รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : การลดความสูญเสียในผลิตผลเกษตรจากศัตรูพืชหลังการเก็บเกี่ยวและสารพิษจากรา

2. **โครงการวิจัย** : การลดความสูญเสียในผลิตผลเกษตรจากโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวด้วยวิธีปลอดภัย

   กิจกรรม : การควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวโดยชีววิธี.

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

1. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : **การควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกหลังการเก็บเกี่ยวด้วยน้ำมันระเหยง่ายจากพืช**

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : **Control of Antracnose Postharvest Disease on Chilli by Using Plants Essential Oil**

2. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : **นายชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์ สังกัด กวป.**

   ผู้ร่วมงาน : นางสาวอารีรัตน์ การุณสถิตย์ชัย สังกัด กวป.
   นางสาวชุติมา วิธูรจิตต์ สังกัด กวป.

3. **บทคัดย่อ** :

บทคัดย่อ

การศึกษาการผลิตชีวภัณฑ์น้ำมันระเหยง่ายในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสหลังการเก็บเกี่ยวที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum capsici* พบว่า ไพล (*Zingiber montunum* Link ex A. Dietr.) มีผลยับยั้งการเจริญเชื้อ *Colletotrichum capsica* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่ 52.7 % และเมื่อทดสอบการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ โดยพบว่าเมทานอล 95 % มีความเหมาะสมในการสกัดสารจากไพลสดและไพลแห้งโดยให้ผลผลิตที่มีปริมาณใกล้เคียงกันคือ 195.7 และ 182.1 มก.ต่อ

กรัม ตามลำดับ เมื่อนำมาใช้ในการเตรียมชีวภัณฑ์ไพลต้นแบบ การเตรียมชีวภัณฑ์ไพลต้นแบบโดยใช้ไพลสด 400 กรัม แช่เมทานอลนำมาลดปริมาตรด้วย rotary evaporator จนเหลือประมาณ 250 มล. จึงนำมาผสมกับ Silicon dioxide 500 กรัม ผึ่งให้แห้งใน desiccator จนกระทั่งเมทานอล ระเหยออกหมด จึงนำมาบดให้ละเอียด บรรจุถุงซิบ และการเก็บรักษาในตู้เย็นนาน 6 เดือน ไม่มีความเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้ด้วยสายตา โดยมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ใกล้เคียงกันกับชีวภัณฑ์ไพลต้นแบบที่ผลิตขึ้นใหม่ ขณะที่ผลการทดสอบชีวภัณฑ์ไพลต้นแบบในการควบคุมโรคแอนแทรคบนผลพริกเหลืองที่ปลูกเชื้อ แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มในการควบคุมโรคของชีวภัณฑ์ไพลที่มีต่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคโดยมี % การควบคุมโรคระหว่าง 10.3 -44.8 %

คำหลัก: น้ำมันระเหยง่าย, แอนแทรคโนส, หลังการเก็บเกี่ยว, *Colletotrichum capsica*

Abstract

The study of essential oils extracted from medicinal plants was tested for controlling of antracnose postharvest disease of Chili caused by *Colletotrichum capsici* and led to develop to the biological product. Phlai (*Zingiber montunum* Link ex A. Dietr.) gave the inhibitory effects to mycelial growth of *Colletotrichum capsici* at 52.7 % growth inhibition and the results of the testing to seek out the proper organic solvent revealed that methanol 95 % was the proper organic solvent to bioactive compound extraction, either from fresh Phlai or dry Phlai, the yield were given 195.7 and 182.1 mg/g of Phlai sample, respectively. The SiO_2 (silicon dioxide), the main components of biological product, was using as carrier of essential oil in portion of 500 g per 400 g. of crude extract of Phlai. After drying, biological product was grounds and separated into small portion and load in plastic bag. The inhibitory effects to mycelia growth of *C. capsici* was conducted in biological product those kept for 6 months comparing with the new producing biological product, the results revealed that the percentage of growth inhibition of those biological products were little differentiate. While using of biological product of Phai at 1 2 4 and 6 gram fresh Phai for controlling of antractnose disease on Chili showed % of disease control during 10.3 to 44.8 % after 5 days of incubation period at room temperature (25±3 °C)

Keywords: essential oil, antracnose, Chili, Phlai, *Zingiber montunum*

4. คำนำ :

ปัญหาโรคที่สำคัญของผลพริกหลังการเก็บเกี่ยว คือโรคแอนแทรคโนส หรือโรคกุ้งแห้ง มีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ใน 4 species คือ *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc., *C. capsici* (Syd.) Butl. & Bisby, *C. acutatum* Simmonds และ *C coccodes* (Wallr.) Hughes (Hadden and Black, 1987) นอกจากนี้มีรายงานว่าเชื้อราเหล่านี้เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสกับมะเขือเทศอีกด้วย ในประเทศไทยพบเชื้อรา 2 ชนิด ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก คือ เชื้อรา *C. gloeosporioides* (Telomorp; *Glomerella cingulata*) และ *C. capsici* สามารถทำให้เกิดโรคบนผลพริกสุกได้กับพริกทุกพันธุ์ จะรุนแรงมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของพริก สมศิริ (2521) รายงานว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ทำให้เกิดโรคอย่างรุนแรงกับพริกยักษ์ แสดงอาการปานกลางกับพริกใหญ่และพริกเหลือง แต่เป็นโรคน้อยที่สุดกับพริกขี้หนู ส่วนเชื้อรา *C. capsici* จะทำให้เกิดโรครุนแรงกับพริกหยวก พริกเหลืองและพริกบางช้าง แสดงอาการปานกลางกับพริกใหญ่ และเป็นโรคน้อยที่สุดกับพริกขี้หนู

การทดสอบประสิทธิภาพของสารน้ำมันระเหยง่ายจาก *Magnolia liliflora* ในการควบคุมเชื้อราโรคพืช Bajpai and Kang .(2012) พบว่าสารที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย เช่น hexane, chloroform, ethyl acetate และเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis cinerea C. capsici Fusarium oxysporum F. solani Phytophthora capsici Rhizoctonia solani* และ *Sclerotinia sclerotiorum* ในระดับห้องทดลอง โดยพบว่าสารสกัดยับยั้งการงอกของสปอร์ ขณะที่การทดลองในสภาพเรือนเพาะชำพบว่าสารสกัดจากทั้งดอกและใบสามารถยับยั้งการเข้าทำลายพริกหวานของเชื้อ *P. capsici* ขณะที่ Khewkhom and Somsiri (2009) ได้ทดสอบสารสกัดหยาบ 3 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อโรคหลังการเก็บเกี่ยวสำคัญ โดยเลือกส่วน lipophilic extract ของสารสกัดจากอบเชย (*Cinnamomum zeylanicum*) กระชาย (*Boesenbergia pandurata*) และกานพลู (*Syzygium aromaticum*) มาทำการทดลอง พบว่าสารสกัดจากเปลือกต้นอบเชยมีประสิทธิภาพสูงสุดโดยมีค่า Minimum inhibitory concentrations (MIC) ที่ 1.2 µg/mL ต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *B. theobromae* ที่เวลา 24 48 และ 120 ชม.หลังปลูกเชื้อ และมีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ที่ 100 µg/mL ที่ 24 ชม. อย่างไรก็ตาม สารนี้ไม่มีผลในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสหลังการเก็บเกี่ยวบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ แม้ว่าจะใช้ที่ความเข้มข้น 5,000 และ 10,000 ppm แต่กลับทำให้เกิดผลให้สีผิวผิดปกติเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงกว่านี้

การทดลองของ Tzortzakis and Economakis (2007) พบว่าน้ำมันระเหยง่ายจากตะไคร้ (*Cympopogon citratus* L.) ความเข้มข้น 25 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum coccodes, B. cinerea, Cladosporium herbarum, Rhizopus stolonifer* และ *A. niger* และยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ ร้อยละ 70 และยับยั้งได้สมบูรณ์ที่ 500 ppm และยังพบว่าสามารถมีผลต่อการงอกของสปอร์และความยาวของ germ tube ใน *C. coccodes, B. cinerea, C. herbarum* และ *R. Stolonifer* แต่พบว่าที่ 100 ppm มีการกระตุ้นการงอกของสปอร์ใน *A. niger* จากการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีแนวโน้มนำมาใช้รมในการลดปริมาณสปอร์ตั้งต้น (spore load) ในสภาพเก็บรักษาหรืออาจใช้เป็นสารถนอมอาหารทางเลือกได้

นอกจากนั้นการทดลองของ Tripathi *et al*. (2007) พบว่าน้ำมันระเหยง่ายจากพืช 10 ชนิด *Chenopodium ambrosioides, Eucalyptus citriodora, Eupatorium cannabinum, Lawsonia inermis, Ocimum canum, O. gratissimum, O. sanctum, Prunus persica, Zingiber cassumunar และ Z. officinale* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *B. cinerea* ได้ถึงร้อยละ 100 และเมื่อเลือกน้ำมันระเหยง่ายจากพืช *O. sanctum, P. persica* และ *Z. officinale* มาทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) คือ 200, 100 and 100 ppm (mg/l) ตามลำดับ และฤทธิ์ของสารสามารถทนทานต่อช่วงอุณหภูมิ 5 -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36- 48 เดือน และออกฤทธิ์กว้างต่อเชื้อก่อโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวถึง 15 ชนิด ในการทดลองการควบคุมโรค grey mould ขององุ่นจากเชื้อ *B. cinerea* ระหว่างการเก็บรักษาพบว่าน้ำมันระเหยง่าย *O. sanctum* และ *P. persica* สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้ 4 และ 5 วัน ตามลำดับ ส่วน *Z. officinale* ยืดอายุการเก็บรักษาได้ถึง 6 วัน โดยไม่มีอาการ Phytotoxic ต่อผล

ขณะที่ Espitia, P.J.P. *et al*. (2012) ได้เสนอวิธีการควบคุมการเน่าเสียหลังการเก็บเกี่ยวจากเชื้อราโรคพืชของผลมะละกอด้วยน้ำมันระเหยง่ายที่บรรจุซองขนาดเล็กร่วมกับถุงบรรจุภัณฑ์กระดาษ (paper pouch) พบว่าน้ำมันระเหยง่ายจากอบเชย ออริกาโน (Oregano) และตะไคร้ที่บรรจุซองมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *A. alternata, Fusarium semitectum, Lasiodiplodia theobromae* และ *R. stolonifer* ส่วนการทดลองกับผลมะละกอที่บรรจุถุงบรรจุภัณฑ์กระดาษพบว่าน้ำมันระเหยง่ายทั้ง 3 ชนิด ลดปริมาณแบคทีเรีย รา และ ยีสต์ได้ โดยที่อบเชยลดได้มากที่สุดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (12 วัน) โดยไม่พบความผิดปกติของผลมะละกอเมื่อเทียบกับผลมะละกอควบคุม

การศึกษาการผลิตชีวภัณฑ์น้ำมันระเหยง่ายอาจเป็นวิธีการทางเลือกในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสหลังการเก็บเกี่ยว ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ซึ่งจะช่วยลดการตกค้างของสารกำจัดเชื้อราในผลิตผลพริกได้

5. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

1. ข่า ขมิ้น ขมิ้นขาว ไพล ตะไคร้ เสม็ด และพลู
2. rotary vacuum evaporator
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ: Potato Dextrose Agar (PDA)
4. Acetone
5. n-Hexane
6. เมทานอล 95 %
7. SiO_2 (silicon dioxide)
8. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
9. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ
10. โถ Desiccator
11. ถุงซิปขนาดบรรจุ 10 กรัม

- วิธีการ

1. การศึกษาน้ำมันระเหยง่ายที่สกัดจากพืชเพื่อใช้ในการควบคุมโรค

1.1 ศึกษาพืชที่เหมาะสมในการนำมาใช้สกัดสาร

โดยเลือกพืชกลุ่มที่ใช้เป็นอาหารหรือพืชเครื่องเทศ นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกในห้องปฏิบัติการ โดยเตรียมตัวอย่างพืชที่ผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาบดด้วยโกร่งเซรามิคที่มีการเติมไนโตรเจนเหลว นำตัวอย่างพืชน้ำหนัก 10 กรัมนำมาทดสอบการควบคุมเชื้อราด้วยสารระเหยง่าย โดยการวางตัวอย่างพืชบดในฝาจานเลี้ยงเชื้อที่วางหงาย และก้นจานเลี้ยงเชื้อที่วางชิ้นวุ้นเชื้อรา *C. capsici* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA คว่ำปิดอยู่ (Figure 1) โดยทดสอบกับตัวอย่างพืช คือ ข่า ขมิ้น ขมิ้นขาว ไพล ตะไคร้ เสม็ด และพลู

บันทึกผลโดย วัดขนาดของโคโลนีเชื้อรา ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา วัน นำมาคำนวณหาร้อยละของยับยั้งการเจริญเติบโตเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ไม่มีการวางตัวอย่างพืชบด) โดยใช้สูตร

ร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเส้นใย = [(A – B) / A] x 100

A คือค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA (ควบคุม)

B คือค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA (มีพืชตัวอย่างบด)

1.2 การศึกษาวิธีสกัดที่เหมาะสม

ในการทดลองได้ใช้ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคในการทดลองที่ 1.1 ซึ่งพบว่าตัวอย่างพืชบดที่เตรียมจาก ไพล และใบพลู ให้ผลการควบคุมที่ดีจึงคัดเลือกมาทำการทดสอบ

การเตรียมสารสกัดจากไพล

เตรียมตัวอย่างหัวไพลสดที่ผ่านการล้างทำความสะอาดและผึ่งจนแห้งเก็บในตู้เย็น แบ่งหัวไพลส่วนแรกนำมาหั่นเป็นชิ้นที่มีความหนาประมาณ 2-3 มม. แล้วผึ่งให้แห้งในที่ร่มนาน 3 วัน ใช้เป็นตัวอย่างไพลแห้ง ส่วนตัวอย่างไพลสดจะเตรียมจากหัวไพลที่เหลือนำมาหั่นในลักษณะเดียวกันก่อนทำการสกัดสาร โดยเตรียมตัวอย่างไพลสด และแห้ง จำนวน 30 กรัม นำมาสกัดโดยเติมตัวทำละลายอินทรีย์ให้ท่วมตัวอย่าง ทิ้งไว้ข้ามคืน นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 และนำส่วนกากมาเติมทำละลายอินทรีย์ใหม่เพื่อทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำส่วนใสที่ได้จากการกรองแต่ละครั้งมารวมกันแล้วลดปริมาตรจนแห้งด้วย rotary evaporator

การเตรียมสารสกัดจากใบพลู

เตรียมตัวอย่างพลูโดยนำตัวอย่างใบสดที่ผ่านการล้างทำความสะอาดและแล้วผึ่งให้แห้งในที่ร่มนาน 3 วัน แล้วบดด้วยเครื่องบดพืช ชั่งน้ำหนัก 30 กรัม นำมาสกัดโดยเติมตัวทำละลายอินทรีย์ให้ท่วมตัวอย่าง ทิ้งไว้ข้ามคืน นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 และนำส่วนกากมาเติมทำละลายอินทรีย์ใหม่เพื่อทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำส่วนใสที่ได้จากการกรองแต่ละครั้งมารวมกันแล้วลดปริมาตรจนแห้งด้วย rotary evaporator

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด คือ n-Hexane, Acetone และ เมทานอล

บันทึกผลโดย นำสารสกัดหยาบจากพืชที่ได้จากการสกัดด้วยทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ นำมาชั่งเพื่อหาน้ำหนักผลผลิตสารสกัดหยาบเพื่อเปรียบเทียบระหว่างลักณะตัวอย่างพืช ชนิดทำละลายอินทรีย์

1.3 การทดสอบน้ำมันระเหยง่ายที่สกัดได้ต่อการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค

โดยเตรียมสารสกัดหยาบจากการทดลองที่ 1.2 จากไพลสดและแห้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ นำมาเจือจางโดยคำนวณปริมาตรเมทานอลที่จะเจือจางให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่จะหยดลงบนกระดาษกรองเท่ากับ 400 ul. เทียบเท่ากับ 1 กรัมตัวอย่างไพล แล้วหยดลงบนกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. ทิ้งให้เมทานอลระเหยหมด นำมาวางในฝาจานเลี้ยงเชื้อที่วางหงาย และก้นจานเลี้ยงเชื้อที่วางชิ้นวุ้นเชื้อรา *C. capsici* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA คว่ำปิดอยู่ (Figure 1) และบันทึกผลโดยวัดขนาดโคโลนีทุก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 7 วัน

2. การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบและการเก็บรักษา

ตัวพา (carrier) สำหรับใช้เป็นตัวกลางสำหรับเก็บน้ำมันระเหยง่ายในสภาพที่สามารถนำไปใช้งานได้สะดวกและต้องมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคเนื่องจากตัวพาอาจมีการสัมผัสโดยตรงกับผลิตผล ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกเอา SiO_2 (silicon dioxide) ซึ่งเป็นสารที่ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารแปรรูปและมีราคาไม่สูงนัก มีลักษณะเป็นผงสีขาวที่สามารถนำมาบรรจุในภาชนะได้หลายแบบ สามารถดูดซับน้ำมันระเหยง่ายและปลดปล่อยในรูปไอระเหย

การเตรียมชีวภัณฑ์ต้นแบบทำโดยการสกัดสารสกัดหยาบจากไพลสดโดยใช้ไพลสด 400 กรัม แช่เมทานอลข้ามคืนแล้วกรองส่วนใสเก็บไว้ นำส่วนกากมาสกัดซ้ำด้วยเมทานอลซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมส่วนใสที่สกัดได้ทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วนำมาลดปริมาตรด้วย rotary evaporator จนเหลือประมาณ 250 มล. จึงนำมาผสมกับ Silicon dioxide 500 กรัม ผสมให้เข้ากัน ผึ่งให้แห้งใน desiccator ที่สามารถดูดอากาศออกได้ประมาณ 24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเมทานอลระเหยออกหมดจึงนำมาบดให้ละเอียด แบ่งใส่ถุงซิบถุงละ 1, 2, 4, 6 กรัม (เทียบเท่ากับไพลสดในปริมาณ 1, 2, 4, 6 กรัม ตามลำดับ) อย่างละ 28 ถุง แล้วเตรียม Silicon dioxide ไม่เติมอะไรเลย 28 ถุง เป็น control treatment นำมาเก็บในสภาพอุณหภูมิต่ำ (5°C) เป็นเวลา 6 เดือน และนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici*

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ในห้องปฏิบัติการ ทำโดย

1. แยกเชื้อ *Colletotrichum capsici* จาก stock เก็บเชื้อราที่เก็บในเมล็ดพริกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

2. เตรียมอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ

3. นำชีวภัณฑ์ไพลในถุงซิบขนาดต่างๆ (เทียบเท่ากับไพลสดในปริมาณ 1, 2, 4, 6 กรัม ตามลำดับ) นำมาเจาะรูให้ทั่วถุง แล้วติดไว้ที่ฝาจานเลี้ยงเชื้อ

4. เจาะชิ้นวุ้นเชื้อ *Colletotrichum capsici* ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตร วางไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อกลางจานเลี้ยงเชื้อ แล้วประกบด้วยฝาจานเลี้ยงเชื้อที่มีถุงชีวภัณฑ์ไพลติดอยู่

5. หลังจากนั้นวัดการเจริญของเชื้อราในวันที่ 1, 3, 5, และ 7 วัน

บันทึกผลโดย วัดขนาดโคโลนีคำนวณ % ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

3. การทดสอบชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรคในผลิตผลพริกหลังการเก็บรักษา

คัดเลือกผลพริกเหลืองที่สมบูรณ์ที่ปลูกเชื้อรา *Colletotrichum capsici* โดยทำแผลลึกประมาณ 1 มม. แล้ววางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *C. capsici* เจริญอยู่ที่บาดแผล แล้วนำผลพริกบรรจุในจานเลี้ยงเชื้อขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 14 ซม. โดยใส่ซองชีวภัณฑ์จำนวน 1 ซองที่มีปริมาณเทียบเท่าไพลสด 0, 1, 2, 4 และ 6 กรัม ไว้ภายใน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25±3 °C เป็นเวลา 5 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) เปรียบเทียบ 5 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ หน่วยทดลองเป็นพริก 2 ผล

กรรมวิธีที่ 1 ใส่ซองชีวภัณฑ์ 0 กรัมไพลสด (control)

กรรมวิธีที่ 2 ใส่ซองชีวภัณฑ์ 1 กรัมไพลสด

กรรมวิธีที่ 3 ใส่ซองชีวภัณฑ์ 2 กรัมไพลสด

กรรมวิธีที่ 4 ใส่ซองชีวภัณฑ์ 4 กรัมไพลสด

กรรมวิธีที่ 5 ใส่ซองชีวภัณฑ์ 6 กรัมไพลสด

บันทึกผลโดย วัดขนาดแผลโรคที่ 1, 3 และ 5 วัน

- เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562 ห้องปฏิบัติการ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

6. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาน้ำมันระเหยง่ายที่สกัดจากพืชเพื่อใช้ในการควบคุมโรค

1.1 ศึกษาพืชที่เหมาะสมในการนำมาใช้สกัดสาร

จากการทดสอบตัวอย่าง ข่า ขมิ้น ขมิ้นขาว ไพล ตะไคร้ เสม็ด และพลู ในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *Colletotrichum capsica* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส พบว่าสารระเหยจากไพล เสม็ด ตะไคร้ และใบพลู มีฤทธิ์ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา โดยยับยั้งการเจริญที่ 52.7, 26.8, 20.3 และ 11.1 % (Figure 2) โดยที่ได้มีการทดสอบเพิ่มเติมในใบยูคาลิปตัส แต่พบว่าไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งจากการพิจารณาความเหมาะสม จึงตัดเสม็ดและตะไคร้ออก แล้วทำการทดสอบซ้ำในไพล และใบพลู พบว่าทั้ง 2 ชนิดมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่ปริมาณ 2-4 กรัมต่อจานเลี้ยงเชื้อ (Figure 3) จึงคัดเลือกไพลและใบพลูมาทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

1.2 ศึกษาวิธีสกัดที่เหมาะสม

จากการสกัดสารสกัดหยาบจากไพลสดและแห้ง พบว่าไพลที่สกัดด้วย n-Hexane ให้ผลผลิตที่มีปริมาณที่แตกต่างกันมาก โดยที่ไพลสดให้ถึง 440 มก.ต่อกรัม ขณะที่ไพลแห้งให้เพียง 7.4 มก. ต่อกรัม อาจเป็นผลจากสารประกอบที่สามารถสกัดได้ด้วย n-Hexane สูญเสียไปในขั้นตอนการผึ่งให้แห้ง ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสารในกลุ่มน้ำมันหอมระเหยที่ส่วนใหญ่ละลายได้ดีใน n-Hexane ซึ่งจากรายงานของ Khewkhom and Somsiri (2009) ได้ทดสอบสารสกัดหยาบ 3 ชนิด โดยเลือกส่วน lipophilic extract ของสารสกัดจากอบเชย (*Cinnamomum zeylanicum*) กระชาย (*Boesenbergia pandurata*) และกานพลู (*Syzygium aromaticum*) ในการยับยั้งเชื้อโรคหลังการเก็บเกี่ยว พบว่าสารสกัดจากเปลือกต้นอบเชยมีประสิทธิภาพสูงสุดโดยมีค่า Minimum inhibitory concentrations (MIC) ที่ 1.2 µg/mL ต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *B. theobromae* ที่เวลา 24 48 และ 120 ชม.หลังปลูกเชื้อ

ส่วนไพลสดและไพลแห้งที่สกัดด้วยเมทานอลให้ผลผลิตที่มีปริมาณใกล้เคียงกันคือ 195.7 และ 182.1 มก.ต่อกรัม ตามลำดับ ส่วน Acetone สามารถสกัดสารจากไพลสดและไพลแห้งได้ต่ำกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งสองชนิด โดยให้ 35.9 และ 74.0 มก.ต่อกรัม ตามลำดับ (Table 1)

ผลการสกัดสารในพลู ซึ่งทำการสกัดในใบแห้งเท่านั้น พบว่าเมทานอลสามารถสกัดสารได้มากที่สุด รองลงมาคือ Acetone และ n-Hexane โดยให้ผลผลิต 109.5, 69.5 และ 5.0 มก.ต่อกรัม ตามลำดับ

1.3 การทดสอบน้ำมันระเหยง่ายที่สกัดได้ต่อการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค

ได้คัดเลือกไพลใช้ในการทดลอง โดยพิจารณาจากผลจากการทดสอบน้ำมันระเหยง่ายที่สกัดได้ต่อการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนส พบว่าสารสกัดจากไพลแห้งด้วย n-Hexane สารสกัดจากไพลแห้งด้วยเมทานอลและสารสกัดจากไพลสดด้วยเมทานอลให้ขนาดของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคต่ำที่สุด โดยมี % ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคคือ 57.7, 66.5 และ 63.0 % ตามลำดับ (Figure 4) แต่สารที่สกัดได้จากไพลแห้งด้วย n-Hexane มีปริมาณผลผลิตที่ต่ำเมื่อเทียบกับเมทานอล และเมื่อเปรียบเทียบ n-Hexane กับเมทานอลพบว่าประสิทธิภาพในการสกัดสารออกฤทธิ์มีความใกล้เคียงกัน แต่เมทานอลมีความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติมากกว่า ต้นทุนต่ำกว่า สามารถใช้กับไพลทั้งรูปสดและแห้งโดยให้ผลไม่ต่างกันและหาง่ายกว่า ชี้ให้เห็นว่าเมทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการใช้ในกระบวนการสกัดเพื่อผลิตเป็นชีวภัณฑ์ต่อไป

2. การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบและการเก็บรักษา

ผลจากการเตรียมชีวภัณฑ์ไพลต้นแบบโดยใช้ไพลสด 400 กรัม แช่เมทานอลนำมาลดปริมาตรด้วย rotary evaporator จนเหลือประมาณ 250 มล. จึงนำมาผสมกับ Silicon dioxide 500 กรัม ผึ่งให้แห้งใน desiccator จนกระทั่งเมทานอลระเหยออกหมดจึงนำมาบดให้ละเอียด แบ่งใส่ถุงซิบ จนกระทั่งได้ชีวภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นไพล เมื่อหลังจากเก็บรักษาในตู้เย็นนาน 6 เดือน ไม่มีความเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้ด้วยสายตา (Figure 5) เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* เปรียบเทียบกับชีวภัณฑ์ไพลต้นแบบที่ผลิตขึ้นใหม่ พบว่าประสิทธิภาพใกล้เคียงกันโดยมี % ยับยั้งการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันเล็กน้อย โดยชีวภัณฑ์ไพลต้นแบบที่ผลิตขึ้นใหม่มี % สูงกว่าชีวภัณฑ์ไพลต้นแบบที่เก็บรักษา 6 เดือน เพียง 1 – 5 % (Table 2)

3. การทดสอบชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรคในผลิตผลพริกหลังการเก็บรักษา

ผลจากการทดลองให้ชีวภัณฑ์ไพลต้นแบบที่ระดับ 0 1 2 4 และ 6 กรัมไพลสด แก่ผลพริกเหลืองที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก พบว่าในวันที่ 5 หลังการปลูกเชื้อ ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์แผลโรคบนผลพริกมีความแตกต่างกัน (Figure 6) โดยพริกที่ให้ชีวภัณฑ์ไพลต้นแบบที่ระดับ 0 กรัม มีขนาดใหญ่ที่สุดคือ 4.8 มม. ขณะที่พริกที่ได้รับชีวภัณฑ์ไพลที่ระดับ 1 3 4 และ 6 กรัม มีขนาดแผลโรคที่เล็กว่าคือ 3.0 3.2 และ 2.7 คิดเป็น % ควบคุมโรค 37.9 34.5 และ 44.8 % ตามลำดับ ยกเว้นที่ระดับ 2 กรัมที่มีขนาดใกล้เคียงกัน คือ 4.3 มม. คิดเป็น % ควบคุมโรค 10.3 % แสดงให้เห็นแนวโน้มของผลการยับยั้งความรุนแรงของโรคของชีวภัณฑ์ไพลที่มีต่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรค ซึ่งพริกที่เลือกใช้ในการทดลองเป็นพริกเหลืองซึ่งมีความอ่อนแอต่อโรคแอนแทรคโนสจึงสามารถแสดงอาการโรคได้เร็วกว่าในพริกชนิดอื่น

7. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

พืชที่คัดเลือกใช้สกัดสารคือ ไพล ยับยั้งการเจริญเชื้อ *Colletotrichum capsica* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่ 52.7 % ตัวทำละลายอินทรีย์มีความเหมาะสมในการสกัดสารจากไพลสดและไพลแห้งคือเมทานอลที่ให้ผลผลิตที่มีปริมาณใกล้เคียงกันคือ 195.7 และ 182.1 มก.ต่อกรัม ตามลำดับ มีความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติมากกว่า ต้นทุนต่ำกว่า สามารถใช้กับไพลทั้งรูปสดและแห้งโดยให้ผลไม่ต่างกัน และหาง่ายกว่า มีความเหมาะสมในการใช้ในกระบวนการสกัดเพื่อผลิตเป็นชีวภัณฑ์

การเตรียมชีวภัณฑ์ไพลต้นแบบทำโดยใช้ไพลสด 400 กรัม แช่เมทานอลนำมาลดปริมาตรด้วย rotary evaporator จนเหลือประมาณ 250 มล. จึงนำมาผสมกับ Silicon dioxide 500 กรัม ผึ่งให้แห้งใน desiccator จนกระทั่งเมทานอลระเหยออกหมดจึงนำมาบดให้ละเอียด บรรจุถุงซิบ และการเก็บรักษาในตู้เย็นนาน 6 เดือน ไม่มีความเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้ด้วยสายตา และประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ใกล้เคียงกันกับชีวภัณฑ์ไพลต้นแบบที่ผลิตขึ้นใหม่

ขณะที่ผลการทดสอบชีวภัณฑ์ไพลต้นแบบในการควบคุมโรคแอนแทรคบนผลพริกเหลืองที่ปลูกเชื้อ แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มในการควบคุมโรคของชีวภัณฑ์ไพลที่มีต่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรค โดยมี % การควบคุมโรคระหว่าง 10.3 -44.8 %

8. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

- ชีวภัณฑ์ไพลต้นแบบเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสหลังการเก็บเกี่ยวของพริกที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum capsici* เป็นชีวภัณฑ์ต้นแบบที่มีรูปแบบการใช้งานที่ไม่ก่อให้เกิดการตกค้างในผลิตผลเนื่องจากไม่มีการสัมผัสโดยตรงกับผลผลิต แต่ยังมีความจำเป็นในการทดสอบและพัฒนาร่วมกับบรรจุภัณฑ์ที่มีความเหมาะสม เนื่องจากสารระเหยง่ายที่ปลดปล่อยออกมาต้องการระบบปิดที่จะคงความเข้มข้นไว้ได้

9. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : -

10. เอกสารอ้างอิง :

สมศิริ จิ๋วสกุล. 2521. เซรุ่มวิทยาการถ่ายทอดทางเมล็ดของโรคแอนแทรคโนสของพริกและประสิทธิภาพของสารเคมีควบคุมโรคบนใบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Bajpai, V. K. and S. C. Kang. 2012 *In Vitro* and *In Vivo* Inhibition of Plant Pathogenic Fungi by Essential Oil and Extracts of *Magnolia liliflora* Desr. J. Agr. Sci. Tech. 14: 845-856

ESPITIA , P. J. P., N. de F. F. SOARES, L. C. M. BOTTI, N. R. de MELO, O. L. PEREIRA and W. A. da SILVA. 2012. Assessment of the efficiency of essential oils in the preservation of postharvest papaya in an antimicrobial packaging system. Campinas, v. 15, n. 4, p. 307-316. http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232012005000027 5/6/2557

Hadden, J .F. and L. L. Black. 1987. Comparison of virulence of tomato and pepper isolates of tomato and pepper isolates of *Colletotrichum* spp. (Abstc). Phytopathology. 70: 641.

Khewkhom, N. and S. Shangchote. 2009. Postharvest antifungal activity of extracts and compounds from *Cinnamomum zeylanicum*, *Boesenbergia pandurata* and *Syzygium aromaticum* against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Botryodiplodia theobromae*. As. J. Food Ag-Ind. 2009, Special Issue, S125-S132

Tripathi, Pramila , N. K. Dubey and A. K. Shukla. 2007. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mold of grapes caused by *Botrytis cinerea*. World J MicrobiolBiotechnol. 24: 39–46

Tzortzakis, N. G.; Economakis, C. D. 2007. Antifungal activity of lemongrass (*Cympopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. Innovative Food Science and Emerging Technologies, Amsterdam, v. 8, n. 2, p. 253-258. http://dx.doi.org/10.1016 /j.ifset. 2/1/2007.

11. ภาคผนวก : -

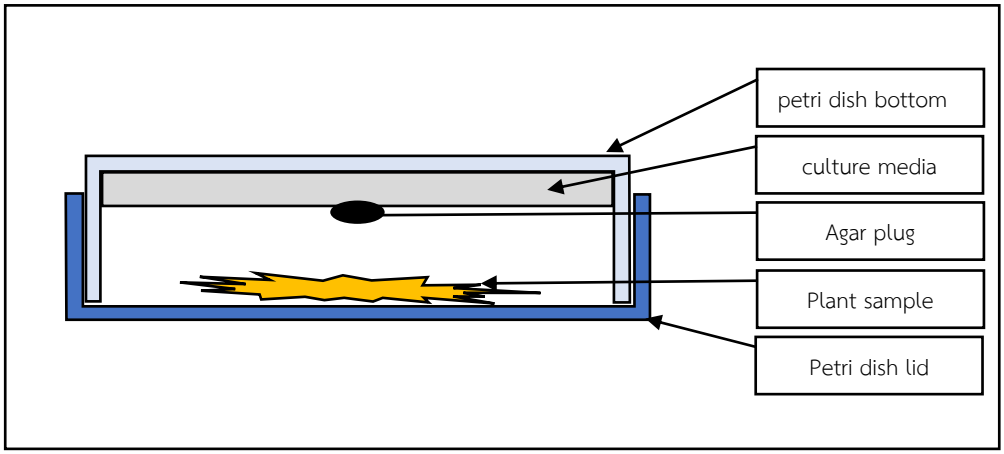

Figure 1 Diagram of plants volatile oil testing for inhibitory effects on mycelial growth of *Colletotrichum capcisi*

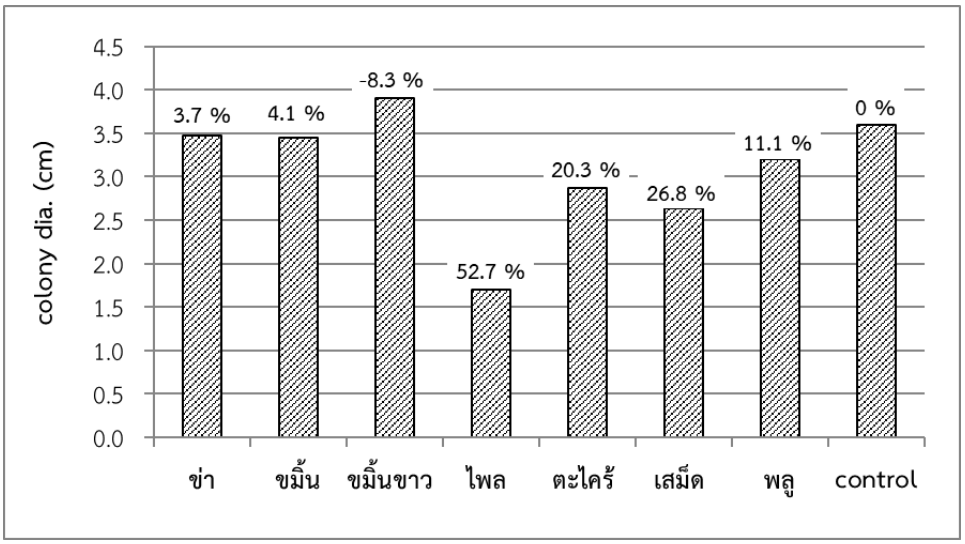

Figure 2 Effect of plant volatile oil on colony diameter (cm) and % growth inhibition of *Colletotrichum capsici* after 7 days of incubation period.

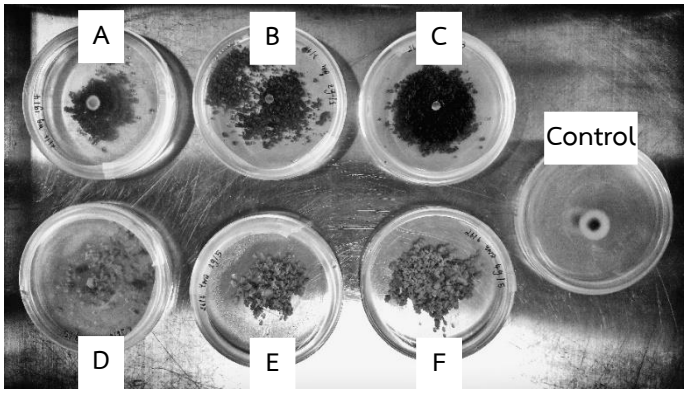

Figure 3 Growth of *Colletotrichum capsici* on PDA in exposing of Betal leave (*Piper betal*) volatile oil at 1, 2 and 4 gram samples (A, B and C) and Phlai (*Zingiber montunum*) 1, 2 and 4 gram samples (D, E and F)

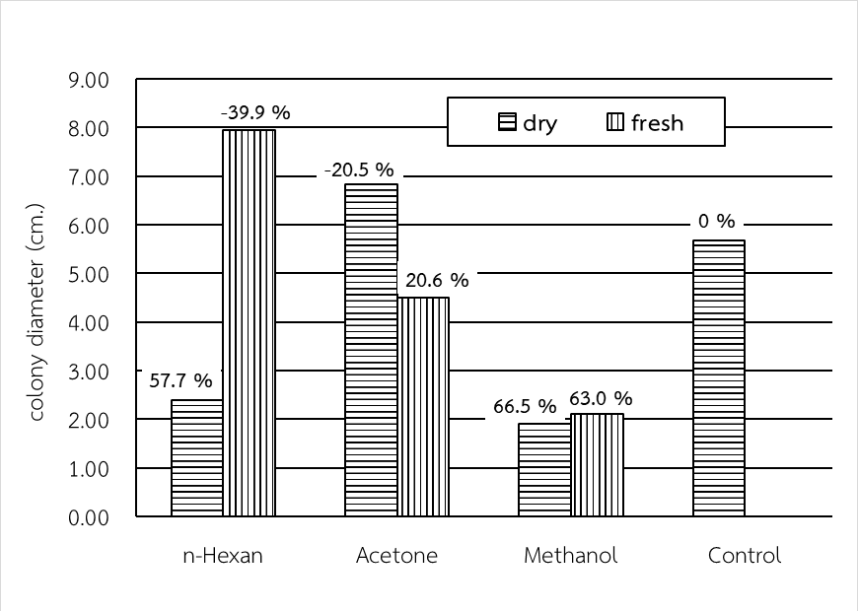

Figure 4 Effects of crude extracts of dry and fresh Phlai (*Zingiber montunum*) by using difference organic solvents on colony diameter (cm) and % growth inhibition of *Colletotrichum capsici* after 7 days of incubation period.

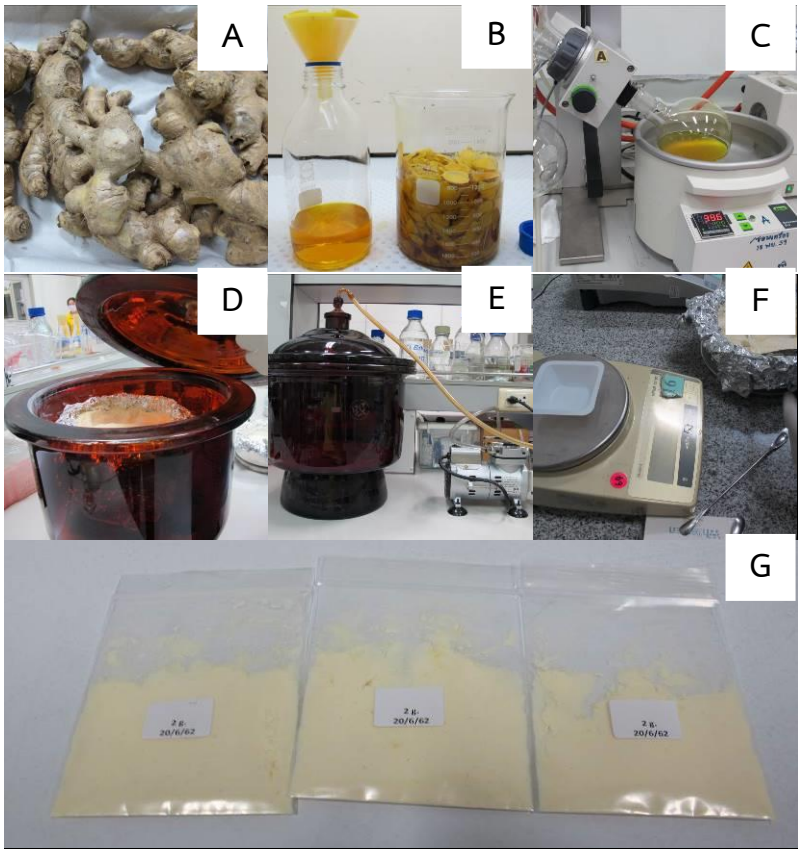

Figure 5 Preparation of fresh Phlai (A) cut into small pieces 2 mm. in thickness soaking overnight with MeOH and filtered 3 times (B) the supernatant was brought to volume reduction by using vacuum rotary evaporator (C) and mixed with Silicon dioxide then let dry in desiccator jar (D) until dryness (E) grinded and packed in plastic bag 1, 2, 4, 6 gram (F) and the biological product of Phlai (G)

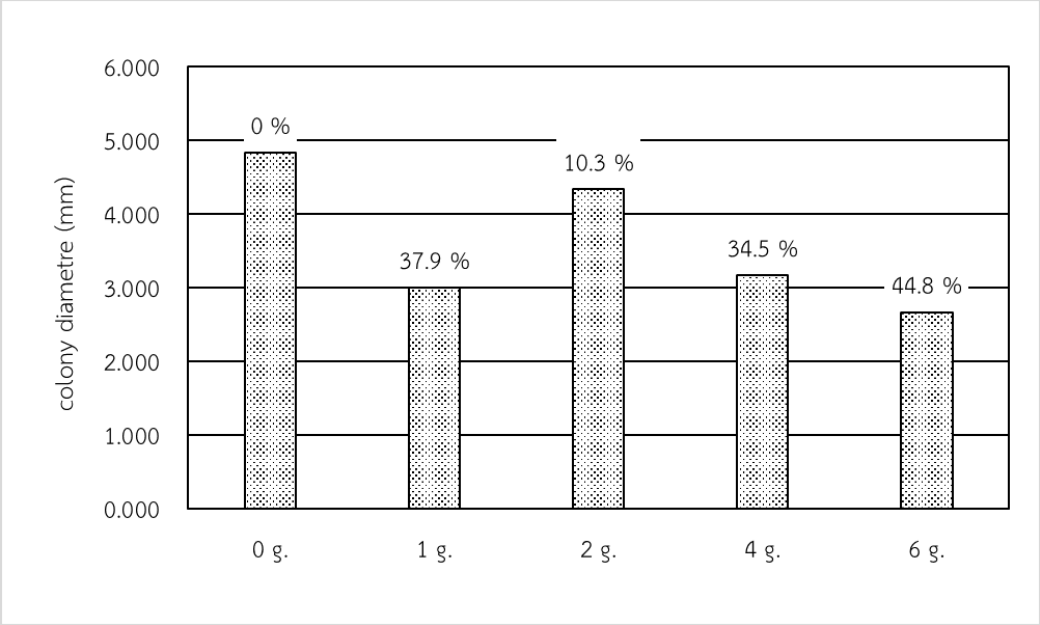

Figure 6 Effects of biological product of Phlai at 0 1 2 4 and 6 gram on colony diameter (cm) and % inhibition of *Colletotrichum capsici* infection on Chili fruit after 5 days of incubation period.

Table 1 Yields of crude extract from Phlai and Betal veave by using difference organic solvents.

Organic solvents	sample	Crude extract yield per gram sample (mg)	
		Phlai	Betal leave
n-Hexane	fresh	440.0	-
	dry	7.4	5.0
Acetone	fresh	35.9	-
	dry	74.0	69.5
Methanol	fresh	195.7	-
	dry	182.1	109.5

Table 2 Effect of the new producing lots of biological product of Phlai in difference sizes of Phlai samples on growth inhibition of *Colletotrichum capsici* (%) comparing with 6 months storage lot

Phlai sample (gram)	Age of storing periods	
	6 months	0 month
1	15.03[1/]	16.08
2	14.34	19.93
4	20.98	22.38
6	34.27	34.27
0 (control)	0.00	0.00

[1/] Average by 4 replications