ห้องสมุดกรมวิชาการเกษตร

ผลงานฉบับเต็ม

ของ

นางณัฏฐพร อุทัยมงคล

ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตร 6ว

ตำแหน่งเลขที่ 214

กลุ่มงานวิจัยการกักกันโรคพืช

กลุ่มวิจัยการกักกันพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง นักวิชาการเกษตร 7ว

ตำแหน่งเลขที่ 214

กลุ่มงานวิจัยการกักกันโรคพืช

กลุ่มวิจัยการกักกันพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ห้องสมุดกรมวิชาการเกษตร
วันที่ 11 เดือน ก.ค. พ.ศ. 2548

ผลงานฉบับเต็ม

ของ

นางณัฏฐพร อุทัยมงคล

ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตร 6ว

ตำแหน่งเลขที่ 214

กลุ่มงานวิจัยการกักกันโรคพืช

กลุ่มวิจัยการกักกันพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง นักวิชาการเกษตร 7ว

ตำแหน่งเลขที่ 214

กลุ่มงานวิจัยการกักกันโรคพืช

กลุ่มวิจัยการกักกันพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

สารบัญ

ผลงานเรื่องเต็ม

ลำดับที่	ชื่อเรื่อง	หน้า
1	การผลิตแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศ	1
2	การศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อ *Erwinia stewartii* สาเหตุโรคเหี่ยวของข้าวโพดในแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก	22
3	การตรวจสอบศัตรูพืชสำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชไร่และรับรองการปลอดโรคเพื่อการส่งออกฤดูการผลิตปี 2545-2547	49

กรมวิชาการเกษตร

การผลิตแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศ

Antiserum for Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* The Causal Agent of Bacterial Spot on Tomato

ณัฏฐพร อุทัยมงคล
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล [1/]
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* โดยวิธี Glutaraldehyde fixed cell โดยใช้ไอโซเลทของ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ที่รุนแรงที่สุดคือ No.260 ซึ่งแยกเชื้อได้จากใบมะเขือเทศที่เป็นโรคจากอำเภอปากช่องจังหวัดนครราชสีมา มาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้เชื้อดังกล่าวปริมาณ 10^9 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ฉีดเข้าใต้ผิวหนังกระต่าย 4 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ หลังการฉีดครั้งสุดท้าย 1 สัปดาห์ ทำการเจาะเลือดกระต่าย 4 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ การหาค่า titer โดยวิธี ELISA และ DIBA พบว่าแอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 2, 3 และ 4 ได้ค่า titer สูงสุด คือ 1: 20,000 แอนติซีรัมที่ผลิตได้มีความไวจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* เท่านั้น โดยสามารถทำให้เกิด ปฏิกิริยากับเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ทุกไอโซเลท แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *X. campestris* pv. *citri, X. campestris* pv. *campestris, X. oryzae* pv. *oryzae, Erwinia carotovora* pv. *carotovora* และ *Pseudomonas solanacearum* รวม 10 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* จากเมล็ดมะเขือเทศต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรและให้ผลของปฏิกิริยาเช่นเดียวกับแอนติซีรัมที่สั่งซื้อจากต่างประเทศ

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 45 04005 009

[1/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

The antiserum for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* was produced from virulent isolate NO. 260 collected from tomato planted at Amphur Pak Chong, Nakhon Ratchasima Province. Antiserum was prepared by using Glutaraldehyde fixed cell techniques, then followed by subcutaneous injection into a white rabbit using 10^9 colony forming unit/ml (cfu/ml) of the bacterial suspension for 4 times at weekly interval. First antiserum was bled at one week after the last injection and continuing collected for 3 times at one week interval. The results indicated that the highest titer of antiserum collected, was 1: 20,000 from the second to the forth bleed using ELISA and DIBA techniques. The sensitivity of antiserum was reacted to 10^4 cfu/ml of bacterial suspension and the produced antiserum was specific against all the isolates of *X. campestris* pv. *vesicatoria* but had no reaction to the other species of tested bacteria

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* L.) เป็นพืชผักที่อยู่ในวงศ์ Solanaceae ที่ปลูกกันมากในหลายประเทศทั้งแถบเอเชีย ยุโรป และอเมริกาใต้ เพื่อการบริโภคผลสดภายในประเทศหรือเพื่อการส่งออก สำหรับประเทศไทยมีแหล่งปลูกอยู่ในภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แบ่งเป็น 2 รูปแบบ คือ เพื่อบริโภคผลสด และเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ การผลิตทั้ง 2 รูปแบบต้องมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากต่างประเทศ หรือใช้เมล็ดพันธุ์ที่ผลิตภายในประเทศ การนำเข้าจากต่างประเทศจะมาจากหลายประเทศ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส ฮอลแลนด์ ญี่ปุ่น เป็นต้น (ตารางที่ 1) ในทางตรงกันข้าม ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีศักยภาพในการส่งออกเมล็ดพันธุ์ไปจำหน่ายยังต่างประเทศเช่นกัน ประเทศผู้ซื้อได้แก่ สหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส เนเธอร์แลนด์ อิตาลี ญี่ปุ่น อิสราเอล สเปน อัฟริกาใต้ เป็นต้น

ศัตรูพืชที่สำคัญของมะเขือเทศได้แก่ โรคและแมลง โรคที่สำคัญและพบมากในทุกแหล่งปลูก คือ โรคใบจุด (Bacterial spot) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* และสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ (Seed borne) ทำให้เชื้อแพร่ระบาดไปกับเมล็ด เชื้อนี้มีพืชอาศัยกว้าง เช่น พริก มะเขือม่วง และวัชพืชหลายๆ ชนิด เมล็ดพันธุ์ส่งออกไปยังต่างประเทศเกือบทุกประเทศที่เป็นคู่ค้าจะกำหนดให้ประเทศไทยต้องมีการตรวจสอบและรับรองว่าเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวต้องปราศจากแบคทีเรียชนิดนี้ โดยอาจเป็นการรับรองในรูปของเมล็ดพันธุ์ หรือรับรองในช่วงระยะการเจริญเติบโตในแปลงปลูก (ตารางที่ 2.1,2.2)

การตรวจสอบโรคใบจุดนี้สามารถตรวจสอบจากเมล็ดพันธุ์ หรือจากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการ การจำแนกเชื้อสาเหตุอาจใช้วิธีการทางสรีรวิทยา, สัณฐานวิทยาและปฏิกิริยาทางชีวเคมี ซึ่งต้องใช้เวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ หรือใช้ วิธี ELISA โดยต้องสั่งซื้อแอนติซีรัมจากต่างประเทศในราคาแพง แต่วิธีทางเซรุ่มวิทยาเป็นวิธีการหนึ่งที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ (Civerolo and Fan, 1982) ดังนั้นการผลิตแอนติซีรัมจากเชื้อแบคทีเรียที่พบในประเทศไทย จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งเพราะมีความเฉพาะเจาะจงสูงกับเชื้อที่ปรากฏในประเทศไทย รวมทั้งยังลดค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อจากต่างประเทศอีกด้วย

ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ จึงเป็นการทดสอบสารแอนติซีรัมจากเชื้อแบคทีเรียในประเทศ เพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1.เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

2.หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ,จานอาหารเลี้ยงเชื้อ,กระดาษไนโตรเซลลูโลส

3.สารเคมีต่างๆที่ใช้ในการแยกเชื้อและจำแนกชนิดแบคทีเรีย

4.กระต่ายพันธุ์ New Zealand สีขาว

5.เครื่องหมุนเหวี่ยง , เครื่องอ่านผล ELISA

6.เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศพันธุ์สีดา

7.ชุดตรวจสอบ ELISA สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ของบริษัท Agdia

วิธีการ

แหล่งที่มาของเชื้อ

เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* No. 260 ได้จากกลุ่มวิจัยโรคพืชที่แยกจากใบมะเขือเทศที่เป็นโรคใบจุด เก็บที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

การนำเชื้อมาเตรียมสภาพเพื่อใช้ผลิตแอนติเจน

การปลูกเชื้อลงบนพืชอาศัย

นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บไว้ในหลอดอาหารเอียง NA มาเลี้ยงเชื้อขยายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารละลายเชื้อให้มีความเข้มข้น 10^8 -10^9 โคโลนี/มิลลิลิตร นำมาปลูกเชื้อโดยการพ่นเชื้อแบคทีเรียบนใบของมะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 2สัปดาห์ ให้คลุมต้นมะเขือเทศด้วยถุงพลาสติกนาน 2 วัน เปิดถุงออกสังเกตุอาการโรค และให้ใช้น้ำกลั่นนึ่งฉีดพ่นแทนเชื้อแบคทีเรีย เป็นตัวเปรียบเทียบ (check)

วิธีการแยกเชื้อแบคทีเรีย

แยกเชื้อแบคทีเรียจากส่วนของพืชที่แสดงอาการจุดฉ่ำน้ำ โดยตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ระหว่างส่วนที่เป็นโรคและส่วนที่ไม่เป็นโรค ชิ้นส่วนนี้นำมาแช่ในสารละลาย 0.1%โซเดียมไฮโปครอไลด์ นาน 1 นาที จากนั้นล้างตามด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แยกตัวอย่างพืชออกเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งนำชิ้นส่วนพืชประมาณ 0.5 กรัมใส่ในหลอดแก้วที่มีน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% ปริมาณ 1 มิลลิลิตรใช้แท่งแก้วที่ฆ่า

เชื้อแล้วบดให้ละเอียด แล้วตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที นำน้ำใสส่วนบนไปเลี้ยงเชื้อโดยการ steak plate บนอาหาร Nutrient agar (NA) ส่วนที่สองโดยวางชิ้นพืชที่ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อบนอาหาร NA นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองส่วนไปบ่มในตู้ที่อุณหภูมิ28°C นาน 24-48 ชั่วโมง เก็บโคโลนีที่มีสีเขียวอมเหลืองไป streakให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร NA อีกครั้งหนึ่ง จากนั้นเก็บเชื้อในหลอดอาหารเอียง NA เพื่อทำการทดสอบต่อไป

การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย

ทำการจำแนกเชื้อแบคทีเรียตามลักษณะทาง สัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และปฏิกริยาชีวเคมี ที่ปรากฏในหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition 1994 และ Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria., Shaad. (2001) และตามวิธีการของ Dye (1960, 1962) Lawrence (1967) รวมทั้งใช้ ELISA ของAgdia kit ตรวจสอบอีกครั้งหนึ่ง

การเตรียมแอนติเจน

นำเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *vesicatoria* No.260 ที่จำแนกชนิดและทดสอบความรุนแรงโรคแล้วมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA (Potato semi-synthetic agar) ให้มีอายุ 48 ชั่วโมง นำมาล้างเซลแบคทีเรีย 3 ครั้งด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) (Allan and Kelman, 1977) แล้วนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifugue) ที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 20 นาที นำเซลแบคทีเรียที่ล้างแล้วมาละลายใน PBS จากนั้นนำไปทำการ fix เซลแบคทีเรียด้วย 2% glutaraldehyde เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (Allan and Kelman, 1977) นำมาทำให้ glutaraldehyde เจือจางหมดไปโดยการ *dialysis* ใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที โดยเปลี่ยน PBS ทุกๆ 4 ชั่วโมง เก็บสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการฉีดกระต่ายต่อไป

การผลิตแอนติซีรัม

ทำการละลายเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการ fix เซลด้วย glutaraldehyde แล้วปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้ได้ประมาณ 10^9 หน่วยโคโลนี /มิลลิลิตรด้วย PBS จากนั้นนำไปผสมกับ Freund's incomplete adjuvant ในอัตรา 1:1 ผสมให้เข้ากันเพื่อนำไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่ายทดลองพันธุ์ New Zealand สีขาว ก่อนการฉีด 1 สัปดาห์ เจาะเก็บเลือดกระต่ายไว้ก่อนเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (Normal serum) จากนั้นนำสารละลายแบคทีเรียที่ผสมกับ adjuvant แล้วฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่าย โดยฉีดสัปดาห์ละหนึ่งครั้ง รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 4 สัปดาห์ หลังการฉีดครั้งสุดท้าย 1 สัปดาห์ เจาะเก็บเลือดกระต่าย 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ แยกและเก็บแอนติซีรัม โดยนำเลือดกระต่ายที่เจาะเก็บมาตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแข็งตัว จากนั้นใช้เข็มลนไฟฆ่าเชื้อ กรีดที่ผิวตรงรอยต่อระหว่างบีกเกอร์กับเลือดจนรอบ นำบีกเกอร์ไปตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 12 ชั่วโมง แล้วนำเอาเฉพาะส่วนน้ำใสมาปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุน

เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเอาส่วนเม็ดเลือดแดงออกไป นำส่วนน้ำใสที่ได้ซึ่งเป็นแอนติซีรัมเก็บแช่แข็งไว้

การหาค่า titer และความไวจำเพาะ (Sensitivity) ของแอนติซีรัม

ดำเนินการโดยใช้วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Clark, 1981; Civerolo and Fan, 1982) และวิธี Dot Immunobinding assay (DIBA) (Hamplton *et al.*, 1990)

การเตรียมแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *vesicatoria* โดยนำเซลแบคทีเรีย *X.campestris* pv. *vesicatoria* No. 260 ที่เลี้ยงไว้บนอาหารแข็ง PSA อายุ 24-48 ชั่วโมง มาละลายโดยใช้ PBS ปรับค่า optical density (OD)ที่ 600 นาโนเมตรให้ได้ 0.1 ซึ่งจะมีความเข้มข้น 10^9 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร นำมาทำ serial dilution โดยใช้สารละลาย PBS หลอดละ 9 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ให้มีความเข้มข้น 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 และ 10 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตรตามลำดับ เตรียมไว้สำหรับใช้ทดสอบหาค่า titer และความไวจำเพาะ(Sensitivity) โดยวิธีELISA และDIBA

การเตรียมแอนติซีรัม การเตรียมแอนติซีรัมสำหรับทดสอบโดยวิธี ELISA ให้นำแอนติซีรัมที่ได้จากการสกัดข้างต้น มาทำให้เจือจางด้วย Conjugate buffer (2.0 กรัม Polyvinyl Pyrrolidone,5.0 กรัม Bovine Serum albumin) สำหรับวิธีทดสอบด้วย DIBAให้เจือจางด้วย Blocking buffer (Tris buffer saline (50 mM Tris,150 mM NaCl ,pH 7.4) เติมด้วย 5% skim milk โดยทั้งสองวิธีจะเตรียมให้แอนติซีรัมเจือจางตั้งแต่ 1:100, 1:500, 1:5000, 1:10,000, 1:15,000, 1:20,000, 1:25,000, 1:30,000, 1:35,000 และ 1:40,000 ตามลำดับ เตรียมไว้สำหรับใช้ทดสอบหาค่า titer และความไวจำเพาะ (Sensitivity) ต่อไป

วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) นำสารละลายเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ ใส่ลงในหลุมของ microtiter plate โดยใส่หลุมละ 50 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้งข้ามคืนที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เชื้อติดหลุม ทำการล้าง plate ด้วยสารละลาย BPS ที่ผสม 0.5 มิลลิลิตรของ Tween 20 (PBST) จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที หยอด antiserum ที่เจือจาง 1:100 ถึง 1:40,000 ด้วย conjugate buffer จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม และ มี normal serum ที่เก็บไว้ตอนแรกเป็นตัวเปรียบเทียบ นำ plate ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงนำออกมาและล้าง plate ด้วย PBST จำนวน 3 ครั้งๆละ 3 นาที หยอดด้วย P-nitrophenyl phosphate ที่ละลายใน substrate buffer ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำ plate ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อปล่อยให้เกิดปฏิกิริยานาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย 3M. Sodium hydroxide หลุมละ 50 ไมโครลิตร อ่านผลการเกิดปฏิกิริยาของแต่ละความเข้มข้นของ antiserum โดยปฏิกิริยาที่ให้ผลบวก (positive) จะปรากฏเป็นสีเหลืองซึ่งเป็นผลการย่อย p-nitophenyl phosphate ส่วนปฏิกิริยาที่ให้ผลลบ (negative) ไม่เกิดสี นำplate

การเกิดปฏิริยาที่ได้ไปอ่านค่าอีกครั้งหนึ่งโดยการใช้เครื่องอ่าน (ELISA READER) ที่ใช้ค่าการดูดซับคลื่นที่ 405 นาโนเมตร ค่าของปฏิกิริยาบวกจะต้องมีค่ามากกว่า negative control 1.5 เท่า

วิธี Dot Immunobinding assay (DIBA) นำสารละลายเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้และมี nomal serum ที่เก็บไว้เป็นตัวเปรียบเทียบ จำนวน 10 ไมโครลิตร นำมาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโรส (Nitrocellulose membrane ขนาด 0.45 ไมครอน) ที่ขีดเป็นตารางด้วยดินสอดำขนาด 1x1 เซนติเมตร ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง 2 จุดต่อความเข้มข้น ทำจำนวน 11 แผ่น เท่าจำนวนแอนติซีรัมที่เจือจางความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมไว้ นำกระดาษไนโตรเซลลูโรสที่หยดสารละลายเชื้อแล้วแต่ละแผ่นไปแช่ใน Blocking buffer นาน 5 นาทีบน rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ล้างกระดาษไนโตรเซลลูโรสใน TBST (TBS 1 ลิตร มี Tween 20 ผสมอยู่ 0.5 มล.) 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ใน แอนติซีรัมที่เตรียมให้เจือจางที่ 1 : 100 ใช้หนึ่งแผ่นต่อหนึ่งความเข้มข้นจนครบ 1:40,000 นาน 1 ชั่วโมง บน rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที แล้วล้างอีก 3 ครั้งๆ ละ 5 นาทีด้วย TBST นำกระดาษไนโตรเซลลูโรสแช่ใน Blocking buffer ที่เติมด้วย Goat-anti-Rabbit ติดฉลากด้วยเอนไซม์บ่งชี้ alkaline phosphatase (Sigma A-8025) ที่ความเข้มข้น 1:1,000 นาน 1 ชั่วโมงบน rotary shaker ความเร็วรอบ 50 รอบ/นาที ล้างกระดาษไนโตรเซลลูโลสด้วย TBST อีก 3 ครั้ง ใน TBS pH 9.6 เป็นเวลา 5 นาที เพื่อปรับสภาพให้เหมาะสมกับปฏิกิริยาของเอนไซม์ ก่อนแช่ลงใน substrate buffer โดยเตรียมจาก 0.1 มิลลิลิตรของสารละลาย 5-bromo-4-chloroindoxyl phosphate ใน dimethyl formamide ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตรของสารละลาย Nitro Blue tetrazolium ใน 95% ethanol ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 20 ไมโครลิตรของ 2M $MgCl_2$ และ 9 มิลลิลิตรของ TBS pH 9.6 ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องบน rotary shaker ความเร็วรอบ 50 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ปฏิกิริยาบวกจะเกิดจุดสีม่วงน้ำเงินขึ้น ส่วนปฏิกิริยาที่ให้ผลลบ (negative) ไม่เกิดสี

การทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัม (Specificity of antiserum) กับเชื้อแบคทีเรียต่างๆ

ทำการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัมโดยวิธี ELISA กับเชื้อแบคทีเรียต่างๆ จำนวน 14 ไอโซเลท ดังนี้ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* จำนวน 4 ไอโซเลท , *X. campestris* pv. *citri* จำนวน 2 ไอโซเลท *X. campestris* pv. *campestris* จำนวน 2 ไอโซเลท *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 2 ไอโซเลท *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* จำนวน 2 ไอโซเลท *Pseudomonas solanacearum* จำนวน 2 ไอโซเลท (ตารางที่ 6) โดยนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ นี้มาเลี้ยงบนอาหาร PSA ให้มีอายุ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาละลายด้วย PBS ให้ได้ค่า OD = 0.1 ที่ 600 นาโนเมตร นำสารละลายของเชื้อแต่ละชนิดมาหยดในหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร ของ microtiter plate วางไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาทำตามวิธี ELISA ดังที่

อธิบายไว้ข้างต้นแล้ว โดยใช้แอนติซีรัมในอัตราส่วน 1:1,000(ตามคำแนะนำในฉลากของGoat-antirabbit) จากนั้นทำการตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาในแต่ละชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบประสิทธิภาพแอนติซีรัมที่ผลิตได้และแอนติซีรัมจากต่างประเทศ

นำสารละลายเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 10-10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตรที่เตรียมตามวิธีที่อธิบายไว้ข้างต้นแล้วแต่ละความเข้มข้นมาหยดใน microplate หลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 2 หลุมต่อความเข้มข้นของเชื้อ บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาทำตามวิธี ELISA ดังที่อธิบายไว้ข้างต้นแล้ว ทำการทดสอบเปรียบเทียบการใช้แอนติซีรัมที่ผลิตในอัตราส่วน 1: 1000 ทดสอบเปรียบเทียบกับ แอนติซีรัมจากต่างประเทศคือของบริษัท Agdia จากสหรัฐอเมริกา ใช้อัตรา1:1,000 ตามคำแนะนำในคู่มือที่แนบ เปรียบเทียบปฏิกิริยาที่ได้

การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิต กับเมล็ดมะเขือเทศ

นำเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์สีดาที่ไม่เป็นโรคจำนวนสายพันธุ์ละ 100 เมล็ดแช่ในสารละลายเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่10-10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตรที่เตรียมตามวิธีที่อธิบายไว้ข้างต้นแล้ว นาน 15-20 นาที นำขึ้นผึ่งให้แห้งแล้วเก็บไว้ทดสอบ โดยการนำเอาเมล็ดมะเขือเทศแต่ละความเข้มเข้นออกมาแช่ใน PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นาน 15 นาที นำสารละลายที่ได้ของแต่ละความเข้มข้นไปตรวจสอบโดยวิธี ELISA และ DIBA โดยใช้แอนติซีรัมที่ผลิตได้ความเข้มข้น 1: 1000 เป็นตัวทดสอบ

ระยะเวลาดำเนินการ

ตุลาคม 2544 – กันยายน 2546

สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

แหล่งที่มาของเชื้อ

เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* No. 260 จากกลุ่มวิจัยโรคพืชที่แยกจากใบมะเขือเทศ เก็บที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

การนำเชื้อมาเตรียมสภาพเพื่อใช้ผลิตแอนติเจน

การปลูกเชื้อลงบนพืชอาศัย

พบลักษณะอาการโรคบนใบหลังจากเพาะเชื้อแล้ว 5 วัน อาการเริ่มแรกบนใบจะเห็นเป็นจุดกลมๆเล็ก ๆ ฉ่ำน้ำสีเขียวจาง ๆ จากนั้นแผลจะขยายออกไป มีรูปร่างกลมไม่สม่ำเสมอสีน้ำตาลและบริเวณกลางแผลจะมีสีน้ำตาล เซลของพืชตายจึงมีลักษณะเป็น necrotic ต่อไปใบจะเหลืองจะร่วงไปในที่สุด

การแยกเชื้อแบคทีเรีย

ได้เชื้อที่มีโคโลนีมีสีเขียวอมเหลืองจากการแยกเชื้อด้วยการ streak plate และ โดยการวางชิ้นพืชบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย

จากการศึกษาลักษณะทางทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีและELISA พบว่าเชื้อ NO 260 ตรงกับเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* (ตารางที่ 3)

การหาค่า titer และความไวจำเพาะ (Sensitivity) ของแอนติซีรัม

จากการตรวจหาค่า titer ของแอนติซีรัมเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* NO 260 โดยวิธี ELISA และDIBAพบว่า titer ของแอนติซีรัม ที่เจาะครั้งแรกได้ค่า titer เพียง 1:5,000 แต่ในครั้งที่ 2 ครั้งที่ 3 และครั้งที่ 4 มีความสูงถึง 1:20,000 การที่ titer ที่เจาะในครั้งแรกมีค่าต่ำน่าจะเนื่องมาจากแอนติเจนหรือเชื้อแบคทีเรียที่ฉีดเข้าไปในกระต่ายเพิ่งเริ่มเข้าไปกระตุ้นให้กระต่ายผลิตแอนติบอดีในร่างกาย ทำให้ titer ของการเจาะเลือดครั้งแรกมีค่าต่ำ เมื่อเจาะในครั้งที่ 2, 3 และ 4 กระต่ายได้ผลิตแอนติบอดีขึ้นมาสูงสุดแล้ว เช่นเดียวกับที่ Ball *et al.*,(1990) ได้รายงานไว้ แอนติซีรัมที่ผลิตได้มีความไวในการตรวจหาเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ในปริมาณต่ำสุด 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรด้วยวิธี ELISA (ตารางที่4) และ DIBA (ตารางที่5)

การทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัม (Specificity of antiserum) กับเชื้อแบคทีเรียต่างๆ

จากการทดสอบแอนติซีรัมที่ผลิตกับเชื้อแบคทีเรีย 6 ชนิด 14 ไอโซเลท พบว่าแอนติซีรัมของเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ที่ผลิตได้เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ทั้ง 4 สายพันธุ์ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *X. campestris* pv. *citri, X. campestris* pv. *campestris, X. oryzae* pv. *oryzae, Erwinia carotovora* pv. *carotovora, Pseudomonas solanacearum* รวม 10 ไอโซเลท แสดงว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* (ตารางที่6)

การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ และแอนติซีรัมจากต่างประเทศ

ผลการทดลองพบว่าเมื่อนำแอนติซีรัมไปตรวจสอบกับเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* พบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้ และแอนติซีรัมที่ซื้อให้ผลการเกิดปฏิกิริยาเหมือนกัน โดยสามารถตรวจสอบเชื้อได้ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อต่ำสุด10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 7)

การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตกับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ

ผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* จากเมล็ดมะเขือเทศโดยวิธี ELISA และ DIBA โดยสามารถตรวจสอบเชื้อได้ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ ต่ำสุด10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 8)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการนำเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* No. 260 จากกลุ่มวิจัยโรคพืชที่ได้เชื้อโดยแยกจากมะเขือเทศแสดงอาการใบจุด ที่ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมามาเตรียมสภาพเชื้อเพื่อใช้ในการผลิตแอนติเจน โดยการปลูกเชื้อลงบนพืชอาศัย(มะเขือเทศพันธุ์สีดา) ทำการแยกเชื้อ แล้วจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยการตรวจคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ปฏิกิริยาชีวเคมี และ ชุดตรวจสอบ ELISA Kit พบว่าเชื้อที่ทำการศึกษาคือเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* No. 260 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่รุนแรงมาผลิตแอนติซีรัมโดยวิธี Glutaraldehyde fix cell และใช้ความเข้มข้น 10^9 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรแล้วฉีดกระต่ายทดลองพันธุ์ New Zealand สีขาว 4 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ พบว่าแอนติซีรัมที่เจาะครั้งที่ 2, 3 และครั้งที่ 4 มีค่า titer สูงสุดคือ 1:20,000 เมื่อทดสอบโดยวิธี ELISA และ DIBA รวมทั้ง แอนติซีรัมที่ผลิตได้มีความไวจำเพาะในการตรวจหาเชื้อได้ที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของแอนติซีรัมที่ใช้คือ 1:1000 จากการศึกษาความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัมพบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้สามารถเกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *X. campestris* pv. *citri, X. campestris* pv. *campestris, X. oryzae* pv. *oryzae, Erwinia carotovora* pv. *carotovora, Pseudomonas solanacearum* ทั้งหมด 10 ไอโซเลท แสดงว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* เท่านั้นและเมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้กับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* จะตรวจพบเชื้อได้ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อต่ำสุดคือ10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับแอนติซีรัมที่สั่งซื้อจากต่างประเทศผลให้การเกิดปฏิกิริยาเหมือนกัน ดังนั้นแอนติซีรัมที่ผลิตได้สามารถใช้แทนแอนติซีรัมที่สั่งซื้อโดยใช้ความเข้มข้น 1:1000

เอกสารอ้างอิง

Allan, E. and A. Kelman. 1977. Immunofluorescent strain procedures for detection and identifcation of *Erwinia carotovora* var. *carotovora.* Phytopathology 67:1305-1312.

Ball, E.M., R.O. Hampton, S.H. De Boer and N.Schaad. 1990. Polyclonal. p.33-54 *In* (R.O. Hampton, E.M. Ball, S.H. Boer; eds). Serological methods for detection and identification of virail and bacterial plant pathogens a laboratory manual. The American Phytopathological Society st. Paul Mimmesota.

Breed, R. .S., E.G.D. Murry and N. R. Smith. 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th ed. By William & Wilkins Co, Baltimore U.S.A.

Civerolo, E.L. and F.Fan.1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detecting and identification by Enzyme linked immunosorbent assay. Plant Dis. 66:231-235.

Clark, M.F. 1981. Immunosorbent assays in plant pathology. Ann. Rev. Phytopathol. 19:83-106.

Dye, D.W. 1960. Pectolytic Activity in Xanthomonas N.A.J. of Sci. 3:61-69.

Dye, D.W. 1962. The inadequacy of the usnal determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. N.Z.J. of Sci 5:395-416.

Good, M.J., and S. Myron. 1980. Prevention the Key to Controlling Bacterial Spot and Bacterial Speck of Tomato. Plant Dis. 64:831-834.

Hamplton, R.O, E.M. Ball, S.H. De Boer. 1990. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant Pathogens a laboratory manual. The American Phytopathological society St. Paul Minnesota.

Holt, J.G., N.R., Krieg P.H.A., Sneath, J.T. Staley. and S.T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed.by Williams & Wilkins, Baltimore, USA 376 p.

Lawrence, R.C. 1967. Microbial lipases and related esterases Part 1. Debtection, Distribution and production of Microbial lipases. Dainy Sci. Abstr. 29(11): 1-8.Schaad, N.W., J.B. Jones, and W. Chun. 2001 In Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third Edition. APS Press, St. Paul, Minnesota. p. 178-200.

ตารางที่ 1 ข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากต่างประเทศ พ.ศ 2545-2546

ลำดับที่	รายชื่อประเทศที่นำเข้า	ปริมาณการนำเข้า (กก.)	บริษัทที่นำเข้า
1	เนเธอร์แลนด์ (ฮอลแลนด์)	890.582	บจก. อดัมส์เอ็นเตอร์ไพรเซส, บจก. ซีนเมล็ดพันธุ์ บจก. เซมินิส เวเจทเทเบิ้ล ซีดส์, บจก. ดัชท์ กรีนเนอร์รี่ บจก. ที.เอส.เอ
2	อิตาลี	2.467	บจก. อดัมส์เอ็นเตอร์ไพรเซส, บจก. เอ็ อี เอ็นเตอร์ไพรเซส
3	อิสราเอล	1.811	บจก. ที เอ็น ซีดส์, บจก. ซีนเมล็ดพันธุ์, บจก. ที เค อาร์ บจก. เจียไต๋เมล็ดพันธุ์, บจก. ไทยโกลเด้นซีดส์
4	จีน	0.244	บจก. ซีนเมล็ดพันธุ์, บจก. เซมินิส เวเจทเทเบิ้ล ซีดส์, บจก. เมล็ดพืชพันธุ์ตราสิงห์
5	สหรัฐอเมริกา	2,297.987	บจก. ซีนเมล็ดพันธุ์, บจก. จีเนียนเมล็ดพันธุ์ บจก. เซมินิส เวเจทเทเบิ้ล ซีดส์, บจก. ไทยซูนฟูดส์ บจก. ซันซีดส์, บจก. ซินเจนทาซีดส์, บจก.อีสเวส ซีดส์ บจก. เจียไต๋เมล็ดพันธุ์, บจก. เฮง ฮวด เฮง
6	เกาหลี	23.75	บจก. เซมินิส เวเจทเทเบิ้ล ซีดส์, บจก. เมล็ดพืชพันธุ์ตราสิงห์
7	ญี่ปุ่น	11.748	บจก. ซาคาตะ, บจก. เชี่ยง เฮง ซีดส์
8	เวียดนาม	0.24	บจก. เมล็ดพืชพันธุ์ตราสิงห์
9	อินเดีย	25.061	บจก. ซินเจนทาซีดส์, บจก.นามธารี ซีดส์
10	ฝรั่งเศส	0.395	บจก. ซีนเมล็ดพันธุ์, บจก.จีเนียนเมล็ดพันธุ์, บจก. เอ.จี.ยู
11	ไต้หวัน	154.14	บจก. เพื่อนเกษตร
12	อิสราเอล	1.811	บจก. ที เอ็น ซีดส์, บจก. ซีนเมล็ดพันธุ์, บจก. ที เค อาร์, บจก. เจียไต๋เมล็ดพันธุ์, บจก. ไทยโกลเด้นซีดส์
13	เดนมาร์ก	0.505	บจก. เรียว ซีดส์
14	อินโดนีเซีย	370	บจก. อีสเวท ซีดส์
รวม	**14 ประเทศ**	**3,780.3741**	**24 บริษัท**

ตารางที่ 2.1 รายชื่อเชื้อโรคศัตรูพืชที่ประเทศผู้ซื้อต้องการให้รับรองในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์

พืช	เชื้อโรคและศัตรูพืช	ประเทศผู้ซื้อ
มะเขือเทศ (Tomato) (*Lycopersicon esculentum* L.)	<u>เชื้อรา</u> *Claviceps sclerotia* *Colletotrichum coccoides* *Colletotrichum phomoides* *Didymella lycopersici* *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici race* III *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* *Phoma destructiva* *Phoma rostrupi* *Phytophthora capsici* *Phytophthora infestans* *Verticillium albo-atrum* *Verticillium dahliae* *Verticillium tricarpus* <u>แบคทีเรีย</u> *Acidovorax* sp. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*) (*Corynebacterium michiganense*) (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) (*Corynebacterium sepedonicum*) *Erwinia corotovora* var. *carotovora* *Pseudomonas corrugata* *Pseudomonas solanacearum* *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* *(Pseudomonas punctulans)* *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* ***Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria**** <u>ไวรัส</u> Arabis Mosaic Virus Capsicum Mosaic Virus Cucumber Mosaic Virus (CMV)*	สหรัฐอเมริกา, ฝรั่งเศส, เนเธอร์แลนด์ , อิตาลี, ญี่ปุ่น, อิสราเอล, สเปน, อัฟริกาใต้

พืช	เชื้อโรคและศัตรูพืช	ประเทศผู้ซื้อ
มะเขือเทศ (Tomato) (*Lycopersicon esculentum* L.)	Cucumber Ring Spot Virus (CRSV) Pepino Mosaic Virus (PeMV) Potato Mop Top Virus (PMTV) Potato Yellow Dwarf Virus Potato Virus Y Squash comovirus Tobacco Mosaic Virus (TMV)* Tobacco Rattle Virus (TRV) Tomato Black Ring Virus (TBRV) Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV) Tomato Mosaic Virus* (ToMV) Tomato Ring Spot Virus (TRSV) Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) Tomato Streak Virus (TSV) Tomato Yellow Virus (TYV) **ไวรอยด์** Potato Spindle Tuber Viroid (PSTV) (Tomato Bunchy Top Virus) **ไมโคพลาสมา** Potato Witches Broom (MLO) Tomato Big Bud (MLO) Tomato stolbur (MLO) **ไส้เดือนฝอย** *Heterodera schachtii* *Cacoecimorpha pronubane* *Dermestidae beetles* *Trogoderma* spp. **วัชพืช** Cuscuta spp. (Dodder)	สหรัฐอเมริกา, ฝรั่งเศส, เนเธอร์แลนด์ , อิตาลี, ญี่ปุ่น, อิสราเอล, สเปน, อัฟริกาใต้

* ข้อมูลจากกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ตารางที่ 2.2 รายชื่อเชื้อโรคศัตรูพืชที่ประเทศผู้ซื้อต้องการให้รับรองในเมล็ดพันธุ์ที่ส่งออก

พืช	เชื้อโรคและศัตรูพืช	ประเทศผู้ซื้อ
มะเขือเทศ (Tomato) (*Lycopersicon esculentum* L.)	<u>เชื้อรา</u> *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* *Fusarium oxysporum* race III *Didymella ligulicola* *Deplodina lycopersici* *Phytophthora capsici* <u>แบคทีเรีย</u> ***Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*** *Corynebacterium michiganenense* pv *michiganense* *Pseudomonas pustulena* (*Pseudomonas punctulans*) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* *Pseudomonas corrugata* *Pseudomonas solanacearum* <u>ไวรัส</u> Tobacco streak virus Tomato ring spot virus (TRSV) Arabis Mosaic virus Tomato mosaic virus (ToMV) Pepino mosaic virus (PeMV) Tobacco mosaic virus (TMV) Tomato Bushy stunt virus (TBSV) <u>ไวรอยด์</u> Potato spindle tuber viroid Tomato Bunchy top virus	มาเลเซีย, เมริเซียส, อินเดีย, ไอสแลนด์, อิสราเอล, สหรัฐอเมริกา, ซัมบับเวย์, ศรีลังกา, ญี่ปุ่น

*ข้อมูลจากกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบลักษณะของเชื้อที่แยกจากมะเขือเทศเป็นโรคใบจุด

ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของแบคทีเรีย NO. 260	ผลการทดสอบทางชีวเคมีและสรีรวิทยา	
	ปฏิกิริยาทดสอบ	ผลปฏิกริยา
ปร่าง เป็นแท่ง	Oxidase test	-
ารติดสี แกรมลบ	Catalase test	+
ารเคลื่อนไหว มี flagella	Arginine dihydrolase	+
นาดของเซล 0.7x 1.8 um	Indole production	-
กษณะของโคโลนีบนอาหารชนิดต่างคือ	Litmus milk	+
บนอาหาร NA อายุ 3 วัน โคโลนี กลม นูน มัน ขอบเรียบ สีเหลืองอมเขียว	Hydrolysis of starch	+
บน King' s medium B โคโลนี กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ ไม่เปลี่ยนสีอาหาร	Hydrolysis of Tween 80	-
	Hydrolysis of Gelatin	-
	Urease production	-
	H_2S production	+
GyCA โคโลนีกลมนูนเยิ้มเป็นเมือกสีเหลือง เชื้อเจริญเติบโตบนอาหารได้ดี	ปฏิกิริยาการสร้าง acid จาก	
	D-glucose	acid
การย่อยบนมันฝรั่ง (Protopectinase activity) เชื้อนี้จะเติมโตบนมันฝรั่งมีลักษณะเยิ้มเป็นมันและสามารถย่อยมันฝรั่งได้ทำให้มันฝรั่งยุบตัวลง	D-galactose	acid
	Saccharose	acid
	Lactose	acid
	Raffinose	acid
	L – Inositol	-
	D – xylose	acid
	Cellobiose	acid
	D-sorbitol	-
	Dulcitol	-
	D + mannose	acid
	Rhamnose	-
	L –Arabinose	acid
	Dextrose	acid
	Maltose	acid
	Erythritol	-

ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของแบคทีเรีย NO. 260	ผลการทดสอบทางชีวเคมีและสรีรวิทยา	
	ปฏิกิริยาทดสอบ	ผลปฏิกริยา
	Salicin	-
	Mannitol	-
	L – iso – lencine	acid
	D + Melibiose	-
	Adenine	-
	Adonitol	-
	D – ribose	acid
	Glycerol	acid
	Tyrosinase	acid

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4 แสดงผลการหาค่า Titer และความไวจำเพาะ ของแอนติซีรัม โดยวิธี ELISA

ความเข้มข้นของแอนติซีรัม	สัปดาห์ที่ 1								สัปดาห์ที่ 2								สัปดาห์ที่ 3								สัปดาห์ที่ 4							
	ความเข้มข้นของเชื้อ								ความเข้มข้นของเชื้อ								ความเข้มข้นของเชื้อ								ความเข้มข้นของเชื้อ							
	10	10^{2}	10^{3}	10^{4}	10^{5}	10^{6}	10^{7}	10^{8}	10	10^{2}	10^{3}	10^{4}	10^{5}	10^{6}	10^{7}	10^{8}	10	10^{2}	10^{3}	10^{4}	10^{5}	10^{6}	10^{7}	10^{8}	10	10^{2}	10^{3}	10^{4}	10^{5}	10^{6}	10^{7}	10^{8}
ELISA 1:100	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4
1:5 0 0	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4
1:1,000	-	-	-	+3	+3	+3	+3	+3	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4
1:5,000	-	-	-	+3	+3	+3	+3	+3	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4
1:10,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4
1:15,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+3	+3	+3	+3	+3	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4
1:20,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+3	+3	+3	+3	+3	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4
1:25,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:30,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:35,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:40,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Negative control ที่ OD 405 มีค่าเท่ากับ 0.134

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.201-0.360 ให้ผลการทดสอบเป็น +1

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.361-0.512 ให้ผลการทดสอบเป็น +2

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.513-0.987 ให้ผลการทดสอบเป็น +3

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.988 ให้ผลการทดสอบเป็น +4

ตารางที่ 5 แสดงผลการหาค่า Titer และความไวจำเพาะ ของแอนติซีรัม โดยวิธี DIBA

ความเข้มข้นของแอนติซีรัม	สัปดาห์ที่ 1 ความเข้มข้นของเชื้อ								สัปดาห์ที่ 2 ความเข้มข้นของเชื้อ								สัปดาห์ที่ 3 ความเข้มข้นของเชื้อ								สัปดาห์ที่ 4 ความเข้มข้นของเชื้อ							
	10	10^{2}	10^{3}	10^{4}	10^{5}	10^{6}	10^{7}	10^{8}	10	10^{2}	10^{3}	10^{4}	10^{5}	10^{6}	10^{7}	10^{8}	10	10^{2}	10^{3}	10^{4}	10^{5}	10^{6}	10^{7}	10^{8}	10	10^{2}	10^{3}	10^{4}	10^{5}	10^{6}	10^{7}	10^{8}
DIBA 1:100	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
1: 5 0 0	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
1:1,000	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
1:5,000	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
1:10,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
1:15,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
1:20,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
1:25,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:30,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:35,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:40,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\+ ปฏิกิริยาบวก เกิดจุดสีม่วง

\- ปฏิกิริยาบวกลบ ไม่เกิดจุดสีม่วง

ตารางที่ 6 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตแอนติซีรัมและศึกษาปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่ได้จากเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

หมายเลข	ชื่อ	พืชอาศัย	แหล่งที่มา	ปฏิกิริยา ELISA
1	*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*	มะเขือเทศ	ขอนแก่น	+4
2	*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*	มะเขือเทศ	อุดรธานี	+4
3	*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*	มะเขือเทศ	ขอนแก่น	+4
4	*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*	มะเขือเทศ	ขอนแก่น	+4
931	*Xanthomonas campestris* pv. *citri*	ส้มเขียวหวาน	ปทุมธานี	-
1007	*Xanthomonas campestris* pv. *citri*	มะนาว	เพชรบุรี	-
12	*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*	คะน้า	กาญจนบุรี	-
53	*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*	บลอคเคอร์ลี่	กรุงเทพฯ	-
7	*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*	ข้าว	ปทุมธานี	-
0 0 8	*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*	ข้าว	ปทุมธานี	-
253	*Erwinia carotovora* pv. *carotovora*	กะหล่ำ	ปทุมธานี	-
262	*Erwinia carotovora* pv. *carotovora*	ผักกาดหอม	สุราษฎร์ธานี	-
238	*Pseudomonas solanacearum*	ขิง	ชุมพร	-
334	*Pseudomonas solanacearum*	มะเขือเทศ	หนองคาย	-

หมายเหตุ : 1/ Negative control ที่ OD 405 มีค่าเท่ากับ 0.100

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.150-0.179 ให้ผลการทดสอบเป็น +1

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.180-0.259 ให้ผลการทดสอบเป็น +2

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.260-0.349 ให้ผลการทดสอบเป็น +3

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.350 ให้ผลการทดสอบเป็น +4

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้กับแอนติซีรัมที่นำเข้าจากต่างประเทศ ELISA

แอนติซีรัม	ความเข้มข้นของปริมาณเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria*							
	10	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
แอนติซีรัมที่ผลิต	-	-	-	+3	+4	+4	+4	+4
แอนติซีรัมของ Agdia	-	-	-	+3	+4	+4	+4	+4

Negative control ที่ OD 405 มีค่าเท่ากับ 0.134

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.201-0.360 ให้ผลการทดสอบเป็น +1

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.361-0.512 ให้ผลการทดสอบเป็น +2

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.513-0.987 ให้ผลการทดสอบเป็น +3

ค่า OD 405 มากกว่า 0.988 ให้ผลการทดสอบเป็น +4

ตารางที่ 8 การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัม กับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ

แอนติซีรัม	ความเข้มข้นของปริมาณเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria*							
	10	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
ELISA[1/]	-	-	-	+3	+4	+4	+4	+4
DIBA[2/]	-	-	-	+	+	+	+	+

1/ Negative control ที่ OD 405 มีค่าเท่ากับ 0.177

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.266-0.400 ให้ผลการทดสอบเป็น +1

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.401-0.645 ให้ผลการทดสอบเป็น +2

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.646-0.999 ให้ผลการทดสอบเป็น +3

ค่า OD 405 มากกว่า 1.000 ให้ผลการทดสอบเป็น +4

2/ + ปฏิกิริยาบวก เกิดจุดสีม่วง

- ปฏิกิริยาลบ ไม่เกิดจุดสีม่วง

การศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อ *Erwinia stewartii* สาเหตุโรคเหี่ยวของข้าวโพดในแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก

Study on the Dissemination of *Erwinia stewartii* Causing Bacterial Wilt of Corn in Growing Exporting Areas

ณัฏฐพร อุทัยมงคล ดรุณี วงศ์ศศิธร 1/
สุรพล ยินอัศวพรรณ ชลธิชา รักใคร่
กลุ่มงานวิชาการกักกันโรคพืช กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรีย *Erwinia stewartii* (*Pantoea stewartii*) สาเหตุโรคเหี่ยว (Bacterial wilt) ของข้าวโพดจัดเป็นศัตรูพืชกักกัน (Quarantine pest) ของประเทศผู้สั่งซื้อเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากประเทศไทย โดยประเทศผู้ซื้อขอให้ระบุข้อความในใบรับรองปลอดศัตรูพืชว่าเมล็ดพันธุ์ต้องปราศจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ หรือเมล็ดพันธุ์ต้องได้มาจากแหล่งผลิตที่ปราศจากเชื้อ *E. stewartii* จากการศึกษาในแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเพื่อการส่งออกในระหว่างปี 2541-2544 (ฤดูผลิต41/42-44/45) จำนวน 331 แปลงเกษตรกร ในพื้นที่ 2,692.88 ไร่ เก็บตัวอย่าง 503 ตัวอย่าง พบแบคทีเรีย 8 ไอโซเลทที่ทำให้เกิดโรคกับข้าวโพด เมื่อตรวจสอบทางสรีรวิทยา สัณฐานวิทยา ปฏิกริยาชีวเคมี ELISA การเจริญบนอาหาร Nigrosin และการตรวจสอบด้วยระบบ Biolog MT พบว่ามีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลทที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงเชื้อ *E. stewartii* ซึ่งแยกเชื้อได้จากต้นที่ปลูกในแปลงทดลองเพื่อทดสอบสายพันธุ์สำหรับการส่งออกโดยใช้เมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศในพื้นที่อำเภอสูงเม่น จังหวัดแพร่และอำเภอแม่ระมาด จังหวัดตาก ซึ่งขณะนี้ได้ถูกกำจัดและควบคุมโรคหมดสิ้นแล้ว

รหัสทะเบียนวิจัย 44 04005 009

1/ สำนักผู้เชี่ยวชาญ กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Erwinia stewartii, the causal agent of bacterial wilt of corn, is the quarantine pest for many importing country. Field survey for *Erwinia stewartii* in Thailand was conduct in the area of corn seed production. Suspected disease samples were collected from 331 corn fields for bacterial isolation. The pathogenicity test for bacterial cultures collected from disease samples has been done. The 8 isolates from 503 bacterial cultures were pathogenic to corn seedlings. The morphological, biochemical, physiological and Biolog MT tests revealed 2 plant pathogenic isolates as *E. stewartii*. Then, both isolates were traced back to the infested corn field in Prae and Tak province for eradication.

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

ข้าวโพด (*Zea mays L.*) จัดว่าเป็นธัญพืชที่สำคัญหนึ่งในสามของโลกรองจากข้าวและข้าวสาลี แหล่งเพาะปลูกอยู่ในเขตอบอุ่นและร้อนชื้นที่ต้องอาศัยน้ำฝนหรือการชลประทานที่ดี ประเทศที่ปลูกข้าวโพดเป็นพืชหลักที่สำคัญได้แก่ สหรัฐอเมริกา บราซิล เม็กซิโก อาร์เจนติน่า จีน อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และประเทศไทย เป็นต้น ประเทศไทยมีการปลูกข้าวโพดเพื่อการบริโภค การอุตสาหกรรม และใช้เป็นอาหารสัตว์ ข้าวโพดที่ปลูกได้แก่ ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวโพดฝักอ่อน ข้าวโพดหวาน ข้าวโพดเทียนหรือข้าวโพดข้าวเหนียว นอกจากนี้ประเทศไทยยังเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม (Hybrid corn) เพื่อจำหน่ายที่ใหญ่แห่งหนึ่งในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แหล่งปลูกข้าวโพดจะอยู่เขตภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในปี 2543/44 มีพื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ประมาณ 7.87 ล้านไร่ ให้ผลผลิต 4.45 ล้านตัน ส่งออก 0.28 ล้านตันไปยังประเทศ มาเลเซีย อินโดนีเซีย สิงคโปร์ ฯลฯ มูลค่าประมาณ 1,315 ล้านบาท (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2546) นอกจากนี้ยังส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดไปยังประเทศ อาร์เจนติน่า บราซิล ชิลี เอควาดอร์ อียิปต์ อินเดีย อินโดนีเซีย มาเลเซีย ญี่ปุ่น ปากีสถาน เป็นต้น (กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2544)

ปัจจุบันการปลูกข้าวโพดมักประสบปัญหาเรื่องโรคและแมลงศัตรูพืชที่ทำให้ผลผลิตลดลง โรคที่สำคัญในข้าวโพด ได้แก่ โรคราน้ำค้าง โรคใบไหม้ โรคราสนิม โรคเหี่ยวและโรคโคนเน่า เป็นต้น โรคเหล่านี้สามารถถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ได้ (Seed Transmission) โรคที่เกิดแล้วยากต่อการกำจัดคือโรคที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ โรคเหี่ยว (Stewart's bacterial wilt) มีเชื้อสาเหตุ คือ *Erwinia stewartii* (*Pantoea stewartii*) และ Goss's Bacterial Wilt มีเชื้อสาเหตุ คือ *Corynebacterium michiganense* subsp. *nebraskense* ในต่างประเทศมีรายงานความเสียหายของโรคที่เกิดจากแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ โดยเฉพาะโรค Stewart's bacterial wilt ในประเทศสหรัฐอเมริกามีรายงานว่าโรคนี้ก่อให้เกิดความเสียหายให้แก่ข้าวโพดเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ในรัฐ Iowa, Illinois และIndiana เกิดกับข้าวโพดหวานมากกว่าข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และหากมีการทำลายในระยะที่ก่อนต้นข้าวโพดจะแก่ โรคจะเข้าทำลายในข้าวโพดพันธุ์ต้นเตี้ยได้มากกว่าพวกที่มีลำต้นสูง (Pepper, 1967) เคยมีรายงานการสูญเสียของข้าวโพดหวานในรัฐนิวยอร์คสูงถึง 20-100% ปัจจุบันประเทศสหรัฐอเมริกาแก้ปัญหาโดยการใช้ข้าวโพดลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคนี้ หรือมีการใช้เมล็ดพันธุ์ที่ปราศจากโรค มีการพ่นด้วยสารกำจัดแมลงเพื่อกำจัดแมลงพาหะก่อนฤดูปลูกซึ่งเป็นวิธีการควบคุมอีกวิธีหนึ่ง (Jim *et al.*, 2001) นอกจากสหรัฐอเมริกาแล้ว ยังมีการระบาดของโรคนี้ในแหล่งปลูกของข้าวโพดในประเทศอื่นๆ เช่น บราซิล แม็กซิโก โซเวียต โปแลนด์ ยูโกสลาเวีย อิตาลี แคนาดา (Hadgistevicd, 1986) ความเสียหายจะเกิดมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความอ่อนแอของพันธุ์ ข้าวโพด (susceptible) และระยะของพืชที่เชื้อเข้าทำลาย

ในประเทศไทยเคยมีบันทึกรายงานแบคทีเรียชนิดนี้ในปี 2515 (Chantrasrikul, 1962) รายงานของ OEPP/EPPO ในปี 1978 และ 1999 ระบุว่า เคยพบในประเทศไทยแต่ไม่มีหลักฐานการพบ อย่างไรก็ตามมีการระบุพบ bacteria ชนิดนี้ในประเทศไทยในรายชื่อศัตรูพืชของ FAO ทำให้ประเทศผู้นำเข้าออกข้อกำหนด

ทางกักกันพืชให้ประเทศไทยต้องมีการรับรองเมล็ดพันธุ์หรือรับรองแปลงผลิตข้าวโพดว่าปราศจากเชื้อดังกล่าวก่อนส่งออก

เชื้อ *E. stewartii* (E.F. Smith) Dye, 1963 หรือ *Pantoea stewartii* (E.F. Smith) Margaert *et al.*,1993 สาเหตุโรคเหี่ยว Stewart's bacterial wilt (Bacterial wilt) ของข้าวโพดจัดเป็นโรคเมล็ดพันธุ์ (Lamka *et al.*, 1991) ชนิดหนึ่ง สามารถถ่ายทอดโรคทางเมล็ดพันธุ์ได้โดยเชื้อสาเหตุติดอยู่ในส่วนของ endosperm (Ivanoff, 1933) สามารถตรวจพบเชื้อนี้กับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดได้แม้จะเก็บไว้นานมากกว่า 5 เดือน การเข้าทำลายข้าวโพดของโรคนี้เมื่อพืชเจริญเติบโตเต็มที่หลังจากติดฝักแล้ว ต้นที่เป็นโรคจะให้ ฝักไม่ปกติผิดรูปไป เมล็ดมีขนาดเล็กลง หดสั้น งอ และไม่มีสี และมีผลต่อความงอกของเมล็ด (Pepper, 1967; Block, 1998) ข้าวโพดที่เป็นโรคจะแสดงลักษณะอาการโรค 2 แบบ คือ แบบที่ 1 อาการเหี่ยวในระยะต้นอ่อน มักจะพบกับข้าวโพดหวาน แบบที่ 2 อาการใบไหม้ซึ่งพบได้มากกับพ่อแม่หรือลูกผสมของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในช่วงหลังผสมเกสรแล้ว (Jim *et al.*, 2001) เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีพืชอาศัยหลายชนิด เช่น ข้าวโพดหวาน ข้าวโพดไร่ ข้าวโพดป๊อบคอน ข้าวฟ่าง หญ้าแกมม่า หญ้าซูดาน เป็นต้น โดยมี Corn flea beetle *(Chaetoenema pulicaria* Melsh) เป็นพาหะที่สำคัญของโรคนี้ นอกจากแมลงชนิดนี้แล้วยังเคยมีรายงานว่าตัวอ่อนของ *Diabrotica longicornis* และ*Phorbia cilicruna* สามารถพาเชื้อจากรากข้าวโพดต้นหนึ่งไปยังอีกต้นหนึ่งได้

นอกจากการแพร่ระบาดของโรคโดยมีแมลงเป็นพาหะแล้ว เชื้อแบคทีเรียนี้ยังสามารถอยู่ข้ามฤดูได้ในดิน ปุ๋ยพืชสด หรือเศษซากพืชที่ทิ้งค้างไว้ในไร่ ซึ่งจะเป็นแหล่งแพร่ของเชื้อต่อไป แต่หากในดินที่มีแคลเซียมและโปตัสเซียมสูงจะช่วยลดการเกิดโรคได้ (Robert, 1955)

ในปัจจุบันการส่งออกข้าวโพดของประเทศไทยมีระบบการรับรองปลอดเชื้อชนิดนี้ 2 แบบ ขึ้นอยู่กับข้อกำหนดที่ระบุในเงื่อนไขในใบอนุญาตนำเข้า (Import permit) ของประเทศผู้ซื้อ คือ 1) ต้องการใบรับรองปลอดศัตรูพืชที่ระบุว่าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดปราศจาก หรือได้ผลิตมาจากแหล่งผลิตที่ปราศจากศัตรูพืชที่สำคัญทางกักกันพืชที่ระบุชื่อ (เช่น ประเทศญี่ปุ่นให้ระบุว่า The seed in this shipment came from places are free of *Erwinia stewartii* based on field inspection) ทำให้เชื้อแบคทีเรียนี้มีความสำคัญต่อการส่งออก จึงสมควรศึกษาว่าในแหล่งที่มีการปลูกข้าวโพดเพื่อส่งออกนั้นมีการแพร่ระบาดของแบคทีเรียชนิดนี้อยู่ที่ใดหรือไม่

วิธีดำเนินการ

<u>อุปกรณ์</u>

1. แปลงข้าวโพดที่ปลูกในฤดูการผลิตเพื่อส่งออกระหว่าง 2541-2544
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ *Nutrient agar* (NA), *Nutrient broth yeast extract agar* (NBY), Nigrosin Medium (NM), อาหารสำหรับตรวจสอบทางชีวเคมี
3. ชุดตรวจสอบ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA Kit) ของ Agdia.

4. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์สำหรับแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคและเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

5. สารเคมีต่างๆ สำหรับศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรีย

6. ต้นข้าวโพดหวานอายุประมาณ 2 สัปดาห์และต้นยาสูบสำหรับใช้เป็นพืชทดสอบ

7. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยระบบ Biolog MT

วิธีดำเนินการ

1. การเก็บตัวอย่างโรค

เก็บตัวอย่างใบข้าวโพดที่แสดงอาการโรค เป็นจุด โปร่งแสงเล็กน้อยที่ฉ่ำน้ำ มีรอยไหม้ หรือต้นแสดงอาการเหี่ยว ในแปลงปลูกข้าวโพดเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 ระยะก่อนออกดอก (พืชอายุ 40-45 วัน) ครั้งที่ 2 ระยะเติบโตเต็มที่ก่อนเก็บเกี่ยว (พืชอายุ 70-75 วัน) โดยทำการเก็บตัวอย่างพืชแสดงอาการโรครวม 15 จังหวัด ได้แก่จังหวัดสระบุรี ลพบุรี นครสวรรค์ พิษณุโลก ตาก สุพรรณบุรี กาญจนบุรี ขอนแก่น สกลนคร หนองคาย มุกดาหาร กำแพงเพชร อุตรดิตถ์ แพร่และเพชรบูรณ์(ตารางที่ 1-5) โดยเก็บใส่ถุงพลาสติก บันทึกลักษณะอาการ ชื่อเกษตรกร สถานที่เก็บ เพื่อนำมาตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุต่อไป

2. การแยกหาเชื้อแบคทีเรีย

แยกเชื้อจาก 2 ส่วนตามอาการที่พบ คือ จากส่วนของใบที่แสดงอาการใบจุดโปร่งแสง ฉ่ำน้ำ หรือรอยไหม้และจากส่วนของต้นที่แสดงอาการเหี่ยว การแยกเชื้อทำ 2 วิธี คือ

1. Tissue Transplant โดยตัดชิ้นส่วนที่เป็นโรคมาล้างด้วยน้ำเปล่า 2-3 นาที นำชิ้นส่วนมาตัดเป็นสี่เหลี่ยมเล็กๆ บริเวณรอยต่อระหว่างส่วนพืชที่ดีกับบริเวณที่เกิดโรคขนาดประมาณ 2x3 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวรอบนอกด้วย Clorox 10% หรือ 1% โซเดียมไฮโปรคลอไรท์ (NaOCl) นาน 1-3 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 2 ครั้ง นำชิ้นส่วนพืชไปผึ่งภายใต้กระแสลมในตู้เขี่ยเชื้อให้พอหมาด จากนั้นนำไปวางลงบนอาหาร Nutrient Agar (NA)

2. Streak plate เริ่มต้นตัดชิ้นส่วนพืชทำเหมือนวิธีการที่ 1 แต่หลังจากล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้งแล้ว นำชิ้นพืชมาบดกับน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 มิลลิลิตรในโกร่งที่อบฆ่าเชื้อให้ละเอียด เทตัวอย่างที่บดแล้วลงในหลอดแก้วที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ใช้เข็มเขี่ยชนิดลูปที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในตัวอย่างนำน้ำใสส่วนบนไปขีดเป็นเส้น (streak) ลงบนอาหารแข็ง NA เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อจากทั้ง 2 วิธีไปบ่มไว้ที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง (2-3 วัน) นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้ง เก็บเชื้อที่ได้บนอาหารเอียง NA และในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อใช้เป็นเชื้อทดสอบต่อไป

3. **การทดสอบการเกิดโรค (Pathogenicity Test)**

นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาทำการทดสอบการเกิดโรค ทำตามวิธีของ (Block, 1998; Schaad *et al.*, 2001) ทดสอบการเกิดโรคกับต้นข้าวโพดหวานที่มีอายุ 10-14 วัน โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบบนอาหาร Nutrient broth yeast extract agar (NBY) ให้มีอายุ 48 ชั่วโมง นำมาทำให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 7,000 รอบ/นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เอาตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลาย Phosphate buffer saline pH 7.0 (PBS) วัดปริมาณความขุ่นของสารละลายเชื้อโดยวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Model U-2001-Hitachi) ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ให้ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 จะมีเชื้อประมาณ $2x10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ปลูกเชื้อลงบนต้นข้าวโพดหวาน อายุ 10-14 วันโดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร บรรจุเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร แทงลงไปที่ pseudostem ที่อยู่เหนือดิน ให้ความชื้นแก่ต้นข้าวโพดโดยการคลุมด้วยถุงพลาสติกที่พ่นน้ำไว้ภายใน เก็บต้นข้าวโพดไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง แล้วเปิดถุงออกสังเกตอาการทุกวัน

4. การทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (Hypersensitivity reaction)

เตรียมเชื้อทดสอบอายุ 18-24 ชั่วโมงให้มีความเข้มข้นเชื้อ $2x10^8$ โคโลนี/มิลลิลิตรโดยวิธีเดียวกับการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค แล้วใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตรที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายของแบคทีเรียที่เตรียมมา 0.5 มิลลิลิตรฉีดเข้าสู่ใบยาสูบใบใหญ่ (*Nicotiana tabacum* L.) อย่างช้าๆ ทางด้านใต้ใบ โดยใช้ใบแก่ส่วนล่างของต้น ปฏิบัติอีกเช่นเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทนเชื้อทดสอบ ฉีดใบยาสูบใบถัดมาบนต้นเดียวกันเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ (Control) เก็บต้นยาสูบไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบสังเกตอาการที่ใบยาสูบหลังฉีด 24 ชั่วโมง

5. การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่ทดสอบแล้วเกิดอาการโรคมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ซ้ำ (reisolate) อีกครั้งหนึ่ง นำมาทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี (ตารางที่ 6) เพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้หลักการของ Bergey's manual of determination bacteriology (Holt *et al.*, 1994) Laboratory guide of identification of plant pathogenic bacteria (Schaad, 1989; Schaad *et al.*, 2001) โดยศึกษาลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย การสร้างสารสีเหลืองบน YDC การเจริญบนอาหาร Casamino acid peptone glucose (CPG) agar, การเจริญบนอาหาร nigrosine medium (NM), การสร้างสารสีน้ำตาลบน YDC (Taupe pigment) ทดสอบปฏิกิริยาต่างๆ เช่น การจัดจำแนกชนิดของแกรม (Gram reaction), oxidation-fermentation test (O-F test) การเจริญในสภาพ anaerobe (anaerobic growth), การสร้างสารเรืองแสง (fluorescent pigment) บนอาหาร King medium'B (KMB) การสร้าง indol (Indole test) การสร้างแก๊สซัลไฟด์ (H_2S) จากสาร cystine การใช้ arginine (arginine dihydrolase), การย่อย gelatin, การสร้างเอนไซม์ urease, การสร้างไนเตรต (Nitrate reduction) ปฏิกิริยา oxidase, ปฏิกิริยา Catalase, การสร้างสาร acetoin, การสร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส (gas form glucose), การสร้างสีเหลือง การใช้น้ำตาลต่างๆ ได้แก่ arabinose, cellobiose, dulcitol, esculin, glycerol,

myo-inositol, lactose, maltose, manitol, mannose, melibiose, ribose, raffinose, rhamnose, salicin, sorbitol, sucrose, trehalose, xylose, fructose, galactose การ Utilization ของ citrate, malonate และ tartrate

ทำการบันทึกผลการทดสอบ เปรียบเทียบผลการทดสอบกับคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia stewartii* ที่มีรายงานใน Bergey's manual of determination bacteriology (Holt *et.al.*, 1994) Laboratory guide of identification of plant pathogenic bacteria (Schaad, 1989; Schaad *et al.*, 2001)

6. การตรวจสอบด้วยวิธี Enzyme linked immunosobent assay (ELISA Technique)

โดยการใช้ ELISA test kit ของ Agdia Inc. ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้เป็นที่ยอมรับในการตรวจสอบเชื้อนี้ (Schaad *et al.*, 2001) โดยใช้เซลของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *E. stewartii* มาตรวจสอบ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร Nutrient broth (NBY) นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อ 1 นาที เพื่อให้สารละลายของเชื้อตกตะกอน เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง ละลายตะกอนด้วย phosphate buffer (PBS) pH 7 ที่มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร ล้างเซลตามอีก 2 ครั้ง หลังจากล้างเซลครั้งสุดท้ายให้ละลายเซลด้วย Coating buffer ปรับปริมาณเซลของแบคทีเรียให้ได้ $2x10^8$ หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร หยดตัวอย่างทดสอบเซลเชื้อ *E. stewartii* (เชื้อมาตรฐาน) และ Coating buffer ลงในหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร เก็บภาชนะทดสอบไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 คืน (12 ชั่วโมง) เพื่อให้สารละลายเซลแบคทีเรียแห้ง จากนั้นนำมาเติมด้วย blocking solution หยดหลุมละ 200 ไมโครลิตร เก็บภาชนะในกล่องที่มีความชื้นนาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ล้างภาชนะด้วย PBST buffer 5 ครั้ง หยดแอนติบอดี้ของเชื้อแบคทีเรียลงหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำภาชนะทดสอบใส่กล่องรักษาความชื้น 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างตามด้วย PBST buffer อีก 5 ครั้ง แล้วหยด Alkaline phosphate enzyme conjugate หลุมละ 100 ไมโครลิตร และเก็บภาชนะไว้ที่ชื้นอีก 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างภาชนะด้วย PBST buffer อีก 5 ครั้ง หยอด substate (PNP solution) หลุมละ 10 ไมโครลิตร เก็บภาชนะในที่มีความชื้นนาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการหยด 3 M Sodium hydroxide หลุมละ 50 ไมโครลิตร ตรวจปฏิกิริยาด้วยตาเปล่า และนำไปอ่านด้วยเครื่องอ่านผล ELISA reader ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

7. การตรวจสอบด้วยระบบ Biolog MT

ระบบ Biolog MT จะใช้ในการตรวจสอบและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ เป็นวิธีหนึ่งที่เริ่มมีการใช้ในการจำแนกชนิดแบคทีเรีย (David *et a.*, 2001; Wilson and Jackson, 2001 (abstract) โดยการใช้คาร์บอน (carbon source) มีทั้งหมด 95 ชนิด ที่อยู่บน microtiter plate (Microplate) ข้อมูลจากการใช้ carbon ทั้ง 95 ชนิดนี้จะใช้เป็นรูปแบบเฉพาะเจาะจง (Unique pattern) หรือลายพิมพ์ (fingerprint) สำหรับเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดซึ่งใช้ในกระบวนการหายใจ (respiration) ของแบคทีเรียจะมีการ reduce ของสาร tetrazolium redox dye ทำให้หลุม (well) ที่เป็นแหล่ง carbon source ของแบคทีเรียนั้นมีสีเปลี่ยนไปเกิดเป็นสีม่วง ซึ่งสุดท้ายแล้วก็จะปรากฏเป็น pattern ของสีที่เป็นลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียนั้นๆรูปแบบ (pattern) นี้จะถูกอ่านด้วยเครื่อง Biolog MT แล้วจะส่งข้อมูลที่ได้ไปยังฐานข้อมูลที่มีอยู่ในระบบ (Microlog Identification Database) เพื่อทำการจำแนกชนิด (Identified) จากข้อมูลที่มีอยู่

วิธีการจำแนกชนิด (Identification) เชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง Biolog มีขั้นตอนปฏิบัติ คือ

1. ตรวจสอบชนิดแกรมของแบคทีเรียจากเชื้อที่บริสุทธิ์ (pure culture) โดยวิธี Gram straining หรือใช้สารละลาย 3% โซเดียมไฮดรอกไซด์ (3% KOH)

2. ถ้าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ให้ตรวจสอบการสร้างสปอร์โดยการย้อมสีสปอร์ แต่ถ้าเป็นแบคทีเรียแกรมลบให้ทดสอบปฏิกิริยา Oxidase test ซึ่งถ้าปฏิกิริยาให้ผลบวก A แสดงว่าเป็นแบคทีเรียพวก Non enteric ในทางตรงกันข้าม ถ้าปฏิกิริยาให้เป็นผลลบแสดงว่าเป็นแบคทีเรียพวก enteric ปฏิกิริยา oxidase test นี้จะเป็นการทดสอบการ fermentation ของเชื้อ ถ้าผล oxidase test เป็นลบ เชื้อนี้จะมีคุณสมบัติในการ fermentation คือ สามารถหายใจได้โดยไม่ใช้ออกซิเจนได้ โดยส่วนมากจะเป็นแบคทีเรียใน family Enterobacteriaceae ดังนั้นแบคทีเรียที่ให้ผล Oxidase test เป็นลบ จึงจัดเป็นพวก Enteric bacteria

3. การเลี้ยงเชื้อ (Sub culture) เลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Nutrient Agar (NA) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28°C ± 1

4. ใช้ก้านสำลีนึ่งฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อบนอาหารที่เลี้ยง นำไปละลายลงในหลอดที่มีสาร Inoculation fluid ปรับสารละลายเชื้อให้มีค่า % transmission เท่ากับ 63% T (± 2%) สำหรับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบพวก enteric ส่วนแบคทีเรียแกรมลบพวก non enteric ให้ปรับสารละลายให้มีค่าเท่ากับ 52% T (± 2%)

5. ดูดสารละลายเชื้อที่ปรับค่า %T แล้วหยดลงในหลุม microplate หลุมละ 150 ไมโครลิตร ทั้งหมด 96 หลุม ใช้น้ำเป็นตัวเปรียบเทียบ (Negative control) 1 หลุม หลุมที่เหลือจะเป็น carbon source ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

6. นำ microplate ไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28°C ± 1 นาน 16-24 ชั่วโมง

7. นำ microplate ไปอ่านค่าการดูดซับคลื่นแสงสีม่วงซึ่งเกิดจากการใช้แหล่ง carbon source ในแต่ละหลุม โดยจะเป็นรูปแบบ (pattern) ที่เป็นลักษณะเฉพาะเจาะจงของเชื้อ

8. Pattern ของเชื้อที่อ่านได้จะนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่แล้ว จากนั้นเครื่องจะจำแนกชนิด (identify) เชื้อนั้นออกมาเป็นค่า % Probability ค่า Similarity ที่เหมือนกับข้อมูลที่มีอยู่

ระยะเวลาดำเนินการ ตุลาคม 2543 - กันยายน 2545 (เริ่มดำเนินการตั้งแต่ มกราคม 2541)

สถานที่ดำเนินการ 1. แปลงเกษตรกรและแปลงทดลองพันธุ์ข้าวโพดของบริษัทต่างๆ

2. ห้องปฏิบัติการฝ่ายกักกันพืช กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

3. ห้องปฏิบัติการภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างโรค

ในการเก็บตัวอย่างใบและต้นข้าวโพดจากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ในระหว่างปี 2541-2544 พื้นที่ที่ดำเนินการรวม 15 จังหวัด ได้แก่ สระบุรี ลพบุรี นครสวรรค์ กำแพงเพชร อุตรดิตถ์ พิษณุโลก แพร่ เพชรบูรณ์ ตาก ขอนแก่น มุกดาหาร สกลนคร หนองคาย สุพรรณบุรี กาญจนบุรี เก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง ดังนี้

ครั้งที่ 1 เมื่อพืชอายุประมาณ 40-45 วัน เก็บอาการใบเป็นรอยขีดจุดประตามยาวของเส้นใบ ฉ่ำน้ำ ทางยาวลงมาหรือขาดเป็นระยะๆ หรือพืชแสดงอาการต้นแคระ เหี่ยว ได้ตัวอย่าง 428 ตัวอย่าง

ครั้งที่ 2 เมื่อพืชอายุประมาณ 70-80 วัน พืชจะแสดงอาการใบขีดยาวลงมายังกาบใบด้านล่าง แต่ไม่พบอาการต้นเหี่ยว ได้ตัวอย่าง 75 ตัวอย่าง

รวมพื้นที่ 2,689.88 ไร่ จำนวน 331 แปลงเกษตรกร จำนวนสายพันธุ์1,888 สายพันธุ์ เก็บตัวอย่างทั้งหมด 503 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1-5 และภาพที่ 1-6)

2. การแยกเชื้อแบคทีเรีย

จากการแยกเชื้อบนอาหารจากพืชที่แสดงอาการบนใบและต้นเหี่ยวโดยวิธี Tissue transplant (ภาพที่ 7) และ Streak plate (ภาพที่ 8) โดยการบดแล้วนำไป streak บนอาหาร Nutrient agar (NA) เมื่อนำไปแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ (single colony) ตามรูปแล้วทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่ง พบว่ามีแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท (ตารางที่ 7) ที่แยกได้จากพืชที่แสดงอาการใบขีดเป็นทาง ฉ่ำน้ำ โดยไอโซเลทที่แยกได้มาจากการเก็บครั้งที่ 1 เท่านั้น

3. การทดสอบการเกิดโรค

การทดสอบการเกิดโรคบนต้นข้าวโพด ที่มีอายุ 10-14 วัน ฉีดเข้าไปใน pseudostem โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ที่โคนของใบล่างสุด พบข้าวโพดแสดงอาการเป็นจุดฉ่ำน้ำ และเป็นทางขีดยาวไปตามเส้นของข้าวโพด หลังปลูกเชื้อ 3 วันในแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1-5 ไอโซเลทที่ 6-8 เริ่มแสดงอาการหลัง 5 วันแล้ว (ภาพที่ 10) และเมื่อนำใบที่แสดงอาการไปแยกเชื้อสาเหตุซ้ำอีกครั้งจะได้เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีเหมือนกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่ปลูกเชื้อ แสดงว่าเชื้อที่แยกได้เป็นเชื้อสาเหตุโรคตามวิธีการพิสูจน์โรคของ Koch

4. การทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลัน

ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลท ลงบนใบยาสูบใบใหญ่ (*Nicotiana tabacum* L.) ทางด้านใต้ของใบ โดยมีน้ำเป็นตัวเปรียบเทียบ และอ่านผลใน 24 ชั่วโมง พบว่าไอโซเลทที่ 2, 3, 5, 6, 7 สามารถเกิดปฏิกิริยากับใบยาสูบใบใหญ่ได้ ทำให้เซลล์ใบยาสูบตาย ขณะที่ไอโซเลทที่ 1, 4, 8 ไม่เกิดปฏิกิริยากับใบยาสูบใบใหญ่

5. การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา, สรีรวิทยา และชีวเคมี

ผลการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี ของเชื้อแบคทีเรีย ทั้ง 8 ไอโซเลท พบว่าเป็นแกรมลบทั้งหมด (Gram negative) เกิดปฏิกิริยา oxidation และ fermentation คือ สามารถเจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เจริญที่อุณหภูมิ 37°C ได้ดี มีการเจริญบนอาหาร Casamino acid peptone (CPG) ให้ลักษณะโคโลนี นูน มัน เยิ้ม ไม่สร้างสาร Taupe pigment บนอาหาร YPC และไม่เรืองแสงบนอาหาร King medium B. แต่ให้ผลแตกต่างกันบางไอโซเลท เช่นการเคลื่อนที่ (Motiliy) ของเซลล์แบคทีเรีย การเจริญบนอาหาร Nigrosin (ภาพที่ 9) ที่จะให้ลักษณะโคโลนีคล้ายตากบ การตอบสนองต่อใบยาสูบ (Tobacco hypersensitivity) สำหรับผลการทดสอบทางชีวเคมีเกือบทุกไอโซเลทจะไม่เกิดปฏิกิริยา Methyl red Voges-

Proskaun, การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) มีความคงทนต่อ NaCl (NaCl-tolerance) ได้สูง 1-8% ไม่เกิดปฏิกิริยาหลายๆ ชนิดเช่น indole test การใช้เอนไซม์ urease การเปลี่ยนไนเตรดเป็นไนไตรท์ (Nitrate reduction) การย่อยแป้ง (Starch hydrolysis) การใช้ (utilise) citrate, malonate, tartrate และการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ แสดงผลแตกต่างกันไปแต่ละไอโซเลท (ตารางที่ 6)

จากคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Erwinia stewartii* (*Pantoea stewartii*) พบว่าเชื้อแบคทีเรียในไอโซเลทที่ 1 และ 2 มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเชื้อ *Erwinia stewartii* มีข้อแตกต่างกันเล็กน้อย คือผลการทดสอบการตอบสนองต่อใบยาสูบ (Tobacco hypersensitivity) การใช้ Arginine การใช้ (utilise) tartrate การใช้น้ำตาล lactose ซึ่งผลปฏิกิริยาสอดคล้องกับการทดสอบของ Wongsasithorn (1983) ว่า *E. stewartii* ไม่ตอบสนองต่อใบยาสูบและผลการใช้น้ำตาลของ Holt *et al.*, (1994) ที่จัดจำแนกใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9 edition ซึ่งจากคุณสมบัติทั้งหมดตามตารางที่ 6 พบว่าไอโซเลทที่ 1 และไอโซเลทที่ 2 มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *Erwinia stewartii*

6. การตรวจสอบด้วยวิธี Enzyme linked immunosobent assay

จากการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA เมื่อใช้ชุดตรวจสอบ test kit ของ บ. Agdia จากเชื้อแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลท พบว่าทั้ง 8 ไอโซเลท ให้ปฏิกิริยาบวกในการตรวจสอบ ELISA โดยเกิดปฏิกิริยาสีเหลืองเมื่อดูด้วยตาเปล่า และเมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเครื่องอ่าน (ELISA Reader) ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโมเมตรก็ให้ผลการอ่านเป็นบวกเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 11)

7. การตรวจสอบด้วยระบบ Biolog MT

จากการตรวจสอบด้วยระบบ Biolog MT กับเชื้อแบคทีเรีย 8 ไอโซเลท ให้ผลว่าแบคทีเรียไอโซเลท ที่ 1-5 จำแนกชนิดเป็น *Pantoea agglomerans* ในขณะไอโซเลท ที่ 6-8 ให้ผลจำแนกชนิดเป็น *Pantoea dispense* ตามตารางที่8 โดยค่าตัวเลขเลขที่แสดง similarity สูงที่สุดคือมีความคล้ายคลึงมากที่สุดคือ ไอโซเลทลำดับที่1 และ 2 คือเชื้อ *Pantoea agglumerans* หรือ *Erwinia stewartii* นั่นเองตามที่ Mergaert *et al.*, (1993) ได้รายงานไว้ (ภาพที่ 12)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของข้าวโพดจากแหล่งต่างๆที่เพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ส่งออกจากพื้นที่ 15 จังหวัดคือ สระบุรี ลพบุรี นครสวรรค์ กำแพงเพชร อุตรดิตถ์ พิษณุโลก แพร่ เพชรบูรณ์ ตาก ขอนแก่น มุกดาหาร สกลนคร หนองคาย สุพรรณบุรี กาญจนบุรี จำนวน 331แปลงเกษตรกร รวมพื้นที่ 2,692.88 ไร่แยกเชื้อ 503 ตัวอย่าง พบเชื้อ 8 ไอโซเลทที่แยกได้จากจังหวัดนครสวรรค์ ตาก และแพร่ที่ทำให้เกิดโรคกับข้าวโพดได้ และเมื่อนำไปตรวจสอบดูการเจริญบนอาหาร Nigrosin medium, Casamino acid Peptone การทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลันกับใบยาสูบ คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมี การเกิด ELISA รวมทั้งการจำแนกชนิดด้วยระบบ Biolog พบแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลทที่ 1 (Pujava 1) เก็บจาก อ.แม่ระมาดจังหวัด ตาก และไอโซเลทที่ 2 (Mon 3H) ได้จากอ.สูงเม่นจังหวัด

แพร่ มีคุณสมบัติทางสัญฐานวิทยา สรีรวิทยา ปฏิกิริยาชีวเคมี ค่า ELISA ใกล้เคียงกับเชื้อ *Erwinia stewartii* (*Pantoea stewartii*) มากที่สุด และผลของ Biolog MT ให้ค่า similarity ทั้ง 2 ไอโซเลท คือ เชื้อ *Pantoea agglumerans* หรือ *Pantoea stewartii* นั่นเองแบคทีเรีย แม้ว่าทั้ง 2 ไอโซเลทจะมีค่าแตกต่างในการตอบสนองอย่างเฉียบพลันและการใช้น้ำตาล tartrate lactose อย่างไรก็ตามมีการทดลองของ Wongsasithorn (1983) และ Holt *et al.*,(1994) ให้ผลของปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการศึกษานี้ จากการหาข้อมูลพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้มาจากแปลงที่ใช้เมล็ดนำเข้าสำหรับใช้ปรับปรุงพันธุ์ต่อไป จากการศึกษานี้พบว่าปัจจุบันมีโอกาสพบเชื้อแบคทีเรียนี้ในเขตภาคเหนือที่ อ.แม่ระมาดจังหวัด ตาก และอ.สูงเม่นจังหวัดแพร่ อาจเนื่องจากภาคเหนือมีสภาพอากาศเย็นและเป็นแหล่งปลูกข้าวโพดแหล่งใหญ่ที่หลาย ๆ บริษัทไปดำเนินการทำอย่างต่อเนื่อง มักใช้เมล็ดพันธุ์ที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศจึงมีโอกาสที่ศัตรูพืชอาจติดเข้ามาด้วยได้ ผลจากการศึกษานี้ได้ดำเนินมาตรการโดยตัดต้นข้าวโพดทั้งหมดและเมล็ดพันธุ์เผาทำลายรวมทั้งติดตามดูแปลงดังกล่าวอีก1ฤดูกาลเพื่อให้แน่ใจว่าได้กำจัดหมดสิ้นแล้ว

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2545. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2544/45 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 121 น.

กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2544. รายงานประจำปี กรมวิชาการเกษตร.

Block, C.C., J.H. Hill and D.C. Mc Gee. 1998 Seed transmission of *Pantoea stewartii* in field corn and sweet corn. Plant Disease 82:775-780.

Bradbury, J.F. 1967, C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. No 123 Commonwealth Agricultural Bureau.

Chandrasrikul, A. 1962. A preliminary lost list of plant disease in Thailand. Tech. Bull. No. 6, Department of Agriculture, Bangkok. 23 p.

David, J.C., W.L. Thomas, R. J. Burgess, and T.L. Hadfiel. 2001. Comparison of Vitek 32 and Microlog ML3 System for Identification of Select Biology Warfare Agents, American Registry of Pathology, Washington, DC.

Guo-y-Feng. Liang Zaiqun and Yu Dafu 1980. A selective medium for isolation of *Erwinia stewartii*.(E.F. Smith) Dye from imported corn. Kexue Tongbao 26(10), 630 (in Chinese).

Hadgistevicd, A. 1986. Bacterial of maize caused by *Erwinia stewartii* not yet recorded in Yugoslavia, Zastita Bitja 37:87-91.

Holt, J.G., N.R, Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. William 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed., Williams Silkins, Baltimore. 787 pp.

Ivanoff, S.S. 1933. Stewart's wilt disease of corn, with emphasis on the life history of *Phytomonas stewartii* in relation to pathogenesis. J. Agr. Res. 47: 749-770.

Jim, S.J. Chaky and L. Giesler. 2001. Stewart's wilt of Corn. Http://www.Ianr.Unl.Edu/pubs/ Plant disease/nt 473. htm Neb Facts.

Lamka. G.L, J.D Hill, D.C. Mc Gee, and E.J. Braun, 1991 Development of an immunosorbent assay for seed borne *Erwinia stewartii* in corn seeds Phytopathology 81:839-846.

Lelliott. R.A and D.E. Stead, 1987, Methods for the Diagnosis Bacterial Diseases of Plants, Volume2 Palo Alto Melbourne, 215 pp.

Mergaert, J., Verdonck, L. and Kersters. 1993 Transfer of *Erwinia ananas* (synonym: *Erwinia amylovora*) and *Erwinia stewartii* to the Genus *Pantoea* emend. As *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1989) comb. nov. Respectively, and Description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. Inter. J. syst. Bact. 43(1) 162-137.

OEPP/EPPO. 1978 Data sheets on quarantine organism No. 54 Erwinia *stewartii.* Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 8.

OEPP/EPPO. 1990. Specific quarantine organism requirements. EPPO Technical Document. No. 1008.

Pataky, J.K. 2000. The risk of introducing *Erwinia stewartii.* in maize seed University of Illinois, Dept of Crop Science, Urbana, USA 27 p.

Pepper, E. H. 1967. Stewart's bacterial wilt of corn, Monogr. No. 4, American Phylopathol. Soc., St. Paul Minnesota.

Robert, A.L. 1955, Bacterial wilt and Stewart's leaf blight of corn. Farmers Bull USDA no. 2092.

Schaad, N.W.1989. Detection and Identification of Bacteria *In*: Saettler, A.W., Schaad, N.W. and D.A. Roth (eds) Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Materials. APS Press St. Paul, Minnesota pp. 9-16.

Schaad, N.W., J.B. Jones and W. Chun., 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition, APS Press. St. Paul Minnesota.

Wilson M.E. and N.E Jackson 2100 (abstract) Identification of Gram negative Aerobic Microaerophilic Rods with Four Automated and Semi-Automated Systems. (Poster in 96th General Meeting of the American Society for Microbiology).

Wongsasithorn, D. 1983. Identification and Detection of *Erwinia stewartii.* in Maize Seed. Copenhagen, Denmark 37 p.

ตารางที่ 1 ข้อมูลการตรวจแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดปี พ.ศ. 2541 (ฤดูผลิต 41/42)

ลำดับที่	บริษัทที่ปลูก	จังหวัด	พื้นที่ (ไร่)	จำนวนแปลง เกษตรกร	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวน สายพันธุ์	ประเทศ ผู้ซื้อ
1	บริษัท โนวาตีส (ประเทศไทย) จำกัด	นครสวรรค์ (ทดลอง)	4.5	6	51	281	ญี่ปุ่น
2	บริษัทโนวาตีส (เอ็ม.พี.แอล) จำกัด	ลพบุรี	14	3	3	1	ญี่ปุ่น
		นครสวรรค์	52	3	5	1	ญี่ปุ่น
		กำแพงเพชร	35	4	4	1	ญี่ปุ่น
3	บริษัท คาร์กิลเมล็ดพันธุ์ จำกัด	พิษณุโลก (ทดลอง)	0.35	1	50	110	ญี่ปุ่น
		แพร่	42.5	15	15	1	ญี่ปุ่น
รวม		**5 จังหวัด**	**148.35**	**32**	**128**	**395**	

ตารางที่ 2 ข้อมูลการตรวจแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดปี พ.ศ. 2542 (ฤดูผลิต 42/43)

ลำดับที่	บริษัทที่ปลูก	จังหวัด	พื้นที่ (ไร่)	จำนวนแปลง เกษตรกร	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวน สายพันธุ์	ประเทศผู้ซื้อ
1	บริษัท โนวาตีส (ประเทศไทย) จำกัด	นครสวรรค์ (ทดลอง)	3	4	18	290	ญี่ปุ่น
2	บริษัทโนวาตีส (เอ็ม.พี.แอล) จำกัด	ลพบุรี	123	3	12	2	ญี่ปุ่น
		สระบุรี (ทดลอง)	1	1	5	42	ญี่ปุ่น, บราซิล
		กำแพงเพชร	122	10	14	1	ญี่ปุ่น, บราซิล
		นครสวรรค์	240	18	17	1	ญี่ปุ่น
		สุพรรณบุรี	62	43	3	1	ญี่ปุ่น
		ขอนแก่น	182	26	13	1	ญี่ปุ่น
		กาญจนบุรี	155	5	5	1	ญี่ปุ่น
3	บริษัท มอนซานโต้ เมล็ดพันธุ์	แพร่	42	14	6	1	ญี่ปุ่น
	(ไทยแลนด์) จำกัด แทน	อุตรดิตถ์	2	1	1	1	ญี่ปุ่น
	บริษัท คาร์กิลเมล็ดพันธุ์ จำกัด	พิษณุโลก (ทดลอง)	1	1	14	80	ญี่ปุ่น,บราซิล
รวม		**10 จังหวัด**	**933**	**126**	**108**	**421**	

ตารางที่ 3 ข้อมูลการตรวจแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดปี พ.ศ. 2543 (ฤดูผลิต 43/44)

ลำดับที่	บริษัทที่ปลูก	จังหวัด	พื้นที่ (ไร่)	จำนวนแปลงเกษตรกร	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนสายพันธุ์	ประเทศผู้ซื้อ
1	บริษัท โนวาตีส (ประเทศไทย) จำกัด	นครสวรรค์ (ทดลอง)	5	4	38	489	ญี่ปุ่น
2	บริษัทโนวาตีส (เอ็ม.พี.แอล) จำกัด	กาญจนบุรี	155	5	5	1	ญี่ปุ่น
		ชอนแก่น	142	40	4	2	ญี่ปุ่น
		นครสวรรค์ (ทดลอง)	6.25	4	14	204	ญี่ปุ่น, บราซิล
		นครสวรรค์	303	12	11	2	ญี่ปุ่น
		ลพบุรี	258	12	8	2	ญี่ปุ่น
		เพชรบูรณ์	6	1	1	1	ญี่ปุ่น
		กำแพงเพชร	35	4	8	1	ญี่ปุ่น
3	บริษัท มอนซานโต้ เมล็ดพันธุ์ (ไทยแลนด์) จำกัด	พิษณุโลก (ทดลอง)	3	3	20	24	ญี่ปุ่น,บราซิล, เปรู,โคลัมเบีย, เอกวาดอร์
		อุตรดิตถ์	49	5	5	1	ญี่ปุ่น
รวม		8 จังหวัด	962.25	90	114	727	

ตารางที่ 4 ข้อมูลการตรวจแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดปี พ.ศ. 2544 (ฤดูผลิต 44/45)

ลำดับที่	บริษัทที่ปลูก	จังหวัด	พื้นที่ (ไร่)	จำนวนแปลงเกษตรกร	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนสายพันธุ์	ประเทศผู้ซื้อ
1	บริษัท โนวาตีส (ครอปโปรเทคชั่น) จำกัด	นครสวรรค์ (ทดลอง)	5	3	25	3	ญี่ปุ่น
			1	1	3	74	บราซิล
2	บริษัท ซินเจนทา ซีดส์ จำกัด	ตาก	73	14	10	2	ญี่ปุ่น
		นครสวรรค์	210	10	10	2	ญี่ปุ่น
		มุกดาหาร	205	23	20	1	ญี่ปุ่น
		สกลนคร	60	12	3	2	ญี่ปุ่น
		สระบุรี	1	1	5	37	ญี่ปุ่น, บราซิล
		สุพรรณบุรี	58	8	3	1	ญี่ปุ่น
3	บริษัท แปซิฟิคเมล็ดพันธุ์ จำกัด	สระบุรี	3.28	3	7	3	ญี่ปุ่น, เอกวาดอร์, บราซิล, อาร์เจนตินา่
		หนองคาย	30	5	2	1	ญี่ปุ่น,บราซิล
4	บริษัท มอนซานโต้ เมล็ดพันธุ์ (ไทยแลนด์) จำกัด	พิษณุโลก (ทดลอง)	3	3	65	219	ญี่ปุ่น, บราซิล เปรู,โคลัมเบีย อาฟริกาใต้
	รวม	8 จังหวัด	649.28	83	153	345	

ตาราง ที่ 5 สรุปข้อมูลการตรวจแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดในปี พ.ศ. 2541-2544

ลำดับที่	พื้นที่ปลูก	พื้นที่ (ไร่)	จำนวนแปลงเกษตรกร	จำนวนตัวอย่างตัวอย่าง	จำนวนสายพันธุ์
1	สระบุรี	5.28	5	17	82
2	ลพบุรี	395	18	23	5
3	นครสวรรค์	829.75	65	192	1,347
4	กำแพงเพชร	192	18	26	3
5	อุตรดิตถ์	51	6	6	2
6	พิษณุโลก	7.35	8	149	433
7	แพร่	84.5	29	21	2
8	เพชรบูรณ์	6	1	1	1
9	ตาก	73	14	10	2
10	ขอนแก่น	324	66	17	3
11	มุกดาหาร	205	23	20	1
12	สกลนคร	60	12	3	2
13	หนองคาย	30	5	2	1
14	สุพรรณบุรี	120	51	6	2
15	กาญจนบุรี	310	10	10	2
รวม		**2,692.88**	**331**	**503**	**1,888**

ตารางที่ 6 การตรวจสอบหาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และปฏิกิริยาทางชีวเคมีเชื้อที่ตรวจสอบ

aracter	*Erwinia stewartii* [1/]	1	2	3	4	5	6	7	8
ram strain	Gram negative	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
owth anaerobically	+	+	+	+	+	+	+	+	+
owth at 37°C	-	+	+	+	+	+	+	+	+
lonies yellow on YDC =	yes	+	+	+	+	+	+	+	+
otility	no	-	-	-	-	+	+	-	-
owth on Casamino acid peptone PG) =	yes	+	+	+	+	+	+	+	+
owth on Nigrosin medium =	yes	+	+	+	+	-	-	-	-
oduced Taupe pigment on YDC	no	-	-	-	slightly	-	-	-	-
uorescent Pigment on King edium B (KMB) =	no	-	-	-	-	-	-	+	-
bacco hypersensitivity	no[2/]	-	+	+	-	+	+	+	-
xidase	no	-	-	-	-	-	-	-	-
xidation /Fermentation	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F
ethyl red-Voges-Proskaun	no	-	-	-	-	+	-	-	-
trate (Simonons)	no	-	-	-	-	-	-	-	
ydrogen sulfide production	no	-	-	-	-	+	-	-	-

aracter	*Erwinia stewartii* [1/]	1	2	3	4	5	6	7	8
ginine dihydrolase	no	-	+	+	-	+	+	-	-
Cl-tolerance	5-7%	1-8%	1-8%	1-8%	1-8%	1-8%	1-8%	1-8%	1-8%
tion in litmus milk	no curd, slightly acid	slightly	-	+	+	-	+	+	-
iole production	slight or none	-	-	-	-	-	-	-	-
ease activity	none	-	-	-	-	-	-	-	-
latin hydrolysis (liquification)	slight or none	Slightly	-	-	-	-	-	-	-
rate reduction	none	-	-	-	-	-	-	-	-
drolysis of starch	no	-	-	+	-	-	-	-	-
ilisation of :									
citrate	no	-	-	-	-	+	+	+	+
malonate	no	-	-	-	-	-	-	-	-
tartrate	*no* [3/]	+	+	+	+	+	+	+	+
id production :									
glucose	acid	+	+	+	-	+	-	-	+
sucrose	acid	+	+	+	-	-	-	+	+
lactose	no acid	+	-	-	-	-	-	-	-
salicin	no acid	-	-	-	+	-	-	-	+
meso – inositol	acid	-	-	-	-	-	-	-	-
sorbitol	acid	-	-	-	+	-	-	-	-
galactose	acid	+	+	+	+	+	+	+	-
mannose	acid	+	+	+	+	+	+	-	+
cellobiose	no acid [4/]	-	-	+	+	-	+	-	-
arabinose	acid	+	+	-	+	-	+	+	+
ribose	acid	+	+	+	-	+	-	-	-
xylose	acid	+	+	-	-	-	+	-	-
galactose	acid	+	+	-	-	-	+	-	-
mannitol	acid	+	+	+	+	+	-	+	+
maltose	no acid	-	-	+	-	-	-	-	-
esculin	no acid	-	-	-	-	+	+-	-	-
rhamnose	no acid	-	-	-	-	-	-	-	-
dulcitol	no acid	-	-	-	-	-	-	-	-
fructose	acid	+	+	+	-	-	+	+	+
glycerol	acid	-	-	-	-	+	-	-	-
Myo-inositol	no	-	-	-	+	-	-	-	-
Melibiose	acid	+	+	+	+	+	+	+	+
Rattinose	acid	+	+	+	+	+	+	+	-

1/ References: Holt *et al.*, 1994, Schaad, 1989: Schaad *et al.*, 2001.

2/ Shaad *et al.* 2001 : Tobacco hypersensitivity แสดงผลเป็น +

3/ Holt *et al.* 1994 : และ tartrate แสดงผลเป็น +

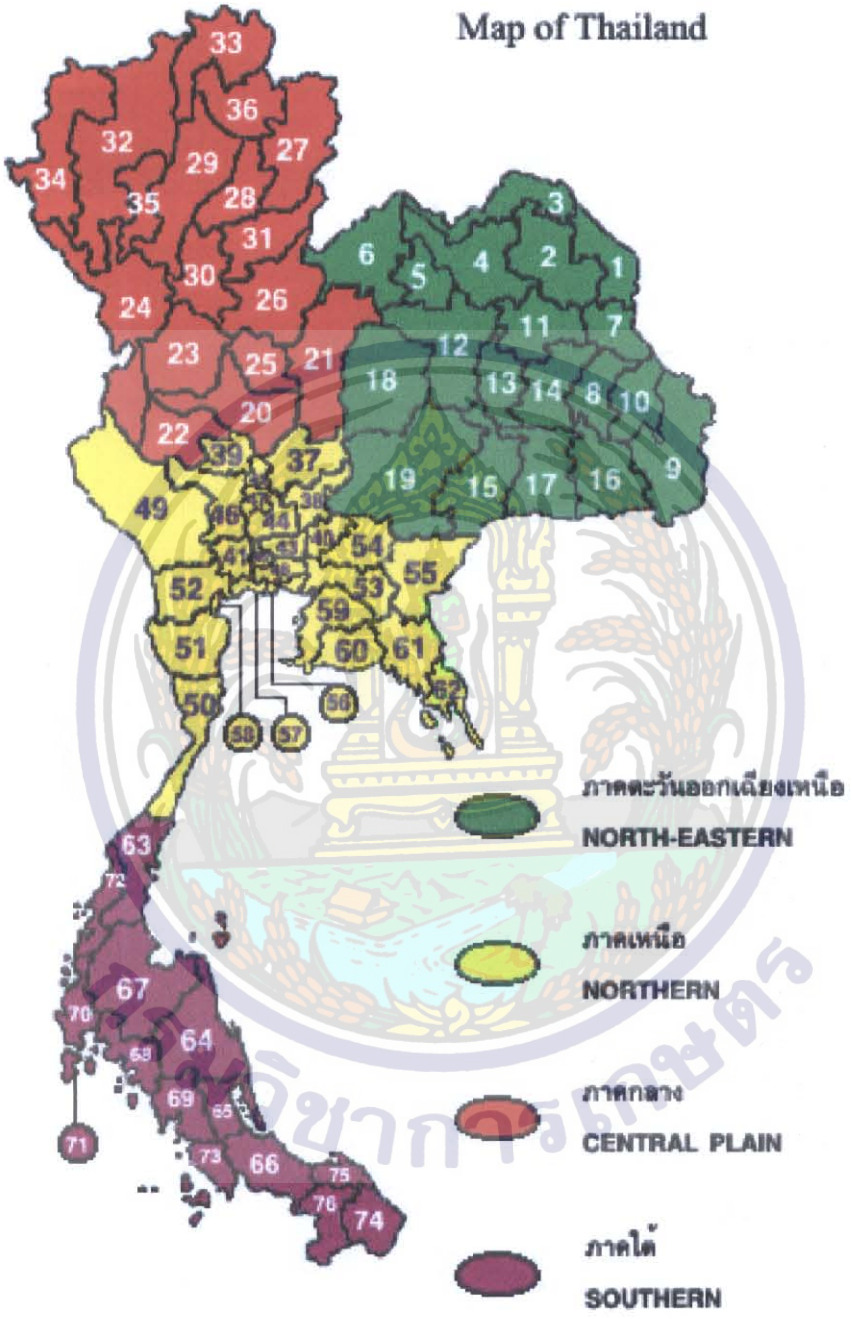
4/ Holt *et al.*1994 : acid production ของ lactose แสดงผลเป็น +

ตารางที่ 7 แหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของข้าวโพดที่ใช้ศึกษา

ลำดับที่	ไอโซเลท	แหล่งที่มา
1	Pujava 1.	ตาก
2	Mon 3 H	แพร่
3	Mon 3 E	แพร่
4	Pujava 2.	ตาก
5	Mon 3 B	แพร่
6	7171	นครสวรรค์
7	Mon A	แพร่
8	Mon F	แพร่

ตารางที่ 8 ผลแสดงการจำแนกชนิดโดยเครื่อง Biolog

ลำดับที่	ไอโซเลท	Probability	Similality	Species
1	Pujava 1	100	0.51	*Pantoea agglomerans*
2	Mon 3 H	-	0.49	*Pantoea agglomerans*
3	Mon 3 E	-	0.45	*Pantoea agglomerans*
4	Pujava 2	-	0.33	*Pantoea agglomerans*
5	Mon 3 B	-	0.25	*Pantoea agglomerans*
6	7171	-	0.56	*Pantoea dispersa*
7	Mon A	-	0.42	*Pantoea dispersa*
8	Mon F	-	0.42	*Pantoea dispersa*

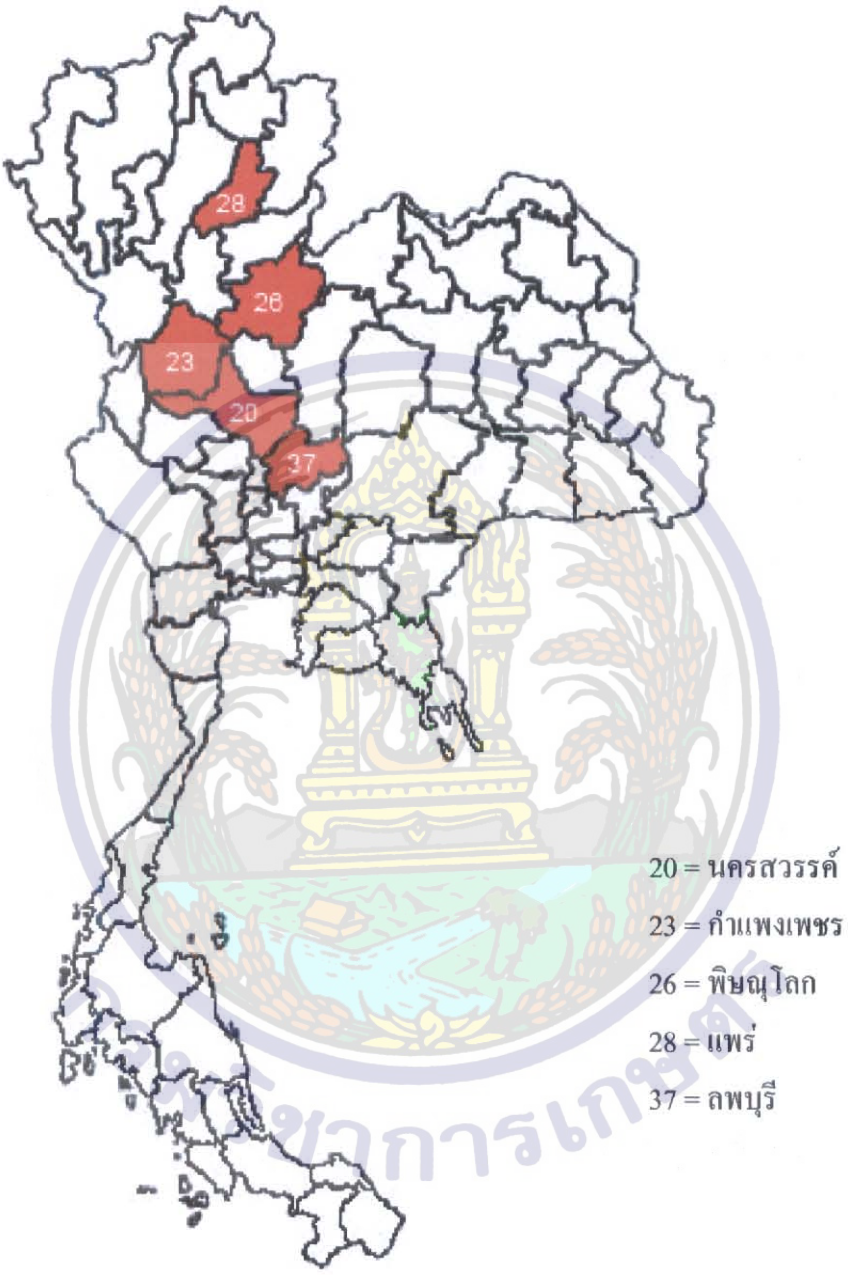


ภาพที่ 1 แผนที่ประเทศไทย

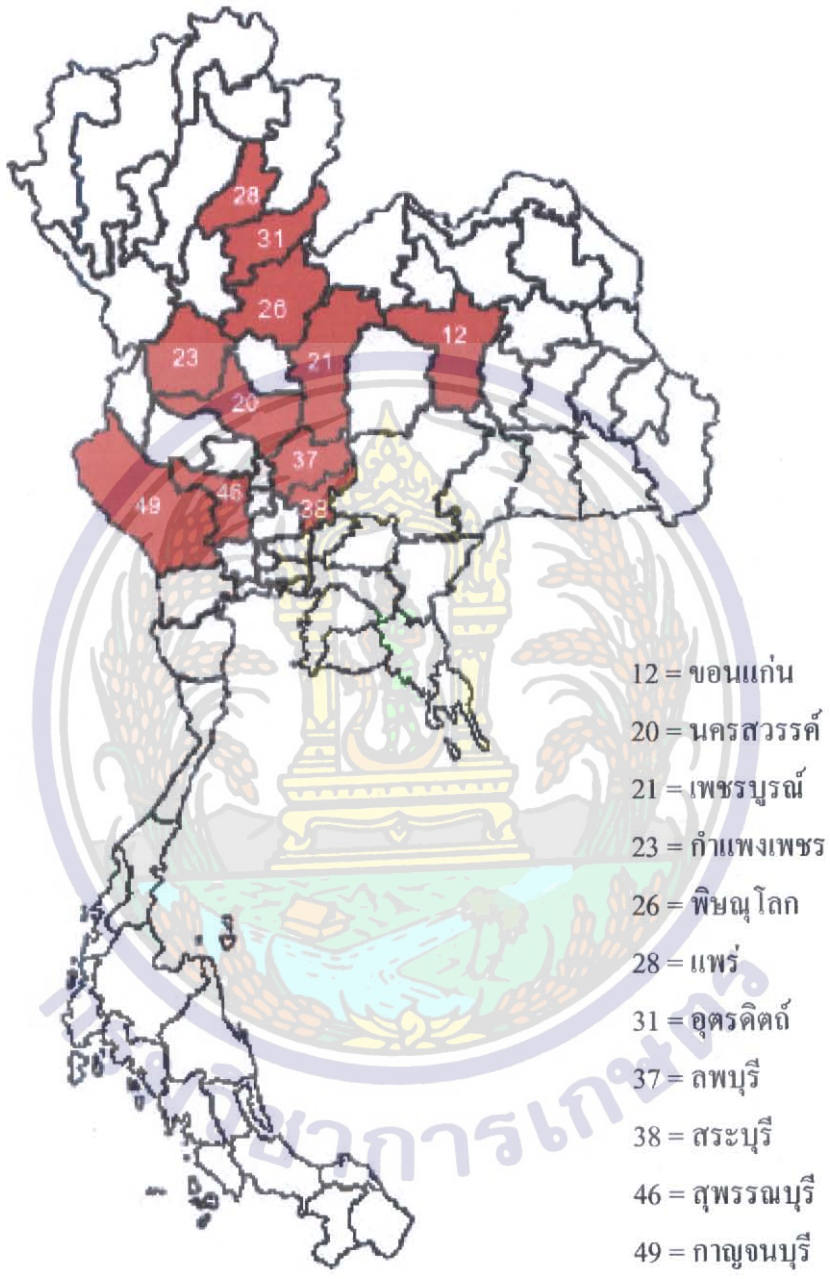
List of Provinces and Regions

North-Eastern Region	Northern Region	Central Plain Region	Southern Region
1. Nakhon Phanom	20. Nakhon Sawan	37. Lop Buri	63. Chumphon
2. Sakon Nakhon	21. Petchabun	38. Saraburi	64. Nakhon Si Thammarat
3. *Nongkhai*	22. Uthai Thani	39. Chai Nat	65. Phatthalung
4. Udon Thani	23. *Kampheang* Phet	40. Nakhon Nayok	66. Songkhla
5. Nong Bua Lam Phu	24. Tak	41. Nakhon Pathom	67. Surat Thani
6. Loei	25. Phichit	42. Nonthaburi	68. Krabi
7. Mukdahan	26. Phitsanulok	43. Pathum Thani	69. Trang
8. Yasothon	27. Nan	44. Ayuthaya	70. Phang-nga
9. Ubon Ratchathani	28. Phrae	45. Sing Buri	71. Phuket
10. Amnat Charoen	29. Lampang	46. Suphan Buri	72. Ranong
11. Kalasin	30. Sukhothai	47. Ang Thong	73. Satun
12. Khon Kaen	31. Uttaradit	48. Bangkok Metropolis	74. Narathiwat
13. Maha Sarakham	32. Chiang Mai	49. Kanchanaburi	75. Pattani
14. Roi Et	33. Chiang Rai	50. Prachuap Khiri Khan	76. Yala
15. Buri Ram	34. Mae Hong Son	51. Phetchaburi	
16. Si Sa Ket	35. Lamphun	52. Ratchaburi	
17. Surin	36. Phayao	53. *Chachoengsao*	
18. Chaiyaphum		54. Prachin Buri	
19. Nakhon Ratchasima		55. Sa Kaeo	
		56. Samut Prakan	
		57. Samut Sakhon	
		58. Samut Songkhram	
		59. Chon Buri	
		60. Rayong	
		61. Chanthaburi	
		62. Trat	

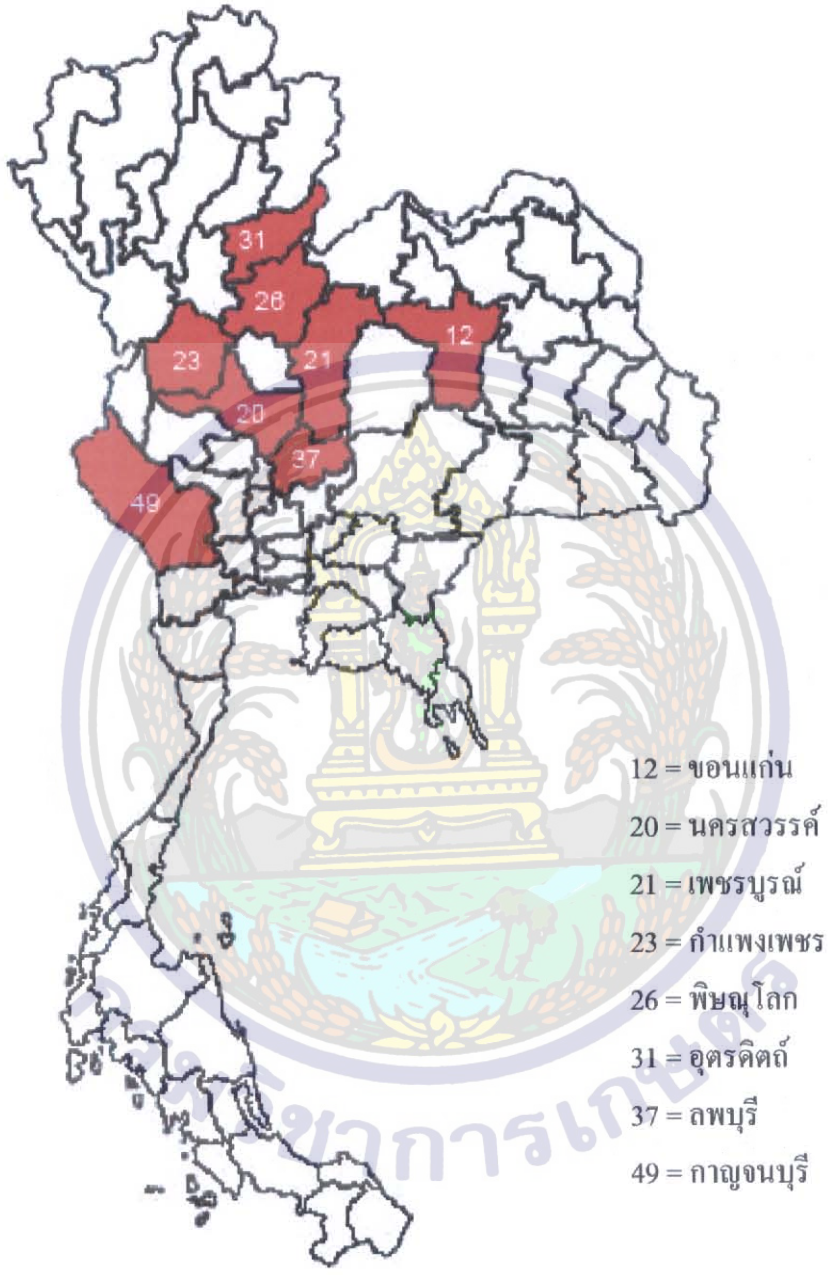
กรมวิชาการเกษตร



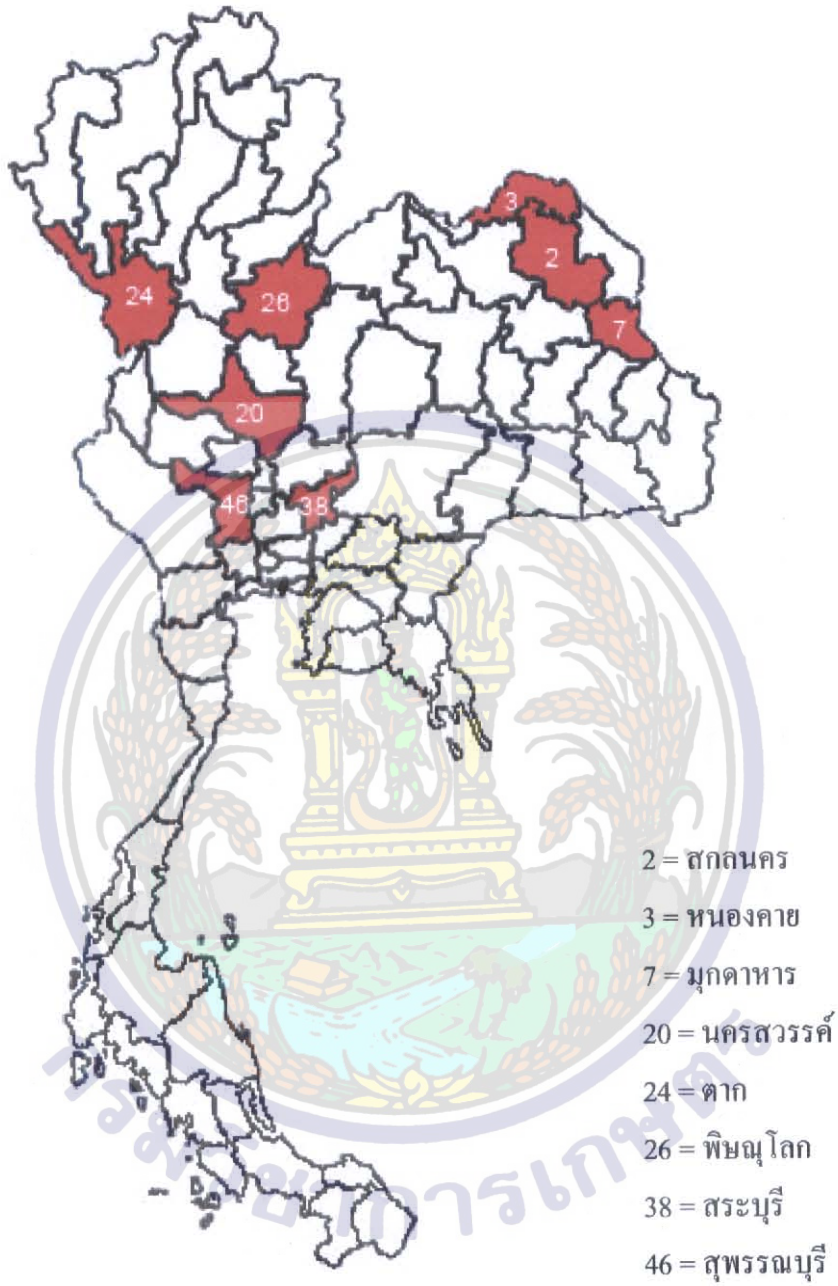
ภาพที่ 2 แผนที่แสดงแหล่งปลูกข้าวโพด ปี พ.ศ. 2541



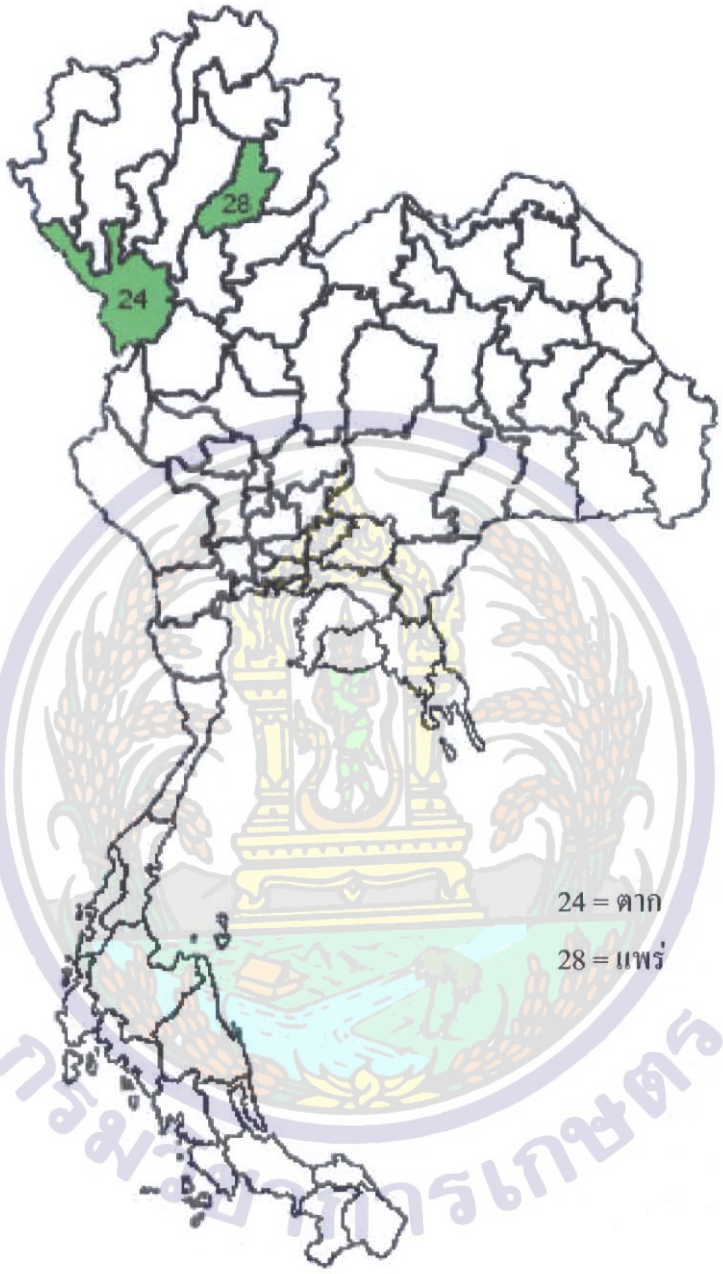
ภาพที่ 3 แผนที่แสดงแหล่งปลูกข้าวโพด ปี พ.ศ. 2542



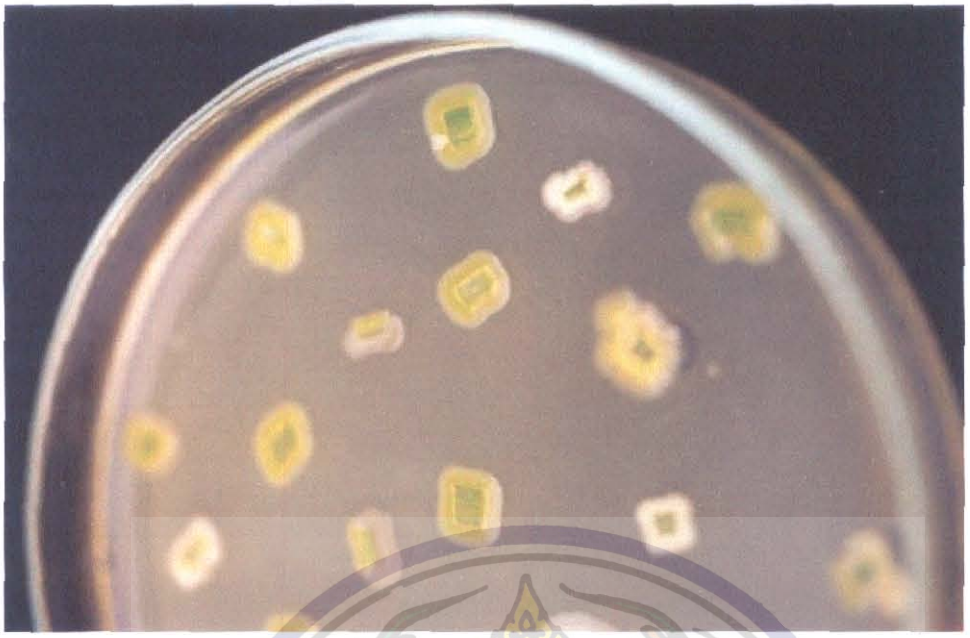
ภาพที่ 4 แผนที่แสดงแหล่งปลูกข้าวโพด ปี พ.ศ. 2543



ภาพที่ 5 แผนที่แสดงแหล่งปลูกข้าวโพด ปี พ.ศ. 2543



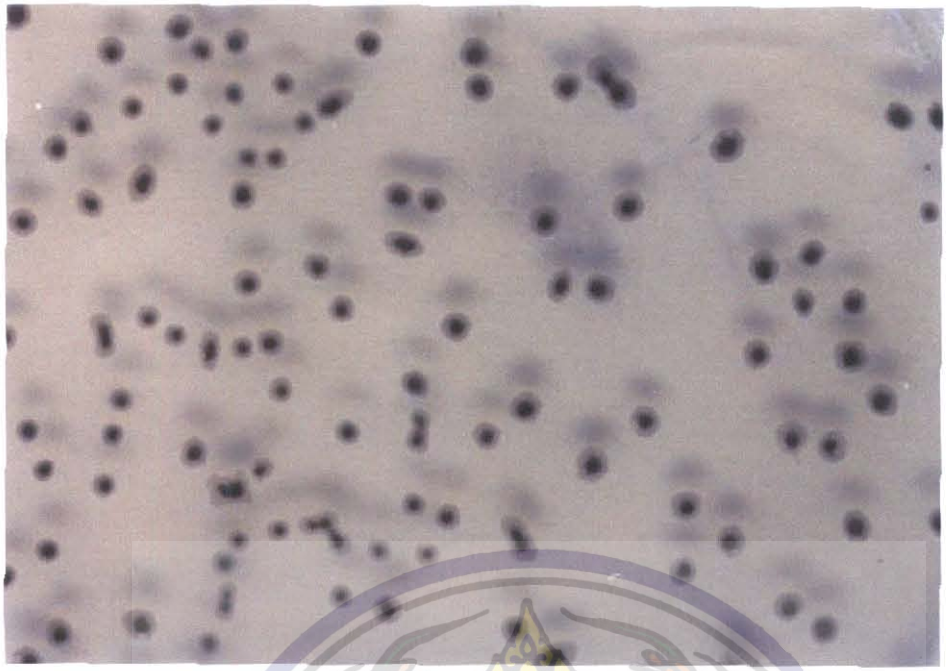
ภาพที่ 6 แผนที่แสดงแหล่งที่พบเชื้อสาเหตุโรค



ภาพที่ 7 แสดงการแยกเชื้อจากข้าวโพดโดยวิธี Tissue transplant บนอาหาร Nutrient agar

ภาพที่ 8 แสดงการแยกเชื้อจากข้าวโพดโดยวิธี streak plate และทำเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ (single colony) บนอาหาร Nutrient agar

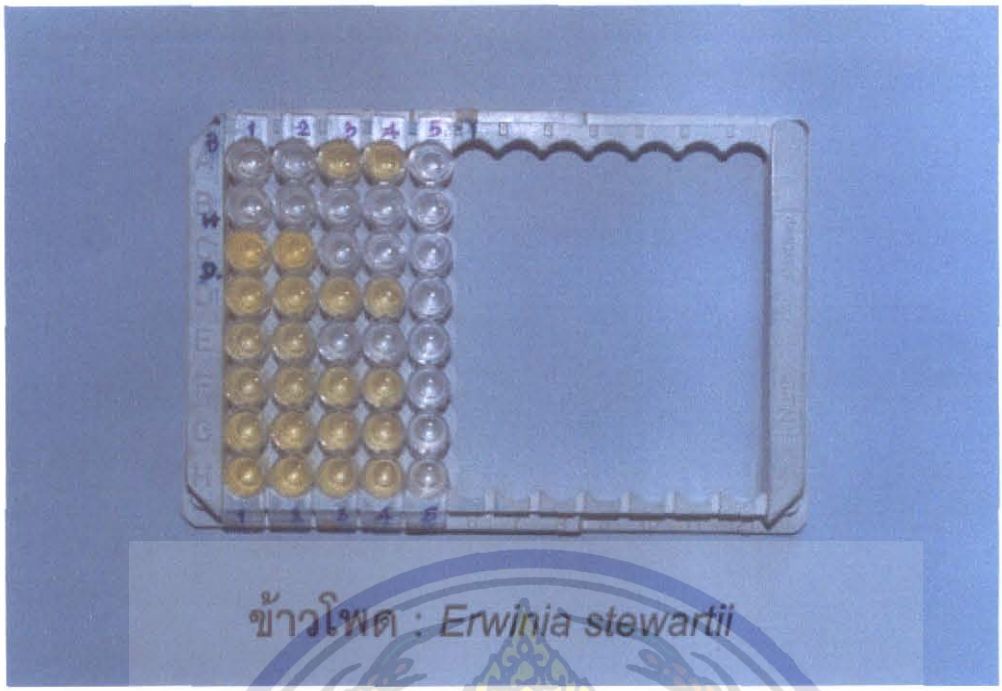
วิทยวิทยาการเกษตร



ภาพที่ 9 แสดงการเจริญบนอาหาร Nigrosin medium แสดงโคโลนีคล้ายตากบ

ภาพที่ 10 แสดงการเกิดโรคบนต้นข้าวโพดหวาน (Pathogenicity test)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 11 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี ELISA

Program	: Biolog MicroLog3 4.20
Read From File	: C:\Biolog\Nathima.D4C
Save To File	: C:\Biolog\Nathima.D4C
Unrestricted Access?	: Yes
Read Time	: ม.ค. 05 2004 20:12
Parent File	: C:\Biolog\Nathima.D4C
Plate Number	: 9
Incubation Time	: 16-24
Sample Number	: Pujava maesord I Plate Type: GN2
Strain Type	: GN-ENT
Strain Number	:
Strain Name	:
Other	: 16-24 hr
Data Input Mode	: File
590/750 Filters Used	: 6 / 5
Threshold Mode	: Automatic: Color: 44/184
Number +/b/- Reactions	: 58 / 5 / 33
Database To Search	: MicroLog
Data Base(s) Searched	: C:\Biolog\Databases\GN002.KID

Key : <X>: positive; <X-: mismatched positive; X: negative; X+: mismatched negative
(X): borderline; -X: less than A1 well

Color	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	6	< 816>	{ 165}	< 547>	< 666>	9	<1545>	15	<1580>	<1366>	<1325>
B	6	<1593>	40	<1538>	<1284>	<1613>	<1428>	<1584>	<1073>	<1299>	<1452>	<1673>
C	< 831>	<1565>	<1522>	<1476>	<1447>	{ 77}	<1701>	<1716>	{ 81}	24	<1224>	< 362>
D	< 502>	<1514>	<1072>	< 247>	2	<1397>	<1323>	<1497>	<1092>	16	1	<1050>
E	-0	-10	1	12	22	<1028>	-7	-11	<1269>	< 629>	-9	< 821>
F	< 525>	23	{ 105}	4	< 920>	<1233>	< 936>	<1395>	<1478>	<1617>	< 717>	< 871>
G	< 918>	-8	-8	< 809>	-2	<1529>	-7	19	<1456>	-2	7	10
H	28	<1348>	{ 46}	< 429>	-8	-5	-3	1	<1375>	< 489>	<1193>	<1002>

=> Species ID: Pantoea agglomerans <=

	Species	PROB	SIM	DIST	TYPE
=>1)	*Pantoea agglomerans*	*100*	*0.51*	*7.83*	*GN-ENT*
2)	Pantoea dispersa	0	0.00	10.00	GN-ENT
3)	Enterobacter sakazakii	0	0.00	10.66	GN-ENT
4)	Raoultella terrigena	0	0.00	11.76	GN-ENT
5)	Enterobacter cloacae	0	0.00	12.09	GN-ENT
6)	Klebsiella oxytoca	0	0.00	12.32	GN-ENT
7)	Klebsiella pneumoniae ss pneumoniae	0	0.00	13.03	GN-ENT
8)	Pectobacterium cypripedii	0	0.00	13.08	GN-ENT
9)	Salmonella gp 1 (choleraesuis) ST typhimurium	0	0.00	13.10	GN-ENT
10)	Enterobacter amnigenus	0	0.00	13.17	GN-ENT
Other)		---	---	96.00	---

Print Time = ม.ค. 28 2004 11:36 Page 1 of 1 pages

ภาพที่ 12 แสดงผลการตรวจสอบโดย Biolog

การตรวจสอบศัตรูพืชสำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชไร่และรับรองการปลอดโรคเพื่อการส่งออกฤดูการผลิตปี 2545-2547

ณัฏฐพร อุทัยมงคล อุดร อุณหวุฒิ
สุรพล ยินอัศวพรรณ ชลธิชา รักใคร่
ปรียพรรณ พงศาพิชญ์

กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีศักยภาพสูงในการผลิตเพื่อส่งออกเมล็ดพันธุ์พืชที่สำคัญ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชได้จัดทำโครงการการตรวจสอบและรับรองการปลอดศัตรูพืชให้กับเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตเพื่อส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ โดยกำหนดขั้นตอนการตรวจสอบและรับรองการปลอดศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์พืชไร่ ไว้ 5 ขั้นตอน คือ ตรวจโรคและศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์ พ่อ-แม่ กรณีที่เป็นเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศ จัดให้มีโปรแกรมกำจัดศัตรูพืช ตรวจรับรองการปลอดโรคและศัตรูพืชช่วงเจริญเติบโตในแปลงปลูก และตรวจรับรองการปลอดโรคและศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์หลังการเก็บเกี่ยวก่อนส่งออก

ในระหว่างปี 2545-2547 มีบริษัทผลิตและส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดได้ยื่นความจำนงขอร่วมโครงการฯ โดยขอให้ตรวจรับรองการปลอดโรคพืชสำคัญบางชนิดช่วงพืชเจริญเติบโตในแปลงปลูก 3 ราย และขอให้ตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืชทั้งในแปลงปลูกและเมล็ดพันธุ์หลังเก็บเกี่ยวด้วย 2 ราย ในท้องที่ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวม 14 จังหวัด คือ สระบุรี, ลพบุรี, นครสวรรค์, พิษณุโลก, กำแพงเพชร, อุตรดิตถ์, ตาก, แพร่, ลำปาง, เชียงใหม่, แม่ฮ่องสอน, หนองคาย, นครราชสีมา และกาญจนบุรี พื้นที่ผลิตรวม 1,557.50 ไร่ เกษตรกร 302 ราย เพื่อส่งออกไปต่างประเทศรวม 9 ประเทศ ศัตรูพืชที่ขอให้รับรองการปลอดเป็นเชื้อโรคพืช 21 ชนิด วัชพืช 1 ชนิด และแมลง 6 ชนิด ผลการตรวจสอบแปลงปลูกพบเชื้อโรคพืช 21 ชนิด เป็นแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Erwinia carotovora, Erwinia chrysanthemi* และ *Pseudomonas avenae* และเชื้อราโรคพืช 18 ชนิด ที่สำคัญ เช่น *Cephalosporium acremonium, Drechslera carbonum* และ *Drechslera turcicum* เป็นต้น ผลการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหลังเก็บเกี่ยวจากจังหวัดสระบุรี และตาก พบเชื้อโรคพืช 2 ชนิด คือ *Fusarium moniliforme* และ *Cephalosporium acremonium* ซึ่งไม่ใช่ศัตรูพืชที่ประเทศผู้ซื้อต้องการให้รับรอง ทำให้ในฤดูกาลผลิตปี 2545-2547 ประเทศไทยสามารถส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดไปจำหน่ายยัง 9 ประเทศ ได้ตามข้อกำหนดของประเทศผู้ซื้อ

การตรวจสอบศัตรูพืชสำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชไร่
และรับรองการปลอดโรคเพื่อการส่งออกฤดูการผลิต ปี 2545 – 2547

---

1. เหตุผลและความจำเป็น

ปัจจุบันนี้หลาย ๆ ประเทศ ทั่วโลกต่างมีความต้องการเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด (*Zea mays* L.) ที่มีคุณภาพดีปราศจากโรคศัตรูพืชและให้ผลผลิตสูงในปริมาณที่เพิ่มขึ้นทุก ๆ ปี ในขณะที่บางประเทศไม่สามารถผลิตเมล็ดพันธุ์ทางการค้าเองได้ เนื่องจากข้อจำกัดด้านสภาพภูมิอากาศ ค่าแรงงานในการดำเนินการ ตลอดจนคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ที่ได้ ทำให้ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่สำคัญ โดยเฉพาะเมล็ดพันธุ์ลูกผสมต่าง ๆ ทั้งข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวโพดฝักอ่อนและข้าวโพดหวานที่มีคุณภาพ ซึ่งมีพื้นที่ผลิต สภาพภูมิอากาศเหมาะสม และเกษตรกรที่มีความสามารถ ทำให้สามารถผลิตเมล็ดพันธุ์และส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศได้ตามความต้องการของประเทศผู้ซื้อ ซึ่งมีข้อกำหนดให้มีการรับรองการปลอดเชื้อโรคพืชที่สำคัญบางชนิดกับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดในช่วงพืชเจริญเติบโตในแปลงปลูกและ/หรือเมล็ดพันธุ์หลังเก็บเกี่ยว ดังนั้น บริษัทผู้ผลิตจึงขอให้กรมวิชาการเกษตรเข้ามาดำเนินการให้เป็นไปตามข้อกำหนดเงื่อนไขของประเทศปลายทางดังกล่าว โดยให้คำแนะนำ และตรวจสอบรับรองการปลอดศัตรูพืชในช่วงที่พืชเจริญเติบโตในแปลงปลูกและ/หรือเมล็ดพันธุ์หลังเก็บเกี่ยว

กรมวิชาการเกษตรได้พิจารณาเห็นว่าการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชไร่ โดยเฉพาะข้าวโพดเพื่อการส่งออกเป็นเรื่องที่มีความสำคัญ การส่งออกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่มีระบบการรับรองปลอดศัตรูพืชเป็นการปรับปรุงคุณภาพและมูลค่าของเมล็ดพันธุ์ที่ส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศ และสนับสนุนภาคเอกชนด้วยสามารถนำเงินตราเข้าประเทศไทยปีละหลายสิบล้านบาท และยังเป็นประโยชน์โดยเป็นการกระจายรายได้สู่ชนบท ช่วยให้เกษตรกรมีอาชีพและรายได้เสริมเพิ่มขึ้นจากการทำนา หรือทำสวนเพิ่มขึ้น กรมวิชาการเกษตรจึงอนุมัติให้กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ดำเนินการตรวจสอบศัตรูพืชสำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์และรับรองการปลอดโรคเพื่อการส่งออกสำหรับข้าวโพดดังกล่าว

2. วัตถุประสงค์

1) เพื่อควบคุมและตรวจสอบการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดให้ปราศจากโรคและศัตรูพืชตั้งแต่ในช่วงพืชเจริญเติบโตในแปลงปลูกและ/หรือเมล็ดพันธุ์หลังเก็บเกี่ยว และออกใบรับรองปลอดศัตรูพืชสำคัญบางชนิดตามความต้องการของประเทศผู้ซื้อ ในฤดูการผลิตปี 2545-2547

2) เพื่อพัฒนา คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดให้เป็นที่ยอมรับของนานาประเทศ และสามารถแข่งขันกับประเทศผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด ในตลาดโลก

3. เป้าหมาย

1) ผลิตเมล็ดพันธุ์พืชไร่ 1 ชนิด คือเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด (ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์, ข้าวโพดหวาน, ข้าวโพดฝักอ่อน) เพื่อส่งออกให้ได้ปริมาณตามความต้องการ โดยผ่านการตรวจรับรองการปลอดโรคตามความต้องการของประเทศผู้ซื้อปลายทาง

2) พัฒนาเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดให้มีคุณสมบัติตรงตามความต้องการของประเทศผู้ซื้อ

3) ยกระดับเศรษฐกิจของเกษตรกรผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์ทั้งในภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันตก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทำให้มีรายได้เสริมเพิ่มขึ้น

4) นำเงินตราเข้าประเทศปีละหลายล้านบาท

4. หน่วยงานที่รับผิดชอบ

1) กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

2) สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1 และ 3 กรมวิชาการเกษตร (เข้าร่วมฝึกการดำเนินการเก็บตัวอย่าง และสังเกตอาการโรค)

5. พื้นที่ดำเนินงาน

1) แปลงปลูกของเกษตร ซึ่งอยู่ในการดูแลของบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

6. ระยะเวลาในการดำเนินงาน

1) บริษัทยื่นความจำนงขอให้เจ้าหน้าที่ตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อรับรองการปลอดโรคประมาณเดือนพฤษภาคม - กรกฎาคม และกันยายน – ตุลาคม ของทุกปี

2) ในกรณีใช้พ่อ-แม่พันธุ์จากต่างประเทศ จะได้รับการตรวจสอบในการนำเข้าตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติม โดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 ว่าปราศจากเชื้อโรคกักกันพืชแล้ว จึงจะนำไปดำเนินการใช้ประโยชน์ต่อไป

3) จัดประชุมร่วมระหว่างหน่วยงานที่เกี่ยวข้องระหว่างกรมวิชาการเกษตรและบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ ประมาณเดือนตุลาคมของทุกปีหรือเมื่อมีการเปลี่ยนแปลง

4) ดำเนินการตรวจสอบโรคและศัตรูพืชในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ช่วงพืชเจริญเติบโตในแปลงปลูกของเกษตรกรช่วงฤดูแล้งระหว่างเดือนพฤศจิกายน-กุมภาพันธ์ และช่วงฤดูฝน ระหว่างกรกฎาคม-ตุลาคม

5) ดำเนินการตรวจวินิจฉัยโรคพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ช่วงฤดูแล้งระหว่างเดือนพฤศจิกายน-เมษายน และช่วงฤดูฝนระหว่างกรกฎาคม-ธันวาคม

6) รายงานผลการตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อการออกใบรับรองปลอดศัตรูพืชของเชื้อโรคที่สำคัญบางชนิด ระหว่างเดือนตุลาคม-ธันวาคม และเมษายน-กันยายน

7) จัดทำสรุปผลการปฏิบัติตลอดฤดูการผลิตระหว่างเดือนตุลาคม 2545 - กันยายน 2547

7. บริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ที่เข้าร่วมโครงการ

บริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ที่เข้าร่วมในโครงการตรวจสอบศัตรูพืชสำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์และรับรองการปลอดโรคเพื่อการส่งออกฤดูการผลิต 5 บริษัท

8. เชื้อโรคพืชและศัตรูพืชที่ต้องตรวจรับรองการปลอดโรคกับข้าวโพด

มีศัตรูพืชรวม 28 ชนิด เป็นเชื้อโรคพืช 21 ชนิด วัชพืช 1 ชนิด และแมลง 6 ชนิด (ตารางที่ 3)

9. ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงาน

ในการดำเนินงานได้กำหนดแนวทางปฏิบัติเพื่อให้บริษัทดำเนินการมี 2 ขั้นตอน คือ

ก) การดำเนินการของบริษัทก่อนการผลิตเมล็ดพันธุ์

บริษัทที่ต้องการผลิตเมล็ดพันธุ์จะมีการผลิตเพื่อจุดประสงค์ 2 อย่าง คือ 1) เพื่อทำการทดลองหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อไปทดสอบการปลูกในประเทศที่สั่งซื้อ และ 2) การปลูกเพื่อส่งเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมไปเพื่อจำหน่าย ทั้ง 2 กรณีสามารถดำเนินการโดยใช้เมล็ดพันธุ์ในประเทศไทยเองเป็นพ่อ-แม่พันธุ์หรือมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากต่างประเทศมาเพื่อใช้เป็นคู่ผสม ในกรณีหลังที่เมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าต้องมีการตรวจสอบหาโรคศัตรูพืชที่อาจติดเข้ามา ตามที่กำหนดไว้ในประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ฉบับที่ 2 ในพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ.2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2542 ว่าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเป็นสิ่งกำกัดต้องมีใบรับรองปลอดศัตรูพืชและกักเพื่อตรวจสอบหาศัตรูพืชก่อน หากไม่พบศัตรูพืชร้ายแรง จึงจะปล่อยคืนให้เจ้าของไปดำเนินการต่อไป

ข) ขั้นตอนการควบคุมและตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อรับรองการปลอดโรค

การดำเนินงานตามโครงการตรวจสอบศัตรูพืชสำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์และรับรองการปลอดโรคเพื่อการส่งออกมีขั้นตอนการควบคุมตรวจสอบศัตรูพืช 5 ขั้นตอน (ภาคผนวก 1) ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การตรวจโรคและศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์พ่อ-แม่ที่นำเข้า
ขั้นตอนที่ 2 จัดให้มีโปรแกรมกำจัดศัตรูพืช
ขั้นตอนที่ 3 ตรวจโรคและศัตรูพืชช่วงพืชเจริญเติบโตในแปลงปลูก
ขั้นตอนที่ 4 ตรวจโรคและศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์หลังการเก็บเกี่ยว
ขั้นตอนที่ 5 ออกใบรับรองปลอดศัตรูพืช

อย่างไรก็ตามในการขอให้รับรองการปลอดศัตรูพืชตามความต้องการของประเทศผู้ซื้อนั้น บริษัทสามารถเลือกเอากรณีใดกรณีหนึ่งก็ได้ใน 3 กรณี ดังนี้

กรณีที่ 1ตรวจรับรองการปลอดโรคพืชที่สำคัญบางชนิดช่วงพืชเจริญเติบโตในแปลงปลูก
กรณีที่ 2 ตรวจรับรองการปลอดโรคพืชที่สำคัญบางชนิดกับเมล็ดพันธุ์หลังเก็บเกี่ยว
กรณีที่ 3ตรวจรับรองการปลอดโรคพืชที่สำคัญบางชนิดช่วงพืชเจริญเติบโตในแปลงปลูกและเมล็ดพันธุ์หลังเก็บเกี่ยว

ขั้นตอนที่ 1 การตรวจโรคและศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์พ่อ-แม่ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

การผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม ในกรณีที่ 1 บริษัทฯ จะนำเข้าเมล็ดพันธุ์พ่อ-แม่ มาจากต่างประเทศ และเพื่อให้การนำเข้าเมล็ดพันธุ์พ่อ-แม่ถูกต้องตาม พ.ร.บ. กักพืช พ.ศ. 2507 จะต้องปฏิบัติตามเงื่อนไขการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พ่อ-แม่ และเพื่อให้เมล็ดพันธุ์ปลอดจากศัตรูพืชจำเป็นต้องจึงตรวจโรคและศัตรูพืชเมล็ดพันธุ์พ่อ-แม่ก่อนนำไปใช้ทำพันธุ์ปลูก ในกรณีที่ 2 ใช้สายพันธุ์ที่ผลิตในประเทศไทยไม่ต้องมีการตรวจพ่อ-แม่ก่อนปลูก

ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคพืชจะทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association, 1993) แล้วนำตัวอย่างมาตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคพืชซึ่งอาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ตามขั้นตอนและวิธีการ **ตามวิธีการที่ใช้ในเอกสารอ้างอิง** ดังต่อไปนี้

1. การตรวจสอบเชื้อรา

1) การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะยังไม่งอก (Dry seed examination)

การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืช จะต้องตรวจสอบตั้งแต่ขณะเมล็ดพันธุ์ยังไม่งอกว่ามีเชื้อโรคพืชชนิดใดติดมาหรือไม่ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นประกอบการพิจารณาใช้วิธีการตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป ซึ่งการตรวจสอบสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะยังไม่งอกดำเนินการดังนี้

(1) ตรวจสอบลักษณะอาการโรคและส่วนขยายพันธุ์เชื้อราหรือตัวเชื้อโรค ซึ่งปะปนมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยตาเปล่าหรือตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope เนื่องจากเชื้อโรคพืชอาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ในลักษณะเมล็ดพันธุ์ที่เป็นโรค (diseased seed) โดยแสดงอาการโรคออกมาเด่นชัด หรือทำให้เมล็ดพันธุ์มีรูปร่างผิดปกติ หรืออาจติดมาภายในเมล็ดพันธุ์โดยไม่แสดงอาการ นอกจากนี้เชื้อโรคพืชอาจติดมากับเศษพืชในลักษณะเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์ในรูปตัวเชื้อเอง เช่น pycnidia, sclerotia เป็นต้น

(2) ตรวจสอบโดยวิธีแช่เมล็ดพันธุ์ในน้ำแล้วนำเมล็ดพันธุ์ไปเขย่าในเครื่องเขย่าเพื่อให้สปอร์ของเชื้อที่ติดหลุดออกมา และตรวจน้ำล้างเมล็ดใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope โดยนำเมล็ดพันธุ์ที่สุ่มตัวอย่างได้จำนวน 100 เมล็ด มาแช่ในน้ำและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใช้ไปเปตต์ดูดน้ำล้างเมล็ดพันธุ์และนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งและล้างตะกอนโดยหยด lactophenol ลงบนตะกอนเขย่าให้เข้ากันและนำไปตรวจสอบหาสปอร์เชื้อราใต้กล้องจุลทรรศน์

2) การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะเมล็ดงอก ดำเนินการตรวจสอบ 2 วิธี คือ

1.1 Blotter method ใช้ตัวอย่างวิเคราะห์จำนวน 400 เมล็ด ต่อ 1 สายพันธุ์ โดยวางเมล็ดลงบนกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่นที่ชุ่มน้ำซึ่งวางอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางเมล็ดข้าวโพด 10 เมล็ดต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำจานเพาะเมล็ดไปบ่มเชื้อ (incubate) ใต้แสง near ultraviolet (NUV) สลับกับ

ความมืด 12/12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจและจำแนกชนิดเชื้อราบนเมล็ดพันธุ์ใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (compound microscope)

1.2 Deep freeze Blotter method ดำเนินการเหมือน 2.1 แต่หลังจากวางเมล็ดข้าวโพดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มเชื้อที่ใต้แสง NUV สลับกับความมืด 12/12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 1 วันแล้วนำมาเก็บในตู้เย็น อุณหภูมิประมาณ - 4°C เป็นเวลา 1 วันก่อน แล้วนำออกมาไว้ที่ใต้แสง NUV ต่ออีกจนครบ 7 วัน จึงจะนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตริโอไมโครสโคป และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง

2. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย

ในการตรวจและจำแนกชนิดแบคทีเรียดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1) การแยกเชื้อสาเหตุ

เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชสามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดได้ใน กรณีที่เชื้อติดมาในปริมาณมากจะสามารถแยกเชื้อจากเมล็ดโดยตรงได้

สำหรับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่ติดมากับเมล็ดในปริมาณน้อย จะต้องเพาะเมล็ดให้งอกเป็นต้นกล้าแล้วแยกเชื้อจากใบพืชซึ่งแสดงอาการโรค การแยกเชื้อสามารถดำเนินการได้ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

(1) แยกเชื้อสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงด้วยวิธี Dilution plate โดยบดเมล็ดจำนวน 100-500 เมล็ด หรือแล้วแต่เชื้อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจหา และจำนวนเมล็ดพันธุ์ที่มีอยู่. โดยการแยกเชื้อทำแยกในแต่ละสายพันธุ์ของข้าวโพด เมื่อได้เมล็ดพันธุ์แล้วนำมาใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไลด์ (0.85% NaC1) หรือบัฟเฟอร์ จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำให้เจือจางในอาหารเหลว Nutrient broth ให้มีความเจือจางเป็น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ ใช้ไปเปตต์ดูด suspension แต่ละความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) หรืออาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะเจาะจง (semiselective media) โดยใช้อาหาร Nigrosin medium เพื่อตรวจ *Erwinia stewartii* หรือใช้อาหาร CNS เพื่อตรวจสอบเชื้อ *Clavibacter michiganense* sub sp. *nebraskense* แล้วใช้แท่งแก้ว spread ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน จึงนำมาตรวจหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย แยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปจำแนกชนิดต่อไป

(2) แยกเชื้อจากต้นกล้าซึ่งเพาะจากเมล็ด เพาะเมล็ดในดินนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 400 เมล็ด หรือที่มีอยู่จริง โดยเพาะ 50-100 เมล็ดต่อถุง และเก็บถุงเพาะที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เมื่อต้นกล้าออกใบจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนพืช หรืออาจใช้ถุงพลาสติกที่ฉีดพ่นน้ำคลุมให้ความชุ่มชื้นเป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนใบพืช เก็บใบพืชที่สงสัยไปแยกเชื้อด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

(2.1) วิธี Dilution plate ตัดใบพืชที่เป็นโรคเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมแล้วฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย

10% clorox นาน 2-3 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อ แล้วบดชิ้นส่วนในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ จากนั้นนำมาทำให้ เจือจางเป็นลำดับจาก 10^{-1} ถึง 10^{-5} และดำเนินการ เช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ (1) กรณีที่ต้องการตรวจสอบเชื้อ *Erwinia stewarii* จะใช้อาหาร NA และ Nigrosin mediun และอาหาร CNS เพื่อตรวจ *Clavibacter michiganense* sub sp. *nebraskense*

(2.2) วิธี Tissue transplanting ตัดใบพืชเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2 x2 มิลลิเมตร ล้างฆ่าเชื้อที่ ผิวด้วย 10% clorox นาน 2-3 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายใต้กระแสลมตู้เขี่ยเชื้อ แล้ววางพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA หรืออาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะเจาะจง (semiselective media) นำจานเลี้ยงเชื้อไปเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาตรวจสอบหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย เก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจนครบ 3-5 วัน เพื่อตรวจหาโคโลนีของแบคทีเรียชนิดอื่นจากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และนำไปศึกษาคุณลักษณะเพื่อจำแนกชนิดต่อไป

2) การจำแนกชนิด (Identification)

(1) ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย โดยบันทึกลักษณะและสีของโคโลนี ตรวจสอบรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

(2) ทดสอบแกรม (Gram reaction) โดยใช้โปรแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 3% (3% KOH) ที่เตรียมใหม่ใช้ภายใน 2 สัปดาห์ หากตรวจพบเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) และแกรมบวก (Gram positive) รูปร่างแบบ Coryneform rod ก็จะนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

(3) ทดสอบ hypersensitivity reaction บนยาสูบโดยการฉีด suspension ของเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมงซึ่งมีความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตรเข้าไปในใบยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.) บริเวณ เนื้อใบระหว่างเส้นใบ สังเกตลักษณะอาการเซลล์ตายตรงเนื้อใบหลังการฉีดเชื้อ 24-48 ชั่วโมง หากพบอาการเซลล์ตายแสดงว่าเชื้อแบคทีเรีย isolate ดังกล่าวเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช

(4) ทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Physiological and biochemical characters) เช่น การใช้ยูเรีย การย่อยเจลาติน การย่อยเอสคูลิน และแป้ง reduce ไนเตรต ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นต้น

(5) ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัย Pathogenicity test) โดยเตรียม suspension ของเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้น 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร ปลูกเชื้อตามอาการของโรคของเชื้อที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุ เช่น

ปลูกเชื้อโดยฉีดเข้าในลำต้นข้าวโพดหวานอายุ 2-3 สัปดาห์ เมื่อสงสัยว่าเป็นเชื้อ *Erwinia stewartii, Clavibacter michiganense* sub sp. *nebraskense, Pseudomonas avenae* หรือโดยการเอากรรไกรที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มสารละลายของเชื้อแบคทีเรียแล้วตัดที่ใบข้าวโพด โดยให้ห่างจากปลายใบประมาณ 1-2 เซนติเมตร เมื่อคิดว่าเป็น *Pseudomonas avenae* ฉีดพ่นน้ำให้ความชุ่มชื้นคลุมด้วยถุงพลาสติกและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ตรวจลักษณะอาการโรคหลังปลูกเชื้อ 3-5 วัน จากนั้นนำใบเป็นโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อสาเหตุที่ทำให้พืชเป็นโรคเป็นชนิดเดียวกับที่แยกได้ในครั้งแรกหรือไม่

(6) การตรวจสอบด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วจะนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว 523 medium และนำมาทำการตรวจสอบตามขั้นตอน ดังนี้

- เตรียมตัวอย่าง เก็บรวบรวมเซลล์เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว 523 medium อายุ 24-48 ชั่วโมง โดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และกวนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นผสมสาร ทำการล้างเซลล์ตามขั้นตอนข้างต้นอีก 2 ครั้ง หลังจากล้างเซลล์ครั้งสุดท้ายให้ละลายเซลล์ด้วย coating buffer และปรับปริมาณเซลล์แบคทีเรียให้ได้ 2.5 x 10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร
- หยดตัวอย่างทดสอบที่เตรียมได้ปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงในภาชนะทดสอบ โดยหยดเซลล์เชื้อแบคทีเรีย (เชื้อมาตรฐาน) และ control treatment หลุมละ 100 ไมโครลิตร
- เก็บภาชนะทดสอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืนเพื่อให้สารละลายเซลล์แบคทีเรียแห้ง
- เติม blocking solution หลุมละ 200 ไมโครลิตร และเก็บภาชนะทดสอบในกล่องรักษาความชื้นเป็นเวลา 30 นาที ในสภาพอุณหภูมิห้อง
- ล้างภาชนะทดสอบด้วยphosphate buffer saline ซึ่งเติม Tween –20 (PBS-T) 5 ครั้งละ 3-5 นาที
- หยอดแอนติบอดี้ (primary antibody) ของเชื้อแบคทีเรียหลุมละ 100 ไมโครลิตร และเก็บภาชนะทดสอบในกล่องรักษาความชื้น 1 ชั่วโมง ในสภาพอุณหภูมิห้อง
- ล้างภาชนะทดสอบด้วย PBS-T จำนวน 5 ครั้ง ครั้งละ 3-5 นาที

- หยอด Alkaline phosphatase enzyme conjugate หลุมละ 100 ไมโครลิตร และเก็บภาชนะทดสอบในกล่องรักษาความชื้น 1 ชั่วโมง ในสภาพอุณหภูมิห้อง
- ล้างภาชนะทดสอบด้วย PBS –T จำนวน 5 ครั้ง ครั้งละ 3-5 นาที
- หยอด substrate (p – nitropheny phosphae) หลุมละ 100 ไมโครลิตรและเก็บภาชนะทดสอบในกล่องรักษาความชื้น 30-60 นาที
- หยุดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงด้วยการหยด 3 M sodium hydroxide ลงหลุมละ 50 ไมโครลิตร
- ตรวจปฏิกิริยาโดยดูด้วยตาเปล่าหรือวัดความเข้มข้นสีด้วยเครื่องอ่านผล (photometer) โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 405 นาโนเมตร

3. การตรวจสอบเชื้อไวรัส

ด้วยเหตุที่เชื้อไวรัสส่วนใหญ่จะติดกับเมล็ดพันธุ์ในปริมาณน้อย จึงเป็นการยากที่จะตรวจพบ หากตรวจจากเมล็ดโดยตรง จึงต้องเพาะเมล็ดให้งอกแล้วสังเกตลักษณะอาการโรค จากนั้นนำใบพืชที่แสดงอาการผิดปกติไปจำแนกชนิดเชื้อไวรัสต่อไป ในการตรวจสอบจะดำเนินการตามขั้นตอน ดังนี้

(1) ปลูกสังเกตลักษณะอาการโรคบนต้นกล้า (Seedling symptom test) โดยเพาะเมล็ดพันธุ์ในดินอบฆ่าเชื้อ ตัวอย่าง 200-1,000 เมล็ด เก็บรักษาไว้ในโรงปลูกพืชกันแมลงเมื่อต้นพืชออกใบจริง 1-2 ใบ จึงตรวจสอบลักษณะอาการโรค ต้นกล้าที่แสดงอาการผิดปกติ สงสัยว่ามีสาเหตุจากเชื้อไวรัสจะนำใบอ่อนไปตรวจสอบด้วยวิธีการอื่นเพื่อจำแนกชนิดต่อไป

(2) ปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ (Infectivity test) ในการทดสอบจะทาน้ำคั้นพืช (sap) ที่สงสัยบนพืชทดสอบ (Indexing plant) ชนิดที่เหมาะสมกับเชื้อไวรัสแต่ละชนิดในการตรวจสอบโรคไวรัสของข้าวโพดที่ต้องให้การรับรองจะใช้พืชทดสอบ เช่น *N. tabacum* cv. White Burley หรือบนข้าวโพดหวาน (Sweet corn) โดยเตรียมน้ำคั้นพืชสำหรับทดสอบโดยบดใบพืชที่แสดงลักษณะอาการผิดปกติในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ตรวจสอบเชื้อไวรัสใช้ 0.1 M phosphate buffer pH 7.0) โดยใช้ใบพืชหนัก 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร ในสภาพเย็น จากนั้นใช้สำลีหรือนิ้วที่สะอาดจุ่มน้ำคั้นพืชทาลงบนใบพืชทดสอบ ซึ่งโรยด้วยผงคาร์โบรันดัม (carborundum ขนาด 600 mesh) หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 5 นาที ให้ล้างใบพืชและนำพืชทดสอบไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส สังเกตลักษณะอาการบนพืชทดสอบหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 1-4 สัปดาห์ โดยพืชทดสอบจะแสดงอาการแผลเฉพาะแห่ง (local lesion) หรืออาการแบบกระจายทั่วลำต้น (systemic infection)

(3) การตรวจสอบอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Electron microscopy) โดยวิธีลอยกริดบนน้ำคั้นพืช เตรียมน้ำคั้นพืชโดยบดใบพืชที่แสดงอาการผิดปกติในฟอสเฟทบัฟเฟอร์ 0.1 M phosphate buffer pH 7.0) อัตรา 1 : 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นหยดน้ำคั้นซึ่งเตรียมได้บนแผ่นพาราฟิล์ม วางกริดด้านที่เคลือบเยื่อฟอร์มวาร์ (formvar) สัมผัสกับหยดน้ำคั้นพืชเป็นเวลา 5-15 นาที ล้างกริดด้วยน้ำ

กลั่น 30 หยด แล้วย้อมด้วยสารย้อมสี 2% Uranyl acetate 7 หยด ซับให้แห้งแล้วนำกริดไปตรวจสอบอนุภาคเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนต่อไป

(4) การตรวจสอบด้วยวิธีทางเซรุ่มวิทยา (Serological techniques)

4.1 การตรวจสอบด้วยวิธี Immunoelectron microscopy IEM แบบ Derrick ร่วมกับ Decorate เป็นการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนร่วมกับวิธีทางเซรุ่มวิทยา โดยลอยกริดบนหยดแอนติบอดี (antibody) ต่อเชื้อไวรัสที่ต้องการตรวจสอบที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม เป็นเวลา 15 นาที ล้างกริดด้วยฟอสเฟทบัฟเฟอร์ 30 หยด ซับกริดพอหมาดแล้วลอยกริดบนหยดน้ำคั้นพืชที่ต้องการตรวจสอบนาน 5 นาที จากนั้นล้างกริดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 30 หยด และลอยกริดบนหยดแอนติบอดี้นาน 15 นาที ล้างกริดด้วยน้ำกลั่น 30 หยด ซับกริดให้แห้งแล้วย้อมด้วยสารย้อมสี 2% Uranyl acetate 7 หยด ซับกริดให้แห้งแล้วนำไปตรวจสอบอนุภาคไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

4.2 การตรวจสอบด้วยวิธี Enzyme – linked Immunosorbent Assay : ELISA เป็นวิธีตรวจสอบเชื้อไวรัสที่มีความไวสูง แม้จะมีเชื้อไวรัสปริมาณต่ำหรืออนุภาคแตกหักก็สามารถตรวจได้ ให้ผลรวดเร็ว แน่นอน และยังสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก วิธีการที่นำมาใช้เป็นแบบ Indirect ELISA ซึ่งมีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้

- หยอดน้ำคั้นพืช (เตรียมโดยบดใบพืชแสดงอาการผิดปกติใน coating buffer ซึ่งเติม 1% polyvinyl pyrolidone) ลงในภาชนะทดสอบ (microtiter หลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บภาชนะทดสอบในถุงพลาสติกที่มีกระดาษชุ่มน้ำให้ความชื้นแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
- ล้างภาชนะทดสอบด้วย phosphate buffer saline pH (PBS) ซึ่งผสม Tween-20 (PBST) 3 ครั้งๆ ละ 3-5 นาที
- หยด blocking solution (1% bovine serum และ นมผงพร่องมันเนย 1% ใน PBS) หลุมละ 150 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
- หยอดแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสที่ต้องการตรวจสอบ โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมหลุมละ 100ไมโครลิตร แล้วเก็บภาชนะทดสอบไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส
- ล้างภาชนะทดสอบด้วย PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 3-5 นาที
- หยอด enzyme-labelled goat antirabbit conjugate อัตราความเข้มข้น 1:2000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วเก็บภาชนะทดสอบไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
- ล้างภาชนะทดสอบด้วย PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 3-5 นาที

- หยอด substrate หลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตรวจปฏิกิริยาโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงเกิดสีเหลืองเนื่องจากเอนไซม์ย่อย substrate
- หยุดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีด้วยการหยอดโซเดียมไฮดรอกไซด์ (3 M Sodium hydroxide) หลุมละ 50 ไมโครลิตร
- ตรวจปฏิกิริยาโดยสังเกตปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยตาเปล่าหรือวัดความเข้มข้นของสีด้วย photometer โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 405 นาโนเมตร

ขั้นตอนที่ 2 จัดให้มีโปรแกรมกำจัดศัตรูพืช

เพื่อให้เมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้มีคุณภาพดีปราศจากโรคและศัตรูพืช ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ช่วงพืชเจริญเติบโตในแปลงปลูกจำเป็นต้องจัดให้มีโปรแกรมกำจัดศัตรูพืช โดยบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์จะกำหนดชนิดและโปรแกรมการกำจัดศัตรูพืชให้แก่เกษตรกรที่อยู่ในความรับผิดชอบของบริษัท และพนักงานเจ้าหน้าที่กักกันพืชจะทำการกำกับดูแลเกี่ยวกับการกำหนดชนิดสารเคมีและโปรดแกรมกำจัดศัตรูพืชดังกล่าว พร้อมทั้งให้คำแนะนำขณะปฏิบัติงานตรวจสอบศัตรูพืชเมื่อตรวจพบการระบาดของโรคและศัตรูพืช สารเคมีที่แนะนำให้ใช้ป้องกันกำจัดศัตรูพืชกับข้าวโพดมี ดังนี้

เมทาแลคซิล (Metalaxyl)
อะมาเม็กติน (Abamectin)
อะลาคลอร์ (Alachlor)
คาร์โบซัลแฟน (Carbosulfan)
โฟแทน (Fortan)
คลอโรทาโรนิล (Chlorothalonil))
เมโทมิล (Methomyl)
คอปเปอร์ออกซิคลอไรด์ (Copper oxychloride)
คาโบฟูแลนด์ (Carbofuran)
ไซเปอร์เมททิน (Cypermethrin)
ไฟโปรนิล (Fipronil)
แมนโคแซบ (Mancozeb)
เมททิลพาราไทออน (Methyl parathion)
Propicanaazole + defenocaneazole
Earthec (Copper sulfate Rentahydrate)

ขั้นตอนที่ 3 การตรวจสอบโรคและศัตรูพืชช่วงเจริญเติบโตในแปลงปลูก

1) สถานที่เพาะปลูก สภาพพื้นที่

ดำเนินการตรวจสอบแปลงปลูกข้าวโพดในทุกภูมิภาค ตามที่บริษัทได้ยื่นความจำนงให้ไปดำเนินการตรวจสอบ ซึ่งพื้นที่ปลูกส่วนใหญ่จะเป็นพื้นที่ปลูกข้าว ข้าวโพด หรือยาสูบ โดยเกษตรกรจะปลูกหลังเก็บเกี่ยวข้าว หรือยาสูบแล้ว แต่บางรายเป็นพื้นที่ปลูกข้าวโพดอยู่เดิมแล้ว บางแหล่งเพิ่งเริ่มดำเนินการปลูกครั้งแรก ลักษณะพื้นที่ปลูกจะอยู่กระจัดกระจายตามแหล่งน้ำ ซึ่งอาจจะเป็นคลองชลประทาน แม่น้ำเขื่อน หรือแหล่งน้ำธรรมชาติ เช่น น้ำบาดาล

2) อายุพืชและจำนวนครั้งที่ทำการตรวจสอบโรคและศัตรูพืช

การตรวจสอบโรคและศัตรูพืชเพื่อรับรองการปลอดโรคและศัตรูพืช ขึ้นอยู่กับความต้องการของประเทศผู้ซื้อ ซึ่งส่วนใหญ่จะขอให้รับรองการปลอดโรคและศัตรูพืชที่สำคัญบางชนิดในช่วงการผลิต โดยกลุ่มวิจัยการกักกันพืชได้มีการกำหนดให้ตรวจสอบ 2 ครั้ง ตามการดำเนินการในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาเพื่อให้เหมาะสมต่อการเก็บตัวอย่างเพื่อหาสาเหตุโรค คือ

ครั้งที่ 1 เมื่อข้าวโพดอยู่ในระยะก่อนออกดอก อายุประมาณ 40-45 วัน

ครั้งที่ 2 เมื่อข้าวโพดเจริญเติบโตเต็มที่ก่อนเก็บเกี่ยว อายุประมาณ 70-75 วัน

การตรวจสอบโรคและศัตรูพืชทั้ง 2 ครั้งนี้ จะครอบคลุมช่วงที่โรคและศัตรูพืชที่ประเทศผู้ซื้อเมล็ดพันธุ์ต้องการให้รับรองเป็นกรณีพิเศษเพื่อเข้าประเทศ

3) การตรวจสอบโรคและศัตรูพืชในช่วงพืชกำลังเจริญเติบโตในแปลงปลูก

การดำเนินงานตรวจสอบโรคและศัตรูพืชดำเนินการโดยเจ้าหน้าที่กักกันพืช และลูกจ้างชั่วคราวรายเดือน ซึ่งมีความรู้และประสบการณ์ทางด้านโรคและศัตรูพืชเป็นอย่างดี โดยเจ้าหน้าที่กักกันพืชจะทำหน้าที่ควบคุมการปฏิบัติงาน นับตั้งแต่การวางแผนการตรวจสอบศัตรูพืช ให้คำแนะนำตลอดจนการตัดสินใจในกรณีที่มีปัญหาในการปฏิบัติงาน และร่วมปฏิบัติงานในการตรวจสอบศัตรูพืช

การปฏิบัติงานการตรวจสอบศัตรูพืชจะดำเนินการตรวจสอบทุกแปลงโดยมิได้ทำการสุ่มตรวจเป็นบางแปลงได้เพราะแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์แต่ละรายการจะอยู่กระจัดกระจายอยู่ตามหมู่บ้านต่างๆ และพื้นที่ที่ปลูกในแต่ละฤดูกาลจะเปลี่ยนแปลงไป อาจไม่ซ้ำพื้นที่เดิม ตลอดจนโรคและศัตรูพืชที่ต้องการให้รับรองอาจพบการระบาดในแต่ละแหล่งได้ไม่เหมือนกัน การตรวจสอบจะมุ่งเน้นตรวจหาลักษณะอาการโรคพืชที่ต้องการให้รับรอง ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส เจ้าหน้าที่กักกันพืชปฏิบัติงานตรวจสอบและเก็บตัวอย่างพืชที่สงสัยว่ามีอาการเหมือนโรคที่ต้องการให้รับรองพร้อมบันทึกรายละเอียด และแหล่งที่ปลูกนำเข้ามาตรวจวินิจฉัยขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ พร้อมทั้งขณะดำเนินการตรวจสอบหากตรวจพบการระบาดโรค และศัตรูพืชในแปลงปลูกจะให้คำแนะนำเกี่ยวกับการป้องกันและกำจัดแก่พนักงานบริษัท หรือเกษตรกรด้วย ในฤดูกาล 46-47 มีนักวิชาการและลูกจ้างจากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช 1 และ 3 ร่วมดำเนินการตรวจสอบและช่วยเก็บตัวอย่าง แต่ยังมิได้ดำเนินการรับผิดชอบตรวจสอบและจำแนกชนิด รวมทั้งสิ้น 2 ครั้ง

4) การตรวจสอบและวินิจฉัยตัวอย่างพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างข้าวโพดที่เก็บจากแปลงปลูกจะนำมาตรวจวินิจฉัยขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการตามขั้นตอนและวิธีการตรวจสอบชนิดเชื้อรา แบคทีเรีย และ ไวรัส ที่ดำเนินการเช่นเดียวกับขั้นส่วนพืชที่เป็นโรคตามที่กล่าวแล้วในขั้นตอนที่ 1

ขั้นตอนที่ 4 ตรวจโรคและศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์หลังการเก็บเกี่ยว

การตรวจสอบพืชเพื่อให้การรับรองว่าปราศจากโรคพืชสำคัญบางชนิดตามความต้องการของประเทศผู้ซื้อนั้น นอกจากจะต้องทำการตรวจโรคและศัตรูพืชในแปลงปลูกแล้ว เพื่อให้แน่ใจว่าพืชปราศจากโรคที่ต้องการรับรองจะทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ลูกผสมหลังเก็บเกี่ยว แล้วนำมาตรวจสอบเชื้อโรคพืชซึ่งอาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ในห้องปฏิบัติการก่อนออกใบรับรองปลอดศัตรูพืชหรือประเทศผู้ซื้อบางประเทศอาจต้องการให้ตรวจสอบเมล็ดพันธุ์หลังการเก็บเกี่ยวเพียงขั้นตอนเดียว ในการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์จะดำเนินการตรวจสอบเชื้อรา แบคทีเรีย และ ไวรัส ตามวิธีการและขั้นตอนตรวจสอบโรคพืชกับเมล็ดพันธุ์พ่อ-แม่ ที่นำเข้าจากต่างประเทศในขั้นตอนที่ 1

ขั้นตอนที่ 5 การออกใบรับรองปลอดศัตรูพืช (ดำเนินการโดยกลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร)

บริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ที่ร่วมในโครงการฯ ซึ่งมีความประสงค์จะส่งออกเมล็ดพันธุ์และต้องการให้ออกใบรับรองปลอดศัตรูพืชจะต้องดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1) ยื่นคำขอใบรับรองปลอดศัตรูพืชแบบ พ.ก. 9 และคำขอการเพิ่มข้อความในใบรับรองปลอดศัตรูพืช ณ กลุ่มมาตรฐานและบริการสินค้าเกษตร สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร และสำเนาเรื่องให้ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2) รมยากำจัดศัตรูพืช ในกรณีที่มีการกำหนดให้มีการกำจัดศัตรูพืช ณ ประเทศต้นทาง การรมยากำจัดศัตรูพืชจะดำเนินการภายใต้การกำกับดูแลของ เจ้าหน้าที่กักกันพืช โดยในการรมยากำจัดแมลงศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์พืชจะใช้ฟอสฟีนแก๊สที่เกิดจากปฏิกิริยาของอลูมิเนียมฟอสไฟด์หรือแมกนีเซียมฟอสไฟด์กับความชื้นในอากาศ ซึ่งจะมีประสิทธิภาพกำจัดแมลงและเมล็ดพันธุ์ไม่สูญเสียความงอก โดยใช้อัตรา 2 กรัมต่อ 1 ลูกบาศก์เมตรระยะเวลา 72 ชั่วโมงเมื่อใช้อลูมิเนียมฟอสไฟด์และใช้ระยะเวลา 48 ชั่วโมงเมื่อใช้แมกนีเซียมฟอสไฟด์

3) รายชื่อเกษตรกร น้ำหนักผลผลิตที่ได้ น้ำหนักผลผลิตที่จะส่งออก รายการสายพันธุ์ของข้าวโพดที่จะส่งออก มายังกลุ่มวิจัยการกักกันพืชก่อนการส่งออก 3-5 วัน สำหรับเป็นข้อมูลประกอบในการจัดทำรายงานผลการตรวจสอบโรคพืชเพื่อการออกใบรับรองปลอดศัตรูพืช

4) กำหนดให้การส่งออกเมล็ดพันธุ์ลูกผสมซึ่งได้รับการรับรองปลอดโรคพืชสำคัญบางชนิดจะต้องไม่ปะปนกับเมล็ดพันธุ์ซึ่งไม่ได้ผ่านการตรวจสอบโรคพืช

5) การเติมข้อความลงในใบรับรองปลอดศัตรูพืชในช่อง Additional declaration หากข้อความที่ต้องระบุเพิ่มเติมมีความยาวต้องพิมพ์เป็นเอกสารแนบ (Attached sheet) ออกใบรับรองปลอดศัตรูพืชและเอกสารแนบจะต้องออกให้พร้อมกัน

ผลการดำเนินงาน

1. หน่วยงานที่รับผิดชอบ

ในการปฏิบัติงานตรวจสอบศัตรูพืชฤดูผลิตปี 2545-46 มีหน่วยงานที่ร่วมดำเนินการดังนี้

1. งานวิชาการกักกันโรคพืช กลุ่มวิจัยการกักกันพืช รับผิดชอบตรวจสอบข้าวโพด จำนวน 59 รายเกษตรกร พื้นที่ผลิต 187.75 ไร่ ในพื้นที่ 9 จังหวัด

2. ความร่วมมือระหว่างกลุ่มวิจัยการกักกันพืช และศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ 2 ครั้ง ร่วมฝึกเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง

ในการปฏิบัติงานตรวจสอบศัตรูพืชฤดูผลิตปี 2546-47 มีหน่วยงานที่ร่วมดำเนินการดังนี้

1. งานวิชาการกักกันโรคพืช กลุ่มวิจัยการกักกันพืช รับผิดชอบตรวจสอบศัตรูพืชของข้าวโพด 3 ชนิด คือ ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดฝักอ่อนจำนวนเกษตรกร 243 รายเกษตรกร พื้นที่ผลิต 1,369.75 ไร่ ในพื้นที่ 10 จังหวัด

2. ภาควิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น รับผิดชอบตรวจสอบศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์ข้าวโพด จำนวนเกษตรกร 1 ครอบครัว พื้นที่ผลิต 1 ไร่

3. การร่วมมือระหว่างกลุ่มวิจัยการกักกันพืช และสำนักวิจัยพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 (เชียงใหม่) 2 ครั้ง และสำนักวิจัยพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 (พิษณุโลก) 1 ครั้ง

2. บริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ที่เข้าร่วมโครงการ

ในฤดูผลิตปี 2545-2547 มีบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ร่วมโครงการฯ 5 บริษัท ได้แก่ บริษัท ซินเจนทา ซีดส์ จำกัด บริษัท โนวาตีส ครอป โปรเทคชั่น จำกัด บริษัท มอนซานโต้ (ไทยแลนด์) จำกัด บริษัท คลอแมน (ประเทศไทย) จำกัด และบริษัทแปซิฟิคเมล็ดพันธุ์จำกัด (ตารางที่ 4 ก, ข)โดยยื่นความจำนงขอให้ทำการตรวจสอบศัตรูพืชเจริญเติบโตในแปลงปลูก 5 บริษัท และ 2 บริษัทยื่นให้ตรวจโรคในแปลงปลูกและตรวจเมล็ดพันธุ์หลังการเก็บเกี่ยวด้วย คือ บริษัท ซินเจนทาซีสด์ จำกัด และบริษัท แปซิฟิค เมล็ดพันธุ์ จำกัด (ตาราง 4 ค)

3. ผลการดำเนินงานของการตรวจสอบศัตรูพืชสำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชไร่และรับรองการ ปลอดโรคเพื่อการส่งออกในฤดูผลิตปี 2545-2547 สรุปได้ดังนี้

3. 1 ผลการตรวจสอบโรคและศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้าจากต่างประเทศ

1) <u>แหล่งของเมล็ด</u>

- ปี 2545-2546 มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดมาจาก 11 ประเทศ รวม 95 ครั้ง

ปริมาณ 1,348,946.58 กิโลกรัม (ประมาณ 1,851 ตัน) 405 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1ก)

- ปี 2546-2547 มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดมาจาก 13 ประเทศ รวม 86 ครั้ง

ปริมาณ 1,850,865.71 (1,850 ตัน) 1,654 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1ข)

สรุปการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดระหว่างปี 2545-2547 มีการนำเข้ามาจาก 16 ประเทศ ได้แก่ ฟิลิปปินส์ ปากีสถาน อินเดีย อินโดนีเซีย อิตาลี ออสเตรเลีย จีน บราซิล สหรัฐอเมริกา ชิลี โบลิเวีย ญี่ปุ่น นิวซีแลนด์ พม่า เวียดนาม และไต้หวัน รวมทั้งหมด 181 ครั้ง คิดเป็นปริมาณ 3,199,810.4 กิโลกรัม (ประมาณ 3,200 ตัน) มีตัวอย่างที่ตรวจสอบทั้งสิ้น 2,059 ตัวอย่าง มีการนำเข้าจำนวนครั้งมากที่สุดคือจากประเทศสหรัฐอเมริกา

2) ผลการตรวจสอบศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้า

ปี 2545-2546 ตรวจพบศัตรูพืช 14 ชนิด ได้แก่ *Altenaria alternata, Al. tenuissima, Botryodiplodia theobromae, Cladosporium* sp., *Cephalosporium acremonium, Cep. maydis, Curvularia lunata C. pallescense, Drechslera australinensis, D. halodes, Fusarium moniliforme, Helminthosporium cynodontis, Trichoderma* sp. และ *Sphaceopsis* sp. (ตารางที่ 2 ก)

ปี 2546-2547 ตรวจพบศัตรูพืช 15 ชนิด ได้แก่ *Alternaria alternata, Al. tenuis Bipolaris* sp., *Cladosporium* sp. *Cephalosporium acremonium, Colletotrichum graminicola, Curvularia eragrostidis, C. lunata, C. pallescense, Didymella* sp, *Drechslera carbonum, D. rostata, Fusarium moniliforme, F.solani, Helminthosporium cynodontis, Trichoderma* sp. (ตารางที่ 2 ข.)

สรุปผลจากการตรวจสอบระหว่างปี 2545-47 พบศัตรูพืช 21 ชนิด คือ *Alternaria alternata, Al. tenuis. Al. tenuissima, Bipolaris* sp. *Botryodiplodia theobromae, Cephalosporium acremonium, Cep. maydis, Cladosporium* sp. *Colletotrichum graminicola, Curvularia pallescense, C. eraglostidis C. lunata, Didymella* sp. *Drechslera australinensis D. carbonum D. halodes D. rostrata, Helminthosporium cynodontis, Fusarium moniliforme, F. solani, Sphaceopsis* sp. และ *Trichoderma* sp. (ตารางที่ 2 ค.) เชื้อดังกล่าวมี 11 ชนิด จัดเป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญคือ

1. *Alternaria alternata* สาเหตุโรค Alternaria leaf spot พบจากประเทศ ปากีสถาน จีน สหรัฐอเมริกา พบ 8 ครั้ง
2. *Bipolalis* sp. สาเหตุโรค Seed Rot, Seedling blight และ damping off พบจากประเทศ ปากีสถาน พบ 1 ครั้ง
3. *Botryodiplodia theobromae* สาเหตุโรค Black kernel rot พบจากประเทศ อินเดีย พบ 1 ครั้ง
4. *Cephalosporium acremonium* สาเหตุโรค Stalk rot พบจากประเทศ ฟิลิปปินส์ อินเดีย จีน อินโดนีเซีย บราซิล สหรัฐอเมริกา เวียดนาม ชิลี ไต้หวัน พบ 35 ครั้ง
5. *Cephalosporium maydis* สาเหตุโรค Late wilt พบจากประเทศอินเดีย พบ 2 ครั้ง

6. *Colletotrichum graminicola* สาเหตุโรค Anthracnose Leaf Blight พบจากประเทศอินเดีย พบ 1 ครั้ง
7. *Curvularia lunata* สาเหตุโรค Curvularia leaf spot พบจากประเทศ ฟิลิปปินส์ และปากีสถาน พบ 3 ครั้ง
8. *Curvularia pallescence* สาเหตุโรค Curvularia leaf spot พบจากประเทศ ฟิลิปปินส์ และจีน พบ 5 ครั้ง
9. *Didymella* sp. สาเหตุโรค Didymella leaf spot นำเข้าจากประเทศเวียดนาม พบ 1 ครั้ง
10. *Drechslera carbonum* สาเหตุโรค Northern corn leaf spot พบจากประเทศเวียดนาม พบ 1 ครั้ง
11. *Drechslera rostrata* สาเหตุโรค Rostratum Leaf spot พบจากประเทศอินเดีย 1 ครั้ง
12. *Fusarium moniliforme* สาเหตุโรค Fusarium stalk rot หรือ Fusarium leaf scorch พบจากทุกประเทศ (ยกเว้นประเทศ ปากีสถาน) พบ 132 ครั้ง
13. *Fusarium solani* สาเหตุโรค Fusarium Root Rot พบจากประเทศ ฟิลิปปินส์ ปากีสถาน อินโดนีเซีย สหรัฐอเมริกา และเวียดนาม พบ 8 ครั้ง

ประเทศที่มีการตรวจพบศัตรูพืชติดมากับเมล็ดพันธุ์นำเข้ามากที่สุดคือประเทศฟิลิปปินส์ ผลการตรวจเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้ามาจากต่างประเทศไม่ตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และไวรอยด์ เชื้อราทั้งหมด 13 ชนิด ที่กล่าวมามีรายงานการพบอยู่ในประเทศไทยแล้ว เชื้อราบางชนิดยังไม่สามารถจำแนกถึงระดับสกุลได้ เนื่องจากมีลักษณะใกล้เคียงกันมากต้องใช้เวลาและเทคนิคในการจำแนกชนิด แต่อย่างไรก็ตามแม้จะมีการพบแล้วในประเทศไทย ก็อาจทำความเสียหายต่อการปลูกข้าวโพดในประเทศไทยเพิ่มขึ้นเช่นชื้อ *Fusarium moniliforme* สาเหตุโรค Stalk rot จะทำให้เมล็ดข้าวโพดไม่งอก หรือเน่าตายได้ เชื้อ *Drechslera carbonum* สาเหตุโรค Northern corn leaf spot เป็นโรคเมล็ดพันธุ์ที่มีความสำคัญพบในเขตภาคเหนือของประเทศไทย จึงไม่ควรนำเชื้อโรคเหล่านี้ติดเข้ามาเพิ่มปริมาณในประเทศไทยเพิ่มมากขึ้นไปอีก นอกจากนี้ เชื้อ *Cephalosporium maydis* ยังไม่มีรายงานการพบในประเทศไทยหากแต่ไม่จัดเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย เพราะเชื้อนี้ไม่ทำให้ผลผลิตพืชลดลงแต่เป็นเชื้อที่ทำลายเมล็ดพันธุ์ได้ จึงไม่ควรให้มีการระบาดในประเทศไทยได้

ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันมิให้ศัตรูพืชต่างๆ จากต่างประเทศสามารถเข้ามาและก่อให้เกิดโรคกับข้าวโพดได้ จึงต้องมีการป้องกันโดยให้คลุกยากับเมล็ดเพื่อกำจัดศัตรูพืชก่อนปล่อยออกไป หรือมีการคลุกยาก่อนปลูกโดยให้เชื้อราที่มี สปอร์สีเข้ม เช่น *Drechslera* sp. หรือ *Bipolaris* sp. จะคลุกเมล็ดด้วย Iprodione 50%wp และเชื้อราที่มีสปอร์สีอ่อน เช่น *Fusarium* sp. และ *Cephalosporium* sp. ให้คลุกเมล็ดด้วย Benomyl 50%wp หรือ Mancozeb 80%wp ก่อนปลูก

3.2 ผลการตรวจสอบโรคและศัตรูพืชกับแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อส่งออกต่างประเทศ

โดยเหตุที่พืชที่ปลูกอยู่กระจัดกระจาย และโรคที่ต้องให้การรับรองบางชนิดแนวโน้มการแพร่ระบาดไม่จำกัดเฉพาะในบางพื้นที่ จึงจำเป็นต้องทำการตรวจสอบทุกแปลง โดยจะทำการตรวจสอบ 2 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 ในระยะข้าวโพดออกดอกหรือก่อนถอดดอก ครั้งที่2 ระยะเติบโตเต็มที่ก่อนเก็บเกี่ยว พืชมีอายุประมาณ 70-75 วัน ช่วงระยะเวลาดังกล่าวเป็นช่วงที่เหมาะสมกับการเกิดโรค ซึ่งต้องตรวจสอบและให้การรับรอง การปฏิบัติงานตรวจสอบโรคศัตรูพืชจะมุ่งเน้นตามโรคพืชที่ต้องให้การรับรอง โดยสังเกตลักษณะอาการโรคซึ่งปรากฏบนต้นพืช และทำการเก็บตัวอย่างพืชที่สงสัยมาตรวจวินิจฉัยขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ โดยดำเนินการตรวจสอบโรคศัตรูพืชตามที่ประเทศผู้ซื้อระบุไว้ รวม 24 ชนิด จัดเป็นแบคทีเรีย 4 ชนิด เชื้อรา 11 ชนิด ไวรัส 1 ชนิด แมลง 7 ชนิด และวัชพืช 1 ชนิด (ตารางที่ 3)

1) <u>พื้นที่การตรวจสอบโรคและศัตรูพืชในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก</u>

- ในปี 2545-46 มีบริษัทยื่นเรื่องให้ดำเนินการตรวจสอบเพื่อส่งออกจำนวน 5 บริษัท คือ บริษัท ซินเจนทา ซีดส์ จำกัด บริษัท โนวาตีส ครอปโปรเทคชั่น (ประเทศไทย) จำกัด บริษัท มอนซานโต้เมล็ดพันธุ์ (ไทยแลนด์) จำกัด บริษัท คลอแมน (ประเทศไทย) จำกัด และบริษัท แปซิฟิค เมล็ดพันธุ์ จำกัด โดยมีพื้นที่ปลูก 9 จังหวัด ได้แก่ ภาคกลางที่จังหวัด สระบุรี ลพบุรี นครสวรรค์ ภาคเหนือที่จังหวัด พิษณุโลก กำแพงเพชร แพร่ ตาก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่จังหวัด นครราชสีมา และหนองคาย รวมพื้นที่ 187.75 ไร่ 59 รายเกษตรกร เพื่อส่งไปจำหน่ายยังต่างประเทศ รวม 8 ประเทศ ดำเนินการตรวจสอบทั้งหมด 20 ครั้ง (ตารางที่ 4 ก)
- ในปี 2546-47 มีบริษัทยื่นความจำนงค์ให้ดำเนินการตรวจสอบ 5 บริษัท เช่นเดียวกับปี 2545-46 โดยมีพื้นที่ปลูก 10 จังหวัด ได้แก่ ภาคกลางที่จังหวัด สระบุรี นครสวรรค์ กาญจนบุรี ภาคเหนือได้แก่ พิษณุโลก อุตรดิตถ์ แพร่ ลำปาง ตาก แม่ฮ่องสอน และเชียงใหม่ พื้นที่ 1,369.75 ไร่ 243 รายเกษตรกร เพื่อส่งออกไป 8 ประเทศดำเนินการตรวจสอบทั้งหมด 28 ครั้ง (ตารางที่ 4 ข)

สรุปผลการตรวจสอบศัตรูพืชที่พบในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ระหว่างปี 2545-2547 มีทั้งหมด 14 จังหวัด ในพื้นที่ภาคกลาง 4 จังหวัด คือ สระบุรี ลพบุรี นครสวรรค์ กาญจนบุรี ภาคเหนือ 8 จังหวัด คือ พิษณุโลก ตาก ลำปาง แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ แพร่ กำแพงเพชร อุตรดิตถ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2 จังหวัด คือ หนองคาย และนครราชสีมา

2.) <u>ผลการตรวจโรคและแมลงศัตรูพืชช่วงพืชเจริญเติบโตในแปลงปลูก</u>

- ในฤดูการผลิตปี 2545-46 ตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคพืชดังนี้ เป็นเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Erwinia carotovora, E. chrysanthemi, Pseudomonas avenae* และเชื้อราอีก 15 ชนิด คือ *Cephalosporium acremonium, Cercospora sorghi, Cladosporium* sp., *Curvularia lunata, C.pallescense,*

Drechslera carbonum, D. maydis, D. sorghicola, Fusarium moniliforme, F. semitectum, Puccinia polysora, P. sorghi, Rhizoctonia solani, Sclerotium rolfsii และ *Ustilago maydis* มีเชื้อโรคที่เป็นศัตรูพืชที่สำคัญคือ *Pseudomonas avenae, Drechslera carbonum, D. maydis, Rhizoctonia solani, Sclerotium rolfsii, Ustilago maydis.* โดยเฉพาะ *Drechslera maydis* พบในพื้นที่ทุกจังหวัดแต่ที่พบจำนวน 1 แปลงที่จังหวัดนครสวรรค์และ 2 แปลง พิษณุโลกที่ไม่ผ่านการรับรองเพื่อออกใบรับรองปลอดศัตรูพืช (ตารางที่ 5 ก)

- ในฤดูการผลิตปี 2546-47 พบเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Erwinia carotovora, E. chrysanthemi, Pseudomonas avenae* และเชื้อราอีก 17 ชนิด คือ *Cephalosporium acremonium, Cladosporium* sp. *Curvularia lunata, C. pallescense, Diplodia maydis, Drechslera carbonum, D. maydis, D. prolata, D. turcicum, D. sorokiniana, Fusarium semitectum, Peronosclerospora sorgi, Puccinia polysora, P. sorghi, Rhizoctonia solani, Sclerotium rolfsii, Ustilago maydis.*มีโรคพืชที่เป็นศัตรูพืชที่สำคัญคือ *Pseudomonas avenae, Diplodia maydis Drechslera caronum, D. maydis, D. turcicum, Rhizoctonia solani, Sclerotium rolfsii* และ *Ustilago maydis* ซึ่ง *Drechslera maydis* พบในพืชที่ทุกจังหวัด จำนวน 24 แปลงซึ่งที่พบ 5 แปลง ที่จังหวัดแพร่ เป็นแปลงที่ให้ระบุในการรับรองแปลงจึงทำให้ไม่ผ่านการรับรอง และ *Rhizoctonia solani* พบ 3 แปลงที่จังหวัดพิษณุโลก จึงไม่ผ่านการตรวจแปลงเช่นกัน (ตารางที่ 5 ข)

สรุปผลการตรวจสอบแปลงผลิตปี 2545-2547 พบแบคทีเรียทั้งหมด 3 ชนิด และเชื้อราทั้งหมด 20 ชนิด มีแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ที่ไม่ผ่านการรับรองทั้งสิ้น 11 แปลง โดยพบเชื้อ *D. maydis* สาเหตุโรค Southern Corn leaf blight จำนวน 8 แปลง ที่จังหวัด นครสวรรค์ พิษณุโลก และแพร่ และเชื้อ *Rhizoctoni solani* สาเหตุโรค Root Rot พบจำนวน 3 แปลง ที่จังหวัด พิษณุโลก ทำให้ไม่สามารถส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศได้ (ตารางที่ 5 ค)

จากการตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พบว่าจะพบศัตรูพืชได้ในการเก็บตัวอย่างตรวจสอบทั้ง 2 ครั้ง โดยเก็บครั้งที่ 1 ในระยะพืชก่อนถอดดอก (พืชอายุ 40-45 วัน) และครั้งที่ 2 เมื่อพืชอายุ 70-75 วัน นั้น สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ สำหรับเชื้อราอีก 13 ชนิด สามารถตรวจพบทั้ง 2 ระยะเช่นกัน ยกเว้น *Cladosporium sorghi, Diplodia maydis, Drechslera carbonum, D. prolata, Fusarium semitectum, Puccinia polysora, Rhizoctonia solani, Sclerotium rolfsii* และ *Ustilago maydis* จะพบในการตรวจครั้งที่ 2 (ตารางที่ 6) ซึ่งจะเป็นประโยชน์ที่จะนำข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืชที่ได้ไปตรวจหาศัตรูพืชแต่ละชนิดในระยะเวลาที่เหมาะสมได้ต่อไป

3.3 การตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหลังการเก็บเกี่ยว

1) แหล่งของเมล็ด คือที่จังหวัด สระบุรี และตาก พื้นที่ 16 ไร่ จากเกษตรกร5 ราย (ตารางที่ 4 ค)
2) ศัตรูพืชที่ตรวจพบมีการตรวจเฉพาะปี 2545-2546 พบ *Cephalosporium acremonium* และ *Fusarium moniliforme* แต่ไม่พบศัตรูพืชที่ต้องการให้รับรอง (ตารางที่ 7)

วิจารณ์และข้อเสนอแนะ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีศักยภาพในการผลิตเมล็ดพันธุ์ อย่างมากแต่มีปัญหาและอุปสรรคอยู่หลายประการที่ควรรีบดำเนินการแก้ไข

ปัญหาและอุปสรรค

เนื่องจากปัจจุบันนานาประเทศในตลาดโลกมีความต้องการเมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพสูงกว่าคือ ความงอกสูง ตรงต่อสายพันธุ์ ความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์และปราศจากเชื้อโรคศัตรูพืชในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นทุกปี ซึ่งการปฏิบัติงานตรวจสอบศัตรูพืชให้บรรลุวัตถุประสงค์ โดยได้เมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพปราศจากโรคและศัตรูพืชตามความต้องการของประเทศผู้ศซื้อนั้น จะต้องใช้บุคคลากรที่มีความรู้และประสบการณ์ทางด้านโรคและแมลงศัตรูพืชเป็นอย่างดีทั้งด้านลักษณะอาการโรค เชื้อสาเหตุ การป้องกันกำจัด ตลอดจนการตรวจสอบและจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าวจะมีทั้งที่มีหรือไม่มีรายงานในประเทศ ผู้ดำเนินงานต้องสามารถตรวจสอบและจำแนกชนิดได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ มิฉะนั้นจะก่อให้เกิดความเสียหายในด้านคุณภาพเมล็ดพันธุ์ไม่เป็นที่เชื่อถือของนานาประเทศ นอกจากนี้ยังต้องมีห้องปฏิบัติการซึ่งมีความพร้อมในด้านวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการปฏิบัติงาน ซึ่งหากขาดทั้งบุคคลากรและห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมย่อมไม่สามารถปฏิบัติให้สำเร็จลุล่วงไปได้ การปฏิบัติงานของโครงการในฤดูผลิตที่ผ่านมาประสบปัญหาและอุปสรรค ดังนี้

1. เรื่องที่มาของเมล็ดพันธุ์แม้จะมีการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า แต่ไม่เป็นที่แน่นอนว่าเมล็ดชุดไหน หรือจากปีไหนจะถูกนำมาใช้เป็นพ่อ-แม่พันธุ์ที่ใช้ในการผลิต ต้องขึ้นกับการสั่งซื้อ
2. แหล่งที่ปลูกมักจะมีการเปลี่ยนแปลงเกือบทุกๆ ปี ทำให้ขาดข้อมูลศัตรูพืชในแหล่งนั้น
3. อัตรากำลังคนในการปฏิบัติงาน

นับเป็นปัญหาสำคัญที่สุด เนื่องจากปริมาณความต้องการผลิตเมล็ดพันธุ์และรับรองการปลอดโรคมีเพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับ แต่ขาดบุคคลากรรองรับดำเนินงานที่แน่นอน อัตรากำลังส่วนใหญ่เป็นลูกจ้างชั่วคราวรายเดือน มักประสบปัญหาการลาออกไปปฏิบัติงานที่หน่วยงานอื่น สำหรับเจ้าหน้าที่กักกันพืชซึ่งรับผิดชอบดำเนินงานทั้งหมดต้องปฏิบัติงานประจำทั้งด้านการตรวจสอบเชื้อโรคพืชกับพืชที่นำเข้าและส่งออกตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 ต้องศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อโรคศัตรูพืชทั้งในและต่างประเทศ วิธีการตรวจสอบและกำจัดโรคพืชในงานกักกันพืช สำหรับเรื่องนี้ในฤดูผลิตปี 2545-2547 ได้ดำเนินการแก้ไขโดยกรมฯ เห็นชอบให้หน่วยงานในพื้นที่รับผิดชอบเข้าร่วมดำเนินการตรวจสอบ เพื่อจะเป็นผู้ดำเนินการรับผิดชอบงานนี้ต่อไป ตามนโยบายที่มอบหมายงานนี้สำหรับการมอบหมายงานบางส่วนให้มหาวิทยาลัยขอนแก่น เนื่องจากเป็นหน่วยงานที่มีศักยภาพในพื้นที่ๆ จะดำเนินการได้แต่ฤดูกาลที่ผ่านมามีบุคลากรเข้าร่วมฝึกจำนวนน้อยและปฏิบัติงานน้อยครั้ง เนื่องจากปัญหาการขาดบุคลากร และในปี 2547 ที่ผ่านมาเกิดปัญหาเรื่องไข้หวัดนกที่เจ้าหน้าที่ในพื้นที่ส่วนใหญ่ ต้องไปร่วมปฏิบัติการด้วย พร้อมทั้งทำ GAP ลำไยซับซ้อนกัน

4. การรับรองปลอดโรคพืชตามความต้องการของผู้ซื้อ

4.1 การรับรองเชื้อโรคพืชที่ไม่มีรายงานในประเทศไทย ผู้ปฏิบัติงานขาดความรู้และประสบการณ์ ซึ่งในการตรวจสอบและจำแนกชนิดจำเป็นต้องศึกษาลักษณะอาการโรคจากแผ่นภาพและเอกสารซึ่งตีพิมพ์ในต่างประเทศหรือโดยติดต่อขอข้อมูลจากแหล่งต่างๆ โดยไม่เห็นลักษณะอาการที่แท้จริง ทำให้ต้องมีการสั่งซื้ออุปกรณ์การตรวจสอบที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ และบางครั้งยังต้องใช้เทคโนโลยีขั้นสูง

4.2 การรับรองเชื้อโรคพืชโดยให้ระบุการปลอดโรคถึงระดับสายพันธุ์เชื้อ (race) ซึ่งในกรณีมีการรับรองการปลอดโรคในระดับสายพันธุ์เชื้อจะต้องมีการตรวจสอบขั้นละเอียดด้วยวิธีการเฉพาะ หรือวิธีการที่ต้องใช้เทคโนโลยีขั้นสูง

4.3 การรับรองเชื้อโรคพืชที่มีโอกาสพบได้ทั่วไปในประเทศไทย ในการปฏิบัติงานผู้ดำเนินงานจะต้องใช้ความละเอียดในการตรวจสอบอย่างมาก มิฉะนั้นอาจเล็ดลอดติดกับเมล็ดพันธุ์ที่ส่งออก และหากผู้นำเข้าตรวจพบย่อมมีผลทำให้ผู้ซื้อขาดความเชื่อถือในสินค้าเมล็ดพันธุ์จากประเทศไทยอีกต่อไป

5. พื้นที่ผลิต

ปัจจุบันมีบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์จำนวนมากทำการผลิตเมล็ดพันธุ์ในท้องที่ภาคเหนือและภาคกลาง จึงทำให้เกิดการแข่งขันในเรื่องพื้นที่ผลิต บางบริษัทไม่สามารถเลือกพื้นที่ผลิตในบริเวณใกล้ชุมชนหรือแหล่งน้ำ ต้องไปเปิดพื้นที่ห่างไกล แปลงปลูกเมล็ดพันธ์จึงอยู่กระจัดกระจาย ทำให้ยากลำบากแก่พนักงานเจ้าหน้าที่ไปทำการตรวจสอบศัตรูพืชต้องไปตามหมู่บ้านซึ่งมักมีชาวบ้าน หรือกะเหรี่ยงดำเนินการซึ่งการสื่อสารค่อนข้างยากลำบาก และแปลงข้าวโพดจะอยู่เข้าไปในเขาลึกยากต่อการตรวจสอบ

แนวทางแก้ไข

1. สนับสนุนให้ภาคเอกชนมีการก่อตั้งบริษัทดำเนินการตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืช โดยความเห็นชอบของกรมวิชาการเกษตร และการดำเนินงานให้อยู่ภายใต้การกำกับดูแลของเจ้าหน้าที่กักกันพืช

2. ให้หน่วยงานซึ่งมีศักยภาพหรืออยู่ในพื้นที่ดำเนินงานตรวจสอบศัตรูพืช

3. กรมวิชาการเกษตรจัดอัตรากำลังที่มีความรู้และประสบการณ์รับผิดชอบงานนี้โดยเฉพาะ

4. สนับสนุนให้ผู้ปฏิบัติงานได้มีโอกาสไปเพิ่มพูนความรู้และประสบการณ์ โดยการศึกษาฝึกอบรม หรือดูงาน ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับแนวปฏิบัติการตรวจและรับรองปลอดโรคและศัตรูพืชในประเทศที่พัฒนาแล้ว ซึ่งมีแนวปฏิบัติที่เป็นมาตรฐานรวมทั้งฝึกอบรมเกี่ยวกับเทคนิคใหม่ๆ ซึ่งใช้ในการตรวจสอบและจำแนกชนิดโรคและศัตรูพืช เพื่อปรับปรุงและพัฒนาการปฏิบัติงานให้มีประสิทธิภาพและเป็นมาตรฐานสากล เป็นที่ยอมรับของนานาประเทศต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Anonymous. 1993. International rules for seed testing. Seed Science and Technology. Rules, Vol. 21 supplement. 287 pp.

Ball, S. and J.C.Reeves. 1992. Application of rapid techniques to seed health testing prospects and potential. *In* : Duncan J. M. and L. Z.Torrance,) Techniques for the Rapid Detection of Plant Pathogens. Oxford.

Hutchins J. D. and J. C. Reeves. 1997. Seed Health Testing Progress towards the 21st Century, CAB International. 263 pp.

Limonard, T. 1966. A modified blotter test for seed health. Netherlands Journal of Plant Pathology 72: 319-321.

Maude, R.B. 1996. Seedborne Diseases and their Control. Principles and Practice. 280 pp.

Mc Gee, D.C. 1988. Maize Disease. APS Press, St. Paul Minnesota. 150 pp.

Phatak H.C. 1974. Seed borne plant virus-identification and diagnosis in seed health testing, Seed Science and Technology 2: 3-155.

Rao, B.M., H.S. Prakash, S. Shethly and K.M. Safeeula. 1984. Techniques to detect seed borne inoculum of *Peronosclerospora sorghi* in maize. Seed Science and Technology 12: 593-599.

Schaad, N.W. 1988. Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 2nd ed, APS Press, St. Paul, Minnesota.

Schaad, N.W. 1989. Detection and Identification of Bacteria. *In* : Saettler, A.W., N.W. Schaad, and D.A. Roth (eds) Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material. APS Press, St. Paul, Minnesota.

ตารางที่ 1 ก. ข้อมูลและการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากต่างประเทศระหว่างปี 2545-46

ลำดับที่	ประเทศ	ปริมาณ	ตัวอย่าง	จำนวนครั้งนำเข้า	พบศัตรูพืช
1	ฟิลิปปินส์	8,412.59	68	12	26
2	ปากีสถาน	200,001	3	3	5
3	อินเดีย	1,126,032.65	249	27	26
4	อินโดนีเซีย	140.1	4	4	4
5	จีน	4.00	4	12	6
6	บราซิล	569.00	6	7	6
7	อิตาลี	22.00	1	1	1
8	สหรัฐอเมริกา	11,258.40	63	22	18
9	เวียดนาม	2500.00	1	1	1
10	ออสเตรเลีย	4.34	5	2	1
11	พม่า	2.50	1	1	1
รวม 11 ประเทศ		1,348,946.58	405	92	95

ตารางที่ 1 ข. ข้อมูลและการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากต่างประเทศระหว่างปี 2546-47

ลำดับที่	ประเทศ	ปริมาณ	ตัวอย่าง	จำนวนครั้งนำเข้า	พบศัตรูพืช
1	ฟิลิปปินส์	82,621.17	183	14	22
2	ปากีสถาน	17.00	3	1	3
3	อินเดีย	604,799.25	42	18	19
4	อินโดนีเซีย	629880.00	10	8	12
5	จีน	3.00	1	1	3
6	บราซิล	80.03	17	4	6
7	สหรัฐอเมริกา	9,411.66	120	26	24
8	ชิลี	408.00	3	2	3
9	โบลิเวีย	6.80	2	2	1
10	ญี่ปุ่น	17.40	1,253	2	1
11	นิวซีแลนด์	7.00	5	2	6
12	ไต้หวัน	20.00	1	1	4
13	เวียดนาม	523,592.50	14	5	12
รวม 13 ประเทศ		1,850,863.71	1,654	86	116

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 ค. สรุปข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากต่างประเทศระหว่างปี 2545-2547

ลำดับที่	ประเทศ	ปริมาณ	ตัวอย่าง	จำนวนครั้งนำเข้า	พบศัตรูพืช
1	ฟิลิปปินส์	91,033.76	251	26	48
2	ปากีสถาน	200,018	6	4	8
3	อินเดีย	1,730,831.90	291	45	45
4	อินโดนีเซีย	630,020.10	14	12	16
5	จีน	7.00	5	13	9
6	บราซิล	649.03	23	11	12
7	สหรัฐอเมริกา	20,670.06	183	48	42
8	อิตาลี	22.00	1	1	1
9	ชิลี	408.00	3	2	3
10	โบลิเวีย	6.80	2	2	1
11	ญี่ปุ่น	17.40	1,253	2	1
12	นิวซีแลนด์	7.00	5	2	6
13	ออสเตรเลีย	4.34	5	2	1
14	เวียดนาม	526,092.50	15	6	13
15	ไต้หวัน	20.00	1	1	4
16	พม่า	2.50	1	1	1
รวม 16 ประเทศ		3,199,810.39	2,059	178	211

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 ก. แสดงผลการตรวจสอบศัตรูพืชในเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้าจากต่างประเทศ ปี 2545 – 2546

ประเทศต้นทาง(%) / จุลินทรีย์ และสาเหตุโรค	ฟิลิปปินส์	ปากีสถาน	อินเดีย	อินโดนีเซีย	จีน	บราซิล	สหรัฐอเมริกา	ออสเตรเลีย	เวียดนาม	พม่า	ชิลี	โรมาเนีย	ญี่ปุ่น	นิวซีแลนด์	ไต้หวัน	อิตาลี	รวม
1. *Alternaria alternata* (โรค Alternaria leaf spot)	-	-	-		1	-	-	-	-	-	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	-	1
2. *Alternaria tenuissima*	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	-	1
3. *Botryodiplodia theobromae* (โรค Black kernel rot)	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	-	
4. *Cladosporium* sp. (โรค Cladosporium rot)	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	-	1
5. *Cephalosporium acremonium* (โรค Stalk rot)	8	-	2	-	1	3	3	-	-	-	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	-	17
6. *Cephalosporium maydis* (โรค Late Wilt)	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
7. *Curvularia lunata* (โรค Curvularia leaf spot)	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	-	4
8. *Curvularia pallescense* (โรค Curvularia leaf spot)	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	-	3
9. *Drechslera australinensis*	-	2	2	-	1	-	-	-	-	-	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า		5
10. *Drechslera halodes*	-	-	-	-	-	-	1	-			ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า		1
11. *Fusarium moniliforme* (โรค Fusarium Stalk Rot. หรือ Fusarium leaf scorch)	11	-	16	4	2	4	14	1	2	1	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	1	56

ประเทศต้นทาง(%) / จุลินทรีย์ และสาเหตุโรค	ฟิลิปปินส์	ปากีสถาน	อินเดีย	อินโดนีเซีย	จีน	บราซิล	สหรัฐอเมริกา	ออสเตรเลีย	เวียดนาม	พม่า	ชิลี	โบลิเวีย	ญี่ปุ่น	นิวซีแลนด์	ไต้หวัน	อิตาลี	รวม
12. *Helminthosporium cynodontis*	1	-	-	-	-	-	2	-	-	-	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า		3
13. *Trichoderma* sp.	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า		3
14. *Sphaceopsis* sp.	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า		1
รวม	26	5	26	0	6	7	20	0	0	0	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	ไม่นำเข้า	-	99

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 ข. แสดงผลการตรวจสอบศัตรูพืชในแต่ละประเทศ ปี 2546 – 2547

ประเทศต้นทาง(%) / จุลินทรีย์และสาเหตุโรค	ฟิลิปปินส์	ปากีสถาน	อินเดีย	อินโดนีเซีย	จีน	บราซิล	สหรัฐอเมริกา	ออสเตรเลีย	เวียดนาม	พม่า	ชิลี	โบลิเวีย	ญี่ปุ่น	นิวซีแลนด์	ไต้หวัน	อิตาลี	รวม
1. *Alternaria alternata* (โรค Alternaria leaf spot)	-	1	-	-	1	-	2	ไม่นำเข้า	-	ไม่นำเข้า	-	-	-	2	1	ไม่นำเข้า	7
2. *Alternaria tenuis*	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3. *Bipolaris* sp. (โรค Seed Rot, Seedling blight และ damping off)	-	1	-	-	-	-	-	-	-	ไม่นำเข้า	-	-	-	-		ไม่นำเข้า	1
4. *Cladosporium* sp. (โรค Cladosporium rot)	1	-	-	-	-	-	1	ไม่นำเข้า	-	ไม่นำเข้า	-	-	-	-	-	ไม่นำเข้า	2
5. *Cephalosporium acremonium* (โรค Stalk rot Cep.acremonium)	1	-	4	2	1	3	3	ไม่นำเข้า	2	ไม่นำเข้า	-	-	-	-	1	ไม่นำเข้า	17
6.*Colletotrichumgraminicola* (โรค Anthracnose Leaf Blight)	-	-	1	-	-	-	-	ไม่นำเข้า	-	ไม่นำเข้า	-	-	-	-		ไม่นำเข้า	1
7. *Curvularia eragrostidis*	-	-	-	-	-	-	-	ไม่นำเข้า	1	ไม่นำเข้า	-	-	-	-		ไม่นำเข้า	1
8. *Curvularia pallescense* (โรค Curvularia leaf spot)	2	-	-	-	-	-	-	ไม่นำเข้า	-	ไม่นำเข้า	-	-	-	-	-	ไม่นำเข้า	2
9. *Didymella* sp.	-	-	-	-	-	-	-	ไม่นำเข้า	1	ไม่นำเข้า						ไม่นำเข้า	1
10. *Drechsleracarbonum* (โรค Northern corn leaf spot)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
11. *Drechslera rostrata* (โรค Rostratum spot)	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12. *Fusarium moniliforme* (โรค Fusarium Stalk Rot. หรือ Fusarium leaf scorch)	14	-	11	9	1	3	17	ไม่นำเข้า	5	ไม่นำเข้า	1	1	1	2	1	ไม่นำเข้า	66

ประเทศต้นทาง(%) / จุลินทรีย์ และสาเหตุโรค	ฟิลิปปินส์	ปากีสถาน	อินเดีย	อินโดนีเซีย	จีน	บราซิล	สหรัฐอเมริกา	ออสเตรเลีย	เวียดนาม	พม่า	ชิลี	โบลิเวีย	ญี่ปุ่น	นิวซีแลนด์	ไต้หวัน	อิตาลี	รวม
13. *Fusarium solani* (โรค Fusarium Root Rot)	3	1	-	1	-	-	1	ไม่นำเข้า	2	ไม่นำเข้า	-	-	-	-	-	ไม่นำเข้า	8
14. *Helminthosporium cynodontis*	-	-	1	-	-	-	-	ไม่นำเข้า	-	ไม่นำเข้า	1	-	-	-	1	ไม่นำเข้า	3
15. *Trichoderma* sp.	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
รวม	22	3	19	12	3	6	24		12		2	1	1	4	4		113

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 ค. แสดงผลการตรวจสอบศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดระหว่างปี พ.ศ 2545 – 2547

ประเทศต้นทาง / รายชื่อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบ	ฟิลิปปินส์	ปากีสถาน	อินเดีย	อินโดนีเซีย	จีน	บราซิล	สหรัฐอเมริกา	ออสเตรเลีย	เวียดนาม	พม่า	ชิลี	โมลิเวีย	ญี่ปุ่น	นิวซีแลนด์	ไต้หวัน	อิตาลี	รวม
เชื้อรา	จำนวนครั้งที่พบ																
1. *Alternaria alternata*	-	1	-	-	2	-	2	-	-	-	-	-	-	2	1	-	8
2. *Alternaria tenuis*	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
3. *Alternaria tenuissima*	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
4. *Bipolaris* sp.	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
5. *Botryodiplodiatheobromae*	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
6. *Cephalosporium acremonium*	9	-	6	2	2	6	6	-	2	-	1	-	-	-	1	-	35*
7. *Cladosporium maydis*	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
8. *Cladosporium* sp.	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2	-	-	5
9. *Colletotrichum graminicola*	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
10. *Curvularia eraglostidis*	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
11. *Curvularia lunata*	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
12. *Curvularia pallescense*	4	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
13. *Didymella* sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
14. *Drechslera australinensis*	-	2	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
15. *Drechslera carbonum*	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
16. *Drechslera halodes*	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
17. *Drechstlera rostrata*	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
18. *Helminthosporium cynodontis*	1	-	1	-	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-	1	-	6
19. *Fusarium moniliforme*	35	-	27	13	3	7	31	1	7	1	1	1	1	2	1	1	132*
20. *Fusarium solani*	3	1	-	1	-	-	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	8
21. *Sphaceopsis* sp.	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
22. *Trichoderma* sp.	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
รวม	56*	8	44*	16	9	13	44*	1	14	1	3	1	1	6	4	1	223

* หมายถึงเชื้อแบคทีเรียที่พบเป็นจำนวนมาก

ตารางที่ 3 รายชื่อประเทศและศัตรูพืชที่ต้องการให้ตรวจสอบในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์

ที่	รายชื่อประเทศ	รายชื่อศัตรูพืช
1	ประเทศบราซิล	*Mycoshaerella zeae-maydis, Erwinia stewartii, Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskense, Cercospora sorghi, Striga* sp., *Prostephanus truncatus, Trogoderma granarium*
2	ประเทศกัวเตมาลา	*Pseudomonas syringae* pv. *syringae, Sclerophthora rayssiae* var. *zeae, Gibberella fujikuroi, Glomerella graminicola, Sclerospora spontanea, Sclerospora macrospora, Stenocarpella maydis*
3	ประเทศอียิปต์	*Diplodia maydis, Gibberella zeae, Cochliobolus carbonum, Cochliobolus heterosportus, Gibberella fujikuroi, Helminthosporium turcicum*
4	ประเทศญี่ปุ่น	*Erwinia stewartii*
5	ประเทศเปรู	*Cochiobolus heterostrophus, Glomerella graminicola, Perosoclerospora philippinensis, Cucumber mosaic cucumovirus, Peronosclerospora sorghi, Pseudomonas syringae* pv. *syringae, Araecenes fasciculatus, Conogethes punctuferalis, Corcyra cephalonica, Ostrinia nubilalis*
6	ประเทศโคลัมเบีย	*Sclerospora maydis, Sclerophthora macrospora, Pseudoperonosporora sorghi, Peronosclerospora philippinensis, P. sorghi, Sclerophthora rayssiae* var. *zeae, Erwinia chrysanthemi, Trogoderma* spp.
7	ประเทศเอควาดอร์	*Sclerospora maydis, Sclerophthora macrospora, Pseudoperonosporora sorghi, Sclerophthora rayssiae* var. *zeae, Erwinia chrysanthemi, Peronosclerospora sorghi, Peronosclerospora philippinensis*
8	ประเทศอาร์เจนตินา	*Erwinia stewartii, Striga* sp, *Trogoderma variable*
9	ประเทศอินโดนีเซีย	*Erwinia stewartii, Erwinia chrysanthemi, Rhizoctonia solani, Diplodia* sp. *Helminthosporium maydis*

ตารางที่ 4 ก. ข้อมูลการตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเพื่อส่งออก

ระหว่าง ต.ค. 2545 – ก.ย. 2546

ลำดับที่	บริษัทผู้นำเข้า	จังหวัด	พื้นที่ (ไร่)	จำนวนเกษตรกร (ราย)	ประเทศผู้รับซื้อ	ตรวจสอบ (ครั้ง)1/
1	บริษัท ซินเจนทาซีดส์ จำกัด	กำแพงเพชร	45	8	ญี่ปุ่น	1,2
		สระบุรี	1	1	บราซิล	1*
		นครสวรรค์	9	1	ญี่ปุ่น	1,2
2	บริษัท โนวาร์ตีส ครอปโปรเทคชั่น (ประเทศไทย) จำกัด	นครสวรรค์	10.25	6	ญี่ปุ่น	1,2
		นครสวรรค์	2.50	2	บราซิล	1,2**
3	บริษัท มอนซานโต้เมล็ดพันธุ์ (ไทยแลนด์) จำกัด	พิษณุโลก	5	2	ญี่ปุ่น, บราซิล, เปรู, โคลัมเบีย, เอกวาดอร์	1,2
		แพร่	54	22	ญี่ปุ่น	1,2
4	บริษัท คลอแมน (ประเทศไทย) จำกัด	นครราชสีมา	1	1	ญี่ปุ่น	1,2
5	บริษัท แปซิฟิค เมล็ดพันธุ์ จำกัด	ลพบุรี	30	5	บราซิล,กัวเตมาลา	1,2
		หนองคาย	15	7	เอกวาดอร์, อียิปต์ อาร์เจนตินา	1,2
		ตาก	15	4	บราซิล,กัวเตมาลา	1*
รวม	5 บริษัท	9 จังหวัด	187.75	59	8 ประเทศ	20

*** ตรวจแปลงเฉพาะวัชพืชและตรวจโรคโดยตรวจเมล็ดพันธุ์หลังเก็บเกี่ยว**

1/ ตรวจสอบ 2 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 ก่อนถอดดอกผสมเกสร ครั้งที่ 2. เติบโตเต็มที่ก่อนเก็บเกี่ยว

**** ตรวจแปลงวัชพืชและศัตรูพืชในแปลงผลิต**

ตารางที่ 4 ข. ข้อมูลการตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเพื่อส่งออก ระหว่าง ต.ค. 2546 – ก.ย. 2547

ลำดับที่	บริษัทผู้นำเข้า	จังหวัด	พื้นที่ (ไร่)	จำนวนเกษตรกร (ราย)	ประเทศผู้รับซื้อ	ตรวจสอบ (ครั้ง)1/
1	บริษัท ซินเจนทาซีดส์ จำกัด	ตาก กาญจนบุรี ลำปาง	119 79 107	9 2 8	ญี่ปุ่น ญี่ปุ่น ญี่ปุ่น	1,2 1,2 1,2
2	บริษัทโนวาร์ตีส ครอปโปรเทคชั่น (ประเทศไทย) จำกัด	นครสวรรค์ (สถานีทดลอง)	2.5 6.5 1	6 6 8	โคลัมเบีย ญี่ปุ่น อาร์เจนติน่า	1,2 1,2 1,2
3	บริษัท มอนซานโต้เมล็ดพันธุ์ (ไทยแลนด์) จำกัด	แพร่ อุตรดิตถ์ พิษณุโลก (สถานีทดลอง)	900.5 40 6	150 19 3	อินโดนีเซีย เปรู,ญี่ปุ่น, โคลัมเบีย, เอวาดอร์	1,2 1,2 1,2 1,2 1,2
4	บริษัท คลอแมน (ประเทศไทย) จำกัด	แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่	100 8	30 1	ญี่ปุ่น ญี่ปุ่น	1,2 1,2
5	บริษัท แปซิฟิค เมล็ดพันธุ์ จำกัด	สระบุรี	.25	1	กัวเตมาลา	1,2
รวม	**5 บริษัท**	**10 จังหวัด**	**1369.75**	**243**	7 ประเทศ	**28**

1/ ตรวจสอบ 2 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 ก่อนถอดดอกผสมเกสร ครั้งที่ 2. เติบโตเต็มที่ก่อนเก็บเกี่ยว

ตารางที่ 4 ค. ข้อมูลการตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์และเมล็ดพันธุ์หลังเก็บเกี่ยว ระหว่าง ต.ค. 2545 – ต.ค. 2546

ลำดับที่	บริษัทผู้นำเข้า	จังหวัด	พื้นที่ (ไร่)	จำนวนเกษตรกร (ราย)	ประเทศผู้รับซื้อ	ตรวจสอบ (ครั้ง)
1	บริษัท ซินเจนทาซีดส์ จำกัด	สระบุรี	1	1	บราซิล	1
2	บริษัท แปซิฟิค เมล็ดพันธุ์ จำกัด	ตาก	15	9	บราซิล	1
รวม	**2 บริษัท**	**2 จังหวัด**	**2.5**	**10**	1 ประเทศ	**2**

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 5 ก. ศัตรูพืชที่ตรวจพบในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเพื่อการส่งออก ปี 2545-46

แหล่งที่พบ / รายชื่อจุลินทรีย์ที่พบในแปลง	ภาคกลาง			ภาคเหนือ				ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	
	สระบุรี	ลพบุรี	นครสวรรค์	พิษณุโลก	ตาก	แพร่	กำแพงเพชร	หนองคาย	นครราชสีมา
เชื้อแบคทีเรีย									
1. *Erwinia carotovora*		☐				☐	☐		
2. *Erwinia chrysanthemi*		☐					☐		
3. *Pseudomonas avenae*			☐	☐	☐	☐			
เชื้อรา									
1. *Cephalosporium acremonium*			☐	☐					
2. *Cercospora sorghi*								☐	
3. *Cladosporium* sp.			☐						
4. *Curvularia lunata*	☐	☐	☐	☐		☐	☐		☐
5. *Curvularia pallescense*									☐
6. *Drechslera carbonum*					☐	☐			
7. *Drechslera maydis*	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
8. *Drechslera sorghicola*					☐				☐
9. *Fusarium moniliforme*							☐		☐
10. *Fusarium semitectum*	☐								
11. *Puccinia polysora*			☐						
12. *Puccinia sorghi*					☐				☐
13. *Rhizoctonia solani*					☐	☐			☐
14. *Sclerotium rolfsii*			☐						
15. *Ustilgo maydis*					☐	☐			☐

หมายเหตุ ☐หมายถึง พบเชื้อจุลินทรีย์

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 5 ช. ศัตรูพืชที่ตรวจพบในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเพื่อการส่งออก ปี 2546-47

แหล่งที่พบ / รายชื่อจุลินทรีย์ที่พบในแปลง	ภาคกลาง			ภาคเหนือ						
	สระบุรี	นครสวรรค์	กาญจนบุรี	พิษณุโลก	ตาก	ลำปาง	แม่ฮ่องสอน	เชียงใหม่	แพร่	อุตรดิตถ์
เชื้อแบคทีเรีย										
1. *Erwinia carotovora*		☐							☐	
2. *Erwinia chrysanthemi*			☐							
3. *Pseudomonas avenae*				☐	☐				☐	
เชื้อรา										
1. *Cephalosporium acremonium*			☐					☐		
2. *Cladosporium* sp.		☐	☐			☐				
3. *Curvularia lunata*	☐		☐	☐		☐			☐	☐
4. *Curvularia pallescense*			☐	☐		☐			☐	☐
5. *Diplodia maydis*					☐					
6. *Drechslera carbonum*					☐				☐	☐
7. *Drechslera maydis*	☐	☐		☐	☐	☐	☐		☐	☐
8. *Drechslera prolata*			☐							
9. *Drechslera turcicum*				☐	☐	☐		☐	☐	☐
10. *Drechslera sorokiniana*					☐		☐			
11. *Fusarium semitectum*	☐		☐							
12. *Peronosclerospora sorghi*		☐								
13. *Puccinia polysora*		☐		☐		☐	☐			
14. *Puccinia sorghi*	☐	☐		☐	☐	☐				
15. *Rhizoctonia solani*		☐		☐					☐	☐
16. *Sclerotium rolfsii*				☐						
17. *Ustilago maydis*				☐	☐	☐	☐		☐	☐

หมายเหตุ ☐หมายถึง พบเชื้อจุลินทรีย์

ตารางที่ 5ค. สรุปศัตรูพืชที่ตรวจพบในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเพื่อการส่งออก ปี 2545-2547

แหล่งที่พบ / รายชื่อจุลินทรีย์ที่พบในแปลง	ภาคกลาง				ภาคเหนือ								ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	
	สระบุรี	ลพบุรี	นครสวรรค์	กาญจนบุรี	พิษณุโลก	ตาก	ลำปาง	แม่ฮ่องสอน	เชียงใหม่	แพร่	อุตรดิตถ์	กำแพงเพชร	หนองคาย	นครราชสีมา
เชื้อแบคทีเรีย														
1. *Erwinia carotovora*		☐	☐							☐		☐		
2. *Erwinia chrysanthemi*		☐		☐								☐		
3. *Pseudomonas avenae*			☐		☐	☐				☐				
เชื้อรา														
1. *Cephalosporium acremonium*			☐	☐	☐				☐					
2. *Cladosporium sorghi*													☐	
3. *Cladosporium* sp.			☐	☐			☐							
4. *Curvularia lunata*	☐	☐	☐	☐	☐		☐			☐	☐	☐		☐
5. *Curvularia pallescense*				☐	☐		☐			☐	☐			☐
6. *Diplodia maydis*						☐								
7. *Drechslera carbonum*						☐				☐	☐			
8. *Drechslera maydis*	☐	☐	☐		☐	☐	☐	☐		☐	☐	☐	☐	☐
9. *Drechslera prolata*				☐										
10. *Drechslera turcicum*					☐	☐	☐		☐	☐	☐			
11. *Drechslera sorghicola*						☐								☐
12. *Drechslera sorokiniana*						☐		☐						
13. *Fusarium moniliforme*												☐		☐
14. *Fusarium semitectum*	☐	☐		☐										
15. *Peronosclerospora sorghi*			☐											
16. *Puccinia polysora*			☐		☐		☐	☐						
17. *Puccinia sorghi*		☐	☐		☐	☐	☐							☐
18. *Rhizoctonia solani*			☐		☐	☐				☐	☐			☐
19. *Sclerotium rolfsii*			☐		☐									
20. *Ustilago maydis*					☐	☐	☐	☐		☐	☐			☐

หมายเหตุ ☐หมายถึง พบเชื้อจุลินทรีย์

ตารางที่ 6 แสดงผลการตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด เพื่อส่งออกในการตรวจแปลง 2 ครั้ง ระหว่างปี 2545-2547

ศัตรูพืช	สาเหตุโรค	ตรวจครั้งที่ 1	ตรวจครั้งที่ 2
เชื้อแบคทีเรีย			
1. *Erwinia carotovora*	- Bacterial Stalk Rot	☐	☐
2. *Erwinia chrysanthemi*	- Bacterial Top and Stalk Rot	☐	☐
3. *Pseudomonas avenae*	- Bacterial Leaf Blight	☐	☐
เชื้อรา			
1. *Cephalosporium acremonium*	- Black bundle	☐	☐
2. *Cladosporium sorghi*	- Cercospora leaf spot	-	☐
3. *Cladosporium* sp.	- Cladosporium rot	☐	☐
4. *Curvularia lunata*	- Curvularia leaf spot	☐	☐
5. *Curvularia pallescense*	- Curvularia leaf spot	☐	☐
6. *Diplodia maydis*	- White ear rot, Diplodia stalk rot	-	☐
7. *Drechslera carbonum*	- Northern leaf spot	-	☐
8. *Drechslera maydis*	- Southern Corn leaf blight	☐	☐
9. *Drechslera prolata*	-	-	☐
10. *Drechslera turcicum*	- Northern Corn leaf blight	☐	☐
11. *Drechslera sorghicola*	-	☐	☐
12. *Drechslera sorokiniana*	- Helminthosporium sativum Root Rot	☐	☐
13. *Fusarium moniliforme*	- Fusarium stalk rot, Fusarium ear rot	☐	☐
14. *Fusarium semitectum*	- Pinkish-gray spot, Fusarium stalk rot	-	☐
15. *Peronosclerospora sorghi*	- Sorghum Downy mildew	☐	☐
16. *Puccinia polysora*	- Southern rust	-	☐
17. *Puccinia sorghi*	- Common Rust	☐	☐
18. *Rhizoctonia solani*	- Brace Root Rot ; Rhizoctonia root rot	-	☐
19. *Sclerotium rolfsii*	- Sclerotium rolfsii ear rot	-	☐
20. *Ustilago maydis*	- Common smut	-	☐

หมายเหตุ ☐หมายถึง พบเชื้อจุลินทรีย์

ตารางที่ 7 ผลการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหลังการเก็บเกี่ยว ในปี 2545-2546

จังหวัดที่ผลิต	พื้นที่ (ไร่)	จำนวนเกษตรกร (ราย)	ศัตรูพืชที่ตรวจพบ	จำนวนที่พบ
1. สระบุรี	1	1	1. *Cephalosporium acremonium*	0.50%
2. ตาก	15	4	1. *Cephalosporium acremonium*	2%
			2. *Fusarium moniliforme*	1%
รวม 2 จังหวัด	**16**	**5**	**2 ชนิด**	**3.5**

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

Anonymous, 1993. International rules for seed testing Seed Science and Technology. Rules, Vol. 21 supplement, 287 pp.

Ball, S. and J.C.Reeves , 1992. Application of rapid techniques to seed health testing prospects and potential. In : Duncan J. M. and L. Z.Torrance,) Techniques for the Rapid Detection *of Plant Pathogens. Oxford* 193-207 pp.

Hutchins J. D. and J. C. Reeves 1997. Seed Health Testing Progress towards the 21 st Century, CAB International 263 pp.

Limonard, T. 1966. A modified blotter test for seed health. Netherlands Journal of Plant Pathology 72, 319-321

Maude, R.B., 1996. Seedborne Diseases and their Control Principles and Practice 280 pp.

Mc Gee, D.C., 1988. Maize Diseast, APS PRESS St. Panl Minnesota 150 pp.

Phatak H.C. 1974, Seed borne plant virus-identification and diagnosis in seed health testing, Seed Science and Technology 2, 3-155

Rao, B.M., H.S. Prakash, S. Shethly and K.M. Safeeula, 1984. Techiques to detect seed borne inoculum of Peronosclerospora sorghi in maize. Seed Sciena and Technology 12, 593-599

Schaad, N.W. 1988. Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 2nd ed, APS Press, St. Paul, Minnesota

Schaad, N.W. 1989. Detection and Identification of bacteria. In : Saettler, A.W., N.W. Schaad, and D.A. Roth (eds) Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material. APS. Press, St. Paul, Minnesota, pp 9-16.

ขั้นตอนการตรวจสอบโรคศัตรูพืชสำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชไร่ และรับรองการปลอดโรคเพื่อการส่งออก

ขั้นตอนการตรวจสอบโรคศัตรูพืชสำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์และรับรองการปลอดโรคเพื่อการส่งออกมีดังต่อไปนี้

ก. ขั้นตอนที่บริษัทต้องปฏิบัติก่อนการผลิตเมล็ดพันธุ์

1. ทำหนังสือแจ้งความจำนงถึงอธิบดีกรมวิชาการเกษตรก่อนการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พ่อ-แม่ หรือก่อนปลูก โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1) หลักฐานการขอให้ตรวจรับรองการปลอดโรคเป็นทางการจากต่างประเทศโดยอาจเป็นหลักฐานจากส่วนราชการของประเทศผู้ซื้อ หรือจากบริษัทผู้รับซื้อเมล็ดพันธุ์ เช่น Import Permit, Letter of Credit (L.C.)
2) ชนิดเมล็ดพันธุ์และปริมาณการผลิต
3) ประเทศผู้ซื้อ
4) เชื้อโรคที่ต้องการให้ระบุลงในใบรับรองปลอดศัตรูพืช
5) แหล่งปลูกและพื้นที่ผลิต
6) จำนวนเกษตรกร

2. ร่วมประชุมปรึกษาหารือระหว่างหน่วยงานที่ตรวจสอบกับภาคเอกชนในประเด็นปัญหาดังต่อไปนี้

1) ชนิดเมล็ดพันธุ์ ปริมาณการผลิต และเชื้อโรคที่ต้องการให้รับรองการปลอดโรคในแปลงปลูก
2) พื้นที่และแหล่งปลูก
3) กำหนดโปรแกรมการป้องกันกำจัดโรคและศัตรูพืชในแปลงปลูก
4) กำหนดช่วงเวลาในการตรวจโรคและศัตรูพืชในแปลงปลูก
5) ค่าใช้จ่ายในการเดินทางไปปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่
6) ค่าใช้จ่ายในการตรวจวินิจฉัยตัวอย่างพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ
7) ความปลอดภัยของเจ้าหน้าที่ในการปฏิบัติงาน

ข. ขั้นตอนการควบคุมการตรวจสอบและรับรองการปลอดโรค

1. ตรวจโรคและศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์พ่อ-แม่ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ในการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พ่อ-แม่ เพื่อให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์แห่งพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 จะต้องปฏิบัติตามเงื่อนไขทางวิชาการซึ่งกำหนดโดยฝ่ายกักกันพืช และเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวจะต้องผ่านการตรวจโรคและ

ศัตรูพืช ทั้งนี้เพื่อให้เมล็ดพันธุ์พ่อ-แม่ที่นำเข้าปราศจากโรคและศัตรูพืชทุกชนิด ทั้งที่มีและไม่มีรายงานในประเทศไทย

2. กำหนดให้มีโปรแกรมการกำจัดศัตรูพืชตลอดระยะเวลาการปลูกเพื่อให้การผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมมีคุณภาพดีปราศจากโรคและศัตรูพืช

3. ตรวจโรคและศัตรูพืชช่วงพืชเจริญเติบโตในแปลงปลูก ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อการส่งออก ประเทศผู้ซื้อกำหนดเงื่อนไขไว้ว่าต้องเป็นเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากต้นในแปลงปลูกที่เจริญเติบโตโดยปราศจากโรคพืชที่ประเทศผู้ซื้อได้ระบุไว้ในสัญญาการซื้อขาย ด้วยเหตุนี้เจ้าหน้าที่ของฝ่ายกักกันพืช จึงต้องทำการตรวจโรคและศัตรูพืชในแปลงปลูก ซึ่งมีแนวปฏิบัติดังนี้

1) บริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์จะต้องแจ้งยืนยันต่อเจ้าหน้าที่ก่อนถึงกำหนดการตรวจแปลงปลูกอย่างน้อย 10 วัน โดยแจ้งรายละเอียดเกี่ยวกับจำนวนแปลง รายชื่อเกษตรกร ท้องที่ปลูก สายพันธุ์และอายุพืชเพื่อเป็นข้อมูลในการวางแผนปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่

2) การตรวจสอบศัตรูพืชจะดำเนินการ 2 ครั้ง

- ระยะก่อนออกดอก ประมาณ 40-45 วัน
- ระยะเติบโตเต็มที่ก่อนเก็บเกี่ยว ประมาณ 70-75 วัน

3) แปลงปลูกพืชใดที่ตรวจพบเชื้อโรคพืชที่ต้องการให้การรับรองจะทำการยกเลิกการรับรองพิเศษกับแปลงดังกล่าว

4. การออกใบรับรองปลอดศัตรูพืช บริษัทฯ ที่มีความประสงค์จะส่งออกเมล็ดพันธุ์จะต้องดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1) บริษัทจะต้องทำหนังสือแจ้งความจำนงถึงกลุ่มกักกันพืชก่อนการส่งออกอย่างน้อย 5 วัน พร้อมแนบเอกสารดังต่อไปนี้

1.1 รายชื่อเกษตรกร (พร้อมหมายเลขแปลง), สายพันธุ์พืช, น้ำหนักเมล็ดพันธุ์ของเกษตรกรแต่ละราย และพื้นที่ปลูก (ไร่)

1.2 Packing list/ Blend number list และ Invoice

1.3 รายชื่อเชื้อโรคพืชที่ต้องการให้ระบุในใบรับรองปลอดศัตรูพืชทุกครั้งที่ต้องการส่งออก

หมายเหตุ หลังจากบริษัทฯ ยื่นหนังสือแจ้งความจำนงแล้ว ให้ประสานงานกับเจ้าหน้าที่เพื่อตรวจสอบความถูกต้องในการออกใบรับรองปลอดศัตรูพืชต่อไปด้วย

2) ยื่นคำขอใบรับรองปลอดศัตรูพืช แบบ พ.ก. 9 และคำขอการเพิ่มข้อความในใบรับรองปลอดศัตรูพืช ณ งานมาตรฐานสินค้าและบริการส่งออก

3) รมยากำจัดแมลงศัตรูพืช ตามความต้องการของประเทศผู้ซื้อ

4) การส่งออกเมล็ดพันธุ์ลูกผสมซึ่งได้รับการรับรองการปลอดโรคพืชสำคัญบางชนิดช่วงการเจริญเติบโตในแปลงปลูก จะต้องไม่ปะปนกับเมล็ดพันธุ์ซึ่งไม่ได้ผ่านการตรวจสอบโรคพืชในแปลงปลูก

5) การเติมข้อความลงในใบรับรองปลอดศัตรูพืชในช่อง Additional declaration หากข้อความที่ต้องการระบุเพิ่มเติมมีความยาวต้องพิมพ์เป็นเอกสารแนบ (Attached sheet) การออกใบรับรองปลอดศัตรูพืชและเอกสารแนบจะต้องออกให้พร้อมกัน

กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนและระยะเวลาการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดพันธุ์พ่อ- แม่
และการตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืชช่วงพืชเจริญเติบโตในแปลงปลูก