

บทที่ 5

อภิปรัชญาการวิจัย

จากการนำเชื้อรา จำนวน 165 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหาร EPM ที่มี colloidal chitin 2% เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วนำน้ำกรองเลี้ยงเชื้อรา มาทดสอบผลยับยั้งการเจริญเชื้อราโรคพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. โดย cylinder plate method พบว่า *Trichoderma* sp. CK₂₀ ซึ่งแยกได้จากเห็ดสามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้ง *Cladosporium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. โดยให้ผลในการยับยั้ง *Cladosporium* sp. ได้ดีที่สุด แต่เมื่อนำเชื้อราทั้งหมดมาทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์พบว่า ไอโซเลทที่ให้ผลยับยั้ง *Cladosporium* sp. ได้ดีที่สุดคือ *Trichoderma* sp. CH₄₃ แต่น้ำกรองเลี้ยงเชื้อราจากไอโซเลทนี้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Cladosporium* sp. ได้ ซึ่งอาจมีกลไกอื่นนอกเหนือไปจากการสร้างสารออกมาทำลายเชื้อโรคพืช และเมื่อนำน้ำกรองเลี้ยงเชื้อราจาก *Trichoderma* sp. CK₂₀ มาทดสอบการยับยั้ง *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. โดย poisonous food technique กลับพบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *Cladosporium* sp. ของ *Trichoderma* sp. CK₂₀ น้อยกว่า *Paecilomyces* SI-11 และ *Trichoderma* sp. SC-23 และไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lasiodiplodia* sp. ได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าเก็บเชื้อราไว้เป็นเวลานานหรืออาจเก็บด้วยวิธีที่ไม่เหมาะสม จึงทำให้ผลยับยั้งลดลง

จากการวิจัยถึงแม้ว่าจะกระตุ้นเชื้อให้ผลิตไคตินเนส โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหาร chitin agar ที่มีไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหาร EPM แต่ก็ยังไม่อาจสรุปได้ว่าการยับยั้งนั้นเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนส ซึ่งเชื้อราอาจสังเคราะห์สารชนิดอื่นออกมาในอาหารซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของราโรคพืชโดยมีผลต่อการสร้างผนังเซลล์ และเชื้อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา (เกษม, 2532) ฉะนั้นในการทดลองต่อไปจึงควรพัฒนาวิธีการใหม่ๆ เช่น การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตก่อนนำมาทดสอบ เช่น การทดลองของ Gunaratna and Balasubramanian (1994) ซึ่งนำเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Puccinia arachidis* พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของ uredospore และยับยั้งการเจริญของ germ tube ได้ นอกจากนี้ de la Cruze *et al.* (1995) ได้ทำเอนไซม์จาก *Trichoderma* sp. ให้บริสุทธิ์บางส่วน พบว่า เอนไซม์ที่ได้จะสามารถย่อยผนังเซลล์ของ *Borytis cinerea*, *Gibberella fujikuroi* และ *Phytophthora syringae* ได้ หรืออาจนำ culture filtrate มาทำ dialysis เพื่อทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้นก่อนนำมาทดสอบ ถ้าหากพิจารณาจากค่า enzyme activity ของ *Trichoderma* sp. CK₂₀ ร่วมกับผลยับยั้งการเจริญก็อาจพอสรุปได้ว่าการยับยั้งดังกล่าวมิได้เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนสเพียงอย่างเดียว เพราะมีค่า enzyme activity ต่ำกว่าไอโซเลทอื่นซึ่งให้ผลในการยับยั้งน้อยกว่า จากการศึกษาของณัฐธิดา (2540) ซึ่งใช้น้ำเลี้ยงจากเชื้อรา จำนวน 41 ไอโซเลทมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของ

Cladosporium sp. พบว่าน้ำเลี้ยงจากเชื้อรา *Trichoderma* sp. 3 และ *Penicillium* sp. 24 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Cladosporium* sp. ได้ โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงไฮฟาเท่ากับ 16 และ 24 มม. ตามลำดับ แต่ในการวิจัยครั้งนี้ น้ำกรองเลี้ยงเชื้อราจาก *Trichoderma* sp. CK₂₀, *Trichoderma* sp. CT₂₆ และ *Trichoderma* sp. SC-23 ยับยั้งการเจริญของ *Cladosporium* sp. โดยให้วงไฮฟาขนาด 27, 9 และ 16.7 มม. ตามลำดับ ซึ่งพบว่าน้ำกรองเลี้ยงเชื้อราที่ให้ผลยับยั้ง *Cladosporium* sp. ได้ในทั้ง 2 การทดลองเป็นเชื้อราใน genus *Trichoderma* sp. เหมือนกัน ส่วนการศึกษาผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืช โดย *Bacillus* P9 ของ Wannissorn และคณะ (1996) ซึ่งใช้วิธี poisonous food technique พบว่าน้ำเลี้ยงจาก *Bacillus* P9 ที่ความเข้มข้น 10%, 20% และ 40% ให้ผลยับยั้งการเจริญของ *Cladosporium* sp. เป็น 10%, 30% และ 100% ตามลำดับ ส่วนเครือวัลย์ (2541) ใช้ความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* M16 6.25% ให้ผลยับยั้งต่อการเจริญของ *Cladosporium* sp. เป็น 71.4% และ *Lasiodiplodia* sp. เป็น 84% เมื่อเปรียบเทียบกับผลการยับยั้ง *Cladosporium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. จากน้ำกรองเลี้ยงเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท ในการวิจัยครั้งนี้โดย poisonous food technique เช่นกัน โดยใช้น้ำกรองเลี้ยงเชื้อรา ความเข้มข้น 6.67% (ในอาหาร PDA 15 มล. มีน้ำกรองเลี้ยงเชื้อรา 1 มล.) พบว่า น้ำกรองเลี้ยงเชื้อราจาก *Trichoderma* sp. SC-23 ให้ผลยับยั้งการเจริญของ *Cladosporium* sp. ได้ดีที่สุดคือ 36.36% และ *Trichoderma* sp. SC-21 ให้ผลยับยั้งการเจริญของ *Lasiodiplodia* sp. ได้ดีที่สุดคือ 26.67% ซึ่งผลการยับยั้งโดยเชื้อ *Trichoderma* sp. SC-23 และ *Trichoderma* sp. SC-21 น้อยกว่า *Bacillus* M₁₆ จึงควรแก้ไขปรับปรุงวิธีการทดลองตลอดจนศึกษาในจุลินทรีย์หลายๆ ชนิด เช่น แบคทีเรียและแอคติโนมัยซิส เป็นต้น ตลอดจนคัดเลือกรูปแบบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้สูงๆ โดยอาจชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ไคตินเอส ดังเช่นการศึกษาของ Chernin *et al.* (1997) ซึ่งได้ทำการโคลนยีน *chi A* และ *E. agglomerans* และชักนำเข้าสู่เซลล์ *E. coli* พบว่า endochitinase ที่ถูกสร้างขึ้นมีคุณสมบัติในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *F. oxysporum* และ *R. solani* เป็นต้น เพื่อใช้แทนสารเคมีในการควบคุมโรคพืชและนำไปประยุกต์ใช้ในทางการเกษตร เช่น ในปี ค.ศ.1999 Hallmann *et al.* ได้ชักนำให้จุลินทรีย์ที่สามารถใช้ไคตินได้ในดินและละแวกบริเวณ rhizosphere เพิ่มจำนวนขึ้น โดยการเติมไคตินปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักลงไปในดิน ซึ่งพบว่าจะสามารถกำจัดพวก nematode ในดินได้ ซึ่งอาจจะนำวิธีการนี้มาใช้โดยการคลุกเปลือกกุ้งที่บดละเอียด ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งที่มีเป็นจำนวนมากลงไปในดิน เพื่อชักนำให้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้ไคตินเพิ่มจำนวนขึ้น ซึ่งจะมีผลในด้านการควบคุมเชื้อก่อโรคพืชในดินและพวก nematode ได้อีกทางหนึ่ง แต่ทั้งนี้การควบคุมในสภาวะแบบเปิดก็ต้องศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับเชื้อกล่าวคือ เชื้อนั้นจะต้องไม่ทำอันตรายให้แก่พืชและสัตว์ นอกจากนี้สภาพแวดล้อมที่ใช้ต้องเหมาะสมจึงจะทำให้การควบคุมนั้นเกิดประโยชน์สูงสุด