รายงานโครงการวิจัย

ศึกษาปริมาณและคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสคอพอเลตินจากพืชและการประยุกต์ใช้ควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

Study on the quantity and biological properties of plant scopoletin and its application in the control of plant pathogenic microorganisms.

กรมวิชาการเกษตร

เขมมิการ์ โขมพัตร

Khemmikar Khompatara

2564

รายงานโครงการวิจัย

ศึกษาปริมาณและคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสคอพอเลตินจากพืชและการประยุกต์ใช้ควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

Study on the quantity and biological properties of plant scopoletin and its application in the control of plant pathogenic microorganisms.

กรมวิชาการเกษตร

เขมมิการ์ โขมพัตร

Khemmikar Khompatara

2564

คำปรารภ

โครงการนี้มีเป้าหมายเพื่อนำสารสคอพอเลติน (Scopoletin) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในพืชบางชนิด และได้มีข้อมูลการรายงานถึงคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ทางการเกษตร โดยดำเนินการครอบคลุมตั้งแต่การศึกษาวัตถุดิบที่เหมาะสม ศึกษาวิธีสกัดแยกเพื่อให้สารบริสุทธิ์ ไปจนถึงศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานทั้งทางกายภาพและชีวภาพ เพื่อให้ได้มาซึ่งสารสคอพอเลตินสำหรับนำไปทดสอบประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางการเกษตร

ผลจากการบูรณาการองค์ความรู้ และร่วมมือระหว่างหน่วยงานทั้งภายในกรมวิชาการเกษตร ได้แก่ หน่วยงานสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8 ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสงขลา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ตลอดจนหน่วยงานทางด้านการศึกษา ได้แก่ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช (ไสใหญ่) ตลอดจนประชาชนและเกษตรกรในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง นำมาซึ่งผลการวิจัยที่จะพัฒนาพืชท้องถิ่นในเชิงการเพิ่มมูลค่าสู่การใช้ประโยชน์ ซึ่งจากงานวิจัยนี้พบว่า ผลยอบ้าน เป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการนำมาสกัดสารสคอพอเลติน และจากการศึกษาคุณสมบัติทั้งในทางกายภาพและชีวภาพของสารสคอพอเลตินที่สกัดได้ บ่งชี้ให้เห็นถึงคุณสมบัติที่น่าสนใจหลายประการ ทั้งการเป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้หลายชนิด การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จนกระทั่งการใช้เป็นตัวชักนำความต้านทานให้แก่พืช ซึ่งเมื่อได้ทดสอบแนวโน้มการนำไปประยุกต์ใช้กับพืชเศรษฐกิจ พบว่าสามารถใช้ลดความรุนแรงของพืชที่ติดเชื้อทั้งในมะม่วงและคะน้า ซึ่งผลจากงานวิจัยได้นำมาสู่โอกาสที่ดีสำหรับเกษตรกร รวมทั้งนักวิชาการที่เกี่ยวข้องในการเพิ่มสารทางเลือกชนิดใหม่ๆที่น่าสนใจ สำหรับนำไปศึกษาเพิ่มเติมเพื่อก้าวไปสู่ปรับใช้ส่งเสริมการเกษตรภายใต้แนวทางการลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์

คณะผู้วิจัยคาดหวังว่างานวิจัยนี้จะเป็นก้าวหนึ่งทางวิชาการเกษตรที่ก่อให้เกิดประโยชน์โดยตรงต่อเกษตรกรไทยทั้งในแง่การลดต้นทุนค่าใช้จ่ายในการใช้สารเคมีสังเคราะห์เพื่อควบคุมโรคพืช การเพิ่มรายได้จากการผลิตวัตถุดิบเพื่อนำไปสกัดสารสำคัญ รวมทั้งยังเป็นการสนับสนุนแนวทางการผลิตพืชปลอดภัยผ่านงานวิจัยที่สามารถใช้ประโยชน์ได้จริงสำหรับประเทศไทยต่อไปในอนาคต

(นางสาวเขมมิการ์ โขมพัตร)

หัวหน้าโครงการวิจัย

31 มกราคม 2565

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	5
ผู้วิจัย	6
บทนำ	8
บทคัดย่อ	11
1. กิจกรรมการสกัดสารสคอพอเลตินและทำสารให้บริสุทธิ์	13
2. กิจกรรมการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสคอพอเลติน	41
3. กิจกรรมการประยุกต์ใช้สารสคอพอเลตินเพื่อควบคุมโรคในพืชเศรษฐกิจบางชนิด	67
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	84
บรรณานุกรม	86

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะที่ปรึกษาด้านวิชาการ ผู้บริหารของหน่วยงานจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสงขลา กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช (ไสใหญ่) ตลอดจนเกษตรกรที่ให้การสนับสนุนการปฏิบัติงาน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์จุลินทรีย์และสารพิษจากจุลินทรีย์ กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สวพ.8 เป็นอย่างยิ่งสำหรับความร่วมมือร่วมใจทุ่มเทปฏิบัติงานตั้งแต่การลงพื้นที่เก็บตัวอย่างวัตถุดิบพืชชนิดต่างๆ จนกระทั่งการทดสอบและวิเคราะห์บรรลุตามวัตถุประสงค์ของผู้วิจัยในการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายด้วยการสกัดสารสำคัญมาปรับใช้ประโยชน์ในทางการเกษตร หรือใช้ประโยชน์ในสาขาอื่นๆต่อไปผ่านงานวิจัยนี้ จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

กรมวิชาการเกษตร

ผู้วิจัย

นางสาวเขมมิการ์ โขมพัตร
Ms. Khemmikar Khompatara
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8

นางสรัญญา ช่วงพิมพ์
Ms. Saranya Choungpim
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสตูล

นางสาวสาวิตรี เขมวงศ์
Ms. Sawitri Khemvong
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8

นางสาวปริยากร ฤทธิสุนทร
Ms. Pariyakorn Ritthisoonthorn
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8

นางสาวอภิญญา สุราวุธ
Ms. Apinya Surawoot
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8

นางสาวนพวรรณ นิลสุวรรณ
Ms. Noppawan Nilsuwan
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสงขลา

นางสาวธารทิพย์ ภาสบุตร
Ms. Tharntip Bhasabutra
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

นางสาวทิพวรรณ กันหาญาติ
Ms. Tippawan Kanhayart
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กรมวิชาการเกษตร

ผู้วิจัย (ต่อ)

นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน
Ms. Manorat Sudsanguan
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

นางสาวกาญจนา ศรีไม้
Ms. Kanchana Srimai
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

นางสาวบุษราคัม อุดมศักดิ์
Ms. Boossaracum U-domsak
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

นางสาววิมลวรรณ วัฒนวิจิตร
Ms. Wimonwan Wattanawichit
กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

นางสาวเยาวภา สุขพรมา
Ms. Yaowapa Sukpondma
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

นางฐิติกร พรหมบรรจง
Ms. Thitikorn Prombanchong
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช ไสใหญ่

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

ในกระบวนการผลิตทางการเกษตร ปัญหาโรคพืช ทั้งที่เกิดจากแบคทีเรีย เชื้อรา หรือแม้กระทั่งไวรัส นับเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อความเสียหายให้แก่เกษตรกรผู้ผลิตอยู่เสมอ สำหรับในพื้นที่ภาคใต้ ปัญหาโรคพืชที่พบบ่อยครั้ง เช่น การเกิดโรคใบร่วงในยางพาราจากเชื้อไฟทอปธอร่า (*Phytophthora* spp.) โรคเหี่ยวในกล้วยหินจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* โรคเหี่ยวในต้นสับปะรดจากเชื้อ *Closterovirus* เป็นต้น ซึ่งปัญหาจากโรคพืชดังกล่าวล้วนสร้างความเสียหายต่อคุณภาพของผลผลิตทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ สำหรับในปัจจุบันเมื่อพบว่ามีการระบาดของโรคเกิดขึ้น ทางเลือกของเกษตรกรในการแก้ปัญหายังคงมุ่งไปยังการเลือกใช้สารเคมีสังเคราะห์ซึ่งต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง เพื่อไม่ให้เกิดผลกระทบต่อความปลอดภัยเกษตรกรผู้ใช้สารเคมีนั้นๆ โดยตรง รวมไปถึงการตกค้างของสารเคมีในผลผลิต ซึ่งนำไปสู่ความไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค อีกทั้งยังถูกหยิบยกมาเป็นประเด็นด้านอาหารปลอดภัยเพื่อใช้พิจารณาในการตกลงซื้อขายสินค้า

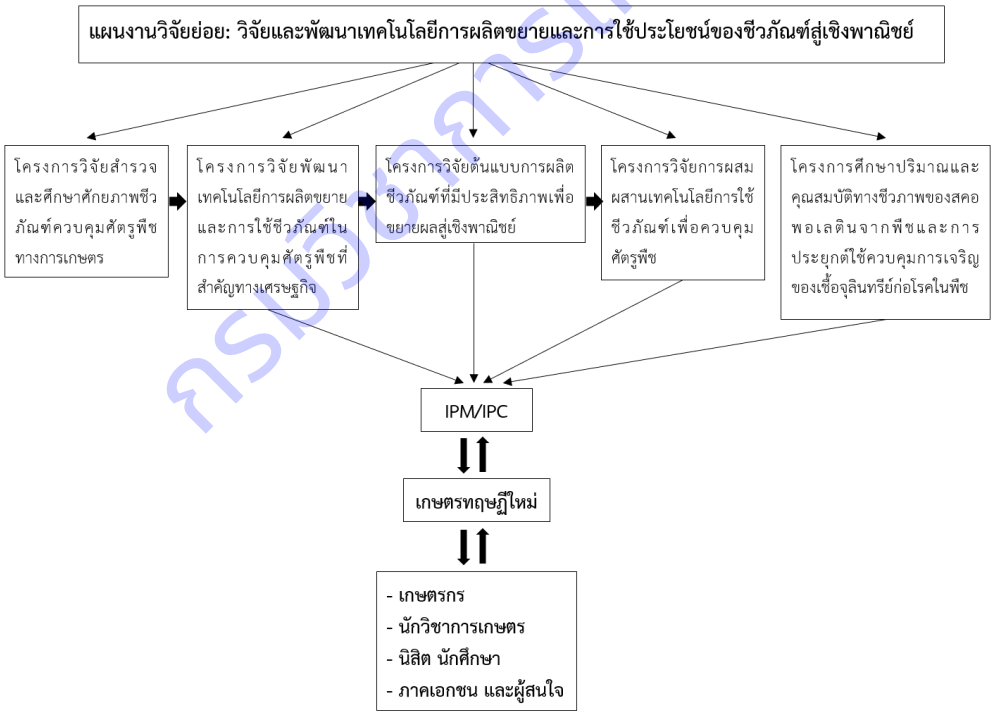
ปัจจุบันหน่วยงานภาครัฐได้เข้ามามีส่วนในการควบคุมดูแลคุณภาพสินค้าเกษตรโดยสนับสนุนให้เกษตรกรผลิตตามระบบเกษตรดีที่เหมาะสม (Good Agricultural Practice: GAP) และได้เร่งส่งเสริมนโยบายเพิ่มการทำเกษตรอินทรีย์เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีความปลอดภัยปราศจากสารเคมีปนเปื้อน โดยได้กำหนดเป็นแผนยุทธศาสตร์เกษตรอินทรีย์แห่งชาติ มีเป้าหมายที่จะเพิ่มพื้นที่เกษตรอินทรีย์ เพิ่มสัดส่วนตลาดในประเทศ ตลาดส่งออกเป็น 40:60 และยกระดับกลุ่มเกษตรอินทรีย์วิถีพื้นบ้านเพิ่มขึ้น ดังนั้นเพื่อรองรับแนวทางการผลิตพืชดังกล่าวข้างต้นภายใต้สภาวะที่การเกิดโรคพืชยังคงพบอยู่เสมอจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาและวิจัยเพื่อให้ได้สารชีวภัณฑ์ (biocontrol) สำหรับเป็นทางเลือกให้แก่เกษตรกรนำไปปรับใช้แก้ปัญหาโรคพืชแทนการใช้สารเคมี ทั้งนี้ปัจจุบันสารชีวภัณฑ์สำหรับใช้ป้องกันโรคพืชได้มีการผลิตเชิงการค้าโดยภาคเอกชน แต่ยังคงมีตัวเลือกไม่มากนักและส่วนใหญ่จะเป็นการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เช่น เชื้อราไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma harzianum*) เชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส ซับทีลิส (*Bacillus subtilis*) เชื้อรากลิโอคลาเดียม ไวเรน (*Gliocladium virens*) เชื้อแบคทีเรีย สเตรปโตมัยซีส (*Streptomyces* sp.) ซึ่งจำเป็นต้องใช้ความรู้ทางด้านจุลชีววิทยาในการผลิตผลิตภัณฑ์เพื่อให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้แก้ปัญหาในแปลงต่อไปได้

สคอพอเลติน เป็นสารทุติยภูมิที่มีมวลโมเลกุลต่ำ จุดเดือดสูง มีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ภายใต้สภาวะที่ถูกกระตุ้นทั้งจากตัวกระตุ้นแบบชีวภาพและทางกายภาพ พืชสามารถสร้างสารชนิดนี้เพิ่มขึ้นมาได้อีกในปริมาณมาก โดยอาจพบได้ในบริเวณชิ้นส่วนต่างๆ เช่น ลำต้น ราก ใบ และผล อย่างไรก็ตามสารนี้ถูกสร้างขึ้นในพืชเพียงบางชนิด โดยจุดเด่นของสารชนิดนี้คือการมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) รวมทั้งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ปัจจุบันจึงได้มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย

กรมวิทยาศาสตร์

โดยเฉพาะในทางการแพทย์ อย่างไรก็ตามการศึกษาและนำสคอพอเลตินมาใช้ประโยชน์ในเชิงการเกษตรเพื่อป้องกันหรือลดระดับความรุนแรงจากการถูกเชื้อรุกรานสำหรับประเทศไทยยังคงมีข้อมูลน้อย

ในปี 2562 โครงการวิจัยนี้เริ่มดำเนินการโดยเข้ามาเป็นส่วนหนึ่งของแผนงานวิจัยย่อย เรื่อง"วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์" ซึ่งดำเนินงานตั้งแต่ปี 2559-2564 (ภาพที่ ก.) ซึ่งแนวทางงานวิจัยมุ่งเน้นไปที่การศึกษาวิธีการนำสารสคอพอเลตินจากพืชที่พบในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างรวมถึงอาจพบได้ในพื้นที่อื่นๆทั่วประเทศมาศึกษา ตั้งแต่กระบวนการสกัดสาร การตรวจสอบคุณสมบัติพื้นฐานที่จำเป็นของสารชนิดนี้เพื่อเป็นข้อมูลสู่การนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ ได้แก่ คุณสมบัติการต้านการเจริญของเชื้อ จุลินทรีย์บางชนิด การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และการใช้เป็นสารชักนำความต้านทานในพืช (elicitor) เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ในทางการเกษตร เช่น การผลิตสารสกัดที่มีปริมาณสคอพอเลตินสูงมาใช้ป้องกันกำจัดโรคในพืชเศรษฐกิจบางชนิดลดความเสียหายของผลผลิตทางการเกษตรอันมีสาเหตุจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เพื่อทดแทนหรือลดปริมาณการใช้สารเคมี ทั้งนี้องค์ความรู้จากคุณสมบัติของสารสคอพอเลตินที่สกัดได้จากพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่าย และผลจากการนำไปทดสอบประยุกต์ใช้กับงานด้านการเกษตร ยังนำไปสู่การเพิ่มมูลค่าให้กับพืชท้องถิ่นในการใช้เป็นพืชวัตถุดิบเพื่อการสกัดสารสคอพอเลตินสู่การใช้ประโยชน์ในศาสตร์ที่เกี่ยวข้องในอีกทางหนึ่งด้วย



ภาพที่ ก. แผนผังความเชื่อมโยงของโครงการวิจัยภายใต้แผนงานวิจัยย่อยเรื่องวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์

กรมวิชาการเกษตร

2. วัตถุประสงค์

1 เพื่อศึกษาวิธีการและอัตราส่วนที่เหมาะสมในการสกัด เปรียบเทียบปริมาณสารสคอพอเลตินจากชิ้นส่วนพืชได้แก่ ราก ใบ หัว และเมล็ด ในลองกอง, ยางพารา, ยอบ้าน, ผักกาดนกเขา และมันสำปะหลังและทำบริสุทธิ์สารเพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ

2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสคอพอเลตินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และการใช้เป็นตัวชักนำความต้านทานต่อโรคในพืชเศรษฐกิจ

3 เพื่อทดสอบประยุกต์ใช้คุณสมบัติทางชีวภาพของสารสคอพอเลตินให้เกิดประโยชน์ในทางการเกษตร โดยใช้ป้องกันกำจัดโรคพืชในพืชเศรษฐกิจบางชนิด

3.วิธีการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการนำความรู้ทางด้านเคมี ชีวเคมี โรคพืช และเกษตรศาสตร์ มาปรับใช้ในการสกัดสารสคอพอเลติน (Scopoletin) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในพืชมาใช้ประโยชน์ในทางการเกษตร เพื่อก่อให้เกิดการเพิ่มมูลค่ากับพืชท้องถิ่น โดยในการวิจัยนี้ครอบคลุมการศึกษาศึกษาวิธีการสกัดและวิเคราะห์สารสคอพอเลตินจากพืช การหาปริมาณสคอพอเลตินในพืชที่หาได้ทั่วไปในท้องถิ่นพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างหรือภาคอื่นๆ เช่น ลองกอง, ยางพารา, ยอบ้าน, ผักกาดนกเขา และมันสำปะหลัง ฯลฯ เพื่อคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพในการใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตสารสคอพอเลตินสำหรับต้านเชื้อก่อโรคพืช และจัดทำฐานข้อมูลปริมาณสารสคอพอเลตินที่พบในพืชที่คัดเลือก ได้แก่ ปริมาณสารโดยเฉลี่ยและช่วงปริมาณสารที่พบในพืชชนิดนั้น จากนั้นดำเนินการแยกสารสคอพอเลตินให้ได้สารบริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิคทางเคมีในการแยก และตรวจสอบสารที่แยกได้ เช่น Column chromatography, Thin-layer chromatography, High-pressure liquid chromatography, Nuclear magnetic resonance และ Fourier Transform Infrared Spectroscopy จากนั้น นำสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์ที่ผ่านการแยกและตรวจสอบเรียบร้อยแล้ว มาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่างๆ ได้แก่ การต้านการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช ทั้งแบคทีเรียและราโดยคัดเลือกมาจากเชื้อก่อโรคที่มักพบได้บ่อยและก่อให้เกิดปัญหาในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และการทดสอบใช้เป็นสารชักนำความต้านทานโรคในพืช โดยใช้ต้นยาสูบซึ่งเป็นพืชที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นและเป็นที่นิยมใช้ในการศึกษาสารชีวโมเลกุลในหลายงานวิจัยทั่วโลก เพื่อเป็นตัวแทนพืชสำหรับทดสอบ โดยทำการตรวจสอบสัญญาณบ่งชี้ความต้านทานในพืช ได้แก่ กรดซาลิซิลิก และกรดแอบไซซิก ซึ่งเป็นโมกุลส่งสัญญาณในระบบภูมิต้านทานในพืชแบบ systemic acquired resistance และ induced systemic resistance เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบการป้องกันตนเองในพืช ได้แก่ ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส เปอร์ออกซิเดส และกลูคาเนส ซึ่งผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจะนำไปสู่การประเมินเพื่อนำมาปรับใช้ให้เกิดประโยชน์ทางการเกษตร โดยทำการศึกษาแนวโน้มการนำสารสคอพอเลตินที่สกัดแยกได้จากพืชท้องถิ่นมาประยุกต์ใช้ควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เพื่อช่วยลดระดับความรุนแรงของการเกิดโรคในพืชเศรษฐกิจสำคัญ ได้แก่ มะม่วง และ คะน้า ในระดับห้องปฏิบัติการและโรงเรือน

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

สคอพอเลตินเป็นสารพฤษเคมีที่พบในพืชบางชนิดได้ถูกสกัดและนำมาทดสอบปรับใช้ส่งเสริมกระบวนการผลิตพืชครั้งแรกในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย จากการสำรวจพืชในท้องถิ่นจำนวน 18 ชนิด พบยอบ้าน (Morinda citrifolia L.; noni) มีปริมาณสารสคอพอเลตินสูงที่สุดเฉลี่ย 393.27$\pm$ 165.42 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักผลแห้ง การสกัดและแยกสารสคอพอเลตินจากผลยอบ้าน ด้วยวิธี maceration ด้วย ethanol โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ด้วยซิลิกาเจล ชะด้วยส่วนผสมของเอทิลอะซิเตท และเฮกเซน (0-60 เปอร์เซ็นต์ v/v) ต่อด้วย 2 เปอร์เซ็นต์เมทานอลในไดคลอโรมีเทน สารที่แยกได้เป็นผลึกสีเหลือง การตรวจสอบด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) ยูวีสเปกตรัม Nuclear Magnetic Resonance (^{1}H NMR และ ^{13}C-NMR) และวิธี Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) เปรียบเทียบกับสคอพอเลตินมาตรฐาน พบว่า สารประกอบที่แยกออกมาเป็นสารประกอบเดียวกันหรือสารประกอบที่แยกได้คือ สคอพอเลติน ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสคอพอเลติน พบว่า 1) ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถต้านการเจริญของเชื้อรา 7 ชนิด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 50 แต่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เล็กน้อย 2) มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยผลการสอบ เปรียบเทียบกับกรดแอสคอบิก ให้ค่า IC_{50} (DPPH) 0.6 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ 3) เป็นสารชักนำความต้านทาน (elicitor) โดยสามารถกระตุ้นแอคติวิตี้ของเอนไซม์และการสะสมโมเลกุลส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานในต้นยาสูบ ได้แก่ เอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส เอนไซม์กลูคาเนสเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส กรดซาลิซิลิก และ กรดแอบไซซิก การนำสารสคอพอเลตินมาประยุกต์ใช้ควบคุมโรคพืช พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm ช่วยลดความเสียหายจากโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงและโรคใบจุดในคะน้าได้ โดยมีผลใกล้เคียงกับการใช้สารชีวภัณฑ์หรือสารเคมีภัณฑ์

ผลจากงานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าสคอพอเลตินที่สกัดจากผลยอบ้านมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา, กำจัดอนุมูลอิสระ และชักนำความต้านทานของพืช นอกจากนี้ยังช่วยลดระดับความรุนแรงของโรคในพืชทดสอบได้ **ดังนั้นสคอพอเลตินจึงเป็นตัวเลือกที่มีแนวโน้มน่าสนใจสำหรับนำมาสกัดนำสารพฤกษเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงจากพืชท้องถิ่นต้นทุนต่ำไปใช้สนับสนุนกระบวนการผลิตทางการเกษตรให้กับเกษตรกรไทยในอนาคต**

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Scopoletin, a phytochemical found in some plants, was first extracted and applied to promote plant production in the lower southern region of Thailand. A survey of 18 local plants found that yor banyan (*Morinda citrifolia* L.; noni) had the highest scopoletin content, on average 393.27+ 165.42 mg/kg of dried fruit weight. Scopoletin was extracted from noni fruit by maceration method using ethanol. Column chromatography with silica gel was extracted by elute with a mixture of ethyl acetate and hexane (0-60% v/ v) followed by 2 percent methanol in dichloromethane. The isolated substance is yellow crystals. The Thin Layer Chromatography (TLC), UV spectra, Nuclear Magnetic Resonance (1H NMR and 13C-NMR) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) methods were compared with standard scopoletin. The bioactivity of scopoletin is as follows: 1) at a concentration of 1000 ppm. it was resistant to the growth of 7 fungi with a percentage inhibition greater than 50, however it inhibited a small percentage of bacteria; 2) It has free radical scavenging potential. Test results compared with ascorbic acid gave lc50 (DPPH) of 0.6 and 0.01 mg/mL, respectively. 3) It is an elicitor that can stimulate the activity of enzymes and the accumulation of immune signaling molecules in tobacco plants, such as phenylalanine ammonium lyase (PAL), glucanase (GLU), peroxidase (POD), salicylic acid (SA) and abscisic acid (ABA). The use of scopoletin to control plant diseases found that 1,000 ppm scopoletin reduces anthracnose damage in mangoes. and leaf spot disease in kale. The results are similar to the use of biological agents or chemicals.

The result of this project indicates that scopoletin is a promising alternative agent that inhibits fungal growth, eliminates free radicals and induces plant resistance. It also reduced the degree of disease severity in the test plants. **Therefore, it can be seen that scopoletin is a promising option for extracting high-performance phytochemicals from low-cost local plants to support agricultural production for Thai farmers in the future.**

กรมวิทยาศาสตร์

กิจกรรมที่ 1

การสกัดสารสคอพอเลตินและทำสารให้บริสุทธิ์

Extraction and Purification of Scopoletin

ผู้วิจัย

นางสาวเขมมิการ์ โขมพัตร

Ms. Khemmikar Khompatara

นางสรัญญา ช่วงพิมพ์

Ms. Saranya Choungpim

นางสาวสาวิตรี เขมวงศ์

Ms. Sawitri Khemvong

นางสาวปริยากร ฤทธิสุนทร

Ms. Pariyakorn Ritthisoonthorn

นางสาวเยาวภา สุขพรมา

Ms. Yaowapa Sukpondma

นางสาววิมลวรรณ วัฒนวิจิตร

Ms. Wimonwan Wattanawichit

กรมวิชาการเกษตร

คำสำคัญ สคอพอเลติน ยอบ้าน การสกัดสาร การทำบริสุทธิ์

Key words scopoletin, noni, extraction, purification

บทคัดย่อ

ปัจจุบันกระบวนการผลิตทางการเกษตรของไทย ประสบกับสภาวะต้นทุนการผลิตสูง อันเนื่องจากการเพิ่มราคาของปัจจัยการผลิต ทั้งปุ๋ยและยาป้องกันกำจัดศัตรูพืช รวมทั้งระบบการตลาดตลอดจนผู้บริโภคก็ยังได้เข้ามามีบทบาทในการกำหนดคุณภาพสินค้าเกษตร โดยเน้นความปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้เกษตกรได้รับความเดือดร้อน การศึกษาค้นคว้าเพื่อให้ได้มาซึ่งสารทางเลือกใหม่ๆที่มีความปลอดภัยและหาได้ง่ายในท้องถิ่น รวมทั้งมีต้นทุนต่ำเพื่อนำมาใช้ส่งเสริมกระบวนการผลิตให้แก่เกษตรกรจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหา โดยกิจกรรมแรกของงานวิจัยนี้ เป็นการสำรวจพืชที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นภาคใต้ตอนล่าง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารสคอพอเลตินซึ่งเป็นสารที่เคยมีการรายงานถึงคุณสมบัติการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยพบได้ในพืชบางชนิด ซึ่งผลการสำรวจพืชจำนวน 18 ชนิด ได้แก่ ขี้กา คล้า เคี่ยม ดาหลา ทุเรียนเทศ เนียงนก ผักกาดนกเขา ผักบุ้งน้ำ พาโหม ฟักข้าว มะเดื่อ มะม่วงหิมพานต์ มันสำปะหลัง ยอบ้าน ยอป่า ลองกอง ลังแข และ ยางพารา โดยใช้ชิ้นส่วนใบ ราก หัว และผล ขึ้นอยู่กับลักษณะของพืชนั้นๆ พบว่าผลยอบ้านมีสารสคอพอเลตินมากที่สุด 393.27 $\pm$ 165.42 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง การศึกษาวิธีการสกัดแยกสารสคอพอเลตินพบว่าสามารถแยกได้โดยวิธีสกัดแบบ maceration และแยกผ่านคอลัมน์ซิลิกา 2 ครั้ง ด้วยระบบตัวทำละลายเฟสเคลื่อนที่ครั้งที่ 1 เป็นระบบ 0-60 เปอร์เซ็นต์เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน และแยกครั้งที่ 2 ด้วยระบบ 2 เปอร์เซ็นต์เมทานอลในไดคลอดโรมีเทน เมื่อนำสารที่ชะออกจากคอลัมน์แล้วไปวิเคราะห์ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC) พบแถบของสารที่สกัดได้เพียงแถบเดียวในตำแหน่งตรงกับสารมาตรฐานสคอพอเลติน และเมื่อวิเคราะห์ทางกายภาพด้วยวิธีการวัดค่ายูวีสเปกตรัม ร่วมกับวิธี Nuclear Magnetic Resonance ชนิด ^{1}H NMR และ ^{13}C-NMR และวิธี Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานสคอพอเลติน พบว่าสารที่สกัดได้จากผลยอบ้านเป็นสารสคอพอเลติน

กรมวิชาการเกษตร

Abstracts

Nowadays, the agricultural production process in Thailand is experiencing high production costs. This was caused by increasing prices of fertilizers and pesticides in the market. At the same time, the marketing system and consumers all play a role in determining the quality of agricultural products. By raising expectations of produce that is safe for both consumers and the environment, farmers need to adjust their production practices. Research into new, safe, inexpensive, and readily available local alternatives to support the production process is an alternative solution for farmers.

This study aims to survey of local plants that are readily available in the lower southern region and analyze the scopoletin in plants. The results of the survey consisted of 18 plant species, including *Gymnopetalum integrifolim* Kurz., *Schumannianthus dichotomus* (Roxb.) Gagnep, *Cotylelobium lanceolatum* Craib, *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith, *Annona muricata* L, *Archidendron bubalinum* (jack) I.C. Nielsen, *Emilia sonchifolia* (L.) DC.ex Wight, *Ipomoea aquatica*, *Paederia foetida* Linn, *Ficus hispida* L, *Anacardium occidentale, Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng, *Manihot esculenta* (L.) Crantz, *Morinda citrifolia* L (noni), *Morinda coreia* Buch-Ham, *Hevea brasiliensis* Muell Arg, *Lansium domesticum* Corr. and *Baccaurea macrophylla* Muell. Arg. Plant organs such as leaves, roots, tubers and fruits from each plant were analyzed. The noni fruit contained the highest scopoletin (393.27$\pm$165.42 mg/kg dry weight). The extraction method was successfully performed with maceration extraction and two times of silica column separation. For the first column, 0-60 % ethyl acetate in hexane was used as an elution agent. Subsequently, the next column used 2% methanol in dichloromethane as an elution agent. The fractions obtained were analyzed for purity by Thin-layer chromatography (TLC). Only one band of the extracted substance was found in the position corresponding to the scopoletin standard. Physical analysis by UV-spectrum scanning, Nuclear Magnetic Resonance (^{1}H and ^{13}C-NMR) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) analysis have confirmed that the extracts from noni fruit are scopoletin.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

บทนำ

สคอพอเลติน เป็นสารทุติยภูมิที่มีมวลโมเลกุลต่ำ จุดเดือดสูง มีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ภายใต้สภาวะที่ถูกกระตุ้นทั้งจากตัวกระตุ้นแบบชีวภาพและทางกายภาพ พืชสามารถสร้างสารชนิดนี้เพิ่มขึ้นมาได้อีกในปริมาณมาก โดยอาจพบได้ในบริเวณชิ้นส่วนต่างๆ เช่น ลำต้น ราก ใบ และผล อย่างไรก็ตามสารนี้ถูกสร้างขึ้นในพืชเพียงบางชนิด โดยจุดเด่นของสารชนิดนี้คือการมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) รวมทั้งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ปัจจุบันจึงได้มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในทางการแพทย์ และด้วยคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด จึงมีความน่าสนใจในการศึกษาและนำสคอพอเลตินมาใช้ประโยชน์ในเชิงการเกษตรเพื่อป้องกันหรือลดระดับความรุนแรงจากการถูกเชื้อก่อโรคพืชรุกราน โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายใต้นโยบายเกษตรปลอดภัยที่หน่วยงานภาครัฐมุ่งส่งเสริมและผลักดันให้เกิดขึ้น มีความจำเป็นต้องทำการศึกษาหาสารธรรมชาติที่มีความปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อเป็นสารตัวเลือกใหม่ๆ ให้กับเกษตรกรในการใช้ป้องกันและหรือแก้ปัญหาโรคพืช อย่างไรก็ตามข้อมูลการใช้สารสคอพอเลตินสำหรับการประยุกต์ใช้ในทางการเกษตรสำหรับประเทศไทยยังคงมีน้อย

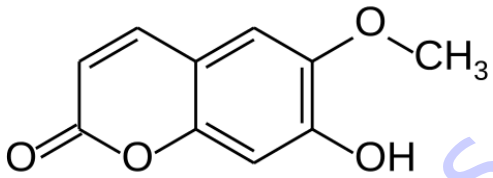
นอกจากการศึกษาเพื่อพัฒนาด้านการอารักขาพืชอันเป็นการรองรับแนวนโยบายเกษตรปลอดภัยแล้ว การศึกษาสารสำคัญในพืชที่สามารถหาได้ง่าย และราคาต่ำยังนับเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชชนิดนั้นๆ ได้ โดยเฉพาะในพืชบางชนิดที่มักประสบปัญหาผลผลิตล้นตลาดในบางฤดูกาล เช่น ลองกอง หรือผลสุกร่วงหล่นส่งกลิ่นเหม็นรบกวน เช่น ผลยอ เป็นต้น ดังนั้นหากมีแนวทางช่วยเหลือเกษตรกรโดยการนำผลผลิตดังกล่าวมาสกัดสารสำคัญที่สามารถพัฒนาต่อยอดไปในอีกหลากหลายสาขาทั้งในงานด้านการเกษตร ตลอดจนงานด้านอุตสาหกรรมและการแพทย์ ย่อมจะก่อให้เกิดประโยชน์ในเชิงเศรษฐกิจอีกมากมาย กิจกรรมภายใต้โครงการวิจัยนี้จึงได้จัดทำขึ้นเพื่อสำรวจหาพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายและมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการสกัดสารสคอพอเลติน โดยมีการปรับวิธีการตรวจสอบสารโดยเทคนิค TLC ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่ายและต้นทุนต่ำเพื่อให้สามารถใช้ในการประเมินพืชเบื้องต้น ควบคู่กับการยืนยันผลในเชิงปริมาณด้วยเทคนิค HPLC เพื่อคัดเลือกพืชท้องถิ่นที่มีศักยภาพสำหรับนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดแยกสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์โดยมีการศึกษาค้นคว้าวิธีการแยกสารให้บริสุทธิ์พร้อมทั้งตรวจสอบคุณสมบัติของสารที่แยกได้เพื่อยืนยันชนิดสาร ก่อนจะนำสารที่สกัดแยกได้ไปใช้ในการศึกษาทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพเพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับพิจารณาการนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทางการเกษตรต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

การทบทวนวรรณกรรม

1 สคอพอเลติน (Scopoletin)

สคอพอเลติน เป็นสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อตอบสนองต่อการกระตุ้นทั้งตัวกระตุ้นชีวภาพ เช่น เชื้อจุลินทรีย์ หรือ ตัวกระตุ้นกายภาพ เช่น การเกิดบาดแผล หรือการได้รับรังสีบางชนิด สคอพอเลตินมีขนาดโมเลกุล 192.17 กรัมต่อโมล และจุดหลอมเหลวที่ 204 องศาเซลเซียส โดยมีโครงสร้างดังภาพที่ 1



ภาพที่1 โครงสร้างของสคอพอเลติน

สคอพอเลตินจัดอยู่ในกลุ่มไฟโตอเล็กซินที่มีการรายงานการพบในพืชหลายชนิด เช่น พืชในตระกูลผักบุ้ง *(Convolvulus microphyllus)* (Zafar *et al*., 2005), พืชตระกูลยาสูบ *(Nicotiana benthamiana)* (Vialart *et al*., 2012), ยางพารา (*Hevea brasiliensis)* (Churngchow and Rattarasarn, 2001), มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) (Andreae and Andreae, 1949) ผักคราดหัวแหวน *(Spilanthes acmella* Murr.) (Abyari *et al.,* 2016), ยอ *(Morinda citrifolia* Linnaeus) (West and Deng, 2010) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) (BA *et al*., 2017) และ ทานตะวัน (*Helianthus annuus*) (Saftić-Panković *et al.,* 2006) โดย Gutierrez *et al.,* (1995) ได้นำใบของทานตะวันมาศึกษากระบวนการสะสมของสคอพอเลติน พบว่าสามารถเหนี่ยวนำกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ออกซิไดซ์สคอพอเลตินให้เป็นสารประกอบที่มีสีและไม่ละลายน้ำ หลังการกระตุ้นใบด้วย $CuCl_2$ หรือน้ำตาลซูโครส โดยเห็นการเรืองแสงเกิดขึ้นภายใต้แสง UV ในขณะที่กระตุ้นด้วย salicylic acid, dichloroisonicotinic acid หรือ glutathione ไม่เกิดการเรืองแสง การสร้างสารประกอบนี้ในพืชจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่มากระตุ้นและอายุของเนื้อเยื่อพืช ในยางพารามีการศึกษาปริมาณของสคอพอเลตินเพื่อใช้ในการบ่งบอกระดับความต้านทานโรคของพันธุ์ยางชนิดต่างๆได้ โดยพันธุ์ยางที่อ่อนแอจะผลิตสคอพอเลตินได้น้อยกว่าพันธุ์ต้านทาน (Churngchow and Rattarasarn, 2001) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Khompatara, 2017 พบว่าในสภาวะปกติใบยางพาราชำถุงพันธุ์ RRIM600 สามารถตรวจพบสคอพอเลตินได้ที่ระดับ 0.2-0.4 มิลลิกรัม จากใบยางสด 1 กิโลกรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร

2 คุณสมบัติของสารสคอพอเลติน

Tegos *et al.* (2002) ได้รายงานว่าสคอพอเลตินมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยยับยั้งกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ ต่อมา Rigane *et al*. (2013) ได้รายงานถึงคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียโดยใช้สารสกัดด้วยเมทานอลจากใบและดอกของต้น *Calendula officinalis* ซึ่งมีสารสคอพอเลตินเป็นส่วนประกอบสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 3 ชนิดและเชื้อราอีก 2 ชนิด โดยได้ชี้ว่าผลที่ได้สามารถนำไปใช้ในเชิงอุตสาหกรรมเพื่อการผลิตสาร bioactive จากพืชได้ และในปีเดียวกันนี้ Acharya *et al.* (2013) ได้รายงานถึงคุณสมบัติของสคอพอเลตินในการยังยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella typhi* ได้นอกจากคุณสมบัติด้านการเป็นสาร antimicrobial แล้ว สคอพอเลตินยังได้รับการรายงานถึงคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยสคอพอเลตินที่สกัดจาก *Sinomonium acutum* สามารถกำจัดอนุมูล superoxide anion ในปฏิกิริยา xanthine/xanthine oxidase (Shaw *et al.,* 2003) นอกจากนี้ Malik *et al.* (2011) ได้รายงานว่าสคอพอเลตินสามารถนำมาใช้กำจัดอนุมูลอิสระชนิด 1, 1-diphenyl-2-picrul-hydrazil free radical (DPPH), อนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ได้ โดยผู้วิจัยชี้ว่าสคอพอเลตินควบคุมอนุมูลอิสระได้โดยผ่านทางกระบวนการที่หลากหลาย เช่น การขนส่งกรดไขมันสายยาวในไมโตคอนเดรีย เป็นต้น ทั้งนี้สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) มีความสำคัญคือเป็นสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชั่น เช่น กระบวนการเกิดสนิมของเหล็ก การเกิดสีน้ำตาลในผลไม้ (เช่นในแอปเปิ้ล) หรือการทำให้น้ำมันพืชเหม็นหืน หรือกระบวนการออกซิเดชั่นที่เกิดในร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ เช่น การย่อยสลายโปรตีนและไขมันจากอาหารที่กินเข้าไป มลพิษทางอากาศ การหายใจ ควันบุหรี่ หรือรังสียูวี ปัจจัยเหล่านี้ล้วนทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นซึ่งสร้างความเสียหายได้ทั้งในพืชและในร่างกายมนุษย์ จึงได้มีการศึกษาหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งต่างๆสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ทั้งทางด้านการเกษตร ด้านเภสัชกรรม รวมไปถึงด้านการแพทย์

จากประโยชน์อันหลากหลายของสารสคอพอเลตินตามที่ได้เคยมีการรายงานก่อนนี้ ทั้งในด้านการนำไปปรับใช้เพื่อการต้านเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด ตลอดจนต้านอนุมูลอิสระ บ่งชี้ให้เห็นถึงความสำคัญและคุณค่าของสารคอพอเลติน อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าการศึกษาสคอพอเลตินในพืชมักมีดำเนินการเฉพาะพืชที่นักวิจัยสนใจทีละชนิดเป็นส่วนใหญ่ แต่ข้อมูลเชิงเปรียบเทียบปริมาณสคอพอเลตินในพืชหลากหลายชนิดเพื่อคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพสู่การนำไปใช้ประโยชน์ยังไม่พบการรายงาน การศึกษาปริมาณสารชนิดนี้ในพืชท้องถิ่นหลากหลายชนิด เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับนำไปประกอบการพิจารณาคัดเลือกวัตถุดิบต้นทุนต่ำสำหรับสกัดสารสคอพอเลติน ตลอดไปถึงการศึกษาวิธีการสกัดแยกสารสคอพอเลตินออกจากพืชที่คัดเลือกได้ นับเป็นก้าวแรกของงานวิจัยภายใต้แนวทางการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายของพืชท้องถิ่น ทั้งยังเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับพืชนั้นๆอันเป็นการเสริมรายได้ให้แก่เกษตรกรอีกทางหนึ่งด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร

3. วัตถุประสงค์ของกิจกรรม

3.1 เพื่อศึกษาวิธีการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารสคอพอเลตินในพืชที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นภาคใต้ตอนล่าง

3.2 เพื่อศึกษาวิธี**ก**ารทำบริสุทธิ์สารสคอพอเลตินและตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ

ระเบียบวิธีวิจัย

กิจกรรมที่ 1 การสกัดสารสคอพอเลตินและทำสารให้บริสุทธิ์ (2562-563)

การทดลองที่ 1 ศึกษาวิธีสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารสคอพอเลตินในพืชที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นภาคใต้ตอนล่าง

<u>อุปกรณ์</u>

1. พืชท้องถิ่นชนิดต่างๆ เช่น ลองกอง, ยางพารา, ยอบ้าน, ผักกาดนกเขา และมันสำปะหลัง ฯลฯ
2. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
3. ตู้อบความร้อน (hot-air oven)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า (electric balance) ทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 3 ตำแหน่ง
5. เครื่องบดตัวอย่างพืช (Blender)
6. เครื่องระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator)
7. เครื่องเขย่าสารแบบหมุน (orbital shaker)
8. กล่องทดสอบสารด้วยแสงยูวี (UV box)
9. เครื่อง High-pressure liquid chromatography (HPLC)
10. วัสดุและสารเคมีสำหรับการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่าง เช่น แผ่น TLC, ซิลิกาเจล, โถแก้วดูดความชื้น, ชุดกรองสุญญากาศ, syringe filter, ขวด vial, TLC แทงค์, สารสคอพอเลตินมาตรฐาน, เอทานอล, เมทานอล, อะซิโตไนไตรล์ และกรดอะซิติก เป็นต้น

<u>วิธีการปฏิบัติ</u>

1. การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์

เก็บรวบรวมตัวอย่างพืชที่พบได้ง่ายในท้องถิ่นภาคใต้ตอนล่าง จำนวน 18 ชนิด ได้แก่ ขี้กา คล้า เคี่ยม ดาหลา ทุเรียนเทศ เนียงนก ผักกาดนกเขา ผักบุ้งน้ำ พาโหม ฟักข้าว มะเดื่อ มะม่วงหิมพานต์ มันสำปะหลัง ยอบ้าน ยอป่า ลองกอง ลังแข และ ยางพารา ซึ่งพืชแต่ละชนิดจำแนกเป็นส่วนใบ ผล ราก และเปลือกขึ้นอยู่กับชนิดพืชนั้น นำมาสกัดตามวิธีที่ปรับจาก Ba *et al*., 2017 ดังนี้ เตรียมตัวอย่างโดยนำส่วนใบพืชมาวางผึ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน และนำมาอบที่อุณหภูมิ 60$\pm$1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนบดเพื่อให้ตัวอย่างแห้งกรอบบดได้ง่าย สำหรับตัวอย่าง

กรมวิชาการเกษตร

ผล เมล็ด เปลือก หรือหัวของพืชที่มีลักษณะอวบน้ำและเสี่ยงต่อการเน่าเสีย นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆและอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60±1 องศาเซลเซียสจนกว่าตัวอย่างจะแห้งและมีน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำตัวอย่างพืชมาสกัด โดยผสมผงตัวอย่างแห้งในอัตราส่วน 0.5 กรัม 1 กรัม และ 5 กรัม ใน 100 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร วางไว้ 3 วันที่อุณหภูมิห้อง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เก็บเฉพาะส่วนสารละลายใสนำไปทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นด้วยเครื่อง rotary evaporator ปรับปริมาตรด้วย 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอลให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 3 มิลลิลิตร เก็บสารละลายส่วนใสในภาชนะทึบแสง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสสำหรับไว้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2 การวิเคราะห์สคอพอเลตินเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค TLC (Thin-Layer Chromatography)

ปรับจากวิธีตั้งต้นของ Ba *et al*., 2017 ทำการตรวจสอบและปรับระบบการแยกสารสคอพอเลตินด้วยเทคนิค TLC ให้สามารถแยกสารรบกวนที่บดบังการเรืองแสงของสารสคอพอเลติน ออกจากตำแหน่งที่มีสารสคอพอเลตินเพื่อให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความหลากหลายของชนิดพืชและชิ้นส่วนพืชได้ในคราวเดียวกัน ทำการทดสอบยืนยันโดยคัดเลือกพืชไม่ต่ำกว่า 3 ชนิด แยกชิ้นส่วนของพืชแต่ละชนิด เช่น ใบ ราก และผล นำมาทดสอบการแยกด้วยระบบที่มีการปรับเรียบร้อยแล้ว จากนั้นทำการทดสอบระดับความสามารถในการวิเคราะห์ปริมาณสคอพอเลตินเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC โดยใช้สารสคอพอเลตินมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 และ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการแยกเพื่อประเมินค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ มา spot ลงบนแผ่นซิลิกา รอให้แห้งแล้วนำไปแยกโดยจุ่มแผ่นซิลิกาลงในอ่างแก้วที่บรรจุสารละลายเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม กำหนดระยะทางในการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย 6 เซนติเมตร เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงระยะทางที่กำหนด ยกแผ่นซิลิกาออกมาวางผึ่งให้แห้ง นำไปส่องภายใต้แสงยูวี หากมีสารสคอพอเลตินจะปรากฏเป็นแถบสีน้ำเงินเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวแสง 365 นาโนเมตร เปรียบเทียบขนาดและตำแหน่งของแถบสีน้ำเงินเรืองแสงในแต่ละตัวอย่างที่ปรากฏตรงกันกับแถบสีน้ำน้ำเรืองแสงของสารมาตรฐานสคอพอเลตินเพื่อประเมินชนิดและปริมาณของสารสคอพอเลตินในตัวอย่างนั้นๆ

3. การวิเคราะห์ปริมาณสคอพอเลตินเชิงปริมาณด้วยเทคนิค High-pressure liquid chromatography: (HPLC) เพื่อคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพสำหรับการจัดทำฐานข้อมูลสู่การใช้ประโยชน์

นำสารละลายตัวอย่างพืชที่สกัดได้ในข้อ 1 โดยเลือกใช้ตัวอย่างที่ความเข้นข้น 0.5 กรัมใน 10 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดเป็นอันดับแรก นำมากรองผ่านแผ่นกรอง (syringe membrane) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 ไมครอน บรรจุในขวด vial สีชา นำไปวิเคราะห์ตามวิธีของ Khompatara, 2017 ด้วยเครื่อง HPLC (Agilent 1100) โดยใช้คอลัมน์แบบ reverse-phase (ZORBAX Eclipse XDB-c18, 4.6x150mm, 5 micron) ตั้งค่าการแยกแบบ gradient โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ 2 ชนิด คือ 1) อะซิโตไนไตรล์ และ 2) 0.1เปอร์เซ็นต์ กรดฟอร์มิก ควบคุมอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ตามระยะเวลา (นาที) ต่อ เปอร์เซ็นต์ ของอะซิโตไนไตรล์ ดังนี้ นาทีที่ 0-2/80, นาทีที่ 8.5-

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

10/60, นาทีที่ 12/55, นาทีที่ 13/40 และนาทีที่ 15/50 ควบคุมอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 40 องศาเซลเซียสตลอดระยะเวลาที่ทำการแยก ตรวจสอบสัญญาณของสารที่แยกได้ด้วย fluorescence detector (FLD) โดยตั้งค่าช่วงแสง excitation และ emission สำหรับสคอพอเลตินเป็น 337 นาโนเมตร และ 425 นาโมเมตร ตามลำดับ วิเคราะห์ผลจากพื้นที่ใต้พีคด้วยโปรแกรม Chemstation Software (Agilent Technologies) ปริมาตรการฉีดตัวอย่าง (injection volume) 20 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสคอพอเลติน (0.05-10 ไมโครกรัมสคอพอเลติน/มิลลิลิตร) กรณีความเข้มข้นสูง เจือจางด้วย 95เปอร์เซ็นต์เอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการปรับปริมาตรตัวอย่างในขั้นตอนการสกัด และกรณีความเข้มข้นต่ำเกินไปจนไม่พบสัญญาณของสารสคอพอเลติน ทดสอบซ้ำโดยใช้ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สูงขึ้น นำค่าการคำนวณผลวิเคราะห์ที่ได้มาประเมินร่วมกับผลการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ โดยพืชที่มีปริมาณสคอพอเลตินสูงกว่า 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งจะถูกคัดเลือกเป็นพืชที่มีศักยภาพเหมาะสมสำหรับนำไปสกัดแยกสารสคอพอเลตินในการทดลองต่อไป จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างพืชที่คัดเลือกได้เพิ่มเติมโดยครอบคลุมพื้นที่ที่ต่างกันไม่ต่ำกว่า 5 พื้นที่ต่อจังหวัด โดยเก็บตัวอย่างในพื้นที่ จ.สงขลา จ.ตรัง และจ.พัทลุง หรือจังหวัดอื่นๆใกล้เคียง นำตัวอย่างพืชที่ได้มาสกัดและวิเคราะห์ เพื่อหาช่วงปริมาณของสคอพอเลตินในพืชชนิดนั้น

<u>การบันทึกข้อมูล</u>: ปริมาณสคอพอเลตินในหน่วยมิลลิกรัมสคอพอเลตินต่อน้ำหนักพืชแห้ง 1 กิโลกรัม แยกตามชิ้นส่วนของพืชที่ศึกษา ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้เป็นข้อมูลของปริมาณสคอพอเลติน base-line ที่มีอยู่เดิมในพืชนั้นๆ
<u>ระยะเวลาในการดำเนินการ</u>: เริ่มต้นตุลาคม 2561 สิ้นสุด กันยายน 2563 รวม 2 ปี
<u>สถานที่ดำเนินการทดลอง</u>: ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์จุลินทรีย์และสารพิษจากจุลินทรีย์ และห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารพิษตกค้างทางการเกษตร กลุ่มพัฒนาฯ สวพ.8

การทดลองที่ 2 การทำบริสุทธิ์สารสคอพอเลตินและตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ

<u>อุปกรณ์</u>

1. ผลยอบ้าน
2. คอลัมน์แก้ว
3. กล่องแสงยูวี (UV-box)
4. แผ่น TLC ซิลิกาเจล แบบ normal-phase
5. เครื่องมือตรวจวิเคราะห์ทางกายภาพ เช่น เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง เครื่อง NMR และเครื่อง FTIR
6. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับทำการแยกและวิเคราะห์สาร

<u>วิธีการ</u>

สกัดสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Napiroon *et al.,* 2018 โดยนำผลยอแห้งที่บดละเอียดแล้ว 200 กรัมมาสกัดด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ปริมาตร 600 มิลลิลิตร สกัดโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ

กรมวิชาการเกษตร

200 รอบต่อนาที วันละ 6 ชั่วโมง เก็บสลับกับวางทิ้งไว้ในที่มืด เก็บส่วนสารละลายใสที่ได้ในวันที่ 2 และทำการสกัดซ้ำอีก 2 รอบโดยใช้ 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ในการสกัด นำสารละลายใสที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 รอบมารวมกัน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำไประเหยไล่ตัวทำละลายออกด้วยด้วยเครื่อง evaporator จนได้สารสกัดเอทานอลที่มีลักษณะเป็น semi-solid สีน้ำตาลดำ นำไปชะแยกสารชนิดอื่นที่ไม่มีขั้วออกด้วยเฮกเซน จากนั้นนำสารสกัดส่วนที่เหลือจากการชะด้วยเฮกเซนบดรวมกับผงซิลิกาอัตราส่วน 1:1 W/W เพื่อให้จับกันแน่นเป็นผง นำผงดังกล่าวไปแยกผ่านคอลัมน์ซิลิกาในอัตรา ผงตัวอย่าง 50 กรัม ต่อคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกา 225 กรัม (ตัวอย่าง 25 กรัมต่อซิลิกา 250 กรัม) ทำการชะแบบ gradient ด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่ตั้งแต่ 0-60 เปอร์เซ็นต์ เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน โดยเพิ่มความเข้มของเอทิลอะซิเตทขึ้นทีละ 10 เปอร์เซ็นต์ และเก็บสารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ fraction ละ 50 มิลลิลิตร นำสารที่ชะออกจากคอลัมน์มาทดสอบด้วยเทคนิค TLC (ในขั้นตอนนี้ได้ปรับมาใช้การทดสอบสารบนแผ่นซิลิกาเจลชนิด normal-phase และปรับใช้ระบบตัวพาเป็น เอทิลอะซิเตท:เฮกเซน อัตราส่วน 50:50 เนื่องจากสารที่ออกจากคอลัมน์ไม่ได้ถูกรบกวนจากสารสีในปริมาณที่มีผลต่อการตรวจการเรืองแสงของสารเป้าหมาย) จากนั้นทำการรวม fraction ที่พบว่ามีสคอพอเลติน วัดปริมาณและบันทึกลักษณะสารที่ได้ นำไปตรวจวิเคราะห์สเปคตรัมที่ช่วงความยาวคลื่นต่างๆ วิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค NMR และวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นด้วยเทคนิค FTIR เปรียบเทียบกับสารสคอพอเลตินมาตรฐานซึ่งสารสคอพอเลตินที่แยกได้นี้จะนำไปใช้สำหรับการทดลองศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพในการทดลองลำดับต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

<u>การบันทึกข้อมูล</u>: -ปริมาณสคอพอเลตินบริสุทธิ์ต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ในพืชที่คัดเลือกว่ามีศักยภาพในการใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการสกัดสารชนิดนี้

-ลักษณะของสารบริสุทธิ์ที่ได้ และ รูปแบบโครมาโตแกรมจากการนำสารที่สกัดได้ และสารที่แยกผ่านคอลัมน์ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค spectrophotometry NMR และ FTIR เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ สูตรโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชั่นของสารที่ได้โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานสคอพอเลติน

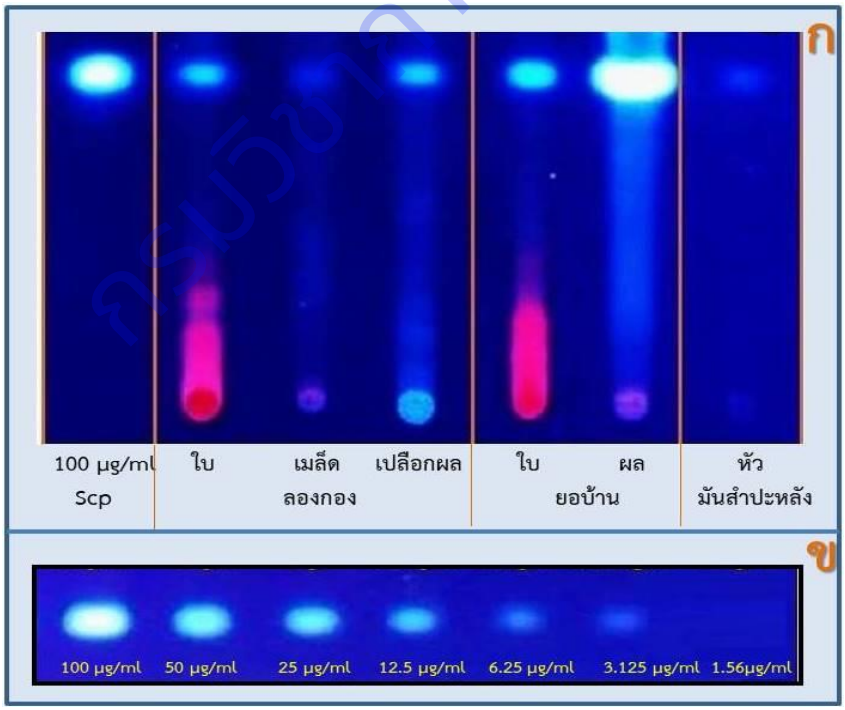
<u>ระยะเวลาในการดำเนินการ</u>: เริ่มต้นตุลาคม 2561 สิ้นสุด กันยายน 2563 รวม 2 ปี

<u>สถานที่ดำเนินการทดลอง</u>: ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์จุลินทรีย์และสารพิษจากจุลินทรีย์ กลุ่มพัฒนาฯ สวพ.8

ผลการทดลองและอภิปราย

การทดลองที่ 1 ศึกษาวิธีสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารสคอพอเลตินในพืชที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นภาคใต้ตอนล่าง

ผลการศึกษาปริมาณสารสคอพอเลติน (scopoletin; scp) ในพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายในพื้นภาคใต้ตอนล่าง จำนวน 18 ชนิด ได้แก่ ขี้กา คล้า เคี่ยม ดาหลา ทุเรียนเทศ เนียงนก ผักกาดนกเขา ผักบุ้งน้ำ พาโหม ฟักข้าว มะเดื่อมะม่วงหิมพานต์ มันสำปะหลัง ยอบ้าน ยอป่า ลองกอง ลังแข และ ยางพารา ซึ่งพืชแต่ละชนิดจำแนกเป็นส่วนใบ ผล ราก และเปลือกขึ้นอยู่กับชนิดพืชนั้น โดยทำการปรับระบบการแยกสารด้วยเทคนิค Thin-layer chromatography (TLC) ให้สามารถวิเคราะห์สารสคอพอเลตินจากตัวอย่างที่มีความหลากหลายทั้งชนิดและชิ้นส่วนพืชทดสอบ ซึ่งเหมาะสำหรับใช้ประเมินเบื้องต้นในเชิงคุณภาพ โดยสารสคอพอเลตินที่วิเคราะห์ได้จากการปรับเทคนิคการแยกด้วยแผ่น TLC ชนิด reverse-phase และทำการแยกด้วยระบบ เมทานอล:น้ำ อัตราส่วน 75:25 (v/v) จะปรากฏแถบสีน้ำเงินเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร โดยมีค่าอัตราส่วนระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Rf) เป็น 0.7 (ภาพที่ 2-ก) และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคนี้คือ 3.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาพที่ 2-ข)



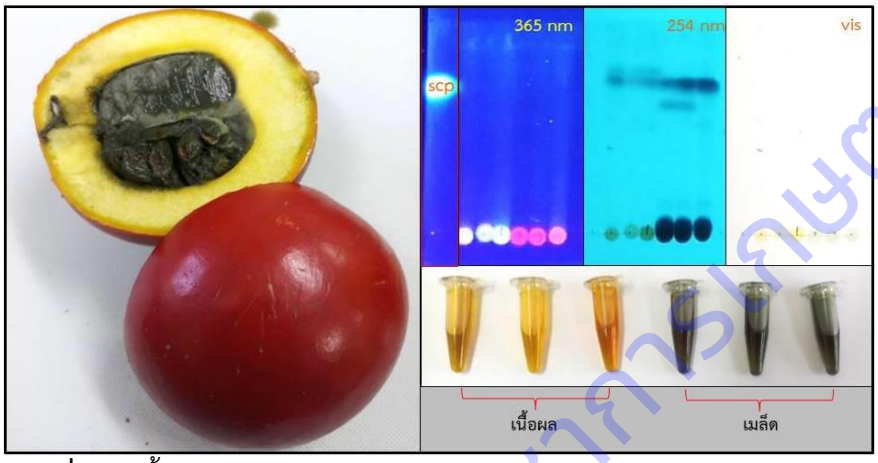
ภาพที่ 2 การวิเคราะห์สารสคอพอเลตินด้วยเทคนิค TLC; ก) การเรืองแสงของสารสคอพอเลตินในสารสกัดเอทานอลจากตัวอย่างชิ้นส่วนอวัยยะ (organ) ของลองกอง ยอบ้าน และมันสำปะหลัง และ ข) การเรืองแสงของสาร

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

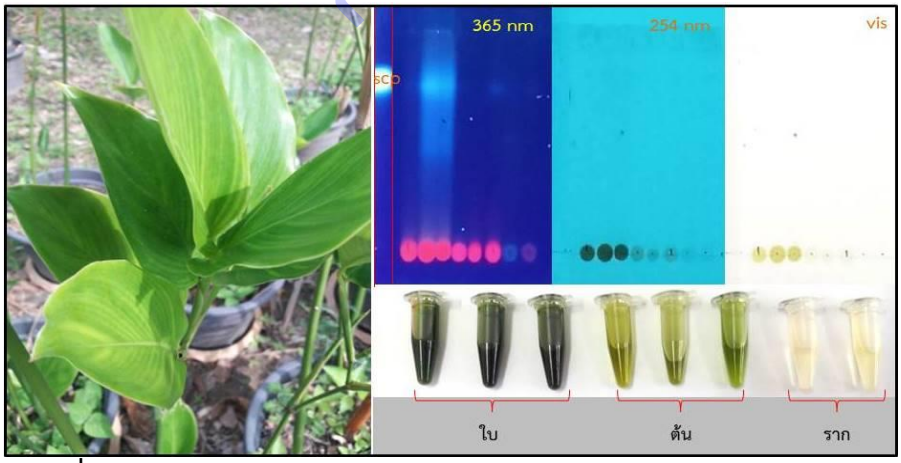
มาตรฐานสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 และ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการวิเคราะห์สคอพอเลตินเชิงคุณภาพในพืชท้องถิ่นชนิดต่างๆด้วยเทคนิค TLC

การออกพื้นที่สำรวจและสุ่มเก็บพืชท้องถิ่นในพื้นที่ภาคใต้ ดำเนินการโดย ครอบคลุมพื้นที่ จ.สงขลา จ.พัทลุง จ.ตรัง จ.นราธิวาส* จ.ปัตตานี* จ.สตูล* จ.นครศรีธรรมราช* และ จ.ชุมพร* (* = ได้รับความอนุเคราะห์จากเกษตรกรในพื้นที่เก็บและจัดส่ง) ได้พืชจำนวน 18 ชนิดพืช ได้แก่ ขี้กา คล้า เคี่ยม ดาหลา ทุเรียนเทศ เนียงนก ผักกาดนกเขา ผักบุ้งน้ำ พาโหม ฟักข้าว มะเดื่อ มะม่วงหิมพานต์ มันสำปะหลัง ยางพารา ยอบ้าน ยอป่า ลองกอง และลังแข โดยผลการประเมินระดับปริมาณสารสคอพอเลตินด้วยเทคนิค TLC ในพืชแต่ละชนิดแสดงดังภาพที่ 3-21



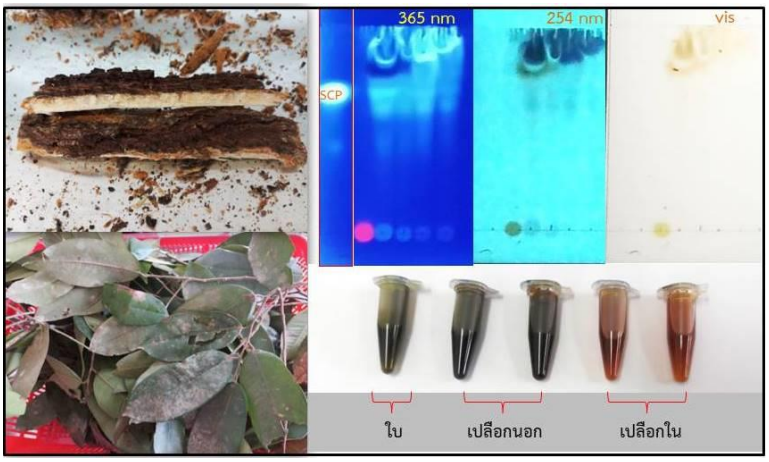
ภาพที่ 3 ผลขี้กา (*Gymnopetalum integrifolim* Kurz.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของเนื้อผลและเมล็ด ที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



ภาพที่ 4 ต้นคล้า (*Schumannianthus dichotomus* (Roxb.) Gagnep) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบ

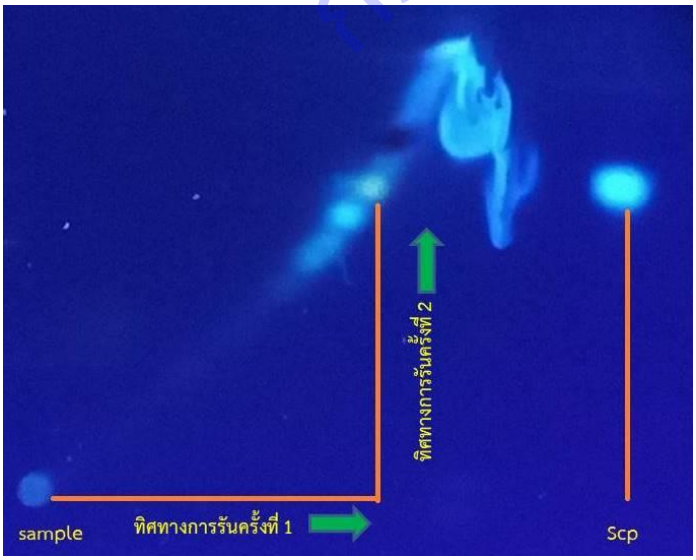
กรมวิชาการเกษตร

ต้น และราก ที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



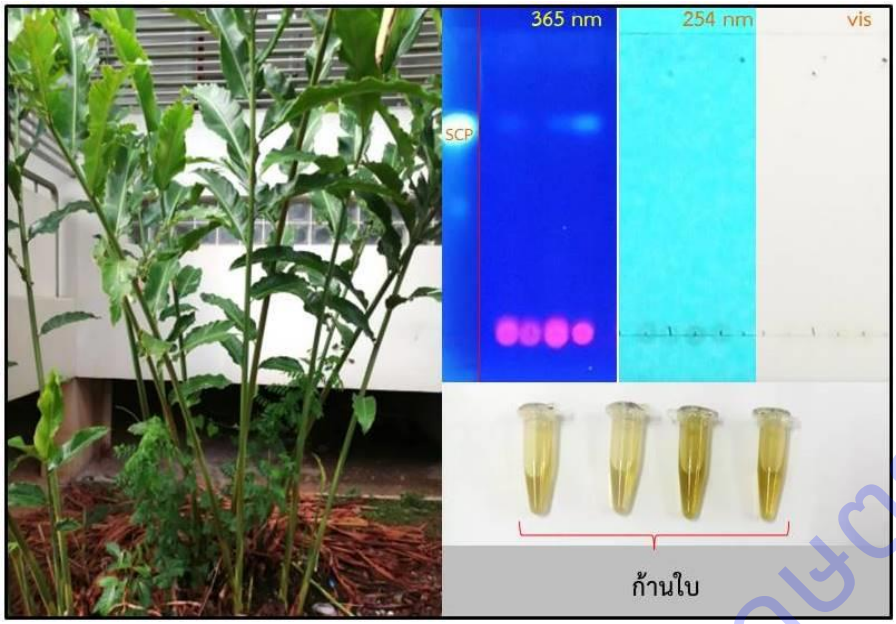
ภาพที่ 5 เคี่ยม (*Cotylelobium lanceolatum* Craib) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบ เปลือกนอก และเปลือกในที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

จากภาพที่ 5 พบว่าการแยกสารสกัดจากเปลือกนอกและเปลือกในเคี่ยมด้วย TLC ถูกรบกวนโดยสารไม่ทราบชนิดจำนวนมาก ซึ่งการรบกวนดังกล่าวมีลักษณะคล้ายคลึงกัน จึงคัดเลือกสารสกัดเปลือกนอกเคี่ยมมาทำการแยกเพื่อยืนยันการมีอยู่ของสคอพอเลติน โดยรัน TLC 2 ครั้งในทิศทางตั้งฉากกัน ซึ่งในการรันครั้งที่ 1 ทำการรันเฉพาะตัวอย่าง และในครั้งที่ 2 ทำการ spot สารรสคอพอเลตินร่วมในการรันด้วย ซึ่งจากภาพที่ 6 จะเห็นได้ว่า ตรวจพบสารเรืองแสงในตัวอย่าง ณ ตำแหน่งเดียวกันกับสารสคอพอเลติน

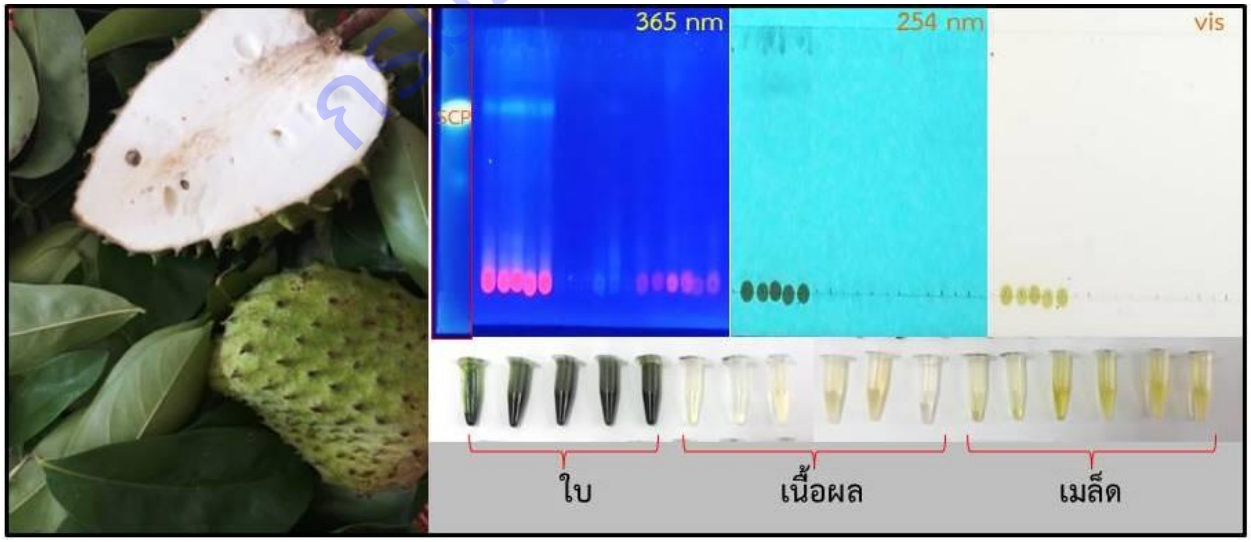


กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 6 การทดสอบสารสคอพอเลตินในเปลือกนอกเคี่ยมโดยการรัน TLC แบบ 2 ทิศทางเปรียบเทียบกับสคอพอเลตินมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



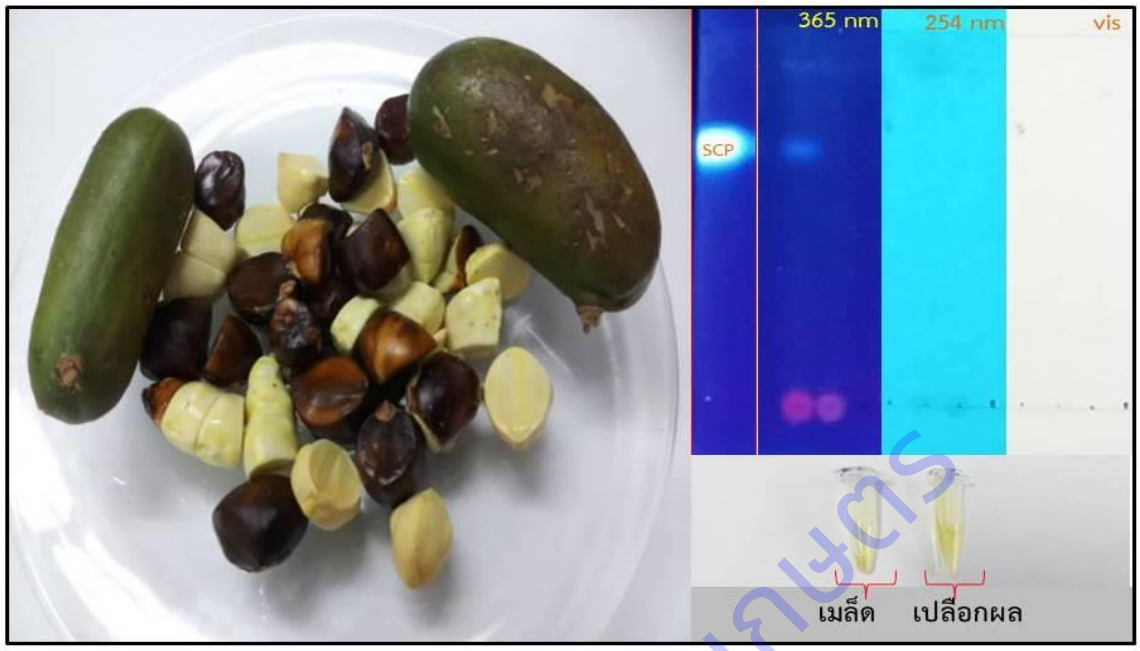
ภาพที่ 7 ดาหลา (*Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของก้านใบที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



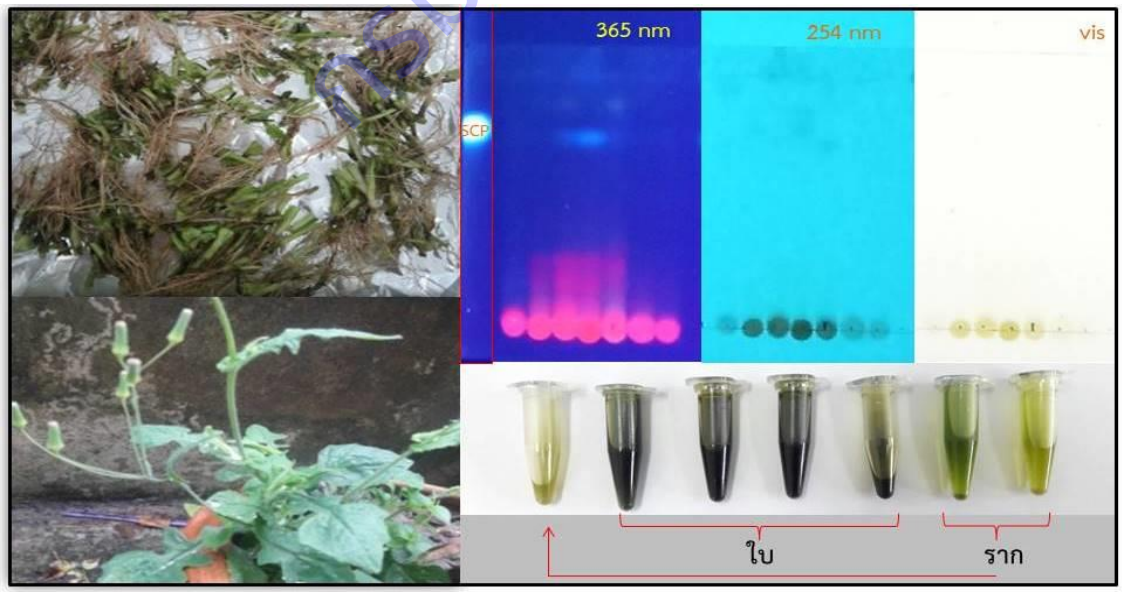
ภาพที่ 8 ทุเรียนเทศ (*Annona muricata* L.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบ เนื้อผล และเมล็ดที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้

กรมวิชาการเกษตร

แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



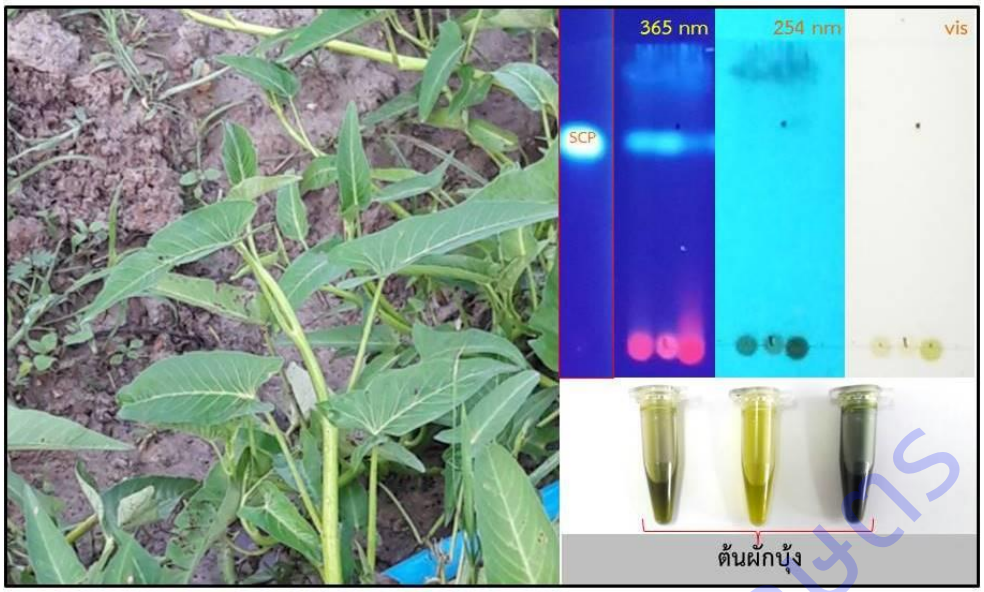
ภาพที่ 9 เนียงนก (*Archidendron bubalinum* (jack) I.C. Nielsen) และการแยกสารสกัดเอทานอลของเมล็ดและเปลือกผลที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



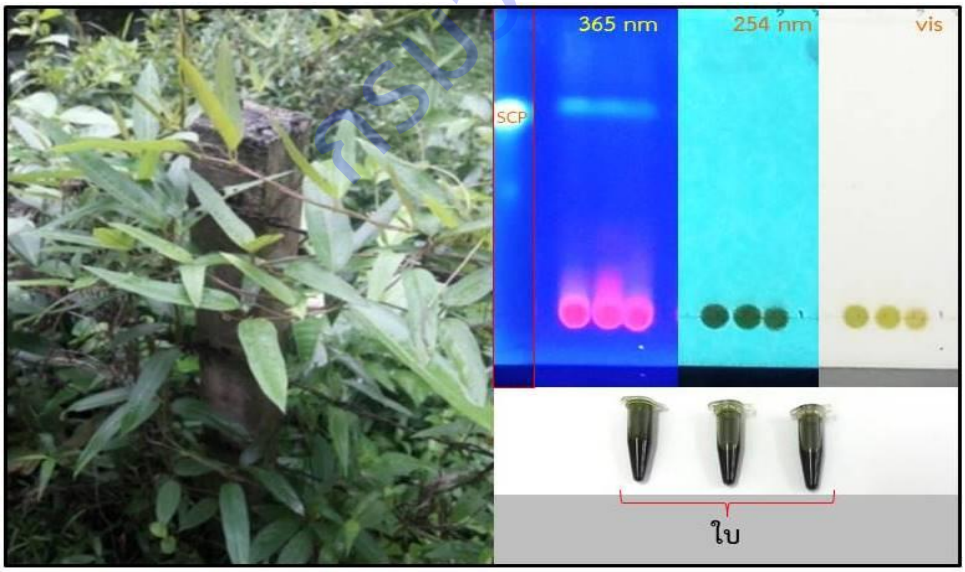
ภาพที่ 10 ผักกาดนกเขา (*Emilia sonchifolia* (L.) DC.ex Wight) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบและราก

ภาควิชาเภสัชกรรม

ที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



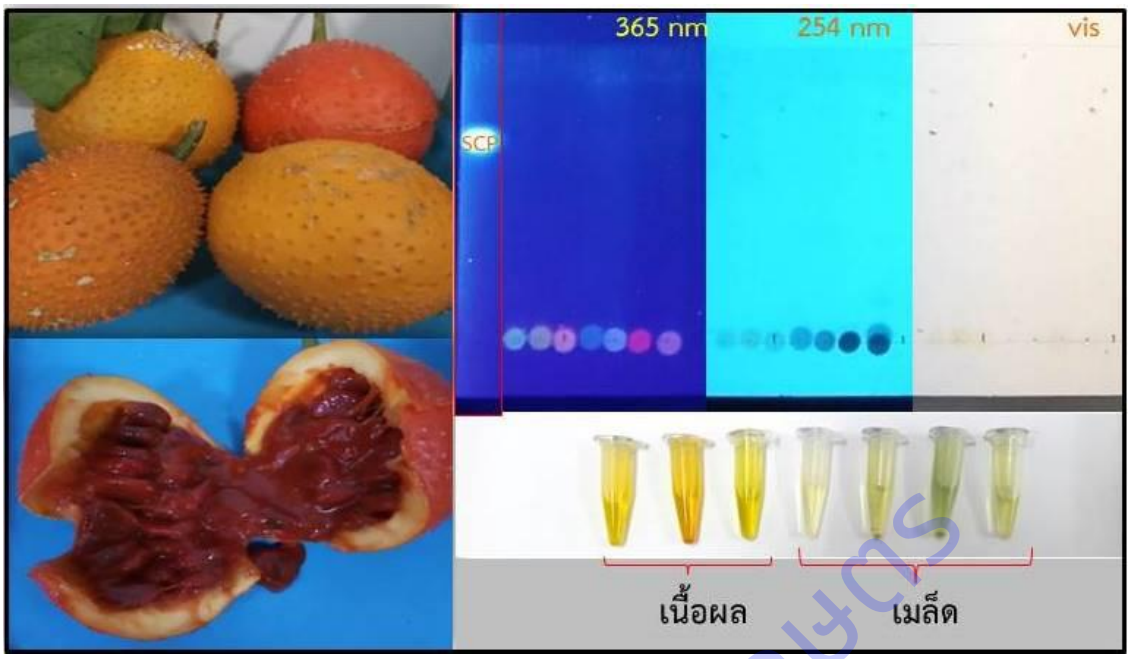
ภาพที่ 11 ผักบุ้งน้ำ (*Ipomoea aquatica*) และการแยกสารสกัดเอทานอลของต้นผักบุ้งที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



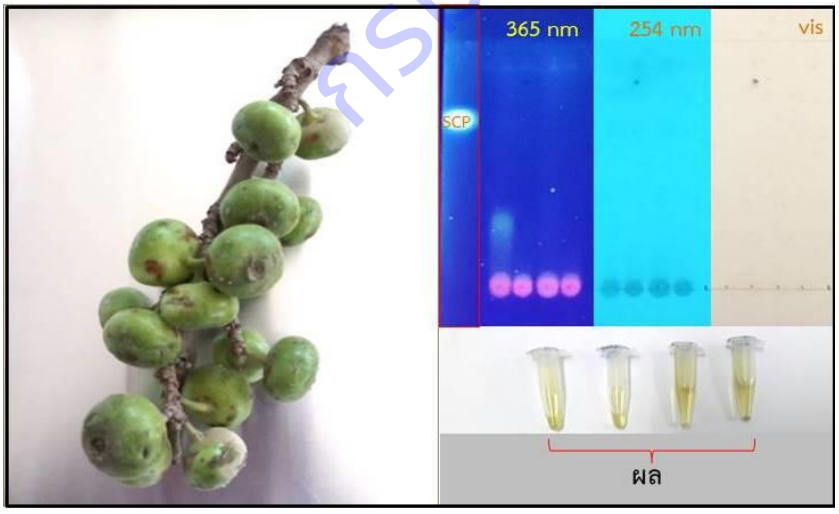
ภาพที่ 12 พาโหม (*Paederia foetida* Linn) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโน

กรมวิชาการเกษตร

เมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



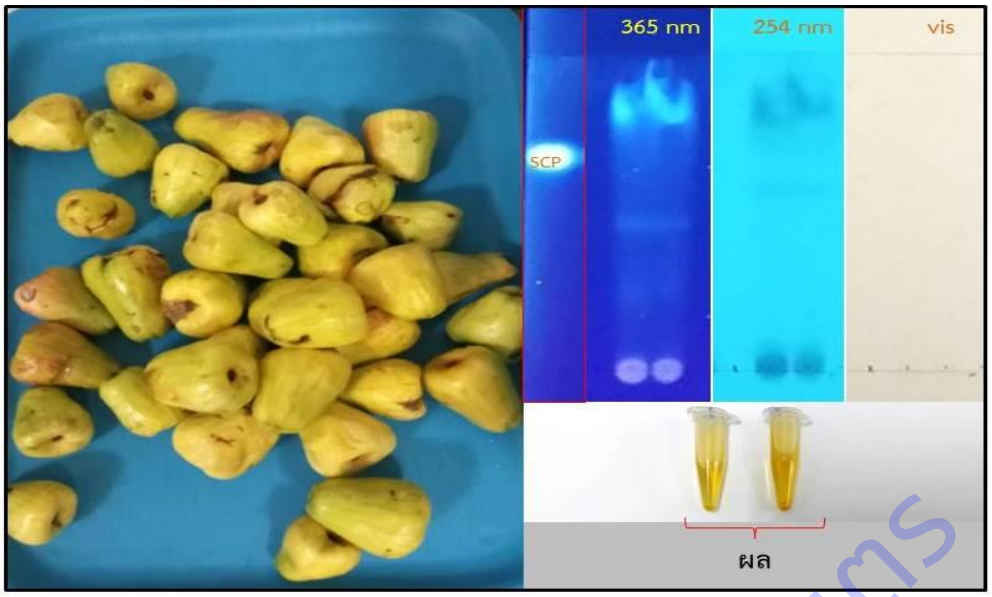
ภาพที่ 13 ฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของเนื้อผลและเมล็ดที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



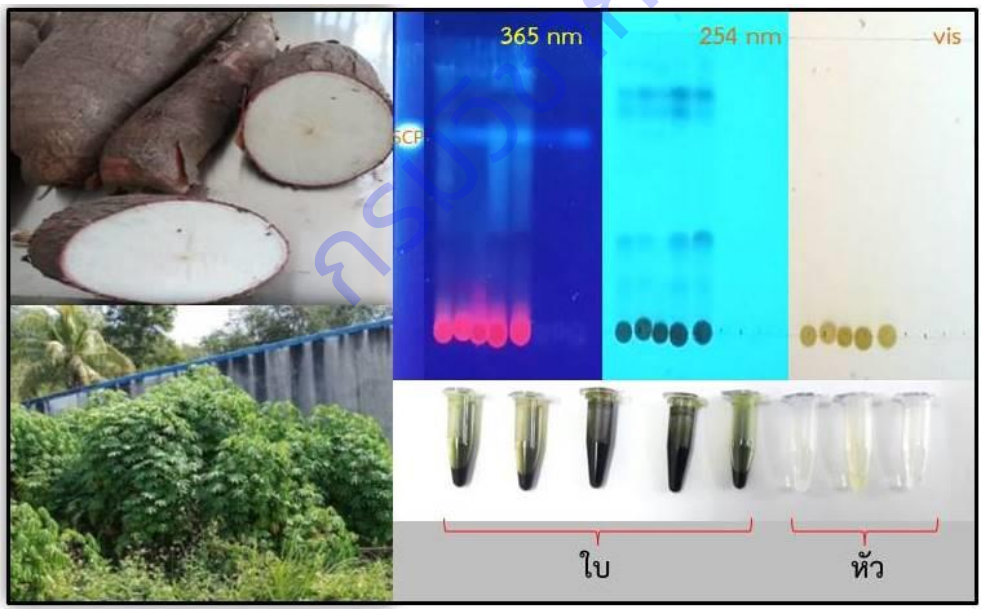
ภาพที่ 14 มะเดื่อ (*Ficus hispida* L.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของผลที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโน

กรมวิชาการเกษตร

เมตร และแสง visible

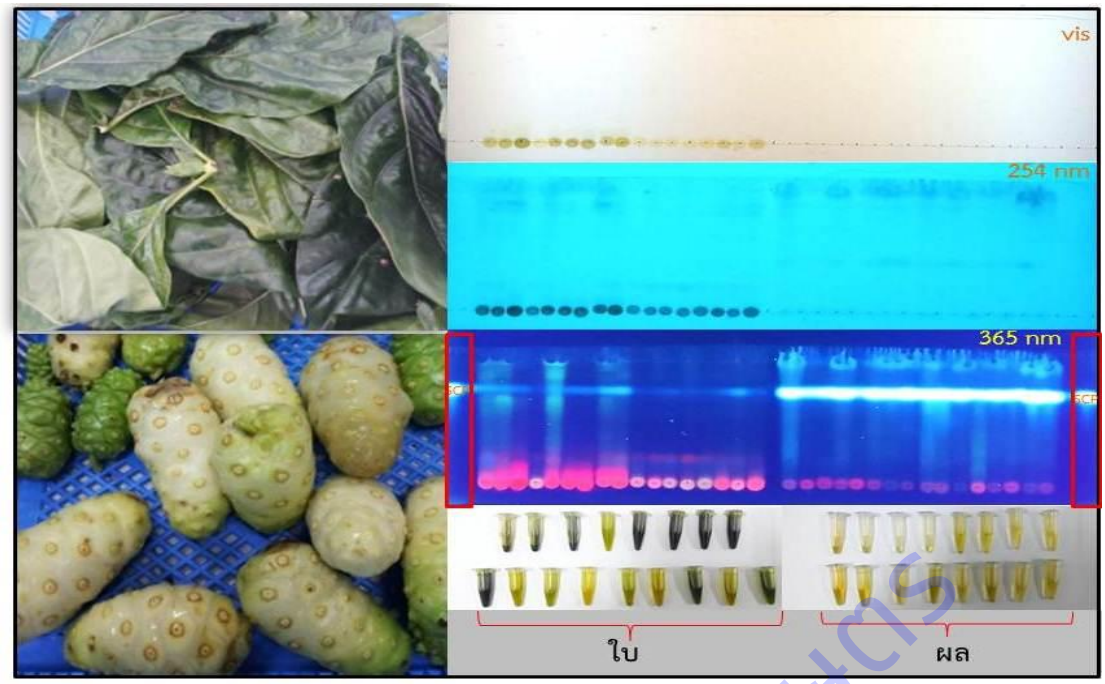


ภาพที่ 15 มะม่วงหิมพานต์ (*Anacardium occidentale*) และการแยกสารสกัดเอทานอลของผลที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

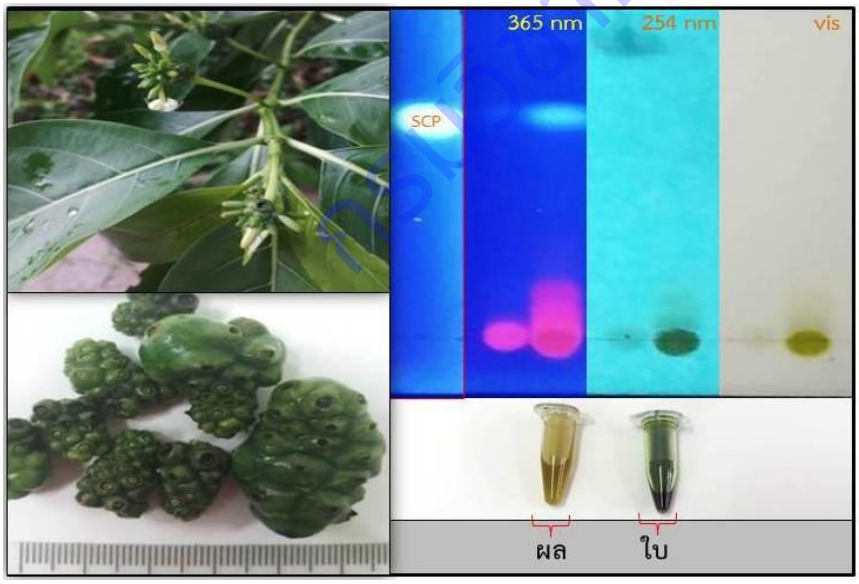


ภาพที่ 16 มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* (L.) Crantz.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบและหัวที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน(scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

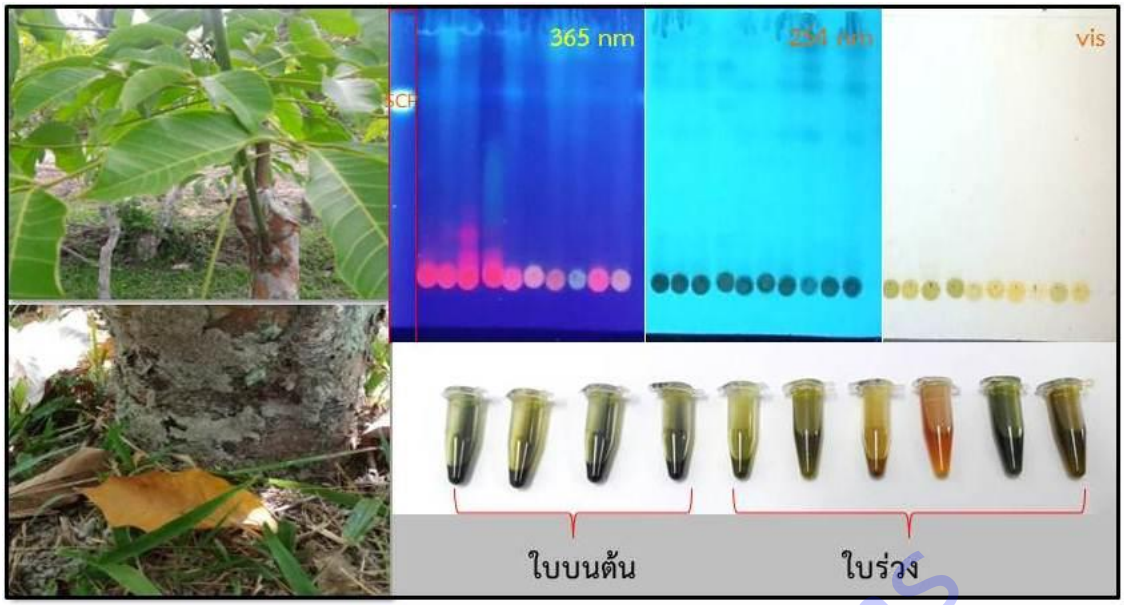
กรมวิชาการเกษตร



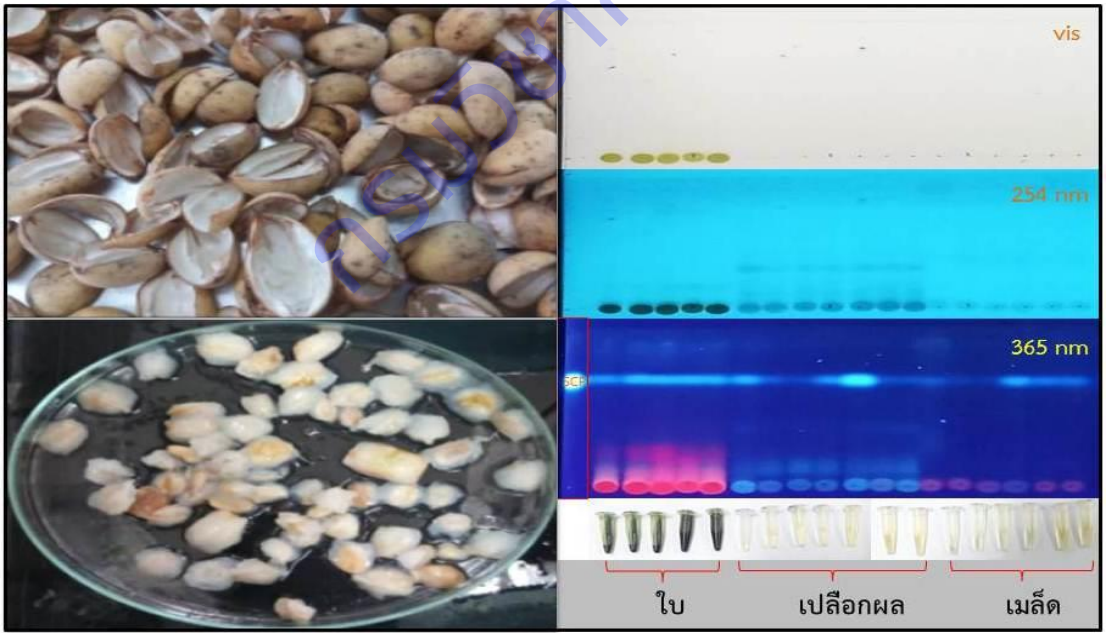
ภาพที่ 17 ยอบ้าน (*Morinda citrifolia* L.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบและผลที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน(scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



ภาพที่ 18 ยอป่า (*Morinda coreia* Buch.-Ham.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของผลและใบที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน(scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

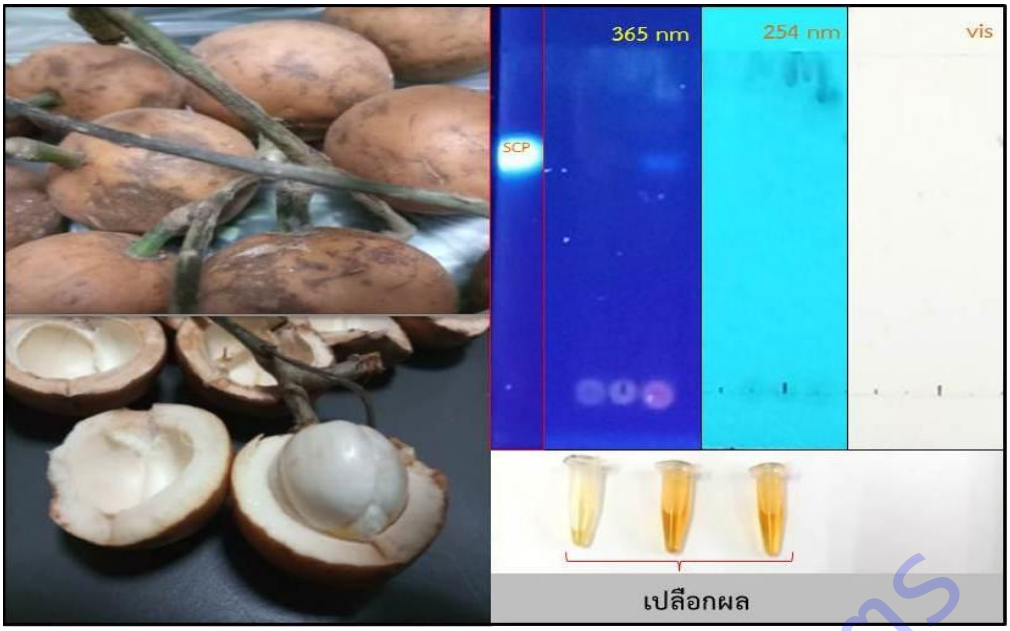


ภาพที่ 19 ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบบนต้นและใบร่วงที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน(scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



ภาพที่ 20 ลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบ เปลือกผล และเมล็ดที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp)ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

ลิขสิทธิ์การเกษตร



ภาพที่ 21 ลังแข (*Baccaurea macrophylla* Muell. Arg.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของเปลือกผลที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน(scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

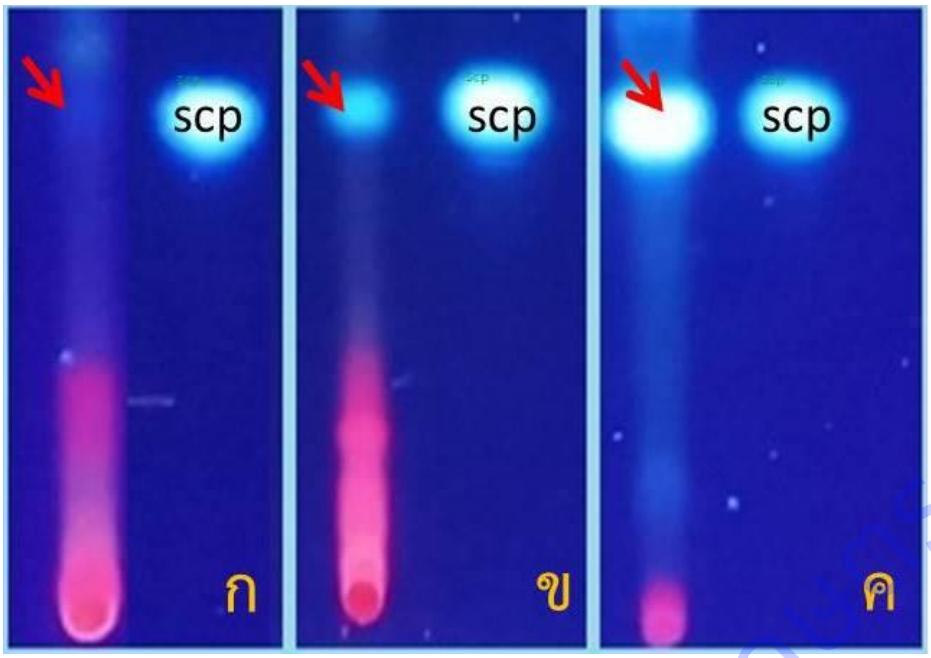
จากการประเมินเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค TLC โดยใช้สารสกัดจากพืชชนิดต่างๆที่ความเข้มข้นการสกัดเท่ากัน และใช้สารสคอพอเลตินที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการเปรียบเทียบ ภายใต้เกณฑ์ในการจำแนกกลุ่มพืชดังภาพที่ 22 สามารถจำแนกได้ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มีสคอพอเลตินในระดับสูง (ความเข้มของแถบเรืองแสงในตัวอย่างทดสอบสูงกว่าแถบสคอพอเลตินมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ได้แก่ ยอบ้าน (ผล)

กลุ่มที่ 2 มีสคอพอเลตินในระดับปานกลาง (มองเห็นแถบเรืองแสงได้ชัดเจนในตัวอย่างทดสอบแต่ไม่เกินความเข้มของแถบสคอพอเลตินมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ได้แก่ ลองกอง (ใบ) ยอป่า (ใบ) และผักบุ้งน้ำ (ต้น)

กลุ่มที่ 3 มีสคอพอเลตินในระดับน้อยหรือไม่พบ (มองเห็นแถบเรืองแสงได้เล็กน้อยในตัวอย่างทดสอบหรือไม่พบแถบการเรืองแสง) ได้แก่ เคี่ยม (ใบ และเปลือก) เนียงนก (เมล็ด และเปลือกผล) ทุเรียนเทศ (ใบ, เนื้อผล และเมล็ด) ฟักข้าว (เนื้อผล และเมล็ด) ขี้กา (เมล็ด และเนื้อผล) คล้า (ใบ, ต้น และราก) มะม่วงหิมพานต์ (เนื้อผล) ลังแข (เนื้อผล) มะเดื่อ (ผล) ผักกาดนกเขา (ใบ และราก) ยางพารา (ใบบนต้น และใบร่วง) ดาหลา (ก้านใบ) ยอป่า (ผล) ลองกอง (เมล็ด) มันสำปะหลัง (หัว) ยอบ้าน (ใบ) พาโหม (ใบ) มันสำปะหลัง (ใบ) และลองกอง (เปลือกผล)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 22 ตัวอย่างการประเมินเปรียบเทียบปริมาณสารสคอพอเลตินด้วยเทคนิค TLC ในตัวอย่างพืชทดสอบ(ลูกศรสีแดง) กับสคอพอเลตินมาตรฐาน (Scp) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร; ก) พบระดับน้อยหรือไม่พบ ข) พบระดับปานกลาง และ ค) พบระดับสูง

ผลการวิเคราะห์สคอพอเลตินในพืชท้องถิ่นชนิดต่างๆด้วยเทคนิค High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) เพื่อคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพสำหรับการจัดทำฐานข้อมูลสู่การใช้ประโยชน์

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง จำนวน 18 ชนิดพืช นำมาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสคอพอเลตินโดยเทคนิค HPLC โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสคอพอเลติน (0.05-10 ไมโครกรัมสคอพอเลติน/มิลลิลิตร ; R^2 = 0.9999) พบว่าในการวิเคราะห์ปริมาณสคอพอเลตินในเปลือกเคี่ยมด้วย HPLC ไม่สามารถระบุข้อมูลในเชิงปริมาณได้ทั้งนี้อาจเนื่องจากภายในเคี่ยมยังมีสารสำคัญอื่นๆอีกหลายชนิดนอกเหนือจากสารสคอพอเลติน ดังจะเห็นได้จากการแยกด้วยวิธี TLC ซึ่งอาจมีสารบางชนิดที่มีค่าช่วงเวลาการแยก (retention time) ใกล้เคียงหรือซ้อนทับกับสารสคอพอเลติน ส่งผลให้ไม่สามารถแยกพีคเดี่ยวของสารสคอพอเลตินออกมาคำนวณเชิงปริมาณได้ อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์สารสคอพอเลตินเชิงปริมาณในพืชท้องถิ่นชนิดอื่นๆด้วย HPLC แสดงดังตารางที่ 1

การประเมินพืชท้องถิ่นทั้ง 18 ชนิด ด้วยเทคนิค High-pressure liquid chromatography (HPLC) พบว่าให้ผลไปในทิศทางเดียวกับการประเมินเบื้องต้นด้วยวิธี TLC โดยผลยอบ้านมีปริมาณสารสคอพอเลตินสูงที่สุด (ภาพที่ 23)

ตารางที่ 1 ปริมาณสคอพอเลตินในตัวอย่างพืชที่พบได้ง่ายในท้องถิ่นภาคใต้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

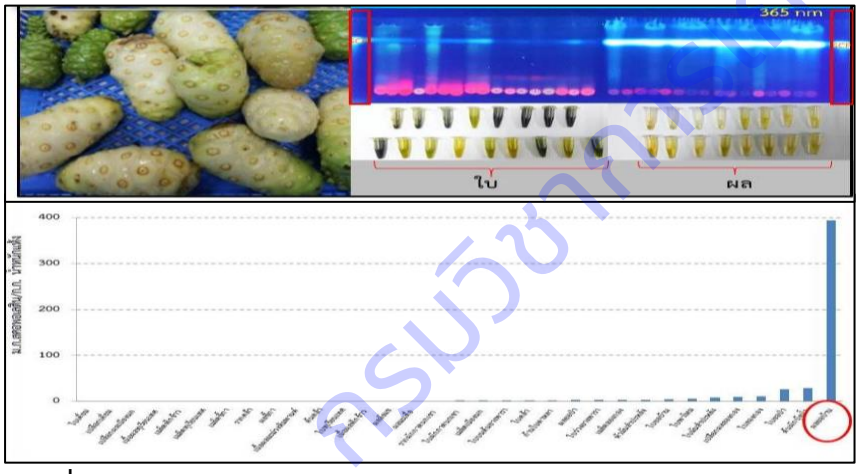
ชนิดพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์/วงศ์	แหล่งที่มาของตัวอย่าง	ชิ้นส่วนพืช (organ)	ปริมาณสคอพอเลติน (มก/.กก.น้ำหนักแห้ง)	
				mean ± SD.	ซ้ำ
1. ขี้กา	*Gymnopetalum integrifolim* Kurz. (Cucurbitaceae)	จ.สงขลา	ผล	0.23 ± 0.22	3
			เมล็ด	0.19± 0.07	3
2. คล้า	*Schumannianthus dichotomus* (Roxb.) Gagnep. (Marantaceae)	จ.พัทลุง และ จ.สงขลา	ใบ	2.81 ± 2.47	3
			ต้น	0.45 ± 0.52	3
			ราก	0.21± 0.02	2
3. เคี่ยม	*Cotylelobium lanceolatum* Craib (Dipterocarpaceae)	จ.ชุมพร*	ใบ	ND	1
			เปลือก	ND	1-
4. ดาหลา	*Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith. (Zingiberaceae)	จ.นราธิวาส* และ จ.สงขลา	ก้านใบ	2.95± 3.61	4
5. ทุเรียนเทศ	*Annona muricata* L. (Annonaceae)	จ.สงขลา	ใบ	0.59 ± 0.21	5
			เมล็ด	0.14 ± 0.17	6
			เนื้อผล	0.02 ± 0.04	6
6. เนียงนก	*Archidendron bubalinum* (jack) I.C. Nielsen (Leguminosae)	จ.สงขลา	เมล็ด	2.64	1
			เปลือกผล	0.00	1
7. ผักกาดนกเขา	*Emilia sonchifolia* (L.) Dc. (Compositae)	จ.สงขลา	ใบ	2.49 ± 2.62	4
			ราก	1.59 ± 2.05	3
8. ผักบุ้งน้ำ	*Ipomoea aquatic* (Convolvulaceae)	จ.สงขลา	ต้น	29.19 ± 15.45	3
9. พาโหม	*Paederia foetida* Linn. (Rubiaceae)	จ.สงขลา	ใบ	6.32 ± 1.37	3
10 ฟักข้าว	*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng. (Cucurbitaceae)	จ.สงขลา	เนื้อผล	0.60 ± 0.78	3
			เมล็ด	0.11 ± 0.12	4
11. มะเดื่อ	*Ficus hispida* L. (Moraceae)	จ.สงขลา	ผล	1.51 ± 1.15	4
12.มะม่วงหิมพานต์	*Anacardium occidentale* (Anacardiaceae)	จ.สงขลา	เนื้อผล	0.42 ± 0.38	2
13. มันสำปะหลัง	*Manihot esculenta* (L.) Crantz (Euphorbiaceae)	จ.สงขลา	ใบ	8.34 ± 5.49	5
			หัว	4.22 ± 2.41	3
14. ยอบ้าน	*Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae)	จ.ปัตตานี* จ.สงขลา จ.ตรัง และจ.พัทลุง	ใบ	5.65 ± 4.91	21
			ผล	393.27± 165.42	21
15. ยอป่า	*Morinda elliptica (*Hook.f.) Ridl (Rubiaceae)	จ.สงขลา	ใบ	26.55	1
			ผล	3.26	1

ศรีวิชาการเกษตร

ชนิดพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์/วงศ์	แหล่งที่มาของตัวอย่าง	ชิ้นส่วนพืช (organ)	ปริมาณสคอพอเลติน (มก/.กก.น้ำหนักแห้ง)	
				mean ± SD.	ซ้ำ
16. ยางพารา	*Hevea brasiliensis* Mull-Arg. (Euphorbiaceae)	จ.สงขลา และจ.พัทลุง	ใบบนต้น	2.74 ± 0.47	4
			ใบร่วง	3.83 ± 2.25	6
17. ลองกอง	*Lansium domesticum* Corr. (Meliaceae)	จ.สงขลา จ.สตูล* และ จ. นครศรีธรรมราช*	ใบ	11.31 ± 1.50	5
			เปลือกผล	9.75 ± 15.54	7
			เมล็ด	3.97 ± 3.68	6
18. ลังแข	*Baccaurea macrophylla* Muell. Arg. (Euphorbiaceae)	จ.นราธิวาส*	ผล	0.70 ± 0.77	3

หมายเหตุ ND = not detected (ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ในการทดลองนี้)

* = ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากเกษตรกรหรือบุคคลในพื้นที่เป็นผู้สุ่มเก็บและส่งตัวอย่าง



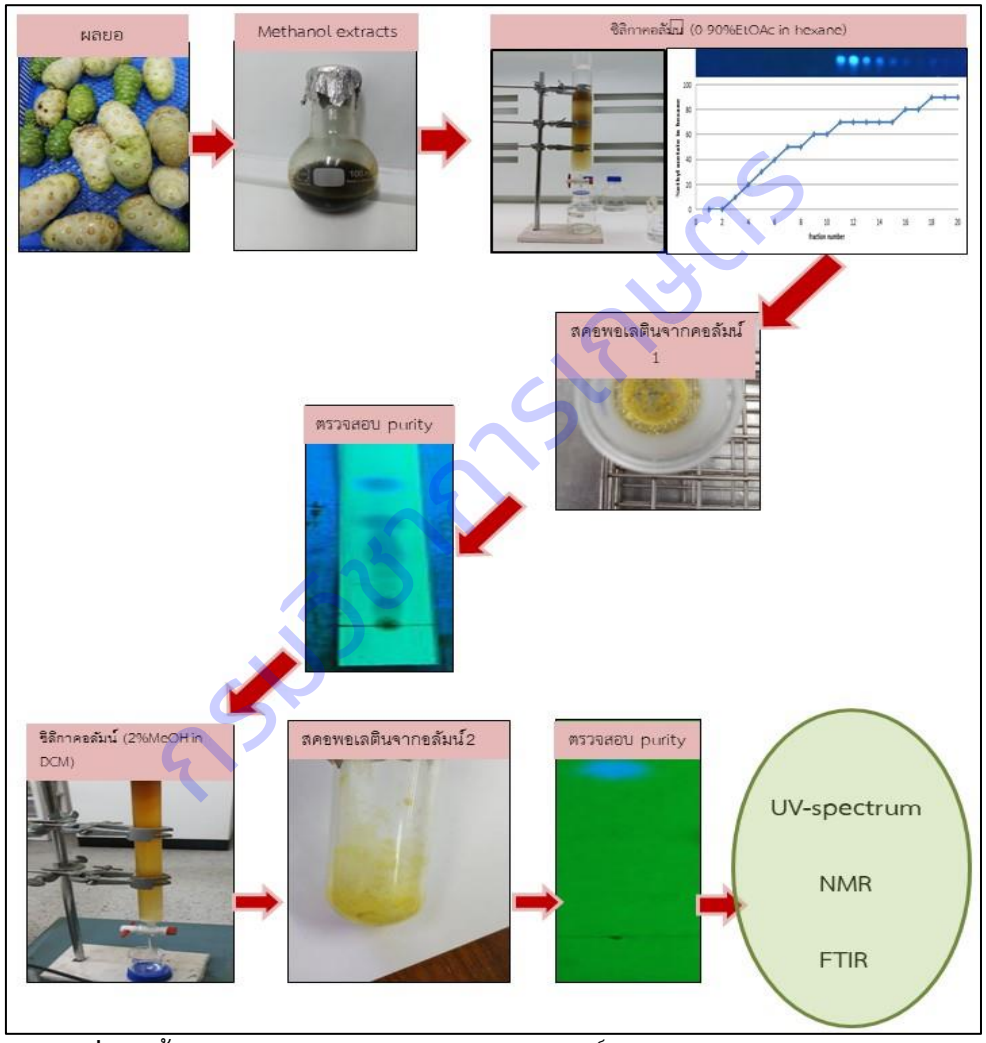
ภาพที่ 23 การวิเคราะห์ปริมาณสคอพอเลตินในใบและผลยอบ้านเชิงคุณภาพด้วยวิธี TLC (บน) และการวิเคราะห์ปริมาณสคอพอเลตินในพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายในพื้นที่ภาคใต้ในเชิงปริมาณด้วยวิธี HPLC (ล่าง)

จากการเก็บรวบรวมผลยอบ้านในพื้นที่ต่างๆจำนวน 21 พื้นที่ ครอบคลุม จ.สงขลา จ.ตรัง และจ.พัทลุง พบว่ามีปริมาณสคอพอเลตินอยู่ในช่วง 190.44 - 785.52 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 393.27± 165.42 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ระดับปริมาณของสารสคอพอเลตินเฉลี่ยในผลยอที่ได้จากการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ West and Deng (2010) ซึ่งได้วิเคราะห์ปริมาณสารสคอพอเลตินจากผลยอที่เก็บจากพื้นที่ต่างกัน 8 แหล่ง ครอบคลุมพื้นที่เฟรนโปลินิเซีย ได้แก่ ตาฮิติ โมโอเรอา โมทูฟาเรโอเน่ ตองก้า สาธารณรัฐโดมินิกัน โอกินาวา ไทย และฮาวาย พบว่ามีสคอพอเลตินอยู่ในช่วง 100-400 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักผลยอแห้ง 1 กิโลกรัม

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2 การทำบริสุทธิ์สารสคอพอเลตินและตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ

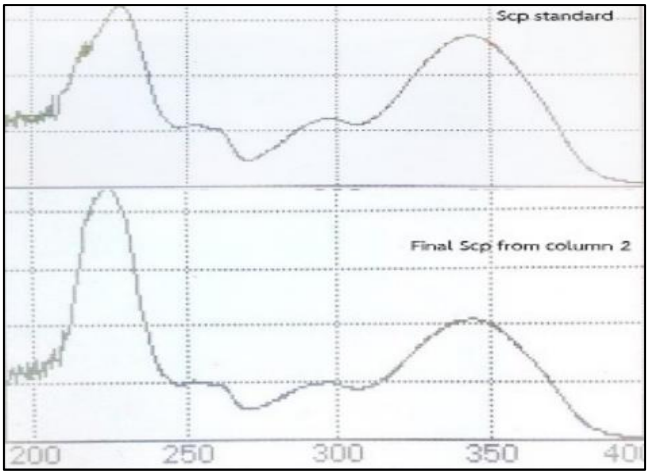
การสกัดสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์จากผลยอบ้านด้วยเทคนิค Column chromatography โดยนำสารสกัดหยาบเมทานอลจากผลยอมาแยกผ่านคอลัมน์ซิลิกา 2 ครั้ง โดยครั้งแรกชะด้วย 0-60 เปอร์เซ็นต์ เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน และ แยกครั้งที่ 2 โดยชะด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทน เมื่อนำ fraction ที่ตรวจพบการเรืองแสงสีน้ำเงินบนแผ่น TLC ในตำแหน่งเดียวกับสารสคอพอเลติน ไปตรวจสอบพบว่าสารที่แยกได้มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง ดังภาพที่ 24



ภาพที่ 24 ขั้นตอนการแยกและทดสอบความบริสุทธิ์ของสารสคอพอเลตินจากผลยอ

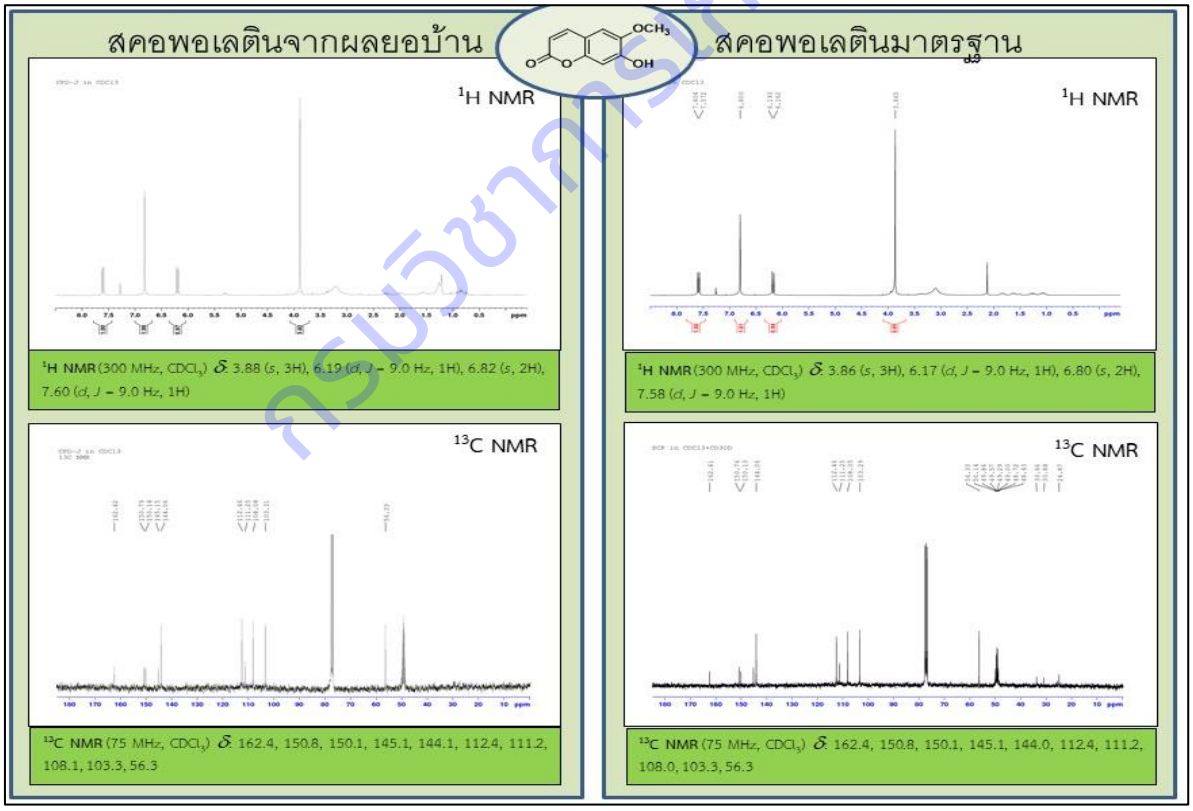
ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพของสารสคอพอเลตินที่สกัดได้จากผลยอบ้านและสารสคอพอเลตินมาตรฐานโดยวิเคราะห์สเปกตรัมของสารทั้ง 2 UV-spectrum ของสารสคอพอเลตินที่แยกได้จากผลยอบ้านแสดงพีคหลักที่ 228 และ 345 นาโนเมตร สอดคล้องกับสารสคอพอเลตินมาตรฐาน (ภาพที่ 25)

ศูนย์วิทยทรัพยากร



ภาพที่ 25 ยูวีสเป็กตรัมของสารสคอพอเลตินมาตรฐาน (บน) และสารสคอพอเลตินที่แยกได้จากผลยอบ้าน (ล่าง)

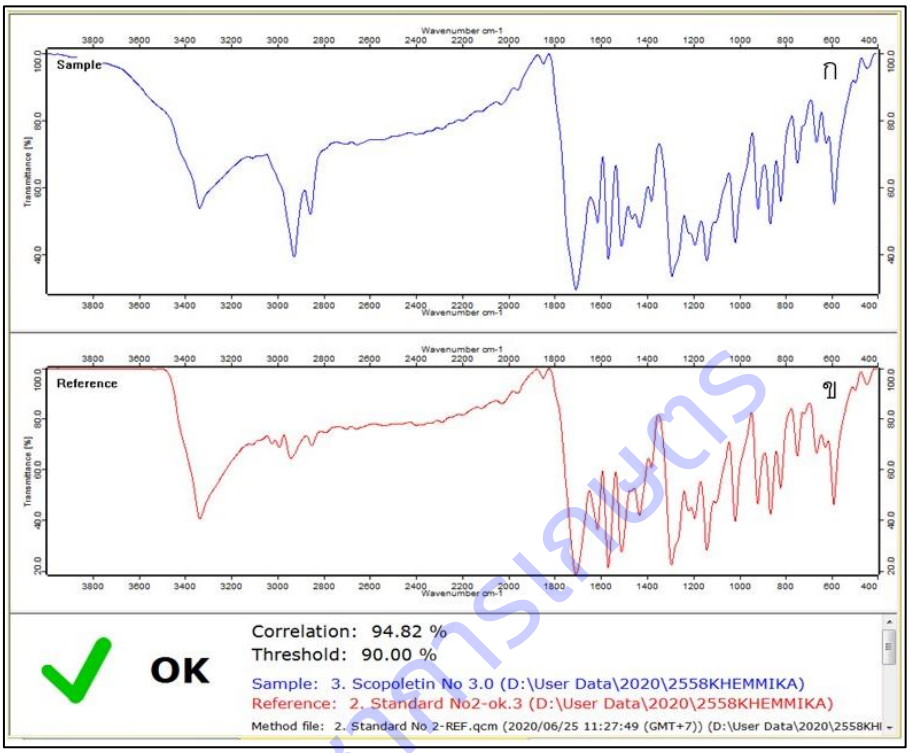
เมื่อเปรียบเทียบเทียบโครมาโตแกรม ^{1}H และ ^{13}C NMR พบว่า สเปกตรัมของสารสคอพอเลตินที่แยกได้จากผลยอบ้านมีความเหมือนกับสารมาตรฐานสคอพอเลติน (ภาพที่ 26) โดยมีรายละเอียดโครงสร้างดังนี้



ภาพที่ 26 ^{1}H NMR และ ^{13}C-NMR สเปกตรัม ของสารสคอพอเลตินที่แยกได้จากผลยอบ้าน และสารสคอพอเลตินมาตรฐาน (ข)

กรมวิชาการเกษตร

ผลการตรวจสอบหมู่ฟังก์ชั่นของสารที่สกัดได้โดยเทคนิค FTIR เปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารสคอพอเลตินมาตรฐาน แสดงดังภาพที่ 27 โดยพบว่าสารที่สกัดได้และสารสคอพอเลตินมาตรฐาน ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล และหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์



ภาพที่ 27 FTIR สเปกตรัม ของสารสคอพอเลตินที่แยกได้จากผลยอบ้าน (ก) และสารสคอพอเลตินมาตรฐาน (ข)

จากการตรวจสอบหมู่ฟังก์ชั่นของสารที่สกัดได้จากผลยอบ้านโดยเทคนิค FTIR เปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของสารสคอพอเลตินมาตรฐาน ผลพบว่ามีความคล้ายคลึงกับสารมาตรฐาน 94.82 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งผลจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบด้วย TLC, UV-spectrum scanning และ NMR จึงยืนยันได้ว่าสารที่สกัดได้ คือ สคอพอเลติน

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

ผลการจากการศึกษาสำรวจพืชท้องถิ่นในงานวิจัยนี้ บ่งชี้ว่าผลยอบ้านซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นที่สามารถหาได้ง่ายในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างและพื้นที่อื่นๆทั่วประเทศ เป็นพืชที่มีศักยภาพสูงสำหรับนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อสกัดสารสคอพอเลติน สำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อไป ในด้านการเกษตร การแพทย์ หรือด้านอื่นๆที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้จากการตรวจสอบราคาในปี 2564 พบว่าสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์ (purity $\geq$ 99.99 เปอร์เซ็นต์) ขนาดบรรจุ 100 มิลลิกรัมที่มีจำหน่ายในเชิงการค้ามีราคาจำหน่ายในตลาดประมาณ 1 หมื่นบาท ซึ่งการใช้ประโยชน์จากการสกัดสารสำคัญนับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการการเพิ่มมูลค่าให้กับยอต่อไปในอนาคตและอาจเป็นแนวทางสู่การพัฒนาพืชชนิดอื่นๆต่อไป

การสกัดและทำบริสุทธิ์สารสคอพอเลตินได้โดยใช้การแยกผ่านคอลัมน์ 2 ครั้ง โดยก่อนการแยกทำการแยกส่วนสารอื่นๆที่ไม่มีขั้วออกก่อนโดยใช้เฮกเซน จากนั้นแยกผ่านคอลัมน์ซิลิกาที่ชะด้วย 0-60 เปอร์เซ็นต์ เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน แล้วทำการแยกอีกครั้งผ่านคอลัมน์ซิลิกาที่ชะด้วย 2 เปอร์เซ็นต์เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ซึ่งสารที่ได้นี้เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC NMR และ FTIR โดยเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานสคอพอเลติน มีค่าความสอดคล้องกัน 94.82 เปอร์เซ็นต์ จึงยืนยันได้ว่าสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้คือสารสคอพอเลติน ซึ่งจะนำไปใช้สำหรับการสกัดสารดังกล่าวออกมาเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

นอกจากนี้เทคนิค TLC ที่ได้มีการปรับใช้ในงานวิจัยนี้สามารถใช้วิเคราะห์ชิ้นส่วนพืชได้หลายชนิดพร้อมกันทั้งส่วนใบ ราก และผล โดยถูกรบกวนจากสีของสารชนิดอื่นในพืชนั้นๆน้อยมาก ซึ่งระบบตรวจสอบสารสคอพอเลตินด้วยเทคนิคนี้ คือ การแยกบนแผ่น TLC ชนิด reverse phase ภายใต้ระบบตัวทำละลายเฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอล:น้ำ อัตรา 75:25 (V/V) ซึ่งการใช้เทคนิคดังกล่าวให้ผลสอดคล้องเป็นไปในทางเดียวกับการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค HPLC นอกจากนี้เทคนิค TLC ยังมีข้อดีคือต้นทุนการวิเคราะห์ค่อนข้างต่ำ วิธีการไม่ยุ่งยากมาก ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีความซับซ้อน ดังนั้นแม้จะมีข้อจำกัดในความละเอียดการวิเคราะห์ไม่เทียบเท่าการวิเคราะห์ด้วย HPLC แต่สามารถนำเทคนิคนี้ไปปรับใช้ รองรับการศึกษาเชิงสำรวจ หรือเพื่อการประเมินเชิงคุณภาพของสารสคอพอเลตินในพืชหรือผลิตภัณฑ์จากพืชได้ต่อไปในอนาคต

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 2

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสคอพอเลติน

Biological activity study of scopoletin.

ผู้วิจัย

นางสาวเขมมิการ์ โขมพัตร

Ms. Khemmikar Khompatara

นางสาวอภิญญา สุราวุธ

Ms. Apinya Surawoot

นางสาวนพวรรณ นิลสุวรรณ

Ms. Noppawan Nilsuwan

นางสาวปริยากร ฤทธิสุนทร

Ms. Pariyakorn Ritthisoonthorn

นางสาวธารทิพย์ ภาสบุตร

Ms. Tharntip Bhasabutra

นางสาวทิพวรรณ กันหาญาติ

Ms. Tippawan Kanhayart

นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน

Ms. Manorat Sudsanguan

นางสาวกาญจนา ศรีไม้

Ms. Kanchana Srimai

นางฐิติกร พรหมบรรจง

Ms. Thitikorn Prombanchong

นางสรัญญา ช่วงพิมพ์

Ms. Saranya Choungpim

กรมวิชาการเกษตร

คำสำคัญ (TH) สคอพอเลติน, ไฟโตอเล็กซิน, ยอบ้าน, ความต้านทานในพืช, สารชักนำความต้านทาน

คำสำคัญ (EN) scopoletin, phytoalexin, *Morinda citrifolia* L., plant defense**,** elicitor

บทคัดย่อ

ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสคอพอเลตินที่สกัดได้จากผลยอบ้าน โดยทำการทดสอบยับยั้งเชื้อรา 9 ชนิด และเชื้อแบคทีเรีย 10 ชนิด บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า สคอพอเลตินความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 7 ชนิดเชื้อ ได้แก่ *Fusarium* sp.(2 ชนิด), *Alternaria* sp. (1 ชนิด), *Curvularia* sp. (2 ชนิด), *Sclerotium* sp. (1 ชนิด) และ *Tricoderma* sp. (1 ชนิด) โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสูงกว่า 50 ในทุกชนิดเชื้อ อย่างไรก็ตามสคอพอเลตินความเข้มข้นเดียวกันยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เล็กน้อย การทดสอบแบบ detached leaf ในคะน้าที่ถูกปลูกเชื้อ *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltshire และ detached fruit ในมะม่วงที่ถูกปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* พบว่า การนำสคอพอเลตินที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ลงบนรอยแผลของพืชได้รับเชื้อ สามารถลดระดับความรุนแรงของโรคบนพืชนั้นได้มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสคอพอเลตินด้วยวิธี DPPH เทียบกับกรดแอสคอบิก ให้ค่า IC_{50} (DPPH) 0.6 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารชักนำความต้านทาน (elicitor) ในต้นยาสูบ โดยวิธี infiltrate สคอพอเลตินความเข้มข้น 100, 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์เข้าทางใบ โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี colorimetric method พบแอคติวิตี้ของเอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสเพิ่มขึ้นชั่วโมงที่ 120 หลังได้รับสคอพอเลติน 100 ไมโครโมลาร์ แอคติวิตี้ของเอนไซม์กลูคาเนสเพิ่มขึ้นชั่วโมงที่ 24 และ 120 หลังได้รับสคอพอเลติน 100, 500 และ 1,000 มิลลิโมลาร์ การวิเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยวิธี gel activity staining พบแถบของเอนไซม์เข้มขึ้นมากกว่าชุดควบคุมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 120 หลังการชักนำด้วยสคอพอเลตินในทุกความเข้มข้น การวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิด้วยวิธี HPLC พบการสะสมกรดซาลิซิลิกเพิ่มขึ้นชั่วโมงที่ 12 และ 48 หลังได้รับสคอพอเลติน 500 ไมโครโมลาร์ การสะสมกรดแอบไซซิกเพิ่มขึ้นชั่วโมงที่ 48 และ 120 หลังได้รับสคอพอเลติน 120 ไมโครโมลาร์ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสคอพอเลตินมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่น่าสนใจ โดยสามารถใช้ควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะกลุ่มเชื้อรา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งมีคุณสมบัติเป็นสาร elicitor เนื่องจากสามารถกระตุ้นเอนไซม์และโมเลกุลส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานในพืชได้จึงเป็นสารทางเลือกที่ดีสำหรับการนำไปปรับใช้ประโยชน์ต่อไปภายใต้คุณสมบัติของสารชนิดนี้

กรมวิทยาศาสตร์

Abstracts

A study on the bioactivity of scopoletin extracted from noni fruit. The antifungal activity of 9 types of fungi and 10 types of bacteria on agar plates showed that scopoletin at a concentration of 1,000 mg/l. It was able to inhibit the growth of 7 types of fungi such as *Fusarium* sp. (2 species), *Alternaria* sp. (1 species), *Curvularia* sp. (2 species), *Sclerotium* sp. (1 species) and *Tricoderma* sp. (1 species) with % inhibition above 50 in all pathogens. However, the same concentration of scopoletin inhibited the bacteria slightly. Detached leaf test in kale inoculated with *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltshire and detached fruit in mangos inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides* It was found that the scopoletin concentration at 10 mg/L put on the wound of infected plant can reduce the severity of disease on that plant by more than 20 percent. The antioxidant activity of scopoletin by DPPH compared with ascorbic acid gave lc50 (DPPH) 0.6 and 0.01 mg/mL, respectively. Test of elicitor properties in tobacco plants using infiltrate method. 100, 500 and 1000 µM scopoletin was infiltrate into leaves using distilled water as a control. Analysis by colorimetric method showed an increase in Phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity at 120 h after 100 µm scopoletin induction. The activity of Glucanase (Glu) was increased at 24 and 120 hours after induction with 100, 500 and 1000 mM scopoletin. Peroxidase (POD) activity assay was performed with gel activity staining method. The POD activity bands were more intense than the control from 24 hours to 120 hours after scopoletin induction at all concentrations. Secondary metabolite quantification using HPLC method revealed an increase in salicylic acid accumulation at 12 and 48 hours after 500 µm scopoletin induction, while the accumulation of abscisic acid increased at 48 and 120 hours after 120 µm scopoletin induction.

The results of this study suggest that scopoletin has interesting biological properties. It can be used to control the growth of microorganisms, especially fungi. It has an antioxidant effect. It is also an elicitor because it can activate a number of enzymes and signaling molecules involved in plant resistance systems. Therefore, it is a good choice for further application under the properties of this substance.

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

ในกระบวนการผลิตทางการเกษตร ปัญหาโรคพืช ทั้งที่เกิดจากแบคทีเรีย เชื้อรา หรือแม้กระทั่งไวรัส นับเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อความเสียหายให้แก่เกษตรกรผู้ผลิตอยู่เสมอ สำหรับในพื้นที่ภาคใต้ ปัญหาโรคพืชที่พบบ่อยครั้ง เช่น การเกิดโรคใบร่วงในยางพาราจากเชื้อไฟทอปธอร่า (*Phytophthora* spp.) โรคเหี่ยวในกล้วยหินจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* โรคเหี่ยวในต้นสับปะรดจากเชื้อ *Closterovirus* เป็นต้น ซึ่งปัญหาจากโรคพืชดังกล่าวล้วนสร้างความเสียหายต่อคุณภาพของผลผลิตทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ สำหรับในปัจจุบันเมื่อพบว่ามีการระบาดของโรคเกิดขึ้น ทางเลือกของเกษตรกรในการแก้ปัญหายังคงมุ่งไปยังการเลือกใช้สารเคมีสังเคราะห์ซึ่งต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง เพื่อไม่ให้เกิดผลกระทบต่อความปลอดภัยเกษตรกรผู้ใช้สารเคมีนั้นๆโดยตรง รวมไปถึงการตกค้างของสารเคมีในผลผลิต ซึ่งนำไปสู่ความไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค อีกทั้งยังถูกหยิบยกมาเป็นประเด็นด้านอาหารปลอดภัยเพื่อใช้พิจารณาในการตกลงซื้อขายสินค้า

ปัจจุบันหน่วยงานภาครัฐได้เข้ามามีส่วนในการควบคุมดูแลคุณภาพสินค้าเกษตรโดยสนับสนุนให้เกษตรกรผลิตตามระบบเกษตรดีที่เหมาะสม (Good Agricultural Practice: GAP) และได้เร่งส่งเสริมนโยบายเพิ่มการทำเกษตรอินทรีย์เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีความปลอดภัยปราศจากสารเคมีปนเปื้อน โดยได้กำหนดเป็นแผนยุทธศาสตร์เกษตรอินทรีย์แห่งชาติ มีเป้าหมายที่จะเพิ่มพื้นที่เกษตรอินทรีย์ เพิ่มสัดส่วนตลาดในประเทศ ตลาดส่งออกเป็น 40:60 และยกระดับกลุ่มเกษตรอินทรีย์วิถีพื้นบ้านเพิ่มขึ้น ดังนั้นเพื่อรองรับแนวทางการผลิตพืชดังกล่าวข้างต้นภายใต้สภาวะที่การเกิดโรคพืชยังคงพบอยู่เสมอจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาและวิจัยเพื่อให้ได้สารชีวภัณฑ์ (biocontrol) สำหรับเป็นทางเลือกให้แก่เกษตรกรนำไปปรับใช้แก้ปัญหาโรคพืชแทนการใช้สารเคมีทั้งนี้ปัจจุบันสารชีวภัณฑ์สำหรับใช้ป้องกันโรคพืชได้มีการผลิตเชิงการค้าโดยภาคเอกชน แต่ยังคงมีตัวเลือกไม่มากนักและส่วนใหญ่จะเป็นการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เช่น เชื้อราไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma harzianum*) เชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส ซับทีลิส (*Bacillus subtilis*) เชื้อรากลิโอคลาเดียม ไวเรน (*Gliocladium virens*) เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตมัยซีส (*Streptomyces* sp.) ซึ่งจำเป็นต้องใช้ความรู้ทางด้านจุลชีววิทยาในการผลิตผลิตภัณฑ์เพื่อให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้แก้ปัญหาในแปลงต่อไปได้

สคอพอเลติน เป็นสารทุติยภูมิที่มีมวลโมเลกุลต่ำ จุดเดือดสูง มีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ภายใต้สภาวะที่ถูกกระตุ้นทั้งจากตัวกระตุ้นแบบชีวภาพและทางกายภาพ พืชสามารถสร้างสารชนิดนี้เพิ่มขึ้นมาได้อีกในปริมาณมาก โดยอาจพบได้ในบริเวณชิ้นส่วนต่างๆ เช่น ลำต้น ราก ใบ และผล อย่างไรก็ตามสารนี้ถูกสร้างขึ้นในพืชเพียงบางชนิด โดยจุดเด่นของสารชนิดนี้คือการมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

(antimicrobial) รวมทั้งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ปัจจุบันจึงได้มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในทางการแพทย์ อย่างไรก็ตามการศึกษาและนำสคอพอเลตินมาใช้ประโยชน์ในเชิงการเกษตรเพื่อป้องกันหรือลดระดับความรุนแรงจากการถูกเชื้อรุกราน สำหรับประเทศไทยยังคงมีข้อมูลน้อย

นอกจากการศึกษาเพื่อพัฒนาด้านการอารักขาพืชแล้ว การศึกษาสารสำคัญในพืชที่สามารถหาได้ง่าย และราคาต่ำยังนับเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชชนิดนั้นๆได้ โดยเฉพาะในพืชบางชนิดที่มักประสบปัญหาผลผลิตล้นตลาด เช่น ลองกอง หากมีแนวทางช่วยเหลือเกษตรกรโดยการนำผลผลิตดังกล่าวมาสกัดสารสำคัญที่สามารถพัฒนาไปใช้ต่อยอดในอีกหลากหลายสาขาทั้งในงานด้านการเกษตร ตลอดจนงานด้านอุตสาหกรรมและการแพทย์ จะก่อให้เกิดประโยชน์ในเชิงเศรษฐกิจอีกมากมาย นอกจากนี้การศึกษาแนวทางในการนำสคอพอเลตินที่สกัดได้จากพืชมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร โดยมุ่งเป้าหมายให้เกษตรกรสามารถนำความรู้มาปรับใช้ในแปลงเกษตรด้วยตนเองโดยใช้วิธีการสกัดที่ไม่ซับซ้อนมากนัก ไม่ต้องใช้เทคโนโลยีระดับสูงที่เกษตรกรเข้าถึงได้ยาก และอาศัยวัตถุดิบที่หาได้ง่าย ต้นทุนการผลิตไม่สูงจำเป็นต้องดำเนินการอย่างเร่งด่วนเพื่อรองรับแนวทางการส่งเสริมการเกษตรของทางภาครัฐที่มุ่งไปยังประเด็นการสร้างความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคจากปัญหาสารเคมีตกค้าง การรณรงค์ลดการใช้สารเคมีแก้ปัญหาโรคพืช รวมทั้งลดความเสียหายของผลผลิต จึงจำเป็นต้องสร้างทางเลือกในการแก้ปัญหาโรคพืชให้แก่เกษตรกรผู้ผลิตด้วยควบคู่กัน

การทบทวนวรรณกรรม

จากปัญหาการเกิดโรคพืชในกระบวนการผลิตทางการเกษตร ส่งผลให้มีการใช้สารเคมีเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว และส่งผลกระทบต่อเนื่องมายังสุขภาพของทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค แนวทางในการแก้ไขปัญหาโดยภาครัฐจึงมุ่งควบคุมกระบวนการผลิตทั้งการควบคุมผ่านระบบการเกษตรดีที่เหมาะสม (GAP) และ การผลิตพืชอินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตพืชอินทรีย์ได้ถูกกำหนดให้เป็นยุทธศาสตร์ระดับประเทศ คณะรัฐมนตรีมีมติเห็นชอบยุทธศาสตร์การพัฒนาเกษตรอินทรีย์แห่งชาติ พ.ศ. 2560-2564 ซึ่งเป็นแผนฉบับที่ 2 หลังจากที่แผน 1 สิ้นสุดไปตั้งแต่ปี 2554 โดยในแผนใหม่นี้ ตั้งวิสัยทัศน์ให้ "ประเทศไทยเป็นผู้นำในระดับภูมิภาคด้านการผลิต การบริโภค การค้าสินค้าและการบริการเกษตรอินทรีย์ ที่มีความยั่งยืนและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล"โดยมีเป้าหมายที่จะเพิ่มพื้นที่เกษตรอินทรีย์ให้เป็น 600,000 ไร่ในปี 2564 และมีเกษตรกรที่ทำเกษตรอินทรีย์ไม่น้อยกว่า 30,000 รายรวมทั้งเพิ่มสัดส่วนตลาดในประเทศ-ตลาดส่งออกเป็น 40:60 และยกระดับกลุ่มเกษตรอินทรีย์วิถีพื้นบ้านเพิ่มขึ้น (http://www.greennet.or.th/news/1907 ; accessed 6/23/17) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาปัญหาและอุปสรรคในการปรับเปลี่ยนเป็นการผลิตพืชผักอินทรีย์ โดยณัชชาและดุสิต, 2556 ได้รายงานว่าเกษตรกรส่วนใหญ่ขาดความรู้เกี่ยวกับการห้ามใช้ปุ๋ยเคมีและใช้สารเคมีใดๆในระบบการผลิตพืชทั้งเกษตรกรยังเลือกที่จะใช้สารเคมีในการควบคุม

กรมวิชาการเกษตร

ศัตรูพืช ดังนั้นการแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้นต้องถ่ายทอดองค์ความรู้เกี่ยวกับการใช้ปุ๋ยอินทรีย์หลักการจัดการระบบนิเวศการใช้สารชีวภัณฑ์และจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์

1 สารชีวภัณฑ์เพื่อการแก้ปัญหาโรคพืชในปัจจุบัน

ปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารชีวภัณฑ์เพื่อนำมาใช้แก้ปัญหาโรคพืชเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีโดยนักวิจัยจากหลายหน่วยงาน ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเติบโตเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่าเชื้อก่อโรคพืช หรือมีคุณสมบัติในการชักนำให้พืชสามารถสร้างภูมิคุ้มกันในตัวเอง หรือส่งเสริมให้พืชเจริญเติบโตและมีความแข็งแรงทำให้สามารถทนต่อการถูกเชื้อก่อโรคเข้าทำลาย เช่น การพัฒนาการผลิตชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus velezensis* เพื่อเป็นทางเลือกเพิ่มเติมซึ่งจากการวิจัยของมานะ และคณะ (2553) พบว่าสูตรชีวภัณฑ์ *B. velezensis* รูปแบบของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นสามารถลดเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายที่รากพืชของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าที่ปรากฏในระบบปลูกและยังพบว่าการฉีดพ่นชีวภัณฑ์มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของพืชด้วยเช่นกันอย่างไรก็ตามในกระบวนการผลิตชีวภัณฑ์ดังกล่าวผู้วิจัยได้ระบุถึงปัญหาในแง่ต้นทุนของการผลิตชีวภัณฑ์ดังกล่าวโดยมีราคาที่ค่อนข้างสูงซึ่งอาจจะเป็นอุปสรรคต่อการนำไปใช้โดยเกษตรกรผู้ปลูกพืช หรือ การใช้ *B. subtilis* ซึ่งสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ถึง 65-70 ชนิดโดยสารที่ผลิตขึ้นสามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ได้แก่ iturin A, surfactin, bacilysin, fengymycin, bacliomycin, albolutin, bacillin และ fungistatin รวมทั้งยังสามารถผลิตเอนไซม์ chitinase และ β-1,3 glucanase ซึ่งมีผลต่อการชักนำภูมิต้านทานพืชได้หรือการใช้ *Pseudomonas* spp. ซึ่งสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งเชื้อโรคพืชได้ดีคือ pyoluteorin, 2,4-diacetylphluoroglucinol (DAPG), siderophore, pyrrolnitrin, phenazine-1-carboxylic acid (PCA), antharanilic acid, phenazine-1-carboxamide (PCN) และviscosinamide (พันศักดิ์ และคณะ 2558) นอกจากนี้ชีวภัณฑ์อีกชนิดหนึ่งที่มีการใช้อย่างแพร่หลายได้แก่เชื้อไตรโคเดอร์ม่า ได้ถูกนำมาทดสอบโดย จินันทนา และสุมาฬี ในปี 2558 โดยนำ ชีวภัณฑ์ชนิดผง (wettable powder) ของเชื้อรา*Trichoderma virens* และ *T. harzianum* มาทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคของข้าว ซึ่งพบว่า การพ่นด้วยชีวภัณฑ์เชื้อราให้ผลดีเทียบเท่าหรือดีกว่าการพ่นด้วยสารเคมีกำจัดรา mancozeb นอกจากนี้ในเชิงการค้าพบว่าผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายเพื่อการป้องกันกำจัดโรคพืชมักเป็นสารในกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในกลุ่มเชื้อรา *Trichoderma* spp., เชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis*, เชื้อรา *Gliocladium virens*, เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. (http://www.kasetkawna.com/product; accessed 6.23.17) หรือ สารสกัดจากพืช เช่น ข่า ว่านน้ำ ใบบัวบก และว่านหางจระเข้(http://www.nanagarden.com ; access 6.23.17)

กรมวิชาการเกษตร

2 สารไฟโตอเล็กซิน (Phytoalexin)

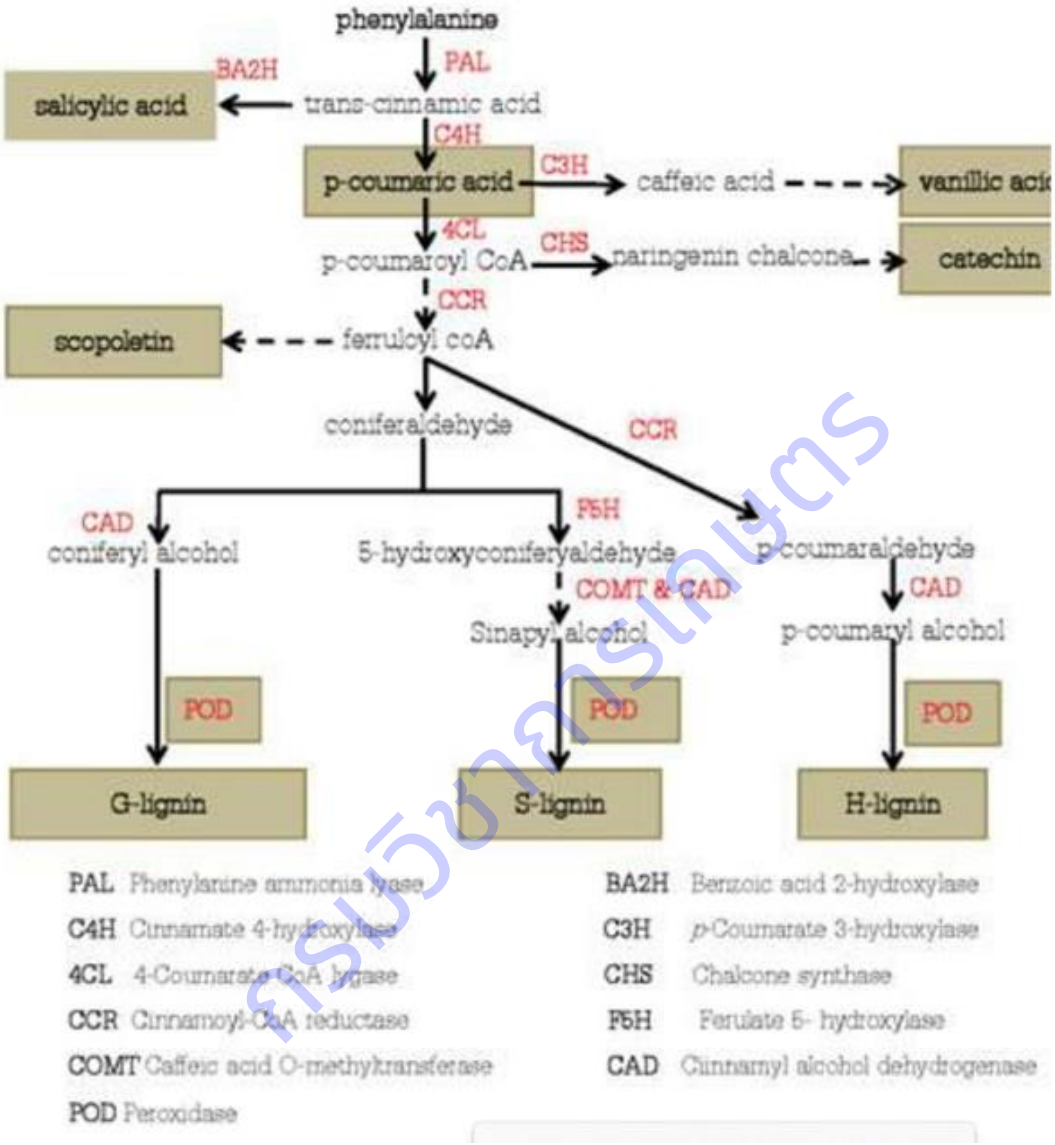
ไฟโตอเล็กซิน เป็นสารปฏิชีวนะที่พืชสร้างขึ้น มีความเป็นพิษต่อเชื้อโรค จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ มีมวลโมเลกุลต่ำ ผลิตโดยพืชเพื่อตอบสนองต่อการกระตุ้นจากเชื้อโรคหรืออิลิซิเตอร์ต่างๆทั้ง biotic และ abiotic สารไฟโตอเล็กซินเป็นสารที่มีคุณสมบัติเฉพาะ ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช แต่ไม่เจาะจงกับเชื้อโรคชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยถูกกล่าวถึงครั้งแรกเมื่อปี 1940 โดย Müller and Börger ซึ่งต่อมาได้มีการศึกษาและพบว่าไฟโตอเล็กซินยังมีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรีย รา รวมทั้งไวรัส จึงนับเป็นสารพิษจากพืชที่มีการแสดงความเป็นพิษครอบคลุมในวงกว้างทั้งในกลุ่มโปรคาริโอทและยูคาริโอทอย่างไรก็ตามมีการรายงานว่าไฟโตอเล็กซินมีความเป็นพิษน้อยกว่าสารเคมีกำจัดเชื้อรา การศึกษาเกี่ยวกับสารชนิดนี้ในช่วงต้นหลังจากการค้นพบมุ่งไปยังพืชในวงศ์ Leguminaceae หรือ Fabaceae และวงศ์ Solanaceae ซึ่งในยุคต่อมาได้มีการศึกษาเพิ่มในอีกหลายวงศ์ เช่น Vitaceae, Malvaceae, Euphorbiaceae, Moraceae, Orchidaceae, และ Ginkgoaceae (Jeandet *et al.,* 2013) สารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเฉพาะขึ้นอยู่กับชนิดของพืช อัตราการเกิดไฟโตอเล็กซินขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืช และเกิดในเซลล์พืชที่มีชีวิตเท่านั้น การสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซินในพืชทุกชนิดอาศัยวิถีของ shikimate, acetate-malonateและ acetate-mevalonate ซึ่งเป็นวิถีเมแทบอลิซึมแบบทุติยภูมิ (Kuc, 1995) ไฟโตอเล็กซินมีหลายชนิด บางชนิดอาจมีผลให้พืชเกิดปฏิกิริยา hypersensitive และบางชนิดมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช สารเหล่านี้ปกติจะมีปริมาณเพียงเล็กน้อยในเซลล์พืช แต่เมื่อพืชเกิดสภาวะเครียดจะมีการผลิตสารชนิดนี้เพิ่มมากขึ้น (จิระภา, 2551)

.3 สคอพอเลติน (Scopoletin)

สคอพอเลติน เป็นสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อตอบสนองต่อการกระตุ้นทั้งตัวกระตุ้นชีวภาพ เช่น เชื้อจุลินทรีย์ หรือ ตัวกระตุ้นทางกายภาพ เช่น การเกิดบาดแผล หรือการได้รับรังสีบางชนิด สคอพอเลตินมีขนาดโมเลกุล 192.17 กรัมต่อโมล และจุดหลอมเหลวที่ 204 องศาเซลเซียส สคอพอเลตินจัดอยู่ในกลุ่มไฟโตอเล็กซินที่มีการรายงานการพบในพืชหลายชนิด เช่น พืชในตระกูลผักบุ้ง *(Convolvulus microphyllus)* (Zafar *et al*., 2005), พืชตระกูลยาสูบ *(Nicotiana benthamiana)* (Vialart *et al*., 2012), ยางพารา (*Hevea brasiliensis)* (Churngchow and Rattarasarn, 2001), มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*)(Andreae and Andreae, 1949), ผักคราดหัวแหวน *(Spilanthes acmella* Murr.) (Abyari *et al.,* 2016), ยอ *(Morinda citrifolia* Linnaeus) (West and Deng, 2010), มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) (BA *et al*., 2017) และทานตะวัน (*Helianthus annuus*) (Saftić-Panković *et al.,* 2006) โดย Gutierrez *et al.,* (1995) ได้นำใบของทานตะวันมาศึกษากระบวนการสะสมของสคอพอเลติน พบว่าสามารถเหนี่ยวนำกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ออกซิไดซ์สคอพอเลตินให้เป็นสารประกอบที่มีสีและไม่ละลายน้ำ หลังการกระตุ้นใบด้วย $CuCl_2$ หรือน้ำตาลซูโครส โดยเห็นการเรืองแสงเกิดขึ้นภายใต้แสง UV ในขณะที่กระตุ้นด้วย salicylic acid, dichloroisonicotinic acid หรือ glutathione ไม่เกิดการเรืองแสง การสร้าง

กรมวิชาการเกษตร

สารประกอบนี้ในพืชจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่มากระตุ้นและอายุของเนื้อเยื่อพืช ตัวอย่างวิถีการสร้างสคอพอเลติน แสดงดังภาพที่ 28



ภาพที่ 28 วิถีการสังเคราะห์สคอพอเลติน กรดซาลิซิลิก กรดพาราคูมาริก กรดวานิลลิก คาเทชิน และลิกนิน ใน phenylpropanoid pathway (เขมมิการ์ และคณะ 2561)

ในยางพารามีการศึกษาปริมาณของสคอพอเลตินเพื่อใช้ในการบ่งบอกระดับความต้านทานโรคของพันธุ์ยางชนิดต่างๆได้ โดยพันธุ์ยางที่อ่อนแอจะผลิตสคอพอเลตินได้น้อยกว่าพันธุ์ต้านทาน (Churngchow and Rattarasarn,

กรมวิชาการเกษตร

2001) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Khompatara, 2017 พบว่าในสภาวะปกติใบยางพาราชำถุงพันธุ์ RRIM600 สามารถตรวจพบสคอพอเลตินได้ที่ระดับ 0.2-0.4 มิลลิกรัม จากใบยางสด 1 กิโลกรัม

.4 คุณสมบัติของสารสคอพอเลติน

Tegos*et al.* (2002) ได้รายงานว่าสคอพอเลตินมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยยับยั้งกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบต่อมา Rigane *et al*. (2013) ได้รายงานถึงคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียโดยใช้สารสกัดด้วยเมธานอลจากใบและดอกของต้น *Calendula officinalis* ซึ่งมีสารสคอพอเลตินเป็นส่วนประกอบสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 3 ชนิดและเชื้อราอีก 2 ชนิด โดยได้ชี้ว่าผลที่ได้สามารถนำไปใช้ในเชิงอุตสาหกรรมเพื่อการผลิตสาร bioactive จากพืชได้ และในปีเดียวกันนี้ Acharya *et al.* (2013) ได้รายงานถึงคุณสมบัติของสคอพอเลตินในการยังยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella Typhi* ได้นอกจากคุณสมบัติด้านการเป็นสาร antimicrobial แล้ว สคอพอเลตินยังได้รับการรายงานถึงคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยสคอพอเลตินที่สกัดจาก *Sinomonium acutum* สามารถกำจัดอนุมูล superoxide anion *ใน*ปฏิกิริยา xanthine/xanthine oxidase (Shaw *et al.,* 2003) นอกจากนี้ Malik *et al.* (2011) ได้รายงานว่าสคอพอเลตินสามารถนำมาใช้กำจัดอนุมูลอิสระชนิด 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), อนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ได้ โดยผู้วิจัยชี้ว่าสคอพอเลตินควบคุมอนุมูลอิสระได้โดยผ่านทางกระบวนการที่หลากหลาย เช่น การขนส่งกรดไขมันสายยาวในไมโตคอนเดรีย ทั้งนี้สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) มีความสำคัญคือเป็นสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชั่นเช่นกระบวนการเกิดสนิมของเหล็ก การเกิดสีน้ำตาลในผลไม้ (เช่นในแอปเปิ้ล) หรือการทำให้น้ำมันพืชเหม็นหืน หรือกระบวนการออกซิเดชั่นที่เกิดในร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ เช่น การย่อยสลายโปรตีนและไขมันจากอาหารที่กินเข้าไป มลพิษทางอากาศ การหายใจควันบุหรี่ รังสียูวี ปัจจัยเหล่านี้ล้วนทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ซึ่งสร้างความเสียหายได้ทั้งในพืชและในร่างกายมนุษย์ จึงได้มีการศึกษาหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งต่างๆ สำหรับนำไปประยุกต์ใช้ทั้งทางด้านการเกษตร ด้านเภสัชกรรม รวมไปถึงด้านการแพทย์

5 การประยุกต์ใช้สารสคอพอเลติน

ด้านการเกษตร

เนื่องจากสารชนิดนี้มีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อรา แบคทีเรีย จึงได้มีการนำมาปรับใช้ทางด้านการเกษตร เช่น การลดการเกิดโรคราเขียวจากเชื้อ *Penicillium digitatum* บนผลส้ม (Sanzani *et al*., 2014), การยับยั้งการเจริญของไมซีเลียมของเชื้อ *Alternaria alternate* ซึ่งก่อให้เกิดโรคจุดสีน้ำตาลในใบยาสูบ (Sun *et al*., 2014), การยับยั้งการสังเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซินโดยเชื้อ *Aspergillus flavus* ในมันฝรั่ง *(*Gnonlonfin *et al., 2011)* การยับยั้งการสร้างสปอร์และการเจริญของไมซิเลียมของเชื้อราชนิดต่างๆเพื่อการเก็บรักษาข้าวโพด เช่น *Penicillium* sp.,

Aspergillus, Fusarium (Ba *et al*., 2017) นอกจากนี้ Sun *et al*., 2014 ได้ทดสอบผลของสารสคอพอเลตินต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Alternaria alternate*ทั้งแบบการยับยั้งโดยตรง (direct inhibition) และแบบการยับยั้งผ่านการกระตุ้นความต้านทานในพืช (induced resistance) โดยในการทดสอบแบบ direct inhibition บนอาหาร PDA ที่มีสารสคอพอเลตินผสมอยู่ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการเจริญของเชื้อ *Alternaria* เหลือ 68 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นไปที่ 480 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการเจริญของเชื้อดังกล่าวเหลือเพียง 14 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้พ่นสารสคอพอเลติน และในการทดสอบการนำไปใช้กระตุ้นความต้านทานในพืช ได้ชักนำให้มีการสร้างความต้านทานในใบยาสูบเป็นเวลา 7 ชั่วโมง โดยทำการแช่ก้านใบยาสูบในสารละลายสคอพอเลตินความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และ 500 ไมโครโมลาร์ เทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นน้ำกลั่นจากนั้นทำการปลูกเชื้อ *Alternaria* แล้วตรวจดูการเกิดแผลหลังจากปลูกเชื้อไปแล้ว 5 วัน พบว่าขนาดของรอยแผลในชุดทดสอบที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสคอพอเลตินทั้งสองระดับความเข้มข้นสามารถลดขนาดของรอยแผลที่เกิดจากเชื้อ *Alternaria* ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้สคอพอเลตินภายนอกสามารถเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ *Alternaria* ในใบยาสูบได้ซึ่งกระบวนการต้านทานภายในพืช (Plant defense) นั้นเป็นกระบวนการหนึ่งที่พืชใช้ปรับตัวเองเพื่อต่อต้านการบุกรุกของเชื้อโรค โดยมีวิธีการต่างๆกัน เช่น การทำให้เซลล์ที่กำลังติดเชื้อและเซลล์ที่อยู่ข้างเคียงตาย เรียกว่าการเกิด hypersensitive cell death โดยกระบวนการนี้จะสังเกตเห็นรอยไหม้สีน้ำตาล (necrosis), การสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค ที่เรียกว่าไฟโตอเล็กซิน, การสร้างโปรตีนขึ้นมาทำลายเชื้อโรค ที่เรียกว่า pathogenesis related-proteins (PR-proteins) เช่น เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสหรือเอนไซม์ไคติเนสเพื่อย่อยผนังเซลล์ของผู้รุกราน, การกักบริเวณเชื้อไม่ให้ลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงโดยกระบวนการสร้างลิกนินหรือซูเบอรินพอกบริเวณผนังเซลล์พืช และการสร้างผนังเซลล์พืชให้แข็งแรงขึ้น เช่น การสร้างแคลโลส แนวทางการประยุกต์ใช้ความรู้ทางชีวเคมีเพื่อป้องกันโรคพืชจึงนำไปสู่การค้นหาสารกระตุ้นความต้านทานภายในพืช หรืออิลิซิเตอร์ (elicitor) ซึ่งอาจเป็นได้ทั้งตัวกระตุ้นชีวภาพ เช่น เชื้อรา จีนัส *Trichoderma*, *Penicillium simpliclassimum*, Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), สารสกัดจากสาหร่าย หรือตัวกระตุ้นเคมี เช่น Acibenzolar-S-methyl (ASM), β-Aminobutyric acid (BABA), Phosphite, Probenazole, Salicylic acid (SA) หรือตัวกระตุ้นทางกายภาพ เช่น การใช้อุณหภูมิสูงหรือต่ำ การใช้รังสีแกมม่า หรือการกระตุ้นด้วยแสงยูวี

นอกเหนือจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยตรงแล้วสารสคอพอเลตินยังมีอีกคุณสมบัติหนึ่งคือการเป็นสารต้านการเกิดอนุมูลอิสระ โดยจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างจากกระบวนการตอบสนองอย่างรวดเร็ว (Hypersensitive response, HR) เมื่อพืชถูกรุกราน ซึ่งโดยทั่วไปเมื่อถูกบุกรุก พืชจะตอบสนองโดยการสร้างสารเคมีขึ้นมาต้านผู้บุกรุก เช่น การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซูเปอร์ออกไซด์ ไนตริกออกไซด์ ฯลฯ ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระ

อย่างไรก็ตาม ผลของกิจกรรมที่เกิดขึ้นจะก่อให้เกิดการสะสมของอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์พืชและส่งผลให้เซลล์พืชในบริเวณนั้นเกิดการถูกทำลายไปด้วย ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระที่พืชสร้างขึ้นจึงทำหน้าที่ในการช่วยลดพิษภายในตัวพืชไม่ให้เซลล์พืชถูกทำลาย (จีระภา, 2551)

6.3.6 ด้านอื่นๆ

สารสคอพอเลตินมีการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์เนื่องจากมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อก่อโรคในคน เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* Typhi (Acharya *et al*., 2013) นอกจากนี้การใช้ประโยชน์จากสารชนิดนี้พบว่ามีการรายงานอย่างกว้างขวาง เช่น การสกัดและนำสารชนิดนี้ไปรักษาโรคความดันโลหิตสูง ควบคุมระดับคอเลสเตอรอล และ LDL รักษาโรคหัวใจและหลอดเลือด และรักษาอาการผิดปกติของระบบประสาท (Mogana *et al*., 2013, Das *et al.,* 2014) การใช้เป็นสารต้านการเกิดเนื้องอก ต้านการเกิดไทรอยด์ (DAS, 2014) การต้านอนุมูลอิสระ การต้านเชื้อจุลินทรีย์ การต้านการอักเสบของไขสันหลัง การป้องกันโรคตับ (Taguchi *et al.*2001) การต้านเชื้อรา การต้านฮีสตามีน การต้านไวรัส และการลดความดันโลหิตสูงโดยการขยายหลอดเลือด (Tanton, 2008) ซึ่งรายงานการศึกษาและประยุกต์ใช้สารชนิดนี้บ่งชี้ให้เห็นถึงความสำคัญและคุณค่าในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆได้หลากหลายโดยสารสคอพอเลตินนี้มีแหล่งกำเนิดจากพืช ดังนั้นคุณประโยชน์ของการศึกษาปริมาณสารชนิดนี้ในพืชที่มีแนวโน้มจะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการสกัดสารสคอพอเลตินก็จะก่อให้เกิดการเพิ่มทางเลือกในการสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรอีกทางหนึ่งด้วย

3. วัตถุประสงค์ของกิจกรรม

3.1 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด (antimicrobial property)

3.2 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant property)

3.3 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารชักนำความต้านทานโรคในพืช (elicitor property)

กรมวิชาการเกษตร

ระเบียบวิธีวิจัย

กิจกรรมที่ 2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสคอพอเลติน (ปีเริ่มต้น. 2563–สิ้นสุด 2563.)

การทดลองที่ 3 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด (antimicrobial property)

<u>อุปกรณ์</u>

1. สารสคอพอเลตินบริสุทธิ์จากผลยอ
2. เชื้อจุลินทรีย์สำหรับทดสอบ เช่น *Collectotrichum* spp., *Alternaria* sp., *Sclerotium* sp. ฯลฯ
3. อุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ
4. สารเคมีสำหรับทดสอบและอาหารเลี้ยงเชื้อ

<u>วิธีการ</u>

1. เตรียมแยกเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มราและแบคทีเรีย เช่น เชื้อ *Pestalotiopsis* sp. จากยางพารา เชื้อ *Collectotrichum* spp. จากยางพารา เชื้อ *Sclerotium* sp. จากพริก (โดยแยกเชื้อจากพืชที่เป็นโรคหรือแยกจากผลิตภัณฑ์พืชที่มีเชื้อเจริญอยู่) สำหรับเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆนำมาจากเชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยง ณ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2.นำสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากผลยอมาผสมในอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ให้มีความเข้มข้นของสาร สคอพอเลตินอยู่ในช่วง 0, 10, 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรอาหาร 10 มิลลิลิตรต่อเพลท จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์สำหรับทดสอบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร มาวางตรงกลางเพลทและบ่ม ทำการทดสอบแต่ละความเข้มข้นอย่างละ 3 ซ้ำ โดยใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชในทางการเกษตรเป็น positive control และ ใช้อาหาร PDA ที่ไม่มีสารสคอพอเลตินผสมอยู่เป็น negative control บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 วัน นำมาวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของไมซีเลียม (ดัดแปลงจาก Ba *et al*., 2017) สำหรับเชื้อแบคทีเรียทำการทดสอบโดยวิธี cellulosic disc method ซึ่งดัดแปลงมาจาก Rigane *et al.,* 2013 โดยใช้สารมาตรฐาน Streptomycin เป็น positive control

3. คัดเลือกเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการยับยั้งด้วยสารสคอพอเลตินจากข้อที่ 2 มาทำการทดสอบแนวโน้มในการปรับใช้สารสคอพอเลตินในการลดระดับความรุนแรงของการเกิดโรคในระดับห้องปฏิบัติการ โดยเลือกคู่ของเชื้อให้ตรงกับชนิดพืชที่เป็นแหล่งที่มาของเชื้อชนิดนั้นๆมาทำการทดสอบ อย่างน้อย 1 คู่ เช่น เชื้อ *Phytophthora* spp. ที่แยกจากต้นยางพารา นำมาทดสอบกับใบยางพารา เชื้อ *Alternaria* sp. ที่แยกมาจากต้นยาสูบ นำมาทดสอบกับใบยาสูบ เชื้อ *Collectotrichum* spp. ที่แยกจากพริก นำมาทดสอบกับผลพริก โดยทำการทดสอบตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Güell *et al.,* 2011 โดยกรณีพืชทดสอบเป็นผล ทำการทดสอบโดยนำผลไม้ที่ได้จากแหล่งผลิตเดียวกัน มาล้างทำความสะอาดที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (1 เปอร์เซ็นต์, 1 นาที) จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง วางไว้ให้แห้ง ใช้ใบมีดที่ปราศจากเชื้อมากรีดให้เกิดแผลบนผิวผลขนาดประมาณ 2x2 มิลลิเมตร จำนวน 4 แผลต่อผล (ขึ้นอยู่

กรมวิชาการเกษตร

กับชนิดและขนาดของผลไม้ที่ทดสอบ) นำผลพืชที่ทดสอบวางในถาดและบรรจุในกล่องพลาสติกใสเพื่อป้องกันการปนเปื้อน

สำหรับการทดสอบใบพืช ทำโดยคัดเลือกใบพืชที่มีขนาดและอายุอ่อนแก่ใกล้เคียงกัน นำมาทำความสะอาดที่ผิวเช่นเดียวกับวิธีที่ปฏิบัติในการทำความสะอาดผลพืช จากนั้นกรีดใบให้เกิดรอยแผลขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตรบนใบ วางใบในกล่องที่มีการควบคุมความชื้น

เตรียมสารละลายเชื้อราในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาหยดลงบนรอยแผล ทำการบ่มพืชในภาชนะที่มีความชื้นสูง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายสคอพอเลตินความเข้มข้น 0, 10, 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรมาหยดลงบนแผลวางไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน ดำเนินการ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผลพืช หรือใบพืชรวมไม่ต่ำกว่า 9 ตัวอย่าง สำหรับชุดควบคุมประกอบด้วย 1) ชุด positive control ทำการหยดเฉพาะเชื้อทดสอบเพียงอย่างเดียว 2) ชุดควบคุมที่หยดด้วยสารเคมีเชิงการค้าตามชนิดของพืชทดสอบในอัตราส่วนที่แนะนำร่วมกับการหยดเชื้อทดสอบ 3) ชุดควบคุมที่หยดเฉพาะสารสคอพอเลตินความเข้มข้นต่างๆ สำหรับการประเมินผลจากการวัดขนาดของรอยแผลที่เกิดขึ้น และ/หรือประเมินระดับความรุนแรงของโรค โดยความรุนแรงของโรคในผลพืช; กำหนดเป็นสเกล 0-3 โดยระดับ 0 = ไม่มีอาการของโรค, 1 = เกิดการตายของเนื้อเยื่อ (necrosis) หรือพบการหลั่งสารบริเวณรอบตำแหน่งที่กรีด, 2 = การตายของเนื้อเยื่อเนื้อตายบริเวณแผลโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 3 ถึง 5 มิลลิเมตร, 3 = การตายของเนื้อเยื่อรอบรอยแผลขยายวงกว้างมากกว่า 5 มิลลิเมตร และความรุนแรงของโรคในใบพืช; กำหนดเป็นสเกล 0-3 โดยระดับ 0 = ไม่มีอาการของโรค, 1 = เกิดการตายของเนื้อเยื่อรอบรอยแผล, 2 = มีการตายของเนื้อเยื่อลุกลามไกลออกไปจากบริเวณรอบๆรอยแผล และ 3 = เกิดการตายของเนื้อเยื่อทั้งใบ

กรมวิชาการเกษตร

<u>การบันทึกข้อมูล</u>:

- วัดเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อบนเพลทอาหารด้วยสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์ในแต่ละระดับความเข้มข้นเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแต่ละชนิดจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละชุดทดสอบ

<u>ระยะเวลาในการดำเนินการ</u>: เริ่มต้นตุลาคม 2562สิ้นสุด กันยายน 2563 รวม 1 ปี

<u>สถานที่ดำเนินการทดลอง</u>: ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์จุลินทรีย์และสารพิษจากจุลินทรีย์ และห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารพิษตกค้างทางการเกษตร กลุ่มพัฒนาฯ สวพ.8

การทดลองที่ 4 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant property)

<u>อุปกรณ์</u>

1. สารสคอพอเลตินบริสุทธิ์จากผลยอบ้าน
2. วัสดุและสารเคมีสำหรับทดสอบ

3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
4. อ่างควบคุมอุณหภูมิ

วิธีการ

1. ทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ตามวิธีการของ Hutadilok-Towatana *et al*. (2006) โดยนำสารละลายสคอพอเลตินในน้ำกลั่น ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง

2 เติมสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ในเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ในที่มืดณอุณหภูมิห้อง 30 นาที

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 518 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใส่น้ำกลั่นแทนสคอพอเลตินโดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

4. คำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสูตร

% scavenging = [(A control - A sample) / A control] x 100

A control = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A sample = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

5 คำนวณหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50) จากกราฟระหว่างร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารสกัด

การบันทึกข้อมูล: ระดับศักยภาพของสารสคอพอเลตินต่อการกำจัดสารอนุมูลอิสระที่ทดสอบ
สถานที่ดำเนินการทดลอง: ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์จุลินทรีย์และสารพิษจากจุลินทรีย์ กลุ่มพัฒนาฯ สวพ.8
ระยะเวลาในการดำเนินการ: เริ่มต้นตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2563 รวม 1 ปี

การทดลองที่ 5 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารชักนำความต้านทานโรคในพืช (elicitor property)

อุปกรณ์

1. ต้นยาสูบ
2. วัสดุสารเคมีสำหรับใช้ในการทดสอบเชื้อและวัดสารชีวโมเลกุล เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ โปรตีนมาตรฐาน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กรดลิโนเลอิก ฯลฯ
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
4. เครื่อง HPLC

RSUวิทยาศาสตร์

5. เครื่องแยกโปรตีนบนแผ่นเจลอะคริลาไมด์

วิธีการ

1. เตรียมต้นยาสูบอายุประมาณ 3 เดือน

2. คัดเลือกใบที่มีขนาดสม่ำเสมอและอยู่ตำแหน่งกลางของต้นจำนวน 5 ใบต่อต้น ฉีดสารสคอเลตินความเข้มข้น 0, 100, 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นละ 5 ต้นโดยใช้หลอดฉีดยาบรรจุสารละลายสคอพอเลตินความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตรทำการ infiltrate เข้าไปยังบริเวณช่องว่างระหว่างเส้นใบจำนวน 4 จุดต่อใบ จำนวน 4 ใบต่อต้นสำหรับใช้ในการเก็บมาวิเคราะห์ที่เวลาต่างๆกันในขั้นตอนต่อไป

3. เก็บใบที่เวลา 0, 12, 24, 48, และ 120 ชั่วโมงมาชั่งและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนทำการวิเคราะห์

4. สกัดและวิเคราะห์ใบเพื่อวัดปริมาณสารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องในระบบการต้านทานของพืช ได้แก่ ปริมาณสารทุติยภูมิ ได้แก่ กรดซาลิซิลิก และกรดแอบไซซิก (ตามวิธีของ Ederli *et al.*, 2011 และ Khompatara, 2017) ความว่องไวของเอนไซม์ (แอคติวิตี้) ได้แก่ เอนไซม์ในระบบการกระตุ้นการสร้างสารประกอบฟีนอลิก (เอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส ตามวิธีของ Zucker, 1968) และเอนไซม์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบ systemic acquired resistance (เอนไซม์กลูคาเนส ตามวิธีของ Santos *et al*., 1977) และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ทั้งการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลดการเกิดพิษต่อเซลล์พืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างลิกนินเสริมสร้างความแข็งแรงให้เซลล์พืช ตามวิธีของ Ali et al., 2005 และวิเคราะห์การเกิดลิกนินในพืชตามวิธีของ Gurav & Gurav (2013) เพื่อตรวจสอบผลการใช้สคอพอเลตินเป็นตัวชักนำ (elicitor) ให้เกิดความต้านทานในต้นยาสูบและความสัมพันธ์กับวิถีการต้านทานในต้นยาสูบที่เกิดขึ้น

การบันทึกข้อมูล: ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารชีวโมเลกุลชนิดต่างๆ ณ เวลาต่างๆกัน และพิจารณาความแตกต่างของแต่ละชุดทดสอบโดยใช้โปรแกรม SPSS ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว one-way analysis of variance (ANOVA) ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

ระยะเวลาในการดำเนินการ: เริ่มต้นตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2563 รวม 1 ปี

สถานที่ดำเนินการทดลอง: ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์จุลินทรีย์และสารพิษจากจุลินทรีย์ กลุ่มพัฒนาฯ สวพ.8

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและอภิปราย

การทดลองที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการใช้ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสคอพอเลตินที่สกัดจากผลยอบ้านต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชบางชนิดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการทดสอบกับเชื้อราจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ *Fusarium* sp.(2 ชนิด), *Alternaria* sp. (1 ชนิด), *Curvularia* sp. (2 ชนิด), *Sclerotium* sp. (1 ชนิด), *Colletotrichum* sp. (1 ชนิด), *Pestalotiopsis* sp. (1 ชนิด) และ *Tricoderma* sp. (1 ชนิด) แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารทดสอบชนิดต่างๆ

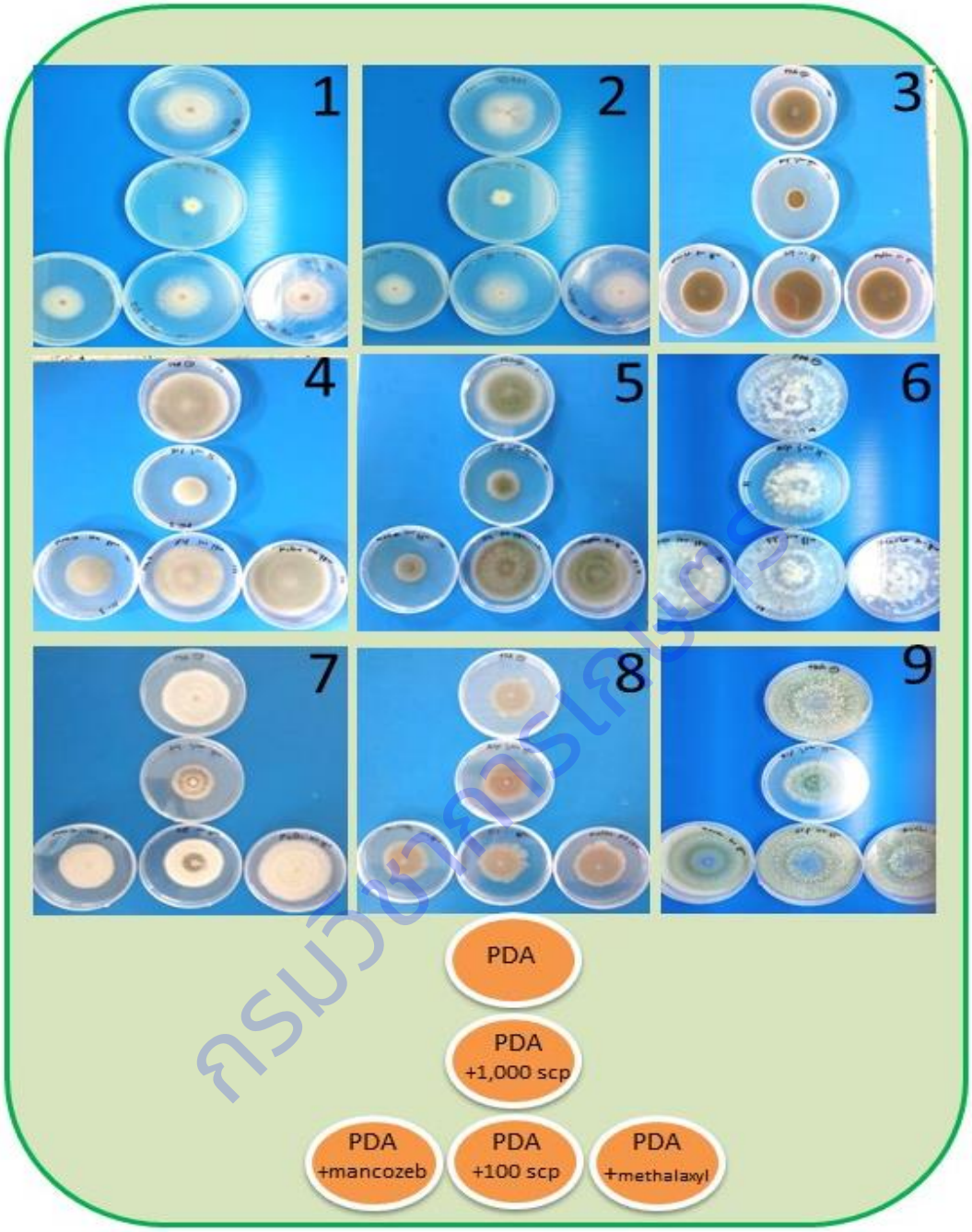
ลำดับที่	ชื่อเชื้อ-แหล่งที่มา	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ			
		PDA	สคอพอเลติน 1,000 ppm.	แมนโคเซป 100 ppm.	เมทาแลกซิล 100 ppm.
1	*Fusarium* sp. (MO 442 : สอพ.)	0.00	59.43	37.98	2.58
2	*Fusarium* sp. (MO 334 :สอพ.)	0.00	68.35	36.71	5.06
3	*Alternaria* sp. (MO 543 : สอพ.)	0.00	57.73	23.71	3.09
4	*Curvularia oryzae* (ปาล์มน้ำมัน : สอพ.)	0.00	59.09	44.21	5.79
5	*Curvularia eragrostidis* (ดอกกล้วยไม้ : สอพ.)	0.00	53.25	61.04	ไม่ยับยั้ง
6	*Sclerotium* sp. (พริก : สวพ.8)	0.00	50.72	53.80	5.54
7	*Colletotrichum* sp. (ยางพารา : สวพ.8)	0.00	37.04	21.69	0.00
8	*Pestalotiopsis* sp. (ยางพารา : สวพ.8)	0.00	ไม่ยับยั้ง	10.96	ไม่ยับยั้ง
9	*Tricoderma* sp. (กาบกล้วย : สอพ.)	0.00	58.42	22.28	3.51

หมายเหตุ : สอพ. = สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

สวพ.8 = สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8 กรมวิชาการเกษตร

สคอพอเลตินบริสุทธิ์ที่สกัดมาจากผลยอบ้านให้ค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชที่ระดับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจำนวน 8 ชนิดเชื้อ ยกเว้นเชื้อ *Pestalotiosis* จากยางพาราซึ่งผลการทดลองพบว่าเชื้อชนิดนี้มีความต้านทานต่อสารเคมีทางการเกษตรที่ใช้ในการทดสอบนี้ด้วย อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากผลการยับยั้งการเจริญในตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าระดับความเข้มข้นของสคอพอเลตินที่ใช้ทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราตั้งแต่ 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป จำนวน 7 ชนิดเชื้อ โดยพบว่ามีจำนวน 5 ชนิดเชื้อที่สคอพอเลตินความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งได้ดีกว่าการใช้สารเคมีเกษตรแมนโคเซป

ศรีวิชาการเกษตร



ภาพที่ 29 การทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชบนอาหารทดสอบ

1=*Fusarium* sp. (MO 442: สอพ.) 2= *Fusarium* sp. (MO 334 :สอพ.) 3=*Alternaria* sp. (MO 543 : สอพ.)

4=*Curvularia oryzae* (ปาล์มน้ำมัน) 5=*Curvularia eragrostidis* (กล้วยไม้) 6=*Sclerotium* sp. (พริก)

7=*Colletotrichum* sp. (ยางพารา) 8=*Pestalotiopsis* sp. (ยางพารา) 9=*Tricoderma* sp. (กล้วย)

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสคอพอเลตินในการต้านเชื้อแบคทีเรียจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *Ralstonia solanacearum* (1 ชนิด), *Pectobacterium* sp. (5 ชนิด), *Bacillus thuringiensis* (1 ชนิด), *Staphylococcus aureous* (1 ชนิด), *Salmonella* spp. (1 ชนิด) และ *Escherichia coli* (1 ชนิด) โดยใช้สารปฏิชีวนะ streptomycin ที่ระดับความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น positive control แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อแบคทีเรียถูกยับยั้งด้วยสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ

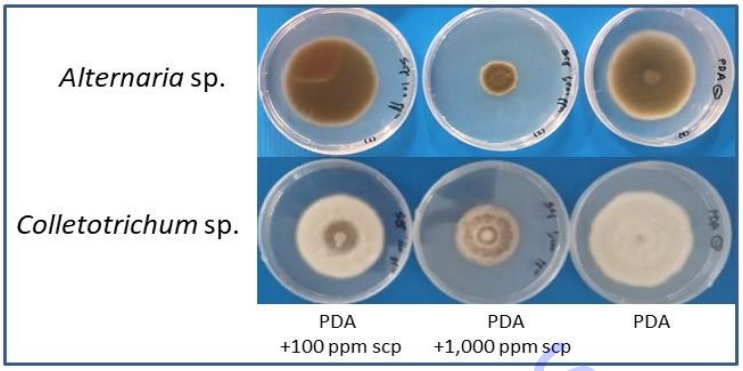
ลำดับที่	ชื่อเชื้อ-แหล่งที่มา	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้ง (ม.ม.)					
		DMSO	100 ugscp/ml	500 ugscp/ml	1,000 ugScp/ml	5000 ugscp/ml	30 ug/ml Streptomycin
1	*Ralstonia solanacearum* พริก (เชียงใหม่) code 1954 (สอพ.)	9.00±1.00	8.00±2.00	9.00±1.00	12.33±0.58	17.00± 1.73	32.00±3.00
2	*Pectobacterium* sp. หอมหัวใหญ่ (กาญจนบุรี) code 3036 (สอพ.)	8.00±1.73	6.00 ±0.00	7.33±1.15	10.33±2.08	16.00± 2.00	23.33 2.08
3	*Pectobacterium* sp. ขนุน (ระยอง) code 1147 (สอพ.)	7.67±1.53	7.33±0.58	8.67±1.53	10.33±0.58	15.33±0.58	39.67 2.89
4	*Pectobacterium* sp. หน่อไม้ฝรั่ง (เพชรบูรณ์) code 681 (สอพ.)	6.33±0.58	7.67±0.58	9.00±1.00	11.00±1.00	14.33±2.31	29.00 1.00
5	*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* จำปาดะ (สงขลา) code 1096-1 (สอพ.)	7.33±1.15	7.33±0.58	8.00±1.73	8.67±1.15	11.00 ±1.73	39.67±2.08
6	*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* จำปาดะ (สงขลา) code 1028-1 (สอพ.)	8.67±1.15	9.00±1.00	9.00±1.00	11.00±1.00	13.67±1.15	38.33±1.53
7	*Bacillus thuringiensis* (ศวพ.สงขลา)	6.67±0.58	6.00±0.58	6.67±0.58	7.33±1.00	8.00±2.52	33.00±0.58
8	*Staphylococcus aureous* (สวพ.8)	6.67±0.58	6.33±0.58	6.33±0.58	9.00±1.00	11.67±2.52	18.67±0.58
9	*Salmonella* spp. (สวพ.8)	8.00± 2.00	6.00± 0.00	8.00± 2.00	8.67 ± 3.06	10.67 ± 4.16	15.00±2.65
10	*Escherichia coli* (สวพ.8)	6.00± 0.00	6.00±.0.00	6.00± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	24.67± 2.31

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; n = 3

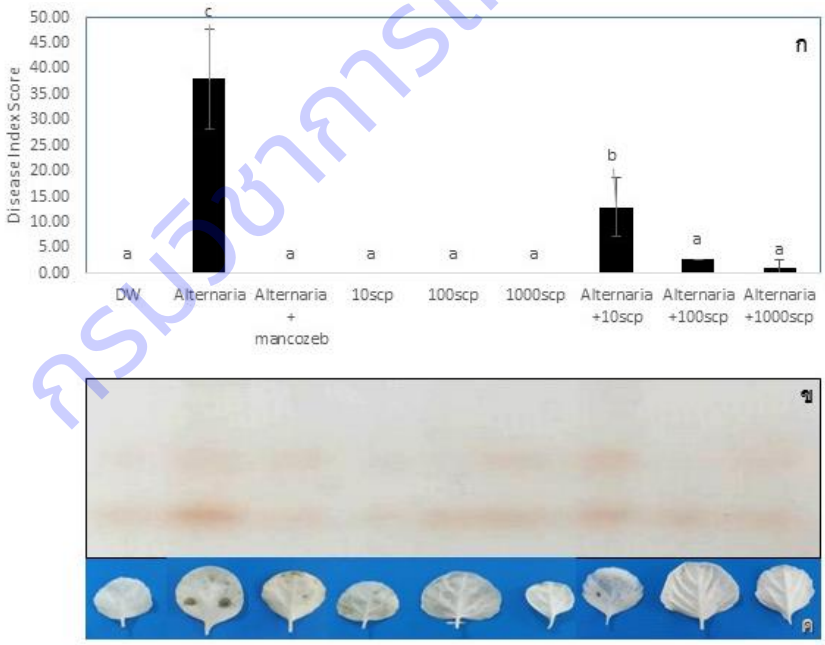
พบว่าสารสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เล็กน้อยเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ Streptomycin และไม่มีผลยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสคอพอเลตินให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าแบคทีเรีย

กรมวิชาการเกษตร

จากผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงได้คัดเลือกเชื้อราจำนวน 2 ชนิดมาทดสอบกับพืชจริง โดยทำการทดสอบแบบ detached leaf กับใบคะน้าด้วยเชื้อรา *Alternaria* sp. และทดสอบแบบ detached fruit กับผลมะม่วงด้วยเชื้อรา *Colletotrichum* sp. (ภาพที่ 30)



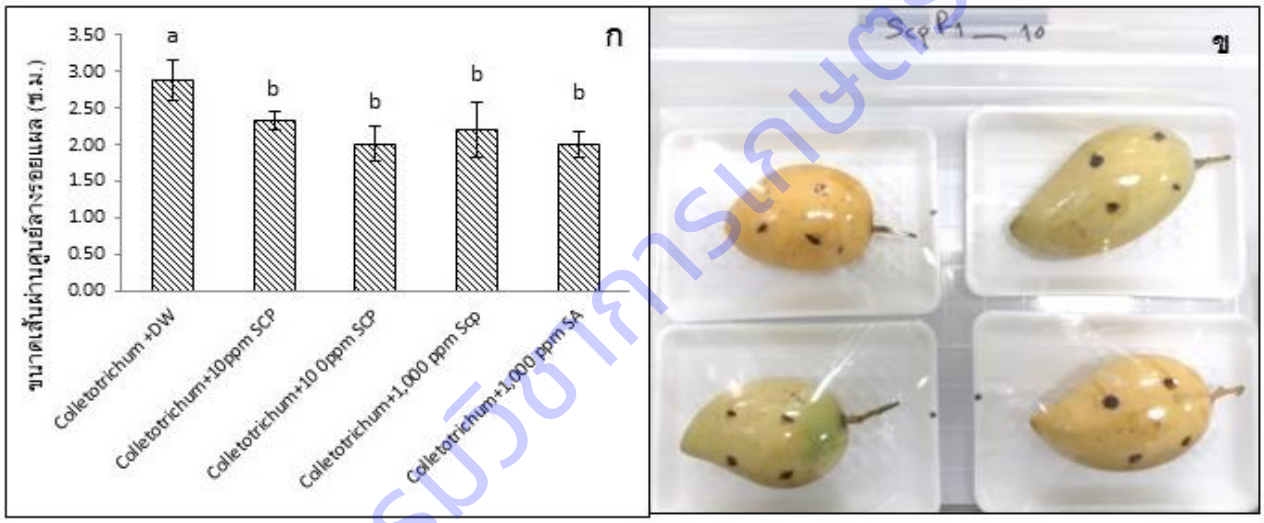
ภาพที่ 30 เชื้อ *Alternaria* sp. และ *Colletotrichum* sp. สำหรับใช้ทดสอบผลของสคอพอเลตินกับพืชจริง



ภาพที่ 31 ค่า Disease index score จากการทดสอบผลของสารสคอพอเลตินต่อการควบคุมการเจริญของเชื้อ *Alternaria* เป็นเวลา 5 วัน (ก) รูปแบบแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแต่ละชุดทดสอบ และลักษณะของใบคะน้าหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 5 วัน (ข และ ค)

กรมวิชาการเกษตร

จากการทดสอบแบบ detached leaf ซึ่งเป็นการจำลองการติดเชื้อก่อโรคใบจุด โดยใช้สารสคอพอเลตินความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ppm มาใช้ในการทดสอบ พบว่าใบคะน้าที่ได้รับเชื้อเพียงอย่างเดียวจะมีระดับค่า DI-score สูงที่สุด สอดคล้องกับลักษณะรอยแผลที่เห็นได้ชัดเจนบนแผ่นใบร่วมกับการปรากฏแถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เข้มอันเป็นการบ่งชี้ถึงการที่เซลล์พืชถูกทำลาย สำหรับการใช้สคอพอเลตินช่วยควบคุมระดับความรุนแรงของโรคพบว่าสคอพอเลตินที่ความเข้มข้น 10 ppm ช่วยลดระดับความรุนแรงของโรคลงได้ แต่ยังคงปรากฏรอยแผลและมีแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เข้มกว่า ชุดทดสอบที่ใช้สารสคอพอเลติน 100 และ 1,000 ppm ซึ่งสามารถควบคุมได้ไม่แตกต่างกับการใช้สารเคมีแมนโคเซป อย่างไรก็ตามพบว่าใบคะน้าปกติที่ได้รับเฉพาะสารสคอพอเลตินความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ppm ไม่พบอาการผิดปกติใดๆเกิดขึ้นจากการประเมินด้วยสายตา ขณะที่เมื่อนำมาวิเคราะห์กลับพบแถบแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเข้มขึ้นตามลำดับ (ภาพที่ 32)



ภาพที่ 32 การทดสอบใช้สารสคอพอเลตินควบคุมการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum* บนผลมะม่วงโดยวิธี detached fruit เป็นระยะเวลา 7 วัน; ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผล (ก) และ การเก็บรักษาผลมะม่วงระหว่างการทดสอบ (ข)

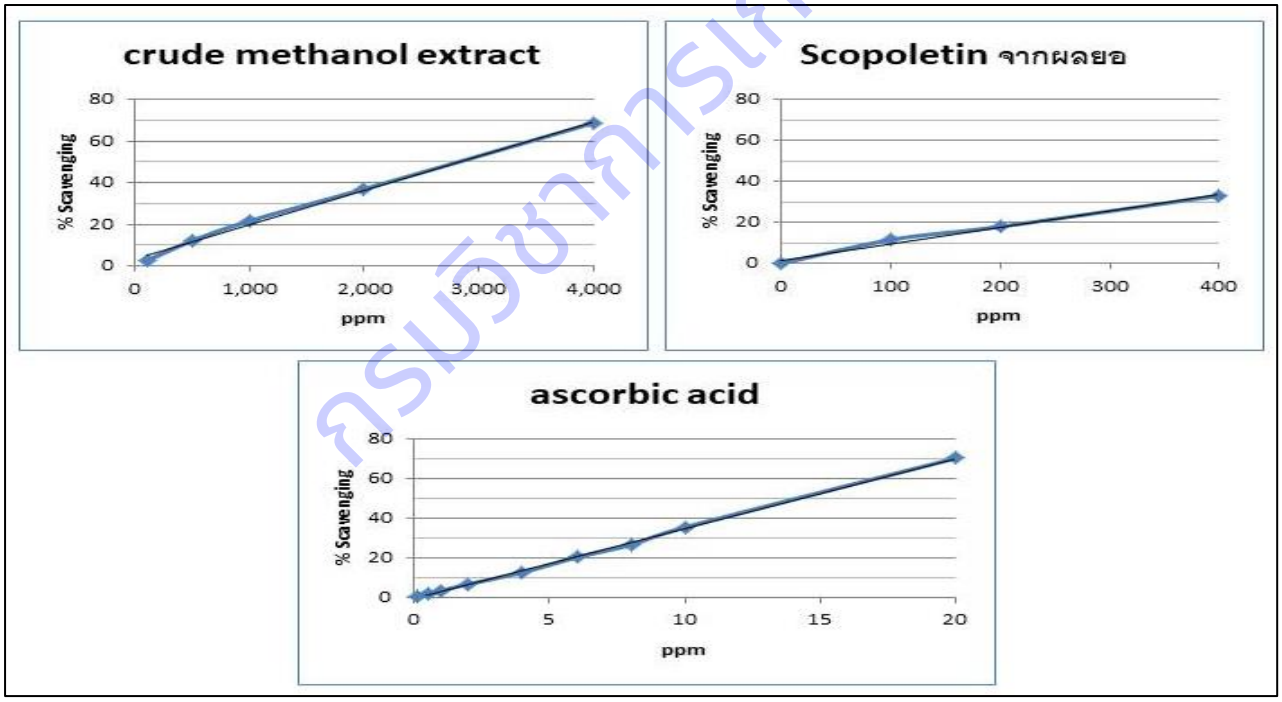
จากการทดสอบแบบ detached fruit ซึ่งเป็นการจำลองการติดเชื้อก่อโรคแอนแทรกโนส และใช้สารสคอพอเลตินความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ppm มาทดสอบควบคุม โดยมีกรดซาลิซิลิกซึ่งเป็นสารที่เคยมีการรายงานการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืช พบว่ามะม่วงที่ได้รับเชื้อเพียงอย่างเดียวจะมีระดับค่า DI-score สูงที่สุดที่ 2.88 $\pm$ 0.27 ในขณะที่การใช้สคอพอเลตินทุกความเข้มข้นสามารถช่วยลดระดับความรุนแรงของโรคได้ โดยมีค่า DI-score อยู่ในช่วง 2.01-2.34 ซึ่งผลดังกล่าวไม่แตกต่างจากการใช้กรดซาลิซิลิกในการควบคุมความรุนแรงของโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

กรมวิชาการเกษตร

ผลจากการประเมินเบื้องต้นในการใช้สคอพอเลตินควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อและทดสอบกับพืชจริง บ่งชี้ว่าสารสคอพอเลตินมีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางการเกษตรโดยใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยตรง (direct inhibition) โดยเฉพาะเชื้อรา นอกจากนี้ยังอาจใช้เป็นสารชักนำความต้านทานในพืชได้ ดังจะเห็นได้จากแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสซึ่งเป็นสารโมเลกุลบ่งชี้การเกิดความต้านทานเพิ่มขึ้นภายในใบคะน้าหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยสารสคอพอเลติน

การทดลองที่ 4 การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารการกำจัดอนุมูลอิสระชนิด DPPH

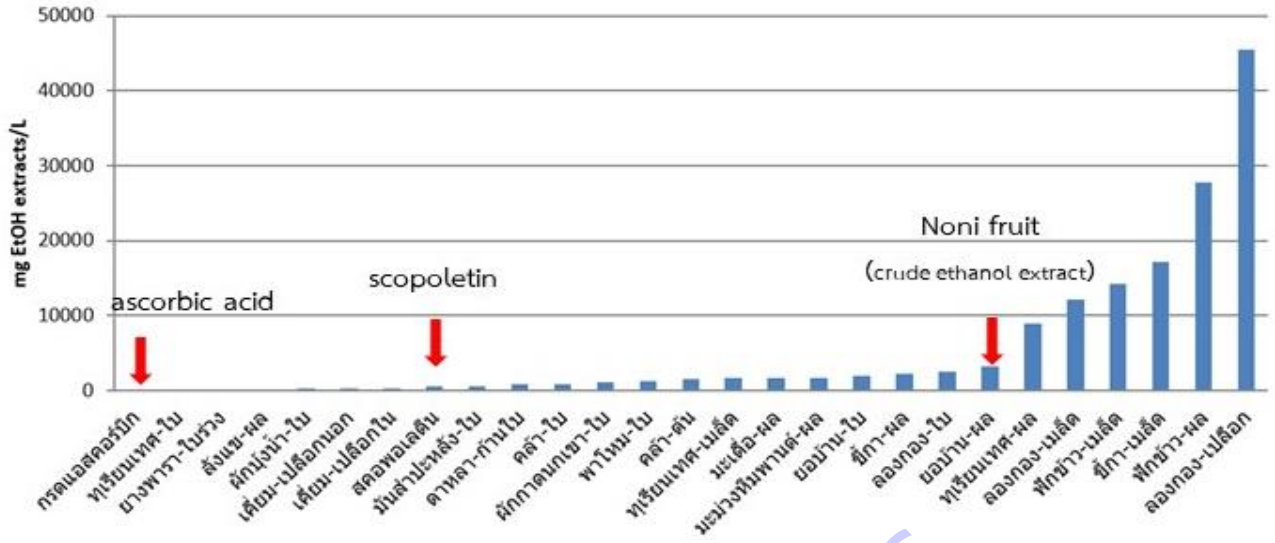
ผลการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสคอพอเลตินที่สกัดและทำบริสุทธิ์จากผลยอบ้าน โดยศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระชนิด 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งผลการศึกษาพบว่า สารสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 0.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า Inhibitory concentration (IC_{50}) หรือค่าความเข้มข้นที่สามารถกำจัดอนุมูล DPPH ให้ลดลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสกัดเอทานอลจากผลยอ และกรดแอสคอบิก ให้ค่า IC_{50} เป็น 2.82 และ 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 33)



ภาพที่ 33 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า เปอร์เซ็นต์ DPPH Scavenging กับความเข้มข้นของสารทดสอบ

นอกจากนี้เมื่อได้ทำการเปรียบเทียบพืชท้องถิ่นชนิดต่างๆในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างจำนวน 25 ตัวอย่าง ๆละ 2 ซ้ำ เพื่อดูศักยภาพในการกำจัดสารอนุมูลอิสระชนิด DPPH ได้ผลดังภาพที่ 34

กรมวิชาการเกษตร



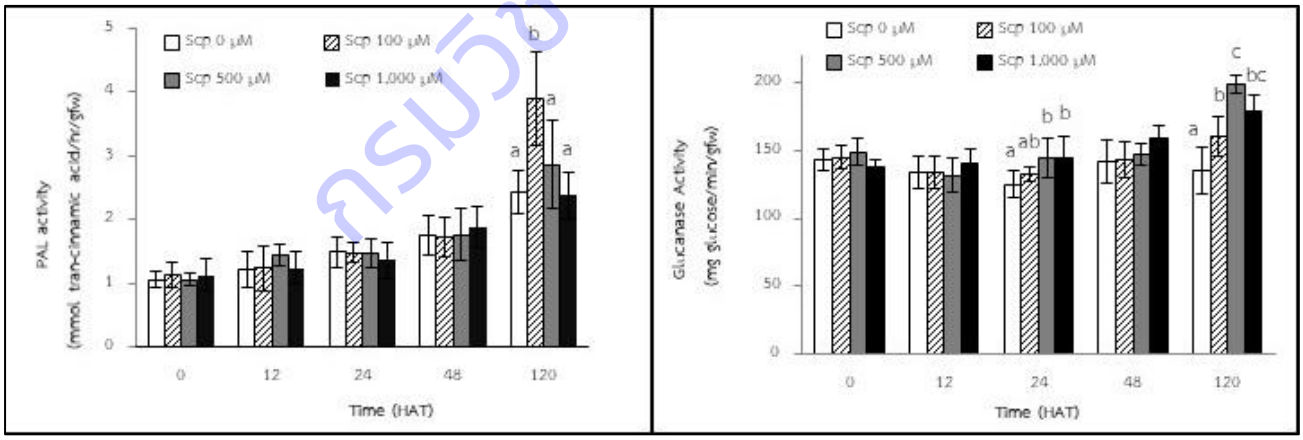
ภาพที่ 34 ความเข้มข้นของสารสคอพอเลตินจากผลยอ กรดแอสคอบิก และสารสกัดเอทานอลจากพืชท้องถิ่นชนิดต่างๆที่พบในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ชนิด DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์

จากภาพที่ 34 จะเห็นได้ว่าสคอพอเลตินจากผลยอมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูง โดยที่ระดับความเข้มข้น ไม่เพียงแต่ยอบ้านที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ ยังมีพืชท้องถิ่นภาคใต้อีกจำนวนหลายชนิดที่มีแนวโน้มในการนำมาใช้ประโยชน์ในแง่ของการช่วยต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน เช่น ทุเรียนเทศ ยางพารา ลังแข ผักบุ้งน้ำ คล้า เป็นต้น ซึ่งพืชเหล่านี้ล้วนมีต้นทุนการผลิตต่ำหากสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้โดยอาศัยคุณสมบัติที่มีอยู่จะสามารถช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับพืชท้องถิ่นอีกทางหนึ่งด้วย

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 5 การทดสอบคุณสมบัติในการใช้สารสคอพอเลตินเป็นสารชักนำความต้านทานในใบยาสูบ

จากการดำเนินการวิเคราะห์แอคติวิตี้ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดความต้านทานในพืช จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์กลูคาเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตนเองในพืชโดยมีหน้าที่ย่อยผนังเซลล์เชื้อที่มีกลูแคนเป็นองค์ประกอบ เอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในวิถี phenylpropanoid อันเป็นวิถีที่มีการสร้างสารทุติยภูมิชนิดต่างๆเพื่อสร้างความแข็งแรงให้แก่พืช และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ช่วยลดความเป็นพิษให้แก่พืช รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างลิกนินเพื่อสริมให้พืชมีความแข็งแรงมากขึ้น โดย infiltrate สคอพอเลตินความเข้มข้น 100, 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์เข้าในใบยาสูบที่ปลูกในสภาพธรรมชาติและใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตี้ของเอนไซม์ต่างๆเกิดขึ้นภายในใบหลังการ infiltrate โดยที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังได้รับทรีตสาร มีการเพิ่มแอคติวิตี้ของเอนไซม์กลูคาเนสขึ้นในใบที่ได้รับสคอพอเลตินทุกความเข้มข้น โดยใบยาสูบที่ทรีตด้วยสคอพอเลติน 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์พบระดับแอคติวิตี้มีความแตกต่างจากใบในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และที่เวลา 120 ชั่วโมงหลังทรีตสาร พบการเพิ่มแอคติวิตี้ของเอนไซม์กลูคาเนสอีกครั้งในใบที่ได้รับสคอพอเลตินทุกความเข้มข้นโดยระดับแอคติวิตี้มีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับแอคติวิตี้ของเอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสในใบยาสูบ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในใบยาสูบที่ได้รับการ infiltrate ด้วยสคอพอเลตินความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 35) โดยพบการเพิ่มดังกล่าวที่เวลา 120 ชั่วโมงหลังทรีตสาร



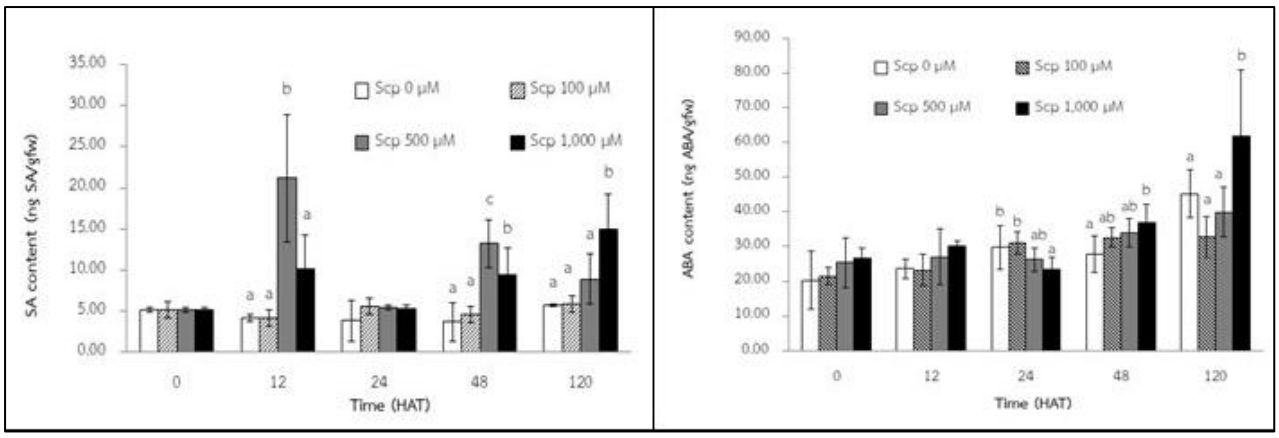
ภาพที่ 35 การเปลี่ยนแปลงของความว่องไวของเอนไซม์ฟินิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส (บน) และเอนไซม์กลูคาเนส (ล่าง) ในใบยาสูบที่ทรีตด้วยสารสคอพอเลตินความเข้มข้น 0, 100, 500, และ 1,000 ไมโครโมลาร์

กรมวิชาการเกษตร

การใช้สารสคอพอเลตินกระตุ้นแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยาสูบ ดำเนินการโดยนำเอนไซม์ที่สกัดจากใบยาสูบมาแยกบนแผ่นเจลอะคริลาไมด์แบบ Native-PAGE และย้อมแอคติวิตี้ของเอนไซม์โดยใช้ guaiacol เป็นซับสเตรท (ภาพที่ 36) พบว่า แถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแต่ละชุดทดสอบในช่วงเริ่มต้น มีความเข้มใกล้เคียงกัน และในชั่วโมงที่ 24 จะเริ่มเห็นชุดใบยาสูบที่ทรีตด้วยสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ให้ความเข้มของแถบแอคติวิตี้สูงที่สุดต่อเนื่องมายังชั่วโมงที่ 48 และ 120 อย่างไรก็ตามที่เวลา 120 ชั่วโมงพบว่าการทรีตสคอพอเลตินลงในใบยาสูบปรากฏแถบของแอคติวิตี้มีขนาดใหญ่ทุกความเข้มข้นซึ่งแถบแอคติวิตี้ดังกล่าวมีความเข้มกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน นอกจากนี้เมื่อทำการเก็บตัวอย่างใบยาสูบในชุดเดียวกับที่ใช้วิเคราะห์เอนไซม์มาทำการย้อมด้วยสาร phloroglucinol เพื่อดูการสะสมของลิกนิน พบปรากฏสีแดงบริเวณก้านใบบริเวณส่วนของระบบท่อลำเลียงโดยสีจะเข้มมากในใบที่ได้รับการทรีตสคอพอเลตินความเข้มข้น 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ขณะที่ชุดควบคุมไม่ปรากฏสีแดง ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีความสอดคล้องกับการปรากฏของลิกนินในใบยาสูบ ทั้งนี้เคยมีการรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสกับลิกนิน โดยบาง isoform ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีความเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการสร้างลิกนินในพืช (Devi & Marimuthu, 2011)

ภาพที่ 36 การย้อมแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยาสูบที่ทรีตด้วยสารสคอพอเลตินความเข้มข้น 0, 100, 500, และ 1,000 ไมโครโมลาร์ บนแผ่นเจลอะคริลาไมด์ชนิดไม่เสียสภาพ (Native-PAGE) ที่เวลาต่างๆ (ซ้าย) และก้านใบยาสูบที่ถูกย้อมด้วยสาร phloroglucinol หลังทรีตสคอพอเลติน 48 ชั่วโมง (ขวา)

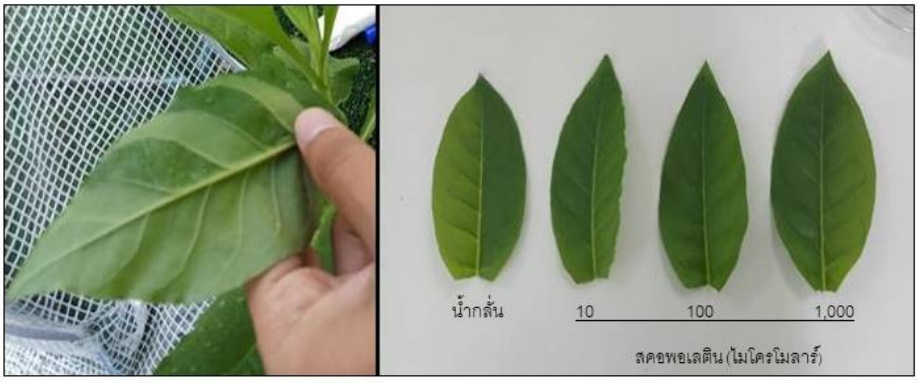
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 37 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดซาลิซิลิก (ซ้าย) และกรดแอบไซซิก (ขวา) ในใบยาสูบที่ทรีตด้วยสารสคอพอเลตินความเข้มข้น 0, 100, 500, และ 1,000 ไมโครโมลาร์ที่เวลาต่างๆ

ผลการกระตุ้นการสะสมสารทุติยภูมิที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานพืช พบว่าสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ให้ผลกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของกรดซาลิซิลิกซึ่งเป็นโมเลกุลส่งสัญญาณหลักในระบบภูมิต้านทานพืชแบบ systemic acquired resistance (SAR) ภายในเวลา 12 ชั่วโมงแรกของการทรีตสาร ดังนั้นการตอบสนองในวิถีนี้จึงเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเพื่อส่งสัญญาณให้มีการสร้างเอนไซม์และสารทุติยภูมิอื่นๆภายในระบบตามมา อย่างไรก็ตามจะเห็นว่ากรดแอบไซซิกซึ่งเป็นโมเลกุลส่งสัญญาณในระบบ ไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นในช่วงแรก แต่กลับพบปริมาณกรดแอบไซซิกสูงขึ้นอย่างชัดเจนในชั่วโมงที่ 48 และ 120 ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการทำงานของกรดซาลิซิลิกมีลักษณะควบคุมสวนทางกับการทำงานของกรดแอบไซซิก สอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยมีการรายงานก่อนหน้าซึ่งระบุว่ากรดซาลิซิลิกและกรดแอบไซซิกมีความสัมพันธ์ในรูปแบบ Antagonistic interaction (Yasuda et al., 2008) และจากการพบการเพิ่มของกรดแอบไซซิกซึ่งจัดเป็นสารทุติยภูมิที่มีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้มภูมิคุ้มกันในพืชผ่านทางวิถีของกรดจัสโมนิก จึงมีแนวโน้มว่าสคอพอเลตินอาจสามารถชักนำความต้านทานในใบยาสูบได้โดยผ่านทางการกระตุ้นภูมิต้านทานในวิถี systemic acquired resistance หรือ induce systemic resistance โดยมีการแสดงออกต่างช่วงเวลา

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 38 ใบยาสูบที่ถูก infiltrate ด้วยสารสคอพอเลติน (ซ้าย) และ สภาพใบยาสูบที่ได้รับสารสคอพอเลติน ความเข้มข้น 0, 100, 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ เมื่อเวลาผ่านไป 120 ชั่วโมง (ขวา)

การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสคอพอเลตินต่อใบยาสูบดำเนินการหลังจากทำการ infiltrate สารสคอพอเลติน ความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ลงบนแผ่นใบบนต้นยาสูบเปรียบเทียบกับการ infiltrate ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำใบยาสูบที่ผ่านการทรีตสารเป็นเวลา 120 ชั่วโมงมาตรวจสภาพใบ พบว่าไม่มีการตายของเซลล์เกิดขึ้นบนแผ่นใบทุกชุดทดสอบ (ภาพที่ 38)

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

ผลจากงานวิจัยภายใต้กิจกรรมนี้พบว่าสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้ถึง 7 ชนิดได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามพบว่าสคอพอเลตินไม่เหมาะสมกับการใช้ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเนื่องจากต้องใช้ความเข้มข้นระดับ 5,000 ppm ประเด็นที่ 2 คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งพบว่าสคอพอเลตินมีคุณสมบัติดังกล่าว โดยเมื่อนำไปใช้กำจัดอนุมูล DPPH พบว่าให้ค่าความเข้มข้นที่สามารถกำจัดอนุมูลดังกล่าวได้อยู่ในระดับต่ำ คือ 0.60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ประเด็นที่ 3 ซึ่งเป็นปัจจุบันมีการรายงานในวารสารต่างๆ น้อยมากสำหรับการนำสคอพอเลตินมาใช้เป็นสารชักนำความต้านทานในพืช โดยผลงานวิจัยพบว่าสคอพอเลตินสามารถชักนำโมเลกุลสัญญาณหลายชนิดซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานในพืช เช่นการชักนำให้มีการสะสมของกรดซาลิซิลิก กรดแอสคอร์บิก และการกระตุ้นให้เอนไซม์มีแอคติวิตี้เพิ่มขึ้น บ่งชี้ถึงการมีคุณสมบัติเป็นสาร elicitor ดังนั้นสคอพอเลตินจึงเป็นสารทางเลือกที่ดีสำหรับการนำไปศึกษาต่อยอดเพื่อใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติต่างๆ ของสารชนิดนี้ เช่น การนำไปปรับใช้ชักนำการต้านทานของพืชเพื่อเสริมกระบวนการผลิต การนำไปใช้เป็นส่วนผสมของฟิล์มเคลือบผลไม้หรือผลิตภัณฑ์ที่ต้องการควบคุมหรือป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ การปรับใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางค์หรือเจลล้างมือ เป็นต้น

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 3

การประยุกต์ใช้สารสคอพอเลตินเพื่อควบคุมโรคในพืชเศรษฐกิจบางชนิด

Application of scopoletin for disease control in some economic crops

ผู้วิจัย

นางสาวเขมมิการ์ โขมพัตร

Ms. Khemmikar Khompatara

นางสาวอภิญญา สุราวุธ

Ms. Apinya Surawoot

นางสาวนพวรรณ นิลสุวรรณ

Ms. Noppawan Nilsuwan

นางสาวปริยากร ฤทธิสุนทร

Ms. Pariyakorn Ritthisoonthorn

นางสาวบุษราคัม อุดมศักดิ์

Ms. Boossaracum U-domsak

นางสรัญญา ช่วงพิมพ์

Ms. Saranya Choungpim

กรมวิชาการเกษตร

คำสำคัญ (TH) สคอพอเลติน, ไฟโตอเล็กซิน, ยอบ้าน, ความต้านทานในพืช, สารชักนำความต้านทาน

คำสำคัญ (EN) scopoletin, phytoalexin, *Morinda citrifolia* L., plant defense**,** elicitor

บทคัดย่อ

ศึกษาการประยุกต์ใช้สคอพอเลตินที่สกัดจากผลยอบ้าน ช่วยลดระดับความรุนแรงของโรคในพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ มะม่วง และ คะน้า โดยสเปรย์สารละลายสคอพอเลตินความเข้มข้น 10, 100, 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงบนมะม่วงที่ผ่านการปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกรดซาลิซิลิกความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่า การสเปรย์ด้วยสคอพอเลตินความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้กรดซาลิซิลิก โดยสามารถลดระดับความรุนแรงของโรค ได้ 18.97, 13.06 และ 4.15 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ที่อายุการเก็บรักษา 7, 10 และ 12 วัน ณ อุณหภูมิห้องตามลำดับ การทดสอบสเปรย์สารละลายสคอพอเลตินความเข้มข้น 100, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับเชื้อบาซิลลัส ซับทิลิส ความเข้มข้น 50 กรัมต่อ 20 ลิตร สารเคมีแมนโคแซป ความเข้มข้น 50 กรัมต่อ 20ลิตร และกรดซาลิซิลิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงบนต้นคะน้าที่ผ่านการปลูกเชื้อ *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltshire ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าทุกสารทดสอบสามารถลดระดับความรุนแรงของโรคใบจุดในคะน้าภายใต้สภาพการปลูกในโรงเรือนเป็นเวลา 7 วัน ได้ 35.34, 24.42, 51.29, 45.01, 46.16 และ 53.01 เปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับชุดควบคุมตามลำดับ ผลการทดสอบนี้ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของสารสคอพอเลตินในการนำมาประยุกต์ใช้ทางการเกษตรโดยการช่วยลดระดับความรุนแรงหลังจากพืชถูกเชื้อบุกรุกแล้ว ดังนั้นแนวทางศึกษาวิจัยในลำดับต่อไปอาจเป็นการใช้สคอพอเลตินเพื่อป้องกันและลดระดับความรุนแรงก่อนการเข้าทำลายโดยเชื้อก่อโรค

กรมวิชาการเกษตร

Abstracts

To study the application of scopoletin extracted from noni fruit to reduce disease severity in economic crops such as mango and kale. Mangos were inoculated with *Colletotrichum. gloeosporioides* for 24 hours. After that, they were sprayed with 10, 100, and 1000 mg/L scopoletin solutions. Compared to 1000 mg/L salicylic acid and using distilled water as a control set. It was found that spraying with scopoletin at a concentration of 1000 mg/L had the similar results as salicylic acid. That is, they were able to reduce disease severity levels by 18.97, 13.06 and 4.15 percent compared to controls during storage for 7, 10 and 12 days at room temperature, respectively.

For kale, the results of spraying 100, 500 and 1000 mg/L of scopoletin solution were compared with *Bacillus subtilis* at 50 g/20 l, Mancozeb at 50 g/20 L and salicylic acid at a concentration of 100 mg/L. with distilled water as a control unit. The 35-day kale plants that were inoculated with *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltshire at a concentration of 1x106 spore/mL for 24 h before being used for the test. The results showed that all test agents were able to reduce the severity of leaf spot disease in kale under 7-day cultivation in greenhouses by 35.34, 24.42, 51.29, 45.01, 46.16 and 53.01 percent reduction. Compared to the control set respectively. The results of this test highlight the potential of scopoletin for agricultural applications by reducing the severity of post-invasive plant infestations. Therefore, the next study approach may be the use of scopoletin to prevent and reduce the severity of pre-infestation by pathogens.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทนำ

ในกระบวนการผลิตทางการเกษตร ปัญหาโรคพืช ทั้งที่เกิดจากแบคทีเรีย เชื้อรา หรือแม้กระทั่งไวรัส นับเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อความเสียหายให้แก่เกษตรกรผู้ผลิตอยู่เสมอ สำหรับในพื้นที่ภาคใต้ ปัญหาโรคพืชที่พบบ่อยครั้ง เช่น การเกิดโรคใบร่วงในยางพาราจากเชื้อไฟทอปธอร่า (*Phytophthora* spp.) โรคเหี่ยวในกล้วยหินจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* โรคเหี่ยวในต้นสับปะรดจากเชื้อ *Closterovirus* เป็นต้น ซึ่งปัญหาจากโรคพืชดังกล่าวล้วนสร้างความเสียหายต่อคุณภาพของผลผลิตทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ สำหรับในปัจจุบันเมื่อพบว่ามีการระบาดของโรคเกิดขึ้น ทางเลือกของเกษตรกรในการแก้ปัญหายังคงมุ่งไปยังการเลือกใช้สารเคมีสังเคราะห์ซึ่งต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง เพื่อไม่ให้เกิดผลกระทบต่อความปลอดภัยเกษตรกรผู้ใช้สารเคมีนั้นๆโดยตรง รวมไปถึงการตกค้างของสารเคมีในผลผลิต ซึ่งนำไปสู่ความไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค อีกทั้งยังถูกหยิบยกมาเป็นประเด็นด้านอาหารปลอดภัยเพื่อใช้พิจารณาในการตกลงซื้อขายสินค้า

ปัจจุบันหน่วยงานภาครัฐได้เข้ามามีส่วนในการควบคุมดูแลคุณภาพสินค้าเกษตรโดยสนับสนุนให้เกษตรกรผลิตตามระบบเกษตรดีที่เหมาะสม (Good Agricultural Practice: GAP) และได้เร่งส่งเสริมนโยบายเพิ่มการทำเกษตรอินทรีย์เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีความปลอดภัยปราศจากสารเคมีปนเปื้อน โดยได้กำหนดเป็นแผนยุทธศาสตร์เกษตรอินทรีย์แห่งชาติ มีเป้าหมายที่จะเพิ่มพื้นที่เกษตรอินทรีย์ เพิ่มสัดส่วนตลาดในประเทศ ตลาดส่งออกเป็น 40:60 และยกระดับกลุ่มเกษตรอินทรีย์วิถีพื้นบ้านเพิ่มขึ้น ดังนั้นเพื่อรองรับแนวทางการผลิตพืชดังกล่าวข้างต้นภายใต้สภาวะที่การเกิดโรคพืชยังคงพบอยู่เสมอจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาและวิจัยเพื่อให้ได้สารชีวภัณฑ์ (biocontrol) สำหรับเป็นทางเลือกให้แก่เกษตรกรนำไปปรับใช้แก้ปัญหาโรคพืชแทนการใช้สารเคมีทั้งนี้ปัจจุบันสารชีวภัณฑ์สำหรับใช้ป้องกันโรคพืชได้มีการผลิตเชิงการค้าโดยภาคเอกชน แต่ยังคงมีตัวเลือกไม่มากนักและส่วนใหญ่จะเป็นการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เช่น เชื้อราไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma harzianum*) เชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส ซับทีลิส (*Bacillus subtilis*) เชื้อรากลิโอคลาเดียม ไวเรน (*Gliocladium virens*) เชื้อแบคทีเรียสเตรปโตมัยซีส (*Streptomyces* sp.) ซึ่งจำเป็นต้องใช้ความรู้ทางด้านจุลชีววิทยาในการผลิตผลิตภัณฑ์เพื่อให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้แก้ปัญหาในแปลงต่อไปได้

สคอพอเลติน เป็นสารทุติยภูมิที่มีมวลโมเลกุลต่ำ จุดเดือดสูง มีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ภายใต้สภาวะที่ถูกกระตุ้นทั้งจากตัวกระตุ้นแบบชีวภาพและทางกายภาพ พืชสามารถสร้างสารชนิดนี้เพิ่มขึ้นมาได้อีกในปริมาณมาก โดยอาจพบได้ในบริเวณชิ้นส่วนต่างๆ เช่น ลำต้น ราก ใบ และผล อย่างไรก็ตามสารนี้ถูกสร้างขึ้นในพืชเพียงบางชนิด โดยจุดเด่นของสารชนิดนี้คือการมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(antimicrobial) รวมทั้งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ปัจจุบันจึงได้มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในทางการแพทย์ อย่างไรก็ตามการศึกษาและนำสคอพอเลตินมาใช้ประโยชน์ในเชิงการเกษตรเพื่อป้องกันหรือลดระดับความรุนแรงจากการถูกเชื้อรุกราน สำหรับประเทศไทยยังคงมีข้อมูลน้อย

นอกจากการศึกษาเพื่อพัฒนาด้านการอารักขาพืชแล้ว การศึกษาสารสำคัญในพืชที่สามารถหาได้ง่าย และราคาต่ำยังนับเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชชนิดนั้นๆได้ โดยเฉพาะในพืชบางชนิดที่มักประสบปัญหาผลผลิตล้นตลาด เช่น ลองกอง หากมีแนวทางช่วยเหลือเกษตรกรโดยการนำผลผลิตดังกล่าวมาสกัดสารสำคัญที่สามารถพัฒนาไปใช้ต่อยอดในอีกหลากหลายสาขาทั้งในงานด้านการเกษตร ตลอดจนงานด้านอุตสาหกรรมและการแพทย์ จะก่อให้เกิดประโยชน์ในเชิงเศรษฐกิจอีกมากมาย นอกจากนี้การศึกษาแนวทางในการนำสคอพอเลตินที่สกัดได้จากพืชมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร โดยมุ่งเป้าหมายให้เกษตรกรสามารถนำความรู้มาปรับใช้ในแปลงเกษตรด้วยตนเองโดยใช้วิธีการสกัดที่ไม่ซับซ้อนมากนัก ไม่ต้องใช้เทคโนโลยีระดับสูงที่เกษตรกรเข้าถึงได้ยาก และอาศัยวัตถุดิบที่หาได้ง่าย ต้นทุนการผลิตไม่สูงจำเป็นต้องดำเนินการอย่างเร่งด่วนเพื่อรองรับแนวทางการส่งเสริมการเกษตรของทางภาครัฐที่มุ่งไปยังประเด็นการสร้างความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคจากปัญหาสารเคมีตกค้าง การรณรงค์ลดการใช้สารเคมีแก้ปัญหาโรคพืช รวมทั้งลดความเสียหายของผลผลิต จึงจำเป็นต้องสร้างทางเลือกในการแก้ปัญหาโรคพืชให้แก่เกษตรกรผู้ผลิตด้วยควบคู่กัน

การทบทวนวรรณกรรม

จากปัญหาการเกิดโรคพืชในกระบวนการผลิตทางการเกษตร ส่งผลให้มีการใช้สารเคมีเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว และส่งผลกระทบต่อเนื่องมายังสุขภาพของทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค แนวทางในการแก้ไขปัญหาโดยภาครัฐจึงมุ่งควบคุมกระบวนการผลิตทั้งการควบคุมผ่านระบบการเกษตรดีที่เหมาะสม (GAP) และ การผลิตพืชอินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตพืชอินทรีย์ได้ถูกกำหนดให้เป็นยุทธศาสตร์ระดับประเทศ คณะรัฐมนตรีมีมติเห็นชอบยุทธศาสตร์การพัฒนาเกษตรอินทรีย์แห่งชาติ พ.ศ. 2560-2564 ซึ่งเป็นแผนฉบับที่ 2 หลังจากที่แผน 1 สิ้นสุดไปตั้งแต่ปี 2554 โดยในแผนใหม่นี้ ตั้งวิสัยทัศน์ให้ "ประเทศไทยเป็นผู้นำในระดับภูมิภาคด้านการผลิต การบริโภค การค้าสินค้าและการบริการเกษตรอินทรีย์ ที่มีความยั่งยืนและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล"โดยมีเป้าหมายที่จะเพิ่มพื้นที่เกษตรอินทรีย์ให้เป็น 600,000 ไร่ในปี 2564 และมีเกษตรกรที่ทำเกษตรอินทรีย์ไม่น้อยกว่า 30,000 รายรวมทั้งเพิ่มสัดส่วนตลาดในประเทศ-ตลาดส่งออกเป็น 40:60 และยกระดับกลุ่มเกษตรอินทรีย์วิถีพื้นบ้านเพิ่มขึ้น (http://www.greennet.or.th/news/1907 ; accessed 6/23/17) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาปัญหาและอุปสรรคในการปรับเปลี่ยนเป็นการผลิตพืชผักอินทรีย์ โดยณัชชาและดุสิต, 2556 ได้รายงานว่าเกษตรกรส่วนใหญ่ขาดความรู้เกี่ยวกับการห้ามใช้ปุ๋ยเคมีและใช้สารเคมีใดๆในระบบการผลิตพืชทั้งเกษตรกรยังเลือกที่จะใช้สารเคมีในการควบคุม

กรมวิชาการเกษตร

ศัตรูพืช ดังนั้นการแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้นต้องถ่ายทอดองค์ความรู้เกี่ยวกับการใช้ปุ๋ยอินทรีย์หลักการจัดการระบบนิเวศการใช้สารชีวภัณฑ์และจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์

1 สารชีวภัณฑ์เพื่อการแก้ปัญหาโรคพืชในปัจจุบัน

ปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารชีวภัณฑ์เพื่อนำมาใช้แก้ปัญหาโรคพืชเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีโดยนักวิจัยจากหลายหน่วยงาน ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเติบโตเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่าเชื้อก่อโรคพืช หรือมีคุณสมบัติในการชักนำให้พืชสามารถสร้างภูมิคุ้มกันในตัวเอง หรือส่งเสริมให้พืชเจริญเติบโตและมีความแข็งแรงทำให้สามารถทนต่อการถูกเชื้อก่อโรคเข้าทำลาย เช่น การพัฒนาการผลิตชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus velezensis* เพื่อเป็นทางเลือกเพิ่มเติมซึ่งจากการวิจัยของมานะ และคณะ (2553) พบว่าสูตรชีวภัณฑ์ *B. velezensis* รูปแบบของเหลวแขวนตะกอนเข้มข้นสามารถลดเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายที่รากพืชของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าที่ปรากฏในระบบปลูกและยังพบว่าการฉีดพ่นชีวภัณฑ์มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของพืชด้วยเช่นกันอย่างไรก็ตามในกระบวนการผลิตชีวภัณฑ์ดังกล่าวผู้วิจัยได้ระบุถึงปัญหาในแง่ต้นทุนของการผลิตชีวภัณฑ์ดังกล่าวโดยมีราคาที่ค่อนข้างสูงซึ่งอาจจะเป็นอุปสรรคต่อการนำไปใช้โดยเกษตรกรผู้ปลูกพืช หรือ การใช้ *B. subtilis* ซึ่งสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ถึง 65-70 ชนิดโดยสารที่ผลิตขึ้นสามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ได้แก่ iturin A, surfactin, bacilysin, fengymycin, bacliomycin, albolutin, bacillin และ fungistatin รวมทั้งยังสามารถผลิตเอนไซม์ chitinase และ β-1,3 glucanase ซึ่งมีผลต่อการชักนำภูมิต้านทานพืชได้หรือการใช้ *Pseudomonas* spp. ซึ่งสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งเชื้อโรคพืชได้ดีคือ pyoluteorin, 2,4-diacetylphluoroglucinol (DAPG), siderophore, pyrrolnitrin, phenazine-1-carboxylic acid (PCA), antharanilic acid, phenazine-1-carboxamide (PCN) และviscosinamide (พันศักดิ์ และคณะ 2558) นอกจากนี้ชีวภัณฑ์อีกชนิดหนึ่งที่มีการใช้อย่างแพร่หลายได้แก่เชื้อไตรโคเดอร์ม่า ได้ถูกนำมาทดสอบโดย จินันทนา และสุมาฬี ในปี 2558 โดยนำ ชีวภัณฑ์ชนิดผง (wettable powder) ของเชื้อรา*Trichoderma virens* และ *T. harzianum* มาทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคของข้าว ซึ่งพบว่า การพ่นด้วยชีวภัณฑ์เชื้อราให้ผลดีเทียบเท่าหรือดีกว่าการพ่นด้วยสารเคมีกำจัดรา mancozeb นอกจากนี้ในเชิงการค้าพบว่าผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายเพื่อการป้องกันกำจัดโรคพืชมักเป็นสารในกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในกลุ่มเชื้อรา *Trichoderma* spp., เชื้อจุลินทรีย์ *B. subtilis*, เชื้อรา *Gliocladium virens*, เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. (http://www.kasetkawna.com/product; accessed 6.23.17) หรือ สารสกัดจากพืช เช่น ข่า ว่านน้ำ ใบบัวบก และว่านหางจระเข้(http://www.nanagarden.com ; access 6.23.17)

กรมวิชาการเกษตร

2 สคอพอเลติน (Scopoletin)

สคอพอเลติน เป็นสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อตอบสนองต่อการกระตุ้นทั้งตัวกระตุ้นชีวภาพ เช่น เชื้อจุลินทรีย์ หรือ ตัวกระตุ้นทางกายภาพ เช่น การเกิดบาดแผล หรือการได้รับรังสีบางชนิด สคอพอเลตินมีขนาดโมเลกุล 192.17 กรัมต่อโมล และจุดหลอมเหลวที่ 204 องศาเซลเซียส สคอพอเลตินจัดอยู่ในกลุ่มไฟโตอเล็กซินที่มีการรายงานการพบในพืชหลายชนิด เช่น พืชในตระกูลผักบุ้ง *(Convolvulus microphyllus)* (Zafar *et al*., 2005), พืชตระกูลยาสูบ *(Nicotiana benthamiana)* (Vialart *et al*., 2012), ยางพารา (*Hevea brasiliensis)* (Churngchow and Rattarasarn, 2001), มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*)(Andreae and Andreae, 1949), ผักคราดหัวแหวน *(Spilanthes acmella* Murr.) (Abyari *et al.,* 2016), ยอ *(Morinda citrifolia* Linnaeus) (West and Deng, 2010), มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) (BA *et al*., 2017) และทานตะวัน (*Helianthus annuus*) (Saftić-Panković *et al.,* 2006) โดย Gutierrez *et al.,* (1995) ได้นำใบของทานตะวันมาศึกษากระบวนการสะสมของสคอพอเลติน พบว่าสามารถเหนี่ยวนำกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ออกซิไดซ์สคอพอเลตินให้เป็นสารประกอบที่มีสีและไม่ละลายน้ำ หลังการกระตุ้นใบด้วย $CuCl_2$ หรือน้ำตาลซูโครส โดยเห็นการเรืองแสงเกิดขึ้นภายใต้แสง UV ในขณะที่กระตุ้นด้วย salicylic acid, dichloroisonicotinic acid หรือ glutathione ไม่เกิดการเรืองแสง การสร้างสารประกอบนี้ในพืชจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่มากระตุ้นและอายุของเนื้อเยื่อพืช ในยางพารามีการศึกษาปริมาณของสคอพอเลตินเพื่อใช้ในการบ่งบอกระดับความต้านทานโรคของพันธุ์ยางชนิดต่างๆได้ โดยพันธุ์ยางที่อ่อนแอจะผลิตสคอพอเลตินได้น้อยกว่าพันธุ์ต้านทาน (Churngchow and Rattarasarn, 2001) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Khompatara, 2017 พบว่าในสภาวะปกติใบยางพาราชำถุงพันธุ์ RRIM600 สามารถตรวจพบสคอพอเลตินได้ที่ระดับ 0.2-0.4 มิลลิกรัม จากใบยางสด 1 กิโลกรัม

3 คุณสมบัติของสารสคอพอเลติน

Tegos*et al.* (2002) ได้รายงานว่าสคอพอเลตินมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยยับยั้งกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบต่อมา Rigane *et al*. (2013) ได้รายงานถึงคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียโดยใช้สารสกัดด้วยเมธานอลจากใบและดอกของต้น *Calendula officinalis* ซึ่งมีสารสคอพอเลตินเป็นส่วนประกอบสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 3 ชนิดและเชื้อราอีก 2 ชนิด โดยได้ชี้ว่าผลที่ได้สามารถนำไปใช้ในเชิงอุตสาหกรรมเพื่อการผลิตสาร bioactive จากพืชได้ และในปีเดียวกันนี้ Acharya *et al.* (2013) ได้รายงานถึงคุณสมบัติของสคอพอเลตินในการยังยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella Typhi* ได้นอกจากคุณสมบัติด้านการเป็นสาร antimicrobial แล้ว สคอพอเลตินยังได้รับการรายงานถึงคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยสคอพอเลตินที่สกัดจาก *Sinomonium acutum สามารถกำจัดอนุมูล*superoxide anion ในปฏิกิริยา xanthine/xanthine oxidase (Shaw *et al.,* 2003)

กรมวิชาการเกษตร

นอกจากนี้ Malik *et al.* (2011) ได้รายงานว่าสคอพอเลตินสามารถนำมาใช้กำจัดอนุมูลอิสระชนิด 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), อนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ได้ โดยผู้วิจัยชี้ว่าสคอพอเลตินควบคุมอนุมูลอิสระได้โดยผ่านทางกระบวนการที่หลากหลาย เช่น การขนส่งกรดไขมันสายยาวในไมโตคอนเดรีย ทั้งนี้สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) มีความสำคัญคือเป็นสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชั่นเช่นกระบวนการเกิดสนิมของเหล็ก การเกิดสีน้ำตาลในผลไม้ (เช่นในแอปเปิ้ล) หรือการทำให้น้ำมันพืชเหม็นหืน หรือกระบวนการออกซิเดชั่นที่เกิดในร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ เช่น การย่อยสลายโปรตีนและไขมันจากอาหารที่กินเข้าไป มลพิษทางอากาศ การหายใจควันบุหรี่ รังสียูวี ปัจจัยเหล่านี้ล้วนทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ซึ่งสร้างความเสียหายได้ทั้งในพืชและในร่างกายมนุษย์ จึงได้มีการศึกษาหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งต่างๆ สำหรับนำไปประยุกต์ใช้ทั้งทางด้านการเกษตร ด้านเภสัชกรรม รวมไปถึงด้านการแพทย์

4 การประยุกต์ใช้สารสคอพอเลตินทางด้านการเกษตร

เนื่องจากสารชนิดนี้มีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อรา แบคทีเรีย จึงได้มีการนำมาปรับใช้ทางด้านการเกษตร เช่น การลดการเกิดโรคราเขียวจากเชื้อ *Penicillium digitatum* บนผลส้ม (Sanzani *et al*., 2014), การยับยั้งการเจริญของไมซีเลียมของเชื้อ *Alternaria alternate* ซึ่งก่อให้เกิดโรคจุดสีน้ำตาลในใบยาสูบ (Sun *et al*., 2014), การยับยั้งการสังเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซินโดยเชื้อ *Aspergillus flavus ในมันฝรั่ง (Gnonlonfin et al., 2011)* การยับยั้งการสร้างสปอร์และการเจริญของไมซิเลียมของเชื้อราชนิดต่างๆเพื่อการเก็บรักษาข้าวโพด เช่น *Penicillium* sp., *Aspergillus, Fusarium* (Ba *et al*., 2017) นอกจากนี้ Sun *et al*., 2014 ได้ทดสอบผลของสารสคอพอเลตินต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Alternaria alternate*ทั้งแบบการยับยั้งโดยตรง (direct inhibition) และแบบการยับยั้งผ่านการกระตุ้นความต้านทานในพืช (induced resistance) โดยในการทดสอบแบบ direct inhibition บนอาหาร PDA ที่มีสารสคอพอเลตินผสมอยู่ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการเจริญของเชื้อ *Alternaria* เหลือ 68 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นไปที่ 480 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการเจริญของเชื้อดังกล่าวเหลือเพียง 14 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้พ่นสารสคอพอเลติน และในการทดสอบการนำไปใช้กระตุ้นความต้านทานในพืช ได้ชักนำให้มีการสร้างความต้านทานในใบยาสูบเป็นเวลา 7 ชั่วโมง โดยทำการแช่ก้านใบยาสูบในสารละลายสคอพอเลตินความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และ 500 ไมโครโมลาร์ เทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นน้ำกลั่นจากนั้นทำการปลูกเชื้อ *Alternaria* แล้วตรวจดูการเกิดแผลหลังจากปลูกเชื้อไปแล้ว 5 วัน พบว่าขนาดของรอยแผลในชุดทดสอบที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสคอพอเลตินทั้งสองระดับความเข้มข้นสามารถลดขนาดของรอยแผลที่เกิดจากเชื้อ *Alternaria* ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้สคอพอเลตินภายนอกสามารถเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ *Alternaria* ในใบยาสูบได้ซึ่งกระบวนการต้านทานภายในพืช (Plant defense) นั้นเป็นกระบวนการหนึ่งที่พืชใช้ปรับตัวเองเพื่อต่อต้านการบุกรุกของเชื้อโรค

กรมวิชาการเกษตร

โดยมีวิธีการต่างๆกัน เช่น การทำให้เซลล์ที่กำลังติดเชื้อและเซลล์ที่อยู่ข้างเคียงตาย เรียกว่าการเกิด hypersensitive cell death โดยกระบวนการนี้จะสังเกตเห็นรอยไหม้สีน้ำตาล (necrosis), การสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค ที่เรียกว่าไฟโตอเล็กซิน, การสร้างโปรตีนขึ้นมาทำลายเชื้อโรค ที่เรียกว่า pathogenesis related-proteins (PR-proteins) เช่น เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสหรือเอนไซม์ไคติเนสเพื่อย่อยผนังเซลล์ของผู้รุกราน, การกักบริเวณเชื้อไม่ให้ลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงโดยกระบวนการสร้างลิกนินหรือซูเบอรินพอกบริเวณผนังเซลล์พืช และการสร้างผนังเซลล์พืชให้แข็งแรงขึ้น เช่น การสร้างแคลโลส แนวทางการประยุกต์ใช้ความรู้ทางชีวเคมีเพื่อป้องกันโรคพืชจึงนำไปสู่การค้นหาสารกระตุ้นความต้านทานภายในพืช หรืออิลิซิเตอร์ (elicitor) ซึ่งอาจเป็นได้ทั้งตัวกระตุ้นชีวภาพ เช่น เชื้อรา จีนัส *Trichoderma*, *Penicillium simpliclassimum*, Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), สารสกัดจากสาหร่าย หรือตัวกระตุ้นเคมี เช่น Acibenzolar-S-methyl (ASM), β-Aminobutyric acid (BABA), Phosphite, Probenazole, Salicylic acid (SA) หรือตัวกระตุ้นทางกายภาพ เช่น การใช้อุณหภูมิสูงหรือต่ำ การใช้รังสีแกมม่า หรือการกระตุ้นด้วยแสงยูวี

นอกเหนือจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยตรงแล้วสารสคอพอเลตินยังมีอีกคุณสมบัติหนึ่งคือการเป็นสารต้านการเกิดอนุมูลอิสระ โดยจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างจากกระบวนการตอบสนองอย่างรวดเร็ว (Hypersensitive response, HR) เมื่อพืชถูกรุกราน ซึ่งโดยทั่วไปเมื่อถูกบุกรุก พืชจะตอบสนองโดยการสร้างสารเคมีขึ้นมาต้านผู้บุกรุก เช่น การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซูเปอร์ออกไซด์ ไนตริกออกไซด์ ฯลฯ ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตาม ผลของกิจกรรมที่เกิดขึ้นจะก่อให้เกิดการสะสมของอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์พืชและส่งผลให้เซลล์พืชในบริเวณนั้นเกิดการถูกทำลายไปด้วย ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระที่พืชสร้างขึ้นจึงทำหน้าที่ในการช่วยลดพิษภายในตัวพืชไม่ให้เซลล์พืชถูกทำลาย (จีระภา, 2551) ซึ่งรายงานการศึกษาและประยุกต์ใช้สารชนิดนี้บ่งชี้ให้เห็นถึงความสำคัญและคุณค่าในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆได้หลากหลายโดยสารสคอพอเลตินนี้มีแหล่งกำเนิดจากพืช ดังนั้นคุณประโยชน์ของการศึกษาปริมาณสารชนิดนี้ในพืชที่มีแนวโน้มจะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการสกัดสารสคอพอเลตินก็จะก่อให้เกิดการเพิ่มทางเลือกในการสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรอีกทางหนึ่งด้วย

3. วัตถุประสงค์ของกิจกรรม

3.1 การควบคุมโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงด้วยสารสคอพอเลตินในห้องปฏิบัติการ

3.2 การใช้สารสคอพอเลตินควบคุมการเกิดโรคใบจุดในคะน้าในเรือนทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

ระเบียบวิธีวิจัย

กิจกรรมที่ 3 การประยุกต์ใช้สารสคอพอเลตินเพื่อควบคุมโรคในพืชเศรษฐกิจบางชนิด(ปีเริ่มต้น. 2564– สิ้นสุด 2564)

การทดลองที่ 6 การควบคุมโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงด้วยสารสคอพอเลตินในห้องปฏิบัติการ

<u>สิ่งที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. สารสคอพอเลตินบริสุทธิ์
2. มะม่วงดิบ
3. เชื้อทดสอบที่แยกได้จากมะม่วงที่เป็นโรค
4. ผลยอ
5. กล่องพลาสติกใส
6. วัสดุสารเคมีสำหรับใช้ในการสกัดสารสคอพอเลติน จัดเตรียมและทดสอบเชื้อ

<u>วิธีปฏิบัติการทดลอง</u>

1. เตรียมสารสคอพอเลตินจากผลยอบ้าน โดยเก็บตัวอย่างผลยอบ้านนำมาหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็กประมาณ 1x1x1 เซ็นติเมตร ทำการสกัดสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์สำหรับใช้ในการทดลอง โดยนำมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักแห้งคงที่ จากนั้นบดด้วยเครื่องบดตัวอย่างแห้ง นำมาสกัดแบบ maceration โดยแช่ด้วยเอทานอล ในอัตราส่วน ผงยอแห้ง 200 กรัม ต่อเอทานอล 600 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีวันละ 6 ชั่วโมง แยกเก็บส่วนสารละลายใสทุก 2 วัน โดยเติมเอทานอลปริมาตรเดิม ในวันที่ 2 และ 4 จากนั้นในวันที่ 7 ทำการรวบรวมสารละลายใสที่เก็บได้ทั้งหมดมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วนำไปแยกเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator สารสกัดเอทานอลที่ได้นำไปแยกส่วนที่ไม่มีขั้วออกโดยการล้างด้วยเฮกเซน จากนั้นนำสารสารกัดที่เหลือบดผสมกับซิลิกาเจลแล้วนำไปแยกผ่านคอลัมน์ซิลิกาโดยใช้ระบบ gradient ตั้งแต่ 0-60 เปอร์เซ็นต์ เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน ทำการแยกเฉพาะ fraction ที่ตรวจพบสารสคอพอเลตินโดยทดสอบบนแผ่น TLC จากนั้นทำการรวม fraction แล้วนำไปแยกอีกครั้งด้วยคอลัมซิลิกา โดยใช้ระบบตัวชะคือ 2 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ตรวจติดตาม fraction ที่ ออกจากคอลัมน์ด้วยการแยกบนแผ่น TLC ซึ่งใช้ระบบตัวชะเดียวกันกับระบบคอลัมน์ คือ 2เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทน และใช้แผ่น TLC ชนิด normal phase จากนั้นทำการรวบรวม fraction ที่มีสคอพอเลตินแสดงเพียงแถบเดียวภายใต้แสงยูวีที่ระดับความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร มาแยกส่วนของตัวทำละลายออก นำสคอพอเลตินที่สกัดที่ ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองมาใช้ในการทดสอบ

2. นำผลมะม่วงที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส มาแยกเชื้อสาเหตุด้วยวิธี tissue transplanting โดยการตัดเนื้อเยื่อเปลือกบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อที่แสดงอาการของโรคขนาดประมาณ 5x5 มิลลิเมตร นำเนื้อเยื่อดังกล่าวไปฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง นำเนื้อเยื่อที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาวางในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบลักษณะโคโลนีของเชื้อรา รูปร่างสปอร์ ภายใต้กล้อง

กรมวิชาการเกษตร

จุลทรรศน์ เพื่อทำการบ่งบอกชนิดของเชื้อรา เมื่อได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้วทำการ sub culture ลงในอาหารวุ้นเอียง (PDA Agar Slant) เชื้อละ 2 ซ้ำ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้เป็น Stock culture เพื่อทำการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อสาเหตุโรค และทำการทดสอบสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *colletotrichum* มาใช้สำหรับการทดสอบต่อไป

3. นำผลมะม่วงที่สมบูรณ์และไม่เป็นโรคมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ วางผึ่งให้แห้ง ปลูกเชื้อ *Collectotricum* ลงบนผลมะม่วง แล้วบ่มเชื้อไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อชักนำให้มะม่วงเกิดโรค

4. ทดสอบผลการใช้สารสคอพอเลตินช่วยละระดับความรุนแรงของโรคแอนแทรกโนส โดยนำมะม่วงที่ถูกชักนำให้เกิดโรคแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (จากข้อ 3) มาสเปรย์ด้วยสารสคอพอเลตินที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ชุดควบคุมคือน้ำกลั่นเป็น negative control และ กรดซาลิซิลิก 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็น positive control ในอัตรา 5 มิลลิลิตรต่อผล นำมาผึ่งลมให้แห้ง แล้วพ่นซ้ำอีก 1 ครั้ง นำมะม่วงที่ผึ่งแห้งแล้ววางเรียงลงบนถาดโฟม หุ้มด้วยพลาสติกใส เก็บในกล่องพลาสติกใสที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 27-28 องศาเซลเซียส) วางแผนการทดลองแบบ RCB 5 ซ้ำ (ซ้ำละ 4 ผล) 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (negative control)

กรรมวิธีที่ 2 สารละลายสคอพอเลินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 3 สารละลายสคอพอเลตินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 4 สารละลายสคอพอเลตินความเข้มข้น1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 5 สารละลายกรดซาลิซิลิก ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (positive control)

5. ตรวจวัดอัตราการเกิดโรคและระดับความรุนแรงของโรคบนผลมะม่วงหลังจากเก็บไว้ 1 สัปดาห์ และทุกๆ 2 วันหลังจากนั้น จนถึงวันที่ 15 หรือจนกว่ามะม่วงจะเสียสภาพ

6. ทำการทดสอบซ้ำอีก 2 ครั้งทั้งกระบวนการ ครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

<u>การบันทึกข้อมูล</u>: - อัตราการเกิดโรคและระดับความรุนแรงของโรคจำนวน 5 ซ้ำในแต่ละชุดทดสอบ โดยใช้วิธีการประเมินความรุนแรงตามวิธีของ วิชัยและคณะ, 2542 ซึ่งแบ่งเป็น 6 ระดับ ตามปริมาณพื้นที่ของรอยแผลต่อพื้นที่ผิวมะม่วงทั้งหมด ดังนี้

ระดับที่ 1 เกิดอาการโรค เป็นแผลขนาดเล็กเท่าหัวเข็มหมุดจำนวน 2-3 แผนและมองเห็นไม่ชัดเจน

ระดับที่ 2 แผนค่อนข้างใหญ่ขนาด 3-4 มิลลิลิตร จำนวน 3-4 แผล มีเนื้อที่ของแผลต่ำกว่าร้อยละ 5 ของเนื้อที่ผล

ระดับที่ 3 เป็นโรคร้อยละ 5-12 ของเนื้อที่ผล

ระดับที่ 4 เป็นโรคร้อยละ 13-15 ของเนื้อที่ผล

ระดับที่ 5 เป็นโรคร้อยละ 26-50 ของเนื้อที่ผล

ระดับที่ 6 เป็นโรคมากกว่าร้อยละ 50 ของเนื้อที่ผล

- บันทึกภาพมะม่วงที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลา

สถานที่ดำเนินการทดลอง: ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์จุลินทรีย์และสารพิษจากจุลินทรีย์ กลุ่มพัฒนาฯ สวพ.8 และอาคารปฏิบัติการผลิตและขยายชีวภัณฑ์ภาคใต้ตอนล่าง ศวพ.สงขลา
ระยะเวลาในการดำเนินการ: เริ่มต้นตุลาคม 2563 สิ้นสุด กันยายน 2564 รวม 1 ปี

การทดลองที่ 7 การใช้สารสคอพอเลตินควบคุมการเกิดโรคใบจุดในคะน้าในเรือนทดลอง

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. สารสคอพอเลตินบริสุทธิ์
2. เชื้ออัลเทอร์นาเรียที่แยกได้จากต้นคะน้าที่เป็นโรค
3. เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตร
4. ต้นคะน้า
5. สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช ได้แก่ แมนโคแซ็บ ซึ่งมีจำหน่ายในทางการค้าและเกษตรกรใช้โดยทั่วไป
7. วัสดุและสารเคมีสำหรับใช้ในการสกัดสารสคอพอเลติน จัดเตรียมเชื้อทดสอบ และปลูกพืชทดสอบ
8. กล้องจุลทรรศน์

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เตรียมสารสคอพอเลตินจากผลยอบ้าน โดยเก็บตัวอย่างผลยอบ้านนำมาหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก นำผลยอบ้านมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นบดด้วยเครื่องบดตัวอย่างแห้ง นำมาสกัดแบบ maceration โดยแช่ด้วยเอทานอล ในอัตราส่วน ผงยอแห้ง 200 กรัม ต่อเอทานอล 600 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีวันละ 6 ชั่วโมง แยกเก็บส่วนสารละลายใสทุก 2 วัน โดยเติมเอทานอลปริมาตรเดิม ในวันที่ 2 และ 4 จากนั้นในวันที่ 7 ทำการรวบรวมสารละลายใสที่เก็บได้ทั้งหมดมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วนำไปแยกเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator สารสกัดเอทานอลที่ได้นำไปแยกส่วนที่ไม่มีขั้วออกโดยการล้างด้วยเฮกเซน จากนั้นนำสารสารกัดที่เหลือบดผสมกับซิลิกาเจลแล้วนำไปแยกผ่านคอลัมน์ซิลิกาโดยใช้ระบบ gradient ตั้งแต่ 0-60 เปอร์เซ็นต์ เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน ทำการแยกเฉพาะ fraction ที่ตรวจพบสารสคอพอเลตินโดยทดสอบบนแผ่น TLC จากนั้นทำการรวม fraction แล้วนำไปแยกอีกครั้งด้วยคอลัมซิลิกา โดยใช้ระบบตัวชะคือ 2 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ตรวจติดตาม fraction ที่ ออกจากคอลัมน์ด้วยการแยกบนแผ่น TLC ซึ่งใช้ระบบตัวชะเดียวกันกับระบบคอลัมน์ คือ 2 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทน และใช้แผ่น TLC ชนิด normal phase จากนั้นทำการรวบรวม fraction ที่มีสคอพอเลตินแสดงเพียงแถบเดียวภายใต้แสงยูวีที่ระดับความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร มาแยกส่วนของตัวทำละลายออก นำสคอพอเลตินที่สกัดที่ ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองมาใช้ในการทดสอบ

2. จัดเตรียมปลูกคะน้าในกระถางทดลองซ้ำละ 20 ต้น จำนวน 4 ซ้ำต่อกรรมวิธีโดยเริ่มนำมาทดสอบเมื่อต้นคะน้าอายุประมาณ 20 วัน โดยทำการวางเลี้ยงทดสอบในโรงเรือน

กรมวิชาการเกษตร

3. นำตัวอย่างใบคะน้า ที่เป็นโรคใบจุดมาแยกเชื้อโดยล้างทำความสะอาดในน้ำไหล และฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเนื่องฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง วางชิ้นพืชบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จึงทำการย้ายเชื้อราให้บริสุทธิ์ และทำการตรวจดูลักษณะโคโลนีของเชื้อรา รูปร่างสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อทำการบ่งบอกชนิดของเชื้อรา เมื่อได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้วทำการ sub culture ลงในอาหารวุ้นเอียง (PDA Agar Slant) เชื้อละ 2 ซ้ำ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้เป็น Stock culture เพื่อทำการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อสาเหตุโรค และทำการทดสอบสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* sp. ลำดับต่อไป

4. ทดสอบผลของสารสกัดในการช่วยลดระดับความรุนแรงของโรคใบจุดในคะน้า โดยพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้ออัลเทอร์นาเรีย ลงบนต้นกล้าพืชทดสอบ ให้ความชื้นโดยคลุมด้วยพลาสติกใส เมื่อพบว่ามีอาการของโรคปรากฏ ทำการฉีดพ่นด้วยสารทดสอบในอัตรา 20 มิลลิลิตรต่อต้น วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ (ซ้ำละ 10 ต้น) 7 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม)
กรรมวิธีที่ 2 สารละลายสคอพอเลินความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์
กรรมวิธีที่ 3 สารละลายสคอพอเลตินความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์
กรรมวิธีที่ 4 สารละลายสคอพอเลตินความเข้มข้น 1,000 ไมโครโมลาร์
กรรมวิธีที่ 5 จุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* อัตราตามคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์
กรรมวิธีที่ 6 สารเคมีแมนโคเซป อัตราตามคำแนะนำการใช้งานผลิตภัณฑ์
กรมมวิธีที่ 7 กรดซาลิซิลิกความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์
พ่นสารทดสอบทุก 7 วัน และหยุดพ่นสารก่อนเก็บเกี่ยว 14 วัน

5. ทำการทดสอบซ้ำอีก 1 ครั้ง ทั้งกระบวนการ ครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

<u>การบันทึกข้อมูล</u> บันทึกข้อมูลระดับการเกิดโรค ก่อนพ่นสารทุกครั้ง และหลังพ่นสารครั้งสุดท้าย 7 วัน โดยใช้เกณฑ์การประเมินระดับความรุนแรงของการเกิดโรค 5 ระดับ (ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2555) ดังนี้

ระดับที่ 1 ไม่ปรากฏอาการของโรค
ระดับที่ 2 ปรากฏอาการโรคร้อยละ 1-25 ของพื้นที่ใบ
ระดับที่ 3 ปรากฏอาการโรคร้อยละ 26-50 ของพื้นที่ใบ
ระดับที่ 4 ปรากฏอาการโรคร้อยละ 51-75 ของพื้นที่ใบ
ระดับที่ 5 ปรากฏอาการโรคมากกว่าร้อยละ 75 ของพื้นที่ใบ

<u>สถานที่ดำเนินการทดลอง</u>: ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์จุลินทรีย์และสารพิษจากจุลินทรีย์ กลุ่มพัฒนาฯ สวพ.8 และอาคารปฏิบัติการผลิตและขยายชีวภัณฑ์ภาคใต้ตอนล่าง ศวพ.สงขลา

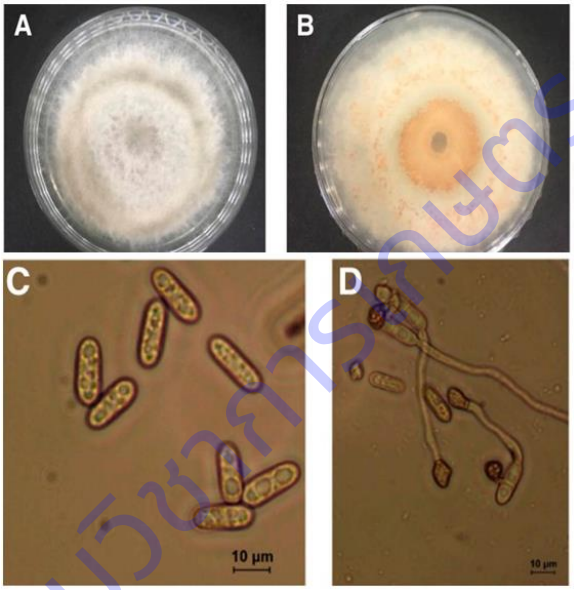
<u>ระยะเวลาในการดำเนินการ</u>: เริ่มต้นตุลาคม 2563 สิ้นสุด กันยายน 2564 รวม 1 ปี

ผลการทดลองและอภิปราย

กิจกรรมที่ 3 การประยุกต์ใช้สารสคอพอเลตินเพื่อควบคุมโรคในพืชเศรษฐกิจบางชนิด(ปีเริ่มต้น. 2564– สิ้นสุด 2564)

การทดลองที่ 6 การควบคุมโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงด้วยสารสคอพอเลตินในห้องปฏิบัติการ

การแยกเชื้อก่อโรคแอนแทรกโนสจากผลมะม่วงที่มีอาการของโรค สามารถแยกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* โดยมีลักษณะของเชื้อที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 39 นอกจากนี้สารสคอพอเลตินที่ใช้ทดสอบได้จากการสกัดแยกจากผลยอบ้านตามกรรมวิธีที่ได้จากการศึกษาในกิจกรรมที่ 1

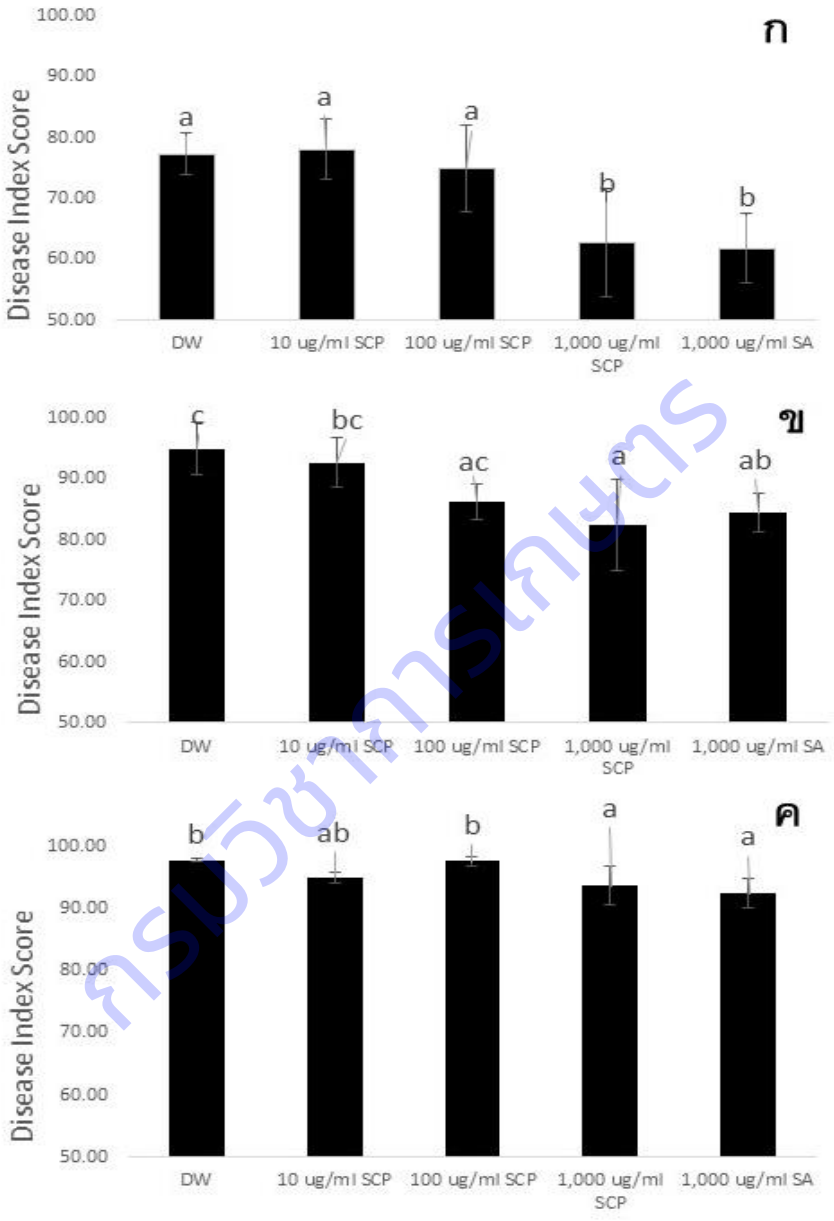


ภาพที่ 39 ลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

การทดสอบประยุกต์ใช้สารสคอพอเลตินที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการช่วยลดระดับความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงซึ่งถูกปลูกเชื้อก่อนการทดสอบสาร พบว่า ในช่วง 7 วันหลังเริ่มทดสอบ สามารถจำแนกกลุ่มมะม่วงได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกเป็นมะม่วงที่ผ่านการปลูกเชื้อและได้รับสารสคอพอเลตินที่ความเข้มข้น 1,000 ppm หรือได้รับกรดซาลิซิลิกที่ความเข้มข้น 1,000 ppm พบมีระดับค่า Disease Index Score (DI-score) อยู่ในช่วง 61-63 ซึ่งน้อยกว่ามะม่วงในกลุ่มที่สองซึ่งได้รับการปลูกเชื้อและถูกทรีตด้วยสารสคอพอเลติน 0, 10 และ 100 ppm โดยในกลุ่มที่ 2 นี้ พบมีค่า DI-score อยู่ในช่วงระหว่าง 75.00-78.13 สำหรับผลการทดสอบในวันที่ 10 และ 12 หลังการทรีตสาร พบว่ามะม่วงในชุดทดสอบที่ผ่านการปลูกเชื้อและได้รับสารสคอพอเลตินที่ความเข้มข้น 1,000 ppm ให้ผลในระดับเดียวกับที่ได้รับกรดซาลิซิลิกที่ความเข้มข้น 1,000 ppm โดยมีค่า DI-score

กรมวิชาการเกษตร

อยู่ในช่วง 92-94 ขณะที่มะม่วงที่ผ่านการปลูกเชื้อและไม่ได้รับสารทดสอบใดๆพบว่ามีระดับ DI-score เท่ากับ 97.71 ± 0.21 ผลแสดงดังภาพที่ 40



ภาพที่ 40 ค่า Disease Index score ของผลมะม่วงที่ผ่านการปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* และได้รับสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 7 วัน (ก) 10 วัน (ข) และ 12 วัน (ค) (n = 3)

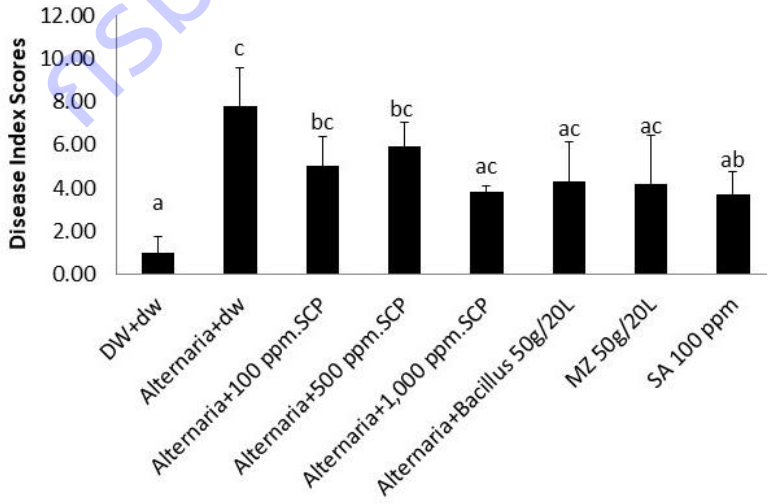
กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 7 การใช้สารสคอพอเลตินควบคุมการเกิดโรคใบจุดในคะน้าในเรือนทดลอง

การแยกเชื้อก่อโรคใบจุดจากต้นคะน้าที่มีอาการของโรค สามารถแยกเชื้อ *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltshire โดยมีลักษณะของเชื้อที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 41 นอกจากนี้สารสคอพอเลตินที่ใช้ทดสอบได้จากการสกัดแยกจากผลยอบ้านตามกรรมวิธีที่ได้จากการศึกษาในกิจกรรมที่ 1

ภาพที่ 41 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltshire
A. conidia และ conidiophores, B- C. conidia

การทดสอบประยุกต์ใช้สารสคอพอเลตินที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการช่วยลดระดับความรุนแรงของโรคใบจุดในคะน้าซึ่งได้รับการปลูกเชื้อก่อนการฉีดพ่นสาร พบว่า ในช่วง 7 วันหลังเริ่มทดสอบ โดยทำการทดสอบ 4 รอบปลูก แสดงดังภาพที่ 42



ภาพที่ 42 ค่า Disease Index score ของต้นคะน้าที่ผ่านการปลูกเชื้อ *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltshire และได้รับสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 7 วัน (n = 4)

กรมวิชาการเกษตร

การใช้สารทดสอบทุกความเข้มข้นมีแนวโน้มที่จะสามารถช่วยลดระดับความรุนแรงของโรคใบจุดได้ ซึ่งจากภาพที่ 16 พบว่าการใช้กรดซาลิซิลิกให้ผลดีที่สุดโดยมีค่า Disease Index Score (DI-score) แตกต่างจากต้นคะน้าในกลุ่มที่ได้รับการปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียวอย่างชัดเจน ในขณะที่การใช้สคอพอเลติน 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือบาซิลลัส ซับทิลิส 50 กรัมต่อ 20 ลิตร หรือแมนโคเซป 50 กรัมต่อ 20 ลิตรให้ค่าเฉลี่ยที่น้อยกว่าแต่ยังคงแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับต้นคะน้าที่ปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองนี้บ่งชี้ถึงการปรับใช้สารสคอพอเลตินในรูปแบบสารที่ใช้ช่วยบรรเทาความรุนแรงเมื่อเกิดปัญหาโรคพืชขึ้น ซึ่งถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากสามารถสกัดออกมาได้จากพืชวัตถุดิบที่หาได้ง่ายและต้นทุนวัตถุดิบไม่สูงมาก

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

ในภาพรวมของกิจกรรมที่ 3 มีเป้าหมายเพื่อการทดสอบประยุกต์นำสคอพอเลตินที่สกัดได้จากผลยอมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร โดยผลการดำเนินการทดสอบใช้สคอพอเลตินช่วยลดระดับความรุนแรงให้กับพืชที่ติดโรค ได้แก่ มะม่วงที่ได้รับเชื้อ *Colletotrichum* และ คะน้าที่ได้รับเชื้อ *Alternaria* ซึ่งผลการทดลองให้ผลเชิงบวก โดยพบว่าสคอพอเลตินสามารถนำมาช่วยลดความเสียหายให้กับคะน้าและมะม่วงที่ได้รับเชื้อทั้ง 2 ชนิดที่ทดสอบได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากการทดสอบในงานวิจัยนี้มีระยะเวลาเพียง 1 ปี จึงสามารถดำเนินการได้เพียงในระดับห้องปฏิบัติการและโรงเรือนซึ่งสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมที่อาจรบกวนการทดสอบได้ ดังนั้นก่อนการนำไปปรับใช้จริงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาทั้งในส่วนของรูปแบบของสารสคอพอเลตินที่เหมาะสมกับการใช้งานจริง รวมทั้งควรมีการนำไปทดลอบใช้จริงในสภาพแปลงตามธรรมชาติก่อนการนำไปเผยแพร่ให้แก่เกษตรกรผู้ใช้ประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. ผลการวิจัยของโครงการ (เน้น output ตรงเป้าประสงค์ของโครงการ ตามวัตถุประสงค์)

ผลการดำเนินงานในภาพรวมของโครงการ สามารถคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสกัดสารสคอพอเลตินจากการสำรวจพืชท้องถิ่นภาคใต้ตอนล่างจำนวน 18 ชนิดพืช ควบคู่ไปกับการปรับวิธีการตรวจสอบเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Thin-layer chromatography ให้สามารถปรับใช้ได้กับชนิดตัวอย่างที่มีความหลากหลายขององค์ประกอบภายในพืช ซึ่งพืชที่มีศักยภาพเหมาะสมที่สุดได้แก่ ผลยอบ้าน โดยจากการสำรวจในพื้นที่จังหวัดสงขลา ตรัง และพัทลุง เพื่อจัดทำฐานข้อมูลปริมาณสารสคอพอเลตินที่พบในผลยอพบว่ามีปริมาณเฉลี่ยที่ 393.27 $\pm$ 165.42 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง และช่วงปริมาณที่พบสารชนิดนี้เท่ากับ 190.44 - 785.52 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง สำหรับการศึกษาวิธีการสกัดแยกสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์ออกจากผลยอ สามารถแยกโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี โดยทำการสกัดด้วยวิธี maceration และแยกผ่านคอลัมน์ซิลิกา 2 รอบโดยรอบแรกใช้ระบบการแยกด้วยสารผสมระหว่างเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท โดยปรับเพิ่มจากขั้วต่ำไปยังขั้วสูง ซึ่งสารสคอพอเลตินจะออกจากคอลัมน์ ที่ 60 เปอร์เซ็นต์เอทิลอะซิเตท จากนั้นนำไปแยกครั้งที่สองผ่านคอลัมน์ซิลิกาโดยชะด้วย 2 เปอร์เซ็นต์เมทานอลในไดคลอโรมีเทน สารสคอพอเลตินที่แยกได้จากผลยอเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่ามีคุณสมบัติในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในจานอาหารทดสอบได้จำนวน 19 ชนิดเชื้อ ได้แก่ เชื้อรา 9 ชนิด และเชื้อแบคทีเรีย 10 ชนิด ขณะที่การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH ของสารสคอพอเลติน พบว่าให้ค่าความเข้มข้นในการกำจัดอนุมูล DPPH ให้ลดลงร้อยละ 50 (50 เปอร์เซ็นต์ DPPH scavenging) เท่ากับ 0.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าสคอพอเลตินมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสำหรับการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นตัวชักนำความต้านทานในพืช (elicitor) พบว่า สคอพอเลตินสามารถใช้ชักนำให้ใบยาสูบเพิ่มการสร้างกรดซาลิซิลิก และเพิ่มความว่องไวของเอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส เอนไซม์กลูคาเนส และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็นโมเลกุลและเอนไซม์ในพืชที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มความต้านทานในพืช สำหรับการทดสอบเพื่อวิเคราะห์แนวโน้มในการประยุกต์นำสคอพอเลตินมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางการเกษตรซึ่งดำเนินการโดยใช้มะม่วงและคะน้าเป็นพืชทดสอบ พบว่าสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถใช้ในการช่วยชะลอความเสียหายของผลมะม่วงที่ได้รับเชื้อแอนแทรกโนสในสภาวะทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ ขณะที่สคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันนี้สามารถใช้ฉีดพ่นเพื่อลดระดับความเสียหายของต้นคะน้าที่ได้รับเชื้อก่อโรคใบจุดในระดับโรงเรือน ซึ่งผลการดำเนินงานศึกษาบรรลุตามวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้ โดยได้องค์ความรู้ใหม่ๆสำหรับการพัฒนาต่อยอดงานวิจัยทั้งทางด้านอารักขาพืช การจัดการหลังการเก็บเกี่ยว หรือการนำไปใช้ทางศาสตร์สาขาอื่น เช่น การแพทย์หรือ การผลิตเครื่องสำอาง เป็นต้น อันเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มในผลิตผลทางการเกษตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร

2. ข้อเสนอแนะเชิงการนำไปใช้ประโยชน์ ผลลัพท์ outcome ที่มีผลกระทบในทางกว้างที่นำผลผลิตไปใช้ หรือนำไปวิจัยต่อ

การใช้ประโยชน์ผลงานวิจัยดำเนินการโดยจัดทำเอกสารตีพิมพ์เผยแพร่องค์ความรู้ (อยู่ระหว่างการจัดเตรียม manuscript) การต่อยอดงานวิจัย โดยนำเทคนิคการตรวจสอบสารสคอพอเลตินไปปรับใช้ในการตรวจสอบผลการชักนำความต้านทานในพืชเบื้องต้น การประสานงานทดสอบการใช้สารสคอพอเลตินในแปลงเกษตรกรเพื่อประเมินประสิทธิภาพการป้องกันหรือลดความรุนแรงของโรคในพืชผักหรือไม้ดอกไม้ประดับโดยมีแปลงเกษตรกรในพื้นที่อ.หาดใหญ่ จ.สงขลาเป็นแปลงทดสอบ นอกจากนี้สำหรับการดำเนินงานต่อยอดจากโครงการ อาจพิจารณาในประเด็นการใช้ประโยชน์จากการแยกสารสคอพอเลตินออกมาจากผลยอเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์สำหรับประยุกต์ใช้ในงานอื่นๆ เช่น การผลิตฟิล์มเก็บรักษาผลไม้ที่ผสมสารสคอพอเลตินโดยอาศัยคุณสมบัติการมีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชั่นรวมทั้งมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิดจึงมีแนวโน้มว่าน่าจะสามารถช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้ได้นานขึ้น และสำหรับการใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรอาจมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนการปรับรูปแบบการใช้งานให้เหมาะสม เช่น การใช้ในลักษณะสารบริสุทธิ์ การใช้ในลักษณะเป็นสารสกัดหยาบ รูปแบบ formulation ที่เหมาะสมในการนำไปใช้งานที่สอดคล้องกับวัตถประสงค์การใช้งาน เช่นการใช้เพื่อลดระดับความรุนแรงหลังพืชติดเชื้อ หรือการใช้เป็นสาร elicitor เพื่อชักนำควาต้านทานให้พืชทนต่อการบุกรุก ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงเป็นเพียงก้าวแรกที่สามารถนำไปพัฒนาศึกษาในก้าวต่อๆไปได้อีกหลากเส้นทางต่อไป

ทั้งนี้ผลลัพท์จากงานวิจัยนี้ได้ต่อยอดสู่การสร้างงานวิจัยการใช้สารสกัดจากผลยอในการชักนำความต้านทานของพืช รวมทั้งเทคนิคการวิเคราะห์สคอพอเลตินด้วย TLC จะถูกนำไปใช้ในการประเมินเบื้องต้น เพื่อวิเคราะห์สัญญาณการต้านทานโรตในพืชทดสอบต่อไป ซึ่งกิจกรรมดังกล่าวเป็นส่วนหนึ่งของการทดลองภายใต้โครงการ”วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีด้านอารักขาพืชเพื่อการเพิ่มขีดความสามารถในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช” ปี 65-67)

กรมวิชาการเกษตร

บรรณานุกรม

เขมมิการ์ โขมพัตร นุรอามาลี ดีนามอ และนันทา เชิงเชาว์. 2561. ผลของสารสกัดจากสาหร่ายทุ่นต่อการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกในยางพาราและการประยุกต์ใช้เพื่อสร้างความต้านทานต่อเชื้อไฟทอปธอร่า. วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์. ปีที่ 10, ฉบับที่ 3. 21230.

จินันทนา จอมดวง และ สุมาฬี พรหมรุกชาติ. 2558. การใช้ชีวภัณฑ์ทดแทนสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเพื่อเพิ่มผลผลิตและลดต้นทุนในการผลิตข้าวที่ใช้เป็นวัตถุดิบอาหารเสริมสุขภาพ.รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.

จีระภา ชัยวงศ์. 2551. เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินและการสลายสคอพอลิตินในใบและเซลล์แขวนลอยยางพาราที่*ถูก*กระตุ้นโดยเชื้อรา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ณัชชา ลูกรักษ์ และ ดุสิต อธินุวัฒน์. 2556. ปัญหาและอุปสรรคในการปรับเปลี่ยนเพื่อการผลิตพืชผักอินทรีย์ของเกษตรกรจังหวัดราชบุรีที่ผ่านการอบรมโครงการพัฒนาระบบเกษตรอินทรีย์.Thai Journal of Science and Technology.*ปีที่ 2. ฉบับที่ 2.*

มานะ กาญจนมณีเสถียร, อัจฉรา เพ็งหนู, ฤดีกร วิวัฒนปฐพี และ วานิด รอดเนียม. 2556. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์และการพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์. รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยศิลปากร.

พันศักดิ์ จิตสว่าง, วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ, ดุสิต อธินุวัฒน์. 2015. เทคโนโลยีการจัดการโรคพืชในระบบการผลิตข้าวอินทรีย์. Thai Journal of Science and Technology 4, 272–285.

ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี, อภิรัชต์ สมฤทธิ์, ธารทิพย ภาสบุตร. 2555. การศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืชในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *Alternaria* สาเหตุโรคพืช. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล, ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล, รุ่งนภา ก่อประดิษฐ์สกุล และ ธารทิพย ภาสบุตร. 2542. การพัฒนาสารออกฤทธิ์จากว่านน้ำเพื่อใช้ควบคุมโรคผลเน่าของมะม่วงเพื่อการส่งออก.รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กรมวิชาการเกษตร

Abyari, M., N Nasr, J soomi and D Sadhu. 2016. Enhanced Accumulation of Scopoletin in Cell Suspension Culture of *Spilanthes acmella* Murr. Using Precursor Feeding. Brazilian Archives of Biology and Technology. 59.

Acharya, D., B. Bogati and P. Risal. 2013. Scopoletin reduces intracellular survival of *Salmonella typhi* within U937 human macrophage cell line in vitro. Sky Journal of Microbiology Research. Vol. 1(6), pp. 47 – 51.

Ali MB, E. J. Hahn and K. Paek. 2005. Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in Phalaenopsis. Plant Physiol Biochem 43:213–223.doi:10.1016/j.plaphy.2005.01.007

Andreae, S.R. and W. A. Andreae. 1949. The metabolism of scopoletin by healthy and virus infected potato tubers. Canadian Journal of Research. 27, 15–22.

Ba, R., T. Alfa, F. Gbaguidi, K.M. Novidzro, K. Dotse, K. Koudouvo, U. Houngue, M.T. DonouHounsode, K.H. Koumaglo, Y. Ameyapoh and others. 2017. Maize Fungal Growth Control with Scopoletin of Cassava Roots Produced in Benin. International Journal of Microbiology. 1-11.

Churngchow, N. and M. Rattarasarn. 2001. Biosynthesis of scopoletin in *Hevea brasiliensis* leaves inoculated with *Phytophthora palmivora*. Journal of plant physiology. 158, 875–882.

DAS, M. 2014. Evaluation of the Laxative Effects of Methanolic Extract of *Spilanthes acmella*. East West University.

Devi, R.P. and P. Marimuthu, (2011). Effect of Botanical Formulation of Polygonum Minus (P-40) on Control of *Alternaria Solani*. Journal of Plant Pathology & Microbiology, 2, 104.

Ederli, L., L. Madeo, O. Calderini, C. Gehring, C. Moretti, R. Buonaurio, F. Paolocci and S. Pasqualini. 2011. The Arabidopsis thaliana cysteine-rich receptor-like kinase CRK20 modulates host responses to *Pseudomonas syringae*pv. tomato DC3000 infection. Journal of plant physiology. 168, 1784–1794.

Gnonlonfin, G., J.B. Adjovi, Y., Gbaguidi, F. Gbenou, J. Katerere, D. Brimer and L. Sanni, A. 2011. Scopoletin in Cassava Products as an Inhibitor of Aflatoxin Production. Journal of Food Safety.

กรมวิทยาศาสตร์

31, 553–558. doi:10.1111/j.1745-4565.2011.00334.x

Güell, I., J. Cabrefiga, E. Badosa, R. Ferre, M. Telleda, E. Bardaji, M. Planas and L. Feliu. 2011. Improvement of the Efficacy of Linear Undecapeptides against Plant-Pathogenic Bacteria by Incorporation of D-Amino Acids. Applied and Environmental Microbiology. 2667-2675.

Gutierrez M-C, A.D. Parry, M. Tena, J. Jorrin and R. Edwards. 1995. Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. Phytochemistry. 38: 1185±1191.

Gurav, S.S. and N.S. Gurav (2013). Indian Herbal Drug Microscopy. Springer Science & Business Media.

Hutadilok-Towatana, N., P. Chaiyamutti, K. Panthong, W. Mahabusarakam and V. Rukachaisirikul, 2006. Antioxidative and free radical scavenging activities of some plants used in Thai folk medicine.Pharmaceutical biology. 44, 221–228.

Jeandet, P., C. Hébrard, M.A. Deville, S. Cordelier, S. Dorey, A. Aziz and J. Crouzet. 2014. Deciphering the role of phytoalexins in plant-microorganism interactions and human health.Molecules. 19, 18033–18056.

Khompatara, K., 2017. Systemic Acquired Resistance in *Hevea brasiliensis* Induced by the Seaweed Extract from *Sargassum polycystum*. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Biochemistry. Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.

Kuc, J. 1995. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. Annual review of phytopathology. 33, 275–297.

Malik, A., A. Kushnoor, V. Saini, S. Singhal, S. Kumar. and Y.C. Yadav. 2011. In vitro antioxidant properties of Scopoletin. J. Chem. Pharm. Res., 2011, 3(3), 659-665.

Mogana, R., K. Teng-Jin and C. Wiart. 2013.Anti-Inflammatory, Anticholinesterase, and Antioxidant Potential of Scopoletin Isolated from *Canarium patentinervium* Miq. (Burseraceae Kunth). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.2013, e734824. doi:10.1155/2013/734824.

Napiroon, T., M. Bacher, H. Balslev, K. Tawaitakham, W. Santimaleeworagun and S. Vajrodaya. 2018.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

Scopoletin from *Lasianthus lucidus* Blume (Rubiaceae): A potential antimicrobial against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2018, 8, 1-6.

Rigane, G., S.Y. Ben, H. Ghazghazi, R. Ben Salem and others. 2013a. Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia.International Food Research Journal. 20, 3001–3007.

Saftić-Panković, D., S. Veljović-Jovanović, M. Pucarević, N. Radovanović and A. Mijić. 2006.Phenolic compounds and peroxidase in sunflower near-isogenic lines after downy mildew infection.Helia. 29, 33–42.

Santos, T., J.R. Villanueva and C. Nombela. 1977. Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* beta-glucanases.Journal of bacteriology 129, 52–58.

Sanzani, S.M., L. Schena and A. Ippolito, 2014. Effectiveness of phenolic compounds against citrus green mould. Molecules. 19, 12500–12508.

Shaw, C.Y., C.H. Chen, C.C. Shu, C.C. Chen and Y.C. Tsai. 2003.Antioxidant properties of scopoletin isolated from *Sinomonium acutum*. Phytother Res. 17(7), 823-5.

Sun, H., L. Wang, B. Zhang, J. Ma, C. Hettenhausen, G. Cao, G. Sun, J. Wu and J. Wu. 2014. Scopoletin is a phytoalexin against *Alternaria alternata* in wild tobacco dependent on jasmonate signalling. Journal of experimental botany. 65, 4305–4315.

Taguchi, G., K. Yoshizawa, R. Kodaira, N. Hayashida and M. Okazaki. 2001. Plant hormone regulation on scopoletin metabolism from culture medium into tobacco cells. Plant science. 160, 905-911.

Tanton DW. A Drug-Free Approach to Healthcare - 2009 Revised Edition: Soaring Heights Publishing; 2008. 356 p.

Tegos, G., F.R. Stermitz, O. Lomovskaya and K. Lewis. 2002. Multidrug pump inhibitors uncover emarkable activity of plant antimicrobials. Antimicrobial agents and chemotherapy. 46, 3133–3141.

Vialart, G., A. Hehn, A. Olry, K. Ito, C. Krieger, R. Larbat, C. Paris, B. Shimizu, Y. Sugimoto, M. Mizutani

กรมวิทยาศาสตร์

and others. 2012. A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from *Ruta graveolens* L. exhibits p-coumaroyl CoA 2′-hydroxylase activity (C2′ H): a missing step in the synthesis of umbelliferone in plants. The Plant Journal. 70, 460–470.

West, B.J. and S. Deng. 2010. Thin layer chromatography methods for rapid identity testing of *Morindacitrifolia* L.(Noni) fruit and leaf. Adv. J. Food Sci. Technol. 2, 298–302.

Yasuda M, A. Ishikawa, Y. Jikumaru, M. Seki, T. Umezawa, T. Asami, A. Maruyama-Nakashita, T. Kudo, K. Shinozaki, S. Yoshida and H Nakashita. 2008. Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in Arabidopsis. Plant Cell 20:1678–1692. doi:10.1105/tpc.107.054296.

Zafar, R., S. Ahmad and M. Mujeeb .2005. Estimation Of Scopoletin In Leaf And Leaf Callus Of *Convolvulus Microphyllus* Sieb. Indian journal of pharmaceutical sciences 67, 562.

Zuker, A.P., B. Buck and J.B. McGrory, 1968. Structure of O_{16}. Physical Review Letters.21, 39.

กรมวิชาการเกษตร