

ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์  
และสหรัฐอเมริกา

Quarantine Pest Associated with Pepper Seeds from India, China,  
Netherland and USA

วานิช คำพานิช<sup>1/</sup> ชลธิชา รักไคร้<sup>1/</sup> ปรียพรรณ พงศาพิชญ์<sup>1/</sup> วันเพ็ญ ศรีชาติ<sup>1/</sup>

โสภา มีอำนาจ<sup>1/</sup> จันทร์พิศ เดชหามาตย์<sup>1/</sup> ณัฐธิดา โฆษิตเจริญกุล<sup>2/</sup>

<sup>1/</sup> กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

<sup>2/</sup> กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

พริก (Pepper; *Capsicum annuum* L.) จัดเป็นพืชวงศ์ Solanaceae จากการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชที่มีความสำคัญด้านกักกันพืชของเมล็ดพันธุ์พริกจากอินเดียและจีน พบว่ามีศัตรูพืช 9 ชนิด และจากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดียและจีน ระหว่างเดือนตุลาคม 2558 - กันยายน 2560 จำนวนทั้งสิ้น 118 ตัวอย่าง ทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่า และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชและการปนเปื้อนของวัชพืช และผลจากการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชชั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี blotter method, dilution plate method และ Enzyme-linked Immunosorbent Assay พบว่าเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดีย มีศัตรูพืช 15 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Alternaria tenuis*, *Alternaria raphani*, *Cercospora capsici*, *Curvularia lunata*, *Curvularia pallescens*, *Drechslera halodes*, *Drechslera hawaiiensis*, *Drechslera tetramera*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium solani* เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* และเชื้อไวรัส *Cucumber mosaic virus*, *Tobacco mosaic virus* และ *Tomato mosaic virus* ส่วนเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากจีน มีศัตรูพืช 7 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *Curvularia pallescens*, *Drechslera cynodontis* และเชื้อไวรัส *Cucumber mosaic virus*, *Pepper mild mottle virus*, *Tobacco mosaic virus* และ *Tomato mosaic virus* รวมทั้งไม่พบอาการผิดปกติภายหลัง การปลูกทดสอบในโรงเรือนปลูกพืช ส่วนการติดตามตรวจสอบในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พริกภายหลังการนำเข้าจากอินเดียและจีน จำนวน 36 แปลง ไม่พบศัตรูพืชที่มีความสำคัญด้านกักกันพืชของประเทศไทย และยังอยู่ระหว่างดำเนินการศึกษาชนิดศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากเนเธอร์แลนด์และสหรัฐอเมริกา

**คำหลัก:** เมล็ดพันธุ์พริก ศัตรูพืชกักกัน พืชนำเข้า อินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา

รหัสการทดลอง 03-04-59-02-01-00-04-59

## คำนำ

รัฐบาลมีนโยบายจะผลักดันให้ประเทศไทยเป็นศูนย์กลางเมล็ดพันธุ์ (seed hub) ของภูมิภาคและของโลก ตามลำดับ ซึ่งจะต้องมีการเคลื่อนย้ายเมล็ดพันธุ์ทั้งการนำเข้า การผลิตและส่งออกเมล็ดพันธุ์ไปจำหน่ายยังประเทศต่างๆ ทั่วโลก ซึ่งจะต้องมีกฎหมายมากำกับดูแลในการป้องกันมิให้ศัตรูพืชที่ร้ายแรงติดมากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว กฎหมายดังกล่าวนี้คือ พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดย พ.ร.บ. กักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และ พ.ร.บ. กักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 ซึ่งกำหนดให้เมล็ดพันธุ์วงศ์ Solanaceae เช่น พริกเป็นสิ่งต้องห้าม (prohibited materials) ห้ามนำเข้ามาในราชอาณาจักร ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์เรื่อง กำหนดพืชและพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้นและเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักกันพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 การนำเข้าเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวในขณะนี้นำเข้าได้ตามบทเฉพาะกาล กรณีที่เป็นสิ่งต้องห้ามจะต้องปฏิบัติตามเงื่อนไขการนำเข้าตามที่กำหนดไว้โดยจะต้องมีใบอนุญาตนำเข้า (import permit) ต้องแจ้งการนำเข้าจะต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืช (Phytosanitary certificate, PC) และในกรณีที่ใช้ทำพันธุ์ปลูกต้องมีหนังสือรับรองว่าไม่เป็นพืชที่ได้จากการตัดต่อสารพันธุกรรม (Non-GMOs certificate) จากประเทศต้นทางกำกับมาด้วย การนำเข้าเมล็ดพันธุ์พืชจากต่างประเทศมีโอกาสสูงที่ศัตรูพืชร้ายแรงและศัตรูพืชสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชและผลิตผลทางการเกษตรจะติดเข้ามาพร้อมกับเมล็ดพันธุ์พืชที่นำเข้า เนื่องจากเชื้อโรคพืชร้ายแรงหลายชนิดสามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์พืช (seed-borne) และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์พืชไปเพาะปลูกก็เข้าทำลายต้นกล้ารวมทั้งถ่ายทอดโรคไปสู่ต้นกล้า (seed transmission) (Singh, 1994) ซึ่งเชื้อโรคพืชและศัตรูพืชเหล่านี้ บางชนิดเป็นเชื้อโรคพืชร้ายแรงที่ไม่ปรากฏในประเทศไทยมาก่อนและยังสามารถเข้าทำลายพืชอาศัยในวงศ์เดียวกันได้หลากหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อโรคและศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์และสหรัฐอเมริกา ได้แก่ แมลง *Trogoderma granarium* วัชพืช *Cirsium arvense* เชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas viridiflava* และเชื้อไวรัส *Alfalfa mosaic virus* (CABI, 2016) ซึ่งสามารถติดเข้ามาพร้อมกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวการนำเข้ามาเพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ให้เกษตรกรเพาะปลูกเพื่อใช้บริโภคในประเทศหรือในกรณีที่นำเข้ามาเพื่อเป็นเมล็ดพันธุ์พ่อแม่ให้เกษตรกรผลิตเป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมแล้วส่งกลับไปจำหน่ายยังต่างประเทศ ซึ่งหากเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวมีเชื้อโรคและศัตรูพืชที่ร้ายแรงติดเข้ามาพร้อมกับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าแล้วมาแพร่ระบาดทำความเสียหายกับพืชปลูกภายในประเทศก็จะส่งผลกระทบต่อธุรกิจการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมของประเทศไทยในการที่จะต้องส่งเมล็ดพันธุ์ลูกผสมที่ผลิตได้กลับไปจำหน่ายยังต่างประเทศ ซึ่งถ้าหากเมล็ดพันธุ์ติดเชื้อโรคที่ร้ายแรงจะทำให้ประเทศผู้ซื้อปฏิเสธการนำเข้าทำให้ประเทศไทยสูญเสียรายได้เป็นอย่างมาก นอกจากจะสร้างความเสียหายเชิงปริมาณและยังส่งผลเชิงคุณภาพทำให้เมล็ดรูปร่างผิดปกติ มีขนาดเล็ก ไม่สมบูรณ์ สีเปลี่ยนแปลงไปจากปกติ ทั้งนี้ย่อมก่อให้เกิดผลกระทบต่อเกษตรกรภายในประเทศและยังส่งผลกระทบต่อส่งออกเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์ Solanaceae ไป

จำหน่ายยังต่างประเทศอีกด้วย รวมทั้งยังส่งผลกระทบต่อความมั่นคงของประเทศ มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา ในห้องปฏิบัติการและโรงเรือนปลูกพืช รวมทั้งติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พริกภายหลังการนำเข้า เพื่อกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชให้เหมาะสมรัดกุม และป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชที่มีความสำคัญด้านกักกันพืชเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศไทย

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา
2. คู่มือ เอกสาร หนังสือ วารสาร และ ซีดีรอม CABI
3. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติก มาร์กเกอร์ มีดคัตเตอร์ หลาว
4. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี ชุดตรวจสอบ  
ตู้แช่แข็ง ตู้บ่มเชื้อ
5. โรงเรือนปลูกพืชทดสอบ
6. พืชทดสอบ เช่น ต้นพริก ต้นยาสูบ ต้นมะเขือเทศ
7. คู่มือการจำแนกศัตรูพืช (คู่มือวัชพืช คู่มือการจำแนกเชื้อรา)

### วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของพริก และศัตรูพืชที่มีรายงานในอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา เปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

ทำการสืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูล ตำราวิชาการ วารสารทางวิชาการ กฎระเบียบด้านกักกันพืชสำหรับการนำเข้าและส่งออกของต่างประเทศ และจากข้อมูลทางอิเล็กทรอนิกส์ เว็บไซต์ต่างๆ เพื่อค้นหาข้อมูลของพริก ข้อมูลรายชื่อศัตรูพืชที่มีรายงานในอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์และสหรัฐอเมริกา เปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศไทย วิธีการตรวจศัตรูพืชในเมล็ดพันธุ์ และวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

2. การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชเบื้องต้นและขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์และสหรัฐอเมริกา ในห้องปฏิบัติการและโรงเรือนปลูกพืช

การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดบนเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์และสหรัฐอเมริกา โดยทำการสุ่มตัวอย่างตามวิธีการมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association, 2016) ดังนี้ เมล็ดพันธุ์ที่มีน้ำหนักไม่เกิน 10,000 กิโลกรัม มีการกำหนดสุ่มตัวอย่างที่ต้องการก่อนตรวจสอบ (submitted sample) ต้องมีปริมาณน้ำหนักอย่างน้อย 150 กรัม ซึ่งความถี่ของการสุ่มขึ้นอยู่กับปริมาณตัวอย่างในภาชนะบรรจุ และถ้าการสุ่มตัวอย่างที่บรรจุอยู่ในกระสอบ หรือภาชนะอื่นๆ ที่มีขนาดบรรจุของภาชนะแต่ละใบเท่าๆกัน โดยมีน้ำหนักของเมล็ดพันธุ์จำนวน 15 กิโลกรัม ถึง 100 กิโลกรัม สุ่มตามตารางด้านล่าง

ตารางการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตามวิธีการมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association, 2016)

จำนวนภาชนะบรรจุ	ความถี่ของการสุ่มตัวอย่าง
1 – 4	3 ตัวอย่างขั้นต่ำ จากแต่ละภาชนะบรรจุ
5 – 8	2 ตัวอย่างขั้นต่ำ จากแต่ละภาชนะบรรจุ
9 – 15	1 ตัวอย่างขั้นต่ำ จากแต่ละภาชนะบรรจุ
16 – 30	15 ตัวอย่างขั้นต่ำ จากภาชนะบรรจุทั้งหมด
31 – 59	20 ตัวอย่าง ขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด
มากกว่าหรือเท่ากับ 60	30 ตัวอย่างขั้นต่ำ จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

หลังจากนั้นนำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์พริกที่นำเข้าจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกาที่ได้ดำเนินการสุ่มตัวอย่าง มาทำการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชชั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งมีขั้นตอนดำเนินการดังต่อไปนี้

## 2.1 การตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

เพื่อตรวจหา ตัวอ่อน หนอน ตัวเต็มวัยของแมลงศัตรูพืช เมล็ดวัชพืช และสิ่งเจือปนในห้องปฏิบัติการ

**2.1.1 การตรวจสอบแมลงศัตรูพืช** เช่น *Trogoderma granarium* โดยนำเมล็ดพันธุ์ พริกที่สุ่มตัวอย่างมาตรวจหาร่องรอยการเข้าทำลายของเมล็ดพันธุ์พริก ตรวจหา ตัวอ่อน หนอน ตัวเต็มวัยของแมลงศัตรูพืช ด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ หลังจากนั้นนำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์พริกใส่ในกล่องพลาสติกที่เจาะฝาและปิดช่องด้วยตาข่าย เก็บกล่องไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน แล้วนำมาตรวจหาแมลงศัตรูพืชอีกครั้ง ทำการบันทึกผล

**2.1.2 การตรวจสอบเมล็ดวัชพืช** เช่น วัชพืช *Circium arvense*, *Orobancha cernua*, *Orobancha aegyptiaca*, *Orobancha ramosa* โดยนำเมล็ดพันธุ์พริกที่สุ่มตัวอย่างในภาชนะอันเหมาะสม เช่น ถาดอลูมิเนียม เคลือบเมล็ดพันธุ์เพื่อตรวจหาเมล็ดพันธุ์วัชพืชปนเปื้อนด้วย ตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) รวมทั้งทำการการคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพ ได้แก่ เมล็ดพืชบริสุทธิ์ เมล็ดพืชอื่น และสิ่งเจือปน และจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชที่ตรวจพบภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอต่อไป ทำการบันทึกผล (Linda, 1993)

**2.2 การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชชั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้าในห้องปฏิบัติการ และโรงเรือนปลูกพืช**

### 2.2.1 การตรวจสอบเชื้อรา

1) การตรวจสอบสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะยังไม่งอก (dry seed examination) โดยตรวจสอบลักษณะอาการโรคและส่วนขยายพันธุ์เชื้อราหรือศัตรูพืชอื่นๆ ซึ่งปะปนมากับเมล็ดพันธุ์ ด้วยตาเปล่าหรือตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ เช่น เมล็ดพันธุ์มีรูปร่างผิดปกติ หรืออาจติดตาม

ภายในเมล็ดพันธุ์โดยไม่แสดงอาการ รวมทั้งอาจติดมากับเศษพืชในลักษณะเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์ เช่น Pycnidia และ Sclerotia เป็นต้น

2) การตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะเมล็ดงอก โดยการสุ่มตัวอย่างเมล็ดตามวิธีการมาตรฐาน ในปริมาณที่เหมาะสมวิเคราะห์โดยสุ่มแยกตามสายพันธุ์ มาทดสอบด้วยวิธี Blotter method โดยวางเมล็ดลงบนกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่นที่ชุ่มน้ำซึ่งวางอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางเมล็ดพันธุ์พริก 25 เมล็ดต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 400 เมล็ด จากนั้นนำจานเพาะเมล็ดไปบ่มเชื้อ (incubate) ใต้แสง near ultraviolet (NUV) สลับกับความมืด 12/12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงนำเมล็ดพันธุ์มาตรวจและจำแนกชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (compound microscope)

### 2.2.2 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย

โดยมีเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย เช่น *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* และ *Pseudomonas viridiflava* เป็นต้น

#### 2.2.2.1 แยกเชื้อสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงหรือด้วยวิธี Dilution plate

ในกรณีที่เชื้อติดมาในปริมาณมากจะสามารถแยกเชื้อจากเมล็ดโดยตรงหลังจากทำการแยกเชื้อด้วยวิธี blotter method (Mathur and Kongdal, 2003) หรือทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงด้วยวิธี Dilution plate โดยสุ่มเมล็ดตามมาตรฐาน นำมาแช่ในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เย็นเชื้อ เมื่อได้เมล็ดพันธุ์จึงนำไปบดละเอียดด้วยเครื่องบด แล้วนำผงของเมล็ดใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ( $0.85\% \text{ NaCl}_2$ ) หรือบัฟเฟอร์ จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยวางบนเครื่องเขย่า จากนั้นนำมาทำให้เจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ให้มีความเจือจางเป็น  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  และ  $10^{-5}$  ตามลำดับ ใช้ไปเปิดจุด suspension แต่ละความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วใช้แท่งแก้วลนไฟ ผึ่งให้เย็น และ spread ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน จึงนำมาตรวจหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปจำแนกชนิดต่อไป

2.2.2.2 แยกเชื้อจากต้นกล้าซึ่งเพาะจากเมล็ดผิปกติบนใบพืชหรือต้นพืช โดยการเพาะเมล็ดในดินนิ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 100 เมล็ด จำนวน 2 ถัง นำลงไปไว้ในโรงเรือนปลูกพืช และเก็บถังเพาะที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เมื่อต้นกล้าออกใบจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิปกติบนพืช หรืออาจใช้ถุงพลาสติกที่ฉีดพ่นน้ำคลุมให้ความชุ่มชื้นเป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตลักษณะอาการผิปกติบนใบพืช เก็บใบพืชที่สงสัยไปแยกเชื้อด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

1) วิธี dilution plate ตัดใบพืชที่เป็นโรคเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมแล้วฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2-3 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อ แล้วบดชิ้นส่วนในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาทำให้เจือจางเป็นลำดับจาก  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-5}$  และดำเนินการเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 2.2.2.1

## 2) วิธี tissue transplanting

ทำการตัดใบพืชเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร หลังจากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2-3 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อแล้ววางพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar หรืออาหารเลี้ยงเชื้อ กิ่งเฉพาะเจาะจง (semi-selective media) เช่น อาหาร KBNP สำหรับแยกเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* และอาหาร T-5 สำหรับแยกเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas viridiflava* นำจานเลี้ยงเชื้อไปเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาตรวจสอบหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรียเก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจนครบ 3-5 วัน เพื่อตรวจหาโคโลนีของแบคทีเรียชนิดอื่นจากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และนำไปศึกษาคุณลักษณะเพื่อจำแนกชนิดต่อไป

### การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

1. ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย โดยบันทึกลักษณะและสีของโคโลนี ตรวจสอบรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2. ทดสอบแกรม (gram reaction) โดยใช้สารละลายโปรแตสเซียม-ไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (3%KOH) ที่เตรียมใหม่ใช้ภายใน 2 สัปดาห์ หากตรวจพบเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) และแกรมบวก (Gram positive) รูปร่างแบบ Coryneform rod ก็จะนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

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

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

5. ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัย (pathogenicity test) โดยเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้น  $10^8$  โคโลนีต่อมิลลิลิตร ปลูกเชื้อตามอาการของโรคของเชื้อที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุโรค เช่น ปลูกเชื้อโดยฉีดเข้าในลำต้น ใบเลี้ยง หรือเนื้อใบของต้นพริกอายุ 2-3 สัปดาห์ ฉีดพ่นน้ำให้ความชุ่มชื้นคลุมด้วยถุงพลาสติกและเก็บไว้ที่



อุณหภูมิ 28 - 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบลักษณะอาการโรคหลังปลูกเชื้อ 3-5 วัน จากนั้นนำไปเป็นโรคมายาแยกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อสาเหตุที่ทำให้พืชเป็นโรคเป็นชนิดเดียวกับที่แยกได้ในครั้งแรกหรือไม่

6. การตรวจสอบด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISA ซึ่งเป็นวิธีการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา โดยใช้ชุดตรวจสอบของ Agdia นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวและนำมาทำการตรวจสอบตามขั้นตอนที่แนะนำ

### 2.2.3 การตรวจสอบเชื้อไวรัส

โดยมีเชื้อไวรัสเป้าหมาย เช่น เชื้อไวรัส *Alfalfa mosaic virus* และ *Tobacco streak virus* เป็นต้น

1) ปลูกสังเกตลักษณะอาการโรคบนต้นกล้า (seedling symptom test) โดยการเพาะเมล็ดในดินนิ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 100 เมล็ด จำนวน 2 ถัง 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 จากนั้นใช้สำลีหรือผ้าที่สะอาดจุ่มน้ำคั้นพืชทาลงบนใบพืชทดสอบ ซึ่งโรยด้วยผงคาร์โบรันดัม (carborundum ขนาด 600 mesh) หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 5 นาที ล้างใบพืชและนำพืชทดสอบไปเก็บไว้ในอุณหภูมิ 25 - 30 องศาเซลเซียส องศาเซลเซียส สังเกตลักษณะอาการบนพืชทดสอบหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 1-4 สัปดาห์ โดยพืชทดสอบจะแสดงอาการแผลเฉพาะแห่ง (local lesion) หรืออาการแบบกระจายทั่วลำต้น (systemic infection)

3) การตรวจสอบด้วยวิธีทางเซรุ่มวิทยา (serological techniques)

ทำการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดตรวจสอบของ Agdia และขั้นตอนตามคำแนะนำทำการบันทึกผล

### 3. การติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชภายหลังการนำเข้าในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา

ดำเนินการติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชภายหลังการนำเข้าในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดียและจีน ซึ่งมีศัตรูพืชกักกันเป้าหมาย ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas viridiflava* เชื้อไวรัส *Alfalfa mosaic virus* และ *Tobacco streak virus*

- การติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชภายหลังการนำเข้าในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดีย จำนวนทั้งหมด 11 แปลง ดังนี้

จังหวัดเชียงใหม่ (อ.สันทราย) จำนวน 5 แปลง

จังหวัดขอนแก่น (อ.ท่าพระ) จำนวน 6 แปลง

- การติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชภายหลังการนำเข้าในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากจีน จำนวนทั้งหมด 24 แปลง ดังนี้

จังหวัดอุดรธานี (อ.กุดจับ) จำนวน 11 แปลง

จังหวัดหนองบัวลำภู (อ.สุวรรณคูหา) จำนวน 6 แปลง

จังหวัดสกลนคร (อ.พังโคน) จำนวน 8 แปลง

วิธีการติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชภายหลังการนำเข้าในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดียและจีน โดยทำการเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการผิดปกติและสงสัยในระยะตอนดอกผสมเกสร ซึ่งผสมเกสรไม่เกิน 50% ของต้น และระยะก่อนเก็บเกี่ยว คือผลเปลี่ยนสีจนถึงเก็บเกี่ยวแล้วไม่เกิน 50% ของต้น หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการตามขั้นตอน 2

#### 4. สรุปผลการทดลอง

##### เวลาและสถานที่

**ระยะที่ 1** ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดีย และจีน

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 (2 ปี)

**ระยะที่ 2** ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากเนเธอร์แลนด์ และ

สหรัฐอเมริกา

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2560 – กันยายน 2562 (2 ปี)

##### สถานที่

1) ห้องปฏิบัติการ และโรงเรือนปลูกพืช กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และด่านตรวจพืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

2) แปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา



## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ระยะที่ 1 ชนิดศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดีย และจีน

### 1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของพริก และข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในอินเดีย และจีน เปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

จากการสืบค้นข้อมูลพริก พบว่ามีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมในทวีปอเมริกาใต้ และใช้ประโยชน์มานานนับหลายพันปี ถูกนำเข้ามาเผยแพร่ในยุโรปในชื่อของพริกแดง (red pepper: *Capsicum* spp.) ตามลักษณะสีของผล พริกมีประมาณ 25 ชนิด ที่นิยมปลูกกันมีเพียง 5 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ *Capsicum annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinensis* Jacq., *C. frutescens* L. และ *C. pubescens* R. & P. และมีพันธุ์ที่ถูกพัฒนาขึ้นอีกมากมาย โดยมีชื่อที่ใช้เรียกกันอยู่หลายคำ ได้แก่ pepper, chili และ capsicum คนไทยอาจจะคุ้นเคยกับคำว่า chili ในประเทศไทยนำเข้าเมล็ดพันธุ์พริกเพื่อผลิต เมล็ดพันธุ์เพื่อใช้ในการค้าหรือเป็นเมล็ดพันธุ์พ่อแม่เพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อการส่งออก

จากการศึกษาข้อมูลศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากต่างประเทศโดยการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์พริกที่นำเข้าระหว่างเดือน มกราคม 2553 - ธันวาคม 2555 จาก 16 ประเทศ ได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีน สหรัฐอเมริกา เนเธอร์แลนด์ เกาหลี อินเดีย ซิลี ฝรั่งเศส อิสราเอล ญี่ปุ่น เม็กซิโก แอฟริกาใต้ อิตาลี สเปน ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน และอินโดนีเซีย จำนวน 48 ตัวอย่าง และทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือการปนเปื้อนของวัชพืช และผลจากการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชชั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี blotter method และ dilution plate method พบเชื้อรา *Alternaria tenuis*, *Alternaria raphani*, *Curvularia pallenscens*, *Fusarium semitectum* เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* แต่ไม่พบอาการผิดปกติที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์ภายหลังการปลูกทดสอบ (seedling symptom test) ในสถานกักพืช และศัตรูพืชที่ตรวจพบ ไม่จัดเป็นศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช (ชลธิชา และคณะ, 2556) แต่ยังไม่มีการการศึกษาและวิจัยอย่างจริงจังกับประเทศใดประเทศหนึ่ง เช่น อินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา และจาก การตรวจเอกสารใบรับรองสุขอนามัยพืชของอินเดียในเบื้องต้น มิได้ระบุมาตรการในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชใดๆ

จากการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชเป้าหมาย พบว่า ศัตรูพืชที่สามารถถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ ตลอดจนเป็นเชื้อโรคและศัตรูพืชที่สามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา พบว่าพริกจากอินเดียและจีน มีศัตรูพืชที่สำคัญ 9 ชนิด ได้แก่ ตัวงออิฐ *Trogoderma granarium* วัชพืช *Cirsium arvense*, *Orobancha cernua*, *O. aegyptiaca*, *O. ramosa* เชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas viridiflava* เชื้อไวรัส *Alfalfa mosaic virus* และ *Tobacco streak virus* ส่วนเมล็ดพันธุ์พริกจากเนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา ยังอยู่ในช่วงสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชเป้าหมาย ซึ่งศัตรูพืชเป้าหมายของพริกจากอินเดียและจีนมีรายละเอียดดังนี้

ด้วงอิฐ (*Trogoderma granarium*) จัดเป็นแมลงศัตรูพืชในโรงเก็บกับเมล็ดพืชหลายชนิดเช่น ข้าวโพดและมีรายงานแพร่ระบาดในอินเดียประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรปจัดเป็นศัตรูพืชกักกัน ระดับ A2 (Smith *et al.*, 1992) สามารถตรวจสอบเบื้องต้นด้วยตาเปล่า แวนชยาย และกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ การตรวจสอบว่าปลอดจากแมลง *Trogoderma* spp. เมล็ดพันธุ์ต้องผ่านการตรวจรับรองตามวิธีการวิเคราะห์ของ ISTA การรมเมล็ดพันธุ์ด้วย Methyl bromide อัตรา 80 g/m<sup>3</sup> เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส หรือรมด้วย Phosphine อัตรา 1.0-1.5 g/m<sup>3</sup> เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิระหว่าง 15-25 องศาเซลเซียส หรือที่อัตรา 1.0-1.5 g/m<sup>3</sup> เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิมากกว่า 25 องศาเซลเซียส (CABI, 2016)

*Circium avense*, *Orobancha cernua*, *Orobancha aegyptiaca* และ *Orobancha ramosa* เป็นวัชพืชที่สำคัญทางกักกันพืชที่สามารถปนเปื้อนหรือติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกได้ วิธีการตรวจสอบเมล็ดวัชพืชเหล่านี้ สามารถตรวจสอบเบื้องต้นด้วยตาเปล่า แวนชยาย และกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ตลอดจนปลูกสังเกตลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (CABI, 2016)

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* มีพืชอาศัยที่สำคัญ ได้แก่ มะเขือเทศ พริก มันฝรั่ง วิธีการตรวจสอบ ทำได้โดย Dilution plate method บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป เช่น Nutrient Glucose Agar (NGA) และ Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA) อาหารกึ่งเฉพาะเจาะจง (semi selective) เช่น KBNP และ ELISA ใช้ขั้นตอนตาม AGDIA reagent (CABI, 2016) การกำจัดเชื้อที่ติดมากับเมล็ดทำได้หลายวิธี เช่น การหมักเมล็ด หรือการแช่เมล็ดใน hydrochloric acid ซึ่งเป็นขั้นตอนปกติที่เกษตรกรใช้แยกเมล็ดออกจากเนื้อของผล และยังสามารถช่วยลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้ หรือการใช้สารเคมี o-hydroxydiphenyl 0.05%, calcium hypochlorite 0.5% และ sodium hypochlorite หรือการแช่เมล็ดในน้ำอุ่นที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่ติดมากับเมล็ดได้ โดยไม่มีผลกระทบต่อความงอก (Thyr *et al.*, 1973; Dhanvantari, 1989; Fatmi *et al.*, 1991; Dhanvantari and Brown, 1993 Dhanvantari, 1994).

*Pseudomonas viridiflava* มีพืชอาศัยหลายชนิด ได้แก่ พริก มะเขือเทศ พืทุเนี่ย พืชตระกูลกะหล่ำบางชนิด เช่น ผักกาดหัว กะหล่ำปลี และกะหล่ำดอก เป็นต้น เชื้อนี้สามารถติดมากับผิวของเมล็ดพืชได้ (Mariano and McCarter, 1992) วิธีการตรวจสอบเชื้อนี้ สามารถตรวจสอบบนโดยการเลี้ยงบนอาหารกึ่งเฉพาะเจาะจง เช่น T-5 medium ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 16-20 วัน (Gitaitis *et al.*, 1997)

*Alfalfa mosaic virus* (AMV) มีพืชอาศัยหลายชนิด ได้แก่ คีนฉ่าย ผักชี พริก มะเขือเทศ มะเขือม่วง มันฝรั่ง ยาสูบ พืทุเนี่ย หัวบีท แตงกวา ถั่วเหลือง ลูกเดือย ถั่วแขก ถั่วลิ้นเต่า ถั่วพู ถั่วเขียว องุ่น เป็นต้น และจากการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเบื้องต้น พบว่า AMV มีความสำคัญทางเศรษฐกิจสูง มีแหล่งแพร่กระจายกว้างขวาง สามารถติดกับเมล็ดพันธุ์ได้ปานกลาง และถ่ายทอดโรคกับเมล็ดพันธุ์ได้ (CABI, 2016) นอกจากนี้ AMV ยังสามารถถ่ายทอดโรคโดยเพลี้ยอ่อน *Acyrtosiphon pisum* และ *Myzus persicae* (Edwardson and Christie, 1997) วิธีการตรวจสอบไวรัส *Alfalfa mosaic virus* สามารถทำได้

โดยการปลูกสังเกตอาการบนต้นกล้า (seedling symptom test) ปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ (infectivity test) และตรวจสอบด้วยวิธีทางเซรุ่มวิทยา เช่นการตรวจสอบด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISA (Bailliss and Offei, 1990) ซึ่งวิธีการนี้สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสที่มีความไวสูง แม้จะมีเชื้อไวรัสปริมาณต่ำหรืออนุภาคแตกหักก็สามารถตรวจได้ ให้ผลรวดเร็ว แน่นนอน และยังสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก

*Tobacco streak virus* (TSV) เป็นไวรัสที่มีพืชอาศัยกว้างมาก เช่นพริก มะเขือเทศ หน่อไม้ฝรั่ง ถั่วเหลือง ฝ้าย ถั่วแดง สตรอเบอร์รี่ ทานตะวัน ผักกาดหอม และมันฝรั่ง เป็นต้น เชื้อสามารถถ่ายทอดโรคด้วยวิธีกล แต่ไม่มีความคงทนในน้ำคั้นพืช อนุภาคของ TSV ในน้ำคั้นพืชจะสูญเสียความสามารถในการเข้าทำลาย (infectivity) ภายใน 2-3 นาที หลังจากสกัดเซลล์ ในสภาพธรรมชาติไวรัสสามารถแพร่กระจายโดยเพลี้ยไฟทั้งตัวเต็มวัยและตัวอ่อนของ *Thrips tabaci* และ *Frankliniella occidentalis* เป็นพาหะ นอกจากนี้ ยังสามารถถ่ายทอดโรคโดยทางเมล็ดและผ่านทางละอองเกสร มีรายงานการถ่ายทอดโรคในเมล็ด ถั่วแดง สตรอเบอร์รี่ และมะเขือเทศ 40-76% ในเมล็ดมะเขือเทศส่วนใหญ่พบไวรัสอยู่ใน endosperm (40-90%) และคัพภะ (10-50%) แต่ส่วนน้อยพบที่เปลือกหุ้มเมล็ด (CABI, 2016) เชื้อไวรัสนี้สามารถทำได้โดยการปลูกสังเกตอาการบนต้นกล้า (seedling symptom test) ปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ (infectivity test) และตรวจสอบด้วยวิธีทางเซรุ่มวิทยา เช่นการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ได้แก่ Direct antigen coated immunosorbent assay (DAC-ELISA) (Vemana and Jain, 2010)

## 2. การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชเบื้องต้นและขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดียและจีนใน ห้องปฏิบัติการและโรงเรือนปลูกพืช

จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดียและจีน จำนวน 118 ตัวอย่าง จำนวน 8,965 กิโลกรัม นำมาตรวจสอบการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สเตอริโอ และตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้าในห้องปฏิบัติการและโรงเรือนปลูกพืช ได้ผลดังนี้

### 2.1 การตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดียและจีน จำนวน 118 ตัวอย่าง

#### 2.1.1 ผลการตรวจสอบแมลงศัตรูพืช พบว่า เมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจาก

อินเดีย มีลักษณะของเมล็ดสีเหลือง เมล็ดค่อนข้างสมบูรณ์ ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืช ส่วนเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากจีน มีลักษณะของเมล็ดสีเหลือง สมบูรณ์ ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืช นอกจากนี้ยังมีการเคลือบเมล็ดด้วยสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

#### 2.1.2 ผลการตรวจสอบวัชพืช

เมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดียและจีนไม่พบการปะปนของเมล็ดวัชพืช แต่พบสิ่งเจือปนอื่นๆกับเมล็ดพันธุ์พริกที่นำเข้าจากอินเดีย

## 2.2 การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้าใน ห้องปฏิบัติการและโรงเรือนปลูกพืช

จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดียและจีน จำนวน 118 ตัวอย่าง

### 2.2.1 การตรวจสอบเชื้อรากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดียและจีน

1) การตรวจสอบสภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะยังไม่งอก (dry seed examination) ผลจากการตรวจสอบด้วยตาเปล่า และภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ พบลักษณะอาการสืผิดปกติ เช่น สีคล้ำอยู่ภายในเมล็ดพันธุ์พริก แต่ไม่พบการปนเปื้อนของเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราบนเมล็ดพันธุ์

2) การตรวจสอบสภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะเมล็ดงอก ด้วยวิธี blotter method

พบว่าเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าอินเดีย พบเชื้อรา 11 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *Alternaria raphani*, *Cercospora capsici*, *Curvularia lunata*, *Curvularia pallescens*, *Drechslera halodes*, *Drechslera hawaiiensis*, *Drechslera tetramera*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium semitectum* และ *Fusarium solani* ซึ่งบางชนิดสามารถปนเปื้อนและติดมากับเมล็ดพันธุ์ภายหลังจากการเก็บเกี่ยว บางชนิดสร้างความเสียหายกับเมล็ดพันธุ์โดยตรงโดยการเข้าไปทำลายภายในเมล็ดพันธุ์ทำให้เมล็ดพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์ความงอกค่อนข้างต่ำ ส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพ และคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ส่วนเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากจีน พบเชื้อรา 3 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *Curvularia pallescens*, *Drechslera cynodontis* ซึ่งไม่ใช่ศัตรูที่สำคัญด้านกักกันพืชของประเทศไทย แต่ควรให้คำแนะนำการป้องกันกำจัดศัตรูพืชเบื้องต้น เช่น คลุกสารเคมีกำจัดเชื้อรา ด้วย Thiram หรือ Captan หรือ คลุกสารเคมีทั้ง 2 ชนิดกับเมล็ดพันธุ์พริกที่นำเข้าหรือก่อนนำไปปลูกตามอัตราแนะนำข้างฉลาก

### 2.2.2 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียกับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดียและจีน

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชจากเมล็ดพริกที่นำเข้าโดยตรงและด้วยวิธี dilution plate method รวมทั้งเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม พบเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกที่นำเข้าจากอินเดีย แต่ยังไม่พบเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีความสำคัญด้านกักกันพืช เช่น *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* และ *Pseudomonas viridiflava* ส่วนเมล็ดพันธุ์พริกที่นำเข้าจากจีน ตรวจสอบแล้วไม่พบเชื้อแบคทีเรีย ส่วนการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชจากต้นกล้าซึ่งเพาะจากเมล็ดผิดปกติบนใบพืช โดยการนำเมล็ดพันธุ์พริกที่นำเข้าจากอินเดียและจีนไปปลูกสังเกตอาการในโรงเรือนปลูกพืช ไม่พบลักษณะอาการผิดปกติ เช่น อาการเหี่ยว เหลือง ใบผิดปกติ ใบไหม้ ลักษณะต้นกล้าเจริญเติบโตสมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามยังมีความจำเป็นที่ต้องปรับปรุงและพัฒนาเทคนิคในการตรวจสอบที่เฉพาะเจาะจงกับเมล็ดพันธุ์ตามมาตรฐาน ISTA หรือมาตรฐานอื่นๆ ที่น่าเชื่อถือเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญด้านกักกันพืชและสร้างความเสียหายกับการผลิตพริกและพืชปลูกชนิดอื่นที่เป็นพืชอาศัยในประเทศไทย

### 2.2.3 การตรวจสอบเชื้อไวรัสกับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดียและจีน

ผลจากการตรวจสอบเชื้อไวรัสของเมล็ดพันธุ์พริกที่นำเข้าจากอินเดียและจีน โดยตรงตามมาตรฐาน ISTA ด้วยวิธี Enzyme – linked Immunosorbent Assay (ELISA) พบว่า เมล็ดพันธุ์พริกที่นำเข้าจากอินเดีย ตรวจพบเชื้อไวรัส จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Cucumber mosaic virus*, *Tobacco mosaic virus* และ *Tomato mosaic virus* ส่วนเมล็ดพันธุ์พริกที่นำเข้าจากจีน ตรวจพบเชื้อไวรัส จำนวน 4 ชนิด เชื้อไวรัส *Cucumber mosaic virus*, *Pepper mild mottle virus*, *Tobacco mosaic virus* และ *Tomato mosaic virus* ดังนั้นจะเห็นว่าเชื้อไวรัสที่ตรวจพบกับเมล็ดพันธุ์พริกที่นำเข้าจากอินเดียและจีน ไม่ใช่ศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช

ส่วนการปลูกเมล็ดพันธุ์พริกที่นำเข้าจากอินเดียและจีนเพื่อสังเกตอาการในโรงเรือนปลูกพืช เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ไม่พบลักษณะอาการต้นกล้าผิดปกติ เจริญเติบโตสมบูรณ์แต่อย่างไรตามยังต้องมีการปลูกสังเกตอาการต่อไปเนื่องจากเชื้อไวรัสที่ตรวจพบจากเมล็ดพันธุ์พริกส่วนใหญ่เมื่อนำมาปลูกสังเกตอาการ (seedling symptom test) สามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดจากรุ่นสู่รุ่นได้ เช่น *Tobacco mosaic virus* สามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์พริก ได้ประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ และ *Alfalfa mosaic virus* ซึ่งมีรายงานว่าสามารถถ่ายทอดโรคกับเมล็ดพันธุ์พริก ประมาณ 1-5 เปอร์เซ็นต์ (Sastry, 2013)

### 3. การติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พริกภายหลังการนำเข้าจากอินเดียและจีน

จากการติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พริกภายหลังการนำเข้าจากอินเดียในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ (อ.สันทราย) และจังหวัดขอนแก่น (อ.ท่าพระ) จำนวนทั้งสิ้น 11 แปลง ตรวจพบศัตรูพืช จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cercospora capsici*, *Peronospora tabacina* เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และเชื้อไวรัส *Tobacco mosaic virus* ส่วนแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พริกภายหลัง การนำเข้าจากจีนในพื้นที่จังหวัดอุดรธานี (อ.กุดจับ) หนองบัวลำภู (อ.สุวรรณคูหา) และจังหวัดสกลนคร (อ.พังโคน) จำนวนทั้งสิ้น 24 แปลง ตรวจพบศัตรูพืช จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Peronospora tabacina* เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และเชื้อไวรัส *Tobacco mosaic virus* ในระหว่างการศึกษามิพบศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช

**ระยะที่ 2 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากเนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา** กำลังอยู่ในช่วงดำเนินการ (ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2560 – กันยายน 2562)

## สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

### ระยะที่ 1 ชนิดศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดีย และจีน

1. การสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชที่เข้าทำลายเมล็ดพันธุ์พริกจากอินเดียและจีน พบว่ามีศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช 9 ชนิด ได้แก่ ตัวงอริฐ *Trogoderma granarium* วัชพืช *Cirsium arvense*, *Orobancha cernua*, *O. aegyptiaca*, *O. ramosa* เชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas viridiflava* เชื้อไวรัส *Alfalfa mosaic virus* และ *Tobacco streak virus*

2. จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดียและจีน 118 ตัวอย่าง เมื่อนำมาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชและการปนเปื้อนของวัชพืช และผลจากการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี blotter method, dilution plate method และ ELISA พบว่าเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดียมีศัตรูพืช 15 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Alternaria tenuis*, *Alternaria raphani*, *Cercospora capsici*, *Curvularia lunata*, *Curvularia pallescens*, *Drechslera halodes*, *Drechslera hawaiiensis*, *Drechslera tetramera*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium solani* เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* และเชื้อไวรัส *Cucumber mosaic virus*, *Tobacco mosaic virus* และ *Tomato mosaic virus* ส่วนเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากจีน มีศัตรูพืช 7 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Alternaria tenuis*, *Curvularia pallescens*, *Drechslera cynodontis* และเชื้อไวรัส *Cucumber mosaic virus*, *Pepper mild mottle virus*, *Tobacco mosaic virus* และ *Tomato mosaic virus* และไม่พบอาการผิดปกติภายหลังการปลูกทดสอบในโรงเรือนปลูกพืช

3. การติดตามตรวจสอบในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พริกภายหลังการนำเข้าจากอินเดียและจีน จำนวน 36 แปลง ไม่พบศัตรูพืชที่มีความสำคัญด้านกักกันพืช แต่อย่างไรก็ตามยังมีความจำเป็นต้องติดตามและตรวจสอบในแปลงต่อไป เพื่อป้องกันโรคและศัตรูพืชร้ายแรงซึ่งมีความสำคัญทางกักกันพืช

4. จากการศึกษาค้นคว้า พบว่าศัตรูพืชที่ตรวจพบกับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากอินเดียและจีน เป็นศัตรูพืชที่ไม่มีความสำคัญด้านกักกันพืช แต่ก็มีความเสี่ยงที่ศัตรูพืชเหล่านี้จะทำความเสียหายกับเมล็ดพันธุ์พริกและพืชอื่นในประเทศไทย เช่น มะเขือเทศ มะเขือยาว มะเขือพวง โทงเทงฝรั่ง ยาสูบ มันฝรั่ง พืชเนย และพืชวงศ์แตง เป็นต้น ดังนั้นเพื่อป้องกันโรคและศัตรูพืชร้ายแรงซึ่งมีความสำคัญทางกักกันพืชสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พริก จึงควรกำหนดมาตรการและเงื่อนไขในการนำเข้า โดยต้องขออนุญาตนำเข้า และดำเนินการดังต่อไปนี้

1) มีใบรับรองสุขอนามัยพืชจากประเทศต้นทางและหนังสือรับรองว่าไม่เป็นพืชตัดแปลงพันธุกรรม (Non-GMOs certificate)

2) เมล็ดพันธุ์พริกที่นำเข้าจะต้องมาจากพื้นที่ที่ปลอดจากเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas viridiflava* เชื้อไวรัส *Alfalfa mosaic virus*



และ *Tobacco streak virus* หรือผ่านการตรวจสอบรับรองในห้องปฏิบัติการว่าเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวปลอดเชื้อ

3) เมล็ดพันธุ์พริกที่นำเข้าจะต้องสะอาด บรรจุอยู่ในภาชนะบรรจุสะอาดที่ปิดมิดชิด ไม่พบร่องรอยการทำลายแมลง เช่น *Trogoderma granarium* รวมทั้งไม่พบการปนเปื้อนของเมล็ดวัชพืช และไม่มิดินและเศษซากพืชปะปนมาเพื่อป้องกันเมล็ดวัชพืชร้ายแรง เช่น *Circium arvense*, *Orobancha cernua* และ *O. ramosa* เป็นต้น

**ระยะที่ 2 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากเนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา** กำลังอยู่ในช่วงดำเนินการ (ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2560 – กันยายน 2562)

### คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณที่ปรึกษาอัคร อุดมวุฒิ อดีตผู้เชี่ยวชาญศรวิเศษ เกษสังข์ อดีตผู้เชี่ยวชาญสุรพล ยินอัครพรหม คุณวาสนา รุ่งสว่าง คุณพัชริดา สีหาบุตร คุณศิริพร ชิงสนธิพร ข้าราชการ พนักงานราชการ และพนักงานจ้างเหมาของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มวิจัยวัชพืช กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำงานวิจัย รวมทั้งขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านการเก็บตัวอย่าง และเอื้ออำนวยในเรื่องสถานที่

### เอกสารอ้างอิง

- ชลธิชา รักไคร่ ศรวิเศษ ศรวิเศษ เกษสังข์ นงพร มาอยู่ดี ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ วันเพ็ญ ศรีชาติ วานิช คำพานิช และโสภา พิศวงปรากฏ. 2556. การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าจากต่างประเทศ. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2556. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- Bailiss, K.W. and Offei, S.K. 1990. *Alfalfa mosaic virus* in lucerne seed during seed maturation and storage, and in seedlings. *Plant Pathology*, 39 (3): 539-547.
- CABI. 2016. *Crop Protection Compendium* (2016 edition). Copyright © 2016 CABI. CAB International is a registered EU trademark. Available source: <http://www.cabi.org/cpc/> (site date: April 01, 2016).
- 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. and Brown, R.J. 1993. Improved seed treatments for control of bacterial canker of tomato. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 15(3): 201-205.

- Dhanvantari, B.N. 1994. Further studies on seed treatment for tomato bacterial canker. Proceedings of the 10th Annual Tomato Disease Workshop, 49-51.
- Edwardson, J.R. and Christie, R.G. 1997. Viruses infecting peppers and other solanaceous crops. Vol. 1. Viruses infecting peppers and other solanaceous crops. Vol. 1., 336 pp.
- 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., Sumner, D., Gay, D., Smittle, D., McDonald, G., Maw, B., Johnson, W.C.III., Tollner, B. and Hung, Y. 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.
- International Seed Testing Association. 2016. International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association (ISTA). Bassersdorf, Switzerland.
- Linda, W. Davis. 1993. Weed Seeds of the Great Plains A Handbook for Identification. 208 pp.
- Mathur, S.B. and Kongdal, O. 2003. Common Laboratory Seed Health Testing Method for Detecting Fungi. Copenhagen. Denmark. 425 pp.
- Mariano, R.L.R. and McCarter, S.M. 1993. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weed species. Microbial Ecology, 26 (1): 47-58.
- Sastry, K.S. 2013. Seed-borne Plant Virus Diseases. Springer. New Delhi. India. 327 pp.
- Singh, R., 1994. Seed transmission studies with *Pseudomonas solanacearum* in tomato and eggplant. Bacterial Wilt Newsletter, 11:12-13
- Smith I.M., McNamara, D.G., Scott, P.R. and Harris, K.M. 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.
- 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.
- Vemana, K. and R.K., Jain. 2010. New experimental host *Tobacco streak virus* and absence of true seed transmission in leguminous hosts. Indian Journal Virology. 21 (2): 117-127.