# รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

**1. ชุดโครงการวิจัย** วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

**2. โครงการวิจัย** วิจัยการกักกันพืช

**กิจกรรม** การศึกษาศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับพืชนำเข้า

**3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ทานตะวันที่นำเข้าจากต่างประเทศ

**ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)** Study on Quarantine Pests Associated with Imported Sunflower Seeds

**4. คณะผู้ดำเนินงาน**


| | | |
|---|---|---|
| **หัวหน้าการทดลอง** | ศรีวิเศษ เกษสังข์ | สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช |
| **ผู้ร่วมงาน** | วันเพ็ญ ศรีชาติ | สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช |
| | ชลธิชา รักใคร่ | สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช |
| | วานิช คำพานิช | สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช |


**5. บทคัดย่อ**


ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) มีศัตรูพืชที่เข้าทำลายส่วนต่างๆ ของทานตะวันมีศัตรูพืชทั้งสิ้น 250 ชนิด คือ จัดเป็นแมลง 120 ชนิด ไรและแมงมุม 2 ชนิด ไส้เดือนฝอย 12 ชนิด เชื้อรา 40 ชนิด แบคทีเรีย 11 ชนิด ไวรัส 5 ชนิด วัชพืช 58 ชนิด และหอยทาก 1 ชนิด และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์ทานตะวันในห้องปฏิบัติการ โดยการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน ที่นำเข้าระหว่างเดือน ตุลาคม 2554 – กันยายน 2556 จาก 9 ประเทศได้แก่ อาร์เยนตินา ออสเตรเลีย อินเดีย สาธารณรัฐประชาชนจีน ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา สเปนและเยอรมัน รวม 69 ตัวอย่างมาทำการตรวจสอบศัตรูพืช เบื้องต้นด้วยสายตา ( Visual inspection) และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเมล็ดทานตะวันที่นำเข้า 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 และเมื่อติดตามตรวจสอบโรคและศัตรูพืชในท้องที่จังหวัด สระบุรี และลพบุรี ตรวจพบโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Alternaria tenuis* โรคราแป้งข้าว เกิดจากเชื้อรา *Oidium* sp. และโรคราสนิมที่เกิดจากเชื้อรา *Puccinia* sp.และในแปลงปลูกจังหวัดเชียงใหม่ ตรวจพบอาการต้นเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และอาการใบด่าง ซึ่งศัตรูพืชที่พบในเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าและตรวจพบในแปลงปลูกไม่ใช่เชื้อโรคและศัตรูพืชที่สำคัญทางกักกันพืชของประเทศไทย

**6. คำนำ**

พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 กำหนดให้เมล็ดพันธุ์ทานตะวัน สิ่งกำกัด (Restricted material) ในการนำเข้ามายังประเทศไทยต้องแจ้งการนำเข้า ณ ด่านตรวจพืชนำเข้า และมีใบรับรองสุขอนามัยพืช ( Phytosanitary Certificate) จากประเทศต้นทางกำกับมาพร้อมกับหนังสือรับรองว่าไม่เป็นพืชติดต่อสารพันธุกรรม(Non – $GMO_s$ Certificate) เมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า โดยไม่มีมาตรการสุขอนามัยกำหนดไว้แต่อย่างใด การนำเข้าสินค้าเกษตรจากต่างประเทศ มีโอกาสที่ศัตรูพืชหลายชนิดที่อาจเป็นศัตรูพืชกักกันที่ร้ายแรงหรือศัตรูพืชที่สำคัญที่ก่อความเสียหายกับผลิตผลทางการเกษตรติดเข้ามากับเมล็ดพืชด้วย โดยอาจเป็นศัตรูพืชร้ายแรงที่ไม่มีปรากฏในประเทศไทย โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ติดมากับทานตะวันซึ่งมีการนำเข้ามาเพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ในการส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูกกระจายทั่วประเทศไทย โดยในแต่ละปีมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์เหล่านี้ในปริมาณมาก ในปี พ.ศ. 2555และ 2556 มีการนำเข้าทั้งหมด 286.56 ตันและ116.34 ตัน ตามลำดับหากศัตรูพืชที่ร้ายแรงซึ่งยังไม่มีรายงานในประเทศไทยติดมากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวสามารถเข้ามาเจริญและแพร่พันธุ์ได้ในประเทศไทย จะก่อให้เกิดผลกระทบทำความเสียหายต่อการเกษตรในประเทศและกระทบต่อการส่งออกพืชผักผลไม้ไทยไปยังต่างประเทศที่มีความเข้มงวดด้านกักกันพืช ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทำการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับพืชนำเข้า เพื่อให้ทราบชนิด แหล่งที่มา การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศคู่ค้า และเส้นทางการเข้ามาของศัตรูพืช ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นฐานข้อมูลการตรวจพบศัตรูพืช มีประโยชน์ใช้อ้างอิงทางวิชาการนำมาพิจารณาหามาตรการเพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชชนิดนั้น ๆ และกำหนดเป็นมาตรการทางด้านกฎหมายและทางวิชาการในการควบคุมการนำเข้า หรือเปลี่ยนแปลงสถานภาพของพืชนำเข้าให้เป็นสิ่งต้องห้ามหรือสิ่งกำกัดตามพระราชบัญญัติกักพืชต่อไป

**7. 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 อินเตอร์เน็ต เพื่อค้นหาข้อมูลของทานตะวันลักษณะทั่วไปของพืช สายพันธุ์ พื้นที่การเพาะปลูก รายชื่อของประเทศที่ประเทศไทยมีการการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ ปริมาณการนำเข้า ข้อมูลชนิดของศัตรูพืชทั้งนอกประเทศและในประเทศ

**2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการกับเมล็ดพันธุ์**ทานตะวันที่**นำเข้าจากต่างประเทศ**

ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ทานตะวันที่นำเข้าจากต่างประเทศมาทำการตรวจวินิจฉัยโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อตรวจหาตัวอ่อน หนอน แมลง เมล็ดวัชพืช หรือลักษณะเมล็ดที่แสดงอาการผิดปกติที่อาจมีสาเหตุจากเชื้อโรค 2.2 การสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association, 1999) และตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์นำเข้า

2.2.1 การตรวจสอบเชื้อรา

1) การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะยังไม่งอก (Dry seed examination)

โดยตรวจสอบลักษณะอาการโรคและส่วนขยายพันธุ์เชื้อราหรือศัตรูพืชอื่นๆ ซึ่งปะปนมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยตาเปล่าหรือตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope เช่นเมล็ดพันธุ์มีรูปร่างผิดปกติหรืออาจติดมา ภายในเมล็ดพันธุ์โดยไม่แสดงอาการ รวมทั้งอาจติดมากับเศษพืชในลักษณะเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์เช่น Pycnidia เป็นต้น

2) การตรวจสุขภาพเมล็ดพันธุ์พืชขณะเมล็ดงอก (Germinated seed examination)

สุ่มตัวอย่างเมล็ดตามวิธีการมาตรฐาน ในปริมาณที่เหมาะสมวิเคราะห์โดยสุ่มแยกตามสายพันธุ์ มาตรวจสอบด้วยวิธี Blotter method โดยวางเมล็ดลงบนกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จำนวน 3 แผ่นที่ชุ่มน้ำซึ่งวางอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน 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

ในกรณีที่เชื้อติดมาในปริมาณมากจะสามารถแยกเชื้อจากเมล็ดโดยตรงหลังจากทำการแยกเชื้อด้วยวิธี Blotter method ได้ หรือทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคจากเมล็ดโดยตรงด้วยวิธี Dilution plate โดยสุ่มเมล็ดตามมาตรฐาน นำมาแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที ล้างตามด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองภายในตู้เขี่ยเชื้อ เมื่อได้เมื่อเมล็ดแห้ง

แล้วจึงนำไปบดละเอียดด้วยเครื่องบด แล้วนำผงของเมล็ดใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (0.85% NaCl) หรือบัฟเฟอร์ จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยวางบนเครื่องเขย่า จากนั้นนำมาทำให้เจือจางเป็น $10^{-1}$, $10^{-2}$, $10^{-3}$, $10^{-4}$ และ $10^{-5}$ ตามลำดับ ใช้ไปเปตต์ดูด suspension แต่ละความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วใช้แท่งแก้วลนไฟฆ่าเชื้อ spread ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 วัน จึงนำมาตรวจหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปจำแนกชนิดต่อไป

2) แยกเชื้อจากต้นกล้าซึ่งแสดงอาการผิดปกติ

โดยการเพาะเมล็ดในดินนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 100 เมล็ดต่อถาดเพาะเมล็ด และเก็บถาดเพาะเมล็ดที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส รดน้ำเช้าเย็นในโรงเรือนสถานกักพืช ของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช เมื่อต้นกล้าออกใบจริง 1-2 ใบ ให้สังเกตลักษณะอาการผิดปกติของพืช หรืออาจใช้ถุงพลาสติกที่ฉีดพ่นน้ำคลุมให้ความชุ่มชื้นเป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตลักษณะอาการผิดปกติบนใบ กิ่ง ลำต้น โค่นต้น และราก เก็บส่วนของพืชที่สงสัยไปแยกเชื้อด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

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

2.2) วิธี Tissue transplanting ตัดใบพืชบริเวณรอยต่อส่วนที่เป็นโรคโรคและปกติเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2-3 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรอง ภายในตู้เขี่ยเชื้อแล้ววางชิ้นพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA หรืออาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเฉพาะเจาะจง (semiselective media) นำจานเลี้ยงเชื้อไปเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาตรวจสอบหาโคโลนีเชื้อแบคทีเรียเก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจนครบ 3-5 วัน เพื่อตรวจหาโคโลนีของแบคทีเรียชนิดอื่น จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และนำไปศึกษาคุณลักษณะเพื่อจำแนกชนิดต่อไป

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

1. ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย โดยบันทึกลักษณะและสีของโคโลนี ตรวจสอบรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงหรือกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

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 หากพบอาการเซลล์ตายแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช

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

5. ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัย (Pathogenicity test) โดยเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้น $10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ปลูกเชื้อตามอาการของโรคของเชื้อที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุโรค เช่นปลูกเชื้อโดยฉีดเข้าในลำต้น หรือฉีดพ่นกับใบเลี้ยงหรือเนื้อใบของต้นกล้าทานตะวัน ฉีดพ่นน้ำให้ความชุ่มชื้นคลุมด้วยถุงพลาสติกและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ตรวจลักษณะอาการโรคหลังปลูกเชื้อ 3-5 วัน จากนั้นนำใบเป็นโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อสาเหตุที่ทำให้พืชเป็นโรคเป็นชนิดเดียวกับที่แยกได้ในครั้งแรกหรือไม่

6. การตรวจสอบด้วยวิธี ELISA เป็นวิธีการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา ปัจจุบันใช้ชุดตรวจสอบของ Agdia นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวและนำมาทำการตรวจสอบตามขั้นตอนที่แนะนำ

2.2.3 การตรวจสอบเชื้อไวรัส

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

2) ปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ (Infectivity test) เตรียมน้ำคั้นพืชสำหรับทดสอบโดยบดใบพืชที่แสดงอาการผิดปกติในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ตรวจสอบเชื้อไวรัสใช้ 0.1 M phosphate buffer pH 7.0) โดยใช้ใบพืชหนัก 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร ในสภาพเย็น จากนั้นใช้สำลีหรือนิ้วที่สะอาดจุ่มน้ำคั้นพืชทาลงบนใบพืชทดสอบ 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 แน่นอน และยังสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก วิธีการที่นำมาใช้เป็นแบบ Indirect ELISA ทำการบันทึกผล

**3. การติดตามตรวจสอบโรคและศัตรูพืชในแปลงปลูกทานตะวันในท้องที่ภาคกลางและภาคเหนือ**

ทำการติดตามตรวจสอบต้นพืชที่มีการนำเมล็ดพันธุ์นำเข้าไปเพาะปลูกในแปลงปลูกทานตะวันในท้องที่ภาคกลางและภาคเหนือ โดยสังเกตอาการผิดปกติของต้นพืชทั้ง โคนต้น ราก ลำต้น ใบและดอกของพืช และทำการเก็บตัวอย่างอาการดังกล่าว นำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและกล้องจุลทรรศน์

กำลังขยายสูง แยกเชื้อ จัดจำแนกชนิดของเชื้อ และทดสอบการเกิดโรคกับพืชในห้องปฏิบัติการเพื่อทำการวินิจฉัยเชื้อโรคศัตรูพืชอย่างละเอียด เช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 2

**4. การบันทึกข้อมูลการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ทานตะวันที่นำเข้าจากต่างประเทศและการตรวจพบโรคและศัตรูพืชที่ตรวจพบในแปลงปลูก และสรุปผลการศึกษาการเป็นศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช**

โดยการจัดทำรายชื่อโรคและศัตรูพืชที่ตรวจพบในห้องปฏิบัติการจากเมล็ดพันธุ์นำเข้าโรคและศัตรูพืชที่ตรวจพบในแปลงปลูกทานตะวันและสรุปผลทดลอง

- เวลาและสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2554 – กันยายน 2556

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ด่านตรวจพืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร และแปลงปลูกทานตะวันในท้องที่ภาคเหนือและภาคกลาง

**8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง**

**1. การรวบรวมข้อมูลทั่วไปของทานตะวันและข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศเปรียบเทียบกับศัตรูพืชในประเทศ**

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 อาร์เยนตินา ออสเตรเลีย อินเดีย สาธารณรัฐประชาชนจีน ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา สเปนและเยอรมัน รวมเป็นปริมาณทั้งหมด 345.08 ตันดำเนินการสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจสอบศัตรูพืช จำนวน 69 ตัวอย่าง

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

**2. การตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการกับเมล็ดพันธุ์ทานตะวันนำเข้าจากต่างประเทศ**

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

จากการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากทุกประเทศในเบื้องต้น พบว่าเมล็ดพันธุ์สมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช

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

เมล็ดพันธุ์ทานตะวันที่นำเข้าจาก 9 ประเทศ ได้แก่ อาร์เจนตินา ออสเตรเลีย สาธารรัฐ-ประชาชนจีน เยอรมัน อินเดีย ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ สเปน และ สหรัฐอเมริกา จำนวน 69 ตัวอย่าง มาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน เมล็ดสมบูรณ์ สะอาด ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืชและจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบเชื้อจำนวน 9 ชนิดได้แก่ *Alternaria tenuis, Alternaria raphani, , Cladosporium* sp., *Ulocladium* sp., *Fusarium semitectum*, *Chaetomium* sp. *Curvularia pallescens* และ *Streptomyces* sp. แต่จากการนำเมล็ดพันธุ์ทานตะวันมาตรวจด้วยวิธี Dilution technique ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่น่าสงสัยจะเป็นเชื้อก่อโรคกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว และเมื่อปลูกสังเกตอาการของโรคบนต้นพืชในโรงเรือน (Seedling symptom test) ไม่พบอาการผิดปกติกับต้นทานตะวันลักษณะต้นเจริญสมบูรณ์ไม่แสดงอาการโรคพืช

**3. การติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ทานตะวันในท้องที่ภาคกลางและภาคเหนือ**

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

**4. การบันทึกข้อมูลการตรวจวินิจฉัยโรคและศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์นำเข้าและการตรวจพบศัตรูพืชในแปลงปลูกและสรุปผลการศึกษาการเป็นศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกันพืช**

การจัดทำรายชื่อโรคและศัตรูพืชที่ตรวจพบเมล็ดพันธุ์ทานตะวันที่นำเข้าจากต่างประเทศ และจากการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกทานตะวัน

**ตารางที่ 1** ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ทานตะวันที่นำเข้าจากต่างประเทศ (ระหว่าง เดือน ตุลาคม 2554- กันยายน 2555)

| ลำดับที่ | ประเทศ | ปริมาณ (กก.) | จำนวนตัวอย่าง | ด่านตรวจพืช | เชื้อโรคศัตรูพืชที่ตรวจพบ |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | อาร์เยนตินา | 80,040.00 | 7 | ลาดกระบัง | *Alternaria tenuis* 1.21 %<br>*Ulocladium* sp. 0.28 % |
| | | 10.35 | 6 | สุวรรณภูมิ | - |
| **2** | ออสเตรเลีย | 115,814.00 | 2 | ท่าเรือกรุงเทพฯ | *Alternaria tenuis* 2.0 % |
| **3** | สาธารณรัฐประชาชนจีน | 1,300.00 | 1 | ท่าเรือกรุงเทพฯ | *Alternaria tenuis* 20.0 %<br>*Chaetomium* sp. 2.5 %<br>*Curvularia pallescens* 2.0%<br>*Streptomyces* sp. 0.3% |
| **4** | เยอรมัน | 1.353 | 1 | ไปรษณีย์ | - |
| **5** | อินเดีย | 89,356.00 | 5 | ท่าเรือกรุงเทพฯ | - |
| **6** | ญี่ปุ่น | 0.40 | 4 | ไปรษณีย์ | *Alternaria tenuis* 6.0 % |
| **7** | สหรัฐอเมริกา | 32.00 | 4 | สุวรรณภูมิ | - |
| **รวม 7 ประเทศ** | | **286,554.10** | **30** | | |

**ตารางที่ 2** ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ทานตะวันที่นำเข้าจากต่างประเทศ (ระหว่าง เดือน ตุลาคม 2555- กันยายน 2556)

| ลำดับที่ | ประเทศ | ปริมาณ (กก.) | จำนวนตัวอย่าง | ด่านตรวจพืช | เชื้อโรคศัตรูพืชที่ตรวจพบ |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | อาร์เยนตินา | 70,008.00 | 5 | ลาดกระบัง | - |
| | | 13.26 | 2 | สุวรรณภูมิ | *Alternaria tenuis* 4.6 %<br>*Alternaria raphani* 0.3 %<br>*Cladosporium* sp. 3.3 %<br>*Ulocladium* sp. 1.6 % |
| 2 | ออสเตรเลีย | 27,921.00 | 8 | ท่าเรือกรุงเทพฯ | *Alternaria tenuis* 4.6 %<br>*Fusarium semitectum* 0.30 % |
| 3 | สาธารณรัฐประชาชนจีน | 2,000.00 | 1 | ท่าเรือกรุงเทพฯ | - |
| 4 | เยอรมัน | 0.654 | 1 | ไปรษณีย์ | - |
| 5 | อินเดีย | 8.00 | 1 | สุวรรณภูมิ | - |
| | | 27,632.00 | 3 | แหลมฉบัง | - |
| 6 | ญี่ปุ่น | 30.774 | 10 | ไปรษณีย์ | *Alternaria tenuis* 16.0%<br>*Ulocladium* sp. 17.0 % |
| 7 | เนเธอร์แลนด์ | 27.75 | 2 | สุวรรณภูมิ | *Alternaria tenuis* 33.5 % |
| 8 | สเปน | 10.00 | 2 | สุวรรณภูมิ | - |
| 9 | สหรัฐอเมริกา | 27.00 | 2 | สุวรรณภูมิ | *Alternaria tenuis* 29.0 % |
| | | 9..071 | 2 | ท่าเรือกรุงเทพฯ | *Alternaria tenuis* 2.0 % |
| **รวม 9 ประเทศ** | | **116,339.509** | **39** | | |

**9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ**

เมล็ดพันธุ์ทานตะวันที่นำเข้าจาก 9 ประเทศ ได้แก่ อาร์เจนตินา ออสเตรเลีย สาธารณรัฐ-ประชาชนจีน เยอรมัน อินเดีย ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ สเปน และ สหรัฐอเมริกา มาทำการตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้นด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืช หรือร่องรอยของเชื้อโรคศัตรูพืช และจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคและศัตรูพืชขั้นละเอียดกับเมล็ดพันธุ์ทานตะวันในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Blotter method พบเชื้อรา จำนวน 9 ชนิดได้แก่ *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 และ จากการติดตามตรวจสอบศัตรูพืชในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์ทานตะวันในท้องที่จังหวัด สระบุรี และลพบุรี ตรวจพบโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Alternaria tenuis* โรคราแป้งข้าว เกิดจากเชื้อรา *Oidium* sp. และโรคราสนิมที่เกิดจากเชื้อรา *Puccinia* sp.และในแปลงปลูกจังหวัดเชียงใหม่ ตรวจพบอาการต้นเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และอาการใบด่าง ซึ่งเชื้อโรคและศัตรูพืชที่พบดังกล่าวไม่จัดเป็นศัตรูพืชกักกัน

**10. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์**

- ได้ข้อมูลศัตรูพืช และตัวอย่างศัตรูพืชที่เก็บไว้เป็นหลักฐานทางวิชาการ
- ได้ข้อมูลชนิดและตัวอย่างพืช ที่ถูกต้อง ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้สามารถนำเป็นแนวทางการป้องกันการแพร่ระบาดของศัตรูพืชได้ และการจัดทำรายชื่อพืชศัตรูพืชของประเทศไทยที่ถูกต้อง โดยกรมวิชาการเกษตรสามารถนำข้อมูลไปใช้ในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในสินค้าเกษตรนำเข้า การกำหนดชนิดพืชห้ามนำเข้าเพื่อป้องกันมิให้มีการนำเข้าพืชที่อาจก่อให้เกิดความเสียหายกับประเทศไทยต่อไป

**11. ขอบคุณ**

ขอขอบคุณ คุณชัยรัตน์ หมั่นการ คุณวิภา เกิดพิพัฒน์ คุณอรนุช นาคะโร คุณยุทธนา ประมาณ คุณวิชาญ สมาธิ คุณสุธรรม คงเอียด คุณจิรวัฒน์ ไกรนรา คุณชลิตา ดาหาญ และคุณอัญชลี ราศรี ตลอดจนเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ด่านตรวจพืชไปรษณีย์ ด่านตรวจพืชลาดกระบัง และด่านตรวจพืชแหลมฉบัง สำนักควบคุมพืชและ-วัสดุการเกษตรและน้องๆ ในห้องปฏิบัติการที่ช่วยสนับสนุนในการทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

**12. 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 Mycoflara of Sunflower and Control of Seed borne Pathogens. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology, 6 : 210-211.

Ellis, M.B. 1971. Dematacеous 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.