

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

จากการสำรวจและเก็บรวบรวม *Cordyceps* บริเวณอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ จากพื้นที่ป่า 5 พื้นที่ ได้แก่ สวนสัตว์เชียงใหม่ น้ำตกวังบัวบาน น้ำตกมณฑาธาร ห้วยคอกม้า และบ้านม้งช่วงเคียน ระหว่างเดือนมิถุนายน – ตุลาคม 2543 ได้ตัวอย่างทั้งหมด 54 ตัวอย่างเจริญบนแมลงหลายชนิดใน 3 อันดับ คือ Hemiptera, Hymenoptera และ Lepidoptera เมื่อตรวจสอบทางอนุกรมวิธานจัดจำแนกได้ 4 สปีชีส์ คือ *C. nutans*, *C. sphecocephala*, *C. myrmecophila* และ *C. irangiensis* มี 4 ตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชื่อได้ให้ชื่อเป็น *Cordyceps* sp.1 และ *Cordyceps* sp.2 กับอีก 7 ตัวอย่างที่ไม่สมบูรณ์เนื่องจากยังเจริญไม่เต็มที่ การจัดจำแนก *Cordyceps* นอกจากจะใช้ชนิดของ host และรูปร่างลักษณะภายนอกที่มองเห็น ด้วยตาเปล่าเป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกแล้ว รูปร่างของ part spore ก็มีความสำคัญโดยเฉพาะ สปีชีส์ที่เจริญบนมด คือ *C. myrmecophila* และ *C. irangiensis* ถ้ามองดูลักษณะภายนอกจะคล้าย กันมาก อีกทั้งยังเจริญบน host ที่คล้ายคลึงกันและอยู่ในแหล่งอาศัยแบบเดียวกัน การจัดจำแนก จึงต้องทำภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่ถ้าตัวอย่างที่เก็บมายังอยู่ในระยะเจริญเติบโตไม่เต็มที่ก็จะทำให้เห็นรูปร่างของ part-spores ไม่ชัดเจน หลายตัวอย่างที่เจริญบนมดจึงไม่สามารถจัดจำแนกได้

จำนวนตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้จากพื้นที่ต่าง ๆ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันโดยคิดเป็น เปอร์เซ็นต์ (รูป 14) พบว่าห้วยคอกม้าเป็นบริเวณที่เก็บตัวอย่างได้จำนวนมากที่สุด อาจเนื่องมาจาก ตัวอย่างส่วนใหญ่ของ *Cordyceps* ที่เก็บรวบรวมได้จากบริเวณนี้เป็นสปีชีส์ที่มี stroma ขนาดใหญ่ สีน้ำตาลสดตา ทำให้มองเห็นได้ง่ายขณะเดินสำรวจ จึงเก็บตัวอย่างได้มากกว่าบริเวณอื่น ๆ เมื่อพิจารณาความหลากหลายของสปีชีส์ พบว่าบริเวณน้ำตกวังบัวบานมีความหลากหลายของ สปีชีส์สูงที่สุด อาจเกิดจากสภาพของป่าที่เป็นป่าผสมผลัดใบ มีพันธุ์ไม้หลากหลายชนิด และ แมลงแต่ละชนิดน่าจะมีแหล่งอาหารที่จำเพาะ ดังนั้นการที่มีต้นไม้หลากหลายชนิดก็น่าจะมีแมลง หลายชนิดด้วย จึงอาจจะมีแมลงที่เป็น host ของ *Cordyceps* อาศัยอยู่มากด้วยเช่นกัน จึงอาจกล่าว ได้ว่าชนิดของแมลงเป็นตัวบ่งชี้ความหลากหลายของ *Cordyceps* ในธรรมชาติได้ หรือสาเหตุอีก ประการหนึ่งอาจเนื่องมาจากสภาพพื้นที่บริเวณน้ำตกวังบัวบานเป็นป่าโปร่ง มีทางเดินทำให้เก็บ ตัวอย่างได้สะดวกกว่าพื้นที่ป่าบริเวณอื่น

ในการสำรวจครั้งนี้สปีชีส์ที่พบมากที่สุดคือ *C. nutans* ที่เจริญอยู่บนตัวเต็มวัยของมวน อาจเป็นเพราะว่าสปีชีส์นี้มีความสามารถในการแพร่กระจายพันธุ์สูง เนื่องจากมี stroma ขนาดใหญ่ มี ascospores อยู่ภายในเป็นจำนวนมาก บางครั้งมีหลาย stromata บนแมลงตัวเดียว จึงทำให้มีการแพร่กระจายพันธุ์ได้ดี ในขณะที่สปีชีส์อื่น ๆ มีขนาดเล็กกว่า เช่น สปีชีส์ที่เจริญบนมด หรืออาจเกิดจากสปีชีส์ที่สะกดตา ทำให้มองเห็นได้ง่ายกว่าสปีชีส์อื่นขณะสำรวจ

จากการสังเกต *Cordyceps* สปีชีส์ต่างๆ ที่เก็บรวบรวมได้ในแต่ละแหล่งสำรวจจะพบ *C. nutans* ในทุกพื้นที่ป่าที่เป็นป่าไม่ผลัดใบรวมทั้งป่าเต็งรังที่เป็นป่าผลัดใบด้วย พบ *C. myrmecophila* ทุกพื้นที่ป่าที่เป็นป่าผลัดใบ ส่วน *C. iranensis* พบเฉพาะที่น้ำตกวังบัวบาน และ *Cordyceps* sp.2 พบเฉพาะที่น้ำตกมณฑลธารเท่านั้น น่าจะมีสาเหตุมาจากความจำเพาะเจาะจงต่อแหล่งอาหารและที่อยู่อาศัยของแมลงที่เป็น host ของ *Cordyceps* แต่ละสปีชีส์ แมลงบางชนิดมีอยู่ได้ในหลายแหล่งอาศัย บางชนิดอยู่อาศัยเฉพาะในป่าบางพื้นที่เท่านั้น ด้วยเหตุนี้จึงพบ *Cordyceps* บางสปีชีส์เฉพาะพื้นที่สำรวจแห่งใดแห่งหนึ่งเท่านั้น ในขณะที่บางสปีชีส์พบได้ทั่วไปหลายพื้นที่

C. nutans ที่พบในการสำรวจครั้งนี้มีลักษณะรูปร่างเหมือนกับที่ Schumacher (1982) และ Hywel-Jones (1995c) ได้บรรยายลักษณะไว้ มีลักษณะเด่น คือ เจริญอยู่บนมวน มี stroma ขนาดใหญ่ บนมวนที่มีขนาดเล็กมักจะพบ stroma เจริญอยู่เดียว ๆ แต่ในบางครั้งอาจพบ 3-4 stromata อยู่บนมวนขนาดใหญ่ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากมวนที่มีขนาดใหญ่กว่าจะมีแหล่งอาหารที่สมบูรณ์มากกว่า *Cordyceps* จึงสามารถสร้าง stromata ได้จำนวนมาก เมื่อนำขนาด stromata ของ *Cordyceps* แต่ละสปีชีส์มาเปรียบเทียบกัน พบว่าแต่ละสปีชีส์มีขนาดของ stromata แตกต่างกันไป *Cordyceps* ที่เจริญบนมวนมี stromata ขนาดใหญ่ที่สุด รองลงมา คือ *Cordyceps* สปีชีส์ที่เจริญบนตัวต่อ บนคอกแค้ของผีเสื้อ และบนมด ตามลำดับ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับขนาดลำตัวของ host จึงอาจกล่าวได้ว่าขนาด stromata ของ *Cordyceps* ขึ้นอยู่กับขนาดของแหล่งอาหาร (Arora, 1986)

ผลจากการสำรวจในครั้งนี้เมื่อเทียบกับผลการสำรวจของ Schumacher (1982) ที่พบ *Cordyceps* เพียงสปีชีส์เดียว จากการศึกษาบนอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย ในขณะที่การสำรวจในครั้งนี้พบ 4 สปีชีส์ กับอีก 2 ตัวอย่างที่ระบุชื่อไม่ได้ อาจเกิดจาก Schumacher ศึกษาฟังไจหลายชนิด ไม่ได้เจาะจงเฉพาะ *Cordyceps* อย่างเดียว อีกทั้ง *Cordyceps* ยังเป็นสปีชีส์ที่พบได้ยากเมื่อเปรียบเทียบกับฟังไจอื่นจึงพบ *Cordyceps* น้อย ส่วนการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาที่เน้นเฉพาะ *Cordyceps* เท่านั้น จึงมีเวลาในการศึกษาหาข้อมูลและการเก็บรวบรวมตัวอย่างมากกว่า ทำให้พบสปีชีส์ที่มากตามไปด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับผลการสำรวจจากทั่วประเทศของ Hywel-Jones

(1994, 1995a, 1995b, 1995c) และ Hywel-Jones & Sivichi (1995) พบ *Cordyceps* 8 สปีชีส์ ซึ่งมากกว่าการสำรวจในครั้งนี้ อาจเนื่องมาจากระยะเวลาในการสำรวจที่นานกว่า โดยใช้ระยะเวลา นานกว่า 3 ปี นอกจากนี้ยังมีพื้นที่สำรวจมากกว่าทั้งที่อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ อุทยานยานแห่งชาติเขาสามหลัน อุทยานแห่งชาติคอยอินทนนท์ และอุทยานแห่งชาติอื่น ๆ ครอบคลุมพื้นที่ทั่วประเทศ ส่วนการศึกษาในครั้งนี้ใช้เวลาในการศึกษาน้อยกว่าคือใช้ระยะเวลาเพียง 5 เดือน และศึกษาเฉพาะพื้นที่ของอุทยานแห่งชาติคอยสุเทพ-ปุยเพียงแห่งเดียวเท่านั้น

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า *Cordyceps* ทั้ง 4 สปีชีส์ คือ *C. irangiensis*, *C. myrmecophila*, *C. nutans* และ *C. sphecocephala* มีลักษณะเหมือนกับที่เคยมีรายงานการพบมาแล้วก่อนหน้านี้ จากการรายงานของ Schumacher (1982), Hywel-Jones (1995b, 1995c และ 1996) และ Li *et al.* (1999) สำหรับ 2 สปีชีส์ที่เจริญบนดักแด้ของผีเสื้อ และยังไม่สามารถบ่งบอกชื่อวิทยาศาสตร์ มีความเป็นไปได้ที่อาจยังไม่เคยพบมาก่อน หรืออาจจะเป็นสปีชีส์ใหม่ก็ได้

การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* ทำได้ด้วยวิธี single spore isolation และ tissue culture บนอาหาร potato dextrose agar จากการศึกษาในขั้นต้นพบว่า การแยกเชื้อด้วยวิธี tissue culture ใช้เวลานานในการเพาะเลี้ยงจากเนื้อเชื้อให้เจริญเป็นเส้นใย และมักเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียหรือยีสต์บนชิ้นเนื้อเชื้อที่วางบนอาหาร การแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์จึงทำได้ยาก สำหรับการแยกเชื้อโดยวิธี single spore isolation พบว่าสปอร์สามารถออกเป็นเส้นใย และเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้รวดเร็วกว่า รวมทั้งมีการปนเปื้อนเกิดขึ้นน้อยกว่าด้วย วิธีนี้จึงน่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps*

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* บนอาหารวุ้น corn meal agar, Czapek's agar, malt extract agar, oat meal agar และ potato dextrose agar ที่อุณหภูมิห้องพบว่า *Cordyceps* เจริญได้ดีบนอาหาร potato dextrose agar ได้ดีกว่าอาหารชนิดอื่น ๆ อาจเนื่องมาจากอาหารชนิดนี้มีสารอาหารต่าง ๆ ที่เหมาะสมกับการเจริญของ *Cordyceps* มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น (corn meal agar, malt extract agar และ oat meal agar) หรืออาจเป็นเพราะว่าอาหาร potato dextrose agar มีแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* จึงนำไปใช้ได้ง่ายกว่าในขณะที่แหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นต้องผ่านกระบวนการย่อยสลายก่อนจึงจะนำไปใช้ได้ สำหรับอาหารสังเคราะห์ (Czapek's agar) เชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* เจริญได้ไม่ดี อาจเป็นเพราะอาหารชนิดนี้มีแหล่งคาร์บอนที่ย่อยสลายยาก และยังขาดแคลนวิตามินและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของเส้นใยด้วย เชื้อ *Cordyceps* จึงเจริญได้เพียงเล็กน้อย ถ้าหากมีการปรับสูตรอาหาร Czapek's agar ให้มีความเหมาะสมกับการเจริญของ *Cordyceps* ก็อาจนำอาหารชนิดนี้ไปใช้ในการทดสอบความต้องการแหล่งอาหารของเชื้อบริสุทธิ์

ของ *Cordyceps* ได้ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Wang (1989) ที่ได้เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* 7 สปีชีส์ และ Sung *et al.* (1995) เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* 6 สปีชีส์ ก็พบว่าสามารถเจริญได้ดีบนอาหาร potato dextrose agar เช่นเดียวกัน

เมื่อเทียบอัตราการเจริญเติบโตในอาหาร potato dextrose agar ของเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* กับการเจริญของฟังไจชนิดอื่นพบว่าเชื้อ *Cordyceps* เจริญได้ค่อนข้างช้า สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะ *Cordyceps* ต้องการสารอาหารบางอย่างจากแมลงในการเจริญของเส้นใยด้วย ดังจะเห็นได้จากการทดลองของ Sung (2000) ที่ทดลองเลี้ยง *C. militaris* ในอาหารที่มีข้าวและดักแด้ของแมลงเป็นส่วนประกอบ พบว่าเชื้อเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* เจริญเติบโตได้ดีและยังสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย

เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar ที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือ 20, 25, 30, 37, 45 °C และที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2 °C) พบว่า *Cordyceps* ทุกสปีชีส์สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20, 25 และที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2 °C) โดยเจริญได้ดีที่ 25 °C มีบางสปีชีส์เจริญได้ที่ 30 °C แต่เจริญได้ไม่ดีนัก ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 °C ไม่พบการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์ ผลการทดลองนี้ใกล้เคียงกับการเลี้ยงเชื้อ *Cordyceps* ของ Hywel-Jones (1994) และ Sung *et al.* (1995) ที่รายงานว่าเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 22 และ 20 °C ตามลำดับ

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* บนอาหาร potato dextrose agar ที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 4, 5, 6, 7, 8 และ ไม่ปรับ pH (pH 5.6) ที่อุณหภูมิ 25 °C พบว่าเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* เจริญได้ในอาหารทุก pH ที่ทดลอง กล่าวคือมีความกว้างของโคโลนีใกล้เคียงกัน โดยอาหารที่มี pH 5-6 จะเป็นอาหารที่เส้นใยของเชื้อบริสุทธิ์เจริญได้ดีที่สุด แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Cordyceps* เจริญได้ในอาหารที่มี pH ทั้งที่เป็นกรดและเบส โดยจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีสภาพเป็นกรดอ่อน

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

1. ก่อนการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างควรมีการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับ *Cordyceps* อย่างละเอียดเสียก่อนเพื่อให้ทราบลักษณะทั่วไป แหล่งอาศัย ชนิดของ host และแหล่งอาศัยของ host ตามธรรมชาติ เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการวินิจฉัยขั้นต้นเมื่อพบตัวอย่าง
2. เนื่องจาก *Cordyceps* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแมลง ผู้ที่ศึกษาเกี่ยวกับ *Cordyceps* จึงควรมีความรู้เกี่ยวกับแมลงอยู่บ้าง เช่น การดำรงชีวิต แหล่งอาศัยของแมลง เป็นต้น พื้นที่ใดที่มีแมลงอาศัยอยู่หนาแน่น ก็มีความเป็นไปได้ว่าจะมี *Cordyceps* อาศัยอยู่ในปริมาณมากเช่นกัน
3. โดยทั่วไปเรามักจะมองไม่เห็น host ที่เป็นแหล่งอาศัยของ *Cordyceps* การเก็บตัวอย่างควรทำด้วยความระมัดระวัง ไม่ให้ stroma ของ *Cordyceps* หลุดออกไปจากตัวแมลง หรือแมลงเกิดความเสียหาย เพราะจะต้องนำข้อมูลในส่วนนี้ไปใช้ในขั้นตอนการจัดจำแนก
4. ตัวอย่างของ *Cordyceps* ที่เก็บรวบรวมได้ควรเก็บใส่กล่องหรือถุงพลาสติกแล้วนำไปไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 10 °C ถ้ายังไม่มีมีการตรวจสอบและแยกเชื้อในทันที เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะลดน้อยลงทำให้การเจริญลดลงด้วย ดังนั้นตัวอย่างจึงยังคงสภาพเดิม อีกประการหนึ่งคือ ตัวอย่างที่เก็บมายังคงติดอยู่กับ host ที่เป็นแหล่งอาหารจึงทำให้มีความสด และไม่สลายไป
5. การศึกษา *Cordyceps* ในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก และยังอยู่ในวงจำกัด ข้อมูลต่าง ๆ รวมทั้งหนังสือ หรือรูปวิธานมีอยู่น้อย จึงเกิดปัญหาในการบ่งบอกชื่อวิทยาศาสตร์ในระดับสปีชีส์ จึงควรสอบถามข้อมูลโดยตรงจากผู้เชี่ยวชาญหรือผู้ที่ศึกษา *Cordyceps* มาก่อน ควรทำฐานข้อมูลและ pictorial key เพื่อให้นักอนุกรมวิธานทำได้รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น
6. ถ้าต้องการให้มองเห็นลักษณะทางจุลภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น ลักษณะของ asci, ascospores หรือ part-spores อย่างชัดเจน ควรทำเป็นสไลด์กึ่งถาวร โดยใช้ lactophenol cotton blue เป็น mounting media
7. ปัญหาที่มักพบบ่อย ๆ ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์คือการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย จึงควรใช้สารปฏิชีวนะ เช่น chloramphenicol ผสมในอาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วย
8. เนื่องจากเชื้อบริสุทธิ์ของ *Cordyceps* เจริญได้ซ้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงควรทดลองเลี้ยงในอาหารหลาย ๆ ชนิด เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อคัดแปลงที่มีส่วนประกอบของแมลงที่อุณหภูมิและ pH ต่าง ๆ หรือเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสม chitin เป็นต้น

9. เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ควรเก็บในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 10 °C จะเก็บไว้ได้นานประมาณ 2-5 ปี ไม่ควรเก็บไว้ในอาหารวุ้นเพราะจะทำให้กลายพันธุ์ได้ง่าย (Isaac & Jennings, 1995)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University