ระดับโครงการ

กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

รายงานผลสัมฤทธิ์สำหรับทุนสนับสนุนงานพื้นฐาน (Fundamental Fund)

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564

หน่วยงาน กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

การศึกษาชนิดศัตรูพืชที่ติดมากับพืชนำเข้า

Study on Quarantine Pest Associated with Imported Plants

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวปรียพรรณ พงศาพิชณ์

Ms. Preyapan Pongsapich

ปี 2564

กรมวิชาการเกษตร

บทสรุปผู้บริหาร

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบชนิดของศัตรูพืชและแหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้าและเส้นทางการเข้ามาของศัตรูพืช ข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้สำหรับอ้างอิงทางวิชาการ เพื่อกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชให้เหมาะสมรัดกุม เพื่อป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชกักกันหรือศัตรูพืชร้ายแรงที่ยังไม่มีในประเทศเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศไทย ลดการสร้างความเสียหายให้กับการเพาะปลูกพืชทั้งเพื่อบริโภคและการผลิตเมล็ดพันธุ์สำหรับจำหน่ายยังต่างประเทศ และลดค่าใช้จ่ายในการป้องกันกำจัดเมื่อมีการแพร่ระบาดของศัตรูพืชกักกันหรือศัตรูพืชชนิดใหม่ที่ร้าย แรงที่ยังไม่มีปรากฏในประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

ประเทศไทยมีการนำเข้าพืชและผลิตผลพืชจากทั่วโลก เช่น เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ พริก พืชตระกูลกะหล่ำ พืชตระกูลแตง และข้าวโพด นอกจากนี้ยังนำเข้าผัก ผลไม้ ไม้ดอก ซึ่งพืชเหล่านี้สามารถเป็นพาหะของศัตรูพืชร้ายแรงที่ยังไม่มีรายงานพบในประเทศไทย จึงได้ทำการศึกษาชนิดศัตรูพืชที่ติดมากับพืชนำเข้า เพื่อป้องกันศัตรูพืชร้ายแรงจากต่างประเทศไม่ให้เข้ามาแพร่ระบาดทำความเสียหายกับการเกษตรของประเทศ รายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบเพื่อใช้สนับสนุนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับกำหนดมาตรการสุขอนามัยกับศัตรูพืชก่อนการนำเข้าพืช การสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ หัวพันธุ์มันฝรั่ง ดอกไม้และผลไม้นำเข้าพืชตามมาตรฐาน International Seed Testing Association และตามมาตรฐาน ISPM No.31 (เดือนตุลาคม 2558 - กันยายน 2564) นำตัวอย่างมาตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น (วัชพืช ไรและศัตรูพืช) ด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี blotter method, dilution plate method, ELISA technique และชีวโมเลกุล ผลการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากอินเดีย จีน สหรัฐอเมริกา และเนเธอร์แลนด์ เมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา อินเดีย ญี่ปุ่น อิสราเอล ชิลี และฟิลิปปินส์ เมลอนนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา อินเดีย ญี่ปุ่น อิสราเอล ชิลี และเนเธอร์แลนด์ เมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้าจากจีนและสหรัฐอเมริกา เมล็ดพันธุ์ผักกาดหัวนำเข้าจากนิวซีแลนด์ เมล็ดพันธุ์คะน้านำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีนและประเทศนิวซีแลนด์ ผลแอปเปิลสดนำเข้าจากญี่ปุ่น กุหลาบตัดดอก ผลองุ่นสดและผลแอปเปิลสดนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน และกุหลาบตัดดอกนำเข้าจากเนเธอร์แลนด์ ผลไม่พบศัตรูพืชกักกัน

ในการตรวจติดตามเชื้อ *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากต่างประเทศ และตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากต่างประเทศ ด้วยวิธีการขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ตรวจแล้วไม่พบศัตรูพืชกักกันดังกล่าว อย่างไรก็ตามสามารถตรวจพบศัตรูพืชกักกันในหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจากสกอตแลนด์ ออสเตรเลีย เนเธอร์แลนด์ คือ *Spongospora subterranea* เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดนำเข้าจากอินเดียและสหรัฐอเมริกาตรวจพบ *Trogoderma granarium* และ *T. variabile* ส่วนเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีนำเข้าจากญี่ปุ่น ผักกาดกวางตุ้งนำเข้าจากนิวซีแลนด์ และผักชีนำเข้าจากอิตาลีและสหรัฐอเมริกา ตรวจพบวัชพืชกักกัน ซึ่งได้ดำเนินการตามมาตรการสุขอนามัยกับศัตรูพืชที่ตรวจพบโดยวิธีการกำจัด ทำลาย หรือส่งกลับประเทศต้นทาง

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Thailand imports plants and plant products from worldwide, such as tomato seeds, peppers seeds, cruciferous seeds, cucurbits seeds and corn seeds. It also imports seeds, fruits, and flowers, all of plants and plant product can be carried of serious pests that have not present in Thailand. The study on quarantine pest associated with imported plants has been prevented serious pests from foreign countries to spread and damage in agriculture area. The pest lists support the pest risk analysis for established phytosanitary measures against pests prior to plant importation. The imported seeds, seed potatoes, cut flower and fruits were randomly sampled according to the standards of the International Seed Testing Association (ISTA) and ISPM No.31 (October 2015 to September 2021) were inspected pests (weeds, mites and pests) by visual inspection and under a microscope and detailed pest diagnostics in laboratories by blotter method, dilution plate method, ELISA technique and molecular biology. The result of the import of tomato seeds (from India, China, the United States and the Netherlands), watermelon seeds (from USA, India, Japan, Israel, Chile and Philippines), melon seeds (from the United States, India, Japan, Israel, Chile and the Netherlands), pepper seeds (from India, China, the Netherlands and the United States), lettuce seeds (from China and the United States), cabbage seeds from New Zealand, kale seeds (from the People's Republic of China and New Zealand), fresh apples fruits from Japan, cut roses flowers, fresh grapes fruits and fresh apples fruits from the People's Republic of China and rose cut flowers from the Netherlands were not found quarantine pests.

The interception of quarantine pests, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* on the imported seed potato and phytoplasma on the imported tomato seeds were examined in the laboratory that they were not found quarantine pest. However, the imported seed potatoes from Scotland, Australia, the Netherlands found *Spongospora subterranea*. The maize seeds from India and the United States were found *Trogoderma granarium* and *T. variabile*. The cabbage seeds from Japan, pakchoi seeds from New Zealand and coriander seeds from Italy and the United States detected quarantine weed seeds that has taken phytosanitary measures against detected pests with appropriated treatments, destroyed or reshipment.

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ แหล่งเงินสนับสนุนโครงการวิจัยจากเงินอุดหนุนส่งเสริมด้านวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) และหน่วยงานต้นสังกัด กรมวิชาการเกษตร และขอขอบคุณหน่วยงานทุกหน่วย บุคลากรที่เกี่ยวข้อง ผู้วิจัย ผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน ที่ทำให้การดำเนินโครงการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	2
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
กิตติกรรมประกาศ	5
บทที่ 1 บทนำ	7
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน	12
บทที่ 3 ผลการศึกษา	70
บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล	82
เอกสารอ้างอิง	85
ภาคผนวก	95

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 1 บทนำ

ปัจจุบันมีการแพร่ระบาดของศัตรูพืชที่สำคัญหลายชนิดในต่างประเทศ บางชนิดเป็นศัตรูพืชที่ยังไม่มีรายงานพบในประเทศไทย เช่น โรคใบไหม้ลาตินอเมริกันของยางพารา (South American Leaf Blight; *Microcyclus ulei*) ซึ่งระบาดทำความเสียหายกับยางพาราในทวีปแถบอเมริกาใต้ ไส้เดือนฝอยซีสต์ (cyst nematode; *Globodera pallida, G. rostochiensis*) ซึ่งระบาดในแหล่งปลูกมันฝรั่งในทวีปยุโรป แมลงวันผลไม้เมดิเตอร์เรเนียน (Mediterranean fruit fly; *Ceratitis capitata*) ซึ่งระบาดในประเทศในแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน เป็นต้น หากศัตรูพืชร้ายแรงดังกล่าวแพร่ระบาดเข้ามาในประเทศไทย นอกจากจะทำความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศแล้ว ยังก่อให้เกิดผลกระทบกับการส่งออกสินค้าเกษตรไปยังต่างประเทศด้วย ซึ่งจะส่งผลกับเศรษฐกิจของประเทศ และต้องใช้งบประมาณสูงในการป้องกันกำจัด

ในอดีตที่ผ่านมามีศัตรูพืชต่างถิ่นหลายชนิดที่เข้ามาแพร่ระบาดและสามารถเจริญแพร่พันธุ์เป็นการถาวรในสภาพนิเวศน์ของประเทศไทย ตัวอย่าง เช่น ผักตบชวา เป็นพืชพื้นเมืองของอินโดนีเซีย ได้ถูกนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยเป็นครั้งแรกในสมัยรัชกาลที่ 5 เมื่อ พ.ศ. 2444 และสามารถขยายพันธุ์อย่างรวดเร็วจนกลายเป็นวัชพืชในแม่น้ำลำคลองทั่วประเทศ ทำให้เป็นอุปสรรคในการคมนาคม การชลประทาน และการเลี้ยงสัตว์น้ำ จนกระทั่งในสมัยรัชกาลที่ 6 ได้ตราเป็นพระราชบัญญัติขึ้นเรียกว่า พระราชบัญญัติสำหรับกำจัดผักตบชวา พ.ศ. 2456 แต่จนถึงปัจจุบันผักตบชวาก็ยังเป็นวัชพืชที่ไม่สามารถกำจัดให้หมดไปจากประเทศไทย ไมยราบยักษ์ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ นำเข้ามาปลูกในประเทศไทยเมื่อประมาณ พ.ศ. 2495 เพื่อใช้เป็นพืชบำรุงดินในไร่ยาสูบ หญ้าขจรจบ นำเข้ามาจากประเทศอินเดียเมื่อปี พ.ศ. 2498 โดยผู้เชี่ยวชาญอาหารสัตว์ของ FAO เพื่อทดลองปลูกเป็นพืชอาหารสัตว์ สามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วจนกลายเป็นวัชพืชที่ทำความเสียหายกับการเกษตรของประเทศไทยอย่างมาก (ประเทืองและคณะ, 2533)

ในช่วงตั้งแต่ปี 2547 เป็นต้นมา มีรายงานการระบาดของแมลงที่เป็นศัตรูพืชต่างถิ่นที่สำคัญ 2 ชนิด คือ แมลงดำหนามมะพร้าว (coconut hispine beetle; *Brontispa longissima*) มีถิ่นกำเนิดในอินโดนีเซีย และปาปัวนิวกินี ระบาดอย่างรุนแรงในประเทศไทยเมื่อปี 2547-2549 ในพื้นที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และสุราษฎร์ธานี ซึ่งเป็นแหล่งผลิตมะพร้าวที่สำคัญ ต่อมาในปลายปี 2550 มีแมลงศัตรูมะพร้าวชนิดใหม่เข้ามาระบาดคือ หนอนหัวดำมะพร้าว (coconut black-headed caterpillar: *Opisina arenosella*) ซึ่งมีถิ่นกำเนิดอยู่ในเอเชียใต้ แถบประเทศอินเดียและศรีลังกา พบครั้งแรกพบที่อำเภอเมือง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระบาดในพื้นที่ 15 ไร่ ในปี 2554 พบระบาดในพื้นที่ 12 จังหวัด รวมพื้นที่การระบาด 48,591 ไร่ ทั้งแมลงดำหนามมะพร้าว และหนอนหัวดำมะพร้าวทำให้ต้นมะพร้าวตายนับหมื่นต้น ทำให้ประเทศไทยขาดแคลนมะพร้าวจนต้องนำเข้าจากต่างประเทศ (นวลศรี, 2554, นวลศรี, 2555) ในปี 2551 พบเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู (pink mealybug; *Phenacoccus manihoti*) ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา ระบาดในพื้นที่ จ.กาญจนบุรี และนครราชสีมา ในปี 2552 มีรายงานความเสียหายที่เกิดจากเพลี้ยแป้งสีชมพูทำลายพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังไปถึง 1.4 ล้านไร่ ประมาณ 21% ของพื้นที่ปลูกทั้งประเทศ

กรมวิชาการเกษตร

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่กำลังพัฒนาเป็นประเทศอุตสาหกรรม พืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่ทำรายได้ให้กับประเทศ เช่น ข้าว ยางพารา ปาล์มน้ำมัน ข้าวโพด อ้อย มันสำปะหลัง และผักผลไม้ จึงจำเป็นอย่างยิ่งต้องป้องกันพืชเศรษฐกิจเหล่านี้จากศัตรูพืชร้ายแรงจากต่างประเทศ พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และ พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 ซึ่งบังคับใช้ในปัจจุบัน มีบทบัญญัติเกี่ยวกับการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชที่ติดมากับสินค้าเกษตรนำเข้า โดยแบ่งพืชออกเป็น 3 ประเภท คือ สิ่งต้องห้าม สิ่งกำกัด และสิ่งไม่ต้องห้าม การนำเข้าหรือนำผ่านสิ่งต้องห้ามหรือสิ่งกำกัดต้องนำเข้าหรือนำผ่านทางด่านตรวจพืชเพื่อให้พนักงานเจ้าหน้าที่ตรวจ และต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการและเงื่อนไขที่อธิบดีกำหนด

งานวิจัยนี้เป็นการตรวจหาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ พริก แตงโม เมลอน ข้าวโพด ผักกาดหัว ผักกาดหอม กะหล่ำปลี ผักกาดกวางตุ้ง คะน้า หัวพันธุ์มันฝรั่ง ผลอุ่นสด ผลมังคุดสด แอปเปิล และดอกกุหลาบที่นำเข้าจากต่างประเทศ และทำการจัดจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนหาข้อมูลเกี่ยวกับวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ตรวจพบโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบชนิดของศัตรูพืชแหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้าและเส้นทางการเข้ามาของศัตรูพืช ข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้สำหรับอ้างอิงทางวิชาการ เพื่อกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชให้เหมาะสมรัดกุม และป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศ

กรมวิชาการเกษตร

1. วิสัยทัศน์ และพันธกิจของหน่วยงาน

<u>วิสัยทัศน์</u>

กรมวิชาการเกษตรเป็นองค์กรที่เป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาด้านพืช เครื่องจักรกลการเกษตร และเป็นศูนย์กลางรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตรด้านพืชในระดับสากล บนพื้นฐานการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

<u>พันธกิจ</u>

1. สร้างและถ่ายทอดองค์ความรู้จากงานวิจัยด้านพืชและเครื่องจักรกลการเกษตรสู่กลุ่มเป้าหมาย
2. กำหนดและกำกับดูแลมาตรฐานระบบการผลิตและผลิตพันธุ์พืชและปัจจัยการผลิต พัฒนาระบบตรวจรับรองสินค้าการเกษตรด้านพืชให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล
3. อนุรักษ์และพัฒนาการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพด้านพืช แมลง และจุลินทรีย์
4. กำกับ ดูแล และพัฒนากฎหมายที่กรมวิชาการเกษตรรับผิดชอบ

2. ยุทธศาสตร์ชาติที่สอดคล้องกับแผนปฏิบัติงานด้าน ววน. ของหน่วยงาน (โปรดเลือกเฉพาะยุทธศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับหน่วยงานของท่าน)

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 1 ด้านความมั่นคง

เพื่อบริหารจัดการสภาวะแวดล้อมของประเทศให้มีความมั่นคง ปลอดภัย และมีความสงบเรียบร้อยในทุกระดับและทุกมิติ

☑ ยุทธศาสตร์ที่ 2 ด้านการสร้างความสามารถในการแข่งขัน

เน้นการยกระดับศักยภาพในหลากหลายมิติควบคู่กับการขยายโอกาสของประเทศไทยในเวทีโลก

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 3 ด้านพัฒนาและเสริมสร้างศักยภาพทรัพยากรมนุษย์

คนไทยในอนาคต มีความพร้อมทั้งกาย ใจ สติปัญญา มีทักษะที่จำเป็นในศตวรรษที่ 21 มีทักษะสื่อสารภาษาอังกฤษและภาษาที่ 3 และมีคุณธรรม

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 4 ด้านการสร้างโอกาสและความเสมอภาคทางสังคม

สร้างความเป็นธรรม และลดความเหลื่อมล้ำในทุกมิติ กระจายศูนย์กลางความเจริญทางเศรษฐกิจและสังคม เพิ่มโอกาสให้ทุกภาคส่วนเข้ามาเป็นกำลังของการพัฒนาประเทศในทุกระดับ

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 5 ด้านการสร้างการเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

คำนึงถึงความยั่งยืนของฐานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของประชาชนให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ผ่านมาตรการต่างๆ ที่มุ่งเน้นให้เกิดผลลัพธ์ต่อความยั่งยืน

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 6 ด้านการปรับสมดุลและพัฒนาระบบการบริหารจัดการภาครัฐ

การปรับเปลี่ยนภาครัฐ ยึดหลัก “ภาครัฐของประชาชนเพื่อประชาชนและประโยชน์ส่วนรวม”

3. วงเงินงบประมาณกองทุน ววน. ที่ได้รับจัดสรรในปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 และโปรดระบุแผนงาน/โครงการให้สอดคล้องกับโปรแกรมของแผน ววน.

โปรแกรมตามแผน ววน.	งบประมาณ (บาท)
P7. โจทย์ท้าทายด้านทรัพยากรสิ่งแวดล้อม และการเกษตร	1,198,400

กรมวิชาการเกษตร

4. รายละเอียดโครงการ

ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล

ปัจจุบันมีการแพร่ระบาดของศัตรูพืชที่สำคัญหลายชนิดในต่างประเทศ บางชนิดเป็นศัตรูพืชที่ยังไม่มีรายงานพบในประเทศไทย เช่น โรคใบไหม้ลาตินอเมริกันของยางพารา (South American Leaf Blight; Microcyclus ulei) ซึ่งระบาดทำความเสียหายกับยางพาราในทวีปแถบอเมริกาใต้ ไส้เดือนฝอยซีสต์ (cyst nematode; Globodera pallida, G. rostochiensis) ซึ่งระบาดในแหล่งปลูกมันฝรั่งในทวีปยุโรป แมลงวันผลไม้เมดิเตอร์เรเนียน (Mediterranean fruit fly; Ceratitis capitata) ซึ่งระบาดในประเทศในแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน เป็นต้น หากศัตรูพืชร้ายแรงดังกล่าวแพร่ระบาดเข้ามาในประเทศไทย นอกจากจะทำความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศแล้ว ยังก่อให้เกิดผลกระทบกับการส่งออกสินค้าเกษตรไปยังต่างประเทศด้วย ซึ่งจะส่งผลกับเศรษฐกิจของประเทศ และต้องใช้งบประมาณสูงในการป้องกันกำจัด

ในอดีตที่ผ่านมามีศัตรูพืชต่างถิ่นหลายชนิดที่เข้ามาแพร่ระบาดและสามารถเจริญแพร่พันธุ์เป็นการถาวรในสภาพนิเวศน์ของประเทศไทย ตัวอย่าง เช่น ผักตบชวา เป็นพืชพื้นเมืองของอินโดนีเซีย ได้ถูกนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยเป็นครั้งแรกในสมัยรัชกาลที่ 5 เมื่อ พ.ศ. 2444 และสามารถขยายพันธุ์อย่างรวดเร็วจนกลายเป็นวัชพืชในแม่น้ำลำคลองทั่วประเทศ ทำให้เป็นอุปสรรคในการคมนาคม การชลประทาน และการเลี้ยงสัตว์น้ำ จนกระทั่งในสมัยรัชกาลที่ 6 ได้ตราเป็นพระราชบัญญัติขึ้นเรียกว่า พระราชบัญญัติสำหรับกำจัดผักตบชวา พ.ศ. 2456 แต่จนถึงปัจจุบันผักตบชวาก็ยังเป็นวัชพืชที่ไม่สามารถกำจัดให้หมดไปจากประเทศไทย ไมยราบยักษ์ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ นำเข้ามาปลูกในประเทศไทยเมื่อประมาณ พ.ศ. 2495 เพื่อใช้เป็นพืชบำรุงดินในไร่ยาสูบ หญ้าขจรจบ นำเข้ามาจากประเทศอินเดียเมื่อปี พ.ศ. 2498 โดยผู้เชี่ยวชาญอาหารสัตว์ของ FAO เพื่อทดลองปลูกเป็นพืชอาหารสัตว์ สามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วจนกลายเป็นวัชพืชที่ทำความเสียหายกับการเกษตรของประเทศไทยอย่างมาก (ประเทืองและคณะ, 2533)

ในช่วงตั้งแต่ปี 2547 เป็นต้นมา มีรายงานการระบาดของแมลงที่เป็นศัตรูพืชต่างถิ่นที่สำคัญ 2 ชนิด คือ แมลงดำหนามมะพร้าว (coconut hispine beetle; *Brontispa longissima*) มีถิ่นกำเนิดในอินโดนีเซีย และปาปัวนิวกินี ระบาดอย่างรุนแรงในประเทศไทยเมื่อปี 2547-2549 ในพื้นที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และสุราษฎร์ธานี ซึ่งเป็นแหล่งผลิตมะพร้าวที่สำคัญ ต่อมาในปลายปี 2550 มีแมลงศัตรูมะพร้าวชนิดใหม่เข้ามาระบาดคือ หนอนหัวดำมะพร้าว (coconut black-headed caterpillar: *Opisina arenosella*) ซึ่งมีถิ่นกำเนิดอยู่ในเอเชียใต้ แถบประเทศอินเดียและศรีลังกา พบครั้งแรกพบที่อำเภอเมือง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระบาดในพื้นที่ 15 ไร่ ในปี 2554 พบระบาดในพื้นที่ 12 จังหวัด รวมพื้นที่การระบาด 48,591 ไร่ ทั้งแมลงดำหนามมะพร้าว และหนอนหัวดำมะพร้าวทำให้ต้นมะพร้าวตายนับหมื่นต้น ทำให้ประเทศไทยขาดแคลนมะพร้าวจนต้องนำเข้าจากต่างประเทศ (นวลศรี, 2554, นวลศรี, 2555) ในปี 2551 พบเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู (pink mealybug; *Phenacoccus manihoti*) ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา ระบาดในพื้นที่ จ.กาญจนบุรี และนครราชสีมา ในปี 2552 มีรายงานความเสียหายที่เกิดจากเพลี้ยแป้งสีชมพูทำลายพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังไปถึง 1.4 ล้านไร่ ประมาณ 21% ของพื้นที่ปลูกทั้งประเทศ

กรมวิชาการเกษตร

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่กำลังพัฒนาเป็นประเทศอุตสาหกรรม พืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่ทำรายได้ให้กับประเทศ เช่น ข้าว ยางพารา ปาล์มน้ำมัน ข้าวโพด อ้อย มันสำปะหลัง และผักผลไม้ จึงจำเป็นอย่างยิ่งต้องป้องกันพืชเศรษฐกิจเหล่านี้จากศัตรูพืชร้ายแรงจากต่างประเทศ พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และ พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 ซึ่งบังคับใช้ในปัจจุบัน มีบทบัญญัติเกี่ยวกับการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชที่ติดมากับสินค้าเกษตรนำเข้า โดยแบ่งพืชออกเป็น 3 ประเภท คือ สิ่งต้องห้าม สิ่งกำกัด และสิ่งไม่ต้องห้าม การนำเข้าหรือนำผ่านสิ่งต้องห้ามหรือสิ่งกำกัดต้องนำเข้าหรือนำผ่านทางด่านตรวจพืชเพื่อให้พนักงานเจ้าหน้าที่ตรวจ และต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการและเงื่อนไขที่อธิบดีกำหนด

งานวิจัยนี้เป็นการตรวจหาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ พริก แตงโม เมลอน ข้าวโพด ผักกาดหัว ผักกาดหอม กะหล่ำปลี ผักกาดกวางตุ้ง หัวพันธุ์มันฝรั่ง ผลองุ่นสด ผลมังคุดสด แอปเปิล และดอกกุหลาบที่นำเข้าจากต่างประเทศ และทำการจัดจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนหาข้อมูลเกี่ยวกับวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ตรวจพบโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบชนิดของศัตรูพืชแหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้าและเส้นทางการเข้ามาของศัตรูพืช ข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้สำหรับอ้างอิงทางวิชาการ เพื่อกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชให้เหมาะสมรัดกุม และป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1) เพื่อศึกษาชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับสินค้าเกษตรนำเข้าจากต่างประเทศ

ขอบเขตการศึกษา

ศึกษาชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับสินค้าเกษตรนำเข้าจากต่างประเทศ

นิยามศัพท์

ศัตรูพืช หมายถึง ชนิดพันธุ์สายพันธุ์หรือต้นแบบชีวภาพของพืช สัตว์หรือเชื้อโรคใดก็ตามที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชหรือผลผลิตพืช

ศัตรูพืชกักกัน หมายถึง ศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่มีศักยภาพต่อพื้นที่ที่อยู่ในอันตรายนั้นและยังไม่มีอยู่ในที่นั้นหรือมีอยู่แต่ไม่แพร่กระจายอย่างกว้างขวาง และการควบคุมอย่างเป็นทางการ

มาตรการสุขอนามัยพืช หมายถึง ตัวบทกฎหมาย ระเบียบข้อบังคับหรือวิธีดำเนินการที่เป็นทางการใดๆก็ตามที่มีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันการนำเข้าหรือการแพร่กระจายของศัตรูพืชกักกันหรือเพื่อจำกัดผลกระทบทางเศรษฐกิจผลกระทบทางเศรษฐกิจของศัตรูพืชที่ไม่ใช่ศัตรูพืชกักกันที่ต้องมีการควบคุม

เมล็ดพันธุ์ (ที่เป็นสินค้าประเภทหนึ่ง) หมายถึง เมล็ดพันสำหรับการปลูกหรือตั้งใจนำไปใช้สำหรับการปลูกและไม่ใช้สำหรับบริโภคหรือการแปรรูป

กรมวิชาการเกษตร

การแพร่กระจาย (ของศัตรูพืช) หมายถึง การแผ่ขยายของการแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ของศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่งภายในพื้นที่ใดพื้นที่หนึ่ง

การตรวจดูด้วยสายตา หมายถึง การตรวจสอบพืช ผลิตพืช หรือวัตถุควบคุมอื่นๆทางกายภาพด้วยการใช้ตาเปล่า แว่นขยาย เครื่องมอง 3 มิติหรือกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจหาศัตรูพืชหรือสิ่งปนเปื้อนต่างๆโดยไม่มีการทดสอบหรือการแปรสภาพ

การเข้ามา (ของศัตรูพืช) หมายถึง การเคลื่อนที่ของศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง เข้าสู่พื้นที่ใดพื้นที่หนึ่ง ซึ่งยังไม่มีศัตรูพืชชนิดนั้นอยู่มาก่อนหรือมีอยู่แต่ไม่แพร่กระจายอย่างกว้างขวาง และมีการควบคุมอย่างเป็นทางการ

การสำรวจแบบติดตาม หมายถึง การสำรวจอย่างต่อเนื่องเพื่อพิสูจน์ยืนยันคุณสมบัติต่างๆ ของประชากรศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง

ศัตรูพืชที่ไม่ใช่ศัตรูพืชกักกัน หมายถึง ศัตรูพืชที่ไม่เป็นศัตรูพืชกักกัน สำหรับพื้นที่ใดพื้นที่หนึ่ง

การวินิจฉัยศัตรูพืช หมายถึง กระบวนการตรวจหา และการจำแนกชนิดของศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง

บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน

กิจกรรมที่ 1 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับพืชและส่วนของพืชที่นำเข้าเพื่อขยายพันธุ์

การทดลองที่ 1.1 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากอินเดีย จีน สหรัฐอเมริกา และเนเธอร์แลนด์ (2559-2562)

แบ่งการดำเนินงานเป็น 2 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากอินเดีย และจีน (2559 -2560 รวม 2 ปี)

ระยะที่ 2 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา และเนเธอร์แลนด์ (2561-2562 รวม 2 ปี)

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

1. การสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชเป้าหมาย เช่น ชีววิทยา วิธีการตรวจศัตรูพืชในเมล็ดพันธุ์ และวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

2. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าตามมาตรฐาน International Seed Testing Association (Mathur and Kongdal, 2003) ทำการสุ่มตัวอย่าง ณ จุดนำเข้า โดยทำการสุ่มตัวอย่างจากด่านตรวจพืชต่างๆ ที่มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ และทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ ด้วยตาเปล่า สังเกตลักษณะสีผิว และรูปร่างว่ามีอะไรผิดปกติหรือไม่ มีรอยเจาะ หรือแตกกระเทาะของเมล็ดพันธุ์หรือไม่ และจึงนำเมล็ดพันธุ์ที่สุ่มได้นำไปตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

3. ตรวจศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

กรมวิชาการเกษตร

3.1 ตรวจสอบและจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชขั้นละเอียดโดยทำการคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพ ได้แก่ เมล็ดพืชบริสุทธิ์ เมล็ดพืชอื่น และสิ่งเจือปน นำแต่ละส่วนมาชั่งหาน้ำหนัก แล้วนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชที่ตรวจพบโดย

3.1.1 ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) เพื่อศึกษาและบันทึกลักษณะภายนอกของเมล็ด เช่น สี ผิว รูปร่างและลายบนผิวของเมล็ด วัดขนาดความกว้าง ยาวของเมล็ด

3.1.2 เปรียบเทียบกับตัวอย่างเมล็ดวัชพืชในพิพิธภัณฑ์และใช้คู่มือจำแนกเมล็ดพืช

3.1.3 จำแนกโดยปลูกดูลักษณะต่างๆตั้งแต่เริ่มงอกเป็นต้นกล้า ลักษณะใบ ดอก ผล

3.2 จำแนกกลุ่มของแมลงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

3.3 จัดเตรียมตัวอย่างแมลงและไรโดย

3.3.1 นำตัวอย่างแมลงที่เก็บรวบรวมได้มาจัดรูปร่าง (set) บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) ตัวอย่างแมลง โดยใช้เข็มไร้สนิมปักบริเวณด้านหน้าตรงมุมของปีกขวา (บริเวณมุมที่ปีกจรดกัน) ใช้ปากคีบจัดขาทั้งสามคู่ให้อยู่ในลักษณะเกาะหรือเดินโดยใช้เข็มหมุดขนาดกลางเป็นตัวยึด ตัวเต็มวัยขนาด เช่น เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด และด้วงที่มีขนาดเล็กให้ติดลงบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง อุณหภูมิ 50-60^{O}C ใช้เวลา 30 – 60 วัน ขึ้นกับขนาดของแมลง

3.3.2 ทำสไลด์ถาวร แมลงจำพวกปากดูดที่มีขนาดเล็กเช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้งและเพลี้ยหอย ต้องนำมาทำสไลด์ถาวร และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50-60^{O}C เพื่อจำแนกชนิด

3.3.3 ไร ทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereomicroscope หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน โดยจัดท่าทางของไรให้อยู่ในท่าคว่ำและท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่างๆที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย coverglass ใช้ปากกาเขียวแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 ^{O}C ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ covergrass ด้วยน้ำยา ทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บและพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

3.4 ตรวจเชื้อรา ด้วยวิธี Blotter method (Mathur and Kongdal, 2003) โดยการนำเมล็ดที่วางไว้ในภาชนะให้ความชื้นไปวางใต้แสง near ultra violet (NUV) โดยให้แสงสลับกับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน และตรวจจำแนกชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและกำลังขยายสูงต่อไป

3.5 ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยวิธี Dilution plate method และ เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar plate method) ตรวจสอบและจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา เช่น Enzyme – linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.6 ตรวจและจำแนกชนิดไวรัสที่ติดมากับเมล็ดด้วยวิธี ELISA โดยตรวจจากเมล็ดโดยตรงหรือตรวจจากต้นกล้าตามวิธีการที่เหมาะสมกับไวรัสแต่ละชนิด

กรมวิชาการเกษตร

4. เพาะเมล็ดพันธุ์ เพื่อสังเกตลักษณะอาการผิดปกติของต้นพืชในโรงเรือนของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช โดยสังเกตดูลักษณะอาการบริเวณโคนต้น ลำต้น ใบเลี้ยง และใบ ของต้นพืช บันทึกผล กรณีถ้าพบอาการผิดปกติให้นำส่วนของพืชไปทำการแยกเชื้อและจำแนกชนิด

5. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงผลิตหรือในโรงเรือนปลูกพืชของบริษัทนำเข้าเมล็ดพันธุ์

การทดลองที่ 1.2 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา อินเดีย ญี่ปุ่น อิสราเอล ชิลี และฟิลิปปินส์ (2559-2564)

แบ่งการดำเนินงานเป็น 3 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา และอินเดีย (2559-2560 รวม 2 ปี)

ระยะที่ 2 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากญี่ปุ่นและอิสราเอล (2561-2562 รวม 2 ปี)

ระยะที่ 3 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากชิลีและฟิลิปปินส์ (2563 -2564 รวม 2 ปี)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ และวารสาร
2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติค มาร์กเกอร์ คัตเตอร์ หลาว
3. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ชุดตรวจสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ และตู้บ่มเชื้อ
4. โรงเรือนปลูกพืชทดสอบ
5. พืชทดสอบ เช่น ต้นยาสูบ ต้นมะเขือเทศ
6. เมล็ดพันธุ์แตงโม

ขั้นตอนและวิธีในการวิจัย ดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. การสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชเป้าหมาย เช่น ชีววิทยา วิธีการตรวจศัตรูพืชในเมล็ดพันธุ์ และวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

2. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากด่านตรวจพืช ตามมาตรฐาน International Seed Testing Association (ISTA, 2018) ปริมาณเมล็ดพันธุ์แตงโมที่ใช้สำหรับตรวจสอบศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ น้ำหนัก 250 กรัม โดยสุ่มตามวิธีการดังนี้

2.1 การสุ่มตัวอย่างที่บรรจุอยู่ในกระสอบ หรือภาชนะอื่นๆ ที่มีขนาดบรรจุของภาชนะแต่ละใบเท่าๆกัน โดยมีน้ำหนักของเมล็ดพันธุ์จำนวน 15 กิโลกรัม ถึง 100 กิโลกรัม

2.1.1 เมล็ดพันธุ์จำนวน 1 – 4 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 3 ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.2 เมล็ดพันธุ์จำนวน 5 – 8 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 2 ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.3 เมล็ดพันธุ์จำนวน 9 – 15 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 1 ตัวอย่าง จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.4 เมล็ดพันธุ์จำนวน 16 – 30 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 15 ตัวอย่างจากภาชนะบรรจุทั้งหมด

กรมวิชาการเกษตร

2.1.5 เมล็ดพันธุ์จำนวน 31 – 59 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 20 ตัวอย่างจากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.6 เมล็ดพันธุ์จำนวนมากกว่าหรือเท่ากับ 60 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 30 ตัวอย่างจากภาชนะบรรจุทั้งหมด

3. การตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ ด้วยตาเปล่า สังเกตลักษณะสี ผิว และรูปร่างว่ามีอะไรผิดปกติหรือไม่ มีรอยเจาะ หรือแตกกระเทาะของเมล็ดพันธุ์หรือไม่ และจึงนำเมล็ดพันธุ์ที่สุ่มได้นำไปตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

4. การตรวจศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

4.1 ตรวจสอบและจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชขั้นละเอียด โดยทำการคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพได้แก่ เมล็ดพืชบริสุทธิ์ เมล็ดพืชอื่น และสิ่งเจือปน นำแต่ละส่วนมาชั่งหาน้ำหนัก แล้วนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชที่ตรวจพบโดย

4.1.1 ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) เพื่อศึกษาและบันทึกลักษณะภายนอกของเมล็ด เช่น สี ผิว รูปร่างและลายบนผิวของเมล็ด วัดขนาดความกว้าง ยาวของเมล็ด

4.1.2 เปรียบเทียบกับตัวอย่างเมล็ดวัชพืชในพิพิธภัณฑ์และใช้คู่มือจำแนกเมล็ดพืช

4.1.3 จำแนกโดยปลูกดูลักษณะต่างๆตั้งแต่เริ่มงอกเป็นต้นกล้า ลักษณะใบ ดอก ผล

4.2 จำแนกกลุ่มของแมลงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)

4.3 จัดเตรียมตัวอย่างแมลงและไร โดย

4.3.1 นำตัวอย่างแมลงที่เก็บรวบรวมได้มาจัดรูปร่าง (set) บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) ตัวอย่างแมลง โดยใช้เข็มไร้สนิมปักบริเวณด้านหน้าตรงมุมของปีกขวา (บริเวณมุมที่ปีกจรดกัน) ใช้ปากคีบจัดขาทั้งสามคู่ให้อยู่ในลักษณะเกาะหรือเดินโดยใช้เข็มหมุดขนาดกลางเป็นตัวยึด ตัวเต็มวัยขนาด เช่น เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด และด้วงที่มีขนาดเล็กให้ติดลงบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 – 60 วัน ขึ้นกับขนาดของแมลง

4.3.2 ทำสไลด์ถาวร แมลงจำพวกปากดูดที่มีขนาดเล็กเช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้ง และเพลี้ยหอย ต้องนำมาทำสไลด์ถาวร และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เพื่อจำแนกชนิด

4.3.3 ไร ทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน โดยจัดท่าทางของไรให้อยู่ในท่าคว่ำและท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่างๆที่ใช้ในการจำแนก จากนั้น แล้วปิดสไลด์ด้วย cover glass ใช้ปากกาเขียนแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ cover glass ด้วยน้ำยาทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บและพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

4.4 ตรวจเชื้อรา เช่น *Chalara elegans, Verticillium dahliae* ด้วยวิธี Blotter method (Mathur and Kongdal, 2003) โดยการนำเมล็ดที่วางไว้ในภาชนะให้ความชื้นไปวางใต้แสง near ultra violet (NUV) โดยให้

กรมวิชาการเกษตร

แสงสลับกับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน และตรวจจำแนกชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) และกำลังขยายสูงต่อไป

4.5 ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ เชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli, Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas viridiflava, Xanthomonas cucurbitae* ที่ติดมากับ เมล็ดพันธุ์โดยวิธี Dilution plate method ตรวจสอบและจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา เช่น Enzyme – linked Immunosorbent Assay (ELISA)

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค ELISA (ชุดตรวจสอบของบริษัท Agdia) โดยมีขั้นตอน ดังนี้

1. ทำการเตรียม capture antibody เจือจางด้วย carbonate coating อัตรา 1:200 โดยหยอด capture antibody ในหลุม ELISA ปริมาตร 100 µl ต่อหลุม

2. บ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง หรือ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

3. ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST 2 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

4. ทำการหยอดเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ รวมถึง negative control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5. ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST มากกว่า 2 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

6. ทำการเตรียมสาร alkaline phosphatase enzyme conjugate เจือจางด้วย RUB3 buffer อัตรา 1:200 โดยหยอดหลุมละ 100 µl (ควรเตรียม 10 นาที ก่อนใช้งาน) แล้วบ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

7. ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST 7 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

8. ทำการเตรียมสาร PNP tablet จำนวน 1 เม็ด เจือจางด้วย PNP buffer ปริมาตร 5 ml. โดยเก็บสารละลายไว้ในที่มืด แล้วจึงหยอดสาร PNP solution หลุมละ 100 µl แล้วบ่มจานหลุมในอุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวัดเครื่องอ่านอีไลซ่า ที่ความยาวคลื่น 405 (OD405) และทำการ

4.6 ตรวจและจำแนกชนิดไวรัส ได้แก่ เชื้อไวรัส Squash mosaic virus, Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV, Kyuri green mottle mosaic virus (KGMMV) ที่ติดมากับเมล็ดด้วยวิธี ELISA โดยตรวจจากเมล็ดโดยตรง หรือตรวจจากต้นกล้าตามวิธีการที่เหมาะสมกับไวรัสแต่ละชนิด

5. เพาะเมล็ดพันธุ์ 25-50 เมล็ดต่อถุง และเก็บถุงเพาะที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เมื่อต้นกล้าเริ่มออกใบจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนพืช โดยสังเกตดูลักษณะอาการบริเวณโคนต้น ลำต้น ใบเลี้ยง และใบของต้นพืช บันทึกผล กรณีถ้าพบอาการผิดปกติให้นำส่วนของพืชไปทำการแยกเชื้อและจำแนกชนิด

6. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงผลิตหรือในโรงเรือนเพาะเมล็ดของบริษัทที่นำเข้า

7. จัดทำรายชื่อศัตรูที่ตรวจพบและสรุปผล

การบันทึกข้อมูล

1. ชนิดและลักษณะของศัตรูพืชที่ตรวจพบ

กรมวิชาการเกษตร

2. ภาพของศัตรูพืช และลักษณะอาการพืชที่ถูกทำลาย และเก็บตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

ระยะเวลาดำเนินการ

เริ่มงานวิจัย ตุลาคม 2558 ถึง กันยายน 2564

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. ด่านตรวจพืช เช่น ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ด่านตรวจพืชไปรษณีย์ ด่านตรวจพืชหนองคาย สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

3. แปลงปลูกของบริษัทและโรงเรือนเพาะเมล็ดของบริษัทที่นำเข้า ในจังหวัด เช่น จังหวัดขอนแก่น จังหวัดอุดรธานี จังหวัดหนองบัวลำภู

การทดลองที่ 1.3 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์เมลอนนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา อินเดีย ญี่ปุ่น อิสราเอล ชิลี และเนเธอร์แลนด์ (2559-2564)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ และวารสาร
2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติค มาร์กเกอร์ คัตเตอร์ หลาว
3. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ชุดตรวจสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ และตู้บ่มเชื้อ
4. โรงเรือนปลูกพืชทดสอบ
5. พืชทดสอบ เช่น ต้นยาสูบ ต้นมะเขือเทศ
6. เมล็ดพันธุ์เมลอน

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

แบ่งการดำเนินงานเป็น 3 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์เมลอนนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา และอินเดีย (2559-2560 รวม 2 ปี)

ระยะที่ 2 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์เมลอนนำเข้าจากญี่ปุ่น และอิสราเอล (2561-2562 รวม 2 ปี)

ระยะที่ 3 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์เมลอนนำเข้าจากชิลี และเนเธอร์แลนด์ (2563-2564 รวม 2 ปี)

ขั้นตอนและวิธีในการวิจัย ดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. การสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชเป้าหมาย เช่น ชีววิทยา วิธีการตรวจศัตรูพืชในเมล็ดพันธุ์ และวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

กรมวิชาการเกษตร

2. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากด่านตรวจพืช ตามมาตรฐาน International Seed Testing Association (ISTA, 2018) ปริมาณเมล็ดพันธุ์เมลอนที่ใช้สำหรับตรวจสอบศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ น้ำหนัก 150 กรัม โดยสุ่มตามวิธีการดังนี้

2.1 การสุ่มตัวอย่างที่บรรจุอยู่ในกระสอบ หรือภาชนะอื่นๆ ที่มีขนาดบรรจุของภาชนะแต่ละใบเท่าๆกัน โดยมีน้ำหนักของเมล็ดพันธุ์จำนวน 15 กิโลกรัม ถึง 100 กิโลกรัม

2.1.1 เมล็ดพันธุ์จำนวน 1 – 4 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 3 ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.2 เมล็ดพันธุ์จำนวน 5 – 8 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 2 ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.3 เมล็ดพันธุ์จำนวน 9 – 15 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 1 ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.4 เมล็ดพันธุ์จำนวน 16 – 30 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 15 ตัวอย่างจากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.5 เมล็ดพันธุ์จำนวน 31 – 59 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 20 ตัวอย่างจากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.6 เมล็ดพันธุ์จำนวนมากกว่าหรือเท่ากับ 60 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 30 ตัวอย่างจากภาชนะบรรจุทั้งหมด

3. การตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ ด้วยตาเปล่า สังเกตลักษณะสี ผิว และรูปร่างว่ามีอะไรผิดปกติหรือไม่ มีรอยเจาะ หรือแตกกระเทาะของเมล็ดพันธุ์หรือไม่ และจึงนำเมล็ดพันธุ์ที่สุ่มได้นำไปตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

4. การตรวจศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

4.1 ตรวจสอบและจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชโดยทำการคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพได้แก่ เมล็ดพืชบริสุทธิ์ เมล็ดพืชอื่น และสิ่งเจือปน นำแต่ละส่วนมาชั่งหาน้ำหนัก แล้วนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชที่ตรวจพบโดย

4.1.1 ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) เพื่อศึกษาและบันทึกลักษณะภายนอกของเมล็ด เช่น สี ผิว รูปร่างและลายบนผิวของเมล็ด วัดขนาดความกว้าง ยาวของเมล็ด

4.1.2 เปรียบเทียบกับตัวอย่างเมล็ดวัชพืชในพิพิธภัณฑ์และใช้คู่มือจำแนกเมล็ดพืช

4.1.3 จำแนกโดยปลูกดูลักษณะต่างๆตั้งแต่เริ่มงอกเป็นต้นกล้า ลักษณะใบ ดอก ผล

4.2 จำแนกกลุ่มของแมลงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)

4.3 จัดเตรียมตัวอย่างแมลงและไรโดย

4.3.1 นำตัวอย่างแมลงที่เก็บรวบรวมได้มาจัดรูปร่าง (set) บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) ตัวอย่างแมลง โดยใช้เข็มไร้สนิมปักบริเวณด้านหน้าตรงมุมของปีกขวา (บริเวณมุมที่ปีกจรดกัน) ใช้ปากคีบจัดขาทั้งสามคู่ให้อยู่ในลักษณะเกาะหรือเดินโดยใช้เข็มหมุดขนาดกลางเป็นตัวยึด ตัวเต็มวัยขนาด เช่น เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด และด้วงที่มีขนาดเล็กให้ติดลงบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง อุณหภูมิ 50 - 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 - 60 วัน ขึ้นกับขนาดของแมลง

กรมวิชาการเกษตร

4.3.2 ทำสไลด์ถาวร แมลงจำพวกปากดูดที่มีขนาดเล็กเช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้งและเพลี้ยหอย ต้องนำมาทำสไลด์ถาวร และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เพื่อจำแนกชนิด

4.3.3 ไร ทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาและจัดตัวอย่างของไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน โดยจัดท่าทางของไรให้อยู่ในท่าคว่ำและท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่างๆที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย cover glass ใช้ปากกาเขียนแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ cover glass ด้วยน้ำยาทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บและพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

4.4 ตรวจเชื้อรา verticillium dahlia ด้วยวิธี Blotter method (Mathur and Kongdal, 2003) โดยการนำเมล็ดที่วางไว้ในภาชนะให้ความชื้นไปวางใต้แสง near ultra violet (NUV) โดยให้แสงสลับกับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน และตรวจจำแนกชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) และกำลังขยายสูงต่อไป

4.5 ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ เชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli, Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas viridiflava* และ *Xanthomonas cucurbitae* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยวิธี Dilution plate method ตรวจสอบและจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค ELISA (ชุดตรวจสอบของบริษัท Agdia) โดยมีขั้นตอน ดังนี้

1. ทำการเตรียม capture antibody เจือจางด้วย carbonate coating อัตรา 1:200 โดยหยอด capture antibody ในหลุม ELISA ปริมาตร 100 µl ต่อหลุม

2. บ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง หรือ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

3. ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST 2 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

4. ทำการหยอดเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ รวมถึง negative control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5. ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST มากกว่า 2 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

6. ทำการเตรียมสาร alkaline phosphatase enzyme conjugate เจือจางด้วย RUB3 buffer อัตรา 1:200 โดยหยอดหลุมละ 100 µl (ควรเตรียม 10 นาที ก่อนใช้งาน) แล้วบ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

7. ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST 7 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

8. ทำการเตรียมสาร PNP tablet จำนวน 1 เม็ด เจือจางด้วย PNP buffer ปริมาตร 5 ml. โดยเก็บสารละลายไว้ในที่มืด แล้วจึงหยอดสาร PNP solution หลุมละ 100 µl แล้วบ่มจานหลุมในอุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวัดเครื่องอ่านอิไลซ่า ที่ความยาวคลื่น 405 (OD405) และทำการบันทึกผล

กรมวิชาการเกษตร

4.6 ตรวจและจำแนกชนิดไวรัส ได้แก่ เชื้อไวรัส Squash mosaic virus (SqMV), Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), Kyuri green mottle mosaic virus (KGMMV) ที่ติดมากับเมล็ดด้วยวิธี ELISA โดยตรวจจากเมล็ดโดยตรงหรือตรวจจากต้นกล้าตามวิธีการที่เหมาะสมกับไวรัสแต่ละชนิด

5. เพาะเมล็ดพันธุ์ 25-50 เมล็ดต่อถุง และเก็บถุงเพาะที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เมื่อต้นกล้าเริ่มออกใบจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนพืช โดยสังเกตดูลักษณะอาการบริเวณโคนต้น ลำต้น ใบเลี้ยง และใบของต้นพืช บันทึกผล กรณีถ้าพบอาการผิดปกติให้นำส่วนของพืชไปทำการแยกเชื้อและจำแนกชนิด

6. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงผลิตหรือในโรงเรือนเพาะเมล็ดของบริษัทที่นำเข้า ที่ช่วงอายุ 25-30 วัน

7. จัดทำรายชื่อศัตรูที่ตรวจพบและสรุปผล

การบันทึกข้อมูล

1. ชนิดและลักษณะของศัตรูพืชที่ตรวจพบ

2. ภาพของศัตรูพืช และลักษณะอาการพืชที่ถูกทำลาย และเก็บตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

ระยะเวลาดำเนินการ

เริ่มงานวิจัย ตุลาคม 2562 ถึง กันยายน 2564

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. ด่านตรวจพืช เช่น ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ด่านตรวจพืชไปรษณีย์ ด่านตรวจพืชเชียงใหม่ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

3. แปลงปลูกของบริษัทและโรงเรือนเพาะเมล็ดของบริษัทที่นำเข้าในจังหวัด เช่น จังหวัดขอนแก่น จังหวัดอุดรธานี จังหวัดหนองบัวลำภู

การทดลองที่ 1.4 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา (2559-2562)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ วารสาร และ ซีดีรอม CABI
2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติค มาร์กเกอร์ คัตเตอร์ หลาว
3. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ชุดตรวจสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ ตู้บ่มเชื้อ
4. โรงเรือนปลูกพืชทดสอบ
5. พืชทดสอบ เช่น ต้นยาสูบ ต้นมะเขือเทศ
6. คู่มือการจำแนกศัตรูพืช

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

แบ่งการดำเนินงานเป็น 2 ระยะ ดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

ระยะที่ 1 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดีย และจีน (2559-2560 รวม 2 ปี)

ระยะที่ 2 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากเนเธอร์แลนด์และสหรัฐอเมริกา (2561-2562)

ขั้นตอนและวิธีในการวิจัย ดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. การสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชเป้าหมาย เช่น ชีววิทยา วิธีการตรวจศัตรูพืชในเมล็ดพันธุ์ และวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์(2559)

2. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากด่านตรวจพืช ตามมาตรฐาน International Seed Testing Association (ISTA, 2016a) (2559-2560)

2.1 การสุ่มตัวอย่างที่บรรจุอยู่ในกระสอบ หรือภาชนะอื่นๆ ที่มีขนาดบรรจุของภาชนะแต่ละใบเท่าๆกัน โดยมีน้ำหนักของเมล็ดพันธุ์จำนวน 15 กิโลกรัม ถึง 100 กิโลกรัม

2.1.1 เมล็ดพันธุ์จำนวน 1 – 4 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 3 ตัวอย่างขั้นต้น จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.2 เมล็ดพันธุ์จำนวน 5 – 8 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 2 ตัวอย่างขั้นต้น จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.3 เมล็ดพันธุ์จำนวน 9 – 15 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 1 ตัวอย่างขั้นต้น จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.4 เมล็ดพันธุ์จำนวน 16 – 30 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 15 ตัวอย่างขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.5 เมล็ดพันธุ์จำนวน 31 – 59 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 20 ตัวอย่าง ขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.6 เมล็ดพันธุ์จำนวนมากกว่า 60 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 30 ตัวอย่างขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.2 การสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากกองใหญ่ที่ไม่อยู่ในภาชนะบรรจุ หรือระหว่างกระบวนการไหลของเมล็ดพันธุ์ โดยมีน้ำหนักของเมล็ดพันธุ์จำนวนมากกว่า 100 กิโลกรัม

2.2.1 เมล็ดพันธุ์น้ำหนักไม่เกิน 500 กิโลกรัม สุ่มอย่างน้อย 5 ตัวอย่างขั้นต้น

2.2.2 เมล็ดพันธุ์น้ำหนัก 501 – 3,000 กิโลกรัม สุ่ม 1 ตัวอย่างขั้นต้น จากเมล็ดพันธุ์ทุก 300 กิโลกรัม แต่ต้องไม่น้อยกว่า 5 ตัวอย่างขั้นต้น

2.2.3 เมล็ดพันธุ์น้ำหนัก 3,001 – 20,000 กิโลกรัม สุ่ม 1 ตัวอย่างขั้นต้น จากเมล็ดพันธุ์ทุก 500 กิโลกรัม แต่ต้องไม่น้อยกว่า 10 ตัวอย่างขั้นต้น

2.2.4 เมล็ดพันธุ์น้ำหนักมากกว่า 20,001 กิโลกรัม สุ่ม 1 ตัวอย่างขั้นต้น จากเมล็ดพันธุ์ทุก 700 กิโลกรัม แต่ต้องไม่น้อยกว่า 40 ตัวอย่างขั้นต้น

3. การตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ ด้วยตาเปล่า สังเกตลักษณะสี ผิว และรูปร่างว่ามีอะไรผิดปกติหรือไม่ มีรอยเจาะ หรือแตกกระเทาะของเมล็ดพันธุ์หรือไม่ และจึงนำเมล็ดพันธุ์ที่สุ่มได้นำไปตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ (2559-2560)

4. การตรวจศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ (2559-2560)

กรมวิชาการเกษตร

4.1 ตรวจสอบและจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชเช่น วัชพืช *Circium arvense*, *Orobanche cernua*, *Orobanche aegyptiaca*, *Orobanche romosa* ขั้นละเอียดโดยทำการคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพ ได้แก่ เมล็ดพืชบริสุทธิ์ เมล็ดพืชอื่น และสิ่งเจือปน นำแต่ละส่วนมาชั่งหาน้ำหนัก แล้วนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชที่ตรวจพบโดย

4.1.1 ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) เพื่อศึกษาและบันทึกลักษณะภายนอกของเมล็ด เช่น สี ผิว รูปร่างและลายบนผิวของเมล็ด วัดขนาดความกว้าง ยาวของเมล็ด

4.1.2 เปรียบเทียบกับตัวอย่างเมล็ดวัชพืชในพิพิธภัณฑ์และใช้คู่มือจำแนกเมล็ดพืช

4.1.3 จำแนกโดยปลูกดูลักษณะต่างๆตั้งแต่เริ่มงอกเป็นต้นกล้า ลักษณะใบ ดอก ผล

4.2 จำแนกกลุ่มของแมลงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

4.3 จัดเตรียมตัวอย่างแมลงและไร เช่น ด้วงอิฐ *Trogoderma granarium* โดย

4.3.1 นำตัวอย่างแมลงที่เก็บรวบรวมได้มาจัดรูปร่าง (set) บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) ตัวอย่างแมลง โดยใช้เข็มไร้สนิมปักบริเวณด้านหน้าตรงมุมของปีกขวา (บริเวณมุมที่ปีกจรดกัน) ใช้ปากคีบจัดขาทั้งสามคู่ให้อยู่ในลักษณะเกาะหรือเดินโดยใช้เข็มหมุดขนาดกลางเป็นตัวยึด ตัวเต็มวัยขนาด เช่น เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด และด้วงที่มีขนาดเล็กให้ติดลงบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 – 60 วัน ขึ้นกับขนาดของแมลง

4.3.2 ทำสไลด์ถาวร แมลงจำพวกปากดูดที่มีขนาดเล็กเช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้งและเพลี้ยหอย ต้องนำมาทำสไลด์ถาวร และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เพื่อจำแนกชนิด

4.3.3 ไร ทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน โดยจัดท่าทางของไรให้อยู่ในท่าคว่ำและท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่างๆที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย coverglass ใช้ปากกาเขียนแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ covergrass ด้วยน้ำยา ทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บและพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

4.4 ตรวจเชื้อรา เช่น *Colletotrichum dematium*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* ด้วยวิธี Blotter method (Mathur and Kongdal, 2003) โดยการนำเมล็ดที่วางไว้ในภาชนะให้ความชื้นไปวางใต้แสง near ultra violet (NUV) โดยให้แสงสลับกับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน และตรวจจำแนกชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) และกำลังขยายสูงต่อไป

4.5 ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยวิธี Dilution plate method และ เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar plate method) ตรวจสอบและจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา เช่น Enzyme – linked Immunosorbent Assay (ELISA)

กรมวิชาการเกษตร

4.6 ตรวจและจำแนกชนิดไวรัส เช่น *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), *Tobacco streak virus* (TSV) ที่ติดมากับเมล็ดด้วยวิธี ELISA โดยตรวจจากเมล็ดโดยตรงหรือตรวจจากต้นกล้าตามวิธีการที่เหมาะสมกับไวรัสแต่ละชนิด

4.7 ตรวจและจำแนกชนิดไวรอยด์ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) ที่ติดมากับเมล็ดด้วยวิธี RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) โดยสกัดอาร์เอ็นเอจากเมล็ดโดยใช้ชุดสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับไวรอยด์แต่ละกลุ่ม ตรวจสอบและยืนยันผลในตัวอย่างที่ให้ผลบวก (positive) ด้วยวิธีการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบผลของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลของ GenBank ต่อไป

5. เพาะเมล็ดพันธุ์ เพื่อสังเกตลักษณะอาการผิดปกติของต้นพืชในโรงเรือนของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช โดยสังเกตดูลักษณะอาการบริเวณโคนต้น ลำต้น ใบเลี้ยง และใบ ของต้นพืช บันทึกผล กรณีถ้าพบอาการผิดปกติให้นำส่วนของพืชไปทำการแยกเชื้อและจำแนกชนิด (2559-2560)

6. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงผลิตหรือในโรงเรือนปลูกพืชของบริษัทนำเข้าเมล็ดพันธุ์ (2559-2560)

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกชนิดและลักษณะของศัตรูพืชที่ตรวจพบ
2. บันทึกภาพของศัตรูพืช และลักษณะอาการพืชที่ถูกทำลาย และเก็บตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
2. ด่านตรวจพืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร
3. แปลงเกษตรกร

การทดลองที่ 1.5 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้าจากจีน และสหรัฐอเมริกา (2559-2560)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ วารสาร และ ซีดีรอม CABI
2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติค มาร์กเกอร์ คัตเตอร์ หลาว
3. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ชุดตรวจสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ ตู้บ่มเชื้อ
4. โรงเรือนปลูกพืชทดสอบ
5. พืชทดสอบ เช่น ต้นยาสูบ ต้นมะเขือเทศ
6. คู่มือการจำแนกศัตรูพืช

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

ขั้นตอนและวิธีในการวิจัย ดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

กรมวิชาการเกษตร

1. การสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชเป้าหมาย เช่น ชีววิทยา วิธีการตรวจศัตรูพืชในเมล็ดพันธุ์ และวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์(2559)

2. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากด่านตรวจพืช ตามมาตรฐาน International Seed Testing Association (ISTA, 2016a) (2559-2560)

2.1 การสุ่มตัวอย่างที่บรรจุอยู่ในกระสอบ หรือภาชนะอื่นๆ ที่มีขนาดบรรจุของภาชนะแต่ละใบเท่าๆกัน โดยมีน้ำหนักของเมล็ดพันธุ์จำนวน 15 กิโลกรัม ถึง 100 กิโลกรัม

2.1.1 เมล็ดพันธุ์จำนวน 1 – 4 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 3 ตัวอย่างขั้นต้น จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.2 เมล็ดพันธุ์จำนวน 5 – 8 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 2 ตัวอย่างขั้นต้น จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.3 เมล็ดพันธุ์จำนวน 9 – 15 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 1 ตัวอย่างขั้นต้น จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.4 เมล็ดพันธุ์จำนวน 16 – 30 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 15 ตัวอย่างขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.5 เมล็ดพันธุ์จำนวน 31 – 59 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 20 ตัวอย่าง ขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.6 เมล็ดพันธุ์จำนวนมากกว่า 60 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 30 ตัวอย่างขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.2 การสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากกองใหญ่ที่ไม่อยู่ในภาชนะบรรจุ หรือระหว่างกระบวนการไหลของเมล็ดพันธุ์ โดยมีน้ำหนักของเมล็ดพันธุ์จำนวนมากกว่า 100 กิโลกรัม

2.2.1 เมล็ดพันธุ์น้ำหนักไม่เกิน 500 กิโลกรัม สุ่มอย่างน้อย 5 ตัวอย่างขั้นต้น

2.2.2 เมล็ดพันธุ์น้ำหนัก 501 – 3,000 กิโลกรัม สุ่ม 1 ตัวอย่างขั้นต้น จากเมล็ดพันธุ์ทุก 300 กิโลกรัม แต่ต้องไม่น้อยกว่า 5 ตัวอย่างขั้นต้น

2.2.3 เมล็ดพันธุ์น้ำหนัก 3,001 – 20,000 กิโลกรัม สุ่ม 1 ตัวอย่างขั้นต้น จากเมล็ดพันธุ์ทุก 500 กิโลกรัม แต่ต้องไม่น้อยกว่า 10 ตัวอย่างขั้นต้น

2.2.4 เมล็ดพันธุ์น้ำหนักมากกว่า 20,001 กิโลกรัม สุ่ม 1 ตัวอย่างขั้นต้น จากเมล็ดพันธุ์ทุก 700 กิโลกรัม แต่ต้องไม่น้อยกว่า 40 ตัวอย่างขั้นต้น

3. การตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ ด้วยตาเปล่า สังเกตลักษณะสี ผิว และรูปร่างว่ามีอะไรผิดปกติหรือไม่ มีรอยเจาะ หรือแตกกระเทาะของเมล็ดพันธุ์หรือไม่ และจึงนำเมล็ดพันธุ์ที่สุ่มได้นำไปตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ(2559-2560)

4. การตรวจศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ (2559-2560)

4.1 ตรวจสอบและจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชขั้นละเอียดโดยทำการคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพ ได้แก่ เมล็ดพืชบริสุทธิ์ เมล็ดพืชอื่น และสิ่งเจือปน นำแต่ละส่วนมาชั่งหาน้ำหนัก แล้วนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชที่ตรวจพบโดย

4.1.1 ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) เพื่อศึกษาและบันทึกลักษณะภายนอกของเมล็ด เช่น สี ผิว รูปร่างและลายบนผิวของเมล็ด วัดขนาดความกว้าง ยาวของเมล็ด

กรมวิชาการเกษตร

4.1.2 เปรียบเทียบกับตัวอย่างเมล็ดวัชพืชในพิพิธภัณฑ์และใช้คู่มือจำแนกเมล็ดพืช

4.1.3 จำแนกโดยปลูกดูลักษณะต่างๆตั้งแต่เริ่มงอกเป็นต้นกล้า ลักษณะใบ ดอก ผล

4.2 จำแนกกลุ่มของแมลงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

4.3 จัดเตรียมตัวอย่างแมลงและไรโดย

4.3.1 นำตัวอย่างแมลงที่เก็บรวบรวมได้มาจัดรูปร่าง (set) บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) ตัวอย่างแมลง โดยใช้เข็มไร้สนิมปักบริเวณด้านหน้าตรงมุมของปีกขวา (บริเวณมุมที่ปีกจรดกัน) ใช้ปากคีบจัดขาทั้งสามคู่ให้อยู่ในลักษณะเกาะหรือเดินโดยใช้เข็มหมุดขนาดกลางเป็นตัวยึด ตัวเต็มวัยขนาด เช่น เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด และด้วงที่มีขนาดเล็กให้ติดลงบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 – 60 วัน ขึ้นกับขนาดของแมลง

4.3.2 ทำสไลด์ถาวร แมลงจำพวกปากดูดที่มีขนาดเล็กเช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้งและเพลี้ยหอย ต้องนำมาทำสไลด์ถาวร และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เพื่อจำแนกชนิด

4.3.3 ไร ทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน โดยจัดท่าทางของไรให้อยู่ในท่าคว่ำและท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่างๆที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย coverglass ใช้ปากกาเขียนแก้วงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ covergrass ด้วยน้ำยา ทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บและพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

4.4 ตรวจเชื้อรา เช่น เชื้อรา *Alternaria cichorii, Botryotinia fukeliana, Cercosspora beticola, Septoria lactucae* ด้วยวิธี Blotter method (Mathur and Kongdal, 2003) โดยการนำเมล็ดที่วางไว้ในภาชนะให้ความชื้นไปวางใต้แสง near ultra violet (NUV) โดยให้แสงสลับกับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน และตรวจจำแนกชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) และกำลังขยายสูงต่อไป

4.5 ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas cichorii, Xanthomonas campestris* pv. *vitians* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยวิธี Dilution plate method และ เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar plate method) ตรวจสอบและจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา เช่น Enzyme – linked Immunosorbent Assay (ELISA)

4.6 ตรวจและจำแนกชนิดไวรัส เช่น *Alfalfa mosaic virus*, *Broad bean wilt viru, Lettuce mosaic virus*, *Tomato black ring virus, Tobacco ringspot virus*, *Tobacco streak virus*, *Tomato spotted wilt virus* ที่ติดมากับเมล็ดด้วยวิธี ELISA โดยตรวจจากเมล็ดโดยตรงหรือตรวจจากต้นกล้าตามวิธีการที่เหมาะสมกับไวรัสแต่ละชนิด

กรมวิชาการเกษตร

5. เพาะเมล็ดพันธุ์ เพื่อสังเกตลักษณะอาการผิดปกติของต้นพืชในโรงเรือนของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช โดยสังเกตดูลักษณะอาการบริเวณโคนต้น ลำต้น ใบเลี้ยง และใบ ของต้นพืช บันทึกผล กรณีถ้าพบอาการผิดปกติให้นำส่วนของพืชไปทำการแยกเชื้อและจำแนกชนิด (2559-2560)

6. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงผลิตหรือในโรงเรือนปลูกพืชของบริษัทนำเข้าเมล็ดพันธุ์ (2559-2560)

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกชนิดและลักษณะของศัตรูพืชที่ตรวจพบ

2. บันทึกภาพของศัตรูพืช และลักษณะอาการพืชที่ถูกทำลาย และเก็บตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
2. ด่านตรวจพืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร
3. แปลงเกษตรกร

การทดลองที่ 1.6 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งจากสกอตแลนด์ ออสเตรเลีย เนเธอร์แลนด์ และแคนาดา (2559-2562)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ วารสาร และ ซีดีรอม CABI
2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติค มาร์กเกอร์ คัตเตอร์ หลาว
3. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ชุดตรวจสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ ตู้บ่มเชื้อ
4. โรงเรือนปลูกพืชทดสอบ
5. พืชทดสอบ เช่น ต้นยาสูบ ต้นมะเขือเทศ
6. คู่มือการจำแนกศัตรูพืช

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

แบ่งการดำเนินงานเป็น 2 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งจากสกอตแลนด์ และออสเตรเลีย (2559-2560 รวม 2 ปี)

ระยะที่ 2 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งจาก เนเธอร์แลนด์ และแคนาดา (2561-2562 รวม 2 ปี)

ขั้นตอนและวิธีในการวิจัย ดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. การสืบค้นข้อมูล และตรวจเอกสาร โดยทำการสืบค้นข้อมูลพืช ปริมาณการนำเข้า รายชื่อศัตรูพืชกักกันที่สำคัญของประเทศไทย และวิธีการตรวจศัตรูพืชเป้าหมาย

กรมวิชาการเกษตร

2. สุ่มตัวอย่างหัวมันฝรั่งที่นำเข้าตามมาตรฐาน ทำการสุ่มตัวอย่าง ณ จุดนำเข้า ด่านตรวจพืชท่าเรือแหลมฉบัง ท่าเรือกรุงเทพ และด่านตรวจพืชลาดกระบัง โดยทำการสุ่มตัวอย่าง 10 กระสอบ (กระสอบละ 25 กิโลกรัม) ต่อทะเบียนแปลงปลูก และทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยตรวจสอบหัวพันธุ์มันฝรั่งด้วยตาเปล่า สังเกตลักษณะสี ผิว และรูปร่างว่ามีอะไรผิดปกติหรือไม่ มีรอยเจาะ หรือแตกของหัวมันฝรั่งหรือไม่ และจึงนำหัวพันธุ์มันฝรั่งที่สุ่มได้นำไปตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

3. การตรวจสอบและจำแนกชนิดศัตรูพืช เช่น เชื้อรา, เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ ทำการแยกเชื้อหรือตรวจจำแนกชนิดศัตรูพืชที่พบด้วยวิธีการมาตรฐานในการ และจำแนกชนิดเชื้อรา โดย การตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและสูง การแยกเชื้อบริสุทธิ์ จำแนกเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การจำแนกเชื้อราโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม สำหรับการจำแนกแบคทีเรีย หรือ ไวรัส และไวรอยด์ด้วยเทคนิค Enzyme – linked Immunosorbent Assay (ELISA), rPAGE , Indirect immunofluorescent staining (IF), Polymerase Chain Reaction (PCR), Fluorescence in situ hybridization (FISH) , bioassay ตามความเหมาะสมแต่ละชนิดของเชื้อ

3.1 การตรวจตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา

3.1.1 ตรวจดูลักษณะอาการของโรค

เมื่อเชื้อราเข้าทำลายพืช ก็จะมีการสร้างส่วนเจริญ และส่วนขยายพันธุ์บนพืช ซึ่งสามารถตรวจดูได้ด้วยตาเปล่า หรือใช้แว่นขยาย และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope)

3.1.2 การตรวจหาสาเหตุของโรค

ใช้เข็มเขี่ยส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อ ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้เลย หรือตัดชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคให้บาง ๆ (section) และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope)

3.1.3 การบ่มส่วนที่เป็นโรค (incubation)

นำส่วนชิ้นหัวพันธุ์มันฝรั่งที่เป็นโรควางบนกระดาษกรองและเติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ลงบนกระดาษ เพื่อให้ความชื้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28+2 องศาเซลเซียส นาน 1-3 วัน และตรวจดูลักษณะของเชื้อราที่เจริญบนแผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) และนำไปเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงต่อไป

3.1.4 การเตรียมสไลด์ เพื่อตรวจดูเชื้อรา

- การเตรียมสไลด์ชั่วคราว เตรียมโดย วางชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคจากการ section หรือส่วนของเชื้อราที่เขี่ยออกมา ลงบน mounting medium หรือหยดน้ำบนสไลด์ แล้วปิดทับด้วย cover slips นำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์

- การเตรียมสไลด์ถาวร ปฏิบัติเช่นเดียวกันแต่ใช้ lactophenol หรือ Shear’s solution หรือย้อมสีด้วย cotton blue, acid fushcin และ seal cover slip ด้วยยาทาเล็บ จะสามารถเก็บไว้ศึกษาได้นานหลายเดือน

3.1.5 การแยกเชื้อราจากชิ้น หัวพันธุ์มันฝรั่ง (Tissue transplanting)

กรมวิชาการเกษตร

ตัดชิ้นส่วนหัวพันธุ์มันฝรั่งที่คาบเกี่ยวกันระหว่างส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติขนาด 3x3 มิลลิเมตร แช่ลงใน clorox 10% นาน 3-5 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวรอบนอก และนำมาซับด้วยกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้แห้งสนิท และวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ และจะต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ด้วยอุณหภูมิและความดันไอน้ำที่แน่นอน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ Potato dextrose agar (PDA), ½ Potato dextrose agar, Corn meal agar (CMA), Malt extract agar (MEA), Carrot agar (CA), V-8 juice agar (V-8), Water agar (WA) และ Selective media ได้แก่ RNV, BNPRV และบางชนิดอาจจะเติมสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย หลังจากวางชิ้นส่วนหัวพันธุ์มันฝรั่งลงบนอาหารแล้ว บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28+2 องศาเซลเซียส นาน 1-5 วัน แล้วแต่ชนิดของเชื้อ เมื่อเส้นใยเจริญออกมา ให้ตัดปลายเส้นใยของเชื้อราเจริญออกมาจากชิ้นส่วนหัวพันธุ์มันฝรั่งและเลี้ยงบนอาหาร แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และนำไปจำแนกชนิดของเชื้อราต่อไป โดยเขี่ยเส้นใยลงบน mounting medium หรือหยดน้ำบนสไลด์ แล้วปิดทับด้วย cover slips นำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์

3.1.6 การชักนำให้เชื้อราสร้างสปอร์

เชื้อราบางชนิดสร้างแต่เส้นใย ทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ ดังนั้นจะต้องชักนำให้เชื้อราสร้างสปอร์ โดยวางไว้ภายใต้แสง ultraviolet หรือเลี้ยงบนอาหาร CMA หรือ WA เป็นต้น

3.1.7 การจำแนกชนิดของเชื้อรา

โดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ได้แก่ ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ลักษณะเส้นใยไม่มีผนังกั้น (non septate) หรือมีผนังกั้น (septate) ลักษณะของส่วนขยายพันธุ์ สีเส้นใย สีสปอร์ และจำแนกชนิดโดยใช้คู่มือ (Barnett and Hunter, 1998; Ellis, 1971;1993 ; Hanlin, 1990; 1998)

3.2 การตรวจตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

แยกจากส่วนของที่มีอาการของโรคหัวพันธุ์มันฝรั่ง ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 4 ตารางมิลลิเมตร ระหว่างรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งแล้ว 3 ครั้ง หลังจากฆ่าเชื้อที่ผิวเนื้อเยื่อพืช (surface sterilize) แล้วนำมาบดในน้ำกลั่น ใช้ loop จุ่มในพืชที่บด นำมา streak บนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร Potato semi-synthetic agar (PSA) หลังจากนั้นเก็บจานเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง แล้วเก็บโคโลนี ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี streak plate หลาย ๆ ครั้ง เก็บ single colony เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และจำแนกลักษณะสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชตามคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์โดยจำแนกลักษณะสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชตามคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์โดย

1. ศึกษาข้อมูลพื้นฐานของเชื้อ ศึกษาคุณสมบัติต่างๆทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อแบคทีเรีย (Schaad et al., 2001)

2. ทำการวิเคราะห์ด้วยระบบ Biolog system (Biolog, Itayward, Calif.) เพื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้คุณสมบัติการใช้ organic test substrates 95 ชนิด ของแต่ละชนิดเชื้อ เทียบกับฐานข้อมูลที่ได้มีการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียไว้เรียบร้อยแล้ว

3.3 การตรวจตัวอย่างโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส

กรมวิชาการเกษตร

3.3.1 ตรวจดูลักษณะรูปร่างของเชื้อไวรัสสาเหตุด้วยกล้องจุลทัศน์อิเล็กตรอน

3.3.2 ดูลักษณะอาการและทดลองการถ่ายทอดด้วยวิธีการปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ

3.3.3 จำแนกชนิดไวรัสด้วยวิธี Enzyme – linked Immunosorbent Assay (ELISA) ตามขั้นตอนดังนี้

1) แบ่งตัวอย่างใบพืชที่ต้องการตรวจสอบบดละเอียดในถุงพลาสติกด้วย Extraction buffer หรือสารละลาย packet 2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ถ้าตัวอย่างเข้มข้นและเหนียวควรเพิ่ม buffer เป็น 1 มิลลิลิตร)

2) วางรูปแบบของแผ่น NCM ด้วยการทำเครื่องหมายที่ตัวแผ่น NCM หัวท้ายเพื่อเรียงตัวอย่างจาก 1 ถึงตัวอย่างสุดท้ายได้ชัดเจนตรงตารางที่เขียนขึ้น

3). แช่แผ่น NCM พร้อมกับวางกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่ตัดให้มีขนาดพอดีกับแผ่น NCM ใน TBS หรือสารละลาย packet 1 ประมาณ 5 นาที

4) คีบแผ่นกระดาษกรองเบอร์ 1 ขึ้นมาพร้อมกับแผ่น NCM ที่ได้แช่ไว้ วางลงบนแผ่นกระดาษกรองเบอร์ 1 แผ่นใหม่ที่แห้งและมีขนาดใหญ่กว่า ใช้ pasture pipet ที่สะอาดรีดแผ่น NCM ให้แนบติดกับกระดาษกรอง

5) หยดตัวอย่างน้ำคั้นของพืช 1 - 2 หยด หรือ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในช่องตารางบนแผ่น NCM ตามรูปแบบที่วางไว้ไม่ให้สับสน เพราะจะมีผลต่อการวินิจฉัยโรคผิดตัวอย่างด้วย เมื่อหยดตัวอย่างเสร็จแล้วคีบแผ่น NCM ออกมาวางบนกระดาษสะอาดทิ้งไว้ประมาณ 10 - 20 นาที (แผ่นตัวอย่างนี้สามารถเก็บใส่ถุงพลาสติกแช่ตู้เย็นไว้ได้นาน 2 - 3 สัปดาห์)

6) นำแผ่นตัวอย่างที่แห้งแล้ว แช่ลงในกล่องสี่เหลี่ยมที่มี (blocking solution) อยู่ 10 ml (TBS ปริมาตร 20 มิลลิลิตร + packet 3 + 0.8 มิลลิลิตร 25% titon x 100) แช่นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หรือ ประมาณ 27-30 องศาเซลเซียส

7) เท blocking solution ออก ใส่ส่วนผสมของ As ORSV และ CyMV ใน buffer TBS + 2% milk หรือ blocking solution นั้นเอง ในอัตรา 20 ไมโครลิตร TBS 2% milk แช่นาน 1 ชั่วโมง

8) ล้างแผ่น NCM ด้วย T-TBS 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที

9) เทส่วนผสม GAR 140 ไมโครลิตร ใน 10 มิลลิลิตร TBS+2% milk บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง

10) ล้างแผ่น NCM อีกครั้งด้วย T-TBS 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที

11) เทส่วนผสม substrate รอดูผลประมาณ 5-30 นาที เมื่อเกิดปฏิกิริยาสีชมพูเข้มตามต้องการแล้วเท substrate ออก เทน้ำกลั่นลงแทน เป็นการล้างเพื่อหยุดปฏิกิริยา

หมายเหตุ blocking solution แต่ละครั้งจะเตรียมได้ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร สามารถแบ่งใช้ในการ blocking ในข้อ 6 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แบ่งใช้ในข้อ 7 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และใช้ในข้อ 9 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในกรณีที่ตัวอย่างมีไม่เกิน 20 ตัวอย่าง

12) วิธีการเตรียม Substrate

กรมวิชาการเกษตร

ละลาย buffer 5 (0.25% AS- MX) 1 ml ใน 5 มิลลิลิตร ของ buffer 4 (0.2 Tris Hcl pH 8.2) ละลาย Fast red TR-salt ใน 6 มิลลิลิตร ของ buffer 4 เทส่วนผสม 1 และ 2 รวมกัน ผสมกันแล้วเทลงในกล่องแช่แผ่น NCM เขย่าเบาๆ แล้วสังเกตปฏิกิริยาสีที่เกิดขึ้น ใช้เวลาประมาณ 5-30 นาที ก็เห็นสีชัดเจนถ้าเป็นไวรัสจะเกิดสีชมพู ถ้าไม่มีไวรัสก็ไม่เกิดสีชมพู

3.3.4 การตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

1) สกัด DNA บริสุทธิ์ ด้วย CAP buffer

2) ทำปฏิกิริยา reverse transcription เพื่อสังเคราะห์ C-DNA

3) ทำปฏิกิริยา PCR เพื่อสังเคราะห์ DNA ของไวรัส

4) วิเคราะห์ผลด้วย electrophorysis

3.4 การตรวจจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูพืช

สามารถแยกไส้เดือนฝอยออกจากส่วนหัวของมันฝรั่งสามารถทำได้หลายวิธีการ เช่น การแช่น้ำ (water soaking) ทำได้โดยการใช้ใบมีดเฉือนบริเวณแผลนั้นเป็นชิ้นบางๆ และแช่ในน้ำกลั่นประมาณ 1 ชั่วโมง ไส้เดือนฝอยจะเคลื่อนที่ออกมาอยู่ในน้ำ แล้วตรวจจำแนกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชบางชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น Ditylenchus dipsaci และ Ditylenchus destructor เป็นต้น ส่วนไส้เดือนฝอยศัตรูพืชของมันฝรั่งที่สำคัญชนิดหนึ่ง คือ Potato cyst nematode (Globodera rostochiensis และ G. pallida) สามารถได้โดยตรง โดยตรวจสอบซีสต์ของไส้เดือนฝอย ด้วยแว่นขยาย หรือกล้องจุลทรรศน์

3.5 การตรวจจำแนกแมลง ไร และสัตว์ศัตรูพืช

1) ตรวจตัวอย่างหัวมันฝรั่งด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) เมื่อพบแมลง ไร และสัตว์ศัตรูพืช ให้เก็บรวบรวมศัตรูพืชดังกล่าว พร้อมกับบันทึกรายละเอียด เช่นส่วนของพืชที่พบ ลักษณะการเข้าทำลาย วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ส่งให้กลุ่มวิจัยกีฏ และสัตววิทยาตรวจวิเคราะห์ชนิดต่อไป

2) วิธีการเก็บตัวอย่างแมลง ไร และ สัตว์ศัตรูพืช เพื่อตรวจวิเคราะห์ชนิดที่แตกต่างกันตามกลุ่มของ แมลง ไร และ สัตว์ศัตรูพืช ผีเสื้อ ด้วง แมลงสาบ ตั๊กแตน มวน แมลงวัน เพลี้ยจั๊กจั่น: ใส่ขวดฆ่า เมื่อตายแล้วจึงเก็บใส่ของสามเหลี่ยม นำไปจัดรูปร่าง และอบให้แห้งเพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน มด ไร: ใช้พู่กันเขี่ยดวงในน้ำยาพิเศษเฉพาะเพลี้ยไฟ (AGA) นำไปทำสไลด์ถาวรและ อบให้แห้ง สำหรับศัตรูพืช ในระยะหนอนตัวอ่อนต้องนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนเป็นตัวเต็มวัย แล้วนำไปจัดรูปร่างหรือทำสไลด์ถาวร ขึ้นอยู่กับชนิดของแมลง

3) จำแนก และวิเคราะห์ชนิดของแมลง ไร และ สัตว์ศัตรูพืช

3.6 การตรวจจำแนกชนิดของวัชพืช

3.6.1 ตรวจวัสดุที่ปนมาตามด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope)

3.6.2 ถ้าตรวจพบศัตรูพืชหรือเมล็ดที่ปะปนมา ดำเนินการจำแนกชนิด

กรมวิชาการเกษตร

3.6.3 นำเมล็ดพืชที่ตรวจพบ ศึกษาความงอก ความมีชีวิต หรือกรณีที่ยังจำแนกชนิดไม่ได้ นำมาปลูกเพื่อศึกษาจากที่ต้นเจริญเติบโต ศึกษาหรือสืบค้นข้อมูลทางด้านชีววิทยา ในกรณีที่ยังจำแนกชนิดเมล็ดพืชได้ และจัดเก็บตัวอย่างพืช หรือเมล็ดพืช ที่ปะปนมา เพื่อเป็นตัวอย่างแห้งต่อไป

4. ตรวจวินิจฉัยดินที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่ง และตรวจหาศัตรูพืชที่อาจติดมากับดิน

5. จัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบและสรุปผลการศึกษาการเป็นศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช

6. วิเคราะห์ผลสรุปและเขียนรายงาน

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกชนิดและลักษณะของศัตรูพืชที่ตรวจพบ

2. บันทึกภาพของศัตรูพืช และลักษณะอาการพืชที่ถูกทำลาย และเก็บตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. ด่านตรวจพืชลาดกระบัง สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร
2. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
3. แปลงเกษตรกร

การทดลองที่ 1.7 การตรวจติดตามเชื้อ *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากต่างประเทศ (2559 - 2560)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ วารสาร
2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติค มาร์กเกอร์ คัตเตอร์ หลาว
3. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ชุดตรวจสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ ตู้บ่มเชื้อ
4. โรงเรือนปลูกพืชทดสอบ
5. พืชทดสอบ เช่น ต้นยาสูบ ต้นมะเขือเทศ

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

มีขั้นตอนและวิธีในดำเนินการการวิจัยดังต่อไปนี้

1. สืบค้นและรวบรวมข้อมูลการนำเข้ามันฝรั่งจากประเทศที่มีรายงานการแพร่ระบาดของเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (cms) สาเหตุโรค Potato ring rot ของมันฝรั่ง สำหรับใช้ตรวจสอบกับเอกสารประกอบการนำเข้าแต่ละครั้ง (lot) ที่จุดนำเข้า ณ ด่านตรวจพืช (2559)

2. การสุ่มเก็บตัวอย่าง (2559-2560)

2.1 สุ่มตัวอย่างมันฝรั่งตามข้อกำหนดและเงื่อนไขการนำเข้าจำนวน 600 หัว ต่อการนำเข้าในแต่ละครั้งเพื่อตรวจสอบดินที่ติดมากับหัวพันธุ์ และ นำหัวพันธุ์มันฝรั่งเก็บใส่ถุงกระดาษและใส่ในถุงพลาสติกรัดปากถุงอีกชั้นหนึ่งบันทึกข้อมูลตัวอย่างที่เก็บเช่นชื่อพันธุ์ประเทศที่นำเข้า ผู้นำเข้า ปริมาณการนำเข้า วันที่เก็บตัวอย่าง เป็นต้น

กรมวิชาการเกษตร

2.2 เก็บตัวอย่างไว้ในกล่องรักษาความเย็นอุณหภูมิไม่เกิน 25 องศาเซลเซียส และนำไปแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

3. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (cms) สาเหตุโรค Potato ring rot ของมันฝรั่ง (2559-2560)

3.1 เจาะเนื้อเยื่อของท่อลำเลียงตรงส่วนหัวที่ติดกับ rhizome (heel end) ประมาณ10 กรัม

3.2 บดตัวอย่างเนื้อเยื่อในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร

3.3 เตรียมserial dilution เพื่อเจือจางน้ำคั้นถึงความเข้มข้น10^{-4}

3.4 หยดน้ำคั้นที่ไม่ได้เจือจางและที่เจือจางแล้วความเข้มข้น10^{-1} , 10^{-2}, 10^{-3} และ10^{-4}ปริมาตร100 ไมโครลิตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NCP 88 และใช้แท่งแก้วโค้งงอเกลี่ยให้ทั่วหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.5 บ่มเชื้อไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 21-23 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ โคโลนี (colony) ของเชื้อ *Cms* จะปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 5 วันหลังจาก 7-10 วันจะเห็นโคโลนีเป็นสีขาวหรือสีครีมมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.5 มิลลิเมตร ลักษณะกลมหรือรูปร่างไม่แน่นอนขอบเรียบนูนเป็นเมือกมันวาว และหลังจากบ่มเชื้อไว้ 10-12 วันโคโลนีของเชื้อจะมีสีค่อนข้างเหลือง

3.6 แยกเชื้อให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยใช้ลูปแตะโคโลนีที่คาดว่าเป็นเชื้อ *Cms* ไป streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NCP 88 หรือ NBY และเลือกโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในหลอดอาหารเอียง (slant agar) ต่อไป

3.7 ทดสอบแกรมของเชื้อที่แยกได้ โดยเชื้อ *Cms* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก

4. การทดสอบเชื้อบนพืชทดสอบโดยใช้ต้นมะเขือ (Eggplant Bioassay) (2559-2560)

เพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างพืชเป็นเชื้อ *Cms* หรือพิสูจน์ว่าในน้ำคั้นจากตัวอย่างพืชบดมีเชื้อ *Cms* อยู่ การปลูกเชื้อลงต้นมะเขือนั้น นอกจากจะเป็นการพิสูจน์เชื้อแล้ว ยังเป็นการเพิ่มปริมาณเชื้อได้อีกด้วย

4.1 นำ suspension ของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชหรือน้ำคั้นตัวอย่างพืชปริมาตร 50 ไมโครลิตรใช้เข็มฉีดยาขนาดไม่น้อยกว่า 23G ฉีดเข้าต้นมะเขือเทศขนาดอายุที่มีใบจริงแล้วไม่เกิน 3 ใบไอโซเลท หรือตัวอย่างละ 5 ต้นโดยฉีดเข้าลำต้นเหนือใบเลี้ยง ต้นควบคุมฉีดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อโดยหยุดให้น้ำกับต้นมะเขือก่อนปลูกเชื้อ 1 วัน เพื่อลดแรงดันเต่ง

4.2 เก็บต้นมะเขือที่ปลูกเชื้อแล้วไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 25 องศาเซลเซียสความชื้นสัมพัทธ์ไม่น้อยกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 40 วัน รดน้ำอย่างสม่ำเสมอ

4.3 สังเกตรอยเขียวเข้มหรือรอยด่างซีดที่อยู่ระหว่างเส้นใบซึ่งหลังจากนั้นประมาณ 10 วันจะแสดงอาการเหี่ยวและใบไหม้โดยเนื้อเยื่อรอบอาการไหม้จะเป็นสีเหลืองหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 40 วัน ถ้าต้นมะเขือยังคงเป็นปกติ ไม่แสดงอาการใดๆ แสดงว่าเชื้อที่ฉีดเข้าต้นมะเขือไปไม่ใช่เชื้อ *Cms* หรือ ในน้ำคั้นไม่มีเชื้อ *Cms*

4.4 แยกเชื้อจากต้นมะเขือที่แสดงอาการใบเหี่ยวหรือไหม้โดยตัดลำต้นเหนือบริเวณที่ปลูกเชื้อขึ้นมา 2 เซนติเมตร และใบที่แสดงอาการเหี่ยว นำไปบดในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อทำให้เจือจางและเกลี่ยบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการแยกเชื้อจากต้น และหัวมันฝรั่งข้างต้นหลังจากนั้นประมาณ 3-5 วัน ให้สังเกตดูโคโลนีของเชื้อที่คล้ายกับโคโลนีของเชื้อ *Cms* เพื่อนำไปแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์อีกครั้ง

5. การตรวจจำแนกชนิด ด้วยวิธี ELISA หรือ วิธี PCR (2559-2560)

วิธี ELISA โดยใช้ชุดตรวจสอบ ของ agdiaสำหรับ วิธี PCR นั้น โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PSA-1/PSA-R (5’- ctccttgtgggggtgggaaaa -3’/ 5’- tactga gat gtttcactt ccc c -3’) สำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอเชื้อ *Cms* และใช้คู่ไพรเมอร์ NS-7-F/NS-8-R (5’- gag gcaataacaggtctgtgatgc -3’/ 5’- tccgcaggttcacctacgga -3’) สำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอพืช (Pastrik, 2000)

6. รวบรวมผลและวิเคราะห์ข้อมูล

สถานที่ดำเนินการ

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช
- ด่านตรวจพืช
- แปลงปลูกหัวมันฝรั่งผู้นำเข้า

การทดลองที่ 1.8 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหัวนำเข้าจากนิวซีแลนด์และญี่ปุ่น (2561 – 2562)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ และวารสาร
2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติค มาร์กเกอร์ คัตเตอร์ หลาว
3. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ชุดตรวจสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ ตู้บ่มเชื้อ
4. โรงเรือนปลูกพืชทดสอบ
5. พืชทดสอบ เช่น ต้นยาสูบ ต้นมะเขือเทศ

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

มีขั้นตอนและวิธีในดำเนินการการวิจัยดังต่อไปนี้

1. การสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชเป้าหมาย เช่น ชีววิทยา วิธีการตรวจศัตรูพืชในเมล็ดพันธุ์ และวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

2. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากด่านตรวจพืช ตามมาตรฐาน International Seed Testing Association (ISTA, 2018) ปริมาณเมล็ดพันธุ์ผักกาดหัวที่ใช้สำหรับตรวจสอบศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ น้ำหนัก 300 กรัม โดยสุ่มตัวอย่างตามวิธีการดังนี้

2.1 การสุ่มตัวอย่างที่บรรจุอยู่ในกระสอบ หรือภาชนะอื่นๆ ที่มีขนาดบรรจุของภาชนะแต่ละใบเท่าๆกัน โดยมีน้ำหนักของเมล็ดพันธุ์จำนวน 15 กิโลกรัม ถึง 100 กิโลกรัม

2.1.1 เมล็ดพันธุ์จำนวน 1 – 4 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 3 ตัวอย่างขั้นต้น จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.2 เมล็ดพันธุ์จำนวน 5 – 8 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 2 ตัวอย่างขั้นต้น จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.3 เมล็ดพันธุ์จำนวน 9 – 15 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 1 ตัวอย่างขั้นต้น จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.4 เมล็ดพันธุ์จำนวน 16 – 30 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 15 ตัวอย่างขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

กรมวิชาการเกษตร

2.1.5 เมล็ดพันธุ์จำนวน 31 – 59 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 20 ตัวอย่าง ขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.6 เมล็ดพันธุ์จำนวนมากกว่าหรือเท่ากับ 60 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 30 ตัวอย่างขั้นต้นจากภาชนะบรรจุทั้งหมด

3. การตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ ด้วยตาเปล่า สังเกตลักษณะสี ผิว และรูปร่างว่ามีอะไรผิดปกติหรือไม่ มีรอยเจาะ หรือแตกกระเทาะของเมล็ดพันธุ์หรือไม่ และจึงนำเมล็ดพันธุ์ที่สุ่มได้นำไปตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

4. การตรวจศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

4.1 ตรวจสอบและจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืช เช่น วัชพืช *Cirsium arvense*, *Lolium temulentum*, *Senecio vulgaris* และ *Spergula arvensis* โดยทำการคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพได้แก่ เมล็ดพืชบริสุทธิ์ เมล็ดพืชอื่น และสิ่งเจือปน นำแต่ละส่วนมาชั่งหาน้ำหนัก แล้วนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชที่ตรวจพบโดย

4.1.1 ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) เพื่อศึกษาและบันทึกลักษณะภายนอกของเมล็ด เช่น สี ผิว รูปร่างและลายบนผิวของเมล็ด วัดขนาดความกว้าง ยาวของเมล็ด

4.1.2 เปรียบเทียบกับตัวอย่างเมล็ดวัชพืชในพิพิธภัณฑ์และใช้คู่มือจำแนกเมล็ดพืช

4.1.3 จำแนกโดยปลูกดูลักษณะต่างๆตั้งแต่เริ่มงอกเป็นต้นกล้า ลักษณะใบ ดอก ผล

4.2 จำแนกกลุ่มของแมลงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

4.3 จัดเตรียมตัวอย่างแมลงและไรโดย

4.3.1 นำตัวอย่างแมลงที่เก็บรวบรวมได้มาจัดรูปร่าง (set) บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) ตัวอย่างแมลง โดยใช้เข็มไร้สนิมปักบริเวณด้านหน้าตรงมุมของปีกขวา (บริเวณมุมที่ปีกจรดกัน) ใช้ปากคีบจัดขาทั้งสามคู่ให้อยู่ในลักษณะเกาะหรือเดินโดยใช้เข็มหมุดขนาดกลางเป็นตัวยึด ตัวเต็มวัยขนาด เช่น เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด และด้วงที่มีขนาดเล็กให้ติดลงบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 – 60 วัน ขึ้นกับขนาดของแมลง

4.3.2 ทำสไลด์ถาวร แมลงจำพวกปากดูดที่มีขนาดเล็กเช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้งและเพลี้ยหอย ต้องนำมาทำสไลด์ถาวร และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เพื่อจำแนกชนิด

4.3.3 ไร ทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่างๆ ได้ชัดเจน โดยจัดท่าทางของไรให้อยู่ในท่าคว่ำและท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่างๆที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย cover glass ใช้ปากกาเขียนแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ

กรมวิชาการเกษตร

cover grass ด้วยน้ำยาทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บและพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

4.4 ตรวจเชื้อรา เช่น *Verticillium dahliae* ด้วยวิธี Blotter method (Mathur and Kongdal, 2003) โดยการนำเมล็ดที่วางไว้ในภาชนะให้ความชื้นไปวางใต้แสง near ultra violet (NUV) โดยให้แสงสลับกับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน และตรวจจำแนกชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) และกำลังขยายสูงต่อไป

4.5 ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola, Pseudomonas viridiflava* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยวิธี Dilution plate method และ เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar plate method) ตรวจสอบและจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา เช่น Enzyme – linked Immunosorbent Assay (ELISA)

4.6 ตรวจและจำแนกชนิดไวรัสที่ติดมากับเมล็ดด้วยวิธี ELISA โดยตรวจจากเมล็ดโดยตรงหรือตรวจจากต้นกล้าตามวิธีการที่เหมาะสมกับไวรัสแต่ละชนิด

4.7 ตรวจสอบไส้เดือนฝอย เช่น *Heterodera shachtii* ด้วยวิธีแช่น้ำและเขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 30 นาที หรือการลอยน้ำ เพื่อสังเกตซีสต์ของไส้เดือนฝอย โดยการนำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ผักกาดหัวมาคลุกเคล้าแล้วผสมน้ำ กวนน้ำ และเทผ่านน้ำไหลและเทผ่านตะแกรงขนาด 18 mesh (ความยาว 1 นิ้วมี 18 ช่อง) แล้วรองด้วยตะแกรงขนาด 325 mesh และตรวจจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) และกำลังขยายสูงต่อไป

5. เพาะเมล็ดพันธุ์ เพื่อสังเกตลักษณะอาการผิดปกติของต้นพืชในโรงเรือนของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช โดยสังเกตดูลักษณะอาการบริเวณโคนต้น ลำต้น ใบเลี้ยง และใบ ของต้นพืช บันทึกผล กรณีถ้าพบอาการผิดปกติให้นำส่วนของพืชไปทำการแยกเชื้อและจำแนกชนิด

6. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงผลิตหรือในโรงเรือนเพาะเมล็ดของบริษัทที่นำเข้า

7. จัดทำรายชื่อศัตรูที่ตรวจพบและสรุปผล

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกชนิดและลักษณะของศัตรูพืชที่ตรวจพบ

2. บันทึกภาพของศัตรูพืช และลักษณะอาการพืชที่ถูกทำลาย และเก็บตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. ด่านตรวจพืช เช่น ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ด่านตรวจพืชไปรษณีย์ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

3. แปลงปลูกของบริษัทในจังหวัด เช่น ราชบุรี นครปฐม เพชรบูรณ์ นครราชสีมา ชัยภูมิ

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.9 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดนำเข้าจากอินเดียและสหรัฐอเมริกา (2561 - 2562)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ และวารสาร
2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติค มาร์กเกอร์ คัตเตอร์ หลาว
3. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ชุดตรวจสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ ตู้บ่มเชื้อ
4. โรงเรือนปลูกพืชทดสอบ
5. พืชทดสอบ เช่น ต้นยาสูบ

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

มีขั้นตอนและวิธีในดำเนินการการวิจัยดังต่อไปนี้

1. การสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชเป้าหมาย เช่น ชีววิทยา วิธีการตรวจศัตรูพืชในเมล็ดพันธุ์ และวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

2. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากด่านตรวจพืช ตามมาตรฐาน International Seed Testing Association (ISTA, 2018) ปริมาณเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่ใช้สำหรับตรวจสอบศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ น้ำหนัก 1,000 กรัม โดยสุ่มตัวอย่างตามวิธีการดังนี้

2.1 การสุ่มตัวอย่างที่บรรจุอยู่ในกระสอบ หรือภาชนะอื่นๆ ที่มีขนาดบรรจุของภาชนะแต่ละใบเท่าๆกัน โดยมีน้ำหนักของเมล็ดพันธุ์จำนวน 15 กิโลกรัม ถึง 100 กิโลกรัม

2.1.1 เมล็ดพันธุ์จำนวน 1 – 4 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 3 ตัวอย่างขั้นต้น จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.2 เมล็ดพันธุ์จำนวน 5 – 8 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 2 ตัวอย่างขั้นต้น จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.3 เมล็ดพันธุ์จำนวน 9 – 15 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 1 ตัวอย่างขั้นต้น จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.4 เมล็ดพันธุ์จำนวน 16 – 30 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 15 ตัวอย่างขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.5 เมล็ดพันธุ์จำนวน 31 – 59 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 20 ตัวอย่าง ขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.6 เมล็ดพันธุ์จำนวนมากกว่าหรือเท่ากับ 60 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 30 ตัวอย่างขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

3. การตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ ด้วยตาเปล่า สังเกตลักษณะสี ผิว และรูปร่างว่ามีอะไรผิดปกติหรือไม่ มีรอยเจาะ หรือแตกกระเทาะของเมล็ดพันธุ์หรือไม่ และจึงนำเมล็ดพันธุ์ที่สุ่มได้นำไปตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

4. การตรวจศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

กรมวิชาการเกษตร

4.1 ตรวจสอบและจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชขั้นละเอียดโดยทำการคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพ ได้แก่ เมล็ดพืชบริสุทธิ์ เมล็ดพืชอื่น และสิ่งเจือปน นำแต่ละส่วนมาชั่งหาน้ำหนัก แล้วนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชที่ตรวจพบโดย

4.1.1 ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) เพื่อศึกษาและบันทึกลักษณะภายนอกของเมล็ด เช่น สี ผิว รูปร่างและลายบนผิวของเมล็ด วัดขนาดความกว้าง ยาวของเมล็ด

4.1.2 เปรียบเทียบกับตัวอย่างเมล็ดวัชพืชในพิพิธภัณฑ์และใช้คู่มือจำแนกเมล็ดพืช

4.1.3 จำแนกโดยปลูกดูลักษณะต่างๆตั้งแต่เริ่มงอกเป็นต้นกล้า ลักษณะใบ ดอก ผล

4.2 จำแนกกลุ่มของแมลงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)

4.3 จัดเตรียมตัวอย่างแมลงและไรโดย

4.3.1 นำตัวอย่างแมลงที่เก็บรวบรวมได้มาจัดรูปร่าง (set) บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) ตัวอย่างแมลง โดยใช้เข็มไร้สนิมปักบริเวณด้านหน้าตรงมุมของปีกขวา (บริเวณมุมที่ปีกจรดกัน) ใช้ปากคีบจัดขาทั้งสามคู่ให้อยู่ในลักษณะเกาะหรือเดินโดยใช้เข็มหมุดขนาดกลางเป็นตัวยึด ตัวเต็มวัยขนาด เช่น เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด และด้วงที่มีขนาดเล็กให้ติดลงบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 – 60 วัน ขึ้นกับขนาดของแมลง

4.3.2 ทำสไลด์ถาวร แมลงจำพวกปากดูดที่มีขนาดเล็กเช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้งและเพลี้ยหอย ต้องนำมาทำสไลด์ถาวร และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เพื่อจำแนกชนิด

4.3.3 ไร ทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน โดยจัดท่าทางของไรให้อยู่ในท่าคว่ำและท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่างๆที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย cover glass ใช้ปากกาเขียนแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ cover glass ด้วยน้ำยา ทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บ และพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

4.4 ตรวจเชื้อรา เช่น *Cercospora zeae-maydis* และ *Cephalosporium maydis* ด้วยวิธี Blotter method (Mathur and Kongdal, 2003) โดยการนำเมล็ดที่วางไว้ในภาชนะให้ความชื้นไปวางใต้แสง near ultra violet (NUV) โดยให้แสงสลับกับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน และตรวจจำแนกชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) และกำลังขยายสูงต่อไป

4.5 ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ เช่น *Pantoea stewartii* และ *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* โดยวิธี Dilution plate method ตรวจสอบและจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา เช่น Enzyme – linked Immunosorbent Assay (ELISA)

กรมวิชาการเกษตร

4.6 ตรวจและจำแนกชนิดไวรัสที่ติดมากับเมล็ด เช่น *High plains virus, Maize chlorotic dwarf virus, Maize chlorotic mottle virus, Maize mosaic virus* และ *Maize rayado fino virus* ด้วยวิธี ELISA โดยตรวจจากเมล็ดโดยตรงหรือตรวจจากต้นกล้าตามวิธีการที่เหมาะสมกับไวรัสแต่ละชนิด

5. เพาะเมล็ดพันธุ์ เพื่อสังเกตลักษณะอาการผิดปกติของต้นพืชในโรงเรือนของกลุ่มวิจัย การกักกันพืช โดยสังเกตดูลักษณะอาการบริเวณโคนต้น ลำต้น ใบเลี้ยง และใบ ของต้นพืช บันทึกผล กรณีถ้าพบอาการผิดปกติให้นำส่วนของพืชไปทำการแยกเชื้อและจำแนกชนิด

6. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงผลิตหรือในโรงเรือนเพาะเมล็ดของบริษัทที่นำเข้า

7. จัดทำรายชื่อศัตรูที่ตรวจพบและสรุปผล

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกชนิดและลักษณะของศัตรูพืชที่ตรวจพบ

2. บันทึกภาพของศัตรูพืช และลักษณะอาการพืชที่ถูกทำลาย และเก็บตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
2. ด่านตรวจพืช เช่น ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ด่านตรวจพืชไปรษณีย์ ด่านตรวจพืชไปรษณีย์ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร
3. แปลงปลูกของบริษัท ในจังหวัด เช่น จังหวัดขอนแก่น สกลนคร กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ลพบุรี นครสวรรค์ พิษณุโลก สุโขทัย กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ ตาก อุตรดิตถ์ แพร่ ลำปาง เชียงใหม่ และเชียงราย

การทดลองที่ 1.10 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีนำเข้าจากนิวซีแลนด์ และญี่ปุ่น (2563-2564)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ และวารสาร
2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติค มาร์กเกอร์ คัตเตอร์ หลาว
3. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ชุดตรวจสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ และตู้บ่มเชื้อ
4. โรงเรือนปลูกพืชทดสอบ
5. พืชทดสอบ เช่น ต้นยาสูบ ต้นมะเขือเทศ
6. เมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลี

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

มีขั้นตอนและวิธีในดำเนินการการวิจัยดังต่อไปนี้

กรมวิชาการเกษตร

1. การสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชเป้าหมาย เช่น ชีววิทยา วิธีการตรวจศัตรูพืชในเมล็ดพันธุ์ และวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

2. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากด่านตรวจพืช ตามมาตรฐาน International Seed Testing Association (ISTA, 2018) ปริมาณเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีที่ใช้สำหรับตรวจสอบศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ น้ำหนัก 100 กรัม โดยสุ่มตามวิธีการดังนี้

2.1 การสุ่มตัวอย่างที่บรรจุอยู่ในกระสอบ หรือภาชนะอื่นๆ ที่มีขนาดบรรจุของภาชนะแต่ละใบเท่าๆกัน โดยมีน้ำหนักของเมล็ดพันธุ์จำนวน 15 กิโลกรัม ถึง 100 กิโลกรัม

2.1.1 เมล็ดพันธุ์จำนวน 1 – 4 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 3 ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.2 เมล็ดพันธุ์จำนวน 5 – 8 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 2 ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.3 เมล็ดพันธุ์จำนวน 9 – 15 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 1 ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.4 เมล็ดพันธุ์จำนวน 16 – 30 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 15 ตัวอย่างจากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.5 เมล็ดพันธุ์จำนวน 31 – 59 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 20 ตัวอย่างจากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.6 เมล็ดพันธุ์จำนวนตั้งแต่ 60 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 30 ตัวอย่างจากภาชนะบรรจุทั้งหมด

3. การตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ ด้วยตาเปล่า สังเกตลักษณะสี ผิว และรูปร่างว่ามีอะไรผิดปกติหรือไม่ มีรอยเจาะ หรือแตกกระเทาะของเมล็ดพันธุ์หรือไม่ และจึงนำเมล็ดพันธุ์ที่สุ่มได้นำไปตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

4. การตรวจศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

4.1 ตรวจสอบและจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชขั้นละเอียดโดยทำการคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพได้แก่ เมล็ดพืชบริสุทธิ์ เมล็ดพืชอื่น และสิ่งเจือปน นำแต่ละส่วนมาชั่งหาน้ำหนัก แล้วนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชที่ตรวจพบโดย

4.1.1 ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) เพื่อศึกษาและบันทึกลักษณะภายนอกของเมล็ด เช่น สี ผิว รูปร่างและลายบนผิวของเมล็ด วัดขนาดความกว้าง ยาวของเมล็ด

4.1.2 เปรียบเทียบกับตัวอย่างเมล็ดวัชพืชในพิพิธภัณฑ์และใช้คู่มือจำแนกเมล็ดพืช

4.1.3 จำแนกโดยปลูกดูลักษณะต่างๆตั้งแต่เริ่มงอกเป็นต้นกล้า ลักษณะใบ ดอก ผล

4.2 จำแนกกลุ่มของแมลงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

4.3 จัดเตรียมตัวอย่างแมลงและไรโดย

4.3.1 นำตัวอย่างแมลงที่เก็บรวบรวมได้มาจัดรูปร่าง (set) บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) ตัวอย่างแมลง โดยใช้เข็มไร้สนิมปักบริเวณด้านหน้าตรงมุมของปีกขวา (บริเวณมุมที่ปีกจรดกัน) ใช้ปากคีบจัดขาทั้งสามคู่ให้อยู่ในลักษณะเกาะหรือเดินโดยใช้เข็มหมุดขนาดกลางเป็นตัวยึด ตัวเต็มวัยขนาด เช่น เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด และด้วงที่มีขนาดเล็กให้ติดลงบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 – 60 วัน ขึ้นกับขนาดของแมลง

4.3.2 ทำสไลด์ถาวร แมลงจำพวกปากดูดที่มีขนาดเล็กเช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้ง และเพลี้ยหอย ต้องนำมาทำสไลด์ถาวร และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เพื่อจำแนกชนิด

กรมวิชาการเกษตร

4.3.3 ไร ทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน โดยจัดท่าทางของไรให้อยู่ในท่าคว่ำและท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่างๆที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย cover glass ใช้ปากกาเขียนแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ cover glass ด้วยน้ำยา ทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บ และพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

4.4 ตรวจเชื้อรา Chalala elegans, Phytophthora megasperma ด้วยวิธี Blotter method (Mathur and Kongdal, 2003) โดยการนำเมล็ดที่วางไว้ในภาชนะให้ความชื้นไปวางใต้แสง near ultra violet (NUV) โดยให้แสงสลับกับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน และตรวจจำแนกชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope)และกำลังขยายสูงต่อไป

4.5 ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย Pseudomonas marginalis pv. maginalis ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยวิธี Dilution plate method และ เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจสอบและจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา เช่น Enzyme – linked Immunosorbent Assay (ELISA)

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค ELISA (ชุดตรวจสอบของบริษัท Agdia) โดยมีขั้นตอน ดังนี้

1 ทำการเตรียม capture antibody เจือจางด้วย carbonate coating อัตรา 1:200 โดยหยอด capture antibody ในหลุม ELISA ปริมาตร 100 µl ต่อหลุม

2 บ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง หรือ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

3 ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST 2 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

4 ทำการหยอดเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ รวมถึง negative control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5 ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST มากกว่า 2 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

6 ทำการเตรียมสาร alkaline phosphatase enzyme conjugate เจือจางด้วย RUB3 buffer อัตรา 1:200 โดยหยอดหลุมละ 100 µl (ควรเตรียม 10 นาที ก่อนใช้งาน) แล้วบ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

7 ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST 7 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

8 ทำการเตรียมสาร PNP tablet จำนวน 1 เม็ด เจือจางด้วย PNP buffer ปริมาตร 5 ml. โดยเก็บสารละลายไว้ในที่มืด แล้วจึงหยอดสาร PNP solution หลุมละ 100 µl แล้วบ่มจานหลุมในอุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวัดเครื่องอ่านอิไลซ่า ที่ความยาวคลื่น 405 (OD405) และทำการ

กรมวิชาการเกษตร

4.6 ตรวจและจำแนกชนิดไวรัส Turnip mosaic virus ที่ติดมากับเมล็ดด้วยวิธี ELISA โดยตรวจจากเมล็ดโดยตรงหรือตรวจจากต้นกล้า

5. เพาะเมล็ดพันธุ์ 25-50 เมล็ดต่อถุง และเก็บถุงเพาะที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เมื่อต้นกล้าเริ่มออกใบจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนพืช โดยสังเกตดูลักษณะอาการบริเวณโคนต้น ลำต้น ใบเลี้ยง และใบของต้นพืช บันทึกผล กรณีถ้าพบอาการผิดปกติให้นำส่วนของพืชไปทำการแยกเชื้อและจำแนกชนิด

6. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงผลิตหรือในโรงเรือนเพาะเมล็ดของบริษัทที่นำเข้า ช่วงอายุ 25-30 วัน

7. จัดทำรายชื่อศัตรูที่ตรวจพบและสรุปผล

การบันทึกข้อมูล

1. ชนิดและลักษณะของศัตรูพืชที่ตรวจพบ

2. ภาพของศัตรูพืช และลักษณะอาการพืชที่ถูกทำลาย และเก็บตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

ระยะเวลาดำเนินการ

เริ่มงานวิจัย ตุลาคม 2562 ถึง กันยายน 2564

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. ด่านตรวจพืช ท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ไปรษณีย์ และท่าเรือกรุงเทพ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

3. แปลงปลูกกะหล่ำปลีนำเข้าของบริษัทหรือเกษตรกร ในจังหวัดเพชรบูรณ์ เลย ตาก น่าน แพร่ ลำพูน ลำปาง เชียงใหม่ เชียงราย

การทดลองที่ 1.11 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักชีนำเข้าจากอิตาลี และสหรัฐอเมริกา (2563-2564)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ และวารสาร
2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติค มาร์กเกอร์ คัตเตอร์ หลาว
3. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ชุดตรวจสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ และตู้บ่มเชื้อ
4. โรงเรือนปลูกพืชทดสอบ
5. พืชทดสอบ เช่น ต้นยาสูบ ต้นมะเขือเทศ
6. เมล็ดพันธุ์ผักชี

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

มีขั้นตอนและวิธีในดำเนินการการวิจัยดังต่อไปนี้

1. การสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชเป้าหมาย เช่น ชีววิทยา วิธีการตรวจศัตรูพืชในเมล็ดพันธุ์ และวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

กรมวิชาการเกษตร

2. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากด่านตรวจพืช ตามมาตรฐาน International Seed Testing Association (ISTA, 2018) ปริมาณเมล็ดพันธุ์ผักชีที่ใช้สำหรับตรวจสอบศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ น้ำหนัก 400 กรัม โดยสุ่มตามวิธีการดังนี้

2.1 การสุ่มตัวอย่างที่บรรจุอยู่ในกระสอบ หรือภาชนะอื่นๆ ที่มีขนาดบรรจุของภาชนะแต่ละใบเท่าๆกัน โดยมีน้ำหนักของเมล็ดพันธุ์จำนวน 15 กิโลกรัม ถึง 100 กิโลกรัม

2.1.1 เมล็ดพันธุ์จำนวน 1 – 4 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 3 ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.2 เมล็ดพันธุ์จำนวน 5 – 8 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 2 ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.3 เมล็ดพันธุ์จำนวน 9 – 15 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 1 ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.4 เมล็ดพันธุ์จำนวน 16 – 30 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 15 ตัวอย่างจากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.5 เมล็ดพันธุ์จำนวน 31 – 59 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 20 ตัวอย่างจากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.6 เมล็ดพันธุ์จำนวนตั้งแต่ 60 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 30 ตัวอย่างจากภาชนะบรรจุทั้งหมด

3. การตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ ด้วยตาเปล่า สังเกตลักษณะสี ผิว และรูปร่างว่ามีอะไรผิดปกติหรือไม่ มีรอยเจาะ หรือแตกกระเทาะของเมล็ดพันธุ์หรือไม่ และจึงนำเมล็ดพันธุ์ที่สุ่มได้นำไปตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

4. การตรวจศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

4.1 ตรวจสอบและจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชขั้นละเอียดโดยทำการคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพได้แก่ เมล็ดพืชบริสุทธิ์ เมล็ดพืชอื่น และสิ่งเจือปน นำแต่ละส่วนมาชั่งหาน้ำหนัก แล้วนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชที่ตรวจพบโดย

4.1.1 ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) เพื่อศึกษาและบันทึกลักษณะภายนอกของเมล็ด เช่น สี ผิว รูปร่างและลายบนผิวของเมล็ด วัดขนาดความกว้าง ยาวของเมล็ด

4.1.2 เปรียบเทียบกับตัวอย่างเมล็ดวัชพืชในพิพิธภัณฑ์และใช้คู่มือจำแนกเมล็ดพืช

4.1.3 จำแนกโดยปลูกดูลักษณะต่างๆตั้งแต่เริ่มงอกเป็นต้นกล้า ลักษณะใบ ดอก ผล

4.2 จำแนกกลุ่มของแมลงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

4.3 จัดเตรียมตัวอย่างแมลงและไรโดย

4.3.1 นำตัวอย่างแมลงที่เก็บรวบรวมได้มาจัดรูปร่าง (set) บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) ตัวอย่างแมลง โดยใช้เข็มไร้สนิมปักบริเวณด้านหน้าตรงมุมของปีกขวา (บริเวณมุมที่ปีกจรดกัน) ใช้ปากคีบจัดขาทั้งสามคู่ให้อยู่ในลักษณะเกาะหรือเดินโดยใช้เข็มหมุดขนาดกลางเป็นตัวยึด ตัวเต็มวัยขนาด เช่น เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด และด้วงที่มีขนาดเล็กให้ติดลงบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 – 60 วัน ขึ้นกับขนาดของแมลง

4.3.2 ทำสไลด์ถาวร แมลงจำพวกปากดูดที่มีขนาดเล็กเช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้ง และเพลี้ยหอย ต้องนำมาทำสไลด์ถาวร และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เพื่อจำแนกชนิด

4.3.3 ไร ทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) หยด

กรมวิชาการเกษตร

Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน โดยจัดท่าทางของไรให้อยู่ในท่าคว่ำและท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่างๆที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย cover glass ใช้ปากกาเขียนแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ cover glass ด้วยน้ำยา ทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บ และพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

4.4 ตรวจเชื้อรา Verticillium dahliae ด้วยวิธี Blotter method (Mathur and Kongdal, 2003) โดยการนำเมล็ดที่วางไว้ในภาชนะให้ความชื้นไปวางใต้แสง near ultra violet (NUV) โดยให้แสงสลับกับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน และตรวจจำแนกชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) และกำลังขยายสูงต่อไป

4.5 ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย Xanthomonas hortorum pv. carotae ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยวิธี Dilution plate method และ เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจสอบและจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา เช่น Enzyme – linked Immunosorbent Assay (ELISA)

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค ELISA (ชุดตรวจสอบของบริษัท Agdia) โดยมีขั้นตอน ดังนี้

1 ทำการเตรียม capture antibody เจือจางด้วย carbonate coating อัตรา 1:200 โดยหยอด capture antibody ในหลุม ELISA ปริมาตร 100 µl ต่อหลุม

2 บ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง หรือ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

3 ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST 2 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

4 ทำการหยอดเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ รวมถึง negative control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5 ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST มากกว่า 2 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

6 ทำการเตรียมสาร alkaline phosphatase enzyme conjugate เจือจางด้วย RUB3 buffer อัตรา 1:200 โดยหยอดหลุมละ 100 µl (ควรเตรียม 10 นาที ก่อนใช้งาน) แล้วบ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

7 ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST 7 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

8 ทำการเตรียมสาร PNP tablet จำนวน 1 เม็ด เจือจางด้วย PNP buffer ปริมาตร 5 ml. โดยเก็บสารละลายไว้ในที่มืด แล้วจึงหยอดสาร PNP solution หลุมละ 100 µl แล้วบ่มจานหลุมในอุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวัดเครื่องอ่านอิไลซ่า ที่ความยาวคลื่น 405 (OD405) และทำการ

กรมวิชาการเกษตร

4.6 ตรวจและจำแนกชนิดไวรัส Alfafa mosaic virus ที่ติดมากับเมล็ดด้วยวิธี ELISA โดยตรวจจากเมล็ดโดยตรงหรือตรวจจากต้นกล้าตามวิธีการที่เหมาะสมกับไวรัสแต่ละชนิด

5. เพาะเมล็ดพันธุ์ 25-50 เมล็ดต่อถุง และเก็บถุงเพาะที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เมื่อต้นกล้าเริ่มออกใบจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนพืช โดยสังเกตดูลักษณะอาการบริเวณโคนต้น ลำต้น ใบเลี้ยง และใบของต้นพืช บันทึกผล กรณีถ้าพบอาการผิดปกติให้นำส่วนของพืชไปทำการแยกเชื้อและจำแนกชนิด

6. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงผลิต ช่วงอายุ 25-30 วัน

7. จัดทำรายชื่อศัตรูที่ตรวจพบและสรุปผล

การบันทึกข้อมูล

1. ชนิดและลักษณะของศัตรูพืชที่ตรวจพบ

2. ภาพของศัตรูพืช และลักษณะอาการพืชที่ถูกทำลาย และเก็บตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

ระยะเวลาดำเนินการ

เริ่มงานวิจัย ตุลาคม 2562 ถึง กันยายน 2564

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. ด่านตรวจพืช เช่น ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ท่าเรือกรุงเทพ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

3. แปลงปลูกผักชีนำเข้าของบริษัทหรือเกษตรกร ในจังหวัดนครราชสีมา เพชรบูรณ์ เลย เชียงใหม่ เชียงราย ราชบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี กาญจนบุรี

การทดลองที่ 1.12 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์คะน้านำเข้าจากจีน และ นิวซีแลนด์ (2563-2564) (เลื่อนการทดลองจากปี 2561-2562)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ และวารสาร
2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติค มาร์กเกอร์ คัตเตอร์ หลาว
3. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ชุดตรวจสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ และตู้บ่มเชื้อ
4. โรงเรือนปลูกพืชทดสอบ
5. พืชทดสอบ เช่น ต้นยาสูบ ต้นมะเขือเทศ
6. เมล็ดพันธุ์คะน้า

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

มีขั้นตอนและวิธีในดำเนินการการวิจัยดังต่อไปนี้

1. การสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชเป้าหมาย เช่น ชีววิทยา วิธีการตรวจศัตรูพืชในเมล็ดพันธุ์ และวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

กรมวิชาการเกษตร

2. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากด่านตรวจพืช ตามมาตรฐาน International Seed Testing Association (ISTA, 2018) ปริมาณเมล็ดพันธุ์คะน้าที่ใช้สำหรับตรวจสอบศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ น้ำหนัก 100 กรัม โดยสุ่มตามวิธีการดังนี้

2.1 การสุ่มตัวอย่างที่บรรจุอยู่ในกระสอบ หรือภาชนะอื่นๆ ที่มีขนาดบรรจุของภาชนะแต่ละใบเท่าๆกัน โดยมีน้ำหนักของเมล็ดพันธุ์จำนวน 15 กิโลกรัม ถึง 100 กิโลกรัม

2.1.1 เมล็ดพันธุ์จำนวน 1 – 4 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 3 ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.2 เมล็ดพันธุ์จำนวน 5 – 8 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 2 ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.3 เมล็ดพันธุ์จำนวน 9 – 15 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 1 ตัวอย่างจากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.4 เมล็ดพันธุ์จำนวน 16 – 30 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 15 ตัวอย่างจากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.5 เมล็ดพันธุ์จำนวน 31 – 59 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 20 ตัวอย่างจากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.6 เมล็ดพันธุ์จำนวนตั้งแต่ 60 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 30 ตัวอย่างจากภาชนะบรรจุทั้งหมด

3. การตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ ด้วยตาเปล่า สังเกตลักษณะสี ผิว และรูปร่างว่ามีอะไรผิดปกติหรือไม่ มีรอยเจาะ หรือแตกกระเทาะของเมล็ดพันธุ์หรือไม่ และจึงนำเมล็ดพันธุ์ที่สุ่มได้นำไปตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

4. การตรวจศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

4.1 ตรวจสอบและจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชขั้นละเอียดโดยทำการคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพได้แก่ เมล็ดพืชบริสุทธิ์ เมล็ดพืชอื่น และสิ่งเจือปน นำแต่ละส่วนมาชั่งหาน้ำหนัก แล้วนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชที่ตรวจพบโดย

4.1.1 ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) เพื่อศึกษาและบันทึกลักษณะภายนอกของเมล็ด เช่น สี ผิว รูปร่างและลายบนผิวของเมล็ด วัดขนาดความกว้าง ยาวของเมล็ด

4.1.2 เปรียบเทียบกับตัวอย่างเมล็ดวัชพืชในพิพิธภัณฑ์และใช้คู่มือจำแนกเมล็ดพืช

4.1.3 จำแนกโดยปลูกดูลักษณะต่างๆตั้งแต่เริ่มงอกเป็นต้นกล้า ลักษณะใบ ดอก ผล

4.2 จำแนกกลุ่มของแมลงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

4.3 จัดเตรียมตัวอย่างแมลงและไรโดย

4.3.1 นำตัวอย่างแมลงที่เก็บรวบรวมได้มาจัดรูปร่าง (set) บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) ตัวอย่างแมลง โดยใช้เข็มไร้สนิมปักบริเวณด้านหน้าตรงมุมของปีกขวา (บริเวณมุมที่ปีกจรดกัน) ใช้ปากคีบจัดขาทั้งสามคู่ให้อยู่ในลักษณะเกาะหรือเดินโดยใช้เข็มหมุดขนาดกลางเป็นตัวยึด ตัวเต็มวัยขนาด เช่น เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด และด้วงที่มีขนาดเล็กให้ติดลงบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 – 60 วัน ขึ้นกับขนาดของแมลง

4.3.2 ทำสไลด์ถาวร แมลงจำพวกปากดูดที่มีขนาดเล็กเช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้ง และเพลี้ยหอย ต้องนำมาทำสไลด์ถาวร และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เพื่อจำแนกชนิด

4.3.3 ไร ทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) หยด

กรมวิชาการเกษตร

Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน โดยจัดท่าทางของไรให้อยู่ในท่าคว่ำและท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่างๆที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย cover glass ใช้ปากกาเขียนแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ cover glass ด้วยน้ำยา ทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บ และพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

4.4 ตรวจเชื้อรา Chalala elegans ด้วยวิธี Blotter method (Mathur and Kongdal, 2003) โดยการนำเมล็ดที่วางไว้ในภาชนะให้ความชื้นไปวางใต้แสง near ultra violet (NUV) โดยให้แสงสลับกับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน และตรวจจำแนกชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) และกำลังขยายสูงต่อไป

4.5 ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย Psedomonas cichorii ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยวิธี Dilution plate method และ เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar plate method) ตรวจสอบและจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา เช่น Enzyme – linked Immunosorbent Assay (ELISA)

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค ELISA (ชุดตรวจสอบของบริษัท Agdia) โดยมีขั้นตอน ดังนี้

1 ทำการเตรียม capture antibody เจือจางด้วย carbonate coating อัตรา 1:200 โดยหยอด capture antibody ในหลุม ELISA ปริมาตร 100 µl ต่อหลุม

2 บ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง หรือ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

3 ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST 2 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

4 ทำการหยอดเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่างๆ รวมถึง negative control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5 ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST มากกว่า 2 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

6 ทำการเตรียมสาร alkaline phosphatase enzyme conjugate เจือจางด้วย RUB3 buffer อัตรา 1:200 โดยหยอดหลุมละ 100 µl (ควรเตรียม 10 นาที ก่อนใช้งาน) แล้วบ่มจานหลุมในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

7 ทำการล้างจานหลุมด้วย 1x PBST 7 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายให้เคาะจานหลุมกับกระดาษให้แห้ง

8 ทำการเตรียมสาร PNP tablet จำนวน 1 เม็ด เจือจางด้วย PNP buffer ปริมาตร 5 ml. โดยเก็บสารละลายไว้ในที่มืด แล้วจึงหยอดสาร PNP solution หลุมละ 100 µl แล้วบ่มจานหลุมในอุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวัดเครื่องอ่านอิไลซ่า ที่ความยาวคลื่น 405 (OD405) และทำการ

4.6 ตรวจและจำแนกชนิดไวรัส Turnip mosaic virus ที่ติดมากับเมล็ดด้วยวิธี ELISA โดยตรวจจากเมล็ดโดยตรงหรือตรวจจากต้นกล้าตามวิธีการที่เหมาะสมกับไวรัสแต่ละชนิด

กรมวิชาการเกษตร

5. เพาะเมล็ดพันธุ์ 25-50 เมล็ดต่อถุง และเก็บถุงเพาะที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เมื่อต้นกล้าเริ่มออกใบจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนพืช โดยสังเกตดูลักษณะอาการบริเวณโคนต้น ลำต้น ใบเลี้ยง และใบของต้นพืช บันทึกผล กรณีถ้าพบอาการผิดปกติให้นำส่วนของพืชไปทำการแยกเชื้อและจำแนกชนิด

6. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงผลิตหรือในโรงเรือนเพาะเมล็ดของบริษัทที่นำเข้า

7. จัดทำรายชื่อศัตรูที่ตรวจพบและสรุปผล

การบันทึกข้อมูล

1. ชนิดและลักษณะของศัตรูพืชที่ตรวจพบ

2. ภาพของศัตรูพืช และลักษณะอาการพืชที่ถูกทำลาย และเก็บตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

ระยะเวลาดำเนินการ

เริ่มงานวิจัย ตุลาคม 2562 ถึง กันยายน 2564

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มวิจัยกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. ด่านตรวจพืช เช่น ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ท่าเรือกรุงเทพ ไปรษณีย์ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

3. แปลงปลูกคะน้าของบริษัทหรือเกษตรกร ในจังหวัด ราชบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี กาญจนบุรี เพชรบูรณ์ ตาก น่าน แพร่ ลำปางลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย

การทดลองที่ 1.13 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งนำเข้าจากประเทศนิวซีแลนด์และสาธารณรัฐประชาชนจีน (2562 – 2563)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ และวารสาร
2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติค มาร์กเกอร์ คัตเตอร์ หลาว
3. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ชุดตรวจสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ ตู้บ่มเชื้อ
4. โรงเรือนปลูกพืชทดสอบ
5. พืชทดสอบ เช่น ต้นยาสูบ ต้นมะเขือเทศ

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

มีขั้นตอนและวิธีในดำเนินการการวิจัยดังต่อไปนี้

1. การสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชเป้าหมาย เช่น ชีววิทยา วิธีการตรวจศัตรูพืชในเมล็ดพันธุ์ และวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

กรมวิชาการเกษตร

2. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากด่านตรวจพืช ตามมาตรฐาน International Seed Testing Association (ISTA, 2018) ปริมาณเมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งที่ใช้สำหรับตรวจสอบศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ น้ำหนัก 70 กรัม โดยสุ่มตามวิธีการดังนี้

2.1 การสุ่มตัวอย่างที่บรรจุอยู่ในกระสอบ หรือภาชนะอื่นๆ ที่มีขนาดบรรจุของภาชนะแต่ละใบเท่าๆกัน โดยมีน้ำหนักของเมล็ดพันธุ์จำนวน 15 กิโลกรัม ถึง 100 กิโลกรัม

2.1.1 เมล็ดพันธุ์จำนวน 1 – 4 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 3 ตัวอย่างขั้นต้น จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.2 เมล็ดพันธุ์จำนวน 5 – 8 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 2 ตัวอย่างขั้นต้น จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.3 เมล็ดพันธุ์จำนวน 9 – 15 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 1 ตัวอย่างขั้นต้น จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.4 เมล็ดพันธุ์จำนวน 16 – 30 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 15 ตัวอย่างขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.5 เมล็ดพันธุ์จำนวน 31 – 59 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 20 ตัวอย่าง ขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.6 เมล็ดพันธุ์จำนวนมากกว่าหรือเท่ากับ 60 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 30 ตัวอย่างขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

3. การตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ ด้วยตาเปล่า สังเกตลักษณะสี ผิว และรูปร่างว่ามีอะไรผิดปกติหรือไม่ มีรอยเจาะ หรือแตกกระเทาะของเมล็ดพันธุ์หรือไม่ และจึงนำเมล็ดพันธุ์ที่สุ่มได้นำไปตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

4. การตรวจศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

4.1 ตรวจสอบและจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชขั้นละเอียด เช่น *Chenopodium album*, *Cirsium arvense*, *Polygonum aviculare*, *Rumex acetosella*, *Phalaris minor*, *Emex spinosa* และ *Spergula arvensis* โดยทำการคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพได้แก่ เมล็ดพืชบริสุทธิ์ เมล็ดพืชอื่น และสิ่งเจือปน นำแต่ละส่วนมาชั่งหาน้ำหนัก แล้วนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชที่ตรวจพบโดย

4.1.1 ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) เพื่อศึกษาและบันทึกลักษณะภายนอกของเมล็ด เช่น สี ผิว รูปร่างและลายบนผิวของเมล็ด วัดขนาดความกว้าง ยาวของเมล็ด

4.1.2 เปรียบเทียบกับตัวอย่างเมล็ดวัชพืชในพิพิธภัณฑ์และใช้คู่มือจำแนกเมล็ดพืช

4.1.3 จำแนกโดยปลูกดูลักษณะต่างๆตั้งแต่เริ่มงอกเป็นต้นกล้า ลักษณะใบ ดอก ผล

4.2 จำแนกกลุ่มของแมลงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)

4.3 จัดเตรียมตัวอย่างแมลงและไร โดย

4.3.1 นำตัวอย่างแมลงที่เก็บรวบรวมได้มาจัดรูปร่าง (set) บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) ตัวอย่างแมลง โดยใช้เข็มไร้สนิมปักบริเวณด้านหน้าตรงมุมของปีกขวา (บริเวณมุมที่ปีกจรดกัน) ใช้ปากคีบจัดขาทั้งสามคู่ให้อยู่ในลักษณะเกาะหรือเดินโดยใช้เข็มหมุดขนาดกลางเป็นตัวยึด ตัวเต็มวัยขนาด เช่น เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด และด้วงที่มีขนาดเล็กให้ติดลงบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและ

กรมวิชาการเกษตร

ด้านข้าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 – 60 วัน ขึ้นกับขนาดของแมลง

4.3.2 ทำสไลด์ถาวร แมลงจำพวกปากดูดที่มีขนาดเล็กเช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้ง และเพลี้ยหอย ต้องนำมาทำสไลด์ถาวร และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เพื่อจำแนกชนิด

4.3.3 ไร ทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope)หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน โดยจัดท่าทางของไรให้อยู่ในท่าคว่ำและท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่างๆที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย cover glass ใช้ปากกาเขียนแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ cover glass ด้วยน้ำยา ทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บและพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

4.4 ตรวจเชื้อรา เช่น *Verticillium dahlia* และ *Botryotinia fuckeliana* ด้วยวิธี Blotter method (Mathur and Kongdal, 2003) โดยการนำเมล็ดที่วางไว้ในภาชนะให้ความชื้นไปวางใต้แสง near ultra violet (NUV) โดยให้แสงสลับกับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน และตรวจจำแนกชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) และกำลังขยายสูงต่อไป

4.5 ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ เชื้อ *Pseudomonas cichorii* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยวิธี Dilution plate method ตรวจสอบและจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา เช่น Enzyme – linked Immunosorbent Assay (ELISA)

4.6 ตรวจและจำแนกชนิดไวรัส เช่น *Turnip mosaic virus*, *Beet western yellows virus*, *Broad bean wilt virus*, *Turnip ringspot virus* ที่ติดมากับเมล็ดด้วยวิธี ELISA โดยตรวจจากเมล็ดโดยตรงหรือตรวจจากต้นกล้าตามวิธีการที่เหมาะสมกับไวรัสแต่ละชนิด

5. เพาะเมล็ดพันธุ์ เพื่อสังเกตลักษณะอาการผิดปกติของต้นพืชในโรงเรือนของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช โดยสังเกตดูลักษณะอาการบริเวณโคนต้น ลำต้น ใบเลี้ยง และใบ ของต้นพืช บันทึกผล กรณีถ้าพบอาการผิดปกติให้นำส่วนของพืชไปทำการแยกเชื้อและจำแนกชนิด

6. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงผลิตหรือในโรงเรือนเพาะเมล็ดของบริษัทที่นำเข้า

7. จัดทำรายชื่อศัตรูที่ตรวจพบและสรุปผล

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกชนิดและลักษณะของศัตรูพืชที่ตรวจพบ

2. บันทึกภาพของศัตรูพืช และลักษณะอาการพืชที่ถูกทำลาย และเก็บตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

กรมวิชาการเกษตร

1. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. ด่านตรวจพืช เช่น ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ด่านตรวจพืชไปรษณีย์ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

3. แปลงปลูกของบริษัท ในจังหวัด เช่น ราชบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี กาญจนบุรี นครราชสีมา เพชรบูรณ์ ตาก แพร่ น่าน ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย

การทดลองที่ 1.14 การตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้า (2562 – 2563)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ และวารสาร
2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติค มาร์กเกอร์ คัตเตอร์ หลาว
3. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ชุดตรวจสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ ตู้บ่มเชื้อ
4. โรงเรือนปลูกพืชทดสอบ
5. พืชทดสอบ เช่น ต้นยาสูบ ต้นมะเขือเทศ

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

มีขั้นตอนและวิธีในดำเนินการการวิจัยดังต่อไปนี้

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไฟโตพลาสมาและวิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์

2. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากด่านตรวจพืช ตามมาตรฐาน International Seed Testing Association (ISTA, 2018) ปริมาณเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้สำหรับตรวจสอบศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ น้ำหนัก 15 กรัม โดยสุ่มตามวิธีการดังนี้

2.1 การสุ่มตัวอย่างที่บรรจุอยู่ในกระสอบ หรือภาชนะอื่นๆ ที่มีขนาดบรรจุของภาชนะแต่ละใบเท่าๆกัน โดยมีน้ำหนักของเมล็ดพันธุ์จำนวน 15 กิโลกรัม ถึง 100 กิโลกรัม

2.1.1 เมล็ดพันธุ์จำนวน 1 – 4 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 3 ตัวอย่างขั้นต้น จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.2 เมล็ดพันธุ์จำนวน 5 – 8 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 2 ตัวอย่างขั้นต้น จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.3 เมล็ดพันธุ์จำนวน 9 – 15 ภาชนะบรรจุ สุ่ม 1 ตัวอย่างขั้นต้น จากแต่ละภาชนะบรรจุ

2.1.4 เมล็ดพันธุ์จำนวน 16 – 30 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 15 ตัวอย่างขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.5 เมล็ดพันธุ์จำนวน 31 – 59 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 20 ตัวอย่าง ขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.6 เมล็ดพันธุ์จำนวนมากกว่าหรือเท่ากับ 60 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 30 ตัวอย่างขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

กรมวิชาการเกษตร

หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างเมล็ดมะเขือเทศมาทำการตรวจสอบเบื้องต้น ด้วยตาเปล่า สังเกตลักษณะสี ผิว และรูปร่างของเมล็ด เช่น ขนาดเมล็ดเล็กกว่าปกติ บิดเบี้ยว สีเปลี่ยนไปจากปกติ พร้อมทั้งบันทึกข้อมูลต่าง ๆ และบันทึกภาพ จากนั้นทำการแบ่งเมล็ดพันธุ์แต่ละตัวอย่าง (แต่ละรายการของการนำเข้า) ออกเป็น 2 ส่วนดังนี้ เมล็ดพันธุ์ส่วนที่ 1 นำไปเพาะบนกระดาษกรอง เมื่อเมล็ดงอกและเริ่มมีใบจริง (ที่อายุประมาณ 7-15 วัน) จึงทำการเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบ โดยทำการสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และเมล็ดพันธุ์ส่วนที่ 2 นำมาสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ด และตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR

3. สกัดดีเอ็นเอ (Total DNA) ทั้งจากเมล็ดพันธุ์และต้นกล้า

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ (Total DNA) ทั้งจากเมล็ดพันธุ์โดยตรง และการสกัดดีเอ็นเอจากต้นกล้าโดยเพาะเมล็ดพันธุ์ เพื่อสังเกตลักษณะอาการผิดปกติของต้นพืชในโรงเรือนของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช โดยสังเกตดูลักษณะอาการบริเวณโคนต้น ลำต้น ใบเลี้ยง และใบ ของต้นพืช บันทึกผล กรณีถ้าพบอาการผิดปกติให้นำส่วนของพืชไปสกัดดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในห้องปฏิบัติการต่อไป

3.2 ขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอ มีดังนี้

นำตัวอย่าง (เมล็ดพันธุ์/ต้นกล้า) มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) โดยบดตัวอย่างร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์ AP1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ย้ายของเหลวที่ได้ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดใหม่นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยกลับหลอดทุก 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP2 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางบนน้ำแข็ง นาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นย้ายของเหลวใส่ลงในชุดคอลัมน์ (QIAshredder spin column) แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ย้ายของเหลวที่อยู่ด้านล่างคอลัมน์ใส่หลอดใหม่ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP3/E ปริมาตร 1.5 เท่าของของเหลวที่อยู่ในหลอดใหม่ ผสมให้เข้ากันจากนั้นย้ายใส่ในชุดคอลัมน์ DNeasy Mini spin column ปริมาตร 650 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลว จากนั้นเติมสารบัฟเฟอร์ AW ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลว เติมสารบัฟเฟอร์ AW ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์อีกครั้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลว จากนั้นปั่นเหวี่ยงคอลัมน์เปล่าอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้น ย้ายส่วนของคอลัมน์ใส่ลงให้หลอดใหม่ (ขนาด 1.5 ไมโครลิตร) เติมสารละลาย AE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บริเวณกึ่งกลางเมมเบรน (membrane) ภายในคอลัมน์ จากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที เก็บรักษาสารละลายกรดนิวคลีอิกที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส

4. การตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค PCR

4.1 การตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาเตรียมองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	7.5	ไมโครลิตร
บัฟเฟอร์ 2X reaction mix	10.0	ไมโครลิตร
10 uM Forward primer	1.0	ไมโครลิตร

กรมวิชาการเกษตร

10 uM Reverse primer	1.0	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอตัวอย่าง	0.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20.0	ไมโครลิตร

4.2 หลังจากนั้นใส่ลงในเครื่องพีซีอาร์ (DNA thermalcycler) เพื่อดำเนินปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนเป้าหมาย แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis และยืนยันผลในตัวอย่างที่ให้ผลบวก (positive) โดยการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำมาวิเคราะห์ผล เพื่อจัดจำแนกเชื้อโดยการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank

4.3 หากตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาจะนำไปทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1) โคลนยีนของเชื้อ

เตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์สำหรับการเชื่อมต่อพลาสมิดพาหะตามวิธี QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®) โดยนำดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR มาแยกขนาดด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีสบน 1% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer แยกดีเอ็นเอออกจากเจลโดยตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ ชั่งน้ำหนักเจลที่ตัดได้ใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม QG buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เขย่าทุก ๆ 5 นาที จนเจลละลาย ผสมให้เข้ากันดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน column นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง เติม QG buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนของเหลว จากนั้นล้าง column ด้วย PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนของเหลว และหมุนเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ย้าย column ใส่ลงหลอดใหม่ เพื่อชะดีเอ็นเอออกจาก column โดยเติม EB buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอ ด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีสบน 1% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer จากนั้นแช่ในสารละลาย ethidium bromide (0.5 mg/ml) นาน 10 นาที แล้วแช่น้ำ 10 นาที ก่อนนำไปตรวจดูภายใต้แสง UV และบันทึกภาพ

2) หลังจากนั้นทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์เข้าสู่พาหะ pGEM® - T Easy (Promega coporation) ตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิตในคู่มือ ดังนี้ เติม 2X T4 DNA ligase buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตามด้วย pGEM® - T Easy vector ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมผลผลิตของดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา RT-PCR ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเติม T4 DNA ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และสุดท้ายเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ครบปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หลังจากนั้นจึงทำการบรรจุพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี heat shock transformation โดยนำสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมปริมาตร 5 ไมโครลิตร กับเซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ DH5α (competent cell) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้นลงเบา ๆ แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจุ่มใน

กรมวิชาการเกษตร

น้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 5 นาที จากนั้นเติมอาหาร LB ปริมาตร 600 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในสภาพเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ จากนั้นทิ้งอาหารเหลวแล้วเติมอาหารเหลว LB ใหม่อีก 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมแอมพิซิลิน (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และเติมสารประกอบ X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosides) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใน Dimethylformamide ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopypanoside) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน (ประมาณ 16-18 ชั่วโมง) จากนั้นนำมาคัดเลือกหาเซลล์ที่มีดีเอ็นเอสายผสม โดยเลือกโคโลนีเดี่ยวสีขาวซึ่งคาดว่ามีดีเอ็นเอสายผสมและโคโลนีสีฟ้าซึ่งเป็นเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มีดีเอ็นเอสายผสมเพื่อใช้เปรียบเทียบขนาด โดยการใช้ไม้จิ้มฟันปลายแหลมที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วแตะที่โคโลนี แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมแอมพิซิลิน สำหรับเตรียมเป็น master plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

3) ทำการคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดสายผสม โดยสกัดพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์แบคทีเรีย *E.coli* ด้วยวิธี Boiling method เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโคโลนีสีขาวซึ่งคาดว่ามีดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) ในอาหารเหลว LB ที่เติมแอมพิซิลิน (1 mg/ml) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในสภาพเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นานข้ามคืน จากนั้นนำสารละลายเซลล์ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เทส่วนของอาหารเหลวทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยสาร STEL (0.1M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0, Triton X-100) ที่เติม lysozyme (1 mg/ml) ปริมาตร 110 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mix และเติมเพิ่มอีก 110 ไมโครลิตร จากนั้นทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกโดยการต้มด้วยน้ำร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แช่ในน้ำแข็งทันทีนาน 5 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยตะกอนเซลล์ซึ่งมีลักษณะเหนียว ๆ ออกให้หมด เติม RNase A ปริมาตร 2.2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตกตะกอนพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยการเติม isopropanol ปริมาตร 220 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนของเหลวทิ้งแล้วตากตะกอนให้แห้ง หลังจากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบพลาสมิดสายผสม เปรียบเทียบกับพลาสมิดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอสายผสม และพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสมที่ทราบขนาดแน่นอนด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีสบน 1% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ จากนั้นแช่ในสารละลาย ethidium bromide (0.5 mg/ml) นาน 10 นาที แล้วแช่น้ำ 10 นาที ก่อนนำไปตรวจดูแถบภายใต้แสง UV และบันทึกภาพ

4) ทำการตรวจสอบพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบทิศทางของ insert DNA และตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ โดยใช้พลาสมิดสายผสมเป็นต้นแบบ (template)

กรมวิชาการเกษตร

ในปฏิกิริยา PCR รวม 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย พลาสมิดสายผสมปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 1 ไมโครลิตร, 10mM dNTPs 0.2 ไมโครลิตร, 50mM $MgCl_2$ 0.8 ไมโครลิตร, forward primer และ reverse primer (ความเข้มข้น 10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase 0.2 ไมโครลิตร (2u/µl) และเติมน้ำให้ครบปฏิกิริยา จากนั้นนำไปไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (DNA thermal cycler) โดยกำหนดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้เพิ่มปริมาณมากขึ้นในแต่ละรอบ ดังนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เพื่อแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นสายเดี่ยว (denaturing) นาน 90 วินาที ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) และขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที เพื่อสังเคราะห์ cDNA ต่อจากไพรเมอร์ (extension) จำนวน 30 รอบ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการและปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีสบน 1% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ จากนั้นแช่ในสารละลาย ethidium bromide (0.5 mg/ml) นาน 10 นาที แล้วแช่น้ำ 10 นาที นำไปตรวจดูภายใต้แสง UV และบันทึกภาพ

4.4 วิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับเบส

นำแบคทีเรียที่คาดว่ามีชิ้นดีเอ็นเอสายผสมตามขนาดที่ต้องการแทรกอยู่มาเลี้ยงในหลอด ไมโครทิวป์ที่มีอาหารเหลว LB ผสมแอมพิซิลิน (100 mg/ml) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เลี้ยงในสภาพเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเมื่อได้รับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำมาทำการจัดการข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมจาก DNASTAR

5. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงผลิตหรือในโรงเรือนปลูกพืชของบริษัทนำเข้าเมล็ดพันธุ์

6. จัดทำรายชื่อศัตรูที่ตรวจพบและสรุปผล

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกลักษณะของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ตรวจพบ

2. บันทึกภาพของศัตรูพืช และลักษณะอาการพืชที่ถูกทำลาย และเก็บตัวอย่างเชื้อไฟโตพลาสมาเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มวิกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. ด่านตรวจพืช เช่น ด่านตรวจพืช ท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ท่าเรือกรุงเทพฯ ไปรษณีย์ ลาดกระบัง สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

3. แปลงปลูกของบริษัทและโรงเรือนเพาะเมล็ดของบริษัทที่นำเข้า ในจังหวัด เช่น จังหวัดขอนแก่นจังหวัดสกลนคร จังวัดอุดรธานี

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 2 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับพืชและผลิตผลพืชที่นำเข้าเพื่ออุปโภคหรือบริโภค

การทดลองที่ 2.1 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับผลแอปเปิลสดนำเข้าจากญี่ปุ่น (2559-2560)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ วารสาร และ ซีดีรอม CABI
2. อุปกรณ์ในการตรวจศัตรูพืช เช่น แว่นขยาย กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) และ compound microscope
3. อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง ได้แก่ เข็มไร้สนิม เข็มหมุดหัวกลม ไม้จัดรูปร่างแมลง ปากคีบโหลชื้น ตู้อบแมลง ฯลฯ
4. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ชุดตรวจสอบ
5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่สารเคมีต่างๆ เช่น AGA, sodium hydroxide, potassium hydroxide, alcohol, hydrochloric acid, glacial acetic acid, xylene, carbolic acid, acid fuchsin, N-butyl alcohol, clove oil และ canada balsam บีคเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร แผ่นสไลด์แก้วและแผ่นแก้วปิดสไลด์
6. กล้องถ่ายภาพ
7. ผลแอปเปิ้ลสดนำเข้า
8. คู่มือการจำแนกศัตรูพืช คู่มือการจำแนกโรคพืช

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

มีขั้นตอนและวิธีในดำเนินการการวิจัยดังต่อไปนี้

1. การสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชเป้าหมาย เช่น ชีววิทยา วิธีการตรวจ และวิธีการกำจัดศัตรูพืช (2559)

2. สุ่มตัวอย่างผลแอปเปิ้ล อย่างน้อย 20 ครั้ง (20 shipments) โดยวิธีการสุ่มดังนี้ (2559-2560)

- นำเข้าจำนวนน้อยกว่า 1,000 ผล สุ่มตัวอย่างจำนวน 450 ผลหรือพวง หรือทั้งหมด
- นำเข้าจำนวน 1,000 ผล หรือมากกว่า สุ่มตัวอย่างจำนวน 600 ผลหรือพวง (Whyte, 2009)

3. ตรวจหาศัตรูพืชเบื้องต้น ณ จุดนำเข้า โดยตรวจสอบด้วยตาเปล่า หรือใช้แว่นขยาย สังเกตลักษณะอาการผิดปกติ ที่อาจเกิดจากเชื้อสาเหตุโรคเช่น อาการเน่า แผลจุด รอยเจาะของแมลง ไข่ หรือตัวอ่อนของแมลง ไร และเมล็ดวัชพืชที่ติดมา โดยตรวจสอบภายนอกผลหรือผ่าดูภายในผล (2559-2560)

4. หากพบแมลง ไร หอย หรือวัชพืช จะตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) และกำลังขยายสูงต่อไป หลังจากนั้นถ่ายภาพ และบันทึกรายละเอียด ขนาด รูปร่างลักษณะ และสีของศัตรูพืช (2559-2560)

5. จำแนกกลุ่มของแมลงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) (2559-2560)

6. จัดเตรียมตัวอย่างแมลงและไรโดย (2559-2560)

6.1 นำตัวอย่างแมลงที่เก็บรวบรวมได้มาจัดรูปร่าง (set) บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) ตัวอย่างแมลง โดยใช้เข็มไร้สนิมปักบริเวณด้านหน้าตรงมุมของปีกขวา (บริเวณมุมที่ปีกจรดกัน) ใช้ปากคีบจัดขา

กรมวิชาการเกษตร

ทั้งสามคู่ให้อยู่ในลักษณะเกาะหรือเดินโดยใช้เข็มหมุดขนาดกลางเป็นตัวยึด ตัวเต็มวัยขนาด เช่น เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด และด้วงที่มีขนาดเล็กให้ติดลงบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 – 60 วัน ขึ้นกับขนาดของแมลง

6.2 นำตัวอย่างแมลงในกลุ่มปากดูด เช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้งและเพลี้ยหอย มาทำสไลด์ถาวรตามวิธีการของแมลงแต่ละชนิดโดยอ้างอิงวิธีการของ ศิริณี และ ลักขณา (2554) แล้วนำสไลด์ที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ประมาณ 1-2 เดือน นำตัวอย่างสไลด์ที่ได้ไปตรวจจำแนกชนิด บันทึกรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง บนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้ว

6.3 ทำสไลด์ถาวรไรศัตรูพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน โดยจัดท่าทางของไรให้อยู่ในท่าคว่ำและท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่างๆที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย coverglass ใช้ปากกาเขียนแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ covergrass ด้วยน้ำยา ทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บและพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

7. หากพบอาการผิดปกติที่อาจเกิดจากเชื้อสาเหตุโรคพืชจะนำมาจำแนกเชื้อสาเหตุจากชิ้นส่วนพืชใต้กล้องจุลทรรศน์ หรือแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อจำแนกชนิดต่อไป (2559-2560)

8. ติดตามตรวจสอบศัตรูพืชจากแหล่งกระจายสินค้า หรือแหล่งจำหน่ายสินค้า อย่างน้อย 10 ครั้ง โดยจัดซื้อผลแอปเปิ้ลมาตรวจสอบตามวิธีการข้อ 3-6 (2559-2560)

9. เตรียมตัวอย่างศัตรูพืชที่พบ เพื่อส่งจัดจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (2559 - 2560)

10. จัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบ และสรุปผลการศึกษา (2559 - 2560)

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกชนิดและลักษณะของศัตรูพืชที่ตรวจพบ

2. บันทึกภาพของศัตรูพืช และลักษณะอาการพืชที่ถูกทำลาย และเก็บตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. ด่านตรวจพืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตรที่มีการนำเข้าผลแอปเปิ้ลสดจากญี่ปุ่น
   - ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ
   - ด่านตรวจพืชท่าเรือแหลมฉบัง
   - ด่านตรวจพืชลาดกระบัง
   - ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ
2. ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กรมวิชาการเกษตร

- กลุ่มวิจัยการกักกันพืช
- กลุ่มวิจัยโรคพืช
- กลุ่มกีฏและสัตววิทยา

การทดลองที่ 2.2 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับกุหลาบตัดดอกนำเข้าจากจีน (2559-2560)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ วารสาร และ ซีดีรอม CABI
2. อุปกรณ์ในการตรวจศัตรูพืช เช่น แว่นขยาย กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) และ compound microscope
3. อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง ได้แก่ เข็มไร้สนิม เข็มหมุดหัวกลม ไม้จัดรูปร่างแมลง ปากคีบ โหลชื้น ตู้อบแมลง ฯลฯ
4. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ชุดตรวจสอบ
5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่สารเคมีต่างๆ เช่น AGA, sodium hydroxide, potassium hydroxide, alcohol, hydrochloric acid, glacial acetic acid, xylene, carbolic acid, acid fuchsin, N-butyl alcohol, clove oil และ canada balsam บีคเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร แผ่นสไลด์แก้วและแผ่นแก้วปิดสไลด์
6. กล้องถ่ายภาพ
7. กุหลาบตัดดอกนำเข้า
8. คู่มือการจำแนกแมลงศัตรูพืช คู่มือไม้ดอกไม้ประดับ คู่มือการจำแนกโรคพืช

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

มีขั้นตอนและวิธีในดำเนินการการวิจัยดังต่อไปนี้

1. สืบค้นข้อมูลศัตรูพืชเป้าหมาย เช่น ชีววิทยา วิธีการตรวจและวิธีการกำจัด (2559-2560)
2. สุ่มตัวอย่างไม้ตัดดอกนำเข้าจากจีน (2559-2560)

ทำการสุ่มตัวอย่างไม้ตัดดอกนำเข้าจากจีน เพื่อตรวจสอบศัตรูพืชและการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืช โดยใช้เกณฑ์การสุ่มตัวอย่าง ดังนี้

ถ้าไม้ตัดดอกมีจำนวน 1- 5 กล่องตรวจทุกดอก

5-10 กล่อง ตรวจ 50% แต่ไม่น้อยกว่า 5 กล่อง ตรวจทุกดอก

11-20 กล่อง ตรวจอย่างน้อย 40% แต่ไม่น้อยกว่า 8 กล่อง ตรวจทุกดอก

มากกว่า 20 กล่อง ตรวจ 30% แต่ไม่น้อยกว่า 8 กล่อง ตรวจทุกดอก (Anonymous, 1968)

3. ตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยตรวจสอบไม้ตัดดอกด้วยตาเปล่า แว่นขยาย สังเกตลักษณะ สี ผิว และรูปร่างว่ามีอะไรผิดปกติหรือไม่ มีรอยเจาะ หรือร่องการทำลายของไร และแมลงหรือไม่ มีเมล็ดวัชพืชหรือสิ่งเจือปนอื่นๆ หรือไม่ และจึงนำไม้ตัดดอกที่สุ่มได้นำไปตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ (2559-2560)

กรมวิชาการเกษตร

4. ตรวจสอบและจำแนกชนิดศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ เช่นเชื้อรา ตรวจด้วยวิธี Moist chamber แยกเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราโดยวิธี tissue transplanting (2559-2560)

บันทึกรายละเอียดของโรค แมลงและไรศัตรูพืชที่ตรวจพบภายใต้แว่นขยาย กล้องสเตอริโอ และกล้องจุลทรรศน์ รวมทั้งข้อมูลอื่นๆ ได้แก่ พบบนส่วนใดของพืช ลักษณะการทำลาย วัน เดือน ปี สถานที่เก็บ พร้อมการถ่ายภาพ

5. จำแนกกลุ่มของแมลงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) (2559-2560)

6. จัดเตรียมตัวอย่างแมลงและไรศัตรูพืช (2559-2560)

ทำการจัดเตรียมตัวอย่างแมลงและไรศัตรูพืช โดยขั้นตอนดังต่อไปนี้

6.1 นำตัวอย่างแมลงที่เก็บรวบรวมได้มาจัดรูปร่าง (set) บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) ตัวอย่างแมลงโดยใช้เข็มไร้สนิมปักบริเวณด้านหน้าตรงมุมของปีกขวา (บริเวณมุมที่ปีกจรดกัน) ใช้ปากคีบจัดขาทั้งสามคู่ให้อยู่ในลักษณะเกาะหรือเดินโดยใช้เข็มหมุดขนาดกลางเป็นตัวยึด ตัวเต็มวัยขนาด เช่น เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด และด้วงที่มีขนาดเล็กให้ติดลงบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 – 60 วัน ขึ้นกับขนาดของแมลง

6.2 นำตัวอย่างแมลงในกลุ่มปากดูด เช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้งและเพลี้ยหอย มาทำสไลด์ถาวรตามวิธีการของแมลงแต่ละชนิดโดยอ้างอิงวิธีการของ ศิริณี และ ลักขณา (2554) แล้วนำสไลด์ที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 - 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 - 2 เดือน นำตัวอย่างสไลด์ที่ได้ไปตรวจจำแนกชนิด บันทึกรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง บนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้ว

6.3 ทำสไลด์ถาวรไรศัตรูพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน โดยจัดท่าทางของไรให้อยู่ในท่าคว่ำและท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่างๆที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย coverglass ใช้ปากกาเขียนแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ covergrass ด้วยน้ำยา ทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บและพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

7. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้าในแหล่งจัดจำหน่าย (2559-2560)

8. จัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบและสรุปผลการศึกษา (2559-2560)

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกชนิดและลักษณะของศัตรูพืชที่ตรวจพบ

2. บันทึกภาพศัตรูพืช อาการที่พบที่เกิดจากการเข้าทำลายจากเชื้อโรคและศัตรูพืช และเก็บตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. ด่านตรวจพืชเชียงของ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

2. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 2.3 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับผลองุ่นสดนำเข้าจากจีน (2561-2562)

กรมวิชาการเกษตร

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ และวารสาร
2. อุปกรณ์ในการตรวจศัตรูพืช เช่น แว่นขยาย กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope
3. อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง ได้แก่ เข็มไร้สนิม เข็มหมุดหัวกลม ไม้จัดรูปร่างแมลง ปากคีบ โหลชี้น ตู้อบแมลง ฯลฯ
4. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ชุดตรวจสอบ
5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่สารเคมีต่างๆ เช่น AGA, sodium hydroxide, potassium hydroxide, alcohol, hydrochloric acid, glacial acetic acid, xylene, carbolic acid, acid fuchsin, N-butyl alcohol, clove oil และ canada balsam
บีคเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร แผ่นสไลด์แก้วและแผ่นแก้วปิดสไลด์
6. กล้องถ่ายภาพ
7. ผลองุ่นนำเข้า
8. คู่มือการจำแนกศัตรูพืช

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

มีขั้นตอนและวิธีในดำเนินการการวิจัยดังต่อไปนี้

1. การสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชเป้าหมาย เช่น ชีววิทยา วิธีการตรวจ และวิธีการกำจัดศัตรูพืช

2. สุ่มตัวอย่างผลองุ่นสดจากด่านตรวจพืช โดยทำการสุ่มตัวอย่างพวงองุ่น อย่างน้อย 20 ครั้ง (20 shipments) โดยวิธีการสุ่มตามมาตรฐานของ Whyte (2009) ดังนี้

- นำเข้าจำนวนน้อยกว่า 1,000 พวง สุ่มตัวอย่างจำนวน 450 พวง หรือทั้งหมด
- นำเข้าจำนวน 1,000 พวง หรือมากกว่า สุ่มตัวอย่างจำนวน 600 พวง

3. การตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยตรวจสอบด้วยตาเปล่า หรือใช้แว่นขยาย สังเกตลักษณะอาการผิดปกติ ที่อาจเกิดจากเชื้อสาเหตุโรค เช่น อาการเน่า แผลจุด รอยเจาะของแมลง ไข่ หรือตัวอ่อนของแมลง ไร และเมล็ดวัชพืชที่ติดมา โดยตรวจสอบภายนอกผลหรือผ่าดูภายในผล

4. หากพบแมลง ไร หอย หรือวัชพืช จะตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) และสูงถ่ายภาพ และบันทึกรายละเอียด ขนาด รูปร่างลักษณะ และสีของศัตรูพืช

5. จำแนกกลุ่มของแมลงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)

6. จัดเตรียมตัวอย่างแมลง และไร

6.1 นำตัวอย่างแมลงที่เก็บรวบรวมได้มาจัดรูปร่าง (set) บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) ตัวอย่างแมลง โดยใช้เข็มไร้สนิมปักบริเวณด้านหน้าตรงมุมของปีกขวา (บริเวณมุมที่ปีกจรดกัน) ใช้ปากคีบจัดขาทั้งสามคู่ให้อยู่ในลักษณะเกาะหรือเดินโดยใช้เข็มหมุดขนาดกลางเป็นตัวยึด ตัวเต็มวัยขนาด เช่น เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด และด้วงที่มีขนาดเล็กให้ติดลงบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและ

กรมวิชาการเกษตร

ด้านข้าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 – 60 วัน ขึ้นกับขนาดของแมลง

6.2 นำตัวอย่างแมลงในกลุ่มปากดูด เช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้งและเพลี้ยหอย มาทำสไลด์ถาวรตามวิธีการของแมลงแต่ละชนิดโดยอ้างอิงวิธีการของ ศิริณี และ ลักขณา (2554) แล้วนำสไลด์ที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ประมาณ 1-2 เดือน นำตัวอย่างสไลด์ที่ได้ไปตรวจจำแนกชนิด บันทึกรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง บนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้ว

6.3 ทำสไลด์ถาวรไรศัตรูพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน โดยจัดท่าทางของไรให้อยู่ในท่าคว่ำและท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่างๆที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย cover glass ใช้ปากกาเขียนแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ cover glass ด้วยน้ำยาทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บและพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

7. หากพบอาการผิดปกติที่อาจเกิดจากเชื้อสาเหตุโรคพืชจะนำมาจำแนกเชื้อสาเหตุจากชิ้นส่วนพืชใต้กล้องจุลทรรศน์ หรือแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อจำแนกชนิดต่อไป

8. ติดตามตรวจสอบศัตรูพืชจากแหล่งกระจายสินค้า หรือแหล่งจำหน่ายสินค้า อย่างน้อย 10 ครั้ง โดยจัดซื้อผลอ่อนมาตรวจสอบตามวิธีการข้อ 3-6

9. เตรียมตัวอย่างศัตรูพืชที่พบ เพื่อส่งจัดจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

10. จัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบ และสรุปผลการศึกษา

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกชนิดและลักษณะของศัตรูพืชที่ตรวจพบ

2. บันทึกภาพของศัตรูพืช ลักษณะอาการพืชที่ถูกทำลายและเก็บตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

สถานที่ทำการทดลอง/ เก็บข้อมูล

1. ด่านตรวจพืชเชียงของ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตรที่มีการนำเข้าผลอ่อนสดจากจีน

2. ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

- กลุ่มวิจัยการกักกันพืช
- กลุ่มวิจัยโรคพืช
- กลุ่มกีฏและสัตววิทยา

การทดลองที่ 2.4 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับกุหลาบตัดดอกนำเข้าจากเนเธอร์แลนด์ (2563-2564)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ วารสาร และ ซีดีรอม CABI

2. อุปกรณ์ในการตรวจศัตรูพืช เช่น แว่นขยาย กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ

กรมวิชาการเกษตร

compound microscope

3. อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง ได้แก่ เข็มไร้สนิม เข็มหมุดหัวกลม ไม้จัดรูปร่างแมลง ปากคีบ โหลชั้น ตู้อบแมลง ฯลฯ
4. สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ ชุดตรวจสอบ
5. กุหลาบตัดดอกนำเข้า

วิธีปฏิบัติการทดลอง

มีขั้นตอนและวิธีในดำเนินการการวิจัยดังต่อไปนี้

1. สืบค้นข้อมูลศัตรูพืชเป้าหมาย เช่น ชีววิทยา วิธีการตรวจและวิธีการกำจัด (2563)
2. สุ่มตัวอย่างกุหลาบตัดดอกนำเข้าจากเนเธอร์แลนด์ (2563-2564)

สุ่มตัวอย่างกุหลาบตัดดอกนำเข้าจากจีน เพื่อตรวจสอบศัตรูพืช โดยใช้มาตรฐาน ISPM No.31 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนี้

จำนวนดอกที่นำเข้า	จำนวนดอกที่สุ่ม
100	45
200	51
300	54
400	55
500 –600	56
700 – 1,000	57
2,000 – 4,000	58
มากกว่า 5,000	59

3. ตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยตรวจสอบกุหลาบตัดดอกด้วยตาเปล่า แว่นขยาย สังเกตลักษณะ สี ผิว และรูปร่างว่ามีอะไรผิดปกติหรือไม่ มีรอยเจาะ หรือร่องการทำลายของไร และแมลงหรือไม่ มีเมล็ดวัชพืชหรือสิ่งเจือปนอื่นๆหรือไม่ และจึงนำไม้ตัดดอกที่สุ่มได้นำไปตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ
4. ตรวจสอบและจำแนกชนิดศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ เช่นเชื้อรา Leveillula taurica, Phytophthora cryptogea ตรวจด้วยวิธี Moist chamber แบคทีเรีย Pseudomonas cichorii และแยกเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราโดยวิธี tissue transplanting บันทึกรายละเอียดของโรค แมลงและไรศัตรูพืชที่ตรวจพบภายใต้แว่นขยาย กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) และกล้องจุลทรรศน์ รวมทั้งข้อมูลอื่นๆ ได้แก่ พบบนส่วนใดของพืช ลักษณะการทำลาย วัน เดือน ปี สถานที่เก็บ พร้อมการถ่ายภาพ
5. จำแนกกลุ่มของแมลงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)
6. จัดเตรียมตัวอย่างแมลงและไรศัตรูพืช

ทำการจัดเตรียมตัวอย่างแมลงและไรศัตรูพืช โดยขั้นตอนดังต่อไปนี้

6.1 นำตัวอย่างแมลงที่เก็บรวบรวมได้มาจัดรูปร่าง (set) บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) ตัวอย่างแมลง โดยใช้เข็มไร้สนิมปักบริเวณด้านหน้าตรงมุมของปีกขวา (บริเวณมุมที่ปีกจรดกัน) ใช้ปากคีบจัดขาทั้งสามคู่ให้อยู่ใน

กรมวิชาการเกษตร

ลักษณะเกาะหรือเดินโดยใช้เข็มหมุดขนาดกลางเป็นตัวยึด ตัวเต็มวัยขนาด เช่น เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด และด้วงที่มีขนาดเล็กให้ติดลงบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 – 60 วัน ขึ้นกับขนาดของแมลง

6.2 นำตัวอย่างแมลงในกลุ่มปากดูด เช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้งและเพลี้ยหอย มาทำสไลด์ถาวรตามวิธีการของแมลงแต่ละชนิดโดยอ้างอิงวิธีการของ ศิริณี และ ลักขณา (2554) แล้วนำสไลด์ที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ประมาณ 1-2 เดือน นำตัวอย่างสไลด์ที่ได้ไปตรวจจำแนกชนิด บันทึกรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง บนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้ว

6.3 ทำสไลด์ถาวรไรศัตรูพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน โดยจัดท่าทางของไรให้อยู่ในท่าคว่ำและท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่างๆที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย coverglass ใช้ปากกาเขียนแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ covergrass ด้วยน้ำยา ทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บและพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

7. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้าในแหล่งจัดจำหน่าย

8. จัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบและสรุปผลการศึกษา

การบันทึกข้อมูล

1. ชนิดและลักษณะของศัตรูพืชที่ตรวจพบ

2. ภาพศัตรูพืช อาการที่พบที่เกิดจากการเข้าทำลายจากเชื้อโรคและศัตรูพืช และเก็บตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

ระยะเวลาดำเนินการ

เริ่มงานวิจัย ตุลาคม 2562 ถึง กันยายน 2564

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. ด่านตรวจพืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

- ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานภูเก็ต

2. ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

- กลุ่มวิจัยการกักกันพืช

- กลุ่มวิจัยโรคพืช

- กลุ่มกีฏและสัตววิทยา

3. แหล่งจำหน่าย จังหวัดภูเก็ต

การทดลองที่ 2.5 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับผลมังคุดสดจากสาธารณรัฐอินโดนีเซีย (2561-2562)

(ยกเลิกงานวิจัย เนื่องจากไทยยกเลิกการนำเข้าผลมังคุดสด)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ และวารสาร

2. อุปกรณ์ในการตรวจศัตรูพืช เช่น แว่นขยาย กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope

3. อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง ได้แก่ เข็มไร้สนิม เข็มหมุดหัวกลม ไม้จัดรูปร่างแมลง ปากคีบ โหลชี้น ตู้อบแมลง ฯลฯ

4. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ชุดตรวจสอบ

5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่สารเคมีต่างๆ เช่น AGA, sodium hydroxide, potassium hydroxide, alcohol, hydrochloric acid, glacial acetic acid, xylene, carbolic acid, acid fuchsin, N-butyl alcohol, clove oil และ canada balsam บีคเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร แผ่นสไลด์แก้วและแผ่นแก้วปิดสไลด์

6. กล้องถ่ายภาพ

7. ผลมังคุดนำเข้า

8. คู่มือการจำแนกศัตรูพืช

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

มีขั้นตอนและวิธีในดำเนินการการวิจัยดังต่อไปนี้

1. การสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชเป้าหมาย เช่น ชีววิทยา วิธีการตรวจ และวิธีการกำจัดศัตรูพืช

2. สุ่มตัวอย่างผลมังคุดสดจากด่านตรวจพืช โดยทำการสุ่มตัวอย่างผลมังคุดสด อย่างน้อย 20 ครั้ง (20 shipments) โดยวิธีการสุ่มตามมาตรฐานของ Whyte (2009) ดังนี้

- นำเข้าจำนวนน้อยกว่า 1,000 ผล สุ่มตัวอย่างจำนวน 450 ผล หรือทั้งหมด
- นำเข้าจำนวน 1,000 ผล หรือมากกว่า สุ่มตัวอย่างจำนวน 600 ผล

3. การตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยตรวจสอบด้วยตาเปล่า หรือใช้แว่นขยาย สังเกตลักษณะอาการผิดปกติ ที่อาจเกิดจากเชื้อสาเหตุโรค เช่น อาการเน่า แผลจุด รอยเจาะของแมลง ไข่ หรือตัวอ่อนของแมลง ไร และเมล็ดวัชพืชที่ติดมา โดยตรวจสอบภายนอกผลหรือผ่าดูภายในผล

4. หากพบแมลง ไร หอย หรือวัชพืช จะตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและสูงถ่ายภาพและบันทึกรายละเอียด ขนาด รูปร่างลักษณะ และสีของศัตรูพืช

5. จำแนกกลุ่มของแมลงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

6. จัดเตรียมตัวอย่างแมลงและไรโดย

6.1 นำตัวอย่างแมลงที่เก็บรวบรวมได้มาจัดรูปร่าง (set) บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) ตัวอย่างแมลง โดยใช้เข็มไร้สนิมปักบริเวณด้านหน้าตรงมุมของปีกขวา (บริเวณมุมที่ปีกจรดกัน) ใช้ปากคีบจัดขาทั้งสามคู่ให้อยู่ในลักษณะเกาะหรือเดินโดยใช้เข็มหมุดขนาดกลางเป็นตัวยึด ตัวเต็มวัยขนาด เช่น เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด และด้วงที่มีขนาดเล็กให้ติดลงบนกระดาษรูปสามเหลี่ยมขนาดเล็ก จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 – 60 วัน ขึ้นกับขนาดของแมลง

กรมวิชาการเกษตร

6.2 นำตัวอย่างแมลงในกลุ่มปากดูด เช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้งและเพลี้ยหอย มาทำสไลด์ถาวรตามวิธีการของแมลงแต่ละชนิดโดยอ้างอิงวิธีการของ ศิริณี และ ลักขณา (2554) แล้วนำสไลด์ที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ประมาณ 1-2 เดือน นำตัวอย่างสไลด์ที่ได้ไปตรวจจำแนกชนิด บันทึกรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง บนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้ว

6.3 ทำสไลด์ถาวรไรศัตรูพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo microscope หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน โดยจัดท่าทางของไรให้อยู่ในท่าคว่ำและท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่างๆที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย cover glass ใช้ปากกาเขียวแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ cover glass ด้วยน้ำยาทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บและพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

7. หากพบอาการผิดปกติที่อาจเกิดจากเชื้อสาเหตุโรคพืชจะนำมาจำแนกเชื้อสาเหตุจากชิ้นส่วนพืชใต้กล้องจุลทรรศน์ หรือแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อจำแนกชนิดต่อไป

7.1 การตรวจตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา

7.1.1 ตรวจดูลักษณะอาการของโรค

เมื่อเชื้อราเข้าทำลายพืช ก็จะมีการสร้างส่วนเจริญ และส่วนขยายพันธุ์บนพืช ซึ่งสามารถตรวจดูได้ด้วยตาเปล่า หรือใช้แว่นขยาย และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope

7.1.2 การตรวจหาสาเหตุของโรค

ใช้เข็มเขี่ยส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อ ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้เลย หรือตัดชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคให้บาง ๆ (section) และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope

7.1.3 การบ่มส่วนที่เป็นโรค (incubation)

นำใบพืชที่เป็นโรควางบนกระดาษกรองและเติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ลงบนกระดาษ เพื่อให้ความชื้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28$\pm$2 องศาเซลเซียส นาน 1-3 วัน และตรวจดูลักษณะของเชื้อราที่เจริญบนแผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และนำไปเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound

7.1.4 การเตรียมสไลด์ เพื่อตรวจดูเชื้อรา

- การเตรียมสไลด์ชั่วคราว เตรียมโดยวางชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคจากการ section หรือส่วนของเชื้อราที่เขี่ยออกมา ลงบน mounting medium หรือหยดน้ำบนสไลด์ แล้วปิดทับด้วย cover slips นำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์

- การเตรียมสไลด์ถาวร ปฏิบัติเช่นเดียวกันแต่ใช้ lactophenol หรือ Shear's solution หรือย้อมสีด้วย cotton blue, acid fushcin และ seal cover slip ด้วยยาทาเล็บ จะสามารถเก็บไว้ศึกษาได้นานหลายเดือน

กรมวิชาการเกษตร

7.1.5 การแยกเชื้อราจากชิ้นส่วนผลมังคุด (Tissue transplanting)

ตัดชิ้นส่วนผลมังคุดที่คาบเกี่ยวกันระหว่างส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติขนาด 3x3 มิลลิเมตร แช่ลงใน clorox 10% นาน 3-5 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวรอบนอก และนำมาซับด้วยกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้แห้งสนิท และวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ และจะต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ด้วยอุณหภูมิและความดันไอน้ำที่แน่นอน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ potato dextrose agar (PDA), ½ potato dextrose agar, corn meal agar (CMA), malt extract agar (MEA), carrot agar (CA), V-8 juice agar (V-8), water agar (WA) และ selective media ได้แก่ RNV, BNPRV และบางชนิดอาจจะเติมสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย หลังจากวางชิ้นส่วนพืชลงบนอาหารแล้ว บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส นาน 1-5 วัน แล้วแต่ชนิดของเชื้อ เมื่อเส้นใยเจริญออกมา ให้ตัดปลายเส้นใยของเชื้อราเจริญออกมาจากชิ้นส่วนพืช และเลี้ยงบนอาหาร แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และนำไปจำแนกชนิดของเชื้อราต่อไป โดยเขี่ยเส้นใยลงบน mounting medium หรือหยดน้ำบนสไลด์ แล้วปิดทับด้วย cover slips นำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์

7.1.6 การชักนำให้เชื้อราสร้างสปอร์

เชื้อราบางชนิดสร้างแต่เส้นใย ทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ ดังนั้นจะต้องชักนำให้เชื้อราสร้างสปอร์ โดยวางไว้ภายใต้แสง ultraviolet หรือเลี้ยงบนอาหาร CMA หรือ WA เป็นต้น

7.1.7 การจำแนกชนิดของเชื้อรา

โดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ได้แก่ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ลักษณะเส้นใยเป็น non septate หรือ septate ลักษณะของส่วนขยายพันธุ์ สีเส้นใย สีสปอร์ และจำแนกชนิดโดยใช้คู่มือ (Barnett and Hunter, 1998; Ellis, 1971;1993 ; Hanlin, 1990; 1998)

7.2 การตรวจตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

แยกจากส่วนของพืชที่มีอาการของโรค ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 4 ตร.มม. ระหว่างรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งแล้ว 3 ครั้ง หลังจาก surface sterilize แล้วนำมาบดในน้ำกลั่น ใช้ loop จุ่มในพืชที่บด นำมา streak บนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PSA (Potato Semisynthetic Agar) หลังจากนั้นเก็บจานเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง แล้วเก็บโคโลนี ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี streak plate หลาย ๆ ครั้ง เก็บ single colony เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และจำแนกลักษณะสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชตามคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์โดย

1) ศึกษาข้อมูลพื้นฐานของเชื้อ ศึกษาคุณสมบัติต่างๆทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อแบคทีเรีย (Schaad *et al*., 2001)

2) ทำการวิเคราะห์ด้วยระบบ Biolog system (Biolog, Itayward, Calif.) เพื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้คุณสมบัติการใช้ organic test substrates 95 ชนิด ของแต่ละชนิดเชื้อ เทียบกับฐานข้อมูลที่ได้มีการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียไว้เรียบร้อยแล้ว

ลิขสิทธิ์การเกษตร

8. ติดตามตรวจสอบศัตรูพืชจากแหล่งกระจายสินค้า หรือแหล่งจำหน่ายสินค้า โดยจัดซื้อผลมังคุดมาตรวจสอบ ตามวิธีการข้อ 3-6

9. เตรียมตัวอย่างศัตรูพืชที่พบ เพื่อส่งจัดจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

10. จัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบ และสรุปผลการศึกษา

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกชนิดและลักษณะของศัตรูพืชที่ตรวจพบ

2. บันทึกภาพของศัตรูพืช และลักษณะอาการพืชที่ถูกทำลาย และเก็บตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. ด่านตรวจพืช เช่น ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานดอนเมือง ด่านตรวจพืชแหลมฉบัง ด่านตรวจพืชสะเดาสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.6 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับผลแอปเปิลสดนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน (2564)

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ และวารสาร
2. อุปกรณ์ในการตรวจศัตรูพืช เช่น แว่นขยาย กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope
3. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เตาไฟฟ้า บีคเกอร์ หลอดทดลอง กล่องพลาสติก ตะเกียงแอลกอฮอล์ ใบมีดโกน แผ่นสไลด์ แผ่นปิดสไลด์ สำลี เป็นต้น
4. อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง ได้แก่ เข็มไร้สนิม เข็มหมุดหัวกลม ไม้จัดรูปร่างแมลง ปากคีบ ตู้อบแมลง
5. อุปกรณ์และสารเคมีใช้ในการทำสไลด์ถาวร เช่น sodium hydroxide, potassium hydroxide 10%, alcohol hydrochloric acid, glacial acetic acid, xylene, carbolic acid, acid fuchsin, N-butyl alcohol, clove oil, canada balsam, Hoyer's solution ตู้อบสไลด์ถาวร และกล่องใส่สไลด์ถาวร เป็นต้น
6. กล้องถ่ายภาพ
7. ผลแอปเปิลสดจากสาธารณรัฐประชาชนจีน ที่นำเข้า ณ ด่านตรวจพืชเชียงของ

แบบและวิธีการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูลศัตรูพืชของแอปเปิล
2. สุ่มตัวอย่างผลแอปเปิลสดนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน ณ ด่านตรวจพืชเชียงของ
3. ตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยมองด้วยตาเปล่า ใช้แว่นขยาย หรือกล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope
4. ตรวจสอบและจำแนกศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ

กรมวิชาการเกษตร

5. จัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบและสรุปผลการศึกษา

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูลศัตรูพืชของแอปเปิล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแอปเปิลที่มีแหล่งกำเนิดจากสาธารณรัฐประชาชนจีน เช่น ลักษณะทางชีววิทยา พืชอาศัย และการควบคุมศัตรูพืชจากฐานข้อมูล ตำราวิชาการ วารสารทางวิชาการทั้งในประเทศและต่างประเทศ

2. สุ่มตัวอย่างผลแอปเปิลสดนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน ณ ด่านตรวจพืชเชียงของ

สุ่มตัวอย่างผลแอปเปิล อย่างน้อย 20 ครั้ง (20 shipments) โดยมีวิธีการสุ่มตัวอย่างตาม Whyte (2009) ดังนี้

- นำเข้าจำนวนน้อยกว่า 1,000 ผล สุ่มตัวอย่างจำนวน 450 ผล หรือทั้งหมด
- นำเข้าจำนวน 1,000 ผล หรือมากกว่า สุ่มตัวอย่างจำนวน 600 ผล

3. ตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยมองด้วยตาเปล่า ใช้แว่นขยาย หรือกล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope เพื่อสังเกตลักษณะ สี ผิว และรูปร่าง รวมทั้งความผิดปกติ หรือร่องรอยการเข้าทำลายของโรคและแมลงศัตรูพืช แล้วจึงนำผลแอปเปิลสดที่สุ่มได้ไปตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป

4. ตรวจสอบและจำแนกศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ

4.1 ตรวจสอบและจำแนกโรคพืชที่มีสาเหตุจากเชื้อรา

4.1.1 ตรวจสอบและจำแนกโรคพืชด้วยวิธี Moist chamber จากนั้นใช้เข็มเขี่ย เขี่ยส่วนของเชื้อ มาวางในน้ำกลั่นที่หยดไว้บนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และบันทึกลักษณะของเชื้อที่พบ หรือ ใช้วิธีการตัดขวางส่วนที่เป็นโรค (Cross-section, X-section, Freehand section) โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็กกว่าแผ่นกระจกสไลด์แล้วนำมาวางบนแผ่นสไลด์ จากนั้นนำแผ่นสไลด์อีกแผ่นมาวางทับลงบนชิ้นพืช โดยให้ขอบของแผ่นสไลด์และขอบของชิ้นพืชเหลื่อมกันเล็กน้อย ใช้ใบมีดโกนตัดสไลด์ชิ้นพืชให้บางที่สุด แล้วนำชิ้นพืชที่ได้มาวางบนน้ำกลั่น ที่หยดไว้บนกระจกสไลด์ ปิดด้วย Cover glass ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และบันทึกลักษณะของเชื้อที่พบ

4.1.2 ทำการจัดจำแนกชนิดของศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ หรือส่งตัวอย่างศัตรูพืชให้สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เพื่อระบุชนิด จากนั้นบันทึกรายละเอียดของโรคที่ตรวจพบ รวมทั้งข้อมูลอื่น ๆ ได้แก่ ส่วนของพืชที่พบ ลักษณะการทำลาย วัน เดือน ปี และสถานที่ที่ตรวจพบ รวมทั้งชื่อผู้เก็บตัวอย่างและชื่อผู้ระบุชนิดศัตรูพืช พร้อมบันทึกภาพ

4.2 ตรวจสอบและจำแนกแมลงและไรศัตรูพืช

4.2.1 ทำการจัดเตรียมตัวอย่างแมลงและไรศัตรูพืช โดยขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงที่ตรวจพบ แล้วนำมามาจัดรูปร่างบนไม้จัดรูปร่าง โดยใช้เข็มไร้สนิมปักบริเวณด้านหน้าตรงมุมของปีกขวา ตัวเต็มวัยและด้วงที่มีขนาดเล็กให้ติดลงบนกระดาษรูปสามเหลี่ยม จัดรูปร่างให้เห็นด้านหลังและด้านข้าง แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้อบตัวอย่างแมลง ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 30 – 60 วัน ทั้งนี้ เวลาในการอบขึ้นอยู่กับขนาดของแมลง

2. นำตัวอย่างแมลงในกลุ่มแมลงปากดูดมาทำสไลด์ถาวร โดยอ้างอิงวิธีการของ ศิริณี และ ลักขณา (2554) แล้วนำสไลด์ที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 1-2 เดือน จากนั้นจึงนำ

กรมวิชาการเกษตร

ตัวอย่างสไลด์ที่ได้ไปตรวจเพื่อจำแนกชนิด บันทึกรายละเอียดที่เกี่ยวกับพืชอาศัย วัน เดือน ปี และสถานที่ที่ตรวจพบ รวมทั้งชื่อผู้เก็บตัวอย่าง บนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้ว

3. ทำสไลด์ถาวรไรศัตรูพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด แล้วใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยา จากนั้นจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่สามารถมองเห็นส่วนต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน ในการตรวจดูลักษณะต่าง ๆ เพื่อจำแนกชนิด ให้จัดท่าทางของไรให้อยู่ในลักษณะคว่ำและตะแคงข้าง จากนั้นปิดสไลด์ด้วยแผ่นปิดสไลด์ และนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาประมาณ

1 สัปดาห์ เมื่อสไลด์แห้งแล้ว จึงผนึกขอบแผ่นปิดสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บ และบันทึกรายละเอียดที่เกี่ยวกับพืชอาศัย วัน เดือน ปี และสถานที่ที่ตรวจพบ รวมทั้งชื่อผู้เก็บตัวอย่าง บนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้วบริเวณมุมขวา

4.2.2 ทำการจัดจำแนกชนิดของแมลงและไรศัตรูพืช หรือส่งตัวอย่างศัตรูพืชให้สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เพื่อระบุชนิด จากนั้นบันทึกรายละเอียดของแมลงและไรศัตรูพืชที่ตรวจพบ รวมทั้งข้อมูลอื่น ๆ ได้แก่ ส่วนของพืชที่พบ ลักษณะการทำลาย วัน เดือน ปี และสถานที่ที่ตรวจพบ รวมทั้งชื่อผู้เก็บตัวอย่างและชื่อผู้ระบุชนิดศัตรูพืช พร้อมบันทึกภาพ

5. จัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบและสรุปผลการศึกษา

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกชนิดและลักษณะของศัตรูพืชที่ตรวจพบ

2. บันทึกภาพศัตรูพืช อาการที่พบที่เกิดจากการเข้าทำลายจากเชื้อโรคและศัตรูพืช และเก็บตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

ระยะเวลาดำเนินการ

(เริ่มต้น ตุลาคม 2563 สิ้นสุด กันยายน 2564)

สถานที่ดำเนินการ

1. สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

- ลานตรวจสินค้าขาเข้า และห้องปฏิบัติการ ด่านตรวจพืชเชียงของ

2. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

- ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยโรคพืช
- ห้องปฏิบัติการ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา

กรมวิชาการเกษตร

3. การปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

❑ ไม่มี ❑ มี ได้รับอนุมัติเมื่อวันที่..... (โปรดแสดงหลักฐานในภาคผนวก)

☑ เปลี่ยนแปลงงบประมาณ โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง..ใน ปี2564 ได้เปลี่ยนแปลงหมวดเงินจากค่าใช้สอยเป็นค่าวัสดุ ไม่เกิน 20 % ของหมวดเงินค่าวัสดุที่ได้รับ

❑ เปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์/ผลผลิต โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 3 ผลการศึกษา

3.1 ผลการดำเนินงานของโครงการ

ผลการศึกษากิจกรรมที่1

จากการสุ่มเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากอินเดีย และจีน ตรวจพบไวรัส TMV และ ToMV ในเมล็ดที่นำเข้าจากอินเดีย ถึงแม้ว่าไวรัสทั้งสองชนิดมีรายงานระบาดทั่วไปในแหล่งปลูกมะเขือเทศทั่วโลก แต่ในปัจจุบันยังไม่มีการพิสูจน์ยืนยันว่าการพบ ToMV ในประเทศไทย และเมล็ดที่ตรวจพบไวรัสทั้งสองชนิดเป็นเมล็ดพ่อแม่ที่นำเข้าเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม ซึ่งหากเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดระบาดในแปลงและติดไปกับเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้ และทำให้มีผลกระทบในการส่งออกเมล็ดพันธุ์ จึงต้องปฏิเสธการรับรองเมล็ดพันธุ์ที่จะส่งออก หรือมีการกำกับดูแลให้บริษัทผู้นำเข้าทำการกำจัดเชื้อในเมล็ดด้วยความร้อนก่อนนำไปปลูก

จากการสุ่มเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากสหรัฐอเมริกา และเนเธอร์แลนด์ ด้วยวิธี ELISA ผลการตรวจพบตัวอย่างเมล็ดมะเขือเทศนำเข้าจากอเมริกาให้ผลบวกกับชุดตรวจ TMV และ ToMV แต่เมื่อตรวจจำแนกชนิดด้วยวิธี multiplex RT-PCR สามารถยืนยันผลว่าไวรัสที่ตรวจพบเป็น ToMV แสดงว่าวิธี ELISA โดยใช้ชุดตรวจของบริษัท Agdia ไม่สามารถจำแนกชนิดของ TMV และ ToMV เนื่องจาก แอนติบอดีที่ใช้ไม่มีความจำเพาะในระดับที่จะแยกชนิดไวรัสสองชนิดนี้ได้ ดังนั้นการตรวจจำแนกชนิดจึงควรจะตรวจเบื้องต้นด้วยวิธี ELISA เมื่อตรวจพบตัวอย่างที่ให้ผลบวก จึงตรวจจำแนกชนิดด้วยวิธี RT-PCR และถึงแม้ว่า ToMV มีรายงานระบาดทั่วไปในแหล่งปลูกมะเขือเทศทั่วโลก แต่ในปัจจุบันยังไม่มีการพิสูจน์ยืนยันว่าการพบ ToMV ในประเทศไทย และเมล็ดที่ตรวจพบไวรัสเป็นเมล็ดพ่อแม่ที่นำเข้าเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม ซึ่งหากเชื้อไวรัสดังกล่าวระบาดในแปลงและติดไปกับเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้ ทำให้มีผลกระทบในการส่งออกเมล็ดพันธุ์ จึงต้องปฏิเสธการรับรองเมล็ดพันธุ์ที่จะส่งออก และมีการกำกับดูแลให้บริษัทผู้นำเข้าทำการกำจัดเชื้อในเมล็ดด้วยความร้อนก่อนนำไปปลูก

จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา จำนวน 60 ครั้ง และเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากอินเดีย จำนวน 36 ครั้ง โดยนำเมล็ดพันธุ์มาตรวจสอบเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์- สเตอริโอ ไม่พบลักษณะอาการผิดปกติ ไม่มีร่องรอยการทำลายของแมลงศัตรูพืชและไม่มีวัชพืชติดมากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์มาตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบว่าเมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา พบเชื้อราจำนวน 2 ชนิด ชนิดละ 1 ครั้ง และเมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากอินเดีย ตรวจพบเชื้อรา จำนวน 8 ชนิด ชนิดละ 1 ครั้ง ส่วนการตรวจสอบด้วยวิธี Dilution plate technique และ ELISA technique ไม่พบศัตรูพืชติดมากับเมล็ดพันธุ์ และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นแตงโม และผลการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา ใน จังหวัดขอนแก่น สกลนคร และ อุดรธานี พบโรคกับต้นแตงโม จำนวน 7 ชนิด ซึ่งศัตรูพืชที่พบในแปลงปลูกไม่เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย

จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากประเทศชิลี เมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากชิลี จำนวน 32 ครั้ง และเมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากฟิลิปปินส์ 21 ครั้ง นำเมล็ดพันธุ์มาตรวจสอบเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ไม่พบลักษณะอาการผิดปกติ ไม่มีร่องรอยการทำลายของแมลงศัตรูพืช และไม่มีวัชพืชติดมากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์มาตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการและปลูกทดสอบโรคในโรงเรือนปลูกพืช พบเมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากประเทศชิลี พบเชื้อ

Fusarium oxysporum จำนวน 1 ครั้ง และเชื้อ *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* ซึ่งเชื้อที่พบไม่เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย ส่วนเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากฟิลิปปินส์ ไม่พบเชื้อโรคพืชติดเมล็ดพันธุ์นำเข้า

จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์เมลอนนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา จำนวน 12 ครั้ง และเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากอินเดีย จำนวน 6 ครั้ง โดยนำเมล็ดพันธุ์มาตรวจสอบเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ไม่พบลักษณะอาการผิดปกติ และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์มาตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบว่าเมล็ดพันธุ์เมลอนนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา พบเชื้อราจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Fusarium oxysporum* และ *F. solani* และเมล็ดพันธุ์เมลอนนำเข้าจากอินเดีย ตรวจพบเชื้อรา จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Drechslera halodes* และ *Macrophomina phaseolina* ส่วนการตรวจเมล็ดพันธุ์เมลอนนำเข้า ด้วยวิธี Dilution technique และ ELISA technique ไม่พบศัตรูพืชติดมากับเมล็ดพันธุ์ และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นเมลอน และผลการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์เมลอนนำเข้าจากอเมริกา ในจังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ และ อุดรธานี พบ โรคกับต้นเมลอน จำนวน 4 ชนิด ซึ่งศัตรูพืชที่พบทั้งในห้องปฏิบัติการและในแปลงปลูก ไม่เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย

จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์เมลอนนำเข้าจากชิลี จำนวน 21 ครั้ง น้ำหนักรวม 9.414 กิโลกรัม และนำเข้าจากเนเธอร์แลนด์ 2 ครั้ง น้ำหนักรวม 0.375 กิโลกรัม โดยนำเมล็ดพันธุ์มาตรวจสอบเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ไม่พบลักษณะอาการผิดปกติ และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์มาตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบเชื้อรา *Fusarium oxysporum* บนเมล็ดพันธุ์เมลอนนำเข้าจากชิลี จำนวน 1 ครั้ง ส่วนเมล็ดพันธุ์เมลอนนำเข้าจากเนเธอร์แลนด์ไม่พบเชื้อราสาเหตุโรคพืช และเมื่อนำเข้ามาตรวจสอบด้วยวิธี Dilution technique และ ELISA technique ไม่พบเชื้อสาเหตุโรคพืชติดมากับเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากทั้งสองประเทศ ส่วนจากการนำเมล็ดพันธุ์เมลอนนำมาปลูกสังเกตลักษณะอาการโรคในโรงเรือน ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นกล้าเมลอนนำเข้าจากทั้งสองประเทศ

ข้อมูลศัตรูพืชกักกันที่มีโอกาสติดมากับเมล็ดพริกนำเข้าจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์และสหรัฐอเมริกา มี 12 ชนิด ได้แก่ *Ambrosia artemesiifolia*, *Circium arvense, Orobanche cernua, O. aegyptiaca*, *O. ramosa* เชื้อแบคทีเรีย *Candidatus* Liberibacter solanacearum, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas viridiflava, P. corrugata* เชื้อไวรัส *Alfalfa mosaic virus* และ *Tobacco streak virus* และจากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์นำเข้าพริกจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์และสหรัฐอเมริกา ระหว่างเดือนตุลาคม 2558 - กันยายน 2562 จำนวน 253 ตัวอย่าง นำมาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชและการปนเปื้อนของวัชพืช และผลจากการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี blotter method, dilution plate method และ ELISA ตรวจพบศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกที่นำเข้าจากอินเดีย 15 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *A. raphani*, *Cercospora capsici*, *Curvularia lunata, C. pallescens*, *Drechslera halodes*, *D. hawaiiensis, D. tetramera, Fusarium oxysporum, F. semitectum, F. solani*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Cucumber mosaic virus, Tobacco mosaic virus* (TMV) และ *Tomato mosaic virus* (ToMV) เมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากจีนตรวจพบศัตรูพืช 7 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *Curvularia pallescens*, *Drechslera cynodontis*, *Cucumber mosaic virus, Pepper mild mottle virus*, TMV และ

กรมวิชาการเกษตร

ToMV เมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากเนเธอร์แลนด์และสหรัฐอเมริกาตรวจพบศัตรูพืช 2 ชนิด ได้แก่ *Fusarium oxysporum* และ ToMV ส่วนผล การปลูกสังเกตอาการในโรงเรือนกักกันพืชและผลการติดตามตรวจสอบในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พริก ตรวจแล้วไม่พบศัตรูพืชกักกัน และระหว่างทำการศึกษาไม่พบศัตรูพืชกักกัน

จากการศึกษานี้สามารถนำข้อมูลของศัตรูพืชที่ตรวจพบกับเมล็ดพริกนำเข้าจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา ไปใช้ประโยชน์ในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบประกอบการนำไปใช้วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อปรับปรุงกฎหมาย และเงื่อนไขการนำเข้า กำหนดมาตรการสุขอนามัยพืช และจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชที่ตรวจพบของพริกที่นำเข้าจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์และสหรัฐอเมริกา รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่ตรวจพบเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มวิจัยการกักกันพืชเพื่อใช้ประโยชน์ในการสืบค้นต่อไป

เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้าจากจีนจำนวน 6 ครั้ง 7 ตัวอย่าง น้ำหนัก 17,683.32 กิโลกรัม ทางด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพฯ และด่านตรวจพืชไปรษณีย์ เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา จำนวน 10 ครั้ง 16 ตัวอย่าง น้ำหนัก 6,389.638 กิโลกรัม ทางด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ และด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพฯ ผลการตรวจศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเมล็ดวัชพืช 8 ชนิด ได้แก่ *Ageratina adephora, Amaranthus retroflexus, Amaranthus viridis, Cleome vicosa, Eleusine indica, Setaria viridis, Sonchus arvensis* และ *Oxalis corniculata* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมจากจีน และผลการตรวจเชื้อราบนเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธี Blotter method พบเชื้อรา *Alternaria tenuis*, *Alternaria raphani*, *Cladosporium* sp., *Curvularia lunata*, *Drechslera halodes*, *Fusarium semitectum, Fusarium oxysporum* และ *Ulocladium* sp. บนเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมจากจีน และตรวจพบเชื้อรา *Alternaria tenuis* บนเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมจากสหรัฐอเมริกา ศัตรูพืชดังกล่าวไม่เป็นศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช ผลการตรวจแบคทีเรียด้วยวิธี Dilution technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่เป็นศัตรูพืชกักกัน ผลการตรวจเชื้อไวรัสด้วยวิธี ELISA ไม่พบเชื้อไวรัสที่เป็นศัตรูพืชกักกัน ผลการปลูกสังเกตอาการของโรคในโรงเรือน (Seedling symptom test) ไม่พบอาการผิดปกติ ผลการติดตามตรวจในแปลงปลูกที่ จังหวัดนครราชสีมา นครปฐม กาญจนบุรี และราชบุรีจำนวน 11 แปลง ไม่พบศัตรูพืชกักกันเป้าหมาย

กรณีที่พบเชื้อราบนเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมในปริมาณมาก ได้แนะนำให้บริษัทที่นำเข้าเมล็ดพันธุ์ทำการคลุกสารเคมีก่อนปลูก เนื่องจากเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์อาจมีผลต่อการงอกของเมล็ดพันธุ์ได้ และมีการเฝ้าระวังติดตามในแปลงปลูกเพื่อติดตามการติดมาและแพร่กระจายของเมล็ดวัชพืชต่างถิ่น

จากการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชที่เข้าทำลายหัวพันธุ์ของมันฝรั่งพบว่ามีศัตรูพืชเป้าหมายมีดังนี้ ประเทศสกอตแลนด์ ได้แก่ เชื้อรา 5 ชนิด ไวรัส 12 ชนิด ไฟโตพลาสมา 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 4 ชนิดไสเดือนฝอย และประเทศออสเตรเลีย ได้แก่ แมลง 1ไส้เดือนฝอย 3 ชนิด เชื้อรา 3 ชนิด ไวรัส 6 ชนิด ไวรอยด์ 1 ชนิด ประเทศเนเธอร์แลนด์ ได้แก่ เชื้อรา 4 ชนิด เชื้อแบคทีเรีย 1 ชนิด และไส้เดือนฝอย 5 ชนิด ประเทศแคนาดา ได้แก่ เชื้อรา 2 ชนิด เชื้อแบคทีเรีย 1 ชนิด และไส้เดือนฝอย 2 ชนิด

จากการตรวจสุ่มตรวจศัตรูพืช ณ ด่านตรวจพืช และผลการ วินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ระหว่างเดือนตุลาคม2559 - กันยายน 2562 พบจากการสุ่มตัวอย่างมันฝรั่งจากสกอตแลนด์ ณ จุดนำเข้าและตรวจสอบและจำแนกชนิดศัตรูพืชของหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจาก พบว่าจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดที่ปนเปื้อนมากับมันฝรั่ง ในห้องปฏิบัติการพบเชื้อรา *Spongospora subterranea* เชื้อ

กรมวิชาการเกษตร

สาเหตุโรค powdery scab จำนวน 8 ครั้งจากการนำเข้าทั้งหมด 8ครั้ง ส่วนหัวพันธุ์มันฝรั่งจากออสเตรเลียพบเชื้อรา *Spongospora subterranea* จำนวน 1 ครั้ง จากการนำเข้าทั้งหมด 1 ครั้ง หัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากเนเธอร์แลนด์พบเชื้อรา *Spongospora subterranea* จำนวน 7 ครั้ง จากการนำเข้าทั้งหมด 12 ครั้ง โดยแต่ละครั้งที่ตรวจพบร้อยละการทำลายของโรค powdery scab ครอบคลุมพื้นที่ผิวไม่เกินที่กำหนดไว้และหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากประเทศแคนาดามีการนำเข้า1 ครั้งไม่พบศัตรูพืช ไว้ พร้อมติดตามผลผลิตจากการที่นำหัวพันธุ์ฝรั่งจากทั้ง4ประเทศไปปลูกจากการสุ่มตัวอย่างผลผลิตในแปลงปลูกมาตรวจไม่พบโรค powdery scab ที่ก่อความเสียหายทางเศรษฐกิจของหัวมันฝรั่งแต่อย่างไร

ผลการศึกษาสรุปได้ว่าการตรวจหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าส่วนใหญ่จะพบเชื้อรา *Spongospora subterranea* ซึ่งเชื้อสาเหตุโรค powdery scab ซึ่งเป็นศัตรูพืชกักกันกำหนดไว้ในเงื่อนไขการนำเขาหัวพันธุมันฝรั่งถึงจะอยู่ในระดับการยอมรับได้(มีหัวพันธุ์มันฝรั่งจำนวนไม่เกินร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนักของหัวพันธุ์มันฝรั่งซึ่งแสดงอาการของโรคครอบคลุมพื้นที่ผิวร้อยละ 5 ของหัวมันฝรั่ง) แต่ก็แสดงให้เห็นว่าการจัดการภายหลังเก็บเกี่ยวยังไม่ดีมีโอกาสที่ศัตรูพืชจะติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่ง จึงควรมีการตรวจนำเข้าที่เข้มงวดมากขึ้น บันทึกข้อมูลพร้อมเก็บตัวอย่างศัตรูพืชหรือสิ่งมีชีวิตที่พบไว้เป็นหลักฐาน และแจ้งประเทศผู้ส่งออกทุกครั้ง หากมีการตรวจพบศัตรูพืชบ่อย ๆ ควรมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเพิ่มเติมซึ่งอาจนำไปสู่การทบทวนหรือปรับปรุงมาตรการด้านสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งต่อไป

ระหว่างทำการศึกษาตรวจสอบแล้วไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* สาเหตุของโรค bacterial ring rot เนื่องจากประเทศต้นทางปฏิบัติตามเงื่อนไขที่ประเทศไทยกำหนด รวมทั้งหลายประเทศที่มีการส่งออกมายังประเทศไทย ได้มาตรการในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้โดยกำหนดให้แปลงผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งซึ่งใช้เครื่องจักรกล สถานที่ และพนักงานร่วมกันต้องมีการบังคับใช้กฎระเบียบด้านสุขอนามัยพืชเพื่อควบคุมโรค bacterial ring rot ในแปลงผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งที่พบการระบาด การบริหารจัดการด้านสุขอนามัยพืชสำหรับโรค bacterial ring rot ต้องเป็นไปตามข้อกำหนดของสหภาพยุโรปเกี่ยวกับการควบคุมโรค bacterial ring rot ได้แก่ Council Directive 93/85/EC on the control of bacterial ring rot รวมทั้งประเทศที่นำเข้าทั้ง 6 ประเทศมีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ในห้องปฏิบัติก่อนการส่งออกมายังราชอาณาจักรไทยแต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีความเสี่ยงที่เชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* สาเหตุของโรค bacterial ring rot จะทำความเสียหายกับมันฝรั่ง และพืชอื่นในประเทศไทย เช่น มะเขือเทศ และมะเขือยาว เป็นต้น ดังนั้นเพื่อป้องกันโรคและศัตรูพืชร้ายแรงชนิดนี้ซึ่งมีความสำคัญทางกักกันพืชสำหรับการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากต่างประเทศยังมีความเป็นจะต้องสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจสอบเบื้องต้นโดยการผ่าสังเกตอาการ และตรวจสอบ รวมทั้งจำแนกชนิด ตลอดจนติดตามตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ต่อไป เพื่อป้องกันไม่ให้เข้ามาแพร่ระบาดในราชอาณาจักรไทย

ข้อมูลศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหัวนำเข้าจากนิวซีแลนด์ มี 9 ชนิด ได้แก่ วัชพืช *Cirsium arvense*, *Lolium temulentum*, *Senecio vulgaris*, *Spergula arvensis* เชื้อรา *Verticillium dahliae* เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, *Pseudomonas viridiflava* ไส้เดือนฝอย *Heterodera shachtii* ศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหัวนำเข้าจากญี่ปุ่น มี 8 ชนิด ได้แก่ วัชพืช *Cirsium arvense*, *Lolium temulentum*, *Senecio vulgaris*, *Spergula arvensis* เชื้อรา *Verticillium dahliae* เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas*

marginalis pv. *marginalis*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* และ *Pseudomonas viridiflava* ศัตรูพืชดังกล่าวยังไม่มีรายงานในประเทศไทย (CABI, 2018) และเป็นศัตรูพืชร้ายแรง ถ้าเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศจะทำความเสียหายให้กับการเกษตรในประเทศได้ ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ผักกาดหัวนำเข้าจากนิวซีแลนด์ โดยผ่านทางด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ และไปรษณีย์ จำนวน 7 ตัวอย่าง ปริมาณนำเข้า 58,052.3 กิโลกรัม และญี่ปุ่น ผ่านทางด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ และไปรษณีย์ จำนวน 7 ตัวอย่าง ปริมาณนำเข้า 7,392.56 กิโลกรัม จากการตรวจสอบเบื้องต้น ไม่พบลักษณะอาการผิดปกติ เมล็ดพันธุ์สมบูรณ์ ไม่มีร่องรอย การทำลายของไร และแมลงศัตรูพืช รวมทั้งไม่พบการปนเปื้อนของเมล็ดวัชพืชกับเมล็ดพันธุ์นำเข้าดังกล่าว เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด และปิดมิดชิด นำเมล็ดมาตรวจเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัสในห้องปฏิบัติการ ไม่พบแบคทีเรียและไวรัสสาเหตุโรคพืช แต่ตรวจพบเชื้อรา *Alternaria raphani* บนเมล็ดพันธุ์ผักกาดหัวนำเข้าจากนิวซีแลนด์ จำนวน 1 ครั้ง และญี่ปุ่น จำนวน 1 ครั้ง เชื้อราขนิดนี้เป็นเชื้อราที่สามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ได้ และเข้าทำลายเมล็ดพันธุ์หลังการเก็บเกี่ยวทำให้มีผลต่อคุณภาพการงอกของพืช คำแนะนำถ้าพบมีการปนเปื้อนปริมาณสูงควรมีการจัดการโดยใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา เช่น ไทแรม คลุกเมล็ดพันธุ์ก่อนเก็บรักษาหรือเพาะปลูก เพื่อให้เมล็ดพันธุ์ยังคงคุณภาพในการงอกและเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามเชื้อราชนิดนี้พบมีรายงานในประเทศไทย (CABI, 2018) และไม่ใช่ศัตรูพืชกักกันเป้าหมาย จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ไปปลูกสังเกตอาการในโรงเรือนกักกันพืช ไม่พบอาการของโรคหรือศัตรูพืชกับต้นผักกาดหัวจากเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากนิวซีแลนด์และญี่ปุ่น และจากการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกผักกาดหัวนำเข้า ในจังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี และเพชรบูรณ์ จำนวน 9 แปลง สำรวจศัตรูพืชไม่พบศัตรูพืชกักกันเป้าหมาย

จากการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชที่เข้าทำลายเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากอินเดียและสหรัฐอเมริกา พบว่ามีศัตรูพืชกักกันที่มีโอกาสติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดนำเข้าจากอินเดีย 5 ชนิด ได้แก่ แมลง *Trogoderma granarium*, *Spodoptera frugiperda* เชื้อรา *Cephalosporium maydis* เชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* และไวรัส *Maize mosaic virus* ศัตรูพืชกักกันที่มีโอกาสติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากสหรัฐอเมริกา มีศัตรูพืชกักกัน 11 ชนิด ได้แก่ แมลง *Trogoderma granarium, Trogoderma variabile, Spodoptera frugiperda* เชื้อรา *Cercospora zeae-maydis* เชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* และเชื้อไวรัส *High plains virus, Maize chlorotic dwarf virus, Maize chlorotic mottle virus, Maize mosaic virus* และ *Maize rayado fino virus* ส่วนเมล็ดพันธุ์นำเข้าได้รับการสุ่มตัวอย่างตามหลักเกณฑ์ของ ISTA เพื่อตรวจสอบศัตรูพืช 3 วิธี ได้แก่ การตรวจสอบโดยตรงด้วยตาเปล่า (visual inspection), วิธี blotter method และปลูกสังเกตอาการของโรคในระยะกล้า (Seedling symptom test) และมีการติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้าในพื้นที่ปลูก ผลการตรวจสอบในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดนำเข้าจากสหรัฐอเมริกาตรวจพบแมลงสกุล *Trogoderma* 2 ชนิด คือ *Trogoderma granarium* และ *T. variabile* จากการตรวจสอบโดยตรงและพบเชื้อรา *Fusarium moniliforme* จากการตรวจสอบด้วยวิธี Blotter method ส่วนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดนำเข้าจากอินเดีย ตรวจพบเชื้อรา 2 ชนิด คือ *Cephalosporium acremonium* และ *Fusarium moniliforme* จากการตรวจสอบด้วยวิธี Blotter method เมล็ดพันธุ์จากทั้งสองแหล่งไม่พบศัตรูพืชจากการตรวจสอบโดยวิธีปลูกตรวจสอบอาการในระยะกล้า เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่ตรวจพบ *T. granarium* และ *T. variabile* ได้รับการกำจัดศัตรูพืชโดยการรมด้วยเมทิลโบรไมด์อัตรา 80 กรัม/ลูกบาศก์เมตรนาน 48 ชั่วโมงก่อนส่งกลับประเทศต้น

กรมวิชาการเกษตร

ทาง การติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้าในพื้นที่ปลูกไม่พบศัตรูพืชกักกันติดมา แต่พบการระบาดของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด (Fall army worm, *Spodoptera frujiperda*)

ข้อมูลศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีนำเข้าจากนิวซีแลนด์ มี 17 ชนิด ศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีนำเข้าจากญี่ปุ่น มี 18 ชนิด ศัตรูพืชดังกล่าวยังไม่มีรายงานในประเทศไทย (CABI, 2021) และเป็นศัตรูพืชร้ายแรง ถ้าเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศจะทำความเสียหายให้กับการเกษตรในประเทศได้ ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีนำเข้า จำนวน 48 ตัวอย่าง ปริมาณนำเข้า 17,765.44 กิโลกรัม จากการตรวจสอบเบื้องต้น พบการปนเปื้อนของเมล็ดวัชพืชกับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีนำเข้าจากญี่ปุ่น 2 ชนิด ได้แก่ *Polygonum convolvulus* ซึ่งเป็นวัชพืชกันกันของประเทศไทย ดังนั้นจึงได้ดำเนินการตามมาตรการในการจัดการศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย โดยให้ผู้ประกอบการที่นำเข้ามา ทำลายหรือส่งเมล็ดพันธุ์กลับ และ พบวัชพืช *Gallium* sp. เป็นวัชพืชที่มีรายงานในประเทศไทย (CABI, 2021) จากการตรวจพบเมล็ดวัชพืชที่เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทยนั้น ข้อมูลในส่วนนี้ได้นำไปกำหนดมาตรการข้อปฏิบัติในการเข้มงวดในการตรวจเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีที่นำเข้าจากประเทศญี่ปุ่นเพื่อไม่ให้มีวัชพืชชนิดใหม่เข้ามาแพร่กระจายในประเทศไทย ส่วนผลการตรวจสอบเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ ไม่พบแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช และพบเชื้อรา *Altenaria alternata* 1 ครั้ง *Alternaria brassicicola* 8 ครั้ง *Altenaria raphani* 3 ครั้ง *Cladosporium* sp. 4 ครั้ง และ *Urocladium* sp. 1 ครั้ง ติดมากับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีนำเข้าจากประเทศญี่ปุ่น เชื้อราทั้ง 4 ชนิดนี้เป็นเชื้อราที่สามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ได้ และเข้าทำลายเมล็ดพันธุ์หลังการเก็บเกี่ยวทำให้มีผลต่อคุณภาพการงอกของพืช คำแนะนำถ้าพบมีการปนเปื้อนควรมีการจัดการโดยใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา เช่น ไทแรม หรือ iprodione คลุกเมล็ดพันธุ์ก่อนปลูก (อรพรรณ วิเศษสังข์, 2552) เพื่อให้เมล็ดพันธุ์ยังคงคุณภาพในการงอกและเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามเชื้อราชนิดนี้พบมีรายงานในประเทศไทย (CABI, 2021) ไม่ใช่ศัตรูพืชกักกันเป้าหมาย จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีนำเข้าจากญี่ปุ่นไปปลูกสังเกตอาการในโรงเรือนกักกันพืช ไม่พบอาการผิดปกติของโรคหรือศัตรูพืชกับต้นกล้า และจากการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกกะหล่ำปลีและในโรงเรือนเพาะกล้า ในจังหวัดเพชรบูรณ์ จำนวน 12 แปลง และ 2 โรงเรือน ไม่พบศัตรูพืชกักกันเป้าหมายแต่อย่างไรก็ตามการนำเข้าเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีจากประเทศญี่ปุ่นมีปริมาณที่สูงต่อปี และประเทศญี่ปุ่นยังคงมีรายงานเป็นแหล่งของศัตรูพืชกักกันของประเทศไทยที่มีโอกาสติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลี เพราะฉะนั้นการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ยังคงมีความเสี่ยงจึงต้องมีการเฝ้าระวังต่อไป

1. จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ผักชีนำเข้าจากอิตาลีและสหรัฐอเมริกา 116 ตัวอย่าง น้ำหนักโดยรวม 1,907,796 ตัน นำมาตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ ตรวจพบเมล็ดวัชพืชติดมากับเมล็ดผักชีนำเข้าจากอิตาลี 6 ชนิด ได้แก่ *Convolvulus arvensis*, *Carthamus lanatus*, *Galium aparine*, *Helianthus annanus*, *Polygonum aviculare* และ *Polygonum (Fallopia) convovulus* จัดเป็นวัชพืชกักกัน 3 ชนิด คือ *Galium aparine, Polygonum aviculare* และ *Polygonum (Fallopia) convovulus* ส่วนเมล็ดผักชีที่นำเข้าจากสหรัฐอเมริกาตรวจพบเมล็ดวัชพืช 2 ชนิด ได้แก่ *Convolvulus arvensis* และ *Polygonum (Fallopia) convovulus* จัดเป็นวัชพืชกักกัน 1 ชนิด คือ *Polygonum aviculare* ซึ่งดำเนินการควบคุมกำกับดูแลโดยอาศัยพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 และที่แก้ไข

กรมวิชาการเกษตร

เพิ่มเติม และผลการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ตรวจพบศัตรูพืช 2 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Alternaria alternata* และ *Alternaria raphani* ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักชีที่นำเข้าจากอิตาลีและสหรัฐอเมริกา

2. จากการปลูกสังเกตอาการในโรงเรือนกักกันพืชและผลการติดตามตรวจสอบในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ผักชีตรวจแล้วไม่พบศัตรูพืชกักกัน

ข้อเสนอแนะต่อผู้เกี่ยวข้องสำหรับการดำเนินงานในระยะต่อไป

จากการศึกษานี้สามารถนำข้อมูลของศัตรูพืชที่ตรวจพบกับเมล็ดผักชีที่นำเข้าจากอิตาลีและสหรัฐอเมริกาไปใช้ประโยชน์ในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบประกอบการนำไปใช้วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อปรับปรุงกฎหมาย และเงื่อนไขการนำเข้า กำหนดมาตรการสุขอนามัยพืช และจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชที่ตรวจพบของผักชีที่นำเข้าจากอิตาลีและสหรัฐอเมริกา รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่ตรวจพบเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มวิจัยการกักกันพืชเพื่อใช้ประโยชน์ในการสืบค้นต่อไป

การสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์คะน้านำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีนและนิวซีแลนด์ ตามมาตรฐานของ ISTA ได้ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์คะน้าที่นำเข้าทั้งหมด 27ตัวอย่าง ได้แก่ เมล็ดพันธุ์คะน้านำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน จำนวน 10 ตัวอย่าง และเมล็ดพันธุ์คะน้านำเข้าจากประเทศนิวซีแลนด์ จำนวน 17 ตัวอย่าง เมื่อนำไปตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ ผลปรากฏว่ามีลักษณะของเมล็ดพันธุ์คะน้าที่สมบูรณ์ สะอาด เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในภาชนะบรรจุที่ปิดมิดชิด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืช และไม่พบการปะปนของเมล็ดวัชพืชกักกัน และจากการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี blotter method และdilution plate technique ผลปรากฏว่าตรวจพบศัตรูพืช จำนวน 4 ชนิด คือ *Alternaria alternata Alternaria brassicicola Alternaria raphani* และ *Cladosporium* sp. กับเมล็ดพันธุ์คะน้านำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีนและประเทศนิวซีแลนด์ ซึ่งเป็นศัตรูพืชที่พบในประเทศไทยแล้ว ส่วนการปลูกเมล็ดพันธุ์คะน้านำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีนและประเทศนิวซีแลนด์เพื่อสังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนต้นพืชในโรงเรือนปลูกพืช ตรวจแล้วไม่พบอาการผิดปกติกับต้นคะน้า

จากการศึกษานี้สามารถนำข้อมูลของศัตรูพืชที่ตรวจพบกับเมล็ดคะน้าที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีนและประเทศนิวซีแลนด์ ไปใช้ประโยชน์ในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบประกอบการนำไปใช้วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อปรับปรุงกฎหมาย และเงื่อนไขการนำเข้า กำหนดมาตรการสุขอนามัยพืช และจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชที่ตรวจพบของผักคะน้าที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีนและประเทศนิวซีแลนด์

1. การสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชที่สามารถติดปนมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งจากประเทศนิวซีแลนด์และสาธารณรัฐประชาชนจีน มีศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช 8 ชนิด ได้แก่ วัชพืช *Senecio vulgaris*, *Spergula arvensis, Chenopodium album*, *Cirsium arvense*, *Polygonum aviculare*, *Emex spinosa* เชื้อรา *Verticillium dahliae* และเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas cichorii*

2. การสุ่มตัวอย่างและตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งนำเข้าจากประเทศนิวซีแลนด์และสาธารณรัฐประชาชนจีน ทั้งหมด 77 ตัวอย่าง ตรวจพบเมล็ดวัชพืชปนมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งนำเข้าจากประเทศนิวซีแลนด์ 8 ชนิด และเชื้อรา 2 ชนิด ส่วนเมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน ตรวจพบเมล็ดวัชพืช 2 ชนิด และเชื้อรา 5 ชนิด

กรมวิชาการเกษตร

3. การติดตามตรวจสอบในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งภายหลังการนำเข้าในพื้นที่จังหวัดนครปฐม ราชบุรี และนครราชสีมา ไม่พบศัตรูพืชกักกันเป้าหมาย

จากการศึกษาครั้งนี้ พบศัตรูพืชที่มีความสำคัญด้านกักกันพืช คือ เมล็ดวัชพืช *Polygonum aviculare* และ *Chenopodium album* ซึ่งวัชพืชทั้งสองชนิดมีศักยภาพเป็นศัตรูพืชร้ายแรงและเป็นศัตรูพืชกักกัน ก่อนนำเมล็ดพันธุ์มาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ในการเพาะปลูกหรือเพื่อการค้า ควรทำการคัดแยกเมล็ดวัชพืชกักกันออกจากเมล็ดพันธุ์ก่อน แล้วทำลายเมล็ดวัชพืชดังกล่าว และทำการสำรวจเพื่อเฝ้าระวังป้องกันการแพร่ระบาดในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร ทั้งนี้ยังพบเมล็ดวัชพืช *Viola arvensis*, *Plantago lanceolata* และ *Malva neglecta* ซึ่งจากการสืบค้นข้อมูลวัชพืชทั้งสามชนิดเป็นวัชพืชที่ไม่มีรายงานพบในประเทศ (Cabi, 2020) ทั้งยังเป็นวัชพืชรุกรานต่างถิ่นของต่างประเทศ (NRCS, 2020) ดังนั้นการนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากต่างประเทศในแต่ละปีมีความเสี่ยงที่ศัตรูพืชกักกันและศัตรูพืชที่ศักยภาพเป็นศัตรูพืชร้ายแรงติดปนมากับเมล็ดพันธุ์ จะทำความเสียหายกับพืชปลูกและระบบการเกษตรในประเทศไทย ต้องทำการศึกษาข้อมูลเพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อกำหนดมาตรการในการป้องกันศัตรูพืชกักกันและศัตรูพืชชนิดใหม่ที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชร้ายแรงมิให้เข้ามาแพร่ระบาดในประเทศ รวมทั้งทำการเฝ้าระวังในพื้นที่ปลูกเพื่อยืนยันสถานภาพของศัตรูพืช และกำหนดพื้นที่ปลอดศัตรูพืช และจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชที่ตรวจพบ ตลอดจนเก็บตัวอย่างที่ตรวจพบเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มวิจัยการกักกันพืชเพื่อใช้ประโยชน์ในการสืบค้นต่อไป

จากการสุ่มตัวอย่างและตรวจหาไฟโตพลาสมาในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศในช่วงปี 2562 - 2563 (ตุลาคม 2562 - กันยายน 2563) จำนวน 43 ตัวอย่าง นำเข้าจาก 9 ประเทศดังกล่าว ไม่พบไฟโตพลาสมาติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเหล่านั้น แม้ว่าการวิจัยในครั้งนี้จะบ่งชี้ว่าไม่มีไฟโตพลาสมาติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีการนำเข้าจากทั้ง 9 ประเทศ ก็ไม่ได้หมายความว่าจะไม่มีศัตรูพืชชนิดนี้ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่จะมีการนำเข้ามาจากต่างประเทศอีกในอนาคต ดังนั้น ผู้วิจัยมีความคิดเห็นว่าศัตรูพืชชนิดนี้ ที่เรียกว่า “ไฟโตพลาสมา” แม้จะยังไม่มีการยืนยันว่าสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ และยังไม่มีรายงานการพบศัตรูพืชชนิดนี้เข้าทำลายมะเขือเทศในประเทศไทย เจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชชนิดใหม่เข้ามาในประเทศไทยก็ควรที่จะมีการตรวจสอบไฟโตพลาสมาในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศเป็นประจำอย่างต่อเนื่องต่อไป

ผลการศึกษา กิจกรรมที่2

จากการศึกษาชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับผลแอปเปิลสดนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน ณ ด่านตรวจพืชเชียงของ ปีงบประมาณ 2564 (ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2563 ถึง 30 กันยายน 2564) จำนวน 599 shipments ปริมาณและมูลค่าการนำเข้า 10,199.52 ตัน และ 236.68 ล้านบาท ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าศัตรูพืชเป้าหมายที่สำคัญของผลแอปเปิลสดเป็นไรศัตรูพืช โดยเฉพาะไรแดง *Amphitetranychus viennensis* (Zacher) ซึ่งเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย และจากการสุ่มตรวจผลแอปเปิลสดที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน พบไรรวมทั้งสิ้น 7 ชนิด 6 วงศ์ เป็นไรศัตรูพืช 4 ชนิด 3 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Tetranychidae 2 ชนิด คือ *Tetranychus* sp. และ *Amphitetranychus* sp. วงศ์ Tarsonemidae 2 ชนิด คือ *Tarsonemus* sp. และ *Steneotarsonemus* sp. และวงศ์ Tydeidae แต่เนื่องจากไม่พบไรเพศผู้จึงไม่สามารถจำแนกถึงระดับชนิด (Species) ได้ นอกจากนั้น ยังพบไรศัตรูธรรมชาติ ได้แก่ ไรตัวห้ำ 2 ชนิด คือ

กรมวิชาการเกษตร

Amblyseius adjaricus (Wainstein & Vartapetov) และ *Amblyseius californicus* (McGregor) และไรกินเชื้อรา (Oribatid mite) ซึ่งไรศัตรูพืชที่ตรวจพบทั้งหมดเป็นศัตรูพืชทั่วไป (Common Pest) ไม่ใช่ศัตรูพืชกักกัน (Quarantine Pest) ยกเว้น *Amphitetranychus* sp. ที่ไม่สามารถระบุได้ แต่มีโอกาสสูงมากว่าไรที่ตรวจพบอาจเป็นชนิดที่เป็นศัตรูพืชกักกัน เนื่องจาก A. *veinnensis* มีรายงานในต่างประเทศว่าพบการเข้าทำลายในผลแอปเปิลสด และในปี 2550 พลอยชมพูและคณะ ตรวจพบไรแดง A. *veinnensis* บนผลแอปเปิลสดจากสาธารณรัฐประชาชนจีน ส่วนไรชนิดอื่นในสกุล Amphitetranychus มีรายงานการตรวจพบในพืชชนิดอื่น ดังนั้น พนักงานเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชจึงจะต้องเพิ่มความเข้มงวดในการตรวจสอบศัตรูพืชและเฝ้าระวังไม่ให้ศัตรูพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในราชอาณาจักร โดยก่อนการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืช จะต้องดำเนินการสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับศัตรูแอปเปิลในสาธารณรัฐประชาชนจีน เพื่อให้ทราบถึงศัตรูพืชที่สำคัญที่อาจติดเข้ามากับผลแอปเปิลสดนำเข้า และเมื่อตรวจพบไรศัตรูพืชในสกุล Amphitetranychus ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นไรเพศเมีย จะต้องนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อให้ขยายพันธุ์จนได้ไรศัตรูพืชเพศผู้ จากนั้นจึงนำไปจำแนกชนิด เพื่อวินิจฉัยว่าเป็นศัตรูพืชกักกันหรือไม่ ซึ่งหากตรวจพบว่าเป็นศัตรูพืชกักกัน นอกจากจะต้องดำเนินการตามมาตรการกักกันพืชเหมือนการตรวจพบศัตรูพืชทั่วไปแล้ว ยังจะต้องแจ้งเตือนไปยังประเทศต้นทางตามหลักการของอนุสัญญาเครือข่ายข้อมูลด้านสุขอนามัยพืช หรือ IPPC (International Plant Protection Convention) ด้วย นอกจากนั้น ผลการศึกษาชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับผลแอปเปิลสดนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีนในครั้งนี้ ยังสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงทางวิชาการ สามารถนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อกำหนดมาตรการทางสุขอนามัยพืชให้มีประสิทธิภาพ รัดกุม และเหมาะสมกับสถานการณ์การนำเข้าผลแอปเปิลสดในปัจจุบัน

อภิปรายผล (Discussion)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าผลอุ่นที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีนมีศัตรูพืชกักกัน 5 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยหอย *Aspidiotus nerii*, วัชพืช *Chenopodium album* เชื้อรา *Botryotinia fuckeliana*, *Guignardia bidwellii* และ *Elsinoë ampelina* และจากการศึกษาชนิดศัตรูพืชที่ติดมากับผลอุ่นนาเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยสุ่มตัวอย่างผลอุ่นที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 –เดือนกันยายน พ.ศ. 2562 ปริมาณทั้งสิ้น นาเข้าทั้งหมด 7,899 shipment ปริมาณ 131,880,396 กิโลกรัม มูลค่า 1,408,937,394 ล้านบาท นำมาตรวจสอบศัตรูพืชพบ หนอนแมลงวันผลไม้; *Bactocera dorsalis* 3 ครั้ง เพลี้ยแป้ง 18 ส่วนการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ตรวจพบเชื้อรา 5 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Alternaria alternata* 87 ครั้ง *Penicilium* sp. 51 ครั้ง *Cladosporium* sp. 54 ครั้ง ราแป้ง; *Oidium* sp.11 ครั้ง แอนแทรกโนส; *Collectotrichum* gloeosporioides 9 ครั้ง ระหว่างทาการศึกษาไม่พบศัตรูพืชกักกันเป้าหมาย

ผลการศึกษาชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับกุหลาบตัดดอกจากประเทศเนเธอแลนด์ พบว่าการตรวจพบศัตรูพืชดังกล่าวสามารถใช้สำหรับอ้างอิงทางวิชาการ เพื่อกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชให้เหมาะสมกับชนิดสินค้าพืช และสามารถนำเข้ามูลมาวิเคราะห์ความเสี่ยงศักยภาพการทำลายและการพัฒนาการทำลายพืชของศัตรูพืชที่พบ เจ้าหน้าที่ต้องเพิ่มความเข้มงวดโดยการเพิ่มปริมาณการสุ่มตรวจในปริมาณเพิ่มขึ้นจากเดิม และการใช้ดุลพินิจในการกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีที่เหมาะสม พนักงานเจ้าหน้าที่ควรให้ความสำคัญในการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืช โดยตรวจ

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารหรืองานวิจัยเกี่ยวกับศัตรูพืชกุหลาบเพื่อให้ทราบถึงศัตรูสำคัญของกุหลาบและช่วงเวลาการแพร่ระบาดซึ่งอาจติดเข้ามากับกุหลาบตัดดอกนำเข้าจากประเทศเนเธอแลนด์ โดยจากการวิจัยควรเฝ้าระวังศัตรูพืช ๑๐ ชนิด ข้างต้นที่ได้รายงานไปแล้วนั้น โดยการเฝ้าระวังระหว่างช่วงเวลาการระบาดของศัตรูพืช ช่วงระยะเวลาที่มีการนำเข้ามากซึ่งจะส่งผลถึงแมลงศัตรูพืชที่อาจปนเปื้อนเข้ามา จึงควรมีการตรวจศัตรูพืชเพื่อนำเข้าส่งออกเข้มงวดยิ่งขึ้น เพื่อป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในราชอาณาจักร และเผยแพร่ให้ผู้ที่เกี่ยวข้องนำไปปฏิบัติให้เกิดประโยชน์ เช่น นายตรวจพืช พนักงานเจ้าหน้าที่ที่ปฏิบัติงานเกี่ยวข้องด้านสุขอนามัยเพื่อเป็นแนวทางการปฏิบัติงานที่ตั้งอยู่บนพื้นฐานเดียวกันของด่านที่มีการนำเข้าไม้ตัดดอก หรือนำไปปรับใช้กับการตรวจศัตรูพืชในสินค้าพืชชนิดอื่นต่อไป

จากการศึกษาชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับผลแอปเปิลสดนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน ณ ด่านตรวจพืชเชียงของ ปีงบประมาณ 2564 (ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2563 ถึง 30 กันยายน 2564) จำนวน 599 shipments ปริมาณและมูลค่าการนำเข้า 10,199.52 ตัน และ 236.68 ล้านบาท ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าศัตรูพืชเป้าหมายที่สำคัญของผลแอปเปิลสดเป็นไรศัตรูพืช โดยเฉพาะไรแดง *Amphitetranychus viennensis* (Zacher) ซึ่งเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย และจากการสุ่มตรวจผลแอปเปิลสดที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน พบไรรวมทั้งสิ้น 7 ชนิด 6 วงศ์ เป็นไรศัตรูพืช 4 ชนิด 3 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Tetranychidae 2 ชนิด คือ *Tetranychus* sp. และ *Amphitetranychus* sp. วงศ์ Tarsonemidae 2 ชนิด คือ *Tarsonemus* sp. และ *Steneotarsonemus* sp. และวงศ์ Tydeidae แต่เนื่องจากไม่พบไรเพศผู้จึงไม่สามารถจำแนกถึงระดับชนิด (Species) ได้ นอกจากนั้น ยังพบไรศัตรูธรรมชาติ ได้แก่ ไรตัวห้ำ 2 ชนิด คือ *Amblyseius adjaricus* (Wainstein & Vartapetov) และ *Amblyseius californicus* (McGregor) และไรกินเชื้อรา (Oribatid mite) ซึ่งไรศัตรูพืชที่ตรวจพบทั้งหมดเป็นศัตรูพืชทั่วไป (Common Pest) ไม่ใช่ศัตรูพืชกักกัน (Quarantine Pest) ยกเว้น *Amphitetranychus* sp. ที่ไม่สามารถระบุได้ แต่มีโอกาสสูงมากว่าไรที่ตรวจพบอาจเป็นชนิดที่เป็นศัตรูพืชกักกัน เนื่องจาก A. *veinnensis* มีรายงานในต่างประเทศว่าพบการเข้าทำลายในผลแอปเปิลสด และในปี 2550 พลอยชมพูและคณะ ตรวจพบไรแดง A. *veinnensis* บนผลแอปเปิลสดจากสาธารณรัฐประชาชนจีน ส่วนไรชนิดอื่นในสกุล Amphitetranychus มีรายงานการตรวจพบในพืชชนิดอื่น ดังนั้น พนักงานเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชจึงจะต้องเพิ่มความเข้มงวดในการตรวจสอบศัตรูพืชและเฝ้าระวังไม่ให้ศัตรูพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในราชอาณาจักร โดยก่อนการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืช จะต้องดำเนินการสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับศัตรูแอปเปิลในสาธารณรัฐประชาชนจีน เพื่อให้ทราบถึงศัตรูพืชที่สำคัญที่อาจติดเข้ามากับผลแอปเปิลสดนำเข้า และเมื่อตรวจพบไรศัตรูพืชในสกุล Amphitetranychus ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นไรเพศเมีย จะต้องนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อให้ขยายพันธุ์จนได้ไรศัตรูพืชเพศผู้ จากนั้นจึงนำไปจำแนกชนิด เพื่อวินิจฉัยว่าเป็นศัตรูพืชกักกันหรือไม่ ซึ่งหากตรวจพบว่าเป็นศัตรูพืชกักกัน นอกจากจะต้องดำเนินการตามมาตรการกักกันพืชเหมือนการตรวจพบศัตรูพืชทั่วไปแล้ว ยังจะต้องแจ้งเตือนไปยังประเทศต้นทางตามหลักการของอนุสัญญาเครือข่ายข้อมูลด้านสุขอนามัยพืช หรือ IPPC (International Plant Protection Convention) ด้วย นอกจากนั้น ผลการศึกษาชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับผลแอปเปิลสดนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีนในครั้งนี้ ยังสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงทางวิชาการ สามารถนำข้อมูล

กรมวิชาการเกษตร

มาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อกำหนดมาตรการทางสุขอนามัยพืชให้มีประสิทธิภาพ รัดกุม และเหมาะสมกับสถานการณ์การนำเข้าผลแอปเปิลสดในปัจจุบัน

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

ผลจากการสุ่มตัวอย่างตาม ISPM no. 31 และนำมาตรวจสอบชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับผลแอปเปิลสดนำเข้าจากจีน ญี่ปุ่น กุหลาบตัดดอกจากจีน และเนเธอร์แลนด์ และผลองุ่นสดนำเข้าจากจีน ด้วยวิธีการเบื้องต้นและขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ตรวจแล้วไม่พบศัตรูพืชกักกัน

จากการศึกษานี้สามารถนำข้อมูลของศัตรูพืชที่ตรวจพบกับผลไม้และไม้ตัดดอกที่นำเข้าจากต่างประเทศไปใช้ประโยชน์ในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบประกอบการนำไปใช้วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อปรับปรุงกฎหมาย และเงื่อนไขการนำเข้า กำหนดมาตรการสุขอนามัยพืช และจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชที่ตรวจพบของกับผลไม้และไม้ตัดดอกรวมทั้งเก็บตัวอย่างที่ตรวจพบเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มวิจัยการกักกันพืชเพื่อใช้ประโยชน์ในการสืบค้นต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

3.2 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง (Output) (ภาคผนวก)

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
1. องค์ความรู้	**19**	**เรื่อง**	1. องค์ความรู้ใหม่	19	**เรื่อง**	ได้ข้อมูลพื้นฐานเพื่อจัดทำข้อมูลเชิงสัมพันธ์ของศัตรูพืชที่ติดมากับพืชนำเข้า - เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากอินเดีย จีน สหรัฐอเมริกา และเนเธอร์แลนด์ - เมล็ดพันธุ์แตงโมจาก สหรัฐอเมริกา อินเดีย ญี่ปุ่น อิสราเอล ชิลี และฟิลิปปินส์ - เมล็ดพันธุ์เมลอนจากสหรัฐอเมริกา อินเดีย ญี่ปุ่น อิสราเอล ชิลี และเนเธอร์แลนด์ - เมล็ดพันธุ์พริกจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา - เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมจาก จีน และสหรัฐอเมริกา - หัวพันธุ์มันฝรั่งจาก สกอตแลนด์ ออสเตรเลียเนเธอร์แลนด์ และแคนาดา - ผลแอปเปิ้ลจากญี่ปุ่น - กุหลาบตัดดอกจากจีน - *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่ง นำเข้าจากต่างประเทศ - เมล็ดพันธุ์ผักกาดหัวจากนิวซีแลนด์ และญี่ปุ่น - เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากอินเดีย และสหรัฐอเมริกา - ผลองุ่นสดจากจีน - เมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งจากจีน และนิวซีแลนด์ - เชื้อไฟโตพลาสมาที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ - เมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีจากนิวซีแลนด์ และญี่ปุ่น - เมล็ดพันธุ์ผักชีจากอิตาลี และสหรัฐอเมริกา - เมล็ดพันธุ์คะน้าจากจีน และนิวซีแลนด์ - กุหลาบตัดดอกจากเนเธอแลนด์ - แอบเปิลผลสดจากจีน	- ได้รายชื่อศัตรูพืชและศัตรูพืชกักกันกับพืชนำเข้าจากต่างประเทศเพื่อสามารถแนะนำการจัดการศัตรูพืช หรือมีมาตรการจัดการศัตรูพืชตามมาตรฐานสุขอนามัยพืชได้อย่างทันถ่วงที - ได้รายชื่อศัตรูพืชกักกันเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับประกาศเงื่อนไขการนำเข้าพืชจากต่างประเทศ - เกษตรกรได้พืชหรือผลิตผลพืชที่ปราศจากศัตรูพืชร้ายแรงนำมาเพาะปลูกลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช ส่งผลให้ลดต้นทุนการผลิตพืช

กรมวิชาการเกษตร

3.3 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง (Outcome) (ถ้ามี)

ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลลัพธ์
นำข้อมูลรายชื่อศัตรูพืชและศัตรูพืชกักกันสนับสนุนเพื่อประกอบการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชให้มีประสิทธิภาพ รัดกุม และเหมาะสมกับสถานการณ์ปัจจุบัน กับศัตรูพืชกักกันและกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าให้มีความเหมาะสม	2565

*ผลลัพธ์ : ผลสำเร็จที่เกิดจากการนำผลผลิต (Output)ไปต่อยอด การเปลี่ยนรูปของผลผลิตไปสู่รูปแบบที่ใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง หรือการเคลื่อนผลผลิตไปสู่กิจกรรมที่ต่อเนื่อง ซึ่งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลง (Change) ที่ปรากฏชัด และมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม

3.4 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง (Impact) (ถ้ามี)

ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลกระทบ
ด้านเศรษฐกิจ : ลดค่าใช้จ่ายในการจัดซื้อสารเคมีกำจัดศัตรูพืช	2565
ด้านสังคม : เกษตรกรสามารถผลิตพืชได้อย่างยั่งยืน ทำการเกษตรได้อย่างต่อเนื่อง มีรายได้จากการผลิตพืช ทำให้คุณภาพชีวิตดีขึ้น	2565
ด้านสิ่งแวดล้อม : ไม่มีศัตรูพืชชนิดใหม่ที่ร้ายแรงเข้ามาในประเทศไทยทำให้ และสิ่งแวดล้อมไม่ถูกทำลายเพิ่มจากการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช	2565

* ผลกระทบ : ผลประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงตามผลลัพธ์ (Results of the change) ซึ่งวัดได้อย่างชัดเจนและมีหลักฐานปรากฏชัด (Evidence-based) ทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม ทั้งที่วัดในเชิงปริมาณได้และไม่ได้ ผลกระทบอาจเป็นได้ทั้งทางบวกและทางลบ

3.5 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากการศึกษานี้สามารถนำข้อมูลของศัตรูพืชที่ตรวจพบ ไปใช้ประโยชน์ในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบประกอบการนำไปใช้วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อปรับปรุงกฎหมาย และเงื่อนไขการนำเข้า กำหนดมาตรการสุขอนามัยพืช และจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชที่ตรวจพบ รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่ตรวจพบเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มวิจัยการกักกันพืชเพื่อใช้ประโยชน์ในการสืบค้นต่อไป

ด้านวิชาการ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร ได้นำข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืชกักกันแจ้งไปยังประเทศปลายทาง และได้กำหนดมาตรการในการป้องกันศัตรูพืชก่อนที่จะมีการนำเข้ามายังประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล

สรุปผลและอภิปรายผล

ผลจากการสุ่มตัวอย่างและตรวจสอบชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากอินเดีย จีน สหรัฐอเมริกา และเนเธอร์แลนด์ เมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา อินเดีย ญี่ปุ่น อิสราเอล ชิลี และฟิลิปปินส์ เมลอนนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา อินเดีย ญี่ปุ่น อิสราเอล ชิลี และเนเธอร์แลนด์ เมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้าจากจีนและสหรัฐอเมริกา เมล็ดพันธุ์ผักกาดหัวนำเข้าจากนิวซีแลนด์ เมล็ดพันธุ์คะน้านำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน และประเทศนิวซีแลนด์ ด้วยวิธีการเบื้องต้น และขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ตรวจแล้วไม่พบศัตรูพืชกักกัน

จากการสุ่มตัวอย่างและตรวจสอบชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งจากสกอตแลนด์ ออสเตรเลีย เนเธอร์แลนด์ และแคนาดา ด้วยวิธีการเบื้องต้น และขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ตรวจพบศัตรูพืชกักกัน 1 ชนิด คือ *Spongospora subterranea* ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งจากสกอตแลนด์ ออสเตรเลีย และเนเธอร์แลนด์ โดยได้ดำเนินมาตรการทางด้านกักกันพืช

จากการตรวจติดตามเชื้อ *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากต่างประเทศ ด้วยวิธีการเบื้องต้น และขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ไม่พบศัตรูพืชกักกัน

ผลจากการสุ่มตัวอย่างและตรวจสอบชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดนำเข้าจากอินเดียและสหรัฐอเมริกาด้วยวิธีการเบื้องต้น ตรวจพบร่องรอยการทำแมลง เมื่อนำไปจัดจำแนกชนิดพบว่า เป็นแมลงสกุล *Trogoderma* 2 ชนิด คือ *Trogoderma granarium* และ *T. variabile* และเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่ตรวจพบ T. *granarium* และ *T. variabile* ได้รับการกำจัดศัตรูพืชโดยการรมด้วยเมทิลโบรไมด์อัตรา 80 กรัม/ลูกบาศก์เมตร นาน 48 ชั่วโมงก่อนส่งกลับประเทศต้นทางและขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติ และในแปลงปลูกพืช การระบาดของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด (Fall army worm, *Spodoptera frujiperda*) ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดภายหลังการนำเข้าในพื้นที่ผลิต 17 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น ชัยภูมิ นครราชสีมา อุบลราชธานี กาญจนบุรี สระบุรี ลพบุรี นครสวรรค์ พิษณุโลก กำแพงเพชร ตาก แม่ฮ่องสอน แพร่ ลำพูน ลำปาง เชียงใหม่ และเชียงราย และได้ดำเนินการด้านมาตรการสุขอนามัยพืช เช่นการเฝ้าระวังศัตรูพืช และการสำรวจติดตามอย่างต่อเนื่อง โดยใช้กับดักฟีโรโมนล่อแมลง และสังเกตด้วยตาเปล่าอย่างเข้มงวดในทุกพื้นที่ที่มีการผลิตข้าวโพด

ผลจากการสุ่มตัวอย่างและตรวจสอบชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีนำเข้าจากนิวซีแลนด์ และญี่ปุ่น ด้วยวิธีการเบื้องต้น และขั้นละเอียด ในห้องปฏิบัติการ ตรวจพบเมล็ดวัชพืชกักกัน 1 ชนิด ได้แก่ *Polygonum convolvulus* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีนำเข้าจากญี่ปุ่น โดยได้ดำเนินการตามมาตรการในการจัดการศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย โดยให้ผู้ประกอบการที่นำเข้ามา ทำลายหรือส่งเมล็ดพันธุ์กลับโดยได้ดำเนินมาตรการทางด้านกักกันพืช

ผลจากการสุ่มตัวอย่างและตรวจสอบชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งนำเข้าจากนิวซีแลนด์และจีน ด้วยวิธีการเบื้องต้น และขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ตรวจพบ Polygonum aviculare, Chenopodium albumได้ควบคุมโดยอาศัยพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 และที่แก้ไขเพิ่มเติม เพื่อป้องกันมิให้วัชพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดภายในประเทศไทย เช่น ฝังกลบ เผาทำลาย หรือส่งกลับประเทศต้นทาง

กรมวิชาการเกษตร

ส่วนผลการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้า ด้วยวิธีการขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ จาก 9 ประเทศ ไม่พบไฟโตพลาสมาติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ

ผลจากการสุ่มตัวอย่างและตรวจสอบชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากอินเดีย จีน สหรัฐอเมริกา และเนเธอร์แลนด์ เมล็ดพันธุ์แตงโมนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา อินเดีย ญี่ปุ่น อิสราเอล ชิลี และฟิลิปปินส์ เมลอนนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา อินเดีย ญี่ปุ่น อิสราเอล ชิลี และเนเธอร์แลนด์ เมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้าจากจีนและสหรัฐอเมริกา เมล็ดพันธุ์ผักกาดหัวนำเข้าจากนิวซีแลนด์ เมล็ดพันธุ์คะน้านำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน และประเทศนิวซีแลนด์ ด้วยวิธีการเบื้องต้น และขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ตรวจแล้วไม่พบศัตรูพืชกักกัน

จากการสุ่มตัวอย่างและตรวจสอบชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งจากสกอตแลนด์ ออสเตรเลีย เนเธอร์แลนด์ และแคนาดา ด้วยวิธีการเบื้องต้น และขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ตรวจพบศัตรูพืชกักกัน 1 ชนิด คือ *Spongospora subterranea* ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งจากสกอตแลนด์ ออสเตรเลีย และเนเธอร์แลนด์ โดยได้ดำเนินมาตรการทางด้านกักกันพืช

จากการตรวจติดตามเชื้อ *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากต่างประเทศ ด้วยวิธีการเบื้องต้น และขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ไม่พบศัตรูพืชกักกัน

ผลจากการสุ่มตัวอย่างและตรวจสอบชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดนำเข้าจากอินเดียและสหรัฐอเมริกาด้วยวิธีการเบื้องต้น ตรวจพบร่องรอยการทำแมลง เมื่อนำไปจัดจำแนกชนิดพบว่า เป็นแมลงสกุล *Trogoderma* 2 ชนิด คือ *Trogoderma granarium* และ *T. variabile* และเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่ตรวจพบ T. *granarium* และ *T. variabile* ได้รับการกำจัดศัตรูพืชโดยการรมด้วยเมทิลโบรไมด์อัตรา 80 กรัม/ลูกบาศก์เมตร นาน 48 ชั่วโมงก่อนส่งกลับประเทศต้นทางและขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติ และในแปลงปลูกพืช การระบาดของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด (Fall army worm, *Spodoptera frujiperda*) ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดภายหลังการนำเข้าในพื้นที่ผลิต 17 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น ชัยภูมิ นครราชสีมา อุบลราชธานี กาญจนบุรี สระบุรี ลพบุรี นครสวรรค์ พิษณุโลก กำแพงเพชร ตาก แม่ฮ่องสอน แพร่ ลำพูน ลำปาง เชียงใหม่ และเชียงราย และได้ดำเนินการด้านมาตรการสุขอนามัยพืช เช่นการเฝ้าระวังศัตรูพืช และการสำรวจติดตามอย่างต่อเนื่อง โดยใช้กับดักฟีโรโมนล่อแมลง และสังเกตด้วยตาเปล่าอย่างเข้มงวดในทุกพื้นที่ที่มีการผลิตข้าวโพด

ผลจากการสุ่มตัวอย่างและตรวจสอบชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีนำเข้าจากนิวซีแลนด์ และญี่ปุ่น ด้วยวิธีการเบื้องต้น และขั้นละเอียด ในห้องปฏิบัติการ ตรวจพบเมล็ดวัชพืชกักกัน 1 ชนิด ได้แก่ *Polygonum convolvulus* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีนำเข้าจากญี่ปุ่น โดยได้ดำเนินการตามมาตรการในการจัดการศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย โดยให้ผู้ประกอบการที่นำเข้ามา ทำลายหรือส่งเมล็ดพันธุ์กลับโดยได้ดำเนินมาตรการทางด้านกักกันพืช

ผลจากการสุ่มตัวอย่างและตรวจสอบชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งนำเข้าจากนิวซีแลนด์และจีน ด้วยวิธีการเบื้องต้น และขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ตรวจพบ *Polygonum aviculare,*

กรมวิชาการเกษตร

Chenopodium album ได้ควบคุมโดยอาศัยพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 และที่แก้ไขเพิ่มเติม เพื่อป้องกันมิให้วัชพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดภายในประเทศไทย เช่น ฝังกลบ เผาทำลาย หรือส่งกลับประเทศต้นทาง

ส่วนผลการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้า ด้วยวิธีการขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ จาก 9 ประเทศ ไม่พบไฟโตพลาสมาติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ

จากการศึกษานี้สามารถนำข้อมูลของศัตรูพืชที่ตรวจพบกับเมล็ดพืช หัวพันธุ์พืชที่นำเข้าจากต่างประเทศไปใช้ประโยชน์ในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบประกอบการนำไปใช้วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อปรับปรุงกฎหมาย และเงื่อนไขการนำเข้า กำหนดมาตรการสุขอนามัยพืช และจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชที่ตรวจพบของกับเมล็ดพืช หัวพันธุ์พืชรวมทั้งเก็บตัวอย่างที่ตรวจพบเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มวิจัยการกักกันพืชเพื่อใช้ประโยชน์ในการสืบค้นต่อไป

ผลจากการสุ่มตัวอย่างตาม ISPM no. 31 และนำมาตรวจสอบชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับผลแอปเปิลสดนำเข้าจากจีน ญี่ปุ่น กุหลาบตัดดอกจากจีน และเนเธอร์แลนด์ และผลองุ่นสดนำเข้าจากจีน ด้วยวิธีการเบื้องต้นและขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ตรวจแล้วไม่พบศัตรูพืชกักกัน

จากการศึกษานี้สามารถนำข้อมูลของศัตรูพืชที่ตรวจพบกับผลไม้และไม้ตัดดอกที่นำเข้าจากต่างประเทศไปใช้ประโยชน์ในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบประกอบการนำไปใช้วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อปรับปรุงกฎหมาย และเงื่อนไขการนำเข้า กำหนดมาตรการสุขอนามัยพืช และจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชที่ตรวจพบของกับผลไม้และไม้ตัดดอกรวมทั้งเก็บตัวอย่างที่ตรวจพบเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มวิจัยการกักกันพืชเพื่อใช้ประโยชน์ในการสืบค้นต่อไป

ข้อเสนอแนะต่อผู้เกี่ยวข้องสำหรับการดำเนินงานในระยะต่อไป

จากการศึกษานี้สามารถนำข้อมูลของศัตรูพืชที่ตรวจพบ ไปใช้ประโยชน์ในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืชที่ตรวจพบประกอบการนำไปใช้วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อปรับปรุงกฎหมาย และเงื่อนไขการนำเข้า กำหนดมาตรการสุขอนามัยพืช และจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชที่ตรวจพบ รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่ตรวจพบเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มวิจัยการกักกันพืชเพื่อใช้ประโยชน์ในการสืบค้นต่อไป

ปัญหาและอุปสรรคในการทำงาน

ผลมังคุดจากอินโดนีเซีย เมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีจากนิวซีแลนด์ ไม่มีการนำเข้าจึงไม่สามารถดำเนินงานวิจัยได้

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2552. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวมันฝรั่งจากแคนาดา พ.ศ. 2552. ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 126 ตอนพิเศษ 114 ง. หน้า 72-80.

กรมวิชาการเกษตร. 2552. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวมันฝรั่งจากสหรัฐอเมริกา พ.ศ. 2552. ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 126 ตอนพิเศษ 170 ง. หน้า 46-54.

กรมวิชาการเกษตร. 2552. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าหัวมันฝรั่งจากเครือรัฐออสเตรเลีย พ.ศ. 2552. ราชกิจจานุเบกษา. 2552. เล่ม 126 ตอนพิเศษ 114 ง.

กรมวิชาการเกษตร. 2551. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง หลักเกณฑ์ วิธีการ และ เงื่อนไข การนำเข้าหรือนำผ่านซึ่งสิ่งต้องห้าม สิ่งกำกัด และสิ่งไม่ต้องห้าม พ.ศ. 2551. ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 125 ตอน พิเศษ 165 ง. หน้า 23-29.

กรมวิชาการเกษตร. 2550. 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.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2551. พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดย พระราชบัญญัตกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551. ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 125 ตอนที่ 40 ก. หน้า 28-37.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2542. พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดย พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 116 ตอนที่ 39 ก. หน้า 1-9.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2507. พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507. ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 81 ตอนที่27 ฉบับพิเศษ หน้า 1-12.

กลุ่มวิจัยการกักกันพืช. 2557. ข้อมูลการนำเข้าพืช ปี 2554-2557.กลุ่มวิจัยการกักกันพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

จุมพล สาระนาค อรพรรณ วิเศษสังข์ และจักรพงษ์ เจิมศิริ. 2540. โรคผัก. คู่มือนักวิชาการภาคสนาม ฝ่ายวิเคราะห์และบริการ. สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6, กรมวิชาการเกษตร. 113 หน้า.

ชลธิชา รักใคร่ ศรีวิเศษ เกษสังข์ นงพร มาอยู่ดี ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ วันเพ็ญ ศรีชาติ วานิช คำพานิช และโสภา พิศวงปราการ. 2556. การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากต่างประเทศ. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2556. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

นงพร มาอยู่ดี ชลธิชา รักใคร่ จรรยา มณีโชติ และชาญชัย แสงหิรัญ. 2556. การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักชีนำเข้าจากต่างประเทศ. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2556. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

นวลศรี โชตินันท์. 2554. ศัตรูมะพร้าวต่างถิ่น...สาเหตุมะพร้าวตายนับหมื่น. ผลิใบ. 14 (6): 9-12.

นวลศรี โชตินันท์. 2555. หนอนหัวดำ ศัตรูตัวร้ายทำลายมะพร้าว. ผลิใบ. 15 (6): 9-12.

กรมวิชาการเกษตร

ประเทือง ศรีสุข ดรุณี วงศ์ศศิธร วิชา ธิติประเสริฐ อุดร อุณหวุฒิ สุวนิตย์ จีรวงส์ ศรีวิเศษ เกษสังข์ และคมสัน จำรูญพงษ์. 2533. การกักกันพืชในประเทศไทย. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. กรุงเทพ. 83 หน้า.

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ วันเพ็ญ ศรีชาติ และวานิช คำพานิช. 2549. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรอยดกับเมล็ดมะเขือเทศที่เหมาะสมในงานกักกันพืช. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2549. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ วันเพ็ญ ศรีชาติ และวานิช คำพานิช. 2555. การศึกษาชนิดของศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากต่างประเทศ. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2555. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

พัฒนา สนธิรัตน ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร สหมิตรพริ้นติ้ง จ.นนทบุรี. 285 น.

ศศิวิมล แสวงผล เชฎฐ์ สาทรกิจ และทยา เจนจิตติกุล. 2546. สารานุกรมผลิตผลและผลิตภัณฑ์จากพืชในซุปเปอร์มาร์เก็ต ฉบับคอมพิวเตอร์. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

ศิริณี พูนไชยศรี ชลิดา อุณหวุฒิ พรรณเพ็ญ ชโยภาส รัตนา นชะพงษ์ ลักขณา บำรุงศรี สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี ยุวรินทร์ บุญทบ และณัฐวัฒน์ แย้มยิ้ม. 2548. แมลง การจำแนกและการเก็บตัวอย่าง. กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 100 หน้า.

ศิริณี พูนไชยศรี และ ลักขณา บำรุงศรี. 2554. แมลงปากดูดชนิดที่สำคัญของประเทศไทย. กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง, กลุ่มกีฏและสัตววิทยา, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์สหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. 142 น

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537 โรคของผักและการป้องกันกำจัด ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 198 หน้า.

สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ อลงกต โพธิ์ดี วาสนา ฤทธิ์ไธสง และคมศร แสงจินดา. 2554. การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2554. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ และ Kai-Shu Ling. 2556. การจัดการความเสี่ยงสำหรับไวรอยด์ในพืชวงศ์โซลานาซีอี้และเมล็ดพันธุ์. หน้า 837 - 846. *ใน* การประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 11. ขอนแก่น

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2557. ข้อมูลการนำเข้าพืช ปี 2554-2556 *ณ* ด่านตรวจพืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร . 2556. สถิติการนำเข้าข้าวโพดปี 2556. กลุ่มบริการวิชาการ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2556. สถิติการนำเข้า-ส่งออกสินค้าเกษตรที่สำคัญ. สถิติการนำเข้าองุ่นสดปริมาณและมูลค่าการนำเข้ารายเดือน ปี 2550-2555. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

กรมวิชาการเกษตร

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. 2547. เอกสารวิชาการ ศัตรูพืชกักกันที่สำคัญของ แอปเปิ้ล. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 40 หน้า.สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2557. ข้อมูลทางสถิติ นำเข้า- ส่งออกสินค้าที่สำคัญ http://www.oae.go.th/oae. สืบค้นเมื่อ 10 มิถุนายน 2557.

Adkins, S., Webb, S.E., Achor, D., Roberts, P.D. and Baker, C.A. 2007. Identification and characterization of a novel whitefly-transmitted member of the Family Potyviridae solated from cucurbits in Florida. Phytopathology 97: 145-154.

Adkins, S., Webb, S.E., Baker, C.A., and Kousik, C.S. 2008. *Squash vein yellowing virus* detection using nested polymerase chain reaction demonstrates that the cucurbit weed *Momordica charantia* is a reservoir hosts. Plant Dis. 92: 1119-1123.

Ali, A., Abdalla, O., Bruton, B., Fish, W., Sikora, E., Zhang, S., and Taylor, M. 2012. occurrence of viruses infecting watermelon, other cucurbits, and weeds in the parts of Southern United States. Online. Plant Health Progress doi: 10.1094/PHP-2012-0824-01-RS.

Ali, A., Mohammad, O., and Khattab, A. 2012. Distribution of viruses infecting cucurbit crops and isolation of potential new virus-like sequences from weeds in Oklahoma. Plant Dis. 96 : 243-248.

Anonymous. 1968. A Practical Short Term Course in Plant Quarantine for international Fellows Studying in Australia. Department of External Affairs and Department of Health, Australia. 236 pp.

Ark, P.A. and M.W. Gardner. 1944. Carrot bacterial blight as it affects the roots. Phytopathology, 34: 415-420.

Australian Quarantine & Inspection Service. 1998. Final import risk analysis of the importation of fruit of Fuji Apple *Malus pumila* Miller var. *domestica* Schneider) from Aomori prefecture in Japan. Australian Quarantine & Inspection Service. GPO Box 858. Canberra ACT 2601. AUSTRALIA . 61 pp.

Babadoost, M. and Ravanlou A. 2012. Outbreak of bacterial spot (*Xanthomonas cucurbitae*) in pumpkin fields in Illinois. Plant Dis. 96 (8) pp. 1222.

Bailiss, K.W. and S.K. Offei. 1990. *Alfalfa mosaic virus* in lucerne seed during seed maturation and storage, and in seedlings. Plant Pathology, 39 (3): 539-547.

Barbe, L. 1984. Black rot of grapevines. Arboriculture Fruitiere, 31 (359): 29-30.

Bedi, P.S., G. Singh and D. Suryanaryana, 1969. Field evaluation of Aureofungin and other chemicals to control anthracnose disease of grapes in Punjab. Hindustan Antibiotic Bulletin, 11: 251-253.

กรมวิชาการเกษตร

Block, C.C., J.H. Hill and D.C. McGee, 1999. Relationship between late-season severity of Stewart's bacterial wilt and seed infection in maize. Plant Disease, 83(6): 527-530.

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.

Bradbury, J.F. 1981. *Pseudomonas cichorii*. CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria, No. 695. Wallingford, UK: CAB International.

Bradbury, J.F. 1986. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. Wallingford, UK: CAB International.

CABI. 2014. Crop Protection Compendium (2014 edition). Copyright © 2014 CABI. CAB International is a registered EUtrademark Available source: http://www.cabi.org/CABI/ (site date: April 20, 2014).

CABI. 2007. Crop Protection Compendium, 2007 ed. Wallingford, U.K.: CAB International [CD-ROM].

Chang, R.J., Ries, S.M. and Pataky, J.K. 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. Phytopathology, 81(10): 1276-1281.

Cuppels, D.A. and A. Kelman. 1980. Isolation of pectolytic fluorescent psuedomonads from soil and potatoes. Phytopathology, 70(11): 1110-1115.

Córdoba-Sellés Mdel, C., García-Rández, A., Alfaro-Fernández, A., Jordá-Gutiérrez, C. 2007. Seed transmission of *Pepino mosaic virus* and efficacy of tomato seed disinfection treatments. Plant Disease, 91(10): 1250-1254.

Dhanvantari, B.N. 1989. Effect of seed extraction methods and seed treatments on control of tomato bacterial canker. Canadian Journal of Plant Pathology, 11(4): 400-408.

Dhanvantari, B.N. 1994. Further studies on seed treatment for tomato bacterial canker. Proceedings of the 10th Annual Tomato Disease Workshop. 49-51.

Dhanvantari, B.N., Brown, R.J. 1993. Improved seed treatments for control of bacterial canker of tomato. Canadian Journal of Plant Pathology, 15(3): 201-205.

Dreier, J., Bermpohl, A., Eichenlaub, R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology, 85(4): 462-468.

Douhan, L.I. and D.A. Johnson. 2001. Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium dahliae* from spearmint and peppermint. Plant Disease, 85(3) : 297-302; 38 ref.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

Edwardson, J.R. and R.G. Christie. 1997. Viruses infecting peppers and other solanaceous crops. Vol.1. Viruses infecting peppers and other solanaceous crops. Vol. 1. 336 pp.

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. EFSA Journal 9 (8): 2330. 133 pp.

Erwin D.C. and O.K. Ribeiro, 1996. Phytophthora Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press. St Paul, Minnesota, USA.

Fatmi, M., Schaad, N.W. and Bolkan, H.A. 1991. Seed treatments for eradicating Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis from naturally infected tomato seeds. Plant Disease, 75(4): 383-385.

Gitaitis, R., D. Sumner, D. Gay, D. Smittle, G. McDonald, B. Maw, W.C.III. Johnson, B. Tollner, and Y. Hung. 1997. Bacterial streak and bulb rot of onion: I. A diagnostic medium for the semi selective isolation and enumeration of *Pseudomonas viridiflava*. Plant Disease, 81 (8): 897-900; 24 ref.

Gupta, G.K. and Singh, D. 1996. Resistance to downy mildew in pearl millet hybrid NHB-3. Indian Phytopathology, 40(2): 178-180.

Hancock, D.L., E.L. Hamacek, A.C. Lloyd and M.M. Elson-Harris. 2000. The distribution and host plants of fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Australia. Department of Primary Industries, Queensland, Information Series Q199067: 1-75.

Hardwick, D.F. 1965. The corn earworm complex. Memoirs of the Entomological Society of Canada. 40: 1-247.

Hayward A.C., and Waterston J.M. 1964. *Corynebacterium sepedonicum*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 14. Wallingford, UK: CAB International.

Lee, I.M., Bartoszyk, I.M., Gundersen, D.E., Mogen, B., Davis, R.E. 1997. Nested PCR for ultrasensitive detection of the potato ring rot bacterium, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Applied and Environmental Microbiology, 63(7): 2625-2630.

Hughes, A.M. 1976. The mites of stored food and houses. Technical Bulletin, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, No. 9, Ed. 2: (4) 400 pp.

International Seed Federation. 2011. Method for the Detection of *Lettuce mosaic virus* on Lettuce seed and Seedlings. http://www.worldseed.org/isf/ishi-vegetable.html. (site date: Sep. 23, 2014).

International Seed Federation. 2011. Method for the Detection of *Pepino mosaic virus* on Tomato seed. http://www.worldseed.org/isf/ishi-vegetable.html. (site date: Sep. 23, 2014).

กรมวิชาการเกษตร

International Seed Federation. 2015. Method for the Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomato seed. http://www.worldseed.org/isf/ishi-vegetable.html. (site date: May 28, 2016).

International Seed Testing Association. 2016a. International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association (ISTA). Bassersdort, Switzerland. (site date: Sep. 20, 2013).

International Seed Testing Association. 2016b. Detection of *Squash mosaic virus, Cucumber green mottle mosaic virus* and *Melon necrotic virus* in cucurbit seed. International Rules for Seed Testing 2016. 11 pp.

International Seed Testing Association. 2018. International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association (ISTA). Bassersdort, Switzerland.

Jarvis, W. R. 1992**.** Cucumber diseases**.** Agriculture Canada. Communications Branch. Canada. 49 p.

Jeppson, L.R., H.H. Keifer and E.W. Baker. 1975. Mites Injurious to Economic Plants. Berkeley, USA: University of California Press.

Jones, J.B., Jones J.P., Stall and Zitter R.E. 1991. Compendium of Tomato Diseases. The American Phytopathologal Society. St.Paul, USA. 73 pp.

Kao, J., Jia, L., Tian, T., Rubio, L. and Falk, B.W. 2000. First report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (genus *Crinivirus*) in North America. Plant Disease, 84(1): 101.

Kato, K., Hanada, K., and Kameya-Iwaki, M. 2000. *Melon yellow spot virus*: A Distinct Species of the Genus *Tospovirus* Isolated from Melon. Phytopathology 90: 422-426.

Kimble, K.A., R.G. Grogan., A.S. Greathead, A.O. Paulus and J.K. House. 1975. Development, application and comparison of methods for indexing lettuce seed for mosaic virus in California. Plant Disease Reporter: 59(6): 461-464.

Komuro, Y., A. Tochichara, R. Fukatsu, Y. Nagai and S. Yoneyama. 1971. *Cucumber green mottle mosaic virus* (Watermelon strain) in watermelon and its bearing on deterioration of watermelon fruit known as “Konnyaku”. Ann. Phytopathol. Soc. Jap. 37: 34–42.

Kuan, T.L., G.V. Minsavage and R.L. Gabrielson. 1985. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* in carrot seed. Plant Disease. 69 pp. 758-760.

Linda, W. Davis. 1993. Weed Seeds of the Great Plains A Handbook for Indentification. 208 p.

Ling, K.S. 2008. *Pepino mosaic virus* on tomato seed: virus location and mechanical transmission. Plant Disease, 92(12): 1701-1705.

Ling, K.S. 2010. *E*ffectiveness of chemo- and thermo-therapeutic treatments on *Pepino mosaic virus* in tomato seed. Plant Disease, 94(3): 325-328.

Liquido, N.J., L.A. Shinoda and R.T. Cunningham. 1991. Host plants of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): an annotated world review. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America, 77: 1-52.

Liu, H. W., Luo, L. X., Li, J. Q., Liu, P. F., Chen, X. Y., Hao and J. J. 2014. Pollen and seed transmission of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Cucumber. Plant Pathology, 63: (1) pp. 72-77.

Mansfeld-Giese, K. 1997. Plant-to-plant transmission of the bacterial ring rot pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Potato Research, 40 (2): 229-235.

Mariano, R.L.R. and S.M. McCarter. 1993. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weed species. Microbial Ecology, 26 (1): 47-58.

Martyn, R. D., Miller, M. E. and Bruton, B. D. 1993. Diseases of Cucurbits (*Citrullus* spp., *Cucumis* spp., *Cucurbita* spp., and others). Common Names of Plant Diseases. The American phytopathological Society. APS net Plant pathology Online. (http://www.apsnet.org/online/common/names/ cucurbit.asp) (site date: April 20, 2014).

Mathur, S.B. and O. Kongdal. 2003. Common Laboratory Seed Health Testing Method for Detecting Fungi. Copehagen. Denmark. 425 pp.

Murant, A.F. 1970. *Tomato black ring virus*. Commonwealth Mycological Institute / Association of Applied Biologists Descriptions of Plant Viruses No. 38. Wallingford, UK: CAB International, 4 pp.

Nelson, G.A., 1984. Survival of *Corynebacterium sepedonicum* in potato stems and on surfaces held at freezing and above-freezing temperatures. American Potato Journal, 62(1): 23-28; [2 tab.].

OEPP/ EPPO, 2013a. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diagnostic protocols for regulated pests, PM7/42(2). EPPO Bulletin, 43(1): 46-67.

OEPP/ EPPO, 2013b. *Pepino masaic virus*. Diagnostic protocols for regulated pests, PM7/113(1). EPPO Bulletin, 43(1): 94-104.

Ogiso, H., T. Shimuzu, T. Kawano and Y. Takahashi. 1997. Detection of *Pseudomonas chichorii*, one of the Pathogens of lettuce bacterial rot, from lettuce leaves with ELISA procedure. Proceedings of the Kanto Tosan Plant Protection Society, 44: 57- 61.

Ohki, T., Sako, I., Kanda, A., Mochizuki, T., Honda, Y., and Tsuda, S. 2008. A New Strain of *Molon necrotic spot virus* that is Unable to Systemically Infect *Cucurmis melo*. Phytopathology 98: 1165-1170.

Onuki, M., Kubota, K., and Okuda, M. 2014. Development of RT-PCR Assay Using a Primer Cocktail for eight Virus Species Infecting Melon (*Cucumis melo*) and Cucumber

กรมวิชาการเกษตร

(*Cucumis sativus*).(http://www.agris.fao.org/agris-search/search.do? recordID= JP2008002749) (site date: April 20, 2014).

Ok-Kyung K., Key-Woon L., and Natsuaki, K.T. 2009**.** Occurrence and Molecular Characterization of *Kyuri green mottle mosaic virus* Isolated from Oriental Melon in Korea**.** J. Agric. Sci., Tokyo Univ. Agric., 54 (2). 71-78 pp.

Özdemir, Z. and Zitter, T. A. 2006. Bacterial leaf spot (*Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*) as a factor in cucurbit production and evaluation of seed treatments for control in naturally infested seeds. Cucurbitaceae, 17-21 September 2006, pp. 498-506.

Ozgonen, H. and M. Gulcu, 2011. Determination of mycoflora of pea (*Pisum sativum*) seeds and the effects of *Rhizobium leguminosorum* on fungal pathogens of peas. African Journal of Biotechnology, 10(33): 6235-6240.

Pastrik, K.H. and Rainey, F.A. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. Journal of Phytopathology, 147(11-12): 687-693.

Palti, J. 1974. Striking divergences in the distribution of *Leveillula taurica* (Lev.) Arn. on some major crop hosts. Phytopathologia Mediterranea, 13(1/2): 17-22.

Rich, A.E. 1983. *Potato Diseases*. Academic Press, New York, 238 pp.

Richardson M.J. 1990. An Annotated List of Seed-Borne Diseases. 4 th Ed. International Seed Testing Association, Zurich.

Rubio, L. Ab;ou-Jawsah, Y., Lin, H., and Falk W.B. 2001. Geographically distant isolates of the *Crinivirus Cucurbit yellow stunting disorder virus* show very low genetic diversity in the coat protein gene. Journal of General Virology. 82: 929-933.

Salomone, A. and Roggero, P. 2002. Host range, seed transmission and detection by ELISA and lateral flow of an Italian isolate of *Pepino mosaic virus*. Journal of Plant Pathology. 84(1): 65-68.

Sands, D.C., L. Hankin and M. Zucker. 1972. A selective medium for pectolytic fluorescent Pseudomonads. Phytopathology. 62: 998-1000.

Schuster, M.L., C.C. Smith and M. Ziegelbein. 1985. Inheritance of expression of specific symptoms associated with leaf freckles of maize incited by Corynebacterium nebraskense.. Fitopatologia Brasileira. 10(1) : 159-162.

Shahriari, D. and H. Rahimian. 2002. Occurrence of bacterial leaf spot and blight of cucurbits in Varamin and evaluation of the resistance of some cultivars and lines of cucumber to the disease. Iranian Journal of Plant Pathology. 38: 1-2.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Smith, I.M., D.G. McNamara, P.R. Scott and K.M. Harris. 1992. Quarantine pests for Europe: data sheets on quarantine pests for the European Communities and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization. Wallingford, UK.

Sousa Santos, M., Cruz L., Norskov P., Rasmussen O.F. 1997. A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. Seed Science and Technology. 25(3): 581-584.

Stevenson, W.R., Loria, R., Franc, G.D. and Weingartner, D.P. 2004. Compendium of Potato Diseases. The American Phytopathologal Society. St.Paul, USA. 106 pp.

Thyr, B.D., Webb, R.E., Jaworski, C.A., and Ratcliffe, T.J. 1973. Tomato bacterial canker: control by seed treatment. Plant Disease Reporter. 57: 974-977.

Tomlinson, J.A., Faithfull, E.M. 1984. Studies on the occurrence of *Tomato bushy stunt virus* in English rivers. Annals of Applied Biology, 104 (3): 485-495.

Tzanetakis, I.E., A.B., Halgren, W.M., Wintermantel, K.E., Keller and R.R., Martin. 2004. Two *criniviruses* are associated with the strawberry pallidosis disease. Acta Horticulturae. 656: 21-26.

Varveri, C., N. Vassilokos and F. Bem. 2002. Characterization and detection of *Cucumber green mottle mosaic virus* in Greece. Phytoparasitica. 30: 493-501.

Vannacci, G. and S. Pecchia. 1988. Location and transmission of seed-borne *Alternaria raphani* Groves and Skolko in *Raphanus sativus* L.: a case study. Archiv fur Phytopathologie and Pflanzenschutz, 24(4): 305-315.

Williford, R.E. and N.W. Schaad. 1984. Agar medium for selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* from carrot seeds. Phytopathology. 74, 1142

Whyte, C.F. 2009. Explanatory Document on International Standard for Phytosanitary Measures No.31 (Methodologies for Sampling of Consignments Available. http://www.ippc.int/file_uploaded/1252507962732_ISPM31ED_in format.pdf. (1 September 2010).). (Online).

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.

Zitter T.A., Hopkins D.L. and Thomas C.E. 1996. Compendium of cucurbit diseases. APS Press St. Paul, USA.

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก

ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง (Output) (พร้อมแนบหลักฐาน)

ปีดำเนินงานวิจัย	ชนิดพืช	ประเทศนำเข้า	ปริมาณนำเข้า (กิโลกรัม)	จำนวนครั้งนำเข้า	ชนิดศัตรูพืช	ความถี่การตรวจพบ	สถานภาพ
2559-2560	มะเขือเทศ	อินเดีย	3, 785.60	67	Fungi		
					Curvularia lunata	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Fusarium monoliforme	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Fusarium oxysporum	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Phoma sp.	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Virus		
					Tobacco mosaic virus (TMV)	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Tomato mosaic virus (ToMV)	1	ศัตรูพืชในประเทศ
		จีน	54	10	ไม่พบศัตรูพืช	-	-
2559-2560	แตงโม	สหรัฐอเมริกา		60	Fungi		
					Fusarium oxysporum	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Fuarium solani	1	ศัตรูพืชในประเทศ
		อินเดีย		36	Fungi		
					Drechslera halodes	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Curvularia pallescens	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Cladosporium sp.	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Phoma cucurbitacearum	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Fusarium oxysporum	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					F. Solani	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Macrophomina phaseolina	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Drechslera hawaiiensis	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Acidovorax avenae subsp. *citrulli*	2	ศัตรูพืชในประเทศ
2559-2560	เมลอน	สหรัฐอเมริกา		30	Fungi		
					Fusarium oxysporum	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					F. solani	1	ศัตรูพืชในประเทศ
		อินเดีย		19	Fungi		
					Drechslera halodes	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Macrophomina phaseolina	1	ศัตรูพืชในประเทศ
2559-2560	พริก	อินเดีย	7,183.66	67	Fungi		
					Alternaria tenuis	12	ศัตรูพืชในประเทศ
					Alternaria raphani	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Cercospora capsica	2	ศัตรูพืชในประเทศ
					Curvularia lunata	2	ศัตรูพืชในประเทศ
					Curvularia pallescens	6	ศัตรูพืชในประเทศ
					Drechslera halodes	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Drechslera haweiensis	2	ศัตรูพืชในประเทศ
					Drechslera tetramera	2	ศัตรูพืชในประเทศ
					Fusarium oxysporum	10	ศัตรูพืชในประเทศ
					Fusarium semitectum	2	ศัตรูพืชในประเทศ
					Fusarium solani	5	ศัตรูพืชในประเทศ
					Bacteria		ศัตรูพืชในประเทศ

กรมวิชาการเกษตร

ปีดำเนินงานวิจัย	ชนิดพืช	ประเทศนำเข้า	ปริมาณนำเข้า (กิโลกรัม)	จำนวนครั้งนำเข้า	ชนิดศัตรูพืช	ความถี่การตรวจพบ	สถานภาพ
					Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*	2	ศัตรูพืชในประเทศ
							ศัตรูพืชในประเทศ
					Virus	6	ศัตรูพืชในประเทศ
					Cucumber mosaic virus	8	ศัตรูพืชในประเทศ
					Tobacco mosaic virus	5	ศัตรูพืชในประเทศ
					Tomato mosaic virus		
		จีน	1,781.34	51	Fungi		
					Alternaria alternata	6	ศัตรูพืชในประเทศ
					Curvularia pallescens	8	ศัตรูพืชในประเทศ
					Drechslera cynodontis	2	ศัตรูพืชในประเทศ
					Virus		
					Cucumber mosaic virus	4	ศัตรูพืชในประเทศ
					Pepper mild mottle mosaic virus	2	ศัตรูพืชในประเทศ
					Tobacco mosaic virus	8	ศัตรูพืชในประเทศ
					Tomato mosaic virus	6	ศัตรูพืชในประเทศ
2559-2560	ผักกาดหอม	จีน	33,252.4	11	Fungi		
					Alternaria raphani	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Alternaria tenuis	8	ศัตรูพืชในประเทศ
					Cladosporium sp.	2	ศัตรูพืชในประเทศ
					Curvularia lunata	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Drechslera halodes	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Fusarium semitectum	2	ศัตรูพืชในประเทศ
					Fusarium oxysporum	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Ulocladium sp.	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Virus		
					Lettuce mosaic virus	1	ศัตรูพืชกักกัน
					Weed		
					Ageratina adephora	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Amaranthus retroflexus	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Amaranthus viridis	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Cleome vicosa	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Eleusine indica	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Setaria viridis	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Sonchus arvensis	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Oxalis corniculata	1	ศัตรูพืชในประเทศ
		สหรัฐอเมริกา	6,685.69	14	*Alternaria tenuis*	1	ศัตรูพืชในประเทศ
2559-2560	มันฝรั่ง	สก๊อตแลนด์	1,885,850	8	*Spongospora subterranea*	8	อยู่ในระดับที่ยอมรับได้
		ออสเตรเลีย	650,600	1	*Spongospora subterranea*	1	อยู่ในระดับที่ยอมรับได้
2559-2560	มันฝรั่ง	สก็อตแลนด์	2,920,300	22	ไม่พบ *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*	-	ไม่พบ
		เนเธอร์แลนด์	1,040,850	10	ไม่พบ *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*	-	ไม่พบ

กรมวิชาการเกษตร

ปีดำเนินงานวิจัย	ชนิดพืช	ประเทศนำเข้า	ปริมาณนำเข้า (กิโลกรัม)	จำนวนครั้งนำเข้า	ชนิดศัตรูพืช	ความถี่การตรวจพบ	สถานภาพ
		ออสเตรเลีย	705,200	3	ไม่พบ *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*	-	ไม่พบ
		สหรัฐอเมริกา	1,205	1	ไม่พบ *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*	-	ไม่พบ
		เปรู	36	1	ไม่พบ *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*	-	ไม่พบ
		เกาหลี	0.78	1	ไม่พบ *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*	-	ไม่พบ
2559-2560	ผลแอปเปิ้ล	ญี่ปุ่น	337,480	655	ไร	5	ศัตรูพืชในประเทศ
2559-2560	กุหลาบตัดดอก	จีน	1,804,581	1,130	เพลี้ยไฟ (*Frankliniella occidentalis*)	32	ศัตรูพืชในประเทศ
					ไรสองจุด (*Tetranychidae*)	903	ศัตรูพืชในประเทศ
					ไข่ไรสองจุด (*Tetranychidae*)	155	ศัตรูพืชในประเทศ
					หนอนเจาะดอก (Pyralidae)	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					ดักแด้แมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*)	24	ศัตรูพืชในประเทศ
					โรคราน้ำค้าง (*Peronospora* sp.)	205	ศัตรูพืชในประเทศ
					โรคราแป้ง (*Oidium* sp.)	23	ศัตรูพืชในประเทศ
					โรคราสีเทา (*Botrytis* sp.)	85	ศัตรูพืชในประเทศ
					โรคแอนแทรกโนส (Anthracnose)	15	ศัตรูพืชในประเทศ
2561-2562	มะเขือเทศ	สหรัฐอเมริกา	54.50	98	Fungi		
					Fusrium oxysporum	2	ศัตรูพืชในประเทศ
					virus		
					ToMV	2	ศัตรูพืชในประเทศ
		เนเธอแลนด์	145.33	127	TMV	1	ศัตรูพืชในประเทศ
2561-2562	แตงโม	ญี่ปุ่น		16	Fungi		
					Cladosporium sp.	1	
		อิสราเอล		8	ไม่พบศัตรูพืช	-	
	เมเลอน	ญี่ปุ่น		50	ไม่พบศัตรูพืช	-	
		อิสราเอล		9	ไม่พบศัตรูพืช	-	
2561-2562	พริก	เนเธอแลนด์	42.183	47	Fungi		
					Fusarium oxysporum	4	ศัตรูพืชในประเทศ
					Virus		
					Tomato mosaic virus	2	ศัตรูพืชในประเทศ
		สหรัฐอเมริกา	115.40	88	Fungi		
					Fusarium oxysporum	6	ศัตรูพืชในประเทศ
					Virus		
					Tomato mosaic virus	2	ศัตรูพืชในประเทศ
2561-2562	มันฝรั่ง	เนเธอแลนด์	780,620	12	*Spongospora subterranea*	7	อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ทั้งหมด
		แคนาดา	432,000	1	ไม่พบศัตรูพืช	-	-
2561-2562	ผักกาดหัว	นิวซีแลนด์	93,802.9	14	Fungi		
					Alternaria raphani	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Alternaria brassicicola	2	ศัตรูพืชในประเทศ
					Alternaria alternata	2	ศัตรูพืชในประเทศ

กรมวิชาการเกษตร

ปีดำเนินงานวิจัย	ชนิดพืช	ประเทศนำเข้า	ปริมาณนำเข้า (กิโลกรัม)	จำนวนครั้งนำเข้า	ชนิดศัตรูพืช	ความถี่การตรวจพบ	สถานภาพ
					Cladosporium sp.	3	ศัตรูพืชในประเทศ
					weed		
					Linum usitatissmum	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Galium spp.	1	ศัตรูพืชในประเทศ
		ญี่ปุ่น	10,760.46	12	Fungi		
					Alternaria raphani	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Alternaria brassicicola	2	ศัตรูพืชในประเทศ
					Alternaria alternata	2	ศัตรูพืชในประเทศ
					Cladosporium sp.	3	ศัตรูพืชในประเทศ
2561-2562	ข้าวโพด	อินเดีย	1,032,340	52	Fungi		
					Cephalosporium acremonium	3	ศัตรูพืชในประเทศ
					Fusarium moniliforme	18	ศัตรูพืชในประเทศ
		สหรัฐอเมริกา	10,040	18	Fungi		
					Fusarium moniliforme	5	ศัตรูพืชในประเทศ
					Insect		
					Trogoderma granarium	1	ศัตรูพืชกักกัน
					Trogoderma variabile	1	ศัตรูพืชกักกัน
2561-2562	ผลองุ่น	จีน	131,880,396	7,899	หนอนแมลงวันผลไม้; *Bactocera*	3	ศัตรูพืชในประเทศ
					dorsalis	18	ศัตรูพืชในประเทศ
					เพลี้ยแป้ง (Mealy bugs)	87	ศัตรูพืชในประเทศ
					Alternaria alternata	51	ศัตรูพืชในประเทศ
					Penicilium sp	54	ศัตรูพืชในประเทศ
					Cladosporium sp.	11	ศัตรูพืชในประเทศ
					Oidium sp.	9	ศัตรูพืชในประเทศ
					Collectotrichum gloeosporioides	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Nigrospora sp.		
2561-2562	ผลมังคุด	อินโดนีเซีย	ยกเลิกการนำเข้า				
2562-2563	กวางตุ้ง	นิวซีแลนด์	339,197.27	31	Fungi		
					Alternaria raphani	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Cladosporium sp.	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Weed		
					Polygonum aviculare	1	ศัตรูพืชกักกัน
					Chenopodium album	2	ศัตรูพืชกักกัน
					Persicaria lapathifolia	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Galium spp.	4	-
		จีน	31,475.92	24	Fungi		
					Alternaria raphani	4	ศัตรูพืชในประเทศ
					Alternaria brassicicola	4	-
					Alternaria tenuis	1	-
					Cladosporium sp.	1	ศัตรูพืชในประเทศ
					Ulocladium sp	1	
					Weed		-
					Galium spp.	2	-
					Chenopodium sp.	1	

กรมวิชาการเกษตร

ปีดำเนินงานวิจัย	ชนิดพืช	ประเทศนำเข้า	ปริมาณนำเข้า (กิโลกรัม)	จำนวนครั้งนำเข้า	ชนิดศัตรูพืช	ความถี่การตรวจพบ	สถานภาพ
2562-2563	มะเขือเทศ	อินเดีย			ไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา	-	-
		สหรัฐอเมริกา			ไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา	-	-
		เนเธอแลนด์			ไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา	-	-
		ฟิลิปปินส์			ไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา	-	-
		จีน			ไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา	-	-
		ฮองกง			ไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา	-	-
2563-2564	แตงโม	ชิลี		3	ไม่พบศัตรูพืช	-	-
		ฟิลิปปินส์		3	ไม่พบศัตรูพืช	-	-
2563-2564	เมลอน	ชิลี		1	ไม่พบศัตรูพืช	-	-
		เนเธอแลนด์		1	ไม่พบศัตรูพืช	-	-
2563-2564	กะหล่ำปลี	ญี่ปุ่น	5,780.16	16	Fungi *Alternaria brassicicola* *Alternaria raphani* *Cladosporium* sp. *Ulocladium* sp	 4 2 3 1	 ศัตรูพืชในประเทศ ศัตรูพืชในประเทศ ศัตรูพืชในประเทศ ศัตรูพืชในประเทศ
		นิวซีแลนด์	0	-	-	-	
2563-2564	ผักชี	อิตาลี	360,500	20	Fungi *Alternaria alternata* *Alternaria raphani* Weed *Convolvulus arvensis* *Carthamus lanatus*	 3 7 3 1	 ศัตรูพืชในประเทศ ศัตรูพืชในประเทศ ศัตรูพืชในประเทศ ศัตรูพืชในประเทศ
		สหรัฐอเมริกา	392,005	19	Fungi *Alternaria alternata* *Alternaria raphani* Weed *Convolvulus arvensis*	 4 3 1	 ศัตรูพืชในประเทศ ศัตรูพืชในประเทศ ศัตรูพืชในประเทศ
2563-2564	คะน้า	จีน	14,242.31	9	Fungi *Alternaria alternata* *Alternaria brassicicola*	 1 1	 ศัตรูพืชในประเทศ ศัตรูพืชในประเทศ
		นิวซีแลนด์	127,774	8	Fungi *Alternaria alternata* *Alternaria brassicicola*	 3 1	 ศัตรูพืชในประเทศ ศัตรูพืชในประเทศ
2563-2564	กุหลาบ	เนเธอแลนด์			เพลี้ยไฟ (*Frankliniella occidentalis*.) ไรสองจุด (*Tetranychus urticae*) โรคราน้ำค้าง (*Peronospora* sp.) โรคดอกเน่าหรือโรคราสีเทา (*Botrytis* sp.) โรคราแป้ง (*Oidium* sp.)	2 2 2 2 2	ศัตรูพืชในประเทศ ศัตรูพืชในประเทศ ศัตรูพืชในประเทศ ศัตรูพืชในประเทศ
2564	แอปเปิล	จีน	10,199.52	599	*Tetranychus* sp. *Amphitetranychus* sp. *Tarsonemus* sp. *Steneotarsonemus* sp.	5 2 1 4	เนื่องจากไม่พบเพศผู้ จึงไม่สามารถจำแนกถึงระดับชนิด (Species) ได้

กรมวิชาการเกษตร

ฉบับที่ ๒/๒๕
Form P.Q. 7/4

Department of Agriculture
Ministry of Agriculture and Cooperatives
Bangkok, Thailand

NOTIFICATION OF NON-COMPLIANCE

To Plant Protection Service of Republic of India

1. This is to declare that the plant or plant products described below have been intercepted for the Following reasons:
   - ☐ 1.1 No permit
   - ☐ 1.2 No phytosanitary certificate
   - ☐ 1.3 The phytosanitary certificate was unacceptable for the follow reason:
   - ☑ 1.4 The plant or plant products were infected/infested by: *Tobacco mosaic virus* (TMV)
   - ☐ 1.5 Importation of the plant and plant products in question prohibited.
   - ☐ 1.6 Others:

2. The following measures have been taken
   - ☐ 2.1 Destruction
   - ☐ 2.2 Return
   - ☑ 2.3 Treatment (Trisodium phosphate)
   - ☐ 2.4 Remove infected/ infested produce from consignment
   - ☐ 2.5 Quarantine period imposed
   - ☐ 2.6 Others

3. Description of the intercepted part of consignment
   - 3.1 Botanical name: *Capsicum annuum*
   - 3.2 Quantity: 31.590 Kgs

4. Information on the interception
   - 4.1 Import inspection at Suvarnabhumi Airport Plant Quarantine Station 4.2 On (date) March 29th, 2019

5. Detail of consignment
   - 5.1 Name and address of exporter: MONSANTO HOLDINGS PRIVATE LIMITED AIHURA CENTRE,5th FLOOR, 96 MAHAKALI CAVES RD,ANDHERI (E) MUMBAI,MAHARASHTRA 400093 INDIA
   - 5.2 Name and address of consignee: MONSANTO THAILAND LIMITED 22nd FLOOR ,RASA TOWER I ,555 PHAHOLOYOTHIN ROAD,CHATUCHAK BANGKOK 10900 THAILAND
   - 5.3 Distinguishing marks: Batch 01905860086
   - 5.4 Means of conveyance: Airfreight
   - 5.5 Phytosanitary certificate No.PSC10Mum2019023369
   - 5.6 Issued at: MUMBAI
   - 5.7 On (date) March 07th, 2019

6. Sender of message: Technical Group, Office of Agricultural Regulation
   Contact: arig@doa.in.th

7. Interception file
   - 7.1 Reference No. 67/2019
   - 7.2 Date August 01st, 2019

Signature of authorized officer
Phatchayaphon M.
(Dr. Phatchayaphon Meunchang)
Director, Office of Agricultural Regulation

กรมวิชาการเกษตร

Form P.Q. 7/4

Department of Agriculture
Ministry of Agriculture and Cooperatives
Bangkok, Thailand

NOTIFICATION OF NON-COMPLIANCE

To Plant Protection Service of Republic of India

1. This is to declare that the plant or plant products described below have been intercepted for the Following reasons;
   - ☐ 1.1 No permit
   - ☐ 1.2 No phytosanitary certificate
   - ☐ 1.3 The phytosanitary certificate was unacceptable for the follow reason:
   - ☑ 1.4 The plant or plant products were infected/infested by: *Tobacco mosaic virus* (TMV)
   - ☐ 1.5 Importation of the plant and plant products in question prohibited.
   - ☐ 1.6 Others:

2. The following measures have been taken
   - ☐ 2.1 Destruction
   - ☐ 2.2 Return
   - ☑ 2.3 Treatment (Trisodium phosphate)
   - ☐ 2.4 Remove infected/ infested produce from consignment
   - ☐ 2.5 Quarantine period imposed
   - ☐ 2.6 Others

3. Description of the intercepted part of consignment
   - 3.1 Botanical name: *Capsicum annuum*
   - 3.2 Quantity: Nett : 72,030 Kgs

4. Information on the interception
   - 4.1 Import inspection at Suvarnabhumi Airport Plant Quarantine Station 4.2 On (date) April 02nd, 2019

5. Detail of consignment
   - 5.1 Name and address of exporter: MONSANTO HOLDINGS PRIVATE LIMITED AHURA CENTRE,5th FLOOR, 96 MAHAKALI CAVES RD,ANDHERI (E) MUMBAI,MAHARASHTRA 400093 INDIA
   - 5.2 Name and address of consignee: MONSANTO THAILAND LIMITED 22nd FLOOR ,RASA TOWER 1 ,555 PHAHOLOYOTHIN ROAD,CHATUCHAK BANGKOK 10900 THAILAND
   - 5.3 Distinguishing marks: Batch 0190377637
   - 5.4 Means of conveyance: Airfreight
   - 5.5 Phytosanitary certificate No.PSC10Mum2019014402
   - 5.6 Issued at: MUMBAI
   - 5.7 On (date): February 14th, 2019

6. Sender of message: Technical Group, Office of Agricultural Regulation
   Contact: arteg@doa.in.th

7. Interception file
   - 7.1 Reference No. 68/2019
   - 7.2 Date August 01st, 2019

Signature of authorized officer

Phatchayaphon M.

(Dr. Phatchayaphon Meunchang)

Director, Office of Agricultural Regulation

กรมวิชาการเกษตร

พณ W.11. ๒๓๗
Form P.Q. 7/4

Department of Agriculture
Ministry of Agriculture and Cooperatives
Bangkok, Thailand

NOTIFICATION OF NON-COMPLIANCE

To Plant Protection Service of Republic of India

1. This is to declare that the plant or plant products described below have been intercepted for the Following reasons;
   - ☐ 1.1 No permit
   - ☐ 1.2 No phytosanitary certificate
   - ☐ 1.3 The phytosanitary certificate was unacceptable for the follow reason:
   - ☑ 1.4 The plant or plant products were infected/infested by: *Tobacco mottle mosaic virus*
   - ☐ 1.5 Importation of the plant and plant products in question prohibited.
   - ☐ 1.6 Others:

2. The following measures have been taken
   - ☑ 2.1 Destruction
   - ☐ 2.2 Return
   - ☐ 2.3 Treatment
   - ☐ 2.4 Remove infected/ infested produce from consignment
   - ☐ 2.5 Quarantine period imposed
   - ☐ 2.6 Others

3. Description of the intercepted part of consignment
   - 3.1 Botanical name: *Solanum lycopersicum L.*
   - 3.2 Quantity: 0.200 Kgs

4. Information on the interception
   - 4.1 Import inspection at Suvarnabhumi Airport Plant Quarantine Station 4.2 On (date) February 15th, 2019

5. Detail of consignment
   - 5.1 Name and address of export: HM.CLAUSE INDIA P.1. 6-98/4 SURVEY NO.563/PART, GOWDAVELLI VILLAGE, MEDCHAL MANDAL RANGA REDDY DISTRICT TELANGANA STATE 501401 INDIA
   - 5.2 Name and address of consignee: HM.CLAUSE (THAILAND) CO., LTD. 1 EMPIRE TOWER 18TH FLOOR UNIT 1801 SOUTH SATHORN ROAD YANNAWA SATHORN BANGKOK 10120 THAILAND
   - 5.3 Distinguishing marks: -
   - 5.4 Means of conveyance: Airfreight
   - 5.5 Phytosanitary certificate No.PSC17Hyd2019000278
   - 5.6 Issued at HYDERABAD
   - 5.7 On (date) January 23rd, 2019

6. Sender of message: Technical Group, Office of Agricultural Regulation
   Contact: arig@doa.in.th

7. Interception file
   - 7.1 Reference No. 66/2019
   - 7.2 Date August 01st, 2019

Signature of authorized officer
Phatchayaphon M.

(Dr. Phatchayaphon Meunchang)

Director, Office of Agricultural Regulation

กรมวิชาการเกษตร

แบบ พ.ก. ๙/๔
Form P.Q. 7/4

Department of Agriculture
Ministry of Agriculture and Cooperatives
Bangkok, Thailand

NOTIFICATION OF NON-COMPLIANCE

To Plant Protection Service of Republic of India

1. This is to declare that the plant or plant products described below have been intercepted for the Following reasons:
   - ☐ 1.1 No permit
   - ☐ 1.2 No phytosanitary certificate
   - ☐ 1.3 The phytosanitary certificate was unacceptable for the follow reason:
   - ☑ 1.4 The plant or plant products were infected/infested by: *Tobacco mosaic virus* (TMV)
   - ☐ 1.5 Importation of the plant and plant products in question prohibited.
   - ☐ 1.6 Others:

2. The following measures have been taken
   - ☐ 2.1 Destruction
   - ☐ 2.2 Return
   - ☑ 2.3 Treatment(Trisodium phosphate)
   - ☐ 2.4 Remove infected/ infested produce from consignment
   - ☐ 2.5 Quarantine period imposed
   - ☐ 2.6 Others

3. Description of the intercepted part of consignment
   - 3.1 Botanical name: *Solanum lycopersicum l.*
   - 3.2 Quantity: Nett: 55.230 Kgs

4. Information on the interception
   - 4.1 Import inspection at Suvarnabhumi Airport Plant Quarantine Station 4.2 On (date) June 06th, 2019

5. Detail of consignment
   - 5.1 Name and address of exporter: MONSANTO HOLDINGS PRIVATE LIMITED AHURA CENTRE,5th FLOOR, 96 MAHAKALI CAVES RD,ANDHERI (E) MUMBAI,MAHARASHTRA 400093 INDIA
   - 5.2 Name and address of consignee: MONSANTO THAILAND LIMITED 22nd FLOOR ,RASA TOWER I ,555 PHAHOLOYOTHIN ROAD,CHATUCHAK BANGKOK 10900 THAILAND
   - 5.3 Distinguishing marks: Batch 0191372605
   - 5.4 Means of conveyance Airfreight
   - 5.5 Phytosanitary certificate No.PSC17Hyd2019003300
   - 5.6 Issued at HYDERABAD
   - 5.7 On (date) May 30th, 2019

6. Sender of message: Technical Group,
   Office of Agricultural Regulation
   Contact: artg@doa.in.th

7. Interception file
   - 7.1 Reference No. 70/2019
   - 7.2 Date August 01st, 2019

Signature of authorized officer

Phatchayaphon M.

(Dr. Phatchayaphon Meunchang)

Director, Office of Agricultural Regulation

สำเนาถูกต้อง

พ.ป.ร. ๙/๔
Form P.Q. 7/4

Department of Agriculture
Ministry of Agriculture and Cooperatives
Bangkok, Thailand

NOTIFICATION OF NON-COMPLIANCE

To Plant Protection Service of Republic of India

1. This is to declare that the plant or plant products described below have been intercepted for the Following reasons:
   - ☐ 1.1 No permit
   - ☐ 1.2 No phytosanitary certificate
   - ☐ 1.3 The phytosanitary certificate was unacceptable for the follow reason:
   - ☑ 1.4 The plant or plant products were infected/infested by: *Tobacco mosaic virus* (TMV)
   - ☐ 1.5 Importation of the plant and plant products in question prohibited.
   - ☐ 1.6 Others:

2. The following measures have been taken
   - ☐ 2.1 Destruction
   - ☐ 2.2 Return
   - ☑ 2.3 Treatment(Trisodium phosphate)
   - ☐ 2.4 Remove infected/ infested produce from consignment
   - ☐ 2.5 Quarantine period imposed
   - ☐ 2.6 Others

3. Description of the intercepted part of consignment
   - 3.1 Botanical name: *Solanum lycopersicum L.*
   - 3.2 Quantity: Nett: 105.130 Kgs

4. Information on the interception
   - 4.1 Import inspection at Suvarnabhumi Airport Plant Quarantine Station 4.2 On (date) June 06th, 2019

5. Detail of consignment
   - 5.1 Name and address of exporter: MONSANTO HOLDINGS PRIVATE LIMITED AHURA CENTRE 5th FLOOR, 96 MAHAKALI CAVES RD ANDHERI (E) MUMBAI MAHARASHTRA 400093 INDIA
   - 5.2 Name and address of consignee: MONSANTO THAILAND LIMITED 22nd FLOOR RASA TOWER I 555 PHAHOLOYOTHIN ROAD CHATUCHAK BANGKOK 10900 THAILAND
   - 5.3 Distinguishing marks: Batch 0191194513
   - 5.4 Means of conveyance Airfreight
   - 5.5 Phytosanitary certificate No.PSC17Hyd2019002923
   - 5.6 Issued at HYDERABAD
   - 5.7 On (date) May 15th, 2019

6. Sender of message: Technical Group,
   Office of Agricultural Regulation
   Contact: artg@doa.in.th

7. Interception file
   - 7.1 Reference No. 71/2019
   - 7.2 Date August 01st, 2019

Signature of authorized officer

Phatchayaphon M.

(Dr. Phatchayaphon Meunchang)

Director, Office of Agricultural Regulation

ตัวอย่างเท่านั้น

แบบ พ.ก. ๗/๔
Form P.Q. 7/4

Department of Agriculture
Ministry of Agriculture and Cooperatives
Bangkok, Thailand

NOTIFICATION OF NON-COMPLIANCE

To Plant Protection Service of Republic of India

1. This is to declare that the plant or plant products described below have been intercepted for the Following reasons:
   - ☐ 1.1 No permit
   - ☐ 1.2 No phytosanitary certificate
   - ☐ 1.3 The phytosanitary certificate was unacceptable for the follow reason:
   - ☑ 1.4 The plant or plant products were infected/infested by: *Tobacco mottle mosaic virus* (ToMMV)
   - ☐ 1.5 Importation of the plant and plant products in question prohibited.
   - ☐ 1.6 Others:

2. The following measures have been taken
   - ☐ 2.1 Destruction
   - ☐ 2.2 Return
   - ☑ 2.3 Treatment(Trisodium phosphate)
   - ☐ 2.4 Remove infected/ infested produce from consignment
   - ☐ 2.5 Quarantine period imposed
   - ☐ 2.6 Others

3. Description of the intercepted part of consignment
   - 3.1 Botanical name: *Solanum lycopersicum L.*
   - 3.2 Quantity: Nett: 71.940 Kgs

4. Information on the interception
   - 4.1 Import inspection at Suvarnabhumi Airport Plant Quarantine Station 4.2 On (date) June 07th, 2019

5. Detail of consignment
   - 5.1 Name and address of exporter: MONSANTO HOLDINGS PRIVATE LIMITED AHURA CENTRE 5th FLOOR, 96 MAHAKALI CAVES RD,ANDHERI (E) MUMBAI MAHARASHTRA 400093 INDIA
   - 5.2 Name and address of consignee: MONSANTO THAILAND LIMITED 22nd FLOOR, RASA TOWER I ,555 PHAHOLYOTHIN ROAD,CHATUCHAK BANGKOK 10900 THAILAND
   - 5.3 Distinguishing marks: Batch 0191266887
   - 5.4 Means of conveyance Airfreight
   - 5.5 Phytosanitary certificate No.PSC17Hyd20190003157
   - 5.6 Issued at HYDERABAD
   - 5.7 On (date) May 24th, 2019

6. Sender of message: Technical Group.
   Office of Agricultural Regulation
   Contact: artg@doa.in.th

7. Interception file
   - 7.1 Reference No. 72/2019
   - 7.2 Date August 01st, 2019

Signature of authorized officer

Phatchayaphon M.

(Dr. Phatchayaphon Meunchang)

Director, Office of Agricultural Regulation

กรมวิชาการเกษตร

แบบ พ.ก. ๑๗ค
Form P.Q. 7/4

Department of Agriculture
Ministry of Agriculture and Cooperatives
Bangkok, Thailand

NOTIFICATION OF NON-COMPLIANCE

To Plant Protection Service of Republic of India

1. This is to declare that the plant or plant products described below have been intercepted for the Following reasons:
   - ☐ 1.1 No permit
   - ☐ 1.2 No phytosanitary certificate
   - ☐ 1.3 The phytosanitary certificate was unacceptable for the follow reason:
   - ☑ 1.4 The plant or plant products were infected/infested by: *Tobacco mosaic virus* (TMV)
   - ☐ 1.5 Importation of the plant and plant products in question prohibited.
   - ☐ 1.6 Others:

2. The following measures have been taken
   - ☐ 2.1 Destruction
   - ☑ 2.2 Return
   - ☐ 2.3 Treatment
   - ☐ 2.4 Remove infected/ infested produce from consignment
   - ☐ 2.5 Quarantine period imposed
   - ☐ 2.6 Others

3. Description of the intercepted part of consignment
   - 3.1 Botanical name: *Solanum lycopersicum L.*
   - 3.2 Quantity: Net: 20.00 Kgs

4. Information on the interception
   - 4.1 Import inspection at Suvarnabhumi Airport Plant Quarantine Station 4.2 On (date) May 28th, 2019

5. Detail of consignment
   - 5.1 Name and address of exporter: JK AGRI GENETICS LIMITED 1-10-177,4th FLOOR,VARUN TOWER,BEGUMPET HYDERABAD 500016 INDIA
   - 5.2 Name and address of consignee: DYNAMIC SEEDS CO., LTD. 99/220 TESSABANSONGKROAH LADYAO JATUCHAK BANGKOK 10900 THAILAND
   - 5.3 Distinguishing marks
   - 5.4 Means of conveyance Airfreight
   - 5.5 Phytosanitary certificate No.PSC17Hyd2019002608
   - 5.6 Issued at HYDERABAD
   - 5.7 On (date) May 03rd, 2019

6. Sender of message: Technical Group, Office of Agricultural Regulation
   Contact: artg@doa.in.th

7. Interception file
   - 7.1 Reference No. 85/2019
   - 7.2 Date August 16th, 2019

Signature of authorized officer
Phatchayaphon M.

(Dr. Phatchayaphon Meunchang)

Director, Office of Agricultural Regulation

กรมวิชาการเกษตร

แบบ พ.ก. ๗/๔
Form P.Q. 7/4

Department of Agriculture
Ministry of Agriculture and Cooperatives
Bangkok, Thailand

NOTIFICATION OF NON-COMPLIANCE

To Plant Protection Service of Japan

1. This is to declare that the plant or plant products described below have been intercepted for the Following reasons :
   - ☐ 1.1 No permit
   - ☐ 1.2 No phytosanitary certificate
   - ☐ 1.3 The phytosanitary certificate was unacceptable for the follow reason:
   - ☑ 1.4 The plant or plant products were infected/infested by: *Polygonum convolvulus*
   - ☐ 1.5 Importation of the plant and plant products in question prohibited.
   - ☐ 1.6 Others :

2. The following measures have been taken
   - ☐ 2.1 Destruction
   - ☐ 2.2 Return
   - ☑ 2.3 Treatment
   - ☐ 2.4 Remove infected/ infested produce from consignment
   - ☐ 2.5 Quarantine period imposed
   - ☐ 2.6 Others

3. Description of the intercepted part of consignment
   - 3.1 Botanical name: *Brassica oleracea* L.
   - 3.2 Quantity: Nett: 10 Kilograms

4. Information on the interception
   - 4.1 Import inspection at Suvarnabhumi Airport Plant Quarantine Station 4.2 On (date) May 22nd, 2020

5. Detail of consignment
   - 5.1 Name and address of exporter: THE MUSASHINO SEED CO., LTD. 26-10, MINAMI IKEBUKURO 1-CHOME, TOSHIMA-KU,TOKYO JAPAN
   - 5.2 Name and address of consignee: EAST WEST SEED INTERNATIONAL LIMITED 50/1 MOO3, SAINOI-BANG BUA THONG ROAD, AMPHUR SAINOI NONTHABURI 11150 THAILAND
   - 5.3 Distinguishing marks: -
   - 5.4 Means of conveyance Airfreight (CI835)
   - 5.5 Phytosanitary certificate no. 200-91-0029075
   - 5.6 Issued at YOKOHAMA
   - 5.7 On (date) May 13th 2020

6. Sender of message : Technical Group, Office of Agricultural Regulation
   Contact: arg@doa.in.th

7. Interception file
   - 7.1 Reference No. 96/2020
   - 7.2 Date July 31st, 2020

Signature of authorized officer
Phatchayaphon M.
(Dr. Phatchayaphon Meunchang)
Director, Office of Agricultural Regulation

กรมวิชาการเกษตร

พพ.พ. ๕๗๘
Form P.Q. 7/4

Department of Agriculture
Ministry of Agriculture and Cooperatives
Bangkok, Thailand

NOTIFICATION OF NON-COMPLIANCE

To Plant Protection Service of Italian Republic

1. This is to declare that the plant or plant products described below have been intercepted for the Following reasons ;
   - ☐ 1.1 No permit
   - ☐ 1.2 No phytosanitary certificate
   - ☐ 1.3 The phytosanitary certificate was unacceptable for the follow reason:
   - ☑ 1.4 The plant or plant products were infected/infested by: *Polygonum convolvulus*
   - ☐ 1.5 Importation of the plant and plant products in question prohibited.
   - ☐ 1.6 Others:

2. The following measures have been taken
   - ☐ 2.1 Destruction
   - ☐ 2.2 Return
   - ☑ 2.3 Treatment
   - ☐ 2.4 Remove infected/ infested produce from consignment
   - ☐ 2.5 Quarantine period imposed
   - ☐ 2.6 Others

3. Description of the intercepted part of consignment
   - 3.1 Botanical name: *Coriandrum sativum*
   - 3.2 Quantity: 880 Bags Nett: 22,000 Kilograms

4. Information on the interception
   - 4.1 Import inspection at Port of Bangkok Plant Quarantine Station 4.2 On (date) February 18th 2020

5. Detail of consignment
   - 5.1 Name and address of exporter: ANSEME S.P.A. VIA CIPRO 60 47521 CESENA FC ITALY
   - 5.2 Name and address of consignee: ADVANCE SEEDS CO., LTD. 99/9 MOO 4 SOANPRIKTHAI MUEANG PATHUMTHANI PATHUMTHANI 12000 THAILAND
   - 5.3 Distinguishing marks:
   - 5.4 Means of conveyance Vessel (MSC MANU)
   - 5.5 Phytosanitary certificate n.UE/IT/0918457
   - 5.6 Issued at FORLI(FC)
   - 5.7 On (date) November 19th 2019

6. Sender of message : Technical Group, Office of Agricultural Regulation
   Contact: artg@doa.in.th

7. Interception file
   - 7.1 Reference No. 59/2020
   - 7.2 Date April 20th, 2020

Signature of authorized officer
Phatchayaphon M.
(Dr. Phatchayaphon Meunchang)
Director, Office of Agricultural Regulation

กรมวิชาการเกษตร

แบบ พ.ก. ๗/๔
Form P.Q. 7/4

Department of Agriculture
Ministry of Agriculture and Cooperatives
Bangkok, Thailand

NOTIFICATION OF NON-COMPLIANCE

To Plant Protection Service of Italian Republic

1. This is to declare that the plant or plant products described below have been intercepted for the Following reasons ;
   - ☐ 1.1 No permit
   - ☐ 1.2 No phytosanitary certificate
   - ☐ 1.3 The phytosanitary certificate was unacceptable for the follow reason:
   - ☑ 1.4 The plant or plant products were infected/infested by: *Galium aparine*
   - ☐ 1.5 Importation of the plant and plant products in question prohibited.
   - ☐ 1.6 Others:

2. The following measures have been taken
   - ☐ 2.1 Destruction
   - ☐ 2.2 Return
   - ☑ 2.3 Treatment
   - ☐ 2.4 Remove infected/ infested produce from consignment
   - ☐ 2.5 Quarantine period imposed
   - ☐ 2.6 Others

3. Description of the intercepted part of consignment
   - 3.1 Botanical name: *Coriandrum sativum*
   - 3.2 Quantity: 800 Bags Nett: 20,000 Kilograms

4. Information on the interception
   - 4.1 Import inspection at Port of Bangkok Plant Quarantine Station 4.2 On (date) March 19th ,2020

5. Detail of consignment
   - 5.1 Name and address of exporter: ANSEME S.P.A. VIA CIPRO 60 47521 CESENA FC ITALY
   - 5.2 Name and address of consignee: EAST WEST SEED INTERNATIONAL LIMITED 50/1 MOO2, SAINOI-BANG BUA THONG ROAD, AMPHUR SAINOI NONTHABURI 11150 THAILAND
   - 5.3 Distinguishing marks: -
   - 5.4 Means of conveyance Vessel (NASIA)
   - 5.5 Phytosanitary certificate n.UE/IT/0917937
   - 5.6 Issued at FORLI(FC)
   - 5.7 On (date) January 29th ,2020

6. Sender of message : Technical Group, Office of Agricultural Regulation
   Contact: artg@doa.in.th

7. Interception file
   - 7.1 Reference No. 63/2020
   - 7.2 Date May 28th , 2020

Signature of authorized officer
Phatchayaphon M.
(Dr. Phatchayaphon Meunchang)
Director, Office of Agricultural Regulation

กรมวิชาการเกษตร