ระดับโครงการวิจัย

กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

รายงานผลสัมฤทธิ์สำหรับทุนสนับสนุนงานมูลฐาน (Fundamental Fund)

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2565

หน่วยงาน กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

วิจัยและพัฒนาการกักกันพืชเพื่อการค้าสินค้าเกษตรด้านพืชระหว่างประเทศ

Research and Development on Plant Quarantine for International Plant Commodity Trade

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

ชลธิชา รักใคร่

Chonticha Rakkrai

ปี 2565

บทสรุปผู้บริหาร

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

ประเทศไทยเป็นสมาชิกองค์การการค้าโลก (WTO) ซึ่งประเทศสมาชิกมีพันธกรณีจะต้องปฏิบัติตามความตกลงว่าด้วยการใช้บังคับมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (SPS Agreement) บนหลักการสำคัญที่จำเป็นในการควบคุมการนำเข้าสินค้าเกษตรและอาหาร โดยมาตรฐานระหว่างประเทศคือ อนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (IPPC) ที่มีหลักการสำคัญคือ ความประสานกลมกลืน ความเท่าเทียมกัน การประเมินความเสี่ยง และความโปร่งใส โดยให้องค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (NPPO) ของแต่ละประเทศดำเนินการ ซึ่งมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชได้ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการกีดกันทางการค้ากับสินค้าเกษตร โดยอ้างการตรวจพบเชื้อโรคพืช แมลง และอื่นๆ ซึ่งส่งผลกระทบการค้าของระหว่างประเทศ จากนี้ยังใช้การออกกฎระเบียบใหม่ใช้ศัตรูพืชกักกันมาเป็นเงื่อนไขในการนำเข้าสินค้าเกษตร กรมวิชาการเกษตรในฐานะองค์กรอารักขาพืชแห่งชาติของประเทศไทย ทำหน้าที่กำกับดูแลป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศไทย ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเพื่อการเปิดตลาดสินค้าเกษตร โดยต้องศึกษาชนิดข้อมูลศัตรูพืชตามหลักเกณฑ์วิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องครบถ้วน และทำการสำรวจศัตรูพืชกักกันเพื่อยืนยันสถานภาพของศัตรูพืช กำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชที่เหมาะสมสำหรับสินค้าเกษตรนำเข้าและดำเนินการตรวจสอบมาตรการที่กำหนดนั้นมีประสิทธิภาพหรือต้องแก้ไขทบทวนใหม่ รวมทั้งทำหน้าที่ในการตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืชของสินค้าเกษตรในการส่งออก ศึกษาหาวิธีการกำจัดแมลงวันผลไม้ เพื่อให้ผักและผลไม้สดสามารถส่งออกไปจำหน่ายยังประเทศที่เข้มงวดด้านกักกันพืช พัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และความแม่นยำสูง เพื่อใช้เป็นเครื่องมือสนับสนุนการปฏิบัติงานตามพระราชบัญญัติกักพืชและพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย

2. วัตถุประสงค์

1) เพื่อให้ได้ข้อมูลบัญชีรายชื่อชนิดศัตรูพืชและชนิดศัตรูพืชกักกันที่เป็นปัจจุบัน และเก็บรักษาตัวอย่างศัตรูพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์
2) เพื่อทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของสินค้าเกษตรที่นำเข้าจากต่างประเทศ และได้แนวทางการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชที่เหมาะสม
3) เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์สำหรับขึ้นทะเบียน และการจัดการศัตรูพืชกับพืชสำหรับการส่งออก
4) เพื่อศึกษาเทคโนโลยีการจัดการหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดและโรคตายพราย TR4 ของกล้วยโดยวิธีการต่าง ๆ

กรมวิชาการเกษตร

3. ระเบียบวิธีวิจัย

โครงการวิจัยและพัฒนาการกักกันพืชเพื่อการค้าสินค้าเกษตรด้านพืชระหว่างประเทศ ประกอบด้วย 7 โครงการวิจัยย่อย ได้แก่

1) ศึกษาชนิดของศัตรูพืชในประเทศเพื่อการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช โดยการสำรวจ แมลง ไร โรคพืช วัชพืช และหอยศัตรูพืชของ อินทผลัม มันเทศ ลิลลี่ กล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส จำแนกชนิดของศัตรูพืชให้ถูกต้องตามหลักมาตรฐานสากล และศึกษาด้านชีววิทยานิเวศวิทยา ความเสียหาย การแพร่กระจายของศัตรูพืช เก็บตัวอย่างแห้งไว้ในพิพิธภัณฑ์ และจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชอย่างถูกต้อง

2) ศึกษาความเสี่ยงศัตรูพืชที่สัมพันธ์กับการนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ได้แก่ บลูเบอรี่ แก้วมังกร เชอรี่ สับปะรด อินทผลัม ส่วนขยายพันธุ์องุ่น ลิลลี่ กล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส และวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูกจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ตลอดจนการพิจารณาแนวทางการกำหนดมาตรการวิชาการด้านสุขอนามัยพืชสำหรับจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกัน

3) การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักและหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า การตรวจวินิจฉัยชนิดของไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้า ตรวจวินิจฉัย *Potato cyst nematode* ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า ตรวจวินิจฉัย *Candidatus Liberibacter solanacearum* ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า และตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่ายนำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงทางวิชาการ และกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชให้เหมาะสมรัดกุม รวมทั้งป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศ

4) วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์เพื่อการค้าสินค้าเกษตรด้านพืช โดยพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์ ได้แก่ แมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta*, แมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae*, ไวรัส *Cucumber mosaic virus*, แบคทีเรีย *Xanthomonas perforans*, แบคทีเรีย *Xanthomonas vesicatoria*, ไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* และ *Trichoderma asperellum* และ *Metarhizium anisopliae* ที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และความแม่นยำสูง เพื่อใช้เป็นเครื่องมือสนับสนุนการปฏิบัติงานตามพระราชบัญญัติกักพืชและพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย โดยนำเทคโนโลยีที่ทันสมัย ได้แก่ เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) Multiplex PCR Real-time PCR และ Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) มาประยุกต์ใช้เพื่อให้สามารถลดข้อจำกัดในเรื่องของประสิทธิภาพ ระยะเวลา และความแม่นยำของวิธีการตรวจ

5) วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในผลมะละกอและมะม่วงเพื่อเพิ่มศักยภาพในการส่งออก โดยศึกษาความเสียหายจากความร้อนด้วยเทคโนโลยีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ต่อคุณภาพของผลมะละกอพันธุ์แขกดำ และแขกนวล มะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้า น้ำดอกไม้มัน แดงจักรพรรดิ และอกร่อง และศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ด้วยเทคโนโลยีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในผลมะละกอพันธุ์แขกดำ และแขกนวล มะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้า น้ำดอกไม้มัน แดงจักรพรรดิ และอกร่อง เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเจรจาเปิดตลาดส่งออกผลไม้ไปยังประเทศที่มีความเข้มงวดทางด้านกักกันพืช

กรมวิชาการเกษตร

6) การสำรวจ และเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันของพืชและผลผลิตพืชในประเทศไทย โดยดำเนินการสำรวจและเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันของพืชและผลผลิตพืชในประเทศไทย ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย Pseudomonas *corrugata, Xanthomonas vesicatoria, Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, เชื้อรา *Pseudocercospora angolensis*, *Verticillium albo-atrum*, ไส้เดือนฝอย *Ditylenchus destructor*, *Ditylenchus dipsaci*, แมลงวันผลไม้ *Bactrocera minax*, ตั๊กแตนไผ่ *Ceracris kiangsu*, วัชพืช *Raphanus raphanistrum, Galium aparine* L. ดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 6 (Surveillance: ISPM No. 6) เพื่อให้ทราบข้อมูลการปรากฏหรือไม่ปรากฏเพื่อยืนยันสถานภาพที่เป็นปัจจุบันของประเทศไทย

7) วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชอุบัติใหม่ในข้าวโพดและกล้วยเพื่อการส่งออก โดยการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดและศึกษาโรคตายพราย (Panama disease) tropical race 4 ของกล้วย และการป้องกันกำจัด

4. งบประมาณที่ใช้ (ปี 2565) 7,182,162 บาท **และระยะเวลาที่ดำเนินงาน** ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2564 – มีนาคม 2566

5. ผลการวิจัย

5.1 ศึกษาชนิดของศัตรูพืชในประเทศเพื่อการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรู ไรศัตรูพืช โรคพืชและวัชพืชในแปลง อินทผลัมและลิลลี่ ในพื้นที่ 33 จังหวัด พบศัตรูพืชในอินทผาลัม ได้แก่ แมลง 4 ชนิด ไรศัตรูพืช 6 ชนิด โรคของอินทผลัม 3 ชนิด วัชพืช 55 ชนิด และพบศัตรูพืชในลิลลี่ ได้แก่ โรคของลิลลี่ 1 ชนิด และวัชพืช 11 ชนิด โดยจัดเก็บตัวอย่างไว้ในพิพิธภัณฑ์

5.2 ศึกษาความเสี่ยงศัตรูพืชที่สัมพันธ์กับการนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ศัตรูพืช ได้ข้อมูลทั่วไป รายชื่อศัตรูพืช/กลุ่มศัตรูพืช และข้อมูลศัตรูพืช ของสินค้าเกษตรนำเข้า 9 รายการ ได้แก่ บลูเบอรี่ แก้วมังกร เชอรี่ สับปะรด อินทผลัม ส่วนขยายพันธุ์องุ่น ลิลลี่ กล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส และวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก ที่นำเข้าจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก เมื่อนำรายชื่อศัตรูพืชมาประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนการจัดประเภทศัตรูพืชทำให้ได้รายชื่อศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของสินค้าเกษตรนำเข้า และกลุ่มศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของการนำเข้าวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก และจากการตรวจสอบศัตรูพืชสำหรับสินค้านำเข้า จำนวน 6 รายการ ได้แก่ ผลบลูเบอรี่ ผลแก้วมังกร ผลเชอรี่ ดอกลิลลี่ ต้นกล้วยไม้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก โดยไม่พบศัตรูพืชติดมากับสินค้าที่นำเข้าดังกล่าว

5.3 การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักและหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า ได้ข้อมูลการตรวจเชื้อไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกและมะเขือเทศนำเข้า เมล็ดวัชพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่ายนำเข้า ไส้เดือนฝอย *Potato cyst nematode* ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า เชื้อ *Candidatus Liberibacter solanacearum* ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า นำข้อมูลศัตรูพืชที่พบไปประกอบการวิเคราะห์

กรมวิชาการเกษตร

ความเสี่ยงศัตรูพืชในการออกเงื่อนไขกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชเพิ่มเติม เพื่อไม่ให้มีศัตรูพืชร้ายแรงชนิดใหม่เข้ามาแพร่ระบาดสร้างความเสียหายกับการเพาะปลูกในประเทศไทย

5.4 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์เพื่อการค้าสินค้าเกษตรด้านพืช ได้ดีเอ็นเอต้นแบบจากตัวอย่างที่จำแนกชนิดถูกต้องแล้ว ได้แก่ แมลงวันผลไม้ที่พบในประเทศไทย *Cucumber mosaic virus* จากพริก แบคทีเรีย *X. perforans* จากพริกและมะเขือเทศ ยีนสังเคราะห์ atpD และ gyrB ของแบคทีเรีย *X. vesicatoria* ไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* เชื้อรา *Trichoderma asperellum* เชื้อรา Metarhizium ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรากลุ่ม *T. asperellum* complex และ *Metarhizium* เพื่อออกแบบไพร์เมอร์ และสภาวะการทำปฏิกิริยาของเทคนิค multiplex PCR ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* สภาวะการทำปฏิกิริยาของเทคนิค PCR ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย *X. perforans* และ *X. vesicatoria* สำหรับดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพ ความไว และความจำเพาะของเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์

5.5 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในผลมะละกอและมะม่วงเพื่อเพิ่มศักยภาพในการส่งออก ผลการศึกษาความเสียหายจากความร้อนด้วยเทคโนโลยีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ต่อคุณภาพของผลมะละกอพันธุ์แขกดำ และแขกนวล มะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้า น้ำดอกไม้มัน แดงจักรพรรดิ และอกร่อง พบว่าอุณหภูมิสูง ความชื้น และระยะเวลา ที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อคุณภาพของมะละกอพันธุ์แขกนวล แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อความเสียหายของมะละกอพันธุ์แขกดำ สำหรับมะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้า และน้ำดอกไม้มันที่ผ่านการอบไอน้ำไม่มีการสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณน้ำตาล และปริมาณกรดเมื่อเปรียบเทียบกับมะม่วงที่ไม่มีผ่านการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์

5.6 การสำรวจและเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันของพืชและผลผลิตพืชในประเทศไทย ผลการสำรวจและเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันในปีที่ 1 ไม่ปรากฏของศัตรูพืชกักกัน ได้แก่ แบคทีเรีย *Pseudomonas corrugata, Xanthomonas vesicatoria, Xanthomonas gardneri, Xanthomonas perforans*, รา *Pseudocercospora angolensis*, *Verticillium albo-atrum*, ไส้เดือนฝอย *Ditylenchus destructor*, *Ditylenchus dipsaci*, แมลงวันผลไม้ *Bactrocera minax*, ตั๊กแตนไผ่ *Ceracris kiangsu*, วัชพืช *Raphanus raphanistrum* และ *Galium aparine* L.

5.7 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชอุบัติใหม่ในข้าวโพดและกล้วยเพื่อการส่งออก ได้กระบวนการใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดหวาน โดยใช้สารป้องกันกำจัดแมลงประเภทใช้ทางดิน การใช้สารป้องกันกำจัดแมลงร่วมกับการใช้ SfNPV ที่มีประสิทธิภาพควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในสภาพไร่ เพื่อใช้ในการพิจารณาบริหารจัดการศัตรูพืช และได้กระบวนการจำแนกชนิดเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ต่าง forma specialis ที่ถูกต้องและแม่นยำด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อใช้เปรียบเทียบในการจำแนกชนิด การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc) ระดับ race ที่ถูกต้องและแม่นยำด้วยชีวโมเลกุลในประเทศไทยและใช้เปรียบเทียบในการตรวจสอบและอ้างอิงชนิด ได้ปฏิกิริยาสายพันธุ์/พันธุ์กล้วยที่มีปฏิกิริยาทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา Foc TR4 เพื่อใช้ในการพิจารณาบริหารจัดการศัตรูพืช และการใช้ยูเรียผสมปูน

กรมวิชาการเกษตร

6. ข้อเสนอแนะที่ได้จากงานวิจัย

6.1 การสำรวจชนิดศัตรูพืชในพืชอินทผลัม พบด้วงงวงมะพร้าว *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivie) หรือที่เกษตรกรเรียกว่า ด้วงไฟ เป็นศัตรูพืชที่มีความสำคัญสามารถเข้าทำลายพืชทำให้ผลผลิตเสียหายหรือบางต้นยืนต้นตาย การป้องกันกำจัดทำได้ยาก ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาทดลองถึงวิธีการป้องกันกำจัดและควบคุมเพื่อช่วยเหลือเกษตรกรต่อไป

6.2 การดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชได้ข้อมูลพืชและศัตรูพืชของสินค้าพืชนำเข้า และรายชื่อศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันและกลุ่มศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ซึ่งต้องนำไปดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนต่อไป

6.3 การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักขึ้นฉ่าย ตรวจพบเมล็ดวัชพืชที่เป็นชนิดที่ไม่มีรายงานในประเทศไทย ควรศึกษาถึงศักยภาพเป็นศัตรูพืชร้ายแรงหรือไม่ เพื่อหาแนวทางป้องกันไม่ให้มีการแพร่ระบาดและหาวิธีป้องกันกำจัดต่อไป

6.4 ดีเอ็นเอต้นแบบจากตัวอย่างที่จำแนกชนิดถูกต้องแล้วและสภาวะการทำปฏิกิริยาของเทคนิคที่ได้จากการทดสอบมีความสำคัญสำหรับงานวิจัยในปีต่อไป เพื่อใช้ประโยชน์ในการทดสอบประสิทธิภาพ ความจำเพาะและความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบและพัฒนาเป็นเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และความแม่นยำสูงต่อไป

6.5 งานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* (Hendel) ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ต้องใช้ผลผลิตที่มีคุณภาพตามมาตรฐานการส่งออกมาใช้ในการทดสอบ แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดของฤดูกาลให้ผลผลิตของพืช ดังนั้นควรมีการสำรวจและเก็บข้อมูลช่วงระยะเวลาที่พืชให้ผลผลิตและประมาณการปริมาณผลไม้ที่ใช้ในการทดลองล่วงหน้า เพื่อให้สามารถทำการทดลองให้แล้วเสร็จตามระยะเวลาที่กำหนด

6.6 การสำรวจและเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันของพืชและผลผลิตพืชในประเทศไทยในปีที่ 1 ไม่ปรากฏพบศัตรูพืชกักกันเป้าหมายที่ทำการสำรวจ อย่างไรก็ตามยังต้องทำการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจากแปลงปลูกพืช และนำตัวอย่างมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นการยืนยันสถานภาพของศัตรูพืชกักกันในประเทศไทยต่อไป

7. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

7.1 เผยแพร่ผลงานวิจัย เรื่อง ตั๊กแตนไผ่ ศัตรูพืชเฝ้าระวังที่สำคัญของประเทศไทย ไปเป็นประโยชน์ด้านวิชาการ การเรียนรู้แก่ผู้สนใจด้านวิชาการ นิสิต นักศึกษา นักวิชาการ นักวิจัย ส่วนราชการ และผู้ที่เกี่ยวข้อง

7.3 เผยแพร่ผลงานวิจัย เรื่อง การสำรวจและศึกษาชนิดของโรคอินทผลัมเพื่อการนำเข้า ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 15 ไปเป็นประโยชน์ด้านวิชาการ การเรียนรู้แก่ผู้สนใจด้านวิชาการ นิสิต นักศึกษา นักวิชาการ นักวิจัย ส่วนราชการ และผู้ที่เกี่ยวข้อง

กรมวิชาการเกษตร

7.4 เผยแพร่ผลงานวิจัย เรื่อง การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืช *Potato Cyst Nematode* ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 15 ไปเป็นประโยชน์ด้านวิชาการการเรียนรู้แก่ผู้สนใจด้านวิชาการ นิสิต นักศึกษา นักวิชาการ นักวิจัย ส่วนราชการ และผู้ที่เกี่ยวข้อง

7.5 เผยแพร่ผลงานวิจัย เรื่อง การศึกษาความเสี่ยงศัตรูพืชของการนำเข้าผลอินทผาลัมสดจากสาธารณรัฐอิสลามอิหร่าน ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 15 ไปเป็นประโยชน์ด้านวิชาการการเรียนรู้แก่ผู้สนใจด้านวิชาการ นิสิต นักศึกษา นักวิชาการ นักวิจัย ส่วนราชการ และผู้ที่เกี่ยวข้อง

8. การเผยแพร่ผลงานวิจัย

8.1 บทความวิชาการ เรื่อง ตั๊กแตนไผ่ ศัตรูพืชเฝ้าระวังที่สำคัญของประเทศไทย ในวารสารกีฏและสัตววิทยา ปีที่ 39 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม – ธันวาคม 2564

8.4 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ เรื่อง การสำรวจและศึกษาชนิดของโรคอินทผลัมเพื่อการนำเข้า ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 15 ณ โรงแรมรามาการ์เด้น กรุงเทพมหานคร

8.5 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ เรื่อง การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืช *Potato Cyst Nematode* ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 15 ณ โรงแรมรามาการ์เด้น กรุงเทพมหานคร

8.6 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ เรื่อง การศึกษาความเสี่ยงศัตรูพืชของการนำเข้าผลอินทผาลัมสดจากสาธารณรัฐอิสลามอิหร่าน ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 15 ณ โรงแรมรามาการ์เด้น กรุงเทพมหานคร

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

ด้วยกฎหมายและข้อกำหนดที่เกี่ยวข้องกับการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตรต้องมีข้อมูลศัตรูพืชตามหลักเกณฑ์วิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องครบถ้วน รวมทั้งต้องมีการตรวจสอบและวิธีกำจัดศัตรูพืชเพื่อไม่ให้เกิดความเสียหายแก่ภาคการเกษตรและเกิดผลกระทบต่อเศรษฐกิจ โครงการวิจัยและพัฒนาการกักกันพืชเพื่อการค้าสินค้าเกษตรด้านพืชระหว่างประเทศ ดำเนินการวิจัยตั้งแต่เดือนตุลาคม 2564 – กันยายน 2565 มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ข้อมูลบัญชีรายชื่อชนิดศัตรูพืชและชนิดศัตรูพืชกักกันที่เป็นปัจจุบัน และเก็บรักษาตัวอย่างศัตรูพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์ วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของสินค้าเกษตรที่นำเข้าจากต่างประเทศ และได้แนวทางการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชที่เหมาะสม พัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์สำหรับขึ้นทะเบียนและการจัดการศัตรูพืชกับพืชสำหรับการส่งออก และพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดและโรคตายพราย TR4 ของกล้วยโดยวิธีการต่าง ๆ โดยดำเนินการสำรวจ ตรวจสอบ รวบรวม จัดจำแนกศัตรูพืช และเก็บตัวอย่างศัตรูพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิชาการ ศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของพืชนำเข้าจากต่างประเทศ และหาแนวทางในการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชที่เหมาะสม พัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์สำหรับขึ้นทะเบียน และพัฒนาเทคโนโลยีกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในผลมะละกอและมะม่วงเพื่อเพิ่มศักยภาพในการส่งออก รวมถึงการพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดและโรคตายพราย TR4 ของกล้วยโดยวิธีการต่าง ๆ ผลการศึกษาพบว่า การศึกษาชนิดของศัตรูพืชในประเทศเพื่อการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชได้ข้อมูลชนิดแมลงศัตรู ไรศัตรูพืช โรคพืชและวัชพืชในแปลงอินทผลัม และลิลลี่ และตัวอย่างศัตรูพืชเก็บในพิพิธภัณฑ์ การศึกษาความเสี่ยงศัตรูพืชที่สัมพันธ์กับการนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ได้ข้อมูลทั่วไป รายชื่อศัตรูพืช/กลุ่มศัตรูพืช และข้อมูลศัตรูพืชของสินค้าเกษตรนำเข้า 9 รายการ ได้แก่ บลูเบอรี่ แก้วมังกร เชอรี่ สับปะรด อินทผลัม ส่วนขยายพันธุ์องุ่น ลิลลี่ กล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส และวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก ที่นำเข้าจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก รวมทั้งได้รายชื่อศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของสินค้าเกษตรนำเข้า การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักและหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า ได้ข้อมูลการตรวจเชื้อไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกและมะเขือเทศนำเข้า เมล็ดวัชพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่ายนำเข้า ไส้เดือนฝอย Potato cyst nematode ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า เชื้อ *Candidatus* Liberibacter solanacearum ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์เพื่อการค้าสินค้าเกษตรด้านพืช ได้ดีเอ็นเอต้นแบบจากตัวอย่างที่จำแนกชนิดถูกต้องแล้ว ได้แก่ แมลงวันผลไม้ที่พบในประเทศไทย *Cucumber mosaic virus* จากพริก แบคทีเรีย *X. perforans* จากพริกและมะเขือเทศ ยีนสังเคราะห์ *atpD* และ *gyrB* ของแบคทีเรีย *X. vesicatoria*

กรมวิชาการเกษตร

ไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* เชื้อรา *Trichoderma asperellum* เชื้อรา *Metarhizium* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรากลุ่ม *T. asperellum* complex และ *Metarhizium* เพื่อออกแบบไพร์เมอร์ และสภาวะการทำปฏิกิริยาของเทคนิค multiplex PCR ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* สภาวะการทำปฏิกิริยาของเทคนิค PCR ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย *X. perforans* และ *X. vesicatoria* สำหรับดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพ ความไว และความจำเพาะของเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์ การศึกษาความเสียหายจากความร้อนด้วยเทคโนโลยีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ต่อคุณภาพของผลมะละกอพันธุ์แขกดำ และแขกนวล มะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้า น้ำดอกไม้มัน แดงจักรพรรดิ และอกร่อง พบว่าอุณหภูมิสูง ความชื้น และระยะเวลา ที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อคุณภาพของมะละกอพันธุ์แขกนวล แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อความเสียหายของมะละกอพันธุ์แขกดำ สำหรับมะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้า และน้ำดอกไม้มันที่ผ่านการอบไอน้ำไม่มีการสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณน้ำตาล และปริมาณกรดเมื่อเปรียบเทียบกับมะม่วงที่ไม่มีผ่านการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ การสำรวจและเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันของพืชและผลผลิตพืชในประเทศไทย ยังไม่ปรากฏของศัตรูพืชกักกัน ได้แก่ แบคทีเรีย *Pseudomonas corrugata, Xanthomonas vesicatoria, Xanthomonas gardneri, Xanthomonas perforans*, รา *Pseudocercospora angolensis*, *Verticillium albo-atrum*, ไส้เดือนฝอย *Ditylenchus destructor, Ditylenchus dipsaci*, แมลงวันผลไม้ *Bactrocera minax*, ตั๊กแตนไผ่ *Ceracris kiangsu*, วัชพืช *Raphanus raphanistrum* และ *Galium aparine* L. ในปีที่ 1 และการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชอุบัติใหม่ในข้าวโพดและกล้วยเพื่อการส่งออก ได้กระบวนการใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด และได้วิธีการจำแนกชนิดเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ต่าง forma specialis ที่ถูกต้องและแม่นยำด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล เพื่อใช้เปรียบเทียบในการตรวจสอบและอ้างอิงชนิด รวมทั้งได้ปฏิกิริยาสายพันธุ์/พันธุ์กล้วยที่มีปฏิกิริยาทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา Foc TR4 เพื่อใช้ในการพิจารณาบริหารจัดการศัตรูพืช อย่างไรก็ตามโครงการวิจัยนี้จะต้องทำการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องเพื่อให้งานวิจัยมีประสิทธิภาพและเป็นไปตามมาตรฐานสากล เพื่อเพิ่มศักยภาพงานด้านกักกันพืชเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยและการจัดการศัตรูพืชชนิดใหม่สำหรับการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตรด้านพืชเพื่อให้สินค้าเกษตรมีคุณภาพได้มาตรฐาน และเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันสินค้าเกษตรและการแก้ไขปัญหาการค้าระหว่างประเทศ

คำสำคัญ: กักกันพืช, สุขอนามัยพืช, ศัตรูพืชกักกัน, รายชื่อศัตรูพืช, วิเคราะห์ความเสี่ยง, วินิจฉัย, เฝ้าระวัง, อบไอน้ำ, เทคโนโลยี, ศัตรูพืชอุบัติใหม่

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

According to the laws and regulations related to the import and export of agricultural products, pest information must be completed with the correct scientific rules. There is a need for inspections and pesticides uses to prevent damage to the agricultural sector and affect the economy. Research plan: Research and Development on Plant Quarantine for International Plant Commodity Trad, conducted research from October 2021 – September 2022. This research aims to current list of pests and quarantine pests along with keeping specimens of pests in the museum, Pest risk analysis of imported agricultural products and obtain guidelines for determining appropriate phytosanitary measures, Develop technology for pest diagnosis and biological products for registration and pest management on plants for export and to develop technology for the management of fall armyworm in maize and TR4 of banana by various methods. Methods of operation Survey, inspect, collect, classify pests and keep specimens of pests in the museum for academic evidence. Study and analyze pest risks of imported plants and find ways to determine appropriate phytosanitary measures. Develop technology for pest diagnosis and biological products for registration and development of modified vapor heat treatment for papaya and mango infested with *Bactrocera dorsalis* (Hendel) for export including development of technology to manage fall armyworm in maize and TR4 of banana by various methods. The results of the study revealed information about the species of insects, mites, plant diseases, weeds in the fields of date-palms and lilies and pest samples from the planting area. All pest specimens were kept in the museum. Studies on pest risks associated with agricultural imports from Asia-Pacific countries get general information List of pests/pest groups and pest data of 9 imported agricultural products: blueberry, dragon fruit, cherry, pineapple, date-palm, grape extensions, lily, dendrobium and phalaenopsis species. and planting material with plants for planting imported from countries in the Asia-Pacific region as well as obtaining a list of potential pests as quarantine pests of imported agricultural products. Diagnosis of quarantine pests attached to imported vegetable seeds and potato seedlings Data on the detection of the Tobamovirus genus virus attached to imported chili and tomato seeds were obtained. Weed seeds attached to imported celery seeds Potato cyst nematode attached to imported potato cultivars Candidatus Liberibacter solanacearum attached to imported potato cultivars. Research and development of pest diagnostic technology and biological products for trade in agricultural crops. DNA prototypes were obtained from correctly identified samples: fruit flies found in Thailand, *Cucumber mosaic virus* from chili, *X. perforans* bacteria from chili and tomatoes. The atpD and gyrB synthesis genes of X. vesicatoria, the nematode Radopholus similis, *Trichoderma*

กรมวิชาการเกษตร

asperellum, *Metarhizium*, the nucleotide sequences of *T. asperellum* complex and Metarhizium to design primers. and reaction conditions of multiplex PCR for the diagnosis of *B. correcta* and *Z. cucurbitae*, the reaction conditions of PCR for the diagnosis of *X. perforans* and *X. vesicatoria* for the assay. Efficacy, sensitivity and specificity of pest and biological diagnostic technology. Research and development of modified vapor heat treatment for papaya and mango infested with *B. dorsalis* for export, it was found that high temperature, humidity and increasing duration affecting the quality of Khaek Nuan papaya but did not affect the damage of Khaek Dum papaya. For Mun Deaun Kao and Nam Dok Mai Mun mangoes, fruits were treated were not significantly different in weight loss, soluble solids, and acidity value compared with untreated fruits. Survey and surveillance of quarantine pests of plants and plant products in Thailand. The quarantine pests are not present: *Pseudomonas corrugata*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas gardneri, Xanthomonas perforans, Pseudocercospora angolensis, Verticillium albo-atrum, Ditylenchus destructor nematode, Ditylenchus dipsaci*, *Bactrocera minax*, *Ceracris kiangsu*, *Raphanus raphanistrum* and *Galium aparine* L. in year 1. Research and development of emerging pest management technologies in corn and bananas for export Get a new effective process to prevent and eradicate fall armyworm and the methods for identifying *Fusarium oxysporum* from different forma specialis were accurate and precise by morphological and biomolecular characteristics to be used for comparison in checking and referring species In addition, banana strains/cultivars that were resistant to the infestation of Foc TR4 were also obtained for use in pest management considerations. However, this research project must continue to conduct research studies in order to make research effective and meet international standards to increase the potential of plant quarantine work new technology for diagnosis and management of pests for the import and export of agricultural products in order to meet the quality standards of agricultural products and increase the competitiveness of agricultural products and solve international trade problems.

Key words: Plant Quarantine, phytosanitary, quarantine pest, pest list, pest risk analysis, Interception, surveillance, vapor heat treatment, technology, emerging pest

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่สนับสนุนงบประมาณโครงการวิจัย และขอขอบพระคุณคณะกรรมการที่ปรึกษาด้านวิชาการ คณะกรรมการบริหารงานวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการจัดทำโครงการวิจัย ตลอดจนข้าราชการ พนักงานราชการ ลูกจ้างประจำ และพนักงานจ้างเหมา ที่ให้การสนับสนุนการปฏิบัติงานวิจัยเป็นอย่างดีทำให้รายงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วง

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	2
บทคัดย่อ	8
Abstract	10
กิตติกรรมประกาศ	12
สารบัญ	13
สารบัญภาพ	14
บทที่ 1 บทนำ	17
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน	26
บทที่ 3 ผลการศึกษา	108
บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล	165
เอกสารอ้างอิง	174
ภาคผนวก	181
ภาคผนวก 1 สิ่งที่แสดงประกอบเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับเนื้อหาผลงานวิจัย	182
ภาคผนวก 2 หลักฐานเชิงประจักษ์ของผลผลิตที่ได้	207
ภาคผนวก 3 หลักฐานเชิงประจักษ์ของการนำผลงานไปใช้ประโยชน์	269
ภาคผนวก 4 หลักฐานการปรับแผนงบประมาณระหว่างปี	273

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 1.1	แมลงศัตรูอินทผลัม	108
ภาพที่ 1.2	ไรศัตรูพืชในแปลงอินทผลัม ไร *Oligonychus pratensis* (Banks)	109
ภาพที่ 1.3	ไรศัตรูพืชในแปลงอินทผลัม	109
ภาพที่ 1.4	ลักษณะอาการของโรคใบจุด graphiola หรือ false smut ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Graphiola phoenicis* ที่พบในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี	110
ภาพที่ 1.5	ลักษณะอาการของโรคใบจุด (leaf spot) ของอินทผลัม ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ที่พบในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดอุตรดิตถ์	110
ภาพที่ 1.6	ลักษณะอาการของโรคราดำ (sooty mold) ของอินทผลัมที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Meliola* sp. ที่พบในพื้นที่อำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์	110
ภาพที่ 1.7	ลักษณะอาการขาดธาตุโพแทสเซียมของอินทผลัม	111
ภาพที่ 1.8	ลักษณะอาการของโรคใบด่าง (mosaic) ของลิลลี่ ที่มีสาเหตุจากไวรัส *Cucumber mosaic virus* (CMV) ที่พบในพื้นที่อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่	111
ภาพที่ 1.9	สภาพวัชพืชในแปลงอินทผลัม	112
ภาพที่ 1.10	แปลงแปลงลิลลี่	112
ภาพที่ 1.11	ตัวอย่างวัชพืชที่ยังระบุชนิดไม่ได้	112
ภาพที่ 2.1	ลักษณะผลบลูเบอรี่สดนำเข้า	118
ภาพที่ 2.1	เก็บตัวอย่างผลบลูเบอรี่เพื่อตรวจสอบศัตรูพืช	118
ภาพที่ 2.3	ผลเชอรี่นำเข้า	118
ภาพที่ 2.4	ลักษณะสวนอินทผลัม จ.พระนครศรีอยุธยา	119
ภาพที่ 2.5	โรคราเขม่า (False smut) บนใบอินทผลัม	119
ภาพที่ 2.6	ลักษณะการเข้าทำลายของด้วงแรดบนยอดอินทผลัม	119
ภาพที่ 2.7	ลักษณะต้นลิลลี่ในสภาพโรงเรือน	120
ภาพที่ 2.8	การตัดดอกลิลลี่ที่ปลูกในสภาพโรงเรือน	120
ภาพที่ 2.9	การจัดช่อดอกลิลลี่เพื่อเตรียมจำหน่าย	120
ภาพที่ 2.10	ต้นลิลลี่ในวัสดุปลูกพีทมอส	120
ภาพที่ 2.11	การตรวจสอบดอกลิลลี่ ณ จุดนำเข้า	121
ภาพที่ 2.12	ตัวอย่างดอกลิลลี่ที่สุ่มมาตรวจสอบศัตรูพืช ณ ห้องปฏิบัติการของด่านตรวจพืช	121
ภาพที่ 2.13	การตรวจสอบศัตรูพืชจากตัวอย่างดอกลิลลี่ที่นำเข้า ณ ห้องปฏิบัติการของด่านตรวจพืช	121
ภาพที่ 2.14	ต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	122

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
ภาพที่ 2.15	ลักษณะอาการบริเวณใบของกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิสเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ตรวจพบเชื้อไวรัส CyMV	122
ภาพที่ 2.16	ก้านช่อ *Phalaenopsis* spp.	122
ภาพที่ 3.1	Seedling symptom test.	124
ภาพที่ 3.2	Field inspection in tomato crops.	124
ภาพที่ 3.3	Field inspection in pepper crops.	124
ภาพที่ 3.4	Life cycle of (a) root-knot nematode and (b) cyst nematode	126
ภาพที่ 3.5	ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิด potato cyst nematode ที่เข้าทำลายมันฝรั่ง	126
ภาพที่ 3.6	การเข้าทำลายของ potato cyst nematode ชนิด white potato cyst nematode	127
ภาพที่ 3.7	ภาพการเข้าทำลายของ potato cyst nematode ชนิด Yellow or Golden potato cyst nematode	127
ภาพที่ 3.8	ลักษณะอาการโรค Zebra chip ในหัวพันธุ์มันฝรั่ง	131
ภาพที่ 3.9	ลักษณะในหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากสกอตแลนด์	131
ภาพที่ 3.10	เมล็ดวัชพืชติดมากับเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่าย	133
ภาพที่ 3.11	ทดสอบความงอกของเมล็ดวัชพืช *Helmithotheca echioides*	133
ภาพที่ 3.12	ทดสอบความงอกของเมล็ดวัชพืช *Echinochloa colona*	133
ภาพที่ 3.13	การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูก	135
ภาพที่ 4.1	ลักษณะอาการของตัวอย่างพริกที่เก็บจากแปลงปลูก	135
ภาพที่ 4.2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและโคนิเดียของเชื้อรา *Metarhizium*	135
ภาพที่ 4.3	การตรวจสอบแมลงวันผลไม้ด้วยเทคนิค multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 141 bp และแมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae* มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 83 bp	136
ภาพที่ 4.4	การตรวจสอบ *Cucumber mosaic virus* ด้วยเทคนิค PCR ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 678 bp	136
ภาพที่ 4.5	การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas perforans* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Bs-XpF/Bs-XpR มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 197 bp และไพรเมอร์ HpsF-f/HpaF-r มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 300 bp	137
ภาพที่ 4.6	การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas vesicatoria* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Xv-gyrB-F/Xv-gryB-R มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 104 bp และไพรเมอร์ Xv1/Xv2 มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 404 bp	137

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
ภาพที่ 4.7	การตรวจสอบไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* ด้วยเทคนิค PCR ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 398 bp	138
ภาพที่ 4.8	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ribosomal DNA ของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ด้วยเทคนิค PCR ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 600 bp	138
ภาพที่ 6.1	Specific survey of *P. corrugata* in production areas of tomatoes.	149
ภาพที่ 6.2	อาการใบจุดของมะเขือเทศจากจังหวัดสกลนครที่ตรวจพบเชื้อที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Xanthomonas perforans*	149
ภาพที่ 6.3	Symptoms of *Pseudocercospora angolensis* on leaves and fruit	149
ภาพที่ 6.4	Symptoms of old leaves are pale, yellow, V-shaped brown lesions. The edges of the old leaves wither and will eventually dry up and die.	150
ภาพที่ 6.5	Survey pattern and collecting sample	150
ภาพที่ 6.6	Characteristics of *Bactrocera minax*	151
ภาพที่ 6.7	Survey guide and report form	151
ภาพที่ 6.8	Survey pattern and collecting sample of *Citrus spp.*	151
ภาพที่ 6.9	*Hieroglyphus banian*	152
ภาพที่ 6.10	ลักษณะของ ต้น ดอก และเมล็ดของวัชพืช *Raphanus raphanistrum*	152
ภาพที่ 6.11	การเดินสำรวจวัชพืชแบบซิกแซค (W) ในแปลงปลูกกะหล่ำ	152
ภาพที่ 6.12	วัชพืช *Galium aparine* L.	152

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 1 บทนำ

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 วงน. 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”

กรมวิชาการเกษตร

3. วงเงินงบประมาณกองทุน วงน. ที่ได้รับจัดสรรในปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 จำนวน 7,182,162 บาท

4. รายละเอียดโครงการ

ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล

ปัจจุบันประเทศไทยมีการเปิดการค้าเสรีกับหลาย ๆ ประเทศ (Free Trade Area, FTA) เพื่อชิงความได้เปรียบในการแข่งขันทางการค้า (กรมเจรจาค้าระหว่างประเทศ, 2553) รวมถึงการดำเนินงานภายใต้ยุทธศาสตร์ความร่วมมือทางเศรษฐกิจระหว่างไทยกับเพื่อนบ้าน (Ayeyawady-Chao Phraya-Mekong Economic Corporation Strategy, ACMECS) และระบบการค้าและระบบโลจิสติกส์ระหว่างประเทศหรือภูมิภาคได้ขยายตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้มีการเคลื่อนย้ายสินค้าเกษตรเป็นจำนวนและปริมาณมากเพิ่มขึ้น จึงทำให้ปัจจุบันแต่ละประเทศใช้มาตรการสุขอนามัยพืชเป็นตัวควบคุมการนำเข้าหรือเป็นตัวกีดกันทางการค้ากับสินค้าเกษตร โดยจุดประสงค์หลักคือการปกป้องสินค้าเกษตรของตนเอง สำหรับกฎหมายของประเทศไทยที่เกี่ยวข้องกับการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร คือ พระราชบัญญัติกักพืช 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2551) ได้แบ่งประเภทสินค้าเกษตรนำเข้าเป็น 3 ประเภท ได้แก่ สิ่งต้องห้าม สิ่งกำกัด และสิ่งไม่ต้องห้าม ซึ่งมีขั้นตอนการนำเข้า และวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน โดยการนำเข้าพืช ผลิตผลพืช รวมถึงวัสดุปลูก เพื่อการค้าส่วนใหญ่จะมีปริมาณการนำเข้ามาก จึงมีโอกาสที่ศัตรูพืชร้ายแรงจากต่างประเทศจะติดมากับพืชที่นำเข้า เช่น แมลงวันผลไม้เมดิเตอร์เรเนียน (Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*) หรือแมลงวันผลไม้ควีนส์แลนด์ (Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni*) ที่ติดมากับผลไม้นำเข้า เพื่อการบริโภค หรือการนำเข้าส่วนขยายพันธุ์พืช เช่น เมล็ดพันธุ์ หัวพันธุ์ หรือกิ่งชำ ต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมถึงวัสดุปลูก เพื่อนำมาปลูกกระจายทั่วประเทศ อาจเกิดการแพร่กระจายศัตรูพืชกักกันร้ายแรงอุบัติใหม่หรือชนิดใหม่ที่ไม่มีรายงานพบในประเทศไทย เช่น แบคทีเรีย *Xylella fastidiosa*, *Xylophilus ampelinus* ไวรัส *Grapevine leafroll-associated viruses* ไฟโตพลาสมา *Grapevine yellows phytoplasmas* ที่มีโอกาสติดมากับกิ่งพันธุ์องุ่น เป็นพืชสิ่งไม่ต้องห้าม ไส้เดือนฝอย *Ditylenchus destructor* ที่มีโอกาสติดมากับหัวพันธุ์ลิลลี่ และเชื้อรา *Cylindrosporium phalaenopsidis* ที่มีโอกาสติดมากับต้นกล้วยไม้ เป็นพืชสิ่งกำกัด รวมถึงสัตว์ศัตรูพืช เช่น หอย ที่มีโอกาสติดมากับวัสดุปลูกที่อาจเคลื่อนย้ายวัสดุปลูกในการรวมกันกับพืชสำหรับปลูก ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีข้อกำหนดการนำเข้าด้านสุขอนามัยพืชที่เหมาะสม สำหรับการนำเข้าเพื่อทดลองหรือวิจัยจะมีการควบคุมให้อยู่ในพื้นที่กักกันและมีการกำกับดูแลโดยเจ้าหน้าที่ ดังนั้น การนำเข้าเพื่อการค้าที่มีปริมาณมากกว่าจึงมีความเสี่ยงของศัตรูพืชมากกว่า อีกทั้งการนำเข้าพืชเพื่อการเพาะปลูก (plant for planting) จึงเป็นกลุ่มสินค้าที่มีความเสี่ยงสูงกว่ากลุ่มอื่นตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 32 (ISPM 32) การจำแนกสินค้าตามความเสี่ยงศัตรูพืช (Categorization of commodities according to their pest risk)

กรมวิชาการเกษตร

ประเทศไทยเป็นสมาชิกองค์การการค้าโลก (World Trade Organization, WTO) ซึ่งประเทศสมาชิกมีพันธกรณีจะต้องปฏิบัติตามความตกลงว่าด้วยการใช้บังคับมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures, SPS Agreement) บนหลักการสำคัญที่จำเป็นในการควบคุมการนำเข้าสินค้าเกษตรและอาหาร โดยวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันความเสี่ยงหรืออันตรายที่จะเกิดขึ้นกับคน สัตว์ หรือพืชในประเทศของตนเองได้ โดยมาตรฐานระหว่างประเทศคือ อนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention, IPPC) ที่มีหลักการสำคัญคือ ความประสานกลมกลืน ความเท่าเทียมกัน การประเมินความเสี่ยง และความโปร่งใส โดยให้องค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization, NPPO) ของแต่ละประเทศดำเนินการ ซึ่งมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชได้ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการกีดกันทางการค้ากับสินค้าเกษตร โดยอ้างการตรวจพบเชื้อโรคพืช แมลง และอื่นๆ ซึ่งส่งผลกระทบการค้าของระหว่างประเทศ นอกจากนี้ยังใช้การออกกฎระเบียบใหม่ใช้ศัตรูพืชกักกันมาเป็นเงื่อนไขในการนำเข้าสินค้าเกษตร ประเทศไทยมีพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และ พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 ซึ่งเป็นกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ที่แบ่งประเภทสินค้าเกษตรนำเข้าเป็น 3 ประเภท ได้แก่ สิ่งต้องห้าม สิ่งกำกัด และสิ่งไม่ต้องห้าม เพื่อป้องการติดเข้ามาของศัตรูพืชกับสินค้าเกษตรนำเข้า หากศัตรูพืชสามารถตั้งรกราก แพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งเข้าทำลายพืช ตลอดจนสร้างความเสียหายของพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย และการกำจัดทำได้ยาก ใน พ.ร.บ. กักพืช มาตรา 8 (2) กำหนดว่าการนำเข้าหรือนำผ่านซึ่งสิ่งต้องห้ามเพื่อการค้าจะต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis) ซึ่งสิ่งสำคัญที่สุดคือข้อมูลศัตรูพืช ทั้งชนิด วงจรชีวิต ชีววิทยา การแพร่ระบาด แมลงพาหะและผลกระทบที่เกิดขึ้น เพื่อพิจารณากำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชที่เหมาะสมกำจัดศัตรูพืชกักกันก่อนการนำเข้ามายังประเทศไทย และต้องตรวจสอบสินค้าเกษตรภายหลังการนำเข้า นำผลที่ได้มาปรับปรุง เปลี่ยนแปลงมาตรการสุขอนามัยพืชให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น สำหรับการส่งออกเพื่อเป็นการขยายตลาดไปยังต่างประเทศ ทำให้เพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตร ส่งผลให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้น และเป็นการช่วยเหลือเกษตรกรในเรื่องราคาสินค้าเกษตร ดังนั้นถ้าเราสามารถเปิดตลาดไปจำหน่ายยังต่างประเทศเพิ่มขึ้น โดยจัดส่งข้อมูลเพื่อให้ประเทศคู่ค้าสามารถร่นระยะเวลา การดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของผู้นำเข้าให้รวดเร็วยิ่งขึ้น ส่งผลดีต่อระบบการตลาดในสากลที่ปัจจุบันที่มีการแข่งขันสูง และสามารถเพิ่มมูลค่าการส่งออกสินค้าเกษตรของประเทศได้อย่างยิ่ง โดยมีกรมวิชาการเกษตรในฐานะองค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (NPPO) ของประเทศไทย ทำหน้าที่กำกับดูแลป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศไทย และยังต้องทำหน้าที่ในการตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืชของสินค้าเกษตรในการส่งออก จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชที่ทันสมัย รวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาศัตรูพืชในสินค้าเกษตรป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือ

กรมวิชาการเกษตร

ศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศ และต้องพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชที่ทันสมัย ทันต่อสถานการณ์ มีประสิทธิภาพในการตรวจหาศัตรูพืช และต้องเป็นที่ยอมรับของประเทศคู่ค้า เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรในการส่งออกตามเงื่อนไขของประเทศคู่ค้า หากวิธีการตรวจวินิจฉัยศัตรู พืชไม่มีประสิทธิภาพ ผลผลิตที่ส่งออกจากประเทศไทยอาจถูกตีกลับมาเนื่องจากตรวจพบศัตรูพืชตามเงื่อนไขของประเทศคู่ค้า ทำให้ประเทศไทยเสียภาพลักษณ์และขาดความเชื่อมั่นจากประเทศคู่ค้าได้ หรืออาจทำให้ศัตรูพืชร้ายแรงหรือศัตรูกักกันจากต่างประเทศติดเข้ามากับสินค้าเกษตรนำเข้า ทำให้เกิดการระบาดทำความเสียหายต่อการเพาะปลูกพืชของไทยนอกจากนี้ประเทศไทยมีการผลิตสินค้าทางการเกษตรที่มีศักยภาพในการส่งออก หลายชนิด ปัญหาศัตรูพืชเป็นปัญหาสำคัญทำให้เกิดความเสียหายแก่ขบวนการผลิตพืช ทำให้ผลผลิตไม่มีคุณภาพหรือมีการปนเปื้อนศัตรูพืชไม่สามารถส่งออกได้ เพื่อให้ได้ผลผลิตที่ดีได้มาตรฐาน วิธีการตรวจหาที่รวดเร็วจะทำให้แก้ไขหรือป้องกันกำจัดได้ทันสถานการณ์ ทำให้สามารถส่งออกสินค้าเกษตรไปยังต่างประเทศได้ และการตรวจวินิจฉัยเพื่อทราบชนิดจุลินทรีย์มีประโยชน์ทำให้สามารถระบุชนิดได้รวดเร็วในคำแนะนำการป้องกันกำจัดสนับสนุนการผลิตพืชปลอดศัตรูพืชเพื่อเพิ่มศักยภาพการแข่งขันสินค้าเกษตรด้านพืชและการตรวจสอบชีวภัณฑ์ที่ขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตรได้

การจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูโดยการศึกษาและการสำรวจแบบติดตามข้อมูลศัตรูพืชในแหล่งปลูกเพื่อเป็นการเฝ้าระวัง (Surveillance) เป็นกระบวนการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่งในพื้นที่ ซึ่งการรวบรวมข้อมูลนั้นสามารถทำได้ 2 แบบ ได้แก่ 1) การเฝ้าระวังโดยทั่วไป (general surveillance) โดยการสืบค้นข้อมูลจากแหล่งข้อมูล ได้แก่ ข้อมูลข่าวสารศัตรูพืชที่มีรายงานในประเทศ เช่น จากหน่วยงานภาครัฐ มหาวิทยาลัย ภาคเอกชน ตลอดจนข่าวสารจากแหล่งข้อมูลขององค์กรระหว่างประเทศ เป็นต้น และ 2) การเฝ้าระวังโดยการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific surveys) สามารถดำเนินการโดยการสำรวจแบบตรวจหา (detection surveys) การสำรวจแบบมีขอบเขต (delimiting surveys) และการสำรวจแบบติดตามอย่างต่อเนื่อง (monitoring surveys) (FAO, 2018; McMaugh, 2008) ประโยชน์ของการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจงทั้ง 2 วิธีนี้นอกจากจะสามารถบอกถึงสถานการณ์ของศัตรูพืชในพื้นที่แล้วยังสามารถใช้ข้อมูลที่ได้เป็นการรับรองพื้นที่ปลอดศัตรูพืชในกรณีที่ไม่พบศัตรูพืชในพื้นที่นั้น ๆ เมื่อมีการรับรองพื้นที่ปลอดศัตรูพืชแล้ว การที่จะคงสภาพพื้นที่ปลอดศัตรูพืชจะต้องมีการสำรวจแบบตรวจหาอย่างเป็นระบบ ข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้จากการสำรวจติดตามศัตรูพืชเพื่อการเฝ้าระวังนี้จะส่งให้ NPPO นำไปใช้ประโยชน์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการเฝ้าระวังนี้สามารถนำไปใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น ใช้ในการสนับสนุนการออกประกาศเรื่องการปลอดศัตรูพืชที่ดำเนินการโดย NPPO เป็นกระบวนการช่วยตรวจหาศัตรูพืชชนิดใหม่ได้ทันเวลา การให้การรับรองพื้นที่ปลอดศัตรูพืช เป็นต้น การสำรวจ ติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชเป็นงานพื้นฐานที่มีความจำเป็นสำหรับใช้ในการดำเนินการด้านอื่น ๆ อีก เช่น Pest Risk Analysis,

กรมวิชาการเกษตร

Establishment for pest free area, Pest list, Pest report เป็นต้น ซึ่งแนวทางการดำเนินงานจะสอดคล้องกับ ISPMs (International Standard for Phytosanitary Measures) ฉบับที่ 6 (Surveillance)

ผักและผลไม้สดที่สำคัญของประเทศไทยได้แก่ มะละกอ (พันธุ์แขกดำ และแขกนวล) และมะม่วงพันธุ์แดงจักรพรรดิ ไม่สามารถส่งออกไปจำหน่ายยังประเทศที่เข้มงวดด้านกักกันพืช เช่น ประเทศญี่ปุ่น เกาหลี สหภาพยุโรป เป็นต้น เนื่องจากประเทศไทยเป็นแหล่งแพร่ระบาดของแมลงวันผลไม้และมีปัญหาไข่และหนอน แมลงวันผลไม้ Bactrocera dorsalis (Hendel) ซึ่งเป็นศัตรูพืชกักกันที่สำคัญของต่างประเทศติดไปกับผักและผลไม้เหล่านั้น การกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ด้วยการอบไอน้ำ (Vapor Heat Treatment) ก่อนการส่งออก เป็นวิธีกำจัดที่มีประสิทธิภาพสูง จึงทำการวิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงวันผลไม้ B. dorsalis เพื่อใช้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สำหรับเปิดตลาดผลไม้ไทยส่งออกไป สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น เกาหลี ไต้หวัน ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ สำหรับมังคุดและลำไยหลังจากประสบความสำเร็จในการกำจัดแมลงวันผลไม้ B. dorsalis แต่พบปัญหาในเรื่องของคุณภาพหลังอบไอน้ำ

ดังนั้นกรมวิชาการเกษตรในฐานะเป็นองค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ NPPO จึงมีหน้าที่ต้องเตรียมข้อมูลเพื่อการเปิดตลาดสินค้าเกษตรและดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช โดยต้องศึกษาชนิดข้อมูลศัตรูพืชตามหลักเกณฑ์วิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องครบถ้วน และทำการสำรวจศัตรูพืชกักกันของประเทศไทยที่มีการประกาศ เพื่อยืนยันสถานภาพยังคงเป็นศัตรูพืชกักกัน ทำให้กำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชที่เหมาะสมสำหรับสินค้าเกษตรนำเข้าที่เป็นสิ่งต้องห้ามและต้องดำเนินการตรวจสอบว่ามาตรการที่กำหนดนั้นมีประสิทธิภาพหรือต้องแก้ไขทบทวนใหม่ อีกทั้งการศึกษาหาวิธีการกำจัดแมลงวันผลไม้ เพื่อให้ผักและผลไม้สดสามารถส่งออกไปจำหน่ายยังประเทศที่เข้มงวดด้านกักกันพืช อีกทั้งเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสินค้าเกษตรให้มีคุณภาพมาตรฐานและอำนวยความสะดวกด้านการค้าสินค้าเกษตร และส่งผลให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้น มั่งคั่ง ยั่งยืน รวมถึงลดการย้ายถิ่นฐานของเกษตรกรเข้ามาทำงานในเมือง ได้ข้อมูลศัตรูพืชในการเจรจาต่อรองการค้าสินค้าเกษตรกับต่างประเทศ ทำให้ได้ดุลการค้า เพื่อสนับสนุนการเติบโตทางเศรษฐกิจ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1) เพื่อให้ได้ข้อมูลบัญชีรายชื่อชนิดศัตรูพืชและชนิดศัตรูพืชกักกันที่เป็นปัจจุบัน และเก็บรักษาตัวอย่างศัตรูพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์
2) เพื่อทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของสินค้าเกษตรที่นำเข้าจากต่างประเทศ และได้แนวทางการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชที่เหมาะสม
3) เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์สำหรับขึ้นทะเบียน และการ จัดการศัตรูพืชกับพืชสำหรับการส่งออก
4) เพื่อศึกษาเทคโนโลยีการจัดการหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดและโรคตายพราย TR4 ของกล้วยโดยวิธีการต่าง ๆ

กรมวิชาการเกษตร

ขอบเขตการศึกษา

โครงการวิจัยและพัฒนาการกักกันพืชเพื่อการค้าสินค้าเกษตรด้านพืชระหว่างประเทศ มีขอบเขตการศึกษาโดยการสำรวจ แมลง ไร โรคพืช วัชพืช และหอยศัตรูพืชของ อินทผลัม มันเทศ ลิลลี่ กล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส จำแนกชนิดของศัตรูพืชให้ถูกต้องตามหลักมาตรฐานสากล และศึกษาด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา ความเสียหาย การแพร่กระจายของศัตรูพืช เก็บตัวอย่างแห้งโรคพืช แมลง ไร และวัชพืช ไว้ในพิพิธภัณฑ์ และจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชอย่างถูกต้อง สำรวจและเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันของพืชและผลผลิตพืชในประเทศไทย ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas corrugata, Xanthomonas vesicatoria, Xanthomonas gardneri, Xanthomonas perforans*, เชื้อรา *Pseudocercospora angolensis*, *Verticillium albo-atrum*, ไส้เดือนฝอย *Ditylenchus destructor*, *Ditylenchus dipsaci*, แมลงวันผลไม้ *Bactrocera minax*, ตั๊กแตนไผ่ *Ceracris kiangsu*, วัชพืช *Raphanus raphanistrum*, *Galium aparine* L. ดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 6 (Surveillance: ISPM No. 6) เพื่อให้ทราบข้อมูลการปรากฏหรือไม่ปรากฏเพื่อยืนยันสถานภาพที่เป็นปัจจุบันของประเทศไทย ศึกษาศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักและหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงทางวิชาการ และกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชให้เหมาะสมรัดกุม รวมทั้งป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศ ศึกษาความเสี่ยงศัตรูพืชที่สัมพันธ์กับการนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิกได้แก่ บลูเบอรี่ แก้วมังกร เชอรี่ สับปะรด อินทผลัม ส่วนขยายพันธุ์องุ่น ลิลลี่ กล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส และวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูกจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ตลอดจนการพิจารณาแนวทางการกำหนดมาตรการวิชาการด้านสุขอนามัยพืชสำหรับจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกัน โดยประยุกต์ใช้แนวทางการวิเคราะห์ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures: ISPM) ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Framework for Pest Risk Analysis, adopted 2007) ฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน (Pest risk analysis for quarantine pests, adopted 2013) ฉบับที่ 21 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชควบคุมที่ไม่ใช่ศัตรูพืชกักกัน (Pest risk analysis for regulated non-quarantine pests) ฉบับที่ 36 เรื่อง มาตรการบูรณาการสำหรับพืชสำหรับปลูก (Integrated measures for plants for planting) และ ฉบับที่ 40 เรื่อง การเคลื่อนย้ายวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูกระหว่างประเทศ (International movement of growing media in association with plants for planting. แนวทางการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของประชาคมตลาดร่วมแคริบเบียน (Caribbean Community and Common Market, CARICOM) แนวทางการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขององค์การความมั่นคงทางชีวภาพออสเตรเลีย (Biosecurity Australia) (BA, 2006) และแนวทางการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของประเทศนิวซีแลนด์ พัฒนาเทคโนโลยีการตรวจ

กรมวิชาการเกษตร

วินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และความแม่นยำสูง เพื่อใช้เป็นเครื่องมือสนับสนุนการปฏิบัติงานตามพระราชบัญญัติกักพืชและพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย โดยนำเทคโนโลยีที่ทันสมัย ได้แก่ เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) Multiplex PCR Real-time PCR และ Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) มาประยุกต์ใช้เพื่อให้สามารถลดข้อจำกัดในเรื่องของประสิทธิภาพ ระยะเวลา และความแม่นยำของวิธีการตรวจ ศึกษาความเสียหายจากความร้อนด้วยเทคโนโลยีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ต่อคุณภาพของผลมะละกอพันธุ์แขกดำ และแขกนวล มะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้า น้ำดอกไม้มัน แดงจักรพรรดิ และอกร่อง และศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ด้วยเทคโนโลยีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในผลมะละกอพันธุ์แขกดำ และแขกนวล มะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้า น้ำดอกไม้มัน แดงจักรพรรดิ และอกร่อง เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเจรจาเปิดตลาดส่งออกผลไม้ไปยังประเทศที่มีความเข้มงวดทางด้านกักกันพืช และวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดและศึกษาโรคตายพราย (Panama disease) tropical race 4 ของกล้วย และการป้องกันกำจัด ตามเป้าหมายของโครงการในการเพิ่มศักยภาพงานด้านกักกันพืช เทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยและการจัดการศัตรูพืชชนิดใหม่สำหรับการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตรด้านพืชเพื่อให้สินค้าเกษตรมีคุณภาพได้มาตรฐาน และเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันสินค้าเกษตรและการแก้ไขปัญหาการค้าระหว่างประเทศ ซึ่งสอดคล้องกับเป้าประสงค์และตัวชี้วัดเป้าหมายภายใต้แผนปฏิบัติการด้านวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรมของกรมวิชาการเกษตรเพื่อยกระดับการผลิตและการสร้างมูลค่าเพิ่มให้สินค้าเกษตรด้านพืชมีคุณภาพ ได้มาตรฐาน และเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขัน ตามมาตรการที่ 2 การวิจัยและพัฒนาระบบนวัตกรรมเพื่อยกระดับมาตรฐานการผลิตพืชและผลิตภัณฑ์สู่เกษตรปลอดภัย ในกรอบวิจัยที่ 2.4.1 กรอบวิจัยและพัฒนาด้านอารักขาพืชเพื่อเพิ่มศักยภาพการแข่งขันสินค้าเกษตรปลอดภัย ภายใต้ทิศทางการดำเนินงานวิจัยกรมฯ ในระยะเวลา 3 ปี (ปี 2565-2567) สำหรับงานวิจัยสนับสนุนการปฏิบัติงานตามพระราชบัญญัติที่กรมวิชาการเกษตรรับผิดชอบ

กรมวิชาการเกษตร

นิยามศัพท์

การกักกันพืช	หมายถึง	การจำกัดขอบเขตวัสดุควบคุมต่างๆ อย่างเป็นทางการ เพื่อการเฝ้าสังเกตและการวิจัยหรือเพื่อการตรวจสอบเพิ่มเติม การทดสอบและ/หรือ การปฏิบัติ หรือการบำบัด
ศัตรูพืชกักกัน	หมายถึง	ศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่มีศักยภาพต่อพื้นที่ที่อยู่ในอันตรายนั้น และยังไม่มีอยู่ในที่นั่น หรือมีอยู่แต่ไม่แพร่กระจายอย่างกว้างขวาง และกำลังมีการควบคุมอยู่อย่างเป็นทางการ
การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช	หมายถึง	กระบวนการประเมินหลักฐานด้านชีววิทยาหรือด้านวิทยาศาสตร์ และด้านเศรษฐศาสตร์อื่นๆ เพื่อตรวจสอบว่าศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง ควรมีการควบคุมหรือไม่ และความเข้มงวดของมาตรการสุขอนามัยพืชใดก็ตามที่จะนำมาใช้ควบคุมศัตรูพืชชนิดนั้น
การบริหารจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช	หมายถึง	การประเมินผล และการเลือกทางเลือกต่างๆ เพื่อลดความเสี่ยงของการนำเข้ามา และการแพร่กระจายของศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง
มาตรการสุขอนามัยพืช	หมายถึง	ตัวบทกฎหมาย กฎระเบียบข้อบังคับหรือวิธีการที่เป็นทางการใดๆ ก็ตามที่มีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันการนำเข้ามา และ/หรือการแพร่กระจายของศัตรูพืชกักกัน หรือเพื่อสกัดกั้นผลกระทบทางเศรษฐกิจของศัตรูพืชที่ไม่ใช่ศัตรูพืชกักกันที่ต้องมีการควบคุมต่างๆ
พืชนำเข้า	หมายถึง	พืชที่การอนุญาตนำเข้าที่เป็นไปตามข้อกำหนดการนำเข้า
พืชส่งออก	หมายถึง	พืชที่การอนุญาตจากประเทศปลายทางให้ส่งออกไปตามเงื่อนไขของประเทศปลายทาง
การควบคุมศัตรูพืช	หมายถึง	การยับยั้งการจำกัดบริเวณ หรือการกำจัดประชากรศัตรูพืชให้หมดสิ้น
พื้นที่ควบคุม	หมายถึง	พื้นที่ที่มีการควบคุมพื้นที่ใดพื้นที่หนึ่งซึ่งองกรณ์อารักขาพืชแห่งชาติกำหนดให้เป็นพื้นที่ที่เล็กที่สุดที่จำเป็นต้องมีในการป้องกันการแพร่กระจายของศัตรูพืชออกจากพื้นที่กักกัน
การดำเนินการฉุกเฉิน	หมายถึง	การดำเนินการด้านสุขอนามัยพืชที่รวดเร็วอย่างใดอย่างงหนึ่ง ที่นำมาดำเนินการในสถานการณ์สุขอนามัยพืชที่ใหม่ที่คาดไม่ถึง
การเข้ามาของศัตรูพืช	หมายถึง	การเคลื่อนที่ของศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่งเข้าสู่พื้นที่ใดพื้นที่หนึ่งซึ่งยังไม่มีศัตรูฑืชชนิดนั้นอยู่มาก่อนหรือมีอยู่แต่ไม่แพร่กระจายอย่างกว้างขวาง และมีการควบคุมอย่างเป็นทางการ
การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืช	หมายถึง	กระบวนการตรวจหาและการจำแนกชนิดของศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง

กรมวิชาการเกษตร

การอบไอน้ำเพื่อกำจัดศัตรูพืช	หมายถึง	กระบวนการที่สินค้าชนิดใดชนิดหนึ่ง ถูกทำให้ร้อนจนถึงอุณหภูมิหนึ่ง ในช่วงระยะเวลาหนึ่งเพื่อกำจัดศัตรูพืช ตามข้อกำหนดทางวิชาการที่เป็นทางการ
สถานภาพศัตรูพืช (ในพื้นที่)	หมายถึง	การปรากฏ (มีอยู่) หรือการไม่ปรากฏ (ไม่มีอยู่) ของศัตรูพืชพืชชนิดใดชนิดหนึ่งในขณะปัจจุบันในพื้นที่ใดพื้นที่หนึ่ง รวมถึงการแพร่กระจายของศัตรูพืชชนิดนั้น ซึ่งข้อมูลที่ได้มาจากการสำรวจอย่างเป็นทางการและหลักฐานข้อมูลอ้างอิงทางวิชาการ
การเฝ้าระวัง	หมายถึง	กระบวนการใดกระบวนการหนึ่งที่เป็นทางการ เพื่อรวบรวมและบันทึกข้อมูลเกียวกับการเกิดขึ้นหรือการไม่ปรากฏของศัตรูพืช โดยการสำรวจ การติดตาม หรือวิธดีาเนินการอื่นๆ
การสำรวจ	หมายถึง	วิธีการปฏิบัติวิธีการใดวิธีการหนึ่งที่เป็นทางการที่ดำเนินการในช่วงเวลาที่กำหนด เพื่อตรวจสอบคุณลักษณะต่างๆ ของประชากรศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือตรวจสอบว่ามีชนิดพันธุ์ใด เกิดขึ้นในพื้นที่
การกำจัดให้หมดสิ้น	หมายถึง	การใช้มาตรการสุขอนามัยพืชต่างๆ เพื่อกำจัดศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่งให้หมดสิ้นไปจากพื้นที่
พื้นที่ปลอดศัตรูพืช	หมายถึง	พื้นที่ซึ่งไม่มีศัตรูพืชเฉพาะชนิดใดชนิดหนึ่งเกิดขึ้น โดยมีการแสดงให้เห็นด้วยหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และพื้นที่ดังกล่าวมีการดูแลรักษาอย่างเป็นทางการตามความเหมาะสม

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน

1. วิธีการดำเนินการวิจัย

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 การศึกษาชนิดของศัตรูพืชในประเทศเพื่อการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (4 การทดลอง)

การวางแผนการสำรวจ

แมลงและไรศัตรูพืช ทำการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (Specific survey) สำรวจแบบสืบพบ (Detection survey) เป็นการตรวจสอบศัตรูพืชทุกชนิดที่พบ อย่างน้อยควรทำการสำรวจระยะการเจริญเติบโตของพืชดังต่อไปนี้ ระยะการงอกของต้นกล้า ระยะแตกหน่อ ระยะออกดอก ระยะออกผล และระยะติดเมล็ด กำหนดพื้นที่ของจังหวัดที่ปลูก ทำการสำรวจไม่น้อยกว่า 10 แปลง/จังหวัด แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างโดยเดินเป็นแถว เว้น 3 แถว ตรวจแถวละ 10 ต้น สุ่มตัวอย่าง 20 ต้น/แปลง (สุ่มเก็บตัวอย่างใบ 1 ต้นเว้น 5 ต้น)

โรคพืช ทำการสำรวจเช่นเดียวกับแมลงและไรศัตรูพืช โดยทำการสุ่มตัวอย่างโดยเดิน 1 แถว เว้น 2 แถว แบบตัวยู และสุ่ม 1 ต้น เว้น 5 ต้น การสุ่มตัวอย่าง 20 ต้น/แปลง และวัชพืชทำการสำรวจโดยการเดินเป็นแนวเส้นตรงตั้งฉากกับขอบแปลงอย่างน้อย 3 แนว และเดินตามขอบแปลง หรือเส้นทแยงมุม ทำการบันทึก พื้นที่ – ที่ตั้ง (พิกัดภูมิศาสตร์-GPS) สภาพพื้นที่ สภาพนิเวศ อายุหรือระยะพืชปลูก ชนิดลักษณะวัชพืชที่พบ และข้อมูลอื่นๆ ที่จำเป็น

การทดลองที่ 1 การศึกษาชนิดแมลงศัตรูของอินทผลัมและลิลลี่ เพื่อจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช

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

แมลงจำพวกปากดูดที่มีขนาดเล็ก เช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้ง และเพลี้ยหอย ต้องนำมาทำสไลด์ถาวร และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50-60 ^{o}C เพื่อจำแนกชนิด บันทึกรายละเอียดต่างๆ ของแมลงศัตรูที่สำรวจพบ เช่น ลักษณะ รูปร่าง ขนาด สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพในแต่ละระยะ รวมถึงบันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายที่ต้องติดไว้กับสไลด์แต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่จับ และ วัน/เดือน/ปีที่ทำสไลด์ถาวร ชื่อน้ำยาที่ใช้เมาท์ (mount) สไลด์

นำตัวอย่างของแมลงศัตรูพืชที่รวบรวมได้มาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และเก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์

การทดลองที่ 2 การศึกษาชนิดของไรศัตรูของอินทผลัมและลิลลี่ เพื่อจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช

การเก็บตัวอย่างไรศัตรูพืช เก็บใบ กิ่ง ผล หรือส่วนต่าง ๆ ของพืช อินทผาลัม มันเทศ ลิลลี่ กล้วยไม้สกุลหวาย และฟาเรนนอฟซิส ที่แสดงอาการผิดปกติ จากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย ลงในกล่องพลาสติก หรือถุงกระดาษพับปากถุง บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับตัวอย่างไร เช่น ชื่อพืช วันที่เก็บ ผู้เก็บ สถานที่ที่เก็บ บันทึกข้อมูล การจัดทำสไลด์ถาวร ตัวอย่างไรศัตรูพืชที่ได้กลับมาทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereomicroscope

กรมวิชาการเกษตร

ด้วยน้ำยา Hoyer’s solution การจำแนกชนิด นำตัวอย่างไรที่ทำสไลด์ถาวรแล้วมาจำแนกชนิดภายใต้กล้อง compound microscope จำแนก ชนิด จากตำราต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง บันทึกผลการจำแนกไว้ด้านซ้ายมือของแผ่นสไลด์ก่อนที่จะนำเข้าเก็บในพิพิธภัณฑ์

การทดลองที่ 3 การศึกษาชนิดของโรคในอินทผลัมและลิลลี่ เพื่อจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช

การเก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างโรคของอินทผาลัมและลิลลี่ ที่แสดงอาการโรคที่ใบ ดอก ผล ลำต้น ตา หน่อ เมล็ด และราก โดยห่อตัวอย่างพืชที่เก็บด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก บันทึกข้อมูลสถานที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ และข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์ นำตัวอย่างโรคพืชมาศึกษาลักษณะอาการในห้องปฏิบัติการ จัดเก็บโรคพืชที่แสดงอาการที่ใบอัดทับเป็นตัวอย่างแห้งเข้าพิพิธภัณฑ์โรคพืช ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพ ฯ

การศึกษาเชื้อสาเหตุจากตัวอย่างพืชเป็นโรค ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ และเขี่ยเชื้อจากตัวอย่างโรคพืชลงบนแผ่นสไลด์ (slide) จากนั้นตรวจเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ศึกษาเชื้อราจากเนื้อเยื่อพืชเป็นโรค ด้วยวิธีการแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยใช้ลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์

ศึกษาชนิดของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ด้วยวิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ด้วยอาหาร PSA และจำแนกลักษณะของแบคทีเรียโดยใช้สรีรวิทยา และสัณฐานวิทยา

ศึกษาชนิดของไวรัสสาเหตุโรคพืช

การตรวจสอบโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสตรวจดูจากลักษณะอาการภายนอก จะมีการเจริญที่ผิดปกติในส่วนต่างๆ ของพืชที่มีการเจริญเติบโต โดยเฉพาะบริเวณใบอ่อนหรือยอดอ่อน อาการผิดปกติรวมไปถึงรูปร่างและสีของใบ ดอก ผล เช่น อาการใบด่าง ดอกด่าง ผลบิดเบี้ยว ต้นพืชเตี้ยแคระแกร็นกว่าปกติ แล้วนำไปการตรวจหากรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัส วิธีการที่นิยมใช้ในการตรวจมี 2 วิธีหลัก คือ Molecular hybridization และ Polymerase chain reaction (PCR)

ชนิดของไส้เดือนฝอยสาเหตุโรคพืช

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย โดยใช้ท่อเก็บตัวอย่างดินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 นิ้ว เก็บดินลึกประมาณ 20 เซนติเมตร โดยสุ่มเก็บจำนวน 20 จุดต่อ 1 ตัวอย่าง บันทึกวันที่เก็บตัวอย่าง ชนิดพืช ชนิดดิน อุณหภูมิของดินในขณะเก็บตัวอย่าง บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์โดยใช้เครื่อง GPS แล้วนำไปแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและจัดจำแนก โดยวิธีการรินผ่านตะแกรง ร่วมกับการใช้ถาดแยกตัวอย่าง (Decanting and Sieving with Baermann’s Tray Technique) คงสภาพไส้เดือนฝอยใน Glycerol และทำสไลด์ถาวร (Cob’s Slide) จัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา บันทึกภาพ

เก็บรักษาตัวอย่างแห้งโรคพืช

เก็บตัวอย่างโรคพืชและมาจัดทำตัวอย่างแห้ง โดยนำส่วนของพืชที่แสดงอาการโรค วางบนกระดาษฟาง พร้อมแนบกระดาษบันทึกข้อมูลพืช แล้วส่งเก็บในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 4 การศึกษาชนิดของวัชพืชในอินทผลัมและลิลลี่ เพื่อจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช

การจัดทำตัวอย่างแห้ง

เก็บวัชพืชที่มีใบและดอกสมบูรณ์ ไม่ถูกแมลงทำลาย หากพืชมีขนาดเล็ก ควรมีราก ต้น ใบ –ดอก ครบ หากเป็นพืชไร้ดอก ควรมีส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ หรือลักษณะอื่นที่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดได้ อัดในแผงอัดพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 x30 เซนติเมตร เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่ – นิเวศน์ พืชอาศัย วัน-เวลา ชื่อผู้เก็บ เก็บรักษา ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

การตรวจสอบชนิดพืช (2565-2567) ทำโดยการเทียบตัวอย่างพืชในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช พิพิธภัณฑ์พืชของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ ของแต่ละวงศ์หรือสกุลของพืชนั้น ๆ ตลอดจนการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่างๆ ทั้งนี้หากข้อมูลที่ได้จากการสำรวจในแปลงทดลองไม่เพียงพอสำหรับจำแนกชนิด จะนำต้นหรือเมล็ดวัชพืชดังกล่าวมาปลูก ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช กรมวชาการเกษตร เพื่อจำแนกชนิดที่ถูกต้องต่อไป ในกรณีที่ไม่สามารถจำแนกชนิดวัชพืชได้ในพื้นที่ทำการเก็บตัวอย่างวัชพืชนำมาเพาะเลี้ยงในโรงเรือนทดลอง เพื่อให้ได้ระยะที่สามารถจำแนกชนิดได้

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 ศึกษาความเสี่ยงศัตรูพืชที่สัมพันธ์กับการนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก

การทดลองที่ 1 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าบลูเบอรี่จากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก (ปีงบประมาณ 2565-2567 รวม 3 ปี)

การทดลองที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าแก้วมังกรประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก (ปีงบประมาณ 2565-2567 รวม 3 ปี)

การทดลองที่ 3 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าเชอรี่จากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก (ปีงบประมาณ 2565-2567 รวม 3 ปี)

การทดลองที่ 4 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าสับปะรดจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก (ปีงบประมาณ 2565-2567 รวม 3 ปี)

การทดลองที่ 5 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าอินทผลัมจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก (ปีงบประมาณ 2565-2567 รวม 3 ปี)

การทดลองที่ 6 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าส่วนขยายพันธุ์องุ่นจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก (ปีงบประมาณ 2565-2567 รวม 3 ปี)

การทดลองที่ 7 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าลิลลี่จากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก (ปีงบประมาณ 2565-2567 รวม 3 ปี)

การทดลองที่ 8 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้ากล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิสจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก (ปีงบประมาณ 2565-3567 รวม 3 ปี)

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 9 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูกจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก (ปีงบประมาณ 2565-2567 รวม 3 ปี)

วิธีปฏิบัติการทดลอง มีขั้นตอนและวิธีการดังต่อไปนี้

1. การสืบค้นและรวบรวมข้อมูล

1.1 สืบค้นและรวบรวมข้อมูลทั่วไปของ (1) บลูเบอรี่ (2) แก้วมังกร (3) เชอรี่ (4) สับปะรด (5) อินทผลัม (6) องุ่น (7) ลิลลี่ (8) กล้วยไม้ ที่นำเข้า เช่น ชื่อวิทยาศาสตร์ พันธุ์หรือสายพันธุ์ แหล่งผลิต ในประเทศผู้ส่งออก ผลผลิต การรับรองสุขอนามัยของประเทศผู้ส่งออก เป็นต้น และ (9) ข้อมูลทั่วไปของวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูกที่นำเข้า เช่น ชนิด ต้นกำเนิด ส่วนประกอบของวัสดุปลูก รวมทั้งข้อมูลของพืชสำหรับปลูก แหล่งผลิตในประเทศผู้ส่งออก การรับรองสุขอนามัยของประเทศผู้ส่งออก เป็นต้น

1.2 สืบค้นและรวบรวมข้อมูลศัตรู (1) บลูเบอรี่ (2) แก้วมังกร (3) เชอรี่ (4) สับปะรด (5) อินทผลัม (6) องุ่น (7) ลิลลี่ (8) กล้วยไม้ และ (9) ศัตรูที่มีโอกาสนำเข้ามากับวัสดุปลูก เช่น ชื่อวิทยาศาสตร์ การจำแนกทางอนุกรมวิธาน พืชอาศัย/พืชอาหาร ลักษณะการทำลาย การแพร่ระบาด ความเสียหายของผลผลิตที่เกิดจากการทำลายของศัตรูพืช ที่มีรายงานในประเทศต้นทาง ประเทศไทย และประเทศอื่น ๆ

2. การตรวจสอบศัตรูพืชที่อาจติดมากับพืช/วัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูกนำเข้าในห้องปฏิบัติการ

เก็บตัวอย่าง (1) บลูเบอรี่ (2) แก้วมังกร (3) เชอรี่ (4) สับปะรด (5) อินทผลัม (6) องุ่น (7) ลิลลี่ (8) กล้วยไม้ และ (9) ตัวอย่างวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก นำเข้าจากด่านตรวจพืชนำมาตรวจสอบศัตรูพืชดังนี้

2.1 ตรวจสอบศัตรูพืชที่อาจติดมากับ (1) บลูเบอรี่ (2) แก้วมังกร (3) เชอรี่ (4) สับปะรด (5) อินทผลัม (6) องุ่น (7) ลิลลี่ (8) กล้วยไม้ และ (9) วัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก ที่นำเข้า เช่น แมลง ไร หอย วัชพืช เชื้อรา และแบคทีเรีย โดยตรวจสอบภายนอกหรือผ่าดูภายในหากพบอาการผิดปกติ และสังเกตลักษณะผิดปกติที่อาจเกิดจากโรคพืชหรือแมลงศัตรูพืช

2.2 หากพบแมลง ไร หอย และวัชพืช จะตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและสูง จำแนกกลุ่มของแมลง ไร หอย และวัชพืช โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) และส่งจำแนกชนิดต่อไป

2.3 หากพบอาการผิดปกติที่อาจเกิดจากเชื้อสาเหตุโรคพืชให้ตรวจสอบด้วยวิธีการ ดังนี้

(1) ตรวจสอบเชื้อราด้วย Blotter method (Mathur and Kongdal, 2003) และตรวจจำแนกชนิดของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและกำลังขยายสูง จากนั้นแยกตรวจสอบจำแนกเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) เพื่อตรวจสอบและจำแนกชนิดของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและกำลังขยายสูง

(2) ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วย Dilution plate method เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) เพื่อตรวจสอบและจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

(3) ตรวจสอบไส้เดือนฝอยด้วยวิธีการของ Cobb’s sieving & Baermann และจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) ในห้องปฏิบัติการ

กรมวิชาการเกษตร

3. การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (2565-2567)

ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเชิงคุณภาพ ในการนำเข้า (1) ผลสดและต้นบลูเบอรี่ (2) ผลสด เมล็ดพันธุ์และกิ่งพันธุ์แก้วมังกร (3) ผลสดและต้นเชอรี่ (4) ผลสดและส่วนขยายพันธุ์สับปะรด (5) ผลสดและต้นอินทผลัม (6) กิ่งพันธุ์องุ่น ต้นองุ่นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเมล็ดพันธุ์องุ่น (7) ดอก ต้น และหัวพันธุ์ลิลลี่ (8) กล้วยไม้สกุลหวาย และฟาแลนนอปซิส และ (9) วัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก จากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิกโดยการประยุกต์แนวทางการวิเคราะห์ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Framework for Pest Risk Analysis adopted 2007) (FAO, 2007) และฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน (Pest risk analysis for quarantine pests, adopted 2013) (FAO, 2013) และแนวทางการวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืชของประชาคมตลาดร่วมแคริบเบียน (Caribbean Community and Common Market) (CAHFSA, 2016) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 1: Initiation) (2565)

1.1 ระบุจุดเริ่มต้นของการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช/ระบุพื้นที่ซึ่งมีการดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช/ตรวจสอบว่าเคยมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงโดยศัตรูพืช หรือเส้นทางศัตรูพืช หรือนโยบายของรัฐจากแหล่งข้อมูลภายในประเทศไทยและต่างประเทศพิจารณานำมาใช้ประกอบการวิเคราะห์ศัตรูพืช

1.2 นำข้อมูลศัตรูพืช/กลุ่มศัตรูพืชที่ได้จากการสืบค้นและรวบรวมจากหนังสือ ตำรา เอกสารวิชาการ ฐานข้อมูลศัตรูพืช และจากการตรวจสอบศัตรูพืชที่พบติดมากับ (1) บลูเบอรี่ (2) แก้วมังกร (3) เชอรี่ (4) สับปะรด (5) อินทผลัม (6) องุ่น (7) ลิลลี่ (8) กล้วยไม้ และ (9) วัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก ที่นำเข้าจากต่างประเทศมาจัดทำตารางศัตรูพืชเพื่อใช้สำหรับการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest Risk Assessment) (2565-2567)

การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชมี 4 ขั้นตอนที่สัมพันธ์กัน ดังนี้

2.1 การจัดประเภทศัตรูพืช (Pest categorization) (2565-2567)

2.1.1 นำรายชื่อศัตรูพืช/กลุ่มศัตรูพืชที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 มาพิจารณาจัดประเภทศัตรูพืชว่ามีคุณสมบัติเป็นศัตรูพืชกักกันหรือไม่ โดย (1) ระบุชนิดของศัตรูพืช (pest identity) (2) ตรวจสอบว่าเป็นศัตรูพืชที่มีพบในประเทศไทยหรือไม่ (3) ตรวจสอบสถานภาพการควบคุมศัตรูพืช (Regulatory status) กรณีที่ศัตรูพืชชนิดนั้นมีปรากฏในประเทศไทย (4) ประเมินศักยภาพของศัตรูพืชในการเข้ามาตั้งรกรากและการแพร่กระจายในประเทศไทยหรือไม่ โดยพิจารณาข้อมูลทางชีววิทยาของศัตรูพืช สภาพแวดล้อมและสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญแพร่ขยายพันธุ์ พืชอาศัย/พืชอาหาร และพาหะของศัตรูพืชชนิดนั้นที่มีรายงานการพบในประเทศไทย (5) ประเมินศักยภาพของศัตรูพืช ในการก่อให้เกิดผลตามมาทางเศรษฐกิจในประเทศไทย

2.1.2 จัดทำตารางผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนการจัดประเภทศัตรูพืช และนำรายชื่อศัตรูพืชที่มีศักยภาพติดมากับเส้นทางศัตรูพืช (ส่วนของพืชที่นำเข้า) มีในประเทศผู้ส่งออก และไม่มีในประเทศไทย หรือมีแต่อยู่ภายใต้การควบคุมอย่างเป็นทางการ มีศักยภาพในการตั้งรกราก และการแพร่กระจายใน

กรมวิชาการเกษตร

ประเทศไทย ตลอดจนมีศักยภาพที่จะทำให้เกิดความเสียหายหรือผลกระทบทางเศรษฐกิจไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

2.2 การประเมินความน่าจะเป็นไปได้ของการนำเข้ามาและแพร่กระจายของศัตรูพืช (Assessment of the probability of introduction and spread) (2566-2567)

นำรายชื่อศัตรูพืชที่ได้จากการประเมินในข้อ 2.1 มาประเมินความน่าจะเป็นไปได้ของการนำเข้ามาและแพร่กระจายของศัตรูพืชภายหลังการตั้งรกรากของศัตรูพืช โดยแยกประเมินศัตรูพืชแต่ละชนิด ดังนี้

2.2.1 การประเมินความน่าจะเป็นไปได้ของการนำเข้ามา (introduction) ของศัตรูพืชประกอบด้วย

(1) การประเมินความน่าจะเป็นไปได้ของการเข้ามา (probability of entry) ของศัตรูพืช โดยประเมินความน่าจะเป็นไปได้ที่ศัตรูพืชจะปะปนมากับผลและต้นบลูเบอรี่ที่นำเข้ามาในประเทศไทย

(2) การประเมินความน่าจะเป็นไปได้ของการตั้งรกราก (probability of establish) ของศัตรูพืช โดยประเมินความน่าจะเป็นไปได้ที่ศัตรูพืชสามารถมีชีวิตอยู่รอดและเจริญแพร่ขยายพันธุ์ได้ในประเทศไทย

2.2.2 การประเมินความน่าจะเป็นไปได้ของการแพร่กระจายหลังการตั้งรกราก (Probability of spread after establishment) Spread) โดยประเมินความน่าจะเป็นไปได้ที่ศัตรูพืชสามารถแพร่กระจายในประเทศไทย

ปัจจัยที่นำมาใช้พิจารณาประเมินความน่าจะเป็นไปได้ใช้ตามแนวทางการวิเคราะห์ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน (FAO, 2013) สำหรับรายละเอียดหลักเกณฑ์การประเมินความน่าจะเป็นไปได้แต่ละเหตุการณ์ ตลอดจนการรวมผลการประเมินใน 2 เหตุการณ์ โดยใช้กฎเมตริกซ์สำหรับการรวมโอกาสที่จะเกิดขึ้นเชิงคุณภาพ (Matrix of rules for combining qualitative likelihoods) ดำเนินการตามแนวทางการวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืชของประชาคมตลาดร่วมแคริบเบียน (CAHFSA, 2016)

2.3 การประเมินผลกระทบทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้น (Assessment of Potential Economic Consequence) ภายหลังการเข้ามาของศัตรูพืช (2566-2567)

นำรายชื่อศัตรูพืชที่ได้จากการประเมินในข้อ 2.1 มาประเมินผลกระทบทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้นภายหลังการเข้ามาของศัตรูพืชในประเทศไทย การพิจารณาผลกระทบของศัตรูพืชทั้งทางตรง และทางอ้อมที่มีต่อเศรษฐกิจ สิ่งแวดล้อม และสังคม โดยใช้หลักเกณฑ์การประเมินผลกระทบในแต่ละด้านตามแนวทางการวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืชของประชาคมตลาดร่วมแคริบเบียน (CAHFSA, 2016)

2.4 สรุปผลในขั้นตอนการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Conclusion of the pest risk assessment stage) (2566-2567)

นำผลการประเมินความน่าจะเป็นไปได้ของ 2.2.1 การนำเข้ามาและการแพร่กระจายของศัตรูพืช และ 2.2.2 การประเมินผลกระทบทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้นภายหลังการเข้ามาของศัตรูพืช มารวมกันโดยใช้

กรมวิชาการเกษตร

เมตริกซ์การประเมินความเสี่ยง (risk estimation matrix) (CAHFSA, 2016) บันทึกปัจจัยที่ไม่แน่นอน (uncertainty)

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest Risk Management) (2566-2567)

นำรายชื่อศัตรูพืชกักกัน ที่ได้จากการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนที่ 2 มาพิจารณาหาแนวทางการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชเพื่อจัดการความเสี่ยงของศัตรูพืชแต่ละชนิด โดยจำแนกวิธีการที่จะดำเนินการกับความเสี่ยงที่ศัตรูพืชในการเข้ามาเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ในประเทศไทยตลอดจนผลกระทบทางด้านเศรษฐกิจเพื่อลดความเสี่ยงลงให้ถึงระดับต่ำสุดที่ยอมรับได้ โดยมีความเป็นไปได้ในทางปฏิบัติและไม่เป็นอุปสรรคต่อการค้าระหว่างประเทศ สำหรับนำไปใช้เป็นแนวทางในการกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 และที่แก้ไขเพิ่มเติม ทั้งนี้ การพิจารณาระดับความเสี่ยง (Level of risk): ใช้หลักการจัดการความเสี่ยงให้อยู่ในระดับที่มีระดับที่เหมาะสมซึ่งสามารถยอมรับได้ (Appropriate Level of acceptable; ALOP) หรือระดับความเสี่ยงที่สามารถยอมรับได้ (acceptable) โดยในการทดลองนี้กำหนดให้มีระดับความเสี่ยงที่ยอมรับได้ คือ “ความเสี่ยงในระดับที่ละเลยได้ (negligible)”

4. สรุปผลศึกษาการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (2566, 2567)

สรุปผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนต่าง ๆ รวมถึงรายชื่อศัตรูพืชกักกันของการนำเข้า (1) ผลสดและต้นบลูเบอรี่ (2) ผลสด เมล็ดพันธุ์และกิ่งพันธุ์แก้วมังกร (3) ผลสดและต้นเชอรี่ (4) ผลสดและส่วนขยายพันธุ์สับปะรด (5) ผลสดและต้นอินทผลัม (6) กิ่งพันธุ์องุ่น ต้นองุ่นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเมล็ดพันธุ์องุ่น (7) ดอก ต้น และหัวพันธุ์ลิลลี่ (8) กล้วยไม้สกุลหวายและฟาแลนนอปซิส และ (9) วัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก จากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ที่มีระดับความเสี่ยงแตกต่างกัน แนวทางการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันแต่ละชนิด และมาตรการสนับสนุนอื่น ๆ สำหรับใช้เป็นข้อมูลกำหนดมาตรการทางกฎหมายต่อไป

- การบันทึกข้อมูล

1. รายละเอียดของศัตรูพืชแต่ละชนิด เช่น ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ เขตแพร่กระจาย ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย/อาศัย และมีพาหะ หรือเป็นพาหะของศัตรูพืชชนิดอื่นหรือไม่ การติดมากับส่วนของพืชที่นำเข้า พืชอาศัย ชีววิทยา นิเวศวิทยา เอกสารอ้างอิง

2. ชนิดของศัตรูพืชกักกัน ศัตรูพืช หรืออื่น ๆ ที่ปนเปื้อนหรือติดมากับ (1) บลูเบอรี่ (2) แก้วมังกร (3) เชอรี่ (4) สับปะรด (5) อินทผลัม (6) องุ่น (7) ลิลลี่ (8) กล้วยไม้ และ (9) วัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก นำเข้า วัน เวลา สถานที่ และวิธีการที่ใช้ในการจำแนกชนิดศัตรูพืช ลักษณะอาการบนพืช

3. สถานภาพของศัตรูพืชแต่ละชนิดว่ามีรายงานพบในประเทศไทยหรือไม่ และเอกสารอ้างอิง

4. ชนิดของศัตรูพืชกักกัน เขตแพร่กระจาย (ชื่อประเทศ) ในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก และมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันของ (1) บลูเบอรี่ (2) แก้วมังกร (3) เชอรี่ (4) สับปะรด (5) อินทผลัม (6) องุ่น (7) ลิลลี่ (8) กล้วยไม้ และ (9) วัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก นำเข้าจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก

กรมวิชาการเกษตร

- **ระยะเวลาดำเนินการ** ปีงบประมาณ 2565-2567 รวม 3 ปี

- **สถานที่ดำเนินการ**

1. ห้องปฏิบัติการและโรงเรือนทดลอง กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2. ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ จ.สมุทรปราการ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร
3. ด่านตรวจพืชด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ กรุงเทพฯ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร
4. ด่านตรวจพืชท่าเรือแหลมฉบัง จ.ชลบุรี สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร
5. ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร
6. ด่านตรวจพืชเชียงของ จ.เชียงราย สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร
7. ด่านตรวจพืชท่าลี่ จ.เลย สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร
8. แปลงปลูกเชอรี่ จ. นครราชสีมา
9. แปลงปลูกปลูกอินทผลัม จ.พระนครศรีอยุธยา
10. แปลงปลูกองุ่น จ.นครราชสีมา
11. แปลงปลูก/โรงเรือนปลูกลิลลี่ ของโครงการหลวง/เกษตรที่สูง/บริษัท/แปลงเกษตรกร จ.เชียงราย
12. แปลงปลูก/โรงเรือนปลูกลิลลี่ ของโครงการหลวง/เกษตรที่สูง/บริษัท/แปลงเกษตรกรจ.เชียงใหม่
13. แปลงปลูก/โรงเรือนปลูกลิลลี่ ของโครงการหลวง/เกษตรที่สูง/บริษัท/แปลงเกษตรกรจ.เลย
14. แปลงเกษตกร/บริษัท จ.นครปฐม และ จ.เชียงใหม่

โครงการวิจัยย่อยที่ 3 การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักและหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า

การทดลองที่ 1 การตรวจวินิจฉัยชนิดของไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้า

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ที่มีรายงานการเข้าทำลายในมะเขือเทศทั้งของประเทศไทยและประเทศคู่ค้า รวมทั้งข้อมูลในเรื่องของวิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิคด้านเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อนำมาใช้ในการวางแผนการตรวจสอบ

2. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้าตามมาตรฐาน International Seed Testing Association (ISTA, 2017) โดยทำการสุ่มตัวอย่างจากด่านตรวจพืชต่าง ๆ ที่มีการนำเข้าและทำการตรวจสอบเบื้องต้นโดยการตรวจสอบด้วยตาเปล่า บันทึกข้อมูลต่าง ๆ และบันทึกภาพ

3. การตรวจวินิจฉัยและจัดจำแนกเชื้อไวรัสจีนัส *Tobamovirus* โดยใช้เทคนิค ELISA enzyme-linked immunosorbent assay ด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป ตามวิธีการดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

เตรียม ELISA plate โดยการเติมสารละลาย capture antibody ที่ความเข้มข้น 1:200 (ปริมาตรของแอนติบอดีต่อบัฟเฟอร์ carbonate coating) ลงไปในแต่ละหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

3.1 เตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจสอบ โดยการนำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ที่เตรียมไว้ไปชั่งน้ำหนัก และนำไปปั่นละเอียดด้วยเครื่องบดเมล็ดพันธุ์ (Tube-mill, IKA) จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ Extraction ลงใบในเมล็ดพันธุ์ที่บดละเอียดแล้วด้วยอัตราส่วน 1:10 (น้ำหนักของเมล็ดต่อปริมาตรของบัฟเฟอร์) จะได้สารละลายเมล็ดสำหรับการนำไปตรวจสอบ

3.2 นำ ELISA plate ในข้อที่ 1 มาทำการล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBST wash ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยการใส่สารลงไปในแต่ละหลุม บ่มไว้ 3-5 นาที ทิ้งสารโดยการคว่ำเพลทและตบบนกระดาษซับ จากนั้นทำซ้ำอีก 3 ครั้ง ก่อนดำเนินการในขั้นถัดไป

3.3 นำสารละลายเมล็ดจากข้อที่ 2 ใส่ลงในแต่ละหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.4 นำ ELISA plate ในข้อที่ 4 มาทำการล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBST wash ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยการใส่สารลงไปในแต่ละหลุม บ่มไว้ 3-5 นาที ทิ้งสารโดยการคว่ำเพลทและตบบนกระดาษซับ จากนั้นทำซ้ำอีก 3 ครั้ง ก่อนดำเนินการในขั้นถัดไป

3.5 เติมสารละลาย alkaline phosphatase enzyme conjugate ที่ความเข้มข้น 1:200 (ปริมาตรของแอนติบอดีต่อบัฟเฟอร์ ECI) ลงไปในแต่ละหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.6 นำ ELISA plate ในข้อที่ 6 มาทำการล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBST wash ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยการใส่สารลงไปในแต่ละหลุม บ่มไว้ 3-5 นาที ทิ้งสารโดยการคว่ำเพลทและตบบนกระดาษซับ จากนั้นทำซ้ำอีก 3 ครั้ง ก่อนดำเนินการในขั้นถัดไป

3.7 เติมสารละลายฟอสเฟต ที่ความเข้มข้นของสารซับสเตรท (para-Nitrophenylphosphate; *pNPP*) 1 มิลลิกรัมต่อบัฟเฟอร์ PNP ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในแต่ละหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ในที่มืด) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.8 ตรวจสอบผลโดยการตรวจดูการเปลี่ยนสีด้วยตาเปล่า และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; O.D.) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader โดยหลุมที่สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และมีค่า O.D. มากกว่า 2 เท่าของตัวอย่างเมล็ดปกติ จะบ่งชี้ถึงการตรวจพบเชื้อไวรัสในตัวอย่างนั้นๆ (ให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก)

4. ตรวจวินิจฉัยและจัดจำแนกเชื้อไวรัสจีนัส *Tobamovirus* โดยใช้เทคนิค RT-PCR (reverse-transcription polymerase chain reaction) ตามวิธีการดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

4.1 สกัดสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอ (Total RNA) จากเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าแต่ละรายการ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป

4.2 เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจีนัส *Tobamovirus* แต่ละชนิดด้วยเทคนิค RT-PCR แบบ one-step โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัสแต่ละชนิด

4.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตโฟรีซีส (gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5% อะกาโรสเจล ให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 35-40 นาที

4.4 ตัวอย่างที่ปรากฏแถบแบนของดีเอ็นเอเป้าหมายถือว่าให้ผลบวกกับการตรวจสอบ ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอีกครั้งเพื่อส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

4.5 วิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างไป โดยจัดการข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป DNASTAR และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

5. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงผลิตหรือในโรงเรือนเพาะเมล็ดของบริษัทที่นำเข้าในจังหวัดขอนแก่น สกลนคร และอุดรธานี

- บันทึกข้อมูล การตรวจพบและไม่พบชนิดไวรัสจีนัส *Tobamovirus* จำนวนครั้ง ปริมาณ และประเทศผู้ส่งออกเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริก

การทดลองที่ 2 การตรวจวินิจฉัย Potato cyst nematode ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิด Potato cyst nematode ที่มีรายงานการเข้าทำลายในหัวพันธุ์มันฝรั่งของประเทศคู่ค้าที่ประเทศไทยมีการนำเข้า รวมทั้งข้อมูลเทคนิควิธีการตรวจสอบไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิด Potato cyst nematode และมาตรการการป้องกันการนำเข้า

2. การสุ่มเก็บตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งและดินที่ติดมา จากด่านกักกันพืชสุ่มตัวอย่างนำส่งมา ตรวจดูอาการภายนอก บันทึกภาพตัวอย่าง และข้อมูลการนำเข้า ชื่อประเทศนำเข้า น้ำหนัก ฯลฯ

3. การตรวจวินิจฉัยและจัดจำแนกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิด Potato cyst nematode ตามขั้นตอนต่อไปนี้

3.1 วิธีการแยกไส้เดือนฝอย Potato cyst nematode (EPPO, 2013)

3.1.1 วิธีแยกไส้เดือนฝอยจากหัวพันธุ์มันฝรั่งด้วยวิธี Maceration and centrifugal flotation (Coolen และ D’Herde, 1972) เพื่อแยกไส้เดือนฝอยระยะตัวอ่อนที่ 3 และ 4 (J3 and J4) ที่เข้าทำลายหัวมันฝรั่งซึ่งไม่เคลื่อนที่ภายในรากและดูดกินน้ำเลี้ยงภายในรากพืช

3.1.2 วิธีแยกไส้เดือยฝอยจากดินที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งด้วยวิธี Centrifugal flotation method (Caveness และ Jensen, 1955) โดยใช้สารละลาย sucrose หรือ สารละลาย $MgSO_4$ เพื่อแยกไส้เดือนฝอย

ตัวเต็มวัยเพศเมีย และ ตัวอ่อนระยะที่ 2 ที่ปนเปื้อนมากับดิน นำตัวเต็มวัยเพศเมียที่แยกได้ไปเพิ่มปริมาณประชากรในมันฝรั่งเพื่อนำมาศึกษาครั้งต่อไป

3.2 วิธีการจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอย Potato cyst nematode (EPPO, 2017)

3.2.1 จัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological) ของตัวอ่อนระยะที่ 2 และตัวเต็มวัยเพศเมีย โดยเขี่ยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่แยกได้จากหัวพันธุ์มันฝรั่งและดินที่ติดมากับหัวพันธุ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) ไปบนสไลด์ในหยดน้ำปริมาณ 10 ไมโครลิตร จากนั้นตรวจสอบและจัดจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง ชนิด DIC (Differential Interference Contrast (DIC) microscope) บันทึกภาพรายละเอียดของอวัยวะส่วนสำคัญต่าง ๆ ของไส้เดือนฝอยและนำไปเปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิง

3.2.2 จัดจำแนกชนิดด้วยวิธีชีวโมเลกุลเทคนิค Multiplex PCR test (Bulman และ Marshall, 1997)

1) การสกัดดีเอ็นเอด้วย DNA extraction kit

1. ใช้ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะที่ 2 (J2) แยกจากดินและตัวเต็มวัยเพศเมีย (cyst nematode) ทีติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งด้วยวิธี Centrifugal flotation method 1 ตัวอ่อนระยะที่สอง ตัวเต็มวัยเพศเมีย หรือตัวอ่อนระยะที่เข้าทำลายพืช ระยะที่ 3 และ 4

2. เขี่ยไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องสเตอริโอโดยใช้เข็มเขี่ยนึ่งฆ่าเชื้อลงในหลอด PCR ขนาด 200 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Lysis buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ PCR และนำมาเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาณ 40 ไมโครลิตร

4. นำไปเก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

1. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตโฟรีซีส (gel electrophoresis) โดยใช้ 1% อะกาโรสเจล ให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 35-40 นาที

2. ตัวอย่างที่ปรากฏแถบแบนของดีเอ็นเอเป้าหมายถือว่าให้ผลบวกกับการตรวจสอบ ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอีกครั้งเพื่อส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3. วิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่าง โดยจัดการข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป DNASTAR และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

4. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงปลูกของบริษัทเอกชนหรือเกษตรกรนำเข้าหัวมันฝรั่งในจังหวัดตาก เชียงใหม่ และเชียงราย

กรมวิชาการเกษตร

การบันทึกข้อมูล

- ข้อมูลการตรวจพบและไม่พบชนิดไส้เดือนฝอย Potato cyst nematode จำนวนครั้ง ปริมาณ และประเทศผู้ส่งออกหัวพันธุ์มันฝรั่ง

การทดลองที่ 3 การตรวจวินิจฉัย *Candidatus* Liberibacter solanacearum ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อ *Candidatus* Liberibacter solanacearum ที่มีรายงานการเข้าทำลายในหัวพันธุ์มันฝรั่งของประเทศคู่ค้าที่ประเทศไทยมีการนำเข้า รวมทั้งข้อมูลเทคนิควิธีการตรวจสอบเชื้อ *Candidatus* Liberibacter solanacearum และมาตรการการป้องกันการเข้ามาของเชื้อนี้

2. สุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากทุกประเทศตามมาตรฐาน ISPM 31 (Methodologies for sampling of consignments) โดยทำการสุ่มตัวอย่างจากด่านตรวจพืชต่างๆ ที่มีการนำเข้า

3. การตรวจสอบเบื้องต้นโดยการตรวจสอบด้วยตาเปล่า และผ่าหัวมันฝรั่งเป็นสังเกตอาการ zebra chip ภายในหัวมันฝรั่ง บันทึกข้อมูลต่าง ๆ และบันทึกภาพ หากตรวจพบลักษณะอาการเป็นลายน่าสงสัย นำหัวมันฝรั่งไปปลูกเพื่อสังเกตอาการและเก็บตัวอย่างใบหรือกิ่งมาตรวจวินิจฉัยและจัดจำแนกต่อไป

4. การตรวจวินิจฉัยและจัดจำแนกเชื้อ *Candidatus* Liberibacter solanacearum โดยใช้เทคนิค Conventional PCR ตามวิธีการดังนี้

4.1 สกัดสารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอ (Total DNA) จากใบและก้านที่ปลูกจากหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าที่แสดงอาการ zebra chip ที่หัวหรือส่วนของพืชโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป

4.2 เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *Candidatus* Liberibacter solanacearum ด้วยเทคนิค Conventional PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อดังกล่าว และ Internal control

4.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตโฟรีซีส (gel electrophoresis) โดยใช้ 1% อะกาโรสเจล ให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 35-40 นาที

4.4 ตัวอย่างที่ปรากฏแถบแบนของดีเอ็นเอเป้าหมายถือว่าให้ผลบวกกับการตรวจสอบ ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอีกครั้งเพื่อส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

4.5 วิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่าง โดยจัดการข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป DNASTAR และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

5. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงของบริษัทที่นำเข้าในจังหวัดตาก เชียงใหม่ และเชียงราย

การบันทึกข้อมูล - ข้อมูลการตรวจพบและไม่พบเชื้อ *Candidatus* Liberibacter solanacearum จำนวนครั้ง ปริมาณ และประเทศผู้ส่งออกหัวพันธุ์มันฝรั่ง

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 4 การตรวจและศึกษาชนิดเมล็ดวัชพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่ายนำเข้า

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูลวัชพืชเป้าหมาย เช่น ชีววิทยา ลักษณะเมล็ดวัชพืช วิธีการตรวจศัตรูพืชในเมล็ดพันธุ์ และวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

2. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากด่านตรวจพืช ตามมาตรฐาน International Seed Testing Association (ISTA, 2020) ปริมาณเมล็ดพันธุ์แครอท ที่ใช้สำหรับตรวจสอบศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ น้ำหนัก 30 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 ตัวอย่างขั้นต้น จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

2.1.6 เมล็ดพันธุ์จำนวนตั้งแต่ 60 ภาชนะบรรจุ สุ่มอย่างน้อย 30 ตัวอย่าง จากภาชนะบรรจุทั้งหมด

3. การตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น โดยตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ด้วยตาเปล่า สังเกตลักษณะสี ผิว และรูปร่างว่าผิดปกติหรือไม่ มีรอยเจาะ หรือแตกกระเทาะหรือไม่ แล้วจึงนำเมล็ดพันธุ์ที่สุ่มได้นำไปตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

4. การตรวจศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

4.1 ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope) เพื่อศึกษาและบันทึกลักษณะภายนอกของเมล็ด เช่น สี (colour) ผิว (Texture) รูปร่าง (Shape) และลายบนผิวของเมล็ด วัดขนาดความกว้างความยาวของเมล็ดวัชพืช

4.2 เปรียบเทียบกับตัวอย่างเมล็ดวัชพืชในพิพิธภัณฑ์และใช้คู่มือจำแนกวัชพืชที่เป็นเอกสารและเวบไซต์ที่เชื่อถือได้

5. การทดสอบความงอกของเมล็ดวัชพืช

5.1 วิธีการเพาะในกระดาษเพาะ ตัดจานเพาะขนาดจานเพาะเชื้อสองชิ้น วางลงในจานให้สนิท ค่อยๆหยอดน้ำลงบนกระดาษให้เปียกทั่วถึง แต่ไม่แฉะ (ให้เอียงจานเล็กน้อยหยอดน้ำจากด้านบนลงมา เมื่อน้ำเริ่มสะสมที่มุมจานด้านล่าง แสดงว่าความชื้นพอดี) และวางเมล็ดบนและสัมผัสกระดาษเพาะให้มากที่สุด โดยกระจายให้ทั่วกระดาษอาจปิดหรือเปิดฝาจานเพื่อช่วยรักษาหรือลดความชื้น แล้ววางจานในที่อุณหภูมิห้อง

กรมวิชาการเกษตร

5.2 วิธีเพาะในทราย ใส่ทรายที่เตรียมไว้ (ทรายละเอียด สม่ำเสมอ และสะอาด) ในกล่องพลาสติกให้แน่นพอสมควร โดยใช้แผ่นไม้ปาดผิวทรายให้ได้ระดับสม่ำเสมอ ค่อยๆ รดน้ำในกล่องทรายให้ทั่วถึง คอยเอียงกล่องและดูที่มุมกล่อง หากมีน้ำเริ่มขังที่มุมล่าง แสดงว่ามีความชื้นพอดี วางเมล็ดลงบนทรายไว้ที่อุณหภูมิห้อง (กิตติ, 2559)

6. การติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงผลิต

7. รวบรวมและจัดทำข้อมูลวัชพืชที่ตรวจพบและสรุปผล

การบันทึกข้อมูล

1. ข้อมูลการตรวจพบและไม่พบชนิดวัชพืช จำนวนครั้ง ปริมาณ และประเทศผู้ส่งออกเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่าย

2. บันทึกภาพลักษณะของเมล็ดวัชพืช และเก็บตัวอย่างศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการ

โครงการวิจัยย่อยที่ 4 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์เพื่อการค้าสินค้าเกษตรด้านพืช แบ่งออกเป็น 2 กิจกรรม มีวิธีการวิจัยดังต่อไปนี้

กิจกรรมที่ 1 พัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืช

การทดลองที่ 1.1 การพัฒนาการตรวจสอบแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* และแมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) ด้วย multiplex PCR จากไพร์เมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงเพื่อการนำเข้าและส่งออก (ยุวรินทร์ บุญทบ, 2565 – 2567)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาลำดับพันธุกรรมของแมลงวันผลไม้ที่ใช้ในการทดสอบ

1.1 นำแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. curcubitae* และแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทางการเกษตรอีก 10 ชนิด ที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว มาสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) โดยใช้วิธีการตาม Boontop *et al*. (2016) ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ISOLATE II GenomicDNA kit (Bioline, Australia) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัท จากนั้นนำ DNA ที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ cox1 ซึ่งเป็น universal primer เพื่อยืนยันชนิดแมลงวันผลไม้ที่ต้องการนำมาทดสอบ ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis)

1.3 ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ และนำมาตรวจสอบชนิดกับ Gene Bank เพื่อยืนยันความถูกต้องข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

2. ทดสอบคู่ไพร์เมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* โดยวิธีการ multiplex PCR

กรมวิชาการเกษตร

2.1 หาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค multiplex PCR จากคู่ไพร์เมอร์ที่เฉพาะเจาะจง โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ตามรายงานของ ยุวรินทร์ และคณะ (2562ก, 2562ข)

2.2 ตรวจสอบ PCR product เพื่อดูความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์ทั้งสองคู่ด้วยวิธีการเจลอิเล็คโตรโฟริซิส

3. ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ด้วยวิธีการ multiplex PCR กับแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ จากห้องปฏิบัติการและจากด่านตรวจพืชเพื่อการส่งออก

3.1 ทดสอบวิธีการ multiplex PCR โดยทำการทดสอบกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และตัวอย่างแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการในระยะต่างๆ เช่น ไข่ ตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย

3.2 ทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบาร์โค้ดกับแมลงวันผลไม้ที่พบในพืช ผัก และผลไม้ที่พบบริเวณด่านตรวจพืชที่มีการส่งออกด้วยวิธี PCR

3.3 ทำการบันทึกข้อมูล และจัดทำรายงาน

การบันทึกข้อมูล

ตัวอย่างดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์

การทดลองที่ 1.2 การตรวจ *Cucumber mosaic virus* ในพริกด้วยเทคนิค Reverse transcription loop-mediated isothermal amplifyication (เยาวภา ตันติวานิช, 2565-2567)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. แหล่งที่มาของ *Cucumber mosaic virus* และการเตรียมตัวอย่างพริกที่แสดงอาการของโรค

เก็บตัวอย่างพริกที่ลักษณะอาการคล้ายกันกับ *Cucumber mosaic virus* และเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดลอง

2. คัดเลือกไพรเมอร์และทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค RT-LAMP ในการตรวจเชื้อ *Cucumber mosaic virus*

2.1 สืบค้นข้อมูลและคัดเลือกไพรเมอร์

ข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจ *Cucumber mosaic virus* (CMV) ในพริกได้อย่างเฉพาะเจาะจง และคัดเลือกเพื่อสั่งสังเคราะห์สำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค RT-LAMP และออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจ CMV ด้วยเทคนิค RT-LAMP โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CMV มาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer Explorer version 4 (https://primerexplorer.jp/e/index.html) สำหรับการตรวจสอบด้วยวิธี RT-LAMP ชุดไพรเมอร์ออกแบบให้จำเพาะกับยีนเป้าหมายคือ AC1 (Rep gene) หรือ CP (Coat protein gene)

2.2 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค RT-LAMP ในการตรวจ *Cucumber mosaic virus*

กรมวิชาการเกษตร

ดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัย *Cucumber mosaic virus* ด้วยเทคนิค LAMP

3. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของเทคนิค RT-LAMP ในการตรวจ *Cucumber mosaic virus*

นำดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสที่ต้องการทดสอบมาวัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอนเอที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ng/ul เพื่อนำไปทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค LAMP ด้วยสภาวะที่เหมาะสม และทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา RT-LAMP เปรียบเทียบกับการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR

4. ทดสอบวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจ *Cucumber mosaic virus* ในพริกด้วยเทคนิค RT-LAMP จากตัวอย่างพืช

ทำการเก็บตัวอย่างที่มีลักษณะอาการคล้ายเกิดจากไวรัสในพริกจากแหล่งปลูกสำคัญ เช่น กาญจนบุรี เชียงใหม่ ตาก อุบลราชธานี และ น่าน เป็นต้น เพื่อนำมาใช้ในสำหรับทดสอบหาวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจ *Cucumber mosaic virus* จากตัวอย่างพริกด้วยเทคนิค RT-LAMP ด้วยสภาวะที่เหมาะสม

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกโปรแกรมสภาพที่เหมาะสมของเทคนิค RT-LAMP
2. บันทึกความจำเพาะ (specificity) ในการตรวจ *Cucumber mosaic virus* ในพริก
3. บันทึกความไว (sensitivity) ในการตรวจ *Cucumber mosaic virus* ในพริก
4. บันทึกวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจ *Cucumber mosaic virus* ในพริก

การทดลองที่ 1.3 พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas perforans* สาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ (ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, 2565-2567)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. คัดเลือกไพรเมอร์และทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ

1.1 สืบค้นข้อมูลและคัดเลือกไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศได้อย่างเฉพาะเจาะจง และคัดเลือกเพื่อสั่งสังเคราะห์สำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัย ในเบื้องต้นพบรายงานของ Koenraadt *et al*. (2009) และ Umesha and Avinash (2015)

1.2 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ

ดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR ตามรายงานของ Koenraadt *et al*. (2009) และ Umesha and Avinash

กรมวิชาการเกษตร

(2015) โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 50 ng/µl, 1X One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK)

2. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของเทคนิคทางโมเลกุลในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ

นำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาวัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอนเอที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ng/ul เพื่อนำไปทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยเทคนิค PCR และทดสอบความไวในการตรวจสอบโดยใช้ DNA ของแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม ตรวจด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย, 1X One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK)

3. ทดสอบวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ จากตัวอย่างพืช

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศจากแหล่งปลูกสำคัญ เช่น กาญจนบุรี เชียงใหม่ ตาก นครพนม สกลนคร หนองคาย อุบลราชธานี สระบุรี และน่าน เป็นต้น เพื่อนำมาใช้ในสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย, 1X One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK)

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกโปรแกรมที่เหมาะสมของเทคนิค PCR ในการตรวจแบคทีเรีย *X. perforans*
2. บันทึกความจำเพาะ (specificity) ในการตรวจแบคทีเรีย *X. perforans*
3. บันทึกความไว (sensitivity) ในการตรวจแบคทีเรีย *X. perforans*
4. บันทึกวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจแบคทีเรีย *X. perforans*

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.4 พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas vesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ (ทิพวรรณ กันหาญาติ, 2565-2567)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. คัดเลือกไพรเมอร์และทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ

1.1 สืบค้นข้อมูลและคัดเลือกไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศได้อย่างเฉพาะเจาะจง และคัดเลือกเพื่อสั่งสังเคราะห์สำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัย ในเบื้องต้นพบรายงานของ Koenraadt *et al*. (2009) และ Lue *et al*. (2010)

1.2 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ

ดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR ตามรายงานของ Koenraadt *et al*. (2009) และ Lue *et al*. (2010) โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 50 ng/µl, 1X One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK)

2. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของเทคนิคทางโมเลกุลในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ

นำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาวัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอนเอที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ng/ul เพื่อนำไปทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยเทคนิค PCR และทดสอบความไวในการตรวจสอบโดยใช้ DNA ของแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม ตรวจด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย, 1X One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK)

3. ทดสอบวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศ จากตัวอย่างพืช

กรมวิชาการเกษตร

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศจากแหล่งปลูกสำคัญ เช่น กาญจนบุรี เชียงใหม่ ตาก นครพนม สกลนคร หนองคาย อุบลราชธานี สระบุรี และน่าน เป็นต้น เพื่อนำมาใช้ในสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย, 1X One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK)

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกโปรแกรมที่เหมาะสมของเทคนิค PCR ในการตรวจแบคทีเรีย *X. vesicatoria*
2. บันทึกความจำเพาะ (specificity) ในการตรวจแบคทีเรีย *X. vesicatoria*
3. บันทึกความไว (sensitivity) ในการตรวจแบคทีเรีย *X. vesicatoria*
4. บันทึกวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจแบคทีเรีย *X. vesicatoria*

การทดลองที่ 1.5 การเปรียบเทียบและประเมินประสิทธิภาพการตรวจไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* ด้วยเทคนิค LAMP PCR และ Real-time PCR (ไตรเดช ข่ายทอง, 2565-2567)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างและการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *R. similis*

เก็บตัวอย่างพืชที่มีการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย *R. similis* รวมทั้งวัสดุปลูกจากพื้นที่ต่างๆ แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างรากโดยตัดรากเป็นท่อนสั้นๆ ยาวประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร ห่อด้วยผ้ากรอง วางลงบนชุดกรวยแยกไส้เดือนฝอยนำไปใส่ในตู้พ่นหมอก (Mistifier) เก็บตัวอย่างน้ำที่มีไส้เดือนฝอยมาผ่านตะแกรงโลหะขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร เก็บตัวอย่างไส้เดือนไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แยกไส้เดือนฝอยจากวัสดุปลูกโดยแช่วัสดุปลูกในน้ำนาน 24 ชั่วโมง แยกไส้เดือนฝอยโดยใช้ Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique กรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร วางบนตะแกรงที่มีขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างดินที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่างและนำตัวอย่างใส่ลงบนกระดาษกรอง ที่วางอยู่บนตะแกรงไนลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงแล้วเก็บน้ำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำไส้เดือนฝอย *R. similis* ที่ตรวจพบมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนชิ้นแครอทในสภาพปลอดเชื้อ

2. การสกัดดีเอ็นเอ

2.1 สกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใช้วิธีการตาม Schizas *et al.* (1997) ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์

2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชที่ถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลาย ใช้ชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction (Vivantis) วิธีการตามคำแนะนำ

กรมวิชาการเกษตร

2.3 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินและน้ำที่มีไส้เดือนฝอยหลายชนิด ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างน้ำที่ได้จากการแยกไส้เดือนฝอยที่ 10,000 รอบต่อนาที ดูดน้ำส่วนบนทิ้งแล้วสกัดดีเอ็นเอด้วย PowerSoil®DNA Isolation Kit (Qiagen) วิธีการตามคำแนะนำ

3. การตรวจยืนยันชนิดของไส้เดือนฝอย *R. similis* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานและวิธี PCR

ตรวจยืนยันชนิดของไส้เดือนฝอย *R. similis* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน (Ryss, 2003) และวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะ RsimF/RsimR ตามรายงานของ Ravindran *et al*. (2011)

4. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค LAMP PCR และ Real time PCR

ใช้เทคนิค LAMP PCR ตามรายงานของ Peng *et al*. (2012) โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงกับส่วน D2-D3 region ของ rDNA gene และใช้เทคนิค real-time PCR ตามรายงานของ Krisna and Eapen (2019) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ RAD-F/RAD-R ที่ออกแบบให้จำเพาะเจาะจงกับส่วน ITS ของ *R. similis* ทำปฏิกิริยาโดยใช้ QuantiFast SYBR® Green PCR Kit (Qiagen)

4.1 เปรียบเทียบความจำเพาะเจาะจง

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงโดยทดสอบกับดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอย *R. similis* ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ และไส้เดือนฝอยที่ไม่ใช่ศัตรูพืชที่มักพบในตัวอย่างดิน ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ

4.2 เปรียบเทียบความไว

ทดสอบความไวของปฏิกิริยา โดยการทำ 10-fold dilution ของดีเอ็นเอไส้เดือนฝอย *R. similis* โดยใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ

4.3 เปรียบประสิทธิภาพในการตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอผสม

ทดสอบประสิทธิภาพการตรวจดีเอ็นเอผสมที่สกัดจากไส้เดือนฝอย *R. similis*:*Pratylenchus coffeae* 1:10 1:100 1:500 1:1,000 1:5,000 และ 1:10,000 ตัว ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ

4.4 เปรียบเทียบผลการตรวจตัวอย่างประเภทต่าง ๆ

ทดสอบประสิทธิภาพการตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากดิน น้ำ หรือรากพืชที่มีไส้เดือนฝอย *R. Similis*

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกเปรียบเทียบความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของเทคนิค LAMP PCR และ Real-time PCR ในการตรวจไส้เดือนฝอย *R. similis*
2. บันทึกเปรียบเทียบความไว (sensitivity) ของเทคนิค LAMP PCR และ Real-time PCR ในการตรวจไส้เดือนฝอย *R. similis*
3. บันทึกเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอผสมของเทคนิค LAMP PCR และ Real-time PCR ในการตรวจไส้เดือนฝอย *R. similis*
4. บันทึกเปรียบเทียบผลการตรวจตัวอย่างประเภทต่างๆ ของเทคนิค LAMP PCR และ Real-time PCR ในการตรวจไส้เดือนฝอย *R. similis*

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 2 พัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยชีวภัณฑ์นำเข้าภายใต้พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย

การทดลองที่ 2.1 พัฒนาเทคนิค Polymerase Chain Reaction เพื่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อรา *Trichoderma asperellum* (ชนินทร ดวงสอาด, 2565-2567)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Trichoderma*

1.1 รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Trichoderma* จากพิพิธภัณฑ์โรคพืช และculture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

<u>รวบรวมตัวอย่างและแยกเชื้อให้บริสุทธิ์</u>

แยกเชื้อรา *T. asperellum* ที่ได้จากพิพิธภัณฑ์โรคพืช และ culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชให้บริสุทธิ์ โดยวิธี single spore isolation ย้ายสปอร์เดี่ยวของเชื้อรา *T. asperellum* เลี้ยงลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ ห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน หากไม่มีการปนเปื้อน สามารถดำเนินการสกัดดีเอ็นเอ เชื้อที่เจริญจากสปอร์เดี่ยว จะทำการแยกเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

<u>สกัดดีเอ็นเอ</u>

เขี่ยเส้นใยของเชื้อรา *T. asperellum* ที่เลี้ยงบน PDA แล้วย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ เติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Meyer *et al.* (2012) และ Doungsa-ard *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

<u>Polymerase Chain Reaction (PCR)</u>

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตำแหน่ง the Internal Transcribed Spacer (ITS) และ the translation elongation factor 1-alpha (EF-1α) ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนดใช้ค่า annealing temperature 56 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยังบริษัท Macrogen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

<u>การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์</u>

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทดลองมาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2020 (Kearse *et al.*, 2012) บันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

1.2 รวบรวมข้อมูลลำดับเบสของเชื้อราในสกุล *Trichoderma* จาก GenBank

กรมวิชาการเกษตร

รวบรวมข้อมูลลำดับเบสตำแหน่ง ITS และ tef1 ของเชื้อราใน genus *Trichoderma* ที่มีใน GenBank ทั้งหมด เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้จากข้อ 1.1

1.3 การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง ITS และ tef1 ที่ได้จากการทดลองและจากการรวบรวมข้อมูลมาจัดเรียงด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Katoh and Toh, 2008) จากนั้นตรวจสอบการจัดเรียง (alignment) โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 (Kumar *et al*., 2016)

2. ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อเชื้อรา *T. asperellum*

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา *T. asperellum* โดยการพิจารณาชุดข้อมูลของเชื้อราในสกุล *Trichoderma* และ ใช้โปรแกรม GPRIME ในการออกแบบ โดยออกแบบตำแหน่งจับอยู่ภายในยีนตำแหน่ง ITS และ tef1

3. ทดสอบไพรเมอร์ (Primers validation) จากพิพิธภัณฑ์โรคพืช และ culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้กับดีเอ็นเอในฐานข้อมูล เช่น GenBank และทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อรา *T. asperellum* และเชื้อราในสกุล *Trichoderma* จากพิพิธภัณฑ์โรคพืช และ culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยดำเนินการดังนี้

<u>Polymerase Chain Reaction (PCR)</u>

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตำแหน่ง the Internal Transcribed Spacer (ITS) ด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 (White *et al*., 1990) และไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบบนตำแหน่ง ITS ตำแหน่ง the translation elongation factor 1-alpha (EF-1α) ด้วยไพรเมอร์ the translation elongation factor 1-alpha (EF1-α) EF1-728F/EF1-986R (Carbone and Kohn, 1999) EF1-728F (Carbone and Kohn, 1999)/EF-2 (O'Donnell *et al*., 1998) และไพร์เมอร์ที่ทำการออกแบบบนตำแหน่ง tef1 ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนดใช้ค่า annealing temperature 56 องศาเซลเซียส

<u>Nested Polymerase Chain Reaction</u>

นำ PCR product ที่ได้จากการทำ PCR ตำแหน่ง ITS ซึ่งใช้ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และ ตำแหน่ง tef1 ซึ่งใช้ไพรเมอร์ EF1-728F/EF1-986R และ EF1-728F/EF-2 มาทำ Nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบ โดยใช้ Taq DNA Polymerase ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนดใช้ค่า annealing temperature 56 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยังบริษัท Macrogen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

4. ตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* ที่ไพรเมอร์จำเพาะตรวจจับได้

กรมวิชาการเกษตร

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างจาก clean culture ที่ทำปฏิกริยากับไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อรา *T. asperellum* มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2020 (Kearse *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบชนิด โดยวิธี phylogenetic reconstruction ของ combined dataset ที่ได้จากตำแหน่ง ITS และ tef1 ด้วยเกณฑ์ Maximum Likelihood (ML) โดยเตรียมไฟล์ .phy ใช้โปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) ในการวิเคราะห์ กำหนดค่า model of evolution แบบ GTRGAMMA วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command –f a) เริ่มวิเคราะห์จาก random starting tree และ กำหนดค่า 1000 ซ้ำ สำหรับ maximum likelihood bootstrap วิเคราะห์ผลเพื่อตรวจสอบชนิดที่ถูกต้องที่ไพรเมอร์จำเพาะตรวจจับได้

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

บันทึกข้อมูล เก็บรักษาสายพันธุ์ราที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ

ราที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่าง เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) จะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป และดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.2 การพัฒนาเทคนิคสำหรับตรวจสอบเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ (ทิภาพร นวลเนตร, 2565-2567)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Metarhizium*

1.1 การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Metarhizium* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อรา *Metarhizium* ที่เก็บรวมรวมจากห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลงที่ได้ทำการแยกสปอร์เดี่ยวแล้วมาจำแนกชนิด โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะก้านชูโคนิเดีย (Conidiophores) ลักษณะโคนิเดีย (Conidia) ได้แก่ สี รูปร่าง ขนาด จำนวนโคนิเดีย

1.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS (internal transcribed spacer) ribosomal DNA และ TEF1α (translation elongation factor 1-α)

<u>การเตรียมเส้นใยเชื้อรา (Fungal mycelia preparation)</u>

เตรียมสปอร์แขวนลอย (spore suspension) โดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อราเจริญอยู่ แล้วขูดผิวหน้าด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล ดูดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา ใส่ในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มไว้พร้อมเขย่าเป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง ทำการกรองเส้นใยด้วยเครื่อง vacuum pump และล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 300

มิลลิลิตร เก็บเส้นใยที่กรองได้ในแผ่นกระดาษกรอง Whatman No.1 นำไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry (lyophilization) เป็นเวลา 14-18 ชั่วโมง และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

วิธีการสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงจาก Zimand *et al*. (1994)

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ TEF1α ด้วยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS rDNA ของเชื้อรา *Metarhizium* ด้วยไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ITS1 (5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’) และ ITS4 (5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’) ตามรายงานของWhite *et al*. (1990) จากนั้นนำ PCR product ทั้งสองส่วนที่ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มาตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis จากนั้นทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ด้วย Microspin S-400 HR columm และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

1.3 รวบรวมข้อมูลลำดับเบสของเชื้อราในสกุล *Metarhizium* จาก GenBank

รวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง ITS และ TEF1α ของเชื้อราใน genus *Metarhizium* ที่มีใน GenBank เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้จากข้อ 1.2 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS และ และ TEF1α ที่ได้จากการทดลองและการรวบรวมข้อมูลจากฐานข้อมูล มาทำ Multiple alignment ด้วยวิธี Clustal W (Larkin *et al*., 2007) ด้วยโปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 (Kumar *et al*., 2016)

2. ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อเชื้อรา *Metarhizium*

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา *M. anisopliae* โดยการพิจารณาชุดข้อมูลของเชื้อราในสกุล *Metarhizium* และ ใช้โปรแกรม GPRIME หรือ Primer3 ในการออกแบบ โดยออกแบบตำแหน่งจับอยู่ภายในยีนตำแหน่ง ITS และ TEF1α

ทดสอบไพรเมอร์ (Primers validation)

ทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้กับดีเอ็นเอในฐานข้อมูล เช่น GenBank และทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่เก็บรวบรวมโดยห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลง กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยนำดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่าง มาตรวจสอบด้วยวิธี Nested Polymerase Chain Reaction นำ PCR product ที่ได้จากการทำ PCR ตำแหน่ง ITS ซึ่งใช้ไพร์เมอร์ ITS1/ITS4 และ ตำแหน่ง TEF1α ซึ่งใช้ไพรเมอร์ ef1/ef2 มาทำ Nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ 1% agarose gel electrophoresis จากนั้นทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ด้วย Microspin S-400 HR columm และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3. การตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของเชื้อรา *M. anisopliae* ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ทำปฏิกริยากับไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อรา *M. anisopliae* มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบ

เทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime (Kearse *et al.*, 2012) บันทึกข้อมูลของลำดับ นิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบชนิด โดยวิธี phylogenetic reconstruction ของ combined dataset ที่ได้จากตำแหน่ง ITS และ TEF1α ด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML) โดยเตรียมไฟล์ .phy ใช้โปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) ในการวิเคราะห์ กำหนดค่า model of evolution แบบ GTRGAMMA วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command –f a) เริ่มวิเคราะห์จาก random starting tree และ กำหนดค่า 1000 ซ้ำ สำหรับ maximum likelihood bootstrap วิเคราะห์ผลเพื่อตรวจสอบชนิดของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ไพรเมอร์จำเพาะตรวจจับได้

การบันทึกข้อมูล

1. ข้อมูลประสิทธิภาพและความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบ
2. ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *M. anisopliae*

โครงการวิจัยย่อยที่ 5 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในผลมะละกอและมะม่วงเพื่อเพิ่มศักยภาพในการส่งออก (6 การทดลอง)

การทดลองที่ 1 วิจัยและพัฒนาวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลมะละกอแขกดำเพื่อการส่งออก (ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2567)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของมะละกอพันธุ์แขกดำเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับงานทดลอง

โดยการสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับชีววิทยา พื้นที่ปลูก ลักษณะประจำพันธุ์ และปริมาณการส่งออกของมะละกอพันธุ์แขกดำ จากแหล่งข้อมูลอ้างอิงภายในประเทศ อาทิเช่น กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร และสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร เป็นต้น และภายนอกประเทศ อาทิเช่น เว็บไซต์ และวารสารนานาชาติที่เกี่ยวข้อง เป็นต้น

สำรวจสวนและคัดเลือกมะละกอแขกดำที่ได้คุณภาพตามมาตรฐานส่งออก จากแหล่งปลูกมะละกอที่สำคัญ (มะละกอแขกดำที่ใช้ทดลอง ใช้ผลขนาดใหญ่ ขนาดกลาง และตกเกรด) จากนั้นนำมะละกอกลับมายังห้องปฏิบัติการกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เก็บมะละกอไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้น เพื่อนำมาใช้ในงานทดลองขั้นตอนศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อน และขั้นตอนศึกษาด้านการกำจัดแมลงด้วยความร้อนต่อไป

การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลชีววิทยา ลักษณะประจำพันธุ์ และข้อมูลแหล่งเพาะปลูกน้ำหนักและขนาดของมะละกอพันธุ์แขกดำเพื่อใช้ในการทดลอง จำนวนแหล่งข้อมูลที่ใช้อ้างอิงทั้งหมด และจำนวนวารสารภายในและภายนอกที่มีการตีพิมพ์

กรมวิชาการเกษตร

2. ศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อนและคุณภาพของผลมะละกอพันธุ์แขกดำจากวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์

ดำเนินการโดยอบมะละกอพันธุ์แขกดำด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ให้ความร้อนกับผลมะละกอ อาศัยวิธีการอบไอน้ำ ร่วมกับวิธีการอบอากาศร้อน โดยช่วงแรกจะให้ความร้อนกับผลมะละกอด้วยวิธีอบอากาศร้อน อากาศร้อนที่หมุนเวียนผ่านผลมะละกอจะมีความชื้นสัมพัทธ์ 50-80 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งเมื่ออุณหภูมิในผลมะละกอเพิ่มขึ้นถึง 43 °C แล้วจึงปรับเปลี่ยนเป็นวิธีการอบไอน้ำ อากาศร้อนจะอยู่ในสภาพที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ โดยมีความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (ดัดแปลงจาก อุดร และคณะ, 2549; Unahawutti *et al.*, 2006) สำหรับการวัดอุณหภูมิผลมะละกอทดลองอาศัยการวัดจาก sensor fruit จำนวน 3 ผล อบมะละกอโดยให้อุณหภูมิภายในสุดผลอยู่ที่ 46 47 และ 48 °C และคงอุณหภูมิ นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากอบมะละกอครบตามอุณหภูมิ และระยะเวลาที่กำหนดไว้นำมะละกอ ที่ผ่านความร้อนออกจากตู้อบไอน้ำ มาลดอุณหภูมิผลมะละกอทันทีโดยการเป่าด้วยพัดลมนาน 1 ชั่วโมง จากเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ หลังจากเสร็จสิ้นการให้ความร้อน นำมะละกอที่ผ่านความร้อนห่อผลด้วยตาข่ายโฟม และบรรจุลงในกล่องกระดาษลูกฟูกขนาด 28x58x14 เซนติเมตร จากนั้นเก็บมะละกอทดลองตามรายละเอียดใน (มลนิภา และคณะ 2555) แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 13-15 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 85-95 เปอร์เซ็นต์ บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของมะละกอหลังผ่านความร้อนแล้วเปรียบเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน โดยใช้หลักเกณฑ์พิจารณาและดำเนินการในหัวข้อต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกภาพมะละกอก่อนและหลังทดลองในแต่ละกรรมวิธีเปรียบเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน

2. การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss) ของผลมะละกอ โดยคำนวณเป็นร้อยละของน้ำหนักที่สูญเสียไปด้วยวิธีการบันทึกน้ำหนักมะละกอก่อนและหลังการทดลอง

3. ปริมาณน้ำตาล (brix value) ในการทดลองแต่ละครั้งคั้นน้ำจากเนื้อมะละกอที่ผ่านความร้อน และไม่ผ่านความร้อน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล ปริมาณน้ำตาลในรูปปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solid, TSS) มีหน่วยเป็นค่าองศาบริกซ์ การวัดปริมาณน้ำตาลจากเนื้อมะละกอใช้เครื่อง digital refractometer

4. ความแน่นเนื้อ (firmness)

5. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสีเปลือก น้ำหนักที่สูญหาย ความหวาน และความแน่นเนื้อ หลังการอบไอน้ำ 7 วัน และวิเคราะห์ผลทางสถิติ และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธีการตรวจสอบแบบ t-test

การทดลองที่ 2 วิจัยและพัฒนาวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลมะละกอแขกนวลเพื่อการส่งออก (ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2567)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของมะละกอพันธุ์แขกนวลเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับงานทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

โดยการสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับชีววิทยา พื้นที่ปลูก ลักษณะประจำพันธุ์ และปริมาณการส่งออกของมะละกอพันธุ์แขกนวล จากแหล่งข้อมูลอ้างอิงภายในประเทศ เช่น กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร และสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร เป็นต้น ฯลฯ และภายนอกประเทศ อาทิเช่น เว็บไซต์ และวารสารนานาชาติที่เกี่ยวข้อง เป็นต้น

สำรวจสวนและคัดเลือกมะละกอแขกนวลที่ได้คุณภาพตามมาตรฐานส่งออก จากแหล่งปลูกมะละกอที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดพิจิตร นครสวรรค์ นครปฐม นครราชสีมา กาญจนบุรี ราชบุรี และ จันทบุรี (มะละกอแขกนวลที่ใช้ทดลอง ใช้ผลขนาดใหญ่ ขนาดกลาง และตกเกรด) จากนั้นนำมะละกอกลับมายังห้องปฏิบัติการกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เก็บมะละกอไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้น เพื่อนำมาใช้ในงานทดลองขั้นตอนศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อน และขั้นตอนศึกษาด้านการกำจัดแมลงด้วยความร้อนต่อไป

การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลชีววิทยา ลักษณะประจำพันธุ์ และข้อมูลแหล่งเพาะปลูกน้ำหนักและขนาดของมะละกอพันธุ์แขกนวลเพื่อใช้ในการทดลอง จำนวนแหล่งข้อมูลที่ใช้อ้างอิงทั้งหมด และจำนวนวารสารภายในและภายนอกที่มีการตีพิมพ์

2. ศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อนและคุณภาพของผลมะละกอพันธุ์แขกนวลจากวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์

ดำเนินการโดยอบมะละกอพันธุ์แขกนวลด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ให้ความร้อนกับผลมะละกอ อาศัยวิธีการอบไอน้ำ ร่วมกับวิธีการอบอากาศร้อน โดยช่วงแรกจะให้ความร้อนกับผลมะละกอด้วยวิธีอบอากาศร้อน อากาศร้อนที่หมุนเวียนผ่านผลมะละกอจะมีความชื้นสัมพัทธ์ 50-80 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งเมื่ออุณหภูมิในผลมะละกอเพิ่มขึ้นถึง 43 ℃ แล้วจึงปรับเปลี่ยนเป็นวิธีการอบไอน้ำ อากาศร้อนจะอยู่ในสภาพที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ โดยมีความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (ดัดแปลงจาก อุดร และคณะ, 2549; Unahawutti et al., 2006) สำหรับการวัดอุณหภูมิผลมะละกอทดลองอาศัยการวัดจาก sensor fruit จำนวน 3 ผล อบมะละกอโดยให้อุณหภูมิภายในสุดผลอยู่ที่ 46 47 และ 48 ℃ และคงอุณหภูมิ นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากอบมะละกอครบตามอุณหภูมิ และระยะเวลาที่กำหนดไว้นำมะละกอ ที่ผ่านความร้อนออกจากตู้อบไอน้ำ มาลดอุณหภูมิผลมะละกอทันทีโดยการเป่าด้วยพัดลมนาน 1 ชั่วโมง จากเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ หลังจากเสร็จสิ้นการให้ความร้อน นำมะละกอที่ผ่านความร้อนห่อผลด้วยตาข่ายโฟม และบรรจุลงในกล่องกระดาษลูกฟูกขนาด 28x58x14 เซนติเมตร จากนั้นเก็บมะละกอทดลองตามรายละเอียดใน (มลนิภา และคณะ 2555) แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 13-15 ℃ ความชื้นสัมพัทธ์ 85-95 เปอร์เซ็นต์ บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของมะละกอหลังผ่านความร้อนแล้วเปรียบเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน โดยใช้หลักเกณฑ์พิจารณาและดำเนินการในหัวข้อต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

กรมวิชาการเกษตร

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกภาพมะละกอก่อนและหลังทดลองในแต่ละกรรมวิธีเปรียบเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน

2. การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss) ของผลมะละกอ โดยคำนวณเป็นร้อยละของน้ำหนักที่สูญเสียไปด้วยวิธีการบันทึกน้ำหนักมะละกอก่อนและหลังการทดลอง

3. ปริมาณน้ำตาล (brix value) ในการทดลองแต่ละครั้งคั้นน้ำจากเนื้อมะละกอที่ผ่านความร้อน และไม่ผ่านความร้อน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล ปริมาณน้ำตาลในรูปปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solid, TSS) มีหน่วยเป็นค่าองศาบริกซ์ การวัดปริมาณน้ำตาลจากเนื้อมะละกอใช้เครื่อง digital refractometer

4. ความแน่นเนื้อ (firmness)

5. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสีเปลือก น้ำหนักที่สูญหาย ความหวาน และความแน่นเนื้อ หลังการอบไอน้ำ 7 วัน วิเคราะห์ผลทางสถิติ และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธีการตรวจสอบแบบ t-test

การทดลองที่ 3 วิจัยและพัฒนาวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลมะม่วงมันเดือนเก้าเพื่อการส่งออก (ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2567)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของมะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้าเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับงานทดลอง

โดยการสืบค้นข้อมูลทางเว็บไซต์ของกรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร และจากแหล่งข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่างๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ซึ่งได้จัดหาและคัดเลือกมะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้า จากตลาดสี่มุมเมือง ตลาดไท และสวนมะม่วงของเกษตรกร อำเภอหนองเสือ อำเภอลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานี ใช้ผลมะม่วงขนาดกลาง นำมาเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ของกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช เพื่อนำมาใช้ในการทดลองในขั้นตอนของการประเมินความเสียหายต่อความร้อน และขั้นตอนของการกำจัดแมลงด้วยความร้อนต่อไป

การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลชีววิทยา ลักษณะประจำพันธุ์ และข้อมูลแหล่งเพาะปลูกน้ำหนักและขนาดของมะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้าเพื่อใช้ในการทดลอง จำนวนแหล่งข้อมูลที่ใช้อ้างอิงทั้งหมด และจำนวนวารสารภายในและภายนอกที่มีการตีพิมพ์

2. ศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อนและคุณภาพของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้มันจากวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์

การประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำต่อมะม่วง แยกเป็นมะม่วงที่ผ่านความร้อน (treatment) และมะม่วงที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความร้อน นำมะม่วงทดลองเข้าเครื่องตู้อบความร้อน อบมะม่วงภายในเครื่องตู้อบความร้อนให้อุณหภูมิภายในสุดผลของมะม่วงเพิ่มขึ้นจนถึง 47 และ 48.5 °C และคงความร้อนภายในผลไว้ที่อุณหภูมิ 47 และ 48.5 °C นาน 0 1 และ 2 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการให้ความร้อน

กรมวิชาการเกษตร

ลดลดอุณหภูมิมะม่วงทันที โดยวิธีการผ่านด้วยน้ำนาน 1 ชั่วโมง ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ เปรียบเทียบกับมะม่วงที่ไม่ผ่านความร้อน นำมะม่วงทดลองทั้งหมดที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อนบรรจุใส่ในกล่องกระดาษด้านยาวทั้งสองข้างเจาะรู พร้อมทั้งปิดด้วยผ้าตาข่าย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 1.6 มิลลิเมตร จำนวน 4 รู เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 13-15 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 85-95 เปอร์เซ็นต์ นาน 7 วัน เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดนำมะม่วงทั้งหมดที่ผ่านความร้อน และไม่ผ่านความร้อนมาประเมินความเสียหายจากความร้อน โดยใช้หลักเกณฑ์พิจารณา และดำเนินการในหัวข้อต่างๆ ดังต่อไปนี้

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกภาพมะม่วงก่อนและหลังทดลองในแต่ละกรรมวิธีเปรียบเทียบกับมะม่วงที่ไม่ผ่านความร้อน

2. การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss) ของมะม่วง โดยคำนวณเป็นร้อยละของน้ำหนักที่สูญเสียไปด้วยวิธีการบันทึกน้ำหนักมะม่วงก่อนการทดลอง และในวันที่ตรวจผลการทดลองชั่งน้ำหนักผลมะม่วงอีกครั้งหนึ่ง

3. ปริมาณน้ำตาล (brix value) ในการทดลองแต่ละครั้งคั้นน้ำจากเนื้อมะม่วงที่ผ่านความร้อน และไม่ผ่านความร้อน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล ปริมาณน้ำตาลในรูปปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solid, TSS) มีหน่วยเป็นค่าองศาบริกซ์ ด้วยเครื่อง digital refractometer

4. ปริมาณกรด (acidity value)

5. ความแน่นเนื้อ (firmness)

6. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีเปลือก น้ำหนักที่สูญหาย ความหวาน ปริมาณกรด และความแน่นเนื้อ หลังการอบไอน้ำที่ 7 วัน

วิเคราะห์ผลทางสถิติ และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธีการตรวจสอบแบบ t-test

การทดลองที่ 4 วิจัยและพัฒนาวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลมะม่วงน้ำดอกไม้มันเพื่อการส่งออก (ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2567)

1. ศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้มันเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับงานทดลอง

โดยการสืบค้นข้อมูลทางเว็บไซต์ของกรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร และจากแหล่งข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่างๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ซึ่งได้จัดหาและคัดเลือกมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้มัน จากตลาดสี่มุมเมือง ตลาดไท และสวนมะม่วงของเกษตรกร ฉะเชิงเทรา นครสวรรค์ นครปฐม นครราชสีมา กาญจนบุรี ราชบุรี จันทบุรี และสระแก้ว ใช้ผลมะม่วงขนาดกลาง นำมาเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ของกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช เพื่อนำมาใช้ในการทดลองในขั้นตอนของการประเมินความเสียหายต่อความร้อน และขั้นตอนของการกำจัดแมลงด้วยความร้อนต่อไป

การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลชีววิทยา ลักษณะประจำพันธุ์ และข้อมูลแหล่งเพาะปลูกน้ำหนักและขนาดของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้มันเพื่อใช้ในการทดลอง จำนวนแหล่งข้อมูลที่ใช้อ้างอิงทั้งหมด และจำนวนวารสารภายในและภายนอกที่มีการตีพิมพ์

กรมวิชาการเกษตร

2. ศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อนและคุณภาพของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้มันจากวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์

การประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำต่อมะม่วง แยกเป็นมะม่วงที่ผ่านความร้อน (treatment) และมะม่วงที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความร้อน นำมะม่วงทดลองเข้าเครื่องตู้อบความร้อน อบมะม่วงภายในเครื่องตู้อบความร้อนให้อุณหภูมิภายในสุดผลของมะม่วงเพิ่มขึ้นจนถึง 47 และ 48.5 ℃ และคงความร้อนภายในผลไม้ที่อุณหภูมิ 47 และ 48.5 ℃ นาน 0 1 และ 2 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการให้ความร้อนลดลดอุณหภูมิมะม่วงทันที โดยวิธีการผ่านด้วยน้ำนาน 1 ชั่วโมง ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ เปรียบเทียบกับมะม่วงที่ไม่ผ่านความร้อน นำมะม่วงทดลองทั้งหมดที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อนบรรจุใส่ในกล่องกระดาษด้านยาวทั้งสองข้างเจาะรู พร้อมทั้งปิดด้วยผ้าตาข่าย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 1.6 มิลลิเมตร จำนวน 4 รู เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 13-15 ℃ ความชื้นสัมพัทธ์ 85-95 เปอร์เซ็นต์ นาน 7 วัน เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดนำมะม่วงทั้งหมดที่ผ่านความร้อน และไม่ผ่านความร้อนมาประเมินความเสียหายจากความร้อน โดยใช้หลักเกณฑ์พิจารณา และดำเนินการในหัวข้อต่างๆ ดังต่อไปนี้

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกภาพมะม่วงก่อนและหลังทดลองในแต่ละกรรมวิธีเปรียบเทียบกับมะม่วงที่ไม่ผ่านความร้อน

2. การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss) ของมะม่วง โดยคำนวณเป็นร้อยละของน้ำหนักที่สูญเสียไปด้วยวิธีการบันทึกน้ำหนักมะม่วงก่อนการทดลอง และในวันที่ตรวจผลการทดลองชั่งน้ำหนักผลมะม่วงอีกครั้งหนึ่ง

3. ปริมาณน้ำตาล (brix value) ในการทดลองแต่ละครั้งคั้นน้ำจากเนื้อมะม่วงที่ผ่านความร้อน และไม่ผ่านความร้อน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล ปริมาณน้ำตาลในรูปปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solid, TSS) มีหน่วยเป็นค่าองศาบริกซ์ ด้วยเครื่อง digital refractometer

4. ปริมาณกรด (acidity value)

5. ความแน่นเนื้อ (firmness)

6. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีเปลือก น้ำหนักที่สูญหาย ความหวาน ปริมาณกรด และความแน่นเนื้อ หลังการอบไอน้ำที่ 7 วัน

วิเคราะห์ผลทางสถิติ และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธีการตรวจสอบแบบ t-test

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 5 วิจัยและพัฒนาวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลมะม่วงแดงจักรพรรดิเพื่อการส่งออก (ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2567)

1. ศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของมะม่วงพันธุ์แดงจักรพรรดิเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับงานทดลอง

โดยการสืบค้นข้อมูลทางเว็บไซต์ของกรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร และจากแหล่งข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่างๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ เพื่อจัดหาและคัดเลือกมะม่วง พันธุ์แดงจักรพรรดิ จากตลาดสี่มุมเมือง ตลาดไท และสวนมะม่วงของเกษตรกร อำเภอดอยหล่อ จอมทอง ดอยเต่า จังหวัดเชียงใหม่ แพร่ ปราจีนบุรี ใช้ผลมะม่วงขนาดกลาง นำมาเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ของกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืช

กักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช เพื่อนำมาใช้ในการทดลองในขั้นตอนของการประเมินความเสียหายต่อความร้อน และขั้นตอนของการกำจัดแมลงด้วยความร้อนต่อไป

การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลชีววิทยา ลักษณะประจำพันธุ์ และข้อมูลแหล่งเพาะปลูกน้ำหนักและขนาดของมะม่วงพันธุ์แดงจักรพรรดิเพื่อใช้ในการทดลอง จำนวนแหล่งข้อมูลที่ใช้อ้างอิงทั้งหมด และจำนวนวารสารภายในและภายนอกที่มีการตีพิมพ์

2. ศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อนและคุณภาพของผลมะม่วงพันธุ์แดงจักรพรรดิจากวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์

การประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำต่อมะม่วง แยกเป็นมะม่วงที่ผ่านความร้อน (treatment) และมะม่วงที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความร้อน นำมะม่วงทดลองเข้าเครื่องตู้อบความร้อน อบมะม่วงภายในเครื่องตู้อบความร้อนให้อุณหภูมิภายในสุดผลมะม่วงเพิ่มขึ้นจนถึง 46 47 และ 48 °C และคงความร้อนภายในผลไว้ที่อุณหภูมิ 46 47 และ 48 °C นาน 0 1 และ 2 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการให้ความร้อนลดอุณหภูมิมะม่วงทันที โดยวิธีการผ่านด้วยน้ำนาน 1 ชั่วโมง ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ นำมะม่วงทดลองทั้งหมดที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อนบรรจุใส่ในกล่องกระดาษ ด้านยาวทั้งสองข้างเจาะรู พร้อมทั้งปิดด้วยผ้าตาข่าย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 1.6 มิลลิเมตร จำนวน 4 รู เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 13-15 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 85-95 เปอร์เซ็นต์ นาน 7 วัน เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดนำมะม่วงทั้งหมดที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อนมาประเมินความเสียหายจากความร้อน โดยใช้หลักเกณฑ์พิจารณา และดำเนินการในหัวข้อต่างๆ ดังต่อไปนี้

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกภาพมะม่วงก่อนและหลังทดลองในแต่ละกรรมวิธีเปรียบเทียบกับมะม่วงที่ไม่ผ่านความร้อน
2. การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss) ของมะม่วง โดยคำนวณเป็นร้อยละของน้ำหนักที่สูญเสียไปด้วยวิธีการบันทึกน้ำหนักมะม่วงก่อนการทดลอง และในวันที่ตรวจผลการทดลองชั่งน้ำหนักผลมะม่วงอีกครั้งหนึ่ง
3. ปริมาณน้ำตาล (brix value) ในการทดลองแต่ละครั้งคั้นน้ำจากเนื้อมะม่วงที่ผ่านความร้อน และไม่ผ่านความร้อน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล ปริมาณน้ำตาลในรูปปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solid, TSS) มีหน่วยเป็นค่าองศาบริกซ์ ด้วยเครื่อง digital refractometer
4. ปริมาณกรด (acidity value)
5. ความแน่นเนื้อ (firmness)
6. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีเปลือก น้ำหนักที่สูญหาย ความหวาน ปริมาณกรด และความแน่นเนื้อ หลังการอบไอน้ำที่ 7 วัน

วิเคราะห์ผลทางสถิติ และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธีการตรวจสอบแบบ t-test

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 6 วิจัยและพัฒนาวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลมะม่วงอกร่องเพื่อการส่งออก (ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2567)

1. ศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของมะม่วงพันธุ์อกร่องเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับงานทดลอง

สืบค้นข้อมูลชีววิทยา ลักษณะประจำพันธุ์ จากกรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร และจากแหล่งข้อมูลอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องทั้งในและต่างประเทศ และสำรวจพื้นที่ปลูกและคัดเลือกมะม่วงอกร่องที่ได้คุณภาพตามมาตรฐานส่งออก จากตลาดไท ตลาดสี่มุมเมือง และจากแหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ ชลบุรี จันทบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ระยอง ราชบุรี ร้อยเอ็ด นครสวรรค์ ขอนแก่น เพชรบุรี สระบุรี สมุทรสาคร ตาก พิจิตร นครราชสีมา เพชรบูรณ์ สุโขทัย อุทัยธานี ฉะเชิงเทรา อุบลราชธานี ลพบุรี อุดรธานี หนองคาย ยโสธร นนทบุรี กาฬสินธุ์ สิงห์บุรี ชัยนาท และ นครปฐม เพื่อนำมาใช้ในการทดลองการประเมินความเสียหายของผลไม้ที่เกิดจากความร้อน และการกำจัดแมลงด้วยความร้อนต่อไป

การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลชีววิทยา ลักษณะประจำพันธุ์ และข้อมูลแหล่งเพาะปลูกน้ำหนักและขนาดของผลมะม่วงอกร่องเพื่อใช้ในการทดลอง

2. ศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อนและคุณภาพของผลมะม่วงพันธุ์อกร่องจากวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์

การประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำต่อมะม่วง แยกเป็นมะม่วงที่ผ่านความร้อน (treatment) และมะม่วงที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความร้อน นำมะม่วงทดลองเข้าเครื่องตู้อบความร้อน อบมะม่วงภายในเครื่องตู้อบความร้อนให้อุณหภูมิภายในสุดผลมะม่วงเพิ่มขึ้นจนถึง 46 47 และ 48 °C และคงความร้อนภายในผลไว้ที่อุณหภูมิ 46 47 และ 48 °C นาน 0 1 และ 2 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการให้ความร้อนลดอุณหภูมิมะม่วงทันที โดยวิธีการผ่านด้วยน้ำนาน 1 ชั่วโมง ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ นำมะม่วงทดลองทั้งหมดที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อนบรรจุใส่ในกล่องกระดาษ ด้านยาวทั้งสองข้างเจาะรู พร้อมทั้งปิดด้วยผ้าตาข่าย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 1.6 มิลลิเมตร จำนวน 4 รู เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 13-15 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 85-95 เปอร์เซ็นต์ นาน 8 วัน และอุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดนำมะม่วงทั้งหมดที่ผ่านความร้อน และไม่ผ่านความร้อนมาประเมินความเสียหายจากความร้อน โดยใช้หลักเกณฑ์พิจารณา และดำเนินการในหัวข้อต่างๆ ดังต่อไปนี้

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกภาพมะม่วงก่อนและหลังทดลองในแต่ละกรรมวิธีเปรียบเทียบกับมะม่วงที่ไม่ผ่านความร้อน

2. การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss) ของมะม่วง โดยคำนวณเป็นร้อยละของน้ำหนักที่สูญเสียไปด้วยวิธีการบันทึกน้ำหนักมะม่วงก่อนการทดลอง และในวันที่ตรวจผลการทดลองชั่งน้ำหนักผลมะม่วงอีกครั้งหนึ่ง

3. ปริมาณน้ำตาล (brix value) ในการทดลองแต่ละครั้งคั้นน้ำจากเนื้อมะม่วงที่ผ่านความร้อน และไม่ผ่านความร้อน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล ปริมาณน้ำตาลในรูปปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solid, TSS) มีหน่วยเป็นค่าองศาบริกซ์ ด้วยเครื่อง digital refractometer

กรมวิชาการเกษตร

4. ปริมาณกรด (acidity value)

5. ความแน่นเนื้อ (firmness)

6. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีเปลือก น้ำหนักที่สูญหาย ความหวาน ปริมาณกรด และความแน่นเนื้อ หลังการอบไอน้ำที่ 7 วัน

วิเคราะห์ผลทางสถิติ และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธีการตรวจสอบแบบ t-test

โครงการวิจัยย่อยที่ 6 การสำรวจและเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันของพืชและผลผลิตพืชในประเทศไทย (12 การทดลอง)

การทดลองที่ 1 การสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas corrugata* ในประเทศไทย

(ชลธิชา รักใคร่, 2565 - 2567)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การรวบรวมข้อมูลเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas corrugata*

สืบค้นรวบรวมข้อมูลเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas corrugata* เช่น รายละเอียดของเชื้อ อนุกรมวิธาน ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง รูปร่างลักษณะ การเข้าทำลาย พืชอาศัย การแพร่ระบาดพร้อมรูปภาพประกอบเป็นต้น จากทั้งในและต่างประเทศ ฐานข้อมูล เอกสารวิชาการ วารสาร รายงานการประชุม สัมมนาทางวิชาการและหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้อง

2. การสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas corrugate*

ทำการสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรียตามมาตรฐาน ISPMs (International Standard for Phytosanitary Measures) ดำเนินการสำรวจและเฝ้าระวังตามมาตรฐาน ISPMs ฉบับที่ 6 (Surveillance) ในแปลงปลูกพริกและมะเขือเทศ โดยดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas corrugata* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด ตามขั้นตอนต่อไปนี้

2.1 จัดทำคู่มือการสำรวจและจัดทำฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ

-ทำการรวบรวมตัวอย่างอ้างอิงและรูปภาพของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas corrugata* เพื่อใช้ในการตรวจสอบอ้างอิงขณะทำการสำรวจและจัดทำข้อมูลศัตรูพืช ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพืชอาศัย อาการของโรค รูปภาพสีของโรค และรายละเอียดของศัตรูพืชชนิดอื่นที่คล้ายคลึงกับศัตรูพืชเป้าหมายและจัด ทำแบบฟอร์มการสำรวจเพื่อบันทึกข้อมูลชื่อเกษตรกร สถานที่ วันที่เก็บ ข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์

2.2 การสำรวจ

กำหนดพื้นที่ แหล่งปลูกพริกและมะเขือเทศในประเทศไทย ได้แก่ พื้นที่ภาคกลาง (จังหวัดปทุมธานี กาญจนบุรี ราชบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี ประจวบคีรีขันธ์) ภาคใต้ (ชุมพร นครศรีธรรมราช พังงา) ภาคตะวันออก (สระแก้ว จันทบุรี ตราด) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (นครราชสีมา บุรีรัมย์ ชัยภูมิ ขอนแก่น มหาสารคาม กาฬสินธุ์ สกลนคร อำนาจเจริญ ศรีสะเกษ มุกดาหาร เลย อุดรธานี หนองบัวลำภู หนองคาย บึงกาฬ) และภาคเหนือ (พิษณุโลก เพชรบูรณ์ พิจิตร ตาก แม่ฮ่องสอน น่าน แพร่ ลำปาง พะเยา ลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย)

กรมวิชาการเกษตร

วางแผนการสำรวจ ดำเนินการสำรวจตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 6 (Surveillance: ISPM No. 6) วางแผนการสำรวจในพื้นที่อย่างน้อย 10 แปลงต่อพื้นที่ แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบ สุ่มตรวจโรค 5 แถวต่อแปลง กำหนดการตรวจแบบแถวเว้นแถว

2.3 วิธีการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas corrugata* ในแปลง เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างห่อกระดาษและใส่ถุง นำกลับมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ

3. การแยกเชื้อและจัดจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช โดยการตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ การตรวจสอบโดยการนำตัวอย่างที่เก็บมาหรือสุ่มใบ กิ่ง และลำต้นของพริกและมะเขือเทศที่แสดงอาการคล้ายกับรูปภาพนำมาแยกเชื้อตามวิธีการดังต่อไปนี้

1) วิธี tissue transplanting

ตัดใบพืชเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2-3 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรอง ภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อแล้ววางพืชลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) และอาหารเลี้ยงเชื้อ King’s B Medium หรือบนอาหาร Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA) นำจานเลี้ยงเชื้อไปเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาตรวจสอบหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย และนำไปศึกษาคุณลักษณะเพื่อจำแนกชนิดต่อไป

2) วิธี dilution plate

ตัดใบพืชที่เป็นโรคเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมแล้วฆ่าเชื้อที่ผิว ด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2-3 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อ แล้วบดชิ้นส่วนในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาทำให้เจือจางเป็นลำดับจาก 10-1 ถึง 10-5 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) และอาหารเลี้ยงเชื้อ King’s B Medium หรือบนอาหาร Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA) นำจานเลี้ยงเชื้อไปเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาตรวจสอบหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย และนำไปศึกษาการจำแนกชนิดต่อไป

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

1) ทดสอบแกรม (gram reaction) โดยใช้สารละลายโปรแตสเซียม-ไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (3%KOH) ที่เตรียมใหม่ใช้ภายใน 2 สัปดาห์ หากตรวจพบเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) และนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2) ทดสอบ hypersensitivity reaction บนยาสูบ โดยการฉีดสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 108 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เข้าไปในใบยาสูบ (Nicotiana tabacum L.) บริเวณใต้ใบโดยฉีดเข้าเนื้อใบระหว่างเส้นใบ สังเกตลักษณะอาการเซลล์ตายตรงเนื้อใบหลังการฉีดเชื้อ 24-48 ชั่วโมง หากพบอาการเซลล์ตายแสดงว่าเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลทดังกล่าวเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช

3) ทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Physiological and biochemical properties) เช่น การใช้ยูเรีย การย่อยเจลาติน การย่อยเอสคูลิน และแป้ง reduce ไนเตรต ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นต้น

4) การตรวจสอบด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) และคัดเฉพาะโคโลนีที่สงสัยมายืนยันการพบเชื้อ *P. corrugata* โดยใช้ specific primer โดยใช้วิธี Polymerase chain reaction (PCR)

4. รวบรวมข้อมูลการสำรวจและการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ โดยทำการวิเคราะห์สถานภาพศัตรูพืช สรุปผล และจัดทำรายงานผลการวิจัยสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรีย *P. corrugata* ของพริกและมะเขือเทศ

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกรายละเอียดตำแหน่งของแปลงปลูกพริกและมะเขือเทศที่ทำการสำรวจ/เก็บตัวอย่าง
2. บันทึกข้อมูลจำนวนแปลง และจำนวนตัวอย่างที่ทำการสำรวจ/เก็บตัวอย่าง
3. บันทึกข้อมูลชนิดพืช ขนาดพื้นที่ปลูก ระยะการเจริญเติบโตของพืช และสภาพแวดล้อมอื่น ๆ
4. บันทึกลักษณะอาการการเกิดโรค ส่วนของพืชที่พบอาการของโรค ประเมินความรุนแรงของโรค และการแพร่กระจายในพื้นที่
5. บันทึกข้อมูลชนิดของเชื้อสาเหตุโรคพืช และลักษณะเชื้อสาเหตุที่ตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ

การทดลองที่ 2 การสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas vesicatoria* ในประเทศไทย

(ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, 2565 - 2567)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การรวบรวมข้อมูลเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas vesicatoria*

สืบค้นรวบรวมข้อมูลเชื้อแบคทีเรีย *X. vesicatoria* เช่น อนุกรมวิธาน พืชอาศัย การเกิดโรค เป็นต้น จากทั้งในและต่างประเทศ ฐานข้อมูล จาก เอกสารวิชาการ วารสาร รายงานการประชุม สัมมนาทางวิชาการและหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้อง

2. การสำรวจและเฝ้าระวังตามมาตรฐาน ISPMs (International Standard for Phytosanitary Measures) ดำเนินการสำรวจและเฝ้าระวังตามมาตรฐาน ISPMs ฉบับที่ 6 (Surveillance) ในแปลงปลูกพริกและมะเขือเทศ โดยดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลแบคทีเรีย *X. vesicatoria* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด ตามขั้นตอนต่อไปนี้

2.1 จัดทำคู่มือการสำรวจ โดยการรวบรวมตัวอย่างอ้างอิงและรูปภาพของโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย *X. vesicatoria* เพื่อใช้ในการตรวจสอบอ้างอิงขณะทำการสำรวจและจัดทำข้อมูลศัตรูพืช ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพืชอาศัย อาการของโรค รูปภาพสีของโรค และรายละเอียดของศัตรูพืชชนิดอื่นที่คล้ายคลึงกับศัตรูพืชเป้าหมาย

2.2 จัดทำฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ ได้แก่ ชื่อที่อยู่ที่ตั้งของแปลง วันที่สำรวจ ตำแหน่งพิกัดภูมิศาสตร์ (พิกัด GPS) เป็นต้น

2.3 การสำรวจ กำหนดพื้นที่แหล่งปลูกพริกและมะเขือเทศที่สำคัญในประเทศไทย ในเขตภาคเหนือ เชียงราย เชียงใหม่ น่าน ลำพูน และ ลำปาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดศรีสะเกษ ชัยภูมิ หนองคาย ขอนแก่น นครราชสีมา และสกลนคร เป็นต้น วางแผนการสำรวจในพื้นที่อย่างน้อย 10 แปลงต่อพื้นที่ แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบ สุ่มตรวจโรค 5 แถวต่อแปลง กำหนดการตรวจแบบแถวเว้นแถว

กรมวิชาการเกษตร

2.4 วิธีการตรวจแบคทีเรีย *X. vesicatoria* ในแปลง เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างห่อกระดาษและใส่ถุง นำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ

3. การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ

3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชและเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างกลับมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ โดยตัดส่วนของพืชบริเวณรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคเป็นชิ้นเล็ก ๆ แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วนำมาบดในน้ำกลั่น และแยกเชื้อบนอาหาร PSA หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกเก็บเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนี กลมนูน ขอบเรียบ ผิวเป็นมันวาวสีเหลือง และทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อกลีเซอรอล 15% และ 50% ไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2 ทดสอบการเกิดโรค (Pathogenicity test)

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่าง มาทดสอบการเกิดโรคกับพริกและมะเขือเทศ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 108 CFU/ml พ่นเชื้อแบคทีเรียบนพืชทดสอบแล้วใช้ถุงพลาสติกคลุมไว้ให้มีความชื้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงเปิดถุงออก และสังเกตอาการต้นพืชเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นด้วยน้ำเปล่า และพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch’s postulation)

3.3 ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ

ทำการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียบางประการตามวิธีการของ Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria Third Edition (Schaad *et al.,* 2001)

3.4 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR

ตรวจสอบเชื้อโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR ตามรายงานของ Koenraadit *et al.* (2009) โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 100 ng/µl, One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK)

4. รวบรวมข้อมูลการสำรวจและการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ โดยทำการวิเคราะห์สถานภาพศัตรูพืช สรุปผล และจัดทำรายงานผลการวิจัยสำรวจและเฝ้าระวังแบคทีเรีย *X. vesicatoria* ของพริกและมะเขือเทศ

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกรายละเอียดตำแหน่งของแปลงปลูกพริกและมะเขือเทศที่ทำการสำรวจ/เก็บตัวอย่าง

กรมวิชาการเกษตร

2. บันทึกข้อมูลจำนวนแปลง และจำนวนตัวอย่างที่ทำการสำรวจ/เก็บตัวอย่าง

3. บันทึกข้อมูลชนิดพืช ขนาดพื้นที่ปลูก ระยะการเจริญเติบโตของพืช และสภาพแวดล้อมอื่น ๆ

4. บันทึกลักษณะอาการการเกิดโรค ส่วนของพืชที่พบอาการของโรค ประเมินความรุนแรงของโรค และการแพร่กระจายในพื้นที่

5.บันทึกข้อมูลชนิดของเชื้อสาเหตุโรคพืช และลักษณะเชื้อสาเหตุที่ตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ

การทดลองที่ 3 การสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas gardneri* ในประเทศไทย

(วันเพ็ญ ศรีชาติ, 2565 - 2567)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การรวบรวมข้อมูลเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas gardneri*

สืบค้นรวบรวมข้อมูลเชื้อแบคทีเรีย *X. gardneri* เช่น อนุกรมวิธาน พืชอาศัย การเกิดโรค เป็นต้น จากทั้งในและต่างประเทศ ฐานข้อมูล จากเอกสารวิชาการ วารสาร รายงานการประชุม สัมมนาทางวิชาการและหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้อง

2. การสำรวจและเฝ้าระวังตามมาตรฐาน ISPMs (International Standard for Phytosanitary Measures) ดำเนินการสำรวจและเฝ้าระวังตามมาตรฐาน ISPMs ฉบับที่ 6 (Surveillance) ในแปลงปลูกพริกและมะเขือเทศ โดยดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลแบคทีเรีย *X. gardneri* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด ตามขั้นตอนต่อไปนี้

2.1 จัดทำคู่มือการสำรวจ โดยการรวบรวมตัวอย่างอ้างอิงและรูปภาพของโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย *X. gardneri* เพื่อใช้ในการตรวจสอบอ้างอิงขณะทำการสำรวจและจัดทำข้อมูลศัตรูพืช ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพืชอาศัย อาการของโรค รูปภาพสีของโรค และรายละเอียดของศัตรูพืชชนิดอื่นที่คล้ายคลึงกับศัตรูพืชเป้าหมาย

2.2 จัดทำฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ ได้แก่ ชื่อที่อยู่ที่ตั้งของแปลง วันที่สำรวจ ตำแหน่งพิกัดภูมิศาสตร์ (พิกัด GPS) เป็นต้น

2.3 การสำรวจ กำหนดพื้นที่แหล่งปลูกพริกและมะเขือเทศที่สำคัญในประเทศไทย ในเขตภาคเหนือ เชียงราย เชียงใหม่ น่าน ลำพูน และ ลำปาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดศรีสะเกษ ชัยภูมิ หนองคาย ขอนแก่น นครราชสีมา และสกลนคร เป็นต้น วางแผนการสำรวจในพื้นที่อย่างน้อย 10 แปลงต่อพื้นที่ แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบ สุ่มตรวจโรค 5 แถวต่อแปลง กำหนดการตรวจแบบแถวเว้นแถว

2.4 วิธีการตรวจแบคทีเรีย *X. gardneri* ในแปลง เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างห่อกระดาษและใส่ถุง นำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ

3. การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ

3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชและเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างกลับมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ โดยตัดส่วนของพืชบริเวณรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคเป็นชิ้นเล็ก ๆ แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น

กรมวิชาการเกษตร

ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วนำมาบดในน้ำกลั่น และแยกเชื้อบนอาหาร PSA หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกเก็บเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนี กลมนูน ขอบเรียบ ผิวเป็นมันวาวสีเหลือง และทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อกลีเซอรอล 15% และ 50% ไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2 ทดสอบการเกิดโรค (Pathogenicity test)

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่าง มาทดสอบการเกิดโรคกับพริกและมะเขือเทศ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D. 600 nm เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 108 CFU/ml พ่นเชื้อแบคทีเรียบนพืชทดสอบแล้วใช้ถุงพลาสติกคลุมไว้ให้มีความชื้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงเปิดถุงออก และสังเกตอาการต้นพืชเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นด้วยน้ำเปล่า และพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch’s postulation)

3.3 ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ

ทำการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียบางประการตามวิธีการของ Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria Third Edition (Schaad *et al*., 2001)

3.4 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR

ตรวจสอบเชื้อโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR ตามรายงานของ Koenraadit *et al*. (2009) โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 100 ng/μl, One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 μM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH,Germany) ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK)

4. รวบรวมข้อมูลการสำรวจและการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ โดยทำการวิเคราะห์สถานภาพศัตรูพืช สรุปผล และจัดทำรายงานผลการวิจัยสำรวจและเฝ้าระวังแบคทีเรีย *X. gardneri* ของพริกและมะเขือเทศ

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกรายละเอียดตำแหน่งของแปลงปลูกพริกและมะเขือเทศที่ทำการสำรวจ/เก็บตัวอย่าง
2. บันทึกข้อมูลจำนวนแปลง และจำนวนตัวอย่างที่ทำการสำรวจ/เก็บตัวอย่าง
3. บันทึกข้อมูลชนิดพืช ขนาดพื้นที่ปลูก ระยะการเจริญเติบโตของพืช และสภาพแวดล้อมอื่น ๆ
4. บันทึกลักษณะอาการการเกิดโรค ส่วนของพืชที่พบอาการของโรค ประเมินความรุนแรงของโรค และการแพร่กระจายในพื้นที่
5. บันทึกข้อมูลชนิดของเชื้อสาเหตุโรคพืช และลักษณะเชื้อสาเหตุที่ตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 4 การสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas perforans* ในประเทศไทย

(ทิพวรรณ กันหาญาติ, 2565 - 2567)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การรวบรวมข้อมูลเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas perforans*

สืบค้นรวบรวมข้อมูลเชื้อแบคทีเรีย *X. perforans* เช่น อนุกรมวิธาน พืชอาศัย การเกิดโรค เป็นต้น จากทั้งในและต่างประเทศ ฐานข้อมูล จาก เอกสารวิชาการ วารสาร รายงานการประชุม สัมมนาทางวิชาการและหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้อง

2. การสำรวจและเฝ้าระวังตามมาตรฐาน ISPMs (International Standard for Phytosanitary Measures) ดำเนินการสำรวจและเฝ้าระวังตามมาตรฐาน ISPMs ฉบับที่ 6 (Surveillance) ในแปลงปลูกพริกและมะเขือเทศ โดยดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลแบคทีเรีย *X. perforans* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด ตามขั้นตอนต่อไปนี้

2.1 จัดทำคู่มือการสำรวจ โดยการรวบรวมตัวอย่างอ้างอิงและรูปภาพของโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย *X. perforans* เพื่อใช้ในการตรวจสอบอ้างอิงขณะทำการสำรวจและจัดทำข้อมูลศัตรูพืช ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพืชอาศัย อาการของโรค รูปภาพสีของโรค และรายละเอียดของศัตรูพืชชนิดอื่นที่คล้ายคลึงกับศัตรูพืชเป้าหมาย

2.2 จัดทำฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ ได้แก่ ชื่อที่อยู่ที่ตั้งของแปลง วันที่สำรวจ ตำแหน่งพิกัดภูมิศาสตร์ (พิกัด GPS) เป็นต้น

2.3 การสำรวจ กำหนดพื้นที่แหล่งปลูกพริกและมะเขือเทศที่สำคัญในประเทศไทย ในเขตภาคเหนือ เชียงราย เชียงใหม่ น่าน ลำพูน และ ลำปาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดศรีสะเกษ ชัยภูมิ หนองคาย ขอนแก่น นครราชสีมา และสกลนคร เป็นต้น วางแผนการสำรวจในพื้นที่อย่างน้อย 10 แปลงต่อพื้นที่ แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบ สุ่มตรวจโรค 5 แถวต่อแปลง กำหนดการตรวจแบบแถวเว้นแถว

2.4 วิธีการตรวจแบคทีเรีย *X. perforans* ในแปลง เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างห่อกระดาษและใส่ถุง นำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ

3. การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ

3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชและเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างกลับมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ โดยตัดส่วนของพืชบริเวณรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคเป็นชิ้นเล็ก ๆ แต่ละชิ้นตัวอย่างนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แล้วนำมาบดในน้ำกลั่น และแยกเชื้อบนอาหาร PSA หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกเก็บเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนี กลมนูน ขอบเรียบ ผิวเป็นมันวาวสีเหลือง และทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อกลีเซอรอล 15% และ 50% ไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2 ทดสอบการเกิดโรค (Pathogenicity test)

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่าง มาทดสอบการเกิดโรคกับพริกและมะเขือเทศ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D. 600 nm เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 108 CFU/ml พ่นเชื้อแบคทีเรียบนพืชทดสอบแล้วใช้ถุงพลาสติกคลุมไว้ให้มีความชื้นเป็นเวลา 48

กรมวิชาการเกษตร

ชั่วโมง จึงเปิดถุงออก และสังเกตอาการต้นพืชเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นด้วยน้ำเปล่า และพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch's postulation)

3.3 ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อ

ทำการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียบางประการตามวิธีการของ Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria Third Edition (Schaad *et al*., 2001)

3.4 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR

ตรวจสอบเชื้อโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR ตามรายงานของ Koenraadit *et al*. (2009) โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 100 ng/µl, One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 µM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK)

4. รวบรวมข้อมูลการสำรวจและการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ โดยทำการวิเคราะห์สถานภาพศัตรูพืช สรุปผล และจัดทำรายงานผลการวิจัยสำรวจและเฝ้าระวังแบคทีเรีย *X. perforans* ของพริกและมะเขือเทศ

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกรายละเอียดตำแหน่งของแปลงปลูกพริกและมะเขือเทศที่ทำการสำรวจ/เก็บตัวอย่าง
2. บันทึกข้อมูลจำนวนแปลง และจำนวนตัวอย่างที่ทำการสำรวจ/เก็บตัวอย่าง
3. บันทึกข้อมูลชนิดพืช ขนาดพื้นที่ปลูก ระยะการเจริญเติบโตของพืช และสภาพแวดล้อมอื่น ๆ
4. บันทึกลักษณะอาการการเกิดโรค ส่วนของพืชที่พบอาการของโรค ประเมินความรุนแรงของโรค และการแพร่กระจายในพื้นที่
5. บันทึกข้อมูลชนิดของเชื้อสาเหตุโรคพืช และลักษณะเชื้อสาเหตุที่ตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 5 การสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อรา *Pseudocercospora angolensis* ในประเทศไทย

(วานิช คำพานิช, 2565 - 2567)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การรวบรวมข้อมูลเชื้อรา *Pseudocercospora angolensis*

สืบค้นรวบรวมข้อมูลเชื้อรา *P. angolensis* เช่น รายละเอียดของเชื้อ อนุกรมวิธาน ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง รูปร่างลักษณะ การเข้าทำลาย พืชอาศัย การแพร่ระบาดพร้อมรูปภาพประกอบเป็นต้น จากทั้งในและต่างประเทศ ฐานข้อมูล จาก เอกสารวิชาการ วารสาร รายงานการประชุม สัมมนาทางวิชาการและหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้อง

2. การสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อรา *Pseudocercospora angolensis*

ทำการสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อรา *P. angolensis* ตามมาตรฐาน ISPMs (International Standard for Phytosanitary Measures) ดำเนินการสำรวจและเฝ้าระวังตามมาตรฐาน ISPMs ฉบับที่ 6 (Surveillance)

ในแปลงปลูกพืชวงศ์ส้ม โดยดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลเชื้อรา *P. angolensis* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด ตามขั้นตอนต่อไปนี้

2.1 จัดทำคู่มือการสำรวจและจัดทำฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ

ทำการรวบรวมตัวอย่างอ้างอิงและรูปภาพของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. angolensis* เพื่อใช้ในการตรวจสอบอ้างอิงขณะทำการสำรวจและจัดทำข้อมูลศัตรูพืช ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพืชอาศัย อาการของโรค รูปภาพสีของโรค และรายละเอียดของศัตรูพืชชนิดอื่นที่คล้ายคลึงกับศัตรูพืชเป้าหมาย และจัดทำแบบฟอร์มการสำรวจ เพื่อบันทึกข้อมูลชื่อเกษตรกร สถานที่ วันที่เก็บ ข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์

2.2 การสำรวจ

กำหนดพื้นที่ แหล่งปลูกพืชวงศ์ส้ม เช่น ส้มเขียวหวาน ส้มโอ ส้มประดับ มะกรูด มะนาว ในประเทศไทย เช่น ภาคกลาง (กรุงเทพฯ ปทุมธานี นนทบุรี ชัยนาท นครปฐม สมุทรสงคราม ลพบุรี) ภาคเหนือ (กำแพงเพชร พิจิตร พิษณุโลก เพชรบูรณ์ น่าน ลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (นครราชสีมา เลย ศรีสะเกษ อุดรธานี หนองคาย) ภาคตะวันออก (ชลบุรี ระยอง ปราจีนบุรี จันทบุรี ตราด) และภาคใต้ (ชุมพร นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ระนอง พังงา สตูล พัทลุง สงขลา)

วางแผนการสำรวจ ทำการแบบเฉพาะเจาะจง (Specific survey) ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืชฉบับที่ 6 (Surveillance: ISPM No. 6) โดยทำการสำรวจแบบสืบพบ (Detection survey) เพื่อสืบค้นหาศัตรูพืชเป้าหมาย สำรวจในพื้นที่อย่างน้อย 10 แปลงต่อพื้นที่ แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบ

2.3 วิธีการตรวจเชื้อรา *P. angolensis* ในแปลง เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างห่อกระดาษและใส่ถุง นำกลับมาตรวจหาเชื้อในห้องปฏิบัติการ

3. การตรวจสอบและจำแนกชนิดของเชื้อราที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง

3.1 วิธีการตรวจเชื้อรา *P. angolensis*

โดยจัดทำรูปภาพลักษณะอาการของโรคทุกระยะของพืชจัดทำเป็นคู่มือในการสำรวจเมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือ และบันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคบนใบ บนผล ที่แสดงอาการคล้ายคู่มือการสำรวจ รวมทั้งสุ่มเก็บตัวอย่างพืชปกติมาตรวจสอบเชื้อราและจัดจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ

3.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

3.2.1 ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนใบและส่วนของผลของพืชวงศ์ส้มภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 7-10 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือ conidium ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนใบและผลของพืช รวมทั้งตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปลักษณะเชื้อและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

3.2.2 แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ โดยวิธี Tissue transplanting ตามขั้นตอนดังนี้

นำส่วนของพืช เช่น ใบ หรือเปลือกผลพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้งแล้วนำไปเลี้ยงบน

กรมวิชาการเกษตร

อาหาร water agar (WA) และPotato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ ห้องปฏิบัติการ นาน 7-10 วัน หลังจากนั้นแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.3 การจำแนกชนิดเชื้อรา *P. angolensis*

3.3.1 ศึกษาลักษณะทางชีววิทยา เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ สรีรวิทยา รูปร่างลักษณะของเชื้อรา mount slide ด้วยน้ำ หรือ shear's solution และนำไปจำแนกชนิดของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound

3.3.2 หากตรวจพบตัวอย่างเชื้อราที่สงสัยหรือไม่สามารถจัดจำแนกโดยวิธีการทางสัณฐานวิทยาได้จึงทำการตรวจยืนยัน โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ลำดับเบส ITS1, ITS2 และตำแหน่ง 5.8s ribosomal DNA ที่อยู่ใน GenBank เพื่อเปรียบเทียบ

4. สรุปผลการศึกษาสถานภาพของเชื้อรา *P. angolensis* โดยทำการสรุปผลการศึกษาสถานภาพของเชื้อราเพื่อนำไปใช้ในการจัดทำมาตรการเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกัน

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกรายละเอียดตำแหน่งของแปลงปลูกพืชวงศ์ส้มที่ทำการสำรวจ/เก็บตัวอย่าง
2. บันทึกข้อมูลจำนวนแปลง และจำนวนตัวอย่างที่ทำการสำรวจ/เก็บตัวอย่าง
3. บันทึกข้อมูลชนิดพืช ขนาดพื้นที่ปลูก ระยะการเจริญเติบโตของพืช และสภาพแวดล้อมอื่น ๆ
4. บันทึกลักษณะอาการการเกิดโรค ส่วนของพืชที่พบอาการของโรค ประเมินความรุนแรงของโรค และการแพร่กระจายในพื้นที่
5. บันทึกข้อมูลชนิดของเชื้อสาเหตุโรคพืชและลักษณะเชื้อสาเหตุที่ตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ

การทดลองที่ 6 การสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อรา *Verticillium albo-atrum* ในประเทศไทย

(ธิดาวรรณ ชมเดช, 2565 - 2567)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การรวบรวมข้อมูลเชื้อรา *Verticillium albo-atrum*

สืบค้นข้อมูลลักษณะของเชื้อรา *Verticillium albo-atrum* ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง และลักษณะอาการโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด พร้อมรูปภาพ

สืบค้นข้อมูลของพืชอาศัยของเชื้อรา *Verticillium albo-atrum* ได้แก่ ชนิดของพืชอาศัย ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ ความต้านทานและความอ่อนแอต่อโรค เป็นต้น

สืบค้นข้อมูลพริกและมะเขือเทศในประเทศไทย ได้แก่ พื้นที่ปลูก พันธุ์ปลูก

2. การสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อรา *Verticillium albo-atrum*

ทำการสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อรา *Verticillium albo-atrum* ตามมาตรฐาน ISPMs (International Standard for Phytosanitary Measures) ดำเนินการสำรวจและเฝ้าระวังตามมาตรฐาน ISPMs ฉบับที่ 6 (Surveillance) ในแปลงปลูกพืชวงศ์พริกและมะเขือเทศ โดยดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลเชื้อรา *Verticillium albo-atrum* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด ตามขั้นตอนต่อไปนี้

กรมวิชาการเกษตร

2.1 จัดทำคู่มือการสำรวจจัดทำฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ ทำการรวบรวมตัวอย่างอ้างอิงและรูปภาพของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Verticillium albo-atrum* เพื่อใช้ในการตรวจสอบอ้างอิงขณะทำการสำรวจและจัดทำข้อมูลศัตรูพืช ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพืชอาศัย อาการของโรค รูปภาพสีของโรค และรายละเอียดของศัตรูพืชชนิดอื่นที่คล้ายคลึงกับศัตรูพืชเป้าหมายและจัดทำแบบฟอร์มการสำรวจ เพื่อบันทึกข้อมูลชื่อเกษตรกร สถานที่ วันที่เก็บ ข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์

2.2 การสำรวจ

กำหนดพื้นที่ แหล่งปลูกพริกและมะเขือเทศในประเทศไทย เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (นครราชสีมา บุรีรัมย์ มหาสารคาม มุกดาหาร อุบลราชธานี ศรีสะเกษ ขอนแก่น กาฬสินธุ์ สกลนคร นครพนม อุดรธานี หนองบัวลำภู เลย หนองคาย บึงกาฬ เป็นต้น) ภาคเหนือ (เพชรบูรณ์ พิษณุโลก ตาก แม่ฮ่องสอน น่าน แพร่ ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย เป็นต้น) ภาคกลาง (ปทุมธานี นนทบุรี นครปฐม กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ราชบุรี เป็นต้น) ภาคตะวันออก (ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ตราด เป็นต้น) และภาคใต้ (สุราษฎร์ธานี สงขลา พัทลุง พังงา เป็นต้น)

วางแผนการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (Specific survey) ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืชฉบับที่ 6 (Surveillance: ISPM No. 6) โดยทำการสำรวจแบบสืบพบ (Detection survey) เพื่อสืบค้นหาศัตรูพืชเป้าหมาย สำรวจอย่างน้อย 10 แปลงต่อพื้นที่ แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบ สุ่มตรวจโรค 5 แถวต่อแปลง กำหนดการตรวจแบบแถวเว้นแถว

2.4 วิธีการตรวจเชื้อรา *Verticillium albo-atrum* ในแปลงปลูกพริกและมะเขือเทศ เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างห่อกระดาษและใส่ถุง นำกลับมาตรวจหาเชื้อในห้องปฏิบัติการ

3. การตรวจสอบและจำแนกชนิดของเชื้อราที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง

3.1 วิธีการตรวจเชื้อรา *Verticillium albo-atrum* โดยจัดทำรูปภาพลักษณะอาการของโรคทุกระยะของพืชจัดทำเป็นคู่มือในการสำรวจเมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือและบันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างโรคทุกต้นที่สุ่มที่พบต้นพริกและมะเขือเทศแสดงอาการคล้ายกับโรคเหี่ยวตามคู่มือการสำรวจ และสำหรับต้นปกติ สุ่มเก็บตัวอย่างมาตรวจหาเชื้อในห้องปฏิบัติการ จำนวน 10% โดยเก็บตัวอย่างใบและลำต้นของพริกและมะเขือเทศมาตรวจ ห่อกระดาษหนังสือพิมพ์ เขียนรายละเอียดกำกับ และนำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันผล

3.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

3.2.1 ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจาก จากชิ้นส่วนใบและตัดขวางลำต้นเพื่อดูการเข้าทำลายของเชื้อที่ใบและลำต้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณท่อน้ำและท่ออาหารภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 5-10 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือ conidium ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนใบและส่วนของท่อน้ำ ท่ออาหารให้บาง ๆ และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปลักษณะเชื้อและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

3.2.2 แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplanting โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้ว

กรมวิชาการเกษตร

นำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ ห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน หลังจากนั้นแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.3 การจำแนกชนิดเชื้อรา *Verticillium albo-atrum*

3.3.1 ศึกษาลักษณะทางชีววิทยา เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ สรีรวิทยา รูปร่างลักษณะของเชื้อรา mount slide ด้วยน้ำ หรือ shear's solution และนำไปจำแนกชนิดของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound

3.3.2 หากตรวจพบตัวอย่างเชื้อราที่สงสัยหรือไม่สามารถจัดจำแนกโดยวิธีการทางสัณฐานวิทยาได้ จึงทำการตรวจยืนยัน โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

4. สรุปผลการศึกษาสถานภาพของเชื้อรา *Verticillium albo-atrum* โดยทำการสรุปผลการศึกษาสถานภาพของเชื้อราเพื่อนำไปใช้ในการจัดทำมาตรการเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกัน

การบันทึกข้อมูล

เก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้ในรูป data sheet เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สถานภาพศัตรูพืช จัดทำรายงานผลการวิจัย รวบรวมบันทึกข้อมูลจากการเฝ้าระวังของเชื้อรา *Verticillium albo-atrum* ที่ทำการสำรวจในประเทศไทย ดังนี้

1. บันทึกรายละเอียดตำแหน่งของแปลงปลูกพริกและมะเขือเทศที่ทำการสำรวจ/เก็บตัวอย่าง
2. บันทึกข้อมูลจำนวนแปลง และจำนวนตัวอย่างที่ทำการสำรวจ/เก็บตัวอย่าง
3. บันทึกข้อมูลชนิดพืช ขนาดพื้นที่ปลูก ระยะการเจริญเติบโตของพืช และสภาพแวดล้อมอื่น ๆ
4. บันทึกลักษณะอาการการเกิดโรค ส่วนของพืชที่พบอาการของโรค ประเมินความรุนแรงของโรค และการแพร่กระจายในพื้นที่
5. บันทึกข้อมูลชนิดของเชื้อสาเหตุโรคพืช และลักษณะเชื้อสาเหตุที่ตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ

การทดลองที่ 7 การสำรวจและเฝ้าระวังไส้เดือนฝอย *Ditylenchus destructor* ในประเทศไทย

(ไตรเดช ข่ายทอง, 2565 - 2567)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การรวบรวมข้อมูลไส้เดือนฝอย *Ditylenchus destructor* โดยการสืบค้นข้อมูลลักษณะของไส้เดือนฝอย *D. destructor* ได้แก่ รายละเอียดของไส้เดือนฝอย ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง รูปร่างลักษณะ การเข้าทำลายพืชอาศัย การแพร่ระบาด จากทั้งในและต่างประเทศ ฐานข้อมูล เอกสารวิชาการ วารสาร รายงานการประชุมสัมมนาทางวิชาการและหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้อง

2. การสำรวจและเฝ้าระวัง *Ditylenchus destructor*

2.1 จัดทำคู่มือศัตรูพืชและแบบฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ

- ทำการรวบรวมข้อมูลอ้างอิง ลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ พืชอาศัย สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม แหล่งที่พบ ลักษณะอาการพืชที่ถูกไส้เดือนฝอย *D. destructor* ทำลาย พร้อมรูปภาพสีเพื่อใช้ในการตรวจสอบอาการที่พบในแปลง ตลอดจนรายละเอียดของอาการที่มีลักษณะคล้ายกับอาการของพืชเป้าหมาย และข้อมูลอื่นที่เกี่ยวข้อง

กรมวิชาการเกษตร

- จัดทำแบบฟอร์มการสำรวจเพื่อบันทึกข้อมูล อาทิ ชื่อเกษตรกร สถานที่ วันที่เก็บ ข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์

2.2 การสำรวจ

- กำหนดพื้นที่ที่เป็นแหล่งปลูกมันฝรั่งและหอมหัวใหญ่ เช่น เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน อุตรดิตถ์ ตาก สกลนคร นครพนม นครสวรรค์ กาญจนบุรี เป็นต้น

- วางแผนการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (Specific survey) ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืชฉบับที่ 6 (Surveillance: ISPM No. 6) โดยทำการสำรวจแบบสืบพบ (Detection survey) เพื่อสืบค้นหาศัตรูพืชเป้าหมายอย่างน้อย 10 แปลงต่อพื้นที่ แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างดินและพืชแบบเป็นระบบ

2.3 วิธีการตรวจไส้เดือนฝอยในแปลง เมื่อออกสำรวจให้สังเกตลักษณะอาการเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง ลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป สุ่มเก็บตัวอย่างดินอย่างน้อย 30 จุด/แปลง หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แปลง รวมทั้งเก็บตัวอย่างหัวมันฝรั่งและหอมหัวใหญ่แปลงละ 50-100 หัว ห่อกระดาษหนังสือพิมพ์ เขียนรายละเอียดกำกับ นำกลับมาแยก ตรวจสอบและจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ

3. การตรวจสอบและจำแนกไส้เดือนฝอย *D. destructor* ในห้องปฏิบัติการ

3.1 การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดิน โดยนำดินแต่ละตัวอย่างมาผสมให้เข้ากัน ชั่งน้ำหนัก 250 กรัม แยกไส้เดือนฝอยด้วยวิธี decanting and sieving (Cobb, 1917) ตามด้วย Baermann’s tray เทตัวอย่างน้ำที่ได้จาก tray ซึ่งมีไส้เดือนฝอยอยู่ใส่ขวดแก้วใสปิดฝา ทิ้งให้ไส้เดือนฝอยตกตะกอนที่ก้นขวดอย่างน้อย 6 ชั่วโมง ดูดน้ำที่เกินทิ้งให้เหลือประมาณ 20 มิลลิลิตร นำน้ำที่ได้ (nematode suspension) ไปตรวจหาไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่สนใจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ

3.2 การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างพืช

- นำหัวมันฝรั่งและหอมหัวใหญ่ ที่แสดงอาการผิดปกติและ/หรือไม่แสดงอาการมาล้างให้สะอาดผึ่งให้แห้ง แล้วแยกไส้เดือนฝอยจากหัวมันฝรั่งด้วยวิธี maceration สำหรับหัวหอมให้แช่บีกเกอร์ที่มีน้ำสะอาด 1 คืน เก็บตัวอย่าง nematode suspension ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอเพื่อหาไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ต้องการศึกษา

- นำอย่างรากพืชจากแปลงพืชที่สงสัยมาล้างให้สะอาดและแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากด้วยเครื่อง ultrasonic ความถี่อย่างน้อย 40 กิโลเฮิร์ท (kHz.) เก็บตัวอย่าง nematode suspension ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอเพื่อหาไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ต้องการศึกษา

3.3 การทำสไลด์ถาวร โดยไปเปตไส้เดือนฝอยที่ต้องการใส่ staining block หรือ embryo dish ขนาด 30 มม. ที่มีน้ำสะอาดอยู่ ประมาณ 400 ไมโครลิตร เมื่อได้จำนวน life specimens ที่ต้องการแล้ว ไปเปตน้ำส่วนเกินออกให้เหลือปริมาตรไม่เกิน 1,000 ไมโครลิตร แล้วจึงย้าย embryo dish ไปวางใน water bath ที่มีน้ำร้อนอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ระวังไม่ให้น้ำใน water bath เข้าไปใน embryo dish และไม่ให้น้ำภายใน embryo dish แห้ง จากนั้นจึงนำตัวอย่างไส้เดือนฝอยที่ได้ไป fix ด้วยวิธีของ De Grisse (1969) และทำสไลด์ถาวรด้วยวิธีประยุกต์จาก Cobb’s method ระบุชนิดไส้เดือนฝอย จำนวน specimen วันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง พืชอาศัย และชื่อผู้เก็บ บนสไลด์

กรมวิชาการเกษตร

3.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา นำสไลด์ถาวรที่ได้มาตรวจดูลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Olympus BX53 DIC Nomarski

3.5 ยืนยันชนิด (species level) ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ศึกษาด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) และ sequencing

4. สรุปผลการศึกษาสถานภาพของไส้เดือนฝอย *D. destructor* เพื่อนำไปใช้ในการจัดทำมาตรการเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกัน

การบันทึกข้อมูล

1. วัน เดือน ปีที่สำรวจ/เก็บตัวอย่าง พิกัดภูมิศาสตร์ ภาพถ่ายแปลง ขนาดพื้นที่ปลูก จำนวนแปลง จำนวนตัวอย่าง ผู้เก็บ
2. ภาพถ่ายพืชที่แสดงอาการผิดปกติ ระยะการเจริญเติบโตของพืช พืชข้างเคียง และสภาพแวดล้อมอื่นๆ ประวัติการเพาะปลูกและ/หรือเกษตรกรเจ้าของแปลง (ถ้ามี)
3. ถ่ายภาพลักษณะสัณฐานวิทยาที่สำคัญของไส้เดือนฝอย เช่น ลำตัวทั้งหมด ส่วนหัว กลางลำตัว หาง stylet ลักษณะและตำแหน่งอวัยวะเพศ ระบบสืบพันธุ์ cuticle และลักษณะสำคัญอื่นที่ใช้ในการจัดจำแนก และ morphometric

การทดลองที่ 8 การสำรวจและเฝ้าระวังไส้เดือนฝอย *Ditylenchus dipsaci* ในประเทศไทย

(ธิติยา ชยาภัคพัฒนา, 2565-2567)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การรวบรวมข้อมูลไส้เดือนฝอย *Ditylenchus dipsaci* สืบค้นข้อมูลลักษณะของไส้เดือนฝอย *D. dipsaci* ได้แก่ รายละเอียดของไส้เดือนฝอย ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง รูปร่างลักษณะ การเข้าทำลาย พืชอาศัย การแพร่ระบาด จากทั้งในและต่างประเทศ ฐานข้อมูล เอกสารวิชาการ วารสาร รายงานการประชุม สัมมนาทางวิชาการและหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้อง

2. การสำรวจและเฝ้าระวังไส้เดือนฝอย *Ditylenchus dipsaci*

2.1 จัดทำคู่มือศัตรูพืชและจัดทำฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ โดยรวบรวมข้อมูลอ้างอิง ข้อมูลลักษณะไส้เดือนฝอย ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชนิดของพืชอาศัย สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม แหล่งที่พบ ลักษณะอาการที่เกิดจากไส้เดือนฝอย *D. dipsaci* พร้อมรูปภาพสีเพื่อใช้ในการ ตรวจสอบอาการที่พบในแปลง ตลอดจนรายละเอียดของอาการที่มีลักษณะคล้ายกับอาการของพืชเป้าหมาย และรูปภาพ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย และจัดทำแบบฟอร์มการสำรวจ เพื่อบันทึกข้อมูลชื่อเกษตรกร สถานที่ วันที่เก็บข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์

2.2 การสำรวจ

กำหนดพื้นที่ แหล่งปลูกกระเทียม และหอมหัวใหญ่ ในประเทศไทย เช่น จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง แม่ฮ่องสอน ตาก พะเยา แพร่ น่าน นครสวรรค์ ศรีสะเกษ กาญจนบุรี เป็นต้น และวางแผนการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (Specific survey) ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการ

กรมวิชาการเกษตร

สุขอนามัยพืชฉบับที่ 6 (Surveillance: ISPM No. 6) โดยทำการสำรวจแบบสืบพบ (Detection survey) เพื่อสืบค้นหาศัตรูพืชเป้าหมาย โดยการสำรวจอย่างน้อย 10 แปลงต่อพื้นที่ แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างดินและพืชแบบเป็นระบบ

2.3 วิธีการตรวจไส้เดือนฝอย *D. dipsaci* ในแปลงปลูกกระเทียมและหอมหัวใหญ่ เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป สุ่มเก็บตัวอย่าง อย่างน้อย 30 จุด ต่อแปลง หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แปลง รวมทั้งเก็บตัวอย่างหัวกระเทียมและหอมหัวใหญ่ 50-100 หัวต่อแปลง ห่อกระดาษหนังสือพิมพ์ เขียนรายละเอียดกำกับ นำกลับมาแยก ตรวจสอบและจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ

3. การตรวจสอบและจำแนกไส้เดือนฝอย *D. disaci* ในห้องปฏิบัติการ

การแยกไส้เดือนฝอยทำสองส่วนโดยแยกจากดินและจากพืช (กระเทียม และหอมหัวใหญ่) ตามวิธีใน EPPO Standard PM 7/119 (1) Nematode extraction (EPPO ,2013) ดังนี้

3.1 แยกไส้เดือนฝอยจากดิน โดยวิธี Cobb's sieving and Baermann funnel หรือ Oostenbrink dish ตามขั้นตอนโดยย่อดังนี้ นำตัวอย่างดิน 250กรัม ใส่ในภาชนะพลาสติกเทน้ำลงไป ขยี้ดินให้แตก เพื่อให้ไส้เดือนฝอยแยกตัวหลุดออกมาจากดินมากที่สุด ทิ้งไว้ประมาณ 30 วินาที เทน้ำลงในตะแกรง (sieve) ขนาด 18 - 60 mesh (ความยาว 1 นิ้วมี 18 - 60 ช่อง) โดยมีภาชนะรองรับ เศษพืช เศษไม้ จะติดอยู่บนตะแกรง นำน้ำที่ผ่านตะแกรงแรกแล้ว มาเทลงในตะแกรงขนาด 200 mesh นำน้ำที่ผ่านตะแกรงขนาด 200 mesh เทลงในตะแกรงขนาด 325 - 400 mesh โดยไม่ต้องมีภาชนะรองรับ เนื่องจากไส้เดือนฝอยเกือบทุกชนิดจะติดอยู่บนตะแกรงนี้ ใช้ฝอยน้ำฉีดเบาๆให้ทั่วตะแกรงเพื่อให้ตะกอนดินหลุดลงมา แล้วเก็บน้ำจากตะแกรงนี้กรองผ่านกระดาษกรองโดยใช้วิธี Oostenbrink dish วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 24 - 48 ชั่วโมง ไส้เดือนฝอยจะว่ายน้ำไชผ่านกระดาษกรองมาอยู่ในน้ำ นำน้ำที่ได้ไปตรวจสอบและจัดจำแนกชนิดด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง

3.2 แยกไส้เดือนฝอยจากรากและหัวกระเทียม หรือหอมหัวใหญ่ โดยการนำตัวอย่างกระเทียมหรือหอมหัวใหญ่ ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้ววางลงตะแกรงที่มีกระดาษกรองวางอยู่ด้านบนโดยวิธี Baermann funnel หรือ Oostenbrink dish วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 24 - 48 ชั่วโมง ไส้เดือนฝอยจะว่ายน้ำไชผ่านกระดาษกรองมาอยู่ในน้ำ จากนั้นเก็บน้ำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง

4. การวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง โดยเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยที่พบกับ คู่มือการจำแนกสกุลของไส้เดือนฝอย Plant-parasitic nematodes ; A pictorial key to genera (Mai *et al*., 1996) และ Manual of agricultural nematology (Nickle (ed),1991 และหากสงสัยว่าเป็นไส้เดือนฝอย *Ditylenchus dipsaci* ก็เปรียบเทียบกับข้อมูลลักษณะทางสัณฐาน EPPO Standard PM 7/87 (2) *Ditylenchus destructor and Ditylenchus dipsaci* (EPPO,2017) และ DP 8-1. ISPM 27. (2016) Diagnostic protocols for regulated pests. DP 8: *Ditylenchus dipsaci* and *Ditylenchus destructor* และเอกสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

กรมวิชาการเกษตร

5.ศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลของไส้เดือนฝอยสกุล *D. dipsaci*

5.1 การสกัดดีเอ็นเอ ใช้วิธีการตาม Schizas *et al.,* 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ เขี่ยไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงบนหยด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 20 ไมโครลิตร บนสไลด์แก้ว ตัดตัวไส้เดือนฝอยออกเป็น 2-3 ท่อน โดยใช่ส่วนปลายของ pipette tip ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 500 ไมโครลิตร นำหลอดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที เติม proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดและบ่มที่ 55°C ใน water bath เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดใส่ใน heating block ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อหยุดการทำงานของ proteinase K ใส่ GeneReleaser® 20 ไมโครลิตรลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟ เป็นเวลา 6 นาที ถ้าเตาไมโครเวฟเป็นชนิด 750 วัตต์ (สามารถปรับเวลาตามกำลังไฟของเตาไมโครเวฟให้ได้ 4,500 วัตต์-นาที ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสม)

5.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ในส่วน D2-D3 expansion region ของ 28s ribosomal RNA gene (rDNA) โดยใช้ forward primer D2A (5' - ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG -3') และ reverse primer D3B (5' - TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3') แล้วนำ เพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ (Kaplan *et al*., 2000; Subbotin *et al*., 2006) โดยสารที่ใช้ในปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1.0 U AmpliTaq® DNA Polymerase, 10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 50 mM KCL, 2.5 mM $MgCl_{2,}$ 200 uM dNTPs ,0.2 µM primers และ 1.0 µl DNA template เมื่อเตรียม master mix ใส่ หลอด PCR แล้วเติม DNA template ในหลอด PCR นำหลอด ดังกล่าวใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุ์กรรม (Thermocycle) จากนั้นตั้งอุณหภูมิและเวลาของขั้นตอนปฏิกิริยา PCR ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (ºC)	เวลา(นาที)	
1. Initial denaturation	94	1	
2. Denaturation	94	1	35 cycles
3. Annealing	55	1	
4. Extension	72	1	
5. Final extension	72	5	

เมื่อได้ PCR product ที่ดีสามารถนำมาทดสอบกับ SCAR primers ด้วยการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ในส่วน ITS region ประกอบด้วย ITS1, ITS2 และ 5.8S rDNA gene โดยใช้ primers เฉพาะชนิดของ *Ditylenchus dipsaci* ได้แก่ DdpS1 primer (5′-TGG CTG CGT TGA AGA GAA CT-3′) และ rDNA2 (5′-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3′) โดย *D. dipsaci* มีขนาด 517 bp และหรือ DdpS2 primer (5′-CGA TCA ACC AAA ACA CTA GGA ATT-3′) และ rDNA2 (5′-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3′) ซึ่ง *D. dipsaci* มีขนาด 707 bp เมื่อเตรียม master mix ใส่ หลอด PCR แล้วเติม DNA template ในหลอด PCR นำหลอด

กรมวิชาการเกษตร

ดังกล่าวใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุ์กรรม (Thermocycle) จากนั้นตั้งอุณหภูมิและเวลาของขั้นตอนปฏิกิริยา PCR ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา(นาที)	
1. Initial denaturation	94	1	
2. Denaturation	94	30s	40 cycles
3. Annealing	60	30s	
4. Extension	72	45s	
5. Final extension	72	10	

5.3 การทำอิเลกโทรโฟรีซีสแบบอะกาโรส เตรียมอะกาโรส 1.5% โดยชั่งอะกาโรส 1.5 กรัม ผสมกับ สารละลายบัฟเฟอร์ 0.5xTBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้สารละลายใส ตั้งไว้ให้เย็น แล้วเทอะกาโรสลงในชุด gel box ที่ปรับสมดุล และวางหวีไว้แล้ว เมื่อเจลแข็งตัว จึงดึงหวีออก แล้วนำเจลที่ได้ไปวางในแชมเบอร์ จากนั้นเทสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5xTBE ให้ท่วมแผ่นเจล นำ DNA ที่ได้ผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอ ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 จากนั้นหยอดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรลงในหลุมของเจลอะกาโรสในแชมเบอร์ เรียบร้อยแล้วจึงต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ นานประมาณ 40-50 นาที แล้วเจลอะกาโรสไปย้อมสี DNA แล้วนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่อง UV-transilluminator แล้วถ่ายภาพ

5.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ผลผลิตปฏิกิริยา PCR จาก D2-D3 expansion region และ ITS regions นำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA โดยตรง (direct sequencing) ทั้ง 2 ทิศทางโดยใช้ทั้ง forward และ reverse primers โดยทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR (PCR product) ที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วย Qiagen QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) หรือ ExoSAP-IT® For PCR Product Clean-Up (Affymetrix) โดยใช้วิธีการตามคำแนะนำที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ เตรียมตัวอย่างตามคำแนะนำและส่งตัวอย่างไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

5.5 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลของไส้เดือนฝอย *D. dipsaci* จาก Genbank

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกวัน เดือน ปี รายละเอียดตำแหน่งของแปลงปลูกกระเทียมและหอมหัวใหญ่ที่ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่าง
2. บันทึกข้อมูลจำนวนแปลง และจำนวนตัวอย่างที่ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่าง
3. บันทึกข้อมูลชนิดพืช ขนาดพื้นที่ปลูก ระยะการเจริญเติบโตของพืช และสภาพแวดล้อมอื่น ๆ พืชข้างเคียงประวัติการเพาะปลูก (ถ้ามี) เกษตรกรเจ้าของแปลง (ถ้ามี)
4. บันทึกถ่ายภาพลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ เช่น ลำตัวทั้งหมด ส่วนหัว กลางลำตัว หาง stylet ลักษณะและตำแหน่งอวัยวะเพศ ระบบสืบพันธุ์ cuticle เป็นต้น และลักษณะสำคัญอื่นที่ใช้ในการจัดจำแนก และ morphometric ในห้องปฏิบัติการ

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 9 การสำรวจและเฝ้าระวังแมลงวันผลไม้ *Bactrocera minax* (Enderlein) ในประเทศไทย

(ดนัย ชัยเรือนแก้ว, 2565-2567)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การรวบรวมข้อมูลแมลงวันผลไม้ *Bactrocera minax*

สืบค้นข้อมูลลักษณะของแมลงวันผลไม้ *B. minax* ศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกันพืชของประเทศไทย ได้แก่ รายละเอียดของแมลงวันผลไม้ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง รูปร่างลักษณะ การเข้าทำลาย พืชอาศัย การแพร่ระบาด พร้อมรูปภาพประกอบ

2. จัดทำรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ

รวบรวมข้อมูลลักษณะของแมลงวันผลไม้ พร้อมรูปภาพสีเพื่อใช้เป็นคู่มือในการตรวจสอบ จัดทำแบบฟอร์มการสำรวจ เพื่อบันทึกข้อมูล เช่น ชื่อพืช ชื่อเกษตรกรเจ้าของแปลง สถานที่ วันที่สำรวจ ข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์ ข้อมูลการนำเข้าพืช ประเทศต้นทาง เป็นต้น

3. สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้

- กำหนดพื้นที่ วางแผนการสำรวจ โดยการสำรวจแบบกำหนดขอบเขตตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืชฉบับที่ 6 (Surveillance: ISPM No.6) และการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชกักกันตามเงื่อนไขประกาศกรมวิชาการเกษตร
- สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ในแปลงปลูกพืชทั่วทุกภาคของประเทศไทย ทั้งหมด 150 แปลง (ปีละ 50 แปลง) เลือกกลุ่มตัวอย่างแบบเจาะจง (Purposive sampling) โดยแบ่งเป็นการสำรวจในพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ ซึ่งเป็นพืชวงศ์ส้ม (Citrus) ได้แก่ มะกรูด(*C. hystrix*) 3 แปลง มะนาว (*C. aurantifolia*) 69 แปลง ส้มโอ (*C. maxima*) 30 แปลง ส้มเกลี้ยง (*C. sinensis*) 3 แปลง และส้มเขียวหวาน (*C. reticulata*) 45 แปลง โดยใช้จำนวนพื้นที่ปลูกมาเป็นเกณฑ์ในการตัดสินใจเลือกแปลงที่จะนำมาใช้ในการทดลอง
- สำรวจแมลงวันผลไม้โดยกับดักแมลงวันผลไม้ที่มีสารล่อเป็นเหยื่อโปรตีนร่วมกับสารเมทธิลยูจีนอลผสมกับสารฆ่าแมลง malathion 57%EC
- ทำการเก็บกับดักในทุกเดือน บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง ชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพ บันทึกรายละเอียด เช่น ขนาด รูปร่างลักษณะและสีของแมลงวันผลไม้ก่อนนำตัวอย่างไป ตรวจจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง ตรวจดูลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก
- จัดเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้ในกล่องนำเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล

4. สรุปผลการศึกษาสถานภาพของแมลงวันผลไม้ ทำการสรุปผลการศึกษาสถานภาพของแมลงวันผลไม้ *B. minax* เพื่อนำไปใช้ในการจัดทำมาตรการเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกัน

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกรายละเอียดตำแหน่งของแปลงปลูกพืชที่ทำการสำรวจ/เก็บตัวอย่าง

กรมวิชาการเกษตร

2. บันทึกข้อมูลจำนวนแปลง และจำนวนตัวอย่างที่ทำการสำรวจ/เก็บตัวอย่าง
3. บันทึกข้อมูลชนิดพืช ขนาดพื้นที่ปลูก ระยะการเจริญเติบโตของพืช และสภาพแวดล้อมอื่น ๆ
4. บันทึกรายละเอียดบนป้ายชื่อตัวอย่าง เขียนรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ชื่อวิทยาศาสตร์ เพศ วันเดือนปี ชื่อผู้จำแนก สภาพภูมิอากาศ และพิกัดทางภูมิศาสตร์

การทดลองที่ 10 การสำรวจและเฝ้าระวังตั๊กแตนไผ่ *Ceracris kiangsu* Tsai (Acrididae, Othoptera) ในประเทศไทย (จารุวัตถ์ แต้กุล, 2565-2567)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การรวบรวมข้อมูลตั๊กแตนไผ่ *Ceracris kiangsu* Tsai

สืบค้นหาข้อมูล ศึกษารายละเอียดของศัตรูพืช ชื่อ วงจรชีวิต เขตการแพร่กระจาย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และแนวทางการวินิจฉัย รายละเอียดของพืชอาศัย โดยการสืบค้นข้อมูลทั้งในประเทศและต่างประเทศ

2. จัดทำรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ

จัดทำคู่มือการวินิจฉัยชนิดศัตรูพืชรูปภาพของศัตรูพืชและพืชอาศัยลักษณะการทำลาย สำหรับเจ้าหน้าที่และนักวิชาการที่เกี่ยวข้องรวบรวมข้อมูลลักษณะของตั๊กแตนไผ่ *Ceracris kiangsu* พร้อมรูปภาพสีเพื่อใช้เป็นคู่มือในการตรวจสอบ จัดทำแบบฟอร์มการสำรวจ เพื่อบันทึกข้อมูล เช่น ชื่อพืช ชื่อเกษตรกรเจ้าของแปลง สถานที่ วันที่สำรวจ ข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์ ข้อมูลการนำเข้าพืช ประเทศต้นทาง เป็นต้น

3. วางแผนการสำรวจ

กำหนดพื้นที่ที่ดำเนินการสำรวจ โดยสำรวจตัวอย่างแบบสุ่มในพื้นที่ปลูกพืชไร่ใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่ อ้อย ข้าวโพด ข้าวฝ่าง และพืชอาหารของตั๊กแตนไผ่ ได้แก่ ไผ่ และธัญพืช

โดยสำรวจจังหวัดละ 10 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ในแต่ละภาคที่มีการปลูกพืชเหล่านี้ ได้แก่จังหวัดเชียงราย น่าน พะเยา เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน แพร่ ลำพูน อุตรดิตถ์ พิษณุโลก สุโขทัย เพชรบูรณ์ พิจิตร กำแพงเพชร นครสวรรค์ ลพบุรี ชัยนาท อุทัยธานี สิงห์บุรี อ่างทอง สระบุรี พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี นครนายก ปทุมธานี นนทบุรี นครปฐม สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม หนองคาย นครพนม สกลนคร อุดรธานี หนองบัวลำภู เลย มุกดาหาร กาฬสินธุ์ ขอนแก่น อำนาจเจริญ ยโสธร ร้อยเอ็ด มหาสารคาม ชัยภูมิ นครราชสีมา บุรีรัมย์ สุรินทร์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี สระแก้ว ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ตราด ตาก กาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี

4. แนวทางการเก็บตัวอย่าง

การเดินสำรวจใช้สวิงจับแมลงและใช้มือเก็บตัวอย่าง หลังจากได้ตัวอย่างตั๊กแตนแล้ว ดำเนินการฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า (killing jar) ซึ่งบรรจุน้ำยาเอททิล อะซิเตด (ethyl acetate) หลังจากนั้นห่อตัวอย่างตั๊กแตนที่ตายแล้วด้วยกระดาษลอกลาย บิดหัวท้ายลักษณะคล้ายท็อฟฟี่ เก็บตัวอย่างลงกล่องพลาสติกใส่แมลง นำกล่องใส่

ตัวอย่างใส่ไว้ในกล่องรักษาความเย็นอีกชั้นเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเน่าเสียหาย หลังจากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รอเพื่อจัดรูปร่างและทำตัวอย่างแห้งต่อไป

การจัดรูปร่างตั๊กแตนเพื่อศึกษาด้านอนุกรมวิธานแมลง นำตัวอย่างตั๊กแตนจัดรูปร่าง บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) โดยจัดให้มีรูปร่างเหมือนลักษณะในธรรมชาติ การจัดวางขาและหนวดอยู่ในลักษณะสมมาตรเหมือนกันทั้งสองข้าง หลังจากนั้นนำไปอบให้แห้งในตู้อบ (oven) ปรับอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15-30 วัน ขึ้นกับขนาดตัวอย่าง การศึกษาครั้งนี้นอกจากตัวอย่างตั๊กแตนที่ได้จากการสำรวจแล้ว ยังใช้ตัวอย่างที่มีอยู่เดิมในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตรด้วย รวมถึงตัวอย่างที่ได้รับจากนักวิชาการ หรือจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิดจากหน่วยต่างๆ ภายในกรมวิชาการเกษตร

การตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo microscope แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ ลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญเช่น สี ขนาดลำตัว ลักษณะและตำแหน่งของแหนมแหลมบนลำตัว โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิด ประกอบกับการเปรียบเทียบตัวอย่างแมลงที่ได้จำแนกแล้วในพิพิธภัณฑ์ ดำเนินการจัดจำแนกในระดับอันดับ (order) และวงศ์ (family) โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Triplehorn & Johnson (2005) นับจำนวนของแมลงในแต่ละอันดับในแต่ละครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่าง ทั้งนี้เพื่อศึกษาถึงศักยภาพของกับดัก วิธีการเก็บแมลง แมลงในกลุ่มเป้าหมาย Orthoptera การจัดหมวดหมู่ในระดับ สกุลและชนิดใช้แนวทางการวินิจฉัยประกอบจาก Roffey (1979) และ Centre for overseas pest research (1982) ทั้งนี้ได้รับความร่วมมือจากนักวิจัยด้านตั๊กแตนจากประเทศสหรัฐอเมริกา ช่วยในการตรวจวินิจฉัยชนิด หลังจากนั้นดำเนินการถ่ายภาพใต้กล้อง stereo microscope ใช้โปรแกรมการถ่ายภาพ AutoMontage หรือ Cartograph extended-focus โดยใช้ JVC KY-F75U digital camera, Leica Z16 APOA

5. หลังจากจำแนกชนิดลงบันทึกรายละเอียดในป้ายตัวอย่าง (specimen label) ขนาด 1x2 เซนติเมตร ซึ่งประกอบด้วย แหล่งที่เก็บ พิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง เทคนิคการเก็บตัวอย่าง ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง นำป้ายดังกล่าวติดไว้ใต้ตัวอย่าง พร้องบันทึกรายละเอียดในฐานข้อมูลในโปรแกรม Excel จัดเก็บรักษาตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์แมลง เพื่อเป็นตัวอย่างอ้างอิง (Voucher Specimens)

6. สรุปและรายงานผล สถานภาพศัตรูพืช (pest report)

7. หากมีการพบตัวอย่าง มีมาตรการในการทำลายอย่างรวดเร็วคือ ดำเนินการฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า (killing jar) ซึ่งบรรจุน้ำยาเอททิล อะซิเตด (ethyl acetate) หลังจากนั้นรายงานต่อองการการอารักขาพืชแห่งชาติ (NPPO)

- การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลรายละเอียดแต่ละตัวอย่างที่เก็บได้ ประกอบด้วย แหล่งที่เก็บ พิกัดทางภูมิศาสตร์ พืชอาศัย วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง เทคนิคการเก็บตัวอย่าง ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง เป็นต้น การลงทะเบียนในระบบฐานข้อมูลตั๊กแตนในประเทศไทยโดย ตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมีรายละเอียดแยกกันอย่างชัดเจน (specimen barcode) หากมีการค้นพบชื่อวิทยาศาสตร์ชนิดใหม่ ดำเนินการตีพิมพ์และขึ้นทะเบียนกับ IZCN-Zoobank (Polaszek *et al*. 2005) รูปแบบการเขียนตีพิมพ์ผลงานวิจัย (taxonomic description) ดำเนินการตามแบบมาตรฐานของ Pyle *et al*. (2008) เก็บรักษาตัวอย่างแมลงทั้งตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง ณ พิพิธภัณฑ์แมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 11 การสำรวจและเฝ้าระวังวัชพืช *Raphanus raphanistrum* ในประเทศไทย (ชุติมา อ้อมกิ่ง, 2565-2567)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. รวบรวมข้อมูลวัชพืช *Raphanus raphanistrum*

สืบค้นข้อมูลลักษณะของวัชพืช *Raphanus raphanistrum* เป็นศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกันพืชของประเทศไทย ได้แก่ รายละเอียดของวัชพืช ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง และลักษณะทางพฤกษศาสตร์ การแพร่ระบาด สภาพนิเวศน์ที่มักพบวัชพืชเหล่านี้พร้อมรูปภาพ

2. จัดทำรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ

จัดทำเอกสารคู่มือสำหรับผู้ร่วมงานใช้ในการสำรวจภาคสนาม และสอบถามเกษตรกรในพื้นที่สำรวจ ประกอบภาพ ลักษณะต้น ใบ และดอก และสรุปผลกระทบของพืชนี้ ที่สามารถหาได้จากฐานข้อมูลของต่างประเทศที่สามารถเข้าถึงด้วยระบบเครือข่าย เช่น CABI, Plant Database USDA, invasive.org เป็นต้น ตลอดจนรายละเอียดของวัชพืชอื่น ๆ ที่มีลักษณะคล้ายกับวัชพืชเป้าหมาย และจัดทำแบบฟอร์มการสำรวจ เพื่อบันทึกข้อมูลสถานที่ วันที่เก็บ ข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์

3. สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่าง

- กำหนดพื้นที่ วางแผนการสำรวจ โดยการสำรวจแบบกำหนดขอบเขตตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืชฉบับที่ 6 (Surveillance: ISPM No.6) และการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชกักกันตามเงื่อนไขประกาศกรมวิชาการเกษตร

- กำหนดพื้นที่ วางแผนการสำรวจ อย่างมีระบบ สำรวจแบบเฉพาะเจาะจง โดยการสำรวจแบบตรวจหาตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืชฉบับที่ 6 (surveillance: ISPM No. 6) ในแหล่งปลูกพืชผักวงศ์ผักกาด (กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก ผักกาดเขียว ผักกาดขาว ผักกาดหัว คะน้า กวางตุ้ง บร็อกโคลี่) ในจังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน เชียงราย พะเยา ตาก พิษณุโลก เพชรบูรณ์ นครปฐม ขอนแก่น และประจวบคีรีขันธ์ วางแผนการสำรวจเก็บตัวอย่าง ในพื้นที่ปลูกพืชผักวงศ์ผักกาด ทำการสำรวจแบบสืบพบ (Detection survey) โดยการเดินสำรวจในพื้นที่ที่สามารถเข้าถึงด้วยรถยนต์ หรืออยู่ในระยะที่เดินเข้าได้ โดยมีวัชพืช *Raphanus raphanistrum* เป็นพืชเป้าหมาย โดยเดินแบบซิกแซก รูป W ในพื้นที่ไม่น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ของแปลงปลูกที่ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างพืชที่พบ หากไม่สามารถระบุชนิดได้ เช่น มีลักษณะไม่ชัดเจน พืชยังไม่มีดอก หรือยังอยู่ในระยะต้นอ่อน เก็บตัวอย่าง นำมาปลูกในเรือนทดลอง จนกว่าจะมีดอก หรือมีลักษณะที่สามารถระบุชนิดได้ ถ่ายภาพและจัดทำตัวอย่างแห้ง เพื่อใช้เป็นหลักฐานและเพื่อการตรวจสอบต่อไป

- การตรวจสอบชนิด เนื่องจากไม่มีตัวอย่างแห้ง ทำการตรวจสอบตัวอย่างพืชที่รวบรวมได้ในภาคสนาม นำตัวอย่างมาศึกษาลักษณะโดยละเอียด เปรียบเทียบกับภาพ คำอธิบายลักษณะที่สามารถหาได้จากฐานข้อมูลที่สามารถเข้าถึงได้ด้วยระบบเครือข่าย เช่น CABI, USDA Plant Database, Oregon State University เป็นต้น

กรมวิชาการเกษตร

การบันทึกข้อมูล

1. พื้นที่ บันทึก ที่ตั้ง พิกัดภูมิศาสตร์ และระดับความสูงเฉลี่ยเหนือระดับน้ำทะเล สภาพนิเวศน์
2. พืชปลูก บันทึกข้อมูล ชนิดของพืช
3. ชนิดวัชพืชที่พบ บันทึกประเภท ลักษณะ ระยะการเจริญ การขยายพันธุ์ในพื้นที่ ปริมาณที่พบ การกระจายในพื้นที่

การทดลองที่ 12 การสำรวจและเฝ้าระวังวัชพืช *Galium aparine* L. ในประเทศไทย (พรรณิภา เปษัยศรี, 2565-2567)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูล

สืบค้น ข้อมูล เอกสาร งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวัชพืช *Galium aparine* L. ได้แก่ รายละเอียดของวัชพืช ลักษณะต้น ใบ และดอก ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง และลักษณะทางพฤกษศาสตร์ การแพร่ระบาด สภาพนิเวศน์ที่มักพบวัชพืชเหล่านี้ พร้อมรูปภาพ รวมทั้งพื้นที่ปลูกพืชวงศ์ผักกาดในประเทศไทย

2. จัดทำรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ

โดยรวบรวมข้อมูลลักษณะของวัชพืช *Galium aparine* L. พร้อมรูปภาพประกอบ ลักษณะต้น ใบ และดอก ตลอดจนรายละเอียดของลักษณะวัชพืชอื่น ๆ ที่มีลักษณะคล้ายกับวัชพืชเป้าหมาย เพื่อจัดทำเอกสารคู่มือสำหรับผู้ร่วมงานใช้ในการสำรวจภาคสนาม จัดทำแบบฟอร์มการสำรวจ เพื่อบันทึกข้อมูล เช่น ชื่อพืช ชื่อเกษตรกรเจ้าของแปลง สถานที่ วันที่สำรวจ ข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์ ข้อมูลการนำเข้าพืช ประเทศต้นทาง เป็นต้น

3. การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

กำหนดพื้นที่ แหล่งปลูกพืชวงศ์ผักกาด (กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก ผักกาดเขียว ผักกาดขาว ผักกาดหัว คะน้า กวางตุ้ง บร็อกโคลี่) ในประเทศไทย เช่น จังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง แพร่ น่าน อุตรดิตถ์ ตาก นครสวรรค์ กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ พิษณุโลก ชัยนาท นนทบุรี ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา ลพบุรี สระบุรี อ่างทอง สุพรรณบุรี กาญจนบุรี ราชบุรี นครปฐม เลย อุดรธานี หนองคาย บึงกาฬ นครพนม มุกดาหาร อำนาจเจริญ อุบลราชธานี สุรินทร์ บุรีรัมย์ สระแก้ว จันทบุรี ตราด เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี เป็นต้น

วางแผนการสำรวจ โดยดำเนินการสำรวจตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 6 (Surveillance: ISPM No. 6) อย่างมีระบบ สำรวจแบบเฉพาะเจาะจง โดยมีวัชพืช *Galium aparine* L. เป็นพืชเป้าหมาย โดยเลือกพื้นที่ปลูกอย่างน้อย 10 แปลง ในแต่ละจังหวัด แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบ สุ่มตรวจ 5 แถวต่อแปลง ตรวจแบบแถวเว้นแถว

เก็บและรวบรวมตัวอย่างวัชพืชที่พบว่ามีลักษณะคล้ายหรือใกล้เคียงกับวัชพืชเป้าหมาย โดยเทียบเคียงกับคู่มือในการสำรวจ บันทึกรายละเอียดตามแบบฟอร์มการสำรวจ เช่น วัน เดือน ปี พิกัดภูมิศาสตร์ พืชอาศัย ลักษณะของวัชพืชที่เก็บตัวอย่าง ขนาดทรงพุ่ม สี ใบ ดอก เมล็ด ถ่ายภาพ เป็นต้น และเก็บตัวอย่างวัชพืชมาจัดทำตัวอย่างแห้ง (herbarium) เพื่อใช้เป็นหลักฐานและเพื่อการตรวจสอบและจำแนกชนิดต่อไปในห้องปฏิบัติการ หากไม่สามารถระบุชนิดได้ เช่น มีลักษณะไม่ชัดเจน พืชยังไม่มีดอก หรือยังอยู่ในระยะต้นอ่อน เก็บตัวอย่าง นำมาปลูกในเรือนทดลอง จนกว่าจะมีดอก หรือมีลักษณะที่สามารถระบุชนิดได้ ถ่ายภาพและจัดทำตัวอย่างแห้ง เพื่อใช้เป็นหลักฐานและตรวจสอบจำแนกชนิดต่อไปในห้องปฏิบัติการ

กรมวิชาการเกษตร

4. การตรวจสอบจำแนกชนิด

ทำการตรวจสอบตัวอย่างพืชที่รวบรวมได้ในภาคสนาม นำตัวอย่างมาศึกษาลักษณะโดยละเอียดในห้องปฏิบัติการตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพ บันทึกรายละเอียด เช่น ลักษณะต้น ใบ ดอก และสี เปรียบเทียบกับภาพ คำอธิบายลักษณะจากฐานข้อมูล เช่น CABI, USDA Plant Database, Oregon State University เป็นต้น และจัดเก็บตัวอย่างไว้เป็นหมวดหมู่

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกรายละเอียดตำแหน่งของแปลงปลูกพืชที่ทำการสำรวจ/เก็บตัวอย่าง
2. บันทึกข้อมูลจำนวนแปลง และจำนวนตัวอย่างที่ทำการสำรวจ/เก็บตัวอย่าง
3. บันทึกข้อมูลชนิดพืช ขนาดพื้นที่ปลูก ระยะการเจริญเติบโตของพืช และสภาพแวดล้อมอื่น ๆ
4. ชนิดวัชพืชที่พบ บันทึกประเภท ลักษณะ ระยะการเจริญ การขยายพันธุ์ในพื้นที่ ปริมาณที่พบการกระจายในพื้นที่

โครงการวิจัยย่อยที่ 7 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชอุบัติใหม่ในข้าวโพดและกล้วยเพื่อการส่งออก

กิจกรรมที่ 1 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพด

การทดลองที่ 1.1 การทดสอบประสิทธิภาพสารคลุกเมล็ดและราดสารป้องกันกำจัดแมลงในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด (2565-2566 วิภาดา)

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 cyantraniliprole 24%+thiamethoxam 24%FS อัตรา 7 มิลลิลิตร/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม

กรรมวิธีที่ 2 chlorantraniliprole 62.5%FS อัตรา 7 มิลลิลิตร/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม

กรรมวิธีที่ 3 cyantraniliprole 20%SC ผสมสารอัตรา 20 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร ราดต้นข้าวโพด อัตรา 10 มิลลิลิตร/ต้น (ราดสารที่ 3 วันหลังข้าวโพดงอก)

กรรมวิธีที่ 4 cyantraniliprole 20%SC อัตรา 20 มิลลิลิตร/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม (สารเปรียบเทียบ)

กรรมวิธีที่ 5 ไม่ใช้สารป้องกันกำจัดแมลง

วิธีปฏิบัติการทดลอง

ดำเนินการในแปลงทดลองขนาดแปลงย่อยไม่น้อยกว่า 30 ตารางเมตร จำนวน 20 แปลงย่อย ระยะห่างระหว่างแถว 0.75 เมตร ระยะระหว่างต้น 0.25 เมตร ระยะห่างระหว่างแปลงย่อย 1.5 เมตร สุ่มตรวจนับระดับการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด ให้คะแนนโดยอ้างอิงจาก Davis scale (Davis and Williams, 1992) โดยแบ่งเป็น 9 ระดับ โดยสุ่มตรวจนับจากข้าวโพดไม่น้อยกว่า 20 ต้นต่อแปลงย่อยใน 4 แถวกลาง ตรวจนับจำนวน 3 ใบต่อยอด โดยตรวจนับหลังข้าวโพดงอกที่ 3, 5, 7, 10, 15, 20 และ 25 วัน รวบรวมข้อมูลระดับการทำลายที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การทำลาย โดยใช้สูตรของ Townsend-Heuberger แล้วนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิธีทางสถิติที่เหมาะสม และตรวจอาการเป็นพิษของพืชจากการใช้สารป้องกันกำจัดแมลง (phytotoxicity)

กรมวิชาการเกษตร

การบันทึกข้อมูล

- ระดับการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด
- อาการเกิดพิษของพืช
- ต้นทุนในการป้องกันกำจัด

สถานที่ดำเนินการทดลอง

แปลงข้าวโพดของเกษตรกร จ.กาญจนบุรี (2 สถานที่ทดลอง)

การทดลองที่ 1.2 การใช้ไวรัส NPV ร่วมกับสารป้องกันกำจัดแมลงในการควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดหวาน (2565-2566 อนุสรณ์)

1. การทดลองในห้องปฏิบัติการ (ปี 2565) แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพการควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดหลังได้รับไวรัส SfNPV

ใช้หนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดวัย 3 ในการทดลอง โดยแบ่งหนอนออกเป็น 2 ชุด ชุดละ 280 ตัว มาทำการบังคับให้หนอนกินไวรัส SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตรและ SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ด้วยวิธี diet surface contamination method บนผิวหน้าอาหารเทียมที่บรรจุในถ้วยพลาสติกที่มีฝาปิดขนาด 2 ออนซ์ หยดสารแต่ละกรรมวิธีด้วยเครื่องหยดสารละลาย อัตรา 30 ไมโครลิตรต่อถ้วย จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมหมุนวนบนผิวหน้าของอาหารเทียม เพื่อให้สารทดลองเคลือบทั่วผิวหน้าอาหารปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 3 นาที ปล่อยให้หนอนกินอาหารเทียมที่ infect ไวรัส SfNPV อัตราต่าง ๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นย้ายหนอนทดลอง มาทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ ลงในอาหารเทียมเลี้ยงแมลงด้วยอัตราต่าง ๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ (ใช้หนอน 10 ตัวต่อซ้ำ) จำนวน 15 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 infect ไวรัส SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 2 infect ไวรัส SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 infect ไวรัส SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม.
จึงบังคับให้กิน abamectin 1.8% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 infect ไวรัส SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม.
จึงบังคับให้กิน abamectin 1.8% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 infect ไวรัส SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม.
จึงบังคับให้กิน cypermethrin 35% W/V EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 6 infect ไวรัส SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม.
จึงบังคับให้กิน cypermethrin 35% W/V EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 infect ไวรัส SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม.
จึงบังคับให้กิน chlorantraniliprole 5.17%W/V SC อัตรา มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 8 infect ไวรัส SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม.
จึงบังคับให้กิน chlorantraniliprole 5.17%W/V SC อัตรา มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 9 infect ไวรัส SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม.

จึงบังคับให้กิน thiodicarb 75 % WP อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 10 infect ไวรัส SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม.

จึงบังคับให้กิน thiodicarb 75 % WP อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 11 infect ไวรัส SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม.

จึงบังคับให้กิน deltamethrin 3 % W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 12 infect ไวรัส SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม.

จึงบังคับให้กิน deltamethrin 3 % W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 13 infect ไวรัส SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม.

จึงบังคับให้กิน flubendiamide 20 % WG อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 14 infect ไวรัส SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม.

จึงบังคับให้กิน flubendiamide 20 % WG อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 15 กรรมวิธีควบคุม

ทำการตรวจนับการตายของหนอนในแต่ละกรรมวิธีทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 7 วัน โดยหนอนที่ไม่ตอบสนองต่อการเขี่ยของปลายพู่กันจะถูกพิจารณาว่าตายหากพบหนอนตายในกรรมวิธีควบคุม มากกว่า 5% ให้ปรับค่าเปอร์เซ็นต์การตายด้วย Abbott's formula (Abbott, 1925)

การบันทึกข้อมูล

- จำนวนหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดที่ตายในแต่ละกรรมวิธี

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพของไวรัส SfNPV ที่ผสมด้วยสารฆ่าแมลงชนิดต่างๆ

วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ (ใช้หนอน 10 ตัวต่อซ้ำ) จำนวน 15 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไวรัส SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 2 ไวรัส SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 ไวรัส SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ abamectin 1.8% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 ไวรัส SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ abamectin 1.8% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 ไวรัส SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ cypermethrin 35% W/V EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 6 ไวรัส SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ cypermethrin 35% W/V EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 ไวรัส SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ chlorantraniliprole 5.17%W/V SC อัตรา มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 8 ไวรัส SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ chlorantraniliprole 5.17%W/V SC อัตรา มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 9 ไวรัส SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ thiodicarb 75 % WP อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 10 ไวรัส SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ thiodicarb 75 % WP อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 11 ไวรัส SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ deltamethrin 3 % W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 12 ไวรัส SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ deltamethrin 3 % W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 13 ไวรัส SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ flubendiamide 20 % WG อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 14 ไวรัส SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ flubendiamide 20 % WG อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 15 กรรมวิธีควบคุม

วิธีปฏิบัติการทดลอง

ใช้หนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดวัย 3 ในการทดลอง โดยใช้ไวรัส SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และไวรัส SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับสารฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ และบังคับให้หนอนกิน ด้วยวิธี diet surface contamination method บนผิวหน้าอาหารเทียมที่บรรจุในถ้วยพลาสติกที่มีฝาปิดขนาด 2 ออนซ์ หยดสารแต่ละกรรมวิธีด้วยเครื่องหยดสารละลาย อัตรา 30 ไมโครลิตรต่อถ้วย จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมหมุนวนบนผิวหน้าของอาหารเทียม เพื่อให้สารทดลองเคลือบทั่วผิวหน้าอาหารปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 3 นาที และปล่อยให้หนอนกิน ทำการตรวจนับการตายของหนอนในแต่ละกรรมวิธีทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 7 วัน โดยหนอนที่ไม่ตอบสนองต่อการเขี่ยของปลายพู่กันจะถูกพิจารณาว่าตายหากพบหนอนตายในกรรมวิธีควบคุม มากกว่า 5% ให้ปรับค่าเปอร์เซ็นต์การตายด้วย Abbott’s formula (Abbott, 1925)

การบันทึกข้อมูล

- จำนวนหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดที่ตายในแต่ละกรรมวิธี

2. การทดลองในสภาพไร่ (ปี 2565-66)

เมื่อได้ข้อมูลประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงจากทดลองในห้องปฏิบัติการแล้ว นำไปขยายผลในสภาพไร่ ในแปลงปลูกข้าวโพดหวาน

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สารทดลองที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด จากการทดลองในห้องปฏิบัติการขั้นตอนที่ 1

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 2 สารทดลองที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด จากการทดลองในห้องปฏิบัติการขั้นตอนที่ 2

กรรมวิธีที่ 3 สารฆ่าแมลงที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด จากการทดลองในห้องปฏิบัติการขั้นตอนที่ 1

กรรมวิธีที่ 4 สารฆ่าแมลงที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด จากการทดลองในห้องปฏิบัติการขั้นตอนที่ 2

กรรมวิธีที่ 5 ไวรัส SfNPV อัตรา ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดจาก จาก ข้อ 1.

กรรมวิธีที่ 6 ไม่พ่นสารป้องกันกำจัดแมลง

วิธีปฏิบัติการทดลอง

เตรียมแปลงปลูกข้าวโพดหวาน ขนาดแปลงย่อยไม่น้อยกว่า 30 ตารางเมตร จำนวน 24 แปลงย่อย ระยะปลูก 75x25 เซนติเมตร ทำการพ่นครั้งแรกเมื่อพบระดับการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดเฉลี่ยที่ระดับ 4 ทำการพ่นสารทดลองทุก 7 วัน สุ่มตรวจนับจำนวนหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด และตรวจนับระดับการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด ก่อนพ่นสารและหลังพ่นสาร 7 วัน โดยสุ่มตรวจนับจากข้าวโพดไม่น้อยกว่า 20 ต้นต่อแปลงย่อยใน 4 แถวกลาง ตรวจนับจำนวน 3 ใบต่อยอด ให้คะแนนโดยอ้างอิงจาก Davis scale (Davis and Williams, 1992) โดยแบ่งเป็น 9 ระดับ โดยสุ่มนับจำนวน 20 ต้น/แปลงย่อย นำระดับการทำลายที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การทำลายโดยใช้สูตรของ Townsend-Heuberger

$$\text{การทำลาย (\%)} = \frac{\sum(nv)}{NV} \times 100$$

n = จำนวนต้นในแต่ละระดับการทำลาย v = คะแนนระดับการทำลาย

N = จำนวนต้นทั้งหมดที่สุ่มนับ V= คะแนนระดับการทำลายสูงสุด

นำข้อมูลจำนวน ระดับการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด น้ำหนักผลผลิตของข้าวโพดหวานแบบที่ยังไม่ได้ลอกเปลือก น้ำหนักข้าวโพดหวานที่ลอกเปลือกแล้ว และน้ำหนักของข้าวโพดหวานที่มีคุณภาพในระยะส่งตลาดและน้ำหนักผลผลิตที่มีรอยทำลายในทุกกรรมวิธี มาวิเคราะห์ผลโดยวิธีทางสถิติที่เหมาะสม

การบันทึกข้อมูล

- จำนวนหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด
- ระดับการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด
- น้ำหนักผลผลิตที่มีคุณภาพในระยะส่งตลาดและน้ำหนักผลผลิตที่มีรอยทำลาย
- ต้นทุนในการป้องกันกำจัด

สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา อาคารวิจัยและพัฒนาศัตรูธรรมชาติ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช แปลงข้าวโพดของเกษตรกร จังหวัดกาญจนบุรี หรือจังหวัดลพบุรี (2 สถานที่ทดลอง)

การทดลองที่ 1.3 การใช้การใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ร่วมกับสารป้องกันกำจัดแมลงในการควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดหวาน (2566-2567 อิศเรส)

1. การทดลองในห้องปฏิบัติการ (ปี 2566) แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดกำจัดแมลงชนิดต่างๆ กับหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดหลังได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

โดยแบ่งหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดวัย 3 ที่นำมาใช้ในการทดลองออกเป็น 2 ชุด ชุดละ 300 ตัว ทำการ infect เชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* ลงในอาหารเทียมเลี้ยงแมลงด้วยอัตราต่าง ๆ ดังนี้

ชุดที่ 1 infect *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

ชุดที่ 2 infect *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

ปล่อยให้หนอนกินอาหารเทียมที่ infect เชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* อัตราต่าง ๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นย้ายหนอนทดลองทั้ง 2 ชุด มายังถ้วยอาหารเทียมที่เคลือบด้วยสารป้องกันกำจัดกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ 7 กรรมวิธี ใช้หนอน 10 ตัวต่อซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 abamectin 1.8% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 2 cypermethrin 35% W/V EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 chlorantraniliprole 5.17%W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 thiodicarb 75 % WP อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 deltamethrin 3 % W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 6 flubendiamide 20 % WG อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 ไม่ใส่สาร

ทำการทดลองด้วยวิธี diet surface contamination method บนผิวหน้าอาหารเทียมที่บรรจุในถ้วยพลาสติกขนาด 2 ออนซ์ หยดสารแต่ละกรรมวิธีด้วยเครื่องหยดสารละลาย อัตรา 30 ไมโครลิตรต่อถ้วย จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมหมุนวนบนผิวหน้าของอาหารเทียม เพื่อให้สารทดลองเคลือบทั่วผิวหน้าอาหารปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเทียมแห้ง ใช้พู่กันเขี่ยหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดวัย 3 ใส่ถ้วยละ 1 ตัว ใช้หนอนจำนวน 10 ตัวต่อซ้ำ ตรวจนับและบันทึกผลการตายของหนอนทุก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยหนอนที่ไม่ตอบสนองต่อการเขี่ยของปลายพู่กันจะถูกพิจารณาว่าตายหากพบหนอนตายในกรรมวิธีควบคุมมากกว่า 5% ให้ปรับค่าเปอร์เซ็นต์การตายด้วย Abbott’s formula (Abbott, 1925)

การบันทึกข้อมูล

- จำนวนหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดที่ตายในแต่ละกรรมวิธี

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* ที่ผสมด้วยสารป้องกันกำจัดกำจัดแมลงชนิดต่างๆ

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ 15 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 2 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ abamectin 1.8% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ cypermethrin 35% W/V EC อัตรา 30 ml/20 l

กรรมวิธีที่ 4 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ chlorantraniliprole 5.17%W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ thiodicarb 75 % WP อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 6 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ deltamethrin 3 % W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ flubendiamide 20 % WG อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 8 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 9 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ abamectin 1.8% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 10 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ cypermethrin 35% W/V EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 11 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ chlorantraniliprole 5.17%W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 12 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ thiodicarb 75 % WP อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 13 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* อัตรา 40 มิลลิลิ ตรต่อน้ำ 20 ลิตรผสมกับ deltamethrin 3 % W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 14 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ flubendiamide 20 % WG อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 15 ไม่ใส่สาร

วิธีปฏิบัติการทดลอง

ทำการทดลองด้วยวิธี diet surface contamination method บนผิวหน้าอาหารเทียมที่บรรจุในถ้วยพลาสติกขนาด 2 ออนซ์ หยดสารแต่ละกรรมวิธีด้วยเครื่องหยดสารละลาย อัตรา 30 ไมโครลิตรต่อถ้วย จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมหมุนวนบนผิวหน้าของอาหารเทียม เพื่อให้สารทดลองเคลือบทั่วผิวหน้าอาหารปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเทียมแห้ง ใช้พู่กันเขี่ยหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดวัย 3 ใส่ถ้วยละ 1 ตัว

กรมวิชาการเกษตร

ใช้หนอนจำนวน 10 ตัวต่อซ้ำ ตรวจนับและบันทึกผลการตายของหนอนทุก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยหนอนที่ไม่ตอบสนองต่อการเขี่ยของปลายพู่กันจะถูกพิจารณาว่าตายหากพบหนอนตายในกรรมวิธีควบคุมมากกว่า 5% ให้ปรับค่าเปอร์เซ็นต์การตายด้วย Abbott’s formula (Abbott, 1925)

การบันทึกข้อมูล

- จำนวนหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดที่ตายในแต่ละกรรมวิธี

2. การทดลองในสภาพไร่ (ปี 2566-67)

เมื่อได้ข้อมูลประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงจากทดลองในห้องปฏิบัติการแล้ว นำไปขยายผลในสภาพไร่ ในแปลงปลูกข้าวโพดหวาน

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สารทดลองที่มีประสิทธิภาพอันดับ 1 จากการทดลองในห้องปฏิบัติการขั้นตอนที่ 1

กรรมวิธีที่ 2 สารทดลองที่มีประสิทธิภาพอันดับ 2 จากการทดลองในห้องปฏิบัติการขั้นตอนที่ 1

กรรมวิธีที่ 3 สารทดลองที่มีประสิทธิภาพอันดับ 1 จากการทดลองในห้องปฏิบัติการขั้นตอนที่ 2

กรรมวิธีที่ 4 สารทดลองที่มีประสิทธิภาพอันดับ 2 จากการทดลองในห้องปฏิบัติการขั้นตอนที่ 2

กรรมวิธีที่ 5 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* อัตรา 80 มิลลิลิตร/20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 6 ไม่พ่นสาร

วิธีปฏิบัติการทดลอง

เตรียมแปลงปลูกข้าวโพดหวาน ขนาดแปลงย่อยไม่ต่ำกว่า 30 ตารางเมตร จำนวน 24 แปลงย่อย ทำการพ่นครั้งแรกเมื่อพบระดับการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดเฉลี่ยที่ระดับ 4 ทำการพ่นสารทดลองทุก 7 วัน ตรวจนับจำนวนหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด และตรวจนับระดับการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดก่อนพ่นสารและหลังพ่นสาร 7 วัน โดยสุ่มตรวจนับจากข้าวโพดไม่น้อยกว่า 20 ต้นต่อแปลงย่อยใน 4 แถวกลาง ตรวจนับจำนวน 3 ใบต่อยอด ให้คะแนนโดยอ้างอิงจาก Davis scale (Davis and Williams, 1992) โดยแบ่งเป็น 9 ระดับ นำระดับการทำลายที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การทำลายโดยใช้สูตรของ Townsend-Heuberger

$$\text{การทำลาย (\%)} = \frac{\sum(nv)}{NV} \times 100$$

n = จำนวนต้นในแต่ละระดับการทำลาย v = คะแนนระดับการทำลาย

N = จำนวนต้นทั้งหมดที่สุ่มนับ V= คะแนนระดับการทำลายสูงสุด

นำข้อมูลจำนวน ระดับการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด น้ำหนักผลผลิตของข้าวโพดหวานแบบที่ยังไม่ได้ลอกเปลือก น้ำหนักข้าวโพดหวานที่ลอกเปลือกแล้ว และน้ำหนักของข้าวโพดหวานที่มีคุณภาพในระยะส่งตลาดและน้ำหนักผลผลิตที่มีรอยทำลายในทุกกรรมวิธี มาวิเคราะห์ผลโดยวิธีทางสถิติที่เหมาะสม

กรมวิชาการเกษตร

การบันทึกข้อมูล

- จำนวนหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด
- ระดับการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด
- น้ำหนักผลผลิตที่มีคุณภาพในระยะส่งตลาดและน้ำหนักผลผลิตที่มีรอยทำลาย
- ต้นทุนในการป้องกันกำจัด

สถานที่ดำเนินการ

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา อาคารวิจัยและพัฒนาศัตรูธรรมชาติ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- แปลงข้าวโพดของเกษตรกร จังหวัดกาญจนบุรี หรือจังหวัดลพบุรี (2 สถานที่ทดลอง)

การทดลองที่ 1.4 ประสิทธิภาพการใช้สารป้องกันกำจัดแมลงร่วมกับการใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดเพื่อการผลิตข้าวโพดหวานปลอดภัย (2566-2567 ศรีจำนรรจ์)

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนแบบ Randomize complete block มี 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดข้าวโพดด้วยสาร cyantraniliprole 20% SC (กลุ่ม 28) อัตรา 20 มิลลิลิตร/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม ตามด้วย การพ่นสาร spinetoram 12% SC อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร (กลุ่ม 5) 20 ลิตรที่ ทุก 7 วัน 3 ครั้ง ตามด้วย การพ่นสาร emamectin benzoate 5% WG อัตรา 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร (กลุ่ม 6) ทุก 7 วัน 3 ครั้ง ตามด้วยการพ่นไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (รูปแบบผง) อัตรา 50 ล้านตัว/น้ำ 20 ลิตร ทุก 5 วัน 4 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดข้าวโพดด้วยสาร cyantraniliprole 20% SC (กลุ่ม 28) อัตรา 20 มิลลิลิตร/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม ตามด้วย การพ่นสาร spinetoram 12% SC อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร (กลุ่ม 5) 20 ลิตร ทุก 7 วัน 3 ครั้ง ตามด้วย การพ่นสาร chlorfenapyr 10% SC) อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร(กลุ่ม 13) ทุก 7 วัน 3 ครั้ง ตามด้วยการพ่นไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (รูปแบบผง) อัตรา 50 ล้านตัว/น้ำ 20 ลิตร ทุก 5 วัน 4 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดข้าวโพดด้วยสาร cyantraniliprole 20% SC (กลุ่ม 28) อัตรา 20 มิลลิลิตร/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม ตามด้วย การพ่นสาร spinetoram 12% SC อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร (กลุ่ม 5) 20 ลิตร ทุก 7 วัน 3 ครั้ง ครั้ง ตามด้วย การพ่นสาร lufenuron 5% EC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร (กลุ่ม 15) ทุก 7 วัน 3 ครั้ง ตามด้วยการพ่นไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (รูปแบบผง) อัตรา 50 ล้านตัว/น้ำ 20 ลิตร ทุก 5 วัน 4 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 4 พ่นสาร emamectin benzoate 5% WG อัตรา 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร (กลุ่ม 6) ทุก 7 วัน

กรมวิชาการเกษตร

3 ครั้ง การพ่นสาร spinetoram 12% SC อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร (กลุ่ม 5) 20 ลิตร ทุก 7 วัน 3 ครั้ง ตามด้วย การพ่นสาร chlorfenapyr 10% SC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร (กลุ่ม 13) ทุก 7 วัน 3 ครั้ง ตามด้วยการพ่นไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (รูปแบบผง) อัตรา 50 ล้านตัว/น้ำ 20 ลิตร ทุก 5 วัน 4 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 5 พ่นสารตามวิธีเกษตรกร

กรรมวิธีที่ 6 ไม่พ่นสารป้องกันกำจัดแมลง

วิธีปฏิบัติการทดลอง

ดำเนินการทดลองช่วงข้าวโพดเริ่มปลูก โดยใช้ขนาดแปลงย่อยไม่น้อยกว่า 30 ตารางเมตร เริ่มพ่นสารตามกรรมวิธีต่างๆ เมื่อพบการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด ระดับการทำลาย 4-5 ส่วนกรรมวิธีที่พ่นไส้เดือนฝอย เริ่มพ่นเมื่อข้าวโพดติดดอกตัวผู้ พ่นสารตามกรรมวิธีต่างๆ โดยใช้เครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบแรงดันน้ำสูง โดยใช้อัตราน้ำ 40 ลิตร/ไร่ เมื่อข้าวโพดอายุ 1-4 สัปดาห์ และ 60-80 ลิตร/ไร่ เมื่อข้าวโพดอายุ 4 สัปดาห์ขึ้นไป ประเมินระดับการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดก่อนพ่นสารและหลังพ่นสาร 7 วัน โดยสุ่มตรวจนับจากข้าวโพดไม่น้อยกว่า 20 ต้น/แปลงย่อย จาก 4 แถวกลาง ตรวจนับจำนวน 3 ใบยอด โดยอ้างอิงระดับการทำลายของ Davis and William (1992) นำระดับการทำลายที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การทำลาย โดยใช้สูตรของ Townsend-Heuberger

$$\text{การทำลาย (\%)} = \frac{\sum (nv)}{NV} \times 100$$

n = จำนวนต้นในแต่ละระดับการทำลาย   v = คะแนนระดับการทำลาย

N = จำนวนต้นทั้งหมดที่สุ่มนับ   V = คะแนนระดับการทำลายสูงสุด

ประเมินการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดก่อนใช้สาร และหลังใช้สารครั้งแรกทุก 7 วัน จนกระทั่งเก็บเกี่ยว เก็บผลผลิตข้าวโพดหวานกรรมวิธีละ 1 ตัวอย่าง สุ่มตัวอย่างให้กระจายทั่วแปลงเพื่อเป็นตัวแทนที่ถูกต้อง ให้ได้จำนวนไม่น้อยกว่า 12 ฝัก และหรือปริมาณไม่น้อยกว่า 2 กิโลกรัม โดยเว้นระยะ 1 เมตร ที่หัวแปลงและท้ายแปลง ไม่สุ่มชิดขอบแปลง บรรจุตัวอย่างลงในถุงพลาสติกแล้วปิดให้สนิท ติดป้ายฉลากให้ชัดเจน แล้วส่งห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ด้วยเครื่อง LC-MS/MS และเก็บข้อมูลน้ำหนักและคุณภาพฝักเพื่อวิเคราะห์พิษตกค้าง ประเมินคุณภาพผลผลิตโดยให้คะแนนคุณภาพฝัก เพื่อไปคำนวณรายได้ตามราคาท้องตลาด บันทึกระดับการทำลาย นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การทำลาย น้ำหนักผลผลิตที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติที่เหมาะสม อาการเป็นพิษต่อพืช คำนวณต้นทุนการป้องกันกำจัด

การบันทึกข้อมูล

- ระดับการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด
- น้ำหนักผลผลิตที่มีคุณภาพในระยะส่งตลาดและน้ำหนักผลผลิตที่มีรอยทำลาย
- สารพิษตกค้างในผลผลิต
- ชนิดและจำนวนศัตรูธรรมชาติที่พบ
- อาการเกิดพิษของพืช

กรมวิชาการเกษตร

- ต้นทุนในการป้องกันกำจัด

สถานที่ทำการทดลอง

ศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ จังหวัดนครราชสีมา หรือแปลงข้าวโพดหวานของเกษตรกร จังหวัดกาญจนบุรี หรือราชบุรี (2 สถานที่ทดลอง)

การทดลองที่ 1.5 ศึกษารูปแบบการใช้แมลงศัตรูธรรมชาติร่วมกับชีวภัณฑ์ในการควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดหวาน (2566-67 พัชรีวรรณ)

เปรียบเทียบ 2 วิธี ระหว่างรูปแบบใช้แมลงศัตรูธรรมชาติและชีวภัณฑ์ในการควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดกับวิธีของเกษตรกร

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ดำเนินการทดสอบในแปลงข้าวโพดหวาน โดยแบ่งออกเป็น 2 แปลงๆ ละ 2 งาน ในพื้นที่ห่างกันประมาณ 1 กิโลเมตร

2. เพาะขยายแมลงศัตรูธรรมชาติและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพื่อใช้ควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดให้ได้ปริมาณตามกรรมวิธีที่กำหนด

3. สุ่มตรวจนับจำนวนไข่และหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดทุกระยะบนต้นข้าวโพดหลังงอกทุกสัปดาห์ โดยสุ่มนับจากข้าวโพดบริเวณแถวกลางของแต่ละแปลงย่อย แปลงละ 200 ต้น เมื่อพบระยะไข่ หรือระยะหนอนในแปลงจึงปล่อยแมลงศัตรูธรรมชาติและพ่นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงตามกรรมวิธีที่กำหนด (เทียบจากการควบคุมตามวงจรชีวิตของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด ซึ่งใช้เวลาพัฒนา 30-40 วันต่อรุ่น โดยผีเสื้อเพศเมียวางไข่เป็นกลุ่มประมาณ 100-200 ฟอง ผีเสื้อเพศเมียหนึ่งตัววางไข่ได้ประมาณ 1,500-2,000 ฟอง ระยะไข่ 2-3 วัน หนอนมี 6 วัย ระยะหนอน 14-22 วัน ระยะดักแด้ 7-13 วัน จึงเป็นตัวเต็มวัยมีชีวิต 10-21 วัน (FAO, 2019)) ดังนี้

1) ปล่อยแตนเบียนไข่ *T. pretiosum* อัตรา 20,000 ตัว/ไร่ จำนวน 4 ครั้ง คือที่ 7, 14, 21, และ 28 วันหลังปลูก

2) ปล่อยแมลงหางหนีบ อัตรา 1,600 ตัว/ไร่ จำนวน 4 ครั้ง คือที่ 14, 21, 28 และ 35 วันหลังปลูก

3) ปล่อยมวนพิฆาต อัตรา 500 ตัว/ไร่ จำนวน 3 ครั้ง คือที่ 28, 35 และ 42 วันหลังปลูก

4) พ่นไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (รูปแบบผง) อัตรา 50 ล้านตัว/น้ำ 20 ลิตร จำนวน 4 ครั้ง คือที่ 21, 28, 56 และ 63 วันหลังปลูก

4. ประเมินระดับการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด ทุก 7 วัน ให้คะแนนระดับการทำลายโดยอ้างอิงจาก Davis scale (Davis and Williams, 1992) โดยแบ่งเป็น 9 ระดับ นำระดับการทำลายที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การทำลายโดยใช้สูตรของ Townsend-Heuberger และสุ่มตรวจนับประชากรหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดที่พบในต้นข้าวโพดก่อนและหลังการปล่อยแมลงศัตรูธรรมชาติและพ่นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

5. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างประชากรหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดกับแมลงศัตรูธรรมชาติและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และประสิทธิภาพการควบคุม (Control efficiency percentage) ที่มีต่อ

กรมวิชาการเกษตร

หนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด คำนวณเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพ (% Efficacy) นำข้อมูลหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดที่มีชีวิต อัตราการเบียนไข่ จำนวนแมลงหางหนีบ แมลงช้างปีกใส และมวนพิฆาตที่พบ น้ำหนักผลผลิตที่มีคุณภาพในระยะส่งตลาดและน้ำหนักผลผลิตที่มีรอยทำลาย มาวิเคราะห์ผลโดยวิธีทางสถิติที่เหมาะสม

บันทึกผลการทดลอง

- จำนวนหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดก่อนและหลังปล่อยแมลงศัตรูธรรมชาติและไส้เดือนฝอยทุก 7 วัน
- จำนวนแมลงศัตรูธรรมชาติอื่นที่พบทั้งก่อนและหลังปล่อยแมลงศัตรูธรรมชาติและไส้เดือนฝอยทุก 7 วัน
- ระดับการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด
- น้ำหนักผลผลิตที่มีคุณภาพในระยะส่งตลาดและน้ำหนักผลผลิตที่มีรอยทำลาย
- ต้นทุนในการป้องกันกำจัด

สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

แปลงข้าวโพดหวานของเกษตรกร จังหวัดกาญจนบุรี (2 สถานที่ทดลอง)

การทดลองที่ 1.6 ศึกษารูปแบบการใช้แมลงศัตรูธรรมชาติร่วมกับชีวภัณฑ์ในการควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดฝักอ่อน (2566-67 พัชรีวรรณ)

เปรียบเทียบ 2 วิธี ระหว่างรูปแบบใช้แมลงศัตรูธรรมชาติและชีวภัณฑ์ในการควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดกับวิธีของเกษตรกร

วิธีปฏิบัติการทดลอง

เลือกพื้นที่ปลูกข้าวโพดฝักอ่อนที่พบการระบาดของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด แล้วดำเนินการดังต่อไปนี้

1. เตรียมแปลงปลูกข้าวโพดขนาด 2 งาน จำนวน 2 แปลง ในพื้นที่ห่างกันประมาณ 1 กิโลเมตร

2. เพาะขยายแมลงแมลงศัตรูธรรมชาติและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพื่อใช้ควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด ให้ได้ปริมาณตามกรรมวิธีที่กำหนด

3. สุ่มตรวจนับจำนวนไข่และหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดทุกระยะบนต้นข้าวโพดลายจุดหลังงอกทุกสัปดาห์ โดยสุ่มนับจากข้าวโพดบริเวณแถวกลางของแต่ละแปลงย่อย แปลงละ 200 ต้น เมื่อพบระยะไข่ หรือระยะหนอนในแปลงจึงปล่อยแมลงศัตรูธรรมชาติและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงตามกรรมวิธีที่กำหนด (เทียบจากการควบคุมตามวงจรชีวิตของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด ซึ่งใช้เวลาพัฒนา 30-40 วันต่อรุ่น โดยผีเสื้อเพศเมียวางไข่เป็นกลุ่ม ประมาณ 100-200 ฟอง ผีเสื้อเพศเมียหนึ่งตัววางไข่ได้ประมาณ 1,500-2,000 ฟอง ระยะไข่ 2-3 วัน หนอนมี 6 วัย ระยะหนอน 14-22 วัน ระยะดักแด้ 7-13 วัน จึงเป็นตัวเต็มวัยมีชีวิต 10-21 วัน (FAO, 2019)) ดังนี้

1) ปล่อยแตนเบียนไข่ *T. pretiosum* อัตรา 20,000 ตัว/ไร่ จำนวน 4 ครั้ง คือที่ 7, 14, 21, และ 28 วันหลังปลูก

2) ปล่อยแมลงหางหนีบ อัตรา 1,600 ตัว/ไร่ จำนวน 4 ครั้ง คือที่ 14, 21, 28 และ 35 วันหลังปลูก

4) ปล่อยมวนพิฆาต อัตรา 500 ตัว/ไร่ จำนวน 2 ครั้ง คือที่ 28 และ 35 วันหลังปลูก

กรมวิชาการเกษตร

3) พ่นไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (รูปแบบผง) อัตรา 50 ล้านตัว/น้ำ 20 ลิตร จำนวน 2 ครั้ง คือที่ 32 และ 36 วันหลังปลูก

4. ประเมิน ระดับการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด ทุก 7 วัน เป็นเวลาประมาณ 40-45 วัน ให้คะแนนระดับการทำลายโดยอ้างอิงจาก Davis scale (Davis and Williams, 1992) โดยแบ่งเป็น 9 ระดับ นำระดับการทำลายที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การทำลายโดยใช้สูตรของ Townsend-Heuberger-และสุ่มตรวจนับประชากรหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดที่พบในต้นข้าวโพดก่อนและหลังการปล่อยแมลงศัตรูธรรมชาติและพ่นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

5. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างประชากรหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดกับแมลงศัตรูธรรมชาติและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และประสิทธิภาพการควบคุม (Control efficiency percentage) ที่มีต่อหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด คำนวณเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพ (% Efficacy) ตามวิธีการของ Henderson-Tilton (Henderson and Tilton, 1955) นำข้อมูลหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดที่มีชีวิต อัตราการเบียนไข่ จำนวนแมลงหางหนีบ และมวนพิฆาตที่พบ น้ำหนักผลผลิตที่มีคุณภาพในระยะส่งตลาดและน้ำหนักผลผลิตที่มีรอยทำลาย มาวิเคราะห์ผลโดยวิธีทางสถิติที่เหมาะสม

บันทึกผลการทดลอง

- จำนวนหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดก่อนและหลังปล่อยแมลงศัตรูธรรมชาติและไส้เดือนฝอยทุก 7 วัน
- จำนวนแมลงศัตรูธรรมชาติอื่นที่พบทั้งก่อนและหลังปล่อยแมลงศัตรูธรรมชาติและไส้เดือนฝอยทุก 7 วัน
- ระดับการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด
- น้ำหนักผลผลิตที่มีคุณภาพในระยะส่งตลาดและน้ำหนักผลผลิตที่มีรอยทำลาย
- ต้นทุนในการป้องกันกำจัด

สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการ สอพ. และแปลงข้าวโพดฝักอ่อนของเกษตรกร จังหวัดกาญจนบุรี (2 สถานที่ทดลอง)

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 2 ศึกษาโรคตายพราย (Panama disease) tropical race 4 ของกล้วย และการป้องกันกำจัด

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคตายพราย TR4 ในกล้วยคาเวนดิชของประเทศไทย

(ปี 2565-2567) (ชนินทร ดวงสอาด)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. รวบรวมตัวอย่าง (2565)

รวบรวมตัวอย่างโรคตายพราย TR4 ของกล้วยที่ได้จากโครงการ “Capacity development on diagnostic and surveillance system of banana Fusarium wilt disease (TCP/RAS/3619)” ทั้งที่เป็นตัวอย่าง เนื้อเยื่อลำต้นและ culture

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช (2565-2566)

แยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชจากตัวอย่างเนื้อเยื่อลำต้น

แยกเชื้อราโดยวิธี tissue transplanting นำตัวอย่างส่วนของท่อน้ำท่ออาหารของต้นกล้วยที่มีสีน้ำตาลแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10% เป็นเวลา นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง 3-5 นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง ตัดเป็นเส้นเล็ก ๆ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ ห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน แยกราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

แยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชจาก culture collection

เขี่ยเส้นใยของเชื้อรามาวางลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ ห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน

แยกเชื้อให้บริสุทธิ์

แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ โดยวิธี single spore isolation ย้ายสปอร์เดี่ยวของเชื้อรา Foc เลี้ยงลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ ห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน หากไม่มีการปนเปื้อน สามารถดำเนินการสกัดดีเอ็นเอเชื้อที่เจริญจากสปอร์เดี่ยว จะทำการแยกเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ องศาเซลเซียส 15 เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

3. สกัดดีเอ็นเอ (2566)

ตักและย้ายเส้นใยของรา *Fusarium* spp. ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ และทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง ไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

4. ตรวจสอบชนิดเบื้องต้นของเชื้อราสาเหตุโรคตายพราย TR4 (2566)

ตรวจสอบชนิดเบื้องต้นของเชื้อราแต่ละไอโซเลท โดยทำ PCR ด้วยไพร์เมอร์จำเพาะ FocTR4-F/FocTR4-R2 (Dita *et al*., 2010)โดยมี EF-1/EF-2 (Czislowski *et al.*, 2017) เป็น internal control กำหนด annealing temperature ที่ 60 องศาเซลเซียส

5. จำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม (2566-2567)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างและผ่านการตรวจชนิดเบื้องต้น มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของ *Fusarium* spp. ตำแหน่ง the RNA polymerase largest subunit gene (*rpb1*) ด้วยไพร์เมอร์ RPB1-Fa/RPB1-G2R (O'Donnell *et al*., 2010) ตำแหน่ง the RNA polymerase second largest subunit gene (*rpb2*) ด้วยไพร์เมอร์ RPB2-5f2/RPB2-7cr (O'Donnell *et al*., 2010) และ the translation elongation factor 1-alpha gene (*tef1*) (O'Donnell *et al*., 1998) กำหนด annealing temperature ของแต่ละตำแหน่งที่ 56 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์

กรมวิชาการเกษตร

PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2020 (http://www.geneious.com; Kearse *et al.*, 2012) บันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ชนิด fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น GenBank, Mycobank, Fusarium MLST DATABASE และ Fusarium-ID

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consencus sequence ที่บันทึกไว้ในรูปแบบ fasta ไฟล์) มาจัดเรียง (align) ด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Katoh and Toh, 2008) จากนั้นตรวจสอบการจัดเรียง (alignment) โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม the MEGA (Kumar *et al.*, 2016) จากนั้นใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) ทำการรวมชุดข้อมูลของดีเอ็นเอตำแหน่ง *rpb1 rpb2* และ *tef1* เป็น combined dataset บันทึกชุด alignment ในรูปแบบไฟล์ .nexus หรือ .nex โดยใช้โปรแกรม Mesquite

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

ประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูล ใช้สองเกณฑ์มาตรฐานคือ Maximum Likelihood ใช้โปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) และ Bayesian Inference ใช้โปรแกรม MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) ตรวจสอบความเชื่อมั่นของผลวิเคราะห์ด้วย cumulative and compare functions ด้วย AWTY (Nylander *et al.*, 2008)

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกข้อมูล DNA sequence ในรูปแบบของ FASTA ไฟล์

- บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบ ประกอบด้วยพิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวชนิดของตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

- จัดเก็บดีเอ็นเอต้นแบบไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

สถานที่ทำการวิจัย

- ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ. กรุงเทพฯ

- แปลงปลูกกล้วยของเกษตรกร

ระยะเวลาการวิจัย ตุลาคม 2564-กันยายน 2567

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.2 การตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคตายพราย TR4 กล้วยในประเทศไทยด้วยเทคนิค *SIX* genes (ปี 2565-2567) (ชนินทร ดวงสอาด)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. รวบรวมตัวอย่าง (2565)

รวบรวมตัวอย่างโรคตายพราย TR4 ของกล้วยที่ได้จากโครงการ “Capacity development on diagnostic and surveillance system of banana Fusarium wilt disease (TCP/RAS/3619)” ทั้งที่เป็นตัวอย่าง เนื้อเยื่อลำต้น และ culture รวมถึง Foc race 1 จากพิพิธภัณฑ์โรคพืช และ culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช (2565)

แยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชจากตัวอย่างเนื้อเยื่อลำต้น

แยกเชื้อราโดยวิธี tissue transplanting นำตัวอย่างส่วนของท่อน้ำท่ออาหารของต้นกล้วยที่มีสีน้ำตาลแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง ตัดเป็นเส้นเล็ก ๆ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน แยกราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

แยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชจาก culture collection

เขี่ยเส้นใยของเชื้อรามาวางลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ ห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน

แยกเชื้อให้บริสุทธิ์

แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ โดยวิธี single spore isolation ย้ายสปอร์เดี่ยวของเชื้อรา Foc เลี้ยงลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ ห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน หากไม่มีการปนเปื้อน สามารถดำเนินการสกัดดีเอ็นเอเชื้อที่เจริญจากสปอร์เดี่ยว จะทำการแยกเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

3. สกัดดีเอ็นเอ (2565-2566)

ตักและย้ายเส้นใยของรา *Fusarium* spp. ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ และทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard et al. (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง ไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

4. ตรวจสอบชนิดเบื้องต้นของเชื้อราสาเหตุโรคตายพราย TR4 (2565-2566)

ตรวจสอบชนิดเบื้องต้นของเชื้อราแต่ละไอโซเลท โดยทำ PCR ด้วยไพร์เมอร์จำเพาะ FocTR4-F/FocTR4-R2 (Dita *et al*., 2010)โดยมี EF-1/EF-2 (Czislowski *et al*., 2018) เป็น internal control กำหนด annealing temperature ที่ 60 องศาเซลเซียส

5. จำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม (2566-2567)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

กรมวิชาการเกษตร

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างของเชื้อรา Foc TR4 และ Foc race 1 มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของ *Fusarium* spp. ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ โดยใช้ไพร์เมอร์จำนวน 6 คู่ สำหรับ SIX genes (Czislowski *et al.*, 2017) ดังนี้ SIX9_Foc_F/SIX9_Foc_F (annealing 58 ^{O}C) SIX6b_210_F/SIX6b_210_R (annealing 55 ^{O}C) SIX1a_266_F/ SIX1a_266_R (annealing 55 ^{O}C) SIX8b_206_F/SIX8b_206_R (annealing 62 ^{O}C) SIX10a_309_F/SIX10a_309_R (annealing 58 ^{O}C) SIX13c_343_F/ SIX13c_343_R (annealing 57 ^{O}C) (Figure 1) ทุกปฏิกิริยา PCR ยกเว้นปฏิกริยาที่ต้องนำ PCR product ไปทำ restriction digestion ตามกรรมวิธีของ Carvalhais *et al.* (2019) ใช้ the translation elongation factor 1-alpha gene (tef1) EF1/EF2 (O'Donnell *et* al., 1998) เป็น internal control

Restriction digestions

นำ PCR product ที่ได้จากยีนตำแหน่ง *SIX1* มาทำ restriction digestions ด้วย enzymes HpyAV (New England Biolabs) และ ตำแหน่ง *SIX13* ทำ restriction digestions ด้วย enzymes EagI (Eco521) (New England Biolabs) ในอัตรา PCR product ปริมาณ 4 ไมโครลิตร ต่อ enyzyme ชนิดละ 0.4 units (U) และมีปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C นาน 1 ชั่วโมง และ ที่อุณหภูมิ 65 ^{O}C นาน 20 นาที เพื่อหยุดปฏิกริยาของ digestion ตามกรรมวิธีของ Carvalhais *et al.* (2019)

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.5% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer)

วิเคราะห์ชนิด

นำผลที่ได้จากปฏิกริยา PCR จากแต่ละขั้นตอน มาทำการวิเคราะห์ชนิดสายพันธุ์

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกข้อมูล DNA sequence ในรูปแบบของ FASTA ไฟล์
- บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบ ประกอบด้วยพิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวชนิดของตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง
- จัดเก็บดีเอ็นเอต้นแบบไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

สถานที่ทำการวิจัย

- ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ. กรุงเทพฯ

ระยะเวลาการวิจัย ตุลาคม 2564-กันยายน 2567

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.3 ศึกษาชีวและนิเวศวิทยาของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 สาเหตุโรคตายพราย TR4 ของกล้วย (ปี 2566-2567) (มะโนรัตน์ สุดสงวน)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การทดสอบชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 ในห้องปฏิบัติการ (2566)

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 10 ซ้ำ 5 กรรมวิธี โดยให้อาหารแต่ละชนิดเป็นกรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 Potato dextrose agar (PDA)

กรรมวิธีที่ 2 Carrot agar (CA)

กรรมวิธีที่ 3 Carnation leaf agar (CLA)

กรรมวิธีที่ 4 Agar Spezieller Nährstottarmer (SNA)

กรรมวิธีที่ 5 V-8 juice Agar (V8)

เตรียมเชื้อรา Foc TR4 สาเหตุโรคตายพราย TR4-ของกล้วย โดยนำเชื้อจาก culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 7 วัน

เทอาหารทดสอบแต่ละชนิดในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้อาหารเย็น ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดปลายเส้นใยของเชื้อรา Foc TR4 ที่เตรียมไว้ นำมาวางบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแต่ละชนิด วางไว้ในห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 7 วัน จึงวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารแต่ละชนิด บันทึกผล นำมาวิเคราะห์สถิติ และตรวจดูลักษณะโครงสร้างต่าง ๆ เช่น sporodochium conidia chlamydospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปและบันทึกลักษณะโครงสร้างต่างๆ ของเชื้อ

2. การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ (2566)

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 10 ซ้ำ 9 กรรมวิธี โดยให้อุณหภูมิต่างๆ เป็นกรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 2 อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 3 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 4 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 6 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 7 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 8 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 9 อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ

กรมวิชาการเกษตร

เตรียมเชื้อรา Foc TR4 สาเหตุโรคตายพราย TR4-ของกล้วย โดยนำเชื้อจาก culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 7 วัน

เทอาหาร PDA ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้อาหารเย็น ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดปลายเส้นใยของเชื้อราที่เตรียมไว้ นำมาวางบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 10 15 20 25 30 35 40 45 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 7 วัน จึงวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารแต่ละชนิด บันทึกผล นำมาวิเคราะห์สถิติ และตรวจดูลักษณะโครงสร้างต่าง ๆ เช่น sporodochium conidia chlamydospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปและบันทึกลักษณะโครงสร้างต่างๆ ของเชื้อ

3. ศึกษาความมีชีวิตรอดของรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* TR4 ในดินในสภาพเรือนทดลอง (2566-2567)

เตรียม inoculum ของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* TR4

เตรียมข้าวฟ่างนึ่งสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* TR4 โดยแช่เมล็ดข้าวฟ่างในน้ำ 1 คืนหรือ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนเมล็ดข้าวฟ่างพอง ผึ่งให้เมล็ดข้าวฟ่างที่ต้มแล้วเย็น นำเมล็ดข้าวฟ่าง 50 กรัม ใส่ลงถุงที่ทนร้อน ปิดปากถุงด้วยจุกสำลีแล้วหุ้มด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำถุงเมล็ดข้าวฟ่าง มาผึ่งไว้ให้เย็น

เลี้ยงขยายเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* TR4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 7 วัน หรือจนเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายเชื้อราไปเลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่างที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน จนเส้นใยเชื้อราเจริญแผ่กระจายคลุมเมล็ดข้าวฟ่าง

การปลูกเชื้อให้กับต้นกล้วย

นำเชื้อที่เตรียมไว้ไปผสมกับดิน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้พลั่วขนาดเล็กขุดหลุมลึกประมาณ 8-10 เซนติเมตร นำข้าวฟ่าง 20 กรัมที่มีราเจริญ ใส่ลงในหลุมที่ขุดไว้ นำต้นกล้าของกล้วยอายุ 3 เดือนที่ปลูกเชื้อโดยการจุ่มรากลงในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* TR4 ที่ความหนาแน่นของสปอร์ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที วางพักในที่ร่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมงก่อนปลูก กลบดิน ดูแลให้น้ำและปุ๋ยกับต้นกล้วยตามปกติ ตรวจสอบการเกิดโรคเป็นระยะจนต้นกล้วยแสดงอาการของโรค จากนั้นนำต้นกล้วยที่แสดงอาการโรคออก

การตรวจปริมาณเชื้อ *F. oxysporum* f.sp. *cubense* TR4 ในดิน

ตรวจปริมาณเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* TR4 หลังจากปลูกเชื้อให้กับต้นกล้วยแล้ว 15 วัน หลังจากนั้นตรวจปริมาณเชื้อราทุก 1-3 เดือนหรือเป็นระยะตามความเหมาะสม ตลอดระยะเวลาการทดลอง สุ่มเก็บตัวอย่างดินเพื่อแยกเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* TR4 จากดินด้วยวิธี soil dilution plate technique ชั่งดิน 10 กรัม มาทำสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าดินให้ละลาย แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} หยดสปอร์แขวนลอยแต่ละความ

เข้มข้น จำนวน 1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร Modified Komada medium (K2) (Sun *et al*., 1978) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คำนวณโคโลนีของเชื้อราโดยใช้สูตร จำนวนเชื้อราที่มีชีวิตรอด = n X 10^n X10 โดยกำหนดให้ n = จำนวน โคโลนี 10^n = ความเข้มข้นเชื้อที่เจือจางและมีหน่วยเป็น cfu/g ตรวจสอบเบื้องต้นเมื่อพบว่าแยกเชื้อได้รา *F. oxysporum* จึงย้ายเส้นใยของเชื้อเลี้ยงบนอาหาร PDA

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกขนาดของโคโลนีของเชื้อรา
- บันทึกลักษณะโครงสร้างต่าง ๆ เช่น sporodochium conidia chlamydospore
- บันทึกขอมูลความมีชีวิตหรือปริมาณเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* TR4

สถานที่ทำการวิจัย

- กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
- แปลงปลูกกล้วยของเกษตรกร

ระยะเวลาการวิจัย ตุลาคม 2565-กันยายน 2567

การทดลองที่ 2.4 การศึกษาปฏิกิริยาของสายพันธุ์/พันธุ์กล้วยต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 (ปี 2565-2567) (อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

แบบและวิธีการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 5 ซ้ำ มี 30 กรรมวิธี โดยมีพันธุ์/สายพันธุ์กล้วยเป็นกรรมวิธี

1. เตรียมต้นกล้าสายพันธุ์/พันธุ์กล้วยจาก germ plasm ของภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน

2. เตรียมเชื้อสาเหตุโรค โดยเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 (Foc TR4) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ประมาณ 7 วัน นำน้ำกลั่นฆ่าเชื้อใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ เพื่อล้างสปอร์ (ทั้ง macro และ microconidia) ปรับให้สปอร์แขวนลอยของเชื้อมีความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3. การเตรียมกระถางปลูก ต้องทำเป็น 2 ชั้น (double-pot)

4. ปลูกเชื้อ โดยการจุ่มรากต้นกล้ากล้วยลงในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา Foc TR4 ที่ความหนาแน่นของสปอร์ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที นำออกมาวางพักในที่ร่ม

5. ปลูกต้นกล้ากล้วยที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคแล้วในดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปล่อยให้ต้นกล้ากล้วยแสดงอาการของโรคตายพราย

6. บันทึกระดับความรุนแรงของโรค ตามวิธีการของ Luis Pérez-Vicente, *et al*. (2014) ดังนี้

กรมวิชาการเกษตร

การประเมินโรคด้วยลักษณะภายนอก (อาการเหนือดิน) แบ่งเป็น 5 ระดับ คือ

1 ต้นกล้าไม่แสดงอาการ

2 ใบล่างเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

3 ใบล่างเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองทั้งหมด และใบอ่อนเริ่มเปลี่ยนสี

4 ใบทั้งหมดเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม

5 ต้นกล้ากล้วยตาย

การประเมินโรคด้วยลักษณะภายใน (อาการใต้ดิน) แบ่งเป็น 5 ระดับ คือ

1 เนื้อเยื่อภายในเหง้าไม่แสดงอาการ

2 เนื้อเยื่อภายในเหง้าเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

3 เนื้อเยื่อภายในเหง้าและท่อน้ำท่ออาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

4 เนื้อเยื่อภายในเหง้าเกือบทั้งหมดแสดงอาการ necrosis

5 ต้นกล้ากล้วยตาย

การบันทึกข้อมูล

- จำนวนต้นกล้ากล้วยที่แสดงอาการของโรค
- ลักษณะการแสดงอาการโรคของแต่ละสายพันธุ์/พันธุ์

สถานที่ทำการวิจัย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ระยะเวลาการวิจัย ตุลาคม 2564-กันยายน 2567

การทดลองที่ 2.5 การทดสอบการใช้ยูเรียและปูนขาวอบดินร่วมกับการใช้เชื้อจุลินทรีย์ฏิปักษ์ ในการควบคุมโรคตายพราย TR4 ของกล้วย (ปี 2565-2567) (สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ)

แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1. การทดสอบใช้ยูเรียและปูนขาวอบดินในการกำจัดเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 สาเหตุโรคตายพราย TR4 ของกล้วย (2565)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เตรียมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 (Foc TR4) (2565)

นำเชื้อ Foc TR4 ที่ได้จากโครงการ “Capacity development on diagnostic and surveillance system of banana Fusarium wilt disease (TCP/RAS/3619)” ซึ่งรวบรวมเก็บรักษาไว้ที่ศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ทางการเกษตร (culture collection) ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร นำมาฟื้นฟูให้อยู่ในสภาพพร้อมสำหรับการทดสอบ โดยเลี้ยงเชื้อ Foc TR4 บนอาหาร PDA

กรมวิชาการเกษตร

2. ทดสอบการใช้ยูเรียและปูนขาวอบดินในการกำจัดเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 สาเหตุโรคตายพราย TR4 (Foc TR4) ในกล้วยคาเวนดิช

- วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 10 ต้น มี 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 Foc TR4 + ยูเรีย : ปูนขาว อัตราส่วน 1 : 8

กรรมวิธีที่ 2 Foc TR4 + ยูเรีย : ปูนขาว อัตราส่วน 1 : 10

กรรมวิธีที่ 3 Foc TR4 + ยูเรีย : ปูนขาว อัตราส่วน 1 : 12

กรรมวิธีที่ 4 Foc TR4 + ยูเรีย : ปูนขาว อัตราส่วน 0 : 1

กรรมวิธีที่ 5 Foc TR4 (กรรมวิธีควบคุม)

- เตรียมดินในบล็อกซีเมนต์ โดยใส่เชื้อรา Foc TR4 ที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวเปลือกหุงสุกผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 7 วัน ลงในดิน คลุกเคล้าให้ทั่ว บ่มไว้ 14 วัน จากนั้นผสมยูเรียกับปูนขาวให้เข้ากัน อัตราส่วนตามกรรมวิธีทดลอง ใส่ลงดินในแต่ละบล็อก คลุกเคล้าให้ทั่ว รดน้ำพอประมาณให้หน้าดินปิด คลุมด้วยผ้าพลาสติกปล่อยไว้ 3 สัปดาห์ เปิดหน้าดิน

- ย้ายต้นกล้ากล้วยคาเวนดิช (ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ) อายุประมาณ 3 เดือน ลงปลูกในบล็อกซีเมนต์ ดูแลรดน้ำตามปกติ วันละ 1 ครั้ง

- สุ่มเก็บตัวอย่างดินในทุกกรรมวิธี ตัวอย่างละ 10 กรัม นำมาตรวจนับปริมาณเชื้อรา Foc TR4 ด้วยวิธี soil dilution plate บนอาหาร rose bengal agar โดยสุ่มเก็บดินก่อนอบดินด้วยยูเรียและปูนขาว (หลังปลูกเชื้อ Foc TR4 14 วัน) หลังอบดิน และหลังการประเมินโรค

-วัด pH ของดิน ก่อนอบดินด้วยยูเรียและปูนขาว (หลังปลูกเชื้อ Foc TR4 14 วัน) หลังอบดิน และหลังการประเมินโรค

- ตรวจสอบการเกิดโรค โดยสังเกตจากอาการภายนอกที่เห็น คือการเปลี่ยนสีของใบ และอาการเหี่ยว เริ่มตรวจหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค 14 วัน จนกระทั่งต้นกล้วยในกรรมวิธีควบคุมแสดงอาการโรคชัดเจน จึงบันทึกความรุนแรงของการเกิดโรคในทุกกรรมวิธี โดยบันทึกลักษณะอาการภายนอก คือการเปลี่ยนสีของใบ และตัดต้นกล้วยเพื่อตรวจและบันทึกอาการของโรคที่เกิดภายในเหง้า

อาการภายนอก ประเมินจากการเปลี่ยนสีของใบ แบ่งเป็น 5 ระดับ คือ

ระดับ 1 พืชไม่แสดงอาการของโรค

ระดับ 2 ใบล่างเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ระดับ 3 ใบล่างทุกใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและใบอ่อนเริ่มเปลี่ยนสี

ระดับ 4 ใบทั้งหมดเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ระดับ 5 ต้นพืชตาย

อาการภายใน ประเมินจากการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของเนื้อเยื่อภายในเหง้า แบ่งออกเป็น 8 ระดับ ตามวิธีการของ Mak *et al*. (2004) ดังนี้

ระดับ 1 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าหรือรอบๆ ไม่เปลี่ยนสี

กรมวิชาการเกษตร

ระดับ 2 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าไม่เปลี่ยนเป็นสี แต่เนื้อเยื่อบริเวณเชื่อมต่อกันของรากและเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ระดับ 3 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนสีเล็กน้อย จนถึง 5% ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเหง้า

ระดับ 4 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนสี 6 – 20% ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเหง้า

ระดับ 5 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนสี 21 – 50% ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเหง้า

ระดับ 6 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนสีมากกว่า 50% ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเหง้า

ระดับ 7 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าทั้งหมดเปลี่ยนสี (100%)

ระดับ 8 : ต้นพืชตาย

- นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s Multiple Range Test (DMRT)

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกปริมาณเชื้อรา Foc TR4 ในดิน
- บันทึกระดับความรุนแรงของการเกิดโรคจากอาการภายนอกของกล้วยแต่ละต้น
- บันทึกระดับความรุนแรงของการเกิดโรคจากอาการภายในเหง้าของกล้วยแต่ละต้น

สถานที่ทำการวิจัย

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

ระยะเวลาการวิจัย ตุลาคม 2564-กันยายน 2565

ขั้นตอนที่ 2. การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และ *T. asperellum* ในการควบคุมโรคตายพราย TR4 ของกล้วย (2565-2566)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เตรียมเชื้อรา (2565)

นำเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 (Foc TR4) ที่ได้จากโครงการ “Capacity development on diagnostic and surveillance system of banana Fusarium wilt disease (TCP/RAS/3619)” และ *Trichoderma harzianum* และ *T. asperellum* ที่รวบรวมเก็บรักษาไว้ในศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ทางการเกษตร (culture collection) ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร มาฟื้นฟูให้อยู่ในสภาพพร้อมสำหรับการทดสอบ โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA

2. ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา *T. harzianum* และ *T. asperellum* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Foc TR4 ในห้องปฏิบัติการ (2565)

- ทดสอบด้วยวิธี dual culture technique โดยตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรา Foc TR4 ซึ่งเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน วางลงบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อทดสอบ ห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 1 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28$\pm$2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยของ

กรมวิชาการเกษตร

เชื้อรา *T. harzianum* และ *T. asperellum* แต่ละไอโซเลท ซึ่งเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน วางลงบนอาหาร PDA ในฝั่งตรงข้ามกับเชื้อ Foc TR4 ห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 1 เซนติเมตร สำหรับกรรมวิธีควบคุมวางชิ้นวุ้นอาหารที่ไม่เชื้อรา บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน (โคโลนีเชื้อรา Foc TR4 ของกรรมวิธีควบคุมเจริญเต็มจาน) ทำการทดสอบไอโซเลทละ 5 จานทดสอบ วัดการเจริญของเส้นใยเชื้อรา Foc TR4 โดยวัดรัศมีโคโลนีของเชื้อรา Foc TR4 ในจานทดสอบ และในจานควบคุม แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition rate growth :PIRG) ของเชื้อรา

โดยใช้สูตร PIRG = [(RC - RT) / RC] x 100

RC = รัศมีโคโลนีเชื้อรา Foc TR4 ในจานเลี้ยงเชื้อกรรมวิธีควบคุม

RT= รัศมีโคโลนีเชื้อรา Foc TR4 ในจานเลี้ยงเชื้อทดสอบ

- คัดเลือกเชื้อรา *T. harzianum* และ *T. asperellum* ที่มีประสิทธิภาพดี 5 อันดับแรก นำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคตายพราย TR4 ของกล้วยคาเวนดิชในสภาพเรือนทดลอง

3. ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา *T. harzianum* และ *T. asperellum* ในการควบคุมโรคตายพราย TR4 ของกล้วยคาเวนดิช ในสภาพเรือนทดลอง (2565-2566)

- นำเชื้อรา *T. harzianum* และ *T. asperellum* ที่มีประสิทธิภาพดี 5 อันดับแรก จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคตายพราย TR4 ของกล้วยคาเวนดิชในสภาพเรือนทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 10 ต้น มี 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 *T. harzianum* หรือ *T. asperellum* ไอโซเลท 1 + Foc TR4

กรรมวิธีที่ 2 *T. harzianum* หรือ *T. asperellum* ไอโซเลท 2 + Foc TR4

กรรมวิธีที่ 3 *T. harzianum* หรือ *T. asperellum* ไอโซเลท 3 + Foc TR4

กรรมวิธีที่ 4 *T. harzianum* หรือ *T. asperellum* ไอโซเลท 4 + Foc TR4

กรรมวิธีที่ 5 *T. harzianum* หรือ *T. asperellum* ไอโซเลท 5 + Foc TR4

กรรมวิธีที่ 6 Foc TR4 (กรรมวิธีควบคุม)

- ย้ายต้นกล้ากล้วยคาเวนดิช (ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ) อายุประมาณ 3 เดือน ลงปลูกในดินปลูกที่เตรียมไว้ในบล็อกซีเมนต์ โดยรองก้นหลุมด้วยเชื้อรา *T. harzianum* หรือ *T. asperellum* ไอโซเลทต่างๆ ตามกรรมวิธี ซึ่งเลี้ยงบนเมล็ดข้าวเปลือกหุงสุกผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 7 วัน อัตรา 200 กรัมต่อกระถาง ส่วนกรรมวิธีควบคุมรองก้นหลุมด้วยเมล็ดข้าวเปลือกสุกผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ดูแลรดน้ำตามปกติ วันละ 1 ครั้ง

- หลังจากย้ายปลูกต้นกล้ากล้วย 14 วัน จึงปลูกเชื้อราสาเหตุโรค โดยใส่เชื้อรา Foc TR4 ที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวเปลือกหุงสุกผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 14 วัน ลงดินบริเวณรอบๆโคนต้นกล้วยในกระถาง ใส่กระถางละ 200 กรัม

กรมวิชาการเกษตร

- สุ่มเก็บตัวอย่างดินในทุกกรรมวิธี ตัวอย่างละ 10 กรัม นำมาตรวจนับปริมาณเชื้อรา Foc TR4 และ/หรือ *T. harzianum* หรือ *T. asperellum* เริ่มต้นในดิน ด้วยวิธี soil dilution plate บนอาหาร rose bengal agar และสุ่มเก็บดินเพื่อตรวจนับปริมาณเชื้ออีกครั้งหลังการประเมินโรค

- ตรวจสอบการเกิดโรค โดยสังเกตจากอาการภายนอกที่เห็น คือการเปลี่ยนสีของใบ และอาการเหี่ยว เริ่มตรวจหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค 14 วัน จนกระทั่งต้นกล้วยในกรรมวิธีควบคุมแสดงอาการโรคชัดเจน จึงประเมินและบันทึกความรุนแรงของการเกิดโรคในทุกกรรมวิธี โดยบันทึกลักษณะอาการภายนอก คือการเปลี่ยนสีของใบ และตัดต้นกล้วยเพื่อตรวจและบันทึกอาการของโรคที่เกิดภายในเหง้า

อาการภายนอก ประเมินจากการเปลี่ยนสีของใบ แบ่งเป็น 5 ระดับ คือ

ระดับ 1 พืชไม่แสดงอาการของโรค

ระดับ 2 ใบล่างเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ระดับ 3 ใบล่างทุกใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและใบอ่อนเริ่มเปลี่ยนสี

ระดับ 4 ใบทั้งหมดเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ระดับ 5 ต้นพืชตาย

อาการภายใน ประเมินจากการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของเนื้อเยื่อภายในเหง้า แบ่งออกเป็น 8 ระดับ ตามวิธีการของ Mak et al. (2004) ดังนี้

ระดับ 1 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าหรือรอบๆ ไม่เปลี่ยนสี

ระดับ 2 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าไม่เปลี่ยนเป็นสี แต่เนื้อเยื่อบริเวณเชื่อมต่อกันของรากและเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ระดับ 3 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนสีเล็กน้อย จนถึง 5% ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเหง้า

ระดับ 4 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนสี 6 – 20% ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเหง้า

ระดับ 5 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนสี 21 – 50% ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเหง้า

ระดับ 6 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนสีมากกว่า 50% ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเหง้า

ระดับ 7 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าทั้งหมดเปลี่ยนสี (100%)

ระดับ 8 : ต้นพืชตาย

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s Multiple Range Test (DMRT)

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกรัศมีโคโลนีของเชื้อรา Foc TR4
- บันทึกปริมาณเชื้อรา Foc TR4 และ/หรือ *T. harzianum* หรือ *T. asperellum* ในดิน
- บันทึกระดับความรุนแรงของการเกิดโรคจากอาการภายนอกของกล้วยแต่ละต้น
- บันทึกระดับความรุนแรงของการเกิดโรคจากอาการภายในเหง้าของกล้วยแต่ละต้น

สถานที่ทำการวิจัย

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

ระยะเวลาการวิจัย ตุลาคม 2564-กันยายน 2566

กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนที่ 3 การทดสอบการใช้ยูเรียและปูนขาวอบดินร่วมกับการใช้เชื้อจุลินทรีย์ฏิปักษ์ ในการควบคุมโรคตายพราย TR4 ของกล้วย (2566-2567) (นางสาวสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

ทดสอบการใช้ยูเรียและปูนขาวอบดินร่วมกับการใช้เชื้อจุลินทรีย์ฏิปักษ์ ในการควบคุมโรคตายพราย TR4 ในกล้วย ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

โดยใช้ยูเรีย : ปูนขาว อัตราที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดจากผลการทดลองในขั้นตอนที่ 1 เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ คือ เชื้อรา *Trichoderma harzianum* และ/หรือ *T. asperellum* ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดจากผลการทดลองในขั้นตอนที่ 2 และ *Trichoderma* DOAC 2550 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคตายพรายกล้วยน้ำว้า (อภิรัชต์ และคณะ, 2557) ที่เก็บรักษาไว้ที่ศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ทางการเกษตร

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 10 ต้น มี 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 Foc TR4 + อบดินด้วยยูเรีย : ปูนขาว

กรรมวิธีที่ 2 Foc TR4 + อบดินด้วยยูเรีย : ปูนขาว + รองก้นหลุมด้วย *T. harzianum* หรือ *T. asperellum* ที่ได้จากการทดลองในขั้นตอนที่ 2

กรรมวิธีที่ 3 Foc TR4 + อบดินด้วยยูเรีย : ปูนขาว + รองก้นหลุมด้วย *T. harzianum* หรือ *T. asperellum* ที่ได้จากการทดลองในขั้นตอนที่ 2 และใส่อีกครั้งหลังปลูกกล้วย 7 วัน

กรรมวิธีที่ 4 Foc TR4 + อบดินด้วยยูเรีย : ปูนขาว + รองก้นหลุมด้วย *Trichoderma* DOAC 2550

กรรมวิธีที่ 5 Foc TR4 + อบดินด้วยยูเรีย : ปูนขาว + รองก้นหลุมด้วย *Trichoderma* DOAC 2550 และใส่อีกครั้งหลังปลูกกล้วย 7 วัน

กรรมวิธีที่ 6 Foc TR4 (กรรมวิธีควบคุม)

- เตรียมดินในบล็อกซีเมนต์ โดยใส่เชื้อรา Foc TR4 ที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวเปลือกหุงสุกผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 7 วัน ลงในดิน คลุกเคล้าให้ทั่ว บ่มไว้ 14 วัน จากนั้นผสมยูเรียกับปูนขาวให้เข้ากัน ในอัตราส่วนที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดจากการทดลองในขั้นตอนที่ 1 ใส่ลงดินในบล็อก คลุกเคล้าให้ทั่ว รดน้ำพอประมาณให้หน้าดินปิด คลุมด้วยผ้าพลาสติก ปล่อยไว้ 3 สัปดาห์ จากนั้นเปิดหน้าดิน

- ย้ายต้นกล้ากล้วยคาเวนดิช (ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ) อายุประมาณ 3 เดือน ลงปลูกในบล็อกซีเมนต์ ดูแลรดน้ำตามปกติ วันละ 1 ครั้ง

- การใส่เชื้อรา *T. harzianum* และ/หรือ *T. asperellum* โดยใช้เชื้อรา *T. harzianum* หรือ *T. asperellum* ไอโซเลท ตามกรรมวิธีที่กำหนด ซึ่งเลี้ยงบนเมล็ดข้าวเปลือกหุงสุกผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 7 วัน อัตรา 200 กรัมต่อหลุม

- สุ่มเก็บตัวอย่างดินในทุกกรรมวิธี ตัวอย่างละ 10 กรัม นำมาตรวจนับปริมาณเชื้อรา Foc TR4 และ/หรือ *T. harzianum* หรือ *T. asperellum* และ *Trichoderma* DOAC 2550 ด้วยวิธี soil dilution plate บนอาหาร rose bengal agar โดยสุ่มเก็บดินก่อนอบดินด้วยยูเรียและปูนขาว (หลังปลูกเชื้อ Foc TR4 14 วัน) หลังอบดิน (ก่อนปลูกกล้วย) และหลังการประเมินโรค

กรมวิชาการเกษตร

- ตรวจสอบการเกิดโรค โดยสังเกตจากอาการภายนอกที่เห็น คือการเปลี่ยนสีของใบ และอาการเหี่ยว เริ่มตรวจหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค 14 วัน จนกระทั่งต้นกล้วยในกรรมวิธีควบคุมแสดงอาการโรคชัดเจน จึงบันทึกความรุนแรงของการเกิดโรคในทุกกรรมวิธี โดยบันทึกลัก

ษณะอาการภายนอก คือการเปลี่ยนสีของใบ และตัดต้นกล้วยเพื่อตรวจและบันทึกอาการของโรคที่เกิดภายในเหง้า

อาการภายนอก ประเมินจากการเปลี่ยนสีของใบ แบ่งเป็น 5 ระดับ คือ

ระดับ 1 พืชไม่แสดงอาการของโรค

ระดับ 2 ใบล่างเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ระดับ 3 ใบล่างทุกใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและใบอ่อนเริ่มเปลี่ยนสี

ระดับ 4 ใบทั้งหมดเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ระดับ 5 ต้นพืชตาย

อาการภายใน ประเมินจากการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของเนื้อเยื่อภายในเหง้า แบ่งออกเป็น 8 ระดับ ตามวิธีการของ Mak et al. (2004) ดังนี้

ระดับ 1 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าหรือรอบ ๆ ไม่เปลี่ยนสี

ระดับ 2 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าไม่เปลี่ยนเป็นสี แต่เนื้อเยื่อบริเวณเชื่อมต่อกันของรากและเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ระดับ 3 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนสีเล็กน้อย จนถึง 5% ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเหง้า

ระดับ 4 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนสี 6 – 20% ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเหง้า

ระดับ 5 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนสี 21 – 50% ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเหง้า

ระดับ 6 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนสีมากกว่า 50% ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเหง้า

ระดับ 7 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าทั้งหมดเปลี่ยนสี (100%)

ระดับ 8 : ต้นพืชตาย

- นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s Multiple Range Test (DMRT)

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกปริมาณเชื้อรา Foc TR4 และ/หรือ *T. harzianum* หรือ *T. asperellum* และ *Trichoderma* DOAC 2550 ในดิน

- บันทึกระดับความรุนแรงของการเกิดโรคจากอาการภายนอกของกล้วยแต่ละต้น

- บันทึกระดับความรุนแรงของการเกิดโรคจากอาการภายในเหง้าของกล้วยแต่ละต้น

สถานที่ทำการวิจัย

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

ระยะเวลาการวิจัย ตุลาคม 2565-กันยายน 2567

กรมวิชาการเกษตร

3. การปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

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

❑ เปลี่ยนแปลงงบประมาณ โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง...

❑ เปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์/ผลผลิต โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง...

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 3 ผลการศึกษา

3.1 ผลการดำเนินงานของโครงการ

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 การศึกษาชนิดของศัตรูพืชในประเทศเพื่อการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช

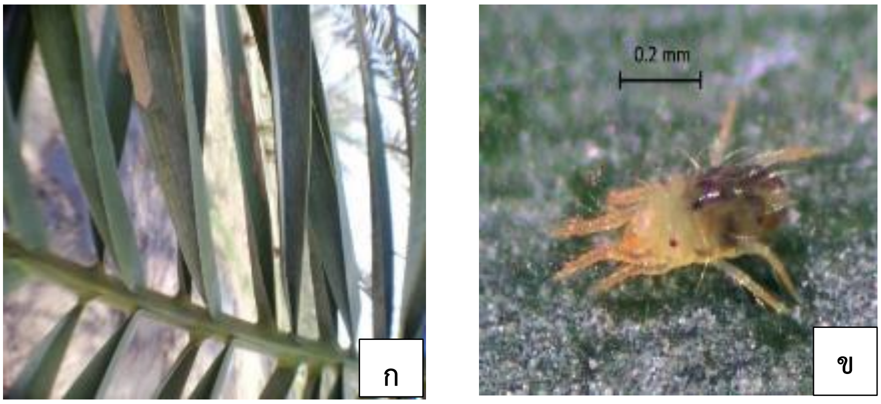
การศึกษาชนิดของแมลงศัตรู อินทผลัม มันเทศ ลิลลี่ กล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส เพื่อจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูอินทผลัมและลิลลี่ในจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง ลำพูน นครราชสีมา บุรีรัมย์ กาญจนบุรี สุพรรณบุรี หนองคาย นครพนม อุดรธานี บึงกาฬ และเพชรบุรี นำมาจัดรูปร่างและอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 50 – 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 – 6 0 วัน และนำไปจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธานแมลง พบแมลงศัตรูอินทผลัม 4 ชนิด (ตารางที่ 1.1) ได้แก่ ด้วงงวงมะพร้าว *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (ภาพที่ 1.1ก) ด้วงแรด *Oryctes rhinoceros* (Linnaeus) (ภาพที่ 1.1 ข) หนอนปลอกใหญ่ *Mahasena corbetti* Tams และด้วงแทะใบปาล์ม *Promecotheca cumingii* Baly

ภาพที่ 1.1 แมลงศัตรูอินทผลัม

ก. ด้วงงวงมะพร้าว *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier)

ข. ด้วงแรด *Oryctes rhinoceros* (Linnaeus)

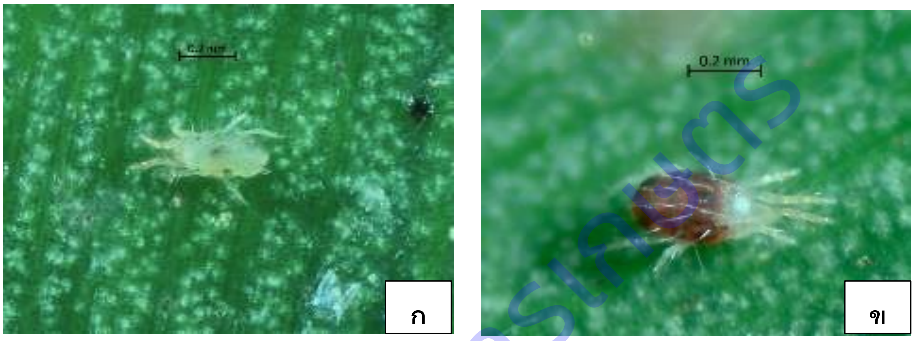
การศึกษาชนิดของไรศัตรู อินทผลัม มันเทศ ลิลลี่ กล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส เพื่อจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช จากการสำรวจไรศัตรูพืชในแปลงอินทผลัม รวมทั้งสิ้น 6 จังหวัด 6 อำเภอ พบไรศัตรูอินทผลัมทั้งหมด 6 ชนิด 2 วงศ์ (ตารางที่ 1.2) วงศ์ Tetranychidae พบไรศัตรูพืช ได้แก่ 5 ชนิด ได้แก่ *Oligonychus pratensis* (Banks) (ภาพที่ 1.2), *Eutetranychus orientalis* (Klein), *Oligonychus oryzae* (Hirst) (ภาพที่ 1.3 ก), *Tetranychus kanzawai* Kishida (ภาพที่ 1.3ข), *Tetranychus fijiensis* Hirst วงศ์ Tenuipalpidae พบไรศัตรูจำนวน 1ชนิด *ได้แก่ Raoiella indica* Hirst จากการสำรวจพบว่า ไร *Oligonychus pratensis* (Banks) เป็นไรที่ยังไม่เคยมีรายงานการพบไรชนิดนี้มาก่อนในประเทศไทย (new record) และไร *Raoiella indica* Hirst เป็นไรศัตรูที่มีความสำคัญในมะพร้าวและพืชตระกูล



ภาพที่ 1.2 ไรศัตรูพืชในแปลงอินทผลัม ไร *Oligonychus pratensis* (Banks)

ก. ลักษณะอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของไร *Oligonychus pratensis* (Banks)

ข. ไรแดง *Oligonychus pratensis* (Banks) ตัวเต็มวัยเพศเมีย



ภาพที่ 1.3 ไรศัตรูพืชในแปลงอินทผลัม ไร

ก. ไร *Oligonychus oryzae* (Hirst)

ข. ไรแดง *Tetranychus kanzawai* Kishida ตัวเต็มวัยเพศเมีย

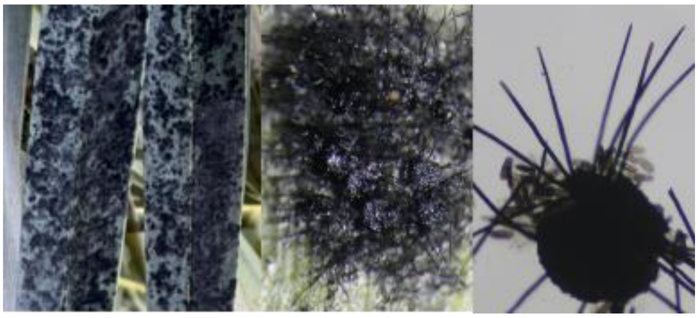
กรมวิชาการเกษตร

การศึกษาชนิดของโรค อินทผลัม มันเทศ ลิลลี่ กล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส เพื่อจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช จากการสืบค้นข้อมูลโรคของอินทผลัมและลิลลี่ ที่มีรายงานในประเทศไทยจากเอกสารต่าง ๆ หรือจากข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ พบโรคของอินทผลัมที่เกิดจากเชื้อรา จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ โรคใบเฉา (wilt) สาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, โรคใบร่วง (leaf fall, leaf spot) สาเหตุจากเชื้อรา *Graphiola phoenicis* และโรคช่อดอกเน่า (leaf blight) สาเหตุจากเชื้อรา *Mauginiella seaettae* และโรคของลิลลี่ ที่เกิดจากเชื้อรา 7 ชนิด และ เชื้อไวรัส 1 ชนิด ได้แก่ โรครากและโคนเน่าดำ (black root and stem rot) สาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum*, โรคหัวเน่าราเขียว สาเหตุจากเชื้อรา *Penicillium* sp., โรคใบจุด สาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria*, *Phoma*, *Mycosphaerella*, โรคใบไหม้ สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Botrytis cinereal* และโรคใบด่าง (mosaic) สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส *Cucumber mosaic virus* (CMV) (ตารางที่ 1.3) สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคของอินทผลัมและลิลลี่ ระหว่างเดือนตุลาคม 2564 ถึง เดือนกันยายน 2565 ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พะเยา อุตรดิตถ์ ชัยภูมิ อุดรธานี หนองคาย อุบลราชธานี บุรีรัมย์ เพชรบูรณ์ กำแพงเพชร พิษณุโลก สุโขทัย นครสวรรค์ อุทัยธานี และตาก รวม 16 จังหวัด นำมาศึกษาและจำแนก

ชนิดของเชื้อสาเหตุได้ ดังนี้ อินทผลัม พบโรคใบจุด graphiola หรือ false smut สาเหตุจากเชื้อรา *Graphiola phoenicis* (ภาพที่ 1.4), โรคใบจุด (leaf spot) สาเหตุจากเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. (ภาพที่ 1.5) และโรคราดำ สาเหตุจากเชื้อรา *Meliola* sp. (ภาพที่ 1.6) ดังตารางที่ 4 นอกจากนี้ยังพบลักษณะอาการใบจุดสีเหลืองออกส้มที่เกิดจากการขาดธาตุโพแทสเซียม (ภาพที่ 7ก) และอาการใบล่างเหลืองที่เกิดจากการขาดธาตุไนโตรเจน (ภาพที่ 1.7ข) ลิลลี่ พบโรคใบด่าง สาเหตุจากเชื้อไวรัส *Cucumber mosaic virus* (CMV) (ภาพที่ 1.8) ตัวอย่างโรคพืชที่ได้จากการศึกษาจะเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.4 ลักษณะอาการของโรคใบจุด graphiola หรือ false smut ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Graphiola phoenicis* ที่พบในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี

ภาพที่ 1.5 ลักษณะอาการของโรคใบจุด (leaf spot) ของอินทผลัม ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ที่พบในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดอุตรดิตถ์



ภาพที่ 1.6 ลักษณะอาการของโรคราดำ (sooty mold) ของอินทผลัม ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Meliola* sp. ที่พบในพื้นที่อำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.7 ลักษณะอาการขาดธาตุโพแทสเซียมของอินทผลัม

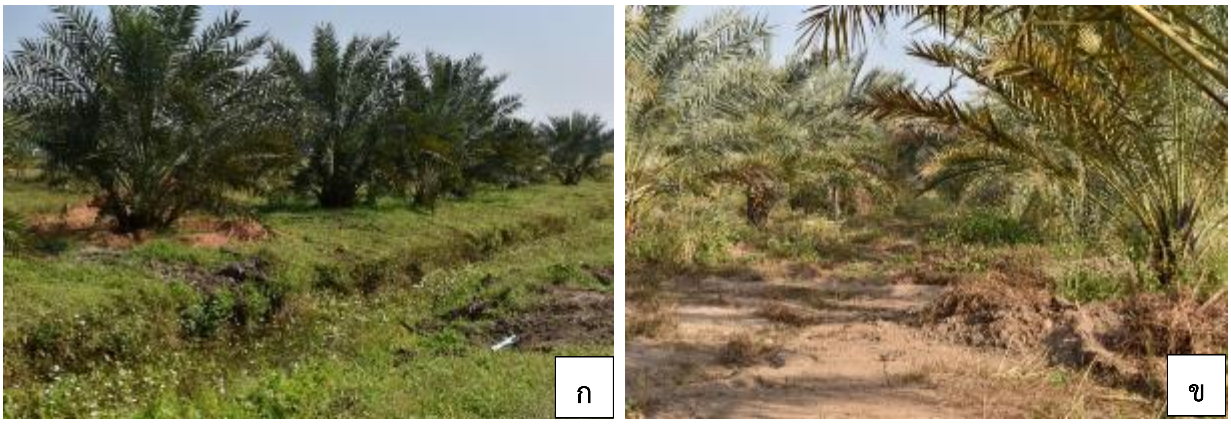
ก. ลักษณะอาการขาดธาตุโพแทสเซียมของอินทผลัม ในพื้นที่อำเภอบ้านไร่ จังหวัดอุทัยธานี

ข. ลักษณะอาการขาดธาตุไนโตรเจนของอินทผลัมที่พบในพื้นที่อำเภอศรีสำโรง จังหวัดสุโขทัย

ภาพที่ 1.8 ลักษณะอาการของโรคใบด่าง (mosaic) ของลิลลี่ ที่มีสาเหตุจากไวรัส *Cucumber mosaic virus* (CMV) ที่พบในพื้นที่อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่

กรมวิชาการเกษตร

การศึกษาชนิดของวัชพืชใน อินทผลัม มันเทศ ลิลลี่ กล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส เพื่อจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช สำรวจวัชพืชในอินทผลัม และลิลลี่ ในภาคเหนือ จำนวน 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ พะเยา ลำปาง แพร่ อุตรดิตถ์ และลำพูน จำนวน 16 แปลง ประกอบด้วย อินทผลัม 14 แปลง และลิลลี่ 2 แปลง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 8 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดนครพนม บุรีรัมย์ อุดรธานี อุบลราชธานี หนองคาย นครราชสีมา กาฬสินธุ์ และสกลนคร จำนวน 17 แปลง เป็นแปลงอินทผลัมทั้งหมด และภาคกลาง จำนวน 13 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดสุพรรณบุรี ชัยนาท สิงห์บุรี ลพบุรี นครสวรรค์ นนทบุรี นครปฐม พระนครศรีอยุธยา อ่างทอง กำแพงเพชร อุทัยธานี พิษณุโลก และสระบุรี จำนวน 24 แปลง เป็นแปลงอินทผลัมทั้งหมด จากการสำรวมวัชพืชจำนวน 57 แปลง ประกอบด้วย อินทผลัม 55 แปลง และลิลลี่ 2 แปลง สามารถระบุชนิดวัชพืชรวมได้ 65 ชนิด โดยแยกเป็นในอินทผลัม 55 ชนิด และในลิลลี่ 11 ชนิด (ภาพที่ 1.9 – 1.10) และยังไม่สามารถระบุชนิดได้อีกหลายตัวอย่าง เช่น วงศ์ Asteraceae (ภาพที่ 1.11) และได้ตัวอย่างวัชพืชเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์วัชพืช 25 ตัวอย่าง



ภาพที่ 1.9 สภาพวัชพืชในแปลงอินทผลัม

ก. สภาพวัชพืชในแปลงอินทผลัม จังหวัดเชียงราย

ข. สภาพวัชพืชในแปลงอินทผลัม จังหวัดพะเยา

ภาพที่ 1.10 แปลงแปลงลิลลี่

ก. ลักษณะแปลงแปลงลิลลี่ จังหวัดเชียงราย ข. สภาพวัชพืชที่ขึ้นในแปลงลิลลี่ จังหวัดเชียงใหม่

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.11 ตัวอย่างวัชพืชที่ยังระบุชนิดไม่ได้

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 ศึกษาความเสี่ยงศัตรูพืชที่สัมพันธ์กับการนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก

1. สืบค้นและรวบรวมข้อมูล

1.1 การสืบค้นและรวบรวมข้อมูลทั่วไปของพืช จากหนังสือ สิ่งพิมพ์ ฐานข้อมูลออนไลน์ (CABI) ได้ข้อมูลพืช ประกอบด้วย ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาตร์ พันธุ์/สายพันธุ์ แหล่งผลิต ในประเทศผู้ส่งออก ผลผลิต ของ (1) บลูเบอรี่ (2) แก้วมังกร (3) เชอรี่ (4) สับปะรด (5) อินทผลัม (6) องุ่น (7) ลิลลี่ (8) กล้วยไม้ และข้อมูลข้อมูลทั่วไปของวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูกที่นำเข้า เช่น ชนิด ต้นกำเนิด ส่วนประกอบของวัสดุปลูก รวมทั้งข้อมูลของพืชสำหรับปลูก แหล่งผลิตในประเทศผู้ส่งออก การรับรองสุขอนามัยของประเทศผู้ส่งออก

1.2 การสืบค้นและรวบรวมข้อมูลทั่วไปของศัตรูพืช จากหนังสือ สิ่งพิมพ์ ฐานข้อมูลออนไลน์ (CABI) ได้ข้อมูลของศัตรูพืช ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ การจำแนกทางอนุกรมวิธาน พืชอาศัย/พืชอาหาร ลักษณะการทำลาย การแพร่ระบาด ความเสียหายของผลผลิตที่เกิดจากการทำลายของศัตรูพืช ที่มีรายงานในประเทศต้นทาง ประเทศไทย และประเทศอื่น ๆ ดังนี้

- **บลูเบอรี่** ได้ข้อมูลศัตรูบลูเบอรี่ที่มีรายงานในประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ประเทศไทย และประเทศอื่นๆ จำนวน 231 ชนิด ประกอบด้วย แมลง 93 ชนิด ไร 3 ชนิด แบคทีเรีย 14 ชนิด รา 87 ชนิด โครมิสตา 8 ชนิด ไวรัส 12 ชนิด วัชพืช 3 ชนิด และไส้เดือนฝอย 11 ชนิด

- **แก้วมังกร** ได้ข้อมูลศัตรูแก้วมังกรที่มีรายงานในประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ประเทศไทย และประเทศอื่นๆ จำนวน 57 ชนิด คือ แมลง 25 ชนิด แบคทีเรีย 7 ชนิด รา 20 ชนิด ไส้เดือนฝอย 5 ชนิด และไวรัส 4 ชนิด

- **เชอรี่** ได้ข้อมูลศัตรูเชอรี่ที่มีรายงานในประเทศต้นทาง ประเทศไทย และประเทศอื่น ๆ จำนวน 262 ชนิด ประกอบด้วย แมลง 165 ชนิด ไร 17 ชนิด แบคทีเรีย 9 ชนิด รา 43 ชนิด ไวรัส 19 ชนิด ไวรอยด์ 3 ชนิด และไส้เดือนฝอย 6 ชนิด

- **สับปะรด** ได้ข้อมูลศัตรูสับปะรดพบมีรายงานในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิก ประเทศไทย และประเทศอื่นๆ พบศัตรูของสับปะรดจำนวน 610 ชนิด ได้แก่ แมลง 202 ชนิด ไส้เดือนฝอย 85 ชนิด เชื้อรา 118 ชนิด แบคทีเรีย 17 ชนิด ไวรัส 7 ชนิด และวัชพืช 181 ชนิด

- **อินทผลัม** ได้ข้อมูลศัตรูอินทผลัมที่มีรายงานในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ประเทศไทย และประเทศอื่น ๆ มีจำนวนทั้งสิ้น 236 ชนิด ได้แก่ แมลง 150 ชนิด ไร 29 ชนิด แบคทีเรีย 2 ชนิด ไฟโตพลาสมา 3 ชนิด รา 30 ชนิด ไวรัส 1 ชนิด ไวรอยด์ 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 8 ชนิด และวัชพืช 12 ชนิด รวมทั้งจากการเก็บตัวอย่างอินทผลัมที่ในแปลงปลูก จ.พระนครศรีอยุธยา เมื่อวันที่ 21 เมษายน 2565 จำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ (1) Hasawi จากคูเวต (2) Um Ed Dahan จากสหรัฐอาหรับอิมิเรต (3) KL แม่โจ้ (4) Medjool จากสหรัฐอาหรับอิมิเรต และ (5) Deglet Noor จากอิหร่าน โดยอินทผลัมในแปลงปลูกมีอายุระหว่าง 3-5 ปี เมื่อนำตัวอย่างศัตรูพืชที่เก็บมาจำแนกพบว่าเป็น โรคราเขม่า (Glaphiola leaf spot) ซึ่งเกิดจากรา *Graphiola phoenicis* ซึ่งเป็นศัตรูพืชที่พบรายงานในประเทศไทย (สุมิตร, 2565) อย่างไรก็ตามยังพบร่องรอยการเข้าทำลายของด้วงแรดบนต้นอินทผลัม

- **องุ่น** ได้ข้อมูลศัตรูพืชของส่วนขยายพันธุ์องุ่นที่มีรายงานจากประเทศต้นทาง ประเทศไทย และประเทศอื่นๆทั่วโลก พบจำนวน 479 ชนิด แบ่งเป็นแมลง 175 ชนิด ไร 22 ชนิด แบคทีเรีย 21 ชนิด เชื้อรา 118 ชนิด

กรมวิชาการเกษตร

ไวรัส 48 ไวรอยด์ 4 ชนิด ไส้เดือนฝอย 43 ชนิด หอยทาก 3 ชนิด วัชพืช 45 ชนิด สำหรับผลการสำรวจศัตรูพืชในแปลงองุ่นพันธุ์แบล็คโอปอ (Black Opal) จำนวน 1 แปลงในอำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา พบศัตรูพืช ได้แก่ เพลี้ยไฟ ราน้ำค้าง และใบไหม้ (*Colletotriuchum* sp., *Alternaria* sp., *Phoma* sp.)

- **ลิลลี่** ได้ข้อมูลศัตรูลิลลี่ที่มีรายงานจากประเทศต้นทาง ประเทศไทย และประเทศอื่น ๆ ทั่วโลก รวม 113 ชนิด เป็นแมลง 35 ชนิด ไร 3 ชนิด หอยทาก 1 ชนิด ทาก 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 15 ชนิด แบคทีเรีย 4 ชนิด ไฟโตพลาสมา 2 ชนิด รา 24 ชนิด ไวรัส 24 ชนิด และวัชพืช 4 ชนิด

- **กล้วยไม้** ได้ข้อมูลศัตรูกล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส รวมทั้งสิ้น 112 ชนิด ประกอบด้วย ไร 6 ชนิด แมลง 35 ชนิด เชื้อรา 21 ชนิด แบคทีเรีย 11 ชนิด ไวรัส 32 ชนิด ไวรอยด์ 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 3 ชนิด และหอยทาก 3 ชนิด

- **วัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก** ได้ข้อมูลกลุ่มศัตรูพืชที่สามารถติดมากับพืชปลูกและวัสดุปลูกจากต่างประเทศ ได้แก่ เมล็ดวัชพืช รา แบคทีเรีย ไส้เดือนฝอย แมลง ไร หอยทาก

2. การตรวจสอบศัตรูพืชที่อาจติดมากับพืช/วัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูกนำเข้าในห้องปฏิบัติการ ได้ผลการตรวจสอบศัตรูพืช ดังนี้

- จากการสุ่มตัวอย่างสินค้าพืชนำเข้าเพื่อนำมาตรวจสอบศัตรูพืช โดยมีสินค้าที่นำเข้าระหว่างเดือนตุลาคม 2564 – ธันวาคม 2565 พบว่า **ผลบลูเบอรี่** จากด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ จ.สมุทรปราการ และ **ผลแก้วมังกร** จากด่านตรวจพืชท่าเรือแหลมฉบัง อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ผลการตรวจสอบศัตรูพืชไม่พบศัตรูพืช **ผลเชอรี่** ไม่พบแมลง ไร และวัชพืชบนผลเชอรี่นำเข้า แต่พบอาการผิดปกติที่อาจเกิดจากเชื้อสาเหตุโรคพืช 2 ชนิด คือ *Alternaria alternata* และ *Botrytis cinerea* ซึ่งราทั้ง 2 ชนิดนี้มีรายงานพบในประเทศไทย **ดอกและต้นลิลลี่** จากสาธารณรัฐประชาชนจีน และสาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม จากด่านตรวจพืชเชียงของ ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ และด่านตรวจพืชหนองคาย และจากการตรวจสอบศัตรูพืช ณ ห้องปฏิบัติการด่านตรวจพืชหนองคาย และด่านตรวจพืชเชียงของ พบเพียงซากของแมลง ได้แก่ แมลงหวี่ขาว และเพลี้ยไฟที่ไม่มีชีวิตจากตัวอย่างดอกและต้นลิลลี่ที่นำเข้า และไม่พบอาการผิดปกติที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช **ต้นกล้วยไม้สกุลหวาย ดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ดอกกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซีส ก้านช่อดอกกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซีส และต้นกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิสลูกผสม** จากญี่ปุ่น ไต้หวัน มาเลเซีย เกาหลี และจีน แสดงรายละเอียดการนำเข้าดังตารางที่ 1 การตรวจสอบศัตรูพืชที่อาจติดมากับตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส (ต้นกล้วยไม้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และก้านช่อดอก) ที่นำเข้าในห้องปฏิบัติการจำนวน 25 ตัวอย่าง ได้แก่ ต้นกล้วยไม้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสกุลหวาย จำนวน 8 ตัวอย่าง ต้นกล้วยไม้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อฟาแลนนอปซีสจำนวน 12 ตัวอย่าง และก้านช่อกล้วยไม้ฟาแลนนอปซีส จำนวน 5 ตัวอย่าง ตรวจสอบชนิดศัตรูพืชเบื้องต้นโดยการสังเกตด้วยตาเปล่าและตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo เพื่อตรวจหาเส้นใยของเชื้อรา อาการฉ่ำน้ำของแบคทีเรีย ไส้เดือนฝอย ตัวอ่อน ไข่ หนอนของแมลงวัน และหอยทาก การตรวจสอบเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการโดยใช้เทคนิคเซรุ่มวิทยาด้วยวิธี ImmunoStrip® Tests (Agdia, USA) สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัส *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) and *Tobacco mosaic virus* (TMV) เทคนิคทางชีวโมเลกุลด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) และ Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) สำหรับการตรวจสอบเชื้อไวรัส *Cymbidium mosaic virus*

กรมวิชาการเกษตร

(CyMV) and *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) และ Potyvirus Group ผลการตรวจไม่พบ แมลง ไร หอยทาก เชื้อรา และแบคทีเรีย พบเชื้อไวรัส TMV, ORSV และ CyMV ในกล้วยไม้ฟาแลนนอปซีส และไวรัส CyMV ในกล้วยไม้สกุลหวายเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สำหรับตัวอย่างก้านช่อกล้วยไม้ฟาแลนนอปซีสตรวจไม่พบเชื้อไวรัส เชื้อไวรัสทั้งสามชนิดที่ตรวจพบในกล้วยไม้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นเป็นศัตรูพืชของกล้วยไม้ที่มีรายงานในประเทศไทย

วัสดุปลูกร่วมกับพืชปลูกนำเข้าจากด่านตรวจพืชท่าเรือแหลมฉบังและด่านตรวจพืชเชียงของ พบว่า พืชสำหรับปลูกที่นำเข้า เช่น ไม้ประดับ (ไม้กระถาง) โดยชนิด (species) ของพืชสำหรับปลูกดังกล่าวจัดเป็นสิ่งกำกัดและสิ่งไม่ต้องห้ามตามกฎหมายว่าด้วยการกักพืชซึ่งยังไม่มีข้อกำหนดการนำเข้าด้านสุขอนามัยพืชเฉพาะ และพบว่าวัสดุปลูกที่ใช้เป็นหรือมีส่วนประกอบเป็นสิ่งต้องห้ามหรือส่วนหนึ่งส่วนใดของสิ่งต้องห้าม เช่น เส้นใยมะพร้าว (กาบมะพร้าว ขุยมะพร้าว) รวมทั้งการนำเข้าพืชสำหรับปลูกจะมีดินติดเข้ามาด้วย ตลอดจนพบสิ่งมีชีวิต เช่น แมลง (ตัวอ่อนแมลงในอันดับ Coleoptera วงศ์ Scarabaeidae) ทาก หอย และไส้เดือน นอกจากนี้ สินค้าที่ส่งมอบดังกล่าวมีใบรับรองสุขอนามัยพืชกำกับมาด้วย

อย่างไรก็ตาม ระหว่างเดือน ตุลาคม 2564 – ธันวาคม 2565 ไม่พบข้อมูลการนำเข้าผลสับปะรดสด หน่อพันธุ์สับปะรด ต้นอินทผลัม และส่วนขยายพันธุ์องุ่น จากต่างประเทศรวมถึงประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก จึงไม่ได้มีการดำเนินการตรวจสอบศัตรูพืชกับพืชนำเข้าดังกล่าว ทั้งนี้ ผลสดอินทผลัมจัดเป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 ลงวันที่ 26 เมษายน พ.ศ. 2550 จึงไม่พบการนำเข้าผลสดอินทผลัมมายังประเทศไทย ทำให้ไม่มีการดำเนินการตรวจสอบศัตรูพืชกับพืชนำเข้าดังกล่าว

3. การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 1: Initiation)

กระบวนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเป็นการทบทวนนโยบาย ระเบียบข้อบังคับ ข้อกำหนด หรือการดำเนินงานด้านสุขอนามัยพืช โดยการวิเคราะห์เส้นทาง (pathway) ของศัตรูพืช ได้แก่ (1) ผลบลูเบอรี่ (2) เมล็ดพันธุ์และกิ่งพันธุ์แก้วมังกร (3) ผลเชอรี่ (4) ผลสับปะรด (5) ผลอินทผลัม (6) กิ่งพันธุ์องุ่น (7) ดอกและต้นลิลลี่ (8) ต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และก้านช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส และ (9) วัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก ที่นำเข้าจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก และพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช คือ ประเทศไทยซึ่งเป็นพื้นที่ที่อยู่ในอันตราย (endangered area) ที่ศัตรูพืชอาจจะติดเข้ามาพร้อมกับการนำเข้าสินค้าพืชดังกล่าวข้างต้น อีกทั้งประเทศไทยยังไม่เคยมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของการนำเข้าสินค้าพืชดังกล่าวรวมถึงวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก จากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ส่วนข้อมูลในต่างประเทศ ที่มีผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเสร็จแล้ว ได้แก่ ออสเตรเลีย พบมีศัตรูพืชกักกันของส่วนขยายพันธุ์องุ่น จำนวน 81 ชนิด ซึ่งมีข้อกำหนดการนำเข้าด้านสุขอนามัยพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน ได้แก่ การตรวจสอบต้นพืชในช่วงการเจริญเติบโต และทดสอบในห้องปฏิบัติการ (field inspection and laboratory test) นอกจากนี้ส่วนขยายพันธุ์องุ่น เมื่อมาถึงยังเครือรัฐออสเตรเลีย ต้องตรวจสอบอาการบนต้นองุ่น และทดสอบในห้องปฏิบัติการ ภายหลังการนำเข้า (Post entry quarantine) และต้องผ่านการกำจัดศัตรูพืช ได้แก่ อิมิดาโคลพริด ความเข้มข้น 100 ppm และ 1% Eco-Oil® นาน 30 วินาที) แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์หรือคลอรีน ความเข้มข้น 1% นาน 5 นาที และแช่ในน้ำร้อน

กรมวิชาการเกษตร

อุณหภูมิ 50℃ นาน 30 นาทีก่อนทำการปลูก โดยทำการปลูกเป็นระยะเวลา 16 เดือน (ปลูกในสถานกักพืช 12 เดือน และตรวจสอบบนต้นพืช และทดสอบโรคพืชในห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 4 เดือน)

นำข้อมูลศัตรูพืช/กลุ่มศัตรูพืช ตามข้อ 1.2 ที่ได้จากการสืบค้นและรวบรวมจากหนังสือ ตำรา เอกสารวิชาการ ฐานข้อมูลศัตรูพืช และจากการตรวจสอบศัตรูพืชที่พบติดมากับ (1) บลูเบอรี่ (2) แก้วมังกร (3) เชอรี่ (4) สับปะรด (5) อินทผลัม (6) องุ่น (7) ลิลลี่ (8) กล้วยไม้ และ (9) วัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก ที่นำเข้าจากต่างประเทศ มาจัดทำตารางศัตรูพืชเพื่อใช้สำหรับการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest Risk Assessment)

ผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนการจัดประเภทศัตรูพืช โดยนำรายชื่อศัตรูพืชในข้อ 1.2 มาจัดทำตารางศัตรูพืช โดยพิจารณาจาก (1) ระบุชนิดของศัตรูพืช (pest identity) (2) ตรวจสอบว่าเป็นศัตรูพืชที่มีพบในประเทศไทยหรือไม่ (3) ตรวจสอบสถานภาพการควบคุมศัตรูพืช (Regulatory status) กรณีที่ศัตรูพืชชนิดนั้นมีปรากฏในประเทศไทย (4) ประเมินศักยภาพของศัตรูพืชในการเข้ามาตั้งรกรากและการแพร่กระจายในประเทศไทยหรือไม่ และ (5) ประเมินศักยภาพของศัตรูพืช ในการก่อให้เกิดผลตามมาทางเศรษฐกิจในประเทศไทย ซึ่งได้รายชื่อศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน ดังนี้

- **ผลบลูเบอรี่** ได้ศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ แมลง 6 ชนิด *Acrobasis vaccinii, Rhagoletis mendax, Scaphytopius magdalensis, Spodoptera eridania, Otiorhynchus rugosostriatus, Ceratitis capitata* ไร 1 ชนิด *Acalitus vaccinii* และรา 1 ชนิด *Exobasidium vaccinii*
- **เมล็ดพันธุ์และกิ่งพันธุ์แก้วมังกร** ได้รายชื่อศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน จำนวน 11 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus avenaceus, Aspergillus flavus var. flavus, Aspergillus tubingensis, Curvularia oryzae, Dysmicoccus lepelleyi, Lopholeucaspis cockerelli, Pseudococcus viburni, Pheidole megacephala, Cactus virus X, Pitaya virus X, Schlumbergera Virus X* และ *Zygocactus virus X*
- **ผลเชอรี่** ได้รายชื่อศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ ไร *Amphitetranychus viennensis* เพลี้ยหอย *Parthenolecanium corni, Diaspidiotus ostreaeformis, Lepidosaphes ulmi, Parlatoria oleae* เพลี้ยแป้ง *Phenacoccus aceris* หนอนผีเสื้อ *Archips rosana, Cydia pomonella, Lobesia botrana*
- **ผลสับปะรด** ได้รายชื่อที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *Pantoea ananatis, Pantoea agglomerans, Erwinia chrysanthemi, Phytophthora cinnamomi, Tomato Spotted Wilt Virus, Erechtites valerianifolius, Hibiscus trionum, Digitaria insularis*
- **ผลอินทผลัม** ได้รายชื่อศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของผลอินทผลัมสดนำเข้าจากประเทศต้นทางในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก จำนวน 18 ชนิด แบ่งเป็น แมลง 14 ชนิด ได้แก่ *Anastrepha suspensa, Bactrocera tryoni, Batrachedra amydraula, Ceratitis capitata, Cadra calidella, Zaprionus indianus, Ectomyelois ceratoniae, Asterolecanium phoenicis, Palmaspis phoenicis, Phoenicoccus marlatti, Parlatoria blanchardi, Aspidiotus nerii, Pseudaulacaspis pentagona, Ommatissus binotatus var. Lybicus* ไร 1 ชนิด *Oligonychus afrasiaticus* และ รา 3 ชนิด ได้แก่ *Alternaria citri, Phaeoacremonium aleophilum, Gibberella intricans*

กรมวิชาการเกษตร

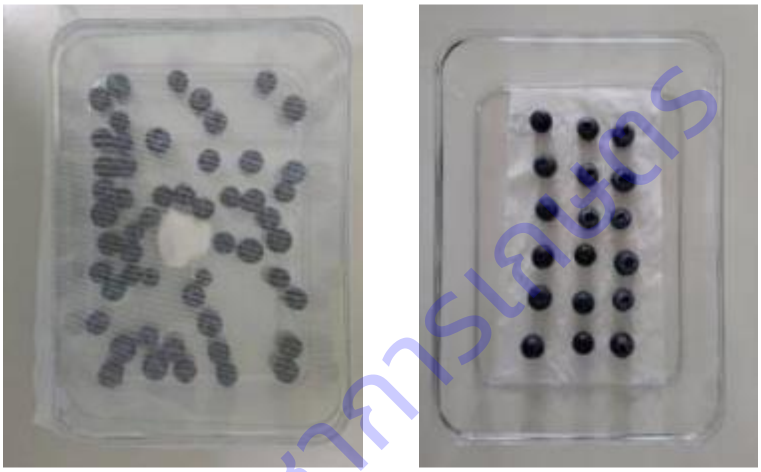
- **กิ่งพันธุ์องุ่น** ได้รายชื่อศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน จำนวน 15 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย *Candidatus Phytoplasma trifolii, Candidatus Phytoplasma solani , Candidatus Phytoplasma australiense, Xylella fastidiosa, Grapevine yellows phytoplasmas, Xylophilus ampelinus* ไวรัส *Grapevine asteroid mosaic-associated virus, Grapevine deformation virus, Grapevine fanleaf virus, Grapevine Pinot gris virus, Grapevine red blotch virus , Grapevine rupestris stem pitting-associated virus , Grapevine rupestris vein feathering virus , Grapevine virus A, Grapevine leafroll-associated viruses*

- **ดอกและต้นลิลลี่** ได้รายชื่อศัตรูพืชที่ที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน จำนวน 41 ชนิด ดังนี้ แมลง 6 ชนิด ได้แก่ *Adelphocoris lineolatus, Agrotis segetum, Lilioceris lilii, Macrosiphum euphorbiae, Peridroma saucia* และ *Theretra oldenlandiae* ไร 2 ชนิด ได้แก่ *Petrobia latens* และ *Tyrophagus putrescentiae* ไส้เดือนฝอย 9 ชนิด ได้แก่ *Aphelenchoides fragariae, Ditylenchus destructor, Ditylenchus dipsaci, Pratylenchus brachyurus, Pratylenchus penetrans, Pratylenchus vulnus, Pratylenchus zeae, Trichodorus* และ *Tylenchorhynchus claytoni* แบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *Burkholderia gladioli pv. gladioli* และ *Pseudomonas marginalis pv. marginalis* ไฟโตพลาสมา 1 ชนิด ได้แก่ *Clover phyllody phytoplasma* รา 7 ชนิด ได้แก่ *Botryotinia fuckeliana, Chalara elegans, Colletotrichum boninense, Globisporangium irregulare, Penicillium expansum, Phytophthora cactorum* และ *Phytophthora cryptogea* ไวรัส 12 ชนิด ได้แก่ *Apple stem grooving virus, Bean yellow mosaic virus, Broad bean wilt virus, Carnation mottle virus, Dasheen mosaic virus, Lily mottle virus, Prunus necrotic ringspot virus, Tobacco rattle virus, Tobacco ringspot virus, Tobacco streak virus, Tomato ringspot virus* และ *Turnip mosaic virus* และวัชพืช 2 ชนิด ได้แก่ *Polygonum aviculare* และ *Senecio vulgaris*

- **ต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และก้านช่อดอกของกล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส** ได้รายชื่อศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันจำนวน 22 ชนิด ได้แก่ ไวรัส จำนวน 21 ชนิด *Calanthe mosaic virus, Capsicum chlorosis virus*-phalaenopsis isolate, *Colombian datura virus, Impatiens necrotic spot virus, Dasheen mosaic virus, Diurus virus* Y, *Dendrobium mosaic virus, Dendrobium vein necrosis virus, Habeneria mosaic virus, Orchid fleck virus, Pecteilis mosaic virus, Phalaenopsis chlorotic spot virus, Phaius virus* X, *Tobacco rattle virus, Tomato ringspot virus, Tomato spotted wilt orthotospovirus, Vanilla mosaic virus, Sarcochilus virus Y, Spiranthes mosaic virus 2, Spiranthes mosaic virus* 3 และไวรอยด์ 1 ชนิด *Dendrobium viroid*

- **วัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก** ได้กลุ่มศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน เช่น รา *Chalara elegans, Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium oxysporum f.sp. elaeidis, Fusarium oxysporum f.sp. melonis, Fusarium oxysporum f.sp. lilii, Fusarium oxysporum f.sp. narcissi, Phytophthora boehmeriae, Phytophthora capsica, Phytophthora citricola, Phytophthora cryptogea, Phytophthora hibernalis, Phytophthora katsurae, Phytophthora megakarya, Phytophthora megasperma, Phytophthora porri, Sclerotium cepivorum*

ภาพที่ 2.1 ลักษณะผลบลูเบอรี่สดนำเข้า



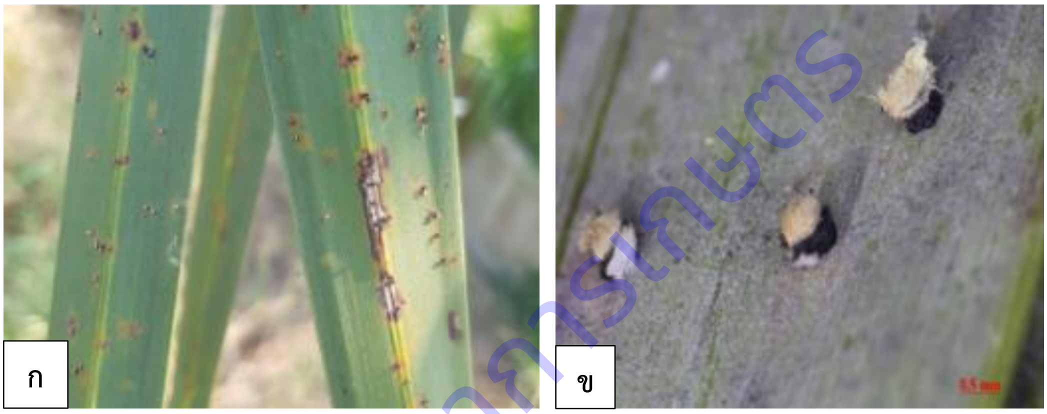
กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.2 เก็บตัวอย่างผลบลูเบอรี่เพื่อตรวจสอบศัตรูพืช

ภาพที่ 2.3 ผลเชอรี่นำเข้า

ก. ผลเชอรี่นำเข้า ข.เก็บผลเชอรี่ที่มีอาการเพื่อตรวจสอบ ค. ลักษณะอาการของโรค

ภาพที่ 2.4 ลักษณะสวนอินทผลัม จ.พระนครศรีอยุธยา



ภาพที่ 2.5 โรคราเขม่า (False smut) บนใบอินทผลัม

ก. อาการของโรคราเขม่า (False smut) บนใบอินทผลัม

ข. ลักษณะของรา *Graphiola phoencis* บนใบอินทผลัมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.6 ลักษณะการเข้าทำลายของด้วงแรดบนยอดอินทผลัม

ภาพที่ 2.7 ลักษณะต้นลิลลี่ในสภาพโรงเรือน

ภาพที่ 2.8 การตัดดอกลิลลี่ที่ปลูกในสภาพโรงเรือน

ภาพที่ 2.9 การจัดช่อดอกลิลลี่เพื่อเตรียมจำหน่าย

ภาพที่ 2.10 ต้นลิลลี่ในวัสดุปลูกพีทมอส

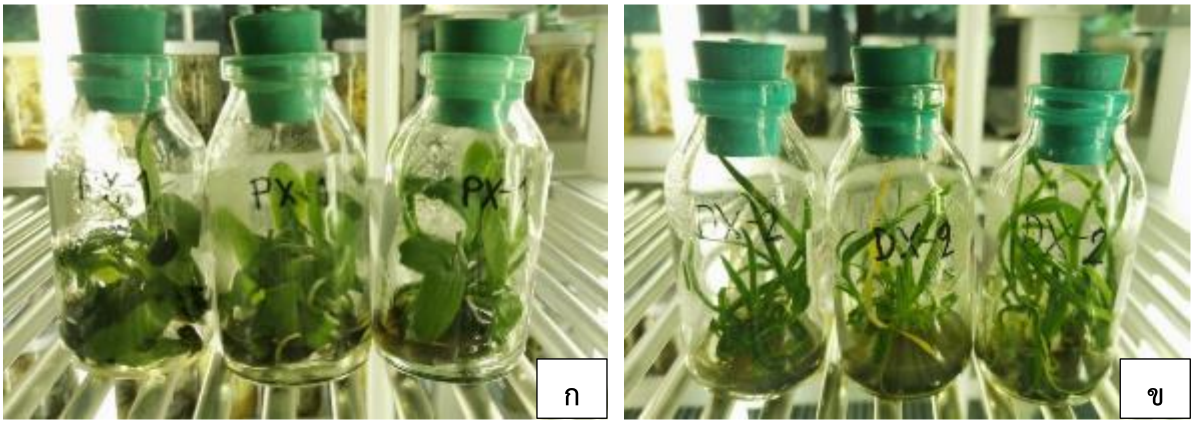
กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.11 การตรวจสอบดอกลิลลี่ ณ จุดนำเข้า

ภาพที่ 2.12 ตัวอย่างดอกลิลลี่ที่สุ่มมาตรวจสอบศัตรูพืช ณ ห้องปฏิบัติการของด่านตรวจพืช

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.13 การตรวจสอบศัตรูพืชจากตัวอย่างดอกลิลลี่ที่นำเข้า ณ ห้องปฏิบัติการของด่านตรวจ



ภาพที่ 2.14 ต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ก.ต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Phalaenopsis* spp. ข.ต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Dendrobium* spp.

ภาพที่ 2.15 ลักษณะอาการบริเวณใบของกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิสเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ตรวจพบเชื้อไวรัส CyMV

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.16 ก้านช่อ *Phalaenopsis* spp.

โครงการวิจัยย่อยที่ 3 การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักและหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า

การตรวจวินิจฉัยชนิดของไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้า จากการสืบค้นข้อมูล ไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ได้แก่ *Tobacco mosaic virus* (TMV) *Tomato mosaic virus* (ToMV) *Pepper mild mottle virus* (PMMoV,PMMV) *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV) *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV) มีโอกาสติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริก (Carlye *et. al*., 2000) ประเทศที่มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ได้แก่ Brazil Chile China England France Guatemala Hungary India Indonesia Israel Italy Japan Kenya Korea Malaysia Myanmar Netherlands Peru Philippines South Africa Spain Taiwan USA และ Vietnam และพริก ได้แก่ Chile China France India Indonesia Israel Italy Japan Korea Malaysia Netherlands Peru Philippines Spain Taiwan Tanzania UK USA และ Vietnam (กลุ่มวิจัยการกักกันพืช, 2022) เทคนิควิธีการในการตรวจสอบไวรัสจีนัส *Tobamovirus* โดยเทคนิค Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นวิธีการทางด้านเซรุ่มวิทยา (รัชนี, 2558) และ เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคด้านชีวโมเลกุลสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA replication (Kary Mullis *et. al*., 2000) สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ จำนวน 275 ตัวอย่าง นำเข้าจาก 24 ประเทศ ได้แก่ Brazil Chile China England France Guatemala Hungary India Indonesia Israel Italy Japan Kenya Korea Malaysia Myanmar Netherlands Peru Philippines South Africa Spain Taiwan USA และ Vietnam ผลการตรวจเชื้อไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค PCR ไม่พบไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้า และ สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์พริก จำนวน 235 ตัวอย่าง นำเข้าจาก 21 ประเทศ ได้แก่ Chile China France India Indonesia Israel Italy Japan Korea Malaysia Netherlands Peru Philippines Spain Taiwan Tanzania UK USA และ Vietnam ผลการตรวจเชื้อไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค PCR ไม่พบไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้า ปลูกสังเกตุลักษณะอาการผิดปกติในโรงเรือนปลูกพืช ไม่พบอาการผิดปกติที่เกิดจากเชื้อไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ติดตามตรวจสอบเชื้อไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริกนำเข้า จังหวัดขอนแก่น อุดรธานี สกลนคร เชียงใหม่ ผลการดำเนินงานไม่พบเชื้อไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ที่เป็นศัตรูพืชกักกันในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ และพริกนำเข้า

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 3.1 Seedling symptom test.

ภาพที่ 3.2 Field inspection in tomato crops.

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 3.3 Field inspection in pepper crops.

การตรวจวินิจฉัย Potato cyst nematode ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า

การสืบค้นข้อมูลการระบาดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิด Potato cyst nematode พบว่าประเทศผู้ส่งออกหัวพันธุ์มันฝรั่งมายังประเทศไทยที่ได้รับการอนุญาตนำเข้าตามประกาศกรมวิชาการเกษตร ได้แก่

1) ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่องเงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากอาณาจักรเนเธอร์แลนด์ พ.ศ. 2552

2) ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่องเงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากนิวซีแลนด์ พ.ศ. 2552

3) ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่องเงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากสกอตแลนด์ พ.ศ. 2552

4) ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่องเงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากสหรัฐอเมริกา พ.ศ. 2552

5) ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่องเงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากเครือออสเตรเลีย พ.ศ. 2552

6) ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่องเงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากรัฐอิสราเอล พ.ศ. 2552

7) ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่องเงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากแคนนาดา พ.ศ. 2559 นั้น มีการรายงานพบการระบาดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิด potato cyst nematode ในมันฝรั่ง (CABI, 2021)

การสืบค้นวิธีการตรวจสอบไส้เดือยฝอยศัตรูพืชชนิด potato cyst nematode 1. วิธีการแยกไส้เดือนฝอย Potato cyst nematode (EPPO, 2013) วิธีแยกไส้เดือนฝอยจากหัวพันธุ์มันฝรั่งด้วยวิธี Maceration and centrifugal flotation (Coolen และ D'Herde, 1972) และ วิธีแยก cyst ของไส้เดือยฝอย potato cyst nematode จากดินที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่ง ด้วยวิธี Centrifugal flotation method (Caveness และ Jensen, 1955)

สืบค้นวิธีการจัดจำแนกไส้เดือนฝอย Potato cyst nematode (EPPO, 2017)

1. จัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological)

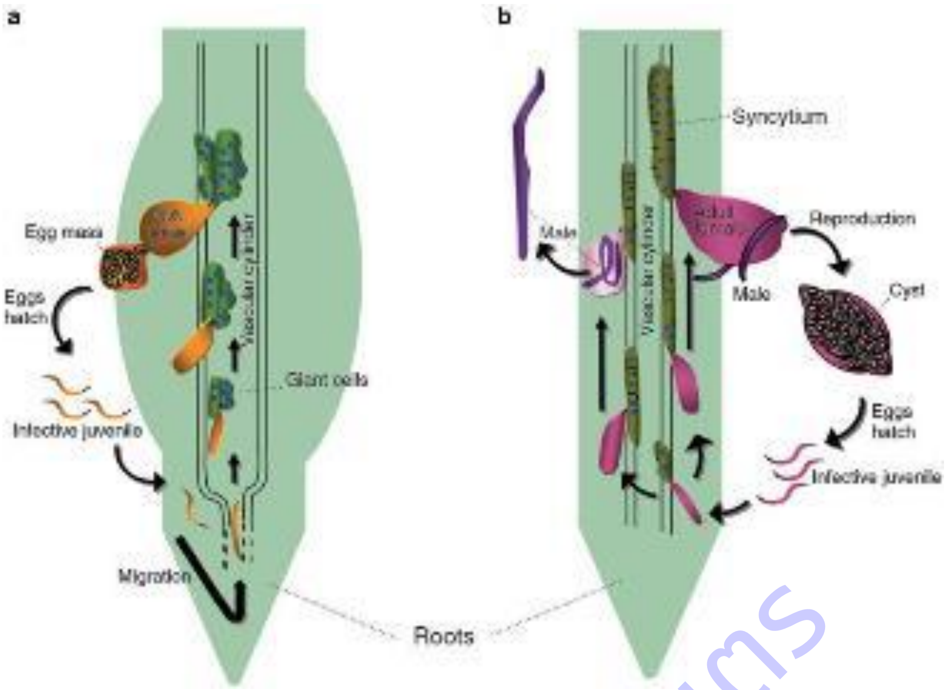
2. จัดจำแนกชนิดด้วยวิธีชีวโมเลกุลเทคนิค Multiplex PCR test (Bulman และ Marshall, 1997)

2. สุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากทุกประเทศตามมาตรฐาน ISPM 31 (Methodologies for sampling of consignments) โดยทำการสุ่มตัวอย่างจากด่านตรวจพืชต่าง ๆ ที่มีการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2564 ถึง 30 กันยายน 2565 ทั้งหมด 6 ประเทศ ได้แก่ 1) ราชอาณาจักรสกอตแลนด์ นำเข้าจำนวน 21 ครั้ง น้ำหนักรวม 4,256,750 กิโลกรัม 2) แคนาดา นำเข้าจำนวน 1 ครั้ง น้ำหนักรวม 729,000 กิโลกรัม 3) เครือรัฐออสเตรเลีย นำเข้าจำนวน 3 ครั้ง น้ำหนักรวม 276,000 กิโลกรัม 4) เนเธอร์แลนด์ นำเข้าจำนวน 4 ครั้ง น้ำหนักรวม 241,500 กิโลกรัม 5) ราชอาณาจักรนิวซีแลนด์ 1 ครั้ง น้ำหนักรวม 25,000 กิโลกรัม 6) สหรัฐอเมริกา นำเข้าจำนวน 1 ครั้ง น้ำหนักรวม 322 กิโลกรัม โดยทำการสุ่มหัวพันธุ์มันฝรั่งจำนวน 600 หัวต่อตัวอย่าง เพื่อใช้สำหรับการตรวจสอบโรคกับหัวพันธุ์

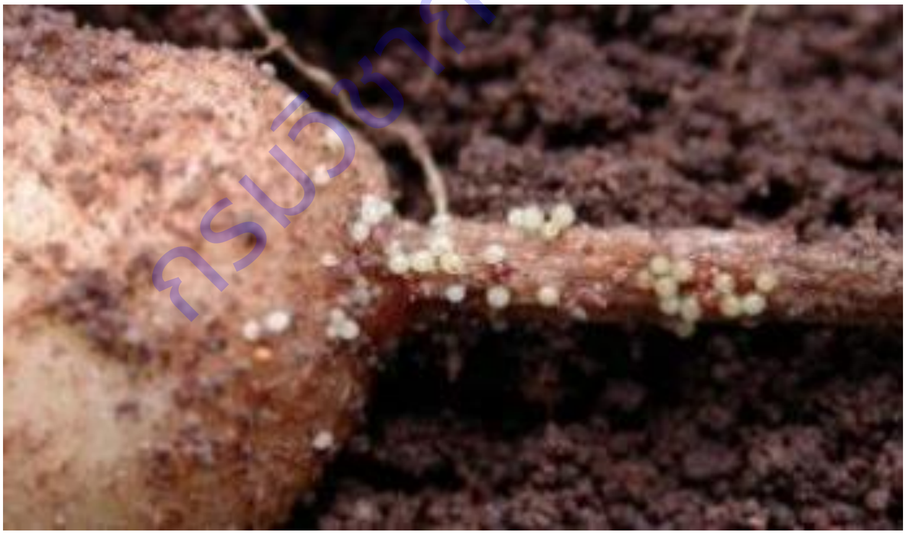
แยกไส้เดือยฝอยศัตรูพืชจากหัวพันธุ์มันฝรั่งและเศษดินที่ติดมากับหัวพันธุ์จากตัวอย่างนำเข้าระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2564 ถึง 30 กันยายน 2565 ยังไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิด potato cyst nematode ด้วยวิธีการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสันฐานวิทยา

ติดตามและสำรวจแปลงปลูกหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าในพื้นที่แปลงปลูก อำเภอเวียงป่าเป้า อำเภอเทิง จังหวัดเชียงราย อำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา และ อำเภอพบพระ จังหวัดตาก สุ่มเก็บตัวอย่างดินแปลงปลูกหัวพันธุ์มันฝรั่ง

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3.4 Life cycle of (a) root-knot nematode and (b) cyst nematode (Abad and Williamson, 2010)



ภาพที่ 3.5 ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิด potato cyst nematode ที่เข้าทำลายมันฝรั่ง

ที่มา : https://www.potatopro.com/es/news/2011/canadian-government-supports-potato-cyst-nematode-research สืบค้นวันที่ 23 กุมภาพันธ์ 2565

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 3.6 การเข้าทำลายของ potato cyst nematode ชนิด white potato cyst nematode (*Globodera pallida*)

ที่มา : https://www.business.qld.gov.au/industries/farms-fishing-forestry/agriculture/crop-growing/priority-pest-disease/potato-cyst-nematodes

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 3.7 ภาพการเข้าทำลายของ potato cyst nematode ชนิด Yellow or Golden potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis*)

ที่มา :https://www.business.qld.gov.au/industries/farms-fishing-forestry/agriculture/crop-growing/priority-pest-disease/potato-cyst-nematodes

การตรวจวินิจฉัย *Candidatus* Liberibacter solanacearum ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า

ผลการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อ *Candidatus* Liberibacter *solanacearum* ที่มีรายงานการเข้าทำลายในหัวพันธุ์มันฝรั่งของประเทศคู่ค้าที่ประเทศไทยมีการนำเข้า

- ประเทศไทยมีเงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจาก 7 ประเทศ ได้แก่ หัวพันธุ์นำเข้าจากประเทศแคนาดา (กรมวิชาการเกษตร, 2559) เนเธอร์แลนด์ (กรมวิชาการเกษตร, 2552ข) อิสราเอล (กรมวิชาการเกษตร, 2552ฉ) นิวซีแลนด์ (กรมวิชาการเกษตร, 2552ก) สกอตแลนด์ (กรมวิชาการเกษตร, 2552ค) ออสเตรเลีย (กรมวิชาการเกษตร, 2552จ) และสหรัฐอเมริกา (กรมวิชาการเกษตร, 2552ง)

- ข้อมูลเทคนิควิธีการตรวจสอบเชื้อ *Candidatus* Liberibacter *solanacearum* มีมาตรฐานการตรวจสอบเชื้อนี้ของ PM 7/143 (1) 'Candidatus Liberibacter *solanacearum*' (EPPO, 2020) และ ISPM 27 ANNEX 21 (DP 21: *Candidatus* Liberibacter *solanacearum* (IPPC, 2017)

- มาตรการการป้องกันการเข้ามาของเชื้อนี้ หัวพันธุ์มันฝรั่งควรมาจากพื้นที่ที่ไม่มีการระบาดของเชื้อนี้และหัวพันธุ์มันฝรั่งควรคัดเลือกเกรดสูง หากมีการนำเข้ามาแล้วควรอยู่ภายใต้การกักกันภายหลังการกักกัน (post-entry quarantine) ส่วนมันฝรั่งที่นำเข้าเพื่อการแปรรูปทางอุตสาหกรรมเท่านั้น นอกจากนี้ยังแนะนำให้ประเทศต่างๆ จัดตั้งระบบควบคุมการกำกับดูแลระดับชาติสำหรับแมลง *Bactovera cockerelli* และ *Candidatus* Liberibacter solanacearum (โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับ haplotypes A และ B) เพื่อปกป้องการระบาดของโรคนี้ในมันฝรั่งและต้องมีการดำเนินการอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพหากเกิดการระบาดของโรคนี้ (EPPO, 2020a)

2. สุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากทุกประเทศตามมาตรฐาน ISPM 31 (Methodologies for sampling of consignments) โดยทำการสุ่มตัวอย่างจากด่านตรวจพืชต่างๆ ที่มีการนำเข้า

3. หัวพันธุ์มันฝรั่งที่มีการนำเข้าตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2564 ถึง 30 กันยายน 2565 มีการนำเข้าจาก 6 ประเทศ ได้แก่ 1) ราชอาณาจักรสกอตแลนด์ นำเข้าจำนวน 21 ครั้ง น้ำหนักรวม 4,256,750 กิโลกรัม 2) แคนาดา นำเข้าจำนวน 1 ครั้ง น้ำหนักรวม 729,000 กิโลกรัม 3) เครือรัฐออสเตรเลีย นำเข้าจำนวน 3 ครั้ง น้ำหนักรวม 276,000 กิโลกรัม 4) เนเธอร์แลนด์ นำเข้าจำนวน 4 ครั้ง น้ำหนักรวม 241,500 กิโลกรัม 5) ราชอาณาจักรนิวซีแลนด์ 1 ครั้ง น้ำหนักรวม 25,000 กิโลกรัม 6) สหรัฐอเมริกา นำเข้าจำนวน 1 ครั้ง น้ำหนักรวม 322 กิโลกรัม โดยทำการสุ่มหัวพันธุ์มันฝรั่งจำนวน 600 หัวต่อตัวอย่าง เพื่อใช้สำหรับการตรวจสอบโรคกับหัวพันธุ์ การตรวจสอบเบื้องต้นโดยการตรวจสอบด้วยตาเปล่า และผ่าหัวมันฝรั่งเป็นสังเกตอาการ zebra chip ภายในหัวมันฝรั่ง บันทึกข้อมูลต่าง ๆ และบันทึกภาพ หากตรวจพบลักษณะอาการเป็นลายน่าสงสัย นำหัวมันฝรั่งไปปลูกเพื่อสังเกตอาการและเก็บตัวอย่างใบหรือกิ่งมาตรวจวินิจฉัยและจัดจำแนกต่อไป

จากการตรวจสอบตัวอย่างนำเข้าจากทั้ง 6 ประเทศ ได้แก่ 1) สกอตแลนด์ 2) แคนาดา 3) เครือรัฐออสเตรเลีย 4) เนเธอร์แลนด์ 5) ราชอาณาจักรนิวซีแลนด์ 6) สหรัฐอเมริกา บริเวณรอบหัวพันธุ์มันฝรั่งมีลักษณะรอยกระแทกหรือรอยที่เกิดจากของมีคม และมีอาการเน่าเละบางหัว มีเศษดินติดมาเล็กน้อย และหัวพันธุ์ที่นำเข้าจากสกอตแลนด์ พบลักษณะอาการ powdery scab แต่ไม่เกินเงื่อนไขที่ประเทศไทยกำหนด และเมื่อผ่าหัวพันธุ์

กรมวิชาการเกษตร

เพื่อสังเกตลักษณะอาการ zebra chip (ภาพที่ 1) ไม่พบลักษณะอาการที่สงสัย เนื้อหัวมีลักษณะปกติไม่มีลาย (ภาพที่ 2) นำหัวพันธุ์ไปปลูกทดสอบในโรงเรือนปลูกพืชเพื่อสังเกตอาการต่อไป

4. การตรวจวินิจฉัยและจัดจำแนกเชื้อ *Candidatus* Liberibacter solanacearum โดยใช้เทคนิค Conventional PCR ตามวิธีการดังนี้

4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบและก้านที่ปลูกจากหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าที่แสดงอาการ zebra chip ที่หัวหรือส่วนของพืชโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปหรือการสกัดด้วยวิธี CTAB (Munyaneza และคณะ, 2010)

4.1.1 การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป วิธีการตามคำแนะนำของชุดสกัด

4.1.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามวิธีการมาตรฐานของ PM 7/143 (1) ‘Candidatus Liberibacter *solanacearum*’ (EPPO, 2020) ที่อ้างอิงโดย Munyaneza และคณะ, 2010

การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืช ด้วยวิธี cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) ตามวิธีการของ European and Mediterranean Plant Protection Organization (Munyaneza และคณะ, 2010) โดยนำเนื้อเยื่อพืชน้ำหนัก 500 มิลลิกรัม บดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน กับบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 500 mM NaCl and 10 mM 2-mercaptoethanol) ดูดสารละลายปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย lysozyme 80 ไมโครลิตร (50 mg mL1 in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) นำ ไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที หลังจากนั้นเติม CTAB buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (100 mM Tris, pH 8.0, 1.4 M NaCl, 50 mM EDTA, pH 8.0, 2% (w/v) CTAB, 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP)-40 and 0.2% (v/ v) 2-mercaptoethanol) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วจึงทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที ก่อนเติมคลอโรฟอร์มเย็นจัดปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมสารละลายด้วย vortex และปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทำการดูดส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดเซนติฟิวส์ใหม่ แล้วเติม isopropanal ปริมาตร 0.6 volume และวางหลอดไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเย็นจัดเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที หลังจากนั้นทิ้งเอทานอลออกจากตะกอนดีเอ็นเอและตั้งให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 100 ไมโครลิตร เก็บตะกอนดีเอ็นไว้เพื่อนำไปตรวจหาเชื้อ Candidatus Liberibacter *solanacearum* ต่อไป

4.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *Candidatus* Liberibacter solanacearum ด้วยเทคนิค Conventional PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อดังกล่าว และ Internal control เทคนิค Conventional PCR ใช้วิธีการตามมาตรฐาน EPPO, 2017 โดยอ้างอิงตามวิธีการของ Li et al.,2009 และ Jagoueix et al., 1996 เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ forward primer ของ real-time PCR ที่ออกแบบโดย Li et al, 2009 ในส่วนที่เฉพาะสำหรับเชื้อ *Candidatus* Literibacter *solanacearum* ร่วมกับไพรเมอร์ universal Liberibacter reverse primer ของ Jagoueix et al., 1996 โดยไพรเมอร์ที่ใช้ LsoF: 5’ -GTC GAG CGC TTA TTT TTA ATA GGA-3’ และ OI2c: 5’ -GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T-3’ ซึ่งขนาดดีเอ็นเอผลผลิต 1,163 bp.

นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธีการ PCR ประกอบไปด้วย

4.2.1 การเตรียมสารประกอบสำหรับดำเนินการ มีดังนี้

น้ำกลั่นที่ปราศจาก nuclease	ปริมาตร 16.30 ไมโครลิตร
PCR buffer เข้มข้น 10x	ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร
MgCl2 เข้มข้น 25 mM	ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร
dNTPs เข้มข้น 10 mM	ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร

ไพรเมอร์ LsoF และ OI2c ความเข้มข้น 10 μM ปริมาตรเส้นละ 0.5 ไมโครลิตร

Taq polymerase (Invitrogen) เข้มข้น 5 U μL-1 ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร

กรดนิวคลีอิกที่ได้จากการสกัดพืชทดสอบปริมาตร 2 ไมโครลิตร

ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร

4.2.2 นำสารประกอบเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งค่าโปรแกรมดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

ขั้นตอนที่ 2 denaturation ที่อุณหภูมิ(94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

ขั้นตอนที่ 3 annealing ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

ขั้นตอนที่ 4 elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที

ขั้นตอนที่ 2-4 ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 5 final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

หลังจากนั้นปล่อยให้หลอดพีซีอาร์อยู่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.2.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตโฟรีซีส (gel electrophoresis) ตามขั้นตอนดังนี้

4.2.3.1 เตรียม 1.5% อะกาโรลเจล โดยชั่งผงอะกาโรส 1.5 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยการให้ความร้อน จากนั้นผสมสารย้อมสีดีเอ็นเอ (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution) ลงในสารละลายเจลก่อนการเทเจล

4.2.3.2 นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในเจลที่เตรียมไว้และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder เป็นตัวเทียบในเจลด้วย จากนั้นให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที

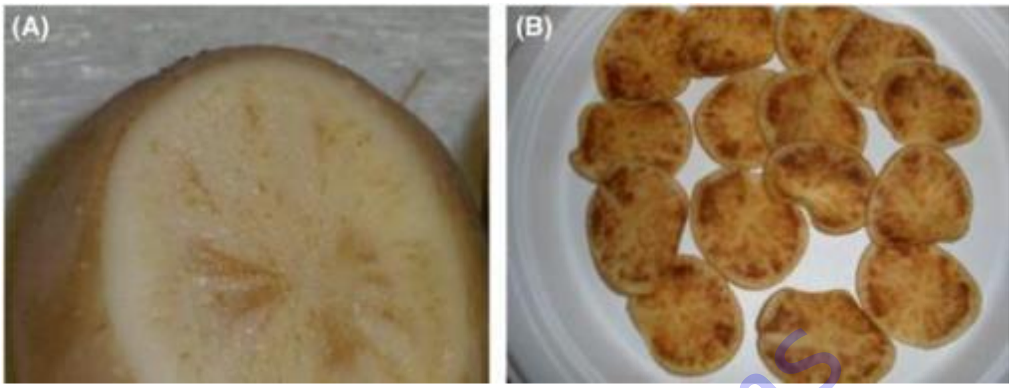
4.2.3.3 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation บันทึกภาพ แล้วนำไปวิเคราะห์ผล

4.2.3.4 ตัวอย่างที่ปรากฏแถบแบนของดีเอ็นเอเป้าหมายถือว่าให้ผลบวกกับการตรวจสอบ ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอีกครั้งเพื่อส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

4.2.3.5 นำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับในฐานข้อมูลของ GenBank

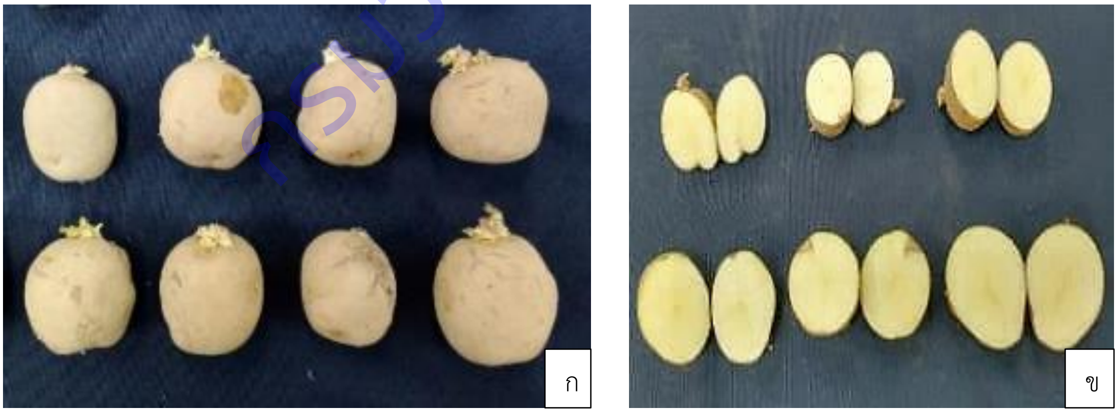
กรมวิชาการเกษตร

5. ติดตามตรวจสอบภายหลังการนำเข้า โดยทำการติดตามตรวจสอบในแปลงของบริษัทที่นำเข้าในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 3 แปลง (อำเภอแม่แจ่ม) จังหวัดเชียงราย จำนวน 7 แปลง (อำเภอเวียงป่าเป้าและอำเภอหงาว) และจังหวัดพะเยา จำนวน 3 แปลง (อำเภอเชียงคำ) ผลการติดตามในแปลงปลูกยังไม่พบอาการสงสัยของโรค zebra chip ในพื้นที่



ภาพที่ 3.8 ลักษณะอาการโรค Zebra chip ในหัวพันธุ์มันฝรั่ง (ก) บริเวณท่อน้ำท่ออาหารและเส้นแฉกเป็นรัศมีของเนื้อเยื่อตามความยาวของเนื้อมันฝรั่งเป็นสีน้ำตาล (ข) รอยแผลตายเป็นจุดด่างและเป็นขีดในเนื้อเยื่อเมื่อนำมันฝรั่งผ่านการทอด (EPPO, 2020)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3.9 ลักษณะในหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากสกอตแลนด์

(ก) ลักษณะภายนอกของหัวพันธุ์มันฝรั่ง (ข) ลักษณะภายในหัวพันธุ์มันฝรั่งปกติ

การตรวจและศึกษาชนิดเมล็ดวัชพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่ายนำเข้า

การสืบค้นข้อมูล

จากการสืบค้นข้อมูลวัชพืชที่สามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่ายได้ เช่น วัชพืช *Amaranthus blitum, Chamomilla recutita, Galinsoga parviflora, Polygonum aviculare, Circium arvense, Orobanche aegyptiaca, Orobanche minor, Orobanche crenata, Orobanche ramosa, Poa annua, Senecio vulgaris, Chenopodium murale, Polygonum lapathifolium, Emex australis* (CABI, 2022) โดยรายชื่อวัชพืชดังกล่าว (*Polygonum aviculare, Circium arvense, Orobanche aegyptiaca, Orobanche minor, Orobanche crenata*) จัดอยู่ในศัตรูพืชกักกันตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 และเป็นวัชพืชที่มีสถานะยังไม่มีรายงานพบในประเทศไทย

การสุ่มตัวอย่าง

ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่ายนำเข้าจากต่างประเทศ พบว่ามีการนำเข้าจากจากประเทศเม็กซิโก อิตาลี สหรัฐอเมริกา และฝรั่งเศส โดยนำเข้าทางด่านตรวจพืชลาดกระบัง ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ด่านตรวจพืชสุวรรณภูมิ และด่านตรวจพืชไปรษณีย์ นำเข้าเมล็ดพันธุ์จำนวน 15 ครั้ง น้ำหนักรวมทั้งสิ้น 31,049.200 กิโลกรัม

การตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น

เมล็ดพันธุ์นำเข้าบรรจุในบรรจุภัณฑ์ที่สะอาด เมล็ดมีความสมบูรณ์ และพบเมล็ดวัชพืชติดปนมากับเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่ายนำเข้าจำนวน 5 ครั้ง โดยพบติดมากับเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากประเทศเม็กซิโก 2 ครั้ง อิตาลี 3 ครั้ง และสหรัฐอเมริกา 1 ครั้ง

การตรวจสอบขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

ทำการจัดจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชที่ตรวจพบจำนวน 5 ชนิด จำแนกได้ 2 ชนิด ได้แก่ *Helminthotheca echioides* และ *Echinochloa colona* ส่วนอีก 3 ชนิด ได้แก่ *Chenopodium* spp. *Rumex* spp. และ *Solanum* spp. อยู่ระหว่างการจำแนกชนิดและทดสอบความงอกของเมล็ดวัชพืช (ภาพที่ 3.10)

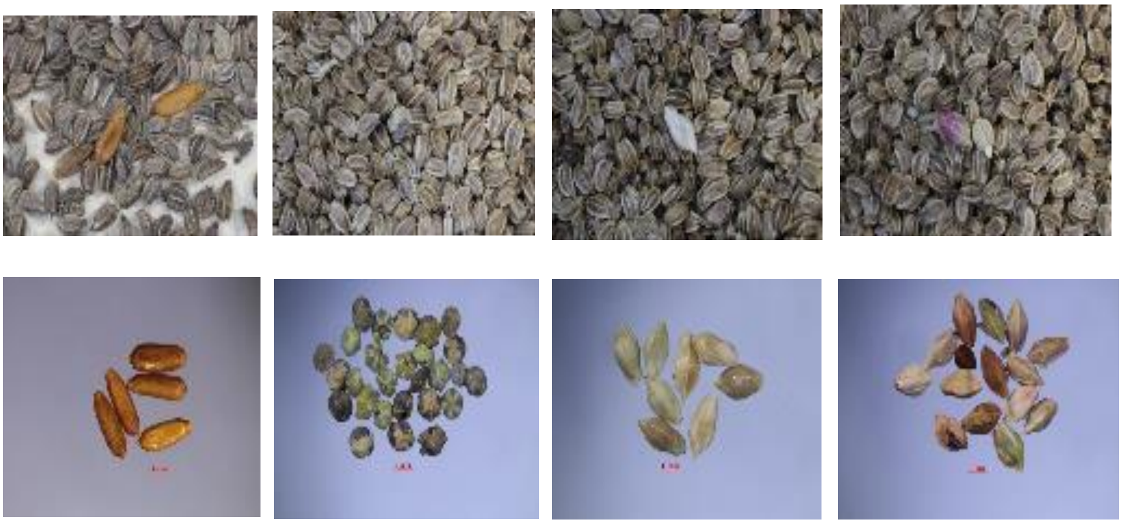
การทดสอบความงอกของเมล็ดวัชพืช

ทำการทดสอบความงอกของเมล็ดวัชพืชโดยวิธีเพาะในทรายพบว่า เมล็ดวัชพืช *H. echioides* และ *E. colona* สามารถงอกและเจริญเติบโตได้ (ภาพที่ 3.11 และ 3.12)

การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกขึ้นฉ่ายนำเข้า

ทำการสำรวจเพื่อตรวจสอบศัตรูพืชในพื้นที่ปลูกขึ้นฉ่ายจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และลำปาง ไม่พบศัตรูพืชที่เป็นศัตรูพืชกักกันในแปลงปลูก

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3.10 เมล็ดวัชพืชติดมากับเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่าย

ภาพที่ 3.11 ทดสอบความงอกของเมล็ดวัชพืช *Helmithotheca echioides*

ภาพที่ 3.12 ทดสอบความงอกของเมล็ดวัชพืช *Echinochloa colona*

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยย่อยที่ 4 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์เพื่อการค้าสินค้าเกษตรด้านพืช

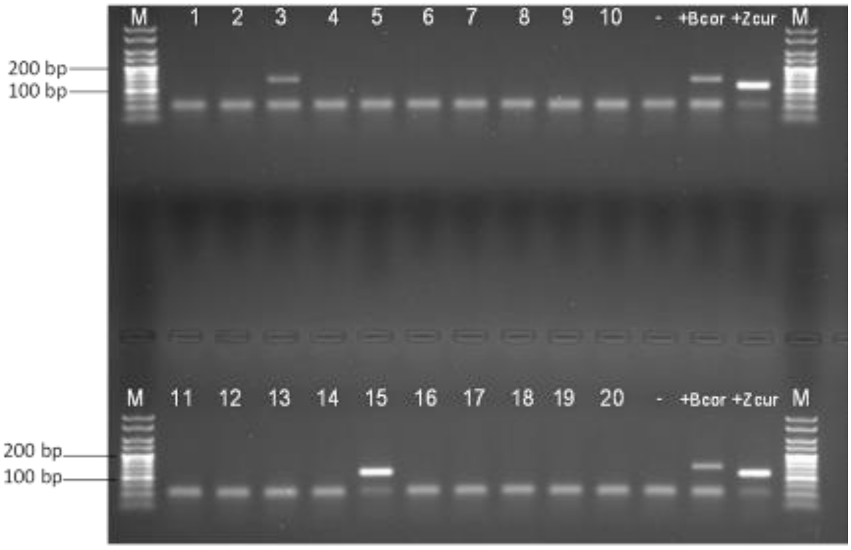
ผลการดำเนินงานในปี 2565 โครงการวิจัยได้ดีเอ็นเอต้นแบบและสภาวะการทำปฏิกิริยาของเทคนิค PCR Multiplex PCR ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* แมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae Cucumber mosaic virus Xanthomonas perforans X. vesicatoria* ไส้เดือนฝอย *Radopholus similis Trichoderma asperellum* และ *Metarhizium anisopliae* โดยเป็นดีเอ็นเอต้นแบบจากตัวอย่างที่จำแนกชนิดถูกต้องแล้ว จากการดำเนินการเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่พบในประเทศไทย สกัดดีเอ็นเอและทำ PCR ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันชนิดได้ 18 ชนิด ได้แก่ *B. albistrigata B. carambolae B. correcta B. dorsalis B. latifrons B. limbifera B. tuberculata B. umbrosa B. zonata Dacus longicornis D. spaeroidalis Z. apicalis Z. cilifer Z. cucurbitae Z. hochii Z. incisus Z. platamus* และ *Z. tau* ผลการสกัดอาร์เอ็นเอตัวอย่างที่มีลักษณะอาการคล้ายเกิดจากไวรัสในพริก (ภาพที่ 4.1) จากจังหวัดหนองคาย นครพนม อุดรธานี สกลนคร มหาสารคาม เลย ชัยภูมิ มุกดาหาร ราชบุรี นครปฐม กาญจนบุรี สุพรรณบุรี นครศรีธรรมราช พัทลุง และสงขลา ได้อาร์เอ็นเอ *Cucumber mosaic virus* จากตัวอย่างพริกที่เป็นโรคในพื้นที่แปลงปลูกพริกจังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง และสงขลา ดีเอ็นเอแบคทีเรีย *X. perforans* จากพริกและมะเขือเทศ 3 ไอโซเลต จากแหล่งเก็บจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ยีนสังเคราะห์ atpD และ gyrB ของแบคทีเรีย *X. vesicatoria* สายพันธุ์ LMG 911 และ LMG 923 ไส้เดือนฝอย *Radopholus* จำนวน 50 ประชากร ที่ได้จากตัวอย่างพลูฉลุ 20 ประชากร และหน้าวัว 30 ประชากร นำมาเลี้ยงขยายบนแคลลัสของอัลฟัลฟาในสภาพปลอดเชื้อ และทำสไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอยแต่ละประชากรสำหรับศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อตรวจสอบชนิด ซึ่งจากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำแนกชนิดได้เป็นไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* สกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบชนิดด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะ RsimF /RsimR ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 398 bp ยืนยันว่าเป็นไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* สอดคล้องกับผลการตรวจสอบทางสันฐานวิทยา ดีเอ็นเอเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 40 ไอโซเลต ทำ PCR ตำแหน่ง ITS และ *tef1* ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นำมาวิเคราะห์และจำแนกชนิดที่ถูกต้องเป็นเชื้อรากลุ่ม *T. asperellum* complex ดีเอ็นเอเชื้อรา *Metarhizium* จำนวน 30 ไอโซเลต (ภาพที่ 4.2) จากการทำ PCR ตำแหน่ง ITS 28S rDNA (LSU) และ RPB2 ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นำมาวิเคราะห์และจำแนกชนิดที่ถูกต้องเป็นเชื้อรา *M. anisopliae* complex และสภาวะการทำปฏิกิริยาของเทคนิค Multiplex PCR ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* (ภาพที่ 4.3) สภาวะการทำปฏิกิริยาของเทคนิค PCR ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย *Cucumber mosaic virus* (ภาพที่ 4.4) สภาวะการทำปฏิกิริยาของเทคนิค PCR ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย *X. perforans* (ภาพที่ 4.5) *X. vesicatoria* (ภาพที่ 4.6) ไส้เดือนฝอย *R. similis* (ภาพที่ 4.7) เชื้อรา *T. asperellum* และ *M. anisopliae* (ภาพที่ 4.8) โดยดีเอ็นเอต้นแบบและข้อมูลสภาวะการทำปฏิกิริยาที่ได้จะใช้สำหรับดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพ ความไว และความจำเพาะของเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 4.1 ลักษณะอาการของตัวอย่างพริกที่เก็บจากแปลงปลูก

ภาพที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและโคนิเดียของเชื้อรา *Metarhizium*

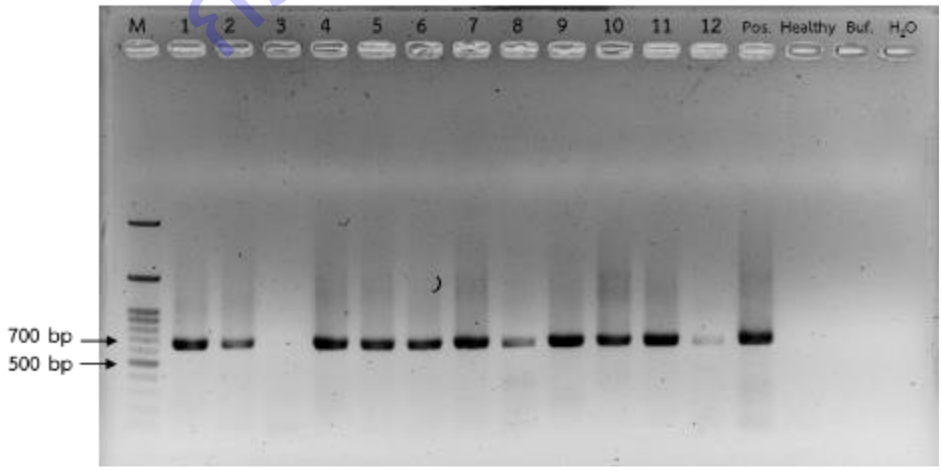
กรมวิชาการเกษตร



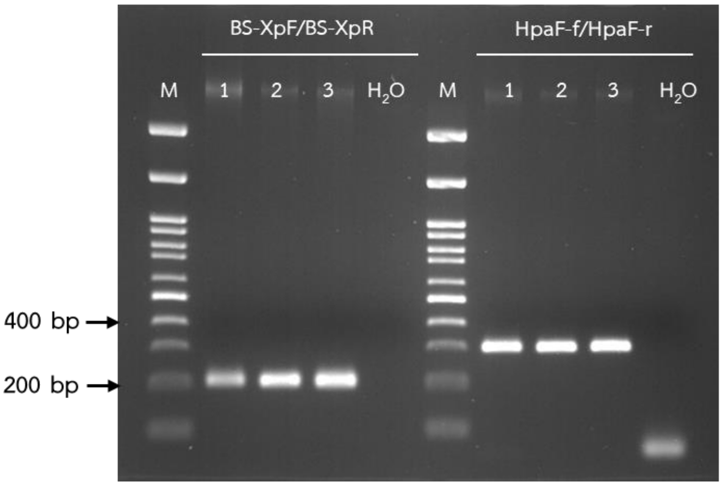
ภาพที่ 4.3 การตรวจสอบแมลงวันผลไม้ด้วยเทคนิค multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 141 bp และแมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae* มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 83 bp

Lane 1 *B. albistrigata*
Lane 2 *B. carambolae*
Lane 3 *B. correcta*
Lane 4 *B. dorsalis*
Lane 5 *B. latifrons*
Lane 6 *B. limbifera*
Lane 7 *B. tuberculata*
Lane 8 *B. umbrosa*
Lane 9 *B. zonata*
Lane 10 *D. longicornis*
Lane 11 *D. spaeroidalis*
Lane 12 *Z. apicalis*
Lane 13 *Z. caudatus*
Lane 14 *Z. cilifer*
Lane 15 *Z. cucurbitae*
Lane 16 *Z. hochii*
Lane 17 *Z. incisus*
Lane 18 *Z. isolatus*
Lane 19 *Z. platamus*
Lane 20 *Z. tau*

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 4.4 การตรวจสอบ *Cucumber mosaic virus* ด้วยเทคนิค PCR ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 678 bp



ภาพที่ 4.5 การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas perforans* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Bs-XpF/Bs-XpR มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 197 bp และไพรเมอร์ HpsF-f/HpaF-r มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 300 bp

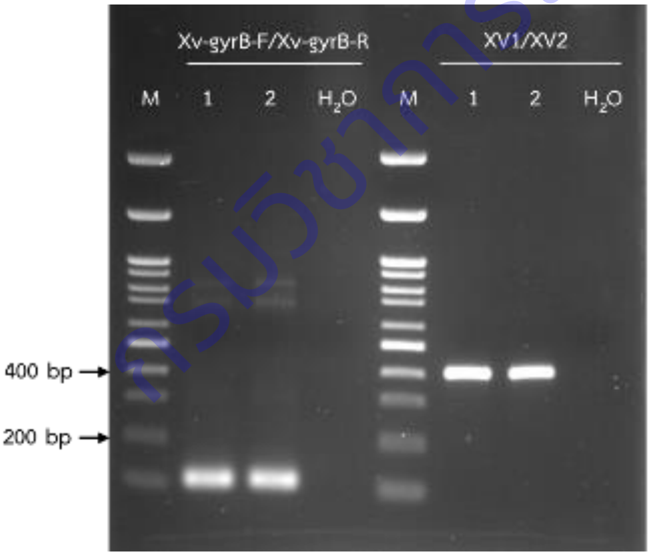
M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน onemark 100

Lane 1 คือแบคทีเรีย *X. perforans* 1692

Lane 2 คือแบคทีเรีย *X. perforans* 1696

Lane 3 คือแบคทีเรีย *X. perforans* 1697

กรมวิชาการเกษตร

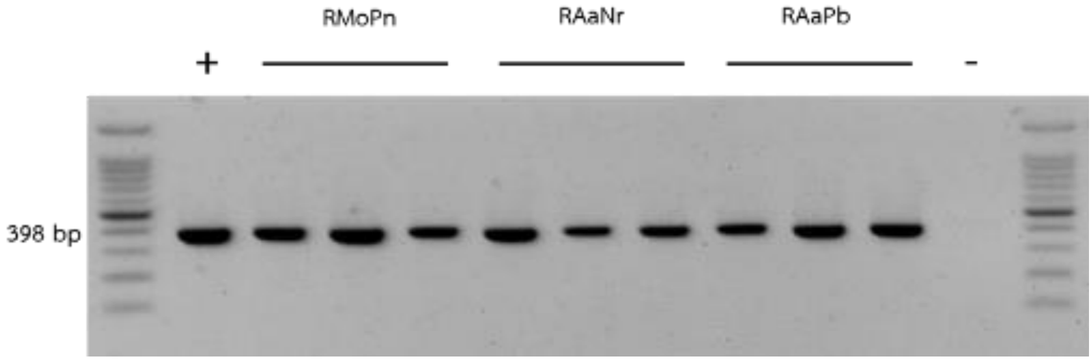


ภาพที่ 4.6 การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas vesicatoria* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Xv-gyrB-F/Xv-gryB-R มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 104 bp และไพรเมอร์ Xv1/Xv2 มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 404 bp

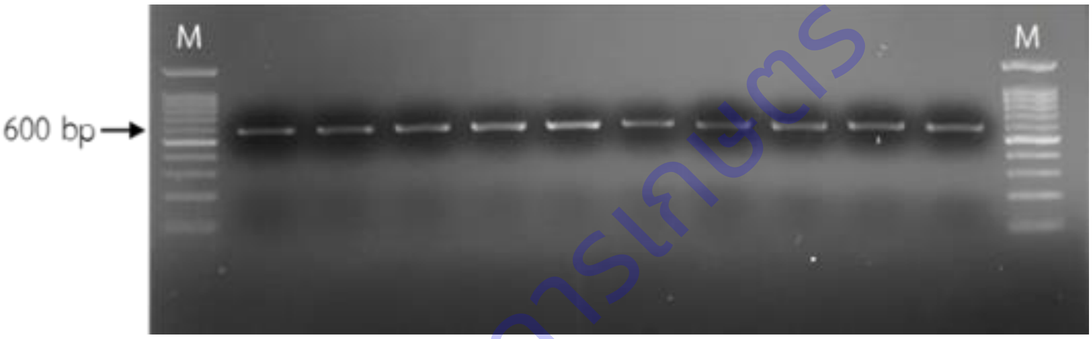
M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน onemark 100

Lane 1 คือ *gyrB* gene synthesis Xv911

Lane 2 คือ *gyrB* gene synthesis Xv923



ภาพที่ 4.7 การตรวจสอบไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* ด้วยเทคนิค PCR ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 398 bp



ภาพที่ 4.8 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ribosomal DNA ของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ด้วยเทคนิค PCR ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 600 bp

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยย่อยที่ 5 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในผลมะละกอและมะม่วงเพื่อเพิ่มศักยภาพในการส่งออก

มะละกอพันธุ์แขกดำ

1. ได้ข้อมูลชีววิทยา ลักษณะประจำพันธุ์ และแหล่งเพาะปลูก มะละกอพันธุ์แขกดำเพื่อใช้ผลผลิตในการวิจัย ในพื้นที่จังหวัดนครปฐม และกาฬสินธุ์

2. ได้ข้อมูลด้านความเสียหายจากความร้อนที่มีผลต่อคุณภาพของมะละกอแขกดำหลังผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ที่อุณหภูมิ 46 47 และ 48 °C นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง และเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 13-15 °C นาน 7 วัน พบว่ามะละกอที่ผ่านที่อุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 46 47 และ 48 °C ทั้ง 3 ช่วงเวลา มีการเปลี่ยนแปลงของสีผิวที่ผลจากสีเขียวเป็นสีเหลือง การสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณน้ำตาล และความแน่นเนื้อ ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน

มะละกอพันธุ์แขกนวล

1. ได้ข้อมูลชีววิทยา ลักษณะประจำพันธุ์ และแหล่งเพาะปลูก มะละกอพันธุ์แขกนวลเพื่อใช้ผลผลิตในการวิจัย ในพื้นที่จังหวัดนครปฐม และกาฬสินธุ์

2. ได้ข้อมูลด้านความเสียหายจากความร้อนที่มีผลต่อคุณภาพของมะละกอแขกนวลหลังผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ที่อุณหภูมิ 46 47 และ 48 °C นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง พบว่ามะละกอที่ผ่านความร้อน ที่อุณหภูมิ 46 และ 47 °C ทั้ง 3 ช่วงเวลา ในสภาพอากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์ 65 และ 80 เปอร์เซ็นต์ และเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 10 °C นาน 7 วัน มีการเปลี่ยนแปลงของสีผิวที่ผลจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ปริมาณน้ำตาล และความแน่นเนื้อ ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน ในขณะที่มะละกอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46 และ 47 °C นาน 2 ชั่วโมง (อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์ 65 เปอร์เซ็นต์) มีการสูญเสียน้ำหนักมากกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และที่อุณหภูมิ 48 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์ ที่ 2 ชั่วโมง ผิวเปลือกมีลักษณะย่น ความแน่นเนื้อลดลงทำให้เนื้อผลอ่อนนุ่มมากขึ้น

มะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้า

1. ได้ข้อมูลชีววิทยา ลักษณะประจำพันธุ์ และแหล่งเพาะปลูก มะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้าเพื่อใช้ผลผลิตในการวิจัย ในพื้นที่จังหวัดปทุมธานี

2. ได้ข้อมูลด้านความเสียหายจากความร้อนที่มีผลต่อคุณภาพของมะม่วงมันเดือนเก้าหลังผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ที่อุณหภูมิ 47 และ 48.5 °C นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ที่เก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 15 °C นาน 7 วัน พบว่ามะม่วงที่ผ่านความร้อน ที่อุณหภูมิ 47 และ 48.5 °C ทั้ง 3 ช่วงเวลา มีการสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณน้ำตาล และปริมาณกรด ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับมะม่วงที่ไม่ผ่านความ

กรมวิชาการเกษตร

ร้อน ในขณะที่มะม่วงที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 48.5 °C นาน 2 ชั่วโมง จะพบอาการโรคของผลมะม่วง และอาการเสียหายที่เนื้อเป็นรูพรุนคล้ายฟองน้ำเมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ

มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้มัน

1. ได้ข้อมูลชีววิทยา ลักษณะประจำพันธุ์ และแหล่งเพาะปลูก มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้มันเพื่อใช้ผลผลิตในการวิจัย ในพื้นที่จังหวัดราชบุรี กรุงเทพมหานคร และนครปฐม

2. ได้ข้อมูลด้านความเสียหายจากความร้อนที่มีผลต่อคุณภาพของมะม่วงน้ำดอกไม้มันหลังผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ที่อุณหภูมิ 47 และ 48.5 °C นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ที่เก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 15 °C นาน 7 วัน พบว่ามะม่วงที่ผ่านความร้อน ที่อุณหภูมิ 47 และ 48.5 °C ทั้ง 3 ช่วงเวลา มีการสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณน้ำตาล และปริมาณกรด ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับมะม่วงที่ไม่ผ่านความร้อน ในขณะที่มะม่วงที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 48.5 °C นาน 2 ชั่วโมง จะพบอาการโรคของผลมะม่วง และอาการเสียหายที่เนื้อเป็นรูพรุนคล้ายฟองน้ำเมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่น ๆ

มะม่วงพันธุ์แดงจักรพรรดิ

1. ได้ข้อมูลชีววิทยา ลักษณะประจำพันธุ์ และแหล่งเพาะปลูก มะม่วงพันธุ์แดงจักรพรรดิเพื่อใช้ผลผลิตในการวิจัย ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ พะเยา แพร่ ฉะเชิงเทรา และราชบุรี

2. เนื่องจากผลผลิตได้รับความเสียหายจากสภาพอากาศที่ไม่เหมาะสม การดำเนินการขณะนี้ผู้ทดลองได้เตรียมอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการอบไอน้ำ และหาแหล่งผลิตมะม่วงเพิ่มเติมเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

มะม่วงพันธุ์อกร่อง

1. ได้ข้อมูลชีววิทยา ลักษณะประจำพันธุ์ และแหล่งเพาะปลูก มะม่วงพันธุ์อกร่องเพื่อใช้ผลผลิตในการวิจัย ในพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ สมุทรสาคร ราชบุรี และจันทบุรี

2. ได้ข้อมูลด้านความเสียหายจากความร้อนที่มีผลต่อคุณภาพของมะม่วงพันธุ์อกร่องหลังผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ที่อุณหภูมิ 46 47 และ 48 °C นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ที่เก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิเย็น 13-15 °C นาน 8 วัน และอุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน พบว่ามะม่วงที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 46 และ 47 °C ทั้ง 3 ช่วงเวลา มีการเปลี่ยนแปลงของสีผิวของผลจากสีเขียวเป็นสีเหลือง การสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณกรด และปริมาณน้ำตาล ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับมะม่วงที่ไม่ผ่านความร้อน ในขณะที่มะม่วงที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 48 °C ทั้ง 3 ช่วงเวลา มีการเปลี่ยนแปลงของสีผิวของผลจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ปริมาณกรดและการสูญเสียน้ำหนักไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับมะม่วงที่ไม่ผ่านความร้อน

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยย่อยที่ 6 การสำรวจและเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันของพืชและผลผลิตพืชในประเทศไทย

การสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas corrugata* ในประเทศไทย เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas corrugata* เป็นศัตรูพืชกักกัน ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์เรื่องกำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้าม ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ.2507 (ฉบับที่ 6) และมีแหล่งแพร่กระจายในหลายประเทศทั่วโลกได้แก่ แอฟริกาใต้ อินเดีย อิสราเอล ญี่ปุ่น ฝรั่งเศส เยอรมนี โปแลนด์ สวีเดน แคนาดา เม็กซิโก สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ บราซิล และอาร์เจนตินา (CABI, 2019) และในต่างประเทศมีรายงานว่าอาการของโรคจะพัฒนาเมื่อต้นพืช อายุ 3 เดือน โดยเริ่มแรกใบอ่อนมีอาการเหลือง บริเวณลำต้นหรือกิ่งที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และเนื้อเยื่อจะยุบลงไป เซลล์ของพืชจะแห้งตาย เมื่อผ่าลำต้นตามทางยาว พบว่าไส้ของลำต้นกลวง ท่อน้ำท่ออาหารถูกทำลาย และเป็นแผลเซลล์ตาย และยืนต้นตายในที่สุด (Moura *et al*., 2005) มีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ได้ และสามารถเจริญเติบโตได้ในดินที่มีการใส่ปุ๋ยไนโตเจนสูง (Zutra, 1989) เชื้อแบคทีเรีย *P. corrugata* เป็นแกรมลบ วิธีการตรวจสอบเชื้อนี้ สามารถตรวจสอบการไม่เรืองแสงบนอาหาร King's B medium และสามารถสร้างรงควัตถุสีเหลืองถึงน้ำตาล และสามารถ บนอาหาร Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA) รวมทั้งสามารถตรวจสอบได้โดยวิธี RAPD PCR (Catara, 2007) จากการสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรีย *P. corrugata* ในประเทศไทย โดยจัดทำคู่มือการสำรวจ วางแผนการสำรวจอย่างมีระบบ และดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 6 (Surveillance: ISPM No. 6) เพื่อให้ทราบข้อมูลการปรากฏหรือไม่ปรากฏเพื่อยืนยันสถานภาพที่เป็นปัจจุบันของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2564 - กันยายน 2565 ในพื้นที่ปลูกของมะเขือเทศ 9 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พะเยา น่าน ขอนแก่น อุดรธานี เลย หนองคาย และนครราชสีมา จำนวน 155 แปลง และสุ่มเก็บตัวอย่างต้นที่แสดงอาการคล้ายหรือสงสัย เช่น ใบเหลือง ไส้ของลำต้นกลวง ท่อน้ำท่ออาหารถูกผิดปกติ รวมทั้งสิ้น 65 ตัวอย่าง (ภาพที่ 6.1) จากการนำตัวอย่างที่สงสัยจำนวนทั้งสิ้น 65 ตัวอย่าง มาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ด้วยวิธี tissue transplanting และเลี้ยงเชื้อบนอาหาร King's B Medium และวิธีการทางชีวเคมี ผลการตรวจสอบพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดไม่ใช่เชื้อแบคทีเรีย *P. corrugata* ทำให้สามารถยืนยันสถานภาพได้ว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวยังคงสถานภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน (quarantine pest) ของประเทศไทย

การสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas vesicatoria* ในประเทศไทย สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศ ในจังหวัดหนองคาย บึงกาฬ นครพนม สกลนคร มุกดาหาร น่าน ตาก และเพชรบูรณ์ จำนวน 138 ตัวอย่าง แยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ พบเชื้อแบคทีเรีย*Xanthomonas* spp. จำนวน 41 ตัวอย่าง เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศหรือพริก ตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR ตามรายงานของ Koenraadt *et al*. (2009) ยังไม่พบเชื้อ *X. vesicatoria*

การสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas gardneri* ในประเทศไทย สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศ ในจังหวัดหนองคาย บึงกาฬ นครพนม สกลนคร มุกดาหาร น่าน ตาก และเพชรบูรณ์ จำนวน 138 ตัวอย่าง แยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ พบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. จำนวน 41 ตัวอย่าง เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศหรือพริก ตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR ตามรายงานของ Koenraadt *et al*. (2009) ยังไม่พบเชื้อ *X. gardneri*

กรมวิชาการเกษตร

การสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas perforans* ในประเทศไทย สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคใบจุดในพริกและมะเขือเทศ ในจังหวัดหนองคาย บึงกาฬ นครพนม สกลนคร มุกดาหาร น่าน ตาก และพิษณุโลก จำนวน 138 ตัวอย่าง แยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ พบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. จำนวน 41 ตัวอย่าง เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศหรือพริก ผลการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR ไม่สอดคล้องกัน ไพรเมอร์ตามรายงานของ Koenraadt *et al*. (2009) ไม่พบผลบวกต่อเชื้อ *X. perforans* แต่ไพรเมอร์ตามรายงานของ Ning (2012) ให้ผลบวกจำนวน 2 ตัวอย่าง จากมะเขือเทศ จ.สกลนคร (ภาพที่ 6.2)

การสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อรา *Pseudocercospora angolensis* ในประเทศไทย เชื้อรา *P. angolensis* เป็นเชื้อราที่มีชื่อพ้องกับ *Phaeoramularia angolensis* ซึ่งเป็นศัตรูกักกัน ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้าม ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) และ CABI (2019) รายงานว่า *Pseudocercospora angolensis* เป็นเชื้อราสาเหตุของโรคใบจุด ผลจุดของพืชวงศ์ส้ม ได้แก่ สกุล *Citrus aurantiifolia* (มะนาว), *C. aurantium* (ส้ม), *C.deliciosa* (ส้ม), *C. jambhiri* (มะนาว), *Citrus latifolia* (มะนาวตาฮิติ), *C. limon* (มะนาว), *C. maxima* (ส้มโอ), *C. medica*, *C. reticulata* (ส้มแมนดาริน), *C. sinensis* (ส้นนาเวล), *C. unshiu* (ส้มอุนชุ), *Citrus x paradisi* (grapefruit) และ *Fortunella japonica* (round kumquat) (CABI, 2019) และในปี 1998 มีรายงานว่า เชื้อรา *P. angolensis* เมื่อทำลายส้มบางพันธุ์แสดงอาการใบจุด ผลจุด และสามารถทำให้ผลผลิตลดลงได้ถึง 50-100% รวมทั้งสร้างความเสียหายในระดับเศรษฐกิจ (CABI, 2019) เชื้อราชนิดสามารถแพร่กระจายได้โดยลม และสามารถไปผลและส่วนขยายพันธุ์ เช่น กิ่งพันธุ์ ต้นตอ สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. angolensis* คือ สภาพอากาศอบอุ่น มีความชื้นสัมพัทธ์สูง (European Food Safety Authority, 2017) ทำให้หลายประเทศให้ความสำคัญกับเชื้อราชนิดนี้ ซึ่งมีความเสี่ยงสูงต่อการผลิตส้มในพื้นที่ปลูก เนื่องจากเชื้อสามารถติดมากับผล ใบ ส่วนขยายพันธุ์พืช รวมทั้งสามารถเจริญเติบโตและแพร่กระจายได้ดีหากมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมและสามารถสร้างความเสียหายทำให้ผลผลิตได้ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ รวมทั้งส่งกระทบต่อการค้าระหว่างประเทศ ในกลุ่มสหภาพยุโรป (EU) จึงมีข้อกำหนดสำหรับการนำเข้าพืชวงศ์ส้มจากประเทศที่สาม เช่น ประเทศไทย คือ ผลพืชวงศ์ส้มที่ต้องการส่งออกไปประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรปต้องมาจากแหล่งหรือพื้นที่ที่ปราศจาก *P. angolensis* จากการสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อรา *P. angolensis* ในประเทศไทย โดยจัดทำคู่มือการสำรวจ วางแผนการสำรวจ อย่างมีระบบ และดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 6 (Surveillance: ISPM No. 6) เพื่อให้ทราบข้อมูลการปรากฏหรือไม่ปรากฏเพื่อยืนยันสถานภาพที่เป็นปัจจุบันของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2564 - กันยายน 2565 ในพื้นที่ปลูกพืชวงศ์ส้มในพื้นที่ 16 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ พะเยา น่าน เลย นครราชสีมา ชัยนาท กาญจนบุรี นครปฐม ราชบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ระยอง ฉะเชิงเทรา ชุมพร และนครศรีธรรมราช จำนวน 80 แปลง สุ่มเก็บตัวอย่างอาการใบจุดและผลจุดหรืออาการที่สงสัยตาม ภาพที่ 6.3 จำนวนทั้งหมด 325 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช ด้วยวิธีการตามมาตรฐานสากล ผลการตรวจสอบพบว่าเชื้อราทั้งหมดที่ตรวจพบทั้งหมดไม่ใช่เชื้อรา *P. angolensis* ทำให้สามารถยืนยันสถานภาพได้ว่าเชื้อราดังกล่าวยังคงสถานภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน (quarantine pest) ของประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

การสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อรา *Verticillium albo-atrum* ในประเทศไทย จากการสืบค้นข้อมูลลักษณะของเชื้อรา *Verticillium albo-atrum* พบว่า เชื้อรา *Verticillium albo-atrum* เป็นศัตรูพืชกักกันสาเหตุของโรคเหี่ยวในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พืชอาศัยสำคัญ ได้แก่ แตงกวา มะเขือเทศ พริก มันฝรั่ง และยาสูบ ในต่างประเทศรายงานว่า เชื้อสามารถอยู่ในดิน และเศษซากพืชได้นาน เมื่ออุณหภูมิต่ำเชื้อจะเข้าทำลายทางราก มีพาหะนำโรคที่สำคัญ ได้แก่ ไส้เดือนฝอยบางชนิด (Tylenchid nematode) ทำให้เชื้อโรคเข้าทำลายพืชได้อย่างรวดเร็ว โรคสามารถแพร่ระบาดจากแหล่งหนึ่งสู่อีกแหล่งหนึ่งได้โดยติดไปเศษซากพืชที่เป็นโรค หรือนำส่วนขยายพันธุ์จากแหล่งที่เป็นโรคไปปลูก นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อราสามารถติดไปเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์มะเขือได้ ลักษณะอาการของโรคจะพบอาการเหี่ยวบนใบแก่ โดยใบจะเริ่มเหี่ยวมีสีเหลือง และเมื่อโรครุนแรงขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ลุกลามเข้าไปในใบเป็นรูปตัววี (V-shape) จากนั้นใบแก่ทั้งหมดจะเหี่ยว และแห้งตายในที่สุด ต้นที่เป็นโรคจะหยุดการเจริญเติบโต ไม่ตอบสนองต่อปุ๋ย และน้ำ เมื่อตัดโคนต้นตามขวาง ลำต้นจะมีสีน้ำตาลอ่อนๆ และจุดสีน้ำตาลเข้มกระจายอยู่ทั่วไปตามท่อน้ำ ท่ออาหาร บริเวณโคนต้นมีสีน้ำตาล หากสภาพอากาศเย็นโรคจะระบาดรุนแรงมากขึ้น ผลผลิตลดลง (ภาพที่ 6.4) และจากการสำรวจและเก็บตัวอย่างต้องสงสัยว่าคล้ายกับอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Verticillium albo-atrum* (Figure 1) ที่แหล่งปลูกพริกและมะเขือเทศ (ภาพที่ 6.5) เดือนตุลาคม 2564 - กันยายน 2565 จำนวน 12 จังหวัด ในพื้นที่จังหวัดเชียงราย พะเยา น่าน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ขอนแก่น ชัยภูมิ มุกดาหาร กาฬสินธุ์ ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี และนครปฐม นำตัวอย่างมาตรวจสอบหาเชื้อรา *Verticillium albo-atrum* ในห้องปฏิบัติการ ระหว่างการศึกษาตรวจตัวอย่างแล้วไม่พบเชื้อรา *Verticillium albo-atrum*

การสำรวจและเฝ้าระวังไส้เดือนฝอย Ditylenchus destructor ในประเทศไทย เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง หอมหัวใหญ่ กระเทียม และหอมแดง จำนวน 3 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ ลำพูน และตาก จำนวน 93 แปลง แบ่งเป็น มันฝรั่ง 85 แปลง หอมหัวใหญ่ 5 แปลง กระเทียม 1 แปลง และหอมแดง 2 แปลง จากผลการตรวจตัวอย่างดินไม่พบไส้เดือนฝอยสกุล Ditylenchus ในทุกตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูพืช 9 สกุล คือ *Pratylenchus* spp. *Helicotylenchus* spp. *Rotylenchulus* spp. *Criconemoides* spp. *Meloidogyne* spp. *Heterodera* spp. *Tylenchorhynchus* spp. *Hirschmanniella* spp. *Hoplolaimus* spp. ทำสไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ตรวจพบและเก็บรักษาจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่พบโดยใช้ dichotomous key ของ Mai and Mullin (1996) ในการจำแนกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชระดับสกุล พบไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุลต่าง ๆ ดังนี้

1) ไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* spp. ลักษณะตัวเต็มวัยเพศเมียทรงกระบอก (cylindrical) ตำแหน่งของ vulva อยู่ค่อนไปทางหางประมาณ 1/3 ของความยาวลำตัว มี ovary ข้างเดียว ยื่นไปทางส่วนหัว ovary อีกด้านหนึ่งลดรูปเรียกว่า postvulval sac ลักษณะของหางส่วนมากมักจะมีปลายมนมีบางชนิดเท่านั้นที่ปลายหางแหลม ผนังลำตัว (cuticle) ไม่มีรอยหยักชัดเจน (not prominently annulated) เมื่อตายตัวจะเหยียดตรงหรือโค้งเล็กน้อย ส่วนของ esophagus ซ้อนทับกับลำ ไส้ไปทางด้าน ventral ลักษณะของ median bulb และ valve ชัดเจน ส่วน stylet สมบูรณ์ ริมฝีปากต่ำ (lip region flattened) แข็งแรง (sclerotized) เมื่อส่องดูภายใต้กล้องเห็นเป็นสีเข้ม

กรมวิชาการเกษตร

2) ไส้เดือนฝอยสกุล *Helicotylenchus* spp. ลักษณะตัวเต็มวัยเพศเมียทรงกระบอก (cylindrical) เมื่อถูกความร้อนและตายลำตัวมักจะโค้งงอคล้ายเลข 1 ไทย ส่วน esophagus ซ้อนทับกับลำไส้ทางด้าน ventral ส่วนริมฝีปากไม่มี longitudinal striation ส่วน dorsal esophageal gland opening อยู่หลัง stylet knob มีความยาวประมาณ 1/4 ของความยาว stylet Phasmid มีขนาดเล็กลักษณะเป็นรู มี ovary 2 ข้าง ตำแหน่ง vulva อยู่ประมาณ 2/3 ของความยาวลำตัว ส่วน median bulk แข็งแรง (sclerotized) มี valve ชัดเจน หางมีลักษณะ asymmetrical ด้าน dorsal มีลักษณะโค้งมากกว่าด้าน ventral ส่วนมากปลายหางโค้งมน

3) ไส้เดือนฝอยสกุล *Rotylenchulus* spp. ตัวอ่อนมีความยาวประมาณ 340 ไมโครเมตร ตัวเต็มวัยเพศผู้มีความยาวประมาณ 420 ไมโครเมตร ตัวเต็มวัยเพศเมียมีความยาวประมาณ 380-520 ไมโครเมตร เมื่อถูกความร้อนและตายลำตัวจะมีลักษณะ C shaped ริมฝีปากของตัวเต็มวัยเพศเมียไม่ offset ส่วนของริมฝีปากชัดเจน (conspicuous) stylet ยาวประมาณ 16 – 20 ไมโครเมตร stylet knob กลมมีขนาดเล็ก dorsal gland orifice อยู่ห่างจากฐานของ stylet knob ประมาณมากกว่า 1/2 ของความยาว stylet ส่วน esophageal gland ซ้อนทับลำไส้ด้าน lateral หรือ ventral ตำแหน่ง vulva ประมาณ 63% ของความยาวลำตัว มี ovary 2 ข้าง แบบ amphidelphic หางของตัวเต็มวัยเพศเมียมักจะยาวเป็น 2 เท่าของความกว้างลำตัวบริเวณ anus หางของตัวอ่อนมีลักษณะ taper ปลายมนมี 20 – 24 annules ส่วน phasmid ลักษณะ pore-like ตัวเต็มวัยเพศผู้มี stylet และ stylet knob ไม่แข็งแรง esophagous ไม่สมบูรณ์ median bulb และ valve ไม่ชัดเจน มี caudal alae แบบ adanal ส่วน lateral field ของตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย และตัวอ่อนมี lateral lines 4 เส้น ไม่ areolated

4) ไส้เดือนฝอยสกุล *Criconemoides* spp. ตัวเต็มวัยเพศเมียมีความยาวประมาณ 300 – 600 ไมโครเมตร มี annulation ชัดเจน cuticle ไม่มีลักษณะเป็นหนาม (spines) และมี cuticle เพียงชั้นเดียว ไม่มี extra cuticle หางมีลักษณะโค้งมน ริมฝีปากมี submedian lobe ชัดเจน แต่บาง species อาจไม่ชัดเจนก็ได้ วง annule แรกอาจไม่สมบูรณ์หรือหายไป annule ที่ 2 มักจะกว้างและชัดเจนกว่า ส่วน valva ปิด ตัวเต็มวัยเพศเมียมี stylet ยาว stylet knob มีลักษณะคล้ายสมอ

5) ไส้เดือนฝอยสกุล Meloidogyne spp. การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินจะพบตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง ซึ่งสามารถจำแนกได้โดยลักษณะทางสัณฐาน ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองมีความยาวประมาณ 200-380 ไมโครเมตร ริมฝีปากไม่ offset labial disc ยกสูง มักจะไม่มี lateral lip, stylet ยาว 11-25 ไมโครเมตร stylet knob offset มีลักษณะกลม หรือ transversely elongated มี hemizonid อยู่ด้านหน้า หรือใกล้ excretory pore หางยาว 15-60 ไมโครเมตร ปลายมน ความกว้างลำตัวบริตำแหน่ง anus ประมาณ 8-17 ไมโครเมตร มีเส้นข้างลำตัว (lateral lines) 4 เส้น และมี incisures หางมี phasmid อยู่บริเวณ subterminal ลักษณะเป็นจุด ใกล้ cloacal aperture

6) ไส้เดือนฝอยสกุล Heterodera spp. ที่แยกจากตัวอย่างดินพบตัวอ่อนระยะที่สองซึ่งสามารถจำแนกได้โดยลักษณะทางสัณฐาน โดยส่วนหัวจะมีลักษณะ offset รูปร่าง hemispherical มี 4 annules มี amphid apertures ด้านข้าง ใกล้ช่องปาก ส่วน stylet ชัดเจน stylet knob ชัดเจนชี้ไปด้านหน้า (forwardly-directed) มีเส้นข้างลำตัว 4 เส้น median bulb ชัดเจน dorsal gland orifice อยู่ห่างจากฐานของ stylet knob 3-4

กรมวิชาการเกษตร

ไมโครเมตร หางมีลักษณะรูปโคนแหลม (acutely conical) ปลายหางมน มี hyaline terminal section ยาว 1-1.25 เท่าของความยาว stylet มี phasmids ที่ไม่ชัดเจน อยู่ post-anal

7) ไส้เดือนฝอยสกุล Tylenchorhynchus spp. ตัวเต็มวัยเพศเมียริมฝีปาก setoff โครงหัวมีความแข็งแรงลักษณะครึ่งวงกลม (hemispherical) ความยาวของ stylet สมบูรณ์มี stylet knob ชัดเจน esophageal gland ไม่ซ้อนทับกับลำไส้ ลักษณะหางแบบ conical หรือ cylindrical ปลายมน มี ovary 2 ข้าง ตำแหน่ง vulva 46-60 เปอร์เซ็นต์ของความยาวลำตัว

8) ไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* spp. ตัวเต็มวัยเพศเมียลำตัวมีความยาว 0.9-4.2 มิลลิเมตร ริมฝีปากไม่ offset จากลำตัว โครงหัวมีความแข็งแรงลักษณะครึ่งวงกลม (hemispherical) esophageal gland ซ้อนทับลำไส้ทางด้าน ventral stylet แข็งแรงยาวประมาณ 1/2-4 เท่าของความกว้างลำตัวมี stylet knob ชัดเจน ตำแหน่ง vulva ประมาณ 48-58 เปอร์เซ็นต์ของความยาวลำตัว มี ovary 2 ข้าง หางลักษณะ taper เรียวแหลม

9) ไส้เดือนฝอยสกุล *Hoplolaimus* spp. ตัวเต็มวัยเพศเมียริมฝีปาก setoff โครงหัวมีความแข็งแรงลักษณะครึ่งวงกลม (hemispherical) ความยาว stylet มากกว่า 2 เท่าของความกว้างริมฝีปาก มี stylet knob ชัดเจน esophageal gland ซ้อนทับลำไส้ทางด้าน dorsal ส่วนของลำไส้มีสีเข้ม ปลายหางมนลักษณะครึ่งวงกลม (hemispherical) ตำแหน่ง vulva 51-62 เปอร์เซ็นต์ของความยาวลำตัว

จากผลการดำเนินการที่ผ่านมาสรุปได้ว่ายังมีพบไส้เดือนฝอย *Ditylenchus destructor* ในประเทศไทย

การสำรวจและเฝ้าระวังไส้เดือนฝอย *Ditylenchus dipsaci* ในประเทศไทย รวบรวมข้อมูลของไส้เดือนฝอย *Ditylenchus dipsaci* และจัดทำคู่มือการสำรวจ และ การศึกษาสัณฐานวิทยาใช้แนวทางวินิจฉัยเพื่อจัดจำแนกชนิดเบื้องต้น ตามแนวทางของ EPPO Standard PM 7/87 (2) *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci* และเก็บตัวอย่างพืชและดินปลูก เดินทางสำรวจ กระเทียม ในพื้นที่ จังหวัด อุตรดิตถ์ แพร่ น่าน พะเยา เพชรบูรณ์ ลำปาง ลำพูน แม่ฮ่องสอน และ เชียงใหม่ ในปี 2565 จากการตรวจวินิจฉัยตัวอย่างกระเทียมพันธุ์พืชเมืองพร้อมดินปลูก หอมแบ่ง (หอมขาว)พร้อมดินปลูก หอมแดง อายุ 30 วันพร้อมดินปลูกกระเทียมแห้ง และหอมหัวใหญ่ จำนวน 228 ตัวอย่าง ทุกตัวอย่างตรวจวินิจฉัย ไม่พบไส้เดือนฝอย *Ditylenchus dipsaci*

การสำรวจและเฝ้าระวังแมลงวันผลไม้ *Bactrocera minax* ในประเทศไทย

สืบค้นข้อมูลสืบค้นข้อมูลลักษณะของแมลงวันผลไม้ *B. minax* (Chinese citrus fly) ได้แก่ รายละเอียดของแมลง ชื่อวิทยาศาสตร์ และลักษณะการทำลายบนพืช ตลอดจนถึงพืชอาศัยและเขตการแพร่กระจายของแมลงชนิดนี้ โดยมีรายละเอียดดังนี้

รายละเอียดของแมลง (CABI, 2021; EPPO, 2020) ดังนี้ (ภาพที่ 6.5)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Bactrocera minax* (Enderlein)

ชื่อสามัญ: Chinese citrus fly

กรมวิชาการเกษตร

อันดับ: Diptera

วงศ์: Tephritidae

สกุล: Bactrocera

ลักษณะของแมลง

ตัวเต็มวัยของแมลงชนิดนี้ จัดอยู่ในสกุล Bactrocera ซึ่งจะมีรูปร่างลักษณะคล้ายกับแมลงในวงศ์ Tephritidae ส่วนใหญ่ โดยมากแล้วแมลงจะมีลวดลายบนปีก อีกทั้งตัวเมียยังมีท่อนำไข่ที่ยาวและมีลักษณะเป็นปลายแหลม ซึ่งคุณลักษณะเหล่านี้เป็นลักษณะสำคัญที่ทำให้แมลงถูกแยกออกจาก Diptera อื่น ๆ โดยรูปร่างของ *B. minax* เป็นสายพันธุ์ที่มีสีน้ำตาลส้มเด่น มีแถบสีเหลืองตรงกลางและด้านข้าง (แถบ) บนหนังหุ้ม รวมทั้งลักษณะที่ผิดปกติของแถบสีเหลืองด้านข้างด้านหน้าของรอยประสาน ไม่มีส่วนหน้าของ supra-alar setae และ aculeus ของตัวเมียมีจุดปลายมนจุดเดียว (ภาพที่ 6.6)

วงจรชีวิตของแมลงชนิดนี้ประมาณ 5 สัปดาห์ ใน 1 ปี สามารถผลิตประชากรได้เพียง 1 รุ่น และการแพร่กระจายนั้นจะเกิดมาจากการขนส่ง โดยติดมากับผลส้มที่นำเข้ามาจากแหล่งที่มีรายงานการระบาด โดยแมลงวันผลไม้ชนิดนี้จะมีการพัฒนาวงจรชีวิตให้สอดคล้องกับระยะการเจริญเติบโตของส้ม ตัวเต็มวัยเพศเมียจะทำการผสมพันธุ์ และวางไข่ในระยะที่ส้มยังเป็นผลอ่อน และหนอนจะกัดกินอาศัยและพัฒนาวงจรชีวิตอยู่ภายในผลก่อนจะออกจากผลเพื่อทิ้งตัวเข้าดักแด้ในผิวดินรอบ ๆ ผลส้ม

ลักษณะการทำลายบนพืช

แมลงชนิดนี้จะทำความเสียหายให้กับพืชตระกูลส้ม โดยตัวเต็มวัยเพศเมียจะวางไข่ในผลส้ม เมื่อหนอนฟักออกจากไข่จะกัดกินและอาศัยอยู่ภายในผลส้ม ทำให้ผลส้มที่ถูกทำลายไม่สามารถจำหน่ายได้ กระทบต่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตร แมลงชนิดนี้มีการเข้าทำลายเฉพาะพืชตระกูลส้มเท่านั้น และพบการระบาดในประเทศจีน (CABI, 2019) ซึ่งมีการส่งออกส้มมายังประเทศไทยมาอย่างต่อเนื่อง แต่ยังไม่มีการรายงานว่าพบแมลงชนิดนี้ในประเทศไทย จากวงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ชนิดนี้ พบว่าตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัว สามารถวางไข่ได้ 50 - 200 ฟอง และตัวหนอนที่อาศัยอยู่ภายในผลส้มจะสามารถทนต่ออุณหภูมิต่ำได้ และโอกาสการแพร่กระจายนั้นจะเกิดมาจากการขนส่ง โดยติดมากับผลส้มนำเข้าจากแหล่งที่มีแมลงวันชนิดนี้

การแพร่กระจาย

ส่วนใหญ่จะเกิดจากนำผลส้มที่มีหนอนแมลงวันผลไม้จากแหล่งที่พบว่ามีการระบาดเข้ามาในพื้นที่ นอกจากนี้ยังพบว่า แมลงวันผลไม้ชนิดนี้สามารถปรับตัวในพื้นที่ที่มีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมได้ดีในระดับหนึ่ง

พื้นที่การระบาด

ทวีปเอเชีย – จีน ภูฏาน อินเดีย และเนปาล

พืชอาศัย

พืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ชนิดนี้จำกัดอยู่ในพืชวงศ์ส้มเท่านั้น (CABI, 2018; EPPO, 2020) ได้แก่ *Citrus aurantiifolia, Citrus aurantium, Citrus junos, Citrus limon, Citrus maxima, Citrus medica, Citrus paradisi,*

กรมวิชาการเกษตร

Citrus reticulata, Citrus sinensis, Citrus tangerina, Citrus trifoliata, Citrus unshiu, Citrus x nobilis, Citrus, Fortunella crassifolia, Fortunella japonica, Fortunella margarita, Fortunella เป็นต้น

จัดทำแบบฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจแมลงวันผลไม้ชนิด *B. minax* และสร้างคู่มือการสำรวจในแปลงปลูกพืชตระกูลส้ม (ภาพที่ 6.7) โดยคู่มือประกอบด้วย

- ข้อมูลพื้นฐานของแมลง และภาพตัวอย่างการทำลาย ตลอดจนวิธีการจำแนกชนิดและความแตกต่างของรอยทำลายที่เกิดขึ้นของแมลงชนิดนี้เทียบกับแมลงวันผลไม้ที่เป็นศัตรูพืชเดิมของพืชชนิดนี้

- แบบบันทึกรายงานการสำรวจโดยมีรายละเอียดคือ วันเดือนปีที่สำรวจ สถานที่สำรวจ (หมู่บ้าน ตำบล อำเภอ จังหวัด) พิกัดทางภูมิศาสตร์ ขนาดของพื้นที่ที่ทำการสำรวจ ชื่อผู้สำรวจ จำนวนแปลงที่สำรวจ ชื่อพืชที่พบรอยทำลาย อัตราการทำลาย และพืชอาศัยอื่นที่อยู่ข้างเคียง

- รูปแบบการเดินสำรวจรอยทำลายของพืชแบบทแยงมุม สังเกตรอยทำลายบนผลส้มต้นละ 4 ทิศรอบทรงพุ่ม จำนวน 10 ต้นต่อแปลง เดินสำรวจในแนวทแยงมุม (ภาพที่ 6.8)

- รูปแบบและวิธีการติดตั้งกับดักชนิดเหยื่อโปรตีนในแปลงปลูก เพื่อดักจับแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัย

- การเก็บตัวอย่าง โดยเก็บส่วนของผลส้มที่มีรอยทำลาย ใส่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วใส่ในถุงพลาสติก เพื่อมาตรวจจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ

จากการสำรวจแปลงปลูกพืชตระกูลส้มในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง แพร่ น่าน พิจิตร กำแพงเพชร สุโขทัย ชัยนาท นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง ปทุมธานี สมุทรสงคราม ปราจีนบุรี ชัยภูมิ นครราชสีมา และอุบลราชธานี ในปีที่ 1 ซึ่งเป็นแหล่งปลูกพืชตระกูลส้มที่สำคัญในประเทศไทย จำนวน 102 แปลง 1,044 ไร่ ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2564 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2565 ผลสำรวจเมื่อตรวจดูลักษณะภายนอกของแมลงวันผลไม้ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างและทำการเปรียบเทียบลักษณะสำคัญของแมลงในห้องปฏิบัติการ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope พบว่า ยังไม่พบแมลงวันผลไม้ที่มีลักษณะภายนอกที่ใกล้เคียงกับแมลงชนิดนี้ เข้าทำลายพืชตระกูลส้มที่ทำการสำรวจ แต่พบว่ามีการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *B. dorsalis B. correcta B. cucurbitae* และ *B. papayae* โดยแมลงวันผลไม้ทั้ง 4 ชนิดนี้จัดเป็นศัตรูพืชที่สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิกอยู่แล้ว

การสำรวจและเฝ้าระวังตั๊กแตนไผ่ *Ceracris kiangsu* Tsai (Acrididae,Othoptera) ในประเทศไทย

สำรวจเก็บตัวอย่างในพื้นที่ภาคเหนือและภาคกลาง ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย พะเยา น่าน สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เป็นต้น ได้ตัวอย่างตั๊กแตนรวมทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง วินิจฉัยชนิดของตั๊กแตนได้ 5 ชนิดได้แก่ 1) *Acrida willemsei* 2) *Oxya hyla* 3) *Hieroglyphus banian* 4) *Atractomorpha crenulata* 5) *Phlaeoba antennata* **ไม่พบตั๊กแตนไผ่ *Ceracris kiangsu*** ได้ชุดข้อมูลรายละเอียดของตั๊กแตนไผ่ วงจรชีวิต การแพร่กระจาย

กรมวิชาการเกษตร

วินิจฉัยลักษณะ ตีพิมพ์ในบทความวิชาการ วารสารกีฏและสัตววิทยา จำนวน 1 บทความ ได้คู่มือการวินิจฉัยตั๊กแตนไผ่ ตั๊กแตนหนวดสั้นวงศ์ Acrididae จำนวน 1 ชุดข้อมูล

การสำรวจและเฝ้าวัชพืช *Raphanus raphanistrum* ในประเทศไทย

จากการสืบค้นข้อมูลลักษณะของวัชพืช *Raphanus raphanistrum* พบว่า วัชพืชชนิดนี้มีพืชอาศัยหลักในพืชตระกูลกะหล่ำ เช่น กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก บร็อคโคลี่ ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวปลี กวางตุ้ง และคะน้า เป็นต้น อาจมีให้มีการแพร่กระจายของวัชพืชทำให้เกิดความเสียหายขึ้นมาได้ในอนาคตเข้าทำความเสียหายได้ จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างที่มีลักษณะคล้ายวัชพืช *Raphanus raphanistrum* (ภาพที่ 1) ที่แหล่งปลูกกะหล่ำปลี (ภาพที่ 6.10 และ 6.11) เดือนตุลาคม 2564 - กันยายน 2565 จำนวน 5 จังหวัด ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย และจังหวัดพะเยา จำนวน 18 แปลง ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 9 แปลง ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดนครปฐม จำนวน 11 แปลง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น จำนวน 2 แปลง ผลการสำรวจพบว่า ไม่พบวัชพืช *Raphanus raphanistrum*

การสำรวจและเฝ้าระวังวัชพืช *Galium aparine* L. ในประเทศไทย

วัชพืช *Galium aparine* L. จัดอยู่ในวงศ์ Rubiaceae เป็นศัตรูพืชกักกันพืชของประเทศไทย เป็นพืชฤดูเดียว ข้อมูลทางชีววิทยาและสัณฐานวิทยาของวัชพืชชนิดนี้เมื่อโตเต็มที่มีความสูงประมาณ 120 เซนติเมตร ใบมีลักษณะรูปทรงไข่ ขนาดกว้าง 3-8 มิลลิเมตร ยาว 30-60 มิลลิเมตร มีเส้นใบ 1 เส้น และมีขนแข็งขึ้นโดยรอบ ดอกมีสีขาว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร กลีบดอก 4 กลีบ และมีก้านดอก 1 ก้าน จะมีดอกอยู่ประมาณ 2-5 ดอก ผลหุ้มเมล็ดมีลักษณะทรงกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-4 มิลลิเมตร สีน้ำตาลอมเทา และมีขนแข็งขึ้นโดยรอบ (ภาพที่ 6.12) พบได้ทั่วไปในเขตอบอุ่นในทุกทวีป เจริญเติบโตในหลากหลายสภาพแต่เจริญเติบโตได้ดีในแหล่งอาศัยที่ชื้น มีการพักตัวเล็กน้อยสามารถงอกในช่วงอุณหภูมิที่กว้างกว่า (5-20 ° C) และในที่ไม่มีแสง พบได้ในพื้นที่ปลูกพืชหลากหลายชนิด เช่น แปลงปลูกพืชตระกูลกะหล่ำ ข้าว ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรย์ ข้าวสาลี บีทรูท ถั่วเหลือง ฝ้าย เป็นต้น รวมทั้งในพื้นที่ป่าไม้ และพื้นที่รกร้าง เมล็ด *G. aparine* อาจกระจายไปตามลม น้ำ สัตว์ เครื่องจักรกลการเกษตร หรือสิ่งปนเปื้อนของเมล็ดพืช ผลไม้และเมล็ดพืช หรือเสื้อผ้าและกระเป๋าของมนุษย์ ซึ่งจะเป็นกลไกแพร่กระจาย ผลกระทบเมื่อมีวัชพืช *G. aparine* ขึ้นรบกวนในแปลงปลูกธัญพืชทำให้มีผลผลิตลดลง 30-60% (CABI, 2019) ในปี 1981 ถึง 1989 Roder และคณะ (1990) พบว่ามีการลดลงของผลผลิตข้าวบาร์เลย์ 0.24 เปอร์เซ็นต์ และข้าวสาลี 0.14 เปอร์เซ็นต์ ในฤดูหนาวที่เกิดจากการมีวัชพืช *G. aparine* จำนวน 1 ต้น/ตารางเมตร ขึ้นรบกวนในแปลงปลูกพืช พื้นที่การแพร่ระบาดในทวีปเอเชีย ได้แก่ อัฟกานิสถาน ภูฏาน สาธารณรัฐประชาชนจีน อินเดีย อิสราเอล ญี่ปุ่น เกาหลี ปากีสถาน ตุรกี

จากการสำรวจแปลงปลูกพืชตระกูลกะหล่ำในพื้นที่สำรวจ ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2564 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2565 ที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน น่าน แพร่ นครปฐม สมุทรสงคราม ราชบุรี กาญจนบุรี นครราชสีมา สกลนคร และอุดรธานี จำนวน 45 แปลง และเก็บรวบรวมตัวอย่างวัชพืชที่มีลักษณะใกล้เคียงกับวัชพืชเป้าหมายจากแหล่งปลูก นำมาตรวจจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ ผลการสำรวจไม่พบวัชพืช *Galium aparine* L.

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 6.1 Specific survey of *P. corrugata* in production areas of tomatoes.

ภาพที่ 6.2 อาการใบจุดของมะเขือเทศจากจังหวัดสกลนครที่ตรวจพบเชื้อที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Xanthomonas perforans*

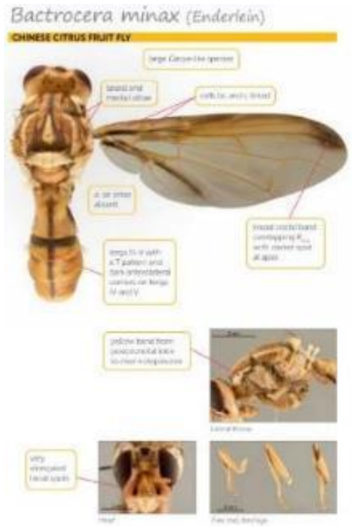
กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 6.3 Symptoms of *Pseudocercospora angolensis* on leaves and fruit. Source: M.C. Pretorius, 2005

ภาพที่ 6.4 Symptoms of old leaves are pale, yellow, V-shaped brown lesions. The edges of the old leaves wither and will eventually dry up and die.Source : Courtesy of Flavia Ruiz, Erieview, Inc. และ Gerald Holmes, California Polytechnic State University

ภาพที่ 6.5 Survey pattern and collecting sample

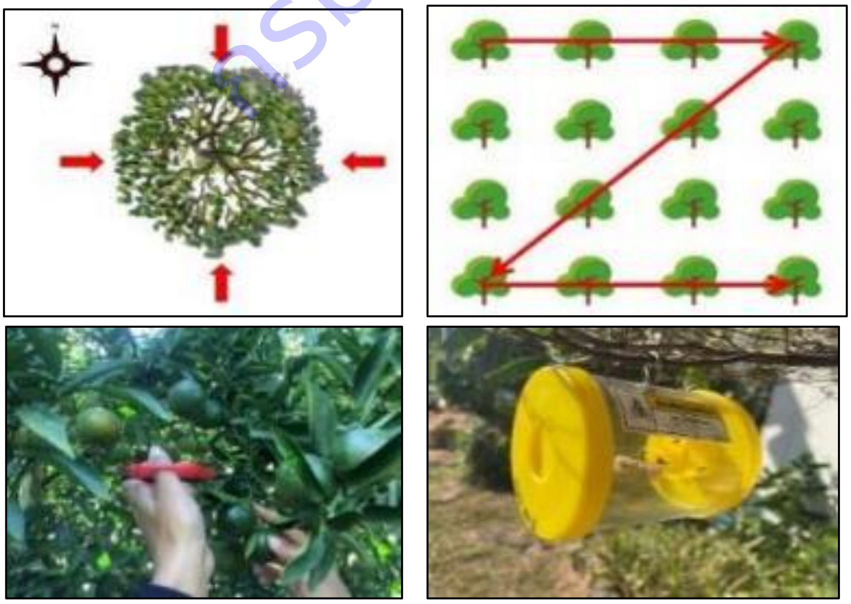
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 6.6 Characteristics of *Bactrocera minax*

Source: THE AUSTRALIAN HANDBOOK FOR THE IDENTIFICATION OF FRUIT FLIES, 2018.

ภาพที่ 6.7 Survey guide and report form

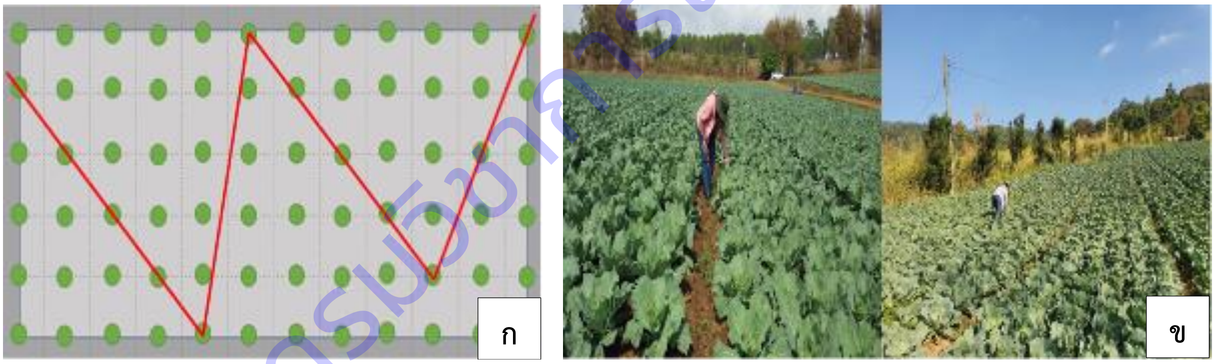


ภาพที่ 6.8 Survey pattern and collecting sample of *Citrus spp.*

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 6.9 *Hieroglyphus banian*

ภาพที่ 6.10 ลักษณะของ ต้น ดอก และเมล็ดของวัชพืช *Raphanus raphanistrum*



ภาพที่ 6.11 การเดินสำรวจวัชพืชแบบซิกแซค (W) ในแปลงปลูกกะหล่ำ

ก.เดินสำรวจแบบซิกแซค (W) ข.แปลงปลูกกะหล่ำปลี

ภาพที่ 6.12 วัชพืช *Galium aparine* L.

ที่มา: ttps://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยย่อยที่ 7 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชอุบัติใหม่ในข้าวโพดและกล้วยเพื่อการส่งออก

ประกอบด้วย 2 กิจกรรม ดังนี้

กิจกรรมที่ 1 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพด

การทดลองที่ 1.1 การทดสอบประสิทธิภาพสารคลุกเมล็ดและราดสารป้องกันกำจัดแมลงในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด (ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2566)

ดำเนินการตามกรรมวิธีในข้าวโพดหวาน ที่ อ.ท่าม่วง และ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี พบว่าสารป้องกันกำจัดแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด ได้แก่ chlorantraniliprole 62.5%FS อัตรา 9 มล./เมล็ดพันธุ์ 1 กก., สาร cyantraniliprole 24%+thiamethoxam 24%FS อัตรา 8 มล./เมล็ดพันธุ์ 1 กก., สาร cyantraniliprole 20%SC ผสมในอัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร ราดต้นข้าวโพด อัตรา 10 มล./ต้น (ราดสารที่ 3 วันหลังข้าวโพดงอก) และ สาร cyantraniliprole 20%SC อัตรา 20 มล./เมล็ดพันธุ์ 1 กก. (กรรมวิธีเปรียบเทียบ) (ตารางที่ 55.7.1.1.1 และ 55.7.1.1.2) และจะดำเนินการทดลองในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ในปี 2566

การทดลองที่ 1.2 การใช้ไวรัส NPV ร่วมกับสารป้องกันกำจัดแมลงในการควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดหวาน (ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2566)

การทดลองในห้องปฏิบัติการ

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> ศึกษาประสิทธิภาพการควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดหลังได้รับไวรัส SfNPV

ผลการทดลอง พบว่ากรรมวิธี SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม. จึงบังคับให้กิน cypermethrin 35% W/V EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร, SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม. จึงบังคับให้กิน cypermethrin 35% W/V EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และ SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม. จึงบังคับให้กิน deltamethrin 3 % W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ทำให้หนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดวัย 3 ตาย 82.50, 85.00 และ 75.00 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลา 5 วัน ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ให้หนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดกินเฉพาะไวรัส SfNPV และกรรรมวิธีอื่นๆ (ตารางที่ 55.7.1.2.1)

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> ศึกษาประสิทธิภาพของไวรัส SfNPV ที่ผสมด้วยสารฆ่าแมลงชนิดต่างๆ

ผลการทดลอง พบว่ากรรมวิธีที่ทำให้หนอนตายมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ คือ กรรมวิธี SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + chlorantraniliprole 5.17%W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และ SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + cypermethrin 35% W/V EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ที่ทำให้หนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดตายได้ 84.27 และ 82.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ได้ในวันที่ 2

กรรมวิธี SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + chlorantraniliprole 5.17%W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร, SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + flubendiamide 20 % WG อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และ SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + deltamethrin 3 % W/V EC อัตรา 20

กรมวิชาการเกษตร

มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ทำให้หนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดตายได้ 100.0 , 97.5 และ 90.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ได้ในวันที่ 3 (ตารางที่ 55.7.1.2.2)

จากผลการทดลองทั้ง 2 ขั้นตอนข้างต้น พบว่า กรรมวิธีการทดลองที่ใช้ไวรัส SfNPV ที่ผสมด้วยสารฆ่าแมลงชนิดต่างๆ มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดวัย 3 ในห้องปฏิบัติการได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ หลังจากได้รับสารทดลองไปในวันที่ 2-3 แตกต่างจากกรรมวิธีการทดลองที่ใช้หนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดกินอาหารเทียมที่เคลือบผิวหน้าไวรัส SfNPV อัตราต่าง ๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นย้ายหนอนทดลอง มากินอาหารที่เคลือบผิวหน้าด้วยสารเคมีชนิดต่างๆ ที่ทำให้หนอนกระทู้ข่าวโพดลายจุดวัย 3 ตายได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 5 ของการทดลอง จึงคัดเลือกวิธีการจากผลการทดลองข้างต้นเพื่อวางแผนการดำเนินการทดลองในแปลงปลูกข้าวโพดหวานสภาพไร่ ดังนี้

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + chlorantraniliprole 5.17%W/V SC
อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 2 SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + cypermethrin 35% W/V EC
อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + flubendiamide 20 % WG
อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + deltamethrin 3 % W/V EC
อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 ไวรัส SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 6 ไม่พ่นสารป้องกันกำจัดแมลง

การทดลองในสภาพไร่ (ตารางที่ 55.7.1.2.3 - 55.7.1.2.4)

ทำการทดลองในสภาพไร่ โดยใช้แปลงปลูกข้าวโพดหวานของเกษตรกรในตำบลเขาน้อย อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ในขณะที่ต้นข้าวโพดหวานมีอายุ 26 วันหลังปลูกได้เริ่มทำการพ่นสารทดลองเนื่องจากสำรวจพบใบข้าวโพดหวานถูกหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดทำลาย มีความเสียหายบนใบเฉลี่ยมากกว่าระดับ 4 และมีความเสียหายบนใบข้าวโพดหวานสม่ำเสมอทั่วทั้งแปลงทดลอง

หลังจากพ่นสารทดลองครั้งที่ 1 ทุกกรรมวิธีพบความเสียหายบนใบไม่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยใบของข้าวโพดหวานถูกทำลาย 15.56 – 26.39 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นกรรมวิธีไม่พ่นสารป้องกันกำจัดแมลง ที่ใบถูกทำลาย 36.39 เปอร์เซ็นต์

หลังพ่นสารทดลองครั้งที่ 2 พบว่า ใบข้าวโพดที่เกิดความเสียหายจากหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดมีความเสียหายลดลงจากเมื่อ 7 วันก่อนหน้า โดยกรรมวิธีที่สามารถลดการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดได้ดีได้แก่ กรรมวิธี SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + flubendiamide 20 % WG อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร, SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + chlorantraniliprole 5.17%W/V SC 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และ SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร ที่พบใบเกิดความเสียหาย 8.47, 9.17 และ 10.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

กรมวิชาการเกษตร

หลังพ่นสารทดลองครั้งที่ 3 พบว่าใบข้าวโพดที่เกิดความเสียหายจากหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดมีความเสียหายลดลงจากเมื่อ 7 วันก่อนหน้า โดยทุกกรรมวิธีพบความเสียหายบนใบไม่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยพบใบของข้าวโพดหวานถูกทำลาย 4.71 – 7.13 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นกรรมวิธีไม่พ่นสารป้องกันกำจัดแมลง ที่ใบถูกทำลาย 24.12 เปอร์เซ็นต์

เนื่องจากได้ทำการทดลองในช่วงเดือน กันยายน 2565 ซึ่งมีฝนตกหนักในจังหวัดกาญจนบุรี ทำให้เกิดน้ำท่วมขังหลายพื้นที่และท่วมแปลงข้าวโพดหวานที่ใช้การทดลองดังกล่าวโดยหลังจากทำการพ่นสารทดลองครั้งที่ 3 มีฝนตกต่อเนื่องและเกิดน้ำท่วมขังหลายวัน ทำให้ต้นข้าวโพดเจริญเติบโตได้ไม่เป็นปกติในช่วง 42 วัน หลังปลูก จึงไม่สามารถทำการพ่นสารทดลองครั้งที่ 4 ได้ และรอให้ข้าวโพดถึงเวลาเก็บเกี่ยวผลผลิตและเมื่อทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตโดยสุ่มเก็บฝักข้าวโพด 20 ฝักจากแต่ละแปลงย่อย พบว่าทุกกรรมวิธีได้ผลผลิตดีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีน้ำหนักฝักดีเฉลี่ยต่อกรรมวิธีที่ 0.65 -1.68 กิโลกรัม ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวยังไม่สมบูรณ์ จำเป็นต้องดำเนินการทดลองซ้ำในปี 2566

กิจกรรมที่ 2 ศึกษาโรคตายพราย (Panama disease) tropical race 4 ของกล้วย และการป้องกันกำจัด
การทดลองที่ 2.1 การศึกษาชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคตายพราย TR4 ในกล้วยคาเวนดิชของประเทศไทย
(ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2567)

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่าง

รวบรวมตัวอย่างโรคตายพรายจากโครงการ “Capacity development on diagnostic and surveillance system of banana *Fusarium* wilt disease (TCP/RAS/3619 ที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืชจำนวน 50 ตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อสีน้ำตาลจากต้นกล้วยที่แสดงอาการโรคตายพรายจำนวน 75 ตัวอย่าง รวมถึงดินบริเวณรอบรากจำนวน 20 ตัวอย่าง จากจังหวัดสระบุรี หนองบัวลำภู นครพนม สุรินทร์ ศรีสะเกษ เพชรบูรณ์ อุบลราชธานี เชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน แพร่ น่าน พะเยา อุตรดิตถ์ จันทบุรี และกาญจนบุรี

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ทำการแยกเชื้อราจากตัวอย่างเนื้อเยื่อลำต้นที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวโดยวิธี tissue transplanting โดยแยกได้จากตัวอย่างกล้วยคาเวนดิช จำนวน 40 ไอโซเลท ตัวอย่างกล้วยน้ำว้าจำนวน 49 ไอโซเลท และจากตัวอย่างดิน 6 ไอโซเลท รวมจำนวน 95 ไอโซเลท

นำเชื้อราทั้ง 95 ไอโซเลท และเชื้อรา *Fusarium* จาก culture collection จำนวน 10 ไอโซเลท รวมจำนวน 105 ไอโซเลท มาแยกให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยวิธี single spore isolation โดยย้ายสปอร์เดี่ยวของเชื้อรา Foc เลี้ยงลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ ห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน จากนั้นนำไปสกัดดีเอ็นเอ

เชื้อที่เจริญจากสปอร์เดี่ยว จะทำการแยกเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

3. จำแนกชนิดเบื้องต้น

ทำการจำแนกชนิดเบื้องต้นของเชื้อรา *Fusarium* ที่แยกได้จากตัวอย่างด้วยรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore conidia ขนาด สี และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อรา โดยอ้างอิงข้อมูลของ Booth (1971) และ Brayford (1992) พบว่าเป็นเชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 85 ไอโซเลท และเป็น *Fusarium* spp. อื่นๆ อีก 20 ไอโซเลท เช่น *F. sonali* และ *F. fujikuroi*

เมื่อจำแนกชนิดเบื้องต้ด้วยข้อมูลทางพันธุกรรมโดยวิธี phylogenetic reconstruction ด้วยข้อมูลของยีนตำแหน่ง *tef1* พบว่าเชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 85 ไอโซเลท จัดอยู่ใน forma specialis *cubense* จำนวน 70 ไอโซเลท และมีความใกล้เคียงกับ forma specialis ได้แก่ *F. oxysporum* f. sp. *melonis* และ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* จำนวน 15 ไอโซเลท ซึ่งต้องทำการจำแนกชนิดอย่างละเอียดต่อไป

การทดลองที่ 2.2 การตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคตายพราย TR4 กล้วยในประเทศไทยด้วยเทคนิค *SIX* genes (ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2567)

1. การรวบรวมตัวอย่างและแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

รวบรวมตัวอย่างโรคตายพรายทั้งที่เป็น culture collection และตัวอย่างเนื้อเยื่อลำต้นกล้วยของกลุ่มวิจัยโรคพืชมาแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชและเลี้ยงให้บริสุทธิ์ ได้เชื้อรา จำนวน 65 ไอโซเลท เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเป็นเชื้อรา *Fusarium* sp. (ภาพที่ 55.7.2.2.1) ซึ่งจะใช้ในการสกัดดีเอ็นเอเพื่อศึกษาต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบชนิดเบื้องต้นของเชื้อราสาเหตุโรคตายพราย TR4

จากการตรวจสอบชนิดของเชื้อรา *Fusarium* sp. ทั้ง 65 ไอโซเลท ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific primer) ต่อเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 (*Foc* TR4) พบว่าเชื้อรา จำนวน 30 ไอโซเลท เป็นเชื้อรา *Foc* TR4 และเมื่อตรวจสอบชนิดของเชื้อราโดยการศึกษาบริเวณ translation elongation factor 1a (*TEF-1a*) พบว่าเป็นเชื้อ *F. oxysporum* f.sp. *cubense* race 1 จำนวน 30 ไอโซเลท และ non-race จำนวน 5 ไอโซเลท (ภาพที่ 55.7.2.2.2) ซึ่งดีเอ็นเอของเชื้อราจะนำไปใช้ศึกษาและจำแนกชนิดในระดับ race ด้วยเทคนิค *SIX* gene ต่อไป

การทดลองที่ 2.3 การศึกษาปฏิกิริยาของสายพันธุ์/พันธุ์กล้วยต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 (ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2567)

1. สายพันธุ์/พันธุ์ กล้วยและเชื้อรา *Foc* TR4 สำหรับใช้ในการทดสอบ

- สายพันธุ์/พันธุ์ กล้วยที่ใช้ในการทดสอบขนาดความสูง 15-25 เซนติเมตร จำนวน 20 พันธุ์/สายพันธุ์ รายละเอียดดังตารางที่ 55.7.2.3.1

กรมวิชาการเกษตร

- เชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 ที่ใช้ในการทดสอบไอโซเลท M0455 เก็บรักษาโดยกลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ซึ่งมีการจำแนกและระบุชนิดโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม และสามารถก่อให้เกิดโรคบนต้นกล้ากล้วย (ภาพที่ 55.7.2.3.1)

2. การทดสอบปฏิกิริยาของสายพันธุ์/พันธุ์กล้วยต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 (*Foc* TR4)

จากการประเมินลักษณะอาการของสายพันธุ์/พันธุ์กล้วย 20 สายพันธุ์/พันธุ์ เมื่อสังเกตุลักษณะอาการหลังจากปลูกเชื้อ 4 สัปดาห์ และนำมาคำนวณดัชนีความรุนแรงของโรค (Disease severity index; DSI) แล้วจัดระดับความต้านทานจากลักษณะอาการภายใน พบว่ากล้วย จำนวน 18 สายพันธุ์/พันธุ์ มีความต้านทานต่อเชื้อรา *Foc* TR4 ในระดับ Highly Susceptible (HS) ซึ่งมีดัชนีความรุนแรงของโรค 62.5-100% ส่วนกล้วยพันธุ์ป่าดอยมูเซอร์ (HB002) และพันธุ์โรส (HB038) มีระดับความต้านทาน Intermediate Resistant (IR) และ Immune (I) ตามลำดับ (ตารางที่ 55.7.2.3.2 และภาพที่ 55.7.2.3.2)

เมื่อนำเนื้อเยื่อภายในของต้นกล้ากล้วยมาแยกเชื้อกลับเพื่อยืนยันถึงสาเหตุการเกิดโรค พบเชื้อรา *Foc* TR4 ในทุกตัวอย่างเนื้อเยื่อกล้วยที่แสดงอาการของโรค

การทดลองที่ 2.4 การทดสอบการใช้ยูเรียและปูนขาวอบดินร่วมกับการใช้เชื้อจุลินทรีย์ฏิปักษ์ ในการควบคุมโรคตายพราย TR4 ของกล้วย (ปีเริ่มต้น 2565 - สิ้นสุด 2567)

ทดสอบการใช้ยูเรียและปูนขาวอบดินในการกำจัดเชื้อรา Foc TR4 สาเหตุโรคตายพราย TR4 ในกล้วยคาเวนดิช ได้อัตราการใช้ยูเรียผสมปูนขาวอบดินที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อรา Foc TR4 คือ ยูเรีย : ปูนขาว อัตรา 50 : 500 กรัมต่อตารางเมตร และทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา *T. harzianum* และ *T. asperellum* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Foc TR4 ในห้องปฏิบัติการ ได้เชื้อรา *T. harzianum* และ/หรือ *T. asperellum* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Foc TR4 ในห้องปฏิบัติการสูงกว่า 60% จำนวน 64 ไอโซเลท คัดเลือก 5 อันดับแรก คือ ไอโซเลท TAAV TAI TAAAB TAAY และ TAAAB เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในโรงเรือนปลูกพืชทดลองต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

3.2 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง (Output)

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)**	เชิงคุณภาพ
1. เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ - ระดับห้องปฏิบัติการ	23	กระบวนการใหม่	เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ - ระดับห้องปฏิบัติการ	23	กระบวนการใหม่	1. กระบวนการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืชของอินทผลัมและลิลลี่ 2. กระบวนจัดทำบัญชีรายชื่อไรศัตรูพืชของอินทผลัมและลิลลี่ 3. กระบวนการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืชของอินทผลัมและลิลลี่ 4. กระบวนการจัดทำบัญชีรายชื่อวัชพืชของอินทผลัมและลิลลี่ 5. กระบวนการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสจีนัส Tobamovirus ของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริกนำเข้า 6. กระบวนการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอย Potato cyst nematode กับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า 7. กระบวนการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Candidatus* Liberibacter solanacearum กับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า 8. กระบวนการตรวจวินิจฉัยเมล็ดวัชพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่ายนำเข้า 9. กระบวนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบและสภาวะการทำปฏิกิริยาสำหรับการตรวจสอบแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* และแมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae* ด้วยเทคนิค multiplex PCR 10. กระบวนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบและสภาวะการทำปฏิกิริยาสำหรับการตรวจสอบ *Cucumber mosaic virus* ในพริกด้วยเทคนิค Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification 11. กระบวนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบและสภาวะการทำปฏิกิริยาสำหรับการตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas perforans* สาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR	1. ได้กระบวนการวินิจฉัยแมลงศัตรูพืช ไรศัตรูพืช โรคพืช และวัชพืชของอินทผลัมและลิลลี่ที่ชัดเจนและถูกต้อง เพื่อใช้จัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชของอินทผลัมและลิลลี่ในประเทศไทย และสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช 2. ได้กระบวนการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริกนำเข้า ไส้เดือนฝอย *Potato cyst nematode* และ *Candidatus Liberibacter solanacearum* กับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า กับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า กระบวนการตรวจวินิจฉัยเมล็ดวัชพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่ายนำเข้า เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงทางวิชาการ และกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชให้เหมาะสมรัดกุม รวมทั้งป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศ 3. ดีเอ็นเอต้นแบบจากตัวอย่างที่จำแนกชนิดถูก ต้องแล้ว และสภาวะการทำปฏิกิริยาของเทคนิค PCR, Multiplex PCR, LAMP สำหรับดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพความไว และความจำเพาะของการตรวจวินิจฉัย เพื่อพัฒนาเป็นเทคโนโลยีการตรวจ

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)**	เชิงคุณภาพ
						12. กระบวนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบและสภาวะการทำปฏิกิริยาสำหรับการตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas vesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR 13. กระบวนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบและสภาวะการทำปฏิกิริยาสำหรับการตรวจไส้เดือนฝอย Radopholus similis ด้วยเทคนิค LAMP PCR และ Real-time PCR 14. กระบวนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบและสภาวะการทำปฏิกิริยาสำหรับการตรวจสอบเชื้อรา Trichoderma asperellum ด้วยเทคนิค PCR 15. กระบวนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบและสภาวะการทำปฏิกิริยาของเทคนิค PCR Multiplex PCR LAMP ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย *Trichoderma asperellum และ Metarhizium anisopliae* 16. กระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้อสัมพัทธ์ที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลมะละกอพันธุ์แขกดำและแขกนวล 17. กระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลมะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้า น้ำดอกไม้มัน แดงจักรพรรดิ และอกร่อง 18. กระบวนการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดโดยใช้สารป้องกันกำจัดแมลง ประเภทใช้ทางดิน (คลุกเมล็ดพันธุ์หรือใช้ราดต้น) 19. กระบวนการจัดการหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดโดยใช้ไวรัส SfNPV ร่วมกับสารป้องกันกำจัดแมลง 20. กระบวนการจำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ในระดับ forma specialis ด้วยลักษณะทางสัญฐานวิทยา	วินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และความแม่นยำสูง 4. กระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลมะละกอพันธุ์แขกดำ และแขกนวล มะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้าน้ำดอกไม้มัน แดงจักรพรรดิ และอกร่อง 5. ได้กระบวนการใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพด และกระบวนการใหม่ในการจำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* (Foc) ระดับ race ที่ถูกต้องและแม่นยำด้วยชีวโมเลกุลและปฏิกิริยาสายพันธุ์/พันธุ์กล้วยที่มีปฏิกิริยาทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา Foc TR4 เพื่อใช้ในการพิจารณาบริหารจัดการศัตรูพืช และได้กระบวนใหม่ของการใช้ยูเรียผสมปูนขาวอบดินที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อรา Foc TR4 สาเหตุโรคตายพราย TR4 ของกล้วยคาเวนดิช และได้กระบวนการใหม่ในการยับยั้งเชื้อรา Foc TR4 ที่มีประสิทธิภาพ

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)**	เชิงคุณภาพ
						21. กระบวนการจำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc) ด้วยชีวโมเลกุล 22. กระบวนการของปฏิกิริยาสายพันธุ์/พันธุ์กล้วยที่ทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา Foc TR4 23. กระบวนการใช้ยูเรียผสมปูนขาวอบดินที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อรา Foc TR4 สาเหตุโรคตายพราย TR4 ของกล้วยคาเวนดิช และกระบวนการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Foc TR4 ที่มีประสิทธิภาพ ด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และ/หรือ *T. asperellum* ในห้องปฏิบัติการ	
2. ฐานข้อมูล ระบบ และกลไก หรือ มาตรฐาน ประเภท: 7.2 ฐานข้อมูล (Database)	10	ฐานข้อมูล	ฐานข้อมูล	10	ฐานข้อมูล	1. ฐานข้อมูลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าบลูเบอรี่จากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก 2. ฐานข้อมูลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าแก้วมังกรจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก 3. ฐานข้อมูลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าเชอรี่จากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก 4. ฐานข้อมูลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าสับปะรดจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก 5. ฐานข้อมูลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าอินทผาลัมจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก 6. ฐานข้อมูลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าองุ่นจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก 7. ฐานข้อมูลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าลิลลี่จากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก 8. ฐานข้อมูลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้ากล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิสจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก	1. ได้ฐานข้อมูลแยกตามชนิดพืชที่นำเข้า จำนวน 9 ชนิด (ฐานข้อมูล) ซึ่งประกอบด้วยข้อมูลดังนี้ - ได้ข้อมูลพืช และรายชื่อศัตรูพืช/กลุ่มศัตรูพืช และข้อมูลศัตรูพืช เช่น การจำแนกทางอนุกรมวิธาน กลุ่มศัตรูพืช หรือชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ และลักษณะการทำลายของศัตรูพืช) ของ (1) บลูเบอรี่ (2) แก้วมังกร (3) เชอรี่ (4) สับปะรด (5) อินทผลัม (6) องุ่น (7) ลิลลี่ (8) กล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส และ (9) วัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก ที่นำเข้าจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก - ได้รายชื่อศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของการนำเข้า (1) บลูเบอรี่ (2) แก้วมังกร (3) เชอรี่ (4) สับปะรด (5) อินทผลัม (6) องุ่น (7) ลิลลี่ (8) กล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)**	เชิงคุณภาพ
						9. ฐานข้อมูลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูกจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก 10. ฐานข้อมูลการสำรวจและเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันของพืชและผลผลิตพืชในประเทศไทย ประกอบด้วย เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas corrugata, Xanthomonas vesicatoria, Xanthomonas gardneri, Xanthomonas perforans*, เชื้อรา *Pseudocercospora angolensis, Verticillium albo-atrum*, ไส้เดือนฝอย *Ditylenchus destructor, Ditylenchus dipsaci*, แมลงวันผลไม้ *Bactrocera minax*, ตั๊กแตนไผ่ *Ceracris kiangsu*, วัชพืช *Raphanus raphanistrum, Galium aparine* L.	- ได้กลุ่มศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของการนำเข้าวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก ที่นำเข้าจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก 2. ได้ข้อมูลการปรากฏ/ไม่ปรากฏของศัตรูพืชกักกันและการแพร่กระจายของศัตรูพืชในประเทศไทย ปีที่ 1 เพื่อใช้ประกอบในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชและสนับสนุนการออกประกาศพื้นที่ปลอดศัตรูพืช

* ใส่ผลผลิตที่ได้ตามคำรับรอง

** หลักฐานเชิงประจักษ์ของผลผลิตให้แสดงรายละเอียดในภาคผนวก และแนบไฟล์ เรียงตามลำดับผลผลิต

กรมวิชาการเกษตร

3.3 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง (Outcome) (ถ้ามี)

ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลลัพธ์
ได้ดีเอ็นเอต้นแบบจากตัวอย่างที่จำแนกชนิดถูกต้องแล้ว และสภาวะการทำปฏิกิริยาของเทคนิค PCR, Multiplex PCR, LAMP สำหรับดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพ ความไวและความจำเพาะของการตรวจวินิจฉัย เพื่อนำไปพัฒนาเป็นเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และความแม่นยำสูงต่อไป	2565
ทราบความเสียหายจากความร้อนต่อคุณภาพของมะละกอพันธุ์แขกดำ และแขกนวล มะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้า น้ำดอกไม้มัน แดงจักรพรรดิ และอกร่อง เพื่อใช้ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้จำนวนไม่น้อยกว่า 3,000 ตัว ในผลมะละกอและมะม่วงต่อไป	2565
ตีพิมพ์ผลงานในวารสารกีฏและสัตววิทยา เรื่อง ตั๊กแตนไผ่ ศัตรูพืชเฝ้าระวังที่สำคัญของประเทศไทย	2565

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

3.4 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง (Impact) (ถ้ามี)

ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลกระทบ
ด้านเศรษฐกิจ :	
ด้านสังคม :	
ด้านสิ่งแวดล้อม :	

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

กรมวิชาการเกษตร

3.5 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

วิธีการ/กระบวนการผลักดันงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (โปรดแนบหลักฐานเชิงประจักษ์การนำผลงานไปใช้ประโยชน์ โดยชี้แจงรายละเอียดไว้ในภาคผนวก และแนบไฟล์หลักฐาน)

ด้านนโยบาย โดยใคร................................(ระบุใครเป็นผู้นำไปใช้)...

อย่างไร (ระบุผลที่เกิดจากการนำไปใช้ประโยชน์ก่อให้เกิดผลอย่างไร)...

ด้านสังคม โดยใคร................................(ระบุใครเป็นผู้นำไปใช้)...

อย่างไร (ระบุผลที่เกิดจากการนำไปใช้ประโยชน์ก่อให้เกิดผลอย่างไร)..

ด้านเศรษฐกิจ โดยใคร...............................(ระบุใครเป็นผู้นำไปใช้)..

อย่างไร..... (ระบุผลที่เกิดจากการนำไปใช้ประโยชน์ก่อให้เกิดผลอย่างไร).......................................

ด้านวิชาการ โดยใคร นิสิต นักศึกษา นักวิชาการ นักวิจัย ส่วนราชการ และผู้ที่เกี่ยวข้อง

อย่างไร 1. ตีพิมพ์ผลงาน เรื่อง ตั๊กแตนไผ่ ศัตรูพืชเฝ้าระวังที่สำคัญของประเทศไทย ในวารสารกีฏและสัตววิทยา ปีที่ 39 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม – ธันวาคม 2564 ไปเป็นประโยชน์ด้านวิชาการ การเรียนรู้ รวมถึงการนำผลงานวิจัยไปวิจัยต่อยอดให้เกิดประโยชน์สูงสุดกับผู้ที่เกี่ยวข้อง

2. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ เรื่อง การสำรวจและศึกษาชนิดของโรคอินทผลัมเพื่อการนำเข้า ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 15 ณ โรงแรมรามาการ์เด้น กรุงเทพมหานคร ไปเป็นประโยชน์ด้านวิชาการ การเรียนรู้ รวมถึงการนำผลงานวิจัยไปวิจัยต่อยอด ให้เกิดประโยชน์สูงสุดกับผู้ที่เกี่ยวข้อง

3. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ เรื่อง การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืช Potato Cyst Nematode ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 15 ณ โรงแรมรามาการ์เด้น กรุงเทพมหานคร ไปเป็นประโยชน์ด้านวิชาการ รวมถึงการนำผลงานวิจัยไปวิจัยต่อยอด การเรียนรู้ ให้เกิดประโยชน์สูงสุดกับผู้ที่เกี่ยวข้อง

4. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ เรื่อง การศึกษาความเสี่ยงศัตรูพืชของการนำเข้าผลอินทผาลัมสดจากสาธารณรัฐอิสลามอิหร่าน ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 15 ณ โรงแรมรามาการ์เด้น กรุงเทพมหานคร ไปเป็นประโยชน์ด้านวิชาการ การเรียนรู้ รวมถึงการนำผลงานวิจัยไปวิจัยต่อยอดให้เกิดประโยชน์สูงสุดกับผู้ที่เกี่ยวข้อง

กรมวิชาการเกษตร

*** คำจำกัดความการนำใช้ประโยชน์ในแต่ละด้าน**

1. **ด้านโยบายและสาธารณะ** การนำความรู้จากงานวิจัยไปใช้ในกระบวนการกำหนดนโยบาย อาจเป็นนโยบายระดับประเทศ ระดับภูมิภาค ระดับจังหวัด ระดับท้องถิ่นการใช้ประโยชน์ด้านนโยบายจะรวมทั้งการนำองค์ความรู้ไปสังเคราะห์เป็นนโยบายหรือทางเลือกเชิงนโยบาย (Policy options) แล้วนำนโยบายนั้นไปสู่ผู้ใช้ประโยชน์ในวงกว้างเพื่อประโยชน์ของสังคม และประชาชนทั่วไป เพื่อเพิ่มคุณภาพชีวิตของประชาชน สร้างสังคมคุณภาพ และส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม
2. **ด้านพาณิชย์/เศรษฐกิจ** เป็นผลงานวิจัยที่เน้นสร้างนวัตกรรม เทคโนโลยี ผลิตภัณฑ์ใหม่ หรือการพัฒนาจากสิ่งที่มีอยู่เดิม โดยเป็นการนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตเชิงพาณิชย์หรือลดการนำเข้าเทคโนโลยีจากต่างประเทศ หรือนำไปสู่การพัฒนารูปแบบธุรกิจใหม่ โดยมีเป้าหมายเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม เพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตและบริการ
3. **ด้านสังคมและชุมชน** การนำกระบวนการ วิธีการ องค์ความรู้ การเปลี่ยนแปลงการเสริมพลัง อันเป็นผลกระทบ ที่เกิดจากการวิจัยและพัฒนาชุมชน ท้องถิ่นพื้นที่ ไปใช้ให้เกิดประโยชน์การขยายผลต่อชุมชนท้องถิ่น หรือรวมถึงสังคมอื่น
4. **ด้านวิชาการ** เป็นผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการ การนำองค์ความรู้จากผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ระดับชาติหนังสือ ตำรา บทเรียน ไปเป็นประโยชน์ด้านวิชาการ การเรียนรู้ การเรียนการสอนในวงนักวิชาการและผู้สนใจด้านวิชาการ รวมถึงการนำผลงานวิจัยไปวิจัยต่อยอดสื่อสาธารณะ การเผยแพร่ความรู้จากผลงานวิจัยที่ได้ต่อสาธารณะ ผ่านทางหนังสือพิมพ์ / วารสาร / โทรทัศน์ / วิทยุ / คู่มือ / แผ่นพับ การฝึกอบรม และสื่อสังคมออนไลน์ต่าง ๆ เป็นต้น

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล

สรุปผลและอภิปรายผล

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 การศึกษาชนิดของศัตรูพืชในประเทศเพื่อการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช

สรุปผล การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรู ไรศัตรูพืช โรคพืชและวัชพืชในแปลง อินทผลัม และลิลลี่ ในพื้นที่ 33 จังหวัด ระหว่างเดือน ตุลาคม 2564 ถึงเดือนกันยายน 2565 พบแมลงศัตรูในอินทผลัม 4 ชนิด ได้แก่ ด้วงงวงมะพร้าว *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivie), ด้วงแรด *Oryctes rhinoceros* (Linnaeus), หนอนปลอกใหญ่ *Mahasena corbetti* Tams และด้วงแทะใบปาล์ม *Promecotheca cumingii* Baly ไรศัตรูพืชที่พบในแปลงอินทผลัมพบทั้งหมด 6 ชนิด 2 วงศ์ วงศ์ Tetranychidae พบไรศัตรูพืช ได้แก่ 5 ชนิดได้แก่ *Eutetranychus orientalis* (Klein) *Oligonychus oryzae* (Hirst) *Oligonychus pratensis* (Banks) (ภาพที่ 4), *Tetranychus kanzawai Kishida* (ภาพที่ 5ข), *Tetranychus fijiensis* Hirst วงศ์ Tenuipalpidae พบไรศัตรูจำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *Raoiella indica* Hirst จากการสำรวจพบว่า ไร *Oligonychus pratensis* (Banks) เป็นไรที่ยังไม่เคยมีรายงานการพบไรชนิดนี้มาก่อนในประเทศไทย (new record) และไร *Raoiella indica* Hirst เป็นไรศัตรูที่มีความสำคัญในมะพร้าว โรคของอินทผลัมและลิลลี่ จำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุได้ ดังนี้ อินทผลัม พบโรคใบจุด graphiola หรือ false smut สาเหตุจากเชื้อรา *Graphiola phoenicis*, โรคใบจุด (leaf spot) สาเหตุจากเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และโรคราดำ สาเหตุจากเชื้อรา *Meliola* sp. นอกจากนี้ยังพบลักษณะอาการใบจุดสีเหลืองออกส้มที่เกิดจากการขาดธาตุโพแทสเซียม และอาการใบล่างเหลืองที่เกิดจากการขาดธาตุไนโตรเจน ลิลลี่ พบโรคใบด่าง สาเหตุจากเชื้อไวรัส *Cucumber mosaic virus* (CMV) และจากการสำรวจวัชพืชในอินทผลัม และลิลลี่ ในภาคเหนือ 7 จังหวัด จำนวน 16 แปลง ประกอบด้วย อินทผลัม 14 แปลง และลิลลี่ 2 แปลง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 8 จังหวัด จำนวน 17 แปลง เป็นแปลงอินทผลัมทั้งหมด และภาคกลาง 13 จังหวัด จำนวน 24 แปลง เป็นแปลงอินทผลัมทั้งหมด พบวัชพืชจำนวน 57 แปลง ประกอบด้วย อินทผลัม 55 แปลง และลิลลี่ 2 แปลง สามารถระบุชนิดวัชพืชรวมได้ 65 ชนิด โดยแยกเป็นในอินทผลัม 55 ชนิด และในลิลลี่ 11 ชนิด และยังไม่สามารถระบุชนิดได้อีกหลายตัวอย่าง เช่น วงศ์ Asteraceae และได้ตัวอย่างวัชพืชเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์วัชพืช 25 ตัวอย่าง

อภิปรายผล จากการสำรวจพบว่าศัตรูที่มีความสำคัญในพืชอินทผลัม ได้แก่ ด้วงงวงมะพร้าว *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivie) หรือที่เกษตรกรเรียกว่า ด้วงไฟ ซึ่งการเข้าทำลายทำให้ผลผลิตเสียหายบางต้นยืนต้นตาย การป้องกันกำจัดทำได้ยาก ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาทดลองถึงวิธีการป้องกันกำจัดและควบคุมเพื่อช่วยเหลือเกษตรกรต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 ศึกษาความเสี่ยงศัตรูพืชที่สัมพันธ์กับการนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก

สรุปผล จากการศึกษาความเสี่ยงศัตรูพืชที่สัมพันธุ์กับการนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ซึ่งได้ข้อมูลทั่วไป รายชื่อศัตรูพืช/กลุ่มศัตรูพืช และข้อมูลศัตรูพืช ของสินค้าเกษตรนำเข้า 9 รายการ ได้แก่ (1) บลูเบอรี่ (2) แก้วมังกร (3) เชอรี่ (4) สับปะรด (5) อินทผลัม (6) ส่วนขยายพันธุ์องุ่น (7) ลิลลี่ (8)

กล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส และ (9) วัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก ที่นำเข้าจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก เมื่อนำรายชื่อศัตรูพืชมาประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนการจัดประเภทศัตรูพืชทำให้ได้รายชื่อศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของสินค้าเกษตรนำเข้า ได้แก่ (1) ผลบลูเบอรี่ จำนวน 5 ชนิด (2) เมล็ดพันธุ์และกิ่งพันธุ์แก้วมังกร จำนวน 12 ชนิด (3) ผลเชอรี่ จำนวน 9 ชนิด (4) ผลสับปะรด จำนวน 8 ชนิด (5) ผลอินทผลัม จำนวน 18 ชนิด (6) กิ่งพันธุ์องุ่น จำนวน 15 ชนิด (7) ดอกและต้นลิลลี่ จำนวน 41 ชนิด (8) ต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และก้านช่อดอกของกล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิสจำนวน 22 ชนิด และกลุ่มศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของการนำเข้าวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก

จากการตรวจสอบศัตรูพืชสำหรับสินค้านำเข้า จำนวน 6 รายการ ได้แก่ ผลบลูเบอรี่ ผลแก้วมังกร ผลเชอรี่ ดอกลิลลี่ ต้นกล้วยไม้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก โดยไม่พบศัตรูพืชติดมากับสินค้าที่นำเข้าดังกล่าว

อภิปรายผล การดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ระหว่างตุลาคม 2564 - ธันวาคม 2565 ได้ข้อมูลพืชและศัตรูพืชของสินค้าพืชนำเข้า 9 รายการ ได้แก่ บลูเบอรี่ แก้วมังกร เชอรี่ สับปะรด อินทผลัม ส่วนขยายพันธุ์องุ่น ลิลลี่ กล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส และวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูก ในประเทศภูมิภาคเอเชียแปซิฟิค และได้รายชื่อศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของผลบลูเบอรี่ เมล็ดพันธุ์และกิ่งพันธุ์แก้วมังกร ผลเชอรี่ ผลสับปะรด ผลอินทผลัม กิ่งพันธุ์องุ่น ดอกและต้นลิลลี่ ต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และก้านช่อดอกของกล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส และกลุ่มศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของการนำเข้าวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูกนำเข้าจากประเทศต้นทางในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ซึ่งจะนำไปดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนต่อไป

โครงการวิจัยย่อยที่ 3 การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักและหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า

สรุปผลจากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ และเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้า ผลการตรวจเชื้อไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค PCR ไม่พบไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและเมล็ดพันธุ์พริก เมื่อทำการปลูกสังเกตุลักษณะอาการผิดปกติในโรงเรือนปลูกพืช ไม่พบอาการผิดปกติที่เกิดจากเชื้อไวรัสจีนัส *Tobamovirus* และจากการติดตามในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริกนำเข้า จังหวัดขอนแก่น อุดรธานี สกลนคร เชียงใหม่ ผลการดำเนินงานไม่พบเชื้อไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ที่เป็นศัตรูพืชกักกันในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ และพริกนำเข้า

จากการสุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากทุกประเทศตามมาตรฐาน ISPM 31 (Methodologies for sampling of consignments) โดยทำการสุ่มตัวอย่างจากด่านตรวจพืชต่าง ๆ ที่มีการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่ง ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2564 ถึง 30 กันยายน 2565 ทั้งหมด 6 ประเทศ ได้แก่ 1) ราชอาณาจักรสกอตแลนด์ นำเข้าจำนวน 21 ครั้ง น้ำหนักรวม 4,256,750 กิโลกรัม 2) แคนาดา นำเข้าจำนวน 1 ครั้ง น้ำหนักรวม 729,000 กิโลกรัม 3) เครือรัฐออสเตรเลีย นำเข้าจำนวน 3 ครั้ง น้ำหนักรวม 276,000 กิโลกรัม 4) เนเธอร์แลนด์ นำเข้าจำนวน 4 ครั้ง น้ำหนักรวม 241,500 กิโลกรัม 5) ราชอาณาจักรนิวซีแลนด์ 1 ครั้ง น้ำหนักรวม 25,000 กิโลกรัม 6) สหรัฐอเมริกา นำเข้าจำนวน 1 ครั้ง น้ำหนักรวม 322 กิโลกรัม โดยทำการสุ่มหัวพันธุ์มันฝรั่งจำนวน 600 หัวต่อตัวอย่าง เพื่อใช้สำหรับการตรวจสอบโรคกับหัวพันธุ์ แยกไส้เดือยฝอยศัตรูพืชจากหัวพันธุ์มันฝรั่งและเศษดินที่ติดมา

กรมวิชาการเกษตร

กับหัวพันธุ์จากตัวอย่างนำเข้าระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2564 ถึง 30 กันยายน 2565 ยังตรวจไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิด potato cyst nematode ด้วยวิธีการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การติดตามและสำรวจแปลงปลูกหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าในพื้นที่แปลงปลูก อำเภอ เวียงป่าเป้า อำเภอ เทิง จังหวัดเชียงราย อำเภอ แม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา และ อำเภอพบพระ จังหวัดตาก สุ่มเก็บตัวอย่างดินแปลงปลูกหัวพันธุ์มันฝรั่ง ยังตรวจไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิด potato cyst nematode

จากการสุ่มตรวจหัวพันธุ์มันฝรั่งที่มีการนำเข้าตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2564 ถึง 30 กันายน 2565 มีการนำเข้าจาก 6 ประเทศ ได้แก่ 1) ราชอาณาจักรสกอตแลนด์ นำเข้าจำนวน 21 ครั้ง น้ำหนักรวม 4,256,750 กิโลกรัม 2) แคนาดา นำเข้าจำนวน 1 ครั้ง น้ำหนักรวม 729,000 กิโลกรัม 3) เครือรัฐออสเตรเลีย นำเข้าจำนวน 3 ครั้ง น้ำหนักรวม 276,000 กิโลกรัม 4) เนเธอร์แลนด์ นำเข้าจำนวน 4 ครั้ง น้ำหนักรวม 241,500 กิโลกรัม 5) ราชอาณาจักรนิวซีแลนด์ 1 ครั้ง น้ำหนักรวม 25,000 กิโลกรัม 6) สหรัฐอเมริกา นำเข้าจำนวน 1 ครั้ง น้ำหนักรวม 322 กิโลกรัม โดยทำการสุ่มหัวพันธุ์มันฝรั่งจำนวน 600 หัวต่อตัวอย่าง เพื่อใช้สำหรับการตรวจสอบโรคกับหัวพันธุ์ การตรวจสอบเบื้องต้นโดยการตรวจสอบด้วยตาเปล่า และผ่าหัวมันฝรั่งเป็นสังเกตอาการ zebra chip ภายในหัวมันฝรั่ง บันทึกข้อมูลต่าง ๆ และบันทึกภาพ หากตรวจพบลักษณะอาการเป็นลายน่าสงสัย นำหัวมันฝรั่งไปปลูกเพื่อสังเกตอาการและเก็บตัวอย่างใบหรือกิ่งมาตรวจวินิจฉัยและจัดจำแนกต่อไป

จากการตรวจสอบตัวอย่างนำเข้าจากทั้ง 6 ประเทศ ได้แก่ 1) สกอตแลนด์ 2) แคนาดา 3) เครือรัฐออสเตรเลีย 4) เนเธอร์แลนด์ 5) ราชอาณาจักรนิวซีแลนด์ 6) สหรัฐอเมริกา บริเวณรอบหัวพันธุ์มันฝรั่งมีลักษณะรอยกระแทกหรือรอยที่เกิดจากของมีคม และมีอาการเน่าเละบางหัว มีเศษดินติดมาเล็กน้อย และหัวพันธุ์ที่นำเข้าจากสกอตแลนด์ พบลักษณะอาการ powdery scab แต่ไม่เกินเงื่อนไขที่ประเทศไทยกำหนด และเมื่อผ่าหัวพันธุ์เพื่อสังเกตลักษณะอาการ zebra chip ไม่พบลักษณะอาการที่สงสัย เนื้อหัวมีลักษณะปกติไม่มีลาย นำหัวพันธุ์ไปปลูกทดสอบในโรงเรือนปลูกพืชเพื่อสังเกตอาการต่อไป

จากการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่ายนำเข้าจากต่างประเทศ พบเมล็ดวัชพืชติดปนมากับเมล็ดพันธุ์จำนวน 6 ครั้ง โดยติดปนมากับเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากประเทศเม็กซิโก 2 ครั้ง อิตาลี 3 ครั้ง และสหรัฐอเมริกา 1 ครั้ง นำเข้าทางด่านตรวจพืชลาดกระบัง ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ด่านตรวจพืชท่าอากาศสุวรรณภูมิ และด่านตรวจพืชไปรษณีย์ เมื่อทำการตรวจสอบศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการเพื่อจัดจำแนกชนิดจำนวน 5 ชนิด สามารถจำแนกชนิดได้ 2 ชนิด ได้แก่ *Helminthotheca echioides* และ *Echinochloa coclona* ส่วนวัชพืชอีก 3 ชนิดได้แก่ *Chenopodium* spp. *Rumex* spp. และ *Solanum* spp. ยังอยู่ระหว่างการจำแนกชนิดและทดสอบความงอก และจากการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกขึ้นฉ่ายจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง และตาก ไม่พบศัตรูพืชที่เป็นศัตรูพืชกักกันในแปลงปลูก

อภิปรายผล จากการตรวจสอบและศึกษาชนิดเมล็ดวัชพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่ายนำเข้าจากต่างประเทศ พบว่าเมล็ดวัชพืช *Helminthotheca echioides* มีสถานภาพยังไม่มีรายงานพบในประเทศไทย จำเป็นต้องเฝ้าระวังไม่ให้มีการแพร่ระบาดในประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยย่อยที่ 4 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์เพื่อการค้าสินค้าเกษตรด้านพืช

สรุปผล โครงการได้ดีเอ็นเอต้นแบบจากตัวอย่างที่จำแนกชนิดถูกต้องแล้ว ได้แก่ แมลงวันผลไม้ที่พบในประเทศไทย 18 ชนิด *Cucumber mosaic virus* จากพริก แบคทีเรีย *X. perforans* จากพริกและมะเขือเทศ 3 ไอโซเลต ยีนสังเคราะห์ *atpD* และ *gyrB* ของแบคทีเรีย *X. vesicatoria* ไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* 50 ประชากร เชื้อรา *Trichoderma asperellum* 40 ไอโซเลต เชื้อรา *Metarhizium* 30 ไอโซเลต ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรากลุ่ม *T. asperellum* complex และ *Metarhizium* เพื่อออกแบบไพร์เมอร์ และสภาวะการทำปฏิกิริยาของเทคนิค multiplex PCR ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* สภาวะการทำปฏิกิริยาของเทคนิค PCR ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย *X. perforans* และ *X. vesicatoria* สำหรับดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพ ความไว และความจำเพาะของเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์

อภิปรายผล ดีเอ็นเอต้นแบบจากตัวอย่างที่จำแนกชนิดถูกต้องแล้วและสภาวะการทำปฏิกิริยาของเทคนิคที่ได้จากการทดสอบมีความสำคัญสำหรับงานวิจัยในปีต่อไปทั้งนี้เพื่อใช้ประโยชน์ในการทดสอบประสิทธิภาพ ความจำเพาะและความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบ และพัฒนาเป็นเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และความแม่นยำสูงต่อไป

โครงการวิจัยย่อยที่ 5 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในผลมะละกอและมะม่วงเพื่อเพิ่มศักยภาพในการส่งออก

สรุปผล จากการสืบค้นข้อมูลชีววิทยาลักษณะประจำพันธุ์ และแหล่งเพาะปลูก พบว่ามะละกอแขกดำ และแขกนวล มีพื้นที่ปลูกในจังหวัดนครปฐม และกาฬสินธุ์ มะม่วงมันเดือนเก้า มีพื้นที่ปลูกในจังหวัดปทุมธานี มะม่วงน้ำดอกไม้มัน มีพื้นที่ปลูกในจังหวัดกรุงเทพฯ ราชบุรี นครปฐม มะม่วงแดงจักรพรรดิ มีพื้นที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ พะเยา แพร่ ฉะเชิงเทรา และราชบุรี และมะม่วงอกร่อง มีพื้นที่ปลูกในจังหวัดกาฬสินธุ์ สมุทรสาคร ราชบุรี และจันทบุรี

ผลการศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อนที่มีผลต่อคุณภาพของมะละกอพันธุ์แขกดำ แขกนวล มะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้า น้ำดอกไม้มัน แดงจักรพรรดิ และอกร่อง หลังผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ พบว่าการอบมะละกอแขกดำที่อุณหภูมิ 46 47 และ 48 °C นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง และเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 13-15 °C นาน 7 วัน พบว่ามะละกอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46 47 และ 48 °C ทั้ง 3 ช่วงเวลา มีการเปลี่ยนแปลงของสีผิวที่ผลจากสีเขียวเป็นสีเหลือง การสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณน้ำตาล และความแน่นเนื้อ ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน

การอบมะละกอพันธุ์แขกนวลที่อุณหภูมิ 46 47 และ 48 °C นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ในสภาพอากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์ 65 และ 80 เปอร์เซ็นต์ และเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 10 °C นาน 7 วัน พบว่ามะละกอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46 และ 47 °C ทั้ง 3 ช่วงเวลา มีการเปลี่ยนแปลงของสีผิวที่ผลจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ปริมาณน้ำตาล และความแน่นเนื้อ ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน ในขณะที่มะละกอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46 และ 47 °C นาน 2 ชั่วโมง (อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์ 65

กรมวิชาการเกษตร

เปอร์เซ็นต์) มีการสูญเสียน้ำหนักมากกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และที่อุณหภูมิ 48 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์ ที่ 2 ชั่วโมง ผิวเปลือกมีลักษณะย่น ความแน่นเนื้อลดลงทำให้เนื้อผลอ่อนนุ่มมากขึ้น

การอบมะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้า และน้ำดอกไม้มัน ที่อุณหภูมิ 47 และ 48.5 °C นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง และเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 15 °C นาน 7 วัน ได้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน พบว่ามะม่วงที่ผ่านความร้อน ที่อุณหภูมิ 47 และ 48.5 °C ทั้ง 3 ช่วงเวลา มีการสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณน้ำตาล และปริมาณกรด ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับมะม่วงที่ไม่ผ่านความร้อน ในขณะที่มะม่วงที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 48.5 °C นาน 2 ชั่วโมง จะพบอาการโรคของผลมะม่วง และอาการเสียหายที่เนื้อเป็นรูพรุนคล้ายฟองน้ำเมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่น ๆ

การอบมะม่วงพันธุ์อกร่องที่อุณหภูมิ 46 47 และ 48 °C นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง และเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิเย็น 13-15 °C นาน 8 วัน และอุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน พบว่ามะม่วงที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46 และ 47 °C ทั้ง 3 ช่วงเวลา มีการเปลี่ยนแปลงของสีผิวของผลจากสีเขียวเป็นสีเหลือง การสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณกรด และปริมาณน้ำตาล ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับมะม่วงที่ไม่ผ่านความร้อน ในขณะที่มะม่วงที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 48 °C ทั้ง 3 ช่วงเวลา มีการเปลี่ยนแปลงของสีผิวของผลจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ปริมาณกรดและการสูญเสียน้ำหนักไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับมะม่วงที่ไม่ผ่านความร้อน

อภิปรายผล จากการผลการศึกษาความเสียหายจากความร้อนด้วยเทคโนโลยีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ต่อคุณภาพของผลมะละกอพันธุ์แขกดำ และแขกนวล มะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้า น้ำดอกไม้มัน แดงจักรพรรดิ และอกร่อง ซึ่งพบว่าอุณหภูมิสูง ความชื้น และระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ส่งผลต่อคุณภาพของมะละกอพันธุ์แขกนวล แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อความเสียหายของมะละกอพันธุ์แขกดำ ขณะที่การศึกษาของมลนิภา และคณะ (2555) ได้ศึกษาด้านความเสียหายของมะละกอด้วยวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) พบว่ามะละกอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46 °C นาน 2 ชั่วโมง พบการเปลี่ยนแปลงของสีผิวที่ผลจากสีเขียวเป็นสีเหลือง (skin yellowing) ใกล้เคียงกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน และพบว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้น ในระยะเวลานานส่งผลต่อความเสียหายของผลมะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้า น้ำดอกไม้มัน และมะม่วงอกร่อง เช่นเดียวกับ การศึกษาของ Unahawutti et al. (1991) ในมะม่วง 3 พันธุ์ คือ น้ำดอกไม้ แรด และพิมเสนแดง ผลการศึกษาด้านความเสียหายของผลมะม่วงจากความร้อนพบว่าการสูญเสียน้ำหนักของมะม่วงทั้งสามพันธุ์ที่ผ่านการอบไอน้ำน้อยกว่ามะม่วงไม่อบไอน้ำปริมาณน้ำตาลและความเป็นกรดไม่แตกต่างกันระหว่างมะม่วงอบไอน้ำและไม่อบไอน้ำมะม่วงแสดงอาการของโรคแอนแทรกโนสและโรคเน่าขั้วผลอย่างรุนแรงมีแนวโน้มลดน้อยลงในมะม่วงอบไอน้ำ การอบไอน้ำทำให้เกิดความเสียหายจากความร้อนขึ้นภายในผลมะม่วงทั้ง 3 พันธุ์ ซึ่งแสดงอาการให้เห็น 2 ลักษณะคือ จุดสีขาว (White spot) และเนื้อมะม่วงแตกเป็นรูพรุนสีขาวลักษณะคล้ายฟองน้ำ (Spongy tissue) ลักษณะผิดปกติดังกล่าวนี้ไม่ปรากฏอาการให้สังเกตเห็นได้จากทางกายภาพและไม่แสดงอาการให้เห็นจนกว่ามะม่วงสุก (อุดร และคณะ, 2536) ในขณะที่ Jacobi and Wong (1992) ได้รายงานความเสียหายของมะม่วงพันธุ์ ‘Kensington’ ว่าเมื่ออบไอน้ำมะม่วงพันธุ์ ‘Kensington’ จาก 3 แหล่งปลูกที่อุณหภูมิผล 47 °C นานตั้งแต่ 7.5 ถึง 30 นาที ความเสียหายภายในและภายนอกผลเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ความเสียหายภายนอกที่สำคัญได้แก่ อาการผิวเป็นรอยสีน้ำตาล และเซลล์ที่เปลือก (Lenticel) เป็นจุดเข้ม ส่วนความเสียหายภายในผลพบอาการเนื้อเกิดเป็นจุดสี

กรมวิชาการเกษตร

ขาว (ricy spot) โดยแหล่งปลูกและระดับความแก่ของผลมะม่วงเมื่อนำมาผ่านความร้อนมีอิทธิพลต่อระดับความเสียหายของมะม่วง

โครงการวิจัยย่อยที่ 6 การสำรวจและเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันของพืชและผลผลิตพืชในประเทศไทย

สรุปผล การสำรวจ และเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันของพืชและผลผลิตพืชในประเทศไทย ได้ข้อมูลของศัตรูพืชเป้าหมาย จัดทำคู่มือการสำรวจและแบบฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ ทำการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างศัตรูพืชเป้าหมายจากแหล่งปลูกพืชตามตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 6 (Surveillance: ISPM No. 6) และนำตัวอย่างพืช/ศัตรูพืชมาตรวจจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ แบคทีเรีย *Pseudomonas corrugata*, *Xanthomonas vesicatoria, Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, รา *Pseudocercospora angolensis*, *Verticillium albo-atrum*, ไส้เดือนฝอย *Ditylenchus destructor*, *Ditylenchus dipsaci*, แมลงวันผลไม้ *Bactrocera minax*, ตั๊กแตนไผ่ *Ceracris kiangsu*, วัชพืช *Raphanus raphanistrum* และ *Galium aparine* L. ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการยังไม่ปรากฏของศัตรูพืชกักกันเป้าหมายในพื้นที่ปลูกพืช เพื่อนำไปจัดทำฐานข้อมูลการปรากฏ/ไม่ปรากฎของศัตรูพืชกักกันและการแพร่กระจายของศัตรูพืชในประเทศไทย ประกอบในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชและสนับสนุนการออกประกาศพื้นที่ปลอดศัตรูพืช

อภิปรายผล โครงการวิจัยย่อยนี้จะต้องทำการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องเพื่อให้งานวิจัยมีประสิทธิภาพและเป็นไปตามมาตรฐานสากลได้ข้อมูลสถานภาพศัตรูพืชกักกันที่เป็นปัจจุบัน และกำหนดมาตรการเฝ้าระวังศัตรูพืชเพื่อป้องกันมิให้เข้ามาแพร่ระบาด สร้างความเสียหายต่อผลผลิตในประเทศและยังสร้างโอกาสในการเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออก หรือเพื่อแก้ปัญหาการนำเข้าและการส่งออก

โครงการวิจัยย่อยที่ 7 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชอุบัติใหม่ในข้าวโพดและกล้วยเพื่อการส่งออก

ประกอบด้วย 2 กิจกรรม จำนวน 6 การทดลอง ดังนี้

กิจกรรมที่ 1 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพด (2 การทดลอง)

การทดลองที่ 1.1 การทดสอบประสิทธิภาพสารคลุกเมล็ดและราดสารป้องกันกำจัดแมลงในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด พบว่าสารป้องกันกำจัดแมลงประเภทใช้ทางดินที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดหวาน ได้แก่ สาร chlorantraniliprole 62.5%FS อัตรา 9 มล./เมล็ดพันธุ์ 1 กก., สาร cyantraniliprole 24%+thiamethoxam 24%FS อัตรา 8 มล./เมล็ดพันธุ์ 1 กก., สาร cyantraniliprole 20%SC ผสมในอัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร ราดต้นข้าวโพด อัตรา 10 มล./ต้น (ราดสารที่ 3 วันหลังข้าวโพดงอก) และ สาร cyantraniliprole 20%SC อัตรา 20 มล./เมล็ดพันธุ์ 1 กก. สามารถใช้เป็นคำแนะนำในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดหวานและเป็นทางเลือกในการป้องกันกำจัดได้อีกวิธีหนึ่ง ซึ่งเป็นวิธีการป้องกันกำจัดตั้งแต่เริ่มปลูกข้าวโพด ช่วยอนุรักษ์ศัตรูธรรมชาติ และเป็นการสนับสนุนให้ศัตรูธรรมชาติช่วยควบคุมแมลงศัตรูพืช สำหรับข้าวโพดเลี้ยงสัตว์จะดำเนินการทดลองในปี 2566 ต่อไป

การทดลองที่ 1.2 การใช้ไวรัส NPV ร่วมกับสารป้องกันกำจัดแมลงในการควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดหวาน ในสภาพไร่เบื้องต้นพบว่าการใช้ไวรัส SfNPV ร่วมกับสารกำจัดแมลง ที่มีประสิทธิภาพในการ

กรมวิชาการเกษตร

ควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด มี 4 กรรมวิธี ได้แก่ SfNPV อัตรา 10 มล./น้ำ 20 ลิตร + chlorantraniliprole 5.17%SC อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร, SfNPV อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร + cypermethrin 35%EC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร, SfNPV อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร + flubendiamide 20%WG อัตรา 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร, SfNPV อัตรา 10 มล./น้ำ 20 ลิตร + deltamethrin 3 %EC อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร โดยเปรียบเทียบกับการใช้ SfNPV อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร และไม่พ่นสารป้องกันกำจัดแมลง ทุกกรรมวิธีมีประสิทธิภาพในการลดการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดหวานได้ดีและความเสียหายบนใบข้าวโพดมีอัตราลดลงตั้งแต่การพ่นครั้งแรก

กิจกรรมที่ 2 ศึกษาโรคตายพราย (Panama disease) tropical race 4 ของกล้วย และการป้องกันกำจัด (4 การทดลอง)

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคตายพราย TR4 ในกล้วยคาเวนดิชของประเทศไทย จากการเก็บรวบรวมและได้ตัวอย่างเชื้อราจำนวน 105 ไอโซเลท พบว่า เชื้อรา *Fusarium* ที่พบในต้นกล้วยที่แสดงอาการเหี่ยว ดินบริเวณรอบราก สามารถพบได้ทั้งเชื้อรา *F. oxysporum F. solani* และ *F. fujikuroi* เมื่อทำการจำแนกชนิดเชื้อราที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า การจำแนกชนิดในระดับ species และ forma specialis ค่อนข้างยากเนื่องลักษณะและขนาดของจากสปอร์ของเชื้อรามีความใกล้เคียงกันมาก จึงจำเป็นต้องนำข้อมูลทางพันธุกรรมมาร่วมวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดด้วย จึงพบว่าเชื้อรา *F. oxysporum* ที่ได้จากการศึกษาส่วนใหญ่เป็นเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* และเชื้อราบางไอโซเลทมีความใกล้เคียงกับ *F. oxysporum* f. sp. *melonis* และ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ซึ่งต้องทำการจำแนกชนิดอย่างละเอียดต่อไป อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการศึกษาได้ระหว่างเดือนตุลาคม 2564 - กันยายน 2565 ได้เชื้อรา *F. oxysporum* ที่จำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับข้อมูลทางพันธุกรรมที่จัดอยู่ใน *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, *F. oxysporum* f. sp. *melonis* และ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ซึ่งสามารถจัดทำเป็นกระบวนจำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ในระดับ forma specialis ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับข้อมูลทางพันธุกรรม

การทดลองที่ 2.2 การตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคตายพราย TR4 กล้วยในประเทศไทยด้วยเทคนิค *SIX* genes จากการรวบรวมตัวอย่างโรคตายพรายทั้งที่เป็น culture collection และตัวอย่างเนื้อเยื่อลำต้นกล้วยของกลุ่มวิจัยโรคพืชมาแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชและเลี้ยงให้บริสุทธิ์ ได้เชื้อรา จำนวน 65 ไอโซเลท สกัดดีเอ็น นำไปตรวจสอบชนิดเบื้องต้นของเชื้อราสาเหตุโรคตายพราย TR4 ด้วย specific primer พบว่าเป็นเชื้อรา *Foc* TR4 จำนวน 30 ไอโซเลท และเมื่อตรวจสอบชนิดของเชื้อราโดยการศึกษาบริเวณ translation elongation factor 1a (*TEF-1a*) พบว่าเป็นเชื้อ *F. oxysporum* f.sp. *cubense* race 1 จำนวน 30 ไอโซเลท และ non-race จำนวน 5 ไอโซเลท ซึ่งดีเอ็นเอของเชื้อราจะนำไปใช้ศึกษาและจำแนกชนิดในระดับ race ด้วยเทคนิค *SIX* gene ต่อไป

การทดลองที่ 2.3 การศึกษาปฏิกิริยาของสายพันธุ์/พันธุ์กล้วยต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 จากสายพันธุ์/พันธุ์กล้วย จำนวน 20 สายพันธุ์/พันธุ์ ประเมินลักษณะอาการภายในและคำนวณดัชนีความรุนแรงของโรค (Disease severity index; DSI) พบว่ากล้วย จำนวน 18 สายพันธุ์/พันธุ์ มีความต้านทานต่อเชื้อรา *Foc* TR4 ในระดับ Highly Susceptible (HS) ซึ่งมีดัชนีความรุนแรง

กรมวิชาการเกษตร

ของโรค 62.5-100% ส่วนกล้วยพันธุ์ป่าดอยมูเซอร์ (HB002) และพันธุ์โรส (HB038) ที่มีระดับความต้านทาน Intermediate Resistant (IR) และ Immune (I) ตามลำดับ

การทดลองที่ 2.4 การทดสอบการใช้ยูเรียและปูนขาวอบดินร่วมกับการใช้เชื้อจุลินทรีย์ฏิปักษ์ ในการควบคุมโรคตายพราย TR4 ของกล้วย พบว่าอัตราการใช้ยูเรียผสมปูนขาวอบดินที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อรา Foc TR4 คือ ยูเรีย : ปูนขาว อัตรา 50 : 500 กรัมต่อตารางเมตร และจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* และ/หรือ *T. asperellum* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Foc TR4 สูงกว่า 60% มีจำนวน 64 ไอโซเลท แล้วคัดเลือก 5 อันดับแรก ได้แก่ ไอโซเลท TAAV TAI TAAAB TAAY และ TAAAB สำหรับนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในโรงเรือนปลูกพืชทดลองต่อไป

ข้อเสนอแนะต่อผู้เกี่ยวข้องสำหรับการดำเนินงานในระยะต่อไป

1. การสำรวจพบว่าศัตรูที่มีความสำคัญในพืชอินทผลัม ได้แก่ ด้วงงวงมะพร้าว *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivie) หรือที่เกษตรกรเรียกว่า ด้วงไฟ ซึ่งการเข้าทำลายทำให้ผลผลิตเสียหาย บางต้นยืนต้นตาย การป้องกันกำจัดทำได้ยาก ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาทดลองถึงวิธีการป้องกันกำจัดและควบคุม เพื่อช่วยเหลือเกษตรกรต่อไป
2. การดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชได้ข้อมูลพืชและศัตรูพืชของสินค้าพืชนำเข้า และรายชื่อศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันและกลุ่มศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ซึ่งต้องนำไปดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนต่อไป
3. เมล็ดวัชพืชที่พบติดมากับเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่าย เป็นชนิดที่ไม่มีรายงานในประเทศไทย ควรศึกษาว่ามีศักยภาพเป็นศัตรูพืชร้ายแรงหรือไม่ เพื่อหาแนวทางป้องกันไม่ให้มีการแพร่ระบาดและหาวิธีป้องกันกำจัดต่อไป
4. ดีเอ็นเอต้นแบบจากตัวอย่างที่จำแนกชนิดถูกต้องแล้วและสภาวะการทำปฏิกิริยาของเทคนิคที่ได้จากการทดสอบมีความสำคัญสำหรับงานวิจัยในปีต่อไป เพื่อใช้ประโยชน์ในการทดสอบประสิทธิภาพความจำเพาะและความถูกต้องของวิธีการตรวจสอบและพัฒนาเป็นเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และความแม่นยำสูงต่อไป
5. เนื่องจากมีข้อจำกัดของฤดูกาลให้ผลผลิตของพืช ควรมีการสำรวจและเก็บข้อมูลช่วงระยะเวลาที่พืชให้ผลผลิต และประมาณการปริมาณผลไม้ที่ใช้ในการทดลองล่วงหน้า เพื่อให้สามารถทำการทดลองให้แล้วเสร็จตามระยะเวลาที่กำหนด
6. การสำรวจและเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันของพืชและผลผลิตพืชในประเทศไทยในปีที่ 1 ไม่ปรากฏพบศัตรูพืชกักกันเป้าหมายที่ทำการสำรวจ อย่างไรก็ตามยังต้องทำการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจากแปลงปลูกพืช และนำตัวอย่างมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นการยืนยันสถานภาพของศัตรูพืชกักกันในประเทศไทยต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

ปัญหาและอุปสรรคในการทำงาน

1. ปัญหาในการเข้าไปสำรวจแปลงศัตรูพืชทำได้ยาก บางแปลงต้องมีการทำหนังสือเพื่อขออนุญาติในการเข้าสำรวจบางพืช เช่น ลิลลี่ แปลงปลูกลิลลี่มีการปลูกในประเทศน้อย ทำให้การหาแปลงในการเข้าสำรวจทำได้ยาก ประกอบกับมีการใช้สารเคมีสูง จึงสำรวจไม่พบแมลงหรือไรศัตรู
2. การเดินทางไปเก็บข้อมูล/สำรวจศัตรูพืชในแปลงปลูกพืชไม่เป็นไปตามแผนที่กำหนด เนื่องภัยธรรมชาติและการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 ทำให้บางช่วงเวลาต้องหยุดชะงักไม่สามารถเข้าสำรวจได้ในบางพื้นที่
3. การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ระหว่างเดือน ตุลาคม 2564 – กันยายน 2565 ไม่พบข้อมูลการนำเข้าผลสับปะรดสดและหน่อพันธุ์สับปะรด ต้นอินทผลัม และส่วนขยายพันธุ์องุ่น จากต่างประเทศรวมถึงประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก จึงไม่มีการดำเนินการตรวจสอบศัตรูพืชที่อาจติดมากับพืชนำเข้าดังกล่าว จำเป็นต้องดำเนินการในปีถัดไป
4. การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* (Hendel) ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในผลมะละกอและมะม่วงเพื่อเพิ่มศักยภาพในการส่งออก มีข้อจำกัดฤดูกาลให้ผลผลิตของพืช สามารถทำการทดลองในช่วงที่พืชให้ผลผลิตได้เท่านั้น
5. การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* (Hendel) ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในผลมะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้าและน้ำดอกไม้มัน ผลผลิตที่ได้คุณภาพไม่เหมาะสมในการศึกษาความเสียหายจากความร้อนต่อคุณภาพของมะม่วง ผู้วิจัยจึงได้ปรับเปลี่ยนแผนการทดลองโดยศึกษาด้านการกำจัดแมลงวันผลไม้เบื้องต้นก่อน และมะม่วงพันธุ์แดงจักรพรรดิ ผลผลิตได้รับความเสียหายจากสภาพอากาศที่ไม่เหมาะสม ผู้ทดลองจึงต้องดำเนินการหาแหล่งผลิตมะม่วงแดงจักรพรรดิเพิ่มเติม
6. ในงานทดลองการใช้ไวรัส SfNPV ร่วมกับสารป้องกันกำจัดแมลง ดำเนินการในสภาพไร่ข้าวโพดหวานของเกษตรกร ในช่วงเดือนกันยายน 2565 ซึ่งมีฝนตกหนักในจังหวัดกาญจนบุรี โดยหลังจากทำการพ่นสารทดลองครั้งที่ 3 มีฝนตกต่อเนื่องและเกิดน้ำท่วมขังหลายวัน ทำให้การเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดไม่เป็นปกติในช่วง 42 วัน หลังปลูก และไม่สามารถทำการพ่นสารทดลองครั้งที่ 4 ได้ อีกทั้งส่งผลกระทบต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิต จึงจำเป็นต้องดำเนินการทดลองซ้ำในปี 2566
7. ในการทดสอบการใช้ยูเรียผสมปูนขาวอบดินในการกำจัดเชื้อรา Foc TR4 การแสดงอาการของโรคตายพราย TR4 ของกล้วยที่ชัดเจนใช้เวลาค่อนข้างนาน จึงจำเป็นต้องขยายเวลาในการบันทึกข้อมูลการเกิดโรค เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์
8. เนื่องจากได้รับการจัดสรรงบประมาณในงวดที่ 2 ล่าช้ากว่ากำหนด (ได้รับงบประมาณปลายเดือนกรกฎาคม 2565) ทำให้การเบิกจ่ายงบประมาณและการดำเนินงานวิจัยไม่เป็นไปตามแผนการปฏิบัติงาน

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2562. รายงานสถานการณ์การเพาะปลูก กำหล่ำปลี ปีเพาะปลูก 2561. ระบบสารสนเทศการผลิตทางด้านเกษตร online. แหล่งที่มา:http://www.agriinfo.doae.go.th/year62/plant/rortor/veget/9.pdf

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2550. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 ประกาศ ณ วันที่ 26 เมษายน 2550 ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 124 ตอนพิเศษ 66 ง. ลงวันที่ 1 มิถุนายน 2550.

กลุ่มวิจัยโรคพืช. 2557. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 288 หน้า

จริงแท้ ศิริพานิช. 2552. มะละกอไทย สถานภาพด้านสายพันธุ์ ระบบการผลิต และการตลาด. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. กรุงเทพฯ. 136 หน้า.

พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ ชนินทร ดวงสอาด ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และเยาวภา ตันติวานิช. 2554. การศึกษาชนิดของโรคพืชของพืชเพื่อการส่งออก (มะละกอ และ มะพร้าวน้ำหอม) และพืชนำเข้า (ปาล์มน้ำมันและหัวพันธุ์ไม้ดอก). *ใน: ผลงานวิจัยประจำปี 2554*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ ชัยณรัตน์ สนศิริ สลักจิต พานคำ รัชฎา อินทรกำแหง และอุดร อุณหวุฒิ. 2555. วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยความร้อนในผลมะละกอเพื่อการส่งออก. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาศัตรูพืชหมดปัญหาเมื่ออารักขาถูกวิธี. 7-9 สิงหาคม 2555. ณ โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แควรีสอร์ท จ. กาญจนบุรี. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร: กรุงเทพฯ.

ยุวรินทร์ บุญทบ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล นพรัตน์ จันทร์หอม และชุติกาญจน์ ใจแล. 2562ข. การพัฒนาการตรวจสอบแมลงวันทองฝรั่ง Bactrocera correcta (Diptera: Tephritidae) เพื่อการนำเข้าและส่งออกด้วยไพร์เมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2562. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพมหานคร.

ยุวรินทร์ บุญทบ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และนพรัตน์ จันทร์หอม. 2562ก. การพัฒนาการตรวจสอบแมลงวันแตง Zeugodacus cucurbitae (Coquillet) (Diptera: Tephritidae) ด้วยไพร์เมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2562. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพมหานคร.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2562. ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ควบคุมฯ.แหล่งที่มา: https://doc-0s-bg-apps-viewer.googleusercontent.com/viewer/secure/ pdf/

สุรภี กีรติยะอังกูร และ ธารทิพย ภาสบุตร. 2548. ลิลลี่. หน้า 91-101. *ใน: โรคไม้ดอก*. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

กรมวิชาการเกษตร

อุดร อุณหวุฒิ, วลัยกร วรวิศิษฏ์ธำรง, รัชฎา อินทรกำแหง, มานะ พุ่มทองและประเทือง ศรีสุข. 2536. คุณภาพมะม่วงน้ำดอกไม้ แรด และพิมเสนแดง หลังจากผ่านกระบวนการอบไอน้ำ. วารสารวิชาการเกษตร. 11: 31-44.

Araújo, E.R., J.R. Costa, M.A.S.V. Ferreira and A.M. Quezado-Duval. 2012. Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR. Journal of Applied Microbiology 113: 1479-1490.

Beran, P., I. Mráz, B. Kokoskova and A. Bohata. 2015. Monitoring the occurrence of bacterial spot of tomato and pepper in the Czech Republic and development of new PCR primers for detection of *Xanthomonas vesicatoria*. Eur J Plant Pathol 141: 617-621.

Boontop, Y. 2016. Natural variation and biogeography of *Zeugodacus cucurbitae* in south-east Asia and the west-Pacific. Ph.D. Thesis. Queensland University of technology, Brisbane, Australia. 346 pp.

Booth, C. 1971. *The Genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK. 237 p.

Brayford, D. 1992. *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria. Set 112, No 1116. *Mycopathologia* 118: 49-50.

Bulletin 47 (3), 401–419

Burlakoti, R.R., C.F. Hsu, J.R. Chen and J.F. Wang. 2018. Population Dynamics of Xanthomonads Associated with Bacterial Spot of Tomato and Pepper during 27 Years across Taiwan. Plant dis 102: 1348-1356.

CABI (CAB International). 2019. *Bactrocera minax* (Chinese citrus fly). CAB International. (Online). Available. https://www.cabi.org/isc/datasheet/8726. (3 December 2019)

CABI (CAB International). 2019. *Pseudocercospora angolensis* (leaf spot of Citrus spp.). CAB International. (Online).Available. https://www.cabi.org/isc/datasheet/12184 (19 November 2019)

CABI (CAB International). 2019. *Pseudomonas corrugata*. CAB International.(Online). Available.https://www.cabi.org/ISC/datasheet/44945. (20 November 2019)

Carbone, I. and L.M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91: 553-556.

Carvalhais, L.C., J. Henderson, V.A. Rincon-Florez, C. O'Dwyer, E. Czislowski, E.A.B. Aitken and A. Drenth. 2019. Molecular diagnostics of banana Fusarium wilt targeting Secreted-in-

กรมวิชาการเกษตร

Xylem genes. *Frontiers in Plant Science* 10: article 547.doi.org/10.3389/fpls.2019. 00547.

Catara, V. 2007. *Pseudomonas corrugata*: plant pathogen and/or biological resource. Molecular plant pathology. 8 (3), 233-244.

Cheam AH, 1986. Seed production and seed dormancy in wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.) and some possibilities for improving control. Weed Research, 26(6):405-413.

David M.G., Melanie L. Lewis Ivey, Georgina Hakiza, Jean H. Juba and Sally A. Miller. 2004. *Gibberella xylarioides* (anamorph: Fusarium xylarioides), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unrecognized member of the *G. fujikuroi* species complex. Mycologia 97(1): 191-201.

Davis, F.M., W.P. Williams. 1992. Visual rating scales for screening whorl-stage corn for resistance to fall armyworrm. Mississippi Agricultural &Forestry Experiment Station, Technical Bulletin 186, Mississippi State University, MS39762, USA.

Dita, M., L. Teixeira, C. Li, S. Zheng, W. O'Neill and J. Daniels. 2021. Phenotyping Musa spp. for host reaction to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, under greenhouse and field conditions, pp. 4-19. *In* : Dita, M., ed. *Practical Guidelines for Early Screening and Field Evaluation of Banana against Fusarium Wilt, Pseudocercospora Leaf Spots and Drought*. Bioversity International: Montpellier, France.

Dita, M.A., C. Waalwijk, I.W. Buddenhagen, M.T. Jr Souza and G.H. Kema. 2010. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. *Plant Patholology* 59: 348–357.

Doungsa-ard, C., A.R. McTaggart, A.D.W. Geering, T.U. Dalisay, J. Ray and R.G. Shivas. 2015. *Uromycladium falcatarium* sp. nov., the cause of gall rust on *Paraserianthes falcataria* in south-east Asia. Australasian Plant Pathology 44: 25-30.

EPPO. 2020. *Bactrocera minax*. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. (Online). Available. https://gd.eppo.int (15 August 2020)

EPPO.2017 PM 7/87 (2) *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci* .Bulletin OEPP/EPPO

European Food Safety Authority (EFSA). 2017. Pest categorization of *Pseudocercospora angolensis*. EFSA.https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2017.4883 (21 July 2017)

กรมวิชาการเกษตร

FAO. 2018. Surveillance. International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM) No.6, FAO, Rome.

Geiser, D.M., M. Jimenez-Gasco, S. Kang, I. Makalowska, N. Veeraraghavan, T.J. Ward, N. Zhang, G.A. Kuldau and K. O'Donnell. 2004. FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying Fusarium. Eur J Plant Pathol 110: 473-479.

Han-Xin, L., L. Rubi, A.B. Smythe and W.F. Bryce. 2004. Molecular population genetics of Cucumber Mosaic Virus in California: Evidence for founder effects and reassortment. J Virol 78(12) : 6666–6675.

Holm L; Doll J; Holm E; Pancho J; Herberger J, 1997. World Weeds. Natural Histories and Distribution. New York, USA: John Wiley and Sons, Inc.

Jacobi, K.K. and L.S. Wong. 1992. Quality of 'Kensington' mango (Mangifera indica Linn.) following hot water and vapor-heat treatments. Postharvest Biology and Technology. 1: 349-359.

Katoh, K. and H. Toh. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9: 286-298.

Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Mentjies and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 28(12): 1647-1649.

Koenraadt, H., B. Van Betteray, R. Germain, G. Hiddink, J.B. Jones, J. Oosterhof, A. Rijlaarsdam, P. Roorda and B. Woudt. 2009. Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato, pp. 99-102. In II International Symposium on Tomato Diseases 808. International Society for Horticultural Science, Belgium.

Krishna, P.B. and S.J. Eapen. 2019. Development of a real-time PCR based protocol for quantifying Radopholus similis in field samples. Journal of Spices and Aromatic Crops 28: 52-60.

Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology and Evolution 33: 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.

กรมวิชาการเกษตร

Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin,I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson and D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23(21): 2947-2948.

Mai, W.F., P.G. Mullin, H.H. Lyon, K. Loeffler. 1996. Plant-parasitic nematodes: a pictorial key to genera. Cornell University Press, New York.pp.277.

McMaugh, T. 2005. Guidelines for Surveillance for Plant Pests in Asia and the Pacific. ACIAR Monograph No. 119, 192p.

McMaugh, T. 2008. คำแนะนำในการสำรวจศัตรูพืชในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิก. ACIAR Monograph No. 119c.

Mekenian MR; Willemsen RW, 1975. Germination characteristics of *Raphanus raphanistrum*. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 102(5):243-252

Moura, M.L., Jacques, M.A., Brito, L.M., Mourão, and I.M. Duclos. 2005. Tomato pith necrosis (TPN) caused by *Pseudomonas corrugata* and *P. mediterranea*: severity of damages and crop loss assessment. Acta Hort. (ISHS), 695, 365–372.

Ning, F. Y. 2012. Identification and detection of *Xanthomonas perforans* by the polymerase chain reaction technique and characterization of *X. perforans* strains in Taiwan by DNA polymorphism. Master’s thesis, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taiwan.

Nylander, J.A., J.C. Wilgenbusch, D.L. Warren and D.L. Swofford. 2008. AWTY (are we there yet?): a system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetics. *Bioinformatics* 24: 581-583.

O’Donnell, K., H.C. Kistler, E. Cigelnik and R.C. Ploetz. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 2044-2049.

O'Donnell, K., D.A. Sutton, M.G. Rinaldi MG, B.A Sarver, S.A. Balajee, H.J. Schroers, R.C. Summerbell, V.A. Robert, P.W. Crous, N. Zhang, T. Aoki, K. Jung, J. Park, Y.H. Lee, S. Kang, B. Park and D.M. Geiser. 2010. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *Journal of Clinical Microbiology* 48(10): 3708-3718. doi: 10.1128/JCM.00989-10.

กรมวิชาการเกษตร

Peng, H., D.L. Peng, X.Q. Hu, X.F. He, Q. Wang, W.K. Huang and W.T. He. 2012. Loop-mediated isothermal amplification for rapid and precise detection of the burrowing nematode, Radopholus similis, directly from diseased plant tissues. Nematology 14: 977-986.

Peng, J., M. Shi, Z. Xia, J. Huang and Z. Fan. 2012. Detection of cucumber mosaic virus isolates from banana by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Archives of Virology 157: 2213-2217.

Plant Health Australia (2018). The Australian Handbook for the Identification of Fruit Flies. Version 3.1. Plant Health Australia. Canberra, ACT.

Ravindran, A., A. Kumar, D. Antony and S.J. Eapen. 2011. Single tube duplex PCR for simultaneous detection of Phytophthora capsici and Radopholus similis infecting black pepper (Piper nigrum). Indian Phytopathol. 64: 353-357.

Ronquist, F. and J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Songpol, S. 2011. Current study of papaya production in Thailand. 70 Pages. *In* : The International Symposium on Papaya. Dec. 19-22, 2011. Chiangmai.

Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312-1313.

Talavera, G. and J. Castresana. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology* 56: 564-577.

Thaipong, K., S. Srimart, K. Iamjud, P. Sangwanankul and S. Wasee. 2011. Collection evaluation and selection of papaya varieties in Thailand. 70 Pages. *In* : The International Symposium on Papaya. Dec. 19-22, 2011. Chiangmai.

Townsend, G.R. and Heuberger, J.W. (1943) Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. The Plant Disease Reporter, 27, 340-343.

Unahawutti, U., M. Poomthong, R. Intarakumheng, W. Worawisitthumrong, C. Lapasathukool, E. Smitasiri, P. Srisook and C. Ratanawaraha. 1991. Vapor heat as plant quarantine treatment of ‘Nang klarngwan’, ‘Nam Dorkmai’, ‘Rad’ and ‘Pimsen Daeng’ mangoes, Infested with fruit flies (Diptera: Tephritidae). A report submitted to the Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries for approved of quarantine treatment on Thai mangoes

กรมวิชาการเกษตร

to be exported to Japan. Tech. Plant Quarant. Sub Div., Agr. Regulat. Div., Dept. of Agr., Bangkok. 342 p.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" (M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky and T. White, eds.), Academic Press. 315-322 pp.

Zimand, G., L. Valinsky, Y. Elad, I. Chet and S. Manulis. 1994. Use of the RAPD procedure for the identification of Trichoderma strains. Mycological Research 98(5): 531-534.

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก 1 สิ่งที่แสดงประกอบเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับเนื้อหาผลงานวิจัย

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 การศึกษาชนิดของศัตรูพืชในประเทศเพื่อการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช

ตารางที่ 1.1 รายชื่อแมลงศัตรูอินทผลัมที่พบในพื้นที่จังหวัดต่าง ๆ

Scientific name of mite	Common name	Location	Symptom of injury	GPS	
				Lat (N)	Long (E)
Rhynchophorus ferrugineus (Olivier)	ด้วงงวงมะพร้าว	กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ นครราชสีมา อุดรธานี หนองคาย เพชรบุรี	-	-	-
Oryctes rhinoceros (Linnaeus)	ด้วงแรด	กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ นครราชสีมา อุดรธานี หนองคาย เพชรบุรี	-	-	-
Mahasena corbetti Tams	หนอนปลอกใหญ่	กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ นครราชสีมา อุดรธานี หนองคาย เพชรบุรี	-	-	-
Promecotheca cumingii Baly	ด้วงแทะใบปาล์ม	กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ นครราชสีมา อุดรธานี หนองคาย เพชรบุรี	-	-	-

ตารางที่ 1.2 รายชื่อไรศัตรูพืชที่พบในแปลงอินทผลัมในพื้นที่จังหวัดต่าง ๆ

Order (Family)	Scientific name of mite	Location	Symptom of injury	GPS	
				Lat (N)	Long (E)
Trombidiformes (Tetranychidae)	*Eutetranychus orientalis* (Klein)	อ.บ่อพลอย จ.กาญจนบุรี		14°15.754'	099°27.552'
	Oligonychus oryzae (Hirst)	อ.เมือง จ.ลำปาง		18°20.536'	099°32.479'
	Oligonychus pratensis (Banks)	อ.บ่อพลอย จ.กาญจนบุรี		14°15.754'	099°27.552'
		อ.กระสัง จ.บุรีรัมย์		15°00.494'	103°21.848'
		อ.จอมบึง ราชบุรี		13°45.719'	099°24.744'
		อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม		13°95.516'	099°91.298'
	Tetranychus kanzawai Kishida	อ.เมือง จ.ลำปาง		18°20.536'	099°32.479'
	Tetranychus fijiensis Hirst	อ.เมือง จ.ลำปาง		18°20.536'	099°32.479'
Trombidiformes (Tenuipalpidae)	*Raoiella indica* Hirst	อ.บ่อพลอย จ.กาญจนบุรี		14°15.754'	099°27.552'

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.3 รายชื่อเชื้อสาเหตุโรคของอินทผลัมและลิลลี่ที่เคยมีรายงานการศึกษาในประเทศไทย

ชื่อโรค	เชื้อสาเหตุโรค	อ้างอิง
อินทผลัม (Date palm) ; *Phoenix dactylifera* L.		
โรคใบเฉา (wilt)	*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*	กลุ่มวิจัยโรคพืช (2557)
โรคใบร่วง (leaf fall, leaf spot)	*Graphiola phoenicis*	กลุ่มวิจัยโรคพืช (2557)
โรคช่อดอกเน่า (leaf blight)	*Mauginiella seaettae*	กลุ่มวิจัยโรคพืช (2557)
ลิลลี่ (Lilly) ; *Lilium speciosum*		
โรครากและโคนเน่าดำ (black root and stem rot)	*Fusarium oxysporum*	สุรภีและธารทิพย์ (2548)
โรคหัวเน่าราเขียว (blue mold)	*Penicillium* sp.	สุรภีและธารทิพย์ (2548)
โรคใบจุด (leaf spot)	*Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria*, *Phoma*, *Mycosphaerella*,	พรพิมล และคณะ (2554)
โรคใบไหม้ (leaf blight)	*Botrytis cinereal*	พรพิมล และคณะ (2554)
โรคใบด่าง (mosaic)	*Cucumber mosaic virus* (CMV)	สุรภีและธารทิพย์ (2548)

ตารางที่ 1.4 รายชื่อเชื้อสาเหตุโรคของอินทผลัมและลิลลี่ที่พบระบาดในจังหวัดต่าง ๆ

ชื่อโรค	เชื้อสาเหตุโรค	แหล่งที่พบ	ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย
อินทผลัม (Date palm) ; *Phoenix dactylifera* L.			
โรคใบจุด graphiola หรือ false Smut	*Graphiola phoenicis*	**เชียงใหม่** (ดอยสะเก็ด) **พะเยา** (ภูกามยาว) **อุตรดิตถ์** (เมือง และ ลับแล) **สุโขทัย** (ศรีสำโรง) **พิษณุโลก** (วังทอง และ พรหมพิราม) **ตาก** (เมือง แม่สอด และวังเจ้า) **เพชรบูรณ์** (เมือง) **อุดรธานี** (เมือง และ บ้านผือ) **หนองคาย** (โพนพิสัย และ รัตนวาปี) **อุบลราชธานี** (เมือง) **บุรีรัมย์** (เมือง และ กระสัง) **กำแพงเพชร** (โกสัมพีนคร และ ขาณุวรลักษบุรี) **นครสวรรค์** (เมือง) **อุทัยธานี** (บ้านไร่)	ใบ
โรคราดำ (sooty mold)	*Meliola* sp.	**อุตรดิตถ์** (เมือง และ ลับแล)	ใบ
โรคใบจุด (leaf spot)	*Pestalotiopsis* sp.	**หนองคาย** (โพนพิสัย) **พะเยา** (ภูกามยาว) **อุตรดิตถ์** (เมือง) **พิษณุโลก** (วังทอง)	ใบ
ลิลลี่ (Lilly) ; *Lilium speciosum*			
โรคใบด่าง (mosaic)	*Cucumber mosaic virus* (CMV)	**เชียงใหม่** (แม่ริม)	ใบ

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.5 รายชื่อวัชพืชที่พบในแปลงอินทผลัม

ลำดับ	วงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย
1	Amaranthaceae	*Achyranthes aspera* L.	พันงูขาว
2	Leguminosae	*Aeschynomene americana* L.	โสนดอน
3	Asteraceae	*Ageratum conyzoides* (L.) L.	สาบแร้งสาบกา
4	Amaranthaceae	*Amaranthus viridis* L.	ผักโขม
5	Lythraceae	*Ammannia baccifera* L.	มะไฟนกคุ้ม
6	Acanthaceae	*Asystasia gangetica* (L.) T.Anderson	บาหยา
7	Poaceae	*Axonopus compressus* (Sw.) P.Beauv.	หญ้ามาเลเซีย
8	Asteraceae	*Bidens pilosa* L.	ก้นจ้ำขาวดอกใหญ่
9	Nyctaginaceae	*Boerhavia diandra* L.	ผักโขมหินใบแหลม
10	Nyctaginaceae	*Boerhavia diffusa* L.	ผักโขมหิน
11	Nyctaginaceae	*Boerhavia repens* L.	ผักโขมหิน
12	Poaceae	*Brachiaria reptans* (L.) C.A.Gardner & C.E.Hubb.	หญ้าตีนติด
13	Asteraceae	*Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob.	สาบเสือ
14	Cleomaceae	*Cleome rutidosperma* DC.	ผักเสี้ยนดอกม่วง
15	Cleomaceae	*Cleome viscosa* L.	ผักเสี้ยนผี
16	Cucurbitaceae	*Coccinia grandis* (L.) Voigt	ตำลึง
17	Commelinaceae	*Commelina benghalensis* L.	ผักปลาบไร่
18	Commelinaceae	*Commelina diffusa* Burm.f.	ผักปลาบ
19	Malvaceae	*Corchorus aestuans* L.	ปอวัชพืช
20	Asteraceae	*Cyanthillium cinereum* (L.) H.Rob.	หญ้าละออง
21	Poaceae	*Cynodon dactylon* (L.) Pers.	หญ้าแพรก
22	Cyperaceae	*Cyperus difformis* L.	กกขนาก
23	Cyperaceae	*Cyperus iria* L.	กกทราย
24	Cyperaceae	*Cyperus laxus* Lam.	หญ้าตีนกา
25	Cyperaceae	*Cyperus rotundus* L.	แห้วหมู
26	Poaceae	*Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd.	หญ้าปากควาย
27	Poaceae	*Digitaria ciliaris* (Retz.) Koeler	หญ้าตีนนก
28	Poaceae	*Echinochloa colona* (L.) Link	หญ้านกสีชมพู
29	Asteraceae	*Eclipta prostrata* (L.) L.	กะเม็ง
30	Asteraceae	*Emilia sonchifolia* (L.) DC. ex DC.	หูปลาช่อน
31	Euphorbiaceae	*Euphorbia heterophylla* L.	หญ้ายาง
32	Euphorbiaceae	*Euphorbia hirta* L.	น้ำนมราชสีห์
33	Convolvulaceae	*Evolvulus nummularius* (L.) L.	ใบต่างเหรียญ
34	Cyperaceae	*Fimbristylis quinquangularis* (Vahl) Kunth	หนวดปลาดุก
35	Amaranthaceae	*Gomphrena celosioides* Mart.	บานไม่รู้โรยป่า

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.5 รายชื่อวัชพืชที่พบในแปลงอินทผลัม (ต่อ)

ลำดับ	วงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย
36	Boraginaceae	*Heliotropium indicum* L.	หญ้างวงช้าง
37	Poaceae	*Imperata cylindrica* (L.) Raeusch.	หญ้าคา
38	Convolvulaceae	*Ipomoea aquatica* Forssk.	ผักบุ้ง
39	Onagraceae	*Ludwigia hyssopifolia* (G.Don) Exell	เทียนนา
40	Poaceae	*Melinis repens* (Willd.) Zizka	หญ้าดอกแดง
41	Malvaceae	*Melochia corchorifolia* L.	เซ่งใบมน
42	Asteraceae	*Mikania micrantha* Kunth	ขี้ไก่ย่าน
43	Leguminosae	*Mimosa diplotricha* Sauvalle	ไมยราบเครือ
44	Leguminosae	*Mimosa pigra* L.	ไมยราบยักษ์
45	Leguminosae	*Mimosa pundica* L.	ไมยราบหนาม
46	Cucurbitaceae	*Momordica charantia* L.	มะระขี้นก
47	Passifloraceae	*Passiflora foetida* L.	กะทกรก
48	Phyllanthaceae	*Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn.	ลูกใต้ใบ
49	Phyllanthaceae	*Phyllanthus virgatus* G.Forst.	ขางอำไพ
50	Solanaceae	*Physalis minima* L.	โทงเทง
51	Asteraceae	*Praxelis clematidea* (Griseb.) R.M.King & H.Rob.	สาบม่วง
52	Acanthaceae	*Ruellia tuberosa* L.	ต้อยติ่ง
53	Plantaginaceae	*Scoparia dulcis* L.	กระต่ายจาม
54	Asteraceae	*Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski	กระดุมทองเลื้อย
55	Asteraceae	*Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn.	ผักแครด

ตารางที่ 1.6 รายชื่อวัชพืชที่พบในแปลงลิลลี่

ลำดับ	วงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย
1	Asteraceae	*Ageratum conyzoides* (L.) L.	สาบแร้งสาบกา
2	Amaranthaceae	*Amaranthus viridis* L.	ผักโขม
3	Apiaceae	*Centella asiatica* (L.) Urb.	ใบบัวบก
4	Asteraceae	*Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob.	สาบเสือ
5	Asteraceae	*Conyza sumatrensis* (Retz.) Wolker	จ้อล่อ
6	Cyperaceae	*Cyperus laxus* Lam.	หญ้าตีนกา
7	Asteraceae	*Galinsoga quadriradiata* Ruiz & Pav.	
8	Asteraceae	*Mikania micrantha* Kunth	ขี้ไก่ย่าน
9	Oxalidaceae	*Oxalis 185orniculate* L.	ส้มกบ
10	Urticaceae	*Pilea microphylla* (L.) Liebm.	ขมหินใบน้อย
11	Asteraceae	*Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn.	ผักแครด

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยย่อยที่ 3 การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักและหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า

ตารางที่ 3.1 *Tobamovirus* associated with tomato seeds.

	Countries	1 ต.ค. 64-30 ก.ย.65 (1 ปี)		*Tobamovirus*	Times
		Quantity (kg)	Consignment		
1	Brazil	0.01	1	ไม่พบ	-
2	Chile	0.507	3	ไม่พบ	-
3	China	37.895	6	ไม่พบ	-
4	England	0.022	1	ไม่พบ	
5	France	148.964	23	ไม่พบ	-
6	Hungary	0.0048	1	ไม่พบ	-
7	Guatemala	3.568	2	ไม่พบ	-
8	India	2,036.48	48	ไม่พบ	-
9	Indonesia	2.437	5	ไม่พบ	-
10	Isael	3.717	23	ไม่พบ	-
11	Italy	1.002	3	ไม่พบ	-
12	Japan	4.022	14	ไม่พบ	-
13	Kenya	3.395	3	ไม่พบ	-
14	Korea	0.045	1	ไม่พบ	-
15	Malaysia	1.114	1	ไม่พบ	-
16	Myanmar	11.218	2	ไม่พบ	-
17	Netherlands	7,057	83	ไม่พบ	-
18	Peru	2.513	4	ไม่พบ	-
19	Philippines	409.893	5	ไม่พบ	-
20	South Africa	0.656	2	ไม่พบ	-
21	Spain	1.851	6	ไม่พบ	-
22	Taiwan	1.047	5	ไม่พบ	-
23	USA	292.328	32	ไม่พบ	-
24	Vietnam	30	1	ไม่พบ	-
	รวม	10,050.0728	275		

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3.2 *Tobamovirus* associated with pepper seeds.

		1 ต.ค. 64-30 ก.ย.65 (1 ปี)			
	Countries	Quantity (kg)	Consignment	*Tobamovirus*	Times
1	Chile	12.742	3	ไม่พบ	-
2	China	3,811.060	12	ไม่พบ	-
3	France	19.719	34	ไม่พบ	-
4	Guatemala	13.324	1	ไม่พบ	-
5	Hungary	0.175	1	ไม่พบ	-
6	India	4,907.069	45	ไม่พบ	-
7	Indonesia	44.885	10	ไม่พบ	-
8	Isael	30.875	11	ไม่พบ	-
9	Italy	2.160	1	ไม่พบ	-
10	Japan	1.086	5	ไม่พบ	-
11	Korea	130.852	6	ไม่พบ	-
12	Malaysia	480.559	3	ไม่พบ	-
13	Netherlands	726.800	38	ไม่พบ	-
14	Peru	63.368	1	ไม่พบ	-
15	Philippines	38.930	3	ไม่พบ	-
16	Spain	8.842	14	ไม่พบ	-
17	Taiwan	10.672	4	ไม่พบ	-
18	Tanzania	0.018	1	ไม่พบ	-
19	UK	0.217	1	ไม่พบ	-
20	USA	329.157	37	ไม่พบ	-
21	Vietnam	64.561	4	ไม่พบ	-
	รวม	10,697.071	235		

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3.3 แสดงการสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิด potato cyst nematode ในแปลงปลูกหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากต่างประเทศ

ลำดับ	รหัส ตัวอย่างดิน แปลงปลูก	พื้นที่ปลูก	Location (GPS X,Y)	ผลการตรวจวิเคราะห์ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช ชนิด potato cyst nematode	ผลการตรวจวิเคราะห์ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิดอื่น
1	PVP1	อำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย	19.209906,99.524330	ไม่พบ	*Aphelenchus* spp. *Tylenchus* spp.
2	PVP2	อำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย	19.212894,99.533905	ไม่พบ	*Aphelenchus* spp. Helicotylenchus spp.
3	PMC1	อำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่	18.505785,98.348495	ไม่พบ	Meloidogyne spp.
4	PMC2	อำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่	18.516085,98.356354	ไม่พบ	*Tylenchus* spp. *Meloidogyne* spp.
5	PMC3	อำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่	18.516088,98.356400	ไม่พบ	*Meloidogyne* spp.
6	PMC4	อำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่	18.503693,98.355118	ไม่พบ	*Meloidogyne* spp.
7	PCH1	อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา	19.460657,100.336754	ไม่พบ	*Tylenchorhynchus* spp.
8	PCH2	อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา	19.458719,100.336143	ไม่พบ	*Tylenchorhynchus* spp.
9	PCH3	อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา	19.463728,100.340408	ไม่พบ	*Tylenchorhynchus* spp.
10	PCH4	อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา	19.470993,100.337334	ไม่พบ	*Tylenchorhynchus* spp.
11	PTT1	อำเภอเทิง จังหวัดเชียงราย	19.680710,100.264610	ไม่พบ	*Tylenchorhynchus* spp.
12	PTT2	อำเภอเทิง จังหวัดเชียงราย	19.707636,100.286598	ไม่พบ	*Tylenchorhynchus* spp.
13	PPT1	อำเภอพบพระ จังหวัดตาก	16.593417,98.776481	ไม่พบ	*Helicotylenchus* spp. *Pratylenchus* spp.
14	PPT2	อำเภอพบพระ จังหวัดตาก	16.593586,98.775317	ไม่พบ	*Helicotylenchus* spp. *Pratylenchus* spp. *Criconemella* spp.
15	PPT3	อำเภอพบพระ จังหวัดตาก	16.529611,98.746911	ไม่พบ	*Helicotylenchus* spp. *Pratylenchus* spp. *Meloidogyne* spp.
16	PPT4	อำเภอพบพระ จังหวัดตาก	16.554108,98.823697	ไม่พบ	*Helicotylenchus* spp. *Pratylenchus* spp. *Meloidogyne* spp.

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยย่อยที่ 4 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและชีวภัณฑ์เพื่อการค้าสินค้าเกษตรด้านพืช

ตารางที่ 4.1 พื้นที่สำรวจและเก็บตัวอย่างพริกที่มีลักษณะอาการคล้าย *Cucumber mosaic virus*

สถานที่	จำนวนตัวอย่าง
อำเภอท่าบ่อ จังหวัดหนองคาย	5
อำเภอศรีเชียงใหม่ จังหวัดหนองคาย	4
อำเภอโพนพิสัย จังหวัดหนองคาย	7
อำเภอธาตุพนม จังหวัดนครพนม	9
อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี	8
อำเภอโคกสะอาด จังหวัดอุดรธานี	11
อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม	7
อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร	9
อำเภอเมือง จังหวัดเลย	10
อำเภอวังสะพุง จังหวัดเลย	12
อำเภอจตุรัส จังหวัดชัยภูมิ	11
อำเภอดงหลวง จังหวัดมุกดาหาร	8
อำเภอวัดเพลง จังหวัดราชบุรี	6
อำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี	7
อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี	5
อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี	9
อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี	11
อำเภอหนองหญ้าไทร จังหวัดกาญจนบุรี	10
อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม	8
อำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง	12
อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา	11
อำเภอกระแสสินธุ์ จังหวัดสงขลา	19
อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช	9
อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช	8
อำเภอชะอวด จังหวัดนครศรีธรรมราช	9
อำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดนครศรีธรรมราช	8
อำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช	7
อำเภอเชียรใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช	9

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4.2 ไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* 50 ไอโซเลตที่แยกได้จากพลูฉลุและหน้าวัว

ไอโซเลต	ชนิดพืช	จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	เลี้ยงในแคลลัสรากอัลฟัลฟา	ทำสไลด์ถาวร	การจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา	การจำแนกชนิดด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะ	ชนิด
RMoPn 01	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 02	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 03	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 04	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 05	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 06	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 07	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 08	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 09	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 10	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 11	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 12	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 13	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 14	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 15	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 16	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 17	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 18	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 19	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RMoPn 20	พลูฉลุ	ปทุมธานี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaNr 01	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaNr 02	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaNr03	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaNr 04	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaNr 05	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaNr 06	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaNr 07	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaNr 08	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaNr 09	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaNr 10	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaNr 11	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaNr 12	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaNr 13	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4.2 ไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* 50 ไอโซเลตที่แยกได้จากพลูฉลุและหน้าวัว (ต่อ)

ไอโซเลต	ชนิดพืช	จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	เลี้ยงในแคลลัสรากอัลฟัลฟา	ทำสไลด์ถาวร	การจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา	การจำแนกชนิดด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะ	ชนิด
RAaNr 14	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaNr 15	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaPb 01	หน้าวัว	เพชรบูรณ์	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaPb 02	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaPb 03	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaPb 04	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaPb 05	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaPb 06	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaPb 07	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaPb 08	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaPb 09	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaPb 10	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaPb 11	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaPb 12	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaPb 13	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaPb 14	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*
RAaPb 15	หน้าวัว	นนทบุรี	✓	✓	✓	✓	*R. similis*

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยย่อยที่ 6 การสำรวจและเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันของพืชและผลผลิตพืชในประเทศไทย

ตารางที่ 6.1 แสดงการเก็บตัวอย่างกระเทียมพันธุ์พืชเมือง พร้อมดินปลูกเพื่อนำมาตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืช

พืช	สถานที่เก็บตัวอย่าง	พิกัดภูมิศาสตร์	จำนวนตัวอย่าง	สุ่ม 100%ของ1 จำนวนตัวอย่าง	ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่พบ
กระเทียมพันธุ์พืชเมือง พร้อมดินปลูก	ตำบลสันทราย อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่	19.8993692 N 99.2143106 E	35	35	*Helicotylenchus* spp. *Tylenchorhychus* spp. *Aphelenchus* spp. *Meloidogyne* spp. *Aphelenchoides* spp. *Hirschmanniella* spp.
กระเทียมพันธุ์พืชเมือง พร้อมดินปลูก	ตำบลเวียง อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่	19.9405321 N 99.1693058 E	27	27	*Helicotylenchus* spp. *Tylenchorhychus* spp. *Aphelenchus* spp. *Meloidogyne* spp. *Aphelenchoides* spp. *Hirschmanniella* spp.
กระเทียมพันธุ์พืชเมือง พร้อมดินปลูก	ต.โป่งน้ำร้อนอ. ฝาง จ. เชียงใหม่	19.9405321 N 99.1693058 E	15	15	*Helicotylenchus* spp. *Tylenchorhychus* spp. *Aphelenchus* spp. *Meloidogyne* spp. *Aphelenchoides* spp. *Hirschmanniella* spp.
กระเทียมพันธุ์พืชเมือง พร้อมดินปลูกปลูก	ต.บ้านถ้ำ อ.ดอกคำใต้ จังหวัดพะเยา	พิกัด: 19°6′58″N 100°4′0″E	3	3	*Helicotylenchus* spp. *Tylenchorhychus* spp. *Aphelenchus* spp. *Meloidogyne* spp. *Aphelenchoides* spp. *Hirschmanniella* spp.
กระเทียมพันธุ์พืชเมือง พร้อมดินปลูก	ตำบลสันทราย อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่	19.8993692 N 99.2143106 E	50	5	*Helicotylenchus* spp. *Tylenchorhychus* spp. *Aphelenchus* spp. *Meloidogyne* spp. *Aphelenchoides* spp. *Hirschmanniella* spp.
กระเทียมพันธุ์พืชเมือง พร้อมดินปลูก	ตำบลเวียง อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่	19.9405321 N 99.1693058 E	50	5	*Helicotylenchus* spp. *Tylenchorhychus* spp. *Aphelenchus* spp. *Meloidogyne* spp. *Aphelenchoides* spp. *Hirschmanniella* spp.
กระเทียมพันธุ์พืชเมือง พร้อมดินปลูก	ต.โป่งน้ำร้อนอ. ฝาง จ. เชียงใหม่	19.9405321 N 99.1693058 E	50	5	*Helicotylenchus* spp. *Tylenchorhychus* spp. *Meloidogyne* spp. *Hirschmanniella* spp. *Radopholus* spp.
กระเทียมพันธุ์พืชเมือง พร้อมดินปลูก		**จำนวนตัวอย่างรวม**	**230**	**23**	

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 6.2 แสดงการเก็บตัวอย่างหอมแบ่ง (หอมขาว) พร้อมดินปลูกเพื่อนำมาตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืช

พืช	**สถานที่เก็บตัวอย่าง**	**พิกัดภูมิศาสตร์**	**จำนวนตัวอย่าง**	**สุ่ม 10%ของจำนวนตัวอย่าง**	**ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่พบ**
หอมแบ่ง (หอมขาว) พร้อมดินปลูก	ตำบลชัยจุมพล อำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์	17.6266875 N 100.0434217 E	50	5	*Helicotylenchus* spp. *Tylenchorhychus* spp. *Aphelenchus* spp. *Meloidogyne* spp. *Aphelenchoides* spp. *Hirschmanniella* spp.
หอมแบ่ง (หอมขาว) พร้อมดินปลูก	ตำบลชัยจุมพล อำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์	17.6183535 N 100.0445589 E	50	5	*Helicotylenchus* spp. *Tylenchorhychus* spp. *Meloidogyne* spp. *Hirschmanniella* spp. Criconemoides spp.
หอมแบ่ง (หอมขาว) พร้อมดินปลูก	ตำบลชัยจุมพล อำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์	17.6236455 N 100.0513144 E	50	5	*Criconemoides* spp. *Helicotylenchus* spp. *Aphelenchus* spp. Aphelenchoides spp. *Radopholus* spp.
หอมแบ่ง (หอมขาว) พร้อมดินปลูก	ต.ศรีดงเย็น อ.ไชยปราการ จ.เชียงใหม่	19.6935933 N 99.1523822 E	100	10	*Criconemoides* spp. *Aphelenchus* spp. Aphelenchoides spp. *Radopholus* spp.
หอมแบ่ง (หอมขาว) พร้อมดินปลูก	ต.ศรีดงเย็น อ.ไชยปราการ จ.เชียงใหม่	19.7021558 N 99.153389 E	100	10	*Helicotylenchus* spp. *Criconemoides* spp. *Aphelenchus* spp. Aphelenchoides spp. *Radopholus* spp.
หอมแบ่ง (หอมขาว) พร้อมดินปลูก		**จำนวนตัวอย่างรวม**	**350**	**35**	

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 6.3 แสดงการเก็บตัวอย่างหอมแดง อายุ 30 วันพร้อมดินปลูกเพื่อนำมาตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืช

พืช	**สถานที่เก็บตัวอย่าง**	**พิกัดภูมิศาสตร์**	**จำนวนตัวอย่าง**	**สุ่ม 10%ของจำนวนตัวอย่าง**	**ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่พบ**
หอมแดง อายุ 30 วันพร้อมดินปลูก	ตำบลชัยจุมพล อำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์	17.6201791 N 100.0491472 E	100	10	*Helicotylenchus spp.* *Tylenchorhychus spp.* *Meloidogyne spp.* *Pratylenchus spp.* *Hirschmanniella spp.* *Radopholus spp.*
หอมแดง อายุ 30 วันพร้อมดินปลูก	ตำบลหนองบัว อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่	19.7200489 N 99.1283327 E	100	10	*Helicotylenchus spp.* *Tylenchorhychus spp.* *Meloidogyne spp.* *Hirschmanniella spp.* *Radopholus spp.*
หอมแดง อายุ 30 วันพร้อมดินปลูก	ตำบลหนองบัว อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่	19.7146329 N 991211190 E	100	10	*Helicotylenchus spp.* *Tylenchorhychus spp.* *Meloidogyne spp.* *Hirschmanniella spp.* *Radopholus spp.*
หอมแดง อายุ 30 วันพร้อมดินปลูก		**จำนวนตัวอย่างรวม**	**300**	**30**	

ตารางที่ 6.4 แสดงการเก็บตัวอย่างกระเทียมแห้งเพื่อนำมาตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืช

พืช	**สถานที่เก็บตัวอย่าง**	**พิกัดภูมิศาสตร์**	**จำนวนตัวอย่าง**	**สุ่ม 10%ของจำนวนตัวอย่าง**	**ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่พบ**
กระเทียมแห้ง	ต.ปางหมู อ.เมือง จ.แม่ฮ่องสอน	19.3731615"N 97.8848775"E	100	10	*Hirschmanniella* spp. *Pratylenchus* spp. *Radopholus* spp.
กระเทียมแห้ง	ต.ปางหมู อ.เมือง จ.แม่ฮ่องสอน	19.37312 N 97.88497 E	50	5	*Hirschmanniella* spp
กระเทียมแห้ง	ต.ปางหมู อ.เมือง จ.แม่ฮ่องสอน	19.37312 N 97.88497 E	50	5	*Hirschmanniella* spp
กระเทียมแห้ง		**จำนวนตัวอย่างรวม**	**200**	**20**	

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 6.5 แสดงการเก็บตัวอย่างหอมหัวใหญ่เพื่อนำมาตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืช

พืช	**สถานที่เก็บตัวอย่าง**	**พิกัดภูมิศาสตร์**	**จำนวนตัวอย่าง**	**สุ่ม 10%ของจำนวนตัวอย่าง**	**ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่พบ**
หอมหัวใหญ่	ต.ปางมะผ้า อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน	19.9113765 N 98.2025519 E	100	10	ไม่พบ
หอมหัวใหญ่	ต.ทุ่งยาว อ.ปาย จ.แม่ฮ่องสอน	19.3316785N 98.4334523 E	50	5	ไม่พบ
หอมหัวใหญ่	ต.ทุ่งยาว อ.ปาย จ.แม่ฮ่องสอน	19.3136178 N 98.4439841 E	50	5	ไม่พบ
หอมหัวใหญ่	ต.แม่ฮี้ อ.ปาย จ.แม่ฮ่องสอน	19.2965173 N 98.4714025 E	50	5	ไม่พบ
หอมหัวใหญ่	ต.ขี้เหล็ก อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่	19.0881336 N 98.8911098 E	50	5	ไม่พบ
หอมหัวใหญ่	ต.ม่อนปิ่น อ.ฝาง จ.เชียงใหม่	19.9113765 N 99.1745869 E	300	30	ไม่พบ
หอมหัวใหญ่	ต.ม่อนปิ่น อ.ฝาง จ.เชียงใหม่	19.9134628 99.1792388	50	5	ไม่พบ
หอมหัวใหญ่	ต.ม่อนปิ่น อ.ฝาง จ.เชียงใหม่	19.9113765N 99.1745869 E	300	30	ไม่พบ
หอมหัวใหญ่	สหกรณ์ผู้ปลูกหอมหัวใหญ่ฝาง ต.ม่อนปิ่น อ.ฝาง จ.เชียงใหม่		250	25	ไม่พบ
หอมหัวใหญ่		**จำนวนตัวอย่างรวม**	**1,200**	**120**	

กรมวิชาการเกษตร

โครงการวิจัยย่อยที่ 7 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชอุบัติใหม่ในข้าวโพดและกล้วยเพื่อการส่งออก

กิจกรรมที่ 1 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพด

ตารางที่ 7.1 เปอร์เซ็นต์การทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดหวาน จากการทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดแมลงประเภทใช้ทางดิน ทำการทดลองที่แปลงทดลองของเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ระหว่างเดือนมกราคม – มีนาคม 2565 (แปลงทดลองที่ 1)

กรรมวิธี	อัตราการใช้	การทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด (%)[1/]							
		ตรวจนับหลังข้าวโพดงอก (วัน)							
		5	7	10	12	15	18	20	25
1. cyantraniliprole 24%+thiamethoxam 24%FS	8 มิลลิลิตร/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม	0.00	0.28a	2.50a	2.50a	5.56a	9.72a	9.03a	23.19a
2. chlorantraniliprole 62.5%FS	9 มิลลิลิตร/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม	0.00	0.69a	1.94a	1.39a	7.92a	15.56a	15.83a	19.31a
3. cyantraniliprole 20%SC	10 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร ผสมน้ำราดโคนต้น ที่ 3 วันหลังงอก ต้นละ 10 มิลลิลิตร	0.00	0.00a	0.00a	1.94a	2.50a	11.67a	11.67a	23.06a
4. cyantraniliprole 20%SC (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)	20 มิลลิลิตร/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม	0.00	0.28a	0.00a	2.08a	2.22a	10.69a	13.33a	21.25a
5. ไม่ใช้สารกำจัดแมลง	-	0.00	1.39a	15.83b	19.31b	43.89b	48.89b	48.19b	64.44b
C.V. (%)		-	242.9	100	77.3	58.7	48.9	54.2	51.2

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 7.2 เปอร์เซ็นต์การทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดหวาน จากการทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดแมลงประเภทใช้ทางดิน ทำการทดลองที่แปลงทดลองของเกษตรกร อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี ระหว่างเดือนมีนาคม – เมษายน 2565 (แปลงทดลองที่ 2)

กรรมวิธี	อัตราการใช้	การทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด (%)[1/]							
		ตรวจนับหลังข้าวโพดงอก (วัน)							
		5	7	10	12	15	18	20	25
1. cyantraniliprole 24%+thiamethoxam 24%FS	8 มิลลิลิตร/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม	5.69a	18.33b	42.08c	47.08b	51.94a	53.06b	63.71bc	69.58bc
2. chlorantraniliprole 62.5%FS	9 มิลลิลิตร/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม	4.17a	7.36a	12.92a	20.00a	32.64a	33.19a	34.72a	44.72a
3. cyantraniliprole 20%SC	10 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร ผสมน้ำราดโคนต้น ที่ 3 วันหลังงอก ต้นละ 10 มิลลิลิตร	6.81a	11.25ab	20.69ab	27.08a	40.14a	41.39ab	50.42ab	59.86ab
4. cyantraniliprole 20%SC (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)	20 มิลลิลิตร/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม	5.42a	14.72ab	25.69b	31.11a	40.28a	42.92ab	47.78ab	63.61abc
5. ไม่ใช้สารกำจัดแมลง	-	22.22b	49.72c	75.97d	80.28c	74.58b	76.39c	78.06c	83.89c
C.V. (%)		63.5	28.8	21.9	18.8	24.5	16.7	24.4	19.8

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 7.3 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดที่กินอาหารเทียมเคลือบผิวหน้าไวรัส SfNPV อัตราต่าง ๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นย้ายหนอนทดลอง มากินอาหารที่เคลือบผิวหน้าด้วยสารเคมีชนิดต่างๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การตายแบบสะสมของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด (%) [1/]						
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	0	0	0	0.00 e	0.00 e	27.50 e	60.00 cd
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	0	0	0	6.10 bcd	50.00 b	60.00 cd	85.00 ab
SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม. จึงบังคับให้กิน abamectin 1.8% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	0	0	0	0.00 e	10.00 c	55.00 d	72.50 bc
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม. จึงบังคับให้กิน abamectin 1.8% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	0	0	0	5.04 cd	22.50 c	60.00 cd	85.00 ab
SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม. จึงบังคับให้กิน cypermethrin 35% W/V EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	0	0	0	59.59 a	82.50 a	90.00 a	100.00 a
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม. จึงบังคับให้กิน cypermethrin 35% W/V EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	0	0	0	46.82 ab	85.00 a	90.00 a	100.00 a
SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม. จึงบังคับให้กิน chlorantraniliprole 5.17%W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	0	0	0	0.00 e	22.50 c	62.50 bcd	85.00 ab
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม. จึงบังคับให้กิน chlorantraniliprole 5.17%W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	0	0	0	4.05 cd	45.00 b	85.00 a	100.00 a
SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม. จึงบังคับให้กิน thiodicarb 75 % WP อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร	0	0	0	3.58 cd	15.00 c	30.00 e	55.00 d
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม. จึงบังคับให้กิน thiodicarb 75 % WP อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร	0	0	0	3.58 cd	30.00 c	45.00 de	92.5 a
SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม. จึงบังคับให้กิน deltamethrin 3 % W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	0	0	0	29.16 abc	55.00 b	62.50 bcd	75.00 b
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม. จึงบังคับให้กิน deltamethrin 3 % W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	0	0	0	42.49 ab	75.00 a	80.00 ab	95.00 a
SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม. จึงบังคับให้กิน flubendiamide 20 % WG อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร	0	0	0	28.34 abc	52.50 b	77.50 abc	85.00 ab
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร นาน 72 ชม. จึงบังคับให้กิน flubendiamide 20 % WG อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร	0	0	0	2.32 d	27.50 c	60.00 cd	82.50 ab
15. กรรมวิธีควบคุม	0	0	0	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00
CV%	0	0	0	47.8	24.8	19.0	11.4

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธีเปรียบเทียบ DMRT

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 7.4 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดที่กินอาหารเทียมที่เคลือบผิวหน้าด้วยไวรัส SfNPV อัตรา 10 และ 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ที่ผสมด้วยสารฆ่าแมลงชนิดต่างๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การตายแบบสะสมของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด (%) [1/]						
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	0 e	0 d	7.5 d	32.5 c	45.0 c	62.5 d	70.0 cd
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	0 e	0 d	7.5 d	32.5 c	62.5 bc	80.0 abc	95.0 a
SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + abamectin 1.8% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	0 e	0 d	5.0 d	7.5 d	22.5 d	35.0 e	55.0 d
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + abamectin 1.8% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	0 e	0.82 c	10.0 d	40.0 c	70.0 ab	85.0 ab	87.5 ab
SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + cypermethrin 35% W/V EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	52.13 ab	56.71 ab	70.0 b	75.0 ab	82.5 ab	87.5 ab	90.0 ab
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + cypermethrin 35% W/V EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	69.29 a	82.39 a	85.0 ab	87.5 a	87.5 a	90.0 a	90.0 ab
SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + chlorantraniliprole 5.17%W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	69.29 a	84.27 a	87.5 ab	87.5 a	87.5 a	87.5 ab	90.0 ab
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + chlorantraniliprole 5.17%W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	6.1 c	54.81 ab	100 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + thiodicarb 75 % WP อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร	0 e	0 d	12.5 d	45.0 c	65.0 bc	72.5 bcd	75.0 bc
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + thiodicarb 75 % WP อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร	0 e	2.32 c	32.5 c	55.0 ab	82.5 ab	85.0 ab	87.5 ab
SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + deltamethrin 3 % W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	0 e	2.90 c	90.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + deltamethrin 3 % W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	16.87 bc	27.12 ab	37.5 c	47.5 c	75.0 ab	87.5 ab	90.0 ab
SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + flubendiamide 20 % WG อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร	5.04 cd	24.52 ab	42.5 c	45.5 c	62.5 bc	67.5 cd	80.0 abc
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + flubendiamide 20 % WG อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร	0.82 d	20.12 b	97.5 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
กรรมวิธีควบคุม	0 e	0 d	0 e	0 e	2.5 e	2.5 f	2.5 e
CV%	29.9	27.2	28.5	30.9	21.8	15.5	14.0

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธีเปรียบเทียบ DMRT

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 7.5 เปอร์เซ็นต์ความเสียหายของใบข้าวโพดหวานที่เกิดจากการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดโดยเฉลี่ยจากการสุ่มเก็บข้อมูลจากข้าวโพดหวาน 20 ต้นต่อแปลงย่อย

กรรมวิธี	ความเสียหายของใบข้าวโพดหวานจากหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด (%) [1/]			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + chlorantraniliprole 5.17%W/V SC 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	57.22 a	15.56 a	9.17 a	5.61 a
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + cypermethrin 35% W/V EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	42.92 a	23.19 ab	14.56 ab	5.98 a
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + flubendiamide 20 % WG อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร	54.31 a	23.33 ab	8.47 a	6.99 ab
SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + deltamethrin 3 % W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	50.97 a	25.42 ab	19.59 b	4.71 a
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร	48.06 a	26.39 ab	10.56 a	7.13 ab
ไม่พ่นสารป้องกันกำจัดแมลง	54.56 a	36.39 b	48.06 c	24.12 b
CV%	26.0	36.6	29.3	35.65

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธีเปรียบเทียบ DMRT

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 7.6 ผลผลิตข้าวโพดหวานโดยเฉลี่ยที่ได้จากการสุ่มเก็บตัวอย่างฝักข้าวโพด 20 ฝักต่อแปลงย่อย

กรรมวิธี	น้ำหนักเฉลี่ยของข้าวโพดหวานจำนวน 20 ฝัก (กิโลกรัม) [1/]		
	ฝักสด	ฝักลอกเปลือก	ผลผลิตดี
SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + chlorantraniliprole 5.17%W/V SC 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	4.15 a	3.45 b	1.08 ab
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + cypermethrin 35% W/V EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	5.23 a	4.43 a	0.93 ab
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + flubendiamide 20 % WG อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร	4.45 a	3.75 ab	1.68 a
SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + deltamethrin 3 % W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร	4.48 a	3.65 b	0.65 b
SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร	4.48 a	3.75 ab	1.53 ab
ไม่พ่นสารป้องกันกำจัดแมลง	4.80 a	3.53 b	0.80 ab
CV%	15.7	8.5	53.2

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธีเปรียบเทียบ DMRT

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 2 ศึกษาโรคตายพราย (Panama disease) tropical race 4 ของกล้วย และการป้องกันกำจัด

ตารางที่ 7.7 พันธุ์/สายพันธุ์กล้วยที่ใช้ในการทดสอบ

ลำดับ	รหัสสายพันธุ์/พันธุ์	ชื่อสายพันธุ์/พันธุ์	จีโนม
1	HB002	ป่าดอยมูเซอร์	AA
2	HB018	หอมเขียวซุปเปอร์แคระ	AAA
3	HB029	ตีบใหญ่ อุบล	AAB
4	HB031	ไข่กำแพงเพชร	AA
5	HB032	ไข่เกษตรศาสตร์2	AA
6	HB035	น้ำนมเชียงใหม่	AAA
7	HB036	น้ำนมราชสีห์	AAA
8	HB038	โรส	AA
9	HB041	หอมจันทร์	AA
10	HB043	น้ำนมแขก	AAA
11	HB074	ร้อยหวี	AAB
12	HB080	นิ้วจระเข้	AAA
13	HB091	น้ำว้าทองมาเอง	ABB
14	HB111	น้ำว้าปากช่อง 50	ABB
15	HB159	หอมทอง	AAA
16	HB171	หอมทอง	AAA
17	HB196	สา	AA
18	HB132	หอมเขียวค่อม	AAA
19	HB236	แกรนด์เนน	AAA
20	HB245	หอมเขียว	AAA

หมายเหตุ : กล้วยแต่ละพันธุ์/สายพันธุ์ เก็บรวมรวมพันธุ์โดย ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 7.8 เปอร์เซ็นต์ดัชนีความรุนแรงของโรคและระดับความต้านทานของพันธุ์/สายพันธุ์กล้วยจากการทดสอบ

ลำดับ	รหัส	ชื่อสายพันธุ์/พันธุ์	จีโนม	DSI (%)	ระดับความต้านทาน*
1	HB002	ป่าดอยมูเซอร์	AA	11.11	IR
2	HB018	หอมเขียวซุปเปอร์แคระ	AAA	85.00	HS
3	HB029	ตีบใหญ่ อุบล	AAB	81.25	HS
4	HB031	ไข่กำแพงเพชร	AA	94.44	HS
5	HB032	ไข่เกษตรศาสตร์2	AA	100.00	HS
6	HB035	น้ำนมเชียงใหม่	AAA	72.50	HS
7	HB036	น้ำนมราชสีห์	AAA	75.00	HS
8	HB038	โรส	AA	0.00	I
9	HB041	หอมจันทร์	AA	97.22	HS
10	HB043	น้ำนมแขก	AAA	65.625	HS
11	HB074	ร้อยหวี	AAB	92.50	HS
12	HB080	นิ้วจระเข้	AAA	72.22	HS
13	HB091	น้ำว้าทองมาเอง	ABB	72.22	HS
14	HB111	น้ำว้าปากช่อง 50	ABB	62.50	HS
15	HB159	หอมทอง	AAA	100	HS
16	HB171	หอมทอง	AAA	91.67	HS
17	HB196	สา	AA	97.50	HS
18	HB132	หอมเขียวค่อม	AAA	100.00	HS
19	HB236	แกรนด์เนน	AAA	70.00	HS
20	HB245	หอมเขียว	AAA	85.00	HS

หมายเหตุ : *ประเมินระดับความต้านทานตามลักษณะอาการภายใน

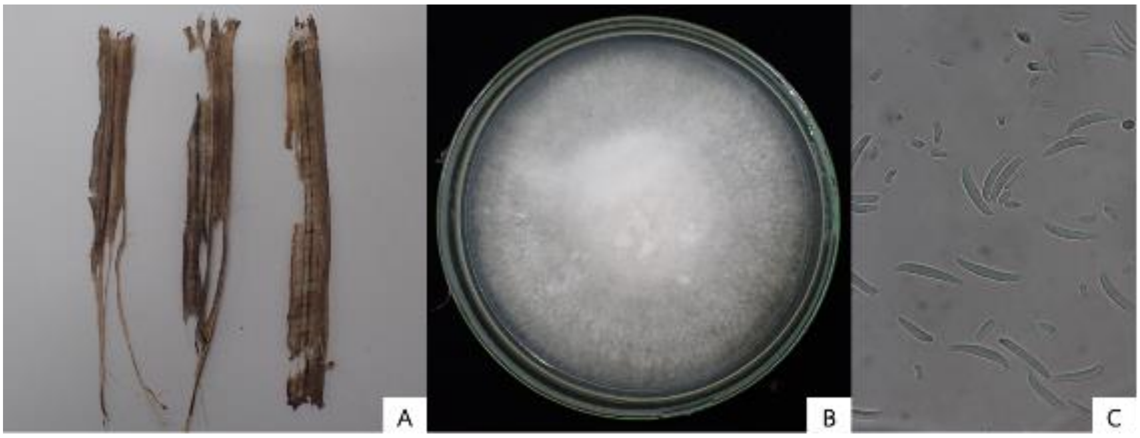
กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 7.9 เปอร์เซ็นต์ดัชนีความรุนแรงของโรคและระดับความต้านทานของพันธุ์/สายพันธุ์กล้วยจากการทดสอบ

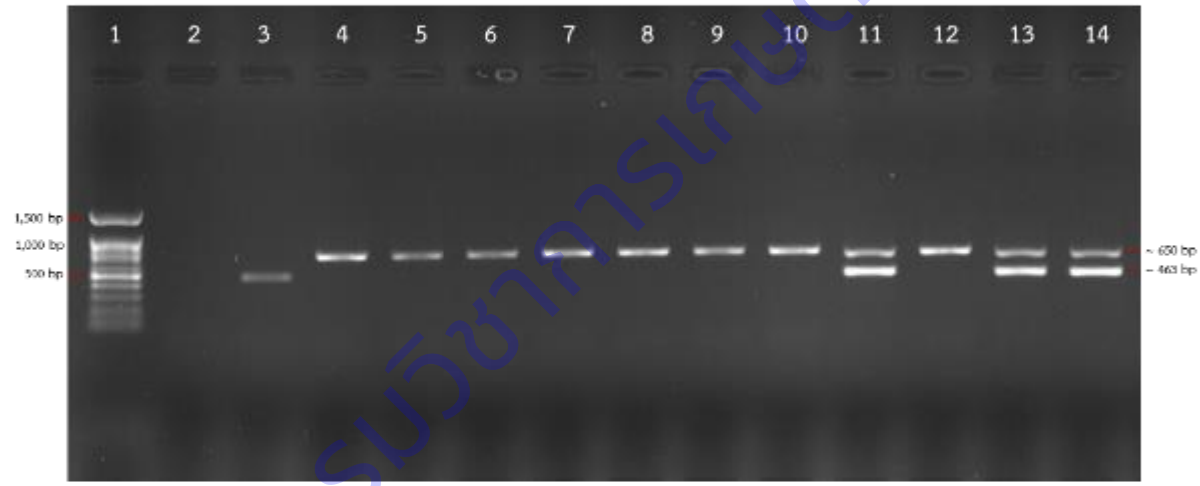
ลำดับ	รหัส	ชื่อสายพันธุ์/พันธุ์	จีโนม	DSI (%)	ระดับความต้านทาน*
1	HB002	ป่าดอยมูเซอร์	AA	11.11	IR
2	HB018	หอมเขียวซุปเปอร์แคระ	AAA	85.00	HS
3	HB029	ตีบใหญ่ อุบล	AAB	81.25	HS
4	HB031	ไข่กำแพงเพชร	AA	94.44	HS
5	HB032	ไข่เกษตรศาสตร์2	AA	100.00	HS
6	HB035	น้ำนมเชียงใหม่	AAA	72.50	HS
7	HB036	น้ำนมราชสีห์	AAA	75.00	HS
8	HB038	โรส	AA	0.00	I
9	HB041	หอมจันทร์	AA	97.22	HS
10	HB043	น้ำนมแขก	AAA	65.625	HS
11	HB074	ร้อยหวี	AAB	92.50	HS
12	HB080	นิ้วจระเข้	AAA	72.22	HS
13	HB091	น้ำว้าทองมาเอง	ABB	72.22	HS
14	HB111	น้ำว้าปากช่อง 50	ABB	62.50	HS
15	HB159	หอมทอง	AAA	100	HS
16	HB171	หอมทอง	AAA	91.67	HS
17	HB196	สา	AA	97.50	HS
18	HB132	หอมเขียวค่อม	AAA	100.00	HS
19	HB236	แกรนด์เนน	AAA	70.00	HS
20	HB245	หอมเขียว	AAA	85.00	HS

หมายเหตุ : *ประเมินระดับความต้านทานตามลักษณะอาการภายใน

กรมวิชาการเกษตร

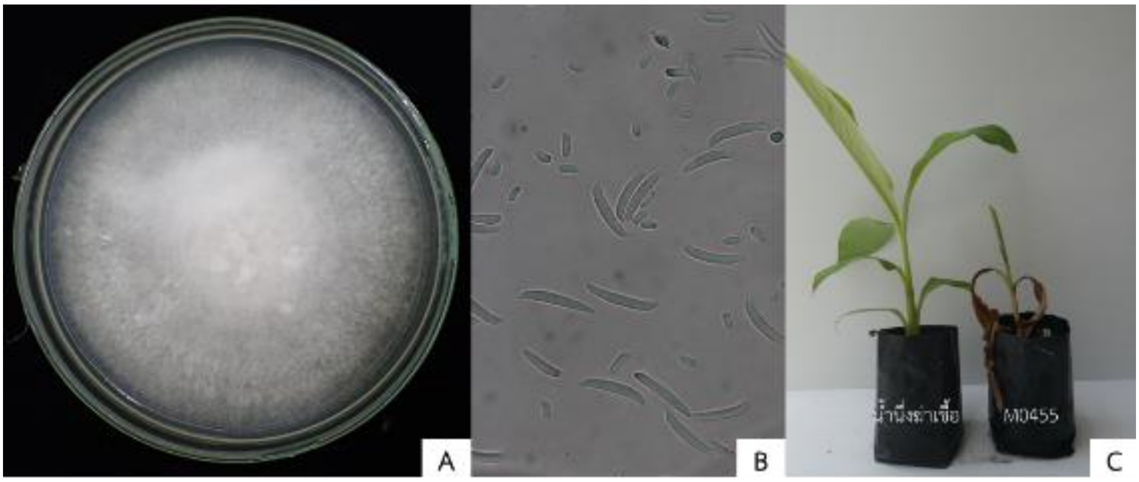


ภาพที่ 7.1 ตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อลำต้นกล้วยที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช (A), เชื้อรา *Fusarium* sp. ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน (B) และ ลักษณะของ macroconidia และ microconidia ของ *Fusarium* sp. (C)



กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 7.2 ผลการตรวจสอบชนิดเบื้องต้นของเชื้อราสาเหตุโรคตายพรายด้วยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ the translation elongation factor 1-alpha gene (EF-1/EF-2) และ intergenic spacer region (FocTR4-F/FocTR4-R2) ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่ขนาดประมาณ 650 และ 463 bp ตามลำดับ เมื่อ 1: 100 bp ladder, 2: น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ (negative control), 3: TR4 plasmid (positive control), 4: M0447, 5: M0448, 6: M0449, 7: M0450, 8: M0451, 9: M0453, 10: M0454, 11: M0455, 12: M0457, 13: M0458 และ 14: M0459



ภาพที่ 7.3 เชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 ไอโซเลท M0455 ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน (A) และ ลักษณะของ macroconidia และ microconidia ของ M0455 (B) และผลการทดสอบการเกิดโรคบนต้นกล้ากล้วยกลุ่มคาเวนดิช

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 7.4 ปฏิกิริยาพันธุ์/สายพันธุ์ของกล้วยภายหลังการปลูกเชื้อรา *Foc* TR4 4 สัปดาห์ โดย A: กล้วยพันธุ์ โรส (HB038) และ B: กล้วยพันธุ์หอมเขียวค่อม (HB132)

ภาคผนวก 2 หลักฐานเชิงประจักษ์ของผลผลิตที่ได้

1. เทคโนโลยีหรือกระบวนการใหม่ จำนวน 23 กระบวนการ

1) กระบวนการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืชของอินทผลัมและลิลลี่

การศึกษาชนิดของแมลงศัตรูเพื่อจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช

↓

สืบค้นข้อมูลแมลงศัตรูพืชในอินทผาลัมและลิลลี่

↓

อินทผาลัม

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูพืชในแปลงปลูกอินทผาลัม

ลิลลี่

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูพืช

↓

นำมาจัดรูปร่างและอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 50 – 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 – 6 0 วัน สำหรับแมลงปากดูดที่มีขนาดเล็กเมื่อทำสไลด์ถาวรและนำไปอบแห้งตามระยะเวลาที่กำหนดและนำไปจำแนกชนิด

↓

ศัตรูพืชที่รวบรวมได้มาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope /ชนิด compound

↓

จัดเก็บตัวอย่างแมลงศัตรูพืชในพิพิธภัณฑ์

กรมวิชาการเกษตร

2) กระบวนจัดทำบัญชีรายชื่อไรศัตรูพืชของอินทผลัมและลิลลี่

การศึกษาชนิดของไรศัตรูเพื่อจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช

สืบค้นข้อมูลไรศัตรูพืชในอินทผาลัมและลิลลี่

อินทผาลัม

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างไรศัตรูพืชในแปลงปลูกอินทผาลัม

ลิลลี่

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างไรศัตรูพืชในแปลงปลูกลิลลี่

การจัดทำสไลด์ถาวร ตัวอย่างไรศัตรูพืชที่ได้กลับมาทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereomicroscope เพื่อตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ที่ใช้ในการจำแนก

จำแนกชนิดภายใต้กล้อง compound microscope จากตำราต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง บันทึกผลการจำแนกไว้ด้านซ้ายมือของแผ่นสไลด์ก่อนที่จะนำเข้าเก็บในพิพิธภัณฑ์

จัดเก็บตัวอย่างไรศัตรูพืชในพิพิธภัณฑ์

กรมวิชาการเกษตร

3) กระบวนการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืชของอินทผลัมและลิลลี่

การวินิจฉัยโรคของอินทผลัมในระดับแปลง

↓

สังเกตุลักษณะอาการบนใบ

↓

แผลจุดสีเหลืองหรือสีน้ำตาลอ่อน ทั้งสองด้านของใบ สร้างลักษณะคล้ายรูปถ้วย เห็นกลุ่มเส้นใยเล็กๆ สีเหลือง คล้ายเส้นด้ายโผล่ขึ้นมา

พบแผลจุดสีเหลืองหรือสีน้ำตาลอ่อน

↓

โรคใบจุด graphiola หรือ false smut
ที่เกิดจาก
เชื้อรา *Graphiola phoenicis*

การวินิจฉัยโรคของอินทผลัมในระดับแปลง

↓

สังเกตุลักษณะอาการบนใบ

↓

ลักษณะเส้นใยสีดำเกิดกระจายเป็นหย่อมๆ บนผิวใบและเจริญเชื่อมกันเป็นแผ่นใหญ่ ส่วนใหญ่พบได้ในแปลงที่มีความชื้นในแปลงสูง

พบลักษณะกลุ่มเส้นใยสีดำ

↓

โรคราดำ (sooty mold)
ที่เกิดจาก
เชื้อรา *Meliola* sp.

กรมวิชาการเกษตร

การวินิจฉัยโรคของ
อินทผลัมในระดับแปลง

↓

สังเกตุลักษณะอาการบนใบ

↓

แผลจุดสีน้ำตาลอ่อนถึงเทา ขอบแผลมีสีน้ำตาล บางครั้งอาจพบกลุ่มสปอร์สีดำบนแผล

พบแผลจุดสีน้ำตาลอ่อนถึงเทา

↓

โรคใบจุด (leaf spot)
ที่เกิดจาก
เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp.

การวินิจฉัยโรคของ
ลิลลี่ในระดับแปลง

↓

สังเกตุลักษณะอาการบนใบ

↓

ใบมีอาการด่าง และมีขนาดเล็กลง ต้นเตี้ยแคระ

พบอาการใบด่าง

↓

โรคใบด่าง (mosaic)
ที่เกิดจากเชื้อไวรัส
Cucumber mosaic virus (CMV)

กรมวิชาการเกษตร

4) กระบวนการจัดทำบัญชีรายชื่อวัชพืชของอินทผลัมและลิลลี่

การศึกษาชนิดของวัชพืชเพื่อจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช

↓

สืบค้นข้อมูลวัชพืชในอินทผาลัมและลิลลี่

↓

อินทผาลัม

↓

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างวัชพืชในแปลงปลูกอินทผาลัม

ลิลลี่

↓

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างวัชพืชในแปลงปลูกลิลลี่

↓

การจัดทำตัวอย่างแห้ง โดยเก็บวัชพืชที่มีใบและดอกสมบูรณ์ ไม่ถูกแมลงทำลาย หากพืชมีขนาดเล็ก ควรมีราก ต้น ใบ –ดอก ครบ หากเป็นพืชไร้ดอก ควรมีส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ หรือลักษณะอื่นที่สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดได้ อัดในแผงอัดพรรณไม้

↓

การตรวจสอบชนิดพืช โดยการเทียบตัวอย่างพืชในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ อาคารพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการเกษตร หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช พิพิธภัณฑ์พืชของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และองค์การสวนพฤกษศาสตร์ รวมถึงสอบถามจากผู้ทรงคุณวุฒิ ของแต่ละวงศ์หรือสกุลของพืชนั้น ๆ ตลอดจนการตรวจสอบกับเอกสารคู่มือต่างๆ ทั้งนี้หากข้อมูลที่ได้จากการสำรวจในแปลงทดลองไม่เพียงพอสำหรับจำแนกชนิด จะนำต้นหรือเมล็ดวัชพืชดังกล่าวมาปลูกเพื่อจำแนกชนิดที่ถูกต้องต่อไป

↓

จัดเก็บตัวอย่างวัชพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์

กรมวิชาการเกษตร

5) กระบวนการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสจีนัส Tobamovirus ของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริกนำเข้า

การตรวจวินิจฉัยชนิดของไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและเมล็ดพันธุ์พริกนำเข้า

↓

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพริก ตามมาตรฐาน ISTA

↓

ตรวจสอบศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ

ปลูกตรวจสอบอาการในโรงเรือน

ตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกหลัง

↓

ตรวจวินิจฉัยชนิดของไวรัสจีนัส *Tobamovirus* โดยใช้เทคนิค RT-PCR (reverse-transcription polymerase chain reaction)

↓

สกัดสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอ (Total RNA) โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป

↓

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจีนัส *Tobamovirus* ด้วยเทคนิค RT-PCR แบบ one-step โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัส

↓

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตโฟรีซีส (gel electrophoresis) โดยใช้ 1.5% อะกาโรสเจล ให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 35-40 นาที

↓

วิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างไป โดยจัดการข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป DNASTAR และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

↓

สรุปผลการทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

6) กระบวนการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอย Potato cyst nematode กับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า

สุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์นำเข้าตามมาตรฐาน ISPM No. 31

แยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิด potato cyst nematode

แยกไส้เดือนฝอยจากดินที่ติดมากับหัวพันธุ์

Centrifugal flotation with Sucrose syrup

แยกตัวอ่อนไส้เดือนฝอยจากหัวพันธุ์

Centrifugal flotation with Sucrose syrup

ตรวจวินิจฉัยด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ เทคนิค PCR

รายงานผลตรวจและตรวจปล่อยสินค้า ณ ด่านตรวจพืช

ตรวจติดตามแปลงปลูกพืช

สถิติการตรวจพบ/ ไม่พบศัตรูพืช

วิเคราะห์ความเสี่ยง

กรมวิชาการเกษตร

7) กระบวนการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Candidatus* Liberibacter solanacearum กับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า

สุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์นำเข้าตามมาตรฐาน ISPM No. 31

↓

ตรวจสอบอาการจากหัวพันธุ์มันฝรั่ง

↓

สกัดดีเอ็นเอจากตุ่มตาหัวพันธุ์มันฝรั่ง

↓

ตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค Nested PCR

↓

รายงานผลตรวจและตรวจปล่อยสินค้า ณ ด่านตรวจพืช

← ตรวจติดตามแปลงปลูกพืช

→ สถิติการตรวจพบ ไม่พบศัตรูพืช

↓

วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

กรมวิชาการเกษตร

8) กระบวนการตรวจวินิจฉัยเมล็ดวัชพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่ายนำเข้า

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่าย

↓

ตรวจสอบหาเมล็ดวัชพืชด้วยวิธี Visual inspection

(ตาเปล่า, กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ, แว่นขยาย)

↓

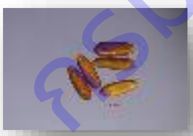
จัดจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืชจากสัณฐานวิทยา ขนาด รูปร่าง สี เทียบกับ herbarium คู่มือการจัดจำแนกชนิด

ทดสอบความงอกของเมล็ดวัชพืช

(กระดาษเพาะ, ทราย)

↓

ได้ข้อมูลชนิดเมล็ดวัชพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ขึ้นฉ่ายนำเข้า



กรมวิชาการเกษตร

กระบวนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบและสภาวะการทำปฏิกิริยาของเทคนิค PCR Multiplex PCR LAMP ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืช

9) กระบวนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบและสภาวะการทำปฏิกิริยาสำหรับการตรวจสอบแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* และแมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae* ด้วยเทคนิค multiplex PCR

1. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงวันผลไม้

การสกัดดีเอ็นเอใช้วิธีการตาม Boontop *et al.* (2016) ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ISOLATE II Genomic DNA kit (Bioline, Australia) มีขั้นตอนดังนี้

1.1 แยกขาขวา 3 ขา จากแมลงวันผลไม้ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นดูด 95% ethanol ทิ้งไป วางหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เพื่อให้ระเหย 95% ethanol ออกไปจากตัวอย่างให้หมด

1.2 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแมลงที่เตรียมไว้ด้วยชุดสกัด ISOLATE II Genomic DNA Kit (Bioline, Australia) เติม Lysis buffer GL 180 ไมโครลิตร และเติม Proteinase K 25 ไมโครลิตร เขย่าเล็กน้อย บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

1.3 เติม Lysis buffer G3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าเล็กน้อย จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

1.4 เติม absolute ethanol 210 ไมโครลิตร เขย่าเล็กน้อย ดูดสารละลายทั้งหมดลงในคอลัมน์ นำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที

1.5 ล้างคอลัมน์ด้วยการเติม Wash buffer GW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ แล้วนำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้งไป

1.6 ล้างคอลัมน์อีกครั้งด้วยการเติม Wash buffer GW2 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ แล้วนำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้งไป

1.7 นำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที อีกครั้งเพื่อกำจัด ethanol ที่เหลือออกให้หมด เปลี่ยนคอลัมน์ไปใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร

1.8 ชะดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์โดยเติม elution buffer G ที่ผ่านการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นนำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 2 นาที

1.9 ทดสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย universal ไพรเมอร์ LCO และ HCO สำหรับตรวจสอบยีน *cox1* (LCO1490 5’-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3’ และ HCO2198 5’-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3’) ขนาดประมาณ 712 bp

กรมวิชาการเกษตร

2. ตรวจสอบแมลงวันผลไม้ *Bactrocera correcta* และ *Zeugodacus cucurbitae* ด้วยวิธี multiplex PCR

การตรวจสอบใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ตามรายงานของ ยุวรินทร์ และคณะ (2562ก, 2562ข) ดังนี้

ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *Bactrocera correcta*

Bco-F1 : 5′-CTAGGACACCCCGGAGCAC-3′

Bco-R1 : 5′-CAGTATTAGGGGGACAAGTCAA-3′

ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *Zeugodacus cucurbitae*

Zcu-F1 : 5′-TGAGCTGTAGTATTGACAGCTCTTC-3′

Zcu-R1 : 5′-AGCCGGGTCGAAGAAAGAGGTG-3′

<u>Master mix</u>

เตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Reagents	Final concentration	Volume (µl)
dH_2O	-	6.5
2x Green PCR Master Mix Direct-load (Biotechrabbit)	1x	12.5
10 µM Bco-F1	0.4 µM	1
10 µM Bco-F1	0.4 µM	1
10 µM Zcu-F1	0.4 µM	1
10 µM Zcu-R1	0.4 µM	1
DNA template	-	2
Total	-	25

<u>PCR program</u>

กำหนดอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

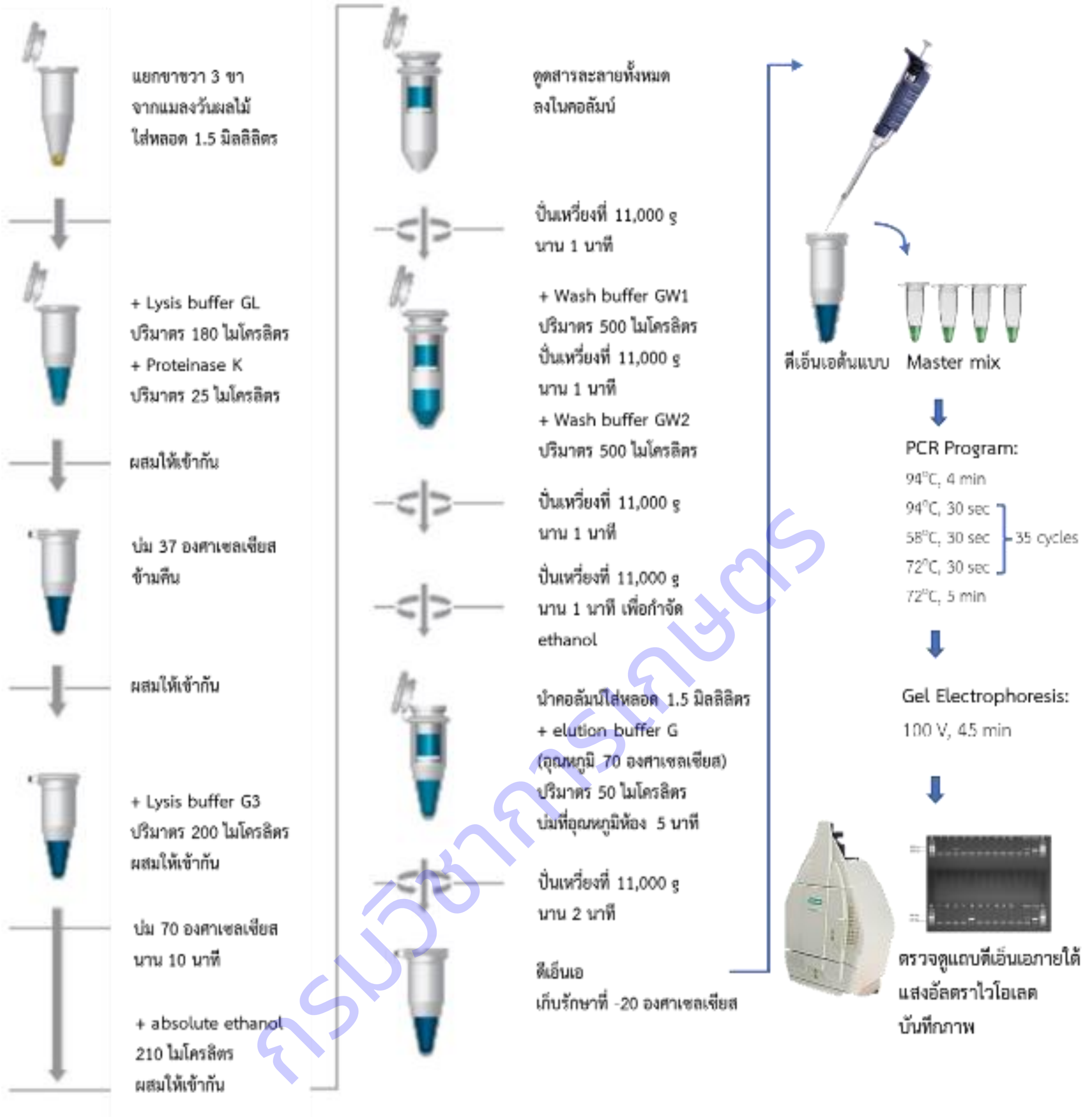
PCR steps	Temperature	Time	Number of cycles
initial denaturation	94°C	4 min	1 cycle
denaturation	94°C	30 sec	35 cycles
annealing	58°C	30 sec	
extension	72°C	30 sec	
final extension	72°C	5 min	1 cycle

<u>Gel electrophoresis</u>

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 % ผสม RedSafe dye (iNtRON Biotechnology, USA) 5 ไมโครลิตร ต่ออะกาโรสเจล 100 มิลลิลิตร โหลดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ตัวอย่างละ 7 ไมโครลิตร โหลดดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน HyperLadder 25 bp (Bioline, Australia) 3 ไมโครลิตร รันผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วถ่ายภาพบันทึกผล

กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ



กรมวิชาการเกษตร

10) กระบวนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบและสภาวะการทำปฏิกิริยาสำหรับการตรวจสอบ *Cucumber mosaic virus* ในพริกด้วยเทคนิค Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification

1. การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างพริก

การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างพริกโดยใช้ชุดสกัด RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Taiwan) มีขั้นตอนดังนี้

1.1 บดใบพริก 100 มิลลิกรัม ในไนโตรเจนเหลวด้วยโกร่ง จนได้เป็นผงละเอียด จากนั้นถ่ายผงใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ RLT 450 ไมโครลิตร ลงในหลอด ผสมให้เข้ากัน

1.2 ดูดสารผสมที่ได้ใส่ลงในคอลัมน์ QIA shredder spin ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000xg ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที

1.3 ดูดของเหลวที่ผ่านคอลัมม์ออกมาใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมเอทานอล 96% ปริมาตรครึ่งเท่า ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดสารผสมใส่ในคอลัมน์ RNeasy Mini spin ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000xg ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วินาที

1.4 เติมบัฟเฟอร์ RW1 700 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000xg ที่อุณหภูมิห้อง 15 วินาที เทของเหลวทิ้ง

1.5 เติมบัฟเฟอร์ RPE 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ปั่นด้วยความเร็ว 8000x g ที่อุณหภูมิห้อง 15 วินาที เทของเหลวทิ้ง

1.6 เติมบัฟเฟอร์ RPE 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ปั่นด้วยความเร็ว 8000x g ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที เทของเหลวทิ้ง

1.7 นำคอลัมน์ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมน้ำปราศจาก RNase ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วินาที เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอ

1.8 นำส่วนของอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่ได้ไปเตรียม cDNA library ด้วย Superscript^{TM} III One-Step RT-PCR System with Platinum (Invitrogen, USA)

กรมวิชาการเกษตร

2. การตรวจสอบ *Cucumber mosaic virus*

ตรวจสอบยีน coat protein โดยใช้ไพรเมอร์ตามรายงานของ Han-Xin *et al*. (2004) ดังนี้

CMVF4-F : 5′-TTGAGTCGAGTCATGGACAAATC-3′

CMVF3-R : 5′-AACACGGAATCAGACTGGGAG-3′

Master mix

เตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Reagents	Final concentration	Volume (µl)
dH_2O	-	5
2x One step Mix	1x	10
20x RT-Rl Blend (biotechrabbit)	1x	1
10 µM CMVF4-F	0.5 µM	1
10 µM CMVF3-R	0.5 µM	1
RNA template	-	2
Total	-	20

PCR program

กำหนดอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

PCR steps	Temperature	Time	Number of cycles
cDNA synthesis	48°C	20 min	1 cycle
pre-denaturation	95°C	2 min	1 cycle
denaturation	95°C	20 sec	35 cycles
annealing	56°C	20 sec	
extension	72°C	1 min	
final extension	72°C	5 min	1 cycle

Gel electrophoresis

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 % ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วถ่ายภาพบันทึกผล

กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ

กรมวิชาการเกษตร

11) กระบวนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบและสภาวะการทำปฏิกิริยาสำหรับการตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas perforans* สาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR

1. การสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรีย *Xanthomonas perforans* บนอาหาร Wakimoto Potato semi-synthetic agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) ขั้นตอนตามแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.1 นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 1 ลูป ละลายในบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมด้วย Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.2 เติมด้วยบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.3 เติมด้วย absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน QIAamp Spin Column ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

1.4 เปลี่ยน collection tube ใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

1.5 เติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที

1.6 นำ QIAamp Spin Column ใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ แล้วเติมด้วยบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

กรมวิชาการเกษตร

2. การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas perforans* ด้วยเทคนิค PCR

วิธีที่ 1 ใช้คู่ไพรเมอร์ตามรายงานของ Koenraadt *et al*. (2009) ใน diagnostic protocol ของ EPPO (EPPO, 2013) ได้แก่

Bs-XpF : 5′-GTCGTGTTGATGGAGCGTTC-3′

Bs-XpR : 5′-GTGCGAGTCAATTATCAGAATGTGG-3′

<u>Master mix</u>

เตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Reagents	Final concentration	Volume (µl)
dH2O	-	9.5
2x One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan)	1x	12.5
10 µM Bs-XpF	0.4 µM	1
10 µM Bs-XpR	0.4 µM	1
DNA template	-	1
Total	-	25

<u>PCR program</u>

กำหนดอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

<table>
<tr><th>PCR steps</th><th>Temperature</th><th>Time</th><th>Number of cycles</th></tr>
<tr><td>initial denaturation</td><td>94°C</td><td>5 min</td><td>1 cycle</td></tr>
<tr><td>denaturation</td><td>94°C</td><td>30 sec</td><td rowspan="3">30 cycles</td></tr>
<tr><td>annealing</td><td>66°C</td><td>1 min</td></tr>
<tr><td>extension</td><td>72°C</td><td>1 min</td></tr>
<tr><td>final extension</td><td>72°C</td><td>7 min</td><td>1 cycle</td></tr>
</table>

<u>Gel electrophoresis</u>

นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 2% agarose ใน 0.5X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที โดยใช้ตัวอย่างที่ได้จากปฏิกิริยา 5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน Onemark 100 (GeneDirex® Inc., Taiwan) 6 ไมโครลิตร ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK) ถ่ายภาพบันทึกผล

กรมวิชาการเกษตร

วิธีที่ 2 ใช้คู่ไพรเมอร์ตามรายงานของ Burlakoti *et al.* (2018) ได้แก่

HpaF-f : 5′-GTGGCAGGCAGGCAATCGACG-3′

HpaF-r : 5′-CCGGCACGTCGACGCCTGGAAACC-3′

<u>Master mix</u>

เตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Reagents	Final concentration	Volume (μl)
dH2O	-	9.5
2x One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan)	1x	12.5
10 μM HpaF-f	0.4 μM	1
10 μM HpaF-r	0.4 μM	1
DNA template	-	1
Total	-	25

<u>PCR program</u>

กำหนดอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

PCR steps	Temperature	Time	Number of cycles
initial denaturation	94°C	5 min	1 cycle
denaturation	94°C	30 sec	
annealing	65°C	30 sec	10 cycles
extension	72°C	30 sec	
denaturation	94°C	30 sec	
annealing	58°C	30 sec	20 cycles
extension	72°C	30 sec	
final extension	72°C	10 min	1 cycle

<u>Gel electrophoresis</u>

นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 2% agarose ใน 0.5X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที โดยใช้ตัวอย่างที่ได้จากปฏิกิริยา 5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน Onemark 100 (GeneDirex® Inc., Taiwan) 6 ไมโครลิตร ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK) ถ่ายภาพบันทึกผล

กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

กรมวิชาการเกษตร

12) กระบวนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบและสภาวะการทำปฏิกิริยาสำหรับการตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas vesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดของพริกและมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR

1. การสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. บนอาหาร Wakimoto Potato semi-synthetic agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) ขั้นตอนตามแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.1 นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 1 ลูป ละลายในบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมด้วย Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.2 เติมด้วยบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.3 เติมด้วย absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน QIAamp Spin Column ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

1.4 เปลี่ยน collection tube ใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

1.5 เติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที

1.6 นำ QIAamp Spin Column ใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ แล้วเติมด้วยบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

กรมวิชาการเกษตร

2. การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas vesicatoria* ด้วยเทคนิค PCR

วิธีที่ 1 ใช้คู่ไพรเมอร์ตามรายงานของ Araújo *et al*. (2013) ได้แก่

Xv-gyrB-F : 5′-ATACGCGTTGGGCGAGCCT-3′

Xv-gyrB-R : 5′-CATCGCTGAAGATGGCCACGGCT-3′

<u>Master mix</u>

เตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Reagents	Final concentration	Volume (µl)
dH2O	-	9.5
2x One PCR Master Mix	1x	12.5
(GeneDirex® Inc., Taiwan)		
10 µM Xv-gyrB-F	0.4 µM	1
10 µM Xv-gyrB-R	0.4 µM	1
gyrB gene synthesis	-	1
Total	-	25

<u>PCR program</u>

กำหนดอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

PCR steps	Temperature	Time	Number of cycles
initial denaturation	95°C	5 min	1 cycle
denaturation	95°C	30 sec	30 cycles
annealing	68°C	30 sec	
extension	72°C	30 sec	
final extension	72°C	3 min	1 cycle

กรมวิชาการเกษตร

<u>Gel electrophoresis</u>

นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 2% agarose ใน 0.5X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที โดยใช้ตัวอย่างที่ได้จากปฏิกิริยา 5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน Onemark 100 (GeneDirex® Inc., Taiwan) 6 ไมโครลิตร ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK) ถ่ายภาพบันทึกผล

วิธีที่ 2 ใช้คู่ไพรเมอร์ตามรายงานของ Beran *et al.* (2015) ได้แก่

Xv1 : 5′-TGGGAAATCCATCGCACT-3′

Xv2 : 5′-TTGCCCTTGCCGTTCTCG-3′

<u>Master mix</u>

เตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Reagents	Final concentration	Volume (µl)
dH2O	-	9.5
2x One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan)	1x	12.5
10 µM Xv1	0.4 µM	1
10 µM Xv2	0.4 µM	1
atpD gene synthesis	-	1
Total	-	25

<u>PCR program</u>

กำหนดอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

PCR steps	Temperature	Time	Number of cycles
initial denaturation	94°C	5 min	1 cycle
denaturation	94°C	30 sec	30 cycles
annealing	69°C	40 sec	
extension	72°C	45 sec	
final extension	72°C	10 min	1 cycle

<u>Gel electrophoresis</u>

นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 2% agarose ใน 0.5X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที โดยใช้ตัวอย่างที่ได้จากปฏิกิริยา 5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน Onemark 100 (GeneDirex® Inc., Taiwan) 6 ไมโครลิตร ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK)

กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

กรมวิชาการเกษตร

13) กระบวนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบและสภาวะการทำปฏิกิริยาสำหรับการตรวจไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* ด้วยเทคนิค LAMP PCR และ Real-time PCR

1. การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างและการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *R. similis*

1. นำตัวอย่างพืชที่มีการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย *Radopholus* รวมทั้งวัสดุปลูกมาแยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่าง ดังนี้

<u>ตัวอย่างพืช</u> ตัดรากเป็นท่อนสั้นๆ ยาวประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร ห่อด้วยผ้ากรอง วางลงบนชุดกรวยแยกไส้เดือนฝอยนำไปใส่ในตู้พ่นหมอก (Mistifier) เก็บตัวอย่างน้ำที่มีไส้เดือนฝอยมาผ่านตะแกรงโลหะขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร เก็บตัวอย่างไส้เดือนไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์

<u>วัสดุปลูก</u> แยกไส้เดือนฝอยจากวัสดุปลูกโดยแช่วัสดุปลูกในน้ำนาน 24 ชั่วโมง แยกไส้เดือนฝอยโดยใช้ Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique กรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร วางบนตะแกรงที่มีขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างดินที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่างและนำตัวอย่างใส่ลงบนกระดาษกรองที่วางอยู่บนตะแกรงไนลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วเก็บน้ำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. นำไส้เดือนฝอย *Radopholus* ที่ตรวจพบมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในแคลลัสของรากอัลฟัลฟ่าในสภาพปลอดเชื้อ ตามวิธีการของ (Elsen *et al.*, 2001) โดยแช่เมล็ดอัลฟัลฟ่าใน H_2SO_4 นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง จากนั้นแช่ใน $HgCl_2$ (1,000 ppm ใน 30% ethanol) นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง นำเมล็ดไปเพาะใน check agar (10 g sucrose, 2 g yeast agar, 10 g agar, 1,000 ml water) เมื่อเมล็ดงอกมีรากยาวประมาณ 2 เซนติเมตร นำไปวางบน White's medium (White, 1963) ที่เติม 0.2 ppm α-NAA และ 2 ppm 2,4-D ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร จากนั้นทิ้งไว้ประมาณ 7-10 วัน เพื่อให้เกิดการสร้างแคลลัส จากนั้นนำตัวไส้เดือนฝอย *Radopholus* ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.1% w/v streptomycin sulfate ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อ 1 ตัวต่อจานเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้ประชากรบริสุทธิ์

3. การคงสภาพและทำสไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอย

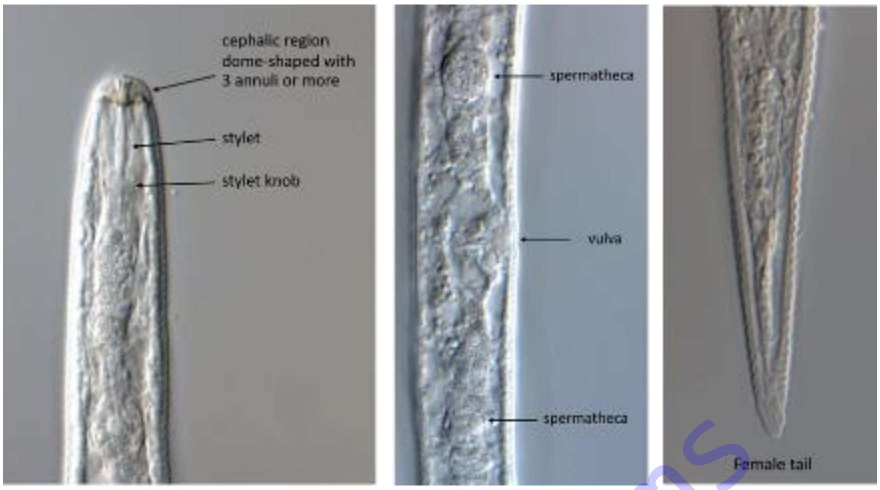
นำไส้เดือนฝอย *Radopholus* ที่เพาะเลี้ยงได้มาทำการคงสภาพ (fixing) ด้วย 4% formaldehyde ที่ 85 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้อย่างน้อย 48 ชั่วโมง เตรียม solution 1 (20 ml ethanol 96%, 1 ml glycerine, 79 ml distilled water) และ solution 2 (93 ml ethanol 96%, 7 ml glycerine) นำตัวไส้เดือนฝอยที่คงสภาพแล้วใส่ลงใน embryo dish แล้วเติม solution 1 นำ embryo dish ใส่ลงในกล่องพลาสติก superlock เติม ethanol 96% ลงในกล่องสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร ปิดฝากล่องแล้วใส่ใน incubator ที่ 40 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ดูด solution 1 ออก ภายใต้กล้องกำลังขยายต่ำ แล้วใส่ solution 2 ลงใน embryo dish จากนั้นนำไปใส่ในจานเลี้ยงเชื้อแล้วปิดฝา นำไปใส่ใน incubator ที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นใส่ dehydrated glycerine ลงใน embryo dish 2 หยด นำ embryo dish ไปเก็บในโถดูดความชื้น เก็บรักษาไส้เดือนฝอยไว้สำหรับนำไปทำสไลด์ถาวรต่อไป

4. การจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา

นำไส้เดือนฝอยที่ได้ทำสไลด์ถาวรแล้วมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานเพื่อจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอย *Radopholus* โดยใช้วิธีการจำแนกจาก EPPO PM 7/88 (1) และแนวทางการจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทาง

กรมวิชาการเกษตร

สัณฐานของ Ryss (2003) โดยไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* มีลักษณะที่สำคัญคือ spermatheca มี rod-like sperm cells อยู่ภายใน spermathecae ทั้ง 2 ข้างมีขนาดเท่ากัน lobe ของ stylet knobs มีขนาดเท่ากัน ปลายหาง annulated lateral field มี lateral lines 4 เส้น แถบ lateral fields มีขนาดเท่ากัน cephalic region มีลักษณะ dome-shaped มี 3 annuli หรือมากกว่า หางลักษณะ conical lateral field ระหว่าง phasmid และปลายหาง มี lateral lines 3 เส้น



2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใช้วิธีการตาม Schizas *et al.* (1997) ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ โดยมีขั้นตอนดังนี้

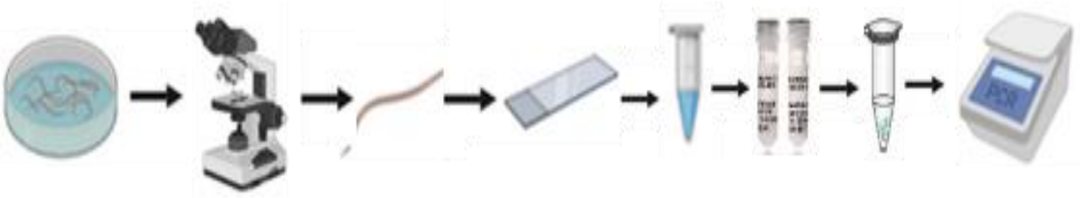
1. เขี่ยไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงบนหยด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 20 ไมโครลิตร บนสไลด์แก้ว ตัดตัวไส้เดือนฝอยออกเป็น 2-3 ท่อน โดยใช้ส่วนปลายของ pipette tip

2. ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 500 ไมโครลิตร นำหลอดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ $70^{\circ}C$ นาน 10 นาที

3. เติม proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดและบ่มที่ $55^{\circ}C$ ใน water bath นาน 3 ชั่วโมง

4. นำหลอดใส่ใน heating block ที่อุณหภูมิ $100^{\circ}C$ 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของ proteinase K

5. ใส่ GeneReleaser® 20 ไมโครลิตร ลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟนาน 6 นาที ปั่นเหวี่ยง แล้วเก็บส่วนใส



กรมวิชาการเกษตร

3. การตรวจยืนยันชนิดของไส้เดือนฝอย *R. similis* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานและวิธี PCR

ตรวจยืนยันชนิดของไส้เดือนฝอย *R. similis* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน (Ryss, 2003) และวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะ RsimF/RsimR ตามรายงานของ Ravindran *et al*. (2011) ได้แก่

RsimF : 5′-GATTCCGTCCTTTG GTGGGCA-3′

RsimR : 5′-GAACCAGGCGTGCCAGAGG-3′

<u>Master mix</u>

เตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Reagents	Final concentration	Volume (µl)
dH2O	-	9.5
2x GoTaq® Green Master Mix	1x	12.5
(Promega Inc., USA)		
10 µM RsimF	0.4 µM	1
10 µM RsimR	0.4 µM	1
DNA template	-	1
Total	-	25

<u>PCR program</u>

กำหนดอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

PCR steps	Temperature	Time	Number of cycles
initial denaturation	94°C	2 min	1 cycle
denaturation	94°C	30 sec	35 cycles
annealing	55°C	1 min	
extension	72°C	1 min	
final extension	72°C	10 min	1 cycle

<u>Gel electrophoresis</u>

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 2% agarose ใน 0.5X TBE ผสม Gel star 5 ไมโครลิตร ต่อการเตรียมอะกาโรสเจล 50 มิลลิลิตร ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ใส่ตัวอย่างที่ได้จากปฏิกิริยา 5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 6 ไมโครลิตร ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วถ่ายภาพบันทึกผล

กรมวิชาการเกษตร

กระบวนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบและสภาวะการทำปฏิกิริยาสำหรับการตรวจไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* ด้วยเทคนิค LAMP PCR และ Real-time PCR

แยกไส้เดือนฝอย *Radopholus*

แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างพืช

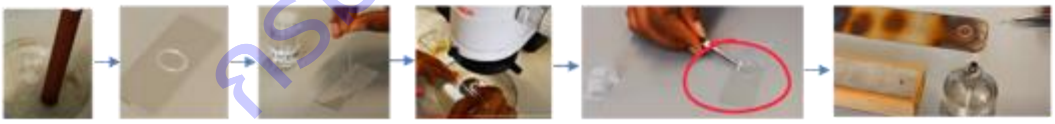
ตัดรากเป็นท่อนสั้นๆ ยาวประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร ห่อด้วยผ้ากรอง วางลงบนชุดกรวยแยกไส้เดือนฝอยนำไปใส่ในตู้พ่นหมอก (Mistifier)

แยกไส้เดือนฝอยจากวัสดุปลูก

แยกไส้เดือนฝอยโดยใช้ Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique

เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอย *Radopholus* ในแคลลัสของรากอัลฟัลฟ่าในสภาพปลอดเชื้อ

คงสภาพและทำสไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอย



ศึกษาลักษณะทางสัณฐานเพื่อจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอย *Radopholus*

กรมวิชาการเกษตร

14) กระบวนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบและสภาวะการทำปฏิกิริยาสำหรับการตรวจสอบเชื้อรา *Trichoderma asperellum* ด้วยเทคนิค PCR

1. การแยกเชื้อรา *Trichoderma asperellum* ให้บริสุทธิ์

เลี้ยงเชื้อรา *T. asperellum* บนอาหาร PDA แล้วแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation โดยมีขั้นตอนดังนี้

a. ตักสปอร์จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อรา *Trichoderma* อยู่ ประมาณ 1 ลูป ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออยู่ 10 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้สปอร์กระจายอย่างสม่ำเสมอ

b. ดูดเอาสารละลายที่มีสปอร์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออยู่ 10 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้สปอร์กระจายอย่างสม่ำเสมอ

c. ทำซ้ำในข้อ 1.2 อีก 2 ครั้ง

d. ดูดสารละลายนำไปหยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทำการ spread plate โดยหน้าของอาหารควรมีลักษณะแห้ง บ่มที่อุณหภูมิห้องหรือประมาณ 27 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องคว่ำหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

e. ตรวจการเจริญของเชื้อนาน 7-21 วัน เมื่อพบเชื้อราเจริญออกมาเป็นโคโลนีเดี่ยว ให้ย้ายเชื้อราลงบนอาหาร PDA หากไม่มีการปนเปื้อนสามารถดำเนินการสกัดดีเอ็นเอได้ และนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เพื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ PureDireX® Genomic DNA Isolation Kit ร่วมกับวิธีการของ Doungsa-ard *et al.* (2015) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.1 เติม micro glass beads ขนาด 0.5 มิลลิเมตร ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 2.0 มิลลิลิตร ประมาณ 0.2 กรัม

2.2 เติม Trichoderma enzyme ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ปริมาณ 8 ไมโครลิตร ลงในหลอดจากข้อ 2.1 จากนั้นเติม cell lysis solution (Buffer CC) ปริมาณ 350 ไมโครลิตร

2.3 เขี่ยเส้นใยของเชื้อราที่เลี้ยงให้บริสุทธิ์โดยวิธี single spore isolation บน PDA แล้วย้ายลงในหลอดจากข้อ 2.2 บ่มหลอดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 4-12 ชั่วโมง

2.4 จากนั้นนำมาเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที จำนวน 3-4 ครั้ง

2.5 ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที

2.6 เติม Buffer CB ปริมาณ 400 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อให้สารเข้ากัน จากนั้นนำหลอดไปพักไว้ ที่อุณภูมิ 4 องศาสเซลเซียส อย่างน้อย 1 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนโปรตีน

2.7 นำหลอดมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที

2.8 ดูดเฉพาะส่วนใสที่อยู่ด้านบน (supernatant) ค่อยๆ หยดลงใน Column CC ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 2 มิลลิลิตร (หลอดใหม่)

กรมวิชาการเกษตร

2.9 นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่านคอลัมน์ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 10,000 x g นาน 1 นาที

2.10 เทสารสะลายที่กรองผ่าน Column CC ทิ้ง และนำ Column CC ใส่กลับไปยังหลอดเดิม

2.11 เติมสารละลาย Buffer W1 ปริมาณ 400 ไมโครลิตร โดยค่อยๆ หยดลงใน Column CC

2.12 นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่านคอลัมน์ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที

2.13 เทสารสะลายที่กรองผ่าน Column CC ทิ้ง และนำ Column CC ใส่กลับไปยังหลอดเดิม

2.14 เติมสารละลาย Buffer W2 ปริมาณ 600 ไมโครลิตร โดยค่อยๆ หยดลงใน Column CC

2.15 นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่านคอลัมน์ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที

2.16 เทสารสะลายที่กรองผ่าน Column CC ทิ้ง และนำ Column CC ใส่กลับไปยังหลอดเดิม

2.17 นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่านคอลัมน์ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 2 นาที

2.18 ย้าย Column CC ไปบรรจุลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.19 เติมสารละลาย Solution BE ปริมาณ 50 ไมโครลิตร โดยค่อยๆ หยดลงใน Column CC โดยระวังไม่ให้ปลาย tip โดนด้านข้างของคอลัมน์ และให้ปลาย tip ใกล้กับ filter membrane

2.20 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที

2.21 นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่านคอลัมน์ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 2 นาที

2.22 เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

3. การตรวจสอบชนิดของเชื้อรา *Trichoderma asperellum*

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ the Internal Transcribed Spacer (ITS) the translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) และ RNA-polymerase subunit 2 (*rpb2*) ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.1 ตำแหน่งยีน the Internal Transcribed Spacer (ITS) ตามรายงานของ White *et al*. (1990) ใช้ไพรเมอร์ ได้แก่

ITS1 : 5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′

ITS4 : 5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′

กรมวิชาการเกษตร

Master mix

เตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Reagents	Final concentration	Volume (µl)
dH2O	-	9.5
2x Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™)	1x	12.5
10 µM ITS1	0.4 µM	1
10 µM ITS4	0.4 µM	1
DNA template	-	1
Total	-	25

PCR program

กำหนดอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

PCR steps	Temperature	Time	Number of cycles
initial denaturation	95°C	5 min	1 cycle
denaturation	95°C	30 sec	
annealing	56°C	30 sec	35 cycles
extension	72°C	45 sec	
final extension	72°C	5 min	1 cycle

Gel electrophoresis

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer)

3.2 ตำแหน่งยีน the translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) ตามรายงานของ Carbone and Kohn (1999) ใช้ไพรเมอร์ ได้แก่

EF1-728F : 5′-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3′

EF1-986R : 5′-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3′

กรมวิชาการเกษตร

Master mix

เตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Reagents	Final concentration	Volume (µl)
dH_2O	-	9.5
2x Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™)	1x	12.5
10 µM EF1-728F	0.4 µM	1
10 µM EF1-986R	0.4 µM	1
DNA template	-	1
Total	-	25

PCR program

กำหนดอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

PCR steps	Temperature	Time	Number of cycles
initial denaturation	95°C	5 min	1 cycle
denaturation	95°C	30 sec	
annealing	56°C	30 sec	35 cycles
extension	72°C	45 sec	
final extension	72°C	5 min	1 cycle

กรมวิชาการเกษตร

Gel electrophoresis

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer)

3.3 ตำแหน่งยีน RNA-polymerase subunit 2 (*rpb2*) ใช้ไพรเมอร์ตามรายงานของ Liu *et al.* (1999)

fRPB2-5F : 5′-GA(T/C)GA(T/C)(A/C)G(A/T)GATCA(T/C)TT(T/C)GG-3′

fRPB2-7cR : 5′-CCCAT(A/G)GCTTG(T/C)TT(A/G)CCCAT-3′

Master mix

เตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Reagents	Final concentration	Volume (µl)
dH2O	-	9.5
2x Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™)	1x	12.5
10 µM fRPB2-5F	0.4 µM	1
10 µM fRPB2-7cR	0.4 µM	1
DNA template	-	1
Total	-	25

PCR program

กำหนดอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

PCR steps	Temperature	Time	Number of cycles
initial denaturation	95°C	5 min	1 cycle
denaturation	95°C	30 sec	35 cycles
annealing	56°C	30 sec	
extension	72°C	45 sec	
final extension	72°C	5 min	1 cycle

Gel electrophoresis

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer)

กรมวิชาการเกษตร

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

1. ส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกันด้วยโปรแกรม Geneious Prime 2020 (Kearse *et al.*, 2012)

2. บันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของเชื้อราที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

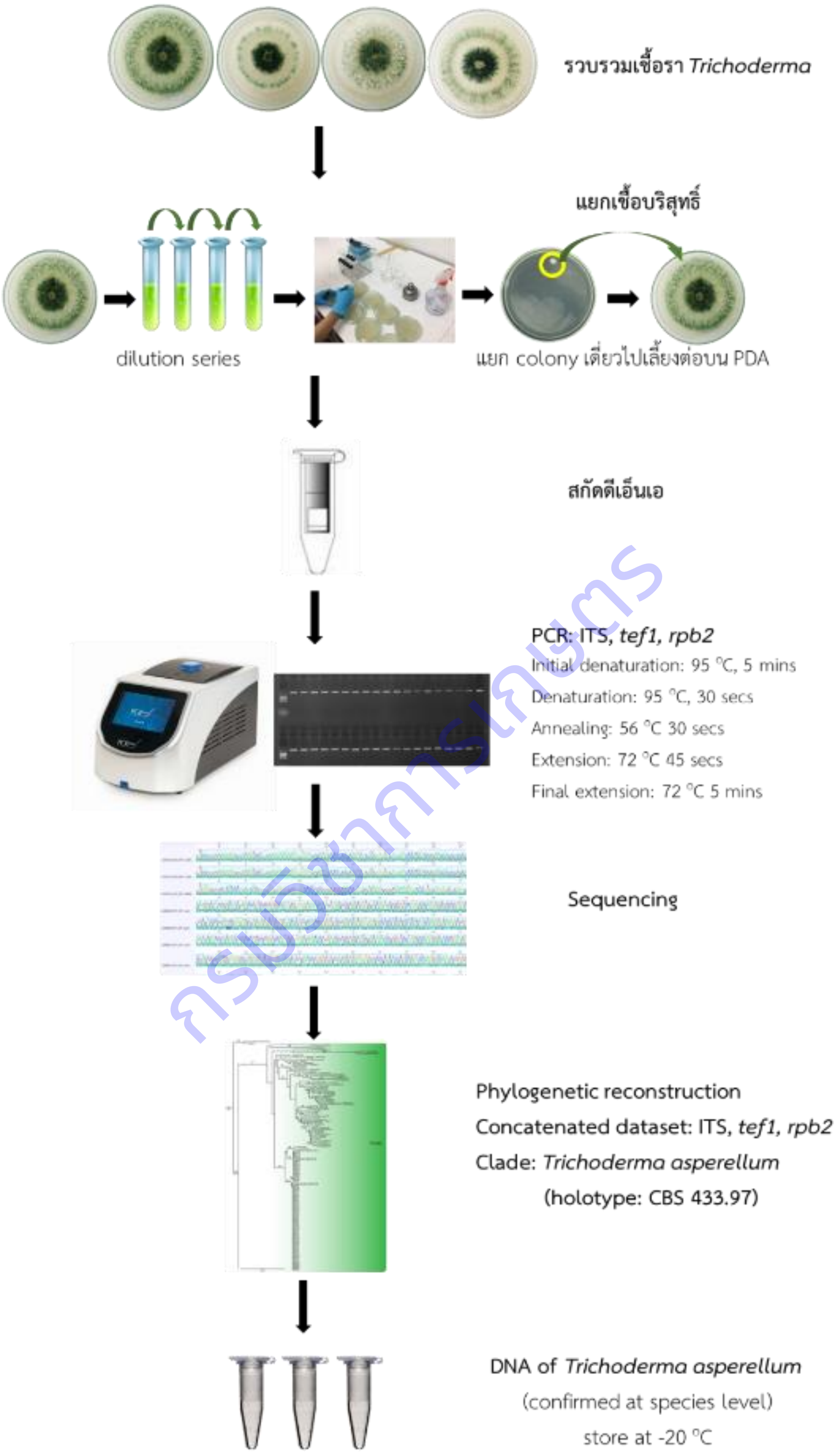
3. รวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง ITS *tef1* และ *rpb2* ของเชื้อราใน genus *Trichoderma* โดยเฉพาะกลุ่มของ *T. asperellum* complex ที่มีใน GenBank รวมถึง type sequence เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งวิเคราะห์

4. นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง ITS *tef1* และ *rpb2* ที่ได้จากการส่งวิเคราะห์และจากการรวบรวมข้อมูลมาจัดเรียงด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Katoh and Toh, 2008) จากนั้นตรวจสอบการจัดเรียง (alignment) โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 (Kumar *et al.*, 2016)

5. วิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดด้วยวิธี phylogenetic reconstruction เปรียบเทียบกับ type sequence โดยเฉพาะในกลุ่มของ *T. asperellum* complex ซึ่งประกอบด้วย *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. kunmingense*, *T. pseudoasperelloides*, *T. yunnanense* จำแนกเชื้อราไอโซเลตที่ปรากฏใน clade เดียวกับ holotype sequence ของเชื้อรา *T. asperellum* CBS 433.97

6. เก็บรักษาเชื้อราไอโซเลตที่ได้รับการจำแนกและยืนยันชนิดเชื้อรา *T. asperellum* ไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาขั้นต่อไป

กรมวิชาการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

15) กระบวนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบและสภาวะการทำปฏิกิริยาของเทคนิค PCR Multiplex PCR LAMP ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย Trichoderma asperellum และ Metarhizium anisopliae

1. การแยกเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ให้บริสุทธิ์

เลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* บนอาหาร PDA แล้วแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation โดยการย้ายสปอร์เดี่ยวของเชื้อรา *M. anisopliae* เลี้ยงลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน หากไม่มีการปนเปื้อนสามารถดำเนินการสกัดดีเอ็นเอได้ โดยเชื้อที่เจริญจากสปอร์เดี่ยวจะทำการแยกเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

2. การสกัดดีเอ็นเอ

2.1 เตรียมสปอร์แขวนลอย (spore suspension) โดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อราเจริญอยู่ แล้วขูดผิวหน้าด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล ดูดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา ใส่ในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มไว้พร้อมเขย่าเป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง

2.2 ทำการกรองเส้นใยด้วยเครื่อง vacuum pump และล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 300 มิลลิลิตร เก็บเส้นใยที่กรองได้ในแผ่นกระดาษกรอง Whatman No.1 นำไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry (lyophilization) เป็นเวลา 14-18 ชั่วโมง และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 สกัดดีเอ็นเอดัดแปลงจาก Zimand *et al*. (1994)

3. การตรวจสอบชนิดของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae*

ตรวจยืนยันชนิดของเชื้อรา *M. anisopliae* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณ ITS (internal transcribed spacer) ribosomal DNA, 28S rDNA (LSU) และ RPB2 ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.1 ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) ribosomal DNA ใช้ไพรเมอร์ตามรายงานของ White *et al*. (1990) ได้แก่

ITS5 : 5′- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3′

ITS4 : 5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′

กรมวิชาการเกษตร

Master mix

เตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Reagents	Final concentration	Volume (µl)
dH_2O	-	10.3
10x buffer	1x	2.5
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	2.5
2 mM dNTPs	0.2 mM	2.5
10 µM ITS5	10 µM	1
10 µM ITS4	10 µM	1
Taq DNA polymerase	1 u	0.2
DNA template	-	5
Total	-	25

PCR program

กำหนดอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

PCR steps	Temperature	Time	Number of cycles
initial denaturation	$94^{\circ}C$	3 min	1 cycle
denaturation	$94^{\circ}C$	1 min	
annealing	$51.5^{\circ}C$	30 sec	35 cycles
extension	$72^{\circ}C$	2 min	
final extension	$72^{\circ}C$	10 min	1 cycle

Gel electrophoresis

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 5, 2 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Tris-borate-EDTA buffer (TBE buffer)

3.2 ตำแหน่ง 28S rDNA (LSU) ใช้ไพรเมอร์ตามรายงานของ Kurtzman *et al*. (1997) ได้แก่

NL1 : 5′-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG -3′

NL4 : 5′-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3′

กรมวิชาการเกษตร

Master mix

เตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Reagents	Final concentration	Volume (µl)
dH_2O	-	10.3
10x buffer	1x	2.5
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	2.5
2 mM dNTPs	0.2 mM	2.5
10 µM NL1	10 µM	1
10 µM NL4	10 µM	1
Taq DNA polymerase	1 u	0.2
DNA template	-	5
Total	-	25

PCR program

กำหนดอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

PCR steps	Temperature	Time	Number of cycles
initial denaturation	94°C	3 min	1 cycle
denaturation	94°C	1 min	
annealing	51.5°C	30 sec	35 cycles
extension	72°C	2 min	
final extension	72°C	10 min	1 cycle

กรมวิชาการเกษตร

Gel electrophoresis

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 5, 2 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Tris-borate-EDTA buffer (TBE buffer)

3.3 ตำแหน่ง Second largest subunit of RNA polymerase II (RPB2) ใช้ไพรเมอร์ตามรายงานของ Liu *et* al. (1999) และ O'Donnell *et* al. (2007) ได้แก่

RPB2-5F3 : 5′-GACGACCGTGATCACTTTGG-3′

RPB2-7Cr2 : 5′-CCCATGGCCTGTTTGCCCAT-3′

Master mix

เตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Reagents	Final concentration	Volume (µl)
dH_2O	-	10.3
10x buffer	1x	2.5
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	2.5
2 mM dNTPs	0.2 mM	2.5
10 µM RPB2-5F3	10 µM	1
10 µM RPB2-7Cr2	10 µM	1
Taq DNA polymerase	1 u	0.2
DNA template	-	5
Total	-	25

PCR program

กำหนดอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

PCR steps	Temperature	Time	Number of cycles
initial denaturation	94°C	3 min	1 cycle
denaturation	94°C	1 min	
annealing	51.5°C	30 sec	35 cycles
extension	72°C	2 min	
final extension	72°C	10 min	1 cycle

กรมวิชาการเกษตร

Gel electrophoresis

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 5, 2 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Tris-borate-EDTA buffer (TBE buffer)

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

1. ทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ด้วย Microspin S-400 HR column แล้วส่งไปยังบริษัท Macrogen Korea เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

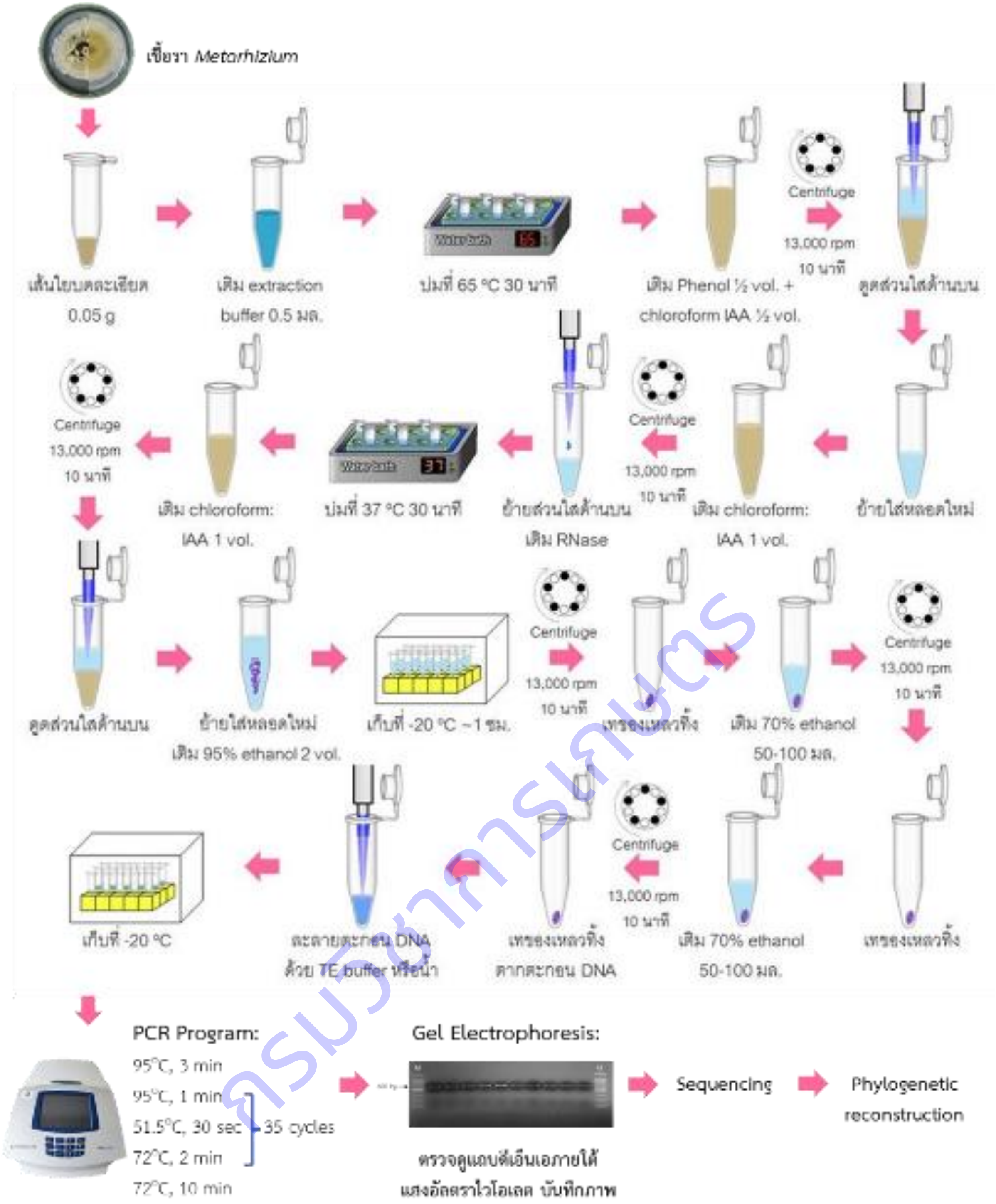
2. นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน

3. บันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

4. รวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง ITS (internal transcribed spacer) ribosomal DNA, 28S rDNA (LSU) และ RPB2 ของเชื้อราใน genus *Metarhizium* ที่มีใน GenBank รวมถึง type sequence เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งวิเคราะห์

5. นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง ITS (internal transcribed spacer) ribosomal DNA, 28S rDNA (LSU) และ RPB2 ที่ได้จากการส่งวิเคราะห์และจากการรวบรวมมาจัดเรียง (alignment) โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MrBayes v. 3.2.7a (Ronquist *et al.,* 2012)

กรมวิชาการเกษตร



เชื้อรา Metarhizium
เส้นใยบดละเอียด 0.05 g
เติม extraction buffer 0.5 มล.
บ่มที่ 65 °C 30 นาที
เติม Phenol ½ vol. + chloroform IAA ½ vol.
Centrifuge 13,000 rpm 10 นาที
ดูดส่วนใสด้านบน
ย้ายใส่หลอดใหม่
เติม chloroform: IAA 1 vol.
Centrifuge 13,000 rpm 10 นาที
ย้ายส่วนใสด้านบน เติม RNase
บ่มที่ 37 °C 30 นาที
เติม chloroform: IAA 1 vol.
Centrifuge 13,000 rpm 10 นาที
ดูดส่วนใสด้านบน
ย้ายใส่หลอดใหม่ เติม 95% ethanol 2 vol.
เก็บที่ -20 °C ~1 ชม.
Centrifuge 13,000 rpm 10 นาที
เทของเหลวทิ้ง
เติม 70% ethanol 50-100 มล.
Centrifuge 13,000 rpm 10 นาที
เทของเหลวทิ้ง
เติม 70% ethanol 50-100 มล.
Centrifuge 13,000 rpm 10 นาที
เทของเหลวทิ้ง ตากตะกอน DNA
ละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer หรือน้ำ
เก็บที่ -20 °C
PCR Program:
95°C, 3 min
95°C, 1 min
51.5°C, 30 sec
72°C, 2 min
35 cycles
72°C, 10 min
Gel Electrophoresis:
ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้ แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกภาพ
Sequencing
Phylogenetic reconstruction

16) **กระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้อสัมพัทธ์ที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลมะละกอพันธุ์แขกดำและแขกนวล**

กระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้อสัมพัทธ์ที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลมะละกอ

มะละกอ

ให้ความร้อนกับผลมะละกอด้วยวิธีอบอากาศร้อนด้วยความชื้นสัมพัทธ์ 56 – 65% จนกระทั่งอุณหภูมิภายในผลเพิ่มขึ้นถึง 43 °C

ปรับเปลี่ยนเป็นวิธีอบไอน้ำ โดยเพิ่มระดับความชื้นภายในตู้อบไอน้ำที่ระดับมากกว่า 90%

สามารถอบผลมะละกอที่ระดับความชื้นมากกว่า 90% อุณหภูมิภายในสุดของผล 46 °C ได้นานถึง 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 47 และ 48 °C ได้นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง โดยไม่ส่งผลต่อความเสียหายของคุณภาพผลมะละกอ

นำข้อมูลอุณหภูมิและความชื้นที่ได้จากกระบวนการนี้ไปใช้ในการศึกษาด้านการกำจัดแมลงวันผลไม้ Bactrocera dorsalis ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในผลมะละกอ

กรมวิชาการเกษตร

17) **กระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลมะม่วงพันธุ์มันเดือนเก้า น้ำดอกไม้มัน แดงจักรพรรดิ และอกร่อง**

กระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้อสัมพัทธ์ที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลมะม่วง

↓

มะม่วง

↓

ให้ความร้อนกับผลมะม่วงด้วยวิธีอบอากาศร้อนด้วยความชื้นสัมพัทธ์ 56 – 65% จนกระทั่งอุณหภูมิภายในผลเพิ่มขึ้นถึง 43 °C

↓

ปรับเปลี่ยนเป็นวิธีอบไอน้ำ โดยเพิ่มระดับความชื้นภายในตู้อบไอน้ำที่ระดับมากกว่า 90%

↓

สามารถอบผลมะม่วงที่ระดับความชื้นมากกว่า 90% อุณหภูมิภายในสุดของผล 46 และ 47 °C ได้นานถึง 2 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 48 °C ได้นาน 1 ชั่วโมง โดยไม่ส่งผลต่อความเสียหายของคุณภาพผลมะม่วง

↓

นำข้อมูลอุณหภูมิและความชื้นที่ได้จากกระบวนการนี้ไปใช้ในการศึกษาด้านการกำจัดแมลงวันผลไม้ Bactrocera dorsalis ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในผลมะละกอ

กรมวิชาการเกษตร

18) กระบวนการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดโดยใช้สารป้องกันกำจัดแมลง ประเภทใช้ทางดิน (คลุกเมล็ดพันธุ์หรือใช้ราดต้น)

เตรียมแปลงปลูกข้าวโพดหวานในสภาพไร่

↓

ดำเนินการคลุกเมล็ดพันธุ์/ผสมน้ำราดต้น ด้วยสารป้องกันกำจัดแมลงตามกรรมวิธีเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดกับกรรมวิธีใช้สารเปรียบเทียบและกรรมวิธีไม่ใช้สารป้องกันกำจัดแมลง โดยประเมินจากเปอร์การเข้าทำลาย

↓

ได้สารป้องกันกำจัดแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดหวาน ได้แก่ สาร cyantraniliprole 24%+thiamethoxam 24%FS อัตรา 8 มล./เมล็ดพันธุ์ 1 กก., chlorantraniliprole 62.5%FS อัตรา 9 มล./เมล็ดพันธุ์ 1 กก., cyantraniliprole 20%SC ผสมสารอัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร ราดต้นข้าวโพด อัตรา 10 มล./ต้น (ราดสารที่ 3 วันหลังข้าวโพดงอก) และ cyantraniliprole 20%SC อัตรา 20 มล./เมล็ดพันธุ์ 1 กก. (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

กรมวิชาการเกษตร

19) กระบวนการจัดการหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดโดยใช้ไวรัส SfNPV ร่วมกับสารป้องกันกำจัดแมลง

เก็บหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในธรรมชาติ
มาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการ

เพิ่มปริมาณหนอนกระทู้ข้าวโพดลาย
จุดในสภาพห้องปฏิบัติการ

ผลิตพ่อแม่พันธุ์
หนอนกระทู้ข้าวโพด

ผลิตไวรัส SfNPV

ศึกษาประสิทธิภาพการควบคุม
หนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดด้วย
สารกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ หลังจากที่
หนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดกิน SfNPV
เข้าไปก่อนแล้วเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ศึกษาประสิทธิภาพการควบคุมหนอน
กระทู้ข้าวโพดลายจุดด้วยสารกำจัด
แมลงชนิดต่าง ๆ ที่ผสมกับ SfNPV

ได้กรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพ 4 กรรมวิธี
ได้แก่ กรรมวิธี SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + chlorantraniliprole 5.17%W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร, SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + cypermethrin 35% W/V EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร, SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + flubendiamide 20 % WG อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร, SfNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร + deltamethrin 3 % W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

ทดสอบในสภาพไร่
ศึกษารูปแบบการใช้ไวรัส SfNPV ร่วมกับการใช้สารป้องกันกำจัดแมลงที่มีประสิทธิภาพ ทั้ง 4 กรรมวิธี เปรียบเทียบกับการใช้ไวรัส SfNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และไม่ใช้สารป้องกันกำจัดแมลง

กรมวิชาการเกษตร

20) กระบวนการจำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ในระดับ forma specialis

เก็บตัวอย่างจากต้นที่แสดงอาการ

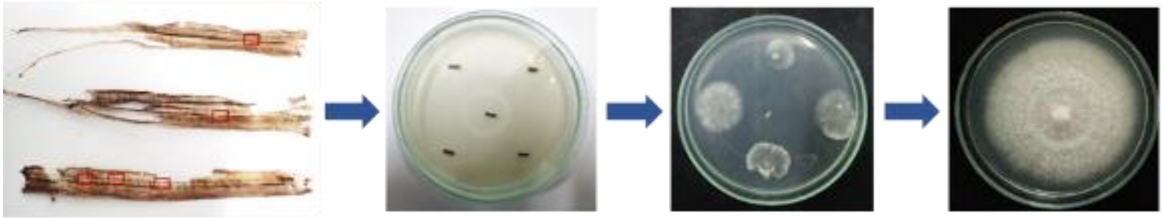
เฉือนเก็บเนื้อเยื่อที่มีสีน้ำตาลโดยเฉือนเป็นเส้นบางๆ

นำไปซับให้แห้งเพื่อลดความชื้น

1. เก็บตัวอย่างจากต้นที่แสดงอาการเหี่ยว โดยเก็บจากส่วนลำต้น (pseudostem) เลือกตัดตัวอย่างเพื่อการวินิจฉัยบริเวณใกล้โคนต้นและแกนกลางลำต้นให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ ควรหลีกเลี่ยงส่วนหรือบริเวณที่มีอาการที่เน่าเสีย อาจเจาะตัด เฉพาะกาบนอกโดยไม่จำเป็นต้องตัดทั้งต้น หรืออาจเฉือนลึกลงไปเพื่อเก็บตัวอย่าง
2. เก็บตัวอย่างภายในลำต้นบริเวณที่มีการเปลี่ยนสีแบบสม่ำเสมอ (continuous discoloration) ซึ่งเป็นลักษณะจากการเข้าทำลายของเชื้อ Foc และจะมีเชื้อ Foc เจริญอยู่ ซึ่งหากนำมาแยกเชื้อหรือตรวจสอบจะเพิ่มโอกาสในการตรวจพบ เนื้อเยื่อส่วนที่มีสีไม่สม่ำเสมอ อาจเกิดจากสาเหตุอื่น ที่ไม่ได้เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา Foc เช่น การเข้าทำลายของแมลง
3. ตัดตัวอย่างหรือฉีกตัวอย่างตามแนวยาวเป็นเส้นเล็ก ๆ แล้วทับด้วยกระดาษหรือกระดาษทิชชูสำหรับซับน้ำมันที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว หากสามารถฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย alcohol 70% ก่อนทับให้แห้งจะช่วยเพิ่มหรือรักษาคุณภาพของตัวอย่างจากการเจริญของเชื้อปนเปื้อนอื่น ๆ
4. ให้ตัวอย่างแห้งที่อุณหภูมิห้อง (หลีกเลี่ยงอุณหภูมิสูง) ไม่ซ้อนทับตัวอย่างหลาย ๆ ชั้น เพราะจะทำให้เกิดการปนเปื้อนเนื่องจากความชื้น
5. หากต้องการเปลี่ยนกระดาษซับต้องใช้กระดาษที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และเปลี่ยนอย่างน้อย 2-3 ครั้ง
6. บรรจุตัวอย่างที่แห้งแล้วลงซองกระดาษหรือซองจดหมายชนิดไม่เคลือบมัน

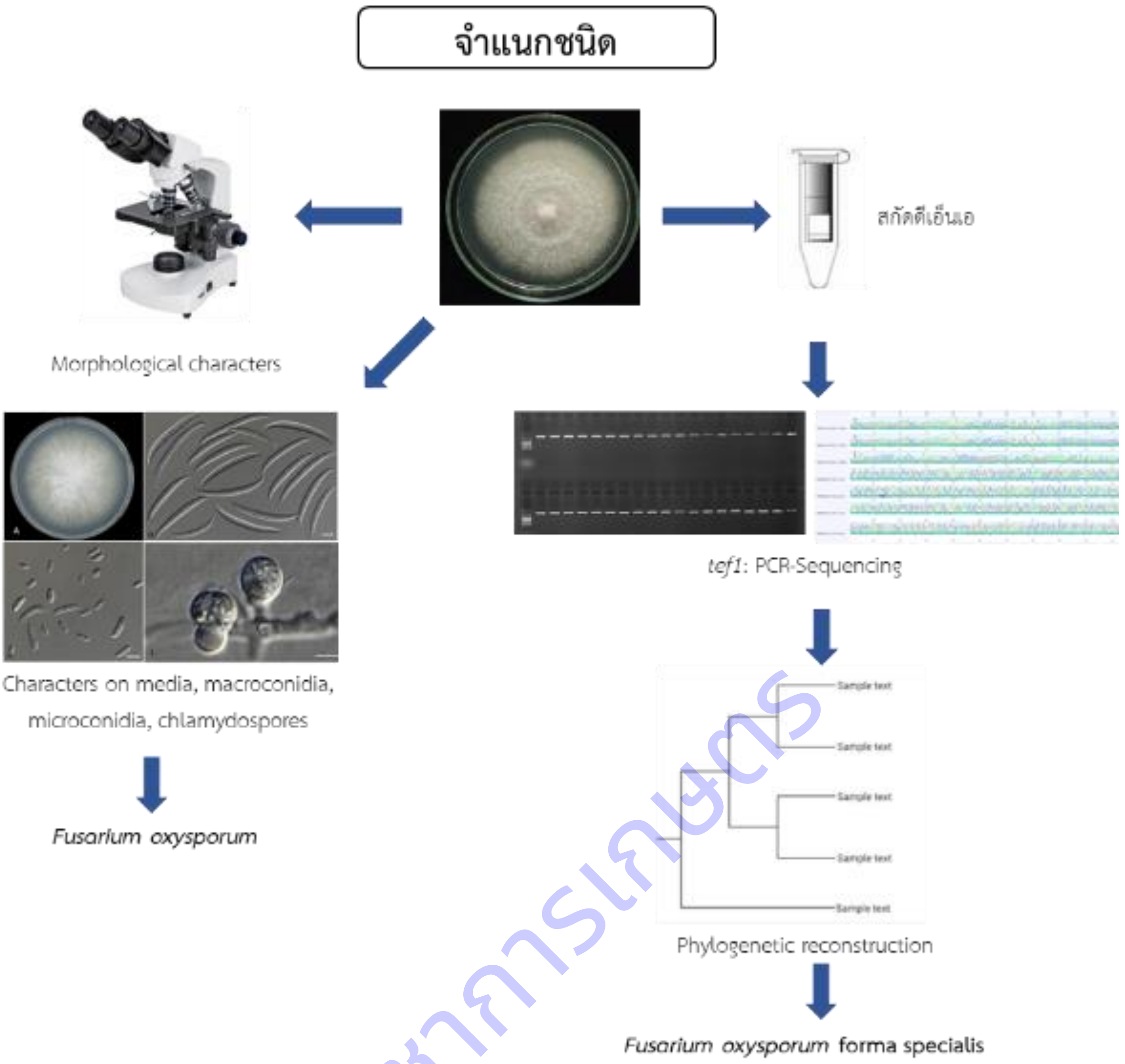
กรมวิชาการเกษตร

แยกเชื้อ



1. แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplant โดยนำส่วนของตัวอย่างเนื้อเยื่อต้นกล้วยมาตัดเป็นสี่เหลี่ยมชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 0.5x0.5 มิลลิเมตร โดยให้มีส่วนเส้นสีน้ำตาลแดงที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ
2. นำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ มาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ 1 % เป็นเวลา 1 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
3. นำชิ้นส่วนของตัวอย่าง วางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ half-Potato Dextrose Agar (1/2 PDA) โดยหน้าของอาหารควรมีลักษณะแห้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง หรือประมาณ 27 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องคว่ำหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. หมั่นตรวจการเจริญของเชื้อ จะพบเชื้อเจริญออกมาจากเนื้อเยื่อที่ประมาณ ประมาณ 2-3 วัน และสำหรับตัวอย่างแห้งจะใช้ระยะเวลาที่นานกว่า ขึ้นกับการรอดชีวิตของเชื้อราในตัวอย่าง เมื่อพบการเจริญของเชื้อทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เพื่อนำแยกเชื้อแบบ single spore ต่อไป

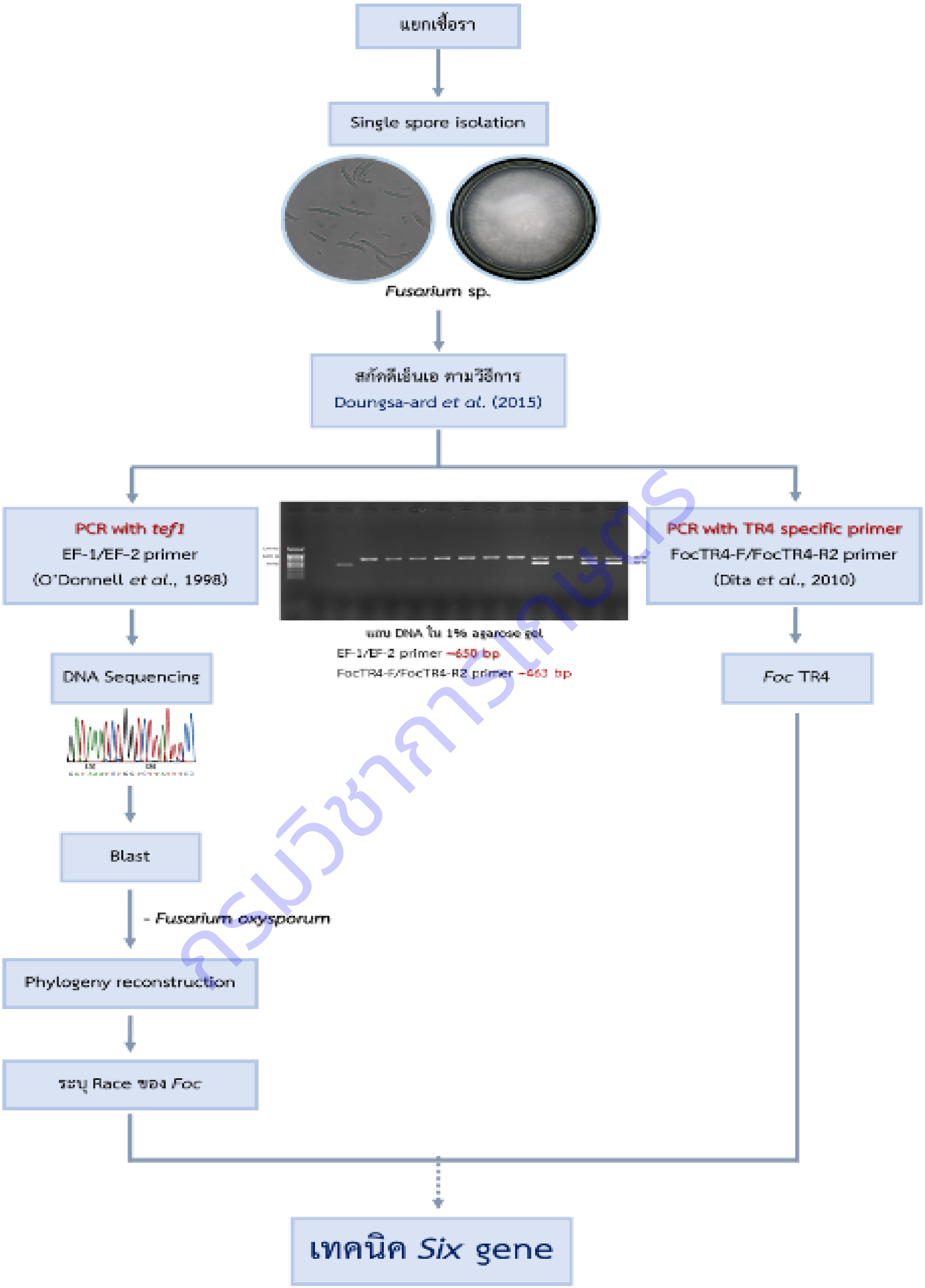
กรมวิชาการเกษตร



กรมวิชาการเกษตร

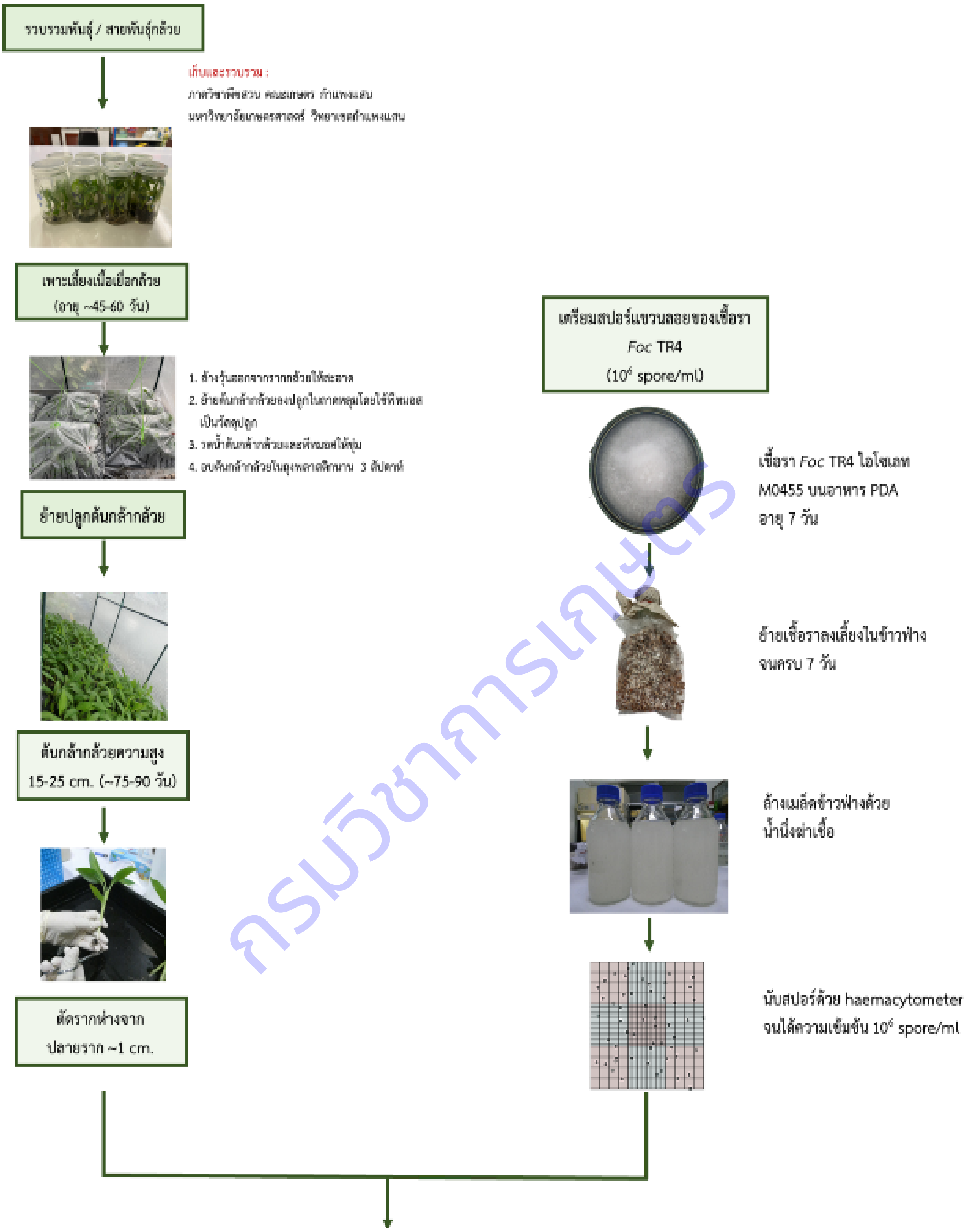
1. ศึกษาด้วยรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ conidiophore macroconidia microconidia chlamydospores ขนาด สี และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อรา เปรียบเทียบกับคำบรรยายคุณลักษณะของเชื้อรา *Fusarium oxysporum*
2. สกัดดีเอ็นเอ
3. จำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรมของยีนตำแหน่ง the translation elongation factor 1-alpha gene (*tef1*) ด้วยวิธี phylogenetic reconstruction เปรียบเทียบกับข้อมูล type sequences ของ *Fusarium*
4. ระบุชนิดของเชื้อราที่จัดกลุ่มอยู่ในแต่ละ clade ของเชื้อรา *F. Oxysporum* forma specilais โดยต้องเป็นแบบ monophyletic based clade

21) กระบวนการจำแนกชนิดของเชื้อรา Fusarium oxysporum f.sp. cubense (Foc) ด้วยชีวโมเลกุล



กรมวิชาการเกษตร

22) กระบวนการของปฏิกิริยาสายพันธุ์/พันธุ์กล้วยที่ทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา Foc TR4



กรมวิชาการเกษตร

แช่รากในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา
นาน 2 hr.

Inoculation

นึ่งฆ่าเชื้อดินก่อนใช้ปลูก
ไม่น้อยกว่า 72 hr.

ย้ายต้นกล้ากล้วยลงปลูก
ในถุงดำขนาด 3 x 7 นิ้ว

รองถุงปลูกกล้วยด้วยถาดที่ไม่มีรูรั่ว
และรองถาดด้วยผ้าใบพลาสติก เพื่อ
ป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราสู่
ภายนอก

ย้ายต้นกล้ากล้วยไว้ในโรงเรือน

- ประเมินลักษณะอาการ<u>ภายนอก</u>ที่ สัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4 หลังปลูกเชื้อ
- ประเมินลักษณะอาการ<u>ภายใน</u>ที่ สัปดาห์ที่ 4 หลังปลูกเชื้อ

ประเมินลักษณะอาการที่ปรากฏทุกสัปดาห์
จนครบ 4 สัปดาห์ พร้อมถ่ายภาพ

คำนวณดัชนีความรุนแรง
ของโรคและจัดกลุ่มความต้านทาน

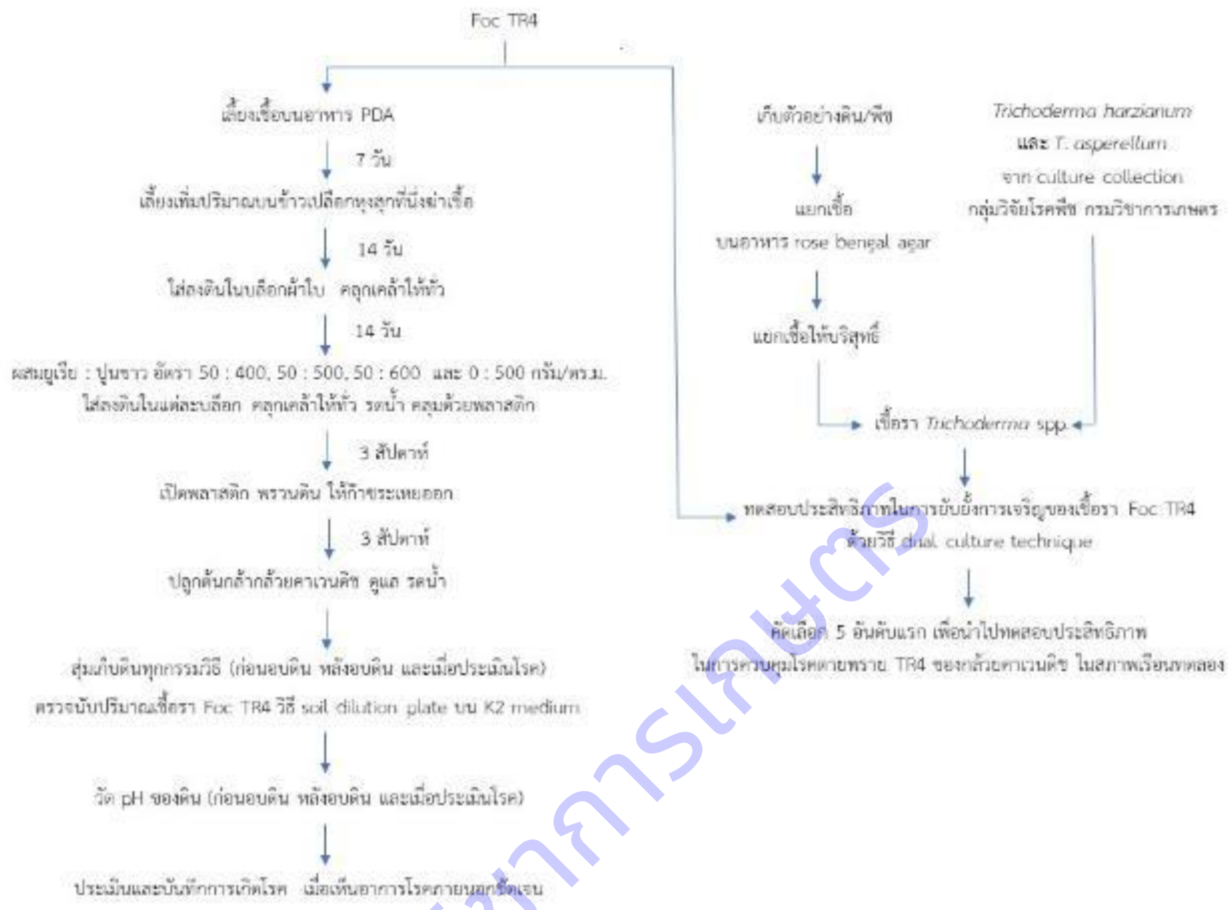
DSI (%)	Disease reaction	Reaction group
0	Immune	I
> 0 ≤ 5	Resistant	R
> 5 ≤ 20	Intermediate Resistant	IR
> 20 < 50	Susceptible	S
> 50	Highly Susceptible	HS

ปฏิกิริยาพันธุ์กล้วยแต่ละ
พันธุ์ /สายพันธุ์

พันธุ์กล้วยที่ทนทานต่อ
การเข้าทำลายของเชื้อรา
Foc TR4

กรมวิชาการเกษตร

23) กระบวนการใช้ยูเรียผสมปูนขาวอบดินที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อรา Foc TR4 สาเหตุโรคตายพราย TR4 ของกล้วยคาเวนดิช และกระบวนการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Foc TR4 ที่มีประสิทธิภาพด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และ/หรือ *T. asperellum* ในห้องปฏิบัติการ



กรมวิชาการเกษตร

เตรียมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 (Foc TR4)

นำเชื้อ Foc TR4 ซึ่งรวบรวมเก็บรักษาไว้ที่หน่วยเก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ทางการเกษตร (culture collection) ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร นำมาฟื้นฟูให้อยู่ในสภาพพร้อมสำหรับการทดสอบ โดยเลี้ยงเชื้อ Foc TR4 บนอาหาร PDA

ทดสอบการใช้ยูเรียและปูนขาวอบดินในการกำจัดเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 สาเหตุโรคตายพราย TR4 (Foc TR4) ในกล้วยคาเวนดิช

- เลี้ยงเชื้อรา Foc TR4 บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนเมล็ดข้าวเปลือกหุงสุกที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 14 วัน

- ใส่เชื้อรา Foc TR4 ที่เจริญบนข้าวเปลือก ลงในดิน อัตรา 400 กรัมต่อตารางเมตร คลุกเคล้าให้ทั่ว บ่มไว้ 14 วัน

- จากนั้นผสมยูเรียกับปูนขาวให้เข้ากัน อัตราส่วนตามกรรมวิธีทดลอง คือ ยูเรีย : ปูนขาว อัตรา 50 : 400, 50 : 500, 50 : 600 และ 0 : 500 กรัมต่อตร.ม. ใส่ลงดินในแต่ละบล็อก คลุกเคล้าให้ทั่ว รดน้ำพอประมาณ

ให้หน้าดินปิด คลุมด้วยพลาสติก เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จึงเปิดพลาสติกที่คลุมดิน และพรวนดินให้ก๊าซระเหยออก ปล่อยไว้ 3 สัปดาห์

- ปลูกต้นกล้ากล้วยคาเวนดิช (ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ) อายุประมาณ 3 เดือน ในบล็อกผ้าใบ ดูแลรดน้ำตามปกติ วันละ 1 ครั้ง

- สุ่มเก็บตัวอย่างดินในทุกกรรมวิธี ตัวอย่างละ 10 กรัม นำมาตรวจนับปริมาณเชื้อรา Foc TR4 ด้วยวิธี soil dilution plate บนอาหาร Komada's selective medium (K2) โดยสุ่มเก็บดินก่อนอบดินด้วยยูเรียและปูนขาว (หลังปลูกเชื้อ Foc TR4 14 วัน) หลังอบดิน และเมื่อประเมินโรค

-วัด pH ของดิน ก่อนอบดินด้วยยูเรียและปูนขาว (หลังปลูกเชื้อ Foc TR4 14 วัน) หลังอบดิน และเมื่อประเมินโรค

- ประเมินและบันทึกการเกิดโรคเมื่อต้นกล้วยในกรรมวิธีควบคุมแสดงอาการโรคชัดเจน โดยบันทึกลักษณะอาการภายนอก คือการเปลี่ยนสีของใบ และตัดต้นกล้วยเพื่อตรวจและบันทึกอาการของโรคที่เกิดภายในเหง้า

ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา *T. harzianum* และ *T. asperellum* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Foc TR4 ในห้องปฏิบัติการ

- รวบรวมเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดย เก็บตัวอย่างดิน และพืช จากแหล่งต่าง ๆ มาแยกเชื้อบนอาหาร rose bengal agar แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และเชื้อรา *T. harzianum* และ *T. asperellum* อีกส่วนหนึ่งนำมาจากหน่วยเก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ทางการเกษตร (culture collection) กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

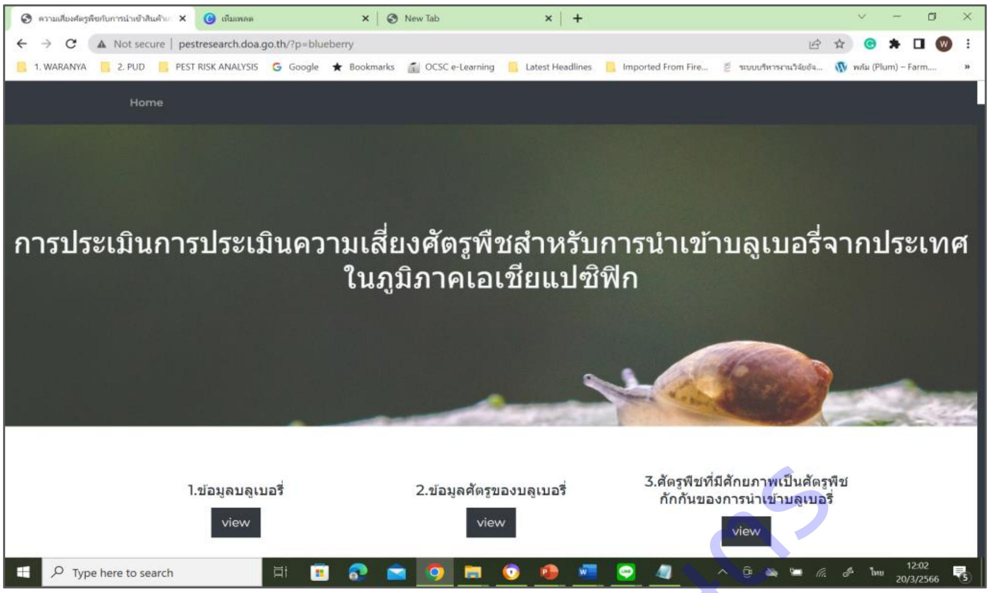
- ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Foc TR4 ในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี dual culture technique เพื่อให้ได้ *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Foc TR4 สูงกว่า 60 เปอร์เซ็นต์

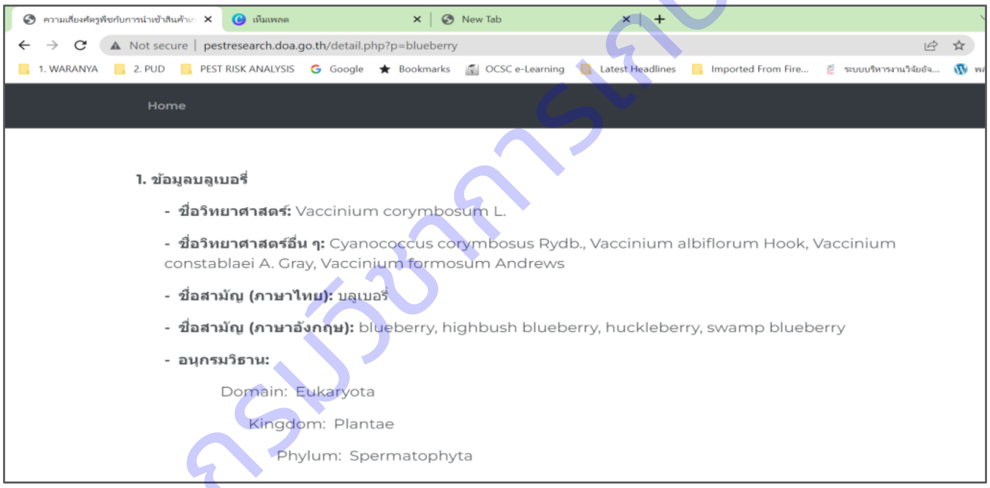
- คัดเลือกเชื้อรา *T. harzianum* และ *T. asperellum* ที่มีประสิทธิภาพดี 5 อันดับแรก นำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคตายพราย TR4 ในโรงเรือนปลูกพืชทดลองต่อไป

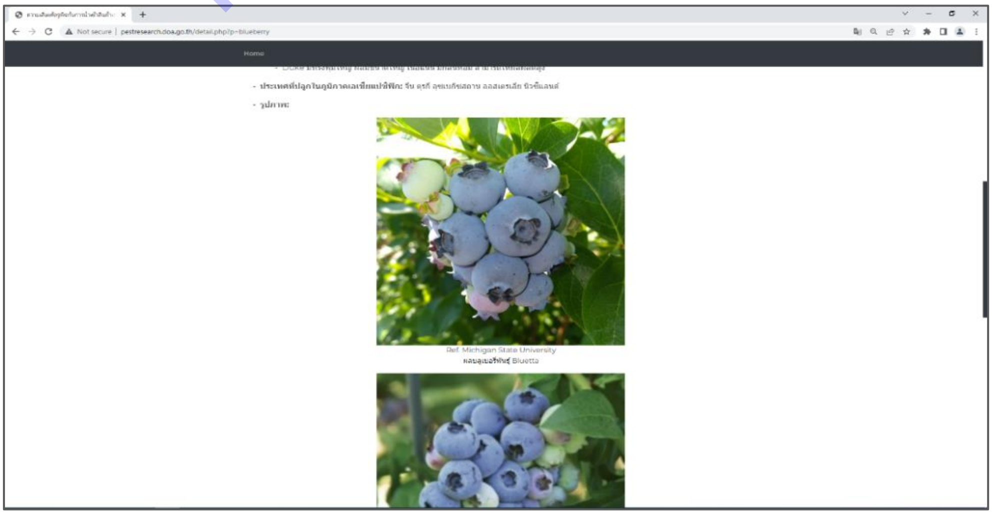
กรมวิชาการเกษตร

2. ฐานข้อมูล จำนวน 10 ฐานข้อมูล

1) ฐานข้อมูลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าบลูเบอรี่จากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก เวปไซต์ http://www.pestresearch.doa.go.th/?p=blueberry

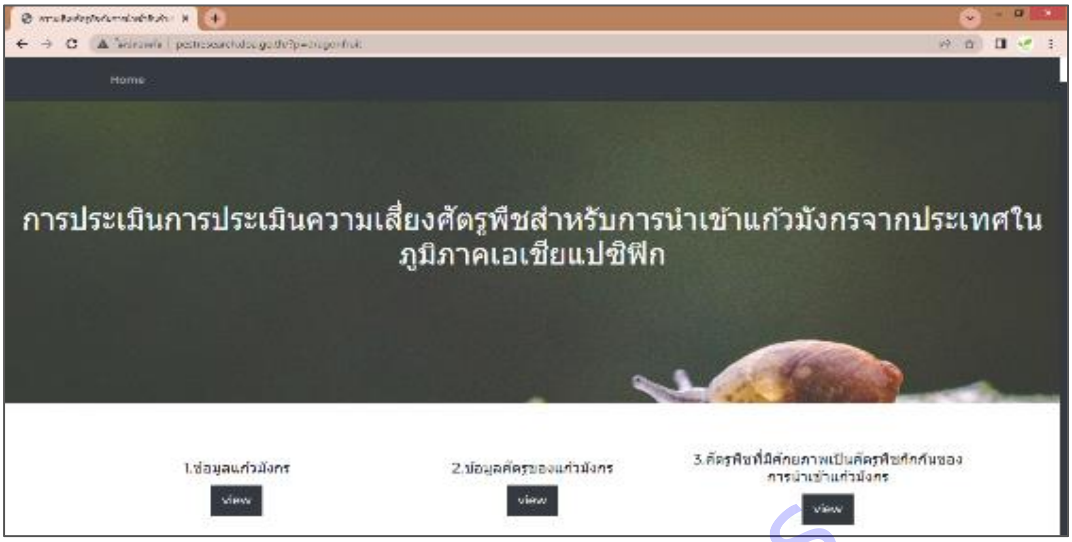


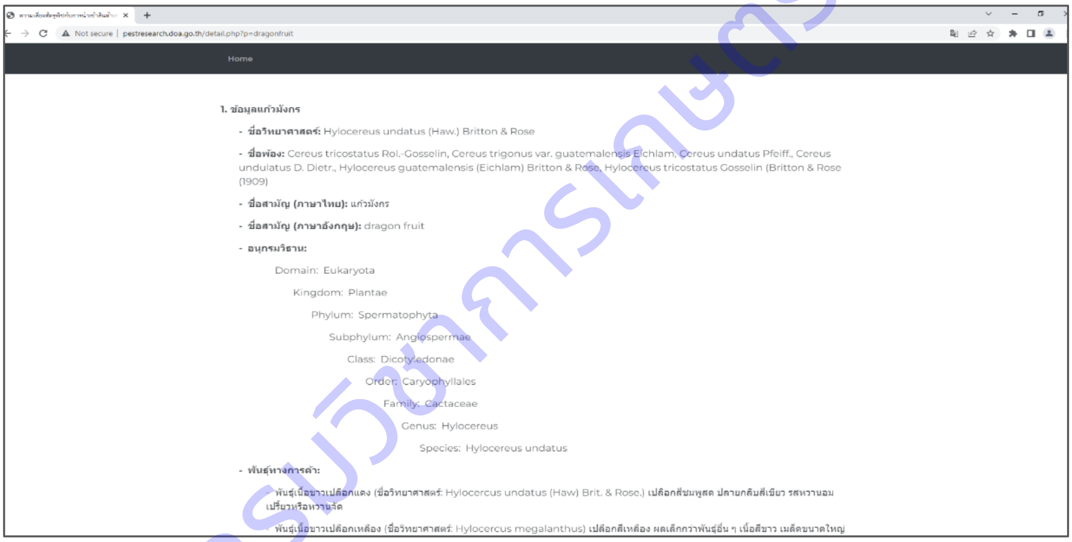


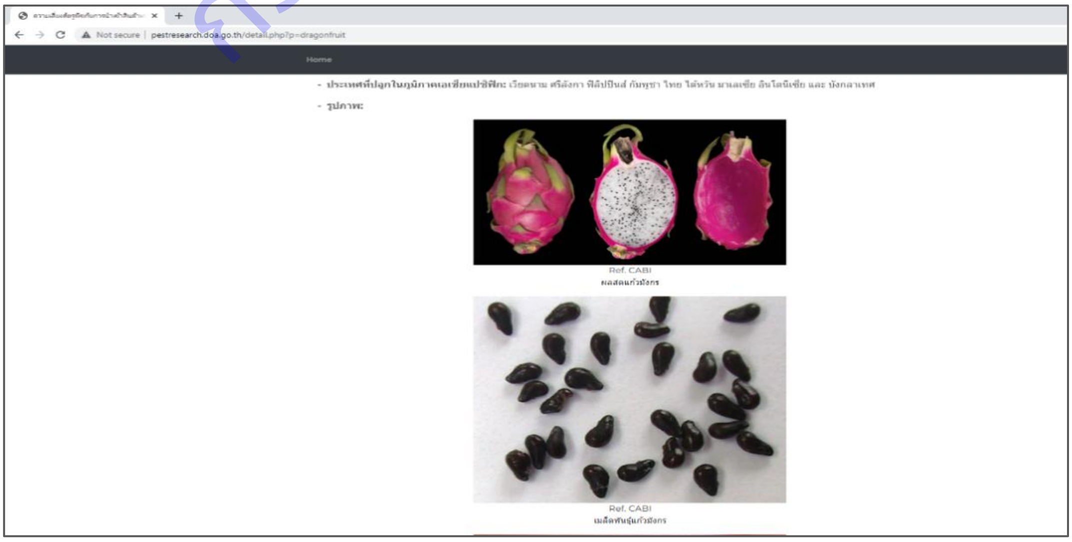


กรมวิชาการเกษตร

2) ฐานข้อมูลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าแก้วมังกรจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก เวปไซต์ http://www.pestresearch.doa.go.th/?p=dragonfruit

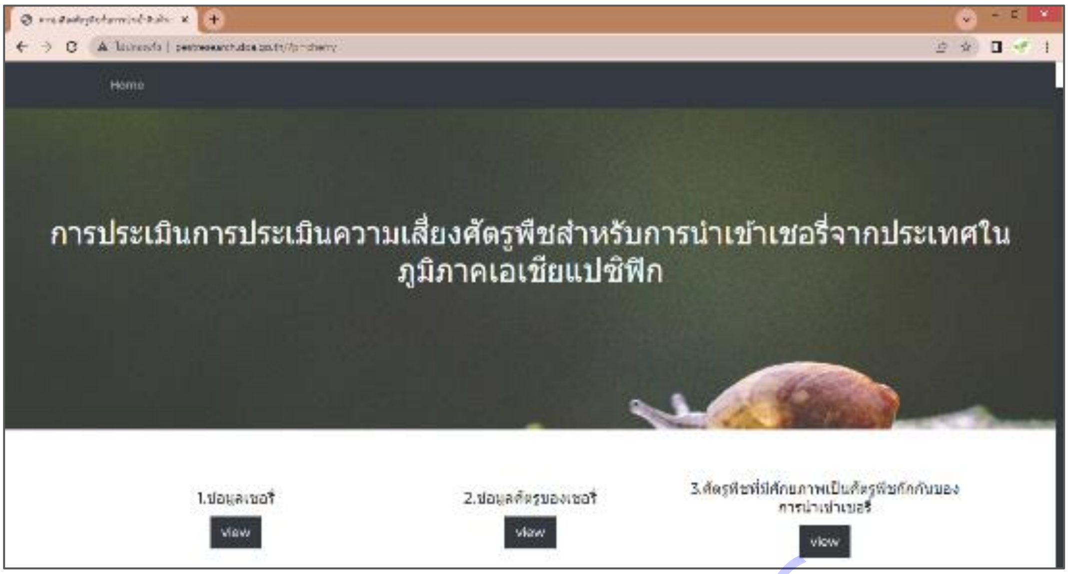


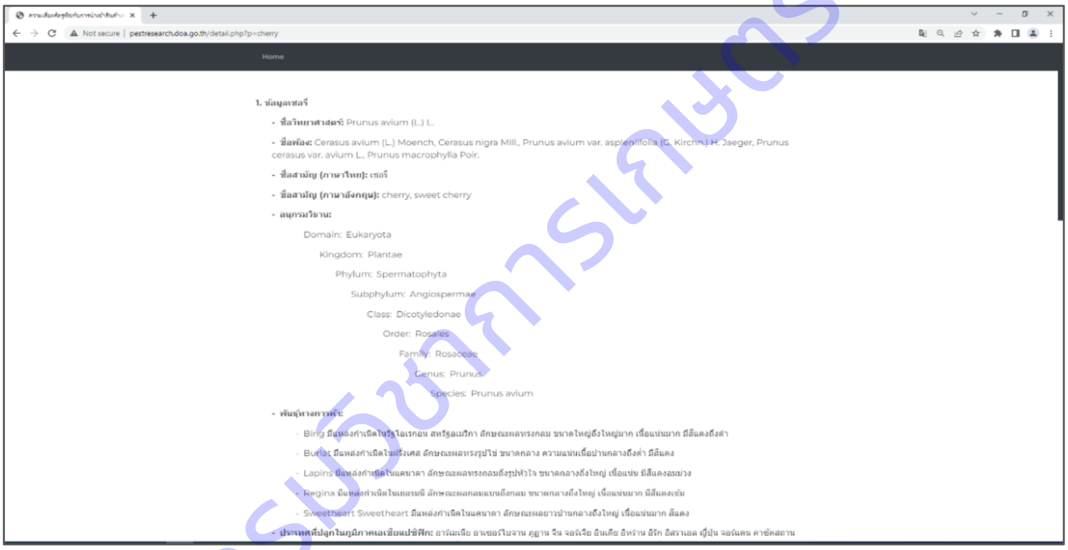


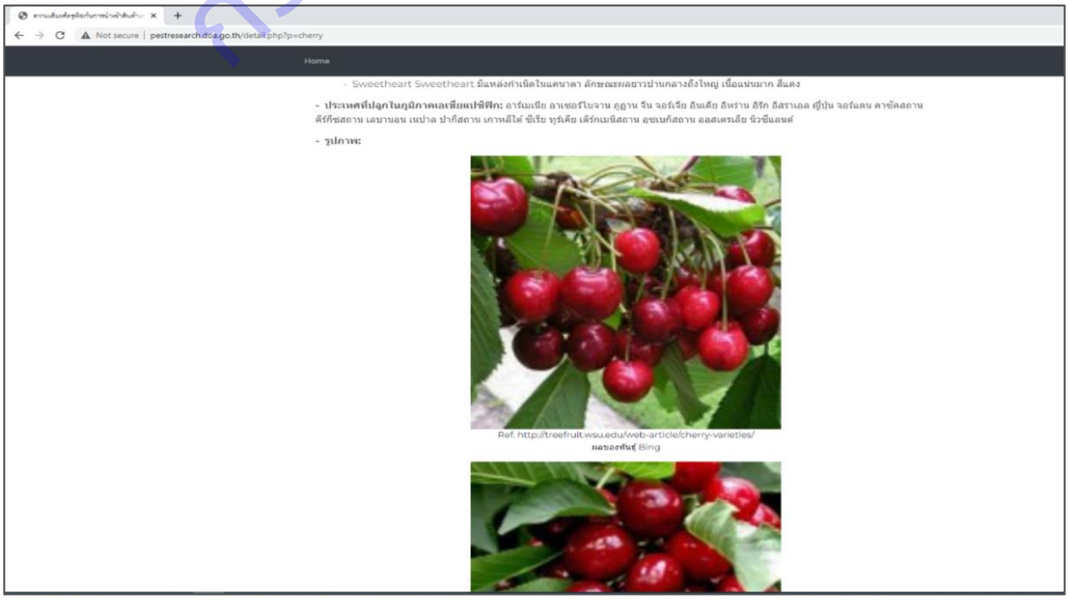


กรมวิชาการเกษตร

3) ฐานข้อมูลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าเชอรี่จากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก เวปไซต์ http://www.pestresearch.doa.go.th/?p=cherry

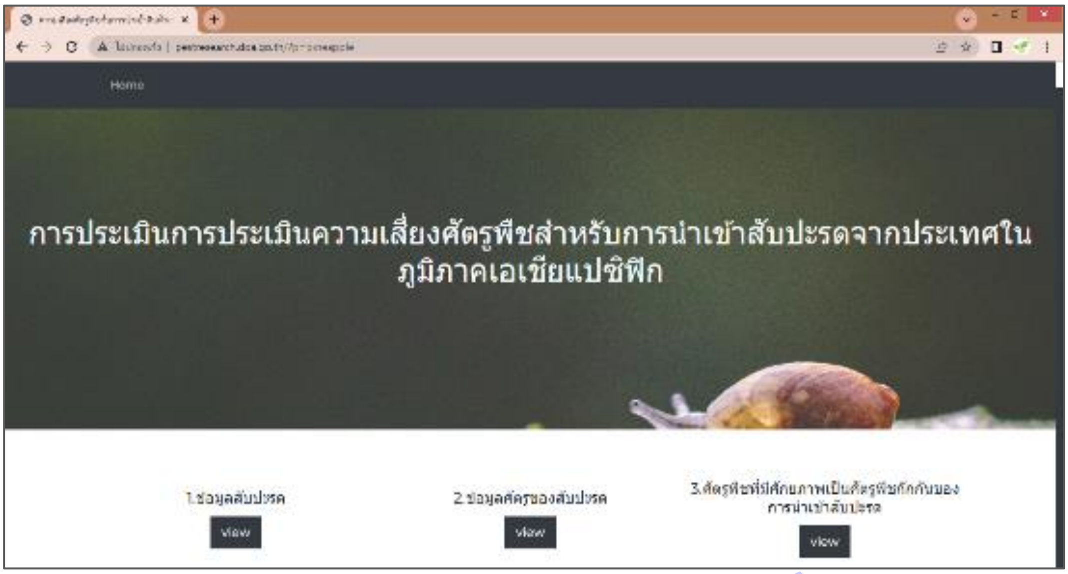


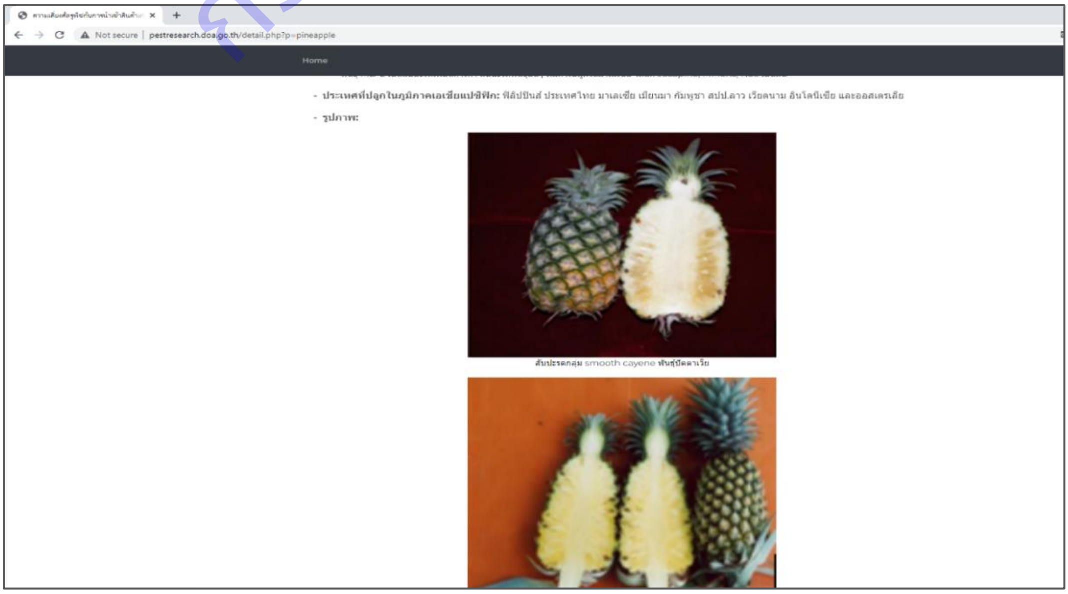




กรมวิชาการเกษตร

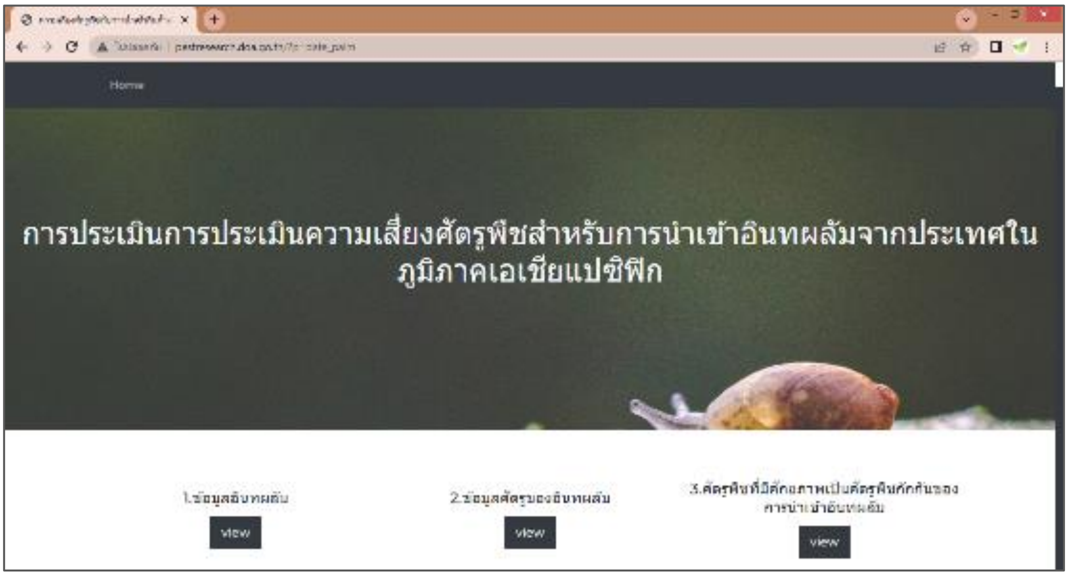
4) ฐานข้อมูลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าสับปะรดจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก เวปไซต์ http://www.pestresearch.doa.go.th/?p=pineapple

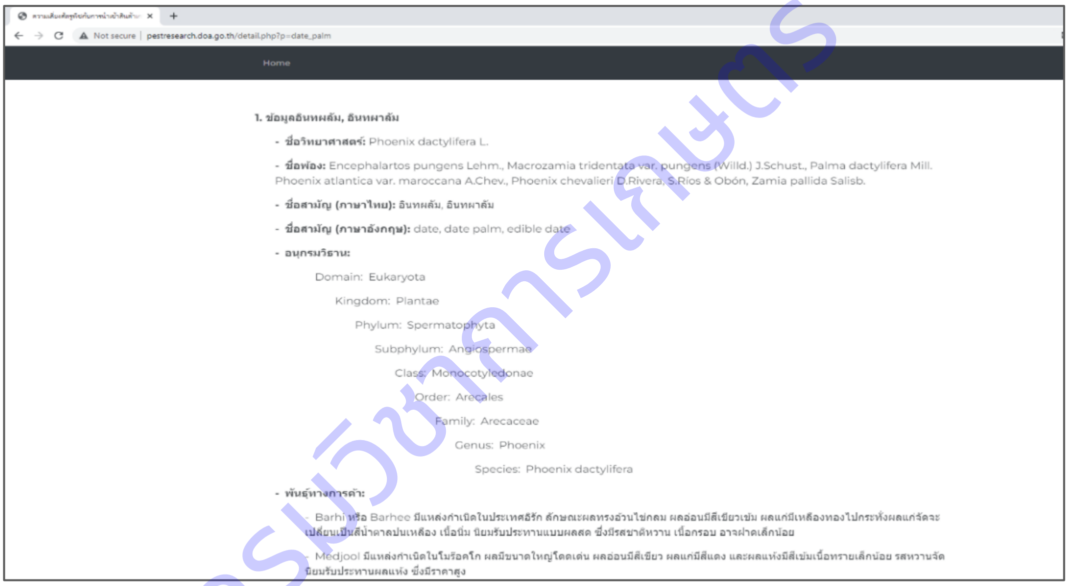


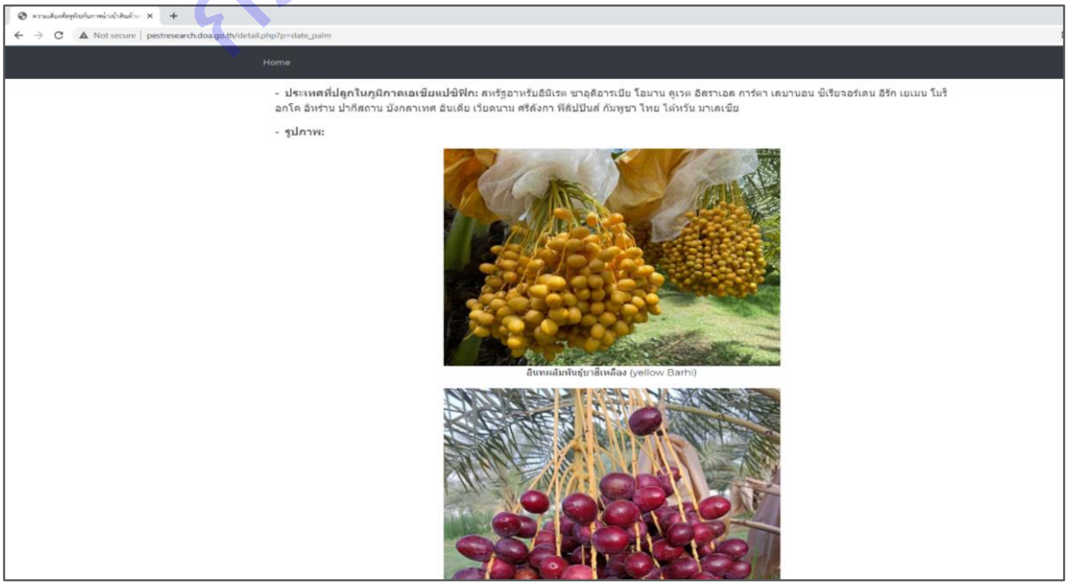


กรมวิชาการเกษตร

5) ฐานข้อมูลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าอินทผลัมจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก เวปไซต์ http://www.pestresearch.doa.go.th/?p=date_palm

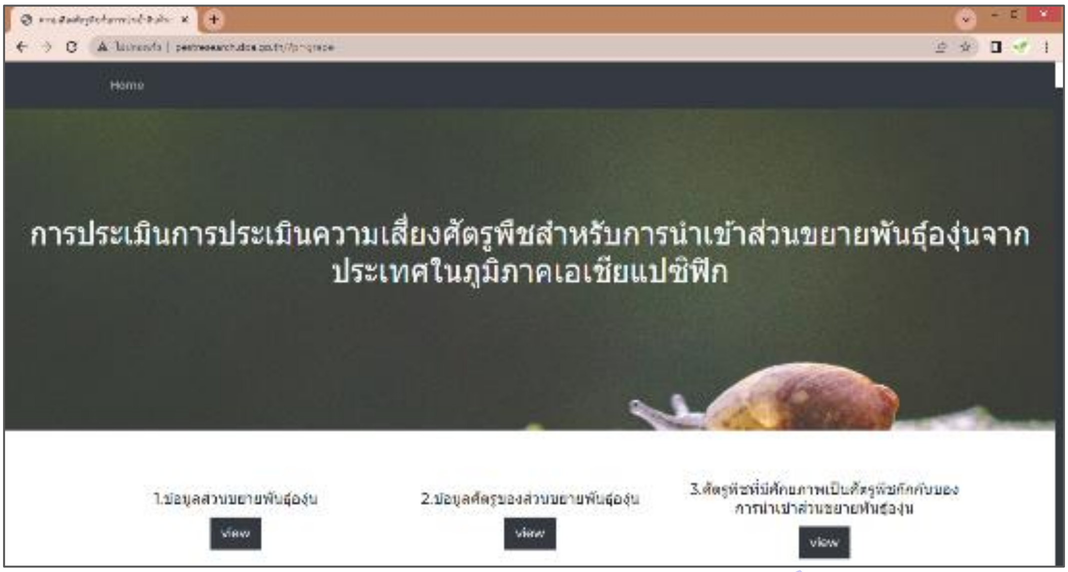


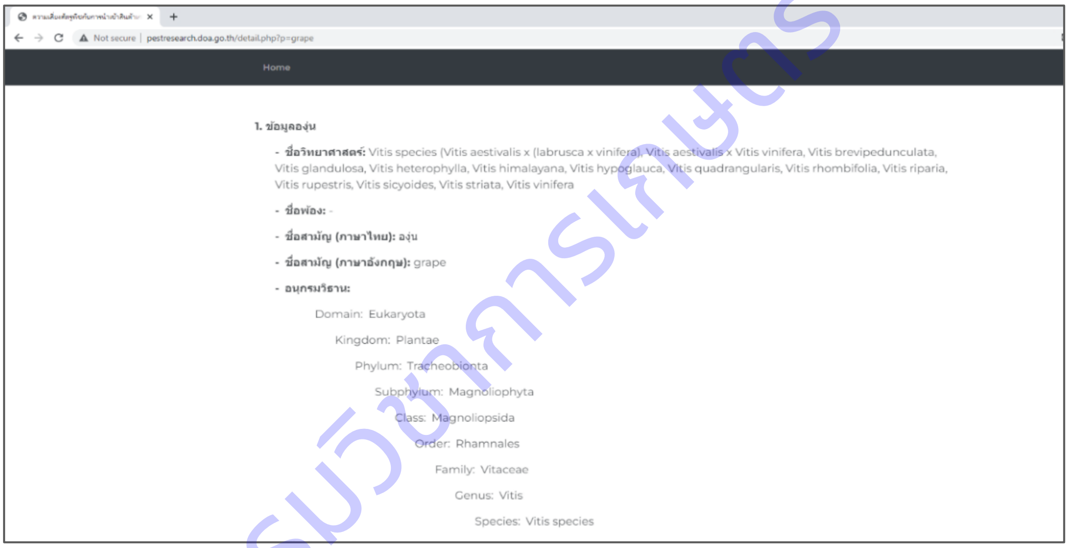


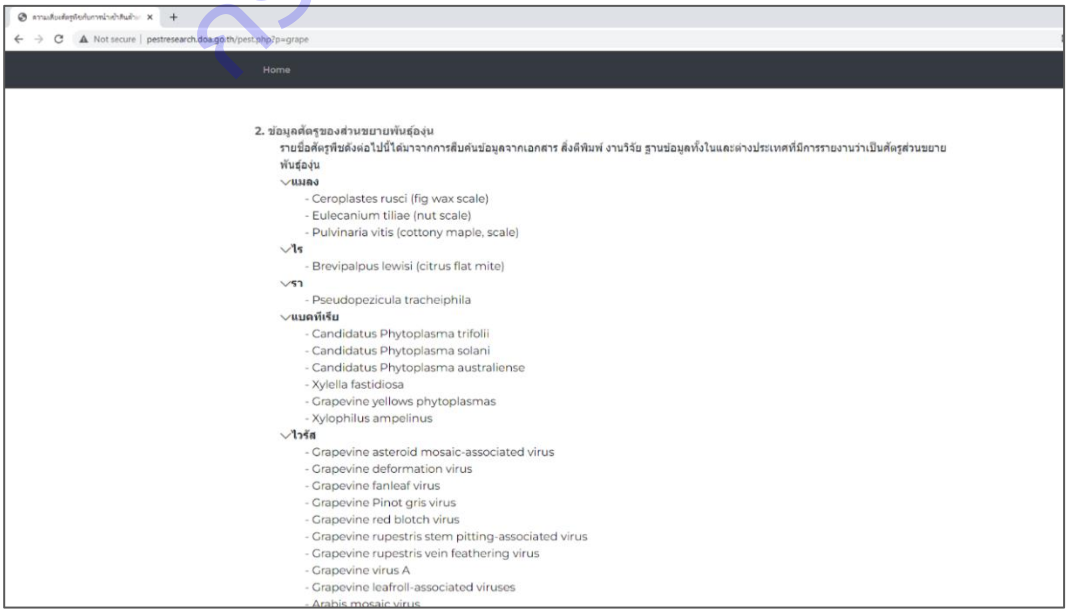


กรมวิชาการเกษตร

6) ฐานข้อมูลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าส่วนขยายพันธุ์องุ่นจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก เวปไซต์ http://www.pestresearch.doa.go.th/?p=grape

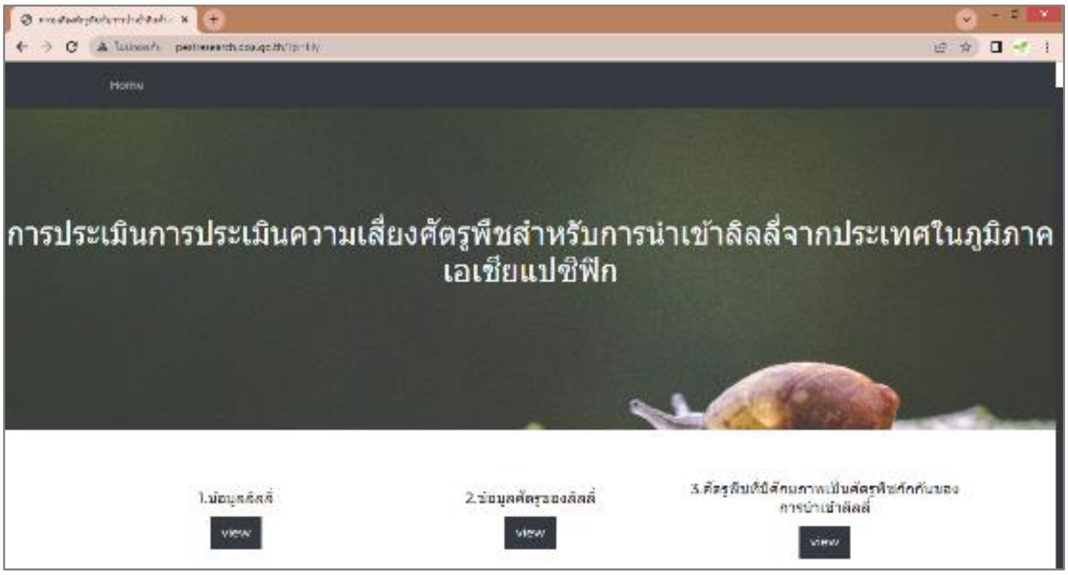


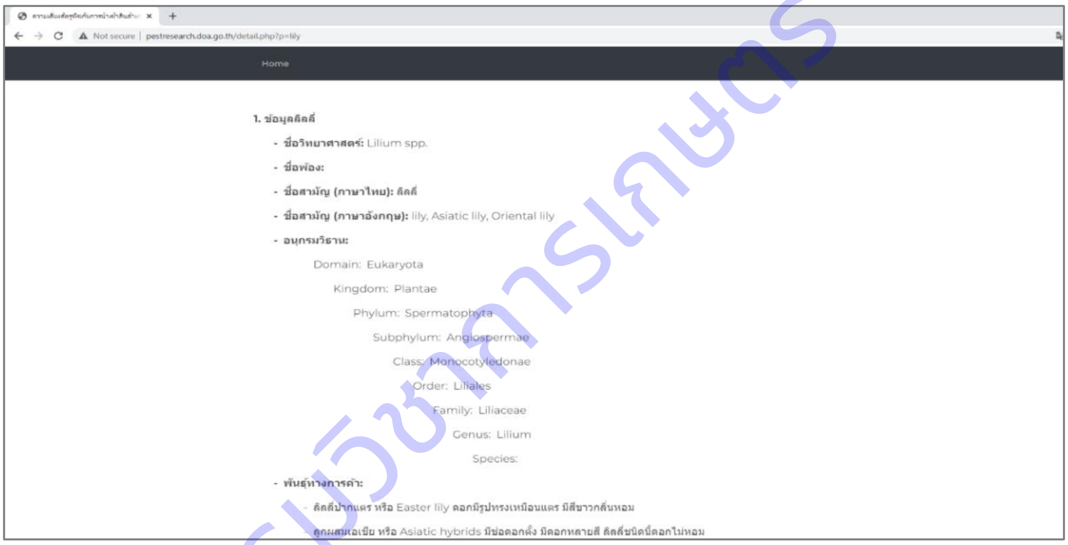


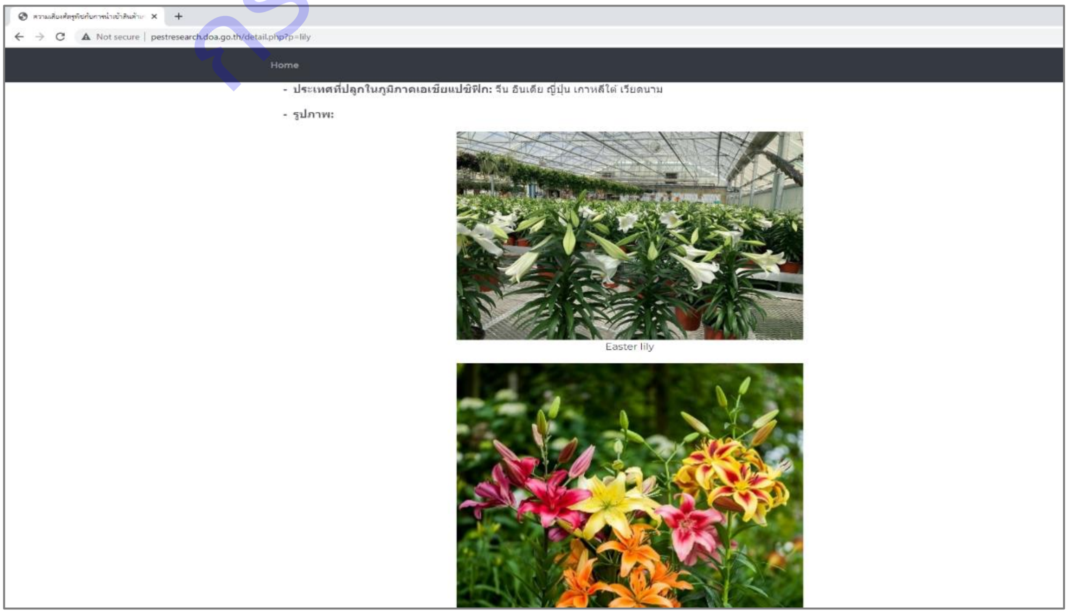


กรมวิชาการเกษตร

7) ฐานข้อมูลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าลิลลี่จากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก เวปไซต์ http://www.pestresearch.doa.go.th/?p=lily

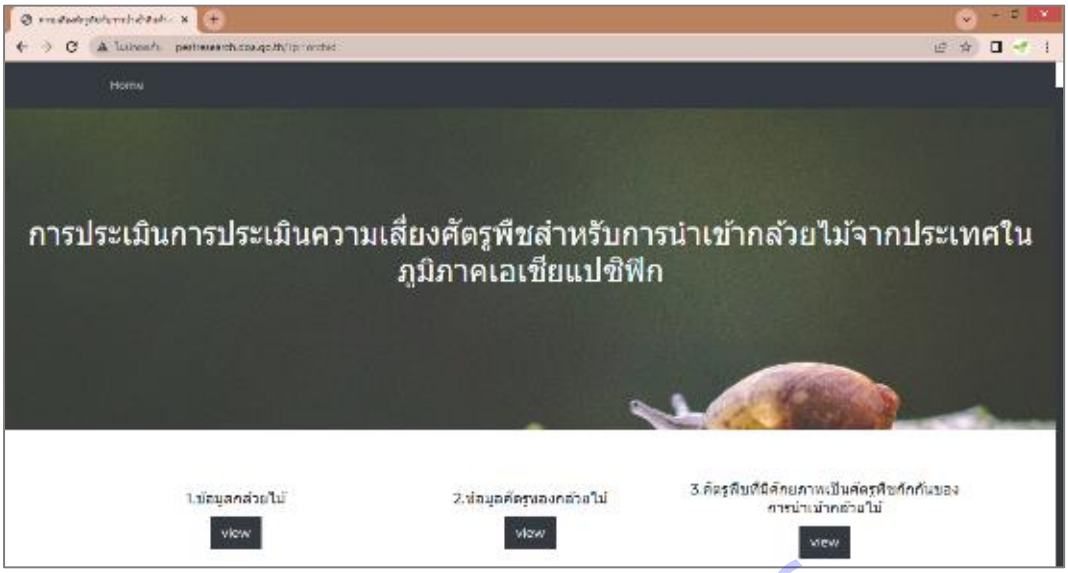


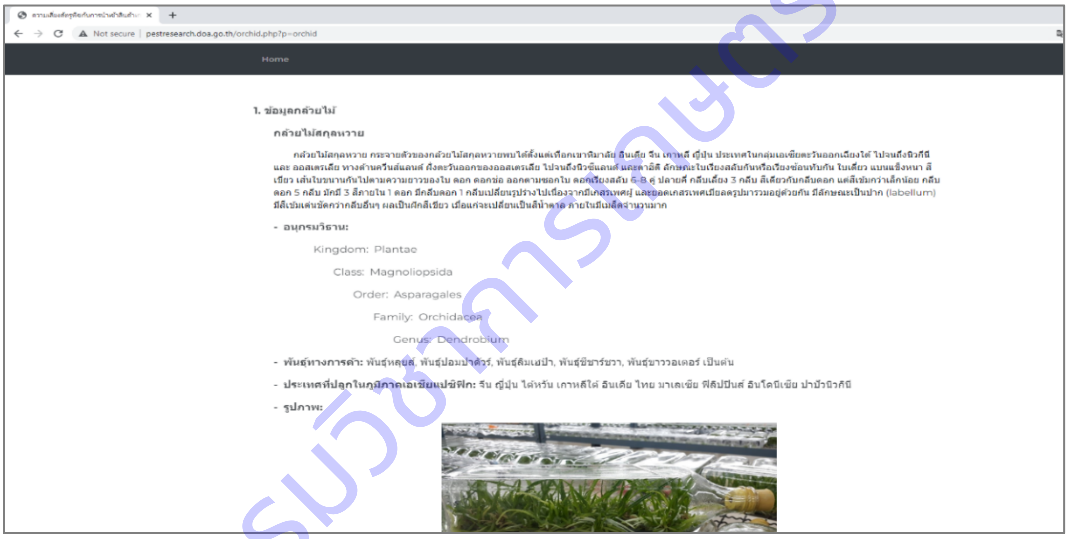


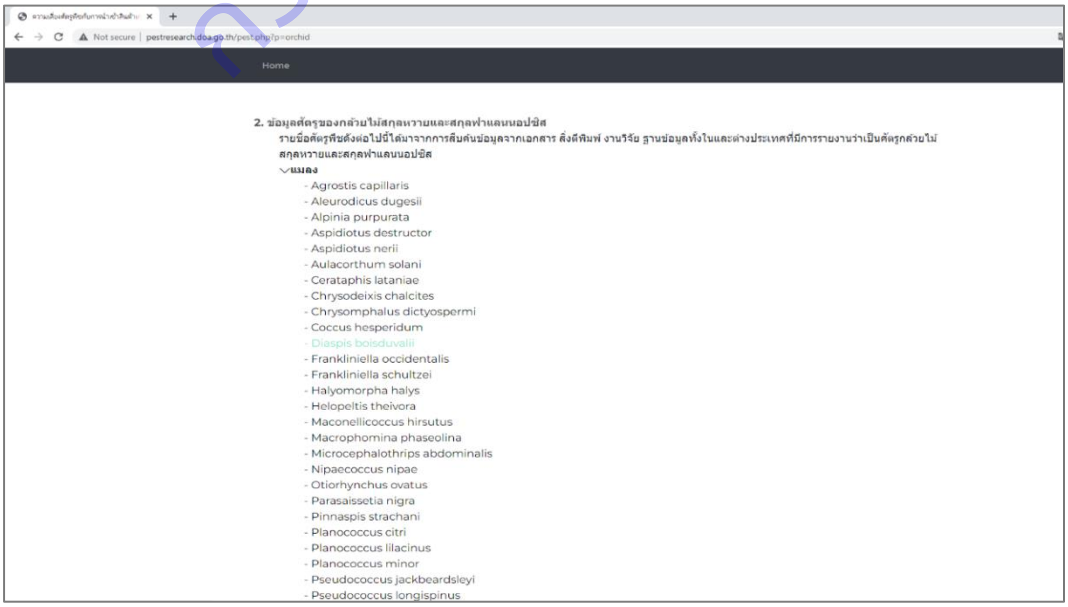


กรมวิชาการเกษตร

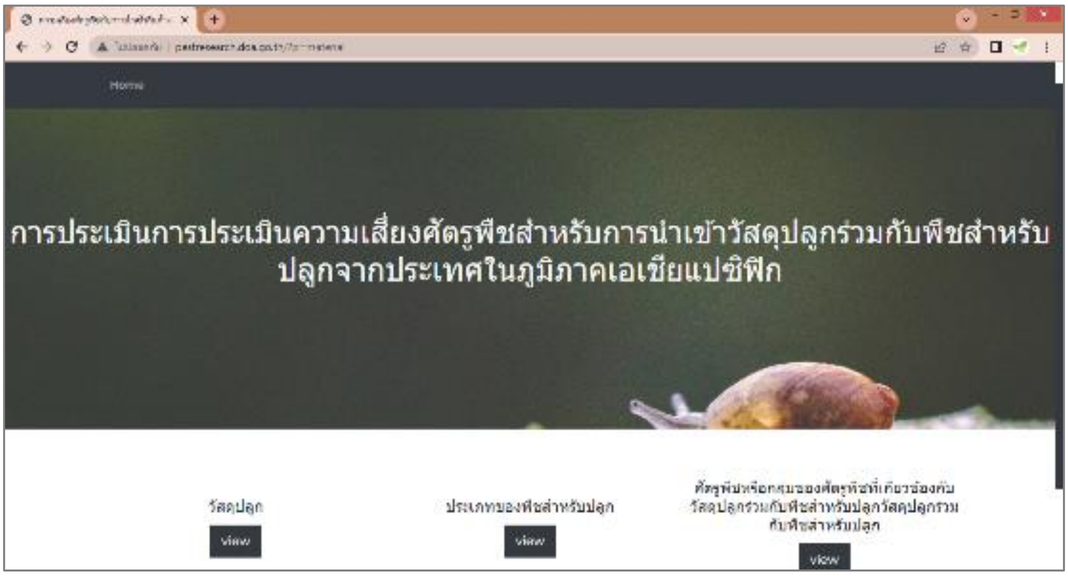
8) ฐานข้อมูลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้ากล้วยไม้สกุลหวายและสกุลฟาแลนนอปซิส จากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก เวปไซต์ http://www.pestresearch.doa.go.th/?p=orchid

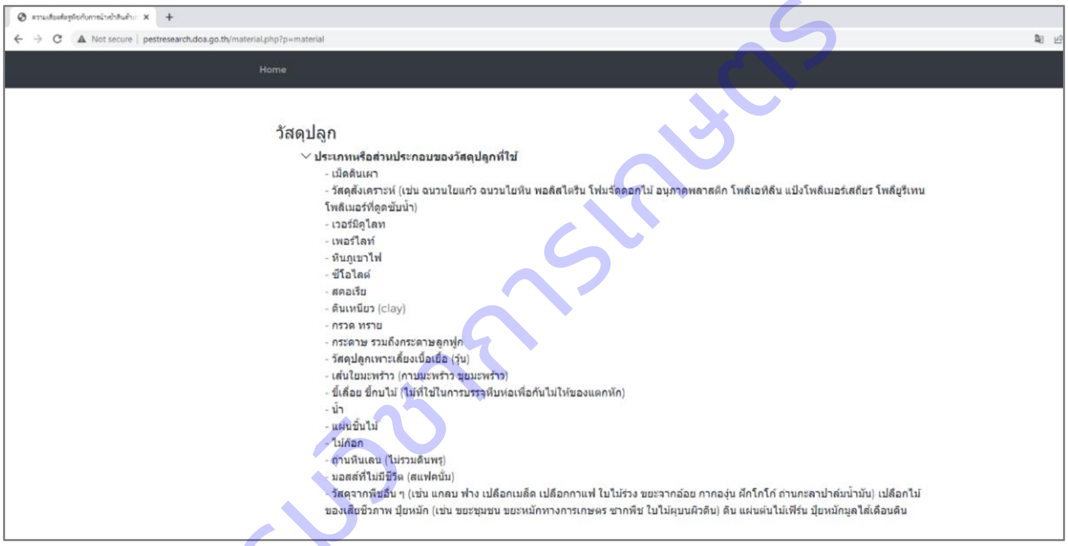


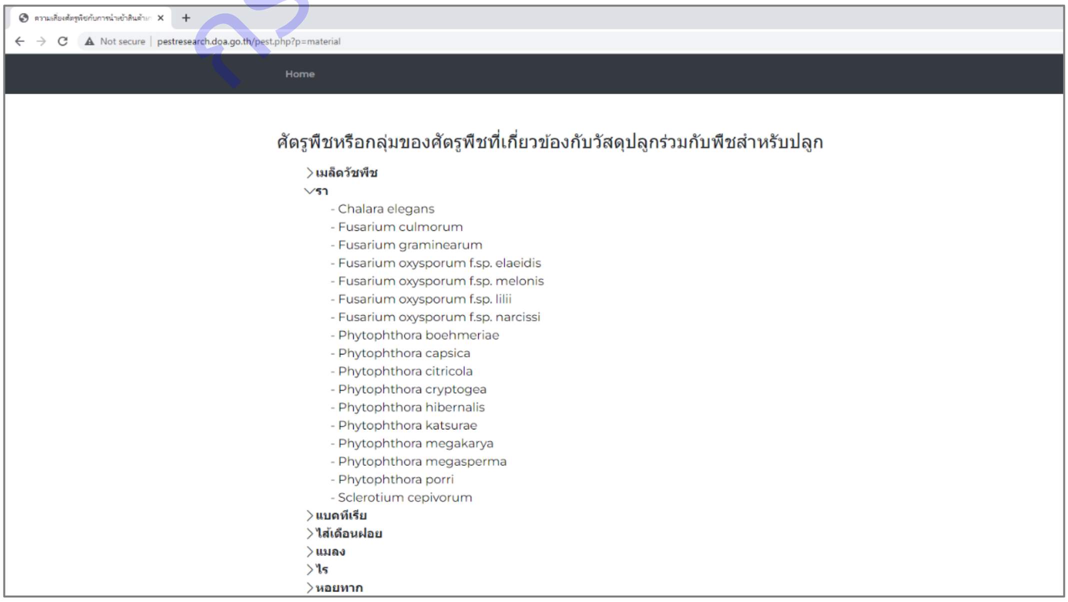




9) ฐานข้อมูลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าวัสดุปลูกร่วมกับพืชสำหรับปลูกจากประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก เวปไซต์ http://www.pestresearch.doa.go.th/?p=material



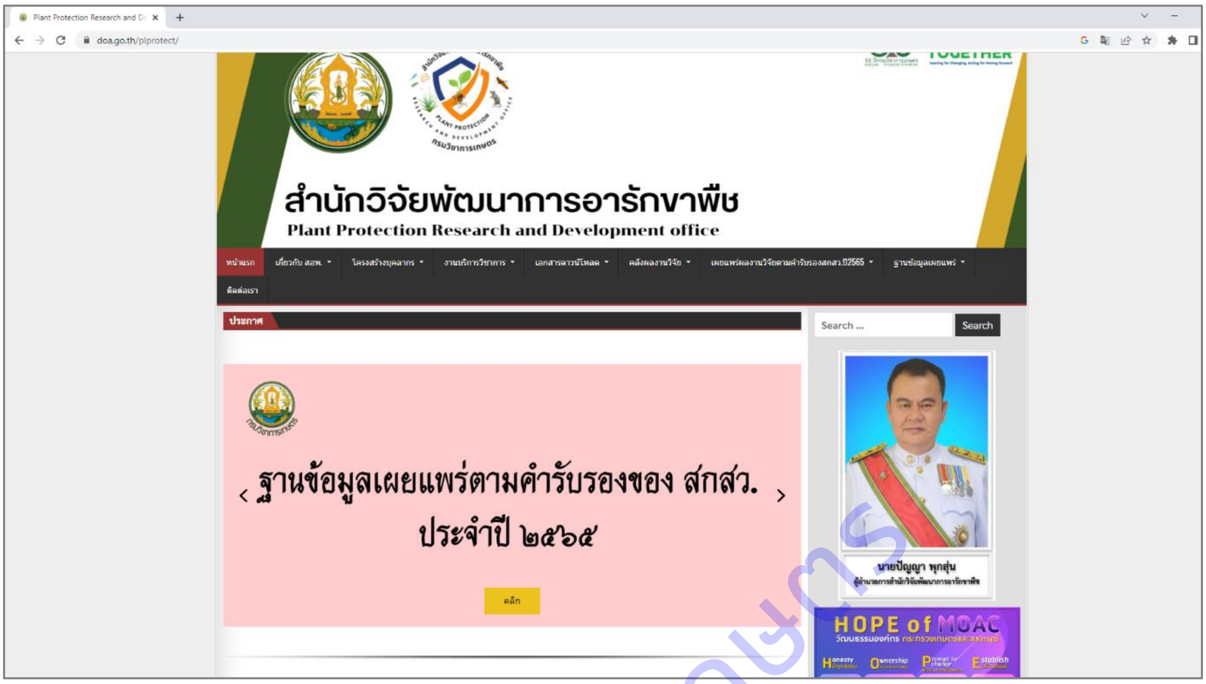




กรมวิชาการเกษตร

10) ฐานข้อมูลการสำรวจและเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันของพืชและผลผลิตพืชในประเทศไทย

เวปไซต์ https://www.doa.go.th/plprotect/?page_id=9660



ฐานข้อมูลการสำรวจและเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันของพืชและผลผลิตพืชในประเทศไทย

ประเทศไทยในฐานะที่เป็นสมาชิกขององค์การการค้าโลก (WTO) ซึ่งต้องปฏิบัติตามเงื่อนไขอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention; IPPC) ซึ่งกำหนดมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช (FAO, 2018) ส่วนมาตรการสุขอนามัยพืช (Phytosanitary measures) หมายถึง ตัวบทกฎหมาย กฎระเบียบข้อบังคับ หรือวิธีการใด ๆ ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันการเข้ามา และ/หรือการแพร่กระจายของศัตรูพืชกักกัน (Quarantine pest) หรือเพื่อสกัดกั้นผลกระทบทางเศรษฐกิจของศัตรูพืชที่ไม่ใช่ศัตรูพืชกักกันที่ต้องมีการควบคุม (Regulated non-quarantine pest) รวมทั้งข้อกำหนดการนำเข้าด้านสุขอนามัยพืช (Phytosanitary import requirements) หมายถึงมาตรการสุขอนามัยพืชเฉพาะ ที่จัดทำขึ้นมาโดยประเทศผู้นำเข้าสำหรับสินค้าที่ขออนุญาตให้นำเข้า เป็นผลจากการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของสินค้านั้น และได้กำหนดให้กรมวิชาการเกษตร คือ องค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization; NPPO) เช่นเดียวกันกับการส่งออกสินค้าพืชของประเทศไทยไปยังประเทศที่ยังไม่เคยอนุญาตนำเข้ามาก่อนก็ต้องส่งมอบข้อมูลสินค้าพืชนั้นและบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest list) ที่เกี่ยวข้องเพื่อการทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของประเทศปลายทาง และป้องกันปัญหาเนื่องจากความตกลงว่าด้วยการใช้บังคับมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures, SPS Agreement) ซึ่งกำหนดให้ประเทศสมาชิก WTO มีสิทธิ์กำหนดหรือใช้มาตรการใด ๆ สำหรับการนำเข้าสินค้า เพื่อป้องกันชีวิตหรือสุขภาพสัตว์หรือพืชจากความเสี่ยงของโรคและแมลงศัตรูพืชที่ทำให้เกิดโรคหรือเป็นพาหะของโรค เพื่อป้องกันชีวิต สุขภาพมนุษย์สัตว์ สิ่งแวดล้อม จากความเสี่ยงซึ่งเกิดจากการใช้สารปรุงแต่ง สิ่งเจือปน สารพิษ หรือสิ่งมีชีวิตที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร เครื่องดื่ม หรืออาหารสัตว์ เพื่อป้องกันชีวิตหรือสุขภาพมนุษย์จากความเสี่ยงซึ่งเกิดจากโรคที่มีในสัตว์ พืช หรือผลิตภัณฑ์จากสิ่งนั้นเป็นพาหะ และเพื่อป้องกันหรือจำกัดความเสียหายอื่น ๆ จากการเข้ามา (Entry) การตั้งรกราก (Establishment) แพร่ระบาด (Spread) ของศัตรูพืช เช่น โรคพืช แมลง ไร วัชพืช และสัตว์ศัตรูพืช รวมทั้งสร้างความเสียหายกับพืชและผลิตพืชในประเทศไทย

การจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูโดยการศึกษาและการสำรวจแบบติดตามข้อมูลศัตรูพืชในแหล่งปลูกเพื่อเป็นการเฝ้าระวัง (Surveillance) ตาม ISPMs (International Standard for Phytosanitary Measures) ฉบับที่ 6 เป็นกระบวนการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่งในพื้นที่ ซึ่งการรวบรวมข้อมูลนั้นสามารถทำได้ 2 แบบ ได้แก่ การเฝ้าระวังโดยทั่วไปโดยการสืบค้นข้อมูลจากแหล่งข้อมูลที่น่าเชื่อถือและการเฝ้าระวังโดยการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง สามารถดำเนินการโดยการสำรวจแบบตรวจหา แบบมีขอบเขต และแบบติดตามอย่างต่อเนื่อง (FAO, 2018; McMaugh, 2008) ประโยชน์ของการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจงสามารถบอกถึงสถานการณ์ของ

1. การสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas corrugata* ในประเทศไทย

การสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas corrugata* ในประเทศไทย เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas corrugata* เป็นศัตรูพืชกักกัน ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์เรื่องกำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้าม ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ.2507 (ฉบับที่ 6) และมีแหล่งแพร่กระจายในหลายประเทศทั่วโลก ได้แก่ แอฟริกาใต้ อินเดีย อิสราเอล ญี่ปุ่น ฝรั่งเศส เยอรมนี โปแลนด์ สวีเดน แคนาดา เม็กซิโก สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ บราซิล และอาร์เจนตินา (CABI, 2019) และในต่างประเทศมีรายงานว่าอาการของโรคจะพัฒนาเมื่อต้นพืช อายุ 3 เดือน โดยเริ่มแรกใบอ่อนมีอาการเหลือง บริเวณลำต้นหรือกิ่งที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และเนื้อเยื่อจะยุบลงไป เซลล์ของพืชจะแห้งตาย เมื่อผ่าลำต้นตามทางยาว พบว่าไส้ของลำต้นกลวง ท่อน้ำท่ออาหารถูกทำลาย และเป็นแผลเซลล์ตาย และยืนต้นตายในที่สุด (Moura *et al.*, 2005) มีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ได้ และสามารถเจริญเติบโตได้ในดินที่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนสูง (Zutra, 1989) เชื้อแบคทีเรีย *P. corrugata* เป็นแกรมลบ วิธีการตรวจสอบเชื้อนี้ สามารถตรวจสอบการไม่เรืองแสงบนอาหาร King's B medium และสามารถสร้างรงควัตถุสีเหลืองถึงน้ำตาล และสามารถ บนอาหาร Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA) รวมทั้งสามารถตรวจสอบได้โดยวิธี RAPD PCR (Catara, 2007)

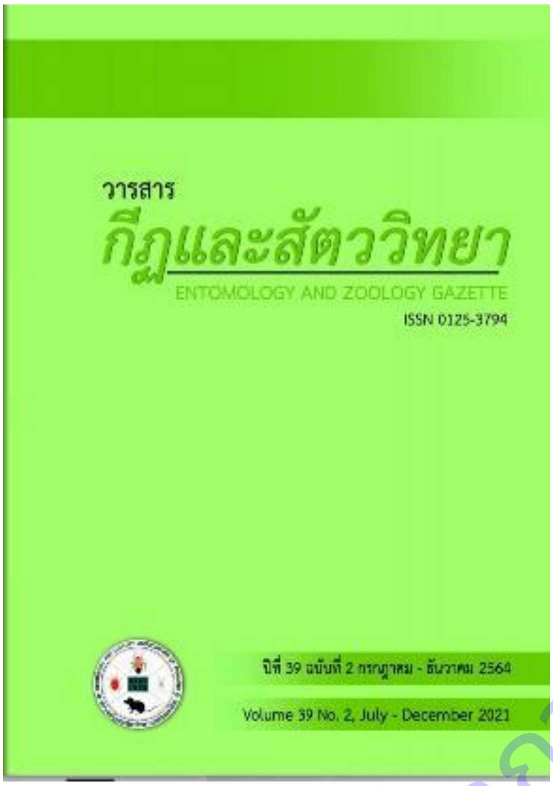
การสำรวจและเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรีย *P. corrugata* ในประเทศไทย โดยจัดทำคู่มือการสำรวจ วางแผนการสำรวจอย่างมีระบบ และดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 6 ระหว่างเดือนตุลาคม 2564 - กันยายน 2565 ในพื้นที่ปลูกของพริกและมะเขือเทศ จำนวน 9 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พะเยา น่าน ขอนแก่น อุดรธานี เลย หนองคาย และนครราชสีมา จำนวน 155 แปลง และสุ่มเก็บตัวอย่างต้นที่แสดงอาการคล้ายหรือสงสัย เช่น ใบเหลือง ไส้ของลำต้นกลวง ท่อน้ำท่ออาหารถูกผิดปกติ รวมทั้งสิ้น 65 ตัวอย่าง จากการนำตัวอย่างที่สงสัยจำนวนทั้งสิ้น 65 ตัวอย่างมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ด้วยวิธี tissue transplanting และเลี้ยงเชื้อบนอาหาร King's B Medium รวมถึงวิธีการทางชีวเคมี ผลการตรวจสอบพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดไม่ใช่เชื้อแบคทีเรีย *P. corrugata* ทำให้สามารถยืนยันสถานภาพได้ว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวยังคงสถานภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน (quarantine pest) ของประเทศไทย

สถานภาพศัตรูพืช (Pest status)

☑ Absent: no pest records
(ไม่ปรากฏพบศัตรูพืช)

ภาคผนวก 3 หลักฐานเชิงประจักษ์ของการนำผลงานไปใช้ประโยชน์

1. บทความวิชาการ เรื่อง ตั๊กแตนไผ่ ศัตรูพืชเฝ้าระวังที่สำคัญของประเทศไทย ในวารสารกีฏและสัตววิทยา ปีที่ 39 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม – ธันวาคม 2564


วารสาร
กีฏและสัตววิทยา
ENTOMOLOGY AND ZOOLOGY GAZETTE
ISSN 0125-3794
ปีที่ 39 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2564
Volume 39 No. 2, July - December 2021

72
วารสารกีฏและสัตววิทยา ปีที่ 39 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2564

บทความ

ตั๊กแตนไผ่ ศัตรูพืชเฝ้าระวังที่สำคัญของประเทศไทย

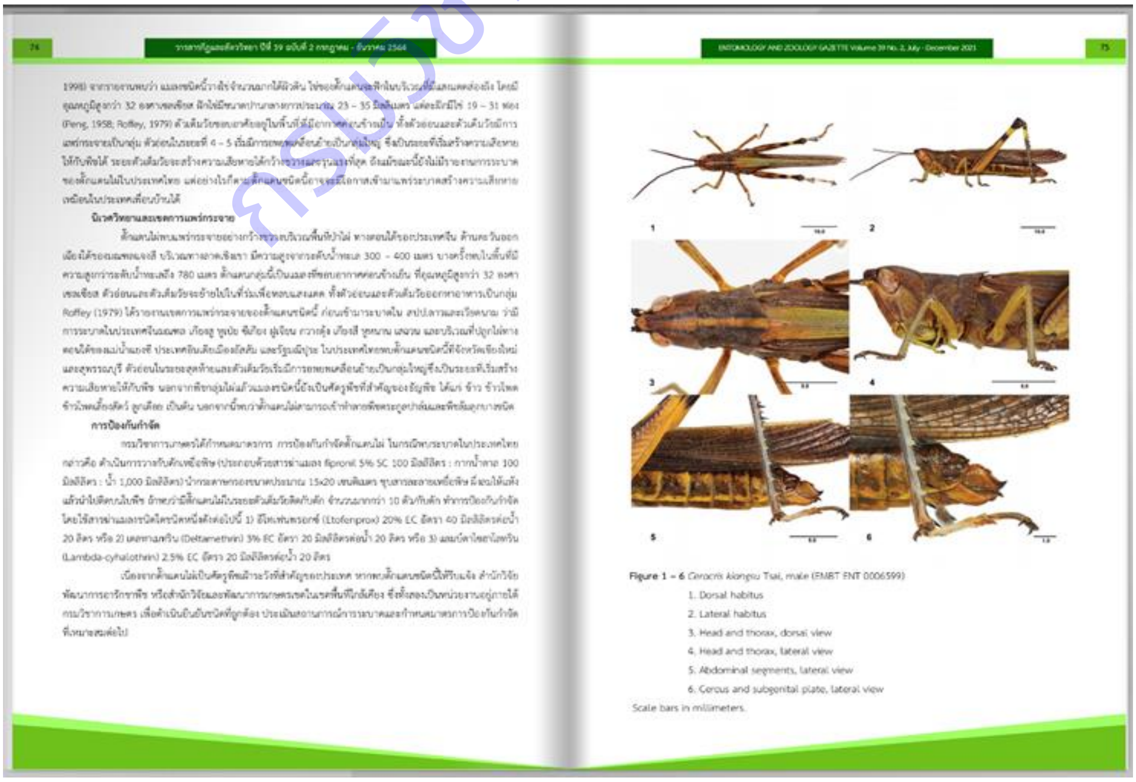


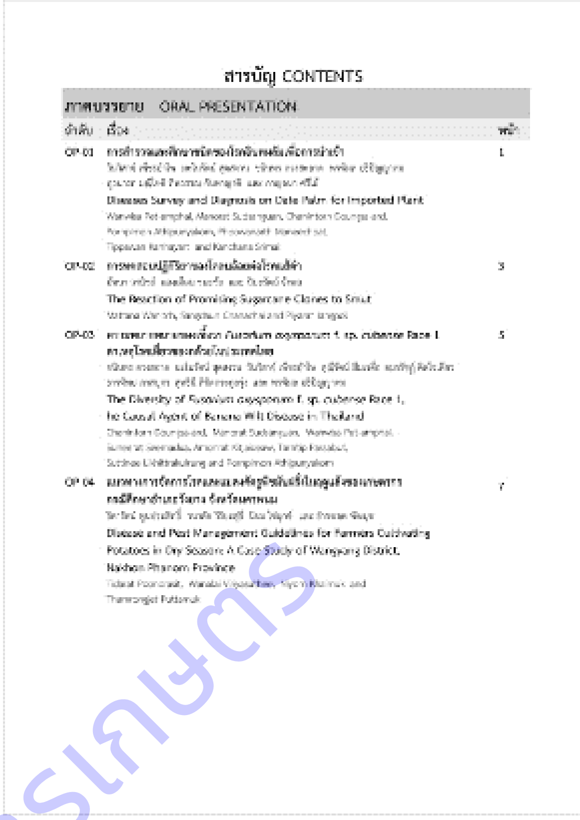
Figure 1 – 6 *Ceracris kiangsu* Tsai, male

1. Dorsal habitus
2. Lateral habitus
3. Head and thorax, dorsal view
4. Head and thorax, lateral view
5. Abdominal segments, lateral view
6. Cercus and subgenital plate, lateral view

Scale bars in millimeters.

กรมวิชาการเกษตร

2. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ เรื่อง การสำรวจและศึกษาชนิดของโรคอินทผลัมเพื่อการนำเข้า ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 15 ณ โรงแรมรามาการ์เด้น กรุงเทพมหานคร



กรมวิชาการเกษตร

3. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ เรื่อง การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืช *Potato Cyst Nematode* ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 15 ณ โรงแรมรามาการ์เด้น กรุงเทพมหานคร

PP-07 Development of Duplex RT-PCR for Detecting Mixed Infection of Tobacco Mosaic Virus (TMV) and Turnip Mosaic Virus (TuMV) from Brassicaceae Plants 107

PP-08 Development of Pepper Chat Fruit Viroid (PCFVd) Detection Technique in Tomato Seeds 109

PP-09 การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืช Potato Cyst Nematode ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า 111

Interception on the Potato Cyst Nematode Quarantine Pest Associated with Imported Seed Potatoes

PP-10 Study on Status of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Caused of Bacterial Speck Disease in Thailand 112

การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืช Potato Cyst Nematode ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้า

บทคัดย่อ

PP-09

111

Interception on the Potato Cyst Nematode Quarantine Pest Associated with Imported Seed Potatoes

ABSTRACT

Keywords: Potato cyst nematode, parasitic nematode, quarantine pest, imported plant, seed potato

112

กรมวิชาการเกษตร

4. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ เรื่อง การศึกษาความเสี่ยงศัตรูพืชของการนำเข้าผลอินทผาลัมสดจากสาธารณรัฐอิสลามอิหร่าน ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 15 ณ โรงแรมรามาการ์เด้น กรุงเทพมหานคร

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก 4 หลักฐานการปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

กรมวิชาการเกษตร