ระดับโครงการ

กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

รายงานผลสัมฤทธิ์สำหรับทุนสนับสนุนงานพื้นฐาน (Fundamental Fund)

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564

หน่วยงาน กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองคุณภาพสูง

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

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต

Supalak Sattayasamitsathit

ปี 2564

บทสรุปผู้บริหาร

โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองคุณภาพสูง มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีการควบคุมโรคในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์และโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์อย่างเหมาะสม เพื่อยกระดับคุณภาพเมล็ดพันธุ์และเพิ่มผลผลิตโดยลดความเสียหายจากโรคพืช โดยมีขอบเขตการดำเนินงานประกอบด้วย การศึกษาการควบคุมโรคโดยวิธีการทางเคมีโดยการศึกษาหาสารกำจัดเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ การศึกษาวิธีทางกายภาพโดยการใช้แสงยูวีและออกแบบ สร้าง และทดสอบตู้ให้แสง UV-C ต่อการใช้ควบคุมโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ และการศึกษาวิธีทางชีวภาพโดยการใช้สารสกัดจากพืชที่มีสารออกฤทธิ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อควบคุมคุณภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ และการใช้เชื้อแอคติโนมัยซิสรวมถึงสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์เพื่อยับยั้งเชื้อที่สำคัญทางเศรษฐกิจในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์และกระตุ้นภูมิคุ้มกันของถั่วเหลือง

การศึกษาประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราในสภาพเรือนทดลองพบว่าการคลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP อัตรา 3 กรัม/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม และพ่น Propiconazole + Difenoconazole 15%+15% EC อัตรา 10 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร พบการเกิดโรคเมล็ดสีม่วงต่ำที่สุด คือ 0.33% ส่วนในแปลงทดลองพบว่าการพ่น Propiconazole + Difenoconazole 15%+15% EC อัตรา 10 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร มีการเกิดโรคเมล็ดสีม่วงต่ำที่สุด คือ 4.75% นอกจากนี้การทดสอบสารป้องกันกำจัดเชื้อราในระดับห้องปฏิบัติการพบว่าสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phomopsis* sp. ได้ดีที่สุด ได้แก่ Carbendazim, Thiophanate-methyl, Difenoconazole และ Mancozeb สามารถยับยั้งเชื้อได้สูงสุดถึง 100%

การศึกษาวิธีการกายภาพโดยการใช้แสงยูวีซีเพื่อกำจัดเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพบว่าเมล็ดพันธุ์ที่ได้รับแสงยูวีซีเป็นเวลา 10 นาทีขึ้นไปมีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus niger* ได้ดี แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp. ได้ แต่อย่างไรก็ตามแสงยูวีซีไม่มีผลทำให้คุณภาพเมล็ดพันธุ์ด้านความงอกและความแข็งแรงลดลง

การศึกษาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดพืช 20 ชนิดที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากสารสกัด และสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์ พบว่าสารสกัดหยาบกานพลู และข่า สามารถยับยั้งเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสกัดให้บริสุทธิ์ขึ้นและนำไปทดสอบด้วยวิธี Contact bioautography พบว่าน้ำมันข่า และน้ำมันกานพลูมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนแผ่น TLC ที่ตำแหน่ง R_F 0.17-0.42 ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเป็นสารกลุ่ม terpenoids กานพลูจึงเป็นพืชที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* โดยมี eugenol เป็นสารออกฤทธิ์ จากการเปรียบเทียบวิธีสกัดน้ำมันกานพลู 5 วิธี คือ การแช่ใน hexane, การแช่ใน ethanol, การสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic ใน hexane, การสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic ใน ethanol และการกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) พบว่า วิธีการสกัดน้ำมันกานพลูที่ดีที่สุด คือ การกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) และจากการวิจัยผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู 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 พบว่า สูตร B น้ำมันกานพลู 40% w/w EC ที่อัตรา 2-2.5 g/kg PDA สามารถยับยั้งการเจริญเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้ถึง 93.72% ซึ่งไม่แตกต่างจากคาร์เบนดาซิม ที่ความเข้มข้น 2.0 g/kg ผลการศึกษาการคงสภาพของผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู พบว่าคงสภาพได้ดีที่สภาวะกรดอ่อน กลาง และเบสอ่อน สำหรับการแยกสารออกฤทธิ์ (eugenol) ในน้ำมันกานพลูพบว่าการแยกด้วยตัวทำละลาย hexane และ 10% EtOAc/hexane ที่อัตราการไหล 35 mL/min ทำให้ได้ eugenol มีความบริสุทธิ์มากกว่า 99%

การศึกษาสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* โดยพัฒนาสารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูเป็นสูตรผลิตภัณฑ์ชนิดน้ำมันเข้มข้นเป็นของเหลวที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน (EC: Emulsifiable Concentrate) ที่ระดับความเข้มข้น 40% w/w นำไปทดสอบโดยการคลุกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พบว่าสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 53.57 กรัมต่อกิโลกรัมเมล็ดสามารถควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองได้ดีที่สุดและไม่มีผลต่อความงอกของเมล็ดพันธุ์ เมื่อ

ทดสอบในโรงเรือนทดลองที่มีการปลูกเชื้อรา *C. kikuchii* ในถั่วเหลืองพบว่าการฉีดพ่นด้วยสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 10 ลิตร เป็นอัตราที่เหมาะสมที่สุดในการฉีดพ่นเพื่อยับยั้งการเกิดโรคเมล็ดสีม่วงในแปลงผลิเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์

การศึกษาการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อราจากเชื้อที่แยกได้ พบเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้ง *C. kikuchii* และ *Phomopsis* sp. ได้แก่ ไอโซเลต PSL 49 เมื่อนำไปจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHB พบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถสร้างเอนโดสปอร์ จึงคัดเลือกสายพันธุ์นี้ไปทำการทดสอบการควบคุมโรคในถั่วเหลืองภายใต้โรงเรือนตามกรรมวิธีต่างๆ ได้แก่ แช่เมล็ดถั่วเหลืองก่อนปลูก ใส่ในดินก่อนปลูก โรยข้างต้น และฉีดพ่นบนใบถั่วเหลือง ผลการทดลองพบว่ากรรมวิธีพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในระยะต้นกล้า V1 พบการติดเชื้อ *C. kikuchii* น้อยสุดเท่ากับ 41% เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีการติดเชื้อ *C. kikuchii* เท่ากับ 51.5% จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการฉีดพ่นเพื่อควบคุมเชื้อราในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองต่อไป

การศึกษาการใช้สารชีวภาพเพื่อกระตุ้นการต้านทานโรค โดยศึกษาประสิทธิภาพของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของ *PR* ยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคในถั่วเหลืองในสภาพเรือนทดลอง พบว่าเมทิลจัสโมเนตที่ความเข้มข้น 90 มก./ลิตร สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *PR*4 สูงสุดโดยมีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น 3.14 เท่า และสามารถลดปริมาณเชื้อ *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลืองได้สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 6,000 มก./ลิตร สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *PR*10 สูงสุดโดยมากกว่าชุดควบคุมถึง 7.38 เท่า แต่ไม่มีการแสดงออกของยีน *PR*4

ข้อเสนอแนะที่ได้จากงานวิจัย

การจัดการและการควบคุมโรคให้มีประสิทธิภาพนั้นจะต้องมีความรู้เกี่ยวกับการพัฒนาของโรค ความสัมพันธ์ระหว่างพืชและเชื้อโรค ตลอดจนสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเกิดโรค ดังนั้นการจัดการโรคจะต้องใช้วิธีผสมผสานตามสถานการณ์ที่เกิดขึ้นในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ จำเป็นที่ต้องมีการตรวจติดตามแปลงอย่างสม่ำเสมอเพื่อประเมินการแพร่ระบาดของโรคต่างๆเพื่อที่จะเลือกใช้วิธีการจัดการโรคได้อย่างเหมาะสม แต่อย่างไรก็ตามแนวทางในการจัดการโรคโดยวิธีการอื่นร่วมด้วยยังคงมีความจำเป็น เช่น การใช้เมล็ดพันธุ์ที่สะอาดปราศจากโรค การจัดการสภาพแวดล้อมไม่ให้เหมาะสมต่อการเกิดโรค เช่น การกำจัดวัชพืชในแปลง การลดความชื้นในแปลงปลูก การเสริมธาตุอาหารตามความต้องการของพืช การหลีกเลี่ยงการใส่ปุ๋ยที่มีไนโตรเจนสูงเกินไป และการนำชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคไปเผาทำลาย เป็นต้น

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

การผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมักประสบปัญหาด้านโรคพืช ซึ่งโรคที่สำคัญของการผลิตเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ โรคเมล็ดสีม่วงซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และโรคเมล็ดเน่าโฟมอบซิสจากเชื้อ *Phomopsis* sp ทำให้ต้องมีการคัดเมล็ดทิ้งในกระบวนการปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์ส่งผลต่อความสูญเสียผลผลิตอย่างน้อย 20 เปอร์เซ็นต์รวมทั้งสิ้นเปลืองแรงงานและเพิ่มต้นทุนในการผลิตเมล็ดพันธุ์ ดังนั้นการใช้หลักการจัดการโรคแบบผสมผสานรวมถึงกลยุทธ์ต่างๆ ในแง่ของการป้องกัน การบุกรุกก่อนที่จะเกิดการเข้าทำลาย และการรักษา หรือกำจัดโรคที่เริ่มปรากฏให้เห็น เพื่อควบคุมไม่ให้มีการแพร่ระบาดจนเกิดความเสียหายได้ จึงเป็นแนวทางที่น่าจะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการจัดการโรคงานวิจัยนี้จึงศึกษากรรมวิธีต่างๆเพื่อนำมาใช้ในแต่ละขั้นตอนของการผลิตเมล็ดพันธุ์ไม่ว่าจะเป็นการลดปริมาณเชื้อในแปลงปลูก การจัดการเมล็ดพันธุ์ให้ปราศจากเชื้อ การส่งเสริมการเจริญและชักนำให้ถั่วเหลืองต้านทานโรค เพื่อป้องกัน ลดและกำจัดเชื้อทั้งในแปลงปลูกและระหว่างเก็บรักษาเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการจัดการโรคสูงสุด โดยดำเนินการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ด้วยวิธีการหลัก 3 วิธีการ ได้แก่ วิธีการใช้สารกำจัดเชื้อรา วิธีทางกายภาพและวิธีทางชีวภาพ ซึ่งจากการศึกษาประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราในสภาพเรือนทดลองพบว่าการคลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย Captan 50% WP อัตรา 3 กรัม/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม และพ่น Propiconazole + Difenoconazole 15%+15% EC อัตรา 10 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร พบการเกิดโรคเมล็ดสีม่วงต่ำที่สุด คือ 0.33% ส่วนในแปลงทดลองพบว่าพบว่าการพ่น 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% ในระดับห้องปฏิบัติการแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทุกระดับความเข้มข้นที่กำหนดไว้ 4 อัตรา ได้แก่ ต่ำกว่าอัตราแนะนำ อัตราแนะนำตามฉลากและสูงกว่าอัตราแนะนำ การศึกษาวิธีการกำจัดเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทางกายภาพโดยการใช้แสงยูวีซีที่ระยะเวลา 0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 และ 75 นาที เพื่อประเมินการกำจัดเชื้อรา *Cercospora kikuchii*, *Phomopsis* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* และ *Cladosporium* sp. พบว่าแสงยูวีซีมีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus niger* ได้ดีเมื่อได้รับแสงยูวีซีเป็นเวลา 10 นาทีขึ้นไป ในขณะที่แสงยูวีซีไม่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเมล็ดพันธุ์ *Cercospora kikuchii*, *Phomopsis* sp. และ *Cladosporium* sp. แต่อย่างไรก็ตามแสงยูวีซีไม่มีผลทำให้คุณภาพเมล็ดพันธุ์ลดลง โดยมีความงอกและความแข็งแรงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีความงอกมาตรฐาน 65-77 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับแสงยูวีมีความงอก 71 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความแข็งแรงมีค่าระหว่าง 50-61 เปอร์เซ็นต์ และเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับแสงยูวีมีความแข็งแรง 60 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาการกำจัดเชื้อราโดยวิธีทางชีวภาพ ได้แก่ การใช้สารสกัดจากพืช การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์และการใช้สารชีวภาพในการกระตุ้นการต้านทานโรค พบว่าสารออกฤทธิ์ในสารสกัดพืชที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากสารสกัด และสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อควบคุมคุณภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป พบว่า % yield สารสกัดหยาบจากขมิ้น และกานพลูมีค่าสูงที่สุด คือ 25.45 และ 24.38 %w/w ตามลำดับ ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 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 จากการเปรียบเทียบวิธีสกัดน้ำมันกานพลู 5 วิธี คือ การแช่ใน hexane, การแช่ใน ethanol, การสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic ใน hexane, การสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic ใน ethanol และการกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) พบว่า วิธีการสกัดน้ำมันกานพลูที่ดีที่สุด คือ การกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) และจากการวิจัยผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู จำนวน 3 สูตร ได้แก่ สูตร A น้ำมันกานพลู 20% w/w EC, สูตร B น้ำมันกานพลู 40% w/w EC และสูตร C น้ำมัน

กรมวิชาการเกษตร

กานพลู 60% w/w EC พบว่า สูตร B น้ำมันกานพลู 40% w/w EC ที่อัตรา 2-2.5 g/kg PDA สามารถยับยั้งการเจริญเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้ถึง 93.72% เช่นเดียวกับสูตร C (น้ำมันกานพลู 60% w/w EC) ที่อัตรา 1-2.5 g/kg PDA ซึ่งไม่แตกต่างจากคาร์เบนดาซิม ที่ความเข้มข้น 2.0 g/kg ผลการศึกษาการคงสภาพของผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู พบว่าคงสภาพได้ดีที่สภาวะกรดอ่อน กลาง และเบสอ่อน สำหรับการแยกสารออกฤทธิ์ (eugenol) ในน้ำมันกานพลูพบว่าการแยกด้วยตัวทำละลาย hexane และ 10% EtOAc/hexane ที่อัตราการไหล 35 mL/min ทำให้ได้ eugenol มีความบริสุทธิ์มากกว่า 99% นอกจากนี้ทำการศึกษาสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *C. kikuchii* โดยการใช้สารสกัดหยาบจากกานพลูพัฒนาเป็นสูตรผลิตภัณฑ์เพื่อให้เหมาะสมต่อการใช้งานในการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง โดยพัฒนาสารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูเป็นสูตรผลิตภัณฑ์ชนิดน้ำมันเข้มข้นเป็นของเหลวที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน (EC: Emulsifiable Concentrate) ที่ระดับความเข้มข้น 40% w/w นำไปทดสอบโดยการคลุกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พบว่าสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 53.57 กรัมต่อกิโลกรัมเมล็ดสามารถควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองได้ดีที่สุดและไม่มีผลต่อความงอกของเมล็ดพันธุ์ เมื่อทดสอบในโรงเรือนทดลองที่มีการปลูกเชื้อรา *C. kikuchii* พบว่าการฉีดพ่นด้วยสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 10 ลิตร เป็นอัตราที่เหมาะสมที่สุดในการฉีดพ่นเพื่อยับยั้งการเกิดโรคเมล็ดสีม่วงในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ สำหรับการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อราโดยทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Streptomyces aminophillus, Streptomyces alboniger* และ *Streptomyces avellaneus* และเชื้อที่แยกได้ 19 ไอโซเลตจากดินรอบรากถั่วเหลืองต่อการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วง และ *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิส ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญของการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พบว่าแอคติโนมัยสีททั้ง 3 สายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. kikuchii* และ *Phomopsis* sp. แต่เชื้อที่แยกได้มี 1 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้ง *C. kikuchii* และ *Phomopsis* sp. ได้แก่ PSL 49 เมื่อนำไปจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHB พบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถสร้างเอนโดสปอร์ จึงคัดเลือกสายพันธุ์นี้ไปทำการทดสอบการควบคุมโรคในถั่วเหลืองภายใต้โรงเรือนตามกรรมวิธีต่างๆ ได้แก่ แช่เมล็ดถั่วเหลืองก่อนปลูก ใส่ในดินก่อนปลูก โรยข้างต้น และฉีดพ่นบนใบถั่วเหลือง ผลการทดลองพบว่ากรรมวิธีพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในระยะต้นกล้า V1 พบการติดเชื้อ *C. kikuchii* น้อยสุดเท่ากับ 41% เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีการติดเชื้อ *C. kikuchii* เท่ากับ 51.5% จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการฉีดพ่นเพื่อควบคุมเชื้อราในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองต่อไป การใช้สารชีวภาพเพื่อกระตุ้นการต้านทานโรคโดยศึกษาประสิทธิภาพของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของ PR ยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคในถั่วเหลือง ได้แก่ สารเมทิลจัสโมเนตที่ระดับความเข้มข้น 30, 60, 90 และ 120 มก./ลิตร และเอทิลอะซิเตทที่ระดับความเข้มข้น 3,000, 6,000, 9,000, 12,000 และ 15,000 มก./ลิตร โดยฉีดพ่นถั่วเหลืองในระยะเริ่มออกดอกในกระถางและพ่นด้วยน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม พบว่าเมทิลจัสโมเนตที่ความเข้มข้น 90 มก./ลิตร สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน PR4 สูงสุดโดยมีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น 3.14 เท่า ในขณะที่เอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 6,000 มก./ลิตร สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน PR10 สูงสุดโดยมากกว่าชุดควบคุมถึง 7.38 เท่า แต่ไม่มีการแสดงออกของยีน PR4 ผลของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการเจริญเติบโต และองค์ประกอบผลผลิตในกระถางสภาพโรงเรือน พบว่า การพ่นสารเมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซีเตทกับต้นถั่วเหลืองทุกระดับความเข้มข้นมีจำนวนข้อต่อต้น จำนวนกิ่งต่อต้นและน้ำหนัก 100 เมล็ดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิต แต่ความสูงจำนวนฝักต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อต้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้การพ่นสารเมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซีเตทไม่ทำให้คุณภาพด้านความงอกและความแข็งแรงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีความงอกมาตรฐานเฉลี่ย 98 เปอร์เซ็นต์ และ ความแข็งแรงเฉลี่ย 98 เปอร์เซ็นต์ ยิ่งไปกว่านั้นการพ่นสารด้วยเมทิลจัสโมเนต ความเข้มข้น 90 มก./ลิตร สามารถลดปริมาณเชื้อ *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลืองได้สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการพ่นสารด้วยเมทิลจัสโมเนตที่ระดับความเข้มข้น 90 มก./ลิตร จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

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. Therefore, the use of integrated disease management principles and strategies in terms of protection invasion and treatment or elimination of disease that has begun to appear to control the spread of the disease until it is damaged. Therefore, it is likely the most effective approach to disease management. Seeds disinfection and inducing disease resistance of soybeans in order to prevent, reduce and eliminate pathogens both in the field and during storage for maximum disease management efficiency. 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 and field condition from 2019 to 2020 at Chiang Mai Seed Research and Development Center. The study was found that in experimental greenhouse condition in 2019, seed mixing before planting with 50% WP Captan at 50 g / 20 l of water and spraying Propiconazole + Difenoconazole 15% + 15% EC at 10 cc / 20 l of water had the lowest of purple seed disease was 0.33 percent. While in experimental field that working in raining season in 2019 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 statistically significant at all 4 concentration levels, which were lower than recommended rates; Label recommended rate and higher than recommended rate.

A study on physical elimination of fungi on soybean seed using UVC light at 0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 and 75 min was conducted to evaluate the elimination of *Cercospora kikuchii*. , *Phomopsis* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Cladosporium* sp. showed 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 that germination was 65-77%, while the non-UV exposed had 71% germination, whereas the vigour was between 50-61% and soybean seed vigour had 60% at non-UV exposed.

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 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 because %yield of crude extract was more than *Alpinia galangal.* Five extract methods of oil clove (maceration with hexane, maceration with ethanol, ultrasonic with hexane, ultrasonic with ethanol and hydro-distillation) were compared. The results showed that hydro-distillation method was the most effective. Three finished products of clove oil in the form

of emulsifiable concentrate (EC) were formulated – A 20% W/W clove oil, B 40% W/W clove oil and C 60% W/W clove oil. Formula B (rate 2-2.5 g/kg) and C (rate 1-2.5 g/kg) could inhibit the growth of *Cercospora kikuchii* in range 93.60-93.72% which were not significantly different from carbendazim (rate 2 g/kg). The stability test of the formulas was also studied at 54°C 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, clove oil crude extract was supplemented with 40 percent w/w dressed soybean seeds. Clove oil, with an EC of 40% w/w at 53.57 g per kg of seeds, was found to be the best choice for seed dressing because it had no influence on seed germination and had the best control of fungal infection in soybean seeds (4%). When tested in greenhouse where *C. kikuchii* was inoculated, 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.

The study of actinomycetes; *Streptomyces aminophillus, Streptomyces alboniger* and *Streptomyces avellaneus* and 19 isolated from rhizospheric soil in controlling *Cercospora kikuchii* caused purple seed stain and *Phomopsis* sp. caused Phomopsis seed decay for importance economic disease of soybean seed production. It was found that 3 actinomycetes could not inhibit *C. kikuchii* and *Phomopsis* sp. Whereas, one 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 by various methods, such as soaking before planting, put in the soil before planting and spray on the soybean leaves. The results showed that the antagonistic spraying process at seedling stage V1 showed 41% infection of *C. kikuchii*, compared with control (51.5% infection), it was suitable to applied to spraying to control the fungus in soybean seed production field.

The effectiveness of bioactive elicitors in the expression of PR-genes that can stimulate disease resistance in soybeans such as methyl jasmonate at the concentration of 30, 60, 90 and 120 ppm and ethyl acetate at the concentration of 3,000, 6,000, 9,000, 12,000 and 15,000 ppm for spraying soybean in the R1 stage of growth in pot experiments and distilled water treated was use as the control. 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.* The effect of bioactive elicitor on growth and yield of soybean it was found that all concentration of bioactive elicitor had no effect of number of nod per plant, number branch per plant, dry weight of 100 seeds. Nevertheless, bioactive elicitor had effect significantly of the plant height, number of pods per plant and number of seeds per plant. Additionally, methyl jasmonate and ethyl acetate were no differences in standard germination and seed vigor by AA test and gave 98% germination and 98% seed vigor. Moreover, 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.

กิตติกรรมประกาศ

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

คณะผู้วิจัย

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	2
บทคัดย่อ	4
Abstract	6
กิตติกรรมประกาศ	8
สารบัญ	9
สารบัญภาพ	10
สารบัญตาราง	11
บทที่ 1 บทนำ	13
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน	15
บทที่ 3 ผลการศึกษา	33
บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล	44
เอกสารอ้างอิง	49
ภาคผนวก	51

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	A) โรคเมล็ดสีม่วงในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง B) เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ไม่เป็นโรค C) โคโลนีของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหาร PDA เชื้อราสร้างเส้นใยฟู สีขาว D) เมื่ออายุมากขึ้นดูด้านใต้เห็นเป็นสีชมพูถึงสีม่วง	51
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	51
ภาพที่ 3	ตำแหน่งสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii*	51
ภาพที่ 4	สารสกัดหยาบกานพลูที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี A) การแช่ในเฮกเซน B) การแช่ในเอทานอล C) การสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic ในเฮกเซน D) การสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic ในเอทานอล E) การกลั่นด้วยน้ำ	52
ภาพที่ 5	น้ำมันกานพลู ในตัวทำละลายกรด-ด่างที่เวลาต่างๆ	52
ภาพที่ 6	ค่า pH ของผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ 0-14 วัน ภายใต้อุณหภูมิ 0, RT, 54 และ 70 องศาเซลเซียส	52
ภาพที่ 7	^{1}H NMR สเปกตรัมของ eugenol (ใน $CDCl_3$) A) สารที่ได้จากการแยก และ B) สารมาตรฐาน	53
ภาพที่ 8	ผลของแสงยูวีซีต่อการควบคุมเชื้อราบนผิวเมล็ดพันธุ์	54
ภาพที่ 9	ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้ต่อการควบคุมเชื้อ *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลือง	55
ภาพที่ 10	ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้ต่อการควบคุมเชื้อ *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิส	56
ภาพที่ 11	ผลของความเข้มข้นของเมทิลจัสโมเนตต่อการแสดงออกของยีน *PR2, PR4* และ *PR10* ในถั่วเหลือง	57
ภาพที่ 12	ผลของความเข้มข้นของเอทิลอะซีเตทต่อการแสดงออกของยีน *PR4* และ *PR10* ในถั่วเหลือง	57
ภาพที่ 13	ประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราต่อการยับยั้งเชื้อ *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิสในถั่วเหลือง	58

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบตัวอย่างพืช 20 ชนิด และปริมาณสารสกัดหยาบต่อกรัม	59
ตารางที่ 2	เปอร์เซ็นต์การยั้บยั้งเชื้อรา *Cercosporl kikuchii* ของสารสกัดสมุนไพร 20 ชนิด	59
ตารางที่ 3	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดที่มีความบริสุทธิ์ขึ้น และปริมาณสารต่อกรัม	60
ตารางที่ 4	เปอร์เซ็นต์การยั้บยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ของสารสกัดสมุนไพร 3 ชนิด จำนวน 12 ส่วน	61
ตารางที่ 5	ผลการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีในสารสกัดหยาบข่าและกานพลูด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ	61
ตารางที่ 6	%yield (กรัม/กรัม) ที่ได้จากการคำนวณด้วยสารสกัดหยาบต่อตัวอย่างบดแห้งของแต่ละวิธีสกัด	62
ตารางที่ 7	ปริมาณ eugenol เฉลี่ยในสารสกัดหยาบ (g/kg) และในกานพลูแห้ง (mg/g)	62
ตารางที่ 8	ลักษณะทางกายภาพของสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลู	62
ตารางที่ 9	ปริมาณ Eugenol (% w/w) ในผลิตภัณฑ์ ก่อนอบ และหลังอบที่อุณหภูมิ 54 °C	62
ตารางที่ 10	ประสิทธิภาพเบื้องต้นของสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลูต่อการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงชื้อ PDA และปริมาณ eugenol ในผลิตภัณฑ์	63
ตารางที่ 11	เวลาที่ eugenol ถูกแยกและเคลื่อนที่ผ่าน detector	63
ตารางที่ 12	เวลาที่ eugenol ถูกแยกและเคลื่อนที่ผ่าน detector ที่อัตราการไหลต่างกัน	64
ตารางที่ 13	เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธ์ของ Eugenol ที่ได้จากการแยกจากน้ำมันกานพลูด้วยระบบตัวทำละลาย 6 ระบบ	64
ตารางที่ 14	ตรวจสอบ Precision ที่ 3 ระดับความเข้มข้น	64
ตารางที่ 15	ตรวจสอบ % recovery ของ eugenol	65
ตารางที่ 16	เปอร์เซ็นต์การพบเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่คลุกด้วยสารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูอัตราต่างๆ	65
ตารางที่ 17	เปอร์เซ็นต์การพบเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่คลุกด้วยน้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตราต่างๆ	66
ตารางที่ 18	เปอร์เซ็นต์การพบเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเมื่อพ่นด้วยน้ำมันกานพลู 40%w/w EC ในอัตราต่างๆ ในสภาพแปลงทดลอง	66
ตารางที่ 19	ผลของระยะเวลาการได้รับแสงยูวีซีของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองต่อการยับยั้งเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์	67
ตารางที่ 20	ผลของระยะเวลาการได้รับแสงยูวีซีต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง	67
ตารางที่ 21	วันที่ปลูก งอก ออกดอกร้อยละ50 และเก็บเกี่ยว ของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ในสภาพเรือนทดลอง และแปลงทดลอง	67
ตารางที่ 22	การเกิดโรคเมล็ดสีม่วง ความงอก ความงอกหลังการเร่งอายุ และน้ำหนัก 100 เมล็ด	68

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 23	การเกิดโรคเมล็ดสีม่วง ความงอก ความงอกหลังการเร่งอายุ และน้ำหนัก 100 เมล็ด	68
ตารางที่ 24	ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลต PSL49 ต่อองค์ประกอบผลผลิต การเข้าทำลายของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และคุณภาพเมล็ดพันธุ์	69
ตารางที่ 25	ผลของความเข้มข้นเมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซิเตทต่อการเจริญและองค์ประกอบผลผลิตของถั่วเหลือง	69
ตารางที่ 26	ผลของความเข้มข้นเมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซิเตทต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและปริมาณการเข้าทำลายของเชื้อ *C. kikuchii*	70
ตารางที่ 27	ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันกำจัดเชื้อราต่อการยับยั้ง *Phomopsis* sp.	70
ตารางที่ 28	ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดเชื้อ *Phomopsis* sp. และคุณภาพเมล็ดพันธุ์	72

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 1 บทนำ

1. วิสัยทัศน์ และพันธกิจของหน่วยงาน

<u>วิสัยทัศน์</u> กรมวิชาการเกษตรเป็นองค์กรที่เป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาด้านพืช เครื่องจักรกลการเกษตร และเป็นศูนย์กลางรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตรด้านพืชในระดับสากล บนพื้นฐานการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

<u>พันธกิจ</u>

๑. สร้างและถ่ายทอดองค์ความรู้จากงานวิจัยด้านพืชและเครื่องจักรกลการเกษตร สู่กลุ่มเป้าหมาย

๒. กำหนดและกำกับดูแลมาตรฐานระบบการผลิตและผลิตพันธุ์พืชและปัจจัยการผลิต พัฒนาระบบตรวจรับรองสินค้าการเกษตรด้านพืชให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล

๓. อนุรักษ์และพัฒนาการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพด้านพืช แมลง และจุลินทรีย์

๔. กำกับ ดูแล และพัฒนากฎหมายที่กรมวิชาการเกษตรรับผิดชอบ

2. ยุทธศาสตร์ชาติที่สอดคล้องกับแผนปฏิบัติงานด้าน ววน. ของหน่วยงาน

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

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

โปรแกรมตามแผน ววน.	งบประมาณ (บาท)
โปรแกรม P7. โจทย์ท้าทายด้านทรัพยากรสิ่งแวดล้อม และการเกษตร	631,728

ศูนย์วิชาการเกษตร

4. รายละเอียดโครงการ

ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล

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 โรคเมล็ดโฟมอบชิส โรคใบจุดวง และโรคไวรัสใบด่าง โดยโรคดังกล่าวมีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่ทำให้ถั่วเหลืองมีผลผลิตลดลง เมล็ดพันธุ์ไม่มีคุณภาพ โดยเฉพาะโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ในช่วงฤดูฝนจะพบโรคเมล็ดสีม่วง และโรคเมล็ดเน่าโฟมอบชิสเป็นจำนวนมาก ซึ่งต้องมีการคัดทิ้งในกระบวนการปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์ส่งผลทำให้สูญเสียผลผลิตและสิ้นเปลืองแรงงาน นอกจากนี้เมล็ดพันธุ์บางส่วนก็มีเชื้อแฝงซึ่งไม่แสดงอาการของโรค เมื่อนำไปปลูกหากสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการพัฒนาของเชื้อจึงทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคได้ แม้ว่ามีการศึกษาวิธีป้องกันโรคที่สำคัญของถั่วเหลืองในแปลงแต่การป้องกันโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ยังไม่มีการศึกษากันอย่างมากนัก ส่วนใหญ่จะใช้สารเคมีในการควบคุมอย่างเดียวและใช้สารเคมีป้องกันเชื้อราทั่วไปที่ไม่ได้จำเพาะต่อเชื้อ ซึ่งประสิทธิภาพยังไม่ดีมากนักจึงยังพบการสูญเสียของผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาโดยตลอด แต่อย่างไรก็ตามเราไม่สามารถใช้วิธีการใดวิธีหนึ่งมาควบคุมหรือกำจัดเพราะโรคสามารถเกิดได้ในทุกขั้นตอนการผลิต ดังนั้นหากมีการใช้หลักการจัดการโรคพืชแบบผสมผสานรวมถึงกลยุทธ์ต่างๆ ในแง่ของการป้องกัน การบุกรุกก่อนที่จะเกิดการเข้าทำลาย และการรักษา หรือกำจัดโรคที่เริ่มปรากฏให้เห็น เพื่อควบคุมไม่ให้มีการแพร่ระบาดจนเกิดความเสียหายได้ จึงเป็นแนวทางที่น่าจะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการจัดการโรคในเมล็ดพันธุ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษากรรมวิธีต่างๆ เพื่อนำมาใช้ในแต่ละขั้นตอนของการผลิตเมล็ดพันธุ์ไม่ว่าจะเป็นการจัดการเมล็ดพันธุ์ให้ปราศจากเชื้อ การส่งเสริมการเจริญและชักนำให้ถั่วเหลืองต้านทานโรค ตลอดจนการจัดการโรคหลังการเก็บเกี่ยวและในระหว่างการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง เพื่อป้องกัน ลดและกำจัดเชื้อทั้งในแปลงปลูกและระหว่างเก็บรักษาเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการจัดการโรคสูงสุด

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1) เพื่อวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการควบคุมโรคในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์และโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์อย่างเหมาะสมสำหรับการยกระดับคุณภาพเมล็ดพันธุ์และเพิ่มผลผลิตโดยลดความเสียหายจากโรคพืช

ขอบเขตการศึกษา

โครงการวิจัยนี้เป็นการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ดำเนินการศึกษาการควบคุมโรคโดยวิธีการต่างๆ ได้แก่ วิธีทางเคมีโดยการศึกษาหาสารกำจัดเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ วิธีทางกายภาพโดยการใช้แสงยูวีและออกแบบ สร้าง และทดสอบตู้ให้แสง UV-C ต่อการใช้ควบคุมโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ และวิธีทางชีวภาพโดยการใช้สารสกัดจากพืชที่มีสารออกฤทธิ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อควบคุมคุณภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ รวมถึงการใช้สารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือชักนำให้ถั่วเหลืองต้านทานโรค

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน

1.วิธีการดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 ศึกษาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดพืชที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์เพื่อควบคุมคุณภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์

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
กรรมวิธีที่ 3	กานพลู	กรรมวิธีที่ 15	เปลือกมังคุด
กรรมวิธีที่ 4	ขมิ้นชั้น	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

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 9	ข้าพลู	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 ข้าพลู 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 และข้าพลู ไปสกัดต่อด้วย วิธี Column chromatography ชะด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ hexane, chloroform, methanol ตามลำดับ แล้วเก็บสารที่ได้จากการชะ (fraction) ทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 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	ข้าพลู (hexane)
กรรมวิธีที่ 3	ข่า (methanol1)	กรรมวิธีที่ 10	ข้าพลู (chloroform1)
กรรมวิธีที่ 4	ข่า (methanol2)	กรรมวิธีที่ 11	ข้าพลู (chloroform2)
กรรมวิธีที่ 5	กานพลู (hexane)	กรรมวิธีที่ 12	ข้าพลู (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

กรมวิชาการเกษตร

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

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 ที่มีการผสมสูตรผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู ชนิด 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

กรมวิชาการเกษตร

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
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

i. ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปสูตรที่ 1 (A) ความเข้มข้น 20% ของน้ำมันกานพลู ใน TWEEN 20 และ SPAN80

ii. ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปสูตรที่ 2 (B) ความเข้มข้น 40% ของน้ำมันกานพลู ใน TWEEN 20 และ SPAN80

iii. ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปสูตรที่ 3 (C) ความเข้มข้น 60% ของน้ำมันกานพลู ใน TWEEN 20 และ SPAN80

1.2 ศึกษาการคงสภาพของสูตรผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู

iv. ศึกษาการคงสภาพของน้ำมันกานพลูเมื่อละลายในตัวทำละลายที่มีสภาพกรด-ด่าง

v. ศึกษาการคงตัวของ pH ของสูตรผลิตภัณฑ์อุณหภูมิต่างๆ

vi. ศึกษาการคงตัวของสารออกฤทธิ์ Eugenol ในสูตรผลิตภัณฑ์

2. เตรียมเชื้อ โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธี Blotter method เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาตรวจหาเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ภายใต้กล้อง Steromicroscope ทำการแยกให้บริสุทธิ์ เลี้ยงบนอาหาร PDA และเก็บเป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดลอง3. 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

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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
	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

กรมวิชาการเกษตร

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

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)

<u>ตรวจสอบความแม่นยำ Within laboratory reproducibility</u>

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

กรมวิชาการเกษตร

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

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 ระดับความเข้มข้นครอบคลุมช่วงใช้งาน 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 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

$$\text{LOD} = 3.14SD$$

$$\text{LOQ} = 10\ SD$$

2. ควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลูโดยตรวจสอบความเข้มข้นที่แน่นอนของผลิตภัณฑ์

นำผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู ที่ได้จากการวิจัย ขั้นตอนที่ 2 (2563) มาเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์หาความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยสภาวะการทำงานของเครื่อง HPTLC

<u>การบันทึกข้อมูลดังนี้</u>

1. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii*

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

2. ข้อมูลชนิดของกลุ่มสารออกฤทธิ์ทางพฤกษเคมี

3. ปริมาณ eugenol

กรมวิชาการเกษตร

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2561 สิ้นสุด ธันวาคม 2564

สถานที่ทดลอง กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

การทดลองที่ 2 การทดสอบสูตรผลิตภัณฑ์จากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วง

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ กล่องเพาะ กระดาษเพาะความงอก
3. อุปกรณ์การตรวจเชื้อราในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ จานเพาะเชื้อ กระดาษเพาะความงอก สไลด์ ปากคีบ

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การทดสอบสูตรผลิตภัณฑ์จากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ 8 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 สูตรผลิตภัณฑ์จากสารสกัดหยาบกานพลู อัตราที่ 1

กรรมวิธีที่ 2 สูตรผลิตภัณฑ์จากสารสกัดหยาบกานพลู อัตราที่ 2

กรรมวิธีที่ 3 สูตรผลิตภัณฑ์จากสารสกัดหยาบกานพลู อัตราที่ 3

กรรมวิธีที่ 4 สูตรผลิตภัณฑ์จากสารสกัดหยาบกานพลู อัตราที่ 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. หาอัตราที่เหมาะสมของสูตรผลิตภัณฑ์จากสารสกัดหยาบกานพลูที่ได้จากข้อ 2 จำนวน 4 อัตรา เปรียบเทียบกับสารยับยั้งเชื้อราคาร์เบนดาซิม และน้ำกลั่น มาคลุกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เป็นโรคเมล็ดสีม่วงตามกรรมวิธี โดยเขย่าให้เมล็ดถั่วเหลืองคลุกเคล้ากับสารสกัดจนทั่ว แล้วเทเมล็ดออกมาผึ่งให้แห้งสนิทในที่ร่ม เก็บใส่กล่องพลาสติกทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ได้จากแต่ละกรรมวิธีมาตรวจเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน และตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธี Blotter method เป็นเวลา 7 วัน กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกเปอร์เซ็นต์การการพบเชื้อ *Cercospora kikuchii* โดยวิธี Blotter method

2. บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน

กรมวิชาการเกษตร

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 105 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

เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2564

ศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่ ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

การทดลองที่ 3 การศึกษาการใช้แสงยูวีต่อการกำจัดเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ และผลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

อุปกรณ์

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

กรมวิชาการเกษตร

วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 8 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ประกอบด้วย

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)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ติดตั้งหลอดไฟ UV-C ในตู้กระจกกันแสง UV ทั้งด้านบน และด้านข้าง 2 ด้าน

2. เตรียมเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองสะอาดที่ไม่เป็นโรคปริมาณ 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) โดยนำไปเพาะบนกระดาษชื้นโดยใช้กระดาษเพาะความงอก จำนวน 3 แผ่น นำไปจุ่มน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ชุ่ม แล้ววางบนจานเลี้ยงเชื้อ (petri-dish) (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. สุ่มเมล็ดพันธุ์นำมาตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ 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) และตรวจสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์โดยวิธีการเร่งอายุ (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

เริ่มต้น ตุลาคม 2561 สิ้นสุด กันยายน 2563

ศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ตำบลวังทอง อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 4 การทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลือง

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 ประกอบด้วย

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
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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

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

กรมวิชาการเกษตร

5. เปอร์เซ็นต์ความแข็งแรง ด้วยวิธีการเร่งอายุ

ขั้นตอนที่ 2 ทดสอบสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากขั้นตอนที่ 1 จำนวน 3 กรรมวิธี ทดสอบสภาพแปลงทดลอง

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

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

วิธีการ

ปลูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ระยะปลูก 50 x 20 เซนติเมตร หยอดเมล็ดหลุมละ 5 เมล็ด หลังปลูกพ่นสารเคมีควบคุมวัชพืชก่อนถั่วเหลืองงอกโดยใช้อลาคลอร์ อัตรา 500 มิลลิลิตร/ไร่ เมื่อถั่วเหลืองอายุครบ 7 วัน พ่นสารเคมีไตรอะโซฟอสป้องกันกำจัดแมลงวันหนอนเจาะลำต้น ถอนแยกต้นถั่วเหลืองให้เหลือหลุมละ 2-3 ต้น หลังจากงอก 20 วัน ใส่ปุ๋ยเคมี เกรด 12-24-12 อัตรา 25 กิโลกรัม/ไร่ โดยโรยข้างแถวแล้วกลบปุ๋ยพูนโคนต้น ทำการพ่นสารเคมีตามกรรมวิธี ที่ระยะออกดอกเต็มที่ (R2) และระยะเมล็ดพัฒนาเต็มที่ (R6) และดูแลรักษาแปลงตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตรจนถึงระยะเก็บเกี่ยว

การบันทึกข้อมูล

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

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2561 – กันยายน 2563

ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 5 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

อุปกรณ์

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

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 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 เจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อรา ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 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.

ขั้นตอนที่ 2 การจำแนกเชื้อที่คัดเลือกได้โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบทางชีวเคมี

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

ขั้นตอนที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการควบคุมโรคที่สำคัญของถั่วเหลืองในสภาพเรือนทดลอง

แบบและวิธีการทดลอง

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

กรรมวิธีที่ 1 แช่เมล็ดถั่วเหลืองก่อนปลูกด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ในอัตรา 10 มิลลิลิตร ต่อ 1 เมล็ด

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

กรมวิชาการเกษตร

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

เวลาและสถานที่

ปีเริ่มต้น ตุลาคม 2561 – สิ้นสุด กันยายน 2562

สถานที่ทดลอง ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

การทดลองที่ 6 ประสิทธิภาพของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคในถั่วเหลือง

อุปกรณ์

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

วิธีการ

แบบและวิธีการทดลอง

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 กระถางต่อกรรมวิธีหยอดเมล็ดกระถางละ 2 เมล็ด พ่นสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงวันหนอนเจาะลำต้น หลังจากงอกประมาณ 1 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 12-24-12 อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อถั่วเหลืองเจริญในระยะ R1 พ่นสารแต่ละกรรมวิธีทดลอง และดูแลรักษาแปลงตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตรจนถึงระยะเก็บเกี่ยว

กรมวิชาการเกษตร

2. การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Nucleo Spin Kit ยี่ห้อ MACHEREY-NAGEL

นำใบถั่วเหลืองหลังจากพ่นสาร 3 วัน มาบดในโกร่งบด สกัด Total RNA โดยชุดสกัดสำเร็จรูปตามวิธีการของบริษัทนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบ

3. การสังเคราะห์ cDNA นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ชุดน้ำยา ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover ยี่ห้อ TOYOBO มีส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตรรวม 8 ไมโครลิตร ที่มีองค์ประกอบได้แก่ อาร์เอ็นเอ ความเข้มข้น 0.5 pg-0.5 µg, 4X DN Master Mix 2 ไมโครลิตร, Nuclease-free Water 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียลเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดแล้วนำไปทำปฏิกิริยาต่อไปโดยมีส่วนผสมปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ที่มีองค์ประกอบของ Reacted solution ที่ได้จากข้างต้น 8 ไมโครลิตร และ 5x RT Master Mix II 2 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Thermal cycles โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ 37oC เป็นเวลา 15 นาที, 50°C เป็นเวลา 5 นาที และ 98oC 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 ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการจับแบบไม่จำเพาะ (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

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

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานเพาะเชื้อ กระบอกตวง
3. กล้องจุลทรรศน์
4. ตู้ปลอดเชื้อ
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, NA
6. สารเคมี ได้แก่

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 Chlorothalonil75% 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 อัตราแนะนำตามฉลาก และสูงกว่าอัตราแนะนำ 0.5 เท่า เจือจางในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปผสมกับอาหาร PDA ที่หลอมเหลว ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เขย่าให้อาหารและสารเคมีผสมเข้ากันทั่วถึง แล้วเทอาหารที่มีสารป้องกันกำจัดโรคพืชความเข้มข้นต่างๆลง ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ เมื่อผิวหน้า

กรมวิชาการเกษตร

อาหารแห้งจึงวางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อ Phomopsis sp. ที่เตรียมจากข้างต้น โดยวางตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ วางจานเลี้ยงเชื้อทดสอบนี้ไว้ในห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราเมื่อโคโลนีของเชื้อราในจานควบคุมที่ไม่มีสารป้องกันกำจัดโรคพืชเจริญเต็มจานและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = $\frac{100-(r2 \times 100)}{R2}$

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 ดูแลตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร จนถึงระยะสุกแก่ทางสรีระ เก็บเกี่ยวถั่วเหลืองมาตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ 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 องศา

กรมวิชาการเกษตร

เซลเซียส) โดยให้แสง NUV 12 ชั่วโมง สลับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากครบกำหนดการบ่มนำจานเพาะไปตรวจสอบเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การบันทึกข้อมูล

- เปอร์เซ็นต์เมล็ดติดเชื้อ
- เปอร์เซ็นต์เมล็ดเน่าโฟมอปซิส
- คุณภาพเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ความงอก เปอร์เซ็นต์ความแข็งแรง

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2562 – กันยายน 2564 ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

3. การปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

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

❑ เปลี่ยนแปลงงบประมาณ โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

❑ เปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์/ผลผลิต โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 3 ผลการศึกษา

3.1 ผลการดำเนินงานของโครงการ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาแนวทางในการจัดการโรคที่สำคัญของการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ได้แก่ เชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงและเชื้อรา Phomopsis sp สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิส ซึ่งในโครงการได้มีวิธีทางเคมีโดยการใช้สารเคมีที่เหมาะสม วิธีทางกายภาพโดยการใช้แสงยูวี และวิธีทางชีวภาพโดยการใช้สารสกัดพืช สารกระตุ้นการต้านทานโรคและการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้

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 จากการเตรียมเชื้อรา *Cercospora kikuchii* จากการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธี Blotter method แล้วทำการแยกเชื้อ *Cercospora kikuchii* พบลักษณะโคโลนีค่อนข้างกลม เส้นใยมีการเจริญขึ้นหนาแน่นฝังลงไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และพบรอยบุ๋มหรือรอยยุบตัวของอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณขอบโคโลนีและไม่พบการสร้างสปอร์ สร้างรงควัตถุสีม่วงจนถึงสีแดงรอบๆโคโลนีบนอาหาร PDA เมื่อนำสารสกัดหยาบพืช 20 ชนิด ไปทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในช่วง 14.5 – 100% โดยส่วนใหญ่สารสกัดจากพืชที่มีน้ำมันสามารถยับยั้งเชื้อราได้ดี ได้แก่ กานพลู และข่าสามารถยับยั้งได้มากที่สุด 100% ไม่แตกต่างจากคาร์เบนดาซิมซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้ควบคุมเชื้อรา รองลองมาคือ ว่านน้ำ ช้าพลู ใบแมงลักป่า และขิง ที่สามารถยับยั้งได้มากกว่า 70% น้ำมันหอมระเหยจากพืชเหล่านี้เป็นสารที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อฆ่าเชื้อราที่ก่อโรคและแบคทีเรีย มักพบสารกลุ่ม terpenes (terpenoids) เป็นองค์ประกอบ (Noriega, 2020) ดังนั้น ข่า กานพลู และช้าพลู จึงถูกเลือกมาสกัดต่อให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธี Column chromatography ได้สารสกัด 12 ส่วน จากพืช 3 ชนิด เมื่อทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของสารสกัด 12 ส่วน ในอัตรา 2500 ppm ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* 100% ได้แก่ ข่า (hexane), กานพลู (hexane), กานพลู (chloroform1), กานพลู (chloroform2) นำสารสกัดส่วนที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercosporl kikuchii* ได้แก่ ข่า (hexane), กานพลู (hexane), กานพลู (chloroform1), กานพลู (chloroform2), มาแยกสารกึ่งบริสุทธิ์โดยเทคนิคทีแอลซี โดยใช้แผ่น TLC silica gel 60 F254 ได้สารกึ่งบริสุทธิ์แต่ละชนิดฉาบอยู่บนแผ่นทีแอลซี 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 ซึ่งพบว่าตำแหน่งที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราจากสารสกัดทั้ง 4 ชนิด เป็นสารกลุ่ม terpenoids ซึ่งยืนยันโดยการสเปรย์ด้วยน้ำยาทดสอบ p-anisaldehyde/sulfuric acid

ศึกษาชนิดของกลุ่มสารออกฤทธิ์โดยวิธีการทดสอบทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ

สารสกัดส่วนที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* จากข่า (hexane), กานพลู (hexane), กานพลู (chloroform1) และกานพลู (chloroform2) เมื่อถูกทดสอบด้วยวิธีการทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบ พบว่าสารกึ่งบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* คือ สารกลุ่ม terpenoids ผลการทดสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ด้วยวิธี Contact bioautography บนแผ่น TLC พบว่าตำแหน่งที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราเป็นสารกลุ่ม terpenoids ซึ่งให้ผลการทดลองตรงกับการทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีด้วยน้ำยาทดสอบชนิดต่างๆ (นพมาศและคณะ, 2554) ที่พบสารกลุ่ม terpenoids ในสารสกัดดังกล่าว และเมื่อพิจารณา % yield ของสารสกัดหยาบของกานพลู มีค่าเท่ากับ 24.4 %w/w ซึ่งมากกว่า

กรมวิชาการเกษตร

สารสกัดหยาบของข่า ที่มีค่าเท่ากับ 3.9 %w/w ผู้วิจัยจึงเลือกกานพลูเป็นพืชที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันกานพลู

การสกัดดอกกานพลูด้วยวิธี ultrasonic และ maceration โดยใช้เฮกเซน และเอทานอลเป็นตัวทำละลาย จะได้สารสกัดหยาบสีน้ำตาลข้นเหนียว ในขณะที่การสกัดด้วยวิธีกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) จะได้น้ำมันสีเหลืองอ่อน %yield ที่ได้จากการคำนวณด้วยสารสกัดหยาบต่อตัวอย่างบดแห้ง พบว่าวิธีการสั่นสะเทือนด้วยคลื่น ultrasonic ในเอทานอลได้สารสกัดหยาบมากที่สุด 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) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณ eugenol ในตัวอย่างกานพลูแห้งที่ได้จากแต่ละวิธีพบว่า ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากกระบวนการผลิตและต้นทุนการผลิตแล้ว วิธีการกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) เป็นวิธีที่ไม่ใช้ตัวทำละลายจึงมีต้นทุนการผลิตต่ำ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่รวดเร็ว และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ผู้วิจัยจึงเลือกวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) ในการสกัดน้ำมันกานพลูเพื่อพัฒนาเป็นสูตรผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปในขั้นตอนต่อไป

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 ลักษณะทางกายภาพของสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลูโดยผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 สามารถละลายน้ำได้ดี และมีค่า pH อยู่ในช่วงกรดอ่อน ซึ่งเป็นช่วงที่น้ำมันกานพลูคงสภาพมาก

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 การคงตัวของสารออกฤทธิ์สูตรผลิตภัณฑ์โดยหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Eugenol ก่อนอบ และหลังอบที่อุณหภูมิ 54 °C ด้วยวิธี GC-MS พบว่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Eugenol ก่อนอบ และหลังอบที่อุณหภูมิ 54 °C มีค่าลดลงเล็กน้อย 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 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 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*

กรมวิชาการเกษตร

ศึกษาวิธีแยกสาร eugenol จากน้ำมันกานพลูด้วยเครื่อง Flash Chromatograph

ผลการศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสาร eugenol จากน้ำมันกานพลูด้วยเครื่อง Flash Chromatograph ด้วยตัวทำละลาย 6 ระบบ พบว่า เวลาที่ eugenol ถูกแยกออกแต่ละระบบตัวทำละลายแตกต่างกัน ดังตารางที่ 11 เมื่อเปรียบเทียบตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ petroleum ether และ hexane พบว่า eugenol ถูกแยกออกมาที่เวลาไม่แตกต่างกัน 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 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 แต่ระบบที่ 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 สารออกเร็วที่สุดและสามารถแยก eugenol ออกจากพีคข้างเคียงได้ดีที่สุด 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) นอกจากนี้การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารที่ได้จากการแยกด้วยเทคนิค NMR จะช่วยยืนยันตัวตนสารได้อีกทางหนึ่ง โดย ^{1}H NMR สเปกตรัมของ eugenol (ใน $CDCl_3$) ของสารที่ได้จากการแยก มีสเปกตรัมตรงกับสารมาตรฐาน eugenol

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 โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC วิธีวิเคราะห์ eugenol ให้ผลการทดสอบ Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

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,

กรมวิทยาศาสตร์

101.49, 101.49 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่ 98-102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำไปวิเคราะห์ เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ได้อย่างถูกต้อง

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

2. การทดสอบสูตรผลิตภัณฑ์จากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

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) และมีเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานเท่ากับ 96, 96 และ 98 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Carmello และ Carlos (2018) พบว่าการคลุกเมล็ดพันธุ์ด้วยสารสกัดจากกานพลูและอบเชย มีผลทำให้การงอกของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมลดลง และอัญชิกา (2552) พบว่าการเคลือบเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองด้วยสารยูจีนอลที่มีระดับความเข้มข้นมากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์จะมีผลทำให้ความงอกของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองลดลง แต่ก็ทำให้ลดการปนเปื้อนของเชื้อราได้ สารคาร์เบนดาซิมเป็นสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่ใช้ในการฉีดพ่นเพื่อยับยั้งการเกิดโรคเมล็ดสีม่วงในระยะเริ่มติดฝักและระยะเริ่มติดเมล็ด ตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาคลุกเมล็ดเพื่อยับยั้งโรคเมล็ดสีม่วง

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 โดยกรรมวิธีที่คลุกเมล็ดพันธุ์ด้วยน้ำเปล่ามีเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานสูงที่สุด เท่ากับ 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

การทดสอบสูตรผลิตภัณฑ์จากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในโรงเรือนทดลอง

ทดสอบสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลูที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *C. kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในโรงเรือนทดลองภายหลังการพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราและน้ำมันกานพลู 40% w/w EC ตามกรรมวิธี เก็บเกี่ยวและปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์ นำเมล็ดถั่วเหลืองมาหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและคุณภาพเมล็ดพันธุ์ พบว่าการฉีดพ่นด้วยน้ำมันกานพลู 40% w/w EC ที่อัตรา 200

กรมวิชาการเกษตร

มิลลิลิตรต่อน้ำ 10 ลิตรมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับการฉีดพ่นด้วยน้ำมันกานพลู 40% w/w EC ที่อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 10 ลิตรและน้ำกลั่น แต่ไม่มีความแตกต่างกับการฉีดพ่นด้วยสารคาร์เบนดาซิม โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเมล็ดสีม่วงน้อยที่สุดเท่ากับ 4.25 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือฉีดพ่นด้วยอัตรา 100 และ 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 10 ลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเมล็ดสีม่วง 5.38 และ 5.56 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับสอดคล้องกับการศึกษาของ 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

3. ผลของแสงยูวีซีต่อการควบคุมโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

เมล็ดพันธุ์ที่เก็บเกี่ยวจากแปลงที่ปลูกในช่วงฤดูฝน พบว่ามีเชื้อราหลายชนิดที่เจริญบนผิวเมล็ดพันธุ์ โดยสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มได้แก่ เชื้อสาเหตุโรคเมล็ดพันธุ์ที่สำคัญได้แก่ เชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วง และเชื้อรา *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิส และกลุ่มเชื้อราทั่วไปและและเชื้อราในโรงเก็บ ได้แก่ *Aspergillus flavus, Aspergillus niger* และ *Cladosporium* sp. และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์มาให้ได้รับแสงยูวีซีที่เวลาต่างๆ พบว่าแสงยูวีซีมีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus niger* ได้ดีเมื่อได้รับแสงยูวีซีเป็นเวลา 10 นาทีขึ้นไป ในขณะที่แสงยูวีซีไม่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเมล็ดพันธุ์ *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp. และเชื้อราทั่วไปที่พบในแปลง ได้แก่ เชื้อรา *Cladosporium* sp. ซึ่งพบเป็นจำนวนมากที่สุดถึง 88 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเชื้อรา *Cladosporium* sp. เป็นราที่พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไป พบในพืชทุกชนิด รา และเศษซากพืช ซึ่งราชนิดนี้มีลักษณะเป็นรา secondary invaders หรือเป็นสาเหตุโรคที่แยกได้จากใบพืชและแยกได้มากที่สุดในอากาศ เนื่องจากราชนิดนี้มีสปอร์ขนาดเล็ก เกิดอยู่บนก้านชูสปอร์ที่แตกกิ่งก้าน จึงทำให้รามีปริมาณมากและสามารถแพร่กระจายไปได้ในระยะที่ไกลมาก มีบางชนิดที่เป็นสาเหตุโรคพืชทำให้เกิดโรคใบจุด ใบไหม้ (Schubert K and Braun U, 2005) หรือบางชนิดเป็นปรสิตเจริญอยู่บนราชนิดอื่นและมีอีกหลายชนิดที่เป็น endophyte เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชและสามารถเจริญเติบโตได้ดีโดยไม่ทำให้ให้เกิดโรคหรือการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่ผิดปกติแก่พืชชนิดนั้นๆ 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)

สถาบันวิจัยเกษตร

ผลของแสงยูวีซีต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

จากการทดสอบประสิทธิภาพตู้ให้แสงยูวีซีต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ได้แก่ ความงอกมาตรฐานและความแข็งแรงด้วยวิธีการเร่งอายุเมื่อได้รับแสงที่เวลาต่างๆ กันพบว่าแสงยูวีซีไม่มีผลให้คุณภาพเมล็ดพันธุ์ลดลง โดยมีความงอกและความแข็งแรงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมล็ดพันธุ์ที่ได้รับแสงยูวีซีที่เวลาต่างๆ มีความงอกมาตรฐาน 65-77 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับแสงยูวีมีความงอก 71 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความแข็งแรงอยู่ระหว่าง 50-61 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับแสงยูวีมีความแข็งแรงเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเมล็ดพันธุ์ที่ได้รับแสงยูวีซีมีความงอกและความแข็งแรงใกล้เคียงกับเมล็ดพันธุ์ที่ไม่ได้รับแสงยูวีซี อย่างไรก็ตามเมล็ดที่ได้รับการแสงยูวีซีมีความงอกมีแนวโน้มสูงขึ้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานที่ศึกษาในเมล็ดพันธุ์พืชอื่นหลายชนิด เช่น ถั่วเหลือง ข้าวสาลี และทานตะวัน (Pournavab *et al*., 2019) ซึ่งเมล็ดเหล่านี้เมื่อผ่านการได้รับแสงยูวีซีมีความงอกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเมล็ดที่ไม่ได้รับแสงยูวีซี ซึ่งความอ่อนไหวของเนื้อเยื่อพืชต่อการได้รับแสงยูวีซีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตามสรีรวิทยาของพืช องค์ประกอบ และความหนาของชั้นเนื้อเยื่อพืช ซึ่งแสงยูวีซีสามารถกระตุ้นระบบต้านทานอนุมูลอิสระด้วยเอนไซม์และไม่ใช่เอนไซม์เพื่อตอบสนองความเครียดในพืชที่แตกต่างกันเมื่อได้รับแสงยูวิซีในระดับต่างๆกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้แสงยูวีซีในเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง พบว่าสามารถกระตุ้นความงอก ความแข็งแรงของต้นกล้า ผลผลิต เมื่อได้รับแสงยูวีซีนานกว่า 60 นาทีเมื่อเทียบกับเมล็ดพันธุ์ชุดควบคุมที่ไม่ได้รับแสงยูวีซี (Neelamegam and Sutha, 2015)

4. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วง 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

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 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ สอดคล้องกับวิเชียร (2537) กล่าวว่าการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดที่แสดงอาการสีม่วงเทียบกับเมล็ดปกติ พบว่า เปอร์เซ็นต์ความงอก โปรตีน น้ำมัน และองค์ประกอบกรดไขมันไม่แตกต่างกัน

น้ำหนัก 100 เมล็ด

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วง ในสภาพเรือนทดลอง พบว่าทุกกรรมวิธี น้ำหนัก 100 เมล็ด ไม่แตกต่างกัน สอดคล้องกับมณฑา (2532) ได้ศึกษาการป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงของถั่วเหลืองโดยการพ่นสารเคมี พบว่าการปลูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ให้น้ำหนัก 100 เมล็ด ไม่แตกต่างกันระหว่างการพ่นสารและไม่พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา ทุกกรรมวิธี

กรมวิชาการเกษตร

การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากขั้นตอนที่ 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 เช่นเดียวกับการป้องกันกำจัดโรคเมล็ดด่างในข้าว ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Cercospora oryzae* แนะนำให้พ่น Propiconazole + Difenoconazole หรือพ่น Azoxystrobin ในระยะที่ข้าวกำลังจะให้รวงหรือให้รวงเป็นเมล็ดแล้ว (กรมส่งเสริมการเกษตร 2557)

ความงอก และความแข็งแรง

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

น้ำหนัก 100 เมล็ด

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วง ในสภาพแปลงทดลอง พบว่าทุกกรรมวิธี น้ำหนัก 100 เมล็ด ไม่แตกต่างกัน สอดคล้องกับมณฑา (2532) ได้ศึกษาการป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงของถั่วเหลืองโดยการพ่นสารเคมี พบว่าการปลูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ให้น้ำหนัก 100 เมล็ด ไม่แตกต่างกันระหว่างการพ่นสารและไม่พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา ทุกกรรมวิธี

5. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cercospora kikuchii*, *Phomopsis* sp. ในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 15 ไอโซเลต ให้ผลยับยั้งการเจริญได้ดี โดยไอโซเลต PSL 49 ยับยั้งได้ดีที่สุด 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 ไอโซเลตPSL 49, PSL 70, PSL 79, PSL 175 และ PSL 423 จะเห็นได้ว่าเชื้อไอโซเลท PSL 49 สามารถยั้บยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp. ได้ดีดังนั้นจึงคัดเลือกไอโซเลท PSL 49

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 และแปรผลการทดลองด้วยโปรแกรม

กรมวิชาการเกษตร

สำเร็จรูป 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 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

6. ประสิทธิภาพของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคในถั่วเหลือง

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* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ 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 จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการฉีดพ่นถั่วเหลืองด้วยอิลิซิเตอร์ได้แก่ เมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซีเตท สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนโปรตีน *PR* ที่เกี่ยวข้องกับระบบความต้านทานโรค ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีบทบาทในการป้องกันการรุกรานของเชื้อทั้งในระบบการตอบสนองแบบเฉียบพลันหรือแบบกระจาย เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อกระจายเพิ่มขึ้น มีการค้นพบว่าการสังเคราะห์โปรตีน PR ถูก

กรมวิชาการเกษตร

ควบคุมตั้งแต่กระบวนการถอดรหัสของยีน โปรตีน *PR* จะถูกสังเคราะห์ขึ้นหลังจากได้รับเชื้ออย่างน้อย 8 ชั่วโมง (Matsuoka and Ohashi, 1986) และโปรตีนนี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นเฉพาะบริเวณที่ถูกกระตุ้น แต่จะไม่มีการส่งโปรตีน PR ไปยังบริเวณอื่น เนื่องจากโปรตีน PR มีบทบาทสำคัญต่อการจัดการโรค

ผลของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการเจริญเติบโต และองค์ประกอบผลผลิต

จากการพ่นสารเมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซีเตทกับต้นถั่วเหลืองตามกรรมวิธศึกษา พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของสารให้ผลของจำนวนข้อต่อต้น จำนวนกิ่งต่อต้นและน้ำหนัก 100 เมล็ดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิต แต่ความสูง จำนวนฝักต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อต้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการพ่นสารเมทิลจัสโมเนต มีความสูงอยู่ระหว่าง 65-81 เซนติเมตร จำนวนข้อ 14-16 ข้อต่อต้น จำนวนกิ่ง 2 กิ่งต่อต้น จำนวนฝัก 49-80 ฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น 79-136 เมล็ด ซึ่งการพ่นด้วยเมทิลจัสโมเนตที่ระดับความเข้มข้น 120 ppm มีผลทำให้ต้นถั่วเหลืองมีความสูง จำนวนฝักต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อต้นสูงสุด เท่ากับ 81 เซนติเมตร จำนวนฝัก 80 ฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น 136 เมล็ด ในขณะที่การพ่นด้วยเอทิลอะซีเตทมีความสูงอยู่ระหว่าง 66-76 เซนติเมตร จำนวนข้อ 14-16 ข้อต่อต้น จำนวนกิ่ง 2-3 กิ่งต่อต้น จำนวนฝัก 57-93 ฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้นเท่ากับ 102-161 เมล็ด

ผลของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

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

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

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 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

กรมวิชาการเกษตร

และ thiophanate-methyl ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Methyl Benzimidazole Carbamates ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดการดื้อยา และยังมีความเสี่ยงที่จะเกิดความต้านทานข้าม (cross-resistance) ระหว่างสารเคมีที่เป็นสมาชิกในกลุ่มนี้ (FRAC, 2012) สารแบบสัมผัสที่ยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ทุกชนิดคือ mancozeb จึงใช้เพื่อป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ได้ทุกระยะของพืช อีกทั้งมีความเสี่ยงต่ำต่อการดื้อยาจึงเหมาะที่จะใช้สลับกับสารแบบดูดซึม หรือสารที่มีความเสี่ยงต่อการดื้อยาสูงเพื่อป้องกันการดื้อยา

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% 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

3.2 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง (Output)

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
1. องค์ความรู้	1	เรื่อง	1. องค์ความรู้ใหม่	1	เรื่อง	องค์ความรู้เรื่อง ผลของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานในถั่วเหลือง	การพ่นสารด้วยเมทิลจัสโมเนตมีประสิทธิภาพต่อการลดปริมาณเชื้อ *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลืองได้สูงถึง 80%
2. ผลงานตีพิมพ์ระดับชาติ (ระบุฐานข้อมูลที่ตีพิมพ์)	2	เรื่อง	2. ผลงานตีพิมพ์ระดับชาติ	2	เรื่อง	1. ตีพิมพ์ระดับชาติในวารสารแก่นเกษตร เรื่อง ผลของสูตรผลิตภัณฑ์กานพลูต่อการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Cercospora kikuchii* 2. ตีพิมพ์ระดับชาติในผลงานวิจัยเรื่องเต็ม Proceeding การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 14 เรื่อง ประสิทธิภาพของสารไบโอแอค ทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออก ของยีนที่สามารถกระตุ้นความ ต้านทานในถั่วเหลือง หน้า 681-688	

กรมวิชาการเกษตร

3. การประชุมเผยแพร่ผลงาน/สัมมนาระดับชาติ	2	เรื่อง	3. การประชุมเผยแพร่ผลงาน/สัมมนาระดับชาติ 3.1 นำเสนอแบบปากเปล่า 3.2 นำเสนอแบบโปสเตอร์	 1 1	 เรื่อง เรื่อง	- นำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง ประสิทธิภาพของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคในถั่วเหลือง ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 14 ระหว่างวันที่ 12 - 14 พ.ศ. 2562 ณ โรงแรมดุสิตธานีหัวหิน จังหวัดเพชรบุรี - นำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง ประสิทธิภาพของเชื้อบาซิลลัสที่มียีนสังเคราะห์เปปไทด์ต้านจุลชีพต่อการควบคุมโรคเมล็ดสีม่วงของถั่วเหลืองในงานแถลงผลงานด้านการวิจัยและพัฒนาของกรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2564	
4. ต้นแบบผลิตภัณฑ์ระดับห้องปฏิบัติการ	1	ต้นแบบ	4. ต้นแบบผลิตภัณฑ์ ระดับห้องปฏิบัติการ	1	ต้นแบบ	ต้นแบบผลิตภัณฑ์ สูตรผลิตภัณฑ์ชนิดน้ำมันเข้มข้นแบบเหลวที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันจากน้ำมันกานพลูที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii*	การพ่นสารด้วยน้ำมันกานพลูชนิดน้ำมันเข้มข้นแบบเหลว มีประสิทธิภาพภาพต่อการลดปริมาณเชื้อ *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลืองได้สูงถึง 60%

กรมวิชาการเกษตร

3.3 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง (Outcome) (ถ้ามี)

ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลลัพธ์
- คู่มือเทคโนโลยีการจัดการโรคพืชในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง	2565
- ผลิตภัณฑ์สูตรผลิตภัณฑ์ชนิดน้ำมันเข้มข้นแบบเหลวที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันจากน้ำมันกานพลูที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii*	2565

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

3.4 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง (Impact) (ถ้ามี)

ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลกระทบ
- ลดการสูญเสียเมล็ดพันธุ์ที่ต้องคัดทิ้งเฉลี่ย10%	2566
- ลดการใช้สารเคมีกำจัดโรคพืชเป็นการลดสารตกค้างในดินและน้ำซึ่งส่งผลต่อสิ่งแวดล้อมและส่งเสริมสุขภาพที่ดีของผู้ปฏิบัติงาน	2566
- เป็นแหล่งความรู้เทคโนโลยีด้านการจัดการโรคที่สำคัญของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่สามารถนำไปอ้างอิงได้เพิ่มขึ้น	2567

3.5 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

วิธีการ/กระบวนการผลักดันงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ด้านสังคม โดยเกษตรกรผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

กลุ่มเกษตรกรนำเทคโนโลยีการจัดการโรคในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ไปปรับใช้เน้นการจัดการโรคโดยใช้วิธีทางชีวภาพ และการใช้สารเคมีจัดการโรคพืชที่เหมาะสมสามารถนำไปถ่ายทอดให้สมาชิกในกลุ่มผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองไปปรับใช้ในพื้นที่ผลิตเมล็ดพันธุ์ส่งผลให้ได้เมล็ดพันธุ์คุณภาพดีเพิ่มขึ้น

ด้านวิชาการ โดยนักวิชาการ นักวิจัย

1. เสริมสร้างองค์ความรู้ด้านฐานข้อมูลการจัดการโรคของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง
2. เกิดองค์ความรู้ใหม่ที่สามารถนำมาต่อยอดในการศึกษาวิจัยครั้งต่อไป
3. ผลงานที่ถูกเผยแพร่ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติและเผยแพร่ผลงานในรูปเอกสารรวมเล่มผลงานวิจัยในระบบออนไลน์ และเผยแพร่ความรู้จากผลงานวิจัยผ่านทางเอกสารวิชาการ การจัดการองค์ความรู้เรื่อง โรคและแมลงศัตรูที่สำคัญของการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและการป้องกันกำจัด และนำไปถ่ายทอดแบ่งปันความรู้อย่างเป็นระบบ เพื่อให้บุคลากรทุกคนในหน่วยงานสามารถเข้าถึงความรู้ และปฏิบัติงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล

สรุปผลและอภิปรายผล

สรุปผล

การศึกษาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดพืชที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* 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

กรมวิชาการเกษตร

สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลถูกต้อง และแม่นยำ ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล และผลวิเคราะห์ปริมาณ eugenol ในสูตรผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปจากน้ำมันกานพลู (B) ได้เท่ากับ 36.87% W/W

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

ประสิทธิภาพของแสงยูวีซีต่อการใช้ควบคุมโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์และผลต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พบว่าแสงยูวีซีสามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus niger* ได้ดีเมื่อได้รับแสงยูวีซีเป็นเวลา 10 นาทีขึ้นไป ในขณะที่แสงยูวีซีไม่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเมล็ดพันธุ์ *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp. ได้แต่อย่างไรก็ตามแสงยูวีซีไม่มีผลให้คุณภาพเมล็ดพันธุ์ลดลง โดยมีความงอกและความแข็งแรงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมล็ดพันธุ์ที่ได้รับแสงยูวีซีที่เวลาต่างๆ มีความงอกมาตรฐาน 65-77 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับแสงยูวีมีความงอก 71 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความแข็งแรงอยู่ระหว่าง 50-61 เปอร์เซ็นต์

ประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลือง พบว่าการพ่นด้วยสารกำจัดเชื้อรา Propiconazole+Difenoconazole 15%+15% EC อัตรา 10 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร ที่ระยะ R2 และ R6 การคลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วยสารกำจัดเชื้อรา Captan 50% WP อัตรา 3 กรัม/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม และพ่นด้วยสารกำจัดเชื้อรา Azoxystrobin 25% SC อัตรา 5 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร ที่ระยะ R2 และ R6 การคลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วยสารกำจัดเชื้อรา Captan 50% WP อัตรา 3 กรัม/เมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม และพ่นสารกำจัดเชื้อรา Propiconazole + Difenoconazole 15%+15% EC อัตรา 10 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร ที่ระยะ R2 และ R6 สามารถใช้ในการป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงได้ดี ปลอดภัยต่อมนุษย์ สิ่งแวดล้อม และสามารถใช้ทดแทนการใช้สาร carbendazim ในการป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงได้ แต่อย่างไรก็ตามแนะนำให้เลือกใช้การพ่นสารกำจัดเชื้อรา Propiconazole + Difenoconazole 15%+15% EC ที่ระยะ R2 และ R6 เนื่องจากมีราคาต้นทุนถูกที่สุด และพบการเกิดโรคเมล็ดสีม่วงต่ำสุด เพียง 4.75%

ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 15 ไอโซเลตที่แยกได้สามารถยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วง ในขณะที่จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 5 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิสได้ดีโดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลต PSL 49 สามารถยับยั้งทั้งเชื้อ *Cercospora kikuchii* และเชื้อ *Phomopsis* sp. เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลต PSL 49 ไปจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาผลทดสอบชีวเคมีและการใช้น้ำตาลด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHB พบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนทานต่อสารเคมี รังสี และความร้อนได้ดีส่วนกรรมวิธีพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในระยะต้นกล้า V1 พบการติดเชื้อ *C. kikuchii* น้อยสุดเท่ากับ 41% เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีการติดเชื้อ *C. kikuchii* เท่ากับ 51.5% จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการฉีดพ่นเพื่อควบคุมเชื้อราในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง แต่อาจจะต้องฉีดพ่นหลายครั้งเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

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

เชื้อ *Phomopsis* sp. (Diaporthe) ที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลืองที่มีอาการของโรคเมล็ดเน่า และแยกให้เชื้อบริสุทธิ์เมื่อมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้แก่ ลักษณะเส้นใย รูปร่างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อมีเส้นใยเจริญอย่างรวดเร็ว

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ปกคลุมเมล็ด เชื้อมีการสร้างโคนิเดียมีลักษณะ elliptical และ hyaline (มีขนาด 6.2 - 7.2 × 2.6 - 3.2 μm) โคโลนีที่เจริญบนอาหารมีลักษณะเป็นกลุ่ม แน่นสีขาว Stromata มีขนาดใหญ่ สีดำและกระจายทั่วทั้งจาน เมื่อนำไปทดสอบสารป้องกันกำจัดโรคพืช ที่ความเข้มข้นต 4 อัตรา คือ ต่ำกว่าอัตราแนะนำ อัตราแนะนำตามฉลาก และสูงกว่าอัตราแนะนำ 0.5 เท่า พบว่าสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phomopsis* sp. ได้ดีที่สุด ได้แก่ Carbendazim, Thiophanate-methyl, Difenoconazole และ Mancozeb สามารถยับยั้งเชื้อได้สูงสุดถึง 100% แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทุกระดับความเข้มข้น กรรมวิธีพ่นด้วย Thiophanate-methyl ที่ระยะ R3+R5 สามารถลดปริมาณเชื้อ *Phomopsis* sp และ *Cercospora kikuchii* ได้สูงสุด

อภิปรายผล

จากการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการควบคุมโรคเมล็ดพันธุ์สำหรับการยกระดับคุณภาพเมล็ดพันธุ์และเพิ่มผลผลิตโดยลดความเสียหายจากโรคพืช โดยดำเนินการศึกษาการควบคุมโรคโดยวิธีการต่างๆ ได้แก่การศึกษาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดพืชที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora Kikuchi* พบว่าสารสกัดจากกานพลู (น้ำมันกานพลู) ให้ผลดีที่สุดเมื่อทดสอบกลุ่มสารทางพฤกษเคมีพบว่ามีสารกลุ่ม terpenoids (eugenol ในน้ำมันกานพลู) เป็นหลักซึ่งสอดคล้องกับการการทดลองของอัญชิกา (2556) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพร พบว่าสารสกัดว่านน้ำ และกานพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราดีที่สุด โดย eugenol เป็นสารออกฤทธิ์ในกานพลู และ eugenol ความเข้มข้น 1% เคลือบเมล็ดถั่วเหลือง พบว่าไม่มีผลกระทบต่อการงอกของเมล็ดพันธุ์รวมถึงสามารถควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองได้เท่ากับสารเคมี captan และวิธีการสกัดน้ำมันกานพลูที่ดีที่สุด คือ การกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) ให้ปริมาณ eugenol มากที่สุดและเมื่อพิจารณาจากกระบวนการผลิตและต้นทุนการผลิตแล้ว วิธี hydro-distillation เป็นวิธีที่ไม่ใช้ตัวทำละลายจึงมีต้นทุนการผลิตต่ำ เป็นวิธีที่รวดเร็ว และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม แต่อย่างไรก็ตาม กานพลูซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในผลิตภัณฑ์ มีราคาสูง เนื่องจากเป็นพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และนำเข้าจากต่างประเทศ จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะส่งเสริมการปลูกกานพลูในประเทศไทยให้มากขึ้น นอกจากนี้ การศึกษาพืชชนิดอื่นที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคศัตรูพืช และมีราคาถูก หาได้ง่าย ก็เป็นงานวิจัยในอนาคตที่น่าสนใจเช่นเดียวกัน

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

การใช้แสงยูวีซีต่อการควบคุมโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์และผลต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพบว่าแสงยูวีซีสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus niger* ได้ดี แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดพันธุ์ *Cercospora kikuchii* และ *Phomopsis* sp. ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าแสงยูวีซีไม่สามารถแทรกซึมเข้าไปภายในเปลือกหุ้มเมล็ดและเอมบริโอซึ่งเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดพันธุ์ทั้งสองชนิดมีการเข้าทำลายภายในเมล็ดและอาศัยอยู่บริเวณเปลือกหุ้มเมล็ดและเอมบริโอจึงทำให้ไม่สามารถกำจัดเชื้อเหล่านี้ สอดคล้องกับรายงานการวิจัยกล่าวว่าระดับที่ทำลายเชื้อโรคขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของแสงยูวีที่ได้รับ ระยะห่างระหว่างแหล่งกำเนิดแสงและตัวอย่างที่ได้รับแสง ความลึกในการแทรกซึมของแสงยูวีซีซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญมาก และข้อจำกัดของแสงยูวีในการแทรกซึมผ่านวัตถุ (ยกเว้นน้ำและของเหลวบางชนิด) เพราะผิวชั้นนอกของวัตถุจะดูดซับรังสีเอาไว้และอันตรายจากรังสีต่างๆ แต่อย่างไรก็ตามแสงยูวีซีไม่มีผลให้คุณภาพเมล็ดพันธุ์ลดลง โดยมีความงอกและความแข็งแรงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมล็ดที่ได้รับการแสงยูวีซีที่นานขึ้นพบว่าความงอกมีแนวโน้มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับแสง ซึ่งแสงยูวีซีสามารถกระตุ้นระบบต้านทานอนุมูลอิสระด้วยเอนไซม์และไม่ใช่เอนไซม์เพื่อตอบสนองความเครียดในพืช ดังนั้นแสงยูวี

กรมวิชาการเกษตร

ซีมีความเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในด้านการกำจัดเชื้อที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์รวมทั้งยังสามารถส่งเสริมความงอกของเมล็ดพันธุ์อีกด้วย

ประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงถั่วเหลือง พันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่ดีที่สุดคือการพ่นสารกำจัดเชื้อรา Propiconazole + Difenoconazole 15%+15% EC อัตรา 10 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร ที่ระยะ R2 และ R6 สามารถใช้ในการป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงได้ดี ปลอดภัยต่อมนุษย์ สิ่งแวดล้อม และสามารถใช้ทดแทนการใช้สาร carbendazim ในการป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงได้ ซึ่งสาร propiconazole + difenoconazole จัดอยู่ในกลุ่ม Triazole ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารดูดซึมและแทรกซึมเข้าสู่พืชได้เร็ว กลไกออกฤทธิ์รบกวนขบวนการการสร้างสปอร์เชื้อรา และยับยั้งการสร้างและพัฒนาเส้นใยของเชื้อรา

การฉีดพ่นถั่วเหลืองด้วยอิลิซิเตอร์ได้แก่ เมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซีเตท มีรายงานการวิจัยศึกษาผลของการฉีดพ่นด้วยอีลิซิเตอร์ salicylic acid, methyl salicylate และ ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-6}, 10^{-3} และ 10^{-1} ของถั่วเหลืองในระยะ R1 (ระยะออกดอก) และระยะ R4 (ระยะติดเมล็ด) พบว่าเมื่อฉีดพ่นด้วย Methyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} ในระยะ R1 สามารถเพิ่มปริมาณไอโซฟลาโวนอย่างมีนัยสำคัญ และอีลิซิเตอร์ที่ทำการทดสอบทั้งสามชนิด ความเข้มข้นเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดในการเพิ่มปริมาณไอโซฟลาโวนมากกว่าระยะเวลาการฉีดพ่น (Zhang *et al*., 2006) แต่จากการทดลองในครั้งเกาะฉีดพ่นถั่วเหลืองด้วยอิลิซิเตอร์ได้แก่ เมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซีเตท พบว่าสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนโปรตีน *PR* ที่เกี่ยวข้องกับระบบความต้านทานโรคซึ่งเป็นกลุ่มที่มีบทบาทในการป้องกันการรุกรานของเชื้อทั้งในระบบการตอบสนองแบบเฉียบพลันหรือแบบกระจาย เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อกระจายเพิ่มขึ้น มีการค้นพบว่าการสังเคราะห์โปรตีน *PR* ถูกควบคุมตั้งแต่กระบวนการถอดรหัสของยีน โปรตีน *PR* จะถูกสังเคราะห์ขึ้นหลังจากได้รับเชื้ออย่างน้อย 8 ชั่วโมง (Matsuoka and Ohashi, 1986) และโปรตีนนี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นเฉพาะบริเวณที่ถูกกระตุ้น แต่จะไม่มีการส่งโปรตีน *PR* ไปยังบริเวณอื่น เนื่องจากโปรตีน *PR* มีบทบาทสำคัญต่อการจัดการโรค

ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ ได้แก่ ไอโซเลต PSL 49 สามารถยับยั้งเชื้อ *C. kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงและเชื้อ *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิส ซึ่งเชื้อราทั้งสองชนิดเป็นปัญหาสำคัญของการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองโดยเฉพาะการผลิตเมล็ดพันธุ์ในช่วงฤดูฝน เชื้อทั้งสองจะเข้าทำลายต้นถั่วเหลืองและทำให้เมล็ดพันธุ์ไม่ได้คุณภาพ สูญเสียความงอก ซึ่งจากผลการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์พบว่าไอโซเลต PSL 49 มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราทั้งสองชนิดได้ดี จึงนำไปจำแนกลักษณะพบว่า ไอโซเลต PSL 49 เป็นเชื้อสกุล *Bacillus subtilis* ซึ่งเชื้อในกลุ่มนี้มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดรวมทั้งโรคในถั่วเหลือง เช่น การใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BS06 สามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรครากเน่าในถั่วเหลือง และยังช่วยเพิ่มน้ำหนักราก ความสูงต้น ปริมาณคลอโรฟิลล์และความกว้างของลำต้นถั่วเหลืองอีกด้วย กลไกการเป็นปฏิปักษ์ที่สำคัญมีหลายรูปแบบ 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

สารเคมีแบบดูดซึมที่ค่อนข้างเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุโรค ได้แก่ carbendazim และ thiophanate methyl ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างลักษณะสปอร์ใส (hyaline) ในขณะที่ difenoconazole ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้หลายชนิด (broad spectrum) จึงเหมาะต่อการใช้สลับกับสาร carbendazim และ thiophanate methyl ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Methyl Benzimidazole Carbamates ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดการดื้อยาและยังมีความเสี่ยงที่จะเกิดความต้านทานข้าม (cross-resistance) ระหว่างสารเคมีที่เป็นสมาชิกในกลุ่มนี้ (FRAC, 2012; Brown et al., 1984) สารแบบสัมผัสที่ยับยั้งเชื้อราทดสอบได้

กรมวิชาการเกษตร

ทุกชนิดคือ mancozeb จึงใช้เพื่อป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ได้ทุกระยะของพืช อีกทั้งมีความเสี่ยงต่ำต่อการดื้อยาจึงเหมาะที่จะใช้สลับกับสารแบบดูดซึม หรือสารที่มีความเสี่ยงต่อการดื้อยาสูง เพื่อป้องกันการดื้อยา

ข้อเสนอแนะต่อผู้เกี่ยวข้องสำหรับการดำเนินงานในระยะต่อไป

การจัดการและการควบคุมโรคให้มีประสิทธิภาพนั้นจะต้องมีความรู้เกี่ยวกับการพัฒนาของโรค ความสัมพันธ์ระหว่างพืชและเชื้อโรค ตลอดจนสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเกิดโรค ดังนั้นการจัดการโรคจะต้องใช้วิธีผสมผสาน เช่น การใช้เมล็ดพันธุ์ที่สะอาดปราศจากโรค การจัดการสภาพแวดล้อมไม่ให้เหมาะสมต่อการเกิดโรค เช่น การกำจัดวัชพืชในแปลง การลดความชื้นในแปลงปลูก การเสริมธาตุอาหารตามความต้องการของพืช การหลีกเลี่ยงการใส่ปุ๋ยที่มีไนโตรเจนสูงเกินไป เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นเพียงการดำเนินงานช่วงเริ่มต้น ผู้ที่จะนำผลงานนี้ไปต่อยอดหรือขยายผลต่อต้องมีการนำไปใช้แบบผสมผสานในการจัดการโรคจึงจะเกิดประสิทธิภาพสูงสุด

ปัญหาและอุปสรรคในการทำงาน

1. เครื่องมือเกิดการขัดข้องในการวิเคราะห์สารสำคัญ เจ้าหน้าที่ไม่สามารถเดินทางไปซ่อมแซมได้เนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของโควิด

2. การจัดหาวัสดุทางวิทยาศาสตร์ต้องสั่งจากต่างประเทศต้องใช้ระยะเวลานานในการรอสินค้าเนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของโควิด

3. สภาพอากาศแปรปรวนทำให้มีผลกระทบต่อฤดูการในการปลูกพืชทดสอบ เจอปัญหาฝนตกชุกในระยะใกล้เก็บเกี่ยวผลผลิตทำให้พืชปลูกได้รับความเสียหาย

4. สภาพอากาศที่ร้อนจัดในฤดูแล้ง ทำให้การปลูกเชื้อโรคพืชเพื่อทำการทดสอบกรรมวิธีต่างๆมีปัญหา เชื้อไม่สามารถเจริญได้หลังการปลูกเชื้อบนต้นพืช จึงต้นดำเนินการเปลี่ยนวิธีดำเนินการ

เอกสารอ้างอิง

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

กฤติเดช อนันต์ และดุสิต อธินุวัฒน์ 2559. การพัฒนาชีวภัณฑ์จาก *Bacillus subtilis* TU-Orga1 เพื่อควบคุมโรคที่สำคัญของผักคะน้า. 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 และสรัญยา ณ ลำปาง. 2553. ลักษณะของเชื้อรา *Cercospora* ที่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิมสาเหตุโรคใบจุดของผักกาดหอมในจังหวัดเชียงใหม่. วารสารวิจัย มข. 15(11): 1053-1060.

มณฑา นันทพันธ์. 2532. การป้องกันกำจัดโรคเมล็ดสีม่วงของถั่วเหลืองโดยการพ่นสารเคมี ใน: รายงานผลการวิจัยประจำปี 2532. ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ กรมวิชาการเกษตร.

กรมวิชาการเกษตร

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

อัญชิกา สวัสดิ์วนิช. 2552. การเคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วยสารกำจัดศัตรูพืชชีวภาพเพื่อการควบคุมเชื้อราก่อโรคพืชของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร 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.

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 S. Ahmad. 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.

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

กรมวิชาการเกษตร

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.

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.

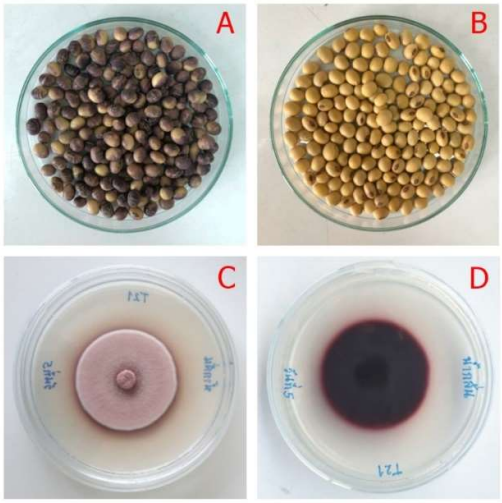
Snyder, L.R. 1978. Classification of the Solvent Properties of Common Liquids. *J. Chromatography.* 92: 223-234.

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.

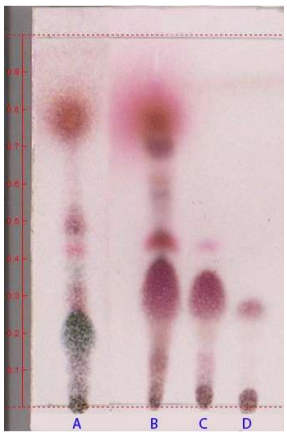
Yan, C. and D. Xie. 2015. Jasmonate in plant defence: sentinel or double agent. Plant Biotechnol. J. 13:1233-1240.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

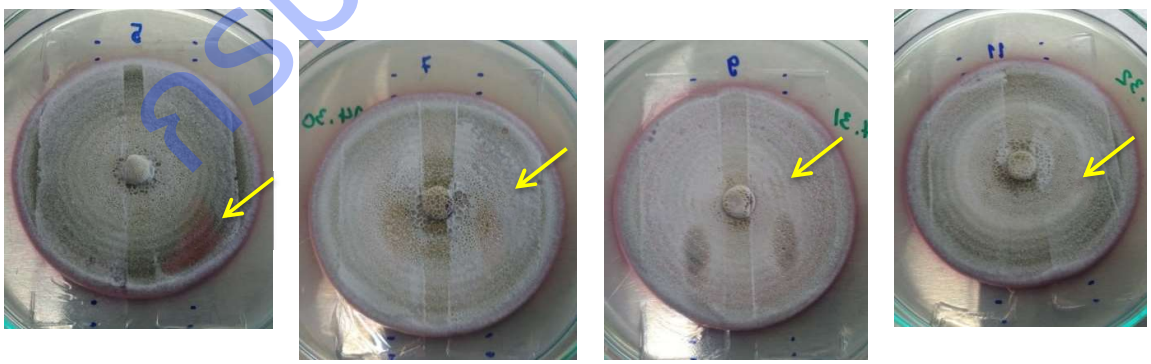
ภาคผนวก ก



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



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



ข่า (hexane), R_F 0.17-0.42

กานพลู (hexane), R_F 0.25-0.42

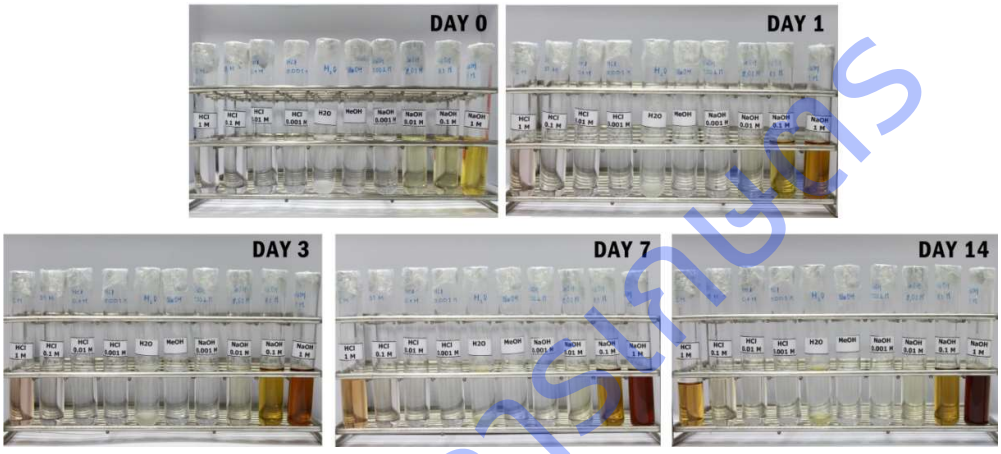
กานพลู (chloroform1), R_F 0.25-0.42

กานพลู (chloroform2), R_F 0.33-0.42

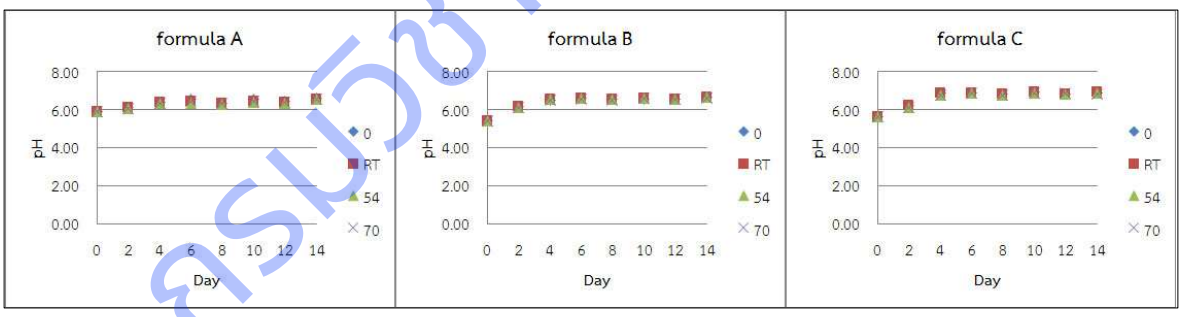
ภาพที่ 3 ตำแหน่งสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cercospora kikuchii*

กรมวิชาการเกษตร

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

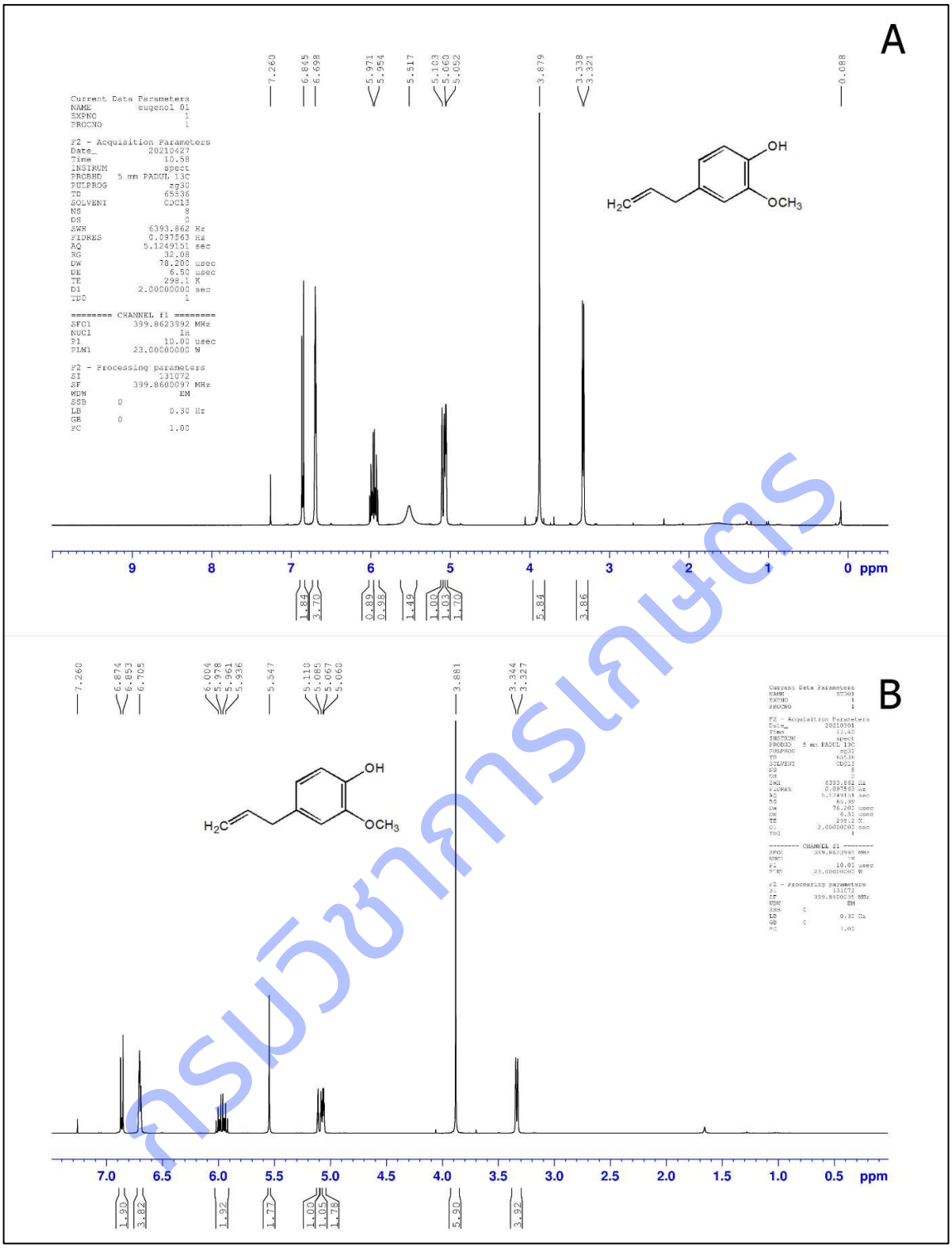


ภาพที่ 5 น้ำมันกานพลู ในตัวทำละลายกรด-ด่างที่เวลาต่างๆ



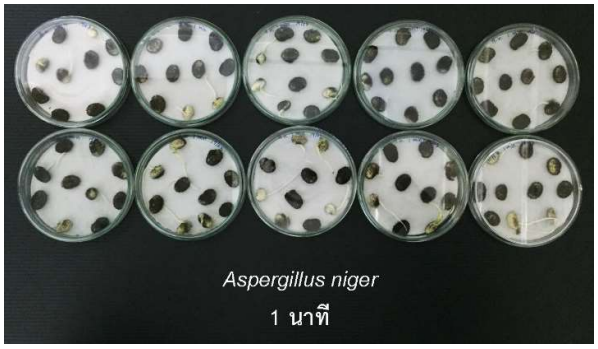
ภาพที่ 6 ค่า pH ของผลิตภัณฑ์ A, B และ C ที่ 0-14 วัน ภายใต้อุณหภูมิ 0, RT, 54 และ 70 องศาเซลเซียส

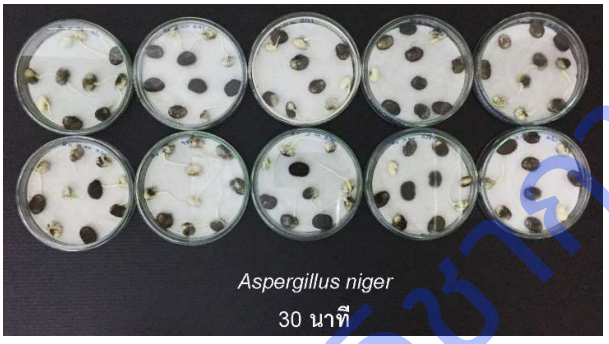
กรมวิชาการเกษตร

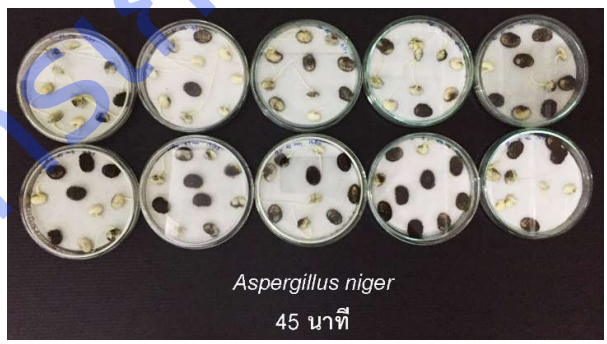


ภาพที่ 7 ^{1}H NMR สเปกตรัมของ eugenol (ใน $CDCl_3$) A) สารที่ได้จากการแยก และ B) สารมาตรฐาน

กรมวิชาการเกษตร

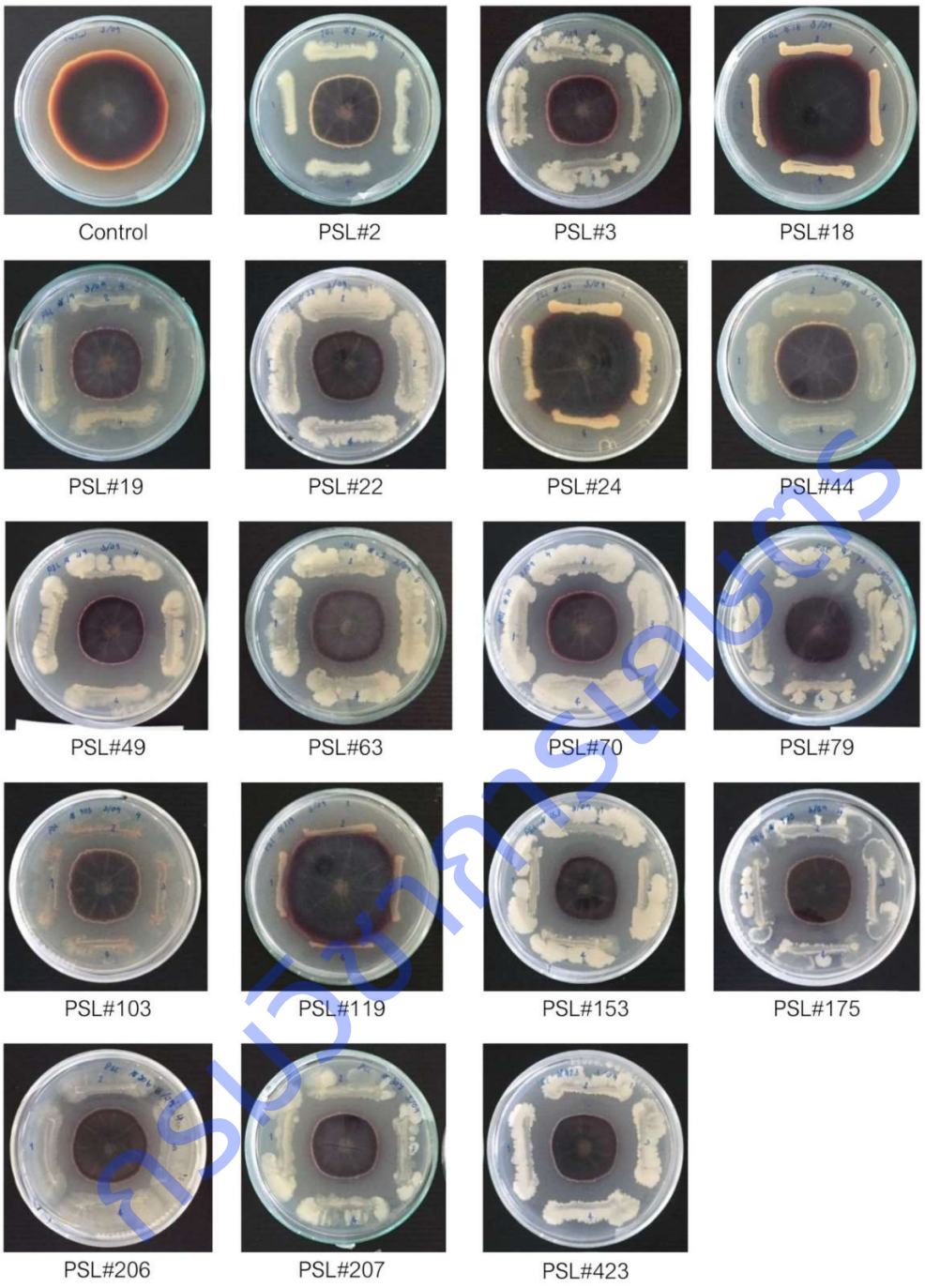






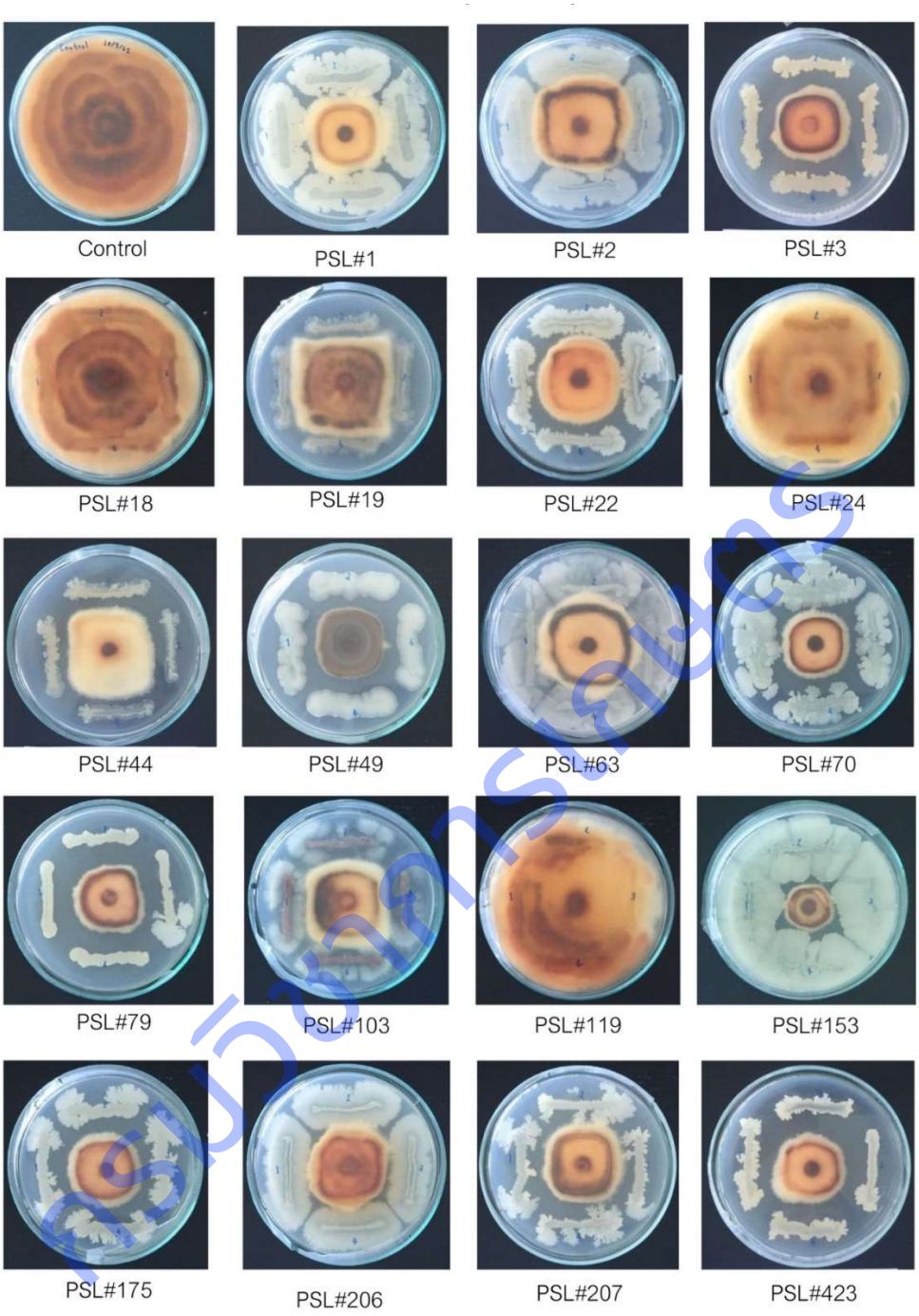
ภาพที่ 8 ผลของแสงยูวีซีต่อการควบคุมเชื้อราบนผิวเมล็ดพันธุ์

ตรวจเอกสารฉบับนี้



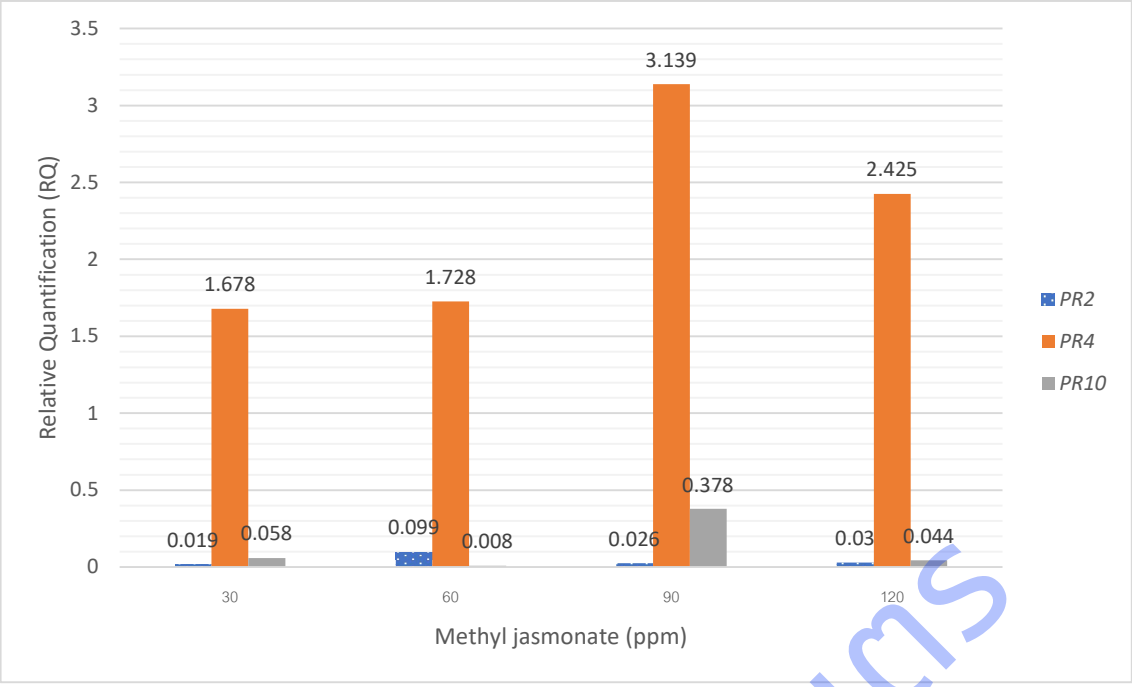
ภาพที่ 9 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้ต่อการควบคุมเชื้อ *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลือง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

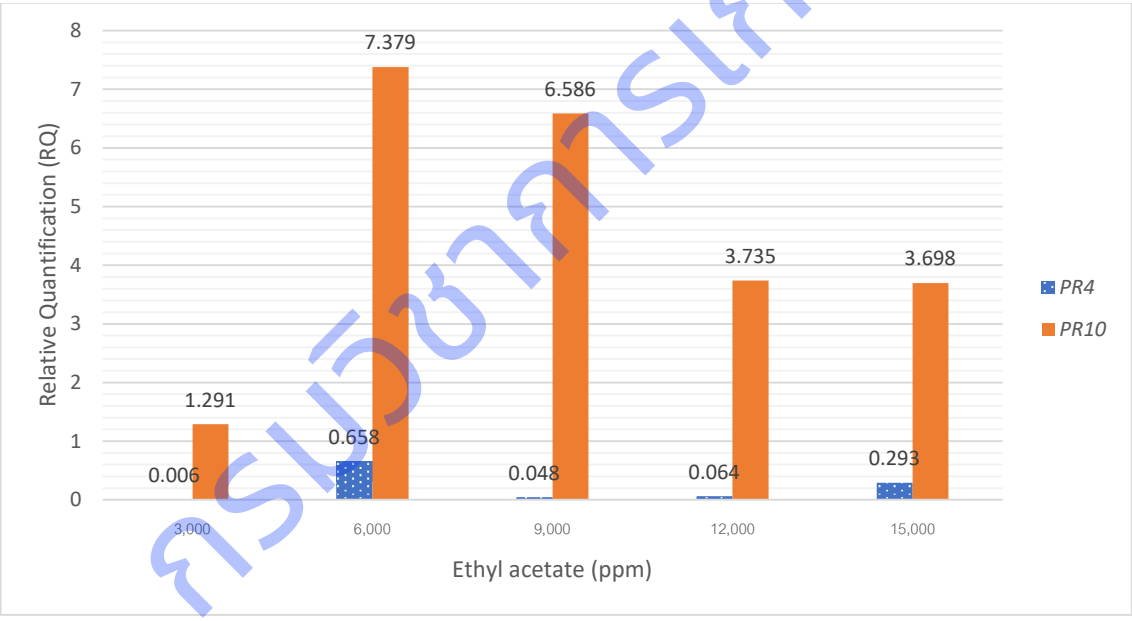


ภาพที่ 10 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้ต่อการควบคุมเชื้อ *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

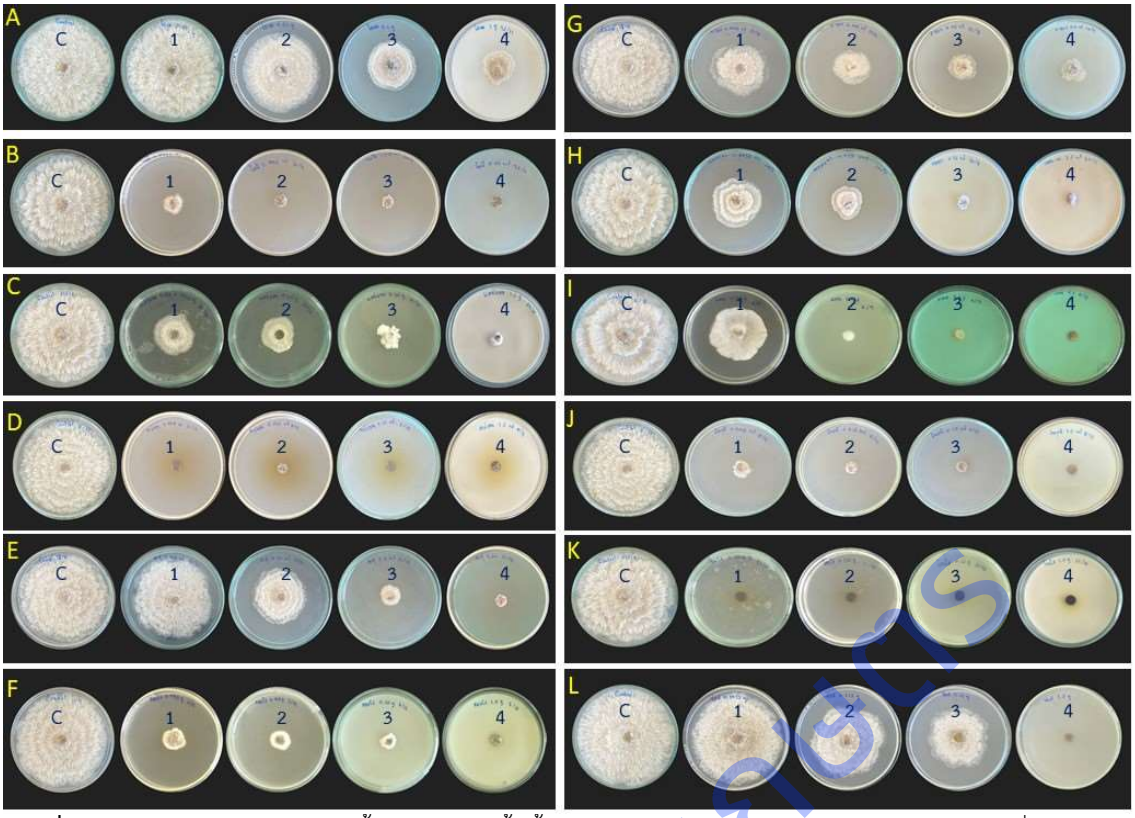


ภาพที่ 11 ผลของความเข้มข้นของเมทิลจัสโมเนตต่อการแสดงออกของยีน *PR2, PR4* และ *PR10* ในถั่วเหลือง



ภาพที่ 12 ผลของความเข้มข้นของเอทิลอะซีเตทต่อการแสดงออกของยีน *PR4* และ *PR10* ในถั่วเหลือง

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 13 ประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราต่อการยับยั้งเชื้อ *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิสในถั่วเหลือง

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบตัวอย่างพืช 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

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การยั้บยั้งเชื้อรา *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%

ตารางที่ 3 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดที่มีความบริสุทธิ์ขึ้น 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

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การยั้บยั้งเชื้อรา *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	ข้าพลู (hexane)	20.24 ± 1.43 c
10	ข้าพลู (chloroform1)	7.79 ± 0.64 e
11	ข้าพลู (chloroform2)	15.25± 0.50 d
12	ข้าพลู (methanol)	9.70 ± 0.95 e
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%

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

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 (g/kg)	ในกานพลูแห้ง (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%

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

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

กรมวิชาการเกษตร

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%

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

กรมวิชาการเกษตร

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

ตาราง 13 เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของ 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

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

กรมวิชาการเกษตร

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

ตารางที่ 16 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

ลิขสิทธิ์การเกษตร

ตารางที่ 17 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 18 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

ตารางที่ 19 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 20 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

ns= ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (>0.05)

ตารางที่ 21 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

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 22 แสดงการเกิดโรคเมล็ดสีม่วง ความงอก ความงอกหลังการเร่งอายุ และน้ำหนัก 100 เมล็ด ในสภาพเรือนทดลอง

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

ตารางที่ 23 แสดงการเกิดโรคเมล็ดสีม่วง ความงอก ความงอกหลังการเร่งอายุ และน้ำหนัก 100 เมล็ด ในสภาพแปลงทดลอง

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

ตารางที่ 24 ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลต PSL49 ต่อองค์ประกอบผลผลิต การเข้าทำลายของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* และคุณภาพเมล็ดพันธุ์

กรรมวิธี	ความสูง (ซม.)	ฝักต่อต้น	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)

ตารางที่ 25 ผลของความเข้มข้นเมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซิเตทต่อการเจริญและองค์ประกอบผลผลิตของถั่วเหลือง

กรรมวิธี	ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนข้อต่อต้น	จำนวนกิ่งต่อต้น	จำนวนฝักต่อต้น	จำนวนเมล็ดต่อต้น	เมล็ดเสียต่อต้น	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

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 26 ผลของความเข้มข้นเมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซิเตทต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและปริมาณการเข้าทำลายของเชื้อ *C. kikuchii*

กรรมวิธี	ความงอกมาตรฐาน (%)	ความแข็งแรงโดยวิธีเร่งอายุ (%)	ปริมาณการเข้าทำลายของเชื้อ *C. kikuchii* (%)
Methyl jasmonate 30 ppm	97a[1/]	98a	68b
Methyl jasmonate 60 ppm	98a	98a	42ab
Methyl jasmonate 90 ppm	98a	98a	20a
Methyl jasmonate 120 ppm	97a	97a	39ab
Ethyl acetate 3,000 ppm	96a	99a	60b
Ethyl acetate 6,000 ppm	96a	98a	49ab
Ethyl acetate 9,000 ppm	97a	97a	54b
Ethyl acetate 12,000 ppm	99a	97a	47ab
Ethyl acetate 15,000 ppm	98a	97a	58b
Water (control)	98a	98a	57b
C.V. (%)	1.88	1.97	38.10

[1/] ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%จากการทดสอบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 27 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

กรมวิชาการเกษตร

Difenoconazole	0.5	77.50
	5	100
	50	100
	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	4	6.26
hydrate	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

ตารางที่ 28 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	*
CV. (%)				

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

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก ข

หลักฐานอ้างอิงผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง

ผลงานตีพิมพ์ระดับชาติ

1. ตีพิมพ์ระดับชาติในวารสารแก่นเกษตร เรื่อง ผลของสูตรผลิตภัณฑ์กานพลูต่อการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Cercospora kikuchii*
2. ตีพิมพ์ระดับชาติในผลงานวิจัยเรื่องเต็ม Proceeding การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 14 เรื่อง ประสิทธิภาพของ

วารสารแก่นเกษตร

Khon Kaen Agriculture Journal SUPPL.
Agricultural Conference
Journal Home Page : https://ag2.kku.ac.th/kaj

KAJ

ผลของสูตรผลิตภัณฑ์กานพลูต่อการควบคุมโรคเมล็ดสีม่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Cercospora kikuchii*

The effect of clove product formulations on the control of Purple Seed Stain caused by *Cercospora kikuchii*

สุมนา จำปา[1]*, ณัฐพร ฉันทศักดา[2], ศิรากานต์ ขยันการ[3], วราลักษณ์ บุญมาชัย[1], ชนันทวัฒน์ ศุภสุทธิรางกูล[1] และ นิภาภรณ์ พรรณรา[1]

Sumana Jumpa[1]*, Nattaporn Chanthasakda[2], Sirakan Khayankarn[3], Waraluk Boonmachai[1], Chanantawat Suphasutthirangkun[1] and Nipaporn Punnara[1]

[1] ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชเชียงใหม่ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
[1] Chiangmai Seed Research and Development Center, Sansai district, Chiangmai province 50290
[2] กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร อ.พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กทม. 10900
[2] Agricultural Production Sciences Research and Development Division, Phahonyothin Rd, Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 10900
[3] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50100
[3] Office of Agricultural Research and Development Region 1, Mueang district, Chiangmai province 50100

บทคัดย่อ : โรคเมล็ดสีม่วง (purple seed stain : *Cercospora kikuchii*) เป็นโรคที่พบอยู่ทั่วไปในพื้นที่ปลูกถั่วเหลือง แม้ว่าจะไม่มีผลทำให้ผลผลิตลดลง แต่จะทำให้คุณภาพของเมล็ดต่ำกว่ามาตรฐานและสูญเสียเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดไป เป็นผลทำให้เกิดความเสียหายกับผลผลิตและยังเป็นอุปสรรคต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *C. kikuchii* โดยการใช้สารสกัดหยาบจากกานพลูพัฒนาเป็นสูตรผลิตภัณฑ์เพื่อให้เหมาะสมต่อการใช้งานในการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง สารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูที่ใช้ทุกอัตราสามารถยับยั้งเชื้อรา *C. kikuchii* บนเมล็ดได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่มีผลต่อความงอกของเมล็ดทำให้ไม่เหมาะที่จะนำมาคลุกเมล็ด เมื่อพัฒนาสารสกัดหยาบน้ำมันกานพลูเป็นสูตรผลิตภัณฑ์ชนิดน้ำมันเข้มข้นเป็นของเหลวที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน (EC: Emulsifiable Concentrate) ที่ระดับความเข้มข้น 40% w/w นำไปทดสอบโดยการคลุกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พบว่าสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 53.57 กรัมต่อกิโลกรัมเมล็ดสามารถควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองได้ดีที่สุด (4 เปอร์เซ็นต์) ไม่มีผลต่อความงอกของเมล็ดพันธุ์ เมื่อทดสอบในโรงเรือนทดลองที่มีการปลูกเชื้อรา *C. kikuchii* พบว่าการฉีดพ่นด้วยสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 10 ลิตรมีอัตราการควบคุมโรคใกล้เคียงกับ อัตรา 200 และ 100 มิลลิลิตรต่อน้ำ 10 ลิตร และไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ เหมาะสมที่สุดในการใช้ยับยั้งเชื้อรา *C. kikuchii* เมื่อเทียบกับสูตรผลิตภัณฑ์อัตราอื่นๆ การศึกษาครั้งนี้พบว่าสูตรผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลู 40% w/w EC อัตรา 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 10 ลิตร เหมาะสมที่สุดในการฉีดพ่นเพื่อยับยั้งการเกิดโรคเมล็ดสีม่วงในการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

คำสำคัญ: เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง; *Cercospora kikuchii*; โรคเมล็ดสีม่วง; กานพลู; สูตรผลิตภัณฑ์

สารไบโอแอค ทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออก ของยีนที่สามารถกระตุ้นความ ต้านทานในถั่วเหลือง หน้า 681-688

วิทยาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ประสิทธิภาพของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคในถั่วเหลือง

Efficiency of Elicitor for Induced Resistance Gene Expression Against Disease in Soybean

ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต พรนิภา ถาโน และ ฉันทนา คงนคร

Supalak Sattayasamitsathit Pornipa Thano and Janana Kongnakorn

ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก อ. วังทอง จ.พิษณุโลก 65130
Phitsanulok Seed Research and Development Center, Wangthong, Phitsanulok 65130

บทคัดย่อ

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไส้เดือนฝอย โรคถั่วเหลืองสามารถพบได้ทุกระยะการเจริญเติบโต การจัดการให้ถั่วเหลืองไม่เป็นโรคหรือจัดการให้พืชปลอดภัยจากการเข้าทำลายโดยเชื้อโรคโดยการส่งเสริมให้พืชต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคจากการใช้สิ่งไม่มีชีวิตมากระตุ้นเพื่อการสร้างระบบป้องกันตนเองจึงเป็นแนวทางการจัดการโรคแนวทางหนึ่ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาประสิทธิภาพของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของ PR ยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคในถั่วเหลือง ได้แก่ เมทิลซัลไมเนตและ เอทิลอะซิเตท เพื่อใช้ฉีดพ่นถั่วเหลืองในระยะ R1 พบว่าเมทิลซัลไมเนตที่ความเข้มข้น 90 พีพีเอ็ม สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *PR4* สูงสุดโดยมากกว่าชุดควบคุมถึง 3.14 เท่า ในขณะที่เอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 6,000 พีพีเอ็ม สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *PR10* สูงสุดโดยมากกว่าชุดควบคุมถึง 7.38 เท่า แต่ไม่มีการแสดงออกของยีน *PR4*

คำสำคัญ : สารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ การแสดงออกของยีน ความต้านทานโรค ถั่วเหลือง

ABSTRACT

Soybean is susceptible to the destruction of many plant pathogens such as fungi, bacteria, viruses and nematodes. Soybean disease can be found at all stages of growth. The management of soybeans disease or the plants are safe from infestation by pathogen. By inducing plants to resistance to pathogens by using bioactive elicitors is a way of managing diseases. Therefore, this research investigated the effectiveness of bioactive elicitors in the expression of PR-genes that can stimulate disease resistance in soybeans, such as jasmonic acid and ethyl acetate, for spraying soybean in the R1 stage of growth, 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 higher than the control, while ethyl acetate concentration of 6,000 ppm can increase the level of gene expression *PR10* by up to 7.38 times more than the control, but does not promote expression of *PR4*.

Keywords: elicitor, resistance gene, soybean

คำนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีความสำคัญและมีบทบาทต่อเศรษฐกิจโลกตั้งแต่การผลิต การตลาด การแปรรูป และใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่างๆ มีการนำถั่วเหลืองมาใช้ประโยชน์มากมาย เช่น เมล็ดใช้สกัดน้ำมัน แปรรูปในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์และอุตสาหกรรมต่อเนื่องอีกหลายชนิด แต่ถั่วเหลืองเป็นพืชที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไส้เดือนฝอย โรคถั่วเหลืองสามารถพบได้ทุกระยะการเจริญเติบโต นอกจากนี้โรคหลายชนิดเป็นโรคที่ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดพันธุ์ เช่น โรคราน้ำค้าง โรคใบจุดนูน โรคแอนแทรคโนส โรคเมล็ดสีม่วง โรคเมล็ดโพ่มอบซิส โรคใบจุดวง และโรคไวรัสใบด่าง มีเชื้อมากกว่า 200 ชนิดที่มีผลกระทบต่อการผลิตถั่วเหลือง และมีประมาณ 35 ชนิดที่เป็นเชื้อสำคัญทางเศรษฐกิจที่ทำให้ถั่วเหลืองมีผลผลิตลดลง โดยทั่วไปการปลูกถั่วเหลืองในทุกพื้นที่จะประสบปัญหาโรคและแมลงศัตรูจำนวนมาก ซึ่งทุกส่วนของต้นถั่วเหลืองมีความไวต่อการเข้าทำลายของศัตรูพืชและมีผลต่อปริมาณและคุณภาพผลผลิตถั่วเหลืองทั้งสิ้น โดยการสูญเสียขึ้นอยู่กับปัจจัยหลักได้แก่ เชื้อโรคหรือสภาวะที่เกี่ยวข้อง ระยะการพัฒนาการเจริญของถั่วเหลืองและสุขภาพพืชในขณะเชื้อเข้าทำลาย ความรุนแรงของโรคต่อต้นถั่วเหลืองแต่ละต้น และจำนวนต้นถั่วเหลืองที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย การจัดการให้ถั่วเหลืองไม่เป็นโรคหรือจัดการให้ถั่วเหลืองปลอดภัยจากการเข้าทำลายจากเชื้อโรค โดยการส่งเสริมให้พืชต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคโดยการใช้สิ่งไม่มีชีวิตเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่มีการนำมาใช้ โดยเฉพาะอิลิซิเตอร์ (elicitors) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ช่วยกระตุ้นกระบวนการทางสรีระของพืชให้เกิดการเปลี่ยนแปลง สารดังกล่าวมีผลต่อการขับเคลื่อนกิจกรรมภายในพืชโดยมีกลไกการกระตุ้นกระบวนการทางสรีระของพืชหลายทาง กลไกที่พืชตอบสนองเมื่อได้รับอิลิซิเตอร์ คล้ายกับการตอบสนองเพื่อป้องกันตัวจากการรุกรานของเชื้อโรค หรือตอบสนองต่อสิ่งเร้าด้านสภาพแวดล้อม เนื่องจากอิลิซิเตอร์มีผลกระทบต่อแทบอลิซึมของพืชและกระตุ้นให้พืชสังเคราะห์สารประกอบยับยั้งบางชนิดขึ้นมา นอกจากนี้รายงานว่าอิลิซิเตอร์หลายชนิดสามารถชักนำให้พืชมีการตอบสนองในลักษณะต่างๆ เช่น เพิ่มความแข็งแรงของผนังเซลล์, สร้าง reactive oxygen species (ROS), สังเคราะห์ ethylene และมีการแสดงออกของ pathogenesis-related (PR) proteins รวมถึงการกระตุ้น hypersensitive response (HR) มีการวิจัยศึกษาผลของการฉีดพ่นด้วยอิลิซิเตอร์ salicylic acid, methyl salicylate และ ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-6}, 10^{-3} และ 10^{-1} โมลาร์ของถั่วเหลืองในระยะ R1 (ระยะออกดอก) และระยะ R4 (ระยะติดเมล็ด) พบว่าเมื่อฉีดพ่นด้วย Methyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} โมลาร์ในระยะ R1 สามารถเพิ่มปริมาณไอโซฟลาโวนอย่างมีนัยสำคัญ และอิลิซิเตอร์ที่

กรมวิชาการเกษตร

การประชุมเผยแพร่ผลงาน/สัมมนาระดับชาติ

1. นำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง ประสิทธิภาพของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคในถั่วเหลือง ในการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 14 ระหว่างวันที่ 12 - 14 พ.ศ. 2562 ณ โรงแรมดุสิตธานีหัวหิน จังหวัดเพชรบุรี

2. นำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์เรื่อง ประสิทธิภาพของเชื้อบาซิลลัสที่มียีนสังเคราะห์เปปไทด์ต้านจุลชีพต่อการควบคุมโรคเมล็ดสีม่วงของถั่วเหลืองในงานแถลงผลงานด้านการวิจัยและพัฒนาของกรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2564

กรมวิชาการเกษตร

ประสิทธิภาพของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคในถั่วเหลือง

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

ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต[1] พรนิภา ถาโน[1] และ ฉันทนา คงนคร[1]

[1]ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก อ. วังทอง จ.พิษณุโลก 65130

บทคัดย่อ

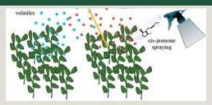
จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารไบโอแอคทีฟอิลิซิเตอร์ต่อการแสดงออกของ PR ยีนที่สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคในถั่วเหลือง ได้แก่ เมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซิเตท เพื่อใช้ฉีดพ่นถั่วเหลืองในระยะ R1พบว่าเมทิลจัสโมเนตที่ความเข้มข้น 90 พีพีเอ็ม สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *PR4* สูงสุดโดยมากกว่าชุดควบคุมถึง 3.14 เท่า ในขณะที่เอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 6,000 พีพีเอ็ม สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *PR10* สูงสุดโดยมากกว่าชุดควบคุมถึง 7.38 เท่า แต่ไม่มีการแสดงออกของยีน *PR4*

บทนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไส้เดือนฝอย โรคถั่วเหลืองสามารถพบได้ทุกระยะการเจริญเติบโต การจัดการให้ถั่วเหลืองไม่เป็นโรคหรือจัดการให้พืชปลอดภัยจากการเข้าทำลายโดยเชื้อโรคโดยการส่งเสริมให้พืชต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคจากการใช้สิ่งไม่มีชีวิตมากระตุ้นเพื่อการสร้างระบบป้องกันตนเองจึงเป็นแนวทางการจัดการโรคแนวทางหนึ่งที่มีการนำมาใช้ โดยเฉพาะอิลิซิเตอร์ (elicitors) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ช่วยกระตุ้นกระบวนการทางสรีระของพืชให้เกิดการเปลี่ยนแปลง สารดังกล่าวมีผลต่อการขับเคลื่อนกิจกรรมภายในพืชโดยมีกลไกการกระตุ้นกระบวนการทางสรีระของพืชหลายทาง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการใช้เมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซิเตทเพื่อดูรูปแบบการแสดงออกของยีน pathogenesis-related (PR) proteins บางกลุ่มได้แก่ *PR2, PR4* และ *PR10*

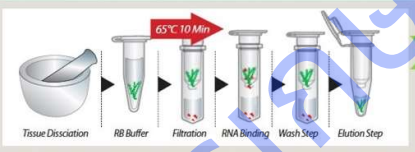
วิธีการ

1 ปลูกถั่วเหลืองในโรงเรือน



- ปลูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ในกระถางดินผา
- เมื่อถั่วเหลืองเจริญในระยะ R1 พ่นเมทิลจัสโมเนตที่ความเข้มข้น 30, 60, 90 และ 120 ppm และเอธิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 3,000, 6,000, 9,000, 12,000 และ 15,000 ppm

2 สกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป



- นำใบถั่วเหลืองหลังจากพ่นสาร 3 วัน มาสกัด Total RNA โดยชุดสกัดสำเร็จรูป

3 สังเคราะห์ cDNA

นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ชุดน้ำยา ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover ยี่ห้อ TOYOBO

4 วิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR

ศึกษาการแสดงออกของ PR gene โดยใช้ Soy Actin gene เป็นยีนอ้างอิงซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ดังนี้

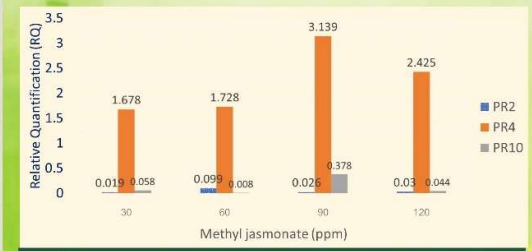
PR2: Forward (5'-GTCTCCTTCGGTGGTAGTG), Reverse (5'-ACCCTCCTCCTCGCTTTCT C)
PR4: Forward (5'-GCTTGCGGGTGACAAATAC), Reverse (5'-ACACTCCCACGTCCAAATC)
PR10: Forward (5'-GCCCAGGAACCATCAAGAAG), Reverse (5'-CGCTGTAGCTGTATCCCAAG)
Soy Actin: Forward (5'-GAGCTATGAATTGCCTGATGG), Reverse (5'-CGTTTCATGAATTCCAGTAGC)

PCR Steps		Temperature	Time
Pre-denaturation		95°C	30 sec.
40 cycle	Denaturation	95°C	15 sec.
	Extension	60°C	60 sec.

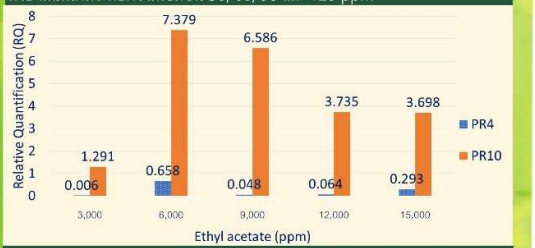
ตามด้วยวิเคราะห์ melting curve

ผลการทดลองและอภิปรายผล

จากการทดลองฉีดพ่นถั่วเหลืองด้วยอิลิซิเตอร์ได้แก่ เมทิลจัสโมเนตที่ความเข้มข้น 30, 60, 90 และ 120 ppm พบว่าหลังฉีดพ่นเป็นระยะเวลา 3 วัน มีการแสดงออกของยีน *PR4* สูงสุดที่ความเข้มข้น 90 ppm โดยมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 3.1 เท่า เมื่อเทียบกับ house keeping 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 อย่างยิ่งซึ่งสอดคล้องกับรายงานว่าจาสโมนิกช่วยให้พืชทนต่อโรคจากเชื้อราและทนต่อความเครียดที่มีจากหลายสาเหตุ เนื่องจากกรดจาสโมนิกมีบทบาทเหนี่ยวนำให้พืชสังเคราะห์ เมแทบอไลต์ทุติยภูมิ ประเภทสารอัลคาลอยด์ (Yan and Xie, 2015) ขณะที่การฉีดพ่นถั่วเหลืองด้วยเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 3,000, 6,000, 9,000, 12,000 และ 15,000 ppm กลับพบว่ายีน *PR10* มีการแสดงออกสูงสุด โดยเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 6,000 ppm มีการเพิ่มการแสดงออกของยีนสูงสุดเท่ากับ 7.4 เท่า รองลงมาที่ความเข้มข้น 9,000 ppm การแสดงออกของยีนสูงสุดเท่ากับ 6.6 เท่า ส่วนยีน *PR4* มีการเพิ่มการแสดงออกเพิ่มขึ้น 0.6 เท่าที่ความเข้มข้นของเอทิลอะซิเตท 6,000 ppm แต่อย่างไรก็ตามไม่พบการแสดงออกของยีน *PR2* ทุกความเข้มข้นของเอทิลอะซิเตท (ภาพที่ 2) จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการฉีดพ่นถั่วเหลืองด้วยอิลิซิเตอร์ได้แก่ เมทิลจัสโมเนตและเอทิลอะซิเตทสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนโปรตีน PRที่เกี่ยวข้องกับระบบความต้านทานโรค ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีบทบาทในการป้องกันการรุกรานของเชื้อทั้งในระบบการตอบสนองแบบเฉียบพลันหรือแบบกระจาย เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อกระจายเพิ่มขึ้น มีการค้นพบว่าการสังเคราะห์โปรตีน PR ถูกควบคุมตั้งแต่กระบวนการถอดรหัสของยีน โปรตีน PR จะถูกสังเคราะห์ขึ้นหลังจากได้รับเชื้ออย่างน้อย 8 ชั่วโมง (Matsuoka and Ohashi, 1986) และโปรตีนนี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นเฉพาะบริเวณที่ถูกกระตุ้น แต่จะไม่มีการส่งโปรตีน PR ไปยังบริเวณอื่น



ภาพที่ 1 การแสดงออกของยีน *PR2, PR4* และ *PR10* หลังการฉีดพ่นถั่วเหลืองด้วยจัสโมนิกที่ระดับความเข้มข้น 30, 60, 90 และ 120 ppm



ภาพที่ 2 การแสดงออกของยีน *PR4* และ *PR10* หลังการฉีดพ่นถั่วเหลืองด้วยเอทิลอะซีเตทที่ระดับความเข้มข้น 3000, 6000, 9000, 12,000 และ 15,000 ppm

เอกสารอ้างอิง

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.

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

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

Research Highlights

ประสิทธิภาพของเชื้อบาซิลลัสที่มียีนสังเคราะห์เปปไทด์ต้านจุลชีพต่อการควบคุมโรคเมล็ดสีม่วงของถั่วเหลือง

Efficiency of *Bacillus* sp. Synthesis Antimicrobial Peptide Genes to Control Purple seed stain of Soybean

ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

บทคัดย่อ

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากตัวอย่างดินรอบๆ แปลงปลูกถั่วเหลืองจำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ 19 ไอโซเลต และนำเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วง พบว่า มี 15 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา โดยเชื้อทั้ง 15 ไอโซเลต มีรูปแบบยีนที่สังเคราะห์เปปไทด์ต้านจุลชีพ AMP biosynthetic genes ต่างกัน แต่เชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อรา คือ PSL 49 ซึ่งมี gene ituA และ gene ituC ในการควบคุมการสังเคราะห์เปปไทด์ต้านจุลชีพ AMP และนำไปจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHB และข้อมูลทางชีวโมเลกุล พบว่า ไอโซเลต ไอโซเลต PSL 49 มีความใกล้เคียงกับ Bacillus subtilis และเมื่อนำไปประยุกต์ในการคลุกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเพื่อดูประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พบว่าเชื้อ PSL49 สามารถยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii*, *Phomopsis* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium* sp., *Macrophomina* sp., *Botryodiplodia theobromae* อยู่ระหว่าง 80-100% และไม่มีผลต่อความงอกของเมล็ดพันธุ์ ดังนั้นการประยุกต์ใช้เชื้อ PSL49 จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาในรูปแบบต่างๆ ให้ง่ายต่อการใช้ของเกษตรกรและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นต่อไป

ที่มาของงานวิจัย

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด โรคที่เกิดกับเมล็ดถั่วเหลืองที่สำคัญ ได้แก่ โรคเมล็ดสีม่วง เกิดจากเชื้อรา *Cercospora kikuchii* เป็นโรคที่ระบาดกับถั่วเหลืองในช่วงฤดูฝน สาเหตุของโรคนี้สามารถทำลายลำต้น ฝัก เมล็ดและใบ ทำให้เกิดอาการบนเมล็ดมีสีชมพูม่วง ถึงม่วงเข้มบนผิวเปลือกของเมล็ด ถ้ารอยสีม่วงครอบคลุมเกินครึ่งหนึ่งของพื้นผิวเมล็ด เมล็ดถั่วเหลืองจะเสียความงอก แต่ถ้าพบเพียงส่วนน้อยเมล็ดจะสามารถงอกได้แต่ต้นกล้าจะไม่แข็งแรง และเป็นแหล่งแพร่ระบาดของเชื้อรา สาเหตุได้ต่อไป ปัจจุบันใช้วิธีการกำจัดโดยการใช้สารเคมี แต่ประสิทธิภาพยังต่ำและเป็นอันตรายต่อผู้ใช้ ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยต่อผู้ใช้ต่อการควบคุมโรค

วัตถุประสงค์

เพื่อแยกเชื้อปฏิปักษ์ที่มียีนสังเคราะห์เปปไทด์ต้านจุลชีพและมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลือง

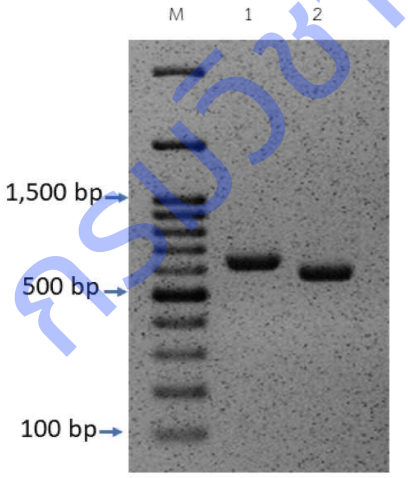
อุปกรณ์และวิธีการ

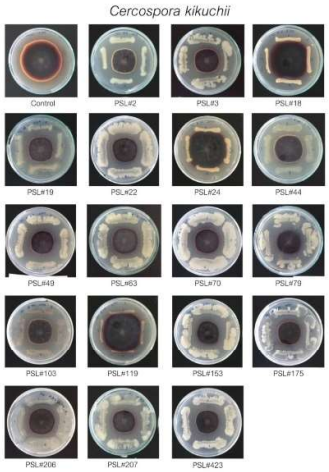
1. แยกเชื้อจากดินบริเวณแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์จำนวน 50 ตัวอย่าง
2. ทดสอบความสามารถของเชื้อที่แยกได้ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cercospora kikuchii* ในห้องปฏิบัติการ
3. ศึกษายีนควบคุมการสังเคราะห์เปปไทด์ต้านจุลชีพจากเชื้อที่แยกได้โดยมียีนเป้าหมาย AMP gene
4. การจำแนกเชื้อโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุล
5. การทำ seed treatments โดยวิธีการคลุกเมล็ดพันธุ์ด้วยสารละลายเซลล์บริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อถั่วเหลือง 1 กิโลกรัม จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ไปผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ไปตรวจสอบคุณภาพ ได้แก่ ความงอก และความแข็งแรง และโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

ได้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเมล็ดสีม่วง สามารถควบคุมโรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิส และเชื้อราในโรงเก็บ และสามารถถ่ายทอดให้เกษตรกร นำเชื้อไปใช้ในการคลุกเมล็ดถั่วเหลืองก่อนปลูก

นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต
โทร. 085-8934939

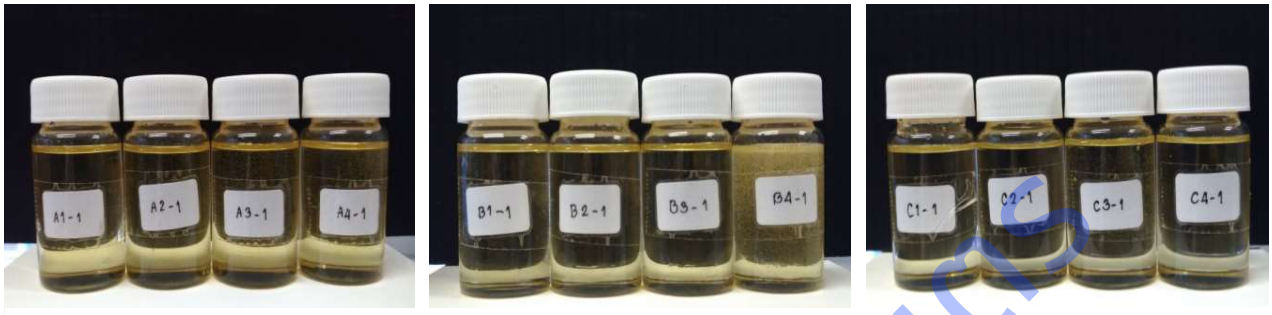




กรมวิชาการเกษตร

ต้นแบบผลิตภัณฑ์ ระดับห้องปฏิบัติการ

ต้นแบบผลิตภัณฑ์ สูตรผลิตภัณฑ์ชนิดน้ำมันเข้มข้นแบบเหลวที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันจากน้ำมันกานพลูที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Cercospora kikuchii*



กรมวิชาการเกษตร