รายงานโครงการวิจัย

การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองคุณภาพสูง

Research and Development of Economic Diseases Management for High Quality of Soybean Seed Production

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต

Supalak Sattayasamitsathit

กรมวิชาการเกษตร

ปี พ.ศ. 2564

รายงานโครงการวิจัย

การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองคุณภาพสูง

Research and Development of Economic Diseases Management for High Quality of Soybean Seed Production

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต

Supalak Sattayasamitsathit

กรมวิชาการเกษตร

ปี พ.ศ. 2564

คำปรารภ

การใช้เมล็ดพันธุ์ดีมีคุณภาพซึ่งจะช่วยลดต้นทุนของเกษตรกรไทยโดยตรง เนื่องจากการใช้เมล็ดพันธุ์ดีจะลดปริมาณการใช้เมล็ดพันธุ์ต่อไร่ลง ผลผลิตต่อไร่เพิ่มขึ้น ลักษณะของเมล็ดพันธุ์คุณภาพดี ต้องมีความบริสุทธิ์ตรงตามสายพันธุ์ ไม่มีพันธุ์อื่นปน รูปร่าง ขนาดและสีของเมล็ดสม่ำเสมอตรงตามพันธุ์ มีความงอกและความแข็งแรงสูง และที่สำคัญคือต้องไม่มีโรคติดมากับเมล็ดพันธุ์ แต่ถั่วเหลืองเป็นพืชที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไส้เดือนฝอย โรคถั่วเหลืองสามารถพบได้ทุกระยะการเจริญเติบโต นอกจากนี้โรคหลายชนิดเป็นโรคที่ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดพันธุ์ ทั้งนี้มีเชื้อมากกว่า 200 ชนิดที่มีผลกระทบต่อการผลิตถั่วเหลือง และมีประมาณ 35 ชนิดที่เป็นเชื้อสำคัญทางเศรษฐกิจที่ทำให้ถั่วเหลืองมีผลผลิตลดลง โดยทั่วไปการปลูกถั่วเหลือง จะพบเชื้อและแมลงศัตรูจำนวนมาก ไม่ว่าจะปลูกพื้นที่ไหนก็ตาม และทุกส่วนของต้นถั่วเหลืองมีความไวต่อการเข้าทำลายของจำนวนศัตรูพืชซึ่งจะมีผลต่อปริมาณและคุณภาพผลผลิตถั่วเหลืองทั้งสิ้น โดยการสูญเสียขึ้นอยู่กับปัจจัยหลักได้แก่ เชื้อโรคหรือสภาวะที่เกี่ยวข้อง ระยะการพัฒนาการเจริญของถั่วเหลืองและสุขภาพพืชในขณะเชื้อเข้าทำลาย ความรุนแรงของโรคต่อต้นถั่วเหลืองแต่ละต้น และจำนวนต้นถั่วเหลืองที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย ในหลายโรคจะมีช่วงที่เชื้อแฝงตัวระหว่างการเข้าทำลายและอาการที่ปรากฏ แต่อย่างไรก็ตามแม้ว่ามีการศึกษาวิธีป้องกันโรคที่สำคัญของถั่วเหลืองในแปลงผลิตแต่สำหรับการป้องกันโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ยังไม่มีการศึกษากันอย่างมากนัก ส่วนใหญ่จะใช้สารเคมีในการควบคุมอย่างเดียว แต่ก็ยังเกิดการสูญเสียของผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาโดยตลอด ทั้งนี้เราไม่สามารถใช้วิธีการใดวิธีหนึ่งมาควบคุมหรือกำจัดเพราะโรคสามารถเกิดได้ในทุกขั้นตอนการผลิต ดังนั้นหากมีการใช้หลักการจัดการโรคพืชแบบผสมผสานรวมถึงกลยุทธ์ต่างๆ ในแง่ของการป้องกัน การบุกรุกก่อนที่จะเกิดการเข้าทำลาย และการรักษา หรือกำจัดโรคที่เริ่มปรากฏให้เห็น เพื่อควบคุมไม่ให้มีการแพร่ระบาดจนเกิดความเสียหายได้ จึงเป็นแนวทางที่น่าจะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการจัดการโรคในเมล็ดพันธุ์ระหว่างเก็บรักษาเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการจัดการโรคสูงสุดโครงการวิจัยการจัดการโรคที่สำคัญของการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองได้ดำเนินการทดลองช่วงปี 2562-2564 มีวัตถุประสงค์เพื่อหาแนวทางในการจัดการโรคที่สำคัญได้แก่ เชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงและเชื้อรา *Phomopsis* sp สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิส ซึ่งในโครงการได้มีวิธีทางเคมีโดยการใช้สารเคมีที่เหมาะสม วิธีทางกายภาพโดยการใช้แสงยูวีและวิธีทางชีวภาพโดยการใช้สารสกัดพืช สารกระตุ้นการต้านทานโรคและการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ โดยนักวิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งที่จะประยุกต์ใช้วิธีการเหล่านี้ในการจัดการโรคที่สำคัญของถั่วเหลืองเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ลดความสูญเสียของเมล็ดพันธุ์ที่เกิดจากโรคให้เหลือน้อยที่สุด และปลอดภัยต่อผู้ใช้

ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	5
ผู้วิจัย	6
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	8
บทนำ	9
บทคัดย่อ.	12
1. ศึกษาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดพืชที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อควบคุมคุณภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์	15
2. การทดสอบสูตรผลิตภัณฑ์จากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วง	41
3. การศึกษาการใช้แสงยูวีต่อการกำจัดเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์และผลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง	46
4. การทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลือง	52
5. ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์	58
6. ประสิทธิภาพของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคในถั่วเหลือง	64
7. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Phomopsis* sp. (Diaporthe) และประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราในการควบคุมโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิสในถั่วเหลือง	70
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	78
บรรณานุกรม	79
ภาคผนวก	82

ศูนย์วิทยทรัพยากร

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัย ขอขอบพระคุณกรมวิชาการเกษตรและสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ในการสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินการวิจัยทั้งหมด ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากรของศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่ กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ที่มีส่วนช่วยปฏิบัติงานให้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี นักวิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย

กรมวิชาการเกษตร

ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

หัวหน้าการทดลองที่ 1 ศึกษาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดพืชที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อควบคุมคุณภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวณัฐพร ฉันทศักดา	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	นางสาวศิริพร สอนท่าโก	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวพจนีย์ หน่อฝั้น	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวสุมนา จำปา	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่
	นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

การทดลองที่ 2 การทดสอบสูตรผลิตภัณฑ์จากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วง

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวสุมนา จำปา	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่
ผู้ร่วมงาน	นางสาวณัฐพร ฉันทศักดา	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวศิราภานต์ ขยันการ	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1
	นางสาววราลักษณ์ บุญมาชัย	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่
	นายชนันทวัฒน์ ศุภสุทธิรางกูล	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่
	นางสาวนิภาภรณ์ พรรณรา	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่

การทดลองที่ 3 การศึกษาการใช้แสงยูวีต่อการกำจัดเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์และผลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก
ผู้ร่วมงาน	นายพรศิลป์กัณธ วีระวันชัย	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

การทดลองที่ 4 การทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลือง

หัวหน้าการทดลอง	นางสาววราลักษณ์ บุญมาชัย	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่
ผู้ร่วมงาน	นางสาวศิราภานต์ ขยันการ	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1
	นางสาวนิภาภรณ์ พรรณรา	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่
	นางสาวสุมนา จำปา	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 5 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก
ผู้ร่วมงาน	นางสาวสุมนา จำปา	ศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่

การทดลองที่ 6 ประสิทธิภาพของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคในถั่วเหลือง

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก
ผู้ร่วมงาน	นางสาวพรนิภา ถาโน	ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่

การทดลองที่ 7 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Phomopsis* sp. (Diaporthe) และประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราในการควบคุมโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิสในถั่วเหลือง

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวอภาพร โพธิยอด	กองวิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืช
ผู้ร่วมงาน	นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก
	นางสาวพรนิภา ถาโน	ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่

กรมวิชาการเกษตร

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CRD = Completely Randomized Design

RCBD = Randomized Completely Block Design

EC = Emulsifiable Concentrate

PDA = Potato dextrose agar

HPTLC = High Performance Thin Layer Chromatography

SD = standard deviation

RSD = relative standard deviation

LOD = limit of detection LOD

LOQ = limit of quantitation

GC-MS = Gas chromatography–mass spectrometry

BP = Between paper

AA = Accelerated aging

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีความสำคัญและมีบทบาทต่อเศรษฐกิจโลกตั้งแต่การผลิต การตลาด การแปรรูป และใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่างๆ มีการนำถั่วเหลืองมาใช้ประโยชน์มากมาย เช่น เมล็ดใช้สกัดน้ำมัน แปรรูปในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์และอุตสาหกรรมต่อเนื่องอีกหลายชนิด ในการปลูกถั่วเหลืองจำเป็นต้องใช้เมล็ดพันธุ์ดีมีคุณภาพซึ่งจะช่วยลดต้นทุนของเกษตรกรไทยโดยตรง เนื่องจากการใช้เมล็ดพันธุ์ดีจะลดปริมาณการใช้เมล็ดพันธุ์ต่อไร่ลง ผลผลิตต่อไร่เพิ่มขึ้น ลักษณะของเมล็ดพันธุ์คุณภาพดี ต้องมีความบริสุทธิ์ตรงตามสายพันธุ์ ไม่มีพันธุ์อื่นปน รูปร่าง ขนาดและสีของเมล็ดสม่ำเสมอตรงตามพันธุ์ มีความงอก และความแข็งแรงสูง และที่สำคัญคือต้องไม่มีโรคติดมากับเมล็ดพันธุ์ แต่ถั่วเหลืองเป็นพืชที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด ซึ่งมีหลายชนิดเป็นโรคที่ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดพันธุ์ เช่น โรคราน้ำค้าง โรคใบจุดนูน โรคแอนแทรคโนส โรคเมล็ดสีม่วง โรคเมล็ดโฟมอบซิส โรคใบจุดวง และโรคไวรัสใบด่าง โดยโรคดังกล่าวมีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่ทำให้ถั่วเหลืองมีผลผลิตลดลง เมล็ดพันธุ์ไม่มีคุณภาพ โดยเฉพาะโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ในช่วงฤดูฝนจะพบโรคเมล็ดสีม่วง และโรคเมล็ดเน่าโฟมอบซิสเป็นจำนวนมาก ซึ่งต้องมีการคัดทิ้งในกระบวนการปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์ส่งผลทำให้สูญเสียผลผลิตและสิ้นเปลืองแรงงาน นอกจากนี้เมล็ดพันธุ์บางส่วนก็มีเชื้อแฝงซึ่งไม่แสดงอาการของโรค เมื่อนำไปปลูกหากสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการพัฒนาของเชื้อจึงทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคได้ โรคเมล็ดโฟมอบซิส เกิดจากเชื้อรา *Phomopsis longicolla* Hobbs จะระบาดในสภาวะที่มีอากาศบริเวณแหล่งปลูกมีความร้อนและความชื้นสูง และการเก็บเกี่ยวช้าเกินไป เมล็ดถั่วเหลืองที่ติดเชื้อนี้จะมีลักษณะเมล็ดที่ยาวเรียว มีขนาดเล็กกว่าเมล็ดปกติ มีรอยแตกหรือรอยแยกลึกลงไป และอาจจะพบเส้นใยสีขาวปกคลุมเมล็ด นอกจากนี้ทำให้เมล็ดถั่วเหลืองเน่า อัตราการงอกและคุณภาพเมล็ดลดลง (Agarwal and Sinclair, 1996) สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ มีรายงานว่า *Phomopsis* spp. สามารถเจริญได้บนอาหาร PDA และในชิ้นส่วนของต้นถั่วเหลืองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่มีความชื้นเหมาะสม แต่ *Phomopsis* ไม่สามารถสร้างสปอร์บนลำต้นถั่วเหลืองที่แก่หรือส่วนที่ตายแล้วจากสภาพแปลงหรือต้นถั่วเหลืองในระยะสุดท้ายของการเพาะปลูกแต่สามารถเจริญข้ามฤดูและสร้างสปอร์ได้ในฤดูปลูกต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรานี้สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารธรรมชาติและอาหารสังเคราะห์ที่ช่วงอุณหภูมิ 15-32 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด คือ 28 องศาเซลเซียส และในสภาพที่ได้รับแสงสลับมืด 12 ชั่วโมง หากมีการผสมกรด ferulic, coniferal, vanillin และ guaiccol ลงในอาหารพร้อมกับเลี้ยงเชื้อในสภาพไร้แสง จะสามารถกระตุ้นการสร้างสปอร์ได้ การเข้าทำลายเมล็ดถั่วเหลืองโดยเชื้อ *Phomopsis longicolla* มีผลต่อคุณภาพและผลผลิตของถั่วเหลือง โดยมีรายงานว่าเมล็ดถั่วเหลืองที่ถูก *Phomopsis* หรือเชื้อ *Fusarium* เข้าทำลายทำให้ได้น้ำมันคุณภาพต่ำ ให้ปริมาณกรดไขมันอิสระสูงกว่าและยังทำให้เมล็ดถั่วเหลืองที่ได้มีสีซีดจางกว่าปกติ นอกจากนี้โปรตีนในถั่วเหลืองที่ถูกทำลายโดยเชื้อ *Phomopsis longicolla* และ *Cercospora kikuchii* จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างฟังก์ชันของโปรตีน ซึ่งในถั่วเหลืองจะมีโปรตีนอยู่หลายชนิด รวมทั้ง globulins ที่มีโปรตีนหลักสะสมอยู่ 2 ชนิด คือ glycinins และ conglycinins โครงสร้างและคุณสมบัติของโปรตีนแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันและมีส่วนเกี่ยวข้องกับปริมาณของไนโตรเจน และกำมะถัน และมีส่วน

กรมวิชาการเกษตร

เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของเมล็ดถั่วเหลืองในด้านที่ใช้ทำอาหาร รวมทั้งความสามารถในการละลาย ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกตะกอน และคุณภาพแป้ง ในการส่วนของผลกระทบต่อเมล็ดพันธุ์ในด้านคุณภาพและความงอกของต้นกล้า มีรายงานว่าในการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง การเข้าทำลายแฝงของเชื้อนับว่าเป็นสิ่งสำคัญมากเนื่องจากมีผลต่อการงอกของเมล็ดที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เชื้อราสามารถทำให้เกิด proteolysis ในเปลือกหุ้มเมล็ดและ cotyledons จึงเป็นสาเหตุให้เกิดเมล็ดเน่า

การจัดการโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์นั้นมีการเจริญและการเข้าทำลายต้นกล้าพืชจนทำให้เกิดโรคกับพืชในแปลงปลูก โดยกลไกของวิธีการจัดการโรคที่ใช้จะมีผลต่อการทำลายหรือฆ่าเชื้อโรคที่แตกต่างกันออกไป วิธีจัดการโรคบางกรรมวิธีเป็นการลดจำนวนเชื้อโรคที่มีอยู่ในเมล็ดพันธุ์ บริเวณเนื้อเยื่อหรือบนผิวเมล็ดพันธุ์ บางกรรมวิธีของการจัดการโรคจะกำจัดเชื้อขณะที่เมล็ดงอกหรือขณะที่เชื้อโรคเจริญขึ้นมา กรรมวิธีในการจัดการโรคนั้นจะมีทั้งการใช้วิธีทางกฎหมายหรือการประยุกต์เอาวิธีการทางชีววิทยา กายภาพ และเคมีมาใช้ในการฆ่าเชื้อโรคหรือป้องกันเมล็ดพันธุ์จากการเข้าทำลายของโรค ประสิทธิภาพของวิธีการเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับเครื่องมือที่ใช้ การจัดการกับเมล็ดพันธุ์ เป็นการประยุกต์ใช้มาตรการต่างๆ เพื่อลดการปนเปื้อนของศัตรูพืชบนเมล็ดพันธุ์ โดยปกติจะหมายถึงการใช้สารกำจัดเชื้อรา มาคลุกกับเมล็ดเพื่อฆ่าเชื้อชนิดที่เป็น seed-borne หรือ soil-borne นอกจากนี้ยังหมายถึงวิธีทางกายภาพต่างๆ เช่น การนำเมล็ดตากแดด การแช่เมล็ดในสารละลาย เป็นต้น การจัดการกับเมล็ดพันธุ์สามารถจัดกลุ่มตามวัตถุประสงค์การใช้งาน เช่น การกำจัดเชื้อ หมายถึงการฆ่าเชื้อที่ติดมากับเมล็ด โดยการกำจัดสปอร์ของเชื้อราที่อยู่ภายในเมล็ด เช่น สปอร์ที่พักตัวในเปลือกหุ้มเมล็ดหรือเนื้อเยื่อเมล็ด การควบคุมที่มีประสิทธิภาพจะใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราชนิดซึมผ่านเมล็ด เพื่อฆ่าเชื้อราที่อยู่ภายใน การทำลายเชื้อที่ผิวเมล็ดหมายถึงการทำลายเชื้อที่ติดบนผิวเมล็ด หรือมีการปนเปื้อนบนพื้นผิวของเมล็ด สำหรับการควบคุมที่มีประสิทธิภาพสามารถใช้วิธีการเคมีบริเวณผิวในรูปแบบฝุ่น สารละลาย หรือของเหลว การป้องกันเมล็ดพันธุ์ มีวัตถุประสงค์ในการคุ้มครองเมล็ดพันธุ์ เพื่อป้องกันเมล็ดและต้นกล้าจากเชื้อในดินที่อาจเข้าทำลายเมล็ดพันธุ์ก่อนที่เมล็ดพันธุ์จะงอก แต่อย่างไรก็ตามเราไม่สามารถใช้วิธีการใดวิธีหนึ่งมาควบคุมหรือกำจัดเพราะโรคสามารถเกิดได้ในทุกขั้นตอนการผลิต ดังนั้นหากมีการใช้หลักการจัดการโรคพืชแบบผสมผสานรวมถึงกลยุทธ์ต่างๆ ในแง่ของการป้องกัน การบุกรุกก่อนที่จะเกิดการเข้าทำลาย และการรักษา หรือกำจัดโรคที่เริ่มปรากฏให้เห็น เพื่อควบคุมไม่ให้มีการแพร่ระบาดจนเกิดความเสียหายได้ จึงเป็นแนวทางที่น่าจะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการจัดการโรคในเมล็ดพันธุ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษากรรมวิธีต่างๆ เพื่อนำมาใช้ในแต่ละขั้นตอนของการผลิตเมล็ดพันธุ์ไม่ว่าจะเป็นการจัดการเมล็ดพันธุ์ให้ปราศจากเชื้อ การส่งเสริมการเจริญและชักนำให้ถั่วเหลืองต้านทานโรค ตลอดจนการจัดการโรคหลังการเก็บเกี่ยวและในระหว่างการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง เพื่อป้องกัน ลดและกำจัดเชื้อทั้งในแปลงปลูกและระหว่างเก็บรักษาเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการจัดการโรคสูงสุด

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1) เพื่อวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการควบคุมโรคในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์และโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์อย่างเหมาะสมสำหรับการยกระดับคุณภาพเมล็ดพันธุ์และเพิ่มผลผลิตโดยลดความเสียหายจากโรคพืช

กรมวิชาการเกษตร

ที่มาของปัญหา

- โรคที่เกิดในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทำให้เกิดความสูญเสียของผลผลิตและทำให้คุณภาพเมล็ดพันธุ์ลดลง
- ต้องใช้สารเคมีในการกำจัดทำให้เพิ่มต้นทุนในการผลิต

ระบบการจัดการโรคที่สำคัญในการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

การจัดการเมล็ดพันธุ์ให้ปราศจากเชื้อ

การทดลองที่ 1 ศึกษาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดพืชที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อควบคุมคุณภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์

การทดลองที่ 2 การทดสอบสูตรผลิตภัณฑ์จากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วง

การทดลองที่ 3 การศึกษาการใช้แสงยูวีต่อการกำจัดเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ และผลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

การส่งเสริมการเจริญและชักนำให้ถั่วเหลืองต้านทานโรค

การทดลองที่ 6 ประสิทธิภาพของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานในถั่วเหลือง

การลดปริมาณเชื้อในแปลงปลูก

การทดลองที่ 4 การทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลือง

การทดลองที่ 5 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์

- ลดต้นทุนการผลิต
- ผลผลิตเพิ่มขึ้น
- เมล็ดพันธุ์มีคุณภาพสูง
- เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้น

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

การผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมักประสบปัญหาด้านโรคพืช ซึ่งโรคที่สำคัญของการผลิตเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ โรคเมล็ดสีม่วงซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และโรคเมล็ดเน่าโฟมอบซิสจากเชื้อ *Phomopsis* sp ทำให้ต้องมีการคัดเมล็ดทิ้งในกระบวนการปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์ส่งผลต่อความสูญเสียผลผลิตอย่างน้อย 20 เปอร์เซ็นต์รวมทั้งสิ้นเปลืองแรงงานและเพิ่มต้นทุนในการผลิตเมล็ดพันธุ์ การศึกษานี้จึงศึกษาการจัดการโรคด้วยวิธีการหลัก 3 วิธีการ ได้แก่ วิธีการใช้สารกำจัดเชื้อรา วิธีทางกายภาพและวิธีทางชีวภาพ ซึ่งจากการศึกษาประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราพบว่าการพ่น Propiconazole + Difenoconazole 15%+15% EC อัตรา 10 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร มีการเกิดโรคเมล็ดสีม่วงต่ำที่สุด คือ 4.75% นอกจากนี้สารป้องกันกำจัดเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phomopsis* sp. ได้ดีที่สุด ได้แก่ Carbendazim, Thiophanate-methyl, Difenoconazole และ Mancozeb สามารถยับยั้งเชื้อได้สูงสุดถึง 100% ในระดับห้องปฏิบัติการ การศึกษาวิธีการกำจัดเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทางกายภาพโดยการใช้แสงยูวีซีที่มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus niger* ได้ดีเมื่อได้รับแสงยูวีซีเป็นเวลา 10 นาทีขึ้นไป ในขณะที่แสงยูวีซีไม่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเมล็ดพันธุ์ *Cercospora kikuchii*, *Phomopsis* sp. และ *Cladosporium* sp. แต่อย่างไรก็ตามแสงยูวีซีไม่มีผลทำให้คุณภาพเมล็ดพันธุ์ลดลง การศึกษาการกำจัดเชื้อราโดยวิธีทางชีวภาพ ได้แก่ การใช้สารสกัดจากพืช พบว่าสารออกฤทธิ์ในสารสกัดพืชที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* พบว่า สารสกัดหยาบกานพลู และข่า สามารถยับยั้งได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสกัดให้บริสุทธิ์ขึ้น นำไปทดสอบด้วยวิธี Contact bioautography พบว่าน้ำมันข่า และน้ำมันกานพลูมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนแผ่น TLC ที่ตำแหน่ง R_F 0.17-0.42 ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเป็นสารกลุ่ม terpenoids กานพลูจึงเป็นพืชที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* โดยมี eugenol เป็นสารออกฤทธิ์ วิธีการสกัดน้ำมันกานพลูที่ดีที่สุด คือ การกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) และผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู พบว่าสูตร B น้ำมันกานพลู 40% w/w EC ที่อัตรา 2-2.5 g/kg PDA สามารถยับยั้งการเจริญเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้ถึง 93.72% การศึกษาการคงสภาพของผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู พบว่าคงสภาพได้ดีที่สภาวะกรดอ่อน กลาง และเบสอ่อน สำหรับการแยกสารออกฤทธิ์ (eugenol) ในน้ำมันกานพลูพบว่าการแยกด้วยตัวทำละลาย hexane และ 10% EtOAc/hexane ที่อัตราการไหล 35 mL/min ทำให้ได้ eugenol มีความบริสุทธิ์มากกว่า 99% เมื่อพัฒนาสารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูเป็นสูตรผลิตภัณฑ์ชนิดน้ำมันเข้มข้นเป็นของเหลวที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน (EC: Emulsifiable Concentrate) ที่ระดับความเข้มข้น 40% w/w เพื่อใช้ในการฉีดพ่น พบว่าอัตรา 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 10 ลิตร เป็นอัตราที่เหมาะสมที่สุดในการฉีดพ่นเพื่อยับยั้งการเกิดโรคเมล็ดสีม่วงในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ สำหรับการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา พบว่าได้เชื้อที่แยกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้ง *C. kikuchii* และ *Phomopsis* sp. ได้แก่ PSL 49 เมื่อนำไปจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHB พบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* และนำไปประยุกต์ใช้ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พบว่ากรรมวิธีพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในระยะต้นกล้า

กรมวิชาการเกษตร

V1 พบการติดเชื้อ *C. kikuchii* น้อยสุด ส่วนการใช้สารชีวภาพเพื่อกระตุ้นการต้านทานโรค โดยศึกษาประสิทธิภาพของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของ PR ยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคในถั่วเหลือง ได้แก่ สารเมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซิเตทโดยฉีดพ่นถั่วเหลืองในระยะเริ่มออกดอกในเรือนทดลอง พบว่าเมทิลจัสโมเนตที่ความเข้มข้น 90 มก./ลิตร สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน PR4 สูงสุด โดยมีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น 3.14 เท่า ในขณะที่เอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 6,000 มก./ลิตร สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน PR10 สูงสุดโดยมากกว่าชุดควบคุมถึง 7.38 เท่า แต่ไม่มีการแสดงออกของยีน PR4 การพ่นสารด้วยเมทิลจัสโมเนต ความเข้มข้น 90 มก./ลิตร สามารถลดปริมาณเชื้อ *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลืองได้สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการพ่นสารด้วยเมทิลจัสโมเนตที่ระดับความเข้มข้น 90 มก./ลิตร จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ โรคเมล็ดสีม่วง โรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิส เมล็ดพันธุ์ ถั่วเหลือง การจัดการโรค น้ำมันกานพลู เมทิลจัสโมเนต จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ สารกำจัดเชื้อรา แสงยูวีซี

Abstract

Soybean seed production often had problems with plant diseases. The major diseases in seed production were purple seed disease caused by *Cercospora kikuchii* and Phomopsis seed decay caused *Phomopsis* sp.. At least 20 percent of the yield was lost, labor wasted and the cost of seed production was increased. By conducting research and development of economically important disease management technologies in the production of soybean seeds with three main methods, namely, the use of fungicides. physical methods and biological methods. The study of the efficiency of purple seed stain disease fungicide in greenhouse condition was found that Propiconazole + Difenoconazole 15% + 15% EC was sprayed at 10 cc per 20 liters of water had the lowest percentage of purple seed disease was 4.75 percent. In addition, the most effective fungicides to inhibit the growth of Phomopsis sp., namely Carbendazim, Thiophanate-methyl, Difenoconazole and Mancozeb, were able to inhibit up to 100% of the pathogen at laboratory test. A study on physical elimination of fungi on soybean seed using UVC light was conducted. It was found that UVC light was effective in inhibiting *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* when exposed to UVC light for 10 min or more, whereas UVC was not able to control *Cercospora kikuchii*, *Phomopsis* sp. and *Cladosporium* sp. However, UVC had no different affect to seed quality. The study of biological method for elimination of fungi was the use of plant extracts, antagonistic microorganisms and biological agents in stimulating disease resistance. Crude extraction from *Eugenia caryophyllus* and *Alpinia galangal* showed a high effect on inhibition of growth to 100%. Both plant extracts

กรมวิชาการเกษตร

were tested by Contact bioautography method and found that the chemical being on R_F 0.17-0.42 showed antifungal activity and were terpenoid group. The extract of *Eugenia caryophyllus* which consisted of eugenol as active compound was chosen to formulate to be finished product. The hydro-distillation method was the most effective for extraction. Three finished products of clove oil in the form of emulsifiable concentrate (EC) were formulated. Formula B (rate 2-2.5 g/kg) could inhibit the growth of *Cercospora kikuchii* about 93.72%. The stability test of the formulas was also studied at 54℃ for 14 days, the result indicated that the products still be stable. Eugenol being an active compound was isolated from the clove oil with hexane and 10% ethyl acetate/hexane as mobile phase, flow rate 35 mL/min. The purity is more than 99%. A crude extract of clove was used to develop a product suitable for use in soybean seed production. To make an emulsifiable concentration, spraying with clove oil EC 40% w/w at the rate of 50 ml per 10 liters of water, had a disease control rate and did not affect the germination percentage and seed vigor. Isolates, PSL 49, suppressed the growth of *C. kikuchii* and *Phomopsis* sp.. The identification of isolate PSL49 by morphology biochemical test and carbohydrate utilization by API 50 CHB it was *Bacillus subtilis*. This species is tested efficacy in the green house. It was found that spraying method at seedling stage V1 was suitable to applied to control the *Cercospora kikuchii*. The effectiveness of bioactive elicitors in the expression of PR-genes that can stimulate disease resistance in soybeans such as methyl jasmonate and ethyl acetate for spraying soybean in the R1 stage of growth in green house condition. It was found that the concentration of 90 ppm methyl jasmonate was able to increase the expression of the *PR4* gene by up to 3.14 times, while ethyl acetate concentration of 6,000 ppm can increase the level of gene expression *PR10* by up to 7.38 times, but does not promote expression of *PR4.* Additionally, foliar methyl jasmonate at the concentration of 90 ppm could be reduced infected of *Cercospora kikuchii* cause purple seed stain about 80%. Therefore, methyl jasmonate at the concentration of 90 ppm could be appropriate to apply for soybean seed production in the field further.

Key word: Purple seed stain, Phomopsis seed decay, Seed, Soybean, Disease management, Clove oil**,** Methyl jasmonate, Antagonistic microorganism, Fungicide, UVC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระเบียบวิธีการวิจัย

การทดลองที่ 1 ศึกษาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดพืชที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อควบคุมคุณภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์

Study on the efficacy of plant extracts on *Cercospora kikuchii* and isolation of fungicidal substance for controlling the quality of the formulated product

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยมสี่ตำแหน่ง รุ่น AC211S (Sartorius)
2. ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)
3. เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) รุ่น R-124 (BUCHI)
4. เครื่อง Flash Chromatograph รุ่น reveleris prep (BUCHI)
5. เครื่องอัลตราโซนิค รุ่น Elmasonic S (Elma)
6. เครื่อง High Performance Thin Layer Chromatogrphy (HPTLC) (CAMAG)
7. เครื่อง Gas Chromatograph-Mass spectrometer (GC-MS) รุ่น 6890N Mass Spectrometry รุ่น 5973 (Agilent Technologies)
8. เครื่องแก้ว ได้แก่ กรวยแยก, กรวยกรองบูชเนอร์ ขวดกำหนดปริมาตร, กรวยกรองแก้ว, บีกเกอร์ หลอดทดลอง, ปิเปต, ขวดก้นกลม, ชุดกรองน้ำมันหอมระเหย (Clevenger Apparatus)
9. สารเคมี ได้แก่ chloroform, ethyl acetate, ethanol, hexane, petroleum ether, methanol, eugenol, acetyl eugenol, sodium sulfate anhydrous, carbendazim, p-anisaldehyde, sulfuric acid เป็นต้น

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดหยาบจากพืชและส่วนต่างๆของพืชในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii*

1.1 ศึกษาสารสกัดหยาบจากพืชและส่วนต่างๆของพืชที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

<u>แบบและวิธีการทดลอง</u>

ในขั้นตอนการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา Cercospora kikuchii วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ 23 กรรมวิธี ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมด้วยสารสกัดหยาบจากพืช 20 ชนิด ความเข้มข้น 6.25 mg/mL, carbendazim (positive control), เอทานอล (blank) และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ไม่เติมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา (negative control) ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	กระชายขาว	กรรมวิธีที่ 13	ใบแมงลักป่า
กรรมวิธีที่ 2	กระเทียม	กรรมวิธีที่ 14	ใบสะเดา

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 3	กานพลู	กรรมวิธีที่ 15	เปลือกมังคุด
กรรมวิธีที่ 4	ขมิ้นชัน	กรรมวิธีที่ 16	ไพล
กรรมวิธีที่ 5	ข่า	กรรมวิธีที่ 17	ว่านน้ำ
กรรมวิธีที่ 6	ขิง	กรรมวิธีที่ 18	หางไหล
กรรมวิธีที่ 7	ชะเอมเทศ	กรรมวิธีที่ 19	อบเชยเทศ
กรรมวิธีที่ 8	ชะเอมไทย	กรรมวิธีที่ 20	อบเชยไทย
กรรมวิธีที่ 9	ช้าพลู	กรรมวิธีที่ 21	คาร์เบนดาซิม (positive control)
กรรมวิธีที่ 10	ตะไคร้หอม	กรรมวิธีที่ 22	น้ำกลั่น+ เอทานอล (blank)
กรรมวิธีที่ 11	ใบน้อยหน่า	กรรมวิธีที่ 23	น้ำกลั่น (negative control)
กรรมวิธีที่ 12	ใบบัวตอง		

1. เตรียมสารสกัดหยาบจากตัวอย่างพืช 20 ชนิด ได้แก่ กระชายขาว กระเทียม กานพลู ขมิ้นชัน ข่า ขิง ชะเอมเทศ ชะเอมไทย ช้าพลู ตะไคร้หอม ใบน้อยหน่า ใบบัวตอง ใบแมงลักป่า ใบสะเดา เปลือกมังคุด ไพล ว่านน้ำ หางไหล อบเชยไทย อบเชยเทศ อบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บดและชั่งน้ำหนักตัวอย่าง สกัดตัวอย่างพืชด้วยตัวทำละลายเอทานอล ในอัตรา 20% w/v จำนวน 3 ครั้ง ด้วยเครื่องอัลตราโซนิค แล้วกรองละเอียดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปลดปริมาตรด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator)

2. ทดสอบสารสกัดหยาบจากพืช 20 ชนิดในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

2.1 เตรียมเชื้อ โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธี Blotter method เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาตรวจหาเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ภายใต้กล้อง Steromicroscope ทำการแยกให้บริสุทธิ์ เลี้ยงบนอาหาร PDA และเก็บเป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดลอง

2.2 นำสารสกัดหยาบของพืชทั้ง 20 ชนิด ในอัตรา 6.25 mg/mL ทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยเมื่อเชื้อราอายุได้ 7 วัน ตัดเจาะชิ้นวุ้นโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำมาวางบนจุดกึ่งกลางจานอาหารที่เติมสารสกัดพืชป้องกันกำจัดเชื้อราตามกรรมวิธี บันทึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อทุก 4 วัน จนกว่าเชื้อราในอาหาร PDA ของชุดควบคุมใกล้เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงหยุดวัดการเจริญ นำผลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

2.3 เลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์มากที่สุด 3 ชนิด คือ การพลู ข่า และช้าพลู ไปสกัดต่อด้วย วิธี Column chromatography ชะด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ hexane, chloroform, methanol ตามลำดับ แล้วเก็บสารที่ได้จากการชะ (fraction) ทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

กรมวิชาการเกษตร

ในอัตรา 2.50 mg/mL ตามวิธีการข้อ 2.2 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ 14 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	ข่า (hexane)	กรรมวิธีที่ 8	กานพลู (methanol)
กรรมวิธีที่ 2	ข่า (chloroform)	กรรมวิธีที่ 9	ช้าพลู (hexane)
กรรมวิธีที่ 3	ข่า (methanol1)	กรรมวิธีที่ 10	ช้าพลู (chloroform1)
กรรมวิธีที่ 4	ข่า (methanol2)	กรรมวิธีที่ 11	ช้าพลู (chloroform2)
กรรมวิธีที่ 5	กานพลู (hexane)	กรรมวิธีที่ 12	ช้าพลู (methanol)
กรรมวิธีที่ 6	กานพลู (chloroform1)	กรรมวิธีที่ 13	คาร์เบนดาซิม (positive control)
กรรมวิธีที่ 7	กานพลู (chloroform2)	กรรมวิธีที่ 14	น้ำกลั่น (negative control)

2.4 นำสารสกัดส่วนที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ได้แก่ ข่า (hexane), กานพลู (hexane), กานพลู (chloroform1), กานพลู (chloroform2) มาแยกสารโดยเทคนิคทีแอลซี โดยใช้แผ่น TLC silica gel 60 F254 แยกสารด้วยวัฏภาคของเหลว (mobile phase) hexane : ethyl acetate (9:1,v/v) เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 แผ่น นำแผ่นดังกล่าว ไปทดสอบบนเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ด้วยวิธี Contact bioautography (Dewanjee et al., 2014) เพื่อหาตำแหน่ง (R_F) ของสารออกฤทธิ์ (active substance) และอีกแผ่นหนึ่งสเปรย์น้ำยาทดสอบ p-anisaldehyde/sulfuric acid

1.2 ศึกษาชนิดของกลุ่มสารออกฤทธิ์โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ

นำสารสกัดส่วนที่สามารถยับยั้งเชื้อรา Cercospora kikuchii ได้แก่ ข่า (hexane), กานพลู (hexane), กานพลู(chloroform1), กานพลู (chloroform2) จาก 2.3 มาทดสอบกลุ่มสารต่างๆ โดยวิธีทางพฤกษเคมี นพมาศและคณะ (2554)

- ทดสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) ด้วยน้ำยาทดสอบ Dragendorff's reagent, Mayer's reagent
- ทดสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ด้วยน้ำยาทดสอบ Shinoda's reagent, Ferric chloride, Lead acetate
- ทดสอบสารกลุ่มฟีนอลและแทนนิน (Phenol and Tannin) ด้วยน้ำยาทดสอบ Ferric chloride, Lead acetate, Gelatin
- ทดสอบสารกลุ่มซาโปนิน (Saponin) ด้วยน้ำยาทดสอบ Foam test
- ทดสอบสารกลุ่มเทอร์ปินอยด์ และเสตียรอยด์ ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น Salkowski's test, Lieberman Burchard
- ทดสอบสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ด้วยน้ำยาทดสอบ เช่น Benedict's reagent, Fehling's reagent, Barfoed's reagent

กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาวิธีการสกัดสารสกัดหยาบพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ และทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เพื่อกำหนดอัตราการใช้

2.1 ศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันกานพลู

ศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันกานพลู จำนวน 5 กรรมวิธี ดังนี้

1. การแช่ (maceration) อัตรา 10% (w/v) ใน hexane เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator)

2. การแช่ (maceration) อัตรา 10% (w/v) ในเอทานอล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator)

3. การสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic อัตรา 10% (w/v) ใน hexane เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator)

4. การสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic อัตรา 10% (w/v) ในเอทานอลเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator)

5. การกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) อัตรา 10% (w/v) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

บันทึกน้ำหนักสารสกัดหยาบ และวิเคราะห์ปริมาณ Eugenol ในสารสกัดหยาบ ด้วย GC-MS (Athar *et al*, 2013)

2.2 ศึกษาประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อกำหนดอัตราการใช้

<u>แบบและวิธีการทดลอง</u>

ในขั้นตอนการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ 18 กรรมวิธี ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีการผสมสูตรผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูชนิด A, B และ C ชนิดละ 5 ความเข้มข้น, ส่วนผสมสูตรที่ไม่มีน้ำมันกานพลู (blank), carbendazim (positive control) และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ไม่เติมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา (negative control) ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูสูตร A ความเข้มข้นเข้มข้น 0.50 mg/mL
กรรมวิธีที่ 2	ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูสูตร A ความเข้มข้นเข้มข้น 1.00 mg/mL
กรรมวิธีที่ 3	ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูสูตร A ความเข้มข้นเข้มข้น 1.50 mg/mL
กรรมวิธีที่ 4	ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูสูตร A ความเข้มข้นเข้มข้น 2.00 mg/mL
กรรมวิธีที่ 5	ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูสูตร A ความเข้มข้นเข้มข้น 2.50 mg/mL
กรรมวิธีที่ 6	ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูสูตร B ความเข้มข้นเข้มข้น 5.00 mg/mL
กรรมวิธีที่ 7	ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูสูตร B ความเข้มข้นเข้มข้น 1.00 mg/mL
กรรมวิธีที่ 8	ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูสูตร B ความเข้มข้นเข้มข้น 1.50 mg/mL
กรรมวิธีที่ 9	ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูสูตร B ความเข้มข้นเข้มข้น 2.00 mg/mL
กรรมวิธีที่ 10	ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูสูตร B ความเข้มข้นเข้มข้น 2.50 mg/mL

ศรีปทุมการเกษตร

กรรมวิธีที่ 11 ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูสูตร C ความเข้มข้นเข้มข้น 5.00 mg/mL
กรรมวิธีที่ 12 ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูสูตร C ความเข้มข้นเข้มข้น 1.00 mg/mL
กรรมวิธีที่ 13 ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูสูตร C ความเข้มข้นเข้มข้น 1.50 mg/mL
กรรมวิธีที่ 14 ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูสูตร C ความเข้มข้นเข้มข้น 2.00 mg/mL
กรรมวิธีที่ 15 ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูสูตร C ความเข้มข้นเข้มข้น 2.50 mg/mL
กรรมวิธีที่ 16 ส่วนผสมสูตรที่ไม่มีน้ำมันกานพลู (blank)
กรรมวิธีที่ 17 carbendazim (positive control)
กรรมวิธีที่ 18 น้ำกลั่น (negative control)

1. ผสมปรุงแต่งเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู และศึกษาการคงสภาพของผลิตภัณฑ์

1.1 เตรียมผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู สูตร Emulsifiable Concentrate (EC) จำนวน 3 สูตร ดังนี้

- ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปสูตรที่ 1 (A) ความเข้มข้น 20% ของน้ำมันกานพลู ใน TWEEN 20 และ SPAN80
- ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปสูตรที่ 2 (B) ความเข้มข้น 40% ของน้ำมันกานพลู ใน TWEEN 20 และ SPAN80
- ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปสูตรที่ 3 (C) ความเข้มข้น 60% ของน้ำมันกานพลู ใน TWEEN 20 และ SPAN80

1.2 ศึกษาการคงสภาพของสูตรผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู

- ศึกษาการคงสภาพของน้ำมันกานพลูเมื่อละลายในตัวทำละลายที่มีสภาพกรด-ด่าง
- ศึกษาการคงตัวของ pH ของสูตรผลิตภัณฑ์อุณหภูมิต่างๆ
- ศึกษาการคงตัวของสารออกฤทธิ์ Eugenol ในสูตรผลิตภัณฑ์

2. เตรียมเชื้อ โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธี Blotter method เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาตรวจหาเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ภายใต้กล้อง Steromicroscope ทำการแยกให้บริสุทธิ์ เลี้ยงบนอาหาร PDA และเก็บเป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดลอง

3. นำผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูสูตร A, B และ C ทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยเมื่อเชื้อราอายุได้ 7 วัน ตัดเจาะชิ้นวุ้นโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำมาวางบนจุดกึ่งกลางจานอาหารที่เติมสารสกัดพืชป้องกันกำจัดเชื้อราตามกรรมวิธี บันทึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อทุก 4 วัน จนกว่าเชื้อราในอาหาร PDA ของชุดควบคุมใกล้เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงหยุดวัดการเจริญ นำผลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาวิธีสกัดและวิธีวิเคราะห์สารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพ

3.1 ศึกษาวิธีแยกสาร eugenol จากน้ำมันกานพลูด้วยเครื่อง Flash Chromatograph

1. เตรียมน้ำมันกานพลูโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) อัตรา 10% (w/v) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
2. ศึกษาระบบตัวทำละลาย ได้แก่ ตัวทำละลาย (mobile phase) และอัตราส่วนตัวทำละลาย ที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบระบบตัวทำละลาย 6 ระบบ ดังตารางที่ 1 โดยปรับสภาวะของเครื่อง Flash Chromatograph ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ระบบตัวทำละลายในการแยกสาร eugenol จากน้ำมันกานพลูด้วยเครื่อง Flash Chromatograph

Solvent System	Solvent A	Solvent B
System I	Petroleum ether	10% v/v Ethyl acetate in petroleum ether
System II (BUCHI)	Petroleum ether	20% v/v Ethyl acetate in petroleum ether
System III	Petroleum ether	40% v/v Ethyl acetate in petroleum ether
System IV	Hexane	10% v/v Ethyl acetate in hexane
System V	Hexane	20% v/v Ethyl acetate in hexane
System VI	Hexane	40% v/v Ethyl acetate in hexane

ตารางที่ 2 สภาวะของเครื่อง Flash Chromatograph ในการแยกสาร eugenol จากน้ำมันกานพลู

Flash Mode Conditions			
Sample	1% w/v clove oil		
Sample volume	10 mL		
Column	ECO Flex silica 12 g		
Flow rate	25 (mL/min)		
Detector	ELSD and UV @ 210, 254, 282 nm		
Cartridge equilibrium	4 min		
Injection type	liquid		
Gradient solvent	Step	Time (min)	% solvent B
	1	0.0	2
	2	4.0	20
	3	2.0	20
	4	1.0	60
	5	2.0	60
	6	1.0	100
	7	2.0	100

กรมวิชาการเกษตร

8	5.0	100

3. ศึกษาอัตราการไหลของระบบตัวทำละลาย (flow rate) ที่ 15, 25 และ 35 mL/min ด้วยระบบตัวทำละลาย System IV และจดบันทึกระยะเวลาการสกัด (run time)

4. เก็บ fraction ที่ได้จากการแยกไปพิสูจน์ความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง GC-MS และเครื่อง NMR (BRUKER ADVANCE NANOBAY 400 MHz NMR Spectrometer MADE IN Switzerland) โดยส่งวิเคราะห์ NMR กับภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 ศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ (eugenol) ด้วยเทคนิค High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

1. ทวนสอบวิธีวิเคราะห์ eugenol ในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู ด้วยเทคนิค HPTLC (Inam *et al*., 2014)

วิธี HPTLC ยี่ห้อ CAMAG ซึ่งประกอบด้วย Linomat5, ACD2, TLC scanner 4 และ TLC Visualizer ทดสอบบนแผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60F254 ขนาด 20x10 cm (Merck) ที่ความยาวคลื่น 282 nm โดยใช้ toluene : ethyl acetate : acetic acid (9:1:0.12, v/v/v) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

1.1 การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and range)

การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นและช่วงการวิเคราะห์ทำโดยวิเคราะห์ด้วยการ spike สารละลายมาตรฐาน eugenol ลงใน sample blank จำนวน 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 200, 300, 400, 500, 600 ,800 ng/spot พ่นลงบนสารละลายลงบนแผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60F254 ขนาด 20x10 cm แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในแต่ละความเข้มข้นด้วย TLC scanner 4 เพื่อนำมาหาความสัมพันธ์เชิงเส้น โดยสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ของสารละลายมาตรฐาน eugenol ใน sample blank คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

1.2 การทดสอบแม่นยำ (Precision)

<u>การทดสอบความแม่นยำ Repeatability</u>

ทดสอบความแม่นยำ Precision แบบ Repeatability ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาเดียวกัน

ชั่งผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูที่เขย่าเข้ากันแล้ว 3 ระดับความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ขวดปริมาตร 25 mL ปรับปริมาตรด้วย methanol แล้วกรองด้วย syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPTLC ที่ทำการกำหนดสภาวะดังข้อ 1. วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ eugenol โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพันธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมินด้วย HORRAT (ต้องมีค่าไม่เกิน 1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, 2016)

คำนวณ % RSD ตามสูตร $\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$

ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT $HORRAT = \frac{\text{RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$

กรมวิทยาศาสตร์

คำนวณ Predicted Horwitz RSD = $0.66 \times 2C^{-0.15}$ (AOAC, 2016)

เมื่อค่า C = Concentration ratio

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

AOAC ยอมรับ 0.3-1.3 (AOAC, 2016)

ตรวจสอบความแม่นยำ Within laboratory reproducibility

ตรวจสอบ Precision แบบ Within laboratory reproducibility ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาต่างวันกัน

ชั่งผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูที่เขย่าเข้ากันแล้ว 3 ระดับความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ขวดปริมาตร 25 mL ปรับปริมาตรด้วย methanol แล้วกรองด้วย syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPTLC ที่ทำการกำหนดสภาวะดังข้อ 1. วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ eugenol โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพันธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมินด้วย HORRAT (ต้องมีค่าไม่เกิน 1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, 2016)

คำนวณ % RSD ตามสูตร $\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$

ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT $HORRAT = \frac{\text{RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD = $2C^{-0.15}$ (AOAC, 2016)

เมื่อค่า C = Concentration ratio

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

AOAC ยอมรับ 0.3-1.3 (AOAC, 2016)

1.3 การทดสอบความถูกต้อง (Accuracy)

1.3.1 เตรียม Stock standard โดย spike สารละลายมาตรฐาน eugenol ใน sample blank ให้มีความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 200 mL

1.3.2 เตรียม Stock sample โดยเตรียมสารละลายตัวอย่าง eugenol 1.4 mg/mL ปริมาตร 100 mL

1.3.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานใน sample blank เพื่อสร้างฟราฟมาตรฐาน โดยเตรียม 6 ระดับความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงใช้งาน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPTLC

1.3.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Origin โดยปิเปต สารละลาย stock sample ข้อ 1.3.2 ปริมาตร 2 mL ใส่ใน volumetric flask 10 mL จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย methanol นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPTLC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานข้อ 1.3.3 เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอน

1.3.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Spike โดยปิเปต สารละลาย stock sample ข้อ 1.3.2 ปริมาตร 2 mL ใส่ใน volumetric flask 10 mL จำนวน 3 ชุด ชุดละ 10 ซ้ำ แล้วปิเปต สารละลาย stock standard

กรมวิชาการเกษตร

ข้อ 1.3.1 ปริมาตร 1, 3, 5 mL แต่ละชุด ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วย methanol นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPTLC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานข้อ 1.3.3

ประเมินค่า Accuracy จากค่า %recovery

$$\% \text{ Recovery} = [(B-A)/C] \times 100$$

A = ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่าง

B = ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่มีการเติมสารมาตรฐาน

C = ปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง

ตามเกณฑ์ AOAC การยอมรับค่า accuracy คือ %recovery อยู่ในช่วง 98-102%

1.4 การหาค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ)

นำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นระดับต่ำมาวิเคราะห์ ทำทั้งหมด 10 ซ้ำ หาค่า SD โดย

$$LOD = 3.14SD$$

$$LOQ = 10\ SD$$

2. ควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูโดยตรวจสอบความเข้มข้นที่แน่นอนของผลิตภัณฑ์

นำผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู ที่ได้จากการวิจัย ขั้นตอนที่ 2 (2563) มาเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์หาความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยสภาวะการทำงานของเครื่อง HPTLC

<u>การบันทึกข้อมูลดังนี้</u>

1. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii*

$$\text{การยับยั้ง (\%)} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม – เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีชุดทดลอง}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม}} \times 100$$

2. ข้อมูลชนิดของกลุ่มสารออกฤทธิ์ทางพฤกษเคมี

3. ปริมาณ eugenol

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2561 สิ้นสุด ธันวาคม 2564

สถานที่ทดลอง กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและอภิปราย

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดหยาบจากพืชและส่วนต่างๆของพืชในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii*

1.1 ศึกษาสารสกัดหยาบจากพืชและส่วนต่างๆของพืชที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

การสกัดพืช 20 ชนิด ได้แก่ กระชายขาว กระเทียม กานพลู ขมิ้นชัน ข่า ขิง ชะเอมเทศ ชะเอมไทย ช้าพลู ตะไคร้หอม ใบน้อยหน่า ใบบัวตอง ใบแมงลักป่า ใบสะเดา เปลือกมังคุด ไพล ว่านน้ำ หางไหล อบเชยเทศ อบเชยไทย ด้วยเอทานอล ได้สารสกัดหยาบ 0.96-25.45% w/w (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบตัวอย่างพืช 20 ชนิด และปริมาณสารสกัดหยาบต่อกรัม

ลำดับที่	ตัวอย่างพืช	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบ	% (w/w)
1	กระชายขาว	สารสีส้มเหลืองหนืด	8.05
2	กระเทียม	สารสีน้ำตาลอ่อนในน้ำมัน	0.96
3	กานพลู	สารสีน้ำตาลเข้มเหลว	24.38
4	ขมิ้นชัน	สารสีส้มในน้ำมัน	25.45
5	ข่า	สารสีเหลือง เหลว	3.94
6	ขิง	สารสีน้ำตาลเข้มหนืด	10.06
7	ชะเอมเทศ	สารสีน้ำตาลแดงหนืด	19.31
8	ชะเอมไทย	สารสีน้ำตาลเหลืองหนืด	8.01
9	ช้าพลู	สารสีเขียวแก่หนืด	4.26
10	ตะไคร้หอม	สารสีน้ำตาลอมเขียวหนืด	5.11
11	ใบน้อยหน่า	สารสีเขียวเข้มหนืด	10.79
12	ใบบัวตอง	สารสีเขียวเข้มหนืด	6.82
13	ใบแมงลักป่า	สารสีเขียวแก่หนืด	5.87
14	ใบสะเดา	สารสีเขียวดำเข้มเหนียว	4.46
15	เปลือกมังคุด	สารสีน้ำตาลเข้มหนืด	21.59
16	ไพล	สารสีน้ำตาลอมเหลืองหนืด	5.86
17	ว่านน้ำ	สารสีน้ำตาลแดงเหลว	4.53
18	หางไหล	สารสีน้ำตาลแดงแข็งแห้ง	11.17
19	อบเชยเทศ	สารสีน้ำตาลแดงแข็งแห้ง	17.30
20	อบเชยไทย	สารสีน้ำตาลเข้ม แข็งร่วน	2.10

กรมวิชาการเกษตร

จากการเตรียมเชื้อรา *Cercospora kikuchii* จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธี Blotter method แล้วทำการแยกเชื้อ *Cercospora kikuchii* พบลักษณะโคโลนีค่อนข้างกลม เส้นใยมีการเจริญขึ้นหนาแน่นฝังลงไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และพบรอยนุ่มหรือรอยยุบตัวของอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณขอบโคโลนีและไม่พบการสร้างสปอร์ สร้างรงควัตถุสีม่วงจนถึงสีแดงรอบๆโคโลนีบนอาหาร PDA (ภาพที่ 1) เมื่อนำสารสกัดหยาบพืช 20 ชนิด ไปทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า เปอร์เซ็นต์การยับยั้งในช่วง 14.5 – 100% ดังตารางที่ 2 โดยส่วนใหญ่สารสกัดจากพืชที่มีน้ำมันสามารถยับยั้งเชื้อราได้ดี ได้แก่ กานพลู และข่าสามารถยับยั้งได้มากที่สุด 100% ไม่แตกต่างจากคาร์เบนดาซิมซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้ควบคุมเชื้อรา รองลองมาคือ ว่านน้ำ ช้าพลู ใบแมงลักป่า และขิง ที่สามารถยับยั้งได้มากกว่า 70% น้ำมันหอมระเหยจากพืชเหล่านี้เป็นสารที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อฆ่าเชื้อราที่ก่อโรค และแบคทีเรีย มักพบสารกลุ่ม terpenes (terpenoids) เป็นองค์ประกอบ (Noriega, 2020) ดังนั้น ข่า กานพลู และช้าพลู จึงถูกเลือกมาสกัดต่อให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธี Column chromatography ได้สารสกัด 12 ส่วน จากพืช 3 ชนิด ดังตารางที่ 3 เมื่อทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัด 12 ส่วน ในอัตรา 2500 ppm ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* 100% ได้แก่ ข่า (hexane), กานพลู (hexane), กานพลู (chloroform1), กานพลู (chloroform2) ดังตารางที่ 4

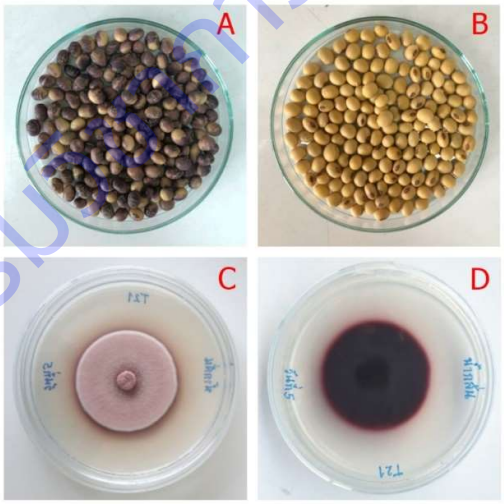
ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Cercosporl kikuchii* ของสารสกัดสมุนไพร 20 ชนิด

	กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
1	กระชายขาว	36.00± 3.26 g
2	กระเทียม	22.73± 0.32 ij
3	กานพลู	100.00± 1.89 a
4	ขมิ้นชั้น	52.57 ± 3.31 e
5	ข่า	100.00 ± 3.44 a
6	ขิง	74.41 ± 3.55 c
7	ชะเอมเทศ	59.42 ± 0.00 d
8	ชะเอมไทย	27.07 ± 2.47 hi
9	ช้าพลู	79.52 ± 1.78 bc
10	ตะไคร้หอม	14.52± 1.24 k
11	ใบน้อยหน่า	44.85± 0.65 f
12	ใบบัวตอง	48.08± 2.67 ef
13	ใบแมงลักป่า	77.13± 0.56 bc

กรมวิชาการเกษตร

14	ใบสะเดา	53.09± 2.27 e
15	เปลือกมังคุด	45.14± 2.59 f
16	ไพล	32.83± 0.92 gh
17	ว่านน้ำ	82.00± 4.11 b
18	หางไหล	31.27± 0.00 gh
19	อบเชยเทศ	32.51± 2.04 gh
20	อบเชยไทย	16.62± 0.00 jk
21	คาร์เบนดาซิม	100.00 ± 0.37 a
22	น้ำกลั่น+ เอทานอล	6.99± 0.00 l
23	น้ำกลั่น	0.00± 2.81 l
	F-test	**
	C.V. (%)	8.86

หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 1 A) โรคเมล็ดสีม่วงในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง B) เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ไม่เป็นโรค C) โคโลนีของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหาร PDA เชื้อราสร้างเส้นใยฟู สีขาว D) เมื่ออายุมากขึ้นดูด้านใต้เห็นเป็นสีชมพูถึงสีม่วง

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทางกายภาพของสารสกัดที่มีความบริสุทธิ์ขึ้น และปริมาณสารต่อกรัม

ตัวอย่างพืช	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัด	% (w/w)
ข่า		
ส่วนที่ 1 (hexane)	น้ำมันสีเหลืองอ่อน	1.81
ส่วนที่ 2 (chloroform)	น้ำมันสีเหลือง	1.01
ส่วนที่ 3 (methanol1)	น้ำมันสีน้ำตาล	1.54
ส่วนที่ 4 (methanol2)	น้ำมันสีเหลืองอ่อน	0.66
กานพลู		
ส่วนที่ 1 (hexane)	น้ำมันสีเหลืองอ่อน	11.52
ส่วนที่ 2 (chloroform1)	น้ำมันสีน้ำตาล	5.96
ส่วนที่ 3 (chloroform2)	สารสีเหลืองอ่อน	0.44
ส่วนที่ 4 (methanol)	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม	1.72
ช้าพลู		
ส่วนที่ 1 (hexane)	สารหนืดสีเขียวเข้ม	1.59
ส่วนที่ 2 (chloroform1)	สารหนืดสีเขียวเข้ม	2.01
ส่วนที่ 3 (chloroform2)	สารหนืดสีเขียวเข้ม	2.77
ส่วนที่ 4 (methanol)	สารหนืดสีเขียวเข้ม	1.21

ตารางที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การยั้บยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ของสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด จำนวน 12 ส่วน

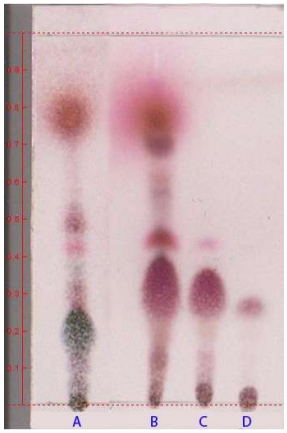
	กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
1	ข่า (hexane)	100.00 ± 0.00 a
2	ข่า (chloroform)	36.64 ± 1.06 b
3	ข่า (methanol1)	-1.71 ±1.68 g
4	ข่า (methanol2)	-7.04 ± 2.14 h
5	กานพลู (hexane)	100.00 ± 0.00 a
6	กานพลู (chloroform1)	100.00 ± 0.00 a
7	กานพลู (chloroform2)	100.00 ± 0.00 a
8	กานพลู (methanol)	2.22± 0.84 f
9	ช้าพลู (hexane)	20.24 ± 1.43 c
10	ช้าพลู (chloroform1)	7.79 ± 0.64 e
11	ช้าพลู (chloroform2)	15.25± 0.50 d
12	ช้าพลู (methanol)	9.70 ± 0.95 e

ศรีวิชาการเกษตร

13	คาร์เบนดาซิม	100.00 ± 0.00 a
14	น้ำกลั่น	0.00 ± 0.00 fg
	F-test	**
	C.V. (%)	4.6

หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

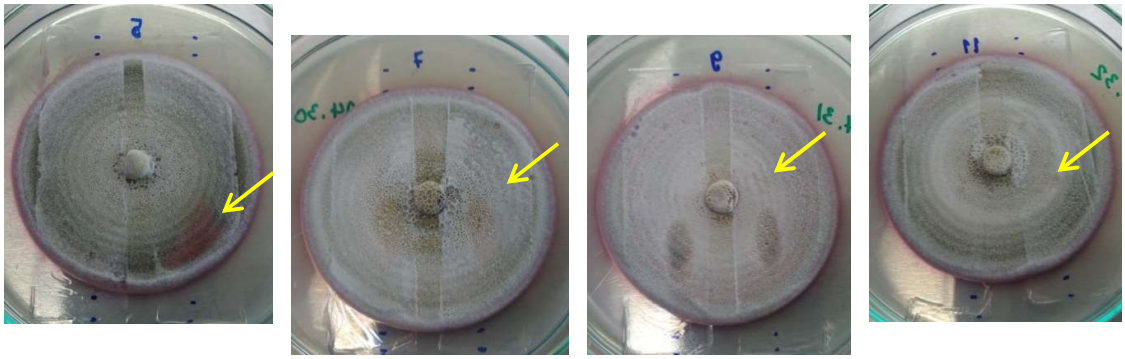
นำสารสกัดส่วนที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercosporl kikuchii* ได้แก่ ข่า (hexane), กานพลู (hexane), กานพลู (chloroform1), กานพลู (chloroform2), มาแยกสารกึ่งบริสุทธิ์โดยเทคนิคทีแอลซี โดยใช้แผ่น TLC silica gel 60 F254 ได้สารกึ่งบริสุทธิ์แต่ละชนิดฉาบอยู่บนแผ่นทีแอลซี ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบ TLC fingerprint ของสารสกัด A. ข่า (hexane) B. กานพลู (hexane), C. กานพลู (chloroform1), D. กานพลู (chloroform2) ด้วยวัฏภาคของเหลว (mobile phase) hexane : ethyl acetate (9:1,v/v) ภายใต้แสง white light หลังจากทำปฏิกิริยากับน้ำยาทดสอบ p-anisaldehyde/sulfuric acid

เมื่อนำแผ่น TLC ดังกล่าวไปทดสอบบนเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ด้วยวิธี Contact bioautography (Dewanjee *et al*., 2014) พบว่าสารสกัดจากข่า (hexane) พบตำแหน่งสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercosporl kikuchii* ที่ตำแหน่ง R_F 0.17-0.42 กานพลู (hexane) พบที่ตำแหน่ง R_F 0.25-0.42 กานพลู (chloroform1) พบที่ตำแหน่ง R_F 0.25-0.42 และกานพลู (chloroform2) พบที่ตำแหน่ง R_F 0.33-0.42 ดังภาพที่ 3 ซึ่งพบว่าตำแหน่งที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราจากสารสกัดทั้ง 4 ชนิด เป็นสารกลุ่ม terpenoids ซึ่งยืนยันโดยการสเปรย์ด้วยน้ำยาทดสอบ p-anisaldehyde/sulfuric acid

กรมวิชาการเกษตร



ข่า (hexane), R_F 0.17-0.42

กานพลู (hexane), R_F 0.25-0.42

กานพลู (chloroform1), R_F 0.25-0.42

กานพลู (chloroform2), R_F 0.33-0.42

ภาพที่ 3 ตำแหน่งสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii*

1.2 ศึกษาชนิดของกลุ่มสารออกฤทธิ์โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ

สารสกัดส่วนที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* จากข่า (hexane), กานพลู (hexane), กานพลู (chloroform1) และกานพลู (chloroform2) เมื่อถูกทดสอบด้วยวิธีการทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ พบว่าสารกึ่งบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* คือ สารกลุ่ม terpenoids ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีในสารสกัดหยาบข่าและกานพลูด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ

กลุ่มสารพฤกษเคมี	**สารสกัด**			
	ข่า (hexane)	กานพลู (hexane)	กานพลู (chloroform1)	กานพลู (chloroform2)
Alkaloids	-	-	-	-
Flavonoids	-	-	-	-
Phenol/ tannin	-	-	-	-
Saponin	-	-	-	-
Terpenoids/steroids	+	+	+	+
Carbohydrate	-	-	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง ให้ผล positive, - หมายถึง ให้ผล negative

ผลการทดสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ด้วยวิธี Contact bioautography บนแผ่น TLC พบว่าตำแหน่งที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราเป็นสารกลุ่ม terpenoids ซึ่งให้ผลการทดลองตรงกับการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ (นพมาศและคณะ, 2554) ที่พบสารกลุ่ม

กรมวิชาการเกษตร

terpenoids ในสารสกัดดังกล่าว และเมื่อพิจารณา % yield ของสารสกัดหยาบของกานพลู มีค่าเท่ากับ 24.4 %w/w ซึ่งมากกว่า สารสกัดหยาบของข่า ที่มีค่าเท่ากับ 3.9 %w/w ดังตารางที่ 1 ผู้วิจัยจึงเลือกกานพลูเป็นพืชที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาวิธีการสกัดสารสกัดหยาบพัฒนาเป็นสูตรผลิตภัณฑ์ และทดสอบประสิทธิภาพสูตรผลิตภัณฑ์เพื่อกำหนดอัตราการใช้

2.1 ศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันกานพลู

การสกัดดอกกานพลูด้วยวิธี ultrasonic และ maceration โดยใช้เฮกเซน และเอทานอลเป็นตัวทำละลาย จะได้สารสกัดหยาบสีน้ำตาลข้นเหนียว ในขณะที่การสกัดด้วยวิธีกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) จะได้น้ำมันสีเหลืองอ่อน ดังภาพที่ 4

ภาพที่ 4 สารสกัดหยาบกานพลูที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี A) การแช่ในเฮกเซน B) การแช่ในเอทานอล C) การสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic ในเฮกเซน D) การสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic ในเอทานอล E) การกลั่นด้วยน้ำ

%yield ที่ได้จากการคำนวณด้วยสารสกัดหยาบต่อตัวอย่างบดแห้ง พบว่าวิธีการสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic ในเอทานอลได้สารสกัดหยาบมากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 6 แต่ไม่อาจสรุปได้ว่าวิธีการสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic ในเอทานอลเป็นวิธีที่ดีที่สุด จำเป็นต้องพิจารณาปริมาณ eugenol ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ จึงได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณ eugenol ในสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) (Athar *et al*, 2013) พบว่าน้ำมันกานพูลที่ได้จากวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) มีปริมาณ eugenol มากที่สุด คือ 849.39 g/ kg (น้ำมันกานพลู) ดังตารางที่ 7 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณ eugenol ในตัวอย่างกานพลูแห้งที่ได้จากแต่ละวิธีพบว่า ไม่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 7 นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากกระบวนการผลิตและต้นทุนการผลิตแล้ว วิธีการกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) เป็นวิธีที่ไม่ใช้ตัวทำละลายจึงมีต้นทุนการผลิตต่ำ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่รวดเร็ว และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ผู้วิจัยจึงเลือกวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) ในการสกัดน้ำมันกานพลูเพื่อพัฒนาเป็นสูตรผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปในขั้นตอนต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 6 %yield (กรัม/กรัม) ที่ได้จากการคำนวณด้วยสารสกัดหยาบต่อตัวอย่างบดแห้งของแต่ละวิธีสกัด

วิธีการสกัด	ค่าเฉลี่ย %yield (w/w)
กรรมวิธีที่ 1 การแช่ (maceration) อัตรา 10% (w/v) ในเฮกเซน	14.07
กรรมวิธีที่ 2 การแช่ (maceration) อัตรา 10% (w/v) ในเอทานอล	17.24
กรรมวิธีที่ 3 การสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic อัตรา 10% (w/v) ในเฮกเซน	15.84
กรรมวิธีที่ 4 การสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic อัตรา 10% (w/v) ในเอทานอล	24.01
กรรมวิธีที่ 5 การกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) อัตรา 10% (w/v)	10.98

ตารางที่ 7 ปริมาณ eugenol เฉลี่ยในสารสกัดหยาบ (g/kg) และในกานพลูแห้ง (mg/g)

วิธีการสกัด	ปริมาณ eugenol เฉลี่ยใน	
	ในสารสกัดหยาบ	ในกานพลูแห้ง
	(g/kg)	(mg/g)
กรรมวิธีที่ 1 การแช่ (maceration) อัตรา 10% (w/v) ในเฮกเซน	703.89 b	101.72 a
กรรมวิธีที่ 2 การแช่ (maceration) อัตรา 10% (w/v) ในเอทานอล	605.78 c	108.60 a
กรรมวิธีที่ 3 การสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic อัตรา 10% (w/v) ในเฮกเซน	616.58 c	96.25 a
กรรมวิธีที่ 4 การสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic อัตรา 10% (w/v) ในเอทานอล	466.43 d	111.53 a
กรรมวิธีที่ 5 การกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) อัตรา 10% (w/v)	849.39 a	93.03 a

หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

กรมวิชาการเกษตร

2.2 ศึกษาประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อกำหนดอัตราการใช้

การผสมปรุงแต่งเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู ได้สูตรชนิดน้ำมันเข้มข้น (Emulsifiable Concentrate, EC) จำนวน 3 สูตร ได้แก่ สูตร A น้ำมันกานพลู 20% w/w EC, สูตร B น้ำมันกานพลู 40% w/w EC และสูตร C น้ำมันกานพลู 60% w/w EC ลักษณะทางกายภาพของสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลู ดังตารางที่ 8 โดยผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 สามารถละลายน้ำได้ดี และมีค่า pH อยู่ในช่วงกรดอ่อน ซึ่งเป็นช่วงที่น้ำมันกานพลูคงสภาพมาก

ตารางที่ 8 ลักษณะทางกายภาพของสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลู

สูตรผลิตภัณฑ์	สีของผลิตภัณฑ์	การละลายน้ำ (1:10)	pH (1%)
A	สีเหลืองใส	ละลายน้ำได้ดี ให้สีขาวขุ่น	5.5
B	สีเหลืองใส	ละลายน้ำได้ดี ให้สีขาวขุ่น	5.1
C	สีเหลืองใส	ละลายน้ำได้ดี ให้สีขาวขุ่น	5.4

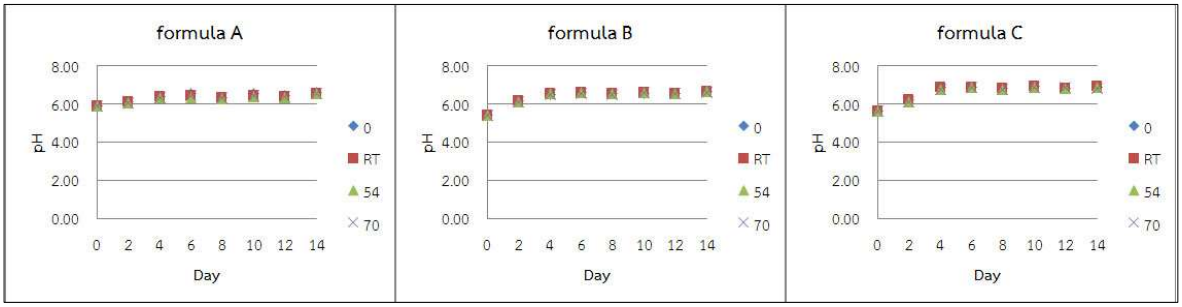
ศึกษาการคงสภาพของผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู

การคงสภาพของน้ำมันกานพลูเมื่อละลายในตัวทำละลายที่มีสภาพกรด-ด่าง ได้แก่ 1.0M HCl, 0.1M HCl, 0.01M HCl, 0.001M HCl, H_2O, 0.001M NaOH, 0.01M NaOH, 0.1M NaOH และ 1.0M NaOH เรียงจากซ้ายไปขวาตามลำดับ สังเกตการเปลี่ยนแปลงในระยะเวลา 0, 1, 3, 7 และ 14 วันโดยชั่งน้ำมันกานพลู 1 g ละลายด้วยตัวสารละลายกรด-ด่าง 4 mL พบว่าในสภาวะกรดอ่อน และด่างอ่อน น้ำมันกานพลูคงสภาพมากกว่าในสภาวะกรดแก่ และด่างแก่ ซึ่งสังเกตจากสีและการเกิดตะกอน ดังภาพที่ 5

ภาพที่ 5 น้ำมันกานพลู ในตัวทำละลายกรด-ด่างที่เวลาต่างๆ

การคงตัวของ pH ของสูตรผลิตภัณฑ์ EC (A, B และ C) ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 0 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง (RT), 54 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส โดยวิเคราะห์ทุก 2 วัน จนครบ 14 วัน จากการวัดค่า pH ของทั้ง 3 สูตร พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากวันแรกถึงวันที่ 4 และคงที่ ถึงวันที่ 14 และทุกอุณหภูมิมีค่า pH ไม่แตกต่างกัน โดยค่า pH มีค่าในช่วง 5.38-6.91 ซึ่งเป็นช่วงที่น้ำมันกานพลูคงสภาพดี ดังภาพที่ 6

กรมวิทยาศาสตร์



ภาพที่ 6 ค่า pH ของผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ 0-14 วัน ภายใต้อุณหภูมิ 0, RT, 54 และ 70 องศาเซลเซียส

การคงตัวของสารออกฤทธิ์สูตรผลิตภัณฑ์โดยหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Eugenol ก่อนอบ และหลังอบที่อุณหภูมิ 54 ℃ ด้วยวิธี GC-MS พบว่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Eugenol ก่อนอบ และหลังอบที่อุณหภูมิ 54 ℃ มีค่าลดลงเล็กน้อย ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ปริมาณ Eugenol (% w/w) ในผลิตภัณฑ์ ก่อนอบ และหลังอบที่อุณหภูมิ 54 °C

สูตรผลิตภัณฑ์	ปริมาณ Eugenol ก่อนอบ 54 °C (% w/w)	ปริมาณ Eugenol หลังอบ 54 °C (% w/w)
A	17.7	17.5
B	35.1	34.5
C	52.1	50.4

การคงตัวของสารออกฤทธิ์ Eugenol ในสูตรผลิตภัณฑ์ EC (A, B และ C) ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 0 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง (RT), 54 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส โดยวิเคราะห์ทุก 2 วัน จนครบ 14 วัน จากการวิเคราะห์พบว่า ปริมาณ Eugenol เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย จากการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผลการทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ดังแสดงในตารางที่ 10 โดยเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ จำนวน 3 สูตร A, B และ C ที่ความเข้มข้น 5 อัตรา 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 mg/mL ผลพบว่า สูตร B ที่ความเข้มข้น 2.00 และ 2.50 mg/mL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ได้ถึง 93.72% เช่นเดียวกับสูตร C ที่ความเข้มข้น 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 mg/mL ซึ่งมีปริมาณ eugenol อยู่ในช่วง 0.537 – 1.344 mg/mL (ดังตารางที่ 10) หมายความว่า ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูที่มี eugenol ในช่วงความเข้มข้นนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อคำนวณเป็นอัตราการใช้เท่ากับ 2.0-2.5 g สูตร B/kg PDA และ 1.0-2.5 g สูตร C/kg PDA ซึ่งไม่แตกต่างจากคาร์เบนดาซิม ที่ความเข้มข้น 2.0 g/kg PDA จึงเป็นช่วงความเข้มข้นพื้นฐานที่จะนำไปเลือกทดสอบกับเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนเมล็ดถั่วเหลือง และในกระถางปลูกเมล็ดถั่วเหลืองในการทดลองที่ 2 การทดสอบสูตรผลิตภัณฑ์จาก

กรมวิชาการเกษตร

พืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วง โดยศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพเบื้องต้นของสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลูต่อการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงชื้อ PDA และปริมาณ eugenol ในผลิตภัณฑ์

กรรมวิธี	eugenol (mg/mL)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
สูตร A 0.50 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (0.3 g/600 mL PDA)	0.095	6.07 ± 1.94 h
สูตร A 1.00 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (0.6 g/600 mL PDA)	0.188	24.18 ± 1.08 f
สูตร A 1.50 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (0.9g/600 mL PDA)	0.282	44.01 ± 5.22 d
สูตร A 2.00 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (1.2 g/600 mL PDA)	0.377	55.35 ± 2.50 c
สูตร A 2.50 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (1.5 g/600 mL PDA)	0.470	82.55 ± 1.01 b
สูตร B 0.50 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (0.3 g/600 mL PDA)	0.192	16.45 ± 1.32 g
สูตร B 1.00 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (0.6 g/600 mL PDA)	0.378	42.25 ± 1.96 d
สูตร B 1.50 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (0.9g/600 mL PDA)	0.564	85.35 ± 1.37 b
สูตร B 2.00 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (1.2 g/600 mL PDA)	0.750	93.60 ± 0.08 a
สูตร B 2.50 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (1.5 g/600 mL PDA)	0.933	93.72 ± 0.09 a
สูตร C 0.50 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (0.3 g/600 mL PDA)	0.267	33.99 ± 1.56 e
สูตร C 1.00 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (0.6 g/600 mL PDA)	0.537	93.72 ± 0.09 a
สูตร C 1.50 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (0.9 g/600 mL PDA)	0.802	93.72 ± 0.09 a
สูตร C 2.00 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (1.2 g/600 mL PDA)	1.071	93.72 ± 0.09 a
สูตร C 2.50 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (1.5 g/600 mL PDA)	1.344	93.72 ± 0.09 a
Control	-	2.83 ± 0.27 hi
คาร์เบนดาซิม 2.0g/kg	-	93.72 ± 0.09 a
น้ำกลั่น	-	0.00 ± 0.00 i
F-test		**
C.V. (%)		5.71

หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาวิธีสกัดและวิธีวิเคราะห์สารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพ

3.1 ศึกษาวิธีแยกสาร eugenol จากน้ำมันกานพลูด้วยเครื่อง Flash Chromatograph

ผลการศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสาร eugenol จากน้ำมันกานพลูด้วยเครื่อง Flash Chromatograph ด้วยตัวทำละลาย 6 ระบบ พบว่า เวลาที่ eugenol ถูกแยกออกแต่ละระบบตัวทำละลายแตกต่างกัน ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 เวลาที่ eugenol ถูกแยกและเคลื่อนที่ผ่าน detector

Solvent system	Solvent A	Solvent B	Time
System I	Petroleum ether	10% v/v Ethyl acetate in petroleum ether	7.687 – 8.353
System II (BUCHI)	Petroleum ether	20% v/v Ethyl acetate in petroleum ether	5.611 – 6.310
System III	Petroleum ether	40% v/v Ethyl acetate in petroleum ether	4.164 – 4.879
System IV	Hexane	10% v/v Ethyl acetate in hexane	7.409 - 8.008
System V	Hexane	20% v/v Ethyl acetate in hexane	5.745 – 6.261
System VI	Hexane	40% v/v Ethyl acetate in hexane	4.447 - 5.063

เมื่อเปรียบเทียบตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ petroleum ether และ hexane พบว่า eugenol ถูกแยกออกมาที่เวลาไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 11) แต่ระบบตัวทำละลายของ hexane สามารถแยก eugenol ออกจากสารใกล้เคียงได้ดี เมื่อพิจารณาปริมาณสัดส่วน ethyl acetate ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้สัญญาณของ eugenol ออกเร็วขึ้น เนื่องจากโครงสร้างของ eugenol ประกอบด้วย hydroxyl group (-OH) จึงมีสภาพขั้วเป็น polar มากกว่า petroleum ether (P'0.1) และ hexane (P'0.1) (Snyder, 1978) eugenol จึงแยกออกมาได้เร็วกับระบบตัวทำละลายที่มีความเป็น polar สูงขึ้นจากสัดส่วนของ ethyl acetate (P'4.4) แต่การแยกเร็วเกินไปก็ทำให้ไม่สามารถแยกจากสารตัวอื่นได้ดีนัก จากตารางที่ 11 system IV – system VI เวลาต่างกันไม่มาก นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่า absorbance ของ UV (AU) พบว่า ระบบที่ VI ให้ค่าสูงสุดคือ 2.40 (AU) รองลงมาคือ ระบบที่ V 1.90 (AU) และระบบที่ IV 1.50 (AU) ตามลำดับ ดังรูปที่ 12 แต่ ระบบที่ VI ไม่สามารถแยก peak ข้างๆออกได้ ดังนั้น system IV (Hex, 10%EtOAc/Hex) จึงเหมาะสมที่สุด และผลการศึกษาอัตราการไหลของระบบตัวทำละลาย โดยนำ system IV มาศึกษาอัตราการไหล 15, 25 และ 35 mL/min พบว่า อัตราการไหล 35 mL/min สารออกเร็วที่สุด ดังตารางที่ 12 และสามารถแยก eugenol ออกจากพีคข้างเคียงได้ดีที่สุด

ศรีปทุม

ตารางที่ 12 เวลาที่ eugenol ถูกแยกและเคลื่อนที่ผ่าน detector ที่อัตราการไหลต่างกัน

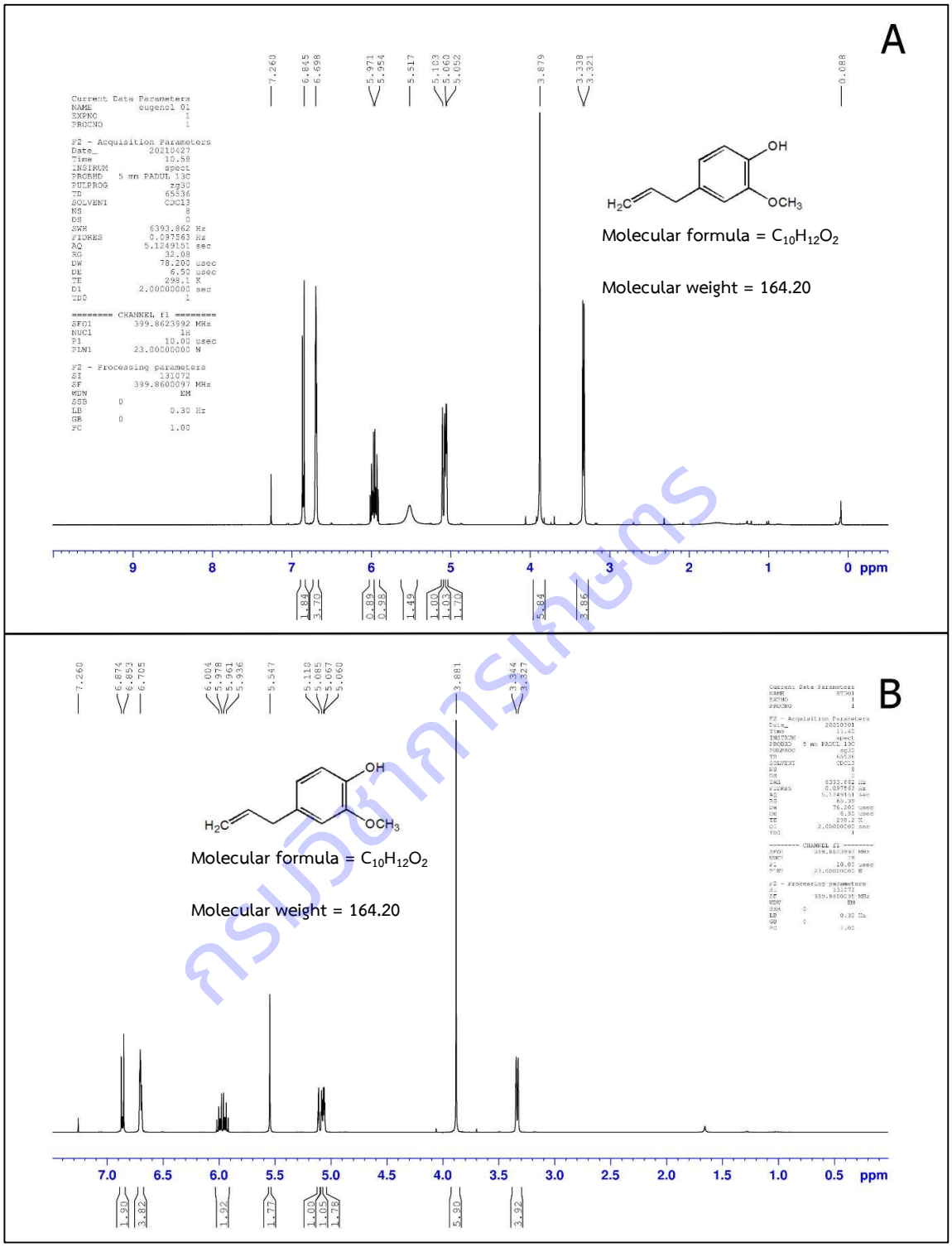
Solvent system	Flow rate (mL/min)	Time
System IV	15	9.488 – 10.371
System IV	25	7.725 – 8.956
System IV	35	5.380 – 6.861

สำหรับผลการพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของ eugenol ของสารที่ได้จากการแยกแต่ละ fraction ด้วยเครื่อง GC-MS พบว่า ระบบตัวทำละลายทั้ง 6 ระบบ สามารถแยก eugenol ได้มากถึง 99% และระบบที่สามารถแยก eugenol ได้ 100% ได้แก่ system IV (Hex, 10% EtOAC/Hex) (ตารางที่ 13) นอกจากนี้การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารที่ได้จากการแยกด้วยเทคนิค NMR จะช่วยยืนยันตัวตนสารได้อีกทางหนึ่ง โดย ^{1}H NMR สเปกตรัมของ eugenol (ใน $CDCl_3$) ของสารที่ได้จากการแยก มีสเปกตรัมตรงกับสารมาตรฐาน eugenol ดังแสดงในภาพที่ 7

ตาราง 13 เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธ์ของ Eugenol ที่ได้จากการแยกจากน้ำมันกานพลูด้วยระบบตัวทำละลาย 6 ระบบ

Solvent system	Fraction	% Eugenol
System I	F5	99.98
	F6	99.95
System II	F4	99.52
System III	F5	92.42
System IV	F3	100.00
	F4	99.98
	F5	96.26
System V	F7	99.87
	F8	99.95
	F9	98.83
	F10	85.13
System VI	F4	99.49
	F5	99.89
	F6	99.90
	F7	79.29
	F8	24.53

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 7 ^{1}H NMR สเปกตรัมของ eugenol (ใน $CDCl_3$) A) สารที่ได้จากการแยก และ B) สารมาตรฐาน

กรมวิชาการเกษตร

3.2 ศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ eugenol ด้วยเทคนิค High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

ผลการทวนสอบวิธีวิเคราะห์ eugenol ในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู ด้วยเทคนิค HPTLC ของ Inam *et al*., 2014 ตรวจวัดด้วยเครื่อง HPTLC ยี่ห้อ CAMAG ประกอบด้วย Linomat5, ACD2, TLC scanner 4 และ TLC Visualizer โดยใช้แผ่น TLC ชนิด HPTLC plate silica gel 60F254 ขนาด 20x10 cm (Merck) ที่ความยาวคลื่น 282 nm ใช้ toluene : ethyl acetate : acetic acid (9:1:0.12, v/v/v) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ปริมาตร 1 µL/spot วิธีวิเคราะห์นี้ให้ผลการทดสอบดังนี้

1.ความสัมพันธ์เชิงเส้นและช่วงการวิเคราะห์ (Linearity and range)

วิธีวิเคราะห์นี้ให้ผลการทดสอบปริมาณ eugenol ที่มีช่วงการวัด (range) ในช่วงความเข้มข้น 200-800 ng/spot ให้ค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) ที่ correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9992 ซึ่งเกณฑ์การยอมรับค่า correlation coefficient (r) ≥ 0.995

2. ความแม่นยำ (Precision)

การตรวจสอบความแม่นยำ (Precision) สำหรับ Repeatability ที่ระดับความเข้มข้น 280, 500 และ 750 ng/spot พบว่า eugenol ได้ค่าเฉลี่ย 36.73, 36.87, 37.03 %W/W ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.65, 0.41, 0.51 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 1.78, 1.11, 1.39 ตามลำดับ และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 1.16, 0.72, 0.91 ตามลำดับ สำหรับ Within laboratory reproducibility ระดับความเข้มข้น 280, 500 และ 750 ng/spot พบว่า eugenol ได้ค่าเฉลี่ย 36.80, 36.53, 37.00 %W/W ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.66, 0.64, 0.51 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 1.80, 1.75, 1.37 ตามลำดับ และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.77, 0.75, 0.59 ตามลำดับ ดังตารางที่ 14 โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC วิธีวิเคราะห์ eugenol ให้ผลการทดสอบ Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 14 ตรวจสอบ Precision ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

concentration	Repeatability			Within laboratory reproducibility		
	280 ng/spot	500 ng/spot	750 ng/spot	280 ng/spot	500 ng/spot	750 ng/spot
mean (%W/W)	36.73	36.87	37.03	36.80	36.53	37.00
SD	0.65	0.41	0.51	0.66	0.64	0.51
%RSD	1.78	1.11	1.39	1.80	1.75	1.37
HORRAT	1.16	0.72	0.91	0.77	0.75	0.59

กรมวิทยาศาสตร์

3. ความถูกต้อง (Accuracy)

ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) โดยหาค่า %recovery พบว่า ความเข้มข้นสารมาตรฐานที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างมี 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 100, 300 และ 500 ng/spot ระดับละ 10 ซ้ำ ค่า %recovery เท่ากับ 99.65, 101.49, 101.49 ตามลำดับ (ตารางที่ 15) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่ 98-102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำไปวิเคราะห์ เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ได้อย่างถูกต้อง

ตารางที่ 15 ตรวจสอบ % recovery ของ eugenol

No.	Eugenol (ng/spot)								
	Conc. Added (100 ng/spot)			Conc. Added (300 ng/spot)			Conc. Added (500 ng/spot)		
	Mean Origin	Spike	Recovery (%)	Mean Origin	Spike	Recovery (%)	Mean Origin	Spike	Recovery (%)
1	282.77	382.66	99.77	282.77	589.04	101.50	282.77	798.70	101.42
2	282.77	382.81	99.92	282.77	587.17	100.88	282.77	800.90	101.85
3	282.77	383.49	100.60	282.77	590.66	102.04	282.77	790.68	99.84
4	282.77	382.52	99.63	282.77	590.07	101.85	282.77	798.19	101.32
5	282.77	383.10	100.21	282.77	590.95	102.14	282.77	800.40	101.75
6	282.77	380.97	98.08	282.77	588.96	101.48	282.77	801.43	101.96
7	282.77	382.47	99.58	282.77	584.54	100.01	282.77	800.23	101.72
8	282.77	381.55	98.66	282.77	588.42	101.30	282.77	801.36	101.94
9	282.77	384.70	101.81	282.77	590.14	101.87	282.77	798.30	101.34
10	282.77	381.16	98.28	282.77	589.87	101.78	282.77	800.58	101.79
Mean		382.54	99.65		588.98	101.49		799.08	101.49
SD		1.1200	1.1187		1.9255	0.6382		3.1885	0.6268
%RSD		0.2928	1.1226		0.3269	0.6288		0.3990	0.6176

กรมวิชาการเกษตร

3. ค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ)

การศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจพบได้ (limit of detection ; LOD) พบว่า สามารถตรวจวัดได้ที่ความเข้มข้น 60 ng/spot และการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจหาปริมาณได้โดยมีความแม่น และความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ limit of quantitation (LOQ) พบว่า สามารถตรวจวัดได้ที่ความเข้มข้น 200 ng/spot ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นที่แน่นอนของ eugenol ในสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลู (B) ด้วยวิธี HPTLC จำนวน 10 ซ้ำ พบว่า ปริมาณ eugenol เฉลี่ยเท่ากับ 36.90 %W/W ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.4 ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 1.1

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การศึกษาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดพืชที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากตัวอย่างพืช 20 ชนิด พบว่า สารสกัดจากกานพลู (น้ำมันกานพลู) ให้ผลดีที่สุด ซึ่งเมื่อทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีพบว่ามีสารกลุ่ม terpenoids (eugenol ในน้ำมันกานพลู) โดยวิธีการสกัดน้ำมันกานพลูที่ดีที่สุด คือ การกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) และวิจัยผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู จำนวน 3 สูตร A (น้ำมันกานพลู 20% W/W EC), B (น้ำมันกานพลู 40% W/W EC) และ C (น้ำมันกานพลู 60% W/W EC) พบว่า สูตร B ที่ความเข้มข้น 2.00 และ 2.50 mg/mL สามารถยับยั้งการเจริญเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้ถึง 93.72% เช่นเดียวกับสูตร C ที่ความเข้มข้น 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 mg/mL และไม่แตกต่างจากคาร์เบนดาซิม ที่ความเข้มข้น 2.0 g/kg เมื่อคำนวณเป็นอัตราการใช้เท่ากับ 2-2.5 g สูตร B/kg PDA และ 1-2.5 g สูตร C/kg PDA นอกจากนี้การแยกสารออกฤทธิ์ในน้ำมันกานพลู (eugenol) โดยเครื่อง Flash chromatograph ด้วยตัวทำละลาย hexane และ 10% EtOAc/hexane ที่อัตราไหล 35 mL/min ทำให้ได้ eugenol มีความบริสุทธิ์มากกว่า 99% และการทวนสอบวิธีวิเคราะห์ปริมาณ eugenol ในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู ด้วยเทคนิค HPTLC มีความเหมาะสม สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลถูกต้อง และแม่นยำ ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล และผลวิเคราะห์ปริมาณ eugenol ในสูตรผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู (B) ได้เท่ากับ 36.87% W/W แต่อย่างไรก็ตาม กานพลูซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในผลิตภัณฑ์ มีราคาสูง เนื่องจากเป็นพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และนำเข้าจากต่างประเทศ จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะส่งเสริมการปลูกกานพลูในประเทศไทยให้มากขึ้น นอกจากนี้การศึกษาพืชชนิดอื่นที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคศัตรูพืช และมีราคาถูก หาได้ง่าย ก็เป็นงานวิจัยในอนาคตที่น่าสนใจเช่นเดียวกัน

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2 การทดสอบสูตรผลิตภัณฑ์จากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วง

Tests of Clove Product Formulations that Inhibits *Cercospora kikuchii*, Causing Purple Seed Disease

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการสุขอนามัยพืช เช่น จานเพาะเชื้อ กระบอกตวง กล้องจุลทรรศน์
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ
4. อุปกรณ์สำหรับเพาะความงอกในห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การทดสอบสูตรผลิตภัณฑ์จากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 สูตรผลิตภัณฑ์จากสารสกัดหยาบกานพลู ความเข้มข้นที่ 1

กรรมวิธีที่ 2 สูตรผลิตภัณฑ์จากสารสกัดหยาบกานพลู ความเข้มข้นที่ 2

กรรมวิธีที่ 3 สูตรผลิตภัณฑ์จากสารสกัดหยาบกานพลู ความเข้มข้นที่ 3

กรรมวิธีที่ 4 สูตรผลิตภัณฑ์จากสารสกัดหยาบกานพลู ความเข้มข้นที่ 4

กรรมวิธีที่ 5 สารคาร์เบนดาซิม อัตรา 2 กรัม/กิโลกรัม (positive control)

กรรมวิธีที่ 6 น้ำกลั่น (negative control)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เตรียมสารสกัดหยาบกานพลูที่มีฤทธิ์สูงที่สุดในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ในการทดลองที่ 1 ขั้นตอนที่ 1

2. หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบกานพลูในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

3. หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสูตรผลิตภัณฑ์จากสารสกัดหยาบกานพลูที่ได้จากการทดลองที่1 ขั้นตอนที่ 2 จำนวน 4 ความเข้มข้น เปรียบเทียบกับสารยับยั้งเชื้อราคาร์เบนดาซิม และน้ำกลั่น มาคลุกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เป็นโรคเมล็ดสีม่วงตามกรรมวิธี โดยเขย่าให้เมล็ดถั่วเหลืองคลุกเคล้ากับสารสกัดจนทั่ว แล้วเทเมล็ดออกมาผึ่งให้แห้งสนิทในที่ร่ม เก็บใส่กล่องพลาสติกทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ได้

กรมวิชาการเกษตร

จากแต่ละกรรมวิธีมาตรวจเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน และตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธี Blotter method เป็นเวลา 7 วัน กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกเปอร์เซ็นต์การการพบเชื้อ *Cercospora kikuchii* โดยวิธี Blotter method
2. บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน

ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบสูตรผลิตภัณฑ์จากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในโรงเรือนทดลอง

วิธีปฏิบัติการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

1. น้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 20 ml/น้ำ 10 l.
2. น้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 50 ml/น้ำ 10 l.
3. น้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 100 ml/น้ำ 10 l.
4. น้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 200 ml/น้ำ 10 l.
5. สารคาร์เบนดาซิม อัตรา 2 กรัม/ กิโลกรัม (positive control)
6. น้ำกลั่น (negative control)

1. ปลูกถั่วเหลืองในกระถางในโรงเรือนทดลอง กรรมวิธีละ 10 กระถาง หยอดกระถางละ 3 เมล็ด หลังจากปลูก 7 วัน พ่นสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงวันหนอนเจาะลำต้น ถอนแยกต้นถั่วเหลืองให้เหลือกระถางละ 2 ต้น หลังจากงอกประมาณ 1 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 12-24-12 อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ ทำการพ่นสารสกัดและสารเคมีตามกรรมวิธี และดูแลรักษาแปลงตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตรจนถึงระยะเก็บเกี่ยว

2. เตรียมสปอร์แขวนลอยจากเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ให้มีความหนาแน่นของสปอร์ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการปลูกเชื้อบนต้นถั่วเหลือง ในระยะ R1 (ระยะดอกเริ่มบาน)

3. เตรียมสารละลายของสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชและสูตรผลิตภัณฑ์จากกานพลูตามกรรมวิธี พ่นลงบนต้นถั่วเหลือง โดยเริ่มพ่นตามกรรมวิธีในระยะ R2 (ระยะออกดอกเต็มที่), R3 (ระยะเริ่มติดฝัก), R4 (ระยะติดฝักเต็มที่), R5 (ระยะเริ่มติดเมล็ด) และ R6 (ระยะเมล็ดพัฒนาเต็มที่) รวมจำนวน 5 ครั้ง

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเมล็ดสีม่วงบนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง
2. บันทึกเปอร์เซ็นต์การการพบเชื้อ *Cercospora kikuchii* โดยวิธี Blotter method
3. บันทึกน้ำหนัก 100 เมล็ด

เวลาและสถานที่ดำเนินการทดลอง

ระยะเวลาดำเนินการ เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2564

สถานที่ดำเนินการ ศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและอภิปราย

จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคจากเมล็ดถั่วเหลืองที่แสดงอาการเมล็ดสีม่วง พบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรามีการสร้างก้านชูโคนิเดียเป็นกลุ่มสีดำเข้ม โคนิเดียติดอยู่ที่ปลายก้านชูโคนิเดีย (conidiophore) มีก้านชูโคนิเดียเกิดบนส่วนที่เรียกว่า stroma ก้านเดี่ยวๆ ไม่แตกกิ่งก้าน สีน้ำตาลเหลืองที่ส่วนฐาน สีจะค่อยจางลงจนสีอ่อนใส มีการสร้างรงควัตถุสีม่วงจนถึงแดงบนอาหาร PDA เกิดจากเชื้อราสร้างสารพิษ cercosporin ในสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรค (ณัฐพงษ์ และคณะ, 2553)

จากการเตรียมสารสกัดหยาบจากกานพลูด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (hydro distillation) พบว่าสารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูมีลักษณะใส สีเหลืองอ่อน ได้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต (%yield) เท่ากับ 10.25% w/w และศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อรา *C. kikuchii* ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง โดยนำสารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูมาคลุกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เป็นโรคเมล็ดสีม่วง พบว่าสารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูที่อัตรา 4.0 และ 5.0 กรัมต่อกิโลกรัมเมล็ด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยที่สุดเท่ากับ 8.00 เปอร์เซ็นต์แตกต่างจากอัตราอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน เท่ากับ 25 และ 29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบกับชุดที่คลุกด้วยน้ำกลั่น สารยับยั้งเชื้อราคาร์เบนดาซิม และเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมากที่สุด (99.5, 99.5 และ 98.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) และมีเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน เท่ากับ 96, 96 และ 98 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับการศึกษาของ Carmello และ Carlos (2018) พบว่าการคลุกเมล็ดพันธุ์ด้วยสารสกัดจากกานพลูและอบเชย มีผลทำให้การงอกของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมลดลง และอัญชิกา (2552) พบว่าการเคลือบเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองด้วยสารยูจีนอลที่มีระดับความเข้มข้นมากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์จะมีผลทำให้ความงอกของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองลดลง แต่ก็ทำให้ลดการปนเปื้อนของเชื้อราได้ สารคาร์เบนดาซิมเป็นสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่ใช้ในการฉีดพ่นเพื่อยับยั้งการเกิดโรคเมล็ดสีม่วงในระยะเริ่มติดฝักและระยะเริ่มติดเมล็ด ตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาคลุกเมล็ดเพื่อยับยั้งโรคเมล็ดสีม่วง

1. อัตราของสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลูที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อรา *C. kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง จากการคลุกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เป็นโรคเมล็ดสีม่วงด้วยน้ำมันกานพลู 40% w/w EC พบว่า น้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 53.57 กรัมต่อกิโลกรัมเมล็ด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยที่สุด (4 เปอร์เซ็นต์) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีน้ำมันกานพลู 40% w/w EC สอดคล้องกับการศึกษาของ ปิยฉัตร และคณะ (2553) ที่พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับแคปแทน สำหรับการคลุกเมล็ดด้วยสูตร EC ไม่มีน้ำมันกานพลูและสูตรสารยับยั้งเชื้อราคาร์เบนดาซิมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมากที่สุด (100 เปอร์เซ็นต์) เมื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานพบว่า ทั้ง 8 กรรมวิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่คลุกเมล็ดพันธุ์ด้วยน้ำเปล่ามีเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานสูงที่สุดเท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่คลุกเมล็ดด้วยน้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 53.57 กรัมต่อกิโลกรัมเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานเท่ากับ 94 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 35.71 กรัมต่อกิโลกรัมเมล็ด มีเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานน้อยที่สุด เท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

กรมวิชาการเกษตร

2. ทดสอบสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลูที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *C. kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในโรงเรือนทดลองภายหลังการพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราและน้ำมันกานพลู 40% w/w EC ตามกรรมวิธีเก็บเกี่ยวและปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์ นำเมล็ดถั่วเหลืองมาหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และคุณภาพเมล็ดพันธุ์ พบว่า การฉีดพ่นด้วยน้ำมันกานพลู 40% w/w EC ที่อัตรา 200 มิลลิลิตรต่อน้ำ 10 ลิตรมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับการฉีดพ่นด้วยน้ำมันกานพลู 40% w/w EC ที่อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 10 ลิตรและน้ำกลั่น แต่ไม่มีความแตกต่างกับการฉีดพ่นด้วยสารคาร์เบนดาซิม โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเมล็ดสีม่วงน้อยที่สุด เท่ากับ 4.25 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือฉีดพ่นด้วยอัตรา 100 และ 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 10 ลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเมล็ดสีม่วง 5.38 และ 5.56 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 3) สอดคล้องกับการศึกษาของ Kishore *et al*. (2007) ที่พบว่าการฉีดพ่นน้ำมันกานพลูทางใบสามารถลดการรุนแรงของโรคได้ เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานของเมล็ดพันธุ์พบว่าต้นถั่วเหลืองที่ได้รับการฉีดพ่นด้วยน้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 20, 50 และ 100 มิลลิลิตรต่อน้ำ 10 ลิตร ฉีดพ่นด้วยสารคาร์เบนดาซิมอัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และฉีดพ่นด้วยน้ำเปล่า ให้ผลความงอกมาตรฐานอยู่ในช่วง 94-97 เปอร์เซ็นต์ มีเพียงการฉีดพ่นด้วยน้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 200 มิลลิลิตรต่อน้ำ 10 ลิตร ที่มีเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานน้อยที่สุด เท่ากับ 83 เปอร์เซ็นต์และทั้ง 6 กรรมวิธีเมล็ดพันธุ์มีความแข็งแรงโดยการเร่งอายุไม่แตกต่างกัน อยู่ในช่วง 70-79 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การพบเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่คลุกด้วยสารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูอัตราต่างๆ

สูตรผลิตภัณฑ์	การตรวจพบเชื้อรา (%)	ความงอกมาตรฐาน (%)
สารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูอัตรา 0.5 กรัม/1 กก.เมล็ด	9.5±1.0 bc	54 ± 3.56 b
สารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูอัตรา 1.0 กรัม/1 กก.เมล็ด	10.5±0.5 bc	54 ± 3.77 b
สารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูอัตรา 2.0 กรัม/1 กก.เมล็ด	11.0±1.0 b	50 ± 3.16 b
สารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูอัตรา 3.0 กรัม/1 กก.เมล็ด	11.0±1.0 b	34 ± 3.74 c
สารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูอัตรา 4.0 กรัม/1 กก.เมล็ด	8.0±0.0 c	25 ± 1.89 d
สารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูอัตรา 5.0 กรัม/1 กก.เมล็ด	8.0±0.8 c	29 ± 3.59 cd
น้ำกลั่น	99.5±0.5 a	96 ± 0.82 a
คาร์เบนดาซิม	99.5±0.5 a	96 ± 1.15 a
50% เอทานอล	98.0±0.8 a	98 ± 0.50 a
F-test	**	**
C.V. (%)	3.77	9.38

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% จากการทดสอบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การพบเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่คลุกด้วยน้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตราต่างๆ

สูตรผลิตภัณฑ์	การตรวจพบเชื้อรา (%)	ความงอกมาตรฐาน (%)
น้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 10.0 กรัม/1 กก.เมล็ด	27.00 ± 0.58 c	92 ± 0.96 bcd
น้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 14.28 กรัม/1 กก.เมล็ด	16.50 ± 0.50 d	93 ± 2.36 abcd
น้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 25.0 กรัม/1 กก.เมล็ด	8.50 ± 0.00 e	91 ± 2.38 cd
น้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 35.71 กรัม/1 กก.เมล็ด	7.00 ± 0.5 f	87 ± 2.08 d
น้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 53.57 กรัม/1 กก.เมล็ด	4.00 ± 0.58 g	94 ± 0.82 abc
สูตร EC ไม่มีน้ำมันกานพลู	100.00 ± 0.0 a	93 ± 2.22 abcd
คาร์เบนดาซิม อัตรา 2 กรัม/1 กก.เมล็ด	98.50 ± 0.0 b	97 ± 1.29 ab
น้ำกลั่น	100.00 ± 0.5 a	98 ± 0.82 a
F-test	**	**
C.V. (%)	1.86	3.76

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%จากการทดสอบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การพบเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเมื่อพ่นด้วยน้ำมันกานพลู 40%w/w EC ในอัตราต่างๆ ในสภาพแปลงทดลอง

อัตราการฉีดพ่น	การเกิดโรค [1/] (%)	ความงอก [1/] (%)	ความแข็งแรง (%)
20 มล. ต่อน้ำ 10 ลิตร	7.38±1.52 bc	94±0.4 a	79±1.4
50 มล. ต่อน้ำ 10 ลิตร	5.56±1.16 ab	96±0.6 a	77±0.2
100 มล. ต่อน้ำ 10 ลิตร	5.38±1.14 ab	96±0.4 a	75±1.6
200 มล. ต่อน้ำ 10 ลิตร	4.25± 0.90 a	83±1.7 b	70±0.5
คาร์เบนดาซิม 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร	6.44±1.38 ab	97±0.4 a	78±2.1
น้ำ	9.63±2.02 c	96±0.6 a	77±1.5
F-test	**	**	ns
C.V. (%)	23.0	3.9	13.9

[1/] ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%จากการทดสอบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การคลุกเมล็ดด้วยสารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคเมล็ดสีม่วง แต่ไม่เหมาะสมที่จะนำมาคลุกเมล็ด เนื่องจากน้ำมันกานพลูมีผลต่อการงอกของเมล็ดพันธุ์ สอดคล้องกับรายงานของ Bainard *et al.* (2006) รายงานว่าน้ำมันกานพลูมีผลในการยับยั้งการเจริญของต้นกล้าและเมมเบรนถูกทำลาย เมื่อนำมาทำเป็นสูตรผลิตภัณฑ์ชนิดน้ำมันเข้มข้นแบบของเหลวที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน (EC) 40% w/w EC อัตรา 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 10 ลิตร ในการฉีดพ่นในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองสามารถลดการเกิดโรคเมล็ดสีม่วงได้ใกล้เคียงกับการฉีดพ่นด้วยสารคาร์เบนดาซิมและไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ด จึงน่าจะเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถนำมาใช้ทดแทนสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราได้

การทดลองที่ 3 การศึกษาการใช้แสงยูวีต่อการกำจัดเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ และผลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

The Study of the Use of UV for Control of Seed-borne Fungi and Affecting Soybean Seed Quality

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการสุขอนามัยพืช เช่น จานเพาะเชื้อ กระบอกตวง กล้องจุลทรรศน์ ตู้ปลอดเชื้อ
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ
4. หลอด UV-C (Philips, 20W/C)
5. อุปกรณ์สำหรับเพาะความงอกในห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์

วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 8 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เมล็ดพันธุ์ได้รับแสง UV-C เป็นเวลา 1 นาที
กรรมวิธีที่ 2 เมล็ดพันธุ์ได้รับแสง UV-C เป็นเวลา 5 นาที
กรรมวิธีที่ 3 เมล็ดพันธุ์ได้รับแสง UV-C เป็นเวลา 10 นาที
กรรมวิธีที่ 4 เมล็ดพันธุ์ได้รับแสง UV-C เป็นเวลา 20 นาที
กรรมวิธีที่ 5 เมล็ดพันธุ์ได้รับแสง UV-C เป็นเวลา 30 นาที
กรรมวิธีที่ 6 เมล็ดพันธุ์ได้รับแสง UV-C เป็นเวลา 45 นาที
กรรมวิธีที่ 7 เมล็ดพันธุ์ได้รับแสง UV-C เป็นเวลา 75 นาที
กรรมวิธีที่ 8 เมล็ดพันธุ์ไม่ได้รับแสง UV-C (ชุดควบคุม)

กรมวิชาการเกษตร

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ติดตั้งหลอดไฟ UV-C ในตู้กระจกกันแสง UV ทั้งด้านบน และด้านข้าง 2 ด้าน
2. เตรียมเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ไม่เป็นโรคปริมาณ 1 กิโลกรัม โดยการนำเมล็ดถั่วเหลืองฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 10% Clorox นาน 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดมาแช่ในสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราแต่ละชนิดได้แก่ *Cercospora kikuchii*, *Phomopsis* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus niger* ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อเชื้อต่อมล. ในอัตราส่วนปริมาตรเชื้อ 1 มล./10 เมล็ด นาน 2 ชั่วโมง ผึ่งเมล็ดให้แห้งในที่ปลอดเชื้อ
3. นำเมล็ดพันธุ์ที่คลุกเชื้อและไม่คลุกเชื้อไปรับแสง UV-C ตามกรรมวิธีต่างๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
4. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง มาตรวจเชื้อราด้วยวิธีเพาะเมล็ดบนกระดาษชื้น (blotter method) สุ่มเมล็ดพันธุ์ นำไปเพาะบนกระดาษชื้นโดยใช้กระดาษเพาะความงอก จำนวน 3 แผ่น นำไปจุ่มน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ชุ่ม แล้ววางบนจานเลี้ยงเชื้อ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร) นำเมล็ดถั่วเขียววางในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ จำนวน 10 เมล็ด/ 1 จานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ (28±2 องศาเซลเซียส) ภายใต้แสง NUV 12 ชั่วโมง สลับกับความมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่เจริญบนเมล็ดภายใต้กล้อง stereo microscope ทำการจำแนกชนิดเชื้อราแต่ละชนิดภายใต้กล้อง compound microscope
5. ตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ได้แก่

   - ความงอกมาตรฐาน (standard germination) ทำการเพาะเมล็ดถั่วเขียวโดยวิธีระหว่างกระดาษ (Between paper, BP) จำนวน 100 เมล็ดต่อซ้ำ ทั้งหมด 4 ซ้ำ บ่มในห้องเพาะความงอกอุณหภูมิสลับที่ 20 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง ประเมินความงอกที่อายุ 7 วัน (ISTA, 2020)

   - ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์โดยวิธีการเร่งอายุ (accelerated aging test; AA test) นำเมล็ดไปเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41±0.3 องศาเซลเซียส ในตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบชื้นคงที่ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 98±2% จำนวน 100 เมล็ดต่อซ้ำ เมื่อครบกำหนด นำเมล็ดไปเพาะความงอกตามวิธีการทดสอบความงอกมาตรฐาน

การบันทึกข้อมูล

- คำนวณเปอร์เซ็นต์เมล็ดติดเชื้อโดยวิธี Blotter method
- เปอร์เซ็นต์ความงอกความงอกมาตรฐาน (standard germination)
- เปอร์เซ็นต์ความแข็งแรงโดยวิธีการเร่งอายุ (accelerated aging test)

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินการ เริ่มต้น ตุลาคม 2561 สิ้นสุด กันยายน 2563

สถานที่ดำเนินการ ศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ตำบลวังทอง อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและอภิปราย

การออกแบบและติดตั้งตู้ยูวีเพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราบนผิวเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและผลต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ โดยการใช้หลอดยูวีจำนวน 10 หลอด โดยติดตั้งผนังด้านข้างละ 3 หลอดและด้านบน 4 หลอด เพื่อให้แสงยูวีซีกระจายได้ทั่วตู้ ซึ่งอยู่ในช่วงของ Short-wave UV (UV-C) (200-280 nm) และจากการเตรียมเชื้อรา *Cercospora kikuchii*, *Phomopsis* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus niger* เริ่มต้นสำหรับการคลุกเมล็ดโดยนำมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารวุ้น PDA ในจานเลี้ยงเชื้อซึ่งบ่มไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเชื้อรามาล้างด้วย tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ขูดผิวหน้าให้สปอร์และเส้นใยแขวนลอยในน้ำ นำไปใส่หลอดทดลอง กรองสปอร์และเส้นใยเชื้อราด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเพื่อให้สปอร์ของเชื้อราแขวนลอยในน้ำ นำสารแขวนลอยโคนิเดียที่ได้ไปตรวจนับปรับระดับความเข้มข้นให้ได้ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ด้วย tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปคลุกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองต่อไป

ผลของแสงยูวีซีต่อการควบคุมโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ไม่เป็นโรค จำนวน 1 กิโลกรัมใส่ในถาดอะลูมิเนียม เตรียมโดยการนำเมล็ดถั่วเหลืองฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 10% Clorox นาน 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดมาแช่ในสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราแต่ละชนิดได้แก่ *Cercospora kikuchii*, *Phomopsis* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus niger* ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อเชื้อต่อมล. ในอัตราส่วนปริมาตรเชื้อ 1 มล./10 เมล็ด นาน 2 ชั่วโมง ผึ่งเมล็ดให้แห้งในที่ปลอดเชื้อจากนั้นให้ได้รับแสง UV-C ตามกรรมวิธีต่างๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง มาตรวจเชื้อราโดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น พบว่าเมล็ดพันธุ์ยังคงมีเชื้อราเจริญอยู่บนผิวเมล็ด (ภาพที่ 1) ทั้งนี้เนื่องจากเมล็ดพันธุ์มีปริมาณเชื้อจำนวนมากจากการนำสปอร์เชื้อราไปคลุกแต่ในความเป็นจริงเมล็ดพันธุ์ที่เก็บเกี่ยวจากแปลงผลิตไม่ได้มีจำนวนเชื้อปริมาณมาก จึงทำการทดสอบเมล็ดพันธุ์ที่เก็บเกี่ยวจากแปลงที่ปลูกในช่วงฤดูฝนมารับแสงในตู้ยูวีซีตามกรรมวิธีที่ศึกษาที่เวลาต่างๆ พบว่ามีเชื้อราหลายชนิดที่เจริญบนผิวเมล็ดพันธุ์ โดยสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มได้แก่ เชื้อสาเหตุโรคเมล็ดพันธุ์ที่สำคัญได้แก่ เชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วง และเชื้อรา *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิส และกลุ่มเชื้อราทั่วไปและและเชื้อราในโรงเก็บ ได้แก่ *Aspergillus flavus, Aspergillus niger* และ *Cladosporium* sp. ซึ่งแสงยูวีซีมีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus niger* ได้ดีเมื่อได้รับแสงยูวีซีเป็นเวลา 10 นาทีขึ้นไป ในขณะที่แสงยูวีซีไม่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเมล็ดพันธุ์ *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp. และเชื้อราทั่วไปที่พบในแปลง ได้แก่ เชื้อรา *Cladosporium* sp. ซึ่งพบเป็นจำนวนมากที่สุดถึง 88 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) ซึ่งเชื้อรา *Cladosporium* sp. เป็นราที่พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไป พบในพืชทุกชนิด รา และเศษซากพืช ซึ่งราชนิดนี้มีลักษณะเป็นรา secondary invaders หรือเป็นสาเหตุโรคที่แยกได้จากใบพืชและแยกได้มากที่สุดในอากาศ เนื่องจากราชนิดนี้มีสปอร์ขนาดเล็ก เกิดอยู่บนก้านชูสปอร์ที่แตกกิ่งก้าน จึงทำให้รามีปริมาณมากและสามารถแพร่กระจายไปได้ในระยะที่ไกลมาก มีบางชนิดที่เป็นสาเหตุโรคพืชทำให้เกิดโรคใบจุด ใบไหม้ (Schubert K and Braun U, 2005) หรือบางชนิดเป็นปรสิตเจริญอยู่บนราชนิดอื่นและมีอีกหลายชนิดที่เป็น endophyte เป็นราที่อาศัยอยู่

กรมวิชาการเกษตร

ในเนื้อเยื่อของพืชและสามารถเจริญเติบโตได้ดีโดยไม่ทำให้ให้เกิดโรคหรือการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่ผิดปกติแก่พืชชนิดนั้นๆ การที่แสงยูวีซีไม่สามารถกำจัดเชื้อสาเหตุโรคเมล็ดพันธุ์เหล่านี้ได้เนื่องจากเชื้อจะเข้าไปภายในเปลือกหุ้มเมล็ดและเข้าทำลายเอมบริโอซึ่งแสงยูวีซีอาจจะแทรกซึมเข้าไปไม่ถึงจึงทำให้ไม่สามารถกำจัดเชื้อเหล่านี้ สอดคล้องกับรายงานการวิจัยกล่าวว่าระดับที่ทำลายเชื้อโรคขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของแสงยูวีที่ได้รับ ระยะห่างระหว่างแหล่งกำเนิดแสงและตัวอย่างที่ได้รับแสง ความลึกในการแทรกซึมของแสงยูวีซีซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญมาก และข้อจำกัดของแสงยูวีในการแทรกซึมผ่านวัตถุ (ยกเว้นน้ำและของเหลวบางชนิด) เพราะผิวชั้นนอกของวัตถุจะดูดซับรังสีเอาไว้และอันตรายจากรังสีต่างๆ แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้พบว่าแสงยูวีซีสามารถลดปริมาณเชื้อ *Aspergillus flavus, Aspergillus niger* ได้สูงสุดถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นเชื้อราที่เข้าทำลายเมล็ดขณะเก็บรักษาอยู่ได้ ซึ่งจะทำให้เมล็ดพันธุ์เกิดความเสียหาย ลดความงอกของเมล็ด เพราะเชื้อเข้าทำลายคัพภะ และเกิดจากเมล็ดมีอัตราการหายใจเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้เชื้อราในโรงเก็บ *Aspergillus flavus* บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ aflatoxin ซึ่งเป็นอันตราย ดังนั้นการใช้แสงยูวีซีจึงสามารถลดปริมาณเหล่านี้ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยรายงานว่าแสง UV-C ที่ระดับ 35 และ 54 mJ cm^{-2} สามารถควบคุมเชื้อในโรงเก็บที่สร้างสารพิษ เช่น *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus fumigatus* (Green *et al*., 2004) นอกจากนี้มีรายงานการนำแสงยูวีซีมาประยุกต์ใช้ในผลิตผลทางการเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวจำนวนมาก เช่น การใช้รังสี UV-C ควบคุมโรคราแป้งที่เกิดจากเชื้อ *Podosphaera aphanis* ในสตอเบอรี่โดยนำเชื้อให้ได้รับรังสี UV-C ในปริมาณ 20.6 μW cm-2 เป็นเวลา 60 วินาที และตามด้วยสภาวะไร้แสง 4 ชั่วโมง พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้ร้อยเปอร์เซ็นต์ (Janisiewicz *et al*., 2016) และมีการใช้รังสี UV-C ในการควบคุมเชื้อ *Monilinia fruticola* ในลูกแพร์ ที่ระดับ 5 kJ m^{-2} โดยมีผลยับยั้งการงอกของสปอร์รวมทั้งยังส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase, β-1,3-glucanase, superoxide dismutase, catalase และ glutathione reductase ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีผลต่อการสะสมของสาร flavonoids, phytoalexins และสารประกอบฟีโนลิกซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (Li *et al*., 2010)

ผลของแสงยูวีซีต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

จากการทดสอบประสิทธิภาพตู้ให้แสงยูวีซีต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ได้แก่ ความงอกมาตรฐานและความแข็งแรงด้วยวิธีการเร่งอายุเมื่อได้รับแสงที่เวลาต่างๆ กันพบว่าแสงยูวีซีไม่มีผลให้คุณภาพเมล็ดพันธุ์ลดลง โดยมีความงอกและความแข็งแรงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมล็ดพันธุ์ที่ได้รับแสงยูวีซีที่เวลาต่างๆ มีความงอกมาตรฐาน 65-77 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับแสงยูวีมีความงอก 71 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความแข็งแรงอยู่ระหว่าง 50-61 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับแสงยูวีมีความแข็งแรงเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่าเมล็ดพันธุ์ที่ได้รับแสงยูวีซีมีความงอกและความแข็งแรงใกล้เคียงกับเมล็ดพันธุ์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีซี อย่างไรก็ตามเมล็ดที่ได้รับการแสงยูวีซีมีความงอกมีแนวโน้มสูงขึ้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานที่ศึกษาในเมล็ดพันธุ์พืชอื่นหลายชนิด เช่น ถั่วเหลือง ข้าวสาลี และทานตะวัน (Pournavab *et al*., 2019) ซึ่งเมล็ดเหล่านี้เมื่อผ่านการได้รับแสงยูวีซีมีความงอกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเมล็ดที่ไม่ได้รับแสงยูวีซี ซึ่งความอ่อนไหวของเนื้อเยื่อพืชต่อการได้รับแสงยูวีซีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตามสรีรวิทยาของพืช องค์ประกอบ และความหนาของชั้นเนื้อเยื่อพืช ซึ่งแสงยูวีซี

กรมวิชาการเกษตร

สามารถกระตุ้นระบบต้านทานอนุมูลอิสระด้วยเอนไซม์และไม่ใช่เอนไซม์เพื่อตอบสนองความเครียดในพืชที่แตกต่างกันเมื่อได้รับแสงยูวีซีในระดับต่างๆกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้แสงยูวีซีในเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง พบว่าสามารถกระตุ้นความงอก ความแข็งแรงของต้นกล้า ผลผลิต เมื่อได้รับแสงยูวีซีนานกว่า 60 นาทีเมื่อเทียบกับเมล็ดพันธุ์ชุดควบคุมที่ไม่ได้รับแสงยูวีซี (Neelamegam and Sutha, 2015)

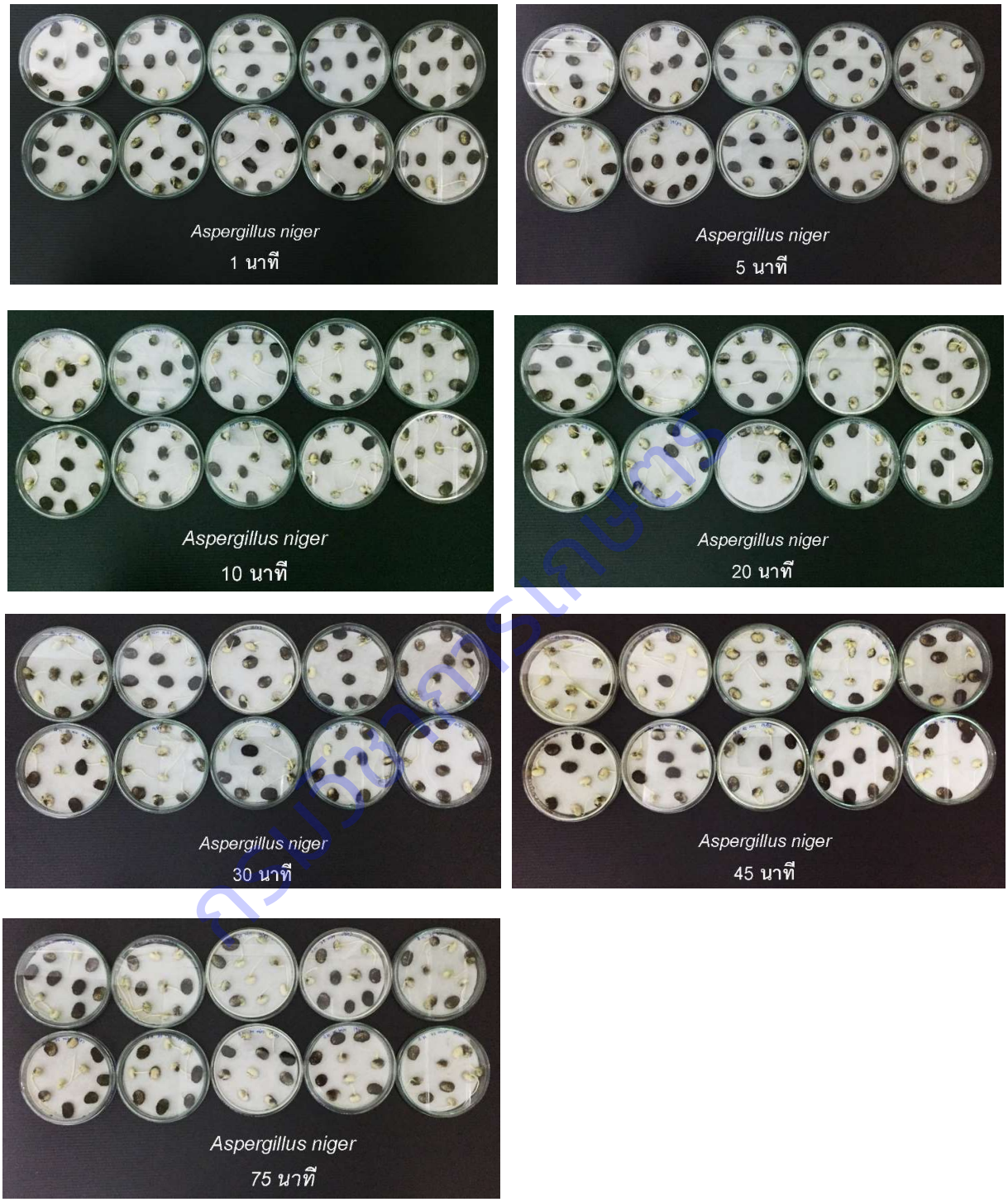
ตารางที่ 1 ผลของระยะเวลาการได้รับแสงยูวีซีของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองต่อการยับยั้งเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

ระยะเวลาที่ได้รับแสง (นาที)	เปอร์เซ็นต์เชื้อที่พบ				
	Aspergillus flavus	*Aspergillus niger*	*Cladosporium* sp.	*Cercospora kikuchii*	*Phomopsis* sp.
0	10	6	83	38	1
1	7	6	86	38	2
5	6	3	87	42	1
10	2	3	78	39	1
20	3	3	78	40	3
30	3	3	87	40	2
45	3	3	80	40	2
75	3	2	88	43	1

ตารางที่ 2 ผลของระยะเวลาการได้รับแสงยูวีซีต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

ระยะเวลาที่ได้รับแสง (นาที)	คุณภาพเมล็ดพันธุ์	
	ความงอกมาตรฐาน (%)	ความแข็งแรงโดยวิธีเร่งอายุ (%)[1/]
0	71	62
1	73	60
5	72	55
10	72	56
20	69	57
30	65	61
45	70	63
75	77	54
Mean	71	57
F-test	ns	ns
CV (%)	1.97	2.88

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1 ผลของแสงยูวีซีต่อการควบคุมเชื้อราบนผิวเมล็ดพันธุ์

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบประสิทธิภาพให้แสงยูวีซีกับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เก็บมาจากแปลงปลูกในช่วงฤดูฝนต่อการใช้ควบคุมโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์และผลต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ พบว่าแสงยูวีซีมีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus niger* ได้ดีเมื่อได้รับแสงยูวีซีเป็นเวลา 10 นาทีขึ้นไป ในขณะที่แสงยูวีซีไม่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเมล็ดพันธุ์ *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp. แต่อย่างไรก็ตามแสงยูวีซีไม่มีผลให้คุณภาพเมล็ดพันธุ์ลดลง โดยมีความงอกและความแข็งแรงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมล็ดพันธุ์ที่ได้รับแสงยูวีซีที่เวลาต่างๆ มีความงอกมาตรฐาน 65-77 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับแสงยูวีมีความงอก 71 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความแข็งแรงอยู่ระหว่าง 50-61 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เมล็ดที่ได้รับการแสงยูวีซีที่นานขึ้นพบว่าความงอกมีแนวโน้มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับแสง ดังนั้นแสงยูวีซีมีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในด้านการกำจัดเชื้อที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์รวมทั้งยังสามารถส่งเสริมความงอกของเมล็ดพันธุ์อีกด้วย

การทดลองที่ 4 การทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลือง

The Efficiency of Fungicides for Controlling Soybean Purple Seed Stain

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พันธุ์เชียงใหม่ 60
2. กระถางดินเผา
3. ดินปลูก
4. สารป้องกันกำจัดแมลง ได้แก่ ไตรอะโซฟอส
5. สารป้องกันกำจัดโรคพืช ได้แก่ Captan, Thiophanate –methyl, Carbendazim, Azoxystrobin, Propiconazole, Propiconazole+Difenoconazole
6. ปุ๋ยเคมี เกรด 12-24-12

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 ทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วง สภาพเรือนทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Randomized Completely Block Design (RCBD) จำนวน 10 กรรมวิธี 3 ซ้ำ

1. ไม่คลุกเมล็ดและไม่พ่นสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วง
2. คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP อัตรา 3 กรัม/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม
3. พ่น Thiophanate –methyl 70% WP อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร
4. พ่น Carbendazim 50% WP อัตรา 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร
5. พ่น Azoxystrobin 25% SC อัตรา 5 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร
6. พ่น Propiconazole 25% EC อัตรา 40 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร

กรมวิชาการเกษตร

7. พ่น Propiconazole+Difenoconazole 15%+15% EC อัตรา 10 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร
8. คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP อัตรา 3 กรัม/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม และพ่น Azoxystrobin 25% SC อัตรา 5 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร
9. คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP อัตรา 3 กรัม/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม และพ่น Propiconazole 25% EC อัตรา 40 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร
10. คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP อัตรา 3 กรัม/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม และพ่น Propiconazole+Difenoconazole 15%+15% EC อัตรา 10 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่แสดงอาการของโรคเมล็ดสีม่วง ปลูกลงในกระถาง จำนวน 10 กระถางต่อกรรมวิธี หยอดเมล็ดกระถางละ 5 เมล็ด หลังจากปลูก 7-10 วัน พ่นสารเคมีไตรอะโซฟอส ป้องกันกำจัดแมลงวันหนอนเจาะลำต้น ถอนแยกต้นถั่วเหลืองให้เหลือกระถางละ 2-3 ต้น หลังจากงอก 20 วัน ใส่ปุ๋ยเคมี เกรด 12-24-12 อัตรา 25 กิโลกรัม/ไร่ และทำการพ่นสารเคมีตามกรรมวิธีที่ระยะออกดอกเต็มที่ (R2) และระยะเมล็ดพัฒนาเต็มที่ (R6)

การบันทึกข้อมูล

1. วันปลูก วันงอก วันออกดอก 50% วันเก็บเกี่ยว
2. น้ำหนัก 100 เมล็ด
3. เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเมล็ดสีม่วง
4. เปอร์เซ็นต์ความงอก
5. เปอร์เซ็นต์ความแข็งแรง ด้วยวิธีการเร่งอายุ

ขั้นตอนที่ 2 ทดสอบสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากขั้นตอนที่ 1 จำนวน 3 กรรมวิธี ทดสอบสภาพแปลงทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Completely Block Design (RCBD) จำนวน 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

1. ไม่คลุกเมล็ดและไม่พ่นสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วง
2. พ่น Carbendazim 50% WP อัตรา 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร
3. พ่น Propiconazole + Difenoconazole 15%+15% EC อัตรา 10 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร
4. คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP อัตรา 3 กรัม/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม และพ่น Azoxystrobin 25% SC อัตรา 5 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร
5. คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP อัตรา 3 กรัม/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม และพ่น Propiconazole + Difenoconazole 15%+15% EC อัตรา 10 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร

ปลูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ระยะปลูก 50 x 20 เซนติเมตร หยอดเมล็ดหลุมละ 5 เมล็ด หลังปลูกพ่นสารเคมีควบคุมวัชพืชก่อนถั่วเหลืองงอกโดยใช้อลาคลอร์ อัตรา 500 มิลลิลิตร/ไร่ เมื่อถั่วเหลืองอายุครบ 7 วัน พ่นสารเคมีไตรอะโซฟอส ป้องกันกำจัดแมลงวันหนอนเจาะลำต้น ถอนแยกต้นถั่วเหลืองให้เหลือหลุมละ 2-3 ต้น หลังจากงอก 20 วัน ใส่ปุ๋ยเคมี เกรด 12-24-12 อัตรา 25 กิโลกรัม/ไร่ โดยโรยข้างแถวแล้วกลบปุ๋ยพูน

กรมวิชาการเกษตร

โคนต้น ทำการพ่นสารเคมีตามกรรมวิธี ที่ระยะออกดอกเต็มที่ (R2) และระยะเมล็ดพัฒนาเต็มที่ (R6) และดูแลรักษาแปลงตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตรจนถึงระยะเก็บเกี่ยว

การบันทึกข้อมูล

1. วันปลูก วันงอก วันออกดอก50% วันเก็บเกี่ยว
2. น้ำหนัก 100 เมล็ด
3. เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเมล็ดสีม่วง
4. เปอร์เซ็นต์ความงอก
5. เปอร์เซ็นต์ความแข็งแรง ด้วยวิธีการเร่งอายุ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินการ เริ่ม ตุลาคม 2561 – สิ้นสุด กันยายน 2563

ดำเนินการที่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและอภิปราย

1. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วง สภาพเรือนทดลอง

จากการตรวจสอบโรคเมล็ดสีม่วง โดยวิธี Blotter method พบว่า การคลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP อัตรา 3 กรัม/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม และพ่น Propiconazole + Difenoconazole 15%+15% EC อัตรา 10 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร พบการเกิดโรคเมล็ดสีม่วงต่ำที่สุด คือ 0.33% รองลงมาคือ การพ่น Propiconazole + Difenoconazole 15%+15% EC อัตรา 10 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร และการคลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP อัตรา 3 กรัม/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม และพ่น Azoxystrobin 25% SC อัตรา 5 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร พบการเกิดโรคเมล็ดสีม่วง 0.67% และ 1% ตามลำดับ ทั้ง 3 กรรมวิธี ไม่แตกต่างกันทางสถิติ สามารถใช้ในการป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงได้ แต่พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติกับการพ่น Carbendazim 50% WP อัตรา 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร และการไม่คลุกเมล็ดและไม่พ่นสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วง (ชุดควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2)

ความงอก และความแข็งแรง

การตรวจสอบความงอกมาตรฐาน โดยวิธีการเพาะเมล็ดระหว่างกระดาษ (Between paper) จำนวน 100 เมล็ดต่อซ้ำ ในห้องเพาะความงอก อุณหภูมิ 20<->30˚C องศาเซลเซียส ประเมินความงอกที่อายุ 8 วัน (ISTA, 2020) และการตรวจสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ โดยวิธีการเร่งอายุ นำเมล็ดไปเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 ±2 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 98+2% (Hamton and Tekrony, 1995) จำนวน 100 เมล็ดต่อซ้ำ เมื่อครบกำหนด นำเมล็ดไปเพาะความงอกตามวิธีทดสอบความงอกมาตรฐาน พบว่า ทุกกรรมวิธี เปอร์เซ็นต์ความงอก และเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรง ไม่แตกต่างกันทางสิถิติ (ตารางที่ 2)

สอดคล้องกับวิเชียร (2537) กล่าวว่าการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดที่แสดงอาการสีม่วงเทียบกับเมล็ดปกติ พบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอก โปรตีน น้ำมัน และองค์ประกอบกรดไขมันไม่แตกต่างกัน

น้ำหนัก 100 เมล็ด

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วง ในสภาพเรือนทดลอง พบว่าทุกกรรมวิธี น้ำหนัก 100 เมล็ด ไม่แตกต่างกัน สอดคล้องกับมณฑา (2532) ได้ศึกษาการป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงของถั่วเหลืองโดยการพ่นสารเคมี พบว่าการปลูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ให้น้ำหนัก 100 เมล็ด ไม่แตกต่างกันระหว่างการพ่นสารและไม่พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อราทุกกรรมวิธี (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 วันที่ปลูก งอก ออกดอกร้อยละ50 และเก็บเกี่ยว ของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ในสภาพเรือนทดลอง และแปลงทดลอง

สถานที่ปลูก	วันที่ปลูก	วันที่งอก	วันที่ออกดอกร้อยละ 50	วันที่เก็บเกี่ยว
เรือนทดลอง	28 ม.ค. 2562	31 ม.ค. 2562	17 ก.พ. 2562	7 พ.ค. 2562
แปลงทดลอง	18 ก.ย. 2562	20 ก.ย. 2562	12 ต.ค. 2562	29 ธ.ค. 2562

ตารางที่ 2 แสดงการเกิดโรคเมล็ดสีม่วง ความงอก ความงอกหลังการเร่งอายุ และน้ำหนัก 100 เมล็ด ในสภาพเรือนทดลอง ปี 2562 ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่

กรรมวิธี	การเกิดโรคเมล็ดสีม่วง	ความงอก (%)	ความงอกหลังเร่งอายุ (%)	น้ำหนัก 100 เมล็ด (กรัม)
1. ไม่คลุกเมล็ดและไม่พ่นสารเคมี	10.00 d	86	47	13.5
2. คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP	9.33 cd	86	47	13.5
3. พ่น Thiophanate –methyl 70% WP	2.33 ab	86	47	14.8
4. พ่น Carbendazim 50% WP	3.33 ab	85	47	13.8
5. พ่น Azoxystrobin 25% SC	5.67 bc	81	47	13.8
6. พ่น Propiconazole 25% EC	1.67 ab	86	48	13.8
7. พ่น Propiconazole+Difenoconazole 15%+15% EC	0.67 a	86	46	14.7
8. คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP + พ่น Azoxystrobin 25% SC	1.00 a	85	46	14.2
9. คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP + พ่น Propiconazole 25% EC	3.67 ab	85	47	13.7

กรมวิชาการเกษตร

10. คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP + พ่น Propiconazole+Difenoconazole 15%+15% EC	0.33 a	85	45	12.5
F-test	*	ns	ns	ns
CV. (%)	45.89	1.40	5.04	12.83

หมายเหตุ * = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p≤0.05), ns= ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (>0.05)

2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากขั้นตอนที่ 1 จำนวน 3 กรรมวิธี ทดสอบสภาพแปลงทดลอง

จากการคัดเลือกสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วง ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากขั้นตอนที่ 1 จำนวน 3 กรรมวิธี ได้แก่ พ่น Propiconazole + Difenoconazole 15%+15% EC อัตรา 10 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร, การคลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP อัตรา 3 กรัม/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม และพ่น Azoxystrobin 25% SC อัตรา 5 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร, การคลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP อัตรา 3 กรัม/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม และพ่น Propiconazole + Difenoconazole 15%+15% EC อัตรา 10 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร เปรียบเทียบกับ การพ่น Carbendazim 50% WP อัตรา 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร และไม่คลุกเมล็ดและไม่พ่นสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วง (ชุดควบคุม) ทดสอบในสภาพแปลงทดลอง จากการตรวจสอบโรคเมล็ดสีม่วง โดยวิธี Blotter method พบว่าการพ่น Propiconazole + Difenoconazole 15%+15% EC อัตรา 10 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร พบการเกิดโรคเมล็ดสีม่วงต่ำที่สุด คือ 4.75% รองลงมาคือ การคลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP อัตรา 3 กรัม/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม และพ่น Propiconazole + Difenoconazole 15%+15% EC อัตรา 10 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร และการคลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP อัตรา 3 กรัม/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม และพ่น Azoxystrobin 25% SC อัตรา 5 ซีซี/น้ำ 20 ลิตรพบการเกิดโรคเมล็ดสีม่วง 5.5% และ 7.5% ตามลำดับ ทั้ง 3 กรรมวิธี ไม่แตกต่างกันทางสถิติ สามารถใช้ในการป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงได้ แต่พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติกับการพ่น Carbendazim 50% WP อัตรา 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร และการไม่คลุกเมล็ดและไม่พ่นสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วง (Control) อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3) เช่นเดียวกับการป้องกันกำจัดโรคเมล็ดด่างในข้าว ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Cercospora oryza*e แนะนำให้พ่น Propiconazole + Difenoconazole หรือพ่น Azoxystrobin ในระยะที่ข้าวกำลังจะให้รวง หรือให้รวงเป็นเมล็ดแล้ว (กรมส่งเสริมการเกษตร 2557)

ความงอก และความแข็งแรง

จากการตรวจสอบความงอกมาตรฐาน โดยวิธีการเพาะเมล็ดระหว่างกระดาษ (Between paper) และการตรวจสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ โดยวิธีการเร่งอายุ พบว่าทุกกรรมวิธี เปอร์เซ็นต์ความงอก และเปอร์เซ็นต์ความแข็งแรง ไม่แตกต่างกันทางสิถิติ (ตารางที่ 3) เช่นเดียวกับการทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

น้ำหนัก 100 เมล็ด

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วง ในสภาพแปลงทดลอง พบว่าทุกกรรมวิธี น้ำหนัก 100 เมล็ด ไม่แตกต่างกัน สอดคล้องกับมณฑา (2532) ได้ศึกษาการป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงของถั่วเหลืองโดยการพ่นสารเคมี พบว่าการปลูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ให้น้ำหนัก 100 เมล็ด ไม่แตกต่างกันระหว่างการพ่นสารและไม่พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อราทุกกรรมวิธี (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงการเกิดโรคเมล็ดสีม่วง ความงอก ความงอกหลังการเร่งอายุ และน้ำหนัก 100 เมล็ด ในสภาพแปลงทดลอง ปี 2562 ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่

กรรมวิธี	การเกิดโรคเมล็ดสีม่วง	ความงอก (%)	ความงอกหลังเร่งอายุ (%)	น้ำหนัก 100 เมล็ด (กรัม)
1. ไม่คลุกเมล็ดและไม่พ่นสารเคมี	26.25 c	95	95	18
2. พ่น Carbendazim 50% WP	19.75 b	94	94	19.5
3. พ่น Propiconazole+Difenoconazole 15%+15% EC	4.75 a	95	95	18.5
4. คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP + พ่น Azoxystrobin 25% SC	7.5 a	94	92	17.5
5. คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP + พ่น Propiconazole+Difenoconazole 15%+15% EC	5.5 a	94	93	19
F-test	*	ns	ns	ns
CV. (%)	19.65	1.07	3.87	6.84

หมายเหตุ * = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$), ns= ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (>0.05)

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การคลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP อัตรา 3 กรัม/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม และพ่น Propiconazole + Difenoconazole 15%+15% EC อัตรา 10 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร ที่ระยะ R2 และ R6 สามารถใช้ในการป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงได้ดี ปลอดภัยต่อมนุษย์ สิ่งแวดล้อม และสามารถใช้ทดแทนการใช้สาร carbendazim ในการป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงได้ แต่อย่างไรก็ตามแนะนำให้เลือกใช้การพ่น Propiconazole + Difenoconazole 15%+15% EC ที่ระยะ R2 และ R6 เนื่องจากมีราคาต้นทุนถูกที่สุด

การทดลองที่ 5 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์

Efficacy of Actinomyces in Controlling Importance Economic Disease for Seed Production Field

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานเพาะเชื้อ กระบอกตวง
3. กล้องจุลทรรศน์
4. ตู้ปลอดเชื้อ
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการ

1. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cercospora kikuchii*, และ *Phomopsis* sp. บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมด 25 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในเมล็ดถั่วเหลือง ได้แก่ *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยวิธี dual culture โดยเลี้ยงเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer เจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร นำไปวางที่จุดศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ก่อน (เนื่องจากเชื้อราสาเหตุโรคมีอัตราการเจริญช้า) แล้วทำการปลูกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ทดสอบ โดยใช้เข็มเขี่ยโคโลนีเชื้อที่เลี้ยงไว้บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 - 48 ชั่วโมง มาขีดบนจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อราไว้แล้ว 4 ด้าน ส่วนในกรรมวิธีควบคุมไม่มีการปลูกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ทำการทดลอง 10 จานเลี้ยง เชื้อ/ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส inhibition zone ซึ่งเป็นบริเวณใสๆ ในวุ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp.

2. การจำแนกเชื้อที่คัดเลือกได้โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบทางชีวเคมี

การจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยนำเชื้อที่คัดเลือกได้มาศึกษารูปร่าง การจัดเรียงตัว และการติดสีแกรม ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB (bioMerieux, France)

3. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการควบคุมโรคที่สำคัญของถั่วเหลืองในสภาพเรือนทดลอง

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) จำนวน 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 แช่เมล็ดถั่วเหลืองก่อนปลูกด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอัตรา 10 มิลลิลิตร ต่อ 1 เมล็ด

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 2 ใส่หรือเติมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงในดินก่อนปลูกในอัตรา 10 มิลลิลิตร ต่อ 1 กระถาง

กรรมวิธีที่ 3 โรยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์รอบโคนต้นในระยะต้นกล้า V1 ในอัตรา 10 มิลลิลิตร ต่อ 1 ต้น

กรรมวิธีที่ 4 พ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในระยะต้นกล้า V1 ในอัตรา 10 มิลลิลิตร ต่อ 1 ต้น

กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยน้ำ (ชุดควบคุม) ในอัตรา 10 มิลลิลิตร ต่อ 1 ต้น

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน จากนั้นเตรียมสารละลายเซลล์ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

2. ปลูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว หยอดเมล็ดกระถางละ 2 เมล็ด หลังจากหยอดเมล็ดและกลบหลุมดีแล้ว หลังจากงอกประมาณ 1 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 12-24-12 และปฏิบัติตามกรรมวิธีทดลองต่างๆ ดูแลรักษาจนถึงระยะเก็บเกี่ยว

การบันทึกข้อมูล

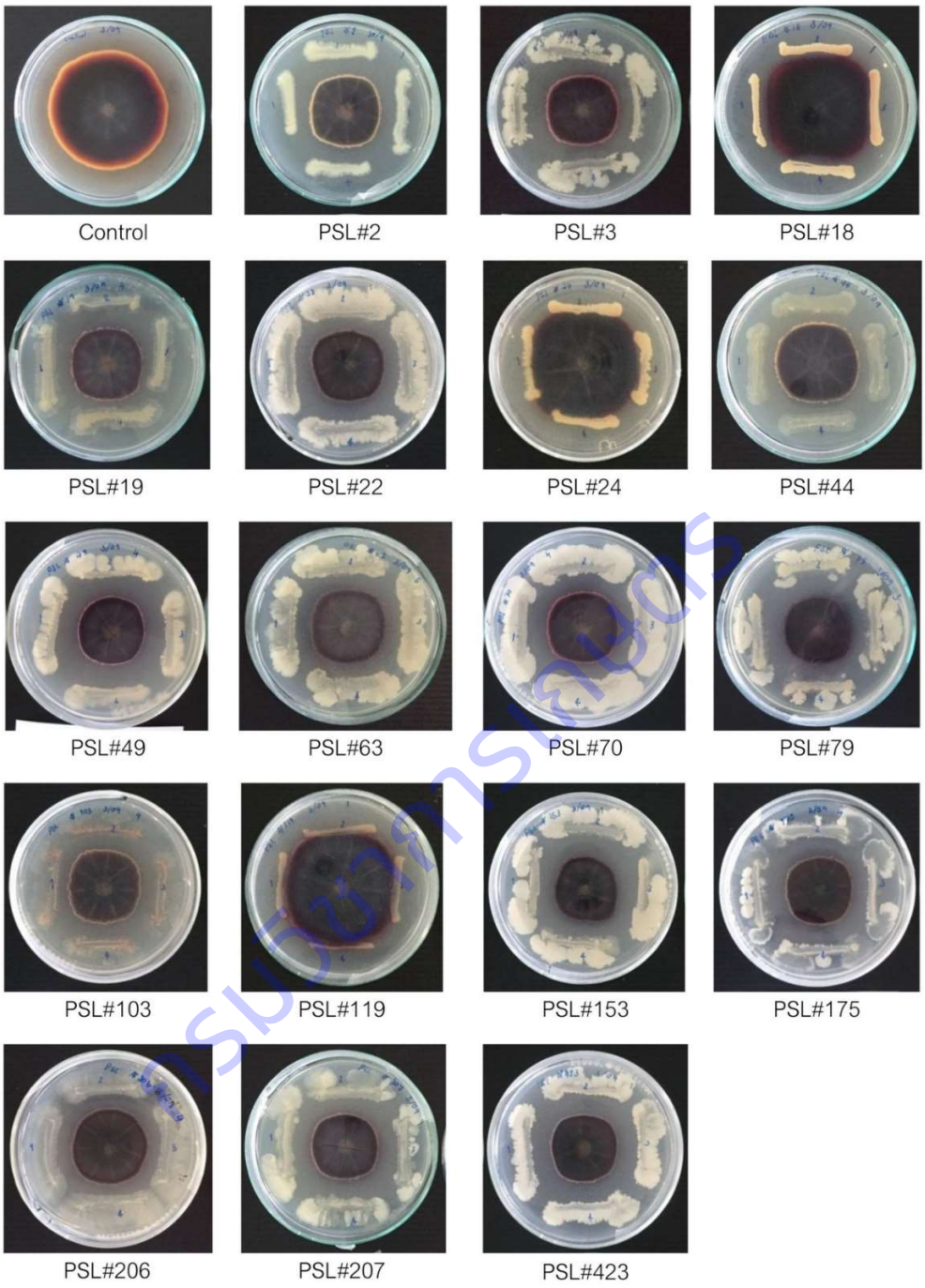
- เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *Cercospora kikuchii*, *Fusarium* sp., *Phomopsis* sp.
- องค์ประกอบผลผลิต ประกอบด้วย ความสูง จำนวนกิ่งต่อต้น จำนวนข้อต่อต้น จำนวนฝักต่อต้น ผลผลิตต่อต้น

ผลการทดลองและอภิปราย

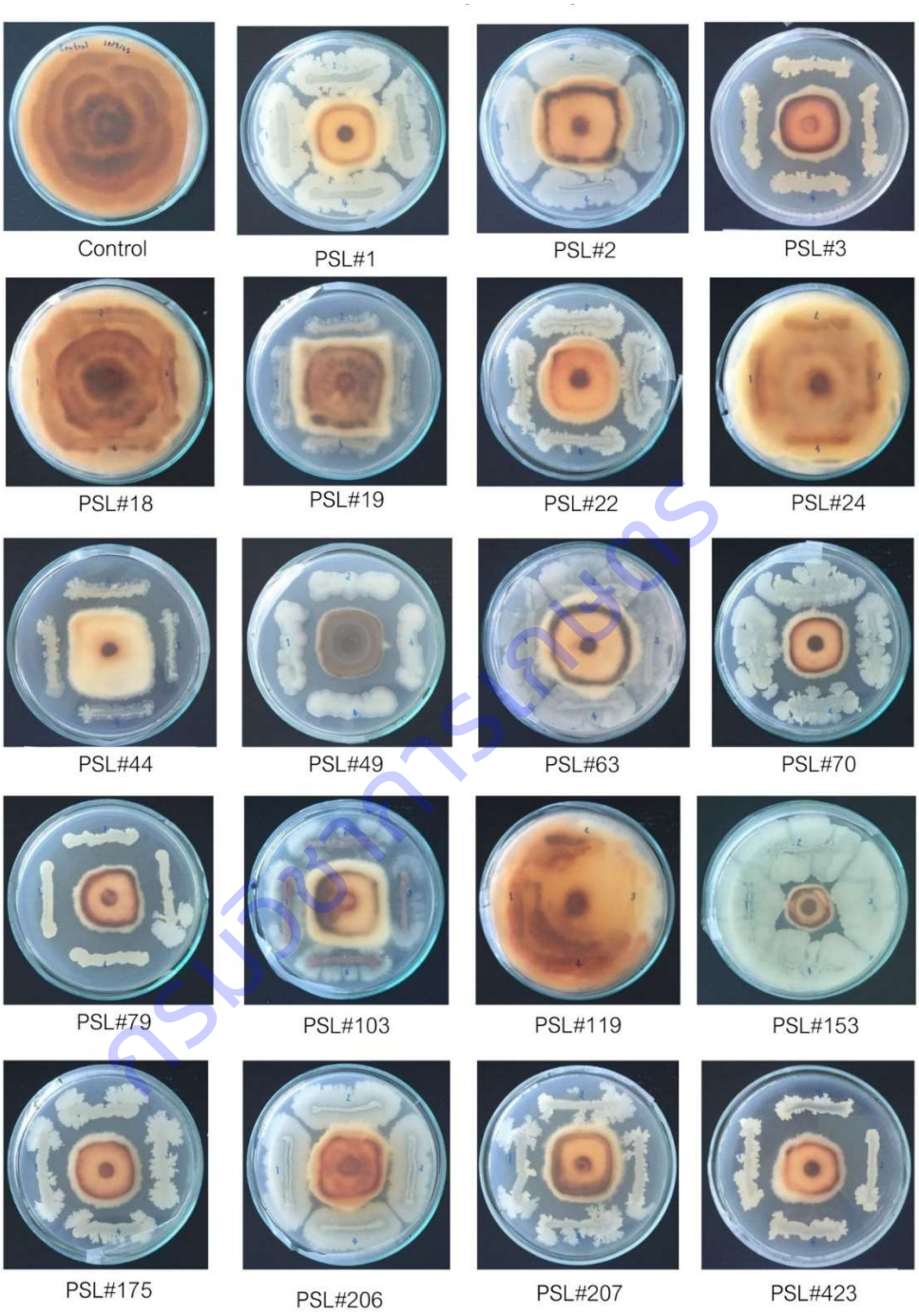
การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cercospora kikuchii*, *Phomopsis* sp. บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ ได้เชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ *streptomyces aminophillus, streptomyces alboniger* และ *streptomyces avellaneus* และเชื้อที่แยกได้ 19 ไอโซเลตต่อการยับยั้งเชื้อ *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp. พบว่าแอคติโนมัยสีททั้ง 3 สายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. kikuchii* และ *Phomopsis* sp. แต่พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 15 ไอโซเลต ให้ผลยับยั้งการเจริญได้ดี โดยไอโซเลต PSL 49 ยับยั้งได้ดีที่สุด (ภาพที่ 1) นอกจากนี้มีเพียง 3 ไอโซเลทที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Cercospora kikuchii* ได้แก่ ไอโซเลต PSL 18, PSL 24 และ PSL 119 ส่วนการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิสในถั่วเหลือง พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 16 ไอโซเลต ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phomopsis* sp. ได้ดี โดยมี 5 ไอโซเลต ที่ยับยั้งได้ดีที่สุด ได้แก่ ไอโซเลต PSL 49, PSL 70, PSL 79, PSL 175 และ PSL 423 (ภาพที่ 2) จะเห็นได้ว่าเชื้อไอโซเลท PSL 49 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp. ได้ดีดังนั้นจึงคัดเลือกไอโซเลท PSL 49 ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้ต่อการควบคุมเชื้อ *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลือง



ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้ต่อการควบคุมเชื้อ *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิส

การจำแนกเชื้อที่คัดเลือกได้โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบชีวเคมี

การจำแนกชนิดของเชื้อที่คัดเลือกได้ PSL 49 พบว่าโคโลนีที่เจริญบนอาหาร NA มีรูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก ผิวหน้าโคโลนีแห้ง เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนสั้น และสร้างเอนโดสปอร์ภายในเซลล์ สามารถสร้าง catalase สร้างเอ็นไซม์ย่อยแป้ง ย่อยเคซีน เมื่อเปรียบเทียบกับ The Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1 สามารถจัดอยู่ในสกุล Bacillus และทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบ API 50 CHB และแปรผลการทดลองด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป APIWEB พบว่าไอโซเลต PSL 49 จัดจำแนกเป็น *Bacillus subtilis* โดยมีเปอร์เซ็นต์การจัดจำแนก (% ID) 99.9 เปอร์เซ็นต์

ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อการควบคุมโรคที่สำคัญของถั่วเหลืองในสภาพเรือนทดลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้สายพันธุ์ PSL 49 ต่อการควบคุมโรคโดยกรรมวิธีต่างๆ ได้แก่ แช่เมล็ดถั่วเหลืองก่อนปลูก ใส่หรือเติมเชื้อลงในดินก่อนปลูก โรยเชื้อรอบโคนต้นในระยะต้นกล้า V1 พ่นเชื้อในระยะต้นกล้า V1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่พ่นด้วยน้ำเพียงอย่างเดียว ผลการทดสอบพบว่า ทุกกรรมวิธีมีค่าเฉลี่ยความสูงของต้น จำนวนฝักต่อต้น น้ำหนัก 100 เมล็ด เมล็ดดีเมล็ดเสีย ความงอก และปริมาณเชื้อ *C. kikuchii* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ให้ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่กรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในระยะต้นกล้า V1 พบการติดเชื้อ *C. kikuchii* น้อยสุด 41% ในขณะที่กรรมวิธีแช่เมล็ดก่อนปลูกและชุดควบคุมพบการติดเชื้อ *C. kikuchii* สูงสุดเท่ากับ 60% และ 52% ตามลำดับ (ตารางที่ 1) แต่อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ PSL 49 ซึ่งเป็นเชื้อสกุล Bacillus เชื้อกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ได้รับความนิยมในอันดับต้นๆ เนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นหลายประการ เช่น สามารถสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนทานต่อสารเคมี รังสี และความร้อนได้ดีกว่าเซลล์ปกติ เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ มีความทนต่ออุณหภูมิ ช่วงกว้างตั้งแต่ -5 ถึง 75 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ใน pH 2-8 ทนความเค็มของเกลือ NaCl ได้ถึง 25 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเจริญได้ในที่อุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียส นอกจากนี้แบคทีเรียสกุล *B. subtilis* ยังมีกลไกการเป็นปฏิปักษ์ที่สำคัญหลายรูปแบบ เช่น สามารถสร้างสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ได้โดยสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น bacillomycin, iturin, mycosubtilin, bacilysin, fengymycin และ mycobacillin (Zhao *et al*., 2013; Thasana *et al*., 2010; Gong *et al*., 2014; Cao *et al*., 2012) สารเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้นอกจากนั้นยังสามารถสร้างเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ glucanase ที่สามารถย่อยสลาย glucans และ chitinase ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราได้ แบคทีเรียสกุล *Bacillus subtilis* บางชนิดเมื่ออยู่ในสภาพที่ขาดธาตุเหล็ก จะสามารถสร้างสาร siderophoreได้ซึ่งสารดังกล่าวจะไปจับกับ ferric iron แล้วเคลื่อนย้ายเข้าสู่ตัวรับ (receptor) ที่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ซึ่งจะรบกวนกระบวนการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่อยู่บริเวณเดียวกันทำให้การเกิดโรคของพืชลดลงนอกจากนี้ ยังพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. หลายชนิด เป็น PGPR ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น ข้าวฟ่าง พริก มะเขือ เทศ และในพืชตระกูลกะหล่ำ เป็นต้น (กฤติเดช อนันต์และคณะ, 2559; Domenech *et al*., 2006) ดังนั้นเชื้อ PSL 49 จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการฉีดพ่นเพื่อควบคุมเชื้อราในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง แต่อาจจะต้องฉีดพ่นหลายครั้งเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลต PSL49 ต่อองค์ประกอบผลผลิต การเข้าทำลายของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และคุณภาพเมล็ดพันธุ์

กรรมวิธี	ความสูง (ซม.)	จำนวนฝักต่อต้น	น้ำหนัก 100 เมล็ด (กรัม)	เมล็ดดีต่อต้น	เมล็ดเสียต้อต้น	ความงอก (%)	*Cercospora kikuchii* Infection (%)
แช่เมล็ด	77.13	65	18.01	94	20	95	59.75
ใส่เชื้อในดินก่อนปลูก	75.18	56	18.04	92	20	93	42.00
โรยเชื้อรอบโคนต้นในระยะต้นกล้า V1	74.74	68	17.84	104	24	94	46.50
พ่นเชื้อในระยะต้นกล้า V1	78.94	64	18.92	95	38	91	41.00
พ่นด้วยน้ำ (ชุดควบคุม)	72.82	57	19.70	97	35	90	51.50
F-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	11.93	26.25	11.68	32.07	59.93	4.34	33.36

ns= ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (>0.05)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

- ผลการทดสอบจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 18 ไอโซเลทต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลืองบนอาหาร PDA ด้วยวิธีการ dual culture พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 15 ไอโซเลท ให้ผลยับยั้งการเจริญได้ดี โดยไอโซเลท PSL 49 ให้ผลยับยั้งได้ดีที่สุด ส่วนผลการทดสอบจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 19 ไอโซเลทต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิสในถั่วเหลืองบนอาหาร PDA ด้วยวิธีการ dual culture พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 16 ไอโซเลท ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phomopsis* sp. ได้ดี โดยมี 5 ไอโซเลท ที่ยับยั้งได้ดีที่สุด ได้แก่ PSL 49, PSL 70, PSL 79, PSL 175 และ PSL 423 สามารถคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลต PSL 49 ซึ่งยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลือง และเชื้อ *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิสได้ดี

- เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลต PSL 49 สามารถจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ผลทดสอบชีวเคมีและการใช้น้ำตาลด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHB พบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนทานต่อสารเคมี รังสี และความร้อนได้ดี

- กรรมวิธีพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในระยะต้นกล้า V1 พบการติดเชื้อ *C. kikuchii* น้อยสุดเท่ากับ 41% เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีการติดเชื้อ *C. kikuchii* เท่ากับ 51.5% จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการฉีดพ่นเพื่อควบคุมเชื้อราในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง แต่อาจจะต้องฉีดพ่นหลายครั้งเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

การทดลองที่ 6 ประสิทธิภาพของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคในถั่วเหลือง

Efficiency of bioactive elicitor for induced resistance gene expression against disease in soybean

อุปกรณ์

1. ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60
2. กระถางดินเผาขนาด 12 นิ้ว
3. สารเคมีสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ และเพิ่มขยายขนาดดีเอ็นเอ
4. เครื่อง ABI QuantStudioTM 6 (Applied Biosystems, Foster, city, CA, USA)

วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ฉีดพ่นด้วยเมทิลจัสโมเนต ความเข้มข้น 30 ppm
กรรมวิธีที่ 2 ฉีดพ่นด้วยเมทิลจัสโมเนต ความเข้มข้น 60 ppm
กรรมวิธีที่ 3 ฉีดพ่นด้วยเมทิลจัสโมเนต ความเข้มข้น 90 ppm
กรรมวิธีที่ 4 ฉีดพ่นด้วยเมทิลจัสโมเนต ความเข้มข้น 120 ppm
กรรมวิธีที่ 5 ฉีดพ่นด้วยเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 3,000 ppm
กรรมวิธีที่ 6 ฉีดพ่นด้วยเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 6,000 ppm
กรรมวิธีที่ 7 ฉีดพ่นด้วยเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 9,000 ppm
กรรมวิธีที่ 8 ฉีดพ่นด้วยเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 12,000 ppm
กรรมวิธีที่ 9 ฉีดพ่นด้วยเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 15,000 ppm
กรรมวิธีที่ 10 น้ำเปล่า (ชุดควบคุม)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ปลูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว จำนวน 3 กระถางต่อกรรมวิธีต่อกรรมวิธีหยอดเมล็ดกระถางละ 2 เมล็ด พ่นสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงวันหนอนเจาะลำต้น หลังจากงอกประมาณ 1 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 12-24-12 อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อถั่วเหลืองเจริญในระยะ R1 พ่นสารแต่ละกรรมวิธีทดลอง และดูแลรักษาแปลงตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตรจนถึงระยะเก็บเกี่ยว

2. การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Nucleo Spin Kit ยี่ห้อ MACHEREY-NAGEL โดยนำใบถั่วเหลืองหลังจากพ่นสาร 3 วัน มาบดในโกร่งบด สกัด Total RNA โดยชุดสกัดสำเร็จรูปตามวิธีการ ของบริษัท นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบ

3. การสังเคราะห์ cDNA นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ชุดน้ำยา ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover ยี่ห้อ TOYOBO มีส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตรรวม 8 ไมโครลิตร ที่มีองค์ประกอบได้แก่ อาร์เอ็นเอความเข้มข้น 0.5 pg-0.5 µg, 4X DN Master Mix 2 ไมโครลิตร, Nuclease-free Water 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียลเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดแล้ว

กรมวิชาการเกษตร

นำไปทำปฏิกิริยาต่อไปโดยมีส่วนผสมปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ที่มีองค์ประกอบของ Reacted solution ที่ได้จากข้างต้น 8 ไมโครลิตร และ 5x RT Master Mix II 2 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Thermal cycles โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ 37°C เป็นเวลา 15 นาที, 50°C เป็นเวลา 5 นาที และ 98°C เป็นเวลา 5 นาที

4. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR ศึกษาการแสดงออกของ PR gene โดยใช้ Soy Actin gene เป็นยีนอ้างอิงซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ดังนี้ PR2: Forward (5'-GTCTCCTTCGGTGGTAGTG), Reverse (5'-ACCCTCCTCCTGCTTTCTC) PR4: Forward (5'-GCTTGCGGGTGACAAATAC), Reverse (5'-ACACTCCCACGTCCAAATC) PR10: Forward (5'-GCCCAGGAACCATCAAGAAG), Reverse (5'-CGCTGTAGCTGTATCCCAAG) Actin: Forward (5'-GAGCTATGAATTGCCTGATGG), Reverse (5'-CGTTTCATGAATTCCAGTAGC) การเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยชุดน้ำยา THUNDERBIRD® SYBR®qPCR Mix ยี่ห้อ TOYOBO ในปฏิกริยาปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย cDNA ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้น 1 ไมโครลิตร, Forward-primer 1 ไมโครลิตร, Reverse-primer 1 ไมโครลิตร, THUNDERBIRD® SYBR®qPCR Mix 4 ไมโครลิตร 50X Rox dye 0.04 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 12.96 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยาไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและวิคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเครื่อง Real-time PCR รุ่น ABI QuantStudioTM 6 (Applied Biosystems, Foster, city, CA, USA) โดยกำหนดสภาวะ ดังนี้ Pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที Denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที และ Extension 60 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที 40 รอบ ตามด้วยวิเคราะห์ melting curve เพื่อยืนยันว่า ผลิตภัณฑ์ (PCR product) ที่ได้จากการศึกษา ด้วยวิธี real-time PCR เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ถูกต้องมักจะแสดง peak เดียวที่อุณหภูมิสูง ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการจับ แบบไม่จำเพาะ (non-specific product) หรือ primer-dimer จะให้ peak ที่มีขนาดกว้างที่อุณหภูมิต่ำ การทำปฏิกริยาแต่ละครั้งจะมี negative control และ ชุดน้ำยามาตรฐานที่เตรียมจาก RT-PCR product การวิเคราะห์ผลจะเป็นการคำนวณแบบสัมพัทธ์ (Relative quantification) โดยหาอัตราส่วนการแสดงออกของยีน protein PR ต่อการแสดงออกของยีนอ้างอิง housekeeping gene ได้แก่ Soy actin โดยทำการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิงก่อนว่ามีความเหมาะสมหรือไม่ ก่อนนำไปคำนวณสูตร Comparative Ct ($2^{-\Delta\Delta}Ct$) (Livak and Schmittgen, 2001)

การบันทึกข้อมูล

- องค์ประกอบของผลผลิตได้แก่ ความสูง จำนวนข้อ/ต้น จำนวนกิ่ง/ต้น จำนวนฝัก/ต้น และจำนวนเมล็ด/ฝัก น้ำหนัก 1,000 เมล็ด
- คำนวณเปอร์เซ็นต์เมล็ดติดเชื้อโดยวิธี Blotter method
- คุณภาพเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ความงอก ความแข็งแรง
- การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบการต้านทานโรค

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา (เริ่มต้น - สิ้นสุด) ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

สถานที่ดำเนินการ ศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

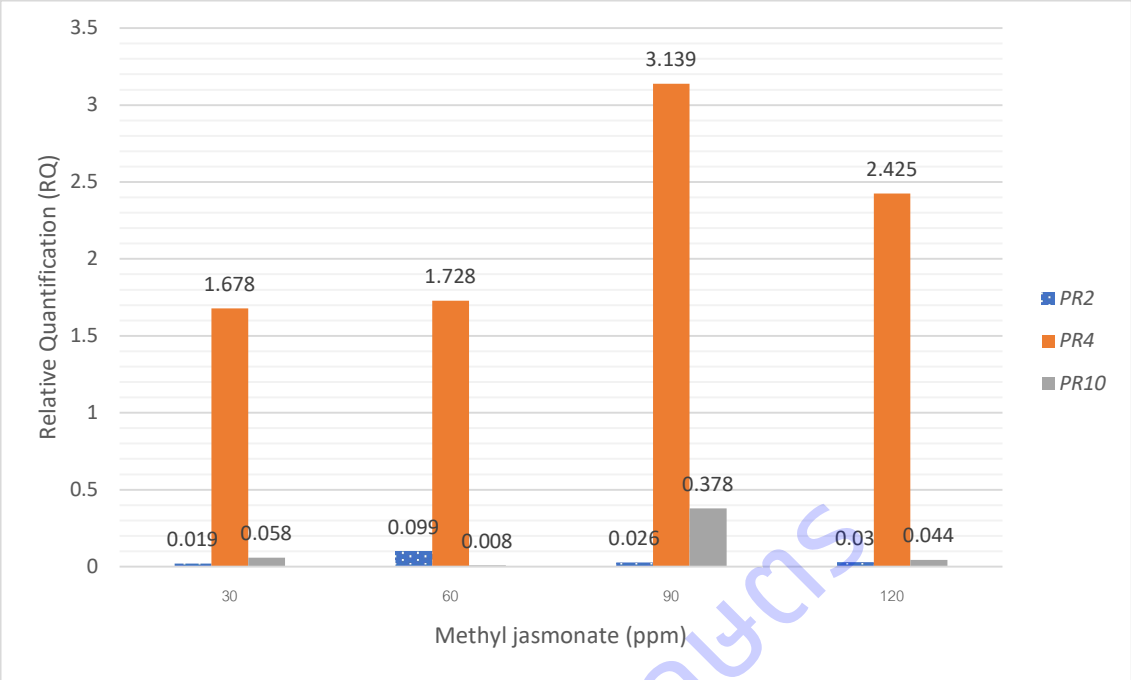
กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและอภิปราย

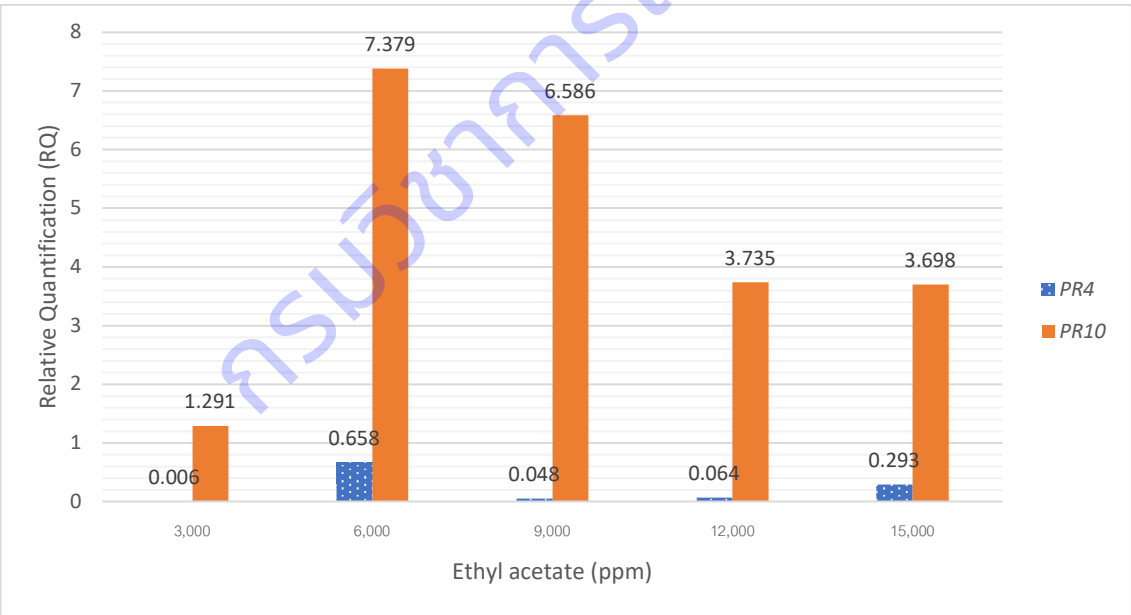
ผลของไบโออิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของยีน

จากการทดลองฉีดพ่นถั่วเหลืองด้วยอิลิซิเตอร์ได้แก่ เมทิลจัสโมเนตที่ความเข้มข้น 30, 60, 90 และ 120 ppm พบว่าหลังฉีดพ่นเป็นระยะเวลา 3 วัน มีการแสดงออกของยีน *PR4* สูงสุดที่ความเข้มข้น 90 ppm โดยมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 3.1 เท่า เมื่อเทียบกับ housekeeping gene (HKG) รองลงมาที่ความเข้มข้น 120 ppm มีการแสดงออกของยีน *PR4* เพิ่มขึ้น 2.4 เท่า ขณะที่ยีน *PR2* และ *PR10* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Agrawal และคณะ 2003 พบว่าการฉีดพ่น JA และ ABA ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.1% (v/v) ในต้นกล้าข้าวอายุ 2 สัปดาห์ สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *OsPR4* mRNA อย่างยิ่ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานว่าจาสโมนิกช่วยให้พืชทนต่อโรคจากเชื้อราและทนต่อความเครียดที่มีจากหลายสาเหตุเนื่องจากกรดจาสโมนิกมีบทบาทเหนี่ยวนำให้พืชสังเคราะห์เมแทบอไลต์ทุติยภูมิ ประเภทสารอัลคาลอยด์ (Yan and Xie, 2015) ขณะที่การฉีดพ่นถั่วเหลืองด้วยเอทิลอะซีเตทที่ความเข้มข้น 3,000, 6,000, 9,000, 12,000 และ 15,000 ppm กลับพบว่ายีน *PR10* มีการแสดงออกสูงสุด โดยเอทิลอะซีเตทที่ความเข้มข้น 6,000 ppm มีการเพิ่มการแสดงออกของยีนสูงสุดเท่ากับ 7.4 เท่า รองลงมาที่ความเข้มข้น 9,000 ppm การแสดงออกของยีนสูงสุดเท่ากับ 6.6 เท่า ส่วนยีน *PR4* มีการเพิ่มการแสดงออกเพิ่มขึ้น 0.6 เท่าที่ความเข้มข้นของเอทิลอะซีเตท 6,000 ppm แต่อย่างไรก็ตามไม่พบการแสดงออกของยีน *PR2* ทุกความเข้มข้นของเอทิลอะซีเตท (ภาพที่ 2) จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการฉีดพ่นถั่วเหลืองด้วยอิลิซิเตอร์ได้แก่ เมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซีเตท สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนโปรตีน *PR* ที่เกี่ยวข้องกับระบบความต้านทานโรค ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีบทบาทในการป้องกันการรุกรานของเชื้อทั้งในระบบการตอบสนองแบบเฉียบพลันหรือแบบกระจายเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อกระจายเพิ่มขึ้น มีการค้นพบว่าการสังเคราะห์โปรตีน PR ถูกควบคุมตั้งแต่กระบวนการถอดรหัสของยีน โปรตีน *PR* จะถูกสังเคราะห์ขึ้นหลังจากได้รับเชื้ออย่างน้อย 8 ชั่วโมง (Matsuoka and Ohashi, 1986) และโปรตีนนี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นเฉพาะบริเวณที่ถูกกระตุ้น แต่จะไม่มีการส่งโปรตีน PR ไปยังบริเวณอื่น เนื่องจากโปรตีน PR มีบทบาทสำคัญต่อการจัดการโรค

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1 ผลของความเข้มข้นของเมทิลจัสโมเนตต่อการแสดงออกของยีน *PR2, PR4* และ *PR10* ในถั่วเหลือง



ภาพที่ 2 ผลของความเข้มข้นของเอทิลอะซีเตทต่อการแสดงออกของยีน *PR4* และ *PR10* ในถั่วเหลือง

ผลของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการเจริญเติบโต และองค์ประกอบผลผลิต

จากการพ่นสารเมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซีเตทกับต้นถั่วเหลืองตามกรรมวิธศึกษา พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของสารให้ผลของจำนวนข้อต่อต้น จำนวนกิ่งต่อต้นและน้ำหนัก 100 เมล็ดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิต แต่ความสูง จำนวนฝักต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อต้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่ง

กรมวิชาการเกษตร

การพ่นสารเมทิลจัสโมเนต มีความสูงอยู่ระหว่าง 65-81 เซนติเมตร จำนวนข้อ 14-16 ข้อต่อต้น จำนวนกิ่ง 2 กิ่งต่อต้น จำนวนฝัก 49-80 ฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น 79-136 เมล็ด ซึ่งการพ่นด้วยเมทิลจัสโมเนตที่ระดับความเข้มข้น 120 ppm มีผลทำให้ต้นถั่วเหลืองมีความสูง จำนวนฝักต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อต้นสูงสุดเท่ากับ 81 เซนติเมตร จำนวนฝัก 80 ฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น 136 เมล็ด (ตารางที่ 1) ในขณะที่การพ่นด้วยเอทิลอะซีเตทมีความสูงอยู่ระหว่าง 66-76 เซนติเมตร จำนวนข้อ 14-16 ข้อต่อต้น จำนวนกิ่ง 2-3 กิ่งต่อต้น จำนวนฝัก 57-93 ฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้นเท่ากับ 102-161 เมล็ด

ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้นของเมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซิเตทต่อการเจริญและองค์ประกอบผลผลิตของถั่วเหลือง

กรรมวิธี	ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนข้อต่อต้น	จำนวนกิ่งต่อต้น	จำนวนฝักต่อต้น	จำนวนเมล็ดต่อต้น	จำนวนเมล็ดเสียต่อต้น	น้ำหนัก 100 เมล็ด (กรัม)
Methyl jasmonate 30 ppm	74.99ab	15a[1/]	2a	70abc	109abc	24ab	17.90a
Methyl jasmonate 60 ppm	65.44a	14a	2a	49a	79a	8a	16.66a
Methyl jasmonate 90 ppm	75.28ab	15a	2a	62ab	91ab	22ab	18.17a
Methyl jasmonate 120 ppm	81.52b	16a	2a	80bc	136bcd	25b	17.14a
Ethyl acetate 3,000 ppm	72.61ab	16a	2a	69abc	122abcd	15ab	17.05a
Ethyl acetate 6,000 ppm	76.91ab	15a	2a	57ab	102abc	12ab	17.31a
Ethyl acetate 9,000 ppm	73.41ab	15a	2a	66ab	140cd	15ab	16.62a
Ethyl acetate 12,000 ppm	66.56a	14a	3a	71abc	112abc	23ab	17.91a
Ethyl acetate 15,000 ppm	69.57ab	15a	3a	93c	161d	14ab	16.81a
Water (control)	71.84ab	15a	3a	57ab	95abc	13ab	17.67a
Mean	72.81	15	2.3	67.4	114.7	17.1	17.32
C.V. (%)	9.94	7.93	3.05	24.70	27.46	50.29	6.64

[1/] ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%จากการทดสอบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ผลของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

การพ่นสารเมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซีเตทกับต้นถั่วเหลืองทำให้คุณภาพด้านความงอกและความแข็งแรงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิต ซึ่งต้นถั่วเหลืองหลังจากพ่นสารสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ หลังการเก็บเกี่ยวเมล็ดถั่วเหลืองมีความงอกมาตรฐานเฉลี่ย 98 เปอร์เซ็นต์ และ ความแข็งแรงเฉลี่ย 98 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) นอกจากนี้การพ่นสารด้วยเมทิลจัสโมเนต ความเข้มข้น 90 ppm สามารถลดปริมาณเชื้อ *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลืองได้สูงถึง 80%

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้นเมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซิเตทต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและปริมาณการเข้าทำลายของเชื้อ *C. kikuchii*

กรรมวิธี	ความงอกมาตรฐาน (%)	ความแข็งแรงโดยวิธีเร่งอายุ (%)	ปริมาณการเข้าทำลายของเชื้อ *C. kikuchii* (%)
เมทิลจัสโมเนต 30 มิลลิกรัมต่อลิตร	97a[1/]	98a	68b
เมทิลจัสโมเนต 60 มิลลิกรัมต่อลิตร	98a	98a	42ab
เมทิลจัสโมเนต 90 มิลลิกรัมต่อลิตร	98a	98a	20a
เมทิลจัสโมเนต 120 มิลลิกรัมต่อลิตร	97a	97a	39ab
เอทิลอะซิเตท 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร	96a	99a	60b
เอทิลอะซิเตท 6,000 มิลลิกรัมต่อลิตร	96a	98a	49ab
เอทิลอะซิเตท 9,000 มิลลิกรัมต่อลิตร	97a	97a	54b
เอทิลอะซิเตท 12,000 มิลลิกรัมต่อลิตร	99a	97a	47ab
เอทิลอะซิเตท 15,000 มิลลิกรัมต่อลิตร	98a	97a	58b
น้ำ (ชุดควบคุม)	98a	98a	57b
C.V. (%)	1.88	1.97	38.10

[1/] ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%จากการทดสอบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

- จากการฉีดพ่นถั่วเหลืองด้วยอิลิซิเตอร์ 2 ชนิดคือ เมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซีเตท พบว่าการฉีดพ่นเมทิลจัสโมเนตให้ผลดีที่สุด โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 90 ppm ทำให้ถั่วเหลืองมีการแสดงออกของยีน *PR4* สูงสุด โดยมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 3.1 เท่า สำหรับผลของเมทิลจัสโมเนตต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบผลผลิต และผลผลิตถั่วเหลืองพบว่า ถั่วเหลืองมีจำนวนข้อต่อต้น จำนวนกิ่งต่อต้นและน้ำหนัก 1000 เมล็ดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิต แต่ความสูง จำนวนฝักต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อต้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยิ่งไปกว่านั้นการพ่นสารด้วยเมทิลจัสโมเนต ความเข้มข้น 90 ppm เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่มีผลต่อการลดปริมาณเชื้อ *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลืองได้ดีที่สุด

- การศึกษาด้าน *PR* ยีนจะเป็นแนวทางหนึ่งที่มีประโยชน์ต่อระบบการป้องกันโรคของพืช การใช้เทคนิคด้านพันธุวิศวกรรมที่เกี่ยวข้อง รวมถึงการเพิ่มการแสงออกของยีนที่เกี่ยวข้องโปรตีน PR ด้วยกลไกการป้องกันต่างๆต่อเชื้อสาเหตุโรคสามารถประยุกต์ใช้ได้กว้างขวางต่อการต้านทานโรคต่างๆ ดังนั้นพืชดัดแปรพันธุกรรมที่มีความสามารถในการเพิ่มการแสดงออกหรือรวมกันของโปรตีน PR สามารถนำมาใช้สำหรับการจัดการโรคที่มีประสิทธิภาพและประสบความสำเร็จได้ ในเบื้องต้นของการควบคุมยีนของโปรตีน PR นั้นเป็นที่เข้าใจกัน แต่การศึกษากลไกที่แน่นอนของการควบคุมยีนและการรับยีนจะทำให้เกิดวิธีการใหม่สำหรับเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมสำหรับพืชเพื่อป้องกันโรคพืชได้ในอนาคต

การทดลองที่ 7 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Phomopsis* sp. (*Diaporthe*) และประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราในการควบคุมโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิสในถั่วเหลือง

Genetic Diversity of *Phomopsis* sp. (*Diaporthe*) and The Efficiency of Fungicides for Controlling Phomopsis Seed Decay

อุปกรณ์

1. เมล็ดถั่วเหลือง พันธุ์เชียงใหม่ 60
2. สารเคมีป้องกันกำจัดโรค
3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ
4. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำ 13 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 Azoxystrobin 25%SC
กรรมวิธีที่ 2 Captan 50%WP
กรรมวิธีที่ 3 Carbendazim 50%WP
กรรมวิธีที่ 4 Chlorothalonil 75% WP
กรรมวิธีที่ 5 Difenoconazole 25% W/V EC
กรรมวิธีที่ 6 Dimethomorph 50WP
กรรมวิธีที่ 7 Fosetyl-aluminium 80%WP
กรรมวิธีที่ 8 Kasugamycin hydrochloride hydrate 2% W/V SL
กรรมวิธีที่ 9 Mancozeb 80%WP
กรรมวิธีที่ 10 Mancozeb + valifenalate 60%+6% WG
กรรมวิธีที่ 11 Propiconazole
กรรมวิธีที่ 12 Thiophanate-methyl 70% WP
กรรมวิธีที่ 13 น้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

1. แยกเชื้อ *Phomopsis* sp จากเมล็ดถั่วเหลืองที่มีอาการเป็นโรคให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

2. เตรียมเชื้อ *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคพืช โดยนำเชื้อเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่ อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดวุ้นอาหารบริเวณส่วนปลายเส้นใยของเชื้อรา เพื่อนำไปทดสอบ

3. ทดสอบหาความเข้มข้นของสารป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Phomopsis* sp. โดยวิธี poison food technique โดยนำสารป้องกันกำจัดโรคพืชที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามอัตราความเข้มข้นกำหนดไว้ 3 อัตรา คือ ต่ำกว่าอัตราแนะนำ 0.5 เท่า อัตราแนะนำตาม

กรมวิชาการเกษตร

ฉลาก และสูงกว่าอัตราแนะนำ 0.5 เท่า เจือจางในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปผสมกับอาหาร PDA ที่หลอมเหลว ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เขย่าให้อาหารและสารเคมีผสมเข้ากันทั่วถึง แล้วเทอาหารที่มีสารป้องกันกำจัดโรคพืชความเข้มข้นต่างๆลง ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ เมื่อผิวหน้าอาหารแห้งจึงวางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อ *Phomopsis* sp. ที่เตรียมจากข้างต้น โดยวางตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ วางจานเลี้ยงเชื้อทดสอบนี้ไว้ในห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราเมื่อโคโลนีของเชื้อราในจานควบคุมที่ไม่มีสารป้องกันกำจัดโรคพืชเจริญเต็มจานและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = $100-(\frac{r^2 \times 100}{R^2})$

R = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของชุดควบคุม, r = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของชุดทดสอบ

2. บันทึกภาพลักษณะเส้นใยบนจานอาหาร

ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดเชื้อ *Phomopsis* sp.

วางแผนการทดลองแบบ RCBD ประกอบด้วย 10 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วย Thiophanate-methyl ที่ระยะ R3 (ระยะเริ่มติดฝัก)

กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วย Thiophanate-methyl ที่ระยะ R5 (ระยะเริ่มติดเมล็ด)

กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วย Thiophanate-methyl ที่ระยะ R3 (ระยะเริ่มติดฝัก) และระยะ R5 (ระยะเริ่มติดเมล็ด)

กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วย Difenoconazole ที่ระยะ R3 (ระยะเริ่มติดฝัก)

กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วย Difenoconazole ที่ระยะ R5 (ระยะเริ่มติดเมล็ด)

กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วย Difenoconazole ที่ระยะ R3 (ระยะเริ่มติดฝัก) และระยะ R5 (ระยะเริ่มติดเมล็ด)

กรรมวิธีที่ 7 พ่นด้วย Carbendazim ที่ระยะ R3 (ระยะเริ่มติดฝัก)

กรรมวิธีที่ 8 พ่นด้วย Carbendazim ที่ระยะ R5 (ระยะเริ่มติดเมล็ด)

กรรมวิธีที่ 9 พ่นด้วย Carbendazim ที่ระยะ R3 (ระยะเริ่มติดฝัก) และระยะ R5 (ระยะเริ่มติดเมล็ด)

กรรมวิธีที่ 10 พ่นน้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

ดำเนินการปลูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ในฤดูฝน เดือน มิถุนายน – สิงหาคม 2564 ณ แปลงทดลองของ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก โดยระยะปลูก 50 x 20 เซนติเมตร หยอดเมล็ดหลุมละ 5 เมล็ด หลังจากหยอดเมล็ดและกลบหลุมดีแล้ว พ่นสารเคมีคุมวัชพืชก่อนถั่วเหลืองงอก โดยใช้อลาคลอร์ อัตรา 500 มิลลิลิตรต่อไร่ หลังจากปลูก 7 วัน พ่นสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงวันหนอนเจาะลำต้น ถอนแยกต้นถั่วเหลืองให้เหลือหลุมละ 2-3 ต้น หลังจากงอกประมาณ 1 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 12-24-12 อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ โดยโรยข้างแถวแล้วกลบปุ๋ย

เตรียมสารละลายสารป้องกันกำจัดโรคพืชพ่นลงบนต้นถั่วเหลืองตามกรรมวิธี ดูแลตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตรจนถึงระยะสุกแก่ทางสรีระ เก็บเกี่ยวถั่วเหลืองมาตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ได้แก่

กรมวิชาการเกษตร

ตรวจสอบความงอกมาตรฐานโดยการเพาะความงอกด้วยทราย จำนวน 100 เมล็ด/ซ้ำ จำนวน 4 ซ้ำ ระยะเวลา 8 วัน แล้วประเมินความงอกมาตรฐาน (ISTA, 2020) ความแข็งแรงโดยวิธีการเร่งอายุ (accelerated aging test) นำเมล็ดไปเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 98±2 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จำนวน 100 เมล็ดต่อซ้ำ เมื่อครบกำหนดนำเมล็ดไปเพาะความงอกตามวิธีการทดสอบความงอกมาตรฐาน และตรวจเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (Blotter method) โดยการสุ่มเมล็ดถั่วเหลืองมา 400 เมล็ด นำไปวางบนกระดาษเพาะที่ชื้นในจานเพาะเชื้อจำนวน 10 เมล็ดต่อจาน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ (20-25 องสาเซลเซียส) โดยให้แสง NUV 12 ชั่วโมง สลับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากครบกำหนดการบ่มนำจานเพาะไปตรวจสอบเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การบันทึกข้อมูล

- เปอร์เซ็นต์เมล็ดติดเชื้อ
- เปอร์เซ็นต์เมล็ดเน่าโฟมอปซิส
- คุณภาพเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ความงอก เปอร์เซ็นต์ความแข็งแรง

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินการ เริ่ม ตุลาคม 2562 – สิ้นสุด กันยายน 2564

ดำเนินการ ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก จ. พิษณุโลก

ผลการทดลองและอภิปราย

ประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราในการควบคุมโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิสในถั่วเหลือง

เชื้อ *Phomopsis* sp. (Diaporthe) ที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลืองที่มีอาการของโรคเมล็ดเน่า และแยกให้เชื้อบริสุทธิ์เมื่อมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้แก่ ลักษณะเส้นใย รูปร่างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อมีเส้นใยเจริญอย่างรวดเร็วปกคลุมเมล็ด เชื้อมีการสร้างโคนิเดียมีลักษณะ elliptical และ hyaline (มีขนาด 6.2 - 7.2 × 2.6 - 3.2 μm) โคโลนีที่เจริญบนอาหารมีลักษณะเป็นกลุ่ม แน่นสีขาว Stromata มีขนาดใหญ่ สีดำและกระจายทั่วทั้งจาน และจากการทดสอบสารป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Phomopsis* sp. โดยวิธี poison food technique โดยนำสารป้องกันกำจัดโรคพืชที่ต้องการทดสอบที่มีความแตกต่างตามกลไกความต้านทานของสารป้องกันกำจัดเชื้อราหรือ Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) โดยสารที่นำมาทดสอบสามารถแบ่งกลุ่มได้ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ Thiophanate-methyl และ Carbendazim ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์โดยการยับยั้งกระบวนการ mitosis และการแบ่งเซลล์ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ Difenoconazole และ Propiconazole กลุ่มที่ 11 ได้แก่ Azoxystrobin มีผลยับยั้งการหายใจของเชื้อรา กลุ่มที่ 24 ได้แก่ Kasugamycin ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน กลุ่มที่ 33 ได้แก่ Fosetyl-Al ซึ่งยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ กลุ่มที่ 40 ได้แก่ Dimethomorph ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ และสุดท้ายคือ กลุ่ม M ได้แก่ Mancozeb, Captan, Chlorothalonil ซึ่งมีผลป้องกันเชื้อราได้หลายจุด (multi-site action) โดยทำการทดสอบสารที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามอัตราความเข้มข้นกำหนดไว้ 4 อัตรา คือ ต่ำกว่าอัตราแนะนำ อัตราแนะนำตามฉลาก และสูงกว่าอัตราแนะนำ 0.5

กรมวิชาการเกษตร

เท่า ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิสในถั่วเหลือง พบว่าสารเคมีทั้ง 12 ชนิดมีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้แตกต่างกัน เนื่องจากสารเคมีแต่ละชนิดมีกลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (fungistatic) ที่แตกต่างกัน สารที่ยับยั้งได้ดีที่สุด ได้แก่ Carbendazim, Thiophanate-methyl, Difenoconazole ซึ่งเป็นสารแบบดูดซึมและ Mancozeb ซึ่งเป็นสารแบบสัมผัส ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยสารเคมีแบบดูดซึมที่ค่อนข้างเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุโรค ได้แก่ carbendazim และ thiophanate-methyl ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสปอร์ใส (hyaline) ในขณะที่ difenoconazole ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้หลายชนิด (broad spectrum) จึงเหมาะต่อการใช้สลับกับสาร carbendazim และ thiophanate-methyl ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Methyl Benzimidazole Carbamates ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดการดื้อยาและยังมีความเสี่ยงที่จะเกิดความต้านทานข้าม (cross-resistance) ระหว่างสารเคมีที่เป็นสมาชิกในกลุ่มนี้ (FRAC, 2012) สารแบบสัมผัสที่ยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ทุกชนิดคือ mancozeb จึงใช้เพื่อป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ได้ทุกระยะของพืช อีกทั้งมีความเสี่ยงต่ำต่อการดื้อยาจึงเหมาะที่จะใช้สลับกับสารแบบดูดซึม หรือสารที่มีความเสี่ยงต่อการดื้อยาสูงเพื่อป้องกันการดื้อยา

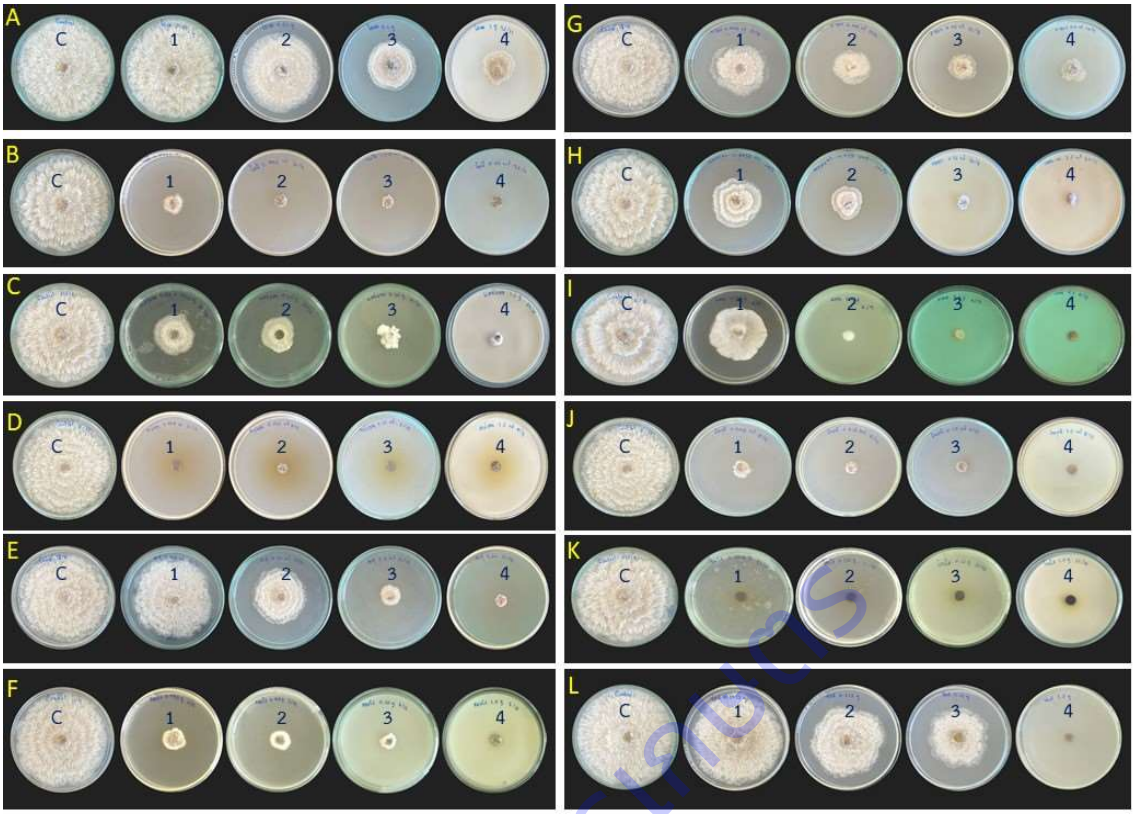
ตารางที่ 1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันกำจัดเชื้อราต่อการยับยั้ง *Phomopsis* sp.

ชนิดของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา	**ความเข้มข้น (มก./ลิตร)**	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *Phomopsis* sp.**
Azoxystrobin	5	38.71
	50	59.90
	500	67.51
	5000	73.73
Captan	1.5	41.50
	15	61.65
	150	69.90
	1500	82.52
Carbendazim	1.5	100
	15	100
	150	100
	1500	100
Chlorothalonil	1.5	73.57
	15	78.05
	150	83.79
	1500	100
Difenoconazole	0.5	77.50
	5	100
	50	100

กรมวิชาการเกษตร

	500	100
Dimethomorph	1	0
	10	18.44
	100	47.11
	1000	63.33
Fosetyl-aluminium	1.5	3.11
	15	16.22
	150	30.67
	1500	100
Kasugamycin hydrochloride hydrate	4	6.26
	40	35.57
	400	76.96
	4000	100
Mancozeb	4	18.65
	40	100
	400	100
	4000	100
Mancozeb+valifenalate	2.5	50.78
	25	67.78
	250	85.68
	2500	100
Propiconazole	1.5	80.09
	15	87.41
	150	100
	1500	100
Thiophanate-methyl	1.5	100
	15	100
	150	100
	1500	100

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราต่อการยับยั้งเชื้อ *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิสในถั่วเหลือง

จากการทดสอบช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดเชื้อ *Phomopsis* sp. ที่คัดเลือกได้ 3 ชนิดได้แก่ Thiophanate-methyl, Difenoconazole และ Carbendazim โดยทำการฉีดพ่นที่ระยะ R3 (ระยะเริ่มติดฝัก), R5 (ระยะเริ่มติดเมล็ด) และระยะ R3+R5 ในสภาพแปลงทดลอง ในฤดูฝน ปี 2564 ระหว่างเดือนมิถุนายน – เดือนสิงหาคม พบว่า เปอร์เซ็นต์การพบเชื้อ *Phomopsis* sp และ *Cercospora kikuchii* ในเมล็ดพันธุ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ แต่กรรมวิธีพ่นด้วย Thiophanate-methyl ที่ระยะ R3+R5 พบเชื้อ *Phomopsis* sp น้อยที่สุดเท่ากับ 3.5% และ *Cercospora kikuchii* เท่ากับ 10.75% (ตารางที่ 2) เช่นเดียวกับคุณภาพเมล็ดพันธุ์ได้แก่ ความงอก ไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ แต่ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีความงอกสูงสุด 46% มีเปอร์เซ็นต์การพบเชื้อ *Phomopsis* sp. อยู่ระหว่าง 3.5-6.75 และ เปอร์เซ็นต์การพบเชื้อ *Cercospora kikuchii* อยู่ระหว่าง 11.25-17.25 ซึ่งไม่แตกต่างกับชุดควบคุมที่พ่นด้วยน้ำเปล่า ทั้งนี้เนื่องจากในระหว่างการทดลองถั่วเหลืองประสบปัญหาฝนตกหนักในช่วงใกล้เก็บเกี่ยวทำให้ต้นถั่วเหลืองล้ม ฝักสัมผัสดินมีเชื้อราและแมลงเข้าทำลาย เมล็ดถั่วเหลืองไม่ได้คุณภาพ

ศูนย์วิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดเชื้อ *Phomopsis* sp. และคุณภาพเมล็ดพันธุ์

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การพบเชื้อ *Phomopsis* sp.	เปอร์เซ็นต์การพบเชื้อ *C. kikuchii*	ความงอก (%)	ความแข็งแรง (%)
1. พ่นด้วย Thiophanate-methyl ที่ระยะ R3	3.75	17.00	34.00	19.75ab
2. พ่นด้วย Thiophanate-methyl ที่ระยะ R5	4.24	16.50	33.25	16.00a
3. พ่นด้วย Thiophanate-methyl ที่ระยะ R3+R5	3.50	10.75	34.00	17.75ab
4. พ่นด้วย Difenoconazole ที่ระยะ R3	4.50	12.00	31.75	17.75ab
5. พ่นด้วย Difenoconazole ที่ระยะ R5	6.75	15.75	29.75	18.75ab
6. พ่นด้วย Difenoconazole ที่ระยะ R3+R5	5.00	17.25	46.00	21.75ab
7. พ่นด้วย Carbendazim ที่ระยะ R3	6.50	11.25	35.50	25.75b
8. พ่นด้วย Carbendazim ที่ระยะ R5	4.25	15.75	31.75	16.00a
9. พ่นด้วย Carbendazim ที่ระยะ R3+R5	6.00	14.25	38.00	19.50ab
10. พ่นด้วยน้ำ (ชุดควบคุม)	4.50	17.25	39.75	18.00ab
F-test	ns	ns	ns	*

หมายเหตุ * = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$), ns= ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (>0.05)

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

- สารที่ยับยั้งเชื้อ *Phomopsis* sp. ได้ดีที่สุด ได้แก่ Carbendazim, Thiophanate-methyl, Difenoconazole ซึ่งเป็นสารแบบดูดซึม และ Mancozeb ซึ่งเป็นสารแบบสัมผัส กรรมวิธีพ่นด้วย Thiophanate-methyl ที่ระยะ R3+R5 สามารถลดปริมาณเชื้อ *Phomopsis* sp และ *Cercospora kikuchii* ได้สูงสุด
- สารเคมีแบบดูดซึมที่ค่อนข้างเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุโรค ได้แก่ carbendazim และ thiophanate-methyl ในขณะที่ difenoconazole ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้หลายชนิด (broad spectrum) จึงเหมาะต่อการใช้สลับกับสาร carbendazim และ thiophanate-methyl
- สารแบบสัมผัสที่ยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ทุกชนิดคือ mancozeb จึงใช้เพื่อป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ได้ทุกระยะของพืช อีกทั้งมีความเสี่ยงต่ำต่อการดื้อยาจึงเหมาะที่จะใช้สลับกับสารแบบดูดซึม หรือสารที่มีความเสี่ยงต่อการดื้อยาสูงเพื่อป้องกันการดื้อยา

กรมวิชาการเกษตร

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาแนวทางในการจัดการโรคที่สำคัญของการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ได้แก่ เชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงและเชื้อรา *Phomopsis* sp สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอป การศึกษาการจัดการโรคได้ดำเนินการ 3 วิธีการ ได้แก่

วิธีทางเคมีโดยการใช้สารกำจัดเชื้อรา พบว่าสารเคมีที่เหมาะสมต่อการควบคุมเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงคือ Propiconazole + Difenoconazole 15%+15% EC โดยฉีดพ่นที่ระยะ R2 (ระยะออกดอกเต็มที่) และ R6 (ระยะเมล็ดพัฒนาเต็มที่) สารเคมีที่เหมาะสมต่อการควบคุมเชื้อรา *Phomopsis* sp สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอป ได้แก่ Carbendazim, Thiophanate-methyl, Difenoconazole ซึ่งเป็นสารแบบดูดซึม และ Mancozeb ซึ่งเป็นสารแบบสัมผัส กรรมวิธีพ่นด้วย Thiophanate-methyl ที่ระยะ R3 (ระยะเริ่มติดฝัก) และระยะ R5 (ระยะเริ่มติดเมล็ด) สามารถลดปริมาณเชื้อ *Phomopsis* sp และ *Cercospora kikuchii* ได้สูงสุด

วิธีทางกายภาพโดยการใช้แสงยูวีซี มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus niger* ได้ดีเมื่อได้รับแสงยูวีซีเป็นเวลา 10 นาทีขึ้นไป ในขณะที่แสงยูวีซีไม่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเมล็ดพันธุ์ *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp. เมล็ดที่ได้รับการแสงยูวีซีที่นานขึ้นพบว่าความงอกมีแนวโน้มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับแสง ดังนั้นแสงยูวีซีมีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในด้านการกำจัดเชื้อที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์รวมทั้งยังสามารถส่งเสริมความงอกของเมล็ดพันธุ์อีกด้วย

วิธีทางชีวภาพโดยการใช้สารสกัดพืชที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สูงสุด คือ สารสกัดจากกานพลู (น้ำมันกานพลู) องค์ประกอบสารทางพฤกษเคมีเป็นสารกลุ่ม terpenoids (eugenol ในน้ำมันกานพลู) และวิธีการสกัดน้ำมันกานพลูที่ดีที่สุด คือ การกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) เมื่อนำมาทำผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู สูตรที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุดคือน้ำมันกานพลู 40% W/W EC ที่ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การนำไปประยุกต์ใช้ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ พบว่า การคลุกเมล็ดด้วยสารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคเมล็ดสีม่วง แต่ไม่เหมาะสมที่จะนำมาคลุกเมล็ด เนื่องจากน้ำมันกานพลูมีผลต่อการงอกของเมล็ดพันธุ์ เมื่อนำมาใช้เป็นสูตรผลิตภัณฑ์ชนิดน้ำมันเข้มข้นแบบของเหลวที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน (EC) 40% w/w EC อัตรา 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 10 ลิตร ในการฉีดพ่นในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองสามารถลดการเกิดโรคเมล็ดสีม่วงได้ใกล้เคียงกับการฉีดพ่นด้วยสารคาร์เบนดาซิมและไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ด จึงน่าจะเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถนำมาใช้ทดแทนสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราได้ ส่วนการใช้สารกระตุ้นการต้านทานโรคในถั่วเหลือง ได้แก่ การพ่นสารด้วยเมทิลจัสโมเนต ความเข้มข้น 90 มิลลิกรัมต่อลิตร บนต้นถั่วเหลืองระยะเติบโตทางลำต้น มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อ *Cercospora kikuchii* และถั่วเหลืองมีการแสดงออกของยีน *PR*4 สูงสุด และการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ ได้แก่ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ PSL49 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้งเชื้อ *Cercospora kikuchii* และเชื้อ *Phomopsis* sp. กรรมวิธีที่ดีที่สุดคือการพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* PSL49 ในระยะต้นกล้า V1 พบการติดเชื้อ *C. kikuchii* น้อยสุด

กรมวิชาการเกษตร

แต่อย่างไรก็ตามแนวทางในการควบคุมโรคโดยใช้วิธีการใดวิธีการเดียว เช่น การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวไม่สามารถควบคุมโรคได้สมบูรณ์ ดังนั้นการควบคุมโรคโดยวิธีการอื่นยังคงมีความจำเป็น เช่น การใช้เมล็ดพันธุ์ที่สะอาดปราศจากโรค การจัดการสภาพแวดล้อมไม่ให้เหมาะสมต่อการเกิดโรค เช่น การกำจัดวัชพืชในแปลง การลดความชื้นในแปลงปลูก การเสริมธาตุอาหารตามความต้องการของพืช การหลีกเลี่ยงการใส่ปุ๋ยที่มีไนโตรเจนสูงเกินไป และการนำชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคไปเผาทำลาย

บรรณานุกรม

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2557. โรค-แมลง ศัตรูข้าว และการป้องกันกำจัด. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

กฤติเดช อนันต์ และดุสิต อธินุวัฒน์ 2559. การพัฒนาชีวภัณฑ์จาก *Bacillus subtilis* TU-Orga1 เพื่อควบคุมโรคที่สำคัญของ ผักคะน้า. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 24 (5): 793-812.

ปิยฉัตร อัครนุชาต สุภามาศ ช่างแต่ง ปิติพงษ์ โตบันลือภพ สุชาดา เวียรศิลป์และสงวนศักดิ์ ธนาพร พูนพงษ์. 2553. ผลของการเคลือบเมล็ดด้วยน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์. วารสารเกษตร 26: 85-92.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, อุทัย โสธนะพันธุ์, ประไพ วงศ์สินคงมั่น. 2554. ทีแอลซี:วิธีอย่างง่ายในการวิเคราะห์คุณภาพเครื่องยาไทย. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ. 468 หน้า.

ณัฐพงษ์ นวลดี พรประพา คงตระกูล วรรษมน บุญยิ่ง Iman Hidayat Yoko Miyamoto Yuriko Izumi Kazuya Akimitsu และ สรัญยา ณ ลำปาง. 2553. ลักษณะของเชื้อรา *Cercospora* ที่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิมสาเหตุโรคใบจุดของ ผักกาดหอมในจังหวัดเชียงใหม่. วารสารวิจัย มข. 15(11): 1053-1060.

มณฑา นันทพันธ์. 2532. การป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงของถั่วเหลืองโดยการพ่นสารเคมี ใน: รายงานผลการวิจัยประจำปี 2532. ศูนย์วิจัยพืชไร่ เชียงใหม่ กรมวิชาการเกษตร.

วิเชียร เอกศิริวรานนท์. 2537. การศึกษาเชื้อรา *Cercospora kikuchii* (Matsumoto & Tomoyasu) Gardner. ที่ทำให้เกิดโรคเมล็ดสีม่วงกับถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill). วิทยานิพนธ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 130 หน้า.

อัญชิกา สวัสดิ์วนิช. 2552. การเคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วยสารกำจัดศัตรูพืชชีวภาพเพื่อการควบคุมเชื้อราก่อโรคพืชของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร ดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Agarwal, V.K. and J.B. Sinclair. 1997. Principles of seed pathology, 2.ed. Boca Raton: CRC. 538p.

Agrawal, G.K., N.-S. Jwa, K.-S. Han, V. P.Agrawal and R. Rakwal. 2003. Isolation of a novel rice PR4 type gene whose mRNA expression is modulated by blast pathogen attack and signaling components. Plant Physiol and Biochem. 41:81-90.

กรมวิชาการเกษตร

AOAC. 2016. *Official Methods of AOAC International.* 20th ed. The Association of Official Analytical Chemists, USA.

Athar, MD.T., Tamboli, E.T., Ansari, S.H. and Ahmad, S. 2013. Quantification of eugenol in hydro-distilled clove oil (Eugenia caryophyllus) and its marketed products by validated GC-MS method. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plant.* 19:365-376.

Bainard, L.D., M.B. Isman, and M.K. Upadhyaya. 2006. Phytotoxicity of clove oil and its primary constituent eugenol and role of leaf epicuticular wax in the susceptibility to these essential oils. Weed Science. 54(5): 833-837.

Cao, Y., Z. Xu, N. Ling, Y. Yuan, X. Yang, L. Chen, B. Shen and Q. Shen. 2012. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing Fusarium wilt of cucumber. Sci. Hortic. 135: 32-39.

Carmello, C. R., and C. J. Carlos. 2018. Effects of plant extracts and sodium hypochlorite on lettuce germination and inhibition of *Cercospora longissima* in vitro. Scientia Horticulture. 234: 245-249.

Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R. and Dua, T.K. 2015. Bioautography and its scope in the fields of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 5(2):75-84.

Domenech, J., M.S. Reddy, J.W. Kloepper, B. Romos and J. Gutierrez Manero. 2006. Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil borne diseases in pepper and tomato. Biocontrol. 51: 245-258.

Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). 2012. FRAC code list 2012: fungicides sorted by mode of action. Available: http://www.frac.info/. Accessed Dec.18, 2012

Gong, Q. C. Zhang and F. Lu. 2014. Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. Food Control. 36:8-14.

Green, C.F., V.V. Scarpino, P. Jensen, N.J. Jensen and S.G. Gibbs. 2004. Disinfection of selected *Aspergillus* spp. using ultraviolet germicidal irradiation. Can J Microbiol. 50: 221-224.

Hampton, J.G. and D. M. Tekrony. D.M. 1995. Handbook of Vigor Test Methods. 3rd Edition, ISTA, Zurich, 117.

ISTA. 2020. International rules for seed testing. International Seed Testing Association, Bassesdorf, Switzerland.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

Inam, F., Deo, S. and N. Narkhede. 2014. Quantification of eugenol in various spices using High Performance Thin Layer Chromatography. International Journal of Scientific & Engineering Research. 5(5):1576-1585.

Janisiewicz, W.J., F. Takeda, B. Nichols, D.M. Glenn, W.M. Jurick II, and M.J. Camp. 2016. Use of low-dose UV-C irradiation to control powdery mildew caused by *Podosphaera aphanis* on strawberry plants. Canadian J. Plant Pathology. 38: 430-439.

Kishore, G. K., S. Pande, and S. Harish. 2007. Evaluation of Essential Oils and Their Components for Broad-Spectrum Antifungal Activity and Control of Late Leaf Spot and Crown Rot Diseases in Peanut. Plant Disease**.** 91: 375-379.

Li, J., Q. Zhang, Y. Cui, J. Yan, J. Cao, Y. Zhao, and W. Jiang. 2010. Use of UV-C Treatment to inhibit the microbial growth and maintain the quality of yali pear. J. Food Science. 75: 503-507.

Livak, K.J and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2−**ΔΔ**CT method. Methods. 25:402-8.

Matsuoka, M. and Y. Ohashi. 1986. Induction of pathogenesis-related proteins in tobacco leaves. Plant Physiol. 80:505-510.

Neelamegam, R. and T. Sutha. 2015. UV-C irradiation effect on seed germination, seedling growth and productivity of groundnut (Arachis hypogaea L.). Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 4: 430–443.

Noriega, P. 2020. Terpenes in essential oils: bioactivity and applications. *Intechopen*. 1-13.

Pournavab, R.F., E.B., Mejía and A.B. Mendoza. 2019. Ultraviolet radiation effect on seed germination and seedling growth of common species from northeastern Mexico. Agronomy 9:269. https://doi.org/10.3390/agronomy9060269

Schubert, K. and U. Braun. 2005: Taxonomic revision of the genus Cladosporium s. lat. 1. Species re-allocated to *Fusicladium, Parastenella, Passalora, Pseudocercospora* and *Stenella*. Mycological Progress. 4(2): 101–109.

Snyder, L.R. 1978. Classification of the Solvent Properties of Common Liquids. *J. Chromatography.* 92: 223-234.

Thasana, N., B. Prapagdee, N. Rangkadilok, R. Sallabhan, S.L. Aye, S. Ruchirawat and S. Loprasert. 2010. *Bacillus subtilis* SSE4 produces subtulene A, a new lipopeptide antibiotic possessing an unusual C15 unsaturated beta-amino acid. FEBS Lett. 584: 3209-3214.

Yan, C. and D. Xie. 2015. Jasmonate in plant defence: sentinel or double agent. Plant Biotechnol. J. 13:1233-1240.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ภาคผนวก ก

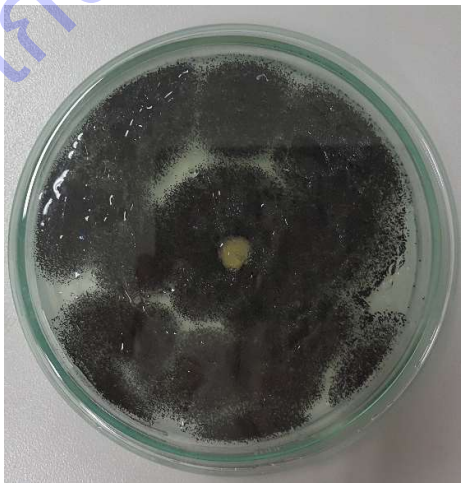
กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก ก1 ลักษณะของเชื้อรา *Cercospora kikuchii*

ก ลักษณะเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

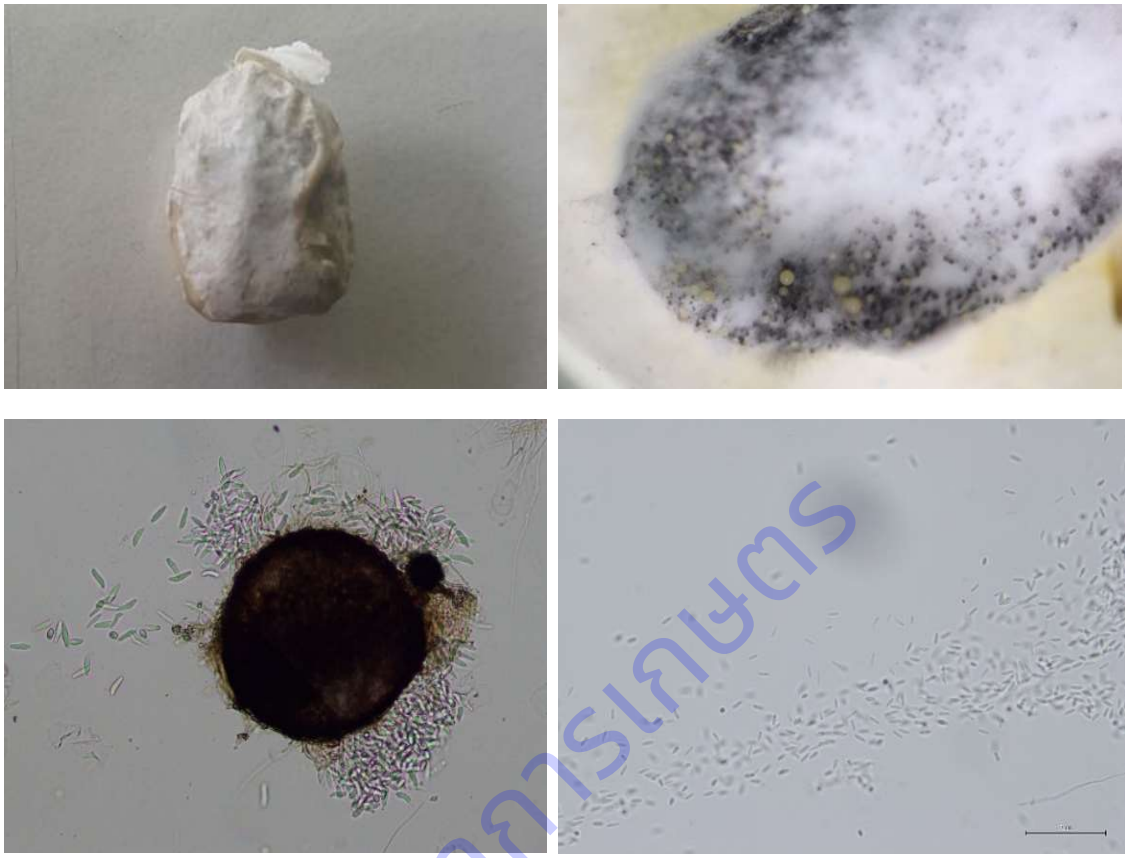
ข ลักษณะเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบ Stereo

ค ลักษณะเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบ Compound

Cercospora kikuchii	*Fusarium* sp
	
Phomopsis sp.	*Aspergillus niger*

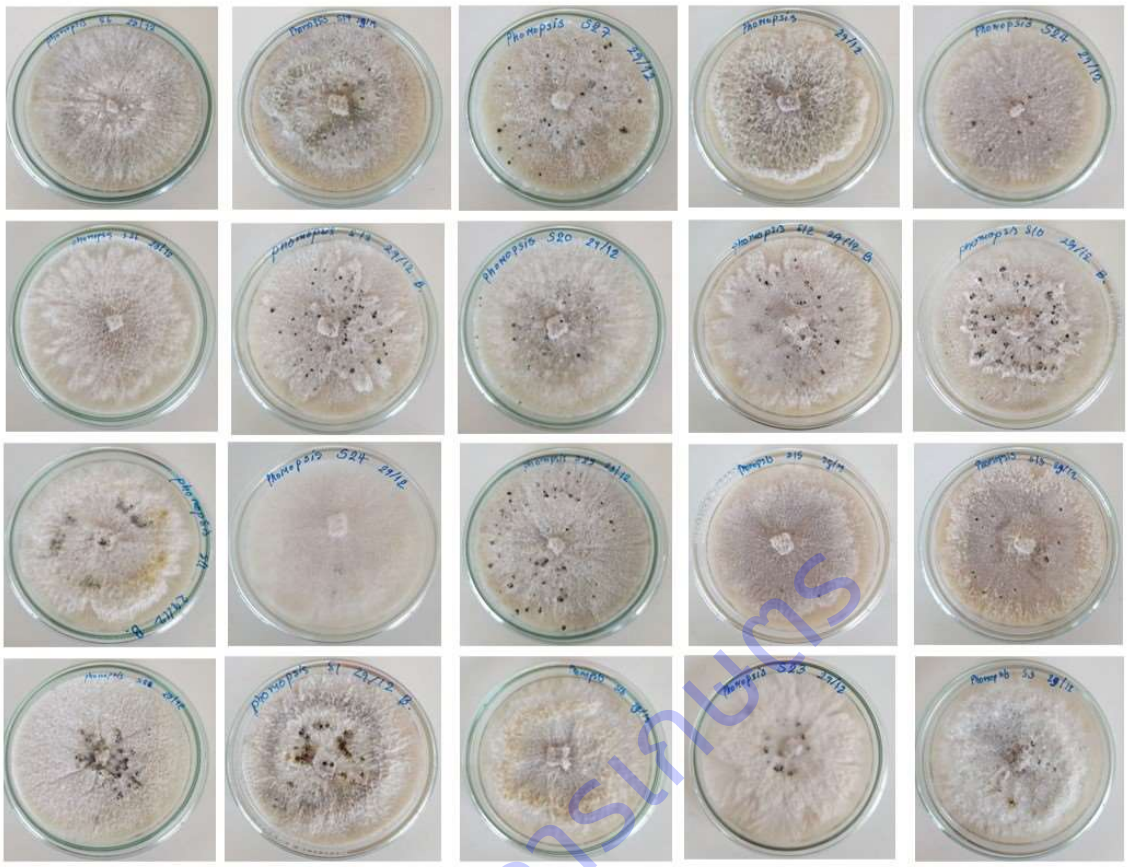
กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก ก2 ลักษณะของเชื้อรา *Cercospora kikuchii*, *Phomopsis* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus niger* ที่เจริญบนอาหาร PDA



ภาคผนวก ก3 ลักษณะของเชื้อ *Phomopsis* sp. ที่เจริญบนผิวเมล็ดถั่วเหลือง

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ ก4 ความหลากหลายของเชื้อ *Phomopsis* sp. ที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลือง

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข1 การออกแบบตู้และการติดตั้งหลอดยูวีซี

กรมวิชาการเกษตร