

เทคนิคโรคพืช

Plant Pathology Techniques



เกวลิน คุณาศักดากุล

คำนำ

ตำราเทคนิคโรคพืชฉบับนี้ ผู้เขียนได้ปรับปรุงและเรียบเรียงเพิ่มเติมจากเอกสารประกอบการสอนกระบวนวิชา 360301 (เทคนิคทางโรคพืช) ซึ่งเปิดสอนที่ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับนักศึกษาที่เริ่มทำงานวิจัยทางด้านนี้ โดยมีเนื้อหาหลักด้านทฤษฎีและวิธีปฏิบัติในเทคนิคสำคัญทางโรคพืชครบถ้วน ตำราฉบับนี้ได้นำเสนอเนื้อหาตั้งแต่เทคนิคพื้นฐาน วิธีการใช้เครื่องมือจำเป็นที่มีในห้องปฏิบัติการทางโรคพืช การฆ่าเชื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ รวมถึงอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการที่เหมาะสมในแต่ละกรณี การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิด ตลอดจนปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อ เทคนิคการเก็บและการแยกเชื้อบริสุทธิ์ เทคนิคการปลูกเชื้อ การเก็บรักษาเชื้อสาเหตุเพื่อใช้ในการทดลองได้อย่างต่อเนื่องโดยเชื้อไม่สูญเสียความสามารถในการทำให้เกิดโรค เป็นต้น ซึ่งเทคนิคต่าง ๆ ดังกล่าว อาจมีการพัฒนา ดัดแปลงให้เหมาะสมตามชนิดของงาน และสถานการณ์จำเป็นที่อาจเกิดขึ้นได้ตลอดเวลา นอกจากนั้นยังได้รวบรวมตัวอย่างและวิธีการที่ใช้ในการศึกษาเชื้อสาเหตุโรคพืชสำคัญบางชนิด รวมทั้งภาพประกอบการอธิบายตามความเหมาะสมในแต่ละบทไว้ด้วย ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ตำราเทคนิคโรคพืชฉบับนี้จะประโยชน์ ให้ความรู้ความเข้าใจพื้นฐานเทคนิคทางโรคพืชแก่ผู้ที่ต้องการศึกษางานด้านโรคพืชโดยตรงหรือการศึกษาในงานที่เกี่ยวข้องได้ไม่มากนักน้อย โดยเฉพาะนิสิต นักศึกษา ที่จำเป็นต้องหมั่นฝึกฝนปฏิบัติ แก่ใจ และปรับปรุงการทำงานในห้องปฏิบัติการทางโรคพืช หรือทางจุลชีววิทยา เพื่อให้สามารถประยุกต์ใช้เทคนิควิธีการต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งจะเป็นพื้นฐานในการทำงานวิจัยให้ประสบผลสำเร็จ

เกวลิน คุณาศักดากุล

ตุลาคม 2556

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	11
1.1 ความสำคัญของโรคพืช	11
1.2 การศึกษาวิจัยด้านโรคพืช	13
เอกสารอ้างอิง	18
บทที่ 2 การทำให้อุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์	19
2.1 การฆ่าเชื้อด้วยตู้อบลมร้อน	20
2.2 การฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ	21
2.3 การฆ่าเชื้อด้วยรังสี	25
2.4 การทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรอง	26
2.5 การฆ่าเชื้อด้วยการรมก๊าซ	29
2.6 การฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย	32
2.7 ข้อควรระวังในการทำให้ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์	37
2.8 ตู้ปลอดเชื้อ	38
เอกสารอ้างอิง	41
บทที่ 3 การแยกเชื้อสาเหตุโรคพืช	43
3.1 การแยกเชื้อสาเหตุโรคจากดิน	43
3.2 การแยกเชื้อจากชิ้นพืชที่เป็นโรค	50
3.3 การแยกเชื้อจากเมล็ดพืชที่เป็นโรค	56
3.4 การแยกเชื้อบริสุทธิ์	61
เอกสารอ้างอิง	66
บทที่ 4 การเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคพืช	67
4.1 องค์ประกอบและการแบ่งกลุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ	67
4.2 เทคนิคการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	72
4.3 อาหารที่ใช้แยกและเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคพืช	75

4.4 อาหารที่ใช้แยกและเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพิษ	79
4.5 การเลี้ยงเชื้อราเพื่อการปลูกเชื้อ	83
4.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณส่วนขยายพันธุ์ ของเชื้อรา	85
เอกสารอ้างอิง	89

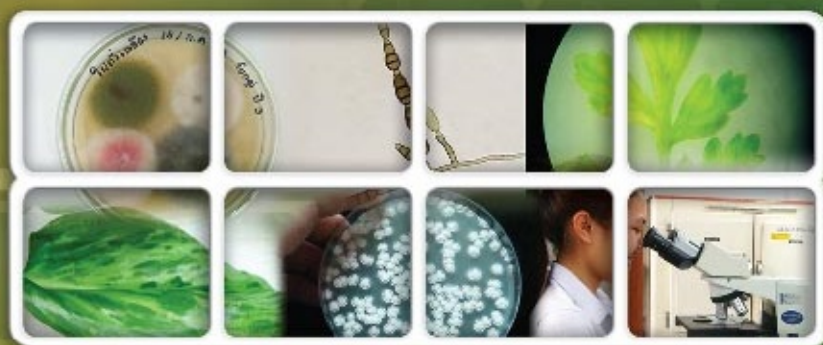
บทที่ 5 การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจสอบภายใต้ กล้องจุลทรรศน์	91
5.1 การทำความสะอาดแผ่นกระจกสไลด์	91
5.2 สารค้ำจุนตัวอย่าง	93
5.3 การเตรียมเนื้อเยื่อพืชเพื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์	96
5.4 การย้อมสีตัวอย่างทางโรคพืช	105
5.5 การย้อมสีชิ้นพืชที่เป็นโรค	108
5.6 การย้อมสีเชื้อแบคทีเรีย	111
5.7 การย้อมสีเชื้อรา	112
5.8 การเลี้ยงเชื้อราบนแผ่นกระจกสไลด์	113
5.9 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัยและ เชื้อสาเหตุโรคพืช	115
เอกสารอ้างอิง	118

บทที่ 6 การปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืช	119
6.1 ความบริสุทธิ์ของเชื้อสาเหตุโรคพืช	120
6.2 ปริมาณและความมีชีวิตของเชื้อสาเหตุโรคพืช	121
6.3 การคำนวณความเข้มข้นของ inoculums ด้วย haemocytometer	123
6.4 ตัวอย่างการเตรียม inoculums ของเชื้อสาเหตุโรคพืช	126
6.5 เทคนิคการปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืช	132
6.6 ข้อควรระวังในการปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืช	139
เอกสารอ้างอิง	141

บทที่ 7	การเก็บรักษาเชื้อสาเหตุโรคพิษ	143
7.1	ความสำคัญและประโยชน์	144
7.2	การแบ่งกลุ่มการเก็บรักษาเชื้อ	145
7.3	การย้ายเชื้อเลี้ยงตามช่วงเวลา	147
7.4	การเก็บรักษาเชื้อใน mineral oil	149
7.5	การเก็บรักษาเชื้อในน้ำกลั่น	151
7.6	การเก็บรักษาเชื้อแบบแห้งบนกระดาษกรอง	152
7.7	การเก็บรักษาเชื้อในดิน	153
7.8	การเก็บรักษาเชือบน glass beads	155
7.9	การเก็บรักษาเชื้อปรสิตถาวร	156
7.10	การป้องกันไร	157
	เอกสารอ้างอิง	159
 บทที่ 8	 การเก็บรักษาตัวอย่างพืชที่เป็นโรค	 161
8.1	การเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรค	162
8.2	การเก็บรักษาตัวอย่างแบบแห้ง	165
8.3	การเก็บรักษาตัวอย่างด้วยการดอง	171
	เอกสารอ้างอิง	174
 บทที่ 9	 การประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	 175
	ด้านโรคพืช	
9.1	การเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคพืชร่วมกับเนื้อเยื่อพืช	175
9.2	การผลิตพืชปลอดโรค	188
9.3	การชักนำให้พืชต้านทานโรค	199
	เอกสารอ้างอิง	203
	กรณีศึกษาวิชาพฤกษศาสตร์เชื้อสาเหตุโรคพืช	205
	อภิธานศัพท์เฉพาะทางโรคพืช	209

เทคนิคโรคพืช

Plant Pathology Techniques



CHIANG MAI
UNIVERSITY PRESS



9 789746 728195

5181 400 บาท

บทที่ 1

บทนำ

ความหมายโดยทั่วไปของ “โรคพืช” มักหมายถึงสภาพความสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัยและเชื้อสาเหตุโรค หรือระหว่างพืชกับปัจจัยอื่นที่เป็นสาเหตุโรคที่ก่อให้เกิดอาการ (symptom) หรือสภาพ (condition) ความผิดปกติของพืช (นุชนารถ และคณะ, 2523) ซึ่งอาจเกิดจากสิ่งมีชีวิตหรือสิ่งไม่มีชีวิตที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชปกติ พืชที่เป็นโรคจึงเป็นพืชที่ถูกรบกวนหรือมีระบบต่าง ๆ ถูกทำลาย เช่น ระบบหายใจ ระบบลำเลียงธาตุอาหาร ระบบคายน้ำ ระบบสืบพันธุ์ ระบบสังเคราะห์แสง ตลอดจนการก่อให้เกิดความผิดปกติระดับเซลล์ของพืช การแสดงอาการโรคของพืชจึงเป็นผลรวมของความผิดปกติที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของพืช สาเหตุที่ทำให้พืชเป็นโรคอาจเกิดจากสภาพแวดล้อมที่พืชเจริญอยู่ เช่น สาเหตุจากดิน น้ำ หรืออากาศ สำหรับสาเหตุจากสิ่งมีชีวิตนั้น สามารถแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ กลุ่มของเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส เชื้อไวรอยด์ เชื้อไฟโตพลาสมา และไส้เดือนฝอย เชื้อสาเหตุโรคพืชเหล่านี้ เมื่อเข้าทำลายพืชแล้ว อาจก่อให้เกิดอาการต่าง ๆ มากมาย ทั้งที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าและไม่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าจำเป็นต้องใช้เทคนิคหรือวิธีการอื่น ๆ เข้ามาช่วย เช่น การตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หรืออาจใช้เทคนิคขั้นสูงระดับโมเลกุล จึงจะสามารถตรวจสอบการเป็นโรคของพืชได้

1.1 ความสำคัญบอบโรคพืช

พืชมีความสำคัญสำหรับมนุษย์ เนื่องจากเป็นแหล่งปัจจัยของการดำรงชีวิต ได้แก่ การนำมาใช้เป็นอาหารทั้งโดยตรงและโดยอ้อม ใช้ทำเครื่องนุ่งห่ม ใช้ทำบ้านเรือนที่อยู่อาศัย ใช้เป็นยารักษาโรค รวมถึงการใช้เพื่อการแก้ไขปัญหาหมอกพิษในเขตเมือง ซึ่งนับวันจะมีความสำคัญมากขึ้น แต่หากพืชเป็นโรค จะทำให้ไม่สามารถนำพืชไปใช้ตามวัตถุประสงค์ดังกล่าวข้างต้นได้อย่างเต็มที่ ซึ่งจะก่อให้เกิดผลกระทบในด้านต่าง ๆ ตามมา

อย่างกว้างขวาง ทั้งในเชิงเศรษฐกิจ สังคม และนิเวศวิทยา การเกิดโรคระบาดของพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต เช่น ข้าว ข้าวโพด มันสำปะหลัง พืชผัก ผลไม้ ถั่วเหลือง ปาล์มน้ำมัน ฝ้าย หรือพืชที่ใช้ในการประดับ ตกแต่งอาคารสถานที่ต่าง ๆ ย่อมจะส่งผลเสียต่อการดำเนินชีวิตของมนุษย์ ซึ่งอาจสรุปเป็นข้อ ๆ ได้ดังนี้

1) การขาดแคลนอาหาร เนื่องจากโรคพืชทำให้ผลผลิตพืชลดลง ไม่เพียงพอต่อความต้องการ เช่น ในอดีต การระบาดของเชื้อรา *Phytophthora infestans* ในมันฝรั่ง ทำให้เกิดการอดอาหารตายของประชากรในไอร์แลนด์ซึ่งบริโภคมันฝรั่งเป็นอาหารหลัก (Agrios, 1969) การระบาดของโรคราสนิมของข้าวสาลีในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนที่ทำความเสียหายกับการปลูกข้าวสาลีถึง 2.67 ล้านเฮกตาร์ (สำนักข่าวรอยเตอร์ อ้างโดย สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2554)

2) การเคลื่อนวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในการแปรรูปในโรงงานอุตสาหกรรม ส่งผลต่อการจ้างงาน และราคาสินค้าสูงขึ้น เช่น ปัญหาการระบาดของหนักรากของโรคใบไหม้ แผลใหญ่ของข้าวโพดหวาน ที่เกิดจากเชื้อรา *Exserohilum turcicum* การระบาดของโรคใบขาวของอ้อยในประเทศไทย ที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา ในพื้นที่เพาะปลูกของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มากกว่า 1 แสนไร่ และภาคเหนือตอนล่างอีกประมาณ 3 หมื่นไร่ (รัช, 2551)

3) การเกิดสารพิษที่สร้างจากเชื้อสาเหตุโรคพืชปนเปื้อนในวัตถุดิบ และอาหารแปรรูปจากผลิตภัณฑ์จากพืช เช่น สารพิษ aflatoxin ที่สร้างโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่มักเข้าทำลายผลิตผลทางการเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว เช่น ถั่ว กระเทียม หัวหอม และข้าวโพด ทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งของผู้บริโภค ก่อให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพของประชากร

4) เกิดผลกระทบในเชิงเศรษฐกิจ การแข่งขันด้านการค้าขายผลิตผลทางการเกษตร โดยเฉพาะการส่งออกสินค้าเกษตรไปขายยังประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก ซึ่งแต่ละประเทศจะมีระเบียบข้อบังคับเกี่ยวกับการไม่อนุญาตให้มีการตกค้างหรือการปนเปื้อนของเชื้อสาเหตุโรคพืช หรือสารพิษที่เชื้อเหล่านั้นสร้างขึ้น ติดไปกับผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งหากมีการตรวจพบ และจำเป็นต้องเผาทำลายที่ต่างประเทศ จะทำให้ผู้ส่งออกต้องเสียค่าใช้จ่ายในการดำเนินการเป็นจำนวนมาก นอกจากนั้นยังอาจทำให้สูญเสียความน่าเชื่อถือด้านการค้าขายอีกด้วย



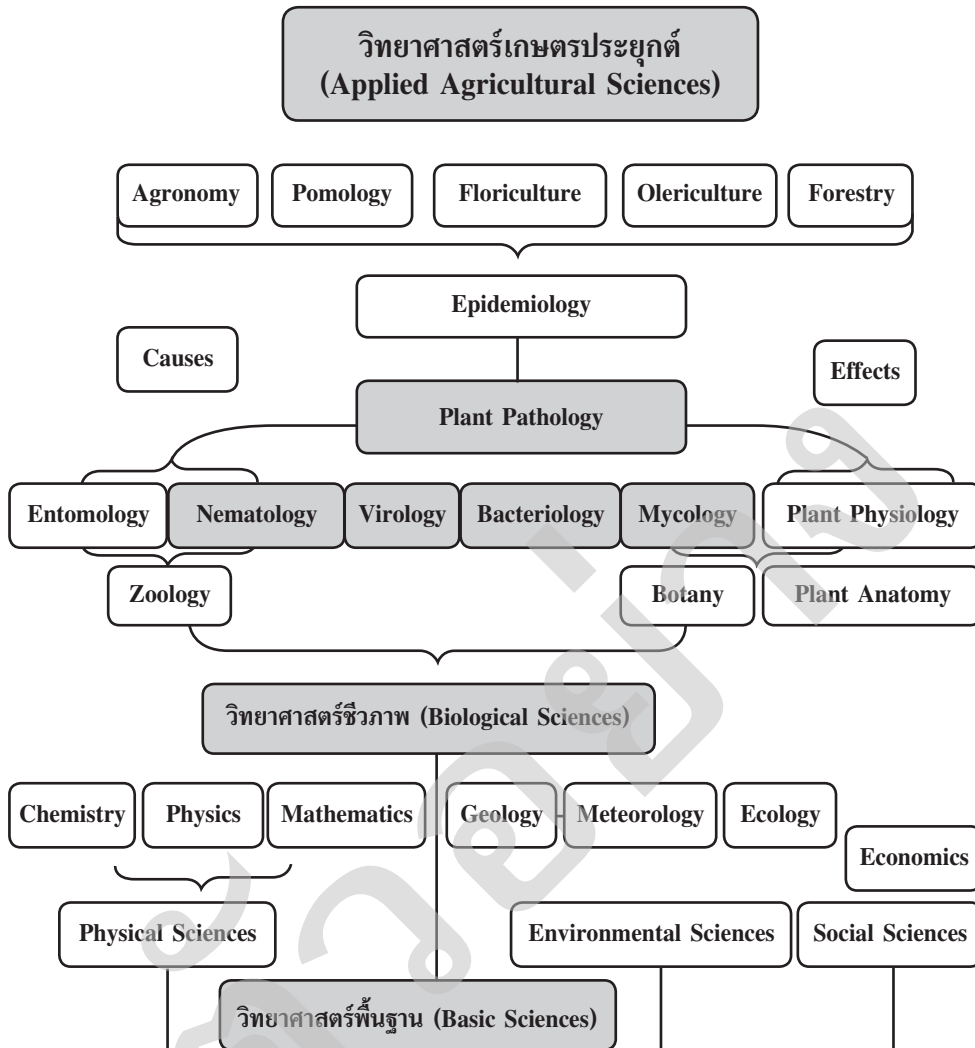
5) การสูญเสียพันธุ์ของพืชที่ตรงตามความต้องการของมนุษย์หากแต่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยเฉพาะในพืชเศรษฐกิจ ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นโดยลำดับ เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิดสามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมและทวีความรุนแรงในการเข้าทำลายพืชได้มากขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้เกิดองค์การที่เข้ามา มีบทบาทในอนุรักษ์ความหลากหลายของพืชปลูกเพื่อให้เกิดความยั่งยืนด้านอาหารของมนุษย์ เช่น Global Crop Diversity Trust ซึ่งเป็นองค์กรอิสระระหว่างประเทศที่เกิดขึ้นจากความร่วมมือระหว่าง FAO (Food and Agriculture Organization) และ CGIAR (Consultative Group on International Agricultural Research) เป็นต้น

6) การเกิดผลเสียด้านความไม่สวยงามของภูมิทัศน์สภาพแวดล้อมและที่อยู่อาศัย เช่น เชื้อราสาเหตุโรค Dutch elm disease ทำลายต้น elm ซึ่งเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ที่นิยมปลูกเพื่อการใช้ประโยชน์ทั้งด้านการใช้เนื้อไม้ และเพื่อความสวยงามด้านภูมิทัศน์ การระบาดของโรคนี้ในช่วงตั้งแต่ต้นจนถึงกลางศตวรรษที่ 20 ทั่วทั้งทวีปยุโรปและอเมริกาเหนือ ทำให้พืชแสดงอาการขาดน้ำ ใบเหลืองร่วง ต้นโทรม และยืนต้นตายเป็นจำนวนมาก

ดังนั้น การศึกษาวิจัยด้านโรคพืชจึงเป็นสิ่งจำเป็น โดยเฉพาะการศึกษาที่มีวัตถุประสงค์เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช การสร้างพันธุ์พืชต้านทานโรค ตลอดจนการพัฒนาวิธีการบริหารจัดการโรคพืชในระบบการเพาะปลูกพืชที่มีความแตกต่างและหลากหลายมากขึ้น เพื่อให้สามารถตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภค ซึ่งปัจจุบันได้มีการรณรงค์ให้ประชาชนมีความตระหนักถึงการบริโภคผลิตภัณฑ์การเกษตรอย่างปลอดภัย หลีกเลี่ยงจากสารพิษที่ตกค้างจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรรวมถึงสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในระบบการผลิตที่ไม่ได้มาตรฐาน ก่อให้เกิดการสะสมของสารพิษเกินมาตรฐานความปลอดภัย

1.2 การศึกษาวิจัยด้านโรคพืช

การปฏิบัติงานด้านโรคพืช เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ตามที่ตั้งไว้ มักมีความเชื่อมโยงกับศาสตร์ด้านอื่น ๆ อยู่เสมอ ดังที่ Robert and Boothroyd (1972) ได้เสนอแผนผังที่แสดงถึงความเชื่อมโยงของวิชาโรคพืชซึ่งเป็นวิทยาศาสตร์เกษตรประยุกต์กับศาสตร์สาขาต่าง ๆ ไว้อย่างน่าสนใจ ดังภาพที่ 1.1



ภาพที่ 1.1 แผนภาพแสดงความเชื่อมโยงระหว่างวิทยาศาสตร์เกษตรประยุกต์และวิทยาศาสตร์พื้นฐาน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Robert and Boothroyd (1972)



จากแผนภาพข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ในการทำงานหรือการศึกษาด้านโรคพิษนั้น ผู้ศึกษาวิจัยอาจจำเป็นต้องใช้ความรู้ด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐาน ทั้งทางวิทยาศาสตร์กายภาพ วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม สังคมศาสตร์ โดยเฉพาะทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เพื่อเป็นหลักอ้างอิงและนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในเชิงของการแก้ไขปัญหาทางการเกษตร ทั้งด้านพืชสวน พืชไร่ และป่าไม้ เป็นต้น รวมถึง องค์ความรู้ทางชีวเคมี สรีรวิทยาของพืช เทคโนโลยีชีวภาพ หรือนาโนเทคโนโลยีที่กำลังเข้ามามีบทบาทสำคัญต่อการทำงานด้านโรคพิษมากขึ้นตามลำดับ

การศึกษาด้านโรคพิษมักเป็นการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์เช่นเดียวกับการศึกษาด้านจุลชีววิทยา เพียงแต่เชื้อที่นำมาใช้ศึกษาจะเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคของพืชชนิดต่าง ๆ เป็นหลัก ในการทำงานจึงสามารถประยุกต์เทคนิคหรือวิธีการมาใช้ร่วมกันได้เป็นอย่างดี เช่น เทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ การถ่ายเชื้อ ซึ่งเป็นเทคนิคพื้นฐานด้านจุลชีววิทยา ที่ผู้วิจัยต้องฝึกฝนให้เกิดความชำนาญ ทั้งนี้ไม่ใช่เพียงเพื่อการบรรลุผลของการทำงานที่วางไว้ แต่ยังเป็นการหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นที่ไม่ต้องการจากบริเวณพื้นที่ทำงานหรือสภาพแวดล้อมใกล้เคียง รวมถึงการระมัดระวังไม่ให้เชื้อที่กำลังศึกษามีโอกาสปนเปื้อนไปในสภาพแวดล้อมเพื่อความปลอดภัยของตนเองและผู้อื่นด้วยเช่นกัน ดังนั้น ผู้มีส่วนเกี่ยวข้องในการทำงานด้านนี้ โดยเฉพาะนิสิตนักศึกษา หรือนักวิจัยรุ่นเยาว์ ที่ต้องฝึกฝนตนเองให้มีทักษะในการปฏิบัติงานและให้ความสนใจกระบวนการการทำให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ (aseptic techniques) เป็นอันดับแรก ๆ ของการฝึกปฏิบัติ

กระบวนการของการวิจัยในงานด้านนี้ เป็นงานที่มีแบบแผนและมีขั้นตอนที่ชัดเจน กล่าวโดยสรุปได้ว่า อาจเริ่มตั้งแต่ การทำความเข้าใจศึกษาข้อมูลต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับที่มาของปัญหาหรือโจทย์ของการวิจัย เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สำคัญและเพียงพอต่อการนำมาวางแผนการวิจัย จากนั้นจึงตั้งเป้าหมายและวัตถุประสงค์ของการวิจัยที่อาจจะบรรลุผลสัมฤทธิ์ทั้งในเชิงผลผลิต (output) หรือผลลัพธ์ (outcome) ตลอดจนการวัดประเมินผลสัมฤทธิ์นั้น ๆ และที่ขาดไม่ได้ในกระบวนการวิจัย คือ การกำหนดขอบเขตพื้นที่การศึกษารายละเอียด และขั้นตอนวิธีการโดยละเอียดของกระบวนการทดลองทั้งหมด ซึ่งอาจมีหลายการทดลองเพื่อให้บรรลุเป้าหมาย การค้นคว้าข้อมูลข้อเท็จจริงในประเด็นที่เกี่ยวข้องกับการทดลองในแต่ละขั้นตอนอย่างละเอียดรอบคอบเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้การทดลองนั้น ๆ มีความน่าเชื่อถือ และเกิดผลสัมฤทธิ์ในแต่ละวัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้ นอกจากนั้น ในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทดลองจำเป็นต้องระบุอุปกรณ์และวิธีการที่นำไปใช้โดยละเอียดรอบคอบเช่นกัน หลังจากนั้นจึงดำเนินการตามขั้นตอนที่ได้

วางแผนไว้ เมื่อทำการทดลองจนได้ผลการทดลองแล้ว จึงทำการเก็บรวบรวมผลการทดลองให้ครบถ้วน และนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์และสรุปว่าได้บรรลุวัตถุประสงค์ตามต้องการหรือไม่อย่างไร

สำหรับขั้นตอนของการดำเนินการทดลองทางโรคพืชนั้น การเลือกเทคนิคหรือวิธีการทดลองในแต่ละขั้นตอนให้เหมาะสม เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพในการดำเนินการทดลองและส่งผลกระทบต่อความสำเร็จของงานวิจัย เช่น ในปัจจุบันมักมีการศึกษาถึงการป้องกันกำจัดโรคพืชที่เน้นการลดการใช้สารเคมีเกษตร โดยเฉพาะสารเคมีที่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในผลผลิตของเกษตรกรและสภาพแวดล้อม วิธีการหนึ่งที่เป็นที่นิยมศึกษากันอย่างแพร่หลายได้แก่ การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรหลายชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืชแทนการใช้สารเคมี ดังนั้น การดำเนินการทดลองจึงควรมีขั้นตอนและข้อสังเกต โดยสรุปดังนี้

1) ระบุที่มาของปัญหา และกำหนดเป้าหมายให้ชัดเจนว่าจะทำการทดลองในโรคใด พืชชนิดใด พร้อมทั้งหาข้อมูลที่จะเป็นประโยชน์ต่องานทดลองให้มากที่สุด

2) กำหนดวัตถุประสงค์ของการทดลองและวางแผนการดำเนินงานให้รอบคอบและครอบคลุมเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

3) กำหนดวิธีการหรือเทคนิคทางโรคพืชที่จะนำมาใช้ในการทดลองในแต่ละขั้นตอนของแผนดำเนินงาน เช่น หากต้องการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเคมีควบคุมโรคพืชที่มีวางขายในท้องตลาดบางชนิดกับสารสกัดจากพืชสมุนไพร อาจจำเป็นต้องกำหนดขั้นตอนของการทดลองที่จะต้องอาศัยเทคนิคการปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืชลงบนพืช เพื่อให้การเกิดโรคเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอก่อนการใช้สารที่ต้องการทดสอบควบคุมโรค ซึ่งเทคนิคในการปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืชลงบนพืชอาศัยมีอยู่ด้วยกันหลายวิธีการ การเลือกใช้เทคนิคการปลูกเชื้อที่เหมาะสมกับส่วนของพืชและชนิดของเชื้อเป็นสิ่งที่คุณทดลองต้องพิจารณาให้รอบคอบทั้งก่อนและหลังการปลูกเชื้อ จึงจะทำให้พืชเป็นโรคได้ตามต้องการ และจะทำให้สามารถเปรียบเทียบวิธีการป้องกันกำจัดได้ผลดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ ควรกำหนดวิธีการหรือเทคนิคอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น การแยกเชื้อบริสุทธิ์ การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ การเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ และการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิด การกระตุ้นให้เชื้อสร้างส่วนขยายพันธุ์ เช่น สปอร์ (spore) (หากเชื้อที่ต้องการเป็นเชื้อราที่มีการสร้างสปอร์ได้น้อย) การเตรียมส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อเพื่อการปลูกเชื้อ หรือการตรวจประเมินการเป็นโรคของพืชที่ได้รับการปลูกเชื้อ ตลอดจน เทคนิคการเก็บรักษาเชื้อสาเหตุเพื่อใช้ในการทดลองได้อย่างต่อเนื่องโดยเชื้อไม่สูญเสียความสามารถในการทำให้เกิดโรค

โดยอาจมีการพัฒนา ดัดแปลงให้เหมาะสมตามชนิดของงาน และสถานการณ์จำเป็นที่อาจเกิดขึ้นได้

4) เนื่องจากการทำงานในห้องปฏิบัติการทางโรคพืชมีเครื่องมือและอุปกรณ์หลากหลายชนิด เช่น อุปกรณ์สำหรับการทำให้ปลอดเชื้อ ได้แก่ ตู้อบลมร้อน (hot air oven) หม้อนึ่งไอน้ำแบบใช้ความดัน (autoclave) อุปกรณ์สำหรับการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ตู้ปลอดเชื้อ ตู้บ่มเชื้อ หรือ เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรค ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์แบบต่าง ๆ เป็นต้น ดังนั้น ผู้ศึกษาวิจัยจึงจำเป็นต้องหมั่นฝึกปฏิบัติแก้ไข ปรับปรุงการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ดังกล่าวข้างต้นของตนเองให้เกิดทักษะความชำนาญจนสามารถประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะเป็นพื้นฐานในการทำงานวิจัยให้ประสบผลสำเร็จในที่สุด

เอกสารอ้างอิง

- รัช หะหมาน. 2551. ปัญหาโรคและแมลงศัตรูอ้อยในประเทศไทย และการป้องกัน
กำจัด. ศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทราย ภาคที่ 4 สำนักงาน
คณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย กระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ.
- นุชนารถ จงเลขา จักรี เส้นทอง พิภพ ถ้ายอง และ วิชชา สอาดสุด. 2523. โรคพืช
เบื้องต้น. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
190 หน้า.
- สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2554. สถานการณ์ด้านสุขอนามัยและ
สุขอนามัยพืช: จีนอ่วมโรคพืชระบาด ข้าวสาลีเสียหายหนัก. [ระบบออนไลน์].
แหล่งข้อมูล: http://www.acfs.go.th/news_detail.php?ntype=07&id=9021
(27 กรกฎาคม 2555).
- Agrios, G.N. 1969. Plant Pathology. Academic Press, Inc., New York. 629 pp.
- Robert, D.A. and C.W. Boothroyd. 1972. Fundamentals of Plant Pathology.
W.H. Freeman and Company, San Francisco. 402 pp.

บทที่ 2

การทำให้อุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์

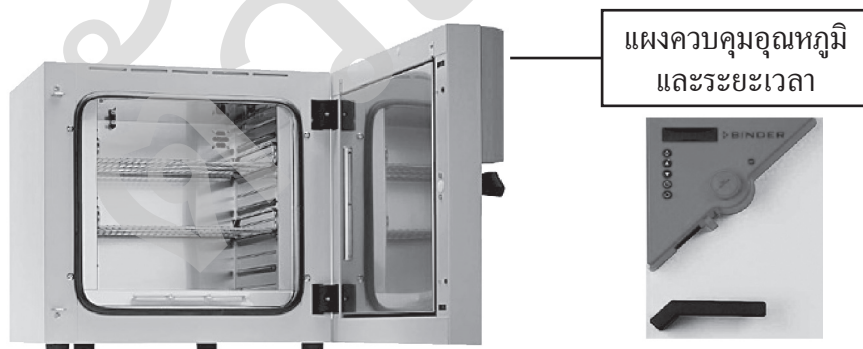
การศึกษาด้านโรคพืช เช่น การแยกเชื้อสาเหตุโรคพืช การจำแนกชนิดของเชื้อ ตลอดจนการเพิ่มปริมาณเชื้อสาเหตุเพื่อเตรียมเป็นส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อเพื่อการปลูกเชื้อ (inoculums) หรือเพื่อการศึกษาสมบัติทั้งทางกายภาพและชีวภาพ จำเป็นอย่างยิ่งที่ผู้ทดลองจะต้องมีความเชี่ยวชาญในเทคนิคการทำให้ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ (aseptic techniques) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้ออื่นที่ไม่ต้องการขณะทำการทดลอง ทั้งนี้วิธีการในการทำให้ปลอดจากเชื้อนั้น จำเป็นจะต้องทำให้ครอบคลุมทั้งสภาพแวดล้อมในการทำงาน เครื่องมือเครื่องใช้ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเป็นต้องใช้ แต่ไม่ได้รวมถึงการปนเปื้อนของสารเคมีที่อาจหลงเหลืออยู่ได้

การฆ่าเชื้อที่อุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อ แบ่งออกเป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ ได้แก่ วิธีการทางกายภาพ ซึ่งเป็นวิธีการทำให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อโดยการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน รังสี หรือการกำจัดเชื้อโดยอาศัยการกรอง และการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการทางเคมี ได้แก่ การใช้สารละลายชนิดต่าง ๆ และการฆ่าเชื้อด้วยการรมด้วยก๊าซ เป็นต้น ในการตัดสินใจเลือกใช้วิธีการทำให้ปลอดจากเชื้อด้วยวิธีการใดนั้น ส่วนใหญ่มักจะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและสภาพของวัตถุที่ต้องการทำให้ปลอดเชื้อ รวมถึงสภาพแวดล้อมความปลอดภัยในการใช้เครื่องมือ และต้องพิจารณาถึงประสิทธิภาพ ความเป็นพิษ ความสะดวก ค่าใช้จ่าย ตลอดจนผลกระทบที่อาจมีขึ้นกับวัตถุที่ต้องการทำให้ปลอดเชื้อด้วยเช่นกัน เครื่องมือและอุปกรณ์สำคัญในการทำให้ปลอดเชื้อที่มักนิยมนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้อบลมร้อน หม้อนึ่งไอน้ำ ตู้ถ่ายเชื้อที่ติดตั้งหลอดรังสีอัลตราไวโอเลต เครื่องกรองของเหลว รวมถึงสารเคมีหรือสารละลายที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ เป็นต้น



2.1 การฆ่าเชื้อด้วยตู้อบลมร้อน

ตู้อบลมร้อน (hot air oven) เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับการฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนแห้ง (dry heat sterilization) มักใช้ในการฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว หรือเครื่องมือที่เป็นโลหะ เช่น เข็มเย็บเย็บ มีด ปากคีบ หรือพลาสติกที่ทนร้อน หลักการฆ่าเชื้อของวิธีนี้ คือการที่ความร้อนไปทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ของโปรตีน ทำให้โมเลกุลของโปรตีนเสื่อมสภาพ หรือทำให้เซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์แห้ง หรือถูกเผาไหม้ตายไป สำหรับเครื่องมือที่ใช้ในการฆ่าเชื้อโดยวิธีนี้ ปัจจุบันมีจำหน่ายหลายตราสินค้า ส่วนใหญ่มักเป็นเครื่องมือที่มีชุดควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ โดยผู้ใช้สามารถตั้งระดับอุณหภูมิและระยะเวลาให้เครื่องทำงานตามค่าที่ตั้งไว้ (ภาพที่ 2.1) โดยความร้อนนั้นอาจมาจากการใช้กระแสไฟฟ้า หรือก๊าซก็ได้ รังสีความร้อนจะส่งผ่านโดยวิธีแผ่รังสีจากผนังตู้มายังวัตถุ การกระจายลมร้อนของตู้อบลมร้อนที่มีใช้ในปัจจุบัน มี 2 แบบ ได้แก่ การกระจายโดยอาศัยความแตกต่างของอุณหภูมิตามแรงโน้มถ่วงของโลก และการกระจายลมร้อนแบบมีพัดลมช่วยในการกระจายความร้อนให้ทั่วถึง ซึ่งแบบหลังจะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อมากกว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจะเป็นสัดส่วนผกผันกับอุณหภูมิ (ตารางที่ 2.1) โดยระยะเวลาที่ตั้งไว้จะเริ่มนับตั้งแต่ความร้อนหรืออุณหภูมิถึงระดับที่ต้องการ ดังนั้นในบางครั้งหากสิ่งที่ต้องการอบฆ่าเชื้อมีปริมาณมากจึงควรเผื่อเวลาไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง



ภาพที่ 2.1 ลักษณะภายในของตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่มีแผงควบคุมอุณหภูมิและระยะเวลาในการอบฆ่าเชื้อแบบอัตโนมัติ