บทที่ 4

ผลการวิจัย

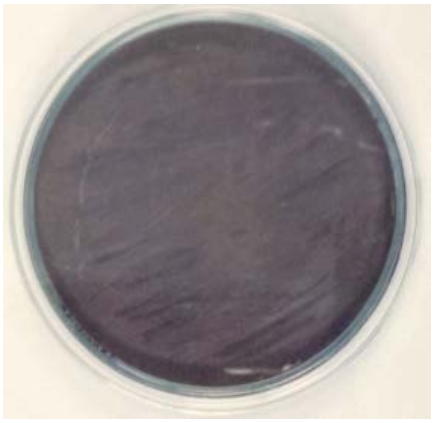
4.1 การแยกเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* จากผลพริกและการพิสูจน์โรค

แยกเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากผลพริกมันพันธุ์หัวเรือ ที่มีลักษณะแผลบนผลเริ่มแรกเป็นแผลรูปวงรีเล็ก ๆ แผลมักยุบตัวลง แล้วค่อย ๆ ขยายขนาดใหญ่ขึ้นบริเวณแผลมีสีเหลืองส้ม (สมศิริ จิ๋วสกุล, 2521) เมื่อนำผลพริกที่แสดงอาการดังกล่าวมาแยกบนอาหาร PDA ผสม rifampicin 100 ppm พบว่าได้เชื้อราที่มีเส้นใยสีขาวอมเทาฟูเล็กน้อย ขอบโคโลนีเรียบสร้างกลุ่มสปอร์สีส้มเกิดเรียงกันเป็นวงแหวน โคโลนีของเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรเมื่ออายุประมาณ 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

จากนั้นนำเชื้อราที่แยกได้จากผลพริกเป็นโรคไปปลูกเชื้อลงบนผลพริกพันธุ์หัวเรือ เพื่อพิสูจน์การเกิดโรคตามวิธีของ Koch (Koch's postulation) โดยใช้ mycelial disc พบว่าผลพริกเริ่มแสดงอาการของโรคหลังปลูกเชื้อ 3 วัน โดยเริ่มเห็นผลพริกเป็นจุดเล็ก ๆ ยุบตัวลง ก่อนที่แผลจะขยายอย่างรวดเร็ว มองเห็นสปอร์สีส้มบนแผลในวันที่ 5 หลังจากปลูกเชื้อ และเมื่อนำผลพริกมาแยกเชื้อสาเหตุโรคบนอาหาร PDA ผสม rifampicin 100 ppm ซ้ำอีกครั้ง พบว่าเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะเหมือนเดิม

4.2 ผลการเตรียมเชื้อ *Cladosporium cladosporioides*

การเตรียมเชื้อ *Cladosporium cladosporioides* โดยเก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสนำมาแยกเชื้อด้วยวิธี Tissue transplanting บนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ดังการทดลองหัวข้อ 3.6.3 ได้เชื้อราที่มีอายุ 5 วันแสดงดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 *Cladosporium cladosporioides* เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยวิธี TLC-bioassay

เมื่อนำสารสกัดดีปลี ไพล และข่า มาละลายด้วยเอทานอลแล้ว spot ลงบน TLC silica gel aluminium sheet ทำการ developed TLC plate ด้วย hexane : ethyl acetate : methanol โดยนำแผ่น TLC ที่ได้มาพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อรา *C. cladosporioides* ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ใน moist chamber ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา พบว่าเกิดแถบที่เชื้อราไม่เจริญเติบโต (inhibited zone) ของเชื้อรา *C. cladosporio* นั่นคือจะพบบริเวณแถบที่ไม่ปรากฏการเจริญของเชื้อรา (clear zone) โดยมีค่า R_f ของแถบที่ต้านเชื้อราอยู่ในช่วง 0.54-0.61, 0.11-0.28 และ 0.30-0.36 สำหรับสารสกัดดีปลี ไพล และข่าตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.2

ภาพที่ 4.2 Inhibited zone ของสารสกัดไพล

4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชต่อการเจริญของเชื้อรา *C. cladosporioides*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของดีปลี ไพล และข่า ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C. cladosporioides* ด้วยวิธี Poisoned food technique โดยใช้ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1000 ppm เปรียบเทียบกับสารเคมี benomyl ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย พบว่าสารสกัดดีปลีสามารถยับยั้งการเจริญได้ 81.6-100.0 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดไพลสามารถยับยั้งการเจริญได้ 4.5-29.2 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดข่าสามารถยับยั้งการเจริญได้ 3.1-21.4 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.1 โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดดีปลี ไพล และข่า ในอาหาร PDA ที่ใช้ทดสอบ

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *C. cladosporioides*

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารสกัด (ppm)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา
ดีปลี	0	0
	200	81.6
	400	95.1
	600	100.0
	800	100.0
	1000	100.0
ไพล	0	0
	200	4.5
	400	6.9
	600	12.3
	800	18.3
	1000	29.2
ข่า	0	0
	200	0
	400	3.1
	600	8.8
	800	15.2
	1000	21.4
benomyl	500	100

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืช 3 ชนิด ได้แก่ ดีปลี ไพล และข่า ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* พบว่า สารสกัดพืชทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Cladosporium cladosporioides* ที่ทำการทดสอบโดยพบว่า สารสกัดพืชแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้แตกต่างกัน สารสกัดพืชที่ออกฤทธิ์ ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดคือ สารสกัดจากดีปลี รองลงมาไพลและข่าตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าพืชที่ใช้ในการทดลองทั้ง 3 ชนิดนี้ มีสารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกได้ ซึ่งประสิทธิภาพของสารสกัดพืชที่แตกต่างกันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคนั้น เป็นผลมาจากประสิทธิภาพและชนิดของสารออกฤทธิ์ ที่มีอยู่ในพืชแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน การนำสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อโรคไปใช้นั้น นอกจากการเลือกใช้พืชที่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโรคได้แล้ว จะต้องคำนึงถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ ได้แก่ อายุของพืช ช่วงเวลาที่เก็บเกี่ยว และความบริสุทธิ์ของส่วนของพืชที่นำมาใช้ ซึ่งสอดคล้องกับวนัสนันท์ สะอาดล้วน (2548) ที่ได้

รายงานว่าสาร dp (สกัดสารออกฤทธิ์จากผลดีปลีแห้ง) ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้ 100 % และมณทิรา ธรรมาภิมุข (2552) รายงานว่าสารสกัดจากข่าที่สกัดด้วยเหล้าขาว 40 ดีกรี และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ได้ดีกว่าสารที่สกัดด้วยน้ำกลั่น น้ำประปา น้ำบาดาล

4.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *C. cladosporioides*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดดีปลี ไพล และข่า ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *C. cladosporioides* ด้วยวิธี Spore Drop technique โดยใช้ความเข้มข้น 0, 200, 400, 600, 800 และ 1000 ppm เปรียบเทียบกับสารเคมี benomyl ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ พบว่าสารสกัดดีปลีสามารถยับยั้งการงอกได้ 78.1-100 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดไพลสามารถยับยั้งการงอกได้ 3.9-26.8 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดข่าสามารถยับยั้งการงอกได้ 2.4-19.4 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.2 โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดดีปลี ไพล และข่า

ตารางที่ 4.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *C. cladosporioides*

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารสกัด (ppm)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา
ดีปลี	0	0
	200	78.1
	400	95.7
	600	100
	800	100
	1000	100
ไพล	0	0
	200	3.9
	400	7.1
	600	14.8
	800	20.4
	1000	26.8

ตารางที่ 4.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *C. cladosporioides* (ต่อ)

ข่า	0	0
	200	0
	400	2.4
	600	9.4
	800	13.1
	1000	19.4
bennomyl	500	100

จากการนำสารสกัดดีปลี ไพล และข่า มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *C. cladosporioides* พบว่า สารสกัดดีปลี ไพล และข่า ทุกระดับความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ คือ 200 ถึง 1,000 ppm สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ โดยสารสกัดจากดีปลีที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 600 ppp ขึ้นไปมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *C. cladosporioides* ได้ 100% ซึ่งไม่สอดคล้องกับวนัสนันท์ สะอาดล้วน (2548) ที่ได้รายงานว่าสารสกัดสารออกฤทธิ์จากผลดีปลีแห้ง ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm ขึ้นไปสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 100%

4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากดีปลี ไพล และข่า ในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกด้วยวิธี Detached Fruit Technique โดยใช้ความเข้มข้น 1,000 ppm โดยการใช้สารสกัดหยาบพืชดีปลี ไพล ข่า ด้วย 2 กรรมวิธี ได้แก่ การใช้สารสกัดพืชก่อนการปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง และการใช้สารสกัดหลังการปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ และสารเคมีในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกที่เกิดจากเชื้อรา *C. cladosporioides* ด้วยวิธี detached fruit หลังปลูกเชื้อราไปแล้ว 7 วัน

สาร	ปลูกเชื้อ *C. Cladosporioides* ก่อนใช้สารทดสอบยับยั้ง 24 ชั่วโมง		ปลูกเชื้อ *C. Cladosporioides* หลังใช้สารทดสอบยับยั้ง 24 ชั่วโมง	
	ขนาดของแผล[1] (cm)	การยับยั้งการเกิดโรค[2] (%)	ขนาดของแผล[1] (cm)	การยับยั้งการเกิดโรค[2] (%)
2% methanol (ชุดควบคุม)	2.1	-	2.0	-
ดีปลี (1000 ppm)	1.5	28.6	1.3	35.0
ไพล (1000 ppm)	1.8	14.3	1.7	15.0
ข่า (1000 ppm)	1.9	9.5	1.8	10.0
Benomyl (1,200 ppm)	1.2	42.8	0.9	55.0
Mancozeb (2,000 ppm)	1.1	47.6	1.0	50.0

1 ค่าเฉลี่ยของขนาดของแผล (cm) บนผลพริกหลังการปลูกเชื้อ ไปแล้ว 7 วัน (5 ผล/กรรมวิธี)

2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคบนผลพริก เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

จากตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก ให้ผลเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับผลการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. cladosporioides* คือพบว่าสารสกัดจากดีปลี ไพล และข่า สามารถลดขนาดแผลของโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *C. cladosporioides* ได้ การใช้สารสกัดหยาบจากพืชก่อนการปลูกเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งพื้นที่การเกิดโรคเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยสามารถยับยั้งการเกิดโรคจากเชื้อราได้เท่ากับ 28.6, 14.3 และ 9.5 เปอร์เซ็นต์สำหรับสารสกัดจากดีปลี ไพล และข่า ตามลำดับ สำหรับการใช้สารสกัดหยาบจากพืชหลังการปลูกเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งพื้นที่การเกิดโรคเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยสามารถยับยั้งการเกิดโรคจากเชื้อราได้เท่ากับ 35.0, 15.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์สำหรับสารสกัดจากดีปลี ไพล และข่า ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบกับสาร benomyl และ mancozeb สารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้น้อยกว่าสารกำจัดเชื้อรา การปลูกเชื้อโดยใช้เข็มทำแผล อาจทำให้พริกผลิตสารในกลุ่ม phytoalexin คือสาร capsicannol (Adikaram, 1998) ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ด้วย ซึ่งอาจส่งผลให้ช่วยเสริมประสิทธิภาพของสารสกัดพืช ในการยับยั้งการเกิดโรคเมื่อทำการปลูกเชื้อหลังการทำแผลและใช้สารสกัดพืช วนัสนันท์ สะอาดล้วน (2548) นำสารสกัดสารออกฤทธิ์จากผลดีปลีแห้ง ไปทดสอบความสามารถควบคุมโรคผลเน่าในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ พบว่าสาร dp ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้ดีเทียบเท่ากับสาร benomyl