บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองใช้กรัมม็อกโซน (paraquat dichloride) ช่วยในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum* sp. พบว่า กรัมม็อกโซนสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง fruiting body ขึ้นอยู่ทั่วใบปกติ และที่เป็นโรค เช่นเดียวกับที่กาญจนา (2536) ได้รายงานถึงเรื่องใช้สารละลาย paraquat ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้าง fruiting body ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporiodes* บนใบมะม่วง ในการปลูกเชื้อ *Colletotrichum* sp. ลงบนใบลำไยโดยวิธีจุ่มลงในสารแขวนลอยสปอร์ และฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ลงบนต้นกล้าลำไยในโรงเพาะชำ พบว่าเชื้อราสามารถทำให้ใบแสดงอาการใบจุดรุนแรง เหมือนกับที่เกิดขึ้นในสภาพธรรมชาติ โดยแผลที่เกิดขึ้นจากการปลูกเชื้อโดยวิธีจุ่งลงในสารแขวนลอยสปอร์ มีสีน้ำตาลเข้ม ตรงกลางเป็นสีเทา และมีกลุ่มของ สปอร์สีส้มเกาะอยู่บริเวณกลางแผล ส่วนแผลที่เกิดขึ้นจากการปลูกเชื้อบนใบลำไยในโรงเพาะชำ จะเป็นจุดสีดำ รูปร่างค่อนข้างกลม กระจายอยู่ตามใบ และเมื่อนำใบที่ผ่านการปลูกเชื้อทั้งสองวิธีมากระตุ้นให้เกิดการสร้างสปอร์ โดยใช้สารละลายกรัมม็อกโซนเป็นตัวกระตุ้น ทั้งบนใบที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวก่อน และไม่ทำการฆ่าเชื้อ มีกลุ่มของสปอร์สีส้มขึ้นอยู่เป็นจำนวนมาก และยังพบว่ามีกลุ่มของสปอร์ขึ้นอยู่เฉพาะบนส่วนของเนื้อเยื่อใบที่ถูกทำลายด้วยกรัมม็อกโซนเท่านั้น อาจเป็นเพราะว่าเนื้อเยื่อใบที่ถูกกรัมม็อกโซนทำลายมีการปลดปล่อยสารบางชนิดที่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อ ทำให้เชื้อสร้าง fruiting body ขึ้นมาบนใบ ดังในรายงานการทดลองของ Cerkauskas และ Sinclair (1982) ที่พบว่ามีการปลดปล่อยสาร eleotrolytes และ amino acid บนเนื้อเยื่อของถั่วเหลืองที่ถูก paraquat เข้าทำลาย ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า เชื้อ *Colletotrichum* sp. เป็นเชื้อที่เจริญแบบแฝงบนใบลำไย จะเจริญและสร้าง fruiting body เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม หรือเมื่อเนื้อเยื่อใบเริ่มเสื่อมสภาพ

การศึกษาการเข้าทำลายของ *Colletotrichum* sp. พบว่าเชื้อสามารถงอกบนแผ่นกรอง millipore ในชั่วโมงที่ 5 แต่ไม่พบการสร้าง appressorium บนกระดาษกรอง ส่วนในการศึกษาการเข้าทำลายบนใบลำไย ในสภาพที่ควบคุมความชื้นตลอดเวลา พบว่าเชื้อสร้าง appressorium ในชั่วโมงที่ 9 สร้าง vesicle ในช่วงของชั่วโมงที่ 30-36 และใบเริ่มเกิดแผล necrosis ขนาดเล็กใน

ชั่วโมงที่ 72 จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า เกิดการเข้าทำลายใบลำไยอย่างสมบูรณ์ โดยสังเกตจากการเจริญของ appressorium ที่มีสีน้ำตาลเข้ม (melanized appressorium) เหมือนการทดลองของ Byrne และคณะ (1997) ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับการงอกของสปอร์ และการสร้าง appressorium ของเชื้อ *C. coccodes* ที่พบว่า melanized appressoria มีความสำคัญต่อการยึดติดกับเนื้อเยื่อใบ และเกิดการเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชได้สำเร็จ จากผลการทดลองยังพบการสร้าง vesicle ที่สามารถพัฒนาต่อเป็น primary และ secondary hypha ซึ่งมีการเจริญแบบ intracellular และยังมีการสร้างสปอร์ใน fruiting body ที่มีชื่อว่า acervulus เหมือนดังรายงานการทดลองต่าง ๆ ที่ศึกษาเกี่ยวกับการเข้าทำลายของเชื้อ *Colletotrichum* spp. และมีการเข้าทำลายแบบ intracellular hemibiotrophy โดยสร้างโครงสร้างในการเข้าทำลายพืชแบบต่าง ๆ คือ germ tube, appressorium, intracellular vesicle, primary hypha และ secondary hypha (Perfect และคณะ, 1999 และ Louise และคณะ, 1996)

ในการสกัดสารพิษจากเชื้อ *Colletotrichum* sp. ด้วย ethyl acetate ได้สารสกัดที่ตกผลึกสีขาว และเมื่อนำสารสกัดมาตรวจสอบหาสารพิษโดยวิธี TLC พบว่าสารสกัดไม่แยกออกเห็นเป็นแถบที่ชัดเจน และเมื่อทดสอบการดูดกลืนแสง พบว่าสารดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

การทดสอบสารสกัดหยาบกับพืชทดสอบ พบว่าสารสกัดหยาบมีความสามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดผักกาดขาว ทำให้เกิดรอยซีดเหลืองรอบบริเวณที่หยดสาร และพัฒนาเป็นแผลสีดำกับใบถั่วเขียว และใบลำไยได้ ในการทดลองของ Anderson (1978) พบว่า glucan-containing polysaccharide ที่สกัดได้จากเชื้อ *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. trifoli* และ *C. destructivum* ทำให้เกิดการอุดตันในท่อน้ำ และแสดงอาการ browning กับต้นกล้าของถั่วลิสง

สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1/10 ทำให้เมล็ดผักกาดขาวงอก แต่มีการเจริญที่น้อยกว่าตัวเปรียบเทียบ การทดสอบกับใบถั่วเขียวและใบอ่อนลำไย ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ใบเกิดแผล คือ $1/10^2$ ส่วนใบแก่ลำไยที่ความเข้มข้น 1/1 เท่านั้นที่ทำให้ใบแก่ลำไยเป็นแผลได้ เมื่อนำสารสกัดหยาบมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้น แล้วนำมาหาค่า MIC โดยทดสอบกับการงอกของเมล็ดผักกาดขาว ใบถั่วเขียว และใบอ่อนลำไย พบว่ามีค่า 125, 15.62 และ 31.25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับ

ในการสกัดสารพิษจากแผลของโรคใบจุดดำที่เกิดขึ้นในสภาพธรรมชาติด้วย PBS buffer ได้สารสกัดที่มีสีน้ำตาลเข้ม และเมื่อนำสารสกัดมาตรวจหาแถบสารพิษโดยวิธี TLC ไม่พบว่าเกิดแถบที่ชัดเจน แต่สารดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จะเห็นว่าผลการทดลองนี้คล้ายกับสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา การที่ได้แถบสารพิษไม่ชัดเจนอาจเป็นเพราะว่าใช้สารละลายตัวพาที่ไม่เหมาะสม ต้องมีการหาสารละลายตัวพาที่เหมาะสมใหม่ จึงจะสามารถตรวจสอบหาแถบสารพิษได้

เมื่อนำสารสกัดมาทดสอบกับพืชทดสอบ พบว่าสารสกัดไม่สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดผักกาดขาวได้ เนื่องจากมีความเข้มข้นที่น้อยเกินไป ส่วนการทดสอบกับใบถั่วเขียวและใบอ่อนลำไย พบว่าสารสกัดสามารถทำให้เกิดแผลบนใบได้

การดูดกลืนแสงของสารพิษที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ภายใต้แสง UV เหมือนกับรายงานการทดลองของ Amusa (1994) ที่ทำการสกัดสารพิษจาก *Colletotrichum* spp. พบว่าสารพิษที่สกัดได้ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร ภายใต้แสง UV และมีความสามารถในการทำให้เกิดแผลจุดตายกับพืชอาศัยที่อ่อนแอ สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ด และยับยั้งการเจริญของต้นกล้าได้

จากผลการทดลองกับพืชทดสอบต่าง ๆ ของสารสกัดจากเชื้อรา และสารสกัดจากแผลใบจุดดำ พบว่าสารสกัดจากทั้ง 2 แหล่ง มีความเป็นพิษต่อพืชทดสอบหลายชนิด คือไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย อาจกล่าวได้ว่าสารสกัดเหล่านี้เป็นพวก non-specific host toxin ซึ่ง Rudolph (1976) และ Scheffer (1983) กล่าวว่า non-specific host toxin นั้นเป็นพิษกับพืชหลายสายพันธุ์ แต่ความเป็นพิษจะมีความสัมพันธ์กับพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุที่ผลิตสารพิษนั้น ๆ

ในการทดสอบสารสกัดกับใบลำไยแต่ละพันธุ์ จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 31.25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งเท่ากับค่า MIC ที่ได้ทำการทดสอบ สามารถทำให้ใบลำไยทุกพันธุ์เกิดแผลได้ แสดงว่าวิธีการทดลองนี้ไม่สามารถหาความต้านทานของลำไยต่อสารพิษได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

เมื่อทำการตรวจสอบหาชนิดของสารพิษที่สกัดได้จากเชื้อราพบว่า หลังจากทดสอบหาน้ำตาลโดยวิธี Anthrone test ซึ่งสารละลายสารสกัดเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเขียวเข้มเหมือนกับสารละลาย glucose ส่วนการทดสอบโปรตีนด้วยวิธี Ninhydrin test และ Biuret test พบว่าสารสกัดไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายไข่ขาว และ casein ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดมีน้ำตาลต่อกันเป็นโมเลกุลใหญ่ (จาก TLC) หรือ polysaccharide เหมือนกับรายงานการทดลองเกี่ยวกับการสกัดสารพิษจาก *Colletotrichum* spp. พบว่าสารสกัดส่วนมากจะมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ ซึ่งในคาร์โบไฮเดรตนี้มีองค์ประกอบย่อยที่แตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของเชื้อ องค์ประกอบย่อยเหล่านี้ คือ galactose, mannose, glucose และ rhamnose (Frantzen และคณะ, 1982 และ Barjau และคณะ, 1995)

การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมี ได้ทำการทดสอบผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum* sp. บนอาหาร PDA ที่ผสมสารเคมีชนิดต่าง ๆ พบว่าสารเคมีเกือบทุกชนิด ได้แก่ Antracol 70 wp, Benlate OD, Dithane M-45 และ Octave สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ยกเว้น Captan 50 WP และ Daconil ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้รองลงมาตามลำดับ