุกรรมที่ได้นำมาใช้ออกแบบไพร์เมอร์ให้จำเพาะต่อ *S. singaporensis* เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมต่อไป ซึ่งผลจากการทดลองที่ได้ในขณะนี้สามารถทราบลำดับเบสของ *S. singaporensis* ระยะซาร์โคซีสต์ที่ได้จากการโคลนนิ่งแล้ว และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิดและหาลำดับเบสของ *S. singaporensis* ทั้งในระยะซาร์โคซีสต์จากกล้ามเนื้อลำตัวหนูและระยะสปอร์โรซีสต์ จากมูลงูเหลือม ได้โดยไม่ต้องโคลนนิ่งอีกต่อไป แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้ยังมีจำนวนตัวอย่างที่นำไปวิเคราะห์ลำดับเบสไม่มากพอ ดังนั้นจึงต้องทำการทดลองกับตัวอย่างเพิ่มเติม เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้องและมีความสมบูรณ์มากขึ้น

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

-

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ นางสาวยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ ที่ช่วยสอนเทคนิคและวิธีการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยาของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ทั้งในระยะสปอร์โรซีสต์และระยะซาร์โคซีสต์ ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นสพ.วรวิทย์ วัชชวัลคุ ที่สอนวิธีออกแบบไพรเมอร์สำหรับการจำแนกชนิดในงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณ คุณสมเกียรติ กล้าแข็งและเจ้าหน้าที่กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตรฯ ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ดักหนูติดเชื้อจากธรรมชาติมาใช้ในการทดลองนี้

เอกสารอ้างอิง

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด .2539. การศึกษาชนิดของโปรโตซัวที่เป็นปรสิต ในหนูพุกใหญ่และหนูพุกเล็ก. หน้า 25-40 ในรายงาน ผลการวิจัย ปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค T. Jaekel กรแก้ว เสือสะอาด, ปราสาททอง พรหมเกิด และ ชูวิทย์ สุขปราการ. 2542. การใช้โปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ชีวินทรีย์กำจัดหนู ชนิดใหม่ เพื่อควบคุมหนูในประเทศไทย. 43 หน้า.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล ,2545 . จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี, ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 115 หน้า

Beaver, P.C. and J.R. Maleckar. 1981. *Sarcocystis singaporensis* Zaman & Colley (1975) 1976. *Sarcocystis villivillosi* and *Sarcocystis zamani* : Development, morphology and persistence in the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. The International Journal for Parasitology. 67: 241-256.

Gardiner, C.H., R. Fayer and J.P. Dubey. 1985. An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues. Agriculture Handbook. 651.

Gjerde, B. and J. Schulze. 2013. Muscular sarcocystosis in two arctic foxes (*Vulpes lagopus*) due to *Sarcocystis arctica* n. sp.: sarcocyst morphology, molecular characteristics and phylogeny. Parasitology Research. 43: 579-591.

Hafner, U. and F.R. Matuschka. 1984. Life cycle studies on *Sarcocystis dirumpens* with to host specificity. Zeitschrift Parsitenkunde. 70: 715 – 720.

Jaekel, T., H. burgstaller and W. Frank. 1996. *Sarcocystis singaporensis*, studies on host specificity, pathologenicity and potential use as a biocontrol agent of rats. The Journal for Parasitology. 82: 280 – 287.

Kolarova, L. and P. Sulc. 1978. *Sarcocystis cernae* Levine, 1977 excystation, life cycle and comparison with other heteroxenous coccidians from rodents and birds. Folia Parasitology. 23: 201 – 207.

Lekakul, B. and J.A. Mcneely. 1977. Mammals of Thailand. Association for the conservation of wildlife, Bangkok.

Lindsay, D.S., B.L. Blagburn and K.G. Braund. 1995. *Sarcocystis* spp. and Sarcocystosis. Microbiological Methods & Bacteriological Analytical Manual 5: 249-254.

Moyer, C. L. 2001. Molecular phylogeny: applications and implications for marine microbiology. Methods Microbiology. 30: 375-394.

Mugridge, N.B., D.A Morrison, A.M. Johnson and J.P. Dubey. 1999. Phylogenetic relationships of the genus Frenkelia: a review of its history and new knowledge gained from camparison of large subunit. The International Journal for Parasitology. 29: 957-72.

Munday, B.L. and R.W. Mason. 1980. *Sarcocystis* and related organisms in Australian wildlife: III. *Sarcocystis murinotechis* life cycle in Rats (*Rattus, Pseudomys and Mastocomys*) and Tiger snake (*Notechis ater*). The Journal of Wildlife Disease. 16: 83 – 86.

Prakas, P. and D. Butkauskas. 2012. Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations in Lithuania. Ekologija. 58: 45-58.

Slapeta, J.R., D. Mordry, J. Votypka, M. Jirku, B. Koudela and J. Lukes. Multiple origin of the dihomoxenous life cycle in sarcosporidia. The International Parasitology. 31: 413-417.

Slapeta, J.R., I. Kyselova , A.O. Richardson , D. Modry and J. Lukes , 2002 . Phylogeny and sequence variability of the *Sarcocystis singaporensis* Zaman and Colly,(1975)1976 ssr DNA . The International Journal for Parasitology. 88: 810-815.

Tenter, A.M. and A.M. Johnson. 1997. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. Advances in Parasitology. 39: 69-139.

อนุกรมวิธานด้วงงวงสกุล *Rhynchophorus*

Taxonomy of Weevils in Genus *Rhynchophorus*

อิทธิพล บรรณาการ จารุวัตถ์ แต้กุล สุนัดดา เชาวลิต
ชมัยพร บัวมาศ เกศสุดา สนศิริ สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาอนุกรมวิธานด้วงงวงสกุล *Rhynchophorus* โดยการสำรวจและเก็บตัวอย่างด้วงงวงสกุล *Rhynchophorus* ระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึง เดือนกันยายน 2557 ในพื้นที่จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี ตรัง ระนอง สงขลา นครราชสีมา นครพนม อุดรธานี สกลนคร ขอนแก่น กาญจนบุรี นครปฐม ราชบุรี สุพรรณบุรี ควบคู่กับการติดตั้งกับดักแสงไฟ (light trap) นำตัวอย่างด้วงงวงที่รวบรวมได้มาศึกษาชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เตรียมตัวอย่างด้วงงวงที่รวบรวมได้ จัดรูปร่างจำแนกและวิเคราะห์ชนิดตัวอย่างด้วงงวง สามารถจำแนกชนิดด้วงงวงได้ 2 ชนิด 135 ตัวอย่าง อยู่ในอันดับ Coleoptera วงศ์ Curculionidae วงศ์ย่อย Rhynchophorinae คือ ด้วงงวงมะพร้าวชนิดเล็ก *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) 112 ตัวอย่าง และด้วงงวงมะพร้าวชนิดใหญ่ *Rhynchophorus vulneratus* (Panzer) 23 ตัวอย่าง การทดลองเรื่องนี้ยังไม่สิ้นสุดต้องดำเนินการต่อในปี 2558

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-36-57

คำนำ

ด้วงงวงสกุล *Rhynchophorus* จัดเป็นศัตรูสำคัญของพืชตระกูลปาล์ม เช่น มะพร้าว และปาล์มน้ำมันที่มีอายุน้อยกว่า 20 ปี ซึ่งเป็นพืชส่งออกและพืชพลังงานที่สำคัญของประเทศ ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของด้วงงวงสกุล *Rhynchophorus* จะสร้างความเสียหายกับพืชโดยการกัดกิน ตัวเต็มวัยเพศเมียจะวางไข่ที่โคนใบอ่อน เมื่อตัวอ่อนฟักออกจากไข่จะเจาะกัดกินเข้าไปภายในใจกลางต้นมะพร้าวหรือปาล์มทำให้ ยอดเหี่ยว ใบม้วนงอ ภายในลำต้นกลวง และยืนต้นตายในที่สุด และอาจเข้าทำลายต่อจากด้วงแรดมะพร้าว (*Oryctes rhinoceros* Linnaeus) ทำให้สูญเสียผลผลิตจำนวนมาก ทวีศักดิ์ (2544) ได้รายงานถึงกลุ่มแมลงศัตรูปาล์มน้ำมันในประเทศไทย ซึ่งมีทั้งประเภทปากกัดและปากดูด แต่ไม่มีรายงานการศึกษาอนุกรมวิธานของด้วงงวงสกุลนี้ Wattanapongsiri (1966) ได้ทบทวนชนิดด้วงงวงสกุล *Rhynchophorus* ทั่วโลกจำนวน 10 ชนิด แต่ไม่มีรายละเอียดของชนิดด้วงงวงสกุลนี้ในประเทศไทยมากนัก ดังนั้นการศึกษาอนุกรมวิธานด้วงงวงสกุล *Rhynchophorus* จะได้ข้อมูลทางอนุกรมวิธานที่เป็นปัจจุบัน และเป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการจัดการด้วงงวงสกุล *Rhynchophorus* เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการสืบค้นเพื่อการศึกษาและการป้องกันกำจัดที่ถูกต้องและเหมาะสม รวมทั้งใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชนำเข้า-ส่งออกสินค้าเกษตรในลำดับต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

ตัวอย่างตัวเต็มวัยด้วงงวง อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง ขวดฆ่าที่บรรจุสารเอทิลอะซีเตท ขวดดอง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง ถังรักษาความเย็น อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง ได้แก่ เข็มไร้สนิม เข็มหมุดหัวกลม ไม้จัดรูปร่างแมลง ปากคีบ โหลชื้น ตู้อบแมลง อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น alcohol 50-100%, sodium hydroxide 10%, clove oil และ canada balsam เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องสไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope กล้องถ่ายภาพ อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา rotring และกระดาษไขเขียนแบบ เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของด้วงงวง

วิธีการ

สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของด้วงงวงจากเอกสารวิชาการที่เกี่ยวข้อง ดำเนินการสำรวจและเก็บรวบรวมด้วงงวงในแหล่งปลูกพืชตระกูลปาล์ม เช่น มะพร้าว และปาล์มน้ำมัน ถ่ายภาพและเก็บตัวอย่าง โดยเก็บตัวอ่อนในหลอดบรรจุแอลกอฮอล์ 80 % และตัวเต็มวัยในขวดฆ่าที่บรรจุสารเอทิลอะซิเตท หลังจากด้วงตายให้เก็บตัวเต็มวัยในกระดาษรูปสามเหลี่ยมโดยห่อแบบท๊อฟฟี่ บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น รูปร่าง ลักษณะ ขนาด สี พืชอาศัย วันเดือนปี ชื่อผู้เก็บ สภาพแวดล้อม อุณหภูมิ และพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) เป็นต้น ในเวลากลางคืนจะเก็บตัวอย่างด้วงงวงจากกับดักแสงไฟ (light trap)

นำด้วงงวงที่รวบรวมได้มาจัดรูปร่างและอบให้แห้ง ศึกษาและวิเคราะห์ชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานโดยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิด White (1983) และ Charles and Norman (2005) รวมทั้งศึกษาเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของขวดดอง ตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุล และชนิดของด้วงงวงที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของพิพิธภัณฑ์ เพื่อใช้ในการตรวจสอบ สืบค้นและอ้างอิง

เวลาและสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2556 ถึง เดือนกันยายน 2557

สถานที่ 1. แปลงปลูกพืชในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สามารถจำแนกชนิดด้วงงวงได้ 2 ชนิด 135 ตัวอย่าง อยู่ในอันดับ Coleoptera วงศ์ Curculionidae คือ วงศ์ย่อย Rhynchophorinae ด้วงงวงมะพร้าวชนิดเล็ก *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) 112 ตัวอย่าง และด้วงงวงมะพร้าวชนิดใหญ่ *Rhynchophorus vulneratus* (Panzer) 23 ตัวอย่าง

รูปร่างลักษณะและชีวประวัติ

ลำตัว คล้ายทรงกระบอก แต่ส่วนปลายท้องจะคอดแหลม ลำตัวแข็งแน่น สีเข้ม มีขนาดต่างกันตั้งแต่ 10-50 มิลลิเมตร

ส่วนหัว ตารวมมีขนาดใหญ่ หัวและปากงุ้มลงด้านล่าง บริเวณโคนของปลายปากใหญ่กว่าส่วนปลาย ปากมีขนาดหนา ใหญ่ และค่อนข้างแข็ง หนวดมีลักษณะงอเป็นข้อศอก ส่วนของ pulp สั้น

ส่วนอก อกปล้องแรกมีขนาดใหญ่ มีร่องหลุมกระจายตัวละเอียดบนอกปล้องแรก บริเวณปีกคู่หน้ามีสันนูนที่บริเวณฐานปีก และมีสันนูนตามแนวยาวไปจนถึงปลายปีก ภายในช่องระหว่างสันนูนมีร่องหลุมเรียงติดต่อกันจำนวนมาก ส่วนปลายของปีกทั้งสองข้างเว้าแหลม ทำให้มองจากด้านบนจะเป็นว่าส่วนท้องของด้วงงวงในวงศ์ย่อยนี้มีลักษณะแหลมกว่าวงศ์ย่อยอื่นๆ

ด้วงงวงในวงศ์ย่อยนี้เป็นศัตรูสำคัญของพืชตระกูลปาล์ม และกล้วย ลักษณะการทำลายจะเริ่มจากตัวเต็มวัยวางไข่ที่บริเวณลำต้นของพืช และตัวอ่อนจะเจาะเข้าไปอาศัยและกัดกินภายในส่วนกลางของลำต้น ทำให้ต้นปาล์มยืนต้นตาย นับว่าด้วงงวงในวงศ์ย่อยนี้เป็นศัตรูสำคัญของพืชตระกูลปาล์ม

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาอนุกรมวิธานด้วงงวงสกุล *Rhynchophorus* โดยการสำรวจและเก็บตัวอย่างด้วงงวงสกุล *Rhynchophorus* ระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึง เดือนกันยายน 2557 ในพื้นที่จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี ตรัง ระนอง สงขลา นครราชสีมา นครพนม อุดรธานี สกลนคร ขอนแก่น กาญจนบุรี นครปฐม ราชบุรี สุพรรณบุรี ควบคู่กับการติดตั้งกับดักแสงไฟ (light trap) นำตัวอย่างด้วงงวงที่รวบรวมได้มาศึกษาชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เตรียมตัวอย่างด้วงงวงที่รวบรวมได้ จัดรูปร่างจำแนกและวิเคราะห์ชนิดตัวอย่างด้วงงวง สามารถจำแนกชนิดด้วงงวงได้ 2 ชนิด 135 ตัวอย่าง อยู่ในอันดับ Coleoptera วงศ์ Curculionidae วงศ์ย่อย Rhynchophorinae คือ ด้วงงวงมะพร้าวชนิดเล็ก *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) 112 ตัวอย่าง และด้วงงวงมะพร้าวชนิดใหญ่ *Rhynchophorus vulneratus* (Panzer) 23 ตัวอย่าง การทดลองเรื่องนี้ยังไม่สิ้นสุดต้องดำเนินการต่อในปี 2558

เอกสารอ้างอิง

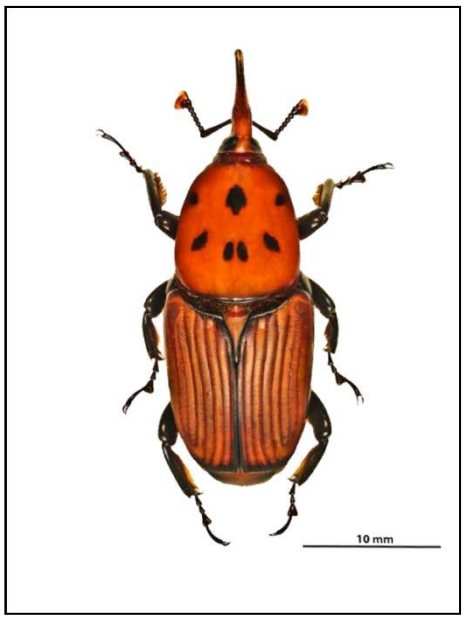
ศิริณี พูนไชยศรี และชลิดา อุณหวุฒิ. 2551. ด้วงงวงขั้วผลส้ม (Fuller Rose Weevil) *Pantomorus cervinus* (Boheman) ; Coleoptera : Curculionidae.

Charles, A. T. and N. F. Johnson. 2005. Borror and Delong's Introduction to the Study of Insects. 7th ed. Brooks/Coles. USA. 864 p.

White, R. E. 1983. Beetles. Peterson Field Guides. Houghton Mifflin Company. USA. 368 p.

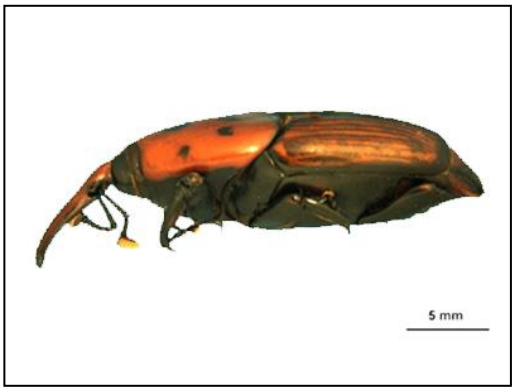
Wattanapongsiri, A. 1966. A Revision of the Genera *Rhynchophours* and *Dynamis* (Coleoptera: Curculionidae). Department of Agruculture Science Bulletin. 1(1). 328 p.

ภาคผนวก



Dorsal image of red palm weevil;
Rhynchophorus ferrugineus (Olivier)

Dorsal image of palm weevil;
Rhynchophorus vulneratus (Panzer)



Lateral image of red palm weevil;
Rhynchophorus ferrugineus (Olivier)

Lateral image of palm weevil;
Rhynchophorus vulneratus (Panzer)

สัณฐานวิทยาและลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* และ *Bathrips*

Morphology and DNA Sequence of Thrips in Genus *Thrips* and *Bathrips*

อิทธิพล บรรณาการ จารุวัตถ์ แต้กุล สุนัดดา เชาวลิต
ชมัยพร บัวมาศ เกศสุดา สนศิริ สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สำรวจ รวบรวมเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชพืชผักสวนครัว เช่น กะเพรา โหระพา มะเขือ พืชตระกูลแตง และไม้ดอก ไม้ประดับ ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนกันยายน 2557 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน เพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟได้ 145 ตัวอย่าง ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae ได้แก่ เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* (Karny) 90 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟโหระพา *Bathrips melanicornis* (Shumsher) 55 ตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงพืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย และได้ตัวอย่างเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* และ *Bathrips* ที่ถูกต้องสำหรับใช้ทำการทดลองหาลำดับพันธุกรรมต่อไป การทดลองเรื่องนี้ยังไม่สิ้นสุดต้องดำเนินการต่อในปี 2558

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-37-57

คำนำ

เพลี้ยไฟสกุล *Thrips* และ *Bathrips* อยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae วงศ์ย่อย Thripinae เป็นกลุ่มเพลี้ยไฟที่เป็นศัตรูที่สำคัญของพืชผักหลายชนิด รวมถึงพืชสวนครัวที่เป็นพืชส่งออก เช่น กะเพรา โหระพา หอม หอมแดงและหอมหัวใหญ่ ชนิดที่พบบ่อยคือ เพลี้ยไฟฝ้าย (*Thrips palmi*) เพลี้ยไฟหอม (*Thrips tabaci*) และเพลี้ยไฟสกุล *Bathrips* ซึ่งนับวันจะพบการระบาดในหลายพื้นที่มากขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะแหล่งปลูกพืชในภาคกลางและภาคตะวันตกของประเทศไทย อีกทั้งยังพบในพืชอื่นๆ เช่น กระเทียม แตงไทย มะเขือเทศ มันฝรั่ง เป็นต้น นอกจากจะสร้างความเสียหายโดยการเขี่ยเนื้อเยื่อพืชเพื่อดูดกินทำให้พืชแคระแกรน ใบเหลืองซีด ใบเหี่ยวแล้ว ยังเป็นพาหะนำโรคมาสู่พืชอีกด้วย (ศิริณี, 2544) ถือได้ว่าเป็นเพลี้ยไฟสกุลที่มีความสำคัญต่อการสูญเสียผลผลิตอย่างมาก รวมถึงทำให้เกิดปัญหาด้านการส่งออกในกรณีที่พบไข่หรือตัวอ่อนของเพลี้ยไฟติดไปกับสินค้า ซึ่งเป็นระยะที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ และปัจจุบันมีการส่งออกพืชผักสวนครัวหลายชนิดไปจำหน่ายในต่างประเทศ ซึ่งสำนักที่ปรึกษาการเกษตรต่างประเทศประจำสหภาพยุโรปเคยรายงายเกี่ยวกับปัญหาการนำเข้าสิ้นค้าประเภทเครื่องปรุงและพืชสมุนไพร จากประเทศไทยในช่วงเดือนสิงหาคม 2545 ถึง พฤษภาคม 2546 มีการถูกตรวจยึด ปฏิเสธการนำเข้า เพราะมีปัญหาเรื่องศัตรูพืชติดไปกับสินค้านั้นๆ จึงจำเป็นต้องดำเนินการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ควบคู่กับลำดับพันธุกรรม (DNA Sequence) ของเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* และ *Bathrips* เพื่อให้ความกระจ่างกับการตรวจจำแนกชนิดไข่หรือตัวอ่อนของเพลี้ยไฟที่พบว่าเป็นตัวอย่างเพลี้ยไฟฝ้ายซึ่งเป็นแมลงศัตรูกักกันของสหภาพยุโรปจริง หรือเป็นเพียงเพลี้ยไฟสกุล *Bathrips* เท่านั้น การศึกษานี้จะช่วยแก้ไขปัญหาการส่งคืนหรือระงับการนำเข้าสินค้า และจะได้ข้อมูลซึ่งไม่มีหน่วยงานอื่นในประเทศทำวิจัยเชิงลึกเช่นนี้ อีกทั้งยังเป็นการวิเคราะห์ชนิดศัตรูพืชโดยวิธีใหม่ที่ทันสมัย สามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษาให้กับเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงได้อย่างทันต่อเหตุการณ์ ช่วยลดระยะเวลาการกักเก็บสินค้าเพื่อตรวจสอบ สร้างความน่าเชื่อถือและไม่ส่งผลเสียในภาพรวม ทั้งนี้การลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* และ *Bathrips* ที่วิเคราะห์ได้นี้สามารถนำมาศึกษา phylogeny กับเพลี้ยไฟชนิดอื่นๆ ได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

ตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง ปากคีบ พู่กัน ขวดดอง กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ถังรักษาความเย็น ฯลฯ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ 50-100%, AGA, โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10%, โคลฟออย และ แคนาดาบัลซัม เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องสไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ PCR ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์ 99% กรดอะซิติก dNTP mixtures, 10X PCR buffer, Automatic pipette บีกเกอร์ หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ DNA Thermal

Cycle เครื่องElectrophoresis, Gel Documentary, Gene Amp PCR กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope ที่ติด camera lucida เป็นอุปกรณ์เสริมช่วยในการวาดภาพแมลงที่พบ กล้องถ่ายภาพ อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา rotring และกระดาษไขเขียนแบบ

วิธีการ

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชต่างๆ ทุกภูมิภาคของประเทศไทย เพื่อศึกษาความแปรปรวนของลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* และ *Bathrips* ในพื้นที่ภูมิภาคเดียวกันและระหว่างภูมิภาค โดยใช้วิธีการตีหรือเขย่าส่วนของพืชเช่น ใบ และดอก ให้เพลี้ยไฟตกลงบนกระดาษขาวที่รองรับ และใช้พู่กันเขี่ยเพลี้ยไฟแต่ละตัวลงในขวดที่บรรจุน้ำยา AGA สำหรับศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและ แอลกอฮอล์ 95% สำหรับศึกษาลำดับพันธุกรรม รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่มีชีวิตด้วย บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟที่เก็บได้ เช่น พืชที่เก็บ ส่วนของพืชที่เก็บ สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) และชื่อผู้เก็บ ลงในขวดดองเพลี้ยไฟ นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาพฤติกรรมและการเจริญเติบโต และนำตัวเต็มวัยไปทำสไลด์ถาวร

วิธีการทำสไลด์ถาวรของเพลี้ยไฟ มีขั้นตอนดังนี้

- ย้ายตัวอย่างเพลี้ยไฟจากขวดลงเก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 60 % แช่ทิ้งไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง
- ย้ายลงในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) 5% เพื่อทำให้สีของเพลี้ยไฟจางลง เวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างเพลี้ยไฟ เจาะส่วนท้องของเพลี้ยไฟบริเวณต้นขาของขาหลังด้วยเข็มแหลมขนาดเล็ก เพื่อให้ของเหลวภายในออกจากตัวเพลี้ยไฟ
- ย้ายเพลี้ยไฟที่เจาะแล้วลงในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 50 %ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที
- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 60 % ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 70 % ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 80 % ทิ้งไว้ 20 นาที
- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95 % ทิ้งไว้ 10 นาที
- ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 100 % ทิ้งไว้ 5 นาที ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง
- ย้ายลงในโคลฟออย (clove oil) เพื่อให้ตัวอย่างของเพลี้ยไฟใส แช่ทิ้งไว้ 20 – 30 นาที
- หยดแคนาดาบัลซัม (Canada balsam) ซึ่งเป็นน้ำยาเมาท์สไลด์ (Mounting media) เพียงเล็กน้อยลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ ป้ายเพลี้ยไฟลงในหยดแคนาดาบัลซัมลงบนกึ่งกลางของแผ่นสไลด์แก้ว ค่อยๆคว่ำแผ่นสไลด์ช้าๆ จนกระทั่งจรดแผ่นแก้วปิดสไลด์ รีบพลิกแผ่นสไลด์แก้วให้ด้านแผ่นแก้วปิดสไลด์กลับขึ้นด้านบน นำไปอบให้แห้ง

3. วาดภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของแมลงที่ได้ศึกษา

การศึกษาลำดับพันธุกรรม

1. นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่ได้จำแนกชนิดเบื้องต้นภายใต้ stereo microscope (ตัวอย่างกลุ่มเดียวกับตัวอย่างที่ใช้ทำสไลด์ถาวร)

2. ศึกษาลำดับพันธุกรรม

วิธีการหาลำดับพันธุกรรมปรับปรุงจากวิธีการศึกษายีน COI ของ Juthayothin (2004)

ขั้นตอนการสกัด ดีเอ็นเอ

- บดตัวอย่างเพลี้ยไฟ 1 ตัวอย่างใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ด้วย sterilized polypropylene pestle ในสารละลาย STE buffer [100 mM NaCl, 10 mM Tris- HCL (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)] 100 ไมโครลิตร
- นำสารละลายที่ได้ incubated ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นแรงเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 14,000 รอบ/นาที เวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- ดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ 2 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็น DNA Template ในขั้นตอน PCR (polymerase chain reaction)

การศึกษายีน COI โดยเทคนิค PCR

- ศึกษายีน COI (cytochrome oxidase subunit I) ซึ่งมีขนาด 642 bp และเป็น conserved region ของแมลงทุกชนิด (บาร์โค้ด) โดยใช้ primer UEA 7 และ UEA 10 ลำดับของ primer คือ

UEA 7	5’-TACAGTTGGAATAGACGTTGATAC-3’
UEA 10	5’-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3’

- นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 3 ทำปฏิกิริยากับ 20 µl reaction volumes [12.5 µl ddH_20, 2 µl 10X PCR buffer (Promega), 2 µl 25 mM $MgCl_2$, 0.5 µl dNTP (10 mM each), 0.5 µl 20 mM forward and reverse primers และ *Tag* DNA polymerase 1 unit (Promega)

ขั้นตอนและอุณหภูมิของขั้นตอนการทำ PCR คือ

Initial denaturation	ที่ 94 °C	3 นาที	
Denaturation	ที่ 94 °C	1 นาที	35 cycles
Annealing	ที่ 55 °C	1 นาที	
Extension	ที่ 72 °C	1 นาที	
Final extension	ที่ 72 °C	30 นาที	

- หลังจากขั้นตอน PCR นำสารที่ได้ 10 ไมโครลิตรทดสอบใน 1% w/v agarose gel เปรียบเทียบ กับ 100 bp DNA ladder เพื่อหาขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ว่ามี

ขนาดประมาณ 700 bp หรือไม่

<u>การหาและวิเคราห์ลำดับเบสของ ยีน COI</u>

- วิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบส นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ยีนของ NCBI

เวลาและสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2556 ถึง เดือนกันยายน 2557

สถานที่ 1. แปลงปลูกพืชในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟได้ 145 ตัวอย่าง ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae ได้แก่ เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* (Karny) 90 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟโหระพา *Bathrips melanicornis* (Shumsher) 55 ตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงพืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย และได้ตัวอย่างเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* และ *Bathrips* ที่ถูกต้องสำหรับใช้ทำการทดลองหาลำดับพันธุกรรมต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาสัณฐานวิทยาและลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* และ *Bathrips* โดยการสำรวจ รวบรวมเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชพืชผักสวนครัว เช่น กะเพรา โหระพา มะเขือ พืชตระกูลแตง และไม้ดอก ไม้ประดับ ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึง เดือนกันยายน 2557 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน เพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟได้ 145 ตัวอย่าง ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae ได้แก่ เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* (Karny) 90 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟโหระพา *Bathrips melanicornis* (Shumsher) 55 ตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงพืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย และได้ตัวอย่างเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* และ *Bathrips* ที่ถูกต้องสำหรับใช้ทำการทดลองหาลำดับพันธุกรรมต่อไป การทดลองเรื่องนี้ยังไม่สิ้นสุดต้องดำเนินการต่อในปี 2558

เอกสารอ้างอิง

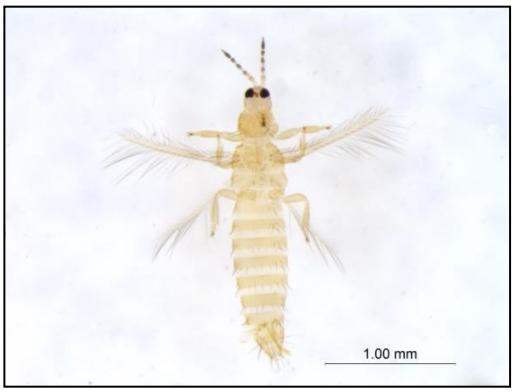
ศิริณี พูนไชยศรี. 2544. เพลี้ยไฟ *Terebrantia*. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. กรุงเทพฯ. 75 หน้า.

Juthayothin. T. 2004. Molecular phylogenetic study of Culicine mosquitoes using the mitochondrial cytochrome oxidase I gene and the relationships with mosquito-borne flaviviruses. Bangkok : Mahidol University,. 258 p.

ภาคผนวก

Adult cotton thrips;
Thrips palmi (Karny)

Adult sweet basil thrips;
Bathrips melanicornis (Shumsher)



Permanent slide image of
Thrips palmi (Karny)

Permanent slide image of
Bathrips melanicornis (Shumsher)

อนุกรมวิธานแมงมุมวงศ์ Clubionidae

Taxonomic study on Spider Fauna in Family Clubionidae

วิมลวรรณ โชติวงศ์ มานิตา คงชื่นสิน

พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์ พลอยชมพู กรวิภาสเรือง

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมในวงศ์ Clubionidae ของประเทศไทยบนพื้นที่ 13 จังหวัด เริ่มต้นเดือน ตุลาคม 2556 สิ้นสุด กันยายน 2558 จากนั้นนำตัวอย่างมาศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานและจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ โดยการใช้ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญในการจำแนกชนิด เช่น จำนวนฟัน ลักษณะของส่วนหัวและอก ลักษณะรูปร่าง และลวดลายบนส่วนหลัง ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ฯลฯ ผลจากการศึกษาพบแมงมุมในวงศ์ Clubionidae ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *Clubiona digitata* Dankittipakul, 2012, *Clubiona filicata* O. Pickard-Cambridge, 1874, *Clubiona japonicola* L. Koch, 1878 และ *Clubiona vigil* Karsch, 1879 และ *Clubiona* sp,

ABSTRACT

Survey of spider family Clubionidae was conducted in 13 provinces of Thailand from October, 2013 to September, 2015. The samples were collected and identified in Laboratory. The taxonomic character such as number of teeth, cephalothorax shape, body shape, pattern and marking on abdomen, the shape of palpus and epigyne are used for identification. The result revealed that there were 5 species of family Clubionidae including *Clubiona digitata* Dankittipakul, 2012, *C. filicata* O. Pickard-Cambridge, 1874, *Clubiona japonicola* L. Koch, 1878 และ *Clubiona vigil* Karsch, 1879 และ *Clubiona* sp,

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-38-57

คำนำ

ข้าวเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอันดับหนึ่งของประเทศ และมีความสำคัญต่อชีวิตคนไทยมากเพราะเป็นอาหารหลักและปลูกทั่วทุกภาค แมลงศัตรูข้าวเป็นอุปสรรคสำคัญอย่างหนึ่งในการปลูกข้าว พบว่ามีแมลงศัตรูหลายชนิดลงทำลายข้าว ตั้งแต่เริ่มงอกถึงระยะเก็บเกี่ยว ที่สำคัญมีดังนี้แมลงจำพวกกัดกินภายในลำต้น ได้แก่ หนอนกอต่างๆ คือ หนอนกอสีครีม, หนอนกอแถบลายสีม่วง, หนอนกอแถบลาย, หนอนกอสีชมพู, แมลงจำพวกปากดูดได้แก่ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล, เพลี้ยจักจั่นสีเขียว, และแมลงจำพวกปากกัดได้แก่ หนอนห่อใบข้าว และแมลงบั่ว ในการพ่นสารฆ่าแมลงถึงแม้จะช่วยลดการระบาดของแมลงศัตรูข้าวได้อย่างรวดเร็ว หากใช้ไม่ถูกวิธีก็มีผลเสียหายตามมาหลายอย่าง เช่น ศัตรูข้าวดื้อสารฆ่าแมลง เป็นอันตรายต่อผู้ใช้ ผู้บริโภค สิ่งมีชีวิตอื่นๆ และสภาพแวดล้อม นอกจากนี้สารฆ่าแมลงยังฆ่าตัวห้ำต่างๆ ที่ช่วยกินศัตรูข้าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งการพ่นสารฆ่าแมลงทำให้ แมงมุมตายด้วย ผลงานวิจัยของนักแมงมุมวิทยาหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น อินเดีย สาธารณรัฐประชาชนจีน ไต้หวัน เกาหลี ฟิลิปปินส์ และไทย สรุปได้ว่าการใช้สารฆ่าแมลงในนาข้าวจะพบเพลี้ยจักจั่นสีเขียวและเพลี้ยกระโดดระบาดมาก เนื่องจากสารฆ่าแมลงไปฆ่าประชากรแมงมุมในนาข้าว ทำให้อัตราการเพิ่มของแมลงศัตรูข้าวในแปลงใช้สารฆ่าแมลงมากกว่าแปลงที่ไม่ใช้สารฆ่าแมลง (Ito *et al.*, 1962; Stern *et al.*, 1959)

วิภาดา 2548 รายงานว่า แมงมุมวงศ์ Clubionidae สกุล *Clubiona* มักพบอาศัยหากินในพืชเศรษฐกิจ และมีบทบาทสำคัญในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในระบบนิเวศเกษตรกรรม นอกจากนี้ *Clubiona japonicola* ยังสามารถพบในนาทุกแห่งทั่วประเทศ และมีบทบาทสำคัญในการช่วยควบคุมประชากรแมลงศัตรูข้าว เช่น หนอนกอ หนอนห่อใบข้าว แมลงสิง เพลี้ยกระโดด และเพลี้ยจักจั่นต่าง

ปัจจุบันมีรายงานการพบแมงมุมวงศ์ Clubionidae ทั่วโลก 15 สกุล 582 ชนิด ซึ่งสกุล *Clubiona* เป็นสกุลที่พบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะบริเวณทรงพุ่มของป่าสมบูรณ์และป่าที่ถูกรบกวนรวมถึงในระบบนิเวศน์การเกษตรด้วยเช่นกัน Dankittipakul and Singtripop (2008a,b), Dankittipakul *et al.* (2012), Jäger and Dankittipakul (2010) ได้ศึกษาแมงมุมสกุล *Clubiona* ในประเทศไทย และค้นพบแมงมุมชนิดใหม่ทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ *Clubiona aberrans, C. abnormis, C. allotorta, C. alticola, C. campylacantha, C. digitata, C. filifera, C. maipai, C. octoginta C. rama* และ *C. suthepica* ในประเทศลาว Jager and Dankittipakul (2010) ได้ค้นพบแมงมุมวงศ์ Clubionidae ชนิดใหม่ 5 ชนิด ได้แก่ *Clubiona kai, C. lala, C. kuu, C. vukomi, Malamatidia zu และ M. christae*

สำหรับการศึกษาแมงมุมวงศ์นี้ในระบบนิเวศน์ทางการเกษตรวิภาดาและคณะ (2543, 2548, 2551) ได้ทำการศึกษาชนิดแมงมุมในสวนมะม่วงในเขตภาคกลางของประเทศ และพบแมงมุม วงศ์ Clubionidae 3ชนิด ได้แก่ *Chiracanthium longtailen*, *Chiracanthium* sp. , *Clubiona kurilensis*, สวนส้มโอในจังหวัดต่าง ๆ ของภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคใต้ของประเทศไทย พบ 2

สกุล 4 ชนิด ดังนี้ *Chiracanthium adjacensoides*, *Clubiona japonicola*, *C vigil* และ *Clubiona* sp. สวนฝรั่งของเกษตรกรต่าง ๆ ในเขตภาคกลางของประเทศ เช่น นครปฐม สมุทรสาคร ฉะเชิงเทรา ปทุมธานี นครนายกพบ 1 ชนิด คือ *Clubiona japonicola* นาข้าวอินทรีย์ของประเทศไทย พบ 1 ชนิด คือ *Clubiona japonicola*

ดังนั้นการศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมวงศ์ Clubionidae จึงนับว่ามีความสำคัญที่ควรจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงจำนวนชนิดที่พบในประเทศไทย ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นพื้นฐานของการบริหารศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีจุดมุ่งหมายในการลดใช้สารฆ่าแมลงเพื่อความปลอดภัย ประหยัดและไม่เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ประกอบกับปัจจุบันมีการศึกษาอนุกรมวิธานของแมงมุมในวงศ์ Clubionidae ยังทำน้อยมาก สมควรศึกษาอนุกรมวิธานของแมงมุมวงศ์นี้เพื่อทราบจำนวนชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ เขตการแพร่กระจาย พืชอาศัย เป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อเป็นแหล่งสืบค้นและเปรียบเทียบตัวอย่างต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1 อุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง หลอดแก้วทดลอง ขวดดองตัวอย่างแมงมุมขนาดต่างๆ กัน กล่องพลาสติกใสขนาดต่างๆ กัน กระดาษทิชชู่ ปากคีบ พู่กัน ถุงพลาสติกใสขนาดต่างๆ กัน สารเคมี ได้แก่ alcohol 95% ethyl acetate

2 อุปกรณ์ในการจำแนกชนิด ได้แก่ กรดแล็กติก จานแก้ว petridish ทรายละเอียด กล้องจุลทรรศน์ (stereomicroscope) tube ขนาดเล็ก ดินสอ ปากกา rotring เบอร์ 1, 2, 3 เอกสารด้านอนุกรมวิธานแมงมุมที่เกี่ยวข้อง

3 อุปกรณ์ในการเขียนผลงานวิจัยและเผยแพร่ ได้แก่ อุปกรณ์ในการถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์ ติดตั้งด้วยกล้องถ่ายภาพ อุปกรณ์คอมพิวเตอร์ วัสดุสำนักงาน

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างแมงมุม ในวงศ์ Clubionidae

การมองหาจับโดยตรงและการใช้สวิงโฉบ วิธีนี้เหมาะสำหรับจับแมงมุมทุกเวลาและสถานที่และทำให้ผู้จับสามารถทราบถึงพฤติกรรมต่าง ๆ ของแมงมุมแต่ละชนิด บันทึกพฤติกรรมต่างๆ ของแมงมุมแต่ละชนิดในสภาพธรรมชาติ เช่น วิธีจับเหยื่อ ชนิดของเหยื่อ เวลาที่ออกหากิน ลักษณะใยดักเหยื่อ เป็นต้น จับแมงมุมโดยใช้มือหรือหลอดทดลองช่วยในการจับ เก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมรักษาตัวอย่างแมงมุมในขวดที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75% บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับตัวอย่างแมงมุม เช่น ชื่อแมงมุม, วันที่จับ, สถานที่จับ, ชื่อผู้จำแนกชนิด ลงในป้ายกระดาษขาวแผ่นเล็ก ๆ แล้วใส่ลงในหลอดแก้วที่ดองแมงมุมไว้

2 การศึกษาอนุกรมวิธาน

แมงมุมที่เก็บรักษาไว้ นำมาจำแนกเป็นวงศ์ สกุล ชนิด การจำแนกศึกษาจากตำราต่างๆ จากเอกสารเกี่ยวกับการศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุม ถ่ายรูปและบรรยายลักษณะทางอนุกรมวิธาน ทำ key เพื่อใช้เป็นแนวทางในการจำแนก เก็บและรักษาตัวอย่างแมงมุมไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2556-กันยายน 2558

โดยการสำรวจและเก็บตัวอย่างบนพื้นที่ 13 จังหวัด ได้แก่ ปทุมธานี ราชบุรี เพชรบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ชัยนาท ตาก น่าน ฉะเชิงเทรา ระยอง เพชรบุรี นครราชสีมา เชียงใหม่

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลจากการสำรวจและจำแนกชนิดแมงมุมในวงศ์ Clubionidae ของประเทศไทยในพืชชนิดต่างๆ และสถานที่ต่างๆ ได้แก่ นาข้าว สวนชมพู่ สวนปาล์มน้ำมัน แปลงมันสำปะหลัง ป่าเต็งรังน้ำตก ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2556-กันยายน 2558 บนพื้นที่ 13 จังหวัด พบแมงมุมในวงศ์ Clubionidae ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *Clubiona digitata, C. filicata*, *C japonicola* และ *C. vigil* และ *Clubiona* sp, สำหรับแมงมุมสกุล *Chiracanthium* เดิมถูกย้ายไปอยู่ในวงศ์ Miturgidae แต่ปัจจุบันได้ถูกย้ายไปอยู่ในวงศ์ Eutichuridae

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

-

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุมที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

วิภาดา วังศิลาบัตร. 2543. การศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในสวนส้มโอ. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยประจำปี 2543. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 14 – 152.

วิภาดา วังศิลาบัตร มานิตา คงชื่นสิน เทวินทร์ กุลปิยวัฒน์ และพิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์. 2548. การศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในข้าวอินทรีย์. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม 2548 เล่มที่ 1. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 471- 513.

วิภาดา วังศิลาบัตร อัมพร วิโนทัย. 2548. การศึกษาชนิดและชีววิทยาของแมงมุมที่กินแมลงวันผลไม้ในสวนฝรั่ง. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม 2548 เล่มที่ 1. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 325- 344.

วิภาดา วังศิลาบัตร. 2551. การศึกษาชนิด ชีววิทยา และประสิทธิภาพการกินของแมงมุมตัวห้ำต่อแมลงวันผลไม้ในสวนมะม่วง. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 356 – 388.

Dankittipakul, P., M. Tavano, W. Chotwong, and T. Singtripop, 2012. New synonym and descriptions of two new species of the spider genus *Clubiona* Latreille, 1804 from Thailand (Araneae, Clubionidae). Zootaxa 3532: 51-63.

Dankittipakul, P. and T. Singtripop. 2008a. Five new species of the spider genus *Clubiona* Latreille (Araneae: Clubionidae) from Thailand. Zootaxa 1747: 34-60.

Dankittipakul, P. and T. Singtripop. 2008b. Spiders of the *Clubiona corticalis* Group from Thailand, with descriptions of three new species (Araneae: Clubionidae). Zoological studies 47(5): 644-656.

Ito, Y; K. Miyashita, and K. Sekiguchi. 1962. Studies on the predators of rice crop insect pests using the insecticides check method. Jap. J. Ecol. 12 : 1 – 11.

Jäger, P. and P. Dankittipakul. 2010. Clubionidae from Laos and Thailand (Arachnida: Araneae). Zootaxa 2730: 23-43.

Karsch, F. 1879. Baustoffe zu einer Spinnenfauna von Japan. *Verhandlungen des Naturhistorischen Vereins der Preussischen Rheinlande und Westfalens* 36: 57-105.

Koch, L. 1878. Japanesische Arachniden und Myriapoden. *Verhandlungen der Kaiserlich-Königlichen Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien* 27: 735-798.

Pickard-Cambridge, O. 1874a. On some new species of Drassides. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1874: 370-419.

Stern, V. M., R.F. Smith, R. van den Bosch and K.S. Hagen. 1959. The integrated control concept. Hilgardia 29 : 81 – 101.

ลักษณะทางอนุกรมวิธานและชีววิทยาของเพลี้ยแป้ง *Phenacoccus solenopsis* Tinsley

Taxonomy, Biology of Mealybug, *Phenacoccus solenopsis* Tinsley

ชมัยพร บัวมาศ จารุวัตถ์ แต้กุล สุนัดดา เชาวลิต
อิทธิพล บรรณาการ เกศสุดา สนศิริ สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานและชีววิทยาของเพลี้ยแป้ง *Phenacoccus solenopsis* Tinsley แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การศึกษาด้านอนุกรมวิธาน ซึ่งดำเนินการสำรวจและรวบรวมตัวอย่างจากพืชหลายชนิด ดาวเรือง ชบา กระเจี๊ยบเขียว วัชพืช ในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ นำตัวอย่างที่ได้มาทำสไลด์ถาวร และอีกส่วนหนึ่งนำมา ศึกษาด้านชีววิทยา โดยนำเลี้ยงบนผลฟักทอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช พบว่า เพลี้ยแป้ง *P. solenopsis* มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ตัวเต็มวัยเพศเมียไม่มีถุงไข่ (ovisac) ตัวอ่อนวัยที่ 1 (crawler) มีลักษณะลำตัวรูปไข่ ผนังลำตัวขาวใสหรือเหลือง ส่วนขาและหนวดมีการเจริญเติบโตดีเห็นได้ชัดเจน ขนาดค่อนข้างเล็กความยาว ประมาณ 0.7 - 1.7 มิลลิเมตร ตัวอ่อนเพศเมียจะมีการลอกคราบจำนวน 3 ครั้ง ตัวเต็มวัยเพศเมียจะมีผนังลำตัวสีน้ำตาล ขนาดตัวเต็มวัยด้านกว้างประมาณ 1.7 – 3.5 มิลลิเมตร ด้านยาว ประมาณ 3.0 – 4.1 มิลลิเมตร วงจรชีวิตจากตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัย 30-41 วัน ที่อุณหภูมิ 27-30 องศาเซลเซียส โดยระยะตัวอ่อน 19-24 วัน ตัวเต็มวัย 10-18 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมียจะสามารถให้กำเนิดตัวอ่อนได้ประมาณ 65 – 120 ตัว

คำสำคัญ : อนุกรมวิธาน ชีววิทยา เพลี้ยแป้ง *Phenacoccus solenopsis* Tinsley
Taxonomy, Biology, *Phenacoccus solenopsis* Tinsley

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-39-57

คำนำ

เพลี้ยแป้ง *Phenacoccus solenopsis* Tinsley เป็นแมลงที่พบเข้าทำลายพืชหลายชนิดทั้งในพืชไร่และพืชสวน ไม้ดอกและไม้ประดับ โดยพบเพลี้ยแป้งชนิดนี้เข้าทำลายพืชกลุ่มมะเขือเทศ ฝ้าย ในประเทศแถบร้อน (tropical) ที่มีอากาศร้อนและแห้งแล้ง มีการระบาดอย่างรุนแรงของเพลี้ยแป้ง *P. solenopsis* ในประเทศอินเดีย ปากีสถาน ซึ่งสร้างความเสียหายให้กับฝ้ายเป็นจำนวนมาก (Hanchinal, 2011) ในประเทศไทย ชลิดา และคณะ (2555) รายงานการสำรวจเพลี้ยแป้งในสกุล *Phenacoccus* พบ จำนวน 4 ชนิดได้แก่ เพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีเขียว, *Phenacoccus madeirensis* Green พบในมันสำปะหลัง เพลี้ยแป้ง *P. solani* Ferris พบในว่านสีทิศ เพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู, *P. manihoti* Matile-Ferrero พบในมันสำปะหลัง และ เพลี้ยแป้ง *P. solenopsis* Tinsley พบในกระเจี๊ยบเขียว ชบา วัชพืช

สำหรับเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูเป็นชนิดที่สร้างความเสียหายรุนแรงแก่เกษตรกรผู้ปลูกมันสำปะหลัง แต่ในปัจจุบัน กรมวิชาการเกษตรได้มีการนำเข้าแตนเบียนเพื่อมาควบคุมในประเทศไทยแล้ว แต่สำหรับเพลี้ยแป้ง *P. solenopsis* มีปริมาณการเข้าทำลายพืชอาศัย มากขึ้นเรื่อยๆ และมีแนวโน้มก่อปัญหาการระบาดที่รุนแรงส่งผลต่อพืชเศรษฐกิจต่างๆ รวมทั้งการส่งออก แต่ในประเทศไทยยังไม่มีข้อมูลด้านชีววิทยาและลักษณะทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งชนิดนี้ ดังนั้นการเตรียมข้อมูลด้านลักษณะทางอนุกรมวิธานและชีววิทยาของเพลี้ยแป้งชนิดนี้ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องดำเนินการศึกษาเพื่อรองรับปัญหาที่อาจจะเกิดขึ้นในอนาคตและสำหรับเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาแนวทางการป้องกันกำจัดเพลี้ยแป้งดังกล่าว และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเพลี้ยแป้ง *P. solenopsis*

2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างเพลี้ยแป้ง ได้แก่ แอลกอฮอล์ 70 – 80% หรือน้ำยา AGA ขวดดองตัวอย่างแมลง คัตเตอร์ กรรไกรตัดกิ่ง กล่องพลาสติก ถุงกระดาษและถุงพลาสติก

3. อุปกรณ์และพืชอาหารสำหรับเลี้ยงแมลง ได้แก่ กล่องพลาสติกกลม พู่กัน ผลฟักทอง

4. อุปกรณ์บันทึกข้อมูล ได้แก่ กระดาษ ดินสอ เวอร์เนียร์คาลิเปอร์ เป็นต้น

5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวรเพลี้ยแป้ง ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น alcohol 70 %, potassium hydroxide 10%, hydrochloric acid, glacial acetic acid, xylene, carbolic acid, acid fuchsin, N-butyl alcohol, clove oil และ Canada balsam เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องใส่สไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร

6. กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ,compound microscope กล้องถ่ายภาพ และเครื่องระบุพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS)

7. อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา rotting และกระดาษไขเขียนแบบ

8. เอกสารประกอบการจำแนกชนิดเพลี้ยแป้ง

วิธีการ

1.สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้ง *P. solenopsis* จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยแป้งอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วใส่ในถุงพลาสติก บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง ชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ

2. นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่รวบรวมได้จากการสำรวจ นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยใช้พู่กันเขี่ยตัวอ่อนตัวอ่อน ตัวเต็มวัย และถุงไข่ ลงบนผลฟักทองประมาณ 5-10 ตัว ต่อผล และต้นชบาประมาณ 5-10 ตัว ต่อต้น รอจนเพลี้ยแป้งวางไข่และมีตัวอ่อนวัยที่ 1 ที่เริ่มฟัก

3. หลังจากนั้นให้ ใช้พู่กันเขี่ยตัวอ่อนเพลี้ยแป้งวัยที่ 1 ลงในฟักทองซึ่งวางไว้ในกล่องพลาสติก จำนวน 1 ตัวต่อ 1 ผล เปลี่ยนพืชอาหารเมื่อจำเป็นบันทึกรูปร่างลักษณะ สี ขนาด ทุกระยะการเจริญเติบโตรวมทั้งพฤติกรรมต่างๆตลอดการทดลอง พร้อมกับถ่ายภาพประกอบ

4. ทำเหมือนขั้นตอนที่ 3 แต่เปลี่ยนพืชอาหารเป็นชบา

5. นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งบางส่วนจากที่เลี้ยงบนฟักทอง มาตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพ บันทึกรายละเอียด เช่น ขนาด รูปร่างลักษณะ สี และระยะการเจริญเติบโตของเพลี้ยแป้งก่อนดองในแอลกอฮอล์ 80%

6. นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากขวดดองตัวอย่างในข้อ 4 มาทำสไลด์ถาวร โดยดัดแปลงวิธีการของ Williams and Watson (1988) มีขั้นตอนดังนี้

6.1 ใช้เข็มเขี่ยเจาะบริเวณกลางส่วนอกด้านบนของตัวอย่างเพลี้ยแป้ง นำไปใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% จากนั้นนำหลอดทดลองไปต้มด้วยวิธีวอเตอร์บาท ใช้เวลาประมาณ 15 นาที (เริ่มนับตั้งแต่น้ำในบีคเกอร์เดือด) โดยระวังไม่ให้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่อยู่ในหลอดทดลองเดือด เพราะจะทำให้ตัวอย่างเกิดความเสียหายได้

6.2 นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่ต้มแล้วมาล้างในน้ำกลั่น กดเบา ๆ บนลำตัวด้วยเข็มดัดปลายโค้ง เพื่อทำให้ไข่ ตัวอ่อน และของเหลวที่อยู่ในลำตัวหลุดออกมาทางรอยที่เจาะไว้ ถ้ายังมีก้อนไขมันตกค้างอยู่ให้นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 2 – 3 นาที

6.3 ย้ายลงในคาร์บอลไซลีน (carbol xylene) แช่ทิ้งไว้ 10 นาทีจนกระทั่งตัวอย่างใส นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95%

6.4 ย้ายลงในกรดแอลกอฮอล์ (acid alcohol) ซึ่งเป็นสารละลายของกรดแกลเซียลอะซิติก 1 ส่วน และแอลกอฮอล์ 50% 4 ส่วน แช่ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที

6.5 ย้อมสีตัวอย่างโดยแช่ในน้ำยาย้อมสี ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิดฟุชซิน (acid fuchsin) กรดเกลือ (hydrochloric acid) และน้ำกลั่น แช่ทิ้งไว้นาน 30 - 60 นาที

6.6 ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95% แช่ทิ้งไว้ 2 – 3 นาที เพื่อกำจัดสีส่วนเกิน

6.7 ย้ายลงในสารละลายเอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alcohol) กับ แอลกอฮอล์ 95 % ในอัตราส่วน 1:1 แช่ทิ้งไว้ 10 นาที

6.8 ย้ายลงในเอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ แช่ทิ้งไว้ 10 นาที

6.9 ย้ายลงในโคล์ฟออย (clove oil) แช่ทิ้งไว้ 20 นาที

6.10 นำตัวอย่างเพลี้ยแป้งวางบนแผ่นสไลด์แก้ว ใช้กระดาษกรองซับโคล์ฟออยส่วนที่เกินออก หยดแคนาดาบัลซัม (canada balsam) 1 หยดบนตัวอย่างแมลงจัดรูปร่าง ให้สวยงามไม่บิดเบี้ยวหรือทับซ้อนกัน ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

6.11 นำไปอบให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 1-2 เดือน

7. ตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยแป้งบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง ตรวจดูลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก ได้แก่ หนวด (antennae) ขน (setae) รู (pores) ท่อ (tubular ducts) กลุ่มอวัยวะที่ผลิตเส้นแป้งด้านข้างลำตัว (cerarii) ช่องเปิดที่มีลักษณะคล้ายรอยแตกตามขวางของลำตัว (ostioles) และวงแหวนที่ล้อมรอบช่องเปิดของอวัยวะขับถ่าย (anal ring)

8. วาดรูปแสดงลักษณะทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งแต่ละชนิด โดยวาดลงบนกระดาษกราฟและลอกลงบนกระดาษไขเขียนแบบและจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพลี้ยแป้ง *P. solenopsis*

9. การบันทึกรายละเอียดบนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้วโดยวางแผ่นสไลด์หันด้านหัวของเพลี้ยแป้งเข้าหาตัว ด้านขวาเขียนรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ด้านซ้ายมือเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ เพศ วันเดือนปี ที่ทำสไลด์และชื่อผู้จำแนก ควรลงรายละเอียดดังกล่าวเป็นภาษาอังกฤษ

10. จัดเก็บตัวอย่างเพลี้ยแป้งในกล่องใส่สไลด์ถาวรและนำเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น เดือนตุลาคม 2556 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2557

สถานที่ : 1. แหล่งปลูกพืชต่างๆ ในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การศึกษาด้านอนุกรมวิธาน ซึ่งดำเนินการสำรวจและรวบรวมตัวอย่างจากพืชหลายชนิด เช่น ดาวเรือง ชบา กระเจี๊ยบเขียว วัชพืช ในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ นำตัวอย่างที่ได้มาทำสไลด์ถาวร และอีกส่วนหนึ่งนำมาศึกษาด้านชีววิทยา โดยเลี้ยงบนผลฟักทอง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช พบว่า เพลี้ยแป้ง *P. solenopsis* มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เพลี้ยแป้งชนิดนี้ไม่มีการสร้างถุงไข่ (ovisac) ตัวอ่อนวัยที่ 1 (crawler) มีลักษณะลำตัวรูปไข่ ผนังลำตัวขาวใสหรือเหลือง ส่วนขาและหนวดมีการเจริญเติบโตดี เห็นได้ชัดเจน ขนาดค่อนข้างเล็กความยาว ประมาณ 0.7 - 1.7 มิลลิเมตร เมื่ออายุมากขึ้นจะมีการสร้างแป้งที่มากขึ้นจนเห็นลำตัวเป็นสีขาวชัดเจน ตัวอ่อนเพศเมียจะมีการลอกคราบจำนวน 3 ครั้ง ก่อนจะเจริญเป็นตัวเต็มวัย ตัวเต็มวัยเพศเมียจะมีผนังลำตัวสีน้ำตาล ขนาดตัวเต็มวัยด้านกว้าง ประมาณ 1.7 – 3.5 มิลลิเมตร ด้านยาว ประมาณ 3.0 – 4.1 มิลลิเมตร วงจรชีวิตจากตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัย 30-41 วัน ที่อุณหภูมิ 27-30 องศาเซลเซียส โดยระยะตัวอ่อน 19-24 วัน ตัวเต็มวัย 10-18 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมียจะสามารถให้กำเนิดตัวอ่อนได้ประมาณ 65 – 120 ตัว สำหรับการเลี้ยงโดยใช้ฟักทอง การศึกษานี้จะต้องดำเนินต่อไปในปี 2558 โดยจะนำเพลี้ยแป้งมาเลี้ยงในชบา และจัดทำแนวทางวินิจฉัยเพลี้ยแป้ง *P. solenopsis* ซึ่งมีความแตกต่างตามระยะการเจริญเติบโต พร้อมบันทึกรายละเอียด และจัดเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การสำรวจและรวบรวมตัวอย่างจากพืชหลายชนิด เช่น ดาวเรือง ชบา กระเจี๊ยบเขียว วัชพืช ในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ เมื่อนำตัวอย่างไปศึกษาด้านชีววิทยา โดยนำเลี้ยงบนผลฟักทอง พบว่า เพลี้ยแป้ง *P. solenopsis* มีการสืบพันธ์แบบอาศัยเพศ ตัวเต็มวัยเพศเมียไม่มีถุงไข่ (ovisac) ตัวอ่อนวัยที่ 1 (crawler) มีลักษณะลำตัวรูปไข่ ผนังลำตัวขาวใสหรือเหลือง ส่วนขาและหนวดมีการเจริญเติบโตดี เห็นได้ชัดเจน ขนาดค่อนข้างเล็กความยาว ประมาณ 0.7 - 1.7 มิลลิเมตร ตัวอ่อนเพศเมียจะมีการลอกคราบจำนวน 3 ครั้ง ตัวเต็มวัยเพศเมียจะมีผนังลำตัวสีน้ำตาล ขนาดตัวเต็มวัยด้านกว้าง ประมาณ 1.7 – 3.5 มิลลิเมตร ด้านยาว ประมาณ 3.0 – 4.1 มิลลิเมตร วงจรชีวิตจากตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัย 30-41 วัน ที่อุณหภูมิ 27-30 องศาเซลเซียส โดยระยะตัวอ่อน 19-24 วัน ตัวเต็มวัย 10-18 วันตัวเต็มวัยเพศเมียจะสามารถให้กำเนิดตัวอ่อนได้ประมาณ 65 – 120 ตัว สำหรับการเลี้ยงโดยใช้ฟักทอง

เอกสารอ้างอิง

ชลิดา อุณหวุฒิ ชมัยพร บัวมาศ ลักขณา บำรุงศรี และ สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์. 2555. อนุกรมวิธานเพลี้ยแป้งสกุล *Phenacoccus,* หน้า 1712-1716. *ใน* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2554 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Hanchinal, S.O. Patil, B.V. Basavanagoud, K. A. Nagangoud, D.P. Biradar and B.S. Janagoudar. 2011. Incidence of invasive mealybug (Phenacoccus solenopsis Tinsley) on cotton. Karnataka J. Agric. Sci., 24(2) : 143-145.

ภาคผนวก

Table 1 Developmental time of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley on pumpkins. Each pumpkin was artificially infested by only one mealybug at laboratory. (Temperature at 28±3)

No.	Developmental time (days)						Number of immature all life cycle
	Crawler/ Immature stage 1	Immature stage 2	Immature stage 3	All immature stages	Adult	All life cycle	
1	4	7	12	23	18	31	120
2	4	8	9	21	12	33	80
3	6	9	7	22	12	34	85
4	4	8	8	20	14	34	103
5	5	9	10	24	16	40	110
6	4	9	7	20	13	33	92
7	5	8	6	19	12	31	83
8	5	8	6	19	15	34	115
9	6	7	8	21	15	36	112
10	6	9	8	23	15	38	87
11	4	8	9	21	12	33	95
12	4	7	9	20	10	30	65
13	5	7	8	20	12	32	80
14	5	8	12	25	16	41	110
15	6	8	7	21	10	31	75
16	4	9	7	20	12	32	85
17	5	8	9	22	12	33	84
18	5	9	7	21	14	35	98
19	5	8	10	23	17	40	105
20	6	9	9	24	12	36	87
Range	4-6	7-10	6-12	19-24	10-18	30-41	65-120
Mean	4.9	8.15	8.4	21.45	13.45	34.35	93.55
SD	0.75	0.73	1.56	1.84	2.09	3.39	14.34

ชนิดมดที่พบในแหล่งผลิตและโรงคัดบรรจุไม้ผลเพื่อการส่งออก

Ants Species Associate with Fruits Orchard and Packing House for Exporting

ชมัยพร บัวมาศ จารุวัตถ์ แต้กุล สุนัดดา เชาวลิต
อิทธิพล บรรณาการ เกศสุดา สนศิริ สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาชนิดมดที่พบในแหล่งผลิตและโรงคัดบรรจุไม้ผลเพื่อการส่งออกดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนกันยายน 2557 เพื่อทราบชนิดของมดในไม้ผลส่งออกแต่ละชนิด และเป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ความเสี่ยงในไม้ผลส่งออก-นำเข้า ซึ่งได้เก็บรวบรวมมดในแปลงปลูกเงาะ ทุเรียน ลองกอง มังคุด สับปะรด และ การสำรวจตัวอย่างบริเวณโรงคัดบรรจุ และโดยรอบพื้นที่ ในจังหวัดชลบุรี ระยองและจันทบุรี ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนกันยายน 2557 พบมดจำนวน 25 ชนิด 21 สกุล 6 วงศ์ย่อยจำนวน 100 ตัวอย่าง โดยพบมดบริเวณผลของเงาะ ทะเรียน ลองกอง มังคุดและสับปะรด จำนวน 8 ชนิด ซึ่งมดก้นห้อย, *Dolichoderus thoracicus* Fr.Smith เป็นมดที่พบบ่อยมากที่สุดในการสำรวจและพบในผลไม้เกือบทุกชนิดยกเว้นในสับปะรด ซึ่งมดที่พบทั้ง 8 ชนิดมักพบอาศัยอยู่ร่วมกับเพลี้ยแป้ง หรือเพลี้ยหอยที่พบอยู่บนผลไม้ สำหรับมดจำนวน 17 ชนิด พบอาศัยอยู่โดยรอบแปลง บนต้นไม้ โดยรอบอาคารโรงคัดบรรจุ การศึกษานี้ยังไม่สิ้นสุดจะต้องดำเนินการต่อไปในปี 2558 โดยสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างมด และจัดเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง

คำสำคัญ : มด โรงคัดบรรจุ ไม้ผลส่งออก

Ants, packing house, exported fruits

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-40-57

คำนำ

มด เป็นแมลงสังคม ที่จัดอยู่ในอันดับ (Oder) Hymenoptera วงศ์ (Family) Formicidae สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในพื้นที่ธรรมชาติและพื้นที่เกษตร พบทั้งในดิน ตามซากพืช ใต้ก้อนหิน ตามต้นไม้หรือไม้พื้นล่าง เป็นต้น จึงทำให้มดมีความหลากหลายทั้งด้านชนิดและแหล่งที่อยู่อาศัยมดมีความสำคัญในการดำรงไว้ซึ่งความสมดุลตามธรรมชาติในระบบนิเวศ เนื่องจากมดสามารถทำหน้าที่ได้หลายบทบาท โดยมดส่วนใหญ่เป็นตัวห้ำ (predators) หรือกินซาก (scavangers) แต่บางชนิดกินทั้งพืชและสัตว์ (omnivores) บางชนิดมีการพึ่งพาอาศัยอยู่ร่วมกับสัตว์อื่น และพืชอีกหลายชนิด (Alonso *et al*., 2000)

ในภาคการเกษตรมีมดบางชนิดที่เป็นศัตรูพืช กัดกินผลผลิตจนเสียหาย เช่น เสี้ยนดิน (*Dorylus orientalis* Westwood) ที่พบในถั่วลิสง (เตือนจิตต์ และคณะ, 2539) เป็นต้น นอกจากเป็นศัตรูพืชโดยตรงแล้วมดยังเป็นพาหนะในการเคลื่อนย้ายแมลงศัตรูในกลุ่มเพลี้ยแป้ง เพลี้ยหอย เพลี้ยอ่อน ไปยังพืชชนิดอื่นๆ สร้างความเสียหายแก่พืชหลายชนิด ปัจจุบันมีหลายหน่วยงานได้ริเริ่มศึกษาความหลากชนิดของมด แต่ยังไม่มีข้อมูลที่ครอบคลุมในภาคเกษตรต่าง โดยเฉพาะพืชในกลุ่มพืชส่งออก ยังขาดข้อมูลอย่างมากในพืชบางชนิดรายงานไว้ในระดับสกุล (genus) ยังไม่ได้จำแนกลงในระดับชนิดทำให้ได้ข้อมูลที่ไม่สมบรูณ์และเป็นปัญหาเกี่ยวกับการส่งออกผลผลิตเหล่านี้ไปยังประเทศต่างๆ ทำให้เกิดปัญหาสุขอนามัยพืช และการกีดกันทางการค้าได้ ซึ่งในพืชส่งออกยังขาดข้อมูลชนิดมดอีกเป็นจำนวนมาก การศึกษาชนิดมดในพืชส่งออกเพื่อให้ทราบชนิดและลักษณะที่สำคัญ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำไปใช้เป็นข้อมูลในการหาวิธีการป้องกันกำจัดที่ถูกต้องและเหมาะสมต่อไป รวมทั้งเป็นข้อมูลสนับสนุนการนำเข้า-ส่งออกไม้ผลของประเทศไทยในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างมด

2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างมด ได้แก่ แอลกอฮอล์ 70 – 80% ปากคีบ ขวดดองตัวอย่างแมลง คัตเตอร์ กรรไกรตัดกิ่ง กล่องพลาสติก และถุงพลาสติก

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการจัดรูปร่างมด ได้แก่ เข็มไร้สนิมแมลง กระดาษสามเหลี่ยม กาวลาเท็กซ์ ไม้จัดรูปร่างแมลง ตู้อบ

5. กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ กล้องถ่ายภาพ

7. เอกสารประกอบการจำแนกชนิดมด

วิธีการ

1. สำรวจความหลากชนิดของมดจากแปลงปลูกสับปะรด เงาะ ทุเรียน มังคุด ลองกอง ให้ครอบคลุมแหล่งที่อยู่อาศัยของมด โดยจะดำเนินการเก็บตัวอย่างมดตามวิธีที่ปรับปรุงจาก Agosti *et al.*, (2000) ดังนี้

- การเก็บโดยใช้มือ เก็บมดที่อาศัยอยู่ตามต้นไม้ กิ่ง ดอก และผล ไม้พื้นล่าง ไม้พุ่ม หรือวัชพืช โดยใช้ปากคีบและใช้สวิงโฉบโดยจับมดใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง วิธีการนี้จะได้ตัวอย่างมดที่อาศัยตามต้นไม้หรือกลุ่มมดที่กินน้ำหวานจากแมลงที่อาศัยอยู่ตามต้นไม้ ไม้พุ่ม หรือวัชพืช

- การร่อนดิน โดยใช้พลั่วหรือเสียมขุดดินในแปลงนำมาร่อนในตะแกรงที่มีถาดรองรับด้านล่าง ใช้ปากคีบจับมดใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง ซึ่งการเก็บมดในวิธีนี้จะทำการเก็บหลังจากเก็บมดโดยใช้กับดักน้ำหวานแล้ว วิธีนี้เป็นการเก็บมดที่อาศัยอยู่ในดิน

- การใช้เหยื่อล่อ เช่นการใช้น้ำหวาน หรือใช้เนยแข็ง วางเป็นจุดๆ เพื่อล่อมดให้ออกมากินเหยื่อที่วางไว้ หลังจากนั้นใช้ปากคีบจับมดใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง

- การใช้กับดัก Winkler extractor โดยเก็บซากพืชที่อยู่ในพื้นที่ใส่ไว้ใน Winkler extractor และแขวนไว้ มดที่อยู่ในซากใบไม้จะหล่นลงมาในขวดตัวอย่างที่อยู่ด้านล่าง

- การใช้กับดักหลุม (pit fall trap) โดยขุดหลุม เพื่อดักมดที่เดินผ่านไปมาตกลงไป โดยทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้มดทั้งที่หากินกลางวันและกลางคืน

2. สำรวจชนิดของมดจากโรงคัดบรรจุสับปะรด เงาะ ทุเรียน มังคุด ลองกอง ให้ครอบคลุมแหล่งที่อยู่อาศัยของมด โดยจะดำเนินการเก็บตัวอย่างมดตามวิธีดังนี้

- การเก็บโดยใช้มือเก็บมดที่อาศัยตามผลไม้ที่อยู่ภายในโรงคัดบรรจุ โดยใช้ปากคีบจับมดใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างที่อยู่ภายในโรงคัดบรรจุ

-การใช้เหยื่อล่อ เช่นการใช้น้ำหวาน หรือใช้เนยแข็ง วางเป็นจุดๆ โดยรอบโรงคัดบรรจุเพื่อล่อมดให้ออกมากินเหยื่อที่วางไว้ หลังจากนั้นใช้ปากคีบจับมดใส่ในขวดเก็บตัวอย่างเพื่อเป็นข้อมูลของชนิดมดที่พบว่าเป็นมดที่อยู่กับผลไม้หรือเป็นมดที่อาศัยอยู่ในโรงคัดบรรจุอยู่แล้ว

- การใช้กับดัก Winkler extractor โดยสุ่มเก็บผลผลิตที่อยู่ในโรงคัดบรรจุใส่ไว้ใน Winkler extractor และแขวนไว้ มดที่อยู่ในผลผลิตจะหล่นลงมาในขวดตัวอย่างที่อยู่ด้านล่าง

3. การบันทึกรายละเอียดของข้อมูลมด พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วัน เดือน ปี สถานที่ที่เก็บและชื่อผู้เก็บ

4. การเตรียมตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างที่รวบรวมได้นำไปจัดรูปร่าง ใช้เข็มไร้สนิมปักที่กึ่งกลางบริเวณอกถ้าเป็นตัวขนาดใหญ่ แต่ถ้าขนาดเล็กนำติดกระดาษสามเหลี่ยมขนาดเล็ก (card point) และนำไปอบให้แห้ง

5. จำแนกชนิดมดและจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์ นำตัวอย่างมดที่จำแนกชนิดแล้วให้จัดเก็บลงในกล่องกระดาษสี่เหลี่ยมสีขาว จัดเรียงตามอักษรของลำดับ ชนิด นำจัดเข้าลิ้นชักในตู้เก็บแมลง บันทึกข้อมูลแต่ละตัวอย่างบนแผ่นป้ายบันทึกกำกับตัวอย่าแมลง (labeling specimen)

6. นำข้อมูลชนิดมดที่ได้มาหาความสัมพันธ์ระหว่างมดที่พบในแหล่งปลูกและมดที่พบในโรงคัดบรรจุเพื่อพิจารณาความแตกต่างต่อไป

7. จัดเก็บตัวอย่างมดที่จัดรูปร่างและอบแห้ง รวมทั้งเพลี้ยแป้งในกล่องใส่สไลด์ถาวร ไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลงโดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล

เวลาและสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2556 **ถึง** เดือนกันยายน 2557

สถานที่ 1. แปลงปลูกเงาะ ทุเรียน ลองกอง มังคุด สับปะรด ในจังหวัดชลบุรี ระยอง และจันทบุรี

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตวิวทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเก็บรวบรวมมดในแปลงปลูกเงาะ ทุเรียน ลองกอง มังคุด สับปะรด และ การสำรวจตัวอย่างบริเวณโรงคัดบรรจุ และโดยรอบพื้นที่ ในจังหวัด ชลบุรี ระยองและจันทบุรี ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนกันยายน 2557 พบมด จำนวน 25 ชนิด 21 สกุล 6 วงศ์ย่อย จำนวน 100 ตัวอย่าง โดยพบมด จำนวน 8 ชนิดบริเวณผลของเงาะ ทะเรียน ลองกอง มังคุดและสับปะรด ได้แก่ มดคันไฟ, *Solenopsis geminata* Fabricius มดน้ำผึ้ง, *Anoplolepis gracilipes* Fr.Smith, มดเหม็น, *Tapinoma melanocephalum* Fabricius มดแดง, *Oecophylla smaragdina* Fabricius มดก้นรูปหัวใจ, *Crematogaster* sp1. *Crematogaster* sp2. *Nylanderia* sp.1 มดดำทุ่ง, *Iridomyrmex anceps* (Roger) มดก้นห้อย, *Dolichoderus thoracicus* Fr.Smith ซึ่งมดก้นห้อยเป็นมดที่พบมากที่สุดในการสำรวจและพบในผลไม้เกือบทุกชนิดยกเว้นในสับปะรด ซึ่งมดที่พบทั้ง 8 ชนิดมักพบอาศัยอยู่ร่วมกับเพลี้ยแป้ง หรือเพลี้ยหอยที่พบอยู่บนผลไม้ มด จำนวน 17 ชนิด พบอาศัยอยู่โดยรอบแปลง บนต้นไม้ โดยรอบอาคารโรงคัดบรรจุ การศึกษานี้ยังไม่สิ้นสุดจะต้องดำเนินการต่อไปในปี 2558 โดยสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างมด และจัดเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการเก็บรวบรวมมดในแปลงปลูกเงาะ ทุเรียน ลองกอง มังคุด สับปะรด และ การสำรวจตัวอย่างบริเวณโรงคัดบรรจุ และโดยรอบพื้นที่ ในจังหวัด ชลบุรี ระยองและจันทบุรี ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนกันยายน 2557 พบมด จำนวน 25 ชนิด 21 สกุล 6 วงศ์ย่อย จำนวน 100 ตัวอย่าง โดยพบมดบริเวณผลของเงาะ ทะเรียน ลองกอง มังคุดและสับปะรด จำนวน 8 ชนิด ซึ่งมดก้นห้อย, *Dolichoderus thoracicus* Fr.Smith เป็นมดที่พบบ่อยมากที่สุดในการสำรวจ

และพบในผลไม้เกือบทุกชนิดยกเว้นในสับปะรด ซึ่งมดที่พบทั้ง 8 ชนิดมักพบอาศัยอยู่ร่วมกับเพลี้ยแป้งหรือเพลี้ยหอยที่พบอยู่บนผลไม้ สำหรับมดจำนวน 17 ชนิด พบอาศัยอยู่โดยรอบแปลง บนต้นไม้โดยรอบอาคารโรงคัดบรรจุ การศึกษานี้ยังไม่สิ้นสุดจะต้องดำเนินการต่อไปในปี 2558

เอกสารอ้างอิง

เตือนจิตต์ สัตยาวิรุทธิ์ มโนชัย กีรติกสิกร และสาทร สิริสิงห์. 2539. แมลงศัตรูถั่วลิสง. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ. 78 หน้า

Alonso, L. E. and D. Agosti. 2000. Biodiversity studies, monitoring, and ants: An overview, pp. 1-8. *In* D. Agosti, L.E. Alonso, J. D. Majer, and T. R. Schultz, eds. Ants: Standard Methods for Measuring and Monitoring Biodiversity. Smithsonian Institution Press, United Satate of America. 280 pp.

D. Agosti, L.E. Alonso, J. D. Majer, and T. R. Schultz, eds. 2000. Ants: Standard Methods for Measuring and Monitoring Biodiversity. Smithsonian Institution Press, United Satate of America. 280 pp.

Pitaksa,C., A. Chantarasuwan and A. Kongkanjana. 1998. Ant Control in Pineapple Field. The Third International Pineapple Symposium, November 17-20, Pattaya, Thailand.

ภาคผนวก

Table 1 Species list of ants association with fruits orchard and packing house for exporting

Family	Subfamily	Genus	species
Formicidae	Dolichoderinae	*Dolichoderus*	*thoracicus*
Formicidae	Dolichoderinae	*Iridomyrmex*	*anceps*
Formicidae	Dolichoderinae	*Philidris*	sp.1
Formicidae	Dolichoderinae	*Technomyrmex*	sp.1
Formicidae	Dolichoderinae	*Tapinoma*	*melanocephalum*
Formicidae	Ectatomminae	*Gnamptogenys*	*bicolor*
Formicidae	Formicinae	*Anoplolepis*	*gracilipes*
Formicidae	Formicinae	*Camponotus*	*tanae*
Formicidae	Formicinae	*Nylanderia*	sp.1
Formicidae	Formicinae	*Oecophylla*	*smaragdina*
Formicidae	Myrmicinae	*Crematogaster*	sp.1
Formicidae	Myrmicinae	*Crematogaster*	sp.2
Formicidae	Myrmicinae	*Momomorium*	*pharaonis*
Formicidae	Myrmicinae	*Pheidole*	sp.1
Formicidae	Myrmicinae	*Pheidole*	sp.2
Formicidae	Myrmicinae	*Pheidologeton*	*affinis*
Formicidae	Myrmicinae	*Tetramorium*	*ciliatum*
Formicidae	Myrmicinae	*Solenopsis*	*geminata*
Formicidae	Myrmicinae	*Tetramorium*	sp.1
Formicidae	Ponerinae	*Diacamma*	*rugosum*
Formicidae	Ponerinae	*Hypoponera*	sp.1
Formicidae	Ponerinae	*Odontoponera*	*denticulata*
Formicidae	Ponerinae	*Pachycondyla*	*astuta*
Formicidae	Ponerinae	*Pachycondyla*	sp.1
Formicidae	Pseudomyrmecinae	*Tetraponera*	sp.1

ชีววิทยา นิเวศวิทยาของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม, *Diaphorina citri* Kuwayama ในพืชตระกูลส้ม

Biology and Ecology of Psyllids, *Diaphorina citri* Kuwayama in Citrus

ธีราทัย บุญญะประภา[1/] ศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา[1/] บุษบง มนัสมั่นคง[1/]

ชมัยพร บัวมาศ[2/] สุทธามาศ ณ น่าน[3/]

[1/]กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช [3/]ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม *Diaphorina citri* Kuwayama ในพืชตระกูลส้ม ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มบริหารศัตรูพืช และในแปลงเกษตรกรพื้นที่ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ และกำแพงเพชร โดยทำการสำรวจในช่วงฤดูฝน เดือนกรกฎาคม – สิงหาคม 2557 ซึ่งเป็นฤดูกาลระบาดของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ในการศึกษานิเวศวิทยา พบว่าในแปลงปลูกพืชตระกูลส้มที่พบเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ในปริมาณมาก ได้แก่ มะนาว และส้มเขียวหวาน ต้นที่ถูกทำลายก่อนมักอยู่บริเวณขอบด้านนอกของแปลง เนื่องจากปริมาณของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ต้นที่อยู่ขอบด้านนอกจะมีปริมาณมากกว่า มีการกระจายตัวทั่วทั้งต้น โดยลักษณะการเข้าทำลายจะพบมีการวางไข่บริเวณตายอด ใบอ่อนที่แตกใหม่ๆ บริเวณซอกระหว่างเส้นใบ และกิ่งอ่อน พบตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเกาะดูดกินต้นพืช ขณะเดียวกันมีการขับไขสีขาวเป็นเส้นยาวออกมา พืชที่ถูกทำลายมากๆ จะเริ่มมีอาการใบเหลือง หลุดร่วง และยังพบมีราดำเกาะอยู่บริเวณใบและกิ่ง เนื่องจากของเหลวที่ถูกขับออกมาขณะกินอาหาร สภาพแปลงที่พบการระบาดมาก คือแปลงที่มีการจัดการวัชพืชในแปลงน้อย หรือไม่มีการจัดการเลย การเพาะเลี้ยงขยายตัวอย่างแมลง เพื่อเก็บข้อมูลทางชีววิทยาพบว่าตัวเต็มวัยความยาวตั้งแต่ส่วนหัวถึงปลายปีก ขนาด 3-4 มิลลิเมตร ส่วนของปีกมีสีน้ำตาลเข้มบริเวณขอบปีก เนื้อปีกส่วนอื่น ส่วนอก และหัว มีสีน้ำตาลอ่อนและขาว เกาะโดยทำมุม 45 องศา กับพื้นผิวที่เกาะ ตัวเต็มวัยสามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้หลายร้อยฟอง ตลอดช่วงชีวิตประมาณ 3-4 เดือน โดยตัวเต็มวัยจะวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ แต่อาจจะอยู่ใกล้ๆ กันโดยวางเป็นกลุ่มหรือเรียงกันเป็นแถว อยู่บนตายอด ส่วนที่แตกยอดแต่ใบยังไม่คลี่ ใบอ่อน หรือดอกอ่อน ไข่มีขนาดความยาว 0.2-0.3 มิลลิเมตร มีรูปทรงคล้ายหยดน้ำ หรือทองหยอด มีสีเหลืองสด ระยะไข่ 3-5 วัน จะฟักเป็นตัวอ่อนวัยที่ 1 ในวัยที่ 1 -5 มีความยาว 0.3 - 1.5 มิลลิเมตร โดยมีลักษณะลำตัวแบนสีเหลือง ในวัยที่ 1 พบการเคลื่อนที่ แต่ในวัย 2-5 พบว่ามักเกาะอยู่นิ่งๆ สามารถมองเห็นจุดสีแดงสองจุดบริเวณส่วนหัว ด้านข้างลำตัวมีแผ่นปีกปรากฏอยู่ทั้งสองข้างซ้ายและขวา ส่วนปลายท้องจะมีเส้นขนเรียงกันอยู่ ส่วนต่างๆ เห็นได้ชัดเจนขึ้นเมื่ออยู่ในวัย 4-5 ระยะเวลาเป็นตัวอ่อน 10-30 วัน จากนั้นจึงเจาะบริเวณด้านบนส่วนท้องออกมาเป็นตัวเต็มวัย

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-41-57

ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย จะขับไขสีขาวออกมาปกคลุมบริเวณที่เกาะ ตลอดเวลาที่กินพืชอาหาร ตลอดช่วงชีวิต ตั้งแต่ไข่ ถึงฟักออกเป็นตัวเต็มวัย ใช้ระยะเวลา 13-35 วัน และตัวเต็มวัยสามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน 3-4 เดือน

คำหลัก : เพลี้ยไก่แจ้ส้ม, พืชตระกูลส้ม, ชีววิทยา, นิเวศวิทยา
Keywords : asian citrus psyllids, citrus, biology, ecology

คำนำ

เพลี้ยไก่แจ้ส้มเป็นศัตรูที่สำคัญในพืชตระกูลส้มที่มักพบในประเทศไทย คือ วงศ์ Psyllidae ชนิดที่พบระบาดมาก คือ Asian citrus psyllids, *Diaphorina citri* Kuwayama ซึ่งมีการแพร่ระบาดในเขตร้อน และ พื้นที่ใกล้เคียงของทวีปเอเชีย เช่น จีน อินเดีย พม่า ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย อินโดนีเซีย ศรีลังกา ปากีสถาน ไทย เป็นต้น โดยตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจะดูดกินน้ำเลี้ยงจากตา และยอดอ่อนของส้มโอ ยอดอ่อนที่ถูกทำลายจะหงิกงอและเหี่ยวแห้งได้ถ้าเป็นรุนแรงจะทำให้ใบร่วงและติดผลน้อยนอกจากทำลายส้มโอโดยตรงแล้วยังเป็นพาหะนำโรคกรีนนิ่งหรือโรคใบเหลืองต้นโทรมซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ต้นส้มโอทรุดโทรมและตายในที่สุด ส่วนเพลี้ยไก่แจ้ส้มแอฟริกัน [African citrus psyllid, *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Hemiptera : Psyllidae)] มีแหล่งแพร่กระจายในทวีปแอฟริกาได้มีการแพร่กระจายสู่ประเทศจีนและมีโอกาสเคลื่อนย้ายเข้าสู่ประเทศไทย โดยเฉพาะในแหล่งปลูกส้มทางภาคเหนือ เพลี้ยไก่แจ้ชนิดนี้ยังเป็นพาหะในการนำโรคกรีนนิ่ง หรือโรคใบเหลืองต้นโทรมได้เช่นเดียวกับชนิดเพลี้ยไก่แจ้ส้ม, *D.citri* ที่ทำความเสียหายอย่างมากแก่เกษตรกรผู้ปลูกส้มโดยเฉพาะแหล่งปลูกส้มทางภาคเหนือซึ่งเป็นแหล่งปลูกใหญ่ของประเทศ

เนื่องจากเพลี้ยไก่แจ้ส้มใน วงศ์ Psyllidae พบลงทำลายส้มโอทางภาคเหนือประกอบกับเป็นพาหะนำโรคกรีนนิ่ง ซึ่งเป็นโรคที่ทำความเสียหายอย่างมากให้กับส้มโอ แม้ชนิดเพลี้ยไก่แจ้ส้มแอฟริกัน ,*T. erytreae* ยังไม่พบการแพร่ระบาดมากนัก แต่เป็นแมลงที่ต้องทำการเฝ้าระวัง ประกอบกับแม้จะมีการศึกษาข้อมูลทางด้านชีววิทยาและนิเวศวิทยาของเพลี้ยไก่แจ้ส้มใน วงศ์ Psyllidae มาบ้างแล้ว แต่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของโลก อาจทำให้แมลงชนิดนี้มีวงจรชีวิตที่เปลี่ยนไป และมีโอกาสแพร่ระบาดมากขึ้น จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาเพื่อให้ทราบวงจรชีวิต พฤติกรรมการทำลาย ระยะการเจริญเติบโต ของเพลี้ยไก่แจ้ส้มใน วงศ์ Psyllidae เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน และหาแนวทางเฝ้าระวังและป้องกันกำจัดหากเกิดการแพร่ระบาดในอนาคตต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กรงเลี้ยงแมลง ขนาด 1.2 x 1.2 x 1 เมตร
2. ต้นส้มโอ / ต้นแก้ว

3. พู่กัน และเข็มเขี่ย
4. แว่นขยาย
5. เครื่องดูดแมลง (aspirator)
6. เครื่องนับจำนวนแมลง
7. เครื่องวัดอุณหภูมิ ความชื้น
8. กล่องพลาสติกขนาดต่างๆ
9. กล่องเก็บรักษาความเย็น
10. ถุงกระดาษและถุงพลาสติก ขนาดต่างๆ
11. อุปกรณ์เก็บข้อมูล
12. ขวดแก้วสำหรับดองแมลง
13. แอลกอฮอล์
14. อุปกรณ์ในการตรวจนับแมลง เช่น สมุดจดบันทึก ปากกา ดินสอ

วิธีการ

1. การสำรวจ และเก็บตัวอย่าง

1.1 สำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่าง เพลี้ยไก่แจ้ส้ม, *Diaphorina citri* Kuwayama ในแหล่งปลูก

1.2 ตัดส่วนของพืชที่มีตัวอ่อน ดักแด้ หรือตัวเต็มวัยของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม พร้อมพืชอาศัย ใส่ห่อกระดาษ และใส่ถุงพลาสติก หรือกล่องพลาสติก

1.3 เก็บรวบรวมไว้ในกล่องรักษาความเย็น เพื่อป้องกันตัวอย่างเน่าเสีย

2. จำแนกชนิดตัวอย่าง

นำตัวอย่างตัวอ่อน ดักแด้ หรือตัวเต็มวัยของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจลักษณะภายนอก เพื่อจำแนกชนิด ภายใต้กล้อง หรือส่งตัวอย่างให้กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงเพื่อจำแนกชนิด

3. การเพาะเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณ

ดำเนินการขั้นตอนการเพาะเลี้ยงขยาย ในโรงเรือนที่อุณหภูมิ และความชื้นเหมาะสมกับการเจริญเติบโต

3.1 ทำการปลูกต้นส้มโอหรือต้นแก้ว ในกระถาง กระถางละ 1 ต้น

3.2 ย้ายกระถางที่ปลูกต้นส้มโอหรือต้นแก้ว ที่เริ่มมีการแตกยอดใหม่ ตั้งแต่ 5 ยอดขึ้นไป จำนวน 20 กระถาง ไปวางในกรงสำหรับเพาะเลี้ยงแมลง ขนาด 1.2 x 1.2 x 1 เมตร

3.3 นำเพลี้ยไก่แจ้ส้มตัวเต็มวัยมาปล่อยจำนวน 10 คู่ เป็นตัวผู้และตัวเมีย ชนิดละ 10 ตัว เพื่อให้ขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณบนต้นส้มโอหรือต้นแก้วที่ปลูกไว้

4. การศึกษาชีววิทยา

4.1 นำต้นส้มโอหรือต้นแก้วที่มีการวางไข่ จากขั้นตอนการเพาะเลี้ยงขยาย แยกออกมาใส่ในกรงสำหรับเพาะเลี้ยงแมลง กรงใหม่ จำนวน 10 กระถาง

4.2 สังเกตการเจริญเติบโต ลักษณะทางชีววิทยา วงจรชีวิต และพฤติกรรม

5.การศึกษานิเวศวิทยาและศัตรูธรรมชาติ

ในสภาพสวน ดำเนินการในพื้นที่ปลูกส้มโอหรือส้มเขียวหวาน จำนวน 2 แห่ง แห่งละ 20 ต้น ทำการสังเกตในส่วนของยอดที่เพิ่งแตกใหม่ ระยะของแมลงที่เข้าทำลาย ลักษณะการเข้าทำลาย ลักษณะอาการของพืช การแพร่กระจายของแมลง

เก็บตัวอย่างแมลงที่ถูกศัตรูธรรมชาติเข้าทำลาย และนำมาเลี้ยงต่อ จนเก็บสามารถเก็บศัตรูธรรมชาติได้ และส่งศัตรูธรรมชาติดังกล่าวให้ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงจำแนกชนิดต่อไป

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินการในปี 2557-2558

สถานที่ทำการทดลอง เชียงใหม่ และเชียงราย ห้องปฏิบัติการกลุ่มบริหารศัตรูพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลอง ชีววิทยา นิเวศวิทยาของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม, Diaphorina citri Kuwayama ในพืชตระกูลส้ม

ดำเนินงานในปีงบประมาณ 2557 เป็นปีที่ 1 ได้รวบรวมข้อมูลการระบาดและ ทำการสำรวจนิเวศวิทยาและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ในแปลงปลูกพืชตระกูลส้ม ซึ่งเป็นพืชอาหารของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม, Diaphorina citri Kuwayama ในพื้นที่ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย และกำแพงเพชร ได้ข้อมูลดังนี้

1. การศึกษาชีววิทยา

การเพาะเลี้ยงขยายตัวอย่างแมลงที่เก็บมาจากแปลงปลูก เพื่อเก็บข้อมูลทางชีววิทยา ทำในสภาพโรงเรือน โดยเลี้ยงบนต้นแก้ว ภายใต้อุณหภูมิ 33-37 องศาเซลเซียส

ระยะตัวเต็มวัย

ตัวเต็มวัยความยาวตั้งแต่ส่วนหัวถึงปลายปีก ขนาด 3-4 มิลลิเมตร ส่วนของปีกมีสีน้ำตาลเข้ม บริเวณขอบปีก เนื้อปีกส่วนอื่น ส่วนอก และหัว มีสีน้ำตาลอ่อนและขาว เกาะโดยทำมุม 45 องศา กับพื้นผิวที่เกาะ ตัวเต็มวัยสามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้หลายร้อยฟอง ตลอดช่วงชีวิตประมาณ 3-4 เดือน

ระยะไข่

ตัวเต็มวัยจะวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ แต่อาจจะอยู่ใกล้ๆ กันโดยวางเป็นกลุ่มหรือเรียงกันเป็นแถว อยู่บน ตายอด ส่วนที่แตกยอดแต่ใบยังไม่คลี่ ใบอ่อน หรือดอกอ่อน ไข่มีขนาดความยาว 0.2-

0.3 มิลลิเมตร มีรูปทรงคล้ายหยดน้ำ หรือทองหยอด มีสีเหลืองสด ระยะไข่ 3-5 วัน จะฟักเป็นตัวอ่อนวัยที่ 1

ระยะตัวอ่อน

ตัวอ่อน วัยที่ 1 -5 มีความยาว 0.3 - 1.5 มิลลิเมตร โดยมีลักษณะลำตัวแบนสีเหลือง ในวัยที่ 1 พบการเคลื่อนที่ แต่ในวัย 2-5 พบว่ามักเกาะอยู่นิ่งๆ สามารถมองเห็นจุดสีแดงสองจุดบริเวณส่วนหัวด้านข้างลำตัวมีแผ่นปีกปรากฏอยู่ทั้งสองข้างซ้ายและขวา ส่วนปลายท้องจะมีเส้นขนเรียงกันอยู่ ส่วนต่างๆ เห็นได้ชัดเจนขึ้นเมื่ออยู่ในวัย 4-5 ระยะเวลาเป็นตัวอ่อน 10-30 วัน จากนั้นจะเจาะบริเวณด้านบนส่วนท้องออกมาเป็นตัวเต็มวัย

ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย จะขับไขสีขาวออกมาปกคลุมบริเวณที่เกาะ ตลอดเวลาที่กินพืชอาหาร ตลอดช่วงชีวิต ตั้งแต่ไข่ ถึงฟักออกเป็นตัวเต็มวัย ใช้ระยะเวลา 13-35 วัน และตัวเต็มวัยสามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน 3-4 เดือน

2. การศึกษานิเวศวิทยา

การศึกษาในสภาพสวน ดำเนินการในแปลงปลูกส้มโอ ส้มเขียวหวาน และมะนาว พืชตระกูลส้มที่พบเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ในปริมาณมาก ได้แก่ มะนาว และส้มเขียวหวาน ต้นที่ถูกทำลายก่อนมักอยู่บริเวณขอบด้านนอกของแปลง ถัดไปจึงจะเข้าทำลายต้นด้านใน เนื่องจากปริมาณของเพลี้ยไก่แจ้ส้มต้นที่อยู่ขอบด้านนอกจะมีปริมาณมากกว่า มีการกระจายตัวทั่วทั้งต้น และพบว่าต้นพืชที่มีประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มในระยะไข่ หรือตัวอ่อนวัย1-2 ปริมาณมากจะพบตัวเต็มวัยน้อย และลักษณะต้นพืชพบร่องรอยถูกทำลายมากกว่า โดยลักษณะการเข้าทำลายจะพบมีการวางไข่บริเวณตายอด ใบอ่อนที่แตกใหม่ๆ บริเวณซอกระหว่างเส้นใบ และกิ่งอ่อน พบตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเกาะดูดกินต้นพืช ขณะเดียวกันมีการขับไขสีขาวเป็นเส้นยาวออกมา

พืชที่ถูกทำลายมากๆ จะเริ่มมีอาการใบเหลือง หลุดร่วง และยังพบมีราดำเกาะอยู่บริเวณใบและกิ่ง เนื่องจากของเหลวที่ถูกขับออกมาขณะกินอาหาร สภาพแปลงที่พบการระบาดมาก คือแปลงที่มีการจัดการวัชพืชในแปลงน้อย หรือไม่มีการจัดการเลย

ศัตรูธรรมชาติที่พบในแปลง ได้แก่ ตัวอ่อนแมลงช้าง แมลงปอ ต่อ แตน และแมงมุม

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ในการศึกษานิเวศวิทยา พบว่าในแปลงปลูก พืชตระกูลส้มที่พบเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ในปริมาณมาก ได้แก่ มะนาว และส้มเขียวหวาน ต้นที่ถูกทำลายก่อนมักอยู่บริเวณขอบด้านนอกของแปลง เนื่องจากปริมาณของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ต้นที่อยู่ขอบด้านนอกจะมีปริมาณมากกว่า มีการกระจายตัวทั่วทั้งต้น โดยลักษณะการเข้าทำลายจะพบมีการวางไข่บริเวณตายอด ใบอ่อนที่แตกใหม่ๆ บริเวณซอกระหว่างเส้นใบ และกิ่งอ่อน พบตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเกาะดูดกินต้นพืช ขณะเดียวกันมีการขับไขสีขาวเป็นเส้นยาวออกมา พืชที่ถูกทำลายมากๆ จะเริ่มมีอาการใบเหลือง หลุดร่วง และยังพบมีราดำเกาะอยู่บริเวณใบ

และกิ่ง เนื่องจากของเหลวที่ถูกขับออกมาขณะกินอาหาร สภาพแปลงที่พบการระบาดมาก คือแปลงที่มีการจัดการวัชพืชในแปลงน้อย หรือไม่มีการจัดการ

การเพาะเลี้ยงขยายตัวอย่างแมลง เพื่อเก็บข้อมูลทางชีววิทยาพบว่าตัวเต็มวัยความยาวตั้งแต่ส่วนหัวถึงปลายปีก ขนาด 3-4 มิลลิเมตร ส่วนของปีกมีสีน้ำตาลเข้มบริเวณขอบปีก เนื้อปีกส่วนอื่น ส่วนอก และหัว มีสีน้ำตาลอ่อนและขาว เกาะโดยทำมุม 45 องศา กับพื้นผิวที่เกาะ ตัวเต็มวัยสามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้หลายร้อยฟอง ตลอดช่วงชีวิตประมาณ 3-4 เดือน โดยตัวเต็มวัยจะวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ แต่อาจจะอยู่ใกล้ๆ กันโดยวางเป็นกลุ่มหรือเรียงกันเป็นแถว อยู่บนตายอด ส่วนที่แตกยอดแต่ใบยังไม่คลี่ ใบอ่อน หรือดอกอ่อน ไข่มีขนาดความยาว 0.2-0.3 มิลลิเมตร มีรูปทรงคล้ายหยดน้ำ หรือทองหยอด มีสีเหลืองสด ระยะไข่ 3-5 วัน จะฟักเป็นตัวอ่อนวัยที่ 1 ในวัยที่ 1 -5 มีความยาว 0.3 - 1.5 มิลลิเมตร โดยมีลักษณะลำตัวแบนสีเหลือง ในวัยที่ 1 พบการเคลื่อนที่ แต่ในวัย 2-5 พบว่ามักเกาะอยู่นิ่งๆ สามารถมองเห็นจุดสีแดงสองจุดบริเวณส่วนหัว ด้านข้างลำตัวมีแผ่นปีกปรากฏอยู่ทั้งสองข้างซ้ายและขวา ส่วนปลายท้องจะมีเส้นขนเรียงกันอยู่ ส่วนต่างๆ เห็นได้ชัดเจนขึ้นเมื่ออยู่ในวัย 4-5 ระยะเวลาเป็นตัวอ่อน 10-30 วัน จากนั้นจะเจาะบริเวณด้านบนส่วนท้องออกมาเป็นตัวเต็มวัย ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย จะขับไขสีขาวออกมาปกคลุมบริเวณที่เกาะ ตลอดเวลาที่กินพืชอาหาร ตลอดช่วงชีวิต ตั้งแต่ไข่ ถึงฟักออกเป็นตัวเต็มวัย ใช้ระยะเวลา 13-35 วัน และตัวเต็มวัยสามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน 3-4 เดือน ศัตรูธรรมชาติที่พบในแปลง ได้แก่ ตัวอ่อนแมลงช้าง แมลงปอ ต่อ แตน และแมงมุม

เพลี้ยไก่แจ้ส้ม พบระบาดมากในช่วงฤดูฝน ดังนั้นจะพบการทำลายชัดเจน และสามารถเก็บตัวอย่างได้มากพอในช่วงดังกล่าว จึงต้องทำการศึกษาเพื่อยืนยันข้อมูลอีกครั้งในการทดลองปีต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ เกษตรกรเจ้าของแปลง จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ และกำแพงเพชร ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการสำรวจให้เป็นอย่างดี และขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย และเจ้าหน้าที่กลุ่มบริหารศัตรูพืชทุกท่านที่ช่วยรวบรวมข้อมูลการสำรวจ และเก็บข้อมูลการเพาะเลี้ยงขยาย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ชลิดา อุณหวุฒิ. 2534. เพลี้ยไก่แจ้ส้ม แมลงพาหะโรคใบเหลืองต้นโทรม.วารสารกีฏและสัตววิทยา ปีที่ 13 ฉบับที่ 4 ประจำเดือน ตุลาคม-ธันวาคม 2534.กองกีฏและสัตววิทยา. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

บุษบง มนัสมั่นคง. 2554. แมลงศัตรูส้มโอ. เอกสารวิชาการ แมลงศัตรูไม้ผล. กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 149 หน้า

พนมกร วีระวุฒิ สุพัตรา อินทวิมลศรี และ ชาญชัย บุญยงค์. 2530 (ก). การสำรวจเพลี้ยอ่อน เพลี้ยกระโดดส้ม และหนอนชอนใบส้ม.รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย ปี 2530. หน้า27-32. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูไม้ผลและพืชสวนอื่นๆ กองกีฏและสัตววิทยา. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 120 หน้า.

พนมกร วีระวุฒิ ไมตรี พรหมมินทร์ พัฒน์พงษ์ ภัทรโกศล และ ชาญชัย บุญยงค์. 2530(ข). การศึกษาชีววิทยาและการเพิ่มปริมาณแตนเบียนของเพลี้ยกระโดดส้ม.รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย ปี 2530.

หน้า22-26. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูไม้ผลและพืชสวนอื่นๆ กองกีฏและสัตววิทยา. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 120 หน้า.

สำนักงานเกษตรจังหวัดกาญจนบุรี. 2555. แจ้งเตือนการระบาดศัตรูพืช ปีที่ 1 ฉบับที่ 8 ประจำเดือนตุลาคม. กรมส่งเสริมการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2553. หจก. อรุณการพิมพ์กรุงเทพฯ. 97 หน้า

ศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา บุษบง มนัสมั่นคง และศรุต สุทธิอารมณ์. 2551. ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลง และสารสกัดธรรมชาติกับแมลงศัตรูที่สำคัญในส้มโอ. *ใน* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Biosecurity Queensland. 2011. African citrus psyllids *Have you seen this citrus pest*. Department of Employment. Economic Development and Innovation. [Online]. (May 12, 2011)

EPPO and CABI. 2009. Data sheets on Quarantine pests *Trioza erytreae*. [Online]. Available. http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/TRioza_erytreae/TRIER_ds.pdf (August 5, 2009)

Espinosa, A and A.C.Hodges. 2009. *Trioza erytreae*. [Online]. Available. http://riki.bugwood.org/Trioza_erytreae (August 5, 2009)

Northern Territory Government. 2009. Citrus hunglongbing(HLB). [Online]. (May 12, 2011)

ภาคผนวก

Figure 1 Female psyllids laying egg in petal

Figure 2 Stage 1-5 nymps of psyllids

Figure 3 Wax and honey dew psyllids excreted

Figure 4 The field at the outbreak of citrus psyllids.

Figure 5 Natural enemies in the field

ชีววิทยาและเขตการแพร่กระจายของไรแมงมุมคันซาวา *Tetranychus kanzawai* Kishida

Biology and Distribution of Kanzawa Spider Mite, *Tetranychus kanzawai* Kishida

อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล มานิตา คงชื่นสิน พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์
พลอยชมพู กรวิภาสเรือง วิมลวรรณ โชติวงศ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาชีววิทยาและเขตการแพร่กระจายของไรแมงมุมคันซาวา *T. kanzawai* บนใบพืชอาศัย กุหลาบ, มะละกอ และมันสำปะหลัง พบว่า วงจรชีวิต อายุตัวเต็มวัยเพศเมียและเพศผู้ ระยะเวลาในการวางไข่ อัตราวางไข่ได้โดยเฉลี่ยตลอดชีวิต อัตราการขยายพันธุ์สุทธิในชั่วอายุขัย(R_0) และ ชั่วอายุขัยของกลุ่ม (G)ของไรแมงมุมคันซาวามากที่สุดเมื่อมีพืชอาศัยเป็นมันสำปะหลัง และอัตราการเพิ่มประชากร(r_m) ของไรแมงมุมในมะละกอ และมันสำปะหลังนั้นใกล้เคียงกัน 0.29 และ 0.24 ตามลำดับซึ่งสูงกว่าในกุหลาบ แสดงให้เห็นว่า ไรแมงมุมชนิดนี้สามารถเพิ่มประชากรได้ดี ซึ่งทำให้เกิดการระบาดอย่างรวดเร็ว เมื่อลงทำลายบนมะละกอและมันสำปะหลังส่วนเขตการแพร่กระจายของไรแมงมุมคันซาวาสามารถแพร่กระจายอยู่ทั่วประเทศไทยตลอดทั้งปี บนพืช 60 ชนิดได้แก่ ไม้ผล 13 ชนิด พืชไร่ 9 ชนิด พืชผักและสมุนไพร 15 ชนิด ไม้ดอกไม้ประดับ 17 ชนิด และวัชพืช 6 ชนิด

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-42-57

คำนำ

ไรแมงมุมคันซาวา *Tetranychus kanzawai* Kishida เป็นศัตรูสำคัญของกุหลาบ ฝ้ายและพืชเศรษฐกิจอีกหลายชนิด เช่น มะละกอ สตรอเบอรี่ ท้อ องุ่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่วลิสง ละหุ่ง กระเทียม แตงไทย ถั่วฝักยาว มะเขือ แกลดิโอลัส ดาวเรือง โป๊ยเซียน ไฮเดรนเยีย ข้าว (วัฒนาและคณะ, 2530; มานิตาและคณะ, 2554) ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของไรชนิดนี้ ชอบดูดทำลายอยู่บริเวณใต้ใบ โดยจะสร้างใยขึ้นปกคลุมผิวใบบริเวณที่ไรอาศัยอยู่รวมกัน กุหลาบที่ถูกไรทำลาย ระยะแรกจะมีรอยประสีขาวเป็นจุดเล็กๆ ปรากฏขึ้นที่บริเวณหน้าใบ ต่อมาจุดประสีขาวนี้จะค่อยๆแผ่ขยายออกเป็นบริเวณกว้าง จนทำให้กุหลาบทั้งใบมีอาการขาวซีด ใบจะค่อยๆ เหลือง และแห้งหลุดร่วงไป ถ้าการทำลายรุนแรงและต่อเนื่อง จะมีผลทำให้กุหลาบทั้งต้นทิ้งใบ และแห้งตาย เหลือแต่กิ่ง เมื่อถึงระยะนี้ไรจะไต่ขึ้นไปรวมกันแน่นบริเวณยอด และปลายกิ่ง พร้อมกับสร้างเส้นใยทิ้งตัวลงมา เพื่อรอเวลาให้ลมพัดปลิวไปตกยังพืชอาศัยต้นใหม่ต่อไป ส่วนการทำลายในฝ้ายนั้น มักพบระบาดเป็นหย่อมๆ โดยใบฝ้ายบริเวณที่ถูกไรชนิดนี้ทำลาย จะมีลักษณะเป็นปื้นสีแดงที่บริเวณหน้าใบ หากระบาดรุนแรงมากจะทำให้ฝ้ายบางพันธุ์ใบร่วง สมอแตกเร็วกว่าฝ้ายพันธุ์อื่นๆ ที่ปลูกในบริเวณเดียวกันนอกจากนี้ MAF Biosecurity New Zealand (2009) รายงานว่า ไรแมงมุมคันซาวา *T. kanzawai* แพร่กระจายอยู่ในประเทศออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา จีน อินเดีย มาเลเซีย ญี่ปุ่น ไทย ไต้หวัน เวียดนาม เกาหลี และกรีซ มีพืชอาศัย 160 ชนิด จาก 62 วงศ์ ส่วนใหญ่เป็นพวกถั่วลิสง ชา มะละกอ ส้ม สตรอเบอรี่ ถั่วเหลือง ต้นฮ็อพ แอปเปิ้ล เชอรรี่ ท้อ มะเขือ และองุ่น ส่วนในประเทศไทย พบทำลายมะละกอ สตรอเบอรี่ ท้อ องุ่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่วลิสง ละหุ่ง กระเทียม แตงไทย ถั่วฝักยาว มะเขือ แกลดิโอลัส ดาวเรือง โป๊ยเซียน ไฮเดรนเยีย ข้าว (มานิตาและคณะ, 2554)

ดังนั้น การศึกษาชีววิทยา และเขตแพร่กระจายของไรแมงมุมคันซาวาในประเทศไทยจึงมีความสำคัญที่ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐาน และศักยภาพการเข้าทำลายพืชอาศัยที่เป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย เช่น กุหลาบ มันสำปะหลัง และมะละกอ เพื่อประโยชน์ในการป้องกันกำจัดต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- ใบพืชอาศัย ได้แก่ กุหลาบ มันสำปะหลัง และมะละกอ
- กล่องพลาสติกที่แบ่งเป็นช่องย่อย 14 ช่อง
- อุปกรณ์เลี้ยงขยายไร
- กล้องจุลทรรศน์แบบสองตา
- อุปกรณ์ทำสไลด์ไร
- อุปกรณ์บันทึกข้อมูล กล้องถ่ายรูป

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1. การเลี้ยงขยายไรแมงมุมคันซาวา *T. kanzawai*

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไร *T. kanzawai*ในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวอย่างไรที่เก็บได้บนพืชอาศัยได้แก่ กุหลาบ มันสำปะหลัง และมะละกอ มาเลี้ยงบนใบพืชอาศัย ได้แก่ กุหลาบ มันสำปะหลัง และมะละกอ และวางอยู่บนสำลีชุ่มน้ำในถาดพลาสติก หล่อน้ำถาดเลี้ยงตลอดเวลา และวางบนชั้นใต้แสงไฟฟลูออเรสเซ็นต์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องปฏิบัติการเพื่อให้ไรเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆจนมากเพียงพอ

ขั้นตอนที่ 2. ศึกษาชีววิทยาของไรแมงมุมคันซาวา *T. kanzawai* Kishida ในพืชอาศัย ได้แก่ กุหลาบ มันสำปะหลัง และมะละกอ

การศึกษาชีววิทยาไร *T. kanzawai*โดยนำตัวเต็มวัยเพศเมียของไรที่เลี้ยงไว้จำนวน 40-50 ตัว ลงบนใบพืชอาศัย (กุหลาบ, มันสำปะหลัง, มะละกอ) ทิ้งไว้ให้วางไข่ 3-4 ชั่วโมง นำไข่ที่ได้มาแยกเลี้ยงเดี่ยวๆบนใบพืชอาศัย (กุหลาบ, มันสำปะหลัง, มะละกอ) ที่ตัดเป็นแผ่นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.7 เซนติเมตร วางบนแผ่นสำลีชุ่มน้ำในกล่องพลาสติกที่แบ่งเป็นช่องย่อย 14 ช่อง ช่องละ 1 ฟอง บันทึกระยะเวลาการเจริญเติบโตทุกๆ 6 ชั่วโมง จากระยะไข่ ตัวอ่อนวัยต่างๆจนเป็นตัวเต็มวัย เขี่ยไรตัวผู้ที่เลี้ยงไว้ใส่ลงไปบนใบให้ผสมพันธุ์กับไรตัวเมีย บันทึกจำนวนไข่และการตายของตัวเมียที่เกิดขึ้นทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งตัวเมียตาย เขี่ยไข่ที่ตัวเมียแต่ละตัวผลิตได้ทั้งหมดแยกออกรวมไว้ บันทึกจำนวนลูกที่ฟักออกเป็นเพศเมีย คำนวณอัตราส่วนทางเพศ (sex ratio) อัตราการเพิ่มประชากร (intrinsic rate of increase, r_m) อัตราการขยายพันธุ์สุทธิในชั่วอายุขัย (net reproductive rate, R_0)ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 28 ตัวในแต่ละพืชอาศัย ได้แก่ กุหลาบ มันสำปะหลัง และมะละกอ

ขั้นตอนที่ 3. การศึกษาเขตการแพร่กระจายของไรแมงมุมคันซาวา *T. kanzawai* Kishida

เก็บตัวอย่างไร *T. kanzawai*บนพืชชนิดต่างๆ ตัดส่วนของพืชที่พบไรหรือที่มีร่องรอยอาการถูกทำลายของไรใส่ถุงกระดาษ แล้วใส่ถุงพลาสติกมัดให้แน่น ใส่ในถังเก็บความเย็นนำไปทำสไลด์ให้เร็วที่สุด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรที่พบบนพืชแต่ละตัววางลงบนสไลด์ เมาส์ด้วยน้ำยา Hoyer's ตามวิธีของวัฒนาและคณะ (2544) ส่วนไรที่ไม่สามารถทำเป็นสไลด์ได้ทันที ให้เขี่ยดองในขวดด้วย ethyl alcohol 70% นำไปทำเป็นสไลด์ภายหลัง เมื่อสไลด์แห้งดีแล้ว ทำการวินิจฉัยไรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกสถานที่และชนิดของพืชอาศัย

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกวงจรชีวิต ระยะเวลาในการเจริญเติบโตตั้งแต่ไข่จนเป็นตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียความสามารถในการผลิตไข่ตลอดอายุขัย และความสามารถในการอยู่รอดตั้งแต่ฟักจากไข่จนตาย (life table) อัตราการเพิ่มประชากร (intrinsic rate of increasing) ในแต่ละพืชอาศัย ได้แก่ กุหลาบ มันสำปะหลัง และมะละกอ

2. บันทึกเขตการแพร่กระจาย พิกัดภูมิศาสตร์ และชนิดของพืชอาศัยของไร *T. kanzawai* ที่พบจากการสำรวจและจากตัวอย่างสไลด์ไร *T. kanzawai* ที่มีแล้วอยู่ในพิพิธภัณฑ์ไร กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2556 - กันยายน 2557

แปลงเกษตรกรจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เก็บรวบรวมตัวอย่างไรที่เก็บได้บนพืชอาศัยได้แก่ กุหลาบ จากแหล่งปลูกจังหวัด นครราชสีมา และตาก มะละกอ จากแหล่งปลูกจังหวัดตาก และจันทบุรี มันสำปะหลัง จากแหล่งปลูกจังหวัดนครราชสีมา ส่วนหนึ่งนำมาทำเป็นสไลด์และอีกส่วนนำมาเลี้ยงบนใบพืชอาศัย วางอยู่บนสำลีชุ่มน้ำในถาดพลาสติก หล่อน้ำถาดเลี้ยงตลอดเวลา และวางบนชั้นใต้แสงไฟฟลูออเรสเซ็นต์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ไรเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ จนมากเพียงพอ จากศึกษาชีววิทยาไรแมงมุมคันซาวา *T. kanzawai* โดยนำตัวเต็มวัยเพศเมียของไรที่เลี้ยงไว้จำนวน 40-50 ตัวลงบนใบพืชอาศัย (กุหลาบ, มันสำปะหลัง, มะละกอ) ทิ้งไว้ให้วางไข่ 3-4 ชั่วโมง นำไข่ที่ได้มาแยกเลี้ยงเดี่ยวๆ บนใบพืชอาศัย (กุหลาบ, มันสำปะหลัง, มะละกอ) ที่ตัดเป็นแผ่นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.7 เซนติเมตร วางบนแผ่นสำลีชุ่มน้ำในกล่องพลาสติกที่แบ่งเป็นช่องย่อย 14 ช่อง ช่องละ 1 ฟอง บันทึกระยะเวลาการเจริญเติบโตทุกๆ 6 ชั่วโมง จากระยะไข่ ตัวอ่อนวัยต่างๆจนเป็นตัวเต็มวัย เขี่ยไรตัวผู้ที่เลี้ยงไว้ใส่ลงไปบนใบให้ผสมพันธุ์กับไรตัวเมีย บันทึกจำนวนไข่และการตายของตัวเมียที่เกิดขึ้นทุกๆ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งตัวเมียตาย เขี่ยไข่ที่ตัวเมียแต่ละตัวผลิตได้ทั้งหมดแยกออกรวมไว้ บันทึกจำนวนลูกที่ฟักออกเป็นเพศเมียและเพศผู้

ไรแมงมุมคันซาวา T. *kanzawai* มีระยะการเจริญเติบโต 5 ระยะ คือ ระยะไข่ (egg) ตัวอ่อนวัย 1 (larva) ตัวอ่อนวัย 2 (protonymph) ตัวอ่อนวัย 3 (deutonymph) และตัวเต็มวัย (adult) ไรแมงมุมคันซาวาเพศเมียที่เลี้ยงบนกุหลาบ, มะละกอ และมันสำปะหลังใช้เวลาในการเจริญเติบโตจากไข่จนเป็นตัวเต็มวัยเฉลี่ยนาน 8.50, 6.50 และ 9.54 วัน ตามลำดับ ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุยืนยาวเฉลี่ย 14.33, 11.43 และ 16.39 วัน ตามลำดับ การเจริญเติบโตในระยะต่างๆแสดงตาม Table 1 ตัวเต็มวัยเพศเมียระยะก่อนวางไข่เฉลี่ย 1.40, 1.02 และ 0.99 วัน ตามลำดับ ระยะวางไข่เฉลี่ย 11.02, 10.24 และ 15.65 วัน ตามลำดับ และระยะหลังวางไข่เฉลี่ยนาน 2.15, 0.84 และ 0.59 วัน ตามลำดับ (Table 1) วางไข่ได้ทั้งหมดประมาณ 18.94, 79.13 และ 83.34 ฟองต่อตัว ตามลำดับ เฉลี่ยวันละ 1.94, 7.29 และ 5.24 ฟองต่อตัว ตามลำดับ (Table 2) อัตราการขยายพันธุ์สุทธิในชั่วอายุขัย (R_0) มีค่า 9.33, 60.29 และ 81.36 ตามลำดับ อัตราการเพิ่มประชากร (r_m) มีค่า 0.13, 0.29 และ 0.24 ตามลำดับ และผลิตลูกได้สุทธิ (λ) 1.37, 1.96 และ 1.75 ตัวต่อวัน ตามลำดับ ชั่วอายุขัยของกลุ่ม

(G) 16.24, 14.03 และ 18.07 วัน ตามลำดับ ไข่ที่วางได้ทั้งหมดของตัวเมียแต่ละตัวมีสัดส่วนของลูกที่ฟักเป็นเพศเมียเท่ากับ 0.36, 0.68 และ 0.70 ตามลำดับ (Table 3)จะเห็นได้ว่า อัตราการเพิ่มประชากร (r_m) ในมะละกอ และมันสำปะหลังใกล้เคียงกัน แต่อัตราการขยายพันธุ์สุทธิในชั่วอายุขัย (R_0) ในมันสำปะหลังมากกว่ามะละกอถึง 21.07 (Table 3) เนื่องจากในมันสำปะหลังมีระยะเวลาการเจริญเติบโตยาวนานกว่าในมะละกอ 3.04 วัน(Table 1)และจำนวนไข่ที่ตัวเต็มวัยเพศเมียวางได้เฉลี่ยต่อวันน้อยกว่า 2.05 ฟองต่อวัน แต่จำนวนไข่ที่ตัวเต็มวัยเพศเมียวางได้เฉลี่ยต่อตัวมากกว่า 4.21 ฟองต่อตัว(Table 2) รวมไปถึงในมันสำปะหลังตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ได้สูงสุดเฉลี่ย 8.41 ฟองในวันที่ 14 ซึ่งในมะละกอตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ได้สูงสุดเฉลี่ย 10.1 ฟองในวันที่ 13 ซึ่งสอดคล้องกับ Gotoh and Gomi (2003) ได้ศึกษาT. *kanzawai* และ T. *parakanzawai* บนพืชอาศัยที่พบ (ชา, ไฮเดรนเยีย, แพร์ และ kudzu) และหม่อน พบว่าทุกสายพันธุ์มีอัตราการเพิ่มประชากร (r_m) ใกล้เคียงกัน ยกเว้นสายพันธุ์ชาที่เลี้ยงบนชา ซึ่งสายพันธุ์ชาที่เลี้ยงบนชา และสายพันธุ์ไฮเดรนเยียที่เลี้ยงบนไฮเดรนเยียมี จำนวนไข่ที่ตัวเต็มวัยเพศเมียวางได้เฉลี่ยต่อวันเท่ากัน แต่สายพันธุ์ชาที่เลี้ยงบนชามีระยะเวลาการเจริญเติบโตยาวนานกว่าสายพันธุ์ไฮเดรนเยียที่เลี้ยงบนไฮเดรนเยีย 2.5 วัน ส่วนสายพันธุ์ไฮเดรนเยียที่เลี้ยงบนหม่อนมีอัตราการเพิ่มประชากร (r_m) สูงกว่าที่เลี้ยงบนไฮเดรนเยีย เพราะในหม่อนตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ได้สูงสุดเฉลี่ย 10.3 ฟองในวันที่ 15 แต่ในไฮเดรนเยียตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ได้สูงสุดเฉลี่ย 4.9 ฟองในวันที่ 14 จะเห็นได้ว่า อัตราการเพิ่มประชากร (r_m) มีปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้อง 2 ปัจจัยด้วยกันคือ ระยะเวลาในการเจริญเติบโต และอัตราการวางไข่ (Snell, 1978; Wrensch, 1985) สำหรับอัตราการเพิ่มประชากร (r_m) ของไรแมงมุมนั้น การเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการเจริญเติบโตมีความสำคัญมากกว่าการเปลี่ยนแปลงอัตราการวางไข่(Sabelis, 1985)

ไรแมงมุมคันซาวา มีเขตแพร่กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย บนพืช 60 ชนิด ได้แก่ ไม้ผล 13 ชนิด พืชไร่ 9 ชนิด พืชผักและสมุนไพร 15 ชนิด ไม้ดอกไม้ประดับ 17 ชนิด และวัชพืช 6 ชนิด (Table 4)

อย่างไรก็ตาม อัตราการเพิ่มประชากร (intrinsic rate of increase, r_m) ของพืชอาศัยเศรษฐกิจที่สำคัญของไรศัตรูพืช ควรจะได้รับการพิจารณามากกว่าพืชที่ทำให้ไรเจริญเติบโตได้ง่าย เช่น ถั่ว โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อหนึ่งในวัตถุประสงค์นั้น คือ การป้องกันกำจัดไรศัตรูพืช (Gotoh and Gomi, 2003)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ไรแมงมุมคันซาวา T. *kanzawai*มีระยะการเจริญเติบโต 5 ระยะ คือ ระยะไข่ (egg) ตัวอ่อนวัย 1 (larva) ตัวอ่อนวัย 2 (protonymph) ตัวอ่อนวัย 3 (deutonymph) และตัวเต็มวัย (adult) ไรแมงมุมคันซาวาที่เลี้ยงบนมันสำปะหลังใช้เวลาในการเจริญเติบโตจากไข่จนเป็นตัวเต็มวัยเฉลี่ยนานที่สุด 9.54 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมียและเพศผู้มีอายุยืนยาวที่สุดเฉลี่ย 16.39 และ 20.50 วัน ตามลำดับ ระยะเวลาในการวางไข่ยาวที่สุดเฉลี่ย 15.65 วัน สามารถวางไข่ได้โดยเฉลี่ยตลอดชีวิตมากที่สุด 83.34 ฟอง อัตราการขยายพันธุ์สุทธิในชั่วอายุขัย (R_0) และ ชั่วอายุขัยของกลุ่ม (G) มีค่ามากที่สุด 81.36 และ

18.07 ตามลำดับ อัตราการเพิ่มประชากร (r_m) ของไรแมงมุมในมะละกอ และมันสำปะหลังนั้นใกล้เคียงกัน 0.29 และ 0.24 ตามลำดับ เนื่องจากในมันสำปะหลังมีระยะเวลาการเจริญเติบโตยาวนานกว่าในมะละกอ 3.04 วัน ไรแมงมุมชนิดนี้จึงสามารถเพิ่มประชากรได้ดีเมื่อมีมะละกอและมันสำปะหลังเป็นพืชอาศัย และเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการระบาดอย่างรวดเร็ว

เอกสารอ้างอิง

มานิตา คงชื่นสิน พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์ และพลอยชมพู กรวิภาสเรือง. 2554. ไรศัตรูพืชเศรษฐกิจ,น. 49-50. *ใน* ไรศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด. เอกสารประกอบการอบรมหลักสูตรแมลง-สัตว์ศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด ครั้งที่ 15, 25-29 กรกฎาคม 2554. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

วัฒนา จารณศรี ฉัตรชัย ศฤงฆไพบูลย์ มานิตา คงชื่นสิน และนวลศรี วงษ์ศิริ. 2530. ลักษณะทางอนุกรมวิธานและชีววิทยาของไรศัตรูกุหลาบในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการในโอกาสประชุมใหญ่สามัญประจำปี 2530. สมาคมกีฏและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย (วันที่ 16-17 กรกฎาคม 2530) บางเขน กรุงเทพมหานคร.149 น.

วัฒนา จารณศรี มานิตา คงชื่นสิน เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และพิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์. 2544. ไรศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด. เอกสารวิชาการ กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพ. 192 น.

Gotoh, T and K. Gomi. 2003. Life-history traits of the Kanzawa spider mite *Tetranychus kanzawai* (Acari: Tetranychidae). Appl. Entomol. Zool. 38 (1): 7-14.

MAF Biosecurity New Zealand. 2009. Import Risk Analysis: Table Grapes (*Vitis vinifera*) from China.Wellington New Zealand. 193-203.

Navajas, M., J. Gutierrez, M. Williams and T. Gotoh. 2001. Synonymy between two spider mite species, *Tetranychus kanzawai* and *T. hydrangea* (Acari: Tetranychidae) shown by ribosomal ITS2 sequences and cross breeding experiments. Bulletin of Entomological research. 91: 117-123.

Sabelis, M.W. 1985. Reproductive strategies. *In Spider Mites. Their Biology, Natural Enemies and Control*, 1A (W. Helle and M. Sabelis eds.). Elsevier, Amsterdam. 265-278.

Snell, T.W. 1978. Fecundity, developmental time, and population growth rate. Oecologia. 32: 119-125.

Wrensch, D.L. 1985. Reproductive parameters. *In Spider Mites. Their Biology, Natural Enemies and Control*, 1A (W. Helle and M. Sabelis eds.). Elsevier, Amsterdam. 165-170.

Table 1 Effects of host plant on the duration of immature and adult development of *T. kanzawai* females at 26.23±2.08 °c and 44.95±6.40 %RH.

stage	Development duration in days (Mean±S.E.)					
	On Rose		On Papaya		On Cassava	
	Range	$\bar{x}$± S.E.	Range	$\bar{x}$± S.E.	Range	$\bar{x}$± S.E.
Egg	0.25-3.75	2.75 ± 1.49	2.00-3.25	2.96±0.28	2.25-4.25	3.70±0.44
Larva	1.25-3.25	1.86±0.49	0.75-2.00	0.98±0.30	1.50-3.25	2.05±0.47
Protonymph	0.50-2.75	1.57±0.46	1.00-2.25	1.19±0.20	0.50-2.75	1.59±0.40
Deutonymph	0.50-4.25	2.25±0.81	1.00-1.75	1.37±0.19	1.25-3.25	2.13±0.42
Total (egg-adult)	5.25-11.25	8.50±1.39	5.50-7.25	6.50±0.30	8.25-11.50	9.54±1.01
Pre- oviposition	0.00-5.00	1.40±1.26	0.00-3.00	1.02±0.28	0.00-1.00	0.99±0.11
Oviposition	2.00-22.00	11.02±4.59	2.00-22.00	10.24±4.98	4.00-27.00	15.65±7.46
Post- oviposition	0.00-7.00	2.15±2.05	0.00-9.00	0.84±1.69	0.00-3.00	0.59±0.96
Female longevity	3.00-25.00	14.33±5.39	2.00-24.00	11.43±5.30	4.00-27.00	16.39±7.42
Male longevity	2.00-24.00	9.73±6.99	1.00-22.00	7.67±6.68	9.00±32.00	20.50±16.26

Table 2 Comparison of egg production and egg hatchability on Rose, Papaya and Cassava.

Host plant	Average number of eggs per female per day	Average total of eggs per female	Egg hatchability (%)
Rose	1.94±0.89	18.94±7.37	94.05%
Papaya	7.29±2.39	79.13±37.14	100%
Cassava	5.24±1.99	83.34±42.83	100%

Mean±S.E. within a column followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.01$)

Table 3 Effects of host plant on the life table parameters of *T.kanzawai*

Parameters	Host plant		
	Rose	Papaya	Cassava
Net reproduction rate, R_0 per generation	9.33	60.29	81.36
Intrinsic rate of increase, r_m per day	0.13	0.29	0.24
generation time, G (days)	16.24	14.03	18.07
finite rate of increase, λ per day	1.37	1.96	1.75
Sex ratio	1: 4.17	1: 3	1: 41
Proportion of female (♀/♀+♂) of F_1	0.36	0.68	0.70

Table 4 Distribution of *Tetranychus kanzawai*, listing the host plants where the kanzawai spider mite was found

Host	Place collected	Time collected
Fruit crops and trees		
Apple (*Malus domestica*)	Chiangrai	Feb
Cherry (*Prunus arium*)	Chiangrai	Feb
Grape (*Vitis vinifera*)	Ratchaburi	Dec
Jujube (*Zizyphus mauritiana*)	Chiangrai	Feb
	Chiangmai	Feb
Mango (*Mangifera indica*)	Chanthaburi	Sep
Papaya (*Carica papaya*)	Bangkok	Jan,Mar,May,Dec
	Chiangmai	Nov
	Chumporn	Nov
	Nakhonratchasrima	Oct,Dec
	Nakornpathom	Feb,Sep
	Petchaburi	Aug
	Pichit	Jul
	Ratchaburi	Feb,Jun,Sep-Oct
	Rayong	Jun
	Srakaew	May
	Srisaket	Apr
	Supanburi	Mar
	Surin	Jul
Passion fruit (*Passiflora edulis*)	Chiangmai	Jan
Peach (*Prunus persica*)	Chiangmai	Mar

Table 4 Distribution of *Tetranychus kanzawai*, listing the host plants where the kanzawai spider mite was found (Continue)

Host	Place collected	Time collected
Pear (*Pyrus communis*)	Chiangmai	May
Raspberry (*Rubus idaeus*)	Chiangmai	Jun
Strawberry (*Fragaria* sp.)	Chiangmai	Feb-Mar,Oct
	Chiangrai	Jan,Mar,Jun
Tangerine (*Citrus reticulata*)	Chiangmai	Nov
	Sukhothai	Nov
Watermelon (*Citrullus lanatus*)	Petchaburi	Aug
Field crops		
Cassava (*Manihot esculenta*)	Bangkok	Jun
	Chiangmai	Dec
	Nakonpathom	Jun
	Phuket	Jul
Corn (*Zea mays*)	Bangkok	Feb-Mar
	Lobburi	Jan
Cotton (*Gossypium* spp.)	Chainat	Apr
	Kanchanaburi	Nov
	Lobburi	Sep,Nov
	Loei	Jan
	Nakhonsawan	Jan,Aug-Nov
	Nakhornratchasrima	Nov
	Roi-et	Jan
	Singburi	Apr
	Srakaew	Dec
	U-thaithani	Nov
Peanut (*Arachis hypogaea*)	Bangkok	Jun
Rice (*Oryza sativa*)	Bangkok	Mar
Sorghum (*Sorghum bicolor*)	Bangkok	Mar
Soybean (*Glycine max*)	Bangkok	Mar
Sweet potato (*Ipomoea batatas*)	Patumthani	Nov
Taro (*Colocasia esculenta*)	Ratchaburi	Oct
Vegetables and herbs		
Angled rag gourd (*Luffa acutangula*)	Nakonpathom	Nov
	Chiangmai	Oct
	Chiangrai	Feb

Table 4 Distribution of *Tetranychus kanzawai*, listing the host plants where the kanzawai spider mite was found (Continue)

Host	Place collected	Time collected
Balsam (*Momordica charantia*)	Chiangmai	Aug
	Nakhornpathom	Feb
Brinjal (*Solanum indicum*)	Nakonpathom	Feb,May
	Ratchaburi	Feb-Mar
Cucumber (*Cucumis sativus*)	Nakhornratchasrima	Sep
Eggplant (*Solanum melongena*)	Bangkok	Jun
	Ratchaburi	Jul
Garlic (*Allium sativum*)	Nakhornratchasrima	Dec
Ivy gourd (*Coccinia grandis*)	Chiangmai	Dec
Lemon Lily (*Hemerocallis lilioasphodelus*)	Chiangmai	Mar
Long bean (*Vigna sinensis*)	Angtong	Aug
	Bangkok	Sep-Oct,Dec
	Chachaengsao	Oct
	Nakhornnayok	Feb
	Nakhornsawan	Mar
	Ratchaburi	Jun,Sep
	Saraburi	Jun
	Sukhothai	Aug
	Suratthani	Apr
	Ubonratchathani	Jul
Mung bean (*Vigna radiata*)	Chainat	Apr
	Ratchaburi	Jun
Para cress (*Spilanthes panniculata*)	Chanthaburi	Jul
Pepermint (*Mentha cordifolia*)	Bangkok	Feb
Turkey berry (*Solanum torvum*)	Nakhornpathom	Mar
Sweet pepper (*Capsicum annuum*)	Nakhornratchasrima	Sep
Wing bean (*Psophocarpus tetragonolobus*)	Nakhornsawan	Mar
Flower and ornamental plants		
Angel's trumpet *(Brugmansia* x *candida*)	Chiangmai	Aug
Anthrurium(*Anthurium* spp.)	Supanburi	May
	Chiangmai	May
Balloon (*Platycodon grandiflorus*)	Chiangmai	May
gypsophila (*Gypsophila paniculata*)	Chiangmai	May
Crown of the thorns(*Euphorbia millii*)	Bangkok	Mar

Table 4 Distribution of *Tetranychus kanzawai*, listing the host plants where the kanzawai spider mite was found (Continue)

Host	Place collected	Time collected
	Chiangmai	Jul
Dehlia (*Dahlia* spp.)	Chiangmai	Mar
Forget me not (*Cynoglossum Lanceolatum*)	Bangkok	Jul
Gerbera (*Gerbera jamesonii*)	Chiangmai	Mar
Gladiolus (*Gladiolus hybrida*)	Chiangmai	Mar
	Nakhonratchasrima	Jan,Sep
	Chiangrai	Jun
Hydrangea (*Hydrangea macrophylla*)	Chiangmai	Jan,Mar,Aug
Jasmine (*Jasminum sambac*)	Bangkok	Dec
Lily (*Lilium* sp.)	Chiangmai	May
Marigold (*Tagetes erecta*)	Bangkok	Apr,Aug
	Chiangmai	Mar
	Kanchanaburi	Aug
Mussel-shell creeper (*Clitoria ternatea*)	Bangkok	May
Rose (*Rosa* spp.)	Bangkok	Jan-Mar,Jul,Nov
	Chainat	Mar
	Chaiyaphum	Sep
	Chanthaburi	Mar
	Chiangmai	Jan-Mar,Aug-Sep
	Chiangrai	Jan-Feb,Nov
	Chonburi	Nov
	Kanchanaburi	Mar,May,Sep,Dec
	Loei	Sep
	Lumpang	Jan-Feb
	Nakhonratchasrima	Jan,Sep
	Nakonpathom	Jun,Aug-Sep
	Nan	Jan
	Nondhaburi	Feb,May,Aug-Sep,Dec
	Pathumthani	Mar
	Patthalung	Apr
	Phetchabun	Jan
	Phetchaburi	Apr
	Phichit	Jul

Table 4 Distribution of *Tetranychus kanzawai*, listing the host plants where the kanzawai spider mite was found (Continue)

Host	Place collected	Time collected
	Phrae	Oct
	Ratchaburi	Mar
	Songkhla	Apr
	Suratthani	Nov
	Tak	Feb
Tuberose (*Polianthes tuberosa*)	Petchaburi	Jun
	Kanchanaburi	May
Zinnia (*Zinnia violacea*)	Bangkok	Aug
Weeds		
Muktajhuri (*Acalypha indica*)	Kanchanaburi	Aug
Andrographis (*Andrographis paniculata*)	Bangkok	Jul
Broadleaf buttonweed (*Borreria latifolia*)	Rayong	Jul
Giant milk weed (*Calotropis gigantea*)	Nakonpathom	Nov
Poping pod (*Ruellia tuberosa*)	Bangkok	Mar
Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*)	Bangkok	Aug-Sep

ชีววิทยา นิเวศวิทยาและการแพร่กระจายของหอยศัตรูพืชสกุล *Bradybeana*

Biology, Ecology and the Distribution of Pest Snails Genus *Bradybeana*

ดาราพร รินทะรักษ์ **อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข**
ณัฐฐิญา กาญจนนิธิพัฒน์ **ปราสาททอง พรหมเกิด**
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

รายงานความก้าวหน้า

ดำเนินการสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยสกุล *Bradybeana* ในพื้นที่เขาหินปูนและพื้นที่เกษตรกรรมอื่นตามภาคต่างๆของประเทศไทย ตั้งแต่เดือนตุลาคม ปี 2556 – กันยายน ปี 2557 นำมาจำแนกชนิดตามระบบอนุกรมวิธานของหอย ตามเอกสารของ Abbott (1989), Laws (1973), Panha (1996) และ Vaught (1989) พบว่า ตัวอย่างหอยที่เก็บจากแปลงไม้น้ำ จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 13 ตัวอย่างเป็นหอย Asian Tramp Snail, *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) และตัวอย่างหอยจากกำแพงเพชร 8 ตัวอย่าง และตัวอย่างหอยจากเชียงใหม่ 12 ตัวอย่าง จัดเป็นหอยสกุล *Bradybena* ซึ่งต้องตรวจสอบเพื่อระบุชนิดเพิ่มเติม ซึ่งจากการสำรวจยังไม่พบหอยที่อยู่ในสกุลดังกล่าวในพื้นที่ภาคกลาง ตะวันออก ตะวันตก และภาคใต้

จากการศึกษาการผสมพันธุ์การวางไข่และการเจริญเติบโตของหอยสกุล *Bradybeana* ในห้องปฏิบัติการ เบื้องต้นพบว่าหอยสกุล *Bradybena* ไม่ชอบแสง ต้องการความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 60 % ขึ้นไป โดยตัวเต็มวัยแต่ละตัวสามารถสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ได้ทั้งเพศผู้และเพศเมีย มีการแสดงพฤติกรรมก่อนการผสมพันธุ์ คือการใช้หนวดที่อยู่บริเวณส่วนหัวแตะที่คู่ผสมพันธุ์ก่อนขึ้นขี่บนเปลือกของคู่ผสม มีการผสมพันธุ์ข้ามตัวในช่วงเวลากลางคืน หรือในสภาพที่มีความชื้นสูง ซึ่งหอยจะวางไข่เป็นกลุ่ม ๆ เฉลี่ย 8-10 ฟอง โดยวางไข่วันละ 1-2 ฟอง จนครบจำนวน ใต้รอยแยกของดินที่ชื้น โดยไม่มีวุ้นใสปกคลุมกลุ่มไข่ ไข่หอยที่เกิดใหม่มีรูปร่างรีๆ ค่อนข้างใส เรียกว่า gelatinous egg การศึกษาดังกล่าวยังไม่เสร็จสิ้น ต้องทำการศึกษาการฟักจากไข่ วงจรชีวิตและการเจริญเติบโตของหอยสกุล *Bradybeana* ในห้องปฏิบัติการต่อไป

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-43-57

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีลักษณะทางภูมิประเทศ และภูมิอากาศที่อุดมสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งผลิตกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญ มีการส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกเป็นอันดับ 1 ของโลก มูลค่าการส่งออกกล้วยไม้ในปัจจุบันไม่ต่ำกว่า 3,000 ล้านบาท เพื่อเป็นการสนับสนุนเกษตรกรผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้เพื่อการส่งออกให้**ปลอดศัตรูพืช** และเพื่อแก้ปัญหาอุปสรรคในการส่งออก กรมวิชาการเกษตรได้มีการวิจัยด้านศัตรูพืชกักกันทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว แมลงและสัตว์ที่มีรายงานว่าสามารถเข้าทำลายกล้วยไม้ มีหลายชนิด ได้แก่ เพลี้ยไฟ บั่วกล้วยไม้ หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก หอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่ง หอยเจดีย์เล็กและหอยเจดีย์ใหญ่ เป็นต้น

หอยทาก หลายชนิดที่มีรายงานว่าเป็นเป็นศัตรูพืชในประเทศไทย เช่นหอยทากยักษ์อาฟริกา, *Achatina fulica*, หอยดักดาน, *Cryptozona siamensis*, หอยทากสาลิกา, *Sarika* sp. หอยเจดีย์ใหญ่, *Prosopea walkeri* (Benson) หอยเจดีย์เล็ก, *Lamellaxis gracilis* , หอยอำพันหรือหอยเล็บ, *Succinea* sp. และหอยเลขหนึ่ง, *Ovachlamys fulgens* (Gude) เป็นต้น และชนิดที่จัดเป็นศัตรูในสวนกล้วยไม้ และก่อให้เกิดปัญหาการส่งออกของประเทศ ได้แก่ หอยอำพัน และหอยเลขหนึ่ง

นอกจากนี้ ในพืชเศรษฐกิจ หลายชนิด อาทิเช่น พืชในกลุ่มไม้น้ำ เริ่มมีรายงานการพบการระบาดของแมลง และหอยทากศัตรูพืช โดยในปี 2553 มีรายงานการพบหอย *Bradybeana* spp. ระบาดในแหล่งเพาะไม้น้ำเพื่อการส่งออก ในเขตจังหวัดนครราชสีมา ซึ่งหอยทากชนิดดังกล่าว เคยมีการพบในสวนผลไม้และไม้ดอกไม้ประดับหลายชนิด ทางภาคเหนือของประเทศไทย

ดังนั้น เพื่อการเฝ้าระวังและเพื่อการควบคุมไม่ให้หอยทากชนิดดังกล่าวเกิดการระบาดรุนแรง สร้างความเสียหายแก่พืชชนิดอื่นๆ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องเร่งทำการศึกษาให้รู้ถึงข้อมูลพื้นฐานต่างๆของหอยทาก เช่น ข้อมูลทางด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา รวมไปถึงสำรวจการแพร่กระจายในสภาพพื้นที่ต่างๆ เพื่อประโยชน์ในการเป็นฐานข้อมูล แหล่งสืบค้นและเป็นแนวทางในการนำไปใช้วางแผนการจัดการหอยทากศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำไปจัดทำคู่มือถ่ายทอดให้แก่เกษตรกรและผู้สนใจต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล่องพลาสติกขนาดต่างๆ /กระดาษเอนกประสงค์ /ไฟฉายและแบตเตอรี่ สำหรับเก็บตัวอย่างหอย อาหารชนิดเม็ด และผักสด สำหรับเลี้ยงหอย
- เครื่องมือวัดขนาดเปลือกหอย ได้แก่ เวอร์เนียร์
- เครื่องมือวัดอุณหภูมิและค่า pH ของน้ำ
- เครื่องวัดพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) และเครื่องวัดอุณหภูมิและค่า pH ของดิน

วิธีการ

1. สำรวจ เก็บตัวอย่าง และจัดทำแผนที่การกระจายพันธุ์หอยศัตรูพืชสกุล *Bradybaena*

โดยสำรวจทุกๆ 2 เดือน ตามพื้นที่ๆกำหนด เช่น ในพื้นที่ป่า พื้นที่เกษตรกรรม ตามภาคต่างๆของประเทศไทย บันทึกข้อมูลของสถานที่เก็บตัวอย่าง และบันทึกพิกัดด้วย GPS เพื่อจัดทำแผนที่การกระจายพันธุ์ของหอยสกุล *Bradybaena* ด้วยโปรแกรม ArcView หรือ ArcGis นำตัวอย่างมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 25x40x26 เซนติเมตร รองพื้นตู้กระจก ด้วยดินผสมขุยมะพร้าว (อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อฆ่าปรสิตบางชนิด) อัตราส่วน 1:1 ให้สูงจากพื้นตู้กระจกประมาณ 5 เซนติเมตร ในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร และให้ความชื้นโดยฉีดพ่นน้ำ วันละ 1 ครั้ง

2. ตรวจสอบชนิดและสัณฐานวิทยาเปลือกของหอยศัตรูพืชสกุล *Bradybaena*

2.1 นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์ชื่อตามระบบอนุกรมวิธานของหอย เปรียบเทียบกับเอกสารหอยทากทั้งในและต่างประเทศ ตามวิธีการของ Abbott (1989), Laws (1973), Panha (1996) และ Vaught (1989)

2.2 ศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือก โดยการวัดค่า shell length, shell width, last whorl height, aperture length และ aperture width ด้วยเวอร์เนีย จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้ ANOVA และถ่ายภาพและวาดภาพในห้องปฏิบัติการ

3. ศึกษาการผสมพันธุ์และการวางไข่ของหอยศัตรูพืชสกุล *Bradybaena*

3.1 ศึกษาพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของหอยศัตรูพืชสกุล *Bradybaena* โดยสุ่มเลือกหอยตัวเต็มวัย ซึ่งเป็นเพศรวม (hermaphrodite) มาเลี้ยงในกล่องพลาสติก ขนาด 15.5x22x7 เซนติเมตร จำนวน10 ตัว/ กล่อง จำนวน 5 กล่อง ให้อาหารปลาสำเร็จรูปและผักสดเป็นอาหาร และฉีดพ่นน้ำเพื่อให้ความชื้น สังเกตพฤติกรรมการเลือกคู่ก่อนการผสมพันธุ์และพฤติกรรมอื่นๆ ที่สังเกตได้ บันทึกบันทึกขนาด อายุ และลักษณะของหอยที่เริ่มจับคู่ผสมพันธุ์

3.2 ศึกษาการวางไข่ของหอยศัตรูพืชสกุล *Bradybaena* โดยเลือกหอยที่ผสมพันธุ์แล้ว (มีการ copulation) จากข้อ 3.1 มาแยกเลี้ยงในกล่องพลาสติก ขนาด 6.5x9.5x2 เซนติเมตร 1 ตัว/ กล่อง จำนวน 30 กล่อง โดยให้อาหารปลาสำเร็จรูปและผักสดเป็นอาหาร และฉีดพ่นน้ำเพื่อให้ความชื้น สังเกตและบันทึกผลการทดลองทุกวัน จนหอยวางไข่ วัดขนาดไข่ ขนาดของกลุ่มไข่ บันทึกจำนวน และลักษณะของไข่หอย พร้อมถ่ายภาพไข่หอยภายใต้กล้อง stereo microscope

3.3 ศึกษาระยะเวลาการฟักจากไข่ (eclosion time) ของหอยศัตรูพืชสกุล *Bradybaena* โดยแยกไข่หอยแต่ละกลุ่มมาศึกษาในกล่องพลาสติก ขนาด 6.5 x 9.5 x 2 เซนติเมตร ที่รองด้วยดินผสมขุยมะพร้าว (อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อฆ่าปรสิตบางชนิด) อัตรา 1:1 หนา 2 เซนติเมตร ฉีดพ่นน้ำ เพื่อให้ความชื้น บันทึกระยะเวลาที่ลูกหอยฟักออกจากไข่ วัดขนาดและชั่งน้ำหนักลูกหอยและถ่ายภาพภายใต้กล้อง stereo microscope

3.4 ศึกษาการเจริญเติบโต โดยแยกลูกหอยมาเลี้ยงในกล่องพลาสติก ขนาด 6.5 x 9.5 x 2 เซนติเมตร 1ตัว/ กล่อง จำนวน 30 กล่อง โดยให้อาหารปลาสำเร็จรูปและผักสดเป็นอาหาร และฉีดพ่นน้ำเพื่อให้ความชื้น บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดและชั่งน้ำหนักลูกหอย เพื่อจัดทำกราฟการเจริญเติบโต

4. การศึกษาวงจรชีวิต (life cycle) ของหอยศัตรูพืชสกุล *Bradybaena*

ศึกษาวงจรชีวิต หอยสกุล *Bradybaena* ที่เลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาด 15.5x22x7 เซนติเมตร และ ขนาด 6.5 x 9.5 x 2 เซนติเมตร รองด้วยดินผสมขุยมะพร้าว (อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อฆ่าปรสิตบางชนิด) อัตรา 1:1 หนา 2 เซนติเมตร ตามขั้นตอนต่างๆที่กล่าวมาโดยแต่ละขั้นตอน ปฏิบัติดังนี้

- บันทึกวันที่เริ่มต้น เห็นระยะไข่ครั้งแรก (F1)
- เก็บกลุ่มไข่หอยรุ่น F1 มาแยกเลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาด 15.5 x 22 x 7 เซนติเมตร
- บันทึกวัน ที่ลูกหอยรุ่น F1 ฟักออกมาจากไข่ วัดขนาดลูกหอย
- เมื่อเริ่มสังเกตเห็นหอยเริ่มจับคู่ผสมพันธุ์ บันทึกอายุและวัดขนาดตัวเต็มวัย (รุ่นF1)
- บันทึกวัน ที่เริ่มเห็นกลุ่มไข่ รอบใหม่ (รุ่น F2) จากตัวเต็มวัย (รุ่นF1)
- บันทึกอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ ในตู้กระจกเลี้ยงหอย เป็นช่วงๆ ตลอดการทดลอง

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม พ.ศ. 2556 – กันยายน พ.ศ. 2557 (รวม 1 ปี)

สถานที่ : พื้นที่เกษตรกรรมและพื้นที่ป่า ตามภาคต่างๆของประเทศไทย

: ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ดำเนินการสำรวจหอยสกุล *Bradybeana* ในพื้นที่ภาคต่างๆดังนี้

ภาคเหนือ ได้แก่ สวนส้ม อำเภอโกสัมพี และพรานกระต่าย จังหวัดกำแพงเพชร ได้ตัวอย่างหอยจำนวน 8 ตัวอย่าง และจากแปลงปลูกกะหล่ำปลี จังหวัดเชียงใหม่ ได้ตัวอย่างหอย จำนวน 12 ตัวอย่าง

ภาคกลางและตะวันตก ได้แก่ สวนกล้วยไม้จังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี ยังไม่พบหอยที่อยู่ในสกุลดังกล่าว

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา และขอนแก่น ได้ตัวอย่างหอยทาก จำนวน 13 ตัวอย่าง ในแปลงไม้น้ำ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

ภาคตะวันออก ได้แก่ สวนผลไม้จังหวัดจันทบุรี ระยอง และตราด ได้ตัวอย่างหอย จำนวน 18 ตัวอย่าง ขณะนี้กำลังตรวจสอบชนิดตามระบบอนุกรมวิธานในห้องปฏิบัติการ

ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดชุมพรและสุราษฎร์ธานี ได้ตัวอย่างหอยจากสวนผลไม้ จำนวน 48 ตัวอย่าง จากการจำแนกชนิดพบว่าเป็นหอยศัตรูพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Cryptozona* spp., *Parmarion* spp. และ *Sarika* spp. และพบหอยตัวห้ำ 1 ชนิด คือ *Discartemon* spp. โดยไม่พบหอยสกุล *Bradybeana*

ได้ตรวจสอบชนิดของตัวอย่างหอย ตามระบบอนุกรมวิธานในห้องปฏิบัติการ พบว่า ตัวอย่างหอยที่เก็บจากแปลงไม้น้ำ จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 13 ตัวอย่างเป็นหอย Asian Tramp Snail, *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) และตัวอย่างหอยจากกำแพงเพชร 8 ตัวอย่าง และตัวอย่างหอยจากเชียงใหม่ 12 ตัวอย่าง จัดเป็นหอยสกุล *Bradybena* ซึ่งต้องตรวจสอบเพื่อระบุชนิดเพิ่มเติม ซึ่งจากการสำรวจยังไม่พบหอยที่อยู่ในสกุลดังกล่าวในพื้นที่ภาคกลาง ตะวันออก ตะวันตก และภาคใต้

การศึกษาการผสมพันธุ์ การวางไข่และการเจริญเติบโตของหอยสกุล *Bradybeana* ในห้องปฏิบัติการจากการสังเกตเบื้องต้น พบว่าหอยสกุล *Bradybena* ไม่ชอบแสง และต้องการความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 60 % ขึ้นไป ตัวเต็มวัยแต่ละตัวสามารถสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ได้ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งเป็นลักษณะทั่วไปของหอยในอันดับ Stylommatophora มีการแสดงพฤติกรรมก่อนการผสมพันธุ์ คือการใช้อวัยวะส่วนหัวแตะที่คู่ผสมพันธุ์ก่อนขึ้นขี่บนเปลือกของคู่ผสม ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถพบได้ในกลุ่มหอยซัคซิเนีย (amber snail, *Succinea* sp.) และหอยเชอรี่ (golden apple snail, *Pomacea canaliculata*) ได้เช่นกัน หอยสกุล *Bradybena* มีการผสมพันธุ์ข้ามตัวในช่วงเวลากลางคืน หรือในสภาพที่มีความชื้นสูง ซึ่งหอยจะวางไข่เป็นกลุ่ม ๆ เฉลี่ย 8-10 ฟอง โดยหอยจะวางไข่วันละ 1-2 ฟอง จนครบจำนวน ใต้รอยแยกของดินที่มีความชุ่มชื้น โดยไม่มีวุ้นใสปกคลุมกลุ่มไข่ ไข่หอยที่เกิดใหม่มีรูปร่างรีๆ ค่อนข้างใส เรียกว่า gelatinous egg จากนั้นเปลือกไข่มีการเปลี่ยนแปลงจากใสเป็นสีขาวขุ่นขึ้น ซึ่ง การเปลี่ยนแปลงดังกล่าว เนื่องจากเปลือกไข่มีการพัฒนาโดยดึงแคลเซียมจากสภาพแวดล้อมมาเป็นองค์ประกอบ การศึกษาดังกล่าวยังไม่เสร็จสิ้น ต้องทำการศึกษาการฟักจากไข่และการเจริญเติบโตของหอยสกุล *Bradybeana* ในห้องปฏิบัติการต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การทราบข้อมูลพื้นฐาน เช่น ชีววิทยา นิเวศวิทยา เขตการแพร่กระจาย การระบาดของหอยศัตรูพืช และความเสียหายของพืช เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้วางแผนการควบคุมหอยศัตรูพืชโดยไม่ใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช หรือลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช เพื่อความปลอดภัยต่อศัตรูธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังมีตัวอย่างหอยศัตรูพืชสกุล *Bradybaena* ที่วิเคราะห์ชนิดแล้ว เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์เพื่อเป็นแหล่งค้นคว้าอ้างอิง และสามารถจัดทำเป็นคู่มือ เพื่อการถ่ายทอดแก่เกษตรกรและผู้สนใจ ต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนางสาวฤทัย นรินทร นักวิทยาศาสตร์ และนางทัศวรรณ พุ่มกาหลง นักวิชาการเกษตร กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ที่ช่วยปฏิบัติงานภาคสนามและช่วยดูแลให้อาหารหอยทดลองในโรงเรือน และบันทึกข้อมูลที่จำเป็นตลอดการทดลอง จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

ชมพูนุท จรรยาเพศ ปราสาททอง พรหมเกิด ปิยาณี หนูกาศ และดาราพร รินทะรักษ์. 2550. ความหลากชนิดของหอยทากและทากในแหล่งสงวนชีวมณฑลสะแกราช. การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 8 : อารักขาพืชใต้ร่มพระบารมี. หน้า 60-72.

Abbott, R.T. 1989. Compendium of landshell. Melbourne,Australia : American Malacologist,Inc.

Burch, J.B. 1962. How to know the eastern land snails. Wm. C. Brown Co., Publishers, Dubuque, Iowa. 214 pp.

Chiu, S.C. and Ken, C.C. 1962. Observations on the biology of the carnivorous snail, *Euglandina rosea* Ferussac. Bulletin Institute of zoology, Academia Sinica 1:17-24.

Dundee, D.S. and Baerwald, R.J. 1984. Observations on a micropredator *Gulella bicolor* (Hutton) (gastropoda: pulmonata: streptaxidae). Nautilus 98: 63-68.

Elger, A. and Barrat-Segretain, M. H. 2002. Use of the Pond Snail *Lymnaea stagnalis* (L.) in laboratory experiments for evaluating Macrophyte palatability. Archiv Fur Hydrobiologie 153(4): 669-683.

Fisher, T.W., Orth, R.E and Swanson, S.C. 1980. Snail against snail. California Agri. (Nov.-Dec.): 3 pp.

Laws, H.M. 1973. The chromosome of some Australian camaenid land snails. Cytologia. 38 : p.229-235.

Panha, S. 1996. A Checklist and classification of the terrestrial Pulmonate snails of Thailand. Walkerana. 8 (19): 11-64.

Mead AR. 1961. The Giant African Snail; a Problem in Economic Malacology. University of Chicago Press, 257 pp.

Vaught, K.C. 1989. A classification of the living mollusca. U.S.A.: American malacologists.

ภาคผนวก

A.

B.

C.

Figure 1: *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) Asian Tramp Snail Sampling Area: Aquatic plant plantation, Pak Chong, Nakornsatchasima (A - C)

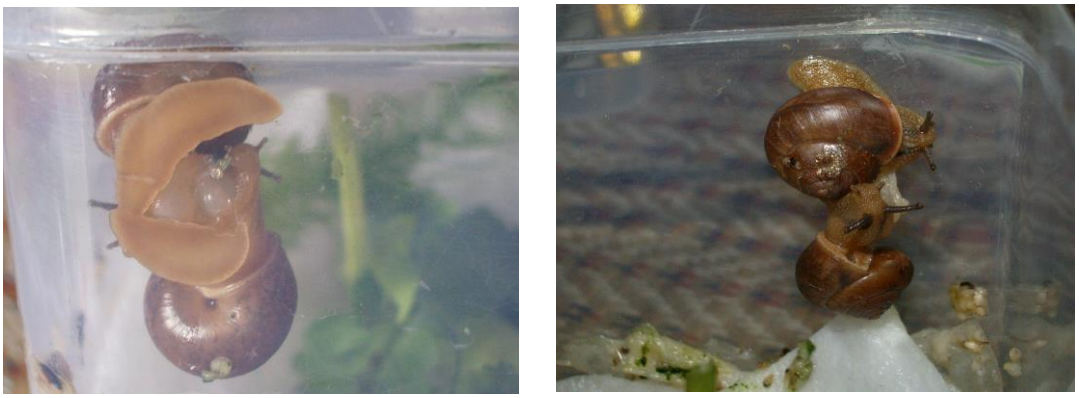


Figure 2: Mating behavior of Asian tramp snail, *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821)

การจำแนกชนิดของราสกุล *Botryosphaeria* สาเหตุโรคพืช โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม

Identification of *Botryosphaeria* Plant Pathogenic Fungi Using Morphological and Molecular Characteristics

พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ ชนินทร ดวงสอาด
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ผลการรวบรวมและเก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Botryosphaeria* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 82 ตัวอย่าง จากพืชทั้งหมด 7 ชนิด จากจังหวัดกำแพงเพชร กรุงเทพฯ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา เชียงใหม่ ชลบุรี นครปฐม นครราชสีมา เพชรบุรี ปทุมธานี ประจวบคีรีขันธ์ ระยอง ราชบุรี สกลนคร สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม สุโขทัย และ สุพรรณบุรี ผลจากการศึกษาแยกราได้ทั้งหมดจำนวน 73 ไอโซเลท จำแนกชนิดเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกได้ราทั้งหมด 5 genera 5 species ได้แก่ *Lasiodiplodia theobromae, Lasiodiplodia pseudotheobromae, Dothiorella mangiferae, Fusicoccum* และ *Neocystalidium dimidiatum* จัดเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืชที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม ของรา *Botryosphaeria* ทั้งหมด 37 ไอโซเลท ได้แก่ ราที่แยกได้จาก โรคเปลือกแตกยางไหลของมะเม่า 2 ไอโซเลท โรคลำต้นจุดแก้วมังกร 15 ไอโซเลท จากโรคผลเน่ากล้วยหอม 5 โซเลท จากลำต้นองุ่น 5 ไอโซเลท ผลเน่าของมะม่วง 7 ไอโซเลท และ ลำต้นยางไหลมะม่วง 3 ไอโซเลท พบว่า ลำดับเบสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง ITS ซึ่งรวมบางส่วนของยีน 18S และ 28S บน rDNA มีขนาดทั้งหมด 541 คู่เบส จากการวิเคราะห์จำแนกชนิดได้เป็นดังนี้ ราที่แยกได้จากโรคเปลือกแตกยางไหลของมะเม่า จำแนกชนิดได้เป็นรา *L. pseudotheobromae* โรคลำต้นจุดของแก้วมังกร จำนวน 15 ไอโซเลท จำแนกชนิดได้เป็นรา *Neocystalidium dimidiatum* จากกล้วยหอม 5 โซเลท จากลำต้นองุ่น 5 ไอโซเลท ผลเน่าของมะม่วง จำนวน 7 ไอโซเลท และ ลำต้นยางไหลมะม่วง จำนวน 3 ไอโซเลท จำแนกชนิดได้เป็นรา *L. theobromae*

คำสำคัญ: การจำแนกชนิด *Botryosphaeria* ราสาเหตุโรคพืช ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางพันธุกรรม

Key words: Identification, *Botryosphaeria*, Plant pathogenic fungi, Morphological Characteristics, Molecular Characteristics

---

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-02-04-54

คำนำ

ราสกุล *Botryosphaeria* Ces. And De Npt พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไป มักพบเป็นสาเหตุโรคแคงเคอร์ของพืชที่เป็นไม้เนื้อแข็ง ราเข้าทำลายพืชทางแผลจากการตัดแต่งกิ่งและทางเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย แต่ราก็สามารถเข้าทำลายพืชโดยตรงทางกลุ่มเซลล์ของพืชและพักตัวอยู่ที่ส่วนของตา บางครั้งมักพบว่ารามีลักษณะเป็นเอ็นโดไฟท์โดยไม่แสดงอาการบนเนื้อเยื่อพืช (Smith *et al.,* 1996) รากลุ่มนี้ก่อให้เกิดโรคพืชที่สำคัญของพืชหลายชนิด ได้แก่ พืชวงศ์แอปเปิ้ล ไม้ผลชนิดเมล็ดแข็งสาเหตุโรคผลสาเหตุโรคผลเน่า ใบจุดตากบ โรคแคงเคอร์บนลำต้นและกิ่ง เปลือกแตกยางไหล ยืนต้นตาย และบางชนิดทำให้ต้นไม้ตาย (Weaver, 1974; Brown and Britton, 1986; Britton *et al*., 1990; Pusey, 1993; Parker and Sutton, 1993)

ในด้านการจำแนกชนิดของรากลุ่มนี้ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Botryosphaeria* ซึ่งเป็นระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศ (teleomorphic stage) นั้นจะแตกต่างกันเล็กน้อยในแต่ละ species แต่ลักษณะทางสัณฐานของราในระยะสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (anamorphic stage) จะมีความแตกต่างกันมาก รา *Botryosphaeria* มีระยะสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ ประมาณ 18 ชนิด จัดอยู่ใน Class Coelomycetes ได้แก่ *Botryodiplodia* (Sacc.) Sacc., *Diplodia* Fr., *Dothiorella* Sacc., *Fusicoccum* Corda, *Lasiodiplodia* Ellis & Everh., *Macrophomina* (Sacc.) Berl. & Voglino และ *Sphaeropsis* Sacc. ลักษณะของราในกลุ่มนี้จะแตกต่างกันแต่ลักษณะบางชนิดก็จะมีลักษณะคล้ายคลึงและใกล้เคียงกันมากเมื่อตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ในปัจจุบันนี้มีการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อมาใช้ในการจำแนกชนิด ซึ่งก็ทำให้การจำแนกชนิดของรามีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น

งานวิจัยนี้ครอบคลุมวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อการจำแนกชนิดของรา *Botryosphaeria* โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อและศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของรา โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ในการแบ่งแยกในระดับ genus และ species

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ กระดาษ ถุงพลาสติค ปากกาเคมี ดินสอ กรรไกรตัดกิ่ง และ GPS
2. อุปกรณ์จัดเก็บตัวอย่างแห้ง ได้แก่ แผ่นไม้อัดทับตัวอย่าง กระดาษ
3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ slide cover slip ปากคีบ เข็มเขี่ยปลายแหลม ใบมีดโกน ตะเกียง ยาทาเล็บ
4. สารเคมีสำหรับ mount slide ได้แก่ lactophenol, lactic acid, shear's sulution
5. สารเคมี ได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ : สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75%

6. อาหารวุ้นสังเคราะห์ corn meal agar (CMA), potato dextrose agar (PDA)

7. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดดูแรน บีกเกอร์ เป็นต้น

8. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว เป็นต้น

9. กล้องจุลทรรศน์ compound microscope และ stereo microscope พร้อมกล้องถ่ายรูปและ camera lucida สำหรับวาดภาพราจากกล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Botryosphaeria*

เก็บตัวอย่างโรคพืชจากส่วนของใบ ดอก ผล กิ่ง ลำต้น และรากของพืช จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ บันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ และลักษณะอาการของโรค ห่อตัวอย่างพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก บรรจุห่อตัวอย่างลงในกล่องเก็บความเย็น เพื่อนำมาทำศึกษาชนิดและแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ และจัดเก็บตัวอย่างแห้งของพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การศึกษารา *Botryosphaeria* จากส่วนที่เป็นโรค

2.1 การศึกษาราจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง (Direct observation)

ศึกษาลักษณะอาการของราสาเหตุโรคและสังเกตลักษณะของโครงสร้างที่ให้กำเนิดสปอร์ของราที่เกิดบนใบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo บันทึกลักษณะต่างๆ ใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยส่วนของรา ได้แก่ สปอร์ หรือส่วนขยายพันธุ์ของรา มาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บางๆ หยดน้ำหรือสีย้อม และปิดทับด้วยแผ่น cover slip และตรวจดูลักษณะต่างๆ ของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound

ถ้าไม่พบสปอร์ของราบนชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคหลังจากตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และเมื่อเขี่ยเชื้อดูแล้ว ไม่พบราบนชิ้นส่วนพืชให้ทำ moist chamber โดยนำตัวอย่างพืชมาบ่มไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว วางชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคไว้บนกระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วและหยดน้ำนึ่งที่ฆ่าเชื้อแล้วบนกระดาษกรองเพื่อให้ความชื้น บ่มไว้อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 3-7 วัน ใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยราที่เจริญอยู่บนชิ้นส่วนพืชมาตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound บันทึกลักษณะต่างๆ วัดขนาดส่วนต่างๆ ของราและถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์

2.2 การศึกษาเชื้อสาเหตุโดยวิธีแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค (Tissue transplanting)

ตัดตัวอย่างพืชที่เป็นโรคบริเวณที่เป็นรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติขนาดประมาณ 2x2 มิลลิเมตร ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวพืช โดยแช่ชิ้นส่วนพืชลงในสารละลายคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้งสนิท นำชิ้นส่วนพืชมาวางบนอาหาร half strength Potato Dextrose Agar (1/2 PDA) และ Malt Extract Agar (MEA) ต้องทำภายใต้ aseptic condition บ่มไว้ในอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 1-3 วัน ตรวจดูเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo ตัดปลายเส้นใย (hyphal tip) ของราที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วน

พืช วางลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ จนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปศึกษารายละเอียดของราเพื่อการจำแนกชนิดของราต่อไป เก็บรักษาสายพันธุ์ราไว้ในอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

2.3 ศึกษาลักษณะของเชื้อบนอาหารชนิดต่างๆ

นำรา *Botryosphaeria* ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar, Oat meal agar หรือ water agar โดยบันทึกลักษณะต่างๆ ดังต่อไปนี้

บันทึกอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารชนิดต่างๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกสีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment)

3. การจำแนกชนิดรา *Botryosphaeria*

- ศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อรา โดยการ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution
- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscope)

4. เก็บรักษาสายพันธุ์ราและตัวอย่างแห้ง

เก็บรักษาราที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

5. การพิสูจน์การเกิดโรค

ทำการพิสูจน์การเกิดโรค โดยทำการปลูกเชื้อส่วนของพืช โดยทำแผลและไม่ทำแผลอย่างละ 10 ซ้ำ เปรียบเทียบกับการเกิดโรคบนส่วนที่ไม่ปลูกเชื้อด้วยวิธีเดียวกัน แยกเชื้อสาเหตุจากต้นที่แสดงอาการโรค เปรียบเทียบชนิดของราสาเหตุโรคใช้ในการปลูกเชื้อ

6. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของรา *Botryosphaeria*

6.1 การเตรียมรา *Botryosphaeria*

เลี้ยงรา *Botryosphaeria* บนอาหาร MEA (Malt extract agar) นาน 7-10 วัน หลังจากนั้นใช้เข็มเขี่ยเอาเส้นใยของรามาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB (Potato dextrose broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน flask 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 7 วัน หลังจากนั้นนำราในอาหารเหลวมากรองด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ และทำให้แห้งด้วยการดูดอากาศออกด้วยเครื่องดูดสัญญากาศ เก็บเส้นใยราที่แห้งด้วยหลอดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาสกัด DNA

6.2 การสกัด DNA จากรา

นำรา *Botryosphaeria* อย่างน้อย 5 genera 5 species อย่างละ 4 isolates ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาสกัด DNA โดยใช้วิธีของ Crous (Crous *et al.*, 2000)

6.3 การเพิ่มปริมาณยีน Internal Transcribed Spacer โดยใช้เทคนิค PCR

นำ DNA ของราที่แยกได้ในข้อ 13.2.3 มาทำ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS1 (5'TTTCCGTAGGTGAACCTGC3') และ ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC)

- สังเคราะห์คู่ primer ITS1 และ ITS4 เพื่อทำการเพิ่มปริมาณของ rDNA ในช่วง ITS1-5.8S rDNA-ITS2-26SrDNA

- นำ DNA ของราทั้งหมดในข้อ 13.2.3 มาเพิ่มปริมาณของ rDNA ในช่วง ITS1-5.8S rDNA-ITS2-26SrDNA โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ITS1 และ ITS4 ด้วยวิธี PCR ประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

10X PCR buffer	6 ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	3 ไมโครลิตร
10 mM dNTP	1 ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS1 (50 พิโคโมล / ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS4 (50 พิโคโมล / ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
Taq DNA Polymerase (5 ยูนิต / ไมโครลิตร)	0.25 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	28.75 ไมโครลิตร
สารละลาย DNA (50 นาโนกรัม / ไมโครลิตร)	10 ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	50 ไมโครลิตร

- ส่วนของ β-tubulin นั้นเพิ่มปริมาณโดยใช้คู่ไพร์เมอร์ Bt2a และ Bt2b

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA โดยมีรอบการทำปฏิกิริยา (Slippers *et al.*, 2004) ดังนี้

94 องศาเซลเซียส	5 นาที		1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	1 นาที	50 วินาที	30 รอบ
52 องศาเซลเซียส	2 นาที		
72 องศาเซลเซียส	1 นาที		
72 องศาเซลเซียส	5 นาที		1 รอบ
4 องศาเซลเซียส	hold		

6.4 การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน ITS1-5.8SrDNA-ITS2-26SrDNA

นำผลผลิตที่ได้จากข้อ 13.2.3 มาตรวจวิเคราะห์ผลด้วย electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 0.5XTBE buffer โดยตัดแถบ DNA ที่เป็นยีนเป้าหมาย ภายใต้ UV transilluminator โดยใช้วิธีของ Slippers และคณะ (2004)

6.5 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาศึกษาทั้งหมด

การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาศึกษาทั้งหมดไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ในช่วงลำดับเบส 15 ITS rDNA และ 15 β-tubulin ซึ่งเป็นราในกลุ่ม *Botryosphaeria* โดยนำมาเปรียบเทียบวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการวิวัฒนาการด้วย PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) version 4.0b8 โดย Swofford (Swofford, 2000)

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2553 – สิ้นสุด กันยายน 2558

สถานที่ - แหล่งพืชธรรมชาติ

- แปลงปลูกพืชของเกษตรกร

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Botryosphaeria*

ผลการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Botryosphaeria* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 82 ตัวอย่าง จากพืชทั้งหมด 12 ชนิด จากจังหวัดกำแพงเพชร กรุงเทพฯ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา เชียงใหม่ ชลบุรี นครปฐม นครราชสีมา เพชรบุรี ปทุมธานี ประจวบคีรีขันธ์ ระยอง ราชบุรี สกลนคร สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม และ สุโขทัย (Table 1) ตัวอย่างโรคพืชที่รวบรวมได้ทั้งหมดนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยการศึกษาราจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง การทำ moist chamber

และโดยวิธีการแยกราจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค

2. การศึกษารา *Botryosphaeria* จากส่วนที่เป็นโรค และการจำแนกชนิด

ผลจากการศึกษาแยกราได้ทั้งหมด 73 ไอโซเลท และจำแนกชนิดเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกได้รา *Lasiodiplodia theobromae* จากโรคเปลือกแตกยางไหลของมะม่วง (2 ไอโซเลท) จากโรคผลเน่าของมะม่วง (6 ไอโซเลท) จากมังคุด (2 ไอโซเลท) จากสน (1 ไอโซเลท) จากกล้วยน้ำว้า (4 ไอโซเลท) จากกล้วยหอม (12 ไอโซเลท) องุ่น (2 ไอโซเลท) *L. pseudotheobromae* จากมะเม่า (2 ไอโซเลท) *Neocystalidium dimidiatum* จากกิ่งแก้วมังกร (15 ไอโซเลท) และผลแก้วมังกร (5 ไอโซเลท) *Dothiorella mangiferae* จาก มะม่วง (1 ไอโซเลท) และ *Fusicoccum* จากผลเน่ามะม่วง (1 ไอโซเลท) และ (Table 2) แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการจำแนกชนิดของเชื้อในระดับ species และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อต่อไป และตัวอย่างแห้งโรคพืชเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์โรคพืชที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ

3. การศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา

จากการศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของราทั้ง 3 ชนิด คือ รา *Lasiodiplodia pseudotheobromae, L. theobromae* และ *Fusicocum* พบว่ารา *L. pseudotheobromae* และรา *L. theobromae* เจริญได้ดีบนอาหาร Oat Meal Agar รองลงมาได้แก่ Potato Dextrose Agar และ Malt Extract Agar รา *Fusicoccum* เจริญได้ดีบนอาหาร Malt Extract Agar รองลงมาได้แก่ Potato Dextrose Agar และ Oat Meal Agar Agar (Table 3)

4. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของรา *Botryosphaeria*

การสกัด ดีเอ็นเอ ของรา *Botryosphaeria* ทั้งหมด ไอโซเลท ได้แก่ ราที่แยกได้จากโรคลำต้นจุดแก้วมังกร จำนวน 15 ไอโซเลท จากกล้วยหอม 5 โซเลท จากลำต้นองุ่น 5 ไอโซเลท ผลเน่าของมะม่วง จำนวน 7 ไอโซเลท และ ลำต้นยางไหลมะม่วง จำนวน 3 ไอโซเลท รวมทั้งหมด 35 ไอโซเลท โดยวิธีของ Doyle and Doyle (1987) และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธีการ agarose gel electrophoresis พบว่าทุกโซเลทปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจน โดยเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของรา *Botryosphaeria* ที่แยกได้ทั้งหมด 35 ไอโซเลท พบว่าลำดับเบสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง ITS ซึ่งรวมบางส่วนของยีน 18S และ 28S บน rDNA มีขนาดทั้งหมด 541 คู่เบส จากการวิเคราะห์จำแนกชนิดได้เป็นดังนี้

ราที่แยกได้จากโรคลำต้นจุดของแก้วมังกร จำนวน 15 ไอโซเลท จำแนกชนิดได้เป็นรา *Neocystalidium dimidiatum* จากกล้วยหอม 5 โซเลท จากลำต้นองุ่น 5 ไอโซเลท ผลเน่าของมะม่วง จำนวน 7 ไอโซเลท และ ลำต้นยางไหลมะม่วง จำนวน 3 ไอโซเลท จำแนกชนิดได้เป็นรา *L. theobromae*

การศึกษาและจำแนกชนิดสาเหตุของโรคโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม

จากการตรวจเชื้อตัวอย่างโรคเปลือกแตกยางไหล ผลของการจำแนกชนิดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา จำแนกได้เชื้อ ดังนี้

สาเหตุ *Lasiodiplodia pseudotheobromae* A.J.L. Phillips, A.Alves & Crous

ลักษณะของรา มีรายละเอียดดังนี้

Lasiodiplodia pseudotheobromae

ลักษณะอาการ โคนต้นมีน้ำยางสีน้ำตาลไหลออกมา บริเวณกิ่งก้าน และ ลำต้นมียางไหลออกมา เริ่มแรกจะเป็นแผลสีดำเป็นรอยช้ำและขยายขึ้น จากนั้นเปลือกจะปริแตกออก ทำให้กิ่งแห้งตาย เมื่อแกะเปลือกบริเวณยางไหลจะมีลักษณะเป็นแอ่งบุ๋ม

โคโลนีบนอาหาร PDA สีเทาดำ เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.5 เซ็นติเมตร อายุ 21 วัน สร้างกลุ่มเส้นใยหนาหนาแน่น เจริญช้า รา *L. pseudotheobromae* และรา *L. theobromae* เจริญได้ดีบนอาหาร Oat Meal Agar รองลงมาได้แก่ Potato Dextrose Agar และ Malt Extract Agar

Pynidium สีน้ำตาลดำ เกิดอยู่ในเนื้อเยื่อพืช และเมื่อแก่ pynidium จะแตกออกมามีลักษณะปากเปิด

Paraphyses ใส รูปร่างคล้ายทรงกระบอก ส่วนใหญ่ไม่มีผนังกั้นเซลล์ บางครั้งมีการแตกกิ่งตรงส่วนปลายกลม ขนาดกว้าง 45-55 ไมครอน ยาว 3-5 ไมครอน paraphysis เกิดอยู่ระหว่าง conidiogenous cells

Conidiogenous cell ใส ผนังเรียบ รูปร่างทรงกระบอก ตรงส่วนฐานกว้างเล็กน้อย

Conidia ใส รูปร่างรีตรงกลางกว้าง ส่วนฐานและส่วนปลายกลมมน ไม่มีผนังกั้น เซลล์เดียว เมื่อแก่สปอร์มีสีน้ำตาลเข้ม และมีผนังกั้นเซลล์ 1 เส้น มี 2 เซลล์ ขนาด 25.5-33.0 x 11.0- 17.0 ไมครอน

รา *Lasiodiplodia theobromae* และ รา *Lasiodiplodia pseudotheobromae* เป็นราที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก มีการแพร่กระจายไปทั่วโลกและมีพืชอาศัยกว้างมาก

จากการศึกษาระดับพันธุกรรมของราที่แยกได้จากโรคเปลือกแตกยางไหลของมะเม่า จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อพบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกับรา *L. theobromae* แต่เมื่อศึกษาในระดับพันธุกรรมของเชื้อพบว่าราสาเหตุโรคเปลือกแตกยางไหลของมะเม่าจำแนกชนิดได้เป็นรา *L. pseudotheobromae* ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับรา *L. theobromae* มาก แต่มีขนาดใหญ่กว่า (Table 4)

จากการศึกษาการจำแนกชนิดโรคลำต้นเน่าของแก้วมังกรโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมจำแนกชนิดได้รา *Neocystalidium dimidiatum* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lan และ คณะ (2012) ได้ศึกษาโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกรซึ่งมีการระบาดอย่างมากในเมืองกวางดง กวางสี ไฮหนาน ในประเทศจีน และประเทศไต้หวัน ได้จำแนกชนิดราสาเหตุเป็นรา *N. Dimidiatum*

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการรวบรวมและเก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Botryosphaeria* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 82 ตัวอย่าง จากพืชทั้งหมด 7 ชนิด จากแหล่งต่างๆ 19 จังหวัด ผลจากการศึกษาแยกราได้ทั้งหมดจำนวน 73 ไอโซเลท จำแนกชนิดเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกได้ราทั้งหมด 5 genera 5 species ได้แก่ *Lasiodiplodia theobromae, Lasiodiplodia pseudotheobromae Dothiorella mangiferae, Fusicoccum* และ *Neocystalidium dimidiatum* จัดเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืชที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม ของรา *Botryosphaeria* ทั้งหมด 37 ไอโซเลท ได้แก่ ราที่แยกได้จาก โรคเปลือกแตกยางไหลของมะเม่า 2 ไอโซเลท โรคลำต้นจุดแก้วมังกร 15 ไอโซเลท จากโรคผลเน่ากล้วยหอม 5 โซเลท จากลำต้นองุ่น 5 ไอโซเลท ผลเน่าของมะม่วง 7 ไอโซเลท และ ลำต้นยางไหลมะม่วง 3 ไอโซเลท พบว่า ลำดับเบสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง ITS ซึ่งรวมบางส่วนของยีน 18S และ 28S บน rDNA มีขนาดทั้งหมด 541 คู่เบส จากการวิเคราะห์จำแนกชนิดได้เป็นดังนี้ ราที่แยกได้จากโรคเปลือกแตกยางไหลของมะเม่า จำแนกชนิดได้เป็นรา *L. pseudotheobromae* โรคลำต้นจุดของแก้วมังกร จำนวน 15 ไอโซเลท จำแนกชนิดได้เป็นรา *Neocystalidium dimidiatum*

จากกล้วยหอม 5 โซเลท จากลำต้นองุ่น 5 ไอโซเลท ผลเน่าของมะม่วง จำนวน 7 ไอโซเลท และ ลำต้นยางไหลมะม่วง จำนวน 3 ไอโซเลท จำแนกชนิดได้เป็นรา *L. theobromae*

เอกสารอ้างอิง

Abdollahzadeh, J., A. Javadi, E. Mohammadi Goltaoeh, R. Zare, and A.J.L. Phillips. 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia*. 25:1-10.

Alves. A., P.W. Crous, A. Correia, and A.J.L. Phillips. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic species in Lasiodiplodia theobromae. *Fungal Diversity*. 28: 1–13.

Britton, KO., FF. Hendrik, PL. Pusey, Okie WR., Reilly, and JW. Daniell. 1990. Evaluating the reaction of peach cultivars to infection by three *Botrysphaeria* species. *HortScience*. 25: 468-470.

Brown, EA. and KO. Britton. 1986. *Botryosphaeria* diseases of apple and peach in the Southeastern United State. *Plant Disease*. 70: 480-484.

Chandrasrikul, A. 1962. A preliminary host list of plant diseases in Thailand. *Tech. Bull.* No. 9, Dept. of Agr., Bangkok. 14p.

Denman, S., P.W. Crous, J.Z. (E) Groenewald, B. Slippers, B. D. Wingfield, M.J. Winfield. 2003. Circumscription of *Botryosphaeria* species associated with Proteaceae based on morphology and DNA sequence data. *Mycologia*. 95 (2): 294-307.

Lan G.-B and Z.F. He. 2012. First report of brown spot disease caused by *Neocystalidium dimidiatum* on *Hylocereus undatus* in Guangdong, Chinese Mainland. *Plant Dis*. (96) 11: 1702.

Parker, KC. And TB. Sutton. 1993. Susceptibility of apple fruit to *Botryosphaeria dothidea* and isolate variation. *Plant Disease*. 77: 385-389.

Puckdeedindan, P. 1996. A supplementary host list of plant disease in Thailand. *Tech. Bull*. No. 7, Dept. of Agr., Bangkok. 24 p.

Pusey, PL. 1993. Role of *Botryosphaeria* species in peach tree gummosis on the basis of differential isolation from outer and inner bark. *Plant Disease*. 77: 170-174.

Schreiber, L.R. 1964. Stem canker and die-back of Rhododendron caused by *Botryosphaeria ribis* Gross. & Dugg. Plant Dis. Rep. 48: 207-210.

Smith, C.O. 1934. Inoculations showing the wide host range of *Botryosphaeria ribis*. *J. Agric. Res.* (Washington, D.C.) 49: 467-476.

Themis, J.M. 1991. Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on Pistachio. *Phytopathology*. 81 (5): 566-573.

Weaver, D.J. 1974. A gummosis dsisease of peach trees caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Phytopathology*. 64: 1429-1432.

Table 1 Infected plants used in this experiment were collected from different locations during October 2010 to September 2014.

Host	Plant part	Locations
Dragon fruit	branch (Brown spot)	Chanthaburi (18), Ratchaburi (2), Samut Sakhon, Samutsongkhrom, Rayong (3), Samut Prakan, Bangkok, Nakhon Ratchasima, Chiang Mai, Nakhon Pathom, Pathum Thani (2), Suphan Buri (3)
Dragon fruit	fruit (Fruit rot)	Chanthaburi (5), Ratchaburi, Samut Sakhon, Pathum Thani, Rayong
Mangosteen	fruit (Fruit rot)	Chanthaburi (6)
Grape	stem (Stem wilt)	Prachuap Khiri Khan, Nakhon Ratchasima
Mango	stem (Stem gummosis)	Nakhon Ratchasima (2), Chanthaburi (2), Chonburi, Chachoengsao (2)
Mango	fruit (stem end rot)	Chachoengsao, Chanthaburi, Rayong, Chachoengsao
Banana	fruit (fruit rot)	Sukhothai (2), Kamphaengphet (2), Phetchaburi (8), Pathum Thani, Chanthaburi (2)
Thai blueberry	stem (Stem gummosis)	Sakhon Nakhon, Bangkok
Pine tree	stem	Bangkok

Table 2 Genera of *Botryosphaeria* on various host from different locations.

Causal agent	Plant part affect	Host	Locations
Lasiodiplodia theobromae	stem (Stem gummosis)	mango	Pak Chong Distr. Nakhon Ratchasima Prov. (3 isolates) Chonburi Prov. (5 isolates)
Lasiodiplodia theobromae	fruit	mango	Plaeng Yao Distr. Chachoengsao Prov. (7 isolates) Bang Khla Distr. Chachoengsao Prov. (5 isolates) Pong Nam Ron Distr. Chanthaburi Prov. (3 isolates)
Lasiodiplodia theobromae	fruit	mangosteen	Chanthaburi Prov. (2 isolates)
Lasiodiplodia theobromae	stem	Pine tree	Bangkok (1 isolate)
Lasiodiplodia theobromae	Fruit rot	Banana	Chanthaburi Prov. (3 isolates) Kamphaengphet Prov. (2 isolates) Sukhothai Prov. (4 isolates) Phetchaburi Prov. (12 isolates)
Lasiodiplodia theobromae	stem	grape	Pak Chong Distr. Nakhon Ratchasima Prov. (2 isolates)
Lasiodiplodia pseudotheobromae	stem	Thai Blueberry	Phu Phan Distr. Sakhon Nakhon Prov. (1 isolate) Bangkok (1 isolate)
Neocystalidium dimidiatum	Stem, fruit	Dragon fruit	Chanthaburi Prov. (15 isolates) Rayong Prov. (3 isolates) Samut Sakhon Samut Sakhon Prov. (1 isolate) Pathum Thani Prov. (1 isolate)
Dothiorella mangiferae	fruit	mango	Nakhon Ratchasima Prov. (1 isolate)
Fusicoccum	fruit	mango	Pong Nam Ron Distr. Chanthaburi Prov. (1 isolate)

Table 3 Suitable media for culturing *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *L. theobromae* isolated from infected plants.

Causal agent	Plant part affect	Plants/Locations	Media
Lasiodiplodia pseudotheobromae	Stem gummosis	Thai Blueberry Sakhon Nakhon	Oat Meal Agar Potato Dextrose Agar Malt Extract Agar
Lasiodiplodia theobromae	Fruit rot	mango / Chachoengsao	Oat Meal Agar Potato Dextrose Agar Malt Extract Agar
Fusicoccum	Fruit rot	mango / Chachoengsao	Malt Extract Agar Potato Dextrose Agar Oat Meal Agar

Table 4 Conidial size and septation of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *L. theobromae*

Species conidia	Septation	Size (µm)	References
Lasiodiplodia pseudotheobromae	1	23.5-32.0 × 14.0-18.0	Alves *et al.*, 2008
Lasiodiplodia pseudotheobromae	1	21.7-26.3.0 x 13.4- 14.8	Abdollahzadeh *et al.*, 2010
Lasiodiplodia pseudotheobromae	1	25.5-33.0 x 11.0- 17.0	การศึกษาครั้งนี้
Lasiodiplodia theobromae	1	26.2-27.0 × 14.0-14.4	*Alves et al.*, 2008

การศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm.

Study on Biology and Ecology of *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm.

ทัศนาพร ทัศคร ธารทิพย ภาสบุตร วัชรี วิทยวรรณกุล อภิรัชต์ สมฤทธิ์
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ได้ศึกษาการเจริญของเชื้อสาแหตุโรคจำนวน 3 ไอโซเลทบนอาหารสูตรต่างๆ และนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 10, 20 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อราสาเหตุโรคสามารถเจริญได้ดีทั้ง 3 ไอโซเลท ในทุกสูตรอาหาร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และจากนั้นจึงได้ทำการบ่มเชื้อต่อเพื่อศึกษาสูตรอาหาร และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้าง pycnidia ของเชื้อราสาเหตุ ซึ่งหลังการทดลอง 40 วัน พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อราสามารถสร้าง pycnidia ได้ทุกสูตรอาหาร และสร้างได้เป็นจำนวนมากบนอาหาร สูตร MEA และ PCA และได้ศึกษาการติดเชื้อบนเมล็ดของแตงเมล่อน แคนตาลูป เทียบกับพันธุ์การค้า โดยการเก็บเมล็ดจากผลที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค มาวางทดสอบบนอาหาร WA และตรวจนับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อบนเมล็ดและเปอร์เซ็นต์การงอก ผลการทดลองพบว่า เมล็ดแตงที่เก็บมามีทั้งการปนเปื้อนและการติดเชื้อที่เมล็ดทั้งในผลที่เป็นโรคและผลไม่เป็นโรค ซึ่งการปนเปื้อนที่มีการติดเชื้อบนเปลือกหุ้มเมล็ดนั้น เมล็ดสามารถงอกและเจริญได้ปกติ และเชื้อราเข้าทำลายต้นอ่อนทีหลัง ซึ่งพบมีเพียง 2-6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการติดเชื้อบนเมล็ดนั้น ทำให้เมล็ดไม่งอกและเชื้อรามีการเจริญคลุมเมล็ด ซึ่งจากการทดลองพบว่าเมล็ดแตงทั้งสองชนิดที่เก็บมามีการติดเชื้อและเมล็ดไม่งอก 23- 71 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงมากเมื่อเทียบกับเมล็ดพันธุ์การค้าที่พบเพียง 9 เปอร์เซ็นต์

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-02-06-54

คำนำ

โรคยางไหล (Gummy Stem Blight) เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm. เป็นโรคสำคัญที่พบมีการระบาดและเข้าทำลายในพืชตระกูลแตง ประเทศไทยพบมีการระบาดในพืชตระกูลแตง ในพื้นที่ปลูกทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ลักษณะอาการของโรคเริ่มแรกจะพบแผลฉ่ำน้ำที่บริเวณ ลำต้น กิ่ง ก้าน และใบ โดยเฉพาะบริเวณข้อต่อของลำต้นกับกิ่ง ลักษณะสำคัญของโรค คือ ที่แผลจะมียางเหนียวสีแดง (gummy ooze) ไหลเยิ้มออกมาจากแผล และเกาะแห้งอยู่ที่บริเวณแผล ซึ่งด้วยลักษณะอาการของโรคเช่นนี้ จึงได้มีการตั้งชื่อโรคตามอาการโรคที่พบ คือ โรคยางไหล ถ้าโรคมีการระบาดในระยะที่ติดผล จะทำให้ต้นแตงมีการเจริญเติบโตช้า ผลโตไม่เต็มที่ และในต้นที่อาการรุนแรงมาก ต้นจะเหี่ยวแห้งและยืนต้นตาย ทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง บางครั้งเกษตรกรจึงรีบเก็บผลผลิตก่อน ทั้งที่แตงยังสุกไม่เต็มที่ทำให้ผลผลิตของแตงไม่ได้คุณภาพ (ทัศนาพรและพีระวรรณ, 2552)

ลักษณะอาการของโรคยางไหล เริ่มแรกจะพบแผลฉ่ำน้ำที่บริเวณ ลำต้น กิ่ง ก้าน และใบ โดยเฉพาะบริเวณข้อต่อของลำต้นกับกิ่ง หลังจากนั้นส่วนทีเป็นแผลจะบุ๋มลึก และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือน้ำตาลแดง ลักษณะสำคัญของโรค คือ ที่แผลจะมียางเหนียวสีแดง (gummy ooze) ไหลเยิ้มออกมาจากแผล และเกาะแห้งอยู่ที่บริเวณแผล ส่วนอาการที่ใบก็จะพบใบเป็นแผลฉ่ำน้ำก่อน จากนั้นแผลที่ใบจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ลุกลามไปตามเส้นกลางใบทำให้ใบไหม้ วงจรการเกิดโรคของเชื้อรา *D. bryoniae* สามารถอาศัยและติดไปได้ทั้งในเมล็ดพันธุ์และดิน (seed borne, soil borne) และอยู่ข้ามฤดูได้เป็นเวลานานในเศษซากพืชที่เป็นโรค โดยอาศัยอยู่ใน perithecium เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม คือ มีความชื้นสูง perithecium ที่อยู่บนเศษซากพืชก็จะเจริญแล้วสร้าง และปล่อย conidia ออกมา และ conidia นี้สามารถแพร่กระจายไปกับน้ำฝน หรือระบบการให้น้ำจากรายงานการสำรวจโรคของ พริพมล (2552) พบว่า โรคยางไหลนี้เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Ascochyta cucumis*

เนื่องจากเชื้อรา *D. bryoniae* เป็นเชื้อราที่สามารถอาศัยและติดไปได้ทั้งในเมล็ดพันธุ์และดิน (seed borne, soil borne) และอยู่ข้ามฤดูได้เป็นเวลานานในเศษซากพืชเพื่อแพร่กระจายโรคได้ในฤดูปลูกถัดไป ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดโรคในแปลง เกษตรกรจึงต้องมีการย้ายพื้นที่ปลูกไปเรื่อยๆ เพราะถ้าปลูกซ้ำที่ติดต่อกัน 2-3 ปี โรคในแปลงจะมีการระบาดที่รุนแรงขึ้น การแก้ปัญหานี้ด้วยการจัดการโรคทั้งระบบการปลูกจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ เพราะถ้ามีการจัดการโรคที่ถูกต้องเหมาะสม เกษตรกรสามารถควบคุมการเกิดโรคในแปลงได้ และลดการสะสมเชื้อสาเหตุโรคในแปลงปลูกได้

ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลนี้ยังขาดข้อมูลทางด้านชีววิทยา การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ การเข้าทำลายพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุโรค และการถ่ายโรคทางเมล็ดพันธุ์ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรค ดังนั้นเพื่อให้การป้องกันกำจัดโรคยางไหลมีประสิทธิภาพและสามารถนำไปสู่การจัดการโรคแบบผสมผสานได้ จึงมี

ความจำเป็นที่จะต้องศึกษาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าวเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการป้องกันกำจัดโรคต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ
2. กล้องจุลทรรศน์
3. อุปกรณ์เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ
4. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติก กล่องเก็บความเย็น ปากกา กรรไกร ฯลฯ
5. กล้องถ่ายภาพ
6. วัสดุการเกษตร ดิน กระถาง เมล็ดพันธุ์ กระบะเพาะกล้า

วิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคยางไหลของพืชตระกูลแตง

สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคยางไหลจากแหล่งปลูกพืชตระกูลแตงที่สำคัญ บันทึกข้อมูลต่างๆ ที่สำคัญในพื้นที่ปลูก ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลาง ที่เป็นแหล่งปลูกสำคัญ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างในลักษณะการเดินซิกแซกตามแบบของ Barker (1985) จำนวน 10 % ต่อพื้นที่เพาะปลูก เมื่อพบต้นที่เป็นโรค ควรเก็บตัวอย่างโรคในระยะต่างๆ โดยห่อตัวอย่างด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์และใส่ในถุงพลาสติก บรรจุลงในกล่องเก็บความเย็นเพื่อนำกลับไปศึกษาแยกเชื้อสาเหตุและจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคในห้องปฏิบัติการ บันทึกข้อมูลตามลักษณะอาการของโรคและถ่ายภาพส่วนที่เป็นโรค ประเมินเปอร์เซ็นต์การเป็นโรค (disease incidence)

2. การศึกษาชนิดเชื้อสาเหตุโรคยางไหล

2.1 การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ศึกษาลักษณะของเชื้อสาเหตุโรค โดยทำการตัดชิ้นส่วนพืชบริเวณที่แสดงอาการโรค (section) และทำสไลด์ เพื่อตรวจดูลักษณะต่าๆ ของเชื้อราที่สำคัญเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อรา เช่น ลักษณะของเส้นใย และสปอร์ ภายใต้กล้อง Compound microscope และเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อราที่พบกับเอกสารที่ใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อรา ILLUSTRATED GENERA of IMPERFECT FUNGI และหนังสือดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย

2.2 การแยกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธี Tissue transplanting

แยกเชื้อสาเหตุโรคจากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคยางไหลที่พบ โดยตัดชิ้นตัวอย่างที่บริเวณส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติขนาดประมาณ 2x2 มิลลิเมตร จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวพืชโดยแช่ชิ้นส่วนพืชลงในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้งสนิท นำชิ้นส่วนพืชมาวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) แล้วบ่มไว้ในห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน ตรวจดูเส้นใยเชื้อราภายใต้

กล้องจุลทรรศน์แบบ stereomicroscope แยก hyphal tip ของเชื้อราที่เจริญออกมาจากชิ้นตัวอย่างพืช วางลงบนอาหาร PDA เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อเก็บไว้เพื่อศึกษาลักษณะรายละเอียดของเชื้อประกอบกับเอกสารอ้างอิงเพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรค

3. การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเส้นใยและการสร้าง pycnidia ของรา *D. bryoniae*

ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราและการสร้าง perithecium โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธี คือ สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Corn Meal Agar (CMA), Oat Meal Agar (OMA), Malt Extract Agar (MEA), Potato Sucrose Agar (PSA) และ V-8 Agar เมื่อเตรียมอาหารตามสูตรต่างๆแล้ว จึงย้ายเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 2.2 มาเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้ จำนวน 10 จานอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออาหาร 1 ชนิด บันทึกข้อมูลโดยวัดขนาดโคโลนีเมื่อเชื้อราอายุ 9 วัน บันทึกลักษณะสีของเส้นใย การเจริญของเส้นใย การสร้าง perithecium เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ

4. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเส้นใยและการสร้าง pycnidia ของรา *D. bryoniae*

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราและการสร้าง pycnidia ของรา *D. bryoniae* 3 ไอโซเลท คือ สระแก้ว สุพรรณบุรี และพะเยา โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธี คือ อุณหภูมิ 10, 20 และ 25 องศาเซลเซียส และทดสอบกับสูตรอาหาร 7 ชนิด คือ Potato Dextrose Agar (PDA), Corn Meal Agar (CMA), Oat Meal Agar (OMA), Malt Extract Agar (MEA), Potato Sucrose Agar (PSA), Potato Carrot Dextrose (PCA) และ V-8 Agar เมื่อเตรียมอาหารตามสูตรต่างๆ แล้ว จึงย้ายเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 2.2 มาเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้ จำนวน 10 จานอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออาหาร 1 ชนิด และนำจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ไปบ่มเชื้อที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิโดยทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 10, 20 และ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นบันทึกข้อมูลโดยวัดขนาดโคโลนีเมื่อเชื้อราอายุ 9 วัน บันทึกลักษณะสีของเส้นใย การเจริญของเส้นใย การสร้าง perithecium เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ

5. ศึกษาการอยู่อาศัยและเข้าทำลายของรา *D. bryoniae* ในเมล็ดแตงเมล่อนและแคนตาลูป

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างผลแตงเมล่อนในระยะเก็บเกี่ยวผลผลิต ที่แสดงอาการผลเน่า และเป็นแผล จากแปลงเกษตรกร อ.อู่ทอง และ อ.หนองหญ้าไซ จ. สุพรรณบุรี นำผลที่ได้มาผ่า ล้างแยกเมล็ด และผึ่งลมให้แห้ง ตรวจนับจำนวนเมล็ดและเก็บใส่ถุงพลาสติก เปรียบเทียบกับเมล็ดจากผลแตงปกติและเมล็ดพันธุ์แตงจากบริษัทที่นำเข้าเมล็ดพันธุ์ เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

2. ในการทดลองครั้งที่ 1 นำเมล็ดแตงเมล่อนและแคนตาลูปที่เก็บมาได้มาตรวจสอบการติดเชื้อบนเมล็ด ตามวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ โดยวิธีเพาะเมล็ดพันธุ์บนอาหารวุ้น (Agar-Plate method) โดยแช่เมล็ดแตงในคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ซับเมล็ดแล้วนำเมล็ดแตงไปวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้ อ WA จำนวน 10 เมล็ดต่อจาน จำนวน 30 จาน ตรวจนับเมล็ดที่มีการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์การงอกและการเจริญของเชื้อสาเหตุบนเมล็ดแตง

3. ในการทดลองครั้งที่ 2 ทำการทดสอบเช่นเดียวกันกับข้อ 2. แต่เมล็ดแตงที่ใช้ในการทดสอบเป็นเมล็ดแตงเมล่อนที่ปกติ และที่เป็นโรคจากแปลงเกษตรกร เปรียบเทียบกับเมล็ดแตงเมล่อนพันธุ์การค้า จำนวน 7 พันธุ์ มาตรวจสอบการติดเชื้อบนเมล็ด โดยเปลี่ยนแช่เมล็ดแตงในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ซับเมล็ดแล้วนำเมล็ดแตงไปวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ WA จำนวน 10 เมล็ดต่อจาน จำนวน 10 จาน ตรวจนับเมล็ดที่มีการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์การงอกและการเจริญของเชื้อสาเหตุบนเมล็ดแตง และนำเชื้อราที่ตรวจพบในเมล็ดแตง มาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และจัดจำแนกชนิดของเชื้อราว่าเป็นเชื้อราสาเหตุโรคยางไหลหรือไม่

6. ศึกษาเทคนิคการปลูกเชื้อสาเหตุ *Didymella bryoniae*

เลี้ยงขยายเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

1. เตรียมกระถางใส่ดินเพื่อปลูกแตงเมล่อนหรือแคนตาลูป นำเมล็ดพันธุ์แตงที่เตรียมไว้ปลูกลงในกระถาง เมื่อแตงมีใบจริงขนาดประมาณ 5 เซนติเมตร จำนวน 5 กระถางต่อซ้ำ ทั้งหมด 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี คือ

1. การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีทำแผลและวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคเจริญ
2. การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีไม่ทำแผลและวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคเจริญ
3. การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีทำแผลและพ่น spore suspension เชื้อราสาเหตุโรค
4. การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีไม่ทำแผลและพ่น spore suspension เชื้อราสาเหตุโรค
5. ไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค

2. นำกระถางที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคใส่ลงในถุงพลาสติกที่มีความชื้นเป็นเวลา 7 วัน

การบันทึกข้อมูล

1. เก็บข้อมูลการเกิดโรคและลักษณะการเกิดแผลทุกวัน
2. วัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นในแต่ละกรรมวิธี เปรียบเทียบกับวิธีไม่ปลูกเชื้อสาเหตุ นำข้อมูลที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2553
สิ้นสุด กันยายน 2558
ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
แปลงเกษตรกรปลูกแตงที่สำคัญ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคยางไหลของพืชตระกูลแตง

ในปี 2554 ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างแตงกวา แตงร้าน แตงแคนตาลูป และแตงเมล่อนที่แสดงอาการโรคในพื้นที่ปลูกแตง จ. กาญจนบุรี สุพรรณบุรี สระแก้ว และพะเยา เพื่อแยกหาเชื้อ

สาเหตุในห้องปฏิบัติการ จากการเก็บตัวอย่างโรคในแตงแคนตาลูป และแตงเมล่อนนั้น พบว่าลักษณะอาการของโรคยางไหล เริ่มแรกจะพบแผลฉ่ำน้ำที่บริเวณ ลำต้น กิ่ง ก้าน และใบ โดยเฉพาะบริเวณข้อต่อของลำต้นกับกิ่ง หลังจากนั้นส่วนทีเป็นแผลจะบุ๋มลึก และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หรือน้ำตาลแดง ลักษณะสำคัญของโรค คือ ที่แผลจะมียางเหนียวสีแดง (gummy ooze) ไหลเยิ้มออกมาจากแผล และเกาะแห้งอยู่ที่บริเวณแผล ส่วนอาการที่ใบก็จะพบใบเป็นแผลฉ่ำน้ำก่อน จากนั้นแผลที่ใบจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ลุกลามไปตามเส้นกลางใบทำให้ใบไหม้ และที่บริเวณแผลที่แห้ง จะพบเชื้อราสร้างเม็ดสีดำ ขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วแผล ซึ่งถ้าพบลักษณะอาการของโรคในช่วงระยะที่แตงติดผลหรือระยะที่กำลังเก็บเกี่ยวจะทำให้เกิดความเสียหายกับผลผลิตของเกษตรกรเป็นอย่างมาก

2. การศึกษาชนิดเชื้อสาเหตุโรคยางไหล

จากการแยกเชื้อสาเหตุจากลักษณะอาการดังกล่าวโดยวิธี Tissue transplanting ซึ่งเมื่อศึกษาเส้นใยเชื้อราที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า สามารถแยกได้เชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยเชื้อรามีสีขาว ฟู ละเอียดในช่วง 3 วันแรก จากนั้นเส้นใยเชื้อราจะเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นเมื่อเชื้อรามีอายุมากขึ้น และการเจริญของโคโลนีเชื้อราจะพบมีการเจริญของเส้นใยไม่เท่ากัน ทำให้ขอบโคโลนีเกิดเป็นขอบหยัก เมื่อศึกษาและจำแนกชนิดของเชื้อจากชิ้นส่วนพืชที่มีการสร้างส่วนขยายพันธุ์สีดำที่เชื้อสร้างขึ้น ก็พบว่าเชื้อรามีการสร้าง pycnidia ขนาดเล็กสีดำ ฝังที่บริเวณแผล และภายใน pycnidia มีสปอร์ขนาดเล็กบรรจุอยู่ มีลักษณะรูปร่าง กลมรี เล็ก ใส มี 1-2 septate เมื่อเปรียบลักษณะเชื้อราดังกล่าวที่แยกได้กับเอกสารที่ใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อรา ILLUSTRATED GENERA of IMPERFECT FUNGI และหนังสือดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย ก็พบว่า โรคยางไหลจากแตงแคนตาลูป และแตงเมล่อนที่เก็บตัวอย่างได้จาก จ. พะเยา จ. สระแก้ว และ จ. สุพรรณบุรี จำนวน 3 ไอโซเลท นั้น คือ เชื้อรา *D. bryoniae* ซึ่งตรงกับรายงานต่างประเทศ ที่พบว่าลักษณะที่พบในระยะนี้เป็นเชื้อรา *Phoma cucurbitacearum* เพราะเชื้อราในระยะนี้จะสังเกตพบว่า เชื้อราจะมีการสร้าง pycnidia สีดำ เล็กๆ กระจายอยู่ทั่วบริเวณแผล และ pycnidia นี้สามารถสร้าง conidia ที่ไม่มี septate หรือมี septate เพียงอันเดียว (Keinath *et al.*,1995) ซึ่งเชื้อสาเหตุโรคยางไหล (Gummy Stem Blight) ที่เกิดจากเชื้อรา *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm. ซึ่งเป็นราชั้นสูง มีการระยะการสืบพันธุ์ 2 แบบ คือ ในระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual stage, teleomormp) เชื้อราจะมีการสร้าง perithecia ที่มี ascospores อยู่ภายในถุง ascus ดังนั้นเชื้อราที่แยกได้จึงพบอยู่ในระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual stage, anamorph) เพราะพบการสร้าง เชื้อรามีการสร้าง pycnidia ขนาดเล็กสีดำ ฝังที่บริเวณแผล และภายใน pycnidia มีสปอร์ขนาดเล็กบรรจุอยู่ มีลักษณะรูปร่าง กลมรี เล็ก ใส มี 1-2 septate

3. การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเส้นใยของรา *D. bryoniae*

จากการทดสอบเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคจำนวน 3 ไอโซเลท ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ จำนวน 7 สูตร ได้แก่ PDA PSA PCA MEA CMA OMA และ V8 agar สูตรๆ ละ 10 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และทำการบันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของเชื้อและลักษณะของเส้น

ใยทุกวัน เป็นเวลา 9 วัน ผลการทดลองพบว่า เชื้อราสาเหตุโรคสามารถเจริญได้ดีทั้ง 3 ไอโซเลท ในสูตรอาหาร PDA OMA และ V8 agar ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญแต่ละไอโซเลทแล้ว พบว่า ไอโซเลท สุพรรณบุรี มีการเจริญของเส้นใยได้ดีกว่าไอโซเลท สระแก้ว และ พะเยา (ตารางที่ 1)

ส่วนการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคนั้น ได้ทำการแยกเลี้ยงเชื้อสาเหตุจำนวน 3 ไอโซเลท ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร จำนวน 7 สูตร ได้แก่ PDA PSA PCA MEA CMA OMA และ V8 agar สูตรๆ ละ 10 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ และได้นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 10, 20 และ 25 องศาเซลเซียส และทำการบันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของเชื้อและลักษณะของเส้นใยทุกวัน หลังการทดลอง 9 วัน ได้เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในอาหารแต่ละสูตร พบว่า เชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ดีในทุกสูตรอาหารที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และรองลงมา คือ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อราสาเหตุโรคทุกไอโซเลทเจริญได้ไม่ดี (ตารางที่ 2)

4. การศึกษาสูตรอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการการสร้าง pycnidia ของรา *D. bryoniae*

เมื่อทำการบันทึกข้อมูลสูตรอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคแล้ว จึงได้นำจานเลี้ยงเชื้อทดสอบทั้งหมดไปบ่มเชื้อต่อ เพื่อศึกษาสูตรอาหารและที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้าง pycnidia เมื่อครบ 20 วัน เชื้อราเริ่มมีการสร้างกลุ่มเส้นใยสีดำอัดแน่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ จึงได้ทำการบันทึกการสร้าง pycnidia ในแต่ละสูตร จนถึง 45 วัน ซึ่งผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เชื้อสาเหตุโรคทั้ง 3 ไอโซเลท ไม่มีการสร้าง pycnidia ในทุกสูตรอาหาร ยกเว้นสูตรอาหาร MEA ที่ไอโซเลท สระแก้ว และพะเยา มีการสร้างเพียงเล็กน้อย และที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อสาเหตุโรคไอโซเลท สระแก้ว สร้าง pycnidia ได้ดีในสูตรอาหาร PCA รองลงมา คือ V8 agar และในไอโซเลท พะเยา มีการสร้างเล็กน้อยบนสูตรอาหาร PDA, V8 agar และ OMA ส่วนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อสาเหตุโรคทั้ง 3 ไอโซเลท มีการสร้าง pycnidia ได้ในทุกสูตรโดยเฉพาะสูตรอาหาร PCA และ MEA ที่ไอโซเลท สระแก้ว และสุพรรณบุรี มีการสร้างได้จำนวนมาก ส่วนไอโซเลท พะเยา นั้นเชื้อราสร้างได้เล็กน้อยถึงปานกลาง ในสูตรอาหารทั้งสองชนิด (ตารางที่ 3

5. ศึกษาการอยู่อาศัยและเข้าทำลายของรา *D. bryoniae* ในเมล็ดแตงเมล่อนและแคนตาลูป

ผลการทดสอบการตรวจเมล็ดครั้งที่ 1 พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อรา *Rhizopus* sp. และ *Aspergillus* sp. ที่บริเวณรากของแตงเป็นจำนวนมาก ทำให้การตรวจเช็คประเมินค่อนข้างลำบาก เนื่องจากมีเส้นใยเชื้อราอื่นเจริญคลุมทับ หลังการวางเมล็ด 3 วัน จากการตรวจนับเมล็ดทั้งหมด 300 เมล็ด และนำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ พบว่า เมล็ดพันธุ์การค้ามีเปอร์เซ็นต์การงอกดี 85 เปอร์เซ็นต์ และพบเมล็ดที่งอกมีเชื้อราเจริญที่เปลือกหุ้มเมล็ด 6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดที่ไม่งอกและมีการเจริญของเชื้อราที่บริเวณเปลือกหุ้มเมล็ด พบ 9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดแตงเมล่อนที่ปกติและเป็นโรค มีเปอร์เซ็นต์การงอก 34 และ 23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบเมล็ดที่งอกมีเชื้อราเจริญที่เปลือกหุ้มเมล็ด 2 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดที่ไม่งอกและมีการเจริญของเชื้อราที่บริเวณเปลือกหุ้มเมล็ด พบ

64 และ 71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในเมล็ดแตงแคนตาลูปที่ปกติและเป็นโรค มีเปอร์เซ็นต์การงอก 30 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบเมล็ดที่งอกมีเชื้อราเจริญที่เปลือกหุ้มเมล็ด 2 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน ส่วนเมล็ดที่ไม่งอกและมีการเจริญของเชื้อราที่บริเวณเปลือกหุ้มเมล็ด พบ 55 และ 23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบมีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนเมล็ดแตงแคนตาลูปที่ปกติ 13 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในเมล็ดชนิดอื่นไม่พบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 4)

ดังนั้นในการทดลองครั้งที่ 2 จึงได้มีการเปลี่ยนวิธีการฆ่าเชื้อที่ผิวเป็นการแช่แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อป้องกันเชื้อราชนิดอื่นที่ไม่ใช่เชื้อสาเหตุเจริญก่อนที่จะทำการตรวจผลการทดลอง โดยการนับจำนวนเมล็ดที่งอกและติดเชื้อไม่ติดเชื้อ จำนวนเมล็ดที่ไม่งอกและติดเชื้อไม่ติดเชื้อ ซึ่งหลังการทดลอง 3 วัน พบว่า เมล็ดเมล่อนจากผลที่ปกติ มีจำนวนเมล็ดงอกทั้งหมด 19 เมล็ด มีจำนวนเมล็ดไม่งอกและติดเชื้อรา 79 เมล็ด และติดเชื้อแบคทีเรีย 2 เมล็ด ส่วนเมล็ดเมล่อนจากผลที่เป็นโรคมีจำนวนเมล็ดงอกทั้งหมด 1 เมล็ด มีจำนวนเมล็ดไม่งอกและติดเชื้อรา 99 เมล็ด และพบมีติดเชื้อแบคทีเรียขึ้นปะปน 2 เมล็ด ในเมล็ดพันธุ์การค้า 328น มีจำนวนเมล็ดงอกทั้งหมด 53 เมล็ด มีจำนวนเมล็ดไม่งอกและติดเชื้อรา 1 เมล็ด และพบมีติดเชื้อแบคทีเรีย 46 เมล็ด ในเมล็ดพันธุ์การค้า 329น มีจำนวนเมล็ดงอกทั้งหมด 68 เมล็ด มีจำนวนเมล็ดไม่งอกและติดเชื้อรา 2 เมล็ด และพบมีเชื้อแบคทีเรีย 30 เมล็ด ในเมล็ดพันธุ์การค้า 330น มีจำนวนเมล็ดงอกทั้งหมด 64 เมล็ด มีจำนวนเมล็ดไม่งอกและติดเชื้อรา 2 เมล็ด และพบมีติดเชื้อแบคทีเรีย 34 เมล็ด ในเมล็ดพันธุ์การค้า 331น มีจำนวนเมล็ดงอกทั้งหมด 75 เมล็ด มีจำนวนเมล็ดไม่งอกและติดเชื้อรา 14 เมล็ด และพบมีติดเชื้อแบคทีเรีย 11 เมล็ด ในเมล็ดพันธุ์การค้า 332 น มีจำนวนเมล็ดงอกทั้งหมด 71 เมล็ด ไม่มีจำนวนเมล็ดไม่งอกและติดเชื้อรา แต่พบมีติดเชื้อแบคทีเรีย 29 เมล็ด ในเมล็ดพันธุ์การค้า 333น มีจำนวนเมล็ดงอกทั้งหมด 72 เมล็ด มีจำนวนเมล็ดไม่งอกและติดเชื้อรา 21 เมล็ด และพบมีติดเชื้อแบคทีเรีย 7 เมล็ด และสุดท้าย ในเมล็ดพันธุ์การค้า 523บ มีจำนวนเมล็ดงอกทั้งหมด 42 เมล็ด มีจำนวนเมล็ดไม่งอกและติดเชื้อรา 18 เมล็ด และพบมีเชื้อแบคทีเรีย 40 เมล็ด (ตารางที่ 5)

จากการทดสอบการติดเชื้อบนเมล็ดแตงทั้ง 2 การทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เมล็ดแตงเมล่อนแตงแคนตาลูปจากแปลงเกษตรกร และเมล็ดแตงเมล่อน พันธุ์การค้า พบมีการติดเชื้อราสาเหตุโรคมากับเมล็ดได้ โดยเฉพาะเป็นเมล็ดที่เก็บจากผลที่เป็นโรคจะพบการติดเชื้อบนเมล็ดมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาภายใต้จุลทรรศน์แบบสเตริโอ พบว่า การติดเชื้อบนเมล็ดมี 2 แบบ คือ แบบแรก คือ เชื้อราสาเหตุโรคมีการเจริญอยู่บนเปลือกหุ้มเมล็ดแตงเท่านั้น และเมื่อเมล็ดมีการงอกเจริญส่วนของรากและใบเลี้ยงออกมาจะมีลักษณะปกติ แต่หลังจากเส้นใยเชื้อราเจริญและมีการเข้าทำลายรากและใบเลี้ยง จึงทำให้ต้นอ่อนตาย ส่วนแบบที่สองคือ เชื้อราเจริญคลุมเมล็ด ทำให้เมล็ดตายและไม่มีการงอกของเมล็ด

6. ศึกษาเทคนิคการปลูกเชื้อสาเหตุ *Didymella bryoniae*

ทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคจำนวน 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท สุพรรณบุรี สระแก้ว และพะเยา ตามกรรมวิธีที่วางไว้ และประเมินการเกิดโรคหลังการปลูกเชื้อ 1,3,5 และ 7 วัน หลังการปลูกเชื้อ 1 วัน พบว่า ทุกไอโซเลทสามารถปลูกเชื้อติด คือ ทำให้ใบแตงมีลักษณะอาการ ใบเป็นแผลช้ำ ฉ่ำน้ำ โดย

กรรมวิธีการทำแผลและวางชิ้นวุ้นและความรุนแรงหรือขนาดของแผลที่เกิด ขึ้นอยู่กับไอโซเลทของเชื้อรา และที่หลังการปลูกเชื้อ 3 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีในการปลูกเชื้อสาเหตุโรค สามารถทำให้ต้นพืชเกิดอาการของโรคได้ และเมื่อวัดขนาดแผลที่เกิดขึ้น พบว่า วิธีปลูกเชื้อโดยกรรมวิธีไม่ทำแผลและพ่นสปอร์ทำให้เกิดโรครุนแรง ใบมีอาการไหม้ รองลงมา คือ กรรมวิธีทำแผลและวางชิ้นวุ้น แสดงว่าเชื้อราสาเหตุโรคนี้สามารถเข้าทำลายพืชได้เองโดยวิธีเข้าทางช่องเปิดธรรมชาติ และวิธี artificial inoculation ซึ่งสามารถนำวิธีการที่ได้ไปใช้ในการศึกษาต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สำรวจและเก็บตัวอย่างแตงกวา แตงร้าน แตงแคนตาลูป และแตงเมล่อนที่แสดงอาการโรคยางไหล ที่ จ.สุพรรณบุรี แพร่ สระแก้ว และพะเยา เพื่อแยกหาเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ สามารถแยกได้รา *D. bryoniae* จำนวน 3 ไอโซเลท ทดสอบการเจริญของเชื้อสาแหตุโรคจำนวน 3 ไอโซเลท บนอาหารสูตรต่างๆ จำนวน 7 สูตร ได้แก่ PDA PSA PCA MEA CMA OMA และ V8 agar ผลการทดลองพบว่า เชื้อราสาเหตุโรค *D. bryoniae* ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ดีบนสูตรอาหาร PDA OMA และ V8 agar ส่วนอาหารสูตรอื่นๆ สามารถเจริญได้ดีปานกลาง จากการทดสอบเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคจำนวน 3 ไอโซเลท ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร จำนวน 7 สูตร ได้แก่ PDA PSA PCA MEA CMA OMA และ V8 agar สูตรๆ ละ 10 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 10, 20 และ 25 องศาเซลเซียส ทำการบันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของเชื้อและลักษณะของเส้นใยทุกวัน เป็นเวลา 9 วัน ผลการทดลองพบว่า เชื้อราสาเหตุโรคสามารถเจริญได้ดีทั้ง 3 ไอโซเลท ในทุกสูตรอาหารที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เมื่อทำการศึกษาสูตรอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้าง pycnidia ของเชื้อราสาเหตุโรค ผลการทดลองก็พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อราสามารถสร้าง pycnidia ได้ ในทุกสูตรอาหาร และเชื้อราจะสร้างมากในสูตรอาหาร MEA และ PCA

จากการศึกษาการติดเชื้อบนเมล็ดและการเข้าทำลายเมล็ด โดยทำการศึกษาในเมล็ดแตงเมล่อนแคนตาลูป ผลที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคจากแปลงเกษตรกร เปรียบเทียบกับเมล็ดพันธุ์การค้า ผลการทดลองพบว่า เมล็ดแตงที่เก็บมามีทั้งการปนเปื้อนและการติดเชื้อที่เมล็ดทั้งในผลที่เป็นโรคและผลไม่เป็นโรค ซึ่งการปนเปื้อนที่มีการติดเชื้อบนเปลือกหุ้มเมล็ดนั้น เมล็ดสามารถงอกและเจริญได้ปกติ และเชื้อราเข้าทำลายต้นอ่อนทีหลัง ซึ่งพบมีเพียง 2-6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการติดเชื้อบนเมล็ดนั้น ทำให้เมล็ดไม่งอกและเชื้อรามีการเจริญคลุมเมล็ด ซึ่งจากการทดลองพบว่าเมล็ดแตงทั้งสองชนิดที่เก็บมามีการติดเชื้อและเมล็ดไม่งอก 23- 71 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงมากเมื่อเทียบกับเมล็ดพันธุ์การค้าที่พบเพียง 9 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุ *Didymella bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลบนแตงเมล่อน ได้ทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคจำนวน 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท สุพรรณบุรี สระแก้ว และพะเยา ตามกรรมวิธีที่วางไว้ และประเมินการเกิดโรคหลังการปลูกเชื้อ 1, 3, 5 และ 7 วัน หลังการปลูกเชื้อ 1 วัน พบว่า ทุกไอโซเลทสามารถปลูกเชื้อติด คือ ทำให้ใบแตงมีลักษณะอาการ ใบเป็นแผลช้ำ ฉ่ำน้ำ โดย

กรรมวิธีการทำแผลและวางชิ้นวุ้น และความรุนแรงหรือขนาดของแผลที่เกิดขึ้นอยู่กับไอโซเลทของเชื้อราสาเหตุโรค และที่หลังการปลูกเชื้อ 3 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีในการปลูกเชื้อสาเหตุโรค สามารถทำให้ต้นพืชเกิดอาการของโรคได้ และเมื่อวัดขนาดแผลที่เกิดขึ้น พบว่า วิธีปลูกเชื้อโดยกรรมวิธีไม่ทำแผลและพ่นสปอร์ ทำให้เกิดโรครุนแรง ใบมีอาการไหม้ รองลงมา คือ กรรมวิธีทำแผลและวางชิ้นวุ้น แสดงว่าเชื้อราสาเหตุโรคนี้สามารถเข้าทำลายพืชได้เองโดยวิธีเข้าทางช่องเปิดธรรมชาติ และวิธี artificial inoculation ซึ่งสามารถนำวิธีการที่ได้ไปใช้ในการศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ทัศนาพร ทัศคร และ พีระวรรณ พัฒนวิภาส. 2552. โรคยางไหลในแคนตาลูป. *จดหมายข่าวผลิใบ* ปีที่ 12 ฉบับที่ 3 ประจำเดือน เมษายน 2552. หน้า 2 - 3.

พรพิมล อธิปัญญาคม และ ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. 2552. อนุกรมวิธานราสาเหตุโรคพืช Class Ascomycetes. หน้า 73 – 77. *ใน* รายงานการประชุมสัมมนาวิชาการอารักขาพืช. 1-3 มิถุนายน 2552. ณ โรงแรมเมธาวลัย อ. ชะอำ จ. เพชรบุรี.

Keinath, A. P.,Farnham, M. W.., and Zitter, T. A. 1995. Morphological, pathological, and genetic differentiation of *Didymella bryoniae* and *Phoma* spp. Isolated from cucurbits. *Phytopathology*. 85: 364-369.

การตรวจสุขภาพของเมล็ดพันธุ์ (Seed Health Testing). (Online). Available. http://coursewares.mju.ac.th:81/e-learning47/PP300/0003html/chapter014.htm **(Feb. 3, 2014).**

ตารางที่ 1 การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหล จำนวน 3 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิห้อง หลังการทดลอง 9 วัน

สูตรอาหาร	Isolate		
	สระแก้ว	**พะเยา**	**สุพรรณบุรี**
PDA	6.75	6.65	8.52
V8	6.06	5.90	6.72
MEA	5.74	5.90	5.74
OMA	5.15	5.65	5.78
PCA	6.11	6.15	6.78
CMA	5.10	5.50	6.59
PSA	5.90	4.95	6.64

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากอาหารแต่ละสูตรๆ ละ 10 ซ้ำ

ตารางที่ 2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหล จำนวน 3 ไอโซเลท หลังการทดลอง 9 วัน

สูตรอาหาร	10 °C			20 °C			25 °C		
	สระแก้ว	พะเยา	สุพรรณบุรี	สระแก้ว	พะเยา	สุพรรณบุรี	สระแก้ว	พะเยา	สุพรรณบุรี
PDA	1.64	4.34	1.83	9.00	8.93	9.00	6.08	5.76	8.20
V8	1.85	2.30	2.08	8.28	8.60	9.00	5.41	6.66	6.38
MEA	2.71	1.89	1.04	7.73	8.10	8.28	6.16	6.19	7.01
OMA	2.11	2.30	2.30	8.27	8.07	8.83	7.70	6.95	7.85
PCA	1.64	1.60	0.98	8.48	6.36	8.75	5.73	6.04	7.02
CMA	1.85	1.57	1.14	6.35	7.45	8.92	4.42	3.59	5.71
PSA	1.59	1.41	0.96	9.00	9.00	8.73	6.65	6.70	7.86

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากอาหารแต่ละสูตรๆ ละ 10 ซ้ำ

ตารางที่ 3 การศึกษาสูตรอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญต่อการสร้าง pycnidia ของเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหล จำนวน 3 ไอโซเลท

สูตรอาหาร	10 °C			20 °C			25 °C		
	สระแก้ว	พะเยา	สุพรรณบุรี	สระแก้ว	พะเยา	สุพรรณบุรี	สระแก้ว	พะเยา	สุพรรณบุรี
PDA	-	-	-	+	+	+	+	+	++
V8	-	-	-	++	+	-	+	+	+
MEA	+	+	-	-	-	+	+++	+	+++
OMA	-	-	-	+	+	+	+	+	+
PCA	-	-	-	+++	-	++	+++	++	+++
CMA	-	-	-	-	-	+	++	+	+
PSA	-	-	-	+	-	-	+	+	+

หมายเหตุ :
+++ เชื้อรามีการสร้าง pycnidia จำนวนมาก
++ เชื้อรามีการสร้าง pycnidia ปานกลาง
+ เชื้อรามีการสร้าง pycnidia เล็กน้อย
- เชื้อราไม่มีการสร้าง pycnidia

ตารางที่ 4 การตรวจสอบการติดเชื้อราสาเหตุโรคที่เมล็ดแตงเมล่อน แคนตาลูป และเมล็ดพันธุ์การค้า โดยวิธีเพาะเมล็ดพันธุ์บนอาหารวุ้น (Agar-Plate method) ครั้งที่ 1

เมล็ดพันธุ์	เมล็ดงอก (%)	เมล็ดงอกและมีเชื้อรา ติดที่เมล็ด (%)	เมล็ดไม่งอกและมีเชื้อรา ติดที่เมล็ด (%)	เมล็ดไม่งอกและเชื้อ แบคทีเรียติดที่เมล็ด (%)
เมล็ดพันธุ์การค้า	85	6	9	0
เมล็ดเมล่อนผลปกติ	34	2	64	0
เมล็ดเมล่อนผลเป็นโรค	23	6	71	0
เมล็ดแคนตาลูปผลปกติ	30	2	55	13
เมล็ดแคนตาลูปผลเป็นโรค	75	2	23	0

หมายเหตุ : คิดค่าเปอร์เซ็นต์จากการตรวจนับเมล็ด จำนวน 300 เมล็ด /ชุดเมล็ดทดสอบ

ตารางที่ 5 การตรวจสอบการติดเชื้อราสาเหตุโรคที่เมล็ดแตงเมล่อนและเมล็ดพันธุ์การค้า 7 พันธุ์ๆ ละ 100 เมล็ด โดยวิธีเพาะเมล็ดพันธุ์บนอาหารวุ้น (Agar-Plate method) ครั้งที่ 2

เมล็ดพันธุ์	จำนวนเมล็ดที่งอก	จำนวนเมล็ดไม่งอก/ เชื้อราติดที่เมล็ด	จำนวนเมล็ดไม่งอก/ เชื้อแบคทีเรียติดที่เมล็ด
เมล็ดเมล่อนผลปกติ	19	79	2
เมล็ดเมล่อนผลเป็นโรค	1	99	46
พันธุ์ 328 น	53	1	46
พันธุ์ 329 น	68	2	30
พันธุ์ 330 น	64	2	34
พันธุ์ 331 น	75	14	11
พันธุ์ 332 น	71	0	29
พันธุ์ 333 น	72	21	7
พันธุ์ 523 บ	42	18	40

หมายเหตุ : ทำการตรวจนับเมล็ด จำนวน 100 เมล็ด/พันธุ์

ตารางที่ 6 การปลูกเชื้อสาเหตุโรค *D. bryoniae* จำนวน 3 ไอโซเลท โดยวิธีการต่างๆ หลังการปลูกเชื้อ 1 วัน

วิธีการปลูกเชื้อ	ค่าเฉลี่ยขนาดของแผลที่เกิดขึ้น (ซ.ม.)		
	สุพรรณบุรี	พะเยา	สระแก้ว
Control (ทำแผล)	0	0	0
Control (ไม่ทำแผล)	0	0	0
การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีทำแผลและวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค	1.08	1.17	0.81
การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีไม่ทำแผลและวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค	0.20	0.52	0.27
การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีทำแผลและพ่น spore suspension เชื้อราสาเหตุโรค	0.13	0.06	0.62
การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีไม่ทำแผลและพ่น spore suspension เชื้อราสาเหตุโรค	0.77	0.16	0.36

ตารางที่ 7 การปลูกเชื้อสาเหตุโรค *D. bryoniae* จำนวน 3 ไอโซเลท โดยวิธีการต่างๆ หลังการปลูกเชื้อ 3 วัน

วิธีการปลูกเชื้อ	ค่าเฉลี่ยขนาดของแผลที่เกิดขึ้น (ซ.ม.)		
	สุพรรณบุรี	พะเยา	สระแก้ว
Control (ทำแผล)	0	0	0
Control (ไม่ทำแผล)	0	0	0
การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีทำแผลและวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค	1.28	1.81	0.94
การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีไม่ทำแผลและวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค	0.22	1.46	0.32
การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีทำแผลและพ่น spore suspension เชื้อราสาเหตุโรค	1.26	0.49	1.36
การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีไม่ทำแผลและพ่น spore suspension เชื้อราสาเหตุโรค	1.25	0.52	1.66

ตารางที่ 8 การปลูกเชื้อสาเหตุโรค *D. bryoniae* จำนวน 3 ไอโซเลท โดยวิธีการต่างๆ หลังการปลูกเชื้อ 5 วัน

วิธีการปลูกเชื้อ	ค่าเฉลี่ยขนาดของแผลที่เกิดขึ้น (ซ.ม.)		
	สุพรรณบุรี	พะเยา	สระแก้ว
Control (ทำแผล)	0.10	0	0.10
Control (ไม่ทำแผล)	1.31	0	1.20
การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีทำแผลและวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค	2.55	2.30	1.55
การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีไม่ทำแผลและวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค	0.03	1.47	0.60
การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีทำแผลและพ่น spore suspension เชื้อราสาเหตุโรค	0.76	0.80	2.61
การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีไม่ทำแผลและพ่น spore suspension เชื้อราสาเหตุโรค	2.62	2.34	2.05

ตารางที่ 9 การปลูกเชื้อสาเหตุโรค *D. bryoniae* จำนวน 3 ไอโซเลท โดยวิธีการต่างๆ หลังการปลูกเชื้อ 7 วัน

วิธีการปลูกเชื้อ	ค่าเฉลี่ยขนาดของแผลที่เกิดขึ้น (ซ.ม.)		
	สุพรรณบุรี	พะเยา	สระแก้ว
Control (ทำแผล)	0.18	0.18	0.18
Control (ไม่ทำแผล)	0.76	0.76	0.76
การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีทำแผลและวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค	0.65	1.94	1.40
การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีไม่ทำแผลและวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค	0.27	1.56	0.55
การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีทำแผลและพ่น spore suspension เชื้อราสาเหตุโรค	0.91	0.33	2.38
การปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีไม่ทำแผลและพ่น spore suspension เชื้อราสาเหตุโรค	1.95	1.28	1.80

การจำแนกชนิดและเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของ Race แบคทีเรีย *Ralsonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย

Identification and DNA Fingerprint of Race of *Ralsonia solanacearum* in Thailand

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ทิพวรรณ กันหาญาติ บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ รุ่งนภา ทองเครื่ง

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การจำแนกชนิด Race แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย โดยทำการฟื้นฟูการมีชีวิตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ของพืชตระกูลมะเขือ ขิง และ มันฝรั่ง ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection จำนวน 200 ไอโซเลท คัดเลือกโคโลนีที่รุนแรงบนอาหาร TZC เพื่อใช้ในการทดสอบ ทำการปลูกพืชอาศัยของ แบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้แก่ พริก มะเขือเทศ มะเขือเปราะ มันฝรั่ง ขิง อายุ 1 เดือน จากนั้นทำการทดสอบการเกิดโรคและชนิดของ race โดยนำแบคทีเรีย *R. Solanacearum* ที่คัดเลือกไว้ ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml มาปลูกเชื้อลงบนพืชอาศัยที่เตรียมไว้ ผลการทดสอบพบว่า พืชอาศัยทั้งหมดแสดงอาการของโรคเหี่ยวภายใน 14-28 วัน ยืนยันการเกิดโรค โดยสามารถแยกเชื้อ*R. solanacearum* ได้จากต้นพืชทดสอบที่แสดงอาการเหี่ยวทุกต้น ผลการจัดจำแนก Race ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ของพืชตระกูลมะเขือขิง และ มันฝรั่ง คือ Race 1 ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อจัดจำแนกชนิด Biovar ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากพืชตระกูลมะเขือ สามารถจัดจำแนกเป็น Biovar 3 และ 4 แบคทีเรีย *R. solanacearum* ของพืชตระกูลขิง จัดจำแนก เป็น Biovar 4 ส่วน Biovar ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากมันฝรั่ง คือ Biovar 2 และ 4 อยู่ในระหว่างดำเนินการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค rep PCR โดยใช้ primer ERIC, BOXA และ Rep

---

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-02-07-54

คำนำ

เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (syn. *Pseudomonas solanacearum*) จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง ทำให้เกิดโรคเหี่ยว (bacterial wilt) ก่อความเสียหายกับพืชปลูกหลายชนิด ทั้งที่เป็นพืชเศรษฐกิจจนถึงวัชพืชมากกว่า 200 ชนิดในวงศ์ Solanaceae (Kelman, 1953) ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่เชื้อเข้าทำลาย สภาพแวดล้อมและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย ในประเทศไทยมีการปลูกพืชหลายชนิดที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อโรคชนิดนี้ โดยเฉพาะพืชเศรษฐกิจของประเทศได้แก่ มะเขือเทศ พริก มันฝรั่ง ขิง และปทุมมา เป็นต้น เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถอาศัยอยู่ในดินได้เป็นเวลานาน สามารถเข้าทำลายพืชทางรากโดยเข้าตามรอยแผลที่เกิดจากการทำลายของแมลง ไส้เดือนฝอย รอยฉีกขาดของรากหรือแผลที่เกิดในธรรมชาติ สามารถแพร่ระบาดไปกับน้ำได้ดีโดยเฉพาะในช่วงฤดูฝนที่มีฝนตกชุกจะมีการระบาดของโรครุนแรงและรวดเร็ว เชื้อนี้สามารถติดไปกับหัวพันธุ์โดยสามารถแอบแฝงอยู่ในหัวพันธุ์ (Latent infection) เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมและปริมาณของเชื้อโรคมากพอก็จะแสดงอาการของโรคออกมา โดยจะแสดงอาการเมื่อนำหัวพันธุ์ไปปลูกในสภาพแปลง ทำให้เกิดการระบาดของโรคในแปลงปลูก นอกจากนี้เชื้อนี้ยังสามารถอาศัยอยู่ในพืชอาศัยอื่นได้เนื่องจากมีพืชอาศัยที่กว้าง ทำให้เชื้อโรคสามารถอยู่ข้ามฤดูได้

เชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบกระจายในเขตร้อนและใกล้เขตร้อนอบอุ่นเย็นของพื้นที่ทั่วโลก มีความหลากหลายทางสายพันธุ์มาก โดยมีความแตกต่างในพืชอาศัย(host range) การกระจายตัวตามภูมิศาสตร์(geographical distribution) ความสามารถในการเกิดโรค (pathogenicity) ความสัมพันธ์ของการระบาดของเชื้อโรค (epidemiological relationships) และ คุณสมบัติทางสรีรวิทยาของเชื้อ (physiological properties) ทำให้มีการศึกษาเพื่อการจัดจำแนกหรือบรรยาย (describe) ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียตามการกระจายตามตามภูมิประเทศและการเกิดโรคบนพืชอาศัยไว้ดังนี้

Race 1: มีผลกระทบกับยาสูบ, มะเขือเทศ, มันฝรั่ง, มะเขือยาว, กล้วย diploid และพืชในกลุ่มมะเขืออื่นๆและ วัชพืช มีการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยมีอุณหภูมิสูงสุด (35-37 ° C).

Race 2: มีผลกระทบกับกล้วย triploid (ก่อให้เกิดโรค Moko) และ เฮลิโคเนีย มีการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยมีอุณหภูมิสูงสุด (35-37 ° C).

Race 3: มีผลกระทบส่วนใหญ่กับมันฝรั่งและมะเขือเทศ ไม่มีผลกระทบกับพืชกลุ่มมะเขืออื่นๆ มีการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ อุณหภูมิลดสูงสุด (27 ° C).

Race 4: มีผลกระทบกับพืชตระกูลขิง (Zingiber officinale) มีการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยมีอุณหภูมิสูงสุด (35-37 ° C).

Race 5: มีผลกระทบกับพืชตระกูลหม่อน (Morus spp.) ที่พบที่ประเทศจีน มีการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยมีอุณหภูมิสูงสุด (35-37 ° C).

บางสายพันธุ์สามารถเกิดโรคกับพืชอาศัยได้กว้างแต่บางสายพันธุ์เกิดโรคกับพืชในวงศ์จำกัด เช่น สายพันธุ์ที่พบในแถบเขตหนาวเช่นในแถบประเทศยุโรป เรียกว่าเป็นสายพันธุ์ที่เรียกว่า low temperature จัดอยู่ใน race 3 ซึ่งทำให้เกิดโรคกับมันฝรั่ง และมะเขือเทศในเขตพื้นที่สูงที่มีอากาศหนาวเย็นเท่านั้น นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์ที่เข้าทำลายพืชตระกูลกล้วยเท่านั้น จัดอยู่ใน race 2 (ก่อให้เกิดโรค Moko disease) ในประเทศไทยได้มีการจัดจำแนกชนิดของเชื้อ *R. solanacearum* ไว้บ้างแต่ยังไม่มีการศึกษาและรายงานชนิดของrace ที่พบในประเทศไทย ทำให้ขาดข้อมูลการเกิดโรคความรุนแรง ตลอดจนพืชอาศัยที่พบในประเทศไทย ซึ่งถ้าทราบถึงชนิดของrace ของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* จะทำให้หาวิธีการป้องกันกำจัดได้อย่างถูกต้องต่อไป และเป็นการรายงานชนิดของ race ของเชื้อ *R. solanacearum* ในประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน กระถางต้นไม้ ปุ๋ย
6. โรงเรือนปลูกพืชทดลอง

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การจำแนกชนิด Race แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย

1. ปลูกพืชอาศัยของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ได้แก่ พืชตระกูลมะเขือ (มะเขือเทศ พริก มันฝรั่ง มะเขือยาว มะเขือพวง มะเขือเปราะ ยาสูบ) ตระกูลขิง(ขิง ขิงแดง ปทุมมา กระเจียว กระทือ) หน้าวัว ฤาษีผสม กล้วยชนิดต่างๆ เป็นต้น

2. การเตรียมเชื้อ *Ralstonia solanacearum* นำเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมโรคพืช จำนวน 300 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหาร TTC ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว 523 บนเครื่องเขย่า

ที่มีความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำ 100 µl ของสารละลายเชื้อมาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง 523 บ่มที่อุณหภูมิ 30 C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการละลายเชื้อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นของเชื้อโดยการวัดค่าความขุ่นโดยใช้เครื่องspectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD เท่ากับ 0.3 มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml

3. การปลูกเชื้อ *R. solanacearum* บนพืชอาศัย โดยก่อนปลูกเชื้องดการให้น้ำพืชทดสอบเป็นเวลา 1 วัน ทำการปลูกพืชทดสอบโดยใช้มีดหรือคัตเตอร์ที่สะอาดตัดส่วนรากห่างจากต้น 1-2 เซนติเมตร ราดด้วยสารละลายเชื้อที่เตรียมข้างต้นทันที โดยใช้อัตราส่วนสารละลายต่อดินในกระถาง 1: 10(V/V) (~ 25 มิลลิลิตร/ต้น)

4. บันทึกผล ตรวจผลการทดลองทุกๆ 7 วัน หลังการปลูกเชื้อ โดยให้ค่าคะแนนความรุนแรงของโรคตั้งแต่ 1-5 ตามอาการของพืช ดังนี้

1 = พืชปกติ (healthy plant)

2 = ใบเหี่ยว 1 ใบต่อต้น (one leaflet or leaf wilting)

3 = 1/3 ของต้นแสดงอาการเหี่ยว (1/3 of plant wilting)

4 = 2/3 ของต้นแสดงอาการเหี่ยว (2/3 of plant wilting)

5 = แสดงอาการเหี่ยวทั้งต้นหรือต้นตาย (whole plant wilting or dead)

ยืนยันการเกิดโรคเหี่ยวโดยการตรวจด้วย ELISA และ แยกเชื้อบนอาหาร TTC

5. ทดสอบชนิด Biovar นำเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่ทดสอบพืชอาศัยเรียบร้อยแล้วมาทดสอบการใช้น้ำตาล 6 ชนิดได้แก่ sucrose, lactose, maltose manitol, sorbitol และ dulcitol เพื่อจัดจำแนก biovar ของแต่ละไอโซเลทเพื่อหาความสัมพันธ์ของ biovar กับการเกิดโรคบนพืชอาศัยของสายพันธุ์ประเทศไทยเปรียบเทียบกับรายงานในต่างประเทศ

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของ Race แบคทีเรีย *Ralstoonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย

1. การเตรียมแบคทีเรีย *R. solanacearum* เพื่อสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรีย *R.solanacearum* มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Wakimoto's medium ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ย้ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารแข็ง LB (Luria &Bertani medium) (Sambrook et al., 1989) อายุ 48 ชั่วโมง เตรียมไว้สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

2. การแยกสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ให้บริสุทธิ์

ใช้การแยกสกัดจีโนมิค ดีเอ็นเอ โดยตามวิธีของ Pitcher et al. (1989) ใช้เชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย *R.solanacearum* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง LB อายุ 48 ชั่วโมง ใช้ลูปฆ่าเชื้อ แตะเชื้อ

แบคทีเรียให้เต็มหนึ่งลูปละลาย ใน 1 ml ของ Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA, pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย 100 µl ของ TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA, pH 8.0) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ เครื่องปั่น Vortex เติมด้วย 500 µl ของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 µl ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เก็บไว้ในตู้เย็น -20 oC ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วย 500 µl ของสารผสม chloroform : isoamyl alcohol อัตรา 24/1 ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุสาร isopropanol ที่แช่เก็บไว้ในตู้เย็น -20 oC จำนวน 378 µl ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ ที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 150 µl ของ 70 % ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย TE buffer, pH. 8.0 ปริมาณ 100 µl วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่ช่วงคลื่น A260 และ A280 ด้วยเครื่อง UV/Vis spectrophotometer และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 50 ng/µl เพื่อนำไปศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

3. **การศึกษาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ด้วยเทคนิค rep-PCR**

การศึกษาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ด้วยเทคนิค rep PCR ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ในการทดลองได้แก่ enterobacteria repetitive intergenic concensus (ERIC) และ interspersed repetitive BOX sequence (BOX) (Louws *et al.*, 1994) เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 25 µl ในหลอดขนาด 0.2 ml โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อ *X. axonopodis* pv..*citri* 50 ng ผสมกับ 10X PCR buffer [67 mM Tris-HCl, pH8.8, 83 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2.0 mM $MgCl_2$, 30 mM 2-mercaptoethanol, 10% dimethylsulfoxide และ bovine serum albumin] dNTPs ชนิดละ 125 µM, เอนไซม์ Taq DNA polymerase 1.0 ยูนิต (Invitrogen Corporation Grand Island, NY, USA) และไพรเมอร์ ERIC ชนิดละ 50 pM และ ไพรเมอร์ BOX จำนวน 100 pM แล้วเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 25 µl ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามวิธีของ Louws *et al.* (1994)

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (initial denaturing)	95	7
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	1
3. ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (primer annealing)	53 (BOX)	1
	53 (ERIC)	1
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension)	65	8
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	65	15

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 °C นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 10 µl มาผสมกับ loading dye (0.025% bromophenol blue, 40% Ficoll 400, 0.5% SDS) ปริมาณ 2 µl จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5 % อะกาโรสใน 0.5 xTAE (40mM Tris, 4mM sodium acetate, 1mM EDTA, pH 7.9) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง ย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

เวลาและสถานที่

ต.ค.53 – ก.ย.58 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การจำแนกชนิด Race แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย โดยทำการฟื้นฟูการมีชีวิตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ของพืชตระกูลมะเขือ ขิง และ มันฝรั่ง ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection จำนวน 200 ไอโซเลท คัดเลือกโคโลนีที่รุนแรงบนอาหาร TZC เพื่อใช้ในการทดสอบ ทำการปลูกพืชอาศัยของ แบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้แก่ พริก มะเขือเทศ มะเขือเปราะ มันฝรั่ง ขิง อายุ 1 เดือน จากนั้นทำการทดสอบการเกิดโรคและชนิดของ race โดยนำแบคทีเรีย *R. Solanacearum* ที่คัดเลือกไว้ ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml มาปลูกเชื้อลงบนพืชอาศัยที่เตรียมไว้ ตรวจผลการเกิดโรคเหี่ยวทุก 7, 14, 21,และ 28 วัน ผลการทดสอบ พบว่าพืชอาศัยทุกชนิดแสดงอาการของโรคเหี่ยวภายใน 14-28 วัน นำต้นพืชที่แสดงอาการเหี่ยวมาแยกเชื้อสาเหตุเพื่อยืนยันการเกิดโรค โดยแยกได้เชื้อ *R. solanacearum* ได้จากต้นพืชที่แสดงอาการเหี่ยวทุกต้น ผลการจัดจำแนก Race ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ของพืชตระกูลมะเขือขิง และ มันฝรั่ง คือ Race 1 ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยทดสอบการใช้น้ำตาล 6 ชนิด ได้แก่ sucrose, lactose, maltose manitol, sorbitol และdulcitol เพื่อจัดจำแนก biovar ของแบคทีเรีย *R.*

solanacearum แต่ละไอโซเลทที่พบในประเทศไทย ผลการจัดจำแนกพบว่าแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากพืชตระกูลมะเขือ สามารถจัดจำแนกเป็น Biovar 3 และ 4 แบคทีเรีย *R. solanacearum* ของพืชตระกูลขิง จัดจำแนก เป็น Biovar 4 ส่วน Biovar ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากมันฝรั่ง คือ Biovar 2 และ 4 อยู่ในระหว่างดำเนินการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค rep PCR โดยใช้ primer ERIC, BOXA และ Rep

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การจำแนกชนิด Race แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย โดยทำการฟื้นฟูการมีชีวิตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ของพืชตระกูลมะเขือ ขิง และ มันฝรั่ง ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection จำนวน 200ไอโซเลท สามารถจัดจำแนก Race ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ของพืชตระกูลมะเขือ ขิง และ มันฝรั่ง คือ Race 1 การจัดจำแนกชนิด Biovar ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ทีพบในประเทศไทย พบว่า แบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากพืชตระกูลมะเขือ สามารถจัดจำแนกเป็น Biovar 3 และ 4 แบคทีเรีย *R. solanacearum* ของพืชตระกูลขิง จัดจำแนก เป็น Biovar 4 ส่วน Biovar ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากมันฝรั่ง คือ Biovar 2 และ 4

เอกสารอ้างอิง

Buddenhagen, I.W. (1986) Bacterial wilt revisited. In: *Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an International Workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines, 8-10 October 1985* (Ed. by Persley, G.J.), pp. 126-143. *ACIAR Proceedings* **13**.

Buddenhagen, I.W.; Kelman, A. (1964) Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* **2**, 203-230.

Buddenhagen, I.W.; Sequeira, L.; Kelman, A. (1962) Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **52**, 726.

Cook, D.R.; Sequeira, L. (1988) The use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in taxonomy and diagnosis. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* No. 4, p. 4.

Cook, D.; Sequeira, L. (1994) Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (Ed. by Hayward, A.C.; Hartman, G.L.), pp. 77-93. CAB International, Wallingford, UK.

Echandi, E. (1991) Bacterial wilt. In: *Compendium of tobacco diseases* (Ed. by Shew, H.D.; Lucas, G.B.), pp. 33-35. EPPO/CABI (1992) *Quarantine pests for Europe* (Ed. by Smith, I.M.; McNamara, D.G.; Scott, P.R.; Harris, K.M.). CAB International, Wallingford, UK.

French, E.R.; Sequeira, L. (1968) Bacterial wilt or moko of plantain in Peru. *Fitopatologia* **3**, 27-38.

Hartman, G.L.), pp. 95-112. CAB International, Wallingford, UK.

Hayward, A.C. (1994a) The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (Ed. by Hayward, A.C.; Hartman, G.L.), pp. 9-24. CAB International, Wallingford, UK.

Hayward, A.C. (1994b) Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (Ed. by Hayward, A.C.; Hartman, G.L.), pp. 123-135. CAB International, Wallingford, UK.

การจำแนกชนิดแบคทีเรีย *Erwinia* สาเหตุโรคเน่าเละโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

Characterization of the Bacterial *Erwinia* Causing Soft Rot in Thailand

รุ่งนภา คงสุวรรณ์[1/] บูรณี พั่ววงษ์แพทย์[1/] สุรีย์พร บัวอาจ[1/] ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

รายงานความก้าวหน้า

ได้ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคเน่าเละของพืชต่างๆ นำไปแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคบนอาหาร Nutrient Agar (NA) และทดสอบการทำให้มันฝรั่งเน่า ได้เชื้อที่สามารถทำให้ชิ้นมันฝรั่งเน่า 73 ไอโซเลท เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 8°C ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและที่อุณหภูมิ -20°C ในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ผสม glycerol 40% จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการและการไวต่อสารปฏิชีวนะ erythromycin พบว่าเป็นเชื้อ *Erwinia carotovora* จำนวน 64 ไอโซเลท และเป็นเชื้อ *Erwinia. chrysanthemi*.จำนวน 9 ไอโซเลท และได้สกัดดีเอ็นเอของเชื้อสำหรับจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อหาความสัมพันธ์ของชนิดเชื้อกับชนิดของพืชอาศัยต่อไป

Keywords: โรคเน่าเละ ,soft rot, AFLP, *Erwinia carotovora*, *Erwinia. chrysanthemi*

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-02-08-54

คำนำ

โรคเน่าเละของพืชมักมีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย และส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม soft rot *Erwinia* โดยแบคทีเรียในกลุ่มนี้สร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายเซลล์พืช ที่มักพบเข้าทำลายพืชได้อย่างกว้างขวางได้แก่ *Erwinia carotovora* และ *Erwinia chrysanthemi* สำหรับเชื้อ *Erwinia carotovora* สามารถแบ่งได้เป็น 5 subspecies ได้แก่ *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*, *Erwinia carotovora* ssp. *betavasculorum*, *Erwinia carotovora* ssp. *wasabiae* และ *Erwinia carotovora* ssp. *odorifera*. (Goto&Matsumoto, 1987; Gallois *et al.*, 1992) อาการเน่าเละสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งบนต้นพืชที่กำลังเจริญเติบโต และเก็บเกี่ยวแล้ว รวมทั้งพืชหรือส่วนของพืชที่เก็บไว้ในยุ้งฉาง หรือระหว่างการขนส่ง โดยสภาพอากาศที่ร้อนและมีความชื้นสูงจะเหมาะแก่การเกิดโรคนี้ ความเสียหายทางเศรษฐกิจที่เกิดจากโรคนี้ ขึ้นอยู่กับมูลค่าของพืชที่เชื้อนี้เข้าทำลาย ความเสียหายที่เกิดจากโรคนี้จะแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ และสภาพอากาศในประเทศไทยมีรายงานการเกิดโรคเน่าเละจากแบคทีเรียว่า *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* เป็นสาเหตุโรคของพืชที่สำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะในพืชผักซึ่งพบการระบาดแพร่หลายในทุกพื้นที่ที่มีการปลูกผัก เช่น กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก กะหล่ำปม ผักกาดขาว ผักกวางตุ้ง ผักกาดเขียวปลี บรอคโคลี่ คื่นฉ่าย แครอท ผักกาดหัว พริกหยวก พริกยักษ์ พริกขี้หนู พริกจินดา ผักชี ผักกาดหอม ผักกาดหางหงส์ ผักกาดฮ่องเต้ มันฝรั่ง มันเทศ มะเขือเทศ ถั่วแขก ถั่วลันเตา ถั่วฝักยาว ข้าวโพดหวาน หน่อไม้ฝรั่ง หอม กระเทียม และ พืชผักอื่นๆอีกหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานการเกิดโรคเน่าจากเชื้อ *Erwinia* ในพืชอื่นๆอีก เช่น บุก กล้วยไม้ (พัฒนาและคณะ, 2537; ศักดิ์, 2537; นิตยา, 2545; วงศ์และคณะ, 2538; วิชัย, 2531) เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ เป็นเชื้อที่ทนอุณหภูมิร้อนได้ถึง 37 องศาเซลเซียส จึงเป็นปัญหาที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจในประเทศไทยหลายชนิด ปัจจุบันในยุคการค้าเสรี การเตรียมความพร้อมของข้อมูลเป็นสิ่งสำคัญ *Erwinia* จัดเป็นเชื้อที่สำคัญชนิดหนึ่ง จึงควรมีการสำรวจ รวบรวม และจำแนก เพื่อเป็นฐานข้อมูลสำหรับงานกักกันพืชต่อไป

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ เพื่อสำรวจ รวบรวมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia* สาเหตุโรคเน่าเละ ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ ให้ได้ข้อมูลการเกิดโรค การแพร่ระบาด การจำแนกเชื้อที่ถูกต้อง เพื่อเก็บเป็นฐานข้อมูลเชื้อของกลุ่มวิจัยโรคพืช

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

เครื่องแก้ว สารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูง

วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลการเกิดโรคเน่าเละในพืชต่างๆที่มีรายงานในดรรชนีโรคพืช และวางแผนการสำรวจโรคในพื้นที่ปลูกต่างๆ

2. สำรวจโรค เก็บตัวอย่างโรคจากแหล่งปลูกต่างๆ บันทึกรายละเอียดสถานที่หรือตำแหน่งGPS (Global Positioning System) ของแปลงปลูก ชื่อพืช พันธุ์พืช ขนาดพื้นที่ปลูก ระยะการเจริญเติบโตของพืช และสภาพแวดล้อมอื่นๆ

3. แยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละจากตัวอย่างพืชเป็นโรค บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และทดสอบการทำให้เกิดโรคของเชื้อ

4. ศึกษาการมีชีวิตรอดข้ามฤดูปลูกของแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ เก็บตัวอย่างวัชพืชและดินในแปลงปลูกพืชที่พบอาการของโรค และน้ำที่ใช้ในการเพาะปลูกพืช มาแยกเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ

5. จำแนกเชื้อด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา โดยศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

6. ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ เช่น การใช้แหล่งคาร์บอน การสร้างสาร indole, phosphatase, catalase, lecithinase

7. ศึกษาข้อมูลชีววิทยา ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง สารปฏิชีวนะ

8. เก็บเชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

9. รวบรวมข้อมูล จัดทำฐานข้อมูลชนิด (species) ข้อมูลทางชีววิทยา พืชอาศัย และความสามารถในการอยู่ข้ามฤดูของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละที่สำรวจรวบรวมได้

10. ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia* สาเหตุโรคเน่าเละในประเทศไทย

10.1. สกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Nutrient broth บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดเซลล์แขวนลอยของเชื้อในอาหารเหลว ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองพลาสติก ปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ทิ้งส่วนใส ล้างตะกอนเซลล์ เพื่อกำจัดโพลีแซคคาไรด์ ด้วยน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง เก็บตะกอนเซลล์ นำไปสกัด ดีเอ็นเอ ด้วยชุดสกัด ตามขั้นตอนการของชุดสกัด

10.2. จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือไพรเมอร์ BOX จากส่วน interspersed repetitive Box sequence และไพรเมอร์ ERIC จากส่วน enterobacteria repetitive intergenic consensus (Louws *et al*, 1994)

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ thermal cycler ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 5x Gitschier Buffer 5 ไมโครลิตร, 20 mg/ml BSA 0.2 ไมโครลิตร, 100% DMSO 2.5 ไมโครลิตร, 25mM dNTP's 1.25 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ BOXA1R (25pM) 1ไมโครลิตร (*เฉพาะ ERIC-PCR ไพรเมอร์ ERIC1R และ ERIC2 ชนิดละ 1 ไมโครลิตร) Taq DNA polymerase (5 U/ ul) 0.4 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ (50 นาโนกรัม) 0.5 ไมโครลิตร และ เติมน้ำให้ครบ 25 ไมโครลิตร

ผสมสารประกอบในปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้นให้เข้ากัน แล้วบ่มหลอดปฏิกิริยาในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
1.แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturation)	95	7
2.แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturation)	94	1
3.เริ่มต้นจับคู่ไพเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing)	53	1
4.สังเคราะห์สายดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอแม่แบบ(extension)	65	8
5.สังเคราะหดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	65	15

ทำปฏิกิริยาซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ 30 รอบ และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ขนาดของสายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แยกขนาดของสายดีเอ็นเอ ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ใช้ 1.5% อะกาโรส ในบัฟเฟอร์ 1X Tris-borate EDTA (TBE)ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักดิ์ 70 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง ย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ 5 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี และถ่ายภาพ ด้วย ultraviolet transiluminator

บันทึกข้อมูลโดย และตรวจสอบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ เป็น 0 นำผลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Numerical Taxonomy and Multivariation Analysis System (NTSYS) วิเคราะห์ dendrogram จัดกลุ่มเชื้อ เปรียบเทียบความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม ระหว่างสายพันธุ์ species แหล่งที่มาของเชื้อ และความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรค

10.3. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

โดยการประยุกต์เทคนิค AFLP ของ Vos *et al* (1995) นำดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น 500 นาโนกรัมละลายในน้ำ 5.5 ไมโครลิตร เติม restriction buffer ประกอบด้วยเอ็นไซม์ EcoRI 5 units, MseI 1 units , 10X Ligase buffer with ATP 1.1 ไมโครลิตร, 0.5 M

NaCl 1.1 ไมโครลิตร, 1 mg/ml BSA 0.55 ไมโครลิตร และน้ำ ปริมาตรรวม 9 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นทำการต่อ adaptor โดยเติม ligation buffer ประกอบด้วย 10X Ligase buffer 0.1 ไมโครลิตร, 0.5 M NaCl 0.1 ไมโครลิตร, 1 mg/ml BSA 0.05 ไมโครลิตร เอ็นไซม์ T4DNA ligase (regular conc.) 0.165 ไมโครลิตร 5 uM EcoRI adapter pair 1 ไมโครลิตร 50 uM MseI adapter pair 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรรวมสุดท้ายเท่ากับ 12 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

จากนั้นใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้เป็นต้นแบบ เพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอโดยสุ่มในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย 10X PCR buffer with 15 mM $MgCl_2$ 2 ไมโครลิตร, 1.25 mM dNTPs 1.6 ไมโครลิตร 5 u/ul Taq DNA polymerase 0.125 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Eco (+0, A, G, C, T) (5 uM) 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ Ms (+A, G, C, T) (5 uM) 1 ไมโครลิตร และน้ำ ให้มีปริมาตรสุดท้ายผสมสารประกอบในปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้นให้เข้ากัน แล้วบ่มหลอดปฏิกิริยาในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
1.แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturation)	95	2 นาที
2.แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturation)	94	20 วินาที
3.เริ่มต้นจับคู่ไพเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing)	66	30 วินาที
4.สังเคราะห์สายดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอแม่แบบ (extension)	72	1 นาที
5.สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72	5 นาที

ทำปฏิกิริยาซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ โดยปรับลดอุณหภูมิ annealing 1 องศาเซลเซียส ในทุกๆ รอบ จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 56 องศาเซลเซียส แล้วสังเคราะห์ต่ออีก 19 รอบ สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย นาน 5 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ขนาดของสายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ 20 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แยกขนาดของสายดีเอ็นเอ ด้วย 5% polyacrylamide gel โดยใช้ sequencing apparatus ในบัฟเฟอร์ 1X Tris-borate EDTA (TBE)ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักดิ์ 65 วัตต์ นาน 2.5 ชั่วโมง แล้วตรวจดูแถบและรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดย silver staining

การบันทำข้อมูลรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยตรวจสอบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ เป็น 0 นำผลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS เช่นเดียวกับข้างต้น วิเคราะห์ dendrogram จัดกลุ่มเชื้อ

เปรียบเทียบความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม ระหว่างสายพันธุ์ species แหล่งที่มาของเชื้อ และความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรค

10.4. รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ผล จัดทำฐานข้อมูลการจำแนกเชื้อด้วยลักษณะทางพันธุกรรมแบคทีเรีย *Erwinia* สาเหตุโรคเน่าเละในประเทศไทย

11.รวบรวม วิเคราะห์ข้อมูล สรุป เขียนรายงานผลงานวิจัย

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2556 – กันยายน 2557 ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยโรคพืช และพื้นที่ปลูกพืชผักต่างๆ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคเน่าเละของพืชต่างๆ ในพื้นที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร นครปฐม กาญจนบุรี เชียงใหม่ เชียงราย พะเยา ตาก ลำพูน ลำปาง เพชรบูรณ์ ชัยภูมิ ได้จำนวน 137 ตัวอย่าง นำไปแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละบนอาหาร Nutrient Agar (NA) .ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ทดสอบการสร้างเอนไซม์ pectinolytic บนชิ้นมันฝรั่ง ได้เชื้อที่สามารถทำให้ชิ้นมันฝรั่งเน่า 73 ไอโซเลท โดยเป็นเชื้อจากมันฝรั่ง 38 ไอโซเลท กล้วยไม้สกุลหวาย 8 ไอโซเลท ผักกวางตุ้ง 6 ไอโซเลท ผักกาดขาว 6 ไอโซเลท กะหล่ำปลี 4 ไอโซเลท และจากโฮย่า กุยช่าย ผักกวางตุ้งไต้หวัน กะหล่ำดอก ผักกาดเขียว ผักกาดหัว เตยหอม ข้าวโพดหวาน เผือก มันเทศ และกล้วยไม้สกุลมอคคาร่า ชนิดละ 1 ไอโซเลท และมีตัวอย่างโรคเน่าหลายตัวอย่างที่ไม่สามารถแยกเชื้อสาเหตุของโรคได้ เนื่องจากตัวอย่างมีอาการเน่าเละมาก เมื่อนำมาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มักจะมีเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่เจริญได้รวดเร็วกว่าขึ้นคลุมเต็มหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 10°C ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและที่อุณหภูมิ -20°C ในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ผสม glycerol 40% จากการทดสอบปฏิกิริยา oxidase และ, catalase, phosphatase, lecithinase และการไวต่อสารปฏิชีวนะ erythromycin พบว่าเป็นเชื้อ *Erwinia. carotovora* จำนวน 64 ไอโซเลท และเป็นเชื้อ *Erwinia. chrysanthemi* จำนวน 9 ไอโซเลท ซึ่งแยกเชื้อได้จากตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายและมอคคาร่า

นำเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละที่ได้เก็บไว้ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 10°C จากการทดลองปีก่อน มาเลี้ยงบนอาหาร Nutrient Agar ตรวจสอบความมีชีวิตรอดและความบริสุทธิ์ของเชื้อ พบว่ามีเชื้อบางไอโซเลทที่ตาย ทำการสกัดดีเอ็นของเชื้อที่บริสุทธิ์จำนวน 100 ไอโซเลท สำหรับใช้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อในการทดลองต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากผลการจำแนกเชื้อในเบื้องต้นจะเห็นได้ว่าเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละที่แยกจากตัวอย่างพืชผักส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *Erwinia carotovora* ส่วนเชื้อ *Erwinia chrysanthemi* จะพบในกล้วยไม้สกุลต่างๆ

ซึ่งจะได้จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเหล่านี้เพื่อหาความสัมพันธ์ของชนิดเชื้อกับชนิดของพืชอาศัยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

พัฒนา สนธิรัตน ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช อยู่บำรุง และ อุบล คือประโคน. 2537. **ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย**. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร สหมิตรพริ้นติ้ง นนทบุรี. 285 หน้า.

นิตยา กันหลง. 2545. โรคสาเหตุของพืชสกุลหอม กระเทียม ในประเทศไทย. หน้า 69-75. *ใน:* **เอกสารวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา ปี พ.ศ. 2545**. กรมวิชาการเกษตร.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. **โรคของผักและการป้องกันกำจัด**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 198 หน้า.

วงศ์ บุญสืบสกุล ณัฏฐิมา บุญวัฒน์ สุทธิพงษ์ ญาณวารี สุเนตรา ภาวิจิตร. 2538. การศึกษาสาเหตุโรคเน่าของบุกที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. หน้า 82-92. *ใน:* **รายงานผลวิจัย พ.ศ. 2538.** กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

วิชัย โฆษิตรัตน. 2531. **โรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 133 หน้า

Gallois, A., Samson, R., and P.A.D. Grimont. 1992. *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera*, subsp. *nov.*, associated with odorous soft rot chicory (*Cichorium intybus* L.). *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 582-588.

Goto, M., and K. Matsumoto. 1987. *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae* subsp. *nov.* isolated from diseased rhizomes and fibrous roots of Japanese horseradish (*Eutrema wasabi* Maxim). *International Journal of Systematic Bacteriology* 37: 130-135.

Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T., and F.J. de Bruijn. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied Environmental Microbiology* 60: 2286-2295.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., and M. Kuiper. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.

อนุกรมวิธานและความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย migratory endoparasitic nematodes

Taxonomy and pathogenicity of migratory endoparasitic nematodes

ไตรเดช ข่ายทอง ธิติยา สารพัฒน์ มนตรี เอี่ยมวิมังสา

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การทดลองความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *P. brachyurus* ต่อถั่วเหลือง พันธุ์นครสวรรค์1 และพันธุ์เชียงใหม่ 60 ในกระถางพลาสติกขนาด 6 นิ้ว บรรจุดินอบฆ่าเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี 5 ซ้ำ โดยมีกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอย *P. brachyurus* 500 1,000 3,000 และ 5,000 ตัวต่อกระถาง เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่ไส้เดือนฝอย และตรวจผลการทดลอง 3 เดือนหลังใส่ไส้เดือนฝอย พบว่าไส้เดือนฝอย *P. brachyurus* สามารถขยายพันธุ์ในถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์ แต่ไม่สามารถทำความเสียหายต่อถั่วเหลืองทั้งสองสายพันธุ์ได้

คำสำคัญ : ไส้เดือนฝอยรากแผล การก่อโรค ความเสียหาย ถั่วเหลือง

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-02-09-54

คำนำ

Migratory endoparasitic nematodes เป็นไส้เดือนฝอยชนิดที่เข้าสู่รากพืช ดูดกินอาหารและเคลื่อนที่ภายในรากพืช ไส้เดือนฝอยกลุ่มนี้ไม่ชักนำให้เซลรากพืชเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นแหล่งอาหาร (Feeding Site) เหมือนกับไส้เดือนฝอยรากปม (Root-knot Nematodes) หรือไส้เดือนฝอยซีสต์ (Cyst Nematodes) แต่จะเข้าทำลายเนื้อเยื่อของรากในส่วน Cortex Parenchyma เป็นหลัก โดยดูดกินอาหารจากเซลและเคลื่อนที่ภายในรากพืช การเคลื่อนที่และดูดกินอาหารดังกล่าวทำให้รากเป็นโพรง เกิดแผลสีน้ำตาล ในบางกรณีรากอาจถูกเชื้อโรคอื่นๆ เข้าทำลายซ้ำเติม ต้นพืชที่ระบบรากถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลายจะมีอาการแคระแกรน ต้นโทรม ใบเหลือง ผลผลิตลดลง *Pratylenchus* และ *Radopholus* เป็นไส้เดือนฝอยสกุลที่สำคัญของไส้เดือนฝอยกลุ่มนี้ ซึ่งโดยทั่วไปเป็นไส้เดือนฝอยที่มีพืชอาศัยกว้าง อย่างไรก็ตามไส้เดือนฝอยชนิดต่างๆ จะมีความสำคัญ และทำความเสียหายต่อพืชแต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป เช่น *P. coffeae* และ *P. goodeyi* เป็นศัตรูที่สำคัญของกล้วย (Gowen *et al.*, 2005) *P. coffeae*, *P. brachyurus*, *P. goodeyi*, *P. pratensis*, *P. loosi, P. panamaensis, P. zeae* และ *P. vulnus* เป็นศัตรูของกาแฟ (Campos and Villain, 2005) *P. penetrans* ทำลายพืชได้มากเกือบ 400 ชนิด (Evans *et al.*, 1993) ไส้เดือนฝอยรากโพรง *Radopholus similis* สามารถทำลายพืชได้มากกว่า 250 ชนิด (O'Bannon, 1977) จำนวนไส้เดือนฝอย *R. similis* เริ่มต้นเพียง 10 ตัว สามารถสร้างความเสียหายแก่ต้นหน้าวัวได้ (Sipes and Lichty, 2002) การทดลองนี้เป็นการรวบรวมไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* เป็นหลัก ปัจจุบันไส้เดือนฝอยรากแผลได้ถูกจำแนกแล้วมากกว่า 60 ชนิด มีรายงานการพบไส้เดือนฝอยรากแผล *P. brachyurus, P. coffeae, P. zeae, P. vulnus, P. minyus, P. delattrei*, *P. nongkiensis*, *P. sudanensis*, *P. thornei* และ *Pratylenchus* spp. ในแหล่งปลูกพืชของประเทศไทย (Chunram, 1972; Pliansinchai and Boonduang, 1978; Pliansinchai and Boonduang, 1986) ข้อมูลของไส้เดือนฝอยรากแผลในประเทศไทยค่อนข้างเก่า ซึ่งปัจจุบันการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลได้เปลี่ยนไป ทำให้ชนิดของไส้เดือนฝอยรากแผลในปัจจุบันแตกต่างจากข้อมูลในอดีต การศึกษาการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยกลุ่มนี้จึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อปรับปรุงฐานข้อมูลให้มีความทันสมัย นอกจากนี้ข้อมูลด้านผลกระทบต่อพืชของไส้เดือนฝอยกลุ่มนี้ยังมีไม่มากนัก การศึกษาถึงความสามารถในการทำให้เกิดโรคต่อพืชของไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* ทำให้ทราบถึงข้อมูลในการเข้าทำลายพืช ความเสียหายที่ไส้เดือนฝอยกระทำต่อพืช ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการจัดการไส้เดือนฝอยในสกุลนี้ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และวิธีการ

การดำเนินงานในปีงบประมาณ 2554 เป็นการเก็บตัวอย่างดิน จากแหล่งปลูกพืชชนิดต่างๆ ในประเทศไทย เพื่อตรวจหาไส้เดือนฝอย ทำการคงสภาพไส้เดือนฝอย และทำสไลด์ถาวร จำแนกชนิดของ

ไส้เดือนฝอย รวมทั้งเพิ่มจำนวนไส้เดือนฝอยในพืชอาศัย เพื่อให้ได้จำนวนประชากรของไส้เดือนฝอยมากพอในการศึกษาด้านชีววิทยาต่อไป การดำเนินงานในปีงบประมาณ 2555 ทำการจำแนกไส้เดือนฝอยรากแผล *Pratylenchus* spp. โดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน เพื่อทราบชนิดของไส้เดือนฝอยที่ชัดเจน ในปีงบประมาณ 2556 ดำเนินงานต่อเนื่องจากปี 2555 และทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *P. coffeae* ต่อกาแฟพันธุ์อาราบิก้า ในปีงบประมาณ 2557 ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *P. brachyurus* ต่อถั่วเหลืองพันธุ์นครสวรรค์1 และพันธุ์เชียงใหม่ 60

การเตรียม inoculum

เลี้ยงไส้เดือนฝอย *P. brachyurus* บนรากข้าวโพดในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 3 เดือน แยกไส้เดือนฝอยออกจากรากข้าวโพดโดยการแช่รากข้าวโพดในน้ำ เทไส้เดือนฝอยลงในบีกเกอร์ ตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอย

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *P. brachyurus* ต่อถั่วเหลืองพันธุ์นครสวรรค์1 และพันธุ์เชียงใหม่ 60 โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 5 ซ้ำ 5 กรรมวิธี เพาะเมล็ดถั่วเหลือง ลงในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว บรรจุดินอบฆ่าเชื้อ เมื่อต้นกล้าอายุ 14 วัน ใส่ไส้เดือนฝอยลงในกระถางตามกรรมวิธีทดลอง ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่ไส้เดือนฝอย

กรรมวิธีที่ 2 ใส่ไส้เดือนฝอย 500 ตัว/กระถาง

กรรมวิธีที่ 3 ใส่ไส้เดือนฝอย 1,000 ตัว/กระถาง

กรรมวิธีที่ 4 ใส่ไส้เดือนฝอย 3,000 ตัว/กระถาง

กรรมวิธีที่ 5 ใส่ไส้เดือนฝอย 5,000 ตัว/กระถาง

ตรวจผลการทดลอง 3 เดือนหลังจากใส่ไส้เดือนฝอย โดยชั่งน้ำหนักแห้งต้น จำนวนไส้เดือนฝอยในดินและราก แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดินโดยวิธีการกวนตัวอย่างดินในน้ำ และกรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร ที่วางบนตะแกรงขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร และแยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่าง โดยนำตัวอย่างใส่ลงบนกระดาษกรองที่วางอยู่บนตะแกรงไนลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) และแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพืชโดยใช้ Mistifier ตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธี Analysis of variance โดยแปลงข้อมูลจำนวนไส้เดือนฝอยให้อยู่ในรูป log (x+1) ก่อนวิเคราะห์ข้อมูล

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2558

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ปี 2554 ทำการเก็บตัวอย่างดินจำนวนทั้งสิ้น 113 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* 34 ตัวอย่าง เลี้ยงไส้เดือนฝอยจากตัวเต็มวัยเพศเมียที่มีไข่ 1 ตัวบนชิ้นแครอทได้สำเร็จ 6 ตัวอย่าง ซึ่งการเลี้ยงไส้เดือนฝอยบนชิ้นแครอทประสบปัญหาในการเตรียมชิ้นแครอทที่ปลอดเชื้อ เนื่องจากแครอทที่ซื้อมาจากตลาดส่วนใหญ่มักมีแบคทีเรียอยู่ภายใน ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อขึ้นในภายหลัง นอกจากนี้การเลี้ยงไส้เดือนฝอยจากตัวเต็มวัยเพียง 1 ตัว ใช้เวลานาน สภาพของชิ้นแครอทที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้ออาจเปลี่ยนไป ซึ่งอาจไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย ทำให้ไส้เดือนฝอยตายในที่สุด การเลี้ยงไส้เดือนฝอยบนชิ้นแครอทตรวจสอบการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยได้ยาก ต้องรอจนกระทั่งไส้เดือนเดือนฝอยมีจำนวนมากพอที่จะสังเกตเห็นได้ ได้แก้ปัญหาโดยการเลี้ยงไส้เดือนฝอยบนรากข้าวโพด บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งประสบผลสำเร็จมากกว่า และสามารถตรวจดูการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยและ sub-culture ได้ง่าย

ปี 2555 ได้เลี้ยงไส้เดือนฝอย *Pratylenchus* บนรากข้าวโพด แยกไส้เดือนฝอยจากรากข้าวโพด ทำการคงสภาพไส้เดือนฝอยและทำสไลด์ถาวร จำแนกไส้เดือนฝอยโดยใช้คู่มือการจัดจำแนกของ Castillo, P., and N. Vovlas (2007) โดยจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลจากตัวอย่างดิน 23 แห่ง (38 ตัวอย่าง) จำแนกได้ไส้เดือนฝอย *P. coffeae* จากตัวอย่างดิน 20 แห่ง *P. brachyurus* จากตัวอย่างดิน 1 แห่ง และยังจำแนกชนิดที่ชัดเจนไม่ได้จากตัวอย่างดิน 2 แห่ง

ปี 2556 ผลการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *P. coffeae* ต่อกาแฟพันธุ์อาราบิก้า พบว่าไส้เดือนฝอย *P. coffeae* ไอโซเลตที่ใช้ทดสอบ ไม่สามารถขยายพันธุ์ในกาแฟพันธุ์อาราบิกาได้ โดยไม่พบประชากรไส้เดือนฝอยในดินในทุกกรรมวิธี และพบประชากรไส้เดือนฝอยในรากหนัก 5 กรัมเฉลี่ย 8 5 17 และ 12 ตัว ในกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยเมื่อเริ่มทดลอง 3,000 6,000 9,000 และ 12,000 ตัวตามลำดับ ไม่พบความแตกต่างของน้ำหนักต้นในทุกกรรมวิธี อย่างไรก็ตามพบว่าต้นกาแฟที่ใส่ไส้เดือนฝอยรากแผล มีสีใบชีด ขอบใบไหม้ และรากมีสีน้ำตาล เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้ใส่ไส้เดือนฝอย ซึ่งอาจเกิดจากการเข้าทำลายรากของไส้เดือนฝอยเมื่อเริ่มทดลอง ไส้เดือนฝอย *P. coffeae* ที่ใช้ในการทดลองเป็นไอโซเลตที่แยกได้จากกล้วย จึงอาจทำให้ไม่สามารถขยายพันธุ์และทำให้เกิดโรคได้ในกาแฟ

ปี 2557 ผลการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *P. brachyurus* ต่อถั่วเหลืองพันธุ์นครสวรรค์1 และพันธุ์เชียงใหม่ 60 พบว่าในถั่วเหลืองพันธุ์นครสวรรค์ 1 น้ำหนักต้นในแต่ละกรรมวิธีไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จำนวนประชากรไส้เดือนฝอยเมื่อสิ้นสุดการทดลองในกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอย 1,000 3,000 และ 5,000 ตัวต่อกระถางไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอย 3,000 และ 5,000 ตัวต่อกระถาง มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอย 500 ตัวต่อกระถาง อัตราการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย (*Rf*) ในแต่ละกรรมวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1)

ในถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 พบว่าน้ำหนักต้นแห้งในกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอย 500 3,000 และ 5,000 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอย 500 1,000 และ กรรมวิธีที่ไม่ใส่ไส้เดือนฝอยมีน้ำหนักต้นแห้งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอย 3,000 และ 5,000 ตัวต่อกระถาง มีน้ำหนักมากว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอย 1,000 ตัวต่อกระถางและกรรมวิธีที่ไม่ใส่ไส้เดือนฝอย (Table 2) จำนวนไส้เดือนฝอยในดินเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ในกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยในกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอย 500 ตัวต่อกระถางมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอย 1,000 3,000 และ 5,000 ตัวต่อกระถาง (Table 2)

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าไส้เดือนฝอย *P. brachyurus* สามารถขยายพันธุ์ในถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์ แต่ในการทดลองครั้งนี้พบว่าปริมาณไส้เดือนฝอยระดับต่างๆ ที่ใส่ลงในถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์ ระยะเวลา 3 เดือน ไม่สามารถทำความเสียหายต่อถั่วเหลืองทั้งสองสายพันธุ์ได้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *P. brachyurus* ต่อถั่วเหลืองพันธุ์นครสวรรค์1 และพันธุ์เชียงใหม่ 60 พบว่าเมื่อใส่ไส้เดือนฝอย 500 1,000 3,000 และ 5,000 ตัวต่อกระถาง เป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าไส้เดือนฝอย *P. brachyurus* สามารถขยายพันธุ์ในถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์ได้ แต่ไม่สามารถทำความเสียหายต่อถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์ได้

เอกสารอ้างอิง

Campos, V.P., and L. Villain. 2005. *Nematode parasites of coffee and cocoa*. Pp. 529-579. *In: Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2nd edition. M. Luc, R.A. Sikora and J. Bridge, eds. CAB International.

Castillo, P., and N. Vovlas. 2007. *Pratylenchus (Nematoda: Pratylechidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management*. Brill Leiden, Boston.

Chunram, C. 1972. A list of plant parasitic nematodes in Thailand. *Plant Protection Service Technical Bulletin*. No.1: 23-26.

Evans, K., D.L. Trudgill, and J.M.Webster. 1993. *Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture*. CAB International. Wallingford, UK. Pp. 648

Gowen, R.S., P. Quénéhervé, and R. Fogain. 2005. *Nematode parasites of bananas and plantains*. Pp. 611-643. *In: Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*, 2nd edition. M. Luc, R.A. Sikora and J. Bridge, eds. CAB International.

O'Bannon, J.H. 1977. Worldwide dissemination of *Radopholus similis* and its importance in crop production. *Journal of Nematology*. 9:16-25.

Pliansinchai, U., and A. Boonduang. 1978. A systematic study of plant parasitic nematodes of Black pepper in Thailand. *Nematology Section Technical Bulletin*. No.2: 22-30.

Pliansinchai, U., and A. Boonduang. 1986. A systematic study of plant parasitic nematodes of Sugarcane in Thailand. *Nematology Section Technical Bulletin*. No.5: 48-61.

Ryss A.Y. 2003. Express technique to prepare permanent collection slides of nematodes. *Zoosystematica Rossica*. 11(2): 257–260.

Sipes, B.S., and J.S. Lichty. 2002. *Radopholus similis* damage to *Anthurium andraeanum*. *Nematropica*. 32:77-81.

Table 1 Average plant dry weight, the final nematode population and reproduction factor (*Rf*) of *P. brachyurus* on *Glycine max* cv. "Nakhon Sawan 1".

Treatments	Plant dry weight (g) †	Final population (*Pf*) †	Reproduction factor (*Rf*) †
Non-inoculated	1.68	0 c	-
500	2.28	1,967 b	3.93
1,000	1.69	8,390 ab	8.39
3,000	1.92	11,764 a	3.92
5,000	2.28	19,437 a	3.89
F - test	ns	**	ns
CV (%)	35.62	25.65	21.96

† Numbers in the column with the same letter are not statistically different at 95% level by DMRT

* = Statistically different at 95% level

** = Statistically different at 99% level

Table 2 Average plant dry weight, the final nematode population and reproduction factor (*Rf*) of *P. brachyurus* on *Glycine max* cv. "Chiang Mai 60".

Treatments	Plant dry weight (g) †	Final population (Pf) †	Reproduction factor (*Rf*)
Non-inoculated	0.10 b	0 b	-
500	1.67 ab	12,029 a	24.06 a
1,000	1.11 b	7,387 a	7.39 b
3,000	1.80 a	21,650 a	7.22 b
5,000	1.98 a	15,565 a	3.11 b
F - test	*	**	**
CV (%)	38.52	23.58	24.11

† Numbers in the column with the same letter are not statistically different at 95% level by DMRT

* = Statistically different at 95% level

** = Statistically different at 99% level

2007

การจำแนกชนิดของราสกุล *Colletotrichum* สาเหตุโรคพืช โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม

Identification of *Colletotrichum* Plant Pathogenic Fungi Using Morphological and Molecular Characteristics

พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ ชนินทร ดวงสอาด

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ผลการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Colletotrichum* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 128 ตัวอย่าง จากพืชอาศัยจำนวน 27 ชนิด ใน 29 จังหวัด และศึกษาจำแนกชนิดเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการศึกษาจำแนกได้รา *Colletotrichum* จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum acutatum C. capsici C. circinans C. falcatum C. gloeosporioides C. musae C. truncatum* และ unidentified species *Colletotrichum* spp. 9 ชนิด ซึ่งมีลักษณะของสปอร์คล้ายๆ กัน ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และพบว่า *C. musae* เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร Oat Meal agar รองลงมา ได้แก่ Potato Dextrose Agar และ Czapek Dox Agar

ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของรา *Colletotrichum* ทั้งหมด 50 ไอโซเลท ได้แก่ ราที่แยกได้จากกล้วยหอม 5 ไอโซเลท จากพริก 17 ไอโซเลท จากแก้วมังกร 27 ไอโซเลท และ ลองกอง 1 ไอโซเลท และวิเคราะห์ลำดับเบสของรา *Colletotrichum* ที่แยกได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลท พบว่า ลำดับเบสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง ITS ซึ่งรวมบางส่วนของยีน 18S และ 28S บน rDNA มีขนาดทั้งหมด 578 คู่เบส จำแนกชนิดได้เป็นรา *C. musae C. gloeosporioides C. acutatum* และ *C. capsici*

คำสำคัญ: การจำแนกชนิด *Colletotrichum* ราสาเหตุโรคพืช ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางพันธุกรรม

Key words: Identification, *Colletotrichum*, Plant pathogenic fungi, Morphological Characteristics, Molecular Characteristics

---

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-02-12-54

คำนำ

ราสกุล *Colletotrichum* พบแพร่กระจายอยู่ทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน ดำรงชีวิตแบบ saprophyte และ parasite จัดเป็นราที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นสาเหตุของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด สามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช ตั้งแต่ระยะออกดอกจนถึงระยะหลังการเก็บเกี่ยว ส่งผลให้ปริมาณและคุณภาพลดลง ทำให้ไม่เป็นที่ต้องการของตลาดภายในและภายนอกประเทศ ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งของการส่งออกไม้ผลไปต่างประเทศ

แต่เดิมจัดราที่คล้าย *Colletotrichum* แต่ไม่มี setae ไว้ใน genus *Gloeosporium* แต่ในปัจจุบัน *Gloeosporium* ได้จัดรวมอยู่ใน *Marssonina* ปัจจุบันพบว่ารา *Colletotrichum* มีจำนวนมากกว่า 20 species บนพืชอาศัยต่างๆ กัน ส่วนใหญ่ทำให้เกิดโรคใบจุดหรือโรคแอนแทรคโนส Domsch *et al.* (1993 a, b) ได้รายงาน 2 species ซึ่งในบางครั้งเป็นราดิน (soil-borne) ได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides* (teleomorph เป็นรา *Glomerella cingulata* สร้าง conidia รูปทรงกระบอก หัวท้ายมนไม่มี setae และ *Colletotrichum dematium* สร้าง conidia รูปพระจันทร์เสี้ยว และมี setae

ลักษณะสำคัญของรา Coelomycetes genus นี้คือการสร้าง acervuli อยู่ใต้ epidermis ของพืช บนวุ้นอาหารจะพบลักษณะคล้าย sporodochia ราสร้าง phialides ไม่มีสี เกิดรวมเป็นกลุ่มหนาแน่น บาง species จะพบ setae สีดำ ปลายแหลม เกิดจากฐานของ stroma conidia รูปทรงกระบอก หรือพระจันทร์เสี้ยว มี 1 เซล ไม่มีสี ผนังเรียบ มักเกิดอยู่ในกลุ่มสารเมือกเหลวสีครีม ส้ม แดง หรือน้ำตาล ลักษณะสำคัญอีกอย่างหนึ่งของรา genus นี้คือการสร้าง appressoria เกิดจากการงอกของ conidia มีสีน้ำตาล รูปร่างกลมหรือมีส่วนที่โป่งหรือยื่นออก (lobed) การจัดจำแนกของราในกลุ่มนี้อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่นลักษณะของสปอร์ การมีหรือไม่มี setae การสร้าง sclerotia ลักษณะของโคโลนีบนอาหารต่างๆ ในปัจจุบันมีการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลกันมากขึ้น โดยเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าลักษณะของราในกลุ่มนี้จะแตกต่างกันแต่ลักษณะบางชนิดก็จะมีลักษณะคล้ายคลึงและใกล้เคียงกันมากเมื่อตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ในปัจจุบันนี้มีการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อมาใช้ในการจำแนกชนิด ซึ่งก็ทำให้การจำแนกชนิดของรามีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ กระดาษ ถุงพลาสติค ปากกาเคมี ดินสอ กรรไกรตัดกิ่ง และ GPS
2. อุปกรณ์จัดเก็บตัวอย่างแห้ง ได้แก่ แผ่นไม้อัดทับตัวอย่าง กระดาษ
3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ slide cover slip ปากคีบ เข็มเขี่ยปลายแหลม ใบมีดโกน ตะเกียง ยาทาเล็บ
4. สารเคมีสำหรับ mount slide ได้แก่ lactophenol, lactic acid, shear's sulution

5. สารเคมี ได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ : สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75%

6. อาหารวุ้นสังเคราะห์ corn meal agar (CMA), potato dextrose agar (PDA)

7. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดดูแรน บีกเกอร์ เป็นต้น

8. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว เป็นต้น

9. กล้องจุลทรรศน์ compound microscope และ stereo microscope พร้อมกล้องถ่ายรูปและ camera lucida สำหรับวาดภาพราจากกล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพืช

เก็บตัวอย่างโรคพืช ได้แก่ ใบ ดอก ผล กิ่ง ลำต้น และราก จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ และแบ่งตัวอย่างโรคพืชมาอัดทับตัวอย่างแห้ง จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช

ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 5-10 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือ conidium ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ และตรวจดูลักษณะต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปลักษณะเชื้อและบันทึกลักษณะต่างๆ ของเชื้อ

- แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplant

นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar หรือ water agar บ่มที่อุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียส นาน 3-7 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

3. ศึกษาลักษณะของเชื้อบนอาหารชนิดต่างๆ

นำรา *Colleotrichum* ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar, Oat meal agar หรือ water agar โดยบันทึกลักษณะต่างๆ ดังต่อไปนี้

บันทึกอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารชนิดต่างๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกสีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment)

4. การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- ศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่นๆ ของเชื้อรา โดยการ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscope)

5. เก็บรักษาสายพันธุ์ราและตัวอย่างแห้ง

เก็บรักษาราที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์ โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

6. การพิสูจน์การเกิดโรค

ทำการพิสูจน์การเกิดโรค โดยทำการปลูกเชื้อส่วนของพืช โดยทำแผลและไม่ทำแผล อย่างละ 10 ซ้ำ เปรียบเทียบกับการเกิดโรคบนส่วนที่ไม่ปลูกเชื้อด้วยวิธีเดียวกัน แยกเชื้อสาเหตุจากต้นที่แสดงอาการโรค เปรียบเทียบชนิดของราสาเหตุโรคใช้ในการปลูกเชื้อ

การเตรียม DNA จากเส้นใยของรา

7. การเตรียมเส้นใยของรา

เลี้ยงรา *Colletotrichum* บนอาหาร MEA (Malt extract agar) นาน 7-10 วัน หลังจากนั้นใช้เข็มเขี่ยเอาเส้นใยของรามาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB (Potato dextrose broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน flask 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 7 วัน หลังจากนั้นนำราในอาหารเหลวมากรองด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ และทำให้แห้งด้วยการดูดอากาศออกด้วยเครื่องดูดสัญญากาศ เก็บเส้นใยราที่แห้งด้วยหลอด และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาสกัด DNA

8. การสกัด DNA จากรา

นำรา *Colletotrichum* อย่างน้อย 5 genera 5 species อย่างละ 5 isolates ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาสกัด DNA โดยใช้วิธีของ Crous และคณะ (2000)

9. การเพิ่มปริมาณยีน Internal Transcribed Spacer โดยใช้เทคนิค PCR

นำ DNA ของราที่แยกได้ในข้อ 13.2.3 มาทำ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS1 (5'TTTCCGTAGGTGAACCTGC3') และ ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC)

- สังเคราะห์คู่ primer ITS1 และ ITS4 เพื่อทำการเพิ่มปริมาณของ rDNA ในช่วง ITS1-5.8S rDNA-ITS2-26SrDNA

- นำ DNA ของราทั้งหมดในข้อ 13.2.3 มาเพิ่มปริมาณของ rDNA ในช่วง ITS1-5.8S rDNA-ITS2-26SrDNA โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ITS1 และ ITS4 ด้วยวิธี PCR ประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

10X PCR buffer	6 ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	3 ไมโครลิตร
10 mM dNTP	1 ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS1 (50 พิโคโมล / ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS4 (50 พิโคโมล / ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
Taq DNA Polymerase (5 ยูนิต / ไมโครลิตร)	0.25 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	28.75 ไมโครลิตร
สารละลาย DNA (50 นาโนกรัม / ไมโครลิตร)	10 ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	50 ไมโครลิตร

- ส่วนของ β-tubulin นั้นเพิ่มปริมาณโดยใช้คู่ไพร์เมอร์ Bt2a และ Bt2b

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA โดยมีรอบการทำปฏิกิริยา (Slippers *et al.*, 2004) ดังนี้

94 องศาเซลเซียส	5 นาที		1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	1 นาที	50 วินาที	30 รอบ
52 องศาเซลเซียส	2 นาที		
72 องศาเซลเซียส	1 นาที		
72 องศาเซลเซียส	5 นาที		1 รอบ
4 องศาเซลเซียส	hold		

10. <u>การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน ITS1-5.8SrDNA-ITS2-26SrDNA</u>

นำผลผลิตที่ได้จากข้อ 13.2.3 มาตรวจวิเคราะห์ผลด้วย electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 0.5XTBE buffer โดยตัดแถบ DNA ที่เป็นยีนเป้าหมาย ภายใต้ UV transilluminator โดยใช้วิธีของ Slippers และคณะ (2004)

11. <u>การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาศึกษาทั้งหมด</u>

การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาศึกษาทั้งหมดไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ในช่วงลำดับเบส 15 ITS rDNA และ 15 β-tubulin ซึ่งเป็นราในกลุ่ม *Colletotrichum* โดยนำมาเปรียบเทียบวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการวิวัฒนาการด้วย PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) version 4.0b8 โดย Swofford (2000)

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2553 – สิ้นสุด กันยายน 2558

สถานที่ - แหล่งพืชธรรมชาติ

- แปลงปลูกพืชของเกษตรกร

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพืช

ผลการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Colletotrichum* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 128 ตัวอย่าง จากพืชอาศัยจำนวน 27 ชนิด ในจังหวัดกำแพงเพชร กาญจนบุรี กรุงเทพฯ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชุมพร เชียงใหม่ เชียงราย นครปฐม นครนายก นครราชสีมา ตราดบุรีรัมย์ ปทุมธานี เพชรบูรณ์ เพชรบุรี พะเยา แม่ฮ่องสอน ระยอง ราชบุรี ลำพูน ศรีสะเกษ สระบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม สุโขทัย สุราษฎร์ธานี อุบลราชธานี และ อุตรดิตถ์ ตัวอย่างโรคพืชที่รวบรวมได้ทั้งหมดนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยการศึกษาราจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง การทำ moist chamber และโดยวิธีการแยกราจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค เก็บตัวอย่างโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- <u>ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช</u>

ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 5-10 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือ conidium ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปลักษณะเชื้อและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

- <u>แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplant</u>

นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar หรือ water agar บ่มที่อุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียส นาน 3-7 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

3. ศึกษาลักษณะของเชื้อบนอาหารชนิดต่าง ๆ

นำรา *Colleotrichum musae* ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar, Oat meal agar หรือ

water agar พบว่าราเจริญได้ดีที่สุด Oat Meal agar รองลงมาได้แก่ Potato Dextrose Agar และ Czapek Dox Agar

4. การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- ศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อรา โดยการ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscope)

การศึกษารา *Colletotrichum* จากส่วนที่เป็นโรค และการจำแนกชนิด

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา *Colletotrichum*

ผลจากการศึกษาจำแนกชนิดเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกได้รา *Colletotrichum* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum capsici C. falcatum C. gloeosporioides C. musae C. truncatum* และ unidentified species *Colletotrichum* spp. 9 ชนิด (ตารางที่ 1) ซึ่งมีลักษณะของสปอร์คล้าย ๆ กัน ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการจำแนกชนิดของเชื้อในระดับ species และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อต่อไป

5. เก็บรักษาสายพันธุ์ราและตัวอย่างแห้ง

เก็บรักษาราที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์ โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

6. การสกัด DNA จากเส้นใยของรา

จากการนำเส้นใยของรา *Colletotrichum* จำนวน 50 ไอโซเลท มาสกัด DNA โดยวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Crous *et al.* (2000) เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณ DNA ด้วยวิธีการ agarose gel electrophoresis พบว่าทุกไอโซเลทของราปรากฏแถบ DNA ชัดเจน โดยเปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน เก็บรักษา DNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาเพิ่มปริมาณและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Colletotrichum* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 128 ตัวอย่าง จากพืชอาศัยจำนวน 27 ชนิด ใน 29 จังหวัด และศึกษา

จำแนกชนิดเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการศึกษาจำแนกได้รา *Colletotrichum* จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum acutatum C. capsici C. circinans C. falcatum C. gloeosporioides C. musae C. truncatum* และ unidentified species *Colletotrichum* spp. 9 ชนิด ซึ่งมีลักษณะของสปอร์คล้าย ๆ กัน ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และพบว่า *C. musae* เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร Oat Meal agar รองลงมาได้แก่ Potato Dextrose Agar และ Czapek Dox Agar

ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของรา *Colletotrichum* ทั้งหมด 50 ไอโซเลท ได้แก่ ราที่แยกได้จากกล้วยหอม 5 ไอโซเลท จากพริก 17 ไอโซเลท จากแก้วมังกร 27 ไอโซเลท และ ลองกอง 1 ไอโซเลท และวิเคราะห์ลำดับเบสของรา *Colletotrichum* ที่แยกได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลท พบว่าลำดับเบสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง ITS ซึ่งรวมบางส่วนของยีน 18S และ 28S บน rDNA มีขนาดทั้งหมด 578 คู่เบส จำแนกชนิดได้เป็นรา *C. musae C. gloeosporioides C. acutatum* และ *C. capsici*

เอกสารอ้างอิง

นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2535. โรคผลเน่าของมะม่วงและวิธีการควบคุมโรค. เคหการเกษตร. 16: 72-75.

Bailey, J.A. and M.J. Jeger. 1992. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. CAB International, Kew. 380P.

Sutton,B.C. 1980. The Coelomycetes Fungi Impefect with Pynidia Acervuli and Stromata. Commonwealth Agricultural Bureaux, England. 696 p.

Sutton,B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotichum,* pp. 1-23. *In Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. Bailey, J.A. and M.J. Jeger (eds.) CAB International, Kew.

Table 1 Genera of *Colletotrichum* on various host from different locations during October 2010 to September 2014.

Causal agent	Host	Plant Part Affect	Locations
Colletotrichum acutatum	chilli	Stem, fruit	Chanthaburi, Chumphon, Chiang Mai, Nakhon Ratchasima, Pathum Thani, Rayong, Ratchaburi, Trat, Samut Sakhon
C. capsici	chilli	Flowers, fruit	Kanchanaburi, Phichit, Phrae, Phatchabun, Uttaradit, Ubol Ratchathani
Colletotrichum circinans	onion	leaf	Chiang Mai, Mae Hong San
C. falcatum	sugarcane	Stem leaf	Kanchanaburi, Chaiyaphum, Rayong, Rayong, Phetchabum, Lopburi
C. gloeosporioides *C. truncatum*	Dragon fruit	Stem, fruit	Bangkok, Chanthaburi, Chumphon, Chiang Maim, Nakhon Ratchasima, Pathum Thani, Rayong, Ratchaburi, Trat,Samut Sakhon, Samut Songkham
C. gloeosporioides	mango	Leaf, fruit	Kanchanaburi, Bangkok, Chachoengsao, Nakhon Ratchasima, Chanthaburi, Saraburi, Chiang Mai, Lumphun
C. gloeosporioides	papaya	fruit	Saraburi, Chumphon, Pathum Thani

Table 1 Genera of *Colletotrichum* on various host from different locations during October 2010 to September 2014. (continue)

Causal agent	Host	Plant Part Affect	Locations
C. gloeosporioides	banana	fruit	Kamphaengphet, Chathaburi, Sukhothai Pathum Thani, Phetchaburi
C. gloeosporioides	onion	Leaf, bulb	Chiang Mai, Mae Hong San
C. gloeosporioides,	shallot	Leaf, bulb	Chiang Mai, Chiang Rai, Sisaket, Buri Ram, Ubol Ratchathani, Uttaradit, Lumphun, Mae Hong San
C. gloeosporioides	chilli	Stem, fruit (Anthracnose)	Kanchanaburi, Bangkok, CHanthaburi, Chumphon, Chiang Mai, Nakhon Ratchasima, Pathum Thani, Rayong, Ratchaburi, Trat, Phrae, Samut Sakhon, SamutSongkham, Surat Than, Ubol Ratchathanii
Colletotrichum capsici	chilli	Leaf, fruit (anthracnose)	Kanchanaburi, Phichit, Phrae, Phetchabun, Uttaradit
Colletotrichum sp, Teleomorph: unidentified	Longkong	Fruit (incubate)	-

2017

ลักษณะของเชื้อ *Pectobacterium* spp. และ *Dickeya* spp. สาเหตุโรคเน่าดำและเน่าเละของมันฝรั่งในประเทศไทย

Characterization of *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. Causing Blackleg and Soft Rot on Potatoes in Thailand

รุ่งนภา คงสุวรรณ์[1/] สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[1/] ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]กลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

รายงานความก้าวหน้า

ได้ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคเน่าดำและเน่าเละของมันฝรั่งในแหล่งปลูกมันฝรั่งฤดูแล้งในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างเดือนมกราคม-เมษายน 2557 นำไปแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคบนอาหาร Nutrient Agar (NA) และทดสอบการทำให้มันฝรั่งเน่า ได้เชื้อที่สามารถทำให้ชิ้นมันฝรั่งเน่า 60 ไอโซเลท เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 8°C ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและที่อุณหภูมิ -20°C ในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ผสม glycerol 40% จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการและการไวต่อสารปฏิชีวนะ erythromycin พบว่าเป็นเชื้อ *Pectobacterium* spp. ทั้ง 60 ไอโซเลท ซึ่งต่อไปจะทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อเหล่านี้

Keywords: มันฝรั่ง,โรคเน่าดำ,โรคเน่าเละ, *Pectobacterium*, *Dickeya*, potato, blackleg, soft rot, rep-PCR

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-02-13-56

คำนำ

โรคเน่าดำ (blackleg) และโรคเน่าเละ (soft rot) เป็นโรคที่สำคัญของมันฝรั่งอีกโรคที่เข้าทำลายหัวมันฝรั่งและส่วนลำต้นเหนือดิน ทำให้ต้นมันฝรั่งเน่าตาย ผลผลิตหัวมันฝรั่งลดลง สามารถพบการทำลายได้ทั้งในแหล่งปลูกและในโรงเก็บ (วนิดา, 2544) สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อ *Pectobacterium atrosepticum* (ชื่อเดิม *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) เชื้อ *Pectobacterium carotovorum* subsp. *caratovorum* (ชื่อเดิม *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)และเชื้อ *Dickeya* spp. (ชื่อเดิม *Erwinia chrysanthemi*) เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าดำและเน่าเละของมันฝรั่ง จะเข้าทำลายพืชในช่วงอุณหภูมิที่ต่างกัน โดยเชื้อ *P. atrosepticum* จะเข้าทำลายมันฝรั่งในช่วงอุณหภูมิค่อนข้างเย็น (15-20 °C) เชื้อ *Pcc.* จะเข้าทำลายในช่วงอุณหภูมิปานกลาง (28-30 °C) ส่วนเชื้อ *Dickeya* spp.จะชอบสภาพอากาศอบอุ่นชื้น (30-37 °C) เชื้อ *Dickeya* ที่มีรายงานว่าเข้าทำลายมันฝรั่งนั้นมีอยู่ 4 species ได้แก่ *D. chrysanthemi*, *D. dianthicola*, *D. dadantii* และ *D. zeae* การจำแนกเชื้อ *Dickeya* spp. ที่พบในมันฝรั่ง ในระดับ species นั้นยังไม่มีความแน่ชัด ผลการจำแนกในแต่ละประเทศนั้นแตกต่างไม่เหมือนกันอย่างเห็นได้ชัด ตัวอย่างเช่น *D. chrysanthemi* ในสหรัฐอเมริกาและไต้หวัน *D. dadantii* biovar 3 ในบราซิล เปรู และซิมบับเว *D. zeae* biovar 3 ในออสเตรเลียและปาปัวนิวกินี(Toth et al., 2011)

เชื้อแบคทีเรีย *Erwinia chrysanthemi* เป็นเชื้อสาเหตุโรคเน่าของพืชหลายชนิด พบเข้าทำลายพืชได้อย่างกว้างขวางในพื้นที่อากาศปานกลาง ทั้งในทวีปยุโรป เอเชีย แอฟริกา อเมริกาเหนือ อเมริกากลางและคาริเบียน อเมริกาใต้และโอเชียเนีย ในปี ค.ศ. 2005 เชื้อนี้ได้ถูกแบ่งออกเป็น 6 species ภายใต้ genus *Dickeya* ได้แก่ *Dickeya chrysanthemi* , *Dickeya paradisiaca* , *Dickeya dadantii* , *Dickeya dianthicola* , *Dickeya dieffenbachiae* และ *Dickeya zeae* (Samson et al., 2005)

ในอดีต เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าที่เข้าทำลายมันฝรั่งในประเทศแถบยุโรปส่วนใหญ่คือ *D. dianthicola* (*E. chrysanthemi*) ซึ่งเป็นเชื้อที่ปรับตัวเข้ากับสภาพอุณหภูมิปานกลางได้ดีกว่าเชื้ออื่น รองลงมาคือ *P. atrosepticum* (Toth et al., 2011) แต่หลังจาก ปี ค.ศ. 2000 เป็นต้นมาพบว่า มีเชื้อ *Dickeya* spp. เข้าทำลายมันฝรั่งมากขึ้นและอาการรุนแรงมากกว่าปกติ เชื้อสายพันธุ์นี้ปรับตัวเข้ากับอุณหภูมิที่สูงอันเป็นผลมาจากปรากฏการณ์โลกร้อน (global warming) เนื่องจากสภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลง (climate change)ได้ดีกว่า *D. dianthicola* (van der Wolf et al., 2009; Tsror et al., 2009) ได้มีการรายงานถึงเชื้อ *Dickeya* spp. สายพันธุ์ใหม่ที่รุนแรงนี้ในหลายประเทศในยุโรป เช่น เนเธอร์แลนด์ โปแลนด์ เบลเยี่ยม ฟินแลนด์ ฝรั่งเศส สหราชอาณาจักร สเปน และ จอร์เจีย และมีรายงานการพบเชื้อนี้ในประเทศอิสราเอล โดยส่วนใหญ่จะพบเชื้อนี้จากหัวมันฝรั่งที่นำเข้าจากประเทศเนเธอร์แลนด์ จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและการวิเคราะห์ด้วย REP-PCR พบว่าเป็นเชื้อ *Dickeya* spp. ไบโอวาร์ 3 แต่เชื้อนี้มีความแตกต่างกับเชื้อทั้ง 6 species ใน genus *Dickeya* ไม่

สามารถจัดเข้ากลุ่มใน 6 species นี้ได้ จึงได้มีการเรียกชื่อเชื้อสายพันธุ์ใหม่นี้อย่างไม่เป็นทางการว่า *Dickeya solani*. (Palacio-Bielsa et al., 2006; Slawiak et al., 2008; Tsror et al., 2009; 2011) เชื้อ *D. solani* นี้มีความรุนแรงและเข้าทำลายมันฝรั่งในช่วงอุณหภูมิที่กว้างกว่า *P. atrosepticum* ถึงแม้จะมีปริมาณของเชื้อต่ำกว่า อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ใกล้เคียงกันมากจนเกือบจะไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ ทั้งอาการเหี่ยวที่รวดเร็ว และอาการเน่าดำของระบบท่อน้ำ (Elphinstone, 2009)

การวิเคราะห์ด้วยพีซีอาร์ได้เข้ามามีบทบาทในการพิสูจน์และจำแนกเชื้อใน genus *Dickeya* (ชื่อเดิม *Erwinia chrysanthemi*) และ *Pectobacterium* (ชื่อเดิม *Erwinia carotovora*) มากขึ้น โดย Hauben *et al.* (1998) ได้วิเคราะห์ลำดับ 16S ribosomal DNA ของเชื้อ *Erwinia carotovora* และ *Erwinia chrysanthemi* และได้จัดอันดับใหม่ (reclassified) ให้อยู่ใน genus *Pectobacterum*

Avrova et al. (2002) ได้จำแนกชนิดและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อ *Erwinia carotovora* และ *Erwinia chrysanthemi* โดยใช้เทคนิค AFLP สามารถแยกเชื้อได้เป็น 4 cluster โดยเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. carotovora* subsp. *odorifera* อยู่ใน cluster 1 ใน cluster 2 ประกอบด้วยเชื้อ *E. carotovora* subsp. *atroseptica* และ *E. carotovora* subsp. *betavasculorum* ส่วนเชื้อ *E. carotovora* subsp. *wasabiae* และ *E. chrysanthemi* อยู่ใน cluster 3 และ cluster 4 ตามลำดับ

ส่วนเทคนิค REP-PCR และ RFLP นั้นให้ผลการจำแนกเชื้อใน genus *Dickeya*ในระดับที่น่าพอใจ (Toth et al., 2001; Waleron et al., 2002a, 2002b; Tsror et al., 2009) โดยไพรเมอร์ ADE1/ADE2 (Nassar et al., 1996) จากยีน pectate lyase (*pel*) ถูกใช้ในการตรวจสอบเชื้อในกลุ่มนี้อย่างแพร่หลาย และการวิเคราะห์ 16S-13S rDNA ด้วยเทคนิค Real-time PCR ได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อ *Dickeya* และเชื้อ *Pectobacterium* ในฟินแลนด์ (Laurila et al., 2008)

สำหรับวิธีการพิสูจน์เชื้อ *Dickeya solani* ที่มีประสิทธิภาพในปัจจุบัน คือการใช้วิธีของ Nassar et al. (1996) เพื่อคัดเลือกให้ได้เชื้อใน genus *Dickeya* ก่อน แล้วตามด้วยการลำดับยีน *recA* (Parkinson et al., 2009) หรือยีน *dnaX* (Slawiak et al., 2009) สำหรับความต่างกันของเชื้อ *Dickeya* spp. สามารถพิสูจน์ได้ด้วย fatty acid methyl ester (FAME) หรือ REP-PCR (Laurila et al., 2008; Slawiak et al., 2009)

ในประเทศไทยนั้นมีการปลูกมันฝรั่งมากในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน แต่ปริมาณการผลิตนั้นยังไม่เพียงพอกับความต้องการของตลาดภายในประเทศ ซึ่งมีทั้งการบริโภคสดและส่งเข้าโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปมันฝรั่ง ทำให้ต้องมีการนำเข้าหัวมันฝรั่งจากต่างประเทศเข้ามาทดแทนปีละจำนวนมาก ซึ่งประเทศเนเธอร์แลนด์เป็นประเทศหนึ่งที่ประเทศไทยนำเข้าหัวมันฝรั่ง แต่ในช่วง 5 ปีที่ผ่านมานั้น ได้มีรายงานการเข้าทำลายมันฝรั่งของเชื้อแบคทีเรีย *Dickeya* spp. สายพันธุ์ใหม่ที่มีความ

รุนแรงกว่าปกติ ในเนเธอร์แลนด์ และบางประเทศในทวีปยุโรป ซึ่งพบในหัวมันฝรั่งที่นำเข้าจากเนเธอร์แลนด์ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะมีเชื้อสายพันธุ์ใหม่นี้ติดเข้ามากับหัวมันฝรั่งที่นำเข้ามาได้ และเนื่องจากเชื้อนี้สามารถปรับตัวเข้ากับอุณหภูมิสูงได้ดี โดยมีรายงานว่าเชื้อนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 39 องศาเซลเซียส (Tsror *et al.*, 2011) มีแนวโน้มที่จะเจริญและระบาดได้อย่างรวดเร็วในสภาพอากาศของประเทศไทย และจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อการผลิตหัวมันฝรั่งอย่างมาก สำหรับในประเทศไทยนั้นพบการเข้าทำลายมันฝรั่งของเชื้อ *Dickeya* sp. แต่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับไบโอวาร์ของเชื้อว่าเป็นไบโอวาร์ใด และเป็นสายพันธุ์เดียวกับที่กำลังระบาดทำความเสียหายอยู่ในเขตประเทศยุโรปหรือไม่

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ เพื่อสำรวจ เก็บรวบรวมเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคเน่าดำและเน่าเละของมันฝรั่ง ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ ให้ได้ข้อมูลการเกิดโรค การแพร่ระบาด และการจำแนกเชื้อ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

เครื่องแก้ว สารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูง

วิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคเน่าดำและเน่าเละของมันฝรั่ง

1.1 สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคในแหล่งปลูกต่างๆ บันทึกรายละเอียดตำแหน่งหรือพิกัดของแปลงปลูกที่ทำการเก็บตัวอย่าง ชื่อพันธุ์ ขนาดพื้นที่ปลูก ระยะการเจริญเติบโต ลักษณะอาการการเกิดโรคและสภาพแวดล้อมอื่นๆ

1.2 แยกเชื้อสาเหตุโรคจากตัวอย่างโรคที่เก็บมาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ RAF (RAF medium) บ่มเชื้อไว้ 3-4 วัน

1.3 ตรวจดูโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบนหน้าอาหาร เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเป็นสีแดงอมม่วงไปเลี้ยงบนอาหาร NA (Nutrient agar) อีกครั้งเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อและทำให้เชื้อบริสุทธิ์

1.4 เก็บเชื้อที่แยกให้บริสุทธิ์แล้วในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 8°C สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

2. การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและไบโอวาร์ (biovar) ของเชื้อ

ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆของเชื้อ เช่น การสร้างกรดจากน้ำตาล การใช้สารอินทรีย์ การสร้าง indole จาก tryptophane การสร้างฟอสฟาเตส ความไวต่อ erythromycin (Janse and

Spit, 1989; Cother et al., 1992; Perombelon and van der Wolf, 2002) และทดสอบไบโอวาร์ของเชื้อที่แยกได้ตามวิธีการของ Palacio-Bielsa et al. (2006)

3. การศึกษาลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว Nutrient broth ข้ามคืน แล้วหมุนเหวี่ยงให้เซลล์แบคทีเรียตกตะกอนนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป วิธีการตามคำแนะนำของผู้ผลิต ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณของดีเอ็นเอ

3.2 การทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการตรวจเชื้อ

3.2.1 ทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ADE1/ADE2 (Nassar et al., 1996) และ G1/L1 (Toth et al., 2001) ใช้ปฏิกิริยารวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

สารประกอบในปฏิกิริยา	**ปริมาตร(ไมโครลิตร)**	**ความเข้มข้นสุดท้าย**
10X buffer	2.5	1X
$MgCl_2$	1.5	1.5mM
dNTPs 2.5 mM	2	0.2 mM
ไพรเมอร์ชนิดที่ 1 25 pmol	1	25 pmol
ไพรเมอร์ชนิดที่ 2 25 pmol	1	25 pmol
Taq DNA polymerase 5U	0.25	1.25 U
ดีเอ็นเอต้นแบบ 50 ng	1	50 ng
ddH_2O	15.75	-

3.2.2 ผสมสารประกอบในปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้นให้เข้ากัน แล้วบ่มหลอดปฏิกิริยาในเครื่อง thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
1.แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturation)	94	2 นาที
2.แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturation)	94	45 วินาที
3.เริ่มต้นจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing)	72	45 วินาที
4.สังเคราะห์สายดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอแม่แบบ(extension)	72	2 นาที
5.สังเคราะหดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72	3 นาที

ทำปฏิกิริยาซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ 30 รอบ และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.3 ตรวจวิเคราะห์ขนาดของสายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แยกขนาดของสายดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ใช้ 1.5% อะกาโรส ในบัฟเฟอร์ 1X Tris-borate EDTA (TBE)ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักดิ์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง ย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ 5 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี และถ่ายภาพ ด้วย ultraviolet transiluminator

3.3 การศึกษาลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อด้วยเทคนิค Rep-PCR

3.3.1 เตรียมปฏิกิริยาโดยใช้คู่ไพรเมอร์ REP1R/REP2I (Versalovic et al., 1991) ใช้ปฏิกิริยารวม 27.075 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 1.13 mM dNTPs, ไพรเมอร์แต่ละชนิด 3.69 µM , Taq DNA polymerase 3U และ ดีเอ็นเอต้นแบบ 10 ไมโครลิตร

3.3.2 บ่มหลอดปฏิกิริยาในเครื่อง thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
1.แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturation)	95	7 นาที
2.แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturation)	94	1 นาที
3.เริ่มต้นจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing)	40	2 นาที
4.สังเคราะห์สายดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอแม่แบบ(extension)	65	8 นาที
5.สังเคราะหดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	65	16 นาที

ทำปฏิกิริยาซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ 40 รอบ และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.3 นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แยกขนาดของสายดีเอ็นเอ ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ใช้ 1.5% อะกาโรส ใน บัฟเฟอร์ 1X Tris-borate EDTA (TBE) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักดิ์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง ย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ 5 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี และถ่ายภาพ ด้วย ultraviolet transiluminator

3.3.4 บันทึกข้อมูลรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยตรวจสอบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละไอโซเลท ให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ เป็น 0 นำผลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS วิเคราะห์ dendrogram จัดกลุ่มเชื้อ เปรียบเทียบความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม

4. รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล และเขียนรายงาน

รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ผล จัดทำฐานข้อมูลการจำแนกเชื้อด้วยลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าดำและเน่าเละของมันฝรั่งในประเทศไทยในประเทศไทย

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2556 – กันยายน 2557 ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยโรคพืช และพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคเน่าดำและเน่าเละของมันฝรั่งในแหล่งปลูกมันฝรั่งฤดูแล้งในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่จังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พะเยา ตาก ชัยภูมิ และสกลนคร ระหว่างเดือนมกราคม-เมษายน 2557 ได้ตัวอย่างต้นมันฝรั่งและหัวมันฝรั่งที่มีอาการเน่าดำและเน่าเละ และดินปลูกรวม 106 ตัวอย่าง นำไปแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคบนอาหาร Nutrient Agar (NA) .ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ทดสอบการสร้างเอนไซม์ pectinolytic บนชิ้นมันฝรั่ง ได้เชื้อที่สามารถทำให้ชิ้นมันฝรั่งเน่า 60 ไอโซเลท โดยเป็นเชื้อจากต้น 37 ไอโซเลท จากหัว 22 ไอโซเลท และจากดินปลูก 1 ไอโซเลท เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 8°C ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและที่อุณหภูมิ -20°C ในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ผสม glycerol 40% จากการทดสอบปฏิกิริยา oxidase และ, catalase, phosphatase, lecithinase และการไวต่อสารปฏิชีวนะ erythromycin พบว่าเป็นเชื้อ *Pectobacterium* spp. ทั้ง 60 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้บ่อยเนื่องจากเข้าทำลายในช่วงอุณหภูมิปานกลาง (28-30 °C) และมีพืชอาศัยที่กว้าง (Toth et al., 2011)

ในการแยกเชื้อจากตัวอย่างโรคนั้น พบว่ามีตัวอย่างจากต้นมันฝรั่ง 2 ตัวอย่าง และ หัวมันฝรั่ง 4 ตัวอย่าง ที่แยกได้เชื้อ *Ralstonia solanacearum* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวเขียว (bacterial wilt) ของมันฝรั่งด้วย ซึ่งการเข้าทำลายพืชร่วมกันของเชื้อทั้งสองชนิดนี้สามารถพบได้บ่อย เนื่องจากเชื้อ *Pectobacterium* spp.นั้นปกติจะอาศัยอยู่บนต้นพืชในลักษณะของ saprophyte เมื่อ

ต้นมันฝรั่งมีอาการของโรคเหี่ยวเขียว ต้นเหี่ยว ท่อน้ำท่ออาหารถูกทำลาย เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่านี้จะเข้าทำลายซ้ำ ทำให้อาการของโรครุนแรงขึ้น (วนิดา, 2544)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เชื้อสาเหตุโรคเน่าที่แยกจากตัวอย่างต้นและหัวมันฝรั่งที่แสดงอาการเน่า และดินปลูก ที่เก็บรวบรวมได้ในฤดูปลูกมันฝรั่งฤดูแล้งนี้ เป็นเชื้อ *Pectobacterium* spp.ทั้งหมด ซึ่งจะได้ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อเหล่านี้เปรียบเทียบกับเชื้อในฤดูปลูกอื่นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

วนิดา ฐิตะฐาน. 2544. มันฝรั่งกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค. หน้า 37-47. *ใน* **เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่อง การผลิตมันฝรั่งและหัวพันธุ์มันฝรั่ง**. สถาบันวิจัยพืชสวน และ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 กรมวิชาการเกษตร 19-20 กุมภาพันธ์ 2544. ณ โรงแรมอมิตี้กรีนฮิลล์ จ.เชียงใหม่.

Avrova, A.O., Hyman, L.J., Toth, R.L., and I.K. Toth. 2002. Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(4): 1499-1508.

Cother, E.J., Bradley, J.K., Gillings, M.R., and P.C. Fahy. 1992. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* biovars in alpine water sources by biochemical properties, GLC fatty acid analysis and genomic DNA fingerprinting. *The Journal of Applied Bacteriology* 73: 99-107.

Elphinstone, J. 2009. *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya* spp.) update. *Plant Clinic News. The Food and Environment Research Agency* -: 2.

Hauben, L., Moore, E.R., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., and J. Swings. 1998. Phylogenic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 384-397.

Janse, J.D., and B.E. Spit. 1989. A note on the limitations of identifying soft rot erwinias by temperature tolerances and sensitivity to erythromycin on a pectate medium. *Journal of Phytopathology* 125: 265-268.

Laurila, J., Ahola, V., Lehtinen, A., Joutsjoki, T., Hannukkala, A., Rahkonen, A., and M. Pirhonen. 2008. Characterisation of *Dickeya* strains isolated from potato and river water samples in Finland. *European Journal of Plant Pathology* 122: 213-225.

Nassar, A., Darrasse, A., Lemattee, M., Kotoujansky, A., Dervin, C., Vedel, R., and Y. Bertheau. 1996. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR amplified fragments of *pel* genes. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2228-2235.

Palacio-Bielsa, A., Cambra, M.A., and M.M. Lopez. 2006. Characterization of potato isolates of *Dickeya chrysanthemi* in Spain by a microtitre system for biovar determination. *The Annals of Applied Biology* 148: 157-164.

Pérombelon, M.C.M., and J.M. van der Woft. 2002. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. *Scottish Crop Research Institute Occasional Publication No. 10*.

Samson, R., Legendre, J.B., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., Achouak, W., and L. Gardan. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1415-1427.

Slawiak, M., Lojkowska, E., and J.M. van der Wolf. 2008. First report of bacterial soft rot on potato caused by *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Poland. *New Disease Reports* 18: 25.

Toth, I.K., Avrova, A.O., and L.J. Hyman. 2001. Rapid identification and differentiation of the soft rot Erwinias by 16S-23S intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4070-4076.

Toth, I.K., van der Wolf, J.M., Saddler, G., Lojkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., Tsror (Lahkim), L., and J.G. Elphinstone. 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology* 60: 385-399.

Tsror, L., Erlich, O., Lebiush, S., Hazanovsky, M., Zig, U., Slawiak, M., Grabe, G., van der Wolf, J.M., and J.J. van de Haar. 2009. Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel. *Eur. J. Plant pathol.* 123: 311-320.

Tsror (Lahkim), L., Erlich, O., Lebiush, S., van der Wolf, J., Czajkowski, R., Mozes, G., Sikharulidze, Z., and B. Ben Daniel. 2011. First report of potato blackleg caused by a biovar 3 *Dickeya* sp. in Georgia. *New Disease Reports* 23: 1.

van der Wolf, J.M., Czajkowski, R.L., and H. Velvis. 2009. Why is *Dickeya* spp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) taking over? – The ecology of a blackleg pathogen. *In:* **Symposium KNPV Pests and climate change**. 3 December, 2008. Wageningen, The Netherlands.

Versalovic, J., Koeuth, T., and J.R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19: 6823-6831.

Waleron, M., Waleron, K., Podhajska, A.J., and E. Lojkowska. 2002a. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. *Microbiology* 148: 583-595.

Waleron, M., Waleron, K., and E. Lojkowska. 2002b. Genotypic characterization of the *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of *rpoS* gene. *Plant Protection Science* 38: 288-290.

การจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้และใบจุดของกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าและแวนด้า

Identification of Bacterial Causal Agent of Leaf Blight on Mokara and Vanda

ทิพวรรณ กันหาญาติ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ทัศนาพร ทัศคร
บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ รุ่งนภา ทองเครื่ง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาลักษณะสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้และใบจุดของกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าและแวนด้าโดยใช้เทคนิค repetitive sequence based polymerase chain reaction (rep PCR) ด้วยไพรเมอร์ 2 ชุด ได้แก่ ERIC1R กับ ERIC2 และ BOXA1R ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2556 – กันยายน 2557 พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุอาการโรคใบไหม้และใบจุดของกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าและแวนด้ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย ผลการจัดกลุ่มของเชื้อไม่สอดคล้องกับแหล่งที่มาของเชื้อ โดยในการศึกษาต่อไปเป็นการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA gene ของเชื้อสาเหตุกับฐานข้อมูล GenBank เพื่อให้ทราบชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุอาการโรคใบไหม้และใบจุดของกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าและแวนด้า

Keywords : การจำแนกชนิด, ใบไหม้, identification, leaf blight

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-02-14-56

คำนำ

สืบเนื่องจากในปี 2554 เกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้สกุลมอคคาร่า และแวนด้าในเขตจังหวัดสมุทรสาคร นครปฐม และสมุทรสงคราม ประสบกับปัญหาการระบาดของโรคใบจุดของต้นกล้วยไม้ โดยมีลักษณะอาการเป็นจุดกลมสีน้ำตาลดำ รอบแผลเห็นวงสีเหลืองชัดเจน หากอาการรุนแรงแผลจุดหลายจุดขยายตัวลามมาชนกันเป็นแผลขนาดใหญ่ ทำให้ใบร่วงได้ นอกจากนี้ยังพบการระบาดของโรคใบไหม้ของกล้วยไม้ที่มีลักษณะอาการเป็นแผลฉ่ำน้ำตรงปลายใบต่อมาขยายใหญ่กลายเป็นแผลสีน้ำตาลไหม้ ในแปลงที่มีการระบาดของโรครุนแรงจะพบลักษณะอาการบนดอกกล้วยไม้ทำให้ทั้งใบและดอกร่วงไม่ได้คุณภาพ ซึ่งโรคทั้งสองชนิดพบว่าเป็นปัญหาที่สำคัญทำให้ต้นกล้วยไม้เสียหายอย่างมากและดอกกล้วยไม้ไม่ได้คุณภาพ ไม่สามารถส่งขายได้ แนวโน้มในการระบาดของโรคพบว่ามีการขยายพื้นที่ในการระบาดเพิ่มมากขึ้น จากการแยกเชื้อสาเหตุตามลักษณะอาการ พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีสีเหลือง การทดสอบเบื้องต้นเป็น Facultative anaerobic bacteria ซึ่งไม่ตรงกับลักษณะแบคทีเรียสาเหตุโรคของกล้วยไม้ที่เคยมีรายงานในประเทศไทย (นิยมรัฐ, 2544; ปิยรัตน์ และคณะ, 2552; Chuenchitt *et al.*, 1983) ดังนั้นในการป้องกันกำจัดโรคนี้ให้ได้ผลและมีประสิทธิภาพจำเป็นต้องทราบชนิดที่ถูกต้องตลอดจนข้อมูลทางด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา และการแพร่ระบาดของเชื้อ เพื่อจะได้เข้าใจเกี่ยวกับกลไกการเข้าทำลายของเชื้อได้ดียิ่งขึ้น การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุอาการโรคใบไหม้และใบจุดของกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าและแวนด้า เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงแก่นักวิชาการในการทำวิจัยและแนะนำเกษตรกรในการป้องกันกำจัด รวมถึงเป็นข้อมูลสำหรับในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช (pest list)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดแก้ว ลูปตะเกียงแอลกอฮอล์

2. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ เช่น ปิเปต เครื่องชั่ง pH meter ตู้ควบคุมอุณหภูมิ หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) เครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation)

3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและทำปฏิกิริยา rep PCR

4. เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้และใบจุดของกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าและแวนด้า

วิธีการ

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสาเหตุอาการใบไหม้และใบจุดบนอาหารแข็ง PSA ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์อายุ 48 ชั่วโมง เตรียมไว้สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

2. การแยกสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แตะเชื้อ 1 ลูป ละลายในบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร จากนั้นเติมด้วย Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมด้วยบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมด้วย absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน QIAamp Spin Column ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เปลี่ยน collection tube ใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที นำ QIAamp Spin Column ใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ แล้วเติมด้วยบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 50 ng/µl เพื่อนำไปศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep PCR

3. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นด้วยเทคนิค rep PCR

ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค rep PCR ด้วยไพรเมอร์ 2 ชุด ได้แก่ ERIC1R (5’ ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC 3’) กับ ERIC2 (5’ AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3’) และ BOXA1R (5’ CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3’) โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 25 µl ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 50 ng/ µl, TopTaq Master Mix (QIAGEN Inc., USA) และไพรเมอร์ ERIC ชนิดละ 0.5 µM และไพรเมอร์ BOX จำนวน 1 µM เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) กำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเริ่มต้น 95 °C เป็นเวลา 7 นาที แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing) ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (primer annealing) ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 นาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 8 นาที และสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 8 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5 % agarose ใน 0.5X TAE (40mM Tris, 4mM sodium acetate, 1mM EDTA, pH 7.9) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง ย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต และวิเคราะห์ผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Numerical Taxonomy and Multivariate

Analysis System (NTSYS) ค่า coefficiency ที่ใช้คือค่า Dice และวิเคราะห์ค่า bootstrap ด้วยโปรแกรม Winboot

เวลาและสถานที่

ต.ค. 56 – ก.ย. 57 ที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาลักษณะสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้และใบจุดของกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าและแวนด้าที่ได้จากการคัดเลือกเชื้อที่สามารถทำให้เกิดโรคบนกล้วยไม้ได้ จำนวน 30 ไอโซเลท โดยใช้เทคนิค repetitive sequence based polymerase chain reaction (rep PCR) ด้วยไพรเมอร์จำนวน 2 ชุด ได้แก่ ERIC1R กับ ERIC2 และ BOXA1R (Versalovic *et al.*, 1994) พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยและผลการจัดกลุ่มของเชื้อไม่สอดคล้องกับแหล่งที่มาของเชื้อ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ลักษณะสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้และใบจุดของกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าและแวนด้าที่ โดยใช้เทคนิค rep PCR ด้วยไพรเมอร์ 2 ชุด ได้แก่ ERIC1R กับ ERIC2 และ BOXA1R พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยและไม่มีความสัมพันธ์กันกับแหล่งที่มาของเชื้อ ในการศึกษาต่อไปเป็นการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA gene ของเชื้อสาเหตุกับฐานข้อมูล GenBank เพื่อให้ทราบชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุอาการโรคใบไหม้และใบจุดของกล้วยไม้สกุลมอคคาร่าและแวนด้า

เอกสารอ้างอิง

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด. กลุ่มวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 50 หน้า.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ศรีสุข พูนผลกุล และ จงวัฒนา พุ่มหิรัญ. 2552. การศึกษาโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากแบคทีเรีย. หน้า 1947-1967. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2552. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

Chuenchitt, S., W. Dhirabhava, S. Karnjanarat, D. Buangsuwon and T. Uematsu. 1983. A new bacterial disease on orchids *Dendrobium* sp. caused by *Pseudomonas gladioli*. *Kasetsart J.* 17: 26-36.

Versalovic J, M. Schneider, F.J. De Bruijn and J.R. Lupski. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth. Mol. Cell. Biol.* 5: 25-40.

การจำแนกชนิดของราสกุล *Phyllosticta* สาเหตุโรคพืช โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม

Identification of *Phyllosticta* Plant Pathogenic Fungi Using Morphological and Molecular Characteristics

พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และ ชนินทร ดวงสอาด
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Phyllosticta* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 36 ตัวอย่าง จากพืชอาศัยจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ทับทิม ส้มโอ กล้วยหอม ฝรั่ง พริก และมะม่วง ในจังหวัดกระบี่ ฉะเชิงเทรา เชียงราย นครปฐม นครราชสีมา เพชรบุรี ราชบุรี และอุบลราชธานี นำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยการศึกษาราจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง การทำ moist chamber แยกราจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค ได้ทั้งหมด 36 ไอโซเลท และศึกษาจำแนกชนิดเชื้อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการศึกษาจำแนกได้รา *Phyllosticta* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Phyllosticta mangiferae* แยกได้จากอาการใบจุดของมะม่วง จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 4 ไอโซเลท *P. punicae* แยกได้จากอาการใบจุดของทับทิม จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 1 ไอโซเลท แยกได้จากอาการจุดดำบนผลส้มโอ จากอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย ได้จำนวน 16 ไอโซเลท จากอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม จำนวน 3 ไอโซเลท จำแนกชนิดเป็น *Phyllosticta citriasiana* และ *P. mangiferae* แยกได้จากผลเน่าฝรั่ง จากจังหวัดกระบี่ เพชรบุรี และราชบุรี จำแนกชนิดเป็นรา *P. psidiicola* จำนวน 11 ไอโซเลท และพบว่ารา สร้างระยะสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ *Guignardia psidii* บนอาหารสังเคราะห์ PDA แยกได้จากพริกจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 1 ไอโซเลท จำแนกชนิดเป็นรา *P. mangiferae* จัดเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชทั้งหมดไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืชที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของรา *Phyllosticta* ทั้งหมด 19 ไอโซเลท ที่แยกได้จากะส้มโอ จำแนกชนิดได้รา 2 ชนิด คือ *P. citriasiana* จำนวน 15 ไอโซเลท และ *P. mangiferae* จำนวน 4 ไอโซเลท

คำสำคัญ: การจำแนกชนิด *Phyllosticta* ราสาเหตุโรคพืช ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางพันธุกรรม

Key words: Identification, *Phyllosticta*, Plant pathogenic fungi, Morphological Characteristics, Molecular Characteristics

---

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-02-16-56

คำนำ

ราสกุล *Phyllosticta* Pers จัดอยู่ใน มี Class Coelomycetes มีรา *Guignardia* Viala & Ravaz อยู่ใน Class Ascomycetes, Order Sphaeropsidales, Family Mycosphaerellaceae เป็น Teleomorph state ส่วนใหญ่ราสกุลนี้เจริญอยู่บนใบพืชทำให้เกิดโรคใบจุดกับพืชหลายชนิด โดยราสร้าง pycnidia บนใบพืชและที่ผล conidia มี 1 เซลล์ นอกจากอยู่บนใบพืชแล้วรายังเจริญอยู่บนกิ่งลำต้น ของพืชด้วย และที่สำคัญรานี้เป็นสาเหตุของโรคจุดดำหรือ Citrus Black Spot ของพืชตระกูลส้มสาเหตุเกิดจาก *Guignardia citricarpa* (anamorphic state: *Phyllosticta citricarpa*) (Kiely, 1949; Sutton and Waterston, 1966) โรค Black rot ขององุ่น สาเหตุเกิดจาก *Guignardia bidwelli* (anamorphic state: *Phyllosticta ampelicida*) (Sivanesan and Holliday, 1981) โรคใบจุดของกล้วยสาเหตุเกิดจาก *Guignardia musae* (anamorphic state: *Phyllosticta musarumi*) (Punithalingam and Holliday, 1975) โรคผลเน่าของฝรั่ง สาเหตุเกิดจาก *Guignardia psidii* (anamorphic state: *Phyllosticta psidiicola*) (Gonzlez and Rondn, 2005) เป็นต้น

Guignardia citricarpa สาเหตุโรค Black spot ของพืชตระกูลส้ม เป็นเชื้อสำคัญในการกักกันพืช ของประเทศในเขตยุโรป และอเมริกา ซึ่งห้ามนำเข้าผลไม้ที่มีอาการของโรค Black spot โดยเด็ดขาด (Baayen *et al*., 2002) ปัญหาอีกประการหนึ่งของการตรวจพืชกักกันเพื่อการนำเข้าและส่งออก ลักษณะของแผลมีลักษณะหลายชนิด เช่น hard spot lesions แผลบุ๋มลงไป ไม่ลึก เป็นจุดเล็ก ๆ ตรงกลางมีสีเทาถึงสีแทน ขอบแผลมีสีน้ำตาลดำ ขนาดแผลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-10 มิลลิเมตร มักแสดงอาการเมื่อผลส้มใกล้เปลี่ยนสีเป็นสีส้มหรือเหลือง ปกติมักพบ pycnidia เล็ก ๆ บนแผล ภายในสร้าง conia ของรา *Phyllosticta citricarpa* เป็น anamorph stage (Sutton and Waterson, 1966; Van der Aa, 1973) ซึ่งสามารถมองเห็น pycnidia ด้วยตาเปล่าและสามารถตรวจสอบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ลักษณะแผล hard spot lesions ที่รุนแรงมากแผลจากจุดเล็ก ๆ จะมารวมตัวกัน ขยายใหญ่ขึ้น และมักพบ pycnidia บนแผลมากมาย อาการอีกชนิดหนึ่งคือ freckle spot หรือเรียกว่า false melanose แผลจุด เล็ก ขนาดแผลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร แผลบุ๋มลงไป ไม่ลึก เป็นจุดเล็ก ๆ ตรงกลางมีสีเทา แทน น้ำตาลแดง บริเวณรอบแผลลักษณะนี้ก็มักพบแผล hard spot lesions กระจายอยู่ แต่อย่างไรก็ตามอาการทั้งสองนี้ไม่แตกต่างกันมาก และมีลักษณะคล้ายกับอาการของโรคอื่นๆ ซึ่งแยกความแตกต่างโดยใช้สายตาได้ยาก เช่น อาการของ false melanose โรค melanose (เกิดจาก *Diaporthe citri*) โรค greasy spot (เกิดจาก *Mycosphaerell citri*) และแผลที่เกิดจาก *Phyllosticta* spp. (Kotzé, 2000) ในปัจจุบันประเทศ EU ตรวจสอบราสาเหตุโรค black spot โดยการนำแผลที่ไม่พบการสร้าง pycnidia ของเชื้อไปบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน เชื้อจะสร้าง pycnidia ขึ้นมา หลังจากนั้นต้องนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อศึกษาลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อจำแนกความแตกต่างของรา *G. citricarpa* (pathogenic) และ *G. mangiferae* (non pathogenic) เชื้อทั้งสองมี

ลักษณะทางสัณฐาน คล้ายกันมากจึงมักทำให้การจัดจำแนกชนิดผิด (Glienke-Blanco *et al*., 2002; Baayen *et al*, 2002) เชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อช้า โดยใช้เวลา 14 วัน จึงจะสร้าง mature pycnidia ดังนั้นวิธีนี้ จึงไม่สะดวกในการตรวจพืชนำเข้า และส่งออกด้วยวิธีนี้ ในปัจจุบันมีการพัฒนาการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรค black spot โดยใช้การใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาอณูชีววิทยา (molecule biology) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและความไว รวดเร็วและแม่นยำ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ กระดาษ ถุงพลาสติค ปากกาเคมี ดินสอ กรรไกรตัดกิ่ง และ GPS
2. อุปกรณ์จัดเก็บตัวอย่างแห้ง ได้แก่ แผ่นไม้อัดทับตัวอย่าง กระดาษ
3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ slide cover slip ปากคีบ เข็มเขี่ยปลายแหลม ใบมีดโกน ตะเกียง ยาทาเล็บ
4. สารเคมีสำหรับ mount slide ได้แก่ lactophenol, lactic acid, shear's sulution
5. สารเคมี ได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ : สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75%
6. อาหารวุ้นสังเคราะห์ corn meal agar (CMA), potato dextrose agar (PDA)
7. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดดูแรน บีกเกอร์ เป็นต้น
8. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว เป็นต้น
9. กล้องจุลทรรศน์ compound microscope และ stereo microscope พร้อมกล้องถ่ายรูปและ camera lucida สำหรับวาดภาพราจากกล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. <u>สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพืช</u>

เก็บตัวอย่างโรคพืช ได้แก่ ใบ ดอก ผล กิ่ง ลำต้น และราก จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ และแบ่งตัวอย่างโรคพืชมาอัดทับตัวอย่างแห้ง จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2. <u>การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช</u>

- <u>ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช</u>

ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 5-10 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือ conidium ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามา

วางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปลักษณะเชื้อและบันทึกลักษณะต่างๆ ของเชื้อ

- แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplant

นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar หรือ water agar บ่มที่อุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียส นาน 3-7 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

3. ศึกษาลักษณะของเชื้อบนอาหารชนิดต่างๆ

นำรา *Phyllosticta* ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar, Oat meal agar หรือ water agar โดย

บันทึกลักษณะต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

บันทึกอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารชนิดต่างๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกสีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment)

4. การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- ศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่นๆ ของเชื้อรา โดยการ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscope)

5. เก็บรักษาสายพันธุ์ราและตัวอย่างแห้ง

เก็บรักษาราที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์ โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

6. การพิสูจน์การเกิดโรค

ทำการพิสูจน์การเกิดโรค โดยทำการปลูกเชื้อส่วนของพืช โดยทำแผลและไม่ทำแผล อย่างละ 10 ซ้ำ เปรียบเทียบกับการเกิดโรคบนส่วนที่ไม่ปลูกเชื้อด้วยวิธีเดียวกัน แยกเชื้อสาเหตุจากต้นที่แสดงอาการโรค เปรียบเทียบชนิดของราสาเหตุโรคใช้ในการปลูกเชื้อ

การเตรียม DNA จากเส้นใยของรา

7. <u>การเตรียมเส้นใยขอรา</u>

เลี้ยงรา *Phyllosticta* บนอาหาร MEA (Malt extract agar) นาน 7-10 วัน หลังจากนั้นใช้เข็มเขี่ยเอาเส้นใยของรามาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB (Potato dextrose broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน flask 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 7 วัน หลังจากนั้นนำราในอาหารเหลวมากรองด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ และทำให้แห้งด้วยการดูดอากาศออกด้วยเครื่องดูดสัญญากาศ เก็บเส้นใยราที่แห้งด้วยหลอด และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาสกัด DNA

8. <u>การสกัด DNA จากรา</u>

นำรา *Phyllosticta* อย่างน้อย 5 genera 5 species อย่างละ 5 isolates ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาสกัด DNA โดยใช้วิธีของ Crous และคณะ (2000)

9. <u>การเพิ่มปริมาณยีน Internal Transcribed Spacer โดยใช้เทคนิค PCR</u>

นำ DNA ของราที่แยกได้ในข้อ 13.2.3 มาทำ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS1 (5'TTTCCGTAGGTGAACCTGC3') และ ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC)

- สังเคราะห์คู่ primer ITS1 และ ITS4 เพื่อทำการเพิ่มปริมาณของ rDNA ในช่วง ITS1-5.8S rDNA-ITS2-26SrDNA
- นำ DNA ของราทั้งหมดในข้อ 13.2.3 มาเพิ่มปริมาณของ rDNA ในช่วง ITS1-5.8S rDNA-ITS2-26SrDNA โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ITS1 และ ITS4 ด้วยวิธี PCR ประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

10X PCR buffer	6 ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	3 ไมโครลิตร
10 mM dNTP	1 ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS1 (50 พิโคโมล / ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS4 (50 พิโคโมล / ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
Taq DNA Polymerase (5 ยูนิต / ไมโครลิตร)	0.25 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	28.75 ไมโครลิตร
สารละลาย DNA (50 นาโนกรัม / ไมโครลิตร)	10 ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	50 ไมโครลิตร

- ส่วนของ β-tubulin นั้นเพิ่มปริมาณโดยใช้คู่ไพร์เมอร์ Bt2a และ Bt2b

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA โดยมีรอบการทำปฏิกิริยา (Slippers *et al.*, 2004) ดังนี้

94 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	1 นาที 50 วินาที	30 รอบ

52 องศาเซลเซียส	2 นาที	
72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ
4 องศาเซลเซียส	hold	

10. การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน ITS1-5.8SrDNA-ITS2-26SrDNA

นำผลผลิตที่ได้จากข้อ 13.2.3 มาตรวจวิเคราะห์ผลด้วย electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 0.5XTBE buffer โดยตัดแถบ DNA ที่เป็นยีนเป้าหมาย ภายใต้ UV transilluminator โดยใช้วิธีของ Slippers และคณะ (2004)

11. การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาศึกษาทั้งหมด

การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาศึกษาทั้งหมดไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ในช่วงลำดับเบส 15 ITS rDNA และ 15 β-tubulin ซึ่งเป็นราในกลุ่ม *Colletotrichum* โดยนำมาเปรียบเทียบวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการวิวัฒนาการด้วย PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) version 4.0b8 โดย Swofford (2000)

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2555 – สิ้นสุด กันยายน 2558

สถานที่ - แหล่งพืชธรรมชาติ

- แปลงปลูกพืชของเกษตรกร
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพืช

เก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Phyllosticta* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 36 ตัวอย่าง จากพืชจำนวน 6 ชนิด ในจังหวัดกระบี่ ฉะเชิงเทรา เชียงราย นครปฐม นครราชสีมา เพชรบุรี ราชบุรี และอุบลราชธานี ตัวอย่างโรคพืชที่รวบรวมได้ทั้งหมดนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยการศึกษาราจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง การทำ moist chamber และโดยวิธีการแยกราจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค เก็บตัวอย่างโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

จากการแยกตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 36 ตัวอย่าง จากพืชจำนวน 6 ชนิด ในจังหวัดฉะเชิงเทรา เชียงราย นครปฐม นครราชสีมา และอุบลราชธานี ได้ราทั้งหมด 36 ไอโซเลท

3. การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

จากการศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อร และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound จากการศึกษาจำแนกได้รา *Phyllosticta* จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Phyllosticta mangiferae* แยกได้จากอาการใบจุดของมะม่วง จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 4 ไอโซเลท *P. punicae* แยกได้จากอาการใบจุดของทับทิม จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 1 ไอโซเลท แยกได้จากอาการจุดดำบนผลส้มโอ จากอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย ได้จำนวน 16 ไอโซเลท จากอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม จำนวน 3 ไอโซเลท จำแนกชนิดเป็น *Phyllosticta citriasiana* และ *P. mangiferae* แยกได้จากผลเน่าฝรั่ง จากจังหวัดกระบี่ เพชรบุรี และราชบุรี จำแนกชนิดเป็นรา *P. psidiicola* จำนวน 11 ไอโซเลท และพบว่าราสร้างระยะสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ *Guignardia psidii* บนอาหารสังเคราะห์ PDA แยกได้จากพริกจ จังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 1 ไอโซเลท จำแนกชนิดเป็นรา *P. Mangiferae* (Table 1)

4. เก็บรักษาสายพันธุ์ราและตัวอย่างแห้ง

เก็บรักษาราที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์ โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

5. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของรา *Phyllosticta*

การสกัด ดีเอ็นเอ ของรา *Phyllosticta* ทั้งหมด 19 ไอโซเลท ที่แยกได้จากะส้มโอโดยวิธีของ Doyle and Doyle (1987) และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธีการ agarose gel electrophoresis พบว่าทุกโซเลทปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจน โดยเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธีการ agarose gel electrophoresis พบว่าทุกโซเลทปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจน โดยเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

จากการแยก DNA ของรา *Phyllosticta* จำนวน 19 isolatesและเพิ่มปริมาณDNA โดยวิธี PCR และศึกษาลำดับเบสโดยใช้ คู่ primer ITS5/ITS4 จำแนกชนิดได้รา 2 ชนิด คือ *P. citriasiana* จำนวน 15 ไอโซเลท และ *P. mangiferae* จำนวน 4 ไอโซเลท

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Phyllosticta* ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 36 ตัวอย่าง จากพืชอาศัยจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ทับทิม ส้มโอ กล้วยหอม ฝรั่ง พริก และมะม่วง ในจังหวัดกระบี่ ฉะเชิงเทรา เชียงราย นครปฐม นครราชสีมา เพชรบุรี ราชบุรี และอุบลราชธานี นำมาศึกษาใน

ห้องปฏิบัติการโดยการศึกษาราจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง การทำ moist chamber แยกราจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค ได้ทั้งหมด 36 ไอโซเลท จำแนกได้รา *Phyllosticta* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Phyllosticta citriasiana P. mangiferae P. punicae* และ *P. psidiicola* และพบว่าราสร้างระยะสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ *Guignardia psidii* บนอาหารสังเคราะห์ PDA จัดเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชทั้งหมดไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืชที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของรา *Phyllosticta* ทั้งหมด 19 ไอโซเลท ที่แยกได้จากะส้มโอ จำแนกชนิดได้รา 2 ชนิด คือ *P. citriasiana* จำนวน 15 ไอโซเลท และ *P. mangiferae* จำนวน 4 ไอโซเลท

เอกสารอ้างอิง

Augusto Vianna Barroso and João LÚcio Azevedo. 2002. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. *Genetics and Molecular Biology*. 25 (2): 251-255.

Baayen, R. ,P., Bonants, P. J. M., Verkley, G., Carroll, G. C., Van der Aa, H. A., Weerdt, M., van Brouweeershaven, I. R., Schutte, G. C., Maccheroni, W.,Jr., Glienke de Blanco, C., and Azevedo, J. L. 2002. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitant endophyte bof woody plants, G. *mangifera* (*Phyllosticta* capitalensis). *Phytopathology*. 92:264-477.

Glienke-Blanco, C., Carlos Ivan Aguilar-Vidoso, Maria LÚcia Carneiro Vieira, Paulo Gonzlez, M. S. and Rondn. 2005. First Report of *Guignardia psidii*, an Ascigerous State of *Phyllosticta psidiicola*, Causing Fruit Rot on Guava in Venezuela. *Plant Dis*. 89:773.

Kiely, T.B. 1949. Black spot of citrus in New South Wales coastal orchards. *Agricultural Gazette of New South Wales*. 60: 17-20.

Kotzé, J., M. 2000. *Black spo*t. Pages 23-25. *In: Compendium of Citrus Diseases 2nd* ed. L.W.Timmer, S. M. Garnsey, and J. H. Graham, eds. The American Phytopathological Society, St. Paul,MN.

Sivanesan, A and P. Holliday. 1981. *Guignardia bidwelli*. No. 710 *In*: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institue. Ferry Lane, Kew, Surrey, U.K.

Sutton, B.C and J.M Waterson. 1966. *Guignardia citricarpa*. No. 85 *In*: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institue. Ferry Lane, Kew, Surrey, UK.

Van der Aa HA. 1973. Studies in *Phyllosticta*. Studies in Mycology 5, 110pp.

Table 1 Genera of *Phyllosticta* on various host from different locations.

Plant Pathogens/isolates	Plants	Locations
Phyllosticta citriasiana (15 isolates)	*Citrus maxima* Merr.	Wiengkean Distr. Chiang Rai Prov.
P. mangiferae (1 isolates)	*Citrus maxima* Merr.	Wiengkean Distr. Chiang Rai Prov
P. mangiferae (3 isolates)	*Citrus maxima* Merr.	Nakornchaisri Distr. Nakornprsthom Prov.
P. mangiferae (4 isolates)	*Mangifera indica* L.	Chachoengsao Prov.
P. mangiferae (1 isolates)	Capsicum frutescens L.	Ubon Ratchathani Prov.
P. punica (1 isolates)	*Punica granatum* L.	Nakhon Ratchasima Prov.
P. pisidiicola (11 isolates) (Teleomorph: *Guignardia psidii*)	*Psidium guajava* Linn.	Krabi Prov. Ratchaburi Prov. Phetchaburi Prov.

อนุกรมวิธานและพืชอาศัยของรา *Stemphylium* และ *Alternaria* สาเหตุโรคพืช

Taxonomy and Study on Host of Plant Pathogenic Fungi : Genus *Stemphylium* and *Alternaria*

สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ พรพิมล อธิปัญญาคม ชนินทร ดวงสอาด
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จากการรวบรวมตัวอย่างโรคพืช ในช่วง ธันวาคม 2556 ถึง กันยายน 2557 จากแปลงปลูกพืช ในพื้นที่ 9 จังหวัด ได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Stemphylium* sp. และ *Alternaria* spp. จำนวน 36 ตัวอย่าง บนพืช 14 ชนิด ได้แก่ โรคใบไหม้ของหอมแดง และกระเทียม โรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง และหอมหัวใหญ่ โรคใบจุดคะน้า ผักกาดเขียว กะหล่ำดอก กวางตุ้ง หน่อไม้ฝรั่ง ผักชี มะเขือเทศ ยาสูบ และ เผือก โรคใบไม้ทานตะวัน และดาวเรือง จำแนกชนิด โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานของเชื้อ พบว่า โรคใบไหม้ของหอมแดง และกระเทียม เกิดจากเชื้อ *Stemphylium vesicarium* โรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง และหอมหัวใหญ่ เกิดจากเชื้อ *Alternaria porri* โรคใบจุดคะน้า เกิดจากเชื้อ *A. brassicicola* และ โรคใบไหม้ของทานตะวัน เกิดจากเชื้อ *A. helianthi* เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของรา *S. vesicarium* จำนวน 7 ไอโซเลท และ *Alternaria* spp. จำนวน 29 ไอโซเลท เข้าศูนย์รวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคพืช และจัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืช ส่งเข้าพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ และศึกษาพืชอาศัยของรา *S. vesicarium* *A. brassicicola* และ *A. porri* บนพืชทดสอบ 10 ชนิด พบว่า หอม และกระเทียม เป็นโรคใบไหม้ เกิดจากเชื้อ *S. vesicarium* และ โรคใบจุดสีม่วง เกิดจากเชื้อ *A. porri* และคะน้า เป็นโรคใบจุด เกิดจากเชื้อ *A. brassicicola* ในขณะที่พืชทดสอบอื่นๆไม่เป็นโรค

Keywords : อนุกรมวิธาน, พืชอาศัยของรา, Taxonomy, Host of Plant Pathogenic Fungi *Stemphylium*, *Alternaria*

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-02-18-57

คำนำ

ราสกุล *Stemphylium* และ *Alternaria* เป็นสาเหตุโรคทำความเสียหายต่อผลผลิตของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ทั้งพืชผัก ไม้ผล ไม้ดอก ไม้ประดับ รวมทั้งวัชพืช ราสกุล *Stemphylium* ที่เป็นสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Stemphylium botryosum* สาเหตุโรค black leaf mold ของหอมหัวใหญ่ ใบจุดของอัลฟาลฟา และใบจุดของหน่อไม้ฝรั่ง (Gonsalves and Ferreira., 2009; Takahito ,1973) *S. solani* สาเหตุโรคใบไหม้ หรือใบจุดสีเทาของมะเขือเทศ และโรคใบจุดของพริกหวาน (พัฒนา และคณะ, 2537; กรรณิการ์, 2552; Pairoj and Nopporn,1978; Gonsalves and Ferreira, 2009) *S. vesicarium* สาเหตุโรคใบไหม้ของพืชสกุลหอม กระเทียม (นิตยา, 2545; Gonsalves and Ferreira, 2009) โรคจุดสีน้ำตาลของแพร (brown spot of pear) (de Jong, 2009) *S. lycopersici* สาเหตุโรคใบจุดสีเทาของพริก (กรรณิการ์, 2552) ray speck disease ของเบญจมาศ (Nishi *et al*., 2009) *S. polymorphum* สาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วลันเตา (พัฒนา และคณะ, 2537) *Stemphylium* sp สาเหตุโรคใบไหม้เบญจมาศ และ ผักเบี้ยหิน (พัฒนา และคณะ, 2537) ราสกุล *Alternaria* ที่เป็นสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Alternaria dauci* สาเหตุโรคใบไหม้ของแครอท *A. radicina* สาเหตุโรคเน่าดำของแครอท *A. brassicae* และ *A. brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของพืชตระกูลกะหล่ำ และโรคเน่า (head rot) ของบรอคโคลี่ *A. solani* สาเหตุโรคไบไหม้ และผลเน่าของมะเขือเทศ *A. tenuis* และ *A. alternata* สาเหตุโรคผลจุดของพริก โรคใบจุดของ geranium หรือ จิบโซฟิลล่า *A. porri* สาเหตุโรคใบจุดสีม่วงหรือใบไหม้กับพืชตระกูลหอมกระเทียม *A. dianthi* และ *A. dianthicola* สาเหตุโรคใบไหม้ และกลีบดอกจุดของคาร์เนชั่น และทานตะวัน *A. zinniae* สาเหตุโรคใบจุด และกลีบดอกจุดของบานชื่น *A. tennuissima* สาเหตุโรคใบจุดของแพนซี่ *A. citri* สาเหตุโรคเน่าดำ ซึ่งเป็นโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลส้ม (พัฒนา และคณะ, 2526, 2537; Katoh *et al*., 2005; Chase, 1998; Laemmlen, 2009) เป็นต้น

เนื่องจากราทั้ง 2 สกุล เป็นสาเหตุโรคพืชทำความเสียหายต่อผลผลิตของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด และเชื้อมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก รวมทั้งในประเทศไทยยังมีรายงานในด้านการจัดจำแนกชนิด และการศึกษาพืชอาศัยของราทั้ง 2 สกุลนี้ไม่มาก ดังนั้นจึงควรที่จะทำการศึกษาและจำแนกชนิดของรา *Stemphylium* spp. และ *Alternaria* spp. สาเหตุโรคพืช เพื่อให้ได้ทราบชนิด และลักษณะประจำพันธุ์ รวมทั้งพืชอาศัยของรา ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาวิธีการป้องกันกำจัดโรค เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับนำมาใช้กำหนดแผนการป้องกำจัดโรค ได้รวดเร็ว ทันเหตุการณ์ และยังเป็นข้อมูลอ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้า และได้รา *Stemphylium* spp. และ *Alternaria* spp. สาเหตุโรคพืช เพื่อเก็บในศูนย์รวบรวมราสาเหตุโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช และตัวอย่างแห้งโรคพืชเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างโรคพืชที่คาดว่าเกิดจากรา *Stemphylium* spp. และ *Alternaria* spp. จากแหล่งปลูกพืชของประเทศไทย ระหว่างตุลาคม 2556 ถึง กันยายน 2557
2. อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างโรคพืช เช่น กรรไกร คัตเตอร์ ถุงพลาสติก กระดาษหนังสือพิมพ์ กล่องเก็บความเย็น ปากกา กระดาษบันทึกข้อมูล
3. เครื่องวัดพิกัด
4. แผงไม้อัดตัวอย่างโรคพืช กระดาษฟางและกระดาษหนังสือพิมพ์
5. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการรา เช่น จานเลี้ยงเชื้อ หลอดแก้ว ฟาล์ค เข็มเขี่ย มีดโกน มีดผ่าตัด แผ่นแก้วสไลด์พร้อมแผ่นปิดสไลด์ ตะเกียงแอลกอฮอล์ และcork borer
6. สารเคมี ได้แก่ sodium hypochlorite, shear's solution, และ oil immersion
7. อาหารเลี้ยงรา ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA) และ Carrot Agar (CA)
8. กล้องจุลทรรศน์ พร้อมกล้องถ่ายภาพ
9. ตำราสำหรับใช้ในการจัดจำแนกราสกุล *Stemphylium* และ *Alternaria*
10. วัสดุ อุปกรณ์ในเรือนปลูกพืชทดลอง ได้แก่ เมล็ดพันธุ์พืช ดิน ปุ๋ย กระถาง บัวรดน้ำ พลั่วมือ แผ่นเลเบล

วิธีการ

1. เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืช

เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการเป็นโรคซึ่งคาดว่าเกิดจากราสกุล *Stemphylium* และ *Alternaria* จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย โดยเลือกเก็บส่วนของพืชที่แสดงอาการของโรค ได้แก่ ใบ ดอก ผล กิ่ง และลำต้น ห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก พร้อมแนบกระดาษบันทึกรายละเอียด ชื่อพืช สถานที่เก็บ วันที่เก็บ และลักษณะอาการของโรค บรรจุห่อตัวอย่างโรคพืชลงในกล่องเก็บความเย็น เพื่อนำมาจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการ

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของรา *Stemphylium* spp และ *Alternaria* spp.

- ศึกษาลักษณะอาการของโรคและเชื้อสาเหตุโรคโดยตรงจากพืช

ศึกษาลักษณะอาการของโรคและเชื้อสาเหตุโรคโดยตรงจากพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน เมื่อพบราสร้างเส้นใยหรือ conidium นำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เข็มเขี่ยส่วนของราวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืช (cross section)ให้บางๆ และนำมาตรวจดูลักษณะต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope ถ่ายรูปและบันทึกลักษณะต่างๆ ของเชื้อ

- แยกเชื้อรา และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplant โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์

คลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

- **พิสูจน์โรคตามวิธีการ Koch's postulate**

นำรา *Stemphylium* spp. และ *Alternaria* spp. บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน จากนั้นใช้ cork boror ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดวุ้นอาหารบริเวณส่วนปลายเส้นใยของรา นำไปปลูกเชื้อบนพืชชนิดเดิมสำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบปลูกเชื้อด้วยชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่ปราศจากเชื้อสาเหตุโรค เมื่อพืชเป็นโรค นำส่วนที่แสดงอาการเป็นโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ตรวจดู เพื่อยืนยันเชื้อสาเหตุโรคอีกครั้ง

- **ศึกษาลักษณะของเชื้อรา**

นำเชื้อราที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA และบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ การเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment)

ศึกษา และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราได้แก่ รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย conidia conidiophore และโครงสร้างอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope และถ่ายภาพ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของขนาดโครงสร้างต่างๆของราที่วัดขนาดไว้

- **จำแนกชนิดเชื้อรา *Stemphylium* spp. และ *Alternaria* spp. สาเหตุโรคพืช**

โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา *Stemphylium* spp. และ *Alternaria* spp. ที่ศึกษากับเอกสารการจัดจำแนกราสกุล *Stemphylium* และ *Alternaria*

3. เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อรา

ราที่แยกได้เก็บรักษาไว้ในศูนย์รวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคพืช ของกลุ่มวิจัยโรคพืช โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

4. จัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืช

ตัวอย่างโรคพืชที่เก็บมาได้ ส่วนหนึ่งนำมาจัดทำตัวอย่างแห้ง โดยตัดส่วนของพืชบริเวณที่แสดงอาการโรค วางบนกระดาษฟาง พร้อมแนบกระดาษบันทึกข้อมูลพืช แล้วปิดทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ อัดทับด้วยแผงไม้อัดตัวอย่างโรคพืช นำไปวางผึ่งลม ไม่ให้ถูกแดด เปลี่ยนกระดาษทุกวัน จนกระทั่งตัวอย่างพืชแห้ง จึงนำมาเก็บในถุงกระดาษสำหรับเก็บตัวอย่างแห้ง พร้อมลงรายละเอียดข้อมูลตัวอย่างตามระบบสากล (Anonymous, 2005) ได้แก่ ชื่อพืช ลักษณะอาการโรค สถานที่เก็บชนิดของราสาเหตุโรคพืช วันที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ และชื่อผู้จัดจำแนกชนิดรา เป็นต้น แล้วส่งเก็บในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

5. ศึกษาพืชอาศัยของรา *Stemphylium* sp. และ *Alternaria* sp.

- เตรียมรา *Stemphylium* sp. และ *Alternaria* sp.

เตรียม conidial suspension โดย นำรา *Stemphylium vesicarium* *Alternaria brassicicola* และ *A. porri* แต่ละเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร Carrot Agar ในจานเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้น ล้างสปอร์บนผิวหน้าอาหารด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำมารวมกันในฟาล์ค เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 100 ครั้งต่อนาที นาน 20 นาที เพื่อให้ conidia กระจายออกจากกันโดยสม่ำเสมอ แล้วตรวจนับ conidia ด้วย haemacytometer เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^5 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

- ทดสอบพืชอาศัย

โดยพ่น conidial suspension ของรา *S. vesicarium* *A. brassicicola* และ *A. porri* ที่เตรียมไว้ บนพืชทดสอบชนิดต่างๆ 10 ชนิด ได้แก่ มะเขือยาว พริก ถั่วลิสง ถั่วเหลือง แตงกวา คื่นฉ่าย ผักกาดหัว คะน้า หอม และกระเทียม โดยมีกรรมวิธีพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ รดน้ำตามปกติ และ ตรวจบันทึกการเกิดโรคทุกวัน เมื่อพืชเป็นโรคนำส่วนที่แสดงอาการโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ตรวจดู เพื่อยืนยันเชื้อสาเหตุโรคอีกครั้ง

เวลาและสถานที่

เวลา **เริ่มต้น** ตุลาคม 2556 **สิ้นสุด** กันยายน 2557

สถานที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงปลูกพืชของเกษตรกร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืช

ในช่วง ธันวาคม 2556 ถึง กันยายน 2557 เก็บตัวอย่างโรคพืชที่คาดว่าเกิดจากรา *Stemphylium* หรือ *Alternaria* จำนวน 66 ตัวอย่าง จากแปลงปลูกพืช ในพื้นที่ 9 จังหวัด ได้แก่ เพชรบูรณ์ เชียงใหม่ แพร่ ตาก นครพนม หนองคาย กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และ เพชรบุรี ได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Stemphylium* sp. และ *Alternaria* spp. จำนวน 36 ตัวอย่าง บนพืช 14 ชนิด ได้แก่ โรคใบไหม้ของหอมแดง และกระเทียม โรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง และหอมหัวใหญ่ โรคใบจุดคะน้า ผักกาดเขียว กะหล่ำดอก กวางตุ้ง หน่อไม้ฝรั่ง ผักชี มะเขือเทศ ยาสูบ และ เผือก โรคใบไหม้ทานตะวัน และดาวเรือง (Table 1)

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของรา *Stemphylium* spp. และ *Alternaria* spp.

จากการจำแนกชนิดเบื้องต้น พบว่าได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Stemphylium* sp. จำนวน 7 ตัวอย่าง บนพืช 2 ชนิด คือ โรคใบไหม้หอมแดง และกระเทียม และ *Alternaria* spp. จำนวน 29 ตัวอย่าง บนพืช 13 ชนิด คือ โรคใบจุดสีม่วงหอมแดง และหอมหัวใหญ่ โรคใบจุดคะน้า ผักกาดเขียว กะหล่ำดอก กวางตุ้ง หน่อไม้ฝรั่ง ผักชี มะเขือเทศ ยาสูบ และ เผือก โรคใบไหม้ทานตะวัน และดาวเรือง และจำแนก

ชนิดของราบางส่วนที่รวบรวมได้ในระดับ species โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐาน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้ผลดังนี้ คือ โรคใบไหม้ของหอมแดง และกระเทียม เกิดจากเชื้อ *Stemphylium vesicarium* โรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง และหอมหัวใหญ่ เกิดจากเชื้อ *Alternaria porri* โรคใบจุดคะน้า เกิดจากเชื้อ *A. brassicicola* และ โรคใบไหม้ของทานตะวัน เกิดจากเชื้อ *A. helianthi* (Table 1)

3. เก็บรักษาสายพันธุ์รา

เก็บรา *Stemphylium vesicarium* จำนวน 7 ไอโซเลท และ *Alternaria* spp. ที่แยกได้จำนวน 29 ไอโซเลท เข้าศูนย์รวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคพืช ของกลุ่มวิจัยโรคพืช โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ส่วนหนึ่งเก็บไว้เพื่อศึกษาต่อ

4. จัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืช

ได้จัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืชที่เกิดจากรา *S. vesicarium* จำนวน 7 ตัวอย่าง และ *Alternaria* spp.จำนวน 29 ตัวอย่าง ส่งเข้าพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช

5. ศึกษาพืชอาศัยของรา *Stemphylium* sp. และ *Alternaria* sp.

โดยพ่น conidial suspension ของรา *S. vesicarium* *A. brassicicola* และ *A. porri* บนพืชทดสอบ 10 ชนิด คือ มะเขือยาว พริก ถั่วลิสง ถั่วเหลือง แตงกวา คื่นฉ่าย ผักกาดหัว คะน้า หอม และกระเทียม พบว่า หอม และกระเทียม เป็นโรคใบไหม้ จากเชื้อ *S. vesicarium* และ โรคใบจุดสีม่วง จากเชื้อ *A. porri* และคะน้า เป็นโรคใบจุด จากเชื้อ *A. brassicicola* ในขณะที่พืชทดสอบอื่นๆ ไม่เป็นโรค (Table 2) ซึ่งในการดำเนินงานต่อไปจะเพิ่มชนิดพืชทดสอบ และชนิดของเชื้อทดสอบ

สรุปผลการทดลอง

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคพืช ที่คาดว่าเกิดจากรา *Stemphylium* หรือ *Alternaria* ในช่วง ธันวาคม 2556 ถึง กันยายน 2557 จำนวน 66 ตัวอย่าง จากแปลงปลูกพืช ในพื้นที่ 9 จังหวัด ได้แก่ เพชรบูรณ์ เชียงใหม่ แพร่ ตาก นครพนม หนองคาย กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และ เพชรบุรี ได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Stemphylium* sp. และ *Alternaria* spp. จำนวน 36 ตัวอย่าง บนพืช 14 ชนิด จำแนกชนิดเบื้องต้น พบว่า ได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Stemphylium* sp. จำนวน 7 ตัวอย่าง บนพืช 2 ชนิด คือ โรคใบไหม้ของหอมแดง และกระเทียม และ *Alternaria* spp. จำนวน 29 ตัวอย่าง บนพืช 13 ชนิด คือ โรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง และหอมหัวใหญ่ โรคใบจุดคะน้า ผักกาดเขียว กะหล่ำดอก กวางตุ้ง หน่อไม้ฝรั่ง ผักชี มะเขือเทศ ยาสูบ และ เผือก โรคใบไม้ทานตะวัน และดาวเรือง และจำแนกชนิดของราบางส่วนที่รวบรวม ในระดับ species โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐาน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า โรคใบไหม้ของหอมแดง และกระเทียม เกิดจากเชื้อ *Stemphylium vesicarium* โรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง และหอมหัวใหญ่ เกิดจากเชื้อ *Alternaria porri* โรคใบจุดคะน้า เกิดจากเชื้อ *A. brassicicola* และ โรคใบไหม้ของทานตะวัน เกิดจากเชื้อ *A. helianthi* เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของรา *S. vesicarium* จำนวน 7 ไอโซเลท และ *Alternaria* spp. จำนวน 29 ไอโซเลท

เข้าศูนย์รวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคพืช และจัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืชที่เกิดจากรา *S. vesicarium* จำนวน 7 ตัวอย่าง และ *Alternaria* spp. จำนวน 29 ตัวอย่าง ส่งเข้าพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช และศึกษาพืชอาศัยของรา *S. vesicarium* *A. brassicicola* และ *A. porri* บนพืชทดสอบ 10 ชนิด พบว่า หอม และกระเทียม เป็นโรคใบไหม้ จากเชื้อ *S. vesicarium* และ โรคใบจุดสีม่วง จากเชื้อ *A. porri* และคะน้า เป็นโรคใบจุด จากเชื้อ *A. brassicicola* ในขณะที่พืชทดสอบอื่นๆไม่เป็นโรค

เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ ลาชโรจน์. 2552. **โรคใบจุดสีเทาของพริก**. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://www.oard1.org/techniquestory/28052552/oksite1/Index4.htm (24 สิงหาคม 2552).

นิตยา กันหลง. 2545. **โรคสำคัญของพืชสกุลหอมและกระเทียมในประเทศไทย**. เอกสารวิชาการ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 96 หน้า

พัฒนา สนธิรัตน วิรัช ชูบำรุง ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และปิยะ เกียรติก้อง. 2526. เชื้อรา *Alternaria* ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดของพืชผักบางชนิด. **วารสารโรคพืช** ปีที่ 3 เล่มที่ 4. ต.ค.-ธ.ค. 2526. น. 154-167.

พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2537. **ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย.** ก ลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 285 หน้า

Anonymous. 2005. **Management of Plant Pathogen Collections**. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Commonwealth of Australia. 82 pp.

Chase, A.R. 1998. ***Alternaria* Diseases of Ornamentals** *Western Connection turf & Ornamentals*, A Monthly publication 1(3). (Online). Available. http://www.westernfarmservice.com/newsletters/turf/alternaria.pdf. (August 24, 2009).

de Jong, P.F. and B. Heijne. 2009. **Exclusion of of the inoculum Source of Brown spot (*Stemphyphylium vesicarium*)**. International Society for Horticultural Science. (Online). Available. http://www.pubhort.org/members/showdocument?booknrarnr=800_113 (August 29, 2009).

Gonsalves, A.K. and S.A. Ferreira. 2009. ***Stemphylium* Primer**. (Online). Available. http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/crop/Type/stem_prim.htm (July 2, 2009).

Katoh, H, A. Isshiki, A. Masunaka, H. Yamamoto and K. Akimitsu. 2005. Abstracts & Program. **The Second Asian Conference on Plant Pathology 2005**, 25-28 June 2005, National University of Singapore, Singapore. 113 p.

Laemmlen, F. 2009. **Alternaria Diseases**. Publication 8040. (Online). Available. http://ucanr.org/freepubs/docs/8040.pdf. (August 24, 2009).

Nish, N., T. Muta, Y. Ito, M. Nakamura and T. Tsukiboshi. 2009. Ray speck of chrysanthemum caused by *Stemphylium lycopersici* in Japan. **Journal of General Plant Pathology.** (Online). Available. http://www.citeulike.org/article/3617705. (August 24, 2009).

Piroj Juangbhanich and Nopporn Ubolbarn. 1978. Taxonomic Studies on the Causal Fungus of Tomato Leaf Blight and Pathogenicity Test. **The Kasetsart Journal** 12(2): 130-142.

Takahito, S. 1973. Stemphylium leaf spot (Stemphylium botryosum Wallr.) on asparagus plants [in Japanese] **Annals of the Phytopathological Society of Japan** 39(4) : 364-366. (Online). Available. http://ci.nii.ac.jp/naid/110002760797/en (August 30, 2009).

Table 1 Collection and identification of plant pathogenic fungi : genus *Stemphylium* and *Alternaria* during December 2013 – September 2014.

No.	Host plant	Disease	No. of disease sample	Causal agent	Collection area
1	Shallot	Leaf Blight	5	*Stemphylium vesicarium*	Phetchabun (1), Chiang Mai (2), Kanchanaburi (2),
		Purple Blotch	1	*Alternaria porri*	Phetchabun
2	Onion	Purple Blotch	5	*A. porri*	Chiang Mai (3), Kanchanaburi (2)
3	Garlic	Leaf Blight	2	*S. vesicarium*	Chiang Mai (2)
4	Chinese kale	Leaf Spot	3	*A. brassicicola*	Suphan Buri (2), Phetchabun (1)
5	Chinese green mustard	Leaf Spot	1	*Alternaria* sp.	Chiang Mai
6	Cauliflower	Leaf Spot	2	*Alternaria* sp.	Chiang Mai, Phrae
7	Flowering cabbage	Leaf Spot	1	*Alternaria* sp.	Chiang Mai
8	Asparagus	Leaf Spot	1	*Alternaria* sp.	Suphan Buri
9	Coriander	Leaf Spot	1	*Alternaria* sp.	Phetchabun
10	Tomato	Leaf Spot (on fruit)	2	*Alternaria* sp	Nakhon Pathom
11	Sunflower	Leaf Blight	2	*A. helianthi*	Suphan Buri
12	Marigold	Leaf Blight	3	*Alternaria* sp	Tak
13	Tobacco	Leaf Spot	5	*Alternaria* sp	Phrae (1), Nong Khai (1), Nakhon Pathom (1), Chiang Mai (2)
14	Taro	Leaf Spot (on petiole)	2	*Alternaria* sp	Phetchaburi

Table 2 Study on host of plant pathogenic fungi : genus *Stemphylium* and *Alternaria*.

No.	Test plant	Disease occurrence			
		Stemphylium vesicarium	*Alternaria brassicicola*	*Alternaria porri*	Distilled water
1	Egg plant				
2	Chili				
3	Peanut				
4	Soybean				
5	Cucumber				
6	Celery				
7	Chinese radish				
8	Chinese Kale		√		
9	Shallot	√		√	
10	Garlic	√		√	

สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชวงศ์หญ้างวงช้าง Boraginaceae

Seed Morphology of Boraginaceae Weed

ศิริพร ซึงสนธิพร[1/] ธัญชนก จงรักไทย[1/] อัณศยา สุริยะวงศ์ตระการ[1/] ปิยนันท์ พวงจันทร์[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยวัชพืช [2/]กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ศึกษาสัณฐานวิทยาของเม็ดวัชพืชวงศ์หญ้างวงช้าง โดยการสำรวจและรวบรวมตัวอย่างพืชสดและเมล็ด ร่วมกับการปลูกเพื่อรวบรวมเมล็ดและศึกษาลักษณะเพื่อตรวจสอบชนิด รวบรวมตัวอย่างได้แล้ว 9 ชนิด ไม่สามารถระบุชื่อได้ 2 ชนิด และได้ตัวอย่างเมล็ดแล้ว 6 ชนิด ได้ตัวอย่างพืชแห้งทั้งสิ้น 98 ตัวอย่าง

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-03-09-56

คำนำ

วัชพืช เป็นพืชที่ขึ้นในที่ที่ไม่ต้องการ หรือยังหาประโยชน์ไม่พบ ซึ่งพืชหลายชนิดที่เป็นวัชพืชในแหล่งพื้นที่เกษตร เช่น ตาลปัตรฤาษี (*Limnocharis flava* (L.) Buchen.) หญ้าคออ่อน (*Crassocephum crepidiodes* (Benth) s. Moore.) ตับเต่านา (*Hydrocharis morsus-ranae* L.) แพงพวยน้ำ (*Ludwigia adscendens* (L.) H.Hara) ผักโขมหนาม (*Amaranthus spinosus* L.) แต่พืชเหล่านี้เป็นผักพื้นบ้านในภาคต่างๆ ของประเทศไทย. (สถาบันการแพทย์แผนไทย, 2541; 2542(ก), 2542(ข), 2542(ค) นอกจากนี้หลายชนิดยังใช้เป็นพืชสมุนไพร (วิทย์, 2539; คณะเภสัชศาสตร์, 2538; AICAF, 1996)

วัชพืชร้ายแรง ก่อให้เกิดความเดือดร้อนแก่เกษตรกร และความเสียหายทางเศรษฐกิจของประเทศอย่างมาก เช่น ผักตบชวา ไมยราบยักษ์ หญ้าขจรจบ ล้วนเป็นพืชต่างถิ่น ที่อาจถูกนำเข้าด้วยความตั้งใจ (Intentional introduction) เพื่อวัตถุประสงค์ใดวัตถุประสงค์หนึ่ง เช่น เป็นไม้ประดับ ปรับปรุงบำรุงดิน พืชอาหารสัตว์ หรือ บางครั้งเป็นการนำเข้าโดยรู้เท่าไม่ถึงการณ์ (ignorant introduction) หรือโดยไม่ตั้งใจ (unintentional introduction) เช่น การปนเปื้อนของเมล็ดวัชพืชในสินค้าเกษตร พืชต่างถิ่นเมื่อถูกชักนำเข้าถิ่นใหม่ จะมีการปรับตัว (adaptation) เพื่อความอยู่รอดในสภาพนิเวศใหม่ การตั้งตัว (establishment) หากเป็นพืชที่มีความแข็งแกร่งหรือรุกราน ก็จะกลายเป็นวัชพืชร้ายแรง (noxious weed) บางชนิดแพร่กระจายปะปนไปกับพืชอื่น โดยมิได้เป็นปัญหา เสมือนเป็นพืชพื้นเมือง (naturalization) วัชพืชร้ายแรงอาจเปลี่ยนสถานะเป็นเสมือนพืชพื้นเมืองได้ เช่น ผักตบชวา (*Eichornia crassipes* (Mart.) Solms) หญ้ายาง (*Euphorbia heterophylla* (L.) Klotzsch & Garcke) (บรรพต, 2539) การเปลี่ยนแปลงในแต่ละขั้นตอนใช้เวลาต่างกันไป เช่น ผักตบชวามีการนำเข้าในปี 2444 ต่อมาในปี 2456 จึงมีการประกาศใช้พระราชบัญญัติผักตบชวา เพื่อควบคุมการระบาด แต่ไม่ได้ผล และยังคงเป็นปัญหาวัชพืชน้ำที่สำคัญของประเทศไทยจนถึงปัจจุบัน แต่การคมนาคมทางน้ำได้ลดความสำคัญลงไป ขณะเดียวกันกลับมีปัญหาขาดแคลนผักตบชวาสำหรับทำเครื่องจักสาน จะเห็นได้ว่า ผักตบชวาใช้เวลาพัฒนาตัวเองจากเริ่มนำเข้า จนมาเป็นวัชพืชร้ายแรง ประมาณ 12 ปี ปัจจุบันสามารถพบผักตบชวาได้ทั่วประเทศ เป็นเสมือนพืชพื้นเมืองของไทย นอกจากนี้ยังมีพืชนำเข้าและกลายเป็นวัชพืชร้ายแรง ก่อให้เกิดความเสียหายอีกหลายชนิด มีทั้งที่ทราบประวัติการนำเข้า เช่น ไมยราบยักษ์ (*Mimosa pigra* Linn.) ขจรจบดอกเล็ก (*Pennisetum polystachyon* (L.) Schult) ขจรจบดอกใหญ่ *Pennisetum pedicellatum* Trin.) ขจรจบดอกเหลือง (*Pennisetum setosum* (Swz.) L.C. Rich) และไม่ทราบประวัติการนำเข้า เช่น หญ้าข้าวนก (*Echinocloa crus-galli* Beauv) ขี้ไก่ย่าน (*Mikania micrantha* H.B.K.) ธูปฤาษี (*Typhaangustifolia* Linn.) เป็นต้น อาจเป็นพืชพันธุ์ที่ปนเปื้อนมากับสินค้า วัสดุ อุปกรณ์ หรือติดมากับสัมภาระต่างๆ เมื่อพบสภาพที่.เหมาะสมก็จะงอก และเจริญเติบโตต่อได้ เพราะสภาพภูมิอากาศของไทยเหมาะแก่การเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (ศิริพร, 2546)

หลายประเทศได้มีการศึกษาถึงผลกระทบของชนิดพันธุ์ต่างถิ่นต่อสิ่งแวดล้อมและนิเวศเกษตร พอสรุปได้ว่า ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่เป็นชนิดรุกราน มีผลทางลบต่อเศรษฐกิจ สิ่งแวดล้อม นิเวศวิทยา และสังคมแล้ว เช่น ลดการเจริญเติบโตของพืชที่ต้องการ เป็นข้อจำกัดทางกายภาพสำหรับการเคลื่อนย้าย เช่น หนามที่แน่น ทำให้เดินผ่านไม่ได้ หรือพืชน้ำที่ขึ้นเป็นกลุ่มหนาแน่น ทำให้การไหลของน้ำเป็นไปได้ช้าลง ลดคุณภาพการใช้ประโยชน์ที่ดิน มีผลต่อสุขภาพอนามัยของมนุษย์และสัตว์ โดยตรง ลดความหลากหลายทางชีวภาพพืชที่มีอยู่ในท้องถิ่นเดิม เป็นแหล่งอาศัยของศัตรูพืชและโรค เป็นต้น

พืชวงศ์หญ้างวงช้าง เป็นไม้ล้มลุก ไม้พุ่ม หรือไม้ต้น พบน้อยที่เป็นไม้เลื้อย ใบเป็นใบเดี่ยว ติดเวียนสลับ บางครั้งอาจพบติดกึ่งตรงข้าม ใบมักสาก เนื่องจากมีขนแข็ง ดอกออกเป็นช่อม้วนแบบก้นหอย มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกอย่างละ 5 กลีบ กลีบเลี้ยงติดแน่น กลีบดอกเชื่อมติดกัน ปลายจักเป็น 5 พู เกสรเพศผู้ 5 อัน รังไข่ติดเหนือวงกลีบ มี 2 ช่อง หรือ 4 ช่อง โดยมีผนังกั้นไม่ชัดเจน แต่ละช่องมีไข่อ่อน 1 หน่วย ผลแยกย่อยเป็น 4 มีเมล็ดแข็ง ประเทศไทยมี 15 สกุล (ก่องกานดา, 2548) เช่น *Argusia carmona Coldenia Cyanoglossum Ehretia Heliotropium Onosma Rotula Tournefortia* และ *Trichodesma* เป็นต้น พืชในสกุลนี้ที่พบทั่วไปคือ หญ้างวงช้าง (*Heliotropium indicum* L.) หญ้าตีนตุ๊กแก (*Coldenia procumbens*)

Holm *et. al.* (1977) รายงานว่าหญ้างวงช้าง เป็นวัชพืชร้ายแรงที่สุดชนิดหนึ่งของโลก ถูกจัดเป็นวัชพืชสำคัญอันดับ2 ในไร่อ้อยของอินโดเนเซียหญ้างวงช้าง และยังพบในนาข้าว แปลงถั่ว ข้าวโพด นอกจากนี้พบเป็นวัชพืชในแปลงพืชไร่ พืชผัก ในฟิลิปปินส์ ไต้หวัน แทนซาเนีย ทรินิแดด อินเดีย ด้วย

ในประเทศไทย พบหญ้างวงช้างในนาข้าวหลังเก็บเกี่ยว และในแปลงพืชไร่หลายชนิด เช่น มันสำประหลัง อ้อย ยาสูบ พืชผัก และยังพบเป็นวัชพืชในที่ที่ไม่ได้ทำการเกษตร เช่น ที่พื้นที่ว่างข้างทางหลวง พืชชนิดนี้มีพบในที่ที่มีความชื้นมาก และสามารถทนแล้ง และสภาพน้ำท่วมได้ระยะหนึ่ง

สำหรับประเทศไทย ได้ประกาศให้พืชชนิดหนึ่งในสกุลเดียวกับหญ้างวงช้าง คือ *Heliotropium europaeum* L. เป็นสิ่งต้องห้าม เนื่องจากเป็นศัตรูพืชกักกันในลำดับที่ 335 ตามประกาศประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 ซึ่งลงนามโดยรัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เมื่อ 26 เมษายน 2550 ประกาศในราชกิจจานุเบกษา เมื่อ 1 มิถุนายน 2550 และมีผลใช้บังคับเมื่อ 1 สิงหาคม 2554

H. europium L. เป็นพืชล้มลุก ที่มีถิ่นกำเนิดแถบเมดิเตอเรเนียน จนถึงตะวันตกเฉียงเหนือของอินเดีย เป็นวัชพืชสำคัญในทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ในเขตร้อนจนถึงเขตอบอุ่นของออสเตรเลีย เมล็ดงอกในฤดูใบไม้ผลิ สามารถทนแล้งได้ เนื่องจากมีระบบรากลึก ออกดอกหลังจากงอกเพียง 2-3 สัปดาห์ และสามารถเจริญเติบโตได้จนถึงฤดูร้อน เนื่องจากพืชนี้มีสารอัลคาลอยด์ จึงเป็นพิษต่อตับของสัตว์เลี้ยง และทำให้เกิดความเป็นพิษของทองแดงเรื้อรัง และตาย วัวและม้าจะไวต่อพิษเหล่านี้มากกว่าแกะ (Parsons and Cuthbertson, 1992)

จากการสำรวจเฝ้าระวังการแพร่ระบาดพืชที่เป็นสิ่งต้องห้าม หรือศัตรูพืชกักกัน Congress grass (*Parthenium hysterophous* L.) ระหว่างปี 2550 – 2553 พบวัชพืชในวงศ์หญ้างวงช้าง 3 ชนิด ที่ยังไม่พบเอกสารและตัวอย่างของพืชทั้งสามชนิดในพิพิธภัณฑ์พืชที่ใดเลย คือสกุล *Heliotropium* 2 ชนิด และสกุล *Trichodesma* 1 ชนิด ซึ่ง 2 ชนิดในสกุล *Heliotropium* มีลักษณะคล้ายกัน คือมีดอกสีขาวทั้งคู่ แต่มีพฤติกรรมในการแพร่กระจายต่างกัน และมีลักษณะบางประการคล้าย *H. europium* ศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย

เมล็ดวัชพืช เป็นส่วนขยายพันธุ์ที่มีสามารถถูกเคลื่อนย้ายโดยกิจกรรมของมนุษย์ จะโดยความตั้งใจหรือไม่ก็ตาม จะทำให้วัชพืชนั้นสามารถเจริญเติบโตในที่ใหม่และอาจกลายเป็นวัชพืชร้ายแรง ทำให้เกิดความเสียหายต่อความหลากหลายทางชีวภาพและเศรษฐกิจได้ การปนเปื้อนของเมล็ดวัชพืชในสินค้าเกษตรในการค้าระหว่างประเทศ ทำให้เกิดความเสียหายอย่างมาก การแก้ไข หรือตอบโต้จำเป็นต้องมี การพิสูจน์ ตรวจวิเคราะห์ชนิดจำเป็นต้องใช้ตัวอย่างเมล็ดในการยืนยัน ตัวอย่างเมล็ดวัชพืชและคู่มือการตรวจสอบจึงเป็นสิ่งสำคัญ ในการตอบข้อสงสัยหรือตอบโต้ข้อกล่าวหาในการค้าระหว่างประเทศ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- การสำรวจได้แก่ แผนที่ สมุดบันทึก กรรไกร ถุงพลาสติก ปากกาเขียนพลาสติก หรือกระดาษป้ายชื่อ และกล้องถ่ายภาพ

- อุปกรณ์สำหรับปลูกพืชทดสอบและสารเคมี ได้แก่ กระถาง ดิน ป้ายกำกับการทดลอง ปุ๋ยและสารเคมีกำจัดศัตรูพืช

- การจัดทำตัวอย่างแห้ง ได้แก่ แผงอัดพรรณไม้สำหรับจัดทำตัวอย่างแห้ง กระดาษฟูก กระดาษซับ ฟองน้ำสำหรับรองตัวอย่าง กระดาษติดตัวอย่างพรรณไม้พร้อมปก พร้อมกระดาษป้ายชื่อ

- สารเคมีสำหรับกันเชื้อราและแมลง ได้แก่ เมทานอล (Methanol) คลอโรฟอร์ม และเมอคิวรี่คลอไรด์ พร้อมเครื่องแก้วต่างๆ ที่จำเป็น

- การตรวจสอบชนิดพืช ได้แก่ แว่นขยายขนาด 10 เท่า กล้อง กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำเข็มเขี่ย ปากคีบ หนังสือคู่มือการจำแนกพรรณไม้ต่างๆ

วิธีการ

การกำหนดพื้นที่สำรวจ จากสภาพนิเวศน์ที่มีรายงานการพบพืชชนิดนั้น ๆ เช่น ตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์พืช เอกสารเกี่ยวกับวัชพืช ทำการสำรวจในพื้นที่ต่างๆที่สามารถเข้าถึงโดยรถยนต์ หรืออยู่ในระยะที่สามารถเดินเท้าได้

สำรวจชนิดและการแพร่กระจายของพืชในวงศ์หญ้างวงช้าง ในพื้นที่ต่างๆ เมื่อพบจดบันทึกพิกัด และสภาพพื้นที เก็บตัวอย่างเพื่อจัดทำตัวอย่างแห้ง และอีกส่วนนำมาปลูกในเรือนทดลองของกลุ่มวิจัยวัชพืช เพื่อศึกษารายละเอียดลักษณะพืชและเก็บเมล็ด ตรวจสอบชนิดโดยการเทียบกับตัวอย่างพืชแห้งของพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ และเอกสารด้านอนุกรมวิธานและคู่มือตรวจสอบชนิดพืชต่างๆ

การศึกษาสัณฐานวิทยาของพืชวงศ์หญ้างวงช้าง เก็บรวบรวมเมล็ด นำมาทำความสะอาดและเลือกเฉพาะเมล็ดสมบูรณ์เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของเมล็ด เช่น รูปร่าง ขนาด สีผิวเมล็ด/ผล ลักษณะ-ลวดลายผิว ตำแหน่งช่องเปิดบนเมล็ด ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของแต่ละชนิด เพื่อจัดทำคู่มือการจำแนกชนิดจากเมล็ดต่อไป

เวลาและสถานที่

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืชในปี 2556-2557

ผลการดำเนินการ

สำรวจ รวบรวมพืชวงศ์หญ้างวงช้าง จากจังหวัดนนทบุรี สุพรรณบุรี อยุธยา นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี สระบุรี ลพบุรี เพชรบูรณ์ ชัยภูมิ หนองคาย ขอนแก่น อุดรธานี ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ พิษณุโลก อุตรดิตถ์ แพร่ น่าน ชุมพร สุราษฎร์ธานี พังงา พบวัชพืชวงศ์หญ้างวงช้างและรวบรวมเมล็ดแล้วทั้งสิ้น 8 ชนิด ได้แก่

1. *Coldenia procumbens* L. **หญ้าตีนตุ๊กแก** เป็นวัชพืชอายุฤดูเดียว พบตามคันนา หรือนาข้าวหลังเก็บเกี่ยว ในแปลงพืชที่ปลูกหลังเก็บเกี่ยวข้าว ปาล์มน้ำมัน พบในทุกภาคของประเทศไทย ผลสีเขียว มีขนปกคลุมทั่ว (Figure 1) เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ผลแตกออกตามรอยแยก แต่ละผลประกอบด้วย 4 เมล็ดรูปร่างสามเหลี่ยมฐานค้าง เมล็ดสีน้ำตาล มีขนปกคลุม

2. *Cyanoglossum lanceolatum* Forssk. **หญ้ามวนฟ้า** วัชพืชฤดูเดียว พบในพื้นที่ไม้ผล พื้นที่ที่ไม่ได้ทำการเกษตร ตามไหล่ทาง ที่สูงกว่าระดับน้ำทะเล 500 เมตรขึ้นไป ในจังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน เมล็ดมีขนซึ่งมีต่อมที่ปลายปกคลุมตลอด (Figure 2) ทำให้หลุดติดเสื้อผ้า ขนสัตว์ได้ง่าย

3. *Heliotropium indicum* L. **หญ้างวงช้าง** พบทั่วไปทั้งในพื้นที่ทำการเกษตร และไม่ได้ทำการเกษตร ในพื้นที่ปลูกพืช เป็นวัชพืชในพืชไร่หลายชนิด เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง ฟักทอง พบตามคันนา หรือในนาหลังเก็บเกี่ยว ผลเกิดบนช่อดอกที่ทยอยบานจากโคนช่อดอก ไปปลาย ผลสีเขียว มีขนแข็งปกคลุม เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หนึ่งผลมีสองเมล็ด

4. *Heliotropium strigosum* Willd. **จุกนกยูง หญ้านกยูง** เป็นวัชพืชฤดูเดียว ต้นขนาดเล็ก แตกแขนงมาก ช่อดอกแยกเป็น 2 แฉก (Figure 4) ดอกสีขาวขนาดเล็ก พบตามคันนา หรือทุ่งหญ้าที่ชุ่มชื้น ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

5. *Heliotropium bracteatum* R.Br. **หญ้าดอกขาว** วัชพืชฤดูเดียว อายุประมาณ 2 เดือน ดอกสีขาว ออกที่ปลาย เจริญเติบโตเป็นผล หลุดจากต้นเมื่อแก่ ทำให้เก็บเมล็ดได้น้อย พบตามคันนาที่ไม่ได้ทำการเพาะปลูก ที่มีความชุ่มชื้น พบในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา เพชรบูรณ์

6. *Heliotropium* sp1. **หญ้างวงช้างดอกขาว** เป็นพืชฤดูเดียว พบกระจัดกระจายในแปลงถั่วเขียว ที่ปลูกหลังเก็บเกี่ยวข้าว และพื้นที่ใกล้เคียง ที่เป็นทางเดิน ร่องน้ำที่แห้งแล้ว ใบสีเขียวเข้ม ช่อ

ดอกสี่ขาว แตกแขนง 2-4 แฉก ส่วนใหญ่ 2-3 แฉก เมล็ดแก่จากโคนช่อดอก ไปหาปลายช่อดอก เมื่อแก่มีสีน้ำตาล มีขนขาวแข็งปกคลุมทั่ว (Figure 6) พบในพื้นทีjจังหวัดเพชรบูรณ์

7. *Heliotropium* sp2. **หญ้างวงช้างดอกขาว** เป็นพืชฤดูเดียว ใบเดี่ยว สีเขียวอ่อน ช่อดอกสีขาวแตกแขนง 2-5 แฉก ส่วนใหญ่ 3-4 แฉก ลักษณะผลคล้ายกับที่พบในจังหวัดเพชรบูรณ์ (Figure 7) พบขึ้นไหล่ทางที่เป็นดินลูกรัง บริเวณใกล้ด่านเจดีย์สามองค์ และขึ้นเป็นกลุ่มใหญ่โดยไม่มีพืชอื่นขึ้นปะปนเลย นอกจากนี้ยังพบในริมน้ำเมย อำเภอแม่ระมาด จังหวัดตาก บริเวณพื้นที่ชาวบ้านสองฝั่งขึ้น-ลงเรือ นอกจากนี้ยังพบริมทางหลวงหมายเลข 108 ในพื้นที่อำเภอแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอนด้วย ลักษณะใกล้เคียงกับชนิดที่พบที่จังหวัดเพชรบูรณ์มาก แต่ชนิดนี้สามารถขึ้นได้ทั้งในที่แห้งแล้งและน้ำท่วมขัง และพบเฉพาะพื้นที่ที่ใกล้ชายแดน หรือตามแนวชายแดน ไทย-เมียนม่าร์เท่านั้น

8. *Trichodesma zeylanicum* (Burm.f.) R.Br. ไม้พุ่มอายุฤดูเดียว แต่หากมีความชื้นในดินมากพอ อยู่ข้ามฤดูได้ อาจสูงได้ถึง 2 เมตร แตกแขนงได้ดี มีขนแข็งปกคลุมทั้งต้นและใบ ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับหรือออกตรงข้าม แผ่นใบรูปรี ปลายใบแหลม ฐานใบแหลม ขอบเรียบ มีก้านใบสั้นๆ ออกดอกที่ปลายกิ่ง และโคนใบ ตัวใบมีขนแข็งปกคลุมทั่ว เมล็ดผิวเรียบ สีขาว-น้ำตาล (Figure 8) พบเป็นวัชพืชในมันสำปะหลัง อ้อย ในแปลงข้าวโพดที่เก็บเกี่ยวแล้ว และยังพบตามพื้นที่ที่ไม่ได้ปลูกพืชตามริมทางหลวง พบในพื้นที่จังหวัดลพบุรี สระบุรี เพชรบูรณ์ สุพรรณบุรี และกาญจนบุรี โดยมีการระบาดรุนแรงในพื้นที่ อำเภอด่านขุนทด และอำเภอสีคิ้ว จังหวัดนครราชสีมา จากการสอบถามเกษตรกรปลูกมันสำปะหลัง ทราบว่ากำจัดได้ยาก ลำต้นแข็ง เนื่องจากมีขนแข็งทั่วทั้งต้นและใบ จึงเรียกว่าต้นเอดส์ และบางแห่งเรียกว่าหญ้า ธกส. เนื่องจากกำจัดไม่หมด

9. *Trichodesma indicum* (L.) Lehm. เป็นวัชพืชอายุฤดูเดียว แตกแขนงบริเวณโคนต้นได้ดี และสาขามักแผ่คลุมดิน สูงประมาณ 20 เซนติเมตร มีขนปกคลุมตลอดลำต้น ลำต้นสีเขียว – แดง ใบเดี่ยว ออกตรงข้าม แต่ใบที่ปลายยอดที่มีดอกออกสลับ ดอกเดี่ยวรูปหอก ปลายมน ฐานใบเว้า ไม่มีก้านใบ ดอก ออกตามซอกใบบริเวณปลายกิ่ง กลีบดอกสีขาว-ฟ้า ปลายกลีบแหลมเป็นติ่งยาว โคนกลีบหลอมติดกัน มีแถบสีน้ำตาล-เหลือง กระจายอยู่กลางระหว่างสองกลีบที่เชื่อมติดกัน ใกล้กับเกสรเพศผู้ ทั้ง 5 กลีบ ผลอยู่ระหว่างการรวบรวม พืชชนิดนี้พบเป็นวัชพืชในยาสูบ และยังไม่พบในพื้นที่อื่น

พืชสกุล *Trichodesma* ทั้งสองชนิดนี้ถูกรายงานพืชที่พบเป็นพืชต่างถิ่นที่เข้าไปเจริญเติบโตในไต้หวันด้วย (Wang and Chang, 2014)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

วัชพืชในวงศ์หญ้างวงช้าง มีหลายสกุลที่เป็นวัชพืช แต่สกุลที่มีความหลากหลายที่สุดในประเทศไทยคือสกลุหญ้างวงช้าง *Heliotropium* L. ซึ่งในการศึกษานี้พบแล้ว 5 ชนิด แต่ระบุชื่อไม่ได้อีก 2 ชนิด เมล็ดวัชพืชในสกุลนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกัน สำหรับวัชพืชในสกุล *Trichodesma* พบสองชนิด ชนิดแรกคือ *T. zeylanicum* มีแนวโน้มระบาดในพืชไร่โดยเฉพาะในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและลพบุรี ถึงแม้โดยทั่วไปจะเป็นพืชฤดูเดียว ซึ่งอาจตายเนื่องจากความแห้งแล้ง หากปล่อยให้

เจริญเติบโตจนสร้างเมล็ดแล้ว จะทำการป้องกันยาก เนื่องจากเมล็ดมีเปลือกแข็ง อาจมีชีวิตอยู่ในได้นาน ส่วนชนิด *T. indicum* (L.) Lehm. เพิ่งพบเป็นวัชพืชในแปลงยาสูบ และต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

ก่องกานดา ชมามฤต. 2548. ลักษณะประจำวงศ์พรรณไม้. กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. 113 หน้า

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2538. สยามไภษัชยพฤกษ์ ภูมิปัญญาของชาติ. ภาควิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. อมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์ พับลิชชิ่ง จำกัด. 272 หน้า.

บรรพต ณ ป้อมเพชร. 2539. ชนิดพันธุ์ต่างถิ่น: การควบคุมโดยชีววิธี. *ใน* รายงานการประชุมวิชาการ “ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นในประเทศไทย” สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 24-26 ตุลาคม 2539. โรงแรมอมารีออคิด รีสอร์ท พัทยา. หน้า 85-97.

พิสิษฐ์ ณ พัทลุง. 2539. ผลกระทบจากชนิดพันธุ์ต่างถิ่น. *ใน* รายงานการประชุมวิชาการ “ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นในประเทศไทย” สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 24-26 ตุลาคม 2539. โรงแรมอมารีออคิด รีสอร์ท พัทยา. หน้า 64-67.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2539. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. ประชุมทองการพิมพ์ หน้า 2.

ศิริพร ซึงสนธิพร, วินัย สมประสงค์ และปราโมทย์ ไตรบุญ. 2546. ก้นจ้ำขาวดอกใหญ่ ..วัชพืชชนิดใหม่ของไทย. *ใน* เอกสารการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 6 “หนึ่งทศวรรษแห่งการอารักขาพืชในประเทศ” 24-27 พฤศจิกายน 2546. ขอนแก่น หน้า478-89.

สถาบันแพทย์แผนไทย. 2541. ผักพื้นบ้านภาคอีสาน. สถาบันแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก กรุงเทพฯ 302 หน้า

_____. 2542.(ก) ผักพื้นบ้านภาคกลาง. สถาบันแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก กรุงเทพฯ 278หน้า

_____. 2542.(ข) ผักพื้นบ้านภาคใต้. สถาบันแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก กรุงเทพฯ 278หน้า

_____. 2542.(ค) ผักพื้นบ้านภาคเหนือ. สถาบันแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก กรุงเทพฯ 280หน้า

AICAF. 1996. Weed in the Tropics. Association for International Cooperation of Agriculture & Forestry. Sanbi Printing. Japan 304p.

Holm, L., D.L. Plucknett, J.V. Pancho, and J.P. Herberger. 1979. The World's Worst Weeds Distribution and Biology. Univ. Hawaii Press, Honolulu. p291-294.

Muenscher, W.C. 1980. Weeds 2nd. Cornell University Press. USA. 586p.

Parsons W. And E. Cuthbertson. 1992. *in* Weed Identification : Common heliotrope *Heliotropium europaeum*. at http://www.weeds.org.au/cgi-bin/weedident.cgi?tpl= plant.tpl&state=&s= &ibra=all&card=H76. accessed on 15 June 2011.

WSSA and APHIS. *Trichodesma zeylanicum*. http://wssa.net/wp-content/uploads/Trichodesma-zeylanicum.pdf accessed on 5 Jan 2015

Wang and Chang. 2014. Two Newly Naturalizw plants of the Boraginaceae in Taiwan : *Trichodesma indicaum* (L.) Lehm. and *Trichodesma zeylanicum* (Burm.f.) R. Br. Taiwan J for Sci. 29 (2) : 149-56.

ภาคผนวก

Figure 1 *Coldemia procumbens*, lear and flower (1), fruit (2)

Figure 2 ***Cyanoglossum lanceolatum*** **Forssk, habit** (1) inflorescence and fruit (2)

Figure 3 *Heliotropium indicum* L.

Figure 4 *Heliotropium strigosum* Willd. habit (1) inflorescence (2)

Figure 5 *Heliotropium bracteatum* R.Br.

Figure 6 *Helilotropium* sp. Collected from Petchboon province, habit (1) seed (2)

Figure 7 *Heliotropium* sp2 collected from Kanjanaburi , habit (1) mature seed (2)

Figure 8 *Trichodesma zeylanicum* (Burm.f.) R.Br, habit (1) flower (2) and mature fruit

สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชสกุลลูกใต้ใบ *Phyllanthus* L.

Seed Morphology of *Phyllanthus* L. Weeds.

ธัญชนก จงรักไทย[1/] ศิริพร ซึงสนธิพร[1/] กาญจนา พฤกษพันธ์[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช [2/]สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชสกุลลูกใต้ใบ มีเพื่อทราบชนิด การแพร่กระจาย และลักษณะสัณฐานวิทยาเมล็ดของวัชพืชในสกุลลูกใต้ใบ และรวบรวมตัวอย่างวัชพืช และเมล็ดวัชพืชสำหรับการอ้างอิงในการศึกษา อยู่ในระหว่างการทดลองซึ่งยังไม่สิ้นสุดระยะเวลา ผลที่ได้จากการศึกษา พบวัชพืชสกุลลูกใต้ใบ Phyllanthus L. ที่จำแนกได้จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Phyllanthus urinaria* L., *P. amarus* Schumach ex Thonn., *P. nirui* auct.non L., *P. pulcher* Wall. ex Mull.Arg และ *P. virgatus* G.Forst.

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-03-01-56

คำนำ

ประเทศไทยมีพืชในวงศ์เปล้า (Euphorbiaceae) มากถึง 433 ชนิด ซึ่งกระจายอยู่ใน 87 สกุล (Kongkanda Chayamarit and Perer C. Van Welzen, 2005) สกุลซึ่งมีทั้งที่เป็นพืชเศรษฐกิจ ไม้ประดับ และวัชพืช เช่น ยางพารา (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.Juss.) Mull.Arg.) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) ต้นพญาไร้ใบ *(Euphorbia tirucalli* L.) ตำแยแมว (*Acalypha indica* L.) เป็นต้น ส่วนที่อยู่ในสกุลลูกใต้ใบ (*Phyllanthus* L.) มีหลายชนิดที่เป็นวัชพืชทั่วไป และบางชนิดมีสรรพคุณทางสมุนไพร ลูกใต้ใบ ซึ่งมีชื่อไทยเพียงชื่อเดียว แต่มีถึง 3 ชนิด ได้แก่ *Phyllanthus urinaria* L. *P. amarus* Schumach ex Thonn., และ *P. niruri* auct.non L. ทั้งสามชนิดเป็นวัชพืชในพืชไร่หลายชนิด และพืชผักในบางพื้นที่ *P. amarus* และ *P.urinaria* มีสรรพคุณทางสมุนไพรมากมาย เช่น ใช้แก้โรคดีซ่าน เป็นยาขับปัสสาวะ เป็นยาฝาดสมาน บำรุงธาตุ เป็นต้น (ก่อ กานดา, 2548)

เมล็ดวัชพืชเป็นส่วนสำคัญทำหน้าที่เป็นส่วนขยายพันธุ์ การทราบลักษณะสัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืช จะสามารถช่วยให้การตรวจสอบชนิดเมล็ดวัชพืชที่ปะปนไปกับเมล็ดพันธุ์ได้ถูกต้องและรวดเร็วขึ้น สามารถนำข้อมูลไปประยุกต์ใช้แนะนำเกษตรกร ผู้สนใจ ในการป้องกันการเจือปนปนเปื้อนของเมล็ดวัชพืชสกุลนี้ในเมล็ดพันธุ์ของพืชปลูก วัสดุปลูก และอุปกรณ์ทางการเกษตรได้ อันเป็นการช่วยลดการระบาด และแพร่กระจายโดยการปนเปื้อนไปกับเมล็ดพันธุ์ของพืชปลูก วัสดุปลูก และอุปกรณ์ทางการเกษตรได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นคู่มือในการสำรวจชนิดและจำนวนเมล็ดของวัชพืชที่อยู่ในดินในฤดูปลูก เพื่อคาดคะเนถึงผลเสียหายที่จะเกิดขึ้นและสามารถเลือกวิธีจัดการได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป (ดวงพรและรังสิต, 2544)

Muenscher, 1980 กล่าวว่าวัชพืชร้ายแรงหลายชนิดสามารถสร้างเมล็ดจำนวนมาก เมล็ดมีการพักตัวเมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม หรือมีอายุยาว นอกจากนี้หลายชนิดยังมีขนาดเล็ก ยากต่อการตรวจสอบ หรือมีขนาดใกล้เคียงกับเมล็ดพืชปลูก ทำให้แยกออกจากเมล็ดพันธุ์พืชปลูกได้ยาก

การศึกษานี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาสัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชสกุลน้ำนมราชสีห์ ซึ่งมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของวัชพืชชนิดต่างๆ ในสกุลน้ำนมราชสีห์ และเพื่อรวบรวมตัวอย่างวัชพืช และเมล็ดวัชพืช สำหรับการอ้างอิง เพื่อแยกแยะให้เห็นความแตกต่าง และรวบรวมชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นพืชสมุนไพร เพื่อเป็นตัวอย่างสดและแห้งเพื่อประโยชน์ในการสืบค้นต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1 กล้องถ่ายรูปแบบดิจิตอล

2 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)

3 เลนส์ขยาย 10 เท่า สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นในภาคสนาม

4 เครื่องวัดพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS)

5 กรรไกร มีด เสียม หรือพั่ว สำหรับตัด/ขุด ตัวอย่างพืช

6 แผงอัดตัวอย่างพรรณไม้พร้อมกระกาษฟูก ฟองน้ำ และหนังสือพิมพ์ พร้อมเชือกไส้ตะเกียง และป้ายชื่อสำหรับผูกตัวอย่างพืช

7 กระดาษติดตัวอย่างพืช

8 กล่องใส่เมล็ดพืช

9 ขวดแก้ว และน้ำยาสำหรับดองตัวอย่างพืช (หากจำเป็น)

10 น้ำยาชุปตัวอย่างวัชพืช ประกอบด้วย ฟีนอล เมอคิวลิคคลอไรด์

11 การบูร

12 อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น เช่น ถุงพลาสติกขนาดต่างๆ กระถางขนาดต่างๆ พร้อมดินและป้ายปัก สำหรับปลูกพืชตัวอย่างเพื่อเก็บเมล็ด และศึกษารายละเอียดของพืชเพิ่มเติม

13 สมุดบันทึก

วิธีการ

1 การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

- กำหนดพื้นที่สำรวจ วางแผนการสำรวจเก็บตัวอย่าง แบบการสืบพบ (detection survey) โดยมีพืชสกุลลูกใต้ใบ เป็นพืชเป้าหมาย ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม

- สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชทุกชนิดที่มีลักษณะของพืชสกุลลูกใต้ใบ ตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย นำมาปลูกที่กลุ่มวิจัยวัชพืช เพื่อตรวจสอบชนิด และจัดทำตัวอย่างแห้ง

2 การตรวจสอบชนิดพืช โดยเทียบตัวอย่างพืชในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช พิพิธภัณฑ์พืช ศ. กสิน สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ ของแต่ละวงศ์หรือสกุลของพืชนั้น ๆ ตลอดจนการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่างๆ

3. การศึกษาลักษณะเมล็ด รวบรวมเมล็ดที่แก่จัดจากพื้นที่ หรือต้นที่นำมาปลูก ณ เรือนทดลองกลุ่มวิจัยวัชพืช ศึกษาลักษณะ รูปร่าง สี และลักษณะผิวเมล็ด ด้วยแว่นขยาย หรือกล้องกำลังขยายต่ำของแต่ละชนิด บันทึกภาพลักษณะเมล็ด นำมาเปรียบเทียบลักษณะของแต่ละชนิด เพื่อการจัดทำคู่มือสำหรับจำแนกต่อไป

4 การเก็บตัวอย่างเมล็ดวัชพืช เพื่อเก็บผลที่แก่เต็มที่ เลือกเมล็ดที่ไม่ถูกแมลงทำลาย และไม่เป็นโรค ทำความสะอาดเมล็ด ไม่ให้มีส่วนอื่นปะปน ผึ่งแดดให้แห้ง เพื่อลดความชื้นในเมล็ด นำใส่กล่องพลาสติกใส ปิดให้สนิท เพื่อกันแมลงเข้าทำลาย ปิดป้ายระบุชนิด วงศ์ วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ผู้เก็บ ให้เรียบร้อย เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5 การจัดทำตัวอย่างแห้ง เก็บวัชพืชที่มีใบและดอกสมบูรณ์ ไม่ถูกแมลงทำลาย หากพืชมีขนาดเล็ก ควรมีราก ต้น ใบ –ดอก ครบ หากเป็นพืชไร้ดอก ควรมีส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ หรือลักษณะอื่นที่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดได้ อัดในแผงอัดพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 x30 เซนติเมตร อย่างน้อยชนิดละ 2 ตัวอย่าง เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่ – นิเวศน์ พืชอาศัย วัน-เวลา ชื่อผู้เก็บ เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

6 การเก็บตัวอย่างเมล็ดวัชพืช เก็บเมล็ดที่แก่เต็มที่ ไม่ถูกแมลงทำลาย และไม่เป็นโรค ทำความสะอาดเมล็ด ไม่มีส่วนอื่นปะปน ผึ่งแดดให้แห้ง เพื่อลดความชื้นในเมล็ด นำใส่กล่องพลาสติก ปิดให้สนิท เพื่อกันแมลงเข้าทำลาย เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช เพื่อใช้ในการตรวจสอบ สืบค้นต่อไป

การบันทึกข้อมูล

ข้อมูลภาคสนาม : สถานที่หรือพิกัด สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูก ชนิดลักษณะวัชพืช วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ และข้อมูลอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบชนิด

ข้อมูลในห้องปฏิบัติการ : ขนาด รูปร่าง สี ลักษณะผิวเมล็ด และภาพเมล็ด นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบลักษณะที่สามารถใช้ระบุชนิดจากเมล็ดและจัดทำคู่มือ

การตรวจสอบชนิดพืชโดยการเทียบกับตัวอย่างพันธุ์ไม้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร หรือหอพรรณไม้ กรมอุทยาน พรรณพืชและสัตว์ป่า และ/หรือ ตรวจสอบกับเอกสารเกี่ยวกับวัชพืช และพืชพรรณต่างๆ เช่น Flora of Thailand, Weeds of Rice in Indonesia, Common Weeds of Malaysia, Major Weed of Thailand, Weeds in Highland of Northern Thailand, Major Weeds of the Philippines, Common Weeds in Vietnam, Weeds of Soybean Fields in Thailand, Wild Flowers of Japan, Chinese Colored Weed Illustrated Book, Weed Flora of Japan – Illustrated by Colour, Weeds in Australia, Western Weeds, Weeds เป็นต้น

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สำรวจรวบรวม วัชพืชสกุลลูกใต้ใบในพื้นที่ ในภาคกลาง และภาคเหนือ เพื่อเปรียบเทียบ และยืนยัน และตรวจสอบชนิดวัชพืชสกุลลูกใต้ใบที่ยังไม่ทราบชื่อ โดยปลูกรวบรวมไว้ที่เรือนทดลองกลุ่มวิจัยวัชพืช พบวัชพืชสกุลลูกใต้ใบ ที่สามารถจัดจำแนกได้ ได้แก่

Phyllanthus urinaria L., เป็นไม้ล้มลุก ใบเป็นใบเดี่ยว รูปขอบขนาน ขอบใบสีม่วงแกมน้ำตาล ออกดอกตามข้อ หนึ่งข้อมีหนึ่งใบ ผล ผิวขรุขระแต่ขนาดค่อนข้างใหญ่กว่า

P. amarus Schumach ex Thonn., ไม้ล้มลุก ใบเรียงสลับระนาบเดียว ใบเดี่ยว รูปวงรีหรือขอบขนาน โคนใบมน ปลายใบมนหรือแหลม ดอกช่อออกที่ซอกใบ ดอกแยกเพศอยู่บนต้นเดียวกัน ผลแห้งแตกได้ กลม ผิวเรียบ

P. nirui auct.non L., เป็นไม้ล้มลุก ต้นเล็ก ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงตัวคล้ายใบประกอบ ทำให้บางครั้งเกิดความสับสนว่าเป็นใบประกอบ ออกดอกตามข้อ หนึ่งข้อมีหนึ่งใบ โคนก้านใบติดกับลำต้น สีม่วงแดง ดอกสีเขียว ดอกออกตามซอกก้านใบย่อยและห้อยลง ผลกลมเรียบ เมื่อแก่แตกเป็นสามพู

P. pulcher Wall. ex Mull.Arg. ไม้พุ่ม ใบ เดี่ยว เรียงสลับ รูปไข่แกมวงรี ดอก ออกที่ซอกใบ และปลายกิ่ง แยกเพศ อยู่บนต้นเดียวกัน ดอกตัวผู้ออกเป็นกระจุกที่โคนกิ่ง ดอกตัวเมียมักออกตอนปลายกิ่ง สีเขียวอ่อน โคนกลีบสีแดงเข้ม ก้านดอกยาว ผล แห้ง แตกได้ ค่อนข้างกลม

P virgatus G.Forst. ไม้ล้มลุก ใบ เดี่ยว ออกสลับ รูปแถบหรือรูปใบหอก ปลายใบแหลม ฐานใบมน ช่อดอก แบบช่อกระจุก ออกที่ซอกใบ ดอกแยกเพศอยู่บนต้นเดียวกัน และอยู่ในช่อเดียวกัน ผลรูปวงกลม ผิวมีต่อมคลุมทั่วไป แบบแห้งแตกตามรอย เมล็ด มี 6 อัน สีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม มีต่อมปกคลุมทั้งเมล็ด

และจัดทำตัวอย่างวัชพืชแห้ง เพื่อเก็บรักษาไว้ในการประกอบการตรวจสอบชนิด และศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา สำหรับผู้ที่สนใจต่อไป โดยขณะนี้อยู่ระหว่างการดำเนินการจัดทำ โดยลักษณะของวัชพืชสกุลลูกใต้ใบ เป็นพืชล้มลุก ต้นเล็ก ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงตัวคล้ายใบประกอบ ออกดอกตามข้อ หนึ่งข้อมีหนึ่งใบ โคนก้านใบติดกับลำต้น ดอกออกตามซอกก้านใบย่อยและห้อยลง ผลมีทั้งลักษณะกลมเรียบ และขรุขระ เป็นหยักลึก และหยักตื้น ผลเมื่อแก่แตกเป็นสามพู

เอกสารอ้างอิง

ก่องกานดา ชยามฤต. 2548. พืชที่มีประโยชน์วงศ์เปล้า. บริษัท ประชาชน จำกัด, กรุงเทพฯ. 282 หน้า

ดวงพร สุวรรณกุล และรังสิต สุวรรณเขตนิคม. 2544. สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชในประเทศไทย. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 146 น.

Muenscher, W. C. 1980. Weeds. 2nd edition. Cornell University Press, Ithaca and London.

ภาคผนวก

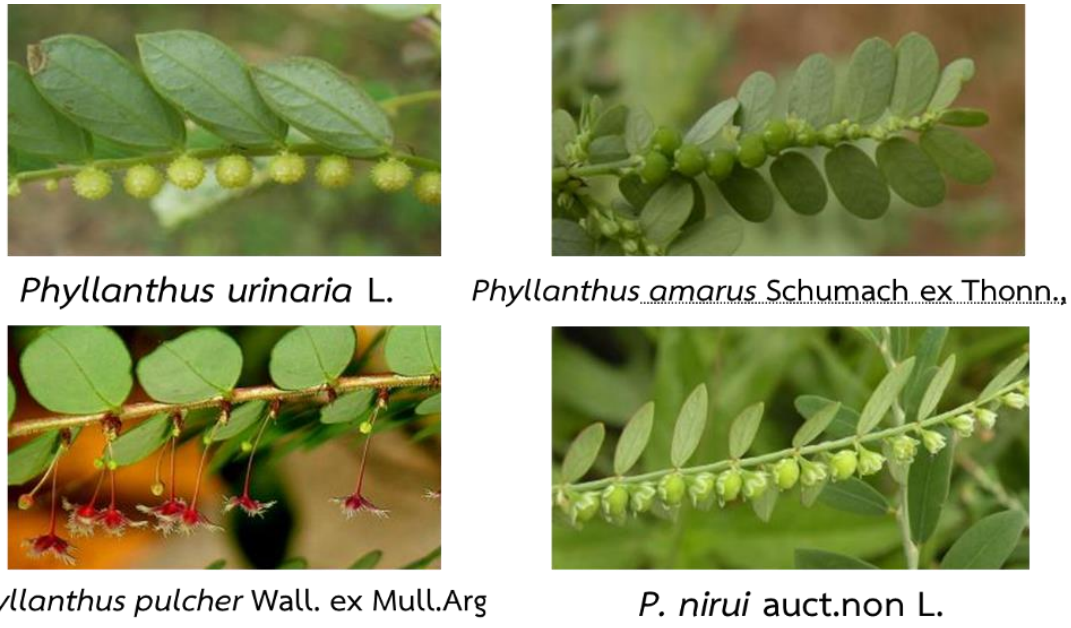


Figure 1 Fruit characteristic of *Phyllanthus* weeds

ชีววิทยา นิเวศวิทยา และการแพร่กระจายของวัชพืชสกุลกระเม็ง *Eclipta* L.

Biology, Ecology Distribution and Management of *Eclipta* L.

ธัญชนก จงรักไทย[1/] ศิริพร ซึงสนธิพร[1/] อัณศยา สุริยะวงศ์ตระการ[1/] ปิยนันท์ พวงจันทร์[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การทดลอง อยู่ในระยะรวบรวมตัวอย่างเมล็ด สำรวจรวบรวม วัชพืชสกุลกะเม็งในพื้นที่ ในภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ พบมีการแพร่กระจายในทั้งในและนอกพื้นที่ทำการเกษตร โดยพบทั้งในสภาพน้ำท่วมขัง ดินมีความชื้นสูง และที่ดอนหรือน้ำไม่ท่วมขัง เป็นวัชพืชในนาข้าว พืชผัก และพืชไร่ จากการสำรวจได้เก็บตัวอย่างเพื่อจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้ง จำนวน 65 ตัวอย่าง ตัวอย่างเมล็ด 16 ตัวอย่าง และต้นนำมาปลูก 15 ตัวอย่าง และเก็บมาปลูกทดสอบที่โรงเรือนกลุ่มวิจัยวัชพืช โดยเก็บตัวอย่างเมล็ดที่มีความสมบูรณ์ ที่ทราบชนิดแล้ว คือ *Eclipta prostrata* (L.) L. และที่ยังไม่ทราบชนิดที่ถูกต้อง ซึ่งได้นำมาเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ปลูกทดสอบยืนยันชนิดที่ถูกต้อง และบันทึกลักษณะสัณฐานเมล็ดต่อไป

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-03-11-57

คำนำ

กะเม็งเปนวัชพืชที่รบกวน และสร้างความเสียหายแกพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองเปนอยางมาก (กลุมงานวิทยาการวัชพืช, 2538) ดังนั้นการจัดการโดยอาศัยพื้นฐานทางด้านชีววิทยาวัชพืชจึงมีความสำคัญมาก ซึ่งการศึกษาชีววิทยาของวัชพืชประกอบด้วยสาขาวิชาหลักได้แก นิเวศวิทยา พันธุศาสตร สรีรวิทยา และ สัณฐานวิทยาของวัชพืช ซึ่งชวยให้สามารถเข้าใจการวางแผนการจัดการวัชพืชไดอยางมีประสิทธิภาพ (ดวงพร, 2543) พื้นฐานทางด้านชีววิทยาของวัชพืชชวยให้สามารถวางแผนในการจัดการวัชพืชได้อยางเหมาะสม และตรงประเด็นปญหาของวัชพืช ทำให้สามารถลดการใช้สารกำจัดวัชพืชที่เกินความจำเปนซึ่งอาจมีผลกระทบตอสิ่งแวดล้อม และระบบนิเวศเกษตร ความสัมพันธระหวางวัชพืช และสิ่งแวดล้อม ระบบการปลูกพืช ดังนั้นการจัดการวัชพืชอยางเหมาะสมจึงควรเริ่มจากการศึกษาขอมูลพื้นฐานเกี่ยวกับวัชพืช รวมทั้งชีววิทยาของวัชพืชที่เป็นสิ่งสำคัญ

Holm *et al.* (1979) ได้สรุปจากแบบสอบถามเกี่ยวกับวัชพืชร้ายแรงจากประเทศต่างๆ ว่าวัชพืชที่ร้ายแรงที่สุดของโลก (World Worst Weed) มีวัชพืชในวงศ์ Asteraceae ถึง 13 ชนิด ซึ่งพบระบาดในประเทศ ถึง 8 ชนิด ได้แก่ สาบแร้งสาบกา (Ageratum conyzoides L.) *Ageratum houstorniamum* Mill.) ก้นจ้ำขาว (*Bidens pilosa* L.) สาบเสือ (*Chromolaena odorata* (L>) R.M.King& H.Robinson / *Eupatorium odoratum* L.) กะเม็ง (*Eclipta prostrata* (L.) L. ทหารกล้า (*Galinsoga parviflora* Cav.) ขี้ไก่ย่าน (*Mikania micrantha* HBK) และกระซับ (*Xanthium strumarium* L.) และพืชในวงศ์นั้บางชนิดถูกกำหนดเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย ได้แก่ *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Cirsium arvense* (L.) Scop. *Cirsium vulgare* Savi (Ten.) *Parthenium hysterophorus* L. เป็นต้น

เมล็ดวัชพืช เป็นส่วนขยายพันธุ์ที่มีสามารถถูกเคลื่อนย้ายโดยกิจกรรมของมนุษย์ จะโดยความตั้งใจหรือไม่ก็ตาม จะทำให้วัชพืชนั้นสามารถเจริญเติบโตในที่ใหม่และอาจกลายเป็นวัชพืชร้ายแรง ทำให้เกิดความเสียหายต่อความหลากหลายทางชีวภาพและเศรษฐกิจได้ การปนเปื้อนของเมล็ดวัชพืชในสินค้าเกษตรในการค้าระหว่างประเทศ ทำให้เกิดความเสียหายอย่างมาก การแก้ไข หรือตอบโต้จำเป็นต้องมีการพิสูจน์ การตรวจวิเคราะห์ชนิดจำเป็นต้องใช้ตัวอย่างเมล็ดในการยืนยัน ตัวอย่างเมล็ดวัชพืชและคู่มือการตรวจสอบจึงเป็นสิ่งสำคัญ ในการตอบข้อสงสัยหรือตอบโต้ข้อกล่าวหาในการค้าระหว่างประเทศ

วัชพืชร้ายแรงหลายชนิดสามารถสร้างเมล็ดจำนวนมาก เมล็ดมีการพักตัวเมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม หรือมีอายุยาว นอกจากนี้หลายชนิดยังมีขนาดเล็ก ยากต่อการตรวจสอบ หรือมีขนาดใกล้เคียงกับเมล็ดพืชปลูก ทำให้แยกออกจากเมล็ดพันธุ์พืชปลูกได้ยาก (Muenscher, 1980) เมล็ดวัชพืชเป็นส่วนสำคัญของต้นวัชพืช เพราะทำหน้าที่เป็นส่วนขยายพันธุ์ หากเรารู้จักลักษณะและสัณฐานวิทยาของวัชพืชแล้วจะสามารถช่วยลดการระบาด และแพร่กระจายโดยการปนเปื้อนไปกับเมล็ดพันธุ์ของพืชปลูก วัสดุปลูก และอุปกรณ์ทางการเกษตรได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นคู่มือใน

การสำรวจชนิดและจำนวนเมล็ดของวัชพืชที่อยู่ในดินในฤดูปลูก เพื่อคาดคะเนถึงผลเสียหายที่จะเกิดขึ้นและสามารถเลือกวิธีจัดการได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป (ดวงพรและรังสิต, 2544)

วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

1) กล้องถ่ายรูปแบบดิจิตอล
2) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
3) เลนส์ขยาย 10 เท่า สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นในภาคสนาม
4) จานแก้ว บีกเกอร์ กระบอกตวง หลอดแก้วก้นตัด และเครื่องแก้วอื่นๆ ที่จำเป็นสำหรับการศึกษาในห้องปฏิบัติการ
5) กระดาษกรอง ผงวุ้น ผงเซลลูโลส พลาสติกใสสำหรับปิดอาหาร
6) กรรไกร มีด เสียม หรือพั่ว สำหรับตัด/ขุด ตัวอย่างพืช
7) ดินและกระถาง สำหรับปลูกพืชทดสอบในเรือนทดลอง
8) แผงอัดตัวอย่างพรรณไม้พร้อมกระดาษฟูก ฟองน้ำและหนังสือพิมพ์ พร้อมเชือกไส้ตะเกียงและป้ายชื่อสำหรับผูกตัวอย่างพืช
9) กระดาษติดตัวอย่างพืช พร้อมแฟ้มปก
10) ขวดแก้ว และน้ำยาสำหรับดองตัวอย่างพืช (หากจำเป็น)
11) น้ำยาชุบตัวอย่างวัชพืช ประกอบด้วย ฟีนอล เมอคิวริคคลอไรด์ เอทธิลอัลกอฮอล์
12) การบูร
13) เครื่องรับสัญญาณดาวเทียม เพื่อระบุพิกัด
14) อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น เช่น ถุงพลาสติกขนาดต่างๆ กระถางขนาดต่างๆ พร้อมดินและป้ายปัก สำหรับปลูกพืชตัวอย่างเพื่อเก็บเมล็ด และศึกษารายละเอียดของพืชเพิ่มเติม
15) สมุดบันทึก

วิธีการ

1) การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

- กำหนดพื้นที่สำรวจ วางแผนการสำรวจเก็บตัวอย่าง แบบการสืบพบ (detection survey) โดยมีพืชสกุลกะเม็ง *Eclipta* L. เป็นพืชเป้าหมาย ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม

- สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชทุกชนิดที่มีลักษณะของพืชสกุลกะเม็ง *Eclipta* L. ตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย นำมาปลูกที่กลุ่มวิจัยวัชพืช เพื่อตรวจสอบชนิด และจัดทำตัวอย่างแห้ง

2) การตรวจสอบชนิดพืช โดยเทียบตัวอย่างพืชในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช พิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิน สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การ

สวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ ของแต่ละวงศ์หรือสกุลของพืชนั้นๆ ตลอดจนการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่างๆ

3) การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของพืชสกุลกะเม็ง รวบรวมเมล็ดจากแหล่งที่พบ หรือพืชที่นำมาปลูก (เมื่อไม่สามารถรวบรวมเมล็ดจากพื้นที่สำรวจ) และทำการศึกษา

- เปอร์เซ็นต์การงอกในห้องปฏิบัติการ โดยนำเมล็ดวัชพืชที่แก่เต็มที่และมีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 50 เมล็ด ใส่ในจานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร บรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดผา นำไปวางในห้องปฏิบัติการ สภาพอุณหภูมิ-แสง ปกติ บันทึกจำนวนเมล็ดงอกทุกวัน จนเมล็ดงอกหมด แต่ไม่เกิน 30 วัน หากงอกไม่นำมาตรวจสอบการมีชีวิตโดยการย้อมสีด้วย 2, 3, 5 triphenyl tetrazolium chloride (tetrazolium chloride straining technique)

- การเจริญเติบโต นำเมล็ดพืชมาเพาะในกระถางปูน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40 เซนติเมตร กระถางละ 50 เมล็ด ชนิดละ 15 กระถาง หลังวัชพืชงอก 1 สัปดาห์ ถอนออก ให้เหลือเฉพาะต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์ที่สุด 1, 3 และ 5 ต้น/กระถาง โดยแต่ละต้นมีระยะห่างกันพอประมาณ บันทึกความสูง/ความยาวต้น จำนวนแขนง ทุกสัปดาห์ วันที่ออกดอก ระยะเวลาที่พัฒนาจากดอกเป็นผล ผลแก่ จำนวนผลต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อผล

- การขยายพันธุ์ ตรวจสอบความสามารถขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดและส่วนของต้น ในสภาพเรือนทดลอง

- คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิเบื้องต้น ใช้ใบสด/ใบแห้ง ของพืชในสกุลกะเม็ง *Eclipta* L. ทดสอบฤทธิ์ทางอัลลิโลพาธิในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Sandwich method ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ไมยราบยักษ์เป็นพืชทดสอบ

4) **การจัดทำตัวอย่างแห้ง** เก็บวัชพืชที่มีใบและดอกสมบูรณ์ ไม่ถูกแมลงทำลาย หากพืชมีขนาดเล็ก ควรมีราก ต้น ใบ –ดอก ครบ หากไม่พบดอก ควรมีส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ หรือลักษณะอื่นที่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดได้ อัดในแผงอัดพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 x30 เซนติเมตร อย่างน้อยชนิดละ 2 ตัวอย่าง เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่ – นิเวศน์ พืชอาศัย วัน-เวลา ชื่อผู้เก็บ เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

การบันทึกข้อมูล

-ข้อมูลภาคสนาม : สถานที่หรือพิกัด สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูก ลักษณะวัชพืช วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ และข้อมูลอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบชนิด

-ข้อมูลในห้องปฏิบัติการ/เรือนทดลอง การงอก การเจริญเติบโต (ความยาวต้น จำนวนแขนง) การสร้างดอก เมล็ด

-นำข้อมูลที่ได้คำนวณอัตราการงอก อัตราการเจริญเติบโต ความสามารถในการสร้างหน่วยขยายพันธุ์ คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิ เปรียบเทียบกันทุกชนิดในสกุลกะเม็ง *Eclipta* L.

-นำข้อมูลสถานที่หรือพิกัดที่ได้จากการสำรวจ จัดทำแผนที่การระบาด/การแพร่กระจาย

เวลาและสถานที่

สถานที่ทำการทดลอง จังหวัดต่างๆ ที่เก็บตัวอย่าง และกลุ่มวิจัยวัชพืชในปี 2557

ผลการทดลอง

สำรวจรวบรวม วัชพืชสกุลกะเม็งในพื้นที่ ในภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ พบมีการแพร่กระจายในทั้งในและนอกพื้นที่ทำการเกษตร โดยพบทั้งในสภาพน้ำท่วมขัง ดินมีความชื้นสูง และที่ดอนหรือน้ำไม่ท่วมขัง เป็นวัชพืชในนาข้าว พืชผัก และพืชไร่ จากการสำรวจได้เก็บตัวอย่างเพื่อจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้ง จำนวน 65 ตัวอย่าง ตัวอย่างเมล็ด 16 ตัวอย่าง และต้นนำมาปลูก 15 ตัวอย่าง และเก็บมาปลูกทดสอบที่โรงเรือนกลุ่มวิจัยวัชพืช โดยเก็บตัวอย่างเมล็ดที่มีความสมบูรณ์ ที่ทราบชนิดแล้ว คือ *Eclipta prostrata* (L.) L. (Figure 1) และที่ยังไม่ทราบชนิดที่ถูกต้อง ซึ่งได้นำมาเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ปลูกทดสอบยืนยันชนิดที่ถูกต้อง และบันทึกลักษณะสัณฐานเมล็ดต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ก่องกานดา ชยามฤต. 2548. พืชที่มีประโยชน์วงศ์เปล้า. บริษัท ประชาชน จำกัด, กรุงเทพฯ. 282 หน้า

ดวงพร สุวรรณกุล และรังสิต สุวรรณเขตนิคม. 2544. สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชในประเทศไทย. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 146 น.

เต็ม สมิตินันทน์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้.

ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันทน์ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. หน้า 74.

Holm, L., D.L. Plucknett, J.V. Pancho, and J.P. Herberger. 1979. The World's Worst Weeds Distribution and Biology. Univ. Hawaii Press, Honolulu. p291-294.

Kongkanda Chayamarit and Perer C. Van Welzen. 2005. Euphorbiaceae. Flora of Thailand Vol.8 part 1.

Muenscher, W. C. 1980. Weeds. 2nd edition. Cornell University Press, Ithaca and London.

ภาคผนวก

Table 1 List of *Eclipta* L. detected during 2014.

Weed species	Number of specimens	Number of seed samples	Location	Geographic coordinates
Eclipta prostrata (L.) L.	1	1	Phitsanulok	N 16.88271, E 100.35721
	4	2	Phrae	N 18.20633, E 100.19339
	5	1	Phrae	N 18.38458, E 100.45491
	7	2	Nan	N 18.51199, E 100.7648
	13	2	Mae Hong Son	-
	6	1	Mae Hong Son	-
	3	1	Rayong	-
Eclipta sp.	6	2	Nonthaburi	N 13.80174, E 100.50226
	5	1	Nakhon Pathom	N 14.01053, E 99.94962
	15	3	Kanchanaburi	N 13.98146, E 99.636

Figure 1 Seed of *Eclipta prostrata* (L.) L.

ชีววิทยา และการแพร่กระจาย ของผักเบี้ยเล็ก (*Portulaca quadrifida* L.)

Biology and Distribution of Purslane (*Portulaca quadrifida* L.)

จรัญญา ปิ่นสุภา ศิริพร ซึงสนธิพร คมสัน นครศรี
กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สำรวจการแพร่กระจายของผักเบี้ยเล็ก (*Portulaca quadrifida* L.) ในพื้นที่ปลูกผัก และพืชไร่ ในเขตภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และศึกษาข้อมูลชีววิทยา เรือนทดลองกลุ่มวิจัยวัชพืช ในปี 2557 จากการสำรวจการแพร่กระจายของผักเบี้ยเล็ก โดยส่วนใหญ่พบในพื้นที่ปลูกผักในเขตภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนภาคกลางพบทั้งในพื้นที่ปลูกผักและพืชไร่ ข้อมูลทางชีววิทยา เมล็ดสามารถงอกได้ในสภาพที่ได้รับแสง ตลอด 24 ชั่วโมง สภาพที่ได้รับแสงสลับกลางวันและกลางคืน และสภาพห้องปฏิบัติการ อัตราการงอกไม่แตกต่างกันทางสถิติ อยู่ระหว่าง 6.8-8.2 เปอร์เซ็นต์ แต่อัตราการงอกจากลำต้น สามารถงอกได้ดีสูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวางบนผิวดินในสภาพเรือนทดลอง

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-03-12-57

คำนำ

ผักเบี้ยเล็ก เป็นพืชวงศ์ Portulacaceae ที่อยู่ในสกุล Portulaca ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Portulaca quadrifida* L .มีชื่อภาษาไทยว่า ผักเบี้ยเล็ก ผักเบี้ยหนู และบานเที่ยง (เต็ม, 2001) เป็นพืชฤดูเดียว มีความสามารถในการแข่งขัน การเจริญเติบโตได้เร็ว ขยายพันธุ์ได้ดีทั้งส่วนของลำต้นและเมล็ด และสามารถเจริญเติบโตในสภาพแล้งได้ ไม่ทราบแน่ชัดว่ามีการแพร่ระบาดเข้ามาในแปลงปลูกผัก และปลูกพืชไร่เมื่อใด แต่สามารถขึ้นแข่งขันกับพืชประทานตั้งแต่เริ่มงอกจนถึงระยะเก็บเกี่ยว และสร้างความเสียหายให้กับพืชประทาน ทำให้ผลผลิตที่ได้มีปริมาณและคุณภาพลดลง ได้ราคาต่ำ และยังต้องเสียค่าใช้จ่ายในการป้องกันกำจัดวัชพืช เกษตรกรบางรายใช้สารกำจัดวัชพืชบางชนิด ไม่สามารถป้องกันกำจัดวัชพืชชนิดนี้ได้ หรือใช้วิธีกล หรือการไถ ยังไม่สามารถกำจัดวัชพืชชนิดนี้ได้เช่นกัน กลับทำให้มีการเพิ่มปริมาณมากขึ้น ตามปกติการจัดการวัชพืชให้มีประสิทธิภาพหรือประสบความสำเร็วนั้นจำเป็นต้องรู้จักข้อมูลทางด้านชีววิทยาของวัชพืชชนิดนั้น เช่น การงอก การเจริญเติบโต และการแพร่กระจายพันธุ์ เป็นต้น เพื่อนำไปสู่วิธีการป้องกันกำจัด แต่ข้อมูลดังกล่าวมีรายงานน้อยมาก หรือยังไม่มีการศึกษาเลย จึงควรทำการวิจัย เพื่อศึกษาข้อมูลทางด้านชีววิทยา ผลการวิจัยจะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนในการจัดการผักเบี้ยเล็กได้อย่างถูกวิธีและมีประสิทธิภาพ และเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ต่องานวิจัยด้านวิทยาการวัชพืช และงานด้านอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- อุปกรณ์ในการสำรวจ ได้แก่ เครื่องวัดพิกัดภูมิศาสตร์ แผนที่ กรรไกร ถุงพลาสติก กระดาษป้ายชื่อ และกล้องถ่ายภาพ

- อุปกรณ์ในการศึกษาข้อมูลทางด้านชีววิทยา ได้แก่ จานเพาะเมล็ด กระถาง ป้ายปักหน่วยการทดลองพลาสติก ตู้เพาะเมล็ดควบคุมแสง

วิธีการ

1) การสำรวจเพื่อศึกษาการแพร่กระจาย สำรวจการแพร่กระจายของผักเบี้ยเล็กในจังหวัดต่างๆในพื้นที่ปลูกผัก และพืชไร่ ในเขตภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง โดยกำหนดพื้นที่ในการสำรวจในพื้นที่ที่มีการปลูกผัก และพืชไร่ เป็นหลักของพื้นที่ดังกล่าว ใช้วิธีการสำรวจแบบสืบพบ (detection survey) โดยมีผักเบี้ยเล็กเป็นพืชเป้าหมาย บันทึกสถานที่ พิกัด สภาพนิเวศน์ พืชปลูก บริเวณที่พบผักเบี้ยเล็ก นำค่าพิกัดที่พบผักเบี้ยเล็กมาจัดทำแผนที่การระบาด

2) ศึกษาการงอกจากเมล็ด ในห้องปฏิบัติการ เก็บเมล็ดผักเบี้ยเล็ก คัดแยกเมล็ดที่แก่และสมบรูณ์ ศึกษาการงอก วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

- สภาพเมล็ดได้รับแสงตลอด 24 ชั่วโมง
- สภาพเมล็ดได้รับความมืดตลอด 24 ชั่วโมง

- สภาพเมล็ดได้รับแสงสลับกลางวัน/กลางคืน 12 ชั่วโมง
- สภาพห้องปฏิบัติการ (อุณหภูมิและแสงตามธรรมชาติ)

-วิธีการปฏิบัติการทดลอง

รวบรวมเมล็ดผักเบี้ยเล็กจากแปลงเกษตรกรหรือที่พบตามธรรมชาติ เลือกเมล็ดที่สมบูรณ์และแก่ เพาะในจานแก้วที่ใส่กระดาษกรอง 1 แผ่น ใส่เมล็ด 100 เมล็ด ใส่น้ำกลั่นจานละ 5 มิลลิลิตร นำไปวางในสภาพที่กำหนด 4 สภาพ คือ ได้รับแสงตลอด 24 ชั่วโมง สภาพมืดตลอด 24 ชั่วโมง สภาพได้รับแสงสลับกลางวัน/กลางคืน และสภาพห้องปฏิบัติการ สภาพละ 5 ซ้ำ บันทึกจำนวนเมล็ดงอกหลังเริ่มทดลองทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน

3) ศึกษาการงอกจากเมล็ด และส่วนของลำต้น ในสภาพเรือนทดลอง ที่ระดับความลึกต่างๆ กัน

3.1) **การงอกจากเมล็ด**

- วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

1. วางเมล็ดบนผิวดิน
2. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 2 เซนติเมตร
3. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 4 เซนติเมตร
4. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 6 เซนติเมตร
5. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 8 เซนติเมตร
6. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 10 เซนติเมตร

- วิธีการปฏิบัติการทดลอง

บรรจุดินใส่กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สูง 18 เซนติเมตร ให้ผิวดินห่างจากขอบบนของกระถาง 4, 6, 8, 10 และ 12 เซนติเมตร นำเมล็ดที่แก่และมีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด โรยลงให้ทั่วกระถาง แล้วเติมดินจนถึงระดับห่างจากขอบบนกระถาง 2 เซนติเมตร แต่ละระดับจำนวน 5 กระถาง (ซ้ำ) รดน้ำทุกวัน บันทึกจำนวนต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน

3.2) **การขยายพันธุ์ด้วยลำต้น**

- วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 5 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

1. วางลำต้นบนผิวดิน
2. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 2 เซนติเมตร
3. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 4 เซนติเมตร
4. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 6 เซนติเมตร
5. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 8 เซนติเมตร
6. ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 10 เซนติเมตร

-วิธีการปฏิบัติการทดลอง

บรรจุดินใส่กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สูง 18 เซนติเมตร ให้ผิวดินห่างจากขอบบนของกระถาง 4, 6, 8, 10 และ 12 เซนติเมตร นำลำต้นของผักเบี้ยเล็กจากโคน และปลายยอด ตัดเป็นท่อนๆ ให้มีความยาว 2 เซนติเมตร ส่วนละ 20 ท่อนต่อกระถาง วางลงให้ทั่วกระถาง แล้วเติมดินจนถึงระดับห่างจากขอบบนกระถาง 2 เซนติเมตร แต่ละระดับจำนวน 5 กระถาง (ซ้ำ) รดน้ำทุกวัน บันทึกจำนวนต้นอ่อนที่งอกจากลำต้นทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน

เวลาและสถานที่

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืชในปี 2557

ผลและวิจารณ์การทดลอง

การแพร่กระจาย ผักเบี้ยเล็ก (*Portulaca quadrifida* L.)

สำรวจผักเบี้ยเล็กในพืชที่ปลูกผัก และพืชไร่ ในเขตภาคเหนือ พื้นที่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน ลำพูน ตาก แพร่ นาน ลำปาง อุตรดิตถ์ และพะเยา ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พื้นที่จังหวัดนครราชสีมา หนองคาย ศรีสะเกษ อุบลราชธานี มุกดาหาร นครพนม อำนาจเจริญ เลย ชัยภูมิ มหาสรคาม กาฬสินธุ์ ร้อยเอ็ด สกลนคร อุดรธานี และยโสธร และภาคกลาง พื้นที่ จังหวัด สระบุรี ลพบุรี ราชบุรี นครปฐม กาญจนบุรี สมุทรสงคราม และสมุทรสาคร ทำการสำรวจในแปลงปลูกผักคะน้า หอมแบ่ง หอมใหญ่ กวางตุ้ง หัวใช้เท้า ผักบุ้ง แมงลัก สาระแหน่ มะเขือ ถั่วฝักยาว ผักกาดขาว ผักกุยช่าย กระเพรา มะนาว และ แตง ในเขตภาคเหนือ พบในพื้นที่จังหวัด ลำพูน ส่วนพื้นที่ปลูกพืชไร่ ได้แก่ ข้าวโพด มันสำปะหลัง และอ้อย จากการสำรวจพื้นที่ในภาคเหนือ จำนวน 50 แปลง พบเฉพาะในพื้นที่ปลูกผักในจังหวัดลำพูน 9 แปลง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 50 แปลง พบเฉพาะในพื้นที่ปลูกผัก 11 แปลง มีการกระจายตัวในพื้นที่ จังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ มหาสารคาม และร้อยเอ็ด ส่วนในภาคกลาง จำนวน 50 แปลง พบทั้งในแปลงผักและพืชไร่ จำนวน 28 แปลง กระจายตัวในพื้นที่ จังหวัดลพบุรี สมุทรสาคร ราชบุรี กาญจนบุรี นครปฐม และ เพชรบุรี โดยส่วนใหญ่พื้นที่ภาคกลางเป็นพื้นที่อยู่ในเขตชลประทานทำให้สามารถทำการเกษตรได้ทั้งปี และมีการปลูกพืชหมุนเวียนในพื้นที่เดียวกันมีทั้งปลูกพืชผักและพืชไร่ ทำให้มีการสำรวจพบวัชพืชผักเบี้ยเล็กทั้งในพืชผัก และพื้นที่ปลูกพืชไร่ (Table 1)

ศึกษาการงอกจากเมล็ด ในห้องปฏิบัติของผักเบี้ยเล็ก (*Portulaca quadrifida* L.)

ศึกษาการงอกของเมล็ดในสภาพที่ได้รับแสงแตกต่างกัน ได้แก่ ในสภาพที่รับแสงตลอด 24 ชั่วโมง สภาพมืดตลอด 24 ชั่วโมง สภาพได้รับแสงสลับกลางวัน/กลางคืน 12 ชั่วโมง และสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าเมล็ดสามารถงอกได้ดีในสภาพที่ได้รับแสงตลอด 24 ชั่วโมง สภาพที่ได้รับแสงสลับกลางวัน/กลางคืน 12 ชั่วโมง และสภาพห้องปฏิบัติการ ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ มีเปอร์เซ็นต์การงอกของผักเบี้ยเล็ก 7.5 8.2 และ 6.8 ตามลำดับ แต่ในสภาพที่มืดตลอด 24 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์

ความงอกของเมล็ดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีอื่นๆ โดยให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด 0.2 (Table 2)

ศึกษาการงอกจากเมล็ด และส่วนของลำต้น ในสภาพเรือนทดลอง

ศึกษาการงอกของเมล็ด และส่วนของลำต้น ที่ระดับความลึก 2, 4, 6, 8, และ 10 เซนติเมตร พบว่าเมล็ดสามารถงอกได้ที่ระดับผิวดิน และที่ระดับความลึก 2 เซนติเมตร 4.2 และ 12.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยจะเริ่มทยอยงอกที่ระยะ 3-7 วันหลังปลูก(Table 3) ส่วนการงอกจากลำต้น พบว่า ลำต้นของผักเบี้ยเล็กสามารถงอกและเจริญเป็นลำต้นใหม่ได้ที่ระดับผิวดิน และระดับความลึก 2 เซนติเมตร อัตราการงอกเป็นต้นใหม่จากลำต้นเท่ากับ 70 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่ระดับความลึกที่ระยะ 4, 6, 8 และ 10 เซนติเมตร ไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ได้(Table 4) จะเห็นได้ว่าการงอกจากเมล็ด และส่วนของลำต้นของผักเบี้ยเล็ก สามารถงอกได้ที่ระดับผิวดิน และที่ระดับความลึก 2 เซนติเมตร ได้เหมือนกันแต่อัตราการงอกจากเมล็ดต่ำกว่าจากการงอกในส่วนของลำต้น

สรุปผลการทดลอง

การแพร่กระจายของผักเบี้ยเล็ก (***Portulaca quadrifida*** **L.)** ในเขตภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบการกระจายตัวของผักเบี้ยเล็ก ในพืชที่ปลูกผักเป็นส่วนใหญ่ ส่วนในพื้นที่ภาคกลางพบผักเบี้ยเล็กทั้งในพื้นที่ปลูกผักและพืชไร่ และพบการแพร่กระจายผักเบี้ยเล็กสูงกว่าภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนการศึกษาข้อมูลทางด้านชีววิทยา เมล็ดสามารถงอกได้ดีในสภาพที่ได้รับแสง และในส่วนของลำต้นมีอัตราการงอกเจริญเป็นต้นใหม่ได้ดีกว่าการงอกจากเมล็ด

เอกสารอ้างอิง

เต็ม สมิตินันทน์. 2001. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. 810 หน้า.

Syed, K.M.; A.MD. Liyakha and S. Paramjyothi. 2010. Neuropharmacological Effects of Ethanolic Extract of *Portulaca quadrifida* Linn. In Mice.International Journal of PharmTech Research. 2:1386-1390

Anonymous a. 2012. Chicken Weed. [Online]. Available. http:www.flowersofindia.net. (April 7, 2012

Anonymous b.2012. *Portulaca quadrifida*L. [Online]. Available. http:www.database.prota.org. (April 7, 2012)

ภาคผนวก

Table 1 The survey areas were found Purslane (*Portulaca quadrifida* L.)

Areas	Crops
Northern region	
- Wiang Nong Long,	onion, garland
King Amphoe Wiang Nong Long, Lamphun	chrysanthemum
- Lao Yao, Ban Hong Amphoe, Lamphun	kale
- Ban Hong, Ban Hong Amphoe, Lamphun	pakchoi
- Muang Noi, Pa Sang Amphoe, Lamphun	kale, pakchoi
- Umong, Muang Amphoe, Lamphun	sweet basil
Northeastern region	
- Wang Nam Khiao, Wang Nam Khieo Amphoe, Nakhon Ratchasima	lettuce
- Lum Lamchi, Ban Khwao Amphoe, Chaiyaphum,	shallot, packchoi, kwangtung hairy basil, sacred basil, kale, kitchen mint, morning glory,
- Khwao Rai, Kosum Phisai Amphoe, Maha Sarakham	chilli
- Nong Phai, Thawat Buri Amphoe, Roi Et	chilli, brenjal
Central region	
- Hua Lam, Tha Luang Amphoe, Lop Buri	cassava, corn, sugarcane
- Sab Takhian, Chai Badan Amphoe, Lop Buri	cassava
- Khoktum, Muang Lopburi, Lop Buri	yard long bean
- Lak Song, Ban Paeo Amphoe, Samut Sakhon	lemon, garlic chive
- Ban Paeo, Ban Paeo Amphoe, Samut Sakhon	lemon
- Don Yai, Bang Phae Amphoe, Ratchaburi	kale
- Tha Muang, Tha Muang Amphoe, Kanchanaburi,	brussel, sacred basil, onion, multiplier onion, chilli , yard long bean, cucumber,
- Map Pla Khao, Tha Yang Amphoe, Phetchaburi	yard long bean, cucumber, chilli, brenjal
- Thung Thong, Tha Muang Amphoe, Kanchanaburi	garlic chive
- Nong Ri, Bo Phoi Amphoe, Kanchanaburi	chilli
- Rang Pikun, Kam Paeng Saen Amphoe, Nakhon Pathom	sacred basil, cucumber
- Thung Khwang, Kam Paeng Saen Amphoe, Nakhon Pathom	sacred basil, cucumber

Table 2 Percentage germination of Purslane seeds under various conditions.

Conditions	Percentage germination
Light 24 hours	7.5[1/] a
Dark 24 hours	0.2 b
Light / Dark	8.2 a
Control	6.8 a
cv	12.36

1/ Means followed by a same letter are not significantly difference at the 5% level by DMRT

Table 3 Percentage germination of Purslane buried seeds in various soil depths.

soil depths (cm)	Percentage germination
0	4.2[1/] b
2	12.7 a
4	0 c
6	0 c
8	0 c
10	0 c
cv	22.37

1/ Means followed by a same letter are not significantly difference at the 5% level by DMRT

Table 4. Percentage germination of Purslane buried branches in various soil depths.

soil depths (cm)	Percentage germination
0	70[1/] a
2	30 b
4	0 c
6	0 c
8	0 c
10	0 c
CV	20.12

1/ Means followed by a same letter are not significantly difference at the 5% level by DMRT

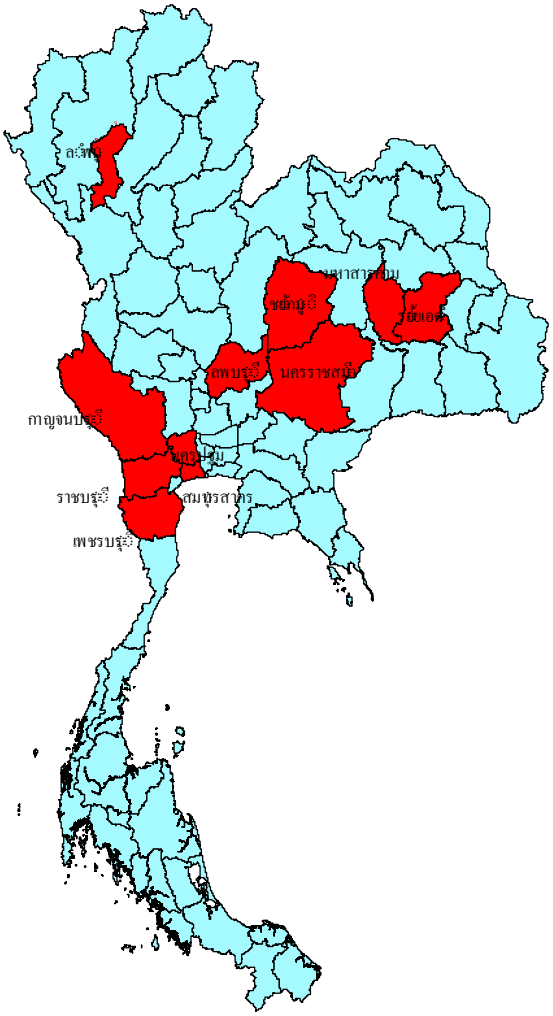


Figure 1 Distribution map of Purslane in Thailand

สัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชวงศ์หญ้า Poaceae

Seed Morphology of some Grass Weed

ศิริพร ซึงสนธิพร[1/] ธัญชนก จงรักไทย[1/] อัณศยา สุริยะวงศ์ตระการ[1/]
ปิยนันท์ พวงจันทร์[2/] กาญจนา พฤษพันธ์[3/]
[1/]กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช [3/]สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช

รายงานความก้าวหน้า

การสำรวจและรวบรวมตัวอย่างพืช เพื่อศึกษาลักษณะเมล็ดของวัชพืชวงศ์หญ้า สำหรับใช้เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบเพื่อพิสูจน์ทราบชนิดพืชจากเมล็ด ในระหว่างปีงบประมาณ 2557 รวบรวม ตรวจสอบชนิด และศึกษาลักษณะเมล็ดได้แล้ว จำนวน 14 ชนิด 105 ตัวอย่าง และอีก 10 ชนิดอยู่ระหว่างการศึกษารายละเอียดเพิ่มเติม

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-03-13-57

คำนำ

เมล็ดวัชพืช เป็นส่วนขยายพันธุ์ที่มีสามารถถูกเคลื่อนย้ายโดยกิจกรรมของมนุษย์ จะโดยความตั้งใจหรือไม่ก็ตาม จะทำให้วัชพืชนั้นสามารถเจริญเติบโตในที่ใหม่และอาจกลายเป็นวัชพืชร้ายแรง ทำให้เกิดความเสียหายต่อความหลากหลายทางชีวภาพและเศรษฐกิจได้ การปนเปื้อนของเมล็ดวัชพืชในสินค้าเกษตรในการค้าระหว่างประเทศ ทำให้เกิดความเสียหายอย่างมาก การแก้ไข หรือตอบโต้จำเป็นต้องมีการพิสูจน์ ตรวจวิเคราะห์ชนิดจำเป็นต้องใช้ตัวอย่างเมล็ดในการยืนยัน การตอบโต้มาตรการการกีดกันทางการค้าโดยด้วยมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช

พืชวงศ์หญ้า Poaceae เป็นวงศ์ที่มีสมาชิกจำนวนมาก ประมาณ 10,000 ชนิด กระจายอยู่ใน 668 สกุล ซึ่งมีทั้งที่เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญ เช่น ข้าว อ้อย ข้าวสาลี พืชอาหารสัตว์ เช่น หญ้าเพ็ก (*Arundinaria pusilla* A. Chev. & A. Camus) หญ้ากินนี (*Panicum maximum*) หญ้าขจรจบชนิดต่างๆ หญ้าแพงโกล่า (*Digitaria decumbens*) ซึ่งมีทั้งที่เป็นพืชพื้นเมืองและชักนำมาจากต่างประเทศและหลายชนิดได้กลายเป็นวัชพืชต่อมา เมล็ดมีขนาดและรูปร่างแตกต่างกัน จำเป็นต้องมีการศึกษาและรวบรวมไว้ เพื่อประโยชน์ในการตรวจสอบชนิดต่อไป

พืชวงศ์หญ้า Poaceae หรือ Gramineae เป็นวงศ์ที่มีสมาชิกเป็นไม้ล้มลุก อายุหลายปี หรือปีเดียว เหง้าหรือไหลทอดเลื้อยแนวนอน หรือตั้งตรง ลำต้นกลวง มีข้อ ปล้องชัดเจน ด้านในปล้องกลวง ใบเรียงสลับ แผ่นใบมักเป็นรูปแถบเรียวยาว โคนใบแผ่ออกเป็นกาบ มีลิ้นใบ ดอก ออกเป็นช่อแบบแยกแขนง ชื่อดอกแบบช่อกระจะ หรือช่อเชิงลด ดอกสมบูรณ์เพศ หรือแยกเพศ เป็นแบบดอกแยกเพศร่วมต้น หรือดอกแยกเพศแยกต้น ไม่มีวงกลีบดอก ช่อดอกย่อยมีใบประดับที่โคนช่อ 2 ใบ แต่ละดอกมีใบประดับสองแผ่น เรียกว่า กาบบนและกาบล่าง เกสรเพศผู้มักมี 3 อัน รังไข่มี 1 อัน ยอดเกสรเพศเมียแยกเป็นสองแฉก มีขนยาวนุ่ม ผลแห้งเมล็ดเดียว (achence) มีเปลือกหุ้มเมล็ด ทั่วโลกมีประมาณ 675 สกุล 10,000 ชนิด ประเทศไทยมี 100 สกุล 600 ชนิด หญ้าหลายชนิดเป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ เป็นแหล่งอาหาร หรือพืชอาหารสัตว์ เช่น ข้าว *Oryza sativa* L. เป็นพืชอาหารที่สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศ ข้าวโพด *Zea mays* L. ผักกินเป็นอาหาร ใบและลำต้นนำมาทำวัสดุใช้สอย อ้อ *Arundo donax* L. แขม *Saccharum arundinaceum* Retz. เป็นต้น (ก่องกานดา, 2551)

Holm *et al.* (1977) ได้สรุปจากแบบสอบถามเกี่ยวกับวัชพืชร้ายแรงจากประเทศต่างๆ ว่าวัชพืชที่ร้ายแรงที่สุดของโลก (World Worst Weed) กลุ่มที่ 1 จำนวน 18 ชนิด เป็นวัชพืชในวงศ์ Poaceae ถึง 11 ชนิด ได้แก่ หญ้าแพรก *Cynodon dactylon* (L.) Pers. หญ้าข้าวนก *Echinochloa crus-galli*(L.) Beauv. หญ้านกสีชมภู *Echinochloa colonum* (L.) Link. หญ้าตีนกา *Eleusine indica* (L.) Gaertn. หญ้าพง *Sorghum halepense* (L.) Pers. หญ้าคา *Imperata cylindrica* (L.) Beauv. หญ้าตีนนก *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. ข้าวโอ๊ตป่า *Avena fatua* L. หญ้าเห็บหรือหญ้านมหนอน *Paspalum conjugatum* Berg. และหญ้าโขย่ง *Rottboellia exaltata* L.f.

ชาญชัย (2520) รายงานว่า มีหญ้าพื้นเมืองมากกว่า 50 ชนิด ขึ้นกระจัดกระจายทั่วไป แต่มีความสำคัญในด้านอาหารสัตว์อยู่ประมาณ 30 ชนิด ซึ่งสามารถขึ้นเองโดยธรรมชาติ บางชนิดขึ้นเป็นกลุ่มก้อน เป็นทุ่งใหญ่ เช่น หญ้าคา หญ้าเพ็ก หญ้าปากควาย หญ้าพื้นเมืองเหล่านี้สามารปรับตัวได้ดี แต่มีข้อจำกัดในด้านศักยภาพการให้ผลผลิต และระยะที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นอาหารสัตว์ค่อนข้างสั้น เพราะมีการออกดอก และสะสมเยื่อใยเร็ว ขณะเดียวกันก็มีการชักนำหญ้าจากต่างประเทศ เพื่อปลูกเป็นแปลงหญ้าเลี้ยงสัตว์ เช่น หญ้ากินนี *Panicum maximum* หญ้ามาการิการิ *Panicum coloratum* หญ้ารูซี่ *Brachiaria ruziziensis* เป็นต้น

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1) กล้องถ่ายรูปแบบดิจิตอล
2) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
3) เลนส์ขยาย 10 เท่า สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นในภาคสนาม
4) กรรไกร มีด เสียม หรือพั่ว สำหรับตัด/ขุด ตัวอย่างพืช
5) เครื่องวัดพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)
6) แผงอัดตัวอย่างพรรณไม้พร้อมกระดาษฟูก ฟองน้ำและหนังสือพิมพ์ พร้อมเชือกไส้ตะเกียงและป้ายชื่อสำหรับผูกตัวอย่างพืช
7) กระดาษติดตัวอย่างพืช
8) กล่องใส่เมล็ดพืช
9) ขวดแก้ว และน้ำยาสำหรับดองตัวอย่างพืช (หากจำเป็น)
10) น้ำยาชุบตัวอย่างวัชพืช ประกอบด้วย ฟีนอล เมอคิวริคคลอไรด์
11) การบูร
12) อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น เช่น ถุงพลาสติกขนาดต่างๆ กระถางขนาดต่างๆ พร้อมดิน และป้ายปัก สำหรับปลูกพืชตัวอย่างเพื่อเก็บเมล็ด และศึกษารายละเอียดของพืชเพิ่มเติม
13) สมุดบันทึก

วิธีการ

การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

- กำหนดพื้นที่สำรวจ วางแผนการสำรวจเก็บตัวอย่าง แบบการสืบพบ (detection survey) โดยมีวัชพืชในวงศ์หญ้า Poaceae เป็นพืชเป้าหมาย ในพื้นที่การเกษตรและพื้นที่ที่ไม่ได้ทำการเกษตร เช่น ในเขตเมือง พื้นที่รอบแปลงเพาะปลูกพืช หรือพื้นที่ว่างเปล่า ไม่รวมพื้นที่อุทยานแห่งชาติ หรือพื้นที่ป่า

- เก็บตัวอย่างพืชทุกชนิดที่มีลักษณะเด่นของพืชวงศ์หญ้า เช่น ลำต้นตรง มีข้อ ปล้องชัดเจน แผ่นใบเป็นแถบยาว นำมาปลูกที่กลุ่มวิจัยวัชพืช เพื่อตรวจสอบชนิด รวบรวมเมล็ด และอีกส่วนนำมาจัดทำตัวอย่างแห้ง

2) **การตรวจสอบชนิดพืช** นำตัวอย่างพืชที่สำรวจพบ ไปเทียบกับตัวอย่างพืชในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช พิพิธภัณฑ์พืชของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ ของแต่ละวงศ์หรือสกุลของพืชนั้น ๆ ตลอดจนการตรวจสอบกับเอกสาร คู่มือต่างๆ เช่น Flora of China, Flora of Pakistan เป็นต้น

3) **การศึกษาลักษณะเมล็ด** รวบรวมเมล็ดที่แก่จัดจากพื้นที่ หรือต้นที่นำมาปลูก ณ เรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช ศึกษา ขนาด รูปร่าง สี และลักษณะผิวเมล็ด ด้วยแว่นขยาย หรือกล้องกำลังขยายต่ำ ของแต่ละชนิด บันทึกภาพลักษณะเมล็ด นำมาเปรียบเทียบลักษณะของแต่ละชนิด เพื่อการจัดทำคู่มือ สำหรับการจำแนกต่อไป

4) **การเก็บตัวอย่างเมล็ดวัชพืช**เพื่อการสืบค้น เก็บผลที่แก่เต็มที่ เลือกเมล็ดที่ไม่ถูกแมลงทำลาย และไม่เป็นโรค ทำความสะอาดเมล็ด ไม่มีส่วนอื่นปะปน ผึ่งแดดให้แห้ง เพื่อลดความชื้นในเมล็ด นำใส่กล่องพลาสติกใส ปิดให้สนิท เพื่อกันแมลงเข้าทำลาย ปิดป้ายระบุชนิด วงศ์ วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ผู้เก็บ ให้เรียบร้อย เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5) **การจัดทำตัวอย่างแห้ง** เก็บวัชพืชที่มีใบและดอกสมบูรณ์ ไม่ถูกแมลงทำลาย หากพืชมีขนาดเล็ก ควรมีราก ต้น ใบ –ดอก ครบ หากไม่พบดอก ควรมีส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ หรือลักษณะอื่นที่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดได้ อัดในแผงอัดพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 x30 เซนติเมตร อย่างน้อยชนิดละ 2 ตัวอย่าง เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่ – นิเวศน์ พืชอาศัย วัน-เวลา ชื่อผู้เก็บ เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

6) **การบันทึกข้อมูล** การสำรวจในภาคสนาม เมื่อเก็บตัวอย่างพืชต้องบันทึก

(1) ข้อมูลภาคสนาม : สถานที่หรือพิกัด สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูก ชนิดลักษณะวัชพืช วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ และข้อมูลอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบชนิด

(2) ข้อมูลในห้องปฏิบัติการ บันทึกขนาด รูปร่าง สีผิว ลักษณะผิว หรืออื่นๆ ที่จำเป็นสำหรับการระบุชนิด

ผลการดำเนินการ

สำรวจ รวบรวมวัชพืชวงศ์หญ้า ในพื้นที่จังหวัดนนทบุรี สุพรรณบุรี อยุธยา นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี สระบุรี ลพบุรี เพชรบูรณ์ ชัยภูมิ หนองคาย ขอนแก่น อุดรธานี ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ รวบรวมตัวอย่างพืช เมล็ด ศึกษาลักษณะได้แล้ว 14 ชนิด และได้ตัวอย่างแห้งทั้งสิ้น 105 ตัวอย่าง ได้แก่

1 *Acrachne racemosa* (Heyne ex Roth) Ohwi **หญ้าตีนกา** หญ้ายอนหู หญ้าตีนมือตุ๊ดตู่ หญ้าตีนมือกัก เมื่อมีเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นนอกรูปร่างยาว-รี สีน้ำตาล-เหลือง ผิวเรียบ ได้ตัวอย่างจำนวน 7 ตัวอย่าง

2. *Brachiaria mutica* (Forssk.) Stapf หญ้าขน เปลือกหุ้มเมล็ดชั้นนอกแข็ง สีน้ำตาลอ่อน สีน้ำตาล ได้ตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่าง

3 *Brachiaria reptans* (L.) C.A.Gardner & C.E.Hubb. หญ้าต้นติด หญ้าผักไก หญ้าตีนติด เปลือกหุ้มเมล็ดชั้นนอกแข็ง สีน้ำตาลอ่อน สีน้ำตาล รูปร่างกลม ผิวเรียบ ได้ตัวอย่างจำนวน 7 ตัวอย่าง

4 *Cenchrus echinatus* L. **หญ้าสอนกระจับ** หญ้าขี้ครอก เปลือกหุ้มเมล็ดชั้นนอกมีสีน้ำตาล-ดำ มีหนามแข็งทำให้ติดไปกับเสื้อผ้าได้ง่าย เปลือกแข็ง ได้ตัวอย่างจำนวน 7 ตัวอย่าง

5 *Cenchrus brownii* Roem. & Schult. **หญ้าบุ้ง** เปลือกหุ้มเมล็ดชั้นนอกมีสีน้ำตาล-ดำ มีหนามแข็งทำให้ติดไปกับเสื้อผ้าได้ง่าย เปลือกแข็ง ได้ตัวอย่างจำนวน 7 ตัวอย่าง

6 *Chloris barbata* Sw. **หญ้ารังนก** รูปร่างคล้ายสี่เหลี่ยม ฐานเล็ก ปลายบาน มีหาง 2 -3 เส้นที่ปลาย สีน้ำตาล-ดำ ได้ตัวอย่างจำนวน 7 ตัวอย่าง

7 *Dactyloctenium aegyptium* (L.) P.Beauv. **หญ้าปากควาย** หญ้าปากกล้วย รูปร่างกลม สีน้ำตาล-แดง ขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร ได้ตัวอย่างจำนวน 7 ตัวอย่าง

8 *Echinochloa colona* (L.) Link **หญ้าข้าวนก** หญ้ากับแก หญ้านกเขา หญ้าปล้องนก หญ้าปล้อง รูปร่างกลม ปลายแหลม มักมีหาง 1 เส้นติดที่ปลาย ขนาดความยาวไม่เท่ากัน เปลือกชั้นนอกแข็ง สีน้ำตาล-เหลือง ได้ตัวอย่างจำนวน 7 ตัวอย่าง

9 *Echinochloa crus-galli* (L.) P.Beauv. **หญ้าปล้องละมาน** หญ้าข้าวนก หญ้าข้าวนกสีชมพู หญ้าลิเก รูปร่างกลม ปลายแหลม มักมีหาง 1 เส้นติดที่ปลาย ขนาดความยาวไม่เท่ากัน เปลือกชั้นนอกแข็ง สีน้ำตาล-เหลือง ได้ตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่าง

10.*Echinochloa stagnina* (Retz.) P.Beauv. หญ้าปล้องใหญ่ หญ้าปล้อง หญ้าข้าวนกใหญ่ รูปร่างกลม ปลายแหลม มีหาง 1 เส้นติดที่ปลาย ขนาดความยาวไม่เท่ากัน เปลือกชั้นนอกแข็ง สีน้ำตาล-เหลือง ได้ตัวอย่างจำนวน 5 ตัวอย่าง

11 *Heteropogon contortus* (L.) Roem. & Schult. **หญ้าหนวดฤาษี** หญ้าพุ่งชู้ หญ้าลูกหนอง หญ้ารังตั๊กแตน หญ้าเหล็ม เมล็ดพร้อมเปลือกชั้นนอก สีน้ำตาล-ดำ รูปร่างยาว ปลายแหลม มีขนยาวที่ปลายเหมือนมีหางที่ ได้ตัวอย่างจำนวน 7 ตัวอย่าง

12 *Imperata cylindrica* (L.) P.Beauv. **หญ้าคา** เก้อฮี ลาลาง ลาแล เมล็ดสีน้ำตาล ขนาดเล็ก มีความยาวมากว่าความกว้าง มีขนอ่อนนุ่มติดที่ปลาย ทำให้ปลิวไปตามลมได้ดี ได้ตัวอย่างจำนวน 7 ตัวอย่าง

13. *Chinonachne semiteres* (Benth) Henr. หญ้าก้านกรวย เมล็ดพร้อมเลือกหุ้มเมื่อแก่ สีน้ำตาล-เหลือง ฐานมนโค้ง เป็นปล้องตรงกลาง ปลายเป็นแผ่นที่หุ้มกับเมล็ดด้านบน ได้ตัวอย่างจำนวน 7 ตัวอย่าง

14. *Dinebra retroflexa* (Vahl) Panz - อยู่ระหว่างการรวบรวมเมล็ด ได้ตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่าง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

วัชพืชวงศ์หญ้าในสกุลเดียวกัน เช่น *Cenchus Echinochloa* มักมีลักษณะเมล็ดคล้ายคลึงกันมาก ต้องศึกษาหาลักษณะแตกต่างเพิ่มเติม เพื่อเป็นจดสังเกตในการเพื่อตัดสินชนิด ดังนั้นการศึกษาเพื่อพิสูจน์ทราบชนิดจากองค์ประกอบอื่น ได้แก่ ทรงต้น ลักษณะใบ ช่อดอก แล้วจึงศึกษาลักษณะเมล็ดอย่างละเอียด ซึ่งจะทำให้เกิดความถูกต้องมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

ก่องกานดา ชยามฤต. 2551. ลักษณะประจำวงศ์พรรณไม้ 3. สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช, กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. 90 หน้า

ชาญชัย มณีดุล. 2520. คุณค่าทางอาหารของหญ้าขจรจบ. สาสน์ไก่. 25(1) หน้า 17-27. อ้างโดย สายัณห์ ทัดศรี. (2540) *ใน* พืชอาหารสัตว์เขตร้อน การผลิตและการจัดการ. โรงพิมพ์ลินคอร์น กรุงเทพฯ 375 หน้า.

Holm, L., D.L. Plucknett, J.V. Pancho, and J.P. Herberger. 1979. The World's Worst Weeds Distribution and Biology. Univ. Hawaii Press, Honolulu. p291-294.

ชีววิทยา นิเวศวิทยา และการแพร่กระจายของวัชพืชสกุล *Boerhavia* L.

Biology, Ecology and Distribution of *Boerhavia* L.

ปิยนันท์ พวงจันทร์[1/] ศิริพร ซึงสนธิพร[2/] อัณศยา สุริยะวงศ์ตระการ[2/] ธัญชนก จงรักไทย[2/]

[1/]กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สำรวจ รวบรวมวัชพืชสกุลผักโขมหิน จากจังหวัดนนทบุรี สุพรรณบุรี อยุธยา นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี สระบุรี ลพบุรี เพชรบูรณ์ ชัยภูมิ หนองคาย ขอนแก่น อุดรธานี นครพนม ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ ชุมพร สุราษฎร์ธานี ประจวบคีรีขันธ์ พบวัชพืชสกุลนี้ 4 ชนิด รวบรวมเมล็ดเพื่อศึกษาการงอกในห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง และศึกษาการเจริญเติบโตในสภาพเรือนทดลอง โดยเลือกเฉพาะเมล็ดดีที่ไม่ถูกแมลงทำลาย ปรากฏว่าพืชทั้งสี่ชนิด ไม่งอกในห้องปฏิบัติการ แต่สามารถงอกได้ในสภาพเรือนทดลอง โดย *B. erecta* L. มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-03-14-57

คำนำ

ผักโขมหิน (*Boerhavia* sp.) เป็นวัชพืชที่พบเป็นปัญหาทั้งในพืชผักและพืชไร่ ที่รู้จักกันทั่วไปมีเพียงสองชนิด คือ *Boerhavia diffusa* L. และ *Boerhavia erecta* L. แต่ในปัจจุบัน พบวัชพืชในสกุลนี้ถึง 4 ชนิด ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน ซึ่งยังไม่สามารถระบุชนิดได้ และมีแนวโน้มการแพร่ระบาดมากขึ้น จึงมีความจำเป็นต้องศึกษา ชีววิทยา นิเวศวิทยา และการแพร่กระจายของวัชพืชสกุลนี้ เพื่อให้เกิดความชัดเจน ทราบความหลากหลาย และสามารถระบุชนิดของวัชพืชในสกุลนี้ได้ถูกต้อง ตลอดจนทราบแนวทางในการจัดการวัชพืชในสกุลนี้ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง เป็นปัจจุบัน และสามารถใช้เป็นข้อมูลในการจัดการวัชพืชสกุลนี้

การคมนาคมที่สะดวก รวดเร็ว ทำให้มีการค้าขายระหว่างประเทศ และการเดินทางท่องเที่ยวเพิ่มมากขึ้น มีผลทำให้เกิดการชักนำสิ่งมีชีวิตต่างๆ ข้ามสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์ได้ในเวลาอันรวดเร็ว ทั้งโดยตั้งใจและไม่ตั้งใจ สิ่งมีชีวิตที่ถูกชักนำเข้ามาเหล่านี้หากสามารถปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ได้ดี ก็จะสามารถตั้งถิ่นฐาน ขยายพันธุ์และแพร่กระจายออกไป และหากสามารถแข่งขันชนะพืชท้องถิ่นหรือพืชที่มีอยู่เดิม ก็จะกลายเป็นพืชรุกรานในสิ่งแวดล้อม และเมื่อเข้ามาในพื้นที่การเกษตรก็คือวัชพืชหรือวัชพืชร้ายแรงนั่นเอง ตัวอย่างของพืชต่างถิ่นที่ถูกชักนำเข้ามาและกลายเป็นวัชพืช เช่น ผักตบชวา ขจรจบ ไมยราบยักษ์ หญ้ายาง (ศิริพร, 2549)

สกุล *Boerhavia* เป็นพืชในวงศ์ Nyctaginaceae ลักษณะพืชเป็นไม้ล้มลุก ทอดนอนตามพื้น ใบเรียงตรงข้าม ขนาดใบมักไม่เท่ากัน ดอกออกเป็นช่อกระจุกคล้ายซี่ร่มแยกแขนงห่างๆ ดอกสมบูรณ์เพศ วงกลีบรูประฆัง แยกเป็น 5 แฉก ปลายตัดหรือพับจีบ เกสรเพศผู้ 1-5 อัน อยู่ในวงกลีบหรือยื่นออกเพียงเล็กน้อย ก้านเกสรเชื่อมติดกันที่โคน รังไข่มีก้านติดเหนือวงกลีบ เบี้ยวเล็กน้อย ปลายเกสรเพศเป็นตุ่ม ผลคล้ายแบบผลแห้งเมล็ดล่อน (achene anthocarp) รูปกรวยกลับหรือคล้ายกระบอง เป็นสัน 5 สัน มักมีขนต่อมเหนียว เมล็ดเดียว สกุลผักขมหินมีสมาชิกจำนวนยังไม่แน่นอน อยู่ระหว่างประมาณ 20-40 ชนิด ทั่วโลก ส่วนใหญ่เป็นวัชพืช กระจายพันธุ์ทั่วไปในเขตร้อนและกึ่งร้อน คือ ผักขมหิน *Boerhavia erecta* L. และ ผักขมหิน *Boerhavia diffusa* L. และผักเมียก *Boerhavia repanda* Benth. (สำนักงานหอพรรณไม้, 2555)

Larsen (1991) รายงานว่าในประเทศไทยมีพืชในสกุลนี้ 3 ชนิดคือ *Boerhavia erecta* L., *Boerhavia diffusa* L. และ *Boerhavia chinensis* (L.) Asch. & Schweinf. ซึ่งชนิดสุดท้ายนี้ได้เปลี่ยนเป็น *Commicarpus chinensis* (L.) Heimerl และ *B. chinensis* เป็นชื่อพ้อง (Dequan and Gilbert, 2003)

ผักขมหิน หรือ ปังแป, ผักเบี้ยหิน (ภาคเหนือ); ผักขมฟ้า (สุโขทัย); ผักปั่งดิน (เชียงใหม่) *Boerhavia diffusa* L. เป็นพืชล้มลุก ลำต้นตั้งตรงหรือทอดเลื้อยไปตามพื้น สูง/ยาวได้กว่า 1 เมตร ใบรูปไข่แกมรูปขอบขนานหรือรูปใบหอก ปลายใบแหลมหรือมน โคนใบกลมหรือตัด ใบยาวได้ถึง 4 เซนติเมตร ขอบใบมีต่อมสีแดง ดอกสีชมพู แดง หรือขาว กลีบรวมยาวประมาณ 0.2 เซนติเมตร เกสรเพศผู้ 2-3 อัน ยื่นพ้นกลีบรวมเล็กน้อย ผลรูปคล้ายกระบอง เป็นสัน 5 สัน มีต่อมทั่วไป ยาวประมาณ

0.2-0.3 เซนติเมตร ผักขมหินขึ้นเป็นวัชพืชทั่วไปในเขตร้อน ในไทยพบทั่วทุกภาคตามที่รกร้าง และข้างถนน รับประทานเป็นผัก โดยเฉพาะคนที่มีฐานะยากจนในหลายประเทศเช่นอินเดีย ศรีลังกา และไทย ในออสเตรเลียถือว่าเป็นวัชพืชชั้นดีใช้เลี้ยงแกะและวัว

ผักขมหิน หรือหญ้าหนวดแมว *Boerhavia erecta* L. เป็นพืชล้มลุก ลำต้นตั้งตรง สูงประมาณ 1 เมตร ใบรูปไข่แกมรูปขอบขนานหรือรูปใบหอก ปลายใบแหลม โคนใบกลมหรือตัด ใบยาว 2-3.5 เซนติเมตร ดอกสีชมพู แดง หรือสีขาว กลีบรวมยาวประมาณ 0.2 เซนติเมตร มักเว้าตรงกลาง เกสรเพศผู้ 1-2 อัน ยื่นพ้นกลีบรวมเล็กน้อย ผลรูปกรวยกลับ ปลายตัด เป็นสันนูนชัดเจน 5 สัน เกลี้ยง ยาวประมาณ 0.2 เซนติเมตร เป็นวัชพืชทั่วไปในเขตร้อน ในไทยพบทั่วทุกภาคตามที่รกร้างและข้างถนน เช่นเดียวกับชนิด *Boerhavia diffusa* L.

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1) กล้องถ่ายรูปแบบดิจิตอล
2) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
3) เลนส์ขยาย 10 เท่า สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นในภาคสนาม
4) จานแก้ว บีกเกอร์ กระบอกตวง หลอดแก้วก้นตัด และเครื่องแก้วอื่นๆ ที่จำเป็นสำหรับการศึกษาในห้องปฏิบัติการ
5) กระดาษกรอง ผงวุ้น ผงเซลลูโลส พลาสติกใสสำหรับปิดอาหาร
6) กรรไกร มีด เสียม หรือพั่ว สำหรับตัด/ขุด ตัวอย่างพืช
7) ดินและกระถาง สำหรับปลูกพืชทดสอบในเรือนทดลอง
8) แผงอัดตัวอย่างพรรณไม้พร้อมกระดาษฟูก ฟองน้ำและหนังสือพิมพ์ พร้อมเชือกไส้ตะเกียงและป้ายชื่อสำหรับผูกตัวอย่างพืช
9) กระดาษติดตัวอย่างพืช พร้อมแฟ้มปก
10) ขวดแก้ว และน้ำยาสำหรับดองตัวอย่างพืช (หากจำเป็น)
11) น้ำยาชุบตัวอย่างวัชพืช ประกอบด้วย ฟีนอล เมอคิวริคคลอไรด์ เอทธิลอัลกอฮอล์
12) การบูร
13) เครื่องรับสัญญาณดาวเทียม เพื่อระบุพิกัด
14) อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น เช่น ถุงพลาสติกขนาดต่างๆ กระถางขนาดต่างๆ พร้อมดินและป้ายปัก สำหรับปลูกพืชตัวอย่างเพื่อเก็บเมล็ด และศึกษารายละเอียดของพืชเพิ่มเติม
15) สมุดบันทึก

วิธีการ

1) การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

- กำหนดพื้นที่ วางแผนการสำรวจเก็บตัวอย่าง แบบการสืบพบ (detection survey) โดยมีพืชสกุล *Boerhavia* L. เป็นพืชเป้าหมาย ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม

- สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชทุกชนิดที่มีลักษณะของพืชสกุล *Boerhavia* L. ตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย นำมาปลูกที่กลุ่มวิจัยวัชพืช เพื่อตรวจสอบชนิด และจัดทำตัวอย่างแห้ง

2) **การตรวจสอบชนิดพืช** โดยเทียบกับตัวอย่างพืชในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช พิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิน สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ ของแต่ละวงศ์หรือสกุลของพืชนั้น ๆ ตลอดจนการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่างๆ

3) **การศึกษาลักษณะทางชีววิทยา**ของพืชสกุล *Boerhavia* L. รวบรวมเมล็ดจากแหล่งที่พบ หรือพืชที่นำมาปลูก (เมื่อไม่สามารถรวบรวมเมล็ดจากพื้นที่สำรวจ) เลือกเฉพาะเมล็ดที่แก่และมีลักษณะสมบูรณ์ เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

- **การงอกในห้องปฏิบัติการ** โดยนำเมล็ดวัชพืชที่แก่เต็มที่และมีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 50 เมล็ด ใส่ในจานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซ็นติเมตร บรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น จำนวน 10 จานสำหรับพืชแต่ละชนิด และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดผา นำไปวางในห้องปฏิบัติการ สภาพอุณหภูมิ-แสง ปกติ บันทึกจำนวนเมล็ดงอกทุกวัน จนเมล็ดงอกหมด แต่ไม่เกิน 30 วัน หากงอกไม่นำมาตรวจสอบการมีชีวิตโดยการย้อมสีด้วย 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride (tetrazolium chloride straining technique)

- **การงอกในสภาพเรือนทดลอง** นำเมล็ดวัชพืชที่แก่และมีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 50 เมล็ด โรยหน้าผิวดิน ที่บรรจุในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์ 20 เซนติเมตร สูง 18 เซนติเมตร ที่บรรจุดินจนถึงระดับห่างจากขอบกระถางด้านบน 2-3 เซนติเมตร จำนวนชนิดละ 10 กระถาง รดน้ำทุกวัน บันทึกจำนวนต้นงอกทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน

- **การเจริญเติบโต** นำเมล็ดพืชมาเพาะในกระถางปูน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40 เซนติเมตร กระถางละ 50 เมล็ด ชนิดละ 15 กระถาง หลังวัชพืชงอก 1 สัปดาห์ ถอนออก ให้เหลือเฉพาะต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์ที่สุด 1, 3 และ 5 ต้น/กระถาง โดยแต่ละต้นมีระยะห่างกันพอประมาณ บันทึกความสูง/ความยาวต้น จำนวนแขนง ทุกสัปดาห์ วันที่ออกดอก ระยะเวลาที่พัฒนาจากดอกเป็นผล ผลแก่ จำนวนผลต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อผล

- **การขยายพันธุ์ด้วยส่วนของลำต้น** ตรวจสอบความสามารถด้วยส่วนของลำต้น ในสภาพเรือนทดลอง โดยตัดส่วนของต้นจากโคน และจากยอด ให้มีความยาวประมาณ 5 เซนติเมตร ส่วนละ 50 ท่อน ต่อชนิด นำมาปักในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์ 20 เซนติเมตร สูง 18 เซนติเมตร ที่บรรจุดินจนถึงระดับห่างจากขอบกระถางด้านบน 2-3 เซนติเมตร จำนวนชนิดละ 10 ท่อนต่อกระถาง บรรจุใน

ถุงพลาสติก รดน้ำทุกวัน เพื่อรักษาความชื้นในถุง ตรวจนับต้นที่สามารถสร้างใบใหม่ขึ้นมาได้ทุกสัปดาห์ นาน 1 เดือน

- **คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิ** (Allelopathy) เบื้องต้น ใช้ใบสด/ใบแห้ง ของพืชในสกุล *Boerhavial* L. ทดสอบฤทธิ์ทางอัลลิโลพาธิในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Sandwich method ในห้องปฏิบัติการ และใช้ไมยราบยักษ์เป็นพืชทดสอบ วางหลอดทดลองในตู้ควบคุมอุณหภูมิแสง วัดความยาวรากไมยราบยักษ์ หลังทดลอง 7 วัน

4) การจัดทำตัวอย่างแห้ง เก็บวัชพืชที่มีใบและดอกสมบูรณ์ ไม่ถูกแมลงทำลาย หากพืชมีขนาดเล็ก ควรมีราก ต้น ใบ –ดอก ครบ หากไม่พบดอก ควรมีส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ หรือลักษณะอื่นที่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดได้ อัดในแผงอัดพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 x30 เซนติเมตร อย่างน้อยชนิดละ 2 ตัวอย่าง เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่ – นิเวศน์ พืชอาศัย วัน-เวลา ชื่อผู้เก็บ เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

12.3 การบันทึกขอมูล

- ข้อมูลภาคสนาม : สถานที่หรือพิกัด สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูก ชนิดลักษณะวัชพืช วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ และข้อมูลอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบชนิด

- ข้อมูลในห้องปฏิบัติการ/เรือนทดลอง การงอก การเจริญเติบโต (ความยาวต้น จำนวนแขนง) การสร้างดอก เมล็ด

- นำข้อมูลที่ได้คำนวนอัตราการงอก อัตราการเจริญเติบโต ความสามารถในการสร้างหน่วยขยายพันธุ์ คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิ เปรียบเทียบกันทุกชนิดในสกุล *Boerhavia* L.

- นำข้อมูลสถานที่หรือพิกัดที่ได้จากการสำรวจ ทำแผนที่การระบาด/การแพร่กระจาย

เวลาและสถานที่

สถานที่ทำการทดลอง จังหวัดต่างๆ ที่เก็บตัวอย่าง และกลุ่มวิจัยวัชพืชในปี 2557

ผลการทดลอง

สำรวจ รวบรวมวัชพืชสกุลผักโขมหิน จากจังหวัดนนทบุรี สุพรรณบุรี อยุธยา นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี สระบุรี ลพบุรี เพชรบูรณ์ ชัยภูมิ หนองคาย ขอนแก่น อุดรธานี นครพนม ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ ชุมพร สุราษฎร์ธานี ประจวบคีรีขันธ์ พบวัชพืชสกุลนี้ 4 ชนิด(Table 1) รวบรวมเมล็ดเพื่อศึกษาการงอกในห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง และศึกษาการเจริญเติบโตในสภาพเรือนทดลอง โดยเลือกเฉพาะเมล็ดดีที่ไม่ถูกแมลงทำลาย ปรากฏว่าพืชทั้งสี่ชนิด ไม่งอกในห้องปฏิบัติการ แต่สามารถงอกได้ในสภาพเรือนทดลอง โดย *B. erecta* L. มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด

เอกสารอ้างอิง

ศิริพร ซึงสนธิพร. 2549. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับวัชพืช. หน้า 12-1 -12-64. *ใน:* เอกสารการสอนชุดวิชาศัตรูพืชเบื้องต้น มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช สาขาวิชาส่งเสริมการเกษตรและสหกรณ์.

สำนักงานหอพรรณไม้. สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช 2555. สารานุกรมพืชในประเทศไทย : ผักขม. [ออนไลน์]. แหล่งข้อมูล : http://web3.dnp.go.th/botany/ detail.aspx?words=%BC%D1%A1%A2%C1&typeword=group วันที่ 10 พฤษภาคม 2555.

Dequan, L. and M. Gilbert. 2003. Nyctaginaceae. Pages 433-434. *In*: Flora of China Vol. 5.

Larsen, K. 1991. Nyctaginaceae. Pages 371-374. *In:* Flora of Thailand. Vol. 5 part 3.

ภาคผนวก

Table 1 Comparing of character, habitat and plant sample of *Boerhavia* weed found.

Weed	Habitat	provice	samples
Boerhavia erecta L.	Vegetable growing area, corn, sugar can, pine apple and along railway	Every province where survey was conducted	30
Boerhavia diffusa L.?	Non-crop area or boarder of field crop, under shading of big tree and sugar cane growing area.	Kanchanabuir, Ratchburi, Saraburi, Lopburi and Petchboon	25
Boerhavia sp1.	Vegetable growing area, field crop growing area such as" corn field, sugarcane, cassava and along road side non-crop area	Every province where survey was conducted	18
Boerhavia sp2	Vegetable growing area, field crop growing area such as" corn, sucarcane, casawa, historical site	Nontaburi, Supanbuir, Ayuthaday, NaokrnPathom, Kanchanaburi, Ratchaburi, Saraburi, Lobbuir, Petchaboon, Chaiayaphume, Nongkhai, KhonKaen, Udornthani	20

2095

ชีววิทยา การแพร่ระบาด ของวัชพืชวงศ์ทานตะวันสองชนิด : หญ้าหน้าแมว และทานตะวันหนู

Biology and Distribution of Two Asteraceae Weeds

อัณศยา สุริยะวงศ์ตระการ[1/] ศิริพร ซึงสนธิพร[1/] ธัญชนก จงรักไทย[1/]
ปิยนันท์ พวงจันทร์[1/] กาญจนา พฤษพันธ์[2]
[1/]กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช [2/]สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช

รายงานความก้าวหน้า

สำรวจการแพร่กระจายของทานตะวันหนูและหญ้าหน้าแมว และศึกษาการงอก การเจริญ การสร้างหน่วยขยายพันธุ์ของวัชพืชวงศ์ทานตะวันสองชนิด เพื่อตรวจสอบชนิด ข้อมูลทางชีวิทยาเพื่อประกอบแนวทางในการจัดการพืชทั้งสองชนิดต่อไป

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-03-15-57

คำนำ

พืชวงศ์ทานตะวัน เป็นวงศ์ที่มีสมาชิกจำนวนมากประมาณ 20,000 ชนิด (ประมาณ 1,000 สกุล) ส่วนใหญ่หรือเกือบทั้งหมดเป็นพืชล้มลุก มีทั้งที่เป็นพืชเศรษฐกิจ เช่น ทานตะวัน เบญจมาศ ตั้งโอ๋ และเป็นวัชพืชที่สำคัญหลายชนิด เช่น สาบเสือ สาบแร้งสาบกา สาบหมา หญ้าละออง กะเม็ง จากการศึกษาสำรวจวัชพืชในข้าวฟ่างและข้าวโพด ในพื้นที่สระบุรีและลพบุรี พบวัชพืชในวงศ์ทานตะวันสองชนิด ซึ่งไม่พบหรือมีรายงานการระบาดมาก่อนในประเทศไทย และมีแนวโน้มระบาดเพิ่มขึ้น แต่ยังไม่สามารถระบุชนิด (ชื่อวิทยาศาสตร์) ดังนั้นจึงทำการศึกษานี้เพื่อตรวจสอบชนิด ข้อมูลทางชีววิทยา การแพร่ระบาด เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการวางแผนการควบคุม ป้องกันก่อนที่พืชชนิดนี้จะกลายเป็นปัญหาวัชพืชร้ายแรงในอนาคต

พืชวงศ์ทานตะวัน Asteraceae หรือ Compositae เป็นวงศ์ที่มีสมาชิกส่วนใหญ่เป็นไม้ล้มลุก ส่วนของพืชเหนือระดับดินมักมีขนอ่อนคลุม ใบ เป็นใบเดี่ยวหรือใบประกอบ ติดเรียงแบบสลับหรือตรงกันข้าม หรือเป็นวงรอบข้อ หรือแบบ rosette ขอบใบเป็นจักหรือเป็นหยักเว้า ช่อดอก เป็นแบบ capitulum, head, composite มักมีกลีบประดับจำนวนมากซ้อนรองรับอยู่ใต้ฐานรองดอกเป็น involucral bract หรือ receptacular bract ซึ่งอาจมีสภาพคงทนฐานรองดอกมักขยายและแบบนูนหรือเว้า บางชนิดเป็นรูปกรวยหรือเป็นแท่ง กลีบประดับอาจแยกกันหรือเชื่อมติดกันเป็น phyllaries ดอกย่อยมีเพศครบหรือมีเพศเดียวอยู่บนช่อดอกเดียวกัน รูปทรงไม่มีสัดส่วนสมดุลย์ กลีบรอง มักแปรสภาพไปเป็นเส้นขนนุ่มละเอียดเรียกว่า pappus ปกติมี 5 อัน โคนติดกันหรือแยกกัน กลีบดอก มี 5 กลีบ เชื่อมติดกันเป็นหลอดตอนโคน ปลายแผ่ออกเป็นแผ่น มีลักษณะรูปทรงแยกออกได้เป็น 3 แบบ คือ Disc floret, Ligulate floret หรือ ray floret และ Bilabiate florel เกสรตัวผู้ มี 5 อัน มีรังไข่เป็นแบบ inferior ไข่ติดแบบ basal placentation ผล เป็นแบบ achene มีขนาดแตกต่างกัน แต่ส่วนใหญ่มักมีขนาดเล็ก และขนแบบ pappus (ก่องกานดา, 2551) ซึ่งเป็นปัจจัยช่วยให้เมล็ดปลิวไปตามลมเป็นระยะทางไกลได้

Holm *et al.* (1977) ได้สรุปจากแบบสอบถามเกี่ยวกับวัชพืชร้ายแรงจากประเทศต่างๆ ว่าวัชพืชที่ร้ายแรงที่สุดของโลก (World Worst Weed) มีวัชพืชในวงศ์ Asteraceae ถึง 13 ชนิด ซึ่งพบระบาดในประเทศ ถึง 8 ชนิด ได้แก่ สาบแร้งสาบกา (Ageratum conyzoides L.) *Ageratum houstorniamum* Mill.) ก้นจ้ำขาว (*Bidens pilosa* L.) สาบเสือ (*Chromolaena odorata* (L>) R.M.King& H.Robinson / *Eupatorium odoratum* L.) กะเม็ง (*Eclipta prostrata* (L.) L. ทหารกล้า (*Galinsoga parviflora* Cav.) ขี้ไก่ย่าน (*Mikania micrantha* HBK) และกระชับ (*Xanthium strumarium* L.) และพืชในวงศ์นั้บางชนิดถูกกำหนดเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย ได้แก่ *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Cirsium arvense* (L.) Scop. *Cirsium vulgare* Savi (Ten.) *Parthenium hysterophorus* L. เป็นต้น

ศิริพร และคณะ (2554) รายงานการสำรวจและรวบรวมวัชพืชในพืชผัก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง พบวัชพืชหน้าแมวในพื้นที่จังหวัดสระบุรี แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ และยังไม่พบรายงานการศึกษาเกี่ยวกับวัชพืชชนิดนี้แต่อย่างใด

สำหรับวัชพืช ทานตะวันหนู เป็นวัชพืชที่พบในการสำรวจในแปลงข้าวโพด และข้าวฟ่าง ในพื้นที่จังหวัดสระบุรีและลพบุรี ซึ่งยังไม่พบรายงานในเอกสารใดๆ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1) กล้องถ่ายรูปแบบดิจิตอล
2) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
3) เลนส์ขยาย 10 เท่า สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นในภาคสนาม
4) จานแก้ว บีกเกอร์ กระบอกตวง หลอดแก้วก้นตัด และอุปกรณ์อื่นที่จำเป็น สำหรับการศึกษาในห้องปฏิบัติการ
5) กระดาษกรอง ผงวุ้น ผงเซลลูโลส พลาสติกใสสำหรับปิดอาหาร
6) กรรไกร มีด เสียม หรือพั่ว สำหรับตัด/ขุด ตัวอย่างพืช
7) ดินและกระถาง สำหรับปลูกพืชทดสอบในเรือนทดลอง
8) แผงอัดตัวอย่างพรรณไม้พร้อมกระดาษฟูก ฟองน้ำและหนังสือพิมพ์ พร้อมเชือกไส้ตะเกียงและป้ายชื่อสำหรับผูกตัวอย่างพืช
9) กระดาษติดตัวอย่างพืช พร้อมแฟ้มปก
10) ขวดแก้ว และน้ำยาสำหรับดองตัวอย่างพืช (หากจำเป็น)
11) น้ำยาชุบตัวอย่างวัชพืช ประกอบด้วย ฟีนอล เมอคิวริคคลอไรด์ เอทธิลอัลกอฮอล์
12) การบูร สำหรับไล่แมลง
13) เครื่องวัดพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)
14) อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น เช่น ถุงพลาสติกขนาดต่างๆ กระถางขนาดต่างๆ พร้อมดินและป้ายปัก สำหรับปลูกพืชตัวอย่างเพื่อเก็บเมล็ด และศึกษารายละเอียดของพืชเพิ่มเติม
15) สมุดบันทึก

- วิธีการทดลอง การสำรวจแบบสืบพบ

วิธีการ

1) **การสำรวจและเก็บตัวอย่าง** กำหนดพื้นที่ วางแผนการสำรวจเก็บตัวอย่าง แบบการสืบพบ (Detection survey) โดยมีหญ้าหน้าแมว และทานตะวันหนู เป็นพืชเป้าหมาย ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย บันทึกข้อมูลพื้นที่พิกัด พืชปลูก สภาพนิเวศ

2) **การตรวจสอบชนิดพืช** โดยเทียบตัวอย่างพืชในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช พิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิน สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ ของแต่ละวงศ์หรือสกุลของพืชนั้นๆ ตลอดจนการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่างๆ

3) **การศึกษาลักษณะทางชีววิทยา**ของหญ้าหน้าแมว และทานตะวันหนู รวบรวมเมล็ดจากแหล่งที่พบ หรือพืชที่นำมาปลูก (เมื่อไม่สามารถรวบรวมเมล็ดจากพื้นที่สำรวจ) และทำการศึกษา

- **การงอกในห้องปฏิบัติการ** โดยนำเมล็ดวัชพืชที่แก่เต็มที่และมีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 50 เมล็ด ใส่ในจานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร บรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดผา นำไปวางในห้องปฏิบัติการ สภาพอุณหภูมิ-แสง ปกติ บันทึกจำนวนเมล็ดงอกทุกวัน จนเมล็ดงอกหมด แต่ไม่เกิน 30 วัน หากไม่งอกนำมาตรวจสอบการมีชีวิตโดยการย้อมสีด้วย 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride (tetrazolium chloride straining technique) เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ด

- **การงอกในสภาพเรือนทดลอง** นำเมล็ดวัชพืชที่แก่และมีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 50 เมล็ด โรยหน้าผิวดิน ที่บรรจุในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์ 20 เซนติเมตร สูง 18 เซนติเมตร ที่บรรจุดินจนถึงระดับห่างจากขอบกระถางด้านบน 2-3 เซนติเมตร จำนวนชนิดละ 10 กระถาง รดน้ำทุกวัน บันทึกจำนวนต้นงอกทุกวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน

- **การเจริญเติบโต** นำเมล็ดพืชมาเพาะในกระถางปูน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40 เซนติเมตร กระถางละ 50 เมล็ด จำนวน 15 กระถาง หลังวัชพืชงอก 1 สัปดาห์ ถอนออก ให้เหลือเฉพาะต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์ที่สุด 1, 3 และ 5 ต้น/กระถาง ความหนาแน่นละ 5 กระถาง บันทึกความสูง/ความยาวต้น จำนวนแขนง ทุกสัปดาห์ วันที่ออกดอก ระยะเวลาที่พัฒนาจากดอกเป็นผล ผลแก่ จำนวนผลต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อผล

- **การขยายพันธุ์** ตรวจสอบความสามารถด้วยส่วนของลำต้น ในสภาพเรือนทดลอง โดยตัดส่วนของต้นจากโคน และจากยอด ให้มีความยาวประมาณ 5 เซนติเมตร ส่วนละ 50 ท่อน ต่อชนิด นำมาปักในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์ 20 เซนติเมตร สูง 18 เซนติเมตร ที่บรรจุดินจนถึงระดับห่างจากขอบกระถางด้านบน 2-3 เซนติเมตร จำนวนชนิดละ 10 ท่อนต่อกระถาง บรรจุในถุงพลาสติก รดน้ำทุกวัน เพื่อรักษาความชื้นในถุง ตรวจนับต้นที่สามารถสร้างใบใหม่ขึ้นมาได้ทุกสัปดาห์ นาน 1 เดือน

- **คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิเบื้องต้น** ใช้ใบสด/ใบแห้ง ของหญ้าหน้าแมว และทานตะวันหนู ทดสอบฤทธิ์ทางอัลลิโลพาธิในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Sandwich method ในห้องปฏิบัติการ และใช้ไมยราบยักษ์เป็นพืชทดสอบ วางหลอดทดลองในตู้ควบคุมอุณหภูมิแสง วัดความยาวรากไมยราบยักษ์หลังทดลอง 7 วัน

4) **การจัดทำตัวอย่างแห้ง** เก็บวัชพืชที่มีใบและดอกสมบูรณ์ ไม่ถูกแมลงทำลาย หากพืชมีขนาดเล็ก ควรมีราก ต้น ใบ –ดอก ครบ หากไม่พบดอก ควรมีส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ หรือลักษณะ

อื่นที่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดได้ อัดในแผงอัดพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 x30 เซนติเมตร อย่างน้อยชนิดละ 2 ตัวอย่าง เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่ – นิเวศน์ พืชอาศัย วัน-เวลา ชื่อผู้เก็บ เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

การบันทึกขอมูล

ข้อมูลภาคสนาม : สถานที่หรือพิกัด สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูก ชนิดลักษณะวัชพืช วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ และข้อมูลอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบชนิด

ข้อมูลในห้องปฏิบัติการ/เรือนทดลอง การงอก การเจริญเติบโต (ความสูงต้น จำนวนแขนง) การสร้างดอก เมล็ด

นำข้อมูลที่ได้คำนวณอัตราการงอก อัตราการเจริญเติบโต ความสามารถในการสร้างหน่วยขยายพันธุ์ คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิ

นำข้อมูลสถานที่หรือพิกัดที่ได้จากการสำรวจ ทำแผนที่การระบาด/การแพร่กระจาย

เวลาและสถานที่

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืชในปี 2557

ผลการดำเนินการ

1. ทานตะวันหนู (ยังไม่สามารถตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์)

ทานตะวันหนู เป็นพืชฤดูเดียว ลำต้นตั้งตรง สูงได้ถึง 1.5 เมตร แตกแขนงได้ดี ลำต้นมีขนแข็งคาย สากมือ ปกคลุมทุกส่วนของลำต้น ใบเดี่ยว ปลายใบแหลม ฐานใบกว้าง ขอบใบจัก เส้นใบเห็นชัดเจน ออกตรงข้าม ดอกออกเป็นช่อที่ซอกใบและปลายกิ่ง ประกอบด้วยดอกย่อย 20-30 ดอก กลีบดอกของดอกย่อยสีขาว ผลเมื่อแก่มีสีดำ และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อแห้ง (Figure 1)

การแพร่กระจายของทานตะวันหนู พบระบาดในแปลงข้าวโพด มันสำปะหลัง ถั่วเขียว ในพื้นที่จังหวัดสระบุรี และลพบุรี ยังไม่พบการระบาดในท้องที่อื่น

ชีววิทยาของทานตะวันหนู

1.**1. การงอก** การงอกในห้องปฏิบัติ ผลการเพาะในจานรองแก้ว และวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 2 เดือน ทานตะวันหนูงอกเพียงเล็กน้อย แต่งอกได้มากกว่าเมื่อเพาะในดิน แต่เริ่มงอกหลังจากหว่านประมาณ 10 วัน และทยอยงอกไป

1.2. การเจริญเติบโตในกระบะดิน ทานตะวันหนูมีการเพิ่มความสูงและจำนวนใบอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะเมื่อขึ้นเป็นกลุ่ม เมื่ออายุประมาณ 30 วัน จะเริ่มออกดอก แต่ละช่อดอกมีจำนวนเมล็ดได้มากกว่า 20-30 เมล็ด เป็นพืชอายุสั้นประมาณ 3-4 เดือน ใบทยอยแห้ง ค่อยๆตาย

1.3 ความสามารถในการขยายพันธ์ ทานตะวันหนูขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดเป็นหลัก ไม่พบการขายพันธุ์ด้วยส่วนของลำต้นในธรรมชาติ

1.4 คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิ ใบแห้งของทานตะวันหนู มีผลต่อการเจริญรากของต้นอ่อนไมยราบยักษ์เล็กน้อย

1.5 ตัวอย่างแห้ง เมื่อสำรวจพบหญ้าหน้าแมว เก็บตัวอย่างเพื่อจัดทำตัวอย่างแห้งได้ทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง

2. หญ้าหน้าแมว *Cyanthillium patulum* (Dryand. ex Dryand.) H.Rob.

มีชื่อพ้องหลายชื่อ ได้แก่ *Bothriocline papuana* O.Hoffm. *Cacalia patula* Kuntze *Conyza patula* Dryand. ex Dryand. *Cyanopis madagascariensis* DC. *Cyanthillium pubescens* Blume *Cyanthillium villosum* Blume *Isonema ovata* Cass. (The PlantList, 2015) แต่ชื่อพ้องที่พบใช้บ่อยได้แก่ *Vernonia patula* (Dryand.) Merr. เคยพบในแปลงผักในพื้นที่อำเภอพระพุทธบาทและบ้านหมอ จังหวัดสระบุรี (ศิริพรและคณะ. 2553) ในการศึกษานี้พบระบาดในพื้นที่ปลูกพืชไร่ เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง และแปลงต้นอ่อนยาสูบ ในพื้นที่จังหวัดลพบุรี และเพชรบูรณ์

ชีววิทยาของหญ้าหน้าแมว

2.1. **การงอก** การงอกในห้องปฏิบัติ ผลการเพาะในจานรองแก้ว และวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 2 เดือน หญ้าหน้าแมวงอกเพียงเล็กน้อย แต่งอกได้มากกว่าเมื่อเพาะในดิน แต่เริ่มงอกหลังจากหว่านประมาณ 10 วัน และทยอยงอกไป

2.2. **การเจริญเติบโต**ในกระบะดิน หญ้าหน้าแมวมีการเพิ่มความสูงและจำนวนใบอย่างช้าๆ ในช่วงหนึ่งเดือนหลังจากงอก หลังจากนั้นมีการเพิ่มความสูง จำนวนใบ สาขา อย่างรวดเร็ว เมื่ออายุประมาณ 40 วัน จะเริ่มออกดอก แต่ละช่อดอกมีจำนวนเมล็ดได้มากกว่า 30 เมล็ด เป็นพืชอายุสั้นประมาณ 3-4 เดือน มีการเจริญเติบโตช้ามากในช่วงประมาณ 1 เดือน หลังงอก แต่หลังจากนั้นจะเพิ่มจำนวนใบและจำนวนสาขาอย่างรวดเร็ว

2.3 **ความสามารถในการขยายพันธ์** หญ้าหน้าแมวขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดเป็นหลัก ไม่พบการขายพันธุ์ด้วยส่วนของลำต้นในธรรมชาติ

2.4 **คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิ** ใบแห้งของหญ้าหน้าแมว มีผลต่อการเจริญรากของต้นอ่อนไมยราบยักษ์เล็กน้อย อยู่ระหว่างการวิเคราะห์ผล

2.5 **ตัวอย่างแห้ง** เมื่อสำรวจพบหญ้าหน้าแมว เก็บตัวอย่างเพื่อจัดทำตัวอย่างแห้งได้ทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ทั้งทานตะวันหนู และหญ้าหน้าแมว สามารถงอกได้ดีในดิน แต่งอกไม่พร้อมกัน ทำให้การควบคุมด้วยสารเคมีทำได้ยาก แต่ละต้นสามารถผลิตเมล็ดได้จำนวนมาก ดังนั้นควรกำจัดออกก่อนที่จะเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในพืชปลูกอายุสั้น ที่มีความสูงไม่มาก เช่น ถั่วเขียว

เอกสารอ้างอิง

ก่องกานดา ชยามฤต. 2551. ลักษณะประจำวงศ์พรรณไม้ 3. สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช, กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. 90 หน้า

ศิริพร ซึงสนธิพร ธัญชนก จงรักไทย มัตติกา ทองรส. 2554. สำรวจและรวบรวมวัชพืชในพืชผัก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง. ใน รายงานผลงานประจำปี 2553 เล่ม 3 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช.น.1655-1684

Holm, L., D.L. Plucknett, J.V. Pancho, and J.P. Herberger. 1979. The World's Worst Weeds Distribution and Biology. Univ. Hawaii Press, Honolulu. P291-294.

The Plant List. 2015. (Online database) http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/gcc-115562.

Bunwong S., P. Chantaranothai and S. Keeley. 2014. Revisions and key to the Vernonieae (Compositae) of Thailand PhytoKeys 37: 25–101.

ภาคผนวก

Figure 1 Habit (1), inflorescence (2) and mature fruit (3X of unknown 1 (Tiny Sunflower)

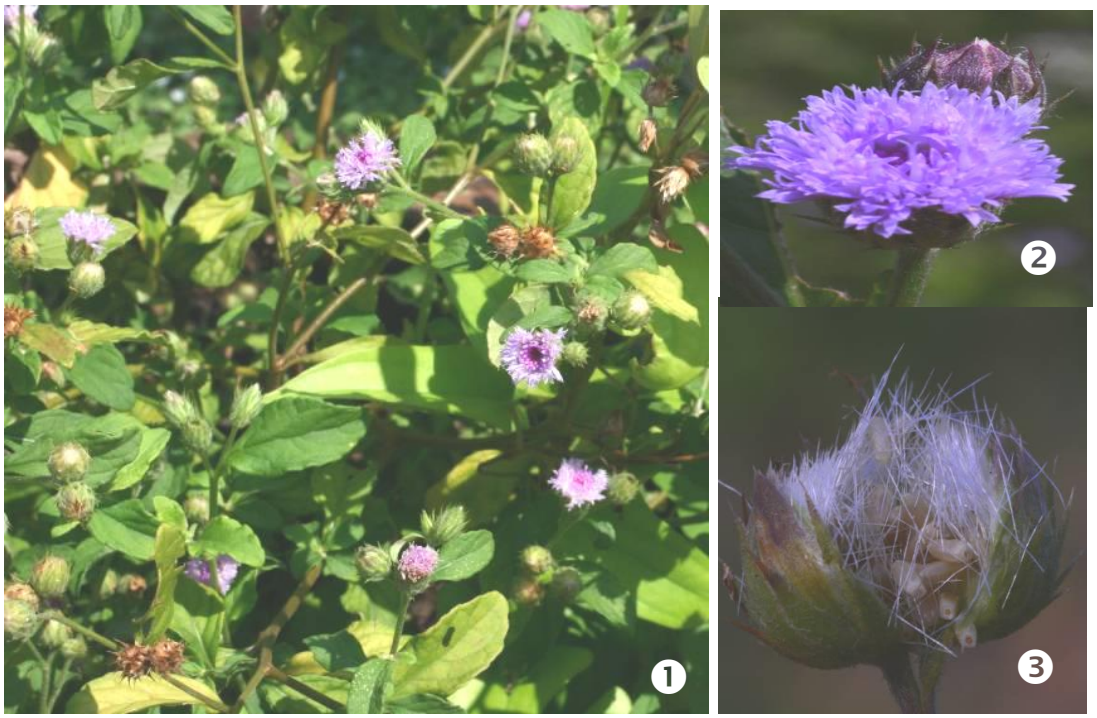


Figure 2 Habit (1), inflorescence (2) and mature fruit (3X of *Vernonia patula*

ศึกษาชนิดวัชพืชต่างถิ่นในพื้นที่เกษตรที่สูงภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ

Diversity of Alien Weeds in the High Land Agriculture in Northern and North Eastern Region

อัณศยา สุริยะวงศ์ตระการ[1/] ศิริพร ซึงสนธิพร[1/] ธัญชนก จงรักไทย[1/] กาญจนา พฤษพันธ์[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช [2/]สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช

รายงานความก้าวหน้า

พื้นที่เกษตรที่สูงเป็นแหล่งที่มีการชักนำพืชจากต่างถิ่นมาปลูกเป็นจำนวนมาก และพื้นที่ใกล้แหล่งอาศัยของพืชถิ่นเดียวของไทยจำนวนมาก จึงมีความเสี่ยงที่อาจมีพืชต่างถิ่นที่รุกรานติดมาและกลายเป็นวัชพืชที่คุกคามพืชท้องถิ่นได้ วัชพืชร้ายแรงในแต่ละประเทศ มักเป็นพืชที่มิได้มีถิ่นกำเนิดในประเทศนั้นๆ ตัวอย่างวัชพืชร้ายแรงของประเทศไทย ได้แก่ ผักตบชวา ไมยราบยักษ์ หญ้าขจรจบ ธูปฤาษี ล้วนมิได้มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย และถูกนำเข้าประเทศไทยอย่างจงใจ เพื่อใช้ประโยชน์ทางการเกษตร และ/หรือไม้ประดับ และต่อมาได้หลุดออกสู่สิ่งแวดล้อม และกลายเป็นวัชพืชร้ายแรงในที่สุด ดังนั้นหากสามารถตรวจพบ (Early detection) และจัดการก่อนที่กลายเป็นวัชพืชร้ายแรง จะเป็นการป้องกันการเกิดวัชพืชร้ายแรงจากพืชต่างถิ่นที่นำเข้ามาได้

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-03-16-57

คำนำ

การเกษตรที่สูง หมายถึง ระบบการเกษตรในพื้นที่ที่มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเล ตั้งแต่ 700 เมตรขึ้นไป ซึ่งเป็นพื้นที่ตั้งแต่เชิงเขาไปจนถึงยอดเขา (ปวิณ, 2542)

เป็นที่ทราบกันทั่วไปว่า ปัญหาชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกราน จัดเป็นปัญหาสำคัญอันดับต้นๆ ที่นำไปสู่การสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพ ปัจจุบันโลกได้ให้ความสนใจต่อชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกรานมากขึ้น และระบุว่าชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกรานเป็นภัยร้ายแรงที่คุกคามต่อความหลากหลายทางชีวภาพเป็นอันดับสองรองจากการทำลายแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกรานบางชนิดเคยก่อปัญหาที่ยากต่อการแก้ไข และหลายชนิดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระบบนิเวศโดยสิ้นเชิง ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกรานเป็นหนึ่งในประเด็นปัญหาการคุกคามต่อความหลากหลายทางชีวภาพ ที่จัดว่ามีความสำคัญเป็นอันดับแรกๆ ของโลก การนำเข้ามาและการแพร่ระบาดของชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกรานได้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อความหลากหลายทางชีวภาพในระบบนิเวศต่างๆ และได้ส่งผลกระทบต่อเนื่องทั้งทางเศรษฐกิจและสุขอนามัยของมนุษย์ สาเหตุที่สำคัญที่สุดที่ทำให้เกิดการนำเข้าและแพร่ระบาดของชนิดพันธุ์ต่างถิ่น ได้แก่ การค้าระหว่างประเทศ โดยมีมูลค่าการค้าชนิดพันธุ์ต่างๆ ทั่วโลกสูงถึงประมาณ 5 แสนล้านเหรียญสหรัฐ ปัจจุบันประเทศไทยมีชนิดพันธุ์ต่างถิ่นอยู่มากกว่า 3,500 ชนิด ส่วนใหญ่ถูกนำเข้ามาเพื่อใช้ในทางการเกษตร การเพาะเลี้ยง เป็นสัตว์เลี้ยงและไม้ดอกไม้ประดับ รวมทั้งการเก็บรวบรวมไว้ในสวนสัตว์และสวนพฤกษศาสตร์ บางชนิดมีการแพร่ระบาดข้ามพรมแดนผ่านทางประเทศเพื่อนบ้าน และติดมากับยานพาหนะ การเดินทาง การขนส่งสินค้า และการท่องเที่ยว รวมทั้งการเข้ามาทางน้ำอับเฉาของเรือ ซึ่งชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่เข้ามาบางชนิดสามารถดำรงชีวิตได้ดีในสภาพธรรมชาติและเป็นพืชและสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ อาทิ ข้าวโพด อ้อย ยางพารา หมู และเป็ดเทศ เป็นต้น

ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่เข้ามาแล้วสามารถตั้งถิ่นฐานและมีการแพร่กระจายได้ดีในธรรมชาติ จนกลายเป็นชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกราน จะส่งผลคุกคามต่อความหลากหลายทางชีวภาพและก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมาก หากไม่มีการจัดการป้องกันและควบคุมอย่างทันท่วงที ซึ่งที่ผ่านมาประเทศไทยประสบปัญหาในการแก้ไขการแพร่ระบาดของชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกรานอยู่บ่อยครั้ง อาทิ การแพร่ระบาดของผักตบชวา ไมยราบยักษ์ นากหญ้า และการแพร่ระบาดของหอยเชอรี่ในนาข้าวที่มีการประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจไว้กว่า 1 พันล้านบาทต่อปี ซึ่งการดำเนินการแก้ไขเมื่อพบว่ามีการแพร่ระบาดแล้วนั้น มีค่าใช้จ่ายสูงและยังไม่สามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นได้ในระยะเวลาอันสั้น รวมทั้งไม่สามารถแก้ไขความเสียหายบางประการ เช่น การสูญพันธุ์ของชนิดพันธุ์พื้นเมืองและโครงสร้างของระบบนิเวศที่เปลี่ยนแปลงไปได้

ในอดีตที่ผ่านมามีการชักนำชนิดพันธุ์ต่างถิ่นเข้ามาในประเทศเข้ามามากมาย หลายชนิดเป็นพืชสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ แต่มีหลายชนิดที่กลายเป็นวัชพืชร้ายแรง ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจที่ประเมินค่ามิได้ โดยทั่วไปผลกระทบที่เกิดจากวัชพืชอาจไม่รุนแรงเมื่อเทียบกับ

ผลกระทบที่เกิดจากศัตรูพืชและโรคพืช มักใช้เวลานานกว่าจะเห็นผลกระทบ หรือหากไม่สนใจแล้วอาจไม่เห็นผลกระทบ แต่เมื่อเกิดแล้วมักคงอยู่เป็นระยะเวลายาวนาน ผลกระทบที่เกิดขึ้น เช่น

- **ผลกระทบต่อระบบนิเวศน์** ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกรานสามารถเปลี่ยนระดับหรือปริมาณของแสง และลดปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำ เปลี่ยนโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของดิน เพิ่มปริมาณน้ำไหลบนพื้นผิว และการกัดเซาะหน้าดิน ที่สำคัญที่สุดคือ ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นสามารถส่งผลกระทบต่อกระบวนการในระบบนิเวศ เช่น วัฏจักรของสารอาหาร การถ่ายละอองเกสร การทับถมหรือเกิดชั้นดินขึ้นมาใหม่ และการถ่ายเทพลังงาน เป็นต้น นอกจากนี้ ยังอาจมีลักษณะหรือพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงภัยธรรมชาติ หรือสภาวะที่ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศ เช่น ความถี่ การแพร่กระจาย และความรุนแรงของไฟป่า หรือขัดขวางกระแสน้ำ เป็นต้น

- **ผลกระทบต่อพืชท้องถิ่น** ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่มีลักษณะเป็นผู้รุกรานจะดำรงชีวิตแบบแก่งแย่งแทนที่ หรือบริโภคสิ่งมีชีวิตในท้องถิ่น หรืออาจเป็นปรสิต หรือพาหะนำโรค ลดอัตราการเจริญเติบโตและการอยู่รอด ของชนิดพันธุ์ท้องถิ่น หรืออาจทำให้จำนวนประชากร ลดลงจนถึงขั้นสูญพันธุ์ และอาจถอนรากถอนโคนหรือทำความเสียหายแก่พืชในท้องถิ่น

- **ผลกระทบต่อความหลากหลายทางพันธุกรรม** ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นสามารถลดความหลากหลายทางพันธุกรรมลงได้ จากการสูญเสียจำนวนประชากรที่มีลักษณะเด่นทางพันธุกรรม การสูญเสียยีนและความซับซ้อนของยีน และการผสมข้ามชนิดพันธุ์หรือสายพันธุ์ระหว่างชนิดพันธุ์ต่างถิ่นกับชนิดพันธุ์พื้นเมือง

- **ผลกระทบทางเศรษฐกิจ** ความเสียหายทางเศรษฐกิจที่เกิดจากชนิดพันธุ์ต่างถิ่นรุกรานจะมีการเปลี่ยนแปลง หรือผันแปรในวงกว้างอยู่ตลอดเวลา เช่น ในสหรัฐอเมริกา ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นรุกรานก่อให้เกิดความเสียหายถึงประมาณปีละ 123 พันล้านเหรียญสหรัฐ และจัดว่าเป็นภัยสำคัญอันดับสองรองจากการทำลายแหล่งที่อยู่อาศัย ซึ่งคุกคามชนิดพันธุ์พื้นเมืองจนแทบสูญพันธุ์ นักนิเวศวิทยาสรุปว่าลักษณะพิเศษของการรุกรานทางชีวภาพ คือ เมื่อเกิดขึ้นและดำเนินไปแล้วความเสียหายและความสูญเสียที่เกิดขึ้นสามารถดำรงอยู่ต่อไปและอาจเพิ่มขึ้น ถึงแม้ว่าได้จัดการกับต้นตอของปัญหาได้แล้วก็ตาม

ทุกวันนี้ชนิดพันธุ์มากกว่าครึ่งหนึ่งที่ปรากฏในพื้นที่ต่างๆ ไม่ใช่ชนิดพันธุ์สิ่งมีชีวิตดั้งเดิมที่มีต้นกำเนิดอยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ (native) แต่เป็นชนิดพันธุ์ที่ถูกนำเข้ามาหรือแพร่กระจายมาจากที่อื่น ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นเหล่านี้อาจเข้าไปแก่งแย่งอาหาร ที่อยู่อาศัยกับชนิดพันธุ์พื้นเมือง หรือผสมพันธุ์กับชนิดพันธุ์พื้นเมือง ทำให้ได้ลูกผสมที่สามารถอยู่ในระบบนิเวศเหล่านั้นได้ดี ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่เข้ามาใหม่และชนิดพันธุ์ลูกผสมอาจมีโอกาศเป็นชนิดพันธุ์เด่นในระบบนิเวศใหม่ เนื่องจากไม่มีผู้ล่า หรือมีตัวควบคุมตามธรรมชาติน้อย ส่งผลต่อสายใยอาหารของระบบนิเวศ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในระบบนิเวศ และอาจนำไปสู่การสูญพันธุ์ของชนิดพันธุ์พื้นเมือง นอกจากชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกรานจะมีผลต่อความหลากหลายทางชีวภาพ และระบบนิเวศแล้ว ยังส่งผลต่อมนุษย์ ทั้งทางด้านสิ่งแวดล้อมรอบตัวมนุษย์ เศรษฐกิจ สังคม สุขอนามัย เนื่องจากชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกรานบ้างชนิดเป็นศัตรูพืช โรค

สัตว์ เกษตรกรมักใช้สารเคมีในการควบคุมและกำจัด ซึ่งสารเคมีเหล่านี้มักจะต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ส่งผลต่อเศรษฐกิจของประเทศ อีกทั้งสารเคมีส่วนใหญ่ยังตกค้างในสิ่งแวดล้อมทำให้ชนิดพันธุ์ในสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ได้รับผลจากสารเคมีไปด้วย และบางครั้งสารเคมีเหล่านี้ยังตกค้างในอาหารที่มนุษย์ต้องรับประทานอยู่เป็นประจำทุกวัน ส่งผลต่อสุขอนามัยของมนุษย์ ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นบ้างชนิดไม่ได้ก่อโรคในพืชหรือในสัตว์แต่เป็นชนิดพันธุ์ที่ก่อโรคในมนุษย์ และบางชนิดเป็นภาหะนำโรคมายังมนุษย์ สัตว์ และพืช

ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นเข้ามาในพื้นที่ใหม่ได้หลากหลายวิธี อาจแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

โดยความตั้งใจของมนุษย์ โดยมีวัตถุประสงค์ต่างๆ ดังนี้

- เพื่อประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรม

- การเกษตร เช่น นำพืชผลไม้สายพันธุ์ดีจากต่างประเทศเข้ามาปลูกในประเทศไทย

- การประมง เช่น นำสัตว์น้ำที่ให้ผลผลิตสูงเข้ามาเลี้ยงในประเทศ

- ปศุสัตว์ เช่น นำเชื้อพันธุ์ของสัตว์ต่างถิ่นเข้ามาปรับปรุงพันธุ์สัตว์ภายในประเทศ รวมทั้งนำพืชอาหารสัตว์ที่มีคุณภาพดีเข้ามาเพาะปลูก

- เพื่อความสวยงาม ทำให้เกิดความเพลิดเพลิน

การนำเข้าพืชและสัตว์ต่างถิ่นเพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าว จะมีตั้งแต่การปลูก เพาะเลี้ยงในระดับครัวเรือน จนถึง การปลูก เพาะเลี้ยง เพื่อขายในตลาดสัตว์เลี้ยงและตลาดไม้ดอกไม้ประดับภายในประเทศและส่งออกต่างประเทศ เช่น พืชประดับสวน ปลาสวยงาม แมงมุม กบ กิ้งก่า ฯลฯ

- เพื่อใช้ในการศึกษา ทดลอง และจัดแสดง การนำเข้าสัตว์ทดลอง หรือพ่อ-แม่พันธุ์สัตว์ทดลอง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น หนู การนำเข้าชนิดพันธุ์เพื่อจัดแสดงในพิพิธภัณฑ์สัตว์น้ำ สวนสัตว์ สวนพฤกษศาสตร์ ฯลฯ

- เพื่อใช้ในกระบวนการควบคุมทางชีวภาพ (Biological Control) เช่น การนำเข้าตัวห้ำ ตัวเบียน เพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช เพื่อกิจกรรมอื่นๆ เช่น นำเข้าเหยื่อที่มีชีวิตเพื่อใช้ในกีฬาตกปลา

- **โดยความไม่ตั้งใจของมนุษย์** ซึ่งเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น

- ติดมากับการขนส่ง เช่น เมล็ดพืชที่ติดมากับล้อรถหรือกล่องบรรจุสินค้า สิ่งมีชีวิตที่ติดมากับน้ำอับเฉา

- ติดมากับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น แมลง ปรสิต จุลินทรีย์ ที่ติดมากับ พืช สัตว์ มนุษย์ที่มาจากต่างประเทศ รวมถึงชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่ติดตาม รองเท้า กระเป๋าเดินทาง เป้ของนักท่องเที่ยว

- ติดมากับการให้ความช่วยเหลือและบรรเทาสาธารณภัย เช่น เสื้อผ้าที่ได้จากการบริจาค

- ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่ติดมากับกิจกรรมทางทหาร เช่น การส่งทหารพร้อมยุทธโธปกรณ์ไปช่วยรบ เมื่อกลับมาอาจมีชนิดพันธุ์ต่างถิ่นติดมากับตัวคน หรือติดมากับล้อรถถัง

- ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่เดินทางเข้ามาได้เอง หรือถูกปัจจัยทางธรรมชาตินำพาเข้ามา เช่น เมล็ดพืชบางชนิดถูกพัดพาเข้ามาโดยลมพายุ, ถูกพัดพาเข้ามาจากการเกิดอุทกภัยที่รุนแรง หรือสัตว์น้ำต่างถิ่นบางชนิดอาจเข้ามาในพื้นที่ใหม่เนื่องจากกระแสน้ำอุ่นเปลี่ยนแปลง

Harada *et al.* (1997) ทำการสำรวจและรายงานชนิดวัชพืชในพื้นที่สูงทางภาคเหนือ ทั้งสิ้น 218 ชนิด และในจำนวนนี้ 7 ชนิด เป็นวัชพืชพบใหม่สำหรับประเทศไทยถึง 7 ชนิด ได้แก่ *Sagiaria aginashi* Makino, *Chloris pycnothrix* Trin., *Eragrostis nigra* Steud., *Fimbristylis aphylla* Steud., *Eragrostis trichodes* (Nutt.) Wood, *Miscanthus floridulus* (Labill.) Warb. Ex K. Schum และ *Poa annua* L.

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1) กล้องถ่ายรูปแบบดิจิตอล
2) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
3) เลนส์ขยาย 10 เท่า สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นในภาคสนาม
4) จานแก้ว บีกเกอร์ กระบอกตวง หลอดแก้วก้นตัด และอุปกรณ์อื่นที่จำเป็น สำหรับการศึกษาในห้องปฏิบัติการ
5) กระดาษกรอง ผงวุ้น ผงเซลลูโลส พลาสติกใสสำหรับปิดอาหาร
6) กรรไกร มีด เสียม หรือพั่ว สำหรับตัด/ขุด ตัวอย่างพืช
7) แผงอัดตัวอย่างพรรณไม้พร้อมกระดาษฟูก ฟองน้ำและหนังสือพิมพ์ พร้อมเชือกไส้ตะเกียงและป้ายชื่อสำหรับผูกตัวอย่างพืช
8) กระดาษติดตัวอย่างพืช
9) ขวดแก้ว และน้ำยาสำหรับดองตัวอย่างพืช (หากจำเป็น)
10) น้ำยาชุบตัวอย่างวัชพืช ประกอบด้วย ฟีนอล เมอคิวริคคลอไรด์ เอทธิลอัลกอฮอล์
11) การบูร
12) เครื่องวัดพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)
13) อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น เช่น ถุงพลาสติกขนาดต่างๆ กระถางขนาดต่างๆ พร้อมดิน และป้ายปัก สำหรับปลูกพืชตัวอย่างเพื่อเก็บเมล็ด และศึกษารายละเอียดของพืชเพิ่มเติม
14) สมุดบันทึก

วิธีการ

1) ตรวจสอบ สืบค้น ข้อมูล เอกสาร งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชนิดพืชในพื้นที่เกษตรที่สูงและพื้นที่สูงในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

2) การสำรวจและเก็บตัวอย่าง กำหนดพื้นที่ วางแผนการสำรวจเก็บตัวอย่าง ในพื้นที่เกษตรที่สูงในภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ สำรวจแบบสืบพบ (Detection survey) โดยการเดินสำรวจในพื้นที่ที่สามารถเข้าถึงด้วยรถยนต์ หรืออยู่ในระยะที่เดินเข้าได้ ในพื้นที่เกษตรที่สูง ความสูงเหนือระดับน้ำทะเลเฉลี่ย มากกว่า 700 เมตรขึ้นไป เก็บตัวอย่างทุกชนิดที่ไม่เคยพบรายงานในประเทศไทย และมีรายงานเป็นวัชพืชในต่างประเทศ สำหรับชนิดที่ไม่สามารถระบุได้ขณะสำรวจ นำมาปลูกเพื่อศึกษารายละเอียดและตรวจสอบชนิดต่อไป

3) ศึกษาคุณสมบัติการเป็นพืชที่รุกราน/วัชพืชร้ายแรง หากพบวัชพืชต่างถิ่นที่ไม่พบรายงานมาก่อน มีลักษณะแข็งแรง สมบูรณ์ สามารถเจริญเติบโตได้ดี ไม่มีร่องรอยถูกทำลายจากศัตรูธรรมชาติ และไม่ได้เป็นพืชที่ปลูกเพื่อวัตถุประสงค์ใด สำรวจเพิ่มเติมเพื่อทราบขอบเขตการระบาด และเก็บตัวอย่างสด นำมาศึกษารายละเอียดเพิ่มเติม เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นพืชที่รุกรานหรือวัชพืชร้ายแรง เช่น การเจริญเติบโต ความสามารถในการสร้างหน่วยขยายพันธุ์ การเกิดต้นใหม่จากหน่วยขยายพันธุ์ คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิ เป็นต้น

4) การตรวจสอบชนิดพืช เทียบตัวอย่างวัชพืชกับตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช พิพิธภัณฑ์พืชของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ ของแต่ละวงศ์หรือสกุลของพืชนั้นๆ ตลอดจนการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่างๆ

5) การจัดทำตัวอย่างแห้ง เก็บวัชพืชที่มีใบและดอกสมบูรณ์ ไม่ถูกแมลงทำลาย หากพืชมีขนาดเล็ก ควรมีราก ต้น ใบ –ดอก ครบ หากเป็นพืชไร้ดอก ควรมีส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ หรือลักษณะอื่นที่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดได้ อัดในแผงอัดพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 x30 เซนติเมตร อย่างน้อยชนิดละ 2 ตัวอย่าง เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่ – นิเวศน์ พืชอาศัย วัน-เวลา ชื่อผู้เก็บ เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

การบันทึกข้อมูล

- พื้นที่ บนทึก ที่ตั้ง พิกัดภูมิศาสตร์ และระดับความสูงเฉลี่ยเหนือระดับน้ำทะเล สภาพพื้นที่-นิเวศน์
- พืชปลูก บันทึกข้อมูล ชนิด อายุ หรือระยะพืชปลูก ความสูง การบังร่มเงาในพื้นที่
- ชนิดวัชพืชที่พบ บันทึกประเภท ลักษณะ ระยะการเจริญ การขยายพันธุ์ในพื้นที่ ความสูง ปริมาณที่พบ การกระจายในพื้นที่ และลักษณะการถูกทำลายจากศัตรูพืชอื่นในพื้นที่

เวลาและสถานที่

สถานที่ทำการทดลอง จังหวัดที่ทำการสำรวจ และกลุ่มวิจัยวัชพืชในปี 2557

ผลการทดลอง

พื้นที่สำรวจ ในปีงบประมาณ 2557 สำรวจพื้นทีโครงการหลวง จำนวน 7 แห่ง ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่

1. ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงอินทนนท์ เขตตำบลบ้านหลวง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ สูงจากระดับน้ำทะเล 1,260-1,400 เมตร พบพืชทั้ง 4 ชนิด คือ *Taraxacum officinale* G.H. Weber ex Wiggers. (Dandellion) (Figure 1) *Hypochaeris radicata* L. (False Dandelion) (Figure 2) *Polygonum capitatum* Buch.-Ham. ex D. Don (pinkhead smartweed) (Figure 3) และ *Cyathocline purpurea* (Buch Han ex D.Don) (Figure 4) ได้ตัวอย่างจำนวน 20 ตัวอย่าง

2. ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง ตำบลแม่วิน อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ สูงจากระดับน้ำทะเล 1,300-1,400 เมตร พบวัชพืชทั่วไป ที่มีรายงานแล้ว ได้ตัวอย่างจำนวน 54 ตัวอย่าง

3. ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่แฮ ตำบลแม่วิน อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ สูงจากระดับน้ำทะเล 1,200 เมตร พบวัชพืชทั่วไป ที่มีรายงานแล้ว ได้ตัวอย่างจำนวน 30 ตัวอย่าง

4. ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะป๊อก ตำบลแม่วิน อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ สูงจากระดับน้ำทะเล 580 เมตร พบ *Cyathocline purpurea* (Buch Han ex D.Don) (Figure 4)

5. ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ ตำบลแม่วิน อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ สูงจากระดับน้ำทะเล 1,200 เมตร พบวัชพืชทั่วไป ที่มีรายงานแล้ว ได้ตัวอย่างจำนวน 35 ตัวอย่าง

6. ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก อำเภอแม่ออน เชียงใหม่ สูงจากระดับน้ำทะเล 1,200 เมตร พบวัชพืชทั่วไป ที่มีรายงานแล้ว ได้ตัวอย่างจำนวน 17 ตัวอย่าง

7. ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย ตำบลแม่แรม อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ สูงจากระดับน้ำทะเล 850-1,460 เมตร พบวัชพืชทั่วไป ที่มีรายงานแล้ว ได้ตัวอย่างจำนวน 25 ตัวอย่าง

วัชพืชทั้งสี่ชนิดที่พบ สามารถสร้างเมล็ดที่ขยายพันธุ์ได้ แสดงว่า ทั้งสี่ชนิดสามารถตั้งตัว เจริญและขยายพันธุ์ได้ แต่ไม่พบการระบาดในพื้นที่อื่น เมื่อนำตัวอย่างพืชมาศึกษาต่อที่โรงเรือนของกลุ่มวิจัยวัชพืช ในกรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพมหานคร ปรากฏว่าพืชทั้ง 4 ชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ดี สร้างดอกได้

เอกสารอ้างอิง

ปวิณ ปุณศรี, เกษตรที่สูง (หนังสือที่ระลึกครบรอบ 8 ปีที่สถาบันค้นคว้าและพัฒนาระบบเกษตรในเขตวิกฤต : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2542), หน้า 38

นิรนาม. (ไม่ระบุปี.) ปัญหาชนิดพันธุ์ต่างถิ่น. ชนิดพันธุ์ต่างถิ่น. กลไกการเผยแพร่ข้อมูลข่าวสารความหลากหลายทางชีวภาพ. ออนไลน์]. แหล่งข้อมูล : http://chm-thai.onep.go.th/chm/alien/problem_Al.html. (10 พฤษภาคม 2555)

Harada, J.,Y. Paisooksantivatana, and S. Zungsontiporn. 1987. Project Manual no.3 Weeds in the Highlands of Northern Thailand: illustrated by color. National Weed Science Research Institute Project. Japan International Cooperation Agency and Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives. Thailand. Mass Medias. 126p.

ภาคผนวก

Figure 1 *Taraxacum officinale* G.H. Weber ex Wiggers. (Dandellion)

Figure 2 *Hypochaeris radicata* L. (False Dandelion)

Figure 3 *Polygonum capitatum* Buch.-Ham. ex D. Don (pinkhead smartweed)

Figure 4 *Cyathocline purpurea* (Buch Han ex D.Don)

ชนิดของแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย

Study of the Rare and Endanger Insects Species in the Southern Part Of Thailand

สุนัดดา เชาวลิต ชมัยพร บัวมาศ

อิทธิพล บรรณาการ เกศสุดา สนศิริ สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาชนิดของแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย เพื่อประเมินสถานภาพของแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ ให้ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง เขตการแพร่กระจาย พร้อมจัดทำฐานข้อมูลแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ซึ่งสามารถนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการ สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2557 จากแหล่งที่มีสภาพป่าอุดมสมบูรณ์ ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย จากการศึกษาครั้งนี้พบแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ ทั้งหมด 26 ตัวอย่าง จำแนกได้ 6 ชนิด ได้แก่ ผีเสื้อร่อนลมสยาม, *Idea leuconoe* (Lepidoptera: Danaidae) จำนวน 2 ตัวอย่าง ผีเสื้อค้างคาว, *Lyssa zampa* Butler (Lepidoptera: Uraniidae) จำนวน 2 ตัวอย่าง และด้วงดินปีกแผ่น, *Mormolyce phyllodes* Hegenb (Coleoptera: Carabidae) จำนวน 3 ตัวอย่าง หิ่งห้อยยักษ์, *Lampigera* sp. (Coleoptera: Lampyridae) จำนวน 4 ตัวอย่าง; *Diaphanes* sp.จำนวน 2 ตัวอย่าง และตั๊กแตนขาหนาม, *Heteropteryx dilatata* (Parkinson) (Phasmatodea, Phasmatidae) จำนวน 7 ตัวอย่าง ตัวอย่างแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ทั้งหมดนำเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

คำสำคัญ : แมลงหายาก แมลงใกล้สูญพันธุ์ ภาคใต้ ประเทศไทย

Rare Insects, Endanger Insects, Southern Part, Thailand

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-02-00-02-54

คำนำ

แมลงหายากในความหมายของพิพิธภัณฑ์แมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร หมายถึง แมลงที่พิจารณาจากตัวอย่างที่เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยเป็นชนิดที่จับได้เมื่อ 30-40 ปีมาแล้ว และสำรวจไม่พบแมลงชนิดนั้นอีก หรือพบแต่มีปริมาณน้อยมาก รวมทั้งแมลงที่มีอยู่ในบัญชีรายชื่อในอนุสัญญา CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) หรือ อนุสัญญาระหว่างประเทศว่าด้วยการค้า ซึ่งพืชและสัตว์ป่าที่กำลังสูญพันธุ์ ในบัญชีหมายเลข 2 องุ่น (2540) ได้รายงานว่าในประเทศไทยมีการค้าขายแมลงกันมาก จึงควรมีการอนุรักษ์แมลงที่หายากและสวยงามและได้ร่วมกับกรมป่าไม้กำหนดชนิดแมลงที่ต้องมีการอนุรักษ์ 13 ชนิด เป็นแมลงด้วงปีกแข็ง 4 ชนิด และผีเสื้อ 9 ชนิด เข้าไว้ใน พ.ร.บ.สงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า ปี พ.ศ.2535 เพื่อป้องกันการล่าและค้าแมลงที่หายากและใกล้สูญพันธุ์ นอกจากนี้ องุ่น (2543) รายงานว่าพบแมลงอนุรักษ์ 19 ชนิด ในประเทศไทย ในจำนวนนี้มี 13 ชนิด เป็นสัตว์คุ้มครอง ซึ่งประกาศอยู่ในบัญชีท้ายกฎกระทรวงฉบับที่ 4 (2537) ออกตามความในพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 และประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับกฤษฎีกา เล่ม 111 ตอนที่ 31 ก ลงวันที่ 16 พฤศจิกายน 2537

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางด้านแมลงสูงทั้งด้านจำนวนชนิดและปริมาณ แต่จากสภาพแวดล้อมปัจจุบันนี้เกิดสภาวะโลกร้อน (Global Warming) ที่หมายถึงการเปลี่ยนแปลงในระดับโลก อันเป็นผลมาจากกิจกรรมการเบียดเบียนและทำลายธรรมชาติ โดยไม่ตระหนักถึงคุณค่าและผลที่จะติดตามมา โดยเฉพาะปัญหาในการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซน์ (CO_2) สู่ชั้นบรรยากาศ ซึ่งก่อให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก การกระทำดังกล่าวก่อให้เกิด การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ (Climate Change) ซึ่งก็คือความเปลี่ยนแปลงของดิน ฟ้า อากาศ ในระดับโลก ระดับภูมิภาค หรือระดับท้องถิ่น ที่เกิดขึ้นแล้วในอดีต กำลังเกิดขึ้นในปัจจุบัน หรืออาจจะเกิดขึ้นในอนาคต (โชติชัย, 2552) และส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศของแมลง ประกอบกับแมลงบางชนิดมีรูปร่างแปลก สวยงาม เป็นที่ต้องการและแสวงหาเพื่อสะสมไว้เป็นสมบัติส่วนตัวหรือซื้อขายแลกเปลี่ยน จึงมีการล่าจับแมลงกันมากเพื่อประโยชน์ทางการค้า จากปัญหาของระบบนิเวศที่เปลี่ยนแปลงไปรวมทั้งมีธุรกิจค้าแมลงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วนี้ ทำให้น่าเป็นห่วงว่าแมลงอาจขาดแหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารหรือถูกจับไปเป็นจำนวนมาก มีผลให้แมลงบางชนิดที่มีปริมาณน้อยอยู่แล้วในธรรมชาติอาจสูญพันธุ์ไปได้ ดังนั้นจึงได้ดำเนินการศึกษาชนิดของแมลงอนุรักษ์โดยเฉพาะแมลงที่สวยงามและหายาก ซึ่งมีการล่า การค้ามากไม่ให้สูญพันธุ์ไปจากประเทศไทย โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคใต้นั้นยังมีทรัพยากรธรรมชาติที่อุดมสมบูรณ์ มีสภาพป่าเป็นป่าดิบชื้น มีความหลากหลายทางชีวภาพรวมถึงความหลากหลายของชนิดแมลง และพื้นที่ดังกล่าวยังไม่มีการศึกษาชนิดของแมลงอนุรักษ์ ดังนั้นจึงได้เนินการศึกษาชนิดแมลงอนุรักษ์ โดยเฉพาะแมลงที่สวยงามและหายาก และจากข้อมูลที่ได้ยังก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการประเมินสถานภาพของแมลงหายาก แมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ และแมลงที่สูญพันธุ์แล้วได้อีกด้วย

การรวบรวมและเก็บรักษาตัวอย่างแมลง แมลงศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ แมลงหายาก/ใกล้สูญพันธุ์ ในพิพิธภัณฑ์ และทั้งการจัดทำฐานข้อมูล พบว่าได้มีการจัดพิมพ์เอกสารวิชาการการเก็บรักษาตัวอย่างแมลงเพื่อการศึกษาวิจัยสำหรับแนะนำการเก็บและรักษาตัวอย่างแมลงก่อนนำส่ง เพื่อขอรับบริการการตรวจวิเคราะห์นอกจากนี้ ศิริณี (2545ก.) ยังได้จัดพิมพ์เอกสารเรื่อง พิพิธภัณฑ์-นิทรรศการแมลง และพิพิธภัณฑ์แมลง (ศิริณี, 2545ข.)

จากการสืบค้นข้อมูลแมลงในพิพิธภัณฑ์แมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เพื่อประกอบการวิเคราะห์ชนิดแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย พบว่ามีแมลงหลายชนิดที่สำรวจไม่พบมาเป็นเวลานานกว่า 30 ปี หรือสำรวจพบแต่มีปริมาณน้อยมาก ได้แก่

ผีเสื้อถุงทองปักษ์ใต้ *Troides amphrysus* Cramer (Lepidoptera: Papilionidae) ปัจจุบันมีตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์แมลงทั้งหมด 4 ตัวอย่าง สำรวจพบเมื่อ พ.ศ. 2502 จำนวน 1 ตัวอย่าง, พ.ศ. 2503 จำนวน 1 ตัวอย่าง และ พ.ศ. 2549 จำนวน 2 ตัวอย่าง

ผีเสื้อถุงทองป่าสูง *Troides helena* Linnaeu (Lepidoptera: Papilionidae) ปัจจุบันมีตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์แมลงทั้งหมด 2 ตัวอย่าง สำรวจพบเมื่อ พ.ศ. 2503 จำนวน 1 ตัวอย่าง และ พ.ศ. 2515 จำนวน 1 ตัวอย่าง

ผีเสื้อหางติ่งสะพายเขียว *Papilio palinurus* Fabricius (Lepidoptera: Papilionidae) ปัจจุบันมีตัวอย่างแมลงทั้งหมด 6 ตัวอย่าง สำรวจพบเมื่อ พ.ศ. 2458 จำนวน 1 ตัวอย่าง, พ.ศ. 2478 จำนวน 1 ตัวอย่าง, พ.ศ. 2502 จำนวน 2 ตัวอย่าง, พ.ศ. 2523 จำนวน 1 ตัวอย่าง และมี 1 ตัวอย่างที่ไม่ระบุช่วงเวลา

ผีเสื้อนางพญากอดเฟรย์ *Stichophthalma godfreyi* Rothschild (Lepidoptera: Amathusiidae) ปัจจุบันมีตัวอย่างแมลง 1 ตัวอย่าง สำรวจพบเมื่อ พ.ศ. 2519

ผีเสื้อหางยาวตาเคียวปีกลายหยัก *Actias maenas* Doubleday (Lepidoptera: Saturniidae) ปัจจุบันมีตัวอย่างแมลงทั้งหมด 5 ตัวอย่าง สำรวจพบเมื่อ พ.ศ. 2512 จำนวน 1 ตัวอย่าง, พ.ศ. 2513 จำนวน 1 ตัวอย่าง และ พ.ศ. 2540 จำนวน 1 ตัวอย่าง

ด้วงไวโอลิน *Mormolyce phyllodes* Hagenbach (Coleoptera: Carabidae) ปัจจุบันมีตัวอย่างแมลงทั้งหมด 6 ตัวอย่าง สำรวจพบเมื่อ พ.ศ. 2482 จำนวน 1 ตัวอย่าง, พ.ศ. 2496 จำนวน 1 ตัวอย่าง, พ.ศ. 2549 จำนวน 3 ตัวอย่าง และมี 1 ตัวอย่างที่ไม่ระบุช่วงเวลาเก็บ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1) ตัวอย่างแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ ที่รวบรวมได้จากแหล่งที่มีสภาพป่าอุดมสมบูรณ์

2) อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง ชุดกับดักแสงไฟ (จอผ้าขาวขนาด 3×3 เมตร หลอดไฟแสงจันทร์, หลอดไฟแสงสีม่วง) ขวดฆ่า ขวดดอง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง ถังรักษาความเย็น

3) สารเคมีต่างที่ใช้เก็บตัวอย่างแมลง เช่น เอทิลอะซีเตท แอลกอฮอล์ 80%

4) กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereomicroscope ,compound microscope และกล้องถ่ายภาพ

5) อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา roting และกระดาษไขเขียนแบบ

6) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์

วิธีการ

1) สืบค้นข้อมูลแมลงในพิพิธภัณฑ์แมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เพื่อประกอบการวิเคราะห์ชนิดแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย

2) สำรวจและรวบรวมตัวอย่างแมลงจากแหล่งที่มีสภาพป่าอุดมสมบูรณ์ เช่น จากสวนพฤกษศาสตร์ สถานีวิจัย และบริเวณที่มีป่าไม้อุดมสมบูรณ์ต่างๆ ในเขตพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย โดยใช้ข้อมูลการสำรวจพบแมลงจากพิพิธภัณฑ์แมลงเป็นแนวทางในการวางแผนการออกสำรวจ โดยออกสำรวจทุกๆ 2 เดือน ในระยะเวลา 5 ปี

3) บันทึกลักษณะของพื้นที่ที่ทำการสำรวจแมลง รวมทั้งเก็บรายละเอียดเกี่ยวกับความชื้นสัมพัทธ์ อุณหภูมิ ความสูงจากระดับน้ำทะเล วันเดือนปี ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง และสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง

4) นำตัวอย่างแมลงที่รวบรวมได้ มาจัดรูปร่างและตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิดจากลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น รูปร่างลักษณะ ขนาด และสี เป็นต้น โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดแมลง ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ ซึ่งทำให้ทราบถึงชนิดของแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์

5) บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงโดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของแมลงแต่ละตัว โดยบันทึกรายละเอียดของแมลงชนิดต่างๆที่สำรวจพบ และข้อมูลอื่นที่สำคัญ ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่พบตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

6) นำข้อมูลและตัวอย่างแมลงที่บันทึกได้เปรียบเทียบกับข้อมูลและตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์โดยดูจำนวนที่มีในพิพิธภัณฑ์ ปีที่จับได้ครั้งสุดท้าย ศึกษาค้นคว้าข้อมูลจากเอกสารต่างๆ ถึงสถานภาพความมากน้อยของแมลงเหล่านั้น

7) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบการเก็บรักษาตัวอย่างสากล โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล

8) สรุปและจัดทำรายงานผลการวิจัย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำการวิจัยต่อไป

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น เดือนตุลาคม 2553 – สิ้นสุด เดือนกันยายน 2558

สถานที่ พื้นที่ป่าอุดมสมบูรณ์ทางภาคใต้ของประเทศไทย และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงกลุ่มกีฏและสัตวิวทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาชนิดของแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย โดยมีพื้นที่การสำรวจทั้งหมด 10 จังหวัด จังหวัด ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ระนอง พังงากระบี่ และภูเก็ต แบ่งเป็นช่วงเวลาการสำรวจแต่ละปี พบว่า

การสำรวจใน พ.ศ. 2554 พบแมลงหายาก 1 ชนิด จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ผีเสื้อร่อนลมสยาม, *Idea leuconoe* Erichon (Lepidoptera, Danaidae) สำรวจพบที่จังหวัดภูเก็ต

การสำรวจใน พ.ศ. 2555 พบแมลงหายาก 2 ชนิด จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ ผีเสื้อค้างคาว, *Lyssa zampa* Butler (Lepidoptera, Uraniidae) จำนวน 2 ตัวอย่าง สำรวจพบที่จังหวัดภูเก็ต กระบี่ และสุราษฎร์ธานี ด้วงดินปีกแผ่น, *Mormolyce phyllodes* Hegenb (Coleoptera, Carabidae) จำนวน 3 ตัวอย่าง สำรวจพบที่จังหวัดระนอง สุราษฎร์ธานี และภูเก็ต

การสำรวจใน พ.ศ. 2556 พบแมลงหายาก 2 ชนิด จำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่หิ่งห้อยยักษ์หรือหิ่งห้อยช้าง, *Lamprigera* sp. (Coleoptera, Lampyridae) จำนวน 4 ตัวอย่าง สำรวจพบที่จังหวัดชุมพร และตรัง ตั๊กแตนขาหนาม, *Heteropteryx dilatata* (Parkinson) (Phasmatodea, Phasmatidae) จำนวน 2 ตัวอย่าง สำรวจพบที่จังหวัดภูเก็ต

การสำรวจใน พ.ศ. 2557 พบแมลงหายาก 3 ชนิด จำนวน 13 ตัวอย่าง ได้แก่หิ่งห้อยยักษ์หรือหิ่งห้อยช้าง, *Lamprigera* sp. (Coleoptera, Lampyridae) จำนวน 6 ตัวอย่าง สำรวจพบที่จังหวัดชุมพร และตรัง หิ่งห้อย Diaphanes, *Diaphanes* sp. (Coleoptera, Lampyridae) จำนวน 2 ตัวอย่าง สำรวจพบที่จังหวัดชุมพร ตั๊กแตนขาหนาม, *Heteropteryx dilatata* (Parkinson) (Phasmatodea, Phasmatidae) จำนวน 5 ตัวอย่าง สำรวจพบที่จังหวัดระยอง

รายละเอียดแมลงหายากใกล้สูญพันธุ์แต่ละชนิด

Idea leuconoe Erichson (Figure 1 A)

อันดับ (Order) Lepidoptera

วงศ์ (Family) Danaidae

ชื่อสามัญ (Common name) ผีเสื้อร่อนลมสยาม (Siam Tree Nymph)

ลักษณะสำคัญ

ขนาดลำตัววัดจากขอบปีกด้านหนึ่งถึงขอบปีกอีกด้านหนึ่งกว้าง 12.6 เซนติเมตร ลำตัวเรียวยาว หัวสีดำ อกและปล้องท้องสีขาวสลับดำ ปีกคู่หน้าพื้นปีกสีขาว เส้นปีกสีดำมีจุดสีตดกระจายทั่วทั้งปีก คล้ายผีเสื้อร่อนลมน้อยและร่อนลมมลายู แตกต่างกันที่ตำแหน่งของจุด และขนาดปีกที่ใหญ่กว่าปีกคู่หลังคล้ายปีกคู่หน้า

แหล่งที่สำรวจพบ: อำเภอถลาง จังหวัดภูเก็ต

สถานภาพ: เป็นแมลงหายากใกล้สูญพันธ์

Lyssa zampa **Butler** (**Figure** 1 B)

อันดับ Lepidoptera

วงศ์ Uraniidae

ชื่อสามัญ ผีเสื้อค้างคาว: Giant Uranid Moth, Long-tailed Moth

ลักษณะสำคัญ

ขนาดลำตัววัดจากขอบปีกด้านหนึ่งถึงขอบปีกอีกด้านหนึ่งกว้าง 11.0-14.0 เซนติเมตร ลำตัวมีขนสีน้ำตาลเทาปกคลุม ปีกค่อนข้างบอบบาง ลวดลายปีกเพศผู้และเพศเมียคล้ายกันแต่เพศผู้สีเข้มกว่า ปีกคู่หน้าและคู่หลังมีแถบสีขาวพาดขวางปีก ปีกคู่หลังขอบปีกด้านนอกมีติ่งคล้ายหางสองติ่งปลายติ่งที่ยาวมีสีขาว

แหล่งที่สำรวจพบ : จังหวัด กระบี่ และสุราษฎร์ธานี

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย: จังหวัดกรุงเทพมหานคร เชียงใหม่ นครศรีธรรมราช อุทัยธานี นครราชสีมา

สถานภาพ: เป็นแมลงที่กำหนดไว้ในบัญชีรายชื่อของอนุสัญญา CITES

Mormolyce phyllodes **Hegenb** (Figure 1 C)

อันดับ Coleoptera

วงศ์ Carabidae

ชื่อสามัญ ด้วงดินปีกแผ่น : Violin Beetle

ลักษณะสำคัญ

เป็นด้วงในวงศ์ด้วงดิน มีลักษณะเด่นที่มีรูปร่างคล้ายไวโอลิน จึงเรียก “Violin Beetle” ลำตัวและปีกมีลักษณะแบน สีน้ำตาลคล้ายใบไม้แห้ง อกที่มีรูปร่างคล้ายหอก ขอบหยักไม่เป็นระเบียบ ปีกขรุขระ ขอบเรียบ รูปโค้งมนได้รูป

แหล่งที่สำรวจพบ: จังหวัดระนอง สุราษฎร์ธานี และภูเก็ต

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย: จังหวัดชัยภูมิ พิษณุโลก เชียงใหม่ นครราชสีมา ตรัง ลำปาง เลย นครนายก อุทัยธานี มีรายงานการพบเฉพาะในคาบสมุทรตอนใต้ของไทย ตั้งแต่จังหวัด

นครศรีธรรมราช จนถึงประเทศมาเลเซีย จากข้อมูลการสำรวจในระหว่างปี 2547-2548 พบติดกับดักแสงไฟในท้องที่จังหวัดนครศรีธรรมราช ตรัง นราธิวาส และเพชรบุรี

สถานภาพ: เป็นแมลงที่กำหนดไว้ในบัญชีรายชื่อของอนุสัญญา CITES และในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร มีตัวอย่างทั้งหมด 6 ตัวอย่าง สำรวจพบเมื่อ พ.ศ. 2482 จำนวน 1 ตัวอย่าง, พ.ศ. 2496 จำนวน 1 ตัวอย่าง, พ.ศ. 2549 จำนวน 3 ตัวอย่าง และมี 1 ตัวอย่างที่ไม่ระบุช่วงเวลาเก็บ

Lampigera sp. (Figure 1 D)

อันดับ Coleoptera

วงศ์ Lampyridae

ชื่อสามัญ หิ่งห้อยยักษ์, หิ่งห้อยช้าง (Giant Firefly)

ลักษณะสำคัญ

ตัวเต็มวัยเพศผู้มีปีกขนาดลำตัว 2 เซนติเมตร หัวสีดำ ปล้องออกมีแผ่นแข็งสีน้ำตาลอ่อนขยายคลุมอกทั้งสามปล้อง ปีก 2 คู่สีน้ำตาลเทาปกคลุมส่วนท้อง ปล้องทำแสงตั้งอยู่ที่ปล้องท้องสองปล้องสุดท้าย กระพริบแสงส่งสัญญาณเพื่อการสื่อสารในการดำรงชีวิตหรือหาคู่ผสมพันธุ์ ตัวเต็มวัยเพศเมียไม่มีปีกลักษณะเหมือนหนอนมีขนาดค่อนข้างใหญ่ลำตัวยาวถึง 6-10 เซนติเมตร มีแผ่นแข็งหุ้มลำตัวสีขาว-น้ำตาลอ่อน ต่างจากตัวหนอนที่มีแผ่นแข็งบริเวณหัวและอกสีน้ำตาลเข้ม บริเวณลำตัวสีดำ อวัยวะทำแสงอยู่ที่ปล้องท้องปล้องสุดท้าย

แหล่งที่สำรวจพบ: จังหวัดระนอง สุราษฎร์ธานี และภูเก็ต

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง แม่ฮ่องสอน จันทบุรี ชุมพร นครศรีธรรมราช พัทลุง และตรัง

สถานภาพ: เป็นแมลงหายากใกล้สูญพันธ์

Diaphanes sp. (Figure 1 E)

อันดับ Coleoptera

วงศ์ Lampyridae

ชื่อสามัญ หิ่งห้อยไดฟาเนส (Diaphanes firefly)

ลักษณะสำคัญ

ลำตัวแบนมีขนาดยาว 1-1.5 เซนติเมตร กว้าง 0.3-0.4 เซนติเมตร ส่วนหัวสีส้มมีลักษณะแบนแผ่ขยายกว้าง หนวดสีดำ ปีกคู่หนึ่สีส้ม บริเวณขอบปีกด้านในมีสีดำเห็นได้ชัดเจน ขาทั้งสามคู่สีดำ

แหล่งที่สำรวจพบ: จังหวัดชุมพร

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย: เชียงใหม่ แพร่ น่าน ลพบุรี อุทัยธานี และเพชรบุรี

Heteropteryx dilatata (Parkinson) (Figure 1 F)

อันดับ Phasmatodea

วงศ์ Phasmatidae

ชื่อสามัญ ตั๊กแตนขาหนาม (jungle nymph)

ลักษณะสำคัญ

ตัวเต็มวัยเพศเมียมีขนาดลำตัวยาวประมาณ 150 เวนติเมตร ลำตัวสีเขียว หนวดแบบเส้นด้าย ยาวมากกว่าปล้องอก หัว อก และท้องมีหนามกระจายอยู่ทั่วไป ปีกคู่หน้าสั้นกว่าท้อง ปีกคู่หลังมีขนาดเล็กซ่อนอยู่ใต้ปีกคู่หน้า ขามีหนาม ปล้องท้องขยายใหญ่ ปล้องปลายแหลม เพศผู้สีน้ำตาลขนาดเล็กกว่าเพศเมีย

แหล่งที่สำรวจพบ: จังหวัดภูเก็ต ระนอง

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย: ระนอง **ตรัง กระบี่ และ**ภูเก็ต

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการศึกษาชนิดของแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย เพื่อประเมินสถานภาพของแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ ให้ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง เขตการแพร่กระจาย พร้อมจัดทำฐานข้อมูลแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ซึ่งสามารถนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการ สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2557 จากแหล่งที่มีสภาพป่าอุดมสมบูรณ์ ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย จากการศึกษาครั้งนี้พบแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ ทั้งหมด 26 ตัวอย่าง จำแนกได้ 6 ชนิด ได้แก่ ผีเสื้อร่อนลมสยาม, *Idea leuconoe* (Lepidoptera: Danaidae) จำนวน 2 ตัวอย่าง ผีเสื้อค้างคาว, *Lyssa zampa* Butler (Lepidoptera: Uraniidae) จำนวน 2 ตัวอย่าง และด้วงดินปีกแผ่น, *Mormolyce phyllodes* Hegenb (Coleoptera: Carabidae) จำนวน 3 ตัวอย่าง หิ่งห้อยยักษ์, *Lampigera* sp. (Coleoptera: Lampyridae) จำนวน 4 ตัวอย่าง; *Diaphanes* sp.จำนวน 2 ตัวอย่าง และตั๊กแตนขาหนาม, *Heteropteryx dilatata* (Parkinson) (Phasmatodea, Phasmatidae) จำนวน 7 ตัวอย่าง ตัวอย่างแมลงหายากและใกล้สูญพันธุ์ทั้งหมดนำเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

การศึกษาแมลงหายากใกล้สูญพันธุ์ นอกจากจะมีประโยชน์อย่างมาก ต่อการประเมินสถานภาพของแมลงที่พบ และเป็นโอกาสให้ผู้วิจัยได้ค้นหาพืชอาหาร เพื่อที่จะสามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณและปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ ข้อมูลทั้งหมดที่ได้ยังเป็นประโยชน์ในการจัดทำฐานข้อมูลทรัพยากรพันธุกรรมของแมลงหายากใกล้สูญพันธุ์ในประเทศไทย เพื่อเป็นแหล่งสืบค้นของนักวิชาการ นักเรียน นักศึกษาและบุคคลทั่วไป อีกทั้งเป็นข้อมูลสนับสนุน / ยืนยัน / เพิ่มเติม ในการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงอนุรักษ์ของประเทศไทย ตามบัญชีรายชื่ออนุสัญญา CITES ดังนั้น ควรมีการศึกษาวิจัยในเรื่องนี้อย่างจริงจังและต่อเนื่องไม่มีวันสิ้นสุด หากต้องการที่จะฟื้นฟู ปรับปรุง

สภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับแมลงหายากใกล้สูญพันธุ์ชนิดต่างๆ อันจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งทั้งทางตรงและทางอ้อม ในการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมแมลงหายากใกล้สูญพันธุ์ให้คงอยู่ในธรรมชาติอย่างสมดุลและยั่งยืนตลอดไป

เอกสารอ้างอิง

โชติชัย สุวรรณาภรณ์ . 2552. ผลกระทบ และแนวทางการแก้ไขปัญหา Climate Change. สำนักงานเศรษฐกิจการคลัง.

ศิริณี พูนไชยศรี. 2545ก. พิพิธภัณฑ์นิทรรศการแมลง. แผ่นพับ. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตรกรุงเทพฯ. พิมพ์ครั้งที่ 1.

ศิริณี พูนไชยศรี. 2545ข. พิพิธภัณฑ์แมลง. แผ่นพับ. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร,

องุ่น ลิ่ววานิช. 2540. การอนุรักษ์แมลงในประเทศไทย. ว. กีฏ. สัตว. 19(2): 95-99.

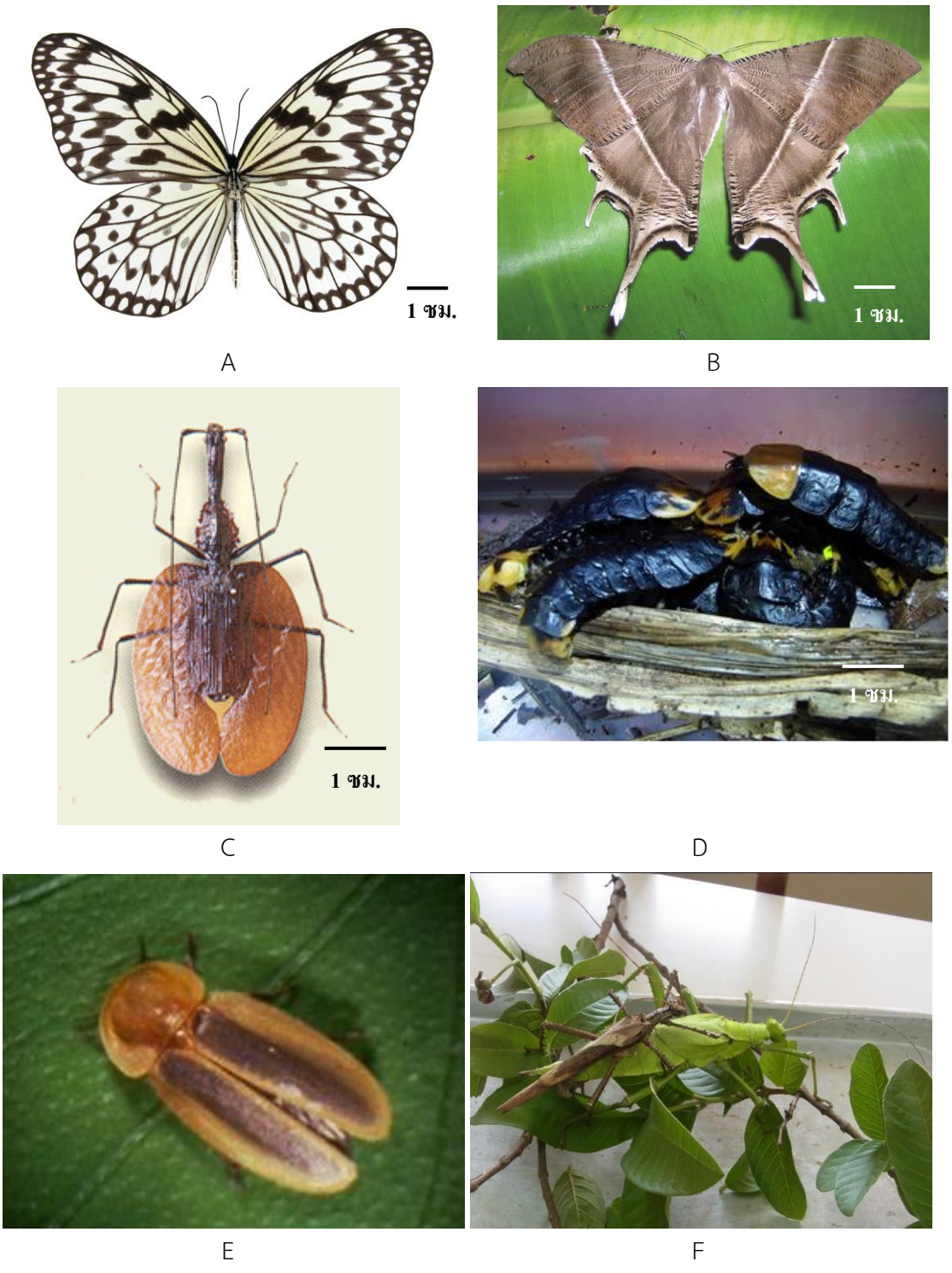
องุ่น ลิ่ววานิช และ สุระ พิมพะสาลี. 2543. แมลงอนุรักษ์. เอกสารวิชาการแผ่นพับ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

Hollaway, J. D. 2530. The Moth of Borneo. United Selangor Press Sdn., Bhd., Kuala Lampur, Malaysia.

ภาคผนวก

Table 1 The Species of Rare and Endanger Insects Species in the Southern Part of Thailand

	Scientific name	Common name	Host	Distribution	Number Of specimens
1	*Idea leuconoe* Erichson (Lepidoptera: Danaidae)	Siam Tree Nymph	-	Phuket	2
2	*Lyssa zampa* Butler (Lepidoptera: Uraniidae)	Giant Uranid Moth	-	Krabi Surat Thani	2
3	*Mormolyce phyllodes* Hegenb (Coleoptera: Carabidae)	Violin Beetle	millipedes Nightcrawler	Ranong Surat Thani Phuket	3
4	*Lampigera* sp. (Coleoptera: Lampyridae	Giant Firefly	Snail	Trang, Chumphon	10
5	*Diaphanes* sp. (Coleoptera: Lampyridae	Diaphanes firefly	Snail	Chumphon	2
6	*Heteropteryx dilatata* (Parkinson) (Phasmatodea, Phasmatidae)	jungle nymph	Siamese rough bush	Phuket Ranong	7



A B C D E F

Figure 1 Rare and Endanger Insects Species in the Southern Part of Thailand

A. Siam tree nymph, *Idea leuconoe* B. giant uranid moth, *Lyssa zampa* Butler

C. violin beetle, *Mormolyce phyllodes* Hegenb

D. giant firefly, *Lampigera* sp. E. diaphanes firefly, *Diaphanes* sp.

F. jungle nymph, *Heteropteryx dilatata* (Parkinson)

ความหลากชนิดของแมลงปออันดับโอโดนาทา (Odonata) ในภาคเหนือของประเทศไทย

Species Diversity of Dragonflies in Order Odonata in the Northern Part of Thailand

อิทธิพล บรรณาการ จารุวัตถ์ แต้กุล สุนัดดา เชาวลิต
ชมัยพร บัวมาศ เกศสุดา สนศิริ สิทธิศิโรดมภ์ แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สำรวจ รวบรวมแมลงปอในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนกันยายน 2557 นำตัวอย่างแมลงปอที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดแมลงปอได้ 5 วงศ์ (Family) 5 ชนิด 277 ตัวอย่าง ซึ่งจัดอยู่ในอันดับ (Order) Odonata อันดับย่อย Anisoptera วงศ์ Aeshnidae คือ แมลงปอยักษ์ *Gynacantha* sp. 13 ตัวอย่าง วงศ์ Gomphidae คือ แมลงปอเสือลาย *Gomphidictinus perakensis* (Laidlaw) 27 ตัวอย่าง วงศ์ Libellulidae คือ แมลงปอบ้านใต้โคนปีกดำ *Trithemis festiva* (Rambur) 135 ตัวอย่าง อันดับย่อย Zygoptera วงศ์ Chlorocyphidae คือแมลงปอน้ำตก *Libellago lineata* (Burmeister) 60 ตัวอย่าง และวงศ์ Lestidae คือ แมลงปอเข็มป่าปีกลาย *Orolestes octomaculatus* (Martin) 42 ตัวอย่าง การทดลองเรื่องนี้ยังไม่สิ้นสุดต้องดำเนินการต่อในปี 2558

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-02-00-03-54

คำนำ

ในจำนวนแมลงทั้งหลายแมลงปอนับว่าเป็นแมลงที่มีขนาดใหญ่และสีสันสวยงามชนิดหนึ่ง เป็นแมลงที่คุ้นเคยและอยู่ใกล้ตัวมนุษย์ แมลงปอเป็นสัตว์ที่ล่าสัตว์อื่นกินเป็นอาหาร ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัย มีธรรมชาติของการเป็นตัวห้ำตลอดชีวิต กินแมลงเกือบทุกชนิดและทุกตัวที่อ่อนแอกว่า เช่น ยุง ริ้น แมลงวัน ผีเสื้อ ผึ้ง รวมทั้งแมลงปอด้วยกันเอง แมลงปอเป็นสัตว์ที่ไม่มีอันตรายต่อมนุษย์ มีประโยชน์สำหรับการควบคุมทางชีวภาพ และสามารถเป็นตัวบ่งชี้ถึงความอุดมสมบูรณ์ของสภาพแวดล้อมได้เป็นอย่างดี (Charles and Norman, 2005) แมลงปอจะหายไปถ้าน้ำเริ่มสกปรกและเน่าเสีย ประเทศไทยมีการค้นพบแมลงปอมากกว่า 295 ชนิด แต่เนื่องจากภาวะโลกร้อน สถานการณ์ป่าไม้ และแหล่งน้ำในประเทศไทยถูกทำลายจนเหลือน้อยลง ทำให้การศึกษาและค้นพบแมลงปอเป็นไปด้วยความยากลำบากมากขึ้น เพราะป่าไม้เป็นที่อยู่เพียงแหล่งเดียวที่เหมาะสมกับแมลงปอมากที่สุด ถึงแม้ว่าเราจะสามารถปลูกป่าทดแทนได้แต่สภาพแวดล้อมก็ไม่สมบูรณ์เท่ากับในธรรมชาติ ปัจจุบันสภาพทางภูมิศาสตร์และสภาพแวดล้อมทางตอนเหนือของประเทศไทยนั้นมีความอุดมสมบูรณ์มากกว่าภูมิภาคอื่นๆ ทั้งในเรื่องของสภาพอากาศ พื้นที่ป่าไม้ แม่น้ำ และน้ำตก อาทิ ลักษณะภูมิประเทศของจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง และลำพูน มีทั้งพื้นที่ภูเขา พื้นที่ป่าต้นน้ำลำธาร พื้นที่ราบลุ่มน้ำ ที่ราบเชิงเขา และพื้นที่เกษตรกรรม จึงเป็นพื้นที่ที่มีความเหมาะสมสำหรับการศึกษาความหลากชนิดของแมลงปอ การศึกษาความหลากชนิดและการเก็บรวมรวมตัวอย่างแมลงปอจะได้จำนวนตัวอย่างแมลงปอและข้อมูลที่เป็นประโยชน์อย่างมาก ในการศึกษาถึงจำนวนชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ และเขตการแพร่กระจายของแมลงปอในภาคเหนือ รวมถึงสภาพความอุดมสมบูรณ์ของสิ่งแวดล้อม รวมทั้งได้ตัวอย่างแมลงปอเพื่อเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง เพื่อใช้เป็นแหล่งข้อมูล สืบค้น อ้างอิง สำหรับนักวิชาการ นักวิจัย นิสิต นักศึกษา เกษตรกร อีกด้วย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

ตัวอย่างตัวเต็มวัยแมลงปอและตัวอ่อนที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช พื้นที่ป่าไม้ แม่น้ำ และน้ำตก อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง ขวดฆ่าที่บรรจุสารเอทิลอะซีเตท ขวดดอง ปากคีบพู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง ถังรักษาความเย็น อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง ได้แก่ เข็มไร้สนิม เข็มหมุดหัวกลม ไม้จัดรูปร่างแมลง ปากคีบ โหลชื้น ตู้อบแมลง อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น alcohol 50-100%, sodium hydroxide 10%, clove oil และ canada balsam เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องสไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope กล้องถ่ายภาพ อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา rotring และกระดาษไขเขียนแบบ เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของแมลงปอ

วิธีการ

สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของแมลงปอจากเอกสารวิชาการที่เกี่ยวข้อง ดำเนินการสำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างในเขตภาคเหนือตอนบน (เชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง ลำพูน แพร่) สำรวจและเก็บตัวอย่างแมลงปอทุกๆ 2 เดือน เดินสำรวจแมลงปอ โดยเฉพาะบริเวณใกล้แหล่งน้ำในพื้นที่เกษตรกรรม ที่ราบเชิงเขา พื้นที่ราบลุ่มน้ำ พื้นที่ป่าต้นน้ำลำธาร พื้นที่ภูเขา ถ่ายภาพและเก็บตัวอย่าง โดยใช้สวิงช้อนตัวอ่อนในแหล่งน้ำ เก็บรักษาในหลอดบรรจุแอลกอฮอล์ 80% และใช้สวิงโฉบตัวเต็มวัยและในขวดฆ่าที่บรรจุสารเอทิลอะซิเตท หลังจากแมลงปอตายต้องจัดส่วนหางซึ่งมีลักษณะผอมเรียวบางและหักง่ายให้มีสภาพคงเดิม โดยใช้เส้นขนที่มีความแข็ง (ขนหมูหรือขนหางม้า) แทงผ่านจากส่วนอกไปยัง ส่วนท้องแต่ไม่ให้สุดปลายส่วนท้อง เพราะอวัยวะสืบพันธุ์เป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการวิเคราะห์จะเสียหาย เก็บตัวเต็มวัยในซองกระดาษรูปสามเหลี่ยม บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น รูปร่าง ลักษณะ ขนาด สี วัน เดือนปี ชื่อผู้เก็บ สภาพแวดล้อม อุณหภูมิ และพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) เป็นต้น นำแมลงปอที่รวบรวมไปจัดรูปร่าง (set) ตามวิธีการของ Poonchaisri (2004) และนำมาศึกษาชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดของ Charles and Johnson (2005) Paulson (2009) และ พิสุทธิ์ (2541) รวมทั้งศึกษาเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของขวดดองตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุล และชนิดของแมลงปอ ที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง เพื่อใช้ในการตรวจสอบสืบค้นและอ้างอิง

เวลาและสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2556 ถึง เดือนกันยายน 2557

สถานที่ 1. เขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย (เชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง ลำพูน แพร่)

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สามารถจำแนกชนิดแมลงปอได้ 5 วงศ์ (Family) 5 ชนิด 277 ตัวอย่าง ซึ่งจัดอยู่ในอันดับ (Order) Odonata อันดับย่อย Anisoptera วงศ์ Aeshnidae คือ แมลงปอยักษ์ *Gynacantha* sp. 13 ตัวอย่าง วงศ์ Gomphidae คือ แมลงปอเสือลาย *Gomphidictinus perakensis* (Laidlaw) 27 ตัวอย่าง วงศ์ Libellulidae คือ แมลงปอบ้านใต้โคนปีกดำ *Trithemis festiva* (Rambur) 135 ตัวอย่าง อันดับย่อย Zygoptera วงศ์ Chlorocyphidae คือ แมลงปอน้ำตก *Libellago lineata*

(Burmeister) 60 ตัวอย่าง และวงศ์ Lestidae คือ แมลงปอเข็มป่าปีกลาย *Orolestes octomaculatus* (Martin) 42 ตัวอย่าง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาความหลากชนิดของแมลงปออันดับโอโดนาทา (Odonata) ในภาคเหนือของประเทศไทย โดยการสำรวจ รวบรวมแมลงปอในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึง เดือนกันยายน 2557 โดยเฉพาะบริเวณใกล้แหล่งน้ำในพื้นที่เกษตรกรรม ที่ราบเชิงเขา พื้นที่ราบลุ่มน้ำ พื้นที่ป่าต้นน้ำลำธาร พื้นที่ภูเขา ถ่ายภาพและเก็บตัวอย่าง นำตัวอย่างแมลงปอที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดแมลงปอได้ 5 วงศ์ (Family) 5 ชนิด 277 ตัวอย่าง ซึ่งจัดอยู่ในอันดับ (Order) Odonata อันดับย่อย Anisoptera วงศ์ Aeshnidae คือ แมลงปอยักษ์ *Gynacantha* sp. 13 ตัวอย่าง วงศ์ Gomphidae คือ แมลงปอเสือลาย *Gomphidictinus perakensis* (Laidlaw) 27 ตัวอย่าง วงศ์ Libellulidae คือ แมลงปอบ้านใต้โคนปีกดำ *Trithemis festiva* (Rambur) 135 ตัวอย่าง อันดับย่อย Zygoptera วงศ์ Chlorocyphidae คือ แมลงปอน้ำตก *Libellago lineata* (Burmeister) 60 ตัวอย่าง และวงศ์ Lestidae คือ แมลงปอเข็มป่า ปีกลาย *Orolestes octomaculatus* (Martin) 42 ตัวอย่าง การทดลองเรื่องนี้ยังไม่สิ้นสุดต้องดำเนินการต่อในปี 2558

เอกสารอ้างอิง

พิสุทธิ์ เอกอำนวย. 2541. แมลงปอของไทย Dragonflies and Damselflies from Thailand. พิมพ์ครั้งที่ 2. บริษัท เลิฟแอนด์ลิพเพรส จำกัด. 168 หน้า.

Charles, A. T. and N. F. Johnson. 2005. Borror and Delong's Introduction to the Study of Insects. 7th ed. Brooks/Coles. USA. 864 p.

Paulson, D. 2009. Dragonflies and Damselflies of the west. Princeton University Press. New Jersy, USA. 535 p.

Poonchaisri, S. 2004. Preserving Insect Specimens for Research. The Agricultural Co-Operative Ferderation of Thailand., Limited. Bangkok. 32 p.

ภาคผนวก

Gynacantha sp.

Gomphidictinus perakensis (Laidlaw)

Trithemis festiva (Rambur)

Libellago lineata (Burmeister)

Orolestes octomaculatus (Martin)

การผลิตชุดตรวจสอบ *Bean yellow mosaic virus* สำเร็จรูปโดยเทคนิค Gold labeling IgG flow test

Production of Gold labeling IgG flow test for detecting *Bean yellow mosaic virus*

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล กาญจนา วาระวิชะนี

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการศึกษา Gold Labeling IgG Flow Test (GLIFT) ในการตรวจเชื้อ *Bean yellow Mosaic virus* (BYMV) โดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยาและ lateral flow technique บนแผ่น nitrocellulose membrane ที่ใช้ทดสอบ 7 ชนิด เลือกใช้อนุภาคของทอง (colloidal gold) ขนาด 40 นาโนเมตร มาต่อเชื่อมกับ IgG ของเชื้อ BYMV ทำการ conjugate กับ IgG ของไวรัส พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line แต่ control line เกิดในทุกชนิดของ nitrocellulose membrane ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบชนิดของบัฟเฟอร์และไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนอีกครั้ง เพื่อดูปฏิกิริยาของเส้น test line และ control line รวมทั้งทำการปรับเปลี่ยนปริมาณในการ spray การ conjugate กับ IgG ของ BYMV หรือปรับความเข้มข้นของ IgG เพื่อทดสอบปฏิกิริยาให้สามารถตรวจและเกิดปฏิกิริยาได้แถบแบนชัดเจน ก่อนที่จะทำการประกอบและตรวจสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ BYMV ต่อไป

Abstract

The study from researched of Gold Labeling IgG Flow Test (GLIFT) in detection of Bean yellow Mosaic virus (BYMV). By using principles of serology and lateral flow technique on a nitrocellulose membrane 7 types. Selection particles of gold (colloidal gold) 40 nanometers to be connected with IgG of BYMV and conjugate with IgG of virus. The result showed not have reaction on the test line. But all kinds in control line have reactions of nitrocellulose membrane. Therefore, after that study comparison kind of buffer and nitrocellulose membrane again to see the reaction of the test line and control line. And adjust the volume of spray, conjugate with IgG of BYMV. Or adjust intensive of IgG for test reaction was clear. Before assembly and test performance of sensitivity in monitoring detection of next BYMV.

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-01-07-56

คำหลัก : ชุดตรวจสอบ, *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)

คำนำ

แกลดิโอลัสมีมากกว่า 150 ชนิด มีทั้งกลิ่นหอมและไม่มีกลิ่น ปัจจุบันมีพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้าเกือบ 3,000 พันธุ์ สำหรับพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทยไม่แน่นอน เพราะได้มีการสั่งพันธุ์ แกลดิโอลัสใหม่ ๆ เข้ามาปลูกอยู่เสมอ เพราะต้องการให้ตรงกับความนิยมของผู้ใช้ และคุณภาพ ของพันธุ์ที่ได้จากการเก็บหัวพันธุ์มาปลูกจะลดลง แกลดิโอลัสจัดเป็นไม้ดอกเมืองหนาว ที่มีการผลิตเป็นการค้ามาไม่นาน ตลาดยังไม่กว้างขวาง ราคาของดอกแกลดิโอลัสจะแตกต่างไปตามคุณภาพ ซึ่งเป็นไปตามขนาดความยาวของก้านดอกเป็นสำคัญ ราคาเฉลี่ยจะอยู่ระหว่าง 1-8 บาท ต่อช่อดอก ปัจจุบันแกลดิโอลัสหรือซ่อนกลิ่นฝรั่ง เป็นไม้ตัดดอกที่ได้รับความนิยมสูงมีสีสันสะดุดตา เช่น สีขาว เหลือง ชมพู แดง ม่วง ส้ม มีช่อดอกยาว เหมาะสำหรับปลูกเพื่อตัดดอกเป็นการค้า เพราะสามารถตัดช่อดอกได้ตั้งแต่ดอกยังไม่บาน และปัจจุบันนี้พื้นที่การปลูกแกลดิโอลัสส่วนใหญ่จะเป็นบริเวณจังหวัดทางภาคเหนือ เช่น เชียงใหม่ เชียงราย และในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น อ.ปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา และในพื้นที่บริเวณเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ ส่วนใหญ่แกลดิโอลัสที่ปลูกจะส่งมาขายยังตลาด ในกรุงเทพมหานคร และส่งไปขายยังตลาดต่างประเทศอีก เช่น ซาอุดิอาระเบีย แคนาดา ซึ่งประสบปัญหาเกี่ยวกับดอกไม่สม่ำเสมอ ค่าขนส่งสูง ปลายช่อดอกโค้งงอ รวมทั้งปัญหาของโรคและแมลงที่ทำให้คุณภาพดอกลดลง โดยเฉพาะโรคใบด่างดอกด่างที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ซึ่งเชื้อสามารถติดมากับหัวพันธุ์ที่นำเข้า รวมทั้งมีเพลี้ยอ่อนและเพลี้ยไฟเป็นแมลงพาหะ ทำให้เกิดการระบาดได้มากและรวดเร็ว ส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพของดอกแกลดิโอลัส โดยจะมีอาการปรากฏชัดบนใบและดอก โดยจะเห็นรอยด่างเป็นทางทำให้ดอกไม่มีคุณภาพและไม่สมบูรณ์

Arneodo *et al.* (2005) ได้รายงานถึงการตรวจสอบในขั้นต้นของเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ในแกลดิโอลัส โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน วิธีซีรัมและ RT-PCR ในการตรวจสอบจากใบของแกลดิโอลัสจำนวน 25 ตัวอย่าง พบว่า BYMV มีอนุภาคเป็น flexuous ยาวประมาณ 750 นาโนเมตร กว้าง 12-15 นาโนเมตร และยังพบ BYMV ใน faba bean (*Vicia faba* L.), Pae (*Pisum sativum* L.) และ Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) เป็นพืชอาศัยด้วย Meenu *et al.* (2002) ได้ศึกษา *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ในแกลดิโอลัส 32 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค ELISA, Immono electron microscopy และ RT-PCR โดยใช้ Primer ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ BYMV จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการกระจายของเชื้อ BYMV ในต้นแกลดิโอลัสจะมีการกระจายในพันธุ์ที่มีลำต้นสูงและมีใบยาว Stein *et al.* (1994) ได้รายงานว่าเชื้อ *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ไม่สามารถตรวจในหัวพันธุ์ได้ ทั้งวิธี ELISA และ RNA hybridization แต่จะตรวจสอบได้ในน้ำคั้นพืชจากส่วนของหัวพันธุ์ที่ตัดหรือเกิดบาดแผล

มาแล้ว 2-5 อาทิตย์ เนื่องจากเชื้อไวรัส BYMV ในหัวพันธุ์ของแกลดิโอลัสนั้น จะมีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อที่ต่ำ ดังนั้นการศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) จึงมีความจำเป็นและมีความสำคัญต่อการตรวจสอบและคัดเลือกหัวพันธุ์ที่ปลอดโรค

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่ติดมากับหัวพันธุ์ จึงจัดว่ามีความจำเป็นเพื่อป้องกันการระบาด และเพื่อสนับสนุนการการผลิตแกลดิโอลัสให้มีคุณภาพ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้เพื่อวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ที่ติดมากับหัวพันธุ์แกลดิโอลัส ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ เพื่อให้ได้หัวพันธุ์ที่มีคุณภาพและปลอดโรค และเพื่อส่งเสริมการผลิตแกลดิโอลัสให้มีคุณภาพ เป็นการพัฒนาคุณภาพการผลิตในประเทศไทยให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เครื่อง centrifuge และ เครื่อง Spectrophotometer
- แอนติซีรัม polyclonal antibody ของเชื้อ *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)
- ตู้แช่แข็ง -20 และ -80 ^{0}C
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA
  เช่น Goat Anti-Rabbit+Phosphatase, non-fat milk, FR-TR salt และ Nitrocellulose membrane เป็นต้น
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบไวรัสกล้วยไม้สำเร็จรูป เช่น Colloidal gold, Goat-anti mouse (GAM), Sucrose และ fiber glass เป็นต้น

วิธีการ

1. การเตรียมแอนติซีรัมและการสกัด IgG ของเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)

สกัด IgG จากแอนติซีรัมของเชื้อ BYMV โดยนำแอนติซีรัม BYMV (ซื้อแอนติซีรัมจากบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ) จำนวน 1 ml มาสกัด IgG โดยผสมกับ น้ำกลั่น 9 ml แล้วผสมกับ ammonium sulfate ที่อิ่มตัว 10 ml ผสมให้เข้ากันดี นำไปตกตะกอน 8,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25^{0}C ละลายตะกอน ด้วย 4 ml ของ ½ เท่า PBS แล้วใส่ถุง dialysis tubing เพื่อละลาย ammonium sulfate ออกให้หมดโดยแช่ ใน ½ PBS 1 ลิตร นาน 3 ชั่วโมง 3 ครั้ง วัดความเข้มข้นของ IgG ที่ได้ด้วย spectrophotometer เพื่อ ปรับให้ IgG มีความเข้มข้นที่ OD_{280}= 1.4 มีความเข้มข้นของโปรตีน = 1 mg/ml ทดสอบคุณภาพ IgG ด้วยวิธี NCM-ELISA โดยเจือจาง IgG เป็น 1:500

2. การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง (colloidal gold)

เตรียมจากสารประกอบ $HAuCl_4$ เพื่อให้ได้อนุภาคทองที่บริสุทธิ์และมีขนาด 40 นาโนเมตร นำสารละลาย 1% ของ Gold chloride หรือ chloroauric acid ($HAuCl_4$, $AuCl_3$) จำนวน 1.2 ml ใส่ลงในน้ำกลั่นจำนวน 174 ml ที่ต้มเดือดแล้วนาน 2 นาที แล้วเติม Sodium citrate ลง 2 ml กวนต่อนาน 10 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำเย็นให้เย็นลง นำไปวัด OD 530 nm ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.5 แล้วปรับเป็น pH 7.3 ด้วย 0.2 M K_2CO_3 ที่เตรียมใหม่และใช้ทันที (Hampton *et al.*,1990) แล้วนำสารละลายของ Colloidal Gold ไปใช้ในการ conjugate กับ IgG ของ BYMV

3. การติดสลาก IgG ของ BYMV ด้วยอนุภาคทอง

นำ IgG ของ BYMV เชื่อมเข้ากับ Colloidal Gold ได้เป็น Colloidial Gold conjugated IgG โดยผสม IgG ของ BYMV ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 1 mg/ml กับ Colloidal Gold ในอัตรา 1:100 กวนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 10 % จำนวน 20 มิลลิลิตร กวนเบา ๆ อีก 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบ/นาที นาน 40 นาที เพื่อตกตะกอน Colloidial Gold conjugated IgG ที่ติดสลากด้วยอนุภาคทอง (gold labeled IgG) แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Passive Gold Diluent ให้มีความเข้มข้นของสารละลายเป็น 0.5 ที่ OD 540 แล้วนำไปหยดหรือพ่น ลงบนแผ่นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) โดยทดลองหยด Gold labeling IgG ในปริมาณ 2 µl/cm

การเตรียม Conjugate Release pad (CRP) ทำการพ่นปริมาณ Gold labeling IgG ของ BYMV ลงบนแผ่น CRP ซึ่งเป็นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) ในปริมาณ 1.5 µl/เซนติเมตร แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำ CRP ของ Gold labeling IgG ของ BYMV มาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร เก็บในสภาพแห้งที่มีความชื้นไม่เกิน 40% ก่อนนำไปประกอบเป็น dipstick และประกอบเป็นชุดตลับตรวจสอบต่อไป

4. การเตรียม test line และ control line

ทำการพ่น IgG ด้วยเครื่องมือ spray ที่สามารถควบคุมแรงดัน ลงบนแผ่น NCM โดยทดลองเปรียบเทียบปริมาณของ IgG ของ BYMV ที่ต่างกัน 4 อัตราได้แก่ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 µl/cm ส่วนการเตรียมเส้นแสดงปฏิกิริยาควบคุม (control line) โดยการพ่น GAR ในอัตรา 1.0 µl/cm ลงบน NCM ในตำแหน่งห่างจาก test line ขึ้นไปด้านบนของ dip stick 0.5 cm แล้วนำไปอบแห้งเช่นเดียวกับ Conjugate Release pad (CRP) นาน 2 ชั่วโมง control line ทำไว้เพื่อให้ Gold labeling IgG ของ Rabbit IgG ละลายออกมาแล้วไหลไปจับกับ control line เพื่อเป็นการตรวจปฏิกิริยาการไหลของสารละลายที่ดี

5. การทดสอบคัดเลือกชนิดของเมมเบรนที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ PVA บนเส้น test line

ได้ทดลองใช้เมมเบรน 7 ชนิด คือ

1. Unisart CN 95
2. AE 100
3. AE 99
4. AE 98 Fast
5. Millipore HF 13504
6. Prisma 60
7. Unisart CN 140

ใช้เครื่องพ่นสารละลายควบคุมปริมาณ ทำการพ่น IgG ของ Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 ปริมาณ 1 μl/cm เป็นเส้น control line ใช้ IgG ของ BYMV พ่นเป็น test line ในปริมาณ 2 μl/cm ตามลำดับ ลงบนแผ่นเมมเบรน โดยเส้นทั้ง 2 มีระยะห่างกัน 0.5 เซนติเมตร และจัดให้อยู่กึ่งกลางของแผ่น NCM ที่มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร นำแผ่นที่พ่น IgG แล้วไปอบที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบ (เส้น control line เป็นเส้นที่มีไว้ตรวจสอบการไหลของสารละลายทั้งหมดในชุดตรวจสอบว่ามีความสมบูรณ์ โดยปรากฏเป็นเส้นสีแดงเกิดจากปฏิกิริยาของ GAR กับ IgG ที่ผลิตมาจากกระต่ายและติดสลากอนุภาคทอง)

6. การเปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช

ทดลองใช้บัฟเฟอร์ ที่แตกต่างกัน 7 ชนิด บดตัวอย่างพืช คือ

PBS pH 7.4
PBS-T pH 7.4
TBS pH 7.4
TBS-T pH 7.4
extraction buffer 1 pH 8.6
extraction buffer 2 pH 7.5
general extraction buffer pH 7.4 (Agdia)

7. การประกอบและตรวจสอบ

นำ NCM บน Plastic Backing polyester ที่อบแห้งแล้ว มาลอกกระดาษปิดกาวออก วางแผ่น Conjugate Release pad ที่เป็น fiber glass ที่มี Gold labeled IgG และอบแห้งแล้วเกย ด้านล่าง

ของแผ่น NCM 1 มิลลิเมตร ปิดทับ Conjugate Release pad ด้วย แผ่นรองรับตัวอย่างน้ำคั้นพืช (sample pad) ที่เป็น fiber glass โดยให้เกยประมาณ 1 มิลลิเมตร ปิดลงไปจนถึงปลายของแผ่น Backing พอดี วางแผ่นซับน้ำอย่างหนา (Wicking paper) ไว้ด้านบนของ NCM ประมาณ 1 มิลลิเมตร ทาบไป จนสุดปลายด้านบนของ Backing ตัดออกเป็น strip กว้าง 0.4 เซนติเมตร ด้วยเครื่องตัดแบบอัตโนมัติ

8. การทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ BYMV

ทำการทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของ Lateral flow test strip ในการตรวจสอบเชื้อ BYMV ในอัตราความเข้มข้นต่างๆ ด้วยการเจือจางน้ำคั้น ในอัตรา 1:10, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1,000 และ 1:2,000 แล้วนำ Lateral flow test strip จุ่มลงในน้ำคั้นในปริมาณที่เท่ากัน อ่านผลปฏิกิริยาเปรียบทียบกัน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2556 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2557

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสกัด IgG ของเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)

การสกัด gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้นของ IgG IgG ที่สกัดออกมาเมื่อวัดความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยเครื่อง spectrophotomer ได้ค่าความเข้มข้น IgG ของ BYMV เท่ากับ 6.0 ปรับให้ IgG มีความเข้มข้นที่ OD^{260} เท่ากับ 1.4 เพื่อให้ IgG ที่ได้นี้มีปริมาณโปรตีนเป็น 1 mg/ml ก่อนนำไป conjugate กับ colloidal Gold

2. การติดสลาก IgG ของ BYMV ด้วยอนุภาคทอง

ภายหลังจากการกวนกับ Sodium citrate จะได้สารละลายของ Colloidal Gold เป็นสี cherry red ซึ่งเป็นผลจากอนุภาคของทอง ที่มีลักษณะ monodisperse colloid ที่มีความคงตัวและมีขนาดประมาณ 40 nm มีความไวและคงรูปเมื่อนำไปใช้ในการ conjugate กับ IgG ของไวรัส (Hampton *et al.*,1990) ผลจากการทดลองหยอด Gold labeling IgG ในปริมาณ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 µl/cm พบว่าทุกอัตราไม่เกิดปฏิกิริยาของสีที่เส้น test line

3. การเตรียม test line และ การเตรียม control line

พบว่าการใช้ IgG ของ BYMV spray เป็น test line ปริมาณความเข้มข้นที่ 1.0, 1.5, 2.0 μl/cm ผลของปฏิกิริยาไม่ขึ้นแถบสี อาจเนื่องมาจากชนิดของไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ความเข้มข้นในการ spray หรือความเข้มข้นของ IgG และแอนติซีรัมที่นำมาใช้ ส่วนการพ่น IgG ของ Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 ปริมาณ 1 μl/cm เป็นเส้น control line เพื่อเข้าไปทำปฏิกิริยา ผลของปฏิกิริยาชัดเจนดีแม้ว่าการใช้ Goat anti-rabbit ทำเป็น control line แผ่น conjugate Release pad ของ IgG BYMV ต้องเฉลี่ยไปทำปฏิกิริยากับทั้ง test line และ control line ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบชนิดของไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน

4. การทดสอบคัดเลือกชนิดของแผ่น ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ BYMV บนเส้น test line

NCM / line	Unisart CN 95	AE 100	AE 99	AE 98 Fast	Millipore HF 13504	Prisma 60	Unisart CN 140
BYMV	-	-	-	-	-	-	-
Control line	++	+++	+++	+++	++	++	++

การเปรียบเทียบชนิดของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่แตกต่างกัน 7 ชนิด พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาในทุกชนิดของไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ซึ่งปัญหานี้อาจเนื่องมาจากชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการบดตัวอย่าง ความเข้มข้นในการ spray หรือความเข้มข้นของ IgG และแอนติซีรัมที่นำมาใช้ และได้ดำเนินการเปรียบเทียบชนิดของบัฟเฟอร์และไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ได้ดำเนินการไปแล้วอีกครั้ง เพื่อดูปฏิกิริยาของเส้น test line และ control line รวมทั้งทำการพัฒนาและปรับปรุงชุดตรวจสอบ ก่อนที่จะทำการประกอบและตรวจสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ BYMV ต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการศึกษาชุด Gold labeling IgG flow test ตรวจสอบเชื้อ BYMV พบว่าการสกัด IgG ของเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) และทำการติดสลาก IgG ของ BYMV ด้วยอนุภาคทองขนาดประมาณ 40 nm เมื่อนำไปใช้ในการ conjugate กับ IgG ของไวรัส พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากการใช้แอนติซีรัม polyclonal antibody ของเชื้อ BYMV รวมทั้งชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการบดตัวอย่าง ปริมาณในการ spray หรือความเข้มข้นของ IgG ดังนั้นจึงได้ดำเนินการเปรียบเทียบชนิดของบัฟเฟอร์และไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ได้ดำเนินการไปแล้วอีกครั้ง เพื่อดูปฏิกิริยาของเส้น test line และ control line รวมทั้งทำการปรับเปลี่ยนความปริมาณในการ spray และความเข้มข้นของ IgG เพื่อทดสอบปฏิกิริยาอีกครั้ง

ในการทดลองผลิต Gold labeling IgG flow test เพื่อตรวจสอบไวรัส BYMV โดยเลือกใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา (Serology) ร่วมกับการต่อเชื่อมแอนติซีรัมหรือ IgG ของไวรัส กับอนุภาคของสารมีสีได้แก่ Colloidal Gold โดยเลือกที่ขนาด 40 nm มาใช้ได้ และอนุภาคของสารดังกล่าวสามารถแสดงผลของปฏิกิริยาให้เห็นได้ชัดเจนเป็นสีสีชมพูเข้ม โดยนำ Colloidal Gold มา conjugate กับ IgG ไปทำปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยากับอนุภาคของไวรัสในน้ำคั้นตัวอย่างที่เป็นโรคชนิดเดียวกับ IgG แล้วไหลผ่านไปบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนไปพบกับแถบ IgG ของไวรัส ที่วางแนวดักไว้ด้านบนของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนดังกล่าว เกิดลักษณะของปฏิกิริยาลูกโซ่แบบแซนวิชที่จับติดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ตรงแนวของแถบ IgG ที่วางไว้จึงมองเห็นเป็นแนวเส้นตรงของปฏิกิริยาสีชมพูเข้มของอนุภาคทอง เทคนิคการตรวจสอบด้วยวิธี lateral flow test เป็นวิธีหนึ่งทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงในการวินิจฉัยโรค วิธีการนี้มีหลักการที่แอนตีบอดี้ที่มาจากแอนติเจนชนิดเดียวกันจะมีความเฉพาะเจาะจงในการจับติดกัน และการเคลื่อนย้ายของของเหลวในลักษณะ capillary จากล่างขึ้นสู่บน หรือจากซ้ายไปขวาในลักษณะ lateral flow จะช่วยให้แอนติเจนหรือตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบเคลื่อนย้ายเข้าหาแอนติบอดี (Haber and Knapen, 1989; Tseda *et al.*, 1992 and Tseda *et al.*, 1993) เมื่อเป็นชนิดเดียวกันย่อมเกิดปฏิกิริยาบน strip สังเกตเห็นแถบสี (band) ของอนุภาคและมีคุณสมบัติสามารถต่อเชื่อมกับแอนติซีรัมได้ ปฏิกิริยานี้ถูกกำหนดให้ไปเกิดขึ้นบน strip ชัดเจน ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้ใช้เวลาในการตรวจสอบเพียง 5-10 นาที วิธีการนี้จึงเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาเพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อไวรัส

เอกสารอ้างอิง

Arneodo, J.D., S. de Breuil, S.L. Lenardon, V.C. Conci and L.R. Conci. 2005. Detection of *Bean yellow mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* infecting gladiolus in Argentina. AGRISCIENTIA, VOL. XXII (2): 87-89.

Haber,S. and H.Knapen, 1989. Filter paper sero-assay (FiPSA) : A rapid, sensitive technique for sero –diagnosis of plant viruses. Can. J. plant Pathol. 11:109-113.

Meenu Katoch, Raja Ram, A. A. Zaidi and I. D. Garg, 2002. Status of *Bean yellow mosaic virus* on Gladiolus.

Stein A., A. Rosner and J. Hammond. 1994. Detection of *Bean yellow mosaic virus* in Gladioli Corms.

Tsuda, S., kameya-lwaki, M.,hanada, K., Kouda, Y., Hikata, M., and K.Tomaru. 1992. A novel detection and Identification technique for plant viruses; Rapid mmunofilter paper assay (RIPA), plant Dis. 76:466-469

Tsuda,S., kameya-lwaki, M.,hanada, K.,Kouda, Y.,Hikata, M.,Fujisawa I and K.Tomaru. 1993. Simultaneous Diagnosis for Plants Infected with Multiple viruses Employing Rapid Immunefilter Paper Assay (RIPA) with Two-Step method' Multi-RIPA. Ann. phythopath. Soc. Japan 59:200-203.

การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัส PVY PVX PVS ในมันฝรั่ง

Development for detecting of PVY PVX PVS in Potato

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[1/] วิวัฒน์ ภานุอำไพ[2/]

[1/]สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

[2/]ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตเชียงใหม่ อ.ฝาง จ.เชียงใหม่

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษา Gold Labeling IgG Flow Test (GLIFT) ในการตรวจเชื้อ PVY PVX และ PVS โดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยาและ lateral flow technique บนแผ่น nitrocellulose membrane ที่ใช้ทดสอบ 7 ชนิด เลือกใช้อนุภาคของทอง (colloidal gold) ขนาด 40 นาโนเมตร มาต่อเชื่อมกับ IgG ของเชื้อ PVY PVX และ PVS ทำการ conjugate กับ IgG ของไวรัส พบว่าการเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line ยังไม่ชัดเจน แถบแบนไม่เข้ม ส่วน control line เกิดในทุกชนิดของ nitrocellulose membrane จึงทำการเปรียบเทียบชนิดของบัพเฟอร์และไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนอีกครั้ง เพื่อดูปฏิกิริยาของเส้น test line และ control line รวมทั้งทำการปรับเปลี่ยนปริมาณในการ spray และความเข้มข้นของ IgG และทำการ conjugate กับ IgG ของ PVY PVX และ PVS ใหม่เพื่อทดสอบปฏิกิริยาอีกครั้ง รวมทั้งปรับการ spray และความเข้มข้นของ IgG ซึ่งไม่ได้เป็นปัญหาแต่อย่างใด แต่เมื่อทำการแยกทดสอบทำเป็นเชื้อเดี่ยวๆ กลับไม่พบปัญหาแต่อย่างใด ดังนั้นจึงได้แก้ปัญหาดังกล่าวโดยทำการแยกเป็น 2 หลุม ในชุดตรวจสอบ 1 ชุด โดยหลุมแรกใช้ในการทดสอบ เชื้อ PVY, PVS ส่วนอีกหลุมใช้ในการทดสอบ เชื้อ PVX เชื้อเดียว แยกกันเพื่อหลีกเลี่ยงและแก้ปัญหาแถบแบนที่ไม่ชัดเมื่อนำมารวมกัน ดังที่เกิดปัญหาข้างต้นตอนนี้ยังอยู่ในการดำเนินการทำ test line และ control line และนำมารวมกันเป็นชุดทดสอบ ก่อนทำการทดสอบต่อไป

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-01-08-56

คำนำ

จากการที่ประเทศไทยได้เปิดเขตการค้าเสรีกับหลายประเทศภายใต้หลักเกณฑ์ขององค์การการค้าโลก (World Trade Organization: WTO) ในการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ประเทศไทยจำเป็นต้องยึดหลักการตามความตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures: SPS Agreement) มาตรการ SPS Agreement นี้ยึดหลักการทางวิทยาศาสตร์ และการประเมินความเสี่ยงเพื่อปกป้องสินค้าเกษตรจากศัตรูพืชที่ไม่เคยมีมาก่อน ซึ่งประเทศไทยมีการนำเข้าพืชจำนวนมากจากทั่วโลกในแต่ละปีและปัจจุบันประเทศไทยได้มีข้อตกลงเปิดการค้าเสรีกับหลายประเทศ มีการวางข้อกำหนดด้านคุณภาพของสินค้า ความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมาเป็นข้อกำหนดการนำเข้าสินค้า ดังนั้นแต่ละประเทศจำเป็นต้องมีข้อมูลด้านวิชาการที่ชัดเจนเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการเจรจาตกลงในเรื่องข้อกำหนดในแต่ละเรื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลด้านศัตรูพืชและการวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืช ที่จะถูกหยิบยกขึ้นมาเป็นเรื่องการกีดกันทางการนำเข้าได้เป็นอย่างดี ในระยะเวลาที่ผ่านมาประเทศไทยได้มีการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งมากกว่าปีละ 8,000-12,000 ตัน จากหลายประเทศ ทั้งจากประเทศออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา สก๊อตแลนด์ เป็นต้น เนื่องจากประเทศไทยไม่สามารถผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้ปลูก แต่จากการนำเข้าหัวพันธุ์จากต่างประเทศมีปัญหาการติดเชื้อไวรัสเข้ามา ฝ่ายวิชาการกักพืชทำหน้าที่กักตรวจศัตรูพืชที่เป็นศัตรูพืชกักกัน ที่ติดเข้ามาโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคของไวรัสที่ไม่เคยพบว่ามีรายงานในประเทศไทยมาก่อน แต่จากการที่มีการสั่งหัวพันธุ์เข้ามาเป็นจำนวนมากทำให้งานการตรวจมีปริมาณมาก ทั้งการตรวจก่อนนำเข้าและมีการเฝ้าระวังหลังนำเข้าโดยออกสำรวจและเก็บตัวอย่างในแปลงปลูกเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส ซึ่งมีรายงานจากต่างประเทศที่ตรวจพบเชื้อไวรัสทั้ง PVY PVX และ PVS โดย Gray *et al.* (2003) ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบด่างจากต้นมันฝรั่ง จำนวน 1,330 ต้น จาก 90 ฟาร์ม 300 ตัวอย่างเก็บจากต้นมีอาการด่างอย่างชัดเจนและ 1,030 ตัวอย่าง สุ่มจากต้นทั่วๆ ไป และทำการตรวจทางเซรุ่มวิทยากับแอนติซีรัมของไวรัส 6 ชนิด ได้แก่ PVA, PVS, PVX, PVY, PVM และ PLRV ซึ่งในโปรแกรมการผลิตหัวพันธุ์รับรองได้ทำการตรวจสอบไวรัสทั้ง 6 ชนิด เพราะไวรัสทั้ง 6 ชนิดนี้ เป็นเชื้อไวรัสที่พบเสมอในแหล่งปลูกมันฝรั่งในสหรัฐอเมริกา ผลจากการสำรวจพบว่ามีการเข้าทำลายของเชื้อ PVY สูงที่สุดมีการเข้าทำลายถึง 68% และ PVS 61% ส่วน PVX มีเพียง 10 % ส่วนไวรัสอื่นๆ มีน้อยกว่า 1% Salim Khan *et al.* (2003) ได้พัฒนาวิธีจำแนกไวรัสที่รวดเร็ว ในห้องทดลองกับมันฝรั่ง 6 พันธุ์คือ Cardinal, Diamant, Dhera, Multa, Cilena and Sieglinde โดยการปลูกเชื้อไวรัส PVA, PVY, PVV, PVM, PVS, PVX และ PLRV บนต้นมันฝรั่ง แล้วจำแนกด้วยวิธี DAS-ELISA เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ปลูกเชื้อ กิตติศักดิ์และคณะ (2532) ได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ PVX, PVY ด้วยวิธี EM, IEM และ ELISA พบว่าวิธี ELISA เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบ รวดเร็วและแม่นยำ ดีกว่าอีก 2 วิธี Tsuda *at al.*(1993) ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสหลายๆชนิดด้วยวิธี

รวดเร็ว (multi RIPA) และตรวจสอบอย่างรวดเร็วเพียง 2 ขั้นตอน บนแผ่นรองรับ แบบ Lateral flow test Hochleitner and Kraus (2002) ได้พัฒนาวิธี Lateral flow test ใช้ Colloidal Gold เป็นวัสดุแสดงปฏิกิริยาในการทำ dipstick ตรวจสอบไวรัสโดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา

ซึ่งจากจำนวนตัวอย่างที่ต้องตรวจมีปริมาณมากทำให้การตรวจมีปัญหาและทำให้ล่าช้า และความล่าช้าจากการที่มันฝรั่งพักตัวนานจึงไม่มีหน่ออ่อนไปตรวจ ดังนั้นจึงควรพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่สามารถตรวจไวรัสจากหัวพันธุ์โดยตรง หรือพัฒนาวิธีการตรวจที่แม่นยำ สะดวก และรวดเร็ว ซึ่งจากเดิมได้พัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตชุดตรวจสอบไวรัสอย่างง่ายของเชื้อไวรัส PVY บนหัวพันธุ์มันฝรั่งไปแล้วบนชุดตรวจสอบ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่สามารถตรวจไวรัสจากหัวพันธุ์มันฝรั่งได้ 3 ชนิด พร้อมกันในหนึ่งชุด คือ PVY PVX และ PVS จึงเป็นสิ่งที่ดีและมีความจำเป็น เพื่อให้สามารถตรวจได้มากขึ้น เร็วขึ้นและมีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อรองรับการนำเข้ามันฝรั่งที่มีปริมาณมากขึ้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เครื่อง centrifuge และ เครื่อง Spectrophotometer
- แอนติซีรัม polyclonal antibody ของเชื้อ PVY PVX และ PVS
- ตู้แช่แข็ง -20 และ -80 ^{0}C
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA
  เช่น Goat Anti-Rabbit+Phosphatase, non-fat milk, FR-TR salt และ Nitrocellulose membrane เป็นต้น
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบไวรัสกล้วยไม้สำเร็จรูป เช่น Colloidal gold, Goat-anti mouse (GAM), Sucrose และ fiber glass เป็นต้น

วิธีการ

1. การเตรียมแอนติซีรัมและการสกัด IgG ของเชื้อไวรัส PVY PVX และ PVS

สกัด IgG จากแอนติซีรัมของเชื้อ PVY PVX และ PVS โดยนำแอนติซีรัม PVY PVX และ PVS จำนวน 1 ml มาสกัด IgG โดยผสมกับ น้ำกลั่น 9 ml แล้วผสมกับ ammonium sulfate ที่อิ่มตัว 10 ml ผสมให้เข้ากันดี นำไปตกตะกอน 8,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25^{0}C ละลายตะกอนด้วย 4 ml ของ ½ เท่า PBS แล้วใส่ถุง dialysis tubing เพื่อละลาย ammonium sulfate ออกให้หมดโดยแช่ ใน ½ PBS 1 ลิตร นาน 3 ชั่วโมง 3 ครั้ง วัดความเข้มข้นของ IgG ที่ได้ด้วย spectrophotometer เพื่อ ปรับให้ IgG มีความเข้มข้นที่ OD_{280}= 1.4 มีความเข้มข้นของโปรตีน = 1 mg/ml ทดสอบคุณภาพ IgG ด้วยวิธี NCM-ELISA โดยเจือจาง IgG เป็น 1:500

2. การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง (colloidal gold)

เตรียมจากสารประกอบ $HAuCl_4$ เพื่อให้ได้อนุภาคทองที่บริสุทธิ์และมีขนาด 40 นาโนเมตร นำสารละลาย 1% ของ Gold chloride หรือ chloroauric acid ($HAuCl_4$, $AuCl_3$) จำนวน 1.2 ml ใส่ลงในน้ำกลั่นจำนวน 174 ml ที่ต้มเดือดแล้วนาน 2 นาที แล้วเติม Sodium citrate ลง 2 ml กวนต่อนาน 10 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำเย็นให้เย็นลง นำไปวัด OD 530 nm ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.5 แล้วปรับเป็น pH 7.3 ด้วย 0.2 M K_2CO_3 ที่เตรียมใหม่และใช้ทันที (Hampton *et al.*, 1990) แล้วนำสารละลายของ Colloidal Gold ไปใช้ในการ conjugate กับ IgG ของ PVY PVX และ PVS

3. การติดสลาก IgG ของ PVY PVX และ PVS ด้วยอนุภาคทอง

นำ IgG ของ PVY PVX และ PVS เชื่อมเข้ากับ Colloidal Gold ได้เป็น Colloidial Gold conjugated IgG โดยผสม IgG ของ PVY PVX และ PVS ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 1 mg/ml กับ Colloidal Gold ในอัตรา 1:100 กวนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 10 % จำนวน 20 มิลลิลิตร กวนเบา ๆ อีก 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบ/นาที นาน 40 นาที เพื่อตกตะกอน Colloidial Gold conjugated IgG ที่ติดสลากด้วยอนุภาคทอง (gold labeled IgG) แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Passive Gold Diluent ให้มีความเข้มข้นของสารละลายเป็น 0.5 ที่ OD 540 แล้วนำไปหยดหรือพ่น ลงบนแผ่นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) โดยทดลองหยด Gold labeling IgG ในปริมาณ 2 µl/cm

การเตรียม Conjugate Release pad (CRP) ทำการพ่นปริมาณ Gold labeling IgG ของ PVY PVX และ PVS ลงบนแผ่น CRP ซึ่งเป็นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) ในปริมาณ 1.5 µl/cm แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำ CRP ของ Gold labeling IgG ของ PVY PVX และ PVS มาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร เก็บในสภาพแห้งที่มีความชื้นไม่เกิน 40% ก่อนนำไปประกอบเป็น dipstick และประกอบเป็นชุดตลับตรวจสอบต่อไป

4. การเตรียม test line และ control line

ทำการพ่น IgG ด้วยเครื่องมือ spray ที่สามารถควบคุมแรงดัน ลงบนแผ่น NCM โดยทดลองเปรียบเทียบปริมาณของ IgG ของ PVY PVX และ PVS ที่ต่างกัน 4 อัตราได้แก่ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 µl/cm ส่วนการเตรียมเส้นแสดงปฏิกิริยาควบคุม (control line) โดยการพ่น GAR ในอัตรา 1.0 µl/cm ลงบน NCM ในตำแหน่งห่างจาก test line ขึ้นไปด้านบนของ dip stick 0.5 cm แล้วนำไปอบแห้งเช่นเดียวกับ Conjugate Release pad (CRP) นาน 2 ชั่วโมง control line ทำไว้เพื่อให้ Gold labeling IgG ของ Rabbit IgG ละลายออกมาแล้วไหลไปจับกับ control line เพื่อเป็นการตรวจปฏิกิริยาการไหลของสารละลายที่ดี

5. การเปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช

ทดลองใช้บัฟเฟอร์ ที่แตกต่างกัน 7 ชนิด บดตัวอย่างพืช คือ

PBS	pH 7.4
PBS-T	pH 7.4
TBS	pH 7.4
TBS-T	pH 7.4
extraction buffer 1	pH 8.6
extraction buffer 2	pH 7.5
general extraction buffer	pH 7.4 (Agdia)

6. การประกอบและตรวจสอบ

นำ NCM บน Plastic Backing polyester ที่อบแห้งแล้ว มาลอกกระดาษปิดกาวออก วางแผ่น Conjugate Release pad ที่เป็น fiber glass ที่มี Gold labeled IgG และอบแห้งแล้วเกย ด้านล่างของแผ่น NCM 1 มิลลิเมตร ปิดทับ Conjugate Release pad ด้วย แผ่นรองรับตัวอย่างน้ำคั้นพืช (sample pad) ที่เป็น fiber glass โดยให้เกยประมาณ 1 มิลลิเมตร ปิดลงไปจนถึงปลายของแผ่น Backing พอดี วางแผ่นซับน้ำอย่างหนา (Wicking paper) ไว้ด้านบนของ NCM ประมาณ 1 มิลลิเมตร ทาบไป จนสุดปลายด้านบนของ Backing ตัดออกเป็น strip กว้าง 0.4 เซนติเมตร ด้วยเครื่องตัดแบบอัตโนมัติ

7. การทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ PVY PVX และ PVS

ทำการทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของ Lateral flow test strip ในการตรวจสอบเชื้อ PVY PVX และ PVS ในอัตราความเข้มข้นต่างๆ ด้วยการเจือจางน้ำคั้น ในอัตรา 1:10, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1,000 และ 1:2,000 แล้วนำ Lateral flow test strip จุ่มลงในน้ำคั้นในปริมาณที่เท่ากัน อ่านผลปฏิกิริยาเปรียบทียบกัน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2556 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2557

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสกัด IgG ของเชื้อไวรัส PVY PVX และ PVS

การสกัด gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้นของ IgG IgG ที่สกัดออกมาเมื่อวัดความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยเครื่อง spectrophotomer ได้ค่าความเข้มข้น IgG ของ PVY PVX และ PVS เท่ากับ 6.0 ปรับให้ IgG มีความเข้มข้นที่ OD^{260} เท่ากับ 1.4 เพื่อให้ IgG ที่ได้นี้มีปริมาณโปรตีนเป็น 1 mg/ml ก่อนนำไป conjugate กับ colloidal Gold

2. การติดสลาก IgG ของ PVY PVX และ PVS ด้วยอนุภาคทอง

ภายหลังจากการกวนกับ Sodium citrate จะได้สารละลายของ Colloidal Gold เป็นสี cherry red ซึ่งเป็นผลจากอนุภาคของทอง ที่มีลักษณะ monodisperse colloid ที่มีความคงตัวและมีขนาดประมาณ 40 nm มีความไวและคงรูปเมื่อนำไปใช้ในการ conjugate กับ IgG ของไวรัส (Hampton *et al.*, 1990) ผลจากการทดลองหยอด Gold labeling IgG ในปริมาณ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 µl/cm พบว่าทุกอัตราไม่เกิดปฏิกิริยาของสีที่เส้น test line

3. การเตรียม test line และการเตรียม control line

พบว่าการใช้ IgG ของ PVY PVX และ PVS spray เป็น test line ปริมาณความเข้มข้นที่ 1.0, 1.5, 2.0 µl/cm ผลของปฏิกิริยาไม่ขึ้นแถบสี อาจเนื่องมาจากชนิดของไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ความเข้มข้นในการ spray หรือความเข้มข้นของ IgG และแอนติซิรัมที่นำมาใช้ ส่วนการพ่น IgG ของ Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 ปริมาณ 1 µl/cm เป็นเส้น control line เพื่อเข้าไปทำปฏิกิริยา ผลของปฏิกิริยาชัดเจนดีแม้ว่าการใช้ Goat anti-rabbit ทำเป็น control line แผ่น conjugate Release pad ของ IgG PVY PVX และ PVS ต้องเฉลี่ยไปทำปฏิกิริยากับทั้ง test line และ control line ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบชนิดของไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน

4. การประกอบและตรวจสอบ

หลังจากประกอบชุดทดสอบ และนำไปทำการทดสอบกับ positive เชื้อ PVX, PVS ซึ่งพบว่าเกิดปฏิกิริยา และนำเชื้อ PVY มา line เพิ่มรวม เข้าไปในชุดเดียวกันนั้นเพื่อทดสอบปฏิกิริยา พบว่าเกิดปัญหาเส้น test line ยังไม่ชัดเจน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การทดลอง Gold labeling IgG flow test เพื่อตรวจสอบไวรัส PVY PVX และ PVS โดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา (Serology) ร่วมกับการต่อเชื่อมแอนติซีรัมหรือ IgG ของไวรัส กับอนุภาคของ

สารมีสีได้แก่ Colloidal Gold โดยเลือกที่ขนาด 40 nm มาใช้ได้ และอนุภาคของสารดังกล่าวสามารถแสดงผลของปฏิกิริยาให้เห็นได้ชัดเจนเป็นสีสีชมพูเข้ม โดยนำ Colloidal Gold มา conjugate กับ IgG ไปทำปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยากับอนุภาคของไวรัสในน้ำคั้นตัวอย่างที่เป็นโรคชนิดเดียวกับ IgG แล้วไหลผ่านไปบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนไปพบกับแถบ IgG ของไวรัส ที่วางแนวดักไว้ด้านบนของแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนดังกล่าว เป็นลักษณะของปฏิกิริยาลูกโซ่แบบแซนวิชที่จับติดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ตรงแนวของแถบ IgG ที่วางไว้จึงมองเห็นเป็นแนวเส้นตรงของปฏิกิริยาสีชมพูเข้มของอนุภาคทอง ซึ่งการตรวจสอบเชื้อไวรัสเพื่อการวินิจฉัยโรคมีด้วยกันหลายวิธี เช่นการตรวจหาอนุภาคของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Jesen and Gold, 1951) การตรวจสอบโดยวิธี ELISA (Enyzme Linked-Immuno Sorbent Assay) (Clark and Adam,1977) และการตรวจสอบด้วยวิธีอณูชีววิทยา แต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไปในการวินิจฉัยโรคอาจต้องพิจารณาจากหลากหลายวิธีประกอบกัน และควรหาวิธีการใหม่ๆมาช่วยเพิ่มการตรวจสอบให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น เทคนิคการตรวจสอบด้วยวิธี lateral flow test เป็นวิธีหนึ่งทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงในการวินิจฉัยโรค วิธีการนี้มีหลักการที่แอนตีบอดี้ที่มาจากแอนติเจนชนิดเดียวกันจะมีความเฉพาะเจาะจงในการจับติดกัน และการเคลื่อนย้ายของของเหลวในลักษณะ capillary จากล่างขึ้นสู่บน หรือจากซ้ายไปขวาในลักษณะ lateral flow จะช่วยให้แอนติเจนหรือตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบเคลื่อนย้ายเข้าหาแอนติบอดี (Haber and Knapen, 1989; Tseda *et al*., 1992 and Tseda *et al*., 1993) เมื่อเป็นชนิดเดียวกันย่อมเกิดปฏิกิริยาบน strip สังเกตเห็นแถบสี (band) ของอนุภาคและมีคุณสมบัติสามารถต่อเชื่อมกับแอนติซีรัมได้ ปฏิกิริยานี้ถูกกำหนดให้ไปเกิดขึ้นบน strip ชัดเจน ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้ใช้เวลาในการตรวจสอบเพียง 5-10 นาที วิธีการนี้จึงเหมาะสมที่จะพัฒนาเพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อไวรัส แต่จากการศึกษาชุด Gold labeling IgG flow test ตรวจสอบเชื้อ PVY PVX และ PVS พบว่าการเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line ยังไม่ชัดเจน จาง แถบแบนไม่เข้ม ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากแอนติซีรัม polyclonal antibody ของเชื้อ PVY PVX และ PVS รวมทั้งชนิดของบัพเฟอร์ที่ใช้ในการบดตัวอย่าง ความเข้มข้นในการ spray หรือความเข้มข้นของ IgG ดังนั้นจึงได้ดำเนินการเปรียบเทียบชนิดของบัพเฟอร์และไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ได้ดำเนินการไปแล้วอีกครั้ง เพื่อดูปฏิกิริยาของเส้น test line และ control line หลังจากทำซ้ำอีกครั้งทำให้ทราบว่าชนิดบัพเฟอร์และไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนไม่ได้เป็นปัญหาแต่อย่างใด รวมทั้งได้ทำการปรับเปลี่ยนปริมาณในการ spray และความเข้มข้นของ IgG เพื่อทดสอบปฏิกิริยาอีกครั้ง ซึ่งเมื่อทำการแยกทำเป็นเชื้อเดี่ยวๆ นั้น ไม่พบปัญหาแต่อย่างใด ดังนั้นจึงได้แก้ปัญหาดังกล่าวโดยทำการแยกเป็น 2 หลุม ในชุดตรวจสอบ 1 ชุด โดยหลุมแรกใช้ในการทดสอบ เชื้อ PVY, PVS ส่วนอีกหลุมใช้ในการทดสอบ เชื้อ PVX เชื้อเดียวแยกกันเพื่อหลีกเลี่ยงและแก้ปัญหาแถบแบนที่ไม่ชัดเมื่อนำมารวมกัน ดังที่เกิดปัญหาข้างต้นตอนนี้ยังอยู่ในการดำเนินการทำ test line และ control line และนำมารวมกันเป็นชุดทดสอบ ก่อนทำการทดสอบต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร สุรภี กีรติยะอังกูร และ นวลจันทร์ ดีมา 2532. การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ PVX, PVY ด้วยวิธี EM, IEM และ ELISA. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2532. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 103-109.

Clark, M.F and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J .Gen. Virol.* 34 : 475-483.

Gray, S., K. Perry and P. Baldauf. 2003. Report of 2003 Research activities funded by the Maine Potato Board.

Haber,S. and H.Knapen, 1989. Filter paper sero-assay (FiPSA) : A rapid, sensitive technique for sero –diagnosis of plant viruses. Can. J. plant Pathol. 11:109-113.

Hampton, H., E. Ball, and S. De Boer. 1990. Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. 389 pp.

Hochleitner,K. and H. Kraus. 2002. Introductory Workshop on Rapid Diagnostic Tests. BGM Company. Bangkok Thailand . 180 pp.

Jesen, D.D. and A.H. Gold. 1951. A virus ringspot of odontoglossum orchid symptom, transmission, and electron microscopy. Phytopathology 41 : 648-653.

Salim Khan M., M. I. Hoque, R. H. Sarker and H.-P. Muehlbach. 2003. Detection of Important Plant Viruses in In vitro Regenerated Potato Plants by Double Antibody Sandwich Method of ELISA. Plant Tissue Cult. 13(1) : 21-29, 2003.

Tsuda, S., kameya-lwaki, M.,hanada, K., Kouda, Y., Hikata, M., and K.Tomaru. 1992. A novel detection and Identification technique for plant viruses; Rapid mmunofilter paper assay (RIPA), plant Dis. 76:466-469

Tsuda,S., kameya-lwaki, M.,hanada, K.,Kouda, Y.,Hikata, M.,Fujisawa I and K.Tomaru. 1993. Simultaneous Diagnosis for Plants Infected with Multiple viruses Employing Rapid Immunefilter Paper Assay (RIPA) with Two-Step method' Multi-RIPA. Ann. phythopath. Soc. Japan 59:200-203.

การโคลนและสังเคราะห์โปรตีน sec.A gene ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยในระบบเซลล์แบคทีเรีย

Cloning and Expression Analysis of *SecA* Gene of Phytoplasma associated with White Leaf Diseases of Sugarcane in Bacterial Cell System

กาญจนา วาระวิชะนี แสนชัย คำหล้า
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สังเคราะห์ *Sec A* geneของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) จากคู่ไพร์เมอร์ SecAfor1/SecArev3 ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 800 เบส ทำการเชื่อม *SecA gene* เข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega) แล้วถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ DH 5α ด้วยวิธีการ heat shock transformation หลังจากวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน genbank พบว่าเหมือนกับ Sugarcane grassy shoot phytoplasma และ Sugarcane white leaf phytoplasma อยู่ในระดับ 97-98 เปอร์เซ็นต์ จึงเก็บโคลนในสารละลาย 30 เปอร์เซ็นต์ glycerol ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอพลาสมิดสายผสม *Sec A* gene ออกจากเซลล์แบคที่เรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5α เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการผลิตโปรตีน Sec A ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยในระบบเซลล์แบคทีเรียในปีงบประมาณ 2558 ต่อไป

Keywords : การโคลนยีน, การสังเคราะห์โปรตีน, ระบบเซลล์แบคทีเรีย, เชื้อไฟโตพลาสมา โรคใบขาวอ้อย, *SecA gene*

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-01-09-57

คำนำ

อ้อยเป็นผลผลิตทางการเกษตรของประเทศไทยในปัจจุบันอ้อยยังเป็นวัตถุดิบที่สำคัญอย่างหนึ่งในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล โดยใช้เป็นส่วนผสมของน้ำมันแก๊สโซฮอล์ จึงมีการขยายพื้นที่ปลูกให้เพิ่มมากขึ้นซึ่งอยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นส่วนใหญ่ แต่ผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยพื้นที่ปลูกกลับมีแนวโน้มลดลง ปัญหาการระบาดของโรคเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญทำให้ผลผลิตอ้อยในประเทศไทยตกต่ำ คือ ปัญหาของโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยเกิดจากสาเหตุเชื้อไฟโตรพลาสมา เพราะซึ่งเชื้อมีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียขนาดเล็กที่สุด แต่ไม่มีผนังเซลล์ (cell wall) ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีเพียงเยื่อหุ้มเซลล์(plasma membrane) รูปร่างไม่แน่นอนมีขนาด 80-900 นาโนเมตร จัดอยู่ใน Class Moliicutes (พรทิพย์, 2544) ได้แพร่กระจายไปสู่พื้นที่ปลูกอ้อยทุกภาคของประเทศไทยอย่างต่อเนื่องในหลายพื้นที่ตั้งแต่ปี 2495 จนถึงปัจจุบัน ถือเป็นโรคอุบัติซ้ำซากที่ทำให้คุณภาพผลผลิตอ้อยลดลง และต้นทุนการผลิตของเกษตรกรเพิ่มสูงขึ้นจากการที่ต้องรื้อแปลงอ้อยเพื่อปลูกใหม่ ทำให้เกษตรกรหันไปปลูกพืชเศรษฐกิจอื่น เช่น ยางพารา และมันสำปะหลัง ทำให้ผลผลิตอ้อยโดยรวมทั้งประเทศลดลงและขาดแคลนวัตถุดิบป้อนเข้าสู่โรงงานน้ำตาลทราย โรงงานเอทานอล และโรงไฟฟ้าชีวมวลซึ่งจะสร้างความสูญเสียทางเศรษฐกิจค่อนข้างสูง และในปัจจุบันยังไม่มีเทคโนโลยีใดที่สามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดจากโรคใบขาวได้ร้อยเปอร์เซ็นต์ ดังนั้น วิธีการตรวจสอบที่มีความแม่นยำสูงเข้ามาเข้าช่วยแก้ปัญหา และในปัจจุบันเริ่มมีการสังเคราะห์โปรตีนจาก *Sec A* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาโดยอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรียได้และนำมาพัฒนางานวิจัยต่อยอดทางด้านอิมมูโนวิทยาได้ พบว่าจากรายงานพบว่า Sec A protein มีศักยภาพผลิตเป็นแอนตีซีรัมต่อเชื้อ Onion yellow phytoplasma จากการ expression โดยอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (Kakizawa *et. al.,* 2001) ทั้งนี้ การใช้ *Sec A* gene จึงเป็นการเพิ่มทางเลือกอีกทางสำหรับการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาว ด้วยเทคนิคทางด้านอิมมูโนวิทยา

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการโรคใบขาว
2. ตัวอย่างอ้อยปกติ
3. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่
    - โกร่งบดตัวอย่าง
    - กระติกสุญญากาศ
    - หลอดพลาสติกขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร
    - ตู้แช่แข็ง -20 ^{0}C
    - อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker)
    - เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
    - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
    - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (High Speed Centrifuge)
    - ตู้ดูดควันและสารพิษ (Hood)
    - เครื่อง Thermal cycler
    - เครื่อง Gel electrophoresis
    - เครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator
4. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่
    - ไนโตรเจนเหลว
    - สารประกอบ CTAB buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 และ 2.0% PVP-40; Na_2SO_3 และ PVP-40)
    - เอ็นไซม์ *Taq* DNA Polymerase, Recombinant (Invitrogen)
    - GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas)
    - Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1)
    - Ethanol
    - TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)
    - Agarose gel

วิธีการ

1.สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชจากแปลงปลูกอ้อย **(Figure 1)** และนำมาปลูกในกระถางและเก็บไว้ในเรือนทดลองเพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อต่อไป**(Figure 2)**

2.สกัดดีเอ็นเอเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุใบขาวอ้อยด้วย DNeasy Plant Mini Kit

3. ทำการออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ *secA* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยจำนวน 1 ชุด

4. สังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction นำตัวอย่างดีเอ็นเอเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย และดีเอ็นเออ้อยปกติ ที่ได้สกัดด้วยวิธีการ DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) ทำการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค PCR

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ได้แก่

-	น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH_2O)	17.0	ไมโครลิตร
-	10x buffer	2.5	ไมโครลิตร
-	$MgCl_2$ (25 mM)	1	ไมโครลิตร
-	dNTP (10 mM)	1	ไมโครลิตร
-	ไพรเมอร์ forward (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
-	ไพรเมอร์ reverse (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
-	platinum Taqmix (Invitogen,0.5unit/µl)	0.5	ไมโครลิตร
-	ดีเอ็นเอต้นแบบ	1	ไมโครลิตร
	รวม	**25.0**	**ไมโครลิตร**

5.นำผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel เตรียมในสารละลาย 0.5x TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 8 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye 2 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบขนาดกับ 100 bp DNA Ladder แล้วนำ agarose gel มาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วย สารละลาย ethidium bromide นาน 15 นาที และแช่น้ำเปล่า 10 นาที แล้วนำแผ่น agarose gel มาตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator ทำการบันทึกภาพและสรุปผลการทดลอง

6. การโคลนยีน *SecA* gene โดยสารละลายพลาสมิดลูกผสมจากปฏิกิริยา ligation ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ในหลอดที่มีเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ที่พร้อมรับ พลาสมิดลูกผสม (competent cell) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำพลาสมิดลูกผสมถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ DH 5α ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook *et. al.,* 1989)

7. วิเคราะห์ สรุปผล และเขียนรายงานผลการวิจัย

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2556-กันยายน 2558

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สามารถนำมาสังเคราะห์*Sec A* gene ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยคู่ไพร์เมอร์ SecAfor1/SecArev3 ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 800 เบส **(Figure 3)** และทำการเชื่อมต่อ *Sec A* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย ด้วยพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน genbank พบว่าเหมือนกับ Sugarcane grassy shoot phytoplasma และ Sugarcane white leaf phytoplasma อยู่ในระดับ 97-98 เปอร์เซ็นต์ และทำการเก็บโคลนในสารละลาย 30 เปอร์เซ็นต์ glycerol ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอพลาสมิดสายผสม *Sec A* gene ออกจากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5α และนำไปใช้ผลิตโปรตีน *Sec A* ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยในระบบเซลล์แบคทีเรียในปีงบประมาณ 2558 ต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

คู่ไพร์เมอร์ SecAfor1/SecArev3 สังเคราะห์ *Sec A* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 800 เบส ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) หลังจากทำการโคลนยีนแล้วทำการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลใน genbank พบว่าเหมือนกับ Sugarcane grassy shoot phytoplasma และ Sugarcane white leaf phytoplasma อยู่ในระดับ 97-98 เปอร์เซ็นต์ จึงทำการเก็บโคลนเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอพลาสมิดสายผสม *Sec A* gene ออกจากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5α เพื่อนำไปใช้ผลิตโปรตีน *Sec A* ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยในระบบเซลล์แบคทีเรียในปีงบประมาณ 2558 ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2544. มอลลิคิวท์สาเหตุโรคพืช. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Kakizawa, S., Oshima, K., Kuboyama, T., Nishigawa, H., Jung H.-Y., Sawayanagi, T., Tsuchizaki, T., Miyata, S.-I., Ugaki, M., and Namba, S., 2001. Cloning and Expression Analysis of Phytoplasma Protein Translocation Genes. Mol. Plant-Microbe Interact. 14(9) : 1043-1050.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Manistis. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2d ed., Cold Spring Habor Laboratory Press, New York. 545 p.

Figure 1 Sugarcane white leaf symptom in Kanchana Buri province

Figure 2 Sugarcane white leaf symptom in glass house

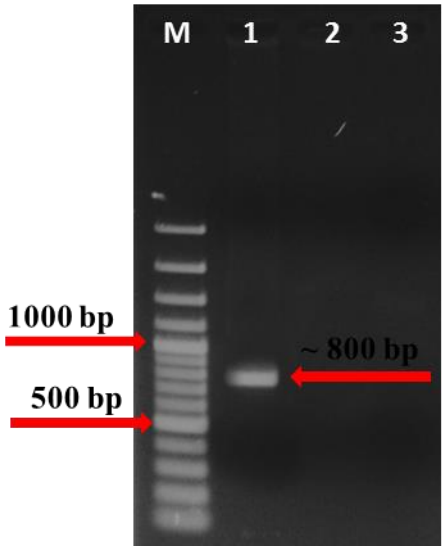


Figure 3 Agarose gel electrophoresis of phytoplasma *secA* gene cause of Sugarcane white leaf by PCR using SecAfor1 / SecArev1 primers

M = marker 100 bps DNA Ladder (fermentus)

1 = DNA amplicon 800 bp

2 = Healthy sugarcane (Negative control)

3 = Water

การผลิตแอนติซีรัมของไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) สาเหตุโรคทริสเทซ่าของพืชตระกูลส้มใช้ระบบเซลล์แบคทีเรีย

Antiserum production of *Citrus tristeza virus* causing citrus tristeza disease by bacterial cell system

แสนชัย คำหล้า กาญจนา วาระวิชะนี
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

โรคทริสเทซ่า (*Citrus tristeza disease*) เป็นโรคติดเชื้อภายในที่สำคัญของพืชตระกูลส้มเกิดจากเชื้อไวรัส *Citrus tristesa virus* (CTV) จัดอยู่ในสกุล *Closterovirus* มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว ทำการสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสด้วยคู่ไพร์เมอร์ CP1/CP2 ด้วยเทคนิค Reverse transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 672 เบส แปลรหัสลำดับอะมิโนได้ 224 อะมิโน เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่ามีความเหมือนในส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CTV ระดับ 93 – 94 เปอร์เซ็นต์ ทำการเชื่อมยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega) แล้วถ่าย พลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5α ด้วยวิธีการ heat shock transformation สำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนการผลิตโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CTV ในระบบเซลล์แบคทีเรียในปีงบประมาณ 2558 ต่อไป

Keywords : การโคลนยีน, การสังเคราะห์โปรตีน, ระบบเซลล์แบคทีเรีย, *Citrus tristeza disease*

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-01-10-57

คำนำ

โรคทริสเทซ่า (Tristeza disease) เป็นโรคติดเชื้อภายในที่สำคัญของพืชตระกูลส้มเกิดจากเชื้อ *Citrus tristeza virus* พบมีการระบาดทั่วโลกและเป็นโรคหนึ่งที่ทำความเสียหายอย่างมากทั้งต่อเกษตรกรรายย่อยจนถึงระดับอุตสาหกรรมการปลูกส้มขนาดใหญ่ สำหรับประเทศไทยมีรายงานครั้งแรกในปี พ.ศ. 2515 โดยกลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร (ไมตรี, 2534) เชื้อไวรัสสาเหตุโรคจัดอยู่ในสกุล *Closterovirus* วงศ์ *Closteroviridae* จัดเป็นไวรัสขนาดใหญ่ที่สุดที่เข้าทำลายพืชมีลักษณะอนุภาคยาวคล้ายเส้นด้าย (thread-liked particle) ขนาดอนุภาค 11 x 2,000 นาโนเมตร มีสารพันธุกรรมเป็นแบบอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวเส้นบวก (plus single strand RNA, อยู่หนาแน่นเฉพาะภายในระบบลำเลียงของพืชโดยเฉพาะท่ออาหารของพืช (phloem)

ลักษณะอาการของโรค พืชตระกูลส้มสามารถติดเชื้อโรคทริสเทซ่าได้ทุกชนิด แต่มีระดับความรุนแรงของโรคไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับทั้งสายพันธุ์พืช สายพันธุ์เชื้อไวรัส รวมถึงภาวะแวดล้อมอื่นๆ ที่พืชได้รับในขณะที่พืชถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย ในมะนาวจะแสดงอาการชัดเจนที่สุด โดยมีอาการใบเหลืองซีดคล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร ใบมีขนาดเล็ก หนาผิดปกติ ขอบใบม้วนเข้า ในใบอ่อนเส้นใบจะแสดงอาการเป็นขีดโปร่งแสง (vein clearing) ส่วนใบแก่เส้นใบจะนูนแข็งและแตก ต้นที่ได้รับเชื้อไวรัสสายพันธุ์รุนแรงจะแสดงอาการแคระแกร็น ให้ผลผลิตต่ำและตายไปในที่สุด ในพืชตระกูลส้มอื่นๆ ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ส้มตรา และส้มโอ อาการของโรคไม่รุนแรงหรือแสดงอาการชัดเจนเท่ากับในมะนาว ในระยะแรกของการติดเชื้ออาการไม่ปรากฏชัดเจน แต่เมื่อต้นส้มให้ผลผลิตแล้ว 1-2 ปี และต้นส้มเริ่มอ่อนแอลงจะแสดงอาการใบกลับ ไม่เขียวสดชื่น คล้ายอาการขาดน้ำ หากต้นส้มติดลูกดกมากเกินไปจะสลัดใบและลูกทิ้งและแสดงอาการทรุดโทรม การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสทริสเทซ่าสามารถเกิดขึ้นได้ 3 วิธี คือ การติดไปกับกิ่งพันธุ์ซึ่งได้มาจากต้นแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัส การติดตาทาบกิ่งจากการใช้ตาที่ไม่ปลอดโรค และการถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อน มีเพลี้ยอ่อนหลายชนิดที่สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสได้ ได้แก่ เพลี้ยอ่อนส้ม (*Toxoptera citricida*), เพลี้ยอ่อนฝ้าย (*Aphis gossypii*), เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Toxoptera aurantii)* และเพลี้ยอ่อนผัก (*Apis spiraecola*)

วิธีการตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุในส้มโดยการใช้พืชทดสอบโดยการติดตา ทาบกิ่ง อาการบนพืชทดสอบเริ่มปรากฏหลังการถ่ายทอดโรคแล้วอย่างน้อย 1-2 เดือน หรือใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น เทคนิค RT-PCR ซึ่งให้ผลที่แม่นยำ และรวดเร็ว แต่ต้องอาศัยความชำนาญเฉพาะด้านรวมทั้งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการตรวจสอบตาหรือกิ่งพันธุ์ส้มเป็นจำนวนมาก สำหรับเทคนิคทางซีรัมวิทยา เช่น เทคนิค ELISA เป็นวิธีการที่ง่ายและค่าใช้จ่ายน้อยกว่าเทคนิค PCR แต่เนื่องจากปริมาณของ *Closterovirus* ในพืชมีน้อย ทำให้ประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ยังไม่ดีที่สุด ในปัจจุบันอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพทำให้สามารถสังเคราะห์ coat protein ของเชื้อไวรัส

CTV ในเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมากและมีความบริสุทธิ์สูงได้ ซึ่งเพื่อนำไปผลิตแอนติซีรัมที่มีความบริสุทธิ์และคุณภาพสูงในสัตว์ทดลองต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชตระกูลส้มที่แสดงอาการโรคทริสเทซ่า
2. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่
    - โกร่งบดตัวอย่าง
    - กระติกสุญญากาศ
    - หลอดพลาสติกขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร
    - ตู้แช่แข็ง -20 ^{0}C
    - อ่างควบคุมอุณหภูมิ
    - เครื่องชั่งละเอียด
    - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง
    - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ
    - ตู้ดูดควันและสารพิษ
    - เครื่อง Thermal cycler
    - เครื่อง Gel electrophoresis
    - เครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator
3. สารเคมีได้แก่
    - ไนโตรเจนเหลว
    - สารประกอบ CTAB buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 และ 2.0% PVP-40; Na_2SO_3 และ PVP-40)
    - 2-mercaptoethanol
    - Nucleotide mix
    - เอ็นไซม์ *Taq* DNA Polymerase, Recombinant (Invitrogen)
    - เอ็นไซม์ Reverse transcriptase
    - GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas®)
    - Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1)
    - Ethanol
    - TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)
    - Agarose gel

วิธีการ

1.เก็บตัวอย่างพืชจากแปลงปลูกส้มและนำมากราฟบนต้นกล้าส้มเก็บไว้ในเรือนทดลองเพื่อใช้เพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสสำหรับสกัดสารพันธุกรรม

2.สกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส CTV ด้วย RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

3. ใช้คู่ไพร์เมอร์ CP1/CP2 (Jiang *et. al.,* 2008) ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CTV สาเหตุโรคทริสเทซ่า

4. สังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CTV สร้างสาย Complementary DNA (cDNA) ด้วยเทคนิค Reverse Transcription (RT) จากอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส CTV ที่ได้สกัดด้วยวิธีการ RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) ทำการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค RT-PCR

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ได้แก่

-	น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH_2O)	7.0	ไมโครลิตร
-	Green master mix	10	ไมโครลิตร
-	ไพรเมอร์ CP1 (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
-	ไพรเมอร์ CP2 (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
-	cDNA	1	ไมโครลิตร
	รวม	20.0	ไมโครลิตร

5.นำผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1.2% agarose gel เตรียมในสารละลาย 1x TAE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 10 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบขนาดกับ 1 kb DNA Ladder แล้วนำ agarose gel มาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วย สารละลาย ethidium bromide นาน 15 นาที และแช่น้ำเปล่า 10 นาที แล้วนำแผ่น agarose gel มาตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator ทำการบันทึกภาพและสรุปผลการทดลอง

6. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CTV โดยสารละลายพลาสมิดลูกผสมจากปฏิกิริยา ligation ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ในหลอดที่มีเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* ที่พร้อมรับ พลาสมิดลูกผสม (competent cell) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำพลาสมิดลูกผสมถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ DH 5α ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook *et. al.,* 1989)

7. วิเคราะห์ สรุปผล และเขียนรายงานผลการวิจัย

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2556-กันยายน 2558

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) ด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ด้วยคู่ไพร์เมอร์ CP1/CP2 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 672 เบส (ภาพที่ 1) เชื่อมต่อยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CTV กับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega®) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน genbank พบว่าเหมือนกับยีนโปรตีนห่อหุ้ม *Citrus tristeza virus* อยู่ในระดับ 93-94 เปอร์เซ็นต์) เมื่อนำมาแปลรหัสลำดับอะมิโนได้ 278 อะมิโน (ภาพที่ 2) ทำการเก็บโคลนในสารละลาย 30 เปอร์เซ็นต์ glycerol ที่ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้สกัดดีเอ็นเอพลาสมิดสายผสมของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส *Citrus tristeza virus* ออกจากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5α เพื่อนำไปใช้ผลิตโปรตีนของยีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CTV ในระบบเซลล์แบคทีเรีย ต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส *Citrus tristeza virus* (CTV) สาเหตุโรคทริสเทซ่าของพืชตระกูลส้มได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 672 เบส และมีความเหมือนกับส่วนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CTV ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ genbank อยู่ในระดับ 93-94 เปอร์เซ็นต์ จึงทำการเก็บโคลนเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอพลาสมิดสายผสมของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CTV จากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5α เพื่อใช้ผลิตโปรตีนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสในระบบเซลล์แบคทีเรียต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ไมตรี พรหมมินทร์. 2534. โรคทริสเทซ่าและโรคใบเหลืองต้นโทรมหรือโรคกรีนนิ่ง. เอกสารวิชาการเทคโนโลยีป้องกันและกำจัดโรคส้ม กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืชกรมส่งเสริมการเกษตร. หน้า 41 – 47.

Jiang, B., N. Hong, G.P. Wang, J. Hu, J.K. Zhang, C.X. Wang, Y. Liu and X.D. Fan. 2008. Characterization of Citrus trizteza virus strains from southern China bases on analysis of restriction patterns and sequences of their coat protein genes. Virus Genes 37: 185-192.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Manistis. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2d ed., Cold Spring Habor Laboratory Press, New York. 545 p.

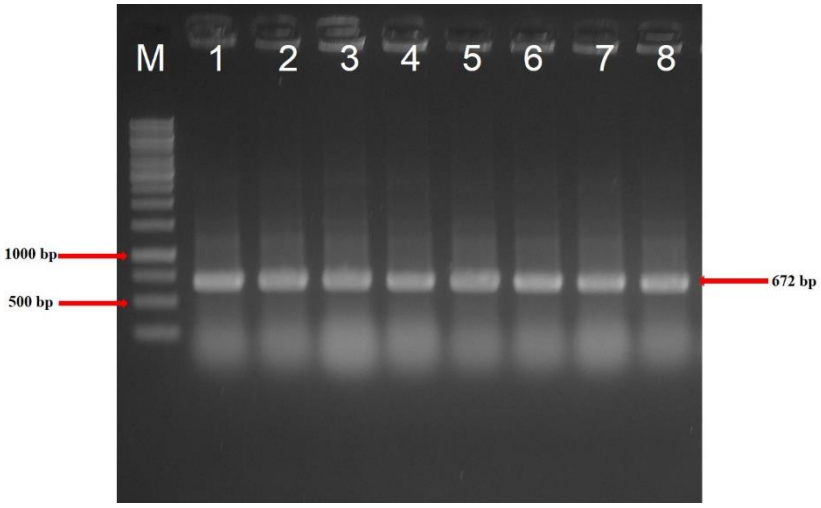


Figure 1 Agarose gel electrophoresis of *Citrus tristeza virus* coat protein gene about 672 bp by PCR using CP1 / CP2 primers

M = marker 1 kb DNA Ladder (fermentus®)

1 – 8 = DNA amplicon about 672 bp

MDDETKKLKNKTKETIEGDNVVAAESSFGSLNLHIDPTLIAMNDVRQLNTQQNATLNRDLFLTLKGKYPNL
PDKDKDFHLAMMLYRLAVKSSSLQSDDDTTGVTYTREGVEVELSDKLWTNVVFNSQGIGNRTNALRVWG
RTNDALYLAFCRQNRNLSYGGRPLDAGIPAGYHYLCADFLTGAGLTDLECAVYIQAKEQLLKKRGADEVVV
TNVRQLGKFNTR

Figure 2 Amino acid sequence of *Citrus tristeza virus* coat protein gene about 224 aa

การพัฒนาชุดตรวจสอบแบบ Immuno-Strip เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ในกล้วยไม้

Development of Immuno-Strip Detection for *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* on Orchid

รุ่งนภา ทองเครั่ง ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ทัศนาพร ทัศคร บูรณี พั่ววงษ์แพทย์
ทิพวรรณ กันหาญาติ
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ที่ผลิตได้ โดยใช้ membrane protein complex เป็นสิ่งกระตุ้น (antigen) ในการผลิตแอนติบอดีนั้น เมื่อทดสอบคุณสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้มีค่าไตเตอร์สูงที่สุด คือ 128,000 เมื่อทดสอบความจำเพาะเจาะจงด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จึงมีความจำเพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* เมื่อทดสอบความไวของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความไวในการตรวจสอบเชื้อที่มีปริมาณต่ำสุด 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ดังนั้นโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ที่ผลิตได้จากการทดลองนี้ มีความไวอยู่ในระดับที่สามารถนำมาใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบแบบ Immuno Strip ตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ได้

Keywords : ชุดตรวจสอบ, Immuno Strip, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-01-11-57

คำนำ

เชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (ชื่อเดิม *Pseudomonas cattleyae*) สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ ลักษณะอาการที่พบเริ่มแรกแผลจะมีอาการฉ่ำน้ำสีเหลืองอ่อน มีวงสีเหลืองล้อมรอบ แผลจะมีการพัฒนาขยายขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนเนื้อเยื่อบริเวณกลางแผลมีการยุบตัวลงไปจากผิวใบ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ มีลักษณะแข็ง แผลมีรูปร่างไม่แน่นอน พบได้ทั้งใบแก่และใบอ่อน มีการระบาดรุนแรงในช่วงฤดูฝน อาจจะพบลักษณะอาการอีกแบบคือ แผลสีขาว เป็นวงสีน้ำตาลหรือเทา ที่ขอบแผลชั้นกลาง จะเป็นสีดำขรุขระ รูปร่างไม่แน่นอน ขอบแผลนอกสุดมีสีเหลืองล้อมรอบ (Divinagracia *et al*., 1984) เชื้อแบคทีเรีย *A. avenae subsp. cattleyae* สามารถเข้าสู่ใบกล้วยไม้ได้ทางบาดแผล (wound) ช่องเปิดธรรมชาติของใบ (hydrathods) เชื้อสามารถแพร่กระจายโดยกระเด็นไปกับน้ำที่ใช้รด โดยเฉพาะวิธีการให้น้ำแบบ overhead จะส่งผลให้เชื้อสามารถแพร่กระจายไปได้ดี (Miller, 1990) พบการระบาดในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลแวนดา (Vanda Hybrid) แคทลียา (Cattleya) ฟาแลนนอปซิส (Phalaenopsis) ซิมบิเดียม (Cymbidium) เดนโดรเบียม (Dendrobium) ม็อคคาร่า (Mokara) และออนซิเดียม (Oncidium) (Miller, 1990) ในเกือบทุกแหล่งที่มีการปลูกกล้วยไม้

จากการระบาดที่พบในปัจจุบันทำความเสียหายให้แก่เกษตรกรอย่างมากเนื่องมาจากเกษตรกรไม่สามารถจำแนกชนิดของโรคได้ถูกต้องในระยะแรกทำให้เกิดการแพร่ระบาด ดังนั้นหากเกษตรกรสามารถวินิจฉัยและรู้ถึงสาเหตุที่ถูกต้องจะทำให้สามารถป้องกันกำจัดได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชจำเป็นต้องมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพและความแม่นยำเพิ่มมากขึ้น และที่สำคัญต้องมีการพัฒนาให้รวดเร็วขึ้น เพื่อสามารถนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากการวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืชเป็นหัวใจสำคัญในการอารักขาพืช เมื่อมีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชอย่างถูกต้องแม่นยำ ประกอบกับการตรวจที่รวดเร็ว ทำให้สามารถหาแนวทางการป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ควบคุมการระบาดของศัตรูพืชได้ทันสถานการณ์

ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคการตรวจสอบสาเหตุโรคหลายชนิด ซึ่งเทคนิคต่างๆ เหล่านั้นอาจต้องใช้เวลาในการตรวจสอบนาน และ/หรือมีค่าใช้จ่ายสูง ไม่สะดวกต่อการปฏิบัติงานในภาคสนามและการให้บริการตรวจสอบผลิตผลเกษตร งานวิจัยนี้จึงได้นำ เทคนิค Immuno Strip มาปรับใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียชนิดนี้ เพื่อให้สามารถตรวจสอบแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ สะดวกรวดเร็วและถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สัตว์ทดลอง กระต่ายพันธ์ White New Zealand จำนวน 1 ตัว
2. แบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae*
3. อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ PSA

4. Goat anti-rabbit IgG

5. สารละลาย Colloidal gold

6. วัสดุที่ใช้ประชุดตรวจสอบ Immuno Strip เช่น nitrocellulose membrane AE99, sample pad, conjugate pad, absorption pad, backing pad

วิธีการ

1. การเตรียมแอนติเจน (Antigen) : นำเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่จำแนกชนิดและทดสอบความรุนแรงโรคแล้วมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA (Potato semi-synthetic agar) ให้มีอายุ 48 ชั่วโมง นำมาล้างเซลล์แบคทีเรีย 3 ครั้งด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) (Allan and Kelman, 1977) แล้วนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 20 นาที นำเซลล์แบคทีเรียที่ล้างแล้วมาละลายใน PBS จากนั้นนำไปทำการ fix เซลล์แบคทีเรีย ด้วย 2% glutaraldehyde (Allan and Kelman, 1977) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาทำให้ glutaraldehyde เจือจางหมดไปโดยการ dialysis ใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาที โดยเปลี่ยน PBS ทุกๆ 4 ชั่วโมง เก็บสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ได้ไว้ที่ 4 °C เพื่อใช้ในการฉีดกระต่ายต่อไป

2. การผลิตแอนติซีรั่ม : ทำการละลายเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการ fix เซลล์ด้วย glutaraldehyde แล้วปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้ได้ประมาณ 10^9 หน่วยโคโลนี ต่อมิลลิลิตร ด้วย PBS จากนั้นนำไปผสมกับ Freund's incomplete adjuvant ในอัตรา 1:1 ผสมให้เข้ากันเพื่อนำไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่ายทดลองพันธุ์ White New Zealand สีขาว โดยก่อนการฉีด 1 สัปดาห์ เจาะเก็บเลือดกระต่ายไว้ก่อนเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (Normal serum) จากนั้นนำสารละลายแบคทีเรียที่ผสมกับ adjuvant แล้วฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่าย โดยฉีดอาทิตย์ละหนึ่งครั้ง รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 4 สัปดาห์ หลังการฉีดครั้งสุดท้าย 1 อาทิตย์ เจาะเก็บเลือดกระต่าย 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ แยกและเก็บแอนติซีรั่ม โดยนำเลือดกระต่ายที่ได้ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแข็งตัว จากนั้นใช้เข็มลนไฟฆ่าเชื้อ แล้วกรีดที่ผิวตรงรอยต่อระหว่างบีกเกอร์กับเลือดจนรอบ นำบีกเกอร์ไปตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 12 ชั่วโมง แล้วนำเอาเฉพาะส่วนน้ำใสมาปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อเอาส่วนเม็ดเลือดแดงออกไป นำส่วนน้ำใสที่ได้ซึ่งเป็น แอนติซีรั่มเก็บแช่แข็งไว้

3. ทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรั่ม :

<u>การตรวจค่าไตเตอร์ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*</u>

ตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect โดยนำสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 ($1.6x10^8$ หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร) สำหรับเคลือบในหลุม ELISA plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยมีตัวควบคุมเปรียบเทียบลบ (Negative control) เป็นหลุมที่เคลือบด้วย 1x PBS pH 7.4 นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน ล้างด้วย PBST (Phosphate buffer+0.05% Tween 20) หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที เติม blocking solution (PBS+2% skim milk) หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม PAb ที่ได้ทำการเจือจางแบบ 2 เท่า เป็นลำดับ (two fold serial dilution) ใน 1x PBS เริ่มจากความเข้มข้น 1:1000 จนถึง 1:128000 โดยมีตัวควบคุม (negative control) คือ normal serum เจือจาง 1:1000 ใน 1x PBS นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที เติม Goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphates ที่เจือจางใน PBST อัตราส่วน 1 : 1000 หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที แล้วเจือจางสาร PNPP ใน substrate buffer อัตราส่วน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 และ 60 นาที เมื่อครบเวลาดังกล่าววัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Optical density ; OD) ด้วยเครื่อง ELISA reader (Multiscan EX, Lab system, Finland) ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*

เตรียมเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่ *A. avenae* subsp. *cattleyae, A. avenae* subsp. *citrulli*, *Bukhoderia gladioli* pv. *gladioli*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E. chrysanthemi*, *Pantoea* sp., *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, *Ralstonia solanacearum* และเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบบนผิวใบกล้วยไม้ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน จำนวน 7 ชนิด ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำเชื้อมาเจือจางด้วย 1x PBS ให้มีปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยมีตัวควบคุมเปรียบเทียบลบ (Negative control) เป็นหลุมที่เคลือบด้วย 1x PBS และทำปฏิกิริยากับ PAb ใน 1x PBS ที่ค่าการเจือจาง 1:1000

การทดสอบความไว (sensitivity) ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae*

เตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ให้มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางเซลล์แบคทีเรียใน 1x PBS ครั้งละ 10 เท่า ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 และ 10^1 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับเคลือบในหลุม ELISA plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบกับ PAb ด้วยเทคนิค indirect ELISA ตามวิธีข้อ 6.3.1 โดยมีตัวควบคุม (Negative control) เป็นหลุมที่เคลือบด้วย 1x PBS และทำปฏิกิริยากับ PAb ใน 1x PBS ที่ค่าการเจือจาง 1:1000

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2557 สิ้นสุด กันยายน 2558

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่ผลิตได้ พบว่ามีค่าไตเตอร์ระหว่าง 1,000 - 128,000 โดยแอนติซีรัมที่เจาะในครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 มีค่าเพียง 1:1,000 ครั้งที่ 3 และครั้งที่ 4 มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 2 ครั้งแรก เป็น 1:8,000 ครั้งที่ 5 และครั้งที่ 6 มีค่า 1:32,000 ในขณะที่การเจาะในครั้งที่ 7 และครั้ง 8 ได้แอนติซีรัมที่มีค่าไตเตอร์สูงถึง 1:128,000 เนื่องจากแอนติเจนที่ฉีดเข้าไปในกระต่ายเริ่มเข้าไปกระตุ้นให้กระต่ายผลิตแอนติบอดีในร่างกาย ทำให้ค่าไตเตอร์ของการเจาะเลือดครั้งแรกๆ มีค่าต่ำ เมื่อเจาะในครั้งที่ 5 และ 6 กระต่ายได้ผลิตแอนติบอดีขึ้นมาสูงขึ้น และในครั้งที่ 7และ 8 ได้ผลิตแอนติบอดีขึ้นมาสูงสุด (ประพันธ์ และคณะ, 2527) ในขณะที่ค่าไตเตอร์เริ่มลดลงในการเจาะเลือดครั้งที่ 9 มีค่า 1:64,000 ดังนั้นจึงเลือก ใช้แอนติซีรัมครั้งที่ 7 และครั้งที่ 8 สำหรับเตรียม IgG บริสุทธิ์ต่อไป และเมื่อทดสอบค่าเจือจางของแอนติบอดี พบว่าที่ค่าเจือจางระดับ 1:1000 สามารถตรวจสอบเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่ผลิตได้ กับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยวิธี indirect ELISA พบว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรีย *Bukhoderia gladioli* pv. *gladioli*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pantoea* sp., *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, *Ralstonia solanacearum* และเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบบนผิวใบกล้วยไม้ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน จำนวน 7 ชนิด ให้ค่า O.D. ที่ 405 นาโนเมตรเป็นลบ แต่ทำปฏิกิริยากับแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* เชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของพืชตระกูลแตง (Bacterial fuit blotch disease) โดยมีค่า O.D. ที่ 405 นาโนเมตร ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดอยู่ใน genus และ species เดียวกันมีความใกล้ชิดกันมาก ต่างกันเฉพาะ subsp. ที่เกี่ยวข้องกับพืชอาศัย โดยแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* พบเฉพาะในพืชตระกูลแตงเท่านั้นไม่พบในกล้วยไม้ แบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* พบเฉพาะในกล้วยไม้เท่านั้น ดังนั้นโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จึงมีความจำเพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ในการตรวจสอบในเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในกล้วยไม้

จากการทดสอบความไว (sensitivity) ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* พบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้สามารถตรวจสอบเชื้อได้ที่ปริมาณต่ำสุด 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี indirect ELISA มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.531 (ตารางที่ 7) ซึ่งโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตได้ส่วนใหญ่ เมื่อนำไปใช้ตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิคทางเซรุ่ม

วิทยา พบว่าจะสามารถตรวจเชื้อแบคทีเรียได้ที่ปริมาณเซลล์แบคทีเรียต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร (sensitivity) ซึ่งเฉลี่ยจากปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่สามารถตรวจได้ด้วยวิธี fluorescent-antibody technique และELISA (Goto, 1992) ดังนั้นโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่ผลิตได้จากการทดลองนี้ มีความไวอยู่ในระดับที่สามารถนำมาใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรียได้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ที่ผลิตได้ โดยใช้ membrane protein complex เป็นสิ่งกระตุ้น (antigen) ในการผลิตแอนติบอดีนั้น เมื่อทดสอบคุณสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้มีค่าไตเตอร์สูงที่สุด คือ 128,000 เมื่อทดสอบความจำเพาะเจาะจงด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าของพืชตระกูลแตง (Bacterial fuit blotch disease) เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดอยู่ใน genus และ species เดียวกันมีความใกล้ชิดกันมาก โดยเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* พบเฉพาะในพืชตระกูลแตงเท่านั้น ไม่พบในกล้วยไม้ แบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* พบเฉพาะในกล้วยไม้เท่านั้น ดังนั้นโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จึงมีความจำเพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* เมื่อทดสอบความไวของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความไวในการตรวจสอบเชื้อที่มีปริมาณต่ำสุด 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร

เอกสารอ้างอิง

ประพันธ์ ภานุภาค, สดใส เวชชาชีวะ, ไหม รัตนวรารักษ์, ฤทัย สกุลแรมรุ่ง และปรียาจิต เจริญงศ์. 2527. **วิทยาภูมิคุ้มกัน**. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

Divinagracia, G.G., B.L. Candole and E.T. Cadapan. 1984. Some studies on bacterial brown spot of orchids caused by *Pseudomonas cattleyae* (Pavarino) saverlesco. **Summary in Philippine Phytopathology** 20: 3-4.

Goto, M. 1992. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathology**. Academic Press, INC.

Miller, J.W. 1990. Bacterial brown spot of orchid caused by *Pseudomonas cattleyae*. **Plant Pathology Circular** 330.

การตรวจสอบเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) ที่เป็นสาเหตุโรคของพืชตระกูลแตงด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา

Detection of *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) Cause Cucurbit Disease by Molecular biology Technique

กาญจนา วาระวิชะนี[1] ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์[1]
วันเพ็ญ ศรีชาติ[2]
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช[1]
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช[2]

รายงานความก้าวหน้า

สำรวจ และเก็บตัวอย่างแตงโมที่มี เชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) สาเหตุโรคในพืชตระกูลแตงในพื้นที่ปลูกภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยรวม 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ มหาสารคาม และสกลนคร โดยเก็บตัวอย่างแตงโมที่แสดงอาการคล้ายกับที่เกิดจากทอสโพไวรัสเข้าทายลาย ได้แก่ แสดงอาการด่างจุดวงแหวน แผลเนื้อเยื่อตาย ผลมีสะเก็ดสีน้ำตาลเข้ม ใบด่าง มาทดสอบรวม 30 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจหาเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA test) พบผลเป็น positive ที่ค่าดูดกลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 540 มากกว่า 2 เท่าของพืชปกติ (>0.207) ตรวจพบจำนวน 5 ตัวอย่าง นำไปตัวอย่างแตงโมไปสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคทางด้านโมเลกุลต่อไป

Keywords : พืชตระกูลแตง, Watermelon silver mottle virus, Detection

---

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-02-08-56

คำนำ

ทอสโพไวรัส (Tospovirus) เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิดทั่วโลก และมีพืชอาศัยที่กว้างมากกว่า 600 ชนิด ทั้งไม้ผล ไม้ประดับ และพืชผัก (Peters and Goldbach, 1995) ซึ่งพืชในตระกูลแตงเองก็พบกับปัญหาโรคไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) เช่นกัน สำหรับประเทศไทยมีข้อมูลรายงานว่าตรวจพบเชื้อไวรัส WSMoV ระบาดและทำความเสียหายกับแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เมลอน และแตงโมลูกผสมเพื่อการส่งออกในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น สกลนคร มหาสารคาม กาฬสินธุ์ และราชบุรี ลักษณะอาการที่พบแผลไหม้นูนที่ผิวผลและแห้งเป็นสะเก็ดแผลสีดำเงาทั่วไปทั้งผล ใบไหม้ดำช่ำน้ำ จากขอบใบ ยอดไหม้ผิวผลจะ ทำให้ผลมีขนาดเล็กลงทำให้เมล็ดพันธุ์ที่ได้ไม่มีคุณภาพเท่าทีควร ซึ่งสร้างปัญหาให้กับเกษตรกรและบริษัทผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกเป็นอย่างมาก และทอสโพไวรัสเป็นเชื้อสาเหตุที่สำคัญในด้านการตรวจรับรองเพื่อการส่งออกไปยังต่างประเทศ เช่น Ie (1970) เคยมีรายงานไว้ว่า *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) สามารถถ่ายทอดผ่านเมล็ด cineraria ได้สูงถึง 96 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น เพื่อป้องกันความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นกับผลผลิตแตงของเกษตรกรและผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก และเป็นการกำจัดแหล่งสะสมโรคออกจากแปลงปลูกรวมทั้งป้องกันการแพร่ระบาดโรคไปยังแปลงปลูกอื่นๆ เพราะโรคนี้มีเพลี้ยไฟเป็นแมลงพาหะช่วยถ่ายทอดโรค จึงต้องเร่งพยายามพัฒนาวิธีทางอณูชีววิทยาเข้ามาช่วยตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัส WSMoV ในพืชตระกูลแตง ซึ่งในปัจจุบันเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ถือว่าเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำ รวดเร็ว และสามารถประยุกต์กระบวนการตรวจสอบได้หลากหลายวิธี เช่น multiplex PCR, RT-PCR, *PCR-ELISA, Real time PCR* เป็นต้น เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่นๆ รวมทั้ง การใช้เทคนิคทางด้านเซรุ่มวิทยายังไม่สามารถแยกเชื้อไวรัสในกลุ่มทอสโพไวรัสได้อย่างชัดเจน

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรค
2. อุปกรณ์ทางการเกษตร ได้แก่ โรงเรือน กระถาง ตระกร้า ดิน ถุงปลูก ปุ๋ย และป้ายชื่อ
3. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ตู้แช่แข็ง -20°C อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker) เครื่องชั่งละเอียด เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) เครื่อง Thermal cycler และเครื่อง Gel electrophoresis
4. สารเคมีวิทยาศาสตร์ เช่น ไนโตรเจนเหลว สารประกอบ CTAB buffer เอ็มไซด์ (Roch) Chlorofrom และ Ethanol

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) สาเหตุโรคในพืชตระกลูแตง จากเอกสารที่เคยรายงานแล้วทั้งในและต่างประเทศเพื่อใช้ประกอบการวิจัยทำการบันทึกผลข้อมูลด้วยการจดบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไวรัส WSMoV
2. สำรวจ และเก็บตัวอย่างแตงโมที่มีเชื้อไวรัส WSMoV สาเหตุโรคในพืชตระกลูแตงในพื้นที่ปลูกสำคัญของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น สกลนคร มหาสารคาม กาฬสินธุ์ เป็นต้น โดยเก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตงโมที่แสดงอาการคล้ายกับที่เกิดจากทอสโพไวรัสเข้าทายลาย ได้แก่ แสดงอาการด่างจุดวงแหวน แผลเนื้อเยื่อตาย ผลมีสะเก็ดสีน้ำตาลเข้ม ใบด่าง เป็นต้น ใส่ตัวอย่างพืชในถุงพลาสติก และทำการบันทึกผลข้อมูลด้วยการจดบันทึกระหว่างการสำรวจ ได้แก่ สถานที่ วันที่ชื่อพืช ระยะการเจริญเติบโตของพืช อาการและส่วนของพืชที่แสดงอาการ ความรุนแรงของโรค และถ่ายภาพลักษณะอาการโรค
3. ตรวจหาเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) ด้วยเทคนิค ELISA
4. สกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV)
5. สืบค้นไพร์เมอร์จากที่เคยมีรายงาน หรือ ออกแบบไพร์เมอร์ใหม่ ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) โดยอาศัยข้อมูลจาก GenBank(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez)
6. สังเคราะห์อาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส Watermelon silver mottle virus (WSMoV) ด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)
7. ตรวจสอบผล PCR ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis
8. รวบรวม วิเคราะห์ และรายงานผลการทดสอบ
9. สรุปผลและเขียนรายงานผลการวิจัย

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2556-กันยายน 2558

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ออกสำรวจหาเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* สาเหตุโรคในพืชตระกูลแตงในพื้นปลูกแตงโมภาคตะวันออกเฉียง ได้แก่ จังหวัด จังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ มหาสารคาม และสกลนคร ได้ตัวอย่างแตงโมมาทดสอบรวมแตงโม 30 ตัวอย่าง

นำมาตรวจด้วยเทคนิค ELISA พบผลเป็น positive ที่ค่าดูดกลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 540 มากกว่า 2 เท่าของพืชปกติ (>0.207) ตรวจพบจำนวน 5 ตัวอย่าง

สกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสม เพื่อทดสอบแตงโม 30 ตัวอย่าง ด้วยชุด GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo scientific) และเก็บอาร์เอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพร์เมอร์ที่จับจำเพาะเชื้อไวรัส Watermelon silver mottle virus สาเหตุโรคสะเก็ดเงินของแตงโม ต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ได้ตัวอย่างแตงโมจังหวัด ขอนแก่น กาฬสินธุ์ และ มหาสารคาม มาทดสอบรวม 30 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจหาเชื้อไวรัส Watermelon silver mottle virus ด้วยเทคนิค ELISA พบผลเป็น positive ที่ค่าดูดกลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 540 มากกว่า 2 เท่าของพืชปกติ (>0.207) ตรวจพบจำนวน 5 ตัวอย่าง นำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพร์เมอร์ที่จับจำเพาะเชื้อไวรัส Watermelon silvermottle virus สาเหตุโรคสะเก็ดเงินของแตงโม ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

GenBank,National Center for Biotechnology. _____ . : Nucleotide.
แหล่งที่มา : (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez /, 5 มิถุนายน 2556)

Ie, T.S. 1970. *Tomato Spotted wilt Virus*. C.M.I./A.A.B. Plant Virus Deseription No. 39. 4 p.

Peter, D. and R. Goldbach. 1995. The biology of tospoviruses, pp. 199-210. In R. P. Singh and K. Kohmoto (eds.) Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases Volume III : Viruses&Viroide. Elsevier Science Ltd., Kidlington, Oxford.

การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* โดยเทคนิค multiplex PCR

Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* by multiplex PCR

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1/] ทิพวรรณ กันหาญาติ[1/] รุ่งนภา ทองเครั่ง[1/] ชลธิชา รักใคร่[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

แบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้ง (Bacterial leaf Blight disease) ของข้าว และแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* สาเหตุโรคใบขีดโปร่งแสง (bacterial leaf streak disease) เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางกักกันพืช ในกลุ่มสหภาพยุโรปจัดให้อยู่ในกลุ่ม EPPO A1 สามารถติดไปกับเมล็ด (seed borne) ทำให้ต้องระมัดระวังการเข้ามาของแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* สายพันธุ์อื่นจากต่างประเทศ (exotic pathogen) โดยพยายามหามาตรการต่างมาเพื่อป้องกัน การตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีประสิทธิภาพเป็นวิธีการหนึ่งที่จำเป็นต้องมีการพัฒนามาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* เพื่อป้องกันการเข้ามาของสายพันธุ์อื่นจากต่างประเทศ ซึ่งวิธีการตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชนั้นต้องเป็นวิธีการที่เป็นมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับจากประเทศผู้ค้า จึงได้มีการนำเทคนิค multiplex PCR มาใช้เพื่อการตรวจสอบแบคทีเรีย ทั้งสองชนิดในหลอดเดียวกัน โดยใช้ primer ที่ออกแบบมาให้เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* จำนวน 4 คู่ นำมาทดสอบ อยู่ระหว่างการทดสอบ ความเหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-02-09-57

คำนำ

แบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้ง (Bacterial leaf Blight disease) ของข้าว และแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* สาเหตุโรคใบขีดโปร่งแสง (bacterial leaf streak disease) เป็นเชื้อที่แพร่ระบาดทำความเสียหายให้กับแหล่งปลูกข้าวทั่วโลก โดยเฉพาะในแถบเอเชีย (Mew, 1987) ทั้งแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* เป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางกักกันพืช ในกลุ่มสหภาพยุโรปจัดให้อยู่ในกลุ่ม EPPO A1 เชื้อนี้มีรายงานว่าสามารถติดไปกับเมล็ด (seed borne) ทำให้ทีโอกาสถ่ายทอดโรคทางเมล็ดได้ (seed transmission) (Singh *et.al.*, 1983) และเชื้อนี้สามารถอยู่ในเมล็ดได้นาน 7-8 เดือน (Reddy, 1972)

แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* เป็นเชื้อที่มีความผันแปรในแง่ของความรุนแรงสูง มีการจัดกลุ่มสายพันธุ์ของเชื้อ (race) ตามปฏิกิริยาระหว่างสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงกับพันธุ์ข้าวมาตรฐาน (differential varieties) ที่มียีนต้านทาน (Mew, 1987) ประเทศไทยมีการศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* (race) ที่พบในประเทศไทยออกเป็น 3 กลุ่มตามความรุนแรงบนพันธุ์ข้าวมาตรฐาน (Eamchit and Mew, 1982; นงรัตน์ และคณะ,2530) สายพันธุ์เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในแต่ละพื้นที่มีความรุนแรงต่อพันธุ์ข้าวมาตรฐานแตกต่างกัน สายพันธุ์เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ของประเทศไทยแตกต่างจากสายพันธุ์เชื้อจากประเทศอื่น เช่น สายพันธุ์เชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จากประเทศญี่ปุ่น จำแนกตามความรุนแรงบนพันธุ์ข้าวมาตรฐานได้ 7 กลุ่ม ในขณะที่สายพันธุ์จากฟิลิปปินส์ จำแนกได้ 6 กลุ่ม อินโดนีเซีย ได้ 9 กลุ่มเป็นต้น(Mew, 1987)

แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzicola* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญอีกชนิดหนึ่ง สามารถทำให้เกิดโรคที่ความเสียหายแก่ผลผลิตข้าวโดยทำให้เมล็ดข้าวลีบสูญเสียน้ำหนักได้มากถึง 17% ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวและสภาพภูมิอากาศ แบคทีเรียชนิดนี้จะมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะในส่วนของเอเชียที่มีการปลูกข้าวพันธุ์ลูกผสมที่มีความอ่อนแอต่อแบคทีเรียชนิดนี้ ทำให้มีการกระจายของแบคทีเรียอย่างกว้างขวางในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน เอเชียรวมทั้งจีน, ไทย, มาเลเซีย, อินเดีย, เวียดนาม,ฟิลิปปินส์อินโดนีเซีย, เวสต์แอฟริกา, South America, และออสเตรเลีย

จากความสำคัญและความรุนแรงของแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ทำให้แต่ละประเทศโดยเฉพาะประเทศไทยที่มีการปลูกข้าวเลี้ยงประชากรของประเทศต้องระมัดระวังการเข้ามาของแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* สายพันธุ์อื่นจากต่างประเทศ (exotic pathogen) โดยพยายามหามาตรการต่างมาเพื่อป้องกัน การตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีประสิทธิภาพเป็นวิธีการหนึ่งที่จำเป็นต้องมีการพัฒนามาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ในห้องปฏิบัติของกักกันพืชเพื่อป้องกันการเข้ามาของสายพันธุ์อื่นจากต่างประเทศ ซึ่งวิธีการตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชนั้นต้องเป็นวิธีการที่เป็นมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับจากประเทศผู้ค้า สถาบันข้าวนานาชาติ (IRRI) ได้นำเสนอวิธีการตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรียในกลุ่ม

X. oryzae pathovars ได้แก่ *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* จากเมล็ดพันธุ์ข้าว โดยใช้เทคนิค multiplex PCR ใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงอย่างสูง 3 คู่ ทำปฏิกริยาในหลอดPCR เดียวกัน.ในการตรวจวินิจฉัยแบคทีเรีย *X. oryzae* pathovars ซึ่งไพรเมอร์ทั้งสามสามารถแยกความแตกต่างระหว่างแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* การทดลองนี้เป็นการนำเทคนิค multiplex PCR มาปรับใช้ในการตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* จากเมล็ดพันธุ์ข้าวและตัวอย่างใบที่เป็นโรคใบไหม้และใบขีดโปร่งแสงให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถตรวจแบคทีเรียทั้งสองชนิดในหลอดเดียวกัน

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) เครื่อง Thermocycler (Biometra ®)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. แบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola*

วิธีการ

1. **สืบค้นข้อมูล** เพื่อหาลำดับเบสของชุดไพรเมอร์ที่ Lang *et.al,* (2010) ได้ออกแบบไว้ในการตรวจวินิจฉัยแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* นำลำดับเบสมาสังเคราะห์ชุดไพรเมอร์เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2. **การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์** (Purified genomic DNA) การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีของ Pitcher et al. (1989) โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง LB ใช้ลูปฆ่าเชื้อ แตะเชื้อแบคทีเรียให้เต็มหนึ่งลูป ละลาย ใน1 มิลลิลิตร Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย 100 ไมโครลิตร TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA pH 8.0) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ เครื่องปั่น vortex

เติมด้วย 500 ไมโครลิตรของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 ไมโครลิตร ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 oC ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วย 500 ไมโครลิตร chloroform/iso-amyl-alcohol (24/1) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุ สาร isopropanol ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 oC จำนวน378 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอนเอด้วย 150 ไมโครลิตร ของ 70 % ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ลายตะกอนDNA ด้วย TE buffer pH. 8.0 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอนเอ ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่อง spectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลทให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

3. **ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR** โดยทดสอบปฏิกิริยา multiplex PCR ในการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ ด้วยชุดไพรเมอร์ที่ Lang *et.al,* (2010) ได้ออกแบบไว้ในการตรวจวินิจฉัยแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* หา Tm ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยา multiplex PCR จะได้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่เหมาะสม ตลอดจนทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาในแต่ละช่วงเวลา

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา multiplex PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ได้แก่

	Initial concentration	V tube (1l)	Final concentration
PCR buffer	10.0 x	2.00	1.0 x
MgCl2	25.0 mM	1.60	2.0 mM
dNTPs	2.5 mM	1.60	0.2 mM
Primer mix*		3.20*	
Xo3756F	5.0 8M	0.40	0.1 8M
Xo3756R	5.0 8M	0.40 0	1 8M
Xoo281-80F	5.0 8M	0.40 0	1 8M
Xoo281-80R	5.0 8M	0.40 0.	1 8M
Xoc318-3866F	5.0 8M	0.40 0	1 8M
Xoc318-3866R	5.0 8M	0.40 0	1 8M
Xoc321-3864F	5.0 8M	0.40 0	1 8M

Xoc321-3864R	5.0 8M	0.40 0	1 8M
Taq DNA Pol	5.0 U/1l	0.10	0.5 U
Water		6.50	
DNA template	80 ng/ 1l	5.00	

ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา multiplex PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามวิธีของ Lang et.al, (2010)

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (initial denaturing)	94	3
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	0.5
3. ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (primer annealing	64	0.5
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension)	68	2
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	68	10

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 35 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 °C นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาณ 10 ul มาผสมกับ loading dye (0.025% bromophenol 28 blue, 40% Ficoll 400, 0.5% SDS) ปริมาณ 2 ul จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5 % อะกาโรสใน 0.5 xTAE (40mM Tris, 4mM sodium acetate, 1mM EDTA, pH 7.9) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง ย้อมดีเอ็นเอด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

4. **ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity)** ของปฏิกิริยา multiplex PCR ในการตรวจแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* เป็นการทดสอบ primer ที่ออกแบบไว้ โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 มาทำการทดสอบความจำเพาะของ primer โดยใช้ DNA และเซลของแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ความเข้มข้นของ DNA ที่ 50 ng และความเข้มข้นของเซลล์ที่ 10^8 cfu/ml การทดสอบความไวในการตรวจสอบแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* (sensitivity) ของ primer เป็นการทดสอบ primer ที่ออกแบบไว้ โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 โดยใช้ DNA ของเชื้อแบคทีเรีย แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม และใช้เซลล์แบคทีเรีย แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ที่ความเข้มข้น 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร

เวลาและสถานที่

ต.ค.56 – ก.ย.58 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

แบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สาเหตุโรคขอบใบแห้ง (Bacterial leaf Blight disease) ของข้าว และแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* สาเหตุโรคใบขีดโปร่งแสง (bacterial leaf streak disease) เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางกักกันพืช ในกลุ่มสหภาพยุโรปจัดให้อยู่ในกลุ่ม EPPO A1 สามารถติดไปกับเมล็ด (seed borne) ทำให้ต้องระมัดระวังการเข้ามาของแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* สายพันธุ์อื่นจากต่างประเทศ (exotic pathogen) โดยพยายามหามาตรการต่างมาเพื่อป้องกัน การตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีประสิทธิภาพเป็นวิธีการหนึ่งที่จำเป็นต้องมีการพัฒนามาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* เพื่อป้องกันการเข้ามาของสายพันธุ์อื่นจากต่างประเทศ ซึ่งวิธีการตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชนั้นต้องเป็นวิธีการที่เป็นมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับจากประเทศผู้ค้า จึงได้มีการนำเทคนิค multiplex PCR มาใช้เพื่อการตรวจสอบแบคทีเรีย ทั้งสองชนิดในหลอดเดียวกัน โดยใช้ primer ที่ออกแบบมาให้เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* จำนวน 4 คู่นำมาทดสอบ อยู่ระหว่างการทดสอบ ความเหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ได้มีการนำเทคนิค multiplex PCR มาใช้เพื่อการตรวจสอบแบคทีเรีย ทั้งสองชนิดในหลอดเดียวกัน โดยใช้ primer ที่ออกแบบมาให้เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* จำนวน 4 คู่นำมาทดสอบ อยู่ระหว่างการทดสอบ ความเหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR

เอกสารอ้างอิง

นงรัตน์ นิลพานิชย์, วิชิต ศิริสันธนะ และสมคิด ดิสถาพร. 2530. การทดสอบความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคของเชื้อขอบใบแห้ง (*Xanthomonas campestris pv. oryzae*) บนพันธุ์ข้าวที่มีพันธุกรรมต่างกัน น 50-60 ใน รายงานผลงานวิจัยกลุ่มงานวิจัยโรคข้าวและธัญพืชเมืองหนาว กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

Adachi, N. and Okua, T. 2000 PCR-mediated Detection of *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* by Amplification of the 16S–23S rDNA Spacer Region Sequence . Journal of General Plant Pathology 66 (4): 303-309.

Eamchit, S. and T.W. Mew. 1982. Camparision of virulence of *Xanthomonas campertris pv. oryzae* in Thailand and the Philippines. Plant Disease 66:556-559.

Fraaije B A, Lovell D, Coelho J M, Baldwin S, Hollomon D W. 2001. PCR-based assays to assess wheat varietal resistance to blotch (*Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum*) and rust (*Puccinia striiformis* and *Puccinia recondita*) diseases. European Journal of Plant Pathology 107:905-917.

Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, Vance G H, Vogt P H. 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-bystep protocol. Biotechniques 23:504-511.

Lang, J. M., Hamilton, J. P., Diaz, M. G. Q., Van Sluys, M. A., Burgos, M. R. G., Vera Cruz, C.M., Buell, C. R., Tisserat, N. A., and Leach, J. E. 2010. Genomics-based diagnostic marker development for *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* and *X. oryzae pv. oryzicola*. Plant Dis. 94:311-319.

Mew, T.W. 1987. Current status and future prospects of research on bacteril blight of rice. Ann.Rev. Phythopathol. 25: 359-382.

Reddy, P.R. 1972. Studies on bacteriophages of *Xanthomonas oryzae* and *Xanthomonas translucens f.sp. oryzicola*, the incitants of blight and streak diseases of rice. PhD thesis, Banaras Hindu University. Varanasi, India.

Singh, D., F.Vinther and S.B. Mathur. 1983. Seed transmission of bacterial leaf blight in rice. Seed Pathology News No.15,p.11

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ในหัวพันธุ์ปทุมมาด้วยเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Detection of *Ralstonia solanacearum* in Curcuma by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

ทิพวรรณ กันหาญาติ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ รุ่งนภา ทองเครั่ง

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจสอบเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ปฏิกิริยา LAMP 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 1.6 µM FIP และ BIP, 0.2 µM F3 และ B3, 0.4 µM loop B , 0.4 µM dNTPs, 1.0 M Betaine, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 6 mM $MgSO_4$, 0.1% Triton X-100 และ 8U Bst DNA polymerase บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2% ใน 0.5X TBE และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นย้อมสีเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต พบแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะคล้ายขั้นบันได การศึกษาในขั้นตอนต่อไปเป็นการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ความไว (sensitivity) และวิธีการที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP ในการตรวจสอบเชื้อ *R. solanacearum* ในหัวพันธุ์ปทุมมา

Keywords : การตรวจสอบ, detection, *Ralstonia solanacearum*, LAMP

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-02-10-57

คำนำ

ปทุมมาเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย สามารถส่งออกทำรายได้เข้าสู่ประเทศถึง 15-30 ล้านบาทต่อปี ซึ่งส่วนมากจะทำการปลูกปทุมมาเพื่อการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศในรูปของหัวพันธุ์ โดยผลิตหัวพันธุ์เพื่อการจำหน่ายปีละไม่ต่ำกว่า 2 ล้านหัวต่อปี (อรวรรณ, 2548) แต่ปัญหาสำคัญในการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาคือ โรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ระบาดทำความเสียหายให้กับเกษตรกรและผู้ส่งออก เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถติดไปกับหัวพันธุ์ปทุมมาได้และเป็นเชื้อโรคที่สำคัญทางกักกันพืช ถ้าพบเชื้อนี้ติดไปกับหัวพันธุ์ที่ส่งออก หัวพันธุ์เหล่านั้นจะถูกเผาทำลายทันที ทำให้ไม่สามารถส่งออกได้ จึงต้องหาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคที่เฉพาะเจาะจง รวดเร็ว และสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยได้ การใช้วิธีทางเซรุ่มวิทยามีข้อจำกัดในการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อซาโปรไฟต์ชนิดอื่นๆ ทำให้เกิดผิดพลาดในการตรวจสอบ นอกจากนี้วิธีทางเซรุ่มวิทยายังมีความไวในการตรวจสอบต่ำกว่าวิธีทางอณูชีววิทยา เทคนิค PCR เป็นวิธีทางอณูชีววิทยาที่เฉพาะเจาะจง ตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว และสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยในตัวอย่างพืชได้ โดยจะใช้เวลาในการตรวจสอบนานประมาณ 3-4 ชั่วโมงขึ้นไป แต่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะที่มีความแม่นยำสูงเช่น เครื่อง PCR เครื่อง real time PCR ซึ่งมีราคาแพง และยังมีขั้นตอนการตรวจสอบยืนที่เพิ่มได้โดยใช้เครื่องมือเฉพาะ ทำให้ไม่สามารถนำเทคโนโลยีนี้ไปใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กๆ หรือใช้ในภาคสนามได้ ในปี ค.ศ. 2000 ได้มีรายงานการพัฒนาวิธีเพิ่มขยายยีนด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ขึ้นมาโดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่นชื่อ Tsugunori Notomi และคณะ ซึ่งได้ช่วยแก้ปัญหาที่สำคัญของเทคนิค PCR คือไม่ต้องใช้เครื่อง PCR เนื่องจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายยีน สามารถเกิดที่อุณหภูมิเดียวคือประมาณ 60-65°ซ และตรวจสอบยีนที่เพิ่มจำนวนได้ในขั้นตอนเดียวกัน (Natomi *et al.*, 2000) เทคนิคนี้จึงเหมาะกับประเทศที่กำลังพัฒนา หรือห้องปฏิบัติการเล็กๆ หรือสำหรับปฏิบัติการในภาคสนามได้ดีและสามารถนำไปปรับใช้ในงานกักกันพืชต่อไปในอนาคตได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น หลอดแก้ว จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลูป ตะเกียงแอลกอฮอล์ ปิเปต

2. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ เช่น เครื่องชั่ง ตู้ควบคุมอุณหภูมิ หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermalcycler) เครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation)

3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและทำปฏิกิริยา LAMP

4. เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

วิธีการ

1. เตรียมเชื้อ *R. solanacearum* เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อ *R. solanacearum* ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างๆ และเก็บรวบรวมไว้ใน culture collection ของกลุ่มงานบักเตรีวิทยา มาเลี้ยงในอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. การสกัดดีเอ็นเอเชื้อ *R. solanacearum* เพื่อใช้ในการทดสอบปฏิกิริยา LAMP

ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แตะเชื้อ 1 ลูป ละลายในบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร จากนั้นเติมด้วย Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมด้วยบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมด้วย absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน QIAamp Spin Column ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เปลี่ยน collection tube ใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที นำ QIAamp Spin Column ใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ แล้วเติมด้วยบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3. ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP

ทำการทดสอบหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *fliC* ซึ่งเป็นยีนที่สร้าง flagellin ของเชื้อ *R. solanacearum* เริ่มทำปฏิกิริยาแยกสายดีเอ็นเอของเชื้อที่ต้องการทดสอบที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ใช้ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร เติมในปฏิกิริยา LAMP 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1.6 µM FIP และ BIP, 0.2 µM F3 และ B3, 0.4 µM loop B , 0.4 µM dNTPs, 1.0 M Betaine, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 6 mM $MgSO_4$, 0.1% Triton X-100 และ 8U *Bst* DNA polymerase แล้วทดสอบบ่มที่อุณหภูมิ 60 และ 65 องศาเซลเซียส และทดสอบเวลาที่ใช้นาน 30 และ 60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

4. ตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา LAMP

ตรวจสอบผลด้วยวิธี gel electrophoresis เพื่อดูผลของปฏิกิริยา โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2% ใน 0.5X TBE (88.9 mM Tris, 8.9 mM boric acid, 2.5 mM EDTA) และใช้ความต่าง

ศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นย้อมสีเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

เวลาและสถานที่

ต.ค. 56 – ก.ย. 57 ที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน fliC ซึ่งเป็นยีนที่สร้าง flagellin ของเชื้อ *R. solanacearum* (Kubota *et al.*, 2008) เริ่มจากการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบโดยบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้ดูดดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร เติมในปฏิกิริยา LAMP 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1.6 µM FIP และ BIP, 0.2 µM F3 และ B3, 0.4 µM loop B , 0.4 µM dNTPs, 1.0 M Betaine, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 6 mM $MgSO_4$, 0.1% Triton X-100 และ 8U Bst DNA polymerase แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2% ใน 1X TBE และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นย้อมสีเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต พบแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะคล้ายขั้นบันได

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาในครั้งนี้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LAMP เพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อ *R. solanacearum* แล้ว การศึกษาในขั้นตอนต่อไปเป็นการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ความไว (sensitivity) และวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อ *R. solanacearum* ในหัวพันธุ์ปทุมมา

เอกสารอ้างอิง

อรวรรณ วิชัยลักษณ์. 2548. เอกสารวิชาการเรื่องปทุมมา. เอกสารเผยแพร่ กลุ่มส่งเสริมการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ กรมส่งเสริมการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด กรุงเทพฯ. 131 หน้า.

Kubota R., B.G. Vine, A.M. Alvarez and D.M. Jenkins. 2008. Detection of *Ralstonia solanacearum* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathol.* 98: 1045-1051.

Notomi T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Wananabe, N. Amino and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28: e63.

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Grapevine yellow speckle viroid* (GYSVd) เชื้อสาเหตุโรคในองุ่นด้วยวิธีอณูชีววิทยา

Development of Detection Technique for *Grapevine yellow speckle viroid* (GYSVd) Causing Grapevine Disease by Molecular Technique

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์[1] คนึงนิตย์ เหรียญวรากร[2]
กาญจนา วาระวิชะนี[1]
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช[1]
ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์[2]

รายงานความก้าวหน้า

เชื้อ *Grapevine yellow speckle viroid* 1 (GYSVd-1) และ *Grapevine yellow speckle viroid* 2 (GYSVd-2) เป็นเชื้อสาเหตุโรค “grapevine yellow speckle disease” ในองุ่น พบได้ทั่วไปในหลายพื้นที่ที่มีการปลูกองุ่น สามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางท่อนพันธุ์และวัสดุอุปกรณ์เกษตรที่ปนเปื้อนเชื้อได้ง่าย ทำให้เชื้อไวรอยด์ดังกล่าวสามารถแพร่กระจายโรคได้ง่ายและรวดเร็ว ประกอบกับในปัจจุบันมีผู้ศึกษาเชื้อดังกล่าวน้อยมาก ทำให้มีข้อมูลผลกระทบของโรคชนิดนี้น้อยตามไปด้วย ดังนั้นการศึกษาพัฒนาวิธีการในการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ มีความถูกต้องแม่นยำสูง จึงมีความจำเป็นต่อการศึกษาเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิด จากการสำรวจโรคไวรัสและไวรอยด์ในพื้นที่ปลูกองุ่นในพื้นที่จังหวัดสระบุรีและนครราชสีมา เดือนกุมภาพันธ์และมีนาคม ปี 2557 ตรวจพบองุ่นแสดงอาการผิดปกติ ใบมีจุดเหลือง (chlorosis) กระจายทั่วใบ เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคอณูชีวโมเลกุลโดยการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB method และปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ GYSVd1 (c-GYSVd1: CGAGGCTCACTCCCCCTCTGCC / h-GYSVd1: TCGTCGACGAAGGGGTGCACTCC) และ GYSVd2 (upper) (c-GYSVd2 (upper): GGTCCGCGGAGGCCTTCCGAGG / h-GYSVd2 (upper): TGCAGAGAAAAGAAGAAGGGCCCAG) สามารถตรวจพบเชื้อ GYSVd-1 จำนวน 6 ตัวอย่าง และ GYSVd-2 จำนวน 11 ตัวอย่าง จากตัวอย่างใบองุ่นทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง โดยเชื้อ GYSVd-1 ที่ตรวจพบมีขนาดตั้งแต่ 353-389 นิวคลีโอไทด์ และเชื้อ GYSVd-2 มีขนาดตั้งแต่ 362-365 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งการสำรวจในครั้งนี้เป็นการตรวจพบเชื้อ GYSVd-2 ครั้งแรกในประเทศไทย

คำหลัก: Detection method, viroid diseases and Grapevine plant

---

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-02-11-57

คำนำ

ปัจจุบันองุ่นเป็นพืชที่มีการปลูกขยายพันธุ์อย่างแพร่หลายในประเทศไทย โดยมีการนำเข้ากิ่งพันธุ์จากต่างประเทศเพื่อนำมาปลูกปรับปรุงพันธุ์ แต่เนื่องจากท่อนพันธุ์องุ่นมีสถานภาพตามพระราชบัญญัติกักพืช เป็นเพียง “สิ่งไม่ต้องห้าม” จึงไม่ได้มีข้อกำหนดหรือเงื่อนไขพิเศษใด ๆ ก่อนการนำเข้า มีเพียงใบรับรองสุขอนามัยพืชที่ไม่ได้ระบุข้อความพิเศษหรือเงื่อนไขข้อกำหนดใด ๆ เท่านั้น ดังนั้นท่อนพันธุ์องุ่นที่นำเข้าจะไม่ได้ถูกตรวจสอบรับรองการปลอดเชื้อสาเหตุโรคหรือศัตรูพืชใด ๆ ก่อนการนำเข้าทั้งสิ้น ซึ่งเป็นความเสี่ยงอย่างมากที่เชื้อสาเหตุโรคพืชอาจติดเข้ามากับส่วนขยายพันธุ์ดังกล่าวได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไวรัสและไวรอยด์

เชื้อไวรอยด์ที่มีรายงานว่าสามารถเข้าทำลายองุ่นได้มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด ได้แก่ *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Australian grapevine viroid* (AGVd) (Hadidi *et al*., 2003), *Grapevine yellow speckle viroid* 1 (GYSVd-1) และ *Grapevine yellow speckle viroid* 2 (GYSVd-2) (Li *et al*., 2007) ซึ่งในจำนวนนี้มี 2 ชนิดที่มีรายงานการเข้าทำลายองุ่นในประเทศไทย คือ HSVd (วราลักษณ์, 2545) และ GYSVd-1 (Hannok, 2004) สำหรับเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 ก่อให้เกิดโรค “grapevine yellow speckle disease” พบครั้งแรกในปี 1972 ที่ประเทศออสเตรเลีย (Taylor and Woodham, 1972) ลักษณะอาการโดยทั่วไปคือ ใบจะมีอาการจุดเหลือง หรืออาจจะเป็นลักษณะจุดหรือกระสีเหลือง กระจายทั่วไปตามเส้นใบ ซึ่งลักษณะอาการจะขึ้นกับสภาพอากาศ หากอาการโรครุนแรงจะส่งผลให้ใบพืชที่แสดงอาการมีระดับการสังเคราะห์แสงลดลงซึ่งส่งผลโดยตรงกับอัตราการเจริญของพืช รวมถึงปริมาณและคุณภาพของผลผลิตด้วย นอกจากนี้ยังอาจเกิดอาการ vein banding คือเนื้อเยื่อบริเวณรอบเส้นใบมีสีเข้มหรือชีดกว่าเนื้อใบได้ด้วย (Hadidi *et al*., 2003) โดยอาจพบอาการผิดปกติได้ตั้งแต่ช่วงต้นเดือนตุลาคมจนถึงมกราคม และอาจพบได้จนถึงเดือนมีนาคมหากต้นองุ่นยังสามารถเจริญเติบโตได้ (คนึงนิตย์, 2556) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อ GYSVd-1 ในไร่องุ่นที่จังหวัดนครราชสีมา (Hannok, 2004) โดยพบว่ามีความเหมือนกับเชื้อ GYSVd-1 ที่มีรายงานในออสเตรเลีย 96% และเมื่อนำมาปลูกเชื้อให้กับมะเขือเทศ สามารถทำให้มะเขือเทศเกิดอาการต้นเตี้ยแคระและใบผิดปกติ (Hannok, 2004; Hannok and Reanwarakorn, 2005) เชื้อไวรอยด์ดังกล่าวสามารถถ่ายทอดโรคด้วยวิธีกล เช่น วัสดุอุปกรณ์การเกษตรที่ปนเปื้อนเชื้อ และติดไปกับท่อนพันธุ์ได้ง่าย จึงง่ายต่อการกระจายตัวเนื่องจากโรคติดไปกับท่อนพันธุ์จากแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่งได้ ประกอบกับเชื้อดังกล่าวมีผู้ศึกษาน้อยมาก จึงทำให้ในปัจจุบันยังมีข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อชนิดนี้น้อยตามไปด้วย ดังนั้นการศึกษาพัฒนาวิธีการในการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ ความถูกต้องแม่นยำสูง จึงมีความจำเป็นต่อการศึกษาเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิด นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยป้องกันความเสียหายที่อาจจะเกิดขึ้นเนื่องจากการแพร่ระบาดของโรคดังกล่าว

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. โรงเรือนมุ้งกันแมลง
2. ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส
3. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส
4. เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 3 ตำแหน่ง
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
7. เครื่อง Thermal cycler (PCR)
8. Gel electrophoresis
9. Gel Documentation UV-transilluminator
10. เอ็นไซม์ One-Step RT-PCR (SS III reverse transcriptase /PLATINUM Taq polymerase) (Invitrogen)
11. เอ็นไซม์ Taq DNA polymerase
12. 100 bp DNA Ladder
13. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอน การสกัดอาร์เอ็นเอ การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา RT-PCR และ DNA cloning
14. วัสดุการเกษตรต่าง ๆ ดินและปุ๋ยเคมี

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในองุ่น

โดยตรวจเอกสารข้อมูลของเชื้อไวรอยด์ 2 ชนิด คือ *Grapevine yellow speckle viroid* 1 (GYSVd-1) และ *Grapevine yellow speckle viroid* 2 (GYSVd-2) ลักษณะอาการที่สำคัญ แหล่งที่มีรายงานการตรวจพบ

2. ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2

โดยอาศัยฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จาก GenBank (http:// ncbi.nlm.nih.gov) และความรู้ทาง bioinformatics นำมาออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 จากนั้นนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับไพรเมอร์ที่เคยมีรายงานมาก่อนแล้ว คือ คู่ไพรเมอร์ cV218 และ hV219 (Hannok, 2004)

3. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคไวรอยด์องุ่น

สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคองุ่นที่แสดงอาการที่จำเพาะของโรค โดยใบพืชจะมีลักษณะจุดเหลืองกระจายทั่วใบ ในพื้นที่ไร่องุ่นอำเภอ มวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี อำเภอ ปากช่อง และ วังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา และนำตัวอย่างใบองุ่นที่แสดงอาการผิดปกติดังกล่าวมาทดสอบต่อในห้องปฏิบัติการ

4. การสกัดอาร์เอ็นเอ

สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบองุ่นด้วยวิธี CTAB method (ปริเชษฐ์, 2548) โดยบดตัวอย่างพืช 100 มิลลิกรัม เติม CTAB Extraction buffer (2 % CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0 % Na_2SO_3 และ 2.0 % PVP-40 โดยเติม Na_2SO_3 และ PVP-40 ก่อนใช้) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บของเหลวส่วนบนปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บของเหลวส่วนบนปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บของเหลวส่วนบนปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติม 5 M NaCl ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ isopropanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ -20°ซ ข้ามคืน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิก ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TE buffer ที่มี 1 % SDS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ isopropanol ที่แช่เย็น 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนกรดนิวคลีอิกด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจาก nuclease ปริมาตร 30 - 50 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ เพื่อนำไปตรวจสอบหาเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค RT-PCR ในขั้นต่อไป

5. ทดสอบหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อใบองุ่น

โดยอาศัยการตรวจหายีน *nadh* ในพืช และใช้เทคนิค RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) กับคู่ไพรเมอร์ Nad (Nad2.1a: GGACTCCTGACGTATACGAAGG ATC และ Nad2.2b: AGCAATGAGATTCCCCAATATCAT) (Thompson *et al.*, 2003) มาช่วยในการประเมินประสิทธิภาพของวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ โดยมีขั้นตอนดังนี้;

ส่วนผสมของปฏิกิริยา RT-PCR มีดังนี้; กรดนิวคลีอิกที่ได้จากการสกัดตัวอย่างใบองุ่น 1 ไมโครลิตร กับไพรเมอร์ Nad2.1a และ Nad2.2b ความเข้มข้น 2 μM ปริมาตรเส้นละ 2 ไมโครลิตร

2X Reaction Mix buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร น้ำกลั่นที่ปราศจาก nuclease ปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร และเอ็นไซม์ SuperScript™ III RT / Platinum® *Taq* Mix ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร (ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร) จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้; อุณหภูมิ 48°ซ นาน 50 นาที จำนวน 1 รอบ, 94 °ซ นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ, denaturation temperature 94 °ซ นาน 30 วินาที, annealing temperature 56 °ซ นาน 30 วินาที, extension temperature 72 °ซ นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ extension temperature สุดท้าย 72 °ซ นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ นำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ตรวจสอบขนาดด้วยวิธีการ Gel electrophoresis ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที โดยใช้ agarose gel เข้มข้น 2.0 % ในสารละลาย 0.5X TBE buffer และย้อม gel ด้วย ethidium bromide และนำไปตรวจแถบของดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator โดยผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ Nad จะมีขนาด 188 base pair ซึ่งหากตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวแสดงว่าวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอวิธีนั้นมีประสิทธิภาพดีเหมาะสมกับเนื้อเยื่อใบอ่อน

6. การทดสอบตรวจเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 ด้วยวิธีการ RT-PCR

6.1 ตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ทั้งสองชนิด ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่และไพรเมอร์ที่เคยมีรายงานมาก่อน ประกอบไปด้วย

1. คู่ไพรเมอร์ GYSVd1 ออกแบบสำหรับตรวจเชื้อ GYSVd-1

c-GYSVd1: (CGAGGCTCACTCCCCCTCTGCC)

h-GYSVd1: (TCGTCGACGAAGGGGTGCACTCC)

2. คู่ไพรเมอร์ GYSVd2 (upper) ออกแบบสำหรับตรวจเชื้อ GYSVd-2 โดยออกแบบจากบริเวณ upper conserve domain ของเชื้อ GYSVd-2

c-GYSVd2 (upper): (GGTCCGCGGAGGCCTTCCGAGG)

h-GYSVd2 (upper): (TGCAGAGAAAAGAAGAAGGGCCCAG)

3. คู่ไพรเมอร์ GYSVd2 (lower) ออกแบบสำหรับตรวจเชื้อ GYSVd-2 โดยออกแบบจากบริเวณ lower conserve domain ของเชื้อ GYSVd-2

c-GYSVd2 (lower): (AGGAGACAGGCCCGCGTTTCGCC)

h-GYSVd2 (lower): (AAGATGCCTCCGCTAGTCGAGCGG)

4. คู่ไพรเมอร์ cV218 และ hV219 (Hannok, 2004) สำหรับตรวจเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 ใช้เป็นไพรเมอร์เปรียบเทียบในการทดลอง

cV218: (GGACGCGAACGTGAATAGG)

hV219: (TTGAGGCCTGGCGTAACGC)

6.2 การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค RT-PCR

ตรวจสอบเชื้อไวรอยด์จากตัวอย่างอาร์เอ็นเอพืชที่สกัดได้ ด้วยปฏิกิริยา One-Step RT-PCR (Invitrogen) โดยการผสมกรดนิวคลีอิกที่สกัดจากพืชทดสอบ 1 ไมโครลิตร กับไพรเมอร์ ความเข้มข้น 2 μM ปริมาตรเส้นละ 2 ไมโครลิตร 2X Reaction Mix buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร และเอ็นไซม์ SuperScriptTM III RT / Platinum® Taq Mix ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal Cycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

คู่ไพรเมอร์ GYSVd1: 48°ซ นาน 45 นาที จำนวน 1 รอบ 94°ซ นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation temperature 94°ซ นาน 30 วินาที, annealing temperature 62°ซ นาน 30 วินาที, extension temperature 72°ซ นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ extension temperature สุดท้าย 72°ซ นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ

คู่ไพรเมอร์ GYSVd2 (upper): 48°ซ นาน 45 นาที จำนวน 1 รอบ 94°ซ นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation temperature 94°ซ นาน 30 วินาที, annealing temperature 62°ซ นาน 30 วินาที, extension temperature 72°ซ นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ extension temperature สุดท้าย 72°ซ นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ

คู่ไพรเมอร์ GYSVd2 (lower): 48°ซ นาน 45 นาที จำนวน 1 รอบ 94°ซ นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation temperature 94°ซ นาน 30 วินาที, annealing temperature 62°ซ นาน 30 วินาที, extension temperature 72°ซ นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ extension temperature สุดท้าย 72°ซ นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ

คู่ไพรเมอร์ cV218 และ hV219: 48°ซ นาน 45 นาที จำนวน 1 รอบ 94°ซ นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation temperature 94°ซ นาน 30 วินาที, annealing temperature 58°ซ นาน 30 วินาที, extension temperature 72°ซ นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ extension temperature สุดท้าย 72°ซ นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ

จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ตรวจสอบขนาดด้วยวิธีเจลอีเล็คโตรโฟริซิส ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที โดยใช้ agarose gel เข้มข้น 2.0 % ในสารละลาย 0.5X TBE buffer และย้อม gel ด้วย ethidium bromide ตรวจแถบของดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator โดยดีเอ็นเอเชื้อไวรอยด์ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 370 เบส โดยหากตัวอย่างใดตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกับเชื้อไวรอยด์ดังกล่าวจะนำมาปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ gynura และมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ด้วยวิธีกล

7. หาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อมีการตรวจพบเชื้อ

นำผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้เชื่อมต่อกับ pGEM-T Easy (Promega) ตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย E. *coli* สายพันธุ์ Library efficiency DH5α competent cells (Invitrogen) โดยใช้วิธีการ heat shock transformation (Fristch *et. al.*, 2001) จากนั้นตรวจสอบโคลนที่ได้และสกัดพลาสมิดด้วยชุด Gene JET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) ตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ และส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำมาวิเคราะห์จำแนกชนิด ลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิ และวิเคราะห์จัดจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อไวรอยด์ที่ตรวจพบด้วยโปรแกรมต่าง ๆ ดังนี้

7.1 วิเคราะห์จำแนกชนิดของเชื้อไวรอยด์ ด้วยโปรแกรม Blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เพื่อยืนยันผลการตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR

7.2 วิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิ ด้วยโปรแกรม RNAstructure (http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html) เพื่อยืนยันผลการตรวจสอบในขั้นสุดท้ายตามคุณลักษณะที่จำเพาะของเชื้อไวรอยด์

7.3 วิเคราะห์จัดจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อไวรอยด์ ด้วยโปรแกรม MEGA 5.2 (ClustalW) ในการทำ multiple sequence alignment และสร้าง phylogenetic tree ของกลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เราศึกษาว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างไร และสามารถจัดจำแนกกลุ่มออกมาได้ในลักษณะไหน เพื่อตรวจสอบว่าเชื้อไวรอยด์ที่ตรวจสอบได้มีความสัมพันธ์กับเชื้อไวรอยด์สายพันธุ์เดียวกัน isolate อื่น ๆ ที่มีรายงานอย่างไร โดยกำหนดค่า parameter ให้ที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ดังนี้

- การวิเคราะห์ pairwise alignment กำหนดให้ค่า gap opening penalty เท่ากับ 10, gap extension penalty เท่ากับ 0.1

- การวิเคราะห์ multiple sequence alignment กำหนดให้ค่า gap opening penalty เท่ากับ 10, gap extension penalty เท่ากับ 0.2

- กำหนดเลือกค่า DNA weight matrix เป็น IUB และ transition weight เท่ากับ 0.8

- ในการสร้าง phylogenetic tree เลือกใช้วิธีการ Neighbor joining method เนื่องจากเป็นวิธีการที่เหมาะสมกับการศึกษาความสัมพันธ์ในกลุ่มประชากรระดับชนิดพันธุ์เดียวกันและไม่ต้องการทราบสายการวิวัฒนาการ บรรพบุรุษร่วม และ molecular clock

8. การปลูกเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 บนพืชทดสอบด้วยวิธีกล

นำตัวอย่างใบอ่อนที่ตรวจพบเชื้อไวรอยด์แล้วมาปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบนพืชทดสอบ gynura และมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers โดยบดใบพืชที่เป็นโรคกับ Phosphate buffer (pH 9.0) ความเข้มข้น 0.1 M ผสมรวมกับผง carborundum หรือ celite นำมาทาบนพืชทดสอบ (ปริเชษฐ์, 2548) จากนั้น

จึงนำพืชทดสอบดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เพื่อเร่งให้พืชทดสอบแสดงอาการผิดปกติที่เป็นจุดสังเกตให้ปรากฏออกมา (Harris and Browning, 1980)

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา: ตั้งแต่ ตุลาคม 2556 ถึงกันยายน 2558 รวม 2 ปี

สถานที่วิจัย : 1. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2. ไร่องุ่นจังหวัดสระบุรีและนครราชสีมา

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูลเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในองุ่น

ได้ข้อมูลทางชีววิทยา การเข้าทำลาย การแพร่กระจายโรค ลักษณะอาการ รวมถึงความเสียหายที่เกิดกับพืช ของเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2

1.1 ปัจจุบันมีรายงานว่าเชื้อไวรอยด์ชนิดนี้ก่อให้เกิดอาการโรคเฉพาะในองุ่นเท่านั้น ลักษณะอาการโดยทั่วไปคือ ใบจะมีอาการจุดเหลือง หรืออาจจะเป็นลักษณะจุดหรือกระสีเหลือง กระจายทั่วไปตามเส้นใบ ซึ่งลักษณะอาการจะขึ้นกับสภาพอากาศ หากอาการโรครุนแรงจะส่งผลให้ใบพืชที่แสดงอาการมีระดับการสังเคราะห์แสงลดลงซึ่งส่งผลโดยตรงกับอัตราการเจริญของพืช รวมถึงปริมาณและคุณภาพของผลผลิตด้วย

1.2 เชื้อสามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางบาดแผลจากอุปกรณ์การเกษตรที่ปนเปื้อนเชื้อ รวมถึงส่วนของกิ่งหรือท่อนพันธุ์ ในขณะที่ปัจจุบันยังไม่ทราบเชื้อทั้ง 2 ชนิด สามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์และละอองเกสรได้หรือไม่

1.3 ประเทศที่มีรายงานการแพร่บาดของเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย จีน เยอรมนี และสหรัฐอเมริกา รวมถึงประเทศไทยด้วย

2. ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2

โดยอาศัยฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จาก GenBank (http:// ncbi.nlm.nih.gov) และความรู้ทาง bioinformatics โดยวิธีการ multiple sequences alignment ร่วมกับ โปรแกรม Blastn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) และโปรแกรม FastPCR version 3.7.53 (Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland) เพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 โดยนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับไพรเมอร์ที่เคยมีรายงานมาก่อนแล้ว คือ คู่ไพรเมอร์ cV218 และ hV219 โดยในขั้นนี้ได้ไพรเมอร์ออกแบบใหม่มาจำนวนทั้งสิ้น 3 คู่ ได้แก่ GYSVd1 GYSVd2 (upper) และ GYSVd2 (lower) โดยมีรายละเอียดตามวิธีการทดลองหัวข้อ 6.1

3. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคไวรอยด์องุ่น

ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคในไร่องุ่นพบ ใบพืชที่แสดงอาการใบมีจุดเหลืองกระจายทั่วใบ (ภาพที่ 1) และพบลักษณะอาการใบมีจุดประกลม (mottling) (ภาพที่ 2) ในไร่องุ่นในพื้นที่ อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี อำเภอ ปากช่อง และ วังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา ได้เก็บตัวอย่างใบองุ่นที่แสดงอาการผิดปกติดังกล่าวจำนวน 20 ตัวอย่าง มาทดสอบต่อในห้องปฏิบัติการ

4. ทดสอบหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื้อใบองุ่น

ทดสอบหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื้อใบองุ่น โดยอาศัยการตรวจหายีน *nadh* ในพืช ซึ่งยีน *nadh* เป็น “Housekeeping gene” สามารถตรวจพบได้ในทุกช่วงอายุและทุกส่วนอวัยวะของพืช ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดในการตรวจคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้

โดยการใช้เทคนิค RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) กับคู่ไพรเมอร์ Nad พบว่าวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ วิธี CTAB method เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพดีเยี่ยม ได้อาร์เอ็นเอรวม (total RNA) ที่มีคุณภาพดี ไม่มีโปรตีนและสารเคมีที่จะไปยับยั้งปฏิกิริยา RT-PCR (inhibitor) ตกค้าง ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 188 คู่เบส (ภาพที่ 3) ดังนั้นวิธีการ CTAB method จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการสกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อใบองุ่น

5. การทดสอบตรวจเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 ด้วยวิธีการ RT-PCR

จากผลการทดสอบตรวจหาเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 กับตัวอย่างใบองุ่นทั้ง 20 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อไวรอยด์ทั้ง 4 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ cV218 และ hV219, GYSVd1, GYSVd2 (upper) และ GYSVd2 (lower) ผลพบว่ามีเพียง 2 คู่ไพรเมอร์เท่านั้นที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกับเชื้อไวรอยด์ โดยมีขนาดประมาณ 370 นิวคลีโอไทด์ คือ คู่ไพรเมอร์ GYSVd1 และ GYSVd2 (upper) (ภาพที่ 4 และ 5) ในขณะที่ไพรเมอร์ GYSVd2 (lower) และ คู่ไพรเมอร์ cV218 และ hV219 ไม่พบแถบดีเอ็นเอใด ๆ ปรากฏ (ภาพที่ 6 และ 7)

จากผลการตรวจตัวอย่างใบองุ่นจำนวน 20 ตัวอย่าง พบเชื้อ GYSVd-1 จำนวน 6 ตัวอย่าง และ GYSVd-2 จำนวน 11 ตัวอย่าง

6. หาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย bioinformatics เมื่อมีการตรวจพบเชื้อ

6.1 วิเคราะห์จำแนกชนิดของเชื้อไวรอยด์ ด้วยโปรแกรม Blastn

เมื่อนำผลผลิต RT-PCR ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ GYSVd1 มีขนาดตั้งแต่ 353-389 นิวคลีโอไทด์ และแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ GYSVd2 (upper) มีขนาดตั้งแต่ 362-365 นิวคลีโอไทด์ โดยเมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยโปรแกรม Blastn ใน GenBank แล้วพบว่า แถบดีเอ็นเอทั้ง 2 มีความเหมือนกันกับเชื้อ *Grapevine*

yellow speckle viroid 1 (GYSVd-1) และ *Grapevine yellow speckle viroid* 2 (GYSVd-2) ตามลำดับ โดยเชื้อ GYSVd-1 มีค่า Identities อยู่ระหว่าง 93-99% มีค่า Score อยู่ระหว่าง 555-671 bits และมีค่า Expect value อยู่ระหว่าง 2e-154 ถึง 0.0 (ภาพที่ 8) ส่วนเชื้อ GYSVd-2 มีค่า Identities อยู่ระหว่าง 98-99% มีค่า Score อยู่ระหว่าง 632-656 bits และมีค่า Expect value อยู่ระหว่าง 9e-178 ถึง 0.0 (ภาพที่ 9) ซึ่งเป็นพิสูจน์ว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว

(หมายเหตุ: % identity เป็นค่าบอกระดับความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ สำหรับเชื้อไวรอยด์จะอยู่ที่ระดับตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปจึงจะถือว่าเป็นเชื้อไวรอยด์ชนิดเดียวกัน, ค่า score เป็นค่าที่เกิดจากการคำนวณเมทริกของโปรแกรมซึ่งจะเปลี่ยนแปลงไปตามความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาเปรียบเทียบ โดยปกติแล้วจะต้องมีค่ามากกว่า 200 bits จึงจะถือว่ามีความน่าเชื่อถือ, และค่า expect value เป็นค่าที่ได้จากการค้นและเปรียบเทียบข้อมูลของ GenBank โดยที่ค่า expect value จะเป็นค่าที่บอกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับสิ่งที่เปรียบเทียบมากน้อยแค่ไหน โดยทั่วไปแล้วจะมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ และหากมีค่าเป็นศูนย์หมายความว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์เดียวกัน)

6.2 วิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิ ด้วยโปรแกรม RNAstructure

ผลการวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้ง 2 กลุ่ม คือ GYSVd-1 และ GYSVd-2 สามารถเกิดโครงสร้างสองมิติเป็นรูปร่าง rod shape ได้ตามคุณสมบัติของเชื้อไวรอยด์ (ภาพที่ 10 และ 11) จึงเป็นการยืนยันว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิดจริง

6.3 วิเคราะห์จัดจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อไวรอยด์ ด้วยโปรแกรม MEGA 5.2

จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิด คือ *Grapevine yellow speckle viroid* 1 (GYSVd-1) และ *Grapevine yellow speckle viroid* 2 (GYSVd-2) ที่มีรายงานทั้งหมดใน NCBI ด้วยโปรแกรม MEGA 5.2 (ClustalW) พบว่าสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อ GYSVd-1 ได้เป็น 5 กลุ่ม (ภาพที่ 12) และสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อ GYSVd-2 ได้เป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 13)

ผลจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ GYSVd-1 โดยการทำ Phylogenetic tree พบว่าสามารถจำแนกความสัมพันธ์ได้เป็น 5 กลุ่มหลัก (ภาพที่ 12) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อ GYSVd-1 ที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ เครือรัฐออสเตรเลีย, นิวซีแลนด์, สาธารณรัฐอิตาลี, สาธารณรัฐตูนิเซีย, ญี่ปุ่น, สาธารณรัฐประชาชนจีน และประเทศไทยซึ่งเคยมีรายงานตรวจพบในปี พ.ศ. 2547 (isolate YS-SB1: (accession number AY639606))

กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ สาธารณรัฐอิตาลี, สาธารณรัฐตูนิเซีย และ สาธารณรัฐประชาชนจีน

กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ เครือรัฐออสเตรเลีย, สาธารณรัฐอินเดีย และ สาธารณรัฐประชาชนจีน

กลุ่มที่ 4 เป็นเชื้อที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ สาธารณรัฐอิตาลี และ สาธารณรัฐอิสลามอิหร่าน

และกลุ่มที่ 5 เป็นเชื้อที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ ญี่ปุ่น, สหรัฐอเมริกา, สาธารณรัฐอิตาลี และ สาธารณรัฐประชาชนจีน

พบว่าเชื้อ GYSVd-1 ทั้ง 6 isolate ใหม่ จัดจำแนกอยู่กลุ่มที่ 2 และ 5 ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อที่มีรายงานในประเทศ ญี่ปุ่น, สหรัฐอเมริกา, สาธารณรัฐอิตาลี, สาธารณรัฐตูนิเซีย และ สาธารณรัฐประชาชนจีน แต่ไม่ได้ถูกจัดจำแนกร่วมกลุ่มเดียวกันกับ isolate YS-SB1 ซึ่งมีรายงานการตรวจพบในปี พ.ศ. 2547 (Hannok and Reanwarakorn, 2005) ซึ่งถูกจัดจำแนกในกลุ่มที่ 1 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ GYSVd-1 ที่ตรวจพบน่าจะติดเข้ามากับท่อนพันธุ์องุ่นนำเข้าจากคนละแหล่งประเทศกัน และอาจด้วยเหตุผลนี้เองที่เป็นสาเหตุให้คู่ไพรเมอร์ cV218 และ hV219 (Hannok, 2004) ไม่สามารถตรวจสอบพบเชื้อ GYSVd-1 isolate ใหม่ได้

นอกจากนี้จากการที่ผลการจัดจำแนก GYSVd-1 6 isolate ใหม่ มีการกระจายตัวแบ่งเป็น 2 กลุ่ม จึงมีความเป็นไปได้อีกว่าปัจจุบันพื้นที่ปลูกองุ่นในประเทศมีการปนเปื้อนเชื้อ GYSVd-1 จากการนำเข้าท่อนพันธุ์จากแหล่งระบาดของโรคมากกว่า 3 แหล่ง

สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ GYSVd-2 โดยการทำ Phylogenetic tree พบว่าสามารถจำแนกความสัมพันธ์ได้เป็น 2 กลุ่มหลัก (ภาพที่ 13) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อ GYSVd-2 ที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ สาธารณรัฐประชาชนจีน และ สาธารณรัฐอิสลามอิหร่าน

และกลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ สหรัฐอเมริกา, สาธารณรัฐอิตาลี และ สาธารณรัฐประชาชนจีน

พบว่าเชื้อ GYSVd-2 ทั้ง 11 isolate ใหม่ จัดจำแนกอยู่กลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อที่มีรายงานในประเทศ สหรัฐอเมริกา, สาธารณรัฐอิตาลี และ สาธารณรัฐประชาชนจีน โดยเชื้อ isolate ใหม่ทั้งหมดมีระดับความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมาก แสดงว่าเห็นว่า GYSVd-2 น่าจะมีการปนเปื้อนติดเข้ามากับท่อนพันธุ์องุ่นนำเข้าเพียงครั้งเดียวจากแหล่งระบาดแหล่งเดียวกัน (กลุ่มที่ 2) แต่ไม่ได้ติดปนเปื้อนจากแหล่งระบาดในประเทศกลุ่มที่ 1 โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ประเทศสาธารณรัฐอิสลามอิหร่าน

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อไวรอยด์องุ่นทั้ง 2 ชนิดนี้ อาจสามารถช่วยชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของปัญหาการปนเปื้อนเชื้อไวรอยด์และไวรัสสาเหตุโรคองุ่นที่อาจติดมากับท่อนพันธุ์องุ่นที่นำเข้าได้ เนื่องจากปัจจุบันท่อนพันธุ์องุ่นมีสถานภาพตามพระราชบัญญัติกักพืช เป็นเพียง “สิ่ง

ไม่ต้องห้าม” จึงไม่ได้มีข้อกำหนดหรือเงื่อนไขพิเศษใด ๆ ก่อนการนำเข้า ซึ่งท่อนพันธุ์องุ่นนำเข้าที่ไม่ได้ผ่านการตรวจสอบรับรองการปลอดเชื้อสาเหตุโรคก่อนการนำเข้าจะมีความเสี่ยงอย่างมากที่จะทำให้เชื้อสาเหตุโรคพืชดังกล่าวติดเข้าตั้งรกราก (establish) และสร้างความเสียหายให้กับประเทศไทยได้ ดังนั้นการแก้ไขกฎหมาย ข้อกำหนด เงื่อนไขการนำเข้า ส่วนขยายพันธุ์องุ่นจึงมีความจำเป็น เพื่อที่จะทำให้สามารถดำเนินการควบคุมป้องกันการแพร่ระบาดของโรคพืชร้ายแรงต่าง ๆ ได้อย่างทันท่วงที

7. การปลูกเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 บนพืชทดสอบด้วยวิธีกล

ผลการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ gynura และมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ด้วยวิธีกลพบว่า ทั้งเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคบนพืชทดสอบทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวได้ ซึ่งได้ทำการตรวจสอบยืนยันด้วยเทคนิค RT-PCR โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ GYSVd1 และ GYSVd2 (upper) แล้ว

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรค grapevine yellow speckle disease ในพื้นที่ปลูกองุ่นจังหวัดสระบุรีและนครราชสีมา ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์และมีนาคม ปี 2557 ตรวจพบ*เชื้อ Grapevine yellow speckle viroid* 1 (GYSVd-1) และ *Grapevine yellow speckle viroid* 2 (GYSVd-2) โดยใช้วิธีการ CTAB method ในการสกัดอาร์เอ็นเอ ซึ่งเป็นวิธีการที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อของใบองุ่น และตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยอาศัยไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิด จำนวน 2 คู่ไพรเมอร์ คือ GYSVd1 และ GYSVd2 (upper) โดยสามารถตรวจจำแนกตัวอย่างพบเชื้อ GYSVd-1 จำนวน 6 ตัวอย่าง โดยมีขนาดตั้งแต่ 353-389 นิวคลีโอไทด์ และพบเชื้อ GYSVd-2 จำนวน 11 ตัวอย่าง โดยมีขนาดตั้งแต่ 362-365 นิวคลีโอไทด์ จากตัวอย่างใบองุ่นทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง ซึ่งการสำรวจในครั้งนี้เป็นการตรวจพบเชื้อ GYSVd-2 ครั้งแรกในประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

คนึงนิตย์ เหรียญวรากร. 2556. **โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรอยด์ (Viroid Disease of Plants)**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 164 หน้า.

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2548. **การตรวจสอบเชื้อไวรอด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 85 หน้า.

วราลักษณ์ รักษ์แดง. 2545. การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในองุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 95 หน้า.

Fristch, E.F., J. Sambrook and T. Maniatis. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 186 p.

Hannok, P. 2004. **Survey of *Grapevine yellow speckle viroid* in Thailand**. Thesis (M.S. (Agricultural Biotechnology)), Kasetsart University.

Hannok, P. and K. Reanwarakorn. 2005. cDNA probe for *Grapevine yellow speckle viroid* Detection. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 39: 46-52.

Hadidi, A., R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik. 2003. **Viroids**. Science Pulishers, Inc., USA. P. 370.

Harris, P.S. and I.A. Browning. 1980. The effects of temperature and light on the symptom expression and viroid concentration in tomato of a severe strain of *Potato spindle tuber viroid*. **Potato Research**. 23(1): 85-93.

Li, S.F., R. Guo, S. Peng and T. Sano. 2007. *Grapevine yellow speckle viroid* 1 and *Grapevine yellow speckle viroid* 2 Isolates From China. **Journal of Plant Pathology**. 89: S72 p.

Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. "Preparation of Plasmid DNA by Small-scale Boiling Lysis." **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Vol. 1. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1.44-1.46.

Taylor, R.H. and R.C. Woodham. 1972. Grapevine yellow speckle - a newly recognized graft-transmissible disease of Vitis. **Australian Journal of Agricultural Research**. 23: 447–452.

Thompson, J.R., S. Wetzel, M.M. Klerks, D. Vaskova, C.D. Schoen, J. Spak and W. Jelkmann. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. **Journal of Virological Methods**. 111: 85-93.

Figure

Figure 1 Yellow spots symptoms on grapevine leaves caused by GYSVd

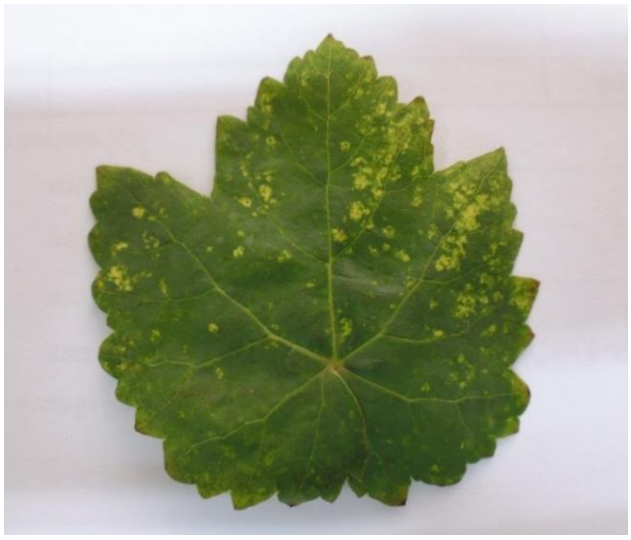


Figure 2 Yellow mottling symptoms on grapevine leaves caused by GYSVd

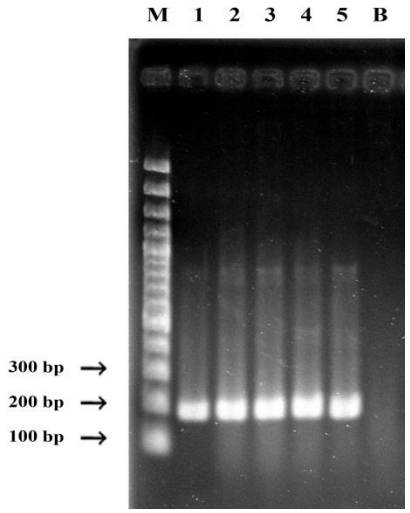


Figure 3 Gel electrophoresis of RT-PCR products of *NdhB* gene using specific Nad primer pair designed to amplify 188 bp fragment in plant samples (lanes 1-5, grapevine leaf samples) compared with buffer (lane B) and 100 bp ladder molecular weight marker (lane M).

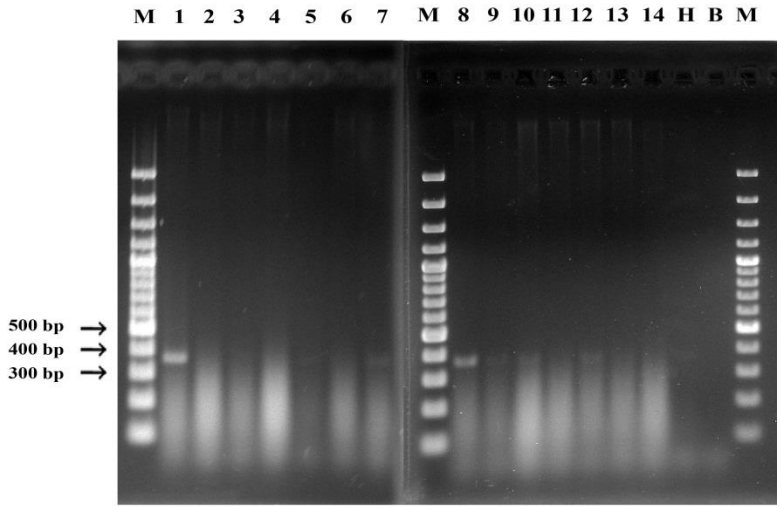


Figure 4 Gel electrophoresis of RT-PCR products (approximately 360 base pairs) of grapevine leaf samples using specific GYSVd1primers, grapevine leaf samples (lanes 1to14) compared with healthy plant (lane H), buffer (lane B) and 100 bp ladder molecular weight marker (lane M).

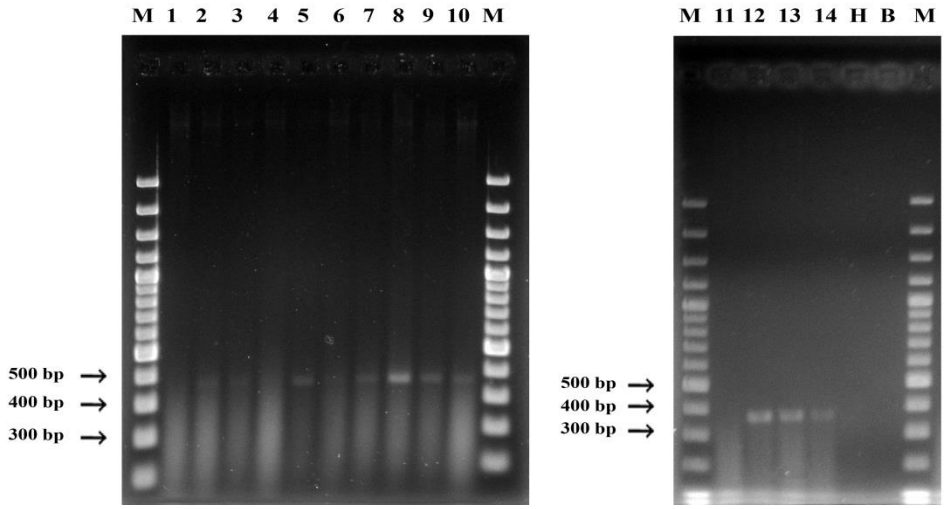


Figure 5 Gel electrophoresis of RT-PCR products (approximately 360 base pairs) of grapevine leaf samples using specific GYSVd2 (upper) primers, grapevine leaf samples (lanes 1to14) compared with healthy plant (lane H), buffer (lane B) and 100 bp ladder molecular weight marker (lane M).

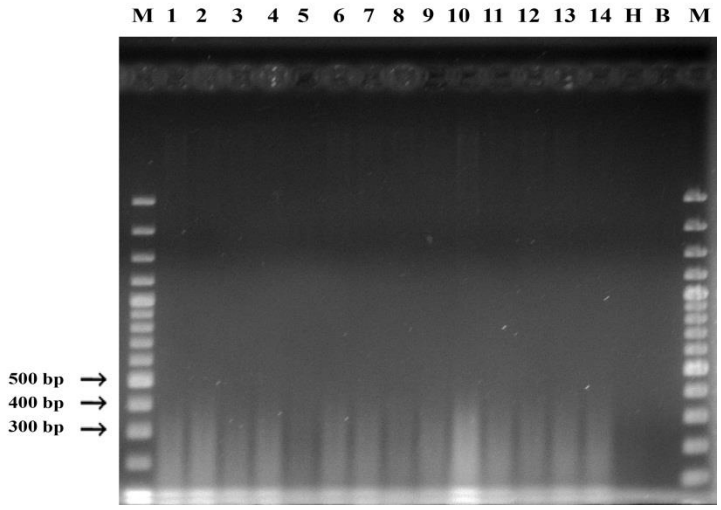


Figure 6 Gel electrophoresis of RT-PCR products of grapevine leaf samples using specific GYSVd2 (lower) primers, grapevine leaf samples (lanes 1to14) compared with healthy plant (lane H), buffer (lane B) and 100 bp ladder molecular weight marker (lane M).

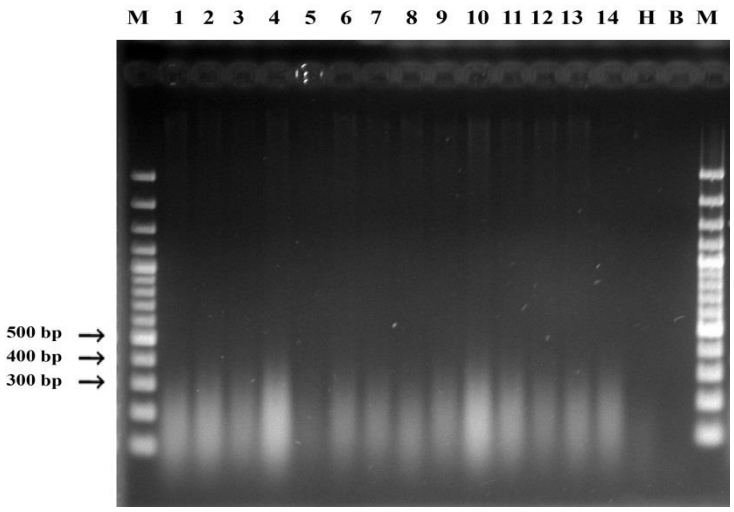


Figure 7 Gel electrophoresis of RT-PCR products of grapevine leaf samples using specific cV218 and hV219 primers, grapevine leaf samples (lanes 1to14) compared with healthy plant (lane H), buffer (lane B) and 100 bp ladder molecular weight marker (lane M).

> *Grapevine yellow speckle viroid* 1 clone Boonmang-1, complete genome
CGGAUCACUUUCCUGUGGUUCCUGUGGUUACACCUCGGAAGGCCGCCGCGGACCUGCA
AAGAAGAAGAUAGGGGCAGAGGGGGAGUGAGCCUCGUCGUCGACGAAGGGGUGCACUC
CAAAGCUCCGAACUGGCGUCGUCCGGCUCUCCUCGGAGCCUCGCUGCUCUGGGCGGAA
GAGUCUUCUGACUUUUCUAGCCUAUUCAGCAUUGCGCUCUUGAGGCCCGGCGAAACGC
GGUUCGUCUGCUGAGGAUGCCUCCGCUAGUCGAGCGGACUUGGUCUCUUCCGCCCAAA
GCCCUUUUUCUUUCAACUGAGCUUGUUCCAACGCGCCCCGCGAGUGGAAUCCCCGGAA
CCCCUGCAAAGAGGUCCU

Figure 8 RNA sequence of *Grapevine yellow speckle viroid* 1 from grapevine plant sample

> Grapevine yellow speckle viroid 2 clone Poochidpha 16, complete genome
CGGAUCAUUUUCCUUGUGGUUCCUGUGGUUACACCUCGGAAGGCCUCCGCGGACCUGC
AGAGAAAAGAAGAAGGGCCCAGAGGGGAAUGAGCCUCGUCGUCGACGAAGGGGUGCAU
UCCGAAGAGCUGGCCUGAGCGUCGUCCGGCUUCCCUCGACCGCACCGGAGCGCCAGAA
AAGGUCCUCGGACUUUCUUCUAUCUCCGAAGUCGGUUUGAGGCCCGGCGAAACGCGGG
CCUGUCUCCUAAGAUGCCUCCGCUAGUCGAGCGGACUUGGCCUCUUCCGCCCGAGGAC
CUUUUCUUUCUGAUCUUGCUUGUUCCAACGAGCCCCGCGAGUGGAAUCCCCGGAACCC
CUGCGAAAAAGGGUCCU

Figure 9 RNA sequence of *Grapevine yellow speckle viroid* 2 from grapevine plant sample

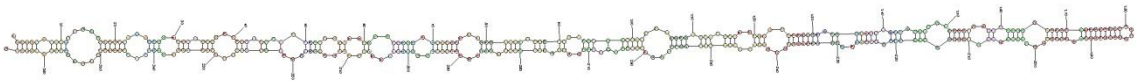


Figure 10 Secondary structure analysis of *Grapevine yellow speckle viroid* 1 by using RNAstructure program.

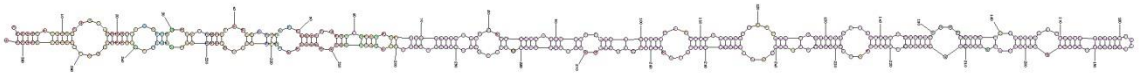


Figure 11 Secondary structure analysis of *Grapevine yellow speckle viroid* 2 by using RNAstructure program.

Figure 12 GYSVd-1 Phylogenetic tree analysis by using MEGA version 5.2 of the Wangnamkeay-5, Poochidpha-6, and Boonmang-1 isolates in this work (indicated with dot) with GYSVd-1 isolates in GenBank database and *Columnea latent viroid* (acc. No. KM214220) used as out-group.

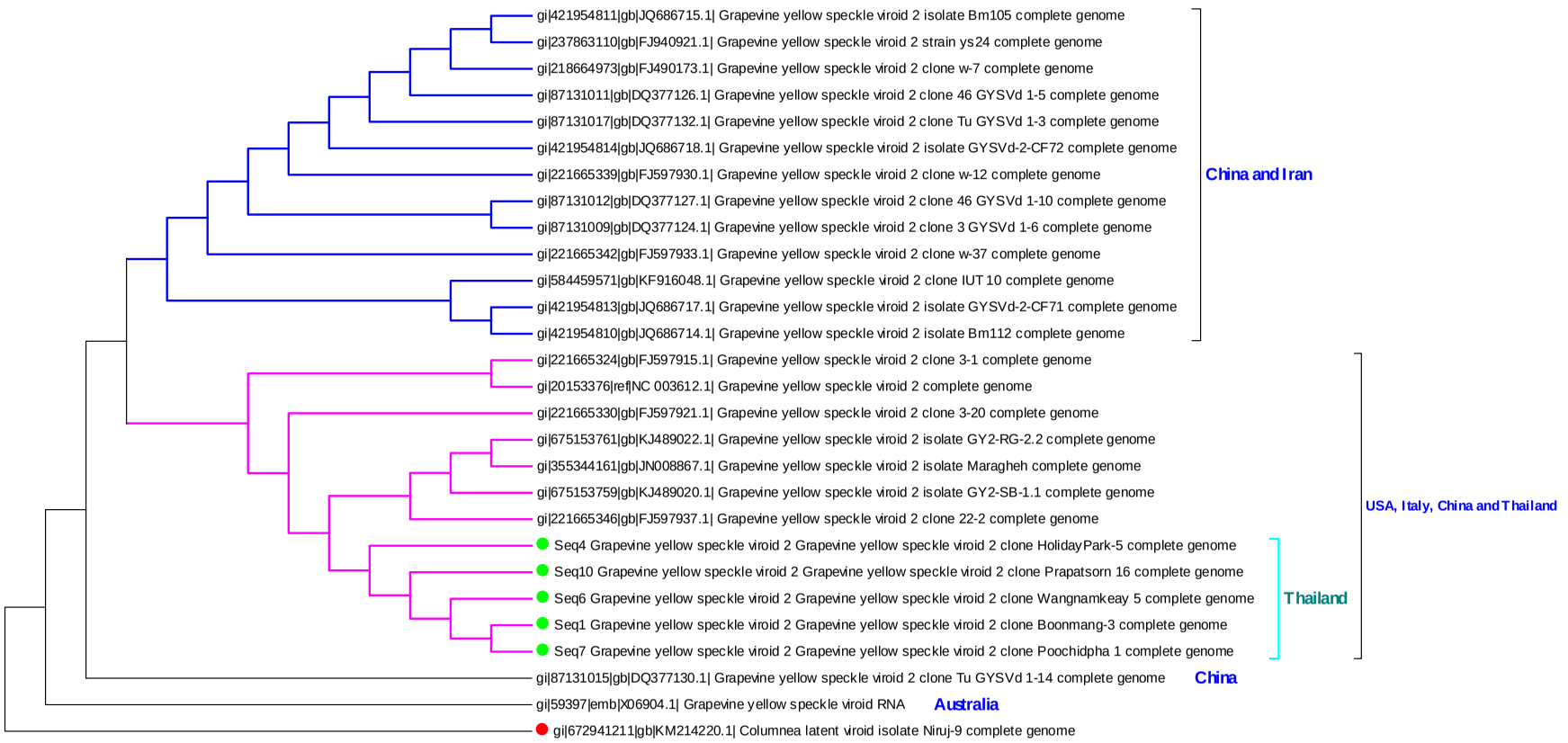


Figure 13 GYSVd-2 Phylogenetic tree analysis by using MEGA version 5.2 of the HolidayPark-5, Prapatsorn 16, Wangnamkeay 5, Boonmang-3, and Poochidpha 1 isolates in this work (indicated with dot) with GYSVd-2 isolates in GenBank database and *Columnea latent viroid* (acc. No. KM214220) used as out-group.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Karny ในประเทศไทย โดยเทคนิค Real-time PCR

Real-time PCR Assay for the Identification of *Thirps palmi* Karny in Thailand

จารุวัตถ์ แต้กุล[1/] อิทธิพล บรรณาการ[1/] รุ่งนภา ทองเครือ[2/] ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[2/]

[1/]กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae) เป็นศัตรูพืชที่สำคัญ สามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิดและปัจจุบันเป็นปัญหาที่สำคัญของกล้วยไม้ส่งออก สำนักงานอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (IPPC) ภายใต้มาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรฐานสุขอนามัยพืช ได้จัดเพลี้ยไฟฝ้ายให้เป็นศัตรูพืชที่สำคัญ และต้องเฝ้าระวังในการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร การตรวจวิเคราะห์วินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* ที่ถูกต้องและรวดเร็วจึงเป็นหัวใจสำคัญของการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตรในปัจจุบัน IPPC ได้กำหนดวิธีตรวจสอบทางชีวโมเลกุลเรียกว่า Real-time PCR assay for *Thrips palmi* ลงใน ISPM No.27: Annex 01 ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็วถูกต้องและแม่นยำ อย่างไรก็ตาม IPPC ได้อ้างอิงจากการทดลองในต่างประเทศซึ่งมีการใช้ตัวอย่างจากประเทศไทยค่อนข้างน้อย และไม่เคยมีการทดลองหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา real-time PCR กับเพลี้ยไฟฝ้ายสายพันธุ์ในประเทศไทยมาก่อน การทดลองนี้เป็นการนำเทคนิค real-time PCR มาปรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* สายพันธุ์ในประเทศไทย เพื่อให้ได้วิธีการที่เหมาะสม และมีเสถียรภาพของการตรวจวินิจฉัย ความก้าวหน้าของการทดลองพบว่า จากการทดสอบชุด primers และ probe กับเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* ที่เก็บจากแปลงกล้วยไม้ส่งออกของเกษตรกรแถบจังหวัดนครปฐมจำนวน 19 ตัวอย่าง พบว่าสามารถตรวจพบเพลี้ยไฟฝ้ายโดยให้ค่า Cp ระหว่าง 23.71 – 28.94 การทดสอบความไวของ primers Tpalmi 139F และ Tpalmi 286R พบว่าไม่สามารถตรวจจับเพลี้ยไฟได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ primer คือ 50 nM ที่ความเข้มข้นของ primer ตั้งแต่ 300 – 1200 nM สามารถตรวจจับ DNA ของเพลี้ยไฟฝ้ายที่เจือจางตั้งแต่ 1 เท่าถึง 1000 เท่า ที่ความเข้มข้นของ primer 1200 nM ให้ค่า Cp ต่ำที่สุดคือ 22.88 อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นเดียวกันให้ค่า Cp สูงที่สุดได้แก่ 33.17 เมื่อทดสอบกับ DNA เพลี้ยไฟที่เจือจาง 1000 เท่า จึงมีแนวโน้มว่าค่าความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายที่ความเข้มข้นของ DNA ที่แตกต่างกันคือ 900 nM

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-02-12-57

คำนำ

เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae) เป็นศัตรูพืชที่สำคัญ สามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิด (polyphagous pests) โดยส่วนใหญ่พบเข้าทำลายพืชผักและไม้ดอก โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชในสกุล Cucurbitaceae และ Solanaceae. มีถิ่นกำเนิดมาจาก เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และแพร่ระบาด กระจายครอบคลุมเขตร้อนชื้น กึ่งร้อนชื้น ตลอดถึงชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกและแคริบเบียน มีรายงานการแพร่กระจายในเขตอเมริกาเหนือ อเมริกากลางและอเมริกาใต้ตลอดถึงแอฟริกา (EPPO/CABI, 1997; Murai, 2002; PaDIL, 2007; EPPO, 2013) ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเข้าทำลายพืชโดยดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชในส่วนยอดอ่อน ตาอ่อน ใบ ดอกและผลทำให้ใบเกิดรอยด่างมีสีซีด การทำลายเห็นชัดเจนในไม้ดอกเมื่อพบเข้าทำลายกลีบดอก (ศิริณี, 2544) สำนักงานอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (IPPC) ภายใต้มาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรฐานสุขอนามัยพืช ได้จัดเพลี้ยไฟฝ้ายให้เป็นศัตรูพืชที่สำคัญ และต้องเฝ้าระวังในการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร การตรวจวิเคราะห์วินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* ที่ถูกต้องและรวดเร็วจึงเป็นหัวใจสำคัญของการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตรในปัจจุบัน

การจำแนกชนิดเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* สามารถทำได้โดยจัดจำแนกออกจากเพลี้ยไฟศัตรูพืชชนิดอื่น โดยใช้ลักษณะพื้นฐานทางสัณฐานวิทยา อย่างไรก็ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถใช้ได้ในระยะตัวเต็มวัย วิธีการดังกล่างมีข้อจำกัดในเพลี้ยไฟระยะอื่นๆ เช่นตัวอ่อนระยะที่ 1, 2 (first, second laval stage) และระยะก่อนเข้าดักแด้และระยะดักแด้ (pre-pupae, pupae) เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ไม่เพียงพอในการตรวจวินิจฉัย เพื่อการตรวจที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็ว IPPC จึงได้บรรจุการตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ลงใน ISPM No.27: Annex 01 ว่าด้วย การตรวจจำแนกชนิดศัตรูพืชควบคุม (Diagnostic protocols for regulated pests) :ซึ่งดำเนินการโดยใช้วิธีตรวจสอบทางชีวโมเลกุล ที่มีประสิทธิภาพรวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ วิธีดังกล่าวนี้เรียกว่า “Real-time PCR assay for *Thrips palmi*”

Real-time PCR เป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุล ที่ผสมผสานระหว่าง การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการ (regular PCR) กับฟลูออเรสเซนต์โพรบ (probe) ที่จับกับผลผลิต DNA (fluorescent detection) ในแต่ครั้งที่ทำการเพิ่มปริมาณ (amplified product) ในกระบวนการโพรบฟลูออเรสเซนต์ ทำหน้าที่เสมือนรายงานผล ในเวลาที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินการ (real-time) ถึงปริมาณความหนาแน่นของผลผลิต DNA เทคนิค real-time PCR เป็นวิธีการที่รวดเร็ว มีความเฉพาะเจาะจง มีความสะดวก รวดเร็วและง่ายในการดำเนินงาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi*

Walsh *et al.* (2005) ได้ออกแบบวิธีการในการตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยไฟฝ้าย โดยเทคนิค real-time PCR เรียกว่า “SCAR marker-generated sequence-based real-time PCR assay for *Thrips palmi*” วิธีการนี้ได้นำมาใช้เป็นมาตรฐานควบคุมสุขอนามัยพืช (phytosanitary authorities) ในประเทศอังกฤษ และเวลส์ การสังเคราะห์ไพรเมอร์ดำเนินการโดยใช้วิธี Random

Amplified Polymorphic DNA analysis และตรวจสอบโดยวิธี Southem blot analysis ผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์มีความเฉพาะเจาะจงสูงต่อเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* จากการทดสอบโดยใช้เพลี้ยไฟในอันดับ Thysanoptera 21 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟสกุล *Thrips* 10 ตัวอย่าง จากประเทศโดมินิกันรีพับบลิค, ญี่ปุ่น, ไทย, และสหราชอาณาจักร พบว่าสามารถใช้วิธี real-time PCR วินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟ *T. palmi* ที่ค่า cycle threshold (Ct) อยู่ระหว่าง 18.75 ถึง 26.41 การวินิจฉัยมีความรวดเร็วใช้เวลา 45 นาทีโดยประมาณ ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่าง real-time PCR assay และ การจำแนกโดยวิธีทาง สัณฐานวิทยา จากการศึกษาเพลี้ยไฟ 152 ตัวอย่าง พบว่าทั้ง 2 วิธีการ มีความสอดคล้องกัน 100 เปอร์เซ็น แสดงถึงความมีเสถียรภาพในการตรวจวินิจฉัย

มาตรฐานควบคุมสุขอนามัยพืช (phytosanitary authorities) ณ ประเทศเนเธอร์แลน ได้ใช้กรรมวิธีการตรวจวินิจฉัยชนิดเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลของ Kox *et al.* (2005) ตาม ISPM No.27.01 เรียกวิธีการนี้ว่า “COI sequence-based real-time PCR assay for *Thrips palmi*” ซึ่งเป็นการใช้ส่วนของไมโตคอนเดรียจีน Cytochrome Oxydasel (COI) เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค real-time PCR ทั้งนี้ COI ถือได้ว่าเป็นไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงสูง อย่างไรก็ตามเมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาใช้ เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA โดยปฏิกิริยา PCR ปกติพบว่าชิ้นส่วน DNA ดังกล่าวไม่มีความเฉพาะเจาะจงจากผลการทดลองพบว่า จากตัวอย่างเพลี้ยไฟฝ้าย 23 ตัวอย่าง สามารถวิเคราะห์ชนิดได้เพียงแค่ 1 ตัวอย่าง (Kox *et al.*, 2005) แต่เมื่อทำการทดสอบโดยวิธี real-time PCR detection พบว่าวิธีการนี้ให้ผลที่มีประสิทธิภาพใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า 3 ชั่วโมง ไพรเมอร์มีความเฉพาะเจาะจงสูง และสามารถใช้ได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของเพลี้ยไฟฝ้าย อย่างไรก็ตามมีรายงานทดลองระบุว่า TaqMan probe ที่ Kox *et al.* ใช้ในเทคนิคข้างต้น ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ชนิดของ *T. palmi* ตัวอย่างจำนวนหนึ่งจากประเทศอินเดีย สายพันธุกรรม (sequence DNA) ดังกล่าวได้ถูกเก็บไว้ใน GenBank และยังไม่สามารถหาข้อสรุปได้ในแง่การจัดจำแนกเปรียบเทียบความแตกต่างทั้งในแง่อนุกรมวิธานและ ความสัมพันธุ์ในเชิงวิวัฒนาการหรือ Phylogeny (Asokan *et al.*, 2007)

การทดลองนี้เป็นการนำเทคนิค real-time PCR มาปรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยขนิดของเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* สายพันธุ์ในประเทศไทย เพื่อให้ได้วิธีการที่เหมาะสม และมีเสถียรภาพ (reliability) ของการตรวจวินิจฉัยซึ่งประกอบไปด้วย ความเฉพาะเจาะจงของ ไพรเมอร์ (molecular marker) ต่อสายพันธุ์ในประเทศไทย สภาพการทดลองและวิธีดำเนินงาน ตลอดถึงความรวดเร็วและแม่นยำของการวินิฉัยจำแนกชนิด

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟเพื่อการสกัด DNA ได้แก่ พู่กันขนาดเล็ก แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 % หลอดพลาสติกเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 ml (eppendorf tube)

2. ชุดสกัด DNA ได้แก่ QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue Kit
3. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับทำสไลด์ถาวรเช่น 5% sodium hydroxide, ethanol, Cannada balsum mounting media สไลด์และกระจกปิดสไลด์
4. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับเก็บตัวอย่างและสารเคมี หม้อนึ่งความดันไอน้ำสูง เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่อง real-time PCR
5. กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope แว่นขยายขนาด 10 เท่าขึ้นไป

วิธีการ

การเตรียมตัวอย่างเพลี้ยไฟ (Acquisition of *Thrips* material)

การเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแปลงปลูกกล้วยไม้ส่งออกและพืชผักสวนครัวที่เป็นแหล่งอาศัยของเพลี้ยไฟใกล้แปลงปลูกกล้วยไม้ ทั้งนี้โดยทำการบันทึกรายละเอียด ประกอบไปด้วย พืชอาศัย แหล่งที่เก็บ รวมถึงพิกัดทางภูมิศาสตร์ เก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟชนิดอื่นนอกเหนือจาก *T. palmi* เพื่อใช้เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบ เช่น *T. tabaci* เก็บรักษาตัวอย่างในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็น (95% ethanol) หลังจากนั้นนำตัวอย่างแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แบ่งตัวอย่างที่เก็บออกเป็น 2 ส่วน ตัวเต็มวัยส่วนหนึ่งเก็บเพื่อทำสไลด์ถาวร (ตัวอย่างแห้ง) อีกส่วนทั้งระยะตัวเต็มวัยและระยะอื่นๆ เก็บเพื่อรอการสกัด DNA (ตัวอย่างสด) ทำการจัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาดำเนินการตามคู่มือการตรวจจำแนกชนิดโดย ศิริณี (2554) ณ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การสกัด DNA จากตัวอย่างเพลี้ยไฟฝ้าย (DNA extraction)

การสกัด DNA เพื่อการเก็บรักษาตัวอย่าง (non-destructive DNA extraction protocol) ข้อดีของวิธีนี้คือหลังจากทำการสกัด DNAยังสามารถเก็บตัวอย่าง ใช้ในการทำสไลด์เพื่อใช้อ้างอิงต่อไป (voucher specimens) วิธีการสกัด DNAชนิดนี้เรียกว่า “salting-out” ซึ่งพัฒนาจาก Sunnucks and Hales (1996) และ Rugman-Jones *et al.* (2006) โดยนำตัวอย่างเพลี้ยไฟจาก 95% ethanol มาทำให้แห้งโดยวางไว้บนกระดาษกรอง 2 นาที เตรียมหลอดทดลองขนาด 0.5 ml (low-binding microfuge tube) เติมสารทำละลายบัฟเฟอร์ TNES (50 mM Tris, pH 7.5, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA, and 0.5% SDS) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และ เอ็นไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteinase K 10 mg/ml) 1.7 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดทดลอง ใช้เข็มขนาดเล็ก (sterilized minute pin) เจาะตรงบริเวณส่วนท้องของเพลี้ยไฟ นำหลอดทดลองอบ (incubate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง เติมสารละลาย 5M NaCl ปริมาณ 28 ไมโครลิตรและเขย่านาน 15 วินาที นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 5 นาที ถ่ายสารละลายส่วนบน (supernatant) ลงในหลอดทดลองใหม่ เติม 100% ethanol ที่แช่เย็นในปริมาณที่เท่ากันทุกหลอด นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 5 นาที ทำการล้าง DNAด้วยการเติม 70%

ethanol ที่แช่เย็น หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น 30 ไมโครลิตร นำตัวอย่างเพลี้ยไฟ จากการปั่นเหวี่ยงในครั้งที่ 1 แช่ใน 5% NaOH นาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาทำสไลด์ถาวรต่อไป

การเพิ่มปริมาณ DNAด้วยเทคนิค real-time PCR เพื่อตรวจวินิจฉัยชนิดเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* (real-time PCR assay for *Thrips palmi*)

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วนตามชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ไพรเมอร์ CO I (CO I sequence-based real-time PCR assay) พัฒนาประยุกต์วิธีการทดลองตาม Kox *et al*. (2005) ไพรเมอร์และโพรบ (Probe) ที่ใช้สำหรับการทดลองได้แก่

PCR primer: Tpalmi 139F* (5'-TCATGCTGGAATTTCAGTAGATTTAAC -3')

PCR primer: Tpalmi 286R* (5'-TCACACTRAATAATCTTAGTTTTTCTCTTG-3')

TaqMan probe: TpP (6-FAM 5'-TAGCTGGGGTATCCTCAA-3' MGB)

ดำเนินการโดยใช้ชุดเพิ่มปริมาณ DNAสำเร็จรูป (core reagent kit) TaqMan PCR ชุดสารละลาย DNAตั้งต้น (reaction mixture) มีปริมาณ 25 µl ซึ่งประกอบไปด้วย 2x TaqMan Universal Master Mix 12.5 µl, ไพรเมอร์แต่ละชนิดใช้ 0.9 µM, และโพรบ (probe) 0.1 µM TaqMan probe ใช้ DNA ตั้งต้น 1 µl ตรวจจับการเพิ่มของปริมาณ DNA โดยใช้ fluorescence ของ ABI Prism 7700 หรือ ABI 7900HT (Sequence Detection Systems) ปฏิกิริยา PCR อุณหภูมิรอบ (PCR thermocycler steps: Initial denaturation, Denaturation, Annealing, and Extention) ตามขั้นตอนดังนี้ 95 °C นาน 10 นาที ใช้ระยะเวลา 40 รอบใน 1 นาทีที่อุณภูมิรอบ 60 °C และ 94 °C 15 วินาที หากสารละลายตั้งต้นเป็น DNA จากตัวอย่างของ *T. palmi* ค่า Ct values ควรมีค่าต่ำกว่า 40

ไพรเมอร์ SCAR (SCAR marker-generated sequence-based real-time PCR assay) พัฒนาประยุกต์วิธีการทดลองตาม Walsh *et al*. (2005) ไพรเมอร์และโพรบ (Probe) ที่ใช้สำหรับการทดลองได้แก่

PCR primer: P4E8-362F (5'-CCGACAAAATCGGTCTGATGA-3')

PCR primer: P4E8-439R (5'-GAAAAGTCTCAGGTACAACCCAGTTC-3')

TaqMan probe: P4E8-385T (FAM 5'-AGACGGATTGACTTAGACGGGAACGGTT-3')

ดำเนินการโดยใช้ชุดเพิ่มปริมาณ DNA สำเร็จรูป (core reagent kit) TaqMan PCR โดยใช้ DNA ตั้งต้น 1 µl (10-20 ng), ไพรเมอร์แต่ละชนิดใช้ 7.5 pmol, และโพรบ (probe) 2.5 pmol ซึ่งรวมสารละลายตั้งต้นปฏิกิริยาที่ใช้ทั้งสิ้น 25 µl ดำเนินปฏิกิริยา PCR อุณหภูมิรอบ (PCR thermocycler steps: Initial denaturation, Denaturation, Annealing, and Extention) ตามขั้นตอนดังนี้ 95 °C นาน 10 นาที ใช้ระยะเวลา 40 รอบใน 1 นาทีที่อุณภูมิรอบ 60 °C และ 95 °C 15 วินาที ตรวจจับการเพิ่มของปริมาณ DNA โดยใช้ fluorescence ของ ABI Prism 7700 หรือ ABI 7900HT (Sequence Detection Systems) หากสารละลายตั้งต้นเป็น DNA จากตัวอย่างของ *T. palmi* ค่า cycle threshold (Ct values) ควรมีค่าต่ำกว่า 40

การบันทึกข้อมูล

ของทั้ง 2 การทดลอง ทำการบันทึกอุณหภูมิของ PCR thermocycler steps และค่า Crossing point (Cp) เมื่อมีการตรวจวินิจฉัยพบ *T. palmi* บันทึกระยะเวลาในการตรวจวินิจฉัยในแต่ละตัวอย่าง ส่วนในกรณีที่ค่า Cp สูงกว่า 35 แสดงว่าไม่มีการพบ *T. palmi* ถึงแม้ว่ามี product DNA และตัวอย่างที่ศึกษาทดลองเป็นเพลี้ยไฟฝ้ายจริง ให้ปรับเปลี่ยนค่า PCR thermocycler steps หลังจากนั้นทำการทดลองซ้ำ หากยังไม่มีการตรวจพบให้บันทึกผลเป็น negative result

เวลาและสถานที่

เริ่มดำเนินการตั้งแต่ ตุลาคม 2556 – กันยายน 2558 โดยทำการเก็บตัวอย่าง ณ แปลงปลูกกล้วยไม้ส่งออก ในเขตปริมณฑลได้แก่ จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร สมุทรปราการ ปทุมธานี และนนทบุรี

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* และเพลี้ยไฟในสกุลใกล้เคียงที่พบปะปนในแปลงกล้วยไม้ บันทึกข้อมูลการเก็บตัวอย่าง พร้อมทั้งระบุเลขรหัสเพื่อใช้อ้างอิง ทั้งเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการ (Ref. code) และติดตั้งบาร์โค้ดตัวอย่างที่ได้หลังจากสกัด DNA แล้ว (Museum voucher ID) ซึ่งขึ้นต้นด้วยรหัสของพิพิธภัณฑ์แมลง EMBT ENT เป็นรหัสย่อของ Entomology and Zoology Museum Bangkok Thailand, Entomology Collection ซึ่งตามด้วยรหัสตัวเลขหรือ “BARCODE”ซึ่งแต่ละตัวอย่างมีรหัส barcode ที่ไม่ซ้ำกัน (ภาพที่ 4) museum voucher barcode ID ในแต่ละพิพิธภัณฑ์มีชื่อรหัสย่อที่ไม่ซ้ำกันทั่วโลก ทั้งนี้ในแต่ละตัวอย่างมีรายละเอียดข้อมูลที่ซ้ำกัน (unique identifiers) รหัสบาร์โค้ดนี้บรรจุรายละเอียดของข้อมูลที่สำคัญจำเป็นต่อการส่งข้อมูล ไปกับยังฐานข้อมูลสากลเช่น ฐานข้อมูลทางพันธุกรรม (Barcode of Life Data Systems: BOLDsystem) หรือการส่งลายพิมพ์ DNA ไปเก็บยังGenBank ซึ่งข้อมูลรายละเอียดของตัวอย่างเหล่านี้ประกอบด้วย ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง วันเดือน ปี ที่เก็บ สถานที่และพิกัดภูมิศาสตร์ในการเก็บตัวอย่าง ความสูงจากระดับน้ำทะเล เทคนิคในการเก็บตัวอย่าง ช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโต ชนิดที่ทำการวินิจฉัยและผู้วินิจฉัย ซึ่งในขณะนี้ข้อมูลนี้ได้เก็บรวบในฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตรและสามารถสืบค้นได้จาก museum voucher ID (ตารางที่ 1)

การสกัด DNA จากเพลี้ยไฟโดยกระบวนการสกัดเพื่อการเก็บรักษาตัวอย่าง (non-destructive DNA extraction protocol) เป็นวิธีการที่ประยุกต์มาจากวิธีการสกัด DNA ของแตนเบียนไข่โดย Taekul *et al.* (2013) ซึ่งเป็นวิธีการใหม่ที่ไม่เคยมีการใช้วิธีการนี้มาก่อนในแมลงปากดูดโดยเฉพาะอย่างยิ่งเพลี้ยไฟ Sunnucks and Hales (1996) และ Rugman-Jones *et al.* (2006) ทำการสกัดเพลี้ยไฟเพื่อเก็บรักษาตัวอย่างโดยกระบวนการที่เรียกว่า “salting-out” โดยนำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดทดลอง ใช้เข็มขนาดเล็ก (sterilized minute pin) เจาะตรงบริเวณส่วนท้อง

ของเพลี้ยไฟ ซึ่งถือเป็นวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อน Kox *et al.* (2005) ทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ดำเนินการสกัด DNA โดยวิธีการการบดตัวอย่าง (destructive techniques) โดยใช้หลอดขนาดเล็ก (micropestle) ในสารละลาย Lysis buffer หลังจากนั้นทำการสกัด ดี เอ็น เอ โดยใช้เอ็นไซม์เพื่อย่อยสลายโปรตีนตามวิธีการโดยทั่วไปของการสกัด DNA จากสิ่งมีชีวิต ถึงแม้ว่าสามารถทดลองในตัวอย่างที่เป็น ตัวอ่อน ดักแด้และตัวเต็มวัย แต่จำเป็นต้องบดมากถึง 9 ตัวอย่างในแต่ละ reaction เพื่อทดสอบความไวของ primers แต่จากการทดลองใช้ตัวอย่างเพียง 1 ตัวอย่าง สามารถให้ผลผลิต DNA ที่เพียงพอต่อการทดลอง นอกจากนี้แล้วข้อดีของวิธีนี้คือหลังจากทำการสกัด DNA แล้วตัวอย่างยังคงสมบูรณ์ ตัวอย่างสามารถนำมาทำเป็นสไลด์ถาวรเพื่อใช้อ้างอิงเปรียบเทียบและบรรจุลงในฐานข้อมูลสากลได้ นอกจากนี้แล้วพบว่าตัวอย่างที่ผ่านการสกัด DNA มีความใสมากกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านการสกัด DNA เนื่องจากเนื้อเยื่อของเพลี้ยไฟถูกย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์ Protenase K ซึ่งมีความชัดเจนและง่ายต่อการตรวจวินิจฉัยและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ภาพที่ 4)

การทดสอบชุด Primers และ Probe ในปฏิกิริยา real-time PCR (Selection of primers and probe for real-time PCR)

ทดสอบชุด primers และ probe กับเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* ที่เก็บจากแปลงกล้วยไม้ส่งออกที่สำคัญของเกษตรกรแถบจังหวัดนครปฐมจำนวน 19 ตัวอย่างโดยมีน้ำเป็น negative control อีก 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้ใช้ตัวเต็มวัยทั้งสิ้น 17 ตัวอย่าง (EMBT ENT 0001603 – 0001614, 0001617 – 0001621) และตัวอ่อนระยะสุดท้ายจำนวน 2 ตัวอย่าง (EMBT ENT 0001615 – 0001616) ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดรวบรวมตามตารางที่ 1 ในการทดลองนี้ไม่ได้ใช้ตัวอย่างทีเป็นไข่และดักแด้เนื่องจากสาเหตุหลายประการ กล่าวคือเพลี้ยไฟเป็นแมลงปากดูดที่มีขนาดเล็กและจะวางไข่ที่มีขนาดเล็กและสีค่อนข้างใสในเนื้อเยื่อของกล้วยไม้ ส่วนดักแด้ของเพลี้ยไฟมีขนาดเล็ก ส่วนใหญ่อยู่ในดินและวัสดุปลูก ซึ่งเป็นไปได้ค่อนข้างยากและมีความซับซ้อนในการเก็บตัวอย่างเพื่อการทดลอง อย่างไรก็ตามระยะการเจริญเติบโตที่สำคัญของเพลี้ยไฟศัตรูพืชที่ติดไปกับกล้วยไม้ส่งออกที่มีการตรวจเจอได้แก่ ระยะตัวเต็มวัย ทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR สำหรับตรวจวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* กับเครื่อง LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Thailand) ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบจะทำปฏิกิริยาในถาดพลาสติกหลุมขนาด 96 หลุม (LightCycler 480 Mutiwell plate 96) สำหรับการทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR กับ primers และ probe ที่เลือกไว้ในแต่ละปฏิกิริยา (reaction) ใช้ปริมาณรวมของสารที่ใช้ในการทดสอบ primer COI ในแต่ละ reaction จำนวน 20 µl ประกอบด้วย LightCycler 480 Probes Master (dNTP mix, fast start Taq DNA polymerase, reaction buffer และ $MgCl_2$) จำนวน 10 µl, forward primer (139F) และ reverse primer (286R) ที่ความเข้มข้น 0.9 µM จำนวน 1.8 µl ในแต่ละ primer DNA ของเพลี้ยไฟแต่ละตัวอย่างจำนวน 5 µl และใช้น้ำกลั่นจำนวน 1.2 µl ซึ่งผลจากการทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR กับ COI primer 139F/286R พบว่าสามารถตรวจพบเพลี้ยไฟฝ้ายได้ (positive result) โดยให้ค่า Cp อยู่ระหว่าง 23.71 – 28.95 (ภาพที่ 1) ซึ่งได้นำตัวอย่างที่มีค่า Cp

value ต่ำที่สุดมาทดสอบหาความไวของ primer (sensitivity test) ต่อไป น้ำกลั่นที่ใช้เป็น control reaction ในการทดลองให้ผลเป็นลบ (negative results)

การทดสอบสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา real-time PCR (Optimization of real-time PCR)

การทดสอบความไวของ primers (sensitivity test) ดำเนินการโดยทำการเจือจางความเข้มข้นของ DNA ของเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* ที่ 1, 10, 100 และ 1000 เท่าจาก DNA ที่สกัดได้จากเพลี้ยไฟ 1 ตัวอย่างได้แก่ EMBT ENT 0001605 ซึ่งเลือกจากตัวอย่างที่ให้ค่า Cp ต่ำที่สุดจากการทดสอบกับเพลี้ยไฟฝ้าย 19 ตัวอย่างข้างต้น ทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR กับ COI primers ได้แก่ Tpalmi 139F และ Tpalmi 286R ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 50, 150, 300, 900 และ 1200 nM และใช้ probe ที่ความเข้มข้นคงที่คือ 100 nM ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2 พบว่า ไม่สามารถตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ primer ที่ใช้ทดสอบคือ 50 nM ซึ่งตรงกับผลการทดลองของ Kox *et al.* (2005) อย่างไรก็ตามเริ่มตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายได้ที่ความเข้มข้นของ primer 150 nM โดยตรวจจับที่ความเข้มข้นของ DNA ที่ 1, 10 และ 100 เท่าแต่ไม่สามารถตรวจจับได้ที่ความเจือจางของ DNA 1000 เท่า ความสามารถของปฏิกิริยาในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้าย ที่เจือจางตั้งแต่ 1 เท่าถึง 1000 เท่า ได้แก่ความเข้มข้นของ primer ตั้งแต่ 300 – 1200 nM หรือกล่าวได้ว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวอัตราการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* ต่อประชากรเพลี้ยไฟชนิดอื่นคือ 1:1000 ที่ความเข้มข้นของ primer 1200 nM ให้ค่า Cp ต่ำที่สุดคือ 22.88 เมื่อทดสอบกับความเข้มข้นของ DNA ที่เจือจาง 1 เท่า อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นเดียวกันเมื่อทดสอบกับ DNA ของเพลี้ยไฟที่เจือจาง 1000 เท่าให้ค่า Cp สูงถึง 33.17 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับค่า Cp ที่ไม่สามารถตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายได้ (>35) จึงมีแนวโน้มว่าค่าความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้าย *T.palmi* ที่ความเข้มข้นของ DNA ตั้งแต่ 1 – 1000 เท่าคือ 900 nM (ตารางที่ 2, ภาพที่ 2)

การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา real-time PCR (Specificity of real-time PCR)

ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยา real-time PC R โดยใช้ primer COI ได้แก่ Tpalmi 139F และ Tpalmi 286R ใช้ตัวอย่างเพลี้ยไฟตามตารางที่ 1 ซึ่งเป็นตัวอย่างเพลี้ยไฟที่เก็บจากแปลงกล้วยไม้ส่งออกที่สำคัญเขตภาคกลางรวมถึงเพลี้ยไฟในแปลงพืชอาหารใกล้เคียง เนื่องจากเพลี้ยไฟเหล่านี้มีโอกาสพบปะปนในกล้วยไม้ส่งออก เพลี้ยไฟที่ใช้ในการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยา real-time PCR มีทั้งสิ้น 19 ตัวอย่าง ประกอบด้วย *Thrips palmi* จำนวน 5 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวเต็มวัย 4 ตัวอย่าง (EMBT ENT 0001622, 0001625, 0001627 – 0001628) และตัวอ่อนระยะสุดท้ายจำนวน 1 ตัวอย่าง (EMBT ENT 0001624) ซึ่งเก็บจากแหล่งปลูกกล้วยไม้จังหวัดนครปฐม ปทุมธานีและสมุทรสาคร เพลี้ยไฟ *Thrips hawaiiensis* จำนวน 3 ตัวอย่าง (EMBT ENT 0001629 – 0001631) *Thrips parvispinus* จำนวน 1 ตัวอย่าง (EMBT ENT 0001640), *Scirtothips dorsalis* ซึ่งเป็นเพลี้ยไฟที่มีลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับเพลี้ยไฟฝ้ายจำนวน 3 ตัวอย่าง (EMBT ENT 0001632 – 0001634), *Frankliniella schultzei* จำนวน 2

ตัวอย่าง (EMBT ENT 0001637 – 0001638), *Megalurothips usitatus* จำนวน 2 ตัวอย่าง (EMBT ENT 0001639, 0001641) และ *Caliothrips indicus* (EMBT ENT 0001642), *Rhipiphorothrips cruentatus* (EMBT ENT 0001636), และ สกัด DNA จากเพลี้ยไฟ 1 ตัวอย่างในแต่ละปฏิกิริยา (reactions) โดยใช้วิธีการสกัดแบบการไม่ทำลายตัวอย่าง (non-destructive DNA extraction) ผลการทดลองพบว่าตัวอย่างของเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* ทั้ง 5 ตัวอย่างทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยให้ผลเป็นบวก (positive result) โดยมีค่า Cp อยู่ระหว่าง 23.92 – 27.76 ในขณะที่ตัวอย่างของเพลี้ยไฟชนิดอื่นอีก 14 ตัวอย่างให้ผลเป็นลบ (negative result) เช่นเดียวกันกับปฏิกิริยาที่ใช้น้ำกลั่นเป็นมาตรฐานควบคุม (control reaction) ซึ่งกล่าวได้ว่าฟลูออเรสเซนต์โพรบที่ใช้ตาม ISPM No.27: Annex 01 (Kox *et al.* 2005) มีความเฉพาะเจาะจงในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* สายพันธุ์ในประเทศไทย (ภาพที่ 3)

มีข้อสังเกตในรายงานซึ่งระบุใน ISPM No. 27 (FAO, 2006a) ว่ามีตัวอย่างเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* จำนวนหนึ่งที่เก็บได้จากประเทศอินเดีย ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ชนิดโดยใช้ TaqMan probe ที่ Kox *et al.* (2005) ได้รายงานไว้ใน ISPM ซึ่งลายพิมพ์ DNA (sequence DNA) ดังกล่าวได้ถูกเก็บไว้ใน GenBank นอกจากนี้แล้วยังไม่สามารถหาข้อสรุปได้ในแง่การจัดจำแนกเปรียบเทียบความแตกต่างทั้งในแง่อนุกรมวิธานและ ความสัมพันธุ์ในเชิงวิวัฒนาการหรือ Phylogeny ของลายพิมพ์ DNA เหล่านี้ (Asokan *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามหลังจากทดลองกระบวนการตรวจวิเคราะห์เพลี้ยไฟฝ้ายสายพันธุ์ในประเทศไทยโดยเทคนิค real-time PCR พบว่า สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ถูกต้องแม่นยำ โดยมีค่า Cp อยู่ระหว่าง 23.71 – 28.94 (ภาพที่ 1) ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำกว่าคำแนะนำใน ISPM โดยให้ใช้ค่า Ct (Cp ขึ้นอยู่กับชนิดของเครื่อง real-time) ที่ต่ำกว่า 40 ในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้าย (FAO, 2006a) แต่สำหรับสายพันธุ์ในประเทศไทยนั้น พบว่าค่า Cp ในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* มีค่าต่ำกว่า 35 และสำหรับการทดสอบถึงสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา real-time PCR Kox *et al.* (2005) ได้สรุปว่าอัตราในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้าย ที่ความเข้มข้นของ primers 300 และ 900 nM สามารถตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายได้ในอัตรา 1:100 (ประชากรเพลี้ยไฟฝ้าย *T.palmi* ต่อประชากรเพลี้ยไฟทั้งหมด) และที่ความเข้มข้นของ probe 25 – 100 nM สามารถตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายได้ในอัตรา 1:1000 ของประชากรเพลี้ยไฟทั้งหมด อย่างไรก็ตามจากการทดลองให้ผลแตกต่างจากที่ได้มีการรายงานใน ISPM คือ ที่ความเข้มข้นของ primers 300 และ 900 nM และความเข้มข้นของ probe ที่ 100 nM สามารถตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายได้ในอัตราที่ 1:1000 ซึ่งประเมินจากความเจือจางของ DNA 1000 เท่า ซึ่งเป็นค่าอัตราการตรวจจับเพลี้ยไฟที่สูงกว่าที่ Kox *et al.* (2005) ได้เคยรายงานไว้ถึง 10 เท่า (ตารางที่ 2)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ปฏิกิริยา real-time PCR จัดเป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายที่ได้รับการรับรองจาก สำนักงานอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ ได้รับการบรรจุอยู่ใน มาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ศัตรูพืชสำคัญ ISPM No.27: Annex 01 ซึ่งเป็นวิธีการที่

สะดวกรวดเร็วและแม่นยำ การทดสอบโดยใช้ primer Tpalmi 139F และ Tpalmi 286R สามารถตรวจพบเพลี้ยไฟฝ้ายได้ โดยให้ค่า Cp ระหว่าง 23.71 – 28.94 ที่ความเข้มข้นของ primers 300 และ 900 nM และความเข้มข้นของ probe ที่ 100 nM มีความสามารถในตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายได้ในอัตราประชากรเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* ต่อประชากรของเพลี้ยไฟทั้งหมดที่อัตรา 1:1000 อย่างไรก็ตาม ค่าความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมในการตรวจจับเพลี้ยไฟฝ้ายที่ความเข้มข้นของ DNA ที่แตกต่างกันคือ 900 nM เทคนิคนี้สามารถตรวจสอบและทราบผลภายใน 2-3 ชั่วโมง โดยเห็นผลการตรวจสอบตามเวลาที่แท้จริง (real-time) นอกจากนี้ยังทำให้สามารถทราบถึงปริมาณผลผลิต DNA ที่ได้รับจากปฏิกิริยา (quantitative PCR: qPCR) วิธีการดังกล่าวสะดวกกว่าการเพิ่มปริมาณ DNA ปกติโดยใช้เทคนิค conventional PCR ไม่ต้องนำไปเข้ากระบวนการ gel electrophoresis ในแผ่น agarose gel และย้อมสีด้วย ethedium bromide ซึ่งเป็นสารอันตรายที่ก่อให้เกิดมะเร็ง

คำขอบคุณ

การทดลองนี้ไม่สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้ ถ้าขาดห้องปฏิบัติการวิจัยที่มีคุณภาพและได้มาตรฐานจากกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ขอขอบคุณ ดร. ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ผู้ช่วยชี้แนะแนวทางซึ่งทำให้เกิดที่มาของการทดลอง ดร. มานิตา คงชื่นสิน ในการช่วยทบทวนและอ่านต้นฉบับ นอกจากนี้แล้วขอขอบคุณนักวิจัยและเจ้าหน้าที่ผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยครั้งนี้ทุกท่าน ทั้งในแง่การเก็บตัวอย่าง ประสานงานและให้การสนับสนุน

เอกสารอ้างอิง

ศิริณี พูนไชยศรี. 2544. เพลี้ยไฟ Terebrantia. กองกีฏและสัตววิทยา. กรมวิชาการเกษตร. 75 หน้า

ศิริณี พูนไชยศรี, ชลิดา อุณหวุฒิ, พรรณเพ็ญ ชโยภาส, รัตนา ชนะพงษ์, ลัขณา บำรุงศรี, สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี, ยุวรินทร์ บุญทบ และ ณัฐวัฒน์ แย้มยิ้ม. 2554. แมลงการจำแนกและการเก็บตัวอย่าง. เอกสารวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์ กรุงเทพฯ. 100 หน้า.

Asokan, R., N.K. Krishna Kumar, V. Kumar and H.R. Ranganath. 2007. Molecular differences in the mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) gene and development of a species-specific marker for onion thrips, *Thrips tabaci* Lindeman, and melon thrips, *T. palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae), vectors of tospoviruses (Bunyaviridae). Bulletin of Entomological Research. 97: 461–470.

EPPO. 2013. Available http://www.eppo.org. .(8 April, 2013)

EPPO/CABI. 1997. *Thrips palmi*. *In*: I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott & M. Holderness, Eds.

FAO. 2006a Diagnostic protocols for regulated pests (2006). The international Plant Protection Convention (IPPC). International Standards for Phytosanitary Measures: ISPM No. 27.

FAO. 2006b Guidelines for surveillance (1997). The International Plant Protection Convention (IPPC). International Standards for Phytosanitary Measures: ISPM No. 6.

FAO. 20099 Annex to ISPM No.27 (Diagnostic protocols for regulated pests) *Thrips palmi*. The international Plant Protection Convention (IPPC). International Standards for Phytosanitary Measures: ISPM No. 27.

Kox, L.F.F., H.E. van den Beld, C. Zijlstra, and G. Vierbergen. 2005. Real-time PCR assay for the identification of *Thrips palmi*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 35: 141–148.

Murai, T. 2002. The pest and vector from the East: *Thrips palmi*. pp. 19–32. *In*: R. Marullo, & L.A. Mound, eds. *Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera*. Italy, 2–7 July 2001. Canberra, Australian National Insect Collection.

PaDIL. 2013. Pests and Diseases Image Library. Available http://www.padil.gov.au (9 April, 2013)

Quarantine pests for Europe, 2nd edition. Wallingford, UK, CAB International. 1425 pp.

Rugman-Jones, P.F., M.S. Hoddle, L.A. Mound and R. Stouthamer. 2006. Molecular identification key for pest species of Scirtothrips (Thysanoptera: Thripidae). Journal of Econommic Entomology. 99(5): 1813–1819

Sunnucks, P. and D.F. Hales. 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus Sitobian (Hemiptera: Aphididae). Molecular Biology and Evolution. 13: 510–524

Walsh, K., N. Boonham, I. Barker and D.W. Collins. 2005. Development of a sequence-specific real-time PCR to the melon thrips *Thrips palmi* (Thysanoptera, Thripidae). Journal of Applied Entomology, 129 (5): 272–279.

ภาคผนวก

Table 1 *Thrips* used in this study

Species	Ref. code	Museum voucher ID "EMBT ENT"	Host Plant	Collected locality
Thrips palmi	ct1.1-1	0001603	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.1-2	0001604	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.1-3	0001605	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.1-5	0001606	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.2-1	0001607	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.2-2	0001608	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.2-3	0001609	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.2-4	0001610	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.2-5	0001611	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.3-1	0001612	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.3-2	0001613	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.3-3	0001614	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.3-4	0001615	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.3-5	0001616	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.4-1	0001617	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.4-2	0001618	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.4-3	0001619	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.4-4	0001620	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct1.4-5	0001621	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct2.1	0001622	*Dendrobium sp.*	Samut Sakhon
	ct2.3	0001623	*Dendrobium sp.*	Samut Sakhon
	ct2.4	0001624	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	ct3.1	0001625	*Dendrobium sp.*	Samut Sakhon
	ct3.2	0001626	*Dendrobium sp.*	Nakhon Pathom
	iti1-1B	0001627	*Ocimum basilicum*	Pathum Thani
	iti1-3B	0001628	*Salanum xanthocarpum*	Pathum Thani

Table 1 *Continued*

Species	Ref. code	Museum voucher ID "EMBT ENT"	Host Plant	Collected locality
Thrips hawaiiensis	iti1-1C	0001629	*Ocimum basilicum*	Pathum Thani
	iti2-5A	0001630	*Zea mays*	Pathum Thani
	iti6-9A	0001631	*Salanum xanthocarpum*	Nakhon Pathom
Thrips parvispinus	ni1-1E	0001640	*Carica papaya*	Pathum Thani
Scirtothirps dorsalis	iti2-6A	0001632	*Capsicum frutescens*	Pathum Thani
	iti3-7C	0001633	*Vigna sesquipedalis*	Pathum Thani
	ni2-2D	0001634	*Capsicum frutescens*	Pathum Thani
Bathrips melanicornis	iti1-1A	0001635	*Ocimum basilicum*	Pathum Thani
Rhipiphorothrips cruentatus	iti1-1D	0001636	*Ocimum basilicum*	Pathum Thani
Frankliniella schultzei	iti1-2B	0001637	*Ocimum sanctum*	Pathum Thani
	ni4-4A	0001638	*Salanum xanthocarpum*	Pathum Thani
Megalurothrips usitatus	iti1-3A	0001639	*Salanum xanthocarpum*	Pathum Thani
	ni7-7A	0001641	*Luffa acutangula*	NaNakhon Pathom
Caliothrips indicus	iti3-7B	0001642	*Vigna sesquipedalis*	Pathum Thani

Table 2 Cycle thresholds at different concentrations of COI primer at 100 nM probe

Dilution of DNA (1 adult)	Cp value				
	50 nM primers	150 nM primers	300 nM primers	900 nM primers	1200 nM primers
1	>35	26.02	23.56	23.22	22.88
10	>35	30.13	27.01	26.61	26.54
100	>35	32.71	30.32	30.19	29.77
1000	-	35	33.07	31.85	33.17
water	-	-	-	-	-

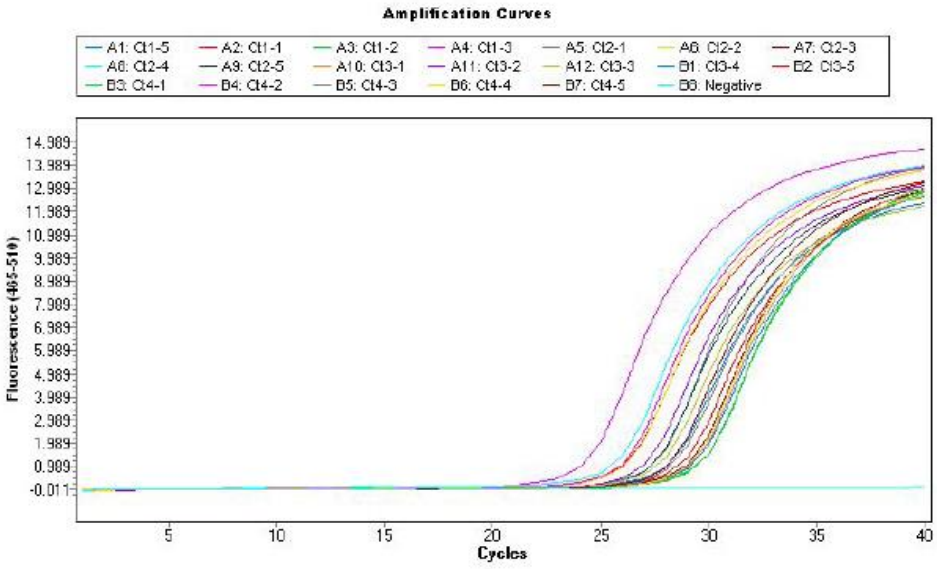


Figure 1 COI sequence-based real-time PCR assay for *Thrips palmi* using primers and probe follow ISPM No27

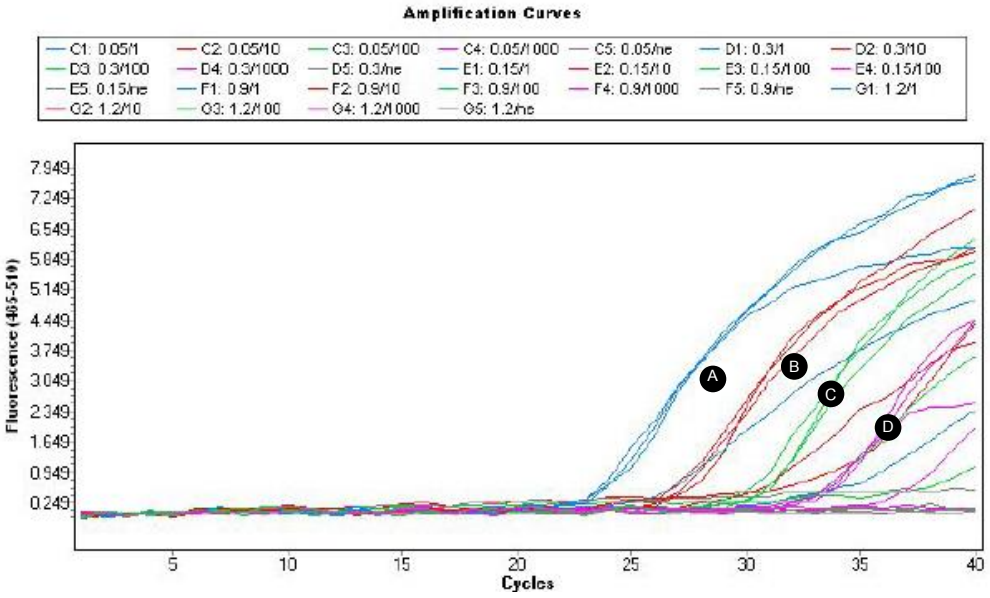


Figure 2 Sensitivity test for COI sequence-based real-time PCR assay using different primer concentrations (100 nM probe): A. dilution of 1 adult DNA, B. 10-fold dilution of *T. palmi* DNA, C. 100-fold dilution of *T. palmi* DNA, and D. 1000-fold dilution of *T. palmi* DNA

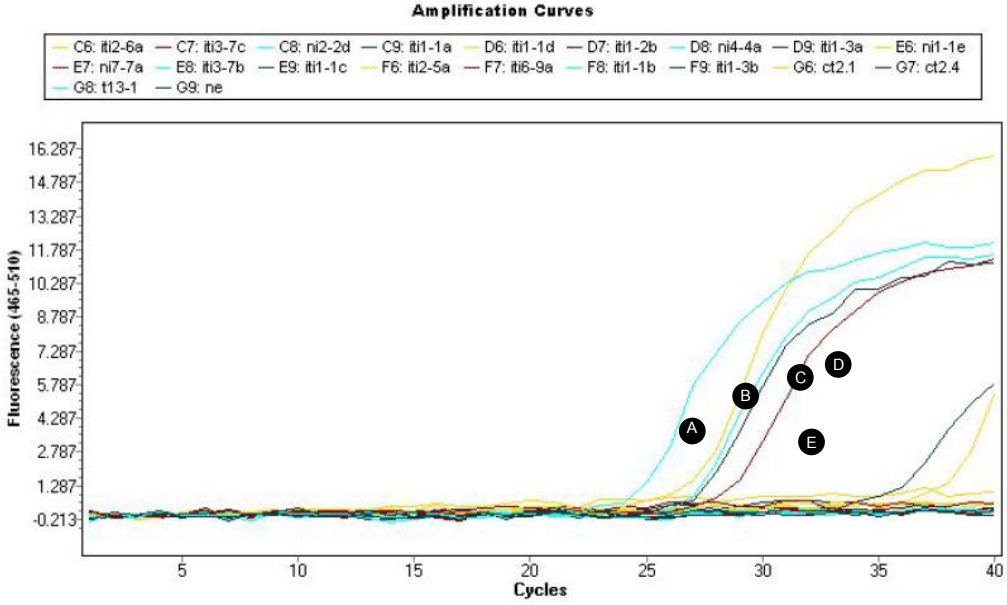


Figure 3 Specificity test for COI sequence-based real-time PCR assay using 19 samples of Thysanoptera, 5 of which are *Thrips palmi* detected at different Cp values: A. 23.92, B. 26.17, C. 26.48, D. 26.53, and E. 27.76

Figure 4 Museum voucher ID which the number prefixed with “EMBT ENT” are unique identifiers for the individual specimens

Figure 5 The comparison between the sample before DNA extraction (EMBT ENT 0003437: A, Dorsal habitus; B, Head-pronotum, dorsal view; C, abdomen, dorsal view) and after non-destructive DNA extraction (EMBT ENT 0001619: D, Dorsal habitus; E, Head-pronotum, dorsal view; F, abdomen, dorsal view).

ผู้รวบรวม

นางสาวภัทรพร	สรรพนุเคราะห์
นางสาวดาราพร	รินทะรักษ์
นางสาวอมรรัชฎ์	คิดใจเดียว
นางสาวกาญจนา	วาระวิชะนี
นางสาวธัญชนก	จงรักไทย
นางสาวภัทร์พิชชา	รุจิระพงศ์ชัย
นางสาวชลธิชา	รักใคร่
นางวรัญญา	มาลี
นางศรีจำนรรจ์	ศรีจันทรา
นางสาววิภาดา	ปลอดครบุรี

ผู้สอบทาน

นางสาวณฐวรรณ	ชนะโชติ
นางสาวณัฐกุล	แขไขแสง

Annual Report 2014 Annual Report 2014 Annual Report 2014 Annual Rep
Annual Report 2014 Annual Report
Annual Report 2014 Annual Report 2014 Annual Report 2014 Annual Rep

Annual Report 2014

กรมวิชาการเกษตร
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Annual Report 2014 Annual Report 2014 Annual Report 2014 Annual Rep
Annual Report 2014 Annual Report
Annual Report 2014 Annual Report 2014 Annual Report 2014 Annual Rep
Annual Report 2014 Annual Report
Annual Report 2014 Annual Report 2014 Annual Report 2014 Annual Rep
Annual Report 2014 Annual Report