

**ประสิทธิภาพน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัสในการควบคุมเชื้อรา
Colletotrichum truncatum s. l. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองฝักสด
ที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม**

**Efficiency of Eucalyptus Wood Vinegar in Controlling
Colletotrichum truncatum s. l. Causing Vegetable Soybean
Anthracnose of Cabendazim Resistance**

กัลยรัตน์ มหาวรรณ¹, ชนินทร ดวงสาอด² และ สรัญญา ณ ลำปาง^{1*}

Kanyarat Mahawan¹, Chanintorn Doungsa-ard² and Sarunya Nalumpang^{1*}

บทคัดย่อ: ศึกษาการใช้น้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* s. l. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองฝักสด โดยแยกจากใบ ลำต้น และฝัก จำนวน 52 ไอโซเลท มาทดสอบความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมด้วยวิธี poisoned food ที่ความเข้มข้น 1, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหาค่า ED₅₀ โดยที่ค่า ED₅₀ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร = ต้านทานระดับสูง (HR) ค่า ED₅₀ 10-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร = ต้านทานระดับปานกลาง (MR) และ ED₅₀ < 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร = อ่อนแอ (S) พบว่า เชื้อราที่มีความต้านทานต่อคาร์เบนดาซิมในระดับสูง (HR) จำนวน 46 ไอโซเลท และอ่อนแอต่อคาร์เบนดาซิม (S) จำนวน 6 ไอโซเลท จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัส 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดกลั่นครั้งเดียวจำนวน 2 ตัวอย่าง และ ชนิดกลั่น 2 ครั้ง จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5% (v/v) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. truncatum* s. l. ด้วยวิธี poisoned food พบว่าน้ำส้มควันไม้ชนิดกลั่นครั้งเดียวทั้ง 2 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 2-5% (v/v) ขึ้นไป และ ชนิดกลั่น 2 ครั้ง ที่ความเข้มข้น 3-5% (v/v) สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 100% จากนั้นทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ด้วยวิธี slide culture โดยใช้น้ำส้มควันไม้ทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3% (v/v) เมื่อวัดความยาวของ germ tube หลังจากบ่มที่เวลา 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า น้ำส้มควันไม้ทุกชนิดและทุกระดับความเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 100%

คำสำคัญ: *Colletotrichum truncatum* s. l., โรคแอนแทรคโนส, ถั่วเหลืองฝักสด, คาร์เบนดาซิม, น้ำส้มควันไม้

ABSTRACT: This study was aimed to investigate the efficiency of eucalyptus wood vinegar on growth inhibition of *Colletotrichum truncatum* s. l. causing vegetable soybean anthracnose. Fifty-two isolates of *C. truncatum* s. l. were isolated from leaves, stem and pods of diseased vegetable soybean. The poisoned food technique was used to evaluate carbendazim-resistant

Received July 11, 2018

Accepted October 17, 2018

¹ ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

² กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of agriculture

* Corresponding author: sarunyav@gmail.com

ability of fungi at concentrations 1, 10, 50, 100, 500 and 1,000 µg/ml. Then, evaluation ED_{50} by $ED_{50} > 100$ = highly resistant, $ED_{50} 10 - 100$ = moderately resistant (MR) and $ED_{50} < 10$ = sensitive (S). The results showed that forty-six isolates were highly resistant (HR), six isolates were sensitive (S) phenotype. Efficacy of two types eucalyptus wood vinegar consist of distilled 1 time (2 samples) and distilled 2 times (1 sample) at concentrations 1, 2, 3, 4 and 5% (v/v), were determined for inhibition of mycelium growth by using poisoned food technique. The results found that eucalyptus wood vinegar distilled 1 time (2 samples) at concentration 2-5% (v/v) and distilled 2 times at concentration 3-5% (v/v) could inhibit 100% mycelia growth of pathogen. Then, the inhibition of spore germination using slide culture technique by two types wood vinegar at concentrations 1, 2 and 3% (v/v) were examined after 6, 9, 12 and 24 hr. of incubation. The results revealed that all treatment could completely inhibit conidial germination of *C. truncatum* s. l.

Keywords: *Colletotrichum truncatum* s. l., anthracnose disease, vegetable soybean, carbendazim, wood vinegar

บทนำ

ถั่วเหลืองฝักสด [*Glycine max* (L.)] ได้แก่ถั่วเหลืองที่มีการเก็บเกี่ยวผลผลิตในระยะเจริญพันธุ์ R6 เป็นพืชที่นิยมบริโภคในประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลี ไต้หวัน และไทย ซึ่งประเทศญี่ปุ่นคือตลาดสำคัญ เนื่องจากมีการนำเข้าถั่วเหลืองฝักสดสูงถึง 30% (Mimura et al., 2007) นำเข้าจากต่างประเทศ ทั้งในรูปแบบของฝักสด (จากไต้หวันและเวียดนาม) และ ถั่วแช่แข็ง (จากไต้หวัน ไทย และจีน เป็นต้น) โดยล่าสุดในปี 2560 ญี่ปุ่นนำเข้าถั่วเหลืองฝักสด ปริมาณ 75,714 ตัน (เพิ่มขึ้น 1.40%) แหล่งนำเข้าสำคัญได้แก่ ไต้หวัน (31,346 ตัน) ไทย (20,414 ตัน) และจีน (19,762 ตัน) (กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ, 2561) ซึ่งโรคที่สำคัญของถั่วเหลือง คือ โรคแอนแทรคโนสที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* (Chen et al., 2006; Yang et al., 2015) ทำให้เกิดโรคกับพืชวงศ์ถั่วได้ทั่วโลกสร้างความเสียหายอย่างรุนแรงในพื้นที่อบอุ่นและชื้น ซึ่งเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสเข้าทำลายได้ทุกส่วนของถั่วเหลือง โรคจะแสดงอาการในระยะเจริญพันธุ์ พบบ่อยที่สุด คือ ลำต้น ก้านใบ และฝัก โดยลักษณะแผลมีสีน้ำตาล รูปร่างไม่แน่นอน และสามารถติดเชื้อแบบแฝง (latent infection) อยู่บนพืชโดยไม่แสดงอาการภายนอก อาการจะชัดเจนขึ้นเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม (Chen et al., 2006) ในการผลิตถั่วเหลืองฝักสดเพื่อการส่งออกจำเป็นต้องมีความพิถีพิถันในเรื่องของคุณภาพฝักสดที่ได้มาตรฐาน โดยฝักสดต้องมีสีเขียวสด ไม่มีรอยตำหนิจากการทำลายของโรคและแมลง นอกจากนี้สารเคมีตกค้างในผลผลิตจะต้องไม่เกินค่ามาตรฐานที่กำหนด

(รัฐนี้, 2558) เนื่องจากปัจจุบันมีการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราในการควบคุมโรคพืช เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค ซึ่งสารในกลุ่มเบนซิมิดาโซล เช่น คาร์เบนดาซิม เป็นสารประเภทดูดซึมสามารถใช้ควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพืชหลายชนิด (Kongtragoul et al., 2011) แต่เมื่อใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานทำให้เชื้อราต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา และทำให้ไม่สามารถใช้สารชนิดนั้นได้อีกต่อไป (ธรรมศักดิ์, 2543) ดังนั้นการใช้น้ำส้มควันไม้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการควบคุมโรคพืช เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเผาถ่านมีกรดอินทรีย์และสารต่างๆ มากกว่า 200 ชนิด เช่น phenol, alkane, alcohol, furan, ester compounds และ acetic acid เป็นต้น (Jothityangkoon, 2006) จัดเป็นสารกำจัดศัตรูพืชอินทรีย์ที่ได้จากธรรมชาติ (natural organic pesticide) สามารถใช้ป้องกันกำจัดเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง (วิลาลินี และสรัญญา, 2553) *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* และ *Pythium splendens* แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (Hwang et al., 2005) และได้เคยผลยสาเหตโรคพืช นอกจากนี้ มีรายงานว่า น้ำส้มควันไม้ที่ความเข้มข้นพอเหมาะช่วยเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เช่น เชื้อแอกติโนไมซีสเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อเลี้ยงในน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัส 0.5% แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น (1%) ทำให้เชื้อแอกติโนไมซีสมีจำนวนลดลง เนื่องจากไม่สามารถทนต่อความเป็นกรดสูงได้ (วิกานดา, 2557) อีกทั้งมีรายงานว่า เชื้อแอกติโนไมซีสและเชื้อราไตรโคเดอร์มาเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เนื่องจากได้รับสารอาหาร

จาก acetic acid (จิระพงษ์, 2552; อุดมพร, 2554) และในน้ำส้มควันไม้มีสาร butenolide 3-methyl-2H-furo [2,3-c]pyran-2-one ซึ่งส่งเสริมการงอกของเมล็ดพันธุ์ และการเจริญเติบโตของต้นกล้า (Flematti et al., 2004) ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้น้ำส้มควันไม้ในการควบคุมโรคแอนแทรกคโนสของถั่วเหลืองฝักสด เพื่อเป็นทางเลือกในการป้องกันความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา อีกทั้งเพื่อลดการใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช

วิธีการศึกษา

การแยกเชื้อราบริสุทธิ์ และเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* s. l. สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสของถั่วเหลืองฝักสด

เก็บตัวอย่างจากพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองฝักสดจากพื้นที่ปลูก 4 อำเภอ ได้แก่ สันป่าตอง และ สันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่ พาน และ แม่สรวย จังหวัดเชียงราย โดยเก็บจากส่วนใบ ลำต้น และฝักที่แสดงอาการโรคแอนแทรกคโนส จากนั้นแยกเชื้อราบริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) เมื่อเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อจำแนกเชื้อราสาเหตุตามหลักเกณฑ์ของ Damm et al. (2009) จากนั้นเก็บเชื้อราบริสุทธิ์ไว้ใน mineral oil ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenecity test)

เลี้ยงเชื้อรา *C. truncatum* s. l. ที่แยกได้จำนวน 52 ไอโซเลท ให้เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการเกิดโรคบนใบและฝักของถั่วเหลืองฝักสด ตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Than et al. (2008) โดยฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 1% sodium hypochlorite เป็นเวลา 2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นทำแผลกลางใบและฝักโดยใช้ปลายเข็มเขี่ยที่ฆ่าเชื้อแล้ว 6 แผล แล้วหยดสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เปรียบเทียบชุดควบคุมที่หยดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ บ่มไว้ในกล่องเก็บความชื้น

ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) จำนวน 3 ซ้ำ โดยวางแผนการทดสอบแบบ completely randomized design (CRD) บันทึกผลโดยการวัดขนาดความยาวและความกว้างของแผลหลังจากปลูกเชื้อทุกวันเป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบขนาดแผลชุดทดสอบกับชุดควบคุม

การทดสอบความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

เลี้ยงเชื้อรา *C. truncatum* s. l. ให้เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นย้ายขึ้นเชื้อราสาเหตุขนาดผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 50, 100, 500 (อัตราแนะนำ) และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบการเจริญเส้นใยของเชื้อรากับชุดควบคุมที่ไม่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) ทดสอบความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ บันทึกผลโดยวัดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราเมื่อเส้นใยในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปหาค่า ED_{50} แล้วจัดระดับความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ดังนี้

$ED_{50} > 100$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร : highly resistant (HR)

ED_{50} 10-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร : moderately resistant (MR)

$ED_{50} < 10$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร : sensitive (S)

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัสในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* s. l. สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสของถั่วเหลืองฝักสด

ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัสที่เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดกลิ่นครึ่งเดียวจำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ A1 และ A2 ซึ่งแหล่งที่มาแตกต่างกัน และชนิดกลิ่น 2 ครั้ง จำนวน 1 ตัวอย่าง ได้แก่ B2 โดยทดสอบการควบคุมเชื้อรา *C. truncatum* s. l. ทั้งหมด 5 ไอโซเลท โดยเกณฑ์ในการพิจารณาคัดเลือกเชื้อราได้แก่ ส่วนของพืชที่แยกเชื้อสาเหตุโรค ความสามารถในการทำให้เกิดโรครุนแรง และระดับความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อรา

คาร์เบนดาซิม ได้แก่ CtSpL_3 (HR), CtPhS_1 (HR), CtPhP_4 (HR), CtPhP_8 (S) และ CtMsP_6 (S) ด้วยวิธี poisoned food ที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5% (v/v) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) ทดสอบความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ โดยวางแผนการทดสอบแบบ CRD บันทึกผลการทดลองเมื่อชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา เพื่อหาค่าเฉลี่ยการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุจากนั้นนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (percent inhibition of diameter growth; PIDG) ดังสูตรต่อไปนี้

$$\text{PIRG} = \frac{D1 - D2}{D1} \times 100$$

D1 = เส้นผ่านศูนย์กลางเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

D2 = เส้นผ่านศูนย์กลางเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัสในการยับยั้งการออกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum truncatum* s. l. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองฝักสด

ทดสอบประสิทธิภาพน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัส 2 ชนิด ในการยับยั้งการออกของสปอร์ ด้วยวิธี slide culture โดยเตรียมสารแขวนลอยที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดและเกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมน้ำส้มควันไม้ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3% (v/v) ตัดให้มีขนาด 1×1 เซนติเมตร มาวางบนสไลด์ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) แล้วตรวจสอบที่เวลา 3, 6, 9, 12, และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ ส่วนใหญ่ตรวจนับสปอร์ ที่ออกและวัดความยาว germ tube โดยนิยามของสปอร์ที่ถือว่าออกนั้น จะต้องมีความยาว germ tube มากกว่าความกว้างของสปอร์ จึงจะถือว่าสปอร์เริ่มออก รวมทั้งสังเกตลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยสุ่มตรวจ 5 ตำแหน่ง ได้แก่ บริเวณขอบขึ้นวัน 4 ตำแหน่ง และกลางวัน 1 ตำแหน่ง กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ วางแผนการทดสอบแบบ CRD

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การแยกเชื้อราบริสุทธิ์และเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* s. l. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองฝักสด

การเก็บตัวอย่างถั่วเหลืองฝักสดที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสจาก 4 แหล่ง ได้แก่ อำเภอสันป่าตอง และ อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอพาน และ อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย สามารถแยกเชื้อรา *C. truncatum* บริสุทธิ์จากส่วนต่างๆ ได้แก่ ลำต้น ใบ และฝัก ได้ทั้งหมด 52 ไอโซเลท โดยแบ่งกลุ่มตามสัโคโลนีได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 1 สีเขียวมะกอกเส้นใยหนาแน่น และเรียบ กลุ่ม 2 สีเขียวมะกอกเข็ม เส้นใยหนาแน่นและฟู ปลายเส้นใยสีขาว กลุ่ม 3 สีเขียวมะกอกเข็มอมเทา และ กลุ่ม 4 สีเขียวอ่อน เส้นใยบาง เส้นใยเจริญเข้าขอบโคโลนีหยักจำนวน 26, 17, 8 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chen et al. (2006) สามารถแบ่งกลุ่มสัโคโลนีวิทยาของโคโลนีเชื้อรา *C. truncatum* เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 1 สีเขียวมะกอกเข็ม เส้นใยหนาแน่น กลุ่ม 2 สีเขียวมะกอกเข็ม เส้นใยเจริญเข้ากลุ่ม 3 สีเขียวมะกอกอ่อนเส้นใยหนาแน่น และกลุ่ม 4 เหลืองอมน้ำตาล เส้นใยบาง เมื่อนำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบ setae สีนํ้าตาลถึงดำ ขนาด $80-170 \times 4-5$ ไมโครเมตร มีผนังกัน 3-5 septates conidiophore สีนํ้าตาลอ่อนหนาแน่นความยาว 80-100 ไมโครเมตร conidiogenous cell สีนํ้าตาลอ่อน กว้าง $8-18 \times 2-5$ ไมโครเมตร และ conidia เซลล์เดี่ยว ไม่มีสี มีลักษณะหัวท้ายแหลมโค้งงอ ขนาด $18-24 \times 3-4$ ไมโครเมตร ซึ่งสอดคล้องกับ damm et al. (2009) ได้รายงานว่าย แยกเชื้อราจากตัวอย่างแห้ง (herbarium) ของถั่วเหลือง ถั่วลิมา และถั่วแขก พบเส้นใยที่เลี้ยงบนอาหารสร้าง setae สีนํ้าตาลอ่อนมีลักษณะเรียบไปจนถึงขรุขระยาว 80-150 ไมโครเมตร มีผนังกัน 2-5 septates เรียวปลายแหลมเล็กน้อย เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-6 ไมโครเมตร conidiophore สีนํ้าตาลอ่อน มีผนังกัน อยู่เป็นกลุ่มหนาแน่นมีความยาว 90 ไมโครเมตร ขึ้นไป conidiogenous cell สีนํ้าตาลอ่อน ทรงกระบอก กว้าง $6-20 \times 2-4$ ไมโครเมตร conidia ผนังเรียบ ไม่มีผนังกัน และ โค้งเล็กน้อย หัวท้ายเรียวแหลม มีขนาด $20-23 \times 3-4$ ไมโครเมตร จัดจำแนกเป็นเชื้อรา

Colletotrichum truncatum และจากการศึกษาของ Sutton (1992) ได้รายงานไว้ว่า เชื้อรา *C. truncatum* ยังเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสที่สำคัญทางเศรษฐกิจของพืชวงศ์ถั่ว และวงศ์มะเขือหลายชนิด

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test)

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนสของเชื้อราที่แยกได้จากฝักสดทั้งหมด 52 ไอโซเลท ที่แยกได้จากฝัก ใบ และ ลำต้น จำนวน 46, 5 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ พบว่า ภายหลังจากการปลูกเชื้อ 5 วัน เชื้อรา *Colletotrichum truncatum* ที่แยกจากฝัก แสดงอาการของโรคได้ทั้งบนใบและฝักจำนวน 46 ไอโซเลท แสดงอาการบนใบอย่างเดียวจำนวน 1 ไอโซเลท และไม่แสดงอาการของโรคจำนวน 5 ไอโซเลท ส่วนเชื้อสาเหตุโรคที่แยกจากใบ และลำต้น พบว่า ภายหลังจากการปลูกเชื้อแสดงอาการของโรคได้ทั้งบนใบและฝัก แสดงว่าเชื้อสาเหตุที่แยกจากส่วนต่าง ๆ ของถั่วเหลืองฝักสดสามารถเข้าทำลายได้ทั้งใบและฝัก ซึ่งปัจจัยสำคัญในการเกิดโรคนั้น สามเหลี่ยมโรคพืช (disease triangle) ทั้ง 4 ปัจจัย จะต้องสมบูรณ์ขาดส่วนใดส่วนหนึ่งไปจะทำให้การเกิดโรคไม่สมบูรณ์หรือไม่เกิดโรค ในส่วนของไอโซเลทที่ไม่สามารถทำให้เกิดโรคได้ อาจเกิดจากเชื้อสาเหตุโรคไม่มีความรุนแรงและระยะเวลาในการเข้าทำลายไม่นานพอ (Table 1) นอกจากนี้ ภายหลังจากการปลูกเชื้อ 2 วัน ไอโซเลท CtpHP_4 ที่แยกเชื้อได้จากฝักสามารถแสดงอาการได้ทั้งบนใบและฝัก โดยบนใบในระยะแรกแสดงอาการแผลขนาดเล็ก สีเหลือง ต่อมาแผลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมีวงสีเหลืองล้อมรอบแผล ส่วนบนฝักแผลมีสีน้ำตาลจ้ำน้ำ ต่อมาแผลขยายใหญ่ขึ้นมีสีน้ำตาลเข้มเนื้อเยื่อเกิดการยุบตัว และพบกลุ่มสปอร์ (spore mass) สีส้มอ่อนบนแผล สอดคล้องกับ Nagaraj (2013) รายงานว่า จากการปลูกเชื้อรา *C. truncatum* บนต้นถั่วเหลืองฝักสดที่อายุ 30 วัน แสดงอาการหลังจากการปลูกเชื้อ 7 วัน อาการบนใบเริ่มแรกแผลมีสีน้ำตาลเข้ม ขอบแผลมีสีเหลือง พบ acervuli เรียงเป็นวงแหวน (concentric rings) และฝักที่ติดเชื้อรุนแรงไม่สามารถสร้างเมล็ดได้ และ Chen et al. (2006) ได้กล่าวว่า โรคแอนแทรคโนสเข้าทำลายได้ทุกส่วนของถั่วเหลืองฝักสด อาการของโรคจะชัดเจนในระยะ

เจริญพันธุ์พบบ่อยที่สุด คือ ลำต้น ก้านใบ และฝัก ลักษณะแผลสีน้ำตาล รูปร่างไม่แน่นอน (Chen et al., 2006)

การทดสอบความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

การทดสอบความต้านทานของเชื้อรา *C. truncatum* s. l. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง ฝักสดต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม 6 ระดับ ดังนี้ 1, 10, 50, 100, 500 (อัตราแนะนำ) และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร ทั้งหมด 52 ไอโซเลท พบว่าเชื้อราที่แยกได้จากฝักจำนวน 40 ไอโซเลท ใบจำนวน 5 ไอโซเลท และลำต้นจำนวน 1 ไอโซเลท มีความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR) มีค่า ED₅₀ อยู่ในช่วง 1,127.23-46,403,617,677.00 และเชื้อราที่แยกได้จากฝักจำนวน 6 ไอโซเลท มีความอ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (S) มีค่า ED₅₀ อยู่ในช่วง 0.00-0.0067 (Table 2 and Figure 1) จากการศึกษาของ McKay et al. (1998) พบว่า ความต้านทานของเชื้อราต่อสารกลุ่มเบนซิมิดาโซล เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน β -tubulin ซึ่งเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงในลำดับเบส และจากการสังเคราะห์กรดอะมิโนส่วนใหญ่ที่ตำแหน่ง codons 198 หรือ 200 และมีรายงานในเชื้อราสกุล *Colletotrichum* เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง codon 198 ในยีน TUB2 ทำให้เกิดการแทนที่ของกรดอะมิโน glutamic acid เป็น glycine, lysine, alanine และ valine (Peres et al., 2004; Chung et al., 2006; Ru-Lin and Jun-Sheng, 2007) นอกจากนี้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน β -tubulin 2 ของเชื้อรา *C. truncatum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกหยวก มีความต้านทานต่อสารบีโนมิลซึ่งอยู่ในสารกลุ่มเบนซิมิดาโซล เกิดการกลายพันธุ์ที่ codon 198 ทำให้กรดอะมิโน glutamic acid เปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน alanine (Ramdial et al., 2016) และเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงที่ต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR) ในประเทศไทยเกิดการกลายพันธุ์ที่ codon 198 จาก adenine เป็น cytosine ส่งผลให้กรดอะมิโน glutamic acid ในไอโซเลทที่อ่อนแอต่อสารคาร์เบนดาซิม (S) เป็นกรดอะมิโน alanine (Kongtragoul et al., 2011)

Table 1 Pathogenicity test of *Colletotrichum truncatum* s. l. causing of vegetable soybean anthracnose on leaf and pod after inoculation 5 day of incubation at room temperature ($28 \pm 2^\circ\text{C}$)

Locations	Isolate	Diseased tissue	Diameter of wound (cm) ^{1/}	
			Leaf	Pod
San Pa Tong (15 isolates)	CtSPL_1	Leaf	0.66 ^{c2/}	0.41 ^{lmn}
	CtSPL_2	Leaf	0.61 ^{cdef}	0.76 ^{defghij}
	CtSPL_3	Leaf	0.96 ^b	0.83 ^{cdefgh}
	CtSPP_1	Pod	0.63 ^{cde}	0.36 ^{mn}
	CtSPP_2	Pod	0.61 ^{cdef}	0.40 ^{lmn}
	CtSPP_3	Pod	0.53 ^{cdefgh}	0.35 ^{mn}
	CtSPP_4	Pod	0.55 ^{cdefg}	0.55 ^{hijklm}
	CtSPP_5	Pod	0.61 ^{cdef}	0.66 ^{e^{ghijkl}}
	CtSPP_6	Pod	0.97 ^b	1.03 ^{abcd}
	CtSPP_7	Pod	0.96 ^b	0.51 ^{jklm}
	CtSPP_8	Pod	0.51 ^{cdefghi}	0.41 ^{lmn}
	CtSPP_9	Pod	0.45 ^{fghi}	0.50 ^{jklm}
San Kamphaeng (15 isolates)	CtSPP_10	Pod	0.65 ^{cd}	0.60 ^{ghijklm}
	CtSPP_11	Pod	0.00 ^j	0.00 ^o
	CtSPP_12	Pod	0.63 ^{cde}	0.43 ^{jklm}
	CtSKP_1	Pod	0.00 ^j	0.00 ^o
	CtSKP_2	Pod	0.40 ^{ghi}	1.21 ^{ab}
	CtSKP_3	Pod	0.35 ^j	0.61 ^{ghijklm}
	CtSKP_4	Pod	0.36 ^{hi}	0.85 ^{cdefg}
	CtSKP_5	Pod	0.00 ^j	0.00 ^o
	CtSKP_6	Pod	0.65 ^{cd}	0.56 ^{ghijklm}
	CtSKP_7	Pod	0.00 ^j	0.00 ^o
	CtSKP_8	Pod	0.35 ^j	0.53 ^{jklm}
	CtSKP_9	Pod	0.66 ^c	1.03 ^{abcd}
	CtSKP_10	Pod	0.46 ^{efghi}	0.61 ^{ghijklm}
	CtSKP_11	Pod	0.60 ^{cdef}	0.95 ^{bcd}
	CtSKP_12	Pod	0.58 ^{cdef2/}	0.56 ^{ghijklm}
Phan (12 isolates)	CtSKP_13	Pod	0.90 ^b	0.95 ^{bcd}
	CtSKP_14	Pod	0.53 ^{cdefgh}	1.10 ^{abc}
	CtSKP_15	Pod	0.00 ^j	0.00 ^o
	CtPHS_1	Stem	0.50 ^{cdefghi}	0.95 ^{bcd}
	CtPHL_1	Leaf	0.66 ^c	0.71 ^{efghijk}
	CtPHL_2	Leaf	0.38 ^{ghi}	0.55 ^{hijklm}
	CtPHP_1	Pod	0.35 ^j	0.40 ^{lmn}
	CtPHP_2	Pod	0.50 ^{cdefghi}	0.51 ^{jklm}
	CtPHP_3	Pod	0.38 ^{ghi}	0.55 ^{hijklm}
Mae Suai (10 isolates)	CtPHP_4	Pod	1.16 ^a	1.10 ^{abc}
	CtPHP_5	Pod	0.00 ^j	0.41 ^{lmn}
	CtPHP_6	Pod	0.51 ^{cdefghi}	0.40 ^{lmn}
	CtPHP_7	Pod	0.45 ^{fghi}	0.56 ^{ghijklm}
	CtPHP_8	Pod	0.53 ^{cdefgh}	0.78 ^{defghij}
	CtPHP_9	Pod	0.38 ^{ghi}	0.20 ^{no}
	CtMSP_1	Pod	0.35 ^j	0.61 ^{ghijklm}
	CtMSP_2	Pod	0.00 ^j	0.00 ^o
	CtMSP_3	Pod	0.85 ^b	1.25 ^a
	CtMSP_4	Pod	0.36 ^{hi}	0.41 ^{lmn}
	CtMSP_5	Pod	0.60 ^{cdef}	0.50 ^{jklm}
	CtMSP_6	Pod	0.46 ^{efghi}	0.63 ^{fghijklm}
	CtMSP_7	Pod	0.35 ^j	0.81 ^{cdefghi}
	CtMSP_8	Pod	0.45 ^{fghi}	0.40 ^{lmn}
	CtMSP_9	Pod	0.58 ^{cdef}	0.50 ^{jklm}
	CtMSP_10	Pod	0.48 ^{defghi}	0.91 ^{cdef}
LSD _{0.05}			0.17	0.28
%CV			22.07	30.54

^{1/}Data are means of 3 replicates^{2/}Means followed by a common letter in each column are not significantly different by LSD at P<0.05

นอกจากพบการกลายพันธุ์ในเชื้อราสกุล *Colletotrichum* แล้ว พบรายงานการกลายพันธุ์ใน ยีน β -tubulin ที่ตำแหน่ง codon 198 ในเชื้อรา *Gibberella zeae* (Liu et al., 2010) และ *Pestalotiopsis* sp. (Kummanid et al., 2017) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การกลายพันธุ์ของยีน β -tubulin ของเชื้อราสาเหตุ โรคพืชสามารถเกิดได้ที่ codon อื่นๆ เช่น 6, 50, 167, 198, 200 และ 240 แต่การกลายพันธุ์ใน codon ที่ต่างกันเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับระดับความ ต้านทานต่อระดับต่างๆ (อ่อนแอ ต้านทานปานกลาง และต้านทานสูง) ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา (Steffens et al., 1996; Ma and Michailides 2005; Ramdial et al., 2016) ดังนั้นในการป้องกันการเกิด ความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราจะต้องไม่ใช้สาร ชนิดเดิม และกลุ่ม (chemical group) เดิม ควรใช้สาร ป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มที่มีสารออกฤทธิ์ (mode of action; MOA) และใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อรา ประเภทสัมผัสกับสารประเภทดูดซึม ควบคู่ไป กับการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (Integrated Pest Management; IPM)

ประสิทธิภาพน้ำส้มควันไม้ในการยับยั้งการเจริญ เติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* s. l. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองฝักสด

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ยู คาลิปัสต์ 2 ชนิด ได้แก่ กลิ่นครั้งเดียวจำนวน 2 ตัวอย่าง (A1 และ A2) กลิ่น 2 ครั้ง จำนวน 1 ตัวอย่าง (B1) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. truncatum* s. l. สาเหตุโรคทั้งหมด 5 ไอโซเลต ได้แก่ CtSpL_3 (HR), CtPhS_1 (HR), CtPhP_4 (HR), CtPhP_8 (S) และ CtMsP_6 (S) พบว่า น้ำส้มควันไม้ยูคาลิปัสต์ชนิด กลิ่นครั้งเดียวทั้ง 2 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 2% (v/v) ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราได้ 100% ส่วนน้ำส้มควันไม้ชนิดกลิ่น 2 ครั้ง ความเข้มข้น 3% (v/v) ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราได้ 100% ซึ่งตัวอย่าง A1, A2 และ B1 ที่ความเข้มข้น 1% (v/v) ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเฉลี่ยเท่ากับ 12.25, 27.57 และ 11.95% ตามลำดับ ส่วนตัวอย่าง B1 ที่ ความเข้มข้น 2% (v/v) ยับยั้งการเจริญเส้นใยเฉลี่ย เท่ากับ 47.66% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 3 and Figure 2) สอดคล้องกับรายงานของ วิลาลินี และสร้อยยา (2553) พบว่า น้ำส้มควันไม้ยูคาลิปัสต์

ความเข้มข้น 2% (v/v) ขึ้นไป มีประสิทธิภาพการยับยั้ง การเจริญเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุ โรคแอนแทรคโนสของมะม่วงได้ 100% และสามารถ ยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของพืชวงศ์กะหล่ำได้ 100% เช่นกัน (วิษณุ และสร้อยยา, 2559) ซึ่งน้ำส้มควันไม้แบบ กลิ่นครั้งเดียว คือวิธีการกลั่นเอาน้ำมันดินที่ไม่ละลาย น้ำ (insoluble tar) ออก แล้วนำไปกลั่นครั้งที่ 2 (ชนิด กลิ่น 2 ครั้ง) เพื่อนำน้ำมันดินที่ละลายน้ำได้ (soluble tar) ออกจากน้ำส้มควันไม้ ซึ่งอาจจะทำให้มีสารบาง ชนิดเจือจางลงจึงทำให้ในความเข้มข้นเท่ากัน ใน น้ำส้มควันไม้แบบกลิ่นครั้งเดียว สามารถยับยั้งการเจริญ ของเส้นใยเชื้อราได้น้อยลง จากการทดสอบหาน้ำมัน ดินละลายน้ำได้ที่เหลืออยู่ในน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปัสต์ 2 ชนิด โดยเทน้ำส้มควันไม้ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) ไม่ ปิดฝาเพื่อให้ น้ำส้มควันไม้สัมผัสกับอากาศ พบว่า 12 และ 24 ชั่วโมง น้ำส้มควันไม้ชนิดกลิ่นครั้งเดียวทั้ง 2 ตัวอย่าง เกิดคราบตะกอนสีน้ำตาลเข้มลอยอยู่บน น้ำส้มควันไม้ เนื่องจากน้ำมันดินที่ละลายน้ำได้สัมผัส กับออกซิเจนในอากาศ และน้ำส้มควันไม้มีสีน้ำตาล เข้มขึ้นกว่าเดิม ส่วนน้ำส้มควันไม้แบบกลิ่น 2 ครั้ง ไม่เกิดคราบตะกอน และมีสีเหลืองใส นอกจากนี้ เมื่อเวลาผ่านไป 12 วัน พบว่า น้ำส้มควันไม้ชนิด กลิ่นครั้งเดียว 2 ตัวอย่าง ตะกอนเปลี่ยนจากสีน้ำตาล เป็นสีดำ และมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น ส่วนน้ำส้มควันไม้แบบ กลิ่น 2 ครั้ง ไม่เกิดตะกอนน้ำส้มควันไม้มีสีเหลืองใส จากรายงานของ อุดมพร (2545), Jun et al. (2006) และ Jothityangkoon et al. (2006) ได้รายงานว่ เนื่องจากน้ำส้มควันไม้มีกรดอินทรีย์และสารต่างๆ มากมาย เช่น acetic acid, propanoic acid, butanoic acid, phenol, alkane, alcohol และ ester compounds เป็นต้น มีฤทธิ์ยับยั้ง เชื้อสาเหตุโรคพืช ได้ อย่างไรก็ตาม Hwang et al. (2005) รายงานว่า สาร phenols และ guaiacols ในน้ำส้มควันไม้จาก สนญี่ปุ่นมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*, เชื้อ รา *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* และ *Pythium splendens* ส่วนสาร methanol และ acetic acid สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด ได้ เพียงเล็กน้อย และ Nweke and Okpokwasili (2010) รายงานว่า จากการทดสอบ TTC-dehydrogenase

Table 2 Carbendazim - resistance of *Colletotrichum truncatum* s. l. causing of vegetable soybean anthracnose

Isolate	Disease tissue	ED ₅₀ ^{1/}	Isolate	Disease tissue	ED ₅₀	Isolate	Disease tissue	ED ₅₀
San Pa Tong			San Kamphaeng			Phan		
CtSpL_1	leaf	11,675,608.00 ^{2/}	CtSKP_1	pod	131,275,959.40	CtPhS_1	stem	1,127.23
CtSpL_2	leaf	11,675,608.42	CtSKP_2	pod	4,189,985,622.00	CtPhL_1	leaf	14,592,556.81
CtSpL_3	leaf	11,675,608.40	CtSKP_3	pod	531,903,042.20	CtPhL_2	leaf	38,559,127.65
CtSpP_1	pod	9,918,451.00	CtSKP_4	pod	1,140,356,191.00	CtPhP_1	pod	0.0022
CtSpP_2	pod	31,055,154.00	CtSKP_5	pod	385,672,811.00	CtPhP_2	pod	0.0034
CtSpP_3	pod	12,792,231.52	CtSKP_6	pod	34,756,842.91	CtPhP_3	pod	0.0028
CtSpP_4	pod	27,094,388.04	CtSKP_7	pod	548,111,116.40	CtPhP_4	pod	111,546,758.20
CtSpP_5	pod	3,724,323.58	CtSKP_8	pod	2,219,717,194.00	CtPhP_5	pod	1,851,682,068.00
CtSpP_6	pod	1,804,360,789.00	CtSKP_9	pod	301,127,754.90	CtPhP_6	pod	0.0026
CtSpP_7	pod	13,194,240.21	CtSKP_10	pod	22,474,161.57	CtPhP_7	pod	9,608,900,320.00
CtSpP_8	pod	14,484,369.83	CtSKP_11	pod	215,776,788.80	CtPhP_8	pod	0.0067
CtSpP_9	pod	8,846,383.65	CtSKP_12	pod	120,146,403.90	CtPhP_9	pod	177,773,856.00
CtSpP_10	pod	6,219,519.52	CtSKP_13	pod	2,575,832.81			
CtSpP_11	pod	8,379,792.70	CtSKP_14	pod	110,214,709.50			
CtSpP_12	pod	1,729,953,090.00	CtSKP_15	pod	122,687,854.10			

^{1/}highly resistant : ED₅₀ > 100 ; moderately resistant (MR) : ED₅₀ 10 - 100 and sensitive (S) : ED₅₀ < 10^{2/}Data are means of 3 replicates

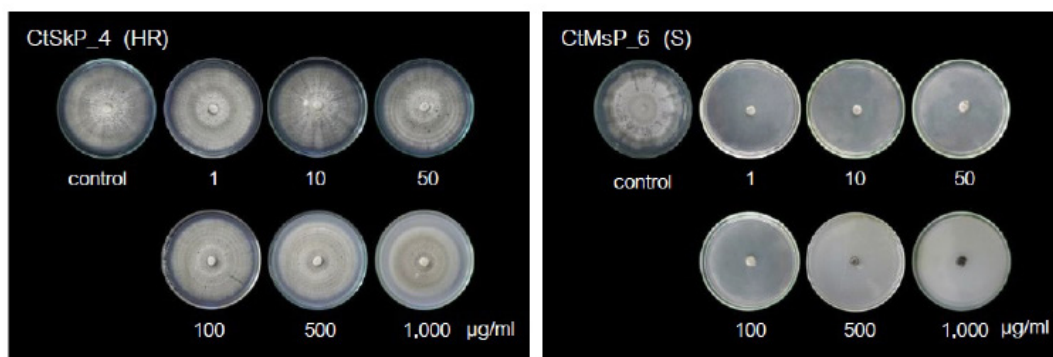


Figure 1 Carbendazim-resistant isolates of *Colletotrichum truncatum* s. l. causing vegetable soybean anthracnose on potato dextrose agar (PDA) amended with carbendazim; HR: highly resistant and S: sensitive.

activity (DHA) สารประกอบ phenol ในความเข้มข้นที่เหมาะสมสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ dehydrogenase ในเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. และ *Escherichia* sp. ได้ เมื่อตรวจดูปลายเส้นใยเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่าพบว่า ปลายเส้นใยเชื้อราทุกไอโซเลทในชุดทดสอบมีลักษณะผิดปกติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ที่มีลักษณะโป่งพอง และเจริญหนาแน่นมากกว่าชุดควบคุม

(Figure 3) ซึ่งสอดคล้องกับกัลยรัตน์ (2557) รายงานว่า เชื้อรา *Gliocephalotrichum* sp. สาเหตุโรคผลเน่าจุดดำของเงาะ ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ผสมน้ำส้มควันไม้ยางพาราและยูคาลิปตัสที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1% (v/v) ทุกไอโซเลทมีปลายเส้นใยผิดปกติ มีลักษณะโป่งพอง ซึ่งความผิดปกติอาจเกิดจากเชื้อราสาเหตุอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต

Table 3 Efficacy eucalyptus wood vinegar on mycelial growth inhibition of 5 isolates *Colletotrichum truncatum* s. l. causing vegetable soybean anthracnose after 10 day of incubation at room temperature ($28 \pm 2^\circ\text{C}$)

Eucalyptus wood vinegar	% Conc. (v/v)	Percentage of growth inhibition ^{1/}				
		CtSpL_3 (HR)	CtPhS_1 (HR)	CtPhP_4 (HR)	CtPhP_8 (S)	CtMsP_6 (S)
distilled 1 time (sample A1)	1	19.03 ^{d2/}	13.16 ^a	11.25 ^d	9.44 ^d	8.37 ^d
	2	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a
	3	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a
	4	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a
	5	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a
distilled 1 time (sample A2)	1	33.47 ^c	35.97 ^c	29.30 ^c	25.55 ^c	13.54 ^c
	2	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a
	3	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a
	4	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a
	5	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a
distilled 2 times (sample B1)	1	16.53 ^a	14.86 ^d	6.66 ^e	8.33 ^d	13.39 ^c
	2	48.33 ^b	52.36 ^b	45.27 ^b	43.47 ^b	48.85 ^b
	3	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a
	4	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a
	5	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a
LSD _{0.05}		1.65	1.65	1.51	1.79	1.94
%CV		1.43	1.43	1.34	1.60	1.73

^{1/}Data are means of 4 replicates

^{2/} Means followed by a common letter in each column are not significantly different by LSD at $P < 0.05$

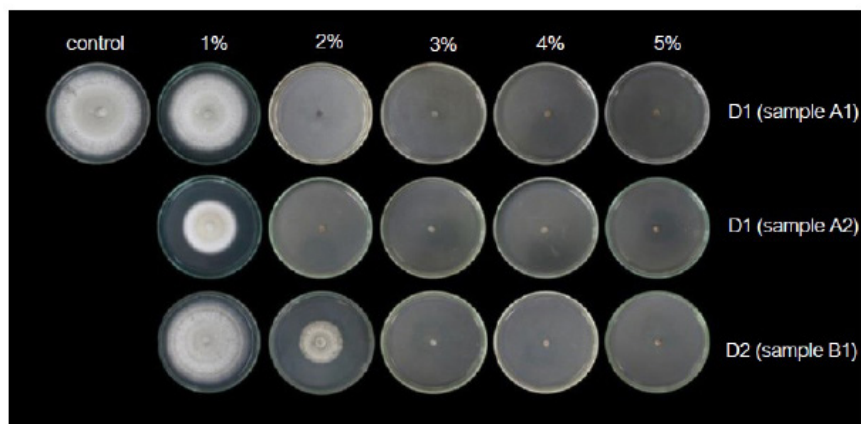


Figure 2 Efficacy of eucalyptus wood vinegar on mycelial growth inhibition of *Colletotrichum truncatum* s. l. isolate CtPhS_1 (HR) causing vegetable soybean anthracnose on PDA after 10 day of incubation at room temperature ($28 \pm 2^\circ\text{C}$): (D1) distilled 1 time and (D2) distilled 2 times.

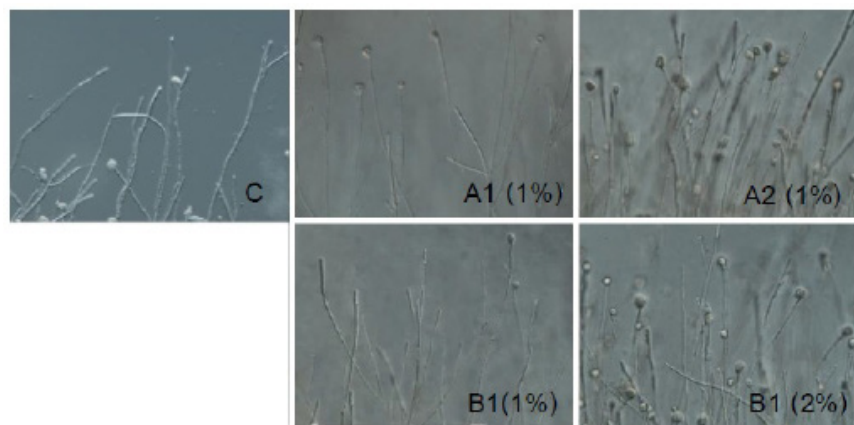


Figure 3 Effects of eucalyptus wood vinegar on mycelial growth of *Colletotrichum truncatum* s. l. isolate CtSpL_3 (HR) causing vegetable soybean anthracnose observed under compound microscope (40X): (C) control, (A1) distilled 1 time, (A2) distilled 1 time and (B1) distilled 2 times.

ประสิทธิภาพน้ำส้มคว้นไม้ในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* s. l. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองฝักสด

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำส้มคว้นไม้ยูคาลิปตัส 2 แบบ ได้แก่ แบบกลั่นครั้งเดียวจำนวน 2 ตัวอย่าง (A1 และ A2) และ กลั่น 2 ครั้ง จำนวน 1 ตัวอย่าง (B1) ในการยับยั้งเชื้อรา *C. truncatum* s. l.

สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองฝักสด 5 ไอโซเลท ได้แก่ CtSpL_3 (HR), CtPhS_1 (HR), CtPhP_8 (HR), CtPhP_4 (S) และ CtMsP_6 (S) ด้วยวิธี slide culture ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3% (v/v) โดยการนับสปอร์ที่งอก germ tube และ วัดความยาว germ tube พบว่า ในชุดควบคุมสปอร์เชื้อราเริ่มงอกในช่วงโมเมนต์ที่ 4 เมื่อเวลาถึงช่วงโมเมนต์ที่ 6, 9 และ 12 สปอร์มีความยาว germ tube

เฉลี่ยเท่ากับ 15.20, 53.40 และ 93.25 ไมโครเมตร ตามลำดับ และช่วงที่ 24 พบว่า ในชุดควบคุมไม่สามารถวัดความยาว germ tube ได้ ส่วนน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัสทั้ง 2 แบบ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1% (v/v) ขึ้นไป มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ 100% (Figure 4) สอดคล้องกับ วิลาลินี และ สรัญญา (2553) รายงานว่า น้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัสและสะเดา ที่ความเข้มข้น 1% (v/v) ขึ้นไป ที่ 24 ชั่วโมงสามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงได้ 100% และสอดคล้องกับ มิซุตระ (2558) รายงานว่า น้ำส้มควันไม้ลำไย ยูคาลิปตัส มะพร้าว ไม้ไผ่ และยางพารา ที่ระดับความเข้มข้น 1% (v/v) ขึ้นไป สามารถยับยั้งการงอก germ tube ของสปอร์เชื้อรา *C. truncatum* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองได้ 100% นอกจากนี้ Kumar et al. (2011) รายงานว่า จากการวิเคราะห์น้ำส้มควันไม้โดยใช้วิธี gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบสารประกอบ 15 ชนิด เช่น o-methoxyphenol, 2,6-dimethoxyphenol, 4-methylenecyclohexanone, 2,3 dihydroxytoluene, levoglucosane และ propanic acid เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้เป็นส่วนประกอบสำคัญ และที่ความเข้มข้น 50% สามารถยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา *Coleosporium plectranthi* สาเหตุโรคราสนิมของใบงาได้ 31.8% ส่วนผลของน้ำส้มควันไม้ไม่มีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์เชื้อรา *C. truncatum* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมจากรายงาน Land et al. (1987) พบว่า น้ำส้มควันไม้สามารถทำให้เชื้อราหยุดชะงักการเจริญเติบโตได้ เนื่องจาก

ในน้ำส้มควันไม้มี สาร polyphenolic compound เช่น guaiacol, cresol และ 4-ethyl-2-methoxyphenol นอกจากนี้ Bortolomeazzi et al. (2007) รายงานว่า คุณสมบัติของน้ำส้มควันไม้ในการยับยั้งเชื้อราขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีและสมรรถนะของสาร phenolic compound นั้น อาจเป็นผลมาจากค่า pH ที่ส่งผลต่อการแตกตัวของประจุ (ionization) ของสารประกอบ phenol รวมไปถึงความสามารถให้อิเล็กตรอนในกลุ่ม alkyl ที่ตำแหน่ง para ของ phenolic compound ทำให้ antioxidant capacity ของสาร phenolic compound เสถียร และความสามารถในการให้อิเล็กตรอนในตำแหน่ง para หรือ ortho มีผลต่อการยับยั้งการเกิดการออกซิเดชันของไขมัน (lipid) ซึ่งกลไกนี้ส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ซึ่งความสามารถในการเป็น antioxidant ของสาร phenolic compound ขึ้นอยู่กับปริมาณของ hydroxyl group (-OH) และ methoxyl group (-O-CH₃) และจากการทดลองของ Velmurugan et al. (2009) เมื่อเติม NaOH ลงในน้ำส้มควันไม้ alkyl group ในตำแหน่ง para ของ phenolic compound จะรับอิเล็กตรอนส่งผลทำให้การแตกประจุของ phenolic compound ลดลง ดังนั้นการยับยั้งการเกิดการออกซิเดชัน (oxidation) ของไขมันลดลงเป็นผลให้คุณสมบัติในการต้านเชื้อรา (antifungal) ลดลงด้วย จึงสรุปว่าการต้านเชื้อราของน้ำส้มควันไม้ที่เกิดจากสาร phenolic compound ขึ้นอยู่กับ pH กล่าวคือ ถ้า pH เป็นกรด จะทำให้การแตกประจุของ phenol สูงขึ้น ทำให้สามารถยับยั้งไขมันได้สูง จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้



Figure 4 Efficacy of eucalyptus wood vinegar concentration 1% (v/v) on inhibition of *Colletotrichum truncatum* s. l. isolate CtPhP_8 (HR) causing vegetable soybean anthracnose on PDA at 24 hr. of incubation at room temperature ($28 \pm 2^\circ\text{C}$): (A) control, (B) distilled 1 time (sample A1), (C) distilled 1 time (sample A2) and (D) distilled 2 times (sample B1).

สรุป

การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัสในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* s. l. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของถั่วเหลืองฝักสด สามารถรวบรวมเชื้อราสาเหตุทั้งหมด 52 ไอโซเลท จากนั้นทดสอบความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม พบว่ามีความต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR) จำนวน 46 ไอโซเลท และพบเชื้อราระดับอ่อนแอ (S) จำนวน 6 ไอโซเลท เมื่อนำตัวแทนเชื้อราสาเหตุโรคมาทดสอบประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัสในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการออกของสปอร์ พบว่า น้ำส้มควันไม้ชนิดกลั่นครั้งเดียวทั้ง 2 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 2% (v/v) และชนิดกลั่น 2 ครั้ง ที่ความเข้มข้น 3% (v/v) ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ 100% และ น้ำส้มควันไม้ทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1% (v/v) ขึ้นไป สามารถยับยั้งการออกของสปอร์ได้ 100% ในช่วงเวลาที่ 24 ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า น้ำส้มควันไม้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในหีบปฏิบัติการใช้ได้ แต่อย่างไรก็ตาม จะต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ในสภาพโรงเรือนต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสาขาวิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และบริษัทลานนาเกษตรอุตสาหกรรม จำกัด เชียงใหม่ ที่สนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ. 2561. ถั่วแปะญี่ปุ่นพันธุ์ใหม่ เมล็ดใหญ่กว่าเดิม สายพันธุ์ปรับปรุงเพื่อเพิ่มผลิตผลและช่วยเกษตรกรสูงวัยญี่ปุ่น. แหล่งข้อมูล: http://www.ditp.go.th/contents_attach/228120/228120.pdf. ค้นเมื่อ 19 สิงหาคม 2561. กัลยรัตน์ มหาวรรณ. 2557. ประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ในการยับยั้งเชื้อรา *Gliocephalotrichum* sp. สาเหตุโรคผลเน่าจุดดำของเงาะ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. จิระพงษ์ คูหากาญจน์. 2552. คู่มือการผลิตถ่านและ

น้ำส้มควันไม้. พิมพ์ครั้งที่ 2. เกษตรกรรมธรรมชาติ กรุงเทพฯ.

ธรรมศักดิ์ สมมาตรย์. 2543. สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช พิมพ์ครั้งที่ 3. โรงพิมพ์ลินคอล์น, กรุงเทพฯ.

มิชุตรา สีตามุย. 2558. ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา และน้ำส้มควันไม้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

รัชนี โสภา. 2558. โครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตถั่วเหลืองฝักสดเพื่อการส่งออก. แหล่งข้อมูล: <http://www.doa.go.th/research/attachment.php?aid=2099>. ค้นเมื่อ 24 กันยายน 2559.

วิกานดา หน่ยขาวนา. 2557. ประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัสร่วมกับเชื้อแบคทีเรียในชีสต่อการควบคุมเชื้อรา *Collectotrichum gloeoides* สาเหตุของโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

วิลาสินี แสงนาค, และสร้อยยา ณ ลำปาง. 2553. ประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้จากต้นยูคาลิปตัสและสะเดาในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*. วารสารเกษตร. 26: 213-222.

วิษณุ สุวรรณมงคล, และสร้อยยา ณ ลำปาง. 2559. ประสิทธิภาพน้ำส้มควันไม้ในการควบคุมเชื้อรา *Atemaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของพืชวงศ์กะหล่ำในหีบปฏิบัติการใช้. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 47: 375-390.

อุดมพร แพนนคร. 2554. น้ำส้มควันไม้และประโยชน์เพื่อการเกษตร. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์โฟกัส มาสเตอร์พริ้น, พิษณุโลก.

Bortolomeazzi, R., N. Sebastianutto, R. Toniolo, and A. Pizzariello. 2007. A comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. Food Chemistry. 100: 1481-1489.

Chen, L. S., C.C. Chu, C.D. Liu, C.D. Chen, and

- J.G. Tsay. 2006. PCR-based detection and differentiation of anthracnose pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from vegetable soybean in Taiwan. J. Phytopathology. 154: 654-662.
- Chung, W. H., H. Ishii, K. Nishimura, M. Fukaya, K. Yano, and Y. Kajitani. 2006. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. Plant Dis. 90: 506-512.
- Damm, U., J. H. C. Woudenberg, P. F. Cannon, and P. W. Crous. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. Fungal Diversity. 39: 45-87.
- Flematti, G. R., E. L. Ghisalberti, K. W. Dixon, and R. D. Trengove. 2004. A compound from smoke that promotes seed germination. Science. 305: 977.
- Hwang, Y. H., Y. I. Matsushita, K. Sugamoto, and T. Matsui. 2005. Antimicrobial effect of the wood vinegar from *cryptomeria japonica* sapwood on plant pathogenic microorganisms. J. Microbiol. Biotechnol. 15: 1106-1109.
- Jothityangkoon, D., R. Koolachart, S. Wanapat, S. Wongkaew, and S. Jogloy. 2006. Using wood vinegar in enhancing peanut yield and in controlling the contamination of aflatoxin producing fungus. Available: <http://www.intlcass.org/files/icss/Jothityangkoon.pdf>. Accessed May.18, 2016.
- Jun, M., Y. Zhi-ming, W. Wen-qiang, and W. Qing-li. 2006. Preliminary study of application effect of bamboo vinegar on vegetable growth. For Stud China. 8: 43-47.
- Kongtragoul, P., S. Nalumpang, Y. Miyamoto, Y. Izumi, and K. Akimitsu. 2011. Mutation at codon 198 of tub2 gene for cabendazim resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose in Thailand. Journal of Plant Protection Research. 51: 377-384.
- Kumar, V., A. K. Chauhan, K. H. Baek, and S. C. Kang. 2011. Inhibitory activity of oak pyroligneous liquor against *Coleosporium plectranthi*, an obligate parasite responsible for the rust disease on perilla leaf. Korean J Environ Agric. 30: 453-458.
- Kummanid, J., K. Akimitsu, and S. Nalumpang. 2017. Mutations of the β -tubulin gene fragments from carbendazim-resistant isolates of *Pestalotiopsis* sp. causing strawberry leaf blight in Chiang Mai, Thailand. Journal of Phytopathology. 165: 515-521.
- Land, C. J., Z. G. Banhidi, and A. Albertsson. 1987. Cold-tolerant (psychrotrophic) moulds and blue stain fungi from softwood in Sweden, growth rates in relation to pH and temperature. Nordic Journal of Botany. 207: 97-106.
- Liu, X., Y. Yin, J. Wu, J. Jiang, and Z. Ma, Z. 2010. Identification and Characterization of Carbendazim-Resistant Isolates of *Gibberella zeae*. Plant Disease. 94: 1137-1142.
- Ma, Z., and T. J. Michailides. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. Crop Protect. 24: 853-863.
- Mckay, G.J., D. Egan, E. Morris, A. E. Brown. 1998. Identification of benzimidazole resistance in *Cladobotrium dendroides* using PCR based method. Mycol. Res. 102: 671-676.
- Mimura, M., C. J. Coyne, M. W. Bambuck, and T. A. Lumpkin. 2007. SSR diversity of vegetable soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. Genet Resour Crop Evol. 54: 497-508.
- Nagaraj, B. T. 2013. Studies on anthracnose of soybean caused by *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus and Moore. M. S. Thesis. Dharwad University of Agricultural Sciences. Dharwad.
- Nweke, C. O., and G. C. Okpokwasili. 2010. Influence

- of exposure time on phenol toxicity to refinery wastewater bacteria. J. Environ. Chem. Ecotoxicol. 2: 20-27.
- Peres, N.A.R., N.L. Souza, T.L. Peever, and L.W. Timmer. 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. Plant Disease. 88: 125-130.
- Ru-Lin, Z., and H. Jun-Sheng. 2007. Cloning of a carbendazim-resistant gene from *Colletotrichum gloeosporioides* of mango in South China. Afr. J. Biotechnol. 6: 143-147.
- Steffens, J. J., E. J. Pell, and M. Tien. 1996. Mechanisms of fungicide resistance in phytopathogenic fungi. Curr. Opin. Biotechnol. 7: 348-355.
- Sutton, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum: Biology, Pathogenicity, and Control* (eds. J.A. Bailey and M.J. Jeger). CAB International, Wallingford, UK.
- Than, P. P., R. Jeewon, K. D. Hyde, S. Pongsupasamit, O. Mongkolporn, and P. W. J. Taylor. 2008. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. Plant Pathology. 57: 562-572.
- Velmurugan, N., S. S. Han, and Y. S. Lee. 2009. Antifungal Activity of Neutralized Wood Vinegar with Water Extracts of *Pinus densiflora* and *Quercus serrata* Saw Dusts. International Journal of Environmental Research. 3: 167-176.
- Yang, H. C., and G. L. Hartman. 2015. Methods and evaluation of soybean genotypes for resistance to *Colletotrichum truncatum*. Plant Disease. 99: 143-148.