

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

การแยกราเอนโดไฟท์ที่เจริญจากใบไม้แต่ละชิ้นของใบเดียวกัน และมีลักษณะแตกต่างกัน รวมถึงราที่มีลักษณะเหมือนกันแต่แยกจากใบไม้แต่ละใบ มาเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์ สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 124 สายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์มีสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสปอร์รวมถึงการสร้างฟรุตบอดี และมีอัตราการสร้างแตกต่างกัน ส่วนใหญ่ยังไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ที่ช่วยในการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยา ดังนั้นในเบื้องต้นจึงจัดกลุ่มรดังกล่าว ไว้ในกลุ่ม *mycelia sterilia* ตามลักษณะโคโลนีและอัตราการเจริญที่แตกต่างกัน 56 ชนิด ราที่มีการสร้างฟรุตบอดีแต่เห็นลักษณะสปอร์ไม่ชัดเจนหรือไม่สร้างสปอร์ รวมถึงราที่เห็นแต่สปอร์แต่ไม่เห็นโครงสร้างสืบพันธุ์อื่นๆ จัดไว้ในกลุ่ม *unclassified* 3 ชนิด/สายพันธุ์ ราที่สามารถจัดกลุ่มได้ ได้แก่ *hyphomycete* 22 ชนิด *coelomycete* 2 ชนิด และ *ascomycete* 3 ชนิด

ราที่แยกได้จากโฮสต์ต่างๆ ยกเว้นโพธิ์ทะเลและผักเป็ด ส่วนใหญ่ยังไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ สอดคล้องกับรายงานอื่นๆ ที่พบว่าส่วนใหญ่ของราเอนโดไฟท์เป็น *mycelia sterilia* (Chaeprasert et al., 2010) เอนโดไฟท์จากโพธิ์ทะเล ส่วนใหญ่สร้างสปอร์และพบ *Colletotrichum* sp.1 และ *Colletotrichum* sp.2 เป็นราเด่น การที่พบเอนโดไฟท์จากโพธิ์ทะเลสร้างสปอร์แตกต่างจากรายงานของ Kokaew et al. (2008) ที่พบราเอนโดไฟท์จากพืชชายเลนโพธิ์ทะเล ส่วนใหญ่เป็น *mycelia sterilia*

จากลักษณะโคโลนีและโคโคนีเดีย อัตราการเจริญ รา *Colletotrichum* sp.1 และ *Colletotrichum* sp.2 มีแนวโน้มสูงที่จะเป็น *Colletotrichum gloeosporioides* (Sanders and Korsten, 2003) . ซึ่งสามารถทำการศึกษาลักษณะโครงสร้างสืบพันธุ์อย่างละเอียดในภายหลัง การใช้วิธีการทางพันธุศาสตร์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ได้ดี (Lacap et al., 2003, Sanders and Korsten, 2003) ในการศึกษาที่มีการนำวิธีการดังกล่าวมาจำแนกชนิดของ สายพันธุ์ TP 621 ที่พบว่าสร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช และจำแนกได้ว่าเป็น *Phomopsis* sp.

Nigrospora sp. เป็น *hyphomycete* ที่พบได้บ่อยในใบโพธิ์ทะเลจากการศึกษานี้ ขณะที่ *hyphomycete* อื่นๆ พบเพียง 1-2 สายพันธุ์ ในการศึกษาอื่นๆ ที่ผ่านมารากลุ่ม *Hyphomycete* ที่มีรายงานการพบเป็นราเด่นได้แก่ *Phyllosticta* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp. (Chaeprasert et al. 2010) การที่เอนโดไฟท์ที่แยกได้จากใบพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟท์น่าจะมีเฉพาะต่อโฮสต์ หรือพืชแต่ละชนิดอาจมีสารอาหารหรือสภาวะที่เหมาะสมกับราแต่ละชนิดแตกต่างกัน (Petri et al., 1982; Kumaresan and Suryanarayanan, 2001) ราที่พบเป็นราเด่นส่วนใหญ่เป็นราเจริญเร็ว (Hyde and Soyong, 2008) คือ *Colletotrichum* spp., *Nigrospora* spp. และ *Phomopsis* sp. ราเอนโดไฟท์ *Colletotrichum* spp. และ *Phomopsis* sp. มีรายงานว่าเป็นราเด่นใน

การศึกษาในพืชหลายชนิด แต่เท่าที่ทราบยังไม่มีรายงานการเป็นราเด่นของ *Nigrospora* (Wong and Hyde, 2001; Photita et al., 2005; Chaeprasert et al. 2010) ลำพูเป็นพืชที่พบเอนโดไฟท์ในไฟล์ม แอสโคไมซัยคอตาได้ถึง 2 ชนิดจากทั้งหมด 3 ชนิดที่พบ พืชที่พบราเอนโดไฟท์หลากหลายสุดใน 1 ใบ คือ ลำพู (4.2 ชนิด) ตามด้วยผักเบี้ย (3.3 ชนิด) และโพธิ์ทะเล (3.1 ชนิด)

การตรวจหาความสามารถของราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชเบื้องต้นด้วยวิธี dual culture พบราเอนโดไฟท์ 18 สายพันธุ์จาก 85 สายพันธุ์ ให้ผลในการยับยั้งราโรคพืช 15 สายพันธุ์จาก 85 สายพันธุ์ (17.6%) ใช้การสร้างสารออกมายับยั้ง *Alternaria brassicicola* ราที่ให้ผลยับยั้งดีที่สุดคือ *Phomopsis TP 121*

เนื่องจากการใช้ชนิดอาหารหรือสภาวะใน dual culture ที่เหมาะสมเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ช่วยให้คัดเลือกเชื้อที่สร้างสารยับยั้งได้ดีมาทำการสกัดได้ และมีรายงานว่าแหล่งไนโตรเจนเป็นแหล่งอาหารสำหรับการผลิตเมตาบอไลต์ของรา (Li et al., 2007) ในการศึกษาจึงคัดเลือกอาหาร 3 ชนิดที่มีความสมบูรณ์ของแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันจากมากไปน้อย มาใช้ทดสอบ คือ PDA 0.5x PDA และ LNA ในการทดลอง พบว่าราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ให้ผลในการยับยั้งราโรคพืชใกล้เคียงกับ 0.5x PDA และดีกว่า LNA ซึ่งมีไนโตรเจนและสารอาหารอื่นๆ น้อย

สารทุติยภูมิที่สกัดได้จากเอนโดไฟท์ในการศึกษานี้ส่วนใหญ่ไม่ยับยั้งหรือยับยั้ง *A. brassicicola* ในระดับต่ำๆ ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าการหมักเชื้อบริสุทธิ์ทำให้ความจำเป็นในการแข่งขันเพื่อการเจริญลดลง เนื่องจากมีรายงานในราเอนโดไฟท์ ว่าสารที่ผลิตขึ้นส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิที่รบกวนสัมพันธ์กับแหล่งอาหารในธรรมชาติ (ecological niche) และการมีปฏิสัมพันธ์ระดับ metabolite (metabolic interaction) ปฏิสัมพันธ์ของรากับสิ่งแวดล้อมอาจมีผลให้ราสร้างสารทุติยภูมิได้มากขึ้น (Schulz, 2002)

ความเค็มอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เหมาะสมอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิจากเอนโดไฟท์จากป่าชายเลน ซึ่งต้องอาศัยในใบพืชที่มีความเค็มน้ำในใบสูงลดลง อย่างไรก็ตาม เท่าที่ทราบขณะนี้ยังไม่มีรายงานผลของสภาวะความเค็มต่อการสร้างสารทุติยภูมิของราเอนโดไฟท์จากป่าชายเลน ขณะที่มีการรายงานว่าในราทะเลแล้วความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิจากความเค็มน้ำทะเลที่แตกต่างกัน (Bugni and Ireland, 2004) นอกจากนี้เนื่องจากสารที่ราเอนโดไฟท์สร้างขึ้นมายับยั้ง *A. brassicicola* เป็นสารเฉพาะที่ต้องใช้การสกัดเชื้อที่จำเพาะเจาะจงมากขึ้น Davis et al. (2002) รายงานว่า การสกัดสารจากราเอนโดไฟท์ *Acremonium coenophialum* ในกลุ่ม steroid ต้องสกัดด้วย chloroform ก่อน แล้วตามด้วย methanol จึงจะได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ หรือในรายงานที่พบการสกัดสารส่วนใหญ่จะสกัดด้วย ethyl acetate ก่อน แล้วตามด้วย methanol หรือ hexane แต่การศึกษานี้สกัดด้วย ethyl acetate เพียงชนิดเดียว สาเหตุประการสุดท้ายอาจเป็นเพราะ *A. brassicicola* เป็นเชื้อที่เจริญเร็ว สร้างสปอร์ง่าย ทำให้ราเอนโดไฟท์ควบคุมการเจริญได้ยากกว่าราสาเหตุโรคพืชชนิดอื่น รายงานการควบคุม *A. brassicicola* ในระยะที่ผ่านมาไม่มากนัก โดยพบว่า

รา *Trichoderma virens* จำนวน 13 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย สายพันธุ์ก่อโรคได้ และเมื่อทดสอบสารสกัดจาก *T. virens* กับสปอร์ของ *A. brassicicola* พบการงอกของสปอร์ *A. brassicicola* เพียง 9.4% ขณะที่ชุดควบคุม พบการงอกของสปอร์ ได้ถึง 98.5%