ฤทธิ์ต้านราก่อโรคพืชของน้ำมันหอมระเหย พิเพอรีน และซาโปนินส์

Antifungal Activities of some Volatile Oils, Piperine and Saponins Against Phytopathogenic Fungi

สุมาลี เลี่ยมทอง

Sumalee Liamthong

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Microbiology

Prince of Songkla University

2540

เลขหมู่ SD 951.3 ส74 2540 ฉ.2

Bib Key 129828

ชื่อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ต้านราก่อโรคพืชของน้ำมันหอมระเหย พิเพอรีน และซาโปนินส์
ผู้เขียน	นางสาวสุมาลี เลี่ยมทอง
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เยาวลักษณ์ ดิสระ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา

.....
(ดร.ไพรัตน์ สงวนไทร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ต้านราก่อโรคพืชของน้ำมันหอมระเหย พิเพอรีน และซาโปนินส์
ผู้เขียน	นางสาวสุมาลี เลี่ยมทอง
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2539

บทคัดย่อ

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านราของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าลิงสด (*Alpinia conchigera* Griff.) ใบเสม็ดสด (*Melaleuca leucadendron* Corner.) สารพิเพอรีนจากเมล็ดพริกไทยดำ (*Piper nigrum* Linn.) และซาโปนินส์จากสารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่ (*Maesa ramentacea* Wall. ex. Roxb.) และผลมะคำดีควาย (*Sapindus emarginatus* Vahl.) ต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก) และ *Alternaria brassicicola* Schw. (สาเหตุโรคใบจุดคะน้า) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารวุ้นผสมสารทดสอบในสไลด์หลุม พบว่า สารสกัดทุกตัวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดได้ น้ำมันข่าลิงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่พิเพอรีนและน้ำมันเสม็ด ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 3.13 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดจากใบกระดูกไก่และสารสกัดจากผลมะคำดีควายมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้น้อยที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากัน คือ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อ *A. brassicicola* ถูกยับยั้งโดย น้ำมันข่าลิงและพิเพอรีน ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากัน คือ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่น้ำมันเสม็ดและสารสกัดจากใบกระดูกไก่ ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากผลมะคำดีควายจะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. brassicicola* ได้น้อยที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าน้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ดและพิเพอรีน กับซาโปนินส์จากใบกระดูกไก่และผลมะคำดีควาย มีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราทั้ง 2 ชนิด นอกจากนั้นยังพบว่า น้ำมันหอมระเหยและพิเพอรีนสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้ดีกว่าสารสกัดจากใบกระดูกไก่และผลมะคำดีควาย น้ำมันข่าลิงและพิเพอรีน มีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* และ *A.*

brassicicola ได้ใกล้เคียงกัน โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 13.49, 13.20 และ 20.59, 18.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของสปอร์ ไม่ได้มีฤทธิ์ฆ่าสปอร์ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ germ tube ของสปอร์ที่งอกแล้ว และยังสามารถยับยั้งการสร้าง appressorium ของสปอร์ได้ด้วย

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ด และพิเพอรีนในรูปของสารเดี่ยว หรือใช้ร่วมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ ที่ระดับความเข้มข้น 800 และ 1,600 เท่าของค่า MIC พบว่า สามารถควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสของพริกในห้องทดลองได้ โดยน้ำมันข่าลิงความเข้มข้น 0.125% และ 0.25% สามารถควบคุมโรคได้ดีที่สุด และสารสกัดที่ใช้ในการทดลองทุกชุด สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในแปลงทดลองได้ใกล้เคียงกับสารต้านราเบนโนมิล 0.06% สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อ *A. brassicicola* บนใบคะน้าในห้องทดลอง พบว่า น้ำมันข่าลิง และพิเพอรีนที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถควบคุมการเกิดโรคใบจุดของคะน้าได้ดีกว่าน้ำมันเสม็ด

Thesis Title	Antifungal Activities of Some Volatile Oils, Piperine and Saponins Against Phytopathogenic Fungi
Author	Miss Sumalee Liamthong
Major Program	Microbiology
Academic Year	1996

Abstract

The volatile oils from *alpinia conchigera* Griff. rhizomes and *Melaleuca leucadendron* Corner. leaves, piperine from black peper (*Piper nigrum* Linn.) and saponins from aqueous extracts of *Maesa ramentacea* Wall. ex. Roxb. leaves and *Sapindus emarginatus* Vahl. fruits were tested for their antifungal activities against plant pathogenic fungi by agar dilution method. All the extracts inhibited the growth of *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. and *Alternaria brassicicola* Schw., the causative agents of chilli anthracnose and chinese kale leaf spot, respectively. *A. conchigera* volatile oil was found to be the most effective agent against *C. gloeosporioides* with the minimum inhibitory concentration (MIC) value of 1.56 µg/ml, *M. leucadendron* volatile oil and piperine were the intermediate with the MIC values of 3.13 and 6.25 µg/ml, respectively, and the aqueous extracts of *M. ramentacea* and *S. emarginatus* were the lowest, with the equal MIC of 12.5 µg/ml. For the inhibition of *A. brassicicola*, *A. conchigera* volatile oil and piperine showed the highest inhibition with the equal MIC of 1.56 µg/ml, whereas *M. leucadendron* volatile oil and the aqueous extract of *M. ramentacea* had an equal MIC values of 6.25 µg/ml and the aqueous extract of *S. emarginatus* showed the least activity (MIC = 12.5 µg/ml). The combination between either of the volatile oils, piperine and the saponins from *M. ramentacea* and *S. emarginatus* were synergistic against both fungi. In addition, the volatile oils and piperine were demonstrated to inhibit conidial germination better than the saponins. *A. conchigera* volatile oil and piperine inhibited *Colletotrichum* sp. and *A. brassicicola* conidial germination with the 50% effective

concentration (EC_{50}) of 13.49, 13.20 and 20.59, 18.98 μg/ml, respectively. These extracts only inhibited the conidial germination, germ tube elongation and appressorium formation but they did not kill the conidia.

The effectiveness for the controlling of chilli anthracnose was examined on chilli fruit in association with single extract of the volatile oils or piperine at the concentration of 800 and 1,600 time of the MICs and with the combination with the aqueous extract of *M. ramentacea*. All the test compounds were able to control the disease. *A. conchigera* volatile oil at the concentration of 0.125 and 0.25% were the most effective. For the field experiment, all the extracts inhibited chilli anthracnose as effective as 0.06% benomyl. *A. conchigera* volatile oil and piperine at the concentration of 500 and 50 μg/ml were able to control the leaf spot disease on Chinese kale leaves better than *M. leucadendron*.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งต่อ รศ.ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล ผศ.เสมอใจ ชื่นจิตต์ กรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำในการศึกษาวิจัย การเขียนและการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ จนเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.เยาวลักษณ์ ดิสระ และ รศ.ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุรไกร เพิ่มคำ และ อ.สุทธิรักษ์ แซ่หลิม ที่กรุณาให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหา

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย ขอขอบคุณคุณลัดดา นิลรัตน์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการทำการวิจัย ขอขอบคุณพี่น้องและเพื่อนๆ ทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือในการทำแปลงทดลอง

ขอขอบคุณสถานีตรวจอากาศเกษตรคอหงส์ ที่กรุณาให้ข้อมูลบันทึกสภาพอากาศ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณวิชัย เจริญทรัพย์สาคร ที่ให้ความช่วยเหลือด้วยดีเสมอมา

ขอบคุณ น้องชายและน้องสาวที่ช่วยให้กำลังใจ และที่สำคัญขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้สนับสนุนช่วยเหลือทั้งกำลังกายกำลังใจจนสำเร็จการศึกษา

สุมาลี เลี่ยมทอง

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... (3)

Abstract ..... (5)

กิตติกรรมประกาศ ..... (7)

สารบาญ ..... (8)

รายการตาราง ..... (9)

รายการภาพ ..... (11)

บทที่

1. บทนำ 1

บทนำต้นเรื่อง 1

การตรวจเอกสาร 2

วัตถุประสงค์ 29

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ 30

วัสดุ 30

อุปกรณ์ 31

วิธีการ 32

3. ผลการทดลอง 51

4. วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง 109

เอกสารอ้างอิง 127

ภาคผนวก 141

ประวัติผู้เขียน 145

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	พืชมีฝักที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อ *C. capsici*	20
2	ผลการยับยั้งการเจริญของสายรา *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* โดยสารสกัดต่างๆ ในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของสายรา	53
3	ค่า MIC ของสารสกัดต่อเชื้อ *C. gloeosporioides*	57
4	ค่า MIC ของสารสกัดต่อเชื้อ *A. brassicicola*	58
5	สมการรีเกรซชันเส้นตรง สัมประสิทธิ์แห่งการกำหนด (R^2) และค่าความชันของเส้นกราฟรีเกรซชันที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารและร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา	60
6	ร้อยละการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* ที่ความเข้มข้นของสปอร์ต่างๆ กัน ที่เวลา 24 ชั่วโมง	64
7	ร้อยละการงอก ร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์ และความยาว germ tube ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides*	68
8	ร้อยละการงอก ร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์ และความยาว germ tube ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์ *A. brassicicola*	69
9	ร้อยละการงอก ร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์ และความยาว germ tube ของสปอร์ *C. gloeosporioides* ที่เวลา 24 ชั่วโมงเมื่อทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยและพิเพอรีนที่ความเข้มข้นต่างๆ	72
10	ร้อยละการงอก ร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์ และความยาว germ tube ของสปอร์ *A. brassicicola* เมื่อทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยและพิเพอรีนที่ความเข้มข้นต่างๆ	73
11	สมการรีเกรซชันเส้นตรง สัมประสิทธิ์การกำหนด (R^2) และ EC_{50} ของสารสกัดในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการงอกของสปอร์	75

ตารางที่		หน้า
12	ปริมาณของสปอร์ *C. gloeosporioides* ที่งอก บนอาหาร PDA หลังจากที่สัมผัสสารสกัดแล้ว 24 ชั่วโมง	77
13	ปริมาณของสปอร์ *A. brassicicola* ที่งอกบนอาหาร PDA หลังจากที่สัมผัสสารสกัดแล้ว 24 ชั่วโมง	78
14	ร้อยละการงอกของสปอร์ และความยาว germ tube ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อสปอร์ *C. gloeosporioides* ที่งอก	80
15	ร้อยละการงอกของสปอร์ และความยาว germ tube ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อสปอร์ *A. brassicicola* ที่งอก	81
16	ร้อยละการงอกของสปอร์และร้อยละการสร้าง appressorium ของสปอร์ *C. gloeosporioides* ชุดควบคุมบนผลพริก	83
17	ฤทธิ์ของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในห้องทดลอง	86
18	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลเมื่อทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย และพิเพอรีนต่อการต้านเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบคะน้า	92
19	ประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในแปลงทดลอง	101

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เหง้าข่าลิง (*Alpinia conchigera*)	4
2	สูตรโครงสร้างของ chavicol acetate	5
3	เสม็ด (*Melaleuca leucadrendron*)	6
4	พริกไทย (*Piper nigrum*)	8
5	สูตรโครงสร้างของพิเพอรีน	9
6	กระดูกไก่ (*Maesa ramentacea*)	11
7	สูตรโครงสร้างของซาโปเจนิน (21,22-0-Diangeloyl-barringtologenol-C) ซึ่งเป็นซาโปนินส์หลักจากใบกระดูกไก่	12
8	มะคำดีควาย (*Sapindus emarginatus*)	13
9	สูตรโครงสร้างของซาโปนินส์จากผลมะคำดีควาย	14
10	อาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก	16
11	*Colletotrichum gloeosporioides*	19
12	*Alternaria brassicicola*	27
13	ขั้นตอนการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าลิงและใบเสม็ด	32
14	ขั้นตอนการแยกพิเพอรีนจากเมล็ดพริกไทยดำ	34
15	ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่และผลมะคำดีควาย	36
16	การเตรียมสไลด์หลุม	37
17	ความเข้มข้นของสารสกัด 2 ชนิด เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านราร่วมกัน โดยวิธี Checkerboard	39
18	ไดอะแกรมการแปลผลการทดสอบฤทธิ์ต้านราร่วมกัน	41
19	ขนาดโคโลนีของ *C. gloeosporioides* ในสไลด์หลุม เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากการทดสอบกับสารสกัดต่างๆ	54
20	ขนาดโคโลนีของ *A. brassicicola* ในสไลด์หลุม เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากการทดสอบกับสารสกัดต่างๆ	55

ภาพที่		หน้า
21	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา	59
22	ไดอะแกรมผลการทดสอบฤทธิ์ต้านร่วมกันของน้ำมันหอมระเหยหรือพิเพอรีนกับซาโปนินส์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. gloeosporioides*	62
23	ไดอะแกรมผลการทดสอบฤทธิ์ต้านร่วมกันของน้ำมันหอมระเหยหรือพิเพอรีนกับซาโปนินส์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. brassicicola*	63
24	ร้อยละการงอกของสปอร์*C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* ที่ความเข้มข้นของสปอร์ต่างๆ กัน ที่เวลา 24 ชั่วโมง	65
25	ลักษณะของสปอร์ *C. gloeosporioides* เมื่อทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่างๆ (กำลังขยาย 400 เท่า)	70
26	ลักษณะของสปอร์ *A. brassicicola* เมื่อทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่างๆ (กำลังขยาย 400 เท่า)	71
27	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์	74
28	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและค่าความยาว germ tube	76
29	ลักษณะของสปอร์ *C. gloeosporioides* บนผลพริกที่เวลาต่างๆ	84
30	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผล เมื่อทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยและพิเพอรีนต่อการต้านโรคแอนแทรคโนสพริกในห้องทดลอง	87
31	ผลพริกที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในห้องทดลอง ในชุดที่ 1 (หยดสารสกัดบนผลพริก 24 ชั่วโมง แล้วจึงหยด spore suspension)	88

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
32	ผลพริกที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในห้องทดลอง ในชุดที่ 2 (หยดสารสกัดและ spore suspension พร้อมกัน	89
33	ผลพริกที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในห้องทดลอง ในชุดที่ 3 (หยด spore suspension บนผลพริก 24 ชั่วโมง แล้วจึงหยดสารสกัด	90
34	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลเมื่อทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าลิงและใบเสม็ด และพิเพอรีนต่อการต้านเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบคะน้าในห้องทดลอง	93
35	ชิ้นใบคะน้าที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยและพิเพอรีน ในการควบคุมโรคใบจุดบนใบคะน้า	94
36	แสดง a) ปริมาณน้ำฝน b) เปอร์เซ็นต์ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ c) อุณหภูมิ วัดโดยสถานีตรวจอากาศเกษตรคอหงส์	96
37	ร้อยละการเกิดโรคแอนแทรคโนสพริก เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในแปลงทดลอง	102
38	ลักษณะรอยแผลของผลบนต้นพริกของชุดทดสอบต่างๆ ในการตรวจผลครั้งที่ 3	(103-104)
39	ผลพริกที่เป็นโรคจำนวน 5 ผล ที่เก็บหลังจากการตรวจผลครั้งที่ 3	(105-106)
40	ผลพริกที่เป็นโรคทั้งหมด ที่เก็บหลังจากการตรวจผลครั้งที่ 3	(107-108)

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ในอดีตประชากรของประเทศไทยส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรรมเป็นหลัก แม้ว่าในปัจจุบันได้มีการผลักดันประเทศให้ก้าวไปสู่ความเป็นอุตสาหกรรม แต่อาชีพเกษตรกรรมก็ยังเป็นอาชีพหลักของคนไทยเช่นเดิม และด้วยเหตุที่ประชากรของประเทศได้เพิ่มจำนวนสูงขึ้นเรื่อยๆ จึงต้องมีการเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้น เพื่อให้เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค ปัญหาหนึ่งที่พบมากในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร ก็คือปัญหาเรื่องโรคพืช ซึ่งเกษตรกรมักใช้สารเคมีในการแก้ปัญหา เนื่องจากสามารถควบคุมการแพร่กระจายของโรคพืชต่างๆ ได้ แต่ก็ทำให้เกิดภาวะการพึ่งพาต่างประเทศ เพราะสารเคมีที่ใช้กันแพร่หลายในประเทศไทยนั้น ส่วนใหญ่จะเป็นสารเคมีนำเข้าจากต่างประเทศ ทั้งในลักษณะสูตรสำเร็จและสารเคมีต่างๆ ซึ่งเป็นวัสดุส่วนผสม แล้วนำมาผสมตามสูตรภายในประเทศ และในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่า สารเคมีเหล่านี้ก่อให้เกิดปัญหาสารพิษตกค้างในสภาพแวดล้อมและในผลผลิตการเกษตร อันก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค ทั้งยังสามารถชักนำให้เชื้อราเกิดความต้านทานต่อสารเคมีซึ่งเกิดจากการใช้สารเคมีป้องกันเชื้อราสาเหตุโรคพืชเป็นเวลานาน การพยายามลดปริมาณของสารเคมีที่ใช้หรือหาสิ่งทดแทนซึ่งผลิตจากพืชที่ไม่มีพิษต่อผู้ใช้และสภาพแวดล้อมเป็นสิ่งที่น่ากระทำ เพราะเกษตรกรสามารถผลิตขึ้นมาได้เองทั้งยังมีความปลอดภัยและมีผลดีทางเศรษฐกิจ

พริกชี้ฟ้าและคะน้าแม้ไม่ได้เป็นผักที่มีการส่งออก แต่ก็จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ เนื่องจากเป็นผักที่นิยมบริโภค แต่การเพาะปลูกพืชทั้งสองมักประสบกับปัญหาเรื่องโรคพืช โดยเฉพาะโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา ซึ่งพบได้บ่อยว่าพริกชี้ฟ้าเป็นโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ในขณะที่โรคใบจุดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* เป็นปัญหาสำคัญของการปลูกคะน้า

มีรายงานการใช้สารสกัดจากพืชหลายชนิด เช่น น้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ด (Dubey *et al.*, 1983) ซาโปนินส์จากใบกระดูกไก่ (Phongpaichit *et al.*, 1992a, 1995) และ

ผลมะคำดีควาย (Phongpaichit *et al.*, 1992b) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดี จึงได้นำมาศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งราก่อโรคแอนแทรคโนสพริก และใบจุดคะน้า ร่วมกับน้ำมันหอมระเหยจากข่าลิงและพิเพอรีนจากเมล็ดพริกไทยดำ ทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและสภาพแปลงทดลอง ซึ่งหากสามารถนำสารสกัดเหล่านี้มาใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชดังกล่าวได้ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง เนื่องจากเป็นสารที่สกัดจากพืชที่พบทั่วไป ซึ่งใช้เป็นยาในตำรับยาไทย ไม่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้ ผู้บริโภค และไม่สะสมในสิ่งแวดล้อม

การตรวจเอกสาร

1. การใช้สารสกัดจากพืชในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช

ในประเทศไทยมีผู้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารสกัดจากพืชในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช หลายท่านด้วยกัน ตัวอย่างเช่น

เกษม และวิจัย (2528) นำพืชสมุนไพร 10 ชนิด คือ หนอนตายหยาก แสลงใจ โล่ติ้น สลอด โป๊ยกั๊ก กานพลู กระเทียม เทียนขาว ตะไคร้และลำโพง มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา สาเหตุโรคพืช 21 ชนิด บนอาหาร PDA (potato dextrose agar) กับพืชสมุนไพรในอัตราความเข้มข้นต่างๆ กัน ปรากฏว่าพืชสมุนไพร ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทุกชนิดที่ใช้ทดสอบได้ดีที่สุด คือ โป๊ยกั๊กที่ระดับความเข้มข้น 20,000 ppm รองลงมาได้แก่ เทียนขาว ตะไคร้ กานพลู หนอนตายหยาก กระเทียม แสลงใจ สลอด ลำโพง และโล่ติ้น ตามลำดับ

ชัยวัฒน์ (2528) นำพืชสมุนไพรและเครื่องเทศรวม 16 ชนิด ได้แก่ กานพลู ขิงแก่ ขี้เหล็ก เจตมูลเพลิงแดง ชะเอมเทศ ดอกจัน ดีปลี เทียนขาว ใบกระวาน โป๊ยกั๊ก พลู พิลังกาสา พริกไทยดำ พริกหอม หนุมานประสานกายและอบเชย มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ใน สกุล *Aspergillus* 12 ชนิด บน PDA ผสมผงพืชสมุนไพรในอัตราความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ คือ 10,000, 30,000, 50,000, 70,000 และ 90,000 ppm ปรากฏว่าพลูเป็นสมุนไพรที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ใช้ทดสอบได้ดีที่สุด โดยยับยั้งอย่างสมบูรณ์ที่ทุกระดับความเข้มข้น รองลงมาได้แก่ กานพลูและพริกหอมตามลำดับ ส่วนสมุนไพรและเครื่องเทศอื่นๆ นอกนั้น ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิดได้แตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อรา นอกจากนี้ยังพบว่ามีสมุนไพรบางชนิดที่ส่งเสริมการ

เจริญของเชื้อราได้ โดยหนุมานประสานกายเป็นสมุนไพรที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อราที่ใช้ทดสอบทุกชนิด รองลงมาได้แก่ ขี้เหล็ก เจตมูลเพลิงแดง และพิลังกาสา

วิชัย และคณะ (2534) ได้นำสารสกัดจากพืช มาทดสอบการป้องกันการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง โดยได้นำมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้มาปลูกเชื้อแล้วชุบด้วยสารสกัดซึ่งสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากพืช จำนวน 6 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm พบว่าสารสกัดทองพันชั่ง สามารถป้องกันการเกิดโรคได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ ข่า ชงโค และว่านน้ำ โดยมีระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ย 1.38, 1.50, 1.50 และ 1.65 ตามลำดับ ขณะที่ผลมะม่วงเปรียบเทียบที่ไม่ปลูกเชื้อและไม่ชุบสารสกัดจากพืช มีระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ย 1.75 และผลมะม่วงเปรียบเทียบที่ปลูกเชื้อและไม่ชุบสารสกัดจากพืช มีระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ย 4.25

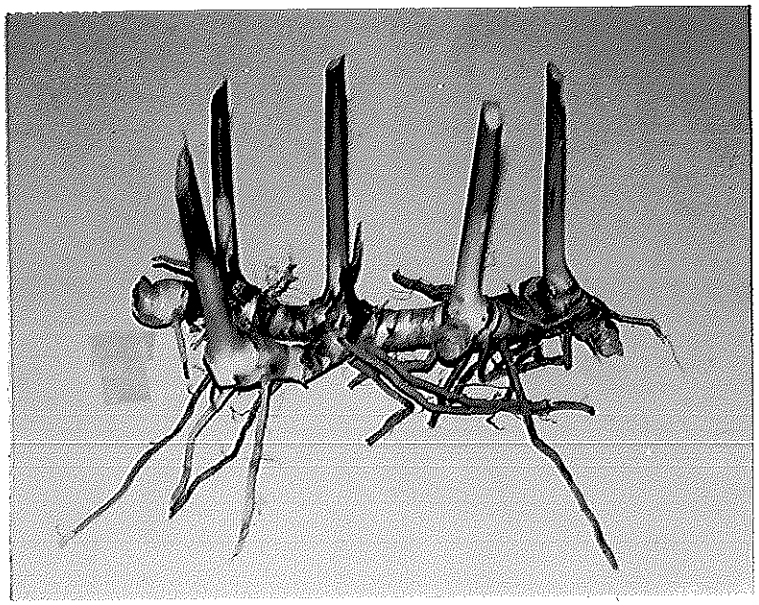
อาภา (2538) ได้สกัดสารจากพืช 6 ชนิด นำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช 9 ชนิด ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดจากเทียนกิ่ง ทองพันชั่ง และประยงค์ ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราต่างชนิดในวงกว้างทุกชนิดที่นำมาทดสอบ โดยสารสกัดจากเทียนกิ่งมีความสามารถยับยั้งเชื้อราต่างชนิดในวงกว้างดีที่สุดและที่ระดับความเข้มข้นเพียง 0.1% สามารถยับยั้งการเจริญของ *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp. และ *Pythium* sp. สูงกว่า 50% ขณะที่สารสกัดจากทองพันชั่ง 0.1% ให้ผลดีในการควบคุมการเจริญของ *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. และ *Fusarium* sp. ส่วนสารสกัดจากประยงค์ 0.5% สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทดสอบทุกชนิด ยกเว้น *Botryodiplodia* sp. สำหรับสารสกัดจากสาบหมา หนุมานประสานกายและหญ้าหวาน ให้ผลในระดับต่ำ การทดสอบสารออกฤทธิ์ naphthopyran จากทองพันชั่ง แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสูงมาก สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้ทุกชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่ำเพียง 100 ppm โดยยับยั้งการเจริญของ *Alternaria* sp. และ *Colletotrichum* sp. ได้สูงกว่า 90%

พืชสมุนไพรที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ มีดังนี้

1.1 ข่าลิง

ข่าลิงมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Alpinia conchigera* Griff. วงศ์ Zingiberaceae อาจเรียกว่า ข่าเล็กหรือข่าน้อย

ข่าลิงเป็นพืชที่มีลำต้นใต้ดินหรือหัว (rhizome) (ภาพที่ 1) เหมือนข่าใหญ่และข่าแดง ต่างกันที่ข่าลิงมีใบ ต้น ดอกและหัวขนาดเล็กกว่า เหง้ามีกลิ่นหอมฉุนและร้อนแรงกว่า เจริญได้ดีในดินที่มีความชุ่มชื้นสูง มีแดดส่องถึงรำไร โดยมากนิยมปลูกไว้ใช้ในการปรุงยา



ภาพที่ 1 เหง้าข่าลิง (*Alpinia conchigera*)

ประโยชน์ทางยาตามสรรพคุณโบราณ มีดังนี้ (สำนักงานปลัดทบวงมหาวิทยาลัย, กองวิชาการ, 2531 และ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, คณะเภสัชศาสตร์, 2528)

ต้น แก้โรคฝีดาษ

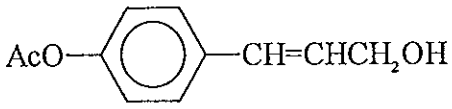
ใบ แก้เกลื้อน

ดอก เป็นยาขับพยาธิในลำไส้

เหง้า แก้กามโรค แพทย์แผนโบราณใช้เหง้าผสมกับสุรา รับประทานแก้ปวดท้อง จุกเสียดแน่นเฟ้อ

เมธี และคณะ (ม.ป.ป.) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของส่วนสกัดน้ำของเหง้าสดข่าลิงและพบว่า ส่วนสกัดนี้ มีผลต่อการบีบตัวของหลอดลมในหนูตะเภา (อ้างถึงใน วัชรินทร์ และ พิมพ์จิตร, 2537)

วัชรินทร์ และพิมพ์จิตร (2537) ได้นำน้ำมันหอมระเหยของเหง้าข่าลิงที่แยกออกมาโดยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำ และนำส่วนสกัดที่ได้ไปแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี จากข้อมูลทาง NMR และ MS สรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าลิงมีองค์ประกอบหลัก คือ chavicol acetate (ภาพที่ 2) นอกจากนี้ยังนำน้ำมันหอมระเหยของเหง้าข่าลิง มาศึกษาด้วย GC และ GC-MS พบว่า ประกอบด้วยสาร 12 สาร โดยมี chavicol acetate เป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ยังประกอบด้วย α-pinene, β-pinene, ρ-cymene, cineol, terpinen-4-ol, α-terpineol และ chavicol สำหรับสารที่พบอีก 4 สารยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นสารใด



ภาพที่ 2 สูตรโครงสร้างของ chavicol acetate

สำหรับการศึกษาองค์ประกอบของเหง้าข่าลิงแห้งนั้น วัชรินทร์และพิมพ์จิตร (2537) ได้นำข่าลิงแห้งมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ เช่น hexane, CH_2Cl_2 และ MeOH จากนั้นนำส่วนสกัดที่แยกได้ไปแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี สามารถแยก 1,7-diphenyl-3,5-heptadione ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประเภท diarylheptanoid ที่แยกจากพืชเป็นครั้งแรกพร้อมด้วยสารอื่นๆอีก 6 สาร ได้แก่ 1,7-diphenyl-5-hydroxy-3-heptanone, 5-hydroxy-7-(4′-hydroxy-3′-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanone, 1,7-diphenylhept-4-en-3-one, 7-(4′-hydroxy-3′-methoxyphenyl)-1-phenylhept-4-en-3-one, 3,5,7-trihydroxy flavone และ 3,5,7-trihydroxy-4′-methoxyflavone

Sirat และ Nordin (1995) ได้อาศัยข้อมูลทาง GC และ GC-MS แล้วรายงานว่า essential oil จากเหง้าข่าลิงสดที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ ประกอบด้วยสาร มากกว่า 40 สาร และสามารถจำแนกได้ 34 สาร โดยสารหลักจะประกอบด้วย β-sesquiphellandrene (20.5%) β-bisabolene (12.1%) และ 1,8-cinenole (11.6%)

1.2 เสม็ด

เสม็ด มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Melaleuca leucadendron* Corner. วงศ์ Myrtaceae ชื่อพื้นเมืองภาคใต้เรียก เหม็ด ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียก เสม็ดขาว

เสม็ดเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก เปลือกมีสีขาว นิ่ม เมื่อลอกออกจากลำต้นจะมีลักษณะเป็นแผ่นกระดาษ ใบรูปไข่ยาว และมีจุดของต่อมน้ำมัน ดอกมีขนาดเล็กอยู่รวมเป็นกระจุกออกเป็นช่อยาว มีสีนวล (ภาพที่ 3) เสม็ดเป็นพืชที่ขึ้นตามชายทะเลในประเทศพม่า เขมร ไทย มาเลเซีย จนถึงออสเตรเลีย เป็นพืชที่ชอบน้ำเค็มและดินที่เป็นกรด

ภาพที่ 3 เสม็ด (*Melaleuca leucadendron*)
a. ต้น b. ใบ

เมื่อนำใบเสม็ดสดมากลั่น จะได้ cajuput oil หรือน้ำมันเขียว น้ำมันเขียวที่กลั่นมาได้ใหม่ๆ ไม่มีสีหรือมีสีเหลืองอ่อน กลิ่นคล้ายกลิ่นการบูร และรสขม แต่ที่นำมาซื้อขายกันในตลาดมีสีเขียว เพราะมีธาตุทองแดงปนอยู่เล็กน้อย น้ำมันเขียวอยู่ในเภสัชตำรับของอินเดีย (พยอม, 2521; Brophy *et al.*, 1989 และ Perry, 1980) ประกอบด้วยสาร cineole อยู่ประมาณร้อยละ 50-60 นอกจาก cineole แล้วยังประกอบด้วย α-terpineol และ ester ของสารนี้ ซึ่งได้แก่ 1-α-pinene, 1-limonene, dipentene, sesquiterpenes, azulene, sesquiterpene

alcohols, valeraldehyde และ benzaldehyde น้ำมันเขียวใช้เป็นยาขับเสมหะ แก้หลอดลมอักเสบและกล่องเสียงอักเสบ ขับลม ถ้ารับประทานเกินขนาดจะทำให้เกิดความระคายเคืองต่อทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังใช้ขับพยาธิไส้เดือนได้ ใช้ทาหรือหยดฟันที่ผุเพื่อบรรเทาอาการปวดฟัน ใช้เป็นส่วนผสมในยาทาถูนวดเพื่อบรรเทาอาการปวดเมื่อย ใช้ฆ่าเชื้อราตามผิวหนัง น้ำมันเขียวใช้ไล่ยุงได้ดีกว่าน้ำมันตะไคร้หอม เพราะว่าระเหยช้ากว่า นอกจากนี้ยังใช้ทาเพื่อฆ่าหมัดและเหาได้ (พยอม, 2521; อรุณพร, 2522 และ วงศ์สถิต, บรรณาธิการ, 2538)

Dubey และคณะ (1983) พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ด สามารถยับยั้งเชื้อราได้หลายชนิดรวมทั้ง *Colletotrichum capsici* น้ำมันเสม็ดความเข้มข้น 500 ppm นั้น สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. capsici* ได้ 100%

อรุณรุ่ง (2537) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคกลาก ของน้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ดขาว โดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารวุ้นผสมสารทดสอบ ผลการศึกษา พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ดขาวมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Microsporum gypseum* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *Trichophyton mentagrophytes* และ *Epidermophyton floccosum* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.16, 0.31 และ 0.62 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ดขาวและสารสกัดจากใบกระดูกไก่มีฤทธิ์เสริมกันในการต้านเชื้อ *T. mentagrophytes*

1.3 พริกไทย

พริกไทยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Piper nigrum* Linn. อยู่ในวงศ์ Piperaceae ชื่อพื้นเมืองภาคเหนือเรียก พริกน้อย

พริกไทยเป็นพืชพื้นเมืองของอินเดียตะวันตกเฉียงใต้ แต่ปัจจุบันได้นำมาปลูกในประเทศที่มีอากาศร้อน เช่น อินโดนีเซีย มาเลเซีย ศรีลังกา เขมร ไทย ฯลฯ สำหรับประเทศไทยนั้นพบว่ามีแหล่งปลูกที่ใหญ่ที่สุดในประเทศอยู่ที่จังหวัดจันทบุรี

พริกไทยเป็นไม้เถาต้องเกาะไม้ค้าง โดยมีรากสั้นๆ ออกตรงข้อเกาะติดกับค้าง เถาของพริกไทยจะต่อกันเป็นปล้องๆ ใบเลี้ยงคล้ายใบพลู แต่เรียวกว่า หรือเป็นรูปไข่ ปลายใบแหลม ใบจะเกิดตามข้อของลำต้นและกิ่งแขนง พริกไทยออกดอกเป็นช่อชนิดสไปค์ (spike) ช่อดอกยาวประมาณ 7-15 ซม. แต่ละช่อมีดอกประมาณ 50-150 ดอก ดอกมีลักษณะกลม มีขนาดเล็กสีขาวติดอยู่บนก้านช่อดอก เป็นดอกที่ไม่มีก้านดอก ไม่มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอก

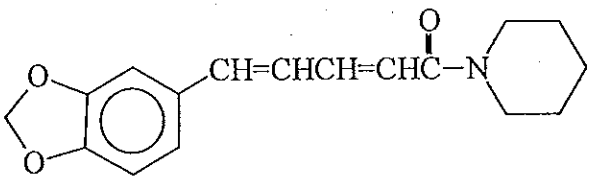
ดอกจะเริ่มบานจากทางโคนไล่ไปทางปลายช่อ เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ขณะที่ช่อดอกยังอ่อนอยู่จะมีสีเหลืองอมเขียว แต่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเมื่อแก่ และชี้ส่วนปลายของดอกช่อสู่พื้นดิน ผลมีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1/3 ถึง 1/4 นิ้ว เมื่อยังอ่อนมีสีเขียว สุกจะมีสีแดง อยู่รวมกันอัดแน่นเป็นช่อยาว 4-8 เซนติเมตร (ภาพที่ 4) ตั้งแต่เริ่มออกดอกจนกระทั่งเก็บเกี่ยวใช้เวลานาน 6 เดือน ผลพริกไทยแห้งที่แก่จัด มีเปลือกสีดำติดอยู่ เรียกชื่อทางการค้าว่า "พริกไทยดำ" (black pepper) แต่ถ้าเอาเปลือกออก ซึ่งโดยปกติเกษตรกรนิยมแช่น้ำ หรือแช่ด้วยคลอรีน ล้างเปลือกออกแล้วตากแห้ง จะได้พริกไทยมีสีขาวเรียก "พริกไทยล่อน" (white pepper) (นิจศิริ, 2534; พเยาว์, 2529; พิทักษ์, 2517; สุรชัย 2535 และ Bailey, 1951)

ภาพที่ 4 พริกไทย (*Piper nigrum*)
a. ต้น b. ผล

พริกไทยเป็นพืชที่มีน้ำมันหอมระเหยอยู่ด้วยประมาณ 1% น้ำมันหอมระเหยนี้ไม่มีสี หรือมีสีค่อนข้างเหลือง ไม่มีกลิ่น ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ 10-15 ส่วน ในเอธิลแอลกอฮอล์ 90% (Parry, 1969) สำหรับสารประกอบอินทรีย์ที่พบในน้ำมันหอมระเหยได้แก่ สารในกลุ่มของ monoterpenes จำนวน 70-80% sesquiterpenes จำนวน 20-30% และสารที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบอีกเล็กน้อยไม่เกิน 5% (บัญญัติ, 2527 อ้างจาก Asian symposium

on medicinal plant and species, n.d.) สารในกลุ่มนี้ประกอบด้วยสารที่สำคัญได้แก่ α-pinene, β-pinene, α-caryophyllene, β-caryophyllene, didydrocarveol, piperonal, linalool, 1-terpinen-4-ol, α-terpineol, cryptone, carvone, p-vymene-8-ol, trans-carveol, cis-carveol, safrole, ar-curcumene, methyl eugenol, necrolidol, myxin, limonene, peperidine (บัญญัติ, 2527 อ้างจาก Russel, 1977 และ Parry, 1969)

นอกจากนี้ในพริกไทยยังมีสารพวกไอลิโอซินอยู่ประมาณ 12-14% ซึ่งประกอบไปด้วยสารเคมีหลายชนิด แต่สารเคมีตัวสำคัญที่ทำให้เกิดรสเผ็ดร้อนและกลิ่นฉุน ได้แก่ พิเพอรีน (piperine) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{17}H_{19}No_3$ (ภาพที่ 5) (อรุณพร, 2522; Clause *et al.*, 1973; Geisfer and Gross, 1990; Trease and Evan, 1975 และ Youngken, 1950) พบร้อยละ 5-9 (นิจศิริ, 2534 และ Trease and Evan, 1975) นอกจากนี้ยังมี chavicine เป็นสารที่มีสีค่อนข้างเหลือง เป็นไอโซเมอร์ของพิเพอรีนจึงมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{17}H_{19}No_3$ สารตัวสุดท้ายคือ pipedine เป็นสารที่ไม่มีสี มีสูตรโมเลกุลเป็น $(CH_2)_5NH$ (Parry, 1969)



ภาพที่ 5 สูตรโครงสร้างของพิเพอรีน

การใช้พริกไทยส่วนใหญ่จะใช้ในการปรุงแต่งรสอาหาร ซึ่งพบว่าเป็นที่นิยมกันทั่วไป (บัญญัติ 2527; พเยาว์ 2529; อรุณพร 2522; Chiranjib *et al.*, 1990 และ Trease and Evan, 1975) แต่การที่พริกไทยมีรสเผ็ดร้อนก็มีผู้นำไปใช้ประโยชน์ในทางยาเช่นกัน เช่น ใช้แต่งกลิ่น ใช้ขับลม แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ขับเหงื่อ แก้ไข้ แก้ปวดท้อง จุกเสียด เป็นยาธาตุทำให้เจริญอาหาร (พเยาว์ 2529; สุภา 2525 และ อรุณพร, 2522) และยังพบว่าพริกไทยจะกระตุ้นการหลั่งของน้ำลายและเอนไซม์ในกระเพาะอาหาร (บัญญัติ, 2527 อ้างจาก Hill, 1974) ใช้รักษาโรคริดสีดวงทวาร โรคหลอดลมอักเสบเรื้อรัง แก้หนองในและแก้ไข้ (บัญญัติ, 2527 อ้างจาก Asian symposium on medicinal plant and species, n.d. และ Trease and Evan, 1975)

Asprey และ Thornton (1976) และ Atal และคณะ (1976) พบว่ามีการใช้พืชในวงศ์เดียวกับพริกไทยในสรรพคุณทางยาและยังใช้เป็นยาฆ่าแมลงได้ด้วย สอดคล้องกับการรายงานของ Clause และคณะ (1973) ซึ่งพบว่าพิเพอรีนมีฤทธิ์ในการฆ่าแมลงวัน

นิจศิริ (2534) กล่าวถึงคุณสมบัติของพิเพอรีนว่า มีคุณสมบัติเสริมฤทธิ์ของ hexobarbital และต้านอาการชักในหนูถีบจักร เพิ่มความดันและการไหลของโลหิตในมดลูกหนูขาว สามารถกระตุ้นการหายใจที่ถูกกดดันโดยมอร์ฟีน และเพนโตบาร์บีทอลในสุนัขที่ถูกทำให้สลบ

นอกจากนั้น ยังมีผู้นำพริกไทยไปใช้ในการถนอมอาหารหลายชนิด เช่น เก็บรักษามะม่วงดอง เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากพริกไทยสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆได้ดี โดยยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ดีกว่ายับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ ที่เป็นเช่นนี้เพราะในน้ำมันหอมระเหยของพริกไทยประกอบด้วยสารเคมีพวก linalool และ α-terpineol ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

1.4 กระดูกไก่

กระดูกไก่ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Maesa ramentacea* Wall.ex.Roxb. วงศ์ Myrsinaceae ชื่อพื้นเมืองภาคเหนือเรียกข้าวสารหลวง ชุมพรเรียกกะผ้าสะลาย เสียดนก จันทบุรีเรียกเม้าหมด ตราดเรียกขี้หนอน เชียงใหม่เรียกไครย้อย หลอดเขา ตรังเรียกลวย นครศรีธรรมราชเรียกปัน (เต็ม, 2523)

กระดูกไก่เป็นพืชที่พบมากแถบภาคเหนือและใต้เส้นศูนย์สูตรประเทศญี่ปุ่น อเมริกา เม็กซิโก ซึ่งบริเวณที่พบมักเป็นแถบภูเขา และประเทศไทยก็พบแถบภูเขาเช่นกัน

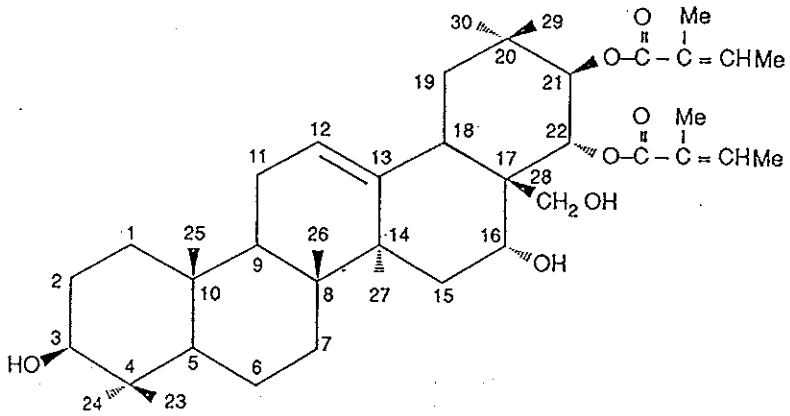
กระดูกไก่เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก มีลักษณะลำต้นเป็นไม้เนื้ออ่อน ใบเป็นใบเดี่ยว รูปร่างลักษณะใบเป็นรูปไข่หรือรูปหอก ปลายใบลักษณะแหลมเล็กน้อย ส่วนฐานใบกลมมน ขอบใบหยักเล็กน้อยแบบฟันเลื่อย ขอบใบกว้าง 2-6.5 เซนติเมตร ยาว 6-14 เซนติเมตร ลักษณะการเรียงของใบจะสลับกันคล้ายบันไดเวียน ไม่มีหูใบ มีใบประดับขนาดเล็ก แผ่นใบและก้านใบไม่มีขน ก้านใบยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร มีดอกสีขาว และผลมีลักษณะเดี่ยว มีเมล็ดจำนวนมาก (Backer and Bakhuizen, 1965; Benson 1959 และ Hutchison; 1973) (ภาพที่ 6)

ภาพที่ 6 กระดูกไก่ (*Maesa ramentacea*)

a. ใบ b. ดอก

สารสำคัญที่มีอยู่ในใบกระดูกไก่เป็นสารผสมพวกซาโปนินส์ 2 สาร ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกัน คือต่างเป็น triterpene ที่มีน้ำตาล 5 โมเลกุล เรียงต่อกันอยู่ที่ตำแหน่ง C-3 (ออมสิน, 2536 อ้างจาก พิทยา, 2535) (ภาพที่ 7) เป็นสารที่มีพิษต่อสัตว์ชั้นต่ำพบในพันธุ์ไม้หลายชนิด และจากการทดสอบสารออกฤทธิ์ต้านทานเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดหยาบจากใบกระดูกไก่ พบว่า สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทานอล อะซีโตน และไดคลอโรมีเธน จากใบกระดูกไก่ในความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียพวก *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Shigella sonnei* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ แต่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคกลาก (dermatophytes) คือ *E. floccosum, M. gypseum* และ *T. mentagrophytes* ได้ (ฉวีวรรณ, 2529) นอกจากนั้นใบกระดูกไก่ยังมีฤทธิ์ต้านราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น *Alternaria brassicicola, Curvularia* sp., *Helminthosporium* sp., *Phomopsis* sp., *Rhizoctonia sp., Ramuralia sp.* และ *Colletotrichum capsici* (Phongpaichit *et.al.*, 1992a และ Phongpaichit *et.al.*, 1992b) รวมทั้งเชื้อ *Rhynchosporium oryzae* ซึ่งก่อโรคใบวงสีน้ำตาลในข้าว สารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่ ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *R. oryzae* ได้มากกว่าร้อยละ 90 (สุวรรณา, 2537) และยังมีผู้นำใบกระดูกไก่มาใช้เป็นยาฆ่าปลาได้ผลดี (Chiayvareesajja *et al.*, 1987 และ Wiriyachitra, 1991) นอกจากนี้ต้นกระดูกไก่ยังใช้รักษาอาการไข้ ลดอาการปวด (Burkill, 1932) และยับยั้งการอักเสบได้ดี (Mahabusarakam *et al.*, 1994) ทั้งยังมีการศึกษาทางพิษวิทยาแล้ว พบว่าปลอดภัยต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสลายตัวได้ง่ายไม่ทำให้เกิดปัญหาทางมลพิษ (Wiriyachitra, 1991)

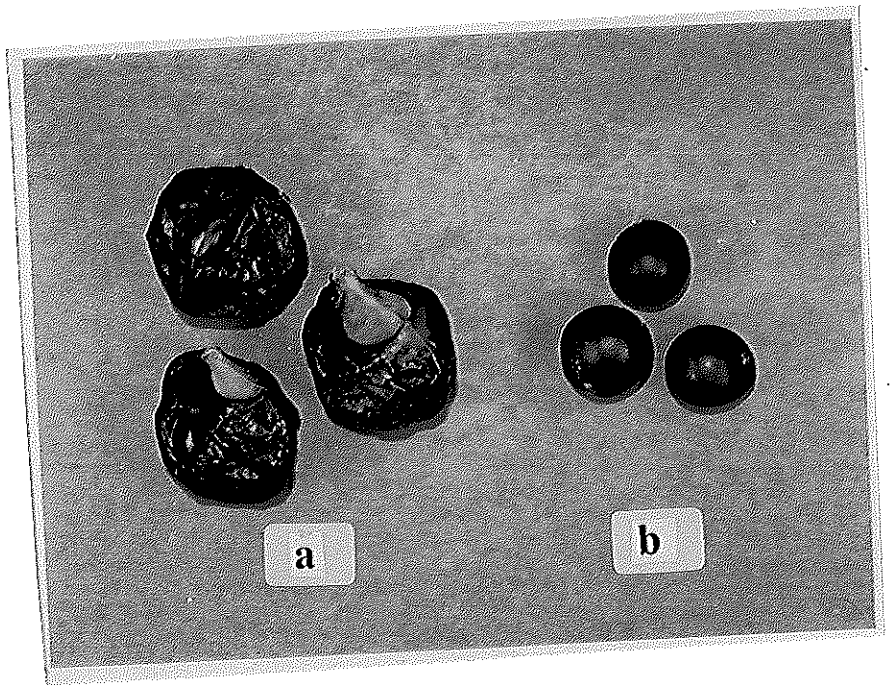


ภาพที่ 7 สูตรโครงสร้างของซาโปเจนิน (21,22-*O*-Diangeloyl-barringtologenol-C) ซึ่งเป็นซาโปนินส์หลักจากใบกระดูกไก่

1.5 มะคำดีควาย

มะคำดีควายมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Sapindus emarginatus* Vahl. วงศ์ Sapindaceae ชื่อพื้นเมืองภาคเหนือเรียก มะซัก ส้มป่อยเถม

มะคำดีควายเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ เปลือกต้นมีสีเทา ใบเป็นใบรวมแบบขนนก ใบย่อยมีตั้งแต่ 8-12 ใบ รูปใบเรียวยาวหรือขอบใบค่อนข้างขนานกัน ใบแหลม เนื้อใบสองข้างไม่เท่ากัน ดอกมีขนาดเล็ก เป็นช่อยาว สีขาวอมเหลืองหรืออมเขียว ผลกลม มีเมล็ดเดี่ยว แข็ง เป็นช่อขนาดใหญ่ เมล็ดโตเต็มที่ขนาดเท่าผลพุทรา มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร เมื่อแก่จัดผิวของผลเป็นสีน้ำตาลดำ ผิวย่น กลิ่นหอมคล้ายพุทราจีน (ภาพที่ 8) พบได้ทั่วไปทุกภาคของประเทศไทย (กระทรวงสาธารณสุข, 2530 และ พยอม, 2521)

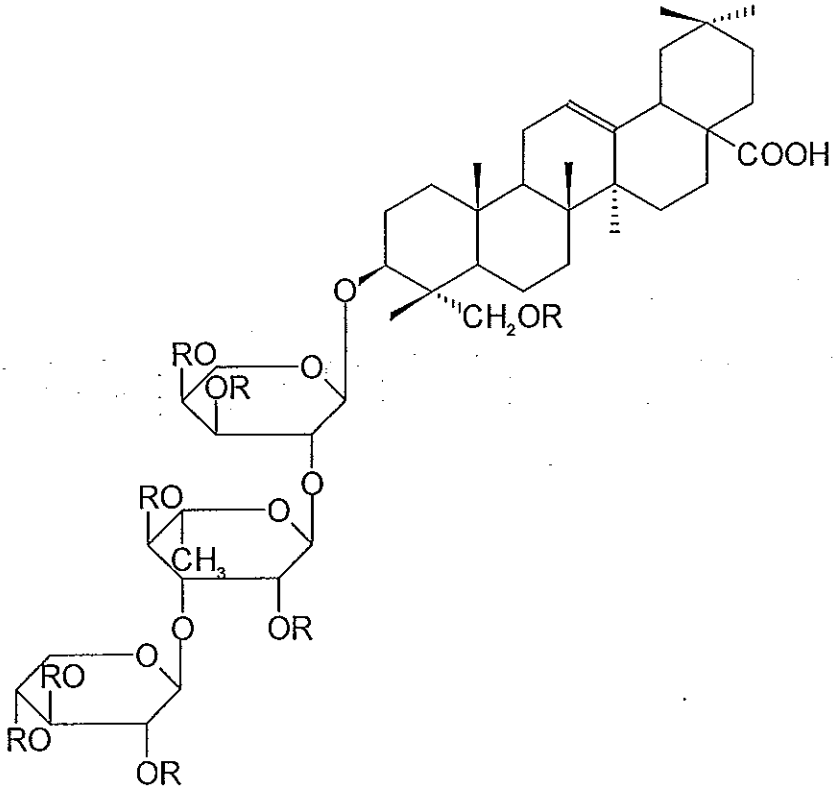


ภาพที่ 8 มะคำดีควาย (*Sapindus emarginatus*)

a. ผล b. เมล็ด

ในตำราสมุนไพรไทย ใช้เนื้อของผลเป็นยาสระผม แก้หนังศีรษะเป็นชันนะตุ ยาชงจากเนื้อมะคำดีควาย ใช้ล้างหน้าแก้สิว แก้กาฬภายใน แก้พิษไข้ ดับพิษร้อน นอกจากนั้นน้ำที่เป็นฟองใช้ฆ่าแมลง และเบื่อปลา (พเยาว์, 2529 และ สุรพล และคณะ, 2532)

สารเคมีที่พบในผลมะคำดีควายคือซาโปนินส์, emarginatonede, O-methyl-saponin เป็นต้น โดยสรรพคุณการแก้โรคชันนะตุ คาดว่าจะเกิดจากสารซาโปนินส์ (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 สูตรโครงสร้างของซาโปนินส์จากผลมะคำดีควาย

สารสกัดหยาบซาโปนินส์ ซึ่งได้จากใบกระดูกไก่ ผลมะคำดีควาย ผลและใบมังตาน (*Schima wallichii*) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกลาก คือ *E. floccosum, M. gypsium* และ *T. mentagrophytes* โดยมะคำดีควายมีประสิทธิภาพดีที่สุด คือมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ทั้ง 3 ชนิด เท่ากับ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดหยาบซาโปนินส์ที่มีประสิทธิภาพรองลงมา ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา คือ ใบกระดูกไก่ และใบมังตาน ส่วนผลมังตาน มีประสิทธิภาพต่ำสุด คือ ค่า MIC เท่ากับ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (พรพิพัฒน์ และคณะ, 2529)

Phongpaichit และคณะ (1992b) พบว่า สารสกัดผลมะคำดีควาย สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่นเดียวกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่

2. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา

เชื้อราจัดอยู่ใน Kingdom Fungi ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) และเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ลำเลียงน้ำและอาหาร นิวเคลียสเป็นแบบมีผนังหุ้มซึ่งจัดเป็นพวก eucaryote ผนังเซลล์ของเชื้อราประกอบด้วยไคติน (chitin) การสืบพันธุ์หรือขยายพันธุ์โดยทั่วๆไป พบว่ามีทั้งแบบใช้เพศและไม่ใช้เพศ ส่วนที่ใช้ในการแพร่พันธุ์หรือแพร่ระบาดได้แก่ สปอร์ (spore) หรือส่วนขยายพันธุ์อื่น เช่น เส้นใย (mycelium) เม็ดขยายพันธุ์ (sclerotium) ทั้งนี้เพราะเชื้อราบางชนิดจะไม่สร้างสปอร์ (Alexopoulos, 1996) จากการสำรวจพบว่ามีเชื้อราประมาณ 100,000 ชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวก saprophyte ช่วยในการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์และสารอินทรีย์ต่างๆ และมีประมาณ 50 ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคผิวหนังกับคนและสัตว์ ส่วนที่เป็นสาเหตุของโรคพืชจะมีมากกว่า 8,000 ชนิด โดยเชื้อราบางชนิดต้องดำรงชีพอยู่เฉพาะบนพืชที่มีชีวิตตลอดวงจรชีวิตของมัน เรียกลักษณะการดำรงชีวิตแบบนี้ว่า obligate parasite หรือ biotroph แต่ส่วนใหญ่เป็น non-obligate parasite คือสามารถเจริญได้ทั้งในพืชอาศัยและในเศษซากพืชหรือสารอินทรีย์ (Agrios, 1988)

2.1 โรคแอนแทรคโนสของพริก

โรคแอนแทรคโนส ใช้เรียกกับพืชที่แสดงอาการที่มีลักษณะเป็นแผลที่มีขอบเขตจำกัด เซลล์แห้งตาย (necrosis) เกิดอาการเจริญเติบโตช้า (hypoplasia) โดยทั่วไปโรคนี้เกิดจาก เชื้อรา 2 สกุล คือ *Colletotrichum* และ *Gloeosporium* (นิพนธ์, บรรณาธิการ, 2523)

โรคแอนแทรคโนสของพริกนับว่าเป็นโรคที่ทำความเสียหายมากที่สุดโรคหนึ่ง ระบาดมากในเขตที่มีความชื้นสูงหรือฝนตกชุก เข้าทำลายในระยะที่ผลพริกกำลังเจริญเติบโต ผลพริกที่แสดงโรคเป็นแผลใหญ่ ผลมักร่วงก่อนสุกหรือก่อนที่จะแก่เต็มที่ หรืออาจเน่าหมดทั้งผล ทำให้ได้ผลผลิตน้อยและคุณภาพต่ำ ขายไม่ได้ราคา ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ถ้ามีโรคนี้เกิดแล้วไม่ได้ทำการป้องกันกำจัด จะมีความเสียหายมากกว่าร้อยละ 50 (ศุภลักษณ์, บรรณาธิการ, 2536)

โรคแอนแทรคโนส พบระบาดทั่วไปในสหรัฐอเมริกาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2233 สำหรับในประเทศไทยโรคนี้พบมากและทำความเสียหายร้ายแรงกับพริกชนิดต่างๆ ในแหล่งที่มีการปลูกพริก เช่น ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ฯลฯ (ชวาลา, 2531)

ลักษณะอาการ

ระยะที่ผลพริกอ่อนแอต่อโรคนี้มากที่สุด คือ ระยะที่ผลพริกเจริญเติบโตเต็มที่แล้วหรือระยะที่ผลพริกจะเปลี่ยนสี อาการเริ่มแรกจะปรากฏเป็นวงช้ำสีน้ำตาล เนื้อเยื่อบุ๋มลึกลงไปจากระดับเดิมเล็กน้อย ต่อมาแผลจะขยายขนาดใหญ่ขึ้นเป็นวงรีหรือวงกลม ซึ่งมองเห็นลักษณะของเชื้อราที่เจริญภายใต้เนื้อเยื่อของพืชขยายออกไปในลักษณะที่เป็นวงสีดำซ้อนกันเป็นชั้นๆ (concentric ring) วงกลมนี้ประกอบด้วยปุ่มสีดำเล็กๆซึ่งเป็นลักษณะของ fruiting body (acervulus) ภายใน acervulus บรรจุสปอร์เชื้อราอยู่เต็ม ในเวลาที่อากาศมีความชื้นสูง สปอร์สีส้มอ่อนที่บรรจุอยู่ภายในจะแตกออกมาจากปุ่มเหล่านี้มีลักษณะคล้ายหยดน้ำ บางแผลอาจพบขนสีดำสั้นๆ (black hair) ซึ่งเรียกว่า setae เจริญขึ้นมาเหมือนหนามอยู่ปะปนกับสปอร์ของเชื้อราบนปุ่มเหล่านั้น ขึ้นกับชนิดของเชื้อที่เข้าทำลาย หลังจากที่เชื้อราเข้าทำลายระยะหนึ่ง เนื้อเยื่อบริเวณแผลแห้งและยุบตัวลง มีผลทำให้ผลพริกงอคล้ายกุ้งแห้ง ชาวบ้านจึงมักเรียกโรคนี้ว่า "โรคกุ้งแห้ง" (ภาพที่ 10) หากแผลใหญ่มักทำให้ผลพริกเน่าหมดทั้งผลและร่วง เมล็ดพันธุ์ที่ได้จากผลพริกที่เป็นโรค เมื่อนำไปเพาะมักไม่งอก หรืองอกแต่ไม่สมบูรณ์ หรือแสดงอาการคล้ายโรคเน่าคอดิน (damping off) และหากสภาพแวดล้อมเหมาะสม เชื้ออาจเข้าทำลายยอดและแสดงอาการกิ่งแห้ง (Holliday, 1980)

ภาพที่ 10 อาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก

สาเหตุของโรค

จากการสำรวจโรคแอนแทรคโนสของพริกในประเทศไทยพบว่า โรคนี้มีสาเหตุมาจากเชื้อรา 3 ชนิด ชนิดแรกทำให้เกิดแผลชนิดวงกลมหรือวงรีรูปไข่ เกิดจาก *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (*C. nigrum* Ellis & Halsted, *C. piperatum*) มี fruiting body สีเหลืองส้มและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำเมื่อแก่ ชนิดที่สองแผลขยายกว้างออกไปไม่มีขอบเขตจำกัด จนอาจทำให้แผลไม่มีรูปร่างเป็นวงกลมหรือรูปไข่อีกต่อไป ขนาดของแผลค่อนข้างใหญ่เกิดจาก *C. capsici* (*C. dematium*) ชนิดที่สามมีลักษณะคล้ายกับแผลที่เกิดจากเชื้อราชนิดแรก ต่างกันที่ไม่มี setae ปรากฏบนแผลเหมือนแผลที่เกิดจากเชื้อราสองชนิดแรก โรคแอนแทรคโนสชนิดที่สามนี้เกิดจากเชื้อรา *Gloeosporium piperatum*

ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา ***C. gloeosporioides*** และ ***C. capsici***

เชื้อรา *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. มี perfect stage คือ *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld & Schrenk (Hawksworth *et al.*, 1983) ซึ่งเป็นราพวก ascomycetes พบได้ทั่วไปในภูมิประเทศเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน มีการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวาง Sutton (1980) รายงานว่า เชื้อรานี้มีความแตกต่างกันถึง 9 forms ทั้งในด้านรูปร่าง การเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พืชอาศัยและความสามารถในการก่อให้เกิดโรค เป็นเชื้อราที่มีความผันแปรค่อนข้างสูง เชื้อราจะสร้าง acervulus ซึ่งประกอบด้วย stromatic cell แต่ละเซลล์อาจมีลักษณะยาว เรียวเล็กลงที่ส่วนปลาย (subculate) หรือรูปร่างทรงกระบอก (cylindrical) อยู่ใต้ชั้น cuticle epidermis ของพืชที่เข้าไปอาศัยอยู่ ภายใน acervulus มีการสร้างก้านชูสปอร์ (conidiophore) ที่ไม่มีสีหรือมีสีน้ำตาล มีผนังกั้นตามขวางแตกแขนงเฉพาะบริเวณฐาน conidiogenous cell มีลักษณะเป็นเซลล์สั้นๆ รูปร่างทรงกระบอก ผนังเรียบ ไม่มีสี เรียกว่า phialide ซึ่งเป็นแหล่งผลิตสปอร์ (conidium) จากผนังเซลล์ด้านใน (enteroblastic) สปอร์รูปร่างทรงกระบอก หัวท้ายมน ลักษณะตรง ไม่มีสี ขนาด 9-24 x 3-4.5 ไมโครเมตร สร้าง appressorium รูปร่างคล้ายกระบอง (clavate) ไม่แตกสาขา สีน้ำตาล ขนาด 6-20 x 4-12 ไมโครเมตร หรืออาจผันแปรในบางครั้ง

เชื้อรา *C. gloeosporioides* เป็นเชื้อราที่มีพืชอาศัยกว้างมาก สามารถเข้าทำลายพริกแล้วทำให้พริกแสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส (Mananhar *et al.*, 1995) เมื่อทำลายหอมจะทำให้เกิดเป็นโรคหอมเลื้อย (onion twister disease) (Ebnebe, 1980) และจากการศึกษาโรคหอมเลื้อยในประเทศไทย พบว่าโรคแอนแทรคโนสของหอมและโรคหอมเลื้อย

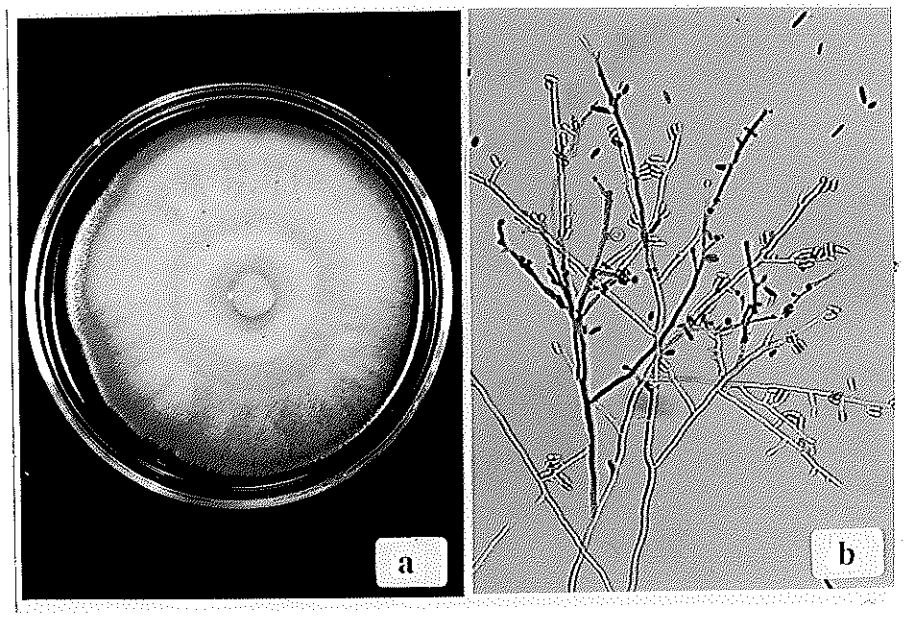
เป็นโรคเดียวกัน (นิตยา และคณะ, 2530) นอกจากนี้มีรายงานว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถเข้าทำลายยางพารา (Dodd *et al.*, 1992 อ้างจาก Tan, 1978) อะโวกาโด (Prusky *et al.*, 1985) สตรอเบอรี่ (Ellis and Bulger, 1986 และ Wilson *et al.*, 1990) มะละกอ (Dickman and Patil, 1986) มะม่วง (Spalding and Reeder, 1986) โกโก้ (Mohanan *et al.*, 1987) ฝ้าย (Holliday, 1980 และ Sutton, 1992) หญ้าสไตโล (Lenne' *et al.*, 1987 และ Chakraborty and Billard, 1995) มันแกว (Green and Simons, 1994) เป็นต้น จึงพบได้บ่อยว่ามีการตั้งชื่อให้แตกต่างกันตามชนิดของพืชอาศัยเพื่อให้ทราบถึงแหล่งที่มา มีผลให้ *C. gloeosporioides* มีชื่อพ้องได้หลายร้อยชื่อ (Bailey *et al.*, 1996 อ้างจาก Sutton, 1992) สำหรับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ก่อให้เกิดโรคบนต้นพริกนั้นจะมีชื่อเรียกว่า *C. nigrum* (Sutton, 1992)

พรพรรณ (2526) พบว่า เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกจากองุ่นที่เป็นโรคแอนแทรคโนส จะสร้างเส้นใยขาวฟู เจริญเติบโตได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มีแสง 12 ชั่วโมง สลับมืด 12 ชั่วโมง ขณะที่ สุนีย์ (2534) พบว่าเชื้อราชนิดเดียวกันนี้ที่แยกจากหอมหัวใหญ่ที่เป็นโรคหอมเลื้อย เจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร onion dextrose agar (ODA) เจริญได้ดีบนอาหาร PDA และ carrot juice agar (CJA) เจริญได้ปานกลางบนอาหาร potato carrot agar (PCA), oat meal agar (OMA) และ corn meal agar (CMA) และเจริญได้น้อยมากบนอาหาร Czapek's agar (CZA) และ potato dextrose agar + orange peel (PDA + O) เมื่อพิจารณาถึงความหนาแน่นของเส้นใย พบว่าบนอาหาร ODA, PDA, PDA + O และ CZA เส้นใยเจริญหนาแน่น และเจริญหนาแน่นปานกลาง บน PCA และ CJA ส่วนบนอาหาร OMA และ CMA เส้นใยเจริญได้เพียงบางๆ และเมื่อนำเชื้อราดังกล่าวมาศึกษาการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อราสามารถเจริญได้ทุกระดับอุณหภูมิที่ทำการทดลองในช่วง 15-35 องศาเซลเซียส โดยเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และรองลงมาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ต่างจากการศึกษาของ Mohanan และคณะ (1987) ซึ่งพบว่า เชื้อนี้สามารถเจริญและสร้างสปอร์ได้ดีบนอาหาร OMA

จากการศึกษาของ Tebeest และคณะ (1983) พบว่า สปอร์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* มีจำนวนนิวเคลียสในสปอร์ไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยง โดยสปอร์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีวุ้นเป็นส่วนผสมจะสร้างสปอร์ที่มีจำนวนนิวเคลียส 3 แบบด้วยกัน คือ สปอร์ที่มี 1 นิวเคลียส พบว่ามี 97.7%, 2 นิวเคลียส 0.4-2.2% และ 3 นิวเคลียสพบน้อยกว่า 1% แต่ถ้า

เลี้ยงในอาหารเหลวพบว่ามีความผันแปรมากกว่าอาหารแข็ง คือพบสปอร์ที่มี 1 นิวเคลียส 79% 2 นิวเคลียส 11.6-16.6% และ 3 นิวเคลียส 2.8% ในบาง isolate พบว่ามีถึง 6 นิวเคลียส

สำหรับลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และจุลสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้แสดงดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 *Colletotrichum gloeosporioides*

a. ลักษณะโคโลนีบน PDA b. จุลสัณฐานวิทยา (กำลังขยาย 200 เท่า)

เชื้อรา *C. capsici* พบได้ทั่วไปในเขตร้อนและเขตอบอุ่น (Holliday, 1980; Manandhar *et al.*, 1995 และ Pring *et al.*, 1995) เป็นเชื้อราชนิดเดียวกันกับ *C. dematium* (Pring *et al.*, 1995 อ้างจาก Arx, 1957 และ Verma, 1973) *C. circinans* (Sutton, 1992) และ *C. trucatum* (Holliday, 1980) เชื้อ *C. capsici* สร้าง acervulus บนผล ใบ หรือลำต้น มีลักษณะกลมหรือยาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 350 ไมโครเมตร มีทั้งแบบ intra และ subepidermal กระจายอยู่บริเวณ epidermal cell wall ของพืชอาศัย สร้าง setae สีน้ำตาลที่มีผนังกั้น 1-5 ชั้น แข็ง มีลักษณะป่องตรงส่วนฐานแล้วค่อยๆเรียวไปสู่บริเวณปลาย บางครั้งพบว่า setae มีความยาวถึง 250 ไมโครเมตร และ กว้าง 5-8 ไมโครเมตร สปอร์มีสีครีมอ่อนหรือไม่มีสี เป็นรูปเคียวหรือพระจันทร์เสี้ยว (falcate) ปลายข้างหนึ่งแหลมอีกปลายค่อนข้าง

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีศุนทร

มน ไม่มีผนังกั้น มีหลายนิวเคลียส (multinucleate) ขนาด 16-30 x 2.5-4 ไมโครเมตร สปอร์ถูกสร้างจาก phialidic conidiophore ซึ่งมีรูปทรงกระบอก ไม่มีผนังกั้น ใสไม่มีสีจนถึงสีน้ำตาลอ่อน สร้าง appressorium สีน้ำตาลแดงเข้ม (sepia brown) ขนาด 6-25 x 4-10 ไมโครเมตร เมื่อเลี้ยงไว้เป็นเวลาหลายวันหรือสร้างบน slide culture (Holliday, 1980)

เชื้อรา *C. capsici* เป็นเชื้อราที่มีพืชอาศัยมากกว่า 176 สกุล (Robert and Snow, 1990 อ้างจาก Sutton, 1980) และไม่มีความจำเพาะเจาะจงกับพืชอาศัย เชื้อที่แยกได้จากพริกสามารถเข้าทำลายพืชชนิดอื่นๆได้ และทำให้พืชแสดงอาการได้หลายอย่าง เช่น damping-off, seedling blight, collar rot, stem canker, leaf spot, leaf blight, die-back, anthracnose และ fruit rot พืชอาศัยของเชื้อที่มีรายงานในประเทศไทย ได้แก่ มะเขือเทศ พริก ถั่วฝักยาว มะละกอ ขมิ้น (ศุภลักษณ์, บรรณาธิการ, 2536) สำหรับต่างประเทศมีรายงานว่าเชื้อเข้าทำลายพืชได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น แคบ้าน ถั่วกัว (ศุภลักษณ์, บรรณาธิการ, 2536) ฝ้าย (Robert and Snow, 1981, 1984) ขมิ้น (Palarpawar, 1987) พลู (Balasubrahmanyam *et al.*, 1988) ถั่ว urd (Kumar *et al.*, 1989) pitted morningglory (Cartwright and Templeton, 1992) มะเขือเทศ (Okoli and Erinle, 1990) และพืชมีฝักอีกหลายชนิดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 พืชมีฝัก ที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อ *C. capsici* (ดัดแปลงจาก Lenne', 1992)

Host	Distribution	Source
Acacia empliceps	India	IMI (1988)
A. tortilis	India	IMI (1987)
Acacia sp.	India	IMI (1987)
Albizia lebbek	Burma, India	IMI (1972, 1968)
A. falcataria	India	IMI (1988)
Arachis hypogaea (peanut, groundnut)	Australia,N. Borneo, Gambia, Ghana, India, Malaysia, Malawi, Nigeria, Solomon Island, Tanzania, Sudan, Zambia	IMI (1974, 1952,1962+, 1955, 1960+, 1972, 1965+, 1958+, 1974, 1984, 1952, 1960+)
A. villosa	Nigeria	IMI (1970)
Arachis sp.	India	IMI (1984)
Cassia occidentalis	Bangladesh, Canary Island, India, Sierra Leone	IMI (1970, 1954,1976, 1949)
C. tora	India	IMI (1970)
Cassia sp.	Venezuela	IMI (1969)+
Cicer arietinum (chickpea)	India	Allen (1983)
Clitoria ternata	Brunei, India, Sudan	IMI (1973, 1972, 1956)
Crotalaria juncea (sunn hemp)	Zimbabwe, India	IMI (1961, 1976)
C. mucronata	Malaysia	IMI (1973)
C. spectabilis	India	IMI (1964)
Crotalaria sp.	Zambia	IMI (1966)
Desmodium gangeticum	India	IMI (1968)
D. velutinum	Sierra Leone	IMI (1935)
Glycine max (soybean)	Argentina, Australia, Brunei, Colombia, India, Malaysia, Mozambique, Papua New Guinea	IMI (1975, 1973, 1978, 1973, 1984, 1978, 1984, 1973)
G. soja	Australia, Fiji, India	IMI (1983, 1968, 1972+)
Indigofera nummulariaefolia	Zambia	IMI (1963)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Host	Distribution	Source
Indigofera sp.	Zambia	IMI (1962)
Lablab purpureus (lablab, hyacinth bean)	Hong Kong, India	IMI (1962, 1982)
Leucaena leucocephala (leucaena)	India	IMI (1984)
Leucaena sp.	India	IMI (1985)
Macrotyloma uniflorum (brown horse gram)	India	IMI (1977+)
Medicago sativa (lucerne)	Tanzania, Venezuela	IMI (1943, 1974)
Pachyrhizuz erosus (yam bean)	Malaysia	IMI (1971)
Parkia sp.	India	IMI (1985)
Pisum sativum (pea)	India, Sierra Leone	IMI (1974,1954)
Psophocarpus tetragonolobus (wing bean)	Brunei, India, Philippines	IMI (1976, 1981, 1945)
Prosopis juliflora	India	IMI (1969)
Stylosanthes humilis (Townsville stylo)	Australia	IMI (1975)
Vigna mungo (urd bean)	India	Raj Kumar et al. (1989)
V. unguiculata (cowpea)	Brunei, Cuba, Gambia, Hong Kong, India, Jamaica, Malaysia, Solomon Islands	IMI (1975, 1967, 1977, 1962, 1974, 1944+, 1959+, 1974)

IMI International Mycological Institute Herbarium Accession Record.

\+ More than one sample from the country exists in the IMI Herbarium; the date of the first accession only is given.

สุวิทย์ (2537) พบว่า เชื้อรา *C. capsici* ที่แยกจากผลพริกที่เป็นโรคสามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA , CZA, malt extract agar (MA), PDA, glucose peptone agar (GPA) และ CMA และสร้างสปอร์ได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, CMA, CZA, GPA, PCA และ MA ตามลำดับ Cartwright และ Templeton (1992) รายงานว่าเชื้อรา *C. capsici* ที่ก่อให้เกิดโรคกับ pitted morningglory สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม streptomycin และสปอร์ของเชื้อรานี้สามารถงอกได้ที่อุณหภูมิ 15, 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส สปอร์จะงอกได้ดีที่สุด

วงจรของโรค

เชื้อราเข้าทำลายพืชโดยทางตรง หรือทางแผลที่ใบและผล ที่ผลจะเกิดอาการของโรคภายใน 5 วัน หลังจากถูกเชื้อเข้าทำลาย (Sherf and Macnab, 1986)

การแพร่ระบาด

แพร่ระบาดได้โดยอาศัยลมและฝน ติดไปกับเครื่องมือเพาะปลูก หรือโดยแมลงที่บินไปเกาะบนเมือกสีชมพูอมส้ม ทำให้สปอร์ติดไปกับขาของแมลง (นิพนธ์, บรรณาธิการ, 2523)

สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม

โรคระบาดมากเมื่อมีความชื้นสัมพัทธ์ 95% อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และจะลดลงเมื่อความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่า 70% นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อราเจริญได้ดีเมื่อมีหมอก น้ำค้าง และฝนตกพรำๆ (Sherf and Macnab, 1986)

การอยู่ข้ามฤดู

เชื้ออยู่ข้ามฤดูได้โดยติดไปกับเมล็ด จากการทดลองพบว่า เชื้อสามารถถ่ายทอดทางเมล็ดได้ร้อยละ 50-90 เชื้อติดไปกับเมล็ดได้โดยอาศัยอยู่ที่เยื่อหุ้มเมล็ด ทำให้เมล็ดไม่งอก หรือเกิดอาการ seedling blight (นิพนธ์, บรรณาธิการ, 2523) และสามารถมีชีวิตอยู่ในเมล็ดพันธุ์ได้อย่างน้อย 9 เดือน (Holliday, 1980 อ้างจาก Smith *et al.*, 1958) Grover และ Bansal (1970) ได้ศึกษาการเป็น seed borne ของเชื้อราชนิดนี้และพบว่า เมล็ดจากผลที่เป็นโรคจะเป็นโรคร้อยละ 94 และทำให้ต้นอ่อนตายถึงร้อยละ 70 นอกจากนี้เชื้อยังติดไปกับเศษซากพืชที่เป็นโรคและพืชในสกุล Solanaceae บางชนิด (นิพนธ์, บรรณาธิการ, 2523) และมีชีวิตอยู่รอดบนซากพืชได้นานกว่า 3 ปี (Grover and Bansal, 1970)

การป้องกันกำจัด

1. ควรเก็บเมล็ดพันธุ์จากแปลงที่ไม่เป็นโรค แต่ถ้าจำเป็นต้องเก็บจากแปลงที่เป็นโรค ก่อนปลูกควรทำ seed treatment โดยแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาทีหรือแช่ในสารละลาย copper sulfate (1 ออนซ์ในน้ำ 4 แกลลอน) 10 นาที หรือคลุกเมล็ดด้วย Thiram, Vitavax, Bisdithane และ Brassicol (Sherf and Macnab, 1986)

2. ปลูกพืชหมุนเวียนสลับกับพืชที่ไม่อยู่ในสกุล Solanaceae และหมั่นกำจัดวัชพืช จัดการระบายน้ำให้ดี ตลอดจนการทำลายเศษซากพืชที่เป็นโรค (นิพนธ์, บรรณาธิการ, 2523)

3. หลังจากเก็บพริกจากต้นและอยู่ในระหว่างการขนส่ง ควรเก็บไว้ในที่เย็น ภายใต้อุณหภูมิคงที่ พริกจะไม่ค่อยเกิดโรค (นิพนธ์, บรรณาธิการ, 2523) Sherf และ Macnab (1986) รายงานว่าถ้าเก็บผลพริกไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จะสามารถเก็บไว้ได้นาน 30 วัน โดยไม่มีอาการของโรค

4. เมื่อต้นพริกโตแล้ว ฉีดยาพวก Captan, Ziram ในอัตราส่วน 2:100 ทุกๆ 7 วัน หรือใช้ยา Benlate และ Folcidin ซึ่งเป็นยาฆ่าเชื้อราประเภทดูดซึมในอัตรา 12 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ทุกๆ 5 วัน สามารถป้องกันไม่ให้เกิดโรคได้ (นิพนธ์, บรรณาธิการ, 2523)

5. ควรเพิ่มปุ๋ยโปแตสเซียม เพื่อช่วยให้พริกแข็งแรง มีความต้านทานต่อโรคสูง พร้อมกับปรับดินให้มี pH 6-6.8 จะช่วยให้ปุ๋ยชนิดนี้ละลายเป็นประโยชน์ต่อพืชมากขึ้น (สุดฤดี, 2527)

2.2 โรคใบจุด

โรคนี้ระบาดกับผักสกุลกะหล่ำทุกชนิด เช่น คะน้า กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก กะหล่ำดาว กะหล่ำปม กะหล่ำดอกอิตาเลียน ผักกวางตุ้ง เรดิช เทอร์นิพ รูทาบาก้า เป็นต้น เข้าทำลายผักได้ทุกส่วน และทุกระยะการเจริญเติบโต เป็นโรคสำคัญโรคหนึ่งที่เป็นอุปสรรคต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ผักสกุลกะหล่ำในภาคเหนือของประเทศไทย (ศุภลักษณ์, 2527)

อาการของโรค

อาการของโรคจะปรากฏหลังการงอกของสปอร์โดยเห็นเป็นจุดสีดำบนต้นกล้า และขยายลุกลามทำให้ต้นกล้าแสดงอาการเน่าคอดิน (damping off) หรือเกิดอาการแคระเกร็น (stunting) หากย้ายไปปลูกจะได้พืชที่ไม่สมบูรณ์ เจริญเติบโตได้ช้า และให้ผลไม่เต็มที่ ในต้นแก่จะเกิดแผลจุดขึ้นบนใบ โดยเริ่มจากจุดเซลล์ตายเล็กๆ สีเหลือง ต่อมาขยายโตขึ้นและ

เปลี่ยนเป็นสีดำ เมื่อแผลแห้งจะเกิดจุดเล็กๆสีน้ำตาลเข้มหรือดำขึ้นเป็นวงค่อนข้างกลมเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ (concentric circle) จุดสีดำดังกล่าวคือกลุ่มของสปอร์ของเชื้อราที่สร้างขึ้นเพื่อใช้ในการแพร่กระจายหรือขยายพันธุ์ แผลมีขนาดต่างกัน ตั้งแต่เป็นจุดเล็กๆ จนถึงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 นิ้ว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความรุนแรงและส่วนหรือชนิดของพืชที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย

พืชหัว เช่น แรดิช เทอร์นิป และกะหล่ำปม เมื่อเกิดโรคขึ้นที่ใบอาจมีผลต่อเนื่องไปถึงหัวที่อยู่ในดินซึ่งมีอยู่ในขณะนั้นด้วย ซึ่งจะแสดงอาการให้เห็นหลังจากเก็บเกี่ยวแล้ว โดยเกิดแผลจุดแผลสีน้ำตาลหรือดำคล้ำ ถ้าหัวของพืชเหล่านี้ถูกเก็บไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิและความชื้นค่อนข้างสูง บริเวณแผลจะมีเส้นใยสีขาวและสปอร์ของเชื้อที่เป็นสาเหตุโรคขึ้นอยู่ทั่วไป

สำหรับกะหล่ำปลีหากเกิดโรคขึ้นหลังจากที่ห่อหัวแล้ว และสิ่งแวดล้อมเหมาะสมมากๆ อาจก่อให้เกิดอาการเน่าขึ้นอย่างรุนแรงจนเสียหมดทั้งหัว ส่วนกะหล่ำดอก และบร็อกคอลี หากเชื้อเข้าทำลายส่วนดอก จะทำให้เกิดแผลสีน้ำตาล โดยเริ่มจากช่อดอกที่อยู่ริมด้านนอกเข้ามา หากเป็นรุนแรงดอกทั้งดอกจะถูกทำลายหมด

สำหรับต้นที่ให้ดอกหรือติดฝักแล้วเชื้อจะเข้าทำลายที่ก้านดอกและฝักเกิดเป็นแผลสีน้ำตาลเข้มหรือดำ อาจกลมหรือยาวรีไปตามลักษณะของก้านมองเห็นชัดเจน แผลเหล่านี้หากเกิดขึ้นมากๆ มีผลทำให้ช่อดอกแห้งทั้งช่อ ซึ่งจะทำให้ฝักที่มีอยู่แห้งฝ่อไม่มีการสร้างเมล็ดแต่ถ้าโรคเกิดขึ้นหลังจากติดเมล็ดหรือฝักแก่แล้ว เมล็ดอาจถูกเชื้อเข้าทำลายด้วย เกิดเป็น seed borne ระบาดหรือไปเกิดโรคขึ้นกับต้นใหม่ที่งอกจากเมล็ดนั้นได้ (ศักดิ์, 2530 และ Sherf and Macnab, 1986)

เชื้อสาเหตุโรค

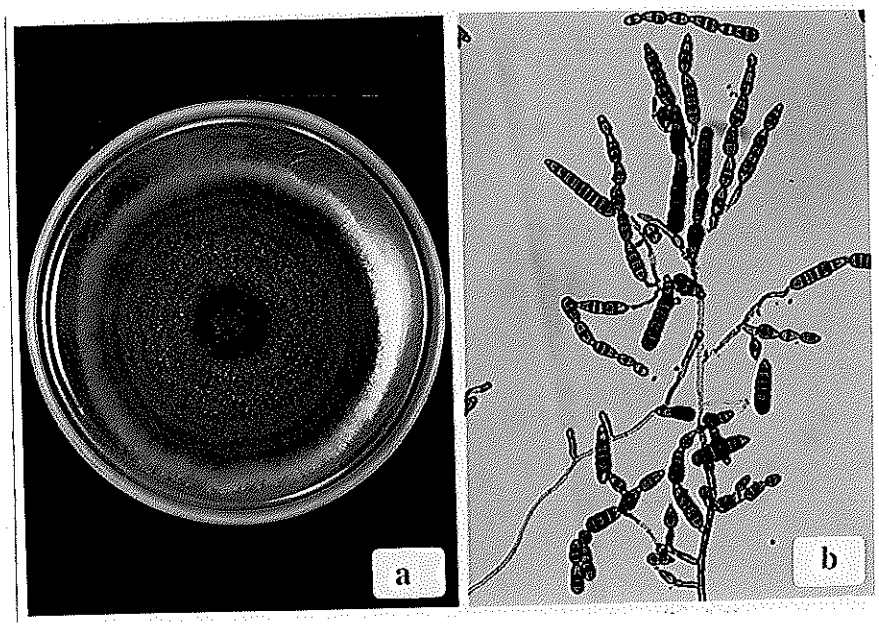
เชื้อรา *Alternaria* ที่สามารถเข้าทำลายผักสกุลกะหล่ำได้ มี 3 ชนิด (species) ชนิดแรกคือ *A. brassicae* มีก้านชูสปอร์สีน้ำตาล สปอร์มีความยาว 80-252 ไมโครเมตร บางครั้งพบว่าประกอบด้วยเซลล์ย่อยๆถึง 12 เซลล์ ส่วนปลายของสปอร์หรือส่วนคอ (beak) ค่อนข้างยาวเมื่อเทียบกับชนิดอื่น เชื้อราชนิดที่ 2 คือ *A. brassicicola* มีก้านชูสปอร์สีน้ำตาลเช่นเดียวกัน แต่ความยาวของสปอร์สั้นกว่าชนิดแรก คือมีขนาด 14-86 ไมโครเมตร ประกอบด้วยเซลล์ย่อยๆ ไม่เกิน 9 เซลล์ มักไม่พบว่ามี beak และสปอร์เกิดต่อกันเป็นสายยาว ขนาดของรอยแผลที่เกิดจากเชื้อ *A. brassicicola* เล็กกว่ารอยแผลที่เกิดจากเชื้อ *A. brassicae*

สำหรับเชื้อราชนิดที่ 3 คือ *A. raphani* มีความสำคัญน้อย เพราะก่อให้เกิดโรคกับแรดิชเท่านั้น สปอร์ของเชื้อราชนิดนี้ยาว 40-141 ไมโครเมตร ประกอบด้วยเซลล์ย่อยๆ ไม่เกิน 10 เซลล์ beak มีขนาดสั้น และมีการเรียงต่อกันของสปอร์เป็นสายสั้นๆ (Holliday, 1980 และ Sherf and Macnab, 1986)

พัฒนา และคณะ (2526) ได้ศึกษาตัวอย่างพืชผักบางชนิดที่เป็นโรคใบจุดที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria* spp. ในท้องที่ของจังหวัดในภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ระหว่างเดือนตุลาคม 2524 ถึงเดือนกันยายน 2525 พบว่ามีเชื้อรา 2 ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดในผักสกุลกะหล่ำ (ผักคะน้า, ผักกาดขาวปลี, ผักกาดเขียว, กวางตุ้ง, กะหล่ำปลี, กะหล่ำดอก, กะหล่ำปม และบร็อกคอลี) คือ *A. brassicae* (Berk.) Sacc. และ *A. brassicicola* Schw.

ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา ***A. brassicicola***

โคโลนีสีน้ำตาลอมเขียว (olivaceous brown) จนถึงสีน้ำตาลดำ (dark blackish brown) ในระยะแรกเส้นใยไม่มีสี ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลอมเขียว ผิวเรียบ กว้าง 1.5-1.7 ไมโครเมตร ก้านชูสปอร์เป็นแบบมีผนังกั้น สีน้ำตาลอมเขียว บางครั้งพบว่ายาวถึง 70 ไมโครเมตร กว้าง 5-8 ไมโครเมตร ก้านชูสปอร์อยู่เดี่ยวๆหรืออยู่เป็นกลุ่ม 2-12 อัน หรือมากกว่านั้น อาจมีรูปร่างเป็นทรงกระบอกหรือไม่ก็ได้ แต่จะค่อยๆโป่งออกตรงบริเวณฐาน สปอร์มีรูปร่างใกล้เคียงกับทรงกระบอกที่ค่อยๆเรียวไปยังส่วนปลาย หรือมีรูปทรงแบบรูปกระบองหัวกลับ (obclavate) เซลล์บริเวณฐาน (basal cell) มีลักษณะโค้งมน ส่วนใหญ่จะไม่พบ beak (ถ้าพบ จะมีขนาดเท่ากับ 1/6 เท่าของขนาดสปอร์และกว้าง 6-8 ไมโครเมตร) เซลล์บริเวณปลาย (apical cell) มีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า (rectancular) หรือรูปกรวยสั้น (truncate cone) มีผนังกั้นตามขวาง 1-11 อันและมีผนังกั้นตามยาว 0-6 อัน บ่อยครั้งที่พบว่ามีรอยคอดเกิดขึ้นบริเวณที่มีผนังกั้น สปอร์มีสีน้ำตาลอมเขียว ผิวเรียบหรือมีปุ่มเล็กน้อย ส่วนที่กว้างที่สุดของสปอร์มีขนาด 18-130 x 8-30 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่แล้วสปอร์จะต่อกันเป็นสายอาจมีความยาวถึง 20 สปอร์หรือมากกว่านั้น บางครั้งจะมีการแตกแขนง (Holliday, 1980) (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 *เชื้อ Alternaria brassicicola*

a. ลักษณะโคโลนีบน PDA b. จุลสัณฐานวิทยา (กำลังขยาย 200 เท่า)

วงจรของโรค

เชื้อเข้าทำลายผักทางปากใบและบาดแผล สำหรับผักที่อ่อนแอมาก เช่น กะหล่ำดอก ระยะเวลาที่สปอร์งอกจนกระทั่งเข้าทำลายพืชใช้เวลา 2 วัน ส่วนผักที่ต้านทานต่อโรค เช่น rape ใช้เวลา 9-14 วัน (Sherf and Macnab, 1986)

การแพร่ระบาด

ส่วนใหญ่แพร่ระบาดโดยลม ฝน หรือติดไปกับเครื่องมือเพาะปลูก คน สัตว์ (Sherf and Macnab, 1986) และเมล็ดพันธุ์ (ศุภลักษณ์, 2527 และ Valkonen and Koponen, 1990 อ้างจาก Neergaad, 1977)

สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม

จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการ พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *A. brassicae* เท่ากับ 24 องศาเซลเซียส ขณะที่ของเชื้อ *A. brassicicola* จะสูงกว่าเล็กน้อย คือที่ 25-27 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการก่อให้เกิดโรคบนต้นพืช จะเท่ากับ 25-30 องศาเซลเซียส โรคระบาดได้มากเมื่อมีความชื้นสูง (Holliday, 1980) ขณะที่ Rangel (1945) รายงานว่า ถ้าเชื้อได้รับความชื้นน้อยกว่า 9 ชั่วโมง จะไม่ทำให้ต้นพืชเป็นโรค

การอยู่ข้ามฤดู

เชื้ออยู่ข้ามฤดูได้ในเศษซากพืชที่เป็นโรค วัชพืช หรืออยู่ในเยื่อหุ้มเมล็ดของเมล็ดพันธุ์ Rangel (1945) รายงานว่าเมื่อเก็บสปอร์ของเชื้อ *A. brassicicola* ไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 เดือน เมื่อนำมาศึกษาการมีชีวิต พบว่า สปอร์ของเชื้อนี้ยังคงมีอัตราการงอกสูง

การป้องกันกำจัด

1. ก่อนปลูกควรทำ seed treatment ซึ่งสามารถทำได้หลายแบบ (Rangel, 1945) คือ

1.1 แช่ในน้ำร้อน อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1.2 แช่ใน แอลกอฮอล์ 95% แล้วแช่ด้วย corrosive sublimate 1-1000 เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำ 4 ครั้ง

1.3 แช่ใน แอลกอฮอล์ 95% แล้วแช่ด้วย corrosive sublimate 1-1000 เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงล้างด้วย คลอร็อกซ์ 25% 2 ครั้ง

1.4 แช่ใน คลอร็อกซ์ 25% เป็นเวลา 5 นาที

2. กำจัดวัชพืชและเศษซากพืชที่เป็นโรค

3. ไม่ควรให้น้ำแบบ sprinkle

4. ปลูกพืชหมุนเวียน

5. ยาป้องกันกำจัดเชื้อราทุกชนิดใช้ได้ผลดีกับโรคนี้ แต่ยา benomyl และกำมะถันจะใช้ได้ผลดี ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส ดังนั้นยาทั้ง 2 ชนิดนี้จึงใช้ไม่ได้ผลในประเทศเขตร้อน เช่นประเทศไทย (ศุภลักษณ์, 2527) การใช้ยากำจัดเชื้อรานั้นจะมีการใช้ทั้งในแปลงปลูกและใช้แช่ผักก่อนเก็บรักษา (Leifert *et al.*, 1993 อ้างจาก Brown *et al.*, 1975)

6. ใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *Aurobasidium pullulan, Epicoccum nigrum, Chaetomium globosum, Trichoderma harzianum, T. koninggii, Fusarium* sp. (Marguaret and Campbell, 1974; Sherf and Macnab, 1986 และ Vannacci and Harman, 1987) และเชื้อ *Streptomyces griseoviridis* (Valkonen and Koponen, 1990) ซึ่งเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ของเชื้อ *A. brassicicola* ในการควบคุมโรค

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านราของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าลิงและใบเสม็ด พิเพอรีน และซาโปนินส์จากสารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่และผลมะคำดีควาย ต่อเชื้อราก่อโรคพืชบางชนิด คือ *C. gleosporioides* และ *A. brassicicola*
2. เพื่อศึกษาผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยหรือพิเพอรีนร่วมกับซาโปนินส์ในการต้านเชื้อรา *C. gleosporioides* และ *A. brassicicola*
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย พิเพอรีนและซาโปนินส์ต่อการงอกของสปอร์ *C. gleosporioides* และ *A. brassicicola*
5. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดในการต้านโรคแอนแทรคโนสพริกชี้ฟ้าในห้องทดลอง
6. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดในการต้านโรคใบจุดคะน้าในห้องทดลอง
7. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อรา *C. gleosporioides* ได้ดีในห้องทดลอง ต่อการต้านโรคแอนแทรคโนสพริกในแปลงทดลอง

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. สารสกัดจากพืชสมุนไพร

1.1 น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าลิง (*Alpinia conchigera*)

1.2 น้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ด (*Melaleuca leucadendron*)

1.3 พิเพอรีนจากเมล็ดพริกไทยดำ (*Piper nigrum*)

1.4 สารสกัดจากใบกระดูกไก่ (*Maesa ramentacea*)

1.5 สารสกัดจากผลมะคำดีควาย (*Sapindus emarginatus*)

สารสกัด 1.1 ถึง 1.3 ทำการสกัดที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สารสกัด 1.4 และ 1.5 ได้รับจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. เชื้อรา

เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนส และ เชื้อรา *A. brassicicola* ที่แยกได้จากใบคะน้าที่เป็นโรคใบจุด ได้รับจากภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3. สารเคมี

ไดคลอโรมีเธน (dichloromethane)	ของบริษัท	Merck
เมธานอล (methanol)	ของบริษัท	Merck
เอธานอล (ethanol)	ของบริษัท	J.T. Baker
คลอร็อกซ์ (clorox)	ของบริษัท	Clorox

ไดเมธิล ซัลโฟไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) ของบริษัท Merck

แอ็ปซ่า-80 (APSA-80)	ของบริษัท	Amway
เบนโนมิล (benomyl)	ของบริษัท	ดูปองท์ (ประเทศไทย)
อะซีโตน (acetone)	ของบริษัท	Carlo Erba
เด็กซ์โทรส (dextrose)	ของบริษัท	Fluka
วุ้น (agar)	ของบริษัท	Difco

อุปกรณ์

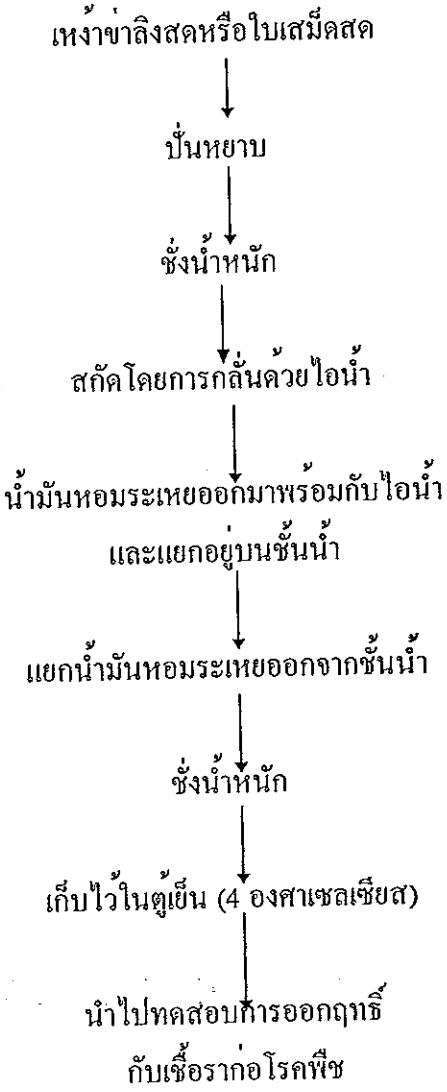
เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด
ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven)
หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
เตาแม่เหล็ก (stirring heating plate)
เครื่องกรอง (millipore membrane filter)
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
ไมโครปิเปตต์ (micro pipette)
เครื่องเขย่าหลอด (vortex mixer)
เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)
ตะเกียงแก๊ส (bunsen burner)
ที่เจาะเชื้อ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
กล้องสเตอริโอซูม (stereo zoom)
เครื่องนับเซลล์ (hemacytometer)
เครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator)
จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 และ 15 เซนติเมตร
สไลด์หลุม
เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น

วิธีการ

1. การสกัดสารจากพืช

1.1 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าลิงและใบเสม็ด

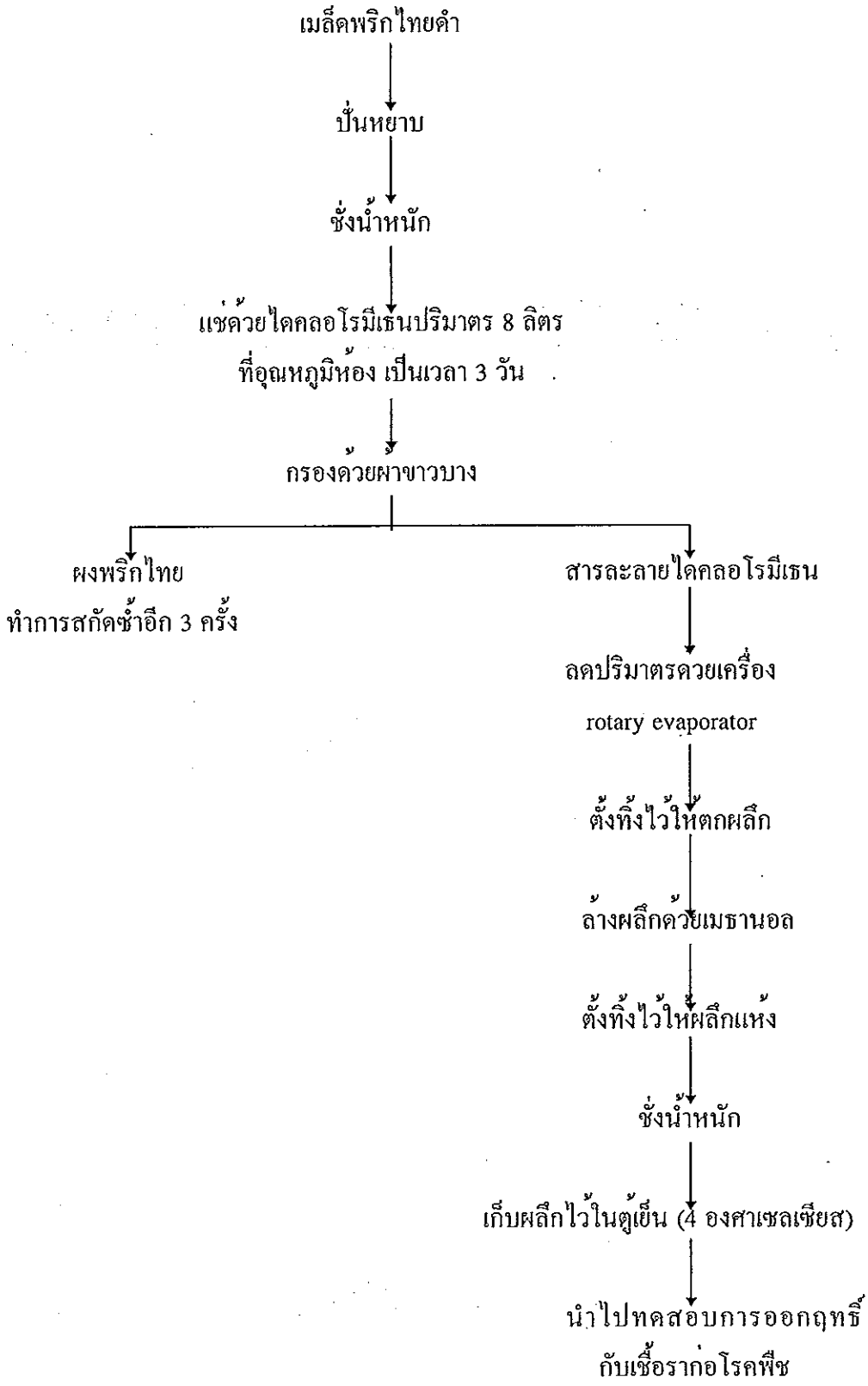
ขั้นตอนการสกัด ดังแสดงในภาพที่ 13 นำเหง้าข่าลิงสดหรือใบเสม็ดสดไปปั่นหยาบ ชั่งน้ำหนัก แล้วจึงนำมากลั่นด้วยไอน้ำ น้ำมันหอมระเหยจะออกมาพร้อมกับไอน้ำและแยกอยู่ชั้นบน จากนั้นจึงแยกออกจากชั้นน้ำ ชั่งน้ำหนักและเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 13 ขั้นตอนการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าลิงและใบเสม็ด

1.2 การแยกพิเพอรีนจากเมล็ดพริกไทยดำ

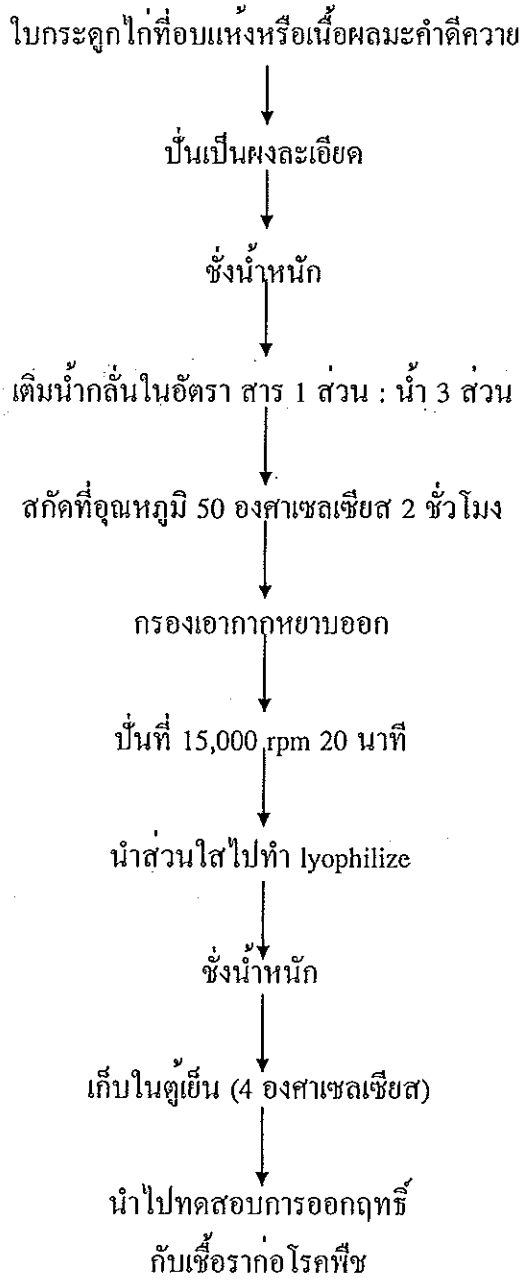
นำพริกไทยดำไปปั่นหยาบ ชั่งน้ำหนัก นำไปแช่ในไดคลอโรมีเธนปริมาตร 8 ลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน กรองสารละลายไดคลอโรมีเธน แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) จากนั้นวางทิ้งไว้ให้ตกผลึก ล้างผลึกด้วยเมธานอล ตั้งทิ้งไว้ให้ผลึกแห้ง ขั้นตอนการแยกดังแสดงในภาพที่ 14 ทำการสกัดพริกไทยดำที่บดแล้วซ้ำอีก 3 ครั้ง โดยใช้ตัวทำละลายเดิมและแยกพิเพอรีนด้วยกระบวนการที่กล่าวมาแล้ว ชั่งน้ำหนักและเก็บพิเพอรีนไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปทดสอบการออกฤทธิ์กับเชื้อราก่อโรคพืชต่อไป



ภาพที่ 14 ขั้นตอนการแยกพิเพอรีนจากเมล็ดพริกไทยดำ

1.3 การสกัดใบกระดูกไก่และผลมะคำดีควายด้วยน้ำ

การเตรียมสารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่และผลมะคำดีควาย โดยภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มีขั้นตอนการสกัดดังแสดงในภาพที่ 15 โดยนำใบกระดูกไก่ที่อบแห้งและเนื้อผลมะคำดีควายมาปั่นให้เป็นผงละเอียด นำมาสกัดสารโดยผสมน้ำกลั่น โดยใช้ผง 1 ส่วน เติมน้ำ 3 ส่วน อุ่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองเอากากหยาบออก นำสารละลายไปปั่นด้วยอัตราเร็ว 15,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกกากละเอียดออก นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปทำ lyophilize ชั่งน้ำหนักและเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



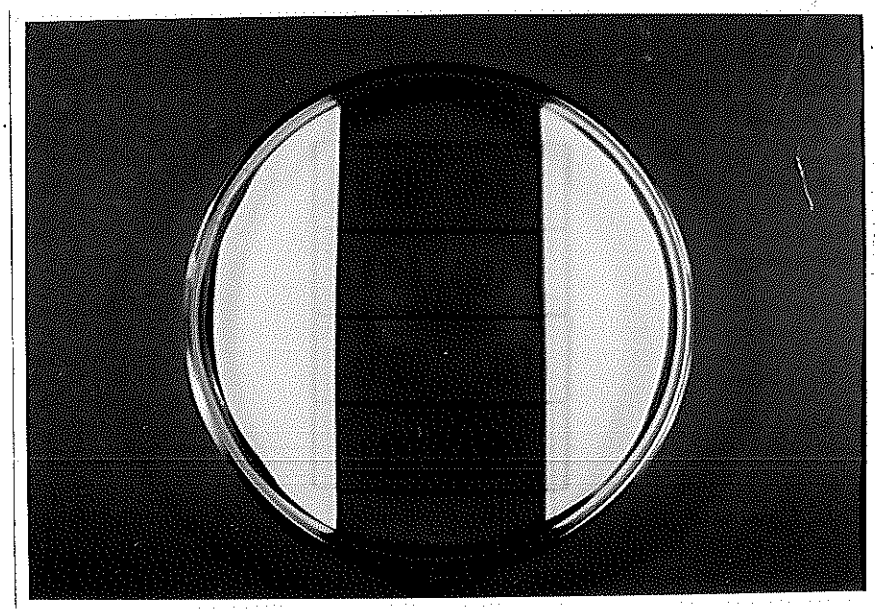
ภาพที่ 15 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่และผลมะคำดีควาย

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสายราในสไลด์หลุม

ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสายราในสไลด์หลุม ตามวิธีการของ Picman และคณะ (1990) ดังนี้

2.1 การเตรียมสไลด์หลุม

ใช้ปากคีบจุ่ม เอธานอล 95% ลนไฟ ปล่อยให้เย็น คีบสไลด์หลุมไร้เชื้อ วางบนกระดาษกรองที่บรรจุในจานไร้เชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร (ภาพที่ 16) ใช้หลอดหยดดูดน้ำกลั่นไร้เชื้อ หยดลงในแผ่นกระดาษกรองให้ชุ่ม



ภาพที่ 16 การเตรียมสไลด์หลุม

2.2 การเตรียมอาหารวุ้นผสมสารที่ใช้ในการทดสอบ

เตรียมสารสกัดแต่ละตัวให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution ในตู้เย็น สำหรับน้ำมันหอมระเหยและพิเพอรีนใช้ เอธานอล 95% เป็นตัวทำละลาย ส่วนสารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่และผลมะคำดีควายใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

ในแต่ละการทดลอง เตรียมสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ กัน ให้มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นที่ผสมอาหารวุ้นแล้ว ผสมสารที่ใช้ทดสอบหรือตัวทำละลายสำหรับชุดควบคุมปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับอาหารวุ้น PDA ไร้เชื้อ ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ที่หลอมเหลวอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้ไมโครปิเปตดูดอาหารวุ้นที่ผสมแล้ว 100

ไมโครลิตร หยดลงในหลุม เกลี่ยให้อาหารวุ้นกระจายเต็มหลุม ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อาหารวุ้นแข็งตัว โดยแต่ละความเข้มข้นทำ 8 ซ้ำ

ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสายราเบื้องต้น เตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เป็น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) เตรียมสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ กันแบบลำดับสอง (serial 2-fold dilution) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 50 - 0.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในการทดลองนี้ใช้สารต้านราเบนโนมิล เป็นสารทดสอบเปรียบเทียบ โดยละลายเบนโนมิล ใน DMSO แล้วเจือจางต่อด้วย เอธานอล 95%

2.3 วิธีการทดสอบการยับยั้งการเจริญของสายรา

เพาะเลี้ยงเชื้อราที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้องจนได้ขนาดโคโลนีที่เหมาะสม (*C. gloeosporioides* 5 วัน และ *A. brassicicola* 4 วัน) ใช้ที่เจาะรูไร้เชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.25 มิลลิเมตร เจาะสายรารอบโคโลนี ใช้เข็มเขี่ยเขี่ยชิ้นวุ้นที่มีสายราไปวางที่จุดกึ่งกลางหลุมที่มีอาหารวุ้น ให้ด้านที่มีสายราสัมผัสกับอาหารวุ้น โดยทำภายใต้กล้องสเตอริโอซูม แล้วนำจานทดสอบทั้งหมดบรรจุในถุงพลาสติก เพื่อป้องกันไม่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง บ่มไว้ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

2.4 การอ่านผลและแปลผล

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา โดยใช้ไมโครมิเตอร์ ภายใต้กล้องสเตอริโอซูม โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในแต่ละหลุม 2 ค่าที่ตั้งฉากกัน คำนวณค่าเฉลี่ย เพื่อนำไปหาค่า MIC โดยนำค่าเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของชุดทดสอบแต่ละความเข้มข้นไปเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยใช้ 2-sample T test จากโปรแกรมสำเร็จรูป Statistix เพื่อพิจารณาว่า เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีจากหลุมทดสอบถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ (โดยใช้ค่า $P < 0.05$)

ค่า MIC เป็นค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารที่ยับยั้งการเจริญของสายราที่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

สำหรับค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา หาได้จากสูตร (Gamliel *et al.*,1989)

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = 100 - (R^2 / r^2) \times 100$$

R = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีของราจากจานที่มีสารทดสอบ

r = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีของราจากจานควบคุม

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านราร่วมกันของน้ำมันหอมระเหยหรือพิเพอรีนกับซาโปนินส์จากสารสกัดด้วยน้ำ

3.1 สารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

สารสกัดที่นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านราร่วมกันมีดังนี้

2.1.1 น้ำมันข่าลิงกับสารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่

2.1.2 น้ำมันข่าลิงกับสารสกัดด้วยน้ำจากผลมะคำดีควาย

2.1.3 น้ำมันเสม็ดกับสารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่

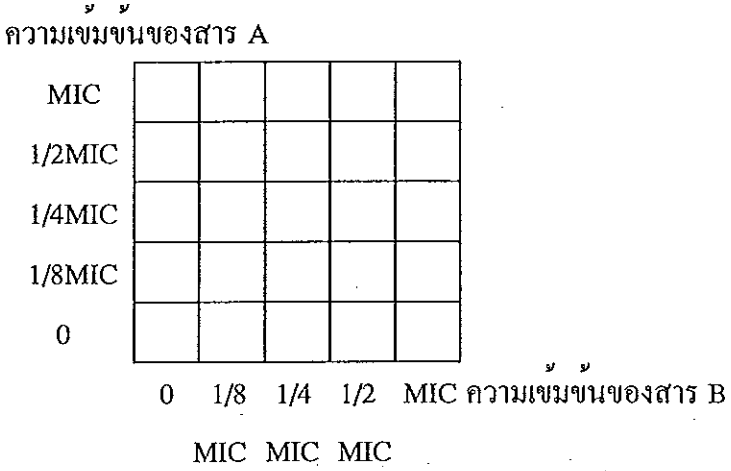
2.1.4 น้ำมันเสม็ดกับสารสกัดด้วยน้ำจากผลมะคำดีควาย

2.1.5 พิเพอรีนกับสารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่

2.1.6 พิเพอรีนกับสารสกัดด้วยน้ำจากผลมะคำดีควาย

3.2 วิธีการทดสอบ

ทำการทดสอบโดยดัดแปลงจากวิธี Checkerboard (Lorian, 1991) วิธีการทดลอง คือ ทำการเจือจางสารสกัดแต่ละคู่ที่จะทดสอบฤทธิ์ต้านราร่วมกันให้มีความเข้มข้นเป็น 20 เท่าของค่า MIC, 1/2(MIC), 1/4(MIC) และ 1/8(MIC) แล้วผสมสารสกัดแต่ละคู่แต่ละความเข้มข้นปริมาตรเท่ากัน (50 ไมโครลิตร) ทำการทดสอบเช่นเดียวกันกับข้อที่ 2.1-2 .4 จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 ความเข้มข้นของสารสกัด 2 ชนิด เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านราร่วมกัน โดยวิธี Checkerboard

3.3 วิธีการแปลผล

การแปลผลการทดสอบฤทธิ์ต้านร่วมกันโดยวิธี Checkerboard แสดงดังภาพที่ 18 และจากการคำนวณค่า fractional inhibitory concentration (FIC) index ของสารทั้งสองจากสูตร

$$\text{FIC index} = FIC_A + FIC_B = [A] / (MIC_A) + [B] / (MIC_B)$$

โดยที่ FIC_A , FIC_B = Fractional Inhibitory Concentration ของ สาร A หรือ B

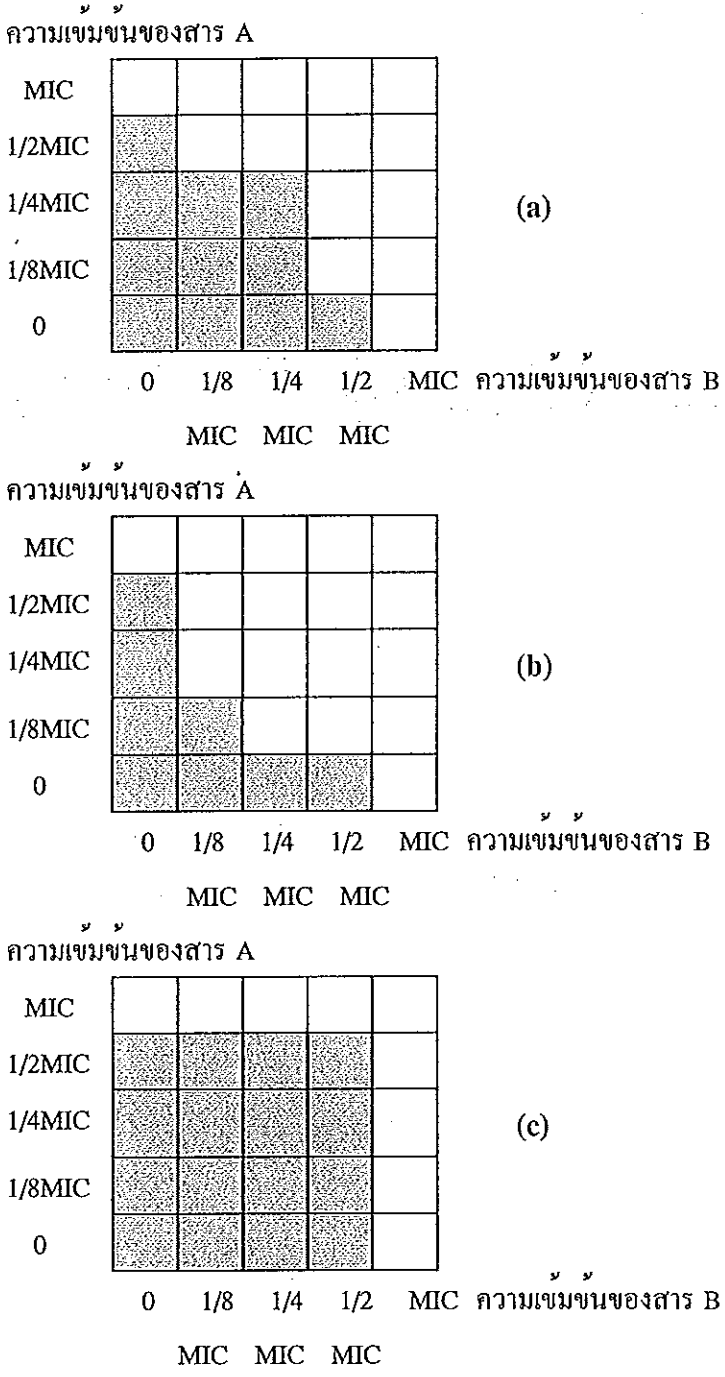
$[A]$, $[B]$ = ความเข้มข้นต่ำสุดของสาร A หรือ B ในสารผสมที่ให้ผลแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

(MIC_A), (MIC_B) = ค่า MIC ของสาร A หรือ B เมื่อทดสอบเพียงอย่างเดียว

ถ้า FIC index = 1.0 แปลผลว่ามีฤทธิ์ร่วมกัน (Additive effect)

FIC index $>$ 1.0 แปลผลว่ามีฤทธิ์ต้านกัน (Antagonism)

FIC index $<$ 1.0 แปลผลว่ามีฤทธิ์เสริมกัน (Synergism)



ภาพที่ 18 ไดอะแกรมการแปลผลการทดสอบฤทธิ์ต้านร่วมกัน

(a) = Additive effect

(b) = Synergism

(c) = Antagonism

ส่วนทึบที่ปรากฏเป็นส่วนที่แสดงว่าการเจริญของสายราแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญกับชุดควบคุม

4. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์

4.1 การเตรียม spore suspension

เลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* และเชื้อรา *A. brassicicola* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง จนมีสปอร์มากพอสมควร (*C. gloeosporioides* 14 วัน และ *A. brassicicola* 10 วัน) ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ *A. brassicicola* ใส่ในหลอดน้ำกลั่นไร้เชื้อ ส่วนการเตรียม spore suspension ของเชื้อ *C. gloeosporioides* ทำได้โดยการใช้ glass bead ไร้เชื้อกลิ้งบนสายรา เพื่อให้สปอร์หลุดออกจากสายรา ใช้หลอดหยดดูดน้ำกลั่นไร้เชื้อใส่ลงไป จากนั้นจึงดูด spore suspension ใส่ในหลอดไร้เชื้อ เขย่า spore suspension ด้วยเครื่องเขย่า นับจำนวนสปอร์ด้วยเครื่องนับเซลล์ ปรับความเข้มข้นของสปอร์ตามต้องการ

4.2 การเตรียมสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

เตรียมสารสกัดเป็น stock solution ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เจือจางสารสกัดให้มีความเข้มข้น 5,000 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดที่ผสม spore suspension ในอัตราส่วน 1:10 แล้วเป็น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์ จากนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ดี มาเจือจางแบบลำดับสอง เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ร้อยละ 50 (50% effective concentration, EC_{50})

4.3 การทดสอบ

4.3.1 การเตรียมสไลด์

ขีดสไลด์ด้วยดินสอเขียนแก้วเป็นวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 เซนติเมตร สไลด์ละ 2 วง วางสไลด์บนแท่งแก้วสามเหลี่ยมในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่มีสำลีสำหรับเก็บความชื้น และฆ่าเชื้อทั้งชุดด้วยตู้อบเครื่องแก้ว

4.3.2 การศึกษาการงอกของสปอร์

หยด spore suspension ที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 90 ไมโครลิตร และสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในวงกลมที่ขีดบนสไลด์ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ ดูดน้ำกลั่นไร้เชื้อใส่สำลี เพื่อให้มีความชื้นในจานเพาะเชื้อสม่ำเสมอ หลังจากที่บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสไลด์วางภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ เพื่อระเหยน้ำให้แห้ง และหยด lactophenal cotton blue ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์

4.3.3 การอ่านผลและการแปลผล

นับจำนวนสปอร์ทั้งงอกและไม่งอกรวม 300 สปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) คำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์ และค่า EC_{50}

โดยกำหนดว่า การงอก คือ เมื่อสปอร์งอก germ tube มีความยาวเกินครึ่งหนึ่งของความกว้างของสปอร์ (Manandhar *et.al.*, 1995)

วัดขนาดของ germ tube โดยใช้ occular micrometer จำนวน 30 สปอร์ เพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยขนาดของ germ tube

ค่า EC_{50} เป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการงอกได้ร้อยละ 50 ซึ่งหาได้จากการใช้ linear regression เขียนกราฟเส้นตรง ระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์ที่แกน y และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่แกน x

EC_{50} สามารถคำนวณได้จากสมการ

$y = a + bx$

a = เป็นค่าจุดตัดแกน y เมื่อ x = 0

b = เป็นค่าความชันของเส้นตรง เรียกว่า สัมประสิทธิ์การถดถอย

เมื่อแทนค่า y = ร้อยละการยับยั้งการงอก = 50

ดังนั้น ค่า x ที่คำนวณได้ = ความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการงอกได้ร้อยละ 50

= ค่า EC_{50}

4.4 ขั้นตอนการทดสอบผลของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์

4.4.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ spore suspension

หยด spore suspension ความเข้มข้น 10^4, $5x10^4$, 10^5, $5x10^5$, 10^6 และ $5x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในสไลด์ ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับและคำนวณร้อยละการงอกของสปอร์ การทดสอบที่มีความแม่นยำและเชื่อถือได้ สปอร์ควรมีร้อยละการงอกมากกว่าหรือเท่ากับ 80

4.4.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์

ผสม spore suspension ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.1 ($5x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อ *C. gloeosporioides* และ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อ *A. brassicicola*) ปริมาตร 90 ไมโครลิตร กับสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ หรือ ตัวทำละลาย

สำหรับชุดควบคุม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการนับจำนวนสปอร์ วัดขนาดของ germ tube คำนวณหาร้อยละการงอกและร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์ เพื่อนำมาเขียนกราฟและคำนวณหาค่า EC_{50}

4.4.3 การศึกษาความอยู่รอดของสปอร์หลังจากสัมผัสกับสารสกัด

ผสม spore suspension ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 900 ไมโครลิตร กับสารสกัดความเข้มข้น 5,000 หรือ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหรือตัวทำละลายสำหรับชุดควบคุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอด eppendorf จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเป็น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่น โดยนำหลอด eppendorf มาปั่นแยกสปอร์ออกโดยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนน้ำใส (supernate) ออก เติมน้ำกลั่นไร้เชื้อ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้สปอร์กระจายทั่วหลอดด้วยเครื่องเขย่า ทำเช่นเดียวกันนี้รวม 3 ครั้ง

นำ spore suspension ที่ผ่านการล้างสปอร์แล้ว เจือจางให้ได้ 10^{-1} และ 10^{-2} ด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ ดูด spore suspension ที่ไม่เจือจางและที่ระดับเจือจาง 10^{-1} และ 10^{-2} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ระดับเจือจางละ 3 จาน ในทุกความเข้มข้นของสารสกัด ใช้ spreader กวาด suspension เพื่อให้สปอร์กระจายทั่วจาน บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน นับจำนวนโคโลนี และคำนวณสปอร์ที่งอกต่อ spore suspension 1 มิลลิลิตร

4.4.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อสปอร์ที่งอก

หยด spore suspension ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 90 ไมโครลิตร ในสไลด์ บ่มที่อุณหภูมิห้องเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้สปอร์งอก ต่อมาหยดสารสกัดความเข้มข้น 5,000 หรือ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ ตัวทำละลายสำหรับชุดควบคุม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใน spore suspension บนสไลด์ จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับร้อยละการงอก วัดขนาด และสังเกตลักษณะของสปอร์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

5. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการงอกและการสร้าง appressorium ของสปอร์ *C. gloeosporioides* บนผลพริก (ดัดแปลงจาก Manandhar และคณะ, 1995)

5.1 การเตรียม spore suspension

เลี้ยง *C. gloeosporioides* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นจึงใช้ glass bead กลิ้งบนผิวของโคโลนี เติมน้ำกลั่น ปรับสารละลายสปอร์ให้ได้ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

5.2 การเตรียมสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

ละลายน้ำมันหอมระเหยและพิเพอรีนใน เอธานอล 95% ให้มีความเข้มข้น 1,000 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดที่ผสม spore suspension ในอัตราส่วน 1:1 แล้วเป็น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.3 การทดสอบ

5.3.1 การเตรียมผลพริก (*Capsicum annuum* L.)

แช่ผลพริกแก่แต่ยังไม่สุก(พริกเขียว) และผลพริกสุก(พริกแดง) ในคลอร็อกซ์ 10% เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ 5 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ ใช้ปากกาขีดเป็นวงกลม ตรงบริเวณกึ่งกลางของผลพริก ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร จำนวน 3 วง โดยมีระยะห่างของแต่ละวงเท่ากับ 1 เซนติเมตร นำไปวางบนตะแกรงที่อยู่ในกล่องพลาสติกขนาด 19x28x10 เซนติเมตร ซึ่งมีน้ำกลั่นไร้เชื้ออยู่ด้านล่างของกล่อง

5.3.2 การงอกและการสร้าง appressorium ของสปอร์

ผสมสารสกัดแต่ละความเข้มข้นหรือตัวทำละลายและ spore suspension ในปริมาณที่เท่ากัน ใส่ในหลอดทดลองไร้เชื้อ เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า จะได้ส่วนผสมที่มีความเข้มข้น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงหยดส่วนผสมนั้น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บนผลพริก ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง นำผลพริกวางใต้ตู้ปลอดเชื้อ เพื่อระเหยน้ำให้แห้ง หยดยาทาเล็บที่ถูกเจือจาง 1:1 ด้วยอะซีโตน ลงในวงกลมที่ขีดบนผลพริก จากนั้นจึงลอกแผ่นยาทาเล็บออก แล้วนำมาย้อมด้วย lactophenol cotton blue

5.3.3 การอ่านและการแปลผล

นับจำนวนสปอร์ 300 สปอร์ แล้วคำนวณหาค่าร้อยละการงอกและร้อยละการสร้าง appressorium สปอร์ที่สร้าง appressorium คือ สปอร์ที่ปลายของ germ tube มีลักษณะโป่งพองและมีสีน้ำตาล

6. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในห้องทดลอง

6.1 การเตรียมสารสกัด

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกเลือกใช้สารสกัด 14 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 (T1) น้ำมันข่าลิง 0.125%
ชุดที่ 2 (T2) น้ำมันข่าลิง 0.25%
ชุดที่ 3 (T3) น้ำมันเสม็ด 0.5%
ชุดที่ 4 (T4) น้ำมันเสม็ด 1%
ชุดที่ 5 (T5) พิเพอรีน 0.25%
ชุดที่ 6 (T6) พิเพอรีน 0.5%
ชุดที่ 7 (T7) น้ำมันข่าลิง 0.125% + สารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่ 1%
ชุดที่ 8 (T8) น้ำมันข่าลิง 0.25% + สารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่ 2%
ชุดที่ 9 (T9) น้ำมันเสม็ด 0.5% + สารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่ 1%
ชุดที่ 10 (T10) น้ำมันเสม็ด 1% + สารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่ 2%
ชุดที่ 11 (T11) พิเพอรีน 0.25% + สารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่ 1%
ชุดที่ 12 (T12) พิเพอรีน 0.5% + สารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่ 2%
ชุดที่ 13 (T13) เบนโนมิล 12 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
ชุดที่ 14 (T14) น้ำ (ชุดควบคุม)

หมายเหตุ ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบในแปลงทดลองเลือกใช้ 800 และ 1,600 เท่า ของค่า MIC

6.2 การเตรียมผลพริก

ใช้ผลพริกเขียว เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 5.3.1

6.3 การทดสอบ

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด ดังนี้

ชุดที่1 หยดสารสกัด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในวงกลมที่ขีดบนผลพริก ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง หยด spore suspension ของ *C. gloeosporioides* (5×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร ลงในวงกลมบนผลพริก

ชุดที่ 2 เตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ นำไปผสมกับ spore suspension (10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตรเท่ากัน ในหลอดทดลองไร้เชื้อ เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นจึงหยดส่วนผสมนี้ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในวงกลมที่ขีดบนผลพริก ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

ชุดที่ 3 หยด spore suspension (5×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร ในวงกลมที่ขีดบนผลพริก ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง จึงหยดสารสกัด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในวงกลมบนผลพริก

* ชุดควบคุมคือชุดที่ใช้ตัวทำละลายแทนสารสกัด

6.4 การบันทึกผล

เมื่อครบ 7 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลของชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและถ่ายภาพ

7. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดต่อเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบคะน้า

(ดัดแปลงจาก Huang และ Levy, 1995)

7.1 การเตรียมสารสกัด

ละลายน้ำมันหอมระเหยและพิเพอรีนใน เอธานอล 95% ให้มีความเข้มข้น 1,000 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดที่ผสม spore suspension ในอัตราส่วน 1:1 แล้วเป็น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7.2 การเตรียมใบคะน้า (*Brassica alboglabra* Bailey)

ตัดใบคะน้าให้เป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ไปแช่ในคลอร็อกซ์ 10% เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ 5 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ นำชิ้นใบคะน้าวางบนกระดาษกรองที่วางอยู่ในจานไร้เชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร โดยวางใบคะน้าจานละ 7 ชิ้น ใช้หลอดหยดดูดน้ำกลั่นไร้เชื้อหยดลงบนกระดาษกรองทุกๆ 2 วัน เพื่อให้ความชื้น

7.3 การทดสอบ

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 หยดสารสกัด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บนกลางชิ้นใบคะน้า บ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง หยด spore suspension จำนวน 10 ไมโครลิตร ของเชื้อ *A. brassicicola* (10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) กลางชิ้นใบคะน้า

ชุดที่ 2 เตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ นำไปผสมกับ spore suspension ($2x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตรเท่ากัน ในหลอดทดลองไร้เชื้อ เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นจึงหยดส่วนผสมนี้ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนกลางชิ้นใบคะน้า

ชุดที่ 3 หยด spore suspension (10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร บนกลางชิ้นใบคะน้า ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง จึงหยดสารสกัด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนกลางชิ้นใบคะน้า

* ชุดควบคุมคือชุดที่ใช้ตัวทำละลายแทนสารสกัด

7.4 การบันทึกผล

เมื่อครบ 7 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลของชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและถ่ายภาพ

8. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในแปลงทดลอง

8.1 การวางแผนการทดลอง

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสพริก วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) มี 14 treatment treatment ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น ดังนี้

treatment ที่ 1 (T1) ฉีดพ่นน้ำมันข่าลิงความเข้มข้น 0.125%

treatment ที่ 2 (T2) ฉีดพ่นน้ำมันข่าลิงความเข้มข้น 0.25%

treatment ที่ 3 (T3) ฉีดพ่นน้ำมันเสม็ดความเข้มข้น 0.5%

treatment ที่ 4 (T4) ฉีดพ่นน้ำมันเสม็ดความเข้มข้น 1%

treatment ที่ 5 (T5) ฉีดพ่นพิเพอรีนความเข้มข้น 0.25%

treatment ที่ 6 (T6) ฉีดพ่นพิเพอรีนความเข้มข้น 0.5%

treatment ที่ 7 (T7) ฉีดพ่นน้ำมันข่าลิงความเข้มข้น 0.125% + สารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่ความเข้มข้น 1%+

treatment ที่ 8 (T8) ฉีดพ่นน้ำมันข่าลิงความเข้มข้น 0.25% + สารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่ความเข้มข้น 2%

treatment ที่ 9 (T9) ฉีดพ่นน้ำมันเสม็ดความเข้มข้น 0.5% + สารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่ความเข้มข้น 1%

treatment ที่ 10 (T10) ฉีดพ่นน้ำมันเสม็ดความเข้มข้น 1% + สารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่ความเข้มข้น 2%

treatment ที่ 11 (T11) ฉีดพ่นพิเพอรีนความเข้มข้น 0.25% + สารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่ความเข้มข้น 1%

treatment ที่ 12 (T12) ฉีดพ่นพิเพอรีนความเข้มข้น 0.5% + สารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่ความเข้มข้น 2%

treatment ที่ 13 (T13) ฉีดพ่นเบนโนมิล ความเข้มข้น 12 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

treatment ที่ 14 (T14) ฉีดพ่นน้ำ (ชุดควบคุม)

8.2 การปลูกพริก

นำเมล็ดพริกชี้ฟ้า (*Capsicum annuum* L.) เพาะในกระบะเพาะ หลังจากนั้น 23 วัน จึงทำการย้ายกล้าลงในถุงดำขนาด 3x5 นิ้ว เมื่อต้นพริกโตเต็มที่แล้วจึงย้ายลงถุงดำขนาด 12x14 นิ้ว

8.3 การปลูกเชื้อลงบนผลพริก

ทำการปลูกเชื้อลงบนผลพริก อายุ 4 สัปดาห์หลังจากออกดอกชุดแรก โดยเตรียม spore suspension ของ *C. gloeosporioides* ($2.5x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) เติมสารจับใบ (แอปซ่า-80) 1-2 หยด เขย่าให้เข้ากัน ทำการฉีดพ่นบนต้นพริกต้นละ 20 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกฉีด (hand sprayer)

8.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด

หลังการปลูกเชื้อ 1 สัปดาห์ ทำการฉีดพ่นสารดังที่กล่าวในข้อ 8.1 โดยฉีดสัปดาห์ละ 1 ครั้ง จำนวน 8 ครั้ง ก่อนฉีดพ่นยาทุกครั้งจะถ่ายภาพต้นพริกและตรวจผลการทดลอง โดยนับจำนวนผลพริกที่เป็นโรคและจำนวนผลพริกทั้งหมด เพื่อคำนวณหาร้อยละการเกิดโรค

หลังการตรวจนับผลครั้งที่ 3 และครั้งที่ 6 ก่อนฉีดพ่นสารสกัด จะเก็บผลสุกของพริกออก และนำผลพริกที่เป็นโรคมาถ่ายภาพ

8.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวนของสิ่งทดลอง และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละการเกิดโรคของแต่ละ treatment ในแต่ละสัปดาห์ โดยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test)

8.6 ข้อมูลทางอุตุนิยมวิทยา

ข้อมูลของความชื้นสัมพัทธ์ อุณหภูมิของอากาศและปริมาณน้ำฝน บันทึกโดยสถานีอากาศเกษตรคอหงส์ กรมอุตุนิยมวิทยา อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การสกัดสารจากพืช

1.1 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าลิงและใบเสม็ด

จากการทดลอง พบว่า เมื่อใช้เหง้าข่าลิงสดน้ำหนัก 21.30 กิโลกรัม จะได้น้ำมันข่าลิง 29.0941 กรัม (0.137%) และใบเสม็ดสดหนัก 37.80 กิโลกรัม จะให้น้ำมันเสม็ด 124.8873 กรัม (0.330%) โดยน้ำมันทั้งสองส่วนที่ได้ มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองอ่อน และมีกลิ่นฉุน

1.2 การแยกพิเพอรีน

จากการทดลอง พบว่า เมื่อใช้พริกไทยดำบดหนัก 2,000 กรัม จะได้พิเพอรีนเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 45.1769 กรัม (2.359%)

1.3 การสกัดใบกระดูกไก่และผลมะคำดีควายด้วยน้ำ

เมื่อนำสารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่และผลมะคำดีควายไปทำ lyophilize พบว่า สารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล โดยใบกระดูกไก่จะให้สารสกัด 4.23% ในขณะที่ผลมะคำดีควายให้สารสกัด 2.98%

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสายราในสไลด์หลุม

2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านราเบื้องต้น

จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งการเจริญของสายรา *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* ในสไลด์หลุม พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าลิงและใบเสม็ดและพิเพอรีนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่และผลมะคำดีควาย โดยที่ความเข้มข้นสูง คือ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำมันข่าลิงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยมีร้อยละการยับยั้ง *C. gloeosporioides* เท่ากับ 98.45 รองลงมาคือพิเพอรีนและน้ำมันเสม็ด ซึ่งมีร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 70.27 และ

48.66 ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ผลการทดสอบเป็นทำนองเดียวกันกับที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่มีค่าร้อยละการยับยั้งต่ำกว่า (ตารางที่ 2, ภาพที่ 19)

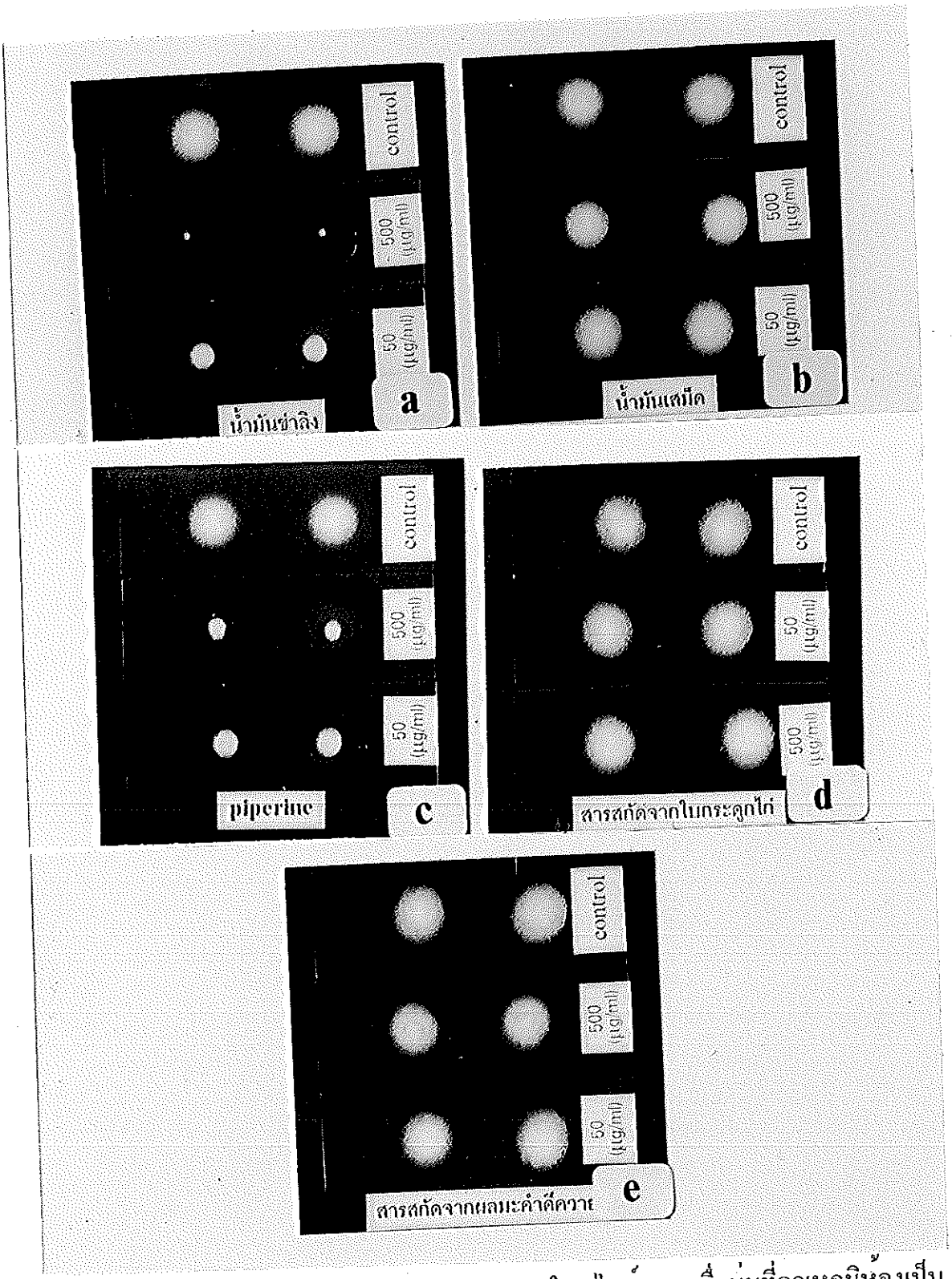
ส่วนผลของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของสายรา *A. brassicicola* นั้น พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำมันข่าลิงและพิเพอรีนยับยั้งการเจริญของสายราได้ดีใกล้เคียงกัน คือมีค่าร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 98.12 และ 90.98 แต่ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าพิเพอรีนสามารถยับยั้งการเจริญของสายรา *A. brassicicola* ได้ดีกว่าน้ำมันข่าลิง (ตารางที่ 2, ภาพที่ 20) นอกจากนั้นยังพบว่าสารสกัดทั้งหมดยกเว้นน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าลิงยับยั้งการเจริญของ *A. brassicicola* ได้ดีกว่า *C. gloeosporioides* และสารสกัดทุกตัวทั้ง 2 ความเข้มข้น สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* ได้อย่างมีนัยสำคัญ ในการทดสอบหาค่า MIC ขั้นต่อไป จึงเลือกการเจือจางแบบลำดับสอง ให้มีความเข้มข้นต่ำกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับเบนโนมิลนั้น พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของสายรา *C. gloeosporioides* ได้ดี โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายราเท่ากับ 76.3 ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นในการหาค่า MIC ในขั้นต่อไป จึงเจือจางเบนโนมิลแบบลำดับสอง ให้มีความเข้มข้นต่ำกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 2 ผลการยับยั้งการเจริญของสายรา *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* โดยสารสกัดต่างๆ ในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของสายรา

สารสกัด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ± S.D.(มิลลิเมตร) (ร้อยละการยับยั้ง)			
	C. gloeosporioides		*A. brassicicola*	
	500 (µg/ml)	50 (µg/ml)	500 (µg/ml)	50 (µg/ml)
น้ำมันหอมระเหย				
น้ำมันข่าลิง	1.74 ± 0.02* (98.45)	7.61 ± 0.09* (70.37)	1.73 ± 002* (98.12)	8.30 ± 0.20* (56.74)
น้ำมันเสม็ด	9.74 ± 0.09* (48.66)	12.16 ± 0.04* (19.94)	9.92 ± 022* (55.37)	12.25 ± 0.18* (31.95)
พิเพอรีน	7.41 ± 0.27* (70.27)	8.44 ± 0.32* (61.43)	4.46 ± 0.22* (90.98)	6.48 ± 0.47* (80.96)
ซาโปนินส์				
สารสกัดจากใบกระดูกไก่	12.05 ± 0.28* (21.38)	12.55 ± 0.14* (14.72)	5.23 ± 0.21* (80.42)	9.40 ± 0.27* (36.75)
สารสกัดจากผลมะคำดีควาย	11.41 ± 0.29* (29.51)	12.73 ± 0.32* (12.26)	12.66 ± 0.29* (29.52)	13.36 ± 0.46* (21.51)
เบนโนมิล 10 (µg/ml)	1.56 ± 0.07* (76.30)		-	

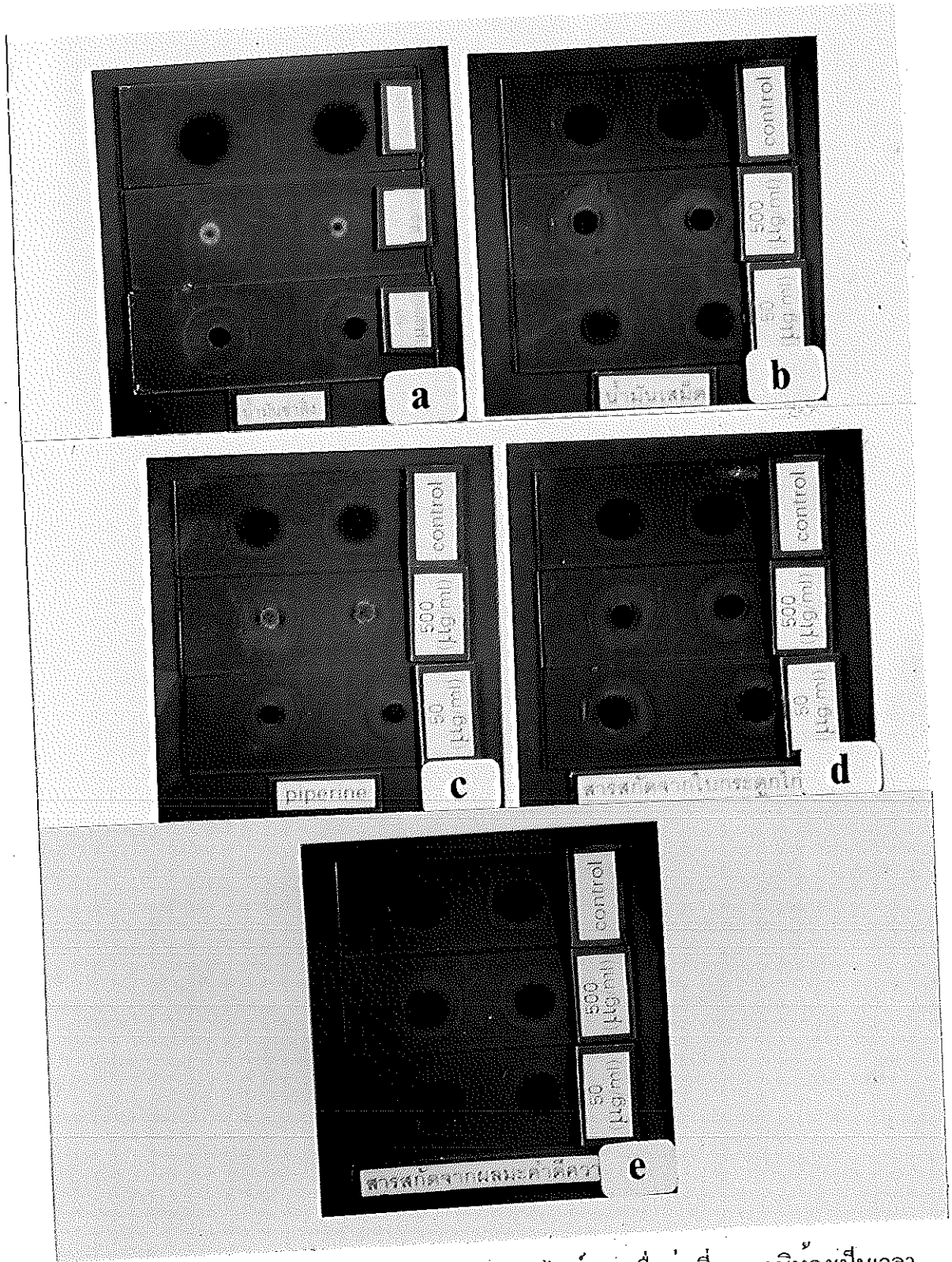
* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 19 ขนาดโคโลนีของ *C. gloeosporioides* ในสไลด์หลุม เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากการทดสอบกับสารสกัดต่างๆ

(a) น้ำมันข่าลิง (b) น้ำมันเสม็ด (c) พิเพอรีน

(d) สารสกัดจากใบกระดูกไก่ (e) สารสกัดจากผลมะคำดีควาย



ภาพที่ 20 ขนาดโคโลนีของ *A. brassicicola* ในสไลด์หลุมเมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากการทดสอบกับสารสกัดต่างๆ

(a) น้ำมันข่าลิง (b) น้ำมันเสม็ด (c) พิเพอรีน

(d) สารสกัดจากใบกระดูกไก่ (e) สารสกัดจากผลมะคำดีควาย

2.2 การหาค่า MIC

จากผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของสายราในสไลด์หลุม จึงได้นำสารสกัดมาทดสอบหาค่า MIC โดยทำการเจือจางสารละลายจากระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบบลำดับสอง ผลการทดลองพบว่า น้ำมันข่าลิงมีฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุดโดยมีค่า MIC ต่ำสุด คือ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่พิเพอรีน และน้ำมันเสม็ด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 3.13 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากใบกระดูกไก่และสารสกัดจากผลมะคำดีควาย จะยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้น้อยที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากันคือเท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเบนโนมิลนั้น พบว่ามีค่า MIC ต่ำกว่าสารสกัดที่ทำการทดสอบทุกตัว คือมีค่า MIC เท่ากับ 0.001 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3) ส่วนเชื้อ *A. brassicicola* นั้นถูกยับยั้งโดยน้ำมันข่าลิงและพิเพอรีน ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่น้ำมันเสม็ดและสารสกัดจากใบกระดูกไก่ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ส่วนสารสกัดจากผลมะคำดีควายยับยั้ง *A. brassicicola* ได้น้อยที่สุดเช่นเดียวกับการยับยั้งเชื้อ *C. gloeosporioides* คือมีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4)

เมื่อพิจารณาจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสาร และ ร้อยละการยับยั้ง พบว่าน้ำมันข่าลิงมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. gloeosporioides* ดีที่สุด โดยมีความชันของเส้นกราฟสูงสุดเท่ากับ 3.38 รองลงมาได้แก่ พิเพอรีน น้ำมันเสม็ด สารสกัดจากใบกระดูกไก่และสารสกัดจากผลมะคำดีควายตามลำดับ สำหรับผลต่อเชื้อ *A. brassicicola* นั้น พบว่า พิเพอรีน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราตัวนี้ได้ดีที่สุด โดยมีความชันของเส้นกราฟสูงสุดเท่ากับ 1.52 รองลงมา ได้แก่ น้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ด สารสกัดจากใบกระดูกไก่และสารสกัดจากผลมะคำดีควายตามลำดับ (ภาพที่ 21, ตารางที่ 5)

ตารางที่ 3 ค่า MIC ของสารสกัดต่อเชื้อ *C. gloeosporioides*

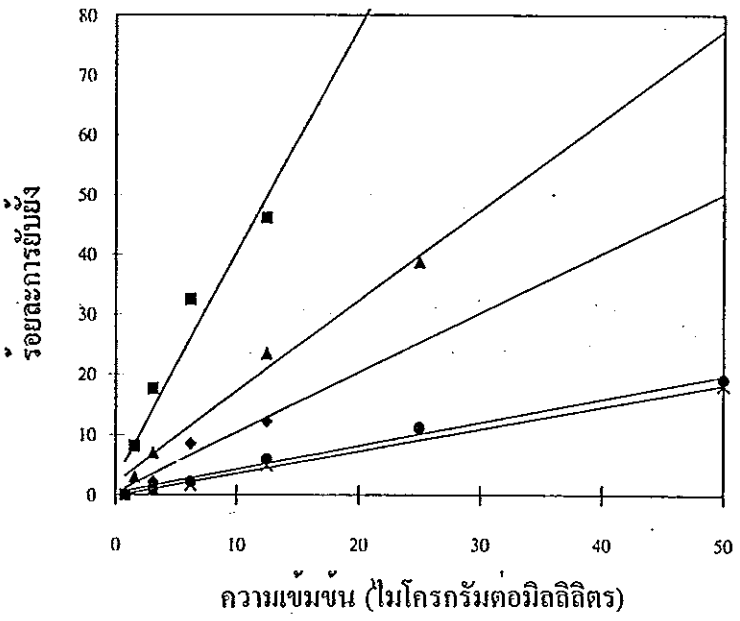
ความเข้มข้น (µg/ml)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ± S.D.(มิลลิเมตร) (ร้อยละการยับยั้ง)				
	น้ำมันหอมระเหย		พิเพอรีน	ซาโปนินส์	
	ข่าลิง	เสม็ด		กระดูกไก่	มะคำดีควาย
50	7.61±0.09*	12.93±0.17*	7.75±0.22*	12.89±0.22*	12.97±0.24*
	(70.37)	(16.38)	(65.58)	(19.20)	(18.20)
25	9.39±0.07*	13.09±0.31*	10.35±0.37*	13.52±0.14*	13.25±0.16*
	(54.89)	(14.30)	(38.61)	(11.11)	(14.63)
12.5	10.27±0.07*	13.25±0.33*	11.56±0.17*	13.91±0.24*	13.98±0.36*
	(46.03)	(12.19)	(23.42)	(5.91)	(4.96)
6.25	11.49±0.47*	13.52±0.43*	11.92±0.11*	14.18±0.33	14.22±0.17
	(32.45)	(8.58)	(18.58)	(2.22)	(1.67)
3.13	12.69±0.06*	13.98±0.22	12.74±0.33*	14.26±0.29	14.26±0.17
	(17.60)	(2.25)	(6.99)	(1.11)	(1.11)
1.56	13.40±0.20*	-	13.01±0.33	-	-
	(8.13)	-	(3.00)	-	-
0.78	13.98±0.12	-	-	-	-
	(0.00)	-	-	-	-
MIC	1.56	6.25	3.13	12.5	12.5
ค่า MIC ของเบนโนมิล = 0.001 (µg/ml)					

* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

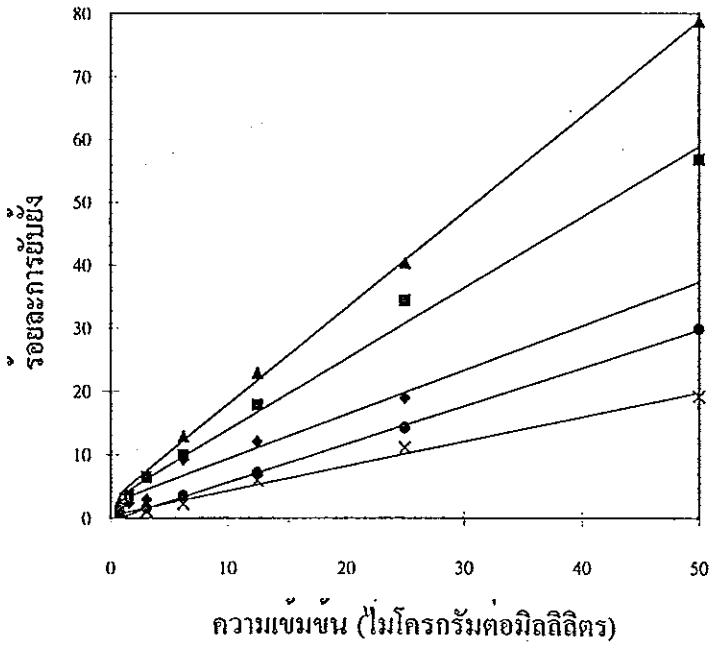
ตารางที่ 4 ค่า MIC ของสารสกัดต่อเชื้อ *A. brassicicola*

ความเข้มข้น (µg/ml)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ± S.D.(มิลลิเมตร) (ร้อยละการยับยั้ง)				
	น้ำมันหอมระเหย		พิเพอรีน	ซาโปนินส์	
	ข่าลิง	เสม็ด		กระดูกไก่	มะคำดีควาย
50	8.3±0.2* (56.74)	11.21±0.20* (22.70)	5.16±0.13* (78.66)	10.47±0.17* (29.84)	12.89±0.22* (19.20)
25	10.23±0.86* (34.29)	11.48±0.14* (18.93)	8.63±0.23* (40.31)	11.58±0.35* (14.18)	13.52±0.14* (11.11)
12.5	11.44±0.16* (17.82)	11.96±0.14* (12.01)	9.81±0.26* (22.87)	12.05±0.28* (7.07)	13.91±0.24* (5.91)
6.25	11.98±0.09* (9.88)	12.15±0.20* (9.19)	10.43±0.17* (12.81)	12.28±0.31* (3.49)	14.18±0.33 (2.22)
3.13	12.21±0.06* (6.39)	12.56±0.23 (2.96)	10.51±0.17* (11.47)	12.40±0.34 (1.59)	14.26±0.29 (1.11)
1.56	12.39±0.07* (3.61)	12.60±0.19 (2.34)	10.55±0.15* (10.79)	- -	- -
0.78	12.55±0.12 (1.10)	- -	11.02±0.44 (2.67)	- -	- -
MIC	1.56	6.25	1.56	6.25	12.5

* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



(a)



(b)

ภาพที่ 21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา

(a) *C. gloeosporioides* (b) *A. brassicicola*

■ น้ำมันข่าลิง ◆ น้ำมันเสม็ด ▲ พิเพอรีน

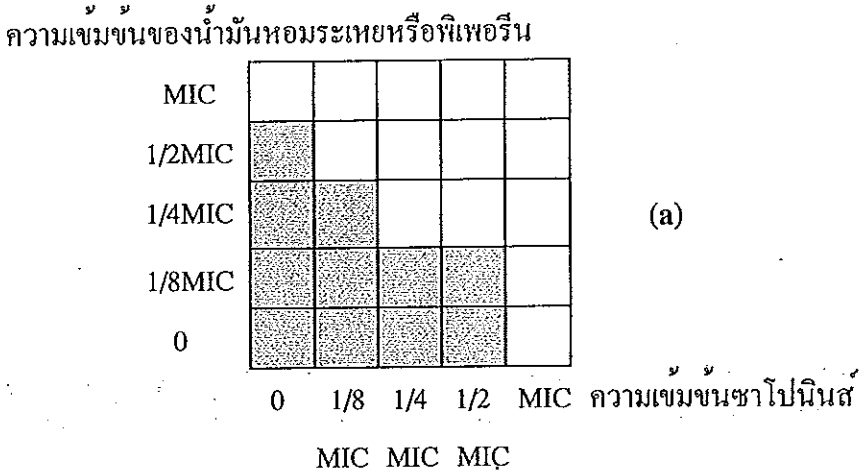
● สารสกัดจากใบกระดูกไก่ × สารสกัดจากผลมะคำดีควาย

ตารางที่ 5 สมการรีเกรซชันเส้นตรง สัมประสิทธิ์แห่งการกำหนด (R^2) และค่าความชันของเส้นกราฟรีเกรซชันเส้นตรงที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายรา

สารสกัด	เชื้อรา					
	C. gloeosporioides			*A. brassicicola*		
	สมการรีเกรซชันเส้นตรง	R^2	ความชัน	สมการรีเกรซชันเส้นตรง	R^2	ความชัน
น้ำมันหอมระเหย						
น้ำมันข่าลิง	y = 3.3757x + 2.6538	0.9314	3.38	y = 1.1236x + 2.6217	0.9899	1.12
น้ำมันเสม็ด	y = 0.9913x + 0.4450	0.8845	0.99	y = 0.6981x + 2.3236	0.9899	0.70
พิเพอรีน	y = 1.5062x + 2.1206	0.9870	1.51	y = 1.5221x + 2.6875	0.9991	1.52
ซาโปนินส์						
สารสกัดจากใบกระดูกไก่	y = 0.3872x + 0.4075	0.9890	0.39	y = 0.6010x - 0.4108	0.9995	0.60
สารสกัดจากผลมะคำดีควาย	y = 0.3677x + 0.1224	0.9974	0.37	y = 0.3872x + 0.4075	0.9890	0.39

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านราร่วมกันของน้ำมันหอมระเหยหรือพิเพอรีนกับซาโปนินส์จากสารสกัดด้วยน้ำ

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านราร่วมกันของน้ำมันหอมระเหยหรือพิเพอรีน กับซาโปนินส์ ด้วยวิธี Checkerboard พบว่า น้ำมันหอมระเหยหรือพิเพอรีน กับซาโปนินส์มีฤทธิ์เสริมกัน (synergism) ในการต้านเชื้อ *C. gloeosporioides* (ภาพที่ 22) และเชื้อ *A. brassicicola* (ภาพที่ 23) เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยหรือพิเพอรีน กับซาโปนินส์ที่ระดับความเข้มข้น 1/4 เท่าของ MIC มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า FIC_{index} เท่ากับ 0.50 ซึ่งแปลผลได้ว่าออกฤทธิ์เสริมกัน



ภาพที่ 22 ไดอะแกรมผลการทดสอบฤทธิ์ต้านราร่วมกันของน้ำมันหอมระเหยหรือ พิเพอรีนกับซาโปนินส์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. gloeosporioides*

ส่วนทึบที่ปรากฏ แสดงว่า การเจริญของราแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญกับชุดควบคุม

(a) น้ำมันเสม็ด + สารสกัดจากใบกระดูกไก่

(b) น้ำมันข่าลิง + สารสกัดจากใบกระดูกไก่

น้ำมันข่าลิง + สารสกัดจากผลมะคำดีควาย

น้ำมันเสม็ด + สารสกัดจากผลมะคำดีควาย

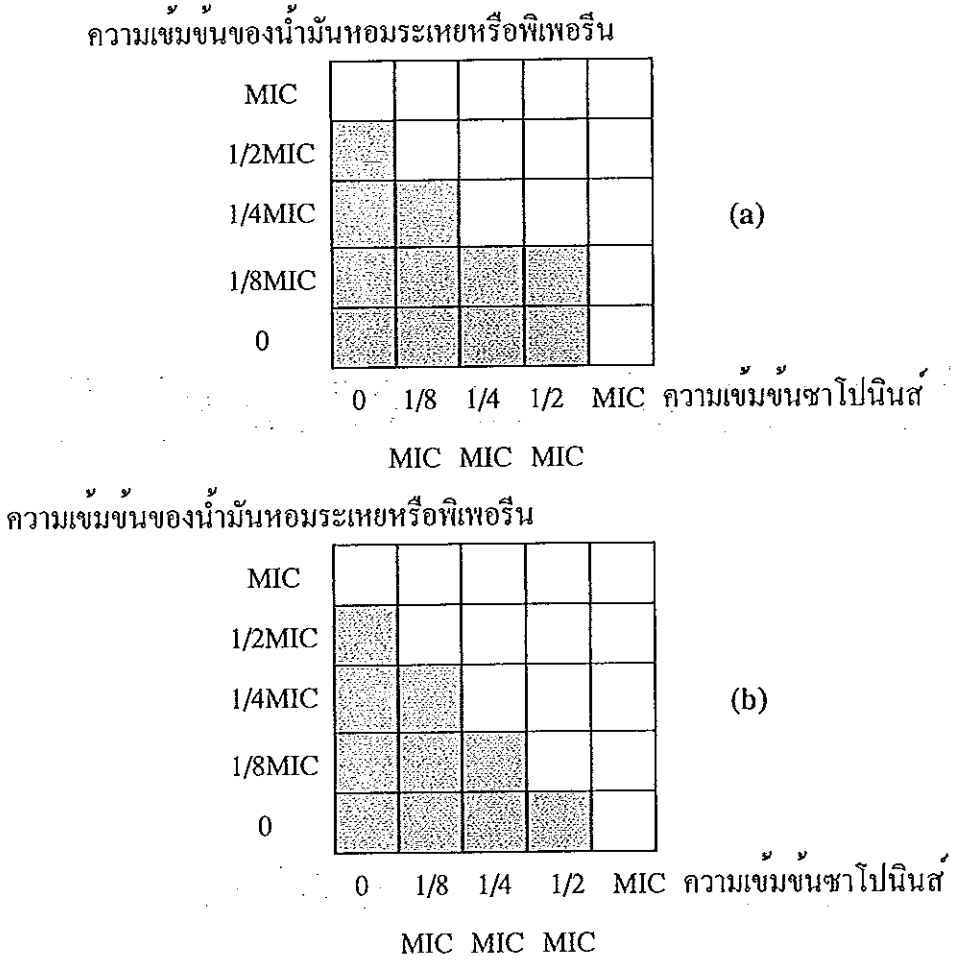
พิเพอรีน + สารสกัดจากใบกระดูกไก่

พิเพอรีน + สารสกัดจากผลมะคำดีควาย

$$FIC_{index} = FIC_{\text{น้ำมันหอมระเหยหรือพิเพอรีน}} + FIC_{\text{ซาโปนินส์}}$$

$$= (1/4MIC)/MIC + (1/4MIC)/MIC$$

$$= 0.50$$



ภาพที่ 23 ไดอะแกรมผลการทดสอบฤทธิ์ต้านราร่วมกันของน้ำมันหอมระเหยหรือ พิเพอรีนกับซาโปนินส์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. brassicicola*

ส่วนทึบที่ปรากฏ แสดงว่า การเจริญของราแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญกับชุดควบคุม

(a) น้ำมันเสม็ด + สารสกัดจากใบกระดูกไก่

น้ำมันเสม็ด + สารสกัดจากผลมะคำดีควาย

(b) น้ำมันข่าลิง + สารสกัดจากใบกระดูกไก่

น้ำมันข่าลิง + สารสกัดจากผลมะคำดีควาย

พิเพอรีน + สารสกัดจากใบกระดูกไก่

พิเพอรีน + สารสกัดจากผลมะคำดีควาย

$$FIC_{index} = FIC_{\text{น้ำมันหอมระเหยหรือพิเพอรีน}} + FIC_{\text{ซาโปนินส์}}$$

$$= (1/4MIC)/MIC + (1/4MIC)/MIC$$

$$= 0.50$$

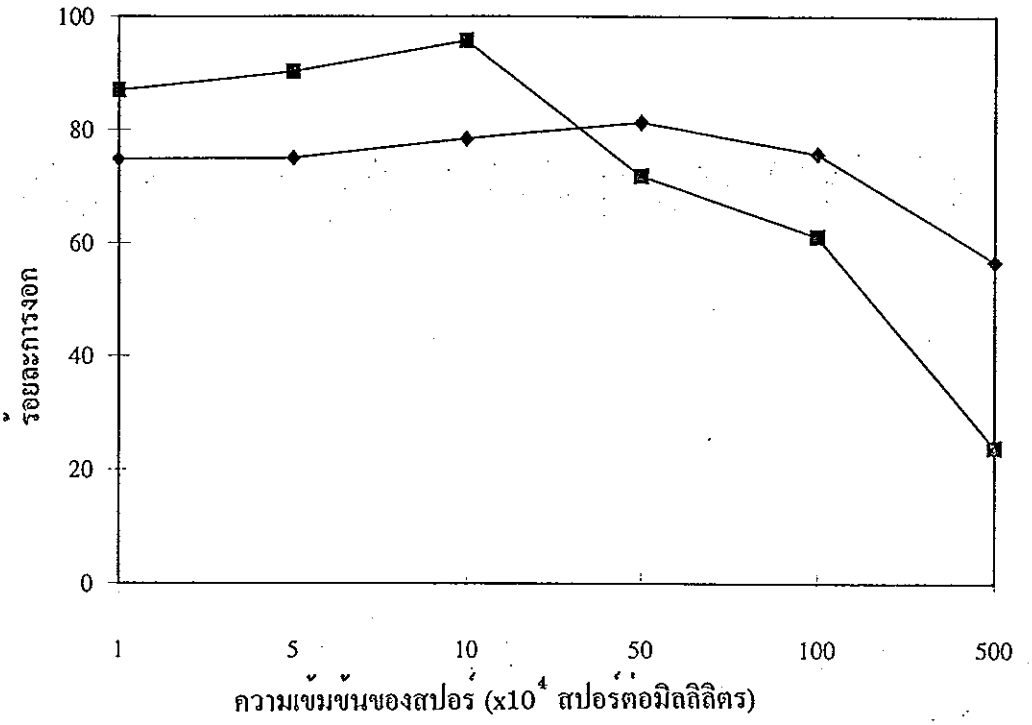
4. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์

4.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ spore suspension

จากการหาร้อยละการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* โดยใช้ spore suspension ความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่า spore suspension ของ *C. gloeosporioides* ที่มีปริมาณสปอร์เท่ากับ $5x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ spore suspension ของ *A. brassicicola* ที่มีปริมาณสปอร์เท่ากับ 10^5 มีร้อยละการงอกสูงสุด คือ มีค่าเท่ากับ 81.25 และ 95.72 (ตารางที่ 6, ภาพที่ 24) ตามลำดับ ดังนั้นในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์ในขั้นต่อไป จึงเลือกใช้ spore suspension ของ *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* เท่ากับ $5x10^5$ และ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ร้อยละการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* ที่ความเข้มข้นของสปอร์ต่างๆกัน ที่เวลา 24 ชั่วโมง

ปริมาณสปอร์ (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละการงอกของสปอร์	
	C. gloeosporioides	*A. brassicicola*
10^4	74.83±2.25	86.90±1.91
$5x10^4$	75.00±1.66	90.22±1.82
10^5	78.42±1.97	**95.72±0.95**
$5x10^5$	**81.25±2.85**	71.83±2.32
10^6	75.66±2.51	61.06±1.93
$5x10^6$	56.75±2.46	23.94±2.26



ภาพที่ 24 ร้อยละการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* (-◆-) และ *A. brassicicola* (-■-) ที่ความเข้มข้นของสปอร์ต่างๆกัน

4.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์

จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* ที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า น้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ด และพิเพอรีน ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* ได้อย่างมาก โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์อยู่ในช่วง 99.84-100 ซึ่งยับยั้งได้ดีกว่าสารสกัดจากใบกระดูกไก่และผลมะคำดีควาย ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ร้อยละ 80.52 และ 79.22 ตามลำดับ และเมื่อทดสอบที่ระดับความเข้มข้นลดลง 10 เท่า คือ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า น้ำมันข่าลิง และพิเพอรีน มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* โดยยังสามารถยับยั้งได้ถึงร้อยละ 98.44 และ 97.63 (ตารางที่ 7, ภาพที่ 25) ซึ่งสอดคล้องกับค่า EC_{50} ที่คำนวณได้จากสมการของกราฟเส้นตรงระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์และความเข้มข้นของสารสกัด (ตารางที่ 9, 11 และภาพที่ 27a) น้ำมันข่าลิงและพิเพอรีนมีค่า EC_{50} ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเท่ากับ 13.49 และ 13.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาได้แก่น้ำมันเสม็ด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 39.99 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนั้นยังพบว่า สารทั้ง 3 ตัวที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 12.5 - 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยังมีผลต่อความยาวเฉลี่ยของ germ tube โดยสปอร์ที่งอกจะมีความยาวเฉลี่ยของ germ tube สั้นกว่าชุดควบคุม 2 - 3 เท่า (ตารางที่ 9, ภาพที่ 28a) และมีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดจากใบกระดูกไก่และสารสกัดจากผลมะคำดีควาย

สำหรับเบนโนมิลนั้น พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* sp. ได้ดีเช่นเดียวกัน โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 16.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 11)

ส่วนฤทธิ์ของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์ *A. brassicicola* พบว่า มีฤทธิ์คล้ายกับฤทธิ์ต่อเชื้อ *C. gloeosporioides* กล่าวคือ ในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์ *A. brassicicola* ที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า น้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ดและพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะยับยั้งการงอกของสปอร์ *A. brassicicola* ได้อย่างสมบูรณ์ แต่สารสกัดจากใบกระดูกไก่และผลมะคำดีควาย ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน มีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ได้น้อยมาก กล่าวคือมีค่าร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์เพียง 3.66 และ 5.47 ตามลำดับ และเมื่อทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า พิเพอรีนและ

น้ำมันข่าลิงมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการงอกของสปอร์ โดยยับยั้งได้ร้อยละ 93.28 และ 92.78 (ตารางที่ 8 ,ภาพที่ 26) ซึ่งสอดคล้องกับค่า EC_{50} ที่พบว่า พิเพอรีนและน้ำมันข่าลิง มีค่า EC_{50} ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเท่ากับ 18.98 และ 20.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ น้ำมันเสม็ด ที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 51.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 10, 11 และภาพที่ 27b) นอกจากนั้นยังพบว่า สารทั้ง 3 ตัว ที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยังมีผลต่อความยาวเฉลี่ยของ germ tube โดยสปอร์ที่งอกจะมีความยาว germ tube สั้นกว่าชุดควบคุม 2 - 5 เท่า (ตารางที่ 10, ภาพที่ 28b) และมีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดจากใบกระดูกไก่และสารสกัดจากผลมะคำดีควาย

ตารางที่ 7 ร้อยละการงอก ร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์และความยาวของ germ tube ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides*

สารสกัด	ความเข้มข้น (µg/ml)	ร้อยละการงอกของสปอร์ ± S.D. (ร้อยละการยับยั้งการงอก)	ความยาว germ tube ± S.D. (µm)
ชุดควบคุม			
น้ำกลั่น	0	80.25±1.69 (0.00)	191.25±19.74
เอธานอล 95%	0	80.08±1.13 (0.00)	189.17±21.89
น้ำมันหอมระเหย			
น้ำมันข่าลิง	500	0.00 (100.00)	0.00
	50	10.00 (98.44)	31.46± 7.25
น้ำมันเสม็ด	500	0.00 (100.00)	0.00
	50	57.08±2.56 (49.19)	114.00±28.5
พิเพอรีน	500	3.17±1.26 (99.84)	0.00
	50	12.33±1.14 (97.63)	85.00±20.34
ซาโปนินส์			
สารสกัดจากใบกระดูกไก่	500	35.42±1.62 (80.52)	99.17 ± 28.03
	50	80.87±0.67 (-1.55)	132.50 ± 37.37
สารสกัดจากผลมะคำดีควาย	500	36.58±2.08 (79.22)	127.08 ± 22.52
	50	80.67±2.26 (-1.05)	185.00 ± 23.25

ตารางที่ 8 ร้อยละการงอก ร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์ และความยาว germ tube ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์ *A. brassicicola*

สารสกัด	ความเข้มข้น (µg/ml)	ร้อยละการงอกของสปอร์ ± S.D. (ร้อยละการยับยั้งการงอก)	ความยาว germ tube ± S.D. (µm)
ชุดควบคุม			
น้ำกลั่น	0	95.94±0.57 (0.00)	201±19.74
เอธานอล 95%	0	95.56±0.40 (0.00)	191±21.89
น้ำมันหอมระเหย			
น้ำมันข่าลิง	500	0.00 (100.00)	0.00
	50	25.67±1.48 (92.78)	71±5.76
น้ำมันเสม็ด	500	0.28±0.28 (100.00)	0.00
	50	40.15±0.98 (82.35)	80±6.78
พิเพอรีน	500	0.00 (100.00)	0.00
	50	24.77±0.31 (93.28)	62±6.39
ซาโปนินส์			
สารสกัดจากใบกระดูกไก่	500	94.17±1.85 (3.66)	172±4.35
	50	95.56±0.66 (0.79)	193±5.03
สารสกัดจากผลมะคำดีควาย	500	93.28±1.04 (5.47)	114±2.06
	50	80.67±2.26 (2.63)	198±2.42

ภาพที่ 25 ลักษณะของสปอร์ *C. gloeosporioides* เมื่อทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่างๆ (กำลังขยาย 400 เท่า)

(a) ชุดควบคุม ที่เวลา 0 ชั่วโมง

(b) ชุดควบคุม ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(c) น้ำมันเสม็ด 500 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(d) น้ำมันเสม็ด 50 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(e) น้ำมันข่าลิง 500 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(f) น้ำมันข่าลิง 50 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(g) พิเพอรีน 500 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

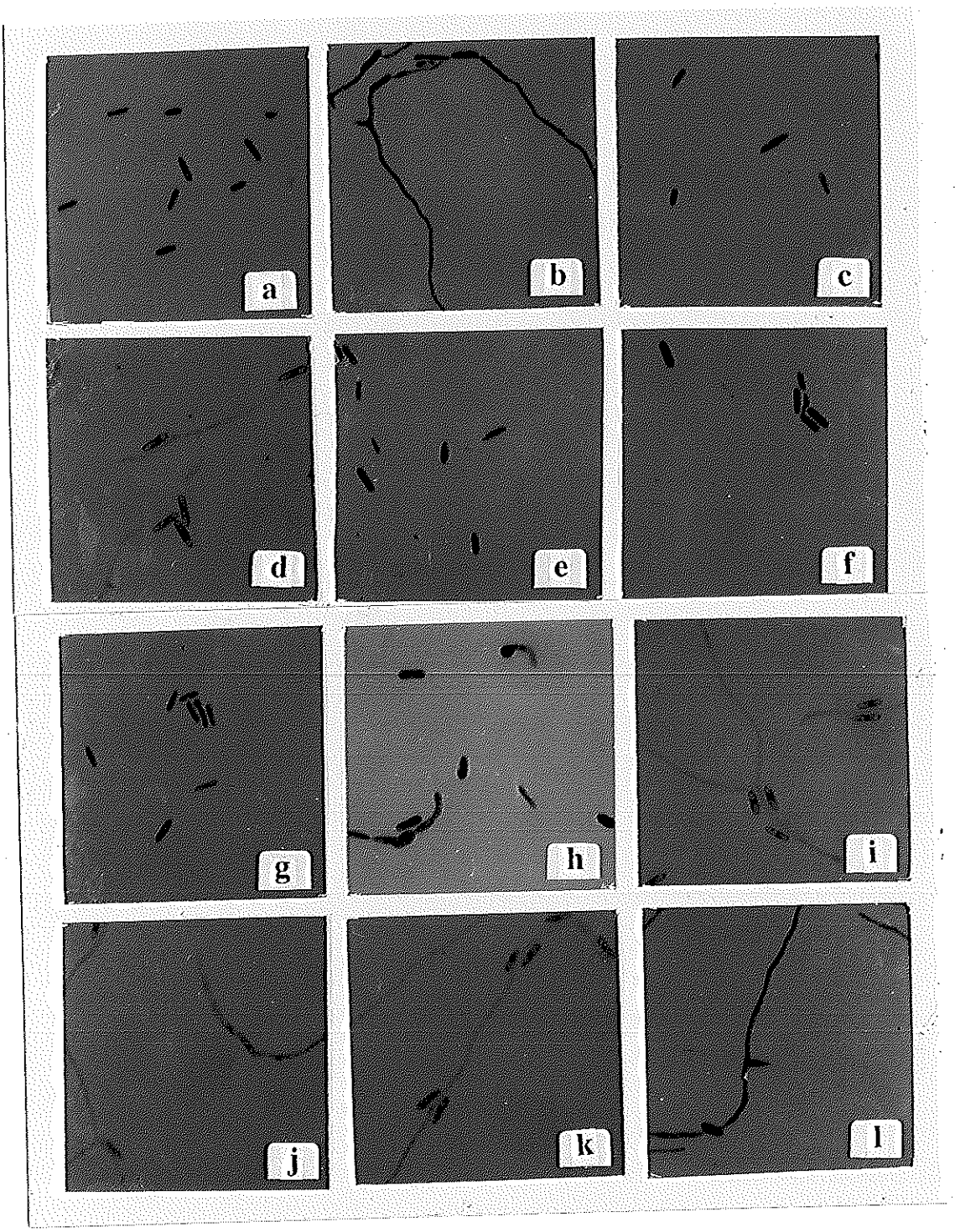
(h) พิเพอรีน 50 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(i) สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 500 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(j) สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 50 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(k) สารสกัดจากผลมะคำดีควาย 500 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(l) สารสกัดจากผลมะคำดีควาย 50 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง


a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l

ภาพที่ 26 ลักษณะของสปอร์ *A. brassicicola* เมื่อทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต่างๆ (กำลังขยาย 400 เท่า)

(a) ชุดควบคุม ที่เวลา 0 ชั่วโมง

(b) ชุดควบคุม ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(c) น้ำมันข่าลิง 500 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(d) น้ำมันข่าลิง 50 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(e) น้ำมันเสม็ด 500 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(f) น้ำมันเสม็ด 50 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(g) พิเพอรีน 50 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

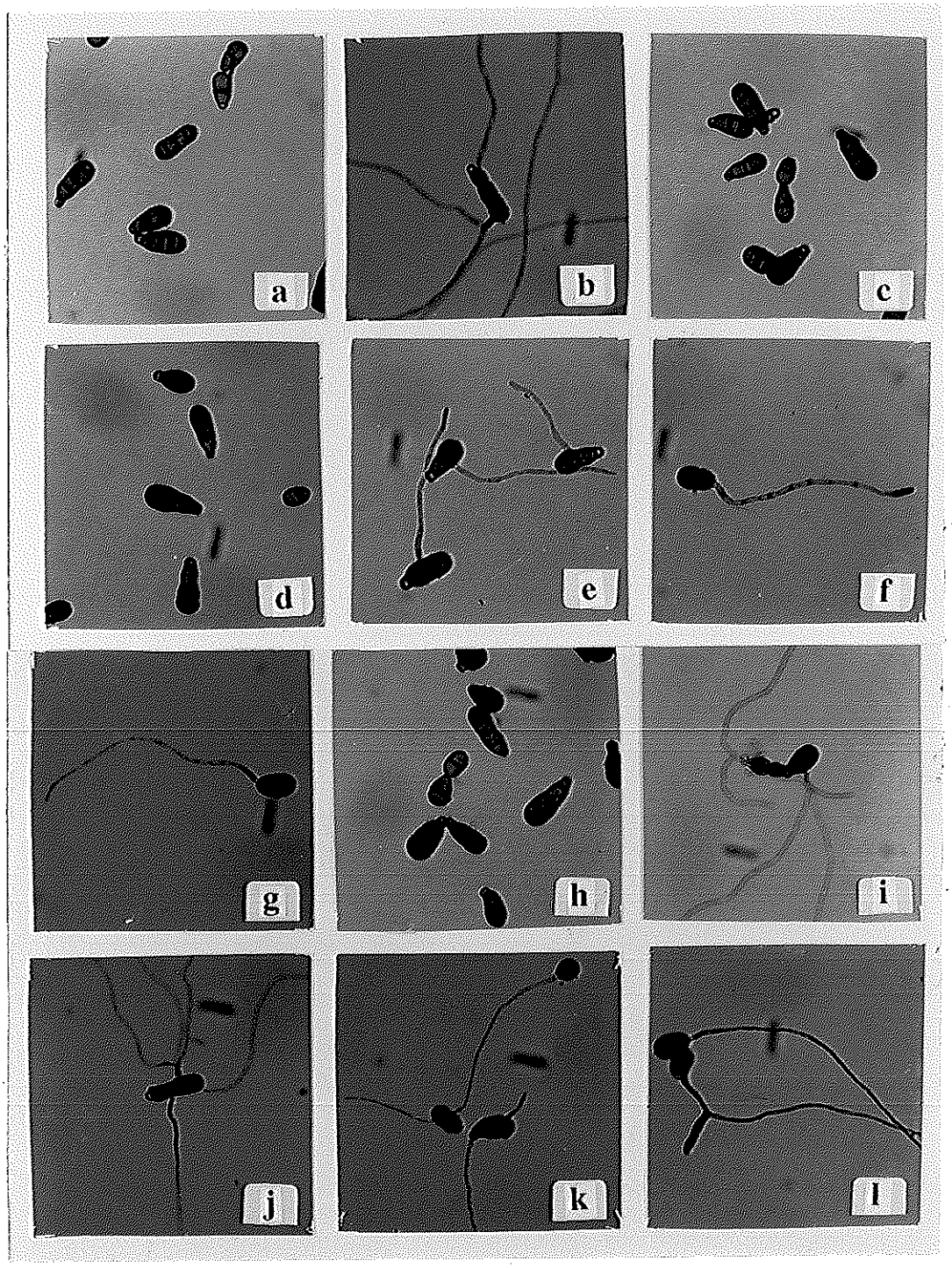
(h) พิเพอรีน 500 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(i) สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 500 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(j) สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 50 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(k) สารสกัดจากผลมะคำดีควาย 500 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

(l) สารสกัดจากผลมะคำดีควาย 50 (µg/ml) ที่เวลา 24 ชั่วโมง

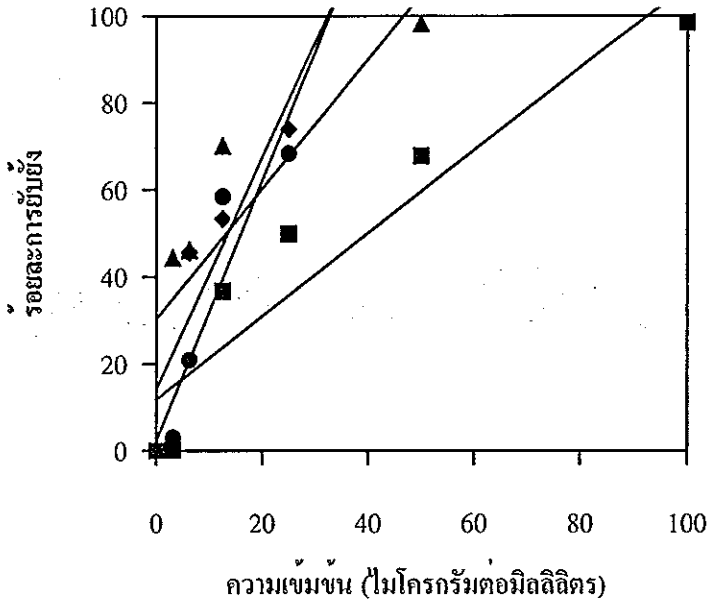

a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l

ตารางที่ 9 ร้อยละการงอก ร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์และความยาว germ tube ของสปอร์ *C. gloeosporioides* ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยและพิเพอรีนที่ความเข้มข้นต่างๆ

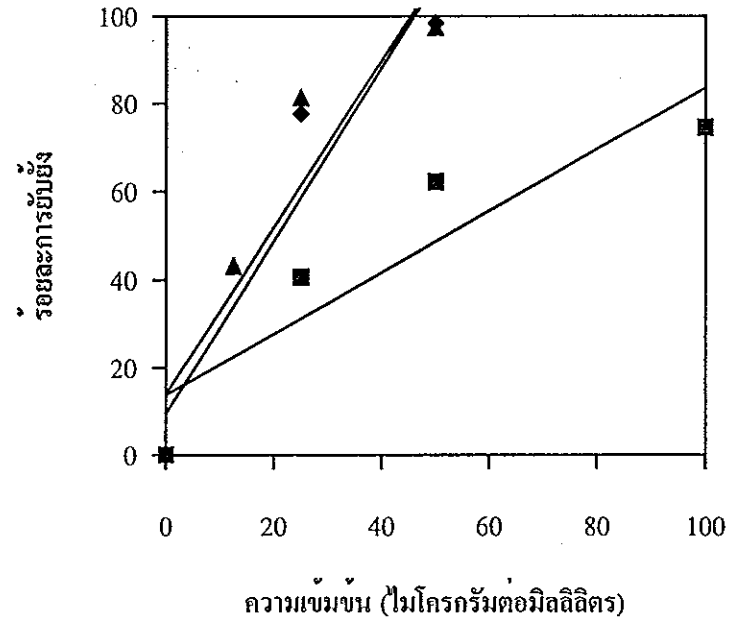
ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)	สารสกัด					
	น้ำมันข่าลิง		น้ำมันเสม็ด		พิเพอรีน	
	ร้อยละการงอก ±S.D. (ร้อยละการยับยั้งการงอก)	ความยาว germ tube ± S.D.	ร้อยละการงอก ± S.D. (ร้อยละการยับยั้งการงอก)	ความยาว germ tube ± S.D.	ร้อยละการงอก ± S.D. (ร้อยละการยับยั้งการงอก)	ความยาว germ tube ± S.D.
0	80.25±1.69 (0.00)	176.25±26.3	80.25±1.69 (0.00)	176.25±26.3	80.25±1.69 (0.00)	176.25±26.3
3.125	62.17±1.48 (39.98)	130.0±27.58	80.17±2.65 (0.20)	157.5±39.75	59.83±2.89 (44.42)	117.00±34.5
6.25	59.17±2.15 (45.64)	104.0±28.71	65.83±1.82 (32.71)	116.67±36.0	58.92±3.53 (46.09)	81.25±29.5
12.5	54.83±3.82 (53.32)	87.08±27.75	63.83±1.73 (36.74)	96.25±25.88	43.92±5.04 (70.05)	59.58±23.83
25	41.00±3.48 (73.90)	77.90±29.30	56.83±5.42 (49.85)	78.75±30.47	14.67±2.34 (96.66)	45.83±23.52
50	18.92±2.08 (94.44)	52.92±2.37	45.58±3.62 (67.74)	54.17±24.86	10.83±4.01 (98.18)	35.42±18.00
100	7.98±3.97 (99.01)	39.58±17.40	10.00±2.99 (98.45)	34.17±17.66	4.00±2.97 (99.75)	31.25±15.31
200	5.83±3.23 (99.47)	29.17±14.06	8.00±3.95 (99.01)	35.00±13.29	4.83±1.04 (99.64)	28.33±15.02

ตารางที่ 10 ร้อยละการงอก ร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์และความยาว germ tube ของสปอร์ *A. brassicicola* ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยและพิเพอรีนที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)	สารสกัด					
	น้ำมันข่าลิง		น้ำมันเสม็ด		พิเพอรีน	
	ร้อยละการงอก ± S.D. ร้อยละการยับยั้ง	ความยาว germ tube ± S.D.	ร้อยละการงอก ± S.D. ร้อยละการยับยั้ง	ความยาว germ tube ± S.D.	ร้อยละการยับยั้ง ± S.D. ร้อยละการยับยั้ง	ความยาว germ tube ± S.D.
0	92.83±1.64 (0.00)	362.5±49.0	92.83±1.64 (0.00)	3.5±49.0	92.75±1.20 (0.00)	360±47.39
12.5	79.00±2.90 (27.58)	220.0±38.0	74.50±3.08 (35.59)	340.8±42.8	69.92±1.32 (43.17)	210.42±55.8
25	43.92±3.10 (77.62)	99.25±24.7	71.50±1.04 (40.68)	190.0±49.5	40.08±3.62 (81.33)	115.42±28.9
50	11.75±1.00 (98.40)	87.5±26.3	57.08±2.56 (62.19)	114.0±28.5	14.92±3.87 (97.41)	65.42±26.28
100	0.00 (100.00)	0.00	46.92±2.51 (74.45)	58.25±20.75	0.00 (100.00)	0.00
200	0.00 (100.00)	0.00	0.00 (100.00)	0.00	0.00 (100.00)	0.00



(a)



(b)

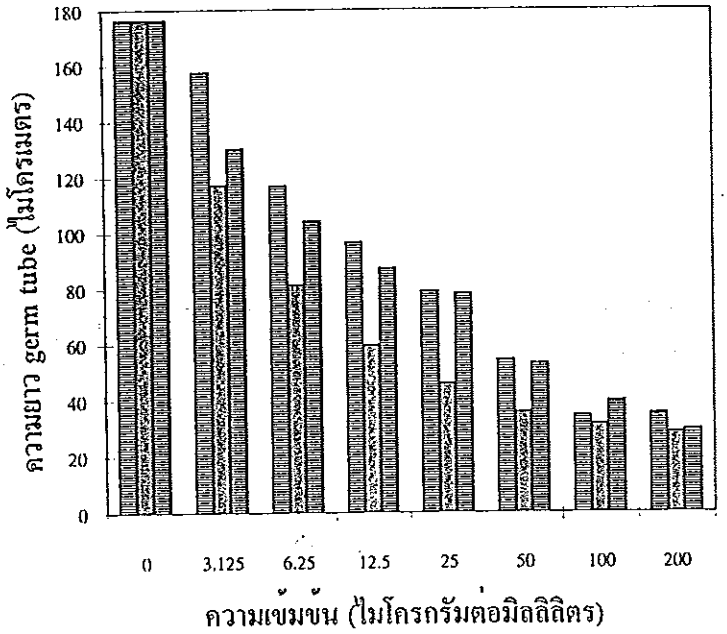
ภาพที่ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์

(a) *C. gloeosporioides* (b) *A. brassicicola*

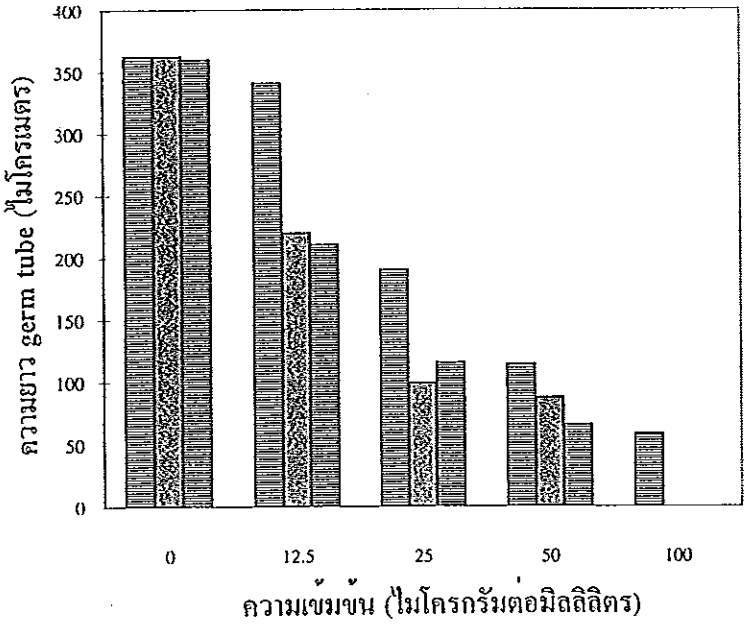
◆ น้ำมันข่าลิง ■ น้ำมันเสม็ด ▲ พิเพอรีน ● เบนโนมิล

ตารางที่ 11 สมการรีเกรชชันเส้นตรง สัมประสิทธิ์แห่งการกำหนด (R^2) และ EC_{50} ของสารสกัด ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการงอกของสปอร์

สารสกัด	เชื้อรา					
	C. gloeosporioides			*A. brassicicola*		
	สมการรีเกรชชันเส้นตรง	R^2	EC_{50}	สมการรีเกรชชันเส้นตรง	R^2	EC_{50}
น้ำมันหอมระเหย						
น้ำมันข่าลิง	y = 2.6583x + 14.140	0.8280	13.49	y = 1.9680x + 9.4733	0.8999	20.59
น้ำมันเสม็ด	y = 0.9538x + 11.859	0.8836	39.99	y = 0.6974x + 13.820	0.8299	51.88
พิเพอรีน	y = 1.4906x + 30.320	0.8070	13.20	y = 1.8937x + 14.052	0.8669	18.98
เบนโนมิล	y = 2.9838 + 2.1825	0.8732	16.03	-	-	-



(a)



(b)

ภาพที่ 28 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและค่าความยาว germ tube

(a) *C. gloeosporioides* (b) *A. brassicicola*

น้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ด พิเพอรีน

4.3 การศึกษาความอยู่รอดของสปอร์หลังจากสัมผัสกับสารสกัด

จากการศึกษาการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* หลังจากที่สัมผัสกับสารสกัดแล้ว โดยนำ spore suspension ที่สัมผัสกับสารสกัดแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 วัน พบว่าจำนวนสปอร์ที่งอกเป็นโคโลนีของทั้งชุดควบคุมและชุดทดสอบที่ความเข้มข้นของสารสกัดและเบนโนมิล 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีจำนวนสปอร์ใกล้เคียงกันดังตารางที่ 12 และตารางที่ 13

ตารางที่ 12 ปริมาณของสปอร์ *C. gloeosporioides* ที่งอกบนอาหาร PDA หลังจากที่สัมผัสกับสารสกัดแล้ว 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)	ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)	จำนวนสปอร์ที่งอก (x 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร)
ชุดควบคุม (เอธานอล 95%)	0	1.81
น้ำมันหอมระเหย		
น้ำมันข่าลิง	500	1.70
	50	1.76
น้ำมันเสม็ด	500	1.73
	50	1.79
พิเพอรีน	500	1.71
	50	1.74
ชุดควบคุม (DMSO + เอธานอล 95%)	0	1.63
เบนโนมิล	500	1.59
	50	1.64

ตารางที่ 13 ปริมาณของสปอร์ *A brassicicola* ที่งอกบนอาหาร PDA หลังจากที่สัมผัสกับสารสกัดแล้ว 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)	ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)	จำนวนสปอร์ที่งอก (x 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร)
ชุดควบคุม	0	4.80
น้ำมันหอมระเหย		
น้ำมันข่าลิง	500	4.63
	50	4.77
น้ำมันเสม็ด	500	4.67
	50	4.77
พิเพอรีน	500	4.60
	50	4.70

4.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อสปอร์ที่งอก

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อสปอร์ *C. gloeosporioides* ที่งอก โดยทำการเพาะเลี้ยงสปอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้สปอร์งอก จากการทดลองพบว่าร้อยละการงอกของสปอร์และความยาว germ tube ทุกการทดลองก่อนผสมสารสกัด มีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าร้อยละการงอกอยู่ในช่วง 78.83 - 83.05 และความยาว germ tube อยู่ในช่วง 181.53 - 201.27 ไมโครเมตร (ไม่ได้แสดงข้อมูล) เมื่อผสมน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าลิง น้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ด และพิเพอรีน ความเข้มข้น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเพาะเลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมง พบว่า การงอกของสปอร์ทั้งชุดควบคุมและชุดทดสอบทั้งสองความเข้มข้น มีค่าใกล้เคียงกัน คือมีค่าร้อยละการงอก 80.67 - 84.33 สำหรับผลต่อความยาว germ tube นั้น พบว่า ชุดควบคุมมีการเจริญของ germ tube อย่างมากเห็นเป็นสายราชัดเจน มีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 343.7 ไมโครเมตร ส่วนสปอร์ที่เลี้ยงในสารละลายที่ผสมสารสกัดจะมีความยาว germ tube สั้นกว่าชุดควบคุม กล่าวคือ มีค่าความยาว germ tube อยู่ในช่วง 190.27 - 263.77 ไมโครเมตร สำหรับเบนโนมิล ให้ผลทำนองเดียวกับสารสกัด (ตารางที่ 14)

ค่าร้อยละการงอกและความยาว germ tube ของสปอร์ *A. brassicicola* ที่เพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนผสมสารสกัด มีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 88.67 - 90.33 และความยาว germ tube อยู่ในช่วง 212.90 - 248.37 ไมโครเมตร (ไม่ได้แสดงข้อมูล) เมื่อผสมน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าลิง น้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ด และพิเพอรีน ความเข้มข้น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเพาะเลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมง พบว่า ฤทธิ์ของสารสกัดต่อสปอร์ *A. brassicicola* ที่งอก มีฤทธิ์คล้ายกับฤทธิ์ต่อสปอร์ *C. gloeosporioides* ที่งอก กล่าวคือการงอกของสปอร์ทั้งชุดควบคุมและชุดทดสอบทั้งสองความเข้มข้น มีค่าใกล้เคียงกัน คือมีค่าร้อยละการงอกอยู่ในช่วง 95.67 - 98.17 สำหรับผลต่อความยาว germ tube นั้น พบว่าชุดควบคุมมีการเจริญของ germ tube อย่างมากเห็นเป็นสายราชัดเจนเช่นเดียวกัน มีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 406.37 ไมโครเมตร ส่วนสปอร์ที่เลี้ยงในสารละลายที่ผสมสารสกัดจะมีความยาว germ tube สั้นกว่าชุดควบคุม กล่าวคือ มีค่าความยาว germ tube อยู่ในช่วง 232.40 - 348.37 ไมโครเมตร (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 14 ร้อยละการงอกของสปอร์ และความยาว germ tube ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อสปอร์ *C. gloeosporioides* ที่งอก

สารสกัด	ความเข้มข้น (µg/ml)	ร้อยละการงอกของสปอร์ ± S.D.	ความยาว germ tube ± S.D. (µm)
ชุดควบคุม (เอธานอล 95%)	0	84.33±4.71	343.70±12.58
น้ำมันหอมระเหย			
น้ำมันข่าลิง	500	81.83±2.59	190.27±15.83
	50	80.67±3.30	213.23±10.42
น้ำมันเสม็ด	500	82.00±0.94	205.53±14.96
	50	81.50±3.06	263.77±17.78
พิเพอรีน	500	81.33±2.36	192.67±14.81
	50	79.50±3.00	213.40±16.62
ชุดควบคุม (DMSO + เอธานอล 95%)	0	81.00±2.45	298.40±14.21
เบนโนมิล	500	81.31±3.21	175.25±15.36
	50	80.33±3.55	189.53±16.35

ตารางที่ 15 ร้อยละการงอกของสปอร์ และความยาว germ tube ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อสปอร์ *A. brassicicola* ที่งอก

สารสกัด	ความเข้มข้น (µg/ml)	ร้อยละการงอกของสปอร์ ± S.D.	ความยาว germ tube ± S.D. (µm)
ชุดควบคุม	0	97.00±0.94	406.37±16.35
น้ำมันหอมระเหย			
น้ำมันข่าลิง	500	95.67±3.77	236.97±13.83
	50	96.17±2.59	334.90±17.02
น้ำมันเสม็ด	500	96.00±1.89	239.13±10.25
	50	98.17±0.24	348.37±20.56
พิเพอรีน	500	95.67±0.47	232.40±17.00
	50	96.00±2.39	320.07±16.03

5. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการงอกและการสร้าง appressorium ของสปอร์ *C. gloeosporioides* บนผลพริก

จากการศึกษาการงอกและการสร้าง appressorium ของสปอร์ *C. gloeosporioides* บนผลพริกเขียวและผลพริกแดง ในสารละลายชุดควบคุม พบว่า พริกแดงอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *C. gloeosporioides* มากกว่าพริกเขียว โดยพบว่า สปอร์ชุดควบคุมบนพริกแดงจะเริ่มงอกในชั่วโมงที่ 12 โดยมีร้อยละการงอกเท่ากับ 40.5 แต่ยังไม่มีการสร้าง appressorium ในชั่วโมงที่ 18 ร้อยละการงอกเพิ่มเป็น 73.67 และมีการสร้าง appressorium ซึ่งจะมีลักษณะเป็นเซลล์กลมสีดำที่ด้านข้างหรือที่ส่วนปลายของสปอร์ (ภาพที่ 29h) โดยคิดเป็นร้อยละ 53.42 และในชั่วโมงที่ 24 สปอร์ส่วนใหญ่จะงอกและสร้าง appressorium โดยร้อยละการงอกและร้อยละการสร้าง appressorium ใกล้เคียงกัน คือ 88.50 และ 88.57 ตามลำดับ ส่วนสปอร์บนผลพริกเขียว จะเริ่มงอกในชั่วโมงที่ 18 โดยมีค่าร้อยละการงอกเท่ากับ 49.83 และร้อยละการสร้าง appressorium เท่ากับ 2.06 และในชั่วโมงที่ 24 แม้ว่าค่าร้อยละการงอกและร้อยละการสร้าง appressorium จะเพิ่มสูงขึ้น แต่ก็ยังน้อยกว่าการทดสอบบนผลพริกแดง (ตารางที่16, ภาพที่ 29)

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าลิงและใบเสม็ด และพิเพอร์รีน ต่อการงอกและการสร้าง appressorium ของสปอร์ *C. gloeosporioides* บนผลพริกเขียวและพริกแดง พบว่าสปอร์จะไม่งอกในสารละลายที่มีสารสกัดทั้งสองความเข้มข้น คือที่ความเข้มข้น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

ตารางที่ 16 ร้อยละการงอกของสปอร์และร้อยละการสร้าง appressorium ของสปอร์ *C. gloeosporioides* ชุดควบคุมบนผลพริก

เวลา (ชั่วโมง)	พริกเขียว		พริกแดง	
	ร้อยละการงอก	ร้อยละการสร้าง appressorium	ร้อยละการงอก	ร้อยละการสร้าง appressorium
0	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0.00	0.00	40.5±4.48	0.00
18	49.83±3.07	2.06±0.13	73.67±6.13	53.42±3.63
24	67.83±6.83	34.51±2.09	88.50±4.48	88.57±2.34

a
b
c
d
e
f
g
h
i

6. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในห้องทดลอง

จากการทดสอบในชุดที่ 1 ซึ่งหยดสารสกัดบนผลพริก บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง หยด spore suspension แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ผลการทดสอบพบว่า ชุดควบคุม (T14) ซึ่งใช้น้ำแทนสารสกัด จะมีขนาดของรอยแผลใหญ่ที่สุด คือ มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลเฉลี่ยเท่ากับ 11.93 มิลลิเมตร แต่ในชุดทดสอบที่ใช้น้ำมันข่าลิง 0.125% และ 0.25% (T1 และ T2) น้ำมันข่าลิงทั้งสองความเข้มข้นผสมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ (T7 และ T8) พิเพอรีน 0.5% ผสมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ (T12) และที่ใช้สารเคมีเบนโนมิล (T13) ไม่เห็นรอยแผล ส่วนในชุดทดลองอื่นๆ คือ T3, T4, T5, T6,T9, T10 และ T11 สังเกตเห็นรอยแผลมีสีจาง ความลึกของรอยแผลน้อยกว่าชุดควบคุม และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลอยู่ในช่วง 4.05-8.40 มิลลิเมตรซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 17, ภาพที่ 30 และ 31)

สำหรับผลการทดสอบในชุดที่ 2 ซึ่งหยดสารสกัดและ spore suspension พร้อมกัน พบว่า จะสังเกตเห็นรอยแผลในชุดควบคุม (T14) โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลเฉลี่ย เท่ากับ 14.42 มิลลิเมตร ส่วนในชุดทดสอบที่ใช้น้ำมันเสม็ด 0.5% ผสมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1% (T9) แม้จะสังเกตเห็นรอยแผลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลเฉลี่ย เท่ากับ 3.62 มิลลิเมตร แต่ก็เป็นรอยแผลเพียง 1 ซ้ำจากการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ ขณะที่ไม่เห็นรอยแผลในชุดการทดลองอื่น (ตารางที่ 17, ภาพที่ 30 และ 32)

จากการทดสอบในชุดที่ 3 ซึ่งหยด spore suspension บนผลพริก บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง หยดสารสกัด แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่า ชุดควบคุมมีขนาดของรอยแผลใหญ่ที่สุดเช่นเดียวกับชุดที่ 1 และชุดที่ 2 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลเฉลี่ยเท่ากับ 15.62 มิลลิเมตร แต่ไม่เห็นรอยแผลในชุดทดสอบที่ใช้ น้ำมันข่าลิง 0.125% และ 0.25% (T1 และ T2) น้ำมันเสม็ด 0.5% และ 1% (T3 และ T4) พิเพอรีน 0.25% และ 0.5% (T5 และ T6) และเบนโนมิล 12 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (T13) ส่วนในชุดการทดลองอื่นๆ คือ T7, T8, T9, T10, T11 และ T12 สังเกตเห็นรอยแผลจางๆ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 17, ภาพที่ 30 และ 33)

ตารางที่ 17 ฤทธิ์ของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในห้องทดลอง

ชุดทดลอง	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรอยแผล ± S.D. (มิลลิเมตร)		
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3
T1 (AC 0.125%)	0.00*	0.00*	0.00*
T2 (AC 0.25%)	0.00*	0.00*	0.00*
T3 (ML 0.5%)	4.78 ± 0.67*	0.00*	0.00*
T4 (ML 1%)	4.05 ± 0.26*	0.00*	0.00*
T5 (PN 0.25%)	5.80 ± 0.64*	0.00*	0.00*
T6 (PN 0.5%)	5.20 ± 0.91*	0.00*	0.00*
T7 (AC 0.125% + MR 1%)	0.00*	0.00*	4.90 ± 0.30*
T8 (AC 0.25% + MR 2%)	0.00*	0.00*	4.63 ± 0.38*
T9 (ML 0.5% + MR 1%)	6.50 ± 0.78*	3.62 ± 1.48*[a]	5.78 ± 1.78*
T10 (ML 1% + MR 2%)	8.40 ± 3.37*	0.00*	4.58 ± 0.14*
T11 (PN 0.25% + MR 1%)	5.88 ± 2.28*	0.00*	5.60 ± 0.59*
T12 (PN 0.5% +MR 2%)	0.00*	0.00*	3.48 ± 0.70*
T13 (BM 12กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร)	0.00*	0.00*	0.00*
T14 (น้ำ (ชุดควบคุม))	11.93 ± 1.40	14.42 ± 1.16	15.62 ± 0.67

* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P< 0.05)

[a] สังเกตเห็นรอยแผลเพียง 1 ซ้ำ จากทั้งหมด 3 ซ้ำ

ชุดที่ 1 หยดสารสกัดบนผลพริก 24 ชั่วโมง แล้วจึงหยด spore suspension

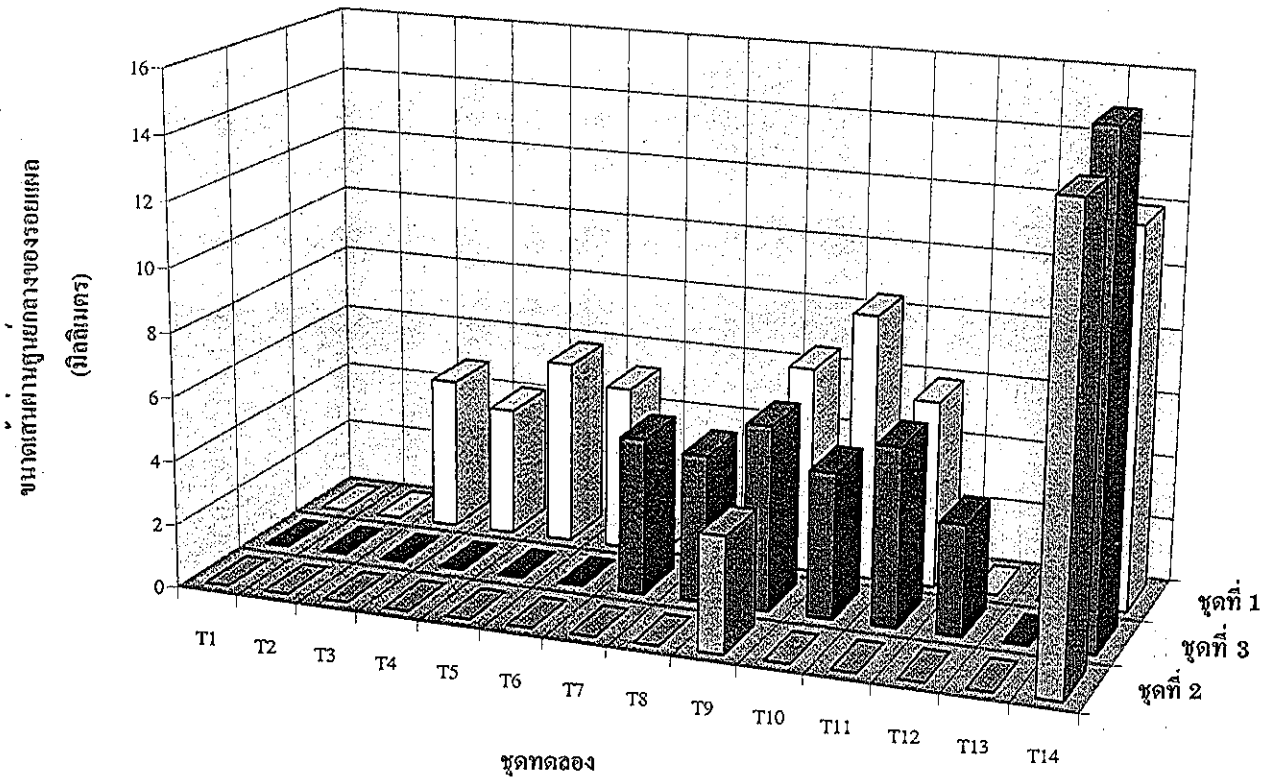
ชุดที่ 2 หยดสารสกัดและ spore suspension พร้อมกัน

ชุดที่ 3 หยด spore suspension บนผลพริก 24 ชั่วโมง แล้วจึงหยดสารสกัด

AC หมายถึง น้ำมันข่าลิง ML หมายถึง น้ำมันเสม็ด

PN หมายถึง พิเพอรีน MR หมายถึง สารสกัดจากใบกระดูกไก่

BM หมายถึง เบนโนมิล



ภาพที่ 30 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลเมื่อทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยและพิเพอรีนต่อการต้านโรคแอนแทรคโนสพริกในห้องทดลอง

ภาพที่ 31 ผลพริกที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในห้องทดลอง ในชุดที่ 1 (หยดสารสกัดบนผลพริก 24 ชั่วโมง แล้วจึงหยด spore suspension)

T1 น้ำมันข่าลิง 0.125%

T2 น้ำมันข่าลิง 0.25%

T3 น้ำมันเสม็ด 0.5%

T4 น้ำมันเสม็ด 1%

T5 พิเพอรีน 0.25%

T6 พิเพอรีน 0.5%

T7 น้ำมันข่าลิง 0.125% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

T8 น้ำมันข่าลิง 0.25% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%

T9 น้ำมันเสม็ด 0.5% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

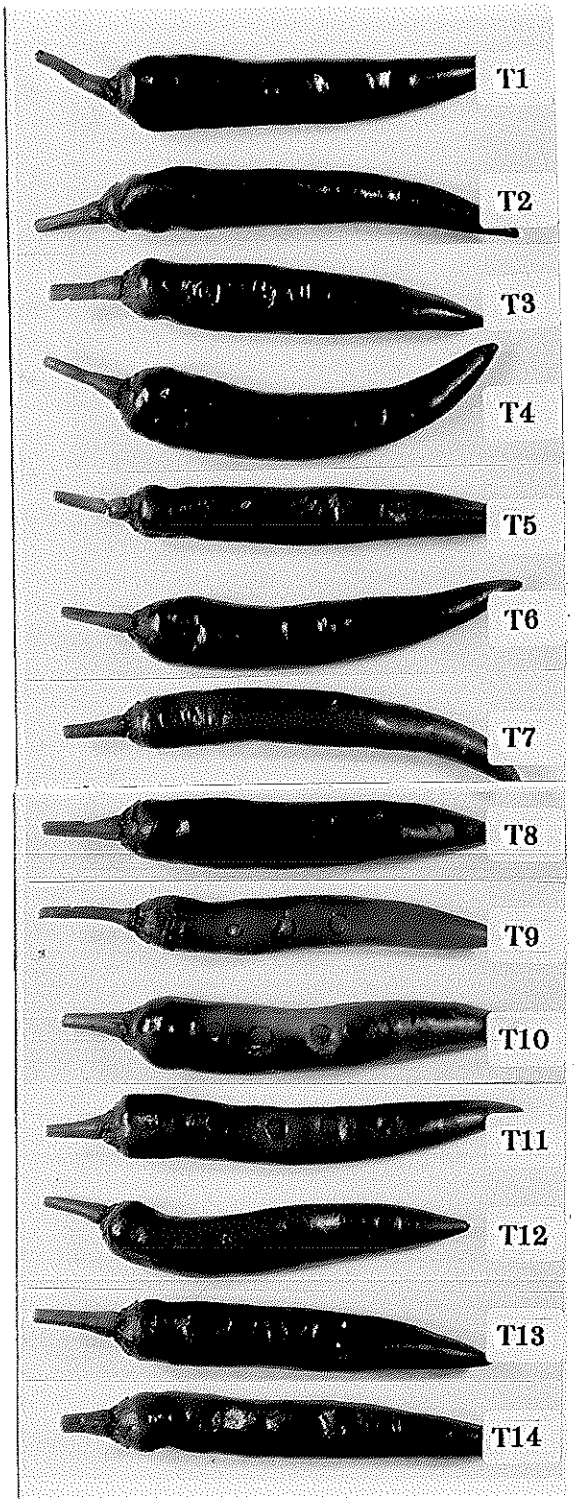
T10 น้ำมันเสม็ด 1% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%

T11 พิเพอรีน 0.25% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

T12 พิเพอรีน 0.5% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%

T13 เบนโนมิล 12 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

T14 น้ำ (ชุดควบคุม)


T1
T2
T3
T4
T5
T6
T7
T8
T9
T10
T11
T12
T13
T14

ภาพที่ 32 ผลพริกที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในห้องทดลอง ในชุดที่ 2 (หยดสารสกัดและ spore suspension พร้อมกัน)

T1 น้ำมันข่าลิง 0.125%

T2 น้ำมันข่าลิง 0.25%

T3 น้ำมันเสม็ด 0.5%

T4 น้ำมันเสม็ด 1%

T5 พิเพอรีน 0.25%

T6 พิเพอรีน 0.5%

T7 น้ำมันข่าลิง 0.125% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

T8 น้ำมันข่าลิง 0.25% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%

T9 น้ำมันเสม็ด 0.5% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

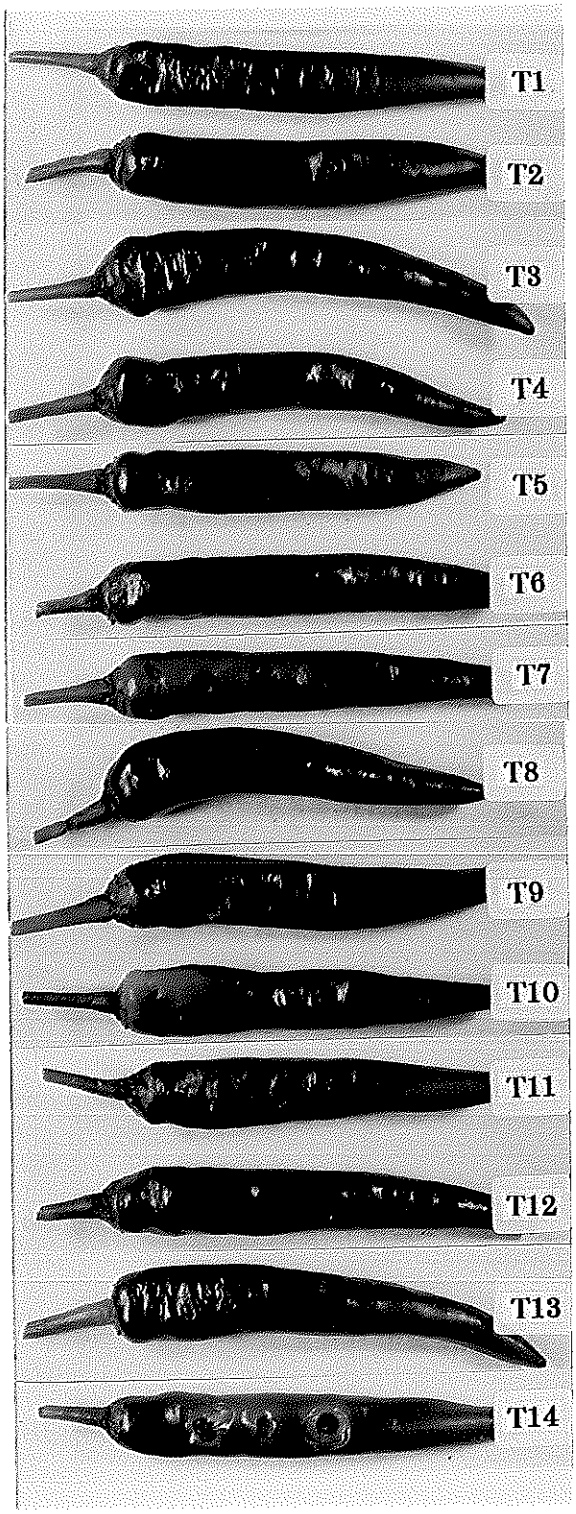
T10 น้ำมันเสม็ด 1% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%

T11 พิเพอรีน 0.25% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

T12 พิเพอรีน 0.5% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%

T13 เบนโนมิล 12 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

T14 น้ำ (ชุดควบคุม)


T1
T2
T3
T4
T5
T6
T7
T8
T9
T10
T11
T12
T13
T14

ภาพที่ 33 ผลพริกที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในห้องทดลอง ในชุดที่ 3 (หยด spore suspension บนผลพริก 24 ชั่วโมง แล้วจึงหยดสารสกัด)

T1 น้ำมันข่าลิง 0.125%

T2 น้ำมันข่าลิง 0.25%

T3 น้ำมันเสม็ด 0.5%

T4 น้ำมันเสม็ด 1%

T5 พิเพอรีน 0.25%

T6 พิเพอรีน 0.5%

T7 น้ำมันข่าลิง 0.125% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

T8 น้ำมันข่าลิง 0.25% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%

T9 น้ำมันเสม็ด 0.5% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

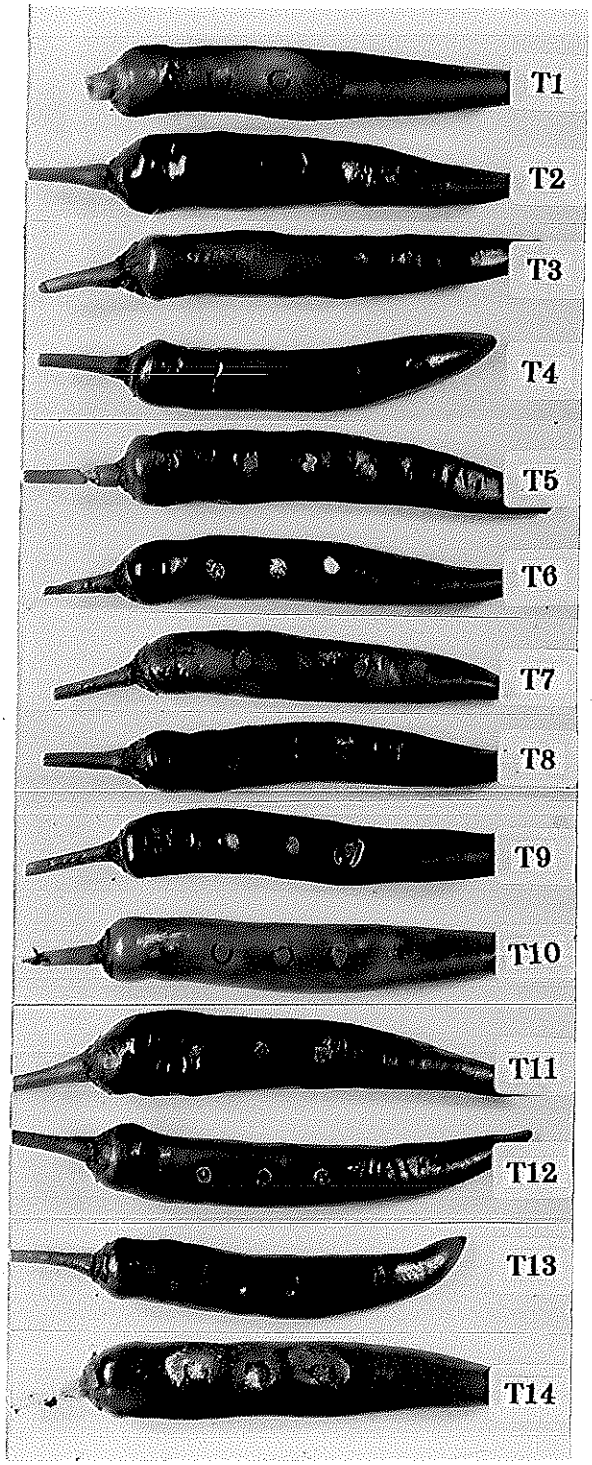
T10 น้ำมันเสม็ด 1% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%

T11 พิเพอรีน 0.25% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

T12 พิเพอรีน 0.5% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%

T13 เบนโนมิล 12 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

T14 น้ำ (ชุดควบคุม)


T1
T2
T3
T4
T5
T6
T7
T8
T9
T10
T11
T12
T13
T14

7. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการต้านเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบคะน้าในห้องทดลอง

จากการทดสอบในชุดที่ 1 ซึ่งหยดสารสกัดบนใบคะน้า บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง หยด spore suspension แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดสอบพบว่า ชุดควบคุมจะมีขนาดของรอยแผลใหญ่ที่สุด เห็นเป็นรอยสีดำชัดเจน โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของรอยแผลเท่ากับ 17.46 มิลลิเมตร ใบคะน้าที่ทดสอบกับน้ำมันข่าลิงและพิเพอรีนที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะเห็นรอยแผลจางๆ และมีขนาดของรอยแผลเล็กสุด คือมีค่าเท่ากับ 4.21 และ 4.25 มิลลิเมตร ตามลำดับ สำหรับน้ำมันเสม็ดความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะสังเกตเห็นจุดสีดำบริเวณรอยแผลชัดกว่าที่ทดสอบด้วยน้ำมันข่าลิงและพิเพอรีน และมีขนาดของรอยแผลกว้างกว่า คือมีขนาดเท่ากับ 6.35 มิลลิเมตร แต่ขนาดของรอยแผลก็เล็กกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในสารสกัดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะพบว่ารอยแผลมีสีดำชัดเจน และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 5.56 - 7.21 มิลลิเมตร (ตารางที่ 18, ภาพที่ 34 และ 35a)

จากการทดสอบในชุดที่ 2 ซึ่งหยดสารสกัดและ spore suspension บนใบคะน้าพร้อมกัน แล้วบ่มพบว่า ชุดควบคุมจะมีขนาดของรอยแผลใหญ่ที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผล เท่ากับ 17.54 มิลลิเมตร ขณะที่ไม่เห็นรอยแผลในชุดที่ทดสอบด้วยน้ำมันข่าลิงและพิเพอรีนที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ส่วนในน้ำมันเสม็ด ความเข้มข้น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำมันข่าลิงและพิเพอรีนที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะสังเกตเห็นรอยแผลจางๆ แต่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลก็แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 18, ภาพที่ 34 และ 35b)

จากการทดสอบในชุดที่ 3 ซึ่งหยด spore suspension ลงบนใบคะน้า บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง หยดสารสกัด แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน ผลการทดสอบพบว่า ชุดควบคุมมีขนาดของรอยแผลใหญ่ที่สุดเช่นเดียวกับชุดที่ 1 และ 2 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของรอยแผล เท่ากับ 18.66 มิลลิเมตร น้ำมันข่าลิงและพิเพอรีนที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะควบคุมโรคได้ดีที่สุดเช่นเดียวกับการทดสอบชุดที่ 1 กล่าวคือ มีขนาดของรอยแผลเล็กสุด โดยมีค่าเท่ากับ 7.46 และ 7.27 มิลลิเมตร ส่วนในสารสกัดอื่นๆ แม้จะมีขนาดของรอยแผลโตกว่านี้ แต่ขนาดของรอยแผลก็ยังเล็กกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 18, ภาพที่ 34 และ 35c)

ตารางที่ 18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลเมื่อทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยและพิเพอรีน ต่อการต้านเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบคะน้า

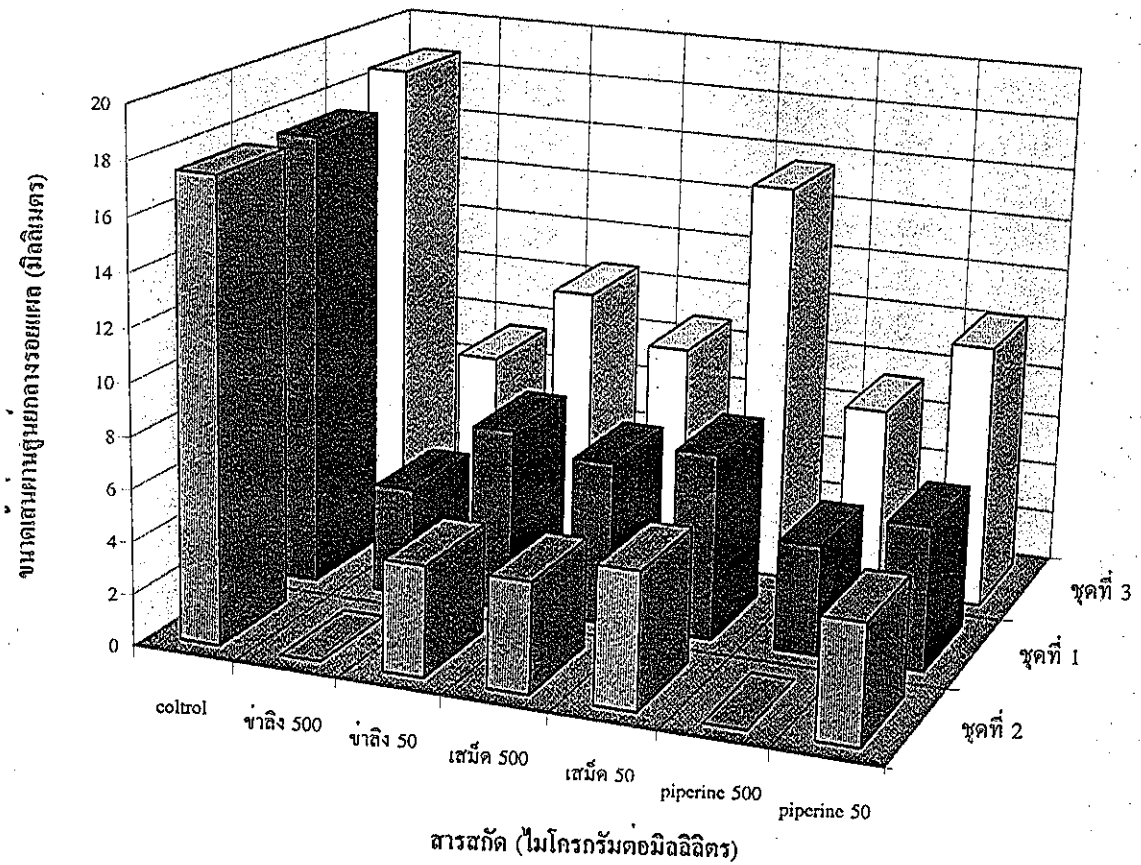
สารสกัด	ความเข้มข้น (µg/ml)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรอยแผล ± S.D. (มิลลิเมตร)		
		ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3
ชุดควบคุม	0	17.46 ± 0.30	17.54 ± 0.10	18.66 ± 0.15
น้ำมันเสม็ด	500	6.35 ± 0.11*	4.23 ± 0.10*	8.77 ± 0.20*
	50	7.21 ± 0.19*	5.21 ± 0.18*	15.56 ± 0.16*
น้ำมันข่าลิง	500	4.21 ± 0.12*	0.00 ± 0.00*	7.46 ± 0.13*
	50	7.09 ± 0.09*	4.24 ± 0.08*	10.54 ± 0.67*
พิเพอรีน	500	4.25 ± 0.16*	0.00 ± 0.00*	7.27 ± 0.17*
	50	5.56 ± 0.14*	4.56 ± 0.17*	10.27 ± 0.15*

* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ชุดที่ 1 หยดสารสกัดบนใบคะน้า 24 ชั่วโมง แล้วจึงหยด spore suspension

ชุดที่ 2 หยดสารสกัดและ spore suspension พร้อมกัน

ชุดที่ 3 หยด spore suspension บนใบคะน้า 24 ชั่วโมง แล้วจึงหยดสารสกัด



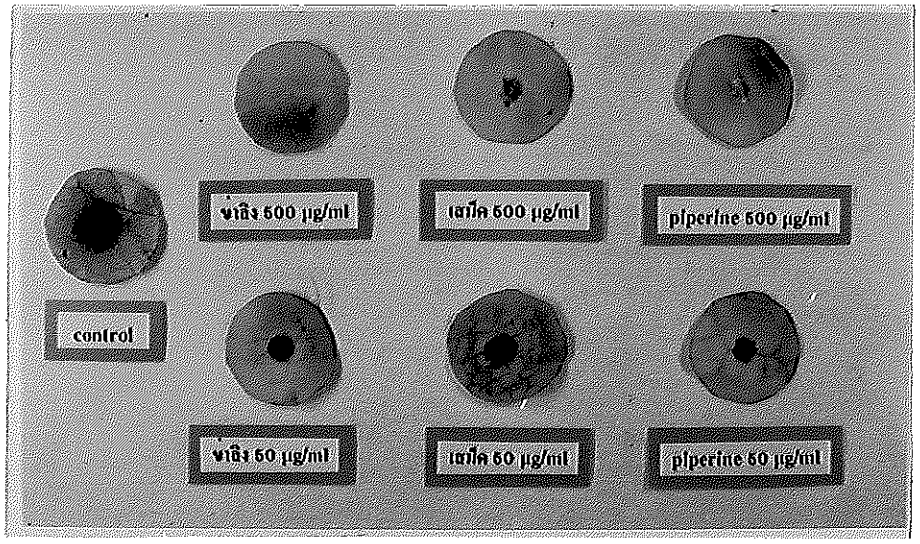
ภาพที่ 34 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลเมื่อทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย จากเหง้าข่าลิงและใบเสม็ด และพิเพอรีน ต่อการต้านเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบคะน้า ในห้องทดลอง

ภาพที่ 35 ชิ้นใบคะน้าที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยและพิเพอรีนในการควบคุมโรคใบจุดบนใบคะน้า

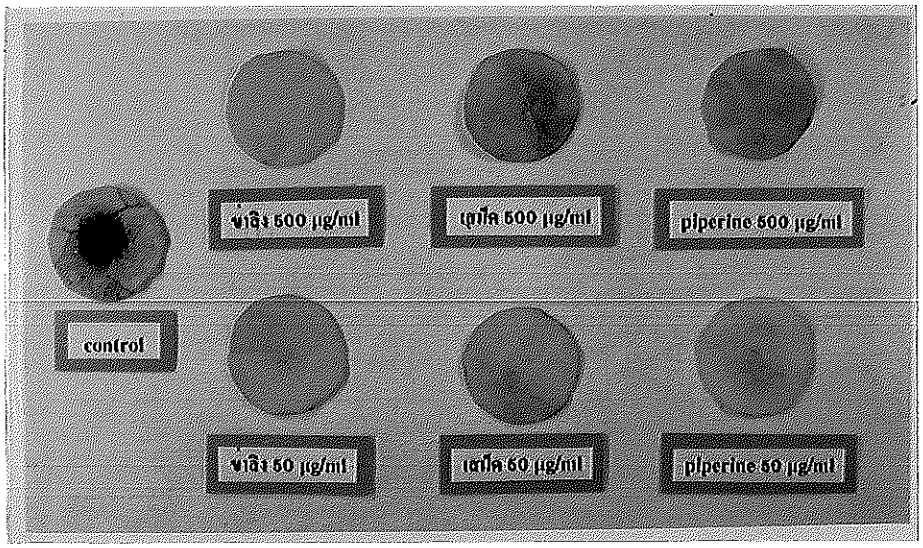
(a) ชุดที่ 1 หยดสารสกัด 24 ชั่วโมง แล้วจึงหยด spore suspension

(b) ชุดที่ 2 หยดสารสกัดและ spore suspension พร้อมกัน

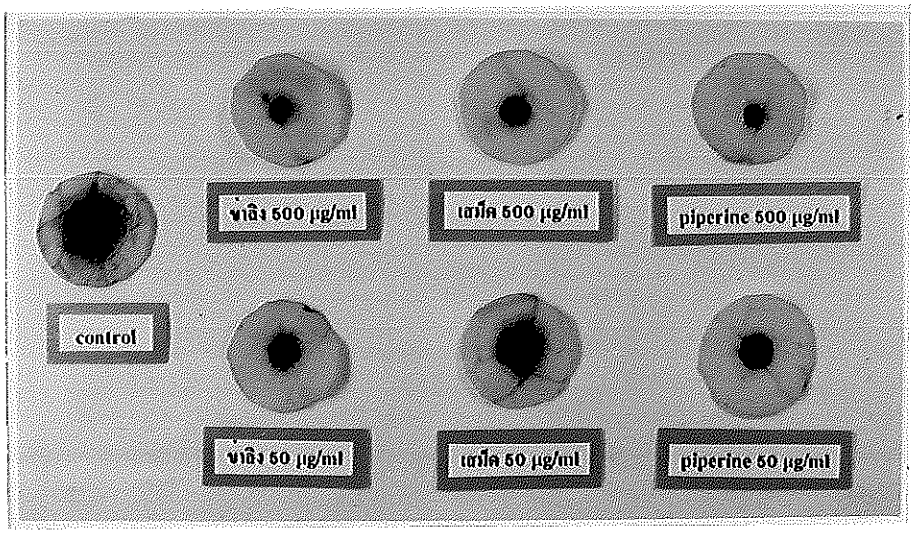
(c) ชุดที่ 3 หยด spore suspension 24 ชั่วโมงแล้วจึงหยดสารสกัด


ขาเดิง 500 µg/ml
เสม็ด 500 µg/ml
piperine 500 µg/ml
control
ขาเดิง 50 µg/ml
เสม็ด 50 µg/ml
piperine 50 µg/ml

(a)


ขาเดิง 500 µg/ml
เสม็ด 500 µg/ml
piperine 500 µg/ml
control
ขาเดิง 50 µg/ml
เสม็ด 50 µg/ml
piperine 50 µg/ml

(b)


ขาเดิง 500 µg/ml
เสม็ด 500 µg/ml
piperine 500 µg/ml
control
ขาเดิง 50 µg/ml
เสม็ด 50 µg/ml
piperine 50 µg/ml

(c)

8. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในแปลงทดลอง

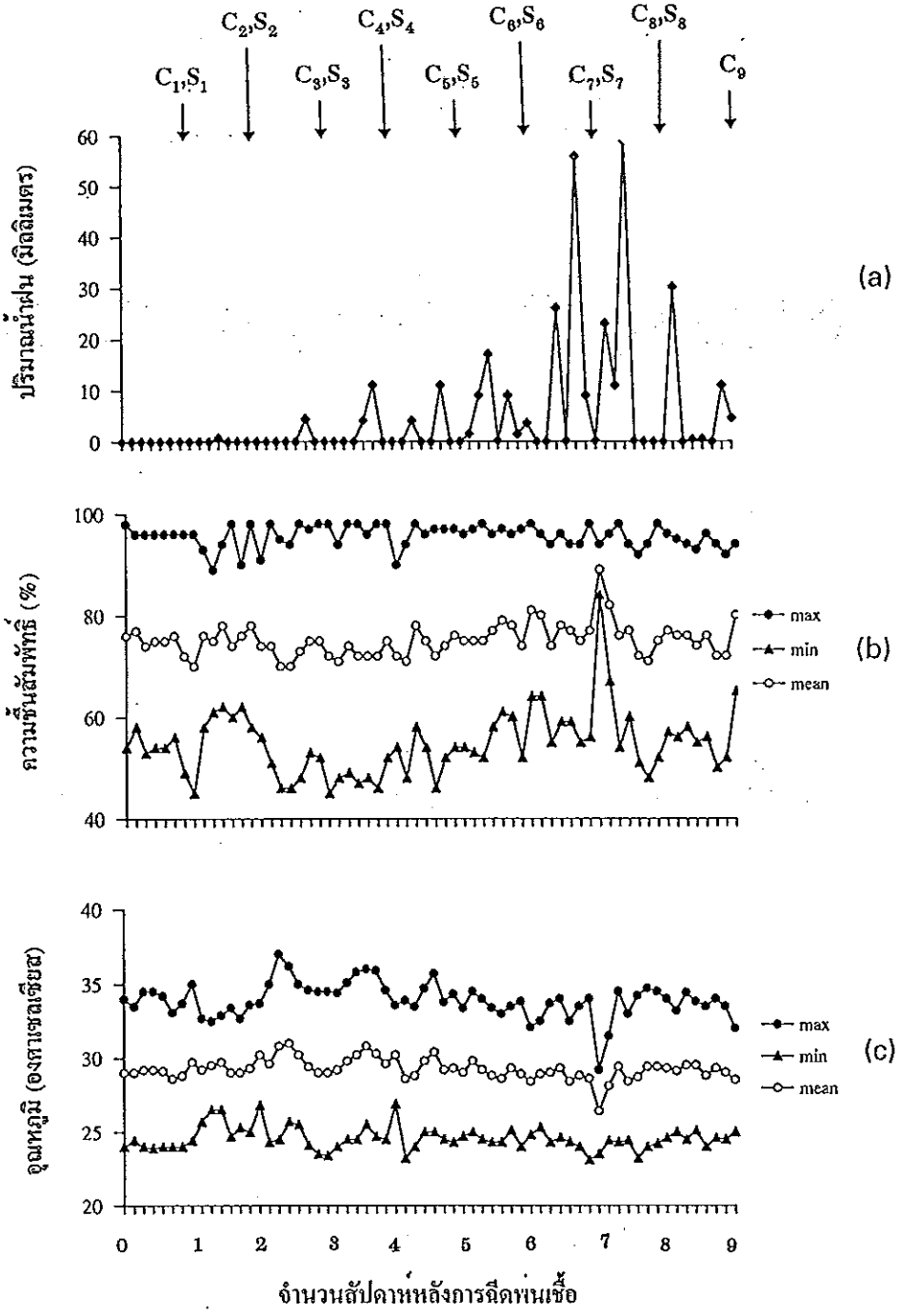
ได้ทำการทดสอบในแปลงทดลอง ระหว่างวันที่ 16 มีนาคม 2539 ถึง วันที่ 11 พฤษภาคม 2539

8.1 ข้อมูลทางอุตุนิยมวิทยา

จากการตรวจวัดปริมาณน้ำฝนในระหว่างการทดลอง พบว่า ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 หลังการฉีดพ่น spore suspension ไม่มีฝนตกหรือมีฝนตกปริมาณน้อยมากจนวัดค่าไม่ได้ ส่วนในสัปดาห์ที่ 3 จนถึงสัปดาห์ที่ 6 มีปริมาณฝนเพิ่มมากขึ้น และเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 7 และสัปดาห์ที่ 8 โดยมีปริมาณฝนสูงสุด เท่ากับ 59 มิลลิเมตร หลังจากนั้นปริมาณน้ำฝนลดน้อยลง ในสัปดาห์ที่ 9 ดังแสดงในภาพที่ 36

ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยของอากาศในระหว่างการทดลอง มีค่าใกล้เคียงกัน อยู่ในช่วง 51-84 % โดยความชื้นสัมพัทธ์สูงที่สุดในวันที่ทำการฉีดพ่นสารครั้งที่ 7 และมีค่าต่ำสุดในวันที่ฉีดพ่นสารครั้งที่ 8

อุณหภูมิของอากาศตลอดการทดลองในแต่ละวัน มีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 26.4-31 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 3 หลังการฉีดพ่น spore suspension และต่ำที่สุดในวันที่ฉีดพ่นสารครั้งที่ 7



ภาพที่ 36 แสดง a) ปริมาณน้ำฝน b) เปอร์เซ็นต์ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ c) อุณหภูมิ วัดโดยสถานีตรวจอากาศเกษตรคอหงส์ (เมื่อ C แสดงเวลาที่ตรวจวัดผล และ S แสดงเวลาที่ฉีดพ่นสาร)

8.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในแปลงทดลอง (ตารางที่ 19 และ ภาพที่ 37)

หลังจากปลูกเชื้อ 1 สัปดาห์ ทำการฉีดพ่นสารสกัดสัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยฉีดจำนวน 8 ครั้ง ก่อนการฉีดพ่นยาทุกครั้งจะถ่ายภาพ นับจำนวนผลพริกที่เป็นโรคและผลพริกทั้งหมดในแต่ละชุดทดลอง เพื่อคำนวณหาร้อยละการเกิดโรค และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติของค่าร้อยละการเกิดโรค

8.2.1 การตรวจผลครั้งที่ 1 (หลังการฉีดพ่นเชื้อ 1 สัปดาห์)

ผลการตรวจวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่าร้อยละการเกิดโรค พบว่า ชุดทดลอง ไม่มีผลต่อค่าร้อยละการเกิดโรค (ตารางภาคผนวกที่ 1) โดยร้อยละการเกิดโรคของชุดควบคุม (T14) มีค่าเท่ากับ 0.40 ซึ่งไม่แตกต่างกับชุดทดลองอื่นๆ ซึ่งมีค่าร้อยละการเกิดโรคเท่ากับ 0

8.2.2 การตรวจผลครั้งที่ 2 (หลังการฉีดพ่นสารครั้งที่หนึ่ง 1 สัปดาห์)

ผลพริกแสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส มีลักษณะเป็นรอยแผลรูปวงรีหรือวงกลม เนื้อเยื่อบริเวณแผลแห้งและยุบตัวลง รอยแผลสีน้ำตาลและมีวงสีดำซ้อนกันเป็นชั้นๆ (concentric ring) ผลพริกที่เกิดโรคในสัปดาห์นี้เป็นผลพริกที่แก่จัดหรือผลพริกที่เริ่มเปลี่ยนสี และผลพริกในชุดควบคุมที่ฉีดพ่นน้ำแสดงอาการของโรคชัดเจนที่สุด

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่าร้อยละการเกิดโรค ในการตรวจผลครั้งนี้ พบว่า มีความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของร้อยละการเกิดโรคของชุดทดลอง (ตารางภาคผนวกที่ 2) โดยชุดควบคุมจะมีค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงสุด เท่ากับ 26.89 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดทดลองอื่นๆทั้งหมด และมีค่าร้อยละการเกิดโรคต่ำในชุดทดลองที่ฉีดพ่นน้ำมันเสม็ด 1% ร่วมกับ สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2% (T10) และ ชุดทดลองที่ฉีดพ่นเบนโนมิล 12 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (T13) โดยมีค่าร้อยละการเกิดโรคเท่ากับ 1.20 และ 1.22 ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ ชุดทดลองที่ฉีดพ่นพิเพอรีน 0.5% ร่วมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2% (T12) ชุดทดลองที่ฉีดพ่นน้ำมันข่าลิง 0.25% ร่วมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2% (T8) ชุดทดลองที่ฉีดพ่นพิเพอรีน 0.25% (T5) ชุดทดลองที่ฉีดพ่นพิเพอรีน 0.25% ร่วมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1% (T11) และชุดทดลองที่ฉีดพ่นน้ำมันเสม็ดความเข้มข้น 1% (T4) ซึ่งมีค่าร้อยละการเกิดโรคเท่ากับ 2.45, 3.11, 3.16, 3.85 และ 4.53 ตามลำดับ

8.2.3 การตรวจผลครั้งที่ 3 (หลังการฉีดพ่นสารครั้งที่สอง 1 สัปดาห์)

ผลพริกแสดงอาการของโรคเช่นเดียวกับการตรวจผลครั้งที่ 2 แต่มีความรุนแรงของโรคมากกว่า คือมีขนาดของรอยแผลใหญ่กว่าเดิม เนื่องจากในผลพริกบางผลมีรอยแผลเกิดขึ้นมากกว่า 1 รอยแผลและเจริญมาเชื่อมกันทำให้แผลมีขนาดใหญ่ขึ้น ลักษณะรอยแผลของผลบนต้นพริกของชุดทดสอบต่างๆ แสดงดังภาพที่ 38

จากการนำผลพริกที่เก็บหลังจากการตรวจผลครั้งที่ 3 มาถ่ายภาพ จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า ชุดควบคุม (T14) แสดงลักษณะอาการของโรครุนแรงที่สุด (ภาพที่ 39, 40)

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ พบว่า มีความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของร้อยละการเกิดโรคของชุดทดลอง (ตารางภาคผนวกที่ 3) โดยชุดควบคุม (T14) ที่ฉีดพ่นน้ำ มีค่าร้อยละการเกิดโรคสูงสุดเท่ากับ 39.14 สูงกว่าทุกชุดทดลอง ที่ทำการทดลองในครั้งนี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และชุดทดลองอื่นๆที่ฉีดพ่นสารสกัดจะมีค่าร้อยละการเกิดโรคอยู่ในช่วง 7.00 - 11.84 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

8.2.4 การตรวจผลครั้งที่ 4 (หลังการฉีดพ่นสารครั้งที่สาม 1 สัปดาห์)

อาการของโรคในการตรวจผลครั้งที่ 4 มีลักษณะใกล้เคียงกับการตรวจผลครั้งที่ 3 และชุดควบคุมแสดงอาการของโรครุนแรงที่สุด

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ พบว่า มีความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของร้อยละการเกิดโรคของชุดทดลอง (ตารางภาคผนวกที่ 4) โดยชุดควบคุม มีค่าร้อยละการเกิดโรคสูงสุดเท่ากับ 29.40 สูงกว่าทุกชุดทดลอง ที่ทำการทดลองในครั้งนี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาในกลุ่มของชุดทดลองที่ฉีดพ่นสารสกัด พบว่า มีค่าร้อยละการเกิดโรคอยู่ในช่วง 8.07 - 14.59 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

8.2.5 การตรวจผลครั้งที่ 5 (หลังการฉีดพ่นสารครั้งที่สี่ 1 สัปดาห์)

อาการของโรคในการตรวจผลครั้งที่ 5 มีความรุนแรงมากกว่าการตรวจผลครั้งที่ 4 เล็กน้อย และชุดควบคุมแสดงอาการของโรครุนแรงที่สุด

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ พบว่า มีความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของร้อยละการเกิดโรคของชุดทดลอง (ตารางภาคผนวกที่ 5) โดยชุดควบคุม มีค่าร้อยละการเกิดโรคสูงสุดเท่ากับ 47.26 สูงกว่าทุกชุดทดลองที่ทำการทดลองในครั้งนี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาในกลุ่มของชุดทดลองที่ฉีดพ่นสารสกัด พบว่า มีค่าร้อยละการเกิดโรคอยู่ในช่วง 17.11 - 26.51 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

8.2.6 การตรวจผลครั้งที่ 6 (หลังการฉีดพ่นสารครั้งที่ห้า 1 สัปดาห์)

อาการของโรคในการตรวจผลครั้งที่ 6 มีความรุนแรงมากกว่าการตรวจผลครั้งที่ 5 เล็กน้อย และชุดควบคุมแสดงอาการของโรครุนแรงที่สุด

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ พบว่า มีความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของร้อยละการเกิดโรคของชุดทดลอง (ตารางภาคผนวกที่ 6) โดยชุดควบคุม มีค่าร้อยละการเกิดโรคสูงสุดเท่ากับ 66.71 สูงกว่าทุกชุดทดลอง ที่ทำการทดลองในครั้งนี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ชุดทดลองที่ฉีดพ่นเบนโนมิล 12 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร (T13) มีค่าร้อยละการเกิดโรคต่ำสุดเท่ากับ 21.14 แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดทดลองที่ฉีดพ่น น้ำมันเสม็ด 1% (T4) ชุดทดลองที่ฉีดพ่นพิเพอรีน 0.5% ร่วมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2% (T12) ชุดทดลองที่ฉีดพ่นพิเพอรีน 0.25% (T5) ชุดทดลองที่ฉีดพ่นพิเพอรีน 0.5% (T6) ชุดทดลองที่ฉีดพ่นน้ำมันเสม็ด 1% ร่วมกับ สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2% (T10) และชุดทดสอบที่ฉีดพ่นพิเพอรีน 0.25% ร่วมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1% (T11) ซึ่งมีค่าร้อยละการเกิดโรคเท่ากับ 29.70, 30.97, 31.52, 31.57, 31.59, 32.98 ตามลำดับ

8.2.7 การตรวจผลครั้งที่ 7 (หลังการฉีดพ่นสารครั้งที่หก 1 สัปดาห์)

อาการของโรคจะรุนแรงกว่าในตรวจผลครั้งที่ผ่านมามาก เพราะหลังจากเก็บผลพริกสุกออกไปหลังตรวจวัดผลครั้งที่ 6 แล้ว พบว่าในสัปดาห์นี้เชื้อสามารถเข้าทำลายผลอ่อนของพริกได้ และอาการของโรคในชุดควบคุมและชุดทดลองอื่นๆมีลักษณะใกล้เคียงกัน

ผลการตรวจวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่าร้อยละการเกิดโรค พบว่าชุดทดลอง ไม่มีผลต่อค่าร้อยละการเกิดโรค (ตารางภาคผนวกที่ 7) โดยชุดควบคุมมีค่าร้อยละการเกิดโรคสูงที่สุด คือมีค่าเท่ากับ 83.71 แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดทดลองอื่นๆ ที่ฉีดพ่นสารสกัด ซึ่งมีค่าร้อยละการเกิดโรคอยู่ในช่วง 66.76 - 71.36

8.2.8 การตรวจผลครั้งที่ 8 (หลังการฉีดพ่นสารครั้งที่เจ็ด 1 สัปดาห์)

อาการของโรคมีความรุนแรงมาก โดยพบว่าผลพริกส่วนใหญ่มีจำนวนรอยแผลมากกว่า 1 รอย อาการของโรคในชุดควบคุมมีลักษณะเหมือนกับชุดทดลองอื่น ๆ

ผลการตรวจวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่าร้อยละการเกิดโรค พบว่าชุดทดลองไม่มีผลต่อค่าร้อยละการเกิดโรค (ตารางภาคผนวกที่ 8) โดยร้อยละการเกิดโรคของชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 94.51 ซึ่งไม่แตกต่างกับชุดทดลองอื่นๆ ซึ่งมีค่าร้อยละการเกิดโรคอยู่ในช่วง 85.42 - 93.43

8.2.9 การตรวจผลครั้งที่ 9 (หลังการฉีดพ่นสารครั้งที่แปด 1 สัปดาห์)

อาการของโรคจะรุนแรงที่สุดในสัปดาห์นี้ โดยพบว่ามีรอยแผลอยู่ทั่วทั้งผล ทำให้เห็นผลพริกมีลักษณะแห้ง และร่วงหล่นจากต้น อาการของโรคในชุดควบคุมมีลักษณะเหมือนกับชุดทดลองอื่น ๆ

ผลการตรวจวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่าร้อยละการเกิดโรค พบว่าชุดทดลองไม่มีผลต่อค่าร้อยละการเกิดโรค (ตารางภาคผนวกที่ 9) โดยชุดควบคุมมีค่าร้อยละการเกิดโรคสูงที่สุด คือมีค่าเท่ากับ 99.34 แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดทดลองอื่นๆ ที่ฉีดพ่นสารสกัด ซึ่งมีค่าร้อยละการเกิดโรคอยู่ในช่วง 96.36 - 98.53

T1 น้ำมันข่าลิง 0.125%

T2 น้ำมันข่าลิง 0.25%

T3 น้ำมันเสม็ด 0.5%

T4 น้ำมันเสม็ด 1%

T5 พิเพอรีน 0.25%

T6 พิเพอรีน 0.5%

T7 น้ำมันข่าลิง 0.125% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

T8 น้ำมันข่าลิง 0.25% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%

T9 น้ำมันเสม็ด 0.5% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

T10 น้ำมันเสม็ด 1% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%

T11 พิเพอรีน 0.25% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

T12 พิเพอรีน 0.5% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%

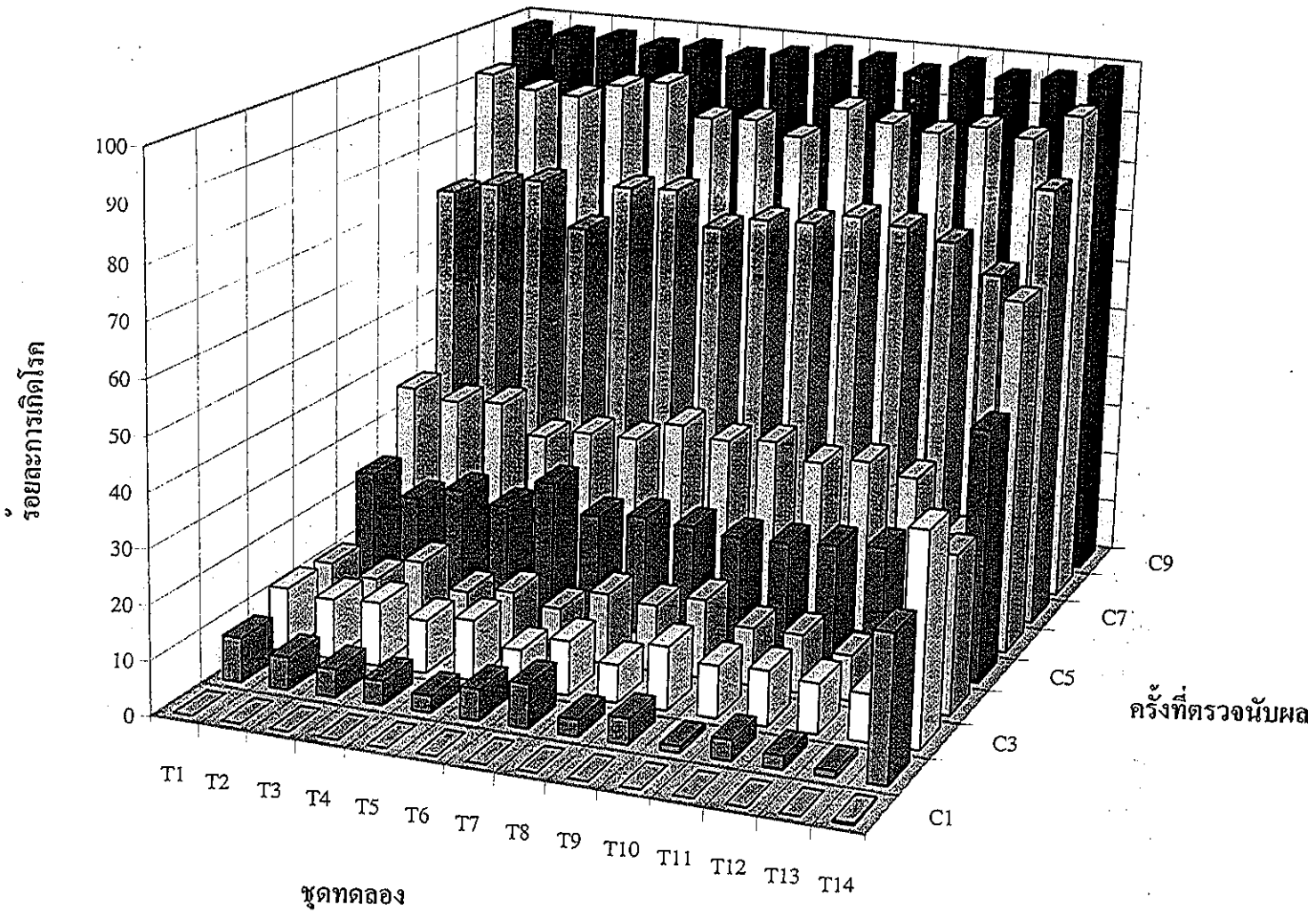
T13 เบนโนมิล 12 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

T14 น้ำ (ชุดควบคุม)

ตารางที่ 19 ประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในแปลงทดลอง

treatment	ร้อยละการเกิดโรค								
	ตรวจผล ครั้งที่ 1	ตรวจผล ครั้งที่ 2	ตรวจผล ครั้งที่ 3	ตรวจผล ครั้งที่ 4	ตรวจผล ครั้งที่ 5	ตรวจผล ครั้งที่ 6	ตรวจผล ครั้งที่ 7	ตรวจผล ครั้งที่ 8	ตรวจผล ครั้งที่ 9
T1	0.00^{a}	8.25^{b}	11.84^{b}	11.15^{b}	23.58^{b}	35.96^{b}	71.36^{a}	91.87^{a}	98.12^{a}
T2	0.00^{a}	6.01^{bcd}	11.05^{b}	9.38^{b}	19.83^{b}	34.43^{b}	73.71^{a}	89.49^{a}	97.69^{a}
T3	0.00^{a}	5.24^{bcd}	11.69^{b}	13.91^{b}	22.60^{b}	35.17^{b}	75.41^{a}	89.12^{a}	97.67^{a}
T4	0.00^{a}	4.53^{de}	9.74^{b}	9.56^{b}	20.69^{b}	29.70^{bc}	66.76^{a}	92.07^{a}	96.81^{a}
T5	0.00^{a}	3.12^{de}	11.10^{b}	10.79^{b}	26.51^{b}	31.52^{bc}	75.87^{a}	93.43^{a}	97.35^{a}
T6	0.00^{a}	5.76^{bcd}	7.01^{b}	8.95^{b}	21.36^{b}	31.57^{bc}	76.39^{a}	87.29^{a}	96.37^{a}
T7	0.00^{a}	8.08^{bc}	9.99^{b}	13.07^{b}	22.37^{b}	35.46^{b}	69.84^{a}	87.85^{a}	97.48^{a}
T8	0.00^{a}	3.11^{de}	7.01^{b}	12.20^{b}	21.77^{b}	33.54^{b}	72.26^{a}	85.42^{a}	98.49^{a}
T9	0.00^{a}	4.75^{cd}	11.75^{b}	14.59^{b}	20.94^{b}	34.47^{b}	72.71^{a}	91.76^{a}	97.95^{a}
T10	0.00^{a}	1.20^{e}	9.65^{b}	10.70^{b}	21.10^{b}	31.59^{bc}	74.85^{a}	89.89^{a}	96.36^{a}
T11	0.00^{a}	3.84^{de}	10.12^{b}	10.81^{b}	21.93^{b}	32.98^{bc}	73.95^{a}	88.81^{a}	98.53^{a}
T12	0.00^{a}	2.44^{de}	9.24^{b}	8.38^{b}	22.77^{b}	30.97^{bc}	72.01^{a}	90.74^{a}	96.94^{a}
T13	0.00^{a}	1.22^{e}	8.72^{b}	8.07^{b}	17.11^{b}	21.14^{c}	66.80^{a}	89.46^{a}	97.52^{a}
T14	0.40^{a}	26.89^{a}	39.14^{a}	29.40^{a}	47.26^{a}	66.71^{a}	83.71^{a}	94.51^{a}	99.34^{a}

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึง มีความแตกต่างกันที่ระดับ 5% โดยวิธี DMRT



ภาพที่ 37 ร้อยละการเกิดโรคแอนแทรคโนสพริก เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในแปลงทดลอง (T1-T14 ดังอธิบายในตารางที่ 20)

ภาพที่ 38 ลักษณะรอยแผลของผลบนต้นพริกของชุดทดสอบต่างๆ ในการตรวจผลครั้งที่ 3

T1 น้ำมันข่าลิง 0.125%

T2 น้ำมันข่าลิง 0.25%

T3 น้ำมันเสม็ด 0.5%

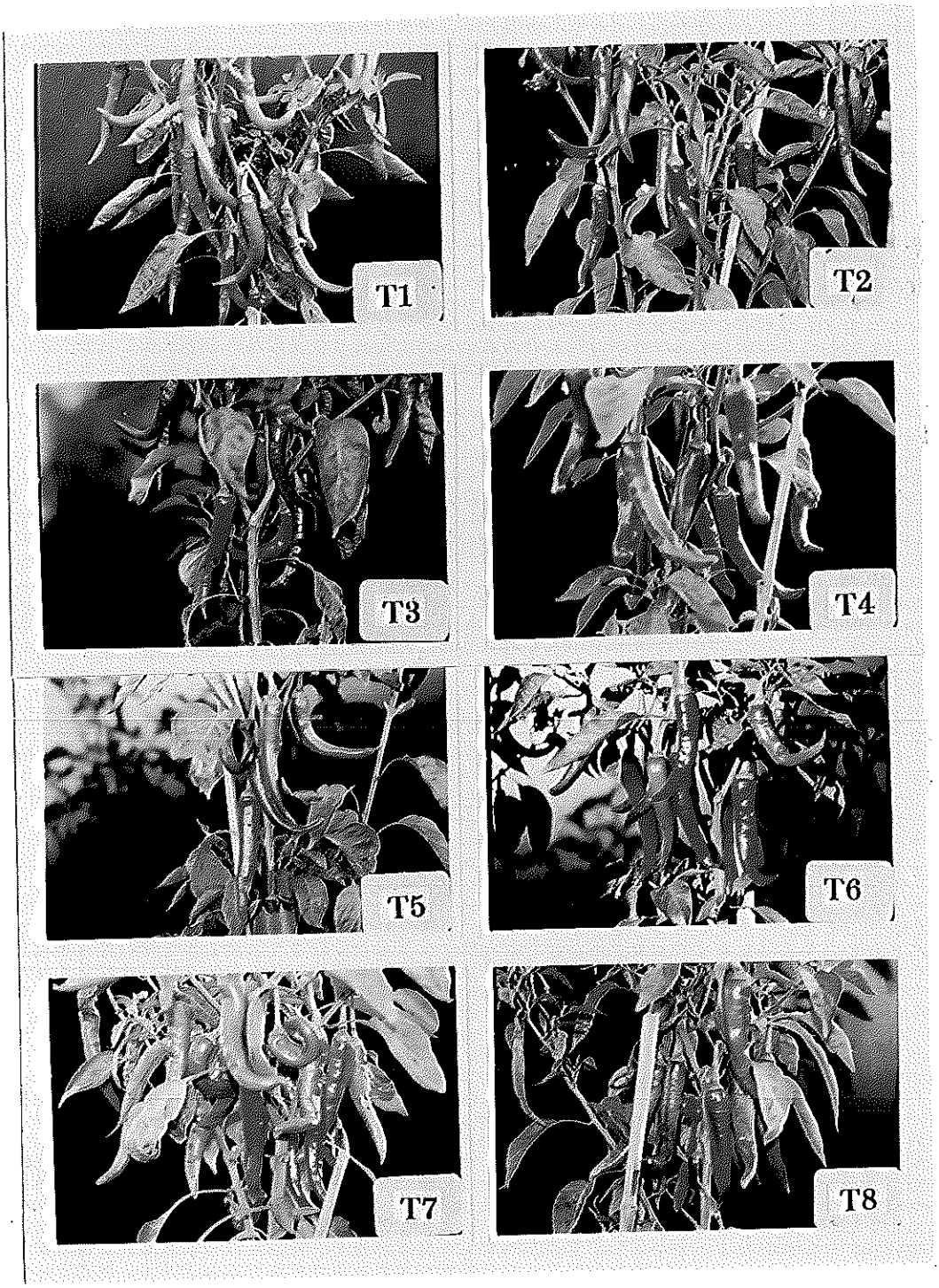
T4 น้ำมันเสม็ด 1%

T5 พิเพอรีน 0.25%

T6 พิเพอรีน 0.5%

T7 น้ำมันข่าลิง 0.125% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

T8 น้ำมันข่าลิง 0.25% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%


T1
T2
T3
T4
T5
T6
T7
T8

ภาพที่ 38 (ต่อ) ลักษณะรอยแผลของผลบนต้นพริกของชุดทดสอบต่างๆ ในการตรวจผล ครั้งที่ 3

T9 น้ำมันเสม็ด 0.5% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

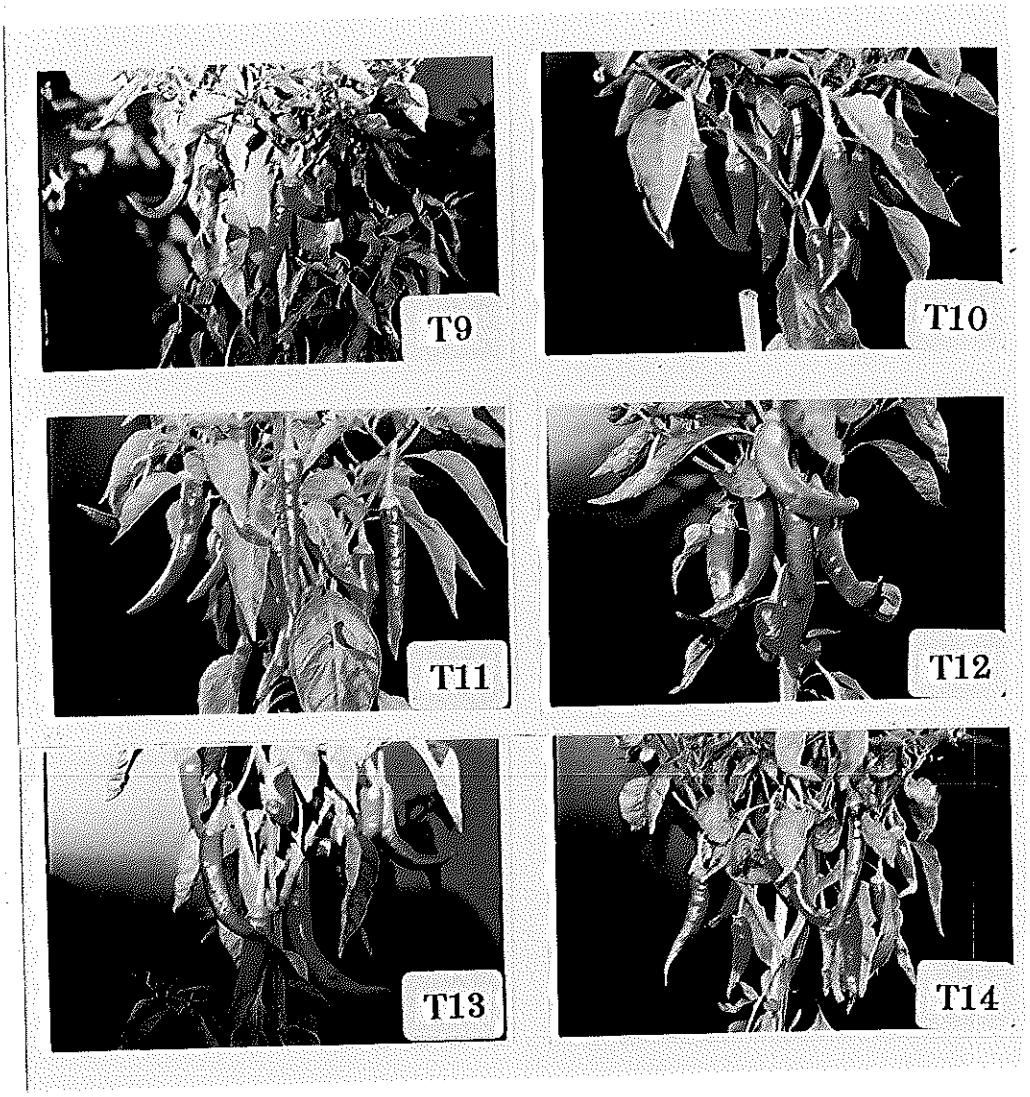
T10 น้ำมันเสม็ด 1% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%

T11 พิเพอรีน 0.25% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

T12 พิเพอรีน 0.5% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%

T13 เบนโนมิล 12 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

T14 น้ำ (ชุดควบคุม)


T9
T10
T11
T12
T13
T14

ภาพที่ 39 ผลพริกที่เป็นโรคจำนวน 5 ผลที่เก็บหลังจากตรวจผลครั้งที่ 3

T1 น้ำมันข่าลิง 0.125%

T2 น้ำมันข่าลิง 0.25%

T3 น้ำมันเสม็ด 0.5%

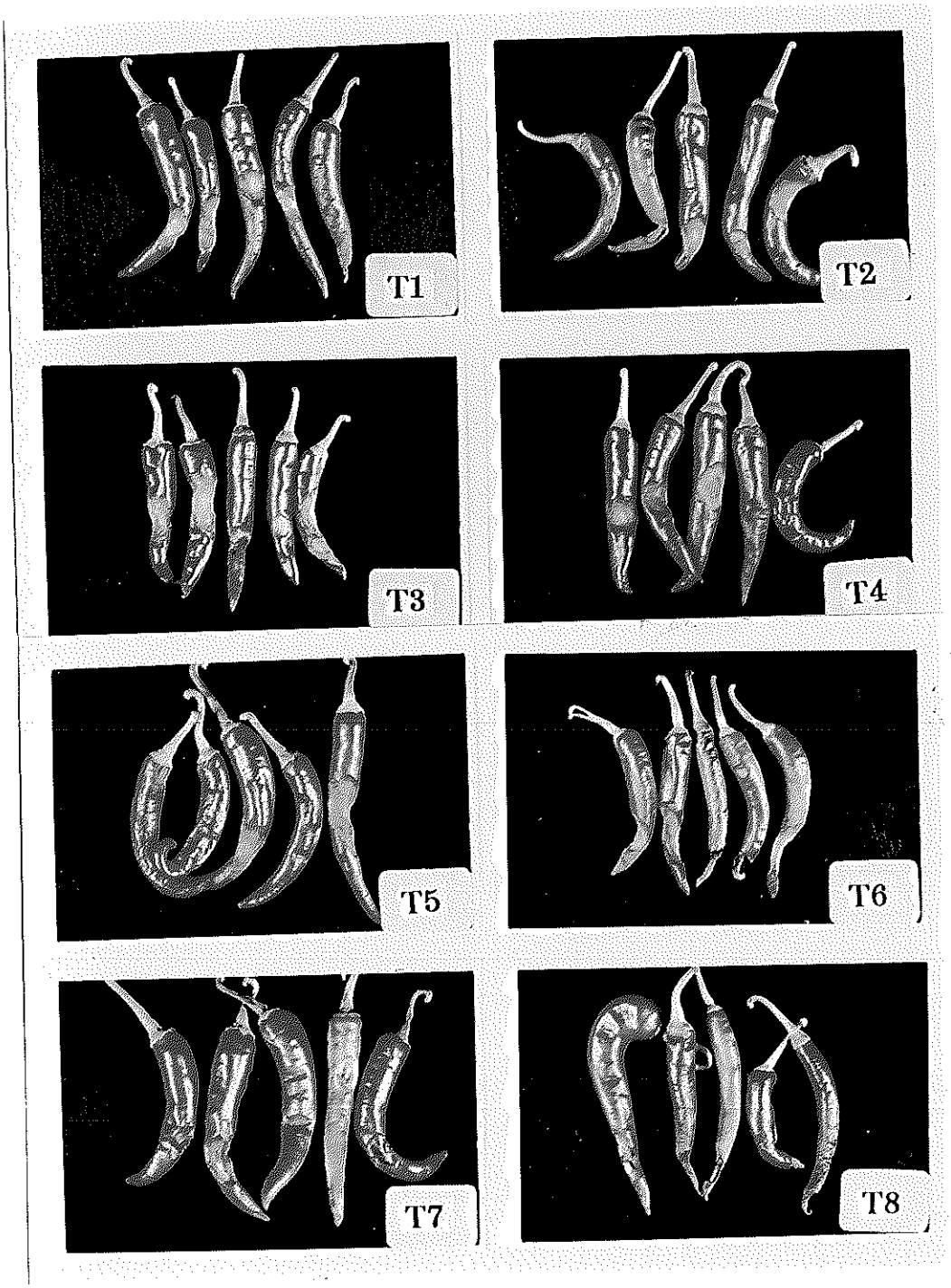
T4 น้ำมันเสม็ด 1%

T5 พิเพอรีน 0.25%

T6 พิเพอรีน 0.5%

T7 น้ำมันข่าลิง 0.125% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

T8 น้ำมันข่าลิง 0.25% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%


T1
T2
T3
T4
T5
T6
T7
T8

ภาพที่ 39 (ต่อ) ผลพริกที่เป็นโรคจำนวน 5 ผลที่เก็บหลังจากตรวจผลครั้งที่ 3

T1 น้ำมันข่าลิง 0.125%

T2 น้ำมันข่าลิง 0.25%

T3 น้ำมันเสม็ด 0.5%

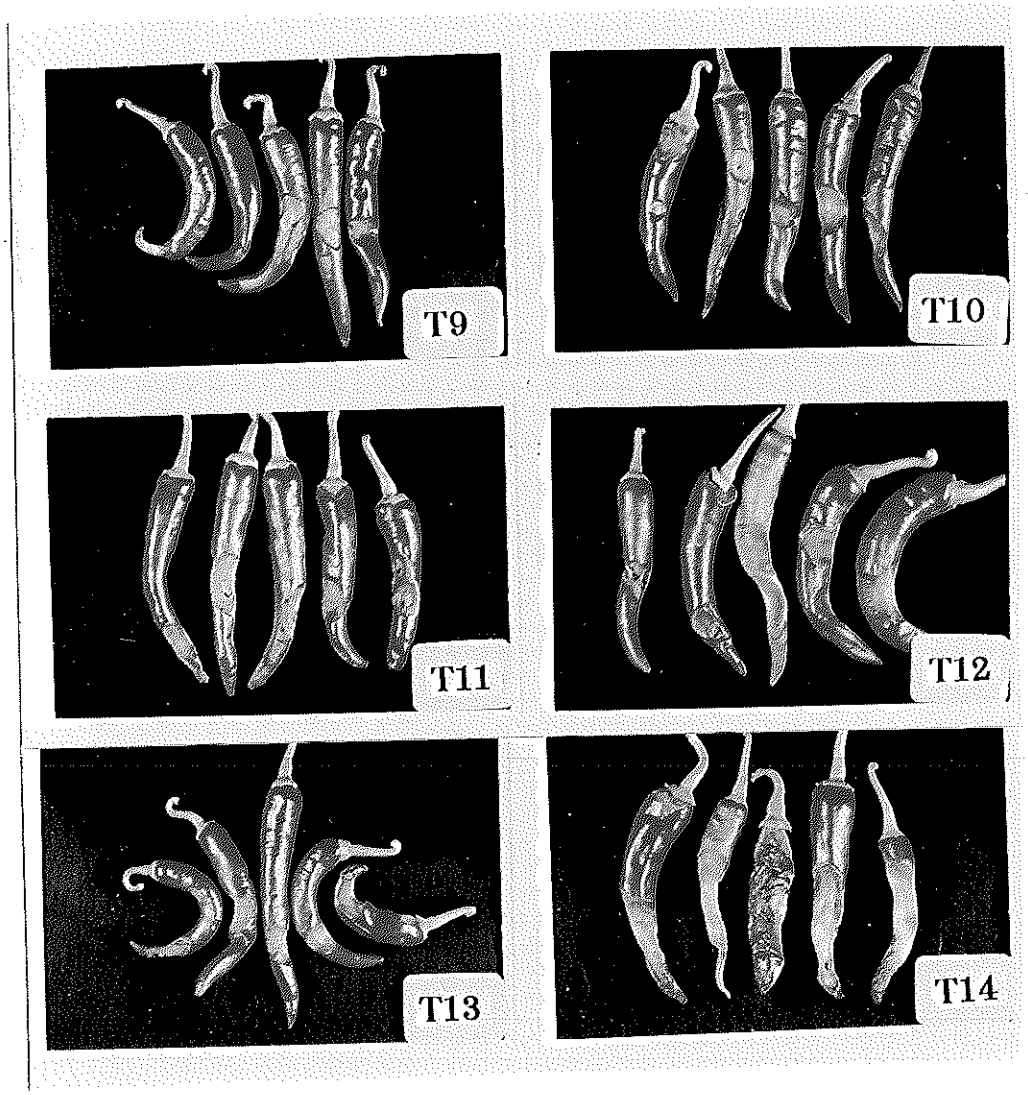
T4 น้ำมันเสม็ด 1%

T5 พิเพอรีน 0.25%

T6 พิเพอรีน 0.5%

T7 น้ำมันข่าลิง 0.125% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

T8 น้ำมันข่าลิง 0.25% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%


T9
T10
T11
T12
T13
T14

ภาพที่ 40 ผลพริกที่เป็นโรคทั้งหมด ที่เก็บหลังจากการตรวจผลครั้งที่ 3

T1 น้ำมันข่าลิง 0.125%

T2 น้ำมันข่าลิง 0.25%

T3 น้ำมันเสม็ด 0.5%

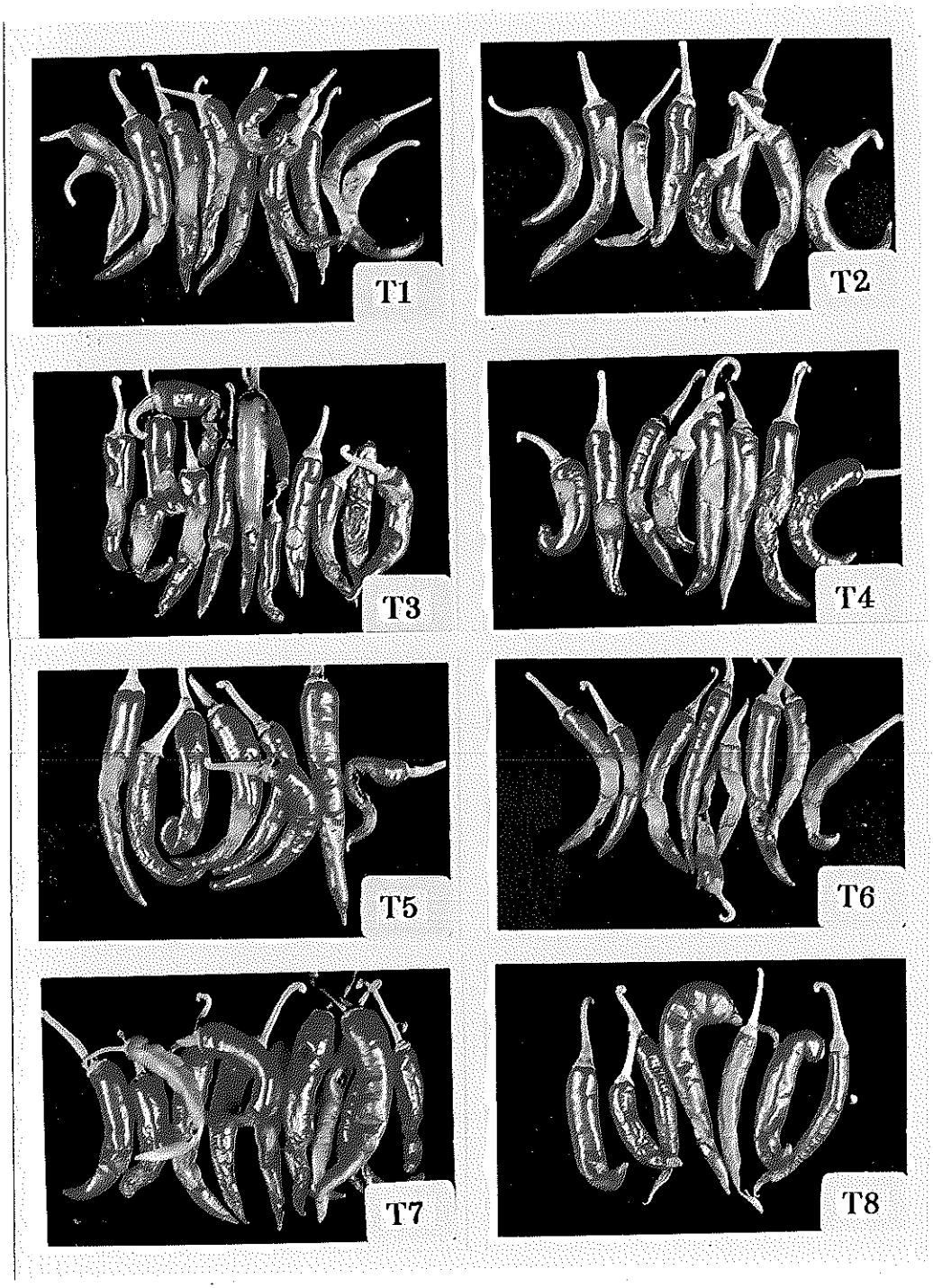
T4 น้ำมันเสม็ด 1%

T5 พิเพอรีน 0.25%

T6 พิเพอรีน 0.5%

T7 น้ำมันข่าลิง 0.125% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

T8 น้ำมันข่าลิง 0.25% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%


T1
T2
T3
T4
T5
T6
T7
T8

ภาพที่ 40 (ต่อ) ผลพริกที่เป็นโรคทั้งหมด ที่เก็บหลังจากการตรวจผลครั้งที่ 3

T9 น้ำมันเสม็ด 0.5% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

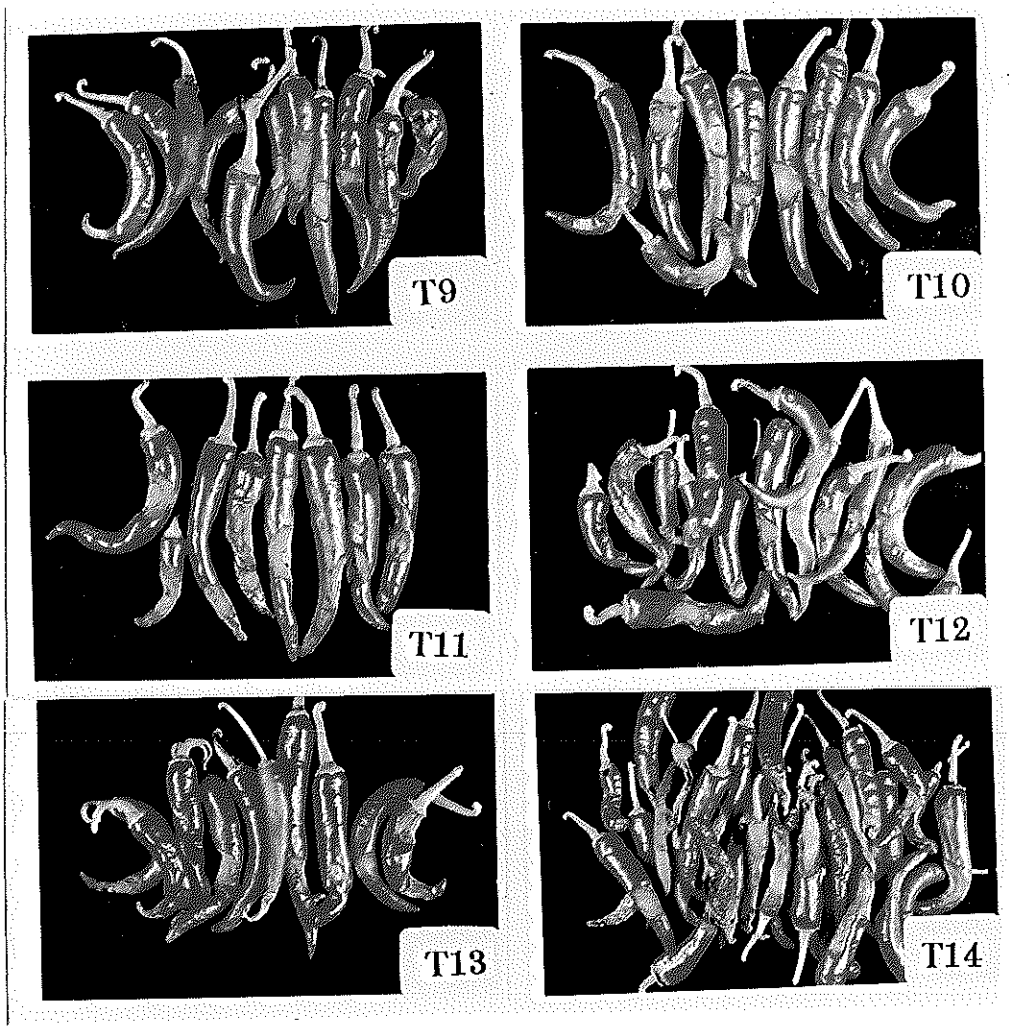
T10 น้ำมันเสม็ด 1% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%

T11 พิเพอรีน 0.25% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1%

T12 พิเพอรีน 0.5% + สารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2%

T13 เบนโนมิล 12 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

T14 น้ำ (ชุดควบคุม)


T9
T10
T11
T12
T13
T14

บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสกัดสารจากพืช

พืชที่นำมาศึกษามีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน จึงเลือกวิธีการสกัดสารที่แตกต่างกันเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์มากที่สุด เหง้าข่าลิงและใบเสม็ด มีน้ำมันหอมระเหยเป็นองค์ประกอบ วิธีการสกัดที่ดีที่สุดและสะดวกที่สุด คือ การกลั่นด้วยไอน้ำ น้ำมันหอมระเหยที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองอ่อน ปริมาณน้ำมันเสม็ดและน้ำมันข่าลิงที่สกัดได้มีค่าเท่ากับ 0.330 และ 0.137% ตามลำดับ ปริมาณน้ำมันข่าลิงที่สกัดในครั้งนี้ได้ผลใกล้เคียงกับ Athamaprasangsa และคณะ (1994) ที่พบว่า การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าลิงสดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำจะได้ปริมาณสารสกัดเท่ากับ 0.15% ในขณะที่ปริมาณน้ำมันเสม็ดมีค่าน้อยกว่าการศึกษาของ Dubey และคณะ (1983) ที่พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ดที่ได้จากการสกัดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ จะได้น้ำมันหอมระเหย 1.0% ทั้งนี้อาจเป็นเพราะใบเสม็ดที่นำมาสกัดสารนั้นได้มาจากต้นเสม็ดที่ขึ้นในพื้นที่ต่างกัน ทำให้ได้รับแร่ธาตุอาหารต่างกัน ซึ่งส่งผลให้ปริมาณสารต่างๆ ในต้นพืชนั้นมีปริมาณต่างกันได้

สำหรับพิเพอรีนในเมล็ดพริกไทยดำนั้น เนื่องจากยังไม่มีรายงานการวิจัยที่ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของพิเพอรีนต่อการต้านเชื้อรา จึงคาดว่าการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ของพิเพอรีนในการต้านเชื้อราเป็นครั้งแรก Nair และ Burke (1990) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชสกุล *Piper* พบว่า สารที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อราคือ 4,5-dimethoxy-2,3-(methylenedioxy)1-allylbenzene ซึ่งมีสูตรโครงสร้างหลักคือ 3,4-methylene dioxyphenol เหมือนกับพิเพอรีน วัชรินทร์ (unpublished data) ได้ศึกษาวิธีการสกัดพิเพอรีนแบบวิธีการสกัดเย็นด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเธน และอะซีโตน พบว่าเมื่อใช้ไดคลอโรมีเธนเป็นตัวทำละลาย สามารถสกัดสารพิเพอรีนได้ปริมาณสูงสุด มีค่าเท่ากับ 2.399%

ส่วนใบกระดูกไก่และเนื้อผลมะคำดีควายนั้น มีสารสำคัญเป็นพวกซาโปนินส์ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านรา พรพิพัฒน์ และคณะ (2529) ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากพืชที่มีซาโปนินส์เป็นองค์ประกอบต่อเชื้อราที่ก่อโรคกลาก แล้วได้ผลการทดลองสอดคล้องกับ ฉวีวรรณ (2529) ที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบกระดูกไก่ โดยผลการทดลองพบว่า ส่วนของสารสกัดที่ให้เปอร์เซ็นต์ซาโปนินส์สูงที่สุดจะให้ค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของสายราสูงที่สุด ออมสิน (2537) พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่ ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชที่ใช้ทดสอบ 3 ชนิดได้ดีกว่าสารสกัดด้วยเมธานอลและอะซิโตน ซึ่งอาจเป็นเพราะสารสกัดด้วยน้ำจะมีส่วนของซาโปนินส์และแทนนิน ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อราทั้งสองส่วน และอาจจะมีฤทธิ์ต้านราร่วมกันของสารทั้ง 2 ทำให้สารสกัดด้วยน้ำมีประสิทธิภาพดีกว่าการสกัดด้วยเมธานอลและอะซีโตน ซึ่งจะได้ซาโปนินส์ แทนนิน และส่วนที่ละลายได้ในตัวทำละลายออกมาอีกมากมาย ทำให้สารสกัดที่มีน้ำหนักเท่ากัน มีปริมาณซาโปนินส์และแทนนินน้อยกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกใช้สารสกัดจากใบกระดูกไก่และผลมะคำดีควายที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ ซึ่งเป็นข้อดีเนื่องจากสารสกัดด้วยน้ำเตรียมง่าย ราคาไม่แพง และถ้าแนะนำให้ชาวบ้านใช้จะสะดวกกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลาย แต่ในการทดลองนี้ได้นำสารสกัดไปทำให้แห้ง โดยการทำ lyophilize เพื่อความสะดวกในการเก็บรักษาสารสกัดให้คงสภาพและในการคิดปริมาณสาร

การนำสารสกัดจากพืชไปใช้ในการยับยั้งเชื้อราในขั้นต่อไป จะใช้ชุดควบคุม 2 ชุด ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดที่ได้ละลายในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 2 ชนิดกล่าวคือ น้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ด และพิเพอรีนละลายในเอธานอล 95% ส่วนสารสกัดจากใบกระดูกไก่และสารสกัดจากผลมะคำดีควายละลายในน้ำ

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสายราในสไลด์หลุม

ในการทดลองครั้งนี้เลือกวิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสายราโดยทำการทดลองในสไลด์หลุมเนื่องจากเป็นวิธีที่เห็นผลการทดลองได้ชัดเจน ใช้สารสกัดและอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณน้อย จึงเหมาะกับการทดลองที่มีปริมาณสารที่ทดสอบน้อย สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เลือกใช้อาหารวุ้น PDA ทั้งนี้เนื่องจากในการศึกษาของสุวิทย์ (2537) พบว่า *C. capsici* สามารถเจริญและสร้างสปอร์ได้ดีในอาหารนี้ และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรนี้ยังเหมาะสำหรับการใช้เลี้ยงเชื้อราเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะเชื้อราที่เป็น

สาเหตุโรคพืชและแบคทีเรียบางชนิด (มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, คณะทรัพยากรธรรมชาติ, 2531)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสายราทำโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของสายราในชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของสายราได้ คือสารสกัดที่มีฤทธิ์ทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของสายรามีขนาดเล็กกว่าชุดควบคุมซึ่งใช้ตัวทำละลายแทนสารสกัด ในการทดลองครั้งนี้จะวัดขนาดโคโลนีของเชื้อราหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่เชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มหลุมอาหารพอดี

เมื่อเชื้อราเจริญในอาหารวุ้นที่ผสมสารทดสอบ อาจดูดซึมสารเหล่านี้เข้าไปในสายรา ซึ่งอาจรบกวนหรือขัดขวางกระบวนการเติบโตระยะใดระยะหนึ่ง เป็นเหตุให้การเติบโตหยุดชะงักหรือช้ากว่าปกติ ให้โคโลนีมีขนาดเล็กกว่าชุดควบคุม ซึ่งควรจะได้มีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านราของสารเหล่านี้ในโอกาสต่อไป

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าสารทดสอบมีฤทธิ์ต้านราหรือไม่ และทำให้สามารถพิจารณาเลือกระดับความเข้มข้น ที่จะทดสอบหาค่า MIC ต่อไปได้ ในการศึกษาครั้งนี้สารสกัดทั้ง 5 สาร สามารถยับยั้งการเจริญของสายรา *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* ได้แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในการทดสอบหาค่า MIC จึงเลือกการเจือจางแบบลำดับสองให้มีความเข้มข้นต่ำกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าค่า MIC ที่คำนวณได้สอดคล้องกับผลในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของสายรา กล่าวคือ น้ำมันข่าลิงมีฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด คือมีค่า MIC ต่ำที่สุด เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่พิเพอรีนและน้ำมันเสม็ด ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 3.13 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากใบกระดูกไก่และสารสกัดจากผลมะคำดีควายจะยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้น้อยที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อ *A. brassicicola* นั้น พบว่าถูกยับยั้งโดยน้ำมันข่าลิงและพิเพอรีนได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากัน คือเท่ากับ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่น้ำมันเสม็ดและสารสกัดจากใบกระดูกไก่ ซึ่งมีค่า MIC เท่ากันเช่นเดียวกัน โดยมีค่าเท่ากับ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากผลมะคำดีควายยับยั้ง *A. brassicicola* ได้น้อยที่สุด คือมีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จะเห็นได้ว่าน้ำมันข่าลิงและพิเพอรีน สามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ก็ไม่อาจนำไปเปรียบเทียบกับค่า MIC ของสารกำจัดราเบนโนมิล ที่มีค่า MIC ต่อ *C. gloeosporioides* เท่ากับ 0.001 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่าสารสกัดจากพืชถึง 1,560 เท่า อย่างไรก็ตาม ค่า MIC ของสารสกัดจากพืชยังอยู่ในระดับที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในแปลงทดลองต่อไปได้

ในการศึกษาประสิทธิภาพของสารอาจพิจารณาจากค่า MIC หรือพิจารณาจากกราฟรีเกรซชันเส้นตรงได้ ซึ่งจะทำให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและร้อยละการยับยั้งการเติบโต และเปรียบเทียบประสิทธิภาพได้จากค่าความชันของเส้นกราฟ ในการทดลองนี้พบว่า การทดลองโดยการหาค่า MIC และจากกราฟให้ผลสอดคล้องกัน คือ น้ำมันข่าลิงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของสายรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ พิเพอรีน และน้ำมันเสม็ด ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากใบกระดูกไก่และสารสกัดจากผลมะคำดีควายจะยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ใกล้เคียงกัน สำหรับผลต่อเชื้อ *A. brassicicola* นั้น พบว่า พิเพอรีนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของสายราได้ดีที่สุด รองลงมาคือ น้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ด สารสกัดจากใบกระดูกไก่และสารสกัดจากผลมะคำดีควายตามลำดับ

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น ปรากฏว่า สารสกัดต่างชนิดกันมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราต่างกัน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้นก็สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เพิ่มขึ้นด้วย สอดคล้องกับการศึกษาของ พรรณนิภา (2521) Fabian และคณะ (1939) และ Morris (1979) ซึ่งพบว่าการที่สารสกัดจากพืชมีฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของสารสกัด ระดับความเข้มข้นที่ใช้และชนิดของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ โดยทั่วไปสารสกัดที่มีความเข้มข้นสูงจะสามารถยับยั้งการเจริญได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นต่ำและสารสกัดชนิดเดียวกันมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิดได้ไม่เท่ากัน นอกจากนั้นสารสกัดจากพืชต่างชนิดกันจะยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ต่างกันอีกด้วย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในสารสกัดนั้นรวมทั้งปริมาณของสารสำคัญนั้นด้วย (บัญญัติ, 2518) ซึ่งในสารสกัดจากพืชแต่ละชนิดนอกจากจะประกอบด้วยสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แล้ว ก็อาจมีสารอื่นๆ ที่เสริมหรือกดฤทธิ์สารดังกล่าวด้วย (อาภา, 2538 อ้างจากพัชรีและสมจิตต์, 2520) เช่น หนุมานประสานกาย ขี้เหล็ก เจตมูลเพลิงแดง และพิลังกาสาสามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อราสกุล *Aspergillus* ได้ (ชัยวัฒน์, 2528)

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านราร่วมกันของน้ำมันหอมระเหยหรือพิเพอรีนกับซาโปนินส์จากสารสกัดด้วยน้ำ

น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่าลิงและใบเสม็ดและพิเพอรีนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของสายรา *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* ได้ดีมาก แต่น้ำมันข่าลิงและน้ำมันเสม็ดเป็นน้ำมันหอมระเหยทำให้การใช้และการเก็บรักษาลำบาก จึงได้นำน้ำมันข่าลิงและน้ำมันเสม็ดมาผสมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่หรือสารสกัดจากผลมะคำดีควายในการต้านเชื้อราทั้งสอง เนื่องจากในสารสกัดจากใบกระดูกไก่และสารสกัดจากผลมะคำดีควายมีสารซาโปนินส์ที่มีฤทธิ์คล้ายสบู่ เมื่อนำสารทั้งสองชนิดนี้มาผสมกันจะทำให้น้ำมันหอมระเหยละลายน้ำได้และยังช่วยลดแรงตึงผิวทำให้เกาะติดพื้นผิวได้ดี และอาจจะออกฤทธิ์เสริมกันในการต้านเชื้อรา ส่วนการใช้พิเพอรีนร่วมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่หรือสารสกัดจากผลมะคำดีควายก็หวังผลในการออกฤทธิ์เสริมกันในการต้านเชื้อราเช่นเดียวกัน ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยหรือพิเพอรีนร่วมกับซาโปนินส์ในทุกคู่สารที่ทำการทดสอบออกฤทธิ์เสริมกันในการต้านเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง เนื่องจากการที่สารออกฤทธิ์เสริมกันในการต้านเชื้อราเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของสารและยังสามารถลดความเข้มข้นของสารที่จะนำไปใช้ได้ การศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ อรุณรุ่ง (2537) ที่พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ดและสารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่ ออกฤทธิ์เสริมกันในการต้านเชื้อ *T. mentagrophytes* Fewell และ Roddick (1993) รายงานว่า สาร glycoalkaloids 2 ชนิด ที่แยกได้จากมันฝรั่ง คือ α-solanine และ α-chaconine เมื่อนำมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 จะออกฤทธิ์เสริมกันในการต้านเชื้อ *A. brassicicola*

4. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์

4.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ spore suspension

เนื่องจากการทดลองนี้เป็นการทดสอบเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการงอกของสปอร์ ถ้าหากชุดควบคุมมีค่าร้อยละการงอกต่ำ อาจทำให้ผลการทดลองที่ได้คลาดเคลื่อน ไม่น่าเชื่อถือ ดังนั้นเพื่อการทดสอบที่มีความแม่นยำและเชื่อถือได้ จึงต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ให้ค่าร้อยละการงอกสูงที่สุด เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบในขั้นต่อไป

จากการหาร้อยละการงอกของ *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* โดยใช้ spore suspension ความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่า spore suspension ของ *C. gloeosporioides* ที่มีความเข้มข้น $5x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการงอกสูงที่สุด คือมีค่าเท่ากับ 81.25 ในขณะที่ spore suspension ของ *A. brassicicola* ที่ระดับความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้ค่าร้อยละการงอกสูงที่สุด โดยมีค่าร้อยละการงอกเท่ากับ 95.72 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในขั้นต่อไป จึงเลือกใช้ spore suspension ของ *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* ที่มีความเข้มข้น $5x10^5$ และ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งต่างจาก Manandhar และคณะ (1995) ที่ใช้ความเข้มข้นของ *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* เท่ากับ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตรในการศึกษาผลของสารต่อการงอกของสปอร์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อราทั้งสองตัวที่ใช้ ซึ่งแยกจากพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนสที่ประเทศไต้หวัน มีสายพันธุ์แตกต่างจากเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้

4.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์

สปอร์ราเป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดโรคในพืช โดยทั่วไปแล้วสปอร์จะปลิวไปตกบนพืช เมื่อมีความชื้นเหมาะสม สปอร์จะงอก germ tube และสร้าง appressorium เพื่อเกาะผิวพืชและแทงทะลุผิวพืช ถ้าสารใดสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ ก็มีศักยภาพที่จะยับยั้งหรือชลอการเกิดโรคได้

สปอร์ของ *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* งอกได้ดีในอาหารวุ้นที่ผสมน้ำกลั่นและเอธานอล 95% โดยมีร้อยละการงอกใกล้เคียงกัน คือมากกว่าร้อยละ 80 และงอก germ tube ยาว 189-201 ไมโครเมตร น้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ด และพิเพอรีน ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* ได้อย่างสมบูรณ์ (ร้อยละการยับยั้ง 99.84-100) และที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำมัน

ข่าลิง และพิเพอรีนก็ยังยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ดี คือยับยั้งได้ถึงร้อยละ 97.63-98.44 ส่วนผลต่อเชื้อ *A. brassicicola* นั้น พบว่า พิเพอรีนและน้ำมันข่าลิง สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ดีเช่นเดียวกัน โดยที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พิเพอรีนและน้ำมันข่าลิงสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *A. brassicicola* ได้อย่างสมบูรณ์

ส่วนสารสกัดจากใบกระดูกไก่และผลมะคำดีควาย ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนั้นพบว่า สารสกัดจากใบกระดูกไก่และสารสกัดจากผลมะคำดีควายมีค่าร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* เท่ากับ 80.52 และ 79.22 และที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารทั้ง 2 ตัว ไม่ยับยั้งการงอกของสปอร์ แต่สำหรับเชื้อ *A. brassicicola* นั้นพบว่าทั้งที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรให้ค่าร้อยละการยับยั้งการงอกใกล้เคียงกัน โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งการงอกต่ำกว่าร้อยละ 6 และความยาวเฉลี่ยของ germ tube ของเชื้อทั้งสองเมื่อทดสอบกับสารสกัดด้วยน้ำทั้ง 2 ชนิด มีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุม จึงแสดงให้เห็นว่าสารทั้งสองตัวนี้ยับยั้งการงอกของสปอร์ได้น้อยกว่าน้ำมันหอมระเหยและพิเพอรีน

ดังนั้นในการทดสอบหาค่า EC_{50} ในขั้นต่อไปจึงเลือกทำการทดลองเฉพาะน้ำมันหอมระเหยและพิเพอรีน ซึ่งพบว่าเมื่อนำค่าความเข้มข้นของสารสกัดและค่าร้อยละการยับยั้งการงอกของสปอร์มาเขียนกราฟรีเกรซชันเส้นตรง พบว่า ค่า EC_{50} ที่คำนวณได้จากสมการรีเกรซชั่นเส้นตรง มีค่าสอดคล้องกับผลในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดในการยับยั้งการงอกของสปอร์ กล่าวคือ น้ำมันข่าลิงและพิเพอรีนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* ได้ดี คือมีค่า EC_{50} เท่ากับ 13.49 และ 13.20 ตามลำดับ และมีค่าใกล้เคียงกับเบนโนมิล ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 16.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับผลต่อเชื้อ *A. brassicicola* นั้นพบว่า พิเพอรีนและน้ำมันข่าลิงยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ดีใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกัน คือมีค่า EC_{50} เท่ากับ 18.98 และ 20.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น ปรากฏว่าสารสกัดต่างๆ ให้ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการงอกของสปอร์ได้เช่นเดียวกับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสายรา โดยน้ำมันข่าลิงและพิเพอรีนจะยับยั้งการเจริญของสายราและยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือน้ำมันเสม็ด ส่วนสารสกัดจากใบกระดูกไก่และสารสกัดจากผลมะคำดีควายนั้น จะให้ค่าการยับยั้งต่ำสุด

4.3 การศึกษาความอยู่รอดของสปอร์หลังจากสัมผัสกับสารสกัด

จากการศึกษาการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* หลังจากที่สัมผัสกับสารสกัดแล้ว โดยนำ spore suspension ที่สัมผัสสารสกัดแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาปั่นล้างที่ 15,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 3 ครั้ง แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA 2 วัน พบว่าจำนวนสปอร์ที่งอกเป็นโคโลนีของทั้งชุดทดสอบและชุดควบคุมมีค่าน้อยกว่าจำนวนสปอร์ที่ใช้ในการทดสอบมาก โดยสปอร์ *C. gloeosporioides* sp มีจำนวนสปอร์ที่งอก 3.4-3.62% ในขณะที่สปอร์ *A. brassicicola* มีจำนวนสปอร์ที่งอก 46.0-48.0% อาจมีสาเหตุมาจากสปอร์ที่งอกแล้วมีพื้นที่ผิวมาก เกาะติดผิวหลอดทดลองได้ดี ทำให้มีจำนวนเชื้อที่ขึ้นบน PDA จำนวนน้อยมาก หรือเนื่องจากการล้างสปอร์โดยผ่านการหมุนเหวี่ยง อาจมีผลกระทบต่อร้อยละการงอกได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Manandhar และคณะ (1995) ที่พบว่าสปอร์ที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงจะมีค่าร้อยละการงอกต่ำ อย่างไรก็ตามสปอร์ที่งอกเป็นโคโลนีของทั้งชุดทดสอบและชุดควบคุมมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของสปอร์เท่านั้น ไม่ได้มีฤทธิ์ฆ่าสปอร์ ส่วนสารเบนโนมิลก็มีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* เช่นเดียวกับน้ำมันหอมระเหยและพิเพอรีน

4.4 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อสปอร์ที่งอก

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อสปอร์ *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* ที่งอก โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้สปอร์งอก พบว่า ร้อยละการงอกของสปอร์และความยาว germ tube ทุกการทดลองก่อนผสมสารสกัด มีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อผสมน้ำมันหอมระเหยและพิเพอรีน ที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเพาะเลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมง พบว่า การงอกของสปอร์ทั้งชุดควบคุมและชุดทดสอบทั้ง 2 ความเข้มข้นมีค่าใกล้เคียงกัน และใกล้เคียงกับจำนวนสปอร์ที่งอกหลังจากเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง แสดงว่าที่เวลา 24 ชั่วโมงสปอร์งอกได้อย่างสมบูรณ์แล้ว สารสกัดที่ผสมลงไปหลังจากชั่วโมงที่ 24 จึงไม่มีผลต่อค่าร้อยละการงอกของสปอร์ แต่จะมีผลต่อความยาว germ tube โดยพบว่า สปอร์ชุดควบคุมจะมี germ tube ยาวกว่าสปอร์ที่เลี้ยงในสารละลายผสมสารสกัดทั้งสองความเข้มข้น โดย germ tube ชุดควบคุมสามารถเจริญยืดยาวออกได้ตามปกติ เป็นสายราแตกแขนงมากมาย มีความยาว 340-400 ไมโครเมตร ส่วนชุดทดสอบนั้นการเจริญของ germ tube ถูกยับยั้งหรือชลอโดยสารสกัดทั้ง 3 ชนิด เช่นเดียวกับการทดสอบในสไลด์หลุมที่โคโลนีชุดทดสอบมีขนาดเล็กกว่าชุดควบคุม ในการทดลองนี้ไม่ได้นำสารสกัดน้ำจากใบ

กระดูกไก่และผลมะคำดีควายมาทดสอบ เนื่องจากสารสกัดทั้งสองมีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ต่ำ

5. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการงอกและการสร้าง appressorium ของสปอร์ *C. gloeosporioides* บนผลพริก

สปอร์ของเชื้อราสามารถงอกและสร้าง appressorium ที่ปลาย germ tube ได้เมื่ออยู่บนผิวพืชหรือพื้นผิวอื่น เช่น กระจกสไลด์หรือ microcellulose membrane (Bailey et al., 1992 อ้างจาก Emmett and Parberry, 1975) appressorium สร้างสารเมือกมาหุ้มทำให้เชื้อราสามารถเกาะติดกับผิวพืชได้ และเป็นบริเวณที่เกิดการแทงทะลุผ่านผิวพืช (penetration) โดยอาจเกิดจากการหลั่งเอนไซม์ cutinase มาย่อยผนังเซลล์พืชแล้วทำให้ผนังเซลล์นุ่มขึ้นส่งผลให้เชื้อราสามารถแทงทะลุผ่านผิวพืชได้ หรือเกิดจากกระบวนการทางกลที่เป็นผลเนื่องจากใน appressorium มีสาร melanin เป็นองค์ประกอบ ซึ่งจากการศึกษาของ Kubo และคณะ (1982) พบว่า melanin จะทำให้ผนังของ appressorium มีความแข็งแรง สามารถทนต่อ hydrostatic pressure ภายในเซลล์ที่สูงได้ จึงสามารถแทงทะลุผ่าน cuticle ของพืชได้ และยังกำหนดทิศทางของการเกิด infection peg ส่วน Haward และ Ferrari (1989) รายงานว่าหน้าที่แรกของ melanin ใน *Magnaporthe grisea* คือ ใช้เป็นที่เก็บสารละลาย ซึ่งทำให้เกิดการดูดน้ำ (absorption) โดยกระบวนการ osmosis ส่งผลให้เกิดการพัฒนาของ hydrostatic pressure

ดังนั้นถ้าสารสกัดใดสามารถยับยั้งการงอกและการสร้าง appressorium ของสปอร์ได้ก็จะป้องกันการเกิดโรคได้ จากการทดสอบที่ผ่านมา พบว่า สารสกัดทั้ง 5 ชนิด สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* บนสไลด์ได้ โดยที่สารสกัด 3 ชนิด คือ น้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ด และพิเพอรีน สามารถยับยั้งได้ดีกว่าซาโปนินส์ ในการทดลองครั้งนี้เป็นการทดลองบนผลพริก ซึ่งใกล้เคียงกับการเกิดโรคในธรรมชาติ โดยหยดสปอร์ที่ผสมอยู่กับน้ำมันหอมระเหยหรือพิเพอรีนบนผลพริก ผลการทดสอบพบว่า ในเวลา 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงสปอร์บนผลพริก สปอร์ชุดควบคุมบนผลพริกแดงจะงอกได้เร็วและมีค่าร้อยละการงอกและร้อยละการสร้าง appressorium สูงกว่าสปอร์ชุดควบคุมบนผลพริกเขียว ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Grover (1971) ที่พบว่า สปอร์ *C. gloeosporioides* บนผลพริกแดงจะงอกได้ดีกว่าบนผลพริกเขียว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารบนผลพริกแดงส่งเสริมการงอกและ

การสร้าง appressorium ของสปอร์ (อ้างถึงใน Mananhar *et al.*, 1995) นอกจากนั้นยังพบว่าสปอร์จะไม่งอกในสารละลายที่ผสมสารสกัดทั้ง 3 ชนิด (น้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ด และพิเพอรีน) ทั้งที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าสารสกัดทั้ง 3 น่าจะมีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดโรคได้

6. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกในห้องทดลอง

การทดลองครั้งนี้เป็นการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในห้องทดลอง ก่อนที่จะมีการนำไปใช้จริงในแปลงทดลองซึ่งมีความแปรปรวนของสภาพแวดล้อมสูง ดังนั้นจึงต้องใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นสูงกว่าที่สามารถยับยั้งเชื้อได้จริง ซึ่งในการทดลองนี้เลือกใช้น้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ด และพิเพอรีน ในรูปของสารเดี่ยวๆ ที่ความเข้มข้น 800 และ 1,600 เท่าของค่า MIC หรือใช้ร่วมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ที่ความเข้มข้น 800 และ 1,600 เท่าของค่า MIC เช่นเดียวกัน แต่ไม่ใช้สารสกัดจากใบกระดูกไก่ในรูปของสารเดี่ยว เนื่องจากในการศึกษาของสุวิทย์ (2537) พบว่า การใช้สารสกัดจากใบกระดูกไก่ในรูปของสารเดี่ยวยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสในแปลงทดลองได้น้อย และไม่ใช้สารสกัดจากผลมะคำดีควาย เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของสายราและยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* ได้น้อยกว่าสารสกัดจากใบกระดูกไก่ นอกจากนั้นการใช้สารสกัดจากใบกระดูกไก่ยังมีข้อดีกว่าสารสกัดจากผลมะคำดีควาย เนื่องจากใบเป็นส่วนที่มีมากที่สุดในต้นไม้ สามารถหาได้ทุกฤดูกาลและหาง่ายกว่าผล

จากการเลือกใช้สารสกัดดังกล่าวข้างต้น จะทำให้ได้สารสกัดที่นำมาทดสอบทั้งสิ้น 12 ชุด และในชุดที่ 13 เลือกใช้สารกำจัดราเบนโนมิล เนื่องจากเป็นสารที่มีประสิทธิภาพดีในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริก โดยใช้ตามอัตราที่แนะนำบนฉลาก คือ ที่ความเข้มข้น 12 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร คิดเป็น 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 6 แสนเท่าของค่า MIC (MIC = 0.001 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนชุดควบคุมจะใช้น้ำแทนสารสกัด

ในการทดลองครั้งนี้เลือกใช้ผลพริกเขียว แม้ว่าผลการทดลองที่ผ่านมาจะพบว่าสปอร์ราจะงอกบนผลพริกแดงได้ดีกว่าพริกเขียว ทั้งนี้เนื่องจากในสภาพธรรมชาติทั้งผลพริกเขียวและผลพริกแดงสามารถติดเชื้อได้ (Sherf and Macnab, 1986) และเกษตรกรมักเก็บผลพริกออกจำหน่ายตั้งแต่ยังเป็นผลเขียว

ในการทดสอบได้แบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง คือ ชุดที่ 1 หยดสารก่อนปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง ชุดที่ 2 หยดสารพร้อมกับปลูกเชื้อ ชุดที่ 3 ปลูกเชื้อก่อนหยดสาร 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ผลการทดสอบพบว่ารอยแผลบนผลพริกของชุดควบคุมจะมีขนาดของรอยแผลใหญ่ที่สุด ทั้ง 3 ชุดการทดลอง จากการทดลองในตารางที่ 18 จะเห็นได้ว่าสารสกัดที่ทดสอบทุกชุด สามารถควบคุมการเกิดโรคบนผลพริกได้ทั้ง 3 ชุดการทดลอง โดยการทดลองชุดที่ 2 มีประสิทธิภาพมากที่สุด สารสกัดทุกชุดทดสอบยกเว้น ชุดที่ใช้น้ำมันเสม็ด 0.5% ผสมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1% (T8) สามารถควบคุมโรคได้อย่างสมบูรณ์ คือ ไม่เกิดรอยแผลเลย แสดงว่าสารสกัดความเข้มข้นสูงๆ สามารถทำลายสปอร์ของ *C. gloeosporioides* ได้เป็นอย่างดี แต่ในธรรมชาติปรากฏการณ์เช่นนี้มีโอกาสเกิดได้น้อยมาก สำหรับการทดลองในชุดที่ 1 ไม่เห็นรอยแผลในชุดทดสอบที่ใช้น้ำมันข่าลิงที่ความเข้มข้น 0.125% และ 0.25% น้ำมันข่าลิงทั้งสองความเข้มข้นผสมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ พิเพอรีน 0.5% ร่วมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2% และที่ใช้สารกำจัดราเบนโนมิล ขณะที่ในชุดทดลองที่ 2 สังเกตเห็นรอยแผลในชุดทดสอบที่ใช้น้ำมันเสม็ด 0.5% ผสมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ 1% แต่ก็เป็นรอยแผลเพียง 1 ซ้ำ จากการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ ขณะที่ไม่เห็นรอยแผลในชุดทดสอบที่ผสมสารสกัดอื่นๆ ส่วนชุดการทดลองที่ 3 พบว่า ไม่รอยแผลในชุดทดสอบที่ใช้สารสกัดทั้ง 3 ชนิดในรูปของสารเดี่ยว และสังเกตเห็นรอยแผลจางๆ ในชุดทดสอบที่ใช้สารสกัดทั้ง 3 ชนิดผสมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ แสดงว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยหรือพิเพอรีนในรูปของสารเดี่ยวมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ร่วมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ ซึ่งขัดแย้งกับผลการทดสอบฤทธิ์ต้านราร่วมกันของสารสกัดทั้ง 3 ชนิดร่วมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ที่พบว่าออกฤทธิ์เสริมกันในการต้านการเจริญของสายรา ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในการศึกษาดังกล่าวเป็นการทดสอบบนอาหารวุ้นแต่ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการทดสอบบนผิวพืช ซึ่งเชื้อที่เจริญในที่ต่างกันอาจจะมีกลไกในการตอบสนองต่อสารสกัดต่างกันได้

จะเห็นได้ว่าน้ำมันข่าลิงทั้งสองความเข้มข้น สามารถควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนส ในการทดสอบทั้ง 3 ชุดการทดลองได้ดีที่สุด และได้ผลเช่นเดียวกับสารกำจัดราเบนโนมิล และชุดทดลองที่ 2 จะให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุด คือสามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้ดีที่สุด ซึ่งอาจเป็นเพราะสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบได้สัมผัสกับสปอร์ของเชื้อราโดยตรงจึงทำให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดีที่สุด

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดทุกชุดที่ทำการทดสอบ มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในห้องทดลองได้ดี แม้ว่าในบางชุดการทดลองสารสกัดในรูปของสารเดี่ยวใช้ได้ผลดีกว่าการใช้ร่วมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ แต่การใช้สารร่วมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่อาจจะทำให้ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดีกว่าการใช้ในรูปของสารเดี่ยว ดังนั้นในการทดสอบในแปลงทดลองต่อไป จึงเลือกใช้สารสกัดทุกชุด โดยทำการฉีดพ่นหลังจากฉีดพ่นเชื้อ 1 สัปดาห์

7. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการต้านเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบคะน้าในห้องทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้เป็นการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าในห้องทดลอง โดยเลือกใช้น้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ด และพิเพอรีนที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง เช่นเดียวกับการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในห้องทดลอง

จากผลการทดลองในตารางที่ 19 พบว่ารอยแผลของชุดควบคุมบนใบคะน้ามีขนาดของรอยแผลโตที่สุด ทั้ง 3 ชุดการทดลอง และสารสกัดที่ทดสอบทั้ง 3 ชนิด สามารถควบคุมการเกิดโรคใบจุดของใบคะน้าได้ทั้ง 3 ชุดการทดลอง โดยการทดลองชุดที่ 2 ซึ่งมีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยไม่เห็นรอยแผลในชุดที่ทดสอบด้วยน้ำมันข่าลิงและพิเพอรีนที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสังเกตเห็นรอยแผลจางๆ ในชุดที่ทดสอบกับน้ำมันเสม็ดทั้ง 2 ความเข้มข้น น้ำมันข่าลิงและพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับผลการทดลองในชุดที่ 1 พบว่า สังเกตเห็นรอยแผลจางๆบนใบคะน้าที่ทดสอบกับน้ำมันข่าลิงและพิเพอรีน ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีขนาดของรอยแผลเล็กที่สุด สำหรับน้ำมันเสม็ดที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันสังเกตเห็นจุดสีดำบริเวณรอยแผลชัด และมีขนาดของรอยแผลกว้างกว่าที่ทดสอบกับน้ำมันข่าลิงและพิเพอรีน ส่วนการใช้สารสกัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีขนาดของรอยแผลโตกว่าการใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลก็แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการทดลองในชุดที่ 3 ซึ่งปลูกเชื้อก่อนหยดสารสกัด 24 ชั่วโมง พบว่า น้ำมันข่าลิงและพิเพอรีนที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ควบคุมโรคได้ดีที่สุดโดยมีขนาดของรอยแผลเล็กที่สุด ส่วนในชุด

ทดสอบอื่น พบว่า แม้จะมีขนาดของรอยแผลโตกว่า แต่ขนาดของรอยแผลก็ยังเล็กกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการทดสอบดังกล่าวข้างต้น จะเห็นว่าน้ำมันข่าลิงและพิเพอรีนสามารถยับยั้งการเกิดโรคใบจุดบนใบคะน้าได้ดีกว่าน้ำมันเสม็ด ซึ่งสอดคล้องกับค่า MIC ที่พบว่าน้ำมันเสม็ดมีค่า MIC สูงกว่าน้ำมันข่าลิงและพิเพอรีน ดังนั้นเมื่อใช้สารสกัดที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน การใช้สารสกัดที่มีค่า MIC ต่ำกว่า ก็จะมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดีกว่าสารสกัดที่มีค่า MIC สูงกว่า และจากการทดลองพบว่าน้ำมันข่าลิงและพิเพอรีนที่ระดับความเข้มข้น เพียง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งโรคใบจุดบนใบคะน้าได้ดี จึงควรมีการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารดังกล่าวในการควบคุมโรคใบจุดบนใบคะน้า ในสภาพแปลงทดลองต่อไป

8. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในแปลงทดลอง

8.1 ข้อมูลทางอุตุนิยมวิทยา

ปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เชื้อราสามารถก่อให้เกิดโรคบนต้นพืชได้นอกเหนือจากความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อราและชนิดของพืชที่อ่อนแอต่อโรค คือการอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม การเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศอาจทำให้พืชมีความอ่อนแอหรือมีความต้านทานต่อโรคเพิ่มขึ้น (Agrios, 1988) ดังนั้นการทดลองในแปลงทดลอง จึงต้องมีการบันทึกข้อมูลทางด้านอุตุนิยมวิทยาไว้ด้วย

ในการศึกษาครั้งนี้ อาศัยข้อมูลทางด้านอุตุนิยมวิทยาที่บันทึกโดยสถานีตรวจอากาศเกษตรคอหงส์ กรมอุตุนิยมวิทยา ซึ่งตั้งอยู่ภายในบริเวณศูนย์วิจัยยาง อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ซึ่งห่างจากแปลงทดลองประมาณ 2 กิโลเมตร

ข้อมูลทางอุตุนิยมวิทยาในช่วงที่ทำการทดลองระหว่างวันที่ 16 มีนาคม 2539 ถึงวันที่ 11 พฤษภาคม 2539 พบว่า สัปดาห์ที่ 1 และ 2 หลังการฉีดพ่น spore suspention ไม่มีฝนตกหรือตกน้อยมากจนวัดค่าไม่ได้ สัปดาห์ที่ 3-6 เริ่มมีฝนตก และมีปริมาณฝนมากในช่วงสัปดาห์ที่ 7-8 หลังจากนั้นปริมาณน้ำฝนจะลดน้อยลงในสัปดาห์ที่ 9 ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศตลอดการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยอยู่ในช่วง 51-84%

และความชื้นสัมพัทธ์สูงสุดในแต่ละวันจะมีค่าสูงกว่า 90% สำหรับอุณหภูมิของอากาศในระหว่างการทดลองนั้น พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 24.4-31 องศาเซลเซียส

สำหรับสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคของ *C. gloeosporioides* นั้น Sherf และ Macnab (1986) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำให้เกิดโรคคือ 27 องศาเซลเซียส และระบาดได้มากเมื่อความชื้นสัมพัทธ์ 95% ซึ่งในการทดลองนี้ ในระยะ 2 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อไม่มีฝนตกหรือฝนตกน้อยมากจนวัดค่าไม่ได้ แต่ความชื้นสัมพัทธ์ในตอนกลางคืนมีค่าสูงมาก ซึ่งเพียงพอที่จะทำให้สปอร์งอกและเข้าทำลายผิวพืชได้

8.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพืชในแปลงทดลอง

ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกในห้องทดลอง พบว่า สารสกัดทุกชุดทดสอบสามารถควบคุมโรคได้ แต่ในทางปฏิบัตินั้น เกษตรกรจะฉีดพ่นสารควบคุมโรคเมื่อมีการเกิดโรคแล้ว ดังนั้นในการทดสอบประสิทธิภาพในแปลงทดลอง จึงปลูกเชื้อก่อนฉีดพ่นสารสกัด โดยปลูกเชื้อบนต้นพริกอายุ 4 สัปดาห์หลังจากออกดอกชุดแรก ความเข้มข้นของ spore suspension ที่ใช้ในแปลงทดลอง มีค่าเท่ากับ $2x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่า spore suspension ที่ใช้ในห้องทดลอง ($5x10^5$) ทั้งนี้เนื่องจากในสภาพแปลงทดลองมีความแปรปรวนของปัจจัยต่างๆ มาก จึงทำให้สปอร์ในแปลงทดลองมีร้อยละการงอกต่ำกว่าในห้องทดลอง จึงต้องใช้ spore suspension ที่มีความเข้มข้นสูงกว่า หลังจากปลูกเชื้อ 1 สัปดาห์ ทำการฉีดพ่นสารดังที่กล่าวในข้อ 6 โดยฉีดสัปดาห์ละ 1 ครั้ง จำนวน 8 ครั้ง ก่อนการฉีดพ่นสารทุกครั้งจะถ่ายภาพ นับจำนวนผลพริกที่เป็นโรคและผลพริกทั้งหมดเพื่อคำนวณหาค่าร้อยละการเกิดโรค

จากการทดลอง พบว่า หลังการฉีดพ่น spore suspension 1 สัปดาห์ (ตรวจผลครั้งที่ 1) จะสังเกตเห็นจุดเล็กสีดำเล็กๆ บนผลพริก แต่เนื่องจากยังไม่เห็นการทำลายที่ทำให้เกิดเป็นรอยแผลชัดเจน จึงยังไม่นับว่าเป็นโรค มีผลพริกเพียงผลเดียวในชุดควบคุมเท่านั้นที่แสดงอาการของโรคชัดเจนจึงทำให้มีค่าร้อยละการเกิดโรคต่ำมากเท่ากับ 0.40 ส่วนในชุดทดสอบอื่นๆ ผลพริกแสดงอาการของโรคไม่ชัดเจน จึงมีค่าร้อยละการเกิดโรคเท่ากับศูนย์ การเกิดโรคเริ่มสังเกตได้ชัดเจนในสัปดาห์ที่ 2 โดยชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยน้ำแทนสารสกัด มีการเกิดโรคร้อยละ 26.89 ซึ่งเป็นอัตราการเกิดโรคที่ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากในช่วงเวลานี้ไม่มีฝนตกหรือฝนตกน้อยมากจนวัดค่าไม่ได้ อย่างไรก็ตามอัตราการเกิดโรคในชุดควบคุมนี้ก็ยังมากกว่าชุดทดสอบทุกชุด 3-22 เท่า โดยชุดทดสอบที่ฉีดพ่นน้ำมันเสมี่ด 1% ร่วมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ 2% (T10) และที่ฉีดพ่นด้วยสารกำจัดราเบนโนมิล (T13) มีประสิทธิภาพดีที่สุด

ในการควบคุมโรค โดยมีร้อยละการเกิดโรคเพียง 1.20 และ 1.23 ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 3-5 หลังการฉีดพ่นเชื้อ (ตรวจผลครั้งที่ 3-5) ซึ่งเป็นช่วงที่มีปริมาณฝนเพิ่มมากขึ้น การเกิดโรคในชุดควบคุมเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยมีร้อยละการเกิดโรคอยู่ในช่วง 29.40-47.26 ซึ่งยังคงมีค่ามากกว่าชุดทดสอบ 1.8-5.6 เท่า และในการสังเกตผลแต่ละสัปดาห์ในช่วงนี้ พบว่า ร้อยละการเกิดโรคของแต่ละชุดทดสอบด้วยสารสกัดทุกชุดและสารกำจัดราเบนโนมิล ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกได้ใกล้เคียงกับเบนโนมิล ซึ่งเป็นสารเคมี แต่เบนโนมิลอาจจะมีข้อดีกว่าเล็กน้อยที่ออกฤทธิ์ได้เร็วกว่า จึงสามารถควบคุมโรคได้ดีตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนถึงสัปดาห์ที่ 6 ซึ่งมีปริมาณน้ำฝนเพิ่มมากกว่าในสัปดาห์ที่ 5 และร้อยละการเกิดโรคของชุดควบคุมเพิ่มสูงถึง 66.71 เบนโนมิลก็ยังสามารถควบคุมโรคได้ โดยมีร้อยละการเกิดโรคเพียง 21.14 ในสัปดาห์ที่ 7-9 หลังการพ่น spore suspension (ตรวจผลครั้งที่ 7-9) ซึ่งมีปริมาณน้ำฝนเพิ่มสูงกว่าในสัปดาห์ที่ 6 มาก พบว่าร้อยละการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคของชุดควบคุมสูงมากถึงร้อยละ 83.71-99.34 แต่ก็ไม่มีความแตกต่างจากชุดทดลองอื่น ซึ่งมีร้อยละการเกิดโรค 66.8-98.53

นอกจากนั้นยังพบว่าในการตรวจผลครั้งที่ 2-4 ซึ่งมีปริมาณฝนไม่มากนักอาการของโรคที่เกิดบนผลพริกชุดควบคุมจะมีความรุนแรงที่สุดเมื่อเทียบกับชุดทดสอบที่ฉีดพ่นสารสกัดหรือสารเคมีเบนโนมิล และในสัปดาห์ที่ 5-6 ซึ่งเป็นช่วงที่มีปริมาณฝนเพิ่มมากขึ้น ผลพริกจะแสดงอาการของโรครุนแรงกว่าการตรวจผลครั้งก่อน แต่ชุดควบคุมก็ยังคงแสดงอาการของโรครุนแรงที่สุดเมื่อเทียบกับชุดทดสอบอื่น สำหรับการตรวจผลครั้งที่ 7-9 ซึ่งเป็นช่วงระยะเวลาที่มีฝนตกมากนั้น พบว่า อาการของโรคในชุดควบคุมและชุดทดสอบอื่นๆ มีลักษณะใกล้เคียงกัน และอาการของโรคจะรุนแรงกว่าสัปดาห์ที่ผ่านมามาก เพราะหลังจากเก็บผลสุกของพริกออกไปหลังจากตรวจผลครั้งที่ 6 แล้ว เชื้อราสามารถเข้าทำลายผลอ่อนของพริกได้ ในขณะที่ในสัปดาห์ก่อนหน้านี้ที่มีปริมาณฝนไม่มากเชื้อราจะเข้าทำลายเฉพาะผลแก่และผลสุกของพริก

จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้น อาจสรุปได้ว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในแปลงทดลอง คือปริมาณน้ำฝน ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อราสามารถเจริญและสร้างสปอร์ได้ดีเมื่อมีฝนตก (Sherf and Macnab, 1986) ซึ่งจะเป็นการเพิ่มปริมาณของเชื้อตั้งต้นที่จะทำให้เกิดโรค และฝนยังเป็นพาหะในการแพร่กระจายสปอร์ที่ดีโดยกลุ่มของสปอร์ที่รวมตัวกันอยู่ในน้ำเมือก ซึ่งถูกดัน

ออกมาจากผิวของพืชที่เป็นโรค เมื่อกระทบกับแรงกระแทกของหยดน้ำฝนก็จะกระเด็นไปรอบ ๆ และสามารถเข้าทำลายพืชอาศัยได้ทันที น้ำฝนแต่ละหยดที่ตกกระทบที่พื้นดินก็จะให้หยดฝอยเป็นละอองเล็กๆ ประมาณ 5,000 หยด ซึ่งสามารถพาสปอร์ของเชื้อรากระจายไปยังรอบๆ ได้ และถ้าหยดน้ำฝนเล็ก ๆ ที่แตกตัวนี้เกิดระเหยก่อนที่จะตกลงสู่พื้นดินหรือลงสู่พืชอาศัย สปอร์ของเชื้อราซึ่งถูกทำให้เคลื่อนที่ไปก็จะมีโอกาสระบาดไปด้วยลม (air borne) (ชวาลา, 2531) นอกจากนี้ฝนยังเป็นตัวการในการชะสารสกัดออกไปจากผิวพืช ทำให้ปริมาณสารสกัดลดน้อยลงได้ ดังนั้นจึงพบว่าสารสกัดจะมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดีถ้าฝนไม่ตกหรือฝนตกน้อย

ในการทดลองครั้งนี้พบว่าการฉีดพ่นด้วยสารสกัดทุกชนิด สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสพริกในแปลงทดลองได้ ดังนั้นถ้าสามารถพัฒนาสารดังกล่าวเพื่อใช้ควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกได้ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

สรุปผลการทดลอง

1. น้ำมันข่าลิงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่พิเพอรีนและน้ำมันเสม็ด ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 3.13 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากใบกระดูกไก่และสารสกัดจากผลมะคำดีควายจะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้น้อยที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากัน คือ เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. น้ำมันข่าลิงและพิเพอรีนยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. brassicicola* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากันคือเท่ากับ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่น้ำมันเสม็ดและสารสกัดจากใบกระดูกไก่ ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 6.25 ส่วนสารสกัดจากผลมะคำดีควายจะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. brassicicola* ได้น้อยที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. น้ำมันหอมระเหยหรือพิเพอรีนกับซาโปนินส์จากสารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์เสริมกันในการต้านการเจริญของเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola*

4. พิเพอรีนและน้ำมันข่าลิงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* ได้ดี โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 13.20 และ 13.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาได้แก่น้ำมันเสม็ด ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 39.99 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากใบกระดูกไก่และสารสกัดจากผลมะคำดีควายยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* ได้น้อย

5. พิเพอรีนและ น้ำมันข่าลิงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ *A. brassicicola* ได้ดี โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 18.98 และ 20.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาได้แก่น้ำมันเสม็ด ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 51.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากใบกระดูกไก่และสารสกัดจากผลมะคำดีควายยับยั้งการงอกของสปอร์ *A. brassicicola* ได้น้อย

6. น้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ดและพิเพอรีน มีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* แต่ไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าสปอร์

7. น้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ดและพิเพอรีนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ germ tube ของเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola*

8. น้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ด และพิเพอรีน มีฤทธิ์ยับยั้งการงอกและการสร้าง

appressorium ของสปอร์ *C. gloeosporioides* บนผลพริกเขียวและผลพริกแดงได้

9. การใช้น้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ด และพิเพอรีนในรูปของสารเดี่ยวที่ระดับความเข้มข้น 800 และ 1,600 เท่าของค่า MIC หรือใช้ร่วมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ที่ระดับความเข้มข้น 800 และ 1,600 เท่าของค่า MIC เช่นเดียวกัน สามารถควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสของพริกในห้องทดลองได้ โดยการใช้น้ำมันข่าลิงที่ความเข้มข้น 0.125% และ 0.25% สามารถควบคุมโรคได้ดีที่สุด

10. น้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ด และพิเพอรีนที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถควบคุมการเกิดโรคใบจุดของคะน้าได้ โดยน้ำมันข่าลิงและพิเพอรีน สามารถควบคุมโรคได้ดีกว่าน้ำมันเสม็ด

11. การใช้น้ำมันข่าลิง น้ำมันเสม็ด และพิเพอรีนในรูปของสารเดี่ยวที่ระดับความเข้มข้น 800 และ 1,600 เท่าของค่า MIC หรือใช้ร่วมกับสารสกัดจากใบกระดูกไก่ที่ระดับความเข้มข้น 800 และ 1,600 เท่าของค่า MIC เช่นเดียวกัน สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสพริกในแปลงทดลองได้ และได้ผลใกล้เคียงกับสารกำจัดราเบนโนมิล ที่ระดับความเข้มข้น 0.06%

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง และ วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2528. พืชสมุนไพรบางชนิดที่มีอิทธิพลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา. ว. โรคพืช 5(2) : 38-47.

ฉวีวรรณ ไชยสุวรรณ. 2529. การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากใบกระดูกไก่. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. (สำเนา)

ชวาลา บุรณศิริ. 2531. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา. กรุงเทพ : คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชัยวัฒน์ โตอนันต์. 2528. อิทธิพลของพืชสมุนไพรและเครื่องเทศบางชนิดที่มีผลต่อการเจริญของรา *Aspergillus*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (สำเนา)

เต็ม สมิตินันท์. 2523. ชื่อพันธุ์ไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง). กรุงเทพฯ : กรมป่าไม้

นิจศิริ เรืองรังษี. 2534. เครื่องเทศ. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิตยา กัณหลง, พัน อินทร์จันทร์ และ ลักษณา วรรณภีร์. 2530. โรคแอนแทรคโนสหอมเลื้อยและการป้องกันกำจัด, หน้า 89-111. ใน รายงานประจำปี กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

นิพนธ์ ทวีชัย, บรรณาธิการ. 2523. บทปฏิบัติการโรคพืชเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2518. ประสิทธิภาพของเครื่องเทศบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (สำเนา)

_____. 2527. เครื่องเทศที่ใช้เป็นสมุนไพร. เล่มที่ 1. กรุงเทพฯ : อมรการพิมพ์.

พยอม ตันติวัฒน์. 2521. สมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย.

พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ. 2529. ตำราวิทยาศาสตร์สมุนไพร. กรุงเทพฯ : เมดิคัลมีเดีย.

พรพรรณ ธารีฉัตร. 2526. การศึกษาสรีรวิทยาของเชื้อ *Colletotrichum lagenraium* และ *Colletotrichum gloeosporioides*. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (สำเนา)

พรพิพัฒน์ ณ พัทลุง, นวลจิรา ภัทรรังรอง และพิเชษฐ์ วิริยะจิตรา. 2529. ฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร. ว. สงขลานครินทร์ 8 : 315-318.

พรรณิภา ชุมศรี. 2521. การตรวจสอบสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์. สภาวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.

พัฒนา สนธิรัตน์, วิรัช ชูบำรุง, ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และปิยะ เกียรติก้อง. 2526. เชื้อรา *Alternaria* ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดของพืชผักบางชนิด. ว. โรคพืช 3(4) : 154-167.

พิทักษ์ อาภาศิริผล. 2517. การปลูกพริกไทย. กสิกร 47 : 189-199.

วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุล, บรรณาธิการ. 2538. สยามไภษัชยพฤกษ์ : ภูมิปัญญาของชาติ. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยมหิดล.

วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล และ พิมพ์จิตร ดามพวรรณ. 2537. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของข่าลิง. สงขลา : ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิชัย ก่อประดิษฐ์กุล, ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล และ รุ่งนภา ก่อประดิษฐ์กุล. 2534. การใช้สารสกัดจากพืชป้องกันการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง, ใน รายงานการวิจัยสาขาพืช การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 29. หน้า 307-317. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2530. โรคของผักและการป้องกันกำจัด. กรุงเทพฯ : ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศุภลักษณ์ ฮอกะวัด. 2527. โรคพืชผัก. ขอนแก่น : ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศุภลักษณ์ ฮอกะวัด, บรรณาธิการ. 2536. โรคผักตระกูลพริกและมะเขือเทศ. ม.ป.ท. : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สงขลานครินทร์, มหาวิทยาลัย. คณะเภสัชศาสตร์, ภาควิชาเภสัชเวท. 2528. ลักษณะวงศ์พืช. สงขลา.

สงขลานครินทร์, มหาวิทยาลัย. คณะทรัพยากรธรรมชาติ, โครงการจัดตั้งภาควิชาการจัดการศัตรูพืช. 2531. บทปฏิบัติการโรคพืชเบื้องต้น. สงขลา.

สาธารณสุข, กระทรวง. 2530. สมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐาน. กรุงเทพฯ : สงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

สำนักงานปลัดทบวงมหาวิทยาลัย, กองวิชาการ. 2531. ประมวลงานวิจัยสมุนไพร. กรุงเทพฯ.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2527. โรคพืชทั่วไปและบทปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ : ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุนีย์ องอาจวาณิชย์. 2534. โรคหอมเลื้อยของหอมหัวใหญ่ที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (สำเนา)

สุภา ชวเดช. 2525. ยาเพื่อชีวิต. เล่มที่ 3. ม.ป.ท.

สุรชัย มัจฉาชีพ. 2535. พืชเศรษฐกิจในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : แพร่พิทยา.

สุรพล ประมงค์, สมหมาย เชี่ยววารีสัจจะ และ นิธิ ฤทธิ์พรพันธุ์. 2532. การใช้ผลมะคำดีควายเป็นยาเบื่อปลาที่ระดับความเค็มต่างๆ กัน. ว. สงขลานครินทร์ 11(1) : 91-94.

สุวรรณา จันทสุบรรณ. 2537. ผลของสารสกัดด้วยน้ำจากใบกระดูกไก่ (*Maesa ramentacea*) ต่อการเจริญของ *Rhynchosporium oryzae*. โครงงานวิจัยทางจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. (สำเนา)

สุวิทย์ รักเอียด. 2537. การใช้สารสกัดจากพืชเพื่อป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสพริก. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. (สำเนา)

อรุณพร อิฐรัตน์. 2522. สมุนไพรไทย-เทศ. เล่ม 1. ม.ป.ท : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อรุณรุ่ง ใจรังษี. 2537. ฤทธิ์ต้านราสาเหตุโรคกลากของน้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ดขาว (*Melaleuca leucadrendron*) และสารสกัดจากใบกระดูกไก่ (*Maesa ramentacea*). โครงงานทางจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. (สำเนา)

ออมสิน สัตยกุล. 2536. ฤทธิ์ต้านราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดจากใบกระดูกไก่ (*Maesa ramentacea*) และผลมะคำดีควาย (*Sapindus emarginatus*). โครงงานทางจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. (สำเนา)

อาภา หวังเกียรติ. 2538. ผลของการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, (สำเนา)

Agrios, G.N. 1988. Plant Pathology. 3rd ed. San Diego : Academic Press.

Alexopoulos C.J.; Mims, C.W. and Blackwell M. 1996. Introductory Mycology. 4th ed. USA : John Wiley & Sons,. Inc.

Asprey, G.F. and Thornton, P. 1976. Medicinal Plants of Java. West Indies. Med. J. 3 : 17-20.

Atal, C.K.; Dhar, K.C. and Pelter, A. 1967. Isolation and Structure Mination of (+)-Diacudesmin, The First Naturally Diaxially Substituted, 3,7-Dioxabiacydo (3,3,30) Octane. J. Chem. Soc. C. (1967) : 228-231.

Athamaprasangsa, S.; Buntrarongroj, U.; Dampawan, P.; Ongkavoranan, N.; Rukachaisirikul, V.; Sethijinda, S.; Sornnarintra, M.; Sriwub, P. and Taylor, W.C. 1994. A 1,7 Diarylheptanoid from *Alpinia conchigera*. Phytochem. 37(3) : 871-873.

Backer, C.A. and Bakhuizen, B.C. 1965. Flora of Java. Netherlands : N.V.P. Noordhoff-groningen.

Bailey, J.A.; Nash C.; Morgan, L.W.; O' Connell R.J. and Tebeest, D.O. 1996. Molecular Texonomy of *Colletotrichum* species Causing Anthracnose on The Malvaceae. Mol. Plant Pathol. 86 : 1076-1083.

Bailey, J.A.; O'Conell, R.J.; Pring R.J. and Nash C. 1992. Infection Strategies of *Colletotrichum* Species. in : Colletotrichum Biology, Pathology and Control, Page 309-325. Bailey J.A. and Jeger M.J., eds. Wallingford, United Kingdom : CAB

Bailey, L.H. 1951. Manual of Cultivated Plants. New York : Macmillan Company.

Balasubrahmanyam, V.R.; Chaurasia, R.S.; Tripathi, R.D. and Johri, J.K. 1988. Evaluation of Some Fungicides and Antibiotics Against Fungal and Bacterial Pathogen of Betelvine (*Piper betle* L.). Pest Manage. 34(3) : 315-317.

Benson L. 1959. Plant Classification. USA : D.C. Health and Company.

Brophy, J.J.; William, L.R.; Davies, N.W.; Stiff, I.A. and Southwell, I.A. 1989. Gas Chromatographic Quality Control for Oil of Melaleuca Terpinen-4-ol Type (Australian tea tree). J. Agri. Food. Chem. 37(5) : 1330-1335.

Burkill, I.H. 1932. Dictionary of the Economic Products of Malay Penninsula, London.

Cartwright, D.K. and Templeton, G.E. 1992. Preliminary Assessment of *Colletotrichum capsici* as a Potential Mycoherbicide for Control of Pitted Morningglory. Plant. Dis. 76(10) : 995-998.

Chakraborty, S. and Billard, L. 1995. Quantitative Relationships between *Colletotrichum gloeosporioides* Infection of *Stylosanthes scabra* and Weather under Field Condition. Plant Pathol. 44(1) : 63-72.

Chiayvareesajja, S.; Mahabusarakam W.; Maxwell, J.F.; Wiriyachitra, P. and Tower, G.H.N. 1987. Thai Piscicidal Plants. J. Sci. Soc. Thailand. 13 : 29-45.

Chiranjib B.; Vaduvatha S.N. and Prasad, S.V. 1990. Phenolics of Green Pepper Berries (*Piper nigrum* L.). J. Agric. Food. Chem. 38(8) : 1696-1699.

Clause, E.P.; Tyler, V.E. and Brady, L.R. 1973. Textbook of Pharmacognosy, Philadelphia : Lea & Febiger.

Dickman, M.B. and Patil, S.S. 1986. A Rapid and Sensitive Plate Assay for the Detection of Cutinase Produced by Plant Pathogenic Fungi. Phytopathology 76 : 473-475.

Dodd, J.C.; Estrada, A. and Jeger, M.J. 1992. Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the Tropics. in : Colletotrichum Biology, Pathology and Control, Page 309-325. Bailey J.A. and Jeger M.J., eds. Wallingford, United Kingdom : CAB International.

Dubey N.K.; Kishore, N. and Singh, S.K. 1983. Antifungal Properties of the Volatile Fraction of *Melaleuca leucadrendron*. Trop. Agric. (Trinidad). 60(3) : 227-228.

Ebnebe, A.D. 1980. Onion Twister Disease Caused by *Glomerella cingulata* in Northern Nigeria. Plant Dis. 64 : 1030-1032.

Ellis, M.A. and Bulger, M.A. 1986. Anthracnose Fruit Rot (*Colletotrichum gloeosporioides*) of Strawberry in Ohio. Plant Dis. 70 : 475.

Fabian, F.W.; Krehl, C.F. and Little, N.W. 1939. The Role of Species Picked Food Spoilage. Food Res. 4 : 629.

Fewell, A.M. and Roddick, J.G. 1993. Interactive Antifungal Activity of the Glycoalkaloids Alpha-solanine and Alpha-chaconie. Phytochem. 33(2) : 323-328.

Gamliel, A.; Katan J. and Cohen, E. 1989. Toxicity of Chloronitrobenzenes to *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* as Related to Their Structure. Phytoparasitica 17 : 101-105.

Geisfer, J.G. and Gross, G.G. 1990. The Biosynthesis of Piperine in *Piper nigrum*. Phytopathology 29(2) : 489-492.

Green, K.R. and Simons, S.A. 1994. "Dead Skin" on Yams (*Dioscorea alata*) Caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Pathol. 43(6) : 1062-1065.

Grover, R.K. and Bansal R.D. 1970. Seed Borne Nature of *Colletotrichum capsici* in Chilli Seed and Its Control by Seed Dressing Fungicides. Indian Phytopath. 23 : 664-668.

Hawksworth, D.L.; Sutton, B.D. and Ainsworth, G.C. 1983. Ainsworth & Bisby's Dictionary of Fungi. 7th ed. Kew survey, England : Commonwealth Mycological Institute.

Haward R.J. and Ferrari, M.A. 1989. Role of Melanin in Appressoria Function. Exp. Mycol. 13 : 403-418.

Holliday, P. 1980. Fungus Diseases of Tropical Crops. Cambridge : Cambridge University Press.

Huang, R. and Levy, Y. 1995. Characterization of Iprodione-Resistant of *Alternaria brassicicola*. Plant Dis. 79 : 828-833.

Hutchison, J. 1973. The Families of Flowering Plant. 3rd ed. England : The Darendon Press.

Kubo, Y.; Suzuki, K.; Furusawa, I.; Ishida, N. and Yamamoto, M. 1982. Relation of Appressoria Pigmentation and Penetration at Nitrocellulose Membrane by *Colletotrichum lagenarium*. Phytopathology 72 ; 498-501.

Kumar, R.; Rathi, Y.P.S. and Mukhopadhyay, A.N. 1989. Survival of *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler and Bisby with urd bean (*Phaseolus mungo* L.) Seed. Curr. Sci. 58(5) : 259-261.

Leifert, C.; Sigee, D.C.; Stanley, R.; Knight, C. and Epton, H.A.S. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerca* and *Alternaria brassicicola* on Dutch White Cabbage by Bacterial Antagonists at Cold-Store Temperature. Plant. Pathol. 42(2) : 270-279.

Lenne', J.M.; Varge, D.A. and Miles J.W. 1987. Effect of Anthracnose and Other Factor on Survival of Segregation *Stylosanthes guianensis* Population in Several Pasture Environment. Phytopathology 77 : 1730.

Lorian,V. 1991. Antibiotics in Laboratory Medicine. 3rd ed. Baltimore : Williams & Wilkins.

Mahabusarakam, W.; Panthong, A. and Kunanusorn, P. 1994. Screening of Anti-Inflammatory Activity and Anagelsic Effect of Chemicals from *Maesa ramentacea*. J. Sci. Technol. 16(3) : 277-281.

Mananhar, J.B.; Hartman, G.L. and Wang, T.C. 1995. Conidial Germination and Appressorial Formation of *Colletotrichum capsici* and *C. gloeosporioides* Isolate from Pepper. Plant Dis. 79 : 361-366.

Marguaret, A.P. and Campbell, R. 1974. The Effect of Saprophytes on Infection of Leaves of *Brassica* sp. and *Alternaria brassicicola*. Trans. Br. Mycol. Soc. 63(1) : 193-196.

Mohanan, R.C.; Nambair, K.K.N. and Kaweriappa, K.M. 1987. Effect of Pre and Post Inoculation Factors on Infection of Cacao by *Colletotrichum gloeosporioides*. Indian Phytopath. 40 : 212-217.

Morris, J.A. 1979. Antimicrobial Activity of Aroma Chemical and Essential Oils. J. Am. Oil Chemist's Soc. 56 : 595-603.

Nair, M.G. and Burke A. 1990. Antimicrobial *Piper* Metabolite and Related Compounds. J. Agric. Food Chem. 38 : 1093-1096.

Okoli, C.A.N. and Erinle, I.D. 1990. Comparative Rate of Rot Induction by Nine Fungal Pathogens on Stored Tomato Fruits in Nigeria. J. Stored Prod. Tes. 26(2) : 77-79.

Palarpawar, M.Y. 1987. Growth and Sporulation of *Colletotrichum capsici* and *Colletotrichum curcumae* on Different Culture Media. Indian J. mycol. Plant Pathol. 17(2) : 208.

Parry, J.W. 1969. Spices. New York : Chemical.

Perry, L.M. 1980. Medicinal Plant of East and Southeast Asia. Cambridge : MIT Press.

Phongpaichit, S.; Schneider, E.F.; Arnason, J.T.; Picman, A. and Wiriyachitra, P. 1992a. Plant Natural Products in Disease Manangement II : Antifungal Activities of *Maesa ramentacea* Leaf Extract. Abtracts. 6th ed. International Congress of Plant Pathology. Montreal Canada.

Phongpaichit, S., Schneider, E.F., Picman, A.K. Tantiwachwuttikul, P., Wiriyachitra P. and Arnason, J.T. 1995. Inhibition of Fungal Growth by an Aqueous Extract and Saponins from Leaves of *Maesa ramentacea* Wall. Biochem. Sys. Ecol. 23(1) : 17-25.

Phongpaichit, S.; Suvannarat, N.; Petcharat, V.; Ongsakul, M.; Nilrat, L. and Wiriyachitra, P. 1992b. Antifungal activities of extract from *Maesa ramentacea*, *Sapindus rarak* and *Sapindus emarginatus*. Songklanakarin J.Sci. Technol. 14(4) : 361-366.

Picman, A.K.; Schneider, E.F. and Gershenzon, J. 1990. Antifungal Activities of Sunflower Terpenoid. Biochem Sys. Ecol. 18 : 325-328.

Pring, R.J.; Nash, C.; Zakaria, M. and Bailey, J.A. 1995. Infection Process and Host Range of *Colletotrichum capsici*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 46(2) : 37-152.

Prusky, D.; Jacoby, B. and Sims, J.J.. 1985. Regulation of Lipoxygenese Activities and Its Possible Relation to Latency of *Colletotrichum gloeosporioides* on Avogado Fruits. Phytopathology 75 : 1032.

Rangel, J.F. 1945. Two Alternaria Diseases of Crucuferous Plants. Phytopathology. 35 : 1002-1007.

Robert, R.G. and Snow, J.P. 1981. Some Histological Effect of *Colletotrichum capsici* on Cotton Lint (Abstr.). Phytopathology 71 : 252.

_____. 1984. Histopathology of Cotton Boll Rot Caused by *Colletotrichum capsici*. Phytopathology. 74 : 390-397.

_____. 1990. Morphological and Pathological Studies of *Colletotrichum capsici* and *C. indicum*. Phytopathology 82(1) : 82-90.

Sherf, A.F. and Macnab, A.A. 1986. Vegetable Diseasses and Their Control. New York : John Wiley & Sons.

Sirat, H.M. and Nordin, A.B. 1995. Chemical Composition of The Rhizome Oil of *Alpinia conchigera* Griff. from Malaysia. J. Ess. Oil Res. 7(2) : 195- 197.

Spalding, D.H. and Reeder W.F. 1986. Decay and Acceptability of Mangos Treated with Combination of Hot Water, Imazalil and Radiation. Plant Dis. 70 : 1149-1151.

Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes. Kew Surrey, England : Commonwealth Mycological Institute.

Sutton, B.C. 1992. The Genus Glomerella and its Teleomorph Colletotrichum. Kew Surrey, England : Commonwealth Mycological Institute.

Tebeest, D.O.; Shilling, L.H.; Riley L.H. and Weidemann G.J. 1983. The Number of Nuclei in Spore of Three Species of *Colletotrichum*. Mycologia 81 : 147-149.

Trease, G.E. and Evan, W.C. 1975. 12th ed. Phamacognosy. Bailiere Tindall : English Language Book Society.

Valkonen, J.P.T. and Koponen, H. 1990. The Seed Borne Fungi of Chinese Cabbage (*Brassica pekinensis*), Their Pathology and Control. Plant Pathol. 39(3) : 510-516.

Vannacci, G. and Harman, G.E. 1987. Biocontrol of Seed-Borne *Alternaria raphani* and *A. brassicicola*. Can. J. Microbiol. 33(10) : 850-856.

Verma, M.L. 1973. Comparative Studies on Virulence of Isolates of Four Species of *Colletotrichum parasitic* on Chillies. Indian phytopath. 26 : 28-31.

Wilson, L.L.; Madden, L.V. and Ellis, M.A. 1990. Influence of Temperature and Wetness Duration on Infection of Immature and Mature Strawberry Fruit by *Colletotrichum aculatum*. Phytopathology 80 : 111-116.

Wiriyachitra, P. 1991. IDRC Report on "Fish Poison"

Youngken, H.W. 1950. Textbook of Pharmacognosy. 6th ed. Philadelphia : The Blakiston.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการตรวจผลครั้งที่ 1

Source	df	SS	MS	F
Treatment	13	0.578	0.045	1.00 NS
Error	42	1.896	0.045	
Total	55	2.483	0.045	

CV = 748.33%

NS = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการตรวจผลครั้งที่ 2

Source	df	SS	MS	F
Treatment	13	2118.920	162.994	35.473**
Error	42	192.982	4.595	
Total	55	2311.903	42.035	

CV = 35.52%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการตรวจผลครั้งที่ 3

Source	df	SS	MS	F
Treatment	13	3300.168	253.859	19.304**
Error	42	552.320	13.150	
Total	55	3852.488	70.045	

CV = 30.21%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการตรวจผลครั้งที่ 4

Source	df	SS	MS	F
Treatment	13	1478.976	113.767	2.659**
Error	42	1796.741	42.780	
Total	55	3275.717	59.558	

CV = 53.57%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการตรวจผลครั้งที่ 5

Source	df	SS	MS	F
Treatment	13	2641.877	203.221	5.250**
Error	42	1625.902	38.712	
Total	55	4267.779	77.596	

CV = 26.41%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการตรวจผลครั้งที่ 6

Source	df	SS	MS	F
Treatment	13	5136.266	395.097	7.344**
Error	42	2259.391	53.795	
Total	55	7395.656	134.466	

CV = 21.16%

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการตรวจผลครั้งที่ 7

Source	df	SS	MS	F
Treatment	13	943.375	72.567	0.664 NS
Error	42	4589.063	109.263	
Total	55	5532.438	100.590	

CV = 14.27%

NS = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการตรวจผลครั้งที่ 8

Source	df	SS	MS	F
Treatment	13	316.156	24.320	0.583 NS
Error	42	1750.563	41.680	
Total	55	2066.719	37.577	

CV = 7.16%

NS = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการตรวจผลครั้งที่ 9

Source	df	SS	MS	F
Treatment	13	37.125	2.856	0.474 NS
Error	42	252.875	6.021	
Total	55	290.000	5.273	

CV = 2.51%

NS = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ