

คู่มือการจัดการ

**ศูนย์เก็บรักษาตัวอย่าง
งโรคพืช**

**“ข้อมูลที่ไม่มีการนำไปใช้ประโยชน์เป็นข้อมูลที่ไม่มี
ค่า.”**

**R.W.G. Dennis, in *British Ascomycetes* (1968),
J. Cramer, Lehre, G**

คำนิยม

คณะผู้จัดทำขอขอบคุณ Dr. John Alcorn ที่ได้ตรวจแก้ไขต้นฉบับ”
คู่มือการจัดการ ศัตรูเก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช” นี้ ขอขอบคุณ Australian
Agency for International Development (AusAID)
ที่ได้ให้การสนับสนุนงบประมาณในการจัดทำคู่มือ ขอขอบคุณ Mr Eli
Szandala, Office of the Chief Plant Protection Officer, Australian Government
Department of Agriculture, Fisheries and Forestry,
ที่ทำหน้าที่ประสานงานจนเอกสารนี้สำเร็จลงด้วยดี

วิธีการต่าง ๆ
ที่ได้กล่าวถึงในคู่มือนี้ได้รวบรวมจากคณะผู้ร่วมประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง
“Herbaria Manual Reference Group Meeting” ซึ่งได้จัดขึ้นเมื่อวันที่ 20
พฤศจิกายน 2547 ณ โรงแรมโลตัสปางสวนแก้ว อำเภอเมือง
จังหวัดเชียงใหม่ คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ

ดร.ศรีสุข พูนผลกุล คุณศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช ดร. พรพิมล อธิปัญญาคม
คุณวุฒิศักดิ์ บุตรธนู จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและ สหกรณ์ ประเทศไทย Dr Kartini
Kramadibrata (Bogor, Indonesia), Dr. Lee Su See (Kepong, Malaysia), Dr.
Hien Thuy Phan (Hanoi, Vietnam), และ Mr Eli Szandala (Canberra, Australia)
ที่ได้ให้ข้อมูลอันเป็นประโยชน์ยิ่งต่อคู่มือฉบับนี้

ผู้เขียนต้นฉบับ

Dr Roger Shivas and Dr Dean Beasley, Plant Pathology Herbarium,
Queensland Department of Primary Industries and Fisheries, Australia

ผู้ให้ข้อมูลและตรวจแก้ไขต้นฉบับ

Dr John Thomas and Dr Andrew Geering, Virology, Queensland Department of
Primary Industries and Fisheries, Australia

Dr Ian Riley, Nematologist, The University of Adelaide, South Australia,
Australia

ผู้แปลและเรียบเรียงเป็นภาษาไทย

ดร.ศรีสุข พูนผลกุล คุณศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช และ ดร.พรพิมล

อธิปัญญาคม

ISBN 0-9751686-8-1

ความหมายอักษรย่อ

AMV	Alfalfa Mosaic Virus
ACIAR	Australian Centre for International Agricultural Research
ASEAN	Association of Southeast Asian Nations
ASEANET	The Southeast Asian LOOP of BioNET International
AusAID	Australian Agency for International Development
BO	Herbarium Bogoriense
BRIP	Queensland Plant Pathology Herbarium
DAFF	Department of Agriculture Fisheries and Forestry
DAR	New South Wales Plant Pathology Herbarium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GA	Glycerol Agar
GBIF	Global Biodiversity Information Facility
GPS	Global Positioning System
KBA	King's B Agar
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IJSB	International Journal of Systematic Bacteriology
IJSEM	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
IMI	CABI Bioscience, UK Centre
IPPC	International Plant Protection Convention
ISPM	International Standard for Phytosanitary Measures
LNYSV	Lettuce Necrotic Yellowing Virus
MEA	Malt Extract Agar
MTA	Material Transfer Agreement
NA	Nutrient Agar
NSW	New South Wales
OCPPPO	Office of the Chief Plant Protection Officer
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PEMV	Pea Enation Mosaic Virus
PRA	Pest Risk Analysis
PRSV	Papaya Ringspot Virus
QDPIF	Queensland Department of Primary Industries and Fisheries
RIRDC	Rural Industries Research and Development Corporation
RNA	Ribonucleic Acid
SEM	Scanning Electron Microscope
SPA	Sucrose Peptone Agar
SPS	Sanitary and Phytosanitary
SCBV	Sugarcane bacilliform virus
SWG	Standard Weight Gauge
TMV	Tobacco Mosaic Virus
TSWV	Tomato Spotted Wilt Virus
TWA	Tap Water Agar
UV	Ultra Violet
VIDE	Virus Identification Data Exchange
WFCC	World Federation for Culture Collections
WTO	World Trade Organization

คำนำ

การจัดทำ *คู่มือการจัดการศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช* ฉบับนี้ ได้รับการสนับสนุนจาก Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry (DAFF). โดยมีจุดประสงค์เพื่อให้ นักวิชาการและผู้ที่เกี่ยวข้องในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิก ใช้เป็นคู่มือเพื่อการอ้างอิงในการเพิ่มประสิทธิภาพและส่งเสริมศักยภาพในการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืชและตัวอย่างโรคพืชเพื่อสนับสนุนในด้านการค้าผลผลิตทางการเกษตร

จากเหตุผลที่องค์การค้าโลก (WTO) ได้ออกมาตรการควบคุมการค้าเสรี เมื่อปี ค.ศ. 1995 เกี่ยวข้องกับมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (SPS Agreement) ทำให้ตลาดการค้าขายผลผลิตทางการเกษตรขยายกว้างขวางขึ้น ขณะเดียวกันประเทศที่พัฒนาหลายประเทศใช้มาตรการนี้กำหนดให้ประเทศกำลังพัฒนาแสดงรายละเอียดของสุขอนามัยพืช ซึ่งพบว่าประเทศกำลังพัฒนาขาดแคลนข้อมูลด้านแมลงและโรคพืช ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการอธิบายสถานภาพศัตรูพืชทางการเกษตรและป่าไม้ ปัญหาที่ตามมาคือ NPPO ไม่สามารถจัดทำ การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชที่ทันสมัยและได้รับความเชื่อถือได้ ถ้าสถานการณ์เป็นเช่นนี้ต่อไป ประเทศที่กำลังพัฒนาในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิกก็จะเสียโอกาสในการเจรจาต่อรองการค้าของสินค้าการเกษตรของประเทศนั้น ๆ

ภายใต้เงื่อนไขความตกลงของมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช ข้อ 9 กำหนดให้ประเทศที่พัฒนางานให้ความช่วยเหลือแก่ประเทศที่กำลังพัฒนาในการเสริมสร้างขีดความสามารถในส่วนที่เกี่ยวข้องกับความตกลงในมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชฉบับนี้ ประเทศออสเตรเลียเป็นประเทศหนึ่งที่ได้ตอบสนองต่อการลงนามนี้หลายประการ รวมทั้งโครงการความช่วยเหลือในภูมิภาคและประเทศคู่ค้า โดยเงินสนับสนุนของรัฐบาลประเทศออสเตรเลีย (AusAID) กิจกรรมที่ช่วยเหลือมีน่านับประการ รวมทั้งการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชที่อ้างอิงได้ จากตัวอย่างศัตรูพืชที่เก็บรวบรวมไว้ ซึ่ง Office of the Chief Plant Protection

Officer

ภายใน

DAFF

มีจุดประสงค์ให้ความช่วยเหลือแก่ประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นหลัก

โครงการนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อเสริมสร้างสมรรถนะของนักวิทยาศาสตร์ในด้านที่เกี่ยวข้องดังนี้

- การสำรวจศึกษาความอยู่รอดของศัตรูพืช
- การวินิจฉัยศัตรูพืช
- การเก็บรักษาตัวอย่างศัตรูพืช
- การจัดการและการดูแลศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างศัตรูพืช
- การจัดการและเก็บรักษาฐานข้อมูล

คู่มือการจัดการศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช

ฉบับนี้

ได้อธิบายวิธีการและเทคนิคที่จำเป็นสำหรับงานวิจัยด้านโรคพืช

ตลอดจนข้อมูลสำคัญของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีผลทางเศรษฐกิจ

การเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคพืชจากแปลงปลูก

และการเก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช

ตลอดจนข้อมูลประกอบพร้อมทั้งเกร็ดความรู้ในการจัดการศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืชและจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช

ซึ่ง

คู่มือการจัดการศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช

ได้ถูกแปลเป็นภาษาไทย

ภาษาเวียดนาม

และภาษาบาฮาซา

เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อนักวิจัยและบุคคลทั่วไปในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

Lois Ransom

Chief Plant Protection Officer

Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry

สารบัญ

คำนิยม.....	3
ความหมายอักษรย่อ	4
คำนำ.....	5
สารบัญ	7
บทที่ 1 บทนำ.....	10
1.1 ความตกลงระหว่างประเทศ (International obligations).....	11
1.2 สถานภาพของศูนย์เก็บรักษาทางชีววิทยาในภูมิภาคเอเชีย (The status of biological collections in ASEAN countries)	12
1.3 ความสำคัญของฐานข้อมูลที่อ้างอิงด้วยตัวอย่างพืช (The importance of specimen-based records)	13
1.4 การสร้างศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืชในประเทศต่าง ๆ ของภูมิภาคเอเชีย (Building and Populating Plant Disease Herbarium in ASEAN Countries)	14
บทที่ 2 ศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช	15
2.1 ศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช (Herbaria).....	15
2.2 ศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชที่มีชีวิต (Culture collections).....	16
2.3 การก่อตั้งศูนย์เก็บรักษาตัวอย่าง (Establishing a collection).....	16
2.4 บัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest lists).....	17
บทที่ 3 การจัดตั้งสถานที่เก็บตัวอย่างโรคพืช.....	23
3.1 การเพิ่มปริมาณตัวอย่างในสถานที่เก็บตัวอย่าง (Populating a collection) ..	23
3.2 การเก็บตัวอย่างจากแปลงปลูก (Collection of specimens from the field)...	24
3.3 การเก็บและดูแลตัวอย่างโรคพืช (Handling specimens).....	27
3.3.1 การเก็บตัวอย่าง ใบ ลำต้นและผล.....	28
3.3.2 การเก็บตัวอย่างรากพืชและตัวอย่างดิน	31
3.3.3 การเก็บรากขนาดใหญ่.....	32
3.4 การบันทึกตัวอย่าง (Labeling specimens).....	33
3.5 การสำรวจและสุ่มเก็บตัวอย่าง (Surveys and sampling)	34
บทที่ 4 การวินิจฉัยตัวอย่างโรคพืช	36
4.1 การย้อมสีราและแบคทีเรีย (Staining fungi and bacteria).....	36
4.2 กล้องจุลทรรศน์ (Light Microscopy).....	39
4.3 การถ่ายภาพ (Photography)	42
4.3.1 การทำชื่อแฟ้มภาพและการจัดการ	42
บทที่ 5 การแยกรา แบคทีเรีย และไส้เดือนฝอย	44

5.1	วิธีการแยกรา (Isolation of fungi)	46
5.1.1	การเก็บตัวอย่างในสภาพชื้น (Moist chamber)	48
5.1.2	การแยกราโดยวิธี (Dilution techniques)	49
5.2	การแยกแบคทีเรีย (Isolation of bacteria)	52
5.3.1	การแยกไส้เดือนฝอยจากดิน (Soil samples)	56
5.3.2	การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างพืช (Plant samples)	60
5.3.3	การเก็บรักษาและการทำสไลด์ถาวร (Preservation and mounting)	62
5.4	อาหารเลี้ยงเชื้อ (Growth media)	64
บทที่ 6 การเก็บรักษาและรวบรวมตัวอย่างโรคพืช		69
6.1	ตัวอย่างแห้งโรคพืช (herbarium specimens)	69
6.1.1	ตัวอย่างที่ทำแห้ง (Dried specimens)	69
6.1.2	ตัวอย่างต้นแบบ (Type Specimens)	72
6.1.3	ตัวอย่างราแห้ง (Dried Cultures)	73
6.1.4	การทำสไลด์ถาวร (Microscope slides)	74
6.1.5	การบรรจุและการขนส่ง (Packing and transport)	75
6.2	การรักษาสภาพตัวอย่างรามีชีวิต (Cultures)	76
6.2.1	การเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Growth on agar)	77
6.2.2	การเก็บรักษาในน้ำมัน (Under mineral oil)	77
6.2.3	การเก็บรักษาในน้ำ (Water storage)	78
6.2.4	การแช่แข็งด้วยความเย็น (Freezing dry)	78
6.2.5	การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในดิน (Soil storage)	79
6.2.6	การเก็บรักษาจุลินทรีย์ใน Silica gel (Silica gel storage)	79
6.2.7	การเก็บรักษารอบกระดาษกรอง (Filter paper storage)	80
6.2.8	การเก็บรักษาจุลินทรีย์ภายใต้ความเย็นยิ่งยวด (Cryopreservation)	80
6.2.9	การเก็บรักษาเชื้อภายใต้ไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen)	80
บทที่ 7 การจำแนกเชื้อสาเหตุโรคพืช		82
7.1	การจำแนกราสาเหตุโรคพืช (Fungi)	82
7.1.1	ราที่ทำลายระบบราก (Root pathogens)	83
7.1.2	ราที่ทำลายลำต้น (Stem Pathogens)	84
7.1.3	ราที่ทำลายใบ (Leaf pathogens)	85
7.1.4	ราที่ทำลายผลและเมล็ด (Fruit and seed pathogens)	89
7.1.5	ราสนิม (Rust fungi)	90
7.1.6	ราเขม่าดำ (Smut)	92
7.2	การจำแนกแบคทีเรีย (Bacteria)	94
7.3	การจำแนกไฟโตพลาสมา (Phytoplasmas)	97
7.4	การจำแนกชนิดไวรัสและไวรอยด์ (Viruses and Viroids)	98
7.4.1	ชนิดของไวรัสและการบันทึกข้อมูล (Virus species and records)	99
7.4.2	ลักษณะอาการที่เกิดจากไวรัส (Virus symptoms)	101
7.5	ไส้เดือนฝอย (Nematodes)	106
7.5.1	เหตุผลของการการจำแนกไส้เดือนฝอย (Need for identification)	107

7.5.2	ความแตกต่างของไส้เดือนฝอยศัตรูพืช (Distinguishing plant parasitic nematodes)	107
7.5.3	การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอย (Species identification)	108
7.6.1	การใช้กล้องจุลทรรศน์สแกนนิ่งอิเล็กตรอน (Scanning electron microscope).....	109
7.6.2	การใช้เทคนิคชีวเคมีและชีวโมเลกุล (Biochemical and molecular techniques)	110
7.6.3	วิธีการเซรุ่มวิทยา (Serology/Immunology).....	111
7.6.4	วิธีการตรวจสอบลำดับกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid based methods)....	111
บทที่ 8	การรักษาฐานข้อมูลตัวอย่าง	113
8.1	ระบบฐานข้อมูล (Databases).....	113
บทที่ 9	การดูแลรักษาศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช	116
9.1	สิ่งอำนวยความสะดวกของศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างแห้งโรคพืช (Herbarium facilities)	116
9.2	การควบคุมแมลงปีกแข็ง (Control of herbarium beetles).....	116
9.3	การควบคุมไรศัตรูเชื้อจุลินทรีย์ (Control of culture mites).....	117
9.4	การขอยืมตัวอย่างโรคพืช (Loans).....	119
9.4	การรักษาความปลอดภัย (Security)	121
บทที่ 10	บรรณานุกรม (Selected literature).....	123

บทที่ 1

บทนำ

(Introduction)

ความสำคัญของการเก็บตัวอย่างทางชีววิทยารวมทั้งการเก็บตัวอย่างโรคพืชและจุลินทรีย์ ได้มีการบันทึกและได้มีการตีพิมพ์ในเอกสารวิชาการและบทความต่าง ๆ ไว้มากมาย ในเอกสารเรื่อง *Mutual Responsibilities of Taxonomic Mycology and Plant Pathology* (1975) นั้น Walker ได้อ้างอิงถึงเอกสารมากกว่า 18 เรื่อง ถึงการจำแนกชนิดจุลินทรีย์ว่าควรจัดอยู่ในชีววิทยาประยุกต์ และยังกล่าวถึงความสำคัญของการจำแนกและงานด้านโรคพืช เอกสารเหล่านี้จะช่วยสนับสนุนงานด้านการเก็บรักษาตัวอย่างโรคพืชและการจำแนกเชื้อสาเหตุได้หรือไม่และอย่างไร ในประเทศออสเตรเลียศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืชส่วนใหญ่จะอยู่ภายใต้การดูแลของรัฐบาล แต่ดูเหมือนว่าจะไม่ได้รับความสนใจเท่าที่ควร

การที่รัฐบาลไม่เห็นความสำคัญของศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างทางชีววิทยา อาจเนื่องมาจากนักอนุกรมวิธานไม่เห็นความสำคัญของผู้ใช้ประโยชน์จากตัวอย่างเหล่านั้น Walker (1975)

ได้กล่าวไว้ตอนหนึ่งในหนังสือของเขาว่า ". นักอนุกรมวิธาน ไม่คำนึงถึงงาน และความต้องการของนักโรคพืชและนักวิจัยด้านชีววิทยาประยุกต์ และบางคนไม่สนใจงานวิจัยด้านชีววิทยา" จากการเกิดการค้าเสรีภายใต้ WTO ในปี 1995

ได้ใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชขึ้นมาเป็นข้อต่อรองทางการค้าสินค้าเกษตร รัฐบาลประเทศต่าง ๆ ถูกกดดันให้ยึดหลักความตกลงว่าด้วยการใช้บังคับด้านมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures¹; SPS Agreement)

เพื่อเพิ่มความได้เปรียบในการแข่งขันและเปิดตลาดการค้าที่ถูกปิดเพราะเหตุผลทางการกักกันศัตรูพืชและเพื่อยกเลิกสินค้าที่มีความเสี่ยงต่อการเกษตรภายในประเทศ มาตรการ SPS Agreement นี้ ยึดหลักการทางวิทยาศาสตร์และการประเมินความเสี่ยงเพื่อปกป้องอุตสาหกรรม

¹ Sanitary and Phytosanitary (SPS) Measures

เป็นมาตรฐานหรือการควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ สารพิษ

โลหะหนักและผลตกค้างจากสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช และปราศจากแมลง วัชพืชและเชื้อโรคพืช

กษตรจากศัตรูพืชที่ไม่เคยมีมาก่อน (exotic pests²) และในขณะเดียวกันก็สนับสนุนการค้าสินค้าเกษตร มาตรการ SPS Agreement นี้ทำให้สมาชิกมีการจัดการสินค้าเกษตรบนพื้นฐานสุขอนามัยและความปลอดภัย ด้วยความโปร่งใสและสามารถตรวจสอบทางเทคนิคได้

1.1 ความตกลงระหว่างประเทศ (International obligations)

The International Plant Protection Convention (IPPC) และ SPS Agreement ได้กำหนดความตกลงการส่งสินค้าไปยังต่างประเทศว่าจะต้องมีบัญชีรายชื่อศัตรูพืชประกอบไปด้วย ซึ่งรวมไปถึง

- IPPC
จะสนับสนุนทางด้านเทคนิคและข้อมูลสถานภาพศัตรูพืชที่ประเทศส่งออกจะต้องจัดทำ
- ตามความตกลงภายใต้ SPS Agreement ข้อ 6.3 บันทึกไว้ว่า “สมาชิกผู้ส่งออกอ้างถึงสินค้าว่าปราศจากศัตรูพืชและโรคพืช หรืออ้างว่ามีระดับศัตรูพืชต่ำ หากประเทศผู้นำเข้าต้องการตรวจสอบ ประเทศผู้ส่งออกต้องดำเนินการตามที่ประเทศนำเข้าต้องการด้วยการตรวจสอบ การทดลอง และวิธีการอื่น ๆ “
- ตามความตกลงของ SPS Agreement ข้อ Annex B ย่อหน้า 3(b) บันทึกไว้ว่า “สมาชิกต้องมีคำตอบต่อคำถามของประเทศนำเข้าเพื่อความมั่นใจ ในขั้นตอนของการควบคุมและการตรวจสอบศัตรูพืช การผลิตพืชและวิธีการกักกันศัตรูพืช การควบคุมวิธีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช และการตรวจสอบเพื่อรับรองอาหาร ว่ามีการปฏิบัติจริงในประเทศผู้ส่งออก

ประเทศต่าง ๆ จำเป็นต้องมีข้อมูลศัตรูพืชที่เชื่อถือได้ เพื่อสามารถนำมาใช้วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และเพื่อจัดทำแผนการควบคุมสุขอนามัยพืช ตลอดจนแผนการป้องกันศัตรูพืชเข้าประเทศและการแพร่กระจายของศัตรูพืช

² ‘pest’ หมายความว่ารวมถึง แมลง เชื้อโรคพืชและไส้เดือนฝอย

จากเอกสาร ISPM หมายเลข 8 บันทึกไว้ว่า “ข้อมูลศัตรูพืชและการประเมินศัตรูพืชที่เชื่อถือได้จะเป็นองค์ประกอบที่สำคัญต่อกิจกรรมต่าง ๆ ภายใต้ IPPC และภายใต้ ISPM No. 1: *Principles of plant quarantine as related to international trade* และ ISPM ที่ใช้ปฏิบัติร่วมกัน

ISPM 8 บันทึกไว้ว่า “ทุกประเทศควรมีข้อมูลสถานภาพศัตรูพืชเพื่อ

- ใช้วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช
- ใช้จัดทำแผนการจัดการศัตรูพืชระดับภูมิภาค ระดับชาติ และระดับประเทศ
- ใช้จัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช
- ใช้จัดทำและรักษาพื้นที่ปราศจากศัตรูพืช (Pest free areas)

ประเทศที่ทำการค้าเสรี ภายใต้ข้อตกลง WTO ต้องยินยอมปฏิบัติตามเงื่อนไขของ IPPC และ WTO ภายใต้มาตรการ SPS Agreement ถ้าต้องการวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืชที่ติดไปกับสินค้าเกษตร หน่วยงานกักกันศัตรูพืชของประเทศสมาชิกจะต้องมีศักยภาพในการดำเนินการได้

1.2 สถานภาพของศูนย์เก็บรักษาทางชีววิทยาในภูมิภาคเอเชีย (The status of biological collections in ASEAN countries)

ระหว่างปี 2001 - 2002 หน่วยงาน Australian Agency for International Development (AusAID) ได้จัดการประชุม ASEANET³ LOOP (Locally Organised and Operated Partnership) ครั้งที่ 2 ขึ้นและมีการสนับสนุนให้จัดตั้งศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างแมลงและตัวอย่างโรคพืชในประเทศภูมิภาคเอเชียหลายประเทศ

³ ASEANET is the Southeast Asian LOOP of BioNET INTERNATIONAL, a body that works collaboratively to develop self-reliance in taxonomy and biosystematics.

คณะทำงานได้ตรวจสอบศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างศัตรูพืชในประเทศภูมิภาคเอเชีย
และพบว่าไม่มีประเทศใดเลยที่สามารถให้ข้อมูลสถานภาพสุขอนามัยพืชได้
ครบถ้วน
เนื่องจากตัวอย่างโรคพืชที่เก็บรักษาไว้มีจำนวนน้อยกว่าตัวอย่างแมลง
และนักกีฏวิทยามีความสามารถในการเก็บรักษาตัวอย่างแมลงและมีการจัดการ
ศูนย์รวบรวมตัวอย่างแมลงได้ดีกว่า

1.3 ความสำคัญของฐานข้อมูลที่อ้างอิงด้วยตัวอย่างพืช (The importance of specimen-based records)

ข้อมูลของศัตรูพืชและจุลินทรีย์โรคพืชได้มีการบันทึกไว้ในแหล่งข้อมูลต่าง ๆ ซึ่งข้อมูลเหล่านั้นมีระดับความน่าเชื่อถือแตกต่างกัน
อย่างไรก็ตามในการค้าสากลข้อมูลที่ปรากฏบนกระดาษบันทึกข้อมูลที่เก็บไว้
กับตัวอย่างศัตรูพืชที่ดูแลโดยเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เก็บรักษาตัวอย่าง
เป็นข้อมูลศัตรูพืชที่เชื่อถือได้มากที่สุด
ตัวอย่างโรคพืชและกระดาษบันทึกข้อมูลที่มีรายละเอียดเช่น สถานที่เก็บ
วันที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ ชื่อพืชอาศัย และการจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุ
จะเป็นข้อมูลที่สำคัญ ศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืชที่มี
ตัวอย่างศัตรูพืชจำนวนมาก ตัวอย่างโรคพืชที่มีสาเหตุชนิดเดียวกัน
เมื่อพบบนพืชอาศัยหลายชนิด และเก็บจากหลายท้องถิ่น
จะใช้ข้อมูลนี้ตรวจสอบชนิดเชื้อสาเหตุ
และได้ข้อมูลการแพร่กระจายของจุลินทรีย์โรคพืช
ในทางกลับกันเอกสารที่ไม่มีตัวอย่างศัตรูพืชเก็บไว้
จะเป็นเอกสารที่ไม่มีคุณค่าและเป็นเครื่องกีดขวางการค้าระหว่างประเทศ
การรายงานที่ผิดพลาดจะทำให้การตรวจสอบและพิสูจน์สถานภาพศัตรูพืช
ลำบากและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง ตัวอย่างที่เก็บอย่างถูกต้อง
มีการบันทึกข้อมูลที่ดี และเก็บไว้ในสถานที่ปลอดภัย
สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการต่อรองในการทำ market access
และการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช

1.4 การสร้างศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืชในประทศต่าง ๆ ของภูมิภาคเอเชีย (Building and Populating Plant Disease Herbarium in ASEAN Countries)

การสร้างศูนย์รวบรวมตัวอย่างจะเกิดขึ้นได้ถ้านักโรคพืชทราบถึงความจำเป็น
ของศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช
รัฐบาลประเทศออสเตรเลียได้เห็นความสำคัญของเรื่องนี้
จึงได้จัดฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ
โดยมีเป้าหมายให้ความรู้แก่นักวิชาการและผู้บริหารได้รับทราบถึงความสำคัญ
ของตัวอย่างโรคพืชที่มีบทบาทต่อการค้าระหว่างประเทศ
การฝึกอบรมนี้มีจุดมุ่งหมายให้นักวิชาการฝึกฝนวิธีการเก็บตัวอย่าง
การรักษาและดูแลตัวอย่าง
วิธีการส่งตัวอย่างไปยังศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช
เอกสารวิชาการเล่มนี้เป็นข้อมูลที่ช่วยนักโรคพืชที่ปฏิบัติงานในศูนย์เก็บรักษา
ตัวอย่างโรคพืชได้เป็นอย่างดี
ตลอดจนเป็นเอกสารอ้างอิงที่เป็นประโยชน์ต่อผู้ดูแลศูนย์ตัวอย่างโรคพืชให้
สืบค้นข้อมูลเพิ่มเติมได้ต่อไป

บทที่ 2 ศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช (Plant Pathogen Collections)

2.1 ศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช (Herbaria)

ศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช เป็นสถานที่เก็บรักษา และรวบรวมตัวอย่างของโรคพืชเก็บแห้ง โดยการอัดทับให้เรียบร้อย หรือตัวอย่างราที่เก็บรักษาไว้แบบถาวรพร้อมกับข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่างนี้ ศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างพืชทั่วไป มีการเก็บรักษาตัวอย่างโรคพืชและราไว้ไม่มากนัก

ศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช ยังมีการเก็บตัวอย่างของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ได้แก่ รา แบคทีเรีย ไวรัส ไวรอยด์ ไล้เดือนฝอย ไฟโตพลาสมาและริคเกตเซีย ไว้ควบคู่กันนักอนุกรมวิธาน นักโรคพืช นักวิชาการสุขอนามัยพืช นักวิชาการกักกันพืช นักชีววิทยา และนักกฎหมาย กลุ่มบุคคลเหล่านี้จะเป็นผู้ใช้ข้อมูลราสาเหตุโรคพืชและตัวอย่างแห้งโรคพืช เพื่อประกอบการทำงาน

ตลอดจนงานด้านความปลอดภัยและความหลากหลายทางชีวภาพ

ศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืชที่รู้จักกันทั่วไปใช้ อักษรย่อ ได้แก่ Herbarium Bogoriense (BO) และ CABI Bioscience, UK Centre (IMI) ตัวอย่างที่เก็บรักษาและรวบรวมไว้จะต้องมีรหัสเลขหมายและอักษรย่อของพิพิธภัณฑ์กำกับไว้ด้วย รหัสเลขหมายที่กำหนดนี้สามารถนำไปเพิ่มในเอกสาร *Index Herbariorum*

ซึ่งเป็นเอกสารที่ตีพิมพ์รหัสเลขหมายของตัวอย่างโรคพืชไว้แล้วมากกว่า 3,000 ตัวอย่างจากพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืชทั่วโลก

ซึ่งมีเจ้าหน้าที่ปฏิบัติงานอยู่มากกว่า 9,000 คน รหัสเลขหมายของตัวอย่างโรคพืชนี้ สามารถสืบค้นข้อมูลได้จากเว็บไซต์ [<http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp>]

โดยเลือกสืบค้นจาก สถาบัน คำย่อของพิพิธภัณฑ์ เลขหมายสมาชิก และชื่อโครงการ *Index Herbariorum* นั้นเป็นโครงการความร่วมมือระหว่าง International Association for Plant Taxonomy และ The New York Botanical Garden.

2.2 ศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชที่มีชีวิต (Culture collections)

ศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชจะรวบรวมและเก็บรักษาตัวอย่างรากและแบคทีเรียที่มีชีวิตในสภาพที่สามารถนำกลับมาศึกษาได้อีกในอนาคต

วิธีการเก็บรักษาโดยการเลี้ยงจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชให้เจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง

หรือเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชในลักษณะที่เชื้อลดกิจกรรมภายในตัวเชื้อนั้น The World Federation for Culture Collections (WFCC) [www.wfcc.info] เป็นหน่วยงานที่มีบทบาทเกี่ยวกับการรวบรวม การรับรอง การเก็บรักษา และการแจกจ่ายจุลินทรีย์และเซลล์มีชีวิต โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการส่งเสริมและสนับสนุนกิจกรรมของศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์ ตลอดจนการให้บริการสายพันธุ์จุลินทรีย์และข้อมูลที่เกี่ยวข้อง เพื่อให้เกิดการติดต่อเชื่อมโยง

และเป็นเครือข่ายของข้อมูลระหว่างหน่วยงานที่มีการเก็บรักษาและรวบรวมจุลินทรีย์

และผู้ที่ใช้ประโยชน์และเพื่อการอนุรักษ์จุลินทรีย์ให้มีชีวิตอยู่ได้ยั่งยืน

หน่วยงาน WFCC แห่งนี้

ได้จัดทำฐานข้อมูลของแหล่งกำเนิดจุลินทรีย์ทั่วโลกไว้ที่ the National Institute of Genetics ในประเทศญี่ปุ่น โดยรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์อยู่เกือบ 500 ตัวอย่าง จาก 62 ประเทศ ข้อมูลประกอบด้วยวิธีการเก็บรักษา การจัดการ การบริการ และข้อมูลต่าง ๆ ของจุลินทรีย์

2.3 การก่อตั้งศูนย์เก็บรักษาตัวอย่าง (Establishing a collection)

ตัวอย่างแห่งโรคพืชและตัวอย่างจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชมีความแตกต่างกันในด้านการดูแลรักษา

นักวิจัยของศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืชจะต้องปฏิบัติงานกับตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดควบคู่กันไป

แต่ในหน่วยงานอาจมีนักวิจัยที่ปฏิบัติงานเฉพาะตัวอย่างชนิดใดชนิดหนึ่ง อย่างไรก็ตามทั้ง

หน่วยงานควรมีความเชื่อมโยงติดต่อกันอย่างใกล้ชิดทั้งระดับประเทศและระดับภูมิภาค

ศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช และจุลินทรีย์
ต้องมีอุปกรณ์พื้นฐานที่จำเป็นต่อการปฏิบัติงานในศูนย์ทั้ง 2
ดังแสดงไว้ในภาพที่ 1 โดยมีหน่วยงานบริหารและบริการร่วมกัน เช่น
การใช้ฐานข้อมูลของสิ่งที่ได้รวบรวมไว้ เป็นต้น

2.4 บัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest lists)

บัญชีรายชื่อศัตรูพืช
เป็นข้อมูลศัตรูพืชและโรคพืชที่เข้าทำลายพืชอาศัยแต่ละพืช
ในแต่ละประเทศ หรือแต่ละภูมิภาค
ข้อมูลเหล่านี้มีความสำคัญเนื่องจากเกี่ยวข้องกับสุขอนามัยของพืชอาหาร
ป่าไม้ สิ่งแวดล้อม และสิ่งมีชีวิตที่มีการนำเข้าและส่งออก ประเทศต่าง ๆ
ที่จะส่งสินค้าไปต่างประเทศจะต้องจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชนี้

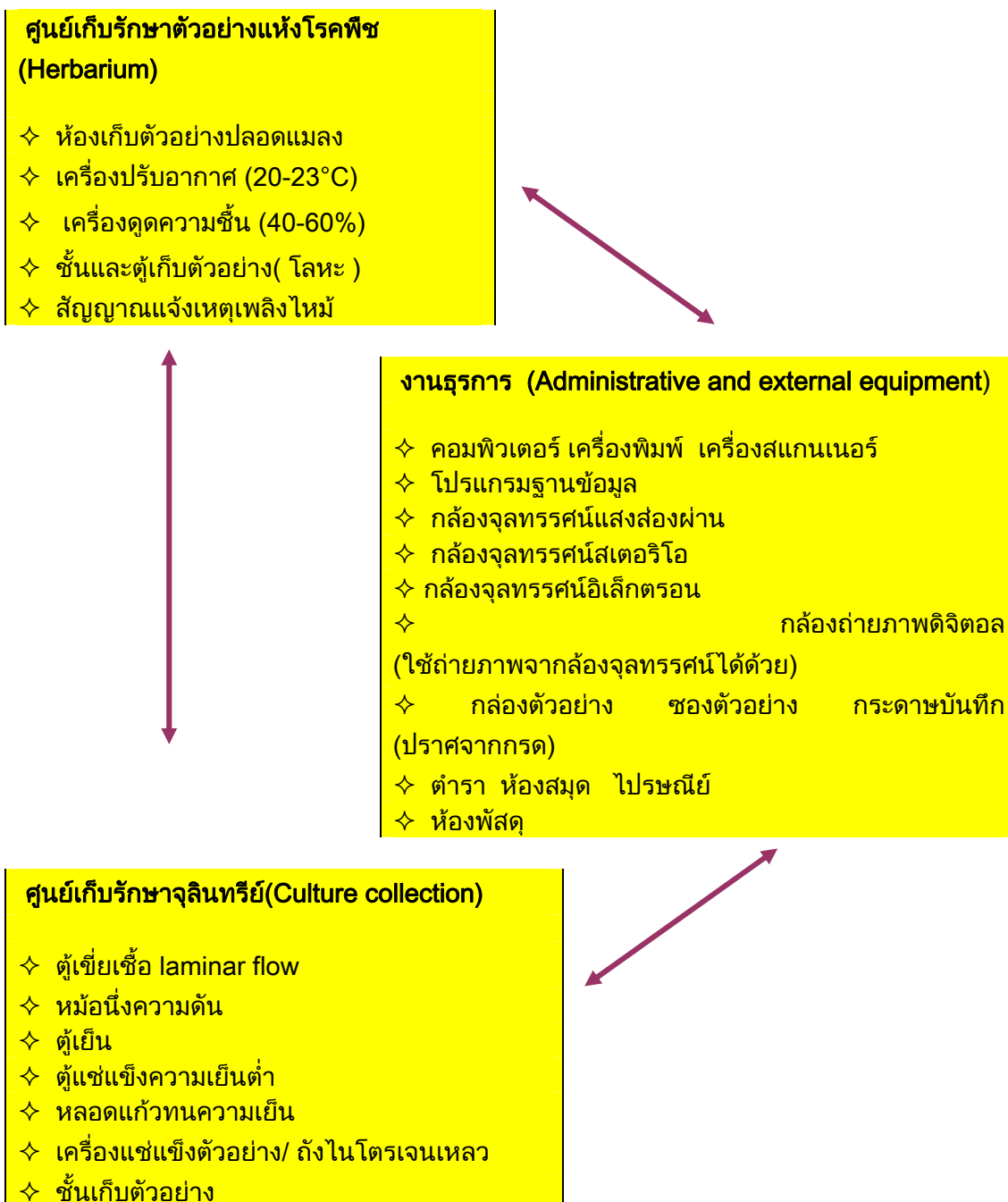
ความน่าเชื่อถือของบัญชีรายชื่อขึ้นอยู่กับตัวอย่างโรคพืชและจุลินทรีย์สาเหตุ
โรคพืชที่มีอยู่จริง ในขณะที่บัญชีรายชื่อที่ไม่น่าเชื่อถือ
ได้แก่บัญชีรายชื่อที่ไม่มีตัวอย่างจริงเป็นหลักฐาน
เป็นเพียงรายชื่อที่ปรากฏในตำรา หรือเอกสารต่าง ๆ ของสถาบันเท่านั้น
นอกจากนั้นความน่าเชื่อถือยังประกอบด้วยสมรรถนะของผู้เก็บรวบรวม
ผู้วินิจฉัยตัวอย่าง วิธีการจำแนก และความน่าเชื่อถือของเอกสารเผยแพร่
ซึ่งเอกสารที่ได้ตีพิมพ์ในวารสารระหว่างประเทศจะมีความน่าเชื่อถือกว่า
(ภาพที่ 2)

ผู้ใช้บัญชีรายชื่อศัตรูพืชจะเป็นผู้กำหนดรูปแบบของบัญชีรายชื่อ ภาพที่ 3
แสดงให้เห็นตัวอย่างรายละเอียดของบัญชีรายชื่อ
ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์โรคพืชและพืชอาศัยในแต่ละท้องถิ่น
พร้อมทั้งชื่อสามัญของ โรคนั้น ๆ

บัญชีรายชื่อได้มาจาก

- การสำรวจศัตรูพืช
- ตัวอย่างโรคพืชที่มีการรวบรวมไว้
- ตัวอย่างที่ได้รับการดูแลอย่างดีในศูนย์เก็บรักษาตัวอย่าง
หรือพิพิธภัณฑ์

- การสำรวจโดยมีการวางแผนการสำรวจในพื้นที่เป้าหมายของพืชที่ต้องการ
- ความร่วมมือระหว่างหน่วยงานต่าง ๆ
- ความมั่นใจในการรวบรวมข้อมูลตามมาตรฐาน ISPM 8



ภาพที่ 1

อุปกรณ์ที่จำเป็นในศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างแห้งโรคพืชและพิพิธภัณฑ์เชื้อจุลินทรีย์

แหล่งข้อมูลที่เชื่อถือได้ (ตามลำดับความน่าเชื่อถือ)

1. ตัวอย่างศัตรูพืชของกรมวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยเกษตร มหาวิทยาลัย และหน่วยงานต่าง ๆ
2. ข้อมูลปฐมภูมิจากเอกสาร : วารสารวิทยาศาสตร์ รายงานผลการวิจัย หนังสือ รายงานศัตรูพืช จากหน่วยงานกักกันศัตรูพืช เอกสารจากหน่วยวิจัยศัตรูพืชและกักกันพืช
3. ข้อมูลทุติยภูมิจากตำรา : หนังสือรวบรวมรายชื่อศัตรูพืชของ CABI
4. รายงานที่มีการอ้างอิงไม่ชัดเจน : รายงานการประชุม แผ่นพับ เอกสารวิเคราะห์ความเสี่ยง ศัตรูพืช
5. ข้อมูลจากแหล่งอื่น ๆ : คำปรึกษาจากผู้เชี่ยวชาญจากในและต่างประเทศ หนังสือพิมพ์รายงานในอินเทอร์เน็ต

ภาพที่ 2 แหล่งข้อมูลสำหรับใช้ในการทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช

CARICACEAE

Carica papaya L. (Pawpaw)

Alternaria tenuis Nees – Leathery fruit spot.

Ascochyta caricae Pat. – Black spot.

Botryosphaeria rhodina (Berk. & M.A. Curt.) Arx – Fruit rot.

Colletotrichum acutatum J.H. Simmonds – Ripe fruit spot.

Corynespora cassiicola (Berk. & M.A. Curt.) C.T. Wei – Leaf spot.

Glomerella cingulata (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk – Ripe fruit spot.

Macrophomina phaseolina (Tassi.) Goid. – Stem girdling.

Phytophthora cinnamomi Rands – Root rot.

Sclerotium rolfsii Sacc. – Damping off.

Thanatephorus cucumeris (A.B. Frank) Donk – Damping off.

Verticillium dahliae Kleb. – Wilt.

ภาพที่ 3 ตัวอย่างบัญชีรายชื่อโรคของมะละกอ

การจัดทำและเพิ่มข้อมูลในบัญชีรายชื่อศัตรูพืชในอดีตทำได้ยาก
เนื่องจากข้อมูลการจัดกระจายอยู่ในแหล่งเก็บตัวอย่างโรคพืชของหน่วยงาน
ต่าง ๆ ดังนี้

- กรมวิชาการเกษตร กรมป่าไม้
- พิพิธภัณฑ์ประวัติศาสตร์
- ศูนย์วิจัยการเกษตรต่าง ๆ
- สถาบันวิจัย และมหาวิทยาลัย

ข้อมูลที่เก็บไว้ในศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช
และศูนย์รวบรวมตัวอย่างจุลินทรีย์
ที่จะเป็นประโยชน์ต่อผู้อื่นต้องเป็นข้อมูลที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูลที่สมบูรณ์
และง่ายต่อการค้นหาโดยผ่านทางเครื่องมือสื่อสารอิเล็กทรอนิกส์
ปัจจุบันระบบสารสนเทศมีส่วนเพิ่มความสะดวกและรวดเร็ว
และโปรแกรมที่ใช้ในการบันทึกข้อมูลมีราคาค่อนข้างถูก
แต่การเพิ่มเติมข้อมูลลงในฐานข้อมูลจะเสียค่าใช้จ่ายสูง
ในระยะแรกการพัฒนาฐานข้อมูลมีความล่าช้าและข้อมูลที่ได้มีปัญหา
การพัฒนาข้อมูลต้องทำอย่างต่อเนื่อง
และในการบันทึกข้อมูลต้องพิจารณาคุณภาพและปริมาณของข้อมูล
ในสถาบันหลายแห่งให้ความสำคัญมากในด้านการจัดจำแนกจุลินทรีย์
ทั้งด้านการบันทึกข้อมูล
และการตรวจสอบตัวอย่างที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้
นอกจากนี้แต่ละประเทศควรจัดทำมาตรฐานของฐานข้อมูลศัตรูพืชให้เป็นมา
ตรฐานสากล ตามแบบของ IPCC (ISPM 8)
ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานของการจัดทำรายชื่อศัตรูพืช (ภาพที่ 4)

รายละเอียดการข้อมูลศัตรูพืช

1. ชื่อวิทยาศาสตร์ของศัตรูพืช
2. วงจรชีวิต
3. อนุกรมวิธาน
4. วิธีการจำแนก (และชื่อผู้จำแนก)
5. วันที่เก็บตัวอย่าง
6. สถานที่เก็บ

สถานที่ (ตำบล อำเภอ จังหวัด) ประเทศ

ตำแหน่งพิกัดของสถานที่เก็บตามค่า GPS

7. ชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชอาศัย
8. ส่วนที่พืชอาศัยถูกทำลาย
9. การแพร่ระบาด
10. เอกสารอ้างอิง

ภาพที่ 4 รายละเอียดการบันทึกข้อมูลศัตรูพืช (ดัดแปลงจาก ISPM 8)

บางประเทศไม่มีหน่วยงานที่รับผิดชอบข้อมูลสุขอนามัยพืชโดยตรง ทำให้การถ่ายทอดข้อมูลเป็นไปด้วยความลำบาก เนื่องจากศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช กระจายอยู่ในหน่วยงานหลายหน่วยงาน และแต่ละหน่วยงานให้ความสำคัญต่อข้อมูลสุขอนามัยพืชแตกต่างกัน คุณภาพของข้อมูลจึงมีความหลากหลาย ปัจจุบันเทคโนโลยีสารสนเทศได้มีการพัฒนาอย่างมากทำให้ปัญหาเหล่านี้ลดลง การส่งข้อมูลผ่านเครือข่ายทำให้สามารถเชื่อมโยงข้อมูลระหว่างกันได้ หรืออีกนัยหนึ่ง เทคโนโลยีสารสนเทศทำให้เกิดฐานข้อมูลเดียวที่สามารถเพิ่มเติมข้อมูลให้ทันสมัย ตลอดจนสามารถควบคุมการเผยแพร่ข้อมูลได้โดยการเข้ารหัสผ่าน ผู้ใช้สามารถค้นหาข้อมูลได้จากการสืบค้นจากชื่อของตัวอย่างจะได้ข้อมูลของแหล่งแพร่ระบาดและพืชอาศัย

ระบบฐานข้อมูลที่มีประสิทธิภาพในการเก็บข้อมูลของสถาบันต่าง ๆ จะประกอบด้วย

- สถาบันที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการรวบรวมตัวอย่างโรคพืช
มีข้อมูลบรรจุอยู่ในฐานข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ที่เชื่อมต่อกับอินเทอร์เน็ตได้
- ข้อมูลที่มีอยู่สามารถปรับให้เข้ากับโปรแกรมที่ใช้เชื่อมโยงกับแ
หลังฐานข้อมูลอื่น ๆ ได้
- สถาบันต่าง ๆ
พร้อมที่จะแลกเปลี่ยนข้อมูลและมีข้อตกลงร่วมกันที่จะรักษาระบบ
เครือข่ายและเป็นส่วนหนึ่งของเครือข่าย
ตลอดจนมาตรฐานของข้อมูลที่ได้ตกลงกันไว้

บทที่ 3

การจัดตั้งสถานที่เก็บตัวอย่างโรคพืช

(How to establish collections)

3.1 การเพิ่มปริมาณตัวอย่างในสถานที่เก็บตัวอย่าง (Populating a collection)

แหล่งของตัวอย่างโรคพืช เริ่มต้นจากนักวิจัยที่เกี่ยวข้องกับงานสุขอนามัยพืช ทำหน้าที่ตรวจวินิจฉัยโรคพืชในห้องปฏิบัติการ ส่วนใหญ่เป็นนักวิชาการจากกรมวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยทางการเกษตร หรือนักวิจัยในมหาวิทยาลัยต่าง ๆ ตัวอย่างโรคพืชที่ได้จากแปลงปลูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างที่ได้จากการออกไปสำรวจ มักถูกส่งไปวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ ซึ่งตัวอย่างเหล่านี้จะได้รับการพิจารณาว่าสมควรเก็บรักษาไว้ต่อไปหรือไม่ ตัวอย่างทุก ๆ ตัวอย่างที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นข้อมูลใหม่ ทั้งชนิดของเชื้อสาเหตุ พืชอาศัยหรือท้องที่การพบโรคใหม่ สมควรได้รับการเก็บรักษาไว้ในสถานที่เก็บตัวอย่างที่ได้รับการยอมรับ สถานที่เก็บตัวอย่างบางแห่งมีเจ้าหน้าที่ทำการตรวจวินิจฉัยโรคพืชได้ และเกือบทุกแห่งมีผู้เชี่ยวชาญที่สามารถจำแนกและจัดกลุ่มเชื้อสาเหตุได้

ตัวอย่างโรคพืชส่วนใหญ่ได้มาจากนักวิชาการและนักศึกษาในมหาวิทยาลัย และนักวิจัยจากศูนย์วิจัยต่าง ๆ
ตัวอย่างที่นำมาเผยแพร่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารต่าง ๆ
จะต้องระบุสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง
ตัวอย่างโรคพืชเหล่านี้จะเป็นหลักฐานที่เชื่อถือได้ในการตรวจสอบกลับของเชื้อสาเหตุของตัวอย่างดังกล่าว
ตลอดจนสามารถใช้สืบค้นข้อมูลของการสำรวจและการศึกษา
(ด้านนิเวศวิทยา ระบาดวิทยา การจัดกลุ่มทางพันธุกรรม
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวโมเลกุล)

เมื่อตัวอย่างเพิ่มมากขึ้น ทำให้ตัวอย่างมีซ้ำกัน
จึงมีการแลกเปลี่ยนกันระหว่างสถานที่เก็บตัวอย่าง
นอกจากนี้ตัวอย่างที่เพิ่มขึ้นอาจได้มาจาก การขอยืม การซื้อขาย

และได้รับเป็นของขวัญ

กรณีสถานที่เก็บรักษาไม่สามารถจัดเก็บตัวอย่างได้ดีพอหรือสถานที่เก็บไม่พอเพียง

จะมีการนำตัวอย่างไปฝากยังสถานที่เก็บอื่นที่เหมาะสมในการรักษาตัวอย่างโรคพืชที่มีคุณค่าและเป็นตัวอย่างที่ไม่สามารถหาพบได้อีก

3.2 การเก็บตัวอย่างจากแปลงปลูก (Collection of specimens from the field)

ตัวอย่างโรคพืชส่วนใหญ่ได้มาจากแปลงปลูกพืช ทั้งแปลงเกษตรกรหรือพืชที่ขึ้นตามธรรมชาติ พืชเป็นโรคสังเกตได้จากลักษณะอาการ (symptom) ที่ปรากฏบนส่วนของพืช และลักษณะของเชื้อสาเหตุ (sign) ที่เกิดขึ้นบนอาการของโรคพืชนั้น ๆ (ตารางที่ 1)

ลักษณะอาการของโรคอาจเป็นผลมาจากความสามารถในการสังเคราะห์แสงของพืชลดลง การให้ผลผลิต การดูดน้ำลดลง และการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารของพืชถูกขัดขวาง

ลักษณะของเชื้อโรคพืช ที่ปรากฏให้เห็น (Sign) เช่น
ส่วนขยายพันธุ์ของจุลินทรีย์
ส่วนที่ใช้ผลิตและปลดปล่อยสปอร์ ลักษณะที่พบทั่วไปได้แก่

- Ascomata, acervuli, pycnidia
ส่วนขยายพันธุ์มีลักษณะพิเศษ
- Conidiophores
ก้านชูสปอร์
- Basidiocarp
ส่วนขยายพันธุ์ของรากลุ่มเห็ด
- Mycelium (เส้นใย)
เป็นกลุ่มของเส้นใยของรา
- Ooze(เมือก)
เป็นของเหลว เหนียวข้น
ที่ถูกปล่อยออก
มาจาก บาดแผล หรือรอยเปิดบนต้นพืช
- Rhizomorph
เส้นใยของราที่เป็นเส้นยาว (มักมีสีดำ)

ชื่อของอาการ	ลักษณะที่ปรากฏ
แอนแทรคโนส (Anthracnose)	อาการสีดำ รอยแผลแสดงอาการตาย เชื้อสาเหตุได้แก่ <i>Colletotrichum</i>
ราดำ (Black mildew)	เส้นใยของรา เป็นกลุ่มสีดำฟูขึ้นมาเหนือผิวพืช มักพบบนใบของพืชในเขตร้อนชื้น ราสาเหตุอยู่ในกลุ่ม Meliolales
อาการไหม้ (Blight)	เนื้อเยื่อพืชตายรวดเร็ว
แคงเกอร์ (Canker)	รอยแผลยุบตัวลง มักพบบนลำต้น กิ่งก้านและรากพืช
ต้นกล้าเมื่องอกพ้นผิว (Damping off)	อาการเน่าคอดินต้นกล้าแสดงอาการเน่าระดับผิวดิน ดิน ยุบตัวหรือตายเกิดจากรา <i>Pythium</i> และ <i>Rhizoctonia</i>
อาการตายจากปลายยอด (Die back)	พืชแสดงอาการใบร่วงบางส่วน กิ่ง ก้านพืชบางส่วนตาย หรือตายทั้งต้น
ราน้ำค้าง (Downy Mildew)	เส้นใยสีขาวฟูบนใบ หรือลำต้น เนื่องจากก้านชูสปอร์และสปอร์ของราในกลุ่ม Peronosporales
อาการพอง (Enation)	เนื้อเยื่อพืชส่วนเล็ก ๆ บริเวณเส้นใบหรือเส้นบนกลีบดอก พองขึ้นมาจากผิวพืชปกติ ลักษณะเป็นตุ่มแบน
Fasination	ยอดแตกเป็นฝอย ยอดโค้งงอเป็นแผ่นบาง ๆ หรือยอดหัก
อาการบวม (Gall)	เนื้อเยื่อพืชขยายใหญ่ผิดปกติ
ยางไหล (Gummosis)	ยางของต้นพืชไหลซึมออกมาจากลำต้น
รอยแผล (Lesion)	เนื้อเยื่อพืชผิดปกติมีขอบเขตชัดเจน
อาการด่าง (Mosaic)	ลักษณะปื้นสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้มบนใบ อาการจากไวรัส
พุ่มไม้กวาด (Phyllody)	กลีบดอกเปลี่ยนรูปเป็นลักษณะคล้ายใบ
ราแป้ง (Powdery Mildew)	ลักษณะคล้ายผงแป้งสีขาวบนผิวด้านบนของใบ ซึ่งเป็น ส่วนของเส้นใย ก้านชูสปอร์ (conidiophore) และสปอร์ (conidia) ของราในอันดับ Erysiphales

แผลจุดนูน (Pustule)	รอยแผลนูนเกิดจากผิวพืชบริเวณที่ราด้นออกมา
โรคราปม (root-knot)	อาการรากบวมหรือเป็นปมเกิดจากไส้เดือนฝอย <i>Meloidigyne</i>
เน่า (Rot)	เนื้อเยื่อพืชเน่า และสลายตัวเนื่องจากเอนไซม์ที่เชื้อสาเหตุ ผลิตขึ้น(อาจพบว่าผิวพืช แข็ง นุ่ม แห้ง เปื่อย สีดำหรือสีขาว)
ราสนิม (Rust)	รอยแผลแตกลักษณะนูนขึ้นเนื่องจากราสนิม (Uredinales)
สแคป (Scab)	รอยแผลแตก ขรุขระนูนขึ้นมาบนผิวพืชมีลักษณะเป็นสะเก็ด
ตายนิ่ง (Scald)	เนื้อเยื่อพืชมีลักษณะคล้ายถูกน้ำร้อนลวก
รอยแผลกระสุน (Shothole)	อาการบนใบพืชบริเวณที่เนื้อเยื่อพืชถูกทำลายและ หลุดร่วงออกจากเนื้อใบ เกิดเป็นช่องว่างวงกลม
ราเขม่าดำ (Smut)	กลุ่มสปอร์สีดำบนใบพืช ลำต้นและดอก ที่เกิดจากรา เขม่าดำ (<i>Ustilago scitaminea</i>)
ราดำ (Sooty Mold)	แผ่นของเส้นใยราที่สานตัวกันบนผิวใบพืช หรือกิ่ง ก้านพืช อาศัยอาหารจากมูลของแมลง (กลุ่มเพลี้ยอ่อน หรือเพลี้ยแป้ง)
อาการเหี่ยว	อาการเหี่ยวเกิดจากใบหรือลำต้นขาดน้ำ ทำให้ใบ
(wilt)	สูญเสียความเต่งและเหี่ยวเนื่องจากราเจริญเติบโตอยู่ใน ระบบท่อน้ำท่ออาหารของพืช
อาการต่างเขี้ยว (Virescence)	รอยแผลสีเขียวปรากฏบนส่วนที่ของพืชที่ไม่มีสีเขียว โดยเฉพาะเกิดบนดอก
พุ่มแฉ่ พุ่มไม้กวาด (witches' broom)	ตาดอกและตายอดแตกแขนงมากผิดปกติ

ตารางที่ 1 ลักษณะอาการของโรคและคำอธิบาย

3.3 การเก็บและดูแลตัวอย่างโรคพืช (Handling specimens)

ตัวอย่างโรคพืช สามารถใช้เป็นตัวอย่างเพื่อการวินิจฉัยโรค หรือเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุ ดังนั้นการตัดสินใจเลือกเก็บตัวอย่างก็มีความสำคัญ ตัวอย่างพืชที่ดีควรเป็นตัวอย่างที่เริ่มแสดงอาการของโรค และเชื้อสาเหตุยังมีชีวิตอยู่ ตัวอย่างพืชที่เป็นโรครุนแรงมักพบว่าไม่สามารถแยกเชื้อสาเหตุได้ เนื่องจากจะพบเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ขึ้นปะปนบนส่วนที่ถูกทำลาย ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับลักษณะอาการและสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคมมีความสำคัญ และเพิ่มความมั่นใจในการเลือกส่วนของพืชที่จะเก็บเป็นตัวอย่าง เช่น โรคเหี่ยวที่อาการปรากฏทางใบ แต่เชื้อสาเหตุเข้าทำลายในระบบท่อน้ำท่ออาหารและส่วนราก

เครื่องวัดระดับเส้นรุ้งเส้นแวง

กรรไกร	แผนที่	กรอบไม้อัดตัวอย่าง
ปากกาหมึกถาวร	เลื่อยมือ	กระดาษหนังสือพิมพ์
ซองกระดาษ	แว่นขยาย	กระดาษบันทึกข้อมูล
ถุงพลาสติก	ดินสอ	กล่องเก็บความเย็น
เอกสารอ้างอิง	พลั่วมือ	ไม้ขีดไฟ เลี่ยม

ภาพที่ 5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการไปเก็บตัวอย่างโรคพืช

หลักการสำคัญในการเลือกเก็บตัวอย่างโรคพืช

- ต้องทราบชนิดพืชอาศัยอย่างถูกต้อง
ถ้าไม่ทราบชนิดพืชต้องเก็บส่วนของดอกและผลของพืชปกติ เพื่อนำไปจำแนกชนิด
แต่ต้องมั่นใจว่าเป็นพืชชนิดเดียวกับพืชที่เป็นโรค ตัวอย่าง เช่น
โรคเหี่ยวดำของหญ้าซึ่งปรากฏอาการบนช่อดอกและต้นหญ้า ส่วนใหญ่อยู่ร่วมกันหลาย ๆ ชนิด
เพราะฉะนั้นอาจทำให้สับสนในการเก็บตัวอย่างได้
- ห่อตัวอย่างพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์
ตัวอย่างพืชอบน้ำไม่ควรใส่ในถุงพลาสติก

เพราะทำให้พืชคายน้ำเกิดความชื้นในถุง
เป็นสาเหตุให้จุลินทรีย์อื่นเข้าทำลายพืชได้อย่างรวดเร็ว
ทำให้ตัวอย่างพืชเน่าเสีย
กรณีที่ต้องการเก็บตัวอย่างที่เปียกสามารถใช้ถุงพลาสติก
ได้แต่ต้องเก็บไว้ในระยะเวลาสั้น ๆ

- ควรเก็บตัวอย่างพืชอย่างระมัดระวัง อย่าให้เกิดการอัดทับ
และกระทบกระเทือน
ไอน้ำบนผิวพืชจะทำให้จุลินทรีย์อื่นเจริญอย่างรวดเร็วและ
เป็นเหตุให้ตัวอย่างใช้การไม่ได้
- บันทึกข้อมูลบนกระดาษบันทึกด้วยดินสอ
ไม่ควรใช้หมึกในการบันทึก
เพราะความชื้นจะทำให้หมึกถูกลบได้
- ในบางท้องที่
อาจมีการเข้มงวดในการจัดเก็บตัวอย่างทางชีววิทยา
ควรจัดเตรียมเอกสารขออนุญาตในการเก็บ
และเคลื่อนย้ายตัวอย่างโรคพืช
เช่นอุทยานแห่งชาติและสถานที่ส่วนบุคคล
ในกรณีการเคลื่อนย้ายตัวอย่างโรคพืชระหว่างประเทศอาจต้
องการใบอนุญาตนำเข้าและส่งออกตัวอย่าง
รวมทั้งใบอนุญาตของหน่วยงานกักกันศัตรูพืชด้วย

3.3.1 การเก็บตัวอย่าง ใบ ลำต้นและผล

การเก็บตัวอย่างใบพืชไม่ควรเก็บตัวอย่างที่เปียกน้ำ
แต่ถ้าไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ควรซับตัวอย่างด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ให้แห้ง
(ห้ามใช้กระดาษทิชชูซับใบพืช เพราะเยื่อกระดาษจะเปื่อยยุ่ย
ทำให้แกะออกจากผิวใบพืชได้ยาก) นำไปสอดระหว่างหนังสือพิมพ์แผ่นใหม่
หรือกระดาษซับ
การวางตัวอย่างควรวางให้ห่างกันเมื่อปิดทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์
ตัวอย่างจะได้ไม่ซ้อนกัน
ถ้าใบพืชมีความชื้นสูงมากควรเปลี่ยนกระดาษหนังสือพิมพ์ทุกวัน
จนกว่าใบพืชที่เก็บไว้จะแห้งสนิท

การเก็บตัวอย่างลำต้น

ควรเลือกเก็บลำต้นบริเวณรอยต่อระหว่างรอยแผลของโรคและส่วนปกติของพืช

ช ใช้กระดาษหนังสือพิมพ์ห่อลำต้นแต่ละต้นไม่นำมาปนกัน เพราะตัวอย่างอาจเกิดความเสียหายถ้าเก็บรวมกันไว้

สำหรับการเก็บตัวอย่างพืชอวบน้ำมาก เช่นผลไม้ ให้เลือกตัวอย่างผลที่เริ่มแสดงอาการ หรืออาการของโรคที่กำลังพัฒนา เนื่องจากอาการของโรคระยะรุนแรงจะพบจุลินทรีย์อื่น ๆ เข้าทำลายซ้ำ ทำให้การวินิจฉัยสาเหตุโรคพืชเป็นไปได้ยาก เมื่อเลือกเก็บผลไม้ที่แสดงอาการของโรคแล้วควรห่อผลไม้ด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์แต่ละผล ห้ามเก็บตัวอย่างผลไม้ที่เป็นโรคในถุงพลาสติก

การเก็บตัวอย่างโรคราสนิมและโรคราเขม่าดำ

การเก็บตัวอย่างโรคราสนิม ควรสังเกตหา teliospore สีนํ้าตาลดำ และ urediniospore สีเหลืองอมส้มทั้งด้านบนใบและด้านใต้ใบ สำหรับโรคราเขม่าดำ จะต้องบันทึกชื่อพืชอาศัยอย่างถูกต้อง ซึ่งชนิดของพืชอาศัยจะช่วยให้การวินิจฉัยโรคราเขม่าดำเป็นไปได้อย่างแม่นยำยิ่งขึ้น เนื่องจากโรคราเขม่าดำเข้าทำลายช่อดอกจึงเป็นการยากที่จะจำแนกชนิดของพืชอาศัย การเก็บตัวอย่างโรคราสนิมและโรคราเขม่าดำ ทำได้โดยการม้วนต้นพืชแล้วห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ เพื่อป้องกันไม่ให้ราสนิมและราเขม่าดำฟุ้งกระจาย

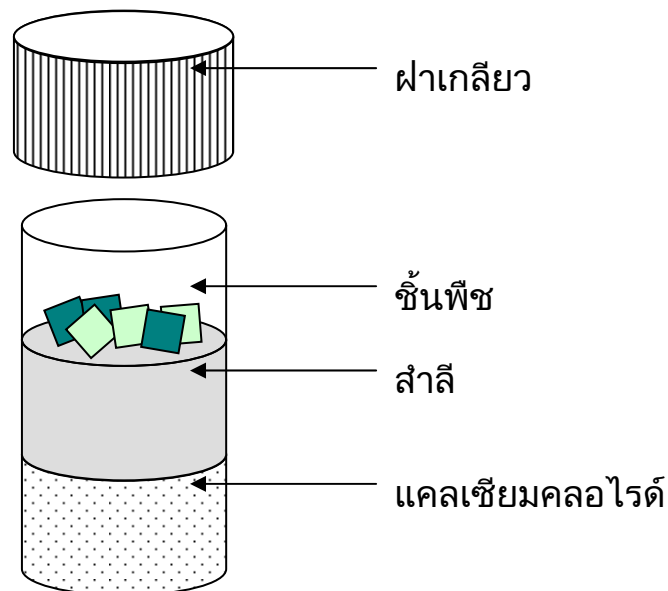
การเก็บตัวอย่างโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย

เป็นการยากที่จะเก็บและดูแลตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย การเก็บและดูแลตัวอย่างทำได้ยาก เพราะเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรคจะถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว วางตัวอย่างโรคในถุงกระดาษและห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ที่ชื้น เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างแห้ง ควรเก็บตัวอย่างในสภาพที่เย็นและไม่ถูกตากแดด โรคใบจุดและโรคใบไหม้ที่เกิดจากแบคทีเรียสามารถอัดเป็นตัวอย่างให้แห้ง เพื่อเก็บเป็นตัวอย่างพืชในพิพิธภัณฑ์และใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงได้ แบคทีเรียหลายชนิดมีชีวิตรอดอยู่ได้หลายเดือนหรือหลายปีบนตัวอย่างแห้งที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง

การเก็บตัวอย่างโรคที่เกิดจากไวรัส

ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากไวรัสสามารถเก็บรักษาไว้ได้ชั่วคราวในห้องที่มีอุณหภูมิ 0 – 4 องศาเซลเซียส หรือเก็บในอุณหภูมิห้องโดยเก็บไว้ในหลอดพลาสติกที่เตรียมด้วยวิธีการดังนี้ เติม calcium chloride (CaCl_2) ลงในหลอดประมาณ 1/3 ส่วนของหลอด ปิดทับด้วยสำลี 1/3 ส่วน ใช้กรรไกรหรือมีดที่คมและสะอาด ตัดใบพืช ขนาดประมาณ 3 – 5 มิลลิเมตร โดยเลือกบริเวณกลางใบ วางชิ้นพืชลงบนสำลีในหลอดพลาสติก 5 – 10 ชิ้น (ดังภาพแสดง) ใส่กรรไกรหรือใบมีดที่ใช้ตัดตัวอย่างพืชด้วยแอลกอฮอล์ หรือ sodium hypochlorite 10% ก่อนใช้ตัดตัวอย่างต่อไปเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ

การเก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสอีกวิธีหนึ่งคือ นำตัวอย่างใส่ในถุงพลาสติกกรวบรวมกับกระดาษที่ชื้น ใส่ลงในกล่องเก็บความเย็นระหว่างการขนส่งไปตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ การเก็บรักษาโดยวิธีนี้จะทำให้ตัวอย่างพืชสดอยู่



ภาพที่ 6 หลอดพลาสติกเก็บรักษาตัวอย่างใบพืชที่ไวรัสเข้าทำลาย

3.3.2 การเก็บตัวอย่างรากพืชและตัวอย่างดิน

การเก็บตัวอย่างรากพืชไม่ควรดึงต้นพืชขึ้นจากดินโดยตรงเพราะจะทำให้เนื้อเยื่อพืชบริเวณที่เป็นโรคนึกขาด จุลินทรีย์สาเหตุหลุดออกจากรากพืช ทำให้วินิจฉัยได้ยาก

ทำความสะอาดรากพืชด้วยการเขย่าเบา ๆ ให้เศษดินหลุดออกหรือล้างรากด้วยน้ำอย่างระมัดระวัง

(ยกเว้นตัวอย่างที่ต้องการตรวจหาไส้เดือนฝอย)

เนื่องจากในธรรมชาติในดินมีจุลินทรีย์จำนวนมาก

ซึ่งพร้อมที่จะเข้ามาอาศัยบริเวณรอบเนื้อเยื่อพืชที่กำลังจะตายหรือบริเวณเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว ขณะที่ทำการล้างดินออกจากราก ห้ามขัดถูรากพืชเพราะจะทำให้เนื้อเยื่อรากพืชฉีกขาด

ไม่สามารถนำไปการตรวจหาสาเหตุของโรคได้

ห่อรากด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์เพื่อนำกลับไปห้องปฏิบัติการควรเก็บตัวอย่างดินให้มากพอเพื่อใช้ในการตรวจหาจุลินทรีย์สาเหตุโรคและเป็นตัวแทนในการวินิจฉัยการเกิดโรค ข้อจำกัดของการเก็บตัวอย่างดินจำนวนมาก ๆ คือน้ำหนักและปริมาณของดิน ดังนั้นควรพิจารณาถึงเวลาที่ใช้ในการเก็บและพื้นที่ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างดินด้วย

ราสาเหตุโรคพืชที่อาศัยอยู่ในดิน ส่วนใหญ่รวมอยู่เป็นกลุ่มกัน โดยอยู่ในบริเวณที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะสม หรืออาจอยู่บริเวณรอบ รากพืชที่เข้าทำลาย วิธีการเก็บตัวอย่างที่ดีควรเก็บโดยการสุมเพื่อหลีกเลี่ยงการกระจายตัวอย่างไม่มีระบบของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ดังนั้นถ้าได้ตัวอย่างดินจำนวนมากยิ่งทำให้การวินิจฉัยถูกต้องยิ่งขึ้น

จำนวนตัวอย่างที่เก็บสามารถเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นกับความหนาแน่นของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช โดยทั่วไปตัวอย่างแต่ละตัวอย่างที่เก็บจะนำมารวมกันและผสมคลุกเคล้าให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วสุมตัวอย่างมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเพียงเล็กน้อย ถ้าเป็นตัวอย่างเพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอย ต้องมีความระมัดระวังในการเก็บและรักษาตัวอย่างดิน เพื่อไม่ให้ไส้เดือนฝอยตายไป

ควรหลีกเลี่ยงการเก็บตัวอย่างดินที่เปียกชื้นมาก ๆ หรือแห้งมาก ๆ
 ควรเก็บดินที่ระดับความลึก 5 – 10 เซนติเมตร
 จากผิวหน้าดินซึ่งเป็นบริเวณที่มีรากพืชและมีจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชอาศัยอยู่
 จำนวนมาก ถ้าพืชแสดงอาการของโรคเป็นหย่อม ๆ
 ควรแยกตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณพืชแสดงอาการรุนแรงและบริเวณพืชปกติ
 ตีออกจากกัน เพื่อนำมาเปรียบเทียบได้ในภายหลัง
 ปริมาณดินที่เก็บในแต่ละจุด ควรมีน้ำหนักประมาณ 250 – 300 กรัม
 ตัวอย่างดินที่เก็บ ควรมีเศษรากพืชปนมาด้วยประมาณ 25 – 100 กรัม
 ในกรณีพืชผักอาจมีรากปนมาน้อย
 แต่พืชลำต้นขนาดใหญ่อาจมีรากพืชจำนวนมาก เช่น รากของต้นกล้วย
 บรรจุตัวอย่างดินไว้ในกล่องพลาสติกที่แข็งแรง
 และบันทึกข้อมูลด้วยดินสอบนกระดาษ หรือพลาสติก
 และวางไว้ในกล่องหรือถุงที่เก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างดินไว้ในที่เย็น
 ไม่ให้ถูกแสงแดดหรือไม่ควรเก็บไว้ในรถยนต์ที่จอดในที่แจ้งและมีแสงแดดส่อง
 นำตัวอย่างดินกลับไปตรวจวินิจฉัยโดยเร็วที่สุด
 ถ้ายังไม่สามารถทำได้ควรเก็บตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 – 8 องศาเซลเซียส
 ซึ่งสามารถเก็บไว้ได้หลายวันโดยไม่เสียสภาพ

3.3.3 การเก็บราชานาดใหญ่

พวกเห็ดราสามารถเห็นได้ง่าย
 แต่การเก็บตัวอย่างกลับมายังห้องปฏิบัติการทำได้ค่อนข้างยาก
 ควรเก็บตัวอย่างหลาย ๆ ระยะของการเติบโต
 ไม่ควรเก็บตัวอย่างด้วยการถอนขึ้นมา
 ให้ใช้อุปกรณ์ช่วยในการขุดเพื่อป้องกันความเสียหายบริเวณโคนดอกเห็ด
 ห่อดอกเห็ดด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ตัวอย่างละหนึ่งห่อ
 และวางในภาชนะเพื่อป้องกันการกระแทก

การทำให้ตัวอย่างราชานาดใหญ่แห้งมีหลายวิธี เช่น

- เก็บในตู้อบชนิดมีพัดลมที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส
- การใช้เครื่องอบผลไม้
- ให้ความร้อน เช่น ให้ความร้อนจากกองไฟ
 เครื่องทำความร้อน ตะเกียงน้ำมัน หรือการผิงแดด

การทำลายพิมพ์สปอร์จะทำให้เห็นรายละเอียดการเรียงตัวของครีบและสีของ
 สปอร์ได้ชัดเจน

ซึ่งมีความสำคัญในการจำแนกชนิดของรายนาดใหญ่ที่สร้างครีบ
เช่น รากกลุ่มเห็ดได้ดี การทำลายพิมพ์สปอร์โดยการตัดก้านดอกเห็ดออก
นำส่วนหมวกเห็ดวางบนกระดาษแข็งสีขาว (ด้านที่เป็นส่วนครีบคว่ำลง)
วางไว้เป็นเวลา 15 นาที หรือ 2 - 3 ชั่วโมง
ควรมีภาชนะวางครอบหมวกเห็ดไว้ด้วยเพื่อป้องกันลม
ถ้าสปอร์มีสีขาวจะมองเห็นได้ยากจึงควรใช้กระดาษสีดำแทน

3.4 การบันทึกตัวอย่าง (Labeling specimens)

ตัวอย่างโรคพืชที่บันทึกอย่างไม่ถูกต้องถือได้ว่าไม่มีประโยชน์
แม้ว่าจะเป็นตัวอย่างที่อยู่ในสภาพที่ดีก็ตาม
ข้อมูลและรายละเอียดที่ควรบันทึกติดไว้กับตัวอย่างประกอบด้วย

- ชื่อพืชและส่วนของพืชที่เป็นโรค
- สถานที่เก็บโดยละเอียด หมู่บ้าน ตำบล อำเภอ จังหวัด ประเทศ
ถ้ามีข้อมูล เส้นรุ้งเส้นแวงและความสูงจากระดับน้ำทะเล
จะเป็นประโยชน์มากขึ้น เครื่องมือวัดตำแหน่ง (Global positioning System/GPS)
เป็นเครื่องมือช่วยในการหาตำแหน่งจุดที่ต้องการบนผิวโลก
โดยเครื่องมือนี้จะติดตามการเคลื่อนที่ของดาวเทียมที่โคจรไปรอบ
ผิวโลก เมื่อมีการใช้วงโคจรของดาวเทียม 3 ดวง
เครื่องมือนี้จะคำนวณพิกัดของตำแหน่งและใช้ทำแผนที่ที่แม่นยำ
เพื่อพัฒนาเป็นแผนที่การระบาดของโรคพืช
- วันที่เก็บ
- ชื่อผู้เก็บ
- หมายเลขตัวอย่าง
- ลักษณะอาการ ความรุนแรงของโรค เช่น
จำนวนของต้นพืชที่แสดงอาการ

ตัวอย่างโรคพืชที่เก็บรักษาในสถานที่เก็บตัวอย่าง

ต้องบันทึกรายละเอียดอย่างสมบูรณ์ (ภาพที่ 7)
ชื่อผู้เก็บและที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้มีความสำคัญและ
ควรบอกถึงเหตุผลในการเก็บอย่างชัดเจน เช่น วัตถุประสงค์เพื่อการจำแนก
หรือเพื่อการเก็บรักษา

BRIP

Genus *Puccinia*
Species *asparagi*
Host genus *Asparagus* species *officinalis*
Host variety/cultivar UC157
Common name *Asparagus*
Symptom(s) reddish lesions on stems, some whole ferns dead, sporadic appearance of symptoms in block
Collector(s) Christine Horlock and Lient-Heng Cheah
Date collected 15 August 2003 Collector No. CMH 6093
Grower Ian Neilson
Precise location "Mirandetta", Little Bridge Rd., approx. 6 km east of Warwick
Town Warwick State QLD, Australia
Latitude 28° 16.368 S Longitude 152° 05.701 E
Additional information Symptoms appear to indicate early and late infection, mainly urediniospores at this stage, some teliospores too.

ภาพที่ 7 ตัวอย่างกระดาดบันทึกข้อมูลที่ใช้ในพิพิธภัณฑ์ BRIP

3.5 การสำรวจและสุ่มเก็บตัวอย่าง (Surveys and sampling)

การสำรวจมีวัตถุประสงค์เพื่อวินิจฉัยโรคและประเมินความรุนแรงของโรคซึ่งจำเป็นต้อง

- ติดตามการระบาดและสถานภาพศัตรูพืชในแต่ละท้องที่เพื่อกำหนดพื้นที่ปลอดโรค
- สำหรับใช้ในการพิจารณาการนำเข้าและส่งออกสินค้า
- จัดระดับความสำคัญของโรค เพื่อพิจารณาถึงวิธีการควบคุมโรค
- ตรวจสอบโรคที่สูญหายไปและโรคที่ปรากฏขึ้นใหม่
- ประเมินความเสียหายของพืชที่เกิดจากเชื้อสาเหตุนั้น ๆ
- เข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงของศัตรูพืช
- จำแนกชนิดพืชอาศัย
- ประเมินประสิทธิภาพของการควบคุมโรค
- ประเมินความรุนแรงและความเสียหายของพืช
- จำแนกชนิดของศัตรูธรรมชาติ

การสำรวจอาจดำเนินการทั้งด้านคุณภาพและปริมาณ การสำรวจด้านคุณภาพเป็นการพิจารณาว่ามีเชื้อสาเหตุปรากฏอยู่หรือไม่ การสำรวจด้านปริมาณ

เป็นการพิจารณาจำนวนต้นพืชที่เป็นโรคว่ามีอยู่เป็นจำนวนเท่าใด
และปริมาณความเสียหายที่เกิดจากเชื้อสาเหตุนั้น ๆ

การสำรวจจะต้องดำเนินการในพื้นที่ที่เป็นตัวแทนของท้องที่และมีขนาดเพียงพอที่ทำให้การประเมินเกิดความแม่นยำ
นอกจากนี้การกำหนดขนาดและพื้นที่สำรวจต้องพิจารณาถึงเครื่องมือที่มีเทคนิคที่ใช้ในการสำรวจและระดับของความแม่นยำ

วิธีการเก็บตัวอย่างควรเป็นวิธีที่ง่าย

๑

ตัวอย่างที่เก็บต้องเป็นตัวแทนที่ดีและมีความเชื่อถือได้

การกำหนดจำนวนตัวอย่างที่ควรเก็บได้มาจากข้อมูลนำร่อง

โดยการเปรียบเทียบจำนวนตัวอย่างที่เก็บจากการสำรวจนำร่องเพื่อใช้ตัดสินใจให้เลือกเก็บตัวอย่างจำนวนน้อยที่สุดที่จะให้ผลการประเมินโรคได้อย่างแม่นยำ

รูปแบบของการเก็บตัวอย่างมีความสำคัญ

จำเป็นต้องใช้วิธีการเก็บตัวอย่างอย่างเป็นระบบเพราะต้องสัมพันธ์กับการกระจายตัวของต้นพืชเป็นโรค

ซึ่งอาจพบว่าต้นพืชเป็นโรคแบบสุ่ม

หรือเป็นโรคแบบสม่ำเสมอ

หรืออาจเกิดโรคเป็นกลุ่ม

การเก็บตัวอย่างแบบสุ่มจะได้ข้อมูลที่ดี

แม้ว่าการเกิดโรคจะมีการกระจายตัวเป็นแบบกลุ่ม

การสำรวจที่ต้องการข้อมูลอย่างละเอียด

ต้องออกแบบการสำรวจที่มีการเก็บข้อมูลอย่างครบถ้วน

นอกจากนี้ต้องพิจารณาช่วงเวลาของการสำรวจและส่วนของพืชที่เหมาะสมที่จะนำมาเป็นตัวอย่าง

เอกสารที่มีรายละเอียดของการเก็บข้อมูลจากการสำรวจหาอ่านเพิ่มเติมได้จาก *Guidelines for Plant Pest Surveillance in Asia and the Pacific*, โดย Dr Teresa McMaugh⁴ (The Office of the Chief Plant Protection Officer (OCPPO), Australian Government Department of Agriculture, Fisheries and Forestry (DAFF)).

⁴ Dr McMaugh is coordinating the production of a publication, *Guidelines for Plant Pest Surveillance in Asia and the Pacific*, funded by the Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR) and the Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC).

บทที่ 4

การวินิจฉัยตัวอย่างโรคพืช (How to examine specimens)

การวินิจฉัยตัวอย่างโรคพืชเริ่มตั้งแต่การตรวจสอบภายนอกด้วยตาเปล่า
แล้วจึงตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ
ขั้นต่อไปเตรียมตัวอย่างบนแผ่นสไลด์เพื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง
เพื่อศึกษาโครงสร้างต่าง ๆ ของรา
ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญ
เมื่อตรวจสอบพบเชื้อสาเหตุจะต้องทำการวัดขนาด
วาดภาพและถ่ายภาพราสาเหตุโรคนั้นไว้
โดยภาพวาดและภาพถ่ายควรเก็บรวบรวมไว้ด้วยกันกับตัวอย่างแห้ง

4.1 การย้อมสีราและแบคทีเรีย (Staining fungi and bacteria)

การตรวจสอบราและแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชสามารถตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์
โดยการเขียนเชื้อสาเหตุลงในหยดน้ำบนแผ่นสไลด์และปิดทับด้วย cover slip
สามารถใช้กรดแลกติกแทนน้ำในการเตรียมตัวอย่างเชื้อสาเหตุก็ได้
เส้นใยราที่ใส ไม่มีสี จำเป็นต้องย้อมสี เพื่อให้เห็นโครงสร้างได้ชัดเจนขึ้น
สีย้อมรา มี 2 ชนิดที่นิยมใช้ ได้แก่ cotton blue และ lacto fuchsin

Cotton blue (or trypan blue)

Cotton blue (or trypan blue)	0.1 g
Lactic acid	25 ml
Glycerol	50 ml
Distilled water	25 ml

Lacto-fuchsin

Acid-fuchsin	0.1 g
Lactic acid	100 ml

เป็นการยากที่จะตรวจสอบแบคทีเรียที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืช การใช้สารละลาย Toluidine blue O 0.1% ช่วยในการตรวจสอบแบคทีเรียให้ได้ง่ายขึ้น โดยตัดชิ้นพืชตรงบริเวณรอยต่อของแผลและเนื้อเยื่อพืชปกติเป็นชิ้นเล็ก ๆ วางลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลาย Toluidine blue O 0.1% ลงบนเนื้อเยื่อพืช ปิดกระจกทับแล้วตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า ถ้าชิ้นพืชมีแบคทีเรียอยู่จะเห็นแบคทีเรียเคลื่อนไหวอยู่รอบ ๆ ขอบของรอยแผล โดยเซลล์ของแบคทีเรียจะติดสีย้อมเป็นสีน้ำเงิน ส่วนเนื้อเยื่อพืชมีสีเขียวจาง

Toluidine blue O	
Toluidine blue O	0.05 g
Distilled water	50 ml

การจำแนกแบคทีเรียออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ สามารถทำได้ด้วยการย้อมสี กลุ่มแบคทีเรียที่ติดสีย้อม Crystal violet และ iodine และไม่สามารถล้างออกด้วย แอลกอฮอล์ เรียกว่า “แบคทีเรียแกรมบวก” ส่วนแบคทีเรียที่ล้างสีออกได้ด้วยแอลกอฮอล์ เรียกว่า “แบคทีเรียแกรมลบ” การย้อมสีแกรมนี้นี้ เป็นการประเมินลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียในเบื้องต้น สารเคมีและวิธีการย้อมสีแกรมนี้นี้

ละลาย Crystal violet 2 กรัม ลงใน ethyl alcohol 95 % ปริมาณ 20 มิลลิลิตรละลาย Ammonium oxalate 0.8 กรัม ลงในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลายทั้ง 2 ส่วน เข้าด้วยกัน

Crystal violet solution	
Crystal violet	2 g
95% ethanol	20 ml
Ammonium oxalate	0.8 g
Distilled water	80 ml

บด Iodine และ Potassium iodine เข้าด้วยกันแล้วเติมน้ำกลั่นลงไป ผสมสารละลายให้เข้ากัน ซึ่งต้องใช้เวลาหลายชั่วโมง

Lugol's iodine solution	
Iodine	1 g
KI	2 g
Distilled water	300 ml

เตรียมสารละลายเข้มข้นโดยละลาย Safranin O 2.5 กรัมใน ethyl alcohol 95 % จำนวน 100 มิลลิลิตร เมื่อต้องการใช้ย้อมสี เติมน้ำกลั่น 1:10 เท่า

Safranin counterstain	
Safranin O	2.5 g
95% ethanol	20 g

เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียในน้ำกลั่น
จากแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้บนอาหารเป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง
หยดสารแขวนลอยแบคทีเรียลงบนแผ่นสไลด์ เกลี่ยให้กระจายบาง ๆ
บนแผ่นสไลด์ ประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร และสามารถเห็นแบคทีเรียบาง ๆ
ทั่วทั้งไว้ให้แห้ง นำแผ่นสไลด์ผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว
โดยให้ด้านที่มีแบคทีเรียอยู่ด้านบน ระวังอย่าให้แผ่นสไลด์ร้อนจนเกินไป
การลนไฟเพื่อให้เซลล์ของแบคทีเรียติดแน่นอยู่บนแผ่นสไลด์ระหว่างขั้นตอนการย้อมสี

หยดสารละลาย Crystal violet ให้ท่วมเซลล์แบคทีเรีย ทิ้งไว้นาน 1 นาที
เทสารละลายออก ใช้ น้ำล้างสีย้อมเบา ๆ
จนไม่มีสีย้อมละลายออกไปกับน้ำอีก หยดสีย้อม Lugol's iodine ให้ท่วม
ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างน้ำอีกครั้ง ซับให้แห้ง หยด ethyl alcohol 95 %
ลงบนเซลล์แบคทีเรีย 2 – 3 วินาที (อย่าให้นานเกิน 30 วินาที)
ซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง หยดสีย้อม Safranin O ทิ้งไว้นาน 20 วินาที
ล้างน้ำอีกครั้ง แล้วซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง
ตรวจสอบแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope
กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยใช้ oil immersion
แบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีฟ้าม่วง ส่วนแกรมลบจะติดสีแดงอมชมพู

การทดสอบปฏิกิริยาของแบคทีเรียที่ติดสีย้อมแกรม อาจทำได้อีกวิธีหนึ่งคือ ทดสอบความสามารถในการละลายใน Potassium hydroxide (KOH) นำแบคทีเรียที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง จากอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 1 loop ผสมลงใน Potassium hydroxide 3% ที่หยดไว้บนแผ่นสไลด์ที่สะอาด คนให้แบคทีเรียและสารละลายเข้ากันดี ยก loop ขึ้นจากแผ่นสไลด์ 2 – 3 เซนติเมตร ถ้าสารละลายเหนียวและถูกยกขึ้นมาได้ (ประมาณ 5 – 20 มิลลิเมตร) แบคทีเรียจะเป็นกลุ่มแกรมลบ ถ้าสารละลายไม่เหนียวเป็นเมือก แบคทีเรียจะเป็นกลุ่มแกรมบวก ทั้งนี้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ จะปล่อยดีเอ็นเอออกมาและละลายได้ใน Potassium hydroxide ส่วนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะทนต่อสารละลาย Potassium hydroxide และไม่มีดีเอ็นเอไหลออกมาใน Potassium hydroxide การทดสอบนี้มีประโยชน์ในกรณีที่การทดสอบด้วยการย้อมสีให้ผลไม่ชัดเจน

4.2 กล้องจุลทรรศน์ (Light Microscopy)

กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereomicroscope มีประโยชน์ในการใช้ตรวจสอบตัวอย่างเบื้องต้น กล้องจุลทรรศน์ compound microscope ชนิดกำลังขยายสูงให้ภาพที่กำลังขยายมากถึง 1,000 เท่า เพื่อใช้ตรวจสอบสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียและราชขนาดเล็ก

การตรวจสอบโรคพืชที่เกิดจากรา วางราใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ใช้เข็มปลายแหลม หรือปลายมีดเขี่ยราส่วนที่เป็นโรค ลงบนหยดสีย้อมบนแผ่นสไลด์ สีย้อมที่คือ Lacto fuchsin (acid fuchsin 1 กรัม และ lactic acid 100 มิลลิลิตร) หรือสารละลายที่ใช้เมาท์สไลด์ เช่น lactic acid (lactic acid 100 มิลลิลิตร glycerol 200 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นหนึ่งขวด 100 มิลลิลิตร) ถ้าส่วนที่เป็นโรคมีความหนา ให้กด cover slip เบา ๆ เพื่อช่วยให้ส่วนของรากระจายออกและบางลง เมื่อมีฟองอากาศให้นำแผ่นสไลด์ผ่านเปลวไฟเบา ๆ (ระวังอย่าให้เกิดเขม่าบนแผ่นสไลด์) ถ้าแผ่นสไลด์ร้อนเกินไป cover slip จะแตกและระเบิดออก

การใช้เทปกาวมีประโยชน์ เมื่อต้องการศึกษาการจัดเรียงตัวของสปอร์ (สปอร์ที่เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่และก้านขุสปอร์) ใช้ปากคีบคีบเทปกาวชิ้นเล็ก ๆ และลงบนกลุ่มของเรา (หรือบนผิวใบพืช) วางชิ้นเทปกาวบนหยดของสารเม้าทสไลด์บนแผ่นสไลด์ที่สะอาดโดยให้ส่วน กาวเหนียวอยู่ด้านบน ปิดทับด้วย cover slip และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

สปอร์ของราบางชนิดจะหลุดออกได้ง่าย เพราะฉะนั้นควรทำ slide culture โดยการทำ moist chamber วางแท่งแก้วบนกระดาษกรองที่มีความชื้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตัดชิ้นอาหารวันขนาด 1 ตารางเซนติเมตร วางบนแผ่นสไลด์ที่ฆ่าเชื้อโดยผ่านเปลวไฟ และวางแผ่นสไลด์ที่มีชิ้นวันบนแท่งแก้วในจานเลี้ยงเชื้อ วางเส้นใยราบนขอบทั้ง 4 ด้านของชิ้นอาหารวัน ปิดทับด้วย cover slip ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ 2 - 3 วัน นำส่วนของรามามาเม้าทสไลด์เพื่อดูลักษณะต่าง ๆ โดยนำชิ้นวันอาหารออก วิธีการนี้สามารถทำสไลด์เพื่อตรวจสอบเชื้อได้ 2 แผ่น คือจากแผ่นสไลด์และ cover slip ถ้าจานเลี้ยงเชื้อไม่มีความชื้นและเราแห้งไปก่อนจะไม่สามารถมองเห็นโครงสร้างราได้

การจำแนกชนิดของราสาเหตุโรคพืชบางชนิด ต้องอาศัยลักษณะของส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราที่เกิดบนเนื้อเยื่อพืช หรือตำแหน่งของการเกิดก้านขุสปอร์ภายในโครงสร้างของส่วนขยายพันธุ์ การตัดเนื้อเยื่อพืชเป็นชิ้นบาง ๆ ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นลักษณะโครงสร้างได้ชัดเจนขึ้น การตัดเนื้อเยื่อทำได้โดยการใช้ใบมีดตัดด้วยมือภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ หรือการใช้เครื่องมือตัดเนื้อเยื่อพืช (microtome) หรือการใช้เครื่องมือตัดเนื้อเยื่อพืชชนิดใช้ความเย็นจัด (freezing microtome) เครื่องมือตัดเนื้อเยื่อพืชชนิดใช้ความเย็นจัดนี้มีประโยชน์ในการตัดเนื้อเยื่อที่ แข็งแรงได้บ้างมาก เครื่องมือนี้ติดตั้งพร้อมกับแท่นที่วางเนื้อเยื่อสำหรับทำให้เนื้อเยื่อกลายเป็น น้ำแข็ง ด้วยกลไก thermoelectric หรือ การใช้ความเย็น แบบ low temperature re-circulating coolant

การตรวจสอบแบคทีเรียบนเนื้อเยื่อพืชเป็นโรคทำได้ไม่ถนัดนัก
การใช้สารเคมี Toluidin Blue O อาจช่วยในการตรวจหาแบคทีเรียได้ง่ายขึ้น
การย้อมสีแกรมมีประโยชน์มากในการจัดกลุ่มแบคทีเรียเป็น 2 กลุ่ม
ที่มีความแตกต่างในคุณสมบัติทางชีวเคมีคือกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกและกลุ่ม
แบคทีเรียแกรมลบ กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีเป็นสีม่วง
ในขณะที่กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบติดสีแดง
ข้อมูลเกี่ยวกับเทคนิคนี้บรรยายไว้ในบทที่ 7 การวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคพืช

การดูแลรักษากล่องจุลทรรศน์ให้คงสภาพดีมีความจำเป็นมาก
กล่องจุลทรรศน์ควรได้รับการทำความสะอาดทุก 6-12 เดือน
ประเทศในเขตร้อนชื้นมีสภาพอากาศที่เหมาะสมต่อราจึงทำให้ราเจริญได้บน
เลนส์และผิวหน้าของอุปกรณ์ ทำให้คุณสมบัติของกล่องจุลทรรศน์เสียไป
ถ้าไม่ได้รับการดูแลรักษาที่ดีความเสียหายจะเกิดขึ้นอย่างถาวร
ดังนั้นควรเก็บกล่องจุลทรรศน์ไว้ในห้องที่มีเครื่องปรับอากาศ

กรณีเมื่อไม่มีการใช้งานกล่องจุลทรรศน์
อาจเก็บกล่องจุลทรรศน์ไว้ในกล่องดูดความชื้น (dehumidifying box) หรือ
“กล่องร้อน” (hot box)
กล่องร้อนนี้ทำด้วยกล่องไม้หรือกล่องพลาสติกที่อับอากาศและใหญ่พอสำหรับ
เก็บกล่องจุลทรรศน์ได้ ภายในกล่องติดตั้งหลอดไฟขนาด 25 วัตต์
ซึ่งหลอดไฟจะทำหน้าที่คล้ายเครื่องดูดความชื้น
โดยความร้อนจากหลอดไฟจะทำให้ไอน้ำในกล่องระเหยไปและทำให้ภายใน
กล่องแห้ง การเก็บรักษาอุปกรณ์การถ่ายภาพ ควรเก็บไว้ใน
“กล่องร้อน” เช่นเดียวกัน

4.3 การถ่ายภาพ (Photography)

ควรมีการถ่ายภาพ (ภาพสไลด์สี ภาพสี หรือภาพจากกล้องดิจิทัล) ของตัวอย่างโรคพืชในแปลงปลูกพืช ภาพถ่ายในแปลงปลูกจะช่วยเพิ่มข้อมูลที่ใช้อ้างอิงของอาการโรคพืชที่เก็บมาอย่างเป็นรูปธรรม ควรถ่ายภาพไว้หลาย ๆ ภาพแล้วเลือกภาพที่ดีที่สุดบันทึกรายละเอียดของภาพทุกภาพเพื่อป้องกันการสับสนเมื่อกลับถึงห้องปฏิบัติการ

การถ่ายภาพตัวอย่างโรคพืชในห้องปฏิบัติการต้องมีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้ดี อาจจะต้องมีการเพิ่มแสงช่วย บางครั้งแสงจากหลอดไฟจะทำให้เกิดเงาที่ไม่ต้องการ การใช้สีเทาอ่อนเป็นพื้นหลังเหมาะสมที่สุด การใช้สีดำและสีขาว ทำให้การภาพมืดหรือสว่างเกินไป

การถ่ายภาพตัวอย่างโรคพืชด้วยกล้องดิจิทัลมีประโยชน์มาก เพราะสามารถส่งภาพเหล่านี้ไปยังผู้ร่วมงานอื่น ๆ ได้อย่างรวดเร็ว ภาพสไลด์และภาพสีที่เก็บไว้เป็นเวลานานโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตร้อนชื้น นั้น ภาพอาจเสียหายเนื่องจากมีราเข้าทำลาย

ภาพถ่ายดิจิทัลอาจได้มาจากกล้องถ่ายภาพโดยตรง จากการสแกนภาพถ่ายหรือสไลด์สี หรือจากการสแกนจากตัวอย่างพืชโดยตรง

4.3.1 การทำชื่อแฟ้มภาพและการจัดการ

กล้องถ่ายภาพดิจิทัลตั้งชื่อแฟ้มภาพได้โดยอัตโนมัติ ตัวอย่างเช่น IMG-001.jpg, IMG-002.jpg เมื่อบันทึกลงบนเครื่องคอมพิวเตอร์ ควรเปลี่ยนชื่อแฟ้มใหม่ ชื่อที่ใช้อาจเป็นชื่อแสดงลักษณะอาการ หรือชื่อพืช เช่น anthracnose on mango.jpg เป็นต้น

ถ้าตัวอย่างภาพดิจิทัลในเครื่องคอมพิวเตอร์มีปริมาณมาก ควรใช้ตัวเลขกำกับไว้ด้วย อย่าลืมนำหน้าตัวเลขที่กำกับด้วยเลข 0 ตัวอย่างเช่น 001 แทนการใช้เลข 1 เพราะเครื่องคอมพิวเตอร์จะอ่านเลข 100 ก่อน เลข 99 การใช้หมายเลขเดียวกันระหว่างภาพและตัวอย่างพืชในศูนย์รวบรวมตัวอย่าง ทำให้ง่ายต่อการใช้อ้างอิง

การเก็บแฟ้มภาพไม่ควรเก็บไว้หลาย ๆ แฟ้ม ในโฟลเดอร์เดียว ถ้ามีแฟ้มจำนวนมาก จะต้องเสียเวลาในการค้นหาภาพที่ต้องการ การตั้งชื่อโฟลเดอร์สำหรับโครงการใหม่และแบ่งแฟ้มออกเป็นกลุ่มตามชนิดเชื้อสาเหตุ พืชอาศัย ประเทศ หรือวันที่ เป็นต้น การใช้โปรแกรมสำเร็จรูปเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะช่วยในการจัดเก็บภาพ สามารถเพิ่มเติมรายละเอียด เพิ่มเติมภาพสี และสไลด์และการจัดการอื่น ๆ ที่จำเป็น สามารถส่งภาพเข้าสู่ระบบเครือข่ายได้ง่ายขึ้น โปรแกรมการจัดการภาพถ่ายที่ใช้ได้ดีประกอบด้วย

- การส่งภาพออกจากกล้องถ่ายภาพ
- การมองภาพ
- การจัดแฟ้มภาพ
- การแก้ไขและตกแต่งภาพ
- การส่งภาพเข้าสู่ระบบเครือข่าย

โปรแกรมการจัดการภาพสำเร็จรูปบางโปรแกรมที่มีให้เลือกใช้ได้แก่

Ablaze Image Manager, ThumbsPlus, Cumulus, Epson's File Factor, Piccolo, PhotoWallet, Polybytes Polyview, Thumber, PIE, ACDSee (PC and Mac), PicaView32, Image Fox, Graphic Workshop, Professional, GraphicConverter, Power Browser, IrfanView32, Photopage, Quisknailer, Compupic, Image Viewer, Photo Recall, Photo Explorer, EXIFRead, VuePrint, ImageAXS, iView Multimedia, Compupic Pro, Sony PictureGear, FlipAlbum, PictureWorks MediaCenter, JASC Media Center, Pictureshow, Qpict Media Organizer and DigiPic

บทที่ 5

การแยกรา แบคทีเรีย และไส้เดือนฝอย (How to isolate fungi, bacteria and nematodes in laboratory)

หลังจากการเก็บตัวอย่างโรคพืช ควรแยกตัวอย่างโรคพืชออกเป็นกลุ่มหลัก ๆ ตามชนิดของตัวอย่าง ตัวอย่างที่จะต้องเลือกดำเนินการก่อนได้แก่ตัวอย่างที่เสียหายง่าย เช่น เห็ดที่มีขนาดใหญ่และอวบน้ำหรือกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการแยกเชื้อบริสุทธิ์ เพื่อตรวจสอบรายละเอียดสำหรับการจำแนกชนิดตัวอย่างอื่น ๆ ที่ไม่จำเป็นต้องตรวจสอบในทันที และสามารถเก็บเอาไว้ได้ในช่วงเวลาหนึ่ง เช่น

ตัวอย่างของโรคราสนิมและโรคราเขม่าดำให้นำไปอัดแห้งและเก็บในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และนำมาตรวจสอบได้ในภายหลัง

ตัวอย่างของไวรัสสามารถเก็บรักษาไว้ชั่วคราวด้วยหลอดดูดความชื้นตามวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในส่วน

3.3.1 ในบทนี้จะไม่กล่าวถึงการแยกเชื้อบริสุทธิ์ของไวรัส เนื่องจากต้องใช้เทคนิคเฉพาะในการแยก

การจำแนกชนิดแบคทีเรียและราต้องแยกเชื้อจากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ก่อน

ในตัวอย่างที่เชื้อสาเหตุของโรคมีจุลินทรีย์อื่นปะปนอยู่ด้วย

ทั้งชนิดจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ต้องอาศัยอยู่บนสิ่งมีชีวิต necrotroph

ก็สามารถนำมาแยกเชื้อได้

ถึงแม้ว่าเชื้อสาเหตุบางชนิดจะต้องการการพักตัวก่อน (fastidious)

การแยกราจากตัวอย่างพืช โดยวางชิ้นเนื้อเยื่อพืชชิ้นเล็ก ๆ

บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ

อาจใช้เข็มที่สะอาดเขี่ยสปอร์ที่อยู่บนส่วนของพืชที่เป็นโรควางบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง

ราและแบคทีเรียอื่น ๆ

หลายชนิดที่ไม่ใช่เชื้อสาเหตุของโรคพืช อาจเจริญอยู่บนเนื้อเยื่อพืช

หรือปนเปื้อนมาบนรอยแผลของพืช

ดังนั้นการแยกเชื้อสาเหตุต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อโดยการฆ่าเชื้อภายนอกที่

ผิวของเนื้อเยื่อพืชก่อน นำกระดาษซับหรือสำลีจุ่มลงในแอลกอฮอล์ 70 %
ทิ้งไว้พอหมาดเช็ดเนื้อเยื่อพืชบริเวณที่ต้องการแยกเชื้อ
วางเนื้อเยื่อพืชบนผิววัสดุที่เรียบ แข็ง ไม่ขรุขระ เช่น แก้ว หรือกระจก
ทำความสะอาดปากคืบและใบมีดด้วยการจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 % และค่อย ๆ
ผ่านเปลวไฟ
อุปกรณ์ที่ใช้เหล่านี้ไม่ควรลงไฟโดยตรงเพราะจะทำให้อุปกรณ์เสียหายเนื่อง
จากแอลกอฮอล์เป็นสารติดไฟง่าย
ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังอย่าให้อุปกรณ์ที่มีไฟลุกอยู่เข้าไปใกล้ภาชนะที่ใส่แ
ลกอฮอล์
เข็มเย็บเมื่อลงไฟแล้วต้องรอให้เข็มเย็บเย็นลงก่อนนำไปใช้งานทุกครั้ง

การฆ่าเชื้อภายนอกที่ผิวของเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค
เป็นการกำจัดจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการบนผิวหน้าพืช
แต่เชื้อสาเหตุของโรคยังมีชีวิตและสามารถเจริญเติบโตได้เมื่อนำไปวางบนอา
หารเลี้ยงเชื้อ การทำความสะอาดโดยใช้สำลีจุ่มแอลกอฮอล์ 70 %
เช็ดผิวพืชที่เป็นโรค หรือการจุ่มตัวอย่างพืชในแอลกอฮอล์ 70 % นั้น
ไม่จำเป็นต้องล้างแอลกอฮอล์ออก เพราะแอลกอฮอล์จะระเหยไปได้เอง
หรือเปลวไฟจะเผาไหม้แอลกอฮอล์ให้หมดไปได้

การฆ่าเชื้อภายนอกตัวอย่างพืชนิยมใช้สาร Sodium hypochlorite
เนื่องจากเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ สาร Sodium
hypochlorite ที่ขายเป็นการค้าสำหรับซักผ้าขาวจะมี chlorine 10 – 14 %
เมื่อต้องการใช้เป็นสารฆ่าเชื้อผิวภายนอกพืช จะผสมให้เป็นสารละลาย 10 %
(สารละลาย 10 % มี chlorine อยู่ประมาณ 1.0 – 1.4 %) แช่ตัวอย่างเป็นเวลา 1
– 5 นาที สารละลายที่เตรียมไว้ควรเก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพ
ควรเตรียมสารละลายนี้ ทุก 2 – 3 สัปดาห์ ข้อจำกัดของการใช้สารละลาย
Sodium hypochlorite นี้คือ สารละลายจะมีกลิ่นรุนแรง
มีผลตกค้างและหากเปื้อนเสื้อผ้าจะทำให้ผ้าเสียหาย

วิธีการแยกแบคทีเรียและราหลายวิธี
การเลือกใช้วิธีแยกเชื้อวิธีใดวิธีหนึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างพืชที่เป็นโรค
ตลอดจนชนิดของเชื้อสาเหตุนั้น ๆ

5.1 วิธีการแยกรา (Isolation of fungi)

ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวภายนอกพืชเนื่องจากมีจุลินทรีย์หลายชนิดอยู่บนพืช โดยใช้ลากล้าง

1. แอลกอฮอล์ 70 % เช็ดผิวพืช
วิธีการนี้แนะนำให้ใช้เฉพาะการทำความสะอาดผิวของเนื้อไม้เท่านั้น
2. ตัดชิ้นส่วนบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค และนำชิ้นส่วนเหล่านี้มาฆ่าเชื้อภายนอกด้วยสาร Sodium hypochlorite 1% ที่ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ 10 %
(อาจมีการปรับเปลี่ยนอัตราให้เหมาะสมซึ่งขึ้นกับชนิดของพืช เช่น ตัวอย่างพืชที่มีรพุนจะดูดซับสารละลายมาก ควรตัวอย่างในสารละลายเป็นเวลา 1–5 นาที)
3. ล้างชิ้นส่วนพืชที่ฆ่าเชื้อภายนอกแล้วด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปแช่ในอ่างบนกระดาษกรองที่หนึ่งฆ่าเชื้อ ควรปฏิบัติในตู้ lamina flow ขั้นตอนการแช่ในอ่างนี้มีความสำคัญมาก เพราะจะทำให้ไม่เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ปนเปื้อน จากนั้นตัดตัวอย่างพืชที่ฆ่าเชื้อแล้วนี้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 2 X 2 มิลลิเมตร นำไปวางบนอาหาร TWA (Tap Water Agar) หรือ PDA (Potato Dextrose Agar) ในขณะที่วางชิ้นตัวอย่างบนอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ ควรยกฝาจานเลี้ยงเชื้ออย่างระมัดระวังเพื่อป้องกันการปนเปื้อน
4. คว่ำจานเลี้ยงเชื้อลงเพื่อป้องกันไอน้ำที่จับตัวบนฝาจานเลี้ยงเชื้อหยดลงบนอาหาร ราสาเหตุโรคพืชเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
5. รวบรวมสปอร์ที่ได้จากการคัดเลือกโคโลนีของราที่เจริญออกมาจากชิ้นตัวอย่างพืชด้วยวิธีการทำ single spore isolation หรือจากปลายเส้นใย
วิธีการทำ single spore isolation โดยนำสปอร์จากโคโลนีของราใส่ในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อเตรียม spores suspension เขย่าให้เข้ากันและนำ spores suspension ที่ได้ไปเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร WA หรืออาหารอื่นที่เหมาะสมในที่มีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ใช้เข็มที่สะอาดย้ายสปอร์ที่ออกไปวางบนอาหารที่เหมาะสม
6. ขั้นตอนดังกล่าวข้างต้นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติ

การแยกราจากใบ

เลือกใบที่เริ่มแสดงอาการของโรคเนื่องจากเป็นระยะที่รามีการเจริญเติบโตดี ตัดใบพืชออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ

โดยเลือกตัดบริเวณขอบของแผลด้วยกรรไกร

หรือใบมิดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ฆ่าเชื้อผิวภายนอกพืชโดยการแช่ในสาร

Sodium hypochlorite 10 % เป็นเวลา 1 - 3 นาที

ล้างออกด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ

ใช้ปากคีบที่สะอาดคีบชิ้นใบพืชไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การแยกราจากลำต้น

การเลือกส่วนของพืชเพื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์

ในกรณีที่รอยแผลอยู่ลึกลงไปในลำต้นหรือเป็นอาการที่เกิดขึ้นบริเวณท่อน้ำอาหาร

ใช้ปลายมีดสะอาดตัดเนื้อเยื่อบริเวณขอบของรอยแผลที่เกิดขึ้นในส่วนด้านในของลำต้นเป็นชิ้นขนาด 3 - 5 มิลลิเมตร

ใช้ปากคีบที่สะอาดคีบชิ้นพืชวางลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมโดยตรง

ส่วนลำต้นที่มีรอยแผลขนาดเล็กอยู่เฉพาะด้านนอก

หรือในสภาพที่ไม่สามารถตัดชิ้นเนื้อเยื่อที่อยู่ด้านในได้

ให้ตัดชิ้นเนื้อเยื่อบริเวณรอยต่อของแผลกับเนื้อเยื่อพืชปกติด้วยใบมีดสะอาด

ฆ่าเชื้อผิวภายนอกพืชโดยใช้สาร Sodium hypochlorite 10% เป็นเวลา 1 - 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปวางบนอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ

การแยกราจากราก

การแยกราจากรากที่มีขนาดเล็ก ล้างรากพืชให้ดินที่ติดอยู่หลุดออก

หยดน้ำกลั่นไว้กลางจานเลี้ยงเชื้อพื้นที่ประมาณ 2 - 3 ตารางเซนติเมตร

วางรากพืชลงไปเพื่อให้มองเห็นอาการของโรคที่ได้ชัดเจน

ใช้ใบมีดหรือปากคีบที่สะอาดฉีกเปลือกรากออก

แล้วตัดรากพืชบริเวณรอยแผลขนาดประมาณ 5 มิลลิเมตร

อาจฆ่าเชื้อผิวภายนอกรากพืชโดยใช้สารละลายทำความสะอาดอย่างเจือจาง

แต่ต้องทำด้วยความระมัดระวังเพราะผิวรากพืชบอบบาง

วิธีการที่ดีที่สุดคือนำรากไปวางบนตะแกรงร่อนที่มีรู ขนาดเล็ก

วางตะแกรงใต้น้ำที่ไหลผ่านได้ เปิดน้ำเพียงเบา ๆ เป็นเวลา 30 - 90 นาที

ใช้ใบมีดหรือปากคีบย้ายรากพืชไปวางบนอาหารที่เหมาะสมในจานเลี้ยงเชื้อ

5.1.1 การเก็บตัวอย่างในสภาพชื้น (Moist chamber)

ในกรณีที่ตัวอย่างพืชแสดงอาการของโรคไม่สามารถแยกเชื้อได้ เนื่องจากไม่พบส่วนของเชื้อราบนพืชจะต้องทำ Moist chamber ก่อน โดยนำตัวอย่างพืชเป็นโรควางในภาชนะที่มีความชื้นเพื่อกระตุ้นให้เชื้อสาเหตุ สร้างส่วนขยายพันธุ์และสปอร์ แต่มักพบปัญหาเนื่องจากจุลินทรีย์อื่นที่อาศัยอยู่บนผิวพืชเจริญขึ้นมาด้วยการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อเช่น แอลกอฮอล์ หรือ Sodium hypochlorite 10% เช็ดทำความสะอาดใบพืชก่อนอาจช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นได้บ้าง แต่ก็ทำลายโครงสร้างบางอย่างของเชื้อสาเหตุที่อยู่บนผิวพืชได้ สามารถใช้การวิธีการอื่น เช่น การล้างตัวอย่างพืชด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อและซับให้แห้งก่อนนำไปปมในสภาพชื้น

การเก็บตัวอย่างในสภาพชื้น ไม่ควรวางตัวอย่างพืชไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิสูง ควรเก็บในที่ที่มีแสงสว่าง เช่น วางบนโต๊ะในห้องปฏิบัติการ แต่ต้องไม่ให้แสงแดดส่องโดยตรง และต้องมีอุณหภูมิค่อนข้างสม่ำเสมอเพื่อป้องกันไอน้ำกลั่นตัวเป็นหยดน้ำ ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอทุกวันเพื่อดูการสร้างสปอร์ของเรา เมื่อราสร้างสปอร์จึงใช้เข็มสะอาดเขี่ยสปอร์มาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หรือวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการแยกเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ต่อไป

จานเลี้ยงเชื้อชนิดแก้วหรือพลาสติกเหมาะสำหรับใช้ปมตัวอย่างพืชขนาดเล็ก เช่น ใบพืชหรือกิ่งไม้ขนาดเล็ก ส่วนกล่องพลาสติกหลาย ๆ ขนาดเหมาะที่จะใช้ปมตัวอย่างพืชขนาดใหญ่ ถ้าเป็นตัวอย่างขนาดใหญ่มากอาจปมด้วยถุงพลาสติกใบใหญ่หรือถุงพลาสติกที่ใช้เป็นถุงหนึ่งฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เล็กใช้แล้ว เป็นต้น

อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการปมตัวอย่างควรทำความสะอาดด้วยการนึ่งหรืออบด้วยความร้อน ถ้านึ่งหรืออบไม่ได้ควรเช็ดด้วย แอลกอฮอล์ 70 % แล้วผึ่งให้แห้ง ถุงพลาสติกที่ใช้ควรเป็นใบใหม่ ใช้กระดาษกรองที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ววางลงในจานเลี้ยงเชื้อหรือในกล่องพลาสติกและใส่น้ำกลั่นสะอาดหนึ่งฆ่าเชื้อผสมกลีเซอรอล ลงไป 2 - 3 หยด ลงบนกระดาษกรอง กลีเซอรอลจะช่วยทำให้น้ำระเหยได้ช้าลง ในกรณีที่ใช้กล่องพลาสติกขนาดใหญ่ควรใช้กระดาษซับที่ใช้ในห้องปฏิบัติการแทนกระดาษกรอง

วางตัวอย่างพืชบนแท่งพลาสติกหรือวัสดุที่ใช้รองที่ทำความสะอาดแล้วด้วยแอลกอฮอล์ 70% บนกระดาษชั้น

5.1.2 การแยกแยะโดยวิธี (Dilution techniques)

การแยกแยะจากดินหรือจากผิวพืช เช่น บนใบพืชหรือดอก โดยล้างส่วนที่เป็นโรคด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำน้ำที่ได้ไปทำให้เจือจาง (dilution) อัตราต่าง ๆ

ถ้าสารแขวนลอยมีจุลินทรีย์อยู่มากก็อาจใช้ความเจือจางต่ำเพื่อให้ได้ราบริสุทธิเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ (single colony) บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ควรหลีกเลี่ยงอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความสมบูรณ์สูงเพราะจะทำให้ราสร้างเส้นใยมากและไม่สร้างสปอร์

ควรใช้สารปฏิชีวนะ เช่น streptomycin sulfate เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียปนเปื้อน

การแยกแยะจากดินโดยวิธี Dilution techniques สามารถทำได้โดยใช้ดินจำนวนเล็กน้อยบด หรือร่อนดินผ่านตะแกรงละเอียด ใส่ดินลงในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร ในขวดแก้ว

การแยกแยะจากตัวอย่างพืชโดยวิธี Dilution techniques ดำเนินการโดยใส่ตัวอย่างพืชที่ต้องการแยกเชื้อลงในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกัน ใช้ไปเปิดสะอาดดูดสารแขวนลอย 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วซึ่งมีน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ใช้ไปเปิดสะอาดอันใหม่ดูดสารแขวนลอยนี้ 1 มิลลิลิตร นำไปใส่ในหลอดแก้วซึ่งมีน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน

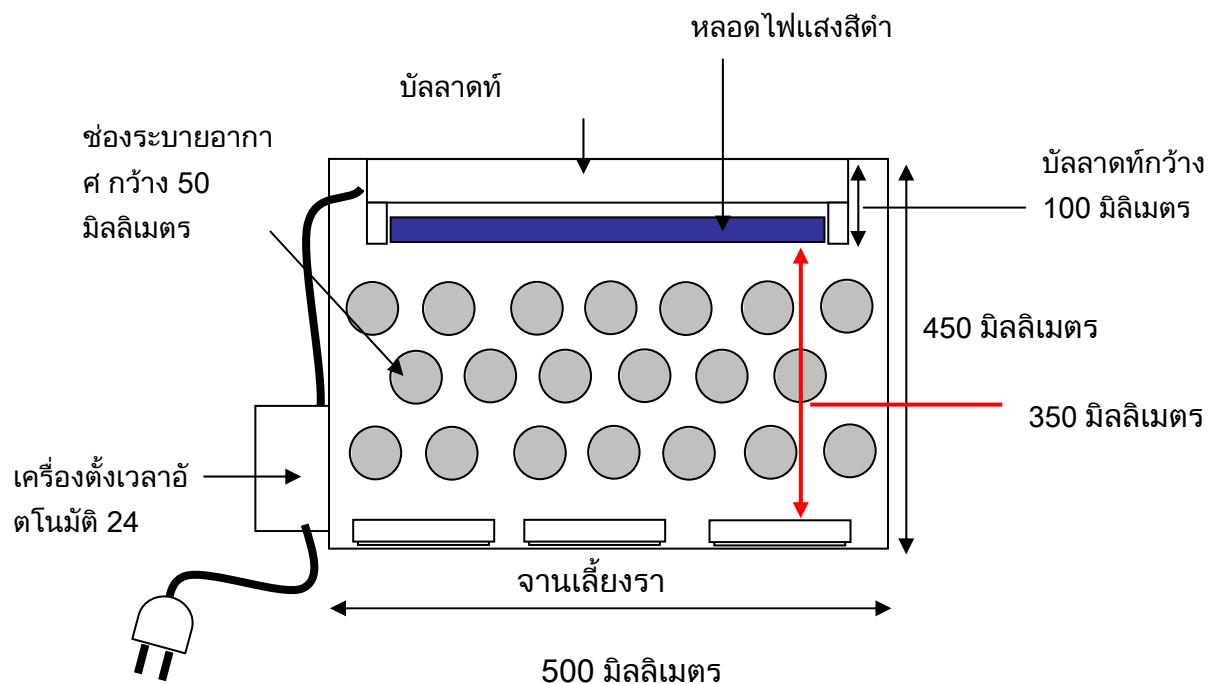
ปฏิบัติตามขั้นตอนดังกล่าวจนได้ dilution ที่เหมาะสม นำสารแขวนลอยที่ความเจือจางสุดท้ายหยดลงอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้วที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยสารแขวนลอยที่หยดไว้นั้นให้ทั่วผิวหน้าอาหาร นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มจนราเจริญสร้างกลุ่มเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

แยกราที่เกิดขึ้นไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ก่อนที่ราต่าง ๆ
ในจานเลี้ยงเชื้อจะเจริญปะปนกัน

ราบางชนิดอาจสร้างสปอร์ได้น้อย ตัวอย่างเช่นรากลุ่ม Ascomycetes หรือ
รากลุ่มที่สร้าง pycnidia กรณีเช่นนี้
อาจใช้วิธีนำส่วนขยายพันธุ์ใส่ลงในหยดน้ำกลั่นหนึ่งหยดบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด
และทิ้งให้ราปล่อยสปอร์ออกมา
ตรวจสอบสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง
นำสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นไปเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TWA
เมื่อเส้นใยเจริญออกมาให้ทำการย้ายลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อไป

การเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของรา

ราส่วนใหญ่สร้างสปอร์เพื่อใช้ขยายพันธุ์และแพร่ระบาดไปในธรรมชาติ
ความสามารถในการสร้างสปอร์ของราขึ้นกับสภาพแวดล้อม
ราส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิของห้องปฏิบัติการ
การจำแนกชนิดของราจำเป็นต้องใช้ลักษณะของสปอร์ในการจำแนก
นอกจากนี้สปอร์ยังจำเป็นต้องใช้ในการปลูกเชื้อเพื่อการพิสูจน์โรคอีกด้วย



ภาพที่ 8 โครงสร้างของกล่องบ่มเชื้อ ภายใต้แสง black light

สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อรา เช่น ห้องบ่มเชื้อที่มืดและร้อนอบอ้าว และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความสมบูรณ์สูง การชักนำให้ราสร้างสปอร์โดยใช้ใบพืช เช่น ใบข้าวโพด ใบคาร์เนชั่น ฟางข้าวสาลี ซึ่งเป็นพืชอาศัย นึ่งฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะช่วยให้ราสร้างสปอร์ได้ดีขึ้น

ราหลายชนิดสามารถชักนำให้สร้างสปอร์ได้ภายใต้แสงสีใกล้ม่วง (black light) แม้ว่าแสงชนิดนี้จะมีผลต่อเมดิสี ลักษณะของโคโลนี และอาจมีผลต่อสัณฐานวิทยาของรา แต่ผลกระทบนี้ไม่มากพอที่จะทำให้การจำแนกชนิดของราผิดไป การจัดทำกล่องสำหรับบ่มเชื้อ ติดตั้งหลอดไฟ black light ดังแสดงในภาพ

ข้อมูลสำหรับการใช้กล่องบ่มเชื้อ เพื่อชักนำการสร้างสปอร์ของรา

- หลอดไฟ black light แบบ fluorescent มีขนาด 20 watt 40 watt และ 80 watt ถ้าไม่สามารถใช้หลอดไฟ cool light ที่มีแสง ultraviolet เกือบเท่ากันแทนหลอดไฟ black light ก็ได้ การติดตั้งอาจใช้หลอดไฟทั้ง 2 ชนิดติดตั้งร่วมกัน โดยใช้หลอด black light 2 หลอดประกบทั้ง 2 ด้านของหลอด cool white day light ไม่ควรใช้หลอดไฟฟ้าทังสแตน (สีเหลืองส้ม)
- ทำการเปิดแสง ultraviolet 12 ชั่วโมง สลับมืด 12 ชั่วโมง โดยการติดตั้งสวิตช์อัตโนมัติ
- ราบางชนิดต้องการความมืดเพื่อการสร้างสปอร์ ดังนั้นกล่องที่ใช้บ่มต้องไม่ให้แสงผ่านเข้าไปได้
- อาจใช้ black light หลังการบ่มเชื้อ 1 – 4 วัน และเปิดตลอดไปจนสิ้นสุดการทดลอง
- ถ้าอุณหภูมิร้อนเกินไปราบางชนิดไม่สามารถสร้างสปอร์ภายใต้แสง ultraviolet ได้

5.2 การแยกแบคทีเรีย (Isolation of bacteria)

ถ้าแบคทีเรียเป็นสาเหตุของโรคจะพบเซลล์ของแบคทีเรียจำนวนมากบริเวณขอบของรอยแผล

หรือบีบให้เซลล์แบคทีเรียไหลออกมาจากท่ออาหารของพืชที่แสดงอาการเปลี่ยนสี

ขั้นตอนพื้นฐานของการตรวจสอบและแยกแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชมีดังนี้

1. ล้างตัวอย่างพืชโดยผ่านน้ำไหล เพื่อล้างดิน เศษผง หรือสิ่งสกปรกอื่น ๆ

ออกจากผิวพืช

ถ้าหากตัวอย่างพืชไม่มีดินติดมาไม่จำเป็นต้องทำความสะอาดผิวพืช

ถ้าตัวอย่างพืชค่อนข้างแห้งหรือแห้งสนิท

ก็ไม่จำเป็นต้องทำความสะอาดเช่นกัน

เพราะสารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจะซึมเข้าไปทำลายเซลล์แบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว หากจำเป็นต้องทำความสะอาดตัวอย่าง อาจจุ่มตัวอย่างพืชเร็ว ๆ

ในสารละลาย Sodium hypochlorite 10% หลังจากการจุ่มในสารละลาย

Sodium hypochlorite 10% แล้ว

ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้ออีกครั้งหนึ่ง

ถ้าตัวอย่างพืชเป็นส่วนหนึ่งของพืชที่มีความหนา เช่น ตาดอก ผล แผลแคงเกอร์

หรือ gall อาจล้างตัวอย่างเหล่านี้ใน เอทิลแอลกอฮอล์ 70 %

และลนไฟก่อนการแยกเชื้อบริสุทธิ์

2. ตัดตัวอย่างพืชเป็นชิ้นเล็ก ๆ

บริเวณรอยต่อของแผลระหว่างเนื้อเยื่อปกติและบริเวณที่แสดง

อาการของโรค

หยดน้ำกลั่นลงบนแผ่นสไลด์ที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยการลนไฟมาแล้ว วางชิ้นตัวอย่างลงในหยดน้ำกลั่น

ตัวอย่างพืชที่มีความหนาควรฉีกให้ขาดออกหลังจากวางบนหยดน้ำก่อนปิด

ด้วย cover slip ที่ผ่านการลนไฟแล้ว วางบนตัวอย่างพืชเบา ๆ

แล้วตรวจสอบทันทีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ชนิด

phase contrast ที่กำลังขยาย 400 เท่า อาจจำเป็นต้องลดระดับ condenser

ลง หรือปิดแผ่นปรับแสงใต้กล้อง (substage diaphragm)

เพื่อให้มองเห็นเซลล์ของแบคทีเรียชัดเจนขึ้น

แบคทีเรียจะไหลเป็นกลุ่มออกมารอบรอยแผลที่ตัดไว้

การตรวจสอบต้องพิจารณาให้แน่ใจว่าสิ่งที่มองเห็นไม่ใช่วัสดุอื่น เช่น

น้ำยางของพืช พลาสมิด หรือเม็ดแป้งที่ปนมากับแบคทีเรีย ถ้ามองเห็นกลุ่มของแบคทีเรียไหลออกจากรอยแผลที่ตัดให้ยก cover slip ออก ใช้ loop แตะน้ำบนแผ่นสไลด์ไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม บางครั้งอาจจำเป็นต้องปล่อยให้ชิ้นตัวอย่างวางอยู่บนหยดน้ำนานหลายชั่วโมงจึงสามารถนำน้ำบนแผ่นสไลด์ไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้

3. การเกลี่ยแบคทีเรียให้กระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ควรใช้ loop แตะหยดน้ำที่มีเซลล์แบคทีเรีย 1 loop วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อ วิธีการทำให้เซลล์แบคทีเรียกระจายไปบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีหลายวิธี เช่น

วิธีการที่ 1 การลาก loop เป็นลักษณะซิกแซกบนเนื้อที่ 1 ใน 4 ของจานเลี้ยงเชื้อ โดยตั้งต้นจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ การลาก loop ครั้งต่อมาทำในเนื้อที่ 1 ใน 4 ของส่วนที่ 2 โดยให้ลากทับกับเส้นของการลาก loop ในส่วนที่ 1 (ภาพที่ 7) loop ที่ใช้ต้องปลอดเชื้อและปล่อยให้เย็นก่อนนำไปแตะบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ครั้งต่อไปทุกครั้ง

วิธีการที่ 2 หยดแบคทีเรีย 1 loop ลงบนอาหารในจานเลี้ยงเชื้อแล้วใช้ loop ลากหยดน้ำให้ทั่วทั้งจานเลี้ยงเชื้อเบา ๆ ตั้งแต่ขอบบนจนถึงขอบล่างอย่างรวดเร็ว

จุดประสงค์ของการเกลี่ยแบคทีเรียทั้ง 2 วิธีนี้ เพื่อให้เซลล์ของแบคทีเรียกระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และสร้างกลุ่มของเชื้อจากเซลล์เซลล์เดียว

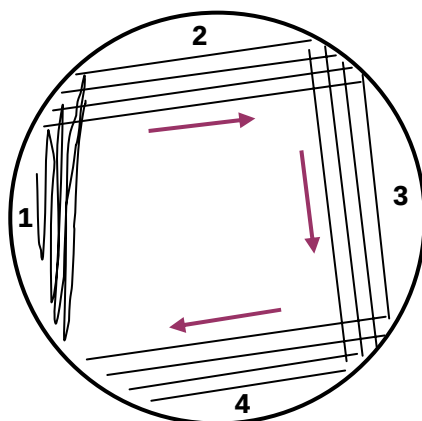
4. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้จะต้องเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสาเหตุ ควรทิ้งให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เทไว้ในจานเลี้ยงเชื้อเย็นและไม่มีหยดน้ำเกาะบนผิวอาหาร โดยวางจานเลี้ยงเชื้อคว่ำไว้ 24 ชั่วโมง หรือแฉกจานเลี้ยงเชื้อที่วางในตู้เชื้อชนิดลมเป่าออก (laminar flow) นาน 30 นาที ระวังอย่าให้มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น

5. จานเลี้ยงเชื้อควรวางไว้ในลักษณะคว่ำลงเพื่อป้องกันไอน้ำจับตัวเป็นหยด
น้ำบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 – 28 องศาเซลเซียส

6. ขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น

สามารถปรับเปลี่ยนได้ตามประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติ



ภาพที่ 9 การแยกแบคทีเรีย

(1) หยดน้ำที่มีเซลล์แบคทีเรีย (2) การลาก loop ครั้งแรก (3) การลาก loop ครั้งที่ 2 (4) การลาก loop ครั้งที่ 3 เกิดแบคทีเรีย โคโลนีเดี่ยวบริเวณนี้

หลังจากเกลี่ยให้แบคทีเรียกระจายไปทั่วอาหารบนจานเลี้ยงเชื้อแล้ว

นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 – 5 วัน

ถ้าแบคทีเรียเป็นชนิดที่เจริญช้ามาก อาจบ่มเป็นเวลา 10 – 14 วัน

การจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยใช้ลักษณะอาการของโรคเป็นบรรทัดฐานสามารถเลือกแยกเชื้อบริสุทธิ์จากกลุ่ม colony

ของแบคทีเรียที่คาดว่าจะสาเหตุของโรคได้แม้ว่าจะมีแบคทีเรียอีกหลายชนิดเจริญอยู่ด้วยกันบนอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ

ในกรณีที่ได้อตัวอย่างพืชที่ดีและเลือกตัวอย่างพืชได้ถูกต้องก็จะได้แบคทีเรียสาเหตุบนอาหารทดสอบ ถ้าพบ colony ของแบคทีเรียมากกว่า 1 ชนิด

ควรสังเกตจำนวนกลุ่มของแบคทีเรียทุกชนิดที่พบบนอาหาร

ควรตรวจสอบแบคทีเรียที่พบบ่อย

จากการแยกเชื้อยกเว้นกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ใช่เชื้อสาเหตุโรคพืช

๓

การเลือกกลุ่มแบคทีเรียไปเลี้ยงเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ควรเลือกจาก colony ที่เกิดเดี่ยว ๆ

วิธีการอื่นที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียใช้วิธีเดียวกับการแยกราโดยการวางชั้นตัวอย่างพืชโดยตรงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะพบกลุ่มแบคทีเรียเจริญรอบ ๆ ชั้นพืช วิธีการนี้จะเหมาะสมในกรณีที่มีจุลินทรีย์อื่นปะปนมาบนชั้นตัวอย่างพืช ซึ่งเชื้อเหล่านี้มักเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่พบเสมอในธรรมชาติ (saprobies) ดังนั้นวิธีการเกลี่ยแบคทีเรียบนอาหารจะใช้ไม่ได้ผลเนื่องจากแบคทีเรียสาเหตุที่เจริญช้ากว่าจะตายไปก่อน

5.3 การแยกไส้เดือนฝอย (Isolation of nematodes)

ไส้เดือนฝอยเป็นสัตว์ขนาดเล็ก ลำตัวไม่มีข้อปล้อง อาศัยอยู่ได้ทุกแหล่งที่มีน้ำถึงแม้ว่าจะมีน้ำอยู่เพียงชั่วคราว ไส้เดือนฝอยบางชนิดมีพืชอาศัยกว้าง ไส้เดือนฝอยหลายชนิดเข้าทำลายพืชโดยเฉพาะเจาะจงกับพืชอาศัย พืชและสัตว์ส่วนใหญ่อาจจะมีไส้เดือนฝอยเข้าทำลายได้ตั้งแต่ 1 ชนิดหรือมากกว่า อาจกล่าวได้ว่าไส้เดือนฝอยเป็นศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สำหรับไส้เดือนฝอยกลุ่มที่เรียกว่า free-living อาศัยแบคทีเรียและราเป็นอาหารจะมีบทบาทที่สำคัญในระบบนิเวศน์ในดิน

ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มที่สามารถเคลื่อนที่ได้และอาศัยหากินบนพืชหรือในส่วนของพืช (Migratory nematodes) ไส้เดือนฝอยกลุ่มนี้มีพืชอาหารหลายชนิด ต้องมีไส้เดือนฝอยในปริมาณมากจึงจะทำให้เกิดความเสียหายและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ
2. กลุ่มที่อาศัยฝังตัวอยู่กับที่บนรากพืชและมีโครงสร้างพิเศษเพื่อใช้ดูดสารอาหาร และใช้ป้องกันตัว (Sedentary nematodes) เป็นกลุ่มที่มีพืชอาศัยในวงแคบแต่มีความเฉพาะเจาะจงกับพืชอาศัยและมีความสัมพันธ์กับพืชอาศัยในระดับโมเลกุล ตลอดจนมีความสำคัญต่อผลผลิตพืช

การแยกไล่เดือนฝอยออกจากดินหรือพืชเพื่อจำแนกชนิด

5.3.1 การแยกไล่เดือนฝอยจากดิน (Soil samples)

วัตถุประสงค์เพื่อการจำแนกชนิดและการเก็บตัวอย่างไว้ในศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช นำดินบริเวณรอบรากพืชที่เป็นโรคมานำมาทำการศึกษา ในกรณีที่พืชแสดงอาการผิดปกติ ให้สุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบ ๆ ราก และเก็บดินบริเวณที่พืชแสดงอาการผิดปกติมาตรวจเพื่อเป็นการเปรียบเทียบ ความลึกของดินและจำนวนของตัวอย่างดินที่เก็บจะมีความสำคัญอย่างยิ่งในการเก็บตัวอย่างนั้น

ควรเก็บตัวอย่างดินที่มีความชื้นสูงเนื่องจากไล่เดือนฝอยบางชนิดที่อยู่ในระยะพักตัวอาจถูกทำลายได้เมื่อดินมีสภาพแห้งมาก เก็บตัวอย่างดินใส่ถุงพลาสติก เก็บไว้ในสภาพที่เย็นในระหว่างการเดินทาง เมื่อกลับถึงห้องปฏิบัติการให้รีบดำเนินการแยกไล่เดือนฝอยโดยเร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้ หรือเก็บตัวอย่างดินไว้ในตู้เย็นก่อนนำมาแยก อย่างไรก็ตามไล่เดือนฝอยบางชนิดไม่สามารถเก็บไว้ในตู้เย็นได้

ในกรณีที่ดินร่วน ให้นำดินมาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 10 มิลลิเมตร เพื่อแยกเศษซากพืชออก คลุกเคล้าดินให้เข้ากัน แต่ไม่สามารถใช้วิธีนี้ในกรณีที่เป้นดินเหนียว

วิธีการแยกไล่เดือนฝอยอาจทำได้ทั้งแบบแยกโดยตรง (active methods) ซึ่งเป็นการแยกไล่เดือนฝอยที่เคลื่อนที่ได้ และแบบแยกทางอ้อม (passive methods) ซึ่งเป็นการแยกโดยใช้ขนาดและน้ำหนักของไล่เดือนฝอย วิธีการที่ง่ายที่สุดคือการแยกไล่เดือนฝอยที่เคลื่อนที่ได้โดยใช้

Whitehead tray หรือการใช้ Baermann funnel แต่การแยกโดยวิธีทั้ง 2 แบบนี้ใช้เวลา 2 – 4 วัน และอาจได้จำนวนไล่เดือนฝอยที่เคลื่อนที่ช้าหรือมีขนาดใหญ่ได้น้อย

การแยกไล่เดือนฝอยแบบแยกโดยทางอ้อมเป็นการแยกไล่เดือนฝอยโดยใช้หลายวิธีร่วมกัน คือ การกรองผ่านตะแกรง และการลอยตัวของไล่เดือนฝอยในสารละลายความหนาแน่นสูง การแยกโดยวิธีนี้มีความแปรปรวนสูง และอาจขาดประสิทธิภาพ

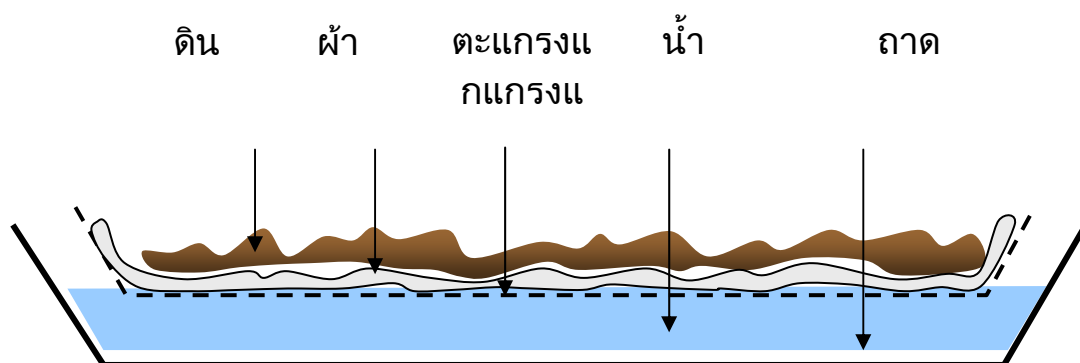
วิธีแยกไส้เดือนฝอยโดยใช้ Whitehead tray (Whitehead tray extraction)

เกลี่ยตัวอย่างดินบนกระดาษทิชชูหรือผ้าเนื้อละเอียดที่วางบนตะแกรงที่มีรูขนาดใหญ่ วางตะแกรงบนภาชนะที่หล่อน้ำให้พอดีให้ดินเปียกหมาด ๆ (ภาพที่ 10) วางทิ้งไว้ 1 – 4 วัน

ไส้เดือนฝอยที่มีชีวิตจะเคลื่อนที่ลงด้านล่างผ่านกระดาษทิชชูลงในน้ำ ปริมาณของดินที่ใช้ขึ้นอยู่กับขนาดของภาชนะ ดิน 200 กรัม

จะใช้ภาชนะขนาดใหญ่ 450 X 300 มิลลิเมตร การเกลี่ยดินบาง ๆ

บนกระดาษทิชชูจะช่วยให้การแยกไส้เดือนฝอยมีประสิทธิภาพและลดเวลาการปฏิบัติงาน



ภาพที่ 10 Whitehead tray ที่ใช้แยกไส้เดือนฝอยจากดินและพืช

ก่อนเก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอยค่อย ๆ

ยกตะแกรงขึ้นจากน้ำระวังอย่าให้ดินไหลลงไปในน้ำ เเทน้ำในภาชนะลงภาชนะ

เช่น cylinder วางทิ้งไว้หลาย ๆ ชั่วโมง

ดูน้ำออกจากภาชนะให้เหลือประมาณ 5 – 20 มิลลิลิตร

ระวังอย่าให้ไส้เดือนฝอยลอยขึ้นมาบนผิวน้ำ

การปฏิบัติอีกวิธีหนึ่งคือเทน้ำผ่านตะแกรงที่มีรูขนาดเล็ก (20 - 38 μm)

แต่ตะแกรงดังกล่าวมีราคาแพงและปฏิบัติงานได้ยาก

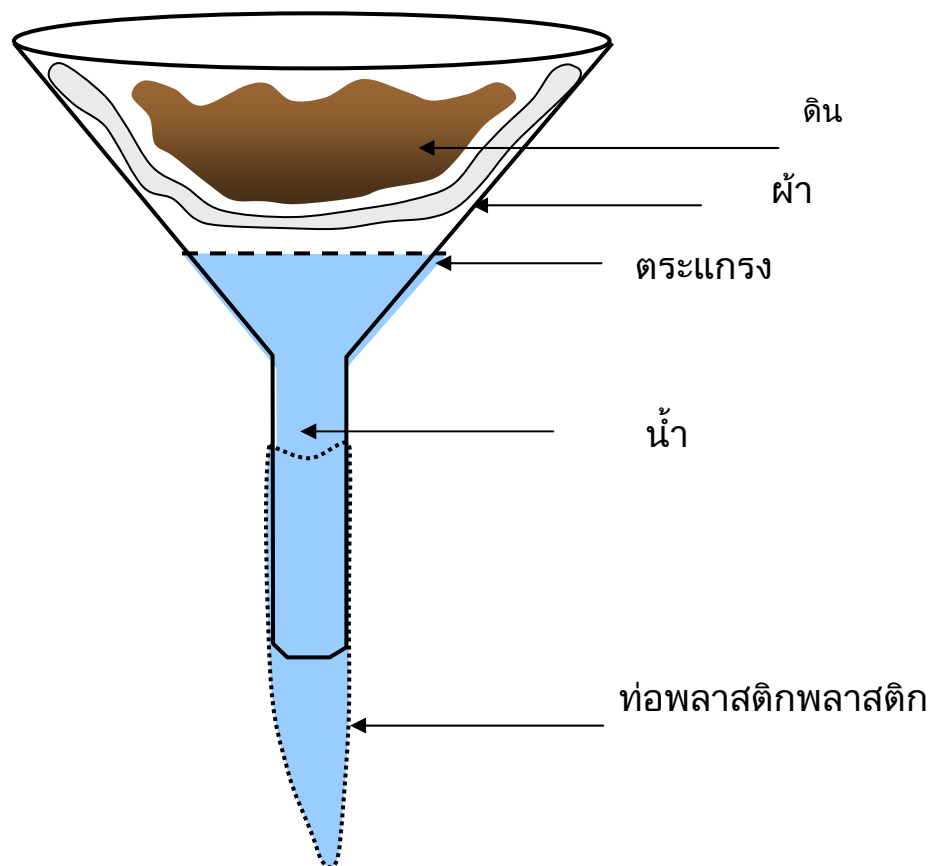
วิธีเทน้ำผ่านตะแกรงนี้อาจทำให้ไส้เดือนฝอยหลุดลอดผ่านตะแกรงไปในการปฏิบัติงาน

การลดการสูญเสียไส้เดือนฝอยจากการแยกวิธีนี้โดยนำน้ำที่ผ่านการกรองแล้วมากรองผ่านตะแกรงใหม่อีกหลาย ๆ ครั้ง

วิธีแยกไส้เดือนฝอยโดยใช้กรวย (Baermann funnel)

นำดินมาวางลงบนกระดาษทิชชูหรือผ้าเนื้อละเอียดที่วางไว้บนกรวยแก้ว
สวมท่อพลาสติกไว้ที่ปลายกรวย ใช้หลอดหนีบนีบปลายท่อพลาสติกไว้
เติมน้ำในกรวยให้เปียกพอดี (ภาพที่ 11)

การปฏิบัติงานแต่ละครั้งจะใช้ดินเพียงเล็กน้อย
ความได้เปรียบของวิธีการนี้คือไส้เดือนฝอยจะรวมกันอยู่ในท่อพลาสติกเหนือล
วดหนีบและพร้อมที่จะผ่านลงภาชนะรองรับซึ่งใช้ vial ปริมาตร 5 – 10
มิลลิลิตร



ภาพที่ 11 กรวย Baermann funnel ที่ใช้แยกไส้เดือนฝอยจากดินและพืช

การร่อนดินด้วยน้ำและการหมุนเหวี่ยง (Wet sieving and differential centrifugation)

ละลายดินในน้ำในอ่างขนาด 4 ลิตร วางทิ้งไว้ 10 วินาที
เพื่อให้ตะกอนดินขนาดใหญ่จมลงก้นอ่าง
เทน้ำที่ได้จากการละลายดินนี้ผ่านตะแกรงขนาด 38 μm ลงในอ่างใบที่ 2

ล้างไส้เดือนฝอยออกจากตะแกรง นำไปหมนเหวี่ยง
 น้ำที่ใช้ล้างไส้เดือนฝอยออกมาปริมาณไม่มากนักและไส้เดือนฝอยจำนวน
 หนึ่งจะลอดผ่านตะแกรงลงไปได้
 ให้นำน้ำส่วนที่รองไว้ไปร่อนผ่านตะแกรงอีกครั้งเพื่อกรองไส้เดือนฝอย
 และถ้ายังมีไส้เดือนฝอยค้างอยู่ในน้ำอีกให้ปฏิบัติเช่นนี้อีกเป็นครั้งที่ 3
 นำน้ำส่วนที่มีไส้เดือนฝอยนี้ไปหมนเหวี่ยง
 คัดน้ำส่วนบนออกด้วยความระมัดระวังและเหลือน้ำที่มีไส้เดือนฝอยไว้เล็กน้อย
 นำไปแขวนลอยในสารละลายน้ำตาล (450 กรัม / ลิตร)
 และหมนเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่ง นำอินทรีย์วัตถุที่ลอยอยู่ส่วนบนออก
 เทส่วนน้ำซึ่งเป็นสารละลายน้ำตาลลงบนตะแกรงร่อนขนาด 38 μm
 และล้างไส้เดือนฝอยออกจากตะแกรง
 นำส่วนน้ำที่ผ่านตะแกรงออกไปนั้นกลับมาร่อนผ่านตะแกรงอีกครั้งหนึ่ง
 เพื่อเก็บไส้เดือนฝอยที่หลุดออกจากการร่อนครั้งแรก

ความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลอาจทำลายตัวไส้เดือนฝอยได้
 ดังนั้นควรปฏิบัติงานโดยเร็วที่สุด สารเคมีชนิดอื่นที่ใช้แทนน้ำตาลได้ ได้แก่
 NaCl, MgSO_4 or colloidal silica (Ludox, DuPont de Nemours).

การแยก Cysts Nematodes (Extracting cysts)

ละลายดินที่ผึ่งลมให้แห้งแล้วในน้ำใน beaker ขนาด 4 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10
 นาที เพื่อให้ดินจมลงก้น beaker เทผ่านลงในตะแกรงร่อนขนาดใหญ่ (710
 μm) ที่วางซ้อนบนตะแกรงขนาด 250 μm
 ล้างดินที่เหลือและร่อนเช่นเดียวกันนี้อีก 2 ครั้ง
 นำเศษอินทรีย์วัตถุและไส้เดือนฝอยที่ค้างบนตะแกรงละเอียด (250 μm)
 ไปวางบนกระดาษกรองที่วางอยู่บนกรวยแก้ว Buchner funnel
 โดยใช้ปั๊มสุญญากาศ ก่อนนำไปตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าใช้กรวย
 Conical funnel อินทรีย์วัตถุจะแขวนลอยอยู่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% cyst
 ของไส้เดือนฝอยจะลอยขึ้นมาเรียงเป็นแถบบริเวณส่วนบนของกระดาษกรอง

5.3.2 การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างพืช (Plant samples)

ไส้เดือนฝอยสามารถอาศัยอยู่ในราก ลำต้น ใบ และเมล็ด วิธีแยกไส้เดือนฝอยจึงแตกต่างกันขึ้นกับส่วนของตัวอย่างและชนิดของไส้เดือนฝอย

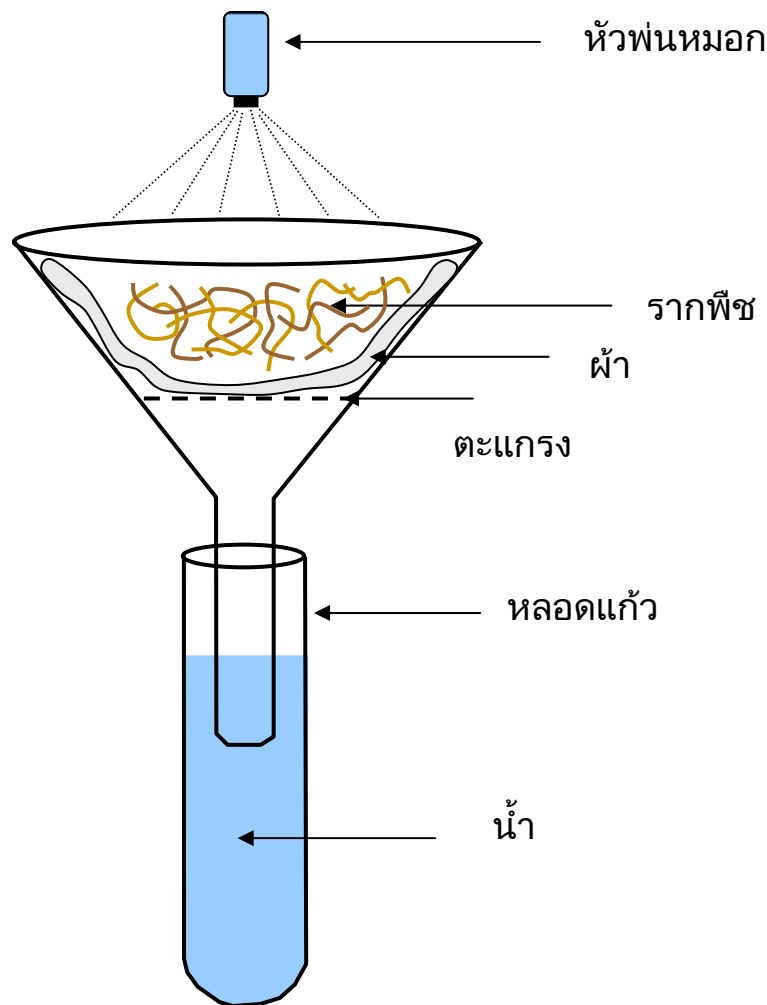
ไส้เดือนฝอยชนิดเคลื่อนที่อาศัยหากินในชั้นส่วนพืชควรใช้วิธีแยกแบบพ่นหมอก (mist) จะให้ผลดีที่สุด แม้ว่าจะสามารถใช้ถาด Whitehead tray หรือใช้กรวย Baermann funnel ได้ก็ตาม การแยกไส้เดือนฝอยชนิดอาศัยฝังตัวในพืช

อาจใช้วิธีนำไส้เดือนฝอยออกมาจากส่วนของพืชที่ถูกทำลายหรือเก็บรักษาไส้เดือนฝอยไว้ในเนื้อเยื่อพืชการแยกไข่ของไส้เดือนฝอยกลุ่มนี้โดยใช้ตะแกรงร่อน ส่วนไส้เดือนฝอยระยะวัยอ่อนและไส้เดือนฝอยเพศผู้ตัวเต็มวัย ซึ่งเคลื่อนที่ได้จะสามารถแยกได้ด้วยวิธีการพ่นหมอก

วิธีการพ่นหมอก (Mist Extraction)

ติดตั้งกรวยแก้วที่มีการวางตะแกรงไว้ด้านบนในตู้พ่นหมอก (ภาพที่ 12) ตัดชิ้นพืชให้มีความยาวประมาณ 10 มิลลิเมตร วางบนกระดาษทิชชูหรือผ้าเนื้อละเอียดที่วางบนตะแกรงภายในกรวยแก้ว พ่นน้ำเป็นหมอกละเอียดทุก 10 นาที เป็นเวลาครั้งละ 10 วินาที น้ำที่ไหลลงในหลอดแก้วใต้กรวยจะล้นออกจากหลอดแก้วในอัตราที่ช้ามาก ไส้เดือนฝอยที่ออกมาจากรากจะไหลลงมาและตกตะกอนอยู่ก้นหลอดแก้ว และจะเก็บไส้เดือนฝอยได้ในเวลา 2 – 4 วัน จากนั้นทำการลดปริมาณน้ำในหลอดแก้วลงโดยการดูดน้ำส่วนบนออกด้วยความระมัดระวัง

ละอองหมอกมีออกซิเจนที่สามารถลดสารพิษที่ปลดปล่อยจากชั้นส่วนพืชขณะสลายตัว จึงทำให้ไส้เดือนฝอยที่ได้อยู่ในสภาพสมบูรณ์ การแยกไส้เดือนฝอย อาจใช้วิธีใช้ถาด Whitehead tray หรือการใช้กรวย Baermann funnel ก็ได้ แต่มีข้อจำกัดต่อชนิดของไส้เดือนฝอย



ภาพที่ 12 การแยกไส้เดือนฝอยด้วยการพ่นหมอกบนเนื้อเยื่อพืช

การตัดชิ้นพืช (Dissection)

นำตัวอย่างพืชที่ตัดเป็นชิ้นวางลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำใส่ไว้เล็กน้อย
ใช้เข็มเย็บหรือปลายมีดตัดชิ้นพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์
กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ควรมีแสงไฟส่องทั้งด้านบนและด้านล่าง
วางตัวอย่างพืชไว้ชั่วคราวเพื่อให้ไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ออกมาจากเนื้อเยื่อพืช
ไส้เดือนฝอยที่หลุดออกมาจากชิ้นพืชจะมองเห็นได้ชัดเจนจากแสงไฟที่ส่อง
จากด้านล่าง
แสงที่ส่องทางด้านบนจะทำให้มองเห็นไส้เดือนฝอยกลุ่มที่ฝังตัวในพืชซึ่งลัก
ษณะตัวอ้วนกลม เช่น ไส้เดือนฝอยรากปม (*Heterodera* spp. และ
Meloidogyne spp.) และไส้เดือนฝอยบนเมล็ดและใบ (*Anguina* spp.)
ได้ชัดเจน

5.3.3 การเก็บรักษาและการทำสไลด์ถาวร (Preservation and mounting)

การฆ่าด้วยความร้อน (Heat killing)

ก่อนการเก็บรักษาหรือการทำสไลด์ต้องทำให้ไส้เดือนฝอยตายก่อนโดยที่ไส้เดือนฝอยยังคงมีโครงสร้างภายในที่สมบูรณ์วิธีการนี้ปฏิบัติได้โดยใช้ความร้อน เติมน้ำร้อนหรือสาร fixative เพื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นถึง 60 องศาเซลเซียส แล้วทำให้เย็นลงโดยเร็วด้วยน้ำเย็นหรือสาร fixative ถ้าไม่มี water bath การทำให้น้ำที่มีไส้เดือนฝอยมีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้ด้วยการเติมน้ำเดือดลงไปในปริมาณที่เท่ากันจะได้อุณหภูมิพอเหมาะในการฆ่าไส้เดือนฝอย อีกวิธีหนึ่งคือการใช้เตาอบ (55 - 60 องศาเซลเซียส) เป็นการให้ความร้อนกับไส้เดือนฝอยที่อยู่ในน้ำปริมาณไม่มากนัก

ตรวจสอบทุก	1	นาที่	จนกว่าไส้เดือนฝอยจะตายหมด
------------	---	-------	---------------------------

การฆ่าไส้เดือนฝอยด้วยความร้อนนี้ต้องไม่ใช้ความร้อนมากจนเกินไปและไม่ควรต้มไส้เดือนฝอยเพราะความร้อนจะทำลายโครงสร้างภายในตัวของไส้เดือนฝอยได้

การรักษาสภาพของตัวอย่างไส้เดือนฝอย (Fixing)

วิธีการที่ง่ายที่สุดในการทำให้ไส้เดือนฝอยคงสภาพคือการเติม formaldehyde เข้มข้นลงไปให้ได้สารละลายสุดท้ายที่มีความเข้มข้นของ formaldehyde ประมาณ 2 - 5 % หรือการให้ความร้อนร่วมกับ formaldehyde ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า

ควรแช่ตัวอย่างไว้ในสารคงสภาพนี้อย่างน้อย	12	ชั่วโมง
แต่โดยทั่วไปจะแช่ไว้เป็นเวลา	2	สัปดาห์

ก่อนที่จะปฏิบัติการในขั้นตอนต่อไป การเก็บรักษาตัวอย่างเป็นเวลานาน ๆ อาจจะใช้สารละลาย formaldehyde นี้ก็ได้

สาร fixative ชนิดอื่น ๆ เช่น TAF (3% formaldehyde, 0.2% triethanolamine ในน้ำกลั่น) และ FA 4:1 (4% formaldehyde, 0.1% acetic acid ในน้ำกลั่น) แต่สาร fixative ดังกล่าวไม่เหมาะสมสำหรับเก็บไส้เดือนฝอยเป็นเวลานาน และไม่ควรใช้เอทิลแอลกอฮอล์เป็นสาร fixative

เพื่อการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา
ยกเว้นการเก็บรักษาเพื่อวิเคราะห์ดีเอ็นเอเท่านั้น

การปิดผนึกสไลด์ (Mounting)

การทำสไลด์ตัวอย่างถาวร

ปฏิบัติได้โดยใส่ตัวอย่างใส่เดือนฝอยที่แขวนลอยอยู่ในน้ำลงในหยดกลีเซอรอลความเข้มข้น 2 – 5 % ประมาณ 2 – 3 มิลลิลิตร ใส่ไว้ในจานแก้วกันตื้นวางจานตัวอย่างใส่เดือนฝอยในเตาอบ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส หรือในโถดูดความชื้น น้ำจะระเหยไปในเวลา 1 สัปดาห์ ขณะที่วางจานไว้ควรเปิดฝาจานเพียงเล็กน้อย เพื่อให้ น้ำระเหยออกไปอย่างช้า ๆ

การเตรียมสไลด์ตัวอย่างใส่เดือนฝอยโดยการตัดใส่เดือนฝอยแต่ละตัวภายใน ตักล่องจุลทรรศน์สเตอริโอ ใช้เข็มปลายแหลม ขนนก ขนตาที่ใช้กวาดติดไว้กับปลายเข็ม หรือวัสดุที่คล้ายกัน ใช้วัสดุปลายแหลมนี้เขี่ยให้ใส่เดือนฝอยลอยขึ้นมาบนผิวหน้าและตักขึ้นให้พูนแรงตึงผิวของน้ำด้วยการกวาดขึ้นมาเร็ว ๆ การใส่น้ำที่มีใส่เดือนฝอยในภาชนะกันตื้นจะช่วยให้งานสะดวก แต่ต้องปรับระยะกล่องจุลทรรศน์ให้พอเหมาะ ขั้นตอนนี้ควรหมั่นฝึกซ้อมให้เกิดทักษะ แต่เมื่อทำได้คล่องแล้วการทำงานจะมีประสิทธิภาพมาก

ย้ายตัวอย่างใส่เดือนฝอยในแต่ละระยะการเจริญเติบโตประมาณ 10 ตัวอย่างลงในหยดกลีเซอรอลเข้มข้นบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ใช้ปลายเข็มเขี่ยตัวใส่เดือนฝอยให้เรียงกันกึ่งกลางสไลด์ โดยแน่ใจว่าใส่เดือนฝอยไม่ลอยขึ้นมาบนผิวกลีเซอรอล ใช้แท่งแก้ว (glass rod) หรือ เศษ cover slip (เบอร์ 0) ที่แตก วางรอบ ๆ ตัวใส่เดือนฝอย เพื่อป้องกันไม่ให้ cover slip กดตัวใส่เดือนฝอยให้แบน ควรใช้ cover slip ชนิดกลม การวาง cover slip บนหยดกลีเซอรอลต้องระวังอย่าให้

กลีเซอรอลไหลออกมาเปื้อน cover slip ถ้าต้องการปิดผนึกสไลด์ด้วยไข (wax) ต้องวางแผ่นสไลด์บนแผ่นความร้อนที่มีอุณหภูมิพอดีที่ไขเริ่มละลาย การใช้กลีเซอรอลเป็นวิธีการที่ใช้ทั่วไป แต่ปัจจุบันหาซื้อกลีเซอรอลได้ยาก สารชนิดอื่นที่สามารถใช้แทนกลีเซอรอลได้ เช่น epoxy resin (เช่น Araldite ชนิดแห้งใน 5 นาที) หรือ DePeX ก็ได้

อาจใช้น้ำยาทาเล็บเพื่อการปิดผนึกอาจทำได้แต่ในสภาพอากาศร้อนสไลด์จะไม่คงทน

5.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ (Growth media)

อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมได้จากส่วนผสมพื้นฐานทั่วไป

หรือได้จากอาหารสำเร็จรูปที่มีขายเป็นการค้า

อาหารสำเร็จรูปจะมีส่วนผสมที่คงที่มากกว่าอาหารจากส่วนผสมพื้นฐาน

การเติมสารปฏิชีวนะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถยับยั้งแบคทีเรียไม่ให้เจริญบนอาหาร แต่สารปฏิชีวนะส่วนใหญ่จะถูกทำลายด้วยความร้อน

ดังนั้นจึงควรเติมสารปฏิชีวนะลงในอาหารหลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วก่อนอาหารจะแข็งตัวเล็กน้อย

Penicillin (50 หน่วย ต่อ มิลลิลิตร) , streptomycin (50 หน่วย ต่อ มิลลิลิตร) และ

Tetracycline (30 หน่วย ต่อ มิลลิลิตร) อาจใช้เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือหลายชนิดร่วมกันก็ได้

Chloramphenicol (50 หน่วย ต่อ มิลลิลิตร)

ใส่ในขณะเตรียมอาหารเพราะสามารถนึ่งฆ่าเชื้อได้

ปริมาณวันที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับบริษัทผู้ขาย ควรเติมผงวันให้มากพอที่จะทำให้อาหารแข็งตัวสำหรับการลากเข็มเขียนบนผิวอาหารได้โดยอาหารไม่แตก

ถ้าไม่สะดวกพอให้ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อในการเตรียมอาหาร

อาหาร Potato dextrose agar (PDA) เป็นอาหารที่ดี
เหมาะสำหรับเลี้ยงเชื้อและแยกราบริสุทธี

เตรียมโดยล้างหัวมันฝรั่งโดยไม่ต้องปอกเปลือก ตัดออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ
ต้มในน้ำเป็นเวลา ประมาณ 1 ชั่วโมง

นำไปกรองผ่านภาชนะกรองน้ำที่นำไปเตรียมอาหาร

ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำมันฝรั่งไป

หรืออีกวิธีหนึ่งคือปั่นส่วนผสมทั้งหมดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า

เติมน้ำตาลเด็กโทรสหรือกลูโคส และวุ้นผง และเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

ส่วนผสมของอาหาร PDA

มันฝรั่ง	200 กรัม,
Dextrose/Glucose	20 กรัม
วุ้นผง	20 กรัม
น้ำ	1 ลิตร

อาจมีการปรับสูตรอาหารด้วยการใช้ผักหรือธัญพืชชนิดอื่น การเตรียมอาหาร PDA ครึ่งสูตร (half PDA) หรือเศษหนึ่งส่วนสี่สูตร ด้วยการลดสัดส่วนของมันฝรั่งและน้ำตาล

อาหาร Tap water agar (TWA) เป็นอาหารที่ดีเหมาะสำหรับการแยกราบวิสุทธิหลาย ชนิด อาจเติมฟางข้าว เมล็ดธัญพืช หรือส่วนของพืชที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหารเพื่อช่วยชักนำให้ราสร้างส่วนขยายพันธุ์และสปอร์มากขึ้น ผสมวุ้นผงลงในน้ำประปาแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ส่วนผสมของอาหาร TWA

วุ้นผง	20 กรัม
น้ำประปา	1 ลิตร

อาหาร V-8 juice agar (V-8J) เป็นอาหารที่ดีเหมาะสำหรับการเลี้ยงรา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง รา *Phytophthora* เตรียมโดย กรอง V-8J เพื่อให้ใส ผสมสัดส่วนทั้งหมดเข้าด้วยกัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ถ้าไม่สามารถหา V-8J ได้ อาจใช้น้ำคั้นของมะเขือเทศ แครอต และผักคื่นช่ายมาปั่นรวมกัน

ส่วนผสมของอาหาร V-8J

V-8J	200 มิลลิลิตร
CaCO ₃	3 กรัม
วุ้นผง	20 กรัม
น้ำกลั่น	800 มิลลิลิตร

อาหาร King's B agar (KBA)

เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์

โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียกลุ่ม fluorescent pseudomonads และ *Erwinia* spp. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ที่ 7.2 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที

ส่วนผสมของอาหาร KBA

Proteose Peptone	20 กรัม,
Glycerol	10 กรัม
K ₂ HPO ₄	1.5 กรัม
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	1.5 กรัม
วุ้นผง	15 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

อาหาร Nutrient agar (NA) เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ที่ 7.4 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ส่วนผสมของอาหาร NA

Yeast extract	3 กรัม
Peptone	3 กรัม
NaCl	5 กรัม
วุ้นผง	5 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

อาหาร Sucrose peptone agar (SPA)
 เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการแยกและเลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์
 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ที่ 7.2 - 7.4 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ
 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ส่วนผสมของอาหาร SPA

Sucrose	20	กรัม
Peptone	5	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.5	กรัม
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.25	กรัม
วุ้นผง	12	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

อาหาร Malt extract agar (MEA)
 เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงและแยกราและยีสต์ ปริมาณของ malt
 extract อาจเปลี่ยนแปลงได้ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน
 20 นาที

ส่วนผสมของอาหาร MEA

malt extract	2 - 20	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

อาหาร Glycerol agar (GA)
 ใช้ในการเลี้ยงราเพื่อการเก็บตัวอย่างราแห้งในศูนย์รวบรวมเชื้อ
 และตัวอย่างโรคพืช นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20
 นาที

นำราที่เลี้ยงบนอาหารที่ค่อนข้างแห้งมาวางบนอาหาร GA
ซึ่งเทลงบนฝาของจานเลี้ยงเชื้อ ตั้งจานเลี้ยงเชื้อไว้ ให้แห้งนาน 2 – 3 วัน
อาหาร GA จะยืดหยุ่นและเป็นยางมากกว่าอาหารอื่น ที่แห้ง

ส่วนผสมของอาหาร GA

Glycerol	25 กรัม
วุ้นผง	20 กรัม
น้ำประปา	1 ลิตร

บทที่ 6

การเก็บรักษาและรวบรวมตัวอย่างโรคพืช (How to preserve and store specimens)

6.1 ตัวอย่างแห้งโรคพืช (herbarium specimens)

ตัวอย่างแห้งโรคพืชหมายถึงชิ้นพืช

และ/หรือราที่เก็บไว้ในซองหรือห่อที่มีการบันทึกข้อมูล

ตัวอย่างโรคพืชอาจรวมถึงราที่อัดแห้งไว้

สไลด์ตัวอย่าง

ภาพถ่ายหรือภาพวาด ซองและห่อของตัวอย่าง อาจมีรายละเอียดต่าง ๆ ของตัวอย่าง

6.1.1 ตัวอย่างที่ทำแห้ง (Dried specimens)

การทำให้พืชและส่วนของราแห้งจากการอัดทับโดยการสอดตัวอย่างไว้ระหว่างแผ่นกระดาษซับหรือกระดาษหนังสือพิมพ์

นำไปวางระหว่างแผ่นอัดตัวอย่าง 2 แผ่น ซึ่งอาจทำด้วยไม้หรือวัสดุอื่นที่แข็งเพียงพอ ใช้เชือกมัดเพื่อให้มีแรงอัดพืชที่สอดไว้

ดังนั้นตัวอย่างพืชจะแห้งและเรียบไม่เสียรูปร่าง

ถ้าต้องการให้ตัวอย่างพืชแห้งเร็วขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาพร้อนชื้น อาจใช้ความร้อนหรือแรงลมเข้าช่วย

ควรเปลี่ยนกระดาษซับความชื้นหรือกระดาษหนังสือพิมพ์ทุกวัน

ควรเก็บตัวอย่างพืชไว้ในแผ่นอัดตัวอย่างจนแน่ใจว่าพืชแห้งสนิท

อาจวางแผ่นอัดตัวอย่างไว้ในที่ที่มีแดดหรือใกล้แหล่งความร้อนหรือในห้องปรับอากาศ ซึ่งจะช่วยให้ตัวอย่างพืชแห้งเร็วยิ่งขึ้น

เวลาที่ใช้ในการอัดตัวอย่างจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของตัวอย่างและความชื้นที่มีในตัวอย่าง ถ้านำตัวอย่างพืชออกจากแผ่นอัดตัวอย่างเร็วเกินไป

จะทำให้ตัวอย่างย่นหรือมีราอื่นเข้าทำลายในภายหลัง

โดยปกติตัวอย่างพืชจะแห้งในเวลา 5 – 10 วัน

ก่อนนำตัวอย่างพืชไปเก็บในห้องรวบรวมตัวอย่างควรนำไปรมด้วยสารเคมี

หรือใส่ในตู้แช่แข็ง

เพื่อป้องกันไร

และแมลงเข้าไปในห้องเก็บรวบรวมตัวอย่าง

วิธีการรักษาสภาพของราขนาดใหญ่ (macro fungi) เช่น Agaricales และรา Ascomycetes ที่ยังคง ต้องทำให้ตัวอย่างแห้งโดยเร็วที่สุด การทำให้ตัวอย่างแห้งมีผลต่อสี รูปร่าง และขนาดของตัวอย่าง การจัดการและการเก็บรักษาตัวอย่างแห้งจะง่ายกว่าการเก็บในของเหลว สำหรับราขนาดใหญ่อาจใช้วิธีทำให้แห้งด้วยจุดเยือกแข็ง (freeze dry) ซึ่งจะรักษาสี และรูปร่างไว้ได้ แต่ตัวอย่างจะฉีกขาดง่ายและดูเลอะเทอะ เนื่องจากราขนาดใหญ่ไม่เหมาะที่จะเก็บไว้ในช่องกระดาดเพราะแตกหักง่าย ดังนั้นจำเป็นต้องใช้กล่องกระดาดขนาดเล็ก หรือถุงพลาสติกชนิดปิดผนึกปากถุงและใส่ silica gel เพื่อรักษาความชื้น จะทำให้เก็บตัวอย่างไว้ได้เป็นเวลานานตัวอย่างแห้งและราแห้งควรเก็บไว้ในห่อกระดาดหรือช่องกระดาดที่ไม่มีส่วนผสมของกรดซึ่งมีขนาด 10-15 X 10 เซนติเมตร

โดยเฉพาะช่องกระดาดที่ห่อตัวอย่างชั้นแรกต้องเป็นกระดาดบาง กระดาดบันทึกข้อมูล ป้าย กาว หมึกที่ใช้เขียน และพลาสติกที่ใช้ในห้องเก็บรวบรวมตัวอย่างก็ควรปราศจากกรดเช่นกัน เพื่อป้องกันไม่ให้กรดทำลายตัวอย่างได้

วิธีการตรวจสอบว่ากระดาดมีส่วนผสมของกรดหรือไม่โดยใช้ปากกาวัดความเป็นกรด – ด่าง

ช่องกระดาดบรรจุตัวอย่างต้องมีข้อมูลกำกับบนหน้าซองซึ่งประกอบด้วย (ภาพที่ 13)

- รหัสเลขหมายของศูนย์เก็บรักษาตัวอย่าง
- ชื่อวิทยาศาสตร์ของเชื้อสาเหตุ
- ชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชอาศัย หรือสิ่งที่ราอาศัยอยู่
- สถานที่เก็บ ประกอบด้วย ประเทศ จังหวัด เส้นรุ้ง เส้นแวงของสถานที่เก็บ
- ชื่อผู้เก็บ และรหัสประจำตัวผู้เก็บ
- วันที่เก็บ
- ชื่อผู้วินิจฉัยโรค และจำแนกตัวอย่าง
- เอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่างนั้น ๆ

QUEENSLAND DEPARTMENT OF PRIMARY INDUSTRIES
PLANT PATHOLOGY HERBARIUM (BRIP)

BRIP 39807

Uredinales

Racospermyces digitatus (G. Winter) J. Walker

Host: *Acacia mangium* Willd.

Host family: Mimosaceae

Symptom: Phyllode rust

Locality: Meunga QLD Australia

Collector(s): Ivory, M.H.

Coll. No: P9288 Coll. Date: 23 Oct 1997

Determiner: Shivas, R.G.

Duplicates:

Additional Comments:

ภาพที่ 13 ตัวอย่างการบันทึกข้อมูลรหัสเลขหมายบนซองใส่ตัวอย่างของ
BRIP

ตัวอย่างในศูนย์เก็บรักษาฯ จะมีรหัสเลขหมายประจำแต่ละตัวอย่างบนซองใส่ตัวอย่างจะมีรหัสเลขหมายซึ่งประกอบขึ้นด้วยเลขที่ตัวอย่างและรหัสประจำศูนย์เก็บรักษาฯ ซึ่งได้จาก Index Herbariorum เพื่อให้ตัวอย่างที่เก็บไว้แตกต่างจากตัวอย่างอื่นทั่วโลก ถ้าในศูนย์เก็บรักษาฯ แต่ละแห่งมีตัวอย่างของโรคที่มีเชื้อสาเหตุเดียวกันมากกว่า 1 ชุด ให้เติมอักษรลงท้ายเลขหมาย (เช่น a, b, c. ฯลฯ) เพื่อเป็นการแสดงลำดับของชุดตัวอย่างที่เหมือนกัน รหัสเลขหมายนี้จะปรากฏควบคู่กับตัวอย่างแห่งโรคพืชและราที่เป็นสาเหตุของโรคนั้น (ภาพที่ 13)

ถ้าหากจำเป็นต้องทำตัวอย่างซ้ำขึ้นอีก จะต้องใส่รหัสเลขหมายของตัวอย่างและรหัสศูนย์เก็บรักษาฯ ลงบนซองเช่นเดียวกับซองตัวอย่างเดิม ตัวอย่างที่ทำซ้ำนี้อาจจะเก็บไว้หรือเพื่อแลกเปลี่ยนกับตัวอย่างจากศูนย์เก็บรักษาฯ อื่น

ตัวอย่างโรคพืชที่เก็บไว้ในศูนย์เก็บรักษาฯ ส่วนใหญ่จะเป็นตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา การเรียงลำดับเลขหมายตัวอย่างเหล่านี้มักเรียงตามวิวัฒนาการของเรา (Phylogeny) ตัวอย่างส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่ม Ascomycotina หรือ

Basidiomycotina แต่ละกลุ่มมีการเรียงลำดับราตามอักษรภาษาอังกฤษของ Genus รากลุ่มที่มีจำนวนมากจะเก็บแยกออกจากกลุ่มอื่นที่เรียงลำดับไว้ เช่น กลุ่มราสนิม (Uredinales) กลุ่มราเขม่าดำ (Ustilagiomycetes) และกลุ่มราแป้ง (Erysiphales) และจะจัดกลุ่มโดยเรียงลำดับอักษรภาษาอังกฤษของชื่อพืชอาศัย เพราะราในกลุ่มเหล่านี้ส่วนใหญ่มิพืชอาศัยจำเพาะเจาะจง

ราที่เป็น Anamorph (ได้แก่ Deuteromycetes, Fungi Imperfecti, asexual fungi, conidial fungi) ควรจัดกลุ่มรา โดยใช้ชื่อ Teleomorph ของรานั้น รา Teleomorph บางชนิดมีชื่อ Anamorph มากกว่า 1 ชื่อ (Synanamorph) ควรจัดตัวอย่างรวมอยู่ภายใต้ชื่อ Teleomorph นั้น ๆ แม้ว่าจะไม่พบระยะ Teleomorph ของรา (stage) ดังกล่าวอยู่ในตัวอย่างโรคพืช และควรบันทึกหมายเหตุไว้บนซองตัวอย่างด้วย

ตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่มากและไม่สามารถนำมารวมไว้ในกลุ่มได้ (Phylogenetic) จะต้องนำไปไว้ที่อื่น ควรมีการบันทึกบัตริอ้างอิงหรือซองเปล่าที่มีข้อความระบุรายละเอียดและสถานที่เก็บรักษาตัวอย่างนั้นไว้อย่างชัดเจน เช่นเดียวกับตัวอย่างที่ถูกขอยืมไป ควรทำบัตรสอดไว้ในตำแหน่งที่ตัวอย่างนั้นควรจะต้องอยู่

6.1.2 ตัวอย่างต้นแบบ (Type Specimens)

ตัวอย่างต้นแบบ เป็นตัวอย่างเดียว (หรือภาพวาด) ที่พบครั้งแรกและตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ไว้ เมื่อพบราชนิดใหม่ต้องเขียนคำอธิบายลักษณะของตัวอย่างและตั้งชื่อไว้ เพื่อใช้ตัวอย่างนี้เป็นตัวอย่างอ้างอิง ตัวอย่างต้นแบบนี้ต้องทำให้แห้งและเก็บรักษาไว้อย่างถาวร ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่มีชีวิตใช้เป็นตัวอย่างต้นแบบไม่ได้ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาไว้ในรูปที่ทำให้หมดกิจกรรมทางเมตาบอลิซึม เช่นการแช่แข็ง สามารถใช้เป็นตัวอย่างต้นแบบได้

ตัวอย่างต้นแบบ ต้องเก็บไว้ในซองสีแดง หรือมีขอบและเครื่องหมายสีแดงกำกับ เพื่อให้มองเห็นและสังเกตได้ง่าย ตัวอย่างต้นแบบชนิดต่าง ๆ มีดังนี้

- Holotype
ตัวอย่างเดี่ยวหรือภาพวาดที่พบครั้งแรกและตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ไว้โดยผู้ตั้งชื่อ (author)
- Isotype ตัวอย่างราใด ๆ ที่แบ่งมาจาก Holotype
- Lectotype ตัวอย่างราหรือภาพวาดที่เก็บมาใหม่จากตัวอย่างดั้งเดิม ในกรณีที่ไม่มี Holotype เป็นหลักฐาน ตามที่ได้อ้างถึงไว้ในเอกสาร หรือกรณี Holotype หายสาบสูญไป หรือถูกตั้งชื่อไว้มากกว่า 1 ชื่อ
- Isolectotype ตัวอย่างราที่แบ่งมาจาก Lectotype
- Syntype ตัวอย่างใด ๆ ที่มีเอกสารอ้างอิงว่ามาจากสถานที่เดียวกับ holotype และไม่มีการกำหนด Holotype ไว้ หรือเป็นตัวอย่างที่มีหนึ่งหรือหลายตัวอย่าง
- Paratype ตัวอย่างใด ๆ ตัวอย่างใด ๆ ที่มีเอกสารอ้างอิงว่ามาจากสถานที่เดียวกับ holotype แต่ไม่ใช่ตัวอย่างที่เป็น Holotype, Isotype หรือตัวอย่างใดตัวอย่างหนึ่งของ Syntype
- Neotype ตัวอย่างเดี่ยวหรือภาพวาดที่ถูกตั้งขึ้นเป็นชื่อใหม่เป็นตัวแทนของตัวอย่างเดิม ถ้าตัวอย่างเดิมได้สูญหายไป หรือถูกทำลายไป
- Epitype ตัวอย่างหรือภาพวาดใด ๆ ที่ถูกเลือกให้เป็นตัวแทนเพื่อการอธิบายถึง Holotype, Lectotype หรือ Neotype หรือตัวอย่างที่เป็นต้นฉบับถูกอ้างถึงในเอกสารเผยแพร่ซึ่งถูกจัดแสดงไว้ และไม่สามารถนำมาอ้างเพื่อจุดประสงค์ในการขอตั้งชื่อใหม่
- Topotype ตัวอย่างใด ๆ ที่เก็บมาจากตำแหน่งเดียวกันกับ Holotype

6.1.3 ตัวอย่างราแห้ง (Dried Cultures)

การจัดจำแนกชนิดของราจำเป็นต้องศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา การเก็บตัวอย่างราไว้ในสภาพแห้งเป็นวิธีเดียวที่จะสามารถเก็บราที่แยกมา

าก ดิน น้ำ สัตว์และพืชอาศัยไว้ได้อย่างถาวร
ควรเก็บตัวอย่างราแห้งไว้กับตัวอย่างแห้งโรคพืชเนื่องจากอาจพบสปอร์ของ
ราสาเหตุบนตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างราแห้ง

โดยการเลี้ยงรบนอาหารที่เหมาะสมในจานเลี้ยงเชื้อ

จนถึงระยะที่ราสร้างส่วนขยายพันธุ์ที่ใช้ในการจำแนกชนิด

ทั้งราไว้ในจานเลี้ยงเชื้อจนกว่าราแห้งและสามารถลอกออกจากจานเลี้ยงเชื้อ

อได้ อาจทำให้แห้งด้วยการวางไว้ภายใน laminar flow 2 - 3 วัน

ลอกราที่แห้งแล้วออกจากจานเลี้ยงเชื้อ

นำไปเก็บไว้ในช่องตัวอย่างโรคพืชที่เป็นพืชอาศัย

ราที่มีโครงสร้างบอบบาง อาจเก็บไว้ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดบางได้

ตัวอย่างราแห้งอาจม้วนงอและแตก

และไม่สามารถลอกออกจากจานเลี้ยงเชื้อได้โดยไม่ทำให้เกิดความเสียหาย

วิธีแก้ไขคือลอกราออกมาบางส่วน แล้วนำไปวางบนอาหาร glycerol agar

(GA) ที่กำลังร้อน ที่เทไว้บนฝาจานเลี้ยงเชื้อจานเดียวกับตัวอย่างรา

เพราะอาจมีส่วนของราติดอยู่ ทิ้งไว้ให้แห้งโดยไม่ต้องมีสิ่งปกปิด

ลอกราแห้งออกจากฝาของจานเลี้ยงเชื้อและนำไปเก็บรวบรวมไว้กับช่องตัว

อย่างแห้งโรคพืช

การทำให้ราแห้งอาจไม่ได้ทำให้ราเสียชีวิต

ราบางชนิดสร้างสปอร์จำนวนมากและสามารถฟุ้งกระจายโดยลมไปบนเพื่อน

ตัวอย่างราชนิดอื่นในห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องฆ่ารานั้น

โดยนำตัวอย่างราแห้งไปวางในโถดูดความชื้นที่มีฟอร์มาลินบรรจุไว้เพื่อฆ่า

รา อีกวิธีหนึ่งคือ หยดฟอร์มาลินลงบนฝาจาน 1.5 มิลลิลิตร

คว่ำจานเลี้ยงเชื้อที่มีราลงบนฝาดังกล่าว วางทิ้งไว้ในตู้ดูดควัน 1 - 3 วัน

6.1.4 การทำสไลด์ถาวร (Microscope slides)

การปิดผนึกขอบ cover slip บนแผ่นสไลด์ที่ใช้กรดแลกติกเป็นสารเม้าท์สไลด์

โดยการใช้น้ำยาทาเล็บทา 2 - 3 ชั้น

จะช่วยป้องกันไม่ให้สไลด์แห้งได้หลายปี วิธีการอื่น เช่น ละลาย polyvinyl

acid ชนิดผง ในกรดแลกติกเพื่อใช้เป็นสารเม้าท์สไลด์ในการทำสไลด์ถาวร

การลดปริมาณน้ำในตัวอย่างราเพื่อใช้ในการทำสไลด์ถาวรได้ด้วยการลดปริมาณน้ำในตัวอย่างลงเป็นระดับ โดยการจุ่มตัวอย่างลงเอทิลแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เช่น 40 % 50% 60% 70% 80% 90% และแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ โดยจุ่มตัวอย่างในแต่ละระดับเป็นเวลาระดับละ 2-3 นาที เพื่อให้ให้น้ำในตัวอย่างลดลงทีละน้อย หลังจากนั้นนำไปทำให้ตัวอย่างใสโดยการใส่ xylene และเตรียมสไลด์ถาวรด้วยสารเม้าท์ Canada balsam ตามหลักการ ไม่ควรนำสไลด์ถาวรเก็บรวมไว้ในช่องตัวอย่างโรคพืช ดังนั้นควรจัดทำลิ้นชักเฉพาะสำหรับเก็บสไลด์ดังกล่าว สไลด์แต่ละแผ่นจะมีรหัสเลขหมายที่อ้างอิงถึงตัวอย่างโรคพืชที่เก็บในศูนย์เก็บรักษา

6.1.5 การบรรจุและการขนส่ง (Packing and transport)

ตัวอย่างโรคพืชที่จะเก็บในพิพิธภัณฑ์ควรบรรจุอยู่ในซองกระดาษที่ปราศจากกรด (acid free paper) หรือใส่ไว้ในซองกระดาษแข็ง (card packet) ตัวอย่างโรคพืชขนาดใหญ่ควรเก็บไว้ในกล่องขนาดใหญ่ เพื่อป้องกันการถูกกระแทก ทุกตัวอย่างที่เก็บในศูนย์เก็บรักษา ๔ ประกอบด้วย กระดาษบันทึกข้อมูลของตัวอย่าง ภาพวาด สไลด์ถาวรของเชื้อสาเหตุ เป็นต้น (ภาพที่ 14) ควรเขียนข้อความไว้อย่างชัดเจนและมีรหัสเลขหมายตัวอย่างอยู่ด้วยทุกชิ้น ตัวอย่างราแห้งควรวางบนกระดาษกรองและห่อด้วยกระดาษใส่เก็บรวมไว้กับ ตัวอย่างโรคพืช ส่วนสไลด์ตัวอย่างเชื้อสาเหตุ ควรเก็บในกล่องกระดาษแข็ง หรือกล่องพลาสติก เพื่อป้องกันการแตกหัก การเคลื่อนย้ายตัวอย่าง ตัวอย่างควรเก็บอยู่ในกระดาษห่อหรือซองที่บรรจุอยู่เสมอ มัดของตัวอย่างที่จะทำการเคลื่อนย้ายไว้รวมรวมกัน ห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ หรือกระดาษกันกระเทือน (Bubble wrap) บรรจุลงในกล่องกระดาษอีกชั้นหนึ่ง ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์แห้งด้วยวิธีแช่เย็น (Freeze dried) ที่เก็บไว้ในหลอดแก้วสุญญากาศ หรือในหลอดแก้วปิดฝาเกลียวควรห่อด้วยสำลีและบรรจุลงในกล่องสำหรับขนส่ง



ภาพที่ 14 ตัวอย่างซองเก็บตัวอย่างโรคพืชที่ใช้ในพิพิธภัณฑ์
Ustilaginales Vánky (HUV) และ QDPI&F Plant
Pathology Herbarium (BRIP)

6.2 การรักษาสภาพตัวอย่างรามีชีวิต (Cultures)

วัตถุประสงค์หลักของการเก็บตัวอย่างราหรือแบคทีเรียให้มีชีวิตและคงสภาพของลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยาหรือลักษณะทางพันธุกรรมไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงให้นานที่สุดตามที่ต้องการอย่างน้อยก็ในช่วงที่ทำการศึกษ
ถ้าจุลินทรีย์มีการเปลี่ยนแปลงไปจากต้นแบบหรือจากที่ได้ตีพิมพ์ไว้ในเอกสาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย จะไม่สามารถนำไปใช้เพื่อการเปรียบเทียบและการตั้งชื่อใหม่ของจุลินทรีย์ชนิดใหม่ได้

ตามข้อกำหนดของความหลากหลายทางชีวภาพที่มีการลงนามระหว่าง 180 ประเทศ ทำให้มีการรวบรวม เก็บรักษา จุลินทรีย์ มาตั้งแต่ปี 1995 ข้อกำหนดนี้ให้สิทธิแก่ประเทศที่เป็นถิ่นกำเนิดให้มีการแลกเปลี่ยนจุลินทรีย์ระหว่างกันอย่างยุติธรรมและเสมอภาคโดยเฉพาะอย่างยิ่งการแลกเปลี่ยนจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ
การแลกเปลี่ยนตัวอย่างจุลินทรีย์ระหว่างพิพิธภัณฑ์ต่าง ๆ ต้องเป็นไปตามความตกลงเรื่องการแลกเปลี่ยน (material transfer Agreement/ MTA) เนื่องจากความหมายของความตกลง MTA นี้ยังไม่ชัดเจน ดังนั้นหน่วยงานเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ จึงควรร่วมกันพิจารณาในรายละเอียดของความตกลงนี้
วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์มีชีวิตมีดังต่อไปนี้

6.2.1 การเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Growth on agar)

การเลี้ยงจุลินทรีย์มักใช้ภาชนะ เช่น ขวดปากกว้าง ซึ่งเหมาะต่อการย้ายเชื้อชุดใหม่ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เช่น อาหาร PDA ครึ่งสูตร สำหรับเลี้ยงรา และ NA สำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย ราหรือแบคทีเรียบางชนิดเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดจำเพาะ โดยเทอาหารที่ต้องการลงในขวดปากกว้างประมาณครึ่งขวด นำไปนิ่งฆ่าเชื้อ นำไปวางเอียงระหว่างที่รอให้อาหารเย็นลง ดังนั้นอาหารวุ้นที่อยู่ในขวดจะแข็งอยู่ในลักษณะเอียง

ย้ายราหรือแบคทีเรียไปวางบนผิวหน้าอาหารที่เอียงไว้ นำไปบ่มในห้องปรับอากาศ สถานที่บ่มเชื้อที่เหมาะสมที่สุดคือในตู้เย็นหรือในห้องที่มีอุณหภูมิ 5-8 องศาเซลเซียส ในกรณีที่ราหรือแบคทีเรียบางชนิดไม่ชอบอากาศเย็น ให้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ทำการตรวจการเจริญเชื้อทุกวัน เพราะอาหารวุ้นจะแห้งอย่างรวดเร็วในสภาพที่มีความชื้นต่ำ การเก็บราต้องระวังเชื้อราทำลาย ควรใช้เทปพลาสติกหุ้มปากขวดก่อนทำการเข้าบ่มหรือการเก็บรักษาควรย้ายเชื้อทุก 6 เดือน ต้องมีการตรวจสอบเพื่อป้องกันการสูญเสียจุลินทรีย์ที่มีค่า แม้ว่าการย้ายเชื้อบ่อยครั้งจะทำให้สัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์เปลี่ยนไปอย่างรวดเร็ว และสูญเสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคพืช ตลอดจนลดการสร้างสปอร์ก็ตาม

6.2.2 การเก็บรักษาในน้ำมัน (Under mineral oil)

วิธีการเลี้ยงเชื้อปฏิบัติตามขั้นตอนที่กล่าวในขั้นต้น แต่การวางขวดให้การเอียงของอาหารวุ้นมีช่วงความเอียงสั้น ๑ ในกรณีที่เป็นรา ต้องเป็นราที่มีการสร้างสปอร์จำนวนมาก เทน้ำมันที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที 2 ครั้ง ลงในขวดอาหาร โดยให้ระดับน้ำมันสูงกว่าผิวหน้าของเชื้อ 1 เซนติเมตร การเทน้ำมันลงในขวดอาหาร ควรเทครั้งละ 1 ขวด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อข้ามไปยังขวดอื่น ๑ ฝาขวดอาจใช้เป็นฝาพลาสติก แต่ถ้าขวดตกลงบนพื้นหรือได้รับการกระแทก อาจทำให้ฝาแตก วิธีการบ่มเชื้อในน้ำมันนี้ เป็นวิธีที่เหมาะสมในสภาพอากาศร้อนชื้น เพราะจะป้องกันไม่ให้เชื้อแห้ง ป้องกันไรเข้าทำลาย

อุปกรณ์หรือสารเคมีที่ใช้ราคาไม่แพง และสามารถปฏิบัติได้ง่าย
การเก็บรักษาในน้ำมันนี้ จุลินทรีย์มีชีวิตอยู่ได้ 2 - 40 ปี
ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ แม้ว่าจะต้องเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 5 ปี
เพื่อให้จุลินทรีย์คงสภาพ

6.2.3 การเก็บรักษาในน้ำ (Water storage)

ตัดชิ้นอาหารวันบริเวณขอบโคโลนีของราที่มีอายุประมาณ 1 สัปดาห์
ใส่ในขวดขนาดเล็ก
เติมน้ำกลั่นหนึ่งฝา เชื้อแล้วลงไปให้ท่วมชิ้นอาหารวันที่มีรา สูง 5 เซนติเมตร
ปิดฝาขวด ใช้เทปพลาสติกพันรอบปากขวด เก็บไว้ในห้องอุณหภูมิปกติ
วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์ในน้ำ นี้พบว่าสามารถเก็บเชื้อไว้ได้หลายปี
และใช้ได้ผลดีกับรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งรา *Pythium* sp. และ *Phytophthora*
sp. การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีนี้ก็ใช้ได้ผลเช่นกัน โดยใช้ loop
ย้ายเชื้อแบคทีเรียที่มีอายุ 24 – 48 ชั่วโมง ใส่ลงไปในน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อ

6.2.4 การแช่แข็งด้วยความเย็น (Freezing dry)

วิธีการทำให้จุลินทรีย์แห้งด้วยความเย็นนี้
เป็นการดึงน้ำออกจากตัวอย่างในสภาวะลดความดันภายใต้ความเย็นที่จุดเยือกแข็ง
ด้วยวิธีการที่เรียกว่า Sublimation
ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อไอน้ำที่แข็งตัวเปลี่ยนสภาพเป็นแก๊สโดยไม่ได้เปลี่ยนสภาพ
เป็นของเหลวก่อน

เก็บตัวอย่างราในหลอดแก้วสุญญากาศ (ampoules หรือ vials) ที่ปิดผนึกอยู่
วิธีการแช่แข็งด้วยความเย็นเหมาะสำหรับเก็บราที่สร้างสปอร์จำนวนมากและ
แบคทีเรีย สามารถเก็บราไว้ได้มากกว่า 10 ปี และ
ไม่ต้องเก็บตัวอย่างนี้ไว้ในตู้เย็น สามารถเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องได้
แต่ข้อเสียคือเครื่องมือสำหรับการเก็บตัวอย่างและการบำรุงรักษาราคาค่อนข้าง
แพงหลังการทำตัวอย่างแห้งด้วยวิธีแช่แข็ง
ควรนำราแต่ละไอโซเลทมาตรวจสอบความมีชีวิตและความบริสุทธิ์
เพราะราแต่ละชนิดทนสภาพการทำแห้งและแช่แข็งได้ไม่เท่ากัน
ย้ายตัวอย่างที่แช่แข็งด้วยความเย็นลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ส่วนแบคทีเรียและยีสต์ต้องทำให้ขึ้นก่อนด้วยการเติมน้ำหรืออาหารเหลว
ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหาร

6.2.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในดิน (Soil storage)

นำดินมาร้อนและอบแห้งด้วยความร้อน อาจใช้การนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน
ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที 2 ครั้ง ใส่ดินลงในขวดขนาด 20
มิลลิลิตร ใส่สปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในดินที่เตรียมไว้
บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 – 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 5 – 10 วัน
จากนั้นนำไปเก็บในตู้เย็น
ตัวอย่างราที่เก็บด้วยวิธีนี้จะมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานาน
การตรวจสอบการมีชีวิตรอดโดยแบ่งดินออกมาเล็กน้อย
วางบนอาหารที่เหมาะสม วิธีการนี้เหมาะสำหรับการเก็บตัวอย่างรา
Fusarium spp. ซึ่งมีการกลายพันธุ์ได้ง่ายเมื่อเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลานาน ๆ

6.2.6 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ใน Silica gel (Silica gel storage)

นำ Silica gel บริสุทธิ์ ขนาด 6 – 22 mesh
ใส่ลงในขวดแก้วฝาเกลียวประมาณครึ่งหลอด นำไปฆ่าเชื้อในเตาอบ
นำออกมาวางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องจน Silica gel
ตกผลึกแยกออกจากกัน (ประมาณ 14 วัน)
เตรียมสารแขวนลอยของสปอร์หรือแบคทีเรียด้วยน้ำนม 5% (skimmed milk)
เทสารแขวนลอยลงใน Silica gel ที่เย็นแล้ว
ปิดฝาขวดนำไปเก็บในขวดปากกว้างบรรจุ Silica gel อบแห้ง (Silica gel
อบแห้งมีสีขาวเมื่อเกิดความชื้น Silica gel เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน)
เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4-6 องศาเซลเซียส ซึ่งจะเก็บได้นานมากกว่า 11 ปี
ขึ้นกับชนิดของรา การตรวจสอบการมีชีวิตรอด นำผลึก Silica gel ออกมา 2
– 3 ผลึก วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม
วิธีการการเก็บรักษาจุลินทรีย์ใน Silica gel
เหมาะในการเก็บราที่ไม่สามารถทนความเย็นจากการแช่แข็งได้
ตลอดจนราที่สร้าง sclerotia หรือ chlamydospores

6.2.7 การเก็บรักษารานบนกระดาษกรอง (Filter paper storage)

นำกระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ววางลงในจานเลี้ยงเชื้อ
หยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงบนกระดาษกรอง 2-3 หยด
ตักขึ้นวันที่เลี้ยงรวางลงบนกระดาษกรอง นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ
25 องศาเซลเซียสจนราเจริญขึ้นปกคลุมกระดาษกรอง
ทิ้งไว้จนกระดาษกรองแห้งสนิท (ประมาณ 2 - 4 สัปดาห์)
ตัดกระดาษกรองด้วยวิธีปลอดเชื้อ เป็นชิ้นเล็ก ๆ
นำไปเก็บในขวดแก้วฝาเกลียว นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
การตรวจสอบการมีชีวิตรอด โดยการนำชิ้นกระดาษกรองไปวางบนอาหาร
PDA ว่าจะงอกเส้นใยภายใน 2 - 4 วัน
การเก็บรักษารานบนกระดาษกรองนี้เหมาะสำหรับเก็บ รา *Fusarium* spp.

6.2.8 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ภายใต้ความเย็นยิ่งยวด (Cryopreservation)

การเก็บรักษาตัวอย่างจุลินทรีย์ภายใต้อุณหภูมิต่ำมาก (Cryopreservation)
ตั้งแต่ - 20 ถึง - 85 องศาเซลเซียส
เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บราเกือบทุกชนิด
วิธีที่ง่ายและเป็นที่ยอมรับคือการแช่ลูกปัดกระเบื้องที่มีรูพรุน (cryobeads)
ลงในสารป้องกันการแข็งตัว (cryopreservative fluid)
ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดพลาสติกขนาดเล็ก (plastic vial) เช่นกลีเซอรอล
ใช้ไปเปิดดูดสารละลายที่มากเกินไปออก
หลังจากบ่มเชื้อแล้วนำไปเก็บรักษาในตู้แช่แข็ง
การตรวจสอบการมีชีวิตรอด โดยนำลูกปัดกระเบื้องออกมาใส่ในอาหารเหลว
หรือวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

6.2.9 การเก็บรักษาเชื้อภายใต้ไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen)

วิธีการเก็บรักษารานหรือแบคทีเรียภายใต้สภาพความเย็น ระหว่าง - 190 ถึง
- 196 องศาเซลเซียส ในไนโตรเจนเหลว หรือเหนือผิวไนโตรเจนเหลว
เป็นวิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด การเก็บโดยใช้สารป้องกันการแข็งตัว

(cryoprotectant) เซนกลีเซอรอล 10%

เพื่อให้จุลินทรีย์ยังทนต่อสภาพความเย็นได้

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการชุบด้วยสารป้องกันการแข็งตัวแล้ว

ใส่ลงในหลอดแก้วเล็ก ๆ ที่ใช้สำหรับเก็บในถังไนโตรเจนเหลว

ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ

นำไปเก็บลงในถังบริเวณไอระเหยเหนือไนโตรเจนเหลว

การลดระดับความเย็นลงอย่างช้า ๆ

มีความสำคัญต่อการรักษาความมีชีวิตของจุลินทรีย์ไว้มากที่สุด

ระดับอุณหภูมิที่ต่ำมากนี้จะยับยั้งเมตาโบลิซึมของจุลินทรีย์

ถ้าจุลินทรีย์มีชีวิตรอดได้ในสภาพนี้ การเก็บรักษาจะได้เป็นเวลานาน

วิธีการเก็บรักษาเชื้อภายใต้ไนโตรเจนเหลวนี้ใช้

อุปกรณ์ราคาแพงและมีขนาดใหญ่

และต้องการแหล่งบริการไนโตรเจนเหลวที่เชื่อถือได้

ตลอดจนผู้ปฏิบัติงานต้องมีประสบการณ์สูง

บทที่ 7

การจำแนกเชื้อสาเหตุโรคพืช (How to identify pathogens)

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคพืชมีมากมายแต่ยังไม่สามารถครอบคลุมการจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ทั้งหมด และค่อนข้างยุ่งยากต่อการใช้ นักวิจัยเท่านั้นจึงจะคุ้นเคยกับการใช้ข้อมูลที่มีอยู่นี้ ถึงแม้ว่านักวิจัยจะคุ้นเคยต่อการจำแนกแต่การตรวจสอบตัวอย่างและเอกสารอ้างอิงก็จำเป็นต่อการจำแนกเพื่อให้เกิดความแม่นยำ

7.1 การจำแนกราสาเหตุโรคพืช (Fungi)

ราเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กมีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (eukaryotic) ส่วนใหญ่มีลักษณะโครงสร้างเป็นเส้นใย (mycelium) เส้นใยเดี่ยว ๆ หรือแขนงของเส้นใยเรียกว่า hyphae ราสร้างสปอร์ ไม่มีคลอโรฟิลล์ ผนังเซลล์ประกอบด้วยไคติน หรือเซลลูโลส หรือทั้ง 2 ชนิด และการเจริญเติบโตของเส้นใยจะอยู่บริเวณปลายของ hyphae

ร่ายยพันธุ์ได้ด้วยการสร้างสปอร์ ซึ่งประกอบด้วยหนึ่งเซลล์หรือหลายเซลล์ สปอร์อาจเกิดขึ้นมาจากการขยายพันธุ์แบบไม่มีเพศ หรือแบบมีเพศก็ได้ ราชั้นต่ำที่มีการขยายพันธุ์แบบไม่มีเพศ สร้าง zoospore ที่เคลื่อนที่ได้ในถุงที่เรียกว่า sporangium ราบางชนิดสร้างสปอร์ที่เรียกว่า conidia บนปลายเส้นใยที่เรียกว่า conidiophore ราบางชนิดสร้าง conidia ภายใน fruiting body ผนังหนาเรียกว่า pycnidia

ราพบเกือบทุกกลุ่มมีการขยายพันธุ์แบบมีเพศที่เกิดจากการรวมกันของ 2 gametes เกิดเป็น zygote ที่เรียกว่า zygospore ราในกลุ่ม ascomycetes สร้างส่วนขยายพันธุ์ภายในเซลล์ของ zygote เรียกว่า ascus และสร้างสปอร์ภายใน ascus เรียกว่า ascospore ราในกลุ่ม basidiomycetes สร้างส่วนขยายพันธุ์ เรียกว่า basidium และสร้างสปอร์ เรียกว่า basidiospore

ราสาเหตุโรคพืชอาจมีมากถึง 250,000 ชนิด

ราส่วนใหญ่ใช้ชีวิตช่วงหนึ่งอาศัยบนพืชที่มีชีวิตและใช้ชีวิตบางช่วงในดินหรือบนเศษซากพืช

นักราวิทยาศึกษาราคโรคพืชที่อยู่ใน Kingdom Fungi แต่มีราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดถูกจัดไว้ใน Kingdom Protozoa และ Kingdom Chromista ใน Kingdom Protozoa ประกอบด้วยราเมือก (slime mould) ใน Kingdom Chromista ประกอบด้วย Oomycetes ซึ่งรวมถึงราน้ำค้าง ตลอดจนรา *Pythium* และ *Phytophthora* สำหรับ Kingdom Fungi ประกอบด้วยรา 4 กลุ่มหลักได้แก่ Zygomycota Chytridiomycetea Ascomycota และ Basidiomycota

โรคพืชที่มีสาเหตุจากราสาเหตุโรคพืช

เกิดจากราเข้าทำลายส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชและแสดงลักษณะอาการของโรค (symptom) ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากราที่พบโดยทั่วไปได้แก่ อาการต้นกล้าเน่า (damping off) รากเน่า (root rot) เหี่ยว (vascular wilt) ราน้ำค้าง (downy mildew) ราแป้ง (powdery mildews) ใบจุด (leaf spot) ใบไหม้ (blights) ราสนิม (rust) ราเขม่าดำ (smut) แอนแทรคโนส (anthracnose) ปุ่มปม (galls) ยอดแห้งตาย (dieback) และโรคหลังการเก็บเกี่ยว (post harvest disease) (ตารางที่ 1)

7.1.1 ราที่ทำลายระบบราก (Root pathogens)

ราที่เข้าทำลายระบบรากพืชจะรบกวนการดูดน้ำและการลำเลียงธาตุอาหารของพืช ทำให้พืชแคระแกรน แสดงอาการใบเหลืองและเหี่ยว รากพืชที่เกิดใหม่จะอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของรา เช่นเดียวกันรากพืชที่ได้รับการกระทบกระเทือนเนื่องจากการไถพรวนหรือย้ายปลูกพบว่าราสามารถเข้าทำลายได้ง่าย ดินที่มีธาตุอาหารต่ำ (ธาตุ P หรือ ธาตุ K) ดินเค็ม หรือดินมีความเป็นกรดต่างไม่สมดุล เหล่านี้ช่วยส่งเสริมให้พืชแสดงอาการรากเน่าได้

การวินิจฉัยสาเหตุของอาการรากเน่าของพืชทำได้ยาก

เพราะอาการเหล่านี้อาจเกิดขึ้นจากการเข้าทำลายของราหลายชนิด

หรือเกิดจากราหลายชนิดเข้าทำลายร่วมกัน เช่น *Fusarium*, *Pythium*,

Macrophomina เข้าทำลายรากพืชร่วมกับไส้เดือนฝอย หรือราอื่นในสภาพดินเปียกชื้นจะพบ *Pythium* และ *Phytophthora* เสมอ ในสภาพอากาศร้อนและในดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูง จะพบ *Rhizoctonia* และ *Fusarium* แม้ว่า *Fusarium* และ *Phytophthora* เป็นสาเหตุของโรครากเน่าของไม้ยืนต้นบางชนิด แต่อาการรากเน่าของพืชเหล่านั้นอาจเกิดจากเนื้อไม้ (cellulose) ถูกทำลายโดยเห็ดรา (Basidiomycetes) เช่น *Armillaria*, *Ganoderma*, *Rigidoporus* และ *Phellinus* ก็ได้ (ข้อมูลเพิ่มเติมจาก *Phytophthora diseases* ของ Erwin and Ribeiro, 1996)

7.1.2 ราที่ทำลายลำต้น (Stem Pathogens)

อาการเหี่ยวของท่อน้ำท่ออาหาร (vascular wilt)

สาเหตุโรคเหี่ยวนี้ จะพบอยู่ในบริเวณท่อน้ำ (xylem) พืชแสดงอาการใบเหี่ยว ใบเปลี่ยนสี (yellowing) กรณีอาการของโรครุนแรงพืชล้มพับและตายในที่สุด หลังจากเนื้อเยื่อพืชตายลงสาเหตุจะเจริญไปสู่เนื้อเยื่อส่วนอื่นและสร้างส่วนขยายพันธุ์และสปอร์ ในเนื้อเยื่อนั้น รา 4 ชนิดที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยว ได้แก่ *Fusarium*, *Verticillium*, *Ceratocystis* และ *Ophiostoma* (ข้อมูลเพิ่มเติมจาก Wingfield *et al.*, 1999)

รา *Fusarium* เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของพืชผัก ไม้ดอก ไม้ผล และพืชเส้นใย ราที่สำคัญในกลุ่มนี้คือ *Fusarium oxysporum* Complex รา *Fusarium* แต่ละชนิดจะมีพืชอาศัยจำเพาะ (formae speciales, f.sp.) และมี pathogenic races อีกหลาย race ด้วย (ข้อมูลเพิ่มเติมจาก Burgess *et al.*, 1994)

อาการแคงเคอร์ (Canker)

อาการแคงเคอร์บนลำต้นของไม้เนื้ออ่อน (herbaceous plant) เกิดจากราสาเหตุ เช่น *Colletotrichum* และ *Phomopsis* นอกจากนี้ราทั้ง 2 ชนิดสามารถเข้าทำลายใบและผลได้ รา *Rhizoctonia solani* และ *Corticium rolfsii* เป็นสาเหตุของอาการรอยแผลบนลำต้นของพืชตระกูลถั่ว นอกจากนี้

Phytophthora

และ

Fusarium

ทำให้เกิดอาการบนลำต้นพืชไม้เนื้อแข็งแต่การตรวจสอบทำได้ยาก

อาการปุ่มปม (Galls)

อาการปุ่มปมเกิดขึ้นจากการที่พืชเจริญเติบโตผิดปกติ

หรืออาการบวมขึ้นเนื่องจากเนื้อเยื่อพืช

ขยายตัวมากกว่าปกติจากการชักนำของแมลง แบคทีเรีย ไวรัส และ รา เช่น *Exobasidium* และ รา *Synchytrium*

อาการพุ่มแฉ่ หรือพุ่มไม้กวาด (Witches' broom)

ลักษณะอาการผิดปกติที่เกิดจากการที่ยอดหรือรากแขนงที่แตกยอดหรือราก ออกมามาก มีลักษณะคล้ายไม้กวาด เช่น รา *Crinipellis perniciosa* สาเหตุโรคพุ่มไม้กวาดของโกโก้

อาการราสีชมพู (Pink crust or pink disease)

อาการราสีชมพูเกิดจาก รา *Corticium salmonicolor* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes

สร้างเส้นใยสีชมพูเป็นแผ่นแบนราบบนกิ่งและแขนงของต้นไม้เนื้อแข็งหลาย ชนิดในเขตร้อนชื้นและเขตกึ่งร้อนชื้น ราเจริญเข้าไปในเนื้อไม้ เข้าทำลายกิ่งและแขนง ทำให้เกิดอาการใบหย่น

7.1.3 ราที่ทำลายใบ (Leaf pathogens)

การวินิจฉัยโรคพืช อาการของโรคบนใบนั้นว่ามีความสำคัญมาก เนื่องจากโรคบนใบพืชบางโรคมีสาเหตุจากราที่อาศัยบนเศษซากพืชหรืออินทรีย์วัตถุ (saprobes) บางโรคมีสาเหตุจากราที่อาศัยบนสิ่งมีชีวิตเท่านั้น (obligate fungal pathogens)

ลักษณะอาการบนใบที่พบเห็นโดยทั่วไปอาจเกิดจากราสาเหตุโรคพืชมากมายหลายชนิด

แต่ในแต่ละอาการที่เด่นชัดจะเกิดจากราสาเหตุที่เฉพาะเจาะจงเท่านั้น

อาการแห้งตาย (necrotic spots) และแผลชำ (blotches)

เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด

ลักษณะรอยแผลมีรูปร่างและขอบแผลที่ชัดเจน

การวินิจฉัยโรคที่แสดงอาการแห้งตายและแผลช้ำนี้โดยใช้ส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อรา (fungal fruiting bodies) อายุของใบและขนาดของพื้นที่ที่ถูกทำลาย

อาการใบจุด (leaf spots)

ลักษณะเนื้อเยื่อแห้งตายเป็นจุด

รอยแผลอาจถูกล้อมรอบด้วยวงสีเหลืองก็ได้

ในบางกรณีเนื้อเยื่อไม่ตายเพียงแต่สีเปลี่ยนไปเนื่องจากมีจุลินทรีย์อาศัยอยู่
ราหลายชนิดทำให้เกิดอาการจุดแผลได้

นอกจากนี้แมลงบางชนิดก็ทำให้พืชแสดงอาการใบจุดได้เช่นกัน

จุดแผลเป้ากระสุน (target spot) แผลมีลักษณะเป็นวงซ้อนกันหลาย ๆ ชั้น

จุดแผลวงแหวน (ring spot)

แผลมีขอบแผลสีน้ำตาลเข้มล้อมรอบ **แผลจุดเหลี่ยม (angular leaf spot)**

แผลถูกล้อมรอบด้วยเส้นใบ **จุดแผลรูปตา (eye spot)**

แผลมีลักษณะเป็นวงรีบริเวณตรงกลางแผลมีสีเข้ม **จุดแผลขาดเป็นรู (shot hole)** เป็นลักษณะของจุดแผลที่ตายแล้วและบริเวณแผลหลุดหายไป

ลักษณะอาการดังกล่าวเป็นผลจากการที่พืชต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุ โดยการยับยั้งการแพร่ของเชื้อไว้ตรงบริเวณรอยแผลนั้น

อาการแอนแทรคโนส (anthracnose)

อาการ anthracnose มีลักษณะเป็นจุดแผลสีเข้ม

รอยแผลยุบตัวลงเนื้อใบตาย บางครั้งขอบแผลนูนสูงขึ้น

อาจจะพบส่วนขยายพันธุ์ของรา เรียกว่า acervuli

เรียงเป็นวงซ้อนกันบนรอยแผล

นอกจากเกิดอาการบนใบแล้วยังพบอาการบน ลำต้น และผล

ในกรณีที่เชื้อสาเหตุ เข้าทำลายพืชอย่างรุนแรงจะทำให้กิ่งหรือแขนงตายได้

ส่วนใหญ่นักโรคพืชเรียกลักษณะอาการแอนแทรคโนส

เมื่อมีสาเหตุมาจากรา *Colletotrichum* แต่ไม่ใช่ทั้งหมด

อาการราสนิมขาว (White rust)

อาการราสนิมขาวเกิดจากราในกลุ่ม Peronosporales ราช้าง sporangia

สีขาวเกิดใต้ผิวใบพืชทำให้เกิดรอยแผลนูนโป่งออกมาเป็นแนว อาจพบ

oospore เกิดอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช เช่น โรคราสนิมขาวของผักกาด
เกิดจากรา *Albugo candida*

อาการไหม้ (Blight)

อาการไหม้ เป็นอาการที่พืชแสดงการตายอย่างเฉียบพลันของใบ ดอก ยอด
ผล หรือการตายของพืชทั้งต้น
โดยทั่วไปราสาเหตุโรคพืชจะเข้าทำลายส่วนที่อ่อนของพืชก่อน
อาการไหม้เกิดจากราหลายชนิด เช่น รา *Colletotrichum gloeosporioides*
ทำให้เกิดโรคดอกไหม้ของมะม่วง และรา *Phytophthora colocaciae*
ทำให้เกิดโรคใบจุดตาเลื่อของเผือก

อาการตายเน่า (Scald)

อาการตายเน่าที่เกิดบนใบทำให้ใบมีลักษณะคล้ายถูกน้ำร้อนลวก
แผลแสดงอาการขีดไม่มีสีแต่บางส่วนอาจโปร่งแสง เช่น โรคข้าวตายเน่า
(rice leaf scald) เกิดจากรา *Gerlachia oryzae* และโรคตายเน่าของข้าวบาร์เลย์
เกิดจากรา *Rhynchosporium secalis*

อาการไหม้ (blast)

อาการไหม้มีลักษณะเป็นปื้นสีดำจาง ๆ บนใบ เกิดจากรา หรือแบคทีเรีย
อาการดังกล่าวอาจมีสาเหตุมาจากเชื้อโรคพืชหรือเกิดจากการทำลายของแ
มลงหรืออาจเป็นเพราะสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง
ตัวอย่างอาการไหม้ที่เกิดจากรา เช่น
โรคไหม้ของข้าวหรือพืชตระกูลหญ้าบางชนิด เกิดจากรา *Pyricularia*
oryzae

อาการสแคป (scab)

รอยแผลสแคป มีลักษณะขรุขระเป็นสะเก็ดหรือมีลักษณะคล้ายหนามเล็ก ๆ
นูนขึ้นมาจากผิวพืช
ส่วนใหญ่อาการเกี่ยวข้องกับการติดปกติของเซลล์ผิวพืชชั้นบน
บางครั้งอาจไม่พบรอยแผลตกระหน่ำ อาการสแคปส่วนใหญ่เกิดจากรา
Elsinoe, *Fusicladium*, *Sphaceloma*, *Venturia* และ *Cladosporium*
อาการอาจพบได้บนผลและลำต้น

อาการราน้ำค้าง (downy mildew)

อาการราน้ำค้างมีลักษณะเป็นรอยแผลสีขาวด้านใต้ใบพืช และพบก้านชูสปอร์ของรา (conidiophore) บนแผล ซึ่งลักษณะของ conidiophore ใช้ในการจำแนก genera ของเชื้อรา โรคราน้ำค้างของพืชตระกูลหญ้า ซึ่งมีสาเหตุจากราในอันดับ Sclerosporales และโรคราน้ำค้างของพืชใบเลี้ยงคู่มีสาเหตุจากราในอันดับ Peronosporales

ราในกลุ่มนี้เกือบทุกชนิดอาศัยความชื้นเพียงเล็กน้อยในการเคลื่อนที่ไปบนผิวพืชอาศัยและเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืช

ในสภาพการปลูกที่มีความชื้นสูงเชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้างสามารถทำให้เกิดความเสียหายได้อย่างมาก เช่น โรคราน้ำค้างของมิลเลต เกิดจากรา *Sclerospora graminicola* และโรค white blister ของพืชตระกูลผักกาดเขียว เกิดจากรา *Albugo candida*

อาการราแป้ง (powdery mildew)

สาเหตุของอาการราแป้งเป็นราที่อาศัยอยู่บนสิ่งมีชีวิตเท่านั้น (obligate parasite) จัดอยู่ในตระกูล Erysiphaceae เช่น *Blumeria graminis* เป็นสาเหตุโรคราแป้งของธัญพืชและพืชตระกูลหญ้า

อาการราแป้งสังเกตได้จากลักษณะเส้นใยสีขาวฟูขึ้นมาบนผิวพืชและสร้างส่วขยายพันธุ์คล้ายผงแป้งบนผิวใบ บางครั้งพบ ascomata ขนาดเล็กบนผิวหน้าของใบ ราสร้าง haustoria แทงเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช บริเวณใต้ชั้นเซลล์ผิวพืช (epidermis) และราสร้าง conidia เซลล์เดี่ยวต่อกันเป็นสายลูกโซ่บริเวณปลาย conidiophore

รากลุ่มนี้ความเฉพาะเจาะจงกับพืชอาศัย (formae specialis, f.sp.) สามารถปรับตัวได้ดีในสภาพอากาศที่ค่อนข้างแห้งแล้ง และเป็นสาเหตุโรคพืชเพียงกลุ่มเดียวที่ conidia สามารถงอกได้แม้ว่าจะไม่มีความชื้น (ข้อมูลเพิ่มเติมจาก Braun ,1987)

อาการราดำ (sooty moulds)

อาการราดำ sooty moulds นี้เกิดจากราสาเหตุโรคพืชในอันดับ Capnodiales และ Chaetothyriales

พบกลุ่มเส้นใยสีดำสานกันเป็นแผ่นบนผิวใบพืชและส่วนของลำต้น โดยอาศัยมูลขับถ่ายของแมลงเป็นอาหาร

อาการราดำมักเกี่ยวข้องกับการทำลายของแมลงชนิดปากดูด ได้แก่ เพลี้ยอ่อนและเพลี้ยแป้ง ราดำทำให้การสังเคราะห์แสงของพืชลดลง ทำให้พืชอ่อนแอและผลผลิตลดลง (ข้อมูลเพิ่มเติมจาก Hughes (1976))

อาการราดำ (black mildew)

อาการราดำ black mildew มีสาเหตุจากราในอันดับ Meliolales ลักษณะอาการของราดำ black mildew จะสับสนกับลักษณะอาการราดำ sooty mould พบโรคราดำนี้ในเขตร้อนชื้นและเขตร้อนชื้น ความเสียหายจากโรคทำให้พืชหมดความสวยงาม อาการที่สังเกตได้คือพบเส้นใยหยาก ล้วน สีดำ ราสร้าง lateral hyphopodia และส่วนขยายพันธุ์ ascomata ชูขึ้นมาบนใบพืช และ ascospore สีดำ ขนาดใหญ่ (ข้อมูลเพิ่มเติมเรื่อง Meliolales จาก Hansford, 1961 และ Hansford, 1963)

7.1.4 ราที่ทำลายผลและเมล็ด (Fruit and seed pathogens)

สาเหตุของโรคที่ทำให้เกิดอาการผลเน่า เช่น รา *Colletotrichum gloeosporioides* (teleomorph : *Glomerella cingulata*) เป็นสาเหตุโรคผลเน่าและ anthracnose มากที่สุด รอยแผลนี้เมื่ออายุมากขึ้นปริและแตก รา *Phytophthora* spp. เป็นสาเหตุโรคผลเน่าของพืชหลายชนิด เช่น โกโก้ และมะพร้าว รา *Phomopsis* และ *Fusicoccum* มีเป็นสาเหตุโรคลำต้นเน่าของไม้ผลเขตร้อนหลายชนิด

ผลไม้หลังเก็บเกี่ยวส่วนใหญ่จะอ่อนแอต่อจุลินทรีย์สาเหตุโรค ซึ่งเชื้อสาเหตุอาจติดมาระหว่างการบรรจุ การเก็บรักษา และการขนส่ง โรคพืชที่พบหลังเก็บเกี่ยวมีสาเหตุจากการเข้าทำลายในระยะแปลงปลูกแต่ยังไม่แสดงอาการให้ปรากฏ อาการของโรคจะพัฒนาได้แม้ว่าจะอยู่ในสภาพของตู้เย็นและลักษณะอาการของโรคเหล่านี้จะปรากฏให้เห็นในขั้นตอนใดก็ได้เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อโรคนั้น ๆ

ตัวอย่างโรคพืชหลังเก็บเกี่ยว ได้แก่ โรค transit rot เกิดจากรา *Rhizopus stolonifer* โรค blue mold เกิดจากรา *Botrytis cinerea* โรคผลเน่าเกิดจากรา *Aspergillus* spp. และโรค stem end rot เกิดจากรา

Phomopsis spp. และ *Fusicoccum* spp.
(ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับโรคพืชหลังเก็บเกี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา ของ Pitt and Hocking, 1999)

โรคเอือกอดส์ (Ergots)

โรคเอือกอดส์มีสาเหตุจากราในอันดับ Clavicipitales พบบนพืชตระกูลหญ้า รวมทั้งธัญพืชต่าง ๆ ราสร้าง conidia ระยะ spore เข้าทำลายรังไข่ของพืช การแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุส่วนใหญ่อาศัยแมลงเป็นพาหะแพร่ โดย conidia ปะปนอยู่ในน้ำหวานในรังไข่ ซึ่งมีลักษณะคล้ายน้ำผึ้ง น้ำหวานนี้เกิดจากกลไกการตอบสนองของพืชที่ต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อเอือกอดส์ ราสาเหตุโรคเอือกอดส์สร้าง sclerotia ที่มีสารอัลคาลอยด์ซึ่งเป็นพิษต่อคนและสัตว์ (ข้อมูลเพิ่มเติมจาก White, et al. 2003)

7.1.5 ราสนิม (Rust fungi)

โรคราสนิมเกิดจากราในอันดับ Uredinales
ลักษณะอาการของโรคจะเกิดแผลบนใบและลำต้น
ราสร้างสปอร์บนแผลมีลักษณะเป็นผงละเอียด สีเหลือง สีส้ม หรือสีน้ำตาลคล้ายสนิมเหล็ก เช่น รา *Puccinia polysora* บนข้าวโพด รา *Puccinia purpurea* บนข้าวฟ่าง และ รา *Phakopsora pachyrhizi* บนถั่วเหลือง เป็นต้น

โรคราสนิมมีความสำคัญต่อพืชเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก
เนื่องจากราในกลุ่มนี้มีมากกว่า 7,000 species
เป็นสาเหตุของโรคราสนิมของพืชกว่า 160 ชนิด โดยราในกลุ่มใหญ่ที่สุดได้แก่
Genus *Puccinia* ทำลายพืชใบเลี้ยงเดี่ยวกว่า 30 ชนิด
ราสนิมสร้างสปอร์ได้ถึง 5 แบบ ในรอบวงจรชีวิต สปอร์ทั้ง 5
แบบมีชื่อเรียกเป็นภาษาโรมันดังนี้

0	Spermatia	สร้างใน spermatogonia
I	Aecidiospores	สร้างใน aecidia
II	Urediniospores	สร้างใน uredinia
III	Teliospores	สร้างใน telia
IV	Basidiospores	เกิดบน basidium โดยการงอกของ teliospore

ราสนิมที่มีการสร้างสปอร์ทั้ง 5 แบบ มีชื่อเรียกว่า macrocyclic rust ราสนิมหลายชนิดไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ครบทั้ง 5 แบบ โดยอาจสร้างสปอร์ เพียง 1 ถึง 2 แบบ เช่น ราสนิมที่สร้างสปอร์แบบ III และ IV มีชื่อเรียกว่า microcyclic rust ราสนิมหลายชนิดมีพืชอาศัย 2 ชนิดที่ต่างชนิดกัน ราสร้างสปอร์แบบที่ II, III และ IV บนพืชอาศัยชนิดแรก และราสร้างสปอร์แบบที่ 0 และ I บนพืชอาศัยชนิดที่ 2 ราสนิมที่ต้องอาศัยบนพืชอาศัยทั้ง 2 ชนิดที่ต่างกันนี้ มีชื่อเรียกว่า heteroecious ส่วนราสนิมที่อาศัยบนพืชอาศัยชนิดเดียว มีชื่อเรียกว่า autoecious

วงจรชีวิตของราสนิมชนิด heteroecious ที่เป็น macrocyclic rust มีดังนี้

1. basidiospore งอกและเข้าทำลายใบพืชอาศัย
2. ราสร้างสปอร์ เรียกว่า spermatia ภายใน spermatogonia ในใบพืช spermatia มีลักษณะเป็นเซลล์เล็ก ๆ ซึ่งแพร่กระจายไปได้โดยแมลง spermatogonia งอกเส้นใยแทงทะลุผ่านเซลล์ใบพืชออกมาภายนอก และได้รับการผสมพันธุ์จาก spermatia ของเพศตรงข้าม
3. ผลจากการผสมพันธุ์ของ spermatia จากเพศตรงกันข้ามทั้ง 2 ส่วน เกิดเป็น aecia และ aeciospores ซึ่งแพร่กระจายไปโดยลม หรือแมลง สปอร์ aeciospores จะเข้า ทำลายพืชอาศัยชนิดที่ 2 เท่านั้น

4. หลังจาก aeciospores งอกเป็นเส้นใยเข้าทำลายพืชอาศัยที่ 2 เส้นใยจะสร้าง uredinia และ urediniospore ลักษณะคล้ายฝุ่นสีส้มหรือสีน้ำตาล urediniospore แพร่กระจายไปโดยลม เข้าทำลายพืชอาศัยชนิดเดียวกันและสร้าง urediniospore ได้หลายรุ่นตลอดฤดูกาลปลูกพืช
5. เมื่อสิ้นสุดฤดูกาลปลูกพืชสร้าง telia และ teliospores บางครั้ง urediniospore และ teliospores อาจเกิดขึ้นบน sorus เดียวกัน teliospores จะเป็นสปอร์ที่อยู่ข้ามฤดูได้ แต่ละเซลล์ของ teliospores จะงอกเป็น basidium ที่มีผนังกัน 1 - 3 septate ซึ่ง basidium สร้าง sterigmata และสร้าง basidiospore บน sterigmata สปอร์ basidiospore นี้แพร่ไปได้โดยลม

การตรวจสอบตัวอย่างพืชที่เป็นโรคราสนิม ให้ตรวจสอบหาสิ่งต่อไปนี้

- ตรวจสอบ uredinia และ telia ว่าเกิดบนด้านใดของใบ หรือเกิดบนส่วนใดของพืช
- ตรวจสอบรูปร่างและผิวของ urediniospore ถ้าพบ paraphyses (sterile cells) ให้ตรวจสอบรูปร่างและขนาดของ paraphyses
- ดูจำนวนและตำแหน่งของ germ pore บน urediniospores
- ตรวจสอบรูปร่าง และจำนวนเซลล์ของ teliospore และ มี pedicels telia หรือไม่

7.1.6 ราเขม่าดำ (Smut)

โรคราเขม่าดำเกิดจากราในชั้น Ustilaginomycetes สามารถตรวจวินิจฉัยได้ง่าย จากผงสปอร์ที่มีสีดำภายใน sori พบ sori ได้ในราก ลำต้น ใบ ช่อดอก ดอก เกสรตัวผู้ และรังไข่

ราเขม่าดำมีความสำคัญต่อพืชไร่ ไม้ดอก ไม้ประดับ ราเขม่าดำมีมากกว่า 2,000 species ใน 90 genera ในช่วงเวลาที่ผ่านมา มีการเปลี่ยนแปลงการจำแนกอันดับของรานี้หลายครั้ง โดยใช้โครงสร้างและเทคนิคทางชีวโมเลกุลในการจำแนก ซึ่งแต่เดิมการจำแนกราเขม่าดำใช้การงอกของสปอร์เป็นหลัก (ข้อมูลเพิ่มเติมจาก Vanky, 2002)

ลักษณะสำคัญของราเขม่าดำ คือ สปอร์มีลักษณะเป็นกลุ่มผงสีดำ (teliospores) เกิดภายใน sori บนส่วนของพืชที่จำเพาะเจาะจง สปอร์ของรากลุ่มนี้ไม่มีก้าน (pedicellate) ซึ่งแตกต่างจาก teliospore ของราสนิม สปอร์ของราเขม่าดำแพร่ระบาดโดยลม

Teliospore จะงอกและสร้างสปอร์ที่เรียกว่า basidiospores (sporidia) ซึ่งมีการงอกคล้ายกับยีสต์ ในสภาพธรรมชาติ basidiospores 2 สปอร์ งอกและรวมตัวกันเป็นเส้นใยสำหรับการเข้าทำลายพืช (infection hyphae) โดยทั่วไปราเขม่าดำเข้าทำลายของส่วนของพืชที่อ่อนแอ ซึ่งมักเป็นส่วนที่เฉพาะเจาะจงต่อรานั้นๆ เช่น รังไข่ หรือดอก

การจำแนกราเขม่าดำในช่วงเวลาที่ผ่านมา ทำให้ชื่อของราเขม่าดำเปลี่ยนแปลงไปหลายชนิด ดังนี้

- *Sporisorium* มีความเฉพาะเจาะจงต่อพืชตระกูลหญ้า และ genus นี้ใช้แทนชื่อราเขม่าดำหลาย genera เช่น *Spacelotheca* และ *Sorosporium*
- *Sphacelotheca* มีความเฉพาะเจาะจงต่อพืชตระกูล Polygonaceae และปัจจุบันรา genus นี้ ถูกจัดไว้ในชั้น Urediniomycetes (ซึ่งรวมทั้งราสนิมด้วย)
- *Sorosporium* มีความเฉพาะเจาะจงกับส่วนของดอกของพืชตระกูล Caryophyllaceae
- *Ustilago* มีความเฉพาะเจาะจงต่อพืชตระกูลหญ้า แต่การเรียก species ของรา จะใช้ตามชื่อของพืชอาศัยซึ่งส่วนใหญ่เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ รา *Ustilago* ใช้แทนชื่อราเขม่าดำ *Microbotryum* ในชั้น Urediniomycetes

การตรวจสอบตัวอย่างโรคราเหมาดำ

- ส่วนของพืชที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย
- เนื้อเยื่อที่บวมพองขึ้นมาจากผิวพืช (hypertrophied tissue)
- ลักษณะการเกาะกันของสปอร์เป็นแบบอัดกันแน่นหรือรวมกันอยู่หลวม ๆ
- ลักษณะ รูปร่าง ขนาด และผิวของสปอร์
- มี sterile cell อยู่ในกลุ่มของสปอร์หรือไม่
- มี peridium และ columella อยู่ภายใน sori หรือไม่

7.2 การจำแนกแบคทีเรีย (Bacteria)

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีเซลล์เดียว นิวเคลียสมีผนังหุ้ม (Prokaryotic) ไม่มีคลอโรฟิลล์ และขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว

แบคทีเรียอาศัยอยู่ทั่วไปในสภาพนิเวศทุกชนิด และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ง่าย

แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคพืชพบได้ทั่วโลก

เนื่องจากแบคทีเรียชอบความชื้นและร้อนอบอ้าว จึงเป็น

จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในเขตร้อน

เขตอบอุ่น

และพื้นที่ที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูง

แบคทีเรียส่วนใหญ่อาศัยอยู่บนเศษซากพืช บนเมล็ด หรือบนต้นพืชที่มีชีวิต แบคทีเรียเข้าทำลายพืชโดยผ่านเข้าทางบาดแผลหรือช่องเปิดตามธรรมชาติ เช่น ปากใบ และช่องคายน้ำ (lenticels) แบคทีเรียสามารถติดไปเมล็ด ส่วนขยายพันธุ์ น้ำฝน แมลง และเครื่องมือในแปลงปลูก

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียยังไม่มีระบบใดเป็นทางการ

การควบคุมการตั้งชื่อแบคทีเรียมีข้อกำหนดไว้ในเอกสาร *The International Code of Nomenclature of Bacteria (Bacteriological Code)* ในปี 1975

ได้มีระบบการตั้งชื่อแบคทีเรียอยู่ในเอกสาร *Bacteriological Code* (1975 Revision) ซึ่งต่อมาได้มีการเปลี่ยนแปลงวิธีการตั้งชื่อใหม่ตามเอกสาร

the Approved Lists of Bacterial Names (International Journal of Systematic Bacteriology, 1980, 30, 225-420)

ในปัจจุบันการตั้งชื่อแบคทีเรียได้ใช้เอกสาร *The International Code of Nomenclature of Bacteria* (1990 Revision) ซึ่งเป็นฉบับที่ใหม่ที่สุด

ในเอกสารนี้มีชื่อของแบคทีเรียที่ได้รับการตั้งชื่อและตีพิมพ์ในวารสารที่ได้รับการยอมรับ การตั้งชื่อแบคทีเรียชนิดใหม่มีกฎเกณฑ์ดังนี้

- ตรวจสอบชื่อแบคทีเรียในเอกสาร the *Approved Lists of Bacterial Names*
- ต้องมีการตีพิมพ์รายละเอียดของแบคทีเรียในวารสาร The *International Journal of Systematic Bacteriology* (IJSB) หรือ ใน the *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) และ มีการเปรียบเทียบกับชื่อแบคทีเรียใน *Bacteriological Code*. ตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2002 เป็นต้นมา นักวิจัยที่ต้องการตั้งชื่อแบคทีเรียชนิดใหม่ (new species, new subspecies และ new combinations) จะต้องปฏิบัติตามกติกาของ IJSEM โดยต้องเก็บตัวอย่างต้นแบบแบคทีเรียบริสุทธิ์ไว้ใน culture collection ที่ได้รับการยอมรับอย่างน้อย 2 แห่ง ใน 2 ประเทศ
- ต้องมีการตีพิมพ์ข้อมูลของแบคทีเรียใน Validation List. ซึ่งจัดพิมพ์โดย IJSB หรือได้รับการตีพิมพ์ใน IJSEM validating bacterial names ซึ่งเผยแพร่ในวารสารทั่วไป เอกสาร "Approved Lists of Bacterial Names" เป็นเอกสารที่บันทึกชื่อและรายละเอียดของแบคทีเรีย จำนวน 2,212 genera, species, subspecies และ 124 ชื่อของ higher taxa ไว้โดยละเอียด ในปี 2002 ได้รวบรวมจำนวนแบคทีเรียไว้เพิ่มขึ้นเป็น 5,806 species ใน 1,094 genera ซึ่งเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช 132 species ใน 29 genera ซึ่ง genera ที่สำคัญ ได้แก่ *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Xanthomonas* และ *Xylella*. แบคทีเรียสาเหตุโรคพืชหลายชนิดมีความเฉพาะเจาะจงกับพืชอาศัย มีการจำแนกถึงระดับ pathovars เช่น *Pseudomonas syringae* ถูกจำแนกไว้มากกว่า 40 pathovars *Xanthomonas campestris* ถูกจำแนกไว้มากกว่า 123 pathovars

ในวงจรการเกิดโรคของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชหลายชนิด

แบคทีเรียสามารถอยู่บนพืชอาศัยแบบ

epiphyte

ก่อนจะเป็นสาเหตุของโรคพืช

แบคทีเรียโรคพืชหลายชนิดเพิ่มปริมาณอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์พืช

ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเข้าสู่พืชทางช่องเปิดธรรมชาติ เช่น ปากใบ
ช่องคายน้ำ (hydrathodes) และรอยแผล

ความรุนแรงของโรคที่เกิดจากแบคทีเรียมีหลายระดับ
ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียนั้น ๆ รวมไปถึงชนิดของ เอ็นไซม์ extracellular
enzymes, toxins, phytohormones และ extracellular polysaccharides

การวินิจฉัยโรคที่เกิดจากแบคทีเรียต้องพิจารณาลักษณะอาการร่วมกับปัจจัย
อื่นที่อาจมีความสำคัญด้วย

การตรวจโรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรียอาจสังเกตได้เมื่อกเยิ้ม (ooze)
ของแบคทีเรีย

และการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูเซลล์ของแบคทีเรียที่ไหลออกจาก
บาดแผลของพืชที่ถูกตัดและแช่น้ำไว้

วิธีการแยกแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชนิยมใช้เทคนิคการทำสารละลายลดระดับ
ความเข้มข้น (dilution method) จุดประสงค์เพื่อการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ
ของแบคทีเรียที่สงสัยว่าเป็นเชื้อสาเหตุเพื่อให้ได้แบคทีเรียบริสุทธิ์และเป็นแบคทีเรีย
ชนิดที่ต้องการ

อาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียต้องเหมาะสมกับชนิดของแบคทีเรีย

ผิวหน้าของอาหารต้องแห้งสนิท

และก่อนทำการทดสอบต้องมั่นใจว่าไม่มีเชื้อชนิดอื่นปนเปื้อน

แบคทีเรียสาเหตุโรคพืชสามารถจำแนกได้คร่าว ๆ

ด้วยวิธีการทดสอบเพียงไม่กี่วิธี

ก่อนทำการจำแนกแบคทีเรีย ควรตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อก่อน
ด้วยเทคนิคการลดระดับความเข้มข้น

โดยละลายเซลล์แบคทีเรียจำนวนหนึ่งในน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อหรือน้ำเกลือ

แล้วนำแบคทีเรียแขวนลอยจำนวน 1 loop

เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่แห้ง

เช่นเดียวกับวิธีการแยกเชื้อบริสุทธิ์

ทำการตรวจสอบเชื้อทุกวัน

เป็นเวลาหลาย

๑

วันเพื่อให้แน่ใจว่าแบคทีเรียที่เกิดใหม่ทุกโคโลนีเป็นชนิดเดียวกัน

บางครั้งโคโลนีที่เกิดเดี่ยว ๆ มีลักษณะแตกต่างจากโคโลนีที่เกิดขึ้นเป็นกลุ่ม

แม้ว่าลักษณะโคโลนีภายนอกจะเหมือนกันก็ตาม

ถ้าเกิดความไม่แน่ใจว่าเชื้อบริสุทธิ์จริง

ควรแยกเชื้อบริสุทธิ์ใหม่

จนกว่าจะแน่ใจว่าได้เชื้อบริสุทธิ์จริง

การแยกเชื้อโดยวิธีนี้นอกจากเพื่อเป็นการแยกเชื้อบริสุทธิ์แล้วยังสามารถใช้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีได้ ควรสังเกตและบันทึก ลักษณะรูปร่าง ขนาด ผิวหน้า ความสูงของขอบโคโลนี ความแน่น สี ความโปร่งใสหรือทึบแสง และอัตราการเติบโตของโคโลนีไว้ด้วยการพบเม็ดสี การสะสมเม็ดสี (precipitates) หรือการเกิดผลึกในอาหารเลี้ยงเชื้อ ก็ควรบันทึกไว้เช่นกัน

คู่มือการจำแนกเชื้อแบบ dichotomous keys เป็นคู่มือจำแนกแบคทีเรียในยุคแรก ๑
การจำแนกดำเนินตามคู่มือเป็นขั้นตอนเรียงกันไป
แม้ว่าคู่มือนี้จะใช้ในการจำแนกแบคทีเรียได้ไม่กว้างขวางนัก
แต่สำหรับแบคทีเรียโรคพืชยังใช้ได้ดี
ซึ่งวิธีการจำแนกจะต้องใช้ความระมัดระวังเป็นพิเศษ
โดยจะต้องปฏิบัติตามขั้นตอน โดยเฉพาะในขั้นตอนเริ่มต้น
การจำแนกแบคทีเรียวิธีอื่น เช่น การวิเคราะห์กรดไขมัน phage-typing, monoclonal antibodies และ nucleic probes

ลักษณะทางสัณฐานวิทยามีข้อจำกัดในการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย
ขนาดของโคโลนี อัตราการเติบโต สีและเนื้อของโคโลนี
ความทึบแสงของโคโลนี
ไม่สามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อการจำแนกแบคทีเรียได้
การจำแนกจำเป็นต้องอาศัยการทดสอบอื่น ๆ เช่น
ตรวจสอบว่าแบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์บางชนิดหรือไม่

7.3 การจำแนกไฟโตพลาสมา (Phytoplasmas)

ไฟโตพลาสมาเดิมเรียกว่า Mycoplasma-like organisms เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (prokaryotes) อยู่ในชั้น Mollicutes ไฟโตพลาสมามีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรีย แต่ไม่มีผนังเซลล์และไม่สามารถอาศัยอยู่อย่างอิสระโดยปราศจากพืชอาศัย และไม่สามารถเลี้ยงได้ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ จะพบไฟโตพลาสมาในชั้นของท่อน้ำท่ออาหารของพืช และส่วนใหญ่ถ่ายทอดได้ด้วยเพลี้ยจักจั่น (leafhoppers) และเพลี้ยกระโดด (plant hoppers) ไฟโตพลาสมาเป็นศัตรู

พืชที่ต้องอาศัยอยู่ในต้นพืชตลอดวงจรชีวิต เชื้อกลุ่มนี้มีพืชอาศัยกว้าง
ลักษณะอาการโดยทั่วไปของโรคที่เกิดจากไฟโตพลาสมาพบว่า
ใบพืชเหลืองและมีขนาดเล็กลง ต้นแคระแกร็น กิ่งและยอดแห้ง
อาการพุ่มแจ้ และช่อดอกบวมโต

วิธีการวินิจฉัยไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพืช

ในอดีตใช้วิธีสังเกตลักษณะอาการของโรค พืชอาศัย พาหะที่เฉพาะเจาะจง
และการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนตรวจสอบเนื้อเยื่อพืชที่ตัดให้บางเป็น
พิเศษต่อมามีวิธีการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลตรวจสอบดีเอ็นเอ
โดย เฉพาะไฟโตพลาสมาที่มีดีเอ็นเอตัวตรวจ (phytoplasmas-specific
PCR primers) ซึ่งเฉพาะเจาะจงกับลำดับเบส อาร์เอ็นเอ ของ 16s ribosomal
RNA ที่มีประสิทธิภาพสูงในการวินิจฉัยไฟโตพลาสมา

7.4 การจำแนกชนิดไวรัสและไวรอยด์ (Viruses and Viroids)

ไวรัสเป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็กมากและมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เท่านั้น ไวรัสมีลักษณะต่างจากราและแบคทีเรียตรงที่ไวรัสไม่มีเซลล์
ไวรัสเป็นเพียงส่วนประกอบของโปรตีนที่เป็นเปลือกหุ้มเรียกว่า capsid
ล้อมรอบส่วนของยีนที่อาจเป็น ribonucleic acid (RNA) หรือ
deoxyribonucleic acid (DNA)

ไวรัสจะขยายพันธุ์ได้ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเท่านั้น

โดยการสังการของยีนของพืชอาศัย

ดังนั้นแหล่งของพลังงานจากพืชจึงถูกนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณไวรัสแทน
การที่ไวรัสเข้าทำลายพืชจะรบกวนกลไกการทำงานของพืช เช่น
การสังเคราะห์แสงและการเจริญเติบโตของพืช

แมลงปากดูด เช่นเพลี้ยอ่อน และเพลี้ยจักจั่น
เป็นพาหะในการระบาดของโรคไวรัสต่าง ๆ
สาเหตุในการแพร่ระบาดโรคไวรัสส่วนใหญ่เป็น ส่วนขยายพันธุ์พืช เช่น
กิ่งพันธุ์ ท่อนพันธุ์ ตาขยายพันธุ์
นอกจากนี้ไวรัสยังสามารถมีชีวิตอยู่บนพืชอาศัยอื่น ๆ เช่นวัชพืชได้ด้วย
เนื่องจากไวรัสอาศัยอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต
จึงไม่อาจเก็บตัวอย่างไวรัสไว้ในตัวอย่างแห้งโรคพืชได้

ไวรอยด์ (Viroids) เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก มีโมเลกุลประกอบด้วย ribonucleic acid (RNA) ต่อกันเป็นวงกลม ไม่มีโปรตีนเป็นผนังหุ้ม สามารถเข้าทำลายและเพิ่มปริมาณในเซลล์พืช และเป็นสาเหตุของโรคพืช การแพร่ระบาดไวรอยด์เกิดในระหว่างการตัดแต่งกิ่ง ติดไปกับเมล็ดพันธุ์ หรือการขยายพันธุ์ด้วยวิธี ตอน หรือติดตา

7.4.1 ชนิดของไวรัสและการบันทึกข้อมูล (*Virus species and records*)

การจัดหมวดหมู่ของไวรัสโดยใช้คุณสมบัติของไวรัสหลายประการตามที่ International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>), ได้อธิบายไว้ดังนี้

- พืชอาศัยที่ไวรัสเข้าทำลายตามธรรมชาติ
- ลักษณะอาการทุกระยะของการเข้าทำลายบนพืชอาศัยตามธรรมชาติ
- วิธีการถ่ายทอดเชื้อ เช่น วิธีสัมผัส ติดไปกับเมล็ด ติดไปกับเกสรตัวผู้ และแมลงพาหะ เป็นต้น
- พืชอาศัยที่แสดงอาการอ่อนแอเมื่อทำการปลูกเชื้อในห้องปฏิบัติการ
- รูปร่างของ ไวรัส
- คุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรตีนและกรดนิวคลีอิก
- การเปรียบเทียบลำดับเบสและการเรียงตัวของลำดับเบสกับไวรัสที่รู้จักมาก่อน
- วิธีทางเซรุ่มวิทยา

ข้อมูลเกี่ยวกับไวรัสสาเหตุโรคพืชจะไม่รวมไว้กับตัวอย่างแห่งโรคพืชที่เกิดจากไวรัส เนื่อง

จากไวรัสไม่สามารถมีชีวิตอยู่บนตัวอย่างแห้งได้

ส่วนใหญ่จะไม่สามารถรักษาคูณสมบัติเดิมไว้ได้แม้ว่าจะนำไปเก็บในสภาพความเย็นยิ่งยวด

แต่ปัจจุบันมีวิธีการเก็บไวรัสได้เป็นเวลานาน เช่นการโคลนเข้าไว้ในจีโนมของแบคทีเรีย เป็นต้น ดังนั้นข้อมูลไวรัสสาเหตุโรคพืชจึงไม่ยึดถือตามตัวอย่างพืชแต่ใช้คุณสมบัติอื่น

น ๆ เช่น คำอธิบาย ภาพถ่าย ข้อมูลงานวิจัย ลำดับเบส และข้อมูลเซรุ่มวิทยา ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากไวรัสสามารถค้นได้จากเอกสาร the VIDE (Virus Identification Data Exchange) database (<http://image.fs.uidaho.edu/viderefs.htm#descriptions>).

ไวรัสรูปร่างแท่งยาว (rod shape viruses)

ไวรัสรูปร่างแท่งยาว เช่น *Tobacco mosaic virus* (TMV) มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 – 25 นาโนเมตร และความยาว 150-2000 นาโนเมตร ซึ่งขึ้นกับความยาวของ RNA รูปร่างของไวรัสอาจเป็นแท่งยาวตรงหรือแท่งโค้งงอ ลักษณะโครงสร้างทั่วไปของไวรัสกลุ่มนี้ ประกอบด้วย RNA และ โปรตีนมีลักษณะเป็นแบบ เกลียว เรียกว่า helix

ไวรัสรูปร่างแบบ Isometric viruses

ไวรัสชนิดนี้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 – 70 นาโนเมตร พบอยู่เดี่ยว ๆ หรืออยู่เป็นคู่ เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าไวรัสจะจับตัวกันแบบ icosahedral symmetry (เช่น มี 12 vertices และ 20 triangular faces) เช่น *Cauliflower mosaic virus* (CaMV).

ไวรัสรูปร่างแท่งมน (Bacilliform viruses)

ไวรัสกลุ่มนี้มีรูปร่างคล้ายแบคทีเรียใน genus *Bacillus* ซึ่งอาจมีเปลือกหุ้มหรือไม่ก็ได้ เช่น *Alfalfa mosaic virus* (AMV) และ *Sugarcane bacilliform virus* (SCBV).

การวินิจฉัยไวรัสสาเหตุโรคพืชมีหลายวิธี นักไวรัสวิทยามักเตรียมพืชดัชนี (herbaceous indicator plants) ไว้ในเรือนทดลองกันแมลง เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของไวรัสและศึกษาคุณสมบัติในการทำลายพืช เมื่อทำการปลูกไวรัสต่างชนิดลงไปพืชดัชนีจะแสดงลักษณะอาการต่างกัน การใช้ลักษณะอาการเพียงอย่างเดียวไม่พอเพียงต่อการจำแนกชนิดไวรัสได้ถูกต้อง การใช้เทคนิคในห้องปฏิบัติการ เช่น เซรุ่มวิทยา การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ตลอดจนการวิเคราะห์ nucleic acid จะช่วยในการจำแนกเชื้อไวรัสได้ดีขึ้น

7.4.2 ลักษณะอาการที่เกิดจากไวรัส (Virus symptoms)

นักวิจัยที่มีประสบการณ์สามารถวินิจฉัยโรคเบื้องต้นได้โดยใช้ลักษณะอาการของโรค ลักษณะอาการของโรคแบ่งออกได้กว้าง ๆ 2 แบบ ได้แก่ ลักษณะอาการที่เป็นผลมาจากการเข้าทำลายเซลล์พืชอาศัย เช่น อาการรอยแผล

และลักษณะอาการที่เกิดจากการทำลายอย่างต่อเนื่องหรือการทำลายทั่วทั้งต้น (systemic infection) เช่น อาการด่าง (mosaic) การเข้าทำลายพืชของไวรัสต่างจากการเข้าทำลายของราเพราะไวรัสจะเข้าทำลายพืชทางบาดแผล เช่น รอยขาดของเซลล์ขนบนผิวใบพืช รอยแตกเล็ก ๆ หรือรอยแยกของเซลล์ชั้นผิวหน้าพืชซึ่งมักเกิดจากการกัดกินของแมลง

ลักษณะอาการเริ่มแรกที่ไวรัสเข้าทำลายพืชเรียกว่า อาการเฉพาะแห่ง (local symptoms) ซึ่งมีขอบเขตของการทำลายเรียกว่ารอยแผล (lesions) รอยแผลนี้มีขนาดต่างกันตั้งแต่เล็กเท่าปลายเข็มหมุดหรือมีขนาดใหญ่เป็นแถบซึ่งพบว่ามีสีขีดจางเนื่องจากขาดคลอโรฟิลล์หรือเกิดแผลแห้งตาย (necrotic) เมื่อมีการถ่ายทอดไวรัสผ่านทางน้ำคั้นบนใบพืช ในบางครั้งจะพบรอยแผลเนื่องจากเซลล์พืชตายหลังจากการปล่อยแมลงพาหะ เช่น เพลี้ยอ่อน ให้ดูดกินพืชเพื่อถ่ายทอดไวรัสเข้าสู่พืช

กลไกการตอบสนองระหว่างไวรัสกับพืชอาศัย ในบางกรณีไวรัสไม่สามารถแพร่ออกจากจุดที่เชื้อเข้าสู่พืชอาศัยได้ทำให้พืชยังคงแสดงอาการจุดแผลปรากฏอยู่ กลไกการตอบสนองนี้เรียกว่า hypersensitive reaction ถ้าไม่มีกลไกการตอบสนองดังกล่าวไวรัสจะแพร่ขยายเข้าไปในชั้น mesophyll ของใบพืช เมื่อใดก็ตามที่ไวรัสแพร่เข้าสู่ระบบท่อน้ำท่ออาหารซึ่งไวรัสส่วนใหญ่เคลื่อนที่ไปได้ในท่ออาหารของพืช ไวรัสก็จะแพร่ได้อย่างรวดเร็วไปทั่วทั้งต้นเป็นผลให้ต้นพืชถูกทำลายต่อเนื่อง ซึ่งเรียการทำลายนี้ว่า secondary or systemic infection

อาการที่เกิดขึ้นทั่วทั้งต้นของไวรัสมีลักษณะแตกต่างกัน เช่น อาการสีขีดเหลือง อาการเหี่ยว หรือมีการเปลี่ยนแปลงภายในต้นพืช เช่น การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเซลล์ที่ผิดปกติไป

ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope หรือกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเท่านั้น

อาการต่าง (*mosaic*)

เกิดขึ้นในเซลล์ที่ไวรัสเข้าทำลายซึ่งโดยทั่วไปมักเป็นเซลล์ใบ
ทำให้เซลล์สีซีดลงเนื่องจากสร้างคลอโรฟิลล์ลดลงในขณะที่เซลล์ปกติมีสีเขียว
รูปแบบและขนาดของอาการต่างจะแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด
พืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะแสดงอาการต่างเป็นแถบ หรือเป็นริ้ว
พืชใบเลี้ยงคู่แสดงอาการสีซีด แพลมลักษณะกลมหรือเป็นหย่อม
รอยแผลสีเหลืองเป็นแต้ม เป็นจุด หรือเป็นวง

กลไกการตอบสนองระหว่างพืชอาศัยกับไวรัสบางกลไก

พบว่าเนื้อใบทั้งใบมีสีเหลือง

เนื่องจากพืชลดการสร้างคลอโรฟิลล์และคลอโรพลาสต์แตกเสียหายทำให้เกิด
อาการเหลืองของไวรัส เช่น beet yellows and barley yellow dwarf
อาการเหลืองนี้

ในระยะแรกจะมักพบอาการเส้นใบมีสีซีดจางในขณะที่บริเวณพื้นที่รอบ ๆ
เส้นใบยังคงมีสีเขียวอยู่

ไวรัสชนิดที่ทำให้เกิดอาการเส้นใบเหลืองและเส้นใบซีดจาง เช่น lettuce
big vein disease และ *Turnip mosaic virus*

อาการจุดวงแหวน

เกิดจากการที่ส่วนที่เป็นโรคถูกจำกัดพื้นที่ทำให้มีลักษณะแผลเป็นวงกลม

เซลล์ที่ได้รับไวรัสจะมีสีซีดจางหรือเซลล์ตาย (ภาพที่ 15)

อาการจุดวงแหวนอาจเกิดขึ้นบนลำต้น

หรือบนผลแม้ว่าจะพบเชื้อไวรัสทั่วไปบนใบพืช เช่น *Tomato spotted wilt
virus* (TSWV) และโรคจุดวงแหวนของมะละกอ (*Papaya ringspot virus* /
PRSV).

อาการแผลที่มีเซลล์ตาย (*cell necrosis*)

รอบจุดที่ถูกทำลายหรือแสดงอาการแบบ systemic ในส่วนอื่นของต้นพืช
เช่น อาการบนผลและเมล็ด หรือบนใบ โรคที่เกิดจากไวรัสกลุ่มนี้ เช่น

Turnip mosaic virus

ทำให้เกิดอาการเซลล์ตายในเนื้อใบของพืชตระกูลกะหล่ำ

อาการแคระแกรนและพืชเจริญเติบโตผิดปกติ

จะพบเสมอเมื่อมีไวรัสเข้าทำลาย โดยทั่วไปจะเกิดร่วมกับอาการอื่น ๆ พืชหยุดการเติบโตได้ทุกส่วนของพืชหรือเฉพาะส่วนใดส่วนหนึ่ง เช่น บริเวณส่วนยอดที่กำลังเจริญเติบโต จะสังเกตลักษณะอาการเช่นนี้ได้ยาก นอกเสียจากต้นพืชที่ได้รับไวรัสจะอยู่ติดกับต้นปกติ

โรค *Bean common mosaic virus* และ *Strawberry latent ringspot virus* เป็นเพียง 2 โรค ที่ทำให้พืชแสดงอาการเจริญเติบโตผิดปกติเมื่อได้รับไวรัส อาการที่พบคือส่วนของใบและลำต้นบิดเบี้ยว

การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดจากฮอร์โมนในใบไม่สมดุล

อาการผิดปกติอื่น ๆ เช่น การสร้างเซลล์มากกว่าปกติของต้นโกโก้ ทำให้เกิดอาการยอดบวม มีสาเหตุจากไวรัส *Cacao swollen shoot virus*

อาการผิดปกติที่พืชเพิ่มปริมาณเซลล์มากกว่าปกติเรียกว่า hyperplasia

การเพิ่มขนาดของเซลล์ใหญ่กว่าปกติเรียกว่า hypoplasia

ตัวอย่างของอาการผิดปกติเนื่องจากการเพิ่มขนาดของเซลล์ เช่น stem pitting ของต้นส้ม ที่เกิดจากเชื้อ *Citrus tristeza virus*



ภาพที่ 15 อาการที่เกิดจากไวรัส อาการใบจุด อาการจุดวงแหวน และอาการใบด่าง

ไวรัสบางชนิดทำให้เกิดอาการบวมหรือเจริญมากกว่าปกติบนใบหรือราก เช่น enations และ tumours การที่ใบเติบโตมากกว่าปกติเรียกว่า enations มีลักษณะเป็นติ่ง พบได้ทั้งบนใบและใต้ใบ ลักษณะ enations ที่พบบนถั่วลันเตา เกิดจากไวรัส *Pea enation mosaic virus* (PEMV) สำหรับอาการบวมของใบและลำต้นเกิดจากการชักนำของไวรัสที่ทำให้ฮอร์โมนไม่สมดุล

อาการกลีบดอกต่างของทิวลิป (Color break)

มีการวินิจฉัยว่าเกิดจากไวรัส ตั้งแต่ศตวรรษที่ 17 โรคนี้เกิดจากไวรัส *Turnip mosaic virus* ทำให้สีดอกของทิวลิปไม่สม่ำเสมอ

ในประเทศเนเธอร์แลนด์หัวพันธุ์ที่ได้รับไวรัสจะมีราคาสูงมาก

ปัจจุบันยังพบโรคนี้อยู่เสมอ ไวรัสที่ทำให้เกิดดอกต่างในพืชอื่น ๆ เช่น

Turnip mosaic virus และ *Bean yellow mosaic virus*

การทำลายของไวรัสที่ทำให้พืชติดผลลดลง

ขนาดของผลเล็กลงหรือบิดเบี้ยวผิดปกติ เช่น ไวรัส *Lettuce mosaic virus*

ทำให้ผลแตกรูปรางผิดปกติ หรือ ไวรัส *Lettuce mosaic virus*

ทำให้ผลผลิตผักกาดลดลง นอกจากนี้ยังทำให้เกษตรกรผู้เป็นหมันด้วย

ได้กล่าวถึงการสลายของคลอโรพลาสและการผิดปกติของเซลล์ไว้แล้วในตอนต้น อย่างไรก็ตามยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงใน cytology และ histology ของเซลล์พืช เช่น ไวรัสชักนำการสร้าง inclusion bodies ในเซลล์พืช จะพบไวรัสหลายชนิดอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์พืช

ไวรัสเหล่านี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของคลอโรพลาสโดยจะทำลายสารเคมีในพืช เช่น ทำให้สี และรูปร่างของพืชเปลี่ยนไป ตัวอย่างการเปลี่ยนแปลงใน histology เช่น การเพิ่มหรือลดจำนวนเซลล์พืช การตายของเซลล์ภายในเนื้อเยื่อ การสร้างสารลิกนินในส่วนของท่าน้ำ และการตายของเซลล์ท่ออาหาร

ไวรัสอาจเพิ่มปริมาณและสะสมอยู่ในเซลล์พืชเป็นจำนวนมาก

เพื่อสร้างส่วนที่เรียกว่า inclusion bodies

ซึ่งประกอบขึ้นจากอนุภาคของไวรัสเกือบทั้งหมด inclusion bodies

อาจถูกสร้างอยู่ในนิวเคลียสแต่ส่วนใหญ่พบทั่วไปใน cytoplasm ของพืช

การเรียงตัวของอนุภาคของไวรัสอาจเรียงตัวแบบสุ่ม

เรียงตัวไปตามด้านข้าง

เรียงตัวต่อปลายกันและกัน

หรืออาจเรียงตัวในรูปสามมิติก็ได้

การที่พืชไม่ได้แสดงอาการของโรคให้ปรากฏก็ไม่ได้หมายความว่าพืชนั้นจะปราศจากไวรัส

ไวรัสหลายชนิดสามารถเข้าสู่พืชอาศัยและเพิ่มปริมาณภายในเซลล์ของพืช

อาศัยได้โดยไม่แสดงอาการ ซึ่งเป็นระยะแฝงตัว (latent infection)

จะพบเสมอเมื่อไวรัสเข้าอาศัยในพืชป่าหรือวัชพืช

ไวรัสสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในพืชอาศัยอื่น (alternate hosts) และเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจได้ในภายหลังด้วยการติดไปกับน้ำคั้นพืชซึ่งมีแมลงเป็นพาหะ

การพัฒนาของอาการที่เกิดจากไวรัสจะแตกต่างกันขึ้นกับ strain และระดับความรุนแรงของยีนของไวรัส พืชอาศัยอาจเป็นพืชพันธุ์ต้านทาน ทนทาน หรืออ่อนแอ ต่อการเข้าทำลายของไวรัส อายุของพืชและช่วงเวลาของการเข้าทำลายมีบทบาทสูงต่อการแสดงออกของอาการ โดยทั่วไปพืชอายุน้อยมักอ่อนแอต่อการเข้าทำลายกว่าพืชอายุมาก การเข้าทำลายพืชตั้งแต่พืชยังเล็ก ๆ มีแนวโน้มว่าผลผลิตพืชจะเสียหายมากกว่าการเข้าทำลายในช่วงหลังของฤดูปลูกพืช

อาการของโรคพัฒนาได้ช้าเมื่อมีอุณหภูมิสูงเนื่องจากไวรัสเพิ่มปริมาณช้า อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่สูงอาจทำให้พืชลดความต้านทานลงได้ ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิลดลงการเข้าทำลายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว พืชที่เติบโตภายใต้สภาพที่มีความเข้มของแสงสูงจะอ่อนแอต่อการทำลายของไวรัสน้อยกว่าพืชที่เติบโตภายใต้สภาพมีแสงน้อย เช่นเดียวกับพืชที่ได้รับสารอาหารจากดินที่อุดมสมบูรณ์มักอ่อนแอต่อโรคมกกว่า เช่น พืชที่ได้รับไนโตรเจนสูงจะอ่อนแอมากกว่า

ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากไวรัสจะคล้ายกับอาการขาดธาตุอาหารของพืช หรือคล้ายกับอาการพืชที่ได้รับพิษของสารเคมี เช่น การทำลายของสารกำจัดวัชพืช มีวิธีสังเกตความแตกต่างของอาการที่เกิดจากไวรัส กับอาการที่เกิดจากการขาดธาตุอาหารหรือพิษจากสารเคมี 2 วิธี คือ

- สังเกตรูปแบบของต้นพืชที่แสดงอาการ โดยทั่วไปถ้าพืชขาดธาตุอาหารจะมีรูปแบบการแสดงความผิดปกติสัมพันธ์กับชนิดของดิน หรืออาการที่เกิดจากพิษสารเคมี รูปแบบจะสอดคล้องกับลักษณะการพ่นสารเคมี ส่วนอาการที่เกิดจากไวรัสมีรูปแบบการเกิดโรคแบบสุ่ม เพราะมีแมลงเป็นพาหะ
- การทาบกิ่งกับพืชปกติ หรือการปลูกเชื้อโดยใช้ น้ำคั้นจากพืชที่แสดงอาการ

ซึ่งเป็นวิธีการเบื้องต้นของการวินิจฉัยโรคตามวิธีของ Koch's postulates นั้นเอง

7.5 ไล่เดือนฝอย (Nematodes)

การจำแนกไล่เดือนฝอยทำได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา กับลักษณะตัวอย่างไล่เดือนฝอยที่ได้

รับการตีพิมพ์ไว้ในเอกสารโดยอาศัยคู่มือในการจำแนกประกอบ

วิธีการนี้จะต้องเตรียมตัวอย่างและทำสไลด์ถาวรที่สามารถมองเห็นลักษณะของไล่เดือนฝอยทุกส่วนอย่างชัดเจน

ต้องวัดขนาดของตัวไล่เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีประสิทธิภาพสูง

ต้องใช้ไล่เดือนฝอยทั้งเพศผู้และเพศเมียอย่างน้อย 5 – 10 ตัว

เพราะบางลักษณะมีความผันแปร

ดังนั้นการนับจำนวนไล่เดือนฝอยที่แสดงลักษณะต่าง ๆ

จึงมีความจำเป็นต่อการจำแนกไล่เดือนฝอย

การจำแนกไล่เดือนฝอยศัตรูพืชในระดับ genus

อาจใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไล่เดือนฝอย ชนิดของพืชอาศัย

และไล่เดือนฝอยที่อยู่บริเวณเดียวกันก็จะเป็นข้อมูลที่เพียงพอต่อการจำแนก

genus ของไล่เดือนฝอย

และในบางกรณีข้อมูลเหล่านี้สามารถใช้จำแนกตัวอย่างไล่เดือนฝอยได้ถึง

ระดับ species

อย่างไรก็ตามไล่เดือนฝอยบาง species จำแนกได้ยาก

แม้กระทั่งนักวิจัยไล่เดือนฝอยที่มี

ประสบการณ์สูงก็ไม่สามารถจำแนกได้

ดังนั้นในปัจจุบันมีการจำแนกชนิดและวินิจฉัยไล่เดือนฝอยที่มุ่งเน้นถึงระดับ

โมเลกุลและใช้เทคนิคทางชีวเคมีจึงมีมากขึ้น การจำแนกไล่เดือนฝอยบาง

genera

ต้องใช้ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอในการจำแนกเพื่อประกอบคำอธิบายใน

การตั้งชื่อไล่เดือนฝอยชนิดใหม่

นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคทางเคมีเพื่อการจำแนกไล่เดือนฝอยกลุ่มที่มี

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่แน่นอน

7.5.1 เหตุผลของการการจำแนกไส้เดือนฝอย (Need for identification)

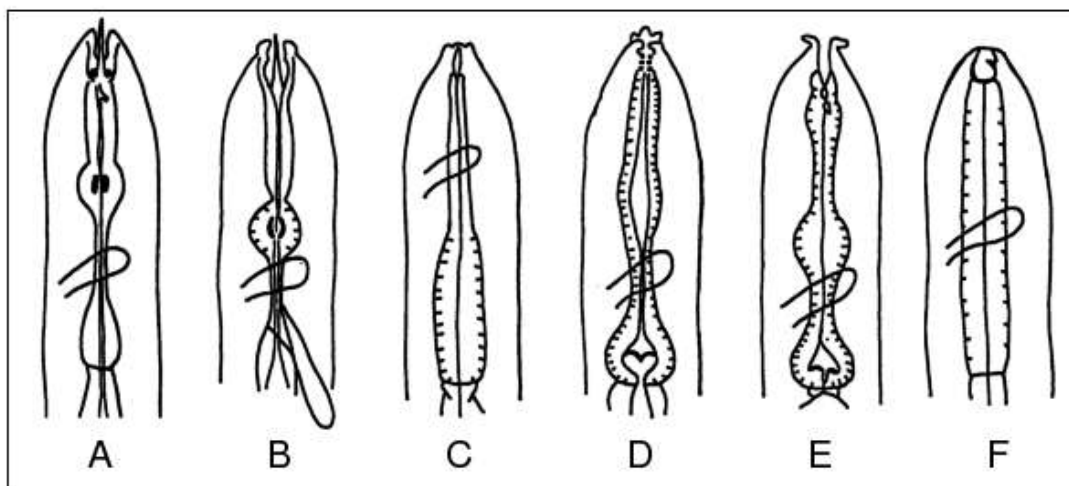
การจำแนกไส้เดือนฝอยขึ้นกับวัตถุประสงค์
ตัวอย่างไส้เดือนฝอยที่เก็บรักษาไว้ในศูนย์รวบรวมตัวอย่างทั้งในและต่างประเทศต้องได้รับการตรวจสอบจากนักอนุกรมวิธานไส้เดือนฝอยที่ชำนาญ

ถ้าวัตถุประสงค์ของการการจำแนกไส้เดือนฝอยที่ได้จากการสำรวจ
นักวิจัยไส้เดือนฝอยอาจไม่สามารถจำแนกชนิดได้ทั้งหมด
นักอนุกรมวิธานจะเลือกศึกษาเฉพาะไส้เดือนฝอยชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีข้อมูลมาก่อน
ในกรณีที่พบไส้เดือนฝอยชนิดใหม่ต้องเก็บตัวอย่างไว้ที่ศูนย์รวบรวมตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบย้อนกลับได้อีกหากจำเป็น
ในกรณีที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ด่านกักกันศัตรูพืช
ควรมีการตรวจสอบและยืนยันอีกครั้งก่อนมีการเผยแพร่เอกสารออกไป

ถ้าวัตถุประสงค์เพื่อการจัดการหรือการศึกษานิเวศ
ควรพิจารณาศึกษาสัตว์ตัวเล็ก
ๆ และพืชอาศัยที่อยู่ในบริเวณเดียวกันเป็นส่วนประกอบในการจำแนกชนิด
อย่างไรก็ตามต้องได้รับการยืนยันจากนักอนุกรมวิธานว่าตัวที่กำลังศึกษาอยู่เป็นชนิดใด

7.5.2 ความแตกต่างของไส้เดือนฝอยศัตรูพืช (Distinguishing plant parasitic nematodes)

วัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการผลิตพืชและการควบคุมศัตรูพืชจะต้องจำแนกชนิดว่าเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชหรือไม่
ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชจะมีโครงสร้างที่ใช้ดูดกินน้ำเลี้ยงพืช (Stylets)
ในช่องปาก การตรวจสอบและจัดกลุ่มตัวอย่างไส้เดือนฝอย
โดยใช้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสงส่องทั้งด้านบนและด้านล่าง ภาพที่
16 จะเห็นความแตกต่างของ stylets ของไส้เดือนฝอย



ภาพที่ 16 การจัดกลุ่มไส้เดือนฝอยโดยการเปรียบเทียบ stylets

A B C - tylenchid, aphelenchid, dorylaimid – styletbearing nematodes
 อาศัยดูดน้ำเลี้ยงบนพืช ราและสาหร่าย บางชนิดเป็นศัตรูตัวห้ำ
 D, E - rhabditid, cephalobid อาศัยดูดกินแบคทีเรีย F – mononchid –
 ศัตรูตัวห้ำ

ไส้เดือนฝอยบางชนิดมี stylets สำหรับดูดกินน้ำเลี้ยงพืช บางชนิดมี stylets
 สำหรับดูดกินรา สาหร่าย และไลเคน บางชนิดอาศัยดูดกินสัตว์ตัวเล็ก ๆ
 ในดิน

ดังนั้นควรพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพื
 ชอาศัยเพื่อการจัดกลุ่มไส้เดือนฝอยศัตรูพืช

7.5.3 การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอย (Species identification)

การจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

วิธีการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยโดยอาศัยรูปร่าง

จำนวนของอวัยวะสืบพันธุ์ ขนาด และสัดส่วน
 เอกสารคู่มือการจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยจะอธิบายถึงโครงสร้างต่าง ๆ
 ที่ใช้ในการจำแนกชนิดถึงระดับ genera และ species
 นอกจากนี้ยังมีคู่มือการจัดจำแนกชนิดที่สามารถหาอ่านได้จากเว็บไซต์ทางร
 ะบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ต เช่น www.lucidcentral.org และ Nematodes of Australia (see www.ento.csiro.au)

การจำแนกด้วยเทคนิคโมเลกุลและชีวเคมี

ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการจำแนกไส้เดือนฝอย เช่น การใช้ลำดับเบสดีเอ็นเอตัวตรวจ หรือลำดับดีเอ็นเอจำเพาะมาใช้ในการแก้ปัญหาการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยและวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอยได้ บางเทคนิคใช้การสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอยเพียงตัวเดียว บางเทคนิคใช้ไส้เดือนฝอยหลายตัวจากกลุ่มไส้เดือนฝอยที่แยกจากดิน ปัญหาสำคัญอยู่ที่การจำแนกชนิดนี้จำกัดขอบเขตอยู่เฉพาะไส้เดือนฝอยไม่กี่ชนิด อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้มีแนวโน้มว่าจะมีการพัฒนามากขึ้น

การพัฒนาวิธีการทางเคมีอื่นๆในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยเช่นการวิเคราะห์ Isozyme การวิเคราะห์โปรตีน เซรัมวิทยา แต่วิธีเหล่านี้ไม่ได้รับความนิยมมากนัก อย่างไรก็ตามการใช้ isozyme เพื่อการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมชนิดต่าง ๆ เป็นวิธีที่สะดวกกว่าการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยโดยการใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจและสารเคมี เป็นวิธีการที่ต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพงเหมาะสำหรับการทำงานที่เป็นลักษณะงานประจำที่ไม่ต้องใช้ผู้ชำนาญการในการจำแนกมากนัก อย่างไรก็ตามการพัฒนางานด้านนี้จะช่วยให้การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยมีความแม่นยำและก้าวหน้าขึ้น

7.6 การตรวจสอบตัวอย่างโรคพืช (Diagnostic techniques)

7.6.1 การใช้กล้องจุลทรรศน์สแกนนิ่งอิเล็กตรอน (Scanning electron microscope)

กล้องจุลทรรศน์สแกนนิ่งอิเล็กตรอน แตกต่างจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงส่องผ่านคือ ใช้รังสีอิเล็กตรอนทำให้เกิดภาพของตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ กล้องจุลทรรศน์สแกนนิ่งอิเล็กตรอน ให้ภาพปรากฏคมชัดมากกว่า เพราะคลื่นแสงอิเล็กตรอนเล็กกว่าคลื่นแสงธรรมดาถึงหนึ่งแสนเท่า

ความคมชัดของการใช้คลื่นแสงธรรมดามีประมาณ 0.2 ไมโครเมตร หรือ 200 นาโนเมตร ในขณะที่ความคมชัดของคลื่นแสงอิเล็กตรอนมีได้ 3-6

นาโนเมตร ซึ่งดีกว่าการใช้แสงธรรมดา 100 เท่า
กล้องจุลทรรศน์สแกนนิ่งอิเล็กตรอนจะได้ภาพที่แสดงรายละเอียดของผิวหน้า
ตัวอย่างได้ดีกว่า และมีความชัดลึกมากกว่า
ในการมองแต่ละครั้งจะเห็นรายละเอียดได้มากกว่า

กล้องจุลทรรศน์สแกนนิ่งอิเล็กตรอน
ใช้ลำแสงอิเล็กตรอนที่ฉายลงบนผิวหน้าของตัวอย่าง
ทำให้เกิดเป็นภาพสามมิติ ลำแสงอิเล็กตรอนนี้เล็กมาก
และถูกสะท้อนกลับด้วยโมเลกุลของก๊าซในอากาศ
ดังนั้นเมื่อต้องการให้แสงอิเล็กตรอนส่องลงถึงตัวอย่าง
ช่องทางที่ให้แสงผ่านถึงตัวอย่างต้องเป็นสุญญากาศ

การเตรียมตัวอย่างในสภาพสุญญากาศเพื่อให้โครงสร้างที่ต้องการตรวจสอบ
อยู่ในลักษณะที่สมบูรณ์ จะต้องเตรียมตัวอย่างอย่างระมัดระวัง
ตัวอย่างต้องแห้งสนิท
โดยการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวในเครื่องมือที่เรียกว่า
เครื่องเป่าแห้งที่จุดวิกฤติ (critical point dryer)
เตรียมตัวอย่างโดยการวางตัวอย่างบนแผ่นโลหะเล็กที่มีเทปกาวสองหน้าชนิด
พิเศษติดไว้ เคลือบผิวตัวอย่างบาง ๆ ด้วยผงโลหะ เช่น ทอง
เพื่อเป็นตัวนำลำแสงอิเล็กตรอน ผิวหน้าของสปอร์ที่มีความหนา เช่น
สปอร์ของราสนิมและราเขม่าดำ อาจไม่จำเป็นต้องแห้งถึงจุดวิกฤติ
จึงสามารถวางตัวอย่างของสปอร์ราสนิมและราเขม่าดำลงบนแผ่นโลหะและ
เคลือบด้วยผงทองได้โดยตรง

7.6.2 การใช้เทคนิคชีวเคมีและชีวโมเลกุล (Biochemical and molecular techniques)

การที่เราไม่เห็นอาการของโรคก็ไม่ได้หมายความว่าพืชนั้นจะไม่มีเชื้อสาเหตุ
ดังนั้นนักโรคพืชจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลในการตร
วสอบเชื้อสาเหตุโรคพืชบางชนิด ดัชนีชี้วัด (Indexing)
เป็นการทดสอบจุลินทรีย์โรคพืชที่ทราบชนิด เช่น ไวรัสสาเหตุโรคพืช
ดัชนีชี้วัดทำให้การควบคุมโรคเป็นไปได้อย่างรวดเร็วและลดการระบาดของ
โรค
ดัชนีชี้วัดนี้ยังมีความสำคัญอย่างยิ่งในด้านการกักกันพืชในกรณีที่จะป้องกัน

ไม่ให้เชื้อโรคต่างถิ่นเข้าสู่ประเทศ
และการออกใบรับรองปลอดศัตรูพืชของพืชและส่วนขยายพันธุ์พืช

7.6.3 วิธีการเซรุ่มวิทยา (Serology/Immunology)

เซรุ่มวิทยาเป็นหลักการใช้ antibodies ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับ antigen ของเชื้อโรคที่ต้องการตรวจสอบ antibodies เหล่านี้อาจเป็นชนิด polyclonal ซึ่งได้จากการนำสารสกัดของเชื้อสาเหตุโรคพืชชนิดเข้าไปในสัตว์เพื่อให้สัตว์สร้าง antibodies แล้วนำเลือดสัตว์มาสกัดเอา antibodies ที่อยู่ในเลือดมาใช้ antibodies มีหลายชนิด antibodies ที่เป็นชนิด monoclonal จะได้จากเซลล์บริเวณม้าม (spleen) ของสัตว์ที่ได้รับสารสกัดจากเชื้อสาเหตุโรคพืช

วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยาก็มีวิธีหนึ่งที่ยอดนิยมมาก คือ วิธีที่ใช้เอนไซม์ร่วมกับสารภูมิคุ้มกัน (ELISA enzyme linked immunosorbent assay) โดยใส่ antibodies ลงในจานแก้วที่มีหลุมเล็ก ๆ antibodies จะเคลือบหลุมบนจานแก้ว เติสารสกัดที่ต้องการตรวจสอบลงไป ในหลุม ถ้าสารสกัดที่ต้องการตรวจสอบมี antigen อยู่ก็จะติดอยู่กับ antibody ที่เคลือบบนผิวจาน ล้างหลุมด้วยน้ำสะอาด เติเอนไซม์ที่ใช้เกาะติดกับ antibody ล้างหลุมด้วยน้ำสะอาดอีกครั้งหนึ่ง เติสารละลายที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ลงไป ในหลุม ถ้ามี antigen ส่วนเอนไซม์ที่ใช้เกาะอยู่กับ antibody จะเกิดปฏิกิริยา เป็นผลให้สารละลายที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์จะเรืองแสง แสดงว่ามี antigen อยู่

7.6.4 วิธีการตรวจสอบลำดับกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid based methods)

สิ่งมีชีวิตที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (eukaryotes) หลายชนิดมียีนที่ใช้ร่วมกัน แต่ยีนที่ควบคุมลักษณะเฉพาะบางยีนมีลำดับแตกต่างกันออกไป ความแตกต่างดังกล่าวนี้อาจนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ โดยเทคนิคต่าง ๆ เช่น การตรวจกรดนิวคลีอิก (nucleic acid hybridization) หรือการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิก (polymerase chain reaction/PCR)

ในปัจจุบันเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดนิวคลีอิกมีความแม่นยำเมื่อใช้ภายใต้เงื่อนไขที่กำหนดสามารถตรวจหากรดนิวคลีอิกแม้ว่าจะมีความเข้มข้นเป็นพิโคกรัม

ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยเทคนิค PCR ใช้หลักการให้ความร้อนแก่ DNA (denaturisation) ใช้เอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนต่อความร้อนในการต่อลำดับ dNTP เข้ากับ DNA primers (annealing) ในสารละลาย buffer ที่เหมาะสมที่อุณหภูมิมากกว่า 90 องศาเซลเซียส ในขณะที่ DNA คลายตัว เมื่ออุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 50 – 60 องศาเซลเซียส สำหรับให้ DNA primers เข้าไปสัมผัสกับสาย DNA ที่คลายตัวนั้น จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการต่อสาย DNA ด้วย dNTP ทำย DNA primers (extension) ให้เกิดคู่สมกับสาย DNA ต้นแบบ เมื่อจบขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA ทั้ง 3 ขั้นตอนทุก ๆ รอบ จะได้ปริมาณ DNA มากขึ้นเป็น 2 เท่าจากปริมาณเดิม เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ รอบที่ 30 จะได้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นมากพอและสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เมื่อย้อมดีเอ็นเอด้วยสีย้อม ethidium bromide และผ่านดีเอ็นเอไปในแผ่นวุ้น agarose

วิธีการตรวจสอบลำดับกรดนิวคลีอิกนี้มีข้อดีคือ ทำได้รวดเร็วและมีความแม่นยำในการตรวจสอบมากกว่าการใช้เทคนิคทางเซรุ่มวิทยา แต่ข้อเสียของวิธีการนี้คือต้องใช้อุปกรณ์ สารเคมี ตลอดจนห้องปฏิบัติการที่มีราคาแพง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทางเซรุ่มวิทยา นอกจากนี้ถ้าตัวอย่างมีการปนเปื้อน ประสิทธิภาพของความแม่นยำของวิธีการก็จะทำให้เกิดปัญหาความผิดพลาดของการตรวจสอบได้

บทที่ 8

การรักษาฐานข้อมูลตัวอย่าง (How to maintain specimen records)

8.1 ระบบฐานข้อมูล (Databases)

การบันทึกข้อมูลของโรคพืชเข้าสู่ระบบฐานข้อมูลมีความสำคัญมาก เพราะจะทำให้เจ้าหน้าที่ที่ปฏิบัติงานในศูนย์รวบรวมตัวอย่างโรคพืชสามารถประมวลผลข้อมูลตัวอย่างได้ โดยไม่จำเป็นต้องใช้แรงงานในการค้นหา ข้อมูลจะถูกจัดลำดับไว้อย่างเป็นระเบียบเรียบร้อย ซึ่งง่ายต่อการค้นหา นำออกมาใช้งาน นำมาวิเคราะห์และเพิ่มเติมข้อมูลให้ทันสมัยตามที่ต้องการ

ข้อมูลที่เก็บรวบรวมไว้ในระบบฐานข้อมูล สามารถนำออกมาทำแผนที่การแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุโรคพืช และข้อมูลมีความสำคัญต่องานกักกันศัตรูพืชและการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ฐานข้อมูลที่ใช้อาจเรียบง่ายเช่นเดียวกับงานที่ทำบนโปรแกรมการสร้างตาราง เช่น โปรแกรม Microsoft Excel หรือข้อมูลอาจเกี่ยวข้องกับโปรแกรมที่ซับซ้อนยิ่งขึ้น เช่น โปรแกรม Microsoft Access, Oracle, BioLink หรือ KE EMu โปรแกรมเหล่านี้ทำให้การจัดการ multimedia เช่น ภาพถ่ายดิจิทัล และเครื่องมือที่ช่วยในการทำรายงาน จะสามารถแลกเปลี่ยนและถ่ายข้อมูลไปมาได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

ระบบฐานข้อมูล เช่น KE EMu (ภาพที่ 17) เป็นโปรแกรมที่มีคุณค่า เพราะโปรแกรมจะอนุญาตสามารถการเปลี่ยนแปลงได้ โปรแกรมนี้มีประโยชน์มากเมื่อสามารถเปลี่ยนแปลงข้อมูล เช่น เชื้อสาเหตุ และชื่อของพืชอาศัย

ระบบฐานข้อมูล ไม่เพียงแต่จะเก็บภาพถ่ายดิจิทัลได้ด้วยเท่านั้น แต่ยังมี multimedia ให้เลือกใช้อีกหลายแบบ เช่น text file, การพิมพ์ข้อความ (Word.doc) PDFs, html, ภาพวิดีโอ เป็นต้น ข้อมูลที่มีรายละเอียดอื่น ๆ เช่น ผู้เก็บตัวอย่าง ผู้วินิจฉัย และเกษตรกร ผู้ปลูกพืช ตัวอย่างเช่น

สถานที่เก็บตัวอย่าง หมายเลขโทรศัพท์ หมายเลขแฟกซ์ e-mail, ประวัติส่วนตัว สิ่งอ้างอิง เป็นต้น ส่วนของ Task template ก็สามารถตั้งระบบเตือนเจ้าหน้าที่ในศูนย์รวบรวมตัวอย่าง เกี่ยวกับการขอยืมตัวอย่างที่เกินกำหนดเวลาขอยืม เวลาที่กำหนดการย้ายเชื้อ และกิจกรรมสำคัญ ๆ ที่ต้องปฏิบัติ เป็นต้น

ข้อมูลของตัวอย่างโรคพืชที่ถูกนำไปเก็บไว้ในระบบฐานข้อมูล ต้องมั่นใจว่าเป็นข้อมูลที่ถูกต้อง ปัจจุบันมีข้อมูลการจำแนกเชื้อสาเหตุในระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ตที่สามารถ ค้นหาได้ง่าย

เครือข่ายข้อมูลระดับภายในประเทศ

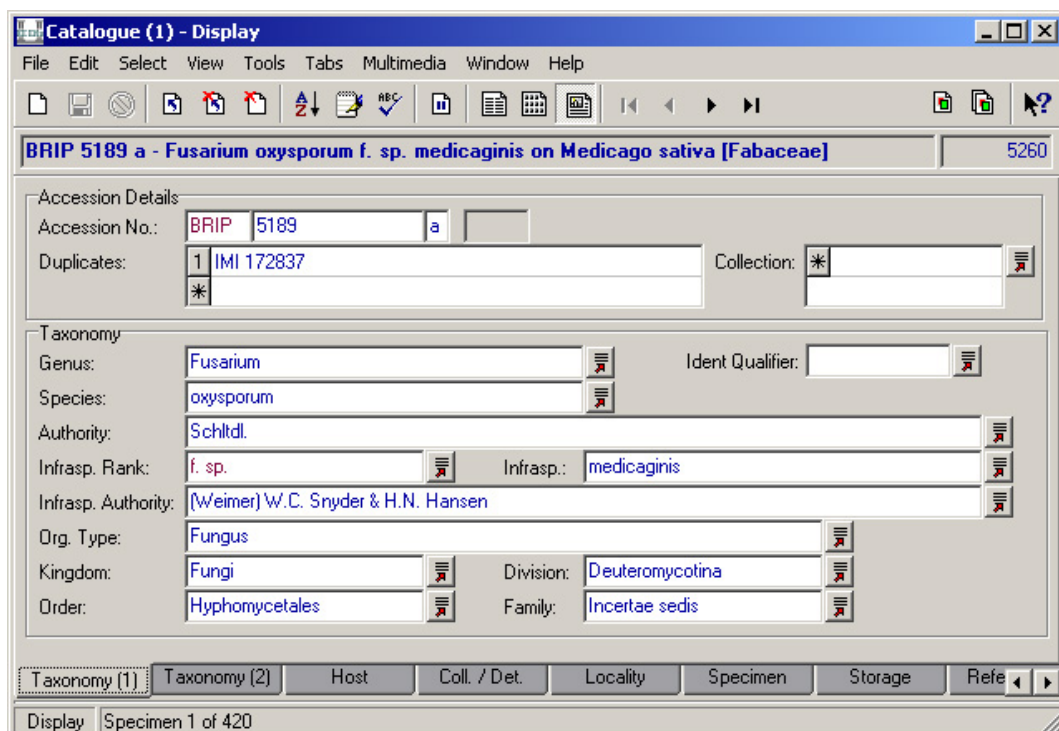
ฐานข้อมูลที่กระจายอยู่ในหน่วยงานสามารถนำมาเชื่อมต่อกันเข้ากับระบบเครือข่ายบนเว็บไซต์

ที่ถูกสร้างขึ้นสำหรับงานเก็บรักษาตัวอย่างโรคพืชเหมือน ๆ กัน ตัวอย่างเช่น The Australian Plant Pest Database (APPD, <http://appd.cmis.csiro.au/>)

มีกรอบสำหรับกรอกข้อมูลศัตรูพืชที่เหมือนกัน โปรแกรม APPD

มีข้อมูลของตัวอย่างกว่า 9 แห่งทั่วประเทศ

และสามารถส่งข้อมูลระหว่างกันได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ



ภาพที่ 17 ภาพแสดงลักษณะของระบบฐานข้อมูล KE Emu

www.indexfungorum.org - CABI Bioscience Database of Fungal Names



www.ipni.org - The International Plant Names Index

ภาพที่ 18 ภาพแสดงเว็บไซต์ของระบบฐานข้อมูล 2 ชนิด ในการจำแนก

สำหรับเครือข่ายข้อมูลระดับต่างประเทศ หน่วยงาน Global Biodiversity Information Facility (GBIF, <http://www.gbif.org/>) มีจุดมุ่งหมายเพื่อเป็นฐานข้อมูลเบื้องต้นในด้านความหลากหลายทางชีวภาพ ที่ผู้ต้องการข้อมูลทั่วโลกสามารถผ่านเข้าสู่ระบบและนำข้อมูลออกไปใช้ได้ อย่างอิสระ GBIF ใช้ postal ของตัวเองที่สามารถค้นหาข้อมูลด้านความหลากหลายทางชีวภาพได้ทั่วโลก และมีฐานข้อมูลในส่วนของการเชื่อมต่อโรคพืชรวมอยู่ด้วย

บทที่ 9

การดูแลรักษาศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช (Care of collections)

9.1 สิ่งอำนวยความสะดวกของศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างแห้งโรคพืช (Herbarium facilities)

สถานที่เก็บตัวอย่างโรคพืชควรเป็นสถานที่ที่ปลอดภัยและเป็นสถานที่ถาวรในการเก็บรักษาตัวอย่างต่าง ๆ ควรสามารถป้องกันแมลงป้องกันไฟและน้ำได้เป็นอย่างดี

โดยทั่วไปสถานที่ที่เหมาะสมต่อการเก็บตัวอย่างที่มีจำนวนปานกลางประมาณ 50,000 ตัวอย่างควรเป็นห้องเดียว มีพื้นที่ประมาณ 9 ตารางเมตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ตู้เก็บที่แน่นหนาและเลื่อนเข้าออกได้เพื่อการเก็บตัวอย่าง

ตู้เก็บและชั้นวางตัวอย่างที่ทำจากโลหะจะป้องกันแมลงได้ดีกว่าตู้ที่ทำจากไม้

ตัวอย่างโรคพืชควรเก็บรักษาในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 20 – 23 องศาเซลเซียส และความชื้น ระหว่าง 40 – 60 % ซึ่งสามารถป้องกันการทำลายของแมลงได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อปฏิบัติรวมกับการนำตัวอย่างแห้งที่ทำใหม่ไปแช่แข็ง ก่อนนำมาเก็บรวบรวมไว้ด้วยกัน

ห้องที่ใช้เก็บตัวอย่างควรมีเครื่องปรับอากาศเพื่อควบคุมอุณหภูมิ และมีเครื่องดูดความชื้นเพื่อลดความชื้นภายในห้อง ควรปิดประตูหน้าต่างเพื่อป้องกันไม่ให้แมลงเข้าไปภายในห้องได้ง่าย ปิดเทปกั้นความร้อนที่รอบขอบหน้าต่างเพื่อสะท้อนความร้อนออกไป

9.2 การควบคุมแมลงปีกแข็ง (Control of herbarium beetles)

สภาพภูมิอากาศในเขตร้อนซึ่งมีอุณหภูมิและความชื้นสูงเหมาะต่อการพัฒนาการและการเข้าทำลายของแมลงอย่างยิ่ง แมลงบางชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแมลงปีกแข็งกินใบไม้แห้งและสามารถทำลายตัวอย่างโรคพืชที่รวบรวมไว้ได้อย่างรวดเร็ว การแช่แข็งตัวอย่างแห้งที่อุณหภูมิ - 20

องค์ศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า อย่างน้อย 7 วัน
เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ที่สุดในการจัดการแมลงศัตรูตัวอย่างพืชอย่างมีศักยภาพ
ภาพ ดังนั้นก่อนนำตัวอย่างใหม่เข้าไปเก็บในห้องเก็บตัวอย่าง
ควรนำไปแช่แข็งอย่างน้อยหนึ่งสัปดาห์
ตัวอย่างแห้งที่รวบรวมอยู่ภายในห้องเก็บก็ควรนำไปแช่แข็งเป็นบางครั้งบาง
คราว

ควรห่อตัวอย่างแห้งด้วยถุงพลาสติกหรือวางในกล่องโฟมที่มีฝาปิดสนิท เพื่อป้องกันความชื้นควบแน่นเป็นหยดน้ำเกาะบนตัวอย่างแห้งขณะที่นำไปใส่ในตู้แช่แข็ง หลังจากแช่แข็งแล้วควรทำให้ตัวอย่างแห้งอุ่นขึ้นอย่างช้า ๆ ด้วยการวางไว้ในห้องปรับอากาศจนกว่าจะมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง ตัวอย่างโรคพืชสดมักถูกส่งไปยังศูนย์รวบรวมตัวอย่างเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรค ตัวอย่างเหล่านี้ไม่ควรนำมาเก็บไว้ใกล้ตัวอย่างแห้ง และควรทำการตรวจวินิจฉัยจากห้องเก็บตัวอย่างแห้ง ตัวอย่างโรคพืชที่ถูกนำออกจากห้องเก็บรักษาซึ่งควบคุมอุณหภูมิและความชื้นอยู่นั้น เพื่อการนำไปตรวจสอบหรือการให้ยืม ควรนำไปแช่แข็งอย่างน้อย 7 วันก่อนนำไปเก็บไว้ในที่เดิม

ศูนย์รวบรวมตัวอย่างหลายแห่งได้รับการรมด้วยสารเคมีจากผู้เชี่ยวชาญปีละครั้ง สารเคมีที่ผ่านการรับรองให้ใช้ได้ เช่น methyl bromide, carbon bisulphide, carbon tetrachloride, ethylene dichloride, hydrocyanic gas, lindane, dichlorvos strips หรือ paradichlorobenzene.

เมื่อทำการรรมด้วยสารเคมี ต้องกระทำด้วยความระมัดระวัง
เพราะสารเคมีเหล่านั้นเป็นพิษต่อมนุษย์ และสารเคมีบางชนิดติดไฟง่าย
อย่างไรก็ตามการรรมด้วยสารเคมีวิธีเดียวไม่สามารถป้องกันแมลงได้สมบูรณ์
เพราะมีไข่และตัวอ่อนของแมลงที่ทำลายไม่หมดหลงเหลืออยู่

9.3 การควบคุมไร้ศัตรูเชื้อจุลินทรีย์ (Control of culture mites)

ในการเก็บรักษาตัวอย่างรา ไรศัตรรานับว่าเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่ง
 ไรเหล่านี้เข้ามาในห้องเก็บรักษาตัวอย่าง
 และห้องปฏิบัติการโดยติดมากับใบพืชสด รองเท้าและเสื้อผ้า
 แมลงและตัวอย่างราที่นำมาจากห้องปฏิบัติการอื่น

ไรค์ตรูราชอบอากาศร้อนชื้น พวกมันไม่เพียงแต่กินรา
แต่ยังเป็นพาหะนำสปอร์ของราหรือแบคทีเรียไปบนลำตัว
และในกระเพาะอาหารไปบนเพื่อนตัวอย่างจุลินทรีย์อื่น ๆ

ถ้าไรที่ไม่ผ่านการตรวจพบมีโอกาสเข้ามาในห้องปฏิบัติการ
จะเป็นปัญหาสำคัญในช่วงเวลาไม่กี่วัน
ไรจะเคลื่อนที่จากจานเลี้ยงเชื้อหนึ่งไปยังจานเลี้ยงเชื้ออื่นในห้องบ่มเชื้อ
หรือบนโต๊ะปฏิบัติการอาศัยกินรา เราจะพบเห็นจุดสีขาวเล็ก ๆ
บนโคโลนีของรากับอาหาร ซึ่งเห็นได้ด้วยตาเปล่า
เรามักพบเห็นร่องรอยของไรจากการปนเปื้อนบนราหรือแบคทีเรียที่ทิ้งไว้บน
จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือร่องรอยบนหยดน้ำบนฝาจานเลี้ยงเชื้อ
เมื่อพบเห็นร่องรอยนี้บ่อยครั้ง
พบว่าได้เกิดการระบาดของไรอย่างมากมาแล้ว

วิธีการป้องกันด้วยหลักสุขอนามัยเป็นวิธีที่ดีกว่าการกำจัด
วิธีป้องกันที่ได้ผลมีดังนี้

- เมื่อนำตัวอย่างราเข้ามาในห้องปฏิบัติการต้องตรวจดูว่ามีไรติดมาด้วยหรือไม่ทุกครั้ง ถ้าต้องการเก็บรักษาราวไว้ให้ทำการย้ายเชื้อลงบนอาหารใหม่และนำจานเลี้ยงเชื้อที่มีไรไปอบฆ่าเชื้อทำลาย
- ห้องบ่มเชื้อตัวอย่างและห้องเก็บราที่แยกใหม่ต้องแยกเป็นคนละห้องกัน
- อบฆ่าเชื้อทำลายตัวอย่างเชื้อราเก่าและตัวอย่างพืชที่ไม่ต้องการให้เร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้
- ทำความสะอาดโต๊ะปฏิบัติการด้วย alcohol 70% ทุกวันและเช็ดภายในตู้บ่มเชื้อด้วยสารกำจัดไรทุกสัปดาห์
- ทำลายตัวอย่างราที่ปนเปื้อนและมีไรเข้าอาศัยนั้นด้วยหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อ ถ้าตัวอย่างราเป็นตัวอย่างที่มีค่าและหาได้ยากจำเป็นต้องเก็บไว้ให้นำไปใส่ในตู้แช่แข็งนาน 24 ชั่วโมงเพื่อทำลายไข่และตัวเต็มวัยของไรแล้วทำการแยกเชื้อไปไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่แล้วรีบทำลายจานเลี้ยงเชื้อเก่าโดยทันทีแต่รบบางชนิดอาจถูกทำลายเมื่ออยู่ในสภาพแช่แข็ง

9.4 การขอยืมตัวอย่างโรคพืช (Loans)

ตัวอย่างโรคพืชอาจถูกขอยืมเพื่อการค้นคว้าวิจัยในช่วงเวลาสั้น ๆ
ขั้นตอนในการระวังรักษาตัวอย่างโรคพืชต้องแน่ใจว่ามีความปลอดภัยต่อตัว
อย่างที่ถูกขอยืมไป

ขอแนะนำว่าการให้ยืมตัวอย่างไปยังศูนย์รวบรวมตัวอย่างแห่งโรคพืชอื่น
ต้องแน่ใจว่าระบบรักษาความปลอดภัยในระหว่างการเดินทางและการเก็บรักษา
ที่ดีเท่านั้น

การขอยืมตัวอย่างอาจถูกปฏิเสธ
ถ้าผู้ดูแลศูนย์รวบรวมตัวอย่างพิจารณาว่าคำร้องขอที่มีมานั้นไม่ถูกวัตถุประสงค์

หรือรบกวนโครงการที่กำลังดำเนินการอยู่

หรือผู้ดูแลมีความรู้สึกว่าคุณขอยืมใช้ตัวอย่างอย่างผิดวิธี

ตัวอย่างอาจถูกทำลายหรือเสียหายได้



ภาพที่ 19 ลักษณะการทำลายของโรบนฝาจานเลี้ยงเชื้อ

ตัวอย่างแห่งโรคพืชที่ถูกส่งไปต่างประเทศอาจถูกปฏิบัติในขั้นตอนการกักกั
นศัตรูพืชเมื่อถึงจุดหมายปลายทาง

การปฏิบัติเหล่านี้อาจรวมถึงการใช้ความร้อน การรมด้วยสารเคมี
และการฉายรังสีแกมมา

การปฏิบัติเช่นนี้อาจทำลายตัวอย่างแห่ง
หรือมีผลต่อดีเอ็นเอของเชื้อโรคพืช

เรื่องนี้เป็นความรับผิดชอบของผู้ดูแลศูนย์รวบรวมฯ

ที่ต้องมั่นใจว่าตัวอย่างที่ถูกขอยืมไปได้รับการดูแลเป็นอย่างดี

ถ้าหากมีความไม่แน่ใจเกี่ยวกับการปฏิบัติต่อตัวอย่าง

หรือวิธีการปฏิบัติมีผลทำลายตัวอย่าง ก็ไม่ควรให้มีการขอยืม

ช่วงเวลาของการให้ยืมตัวอย่าง ปกติจะอยู่ระหว่าง 6 - 12 เดือน แต่อาจขยายเวลาให้ยืมได้ถ้ามีการขอร้องมา ผู้ดูแลศูนย์รวบรวม ฯ ที่ให้ยืมตัวอย่างควรเสนอว่า ผู้ขอยืมต้องรีบนำมาคืนโดยเร็วที่สุด เมื่อการศึกษาวิจัยเสร็จสิ้นแล้ว การส่งคืนตัวอย่างเป็นบางส่วนก็อาจทำได้ แต่ต้องทำความเข้าใจกับผู้ดูแลศูนย์รวบรวม ฯ ให้ชัดเจนก่อน

ข้อกำหนดของการขอยืมตัวอย่างโรคพืชต้องระบุว่า ตัวอย่างที่ขอยืมไปจะต้องได้รับการดูแลให้ปลอดภัย ต้องไม่ฉนวนหรืออหิวาหรือพืชตัวอย่างในอันที่จะทำให้ตัวอย่างเสียหาย ตัวอย่างที่นำไปจะต้องอยู่ในห่อหรือซองที่ใช้เก็บรักษาตลอดเวลา ยกเว้นในขณะทำการตรวจสอบเท่านั้น เมื่อคืนตัวอย่างกลับมายังศูนย์รวบรวม ฯ ต้องคืนห่อหรือซองที่ใส่ตัวอย่างไปให้ครบถ้วน ตัวอย่างทั้งหมดจะต้องเก็บในหีบห่อที่บรรจุไว้และป้องกันการเสียหายระหว่างเดินทางและการพักระหว่างทางด้วย

การขอยืมตัวอย่างโรคพืชสำหรับ non destructive exam ของตัวอย่างโรคพืช และการตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อการศึกษารายละเอียดด้านสัณฐานวิทยาเพื่อการจำแนกชนิดในงานวิจัย เท่านั้น จะต้องไม่นำส่วนใดส่วนหนึ่งออกจากตัวอย่างที่ขอยืมไปเพื่อเก็บรักษาไว้เอง หรือส่งต่อไปให้บุคคลที่สามโดยไม่ได้รับการยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจาก ผู้ดูแลศูนย์รวบรวม ฯ เจ้าของตัวอย่างเป็นอันขาด การแบ่งตัวอย่าง หรือตัดบางส่วนออกจากตัวอย่างที่ขอยืมไป หรือการสกัดดีเอ็นเอออกจากตัวอย่าง เพื่อจุดประสงค์ของการวิจัยบางครั้งอาจอนุญาตให้ทำได้ แต่ต้องทำด้วยความระมัดระวัง และทำได้เมื่อส่วนของตัวอย่างที่สนใจมีปริมาณมากพอ และเหลือตัวอย่างเดิมไว้ในสภาพที่สมบูรณ์ ตัวอย่างที่ถูกตัดออกไปต้องเป็นส่วนที่ต้องการเท่านั้น ควรมีกระดาดบันทึกข้อมูลต่าง ๆ ที่สำคัญตลอดจนการจำแนกตัวอย่างและข้อมูลอนุกรมวิธานของเชื้อสาเหตุโรคพืช และกระดาดที่ใช้ต้องมีคุณภาพดี ข้อความต่อไปนี้ เป็นรายละเอียดของข้อมูลที่จำเป็นสำหรับการขอยืมตัวอย่างโรคพืช จัดทำสำเนาอีก 1 ชุด แนบไปกับตัวอย่างที่ให้ยืม และผู้ดูแลศูนย์รวบรวม ฯ เก็บไว้ 1 ชุด

1. หมายเลขตัวอย่างที่ให้ยืม (เพื่อใช้ในการสืบค้น)
2. ชื่อและรายละเอียดของนักวิจัยที่ขอยืมตัวอย่างที่สามารถติดต่อได้
3. จุดประสงค์ของการขอยืม (รายละเอียดโครงการและอนุกรมวิธาน)
4. วันที่ขอยืมและวันที่กำหนดส่งคืน
5. ตัวอย่างที่ขอยืม
(รายชื่อตัวอย่างโรคพืชแต่ละชนิดที่ขอยืมไปทั้งหมด)
การขอยืมตัวอย่างต้องได้รับการยินยอมจากผู้ดูแลศูนย์รวบรวมฯ
รายการบันทึกต่าง ๆ ต้องมีลายเซ็น
และวันที่ของผู้ดูแลก่อนส่งตัวอย่างโรคพืชออกไป

9.4 การรักษาความปลอดภัย (Security)

วิธีการรักษาความปลอดภัยต่อศูนย์รวบรวมตัวอย่างแห่งโรคพืช มี 2 วิธีคือ
วิธีแรกเป็นความมั่นใจจากระบบการระวังทางภายนอก และวิธีที่ 2
คือความปลอดภัยด้านจริยธรรมและความคุ้มครองทางกฎหมาย

การรักษาความปลอดภัยภายนอก (Physical security)

เพื่อเป็นการรักษาความปลอดภัยของศูนย์รวบรวมตัวอย่างแห่งโรคพืช
มีข้อแนะนำว่า ไม่ควรเปิดเป็นสถานที่สาธารณะ ศูนย์รวบรวมฯ
ควรตั้งอยู่ในอาคารที่ป้องกันสภาพการแปรปรวนของอากาศได้เป็นอย่างดี
มีรั้วรอบขอบชิด และมียามรักษาการณ์ในยามวิกาล

ตัวอย่างโรคพืชควรเก็บไว้ในชั้นเก็บที่ทำด้วยเหล็กอย่างดี
หรือตู้เหล็กปิดมิดชิด
ควรติดตั้งอุปกรณ์เตือนภัยและอุปกรณ์ดับเพลิงอัตโนมัติ
ซึ่งควรเป็นระบบที่ใช้แก๊ส เพราะน้ำจะเปียกตัวอย่างทำให้ตัวอย่างเสียหาย
ควรมีอุปกรณ์ดับเพลิงทั่วไปติดไว้ตามจุดต่าง ๆ นอกอาคาร
และฝึกหัดเจ้าหน้าที่ที่ปฏิบัติการ
ให้รู้จักวิธีใช้อุปกรณ์ดับเพลิงดังกล่าวเป็นอย่างดี

ความปลอดภัยของข้อมูลก็มีความสำคัญเช่นกัน
ข้อมูลควรเก็บไว้ในโปรแกรมอิเล็กทรอนิกส์ เช่น โปรแกรม spreadsheet

และฐานข้อมูล ควรมีการเก็บสำรองข้อมูลทุก ๆ วัน โปรแกรมฐานข้อมูล เช่น KE EMu จะช่วยให้เจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงาน และผู้ใช้ข้อมูลสามารถตรวจสอบแก้ไขข้อมูลได้สะดวกยิ่งขึ้น

ความปลอดภัยด้านจริยธรรมและความคุ้มครองทางกฎหมาย (Ethical and legal responsibility)

สถาบันทุกแห่งที่เป็นแหล่งรวบรวมและเก็บรักษาตัวอย่างที่มีค่าทางวิทยาศาสตร์ ต้องมั่นใจว่าได้รับความคุ้มครองทางจริยธรรมและทางกฎหมาย ดังนั้นจึงจำเป็นที่สถาบันต้องลดระดับเทคนิคที่ทำให้เกิดความเสียหาย สิ่งแวดล้อมที่ไม่ดี และการดูแลที่ต่ำเพื่อให้ตัวอย่างที่มีคุณค่าเหล่านั้นได้รับการปกป้องรักษาทั้ง ปัจจุบันและอนาคต

สถาบันที่ทำหน้าที่ดูแลศูนย์รวบรวมตัวอย่างทุกประเภท ควรมีการตั้งกฎระเบียบและขั้นตอนการทำงานที่เป็นลายลักษณ์อักษร ในการจัดการดูแลและการใช้ประโยชน์ จำเป็นที่สถาบันต้องได้รับบุคลากรที่มีคุณสมบัติตรงตามลักษณะงาน ได้รับเงินทุนสนับสนุน พื้นที่ทำงานและอุปกรณ์ที่เหมาะสมที่จำเป็นสำหรับงานอนุรักษ์ระยะยาว บางรัฐบาลได้เห็นคุณค่าของการรวบรวมตัวอย่างโรคพืช และได้ออกกฎหมายเพื่อป้องกันความเสียหายของศูนย์รวบรวมตัวอย่างของ กฎหมายเช่น Agricultural Scientific Collections Trust Act 1983 (NSW) เป็นต้น

บทที่ 10

บรรณานุกรม (Selected literature)

General

- Crop Protection Compendium*. 2004. CAB International, Wallingford, UK.
- Disease Compendium Series*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Greuter, W., McNeill, J., Barrie, F.R., Burdet, H.M., Demoulin, V., Filgueiras, T.S., Nicolson, D.H., Silva, P.C., Skog, J.E., Trehane, P., Turland, N.J. and Hawksworth, D.L. 2000. *International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code)*. *Regnum Vegetabile*, **138**. Koletz Scientific Books, Germany.
- Holiday, P. 2001. *A Dictionary of Plant Pathology*. 2nd Edition. Cambridge University Press, UK.
- Holmgren, P.K., Holmgren, N.H. and Barnett, L.C. (eds) 1990. *Index Herbariorum. Part 1: The Herbaria of the World*. 8th Edition. *Regnum Vegetabile*, **120**. New York Botanical Garden.
- Ploetz, R.C. 2003. *Diseases of Tropical Fruit Crops*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Walker, J. 1975. Mutual responsibilities of taxonomic mycology and plant pathology. *Annual Review of Phytopathology*, **13**: 335 – 355.
- Waller, J.M., Lenné, J.M. and Waller, S.J. (eds) 2002. *Plant Pathologist's Pocketbook*. 3rd Edition. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Waller, J.M., Ritchie, B.J. and Holderness, M. 1998. *Plant Clinic Handbook*. IMI Technical Handbook No. 3. CAB International, Wallingford, UK.

Bacteria

- Bradbury, J.F. and Sadler, G.S. 1997. *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. 2nd Edition. CAB International Mycological Institute, Surrey, UK.
- Fahy, P.C. and Persley, G.J. 1983. *Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide*. Academic Press, Sydney.
- Goto, M. 1992. *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology*. Academic Press, San Diego, USA.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd Edition. APS Press, St Paul, Minnesota, USA.
- Swings, J.G. and Civerolo, E.L. 1993. *Xanthomonas*. Chapman & Hall, London, UK.

Fungi

- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. 5th Edition. Elsevier Academic Press, USA.
- Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K. and Sussman, A.S. 1973. *The Fungi. An Advanced Treatise*. Vols. IVA, IVB. Academic Press, New York.
- Arx, J.A. von. 1981. *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture*. 3rd Edition. J. Cramer, Lehre.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th Edition. APS Press, St Paul, Minnesota, USA.
- Barron, G.L. 1968. *The Genera of Hyphomycetes from Soil*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA.
- Boerema, G.H., de Gruyter, J., Noordeloos, M.E. and Hamers, M.E.C. 2004. *Phoma Identification Manual*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Braun, U. 1987. A monograph of the Erysiphales (powdery mildews). *Nova Hedwigia* **89**.
- Braun, U. 1995. *A Monograph of Cercospora, Ramularia and Allied Genera (Phytopathogenic Hyphomycetes)*. Vol. 1. IHW-Verlag, München, Germany.
- Braun, U. 1998. *A Monograph of Cercospora, Ramularia and Allied Genera (Phytopathogenic Hyphomycetes)*. Vol. 2. IHW-Verlag, München, Germany.
- Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P. and Backhouse, D. 1994. *Laboratory Manual for Fusarium Research*. 3rd Edition. Fusarium Research Laboratory, Department of Crop Sciences, University of Sydney.
- Carmichael, J.W., Kendrick, W.B., Connors, I.L. and Sigler, L. 1980. *Genera of Hyphomycetes*. University of Alberta Press, Edmonton, Canada.
- Crous, P.W. and Braun, U. 2003. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. *CBS Biodiversity Series 1*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Cummins, G.B. and Hiratsuka, Y. 2003. *Illustrated Genera of Rust Fungi*. 3rd Edition. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T.-H. 1993. *Compendium of Soil Fungi*. Vols. I, II. Academic Press, New York.
- Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. CMI, Kew, UK.
- Ellis, M.B. 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. CMI, Kew, UK.
- Ellis, M.B. and Ellis, J.P. 1997. *Microfungi on Land Plants*. Richmond, London, UK.
- Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Hansford, C.G. 1961. The Meliolineae. *Sydowia*, Beih. **2**:1-806.

- Hansford, C.G. 1963. *Iconographia meliolinearum*. *Sydowia*, Beih. 5: pls. I-CCLXXXV.
- Hawksworth, D.L. 1974. *Mycologist's Handbook*. Commonwealth Agricultural Bureaux, UK.
- Hughes, S.J. 1976. Sooty moulds. *Mycologia* **68**:693-820.
- Index of Fungi*. CAB International Mycological Institute, Surrey, UK.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. and Stalpers, J.A. (eds) 2001. *Dictionary of the Fungi*. 9th Edition. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G. and Lemke, P.A. 2001. *The Mycota*. Vol. VII. Systematics and Evolution. Springer-Verlag, Berlin.
- Mueller, G.M., Bills, G.F. and Foster, M.S. (eds) 2004. *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press, USA.
- Nag Raj, T.R. 1993. *Coelomycetous Anamorphs with Appendage-Bearing Conidia*. Mycologue Publications, Waterloo, Canada.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. 1999. *Fungi and Food Spoilage*. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Rossman, A.Y., Palm, M.E. and Spielman, L.J. 1987. *A Literature Guide for the Identification of Plant Pathogenic Fungi*. The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA.
- Sivanesan, A. 1984. *The Bitunicate Ascomycetes and their Anamorphs*. J. Cramer, Vaduz, Liechtenstein.
- Spencer, D.M. 1981. *The Downy Mildews*. Academic Press, London.
- Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes*. CMI, Kew, UK.
- Smith, D. and Onions, A.H.S. 1994. *The Preservation and Maintenance of Living Fungi*. 2nd Edition. IMI Technical Handbook No. 1. CAB International, Wallingford, UK.
- Vánky, K. 2002. *Illustrated Genera of Smut Fungi*. 2nd Edition. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- White, J.F., Bacon, C.W., Hywel-Jones, N.L. and Spatafora, J.W. 2003. Clavicipitalean Fungi: Evolutionary Biology, Chemistry, Biocontrol, and Cultural Impacts. *Mycology Series 19*. Marcel Dekker, New York.
- Wingfield, M.J., Seifert, K.A. and Webber, J.F. 1999. *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, Ecology and Pathogenicity*. APS Press, St. Paul, Minnesota.

Nematodes

- Anon. 2005. *Interactive diagnostic key to plant parasitic, freeliving and predaceous nematodes*. University of Nebraska - Lincoln Nematology Laboratory, <http://nematode.unl.edu/key/nemakey.htm>
- Bell, M. 2004. *Plant Parasitic Nematodes: Lucid key to 30 genera of plant parasitic nematodes*. <http://www.lucidcentral.com/keys/nematodes/>
- Eisenback, J.D. 2002. *Identification guides for the most common genera of plant-parasitic nematodes*. Mactode Publications, Blacksburg USA.
- Hodda, M. 2005. *Key to the nematodes of Australia*. <http://www.ento.csiro.au/science/nematode.html>
- Hunt, D.J. 1993. *Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae : their systematics and bionomics*. CAB International, Wallingford, UK.
- Nickle, W.R. 1991. *Manual of agricultural nematology*. M. Dekker, New York.
- Nobbs, J.M. 2004. *Plant parasitic nematodes of Australia* [CD]. South Australian Research and Development Institute, Adelaide. (available from nobbs.jackie@saugov.sa.gov.au)
- Shurtleff, M.C and Averre, C.W. 2000. *Diagnosing plant diseases caused by nematodes*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Siddiqi, M.R. 2000. *Tylenchida: parasites of plants and insects*. CABI Publications, Wallingford, UK.
- Stirling, G.R., Nicol, J. and Reay, F. 1999. *Advisory services for nematode pests: operational guidelines*. Rural Industries Research and Development Corporation, Barton, A.C.T. viii, 111 p. (<http://www.rirdc.gov.au/reports/Ras/99-41.pdf>)

Phytoplasmas

- Whitcomb, R.F. and Tully, J.G. (Eds). 1989. *The Mycoplasmas*. Vol. 5. Academic Press, New York.

Viruses

- Brunt, A., Crabtree, K., Dallwitz, M., Gibbs, A. and Watson, L. 1996. *Viruses of Plants: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Hull, R. 2002. *Matthews' Plant Virology*. Academic Press, London, UK.