

# เทคนิคโรคพืช

## Plant Pathology Techniques



เกวลิน คุณาศักดากุล

# ประวัติผู้เขียน



## ผู้เขียน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกวณีน คุณาศักดากุล

วท.บ (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วท.ม (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปร.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

## สถานที่ทำงาน

ภาควิชาภูมิวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

เทคนิคโรคพืชเป็นตำราที่มีเนื้อหาหลักด้านทฤษฎีและวิธีปฏิบัติที่สำคัญทางโรคพืชอย่างครบถ้วน เสนอเนื้อหาตั้งแต่เทคนิคพื้นฐาน การใช้เครื่องมือจำเป็นที่มีในท้องปฏิบัติการทางโรคพืช การฆ่าเชื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ อาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการที่เหมาะสมในแต่ละกรณี ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อ การแยกเชื้อบริสุทธิ์ การปลูกเชื้อ การเก็บรักษาเชื้อสาเหตุโรคเพื่อใช้ในการทดสอบได้อย่างต่อเนื่องโดยเชื้อไม่สูญเสียความสามารถในการทำให้เกิดโรค และรวบรวมตัวอย่าง วิธีการที่ใช้ในการศึกษาเชื้อสาเหตุโรคพืชสำคัญบางชนิด รวมทั้งภาพประกอบการอธิบายตามความเหมาะสมในแต่ละบท เพื่อให้ความรู้ความเข้าใจแก่ผู้ที่สนใจในการนำไปเป็นพื้นฐานและประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยให้ประสบผลสำเร็จ

เนื่องจากปก : นักวิจัยเก็บตัวอย่างโรค Japanese Oak Wilt จากป่าธรรมชาติ ใน Shiga Prefecture, Japan



PLANT  
PATHOLOGY  
TECHNIQUES

# เทคนิคโรคพืช

พศ.ดร. เกวลีน คุณนาคักดากุล

สาขาวิชาโรคพืช  
ภาควิชาพืชวิทยาและโรคพืช  
คณะเกษตรศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
2556

# เทคนิคโรคพืช

ISBN: 978-974-672-819-5

ผู้แต่ง: ผศ.ดร. เกวลิน คุณาศักดากุล

เจ้าของและผู้จัดพิมพ์: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
ศูนย์บริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
โทรศัพท์: 0 5394 2671-2, 0 5394 2676  
โทรสาร: 0 5394 3600  
<http://cmupress.cmu.ac.th>  
E-mail: [cmupress.th@gmail.com](mailto:cmupress.th@gmail.com)

พิมพ์ครั้งแรก: ตุลาคม 2556

ราคา: 450 บาท

## ข้อมูลทางบรรณานุกรมของสำนักหอสมุดแห่งชาติ

เกวลิน คุณาศักดากุล.  
เทคนิคโรคพืช.-- เชียงใหม่ :  
สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2556.  
212 หน้า.  
1. โรคพืช. I. ชื่อเรื่อง.  
571.92  
ISBN 978-974-672-819-5

ออกแบบและพิมพ์: บริษัท วิทอินดีไซน์ จำกัด

© สงวนลิขสิทธิ์ พ.ศ. 2537 ห้ามลอกเลียนแบบ ทำซ้ำ ดัดแปลง ส่วนหนึ่งส่วนใดของตำราเล่มนี้ รวมทั้งการจัดเก็บ ถ่ายทอดไม่ว่ารูปแบบหรือวิธีการใด ๆ ด้วยกระบวนการทางอิเล็กทรอนิกส์ การถ่ายภาพ การบันทึกหรือวิธีการอื่นใดโดยไม่ได้รับอนุญาต

---

กรณีต้องการสั่งซื้อเป็นจำนวนมาก กรุณาติดต่อ สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
โทรศัพท์: 0 5394 2671-2, 0 5394 2676 โทรสาร: 0 5394 3600  
<http://cmupress.cmu.ac.th>, E-mail: [cmupress.th@gmail.com](mailto:cmupress.th@gmail.com)

# คำนิยม

ตำรา “เทคนิคโรคพืช” ที่ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกวลิน คุณาศักดากุล ได้เรียบเรียงขึ้นนี้ ข้าพเจ้าในฐานะที่เคยเป็นอาจารย์ผู้สอนวิชานี้มาก่อน เห็นว่ามีเนื้อหาที่เป็นประโยชน์ต่อนักศึกษา และผู้ที่ทำงานในสาขาวิชาโรคพืชและสาขาที่เกี่ยวข้องเป็นอย่างมาก เพราะวิชานี้เป็นพื้นฐานของงานวิจัยทั้งทางสาขาวิชาโรคพืชโดยตรง และสาขาอื่น ๆ ในด้านการเกษตร จุลชีววิทยา และเทคโนโลยีชีวภาพด้านพืชและจุลชีพ ตำราเล่มนี้รวบรวมเอาความรู้พื้นฐานที่จำเป็น และเทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ครอบคลุมทั้งวัสดุ อุปกรณ์และวิธีการใช้ ซึ่งช่วยให้ท่านผู้อ่านสามารถนำวิธีการไปประยุกต์ใช้ได้ง่าย เนื่องจากวิธีการเขียน รายละเอียดทุกขั้นตอน ใช้ภาษาที่ง่ายไม่ซับซ้อน นับเป็นตำราที่ดีและมีประโยชน์มากเล่มหนึ่ง

รองศาสตราจารย์ ดร. นุชนาฏ จงเลขา  
ผู้อำนวยการศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง

# คำนิยม

ตำรา “เทคนิคโรคพืช” ฉบับนี้ เป็นตำราที่มีเนื้อหาเฉพาะสาขาที่เกี่ยวข้องทางด้าน  
จุลชีววิทยาและโรคพืช สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งอ้างอิงและเป็นคู่มือสำหรับการปฏิบัติการ  
ทางด้านโรคพืชได้เป็นอย่างดี นอกจากนั้น ผู้เขียนคือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกวลิน  
คุณาศักดากุล ยังได้สอดแทรกประสบการณ์ของตนเองที่ได้จากงานวิจัยและการประยุกต์  
ใช้เทคนิคอื่น ๆ เพื่อการศึกษาทางด้านโรคพืชเอาไว้อย่างเหมาะสม ซึ่งเป็นแนวทางให้ผู้  
สนใจและนำไปใช้ประโยชน์เกิดความคิดริเริ่มอย่างต่อเนื่องในงานของตนได้ จึงนับได้ว่า  
เป็นตำราที่มีคุณค่าต่อการเรียนการสอนในระดับอุดมศึกษาฉบับหนึ่ง

รองศาสตราจารย์ ดร. ไสว บุรณพานิชพันธุ์  
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

# คำนำ

ตำราเทคนิคโรคพิษฉบับนี้ ผู้เขียนได้ปรับปรุงและเรียบเรียงเพิ่มเติมจากเอกสารประกอบการสอนกระบวนวิชา 360301 (เทคนิคทางโรคพิษ) ซึ่งเปิดสอนที่ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพิษ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับนักศึกษาที่เริ่มทำงานวิจัยทางด้านนี้ โดยมีเนื้อหาหลักด้านทฤษฎีและวิธีปฏิบัติในเทคนิคสำคัญทางโรคพิษครบถ้วน ตำราฉบับนี้ได้นำเสนอเนื้อหาตั้งแต่เทคนิคพื้นฐาน วิธีการใช้เครื่องมือจำเป็นที่มีในห้องปฏิบัติการทางโรคพิษ การฆ่าเชื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ รวมถึงอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการที่เหมาะสมในแต่ละกรณี การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคพิษแต่ละชนิด ตลอดจนปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อ เทคนิคการเก็บและการแยกเชื้อบริสุทธิ์ เทคนิคการปลูกเชื้อ การเก็บรักษาเชื้อสาเหตุเพื่อใช้ในการทดลองได้อย่างต่อเนื่องโดยเชื้อไม่สูญเสียความสามารถในการทำให้เกิดโรค เป็นต้น ซึ่งเทคนิคต่าง ๆ ดังกล่าว อาจมีการพัฒนา ดัดแปลงให้เหมาะสมตามชนิดของงาน และสถานการณ์จำเป็นที่อาจเกิดขึ้นได้ตลอดเวลา นอกจากนั้นยังได้รวบรวมตัวอย่างและวิธีการที่ใช้ในการศึกษาเชื้อสาเหตุโรคพิษสำคัญบางชนิด รวมทั้งภาพประกอบการอธิบายตามความเหมาะสมในแต่ละบทไว้ด้วย ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ตำราเทคนิคโรคพิษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ ให้ความรู้ความเข้าใจพื้นฐานเทคนิคทางโรคพิษแก่ผู้ที่ต้องการศึกษางานด้านโรคพิษโดยตรงหรือการศึกษาในงานที่เกี่ยวข้องได้ไม่มากนักน้อย โดยเฉพาะนิสิต นักศึกษา ที่จำเป็นต้องหมั่นฝึกฝนปฏิบัติ แก่ไข และปรับปรุงการทำงานในห้องปฏิบัติการทางโรคพิษ หรือทางจุลชีววิทยา เพื่อให้สามารถประยุกต์ใช้เทคนิควิธีการต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งจะเป็นพื้นฐานในการทำงานวิจัยให้ประสบผลสำเร็จ

เกวลิน คุณาศักดากุล

ตุลาคม 2556

# กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไสว บุรณพานิชพันธ์ ที่ให้ความกรุณาอย่างยิ่งในการอ่าน แก้ไข และเสนอแนะในการเตรียมต้นฉบับ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นุชนาฏ จงเสนา และคุณครูที่ผู้เขียนได้มีโอกาสเป็นศิษย์และได้รับการถ่ายทอดวิชาความรู้ด้านเทคนิคโรคพืช ขอขอบคุณในกำลังใจที่มีคุณค่า จากศิษย์ เพื่อนร่วมงาน และครอบครัว ที่ช่วยให้ผู้เขียนสามารถเรียบเรียงและจัดพิมพ์ตำราฉบับนี้เป็นรูปเล่มที่สมบูรณ์ และขอขอบคุณท่านผู้อ่านที่ได้นำตำราฉบับนี้ไปใช้ประโยชน์ตามเจตนาที่ตั้งไว้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้เขียนยินดีรับข้อติชมและชี้แนะเพื่อการแก้ไขปรับปรุงในโอกาสต่อไป

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกวลิน คุณาศักดาคุณ  
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

# สารบัญ

|                                                                         | หน้า      |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>บทที่ 1 บทนำ</b>                                                     | <b>11</b> |
| 1.1 ความสำคัญของโรคพืช                                                  | 11        |
| 1.2 การศึกษาวิจัยด้านโรคพืช                                             | 13        |
| เอกสารอ้างอิง                                                           | 18        |
| <b>บทที่ 2 การทำให้อุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์</b> | <b>19</b> |
| 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        |
| <b>บทที่ 3 การแยกเชื้อสาเหตุโรคพืช</b>                                  | <b>43</b> |
| 3.1 การแยกเชื้อสาเหตุโรคจากดิน                                          | 43        |
| 3.2 การแยกเชื้อจากชิ้นพืชที่เป็นโรค                                     | 50        |
| 3.3 การแยกเชื้อจากเมล็ดพืชที่เป็นโรค                                    | 56        |
| 3.4 การแยกเชื้อbrisuทธิ์                                                | 61        |
| เอกสารอ้างอิง                                                           | 66        |
| <b>บทที่ 4 การเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคพืช</b>                               | <b>67</b> |
| 4.1 องค์ประกอบและการแบ่งกลุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ                           | 67        |
| 4.2 เทคนิคการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ                                     | 72        |
| 4.3 อาหารที่ใช้แยกและเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคพืช                          | 75        |

|                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4 อาหารที่ใช้แยกและเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช          | 79        |
| 4.5 การเลี้ยงเชื้อราเพื่อการปลูกเชื้อ                          | 83        |
| 4.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณส่วนขยายพันธุ์<br>ของเชื้อรา | 85        |
| <b>เอกสารอ้างอิง</b>                                           | <b>89</b> |

|                                                                       |            |
|-----------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>บทที่ 5 การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจสอบภายใต้<br/>กล้องจุลทรรศน์</b> | <b>91</b>  |
| 5.1 การทำความสะอาดแผ่นกระจกสไลด์                                      | 91         |
| 5.2 สารค้ำจุนตัวอย่าง                                                 | 93         |
| 5.3 การเตรียมเนื้อเยื่อพืชเพื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์             | 96         |
| 5.4 การย้อมสีตัวอย่างทางโรคพืช                                        | 105        |
| 5.5 การย้อมสีขึ้นพืชที่เป็นโรค                                        | 108        |
| 5.6 การย้อมสีเชื้อแบคทีเรีย                                           | 111        |
| 5.7 การย้อมสีเชื้อรา                                                  | 112        |
| 5.8 การเลี้ยงเชื้อราบนแผ่นกระจกสไลด์                                  | 113        |
| 5.9 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัยและ<br>เชื้อสาเหตุโรคพืช       | 115        |
| <b>เอกสารอ้างอิง</b>                                                  | <b>118</b> |

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

|                |                                                       |            |
|----------------|-------------------------------------------------------|------------|
| <b>บทที่ 7</b> | <b>การเก็บรักษาเชื้อสาเหตุโรคพิษ</b>                  | <b>143</b> |
| 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            | การเก็บรักษาเชื้อบน glass beads                       | 155        |
| 7.9            | การเก็บรักษาเชื้อปรสิตถาวร                            | 156        |
| 7.10           | การป้องกันไร                                          | 157        |
|                | <b>เอกสารอ้างอิง</b>                                  | <b>159</b> |
| <b>บทที่ 8</b> | <b>การเก็บรักษาตัวอย่างพืชที่เป็นโรค</b>              | <b>161</b> |
| 8.1            | การเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรค                          | 162        |
| 8.2            | การเก็บรักษาตัวอย่างแบบแห้ง                           | 165        |
| 8.3            | การเก็บรักษาตัวอย่างด้วยการดอง                        | 171        |
|                | <b>เอกสารอ้างอิง</b>                                  | <b>174</b> |
| <b>บทที่ 9</b> | <b>การประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช</b> |            |
|                | <b>ด้านโรคพืช</b>                                     | <b>175</b> |
| 9.1            | การเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคพืชร่วมกับเนื้อเยื่อพืช        | 175        |
| 9.2            | การผลิตพืชปลอดโรค                                     | 188        |
| 9.3            | การชักนำให้พืชต้านทานโรค                              | 199        |
|                | <b>เอกสารอ้างอิง</b>                                  | <b>203</b> |
|                | <b>กรณีศึกษาวิชาพฤกษศาสตร์เชื้อสาเหตุโรคพืช</b>       | <b>205</b> |
|                | <b>อภิธานศัพท์เฉพาะทางโรคพืช</b>                      | <b>209</b> |

# 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 (ธวัช, 2551)

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

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



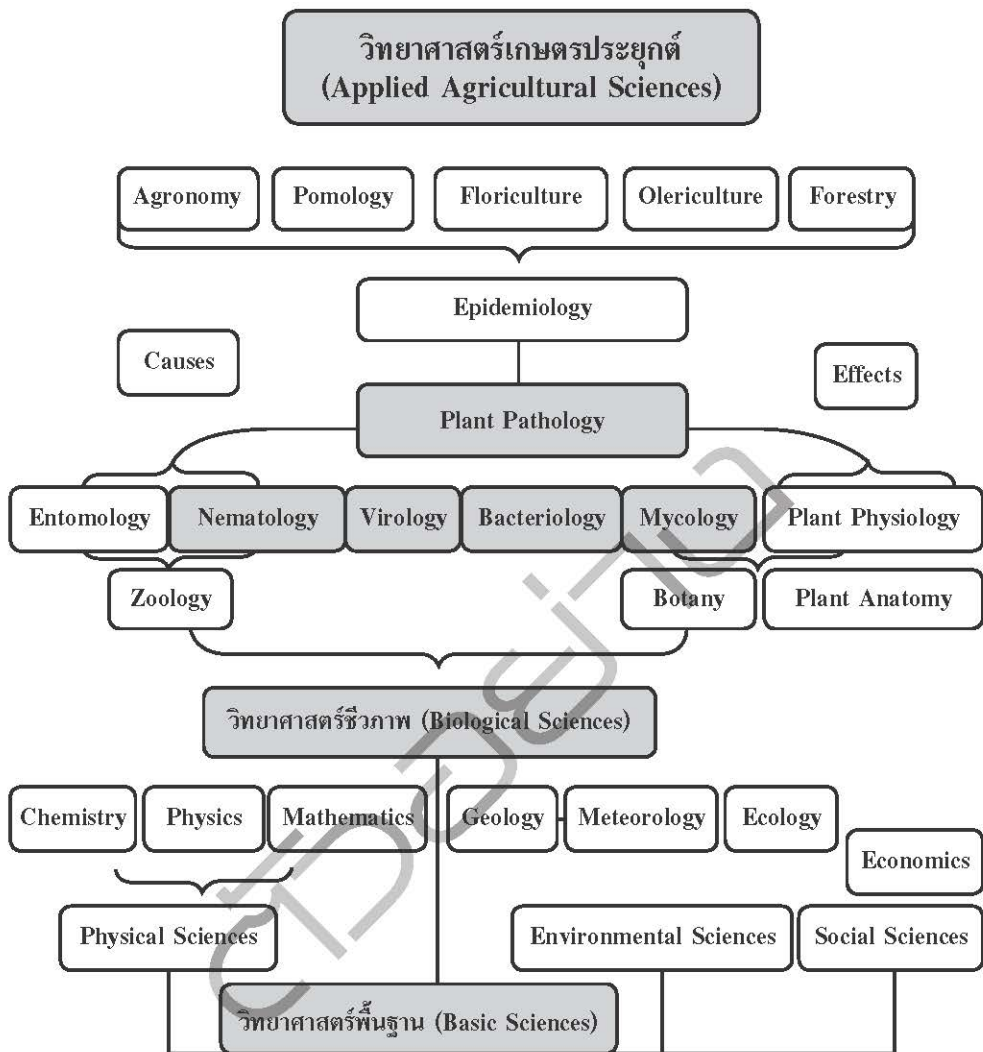
5) การสูญเสียพันธุ์ของพืชที่ตรงตามความต้องการของมนุษย์หากแต่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยเฉพาะในพืชเศรษฐกิจ ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นโดยลำดับ เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิดสามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมและทวีความรุนแรงในการเข้าทำลายพืชได้มากขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้เกิดองค์การที่เข้ามาแก้ปัญหาในอนุรักษ์ความหลากหลายของพืชปลูกเพื่อให้เกิดความยั่งยืนด้านอาหารของมนุษย์ เช่น Global Crop Diversity Trust ซึ่งเป็นองค์กรอิสระระหว่างประเทศที่เกิดจากความร่วมมือระหว่าง 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 การระบาดของโรคนี้นับตั้งแต่ต้นจนถึงกลางศตวรรษที่ 20 ทั่วทั้งทวีปยุโรปและอเมริกาเหนือ ทำให้พืชแสดงอาการขาดน้ำ ใบเหลืองร่วง ต้นโทรม และยืนต้นตายเป็นจำนวนมาก

ดังนั้น การศึกษาวิจัยด้านโรคพืชจึงเป็นสิ่งจำเป็น โดยเฉพาะการศึกษาที่มีวัตถุประสงค์เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช การสร้างพันธุ์พืชต้านทานโรค ตลอดจนการพัฒนาวิธีการบริหารจัดการโรคพืชในระบบการเพาะปลูกพืชที่มีความแตกต่างและหลากหลายมากขึ้น เพื่อให้สามารถตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภค ซึ่งปัจจุบันได้มีการณรงค์ให้ประชาชนมีความตระหนักถึงการบริโภคผลิตภัณฑ์การเกษตรอย่างปลอดภัย หลีกเลี่ยงจากสารพิษที่ตกค้างจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรรวมถึงสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในระบบการผลิตที่ไม่ได้มาตรฐาน ก่อให้มีการสะสมของสารพิษเกินมาตรฐานความปลอดภัย

## 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)

## บทที่ 2

# การทำให้อุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์

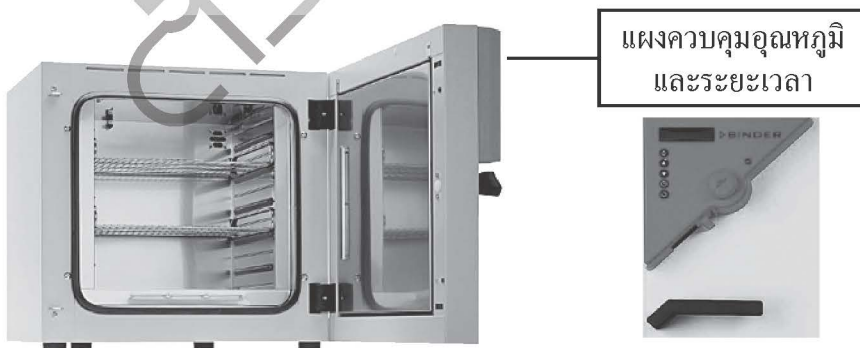
การศึกษาด้านโรคพืช เช่น การแยกเชื้อสาเหตุโรคพืช การจำแนกชนิดของเชื้อ ตลอดจนการเพิ่มปริมาณเชื้อสาเหตุเพื่อเตรียมเป็นส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อเพื่อการปลูกเชื้อ (inoculums) หรือเพื่อการศึกษาสมบัติทั้งทางกายภาพและชีวภาพ จำเป็นอย่างยิ่งที่ผู้ทดลองจะต้องมีความเชี่ยวชาญในเทคนิคการทำให้ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ (aseptic techniques) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้ออื่นที่ไม่ต้องการขณะทำการทดลอง ทั้งนี้วิธีการในการทำให้ปลอดจากเชื่อนั้น 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 ตู้บ่มร้อน 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



**ตารางที่ 2.1** ระดับอุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการอบฆ่าเชื้อด้วยลมร้อน

| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา (นาที) |
|-------------------------|-------------|
| 170                     | 60          |
| 160                     | 120         |
| 150                     | 150         |
| 140                     | 180         |
| 121                     | ข้ามคืน     |

**ที่มา:** นุชนารถ (2540)

การฆ่าเชื้อเครื่องแก้วนั้น ควรเช็ดหยดน้ำออกให้แห้งเสียก่อน เพราะอาจทำให้เครื่องแก้วแตกร้าวได้ สำหรับจานอาหารเลี้ยงเชื้อควรบรรจุลงในกล่องโลหะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นเมื่อภาชนะเย็นลง หรือระหว่างขนย้ายและเก็บ บางกรณีหากไม่มีกล่องโลหะบรรจุอาจใช้การห่อด้วยกระดาษแทนได้ แต่ควรระวังเพราะอาจทำให้เกิดสารพิษตกค้างจากกระดาษ ควรใช้อุณหภูมิต่ำและระยะเวลานานขึ้นแทนการใช้อุณหภูมิสูง อุปกรณ์เครื่องแก้วที่ใช้สำหรับการปรับปริมาตร (calibrated glassware) ไม่ควรนำมาฆ่าเชื้อโดยวิธีนี้ เนื่องจากอาจทำให้อุปกรณ์เกิดความเสียหายและคลาดเคลื่อนได้ นอกจากนั้นอุปกรณ์ที่ประกอบกันเป็นชุด ควรแยกส่วนออกจากกันก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อ ภาชนะบรรจุที่มีจุลกลี พลาสติก หรือจุกยาง ไม่ควรฆ่าเชื้อด้วยวิธีใช้ความร้อนแห้งนี้ หากจำเป็นต้องใช้ควรใช้อุณหภูมิต่ำ และควรเปลี่ยนฝาเป็นฝาโลหะแทน ข้อดีของการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องมือชนิดนี้ นอกจากจะเป็นเครื่องมือที่มีความน่าเชื่อถือสามารถตรวจสอบประสิทธิภาพได้แล้ว การฆ่าเชื้อด้วยลมร้อนจะไม่ทำเครื่องมือที่เป็นโลหะเกิดสนิมหรือสึกกร่อน ใช้งานได้ง่าย และเสียค่าบำรุงรักษาน้อย ส่วนข้อเสียพบว่า มักใช้เวลามากกว่าการทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำและสารเคมี เนื่องจากความร้อนที่เกิดขึ้นจะถูกส่งผ่านอากาศเข้าไปโดยตรงและต้องใช้ระยะเวลานานพอที่จะฆ่าเชื้อได้

## 2.2 การฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ

หม้อนึ่งไอน้ำเป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับการฆ่าเชื้อของเหลวที่ทนความร้อนสูงได้ รวมถึง เครื่องแก้ว อุปกรณ์ที่มียางทนร้อนเป็นส่วนประกอบ โดยมีข้อควรระวังว่า วัตถุที่นำมาฆ่าเชื้อจะต้องไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือเกิดความเสียหายขึ้นภายหลังจากได้รับอุณหภูมิสูง



การฆ่าเชื้อด้วยวิธีนี้จะใช้ความร้อนชื้น (moist heat) หรือไอน้ำเดือด ปัจจุบันมีอุปกรณ์หรือเครื่องมือที่ผู้ใช้สามารถเลือกใช้ได้โดยสะดวก 2 ลักษณะ ได้แก่

### 2.2.1 หม้อนึ่งไอน้ำแบบไม่ใช้ความดัน

หม้อนึ่งไอน้ำแบบไม่ใช้ความดัน เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการฆ่าเชื้อวัสดุด้วยไอน้ำเดือด (sterilization by steam) เหมาะสำหรับการฆ่าเชื้อของเหลว เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ พวกเจลาติน นม และพวกที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ การฆ่าเชื้อโดยวิธีนี้ไม่ทำให้ปริมาตรของของเหลวเปลี่ยนแปลง และไม่ทำให้คาร์โบไฮเดรตสูญเสียคุณสมบัติ อุดมภูมิสูงสุดในการฆ่าเชื้อโดยวิธีนี้นั้นจะเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส และสามารถฆ่าเชื้อได้ดีเมื่อใช้ระยะเวลาในการนึ่งประมาณ 20-40 นาที อย่างไรก็ตาม การนึ่งฆ่าเชื้อด้วยวิธีนี้อาจไม่สามารถทำลายสปอร์ (spore) ซึ่งเป็นส่วนขยายพันธุ์ที่มีผนังหนากว่าเส้นใย (mycelium) ของเชื้อได้หมดในครั้งเดียวและสปอร์ของเชื้อบางชนิดที่สามารถทนต่ออุณหภูมิระดับดังกล่าวได้ ดังนั้น เพื่อให้การฆ่าเชื้อสมบูรณ์มากขึ้น จึงอาจต้องนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำถึง 3 ครั้ง การนึ่งฆ่าเชื้อด้วยวิธีนี้นั้นมักใช้ในงานที่ค่อนข้างเฉพาะ เช่น การนึ่งฆ่าเชื้อก้อนวัสดุที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเห็ดในระดับท้องถิ่น หรือนานที่เกี่ยวกับการผลิตเชื้อจุลินทรีย์ที่นำไปใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น การนึ่งฆ่าเชื้อวัสดุที่จะนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณเชื้อไตรโคเดอร์มา เป็นต้น หม้อนึ่งไอน้ำแบบไม่ใช้ความดันใช้วัสดุอุปกรณ์ราคาถูกและหาง่าย ซึ่งผู้ประกอบการอาจทำขึ้นใช้เอง หรือในปัจจุบันมีผู้ผลิตอุปกรณ์ชนิดนี้จำหน่ายในท้องตลาดบ้างแล้ว มักรู้จักกันในชื่อ ‘หม้อนึ่งลูกทุ่ง’ โดยทั่วไปมักประดิษฐ์หรือประยุกต์จากอุปกรณ์ที่มีราคาไม่สูงนัก เช่น ถังน้ำมัน 200 ลิตร ภายในบรรจุตะแกรงสำหรับวางวัสดุที่ต้องการนึ่งฆ่าเชื้อ โดยเว้นความสูงของตะแกรงล่างสุดประมาณ 8 นิ้ว เหนือระดับน้ำเล็กน้อยจากก้นถัง อาจใช้ ไม้พินหรือก๊าชเป็นเชื้อเพลิงสำหรับต้มน้ำให้เดือดเป็นไอน้ำ ปัจจุบันมีการพัฒนาติดตั้งอุปกรณ์วัดระดับความดันและวาล์วควบคุมความดันไอน้ำภายในหม้อนึ่งไว้ที่ฝา แต่เป็นความดันระดับต่ำ ประมาณ 8 ปอนด์/ตารางนิ้ว ใช้เวลาในการนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 2 ชั่วโมง

### 2.2.2 หม้อนึ่งไอน้ำแบบใช้ความดัน

หม้อนึ่งไอน้ำแบบใช้ความดัน (autoclave) เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการฆ่าเชื้อวัสดุด้วยไอน้ำเดือดแบบใช้ความดัน (sterilization by steam under pressure) เครื่องมือที่ใช้มีจำหน่ายทั้งแบบอัตโนมัติควบคุมด้วยไฟฟ้า (ภาพที่ 2.2) และแบบใช้ก๊าชแบบอัตโนมัติแม้มีราคาค่อนข้างสูงแต่เป็นที่นิยมมากกว่าเนื่องจากสามารถใช้งานได้โดยสะดวกและรวดเร็ว การฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำแบบใช้ความดันนี้จะไม่เหมาะสมกับการฆ่าเชื้อภาชนะหรือวัตถุที่สลายหรือเสียหายได้ง่ายเมื่อมีความชื้นหรืออุณหภูมิสูง มีข้อได้เปรียบกว่าการใช้ตู้อบลมร้อนตรงที่สามารถใช้อุณหภูมิที่สูงและระยะเวลาที่สั้นกว่า



ภาพที่ 2.2 หม้อนึ่งไอน้ำแบบใช้ความดัน (autoclave) ใช้ไฟฟ้าควบคุมความดัน อุณหภูมิ และระยะเวลาแบบอัตโนมัติ

วิธีที่ปฏิบัติกันโดยทั่วไปในการใช้หม้อนึ่งไอน้ำแบบใช้ความดัน จะใช้อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หรือ 115 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว และ 9.5 ปอนด์/ตารางนิ้ว ตามลำดับ ทั้งนี้สามารถปรับระยะเวลา และอุณหภูมิของการใช้งานตามวัตถุหรือสิ่งของที่นำมาฆ่าเชื้อได้ตามความเหมาะสม โดยระวังไม่ให้ปริมาณของวัตถุที่นำมาฆ่าเชื้อมีมากกว่า 2 ใน 3 ของปริมาตรความจุของ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ สำหรับระยะเวลาในการฆ่าเชื้ออาจเพิ่มหรือลดลงได้ในช่วง 12-25 นาที ทั้งนี้ขึ้นกับขนาดของภาชนะและปริมาณของของเหลวที่บรรจุในภาชนะนั้น และหากวัสดุ ที่ต้องการฆ่าเชื้อทนร้อนได้ไม่ดีนักอาจลดระยะเวลาในการฆ่าเชื้อลงได้ ดังตารางที่ 2.2 สำหรับ น้ำมัน เมล็ดพืช และแป้ง อาจแยกบรรจุในภาชนะขนาดเล็กและใช้เวลาในการ ฆ่าเชื้อที่นานขึ้น

# บทที่ 3

## การแยกเชื้อสาเหตุโรคพืช

การแยกเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยทั่วไป มักมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อการวินิจฉัย หรือเพื่อยืนยันสาเหตุเบื้องต้นของการเป็นโรคของพืช ว่าเกิดจากปัจจัยของเชื้อสาเหตุหรือปัจจัยทางกายภาพ ในบางกรณี อาการของโรคที่แสดงจะเป็นตัวบ่งบอกถึงสาเหตุของโรคได้ ในทางกลับกัน โรคบางชนิดอาจไม่สามารถตอบได้ถึงเชื้อสาเหตุในทันที ในกรณีของโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ เช่น เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และไส้เดือนฝอย ส่วนใหญ่จะพบว่าเชื้อสาเหตุนั้นอยู่ในบริเวณผิวพืชที่เป็นโรค หรืออาศัยอยู่ภายในส่วนต่าง ๆ ของพืชที่เป็นโรค หรือในดินที่ปลูกพืชนั้น ๆ ในปัจจุบันแม้จะมีวิธีการทางด้านชีวโมเลกุลเข้ามามีบทบาทในการตรวจวิเคราะห์ทางโรคพืชอย่างกว้างขวาง แต่ก็ยังมีข้อจำกัดในหลายส่วน อย่างไรก็ดี การแยกเชื้อยังเป็นวิธีการที่จำเป็นต้องกระทำการพิสูจน์เพื่อให้ทราบสาเหตุที่แท้จริงของโรค เพื่อประโยชน์หลักในแง่ของการป้องกันกำจัด นอกจากนี้ยังสามารถใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ได้ เช่น การศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อ ระบาดวิทยา การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุกับพืชอาศัย เป็นต้น สำหรับวิธีการแยกเชื่อนั้นมีด้วยกันหลายวิธีขึ้นกับชนิดของเชื้อและวัตถุประสงค์ของงานเป็นหลัก

### 3.1 การแยกเชื้อสาเหตุโรคจากดิน

#### 3.1.1 การแยกเชื้อโดยใช้เหยื่อล่อ

การแยกเชื้อโดยวิธีใช้เหยื่อล่อ (baiting technique) เป็นวิธีการที่มักนำมาใช้สำหรับแยกเชื้อบางชนิด กลุ่มของเชื้อรา และกลุ่มของเชื้อแบคทีเรีย ที่อาจเจริญได้บนเหยื่อล่อโดยไม่มีสิ่งอื่นปะปน หรือการปลูกพืชที่อ่อนแอลงไปในดินก็เป็นวิธีหนึ่งในการใช้เหยื่อล่อเชื้อที่อยู่ในดินด้วยเช่นกัน การเลือกเหยื่อล่อและวิธีการทดลองนั้นทำได้หลายลักษณะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อที่ต้องการแยกเป็นหลัก เช่น หากต้องการแยกเชื้อรา

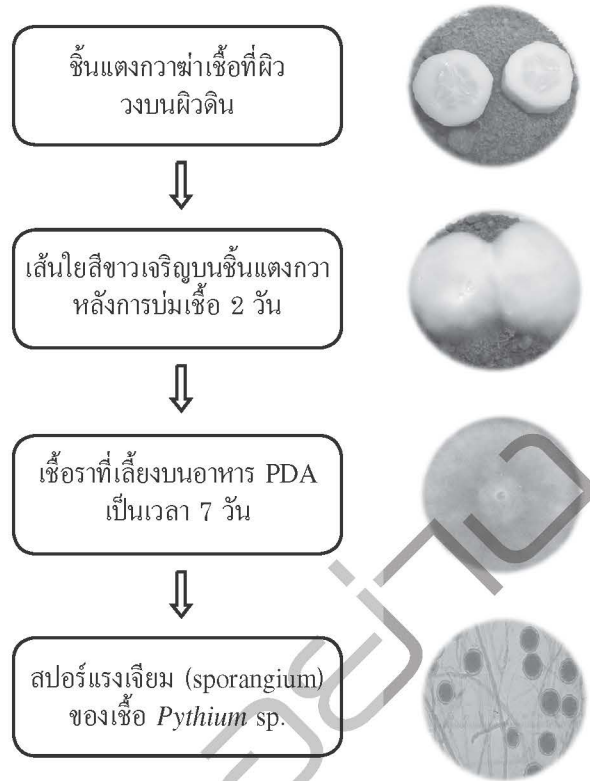


จากตัวอย่างดิน อาจใช้ชิ้นแตงกวา มันฝรั่ง แครอท หรือ แอปเปิล เป็นเหยื่อล่อ เช่น หากต้องการ แยกเชื้อสาเหตุโรคจากดินปลูกมะเขือเทศที่เกิดการระบาดของโรคเหี่ยว สามารถทำได้โดยการผสมตัวอย่างดินต้องการแยกเชื้อมาดำเนินการตามลำดับ ดังนี้

1. นำดินที่ได้มา 500 กรัม ใส่ในกล่องพลาสติก ขนาด 28x18x10 เซนติเมตร ที่เช็ดทำความสะอาด ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ พรหมน้ำให้ดินมีความชื้นพอประมาณ

2. นำชิ้นส่วนของพืช เช่น ผลแตงกวา หัวมันฝรั่ง หรือ แครอท มาฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที (สามารถปรับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ให้น้อยลง หรืออาจยืดระยะเวลาการฆ่าเชื้อออกไป โดยพิจารณาลักษณะเนื้อเยื่อและขนาดของชิ้นส่วนของพืช) ล้างชิ้นพืชด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง

3. ตัดชิ้นพืชให้เป็นแว่น หนาประมาณ 1 เซนติเมตร นำไปวางบนดิน และกดชิ้นพืชให้จมลึกลงไปประมาณ 0.5 เซนติเมตร ปิดฝากล่อง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-3 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อบนชิ้นพืช โดยเฉพาะเชื้อที่มีการเจริญในระยะแรก (ภาพที่ 3.1) ควรย้ายเชื้อที่ได้ไปเลี้ยงในอาหาร PDA ทันที จากนั้นจึงค่อยนำมาตรวจสอบชนิดของเชื้อที่แยกได้ ไม่ควรบ่มเชื้อไว้นานจนเกินไป หรือหากสังเกตพบว่าชิ้นพืชที่ให้เหยื่อล่อนั้นเกิดเน่าเสียหายแล้ว ไม่ควรแยกเชื้อจากชิ้นพืชที่ใช้เป็นเหยื่อล่ออีกต่อไปเนื่องจากอาจเกิดการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ๆ ที่ไม่ใช่เชื้อสาเหตุที่ต้องการ



ภาพที่ 3.1 การแยกเชื้อจากดินโดยใช้แตงกวาล่อเชื้อจากดินปลูกมะเขือเทศที่เป็นโรคเหี่ยว

นอกจากการใช้ชิ้นพืช เช่น แตงกวา มันฝรั่ง แครอท หรือ แอปเปิล เป็นเหยื่อล่อ ดึงกล้าข้างต้นแล้ว บางกรณีอาจใช้เมล็ดพืชเป็นเหยื่อล่อแทนได้ เช่น เลขา และคณะ (2544) ใช้เมล็ดข้าวที่นึ่งฆ่าเชื้อมาวางบนตัวอย่างดินในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ก่อนนำเมล็ดข้าวมาล้างด้วยน้ำไหลเป็นเวลา 30 นาที และนำไปฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแยกเชื้อโดยการวางบน water agar บ่มเชื้อ ไว้เป็นเวลา 3-5 วัน สามารถแยกเชื้อจากเมล็ดข้าวได้ 5 ชนิดได้แก่ *Curvularia eragrostidis*, *C. lunata*, *Curvularia* sp., *Drechslera hawaiiensis* และ *D. oryzae*

ในการแยกเชื้อ *Bipolaris nodulosa* จากดินด้วยวิธีการใช้เหยื่อล่อ โดยเหยื่อที่ ใช้อาจเป็นต้นกล้าพืชที่อ่อนแอต่อเชื้อ ได้แก่ *Eleusine coracana* โดยตัดต้นกล้าอายุ ประมาณ 60 วัน ให้มีความยาว 10 เซนติเมตร จากยอด นำมาล้างฆ่าเชื้อที่ผิวโดยใช้ 0.01 HgCl<sub>2</sub> ที่ผสม streptomycin 250 ppm เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปฝังในดิน



ที่ต้องการแยกเชื้อให้ลึก 1 เซนติเมตร ในกล่องที่มีความชื้น เก็บไว้เป็นเวลา 6 วัน แล้วย้ายต้นกล้าออกมาตรวจดูแผลที่เกิดขึ้น หรือหากต้องการแยกเชื้อ *B. oryzae* ก็อาจใช้วิธีเดียวกันนี้เพียงแต่เปลี่ยนเหยื่อล่อมาเป็นต้นกล้าของข้าวพันธุ์อ่อนแอที่อยู่ในระยะน้ำนม (milky stage) บ่มเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (Dhingra and Sinclair, 1995)

การแยกเชื้อ *Phytophthora* spp. นิยมใช้เหยื่อล่อร่วมกับการใช้ selective media ในการแยกเชื้อราสกุลนี้เช่นเดียวกับเชื้อ *Fusarium* spp. แต่ดินที่นำมาแยกนั้นจะต้องเก็บให้มีความชื้นและเย็น การใช้เหยื่อล่ออาจใช้ผลแอปเปิลเจาะรู นำดินที่ต้องการแยกเชื้อบรรจุลงไป ปิดทับด้วยเทป บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 5-10 วัน เชื้อจะทำให้เนื้อแอปเปิลยุบตัวลง วิธีการนี้อาจประยุกต์โดยวิธีการเจาะรูที่ผลแอปเปิลอีกด้านเพื่อใช้เป็นช่องสำหรับเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเพื่อเพิ่มความชื้น เมื่อต้องการแยกเชื้อให้นำเนื้อเยื่อของแอปเปิลที่อยู่ลึกเข้ามานำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งอาจใช้ maize meal agar ก็ได้ เหยื่อล่อที่ใช้อาจเปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของเชื้อ Dhingra and Sinclair (1995) แนะนำเหยื่อล่อเชื้อไว้ดังนี้

- สับปะรด สามารถใช้ล่อเชื้อ *P. boehmeriae*, *P. cinnamomi*, *P. nicotiana* var. *parasitica* และ *P. palmivora*
- ต้นกล้าทานตะวัน สามารถใช้ล่อเชื้อ *P. cactorum*
- รากสตอเบอรี่ สามารถใช้ล่อเชื้อ *P. fragariae*
- ชีนมันฝรั่ง สามารถใช้ล่อเชื้อ *P. infestans*
- ผลแตงกวา สามารถใช้ล่อเชื้อ *Phytophthora* sp. และ *Pythium* sp.

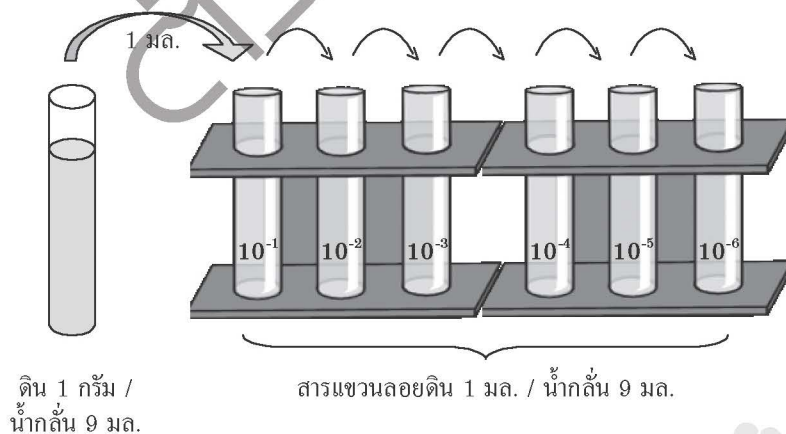
### 3.1.2 การแยกเชื้อจากดินโดยตรง

การแยกเชื้อจากดินโดยตรง (direct soil plating) วิธีการนี้มักใช้กับเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์หรือสร้างเฉพาะเส้นใยในดิน ซึ่งส่วนใหญ่ไม่สามารถแยกได้ง่ายโดยวิธีการแยกเชื้อจากการเตรียมสารแขวนลอยดินเจือจาง (soil dilution plating) เช่นเชื้อในสกุล *Dictyostelium*, *Mortierella*, *Pythium* และ Basidiomycotina หลายชนิด (Warcup, 1950) โดยการนำดินที่ต้องการแยกเชื้อมาใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5-15 มิลลิกรัม จากนั้นจึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ cool molten agar 10-15 มิลลิลิตรลงไป เหยี่ยานแก้วหรือใช้ช้อนตักสารขนาดเล็กเกลี่ยให้ดินกระจายให้ทั่ว หากดินที่นำมาใช้จับตัวกันแน่นควรกดให้แตกละเอียดเสียก่อน หรือหากเป็นดินเหนียวอาจเติมหยดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไปบ้างเล็กน้อยเพื่อให้ดินกระจายได้ดีขึ้น หรือหากดินนั้นมีจำนวนเชื้อมาก อาจเจือจางได้โดยใช้ทรายหรือดินนึ่งฆ่าเชื้อผสมลงไปในอัตราส่วนที่แน่นอน



### 3.1.3 การแยกเชื้อจากสารแขวนลอยดินเจือจาง

การแยกเชื้อจากสารแขวนลอยดินเจือจาง (soil dilution plating) เป็นวิธีที่สามารถใช้ในการแยกเชื้อในดินหลายกลุ่ม เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และ Actinomycotina แต่นิยมให้แยกในกลุ่มของเชื้อราเป็นส่วนใหญ่เนื่องจากเชื้อราสามารถสร้างสปอร์ได้จำนวนมาก และมีสมาชิกในกลุ่มค่อนข้างมาก ทำให้กระจายในดินได้ทั่วไป จึงง่ายต่อการแยกกว่าเชื้ออื่น ๆ (Barron, 1968) สำหรับวิธีการแยกเชื้อโดยวิธีนี้ทำได้โดยเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืช โดยการขุดให้ลึกประมาณ 6 นิ้ว จากผิวน้ำดิน สุ่มเก็บดินหลาย ๆ จุดให้ทั่วแปลงปลูกพืช แล้วจึงนำมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน น้ำหนักรวมของดินที่ใช้ไม่ควรน้อยกว่า 1 กิโลกรัม และเก็บตัวอย่างดินที่ได้ในสภาพชื้นตลอดเวลา จากนั้น สุ่มดินตัวอย่างที่ต้องการแยกเชื้อมา 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร (หรือ ชั่งดิน 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร) เขย่าให้ดินกระจายตัว 20-30 นาที (อาจใช้เครื่องเขย่า, magnetic stirrer หรือ blender กรณีของการใช้ blender จะช่วยในการแยกเชื้อราที่มีการสร้างสปอร์ในจำนวนน้อยได้ดีกว่าเครื่องมือสองชนิดแรก) วางทิ้งไว้ 10 นาที ใช้ micro pipette ดูดสารแขวนลอยดินมา 1 มิลลิลิตร นำไปเจือจางโดยการใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที แล้วเจือจางต่อไปแบบเดิมให้ได้ระดับความเข้มข้น  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  และ  $10^{-6}$  (ภาพที่ 3.2)



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการทำ serial dilutions

# บทที่ 4

## การเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคพืช

ความหมายโดยทั่วไปของการเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคพืช หมายถึง การเพิ่มปริมาณส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อวัตถุประสงค์อย่างใดอย่างหนึ่ง ซึ่งนับเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่องานทดลองหรือการศึกษาวิจัย ที่จำเป็นต้องนำส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อที่ได้ไปใช้ให้ตรงตามวัตถุประสงค์ ดังนั้น ในการเลี้ยงเชื้อ จึงต้องคำนึงถึงองค์ประกอบของอาหาร ตลอดจนเทคนิควิธีการเลี้ยง เพื่อให้ได้เชื้อตรงตามที่ต้องการทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ เช่น การทดลองที่จำเป็นต้องใช้เชื้อสาเหตุโรคพืชเพื่อการปลูกเชื้อ เชื้อที่ได้จากกระบวนการเลี้ยงเชื่อนั้น ต้องมีปริมาณมากเพียงพอ และต้องมีคุณสมบัติในการก่อให้เกิดโรคได้เป็นสำคัญ ปัจจุบัน มีผู้เสนอแนวทาง เทคนิค และวิธีการเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคพืชไว้มากมาย โดยเฉพาะการเลี้ยงเชื้อในกลุ่มของเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากเชื้อทั้ง 2 กลุ่มนี้ มีสมาชิกที่สามารถเจริญได้บนอาหารสังเคราะห์จำนวนมาก อย่างไรก็ตาม และเป็นที่ยอมรับกันว่า ไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใดที่สามารถนำมาใช้เลี้ยงเชื้อได้ทุกชนิด จำเป็นต้องพัฒนาและปรับปรุงเพื่อให้เหมาะสมกับการเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิดและให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ

### 4.1 องค์ประกอบและการแบ่งกลุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 4.1.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ หมายถึงวัสดุใดก็ตามที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต โดยทั่วไป ในการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อสาเหตุโรคพืช เมื่อแยกได้เชื้อบริสุทธิ์แล้ว ก่อนจะนำไปศึกษาตามวัตถุประสงค์ต่าง ๆ จะต้องนำมาเพิ่มปริมาณก่อนเสมอ ดังนั้น ที่ผู้ศึกษาทดลองจึงต้องค้นคว้า ศึกษาข้อมูล ข้อเสนอแนะที่เฉพาะเจาะจงต่อการเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ตนสนใจอย่างละเอียดรอบคอบก่อนด้วยเสมอ โดยทั่วไป อาหารเลี้ยงเชื้อจะประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน และคาร์บอน ส่วนแร่ธาตุอื่น ๆ เช่น



โซเดียม โปแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก ลังกาสี ทองแดง ฟอสฟอรัส และ โคบอล มีความจำเป็นต่อการเจริญของเชื้อแต่ละชนิดในปริมาณความเข้มข้นที่ต่างกันไป สำหรับวิตามินที่เหมาะสมต่อการเจริญได้แก่ วิตามินบีรวม ซึ่งมักได้จาก yeast extract หรือ peptone เป็นต้น สำหรับน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน มีหลายชนิด เช่น การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเรามักใช้น้ำตาลกลูโคส (glucose) ฟรุคโตส (fructose) หรือ แมนโนส (mannose) ซึ่งหากสูตรอาหารที่เตรียมมีส่วนประกอบของวัตถุดิบที่ได้จากพืช ก็มักมีน้ำตาลเหล่านี้เป็นองค์ประกอบอยู่แล้ว สำหรับน้ำตาลทราย (table sugar) มีการนำมาใช้บ้างในบางสูตรอาหาร นอกจากนั้น ควรปรับระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารให้เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อด้วย โดยทั่วไปเชื้อรามักเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 5.5-6.0 ส่วนแบคทีเรียจะเจริญได้ดีในอาหารที่ค่อนข้างเป็นกลาง หรือมีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7.0-7.2 ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนมาก มักมีสารที่มีคุณสมบัติที่เป็นบัฟเฟอร์ผสมอยู่ด้วย เช่น เกลือของกรดอ่อน ได้แก่ เกลือของฟอสเฟตหรือคาร์บอเนต หรือสารพวกเปปโตน และกรดอะมิโนต่าง ๆ ซึ่งจะช่วยรักษาระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารไม่ให้เปลี่ยนแปลงไปมากนักขณะที่เชื้อมีการเจริญ และผลิตสารต่าง ๆ ที่อาจมีความเป็นกรดเกิดขึ้น สำหรับการถ่ายเทหรือการแลกเปลี่ยนอากาศภายในภาชนะบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อกับอากาศภายนอก เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณภาพของการเจริญของเชื้อด้วยเช่นกัน เชื้อทั่วไปมักต้องการออกซิเจนและความชื้นในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการ โดยทั่วไปการเลี้ยงเชื้อบนอาหารชนิดแข็ง มักไม่ประสบปัญหาเกี่ยวกับปริมาณออกซิเจน และการถ่ายเทอากาศ อย่างไรก็ตาม ควรเลือกใช้ภาชนะบรรจุอาหารที่มีการระบายอากาศได้ดี หากเชื้อที่เลี้ยงมีการสะสมของ ก๊าซแอมโมเนีย หรือคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะไปมีผลยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราได้ แต่สำหรับการเลี้ยงเชื้อในอาหารชนิดเหลว จำเป็นต้องวางภาชนะเลี้ยงเชื้อไว้บน เครื่องเขย่าหรืออาจเติมอากาศลงไปขณะเลี้ยงเชื้อ

#### 4.1.2 การแบ่งกลุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ

การแบ่งกลุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคพิษ สามารถจัดแบ่งหลายแบบ เช่น แบ่งตามองค์ประกอบของอาหาร แบ่งตามวัตถุประสงค์ของการใช้อาหาร และแบ่งตามเชื้อสาเหตุที่ต้องการเลี้ยง

1. การแบ่งตามองค์ประกอบของอาหาร สามารถแบ่งได้ ดังนี้

- Synthetic media หรือ อาหารสังเคราะห์ หมายถึงอาหารที่ทราบส่วนประกอบทางเคมีที่แน่นอน เช่น Czapek's medium, glucose medium เป็นต้น



- Non-synthetic media หมายถึงอาหารที่ไม่ทราบองค์ประกอบทางเคมีที่แน่นอน เช่นอาจมีส่วนผสมบางอย่างที่ได้จากธรรมชาติจากพืชหรือสัตว์ เช่น yeast extract, beef extract หรือ corn meal ผสมอยู่ อาจแบ่งอาหารประเภทนี้ออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ 1) Natural media คืออาหารที่ใช้ชิ้นส่วนของพืชโดยตรง ไม่ดัดแปลงเพิ่มเติมสารเคมีใด ๆ ลงไป อาจเตรียมโดยใช้เมล็ดธัญพืช ได้แก่ ข้าว ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต หรือ อาหาร corn meal agar และ อาหาร oat meal agar บางกรณีอาจใช้ชิ้นผักหรือผลไม้ ได้แก่ แตงกวา แครอท มันฝรั่ง หรือ แอปเปิล เป็นต้น และ 2) Semi-synthetic media คืออาหารที่ประกอบด้วยสารเคมีที่ทราบองค์ประกอบแน่นอนผสมกับสารอื่นที่ไม่สามารถระบุองค์ประกอบได้แน่ชัด เช่นการใช้ส่วนผสมที่ได้จากส่วนของพืชหรือสัตว์ เช่น อาหาร PDA (potato dextrose agar) อาหาร NA (nutrient agar) เป็นต้น

### 2. แบ่งตามวัตถุประสงค์หรือลักษณะการใช้งาน ได้แก่

- General media คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้เลี้ยงเชื้อทั่ว ๆ ไป เช่น อาหาร PDA ใช้เลี้ยงเชื้อราได้เกือบทุกชนิด อาหาร NA ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่ว ๆ ไปได้ general media นี้มักเป็นอาหารประเภท non-synthetic media แต่บางครั้งอาหาร PDA หรือ NA อาจไม่เพียงพอ จึงจำเป็นจะต้องเพิ่มเติมสารอาหารหรืออาจต้องเปลี่ยนไปใช้อาหารสูตรอื่น ๆ แทน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการศึกษาในแต่ละการทดลอง

- Selective media คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารบางอย่างลงไป หรือเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ไม่ต้องการ เช่นการเติม crystal violet ลงไป 0.003 เปอร์เซ็นต์ จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก เป็นต้น

- Minimal media คืออาหารที่มีส่วนประกอบของสารในปริมาณน้อยเฉพาะที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อบางชนิด

- Differential media หมายถึงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารเคมีบางชนิดลงไปเพื่อช่วยให้เชื้อที่ต้องการเจริญอย่างรวดเร็ว และหรือมีลักษณะเชื้อที่แตกต่าง แยกไปจากเชื้ออื่น

3. การแบ่งตามชนิดของเชื้อที่ต้องการเลี้ยง วิธีการนี้ นับเป็นการแบ่งกลุ่มที่ค่อนข้างเฉพาะเจาะจง และมีผู้นิยมรวบรวมสูตรอาหารที่ใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคพืชไว้มากมาย เช่น Tuite (1969) ได้รวบรวมกลุ่มของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ไว้มากกลุ่ม ได้แก่



### อาหารสำหรับแยกและเลี้ยงเชื้อราจากดินและน้ำ

- Alcohol agar (*Verticillium*)
- Cellulose asparagine medium
- Carrot disc
- Corn meal agar
- Corn meal PPP (*Phytophthora* และ *Pythium*)
- Dextrose peptone yeast agar
- Glucose nitrate agar
- Hay infusion agar
- Malachite green-Captan medium (*Fusarium*)
- Milk agar (nematode trapping fungi)
- Sea water agar
- Sea water glucose medium
- Sea water glucose peptone medium
- Soil extract isolation agar (*Verticillium dahliae*, *V. alboatrum*)
- V-8 juice medium

### อาหารสำหรับแยกและเลี้ยงเชื้อราจากชิ้นพืชที่เป็นโรค

- Alcohol agar
- Botran-isolation medium (*Aspergillus flavus*)
- Corn meal agar
- Czapek solution agar
- Czapek-dox agar
- Malt agar
- Malt salt agar (storage fungi)
- Potato dextrose agar
- Tomato juice salt agar (storage fungi)
- Water agar



### อาหารสำหรับการกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อรา

- Alfalfa seed decoction agar (*Alternaria brassicae*)
- Apple infusion agar (*Venturia inaequalis*)
- Bean agar (*Phytophthora cactorum*)
- Bean pod agar
- Carrot agar (*Pythium* spp.)
- Charcoal water (*Phytophthora parasitica*)
- Chickpea sucrose (*Phytophthora infestans*)
- Corn meal agar
- Dung agar
- Dung oatmeal agar
- Oat meal agar (*Phytophthora*)
- Potato carrot agar
- Potato dextrose agar
- Prune agar
- Rice polish agar (*Pyricularia oryzae*, *Helminthosporium oryzae*)

### อาหารสำหรับแยกและเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

- Beef peptone agar (nutrient agar)
- Carrot disc (*Agrobacterium tumefaciens*)
- Desoxycholate agar
- Diet food agar
- Elliott agar
- Fluorescein medium (King agar)
- Peptone water
- Potato dextrose agar
- Soil extract agar
- Tetrazolium medium (*Ralstonia solanacearum*)
- Tryptone glucose yeast
- Yeast extract medium

# บทที่ 6

## การปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืช

การปลูกเชื้อเป็นขั้นตอนสำคัญในการศึกษาทางโรคพืช โดยเฉพาะในงานที่จำเป็นต้องทำให้พืชเกิดโรค เช่น การวินิจฉัยสาเหตุที่แท้จริงของโรค การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุ การศึกษากลไกการป้องกันตัวเองของพืช การคัดเลือกพันธุ์พืชเพื่อให้ต้านทานโรค การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืช รวมถึงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุและพืชอาศัย เป็นต้น ในการปลูกเชื้อเพื่อนำไปสู่การศึกษาด้านต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นนั้น ผู้ทดลองสามารถเลือกใช้เทคนิคหรือวิธีการในการปลูกเชื้อได้หลากหลายและแตกต่างกันออกไป ขึ้นกับชนิดของเชื้อสาเหตุ ชนิดและชิ้นส่วนของพืชอาศัย และวัตถุประสงค์ของการศึกษา อย่างไรก็ตามในแต่ละครั้งของการปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืชมีหลักทั่วไปในการปลูกเชื้อที่ผู้ปฏิบัติจำเป็นต้องคำนึงเสมอเพื่อให้สามารถดำเนินงานได้อย่างถูกต้องและส่งผลให้สามารถบรรลุวัตถุประสงค์ในการปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่ง Tuite (1969) ได้สรุปไว้ดังต่อไปนี้

1. เชื้อสาเหตุโรคพืชที่นำมาใช้ในการปลูกเชื้อ ต้องมีความบริสุทธิ์ไม่ปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น
2. ความเข้มข้นของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่นำมาใช้ต้องมีปริมาณมากเพียงพอต่อการทำให้เกิดโรค
3. พืชอาศัยที่นำมาใช้ในการปลูกเชื้อต้องมีความสม่ำเสมอและเหมาะสมทั้งอายุและระยะการเจริญเติบโตต่อการปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิด
4. สภาพแวดล้อมทั้งก่อนและหลังการปลูกเชื้อต้องมีความเหมาะสมต่อการเข้าทำลายและการก่อให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุโรคพืช



## 6.1 ความบริสุทธิ์ของเชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้าง

ความบริสุทธิ์ของเชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้าง เป็นปัจจัยแรกที่มีความสำคัญต่อการเตรียมส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้างเพื่อการปลูกเชื้อ (inoculums) ในการเตรียมเชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้างให้ได้เชื้อบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียว (pure culture) ไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น มีข้อสังเกตแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเชื้อ ซึ่งได้ดัดแปลงมาจาก นุชนารถ (2540) มีดังต่อไปนี้

1. การเตรียม inoculums ของเชื้อรา ควรเลี้ยงเชื้อในอาหารและสภาพแวดล้อมที่ชักนำให้เกิดการสร้างสปอร์ในระยะเวลาอันรวดเร็ว และเตรียมให้ได้เชื้อที่มีอายุใกล้เคียงกัน เลือกใช้เฉพาะเชื้อที่มีอายุน้อยและแข็งแรง ไม่ควรนำเชื้อที่เลี้ยงไว้นานแล้วมาใช้ และควรหมั่นสังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อขณะเลี้ยง หากมีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น จะสังเกตได้จากการเจริญของโคโลนีของเชื้อมักบิดเบี้ยว ไม่สม่ำเสมอ และมีสีเปลี่ยนไป

2. การเตรียม inoculums ของเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่มักเตรียมในลักษณะของเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเลี้ยงเพิ่มปริมาณจากโคโลนีเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เมื่อต้องการเตรียม ควรเลี้ยงเชื้อใหม่ทุกครั้ง และใช้เชื้อที่มีอายุน้อย โดยทั่วไปหากเตรียมเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจะใช้เชื้อที่มีอายุประมาณ 3 ชั่วโมง และไม่ควรใช้เชื้อที่เลี้ยงเป็นเวลามากกว่า 48 ชั่วโมง กรณีเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวจะตรวจสอบการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียอื่นได้ค่อนข้างยาก ส่วนใหญ่จึงมักสังเกตจากการเปรียบเทียบความสม่ำเสมอในการเจริญ เช่น การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ และอัตราการเจริญของเชื้อที่เลี้ยงหลาย ๆ ซ้ำ

3. การเตรียมเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ ทั่วไปอนุโลมให้ใช้เชื้อจากจุดแผลเดียวแทนการใช้อนุภาคเดียวของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคราน้ำค้างซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่ายากต่อการปฏิบัติจริง แผลเดียวที่ได้มักเกิดจากการปลูกเชื้อบนพืชอาศัยที่ให้อาการแบบแผลตายเฉพาะแห่ง (local lesion) (Hill, 1984) ของเชื้อไวรัสแต่ละชนิด นำมาเพิ่มปริมาณบนพืชอาศัยที่อ่อนแอ (susceptible host) ซึ่งให้อาการแบบแพร่กระจาย (systemic symptom) และเก็บรวบรวมเชื้อเมื่อพืชแสดงอาการทั่วทั้งต้นแล้ว

4. การเตรียมไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์ มักได้จากการปลูกเชื้อโดยใช้กลุ่มไข่หรือตัวอ่อน ลงบนพืชอาศัยที่ได้จากการเพาะเมล็ดซึ่งปลูกในกระถางที่บรรจุดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อให้มั่นใจได้ว่าจะไม่มีการปนเปื้อนของไส้เดือนฝอยชนิดอื่นที่อาจติดมากับดินที่ใช้ปลูกพืชนั้น

# บทที่ 7

## การเก็บรักษาเชื้อสาเหตุโรคพืช

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ในระดับสากล มีหน่วยงานหลักที่รับผิดชอบโดยตรง ได้แก่ The World Federation for Culture Collections (WFCC) [www.wfcc.info] ซึ่งเป็นหน่วยงานที่มีบทบาทเกี่ยวกับการรวบรวม การรับรอง การเก็บรักษา และการให้บริการสายพันธุ์จุลินทรีย์และข้อมูลที่เกี่ยวข้อง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เกิดการเชื่อมโยงเป็นเครือข่ายของข้อมูลระหว่างหน่วยงานที่มีการเก็บรักษาและรวบรวมจุลินทรีย์ และผู้ที่ใช้ประโยชน์และเพื่อการอนุรักษ์จุลินทรีย์ให้มีชีวิตอยู่ได้อย่างยั่งยืน และได้มีการจัดทำฐานข้อมูลของแหล่งกำเนิดจุลินทรีย์ทั่วโลกไว้ที่ The National Institute of Genetics ในประเทศญี่ปุ่น (Shivas and Beasley, 2005) เช่นเดียวกับประเทศไทย มีศูนย์จุลินทรีย์ (Microbiological Resources Centre) ภายใต้สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เป็นแหล่งกลางในการรวบรวม เก็บรักษา สายพันธุ์จุลินทรีย์ และให้บริการด้านจุลินทรีย์ (Service Culture Collection) จัดตั้งขึ้นโดย UNESCO เมื่อปี พ.ศ. 2519 ให้ทำหน้าที่เป็นศูนย์ฯ ในระดับภาคพื้นเอเชียอาคเนย์ และเป็นศูนย์เครือข่ายระดับโลก (UNESCO World Network of Microbiological Resources Centre - MIRCEN) ดำเนินกิจกรรมงานวิจัยและงานบริการด้านจุลินทรีย์เพื่อการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ทรัพยากรจุลินทรีย์อย่างยั่งยืน นอกจากนั้น ยังมีหน่วยปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์เฉพาะทางอีกหนึ่งแห่ง ที่ได้จัดตั้งขึ้นโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ในปี พ.ศ. 2539

สำหรับการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคพืชโดยตรงนั้น มีหน่วยงานที่ทำหน้าที่รับผิดชอบหลัก ได้แก่ ศูนย์เชื้อพันธุ์จุลินทรีย์โรคพืช (หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช) กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ภายใต้ศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร และเป็นเครือข่ายศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์แห่งประเทศไทย (Thailand Network on Culture Collection - TNCC)



ทำหน้าที่เก็บรวบรวมจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ และข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องไว้เพื่อเป็นหลักฐานอ้างอิงและเพื่อศึกษาวิจัยในด้านต่าง ๆ (กรมวิชาการเกษตร, 2555)

นอกจากนั้น ยังมีหน่วยงานอื่น ๆ ที่มีการเก็บรักษาเชื้อสาเหตุโรคพืชชนิดต่าง ๆ เอาไว้เพื่อใช้งานตามวัตถุประสงค์ข้างต้นด้วยเช่นกัน แต่ก็มีลักษณะการเก็บรักษาที่ไม่ยั่งยืนต่อเนื่อง โดยเฉพาะ หน่วยงานที่มีห้องปฏิบัติการด้านโรคพืชในมหาวิทยาลัย หรือสถาบันต่าง ๆ ซึ่งส่วนใหญ่มักประสบปัญหาด้านการขาดแคลนบุคลากรและงบประมาณในการดูแล เป็นเหตุให้สูญเสียเชื้อสาเหตุโรคพืชชนิดต่าง ๆ ไปเป็นจำนวนมาก

## 7.1 ความสำคัญและประโยชน์

ความสำคัญและประโยชน์ของการเก็บรักษาเชื้อสาเหตุโรคพืช ส่วนใหญ่เป็นการมุ่งหวังที่จะนำเชื้อและตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ไปใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น ใช้ในการศึกษาการระบาดของโรคพืช ลักษณะทางสัณฐานวิทยา นิเวศวิทยา ชีวจักร และวิวัฒนาการของเชื้อสาเหตุโรคพืช และใช้เป็นข้อมูลในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดการระบาดทำความเสียหายให้กับผลิตผลทางการเกษตร นอกจากนี้ ประโยชน์สำคัญอีกประการหนึ่ง ได้แก่ การนำข้อมูลของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่เก็บรักษาไว้ไปใช้ในการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช และตัวอย่างโรคพืชเพื่อใช้ในการอ้างอิง สืบสวน การค้าผลิตผลทางการเกษตรของประเทศ ซึ่งในปัจจุบัน มีหน่วยงานระดับสากลที่ให้ความสำคัญในเรื่องนี้เป็นอย่างมาก

จากเหตุผลที่องค์การการค้าโลก (WTO) ได้ออกมาตรการควบคุมการค้าเสรี เมื่อปี ค.ศ. 1995 เกี่ยวข้องกับมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (SPS Agreement) ทำให้ตลาดการค้าขายผลิตผลทางการเกษตรขยายกว้างขวางขึ้น ขณะเดียวกันประเทศที่พัฒนาแล้วหลายประเทศใช้มาตรการนี้กำหนดให้ประเทศกำลังพัฒนาแสดงรายละเอียดของสุขอนามัยพืช ซึ่งพบว่าประเทศกำลังพัฒนาขาดแคลนข้อมูลด้านแมลงศัตรูพืชและโรคพืช ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการอธิบายสถานภาพศัตรูพืชทางการเกษตรและป่าไม้ ปัญหาที่ตามมาคือองค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization; NPPO) ไม่สามารถจัดทำกรวิเคราะห้ความเสี่ยงศัตรูพืชที่ทันสมัยและได้รับความเชื่อถือได้ ซึ่งจะส่งผลกระทบให้เสียโอกาสในการเจรจาต่อรองการค้าของสินค้าการเกษตรของประเทศตนเอง

อย่างไรก็ดี ประเทศไทยโดยสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ซึ่งเป็นหน่วยงานหลักที่มีหน้าที่ในการเก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช ได้ร่วมจัดทำ “คู่มือการจัดการศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช” ภายใต้การ



สนับสนุนของรัฐบาลประเทศออสเตรเลีย โดย Australian Agency for International Development (AusAID) มีจุดประสงค์เพื่อให้นักวิชาการและผู้ที่เกี่ยวข้องในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิก ใช้เป็นคู่มือเพื่อการอ้างอิงในการเพิ่มประสิทธิภาพและส่งเสริมศักยภาพในการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืชและตัวอย่างโรคพืชเพื่อสนับสนุนในด้านการค้าผลผลิตทางการเกษตร (ศรีสุข และคณะ, 2555) ซึ่งคู่มือนี้ได้ถูกแปลเป็นภาษาไทย ภาษาเวียดนาม และภาษาบาฮาซา เพื่อให้สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อนักวิจัยและบุคคลทั่วไปในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเพื่อเสริมสร้างสมรรถนะของนักวิทยาศาสตร์ในด้านที่เกี่ยวข้อง เช่น การสำรวจศึกษาความอยู่รอดของศัตรูพืช การวินิจฉัยศัตรูพืช การเก็บรักษาตัวอย่างศัตรูพืช การจัดการและการดูแลศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างศัตรูพืช และการจัดการและเก็บรักษาฐานข้อมูล

## 7.2 การแบ่งกลุ่มการเก็บรักษาเชื้อ

การเก็บรักษาเชื้อสาเหตุโรคพืชในกลุ่มของเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย สามารถแบ่งได้ตามระยะเวลาของการเก็บซึ่งสัมพันธ์กับประโยชน์การใช้สอย เช่น เก็บรักษาไว้เพื่อใช้งาน เป็นการเก็บระยะสั้น ๆ ซึ่งจำเป็นต้องมีการย้ายเลี้ยงเชื้อบ่อย ๆ หรือ เก็บรักษาไว้เพื่อเป็น stock culture ที่อาจมีการเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลายาวนาน ดังนั้น จึงอาจแบ่งกลุ่มการเก็บรักษาเชื้อตามลักษณะการปฏิบัติงานได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

**กลุ่มที่ 1** เป็นการเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคพืชให้เจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้สามารถนำกลับมาใช้ได้โดยสะดวกและรวดเร็ว โดยเฉพาะการนำไปใช้ในการเรียนการสอนและการวิจัย ส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง เช่น เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA และเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA โดยใช้ภาชนะปากกว้าง เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้สะดวกต่อการย้ายเชื้อไปเลี้ยงในอาหารใหม่ได้บ่อยครั้ง นับเป็นการเลี้ยงเชื้อที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และอุปกรณ์ที่ใช้ หาได้ง่ายและมีราคาถูก ส่วนใหญ่มีการย้ายเชื้อเลี้ยงทุก ๆ 1-6 เดือน (ขึ้นกับชนิดของเชื้อสาเหตุโรคพืช) หรือเมื่อเชื้อใช้อาหารจนหมด และเก็บรักษาเชื้อในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นหลัก แต่อาจมีข้อเสีย หากเชื้อที่ต้องการเก็บรักษามีจำนวนมาก จำเป็นต้องใช้แรงงานหรือบุคลากรที่มีหน้าที่ประจำในการย้ายเชื้อเลี้ยงในแต่ละช่วงเวลา นอกจากนั้นยังทำให้เสี่ยงต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นทุกครั้งที่มีการย้ายเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การเก็บรักษาเชื้อไว้ในสภาพที่เชื้อมีการเจริญอย่างต่อเนื่องนี้อาจก่อให้เกิดการผันแปรทางพันธุกรรม เสี่ยงต่อการสูญเสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุ หากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ส่งเสริมการเจริญแบบ saprophytic growth มากเกินไป

## สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Chiang Mai University Press)

สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่เป็นหน่วยงานหนึ่งภายใต้สังกัดศูนย์บริหารงานวิจัยเริ่มดำเนินการจัดพิมพ์หนังสือตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2552 เป็นต้นมา การดำเนินงานของสำนักพิมพ์ได้มีการดำเนินงานภายใต้ความเห็นชอบของคณะกรรมการจัดตั้งสำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมุ่งเน้นการสนับสนุนและส่งเสริมให้บุคลากรสายวิชาการของมหาวิทยาลัยได้ผลิตงานเขียนในรูปของหนังสือ และสิ่งพิมพ์ เพื่อช่วยสร้างความเข้มแข็งทางวิชาการให้เกิดขึ้น อีกทั้งเป็นการยกระดับมาตรฐานทางงานเขียนของบุคลากรกระตุ้นให้เกิดความตื่นตัวในการสร้างและเผยแพร่ผลงานวิชาการช่วยสร้างภาพลักษณ์และเผยแพร่ชื่อเสียงทางวิชาการของมหาวิทยาลัยอีกทางหนึ่ง

สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่จะทำหน้าที่เป็นหน่วยงานกลางในการคัดสรรผลงานเพื่อจัดพิมพ์และเผยแพร่ผลงานเขียนทางวิชาการของบุคลากรสายวิชาการที่เป็นสาระประโยชน์ออกสู่สังคมในปัจจุบันสื่อสิ่งพิมพ์ในการเผยแพร่งานวิชาการมีหลายรูปแบบ และสามารถเผยแพร่ในหลายภาษา ดังนั้นสำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่มีนโยบายการสนับสนุนการสร้างผลงานคุณภาพออกสู่สังคม โดยกำหนดเป้าหมาย กล่าวคือ

- 1) การจัดพิมพ์เผยแพร่ผลงานทางวิชาการที่มีคุณภาพของบุคลากรในมหาวิทยาลัย
- 2) การพัฒนาระบบบริหารจัดการอย่างเป็นระบบ
- 3) การเผยแพร่ผลงานตีพิมพ์อย่างมีประสิทธิภาพ



CHIANG MAI  
UNIVERSITY PRESS

สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ศูนย์บริหารงานวิจัย สำนักงานมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

โทรศัพท์: 053 94 2676, 053 94 2671-2 โทรสาร: 053 94 3600

E-mail: [cupress.th@gmail.com](mailto:cupress.th@gmail.com) Website: <http://cmupress.ac.th>

# เทคนิคโรคพืช

Plant Pathology Techniques



CHIANG MAI  
UNIVERSITY PRESS



9 789746 728195

ราคา 400 บาท