

การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวปลี  
ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ

Interception of Quarantine Pest in Imported  
Chinese mustard Seed Consignments

นางพร มาอยู่<sup>1/</sup> ชลธิชา รักใคร่<sup>1/</sup> ทศนีย์ ศรีโสภ<sup>2/</sup>

<sup>1/</sup> กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

<sup>2/</sup> กลุ่มควบคุมพันธุ์พืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

รายงานความก้าวหน้า

ผักกาดเขียวปลี (Chinese mustard : *Brassica juncea* var. *rugosa* L.) เป็นพืชผักอยู่ในวงศ์กะหล่ำ (Brassicaceae) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบประเทศจีน สถิติการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ปี 2555 ปริมาณ 157,909 กิโลกรัม มูลค่า 8,194,557 บาท (กลุ่มควบคุมพันธุ์พืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร) ผักกาดเขียวปลีมีอายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 55-75 วัน มีแหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ จังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง เพชรบูรณ์ กาญจนบุรี ตาก และ น่าน

ข้อมูลศัตรูพืชที่เข้าทำลายส่วนต่างๆ ของผักกาดเขียวปลี มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 32 ชนิด คือเชื้อรา 5 ชนิด แบคทีเรีย 3 ชนิด ไวรัส 2 ชนิด ไร้เดือนฝอย 1 ชนิด แมลง 18 ชนิด และวัชพืช 3 ชนิด และจากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวปลี ที่นำเข้ามาจาก 5 ประเทศ ได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีน อินโดนีเซีย อิตาลี เม็กซิโก และ นิวซีแลนด์ มาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวปลี มีสีขาว เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชชั้นละเอียดที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวปลี ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบเชื้อรา จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria raphani*, *Cladosporium* sp., และ *Ulocladium* sp., แต่จากการนำเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวปลี มาตรวจด้วยวิธี Dilution technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญด้านกักกันพืช และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นผักกาดเขียวปลี ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ไม่แสดงอาการโรคพืช ผลการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวปลี นำเข้ามาจากต่างประเทศ ใน 6 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ ลำพูน เชียงราย อุตรธานี นครนายก และเพชรบูรณ์ ไม่พบเชื้อสาเหตุโรคพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช แต่พบวัชพืชในแปลงปลูกได้แก่ แห้วหมู หญ้านกสีชมพู เทียนนา กระชับ กะเม็ง โทงเทง ลูกใต้ใบ ผักเบี้ยใหญ่ และ ผักเสี้ยนผี ซึ่งศัตรูพืชที่พบทั้งในเมล็ดพันธุ์นำเข้าและตรวจสอบโรคในแปลงปลูก ไม่ใช่ศัตรูพืชด้านกักกันพืชของประเทศไทย

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-03-00-18-56

## คำนำ

ผักกาดเขียวปลี (Chinese mustard: *Brassica juncea* var. *rugosa* L. เป็นพืชผักที่อยู่ในวงศ์  
กระถ่ำ (Brassicaceae) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศจีน สถิติการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ปี 2555 ปริมาณ  
157909 กิโลกรัม มูลค่า 8,194,557 บาท (กลุ่มควบคุมพันธุ์พืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร  
ผักกาดเขียวปลีเป็นผักประเภทอายุปีเดียว ใบเลี้ยงคู่มี ใบไม่มีขน ใบยาวประมาณ 15-50 ระบบราก  
แก้ว ซม กว้าง 5-40 ซม. ใบที่อยู่ด้านบน มีขนาดใหญ่ส่วนใบที่อยู่ถัดเข้าไปจะค่อยๆ เล็กลง ลำต้นตรง  
ทรงพุ่มแคบตันและใบสีเขียว อ่อน โคนก้านยึดติดกับราก และพื้นดิน สีเขียวอ่อนมีใบหุ้มอยู่โดยรอบ  
ข้อดอกแบบกระจะ (raceame) ดอกเกิดที่ยอด ประกอบด้วย กลีบรองดอกสีเขียวอมเหลือง หรือเขียว  
อ่อน ผลสามารถแตกเองได้เมื่อฝักแก่โดยจะแตกเป็นสองแฉกแยกจากข้างล่างขึ้นข้างบน เมล็ดกลมสี  
น้ำตาลและสีดำ มีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 55-75 วันสามารถปลูกได้ตลอดปี แหล่งปลูกที่สำคัญทาง  
ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แถบจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง ตาก น่าน แพร่  
นครราชสีมา มหาสารคาม เขตตะวันตก กาญจนบุรี การปลูกผักกาดเขียวปลีสามารถขึ้นได้ในดินแทบ  
ทุกชนิด แต่ที่เหมาะสมคือดินร่วนซุย สภาพเป็นกลาง อุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส

พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ.  
2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 กำหนดให้เมล็ดพันธุ์พืชผักต่าง ๆ ไม้ดอกหรือ  
ไม้ประดับหลายชนิดจัดเป็นสิ่งต้องห้าม (Prohibited material) สิ่งกัก (Restricted material)  
และสิ่งไม่ต้องห้าม (unprohibited materials) ในการนำเข้ามายังประเทศไทยต้องแจ้งการนำเข้า  
และมีใบรับรองสุขอนามัยพืชจากประเทศต้นทางกำกับมาพร้อมกับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า โดยไม่มี  
มาตรการสุขอนามัยกำหนดไว้แต่อย่างใด การนำเข้าสินค้าเกษตรจากต่างประเทศ มีโอกาสที่ศัตรูพืช  
หลายชนิดที่อาจเป็นศัตรูพืชกักกันที่ร้ายแรงหรือศัตรูพืชที่สำคัญที่ก่อความเสียหายกับผลิตผลทางการ  
เกษตรติดเข้ามาพร้อมกับเมล็ดพืชด้วย โดยอาจเป็นศัตรูพืชร้ายแรงที่ไม่มีปรากฏในประเทศไทย โดยเฉพาะ  
ในกลุ่มของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ติดมากับผักกาดเขียวปลี ซึ่งมีการนำเข้ามาเพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์หรือ  
เป็นต้นพันธุ์ในการส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูกกระจายทั่วประเทศไทย โดยในแต่ละปีมีการนำเข้า  
เมล็ดพันธุ์เหล่านี้ในปริมาณมาก หากศัตรูพืชที่ร้ายแรงซึ่งยังไม่มีรายงานในประเทศไทยติดมากับเมล็ด  
พันธุ์ดังกล่าวสามารถเข้ามาเจริญและแพร่พันธุ์ได้ในประเทศไทย จะก่อให้เกิดผลกระทบทำความ  
เสียหายต่อการเกษตรในประเทศและกระทบต่อการส่งออกพืชผักผลไม้ไทยไปยังต่างประเทศที่มีความ  
เข้มงวดด้านกักกันพืช ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับพืช  
นำเข้า เพื่อให้ทราบชนิด แหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้า และเส้นทางการเข้ามา  
ของศัตรูพืช ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นฐานข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืช มีประโยชน์ใช้อ้างอิงทางวิชาการ  
นำมาพิจารณาหามาตรการเพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชชนิดนั้น ๆ และกำหนดเป็นมาตรการทางด้าน  
กฎหมายและทางวิชาการในการควบคุมการนำเข้า หรือเปลี่ยนแปลงสถานภาพของพืชตาม  
พระราชบัญญัติกักพืชต่อไป

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวปลี นำเข้าจากต่างประเทศ
2. กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope และ compound microscope
3. วัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

4. สารเคมีตรวจสอบเชื้อโรคพืช
5. ภาชนะเก็บตัวอย่างพืช
6. ชุดตรวจสอบศัตรูพืช ( ELISA Kit)
7. หนังสือ และวารสารทั้งในประเทศและต่างประเทศ

#### วิธีการ

### 1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของผักกาดเขียวปลี และข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศ เปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

ทำการสืบค้นข้อมูลจากเอกสาร วารสาร รายงานการประชุมทางวิชาการ อินเทอร์เน็ต เพื่อค้นหาข้อมูลของผักกาดเขียวปลี ลักษณะทั่วไปของพืช สายพันธุ์ พื้นที่การเพาะปลูก รายชื่อของประเทศที่ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ ปริมาณการนำเข้า ข้อมูลชนิดของศัตรูพืชทั้งนอกประเทศและในประเทศ

### 2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขึ้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวปลี นำเข้าใน ห้องปฏิบัติการ

ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวปลี ที่นำเข้าจากต่างประเทศมาทำการตรวจวินิจฉัยโรคและศัตรูพืชขึ้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อตรวจหาตัวอ่อน หนอน แมลง เมล็ดวัชพืช หรือลักษณะเมล็ดต่าง มีสีดำ บิดงอ ขนาดเล็ก ที่มีสาเหตุจากเชื้อโรค

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

#### 2.2.1 การตรวจสอบเชื้อรา

##### 1) การตรวจสอบสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะยังไม่งอก (Dry seed examination)

โดยตรวจสอบลักษณะอาการโรคและส่วนขยายพันธุ์เชื้อราหรือศัตรูพืชอื่นๆ ซึ่งปะปนมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยตาเปล่าหรือตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope เช่นเมล็ดพันธุ์มีรูปร่างผิดปกติ หรืออาจติดมา ภายในเมล็ดพันธุ์โดยไม่แสดงอาการ รวมทั้งอาจติดมากับเศษพืชในลักษณะเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์เช่น Pycnidia เป็นต้น

##### 2) การตรวจสอบสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะเมล็ดงอก

สุ่มตัวอย่างเมล็ดตามวิธีการมาตรฐาน ในปริมาณที่เหมาะสมวิเคราะห์โดยสุ่มแยกตามสายพันธุ์ มาทดสอบด้วยวิธี Blotter method โดยวางเมล็ดลงบนกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่นที่ชุ่มน้ำซึ่งวางอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางเมล็ดพันธุ์ ผักกาดเขียวปลี 25 เมล็ดต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 200 เมล็ด จากนั้นนำจานเพาะเมล็ดไปบ่มเชื้อ (incubate) ใต้แสง near ultraviolet (NUV) สลับกับความมืด 12/12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงนำเมล็ดพันธุ์มาตรวจและจำแนกชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (compound microscope)

#### 2.2.2 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย

##### 1) แยกเชื้อสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงหรือด้วยวิธี Dilution plate

ในกรณีที่เชื้อติดมาในปริมาณมากจะสามารถแยกเชื้อจากเมล็ดโดยตรง หลังจากทำการแยกเชื้อด้วยวิธี Blotter method ได้ หรือทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงด้วยวิธี Dilution plate โดยสุ่มเมล็ดตามมาตรฐาน นำมาแช่ในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อ เมื่อได้เมล็ดพันธุ์จึงนำไปบดละเอียดด้วยเครื่องบด แล้วนำผงของเมล็ดใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (0.85% NaCl) หรือ บัฟเฟอร์ จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยวางบนเครื่องเขย่า จากนั้นนำมาทำให้เจือจางในอาหารเหลว Nutrient broth ให้มีความเจือจางเป็น  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  และ  $10^{-5}$  ตามลำดับ ใช้ไปแปดต์ดูด suspension แต่ละความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วใช้แท่งแก้วลนไฟฟ้าเชื้อ spread ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน จึงนำมาตรวจหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปจำแนกชนิดต่อไป

## 2) แยกเชื้อจากต้นกล้าซึ่งเพาะจากเมล็ดผิดปกติ

โดยการเพาะเมล็ดในดินนิ่งฆ่าเชื้อ โดยเพาะ 25-50 เมล็ดต่อถาด และเก็บถาดเพาะที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส รดน้ำเข้าเย็นในโรงเรือนกักกันพืช ของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช เมื่อต้นกล้าออกใบจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนพืช หรืออาจใช้ถุงพลาสติกที่ฉีดพ่นน้ำคลุมให้ความชุ่มชื้นเป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนใบ กิ่ง ลำต้น โคนต้น และราก เก็บส่วนของพืชที่สงสัยไปแยกเชื้อด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

2.1) วิธี Dilution plate ตัดใบพืชที่เป็นโรคเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมแล้วฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2-3 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรอง ภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อ แล้วบดชิ้นส่วนในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาทำให้เจือจางเป็นลำดับจาก  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-5}$  และดำเนินการเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ (1)

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

## การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

1. ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย โดยบันทึกลักษณะและสีของโคโลนี ตรวจสอบรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

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

3. ทดสอบ hypersensitivity reaction บินยาสูบ โดยการฉีดสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น  $10^8$  โคโลนีต่อมิลลิลิตร เข้าไปในใบยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.) บริเวณใต้ใบโดยฉีดเข้าเนื้อใบระหว่างเส้นใบ สังเกตลักษณะอาการเซลล์ตายตรงเนื้อใบหลังการฉีดเชื้อ 24-48 ชั่วโมง หากพบอาการเซลล์ตายแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวเป็นเชื้อสาเหตุโรครดพิษ

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

5. ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการทำให้เกิดโรคนบนพืชอาศัย (Pathogenicity test) โดยเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้น  $10^8$  โคโลนีต่อมิลลิลิตร ปลูกเชื้อตามอาการของโรคของเชื้อที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุโรค เช่น ปลูกเชื้อโดยฉีดเข้าในลำต้น ใบเลี้ยง หรือเนื้อใบของต้นฟักทอง สคว๊อชและแว๊กกราวด์ อายุ 2-3 สัปดาห์ ฉีดพ่นน้ำให้ความชุ่มชื้นคลุมด้วยถุงพลาสติกและเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบลักษณะอาการโรคหลังปลูกเชื้อ 3-5 วัน จากนั้นนำใบเป็นโรคมานำแยกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อสาเหตุที่ทำให้พืชเป็นโรคเป็นชนิดเดียวกับที่แยกได้ในครั้งแรกหรือไม่

6. การตรวจสอบด้วยวิธี ELISA เป็นวิธีการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา ปัจจุบันใช้ชุดตรวจสอบของ Agdia นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวและนำมาทำการตรวจสอบตามขั้นตอนที่แนะนำ

### 2.2.3 การตรวจสอบเชื้อไวรัส

1) ปลูกสังเกตลักษณะอาการโรคนต้นกล้า (Seedling symptom test) โดยเพาะ เมล็ดพันธุ์ในดินอบฆ่าเชื้อ ตัวอย่าง 50-200 เมล็ด เก็บรักษาไว้ในโรงปลูกพืชกันแมลงเมื่อต้นพืชออกใบจริง 1-2 ใบ จึงตรวจสอบลักษณะอาการโรค ต้นกล้าที่แสดงอาการผิดปกติ สงสัยว่ามีสาเหตุจากเชื้อไวรัสจะนำไปอ่อนไปตรวจสอบด้วยวิธีการอื่นเพื่อจำแนกชนิดต่อไป

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

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

### 3. การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์นำเข้าไปในพื้นที่ของเกษตรกร

ทำการติดตามตรวจสอบต้นพืชที่มีการนำเมล็ดพันธุ์นำเข้าไปเพาะปลูกในแปลงปลูกของเกษตรกรตามภาคต่างๆ โดยสังเกตอาการความผิดปกติของต้นพืชทั้ง โคนต้น ราก ลำต้น ใบและผล



ของพืช และทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาการดังกล่าว นำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง แยกเชื้อ จัดจำแนกชนิดของเชื้อ และทดสอบการเกิดโรคกับพืชในห้องปฏิบัติการเพื่อทำการวินิจฉัยเชื้อโรคศัตรูพืชอย่างละเอียด เช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 2

### เวลาและสถานที่

เวลา: เดือนตุลาคม 2555 – กันยายน 2556

สถานที่: ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช ด้านตรวจพืช และแปลงปลูกของเกษตรกรในภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การรวบรวมข้อมูลทั่วไปของผักกาดเขียวปลีและข้อมูลศัตรูพืชที่มีระบบงานในต่างประเทศ เปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ ผักกาดเขียวปลี (Chinese mustard : *Brassica juncea* var. *rugosa* L.) เป็นพืชผักอยู่ในวงศ์กะหล่ำ (Brassicaceae) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบประเทศจีน สถิติการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ปี 2555 ปริมาณ 157,909 กิโลกรัม มูลค่า 8,194,557 บาท (กลุ่มควบคุมพันธุ์พืชสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร) ผักกาดเขียวปลีมีอายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 55-75 วัน มีแหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง เพชรบูรณ์ กาญจนบุรี ตาก และ น่าน ข้อมูลศัตรูพืชที่พบเข้าทำลายผักกาดเขียวปลี การศึกษาเบื้องต้นในการวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช พบว่า ขั้นตอนการจัดกลุ่มศัตรูพืช (Pest categorization) มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 32 ชนิด คือ เชื้อรา 5 ชนิด แบคทีเรีย 3 ชนิด ไวรัส 2 ชนิด ไล้เดือนฝอย 1 ชนิด แมลง 18 ชนิด และวัชพืช 3 ชนิด

ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขึ้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวปลี นำเข้าจากต่างประเทศในห้องปฏิบัติการ ผลการตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

จากการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากทุกประเทศในเบื้องต้น พบว่าลักษณะของเมล็ดมีสีสีขาว เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรค ศัตรูพืชเมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด ซึ่งจากการตรวจเอกสารและการสังเกตเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากบางประเทศ มีการคลุกสารเคมีฆ่าเชื้อรา ได้แก่ Thiram หรือ Captan หรือ คลุกสารเคมีทั้ง 2 ชนิดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้า การสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association, 1999) และการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขึ้นละเอียดเมล็ดพันธุ์นำเข้าในห้องปฏิบัติการและการปลูกทดสอบในโรงเรือน เมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวปลี ที่นำเข้าจาก 5 ประเทศ ได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีน อินโดนีเซีย อิตาลี เม็กซิโก และ นิวซีแลนด์ มาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง มีสีขาวยาว เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรค ศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขึ้นละเอียดที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวปลี ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบ เชื้อรา จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria raphani*, *Cladosporium* sp., และ *Ulocladium* sp., แต่จากการนำเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวปลี มาตรวจด้วยวิธี Dilution technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญด้านกักกันพืช และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นผักกาด

เขียวป्ली ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ไม่แสดงอาการโรคพืช และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นผักกาดเขียวป्ली ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ไม่แสดงอาการโรคพืช

ได้การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกผักกาดเขียวป्लीนำเข้าจากต่างประเทศ ในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง เพชรบูรณ์ และ กาญจนบุรี ไม่พบเชื้อสาเหตุโรคพืชในแปลงปลูก แต่พบวัชพืชได้แก่ แห้วหมู หญ้านกสีชมพู เทียนนา กระชับ กะเม็ง โทงเทง ลูกใต้ใบ ผักเบี้ยใหญ่ และ ผักเสี้ยนผี ซึ่งไม่ใช่ศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย

### สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผักกาดเขียวป्ली (Chinese mustard : *Brassica juneca* var. *rugosa* L สถิติการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ปี 2555 ปริมาณ 157,909 กิโลกรัม มูลค่า 8,194,557 ข้อมูลศัตรูพืชที่เข้าทำลายส่วนต่างๆ ของผักกาดเขียวป्ली มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 32 ชนิด คือเชื้อรา 5 ชนิด แบคทีเรีย 3 ชนิด ไวรัส 2 ชนิด ไส้เดือนฝอย 1 ชนิด แมลง 18 ชนิด และวัชพืช 3 ชนิด และจากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวป्ली ที่นำเข้าจาก 5 ประเทศ ได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีน อินโดนีเซีย อิตาลี เม็กซิโก และ นิวซีแลนด์ มาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวป्ली มีสีขาว เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชชั้นละเอียดที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวป्ली ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบเชื้อรา จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria raphani*, *Cladosporium* sp., และ *Ulocladium* sp., แต่จากการนำเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวป्ली มาตรวจด้วยวิธี Dilution technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญด้านกักกันพืช และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นผักกาดเขียวป्ली ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ไม่แสดงอาการโรคพืช ได้การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกผักกาดเขียวป्लीนำเข้าจากต่างประเทศ ในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง เพชรบูรณ์ และ กาญจนบุรี ไม่พบเชื้อสาเหตุโรคพืชในแปลงปลูก แต่พบวัชพืชได้แก่ แห้วหมู หญ้านกสีชมพู เทียนนา กระชับ กะเม็ง โทงเทง ลูกใต้ใบ ผักเบี้ยใหญ่ และ ผักเสี้ยนผี ซึ่งไม่ใช่ศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย

### คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณวิชาญ สมานิ คุณวิภา เกิดพิพัฒน์ คุณอรนุช นาคะโร ช่วยสนับสนุนและเตรียมตัวอย่างพืชและเตรียมงานในห้องปฏิบัติการ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการที่ช่วยสนับสนุนในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

### เอกสารอ้างอิง

เครือพันธุ์ กิตติปภรณ์ และ วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2545. โรคไวรัสที่สำคัญของพืชผักและพืชน้ำมัน. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 88 หน้า.

เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2550. ฐานข้อมูลโรคพืชที่สำคัญในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก : โรคพืชวงศ์แตง. ศูนย์พันธุ์กรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 81 หน้า.

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

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