ดังที่กราบแล้วว่าขณะนี้มีโรคระบาดเกิดกับจำปาดะขนุน ซึ่งเป็นไม้ผลยืนต้นที่มีคุณภาพดี มีชื่อเสียงของ ต.เกาะยอ จ.สงขลา ความเสียหายที่เกิดขึ้นจากโรคนี้ มิใช่เพียงเกิดแผลกับใบหรือลำต้น แต่หากทำให้ใบร่วง ผลร่วง กิ่งหรือต้นแห้งตายขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อ หากมิรีบไม่แห้งตายก็จะโทรม ต้องใช้เวลานานในการที่จะดูแลรักษาให้ได้ผลผลิตดังเดิม ต้นที่พบโรคนี้มีอายุแตกต่างกันตั้งแต่ 6-100 ปี ส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 10-30 ปี จะเห็นว่าต้นที่เป็นโรคนั้นอยู่ในช่วงให้ผลผลิตแทบทั้งสิ้น ซึ่งโดยปกติจำปาดะขนุนจะให้ผลผลิตตลอดปีคิดเป็นรายได้ไม่ต่ำกว่า 1,000.-บาทต่อต้นต่อปี หรือ 25,000 - 30,000.-บาทต่อไร่ต่อปี ต่างจากไม้ผลชนิดอื่นที่จะให้ผลิตผลเป็นฤดูกาล จึงนับเป็นการสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก

ในการนี้จึงได้ศึกษาหาสาเหตุที่แท้จริงของโรคนี้ เนื่องจากเป็นโรคที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนในประเทศหรือในภูมิภาคนี้ ศึกษาการแพร่กระจายของโรค รวมทั้งแนวทางในการป้องกันในห้องปฏิบัติการ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สำรวจการแพร่ระบาดของโรค

เนื่องจากในขณะที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับโรคนี้ เกษตรกรจำนวนหลายรายได้เข้ามาพูดคุยและวิตกถึงเรื่องนี้ ทุกคนต่างกล่าวว่าที่สวนมีจำปาดะขนุนตายในลักษณะอาการเช่นเดียวกันนี้ จึงได้วางแผนทำการสำรวจการแพร่กระจายของโรคทั่วทั้งเกาะ วิธีการที่คือ ออกแบบสอบถามและเข้าไปสำรวจพื้นที่ที่ปลูก นับจำนวนต้นที่ปลูก จำนวนต้นที่เป็นโรค และ/หรือตาย พร้อมทั้งทำแผนที่จุดที่มีโรคระบาดเพื่อเป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาหาแนวทางในการป้องกันและกำจัด

2. ศึกษาลักษณะอาการของโรค

เลือกทำการศึกษาที่สวนของนายกรี้ม สินธุรัตน์ ซึ่งเป็นสวนที่มีการแพร่ระบาดของโรครุนแรงที่สุด โดยให้หมายเลขและทำแผนที่ต้นจำปาดะขนุนทุกต้นในสวน สวนนี้มีจำปาดะขนุนจำนวน 125 ต้น บันทึกลักษณะและความสมบูรณ์ของทุกต้น ตรวจสอบทุก 2 สัปดาห์ เมื่อพบต้นเป็นโรคจะไปศึกษาอย่างใกล้ชิด ทั้งอาการภายนอกและภายในลำต้น บันทึกภาพ พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างมาแยกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อศึกษาหาสาเหตุที่อาจเป็นไปได้ในรูปแบบต่าง ๆ ตามความเหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

3. การแยกเชื้อราและทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากตัวอย่างโรคที่สำรวจในข้อ 2 โดยเลือกแผลที่เปลือก (bark) และเนื้อเยื่อเจริญ (cambium) จำนวน 15 ตัวอย่าง แยกด้วยวิธี tissue transplanting อาหารที่ใช้ได้แก่ water agar (WA), Potato dextrose agar (PDA) และ corn meal agar (CMA) ผสมด้วยสาร BNPRA : Benlate, Nystatin, PCNB, Rifadin และ Ampicilin บ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน จึงตรวจผล และแยกเลี้ยงใน PDA เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

สำหรับรากเลือกเก็บรากฝอยจากต้นที่เป็นโรค ล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อที่ผิว แล้วจึงเลี้ยงใน WA, PDA และ CMA+BNPRA ปฏิบัติเช่นเดียวกับการแยกเชื้อราจากลำต้นหรือกิ่ง

หลังจากที่แยกเชื้อบริสุทธิ์ได้แล้ว นำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคด้วยวิธี pin-pricking inoculation สำหรับเชื้อราที่แยกจากลำต้น และด้วยวิธี Root inoculation สำหรับเชื้อที่แยกจากราก

4. การศึกษาชนิดของไส้เดือนฝอย

สำรวจและเก็บตัวอย่างดินจากต้นจำปาดะขนุนที่กำลังเป็นโรค สุ่มมา 4 จุดต่อต้น รวมน้ำหนักดินประมาณ 500 กรัม นำมาแยกไส้เดือนฝอยด้วยวิธี Cobb sieving method โดยใช้ตะแกรงขนาด 100, 200 และ 325 mesh ร่วมกับวิธี Bearman funnel method ตรวจดูด้วย stereo และ compound microscope

5. การแยกเชื้อบริสุทธิ์เมื่อคาดว่าเชื้อสาเหตุอาจเป็นแบคทีเรีย

จากตัวอย่างที่ได้นำมาทดสอบเบื้องต้นหาแนวโน้มว่าเกิดจากแบคทีเรียหรือไม่ โดยตัดชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรคตามแนวยาวประมาณ 1x1 มม. ให้บางที่สุด วางบนสไลด์หยดด้วย 1% sucrose หรือน้ำกลั่นตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที ตรวจดูด้วยกล้องชนิด light microscope และ phase contrast microscope ตลอด 15 นาที เพื่อตรวจดู bacterial ooze หากพบ bacterial ooze ก็มีแนวโน้มว่าเชื้อสาเหตุของโรคนี้คือ แบคทีเรีย

ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากตัวอย่างโรคจำนวน 30 ตัวอย่างจาก 8 ต้นที่แสดงอาการ ด้วยวิธี direct streak และ dilution plate โดยนำชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรค เลือกเฉพาะด้านในของเปลือกตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แช่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อตั้งทิ้งไว้ 15-20 นาที หากมีเชื้อสาเหตุ แบคทีเรียจะเคลื่อนตัวมาอยู่ในน้ำกลั่นได้เป็น bacterial suspension จากนั้น streak เชื้อบนอาหารแข็งที่เตรียมไว้ อาหารที่ใช้ได้แก่ NA, PSA และ MS (differential

media) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน เลือกเก็บโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่คาดว่าจะเป็นสาเหตุโรค streak ลงบนอาหารชนิดเดิม เพื่อให้แน่ใจว่าได้เชื้อบริสุทธิ์ไว้เพื่อทำการศึกษาต่อไป

ในขณะเดียวกันก็ทำการแยกเชื้อด้วยวิธี dilution plate ควบคู่ไปด้วย จาก bacterial suspension ที่ได้ นำมาทำให้เจือจางเป็นระดับในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ซีซี จำนวน 3 ระดับ ด้วย loop ผสมด้วยอาหารวุ้นที่หลอมและปล่อยให้อุ่นประมาณ 53 °ซ. แล้วจึงเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง กระทำเช่นเดียวกับข้างต้น

6. ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

แม้ว่าโรคนี้จะเกิดเฉพาะกับจำปาดะขนุนที่มีอายุไม่ต่ำกว่า 6 ปี แต่เนื่องจากไม่มีพืชสำหรับทดสอบ ดังนั้นในการทดลองจึงใช้กล้าอายุประมาณ 2 เดือน และนำมาทดสอบในเรือนกระจก

ทำการปลูกเชื้อ 2 วิธี คือ pin-pricking โดยการทำแผลที่ซอกใบที่ 3 นับจากยอด (ดัดแปลงจาก Winstead และ Kelman, 1952) แล้วปิดทับด้วยสำลีจุ่ม bacterial suspension ของเชื้ออายุ 24 ชม. ปรับให้มีเชื้อประมาณ $2x10^8$ cell/ml คลุมปิดทับด้วยถุงพลาสติก 24 ชม. แล้วจึงเอาออก (เนื่องจากไม่มี Growth Chamber) ทำการทดลอง 2 ครั้ง ครั้งแรกทดสอบเพียง 3 ต้น เนื่องจากต้นกล้ามีจำกัด ครั้งหลังทดลอง 10 ต้น

ส่วนอีกวิธีคือ การตัดราก (root cutting) โดยใช้มีดตัดลงไปในดิน ห่างจากโคน 2" ทั้ง 4 ด้าน แล้วเทราดด้วย bacterial suspenson ประมาณ 20 ซีซี ตรวจผลทุกวัน ทดสอบ 5 ต้น

ชุดเปรียบเทียบ (control) ทำการปลูกเชื้อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

7. การจำแนกชนิดของเชื้อ

จะอย่างไรก็ตาม แม้ว่ายังไม่ประสบความสำเร็จในการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของแบคทีเรียที่แยกได้ แต่จากการตรวจเอกสารเปรียบเทียบลักษณะอาการ กอร์ปกับเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ จึงคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อตัวใดตัวหนึ่งใน Amylovora group กรุ๊ปหนึ่งของ Erwinia ที่ทำให้เกิดโรคกับ walnut และ olive จึงได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อตามวิธีที่กล่าวถึงใน Schaad (1986) ได้แก่ ศึกษาการเจริญบน NA, การติดสี Gram, การสร้าง spore, การสร้างสีเหลืองหรือส้มบนอาหาร NA และ YDC, การสร้าง fluorescent pigment บน KB, การเจริญได้ในสภาพไม่มี O_2, การเจริญบน D-1 agar, การสร้าง aerial mycelium และศึกษาจำนวนและลักษณะการเรียงตัวของ flagella

ทำการทดลองกับเชื้อจำนวน 8 isolate ตามที่แยกได้