

การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ
Interception of Quarantine Pest in Imported
Soybean Seed Consignments

นางพร มาอยู่ดี^{1/} ชลธิชา รักใคร่^{1/} ชาญชัย แสงหิรัญ^{2/}
จินตนา สุ่มขุนทด^{2/}

^{1/} กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/} ด่านตรวจพืชลาดกระบัง สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

รายงานความก้าวหน้า

ถั่วเหลือง (Soybean : *Glycine max* (L.) Mers.) เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ถั่ว (Leguminosae) ปริมาณนำเข้าจากต่างประเทศในปี 2555-2556 ประมาณ 79,562 กิโลกรัม มูลค่า 13,463,213 บาท (กลุ่มควบคุมพันธุ์พืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร) ข้อมูลศัตรูพืชที่เข้าทำลายส่วนต่างๆ ของถั่วเหลือง มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 507 ชนิด คือแมลง 249 ชนิด เชื้อรา 78 ชนิด แบคทีเรีย 18 ชนิด ไวรัส 32 ชนิด ไส้เดือนฝอย 29 ชนิด ไร 9 ชนิด ทาก 2 ชนิด และวัชพืช 90 ชนิด และจากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ที่นำเข้ามาจาก 2 ประเทศ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา และสาธารณรัฐประชาชนจีน มาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าลักษณะเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง มีสีขาว เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืช หรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชชั้นละเอียดที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบเชื้อรา จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *Chaetomium* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia lunata*, *Colletotrichum dematium*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium solani*, และ *Nigrospora* sp., แต่จากการนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง มาตรวจด้วยวิธี Dilution technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่น่าสงสัยจะเป็นเชื้อก่อโรคร่วมกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นถั่วเหลือง ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ไม่แสดงอาการโรคพืช ซึ่งจากการตรวจเอกสารและการสังเกตเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากบางประเทศ มีการคลุกสารเคมีฆ่าเชื้อรา ได้แก่ Thiram หรือ Captan หรือ คลุกสารเคมีทั้ง 2 ชนิดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้า

รหัสสารทดลอง 03-04-54-03-03-00-17-56

คำนำ

ถั่วเหลือง (Soybean: *Glycine max* (L) จัดอยู่ในวงศ์ถั่ว(Leguminosae)) สถิติในการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ปี 2555 ปริมาณ 78,000 กิโลกรัม มูลค่า 9,513,892 บาท (กลุ่มควบคุมพันธุ์พืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร) ถั่วเหลืองเป็นพืชล้มลุกอายุฤดูเดียว มีระบบรากแก้ว ลำต้นแบบเป็นพุ่มขึ้นตรงและเลื้อยพันค้ำมีการแตกกิ่ง ความสูงและจำนวนข้อขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของดินและสภาพแวดล้อมในแต่ละฤดูปลูก ใบเกิดแบบสลักบนต้นยกเว้นใบเลี้ยง(Cotyledon)และใบจริงคู่แรก(primary leaf) ของต้นอ่อน ใบที่เกิดต่อมาเป็นใบรวมมีใบย่อย 3 ใบ(Trifoliate)แต่บางพันธุ์อาจจะมีจำนวนใบย่อย 4-7 ก้านใบมีก้านใบรวม (Petiole ยาว 5-10 ซม.) รูปร่างของใบสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิดได้แก่ ใบแคบเรียวยาว(lanceolate) ใบค่อนข้างแคบ(triangular)และใบกว้าง(Ovate) ดอกถั่วเหลืองออกดอกเป็นช่อ(inflorescence)แบบดอกสมบูรณ์มีช่อดอกแบบกระจะ(raceme)ดอกมีสีขาวหรือม่วงเมื่อดอกบานเต็มที่จะมีขนาดประมาณ 3-8 ลิตร ช่อดอกหนึ่งๆมีดอกตั้งแต่ 3-15 ดอกช่อดอกที่เกิดบนยอดของลำต้นมักจะมีจำนวนดอกในช่อมากกว่าช่อดอกที่เกิดตามมุมใบแขนงเมล็ดเกิดในฝักฝักเกิดเป็นตุ่มๆละ 2-10 ฝักมีขนสีเทาหรือน้ำตาลปกคลุมทั่วไปฝักยาวประมาณ 2-7 เซนติเมตรแต่ละฝักมีเมล็ด 1-4 เมล็ดแต่ส่วนมากแต่มีส่วน 2-3 เซนติเมตร เมื่อฝักแก่จะมีสีน้ำตาลอ่อน น้ำตาลเข้ม สีเทา และดำลักษณะมีรูปร่างแตกต่างกันไต่ตั้งแต่ กลมและแบนและยาวสีของเมล็ดที่พบได้แก่ สีเขียว สีน้ำตาล สีน้ำตาลอมแดง สีเทา สีดำ หรือเมล็ดมีสองสี ถั่วเหลืองพันธุ์อายุสั้นเก็บเกี่ยว 75-85 วัน พันธุ์อายุปานกลางอายุเก็บเกี่ยว 86-112 วัน แหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ภาคเหนือ และภาคกลาง เช่น เชียงใหม่ สุโขทัย พิจิตร พิษณุโลก แพร่ ลำปาง ตาก กำแพงเพชร ลพบุรี สระบุรี ชัยนาท สิงห์บุรี อ่างทอง กาญจนบุรี ฉะเชิงเทรา ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ เลย นครราชสีมา ขอนแก่น อุตรดิตถ์ อุบลราชธานี มหาสารคามหนองคาย

พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 กำหนดให้เมล็ดพันธุ์พืชผักต่าง ๆ ไม้ดอกหรือไม้ประดับหลายชนิดจัดเป็นสิ่งต้องห้าม (Prohibited material) สิ่งกักต (Restricted material) และสิ่งไม่ต้องห้าม (unprohibited materials) ในการนำเข้ามายังประเทศไทยต้องแจ้งการนำเข้า และมีใบรับรองสุขอนามัยพืชจากประเทศต้นทางกำกับมาพร้อมกับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า โดยไม่มีมาตรการสุขอนามัยกำหนดไว้แต่อย่างใด การนำเข้าสินค้าเกษตรจากต่างประเทศ มีโอกาสที่ศัตรูพืชหลายชนิดที่อาจเป็นศัตรูพืชกักกันที่ร้ายแรงหรือศัตรูพืชที่สำคัญที่ก่อความเสียหายกับผลิตผลทางการเกษตรติดเข้ามาพร้อมกับเมล็ดพืชด้วย โดยอาจเป็นศัตรูพืชร้ายแรงที่ไม่มีปรากฏในประเทศไทย โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ติดมากับถั่วเหลือง ซึ่งมีการนำเข้ามาเพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์หรือเป็นต้นพันธุ์ในการส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูกกระจายทั่วประเทศไทย โดยในแต่ละปีมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์เหล่านี้ในปริมาณมาก หากศัตรูพืชที่ร้ายแรงซึ่งยังไม่มีรายงานในประเทศไทยติดมากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวสามารถเข้ามาเจริญและแพร่พันธุ์ได้ในประเทศไทย จะก่อให้เกิดผลกระทบทำความเสียหายต่อการเกษตรในประเทศและกระทบต่อการส่งออกพืชผักผลไม้ไทยไปยังต่างประเทศที่มีความเข้มงวดด้านกักกันพืช ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับพืชนำเข้า เพื่อให้ทราบชนิด แหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้า และเส้นทางการเข้ามาของศัตรูพืช ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นฐานข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืช มีประโยชน์ใช้อ้างอิงทางวิชาการ นำมาพิจารณาหามาตรการเพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชชนิดนั้น ๆ และกำหนดเป็นมาตรการทางด้าน

กฎหมายและทางวิชาการในการควบคุมการนำเข้า หรือเปลี่ยนแปลงสถานภาพของพืชตามพระราชบัญญัติกักพืชต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองนำเข้าจากต่างประเทศ
2. กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope และ compound microscope
3. วัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
4. สารเคมีตรวจสอบเชื้อโรคพืช
5. ภาชนะเก็บตัวอย่างพืช
6. ชุดตรวจสอบศัตรูพืช (ELISA Kit)
7. หนังสือ และวารสารทั้งในประเทศและต่างประเทศ

วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของถั่วเหลือง และข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศ เปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

ทำการสืบค้นข้อมูลจากเอกสาร วารสาร รายงานการประชุมทางวิชาการ อินเทอร์เน็ต เพื่อค้นหาข้อมูลของถั่วเหลือง ลักษณะทั่วไปของพืช สายพันธุ์ พื้นที่การเพาะปลูก รายชื่อของประเทศ ที่ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ ปริมาณการนำเข้า ข้อมูลชนิดของศัตรูพืชทั้งนอกประเทศ และในประเทศ

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขึ้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง นำเข้าในห้องปฏิบัติการ

ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ที่นำเข้าจากต่างประเทศมาทำการตรวจวินิจฉัยโรคและศัตรูพืชขึ้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อตรวจหาตัวอ่อน หนอน แมลง เมล็ดวัชพืช หรือลักษณะเมล็ดต่าง มีสีดำ บิดงอ ขนาดเล็ก ที่มีสาเหตุจากเชื้อโรค

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

2.2.1 การตรวจสอบเชื้อรา

1) การตรวจสอบสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะยังไม่งอก (Dry seed examination)

โดยตรวจสอบลักษณะอาการโรคและส่วนขยายพันธุ์เชื้อราหรือศัตรูพืชอื่นๆ ซึ่งปะปนมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยตาเปล่าหรือตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope เช่นเมล็ดพันธุ์มีรูปร่างผิดปกติ หรืออาจติดมา ภายในเมล็ดพันธุ์โดยไม่แสดงอาการ รวมทั้งอาจติดมากับเศษพืชในลักษณะเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์เช่น Pycnidia เป็นต้น

2) การตรวจสอบสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะเมล็ดงอก

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตามวิธีการมาตรฐาน ในปริมาณที่เหมาะสมวิเคราะห์โดยสุ่มแยกตามสายพันธุ์ มาทดสอบด้วยวิธี Blotter method โดยวางเมล็ดลงบนกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่นที่ชุ่มน้ำซึ่งวางอยู่ในจาน

อาหารเลี้ยงเชื้อ วางเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง 10 เมล็ดต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 200 เมล็ด จากนั้น นำจานเพาะเมล็ดไปบ่มเชื้อ (incubate) ได้แสง near ultraviolet (NUV) สลับกับความมืด 12/12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงนำเมล็ดพันธุ์มาตรวจและจำแนก ชนิดเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) และกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายสูง (compound microscope)

2.2.2 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย

1) แยกเชื้อสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงหรือด้วยวิธี Dilution plate

ในกรณีที่เชื้อติดมาในปริมาณมากจะสามารถแยกเชื้อจากเมล็ดโดยตรง หลังจากทำการแยกเชื้อด้วยวิธี Blotter method ได้ หรือทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจาก เมล็ดโดยตรงด้วยวิธี Dilution plate โดยสุ่มเมล็ดตามมาตรฐาน นำมาแช่ในสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งบน กระดาษกรองภายใต้กระแสมลต์เชื้อ เมื่อได้เมล็ดพันธุ์จึงนำไปบดละเอียดด้วยเครื่องบด แล้วนำผง ของเมล็ดใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (0.85% NaCl) หรือ บัฟเฟอร์ จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยวางบนเครื่องเขย่า จากนั้นนำมา ทำให้เจือจางในอาหารเหลว Nutrient broth ให้มีความเจือจางเป็น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ ใช้ไปเปิดจุด suspension แต่ละความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วใช้แท่งแก้ววนไฟฆ่าเชื้อ spread ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บจานอาหาร เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน จึงนำมาตรวจหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำมา แยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปจำแนกชนิดต่อไป

2) แยกเชื้อจากต้นกล้าซึ่งเพาะจากเมล็ดผิปกติ

โดยการเพาะเมล็ดในดินนิ่งฆ่าเชื้อ โดยเพาะ 25-50 เมล็ดต่อถาด และเก็บถาด เพาะที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส รดน้ำเข้าเย็นในโรงเรือนกักกันพืช ของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช เมื่อต้นกล้าออกใบจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิปกติบนพืช หรืออาจใช้ถุงพลาสติกที่ผิปกติ น้ำคลุมให้ความชุ่มชื้นเป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตลักษณะอาการผิปกติบนใบ กิ่ง ลำต้น โคนต้น และ ราก เก็บส่วนของพืชที่สงสัยไปแยกเชื้อด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

2.1) วิธี Dilution plate ตัดใบพืชที่เป็นโรคเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมแล้วฆ่าเชื้อที่ ผิดด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2-3 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรอง ภายใต้กระแสมลต์เชื้อ แล้วบดชิ้นส่วนในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาทำให้เจือจางเป็นลำดับจาก 10^{-1} ถึง 10^{-5} และดำเนินการเช่นเดียวกับ ขั้นตอนในข้อ (1)

2.2) วิธี Tissue transplanting ตัดใบพืชเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิดด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2-3 นาที ผึ่งให้ แห้งบนกระดาษกรอง ภายใต้กระแสมลต์เชื้อแล้ววางชิ้นพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA หรืออาหาร เลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะเจาะจง (semiselective media) นำจานเลี้ยงเชื้อไปเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาตรวจสอบหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรียเก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจนครบ 3-5 วัน เพื่อตรวจหา โคโลนีของแบคทีเรียชนิดอื่นจากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และนำไปศึกษาคุณลักษณะเพื่อจำแนกชนิด ต่อไป

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

1. ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย โดยบันทึกลักษณะและสีของโคโลนี ตรวจสอบรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
2. ทดสอบแกรม (Gram reaction) โดยใช้สารละลายโปรแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (3%KOH) ที่เตรียมใหม่ใช้ภายใน 2 สัปดาห์ หากตรวจพบเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) และแกรมบวก (Gram positive) รูปร่างแบบ Coryneform rod ก็จะไปทดสอบในขั้นต่อไป
3. ทดสอบ hypersensitivity reaction บนยาสูบ โดยการฉีดสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เข้าไปในใบยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.) บริเวณใต้ใบโดยฉีดเข้าเนื้อใบระหว่างเส้นใบ สังเกตลักษณะอาการเซลล์ตายตรงเนื้อใบ หลังการฉีดเชื้อ 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 ปลูกเชื้อตามอาการของโรคของเชื้อที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุโรค เช่น ปลูกเชื้อโดยฉีดเข้าในลำต้น ใบเลี้ยง หรือเนื้อใบของต้นฟักทอง สคว๊อช และแวกักราวด์ อายุ 2-3 สัปดาห์ ฉีดพ่นน้ำให้ความชุ่มชื้นคลุมด้วยถุงพลาสติกและเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบลักษณะอาการโรคหลังปลูกเชื้อ 3-5 วัน จากนั้นนำไปเป็นโรคมายกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อสาเหตุที่ทำให้พืชเป็นโรคเป็นชนิดเดียวกับที่แยกได้ในครั้งแรกหรือไม่
6. การตรวจสอบด้วยวิธี ELISA เป็นวิธีการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา ปัจจุบันใช้ชุดตรวจสอบของ Agdia นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวและนำมาทำการตรวจสอบตามขั้นตอนที่แนะนำ

2.2.3 การตรวจสอบเชื้อไวรัส

- 1) ปลูกสังเกตลักษณะอาการโรคบนต้นกล้า (Seedling symptom test) โดยเฉพาะ เมล็ดพันธุ์ในดินอบฆ่าเชื้อ ตัวอย่าง 50-200 เมล็ด เก็บรักษาไว้ในโรงปลูกพืชกันแมลงเมื่อต้นพืชออกใบจริง 1-2 ใบ จึงตรวจสอบลักษณะอาการโรค ต้นกล้าที่แสดงอาการผิดปกติ สงสัยว่ามีสาเหตุจากเชื้อไวรัสจะนำไปอ่อนไปตรวจสอบด้วยวิธีการอื่นเพื่อจำแนกชนิดต่อไป
- 2) ปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ (Infectivity test) เตรียมน้ำคั้นพืชสำหรับทดสอบ โดยบดใบพืชที่แสดงอาการผิดปกติในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ตรวจสอบเชื้อไวรัสใช้ 0.1 M phosphate buffer pH 7.0) โดยใช้ใบพืชหนัก 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร ในสภาพเย็น จากนั้นใช้สำลีหรือนิวที่สะอาดจุ่มน้ำคั้นพืชทาลงบนใบพืชทดสอบ ซึ่งโรยด้วยผงคาร์โบรันดัม (carborundum ขนาด 600 mesh) หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 5 นาที ล้างใบพืชและนำพืชทดสอบไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส สังเกตลักษณะอาการบนพืชทดสอบหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 1-4 สัปดาห์ โดยพืชทดสอบจะแสดงอาการแผลเฉพาะแห่ง (local lesion) หรืออาการแบบกระจายทั่วลำต้น (systemic infection)

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

3. การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์นำเข้าในพื้นที่ของเกษตรกร

ทำการติดตามตรวจสอบต้นพืชที่มีการนำเมล็ดพันธุ์นำเข้าไปเพาะปลูกในแปลงปลูกของเกษตรกรตามภาคต่างๆ โดยสังเกตอาการความผิดปกติของต้นพืชทั้ง โคนต้น ราก ลำต้น ใบและผลของพืช และทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาการดังกล่าว นำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง แยกเชื้อ จัดจำแนกชนิดของเชื้อ และทดสอบการเกิดโรคกับพืชในห้องปฏิบัติการเพื่อทำการวินิจฉัยเชื้อโรคศัตรูพืชอย่างละเอียด เช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 2

เวลาและสถานที่

เวลา: เดือนตุลาคม 2555 – กันยายน 2556

สถานที่: ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช ตำนตรวจพืช และแปลงปลูกในจังหวัดภาคเหนือ ภาคตะวันตก ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การรวบรวมข้อมูลทั่วไปของถั่วเหลืองและข้อมูลศัตรูพืชที่มีระบบงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ

ถั่วเหลือง (Soybean : *Glycine max* (L.) Mers.) เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ถั่ว ปริมาณนำเข้าจากต่างประเทศในปี 2555-2556 ประมาณ 79,562 กิโลกรัม มูลค่า 13,463,213 บาท (กลุ่มควบคุมพันธุ์พืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ถั่วเหลืองเป็นพืชฤดูเดียว มีระบบรากแก้ว ลำต้นแบบเป็นพุ่มขึ้นตรงและเลื้อยพันค้ำ ใบเกิดแบบสลับบนต้น รูปร่างของใบแบ่งได้ 3 ชนิด ได้แก่ ใบแคบเรียวยาว (Lanceolate) ใบค่อนข้างแคบ (Triangular) และใบกว้าง (Ovate) ดอกถั่วเหลืองออกดอกเป็นช่อ (Inflorescence) แบบดอกสมบูรณ์ (Perfee flower) มีช่อดอกกระจาย (Raceme) ดอกมีสีขาวหรือสีม่วง ช่อดอกหนึ่งๆมีดอกตั้งแต่ 3-15 ดอก เมล็ดเกิดในฝัก ฝักเป็นกลุ่มๆละ 2-10 ฝัก ฝักยาว 2-7 เซนติเมตร ฝักแกมมีสีน้ำตาลอ่อน สีน้ำตาลเข้ม สีเทา และสีดำ เมล็ดมีรูปร่างกลมแบน ค่อนข้างกลมและยาว สีเขียว สีน้ำตาล สีน้ำตาลอมแดง สีเทาหรือมีสองสี ถั่วเหลืองพันธุ์อายุสั้น อายุเก็บเกี่ยว 75-85 วัน พันธุ์อายุปานกลาง อายุเก็บเกี่ยว 80-112 วัน แหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ สุโขทัย เพชรบูรณ์ พิจิตร พิษณุโลก แพร่ ลำปาง ตาก กำแพงเพชร ลพบุรี สระบุรี ชัยนาท สิงห์บุรี อ่างทอง กาญจนบุรี ปราจันบุรี ฉะเชิงเทรา ขอนแก่น อุดรธานี หนองคาย อุบลราชธานี มหาสารคาม

ข้อมูลศัตรูพืชที่พบเข้าทำลายถั่วเหลือง การศึกษาเบื้องต้นในการวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช พบว่า ขั้นตอนการจัดกลุ่มศัตรูพืช (Pest categorization) ถั่วเหลือง มีศัตรูพืชทั้งสิ้น 507 ชนิด คือแมลง 249 ชนิด เชื้อรา 78 ชนิด แบคทีเรีย 18 ชนิด ไวรัส 32 ชนิด ไส้เดือนฝอย 29 ชนิด ไร 9 ชนิด ทาก 2 ชนิด และวัชพืช 90 ชนิดจากการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเบื้องต้นสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง จากต่างประเทศเข้ามาในราชอาณาจักร พบศัตรูพืชที่ไม่มีรายงานในประเทศไทย และเป็นศัตรูพืชที่มีความเสี่ยงสูงที่อาจติดเข้ามาและก่อให้เกิดความเสียหาย

กับพืชผลในประเทศ ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันการระบาดของศัตรูพืชดังกล่าว หรือศัตรูชนิดใหม่จึงทำการตรวจสอบหาศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์เป็นข้อมูลในการหามาตรการที่เหมาะสมกับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง จากต่างประเทศเข้ามาในราชอาณาจักร

2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชชั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง นำเข้าจากต่างประเทศ ในห้องปฏิบัติการ

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

จากการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากทุกประเทศในเบื้องต้น พบว่าลักษณะของเมล็ดมีสีขาว เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด ซึ่งจากการตรวจเอกสารและการสังเกตเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากบางประเทศ มีการคลุกสารเคมีฆ่าเชื้อรา ได้แก่ Thiram หรือ Captan หรือ คลุกสารเคมีทั้ง 2 ชนิดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้า

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

เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่นำเข้าจาก 2 ประเทศ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา และสาธารณรัฐประชาชนจีน มาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง มีสีขาว เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชชั้นละเอียดที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบเชื้อรา จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *Chaetomium sp*, *Cladosporium sp.*, *Curvularia lunata*, *Colletotrichum dematium*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium solani*, และ *Nigrospora sp.*, แต่จากการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง มาตรวจด้วยวิธี Dilution technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่น่าสงสัยจะเป็นเชื้อก่อโรคกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นถั่วเหลือง ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ไม่แสดงอาการโรคพืช ซึ่งจากการตรวจเอกสารและการสังเกตเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากบางประเทศ มีการคลุกสารเคมีฆ่าเชื้อรา ได้แก่ Thiram หรือ Captan หรือ คลุกสารเคมีทั้ง 2 ชนิดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้า

3. การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองนำเข้าจากต่างประเทศ

ได้ติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง จำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน เพชรบูรณ์ อุดรธานี ชัยภูมิ และ ขอนแก่น พบอาการโรคบนใบของถั่วเหลือง ได้แก่ เชื้อราสนิม แอนแทรกโนส และวัชพืช ได้แก่ กระจับ หญ้านกสีชมพู โทงเทง หญ้าปล้องละมาน ลูกใต้ใบ สาบม่วง หญ้ายาง หญ้าปากควาย หญ้าขจรจบ และ หญ้าดอกแดง ซึ่งศัตรูพืชที่พบในแปลงปลูก ไม่ใช่ศัตรูพืชดำนกักกันพืชของประเทศไทย

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ถั่วเหลือง (Soybean : *Glycine max* (L.) Mers.) เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ถั่ว ปริมาณนำเข้าจากต่างประเทศในปี 2555-2556 ประมาณ 79,562 กิโลกรัม มูลค่า 13,463,213 บาท (กลุ่มควบคุมพันธุ์พืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ถั่วเหลืองเป็นพืชฤดูเดียว มีระบบ

รากแก้ว ลำต้นแบบเป็นพุ่มขึ้นตรงและเลื้อยพันค้ำ ใบเกิดแบบสลับบนต้น รูปร่างของใบแบ่งได้ 3 ชนิด ได้แก่ ใบแคบเรียวยาว (Lanceolate) ใบค่อนข้างแคบ (Triangular) และใบกว้าง (Ovate) ดอกถั่วเหลืองออกดอกเป็นช่อ (Inflorescence) แบบดอกสมบูรณ์ (Perfee flower) มีช่อดอกกระจาย (Raceme) ดอกมีสีขาหรือสีม่วง ช่อดอกหนึ่งๆมีดอกตั้งแต่ 3-15 ดอก เมล็ดเกิดในฝัก ฝักเป็นกลุ่มๆ ละ 2-10 ฝัก ฝักยาว 2-7 เซนติเมตร ฝักแก่มีสีน้ำตาลอ่อน สีน้ำตาลเข้ม สีเทา และสีดำ เมล็ดมีรูปร่างกลมแบน ค่อนข้างกลมและยาว สีเขียว สีน้ำตาล สีน้ำตาลอมแดง สีเทาหรือมีสองสี ถั่วเหลืองพันธุ์อายุสั้น อายุเก็บเกี่ยว 75-85 วัน พันธุ์อายุปานกลาง อายุเก็บเกี่ยว 80-112 วัน แหล่งปลูกที่สำคัญใน 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน เพชรบูรณ์ อุตรธานี ชัยภูมิ และ ขอนแก่น

จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ที่นำเข้ามาจาก 2 ประเทศ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา และ สาธารณรัฐประชาชนจีน มาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง มีสีขา เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์บรรจุอยู่ในบรรจุภัณฑ์สะอาด ปิดมิดชิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบเชื้อรา จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *Alternaria tenuis*, *Chaetomium* sp, *Cladosporium* sp., *Curvularia lunata*, *Colletotrichum dematium*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium solani*, และ *Nigrospora* sp., แต่จากการนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง มาตรวจด้วยวิธี Dilution technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่น่าสงสัยจะเป็นเชื้อก่อโรคร่วมกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นถั่วเหลือง ลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ไม่แสดงอาการโรคพืช ซึ่งจากการตรวจเอกสารและการสังเกตเมล็ดพันธุ์นำเข้าจากบางประเทศ มีการคลุกสารเคมีฆ่าเชื้อรา ได้แก่ Thiram หรือ Captan หรือ คลุกสารเคมีทั้ง 2 ชนิดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้าอัตรการใช้

ได้ติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง จำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน เพชรบูรณ์ อุตรธานี ชัยภูมิ และ ขอนแก่น พบอาการโรคบนใบของถั่วเหลือง ได้แก่ เชื้อราสนิม แอนแทรกโนส และวัชพืช ได้แก่ กระจับ หญ้านกสีชมพู โทงเทง หญ้าปล้องละมาน ลูกใต้ใบ สาบม่วง หญ้ายาง หญ้าปากควาย หญ้าขจรจบ และ หญ้าดอกแดง ซึ่งศัตรูพืชที่พบในแปลงปลูกไม่ใช่ศัตรูพืชที่ชดกันพืชของประเทศไทย

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณวิชาญ สมานิต คุณวิภา เกิดพิพัฒน์ คุณอรนุช นาคะโร ช่วยสนับสนุนและเตรียมตัวอย่างพืชและเตรียมงานในห้องปฏิบัติการ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการที่ช่วยสนับสนุนในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- เครือพันธุ์ กิตติปกรณ และ วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2545. โรคไวรัสที่สำคัญของพืชผักและพืชน้ำมัน. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 88 หน้า.
- เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2550. ฐานข้อมูลโรคพืชที่สำคัญในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก : โรคพืชวงศ์แตง. ศูนย์พันธุ์กรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 81 หน้า.

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

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

Denis, P. 1994. Diseases of vegetable crops. Department of Primary Industries. Australia 164 pp.

[http:// www.doa.go.th/fcri/images/files/Soybean/chapter,2,3,4 pdf.](http://www.doa.go.th/fcri/images/files/Soybean/chapter,2,3,4.pdf)