กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

รายงานผลสัมฤทธิ์สำหรับทุนสนับสนุนงานพื้นฐาน (Fundamental Fund)

ปีงบประมาณ พ.ศ.2564

หน่วยงาน กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

ศึกษาปริมาณและคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสคอพอเลตินจากพืชและการประยุกต์ใช้ควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

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

เขมมิการ์ โขมพัตร

Khemmikar Khompatara

ปี 2564\

บทสรุปผู้บริหาร

โครงการนี้มีเป้าหมายเพื่อนำสารสคอพอเลติน (Scopoletin) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในพืช และได้มีข้อมูลการรายงานถึงคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ทางการเกษตร โดยกำหนดระยะเวลาดำเนินโครงการ 3 ปี (2562-2564) ครอบคลุมตั้งแต่การศึกษาวิธีสกัดและตรวจสอบสารสคอพอเลตินเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในกระบวนการแยกสารสคอพอเลตินจากพืช ควบคู่ไปกับการสำรวจข้อมูลปริมาณของสารสคอพอเลตินในพืชท้องถิ่นชนิดต่างๆในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างจำนวน18 ชนิดพืช จากนั้นทำการคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพในการนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับสกัดแยกสารสคอพอเลตินให้บริสุทธิ์ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางการเกษตร

ผลจากการดำเนินงานวิจัยนี้ได้พืชท้องถิ่นที่มีศักยภาพสูงเหมาะสมสำหรับนำมาสกัดสารสคอพอเลตินไปใช้ประโยชน์ คือ ผลยอบ้าน ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่ายมีปลูกอยู่ทั่วไป โดยกรรมวิธีต่างๆในการสกัดและวิเคราะห์ที่ผู้วิจัยได้ศึกษาในงานชิ้นนี้สามารถนำมาใช้สกัดสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์ออกจากผลยอบ้านได้ โดยมีการตรวจสอบวิเคราะห์ยืนยันชนิดสารด้วยเทคนิคทางเคมีก่อนจะนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานสำหรับนำสารชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์ ไม่ว่าจะเป็นด้านการเกษตร ด้านสุขภาพ หรือการแพทย์ ฯลฯ สำหรับงานวิจัยนี้ได้กำหนดเป้าหมายการใช้ประโยชน์ของสารสคอพอเลตินโดยนำไปทดสอบประยุกต์ใช้ควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรย์ก่อโรคในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ได้แก่ คะน้า และมะม่วง ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในระดับโรงเรือน ซึ่งผลจากงานวิจัยจะได้นำมาสู่การเพิ่มสารทางเลือกต้นทุนต่ำชนิดใหม่ๆที่น่าสนใจสำหรับปรับใช้ส่งเสริมการเกษตรภายใต้แนวทางการลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ ทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชท้องถิ่นสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการสกัดสารสคอพอเลติน ซึ่งในภาพรวมแล้วแนวทางงานวิจัยนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์โดยตรงต่อเกษตรกรไทยทั้งในแง่การลดต้นทุนค่าใช้จ่ายในการใช้สารเคมีสังเคราะห์เพื่อควบคุมโรคพืช การเพิ่มรายได้จากการผลิตวัตถุดิบเพื่อนำไปสกัดสารสำคัญ รวมทั้งยังเป็นการสนับสนุนแนวทางการผลิตพืชปลอดภัยผ่านงานวิจัยที่สามารถใช้ประโยชน์ได้จริงสำหรับประเทศไทยต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

สคอพอเลตินเป็นสารพฤษเคมีที่พบในพืชบางชนิดได้ถูกสกัดและนำมาทดสอบปรับใช้ส่งเสริมกระบวนการผลิตพืชครั้งแรกในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย จากการสำรวจพืชในท้องถิ่นจำนวน 18 ชนิด พบยอบ้าน (*Morinda citrifolia* L.; noni) มีปริมาณสารสคอพอเลตินสูงที่สุดเฉลี่ย 393.27± 165.42 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักผลแห้ง การสกัดและแยกสารสคอพอเลตินจากผลยอบ้าน ด้วยวิธี maceration ด้วย ethanol โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ด้วยซิลิกาเจล ชะด้วยส่วนผสมของเอทิลอะซิเตท และเฮกเซน (0-60 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร) 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 เอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส เอนไซม์กลูคาเนสเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส กรดซาลิซิลิก และกรดแอบไซซิกการนำสารสคอพอเลตินมาประยุกต์ใช้ควบคุมโรคพืช พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm ช่วยลดความเสียหายจากโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงและโรคใบจุดในคะน้าได้ โดยมีผลใกล้เคียงกับการใช้สารชีวภัณฑ์หรือสารเคมีภัณฑ์

ผลจากงานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าสคอพอเลตินที่สกัดจากผลยอบ้านมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา, กำจัดอนุมูลอิสระและชักนำความต้านทานของพืช 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

กิตติกรรมประกาศ

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

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	2
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
กิตติกรรมประกาศ	5
สารบัญ	6
สารบัญรูป	7
สารบัญตาราง	8
บทที่ 1 บทนำ	10
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน	14
บทที่ 3 ผลการศึกษา	26
บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล	30
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก	59

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญรูป

หน้า

ก	แผนผังความเชื่อมโยงของโครงการวิจัยภายใต้แผนงานวิจัยย่อยเรื่องวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยาย และการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์	13
1	การวิเคราะห์สารสคอพอเลตินด้วยเทคนิค TLC; ก) การเรืองแสงของสารสคอพอเลตินในสารสกัดเอทานอลจากตัวอย่างชิ้นส่วนอวัยยะ (organ) ของลองกอง ยอบ้าน และมันสำปะหลัง และ ข) การเรืองแสงของสารมาตรฐานสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 และ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	31
2	การวิเคราะห์ปริมาณสคอพอเลตินในใบและผลยอบ้านเชิงคุณภาพด้วยวิธี TLC (บน) และการวิเคราะห์ปริมาณสคอพอเลตินในพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายในพื้นที่ภาคใต้ในเชิงปริมาณด้วยวิธี HPLC (ล่าง)	33
3	ขั้นตอนการแยกและทดสอบความบริสุทธิ์ของสารสคอพอเลตินจากผลยอ	34
4	ยูวีสเป็กตรัมของสารสคอพอเลตินมาตรฐาน (บน) และสารสคอพอเลตินที่แยกได้จากผลยอบ้าน (ล่าง)	35
5	^{1}H NMR และ ^{13}C-NMR สเปกตรัม ของสารสคอพอเลตินที่แยกได้จากผลยอบ้าน (ก) และสารสคอพอเลติน (ข)	35
6	FTIR สเปกตรัมของสารสคอพอเลตินที่แยกได้จากผลยอบ้าน(ก) และสารสคอพอเลตินมาตรฐาน(ข)	36
7	ค่า Disease index score จากการทดสอบผลของสารสคอพอเลตินต่อการควบคุมการเจริญของเชื้อ *Alternaria* เป็นเวลา 5 วัน (ก) รูปแบบแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแต่ละชุดทดสอบและลักษณะของใบคะน้าหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 5 วัน (ข และ ค)	40
8	การทดสอบใช้สารสคอพอเลตินควบคุมการเจริญของเชื้อ Colletotrichum บนผลมะม่วงโดยวิธี detached fruit เป็นระยะเวลา 7 วัน; ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผล (ก) และ การเก็บรักษาผลมะม่วงระหว่างการทดสอบ (ข)	41
9	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH Scavenging กับความเข้มข้นของสารทดสอบ	42
10	การเปลี่ยนแปลงของความว่องไวของเอนไซม์ฟินิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส (บน) และเอนไซม์กลูคาเนส (ล่าง) ในใบยาสูบที่ทรีตด้วยสารสคอพอเลตินความเข้มข้น 0, 100, 500, และ 1,000 ไมโครโมลาร์	43

กรมวิชาการเกษตร

หน้า

11 การย้อมแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยาสูบที่ทรีตด้วยสารสคอพอเลตินความเข้มข้น 0, 100, 500, และ 1,000 ไมโครโมลาร์ บนแผ่นเจลอะคริลาไมด์ชนิดไม่เสียสภาพ (Native-PAGE) ที่เวลาต่างๆ 44

12 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดซาลิซิลิก (บน) และกรดแอบไซซิก (ล่าง) ในใบยาสูบที่ทรีตด้วยสารสคอพอเลตินความเข้มข้น 0, 100, 500, และ 1,000 ไมโครโมลาร์ที่เวลาต่างๆ 45

13 ใบยาสูบที่ถูก infiltrate ด้วยสารสคอพอเลติน (ซ้าย) และ สภาพใบยาสูบที่ได้รับสารสคอพอเลตินความเข้มข้น 0, 100, 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ เมื่อเวลาผ่านไป 120 ชั่วโมง (ขวา) 46

14 ลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* 47

15 ค่า Disease Index score ของผลมะม่วงที่ผ่านการปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* และได้รับสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 7 วัน (ก) 10 วัน (ข) และ 12 วัน (ค) , (n =3) 48

16 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltshire A. conidia และ conidiophores, B- C. conidia 49

17 ค่า Disease Index score ของต้นคะน้าที่ผ่านการปลูกเชื้อ *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltshire และได้รับสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 7 วัน (n = 4) 49

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญตาราง

		หน้า
1	ปริมาณสคอพอเลตินในตัวอย่างพืชที่พบได้ง่ายในท้องถิ่นภาคใต้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC	31
2	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารทดสอบชนิดต่างๆ	37
3	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อแบคทีเรียถูกยับยั้งด้วยสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ	38

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 1 บทนำ

1. วิสัยทัศน์ และพันธกิจของหน่วยงาน

<u>วิสัยทัศน์</u>

กรมวิชาการเกษตรเป็นองค์กรที่เป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาด้านพืช เครื่องจักรกลการเกษตร และเป็นศูนย์กลางรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตรด้านพืชในระดับสากล บนพื้นฐานการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

<u>พันธกิจ</u>

1. สร้างและถ่ายทอดองค์ความรู้จากงานวิจัยด้านพืชและเครื่องจักรกลการเกษตรสู่กลุ่มเป้าหมาย
2. กาหนดและกากับดูแลมาตรฐานระบบการผลิตและผลิตพันธุ์พืชและปัจจัยการผลิต พัฒนาระบบตรวจรับรองสินค้าการเกษตรด้านพืชให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล
3. อนุรักษ์และพัฒนาการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพด้านพืช แมลง และจุลินทรีย์
4. กากับ ดูแล และพัฒนากฎหมายที่กรมวิชาการเกษตรรับผิดชอบ

2. ยุทธศาสตร์ชาติที่สอดคล้องกับแผนปฏิบัติงานด้าน ววน. ของหน่วยงาน (โปรดเลือกเฉพาะยุทธศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับหน่วยงานของท่าน)

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 1 ด้านความมั่นคง

เพื่อบริหารจัดการสภาวะแวดล้อมของประเทศให้มีความมั่นคง ปลอดภัย และมีความสงบเรียบร้อยในทุกระดับและทุกมิติ

☑ ยุทธศาสตร์ที่ 2 ด้านการสร้างความสามารถในการแข่งขัน

เน้นการยกระดับศักยภาพในหลากหลายมิติควบคู่กับการขยายโอกาสของประเทศไทยในเวทีโลก

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 3 ด้านพัฒนาและเสริมสร้างศักยภาพทรัพยากรมนุษย์

คนไทยในอนาคต มีความพร้อมทั้งกาย ใจ สติปัญญา มีทักษะที่จำเป็นในศตวรรษที่ 21 มีทักษะสื่อสารภาษาอังกฤษ

และภาษาที่ 3 และมีคุณธรรม

❑ ยุทธศาสตร์ที่ 4 ด้านการสร้างโอกาสและความเสมอภาคทางสังคม

สร้างความเป็นธรรม และลดความเหลื่อมล้ำในทุกมิติ กระจายศูนย์กลางความเจริญทางเศรษฐกิจและสังคมเพิ่มโอกาส

ให้ทุกภาคส่วนเข้ามาเป็นกำลังของการพัฒนาประเทศในทุกระดับ

กรมวิชาการเกษตร

❑ยุทธศาสตร์ที่ 5 ด้านการสร้างการเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม
คำนึงถึงความยั่งยืนของฐานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของประชาชนให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ผ่านมาตรการต่างๆ ที่มุ่งเน้นให้เกิดผลลัพธ์ต่อความยั่งยืน

❑ยุทธศาสตร์ที่ 6 ด้านการปรับสมดุลและพัฒนาระบบการบริหารจัดการภาครัฐ
การปรับเปลี่ยนภาครัฐ ยึดหลัก “ภาครัฐของประชาชนเพื่อประชาชนและประโยชน์ส่วนรวม”

3. วงเงินงบประมาณกองทุน ววน. ที่ได้รับจัดสรรในปี 2564 และโปรดระบุแผนงานให้สอดคล้องกับโปรแกรมของแผน ววน.

โปรแกรมตามแผน ววน.	**งบประมาณ (บาท)**
P7. โจทย์ท้าทายด้านทรัพยากรสิ่งแวดล้อม และการเกษตร **แผนงานที่ 7 :** แผนงานวิจัยและพัฒนาชีวภัณฑ์เพื่อการผลิตพืชปลอดภัย **แผนงานย่อย :** วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์จากชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์ **โครงการ :** ศึกษาปริมาณและคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสคอพอเลตินจากพืชและการประยุกต์ใช้ควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช	222,355

4. รายละเอียดโครงการ

ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล

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

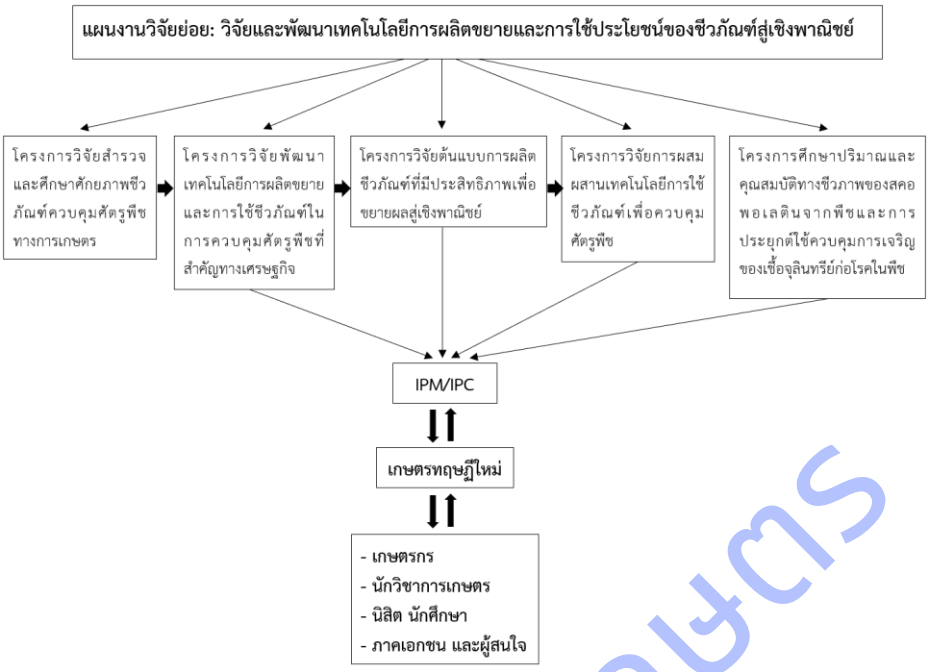
สวบวิชาการเกษตร

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*) เชื้อรากลิโอคลาเดียมไวเรน (*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 โดยเฉพาะในทางการแพทย์ อย่างไรก็ตามการศึกษาและนำสคอพอเลตินมาใช้ประโยชน์ในเชิงการเกษตรเพื่อป้องกันหรือลดระดับความรุนแรงจากการถูกเชื้อรุกรานสำหรับประเทศไทยยังคงมีข้อมูลน้อย

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

สงวนลิขสิทธิ์



ภาพ ก. แผนผังความเชื่อมโยงของโครงการวิจัยภายใต้แผนงานวิจัยย่อยเรื่องวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์

วัตถุประสงค์

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

2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสคอพอเลตินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และการใช้เป็นตัวชักนำความต้านทานต่อโรคในพืชเศรษฐกิจ

3 เพื่อทดสอบประยุกต์ใช้คุณสมบัติทางชีวภาพของสารสคอพอเลตินให้เกิดประโยชน์ในทางการเกษตร โดยใช้ป้องกันกำจัดโรคพืชในพืชเศรษฐกิจบางชนิด

ขอบเขตการศึกษา

งานวิจัยนี้เป็นการนำความรู้ทางด้านเคมี ชีวเคมี โรคพืช และเกษตรศาสตร์ มาปรับใช้ในการสกัดสารสคอพอเลติน (Scopoletin) ซึ่งเป็นสาระสำคัญที่พบในพืชมาใช้ประโยชน์ในทางการเกษตร เพื่อก่อให้เกิดการเพิ่มมูลค่ากับพืชท้องถิ่น โดยในการวิจัยนี้ครอบคลุมการศึกษาศึกษาวิธีการสกัดและวิเคราะห์สารสคอพอเลตินจากพืช การหาปริมาณสคอพอเลตินในพืชที่หาได้ทั่วไปในท้องถิ่นพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างหรือภาคอื่นๆ เช่น ลองกอง, ยางพารา, ยอบ้าน, ผักกาดนกเขา และมันสำปะหลัง ฯลฯ เพื่อคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพในการใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตสารสคอพอเลติน

กรมวิชาการเกษตร

สำหรับต้านเชื้อก่อโรคพืช 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 ซึ่งเป็นโมกุลส่งสัญญาณในระบบภูมิต้านทานแบบ systemic acquired resistance เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบการป้องกันตนเองในพืช ได้แก่ ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส และกลูคาเนส ซึ่งผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจะนำไปสู่การเป็นข้อมูลนำไปปรับใช้ให้เกิดประโยชน์ทางการเกษตร ซึ่งดำเนินการโดยนำสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์ที่แยกจากพืชท้องถิ่นมาปรับใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อช่วยลดระดับความรุนแรงของการเกิดโรคในพืชเศรษฐกิจสำคัญได้แก่ มะม่วง และ คะน้า

นิยามศัพท์

ฤทธิ์ทางชีวภาพ หมายถึง กิจกรรมต่อสิ่งมีชีวิต อาจให้ผลดีหรือผลเสียขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของสาร

บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน

1. วิธีดำเนินการวิจัย

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)

กรมวิชาการเกษตร

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±1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนบดเพื่อให้ตัวอย่างแห้งกรอบบดได้ง่าย สำหรับตัวอย่างผล เมล็ด เปลือก หรือหัวของพืชที่มีลักษณะอวบน้ำและเสี่ยงต่อการเน่าเสีย นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆและอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60±1 องศาเซลเซียสจนกว่าตัวอย่างจะแห้งและมีน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำตัวอย่างพืชมาสกัดโดยผสมผงตัวอย่างแห้งในอัตราส่วน 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 รอให้แห้งแล้วนำไปแยกโดยจุ่มแผ่นซิลิกาลงในอ่างแก้วที่บรรจุ

กรมวิทยาศาสตร์

สารละลายเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม กำหนดระยะทางในการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย 6 เซนติเมตร เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงระยะทางที่กำหนด ยกแผ่นซิลิกาออกมาวางผึ่งให้แห้ง นำไปส่องภายใต้แสงยูวี หากมีสารสคอพอเลตินจะปรากฏเป็นแถบสีน้ำเงินเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวแสง 365 นาโนเมตร เปรียบเทียบขนาดและตำแหน่งของแถบสีน้ำเงินเรืองแสงในแต่ละตัวอย่างที่ปรากฏตรงกันกับแถบสีน้ำน้ำเรืองแสงของสารมาตรฐานสคอพอเลตินเพื่อประเมินชนิดและปริมาณของสารสคอพอเลตินในตัวอย่างนั้นๆ

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

นำสารละลายตัวอย่างพืชที่สกัดได้ในข้อ 1 โดยเลือกใช้ตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมใน10 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) 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอร์มิก ควบคุมอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ตามระยะเวลา (นาที) ต่อ เปอร์เซ็นต์ของอะซิโตไนไตรล์ ดังนี้ นาทีที่ 0-2/80, นาทีที่ 8.5-10/60, 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 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการปรับปริมาตรตัวอย่างในขั้นตอนการสกัด และกรณีความเข้มข้นต่ำเกินไปจนไม่พบสัญญาณของสารสคอพอเลติน ทดสอบซ้ำโดยใช้ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สูงขึ้น นำค่าการคำนวณผลวิเคราะห์ที่ได้มาประเมินร่วมกับผลการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ โดยพืชที่มีปริมาณสคอพอเลตินสูงกว่า 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งจะถูกคัดเลือกเป็นพืชที่มีศักยภาพเหมาะสมสำหรับนำไปสกัดแยกสารสคอพอเลตินในการทดลองต่อไป จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างพืชที่คัดเลือกได้เพิ่มเติมโดยครอบคลุมพื้นที่ที่ต่างกันไม่ต่ำกว่า 5 พื้นที่ต่อจังหวัด โดยเก็บตัวอย่างในพื้นที่ จ.สงขลา จ.ตรัง และ จ.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

สวนวิทยบริการ

สถานที่ดำเนินการทดลอง: ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์จุลินทรีย์และสารพิษจากจุลินทรีย์ และห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารพิษตกค้างทางการเกษตร กลุ่มพัฒนาฯ สวพ.8

การทดลองที่ 2 การทำบริสุทธิ์สารสคอพอเลตินและตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ

อุปกรณ์

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

วิธีการ

สกัดสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Napiroon *et al.,* 2018 โดยนำผลยอแห้งที่บดละเอียดแล้ว 200 กรัมมาสกัดด้วย 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอล ปริมาตร 600 มิลลิลตร สกัดโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที วันละ 6 ชั่วโมง เก็บสลับกับวางทิ้งไว้ในที่มืด เก็บส่วนสารละลายใสที่ได้ในวันที่ 2 และทำการสกัดซ้ำอีก 2 รอบโดยใช้ 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอล 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 เปอร์เซ็นต์เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน โดยเพิ่มความเข้มของเอทิลอะซิเตทขึ้นทีละ 10 เปอร์เซ็นต์และเก็บสารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ 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

การบันทึกข้อมูล: -ปริมาณสคอพอเลตินบริสุทธิ์ต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ในพืชที่คัดเลือกว่ามีศักยภาพในการใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการสกัดสารชนิดนี้

-ลักษณะของสารบริสุทธิ์ที่ได้ และ รูปแบบโครมาโตแกรมจากการนำสารที่สกัดได้ และสารที่แยกผ่านคอลัมน์ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR และ FTIR เพื่อตรวจสอบสูตรโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชั่นของสารที่ได้

ระยะเวลาในการดำเนินการ: เริ่มต้นตุลาคม 2561 สิ้นสุด กันยายน 2563 รวม 2 ปี

สถานที่ดำเนินการทดลอง: ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์จุลินทรีย์และสารพิษจากจุลินทรีย์ กลุ่มพัฒนาฯ สวพ.8

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

การทดลองที่ 3 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด (antimicrobial property)

อุปกรณ์

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

วิธีการ

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 โดยเลือกคู่ของเชื้อให้ตรงกับ

สวพ.8 การเกษตร

ชนิดพืชที่เป็นแหล่งที่มาของเชื้อชนิดนั้นๆมาทำการทดสอบ 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 (ขึ้นอยู่กับชนิดและขนาดของผลไม้ที่ทดสอบ) 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

<u>การบันทึกข้อมูล</u>:

- วัดเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อบนเพลทอาหารด้วยสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์ในแต่ละระดับความเข้มข้นเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแต่ละชนิดจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละชุดทดสอบ

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

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

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 4 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant property)

<u>อุปกรณ์</u>

1. สารสคอพอเลตินบริสุทธิ์จากผลยอบ้าน
2. วัสดุและสารเคมีสำหรับทดสอบ
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
4. อ่างควบคุมอุณหภูมิ

<u>วิธีการ</u>

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

$$\% \text{ scavenging} = [(A_{control} - A_{sample}) / A_{control}] \times 100$$

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

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

<u>การบันทึกข้อมูล</u>: ระดับศักยภาพของสารสคอพอเลตินต่อการกำจัดสารอนุมูลอิสระที่ทดสอบ

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

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

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 5 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารชักนำความต้านทานโรคในพืช (elicitor property)

<u>อุปกรณ์</u>

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

<u>วิธีการ</u>

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 ปริมาณโปรตีน (ตามวิธีของ Bradford, 1976), 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 เพื่อตรวจสอบผลการใช้สคอพอเลตินเป็นตัวชักนำ (elicitor) ให้เกิดความต้านทานในต้นยาสูบและความสัมพันธ์กับวิถีการต้านทานในต้นยาสูบที่เกิดขึ้น

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

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

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

กรมวิชาการเกษตร

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 เปอร์เซ็นต์เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน ทำการแยกเฉพาะ fraction ที่ตรวจพบสารสคอพอเลตินโดยทดสอบบนแผ่น TLC จากนั้นทำการรวม fraction แล้วนำไปแยกอีกครั้งด้วยคอลัมซิลิกา โดยใช้ระบบตัวชะคือ 2 เปอร์เซ็นต์เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ตรวจติดตาม fraction ที่ ออกจากคอลัมน์ด้วยการแยกบนแผ่น TLC ซึ่งใช้ระบบตัวชะเดียวกันกับระบบคอลัมน์ คือ 2 เปอร์เซ็นต์เมทานอลในไดคลอโรมีเทน 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 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อทำการบ่งบอกชนิดของเชื้อรา เมื่อได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้วทำการ sub culture ลงในอาหารวุ้นเอียง (PDA Agar Slant) เชื้อละ 2 ซ้ำ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้เป็น Stock culture เพื่อทำการทดสอบ

กรมวิชาการเกษตร

ความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อสาเหตุโรค 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 เก็บในกล่องพลาสติกใสทีอุณหภูมิห้อง (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

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

ระดับที่ 1 เกิดอาการโรค เป็นแผลขนาดเล็กเท่าหัวเข็มหมุดจำนวน 2-3 แผลและมองเห็นไม่ชัดเจน

ระดับที่ 2 แผลค่อนข้างใหญ่ขนาด 3-4 มิลลิลิตร จำนวน 3-4 แผล เนื้อที่ของแผลต่ำกว่าร้อยละ 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

กรมวิชาการเกษตร

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 2เปอร์เซ็นต์ 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) 6 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
พ่นสารทดสอบทุก 7 วัน และหยุดพ่นสารก่อนเก็บเกี่ยว 14 วัน

5. ทำการทดสอบซ้ำอีก 1 ครั้ง ทั้งกระบวนการ ครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลอง

<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

3. การปรับแผนงบปรมาณระหว่างปี

กรมวิชาการเกษตร

☑ ไม่มี ❑ มี ได้รับอนุมัติเมื่อวันที่..... (โปรดแสดงหลักฐานในภาคผนวก)

❑ เปลี่ยนแปลงงบประมาณ โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

❑ เปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์/ผลผลิต โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

บทที่ 3 ผลการศึกษา

3.1 ผลการดำเนินงานของโครงการ

สรุปผลการดำเนินงานที่ทำได้จริง โดยให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของโครงการ (สรุปภาพรวมของโครงการ)

ผลการดำเนินงานในภาพรวมของโครงการศึกษาปริมาณและคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสคอพอเลตินจากพืช และการประยุกต์ ใช้ควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช (2562-2564) สามารถคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสกัดสารสคอพอเลตินจากการสำรวจพืชท้องถิ่นภาคใต้ตอนล่างจำนวน 18 ชนิดพืช ควบคู่ไปกับการปรับกระบวนการวิเคราะห์ตรวจสอบสคอพอเลตินเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Thin-layer chromatography ทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างพืชที่มีความหลากหลายของ organ ได้จากการทดสอบพร้อมกัน และจากการสำรวจพบพืชที่มีศักยภาพเหมาะสมที่สุดได้แก่ ผลยอบ้าน โดยจากการสำรวจในพื้นที่จังหวัดสงขลา ตรัง และพัทลุง เพื่อจัดทำฐานข้อมูลปริมาณสารสคอพอเลตินที่พบในผลยอพบว่ามีปริมาณเฉลี่ยที่ 393.27$\pm$ 165.42 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง และช่วงปริมาณที่พบสารชนิดนี้เท่ากับ 190.44 - 785.52 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง สำหรับการศึกษาวิธีการสกัดแยกสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์ออกจากผลยอ ได้กระบวนการสำหรับใช้ในการแยกสารดังกล่าวโดยใช้เทคนิคคอลัมโครมาโทกราฟฟี โดยทำการสกัดด้วยวิธี maceration และแยกผ่านคอลัมน์ซิลิกา 2 รอบโดยรอบแรกใช้ระบบการแยกด้วยสารผสมระหว่างเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท โดยปรับเพิ่มจากขั้วต่ำไปยังขั้วสูง ซึ่งสารสคอพอเลตินจะออกจากคอลัมน์ ที่ 60 เปอร์เซ็นต์เอทิลอะซิเตท จากนั้นนำไปแยกครั้งที่สองผ่านคอลัมน์ซิลิกา โดยชะด้วย 2 เปอร์เซ็นต์เมทานอลในไดคลอโรมีเทน สารสคอพอเลตินที่แยกได้จากผลยอเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่ามีคุณสมบัติในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในจานอาหารทดสอบได้จำนวน 19 ชนิดเชื้อ ได้แก่ เชื้อรา 9 ชนิด และเชื้อแบคทีเรีย 10 ชนิด ขณะที่การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH ของสารสคอพอเลตินพบว่าให้ค่าความเข้มข้นในการกำจัดอนุมูล DPPH ให้ลดลงร้อยละ 50 (50 เปอร์เซ็นต์ DPPH scavenging) เท่ากับ 0.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าสคอพอเลตินมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสำหรับการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นตัวชักนำความต้านทานในพืช (elicitor) พบว่า สคอพอเลตินสามารถใช้ชักนำให้ใบยาสูบเพิ่มการสร้างกรดซาลิซิลิก และเพิ่มความว่องไวของเอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส เอนไซม์กลูคาเนส และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็นโมเลกุลและเอนไซม์ในพืชที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มความต้านทานในพืช สำหรับการทดสอบเพื่อวิเคราะห์แนวโน้มในการประยุกต์นำสคอพอเลตินมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางการเกษตรซึ่งดำเนินการโดย

กรมวิชาการเกษตร

ใช้มะม่วงและคะน้าเป็นพืชทดสอบ พบว่าสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถใช้ในการช่วยชะลอความเสียหายของผลมะม่วงที่ได้รับเชื้อแอนแทรกโนสในสภาวะทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ ขณะที่สคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันนี้สามารถใช้ฉีดพ่นเพื่อลดระดับความเสียหายของต้นคะน้าที่ได้รับเชื้อก่อโรคใบจุดในระดับโรงเรือน ซึ่งผลการดำเนินงานศึกษาบรรลุตามวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้

3.2 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง (Output)

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
องค์ความรู้	2	เรื่อง	องค์ความรู้	2	เรื่อง	1. แนวทางการนำสารสคอพอเลตินมาประยุกต์ใช้ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในมะม่วง 2. แนวทางการนำสารสคอพอเลตินมาประยุกต์ใช้ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในคะน้า	มีสารทางเลือกจากธรรมชาติที่สามารถนำมาใช้ต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคในพืชเศรษฐกิจ
ผลงานตีพิมพ์ระดับชาติ	1	เรื่อง	ผลงานตีพิมพ์ระดับชาติ	1	เรื่อง	อยู่ระหว่างการจัดเตรียม manuscript	ได้องค์ความรู้การใช้ประโยชน์จากสารธรรมชาติเพิ่มขึ้น

3.3 ผลลัพท์ที่เกิดขึ้นจริง (Outcome) (ถ้ามี)

ผลลัพท์ที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลลัพท์
- องค์ความรู้จากงานวิจัย ซึ่งพบว่าสคอพอเลตินจากผลยอบ้านมีคุณสมบัติในการเป็น elicitor ได้ต่อยอดสู่การสร้างกิจกรรมงานวิจัยต่อเนื่อง ได้แก่ การใช้สารสกัดจากผลยอในการชักนำความต้านทานของพืช ซึ่งเป็นงานส่วนหนึ่งภายใต้โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีด้านอารักขาพืชเพื่อการเพิ่มขีดความสามารถในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ดำเนินการในปี 65-67)	2565

กรมวิชาการเกษตร

3.4 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง (Impact) (ถ้ามี)

ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลกระทบ
- ได้องค์ความรู้ใหม่ๆสำหรับการพัฒนาต่อยอดงานวิจัยทั้งทางด้านอารักขาพืช การจัดการหลังการเก็บเกี่ยว หรือการนำไปใช้ทางศาสตร์สาขาอื่น เช่น การแพทย์หรือ การผลิตเครื่องสำอาง เป็นต้น อันเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มในผลิตผลทางการเกษตร (ผลลัพท์จากงานวิจัยนี้ได้ต่อยอดสู่การสร้างงานวิจัยการใช้สารสกัดจากผลยอในการชักนำความต้านทานของพืช ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งภายใต้โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีด้านอารักขาพืชเพื่อการเพิ่มขีดความสามารถในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ปี 65-67)	2565
- เกิดการแลกเปลี่ยนองค์ความรู้ และเกิดการสร้างเครือข่ายความร่วมมือระหว่างผู้ร่วมวิจัยและผู้ร่วมสนับสนุนงานวิจัยทั้งภายในหน่วยงานกรมวิชาการเกษตรและหน่วยงานสถาบันการศึกษา ตลอดจนเกษตรกรที่สนใจแนวทางการศึกษาการใช้ประโยชน์จากพืชในลักษณะสหสาขาวิชา ทั้งในด้าน เคมี ชีวเคมี โรคพืช และการเกษตร	2565

3.5 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การใช้ประโยชน์ผลงานวิจัยดำเนินการโดยจัดทำเอกสารตีพิมพ์เผยแพร่องค์ความรู้ (อยู่ระหว่างการจัดเตรียม manuscript) การต่อยอดงานวิจัย โดยนำเทคนิคการตรวจสอบสารสคอพอเลตินไปปรับใช้ในการตรวจสอบผลการชักนำความต้านทานในพืชเบื้องต้น การประสานงานทดสอบการใช้สารสคอพอเลตินในแปลงเกษตรกรเพื่อประเมินประสิทธิภาพการป้องกันหรือลดความรุนแรงของโรคในพืชผักหรือไม้ดอกไม้ประดับโดยมีแปลงเกษตรกรในพื้นที่อ.หาดใหญ่ จ.สงขลาเป็นแปลงทดสอบ

ด้านนโยบาย โดยเจ้าหน้าที่ภาครัฐที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตพืชปลอดภัย

อย่างไร นำองค์ความรู้ไปใช้ส่งเสริมหรือสนับสนุนสารทางเลือกใหม่ให้แก่เกษตรกรนำไปปรับใช้เพื่อลดการใช้สารเคมีตามนโยบาย

โดยเกษตรกร

อย่างไร มีสารทางเลือกสำหรับการนำไปปรับใช้เพื่อยกระดับคุณภาพผลผลิตให้มีความปลอดภัยลดการใช้สารเคมีตามนโยบายภาครัฐ

ด้านสังคม โดยเกษตกรหรือกลุ่มเกษตรกร

กรมวิชาการเกษตร

อย่างไร แหล่งวัตถุดิบในการสกัดสารสคอพอเลตินสามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่นทำให้สามารถนำมาปรับใช้ได้เอง ก่อให้เกิดความเข้มแข็งในการร่วมมือร่วมใจพัฒนาท้องถิ่นวิถีเกษตรแบบพึ่งพาตนเอง

ด้านเศรษฐกิจ โดยเกษตรกร

อย่างไร ใช้สารทางเลือกที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมลดการใช้สารเคมี ทำให้ได้มาซึ่งผลผลิตที่มีคุณภาพดี ส่งผลต่อราคาสินค้าที่มีแนวโน้มสูงขึ้น

โดย เกษตรกร

อย่างไร สามารถเพิ่มรายได้จากการนำพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายมาปลูกเสริมรายได้สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดสารสคอพอเลตินไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆที่ไม่จำกัดเฉพาะทางการเกษตรเท่านั้น เช่น การแพทย์ เป็นต้น

ด้านวิชาการ โดย นักวิจัยกรมวิชาการเกษตร/กรมส่งเสริมการเกษตร/สถาบันการศึกษา และหรือหน่วยงานวิจัยด้านการแพทย์

อย่างไร นำองค์ความรู้จากงานวิจัยนี้ไปต่อยอดสร้างงานวิจัยใหม่ๆทางการเกษตร รวมทั้งปรับใช้ในสาขางานวิจัยที่เกี่ยวข้อง เช่นทางด้านสุขภาพและความงาม หรือทางการแพทย์ เกิดเป็นการบูรณาการงานวิจัยร่วมกันระหว่างหน่วยงานต่อไปในอนาคต

โดย หน่วยงานภาคอุตสาหกรรม

อย่างไร นำองค์ความรู้และแหล่งที่มาของวัตถุดิบไปใช้ในการประยุกต์สร้างสารชีวภัณฑ์ในทางการค้าสำหรับใช้ทดแทนการใช้สารเคมีรวมทั้งใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์อื่นๆตามศักยภาพหรือคุณสมบัติของสารสคอพอเลติน

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล

สรุปผล (ในภาพรวมของกิจกรรมภายใต้โครงการ)

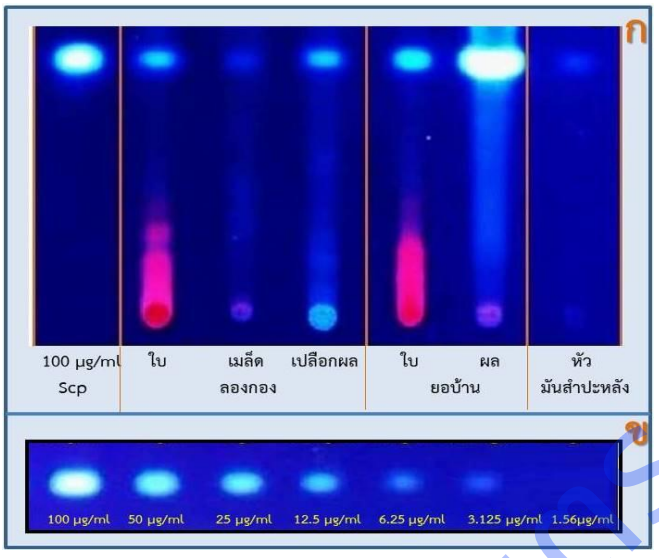
กิจกรรมที่ 1 การสกัดสารสคอพอเลตินและทำสารให้บริสุทธิ์ **(**ปีเริ่มต้น 2562–สิ้นสุด 2563 : 2 การทดลอง**)**

ในภาพรวมของกิจกรรมที่ 1 (ประกอบด้วย 2 การทดลอง) สามารถคัดเลือกพืชท้องถิ่นที่มีศักยภาพในการนำมาเป็นวัตถุดิบสกัดสารสคอพอเลตินจากพืช 18 ชนิด พบว่า ผลยอบ้าน มีปริมาณสคอพอเลตินสูงที่สุดจึงมีความเหมาะสมในการใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับสกัดสารสคอพอเลติน นอกจากนี้ในกระบวนการวิเคราะห์เชิงคุณภาพผู้วิจัยยังได้มีการปรับวิธีการวิเคราะห์สารสคอพอเลตินโดยใช้เทคนิค TLC เพื่อให้สามารถรองรับการวิเคราะห์สำรวจปริมาณสคอพอเลตินในพืชที่มีความหลากหลายของรงควัตถุภายในชิ้นส่วนพืชได้ในคราวเดียวกัน ช่วยให้ง่ายต่อการศึกษาเชิงสำรวจและสามารถปรับใช้เทคนิคนี้ในการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการชักนำความต้านทานในพืชโดยใช้ตัวกระตุ้นต่างๆได้ นอกจากนี้จากการวิจัยยังได้วิธีการสกัดแยกสารสคอพอเลตินจากผลยอโดยเทคนิคการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี ชนิดซิลิกา ซึ่งจากการตรวจสอบยืนยันชนิดสารที่สกัดได้จากวิธีการที่ได้จากการทดลองภายใต้กิจกรรมนี้ พบว่าเป็นเป็นสารสคอพอเลติน ดังนั้นผลที่ได้จากทั้ง 2 การทดลอง จึงเป็นไปตามเป้าหมายวัตถุประสงค์ของกิจกรรม โดยมีรายละเอียดผลการทดลองดังนี้

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 1-ก) และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคนี้คือ 3.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาพที่ 1-ข)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1 การวิเคราะห์สารสคอพอเลตินด้วยเทคนิค TLC; ก) การเรืองแสงของสารสคอพอเลตินในสารสกัดเอทานอลจากตัวอย่างชิ้นส่วนอวัยยะ (organ) ของลองกอง ยอบ้าน และมันสำปะหลัง และ ข) การเรืองแสงของสารมาตรฐานสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 และ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การประเมินพืชท้องถิ่นทั้ง 18 ชนิด (ตารางที่ 1) ด้วยเทคนิค High-pressure liquid chromatography (HPLC) พบว่าให้ผลไปในทิศทางเดียวกับการประเมินเบื้องต้นด้วยวิธี TLC โดยผลยอบ้านมีปริมาณสารสคอพอเลตินสูงที่สุด (ภาพที่ 2)

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

กรมวิชาการเกษตร

ชนิดพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์/วงศ์	แหล่งที่มาของตัวอย่าง	ชิ้นส่วนพืช (organ)	ปริมาณสคอพอเลติน (มก/.กก.น้ำหนักแห้ง)	
				mean ± SD.	ซ้ำ
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
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	ใบ	11.31 ± 1.50	5
		จ.สตูล* และ	เปลือกผล	9.75 ± 15.54	7
		จ. นครศรีธรรมราช *	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

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2 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$\pm$ 165.42 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ผลการจากการศึกษาสำรวจพืชท้องถิ่นในงานวิจัยนี้ บ่งชี้ว่าผลยอบ้านเป็นพืชท้องถิ่นที่มีศักยภาพสูงสำหรับนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อสกัดสารสคอพอเลติน

การทดลองที่ 2 การทำบริสุทธิ์สารสคอพอเลตินและตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ

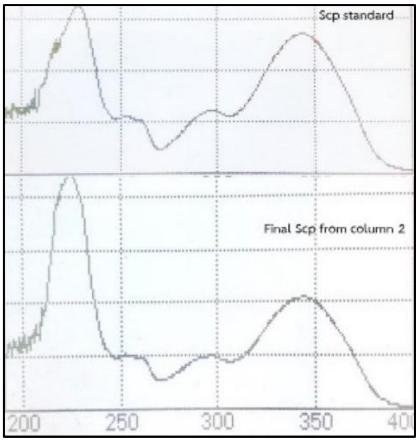
การสกัดสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์จากผลยอบ้านด้วยเทคนิค Column chromatography โดยนำสารสกัดหยาบเมทานอลจากผลยอมาแยกผ่านคอลัมน์ซิลิกา 2 ครั้ง โดยครั้งแรกชะด้วย 0-60 เปอร์เซ็นต์ เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน และ แยกครั้งที่ 2 โดยชะด้วย 2 เปอร์เซ็นต์เมทานอลในไดคลอโรมีเทน เมื่อนำ fraction ที่ตรวจพบการเรืองแสงสีน้ำเงินบนแผ่น TLC ในตำแหน่งเดียวกับสารสคอพอเลติน ไปตรวจสอบพบว่าสารที่แยกได้มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง ดังภาพที่ 3

ระบบการเกษตร

ภาพที่ 3 ขั้นตอนการแยกและทดสอบความบริสุทธิ์ของสารสคอพอเลตินจากผลยอ

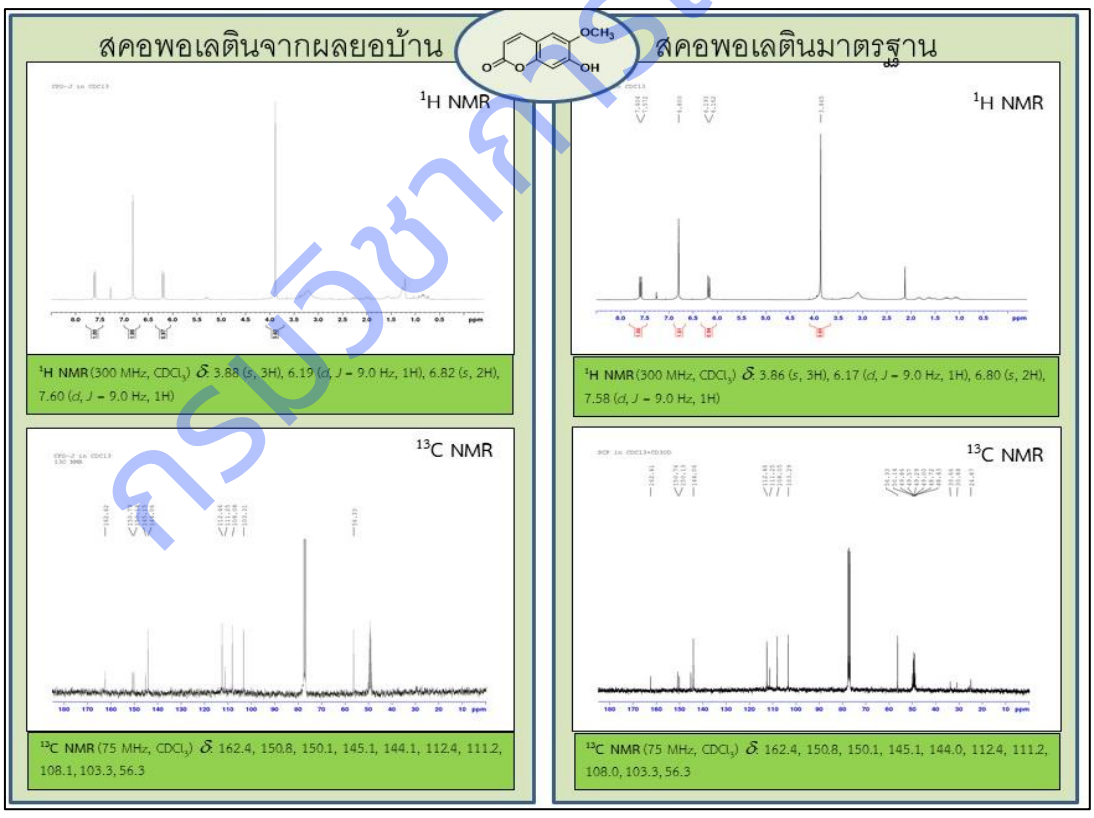
ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพของสารสคอพอเลตินที่สกัดได้จากผลยอบ้านและสารสคอพอเลตินมาตรฐานโดยวิเคราะห์สเปกตรัมของสารทั้ง 2 UV-spectrum ของสารสคอพอเลตินที่แยกได้จากผลยอบ้านแสดงพีคหลักที่ 228 และ 345 นาโนเมตร สอดคล้องกับสารสคอพอเลตินมาตรฐาน (ภาพที่ 4)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 4 ยูวีสเป็กตรัมของสารสคอพอเลตินมาตรฐาน (บน) และสารสคอพอเลตินที่แยกได้จากผลยอบ้าน (ล่าง)

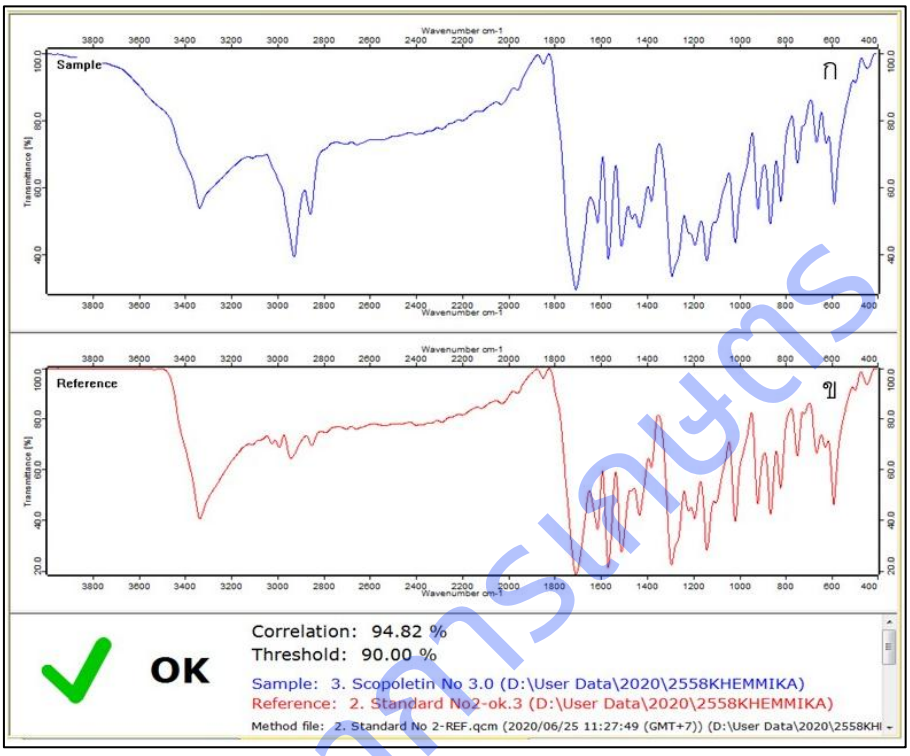
เมื่อเปรียบเทียบเทียบโครมาโตแกรม ^{1}H และ ^{13}C NMR พบว่า สเปกตรัมของสารสคอพอเลตินที่แยกได้จากผลยอบ้านมีความเหมือนกับสารมาตรฐานสคอพอเลติน (ภาพที่ 5) โดยมีรายละเอียดโครงสร้างดังนี้



ภาพที่ 5 ^{1}H NMR และ ^{13}C-NMR สเปกตรัม ของสารสคอพอเลตินที่แยกได้จากผลยอบ้าน และสารสคอพอเลตินมาตรฐาน (ข)

กรมวิชาการเกษตร

ผลการตรวจสอบหมู่ฟังก์ชั่นของสารที่สกัดได้โดยเทคนิค FTIR เปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารสคอพอเลตินมาตรฐาน แสดงดังภาพที่ 6 โดยพบว่าสารที่สกัดได้และสารสคอพอเลตินมาตรฐาน ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล และหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์



ภาพที่ 6 FTIR สเปกตรัม ของสารสคอพอเลตินที่แยกได้จากผลยอบ้าน (ก) และสารสคอพอเลตินมาตรฐาน (ข)

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

กรมวิชาการเกษตร

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

ในภาพรวมของกิจกรรมที่ 2 (ประกอบด้วย 3 การทดลอง) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสคอพอเลตินใน 3 ประเด็น ได้แก่ 1) คุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และคุณสมบัติในการเป็นสารชักนำความต้านทานในพืช ซึ่งผลจากงานวิจัยภายใต้กิจกรรมนี้พบว่าสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้ถึง 7 ชนิดได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามพบว่าสคอพอเลตินไม่เหมาะสมกับการใช้ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเนื่องจากต้องใช้ความเข้มข้นระดับ 5,000 2) คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งพบว่าสคอพอเลตินมีคุณสมบัติดังกล่าว โดยเมื่อนำไปใช้กำจัดอนุมูล DPPH พบว่าให้ค่าความเข้มข้นที่สามารถกำจัดอนุมูลดังกล่าวได้อยู่ในระดับต่ำ คือ 0.60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 3) ซึ่งเป็นปัจจุบันมีการรายงานในวารสารต่างๆน้อยมากสำหรับการนำสคอพอเลตินมาใช้เป็นสารชักนำความต้านทานในพืช โดยผลงานวิจัยบ่งชี้ว่าสคอพอเลตินที่ทดสอบกับใบยาสูบสามารถชักนำโมเลกุลสัญญาณหลายชนิดซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานในพืช เช่นการชักนำให้มีการสะสมของกรดซาลิซิลิก กรดแอสคอร์บิก และการกระตุ้นให้เอนไซม์มีแอคติวิตี้เพิ่มขึ้น เช่น เอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเยไลเอส ซึ่งเกี่ยวข้องกับวิถี phenylpropanoid อันเป็นวิถีที่มีการสร้างสารทุติยภูมิชนิดต่างๆออกมาตอบสนองต่อการสร้างความแข็งแรงให้แก่พืช หรือเอนไซม์กลูคาเนสซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อก่อโรคโดยทำหน้าที่ในการย่อยผนังเซลล์ที่มีกลูแคนเป็นองค์ประกอบ หรือการเพิ่มแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ช่วยในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ลดความเป็นพิษให้แก่พืช รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างลิกนินในพืชเพื่อสริมให้พืชมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น ดังน้นจะเห็นได้ว่าผลจากการดำเนินกิจกรรมนี้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ครบถ้วนทั้ง 3 ประเด็น โดยมีรายละเอียดผลการทดลองดังนี้

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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 1 จะเห็นได้ว่าระดับความเข้มข้นของสคอพอเลตินที่ใช้ทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราตั้งแต่ 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป จำนวน 7 ชนิดเชื้อ โดยพบว่ามีจำนวน 5 ชนิดเชื้อที่สคอพอเลตินความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งได้ดีกว่าการใช้สารเคมีเกษตรแมนโคเซป

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

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อแบคทีเรียถูกยับยั้งด้วยสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆ

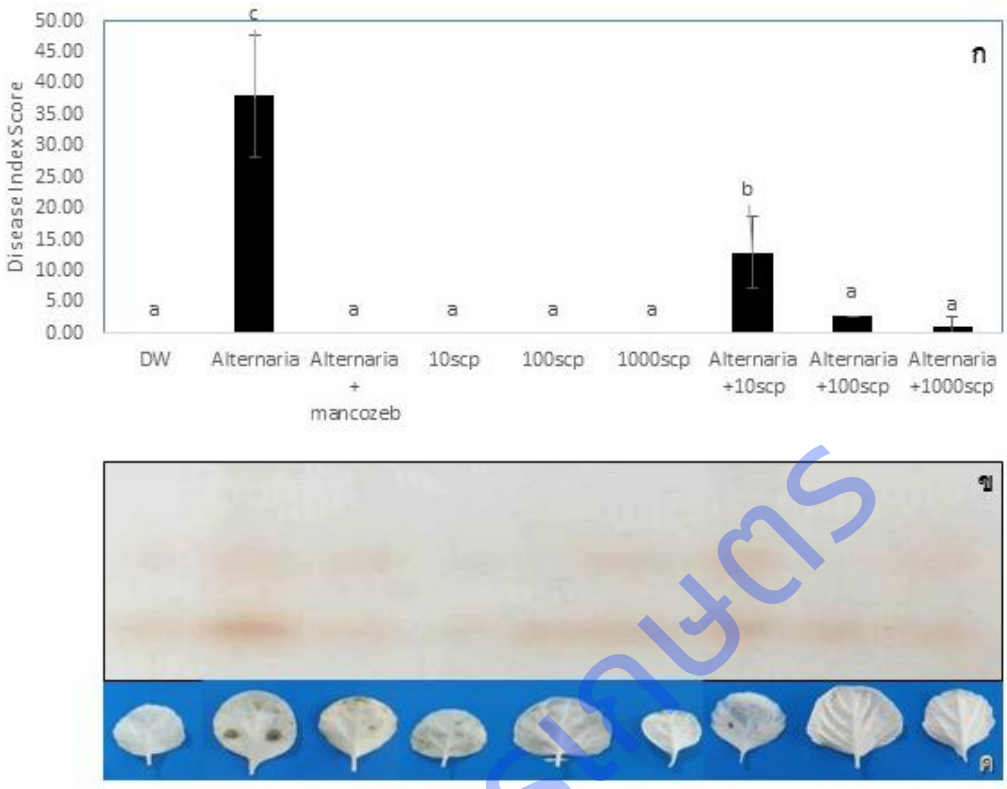
ลำดับที่	ชื่อเชื้อ-แหล่งที่มา	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้ง (ม.ม.)					
		DMSO	100 ugscp/ml	500 ugscp/ml	1,000 ugScp/ml	5000 ugscp/ml	30 ug/ml Streptomycin
1	*Ralstonia solanacearum* พริก (เชียงใหม่) code 1954 (สอพ.)	9.00±1.00	8.00±2.00	9.00±1.00	12.33±0.58	17.00± 1.73	32.00±3.00
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

จากผลการทดสอบที่ได้ในเบื้องต้น จึงได้คัดเลือกเชื้อราจำนวน 2 ชนิดมาทดสอบกับพืชจริง โดยทำการทดสอบแบบ detached leaf กับใบคะน้าโดยใช้เชื้อรา *Alternaria* เป็นเชื้อทดสอบ (ภาพที่ 7) และทดสอบแบบ detached fruit กับผลมะม่วงโดยใช้เชื้อรา *Colletotrichum* เป็นเชื้อทดสอบ (ภาพที่ 8)

กรมวิชาการเกษตร



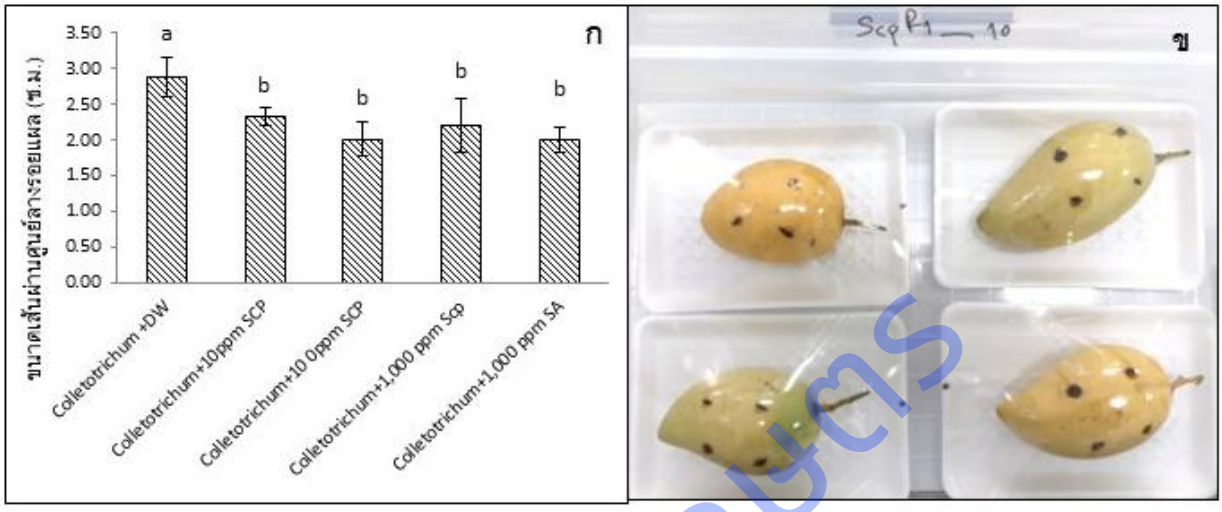
ภาพที่ 7 ค่า Disease index score จากการทดสอบผลของสารสคอพอเลตินต่อการควบคุมการเจริญของเชื้อ *Alternaria* เป็นเวลา 5 วัน (ก) รูปแบบแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแต่ละชุดทดสอบ

และลักษณะของใบคะน้าหลังการทดสอบเป็นระยะเวลา 5 วัน (ข และ ค)

จากการทดสอบแบบ detached leaf ซึ่งเป็นการจำลองการติดเชื้อก่อโรคใบจุด และใช้สารสคอพอเลตินความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ppm มาทดสอบควบคุม พบว่าใบคะน้าที่ได้รับเชื้อเพียงอย่างเดียวจะมีระดับค่า DI-score สูงที่สุด สอดคล้องกับลักษณะรอยแผลที่เห็นได้ชัดเจนบนแผ่นใบร่วมกับการปรากฏแถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เข้มอันเป็นการบ่งชี้ถึงการที่เซลล์พืชถูกทำลาย สำหรับการใช้สคอพอเลตินช่วยควบคุมระดับความรุนแรงของโรคพบว่าสคอพอเลตินที่ความเข้มข้น 10 ppm ช่วยลดระดับความรุนแรงของโรคลงได้ แต่ยังคงปรากฏรอยแผลและมีแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เข้มกว่า ชุดทดสอบที่ใช้สารสคอพอเลติน 100 และ 1,000 ppm ซึ่งสามารถควบคุมได้ไม่แตกต่างกับการใช้สารเคมีแมนโคเซป อย่างไรก็ตามพบว่าใบคะน้าปกติที่ได้รับสารสคอพอเลตินความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ppm แสดงลักษณะใบปกติ โดยมีแถบแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเด

กรมวิชาการเกษตร

สเข้มขึ้นตามลำดับ ซึ่งผลดับกล่าวสนับสนุนผลการทดลองใช้สารสคอพอเลตินกระตุ้นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้ในใบยาสูบ



ภาพที่ 8 การทดสอบใช้สารสคอพอเลตินควบคุมการเจริญของเชื้อ Colletotrichum บนผลมะม่วงโดยวิธี detached fruit เป็นระยะเวลา 7 วัน; ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผล (ก) และ การเก็บรักษาผลมะม่วงระหว่างการทดสอบ (ข)

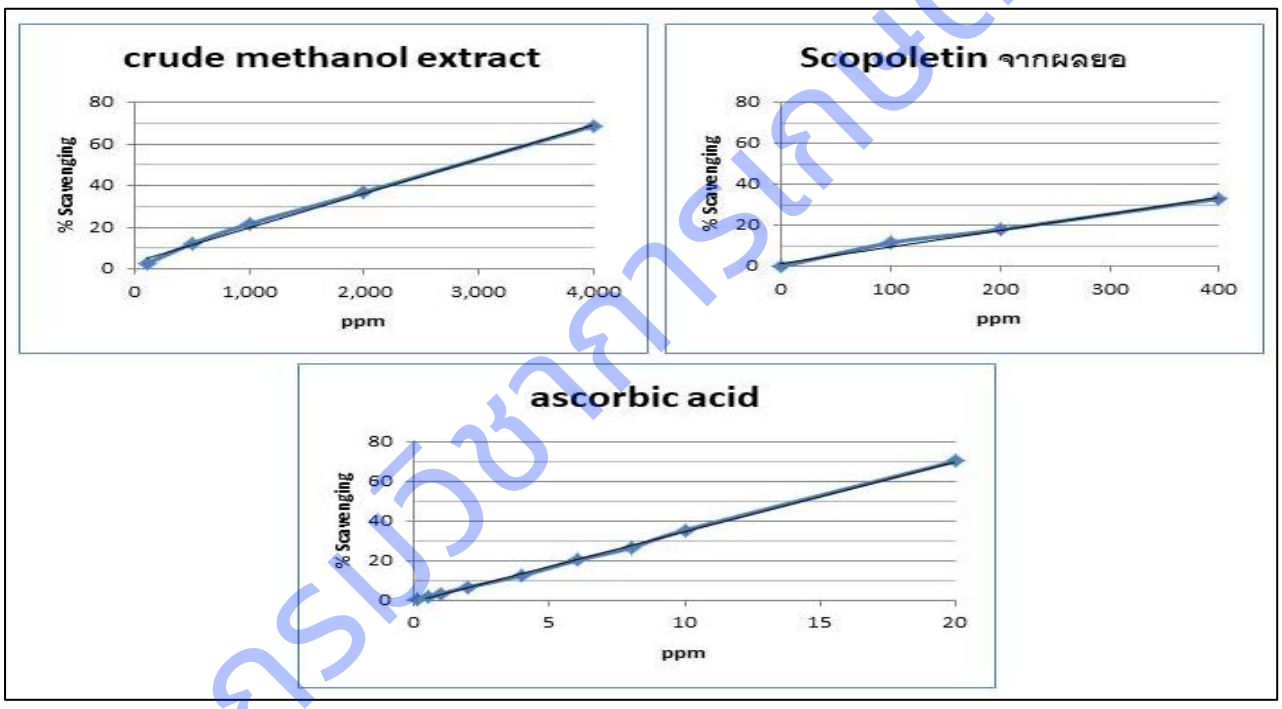
จากการทดสอบแบบ detached fruit ซึ่งเป็นการจำลองการติดเชื้อก่อโรคแอนแทรกโนส และใช้สารสคอพอเลตินความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ppm มาทดสอบควบคุม โดยมีกรดซาลิซิลิกซึ่งเป็นสารที่เคยมีการรายงานการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืช พบว่ามะม่วงที่ได้รับเชื้อเพียงอย่างเดียวจะมีระดับค่า DI-score สูงที่สุดที่ 2.88 $\pm$ 0.27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

จากการประเมินเบื้องต้นในการควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และทดสอบกับพืชจริง บ่งชี้ว่าสารสคอพอเลตินมีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางการเกษตรโดยใช้เป็นสารควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยตรง หรืออาจใช้ในการเป็นสารชักนำความต้านทานในพืชดังจะเห็นได้จากมีการเพิ่มขึ้นของสารโมเลกุลบ่งชี้การเกิดความต้านทานขึ้นภายในต้นพืช เช่น การเพิ่มแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ภายหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยสารสคอพอเลติน

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 4 การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารการกำจัดอนุมูลอิสระชนิด DPPH

ผลการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสคอพอเลตินที่สกัดและทำบริสุทธิ์จากผลยอบ้าน โดยศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระชนิด 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งผลการศึกษาพบว่า สารสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 0.60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 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 9)



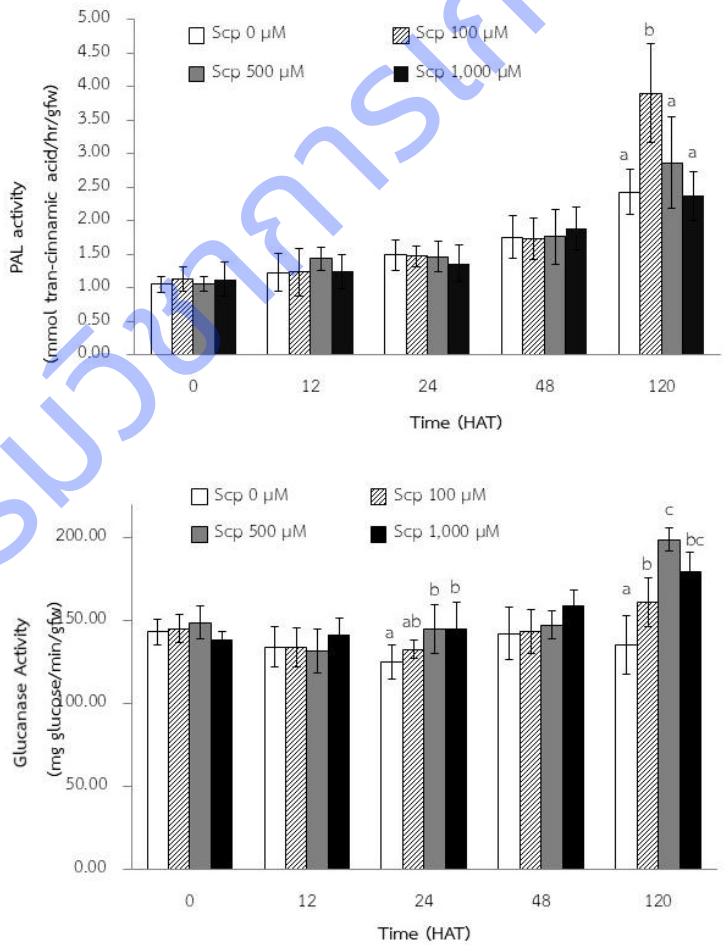
ภาพที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า เปอร์เซ็นต์ DPPH Scavenging กับความเข้มข้นของสารทดสอบ

ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าสารสคอพอเลตินที่สกัดได้จากผลยอมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH ได้ และอาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้ประโยชน์โดยอาศัยคุณสมบัตินี้ได้ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 5 การทดสอบคุณสมบัติในการใช้สารสคอพอเลตินเป็นสารชักนำความต้านทานในใบยาสูบ

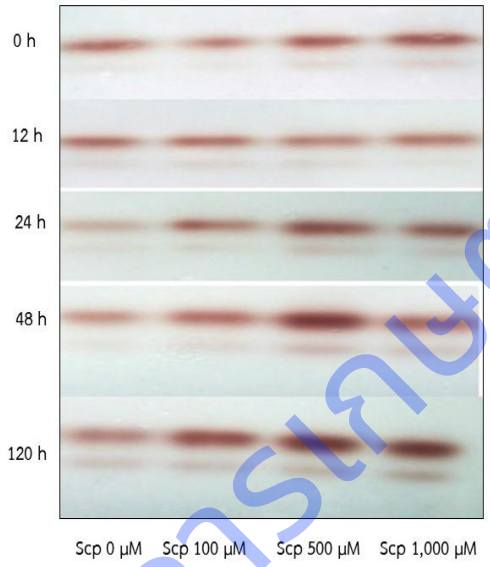
จากการดำเนินการวิเคราะห์ความว่องไวของเอนไซม์เกี่ยวข้องกับการเกิดความต้านทานในพืช จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ กลูคาเนส ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส และเปอร์ออกซิเดส และสารทุติยภูมิที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานพืช 2 ชนิด ได้แก่ กรดซาลิซิลิก และกรดแอบไซซิก พบว่ายาสูบที่ทรีตสารสคอพอเลตินแบบ infiltrate ลงบนใบโดยตรงที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เพียงพอที่จะกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความว่องไวของของเอนไซม์กลูคาเนส สูงกว่าชุดควบคุม โดยเห็นได้ชัดในช่วง 120 ชั่วโมงหลังจากการทรีตสาร ขณะที่สคอพอเลตินความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ ให้ผลกระตุ้นความว่องไวของเอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสโดยเห็นผลแตกต่างชัดเจนหลังการ ที่เวลา 120 ชั่วโมงหลับการทรีตสาร (ภาพที่ 10)



กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของความว่องไวของเอนไซม์ฟินิลอลานีนแอมโมเนียไลเอส (บน) และเอนไซม์กลูคาเนส (ล่าง) ในใบยาสูบที่ทรีตด้วยสารสคอพอเลตินความเข้มข้น 0, 100, 500, และ 1,000 ไมโครโมลาร์

ผลการใช้สารสคอพอเลตินกระตุ้นแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีการย้อมแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสบนแผ่นเจลอะคริลาไมด์แสดงดังภาพที่ 11



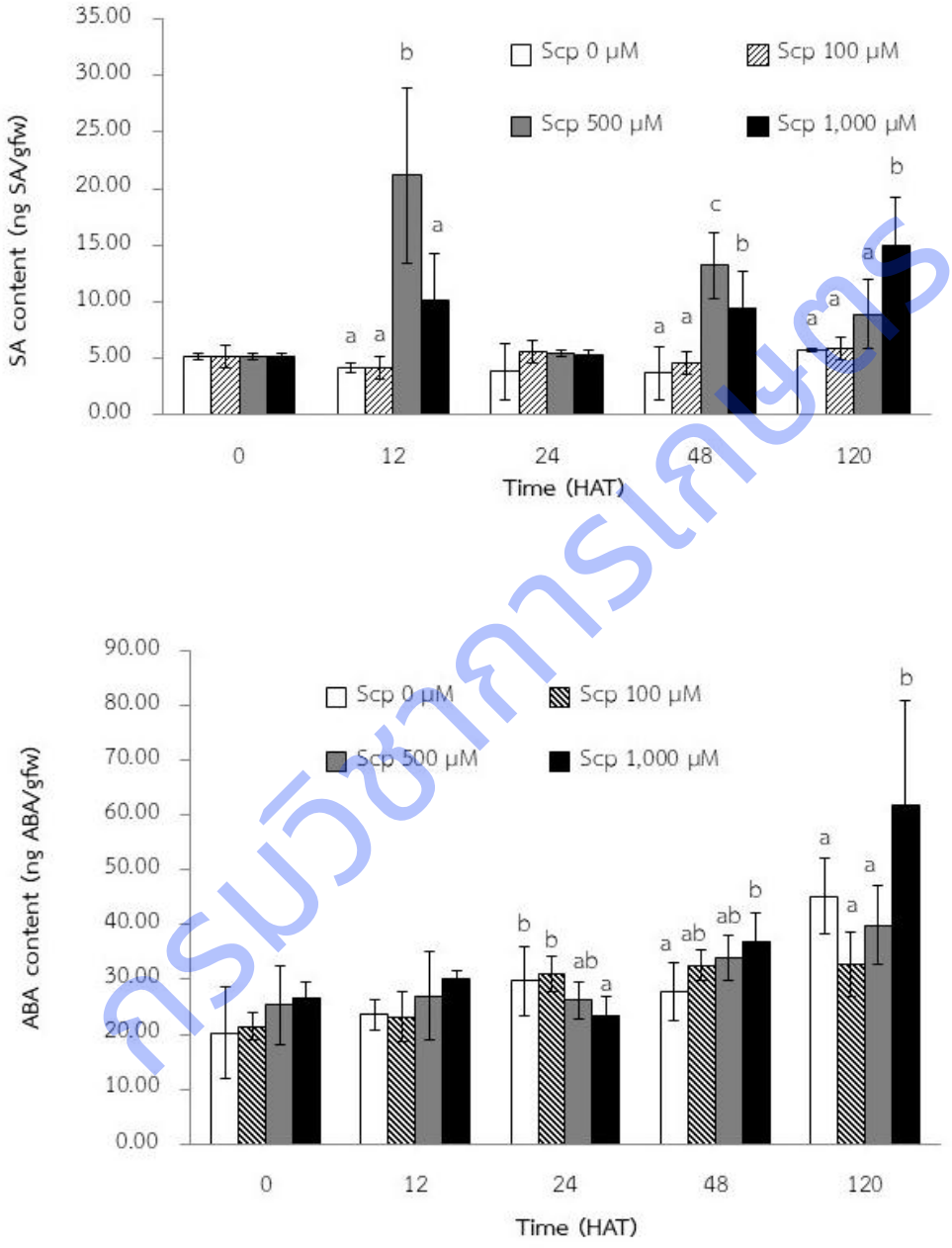
ภาพที่ 11 การย้อมแอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบยาสูบที่ทรีตด้วยสารสคอพอเลตินความเข้มข้น 0, 100, 500, และ 1,000 ไมโครโมลาร์ บนแผ่นเจลอะคริลาไมด์ชนิดไม่เสียสภาพ (Native-PAGE) ที่เวลาต่างๆ

จากภาพที่ 11 พบว่า แถบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแต่ละชุดทดสอบในช่วงเริ่มต้น มีขนาดใกล้เคียงกัน และในชั่วโมงที่ 24 จะเริ่มเห็นชุดใบยาสูบที่ทรีตด้วยสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครโมล่าร์ให้ขนาดของแถบแอคติวิตี้สูงที่สุดต่อเนื่องมายังชั่วโมงที่ 48 และ 120 อย่างไรก็ตามที่เวลา 120 ชั่วโมงพบว่าการให้สคอพอเลตินกับใบยาสูบทุกความเข้มข้นปรากฏแถบของแอคติวิตี้มีขนาดใหญ่และเข้มกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน

สำหรับการใช้สารสคอพอเลตินกระตุ้นโมเลกุลส่งสัญญาณของระบบ systemic acquire resistance ผ่านการเพิ่มปริมาณกรดซาลิซิลิกในใบ พบว่า ใบยาสูบที่ทรีตด้วยสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์มีปริมาณกรดซาลิซิลิกเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนที่เวลา 12 ชั่วโมงแรก ซึ่งกรดซาลิซิลิกจัดเป็นโมเลกุลสัญญาณที่จะถูกพืชใช้ในการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์หรือสารทุติยภูมิต่างๆสำหรับรองรับการบุกรุกของเชื้อก่อโรค โดยจะส่งต่อไปยังบริเวณต่างๆของต้นพืชผ่านระบบท่อลำเลียง นอกจากนี้ยังพบว่าหลังจากใบยาสูบได้รับการทรีตด้วยสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง สามารถตรวจพบปริมาณกรดแอบไซซิกสูงที่สุด (ภาพที่ 12) ทั้งนี้กรดแอบไซซิกจัดเป็นสารทุติยภูมิที่มีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้มภูมิคุ้มกันในพืชผ่านทางวิถีของกรดจัสโมนิก

กรมวิชาการเกษตร

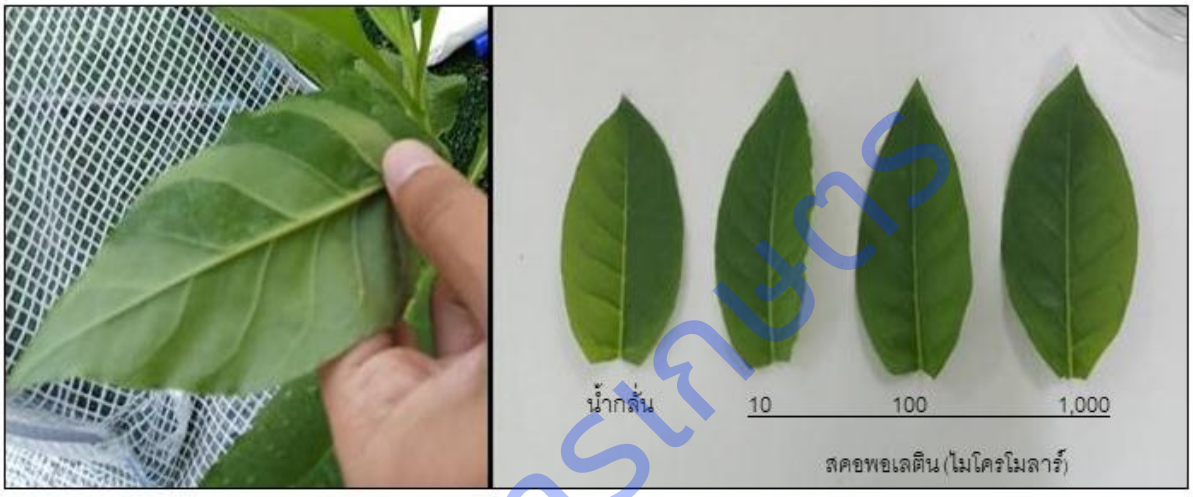
โดยจะเห็นได้ว่าช่วงเวลาในการกระตุ้นสารทุติยภูมิทั้ง 2 ชนิดเกิดขึ้นคนละช่วงเวลาทั้งนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยมีการรายงานก่อนหน้าซึ่งระบุว่ากรดซาลิซิลิกและกรดแอบไซซิกมีความสัมพันธ์ในรูปแบบ Antagonistic interaction (Yasuda et al., 2008)



ภาพที่ 12 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดซาลิซิลิก (บน) และกรดแอบไซซิก (ล่าง) ในใบยาสูบที่ทรีตด้วยสารสคอพอเลตินความเข้มข้น 0, 100, 500, และ 1,000 ไมโครโมลาร์ที่เวลาต่างๆ

กรมวิชาการเกษตร

การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสคอพอเลตินต่อใบยาสูบดำเนินการหลังจากทำการ infiltrate สารสคอพอเลติน ความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ลงบนแผ่นใบบนต้นยาสูบเปรียบเทียบกับการ infiltrate ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำใบยาสูบที่ผ่านการทรีตสารเป็นเวลา 120 ชั่วโมงมาตรวจสภาพใบ พบว่าไม่มีการตายของเซลล์เกิดขึ้นบนแผ่นใบทุกชุดทดสอบ (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 ใบยาสูบที่ถูก infiltrate ด้วยสารสคอพอเลติน (ซ้าย) และ สภาพใบยาสูบที่ได้รับสารสคอพอเลตินความเข้มข้น 0, 100, 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ เมื่อเวลาผ่านไป 120 ชั่วโมง (ขวา)

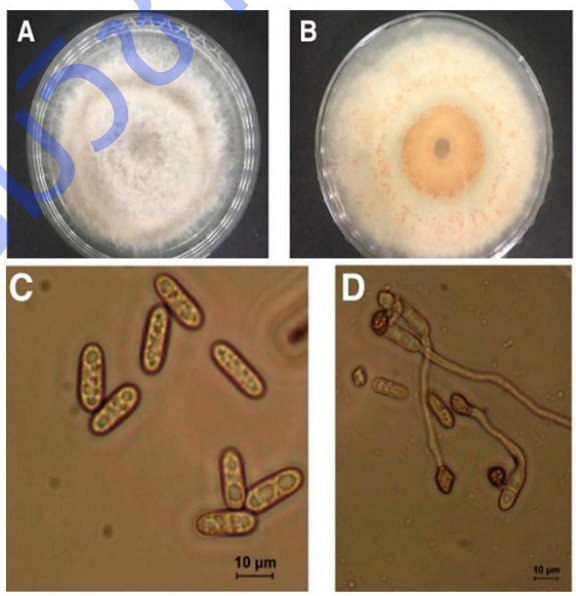
กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 3 การประยุกต์ใช้สารสคอพอเลตินเพื่อควบคุมโรคในพืชเศรษฐกิจบางชนิด(ปีเริ่มต้น. 2564– สิ้นสุด 2564)

ในภาพรวมของกิจกรรมที่ 3 มีเป้าหมายเพื่อการทดสอบประยุกต์นำสคอพอเลตินที่สกัดได้จากผลยอมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร โดยผลการดำเนินการทดสอบใช้ในการช่วยลดระดับความรุนแรงให้กับพืชที่ติดโรค ได้แก่ มะม่วงที่ได้รับเชื้อ *Colletotrichum* และ คะน้าที่ได้รับเชื้อ *Alternaria* ซึ่งการประยุกต์ใช้ดังกล่าวเป็นการใช้คุณสมบัติตรงตามคุณสมบัติข้อแรกของกิจกรรมที่ 2 ได้แก่คุณสมบัติในการเป็นสารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยเป็นการต้านเชื้อโดยตรง ซึ่งผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสคอพอเลตินมีคุณสมบัติในการนำมาใช้ช่วยลดความเสียหายให้กับคะน้าและมะม่วงที่ได้รับเชื้อ อย่างไรก็ตามการนำองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยถึงคุณสมบัติในการชักนำความต้านทานให้กับพืชได้ อาจสามารถนำมาทดสอบเพิ่มเติมได้สำหรับงานวิจัยที่จะต่อยอดจากงานชิ้นนี้ โดยการทดลองภายใต้กิจกรรมที่ 3 มีรายละเอียดดังนี้

การทดลองที่ 6 การควบคุมโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงด้วยสารสคอพอเลตินในห้องปฏิบัติการ

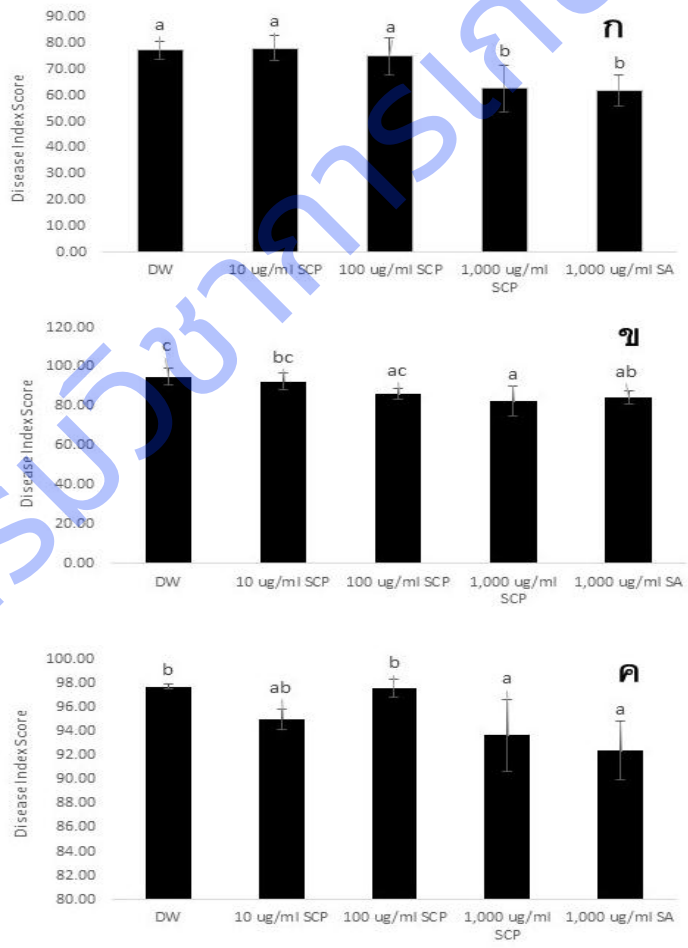
การแยกเชื้อก่อโรคแอนแทรกโนสจากผลมะม่วงที่มีอาการของโรค สามารถแยกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* โดยมีลักษณะของเชื้อที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 14 นอกจากนี้สารสคอพอเลตินที่ใช้ทดสอบได้จากการสกัดแยกจากผลยอบ้านตามกรรมวิธีที่ได้จากการศึกษาในกิจกรรมที่ 1



ภาพที่ 14 ลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

กรมวิชาการเกษตร

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 อยู่ในช่วง 92-94 ขณะที่มะม่วงที่ผ่านการปลูกเชื้อและไม่ได้รับสารทดสอบใดๆพบว่ามีระดับ DI-score เท่ากับ 97.71 $\pm$ 0.21 ผลแสดงดังภาพที่ 15



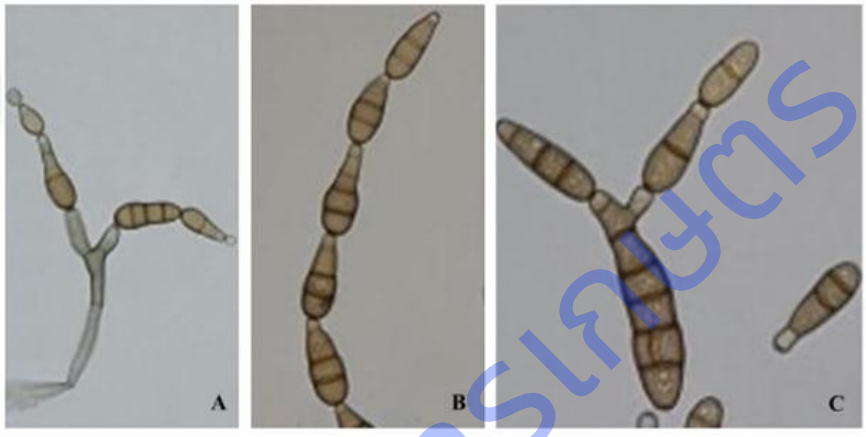
ภาพที่ 15 ค่า Disease Index score ของผลมะม่วงที่ผ่านการปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* และ

กรมวิชาการเกษตร

ได้รับสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 7 วัน (ก) 10 วัน (ข) และ 12 วัน (ค) (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; n = 3)

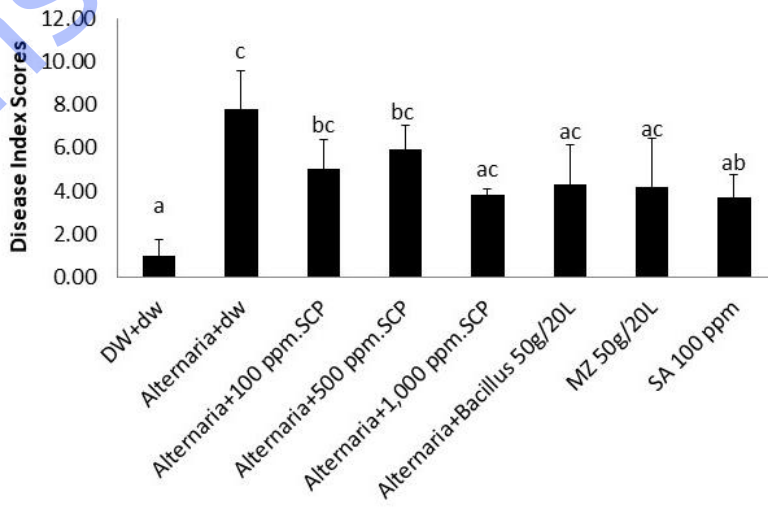
การทดลองที่ 7 การใช้สารสคอพอเลตินควบคุมการเกิดโรคใบจุดในคะน้าในเรือนทดลอง

การแยกเชื้อก่อโรคใบจุดจากต้นคะน้าที่มีอาการของโรค สามารถแยกเชื้อ *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltshire โดยมีลักษณะของเชื้อที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 16 นอกจากนี้สารสคอพอเลตินที่ใช้ทดสอบได้จากการสกัดแยกจากผลยอบ้านตามกรรมวิธีที่ได้จากการศึกษาในกิจกรรมที่ 1



ภาพที่ 16 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 16



กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 17 ค่า Disease Index score ของต้นคะน้าที่ผ่านการปลูกเชื้อ *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltshire และได้รับสารทดสอบความเข้มข้นต่างๆกันเป็นเวลา 7 วัน (n = 4)

การใช้สารทดสอบทุกความเข้มข้นมีแนวโน้มที่จะสามารถช่วยลดระดับความรุนแรงของโรคใบจุดได้ ซึ่งจากภาพที่ 17 พบว่าการใช้กรดซาลิซิลิกให้ผลดีที่สุดโดยมีค่า Disease Index Score (DI-score) แตกต่างจากต้นคะน้าในกลุ่มที่ได้รับการปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียวอย่างชัดเจน ในขณะที่การใช้สคอพอเลติน 1,000 ppm หรือบาซิลลัส ซับทิลิส 50g/20L หรือแมนโคเซป 50g/20L ให้ค่าเฉลี่ยที่น้อยกว่าแต่ยังคงแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับต้นคะน้าที่ปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองนี้บ่งชี้ถึงการปรับใช้สารสคอพอเลตินในรูปแบบสารที่ใช้ช่วยบรรเทาความรุนแรงเมื่อเกิดปัญหาโรคพืชขึ้น ซึ่งถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากสามารถสกัดออกมาได้จากพืชวัตถุดิบที่หาได้ง่ายและต้นทุนวัตถุดิบไม่สูงมาก

4.2 อภิปรายผล

จากการศึกษาพืชท้องถิ่นภาคใต้ตอนล่างจำนวน 18 ชนิด พบว่ายอบ้าน (เฉพาะส่วนผล) เป็นพืชที่มีศักยภาพสูงที่สุดสำหรับนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดสารสคอพอเลตินเพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อไป ทั้งในด้านการแพทย์ ด้านการเกษตร หรือด้านอื่นๆที่เกี่ยวข้อง และจากการตรวจสอบราคาในปี 2564 พบว่าสารสคอพอเลตินที่มีจำหน่ายในเชิงการค้าปริมาณ 100 มิลลิกรัม ที่ความบริสุทธิ์$\geq$ 99 เปอร์เซ็นต์ มีราคาสูงถึงหนึ่งหมื่นบาทโดยประมาณ ซึ่งผลการวิเคราะห์เพื่อจัดทำฐานข้อมูลปริมาณสคอพอเลตินในผลยอบ้านที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ต่างๆ ถึง 21 พื้นที่ ครอบคลุมพื้นที่ จ.สงขลา จ.ตรัง และจ.พัทลุง พบว่า มีปริมาณสคอพอเลตินโดยเฉลี่ย 393.27$\pm$ 165.42 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักผลยอแห้ง 1 กิโลกรัม ระดับปริมาณของสารสคอพอเลตินเฉลี่ยในผลยอที่ได้จากการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ West and Deng (2010) ซึ่งได้วิเคราะห์ปริมาณสารสคอพอเลตินจากผลยอที่เก็บจากพื้นที่ต่างกัน 8 แหล่ง ครอบคลุมพื้นที่เฟรนโปลินิเซีย ได้แก่ ตาฮิติ โมโอเรอา โมทูฟาเรโอเน่ ตองก้า สาธารณรัฐโดมินิกัน โอกินาวา ไทย และฮาวาย พบว่ามีสคอพอเลตินอยู่ในช่วง 100-400 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักผลยอแห้ง 1 กิโลกรัม ดังนั้นจะเห็นได้ว่าหากสามารถสกัดสารสคอพอเลตินได้จากผลยอบ้านซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายทั้งในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างรวมถึงพื้นที่ต่างๆทั่วประเทศ จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชชนิดนี้ได้ต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ในขั้นตอนการประเมินปริมาณสคอพอเลตินเบื้องต้นได้มีการปรับเทคนิค TLC เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ชิ้นส่วนพืชได้หลายชนิดพร้อมกันทั้งส่วนใบ ราก และผล โดยไม่ถูกรบกวนหรือถูกรบกวนน้อยมากจากสีของสารชนิดอื่นในพืชนั้นๆ พบว่าระบบการแยกที่เหมาะสม คือ การแยกบนแผ่น TLC ชนิด normal phase ภายใต้ระบบตัวทำละลายเฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอล:น้ำ ($MeOH:H_2O$) ในอัตรา 75:25 (V/V) ซึ่งการใช้เทคนิคดังกล่าวให้ผลสอดคล้องเป็นไปในทางเดียวกับการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค HPLC นอกจากนี้เทคนิค TLC ยังมีข้อดีคือเป็นเทคนิคที่มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการสกัดและวิเคราะห์ค่อนข้างต่ำ สามารถดำเนินการได้ไม่ยาก และไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีความซับซ้อนและมีต้นทุนการลงทุนสูง แม้จะมีข้อจำกัดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่มีความละเอียดไม่เทียบเท่า HPLC แต่

กรมวิชาการเกษตร

ผู้วิจัยที่สนใจสามารถนำเทคนิคนี้ไปปรับใช้ รองรับการศึกษาเชิงสำรวจหรือเพื่อการประเมินเชิงคุณภาพของสารสคอพอเลตินในพืชหรือผลิตภัณฑ์จากพืชได้ต่อไปในอนาคตได้

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

การทดสอบฤทธิ์ของสารสคอพอเลตินที่สกัดมาจากผลยอบ้านต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจำนวน 9 ชนิด และเชื้อแบคทีเรียจำนวน 10 ชนิด พบว่าสคอพอเลตินมีแนวโน้มในการประยุกต์ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย โดยที่ระดับความเข้มข้นของสคอพอเลติน 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์จำนวน 7 ชนิดเชื้อ และอาจลดปริมาณความเข้มข้นในการใช้เพื่อลดการสิ้นเปลืองการใช้สารลงได้ โดยผู้วิจัยที่สนใจนำสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากยอบ้านซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายสามารถนำไปศึกษาต่อยอดได้ในส่วนของการหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการนำไปใช้ควบคุมเชื้อราโรคพืชทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับแปลงต่อไป นอกจาก เนื่องจากผลการทดสอบฤทธิ์พบว่าต้องใช้สารสคอพอเลตินในปริมาณมาก ทั้งยังให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 10 ชนิดที่ทดสอบได้น้อยหรือไม่ยับยั้งเลย จึงไม่คุ้มค่าต่อการนำไปประยุกต์ใช้จริงกับการควบคุมแบคทีเรียทางการเกษตร

การทดสอบฤทธิ์ของสารสคอพอเลตินที่สกัดมาจากผลยอบ้าน พบว่าสคอพอเลตินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH ได้โดยต้องใช้ความเข้มข้นที่ 0.6 มิลลิลิกรัม/มิลลิลิตร หรือ 600 มิลลิกรัม/ลิตร ในการกำจัดอนุมูล DPPH ลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเทียบกับพืชท้องถิ่นบางชนิดแล้วสารสกัดสคอพอเลตินให้ผลในการกำจัดอนุมูลที่ดีกว่าเนื่องจากใช้ในปริมาณที่น้อยกว่าก็ให้ผลกำจัดอนุมูล DPPH ได้เท่าเทียมกัน อย่างไรก็ตาม การนำสคอพอเลตินมาประยุกต์ใช้โดยอาศัยคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอาจต้องคำนึงถึงต้นทุนในการสกัดร่วมด้วย อย่างไรก็ตาม คุณสมบัติดังกล่าวนับเป็นคุณสมบัติเสริมที่บ่งชี้ให้ทราบว่าสคอพอเลตินเป็นอีกสารทางเลือกหนึ่งที่มีคุณสมบัติในด้านการกำจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านที่มีความจำเพาะกับคุณสมบัตินี้ต่อไป

การศึกษาผลของการใช้สารสคอพอเลตินเป็นสารชักนำความต้านทานในใบยาสูบ พบว่าสคอพอเลตินไม่ก่อให้เกิดการตายของเซลล์ ซึ่งในเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้สคอพอเลตินกับใบยาสูบในรูปแบบ exo-scopoletin สามารถทำได้เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ของใบยาสูบ และเมื่อพิจารณาจากผลการกระตุ้นการเพิ่มของ

กรมวิชาการเกษตร

ของแอคติวิตี้ของเอนไซม์ และสารทุติยภูมิที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานพืช พบว่าสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ให้ผลกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของกรดซาลิซิลิกซึ่งเป็นโมเลกุลส่งสัญญาณหลักในระบบภูมิต้านทานพืชแบบ systemic acquired resistance ภายในเวลา 12 ชั่วโมงแรกของการทรีตสาร ซึ่งมีความสอดคล้องกับพืชโดยทั่วไปใช้กรดซาลิซิลิกเป็นโมเลกุลส่งสัญญาณในวิถีดังกล่าว ดังนั้นการตอบสนองในวิถีนี้โดยผ่านการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดซาลิซิลิกจึงเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วก่อนการกระจายไปยังส่วนต่างๆของพืชเพื่อให้มีการชักนำการสร้างเอนไซม์และสารทุติยภูมิอื่นๆภายในระบบตามมา อย่างไรก็ตามจะเห็นว่ากรดแอบไซซิกไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นในช่วงแรก แต่กลับพบปริมาณกรดแอบไซซิกสูงขึ้นอย่างชัดเจนในช่วง 120 ชั่วโมงหลังการทรีตสาร ซึ่งอาจเป็นผลจากการทำงานของกรดซาลิซิลิกซึ่งเป็นโมเลกุลสัญญาณในระบบ SAR มีลักษณะควบคุมสวนทางกับการทำงานของกรดแอบไซซิกซึ่งมีความสัมพันธ์กับระบบความต้านทานในวิถีของกรดจัสโมนิก และเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงความว่องไวของเอนไซม์ในระบบความต้านต้านพืช จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ กลูคาเนส เปอร์ออกซิเดส และฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส พบว่ายาสูบที่ทรีตสารสคอพอเลตินความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ แบบ infiltrate ลงบนใบโดยตรงเพียงพอที่จะกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความว่องไวของของทั้ง 3 ชนิด โดยเห็นได้ว่ามีระดับแอคติวิตี้สูงกว่าชุดควบคุม โดยเฉพาะในช่วง 120 ชั่วโมงหลังจากการทรีตสาร จึงมีแนวโน้มว่าการใช้สารสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ หรือต่ำกว่าอาจสามารถนำมาใช้ชักนำความต้านทานในต้นยาสูบได้โดยผ่านทางการกระตุ้นภูมิต้านทานในวิถี systemic acquired resistance หรือ induce systemic resistance

การนำสารสคอพอเลตินที่สกัดได้จากผลยอบ้านมาประยุกต์ใช้ทางการเกษตรในพืชเศรษฐกิจได้แก่การใช้ควบคุมโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงและควบคุมโรคใบจุดในคะน้า พบว่าให้ผลเชิงบวก โดยสคอพอเลตินเป็นสารที่มีแนวโน้มนำมาใช้ในการช่วยแก้ปัญหาเพื่อลดระดับความรุนแรงหลังพืชเกิดการติดเชื้อ อันเป็นการแสดงถึงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบบ direct inhibition และในขณะเดียวกันพบว่าสคอพอเลตินยังสามารถชักนำสารโมเลกุลหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้างความต้านทานภายในพืช ดังนั้นจึงอาจทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการประยุกต์ใช้ก่อนที่พืชจะเกิดการติดเชื้อ โดยเป็นการกระตุ้นให้พืชเตรียมความพร้อมรองรับการบุกรุกของศัตรูพืชในช่วงที่มีแนวโน้มเกิดการระบาดซึ่งผลเสียหายจะน้อยกว่าการใช้หลังจากที่พืชเกิดการติดเชื้อไปก่อนหน้าแล้ว

ข้อเสนอแนะต่อผู้เกี่ยวข้องสำหรับการดำเนินงานในระยะต่อไป

สำหรับการดำเนินงานต่อยอดจากโครงการวิจัยนี้ อาจพิจารณาในประเด็นการปรับใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารสคอพอเลตินด้วยวิธี TLC ซึ่งทำได้ง่ายและค่อนข้างประหยัดค่าใช้จ่าย โดยเหมาะสำหรับนำไปใช้ในการสำรวจสคอคอเลตินในพืชเชิงคุณภาพ หรือการปรับใช้ในการศึกษาการสร้างความต้านทานในพืชโดยใช้เทคนิคนี้ในการประเมินปริมาณสคอพอเลตินที่ถูกชักนำให้พืชสร้างขึ้น ภายใต้ปริมาณที่มากเพียงพอที่จะสามารถตรวจสอบด้วยวิธีนี้ได้

กรมวิชาการเกษตร

นอกจากนี้สำหรับอีกประเด็นหนึ่งคือการใช้ประโยชน์จากการแยกสารสคอพอเลตินออกมาจากผลยอเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์สำหรับประยุกต์ใช้ในงานอื่นๆเช่น การผลิตฟิล์มเก็บรักษาผลไม้ที่ผสมสารสคอพอเลตินโดยอาศัยคุณสมบัติการมีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชั่นรวมทั้งมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิดจึงมีแนวโน้มว่าน่าจะสามารถช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้ได้นานขึ้น และสำหรับการใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรอาจมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนการปรับรูปแบบการใช้งานให้เหมาะสม เช่น การใช้ในลักษณะสารบริสุทธิ์ การใช้ในลักษณะเป็นสารสกัดหยาบ รูปแบบ formulation ที่เหมาะสมในการนำไปใช้งานที่สอดคล้องกับวัตถประสงค์การใช้งาน เช่นการใช้เพื่อลดระดับความรุนแรงหลังพืชติดเชื้อ หรือการใช้เป็นสาร elicitor เพื่อชักนำควาต้านทานให้พืชทนต่อการบุกรุก ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงเป็นเพียงก้าวแรกที่สามารถนำไปพัฒนาศึกษาในก้าวต่อๆไปได้อีกหลากเส้นทางต่อไป

ปัญหาและอุปสรรคในการทำงาน

1. ปัญหาด้านงบประมาณ โดยเฉพาะในปี 2563 โครงการวิจัยได้รับผลกระทบอย่างมากเนื่องจากมีการปรับลดงบประมาณทั้งกรม ส่งผลให้แผนการวิเคราะห์ทดสอบต่างๆต้องถูกตัดออกในบางรายการ ส่งผลกระทบต่อเนื่องถึงการจัดทำเอกสารวิชาการสำหรับงานตีพิมพ์ไม่เป็นไปตามที่ผู้วิจัยวางแผนไว้

2. ปัญหาด้านครุภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัยไม่ได้รับการสนับสนุนให้ขอจากหน่วยงานภายนอก ในขณะที่การขอครุภัณฑ์ประจำปีอยู่นอกเหนือการควบคุมของผู้วิจัย ทำให้ปัจจุบันเครื่องมือหลักที่ใช้ในงานวิเคราะห์ ได้แก่ เครื่อง HPLC มีสภาพเก่าและเริ่มเสื่อมสภาพ โดยปัจจุบันไม่มีอะไหล่สำรองจำหน่ายในท้องตลาด ทำให้เกิดปัญหาต่อการทำงานทั้งในปัจจุบันและในอนาคต

3. ปัญหาความไม่สะดวกในการใช้จ่ายงบประมาณ เป็นอุปสรรคต่อการคิดและตัดสินใจทำงานเร่งด่วนซึ่งเป็นการตัดสินใจหน้างาน เช่น เครื่องมือเสียจำเป็นต้องซ่อมด่วนเนื่องจากต้องการใช้งาน และไม่มีเครื่องสำรอง แต่ในทางปฏิบัติไม่สามารถทำได้ทันที เนื่องจากต้องใช้เวลาขออนุมัติ จัดทำเอกสาร รอเอกสารอนุมัติอีกหลายขั้นตอน ซึ่งกระบวนการดังกล่าวกระทบต่อการทำงานวิจัยเป็นอย่างมาก

เอกสารอ้างอิง

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

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

กรมวิชาการเกษตร

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.

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

กรมวิชาการเกษตร

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. 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. 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.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

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 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.

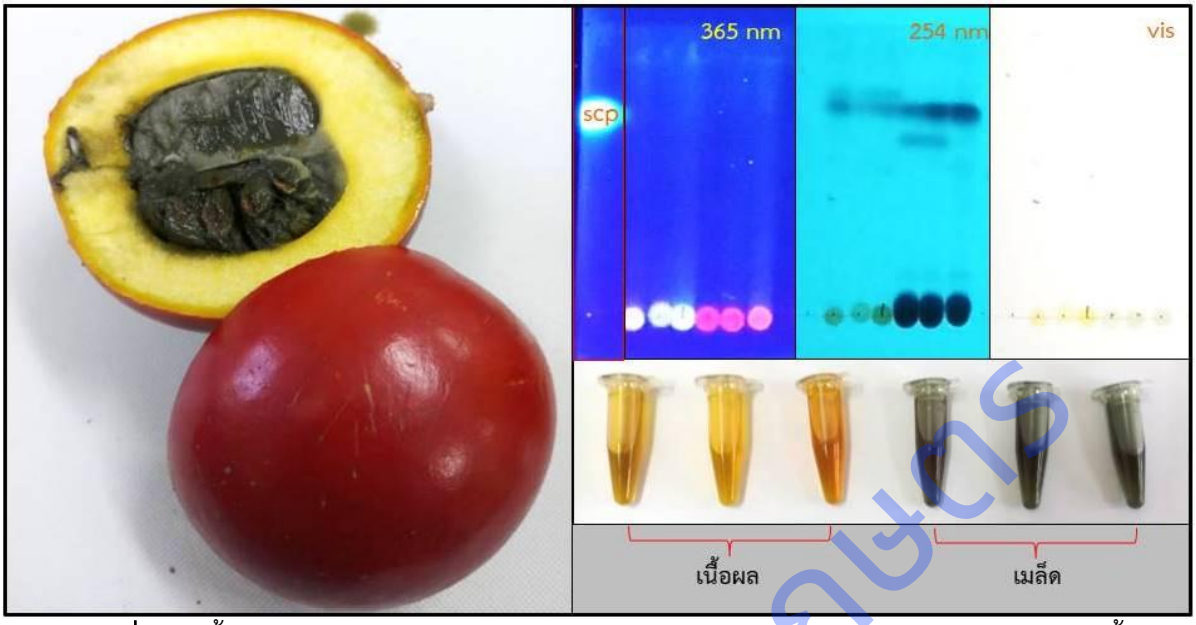
Yasuda M, A. Ishikawa, Y. Jikumaru, M. Seki, T. Umezawa, T. Asami, A. Maruyama-Nakashita, T. Kudo, K. Shinozaki, S. Yoshida and H Nakashita. 2008. Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in Arabidopsis. Plant Cell 20:1678–1692.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

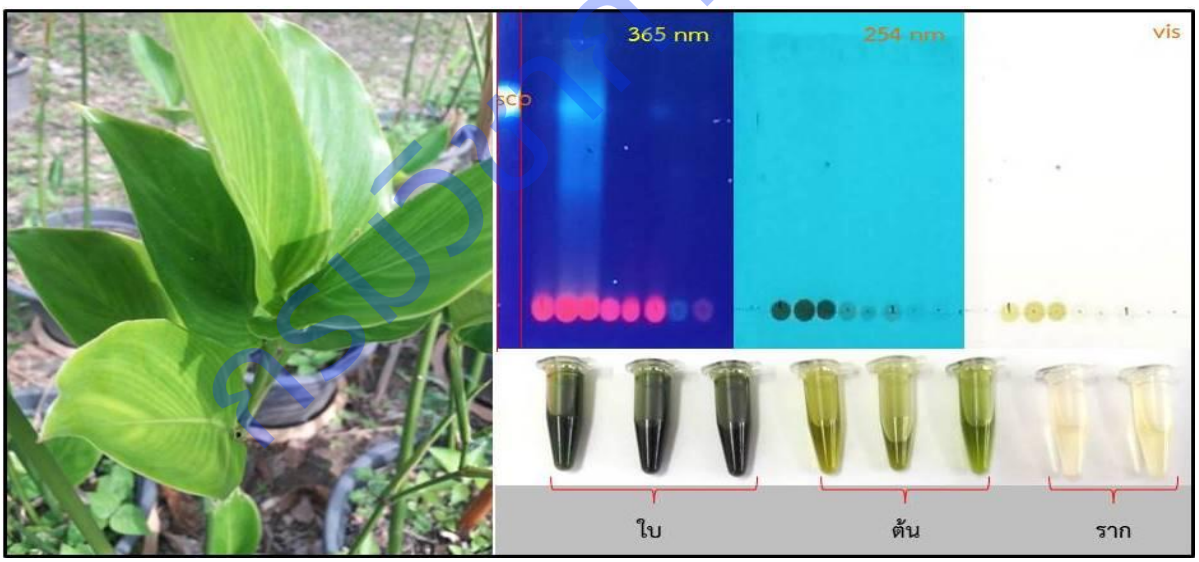
Zuker, A.P., B. Buck and J.B. McGrory, 1968. Structure of O_{16}. Physical Review Letters.21, 39.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ภาคผนวก



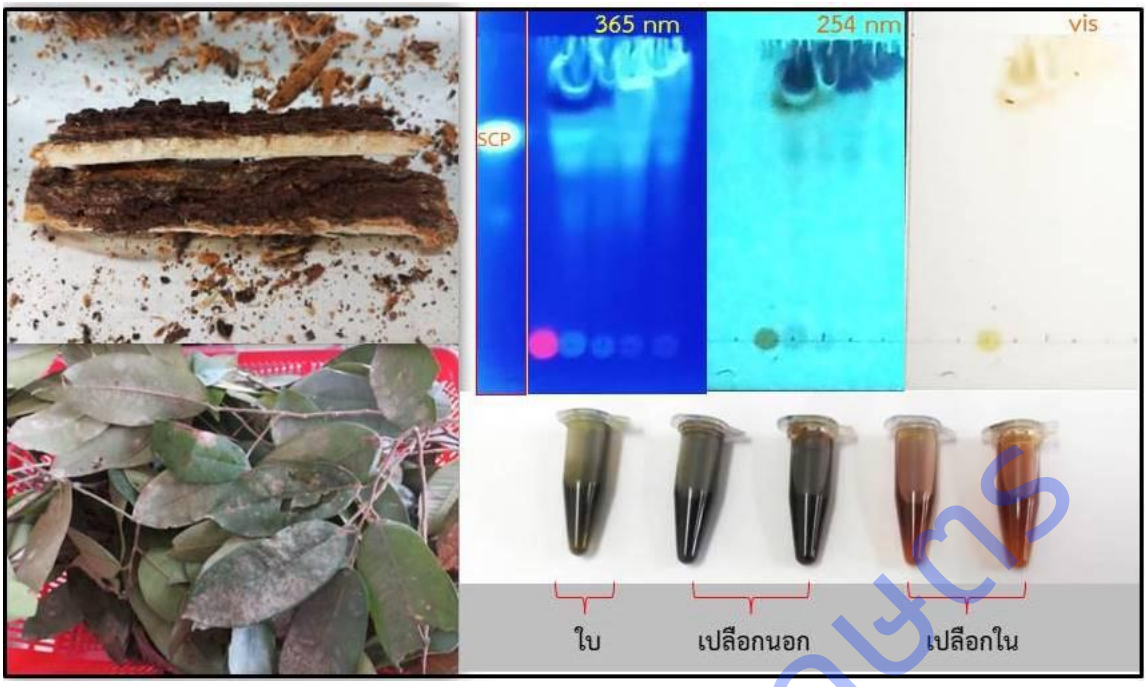
ภาพผนวกที่ 1 ผลขี้กา (*Gymnopetalum integrifolim* Kurz.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของเนื้อผลและเมล็ด ที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



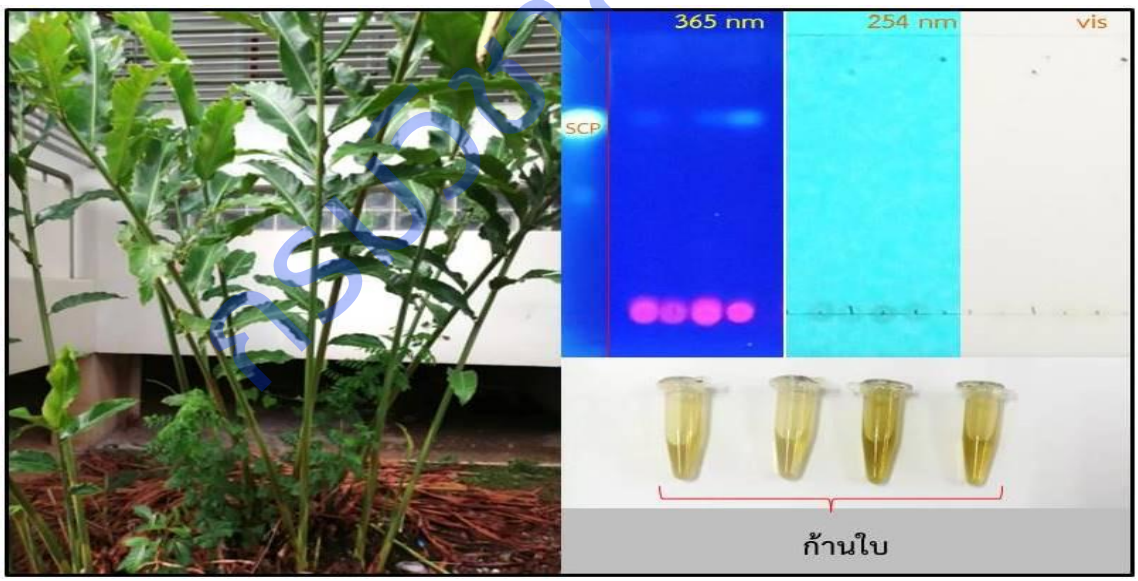
ภาพผนวกที่ 2 ต้นคล้า (*Schumannianthus dichotomus* (Roxb.) Gagnep) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบ ต้น และราก ที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอ

พอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

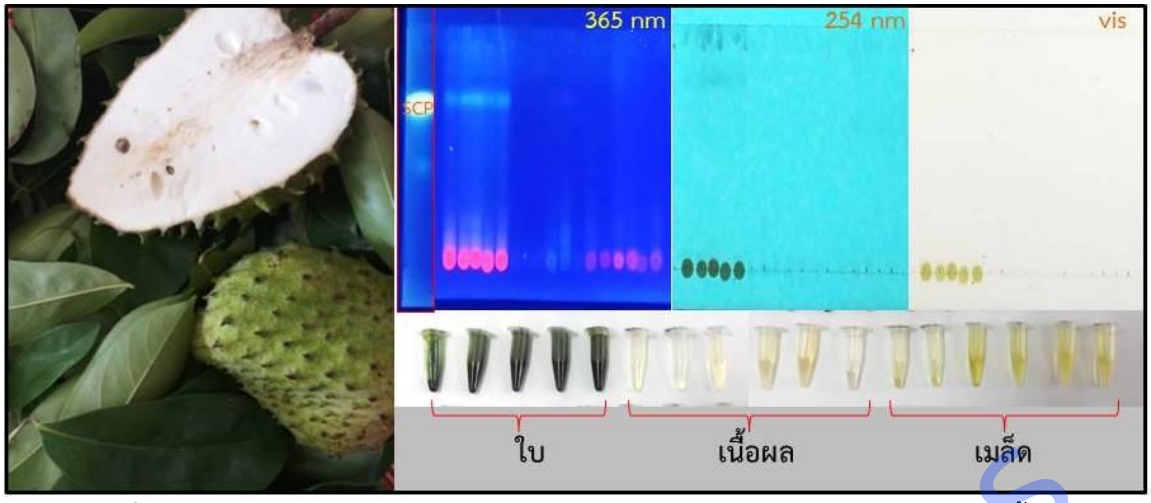
ศูนย์วิทยทรัพยากร



ภาพผนวกที่ 3 เคี่ยม (*Cotylelobium lanceolatum* Craib) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบ เปลือกนอก และเปลือกในที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



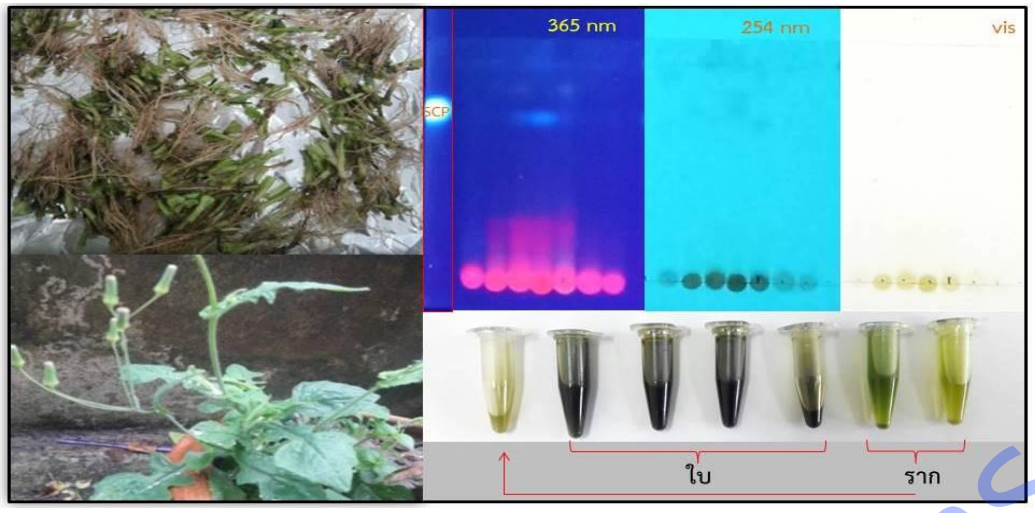
ภาพผนวกที่ 4 ดาหลา (*Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของก้านใบที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



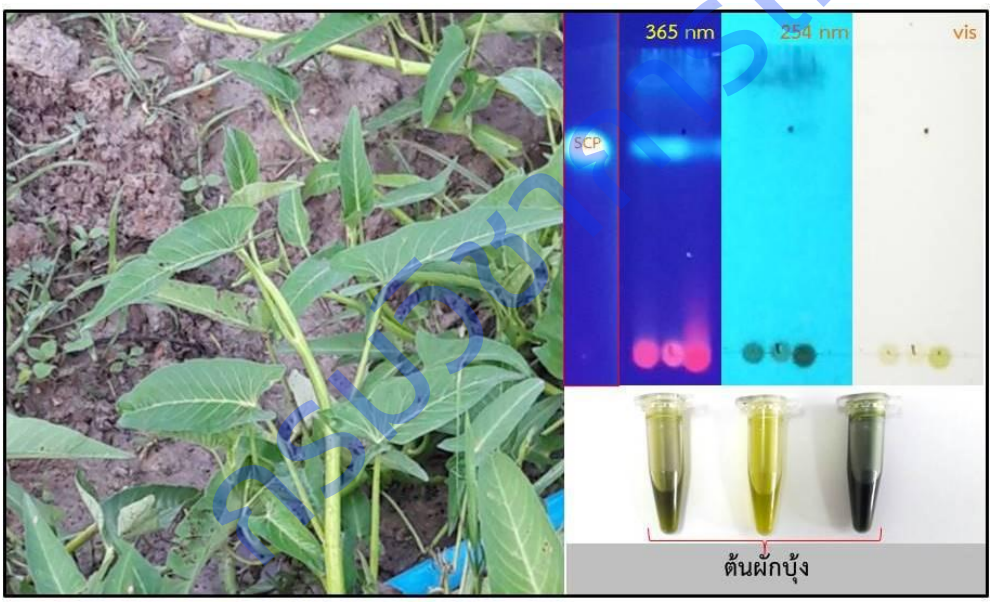
ภาพผนวกที่ 5 ทุเรียนเทศ (*Annona muricata* L.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบ เนื้อผล และเมล็ดที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

ภาพผนวกที่ 6 เนียงนก (*Archidendron bubalinum* (jack) I.C. Nielsen) และการแยกสารสกัดเอทานอลของเมล็ดและเปลือกผลที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอ-พอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

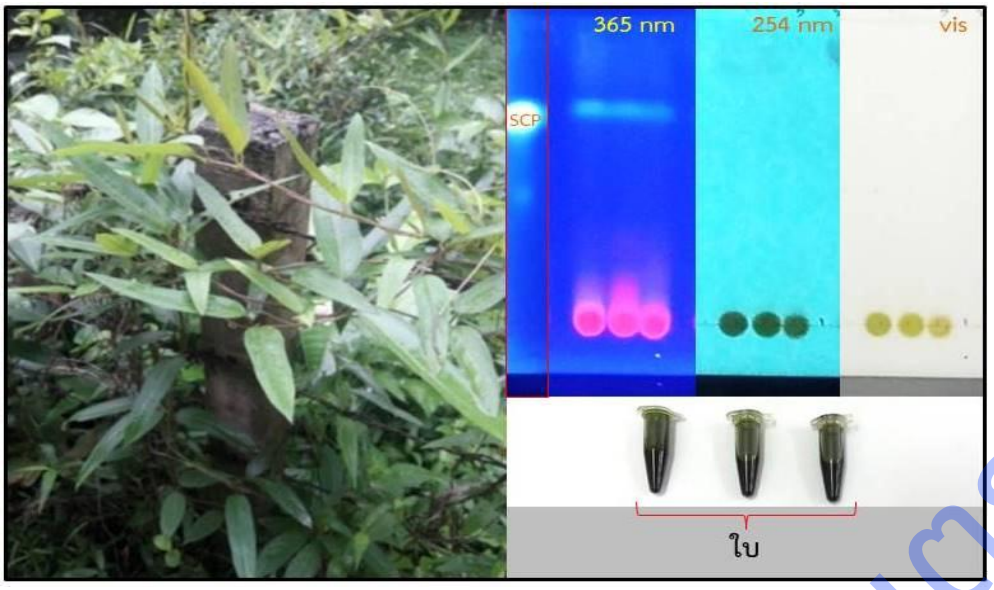
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย



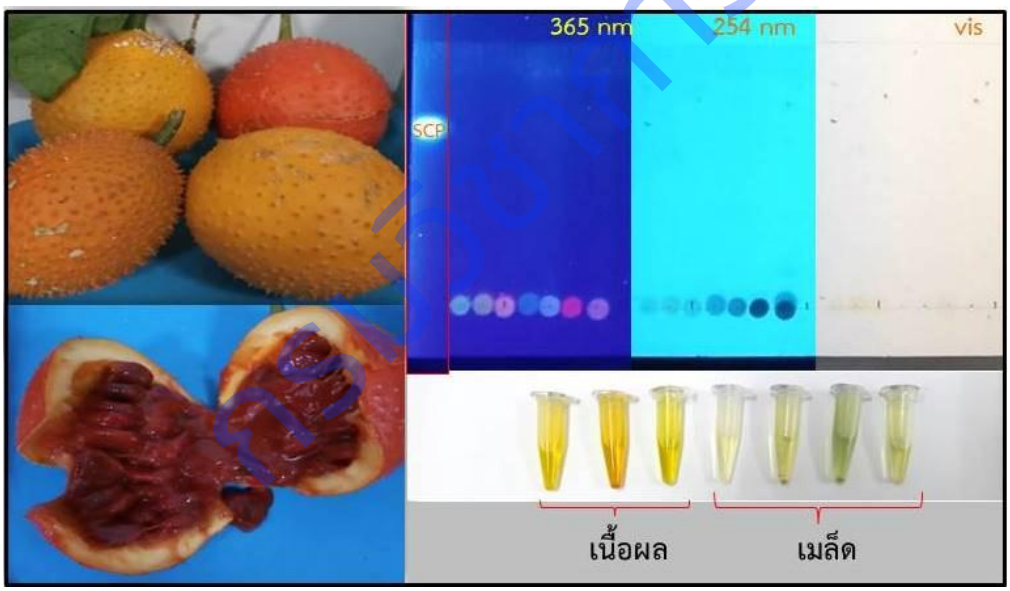
ภาพผนวกที่ 7 ผักกาดนกเขา (*Emilia sonchifolia* (L.) DC.ex Wight) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบและรากที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



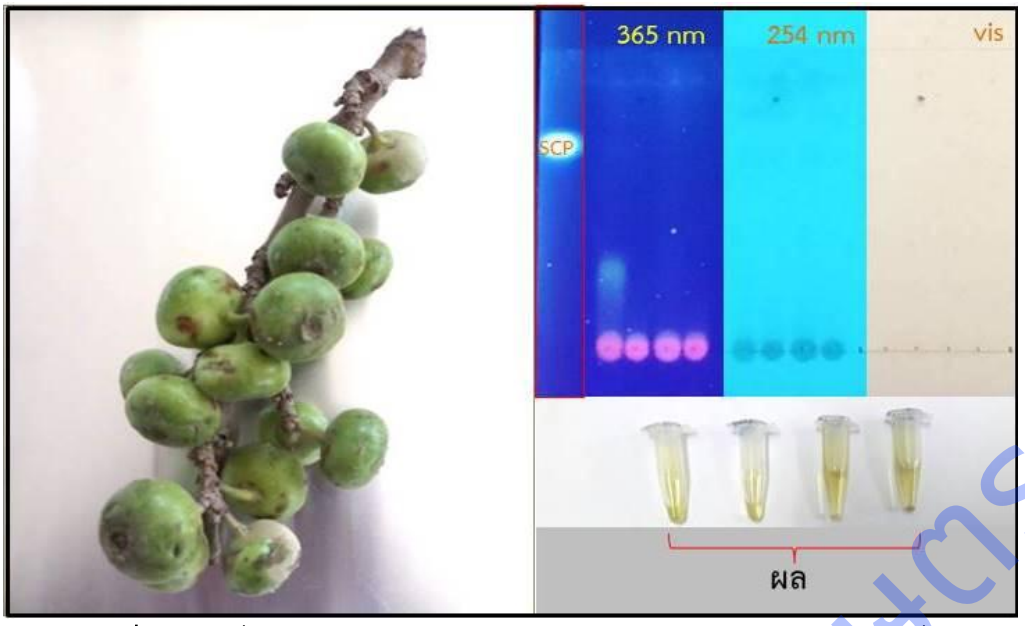
ภาพผนวกที่ 8 ผักบุ้งน้ำ (*Ipomoea aquatica*) และการแยกสารสกัดเอทานอลของต้นผักบุ้งที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



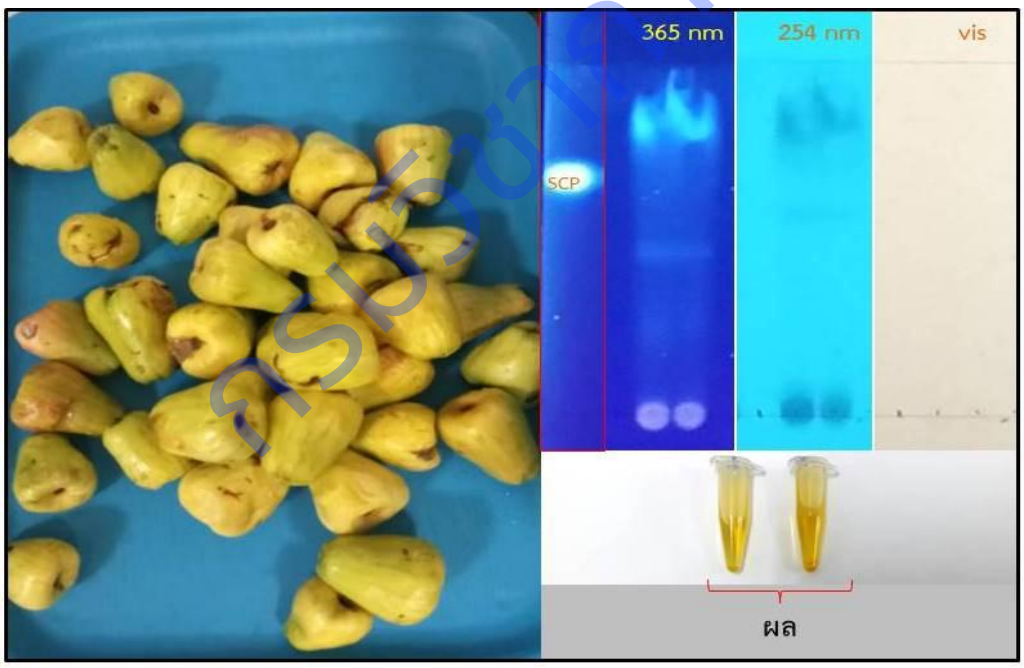
ภาพผนวกที่ 9 พาโหม (*Paederia foetida* Linn) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



ภาพผนวกที่ 10 ฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของเนื้อผลและเมล็ดที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอ พอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

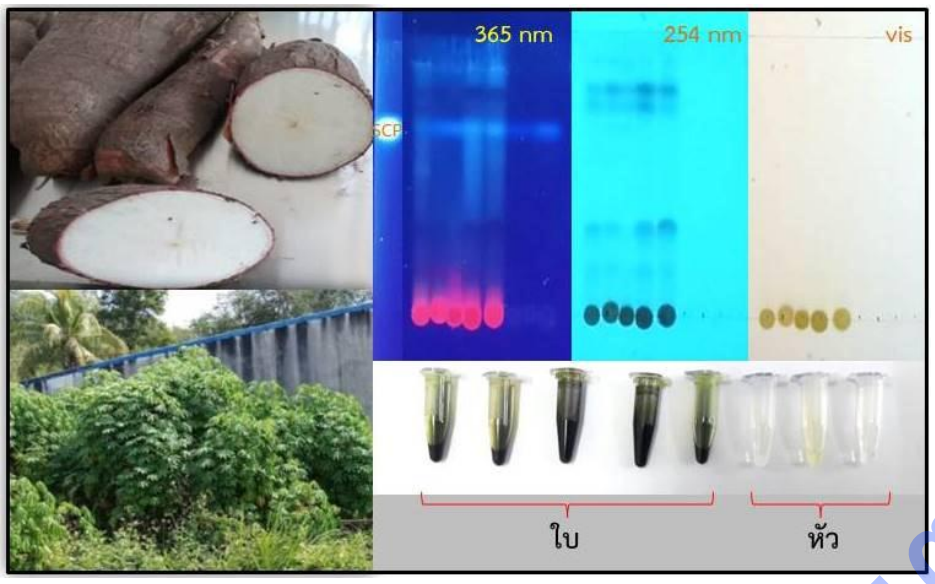


ภาพผนวกที่ 11 มะเดื่อ (*Ficus hispida* L.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของผลที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

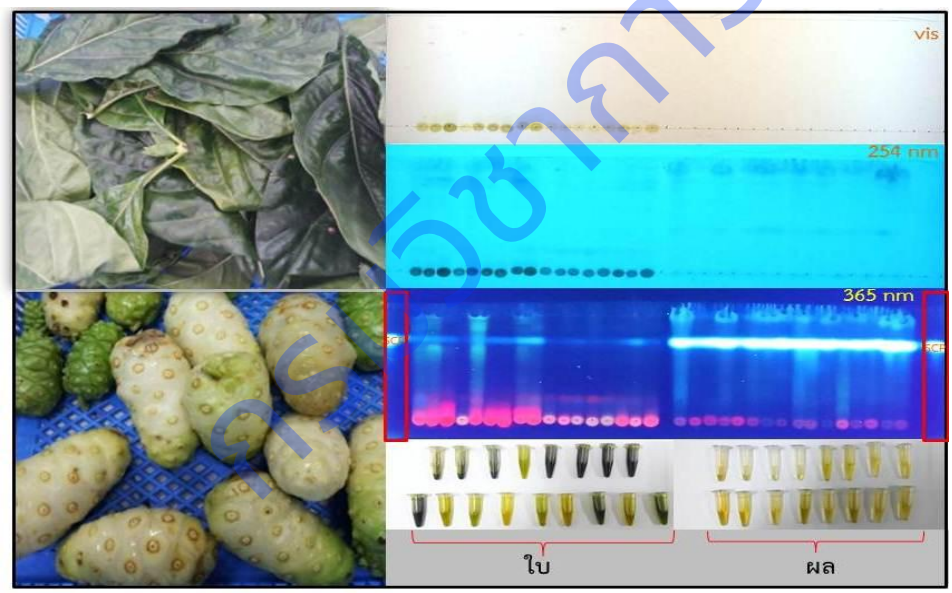


ภาพผนวกที่ 12 มะม่วงหิมพานต์ (*Anacardium occidentale*) และการแยกสารสกัดเอทานอลของผลที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

ศรีปทุมการเกษตร

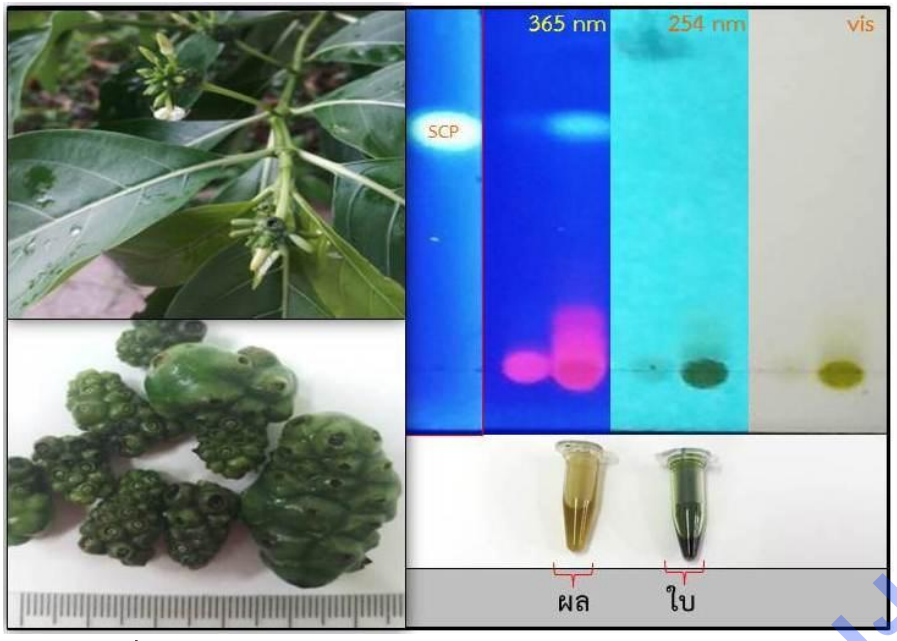


ภาพผนวกที่ 13 มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* (L.) Crantz.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบและหัวที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน(scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

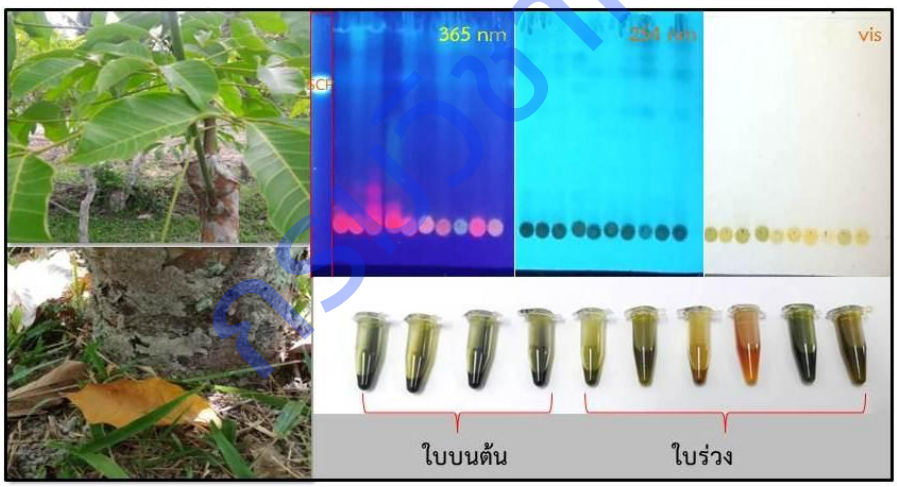


ภาพผนวกที่ 14 ยอบ้าน (*Morinda citrifolia* L.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบและผลที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน(scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

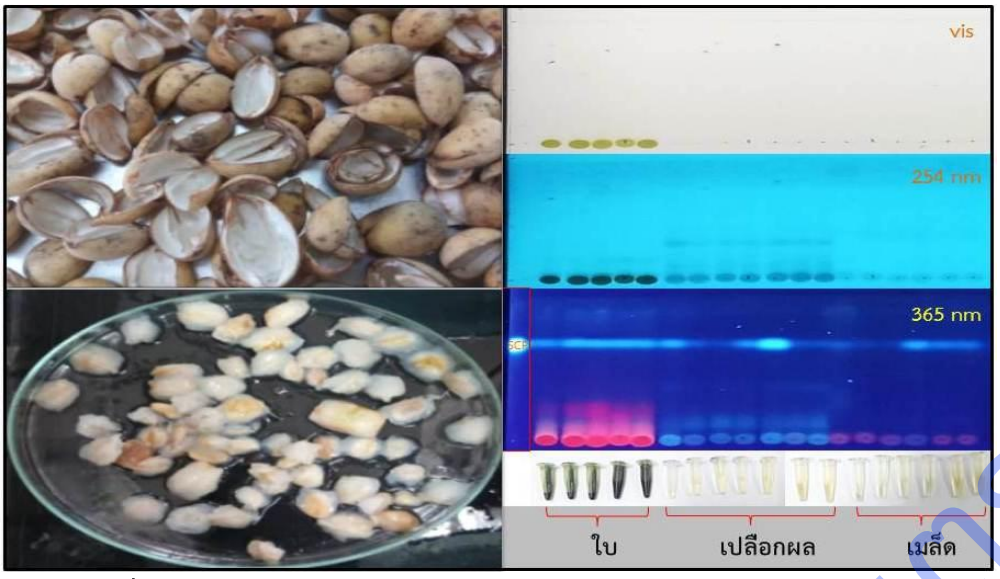
กรมวิชาการเกษตร



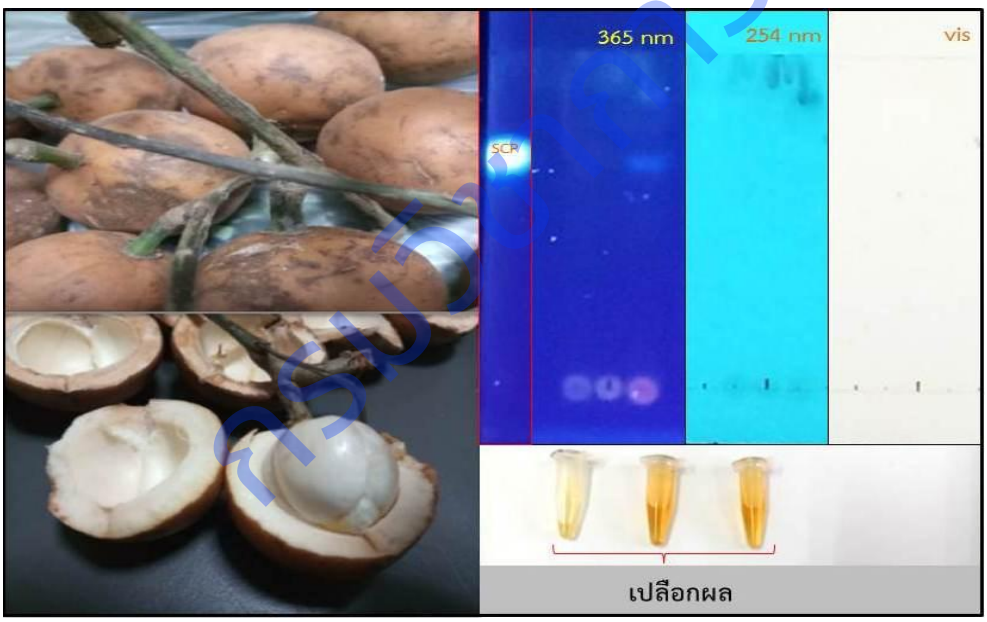
ภาพผนวกที่ 15 ยอป่า (*Morinda coreia* Buch.-Ham.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของผลและใบที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน(scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



ภาพผนวกที่ 16 ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบบนต้นและใบร่วงที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน(scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



ภาพผนวกที่ 17 ลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบ เปลือกผล และเมล็ดที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp)ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



ภาพผนวกที่ 18 ลังแข (*Baccaurea macrophylla* Muell. Arg.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของเปลือกผลที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน(scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์