# บทที่ 5
# สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดสอบหาวิธีการที่เหมาะสมในการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากแปะก๊วยในวิธีที่ 1, 2, 3 และตัวควบคุม พบว่าสามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมดจำนวน 10, 6, 5 และ 9 ชนิด ตามลำดับ โดยในวิธีที่ 1 พบว่าการล้างชิ้นพืชผ่านน้ำไหลเพียงอย่างเดียวไม่สามารถกำจัดเชื้อราบางชนิดที่ฝังตัวอยู่บริเวณพื้นผิวที่ไม่สม่ำเสมอกันของตัวอย่างพืชได้ (Bills, 1996) โดยจะเห็นได้จากการแยกพบเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. ได้มากที่สุด (19.05%) (ตารางที่ 1 ภาคผนวก ข) ซึ่งโดยทั่วไปเชื้อราชนิดนี้เป็นเชื้อรา epiphyte ที่พบบ่อยบนผิวพืช (Osono, 2002; Osono and Mori, 2003) และยังสามารถแยกพบได้เช่นกันในวิธีที่ใช้เป็นตัวควบคุม โดยพบในความถี่ที่สูงมากคือ 60.32% (ตารางที่ 1 ภาคผนวก ข) แต่ไม่สามารถแยกพบได้จากวิธีที่ 2 และวิธีที่ 3 ซึ่งใช้ sodium hypochlorite ในการฆ่าเชื้อที่ผิว จึงถือได้ว่าวิธีที่ 2 และวิธีที่ 3 มีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนของสปอร์หรือเส้นใยของเชื้อราที่อยู่บริเวณผิวภายนอกได้ โดยสอดคล้องกับรายงานของ Petrini (1986) ที่กล่าวว่าควรเลือกใช้วิธีการที่สามารถลดเชื้อราบริเวณผิวให้เหลือน้อยที่สุด และการเลือกระยะเวลาในการฆ่าเชื้อต้องคำนึงถึงความหนาของตัวอย่าง และปรับความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อให้เหมาะกับสภาพของเนื้อเยื่อพืชด้วย โดยสารเคมีที่นิยมใช้มากที่สุดคือ sodium hypochlorite เมื่อพิจารณาค่า IF รวมของทุกวิธีการพบว่า วิธีที่ 2 มีค่า IF รวมต่ำที่สุดคือ 49.21% แต่ถึงอย่างไรก็ตามเมื่อนำค่า IF รวมจากทั้ง 4 วิธีมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติพบว่าวิธีที่ 1, 2 และ 3 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีการที่ใช้เป็นตัวควบคุม ดังนั้นเมื่อพิจารณาภายในกลุ่มพบว่าวิธีที่ 2 มีความเหมาะสมมากที่สุดในการนำมาใช้แยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของแปะก๊วย เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้ sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดคือ 1% และยังคงความสามารถในการฆ่าเชื้อที่ผิวพืชได้โดยก่อให้เกิดความเสียหายแก่เนื้อเยื่อของพืชและเชื้อราที่อาศัยอยู่ภายในพืชน้อยที่สุด

การเก็บตัวอย่างใบสด (living leaves) ของแปะก๊วยได้เริ่มเก็บตัวอย่างครั้งแรกเมื่อพบตาใบเกิดขึ้นในช่วงต้นฤดูใบไม้ผลิ ซึ่งการเก็บตัวอย่างในครั้งแรกๆ นี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์ เนื่องจากเป็นช่วงที่ใบอ่อนมีพัฒนาการอย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามการแยกเชื้อในช่วงที่ใบยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่พบว่าไม่สามารถแยกพบเชื้อใดๆ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Petrini and Carroll (1981); Petrini (1991); Rodrigues (1994); Wilson and Carroll (1994) และ Wilson (2000) ที่กล่าวว่า ค่า IF และความหลากหลายในชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์จะเพิ่มขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตามอายุของเนื้อเยื่อพืชอาศัยในเขตอบอุ่น โดยเฉพาะในไม้ผลัดใบพบว่าใบอ่อนที่เพิ่งแตกตาออกมาจะปราศจากจุลินทรีย์เข้ามาอยู่อาศัย ซึ่งการเข้ามานั้นจะเกิดขึ้นภายหลังจากใบมีการพัฒนาไปเป็นใบที่สมบูรณ์แล้วโดยค่า infection density นั้นจะเพิ่มขึ้นตามอายุของเนื้อเยื่อพืช ซึ่งภายหลังจากใบอ่อนคลี่ตัวเต็มที่การเก็บตัวอย่างจึงทำในทุกเดือน ซึ่งจะครบรอบในช่วงต้นเดือนของทุกครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่าง โดยเริ่มต้นตั้งแต่วันที่ 2 พฤษภาคม 2547 เป็นต้นไป ซึ่งการเก็บตัวอย่างในช่วงต้นเดือนนี้พบว่ามีผลต่อการบันทึกผลการทดลอง ซึ่งมักรายงานผลเป็นชื่อเดือนที่พบเชื้อราเอนโดไฟต์จากตัวอย่างเป็นครั้งแรก โดยจากบันทึกที่ผ่านมาการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ในแปะก๊วย (Ikebe, personal communication) พบเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลักของแปะก๊วยคือเชื้อ *Phyllosticta* sp. ครั้งแรกในเดือนมิถุนายน แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อราชนิดเดียวกันนี้ครั้งแรกในเดือนสิงหาคม ซึ่งการเลื่อนออกของเวลาที่พบเชื้ออาจเป็นไปได้เนื่องจากฤดูกาลในแต่ละปีมีความแตกต่างกัน แต่การพบเชื้อครั้งแรกในเดือนสิงหาคมพบว่าไม่สอดคล้องกับการศึกษาใดๆ ซึ่งเมื่อพิจารณาจากวันที่เก็บตัวอย่างพบว่า ในเดือนกรกฎาคมมีการเก็บตัวอย่างในวันที่ 2 ซึ่ง ณ เวลานั้นยังไม่มีการพบเชื้อ แต่ในช่วงเวลาตั้งแต่วันที่ 2 กรกฎาคมจนถึงวันที่ 8 สิงหาคมไม่มีการเก็บตัวอย่างเนื่องจากการเว้นระยะเวลาเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 1 เดือน จึงเป็นไปได้ว่าในช่วงเวลาดังกล่าวอาจมีการพบเชื้อราเอนโดไฟต์ ซึ่งสามารถบันทึกผลเป็นการพบครั้งแรกในเดือนกรกฎาคมได้ ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าการกำหนดวันในการเก็บตัวอย่างมีความสำคัญต่อการบันทึกข้อมูล ซึ่งแนะนำได้ว่าการกำหนดวันที่ในการเก็บตัวอย่างในแต่ละเดือน เพื่อนำมาใช้เป็นตัวแทนของเดือนที่ทำการศึกษานั้น ควรจะกำหนดให้อยู่ในช่วงระหว่างกลางเดือนไปจนถึงปลายเดือนน่าจะเหมาะสมกว่าในช่วงต้นเดือน

การแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของต้นแปะก๊วย พบเชื้อราทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Peyronellaea* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Phyllosticta* sp. และ yeast ซึ่งพบในเนื้อเยื่อใบ 6 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum* sp., *Peyronellaea* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Phyllosticta* sp. และ yeast พบเชื้อในก้านใบ 4 ชนิด ได้แก่ *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Phyllosticta* sp. และ yeast และพบในกิ่งอ่อน 7 ชนิด ได้แก่ *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Peyronellaea* sp., *Phomopsis* sp. และ yeast โดยมีค่า IF รวมในแต่ละชนิดของเนื้อเยื่อเท่ากับ 17.22%, 18.78% และ 84.32% ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่า IF รวมทั้งหมดพบว่าค่า IF รวมจากกิ่งอ่อนมีค่าสูงมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอายุของเนื้อเยื่อกิ่งอ่อนที่นำมาใช้ศึกษามีอายุมากกว่าเนื้อเยื่อของใบ และก้านใบ ซึ่งการเก็บตัวอย่างกิ่งอ่อนนั้นได้พยายามเลือกกิ่งที่เกิดขึ้นใหม่ในแต่ละปี แต่ในความเป็นจริงกิ่งอ่อนที่เล็กที่สุดที่เก็บได้อาจมีอายุมากกว่า 1 ปี ซึ่งแตกต่างจากตัวอย่างใบและก้านใบ ที่เกิดขึ้นใหม่ในทุกปีเนื่องจากแปะก๊วยเป็นไม้ผลัดใบ จึงทำให้ค่า IF รวม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของกิ่งอ่อนสูงกว่าใบ และก้านใบอย่างชัดเจน แต่ค่า IF รวมของใบและก้านใบนั้นพบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งตรงตามทฤษฎีที่ว่าค่า IF และความหลากหลายในชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์นั้นจะเพิ่มขึ้นตามอายุของเนื้อเยื่อพืช (Petrini, 1991; Wilson, 2000) โดยในจำนวนเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้งหมดที่แยกได้มี 2 ชนิดที่พบบ่อยคือเชื้อ *Phomopsis* sp. ที่พบมากในกิ่งอ่อน (71.48%) และพบได้เช่นกันในใบ (2.78%) และก้านใบ (4.56%) และเชื้อ *Phyllosticta* sp. ที่พบมากในส่วนของใบ (12.56%) และก้านใบ (12.33%) ซึ่งจากแบบแผนการพบเชื้อนี้สามารถระบุได้ว่าเชื้อทั้งสองชนิดเป็นเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลักของต้นแปะก๊วย ซึ่งมีแบบแผนเหมือนกับที่พบในพืชใบกว้าง (broad leaf tree) ชนิดอื่นๆ (Sieber *et al*., 1991) จากผลการทดลองนี้พบว่าสอดคล้องกับรายงานของ Petrini (1991) ที่กล่าวว่าในพืชทุกชนิดที่นำมาศึกษา สามารถตรวจพบเชื้อราเพียงแค่หนึ่งหรือน้อยชนิดเท่านั้นที่มีแบบแผนชัดเจนว่าเป็นเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลักของพืชอาศัยชนิดนั้นๆ

ผลจากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นถึงการกระจายตัวของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อเนื้อเยื่อของพืชอาศัย เช่นเดียวกับรายงานของ Petrini (1986; 1991) และ Sieber *et al*. (1991) โดยจะพบเชื้อ *Phyllosticta* sp. ได้บ่อยในเนื้อเยื่อของใบ (12.56%) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Carroll and Carroll (1978) ที่สรุปว่าโดยทั่วไปแล้วเชื้อ *Phyllosticta* sp. จะพบอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อชั้น mesophyll ซึ่งแบบแผนการแพร่กระจายของเชื้อรานั้น พบว่าสามารถแยกพบเชื้อได้ครั้งแรกในเดือนสิงหาคม และหลังจากนั้นจะพบในปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ โดยพบมากที่สุดในเดือนตุลาคมหลังจากนั้นจะลดลงในช่วงก่อนใบร่วง ซึ่งแบบแผนนี้อธิบายได้จากรายงานของ O'Donnell and Dickison (1980) ที่กล่าวว่าการลดลงอย่างชั่วคราวของเอนโดไฟต์ก่อนที่ใบจะร่วงสืบเนื่องมาจากการแข่งขันกับเชื้อรา epiphyte ที่สามารถเข้าไปอยู่อาศัยภายในเนื้อเยื่อพืช (penetrate) ได้ในระยะที่ใบพืชแก่ ส่วนเชื้อ *Phomopsis* sp. นั้นจะพบมากในเนื้อเยื่อกิ่งอ่อน (71.48%) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sahashi *et al.* (1999) ที่พบเชื้อ *Phomopsis* sp. ที่ความถี่สูงในกิ่งอ่อนอายุประมาณ 1-5 ปี โดยมีแบบแผนการกระจายตัวไม่แน่นอนตลอดระยะเวลาที่ศึกษา แต่อย่างไรก็ตามความถี่ของเชื้อจะลดลงในช่วงที่ใบแก่ ซึ่งพบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลักทั้งสองชนิดนี้ สามารถแยกพบได้เช่นเดียวกันในเนื้อเยื่อของก้านใบแม้พบได้ในความถี่ที่ต่ำกว่าที่พบในใบ และกิ่งอ่อน แต่พบว่ามีแบบแผนการแพร่กระจายคล้ายกันกับที่พบในเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดนั้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sahashi *et al.* (1999) ที่กล่าวว่าเนื้อเยื่อก้านใบน่าจะมีลักษณะการเข้ามาอยู่อาศัยของเชื้อราเอนโดไฟต์ ที่มีความเกี่ยวข้องกับที่พบในเนื้อเยื่อของใบและกิ่งอ่อน และค่า IF ของเชื้อ *Phomopsis* sp. ที่พบในก้านใบนั้นน่าจะเกิดจากการแทรกผ่านของเส้นใยจากเนื้อเยื่อของกิ่งอ่อนที่อยู่ติดกัน

การแยกเชื้อราภายในใบร่วงที่เริ่มมีการย่อยสลายที่เก็บได้จากถุง litter bag ที่แขวนไว้บริเวณบนต้น และที่วางไว้บริเวณใต้ต้นแปะก๊วย พบเชื้อราจำนวนทั้งสิ้น 16 ชนิด ได้แก่ *Alternaria*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

sp., *Aureobasidium* sp., *Cladosporium* sp. 1, *Cladosporium* sp. 2, *Colletotrichum* sp., *Discosia* sp., *Epicoccum* sp., *Fusarium* sp., *Massarina* sp., *Nigrospora* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Peyronellaea* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Phyllosticta* sp., และ yeast โดยในจำนวนนี้พบเชื้อราจำนวน 5 ชนิดที่ไม่สามารถแยกได้จากตัวอย่างใบสด คือ *Aureobasidium* sp., *Discosia* sp., *Epicoccum* sp., *Massarina* sp. และ *Nigrospora* sp. และนอกจากนี้ยังพบเส้นใยของเชื้อราบางชนิดที่ไม่สามารถบ่งชนิดได้ ซึ่งการติดตามความต่อเนื่องของเชื้อราเอนโดไฟต์ภายหลังจากใบร่วง และในขณะที่ใบมีการย่อยสลายภายในระยะเวลา 1 ปี พบว่าค่า IF ของเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลัก *Phyllosticta* sp. จะลดลงอย่างชั่วคราวในใบร่วงใหม่ และจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งในระยะแรกที่ใบมีการย่อยสลาย แต่จะไม่พบในระยะหลังของขบวนการย่อยสลายของใบ ซึ่งการลดลงอย่างชั่วคราวของเอนโดไฟต์ในช่วงที่ใบเพิ่งจะร่วงใหม่นี้ได้มีการอธิบายไว้ในการศึกษาของ Osono (2002) ว่าเป็นไปได้ว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการแข่งขันกับ epiphyte ในการใช้พลังงานจากแหล่งพลังงานที่หาได้ภายในชั้น mesophyll และการพบเชื้อในระยะแรกของขบวนการย่อยสลายนั้นสอดคล้องกับรายงานของ Hudson (1968, 1971) Stone (1987) และ Osono (2002) ที่กล่าวว่าเชื้อราที่ยังคงอยู่ภายหลังจากใบร่วงมีข้อได้เปรียบในการได้รับประโยชน์ จากแหล่งของพลังงานที่สามารถนำไปใช้ได้ทันที เช่น non-lignified holocellulose และ soluble carbohydrate ซึ่งมีอยู่มากมายในใบร่วงใหม่ ก่อนที่เชื้อราชนิดอื่นจะเข้ามาใช้ประโยชน์จากแหล่งพลังงานนี้ ซึ่งจะทำให้เอนโดไฟต์เดิมถูกแทนที่ด้วยเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็น secondary saprophyte ส่วนแบบแผนความต่อเนื่องของเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลัก *Phomopsis* sp. นั้นพบว่าจะแยกเชื้อได้น้อยมากหรือไม่สามารถแยกเชื้อได้เลยในระยะแรกที่ใบร่วง แต่จะพบเชื้ออีกครั้งในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 (1 ธันวาคม) เป็นต้นไป และมีแบบแผนไม่แน่นอนตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา ซึ่งทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่าเชื้อ *Phomopsis* sp. มีการคงอยู่อย่างถาวรมาจากใบสดจนกระทั่งใบร่วงและเกิดการย่อยสลาย ดังนั้นเป็นไปได้ว่าเชื้อมีการ infect เข้าสู่พืชภายหลังจากใบร่วง ซึ่งจากสมมุติฐานนี้ในการศึกษาครั้งต่อไปควรมีการทดสอบการเข้า infect ของเชื้อราเหล่านี้โดยตรงภายหลังจากใบร่วง ส่วนแบบแผนความต่อเนื่องของเชื้อราชนิดอื่นๆ พบว่าสามารถแยกพบเชื้อราจำนวนมากภายหลังจากเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลักมีความถี่ลดลง ซึ่งเชื้อราเหล่านี้จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากเชื้อ *Phyllosticta* sp. หายไปอย่างถาวร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Cabral (1985) ที่กล่าวว่าในใบของ *Eucaluptus viminalis* ที่ตายแล้วจะพบเชื้อ epiphyte เข้ามาอยู่อาศัยในขณะที่ความถี่ของเชื้อราเอนโดไฟต์เดิมนั้นลดลง

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีภายในใบที่กำลังมีการย่อยสลาย พบว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบภายในใบจะเพิ่มขึ้นทีละน้อยในช่วงแรก แต่ในระยะหลังของขบวนการย่อยสลายนั้น ความเข้มข้นของไนโตรเจนจะเพิ่มขึ้นในอัตราที่สูง ซึ่งตรงกันข้าม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กับสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน หรือ C:N ratio ของใบที่กำลังย่อยสลาย ซึ่งพบว่ามีการลดลงอย่างคงที่ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา ซึ่งจากแบบแผนทั้งสองนี้แสดงให้เห็นถึงการดำเนินไปของกระบวนการย่อยสลายของใบ ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป โดยสอดคล้องกับรายงานของ Osono and Takeda (2001) ที่สรุปว่าการเพิ่มขึ้นของไนโตรเจนน่าจะมีผลต่อการย่อยสลายของลิกนิน (lignin) โดยพบว่าใบที่กำลังมีการย่อยสลายของลิกนิน จะมีความเข้มข้นของไนโตรเจนเพิ่มมากขึ้น และการแพร่กระจายของคาร์บอนและไนโตรเจนจะมีผลในการควบคุมกระบวนการย่อยสลายของลิกนินภายในใบที่เกิดขึ้นโดยเชื้อรา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved