ระดับโครงการ

กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

รายงานผลสัมฤทธิ์สำหรับทุนสนับสนุนงานพื้นฐาน (Fundamental Fund)

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564

หน่วยงาน กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

การใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช

Beneficial of Enzyme from Microorganism for Pest Control

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

มัลลิกา แก้ววิเศษ

Mallika Kaewwises

ปี 2565

กรมวิชาการเกษตร

บทสรุปผู้บริหาร
โครงการวิจัยการใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช
Beneficial of Enzyme from Microorganism for Pest Control

ชื่อคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ 1. นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. พยุงศักดิ์ รวยอารี สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

3.. ภรณี สว่างศรี สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

4. วรารัตน์ ศรีประพัฒน์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

6. อิศเรศ เทียนทัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

7. ทัศนาพร ทัศคร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. จีรภา ปัญญาศิริ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

งบประมาณที่ได้รับปี 2564 เป็นเงิน 426,030 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย ตั้งแต่ ตุลาคม 2561 ถึง ธันวาคม 2564

สรุปโครงการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตเอ็นไซม์ที่นำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมศัตรูพืชได้ เอ็นไซม์ไคติเนสเป็นเอ็นไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช สามารถผลิตได้จากเชื้อราเมตาไรเซียมและบิววาเลีย จึงทำการศึกษาการผลิตไคติเนสจากเชื้อราดังกล่าว พบว่าเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตและทำให้หนอนกระทู้ผักตายได้ เมื่อนำไปทดสอบในแปลงคะน้าพบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ที่เข้าทำลายคะน้าได้ การผลิตเอนไซม์เพื่อการย่อยสลายจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนสสามารถผลิตได้จากเชื้อราไตรโคเดอร์มาสปีชีส์ (*Trichoderma* species) ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อการควบคุมโรคพืช โดยได้ศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสในการควบคุมโรคไฟทอปธอราบนใบพริก พบว่าที่ 24 ชั่วโมง ภายหลังการปลูกเชื้อ สังเกตพบการเกิดรอยโรคที่ผิวใบในกลุ่มควบคุมและกลุ่มกรรมวิธี จากการศึกษาครั้งนี้ จึงแนะนำให้การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสในการควบคุมโรคไฟทอปธอราครั้งต่อไปที่ระยะเวลาที่นานขึ้นหลังการปลูกเชื้อที่หลังการทดลอง 10 วัน

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ผลิตเอ็นไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืช
2. เพื่อศึกษาต้นแบบในการผลิตเอ็นไซม์จากจุลินทรีย์เพื่อใช้กำจัดศัตรูพืชเพื่อใช้ในภาคสนาม

กรมวิชาการเกษตร

ระเบียบวิธีวิจัย

ผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อราเมตาไรเซียและเชื้อราบิวลาเรียที่ช่วงระยะเวลาต่างๆ เปรียบเทียบ activity จากการผลิตในช่วงระยะเวลาต่างๆ ศึกษาการเก็บรักษาเอ็นไซม์ ทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผักทั้งในห้องปฏิบัติการและในภาคสนาม ผลิตเอนไซม์เพื่อการย่อยสลายจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนสจากเชื้อราไตรโคเดอร์มา ศึกษาเชื้อที่สามารถผลิตเอ็นไซม์ได้ วิธีการผลิตเอ็นไซม์ที่มีประสิทธิภาพ ศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสในการควบคุมโรคไฟทอปธอราบนใบพริก

ผลการวิจัย

1.ในการทดสอบการใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก การผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสโดยใช้เชื้อราเมตาไรเซียม ใส่โดยใช้ไคติน ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เข้าเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 180 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 3 วัน เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก ผลการทดสอบพบว่าหนอนกระทู้ผักที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสจะกินอาหารลดลง น้ำหนักตัวลดลง

2. การทดสอบไคติเนสในภาคสนาม โดยทดสอบในแปลงคะน้าพบว่าไคติเนสมีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก การทดสอบเปรียบเทียบกับ NPV ที่ใช้ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก และสารฆ่าแมลง Emamectin benzoate ผลการทดสอบพบว่าสารฆ่าแมลงให้ประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักดีที่สุดโดยที่ให้ค่าไม่ต่างจากวิธีควบคุมที่ไม่ได้ปล่อยหนอน ส่วนไคติเนสให้ผลไม่ต่างจากการใช้ผลิตภัณฑ์ NPV ในการควบคุมแมลง

3.การคัดเลือกไอโซเลทเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย จากการทดสอบการแยกเชื้อราไตรโคเดอร์มาจากตัวอย่างดินและเห็ด สามารถได้ราไตรโคเดอร์มาจำนวนทั้งสิ้น 29 ไอโซเลท พบว่าราไตรโคเดอร์มาทุกไอโซเลทสามารถสร้างเอนไซม์ทั้งสามชนิด คือ เซลลูโลส อะไมเลส และเพคติเนสได้

4.การศึกษาการใช้เอ็นไซม์เซลลูเลสเชื้อรา *Trichoderma* sp.ไอโซเลท Tc14 แบ่งตามระดับความเข้มข้นของสารที่ 1 3 และ 5 กรัมต่อลิตร มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytopthora* sp. ซึ่งคัดแยกได้จากผลมะเขือเทศ และเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose (PDA) เพื่อทดสอบในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่า เอ็นไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *T*richoderma sp. ไอโซเลท TC14 มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรค *Phytopthora* sp. ของพริก ได้ดีในสภาพโรงเรือนทดลอง ที่หลังการทดลอง 10 วัน พบเปอร์เซ็นต์โรคลำต้นไหม้เท่ากับ 10.07 และ 15.72 เปอร์เซ็นต์

ข้อมูลใหม่ที่ค้นพบจากงานวิจัย

1. วีธีการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสวิธีที่มีประสิทธิภาพคือเอ็นไซม์ที่ผลิตจากเชื้อเมตาไรเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB โดยใช้ไคติน ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยการเขย่าเชื้อ 3 วัน แล้วทำให้แห้งด้วยวิธี Freeze dry
2. เชื้อรา *Trichoderma* sp.ไอโซเลท Tc14 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลส

ประโยชน์ที่ได้รับจากผลงานวิจัย

1. ได้เทคโนโลยีการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อราเมตาไรเซียมและบิววาเลียในการควบคุมแมลงศัตรูพืช
2. ได้เทคโนโลยีการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนสจากเชื้อราไตรโคเดอร์มา เพื่อใช้ควบคุมโรคพืช

กรมวิชาการเกษตร

กลุ่มเป้าหมายที่นำผลงานไปใช้ประโยชน์ นักวิจัยนำไปขยายประโยชน์ต่อในการพัฒนาเอ็นไซม์ให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมศัตรูพืช และผลิตในเชิงพาณิชย์

ข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัย

ควรมีการวิจัยต่อไปดังนี้

1.ศึกษารูปแบบเอ็นไซม์ที่เหมาะสมในการใช้ในภาคการเกษตร

2.ศึกษาการผลิตเอ็นไซม์จำนวนมากเพื่อขยายออกสู่เกษตรกรต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

เอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อการควบคุมหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) ถูกผลิตจากเชื้อราเมตาไรเซียมและบิววาเลีย ในสภาพเขย่าเชื้อรา 3, 5 และ 7 วัน โดยใช้ไคติน ชนิด A และ ชนิด B ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อให้ไคติเนสกับหนอนกระทู้ผักพบว่าวิธีที่มีประสิทธิภาพดีคือเอ็นไซม์ที่ผลิตจากเชื้อเมตาไรเซียมที่เตรียมเชื้อโดยการเขย่า 3 วัน ขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยของหนอนกระทู้ผักที่ได้รับไคติเนจะมีขนาดลำตัวที่เล็กกว่าและน้ำหนักน้อยกว่าหนอนกระทู้ผักชุดควบคุม เมื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบและนำไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผัก พบว่าความเข้มข้นของเอ็นไซม์ที่ทดสอบทำให้หนอนตายไม่ถึง 50% ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากการทดลองครั้งนี้มีข้อจำกัดในการผลิตเอ็นไซม์ นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบในภาคสนามในแปลงคะน้าโดยทดสอบเปรียบเทียบกับการใช้สารฆ่าแมลงทางการค้าคือ Emamectin และผลิตภัณฑ์ NPV พบว่าสารฆ่าแมลงมีประสิทธิภาพดีที่สุด รองลงมาเป็น NPV และไคติเนส ตามลำดับ การผลิตเอนไซม์เพื่อการย่อยสลายจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนสจากเชื้อราไตรโคเดอร์มา ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อการควบคุมโรคพืช ซึ่งไตรโคเดอร์มาไอโซเลต T14 นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความสามารถเชื้อราไตรโคเดอร์มาจำนวน 29 ไอโซเลตในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลาย เซลลูเลส, อะไมเลส และเพคติเนส ในอาหารเหลว carboxy methyl cellulose (CMC), starch hydrolysed medium และ Czapek medium +1% เพคติน ตามลำดับ ต่อการยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอราโดยวิธี Dual culture plate ในสภาพห้องปฏิบัติการ จากการทดลอง พบว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มาไอโซเลต TC14 สามารถสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสได้ในระดับสูงที่สุด จากนั้นจึงทำการคัดเลือกเชื้อราไตรโคเดอร์ม่าไอโซเลท TC14 มาใช้ในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสในระดับขวดเขย่า และผลิตผงเอ็นไซม์โดยวิธี freeze-dried เพื่อนำผงเอ็นไซม์ไปใช้ในการทดสอบการควบคุมโรคพืชต่อไป ผลการทดลองพบว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่คัดเลือกและแยกได้มีศักยภาพในการสร้างเอ็นไซม์ได้ทั้งสามชนิด เพียงแต่ระดับความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายแตกต่างกันและมีศักยภาพในการผลิตเป็นเอ็นไซม์ได้ เมื่อทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคบนใบพริกของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อไตรโคเดอร์ม่า ไอโซเลท TC14 ที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร 3 กรัมต่อลิตร และ 5 กรัมต่อลิตร พบว่าเอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

The chitinase enzymes for controlling of cutworm (*Spodoptera litura*) were produced from *Metarhizium* spp and *Beauvaria* sp. under shaking conditions for 3, 5 and 5 days by using 1% and 2 % of chitin A and B. After treating cutworm with chitinase, the results indicated the chitinase that produced from *Metarhizium* spp. under shaking conditions for 3 days was most effective method for controlling cutworm. The *average* body size and weight of the chitinase treated cutworms were significantly lower than in the *controls*. The chitinase enzyme product prototype was then developed and the results showed that cutworms died less than 50% which probably because the limited of produce capability. The effectiveness of chitinase compared with the commercial pesticide, Emamectin and NPV, for controlling of cutworm in kale plot showed that the most effective treatment for controlling cutworm were Emamectin, NPV and chitinase, respectively. The Trichoderma-producing degrading enzymes including cellulase, amylase and pectinase in controlling plant diseases were developed. Among all strains, the most effective in degradation of cellulose, amylose and pectin production was the TC14. Furthermore, this study also investigated cell-wall degrading enzyme activities, namely cellulase, amylase in starch hydrolysed medium and pectinase in Czapek medium+1% pectin) in *Trichoderma* isolates for controlling activity of *Phytopththora* sp. causing root rot disease using dual culture method. The TC14 showed presence of highest amount of cellulase enzyme among other *Trichoderma* isolates studied in dual culture plate technique. Then, *Trichoderma* TC14 was used for powder-derived cellulase enzyme production by shake flask-cultured technique using Freeze-dried method. *Trichoderma*-producing cellulase shown in our experiment will further be used for plant disease control. The results indicated that Tc14 may be showed the ability in inhibiting of the pathogenic fungi and can be developed to further exploitation in plant disease control. In addition, the effectiveness of cellulase enzyme from *Trichoderma* spp. at concentration of 1, 3 and 5 gram per liter for controlling root-rot disease in chili was studied. The result show that cellulase was effective for controlling plant disease.

กรมวิทยาศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

รายงานโครงการวิจัยการใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช ปีงบประมาณ 2562-2564 ฉบับนี้ สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือจากบุคคลหลายท่าน ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณนางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ รักษาการผู้ทรงคุณวุฒิด้านอารักขาพืช ผู้อำนวยการแผนวิจัยการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของพืชและจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มมูลค่าและพัฒนานวัตกรรม ที่ให้คำปรึกษาข้อเสนอแนะโครงการ ตลอดจนการจัดทำรายงานฉบับนี้

ขอขอบคุณนักวิจัยทุกท่านที่ให้ความร่วมมือส่งผลการทดลองให้หัวหน้าโครงการวิจัย

ขอขอบคุณคุณอัจฉรา ซอวงศ์ นักวิชาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ช่วยจัดพิมพ์เอกสาร

หวังอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยด้านการเกษตรของกรมวิชาการเกษตร และของประเทศต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	2
บทคัดย่อ	5
Abstract	6
กิตติกรรมประกาศ	7
สารบัญ	8
บทที่ 1 บทนำ	9
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน	11
บทที่ 3 ผลการศึกษา	21
บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล	24
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก	33

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 1 บทนำ

1. วิสัยทัศน์ และพันธกิจของหน่วยงาน

<u>วิสัยทัศน์</u>

กรมวิชาการเกษตรเป็นองค์กรที่เป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาด้านพืช เครื่องจักรกลการเกษตร และเป็นศูนย์กลางรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตรด้านพืชในระดับสากล บนพื้นฐานการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

<u>พันธกิจ</u>

1. สร้างและถ่ายทอดองค์ความรู้จากงานวิจัยด้านพืชและเครื่องจักรกลการเกษตร สู่กลุ่มเป้าหมาย
2. กำหนดและกำกับดูแลมาตรฐานระบบการผลิตและผลิตพันธุ์พืชและปัจจัยการผลิต พัฒนาระบบตรวจรับรองสินค้าการเกษตรด้านพืชให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล
3. อนุรักษ์และพัฒนาการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพด้านพืช แมลง และจุลินทรีย์
4. กำกับ ดูแล และพัฒนากฎหมายที่กรมวิชาการเกษตรรับผิดชอบ

2. ยุทธศาสตร์ชาติที่สอดคล้องกับแผนปฏิบัติงานด้าน ววน. ของหน่วยงาน

- ❑ ยุทธศาสตร์ที่ 1 ด้านความมั่นคง
  เพื่อบริหารจัดการสภาวะแวดล้อมของประเทศให้มีความมั่นคง ปลอดภัย และมีความสงบเรียบร้อยในทุกระดับและทุกมิติ
- ☑ ยุทธศาสตร์ที่ 2 ด้านการสร้างความสามารถในการแข่งขัน
  เน้นการยกระดับศักยภาพในหลากหลายมิติควบคู่กับการขยายโอกาสของประเทศไทยในเวทีโลก
- ❑ ยุทธศาสตร์ที่ 3 ด้านพัฒนาและเสริมสร้างศักยภาพทรัพยากรมนุษย์
  คนไทยในอนาคต มีความพร้อมทั้งกาย ใจ สติปัญญา มีทักษะที่จำเป็นในศตวรรษที่ 21 มีทักษะสื่อสารภาษาอังกฤษและภาษาที่ 3 และมีคุณธรรม
- ❑ ยุทธศาสตร์ที่ 4 ด้านการสร้างโอกาสและความเสมอภาคทางสังคม
  สร้างความเป็นธรรม และลดความเหลื่อมล้ำในทุกมิติ กระจายศูนย์กลางความเจริญทางเศรษฐกิจและสังคม เพิ่มโอกาสให้ทุกภาคส่วนเข้ามาเป็นกำลังของการพัฒนาประเทศในทุกระดับ
- ❑ ยุทธศาสตร์ที่ 5 ด้านการสร้างการเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม
  คำนึงถึงความยั่งยืนของฐานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของประชาชนให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ผ่านมาตรการต่างๆ ที่มุ่งเน้นให้เกิดผลลัพธ์ต่อความยั่งยืน
- ❑ ยุทธศาสตร์ที่ 6 ด้านการปรับสมดุลและพัฒนาระบบการบริหารจัดการภาครัฐ
  การปรับเปลี่ยนภาครัฐ ยึดหลัก “ภาครัฐของประชาชนเพื่อประชาชนและประโยชน์ส่วนรวม”

3. วงเงินงบประมาณกองทุน ววน. ที่ได้รับจัดสรรในปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 และโปรดระบุแผนงาน/โครงการให้สอดคล้องกับโปรแกรมของแผน ววน.

โปรแกรมตามแผน ววน.	งบประมาณ (บาท)
โครงการ การใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช	426,030

4. รายละเอียดโครงการ

กรมวิชาการเกษตร

ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล

จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หลากหลายชนิดและสายพันธุ์ จุลินทรีย์บางชนิดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรง หรือผ่านกระบวนการเพื่อให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์ก่อนนำไปใช้ประโยชน์ เช่น เอ็นไซม์ไคติเนส เอ็นไซม์ เพคติเนส สามารถใช้ในการการควบคุมศัตรูพืช อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เหล่านี้ ยังต้องมีการศึกษาและทดสอบโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริง เช่น การพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์และสารชีวภาพจากจุลินทรีย์ให้ได้ปริมาณมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ในสภาพไร่นาได้ เพื่อการนำสารเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์อย่างเต็มประสิทธิภาพในอนาคตทั้งในเชิงวิชาการและเชิงพาณิชย์

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1) ..เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ผลิตเอ็นไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืช ...

2) ..เพื่อศึกษาต้นแบบเชิงพาณิชย์ในการผลิตเอ็นไซม์จากจุลินทรีย์เพื่อใช้กำจัดศัตรูพืชสำหรับการใช้ในภาคสนาม

ขอบเขตการศึกษา

.โครงการการใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืชจะครอบคลุมการใช้ประโยชน์ในการการเกษตรโดยการผลิตเอ็นไซม์ที่สามารถควบคุมศัตรูพืช คือ เอ็นไซม์ไคติเนสที่สามารถควบคุมแมลง เอ็นไซม์ย่อยสลายจากเชื้อไตรโคเดอร์มาที่ใช้ควบคุมโรคพืช

นิยามศัพท์

-

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน

1.วิธีการดำเนินการวิจัย

กิจกรรมที่ 1 .เอ็นไซม์ควบคุมแมลง

การทดลองที่ 1.1 การใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก (2562-2563)

1. การศึกษาการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส

1.1 วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD มี 2 ปัจจัย (3x4 +1 กรรมวิธีควบคุม (control)) 4 ซ้ำ

ปัจจัยที่ 1) เชื้อรา 3 ไอโซเลต ได้แก่ เมตาไรเซียม 2 ไอโซเลต บิววาเรีย 1 ไอโซเลต

ปัจจัยที่ 2) ไคตินที่จำหน่ายเป็นการค้า 2 ชนิด ไคติน A (sigma) เพราะเป็นชนิดที่เคยผ่านการทดสอบมาแล้ว และ ไคติน B (Hi media) แบ่งเป็น 4 ระดับ ดังนี้

ไคติน A 1%

ไคติน A 2%

ไคติน B 1%

ไคติน B 2%

มีทั้งหมด 13 กรรมวิธีดังนี้

1.เมตาไรเซียม (Birdo) + ไคติน A 1%

2.เมตาไรเซียม (Birdo) + ไคติน A 2%

3.เมตาไรเซียม (Birdo) + ไคติน B 1%

4.เมตาไรเซียม (Birdo) + ไคติน B 2%

5.เมตาไรเซียม (Biotech) + ไคติน A 1%

6.เมตาไรเซียม (Biotech) + ไคติน A 2%

7.เมตาไรเซียม (Biotech) + ไคติน B 1%

8.เมตาไรเซียม (Biotech) + ไคติน B 2%

9.บิวเวอร์เรีย (Biotech) + ไคติน A 1%

10.บิวเวอร์เรีย (Biotech) + ไคติน A 2%

11.บิวเวอร์เรีย (Biotech) + ไคติน B 1%

12.บิวเวอร์เรีย (Biotech) + ไคติน B 2%

13.น้ำกลั่น

1.2 การเตรียมเชื้อราที่สามารถผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส

1.2.1 เตรียมเชื้อราทั้งหมด 3 ตัวอย่าง คือ 1) เชื้อเมตาไรเซียม (สทช- Birdo)

2) เชื้อเมตาไรเซียม (สวทช-Biotech) 3) เชื้อบิววาเรีย (สวทช- Biotech)

1.2.2 นำเชื้อรามาเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

1.2.3 เลือกโคโลนีเดี่ยวมาขยายเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์

กรมวิชาการเกษตร

1.2.4 นำเชื้อที่บริสุทธิ์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ประมาณ 7 วัน จนสร้างสปอร์ เก็บสปอร์ของเชื้อราไว้ในน้ำกลั่น

1.2.5 นับสปอร์ของเชื้อรา ด้วย heamacytometer เตรียม stock ให้ได้ 10^7 สปอร์/มล.

1.2.6 ใส่สปอร์ของเชื้อราแต่ละไอโซเลต 107 สปอร์/ มล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB 10 มล. ใน Flask ขนาด 250 มล. แล้วเติม ไคติน ตามกรรมวิธี ที่ความเร็วรอบ 180 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

1.2.7 วัด activity ของเอ็นไซม์ไคติเนสแต่ละตัวอย่าง

1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสกับหนอนผีเสื้อ

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสทั้ง 12 สูตรโดยเปรียบเทียบกับวิธีควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น ในช่วงการผลิตวันที่ 3, 5, 7 โดยนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก โดยผสมไคติเนสในอาหารเทียมให้กับหนอนกระทู้ผักกิน ใช้หนอน 10 ตัวต่อซ้ำ บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักทุก 24 ชม.

2. การศึกษารูปแบบสารเอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ประโยชน์ในการกำจัดหนอนกระทู้ผัก

2.1. วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 13 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

1. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g
2. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g
3. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 g
4. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม+ Kaoline 0.20 g
5. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม
6. เอ็นไซม์ไคติเนสจากไคตินAในรูปของเหลว
7. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g
8. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g
9. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 g
10. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม+ Kaoline 0.20 g
11. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม
12. เอ็นไซม์ไคติเนสจากไคตินBในรูปของเหลว
13. น้ำกลั่น (วิธีควบคุม)

2.2 การเตรียมรูปแบบเอ็นไซม์

2.2.1 เลือกสูตรการผลิตไคติเนสที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ผักจากการทดลองในปีที่ผ่านมา พบว่าเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผลิตจาก เมตาไรเซียม (1) ผสมกับไคติน A 1% และ เอ็นไซม์ไคติเนสที่ผลิตจาก เมตาไรเซียม (1) ผสมกับไคติน B 1% จะมีประสิทธิภาพดีกว่าสูตรอื่นๆ จึงเลือกทั้งสองสูตรนี้มาทำการทดลองต่อไป

กรมวิทยาศาสตร์

2.2.2 เตรียมเอ็นไซม์ในรูปของเหลว โดยเตรียมสารไคติเนส ใส่สปอร์ของเชื้อรา 107 สปอร์/ มล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB 100 มล. ใน Flask ขนาด 250 มล. แล้วเติม ไคติน เข้าเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 180 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.2.3 เตรียมเอ็นไซม์ในรูปผง โดยทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying)

2.2.4 ผสมผงเอ็นไซม์กับสารปรุงแต่ง (additive) Aluminium silicate และ Kaoline เพื่อให้เอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการคงตัว

2.2.5 ทำการทดสอบเอ็นไซม์รูปแบบต่างๆ กับหนอนกระทู้ผักวัยสอง

3. การหาค่า Lethal Concentration (LC 50) ของเอ็นไซม์ไคติเนส โดยเลือกรูปแบบที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดกับหนอนกระทู้ผัก

3.1 หาค่า LC 50 โดยทดสอบกับเอ็นไซม์ไคติเนสที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อให้ทราบค่าความเข้มข้นที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 50% โดยดูเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก

3.2 วิเคราะห์หาค่า LC 50 เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมไปใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 1.2 การทดสอบเอ็นไซม์ไคติเนสในภาคสนาม (2564)

1.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 6 กรรมวิธี 4 ซ้ำ โดยทำการเก็บรักษา 2 แบบ

- เตรียมเอ็นไซม์ไคติเนสที่ใช้ในการทดสอบ และเก็บเอ็นไซม์ที่อุณหภูมิห้องและตู้เย็นที่ 0, 1, 3, 6 เดือน และทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้

1.2 เลือกเอ็นไซม์ไคติเนสรูปแบบที่สามารถกำจัดหนอนกระทู้ผักได้ดีที่สุดมา 1 รูปแบบจากการทดลองก่อนนี้

1.3 นำเอ็นไซม์ที่เก็บไว้ตามกรรมวิธีต่างๆ ไปทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก โดยใช้หนอน 10 ตัวต่อซ้ำ ทำ 4 ซ้ำวิเคราะห์ผลโดยดูการเจริญเติบโต เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนจากเอ็นไซม์ที่เก็บรักษาในช่วงระยะเวลาต่างๆ

บันทึกข้อมูล

บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักทุก 24 ชม.

2. ทดสอบเอ็นไซม์ไคติเนสในแปลงคะน้า

2.1 ทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสในแปลงคะน้า โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB มี 3 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

1. ไคติเนส+ปล่อยหนอน
2.น้ำ+ปล่อยหนอน
3. ไม่ปล่อยหนอน

2.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของไคติเนสกับสารตัวอื่น โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB มี 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ในแปลงปลูกคะน้า

1. เอ็นไซม์ไคติเนส

ศรีบัวการเกษตร

2. ไวรัสเอ็นพีวีของหนอนกระทู้ผัก (SlNPV)

3.. สารกำจัดแมลง Emamectin benzoate

4. น้ำ

5. ควบคุม (ไม่ปล่อยหนอน)

2.2 สำรวจและบันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์ความเสียหายของหอมหัวใหญ่ที่เกิดจากการทำลายของแมลงก่อนที่จะทำการฉีดพ่น

2.3 ทำการฉีดพ่นตามกรรมวิธีต่างๆ ในแปลง

2.4 บันทึกความเสียหายของผลผลิตที่ได้

กิจกรรมที่ 2 การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายที่มีประโยชน์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มาเพื่อใช้ในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่า (2562 - 2564)

การทดลองที่ 1 การคัดเลือก และจำแนกชนิดของเอนไซม์จากรา *Trichoderma* ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช (2562)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1.1 การคัดเลือก *Trichoderma* ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช

- วิธีการเตรียมเชื้อรา *Trichoderma* แยกเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 30 ไอโซเลต (เก็บรวบรวมไว้ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จำนวน 28 ไอโซเลต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์จำนวน 1 ไอโซเลต และ กรมส่งเสริมการเกษตรจำนวน 1 ไอโซเลต) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เก็บรักษาในหลอดอาหารเอียง (slant PDA)

- เตรียมเชื้อรา *Phytophthora* เชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่ารากเน่า

แยกเชื้อรา *Phytophthora* spp. (ได้รับความอนุเคราะห์ไอโซเลตของเชื้อรา *Phytophthora* spp. จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) โดยใช้วิธีการแยกชิ้นเนื้อเยื่อพืชและเพาะเลี้ยงลงบนวุ้นอาหารแครอท เมื่อเชื้อเจริญเติบโต จึงทำการเขี่ยเชื้อและเก็บรักษาไว้บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน หรือเมื่อมีการเจริญเติบโตของเส้นใย จึงนำมาใช้ศึกษาในขั้นตอนถัดไป

-วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี 15 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดพริกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* และปลูกเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่ารากเน่า

กรรมวิธีที่ 2 ราดดินด้วยเชื้อรา *Trichoderma* เมื่อพืชอายุ 30 วัน หลังเพาะและปลูกเชื้อราสาเหตุโรค

กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดพริกและราดดินด้วยเชื้อรา *Trichoderma* เมื่อพืชอายุ 30 วัน หลังเพาะและปลูกเชื้อ

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่ารากเน่าอย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

<u>วิธีการดำเนินงาน</u>

เตรียมดินอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้วบรรจุในถาดเพาะเมล็ด 15 หลุม เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว เพาะลงดินและปฏิบัติตามกรรมวิธีกำหนด ข้อ 1.3 โดยใช้อัตราเชื้อรา *Trichoderma* $1x10^4$ สปอร์/มิลลิลิตร คลุกเมล็ด และราดดินต่อต้น และอัตราสปอร์แขวนลอยของเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่ารากเน่าที่ $1x10^8$ สปอร์/มิลลิลิตร

ปฏิบัติตามวิธีการดังกล่าวในทุกไอโซเลตของเชื้อรา *Trichoderma*

กรมวิชาการเกษตร

การบันทึกข้อมูล

ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของกล้าพริกในแต่และกรรมวิธีของเชื้อรา *Trichoderma* แต่ละไอโซเลต

1.2 ทดสอบความสามารถการสร้างเอนไซม์ของเชื้อรา Trichoderma โดยวางแผนการทดลองดังต่อไปนี้

วิธีการดำเนินงาน

2.1 นำเชื้อรา *Trichoderma* ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่าจากการทดลองที่ 1 อย่างน้อย 5 ไอโซเลต มาทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลสด้วยวิธี zone clearing technique ด้วยการใช้ starch agar medium เป็นสารตั้งต้น บ่มจานเพาะเลี้ยงเชื้อนาน 3 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส ภายหลังการบ่มแล้วทดสอบปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของแป้งเป็นโซนใสโดยการหยดด้วยสารละลายไอโอดีน สีที่ปรากฏบ่งบอกการปรากฏของแป้ง ในขณะที่พื้นที่รอบๆจุลินทรีย์ที่ทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสได้จะปรากฏลักษณะใส (Marmoodh et al., 2008)

2.2 นำเชื้อรา *Trichoderma* ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่าจากการทดลองที่ 1 อย่างน้อย 5 ไอโซเลต มาทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ดังนี้ นำเชื้อรามาเลี้ยงลงบนอาหาร PDB เป็นเวลานาน 1 วัน เพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ทำการปิเปตสารละลายเชื้อ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในหลุมอาหารวุ้น CMC (Carboxy Methyl Cellulose) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 เซนตริเมตร โดยวิธี agar spot บ่มเป็นเวลา 3 วัน และ flood plate ด้วยสารละลาย congo red ความเข้มข้นร้อยละ 1 ให้ท่วมผิวหน้าอาหาร ทิ้งไว้ 15 นาที และเทออก วัดเส้นผ่านศูนย์กลางการเกิดบริเวณใส (เพชรลดาและกำไร 2556)

2.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและความแตกต่างของค่าเฉลี่ยการสร้างเอ็นไซม์ทางสถิติ

ออกแบบหรือแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (3 replications) ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANALYSIS OF VARIANCE)และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยหรือวิธีการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (DMRT) เพื่อวิเคราะห์ทางสถิติของความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ทั้ง 3 ชนิดของไอโซเลตเชื้อรา

บันทึกผลการทดลอง

คัดเลือกเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่ผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆได้ดีที่สุดตามค่าคะแนน โดยคำนวณจากอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (clear zone) และโคโลนี (Xu and Yang, 2010; Taechapoempol, 2010) ซึ่งจัดเป็นระดับต่างๆ คือ

*	=	< 1.00
**	=	1.10-2.00
***	=	2.01-3.00
****	=	> 3.00

1.3 การจำแนกชนิดของเอนไซม์ที่เชื้อรา Trichoderma สามารถสร้างได้

วิธีการดำเนินงาน

- การจำแนกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

นำเชื้อราไครโคเดอร์มามาเลี้ยงในขวดรูปพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยซับสเตรตประเภทใยแป้ง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 30 มิลลิลิตร

กรมวิชาการเกษตร

บ่มเชื้อต่อนาน 3 วัน จากนั้นนำมาวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ โดยสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โม พีเอช 4.8 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร และวัดปริมาณกลูโคสที่ได้จากซับสเตรตประเภทใยแป้ง

- การจำแนกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส

นำเชื้อรามาเลี้ยงในอาหาร starch agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการ flood plate ด้วย 3% ไอโอดีน (w/v) ให้ท่วมผิวหน้าอาหาร และโคโลนีเชื้อรา ทิ้งไว้นาน 15 นาที แล้ว เทออก ล้างออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และ flood เพลทอีกครั้งด้วย 1M NaCl เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทออก วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการเกิดบริเวณใส (ซม.)

อีกวิธีการหนึ่ง เพาะเลี้ยงเส้นใยเชื้อราในขวด Erlenmeyer flasks ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิลิตรอาหารเหลว ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 เขย่าขวดที่ 200 rpm (รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 72 ชั่วโมง โดยอาหารเหลวประกอบด้วย 2.0% แหล่งคาร์บอน, 1.0% NH_4No_3, 0.14% K_2HPO_4, 0.05%KCl ,0.01% $MgSO_4$ และ $FeSO_4.7H_2O$ โดยบ่มด้วยชิ้นเส้นใยเชื้อราที่โตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นาน 3 วัน ขนาด 1 ตารางเซนตริเมตร ภายหลังเขย่าขวดรูปชมพู่นาน 72 ชั่วโมง จึงวัดหาค่าการทำงานของเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ อุณหภูมิที่ใช้บ่มแตกต่างกัน ความเร็วในการกวน และระยะเวลาในการบ่ม (Mahmood and Rahman 2008)

- การจำแนกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเพคติเนส

ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำเชื้อรามาเลี้ยงในอาหารเหลว Czapek ที่ประกอบด้วยเพคตินเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อนาน 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เหวี่ยงปั่นที่สภาวะเย็นความเร็วรอบ 5000 นาน 10 นาที และนำส่วนใสไปวัดหาการทำงานของเอนไซม์ (Rajeswari 2015)

เมื่อได้เชื้อรา *Trichoderma* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ตามการทดลองข้างต้นแล้ว จึงนำมาใช้ในการศึกษาการเพิ่มปริมาณเอนไซม์แบบปริมาณสูง (Large-scale) ดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 2 การผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า (Flask-Culture technique) ในรูปแบบผงหรือเม็ดแห้ง (2563)

วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 การผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า (Flask-Culture technique)

การผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า (Flask-Culture technique) (Mahmood and Rahman 2008)

นำชิ้นวุ้นเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลตที่ดีที่สุดเริ่มต้นที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และเพคติเนส มาเติมลงในฟลาสต์ปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB หรือ CMC ปริมาตรเลี้ยง 50 มิลลิลิตร ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป โดยเติมซับสเตรตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่ประกอบด้วยแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปปะไฮเตรต โพลิเปปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมไนเตรต หรือที่ CMC ที่ความเข้มข้นต่างๆ (กรัมต่อลิตร) เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อวัดหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

2.2 การผลิตเอนไซม์ในรูปแบบผงหรือเม็ดแห้ง

กรมวิชาการเกษตร

โดยการแยกส่วนโดยการกรองหรือเครื่องเหวี่ยง

1. ได้เซลล์ออกจากสารละลายเอนไซม์และเอนไซม์ไม่บริสุทธิ์ (crude enzyme)
2. การสกัด ทำให้แห้ง และเอนไซม์ผง
3. การทำเอนไซม์ให้เข้มข้น
4. การแยกส่วนเอนไซม์เฉพาะชนิด
5. ตกตะกอนทำให้แห้ง
6. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคของเอนไซม์จากเชื้อรา Trichoderma

วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 กรรมวิธี 15 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดพริกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* และปลูกเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่ารากเน่า

กรรมวิธีที่ 2 ราดดินด้วยเชื้อรา *Trichoderma* เมื่อพืชอายุ 30 วัน หลังเพาะและปลูกเชื้อราสาเหตุโรค

กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดพริกและราดดินด้วยเชื้อรา *Trichoderma* เมื่อพืชอายุ 30 วัน หลังเพาะและปลูกเชื้อ

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่ารากเน่า

กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2.4 การพัฒนารูปแบบและทดสอบผลิตภัณฑ์เอนไซม์ (Formulation)

เอนไซม์ทุกชนิดที่ได้จากการศึกษา จะนำเติมสารปรุงแต่ง (additives) ให้มีความเสถียรและนำมาทำเป็นสูตรเอนไซม์ ทั้งนี้เพื่อคงไว้ซึ่งความเสถียรของผลิตภัณฑ์ ดังนี้

1.การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ในแบบน้ำ

โดยการเติมกลีเซอรอลที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ เช่น 10%, 20%, 30%, 40%, 50% และ 60% เป็นต้น หรือเกลือ (NaCl) ที่ความเข้มข้นต่ำ (น้อยกว่า 0.1 โมลาร์) หรือ ที่ความเข้มข้นสูง (มากกว่า 1.0 โมลาร์) และ KCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นต้น (Weijers and Van't Riet, 1992; Patricia et al., 2015)

2. พัฒนารูปแบบของเอนไซม์ในรูปแบบผงหรือเม็ด

ใช้วิธีการ Ultracentrifugation, Dehydration method, Freeze-dried methods (การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้ง) และ/หรือ Spray-dried method (วิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอย) เป็นต้น

2.1 เลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ ณ ระยะเวลาที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด

2.2 นำของเหลวเชื้อรามาเหวี่ยงปั่นและนำตะกอนมาแช่ในไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen) เพื่อทำการ Ultracentrifucation, Dehydration และ Freeze-Dried เพื่อทำให้เป็นผงหรืออัดเม็ดต่อไป

2.3 ทดสอบผลิตภัณฑ์หรือสูตรเอนไซม์เพื่อใช้ในการควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่า

1. ศึกษาอุณหภูมิสูงสุด ความเป็นกรด-ด่าง และระยะเวลาสั้นสุดที่เอนไซม์ย่อยสลาย

2. ศึกษาการใช้ผลิตภัณฑ์ในการควบคุมโรคเน่ารากเน่าโดยการเก็บตัวอย่างเอนไซม์ชนิดต่างๆที่ระยะเวลา 5 วัน, 10 วัน, 15 วัน, 30 วัน, 45 วัน วัดหาการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดและประสิทธิภาพการควบคุมโรคตามขั้นตอนการทดลองที่ระบุไว้ในข้อ 1.3 ต่อไป บันทึกผลการทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการกระตุ้นความต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคที่เกิดจาก *Phytophthora* ของพริก (2564)

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการกระตุ้นความต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคที่เกิดจาก *Phytophthora* ของพริกในระดับโรงเรือนทดลอง

ทดสอบการกระตุ้นความต้านทานต่อโรคได้ดังต่อไปนี้

ปลูกพริกในถาดหลุม 12 หลุมๆ ละ 1 ต้น ทำกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ 10 ถาด หยดเอนไซม์ (สารละลาย) หรือผง (dried formulation) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร หรือตามความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อราที่ศึกษาได้ในระดับห้องปฏิบัติการร่วมกับการปลูกเชื้อ *Phytophthora* ไอโซเลตรุนแรง ความเข้มข้น $1x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร สังเกตอาการต้นพืชและบันทึกผลการทดลอง

1. รดต้นพริกด้วยเอนไซม์ที่ผลิตได้หรือด้วยเอนไซม์ตามความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ศึกษาได้ที่ได้จากข้อ 7 (2.3) ทั้งชนิดผงและสารละลายร่วมกับเชื้อรา *Phytopthora* และปลูกพริกในกระถางตามความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งในระดับห้องปฏิบัติการร่วมกับการปลูกเชื้อ *Phytopthora* ไอโซเลตรุนแรง (treatments) บันทึกจำนวนต้นพริกที่เกิดอาการโรค

2. รดต้นพริกที่ปลูกในกระถางด้วยน้ำกลั่นร่วมกับเชื้อรา *Phytopthora* (control) บันทึกจำนวนต้นพริกที่เกิดอาการโรค

3. รดต้นพริกที่ปลูกในกระถางด้วยเชื้อ *Phytopthora* ไอโซเลตรุนแรง (positive control) บันทึกจำนวนต้นพริกที่เกิดอาการโรค

4. รดต้นพริกที่ปลูกในกระถางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (control) บันทึกจำนวนต้นพริกที่เกิดอาการโรค

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการกระตุ้นความต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคที่เกิดจาก *Phytophthora* ของพริกในแปลงทดลอง

ทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการควบคุมโรคพืชในแปลงทดลองเกษตรกรในจังหวัดนครปฐมหรือกาญจนบุรี โดยรดต้นพริกด้วยเอนไซม์ที่ผลิตได้หรือด้วยเอนไซม์ตามความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ศึกษาได้ที่ได้ ทั้งชนิดผงและสารละลายร่วมกับเชื้อรา *Phytopthora* และปลูกพริกในกระถางตามความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งในระดับห้องปฏิบัติการร่วมกับการปลูกเชื้อ *Phytopthora* ไอโซเลตรุนแรง (treatments) บันทึกจำนวนต้นพริกที่เกิดอาการโรค รดต้นพริกที่ปลูกในกระถางด้วยน้ำกลั่นร่วมกับเชื้อรา *Phytopthora* (control) บันทึกจำนวนต้นพริกที่เกิดอาการโรค รดต้นพริกที่ปลูกในกระถางด้วยเชื้อ *Phytopthora* ไอโซเลตรุนแรง (positive control) บันทึกจำนวนต้นพริกที่เกิดอาการโรค รดต้นพริกที่ปลูกในกระถางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (control) บันทึกจำนวนต้นพริกที่เกิดอาการโรค

3. การปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

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

❑ เปลี่ยนแปลงงบประมาณ โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

❑ เปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์/ผลผลิต โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 3 ผลการศึกษา

3.1 ผลการดำเนินงานของโครงการ

การใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก ได้ทำการทดลองผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อราเมตาไรเซียม 2 ไอโซเลต และบิววาเลีย 1 ไอโซเลต โดยใช้ไคติน 2 ชนิด คือ ชนิด A และ ชนิด B ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เพื่อชักนำให้ให้เชื้อราผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส เวลาในการเขย่าเชื้อรา 3, 5 และ 7 วัน นำไคติเนสที่อยู่ในรูปของเหลวเข้าเครื่อง Freeze dryer วัดค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสกับหนอนกระทู้ผัก โดยผสมไคติเนสในอาหารเทียมให้กับหนอนกระทู้ผักวัยสองกินเปรียบเทียบกับวิธีควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น เมื่อทำการวัดขนาดลำตัวและชั่งน้ำหนักของหนอนกระทู้ผักหลังจากทำการทดสอบแล้ว 1 สัปดาห์ พบว่าขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยของหนอนกระทู้ผักจากวิธีควบคุมจะมีขนาดลำตัวที่ใหญ่กว่าและน้ำหนักมากกว่าหนอนกระทู้ผักที่ได้รับไคติเนส พบว่าหนอนที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสจะมีเปอร์เซนต์การตายสูงกว่าวิธีควบคุม วิธีที่มีประสิทธิภาพดีคือเอ็นไซม์ที่ผลิตจากเชื้อเมตาไรเซียม ที่เตรียมเชื้อโดยการเขย่า 3 วัน โดยมีความเข้มข้นของไคติน 1 และ 2 % ที่ใช้ผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสเริ่มต้น เมื่อนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้ผักประสิทธิภาพจะไม่ต่างกัน ดังนั้นในการเตรียมรูปแบบเอ็นไซม์จึงเลือกผลิตเอ็นไซม์จากเชื้อเมตาไรเซียม โดยใช้ความเข้มข้นของไคติน 1% แล้วผสมผงเอ็นไซม์กับสารปรุงแต่ง (additive) เพื่อให้เอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการคงตัว ได้แก่ Aluminium silicate และ Kaoline นำไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผักวัยสอง ผลการทดลองพบว่า สารปรุงแต่ง Aluminium silicate จะให้ประสิทธิภาพดีกว่า Kaoline ในกรรมวิธีที่ 2 เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g จะพบการตายของหนอนกระทู้ผัก 60% รองลงมาคือกรรมวิธีที 7 เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g หนอนมีการตาย 57.50 % จากการทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสที่ความเข้มข้นต่างๆ และเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผสมสารปรุงแต่งที่อัตราส่วนต่างๆ บางวิธีการเมื่อเพิ่มปริมาณเอ็นไซม์จะมีผลทำให้การตายของหนอนเพิ่มขึ้น แต่ไม่เสมอไป และจากตารางจะพบว่าหนอนกระทู้ที่ทดสอบด้วย Kaoline เพียงอย่างเดียว สามารถทำให้มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงถึง 20% ทั้งนี้เนื่องจากเกาลีนมีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลงด้วย ทุกกรรมวิธีไม่ทำให้หนอนตายถึง 50% สูงสุดเพียง 25% ทั้งนี้อาจจะมาจากปริมาณเอ็นไซม์ไคติเนสที่มีไม่มากพอ เนื่องจากข้อจำกัดในการผลิตเอ็นไซม์จากเครื่อง freeze dry ในหน่วยงาน ที่เป็นเครื่องขนาดเล็กจึงไม่สามารถผลิตเอ็นไซม์เป็นจำนวนมากๆได้ ในการทดลองต่อไปจึงได้ผลิตเอ็นไซม์จากเครื่อง freeze dry ขนาดใหญ่ของบริษัท โดยได้ทำการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อราเมตาไรเซียม โดยใช้ไคติน ชนิด A ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เข้าเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 180 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 3 วัน นำไคติเนสที่อยู่ในรูปของเหลวเข้าเครื่อง Freeze dryer ให้แห้ง โดยเทียบกับการทำเอ็นไซม์ให้แห้งโดยเครื่อง VKFreezedry ของบริษัท เมื่อนำไปวัด activity ของเอ็นไซม์พบว่าเอ็นไซม์ที่ได้จากเครื่อง Freeze dry ที่ห้องปฏิบัติการจะมีค่าสูงกว่าเอ็นไซม์ที่ทำ Freeze dry จากบริษัท นำไปเก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปทดสอบกับหนอนนำไปผสมกับ Kaoline เพื่อให้เอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการคงตัวนำไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผักวัยสอง พบว่าเมื่อนำหนอนมาชั่งน้ำหนักและวัดขนาดลำตัวหลังจาก

กรมวิชาการเกษตร

หนอนได้รับเอ็นไซม์ไป 1 อาทิตย์ หนอนที่ได้รับเอ็นไซม์จะมีน้ำหนักน้อยกว่าหนอนที่ไม่ได้รับเอ็นไซม์ และประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ที่เก็บไว้ในตู้เย็นจะมีผลต่อหนอนดีกว่าเอ็นไซม์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และเมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือนแล้วนำมาวัดค่า activity ของเอ็นไซม์ พบว่าค่า activity ของเอ็นไซม์จะลดลงไปทั้งที่เก็บในตู้เย็นและอุณหภูมิห้อง ในการทดสอบไคติเนสในภาคหนาม พบว่าพบว่าไคติเนสมีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก และได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบกับ NPV ที่ใช้ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก และสารฆ่าแมลง Emamectin benzoate ผลการทดสอบพบว่าสารฆ่าแมลงให้ประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักดีที่สุด โดยที่ให้ค่าไม่ต่างจากวิธีควบคุมที่ไม่ได้ปล่อยหนอน ส่วนไคติเนสให้ผลไม่ต่างจากการใช้ผลิตภัณฑ์ NPV ในการควบคุมแมลง

การศึกษาทำการผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลายที่มีประโยชน์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มาเพื่อใช้ในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่า ในขั้นแรกได้ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อราไตรโคเดอร์มาสปีชีส์ (*Trichoderma* species) จากตัวอย่างดินและตัวอย่างเห็ด จ.กาญจนบุรี โดยวิธี soil dilution plate บนอาหาร PDA ได้ไตรโคเดอร์มาจำนวน 30 ไอโซเลต เพื่อศึกษาการสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูเลส อะไมเลส และเพคติเนส จากการทดสอบความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (selective medium) โดยวิธีการวัดการเจริญเติบโตเฉลี่ยของราไตรโคเดอร์มาบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะตามค่าเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใย พบว่า ราไตรโคเดอร์มาทุกไอโซเลต คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายได้ทั้ง 3 ชนิด โดยไตรโคเดอร์มาไอโซเลต T14 สามารถสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะเกลือ CMC ไอโซเลต T22 สามารถสร้างเอ็นไซม์อะไมเลสได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะผงวุ้นแป้ง และ ไตรโคเดอร์มาไอโซเลต TC1 สามารถสร้างเอ็นไซม์เพคติเนสได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ Czapek จากนั้นจึงทำการคัดเลือกเชื้อราไตรโคเดอร์ม่าไอโซเลท TC14 มาใช้ในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสในระดับขวดเขย่า (shake flask-cultured technique) และผลิตผงเอ็นไซม์โดยวิธี freeze-dried method เพื่อนำผงเอ็นไซม์ไปใช้ในการทดสอบการควบคุมโรคพืชต่อไป จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราไฟทอปธอราในใบพริก (Capsicum annuum L.) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสไอโซเลท TC14 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง 3 วัน และ 5 วัน ในเบื้องต้น ในเบื้องต้นเราสังเกตพบรอยโรคปรากฏที่ผิวใบพริกในทุกกรรมวิธี จากการทดลองครั้งนี้ เราแนะนำให้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการควบคุมโรคให้นานขึ้น เช่น ที่ 7 วัน 10 วัน 14 เพื่อศึกษาการเกิดรอยโรคของไฟทอปธอราในกลุ่มกรรมวิธีเทียบกับกลุ่มควบคุมต่อไป เพื่อให้ปรากฏผลการทดลองชัดเจนยิ่งขึ้น

กรมวิชาการเกษตร

3.2 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง (Output)

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
1. องค์ความรู้	-	**เรื่อง**	**1. องค์ความรู้**	1	เรื่อง	แผ่นพับเผยแพร่เรื่อง. เอนไซม์ไคติเนสกำจัดแมลง	เทคโนโลยีการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อราเพื่อใช้ในการกำจัดแมลง
2. ต้นแบบผลิตภัณฑ์			**2. ต้นแบบผลิตภัณฑ์**				
2.2 ระดับห้องปฏิบัติการ	2	ต้นแบบ	2.2 ระดับห้องปฏิบัติการ	2	ต้นแบบ	1.ต้นแบบเอ็นไซม์ไคติเนส 2.ต้นแบบเอ็นไซม์จากเชื้อไตรโคเดอร์มา.	ต้นแบบเอ็นไซม์ไคติเนสที่ใช้ในการควบคุมแมลงและเอ็นไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในการควบคุมโรคพืช
3. ต้นแบบเทคโนโลยี			**3. ต้นแบบเทคโนโลยี**				
3.2 ระดับห้องปฏิบัติการ	2	ต้นแบบ	2.2 ระดับห้องปฏิบัติการ	2	ต้นแบบ	1 เทคโนโลยีการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส 2 เทคโนโลยีการผลิตเอ็นไซม์จากเชื้อไตรโคเดอร์มา	ต้นแบบเทคโนโลยีการผลิตเอ็นไซม์ที่นักวิจัยและผู้สนใจสามารถนำไปผลิตต่อได้ เพื่อใช้ในการควบคุมศัตรูพืช
4. ผลงานตีพิมพ์							
4.1 ระดับชาติ	2	เรื่อง	การประชุมวิชาการระดับชาติ	1	เรื่อง	1.เรื่อง “ผลของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อราเมตาไรเซียมและบิววาเลียต่อหนอนกระทู้ผัก “ได้รับการตอบรับในการนำเสนอผลงานวิจัยในวันที่ 19 มีนาคม 2565 . ในการประชุมวิชาการคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์	เผยแพร่งานวิจัยที่นักวิจัยที่เกี่ยวข้องสามารถนำไปขยายผลต่อไปได้

กรมวิชาการเกษตร

3.3 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง (Outcome) (ถ้ามี)

ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลลัพธ์
มีการพัฒนาต่อยอดการผลิตเอ็นไซม์ที่ใช้ในการควบคุมศัตรูพืชให้สามารถผลิตได้มากขึ้นและพัฒนารูปแบบให้มีความเหมาะสมต่อการใช้งาน ทนต่อสิ่งแวดล้อม ในงานวิจัยปี 2565-2567 โครงการย่อย การพัฒนาผลิตภัณฑ์เอนไซม์และไมโครแคปซูบเพื่อควบคุมศัตรูพืช	2565

*ผลลัพธ์ : ผลสำเร็จที่เกิดจากการนำผลผลิต (Output)ไปต่อยอด การเปลี่ยนรูปของผลผลิตไปสู่รูปแบบที่ใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง หรือการเคลื่อนผลผลิตไปสู่กิจกรรมที่ต่อเนื่อง ซึ่งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลง (Change) ที่ปรากฏชัด และมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม

3.4 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง (Impact) (ถ้ามี)

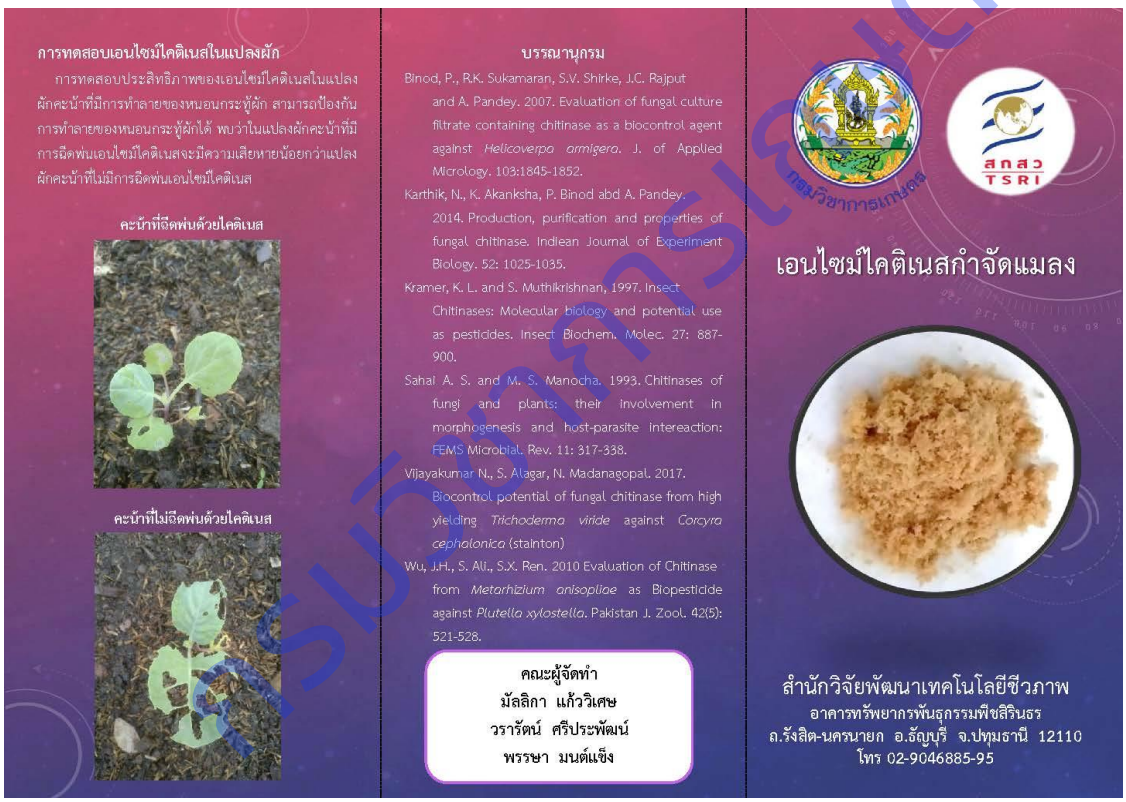
ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลกระทบ
ด้านเศรษฐกิจ : -	
ด้านสังคม :-	
ด้านสิ่งแวดล้อม : -	

* ผลกระทบ : ผลประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงตามผลลัพธ์ (Results of the change) ซึ่งวัดได้อย่างชัดเจนและมีหลักฐานปรากฏชัด (Evidence-based) ทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม ทั้งที่วัดในเชิงปริมาณได้และไม่ได้ ผลกระทบอาจเป็นได้ทั้งทางบวกและทางลบ

3.5 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

วิธีการ/กระบวนการผลักดันงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้จัดทำแผ่นพับ เอนไซม์ไคติเนสกำจัดแมลงเพื่อเผยแพร่แก่ผู้สนใจ



SUBMITTED

ด้านวิชาการ นักวิจัย และผู้ที่เกี่ยวข้อง สามารถนำองค์ความรู้ด้านการผลิตเอ็นไซม์ในการควบคุมพืช ไปพัฒนาต่อเพื่อขยายการผลิตในปริมาณมาก เพื่อใช้ต่อในเชิงพาณิชย์ได้

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล

ในการทดสอบการใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก ได้ทำการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อราเมตาไรเซียม โดยใช้ไคติน ชนิด A และ B ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักในการทดลอง เข้าเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 180 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 3 วัน ผลการทดสอบพบว่าหนอนกระทู้ผักที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสจะกินอาหารลดลง น้ำหนักตัวลดลง จากการวิเคราะห์ทางสถิติจะพบว่าน้ำหนักตัวหนอนที่ได้รับไคติเนสจะน้อยกว่าหนอนที่ไม่ได้รับไคติเนส ไคติเนสที่อยู่ในรูปของเหลวเข้าเครื่อง Freeze dryer ให้แห้ง แล้วผสมผงเอ็นไซม์กับสารปรุงแต่ง (additive) เพื่อให้เอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการคงตัว นำไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผักวัยสอง ผลการทดลองพบว่าในเดือนมกราคม 2563 สารปรุงแต่ง Aluminium silicate จะให้ประสิทธิภาพดีกว่า Kaoline ในกรรมวิธีที่ 2 เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g จะพบการตายของหนอนกระทู้ผัก 60% รองลงมาคือกรรมวิธีที 7 เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g หนอนมีการตาย 57.50 % จากการทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสที่ความเข้มข้นต่างๆ และเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผสมสารปรุงแต่งที่อัตราส่วนต่างๆ บางวิธีการเมื่อเพิ่มปริมาณเอ็นไซม์จะมีผลทำให้การตายของหนอนเพิ่มขึ้น แต่ไม่เสมอไป และพบว่าหนอนกระทู้ที่ทดสอบด้วย Kaoline เพียงอย่างเดียวสามารถทำให้มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงถึง 20% ทั้งนี้เนื่องจากเกาลีนมีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลงด้วย ทุกกรรมวิธีไม่ทำให้หนอนตายถึง 50% สูงสุดเพียง 25% ทั้งนี้อาจจะมาจากปริมาณเอ็นไซม์ไคติเนสที่มีไม่มากพอ เนื่องจากข้อจำกัดในการผลิตเอ็นไซม์จากเครื่อง freeze dry ในหน่วยงาน ที่เป็นเครื่องขนาดเล็ก จึงไม่สามารถผลิตเอ็นไซม์เป็นจำนวนมากๆได้ การทดสอบภาคสนาม ได้ทำการผลิตไคติเนสโดยนำไคติเนสที่อยู่ในรูปของเหลวเข้าเครื่อง Freeze dryer ให้แห้ง เทียบกับการทำเอ็นไซม์ให้แห้งโดยเครื่อง VKFreezedry ของบริษัท เมื่อนำไปวัด activity ของเอ็นไซม์พบว่าเอ็นไซม์ที่ได้จากเครื่อง Freeze dry ที่ห้องปฏิบัติการจะมีค่าสูงกว่าเอ็นไซม์ที่ทำ Freeze dry จากบริษัท นำไปเก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ที่เก็บไว้ในตู้เย็นจะมีผลต่อหนอนดีกว่าเอ็นไซม์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเก็บเอ็นไซม์ไว้นาน แล้วนำมาวัดค่า activity ของเอ็นไซม์ พบว่าค่า activity ของเอ็นไซม์จะลดลงไปทั้งที่เก็บในตู้เย็นและอุณหภูมิห้อง ในการทดสอบภาคสนามโดยทดสอบในแปลงคะน้าพบว่าไคติเนสมีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก การทดสอบเปรียบเทียบกับ NPV ที่ใช้ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก และสารฆ่าแมลง Emamectin benzoate ผลการทดสอบพบว่าสารฆ่าแมลงให้ประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักดีที่สุด โดยที่ให้ค่าไม่ต่างจากวิธีควบคุมที่ไม่ได้ปล่อยหนอน ส่วนไคติเนสให้ผลไม่ต่างจากการใช้ผลิตภัณฑ์ NPV ในการควบคุมแมลง

การคัดเลือกไอโซเลทเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย จากการทดสอบการแยกเชื้อราไตรโคเดอร์มาจากตัวอย่างดินและเห็ด จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยวิธี soil dilution plate บนอาหารพีดีเอ สามารถได้ราไตรโคเดอร์มาจำนวนทั้งสิ้น 29 ไอโซเลท (สาเหตุจากเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาการสร้างเอนไซม์ พบว่าไอโซเลท TC29 ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไปได้) ส่วนไอโซเลทอื่นๆ ลักษณะเชื้อรามีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นใยสีขาวสปอร์มีสีเขียวเข้มเต็มขอบ เส้นใยฟูเจริญเป็นวงกว้างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ ทดสอบการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราทุกไอโซเลทที่สามารถเจริญเติบโตในวุ้นอาหารจำเพาะเพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อเซลลูโลส (CMC) เอนไซม์อะไมเลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแป้ง (star agar) และ เอนไซม์เพคติเนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพคติน (Czapek-Dox) พบว่า ราไตรโคเดอร์มาทุกไอโซเลทสามารถสร้างเอนไซม์ทั้งสามชนิดได้ โดย ไอโซเลท TC14, TC1 และ TC22 สามารถสร้าง

กรมวิชาการเกษตร

เอนไซม์ย่อยสลายเซลลูเลส เพคติเนสและอะไมเลส ได้สูงสุดตามลำดับ โดยได้ค่าเฉลี่ยการสร้างวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดเอนไซม์ที่ 21.20, 7.73 และ 5.00 ตามลำดับ จากการศึกษาการใช้เอ็นไซม์เซลลูเลสเชื้อรา *Trichoderma* sp.ไอโซเลท Tc14 แบ่งตามระดับความเข้มข้นของสารที่ 1 3 และ 5 กรัมต่อลิตร มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytopthora* sp. ซึ่งคัดแยกได้จากผลมะเขือเทศ และเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose (PDA) เพื่อทดสอบในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่า เอ็นไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *T*richoderma sp. ไอโซเลท TC14 มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรค *Phytopthora* sp. ของพริก ได้ดีในสภาพโรงเรือนทดลอง ที่หลังการทดลอง 10 วัน พบเปอร์เซ็นต์โรคลำต้นไหม้เท่ากับ 10.07 และ 15.72 เปอร์เซ็นต์

อภิปรายผล

การผลิตไคติเนสเพื่อทำการทดลองในช่วงแรกจะใช้เครื่อง freeze dry ที่มีขนาดเล็ก ทำให้การผลิตเอ็นไซม์แต่ละครั้งทำได้ไม่มากนัก และต้องใช้ระยะเวลาในการทำให้เอ็นไซม์แห้งอยู่ในรูปผงเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งทำให้ผลิตได้จำนวนไม่มากในแต่ละครั้ง จึงต้องไปใช้เครื่อง freeze dry ของบริษัทที่มีขนาดใหญ่สามารถผลิตได้จำนวนมาก โดยสามารถใช้วัตถุดิบ 10-20 ลิตรเพื่อทำการผลิตเอ็นไซม์ในรูปแห้งได้ ส่วนการทดสอบในภาคสนามการใช้เอ็นไซม์ยังใช้ในปริมาณมากเมื่อเทียบกับสารตัวอื่น ในการผลิตเอ็นไซม์เพื่อใช้ในการควบคุมโรคและแมลงจากการศึกษาครั้งนี้ ยังไม่คุ้มที่จะผลิตเป็นการค้าเนื่องจากจะมีต้นทุนที่สูงมาก

ข้อเสนอแนะต่อผู้เกี่ยวข้องสำหรับการดำเนินงานในระยะต่อไป

ควรมีการวิจัยต่อในกระบวนการผลิตเอ็นไซม์ในปริมาณที่มากในระดับถังหมักและหาวิธีที่จะลดต้นทุนในการผลิตเอ็นไซม์เพื่อสามารถขยายผลต่อยอดได้ในระดับเชิงพาณิชย์เพื่อที่จะสามารถผลิตให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้จริง

ปัญหาและอุปสรรคในการทำงาน

เนื่องจากในช่วงที่ทำงานวิจัยเป็นช่วงที่เกิดการแพร่ระบาดของโรคโควิด ทำให้บางครั้งการทำงานไม่เป็นเป็นไปตามแผน และการออกต่างจังหวัดจะทำได้ลำบาก จึงปรับการทดสอบภาคสนามทำในสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อให้ได้ผลตามแผนงานที่ตั้งไว้

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

Mahmood, Sazzad and Sabita Rezwana Rahman. 2008. Production and Partial Characterization of Extracellcular alpha-Amylase by Trichoderma viride. Bangladesh J Microbial, Volume 25, Number 2, December 2008. Pp. 99-103.

Rajeswari, P. 2015. In Vitro inhibition of Pectinolytic Enzymes of Fusarium oxysporum by Trichoderma spp and Pseudomonas fluorescfens on Arachis hypogaea. L. Int.Curr.Microbiol.App.Sci. 4(1):604-613.

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก

ผนวก ก

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

ชุดคิทประกอบด้วย

Assay buffer **(A4855)**	20ml
4-Nitrophenol N-acetyl-β-D-glucosaminide **(no.N9376)**	10mg
4-Nitrophenol N,N'-diacetyl- β-D-chitobioside **(no.N6133)**	5mg
4-Nitrophenol β –D-N,N',N"-triacetylchitotriose **(no.N8638)**	1mg
Chitinase from *Trichoderma viride* **(C6242)**	1mg
p-Nitrophenol Solution 10mM **(N7660)**	1ml
sodium carbomate **(S2127)**	1g

Reagent และอุปกรณ์ที่ต้องเตรียมเอง

1. Dulbecco's Phosphate buffer saline (PBS) **(no.D8537)**
2. ultrapure water
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 405 nm
4. 96 well plate
5. water bath 37 องศาเซลเซียส
6. For macrophages lysis **(no.C2978)**

การเตรียมสาร

1.Stop Solution

- เติม 24 ml ultrapure water ใน sodium carbonate **(no.S2127)**
- ทำให้ละลายโดยใช้ magnetic จนละลาย
- เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.Substrate Solution(s) (1mg/ml)

-ละลาย 1 mg 4-Nitrophenol N-acetyl-β-D-glucosaminide **(no.N9376)**ใน 1ml ของ Assay Buffer **(A4855)**

-ละลาย 1 mg 4-Nitrophenol β –D-N,N',N"-triacetylchitotriose **(no.N8638)**ใน 1ml ของ Assay Buffer **(A4855)**

-ละลาย 1 mg 4-Nitrophenol N,N'-diacetyl- β-D-chitobioside **(no.N6133)**ใน 1ml ของ Assay Buffer **(A4855)**

1ml ของสารละลายเพียงพอสำหรับ ~10 ปฏิกิริยา mix สารละลายด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง

กรมวิชาการเกษตร

Substrate ละลายยากในบัฟเฟอร์ อาจใช้เวลานานประมาณ 1 ชั่วโมง ในการเขย่าเพื่อให้สารละลาย ละลายสมบูรณ์ เก็บสารละลายบนน้ำแข็งระหว่างทำการทดลอง (เก็บไวที่-20 องศาเซลเซียส เก็บได้นาน 1 เดือน)

3.Chitinase Control Enzyme
- เติม 5 ml ของ PBS ในขวด Chitinase **(no.C6242)**
- จะได้ไคติเนสความเข้มข้น 0.2mg/ml
- Vortex จนสารละลาย
- เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส (เก็บได้นาน 3 เดือน)
- ก่อนใช้ให้ dilute 20 เท่า ด้วย PBS และเก็บบนน้ำแข็ง

4.Strandard Solution
- dilute 5 μl ของ 10 mM สารละลาย *p*-Nitrophenol **(no.N7660)** ด้วย 995 μl ของ stop solution
- Vortex
- เก็บบนน้ำแข็ง

5. Sample preparation
- ตัวอย่างเอนไซม์ เตรียมโดย centrifuge อาหารที่เลี้ยงเชื้อราไว้
- ถ้าเป็น มนุษย์ แมคโคฟาจ โปรตีน ต้องย่อยด้วยชุดคิท ก่อน **(no.C2978)**

6.Procedure
- chitinase hydrolysis จะทำในสภาวะเป็นกรด pH ประมาณ 4-8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- การ hydrolysis enzyme จะปลดปล่อย *p*-Nitrophenol
- เมื่อใส่ stop solution จำทำให้เกิด ionization ของ *p*-Nitrophenol ได้เป็นสีเหลือง
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm[3]

-การหา total activity ของ ไคติเนส จะใช้สับสตรท 3 ตัว ที่มากับชุดคิท

4-Nitrophenol N-acetyl-β-D-glucosaminide **(no.N9376)**
4-Nitrophenol β –D-N,N',N"-triacetylchitotriose **(no.N8638)**
4-Nitrophenol N,N'-diacetyl- β-D-chitobioside **(no.N6133)**

วิธีการทดสอบ
1. ชั่งตัวอย่าง 0.01 ละลายด้วย ultrapure water 10 μl
2. บ่ม substrate solution และ standard solution ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
3. set plate reader ที่ 405 nm
4. ใส่ reaction components ใน 96 well plate ตามตาราง 1 แล้ว mix โดยใช้ไปเปต

กรมวิชาการเกษตร

	Substrate Solution	Sample	Standard Solution
Blank*	100 μl	-	-
Standard**	-	-	300 μl
Positive Control***	90-99 μl	1-10 μl of chitinase control enzyme	-
Test	90-99 μl	1-10 μl of sample	-

5. ใส่ Substrate ก่อนตามด้วยเอนไซม์
6. บ่ม plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา30 นาที (สามารถลดเวลาได้)
7. stop reaction โดยใส่ 200 μl ของ stop reaction ไปในแต่ละ well ยกเว้น wells ที่มี Standard Solution เขย่าจะได้เป็นสีเหลือง
8. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ภายใน30 นาที

วิธีคำนวณ

นิยาม เอนไซม์ 1 ยูนิต หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่สามารถปลดปล่อย *p*-Nitrophenol 1μ mole ภายใต้สภาวะที่กำหนด (pH 4.8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส)

$$\text{Units/ml} = \frac{(A_{405}\text{sample} - A_{405}\text{blank}) \times 0.05 \times 0.3 \times DF}{A_{405}\text{standard} \times \text{time} \times V_{enz}}$$

A_{405}sample=ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ที่ 405 nm
A_{405}blank= ค่าการดูดกลืนแสงของ blank ที่ 405 nm

0.05= μmole/ml ของ *p*-Nitrophenol ใน standard solution
0.3=ปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยาใน 96well plate หลังจากเติม stop solution (ml)
DF=อัตราส่วนระหว่างปริมาตรสุดท้ายและปริมาตรเริ่มต้นของเอนไซม์ไคติเนส
A_{405}standard= ค่าการดูดกลืนแสงของ standard solution ที่ 405 nm
Time= เวลา (นาที)
V_{enz}= ปริมาตรของตัวอย่าง (ml)

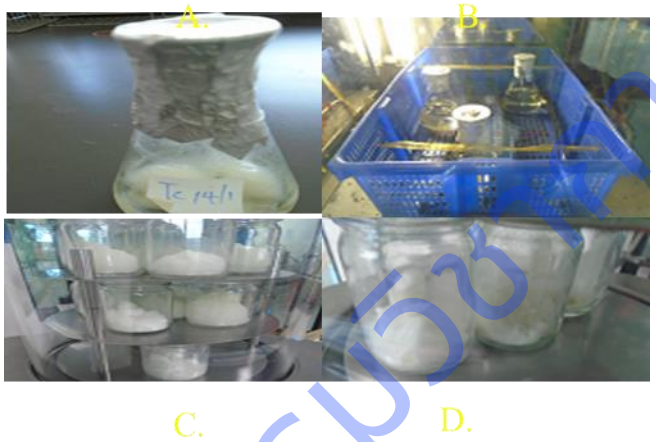
กรมวิชาการเกษตร

ผนวก ข

1.องค์ความรู้ 1 เรื่อง ในรูปแผ่นพับ เรื่อง เอนไซม์ไคติเนสกำจัดแมลง

2. ต้นแบบผลิตภัณฑ์ 2 ต้นแบบ

ผลิตภัณฑ์เอ็นไซม์ไคติเนส



ผลิตภัณฑ์เอ็นไซม์เซลลูเลส

กรมวิชาการเกษตร

3. ต้นแบบเทคโนโลยี 2 ต้นแบบ

ศูนย์วิชาการเกษตร

4. ผลงานตีพิมพ์ เรื่อง ผลของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อราเมตาไรเซียมและบิววาเลียต่อหนอนกระทู้ผัก (Spodoptera litura) นำเสนอผลงานวิจัยในวันที่ 19 มีนาคม 2565 .ในการประชุมวิชาการคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ที่ อว ๐๖๑๘ วท/๖๖

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
ถนนสระบุรี-หล่มสัก
ตำบลสะเดียง อำเภอเมือง
จังหวัดเพชรบูรณ์ ๖๗๐๐๐

๓ กุมภาพันธ์ ๒๕๖๕

เรื่อง แจ้งผลการพิจารณาตีพิมพ์เผยแพร่ในรายงานสืบเนื่อง (Proceedings)

เรียน คุณมัลลิกา แก้ววิเศษ คุณวรารัตน์ ศรีประพัฒน์ คุณอิศเรศ เทียนทัด และคุณจีรภา ปัญญศิริ

ตามที่ท่านได้ส่งผลงานวิจัย เรื่อง **ผลของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อราเมตาไรเซียมและบิววาเลียต่อหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*)** เพื่อนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการระดับชาติด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ประจำปี ๒๕๖๕ ในวันเสาร์ที่ ๑๙ มีนาคม ๒๕๖๕ นั้น

บัดนี้ คณะกรรมการดำเนินงานจัดงานประชุมฯ ได้พิจารณาผลงานวิจัยดังกล่าวเรียบร้อยแล้ว **เห็นสมควรให้งานวิจัยของท่านตีพิมพ์เผยแพร่ในรายงานสืบเนื่อง (Proceedings) ในงานประชุมวิชาการระดับชาติด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ประจำปี ๒๕๖๕**

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กาญจน์ คุ้มทรัพย์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สำนักงานคณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
โทร. ๐-๕๖๗๑-๗๑๒๒ ต่อ ๘๒๐๙
โทรสาร ๐-๕๖๗๑-๗๑๒๓

กรมวิชาการเกษตร