บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อรา *Alternaria* sp.

จากการแยกเชื้อราจากเนื้อเยื่อของคะน้าโดยวิธี Tissue transplanting method โดยเลี้ยงเชื้อราไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (PDA) พบว่า โคโลนีมีลักษณะกลม เส้นใยมีสีเขียวมะกอก มีผนังกั้น ลักษณะของโคโลนีเชื้อราสอดคล้องกับที่ พัฒนา และคณะ (2526) ได้กล่าวไว้ว่า โคโลนีราสกุล Alternaria มีลักษณะทั่วไป คือ โคโลนีมีสีเขียวมะกอกอมเทาถึงสีน้ำตาลดำ ลักษณะคล้ายกำมะหยี่เมื่อเชื้อราอายุได้ 5 วัน โคโลนีจะเป็นสีเขียวมะกอกอ่อน เมื่ออายุได้ 7 วัน โคโลนีจะกลายเป็นสีดำอมเขียวมะกอก สปอร์มีรูปทรงกระบอกปลายมีลักษณะพองออกเล็กน้อย มีผนังกั้น สปอร์มีสีน้ำตาลอ่อน เป็นเซลล์เดี่ยวๆ มีลักษณะตรงหรือบางสปอร์มีลักษณะโค้งงอเล็กน้อย ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะของสปอร์ราสกุล Alternaria ที่มีสปอร์เชื้อราเป็นสีน้ำตาลอ่อน ที่มักเกิดเดี่ยวๆ หรือเกิดเป็นกลุ่ม มีลักษณะโค้งงอเล็กน้อย รูปร่างเป็นทรงกระบอกที่ปลายมีลักษณะพองออกเล็กน้อย มีผนังกั้นตามขวาง (Holiday, 1980; Dickson, 1981)

2. การสกัดสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้น

จากผลการสกัดสารสกัดหยาบจากผลตะไคร้ต้นด้วยวิธี Maceration โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำให้สารสกัดเข้มข้นด้วยวิธีการกลั่นในภาวะสูญญากาศ พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้มีสีน้ำตาลแดงมีลักษณะของน้ำมันเป็นองค์ประกอบ เมื่อนำสารสกัดหยาบที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์สารสกัดหยาบมีค่าเท่ากับ 12.80 ซึ่งเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ รสริน (2547) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 12.88 ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าค่าดังกล่าวมีมากกว่าอาจเป็นเพราะว่าการศึกษาของ รสริน (2547) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นในส่วนของใบ แต่สำหรับการศึกษาในครั้งได้ศึกษาการสกัดในส่วนของผลตะไคร้ต้น และอาจมาจากปัจจัยอื่นๆ อีกได้ เช่น สภาพของพื้นที่ปลูกต่างกัน ฤดูกาลเก็บเกี่ยว ความสูงระดับน้ำทะเล ฯลฯ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราจากตะไคร้ต้น

จากการนำสารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นมาแยกองค์ประกอบด้วยวิธี Thin Layer Chromatography ที่มีตัวทำละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วย Hexane : Ethyl acetate : Methanol ในอัตรา 90 : 10 : 1.5 และทำการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี TLC-bioassay ทำให้ได้สารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา 2 ชนิด เมื่อทำการตรวจสอบด้วย Gas Chromatography - Mass Spectrometer พบว่าเป็นสาร Benzoic acid ปริมาณ 21.71 เปอร์เซ็นต์ และ Citral (Geranial และ Neral) 43.04 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับ จิตติมา และนพงษ์ (2543) ที่ทำการแยกสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้น โดยใช้ตัวทำละลายเป็นสาร Ethyl acetate : Hexane ในอัตราส่วน 75 : 25 และทำตรวจสอบปริมาณสารดังกล่าวด้วย Gas Chromatography พบว่า ในน้ำมันหอมระเหยมี Citral 49.6 เปอร์เซ็นต์ และสารดังกล่าวมีปริมาณใกล้เคียงกันกับ การตรวจสอบน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้น ที่พบสาร Citral เท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ และในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจสอบพบ Citral ในสองรูปแบบ คือ Neral และ Geranial ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ พฤษภา (2546) ที่ทำการศึกษาองค์ประกอบและปริมาณของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้น โดยพบว่า มีองค์ประกอบที่สำคัญคือ Neral และ Geranial และการศึกษาของ สสี และปราณี (2524) ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน คือ น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้นมีองค์ประกอบหลัก คือ Neral และ Geranial

4. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบและสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นในการควบคุมเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp.

จากผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบและสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจำตะไคร้ต้น ในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp. โดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน 4 ระดับ คือ 500, 1,000, 2,500 และ 5,000 ส่วนต่อล้านส่วน พบว่า สารสกัดหยาบจากตะไคร้ต้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้สมบูรณ์ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ส่วนต่อล้านส่วน ขึ้นไป ส่วนสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ที่ระดับความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้านส่วน ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้นี้สอดคล้องกับรายงานของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2546) ที่รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้นมีสรรพคุณในการกำจัดเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช คือ *Alternaria alternate* ได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ อนงค์นาถ และสมบัติ (2548) ก็พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้นยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุดได้สมบูรณ์ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ส่วนต่อล้านส่วน การที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ อาจเนื่องจากว่าน้ำมันหอมระเหยที่เป็นส่วนหนึ่งของสารสกัดหยาบสามารถผ่านเนื้อเยื่อของเซลล์เชื้อราได้และส่งผลทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้สารที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์เกิดการรั่วไหลออกมาสู่ภายนอกเซลล์ได้ ดังเช่น การให้ Citral กับเชื้อรา *Collettrichum* sp. จะทำให้มีการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งเป็นการสูญเสียความเต่งของเซลล์เมมเบรนเชื้อรา (Fernando *et. al*., 2004)

5. การทดสอบฤทธิ์ของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria* sp. พบว่า สารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ โดยสามารถยับยั้งได้ 100 เปอร์เซ็นต์ที่ระดับความเข้มข้น 300 ส่วนต่อล้านส่วน ขึ้นไป ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ อนงค์นาถ (2547) ที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้นต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. brassicicola* และพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้นสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ แต่ต้องใช้น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต้นที่ระดับความเข้มข้นสูงถึง 1,000 ส่วนต่อล้านส่วน จึงจะสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาในกรรมวิธีที่ใช้สารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นในระดับความเข้มข้น 300 ส่วนต่อล้านส่วน พบว่า สปอร์เชื้อราไม่สามารถงอกได้และพบการเหี่ยวของสปอร์เชื้อราในบางส่วน ซึ่งผลอาจจะมาจากสาร Citral ที่เป็นองค์ประกอบในสารชีวภาพกำจัดเชื้อรา เพราะมีรายงานว่า เมื่อมีการให้สาร Citral กับสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จะทำให้พบสปอร์ของเชื้อรามีรูปร่างผิดปกติไปจากชุดควบคุมที่ไม่ได้ให้สาร Citral ซึ่งจะทำให้สปอร์เชื้อรามีส่วนที่เว้าเข้าไปด้านในเหมือนกับมีการยุบตัวของสปอร์เชื้อราเป็นแห่งๆ

6. การศึกษาความคงสภาพของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้น

จากการทดสอบฤทธิ์ในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* sp. ของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับ คือ 4 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง (30 ± 5 องศาเซลเซียส) และ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราแตกต่างกัน โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้น้อยกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (30 ± 5 องศาเซลเซียส) ทั้งนี้อาจเกิดจากการสลายตัวของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่สภาพอุณหภูมิสูง ดังเช่นการเก็บรักษาสารสกัดสะเดาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซียลเซส มีการสลายตัวของสารอะซิแรคตินที่เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญ โดยสารดังกล่าวมีปริมาณลดลงอย่างมาก เมื่อเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (ชัยพัฒน์ และคณะ, 2537)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ในขณะเดียวกันที่ระดับความเข้มข้นที่ต่ำลงมา คือ 500 และ 1,000 ส่วนต่อล้านส่วน พบมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้บ้าง แต่การเจริญของเส้นใยเชื้อราจะมีลักษณะการเจริญของเส้นใยกระจุกตัวไม่สามารถแผ่ขยายเส้นใยออกไปในรัศมีวงกลมได้ ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราเกิดจากองค์ประกอบของสารที่มีอยู่ในตะไคร้ต้น ซึ่งสารประกอบดังกล่าวอาจส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราและทำให้การเจริญของเส้นใยเชื้อราผิดปกติ ดังเช่น การศึกษาของ Billerbeck *et al*. (2001) ได้ศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างพิเศษของเส้นใยเชื้อรา *Aspergillus niger* หลังจากมีการให้น้ำมันหอมระเหยจาก *Cymbopogon nardus* (L.) พบว่าการให้น้ำมันหอมระเหยจาก *Cymbopogon nardus* (L.) สามารถลดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อราบางลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นโดยองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยไปรบกวนปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อรา (Wall synthesis) เป็นผลให้เกิด Fungal morphogenesis และการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Zambonelli *et al.* (1996) ที่รายงานว่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราจะมีความสัมพันธ์กับการเสื่อมสภาพของเส้นใยเชื้อราเมื่อทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยจาก T. valgaris. โดยการเสื่อมสภาพอาจเป็นผลมาจากการรบกวนของน้ำมันหอมระเหยในการตอบสนองของเอนไซม์ในการสร้างผนังเซลล์ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นใน Cytological structure

จากการศึกษาความคงสภาพของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้น พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะสีของสารชีวภาพกำจัดเชื้อรา โดยมีการเปลี่ยนแปลงค่าสี คือ ค่า L และ Hue มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากค่าที่เริ่มทำการศึกษา ส่วนค่า a*, b* และ C* นั้นขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการเก็บรักษา การที่อุณหภูมิเข้าไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าสีอาจเนื่องมาจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาการเสื่อมสลาย โดยมีกฎว่า อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นทุกๆ 10 องศาเซลเซียส (จุไรรัตน์, 2538) และผลของอุณหภูมิอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพกับสารชีวภาพกำจัดเชื้อราเชื้อราได้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงอาจมีความคล้ายคลึงกับ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของเภสัชภัณฑ์ โดยอุณหภูมิมีผลทางเคมี คือ ทำให้มีความร้อนเหนี่ยวนำให้เกิดออกซิเดชัน การเปลี่ยนรูปผลึก การเสื่อมของตัวยา และการเสื่อมทางเคมีของสีทำให้สีจางลง สำหรับทางกายภาพ อุณหภูมิสูงอาจเร่งให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้อาจเป็นผลจากการระเหิดของของแข็งการสูญเสียตัวทำละลายจากสารละลาย ทำให้เกิดการแยกวัฏภาคในอิมัลชัน เป็นต้น (สุวิภา, 2540)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

10.การทดสอบฤทธิ์ควบคุมโรคในแปลงปลูกคะน้าของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้น

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นในการควบคุมโรคใบจุดออลเทอนาเรียในระดับแปลงปลูกของคะน้า ในหกกรรมวิธีที่ทำการทดสอบ คือ กรรมวิธี Control, Inoc, Li500, Li1,000, Li2,000 และ Manco (การทดลองที่ 10.1) พบว่า ทั้งหกกรรมวิธีมีระดับของการเกิดโรคน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการเข้าทำลายของโรค ของ สุคนธ์ทิพย์ (2547) ที่ใช้ความเข้มข้นของสปอร์เชื้อรา *Alternaria* sp. ในระดับเดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า อยู่ในช่วงของการพักตัวในขณะที่เข้าทำลายพืช ทำให้พืชยังไม่แสดงอาการใดๆ ออกมาให้เห็น จนกระทั่งเมื่อสภาพแวดล้อมเอื้อต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรค (กัญชลี, 2542) ซึ่งการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดออลเทอนาเรียจะเกิดได้ดีในฤดูฝนหรือในแหล่งที่มีความชื้นสูง สภาพอากาศร้อนชื้น (จุมพล และอรพรรณ, 2541) แต่สภาพแวดล้อมขณะทำการศึกษามีสภาพร้อนแห้ง และการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุจะเข้าทำลายเมื่อพืชอยู่ในช่วงอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรค การพัฒนาของการเกิดโรคบนพืชจะเกิดขึ้น (กัญชลี, 2542)

แต่เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารชีวภาพกำจัดเชื้อรากับต้นกับคะน้าที่ทำการปลูกที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันอีกครั้ง (การทดลองที่ 10.2) พบว่า มีการเข้าทำลายมากกว่า การทดลองที่ 10.1 และการเข้าทำลายของโรคมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าสภาพแวดล้อมเหมาะสมกับการเกิดโรค เนื่องจากช่วงเวลาที่ทำการศึกษามีสภาพแวดล้อมมีความชื้นสูงอีกทั้งมีสภาพอากาศร้อน ซึ่งสอดคล้องตามหลักสามเหลี่ยมการเกิดโรค (Disease triangle) ที่กล่าวว่าช่วงแรกของการเกิดโรคของพืชนั้นจะต้องมีอย่างน้อยที่สุด 2 องค์ประกอบหลัก คือ พืชและเชื้อโรค ซึ่งทั้งสององค์ประกอบจะต้องสัมผัสกันและมีปฏิสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน แต่ถ้าทั้งสองปัจจัยสัมพันธ์กัน แต่สภาพแวดล้อมไม่เอื้อต่อการเข้าทำลายของเชื้อ เชื้อโรคอาจไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้ (กัญชลี, 2542) ถึงแม้ว่าจะมีการเข้าทำลายของโรคเพิ่มขึ้นแต่กรรมวิธีที่ทำการพ่นสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นก็มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้ไม่มีความแตกต่างกับกรรมวิธีที่ทำการพ่นสารแมนโคแซบที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ สำหรับการทดลองที่ 10.3 นั้น ก็พบว่า สารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นมีประสิทธิภาพในการช่วยลดการเข้าทำลายของโรคได้ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีที่ทำการพ่นสารลาร์มินาซึ่งเป็นแบคทีเรียในรูปผงสปอร์แห้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

11. ผลของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นที่มีต่อสรีรวิทยาของคะน้า

สำหรับผลกระทบของสารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นที่มีต่อสรีรวิทยาของคะน้า ได้แก่ อัตราการสังเคราะห์แสง, ความต้านปากใบ, อัตราการคายน้ำ, ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมและปริมาณ Total nonstructural carbohydrate (TNC) พบว่า ทุกกรรมวิธีไม่มีผลกระทบทำให้ค่าดังกล่าวมีความ

แตกต่างกับกรรมวิธี Control แต่สารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นมีผลทำให้สีใบคะน้ามีการเปลี่ยนแปลงโดยทำให้สีใบเข้มขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากการใช้สารชีวภาพกำจัดราจากตะไคร้ต้นที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งผลการศึกดังกล่าวคล้ายคลึงกับการศึกษาของ รัตติยา (2542) ที่ใช้สารสกัดจากดีปลีที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 20 กรัมต่อลิตร พบว่า ทำให้ใบคะน้ามีอาการใบหงิก รูปร่างบิดเบี้ยว เนื้อใบหนาด้านเป็นแห่งๆ เมื่อทำการตรวจสอบโครงสร้างพื้นฐานของใบ ทำให้ทราบว่าเนื้อเยื่อส่วนของชั้นผิว มีผนังเซลล์หนา เซลล์จับกันแน่น และเซลล์ในใบรูปร่างผิดปกติทำให้การจัดเรียงของเซลล์ผิดปกติตามไปด้วย และ อนุรุณ (2547) ทำการศึกษากับน้ำมันหอมระเหยจากการพลูที่ระดับความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ก็ทำให้ใบคะน้าเป็นพิษโดยแสดงอาการใบไหม้และแห้งตาย ดังนั้นจึงควรใช้สารชีวภาพกำจัดเชื้อราจากตะไคร้ต้นในระดับความเข้มข้นต่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved