

การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน
ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ

Study on Quarantine Pests Associated with
Imported Sunflower Seeds

ศรียุทธ เกษสังข์ วันเพ็ญ ศรีชาติ ชลธิชา รักไคร้

วานิช คำพานิช

กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) มีศัตรูพืชที่เข้าทำลายส่วนต่างๆ ของทานตะวันมีศัตรูพืชทั้งสิ้น 250 ชนิด คือ จัดเป็นแมลง 120 ชนิด ไรและแมงมุม 2 ชนิด ไข่เดือนฝอย 12 ชนิด เชื้อรา 40 ชนิด แบคทีเรีย 11 ชนิด ไวรัส 5 ชนิด วัชพืช 58 ชนิด และหอยทาก 1 ชนิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์ทานตะวันในห้องปฏิบัติการ โดยการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน ที่นำเข้ามาระหว่างเดือน ตุลาคม 2554 - กันยายน 2556 จาก 9 ประเทศได้แก่ อาร์เจนตินา ออสเตรเลีย อินเดีย สาธารณรัฐประชาชนจีน ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา สเปน และเยอรมัน รวม 69 ตัวอย่างมาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยสายตา (Visual inspection) และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเมล็ดทานตะวันที่นำเข้ามา ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือการปนเปื้อนของวัชพืช จากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคพืชกับเมล็ดพันธุ์ทานตะวันในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี Blotter method ตรวจพบเชื้อรา *Alternaria tenuis*, *Alternaria raphani*, *Cladosporium* sp. *Ulocladium* sp. *Fusarium semitectum*, *Chaetomium* sp. *Curvularia pallescens* และ *Streptomyces* sp. และจากการนำเข้าเมล็ดทานตะวัน มาตรวจสอบด้วยวิธี Dilution method ไม่พบเชื้อแบคทีเรียเชื้อสาเหตุโรคพืชและเมื่อนำเมล็ดมาปลูกสังเกตอาการโรค (Seedling symptom test) ในโรงปลูกพืช ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นทานตะวัน ดังกล่าว และเมื่อติดตามตรวจสอบโรคและศัตรูพืชในห้องที่จังหวัด สระบุรี และลพบุรี ตรวจพบโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Alternaria tenuis* โรคราแป้งขาว เกิดจากเชื้อรา *Oidium* sp. และโรคราสนิมที่เกิดจากเชื้อรา *Puccinia* sp. และในแปลงปลูกจังหวัดเชียงใหม่ ตรวจพบอาการต้นเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และอาการใบด่าง ซึ่งศัตรูพืชที่พบในเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้ามาและตรวจพบในแปลงปลูกไม่ใช่เชื้อโรคและศัตรูพืชที่สำคัญทางกักกันพืชของประเทศไทย

รหัสสารทดลอง 03-04-54-03-00-12-55

คำนำ

พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 กำหนดให้เมล็ดพันธุ์ทานตะวัน สิ่งกัก (Restricted material) ในการนำเข้ามายังประเทศไทยต้องแจ้งการนำเข้า ณ ด่านตรวจพืชนำเข้า และมีใบรับรองสุขอนามัยพืช (Phytosanitary Certificate) จากประเทศต้นทางกำกับมาพร้อมกับหนังสือรับรองว่าไม่เป็นพืชติดต่อสารพันธุกรรม (Non - GMO_s Certificate) เมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า โดยไม่มีมาตรการสุขอนามัยกำหนดไว้แต่อย่างใด การนำเข้าสินค้าเกษตรจากต่างประเทศ มีโอกาสที่ศัตรูพืชหลายชนิดที่อาจเป็นศัตรูพืชกักกันที่ร้ายแรงหรือศัตรูพืชที่สำคัญที่ก่อความเสียหายกับผลิตผลทางการเกษตรติดเข้ามาพร้อมกับเมล็ดพืชด้วย โดยอาจเป็นศัตรูพืชร้ายแรงที่ไม่มีปรากฏในประเทศไทย โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ติดมากับทานตะวันซึ่งมีการนำเข้ามาเพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ในการส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูกกระจายทั่วประเทศ โดยในแต่ละปีมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์เหล่านี้ในปริมาณมาก ในปี พ.ศ. 2555 และ 2556 มีการนำเข้าทั้งหมด 286.56 ตัน และ 116.34 ตัน ตามลำดับ หากศัตรูพืชที่ร้ายแรงซึ่งยังไม่มีรายงานในประเทศไทยติดมากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวสามารถเข้ามาเจริญและแพร่พันธุ์ได้ในประเทศไทย จะก่อให้เกิดผลกระทบทำความเสียหายต่อการเกษตรในประเทศและกระทบต่อการส่งออกพืชผักผลไม้ไทยไปยังต่างประเทศที่มีความเข้มงวดด้านกักกันพืช ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับพืชนำเข้า เพื่อให้ทราบชนิด แหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้า และเส้นทางการเข้ามาของศัตรูพืช ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นฐานข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืช มีประโยชน์ใช้อ้างอิงทางวิชาการ นำมาพิจารณาหามาตรการเพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชชนิดนั้น ๆ และกำหนดเป็นมาตรการทางด้านกฎหมายและทางวิชาการในการควบคุมการนำเข้า หรือเปลี่ยนแปลงสถานภาพของพืชนำเข้าให้เป็นสิ่งต้องห้ามหรือสิ่งกักตามพระราชบัญญัติกักพืชต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน นำเข้าจากต่างประเทศ
2. กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope และ compound microscope
3. วัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
4. สารเคมีตรวจสอบเชื้อโรคพืช
5. อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่าง
6. ชุดตรวจสอบศัตรูพืช (ELISA Kit)
7. หนังสือ และวารสารทั้งในประเทศและต่างประเทศที่เกี่ยวข้องกับเชื้อโรคและศัตรูพืช
8. Diagnostic protocols เช่น EPPO diagnostic protocols.
9. โรงเรือนปลูกเพื่อสังเกตอาการผิดปกติ

วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของทานตะวันและข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

ทำการสืบค้นข้อมูลจากเอกสาร วารสาร รายงานการประชุมทางวิชาการ อินเทอร์เน็ต เพื่อค้นหาข้อมูลของทานตะวันลักษณะทั่วไปของพืช สายพันธุ์ พื้นที่การเพาะปลูก รายชื่อของประเทศ

ที่ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ ปริมาณการนำเข้า ข้อมูลชนิดของศัตรูพืชทั้งนอกประเทศ และในประเทศ

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชชั้นละเอียดยในห้องปฏิบัติการกับเมล็ดพันธุ์ ทานตะวันที่นำเข้าจากต่างประเทศ

ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ทานตะวันที่นำเข้าจากต่างประเทศมาทำการตรวจวินิจฉัยโรคและศัตรูพืชชั้นละเอียดยในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อตรวจหาตัวอ่อน หนอน แมลง เมล็ดวัชพืช หรือลักษณะเมล็ดที่แสดงอาการผิดปกติที่อาจมีสาเหตุจากเชื้อโรค

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

2.2.1 การตรวจสอบเชื้อรา

1) การตรวจสอบสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะยังไม่งอก (Dry seed examination)

โดยตรวจสอบลักษณะอาการโรคและส่วนขยายพันธุ์เชื้อราหรือศัตรูพืชอื่นๆ ซึ่งปะปนมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยตาเปล่าหรือตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope เช่นเมล็ดพันธุ์มีรูปร่างผิดปกติ หรืออาจติดมา ภายในเมล็ดพันธุ์โดยไม่แสดงอาการ รวมทั้งอาจติดมากับเศษพืชในลักษณะเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์เช่น Pycnidia เป็นต้น

2) การตรวจสอบสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะเมล็ดงอก (Germinated seed examination)

สุ่มตัวอย่างเมล็ดตามวิธีการมาตรฐาน ในปริมาณที่เหมาะสมวิเคราะห์โดยสุ่มแยกตามสายพันธุ์ มาตรวจสอบด้วยวิธี Blotter method โดยวางเมล็ดลงบนกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่นที่ชุ่มน้ำซึ่งวางอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางเมล็ดพันธุ์ทานตะวันที่ 10 เมล็ดต่อจานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 400 เมล็ด จากนั้นนำจานเพาะเมล็ดไปบ่มเชื้อ (incubate) ใต้แสง near ultraviolet (NUV) สลับกับความมืด 12/12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงนำเมล็ดพันธุ์มาตรวจและจำแนกชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (compound microscope)

2.2.2 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย

1) แยกเชื้อสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงหรือด้วยวิธี Dilution plate

ในกรณีที่เชื้อติดมาในปริมาณมากจะสามารถแยกเชื้อจากเมล็ดโดยตรง หลังจากทำการแยกเชื้อด้วยวิธี Blotter method ได้ หรือทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงด้วยวิธี Dilution plate โดยสุ่มเมล็ดตามมาตรฐาน นำมาแช่ในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายในตู้เขี่ยเชื้อ เมื่อได้เมื่อเมล็ดแห้งแล้วจึงนำไปบดละเอียดด้วยเครื่องบด แล้วนำผงของเมล็ดใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (0.85% NaCl) หรือ บัฟเฟอร์ จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยวางบนเครื่องเขย่า จากนั้นนำมาทำให้เจือจางเป็น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ ใช้ไปเปิดตูด suspension แต่ละความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วใช้แท่งแก้วลนไฟฆ่าเชื้อ

spread ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน จึงนำมาตรวจหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปจำแนกชนิดต่อไป

2) แยกเชื้อจากต้นกล้าซึ่งแสดงอาการผิดปกติ

โดยการเพาะเมล็ดในดินนิ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 100 เมล็ดต่อถาดเพาะเมล็ด และเก็บถาดเพาะเมล็ดที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส รดน้ำเข้าเย็นในโรงเรือนสถานกักพืช ของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช เมื่อต้นกล้าออกไปจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิดปกติของพืช หรืออาจใช้ถุงพลาสติกที่ฉีดพ่นน้ำคลุมให้ความชุ่มชื้นเป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนใบ กิ่ง ลำต้น โคนต้น และราก เก็บส่วนของพืชที่สงสัยไปแยกเชื้อด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

2.1) วิธี Dilution plate ตัดใบพืชตรงบริเวณรอยต่อส่วนที่เป็นโรคและปกติที่เป็นโรคเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมแล้วฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2-3 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายในตู้เชื้อเชื้อ จากนั้นบดชิ้นส่วนของพืชในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ และทำให้เจือจางเป็นลำดับจาก 10^{-1} ถึง 10^{-5} และดำเนินการเช่นเดียวกับ ขั้นตอนในข้อ (1)

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

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

1. ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย โดยบันทึกลักษณะและสีของโคโลนี ตรวจสอบรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงหรือกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2. ทดสอบแกรม (Gram reaction) โดยใช้สารละลายโปรแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (3%KOH) ที่เตรียมใหม่ใช้ภายใน 2 สัปดาห์ หากตรวจพบเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ก็จะนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

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

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

5. ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัย (Pathogenicity test) โดยเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ปลุกเชื้อตามอาการของโรคของเชื้อที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุโรค เช่น ปลุกเชื้อโดยฉีดเข้าในลำต้น หรือฉีด

พ่นกับใบเลี้ยงหรือเนื้อใบของต้นกล้าทานตะวัน ฉีดพ่นน้ำให้ความชุ่มชื้นคลุมด้วยถุงพลาสติกและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบลักษณะอาการโรคหลังปลูกเชื้อ 3-5 วัน จากนั้นนำใบเป็นโรคมายกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อสาเหตุที่ทำให้พืชเป็นโรคเป็นชนิดเดียวกับที่แยกได้ในครั้งแรกหรือไม่

6. การตรวจสอบด้วยวิธี ELISA เป็นวิธีการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา ปัจจุบันใช้ชุดตรวจสอบของ Agdia นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวและนำมาทำการตรวจสอบตามขั้นตอนที่แนะนำ

2.2.3 การตรวจสอบเชื้อไวรัส

1) ปลูกสังเกตลักษณะอาการโรคบนต้นกล้า (Seedling symptom test) โดยเฉพาะเมล็ดพันธุ์ในดินอบฆ่าเชื้อ ตัวอย่างละ 100 เมล็ด เก็บรักษาไว้ในโรงปลูกพืชกันแมลงเมื่อต้นพืชออกใบจริง 1-2 ใบ จึงตรวจสอบลักษณะอาการโรค ต้นกล้าที่แสดงอาการผิดปกติ สงสัยว่ามีสาเหตุจากเชื้อไวรัสจะนำไปอ่อนไปตรวจสอบด้วยวิธีการอื่นเพื่อจำแนกชนิดต่อไป

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

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

3. การติดตามตรวจสอบโรคและศัตรูพืชในแปลงปลูกทานตะวันในท้องที่ภาคกลางและภาคเหนือ

ทำการติดตามตรวจสอบต้นพืชที่มีการนำเมล็ดพันธุ์นำเข้าไปเพาะปลูกในแปลงปลูกทานตะวันในท้องที่ภาคกลางและภาคเหนือ โดยสังเกตอาการผิดปกติของต้นพืชทั้ง โคนต้น ราก ลำต้น ใบและดอกของพืช และทำการเก็บตัวอย่างอาการดังกล่าว นำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง แยกเชื้อ จัดจำแนกชนิดของเชื้อ และทดสอบการเกิดโรคกับพืชในห้องปฏิบัติการเพื่อทำการวินิจฉัยเชื้อโรคศัตรูพืชอย่างละเอียด เช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 2

4. การบันทึกข้อมูลการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ทานตะวันที่นำเข้าจากต่างประเทศและการตรวจพบโรคและศัตรูพืชที่ตรวจพบในแปลงปลูก และสรุปผลการศึกษารายการเป็นศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช

โดยการจัดทำรายชื่อโรคและศัตรูพืชที่ตรวจพบในห้องปฏิบัติการจากเมล็ดพันธุ์นำเข้าโรคและศัตรูพืชที่ตรวจพบในแปลงปลูกทานตะวันและสรุปผลทดลอง

เวลาและสถานที่

เวลา: เดือนตุลาคม 2554 – กันยายน 2556

สถานที่: ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ด้านตรวจพืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร และแปลงปลูกทานตะวันในท้องที่ภาคเหนือและภาคกลาง

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การรวบรวมข้อมูลทั่วไปของทานตะวันและข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศ เปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

ทานตะวัน (Sunflower) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Helianthus annuus* L.

Kingdom : Plantae

Phylum : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Order : Asterales

Family : Asteraceae

Genus : Helianthus

Species : *Helianthus annuus*

แหล่งปลูกทานตะวันในประเทศไทย

1. ภาคเหนือ : เชียงใหม่ เชียงราย ตาก นครสวรรค์ เพชรบูรณ์ อุทัยธานี พะเยา
2. ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ : นครราชสีมา ศรีสะเกษ หนองบัวลำภู ขอนแก่น
3. ภาคกลาง : ลพบุรี สระบุรี
4. ภาคตะวันออก : สระแก้ว ปราจีนบุรี จันทบุรี
5. ภาคตะวันตก : กาญจนบุรี ราชบุรี

ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ทานตะวันจากต่างประเทศ ระหว่างเดือน ตุลาคม 2554 – กันยายน 2556 จาก 9 ประเทศได้แก่ อาร์เจนตินา ออสเตรเลีย อินเดีย สาธารณรัฐประชาชนจีน ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา สเปนและเยอรมัน รวมเป็นปริมาณทั้งหมด 345.08 ตันดำเนินการสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจสอบศัตรูพืชจำนวน 69 ตัวอย่าง

ศัตรูพืชที่พบเข้าทำลายทานตะวันการศึกษาเบื้องต้นในการวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช พบว่า ขั้นตอนการจัดกลุ่มศัตรูพืช (Pest categorization) มีสิ่งมีชีวิตที่เป็นศัตรูพืชรวม 250 ชนิด คือ จัดเป็นแมลง 120 ชนิด ไโรและแมงมุม 2 ชนิด ไข่เดือนฝอย 12 ชนิด เชื้อรา 40 ชนิด แบคทีเรีย 11 ชนิด ไวรัส 5 ชนิด วัชพืช 58 ชนิด และหอยทาก 1 ชนิด จากการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเบื้องต้นสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ทานตะวันจากต่างประเทศเข้ามาในราชอาณาจักร พบศัตรูพืชที่ไม่มีรายงานในประเทศไทย และเป็นศัตรูพืชที่มีความเสี่ยงสูงที่อาจติดเข้ามาและก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชผลในประเทศ ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันการระบาดของศัตรูพืชดังกล่าว หรือศัตรูชนิดใหม่จึงทำการตรวจสอบโรคและศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์ทานตะวันเพื่อเป็นข้อมูลในการหามาตรการที่เหมาะสมกับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน จากต่างประเทศเข้ามาในราชอาณาจักรต่อไป

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชชั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการกับเมล็ดพันธุ์ทานตะวันนำเข้าจากต่างประเทศ

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

จากการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากทุกประเทศในเบื้องต้น พบว่าเมล็ดพันธุ์สมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช

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

เมล็ดพันธุ์ทานตะวันที่นำเข้าจาก 9 ประเทศ ได้แก่ อาร์เจนตินา ออสเตรเลีย สาธารณรัฐประชาชนจีน เยอรมัน อินเดีย ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ สเปน และ สหรัฐอเมริกา จำนวน 69 ตัวอย่าง ทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืชและจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชชั้นละเอียดที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบเชื้อ จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *Alternaria raphani*, *Cladosporium* sp., *Ulocladium* sp., *Fusarium semitectum*, *Chaetomium* sp., *Curvularia pallescens* และ *Streptomyces* sp. แต่จากการนำเมล็ดพันธุ์ทานตะวันมาตรวจด้วยวิธี Dilution technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่นำส่งสัจะเป็นเชื้อก่อโรคกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว และเมื่อปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom test) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นทานตะวันลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ไม่แสดงอาการโรคพืช

3. การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ทานตะวันในท้องที่ภาคกลางและภาคเหนือ

จากการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ทานตะวันในท้องที่จังหวัด สระบุรี และ ลพบุรี ตรวจพบโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Alternaria tenuis* โรคราแป้งข้าว เกิดจากเชื้อรา *Oidium* sp. และโรคราสนิมที่เกิดจากเชื้อรา *Puccinia* sp. และในแปลงปลูกจังหวัดเชียงใหม่ ตรวจพบอาการต้นเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และอาการใบด่าง

4. การบันทึกข้อมูลการตรวจวินิจฉัยโรคและศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์นำเข้าและการตรวจพบศัตรูพืชในแปลงปลูกและสรุปผลการศึกษาการเป็นศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช

การจัดทำรายชื้อโรคและศัตรูพืชที่ตรวจพบเมล็ดพันธุ์ทานตะวันที่นำเข้าจากต่างประเทศ และจากการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกทานตะวัน

ตารางที่ 1 ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ทานตะวันที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ (ระหว่าง เดือน ตุลาคม 2554- กันยายน 2555)

ลำดับที่	ประเทศ	ปริมาณ (กก.)	จำนวน ตัวอย่าง	ด่านตรวจพืช	เชื้อโรคศัตรูพืชที่ตรวจพบ
1	อาร์เจนตินา	80,040.00	7	ลาดกระบัง	<i>Alternaria tenuis</i> 1.21 % <i>Ulocladium</i> sp. 0.28 %
2	ออสเตรเลีย	115,814.00	6	สุวรรณภูมิ	-
		10.35	2	ท่าเรือ กรุงเทพฯ	<i>Alternaria tenuis</i> 2.0 %
3	สาธารณรัฐ ประชาชนจีน	1,300.00	1	ท่าเรือ กรุงเทพฯ	<i>Alternaria tenuis</i> 20.0 % <i>Chaetomium</i> sp. 2.5 % <i>Curvularia pallescens</i> 2.0% <i>Streptomyces</i> sp. 0.3%
4	เยอรมัน	1.353	1	ไปรษณีย์	-
5	อินเดีย	89,356.00	5	ท่าเรือ กรุงเทพฯ	-
6	ญี่ปุ่น	0.4	4	ไปรษณีย์	<i>Alternaria tenuis</i> 6.0 %
7	สหรัฐอเมริกา	32.00	4	สุวรรณภูมิ	-
รวม 7 ประเทศ		286,554.10	30		

ตารางที่ 2 ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ทานตะวันที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ (ระหว่าง เดือน ตุลาคม 2555- กันยายน 2556)

ลำดับที่	ประเทศ	ปริมาณ (กก.)	จำนวนตัวอย่าง	ด้านตรวจพืช	เชื้อโรคศัตรูพืชที่ตรวจพบ
1		70,008.00	5	ลาดกระบ้ง	-
	อาร์เจนตินา	13.26	2	สุวรรณภูมิ	<i>Alternaria tenuis</i> 4.6 % <i>Alternaria raphani</i> 0.3 % <i>Cladosporium</i> sp. 3.3 % <i>Ulocladium</i> sp. 1.6 %
2	ออสเตรเลีย	27,921.00	8	ท่าเรือ	<i>Alternaria tenuis</i> 4.6 %
				กรุงเทพฯ	<i>Fusarium semitectum</i> 0.30 %
3	สาธารณรัฐประชาชนจีน	2,000.00	1	ท่าเรือ	-
				กรุงเทพฯ	-
4	เยอรมัน	0.654	1	ไผ่ชะง่อน	-
5	อินเดีย	8.00	1	สุวรรณภูมิ	-
		27,632.00	3	แหลมฉบัง	-
6	ญี่ปุ่น	30.774	10	ไผ่ชะง่อน	<i>Alternaria tenuis</i> 16.0% <i>Ulocladium</i> sp. 17.0 %
7	เนเธอร์แลนด์	27.75	2	สุวรรณภูมิ	<i>Alternaria tenuis</i> 33.5 %
8	สเปน	10.00	2	สุวรรณภูมิ	-
9	สหรัฐอเมริกา	27.00	2	สุวรรณภูมิ	<i>Alternaria tenuis</i> 29.0 %
		9.071	2	ท่าเรือ กรุงเทพฯ	<i>Alternaria tenuis</i> 2.0 %
รวม 9 ประเทศ		116,339.509	39		

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เมล็ดพันธุ์ทานตะวันที่นำเข้ามาจาก 9 ประเทศ ได้แก่ อาร์เจนตินา ออสเตรเลีย สาธารณรัฐประชาชนจีน เยอรมัน อินเดีย ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ สเปน และ สหรัฐอเมริกา มาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบเชื้อราจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *Alternaria raphani*, *Cladosporium* sp., *Ulocladium* sp., *Fusarium semitectum*, *Chaetomium* sp. *Curvularia pallescens* และ *Streptomyces* sp. แต่จากการนำเมล็ดพันธุ์ทานตะวันมาตรวจด้วยวิธี Dilution technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่น่าสงสัยจะเป็นเชื้อก่อโรคกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom test) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นทานตะวันลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ไม่แสดงอาการโรคพืช และจากการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ทานตะวันในท้องที่จังหวัด สระบุรี และลพบุรี ตรวจพบโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Alternaria tenuis* โรคราแป้งข้าว เกิดจากเชื้อรา *Oidium* sp. และโรคราสนิมที่เกิดจากเชื้อรา *Puccinia* sp. และในแปลงปลูก

จังหวัดเชียงใหม่ ตรวจพบอาการต้นเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และอาการใบด่าง ซึ่งเชื้อโรคและศัตรูพืชที่พบดังกล่าวไม่จัดเป็นศัตรูพืชกักกัน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณชัยรัตน์ หมั่นการ คุณวิภา เกิดพิพัฒน์ คุณอรนุช นาคะโร คุณยุทธนา ประมาณ คุณวิชาญ สมานธิ คุณสุธรรม คงเอียด คุณจิรวัดน์ ไกรนรา คุณชลิตา ดาหาญ และคุณอัญชลิ ราศรี ตลอดจนเจ้าหน้าที่ด้านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ด้านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ด้านตรวจพืชไปรษณีย์ ด้านตรวจพืชลาดกระบังและด้านตรวจพืชแหลมฉบัง สำนักควบคุมพืชและ-วัสดุการเกษตรและน้องๆ ในห้องปฏิบัติการที่ช่วยสนับสนุนในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Anonymous, 1996 International Rules for Seed Testing. Seed Science and Technology 24 : 1-335.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B., 1972, Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publication Ltd. St. Paul. Minnesota, USA, P.241.
- Chohan, J.S. and Jasmit K., 1975. Seed borne Mycoflora of Sunflower and Control of Seed borne Pathogens. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology, 6 : 210-211.
- Ellis, M.B. 1971. Demataceous Hyphomycetes, Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, kew, Surrey, U.K. p 680.
- Jhamaria S.L., Sharma, K.B. and Gupta, R.B. 1975. Fungi Intercepted from Sunflower Seeds and Their Control. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology, 5 : 212.
- Khare, M.N., 1996. Methods to Test Seeds for Associated Fungi Indian Phytopathology, 49 : 319-328.