

สารสกัดยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคน้ำเน่าและของผักกาดขาวปลี

Plant Extracts Controlling Soft Rot Disease of Chinese Cabbage

จิตติมา โสติวิไลพงษ์, วิลาวรรณ เชื้อบุญ และดุสิต อธินวนนท์*

สาขาการจัดการเกษตรอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Jittima Sottiwilaiphong, Wilawan Chuaboon and Dusit Athinuwat*

Major of Organic Farming Management, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืช 5 ชนิด ได้แก่ ใบฝรั่ง ใบพลู เปลือกทับทิม รากหญ้าคา และหัวแก่นตะวัน ในการยับยั้งการเจริญของ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคน้ำเน่าและของผักกาดขาวปลี ทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและเรือนปลูกพืชทดลอง การสกัดยับยั้งพืชทั้ง 5 ชนิด โดยใช้สารตัวทำละลายเอทานอล 95 % เอทิลอะซิเตท เฮกเซน และน้ำ กรองและระเหยแห้งภายใต้สภาพสุญญากาศ ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดยับยั้งใบพลูในเอทานอล 95 % และในเอทิลอะซิเตทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคน้ำเน่าและได้ดีที่สุด โดยแสดงบริเวณยับยั้ง 27 และ 26 มิลลิเมตร ตามลำดับ ($p=0.05$) ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าเอทานอล 95 % เอทิลอะซิเตท และน้ำแสดงความสามารถในการสกัดสารสำคัญจากพืชได้แตกต่างกัน โดยสารสกัดยับยั้งใบพลูที่สกัดด้วยเอทานอล 95 % แสดงแถบของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ 2 แถบ ที่มีค่า $R_f = 0.37$ และ 0.70 เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี thin-layer chromatography ขณะที่เอทิลอะซิเตทแสดงแถบของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญจากใบพลู 4 แถบ ที่ $R_f = 0.37, 0.44, 0.59$ และ 0.70 ส่วนน้ำแสดงแถบของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญจากใบพลู 1 แถบ ที่ $R_f = 0.37$ จากการตรวจสอบด้วยวิธีเดียวกัน ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดยับยั้งใบพลูที่สกัดด้วยเอทานอล 95 % และเอทิลอะซิเตทในการยับยั้ง *E. carotovora* subsp. *carotovora* ได้แก่ 7.5 และ 10 % ตามลำดับ นอกจากนี้การใช้สารสกัดยับยั้งใบพลูในเอทิลอะซิเตท 10 % ทุก 7 วัน จำนวน 5 ครั้ง หรือทุก 14 วัน จำนวน 3 ครั้ง (เมื่อ 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน หรือ 0, 14 และ 28 วันหลังปลูกเชื้อในดิน) มีประสิทธิภาพในการควบคุม *E. carotovora* subsp. *carotovora* สูงที่สุด ($p=0.05$) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดยับยั้งใบพลูในเอทิลอะซิเตทมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคน้ำเน่าและ ซึ่งอาจนำไปสู่การค้นหายาออกฤทธิ์ที่สำคัญต่าง ๆ จากพืชดังกล่าว การศึกษานี้จึงสนับสนุนการใช้ภูมิปัญญาท้องถิ่นในการใช้ประโยชน์จากพืชท้องถิ่นในการลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีทางการเกษตรในโปรแกรมการจัดการโรคพืชอย่างยั่งยืน

คำสำคัญ : การควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี; ลดการใช้สารเคมี; เกษตรยั่งยืน; เกษตรอินทรีย์

Abstract

In this study, the efficacy of 5 plant extracts from guava leaf, betel leaf, pomegranate peel, blady grass root, and sunchoke tuber were tested on the growth inhibition of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, the causal agent of soft rot disease of Chinese cabbage under laboratory and greenhouse conditions. The plant crude extracts were prepared by using 95 % ethanol, ethyl acetate, hexane, and water and filtrated and evaporated under vacuum. The 95 % ethanol and ethyl acetate individual extract of betel leaf could inhibit the growth of soft rot pathogen by showing 27 and 26 mm. clear zone respectively ($p=0.05$). Moreover, we found that 95 % ethanol, ethyl acetate, and water showed different capacity extraction. The 95 % ethanol betel leaf extract showed 2 different bands of the important active ingredient at $R_f = 0.37$ and 0.70 , detected by thin-layer chromatography whereas ethyl acetate; and water extracts showed 4; and 1 important active ingredient bands at $R_f = 0.37, 0.44, 0.59$, and 0.70 ; and 0.37 , respectively. The suitable concentration of 95 % ethanol and ethyl acetate betel leaf extract against *E. carotovora* subsp. *carotovora* were 7.5 and 10 %, respectively. Furthermore, the application of 10 % of ethyl acetate betel leaf extract every 7 days 5 times or 14 days 3 times (at 0, 7, 14, 21 and 28 or at 0, 14 or 28 days after *E. carotovora* subsp. *carotovora* inoculated in the soil), were the most effective against *E. carotovora* subsp. *carotovora* ($p=0.05$). It was concluded that extract of betel leaf showed the most effectiveness on growth inhibition of soft rot pathogen which may be due to their active ingredients. The results support the local wisdom in using local plants to reduce or replace the agrochemical in sustainable plant disease management program.

Keywords: biological control; reduced agrochemical; sustainable agriculture; organic farming

1. คำนำ

ความปลอดภัยของผลผลิตหรือสินค้าทางการเกษตรเป็นปัจจัยสำคัญที่เป็นเครื่องช่วยประกอบการตัดสินใจของผู้บริโภคในการเลือกซื้อผลผลิตทางการเกษตร โดยปัจจุบันคุณภาพผลผลิตส่วนใหญ่ยังไม่ตรงตามความต้องการของผู้บริโภค ซึ่งสาเหตุหลักเกิดจากปัจจัยต่าง ๆ ในระบบการผลิต ได้แก่ พันธุ์ที่ใช้ปลูก สภาพแปลงปลูก ระบบการปลูกและวิธีการจัดการศัตรูพืช เกษตรกรผู้ที่เกี่ยวข้องส่วนใหญ่ขาดความรู้ความเข้าใจในเรื่องการจัดการศัตรูพืชที่เหมาะสม และมักใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชอย่างผิดวิธี เป็นสาเหตุให้เกิดปัญหา

การใช้สารเคมีทางการเกษตรมากเกินไปจนเกิดความจำเป็นเกิดปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิตและสิ่งแวดล้อมและเป็นผลเสียต่อสุขภาพเกษตรกรและผู้บริโภค ตลอดจนปัญหาการดื้อต่อสารเคมีของเชื้อสาเหตุโรค โดยเฉพาะโรคเน่าเละของผักกาดขาวปลีที่เกิดจากแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (หรือ *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) (Hauben et al., 1998) ก่อให้เกิดความเสียหายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตทั้งหมด เมื่อพืชติดเชื้อจะเกิดเป็นรอยช้ำน้ำและกลายเป็นแผลสีน้ำตาล เน่าเละ มีเมือกเยิ้มส่งกลิ่นเหม็น โดยอาการเน่าจะลุกลามอย่างรวดเร็ว

โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่ออากาศร้อนจัด (Zhao *et al.*, 2013) และทำให้ผลผลิตเสียหายในที่สุด โรคนี้สร้างความเสียหายทั้งในแปลงปลูกและหลังเก็บเกี่ยวระหว่างการเก็บในโรงเก็บ การขนส่ง และการรอจำหน่าย ซึ่งโรคนี้นี้หากเกิดขึ้นแล้วจะไม่สามารถทำการรักษาได้ มีเพียงแต่การป้องกันเท่านั้น รวมทั้งแผลเน่าและยังเป็นช่องเปิดให้กับเชื้อโรคอื่น ๆ เข้าทำลายซ้ำเติม (secondary organism) ทำให้เกิดอาการเน่าและมากยิ่งขึ้น เช่น แบคทีเรีย *Bacillus* sp. หรือรา *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. และ *Fusarium* sp. นอกจากนี้ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ยังสามารถก่อโรคในผักกาดหัว กะหล่ำดอก หอมหัวใหญ่ แตงต่าง ๆ ขั้วโพดฝักอ่อน และหน่อไม้ฝรั่ง ได้อีกด้วย (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2542; กรมวิชาการเกษตร, 2552) จากข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นเหตุผลสำคัญที่ผลักดันให้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการควบคุมโรคเน่าและด้วยชีววิธี โดยเฉพาะการใช้พืชสมุนไพรควบคุมโรคพืช นับเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยลดปัญหาการระบาดของโรคและลดปริมาณการสะสมเชื้อโรคในดิน โดยจัดเป็นการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมได้ในระยะยาว (วิลาวรรณ และคณะ, 2549; สุดฤดี และคณะ, 2550; สุดฤดี และคณะ, 2552) อีกทั้งยังเป็นการนำสมุนไพรท้องถิ่นมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด จากการศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดหยาบสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคเน่าและที่ผ่านมา พบว่าสารสกัดหยาบจากพืชหลายชนิด เช่น ใบฝรั่ง ใบพลู เปลือกทับทิม เป็นต้น สามารถนำมาควบคุมโรคนี้ได้ (วงศ์ และคณะ, 2540; ศศิธร, 2546; ศศิธร, 2547; วิชรา และศศิธร, 2553; Prathuangwong *et al.*, 2006; Prathuangwong *et al.*, 2008; Prathuangwong *et al.*, 2009) แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากรากหญ้าคา ใบพลู ใบฝรั่ง แก่นตะวัน และเปลือกทับทิม ใน

การยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าว รวมถึงการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดสมุนไพรท้องถิ่นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อเป็นแนวทางในการลดหรือทดแทนการใช้สารเคมี จัดเป็นการส่งเสริมให้เกษตรกรหันมาปลูกพืชโดยไม่ใช้สารเคมีและตระหนักถึงพิษภัยของสารเคมีเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการนำไปสู่การผลิตพืชผักตามมาตรฐานเกษตรอินทรีย์ในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีวิจัย

2.1 ทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของ *E. carotovora* subsp. *carotovora*

นำ *E. carotovora* subsp. *carotovora* สายพันธุ์ ECC14 จากห้องปฏิบัติการสาขาการจัดการเกษตรอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ มาเพิ่มปริมาณบนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ศศิธร, 2547; วิลาวรรณ, 2551) จากนั้นทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนผักกาดขาวปลีด้วยการใช้ไม้จิ้มฟันหนึ่งมาเชื้อแตะโคโลนีของเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* จากนั้นนำไปจิ้มลงบนใบผักกาดขาวปลี บ่มทิ้งไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง ประเมินความรุนแรงโรคก่อนนำไปทดสอบต่อไป (วิลาวรรณ และสุดฤดี, 2551)

2.2 คัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืช

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) โดยทำการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืช 5 ชนิด ได้แก่ ใบฝรั่ง (*Psidium guajava*) ใบพลู (*Piper betle*) เปลือกทับทิม (*Punica granatum*)

รากหญ้าคา (*Imperata cylindrical*) และหัวแก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus*) ซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้ว ได้แก่ เอทานอล 95 % เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เฮกเซน และน้ำ ในการยับยั้ง *E. carotovora* subsp. *carotovora* ในสภาพห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี paper disc diffusion เปรียบ

เทียบประสิทธิภาพกับกรรมวิธีควบคุมด้วยสารเคมี copper hydroxide (positive control) ตามอัตราแนะนำ และกรรมวิธีควบคุมด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (negative control) รวม 22 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ซึ่งมีรายละเอียดของแต่ละกรรมวิธีต่าง ๆ (Table 1)

Table 1 Treatment of plant extract by different solvents

Code	Treatment	Code	Treatment
T1	Water extract of guava leaf	T12	Hexane extract of betel leaf
T2	Water extract of betel leaf	T13	Hexane extract of pomegranate peel
T3	Water extract of pomegranate peel	T14	Hexane extract of blady grass root
T4	Water extract of blady grass root	T15	Hexane extract of sunchoke tuber
T5	Water extract of sunchoke tuber	T16	Ethyl acetate extract of guava leaf
T6	95 % ethanol extract of guava leaf	T17	Ethyl acetate extract of betel leaf
T7	95 % ethanol extract of betel leaf	T18	Ethyl acetate extract of pomegranate peel
T8	95 % ethanol extract of pomegranate peel	T19	Ethyl acetate extract of blady grass root
T9	95 % ethanol extract of blady grass root	T20	Ethyl acetate extract of sunchoke tuber
T10	95 % ethanol extract of sunchoke tuber	T21	Copper hydroxide
T11	Hexane extract of guava leaf	T22	Distilled water

การเตรียม *E. carotovora* subsp. *carotovora* โดยนำ *E. carotovora* subsp. *carotovora* บริสุทธิ์ มาเพิ่มปริมาณบนอาหาร NGA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเตรียมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย (bacterial suspension) ในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ วัดค่าความเข้มข้นของเซลล์ด้วย spectrophotometer ปรับค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.2 จะได้ความเข้มข้นปริมาณเชื้อ 10^8 cfu/ml (วิลาวรรณ และสุตฤดี, 2551)

จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดพืชในการยับยั้ง *E. carotovora* subsp. *carotovora* ด้วยวิธี paper disc diffusion (วิลาวรรณ, 2551;

Prathuangwong, 2009) ตรวจและบันทึกผล โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) วิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดย Duncan's new multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรม R (ชูศักดิ์, 2551) เพื่อคัดเลือกชนิดของสารสกัดหยาบพืชที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเน่าและไปศึกษารายละเอียดในขั้นถัดไป

2.3 การแยกชนิดสารด้วยวิธี thin-layer chromatography (TLC)

นำแผ่น TLC plate sheet silica gel มาทำการหยดสารสกัดหยาบพืชชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. caroto-*

vora subsp. *carotovora* ที่สกัดได้เป็นจุดขนาดเล็ก แล้วปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำแผ่น TLC plates silica gel ไปจุ่มลงในตัวทำละลายอัตราส่วนที่เหมาะสม (สุนันทนาท และคณะ, 2552) โดยให้ส่วนปลายฐานของแผ่น TLC แच्छอยู่ในตัวทำละลายสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร เมื่อสารละลายเคลื่อนที่มาถึงตำแหน่งที่ห่างจากปลายบน TLC plate silica gel ประมาณ 2 เซนติเมตร นำ TLC plate silica gel มาทำให้แห้ง แล้วนำมาตรวจสอบแถบของสารที่เคลื่อนที่ผ่านตัวกลาง silica gel และวัดระยะที่สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ได้บนแผ่น TLC คำนวณหาค่า R_f ของสารสกัดพืชที่แยกแต่ละชนิด (Stahl, 1969)

2.4 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดพืชในการควบคุมโรคเน่าและ

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยการนำสารสกัดหยาบพืชที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดจากข้อ 2.2 มาศึกษาระดับความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibition concentration, MIC) ที่สามารถยับยั้ง *E. carotovora* subsp. *carotovora* โดยเตรียมสารสกัดหยาบพืชความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10 % เปรียบเทียบกับสารเคมี copper hydroxide และน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยวิธี paper disc diffusion กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ในสภาพอุณหภูมิห้อง ตรวจและบันทึกผล โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งแล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความกว้างของบริเวณยับยั้ง วิเคราะห์หาความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดย Duncan's new multiple range test (DMRT)

2.5 ศึกษาวิธีการและความถี่ในการใช้สารสกัดพืช

การจำลองสภาพดินที่มีการติด *E. carotovora* subsp. *carotovora* ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml จากนั้นนำสารสกัดหยาบพืชที่มีประสิทธิ-

ภาพดีที่สุดราดลงในดินที่ปลูกเชื้อโรคแล้ว เปรียบเทียบกับกรรมวิธีการใช้สารเคมี copper hydroxide และกรรมวิธีควบคุมด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแทนสารสกัดหยาบพืช วางแผนการทดลองแบบ CRD รวมเป็น 12 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ โดยนำชนิดสารสกัดพืชและระดับความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการลดจำนวนประชากรเชื้อโรคจากข้อ 2.4 มาศึกษาวิธีและความถี่ที่เหมาะสมในการใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดพืช โดยศึกษาสารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด 2 ชนิด ได้แก่ สารสกัดหยาบใบพลูในตัวทำละลายเอทานอล 95 % ความเข้มข้น 7.5 % (สารสกัด A) และสารสกัดหยาบใบพลูในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทความเข้มข้น 10 % (สารสกัด B) ซึ่งกรรมวิธีประกอบด้วย

2.5.1 กรรมวิธีที่ 1 (T1) คลุกดินด้วยสารสกัด A ที่ 0 วันหลังปลูกเชื้อในดิน

2.5.2 กรรมวิธีที่ 2 (T2) คลุกดินด้วยสารสกัด B ที่ 0 วันหลังปลูกเชื้อในดิน

2.5.3 กรรมวิธีที่ 3 (T3) คลุกดินด้วย copper hydroxide ที่ 0 วันหลังปลูกเชื้อในดิน

2.5.4 กรรมวิธีที่ 4 (T4) คลุกดินด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อที่ 0 วันหลังปลูกเชื้อในดิน

2.5.5 กรรมวิธีที่ 5 (T5) คลุกดินด้วยสารสกัด A ทุก 7 วัน (0, 7, 14, 21 และ 28 วันหลังปลูกเชื้อในดิน)

2.5.6 กรรมวิธีที่ 6 (T6) คลุกดินด้วยสารสกัด B ทุก 7 วัน (0, 7, 14, 21 และ 28 วันหลังปลูกเชื้อในดิน)

2.5.7 กรรมวิธีที่ 7 (T7) คลุกดินด้วย copper hydroxide ทุก 7 วัน (0, 7, 14, 21 และ 28 วันหลังปลูกเชื้อในดิน)

2.5.8 กรรมวิธีที่ 8 (T8) คลุกดินด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ทุก 7 วัน (0, 7, 14, 21 และ 28 วันหลังปลูกเชื้อในดิน)

2.5.9 กรรมวิธีที่ 9 (T9) คลุกดินด้วยสารสกัด A ทุก 14 วัน (0, 14 และ 28 วันหลังปลูกเชื้อในดิน)

2.5.10 กรรมวิธีที่ 10 (T10) คลุกดินด้วยสารสกัด B ทุก 14 วัน (0, 14 และ 28 วันหลังปลูกเชื้อในดิน)

2.5.11 กรรมวิธีที่ 11 (T11) คลุกดินด้วย copper hydroxide ทุก 14 วัน (0, 14 และ 28 วันหลังปลูกเชื้อในดิน)

2.5.12 กรรมวิธีที่ 12 (T12) คลุกดินด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อ ทุก 14 วัน (0, 14 และ 28 วันหลังปลูกเชื้อในดิน)

ตรวจนับประชากรเชื้อด้วยวิธี plate count ทุก ๆ 7 วัน (วิลาวรรณ และสุตฤดี, 2551) โดยวันที่ 28 ตรวจสอบปริมาณเชื้อหลังเติมสารสกัด

6 ชั่วโมง และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดย DMRT ด้วยโปรแกรม R (ชูศักดิ์, 2551)

3. ผลการวิจัย

3.1 ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของ *E. carotovora* subsp. *carotovora*

การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของ *E. carotovora* subsp. *carotovora* พบว่าสามารถก่อให้เกิดโรคน้ำเน่าและกับผักกาดขาวได้รุนแรง 100 % ในเวลา 48 ชั่วโมง (Figure 1) โดยเมื่อพืชติดเชื้อจะเกิดเป็นรอยช้ำน้ำและกลายเป็นแผลสีน้ำตาล เน่าและ มีเมือกเยิ้ม ส่งกลิ่นเหม็น โดยอาการเน่าจะลุกลามอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่ออากาศร้อนจัด

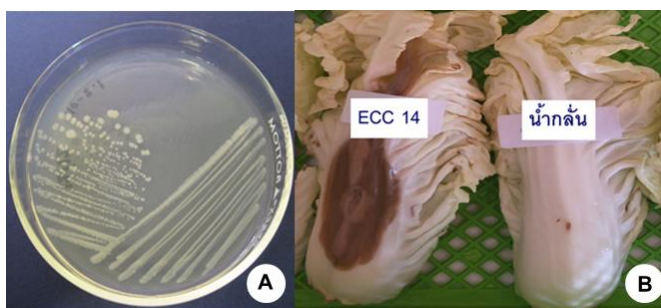


Figure 1 Colony morphology of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ECC14 on nutrient glucose agar (A) and its pathogenicity on Chinese cabbage compared to distilled water (B)

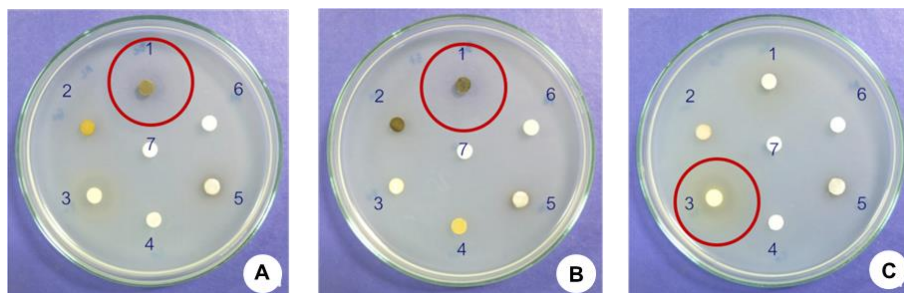


Figure 2 Soft rot pathogen inhibition efficacy of different plant extract including betel leaf (1), guava leaf (2), pomegranate peel (3), and sunchoke tuber (4) and blady grass root (5) extracted by 95 % ethanol (A), ethyl acetate (B), and water (C).

3.2 คัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืช

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืช 5 ชนิด ในสภาพห้องปฏิบัติการด้วยวิธี paper disc diffusion ผลการทดลองพบว่าสารสกัดเหยาบใบพลูในตัวอย่างละลายเอทานอล 95 % และในตัวอย่างละลายเอทิลอะซิเตทมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง *E. carotovora* subsp. *carotovora* รองลงมาคือสารสกัดเหยาบเปลือกหับทิมในตัวอย่างละลายน้ำกลั่น โดยมีความกว้างของบริเวณยับยั้ง 27, 26 และ 14 มิลลิเมตร ตามลำดับ ($p=0.05$) (Figure 2) สอดคล้องกับการรายงานของ วัชรวิศา และศศิธร (2553) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเหยาบจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อโรคเน่าและผก พบว่าสารสกัดพืช 8 ชนิด ได้แก่ ผลกานพลู ใบพลู ผลเบญจกานี ผลสมอทิเพก ผลสมอไทย ใบฝรั่ง และเปลือกหับทิมความเข้มข้น 0.1 % ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ได้

3.3 การแยกชนิดสารด้วยวิธี thin-layer chromatography (TLC)

จากผลการวิจัยข้อ 3.2 ที่พบว่าสารสกัดเหยาบใบพลูมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้ง *E. carotovora* subsp. *carotovora* ทั้งในตัวอย่างละลายเอทานอล 95 % และเอทิลอะซิเตท จึงนำสารสกัดเหยาบใบพลูจากตัวอย่างละลายเอทานอล 95 % เอทิลอะซิเตท และนำมาแยกสารประกอบสำคัญด้วยวิธี TLC พบว่าใบพลูในตัวอย่างละลายเอทานอล 95 % สามารถแยกสารออกฤทธิ์ที่สำคัญได้ 2 ชนิด โดยแสดงค่า R_f ที่ 0.371 และ 0.7 และสารสกัดเหยาบใบพลูในตัวอย่างละลายเอทิลอะซิเตทสามารถแยกสารออกฤทธิ์ที่สำคัญได้ 4 ชนิด ซึ่งแสดงค่า R_f ที่ 0.371, 0.442, 0.586 และ 0.7 ขณะที่ใบพลูในตัวอย่างละลายน้ำสามารถแยกสารออกฤทธิ์ที่สำคัญได้เพียงชนิดเดียวที่ค่า $R_f = 0.37$ (Figure 3) จากการวิจัย

จะเห็นว่าสารสกัดเหยาบพืชมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกันเมื่อถูกสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน เนื่องจากการที่อนุภาคของตัวถูกละลายจะเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างอนุภาคของตัวทำละลายได้นั้นขึ้นอยู่กับแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของตัวทำละลายกับตัวทำละลาย แรงดึงดูดโมเลกุลระหว่างตัวทำละลายกับตัวถูกละลาย และแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลตัวถูกละลายกับตัวถูกละลาย โดยปกติการที่ตัวถูกละลายจะละลายในตัวทำละลายหนึ่ง ๆ ได้นั้น สารทั้ง 2 ชนิด จะต้องมีความสมบัติเหมือนกัน ตามกฎ like dissolves like (Kenneth, 1994) ดังนั้นเมื่อใช้สารละลายต่างชนิดกันในการสกัดสารส่งผลให้สารสกัดต่างชนิดกันและมีคุณสมบัติที่ต่างกัน

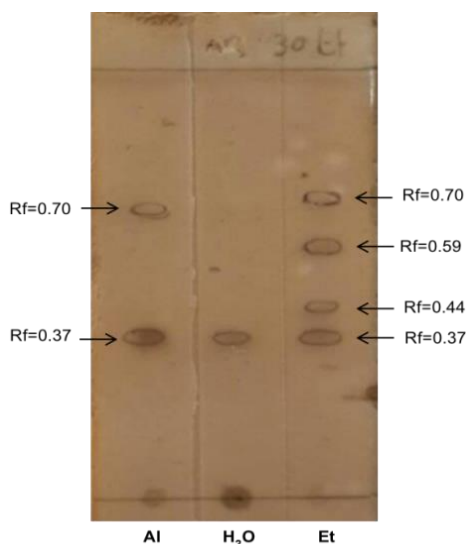


Figure 3 Thin-layer chromatography of betel leaf extracted by 95% ethanol (left), water (middle), and ethyl acetate (right).

3.4 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดใบพลูในการควบคุมโรคเน่าและ

ผลการทดลองพบว่าใบพลูในตัวอย่างละลายเอทิลอะซิเตทที่ระดับความเข้มข้น 10 % มี

ประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้ง *E. carotovora* subsp. *carotovora* โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 21.8 มิลลิเมตร รองลงมาคือสารสกัดใบพลูในตัวอย่างละลายเอทานอล 95 % ที่ระดับความเข้มข้น 7.5 % มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง 14.4 มิลลิเมตร โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ไม่แตกต่างทางสถิติกับระดับความเข้มข้น 10 % (Table 2) ทั้งนี้จึงเลือกใช้สารสกัดหยาบใบพลูในตัวอย่างละลายเอทานอล 95 % ที่ระดับความเข้มข้น 7.5 % ไปใช้ในการวิจัยต่อไป

Table 2 Efficacy of different concentrate of plant extract to *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* inhibition

The concentration of plant extract (%)	Inhibition zone (mm)	
	Ethyl acetate extract of betel leaf	95 % Ethanol extract of betel leaf
10.0	21.8a	15.2a
7.5	11.4b	14.4a
5.0	10.4b	12.4b
2.5	6.6c	8.2c

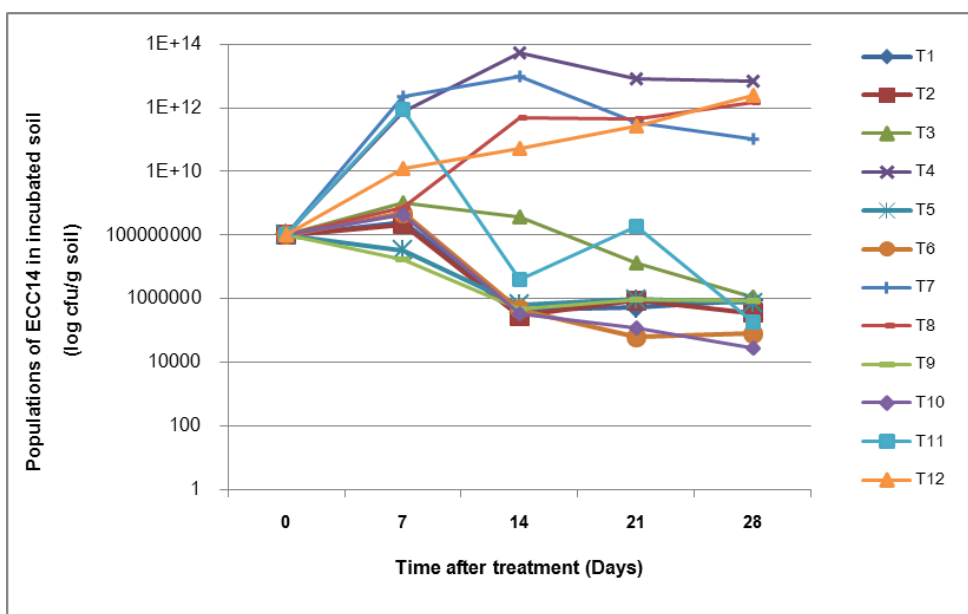


Figure 4 Efficacy of different frequency and application of plant extract to reduce the population of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ECC14 within 28 days after treatment. The treatment details in Materials and Methods.

3.5 ศึกษาวิธีการและความถี่ในการใช้สารสกัดพืช

ผลการทดลองพบว่ากรรมวิธี T6 และ T10 คลุกดินร่วมกับการใส่สารสกัดหยาบใบพลูในตัวอย่างละลายเอทานอล 95 % ที่ระดับความเข้มข้น 10 % ทุก 7 วัน 5 ครั้ง (0, 7, 14, 21 และ 28 วัน

หลังปลูกเชื้อในดิน) และทุก 14 วัน 3 ครั้ง (0, 14 และ 28 วันหลังปลูกเชื้อในดิน) มีประสิทธิภาพดีที่สุดอย่างแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม ($p=0.05$) ในการยับยั้ง *E. carotovora* subsp. *carotovora* โดยมีประชากร *E. carotovora* subsp. *carotovora* คงเหลือในดิน เท่ากับ 8.1×10^4 และ

2.7×10^4 cfu/g soil ตามลำดับ หลังปลูกเชื้อ 28 วัน ขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีประชากรเชื้อ 2.5×10^{12} cfu/g soil ในช่วงเวลาเดียวกัน (Figure 4)

จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการใช้สารสกัดหยาบใบพลูในต้นทำละลายเอทิลอะซิเตทความเข้มข้น 10 % คลุกดินและเติมใส่เพิ่มทุก 14 วัน เพื่อป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรคเน่าและให้ประสิทธิภาพดีไม่แตกต่างจากการใช้สารสกัดหยาบใบพลูในต้นทำละลายเอทิลอะซิเตทคลุกดินร่วมกับการใส่เพิ่มทุก ๆ 7 วัน นั้นแสดงว่าสารสกัดสามารถคงประสิทธิภาพยาวนานได้ 14 วัน ในการลดจำนวนประชากรเชื้อสาเหตุโรคเน่าและในดิน นอกจากนี้ ศศิธร (2546) ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบและกากของพืช 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกทับทิม ใบพลู เปลือกส้มเขียวหวาน ต้นลูกใต้ใบ และเปลือกผลมังคุด เมื่อนำคลุกดิน พบว่าสามารถลดปริมาณ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ได้ในทุกสัปดาห์ที่ตรวจสอบ และวัชร และศศิธร (2553) พบว่าสารสกัดหยาบจากผลสมอพิเภกคลุกในดินที่ความเข้มข้น 2 % มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของประชากร *E. carotovora* subsp. *carotovora* ในดินจำลองการติดเชื้อ และจิตรยา (2552) พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้ง *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศของสารสกัดพืชทุกชนิด พลู ยูคาลิปตัส การเวก ชะพลู มังคุด กระสัง ขวงเจียว ฝรั่ง และสะเดา จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณสารสกัดและระยะเวลามากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยนี้ โดยเมื่อเพิ่มความถี่ในการเติมสารสกัดลงไปดินติดเชื้อพบว่ามีจำนวนประชากร *E. carotovora* subsp. *carotovora* ลดลงอย่างแตกต่างทางสถิติ ($p=0.05$)

4. สรุป

สารสกัดใบพลูมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้ง *E. carotovora* subsp. *carotovora* โดยต้นทำ

ละลายที่เหมาะสมกับการสกัดสารออกฤทธิ์จากใบพลู ได้แก่ เอทานอล 95 % และเอทิลอะซิเตท โดยการใช้ใบพลูในต้นทำละลายเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 10 % ทุก ๆ 7 หรือ 14 วัน (เมื่อ 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน หรือ 0, 14 และ 28 วันหลังปลูกเชื้อในดิน) มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมโรคเน่าและของผักกาดขาวปลี การศึกษาวิจัยนี้จึงมีแนวโน้มความสำเร็จในการควบคุมโรคเน่าและโดยสารสกัดพืชท้องถิ่นและควรรีบบันทึกผลในสภาพไร่อย่างน้อย 3 ฤดูปลูก ก่อนถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่เกษตรกรหรือผู้สนใจ

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) บริษัทบ้านเกษตรรุ่งเรือง จำกัด และศูนย์เครื่องมือคณะวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

6. รายการอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร, 2542, การปลูกผักกาดขาวปลี, พิมพ์ครั้งที่ 2, กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ, 23 น.
- กรมวิชาการเกษตร, 2552, ระบบการจัดการคุณภาพ : GAP พืชตระกูลกะหล่ำ, กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ, 42 น.
- จิตรยา จารุจิตร, 2552, การควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศโดยใช้สารสกัดจากพืชและธาตุซิลิกอนในเรือนทดลอง, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ชูศักดิ์ จรุธสวีสดี, 2551, การวิเคราะห์ข้อมูลและการใช้สถิติในงานวิจัย, ส. เสริมมิตรการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

วงศ์ บุญสืบสกุล, สุตรา ภาวจิตร และสุทธิพงษ์ ญาณวารี, 2540, การศึกษาสารธรรมชาติจาก วัชพืชบางชนิดและพืชอื่น ๆ ต่อการควบคุม โรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย, กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและ สหกรณ์, กรุงเทพฯ.

วัชร สวรรณ์อาศน์ และศศิธร วุฒิวนิชย์, 2553, ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและของ ผักในเรือนทดลอง, น. 301-309, ใน การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วันเพ็ญ เพ็ชรจันทร์ และธีรพร กงบังเกิด, 2551, การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารและการประยุกต์ใช้, ว.วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูล สงคราม 9: 26-36.

วิลาวรรณ เชื้อบุญ, 2551, ลักษณะและการทดสอบ ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ควบคุมเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าและของกะหล่ำดอก, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตร ศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิลาวรรณ เชื้อบุญ, ศศิธร วุฒิวนิชย์, ชัยสิทธิ์ ปรีชา, สุพจน์ กาเซ็ม, ณัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์, 2549, การส่งเสริมการ เจริญเติบโตและชักนำภูมิิต้านทานโรคของ กะหล่ำดอกและผักคะน้าด้วยเชื้อจุลินทรีย์และ สารชีวภัณฑ์ธรรมชาติ, น. 795-810, ใน การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิลาวรรณ เชื้อบุญ และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์, 2551,

ความถี่และความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อ แบคทีเรียที่มีประโยชน์เพิ่มเพื่อประสิทธิภาพ การควบคุมโรคสำคัญของกะหล่ำดอก, น. 572-580, ใน การประชุมวิชาการของมหา วิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46, มหาวิทยา ลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์, วิลาวรรณ เชื้อบุญ, สุพจน์ กา เซ็ม, จารุวัฒน์ เกาธรรมพิทักษ์ และดุสิต อธิ นุวัฒน์, 2550, โปรแกรมการจัดการศัตรูพืช แบบผสมผสานเพื่อการผลิตพืชตระกูลกะหล่ำ คุณภาพที่กาญจนบุรี, น. 405-421, ใน การประชุมวิชาการอรัญญาพืช ครั้งที่ 8, โรงแรม อัมรินทร์ลากูน, พิษณุโลก.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์, สุพจน์ กาเซ็ม, จารุวัฒน์ เกา ธรรมพิทักษ์, วิลาวรรณ เชื้อบุญ, ดิยากร ฉัตร นภารัตน์ และดุสิต อธิณุวัฒน์, 2552, คู่มือ การเกษตร เรื่อง การใช้จุลินทรีย์จัดการโรค และแมลง เพื่อการผลิตข้าวและพืชผัก, ภาค วิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตร ศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุนันทนา นุราภักดิ์, วิลาวรรณ เชื้อบุญ และ สุดฤดี ประเทืองวงศ์, 2552, แบคทีเรียปฏิชีวนะแบบเชื้อ ผสมจะผลิต IAA ได้มากขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับการ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และลดการเกิด โรคที่บริเวณรากของถั่วเหลือง, น. 637-648, ใน การประชุมวิชาการอรัญญาพืช ครั้งที่ 9, โรงแรมสุนีย์ แกรนด์, อุบลราชธานี.

ศศิธร วุฒิวนิชย์, 2546, การจัดการดินโดยใช้ น้ำ สกัดหยาบและกากของพืชเพื่อลดปริมาณเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าและในผักกาดเขียวปลี, วิทยาสารกำแพงแสน 1: 10-18.

ศศิธร วุฒิวนิชย์, 2547, ประสิทธิภาพของสารสกัด หยาบจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญ ของ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

- เชื้อสาเหตุโรคเน่าเละของผัก, วิทยาศาสตร์
กำแพงแสน 2: 72-81.
- Hauben, L., Moore, E.R., Vauterin, L.,
Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck,
L. and Swings, J., 1998, Phylogenetic
position of phytopathogens within the
Enterobacteriaceae, Syst. Appl. Microbiol.
21: 384-397.
- Mohanraj, V.J. and Chen, Y., 2006,
Nanoparticle: A review, Trop. J. Pharm.
Res. 5: 561-573.
- Kenneth, J.W., 1994, Macroscale and
Microscale Organic Experiments, 2nd Ed.,
Lexington, Massachusetts, D.C.
- Prathuangwong, S., Chuaboon, W., Kasem, S.,
Athinuwat, D., Suyama, K. and Negishi,
H., 2009, Potential for application time of
Pseudomonas fluorescens SP007s and
biofertilizer for alternaria leaf spot
management of Chinese kale, J. ISSAAS
15: 231-258.
- Prathuangwong, S., Kasem, S., Preecha, C.,
Chuaboon, W., Hiromitsu, N. and Suyama
K., 2006, Biological control and crop
improvement against cauliflower diseases
with new potential microorganisms and
bioproducts, pp. 23-24, In Proceedings of
the ISSAAS International Congress,
Kualalumpur.
- Prathuangwong, S., Chan-on, P. Kasem, S.
and Chuaboon, W., 2008, Enhanced
biocontrol efficacy by bacterial antagonist
mixtures against bacterial pustule disease
of soybean, Plant Pathol. 90: S2.419.
- Stahl, E., 1969, In Thin Layer Chromatography,
A Laboratory Handbook, 2nd Ed., Springer
Verlag, New York.
- Zhao, Y., Li, P., Huang, K., Wang, Y., Hu, H.
and Sun, Y., 2013, Control of postharvest
soft rot caused by *Erwinia carotovora* of
vegetables by strain of *Bacillus amylo-
liquefaciens* and its potential modes of
action, World J. Microbiol. Biotechnol. 29:
411-420.