บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรจำนวน 10 ชนิด พบเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์จำนวน 179 ไอโซเลท โดยสามารถตรวจพบจากส่วนใบมากที่สุด สำหรับการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ได้มากหรือน้อยนั้น มีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง อาทิเช่น ขั้นตอนของการฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวพืช ซึ่งผู้ทำวิจัยต้องแน่ใจว่า ได้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณผิวพืชได้หมด เพื่อป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการเจริญปกคลุมผิวพืช ทำให้เชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ไม่สามารถเจริญออกมาได้ (Shimizu *et al*., 2000) นอกจากนี้ชนิดของพืชและแหล่งของพื้นที่ที่ปลูกพืชก็มีผลต่อจำนวนและปริมาณของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ด้วยเช่นกัน(Sardi *et al*., 1992) สภาพแวดล้อมและภูมิอากาศต่างเป็นปัจจัยที่มีผลต่อชนิดและปริมาณของเชื้อเอนโดไฟท์ที่พบในพืชในพื้นที่ต่างๆ และการมีเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์หรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับอายุพืช ระยะการเจริญเติบโต ชนิดของดินที่ปลูก และฤดูกาล (วันวิสาข์, 2546)

จากการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานของเชื้อทั้ง 179 สามารถจำแนกสกุลของเชื้อได้ 4 สกุล ได้แก่ *Streptomyces* จำแนกได้ 13 ไอโซเลท สกุล *Nocardiopsis* 1 ไอโซเลท สกุล *Nocardioides* 1 ไอโซเลท และสกุล *Nocardia* 1 ไอโซเลท การตรวจพบเชื้อดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมา (Takao *et al*.,1995; Shimizu *et al*.,2000; Taechowisan, 2003) ที่พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นพืชส่วนมากจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งเชื้อสกุลนี้มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ และplant growth hormone สามารถกระตุ้นให้ต้นพืชมีการป้องกันตัวเองจากการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ส่งเสริมความแข็งแรง และการเจริญเติบโตของต้นพืชได้ดี

การทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคของคะน้า ได้แก่ เชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุด เชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคโคนก้านใบและต้นเน่า และเชื้อรา *Sclerolium rolfsii* สาเหตุโรครากเน่าพบว่า FIT2 สามารถยับยั้งเชื้อ *A. brassicicola* LEM1 สามารถยับยั้งเชื้อ *R. solani* และ HOU1 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* ได้ที่ 82.81% 83.57% และ 90.00% ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Sardi *et al*. (1992) ที่รายงานว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์บางชนิดจะสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ 1-2 ชนิดเท่านั้น จัดเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะพวก narrow antimicrobial spectrum มักพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาคุณสมบัติในด้านต่างๆ ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ เพื่อเป็นข้อมูลที่จะเป็นประโยชน์ในการเพิ่มปริมาณเชื้อเพื่อนำไปใช้ในอนาคต และใช้ประกอบการจัดจำแนกในระดับสายพันธุ์ (species) ร่วมกับการวิเคราะห์หา diaminopimelic acid isomer และ whole cell sugar ผลจากการศึกษาในเบื้องต้นพบว่า

FIT2 LEM1 และ HOU1 เมื่อเจริญบนอาหารต่างชนิดกัน จะทำให้เกิดสีต่างกันเล็กน้อย ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร และการแพร่ของรงควัตถุจะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและชนิดของอาหารด้วย โดยอาจเกิดความแตกต่างของสีเล็กน้อยสอดคล้องกับรายงานของ Shimizu *et al*., 2000 ที่ศึกษาถึงลักษณะของเชื้อบนสภาพอาหาร ISP 2-5 เพื่อใช้ในการจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีส และพบว่าอาหารต่างชนิด มีผลต่อการเจริญของเชื้อและการแพร่ของรงควัตถุที่แตกต่างกัน

เมื่อศึกษาลักษณะของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทเป็นเชื้อที่ต่างสายพันธุ์กัน โดยการเปรียบเทียบรูปร่างของสปอร์ ผิวของสปอร์และลักษณะการเรียงตัวที่ต่างกัน แต่ยังไม่สามารถระบุถึงระดับสายพันธุ์ (species) ได้เนื่องจากต้องวิเคราะห์หา diaminopimelic acid isomer และ whole cell sugar ร่วมด้วย

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมมีความสำคัญมาก เนื่องจากจุลินทรีย์ไม่มีกระบวนการที่ดีในการควบคุมการถ่ายเทความร้อนของเซลล์ ดังนั้นอุณหภูมิภายนอกจึงมีผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ในระบบเมแทบอลิซึม ซึ่งมีผลต่อการเจริญและผลการศึกษาพบว่า FIT2 สามารถเจริญได้ดีมากที่ระดับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส LEM1 สามารถเจริญได้ดีมากที่ระดับอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส และ HOU1 สามารถเจริญได้ดีมากที่ระดับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ (Porter, 1971) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญนั้น มีผลต่อลักษณะของโคโลนี การสร้างสปอร์ และความสามารถในการสร้างสารเมแทบอไลต์หลายชนิดได้ (นพรัตน์, 2546)

ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลท FIT2 อยู่ระหว่าง 5-9 ไอโซเลท LEM1 อยู่ระหว่าง 8-9 และไอโซเลท HOU1 อยู่ที่ 7 ส่วนที่ระดับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4 ไม่พบการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสจำเป็นที่จะต้องทราบถึงระดับค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม เนื่องจากปัจจัยข้อนี้มีผลต่อระบบเมแทบอลิซึมของเชื้อซึ่งส่งผลต่อการเจริญของเชื้อโดยตรง

การศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่คัดเลือกโดยมีอาหาร ISP 9 เป็นอาหารพื้นฐาน เนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดมีความต้องการแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน ผลการศึกษาพบว่า LEM1 สามารถเจริญได้บนอาหาร ISP 9 ที่มีแหล่งคาร์บอนที่ต่างกันทุกชนิด และในอาหาร ISP 9 ที่ไม่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ก็สามารถพบการเจริญของเชื้อได้ FIT2 สามารถเจริญได้บนอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ISP 9 ที่มีแหล่งคาร์บอนที่ต่างกันเกือบทุกชนิด รวมทั้งในอาหาร ISP 9 ที่ไม่มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ยกเว้นอาหาร ISP 9 ที่ผสมน้ำตาล Raffinose พบว่าไม่มีการเจริญของเชื้อ HOU1 สามารถเจริญบนอาหาร ISP 9 ที่ผสมน้ำตาล *D*-glucose และ *D*-mannose เท่านั้น ส่วนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลชนิดอื่น และที่ไม่มีน้ำตาล ไม่ปรากฏการเจริญของเชื้อ และเมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่คัดเลือกมาทดสอบการผลิตเมลานินของเชื้อพบว่า เชื้อทั้ง 3 ชนิดไม่มีการผลิตเมลานิน การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่าง ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีรงควัตถุพบว่า เฉพาะ LEM1 เท่านั้น ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีรงควัตถุ เมื่อค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเปลี่ยนแปลงไป ส่วน FIT2 และ HOU1 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ

การศึกษาการย่อยสลายแป้งของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท โดยทดสอบทั้งบนสภาพอาหารแข็งและอาหารเหลวพบว่าสามารถย่อยแป้งได้ทั้ง 3 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยลักษณะที่ปรากฏบนอาหารแข็งคือ รอบโคโลนีของเชื้อใส ส่วนในอาหารเหลวพบว่า เมื่อหยดไอโอดีนลงไปอาหารมีสีเดิม ต่างจากชุดควบคุมซึ่งเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

ความสามารถในการเปลี่ยนนมให้เป็นเพปโทนของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทพบว่า ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ (innert) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม นั่นคือเชื้อไม่สามารถเกิดกระบวนการย่อยสลายโปรตีน (peptonization) ได้

การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้น พบว่า FIT2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อรา *A. brassicicola* ที่ 68.92 เปอร์เซ็นต์ ถือว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งในระดับสูง LEM1ให้ผลการยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อรา *R. solani* มากที่สุดเท่ากับ 49.45 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับต่ำ และHOU1ให้ผลการยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อรา *S. rolfsii* มากที่สุดเท่ากับ 59.93 เปอร์เซ็นต์ ถือว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับปานกลาง จากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่าสารปฏิชีวนะแต่ละกลุ่มมีความสามารถในการทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน นอกจากนี้การลดลงของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคของคะน้านี้ อาจเนื่องมาจากกรรมวิธีในการทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุ ด้วยวิธีการ dual culture เชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 3 ไอโซเลทสามารถยับยั้งได้สูงมาก แต่เมื่อสกัดเฉพาะสารปฏิชีวนะที่เชื้อปล่อยลงสู่อาหารเหลว IMB-2 โดยใช้ระยะเวลาเพียง 7 วัน และทำการแยกตะกอนของเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 3 ไอโซเลทออก และนำอาหารเหลวผสมกับอาหาร IMA-2 และทำการทดสอบเชื้อ ผลคือความสามารถในการยับยั้งลดลง ซึ่งต่างจากวิธี dual culture ซึ่งเชื้อสามารถผลิตสารปฏิชีวนะลงสู่อาหาร และมีผลไปยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุของโรคได้ตลอดระยะเวลาที่ทำการทดสอบ สอดคล้องกับชนิกานต์ (2544) ที่รายงานว่า สารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นสะสมอยู่ที่บริเวณเส้นใย (mycelium) หรือสะสมในอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เลี้ยงเชื้อหรืออาจพบได้ทั้งในบริเวณ mycelium และในอาหารเลี้ยง และการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการสร้างสารปฏิชีวนะนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและชนิดของสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้าง นอกจากนี้ส่วนประกอบชนิดอื่นๆในอาหารและสภาวะในการเลี้ยงเชื้อก็มีผลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อด้วยเช่นกัน อาจเป็นไปได้ว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงในการทดลองนี้ไม่เหมาะต่อการสร้างและความเสถียรของสารปฏิชีวนะ รวมทั้งสารปฏิชีวนะนั้นอาจสะสมในบริเวณ mycelium ดังนั้นเมื่อทำการแยกตะกอนของเชื้อออก จึงทำให้สารปฏิชีวนะนั้นมีปริมาณจำกัดเนื่องจากแหล่งสะสมสารที่อยู่บริเวณ mycelium ถูกแยกออกไป

การทดสอบความสามารถในการอยู่อาศัยของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ภายในเนื้อเยื่อคะน้า พบว่าไม่สามารถแยกเชื้อ แอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ทั้ง FIT2 LEM1 และ HOU1จากภายในเนื้อเยื่อของคะน้า แต่จะพบเชื้อแอคติโนมัยซีสสกุล *Streptomyces* ที่แตกต่างกัน 8 ไอโซเลท ทำให้สรุปผลได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 3 ไอโซเลทที่แยกได้พืชสมุนไพรอาจเกิดการแข่งขัน (competition) ระหว่างเชื้อและจุลินทรีย์ในดินหรือในต้นคะน้าเอง ทำให้ไม่สามารถอาศัยในต้นคะน้าได้ อีกทั้งเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 3 ไอโซเลทแยกได้จากพืชในวงศ์ (family) ที่ต่างจากคะน้า รวมทั้งสภาพแวดล้อมต่างๆ ไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อทั้ง 3ไอโซเลท จึงทำให้เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากพืชสมุนไพร ไม่สามารถอยู่อาศัย (colonization) ในคะน้าซึ่งเป็นพืชตระกูลกะหล่ำได้ และสอดคล้องกับรายงานของ William *et al.*(1989) ที่กล่าวว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสในสกุล *Nocardioides* พบมากในดินและพืชสมุนไพร สกุล *Nocardia* พบมากในดินและสกุล *Nocardiopsis* พบมากในดิน เมล็ดธัญพืช และ Kunoh (2002) รายงานว่าในการทดสอบควรใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีสจะสามารถอยู่อาศัยได้โดยไม่เกิดการแข่งขัน (competition) ระหว่างเชื้อและจุลินทรีย์ในดิน

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรคของคะน้าที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *A. brassicicola* พบว่า FIT2 HOU1 และ LEM1 สามารถควบคุมการเกิดโรคได้โดยพืชไม่แสดงอาการของโรค เมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งแสดงอาการแคระแกร็น รากสั้น ความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 3 การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* พบว่า LEM1 สามารถควบคุมการเกิดโรคได้โดยพืชไม่แสดงอาการของโรค เมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งแสดงอาการแคระแกร็น รากสั้น ความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 5 คือ ต้นตาย และรากสั้นมาก และการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *S. rolfsii* พบว่า HOU1 สามารถควบคุมการเกิดโรคได้โดยพืชไม่แสดงอาการของโรค เมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งแสดงอาการแคระแกร็น รากสั้น ความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 5 คือ ต้นตาย และรากสั้นมาก และเมื่อปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* ร่วมกับเชื้อแอคติโนมัยซีสที่คัดเลือกได้ พบว่า FIT2 ส่งเสริมความสูงและความสมบูรณ์ต้นกล้าได้มากที่สุด เท่ากับ 11.39

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เซนติเมตร การปลูกเชื้อรา *R. solani* ร่วมกับเชื้อแอคติโนมัยซีสที่คัดเลือก พบว่า LEM1 ส่งเสริมความสูงและความสมบูรณ์ต้นกล้าได้มากที่สุด เท่ากับ 11.44 เซนติเมตร และการปลูกเชื้อรา *S. rolfsii* ร่วมกับเชื้อแอคติโนมัยซีสที่คัดเลือก พบว่าส่งเสริมความสูงและความสมบูรณ์ต้นกล้าได้มากที่สุด เท่ากับ 12.14 เซนติเมตร ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 3 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค โดยดูจากความรุนแรงของโรคที่ปรากฏเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 3 ไอโซเลทนี้น่าจะมีบทบาทในด้านการส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าคะน้าเนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบด้านการเจริญเติบโตของพืช พบว่าต้นกล้าที่ได้รับการปลูกเชื้อแอคติโนมัยซีสร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรคของคะน้า มีความแข็งแรงและสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าในชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับ Marja (2000) ซึ่งรายงานว่า เชื้อ *Streptomyces griseoviridis* ซึ่งเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิดหนึ่ง สามารถผลิตสาร auxin (indole – 3 – acetic acid, IAA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ช่วยกระตุ้นการเจริญ ความแข็งแรง และการเพิ่มผลผลิตของพืชได้ และ Takao *et al.* (2000) รายงานว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสสามารถสร้างสารปฏิชีวนะและฮอร์โมนบางชนิด ไปกระตุ้นให้ต้นพืชสามารถป้องกันตัวเองจากการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรค มีความแข็งแรงและเจริญเติบโตได้ดี รวมทั้งรายงานของ Kunoh (2002) ซึ่งกล่าวว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์อาจมีบทบาทต่อความสมบูรณ์และการพัฒนาของพืช เนื่องจากเชื้อสามารถส่งผลต่อการเจริญของพืชโดยการเพิ่มความสามารถในการดูดซึมสารอาหารหรือโดยการผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชได้ อย่างไรก็ตาม Rukayadi (1995) ได้รายงานว่าการทดสอบในสภาพแปลง โดยการคัดเลือกเชื้อเพื่อควบคุมโรคนั้น เชื้ออาจสูญเสียความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์เมื่อสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลง และเชื้อจุลินทรีย์อาจมีการตอบสนองที่เปลี่ยนไปจากเดิมได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved