บทความวิจัย (Research Article)

การพัฒนาชีวภัณฑ์อารักขาพืชอนุภาคนาโน จากการกักเก็บสารสกัดใบพลูในนาโนไคโตซาน เพื่อควบคุมโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลี

Nano-Biopesticide Development of Betel Extract-Nano Chitosan Encapsulated for Soft Rot Control of Chinese Cabbage

จิตติมา โสตถิวิไลพงศ์ และดุสิต อธินุวัฒน์*

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Jittima Sottiwilaiphong and Dusit Athinuwat*

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

การพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์อารักขาพืชเชิงพาณิชย์จัดเป็นกุญแจสำคัญที่จะกระตุ้นให้เกิดประโยชน์เต็มประสิทธิภาพของสารสกัดพืชควบคุมศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ ภาครัฐและเอกชนจึงได้ร่วมมือพัฒนาต้นแบบชีวภัณฑ์อารักขาพืชชนิดใหม่สูตรน้ำ ที่มีสารสกัดใบพลูเป็นสารออกฤทธิ์ โดยถูกกักเก็บอยู่ในอนุภาคนาโนไคโตซาน รวม 3 สูตร คือ ชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลู ความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10 % โดยทั้ง 3 สูตร ส่งผลให้มีประสิทธิภาพการกักเก็บไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) เท่ากับ 78.69, 82.27 และ 85.39 % ตามลำดับ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ECC14 สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลี ด้วยวิธีมาตรฐาน paper disc agar diffusion พบว่าสูตรชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลู ความเข้มข้น 10 % มีบริเวณยับยั้งสูงที่สุดเท่ากับ 28.28 มิลลิเมตร แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) กับกรรมวิธีควบคุม เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง gas chromatography-mass spectrometry พบว่าชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลูอนุภาคนาโน ประกอบด้วย eucalyptol (1,8-cineole), phenol-2,4-bis(1,1-dimethylethyl), chavicol, eugenol, 3-allyl-6-methoxyphenol, 4-chromanol, α-cadinene และ β-guaiene ซึ่งชีวภัณฑ์นี้มีประสิทธิภาพการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ทั้งแบบสะสมและไม่สะสมภายใน 14 วัน เมื่อทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลูอนุภาคนาโน ที่มีการเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง นาน 12 เดือน ในการควบคุมโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลี ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง เปรียบเทียบกับสารสกัดใบพลู ความเข้มข้น 10 % สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ นาโนไคโตซาน น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และกรรมวิธีที่ไม่ใช้สารใด โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ซ้ำ

*Corresponding author: athinova6@hotmail.com
DOI: 10.14456/tjst.2018.47

ละ 3 กระถาง พบว่าการราดดินด้วยชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลูอนุภาคนาโน ทุก 14 วัน [วันที่ 0, 14 และ 28 วัน หลังปลูกเชื้อ ECC14 (ความเข้มข้น 10^8 cfu/g soil) ลงในดิน] มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนประชากรเชื้อโรคในดินจาก 1.27-1.30 x 10^8 cfu/g soil เหลือ 1.37-2.94 x 10^3 cfu/g soil ในวันที่ 28 หลังปลูกเชื้อโรคในดิน รวมทั้งลดการเกิดโรคเน่าเละได้ 90 % เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (P = 0.05) ข้อมูลทั้งหมดนี้บ่งชี้ให้เห็น ประสิทธิภาพและการใช้ชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลูอนุภาคนาโนอย่างยั่งยืนภายใต้สภาพการระบาดรุนแรงของโรค รวมทั้งเทคโนโลยีสูตรเฉพาะนี้ สามารถขยายผลถ่ายทอดสู่การผลิตภาคอุตสาหกรรม และการนำชีวภัณฑ์ไปใช้อย่างได้ผลในการผลิตพืชเพื่อการค้า

คำสำคัญ : ชีววิธี; โรคที่มากับดิน; นาโนเทคโนโลยี; สารสกัดพืช; เกษตรยั่งยืน

Abstract

Formulation of plant extract is a key step in the development of commercial biopesticides that stimulates its full-exploited efficacy. The development of nano-biopesticides liquid formula containing 5, 7.5 and 10 % of betel extract encapsulated in nano chitosan in three formulations was established under the coordination between government and private sector. The 5, 7.5 and 10 % of betel extract concentrations showed non-significantly encapsulation efficiency in nano chitosan with 78.69, 82.27 and 85.39 %, respectively. But a 10 % of betel extract encapsulated in nano chitosan formulation showed the highest inhibition zone of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ECC14, the causal agent of soft rot of Chinese cabbage by paper disc agar diffusion standard method with 28.28 mm (P = 0.05). Nano betel-biopesticides consist of eucalyptol (1,8-cineole), phenol-2,4-bis(1,1-dimethylethyl), chavicol, eugenol, 3-allyl-6-methoxyphenol, 4-chromanol, α-cadinene and β-guaiene which detected by gas chromatography-mass spectrometry. Nano betel-biopesticides formula showed continuous- and dis-continuous- release of active ingredients within 14 days. Efficacy of innovative biopesticide at 12 months storage under room temperature to control most serious soft rot of Chinese cabbage in greenhouse conditions was investigated compared with 10 % of betel crude extract, copper hydroxide, nano chitosan, distilled water and non-treated control in CRD with 10 replications and 3 pots/replication. Soil drenching with nano betel-biopesticides for 14 day-interval [at 0, 14 and 28 days after ECC14 (10^8 cfu/g soil) inoculation] significantly reduced soft rot pathogen in inoculated soil from 1.27-1.30 x 10^8 cfu/g soil to 1.37-2.94 x 10^3 cfu/g soil at 28 days after ECC14 soil inoculation and reduce soft rot incidence with 90 % when compared with control treatment (P = 0.05). These indicate the sustainable potential and application of nano betel-biopesticides under disease stress conditions. Also, the formulated technology can be scaled-up and the new bioproduct has the potential for use in commercial field production.

Keywords: biocontrol; soilborne disease; nanotechnology; plant extract; sustainable agriculture

1. คำนำ

โรคเน่าเละของผักกาดขาวปลีเกิดจากเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) ก่อให้เกิดความเสียหายมากกว่า 50 % ของผลผลิตทั้งหมด ซึ่งจะแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ และสภาพอากาศ (Holt *et al*., 1994) เมื่อพืชติดเชื้อจะเกิดรอยแผลฉ่ำน้ำ (water soaked) จุดเล็ก ๆ บนพืช จุดฉ่ำน้ำจะขยายโตออกทั้งโดยรอบและลึกลงไปภายในผิวพืชอย่างรวดเร็ว ขณะเดียวกันเนื้อเยื่อส่วนนี้ก็จะอ่อนนุ่มยุบตัวลงภายในเวลาเพียง 2-3 วัน แผลเละแฉะเป็นเมือกเยิ้ม มีสีคล้ำหรือสีน้ำตาล และมีกลิ่นเหม็นฉุนจัด อาการเน่าจะลุกลามไปเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ อย่างรวดเร็ว การติดเชื้อมักมาจากเมือก (slime) หรือน้ำเละ ๆ ซึ่งมีแบคทีเรียสาเหตุโรคอยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อถูกน้ำชะก็จะกระเซ็นไปติดยังต้นข้างเคียง หรือติดไปกับเครื่องมือเครื่องใช้ การสัมผัสจับต้อง ตลอดจนเสื้อผ้าเครื่องนุ่งห่มของผู้ปลูกเอง การระบาดมักเกิดในฤดูฝนและระบาดรุนแรงในสภาพความชื้นสูงและช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส (ศักดิ์, 2537)

การป้องกันกำจัดโรคเน่าเละ ควรหมั่นเอาใจใส่ดูแลแปลงปลูกอย่างสม่ำเสมอ และเก็บทำลายพืชที่แสดงอาการเน่าเละทิ้งทันที หลังจากการเก็บเกี่ยวพืชผักแล้วควรเก็บทำลายซากพืชทันที การเตรียมดินเพาะปลูกในฤดูถัดไปควรไถพลิกกลับหน้าดินขึ้นมาตากแดดสัก 2-3 ครั้ง โดยทิ้งระยะห่างกันพอสมควร หากเป็นไปได้ควรปลูกพืชหมุนเวียน ไม่ควรปลูกพืชผักชนิดเดียวกันกับที่ซึ่งเคยพบโรคระบาด สำหรับการใช้สารเคมีนั้นอาจเป็นการใช้ในกรณีที่ใช้วิธีอื่นแล้วไม่ได้ผล เพื่อป้องกันไม่ให้โรคระบาดลุกลามต่อไป ได้แก่ คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ (copper hydroxide) อัตราการใช้ 10-20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และสารละลายจุนสี เช่น บอร์โดมิกเจอร์ (bordeaux mixture) โดยพ่นทุก ๆ 3-5 วัน (ศักดิ์, 2537) สำหรับภาชนะที่ใช้บรรจุ เช่น เข่ง กระบุง ตะกร้า หรือถุงพลาสติก หากจำเป็นต้องใช้ของเก่าเพื่อความปลอดภัยจากโรค ก่อนนำไปบรรจุครั้งใหม่ควรฆ่าเชื้อโดยนำไปแช่น้ำยาฟอร์มาลีน หรือเมอร์คิวริคคลอไรด์ หรือสารละลายจุนสีอย่างใดอย่างหนึ่งเสียก่อน (ไทยเกษตรศาสตร์ เว็บรวบรวมวิชาความรู้ด้านการเกษตรของไทย, ม.ป.ป.)

สำหรับการใช้สารสกัดพืชควบคุมโรคเน่าเละของพืชวงศ์ผักกาดหรือ Brassicaceae นั้น มีรายงานความสำเร็จของการใช้สารสกัดพืชชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* อย่างมีประสิทธิภาพ ได้แก่ ฝรั่ง (วิชัย และคณะ, 2541; ชลิดา และคณะ, 2543) มะกอกป่า มะกอกฝรั่ง มะขาม มะขามป้อม ทับทิม ยูคาลิปตัส ดอกกระเจี๊ยบ และบัวผัน (ชลิดา และคณะ, 2543) ใบฝรั่ง หูปลาช่อน มะขามสุก และต้นลูกใต้ใบ (เจตน์, 2545) ว่านกาบหอย (อารีย์, 2546) นอกจากนี้ ศศิธร (2546) รายงานการใช้น้ำสกัดหยาบและกากของพืช 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกผลทับทิม ใบพลู เปลือกส้มเขียวหวาน ต้นลูกใต้ใบ และเปลือกผลมังคุด คลุกลงในดินเพื่อลดปริมาณเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดเขียวปลี พบว่าในทุกกรรมวิธีสามารถลดปริมาณเชื้อโรคได้ โดยปริมาณเชื้อในดินในแต่ละสัปดาห์ลดลงในอัตราสูงกว่าการลดลงของปริมาณเชื้อในดินที่เป็นกรรมวิธีควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้สารสกัดหยาบและกากของใบพลูและเปลือกผลทับทิม คลุกลงในดินที่มีการติดเชื้อสามารถชะลอการพัฒนาของโรคได้ดีกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ ศศิธร (2547) รายงานประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร 14 ชนิด ความเข้มข้น 100,000 ppm ซึ่งใช้แอลกอฮอล์ 95 % เป็นตัวทำละลาย ในการยับยั้งเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผัก โดยวิธี paper

disc diffusion พบว่าสารสกัดจากผลเบญกานี ก่อให้เกิดบริเวณยับยั้งสูงที่สุด ที่ค่าเฉลี่ย 3.51 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ สารสกัดจากผลสมอพิเภก สารสกัดจากเปลือกผลทับทิม สารสกัดจากผลสมอไทย และสารสกัดจากใบฝรั่ง ซึ่งมีค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเท่ากับ 2.80, 2.61, 2.45 และ 1.32 เซนติเมตร ตามลำดับ วัชรา และศศิธร (2553) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร 20 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผักโดยวิธี paper disc agar diffusion พบว่าสารสกัดที่ให้ผลดีที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ สารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภก เปลือกผลทับทิม และผลเบญกานี ให้ค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดที่ความเข้มข้น 1,000 ppm เท่ากับ 0.41, 0.33 และ 0.25 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิด มาทดสอบความสามารถในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในดินจำลองการติดเชื้อ พบว่าสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกและสารสกัดหยาบเปลือกผลทับทิม ความเข้มข้น 20,000 ppm สามารถลดปริมาณแบคทีเรียสาเหตุโรคในดินได้ดีที่สุด โดย จิตติมา และคณะ (2558) รายงานประสิทธิภาพการใช้สารสกัดหยาบใบพลูที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทหรือเอทานอล 95 % ในการยับยั้งเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ECC14 สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลี โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 27 และ 26 มิลลิเมตร ตามลำดับ ยิ่งกว่านั้นการราดดินด้วยสารสกัดหยาบใบพลูด้วยเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 10 % ทุก 7 วัน จำนวน 5 ครั้ง (เมื่อ 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน หลังปลูกเชื้อ ECC14 ในดิน) หรือทุก 14 วัน จำนวน 3 ครั้ง (เมื่อ 0, 14 และ 28 วัน หลังปลูกเชื้อ ECC14 ในดิน) มีประสิทธิภาพควบคุมประชากรเชื้อ ECC14 ให้อยู่ในระดับที่ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (P = 0.05) ทั้งภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการและเรือนปลูกพืชทดลอง แสดงให้เห็นถึงความสำเร็จของการควบคุมโรคเน่าเละด้วยสารสกัดพืช โดยเฉพาะสารสกัดใบพลู และแนวโน้มความเป็นไปได้ในการพัฒนาชีวภัณฑ์อารักขาพืชจากสารสกัดใบพลู สำหรับใช้ในการควบคุมโรคเน่าเละของพืชวงศ์ผักกาด การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชีวภัณฑ์อารักขาพืชอนุภาคนาโนจากการกักเก็บสกัดใบพลูในนาโนไคโตซานเพื่อควบคุมโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลี และเป็นต้นแบบการผลิตภาคอุตสาหกรรมต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบใบพลู

นำใบพลูมาล้างน้ำให้สะอาดและหั่นเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 นิ้ว แช่แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 % เป็นเวลา 3 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จึงอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง (ศศิธร และสุพจน์, 2548; สุภาพร และกัญญาญาภัค, 2550) จากนั้นนำไปบดละเอียดด้วยเครื่องปั่น และสกัดหยาบใบพลูด้วยเอทิลอะซิเตท ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพดีในการสกัดสารสำคัญจากใบพลู และมีฤทธิ์ในการควบคุมประชากรเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ECC14 สายพันธุ์รุนแรง สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลี ในดินจำลองการติดเชื้อ ECC14 (จิตติมา และคณะ, 2558) โดยนำใบพลูใส่ลงในขวดชมพู่ขนาด 2 ลิตร ที่เตรียมไว้ เติมเอทิลอะซิเตทด้วยอัตราส่วนตัวอย่างพืช (กรัม) : เอทิลอะซิเตท (มิลลิลิตร) เท่ากับ 1 : 5 ปิดปากขวดด้วยสำลีและอลูมิเนียมฟอยล์ และนำไปเข้าเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (32±3 °C) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองเศษพืชออกด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 และนำส่วนของเหลวที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วย

เครื่องระเหยระบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) (ศศิธร, 2546; วัชรา และศศิธร, 2553) หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบใบพลูที่ได้ เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปแยก fraction และทดสอบประสิทธิภาพ fraction ในการยับยั้งเชื้อ ECC14 สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลีต่อไป

2.2 การแยก fraction สารสกัดหยาบใบพลูและการทดสอบประสิทธิภาพ

นำสารสกัดหยาบใบพลูด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท มาแยกสารสำคัญอย่างละเอียดด้วย column chromatography โดยนำสำลีรองที่ด้านล่างของคอลัมน์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ยาว 45 เซนติเมตร หลังจากนั้นเทซิลิกาเจลขนาด 70-230 mesh ลงในคอลัมน์ โดยให้ซิลิกาเจลมีน้ำหนักเป็น 30 เท่าของน้ำหนักสารสกัดหยาบใบพลู จากนั้นเติมเฮกเซนให้เต็มคอลัมน์แล้วปล่อยให้ไหลออกจนเหลือตัวทำละลายอยู่เหนือซิลิกาเจลประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วค่อย ๆ ใส่สารสกัดหยาบใบพลูลงไปอย่างสม่ำเสมอ ชะสารสกัดด้วยตัวทำละลายครั้งละ 100 มิลลิลิตร เริ่มจากตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยไปมาก ได้แก่ เฮกเซน เฮกเซนกับเอทิลอะซิเตท เอทิลอะซิเตท เอทิลอะซิเตทกับเมทานอล และเมทานอล ตามลำดับ โดยลดปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยลง ครั้งละ 10 % และเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากครั้งละ 10 % เก็บสารที่ชะได้ในแต่ละ fraction นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศ รวบรวมและเตรียมสารละลาย fraction ต่าง ๆ ความเข้มข้น 10 % (จิตติมา และคณะ, 2558) เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ ECC14 ด้วยวิธีมาตรฐาน paper disc agar diffusion โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 3 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ เริ่มต้นจากการนำเชื้อบริสุทธิ์ ECC14 (จิตติมา และคณะ, 2558) มาเพิ่มปริมาณบนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเตรียมเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย ECC14 ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและตรวจวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยปรับค่า optical density (O.D.) เท่ากับ 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ความเข้มข้นเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml) แล้วผสมในอาหาร NGA ที่หลอมละลายและตั้งทิ้งจนกระทั่งมีอุณหภูมิลดลงเหลือ 50-55 ºC ในอัตราส่วนเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย : NGA เท่ากับ 1 : 20 (วิชัย และคณะ, 2541) เขย่าให้เข้ากันแล้วเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รอจนผิวหน้าอาหารแข็ง ใช้ micropipette ดูดสารทดสอบในแต่ละ fraction หรือสารทดสอบในกรรมวิธีควบคุม ซึ่งประกอบด้วย เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เมทานอล คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตราการใช้ 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตรกรรมวิธีละ 10 ไมโครลิตร หยดลงบน paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว รอให้ตัวทำละลายของสารทดสอบบน paper disc ระเหยหมดเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง จึงย้าย paper disc ที่อิ่มตัวด้วยสารทดสอบในแต่ละกรรมวิธี และกรรมวิธีที่ไม่ใช้สารใด มาวางบนอาหาร NGA ผสมเชื้อ ECC14 บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง ตรวจและบันทึกผล โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลและความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า เฉลี่ยทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี Duncan's new multiple range tests (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (ชูศักดิ์, 2551) เพื่อคัดเลือกสารสกัดใบพลู fraction ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์อารักขาพืชต่อไป

2.3 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบพลู

นำสารสกัดใบพลู fraction 8 ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ ECC14 สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลีได้ดีที่สุด (จิตติมา และคณะ, 2558) มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (รุ่น QP-2010 Ultra บริษัท Shimadzu) โดยใช้คอลัมน์ชนิด HP-5MS 30 m x 0.25 mm ID 0.25 mm และใช้ก๊าซฮีเลียมเป็น carrier โดยตั้งอัตราการไหลของก๊าซฮีเลียมเข้าคอลัมน์เป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อวินาที นำสารสกัดใบพลู fraction 8 มาเจือจางด้วยเอทานอล (HPLC grade) 1,000 เท่า และฉีดที่ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ภายใต้สภาวะการฉีดของ GC-MS เท่ากับ 320 องศาเซลเซียส โดยการตั้งโปรแกรมเริ่มต้นที่ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นถึง 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 20 องศาเซลเซียสต่อนาที และอุณหภูมิสุดท้ายเป็น 320 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 8 องศาเซลเซียสต่อนาที ส่วนอุณหภูมิ detector เท่ากับ 200 องศาเซลเซียส แปลผลโดยเทียบกับ library ของ NIST และ Wiley 275 มี quality match > 85 % (กฤติกา, 2548)

2.4 การพัฒนาชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลู

พัฒนาชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลูด้วยการกักเก็บสารสกัดใบพลู fraction 8 ในนาโนไคโตซาน เริ่มจากการเตรียมนาโนไคโตซานจากไคโตซานทางการค้าด้วยวิธีไอออนิกเจลเลชันโดยใช้สารโซเดียมไตรโพลิฟอสเฟส เพื่อให้ได้นาโนไคโตซานความเข้มข้น 0.05 % น้ำหนักโดยปริมาตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกักเก็บสาร (ยุวพร, 2554) มาศึกษาประสิทธิภาพการกักเก็บสารสกัดใบพลู fraction 8 วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ได้แก่ T1 สารสกัดใบพลู fraction 8 ความเข้มข้น 5 % และนาโนไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 % T2 สารสกัดใบพลู fraction 8 ความเข้มข้น 7.5 % และนาโนไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 % T3 สารสกัดใบพลู fraction 8 ความเข้มข้น 10 % และนาโนไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 % และ T4 นาโนไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 % เพียงอย่างเดียว เริ่มต้นจากการนำสารสกัดใบพลู fraction 8 ความเข้มข้นต่าง ๆ ใน T1-T3 ละลายใน DMSO (dimethyl sulfoxide) อัตราส่วน 3 : 1 กวนให้สารละลายเข้ากัน ส่วน T4 ใช้เฉพาะ DMSO (ไม่เติมสารสกัดใบพลู) หลังจากนั้นเติมไคโตซานความเข้มข้น 0.05 % : สารละลายไตรโพลีฟอสเฟต (tripolyphosphate, TPP) ความเข้มข้น 0.075 % ลงในส่วนผสมของสารสกัดใบพลูและ DMSO อัตราส่วน 1 : 1 : 2 กวนให้เข้ากัน นำสารละลายที่ได้ไปเขย่าด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เก็บตะกอนชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลูจากแต่ละกรรมวิธี ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ ECC14 สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลีด้วยวิธีมาตรฐาน paper disc agar diffusion วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 10 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 3 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ T1 ชีวภัณฑ์อารักขาพืช ซึ่งมีสารสกัดใบพลู ความเข้มข้น 5 % เป็นสารออกฤทธิ์ T2 ชีวภัณฑ์อารักขาพืช ซึ่งมีสารสกัดใบพลู ความเข้มข้น 7.5 % เป็นสารออกฤทธิ์ T3 ชีวภัณฑ์อารักขาพืช ซึ่งมีสารสกัดใบพลู ความเข้มข้น 10 % เป็นสารออกฤทธิ์ T4 สารสกัดหยาบใบพลูในตัวทำลายเอทิลอะซิเตต ความเข้มข้น 10 % T5 สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตราการใช้ 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร T6 นาโนไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 % T7 dimethyl sulfoxide T8 tripolyphosphate

T9 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และ T10 กรรมวิธีที่ไม่ใช้สารใด ดังรายละเอียดอุปกรณ์และวิธีการข้อ 2 และศึกษาประสิทธิภาพการกักเก็บสารสกัดใบพลู fraction 8 ความเข้มข้นต่าง ๆ ในนาโนไคโตซาน พร้อมคัดเลือกกรรมวิธีซึ่งมีประสิทธิภาพการกักเก็บสูงสุดมาศึกษาอัตราการปลดปล่อยสารสกัดใบพลูแบบสะสมและไม่สะสม วิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดย DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป เพื่อคัดเลือกกรรมวิธีที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลูต้นแบบต่อไป

2.4.1 ศึกษาประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชในการกักเก็บสารสกัดใบพลู

การศึกษาประสิทธิภาพนาโนไคโตซานในการกักเก็บสารสกัดใบพลู fraction 8 วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ได้แก่ การกักเก็บสารสกัดใบพลู fraction 8 ความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10 % โดยการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญที่พบมากในใบพลู ได้แก่ 3-allyl-6-methoxyphenol และ 4-chromanol ด้วยเครื่อง GC-MS ดังรายละเอียดอุปกรณ์และวิธีการข้อ 3 เปรียบเทียบกับสารสกัดใบพลู fraction 8 ความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนกักเก็บในนาโนไคซานและใช้นาโนไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 % ที่ไม่ได้กักเก็บสาร เป็นกรรมวิธีควบคุม และคำนวณประสิทธิภาพการกักเก็บตามสูตรของ Yan *et al.* (2005) ดังนี้ encapsulation efficiency (% EE) = [(total agent - free agent) ÷ total agent] x 100

2.4.2 ศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยสารสกัดใบพลูจากชีวภัณฑ์อารักขาพืช

การศึกษาการปลดปล่อยสารสกัดใบพลูจากนาโนไคโตซานของชีวภัณฑ์อารักขาพืชต้นแบบนั้น ประยุกต์อุปกรณ์และวิธีการจาก Das และคณะ (2010) และ Rangrong และคณะ (2010) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

(1) อัตราการปลดปล่อยสารแบบสะสม โดยนำสารแขวนลอยชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลู ความเข้มข้น 10 % ซึ่งมีประสิทธิภาพการกักเก็บและยับยั้งเชื้อ ECC14 ได้ดีที่สุด มาเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที วิเคราะห์ปริมาณ 3-allyl-6-methoxyphenol และ 4-chromanol ด้วยเครื่อง GC-MS ในส่วนใสที่ได้ ดังรายละเอียดอุปกรณ์และวิธีการข้อ 3 เปรียบเทียบกับสารสกัดใบพลูที่ถูกกักเก็บในนาโนไคซานและนาโนไคโตซานที่ไม่ได้กักเก็บสาร ทำซ้ำขั้นตอนเดิมเป็นเวลา 7 วัน

(2) อัตราการปลดปล่อยสารแบบไม่สะสม นำสารแขวนลอยชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลู ความเข้มข้น 10 % มาเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ในสภาพอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้นำมาวิเคราะห์ปริมาณ 3-allyl-6-methoxyphenol และ 4-chromanol ด้วยเครื่อง GC-MS ดังรายละเอียดอุปกรณ์และวิธีการข้อ 3 เปรียบเทียบกับสารสกัดใบพลูที่ถูกกักเก็บในนาโนไคซานและนาโนไคโตซานที่ไม่ได้กักเก็บสาร นำส่วนตะกอนมาเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ddH_2O) ใหม่ลงไปแล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ในสภาพอุณหภูมิห้องต่อไป เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงทำซ้ำขั้นตอนเดิมเป็นเวลา 7 วัน

2.5 ศึกษาอายุการเก็บรักษาชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลู

เก็บรักษาชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลูในนาโนไคโตซานในขวดแก้วสีชาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 3, 6, 9, และ 12 เดือน แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ ECC14 สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลี ด้วยวิธีมาตรฐาน

paper disc agar diffusion ดังรายละเอียดอุปกรณ์และวิธีการข้อ 2 วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 13 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 3 จาน อาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกันระหว่าง (1) T1 ชีวภัณฑ์อารักขาพืช อายุ 0 เดือน (2) T2 ชีวภัณฑ์อารักขาพืช อายุ 3 เดือน (3) T3 ชีวภัณฑ์อารักขาพืช อายุ 6 เดือน (4) T4 ชีวภัณฑ์อารักขาพืช อายุ 9 เดือน (5) T5 ชีวภัณฑ์อารักขาพืช อายุ 12 เดือน (6) T6 สารสกัดหยาบใบพลูในตัวทำลายเอทิลอะซิเตต ความเข้มข้น 10 % อายุ 0 เดือน (7) T7 สารสกัดหยาบใบพลูในตัวทำลายเอทิลอะซิเตต ความเข้มข้น 10 % อายุ 12 เดือน (8) T8 สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตราการใช้ 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (9) T9 นาโนไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 % (10) T10 dimethyl sulfoxide (11) T11 tripolyphosphate (12) T12 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และ (13) T13 กรรมวิธีที่ไม่ใช้สารใด วิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดย DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

2.6 ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลูในการควบคุมโรคเน่าเละในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

ทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลูในนาโนไคโตซานในการควบคุมโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลีในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดยเตรียมดิน 140 กิโลกรัม แบ่งใส่ลงในกระถางพลาสติกขนาด 8 นิ้ว กระถางละ 2 กิโลกรัม จำนวน 70 กระถาง นำเมล็ดผักกาดขาวปลีมาปลูกลงในกระถาง 3-5 เมล็ด เมื่อผักกาดขาวปลีอายุ 14 วัน ถอนแยกให้เหลือกระถางละ 3 ต้น เมื่อผักกาดขาวปลีอายุ 30 วัน จึงนำมาใช้ทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลูในการควบคุมโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลี วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 8 กรรมวิธี (T1-T8) กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 3 กระถาง โดยมีรายละเอียดดังนี้ T1 สารสกัดหยาบใบพลูในตัวทำลายเอทิลอะซิเตต ความเข้มข้น 10 % อายุ 0 เดือน T2 สารสกัดหยาบใบพลูในตัวทำลายเอทิลอะซิเตต ความเข้มข้น 10 % อายุ 12 เดือน ในสภาพอุณหภูมิห้อง T3 ชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลู ความเข้มข้น 10 % อายุ 0 เดือน T4 ชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลู ความเข้มข้น 10 % อายุ 12 เดือน ในอุณหภูมิห้อง T5 กรรมวิธีควบคุม สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตราการใช้ 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร T6 กรรมวิธีควบคุม ไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 % T7 กรรมวิธีควบคุม น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และ T8 กรรมวิธีที่ไม่ใช้สารใด โดยปลูกเชื้อ ECC14 สาเหตุโรคเน่าเละ (1×10^8 cfu/g soil) ด้วยวิธีราดดิน เมื่อผักกาดขาวปลี อายุ 30 วัน และราดสารทดสอบต่าง ๆ ตามรายละเอียดในแต่ละกรรมวิธี อัตรา 100 มิลลิลิตรต่อกระถาง หลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค 0, 14 และ 28 วัน ประเมินการมีชีวิตรอดของ ECC14 และความรุนแรงของโรคเน่าเละ วิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดย DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ผลการแยก fraction สารสกัดใบพลูและการทดสอบประสิทธิภาพ

สารสกัดหยาบใบพลูซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต มีลักษณะหนืดข้น สีเขียวเข้ม เมื่อนำมาแยกสารสำคัญด้วยวิธี column chromatography สามารถแยกเก็บสารสำคัญที่สกัดออกมาได้รวม 21 fraction จึงนำส่วนของเหลวของแต่ละ fraction ที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศ รวบรวมและเตรียมสารละลาย fraction ต่าง ๆ ความเข้มข้น 10 % และนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ ECC14 ด้วยวิธีมาตรฐาน paper disc agar diffusion พบว่าสารสำคัญในสารสกัดใบพูล fraction 8 มีประสิทธิ-

ภาพดีที่สุด โดยมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 29 มิลลิเมตร แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) กับ fraction อื่น ๆ และกรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับรายงานของ วัชรา และศศิธร (2553) ในการใช้สารสกัดหยาบพืชสมุนไพรยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของพืชวงศ์ผักกาด ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภก เปลือกทับทิม และผลเบญกานี ความเข้มข้น 1,000 ppm แสดงค่าเฉลี่ยการยับยั้งสูงสุด เช่นเดียวกับ Rahman และคณะ (2012) รายงานว่าสารสกัดหยาบใบปอกระเจา มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละได้เช่นเดียวกัน สำหรับประสิทธิภาพสารสกัดหยาบใบพลูในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชนั้น รายงานโดย อุดมลักษณ์ และคณะ (2544) ซึ่งทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบใบพลูด้วยวิธีมาตรฐาน paper disc agar diffusion พบว่าสารสกัดหยาบใบพลู ความเข้มข้น 100,000 และ 200,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Eurotium amstelodami* และ *E. chevalieri* ตามลำดับ และ หฤทัย และพรอนันต์ (2557) รายงานประสิทธิภาพสารสกัดหยาบใบพลูความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งรา *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. และ *Penicillium* sp. สาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวได้ 100 % ส่วนการใช้สารสกัดหยาบใบพลูยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชและควบคุมโรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย อุมาพร และ ชลิดา (2557) รายงานว่าสารสกัดหยาบใบพลู ปริมาตร 40 ไมโครลิตร มีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ดี โดยมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 8.45 มิลลิเมตร และเมื่อใช้ใบพลูแห้งรองก้นหลุมก่อนปลูกมะเขือเทศในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง ซึ่งมีการปลูกเชื้อ *R. Solanacearum* ให้แพร่กระจายอยู่ในดิน ส่งผลให้มะเขือเทศรอดตาย 25 % ขณะที่กรรมวิธีควบคุม (ปลูกเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเพียงอย่างเดียว) ส่งผลให้มะเขือเทศเป็นโรคเหี่ยวตาย 100 % ขณะที่ จิตติมา

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของสารสกัดใบพลูด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท fraction ต่าง ๆ ในการยับยั้งเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ECC14 สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลี

กรรมวิธี	บริเวณยับยั้งเฉลี่ย (มิลลิเมตร)[1/]	กรรมวิธี	บริเวณยับยั้งเฉลี่ย (มิลลิเมตร)[1/]	กรรมวิธี	บริเวณยับยั้งเฉลี่ย (มิลลิเมตร)[1/]
Fraction 1	0f	Fraction 10	0f	Fraction 19	0f
Fraction 2	14.67±0.5131c	Fraction 11	0f	Fraction 20	0f
Fraction 3	16.67±0.55c	Fraction 12	0f	Fraction 21	0f
Fraction 4	9.67±0.58d	Fraction 13	0f	Hexane	0f
Fraction 5	11.33±0.17cd	Fraction 14	0f	Ethyl acetate	0f
Fraction 6	8.67±0.35d	Fraction 15	0f	Methanol	0f
Fraction 7	21.00±0.12b	Fraction 16	0f	Copper hydroxide	7.00±0.51d
Fraction 8	29.00±0.06a	Fraction 17	0f	น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	0f
Fraction 9	20.00±0.10b	Fraction 18	0f	กรรมวิธีที่ไม่ใช้สารใด	0f

[1/] ประสิทธิภาพของสารสกัดใบพลู fraction ต่าง ๆ แตกต่างกันตามตัวอักษรเปรียบเทียบตามคอลัมน์ โดยวิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดย Duncan's new multiple range tests (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

และคณะ (2558) และ ประทุมพร และคณะ (2558) รายงานประสิทธิภาพสารสกัดหยาบใบพลูในการยับยั้งเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลีและคะน้า ตามลำดับ ตลอดจนประสิทธิภาพในการควบคุมประชากรเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ในดินติดเชื้อจนกระทั่งจำนวนประชากรเชื้อโรคอยู่ในระดับที่ไม่เหมาะสมต่อการเกิดโรคเน่าเละได้ บ่งชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสารสกัดใบพลูในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช และความเป็นไปได้ในการพัฒนาต่อยอดเป็นชีวภัณฑ์อารักขาพืชสำหรับควบคุมโรคเน่าเละต่อไป ซึ่งโรคนี้เป็นโรคที่ยากแก่การควบคุม เพราะแม้แต่สารเคมีอารักขาพืชก็มักจะควบคุมไม่ได้ผล เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคสามารถดำรงชีพอยู่ในดินได้นาน แม้ว่าเศษซากพืชอาศัยจะเน่าเปื่อยไปแล้วก็ตาม (soilborne plant pathogen) ดังนั้นหัวใจสำคัญในการควบคุมโรคนี้ จำเป็นต้องใช้ผลิตภัณฑ์อารักขาพืชที่มีกลไกปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (active ingredients) อย่างช้า ๆ ลงไปในดิน ซึ่งเป็นแหล่งอาศัยของเชื้อสาเหตุโรค จึงจะสามารถควบคุมประชากรเชื้อโรคจนกระทั่งไม่เหมาะสมต่อการเกิดโรคหรือหมดไปจากแหล่งผลิตพืชนั้น ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพยั่งยืน

3.2 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบพลู

ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบพลู fraction 8 พบว่ามีสารสำคัญ 8 ชนิด ได้แก่ eucalyptol (1,8-cineole), phenol-2,4-bis (1,1-dimethylethyl), chavicol, eugenol, 3-allyl-6-methoxyphenol, 4-chromanol, α-cadinene และ β-guaiene ซึ่งสารสำคัญที่พบมาก คือ 4-chromanol และ 3-allyl-6-methoxyphenol มี % of total เท่ากับ 73.45 และ 30.28 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) สอดคล้องกับ อรพิน และคณะ (2553) ที่รายงานสารสกัดใบพลู ประกอบด้วยสารสำคัญ 16 ชนิด ได้แก่ 3-allyl-6-methoxyphenol, α-cadinene, β-cadinene, trans-caryophyllene, eucalyptol, eugenol, elemene, cubenol, aromadendrene, cis-caryophyllene, chavicol, seychellene, valencene, β-guaiene และ juniper camphor บ่งชี้ให้เห็นว่า 4-chromanol และ 3-allyl-6-methoxyphenol จัดเป็นสารสำคัญที่มีแนวโน้มเป็นสารออกฤทธิ์ (active ingredient) ในการควบคุมโรคเน่าเละ โดย 4-chromanol และ 3-allyl-6-methoxyphenol เป็นสารกลุ่ม quinone และฟีนอล (phenol) ตามลำดับ ซึ่งสาร 2 กลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบพลู fraction 8

Peak No.	Compound of betel leaf	Groups	% of total
1	Eucalyptol (1,8-cineole)	Monoterpene	0.28
2	Phenol-2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	Phenol	1.14
3	Chavicol	Phenol	4.23
4	Eugenol	Phenol	1.05
5	3-allyl-6-methoxyphenol	Phenol	30.28
6	4-chromanol	Quinone	73.45
7	α-cadinene	Sesquiterpene	0.57
8	β-guaiene	Sesquiterpene	0.37

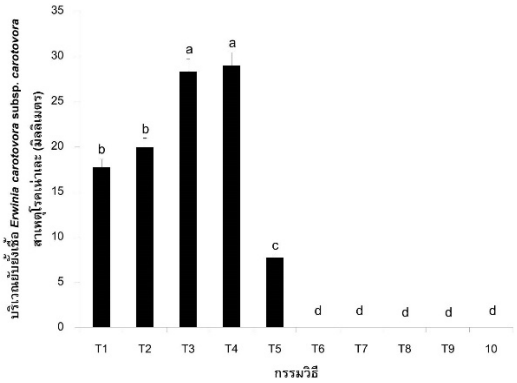
พืชและป้องกันการติดโรคจากเชื้ออื่น ๆ เช่น และ peroxidase สูงกว่าปกติ ส่งผลให้พืชมีภูมิหยุดยั้งเอนไซม์ของเชื้อโรคซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลาย pectin และ cellulose (pectolytic and cellulolytic enzyme) ในผนังเซลล์พืช และกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชที่ติดเชื้อสะสมสารฟีนอลและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานพืช ได้แก่ polyphenol oxidase ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคทั้งระบบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารกลุ่ม quinone และฟีนอล เมื่อถูกออกซิไดซ์แล้ว จะมีความเป็นพิษต่อต้านเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ดีกว่าสารเดิม (Muller, 1956) นอกจากนี้สารอื่น ๆ ที่พบในสารสกัดใบพลู คือ phenol-2,4-bis(1,1-dimethyl ethyl), chavicol และ eugenol ก็จัดอยู่ในกลุ่มสารฟีนอลเช่นกัน อีกทั้ง eucalyptol (1,8-cineole), α-cadinene และ β-guaiene จัดอยู่ในกลุ่ม mono-terpenes และ sesquiterpenes ซึ่งมีสมบัติทางชีววิทยาเป็นน้ำมันหอมระเหย ที่สามารถต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช รวมทั้งเป็นสารไล่แมลงศัตรูพืช สารยับยั้งการกินของแมลงศัตรูพืช และสารฆ่าแมลงศัตรูพืช โดยเฉพาะ eucalyptol (1,8-cineole) และ α-cadinene มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและราสาเหตุโรคพืช ซึ่งนอกจากใบพลูแล้วยังสามารถพบ 1,8-cineole ในยูคาลิปตัส (*Eucalyptus* spp.) แมงลักคา (*Hyptis suaveolens*) และ *Rosmarinus officinalis* เป็นต้น (ศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553)

3.3 ผลการพัฒนาชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลู

การพัฒนาชีวภัณฑ์อารักขาพืชต้นแบบโดยการกักเก็บสารสกัดใบพลู fraction 8 ความเข้มข้น 5, 7.5 และ 1 0% ในนาโนไคโตซาน และศึกษาประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์อารักขาพืชต้นแบบในการยับยั้งเชื้อ ECC14 สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลี รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพของนาโนไคโตซานในการกักเก็บสารสกัดใบพลู ความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10 % และคัดเลือกกรรมวิธีที่กักเก็บสารสกัดใบพลูได้ดีที่สุดเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยสารสกัดใบพลูทั้งแบบสะสมและไม่สะสมจากชีวภัณฑ์อารักขาพืชต้นแบบ ซึ่งมีผลการวิจัยดังนี้

3.3.1 ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชต้นแบบในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ

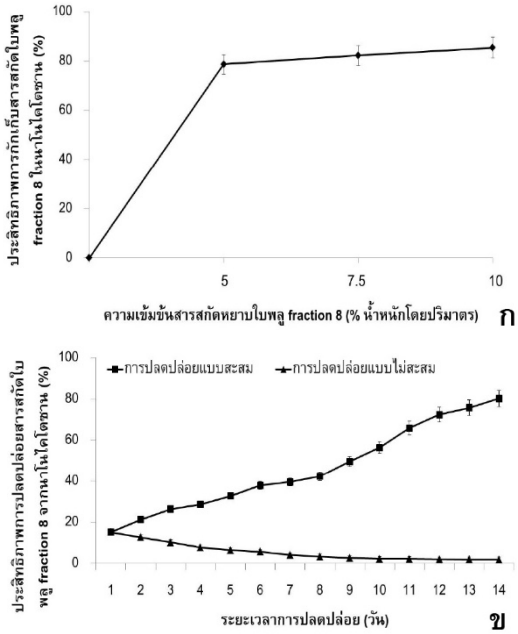
ผลการทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชต้นแบบในการยับยั้งเชื้อ ECC14 สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลีด้วยวิธีมาตรฐาน paper disc agar diffusion พบว่าชีวภัณฑ์อารักขาพืชต้นแบบ ซึ่งมีสารออกฤทธิ์เป็นสารสกัดใบพลู ความเข้มข้น 10 % มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ ECC14 ได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 28.28 มิลลิเมตร ทัดเทียมกับสารสกัดหยาบใบพลูในตัวทำลายเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 10 % มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 28.96 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) กับกรรมวิธีอื่น ๆ และกรรมวิธีควบคุม (รูปที่ 1) สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าถึงประสิทธิภาพสารสกัดหยาบใบพลูในตัวทำลายเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 10 % มีบริเวณยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละได้ดีที่สุดเท่ากับ 21.8 มิลลิเมตร แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) กับความเข้มข้น 5 และ 7.5 % ซึ่งมีบริเวณยับยั้ง 10.4 และ 11.4 มิลลิเมตร ตามลำดับ (จิตติมา และคณะ, 2558) ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบพลู fraction 8 เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญของชีวภัณฑ์อารักขาพืชต้นแบบที่พัฒนาขึ้นจากการวิจัยครั้งนี้ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ รวมทั้งบ่งชี้ถึงความสำเร็จในการใช้นาโนไคโตซานกักเก็บและปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (สารสกัดใบพลู fraction 8) ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ และมีแนวโน้มที่ดีในการพัฒนาต่อยอดเป็นชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลู



รูปที่ 1 ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชต้นแบบในการยับยั้งเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ECC14 สาเหตุโรคเน่าและของผักกาดขาวปลี ด้วยวิธีมาตรฐาน paper disc agar diffusion โดย T1 ชีวภัณฑ์อารักขาพืช ซึ่งมีสารสกัดใบพลูความเข้มข้น 5 % เป็นสารออกฤทธิ์, T2 ชีวภัณฑ์อารักขาพืช ซึ่งมีสารสกัดใบพลูความเข้มข้น 7.5 % เป็นสารออกฤทธิ์, T3 ชีวภัณฑ์อารักขาพืช ซึ่งมีสารสกัดใบพลูความเข้มข้น 10 % เป็นสารออกฤทธิ์, T4 สารสกัดหยาบใบพลูในตัวทำลายเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 10 %, T5 สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตราการใช้ 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร, T6 นาโนไคโตซานความเข้มข้น 0.05 %, T7 dimethyl sulfoxide, T8 tripolyphosphate, T9 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และ T10 กรรมวิธีที่ไม่ใช้สารใด

3.3.2 ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชในการกักเก็บสารสกัดใบพลู

การใช้นาโนไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 % น้ำหนักโดยปริมาตร กักเก็บสารสกัดใบพลู fraction 8 ความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม พบว่านาโนไคโตซานให้ประสิทธิภาพการกักเก็บสารสกัดใบพลู fraction 8 ความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10 % ได้ดี ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งมีประสิทธิภาพการกักเก็บเท่ากับ 78.69, 82.27 และ 85.39 % ตามลำดับ (รูปที่ 2ก)



รูปที่ 2 ประสิทธิภาพการกักเก็บและปลดปล่อยสารสกัดใบพลูของชีวภัณฑ์อารักขาพืช

3.3.3 ประสิทธิภาพการปลดปล่อยสารสกัดใบพลูจากชีวภัณฑ์อารักขาพืช

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการปลดปล่อยสารสกัดใบพลู ความเข้มข้น 10 % ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ของชีวภัณฑ์อารักขาพืชต้นแบบที่พัฒนาขึ้นจากการกักเก็บในนาโนไคโตซาน พบว่านาโนไคโตซานมีการปลดปล่อยสารสกัดใบพลูแบบสะสมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งหมดไปภายใน 14 วัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 15.2-80.2 % (รูปที่ 2ข) สำหรับการปลดปล่อยแบบไม่สะสม พบว่าเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง (14 วัน) เช่นเดียวกัน แต่อัตราการ

ปลดปล่อยในแต่ละวันจะน้อยกว่าการปลดปล่อยแบบสะสม (รูปที่ 2ข)

ผลการวิจัยแสดงให้เห็นถึงความสำเร็จของการพัฒนาชีวภัณฑ์อารักขาพืชต้นแบบโดยการกักเก็บสารสกัดใบพลู ความเข้มข้น 10 % ในนาโนไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 % ซึ่งชีวภัณฑ์อารักขาพืชต้นแบบนี้ มีประสิทธิภาพในการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ทั้งแบบสะสมและไม่สะสมอย่างต่อเนื่องภายใน 14 วัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ จิตติมา และคณะ (2558) พบว่าการราดดินด้วยสารสกัดหยาบใบพลูด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 10 % ทุก ๆ 14 วัน

ตารางที่ 3 ปริมาณสารออกฤทธิ์และประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชต้นแบบ ซึ่งมีอายุการเก็บรักษาแตกต่างกันภายใต้สภาพอุณหภูมิห้อง ในการยับยั้งเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ECC14 สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลี

กรรมวิธี[1/]	สารออกฤทธิ์ (%)		บริเวณยับยั้งเฉลี่ย (มิลลิเมตร)[2/]
	4-chromanol	3-allyl-6-methoxyphenol	
T1	73.45±0.05a	30.28±0.06a	28.08±0.13a
T2	71.33±1.29a	29.45±0.25a	27.86±0.17a
T3	72.68±1.14a	28.66±2.16a	27.16±1.15a
T4	72.35±0.09a	27.98±2.22a	27.69±0.18a
T5	70.46±1.31a	28.36±3.28a	26.85±1.16a
T6	72.55±2.11a	28.49±3.42a	27.15±1.28a
T7	36.9±1.36b	12.39±1.39b	7.68±2.13b
T8	ND	ND	8.12±2.26b
T9	ND	ND	0c
T10	ND	ND	0c
T11	ND	ND	0c
T12	ND	ND	0c
T13	ND	ND	0c

[1/]รายละเอียดกรรมวิธี T1 ชีวภัณฑ์อารักขาพืช อายุ 0 เดือน, T2 ชีวภัณฑ์อารักขาพืช อายุ 3 เดือน, T3 ชีวภัณฑ์อารักขาพืช อายุ 6 เดือน, T4 ชีวภัณฑ์อารักขาพืช อายุ 9 เดือน, T5 ชีวภัณฑ์อารักขาพืช อายุ 12 เดือน, T6 สารสกัดหยาบใบพลูในตัวทำลายเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 10 % อายุ 0 เดือน, T7 สารสกัดหยาบใบพลูในตัวทำลายเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 10 % อายุ 12 เดือน, T8 สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตราการใช้ 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร, T9 นาโนไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 %, T10 dimethyl sulfoxide, T11 tripolyphosphate, T12 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และ T13 กรรมวิธีที่ไม่ใช้สารใด

[2/]ประสิทธิภาพของกรรมวิธี T1-T13 ดังรายละเอียดข้างต้น แตกต่างกันตามตัวอักษรเปรียบเทียบตามคอลัมน์ โดยวิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดย DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป และ ND = not determined

จำนวน 3 ครั้ง (0, 14 และ 28 วันหลังปลูกเชื้อ ECC14 ในดิน) สามารถควบคุมปริมาณประชากรเชื้อ ECC14 ให้อยู่ในระดับที่ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ (2.69×10^4 cfu/ml) บ่งชี้ให้เห็นว่าความถี่ของการใช้ชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลูในการควบคุมโรคเน่าเละให้ประสบความสำเร็จ คือ การใช้ทุก 14 วัน หากมีโรคระบาดรุนแรงสามารถเพิ่มความถี่การใช้ชีวภัณฑ์อารักขาพืชได้ตามความเหมาะสม

3.4 อายุการเก็บรักษาชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลู

ผลการศึกษาพบว่าชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลูที่มีการเก็บรักษาในขวดแก้วสีชาในสภาพอุณหภูมิห้อง (32±3 ºC) เป็นเวลา 0 (T1), 3 (T2), 6 (T3), 9 (T4) และ 12 (T5) เดือน มีสารออกฤทธิ์สำคัญ ได้แก่ 4-chromanol และ 3-allyl-6-methoxyphenol ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) ซึ่งกันและกัน (T1-T5) เท่ากับ 70.46-73.45 % และ 27.98-30.28 % ตามลำดับ และแสดงบริเวณยับยั้งเชื้อ ECC14 ได้ดีที่สุดเท่ากับ 28.08 (T1), 27.86 (T2), 27.16 (T3), 27.69 (T4) และ 26.85 (T5) มิลลิเมตร ตามลำดับ ทัดเทียมกับสารสกัดหยาบใบพลูในตัวทำลายเอทิลอะซิเตท อายุ 0 เดือน (T6 ให้ค่า 4-chromanol เท่ากับ 72.55 % และ 3-allyl-6-methoxyphenol เท่ากับ 28.49 % มีบริเวณยับยั้งเชื้อ ECC14 เท่ากับ 27.15 มิลลิเมตร) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) กับกรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 3) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดหยาบใบพลูในตัวทำลายเอทิลอะซิเตท ในสภาพอุณหภูมิห้อง อายุ 12 เดือน (T7) ให้ค่า 4-chromanol เท่ากับ 36.97 % และ 3-allyl-6-methoxyphenol เท่ากับ 12.39 % มีบริเวณยับยั้งเชื้อ ECC14 เท่ากับ 7.68 มิลลิเมตร และสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ (T8) มีบริเวณยับยั้งเชื้อ ECC14 เท่ากับ 8.12 มิลลิเมตร (ตามลำดับ) ขณะที่ไคโตซาน (T9), dimethyl sulfoxide (T10) และ tripolyphosphate (T11) ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ ECC14 บ่งชี้ให้เห็นว่านาโนไคโตซานมีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสกัดใบพลูและรักษาสภาพสารออกฤทธิ์ ในสารสกัดใบพลูให้มีอายุการเก็บรักษาได้นานอย่างน้อย 1 ปี

3.5 ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลูในการควบคุมโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลีในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลูในการควบคุมโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลีในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่า T3 ราดดินด้วยชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลู อายุ 0 เดือน ทุก 14 วัน จำนวน 3 ครั้ง (วันที่ 0, 14 และ 28 วัน หลังปลูกเชื้อ ECC14 ในดิน) และ T4 ราดดินด้วยชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลู อายุ 12 เดือน ทุก 14 วัน จำนวน 3 ครั้ง (วันที่ 0, 14 และ 28 วัน หลังปลูกเชื้อ ECC14 ในดิน) มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมประชากรเชื้อ ECC14 และควบคุมโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.05) กับกรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 4) โดย T3 ส่งผลให้ประชากรเชื้อ ECC14 ลดลงจาก 1.27×10^8 เหลือ 1.37×10^3 cfu/g soil หลังปลูกเชื้อในดิน 28 วัน และพบการเกิดโรคเน่าเละบนผักกาดขาวปลี 10 % และ T4 ส่งผลให้ประชากรเชื้อ ECC14 ลดลงจาก 1.30×10^8 เหลือ 2.94×10^3 cfu/g soil หลังปลูกเชื้อในดิน 28 วัน และพบการเกิดโรคเน่าเละ 10 % ขณะที่ T5 ราดดินด้วยสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ทุก 14 วัน จำนวน 3 ครั้ง (วันที่ 0, 14 และ 28 วัน หลังปลูกเชื้อ ECC14 ในดิน) ส่งผลให้ประชากรเชื้อ ECC14 ลดลงจาก 1.26×10^8 เหลือ 1.22×10^7 cfu/g soil หลังปลูกเชื้อในดิน 28 วัน และพบการเกิดโรคเน่าเละบนผักกาดขาวปลี 50 % และ T6-T7 ราดดินด้วยนาโนไคโตซานหรือน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อทุก

14 วัน จำนวน 3 ครั้ง (วันที่ 0, 14 และ 28 วัน หลังปลูกเชื้อ ECC14 ในดิน) ส่งผลให้ประชากรเชื้อ ECC14 เพิ่มขึ้นจาก 1.27×10^{8} เป็น 1.32×10^{10}-1.43×10^{10} cfu/g soil หลังปลูกเชื้อในดิน 28 วัน และพบการเกิดโรคเน่าเละบนผักกาด ขาวปลี 100 % (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นว่าชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลู สามารถลดการเกิดโรคเน่าเละบนผักกาดขาวปลีได้ 90 % สอดคล้องกับ ศศิธร (2546) ที่รายงานการศึกษาการจัดการดินเพื่อลดปริมาณเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผักกาดเขียวปลีในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดยใช้สารสกัดหยาบและกากของพืช 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกทับทิม ใบพลู เปลือกส้มเขียวหวาน ต้นลูกใต้ใบ และผลเปลือกมังคุด คลุกลงในดินที่มีแบคทีเรียสาเหตุโรคที่เตรียมไว้ในอัตรา 800 กิโลกรัมต่อไร่ ในกระบะซีเมนต์ขนาด 1 ลูกบาศก์เมตร พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถลดปริมาณเชื้อในดินลงได้ โดยทำให้ปริมาณเชื้อในดินในแต่ละสัปดาห์ลดลงในอัตราที่สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้สารสกัดหยาบใบพลูและเปลือกผลทับทิมคลุกลงในดินที่มีการติดเชื้อสามารถชะลอการพัฒนาของโรคได้ดีกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชีวภัณฑ์

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลูในการควบคุมโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลีในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง[1/]

กรรมวิธี[2/]	ปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ECC14 ในดินจำลองการติดเชื้อ หลังการปลูกเชื้อ ECC14 (cfu/g soil)			การเกิดโรคเน่าเละ (%)
	0 วัน	14 วัน	28 วัน	
T1	1.28×10^{8}a	1.39×10^{4}a	1.30×10^{4}a	10±2.69c
T2	1.28×10^{8}a	1.35×10^{6}a	1.30×10^{5}a	30±3.13bc
T3	1.27×10^{8}a	1.26×10^{4}a	1.37×10^{3}a	10±1.18c
T4	1.30×10^{8}a	1.41×10^{4}a	2.94×10^{3}a	10±2.12c
T5	1.26×10^{8}a	1.08×10^{8}b	1.22×10^{7}a	50±3.33b
T6	1.27×10^{8}a	1.16×10^{9}c	1.32×10^{10}b	100±3.21a
T7	1.27×10^{8}a	1.32×10^{9}d	1.43×10^{10}c	100±2.35a
T8	0b	0e	0d	0d

[1/]ประสิทธิภาพของกรรมวิธี T1-T8 ดังรายละเอียดด้านล่าง แตกต่างกันตามตัวอักษรเปรียบเทียบตามคอลัมน์ โดยวิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดย DMRT ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

[2/]รายละเอียดกรรมวิธี T1 สารสกัดหยาบใบพลูในตัวทำลายเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 10 % อายุ 0 เดือน, T2 สารสกัดหยาบใบพลูในตัวทำลายเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 10 % ในสภาพอุณหภูมิห้อง อายุ 12 เดือน, T3 ชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลู ความเข้มข้น 10 % อายุ 0 เดือน, T4 ชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลู ความเข้มข้น 10 % ในสภาพอุณหภูมิห้อง อายุ 12 เดือน, T5 สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ อัตราการใช้ 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร, T6 นาโนไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 %, T7 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และ T8 กรรมวิธีที่ไม่ใช้สารใด

อารักขาพืชสารสกัดใบพลูจากการวิจัยครั้งนี้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลีได้ดี ซึ่งผลการทดลองราดดินด้วยชีวภัณฑ์อารักขาพืชสารสกัดใบพลูทุก 14 วัน ภายในเวลา 28 วัน สามารถควบคุมปริมาณประชากรเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละให้อยู่ในระดับที่ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ อย่างไรก็ตาม ปริมาณเชื้อโรคสามารถเพิ่มขึ้นได้เมื่อเวลาผ่านไป หากมีการวิจัยเกี่ยวกับการใช้และวิธีการใช้ รวมทั้งความถี่ของการใช้ที่ส่งผลให้สามารถควบคุมปริมาณเชื้อโรคไม่ให้สามารถก่อโรคได้หรือหมดไป จัดเป็นกลยุทธ์การควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพยั่งยืน

4. สรุป

ชีวภัณฑ์อารักขาพืชอนุภาคนาโนต้นแบบสูตรใหม่สำหรับผสมน้ำใช้ราดดิน ผลิตจากการกักเก็บสารสกัดใบพลู fraction 8 ความเข้มข้น 10 % ในนาโนไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 % มีสารออกฤทธิ์สำคัญ ได้แก่ eucalyptol (1,8-cineole), phenol-2,4-bis(1,1-dimethylethyl), chavicol, eugenol, 3-allyl-6-methoxyphenol, 4-chromanol, α-cadinene และ β-guaiene เมื่อนำไปราดดิน ทุก 14 วัน สามารถป้องกันการระบาดของโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลีได้อย่างมีประสิทธิภาพ หากมีโรคระบาดรุนแรงสามารถเพิ่มความถี่การใช้ชีวภัณฑ์อารักขาพืชได้ตามความเหมาะสม ซึ่งชีวภัณฑ์นี้สามารถเก็บรักษาได้ในสภาพอุณหภูมิห้องได้นานอย่างน้อย 1 ปี ข้อมูลทั้งหมดนี้บ่งชี้ให้เห็น แนวทางในการพัฒนาชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่และประสิทธิภาพของการใช้ชีวภัณฑ์อารักขาพืชสูตรใหม่ ภายใต้สภาพการระบาดรุนแรงของโรคเน่าเละและมีความเป็นไปได้ในการขยายผลสู่การผลิตภาคอุตสาหกรรม และเผยแพร่ให้นำชีวภัณฑ์ไปใช้ในระบบการผลิตผักกาดขาวปลี พืชผักวงศ์ผักกาดและพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ อย่างได้ผล เพื่อการค้าต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) บริษัท บ้านเกษตรรุ่งเรือง จำกัด และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สำหรับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัย พร้อมทั้งสนับสนุนเครื่องมือและเครื่องจักรระดับอุตสาหกรรมในการวิจัยครั้งนี้

5. รายการอ้างอิง

กฤติกา นรจิตร, 2548, คุณสมบัติของสารสกัดจากพืชวงศ์ขิง : อิทธิพลของวิธีการสกัดต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ. 142 น.

จิตติมา โสตถิวิไลพงศ์, วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ และดุสิต อธินุวัฒน์, 2558, สารสกัดหยาบพืชควบคุมโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลี, Thai J. Sci. Technol. 4(3): 244-254.

เจตน์ มาธฤทธิ์, 2545, การศึกษาประสิทธิภาพจากพืชสมุนไพรในการยับยั้ง *Xanthomonas campestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาวและ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผัก, ปัญหาพิเศษปริญญาตรี คณะเกษตร กำแพงแสน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

ชลิดา เล็กสมบูรณ์, นิพนธ์ ทวีชัย, วิชัย โฆสิตรัตน และยิ่งยง ไพสุขศานติวัฒนา, 2543, ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชของสารสกัดจากพืชสมุนไพร, ว.วิทยาศาสตร์ 54: 91-97.

ชูศักดิ์ จรูญสวัสดิ์, 2551, การวิเคราะห์ข้อมูลและการใช้สถิติในงานวิจัย, เสริมมิตรการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ไทยเกษตรศาสตร์ เว็บรวบรวมวิชาความรู้ด้านการเกษตรของไทย, โรคเน่าเละของพืชผัก, แหล่งที่มา : http://www.thaikasetsart.com/โรคเน่าเละของพืชผัก, 12 ตุลาคม 2559.

ประทุมพร ปลอดภัย, จิตติมา โสตถิวิไลพงศ์, วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ และดุสิต อธินุวัฒน์, 2558, การควบคุมแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละของผักคะน้าด้วยสารสกัดจากพืช, การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ยุวพร สอนศิริ, 2554, ศึกษาการกักเก็บและปลดปล่อยสารโดยอนุภาคนาโนไคโตซาน, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี.

วิชัย โฆสิตรัตน, นิพนธ์ ทวีชัย และชลิดา เล็กสมบูรณ์, 2541, ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยต่อการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช, น. 10, การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36, 3-5 กุมภาพันธ์ 2541, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วัชรา สุวรรณ์อาศน์ และศศิธร วุฒิวณิชย์, 2553, ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละของผักในเรือนทดลอง, หน้า 301-309, การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศศิธร วุฒิวณิชย์, 2546,การจัดการดินโดยใช้น้ำสกัดหยาบและกากของพืชเพื่อลดปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าเละในผักกาดเขียวปลี, วิทยาสารกำแพงแสน 1(1): 10-18.

ศศิธร วุฒิวณิชย์, 2547, ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* เชื้อสาเหตุโรคเน่าเละของผัก, วิทยาสารกำแพงแสน 2(2): 72-81.

ศศิธร วุฒิวณิชย์ และสุพจน์ ศุภนันธร, 2548, ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ, วิทยาสารกำแพงแสน 3(2): 11-27.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์, 2537, โรคของผักและการป้องกันกำจัด, ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553, ประมวลสารสนเทศพร้อมใช้สารฆ่าศัตรูพืชและสัตว์ธรรมชาติจากน้ำมันหอมระเหยพืช, กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, กรุงเทพฯ. 18 น.

สุภาพร พงษ์มณี และกัญญาญาภัค สนามพล, 2550, การสกัดสารจากพืชสมุนไพรเพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร, ว.วิทย์. กษ. 38(6) (พิเศษ): 54-57.

หฤทัย ไทยสุชาติ และพรอนันต์ บุญก่อน, 2557, การควบคุมเชื้อราปนเปื้อนในกระเทียมด้วยสารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสภาพห้องทดลอง, ว.วิทยาศาสตร์ มข. 42(4): 771-780.

อรพิน เกิดชูชื่น, ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์ และมณฑกาญจน์ ชนะภัย, 2553, คุณลักษณะสารสกัดจากพืชวงศ์ Apiaceae และ Piperaceae จำนวน 4 ชนิด, ว.วิจัย มสด. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3(1): 35-44.

อารีย์ วงศ์เราประเสริฐ, 2546, ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชวงศ์ Commelinaceae ที่มีผลต่อแบคทีเรียบางชนิด, วิทยานิพนธ์

ปริญญาโท, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดบัง, กรุงเทพฯ.

อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ, วิชัย หฤทัยธนาสันติ์, งามผ่อง คงคาทิพย์ และอุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, 2544, การออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราบางชนิดของสารสกัดพลูที่ได้จากตัวทำละลายเอทานอลและเอทานอลผสมกรด, น. 197-202. การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อุมาพร ธัญญเจริญ และชลิดา เล็กสมบูรณ์, 2557, ประสิทธิภาพของพลูและหูกวางในการยับยั้งโรคเหี่ยวมะเขือเทศที่เกิดจากแบคทีเรีย, น. 41-46, การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Das, R.K., Kaosoju, N. and Bora, U., 2010, Encapsulation of curcumin in alginate chitosan pluronic composition nano-particles for delivery to cancer cells, nanomedicine: Nanotechnology, Biol. Med. 6: 153-160.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T., 1994, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Ed.), The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Muller, K.O., 1956, Einige einfache versuch-enzum nachweis yon phytoalexinen, Phytopathology 27: 237-254.

Rahman, M.M., Khan, A.A., Ali, M.E., Mian, I.H., Akanda, A.M. and Abd Hamid, S.B., 2012, Botanicals to control soft rot bacteria of potato, Sci. World J. 2: 1-6.

Rangrong, Y., Jirawutthiwongchai, J. and Arpo, K., 2010, Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes, Coll. Surf. B: Biointerf. 76: 292-297.

Yan, W., Yang, W., Wang, C., Hu, J. and Fu, S., 2005, Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhi-zinate, Int. J. Pharm. 295: 235-245.