

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการตรวจหาชนิดและปริมาณเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีเพาะเมล็ดบนกระดาษขึ้น (Blotter method) และวิธีเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้น (Agar method) พบชนิดและปริมาณของเชื้อราแตกต่างกัน โดยทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและภูมิอากาศ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อชนิดและปริมาณของเชื้อราที่พบในพื้นที่แตกต่างกันออกไป (สุธีรา, 2540) โดยวิธีเพาะเมล็ดบนกระดาษขึ้นจะพบชนิดและปริมาณของเชื้อรามากกว่าวิธีเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้น เนื่องจากเชื้อราที่พบส่วนใหญ่จะเป็นพวก saprophyte อาศัยหรือติดอยู่บนเมล็ดแต่ไม่ได้เข้าทำลายเมล็ด ทำให้วิธีเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้นนั้นจะพบเชื้อราบางชนิดในปริมาณน้อยหรืออาจจะไม่พบเลย ทั้งนี้เพราะเชื้อราพวก saprophyte ดังกล่าวจะติดอยู่บริเวณผิวหนังส่วนนอกของเมล็ดเท่านั้น เมื่อมีการฆ่าเชื้อที่ผิวจึงไม่พบว่ามีการเจริญของเชื้อราบนอาหารหรือมีการเจริญน้อยมาก แต่เชื้อราบางชนิดที่เข้าทำลายหรืออาศัยอยู่ภายในเมล็ดนั้นเชื้อราสามารถเจริญออกมาจากเมล็ดและเจริญเป็นโคโลนิบนอาหารได้ (กัญญา, 2538) ตัวอย่างเช่น เชื้อรา *Drechslera oryzae* จะพบทั้งบริเวณ seed coat หรือ pericarp และ endosperm จึงจัดว่าเชื้อราชนิดนี้เป็น seed coat หรือ pericarp infection โดยเชื้อราดังกล่าวจะอยู่ในรูป dormant mycelium บน seed coat หรือ pericarp ซึ่งเชื้อรา *D. oryzae* จัดเป็น parasite ของธัญพืช โดย *D. oryzae* เป็นเชื้อสาเหตุทำให้เกิดโรคใบจุดสีน้ำตาลในข้าว ส่วนเชื้อราชนิดอื่นๆ เช่น *Fusarium spp.*, และ *C. lunata* จะพบทั้งบริเวณ seed coat และ endosperm สำหรับเชื้อราในโรงเก็บพวก *Aspergillus spp.* และ *Penicillium spp.* จะพบมากบริเวณ seed coat (จินตนา, 2531) ซึ่งจากการตรวจสอบทั้งสองกรรมวิธีสามารถตรวจพบเชื้อรา *F. moniliforme* และ *B. oryzae* โดยเชื้อราทั้งสองชนิดจะพบในบริเวณ seed coat และ endosperm ของเมล็ด ซึ่งพบเป็นปริมาณมากที่สุด คือ 25.00% และ 12.50% ในวิธีเพาะบนกระดาษขึ้น และ 12.75% และ 4.25% ในวิธีเพาะบนอาหารวุ้น ตามลำดับ

จากนั้นทำการแยกเชื้อราที่มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเมล็ดมากที่สุดให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 2 ชนิด คือ เชื้อรา *F. moniliforme* และ *B. oryzae* โดยเชื้อราทั้งสองชนิดเป็นเชื้อราที่ติดมากับเมล็ด (Field fungi) โดยเป็นเชื้อราสาเหตุโรคคอดฟักดาบและโรคใบจุดสีน้ำตาลของข้าว ตามลำดับ (สมบัติ, 2526) เมื่อนำเชื้อราทั้งสองชนิดไปเลี้ยงบนอาหาร PDA พบ

ว่า เชื้อรา *F. moniliforme* มีลักษณะโคโลนีเรียบ เส้นใยมีสีชมพูอมส้ม เส้นใยละเอียด เมื่อตรวจดูภายใต้กล้อง compound microscope พบว่า macroconidia มีหลายเซลล์ ไม่มีสี ส่วนปลายโค้งงอ และ microconidia มีเซลล์เดียว รูปไข่ ซึ่งเจริญเติบโตเร็วกว่าเชื้อรา *B. oryzae* โดยเส้นใยมีสีขาวอมเทา เส้นใยเรียบ และมี conidia หลายเซลล์ สีเข้ม รูปทรงกระบอก ซึ่งสอดคล้องกับการอธิบายลักษณะของเชื้อราของนุชนารถ (2534)

ในการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราทั้งสองชนิด โดยวิธีเพาะบนกระดาษขึ้น และวิธีเพาะบนดิน พบว่า เชื้อราทั้งสองชนิดมีผลต่อความงอก ความแข็งแรง และอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าว ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยวิธีเพาะบนกระดาษขึ้น พบว่า กรรมวิธีที่ปลูกด้วยเชื้อรา *F. moniliforme* มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดมีเชื้อราสูงที่สุด ซึ่งมากกว่ากรรมวิธีที่ปลูกด้วยเชื้อรา *B. oryzae* คือ 89.75 และ 61.72% ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์ความงอก ต้นกล้าปกติ และต้นกล้าผิดปกติทั้งสองกรรมวิธีให้ผลไม่แตกต่างกัน สำหรับในวิธีเพาะบนดิน พบว่า กรรมวิธีที่ปลูกด้วยเชื้อรา *F. moniliforme* มีความผิดปกติของต้นกล้ามากที่สุด คือ 13.25% และมีความยาวลำต้น เมื่อต้นกล้ามีอายุ 21 และ 28 วัน และความยาวรากดำที่สุด คือ 34.14, 41.14 และ 21.93 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยลักษณะความผิดปกติของต้นกล้าข้าว คือ มีลักษณะแคะแกรน ต้นและใบข้าวมีสีขาวซีด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสมคิด (2532) ได้กล่าวไว้ว่า อาการของโรคมีหลายลักษณะทั้งต้นเดียว แคะแกรน และต้นข้าวแสดงอาการสูงชะลูดผิดปกติ ต้นข้าวพอมมีสีเขียวอ่อนซีด

ในการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งได้ (MICs) ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ กานพลู จิง ตะไคร้หอม โหระพา เปปเปอร์มินต์ โป๊ยกั๊ก และอบเชย ที่ระดับความเข้มข้น 9 ระดับ ได้แก่ 16, 31, 63, 125, 250, 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ppm ต่อเชื้อรา *F. moniliforme* และ *B. oryzae* พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากกานพลู ตะไคร้หอม และอบเชย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคทั้งสองชนิดได้ผลดีที่สุด คือ มีค่า MICs เท่ากับ 16 ทั้งนี้เป็นเพราะองค์ประกอบของโครงสร้างทางเคมี และ functional group ของน้ำมันหอมระเหยจะแสดงบทบาทสำคัญในการกำหนดลักษณะของ antimicrobial activity โดยปกติแล้วสารที่เป็นองค์ประกอบของ phenolic group จะมีประสิทธิภาพสูงที่สุด (Dean *et al.*, 1995; Celimene *et al.*, 1999) ในน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูจะมีสาร eugenol เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งเป็นสารประกอบ phenolic ทำให้มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยกลไกความเป็นพิษของสารประกอบ phenolic คือ การไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อรา ซึ่งจะประกอบด้วย -SH group ในตำแหน่งที่เจาะจง (Cowan, 1999; Celimene *et al.*, 1999) และสารประกอบ phenolic ยังจะไปรบกวนความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ของเชื้อรา ส่งผลให้เกิดการ

ยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อราได้ นอกจากนี้ antimicrobial activity ยังขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของสารที่เป็นองค์ประกอบ โดย aromatic nucleus และ phenolic OH group สามารถทำปฏิกิริยากันและทำให้เกิดการสร้าง hydrogen bond กับตำแหน่ง active site ของ target enzyme ของเชื้อรา และประสิทธิภาพของ phenolic compound ยังขึ้นอยู่กับโครงสร้างของโมเลกุล โดยการเพิ่ม alkyl group ใน benzene ring ของสาร phenol ซึ่งมีผลทำให้ antifungal activity เพิ่มขึ้น เมื่อขนาดของกลุ่มของ alkyl group ที่เพิ่มเข้าไปมีผลทำให้ antifungal activity มีค่าสูงขึ้นตามไปด้วย

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารประกอบ monoterpene คือ geraniol ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม (Griffin *et al.*, 1999) จะมีผลทำให้โครงสร้างและหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลง ซึ่งส่งผลทำให้การเจริญเติบโตและกิจกรรมของเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ลดลง (Sikkema *et al.*, 1995) ส่วนในน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยจะพบสาร cinamic aldehyde เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งเป็นสารที่พบในกลุ่ม aldehyde โดย Kurity *et al.* (1981) รายงานว่า สาร cinnamic aldehyde จะมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งนี้เป็นเพราะว่าสารประกอบดังกล่าวมี double bond อยู่ 1 คู่หรือมากกว่าซึ่งเชื่อมต่อกับ carbonyl group ส่งผลทำให้เกิด antifungal activity สูงขึ้น นอกจากนี้แล้วค่า MICs ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด ได้แก่ อุณหภูมิ ระยะเวลาของการบ่มเพาะ และขนาดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ (Lambert, 2000; Friedman *et al.*, 2002)

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. moniliforme* และ *B. oryzae* โดยใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืช ทั้ง 7 ชนิด ที่อัตราความเข้มข้น 10 ระดับ คือ 500, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500, 4,000, 4,500 และ 5,000 ppm บนอาหาร PDA พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและอบเชยในทุกระดับความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคทั้งสองชนิดได้ผลดีที่สุด โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญอยู่ระหว่าง 98.22 – 100% ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Soliman and Badeaa (2002) ที่ได้รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยของอบเชย ความเข้มข้น ≤ 500 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. moniliforme* ได้อย่างสมบูรณ์ และ Velluti *et al.* (2004) ศึกษาและพบว่า เมื่อความเข้มข้นของ น้ำมันหอมระเหยของอบเชยและกานพลู เพิ่มขึ้นจาก 0 – 1,000 $\mu\text{g/ml}$ จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* spp. เพิ่มมากยิ่งขึ้น ซึ่งจากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคทั้งสองชนิดให้ผลแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด โครงสร้างทางเคมี กลุ่มฟังก์ชัน และปฏิกิริยาส่งเสริมกันของสารที่เป็นองค์

ประกอบ (Dorman and Deans, 2000) และยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบอีกด้วย (Lambert, 2000)

เมื่อนำเมล็ดพันธุ์ข้าวมาปลูกด้วยเชื้อรา *F. moniliforme* หรือ *B. oryzae* แล้วนำมาแช่น้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 7 ชนิด และที่ระดับความเข้มข้นทั้ง 10 ระดับ มาทำการทดสอบ 3 วิธี โดยวิธีเพาะบนกระดาษขึ้นเป็นวิธีแรก พบว่า เมล็ดที่แช่น้ำมันหอมระเหยจากกานพลู ที่ความเข้มข้น 500 ppm ให้ผลดีที่สุดในการควบคุมเชื้อรา *F. moniliforme* คือ มีเปอร์เซ็นต์ความงอกและปริมาณต้นกล้าปกติมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (97% และ 95.75% ตามลำดับ) และในเมล็ดที่ปลูกด้วยเชื้อรา *B. oryzae* พบว่า กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู โป๊ยกั๊ก และอบเชย ที่ความเข้มข้น 500 ppm มีค่าเปอร์เซ็นต์ความงอกและจำนวนต้นกล้าปกติมากที่สุด ส่วนการทดสอบโดยวิธีเพาะบนดินเป็นวิธีที่สอง พบว่า เมล็ดที่ปลูกด้วยเชื้อรา *F. moniliforme* และแช่น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและโป๊ยกั๊ก ความเข้มข้น 500 ppm มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์ความงอก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วนเมล็ดที่ปลูกด้วยเชื้อรา *B. oryzae* แล้วแช่น้ำมันหอมระเหยจากโป๊ยกั๊ก ความเข้มข้น 500 ppm ให้ผลดีที่สุด คือ มีค่าสูงที่สุดทั้งเปอร์เซ็นต์ความงอก ความยาวลำต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง และวิธีการสุดท้ายทดสอบโดยวิธีเพาะในระหว่างกระดาษ พบว่า เมล็ดที่แช่น้ำมันหอมระเหยจากกานพลู จิง โป๊ยกั๊ก และอบเชย ความเข้มข้น 500 ppm มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุดทั้งในเมล็ดที่ปลูกด้วยเชื้อรา *F. moniliforme* หรือ *B. oryzae*

จากการทดสอบทั้งสามวิธีการดังกล่าว พบว่า เมื่อความเข้มข้นของน้ำหอมระเหยเพิ่มขึ้น จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราเพิ่มสูงขึ้น แต่ในทางตรงกันข้ามจะมีผลโดยตรงต่อความงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าว คือ ทำให้ความงอกของเมล็ดลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Fischer (1986); Muller (1986) และ Reynolds (1987) พบว่า น้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติเป็น inhibitor agent ต่อความงอกและการเจริญของพืช โดยมีคุณสมบัติเป็น allelopathic และ phytotoxic agents ต่อพืชด้วย (Abraham *et al.*, 2003) ซึ่ง Molisch (1937) ได้ให้ความหมายของ allelopathy คือ ปฏิกริยาทางเคมีระหว่างพืชซึ่งอาจส่งผลในการส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช จากผลการทดลองดังกล่าวอาจสรุปได้ว่า สารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากพืชบางชนิดมีผลกระทบต่อกรงอกของเมล็ด เช่น monoterpenoid (Robinson, 1983; Rice, 1984) phenolic และ terpenoid (Einhelling and Leather, 1988; Wojcik-Woitekowiak, 1992) สารที่เป็นองค์ประกอบเหล่านี้จะไปยับยั้งหรือขัดขวางกระบวนการหายใจของเมล็ด ซึ่งการหายใจเป็นกระบวนการสังเคราะห์สารอนินทรีย์ให้ได้พลังงาน ATP ขึ้นมา เพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ของพืชรวมทั้งการงอกของเมล็ดด้วย (दनัย, 2544) ส่งผลให้การสร้าง ATP ลดลง ตัว

อย่างเช่น สารประกอบ α -pinene ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม monoterpene เมื่อใช้ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 250 μ M จะมีผลกระทบต่อ energy metabolism ของ mitochondria ของ coleoptile และ primary root ของข้าวโพด โดยสารดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็น uncoupler agent ซึ่งจะไปขัดขวางกระบวนการ oxidative phosphorylation และยับยั้งกระบวนการ electron transfer chain โดย α -pinene สามารถยับยั้งการสร้าง ATP ของ mitochondria ได้อย่างรุนแรง นอกจากนี้ยังมีสารที่เป็นองค์ประกอบจากน้ำมันหอมระเหยบางชนิดที่มีผลกระทบต่อกระบวนการหายใจของ mitochondria ของรากพืช ได้แก่ limonene, eucaliptol และ camphor (Abraham *et al.*, 2000) สำหรับสารประกอบ terpene ที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากเปปเปอร์มินต์มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ ion permeability (Nurnberger *et al.*, 1994) โดยไปรบกวน plasma membrane ของพืช ทำให้โครงสร้างของ ion channel และ membrane-bound protein เปลี่ยนแปลง ซึ่งจะไปทำลายโครงสร้างและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใน lipid packing density ส่งผลให้เกิด permeability เพิ่มขึ้น และยังทำให้เกิดความสับสนในหน้าที่ของ membrane-bound-enzyme อีกด้วย (Griffin *et al.*, 2000) โดยสรุปได้ว่าปฏิกิริยาของสาร monoterpene เหล่านี้จะทำให้โครงสร้างและหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลง ซึ่งมีผลทำให้การเจริญเติบโตและกิจกรรมของเซลล์ลดลง (Sikkema *et al.*, 1995) ส่งผลให้เกิดการไหลของไอออน (Warber, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในพืชได้อีกด้วย (Fischer, 1991; Koitabashi *et al.*, 1997) กล่าวคือ การเกิด lipid peroxidation ซึ่งเป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดการสร้างสารพิษขึ้นมา โดยผลที่เกิดขึ้นตามมาคือ เกิดการเปลี่ยนแปลงใน membrane, structure, permeability, fluidity, lysosomal destabilization และเกิดการกระตุ้นของ apoptosis (Dorman *et al.*, 1995; Sikkema *et al.*, 1995) ส่งผลโดยตรงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของราก

ความสามารถในการเก็บรักษามะล็ดพันธุ์ข้าวของน้ำมันหอมระเหยจากพืชในการควบคุมเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าว โดยแช่มล็ดในน้ำและแอลกอฮอล์ กานพลู 500 ppm และอบเชย 500 ppm เปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 6 เดือน ในแต่ละเดือนสุ่มเมล็ดมาทดสอบโดยวิธีเพาะบนกระดาษขึ้นและวิธีเพาะบนดิน พบว่า ในการเพาะบนกระดาษขึ้นนั้น น้ำมันหอมระเหยและระยะเวลาในการเก็บรักษามีความสัมพันธ์ร่วมกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อความงอก ความผิดปกติของต้นกล้า และจำนวนเมล็ดมีเชื้อรา ซึ่งกรรมวิธีที่แช่มล็ดในน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู 500 ppm มีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงกว่ากรรมวิธีอื่นๆ คือ เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 0-4 เดือน ให้ผลไม่แตกต่างกัน คือ มีค่าอยู่ระหว่าง 97-98%

ส่วนจำนวนเมล็ดมีเชื้อราและต้นกล้าผิดปกติ พบว่ากรรมวิธีที่แช่มล็ดในน้ำและแอลกอฮอล์จะมีค่าสูงที่สุด โดยเมื่อเก็บรักษาในเดือนที่ 0-2 มีจำนวนเมล็ดมีเชื้อราสูงที่สุด คือ

มีค่าอยู่ในช่วง 67.50 – 72.50% เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณของเชื้อราลดต่ำลง และเมื่อเก็บรักษาในเดือนที่ 0 – 3 จะมีจำนวนดักแด้ฟักปิดกมมากที่สุด (13.25 – 14.50%) สำหรับการเพาะเมล็ดบนดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว พบว่า เมล็ดที่แช่ในน้ำมันหอมระเหยจาก กานพลู 500 ppm เมื่อเก็บรักษาไว้ในเดือนที่ 0 และ 1 ให้ผลสูงที่สุดทั้งค่าเปอร์เซ็นต์ความงอก ความยาวลำดักแด้ เมื่อดักแด้อายุ 7, 14, 21 และ 28 วัน ความยาวราก และน้ำหนักแห้ง แต่เมื่อระยะเวลาที่เก็บรักษาเพิ่มขึ้นจะทำให้อัตราการเจริญเติบโตและความแข็งแรงของดักแด้ลดลง (วัลลภ, 2540)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved