บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. จากการแยกเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดจากใบเปล้าน้อยที่มีอาการของโรค ซึ่งได้มาจากอำเภอด่านสิงห์ขร จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และนำมาปลูกเชื้อลงบนใบเปล้าน้อย พันธุ์ IBGE 2 เพื่อทำการพิสูจน์เชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคใบจุด ตามวิธีการของ Koch ' s postulation พบว่า ใบเปล้าน้อยที่ได้รับการปลูกเชื้อ มีลักษณะอาการของโรคเหมือนกับใบเปล้าน้อยที่นำมาแยกเชื้อ กล่าวคือ แผลจุดมีลักษณะค่อนข้างกลม สีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ มีวงสีเหลืองถึงสีน้ำตาลเข้มล้อมรอบ

ในการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุโรค โดยการตัดเนื้อเยื่อของใบบริเวณแผลใบจุดและนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถพบแอสคัสซึ่งภายในแอสคัสมี 8 แอสโคสปอร์ และเมื่อนำเชื้อที่แยกได้จากแผลใบจุดมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA พบว่า เชื้อที่เจริญอยู่บนอาหารมีลักษณะเส้นใยฟู โดยเส้นใยบริเวณกลางโคโลนีมีสีเขียวเข้ม นอกจากนี้เชื้อราจะมีการสร้างกลุ่มสปอร์สีส้มจาง ๆ บนอาหาร จากการนำสปอร์มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า สปอร์มีรูปร่างทรงกระบอก หัวท้ายมน

จากผลการทดลองที่ได้จึงคาดว่า เชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคใบจุดแก่เปล้าน้อย มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อรา *G. cingulata* เนื่องจากผลการทดลองที่ได้เกี่ยวกับอาการของโรค และ ลักษณะของเชื้อ มีความสอดคล้องกับรายงานของ ชลิดา เล็กสมบูรณ์ และ นลิน นิลอุบล (2540) ที่พบว่า เชื้อชนิดนี้เป็นเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดที่เกิดกับเปล้าน้อยในเขตอุทยานแห่งชาติหาดวนกร จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และ บริเวณเขื่อนแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี

2. การทดลองเพื่อหาชนิดของอาหารและสภาพแสงที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *G. cingulata* พบว่า Czapek ' s agar เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่า แสงเป็นปัจจัยสำคัญในการกระตุ้นให้ราชนิดนี้สร้างสปอร์ โดยเมื่อนำเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหาร Czapek 's agar และให้แสง 12 ชั่วโมงต่อ วัน เชื้อราสามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุด เท่ากับ 18,703 สปอร์ ต่อ หลอดวุ้นอาหารเอียง ซึ่งการให้แสงในขณะทำการเลี้ยงนั้น มีความสอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Harvey และ

Graham (1965) ที่สรุปผลการทดลองว่า แสงเป็นปัจจัยที่สำคัญในการกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *G. cingulata* ที่สูญเสียความสามารถในการสร้างสปอร์ ให้กลับสร้างสปอร์ได้เป็นปกติ นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดลองของ Pady and Kramer (1971) ซึ่งได้ทำการทดลองเกี่ยวกับระยะเวลาของการให้แสงที่มีผลต่อการปลดปล่อยสปอร์ของเชื้อรา *G. cingulata* โดยได้สรุปผลการทดลองที่ได้ว่า เชื้อราจะมีการสร้างสปอร์มากที่สุดเมื่อเลี้ยงในสภาพให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน สาเหตุที่การให้แสงในช่วงของการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสร้างสปอร์นั้น สามารถอธิบายด้วยรายงานการทดลองของ Ingold and Dring (1957) ซึ่งได้ทำการทดลองเรื่องการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Sordaria fimicola* และได้สรุปไว้ว่า ในภาวะการให้แสง เชื้ออาจจะมีการสร้างสารบางชนิดขึ้นมา โดยสารชนิดนั้นมีคุณสมบัติทำให้เกิดการกระตุ้นการปลดปล่อยสปอร์ หรือ อาจจะไปมีผลทำให้เกิดการทำลายสารอีกกลุ่มหนึ่งที่มีหน้าที่ยับยั้งการสร้างสปอร์ที่เกิดขึ้นในขณะทำการเลี้ยงเชื้อ

3. ในการปลูกเชื้อรา *G. cingulata* เพื่อทำให้เกิดอาการใบจุดกับเปล้าน้อยนั้น จากรายงานของ ชลิดา เล็กสมบูรณ์ และ นลิน นิลอุบล (2540) ได้รายงานถึงระดับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยที่ใช้สำหรับการปลูกเชื้อใบจุดบนใบเปล้าน้อยเพื่อพิสูจน์เชื้อสาเหตุของโรค โดยใช้สปอร์แขวนลอยที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งระดับความเข้มข้นดังกล่าวสอดคล้องกับ ระดับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยที่ใช้ปลูกเชื้อบนใบ และ กิ่งของต้น camellia เพื่อพิสูจน์เชื้อสาเหตุของโรค die back ที่เกิดจากเชื้อรา *G. cingulata* (Dickens and Cook , 1989) เมื่อนำสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *G. cingulata* ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว มาปลูกเชื้อบนใบเปล้าน้อยพันธุ์ IBGE2 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทำให้ใบเปล้าน้อยมีอาการของโรคใบจุดที่มีระดับความรุนแรงของโรคมากที่สุด พบว่า ความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยที่ระดับดังกล่าวสามารถทำให้เกิดอาการของโรคใบจุดขึ้นได้ แต่มีความรุนแรงของโรคต่ำ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสภาวะในการปลูกเชื้อไม่เหมาะสม จากรายงานของ Makowski (1993) สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* ควรมีอุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส มีช่วงเวลาเกิดความชื้นที่ระดับประมาณ 92 % เป็นเวลานานประมาณ 20 - 48 ชั่วโมง ซึ่งสภาวะดังกล่าวไม่สามารถควบคุมให้เกิดภายในเรือนเพาะชำที่ทำการทดลองได้ ดังนั้นจึงเพิ่มความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยขึ้นอีก 2 ระดับ คือ 10^7 และ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ การคลุมถุงพลาสติกเพื่อให้ความชื้นกับส่วนที่จะทำการปลูกเชื้อเป็นเวลาประมาณ 2 - 3 ชั่วโมง ก่อนทำการปลูกเชื้อจริง โดยผลการทดลองที่ได้พบว่า เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบเป็นโรคจะแปรผันตามปริมาณสปอร์แขวนลอยที่ใช้ในการปลูกเชื้อ คือ เมื่อปลูกเชื้อด้วยสปอร์แขวนลอยที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ ทำให้ใบเปล้าน้อยเกิดพื้นที่ใบเป็นโรคโดยเฉลี่ยเท่ากับ 15.64 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบทั้งหมด ต่อ 1 ยอด จากผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Bilgram and Dube (1976) ที่ได้รายงานว่า อาการของโรคจะเพิ่มขึ้นเมื่อส่วนของเชื้อราที่นำมาใช้ทำการปลูกเชื้อ (inoculum) มีจำนวนมากขึ้น

สำหรับสาเหตุที่เลือกสปอร์แขวนลอยที่มีความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นสูงสุดของการทดลองครั้งนี้ เนื่องจากเมื่อใช้ความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยที่สูงกว่านี้ ทำให้ใบเปล้าน้อยบริเวณยอดซึ่งเป็นใบที่มีอายุน้อย มีอาการใบไหม้ที่ขอบใบและเกิดการหลุดร่วงจากกิ่งเป็นจำนวนที่มากกว่าใบจากยอดเปล้าน้อยที่ปลูกเชื้อด้วยความเข้มข้นสปอร์แขวนลอย 3 ระดับที่เลือกทำการทดลอง เมื่อเกิดการหลุดร่วงของใบเปล้าน้อยขึ้น ย่อมส่งผลกระทบต่อปริมาณใบเปล้าน้อยที่จะนำไปใช้ในการสกัดสารเปลาโนทอลในขั้นตอนต่อๆ ไป ดังนั้น จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยเท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง

4. จากการศึกษาการเข้าทำลายใบเปล้าน้อยของเชื้อรา *G. cingulata* ภายหลังจากการปลูกเชื้อด้วยสปอร์แขวนลอยเป็นเวลา 12 - 60 ชั่วโมง และทำการตรวจผิวใบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่า สปอร์ของเชื้อราเมื่อสัมผัสกับผิวใบและได้รับความชื้นที่เพียงพอจะเกิดการงอกของเส้นใยออกมาจากสปอร์ (germ tube) เส้นใยดังกล่าวจะมีการพัฒนาส่วนปลายของเส้นใยเป็นแอปเพรสซอเรียมที่สามารถตรวจพบได้ในชั่วโมงที่ 48 ของการทดลองเป็นต้นไป ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Makowski (1993) ที่พบว่า ระยะเวลาที่เชื้อรา *C. gloeosporioides* สามารถเข้าสู่พืชได้นั้นจะอยู่ในช่วงที่มีความชื้นต่อเนื่องกันประมาณ 20 - 48 ชั่วโมง ในการสร้างแอปเพรสซอเรียมนั้น สามารถเกิดขึ้นได้กับเชื้อราทุกชนิด โดยเชื้อราจะมีการพัฒนาส่วนปลายของเส้นใยเป็นแอปเพรสซอเรียมที่มีลักษณะแตกต่าง ๆ กัน เพื่อทำหน้ายึดเกาะและแทงเข้าสู่ผิวพืช โดยอาศัยแรงดันกลร่วมกับเอนไซม์บางชนิด เช่น เอนไซม์ในกลุ่มเพกโตไลติกเอนไซม์ (pectolytic enzyme) และ เซลล์ลูเลส (cellulase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยผนังชั้นนอกของพืช นอกจากนี้เส้นใยของเชื้อรายังสามารถเข้าสู่พืชได้ตามช่องเปิดในธรรมชาติ ได้แก่ ปากใบ เป็นต้น (Agrios , 1997)

5. ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโรคใบจุด กับ ปริมาณสารเปลาโนทอลในใบเปล้าน้อย โดยทำการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เปลาโนทอลต่อน้ำหนักใบแห้งของใบเปล้าน้อยที่เกิดโรคใบจุดกับใบเปล้าน้อยปกติ พบว่าใบเปล้าน้อยในกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบเป็นโรค ตั้งแต่ 1 - 5 เปอร์เซ็นต์ จนถึง 26 - 30 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์เปลาโนทอลต่อน้ำหนักใบแห้งไม่แตกต่างกับใบเปล้าน้อยปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โดยทั่วไปเมื่อพืชที่มีอาการของโรคใบจุดหรืออาการของโรคที่เกิดจาการถูกทำลายใบนั้น จะเกิดผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชโดยตรง เนื่องจากเป็นการลดพื้นที่การสังเคราะห์แสงบนใบพืช นอกจากนี้เมื่อเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคสามารถเข้าสู่ภายในเซลล์ของพืชได้แล้ว จะทำให้เกิดการใช้น้ำและอาหารของพืชอาศัยที่ส่งมาตามเนื้อเยื่อท่อลำเลียง ในขณะเดียวกันจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรโตพลาสต์(protoplast) และ เนื้อเยื่อต่างๆ ในเซลล์พืช ซึ่งเป็นผลจากเอนไซม์และสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้น ทำให้บริเวณดังกล่าวที่ถูกเชื้อเข้าทำลายกลายเป็นเนื้อเยื่อที่มีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ (Agiros , 1997 ; Bilgram and Dube ,1976) จากผลที่เกิดขึ้นภายหลังที่เชื้อเข้าสู่เซลล์พืชในลักษณะดังกล่าว อาจส่งผลกระทบต่อปริมาณสารเปลาโนทอลในใบเปล้าน้อยที่เกิดโรคใบจุด เนื่องจากตำแหน่งของสารเปลาโนทอลบนใบเปล้าน้อยที่รายงานโดย กันติยา ตัณฑชน , ปณิธิตา พฤกษะวัน และ วันรวี รัตนสุนทร (2537) พบว่า สารเปลาโนทอลจะอยู่ในส่วนของพาลิเซดเซลล์ (palisade cells) และ สปอนจีเซลล์ (spongy cells) โดยเซลล์ทั้ง 2 ชนิดนี้ เมื่อพิจารณาตามโครงสร้างของใบพืช พบว่า เซลล์ดังกล่าวเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อชั้นมีโซฟิลล์ (mesophyll) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่อยู่ระหว่างเนื้อเยื่ออิพิเดอร์มีส (epidermis) ด้านหลังใบและท้องใบ เนื้อเยื่อชั้นมีโซฟิลล์มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสง เนื่องจาก เป็นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยเซลล์ในกลุ่มพาเรนไคมา (parenchyma) ซึ่งภายในเซลล์จะเป็นแหล่งคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ที่สำคัญของพืช (เทียมใจ ตุลยาทร , 1993) ดังนั้นในการที่เชื้อสามารถเจริญไปยังเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ลำเลียงน้ำและอาหาร ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่อยู่ติดกับเนื้อเยื่อชั้นมีโซฟิลล์ของพืชได้นั้น จะต้องทำลายเนื้อเยื่อพืชชั้นอิพิเดอร์มีส และ มีโซฟิลล์ ของพืชอาศัย ซึ่งจากการทำลายเนื้อเยื่อดังกล่าว อาจทำให้คลอโรฟิลล์ในชั้นมีโซฟิลล์ได้รับความเสียหายขึ้นได้ จากรายงานของ Morimoto และ Murai (1989) พบว่า เมื่อปริมาณคลอโรฟิลล์ในแคลลัสลดลงจะมีผลทำให้ปริมาณสารเปลาโนทอลในแคลลัสนั้นลดลงด้วย ดังนั้นหากปริมาณสารเปลาโนทอลในใบเปล้าน้อยที่เกิดโรคใบจุดลดลง จึงอาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นข้างต้น แต่จากผลการทดลองเพื่อหาปริมาณสารเปลาโนทอลในใบเปล้าน้อยที่เกิดโรคใบจุดเปรียบเทียบกับใบเปล้าน้อยปกตินั้น พบว่า

ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก เปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบที่เป็นโรคมีไม่สูงมากนัก เพราะใบเปล้าน้อยที่มีพื้นที่การเกิดโรคมาก ๆ บางส่วนได้หลุดร่วงก่อนครบกำหนดการเก็บใบมาวิเคราะห์ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากฮอร์โมนเอธิลีน (ethylene) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่พืชสามารถสร้างขึ้นเองเมื่อพืชเกิดบาดแผลจากการเข้าทำลายของเชื้อ ดังนั้นเมื่อนำใบภายในยอดมาคิดเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบเป็นโรคเฉลี่ยต่อยอด จึงทำให้เปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบเป็นโรคที่ได้มีความรุนแรงของโรคไม่สูง อาจเป็นผลให้ไม่สามารถเห็นความแตกต่างของปริมาณสารเปลาโนทอลได้ชัดเจน