

บทที่ 5

อภิปรายผล บทสรุป และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผล

1. การแยกเชื้อราบริสุทธิ์จากมณฑาป่า

ในการวิจัยนี้ทำการแยกเชื้อราบริสุทธิ์ทั้งที่เป็นราเอนโดไฟต์และราแซฟโทรบจากกิ่งมณฑาป่า อย่างไรก็ตามเนื่องจากในการแยกเชื้อราแซฟโทรบนั้นมีขั้นตอนและวิธีการในการแยกเชื้อที่ซับซ้อนมากกว่าการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ รวมทั้งค่อนข้างต้องใช้เวลาในการตรวจสอบการงอกของสปอร์ในการแยกเชื้อราแต่ละไอโซเลต อีกทั้งส่วนใหญ่มักจะเกิดการปนเปื้อนระหว่างทำการแยกเชื้อและหลายครั้งที่ไม่พบการงอกของสปอร์ราเกิดขึ้น ผู้วิจัยจึงมุ่งเป้าไปที่การแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่สามารถแยกเชื้อจากตัวอย่างจำนวนมาก ๆ ในคราวเดียวกัน ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบจำนวนไอโซเลตที่ได้ของเชื้อราทั้งสองกลุ่มจึงมีส่วนที่ต่างกันมาก โดยในการวิจัยครั้งนี้เบื้องต้นแยกเชื้อราบริสุทธิ์ของราแซฟโทรบได้ 12 ไอโซเลต ในขณะที่แยกเชื้อราเอนโดไฟต์ได้ถึง 254 ไอโซเลต ราแซฟโทรบที่แยกเชื้อได้ส่วนใหญ่เน้นกลุ่มที่สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศจำนวนมากและพบมีการเจริญกินพื้นที่บนกิ่งไม้แห้งเป็นบริเวณกว้าง (มีอัตราการ colonize สูง) ในขณะที่เชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้มากที่สุดคือเชื้อราในกลุ่ม mycelia sterilia รองลงมาคือ *Phomopsis* spp., *Coletotrichum* spp., *Fusarium* spp. และ *Xylaria* sp. ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่มที่พบเป็นเชื้อราเอนโดไฟต์หลัก ๆ ที่แยกได้จากการทดลองอื่น ๆ ด้วยเช่นกัน แตกต่างกันเพียงแค่จำนวนไอโซเลตของเชื้อราแต่ละสกุลที่แยกได้มากน้อยต่างกัน จึงอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อราในกลุ่มเหล่านี้จะมีความสามารถในการปรับตัวให้อยู่ร่วมกับพืชได้ดีกว่าเชื้อราในสกุลอื่น ๆ จึงเป็นกลุ่มที่พบอยู่เสมอแม้จะแยกจากพืชที่ต่างชนิดต่างกลุ่มที่มีการเจริญเติบโตและการกระจายตัวในสภาพทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน (Arnold and Lutzoni, 2007; Ho et al., 2012)

ตารางที่ 5.1 แสดงเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราเอนโดไฟต์กลุ่มที่ไม่สร้างสปอร์ (mycelia sterilia) ที่แยกได้จากพืชชนิดต่าง ๆ จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื้อเยื่อ/พืช/ประเทศ	สัดส่วนของเชื้อรา mycelia sterilia (%)	เอกสารอ้างอิง
ใบและรากอากาศของ <i>Ficus Benghalensis</i> , (Chennai, India)	3.1	Suryanarayanan and Vijaykrishna, 2001
ใบของ <i>Cordemoya Integrifolia</i> , Mauritius	4.3	Toofanee and Dulymamode, 2002
<i>Trachycarpus fortunei</i> , (China)	11	Taylor et al., 1999
ปาล์ม (<i>Licuala</i>) 2 ชนิด, (Brunei and Australia)	13	Fröhlich et al., 2000
ใบแก่ของ <i>Rhizophora apiculata</i> , (Chennai, India)	13	Kumaresan and Suryanarayanan, 2002
ไม้พุ่ม, (western Oregon, USA)	15	Petrini et al., 1982
ใบ (fronds) <i>Livistona chinensis</i> , (Hong	16.5	Guo et al., 2000

Kong)		
ใบของกล้วยป่า (<i>Musa acuminata</i>), (Thailand)	23.1	Photita et al., 2003
<i>Tripterygium wilfordii</i> , Guangdong, (China)	23.6	Kumar and Hyde, 2004
ใบของ <i>Sequoia semperviens</i> , (Central California, USA)	27	Espinosa-Garcia and Langenheim, 1990
กิ่งของ <i>Quercus ilex</i> , (Switzerland)	54	Fisher et al., 1994

(ดัดแปลงจาก Promputtha, 2006)

ในแง่ของความหลากหลายของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากกิ่งมณฑาป่าในการวิจัยครั้งนี้พบว่าจำนวนไอโซเลตที่แยกได้นับว่ามีจำนวนไม่มากนักเมื่อเทียบกับผลจากงานวิจัยอื่น ๆ ที่ทำการแยกเชื้อจากไม้เนื้อแข็งเช่นเดียวกัน ความแตกต่างดังกล่าวอาจเกิดจากหลายสาเหตุ กล่าวคือ อาจเกิดจากการที่ใช้อาหาร ½ PDA ในการแยกเชื้อ แทนการใช้อาหาร Rose Bengal ซึ่งเป็นอาหารเพาะเลี้ยงชนิดหลักในการทดลองอื่น ๆ นอกจากนี้การแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อกิ่งมณฑาป่าโดยใช้เพียงแค่ส่วนเปลือกและเนื้อไม้ของกิ่งก็ คงจะไม่สามารถเปรียบเทียบความมากชนิดของจำนวนไอโซเลตกับงานวิจัยอื่นที่แยกเชื้อจากชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่หลากหลายกว่าและครอบคลุมถึงส่วนใบและส่วนอื่น ๆ ของต้นพืชด้วยได้ นอกจากนี้วิธีการที่ใช้ในการฆ่าเชื้อที่ผิวก็พบว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการแยกเชื้อรา โดยอาจจะส่งผลยับยั้งเชื้อราบางไอโซเลตที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืชระหว่างที่มีการฆ่าเชื้อได้ (Romero et al., 2001) ส่งผลให้เชื้อราบางสกุลที่ตรวจพบในงานวิจัยอื่น ๆ ไม่มีการตรวจพบในการแยกเชื้อครั้งนี้ อย่างไรก็ตามพบว่าแม้จำนวนไอโซเลตของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ได้จากงานวิจัยนี้จะมีน้อยชนิดกว่าการวิจัยอื่น แต่เชื้อราเอนโดไฟต์กลุ่มหลัก ๆ ที่แยกได้ก็มีความคล้ายคลึงกันในระดับสกุลกับงานวิจัยอื่น ซึ่งสิ่งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อราเอนโดไฟต์หลัก ๆ ที่อาศัยอยู่ในพืชชนิดต่าง ๆ เป็นเชื้อในกลุ่มเดียวกัน (Arnold and Lutzoni, 2007; Ho et al., 2012)

2. การคัดเลือกหาเชื้อราที่มีความสามารถเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรค

ในการศึกษาคุณสมบัติการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่ต่อต้านการเจริญของเชื้อทดสอบด้วยวิธี dual culture technique นั้น โดยทั่วไปเชื่อว่าไอโซเลตที่ให้ค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (inhibition of radial growth: PIRG) สูง จะให้ผลการยับยั้งที่สูงในการทดสอบต่อยอดโดยใช้สารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว และมีศักยภาพสูงในการใช้เป็น Biological Control Agent (BCA) เพื่อควบคุมเชื้อทดสอบด้วย วิธีการนี้นับเป็นวิธีการที่ง่าย รวดเร็ว และใช้ต้นทุนต่ำในการคัดกรองหาเชื้อที่มีคุณสมบัติในการใช้เป็น BCA (Idris et al., 2008) จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการศึกษาเพื่อหาเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์กันอย่างแพร่หลาย

จากผลการวิจัยเมื่อนำเชื้อราเอนโดไฟต์และแซฟโพรบที่แยกได้จากมณฑาป่ามาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum musae* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกล้วยในสภาพห้องปฏิบัติการด้วยวิธี dual culture (biculture) พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์/แซฟโพรบมีปฏิสัมพันธ์กับเชื้อราสาเหตุ 3 ลักษณะ คือ ปฏิสัมพันธ์ในลักษณะเชื้อราเอนโดไฟต์/แซฟโพรบเจริญซ้ำจึงถูกเชื้อรา *C. musae* เจริญรุกเข้าไปคลุม ปฏิสัมพันธ์ในลักษณะเชื้อราเอนโดไฟต์/แซฟโพรบเจริญซ้ำ แต่สร้างสารยับยั้งทำให้โคโลนีของ *C. musae* ไม่สามารถเจริญได้ตามปกติ และปฏิสัมพันธ์ในลักษณะเชื้อราเอนโดไฟต์/แซฟโพรบเจริญเร็วกว่าจึงเจริญรุกเข้าไปคลุมเชื้อรา *C. musae* และจากปฏิกิริยาการยับยั้ง

ของเชื้อราพบว่าราแซฟโพรบ *Trichoderma* sp. 6MG2004 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของกล้วยได้ดีที่สุดที่ 81.08% ซึ่งจัดว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก (very high antagonistic activity) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยหลายเรื่องที่ยืนยันว่าเชื้อราสกุล *Trichoderma* มีความสามารถในการเป็นปรสิตต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชที่นิยมใช้ควบคุมเชื้อโรคพืชกันอย่างกว้างขวาง (จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรณวิไล อินทนู, 2542; Verma *et al.*, 2007; Vinale *et al.*, 2009; John *et al.*, 2010; Gveroska and Ziberoski, 2011)

มีเชื้อบางไอโซเลตที่เกิดปฏิกิริยาการเป็นปฏิปักษ์แบบสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) ที่ให้ผลการยับยั้งใกล้เคียงร้อยละ 60 แต่สามารถสังเกตเห็นการเกิด zone of inhibition (ZI) ระหว่างเส้นใยของเชื้อราเอนโดไฟต์กับ *C. musae* อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4.22) เชื้อเหล่านี้น่าจะเป็นไอโซเลตที่มีศักยภาพในการสร้างสารบางอย่างที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. musae* ได้ดีจึงทำให้เชื้อ *C. musae* ไม่สามารถเจริญได้ตามปกติ การศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของไอโซเลตเหล่านี้จะทำให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปใช้พัฒนาต่อยอดในงานด้านสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติได้

สำหรับราหลายไอโซเลตพบว่าสามารถแสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ แม้ว่าระดับการยับยั้งจะอยู่ในเกณฑ์ที่ไม่สูงมากนัก (มีจำนวน 23 ไอโซเลตที่มีค่าร้อยละการยับยั้งมากกว่า 50%) ผลจากการวิจัยแสดงให้เห็นว่าเชื้อราที่แยกได้จากมณฑลป่าบางไอโซเลตมีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่รายงานว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกจากพืชสมุนไพรมีแนวโน้มที่จะผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้สูงกว่าพืชในกลุ่มอื่น ๆ (Selim *et al.*, 2012) โดยผลจากการทำ dual culture แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคโดยปฏิกิริยาการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง (antibiosis inhibition) และการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและรุกรานส่วนของเชื้อราก่อโรคไว้ (competition inhibition) ในขณะที่เชื้อราอีก 73 ไอโซเลตไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. musae* ได้และมีอัตราการเจริญช้ากว่า

สำหรับราสกุล *Phomopsis* sp. และ *Trichoderma* sp. ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่มที่สามารถระบุสกุลได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเป็นกลุ่มที่ให้ผลการยับยั้งค่อนข้างสูงถึงสูงมาก ผลการวิจัยนี้จึงสอดคล้องกับรายงานอื่น ๆ ก่อนหน้าที่มีการรายงานว่าเชื้อราในกลุ่ม *Phomopsis* sp. และ *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราสกุลที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคหลายชนิด (Akinbode and Ikotun, 2011; Udayanga *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์หลายชนิดมีความสามารถผลิตสาร secondary metabolites และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางการแพทย์และทางการเกษตร รวมทั้งเชื้อราเอนโดไฟต์ยังมีศักยภาพในการผลิตสารต่างๆ ที่ช่วยแก้ปัญหาด้านสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ได้อีกด้วย (Bills and Polishook, 1992; Strobel, 2002) ดังนั้นสำหรับประเทศไทยที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก (Jones and Hyde, 2004) จึงน่าที่จะมีเชื้อราที่ยังรอการค้นพบและนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อแวดวงต่าง ๆ อีกอย่างมากมาย

สรุปผลการวิจัย

1. เชื้อราบางไอโซเลตที่แยกจากมณฑลป่าสามารถต้านการเจริญของเชื้อ *C. musae* ที่ใช้ในการทดสอบ โดยเกิดปฏิกิริยาการเป็นปฏิปักษ์ในสามรูปแบบ คือ ปฏิสัมพันธ์ในลักษณะเชื้อราเอนโดไฟต์/แซฟโพรบเจริญซ้ำจึงถูกเชื้อรา *C. musae* เจริญรุกรานเข้าไปคลุม ปฏิสัมพันธ์ในลักษณะเชื้อราเอนโดไฟต์/

แซฟโทรบสร้างสารยับยั้งทำให้โคโลนีของ *C. musae* ไม่สามารถเจริญได้ตามปกติ และปฏิสัมพันธ์ในลักษณะเชื้อราเอนโดไฟต์/แซฟโทรบเจริญเร็วกว่าจึงเจริญรุกเข้าไปคลุมเชื้อรา *C. musae*

2. เชื้อราที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *C. musae* ได้ดีที่สุดคือ เชื้อราแซฟโทรบ *Trichoderma* sp. 6MG2004 โดยมีร้อยละการยับยั้งการเจริญเท่ากับ 81.08% ซึ่งจัดว่าเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก (very high antagonistic activity)

3. เชื้อราที่ให้ค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของ *C. musae* ได้มากกว่าร้อยละ 60 มีจำนวน 6 ไอโซเลต ประกอบด้วยราแซฟโทรบ *Trichoderma* sp. 6MG2004 และราเอนโดไฟต์ WMG5-1.3-1, MG2-5.5-2, MG3-2.3-2, MG6-5.2-2 และ MG1-4.5-2 โดยมีร้อยละของการยับยั้งเท่ากับ 81.08, 62.16, 62.16, 60.78, 60.68 และ 60.13 ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากในการวิจัยนี้ทำการแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อมณฑาป่าที่จำกัดเฉพาะส่วนของเปลือกและเนื้อไม้ของกิ่งเท่านั้นทำให้ได้จำนวนไอโซเลตของเชื้อราเอนโดไฟต์บริสุทธิ์ที่ไม่มากนักเมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่นที่แยกเชื้อจากทุกส่วนเนื้อเยื่อของพืช ในการวิจัยต่อยอดในอนาคตจึงควรแยกเชื้อเพิ่มจากเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ ด้วยเพื่อให้ได้ไอโซเลตของเชื้อที่มากขึ้น และการแยกเชื้อจากเนื้อเยื่ออื่นนอกเหนือไปจากส่วนของกิ่งยังอาจได้เชื้อในสกุลอื่น ๆ ที่ไม่พบจากการศึกษาในครั้งนี้ด้วยเพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสที่จะค้นพบเชื้อราไอโซเลตใหม่ ๆ ที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ใหม่ ๆ ที่มีประโยชน์ได้

2. จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. musae* พบว่าราแซฟโทรบ *Trichoderma* sp. 6MG2004 ให้การยับยั้งในระดับที่สูงมาก ซึ่งสอดคล้องกับหลาย ๆ งานวิจัย ประกอบกับในปัจจุบันราสกุลนี้ก็เป็นที่ยอมรับว่าเป็นเชื้อ Biological Control Agent ที่มีศักยภาพในการใช้ควบคุมโรคทางชีววิธีและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น *T. harzeanum*, *T. viride* เป็นต้น (จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรณวิไล อินทนู, 2542) การมุ่งคัดแยกเชื้อสกุลนี้จากแหล่งต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นการแยกเชื้อจากพืชหรือจากดินเพื่อนำมาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคต่าง ๆ จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง

ในส่วนของเชื้อราที่แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. musae* ในระดับมากกว่าร้อยละ 60 น่าจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับคุณสมบัติอื่น ๆ ของเชื้อหรือสิ่งที่เชื้อสร้างขึ้น รวมทั้งหาวิธีการระบุชนิดเพื่อจะได้มีข้อมูลสนับสนุนที่เพียงพอในการทำวิจัยต่อยอดในอนาคต

ก่อนการนำเชื้อราที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญที่ดีไปใช้ในควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีในแปลงปลูก ควรทำการศึกษาให้แน่ใจก่อนว่าเชื้อที่จะนำไปใช้จะมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเชื้อก่อโรคที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดได้หรือไม่ในสภาพธรรมชาติ

ในส่วนปัญหาการปนเปื้อนจากไรของเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้ระหว่างการเพาะเลี้ยงหรือการเก็บรักษาสำหรับห้องปฏิบัติการขนาดเล็กที่ขาดเครื่องมือและอุปกรณ์ อาจแก้ไขโดยการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์โดยการแบ่งออกเป็นหลาย ๆ ซ้ำต่อเชื้อหนึ่งชนิด และใช้วิธีการเก็บเชื้อโดยการเลี้ยงในอาหารวุ้นเอียงแล้วเททับด้วย mineral oil กลีเซอรอลหรือน้ำ จะช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากไรได้ในระดับหนึ่ง