# บทที่ 4

# ผลการทดลอง

**1. การตรวจหาสาเหตุของโรคใบจุดดำลำไย**

1.1 การแยกเชื้อราจากใบพืชที่ผ่านการกระตุ้นให้เกิดการสร้างสปอร์ด้วยกรัมม็อกโซน

จากการกระตุ้นให้เกิดการสร้างสปอร์ด้วยกรัมม็อกโซน พบว่าทั้งใบปกติ และใบที่แสดงอาการจุดดำ มีเส้นใยของเชื้อราสีเทาขาวขึ้นปกคลุมอยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อพ่น ethyl alcohol 75 เปอร์เซ็นต์ ลงบนใบเพื่อยับยั้งการเจริญของเส้นใย พบว่าเกิดกลุ่มของสปอร์สีส้มเหลือง กระจายอยู่ตามใบประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในใบที่แสดงอาการจุดยังมีกลุ่มของเส้นใยสีเทาขาวและกลุ่มของสปอร์สีส้มขึ้นอยู่บริเวณแผล (ภาพที่ 18 และ 19)

เมื่อทำการเขี่ยกลุ่มสปอร์สีส้มมาเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่าเชื้อรามีเส้นใยสีเทาขาว สร้างกลุ่มของสปอร์สีส้ม และยังพบว่าเชื้อราสร้างสปอร์เป็นจำนวนมากเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร MYA

1.2 การใช้ กรัมม็อกโซนในการตรวจหาเชื้อราบนใบลำไยที่ผ่านการปลูกเชื้อทั้ง 2 วิธี

การปลูกเชื้อราสาเหตุของโรคใบจุดดำบนใบลำไยในโรงเพาะชำ

จากการปลูกเชื้อ *Colletotrichum* sp. ในโรงเพาะชำโดยวิธีฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์บนใบของต้นกล้าลำไย และบ่มเชื้อนาน 7 วัน พบว่าใบลำไยเกิดปลายใบไหม้สีน้ำตาลเทา รอบ ๆ บริเวณแผลเป็นสีดำ และบริเวณผิวใบด้านบน มีจุดสีดำรูปร่างค่อนข้างกลม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร แผลกระจายอยู่ทั่วใบ ส่วนบริเวณผิวใบด้านล่างแผลมีสีน้ำตาลอ่อน รอบ ๆ บริเวณแผลมีสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 20)

การปลูกเชื้อราที่แยกได้ลงบนใบลำไย โดยวิธี Detach Leaf Technique

เมื่อนำเชื้อรา *Colletotrichum* sp. มาปลูกเชื้อลงบนใบลำไย พบว่าบริเวณผิวใบด้านบนแผลมีขนาดใหญ่ รูปร่างไม่แน่นอน แผลมีสีดำ ตรงกลางแผลเป็นสีเทาขาว มีกลุ่มของสปอร์สีส้มเกาะอยู่บริเวณแผล ส่วนผิวใบด้านล่างแผลมีสีน้ำตาลเข้ม ตรงกลางเป็นสีเทาขาว มีเส้นใยสีขาวขึ้นปกคลุมและมีกลุ่มของสปอร์สีส้มเกาะอยู่บริเวณแผลเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 21)

ก

ข

ภาพที่ 16 ลักษณะอาการใบจุดสีดำบนใบลำไย

ก ลักษณะอาการบนใบอ่อน

ข ลักษณะอาการบนใบแก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพที่ 17 ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. บนเนื้อเยื่อใบที่เป็นโรคใบจุด (กำลังขยาย 400 เท่า)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ก

ข

ภาพที่ 18 ลักษณะใบลำไยปกติ หลังจากจุ่มด้วยกรัมม็อกโซน

ก เกิดกลุ่มของสปอร์สีส้ม (ลูกศรชี้) ขึ้นกระจายอยู่ทั่วใบ

ข ลักษณะของเส้นใยสีเทาขาวของเชื้อรา ขึ้นปกคลุมอยู่ทั่วใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

ก

ข

ภาพที่ 19 ลักษณะใบจุดดำลำไย หลังจากจุ่มด้วยกรัมม็อกโซน

ก การเจริญของเส้นใยสีเทาขาวของเชื้อรา ที่เกาะอยู่บนแผลจุดดำ (หัวลูกศร) และมีกลุ่มสปอร์สีส้ม (ลูกศรชี้) กระจายอยู่ทั่วใบ

ข การเจริญของเส้นใยสีเทาขาวของเชื้อราที่ปกคลุมอยู่ทั่วใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

ภาพที่ 20 ลักษณะอาการที่เกิดขึ้นบนใบอ่อนลำไย ภายหลังทำการปลูกเชื้อ *Colletotrichum* sp. โดยการจุ่มลงในสารแขวนลอยสปอร์ที่ความเข้มข้น $9x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งทำให้เกิดแผลที่มีขนาดใหญ่รูปร่างไม่แน่นอน มีสีดำ ตรงกลางเป็นสีเทาขาว และมีกลุ่มของสปอร์สีส้ม (ลูกศรชี้) เกาะอยู่บริเวณแผลเป็นจำนวนมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

ภาพที่ 21 ลักษณะอาการที่เกิดขึ้นบนใบลำไย ภายหลังทำการปลูกเชื้อ *Colletotrichum* sp. โดยวิธีการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ที่ความเข้มข้น $9x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตรในโรงเพาะชำ ซึ่งทำให้เกิดปลายใบไหม้สีน้ำตาล และเกิดจุดสีดำรูปร่างค่อนข้างกลม (ลูกศรชี้) อยู่บนใบลำไย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

จากภาพที่ 22 พบว่าหลังจากนำใบที่ผ่านการปลูกเชื้อลงบนใบในโรงเพาะชำมาจุ่มลงในกรัมม็อกโซน พบว่าทั้งใบที่ไม่ทำการฆ่าเชื้อที่ผิว และใบที่ฆ่าเชื้อที่ผิวก่อน มีกลุ่มของสปอร์สีส้มเกาะอยู่บริเวณแผลที่โดน กรัมม็อกโซน เป็นจำนวนมาก ส่วนเนื้อเยื่อที่ไม่ถูกทำลายด้วยกรัมม็อกโซนอย่างรุนแรง มีกลุ่มของสปอร์เกาะอยู่เล็กน้อย และมีเส้นใยสีขาวบาง ๆ ขึ้นปกคลุมอยู่

ใบที่ผ่านการปลูกเชื้อโดยวิธี Detached Leaf Technique แล้วนำมาจุ่มในกรัมม็อกโซน พบว่าใบที่ถูกกรัมม็อกโซนทำลายหมดจะมีกลุ่มของสปอร์สีส้มขึ้นปกคลุมกระจายอยู่ทั่วใบ แต่ใบที่ถูกทำลายเป็นบางแห่ง จะมีสปอร์ขึ้นเฉพาะบริเวณที่โดนกรัมม็อกโซนทำลาย ในใบที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวก่อน มีเส้นใยขาวฟูขึ้นปกคลุมกระจายอยู่ทั่วใบในปริมาณมาก แต่ในใบที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวก่อน มีเส้นใยสีขาวปกคลุมอยู่บาง ๆ (ภาพที่ 23)

2. การศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อ *Colletotrichum* sp.

2.1 การศึกษาการงอกของสปอร์ของเชื้อราบนกระดาษกรอง

จากการตรวจสอบการงอกของสปอร์บนกระดาษกรองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าในชั่วโมงที่ 5 สปอร์เริ่มงอก germ tube (57.81 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีความยาวมากกว่าขนาดความกว้างของสปอร์ และในชั่วโมงที่ 6 สปอร์งอก germ tube 96.08 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบว่าสปอร์จะสร้าง appressorium บนกระดาษกรอง แม้ว่าเวลาจะผ่านไปถึง 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 24)

2.2 การศึกษาการงอกของสปอร์ของเชื้อราบนใบพืช

หลังจากทำ Clear Leaf Technique และตัดเนื้อเยื่อพืชด้วยวิธี Paraffin section พบว่าในชั่วโมงที่ 6 สปอร์งอก germ tube และเริ่มสร้าง appresorium สีน้ำตาลอ่อน ในชั่วโมงที่ 9 และสร้างเพิ่มมากขึ้นในชั่วโมงที่ 12 ซึ่ง appresorium ที่สร้างขึ้นมีสีน้ำตาลที่เข้มกว่าเดิม ต่อมาในชั่วโมงที่ 30-36 มีการสร้าง vesicle รูปร่างค่อนข้างกลม สีใส (ภาพที่ 25-26) เนื้อเยื่อใบเริ่มเกิดแผล necrosis ขนาดเล็กในชั่วโมงที่ 72 และแผลจะขยายใหญ่ขึ้น มีสีน้ำตาลเข้มขึ้นในชั่วโมงที่ 96 และยังพบว่ามีการสร้าง acervulus เป็นจำนวนมากในชั่วโมงที่ 108 (ภาพที่ 28)

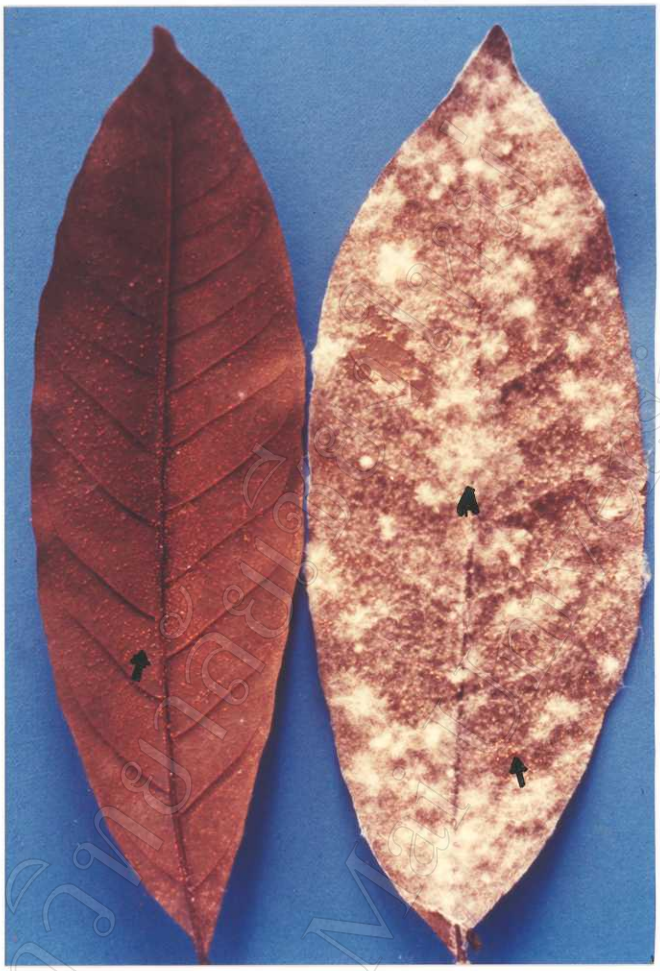
ก ข

ภาพที่ 22 ลักษณะใบที่ผ่านการปลูกเชื้อในโรงเพาะชำแล้วนำมาจุ่มด้วยกรัมม็อกโซน

ก ใบที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวก่อน เกิดกลุ่มของสปอร์สีส้ม (ลูกศรชี้) เกาะอยู่บนเนื้อเยื่อที่ถูกกรัมม็อกโซนทำลาย

ข ใบที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิว มีเส้นใยสีเทาขาว (หัวลูกศร) ขึ้นปกคลุมอยู่บนใบ และมีกลุ่มของสปอร์สีส้ม (ลูกศรชี้) กระจายอยู่ทั่วใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University



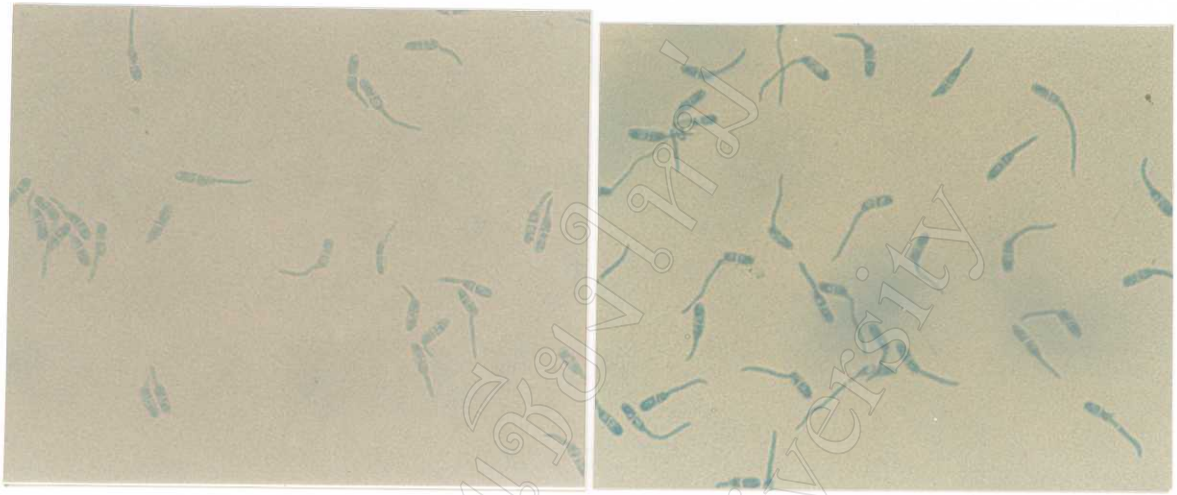
ก ข

ภาพที่ 23 ลักษณะใบที่ผ่านการปลูกเชื้อโดยวิธี Detached leaf technique แล้วนำมาจุ่มด้วยกรัมม็อกโซน

ก ใบที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวก่อน เกิดกลุ่มของสปอร์สีส้ม (ลูกศรชี้) กระจายอยู่ทั่วใบ

ข ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิว มีเส้นใยสีเทาขาว (หัวลูกศร) และกลุ่มของสปอร์สีส้ม (ลูกศรชี้) ขึ้นอยู่ทั่วใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University



ก ข

ค ง

ภาพที่ 24 ลักษณะการงอกของสปอร์ *Colletotrichum* sp. บนกระดาษกรองที่ระยะเวลาต่างๆ (กำลังขยาย 400 เท่า)

ก 5 ชั่วโมง

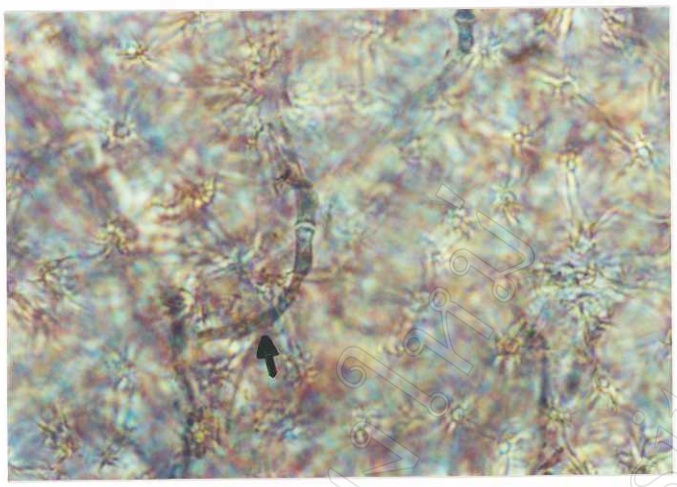
ข 6 ชั่วโมง

ค 9 ชั่วโมง

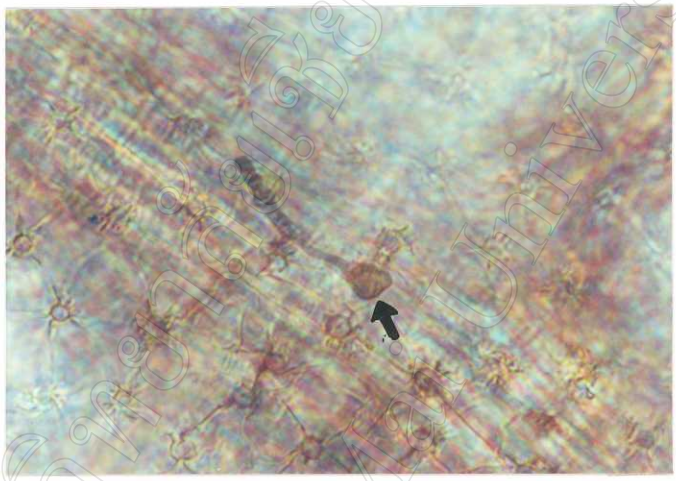
ง 12 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

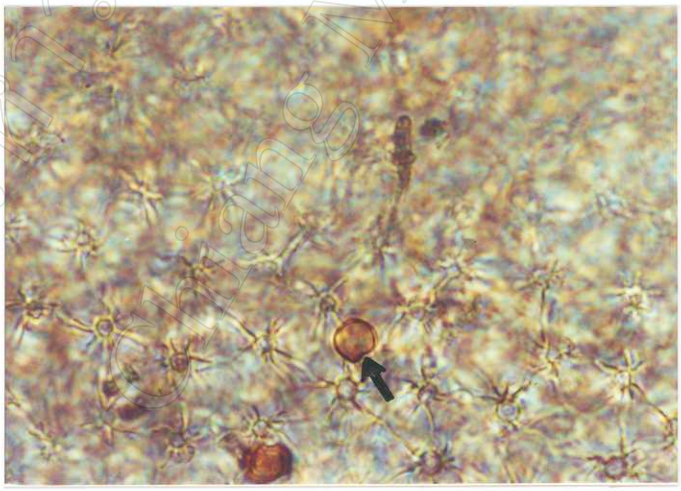
ก



ข



ค



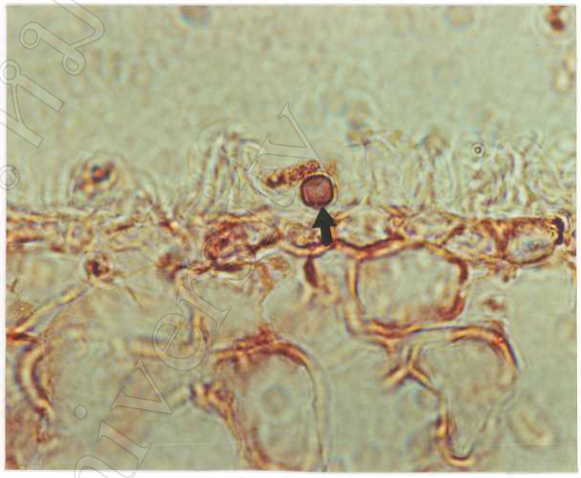
ภาพที่ 25 ลักษณะการงอกของสปอร์ *Colletotrichum* sp. บนเนื้อเยื่อใบลำไย เมื่อทำการตรวจสอบโดยวิธี Clear leaf technique (กำลังขยาย 1000 เท่า)

ก สปอร์งอก germ tube (ลูกศรชี้) ในชั่วโมงที่ 6

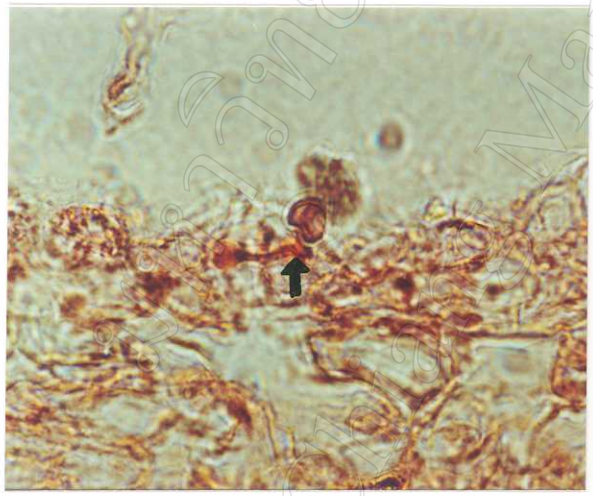
ข สร้าง appressorium (ลูกศรชี้) สีน้ำตาลอ่อนในชั่วโมงที่ 9

ค สร้าง appressorium (ลูกศรชี้) สีน้ำตาลเข้มในชั่วโมงที่ 12

ก



ข



ค

ง

ภาพที่ 26 ลักษณะการงอกของสปอร์ *Colletotrichum* sp. บนเนื้อเยื่อใบลำไย เมื่อทำการตัดเนื้อเยื่อด้วยวิธี Paraffin section (กำลังขยาย 1000 เท่า)

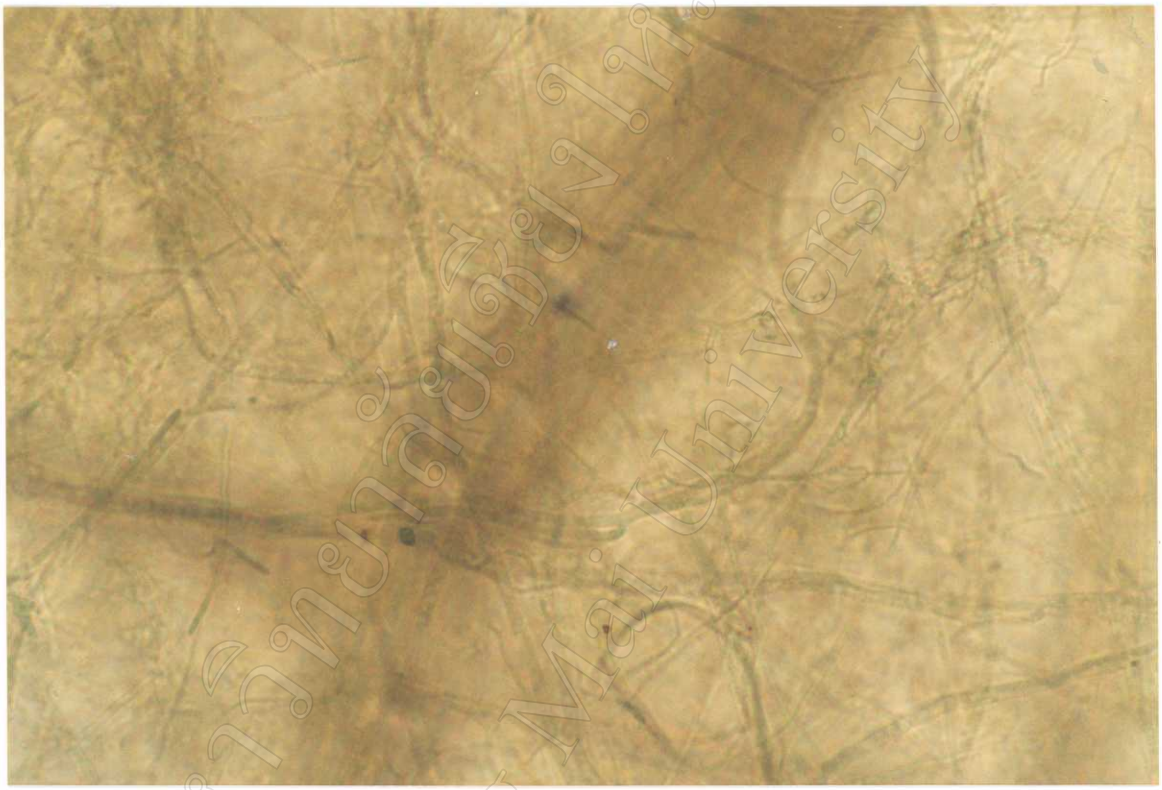
ก สปอร์งอก germ tube (ลูกศรชี้) บนเนื้อเยื่อใบในชั่วโมงที่ 6

ข appressorium ผนังหนาสีน้ำตาลเข้ม (ลูกศรชี้) ในชั่วโมงที่ 15

ค vesicle ติดสีย้อมสีแดง (ลูกศรชี้) ในชั่วโมงที่ 36

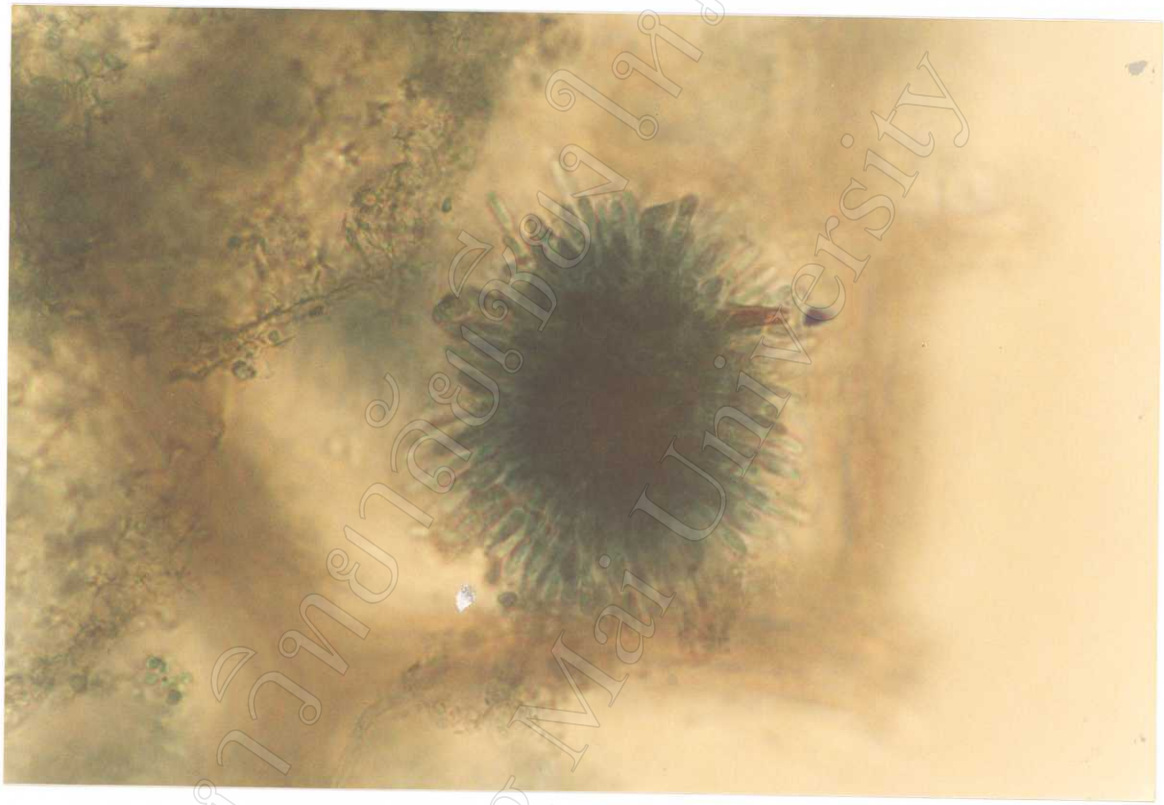
ง secondary hypha มีผนังกั้น (ลูกศรชี้) ในชั่วโมงที่ 96

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



ภาพที่ 27 การเจริญของ secondary hypha ของเชื้อ *Colletotrichum* sp. บนเนื้อเยื่อใบลำไย ที่ 96 ชั่วโมง (กำลังขยาย 400 เท่า)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



ภาพที่ 28 ลักษณะการสร้าง acervulus ของเชื้อ *Colletotrichum* sp. บนใบลำไย (กำลังขยาย 400 เท่า)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

**3. การตรวจสอบหาสารพิษที่ทำให้ใบแสดงอาการใบจุดดำ**

**3.1 การสกัดสารพิษจากเชื้อรา**

จากการสกัดสารพิษจากเชื้อ *Colletotrichum* sp. ด้วย ethyl acetate พบว่าได้สารสกัดในรูปสารหนืด แต่หลังจากนำสารสกัดไปเก็บที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส พบว่าสารเกิดการตกผลึกสีขาวขุ่น (ภาพที่ 29) จึงแยกผลึกออกมาจากสารหนืด นำมาล้างผลึกด้วย ethyl acetate เพื่อเก็บผลึกไว้สำหรับการทดลองต่อไป

**การตรวจแถบสารพิษโดยวิธี TLC**

หลังจากนำแผ่น TLC-plate ที่ผ่านการจุ่มในสารละลายตัวพาแล้ว ไปตรวจแถบสารพิษภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบสารเรืองแสง แต่ไม่แยกออกเป็นแถบชัดเจน สารเป็น polymer ซึ่งมีขนาดของโมเลกุลเป็นกลุ่มต่าง ๆ

**3.2 การทดสอบสารสกัดหยาบกับพืชทดสอบ**

3.2.1 การทดสอบสารสกัดหยาบต่อการงอกของเมล็ดผักกาดขาว

หลังจากที่บ่มเมล็ดผักกาดไว้ในกล่องที่มีความชื้นสูงเป็นเวลา 3 วันบนแผ่น TLC ที่หยดสารละลายของสารสกัดหยาบ และ sodium chlorate พบว่าเมล็ดผักกาดไม่งอกบนแถบที่หยดสารไว้ ส่วนแผ่นที่หยดด้วยสารละลาย Richard's medium เมล็ดผักกาดงอกและเจริญเต็มแผ่น TLC (ภาพที่ 30)

3.2.2 การทดสอบสารสกัดหยาบกับใบถั่วเขียว

จากภาพที่ 31 พบว่าเกิดรอยซีดเหลือง (chlorosis) รอบ ๆบริเวณที่หยดสารหลังจากทำการทดลองครบ 1 ชั่วโมง เมื่อบ่มใบทิ้งไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความชื้นสูง เป็นเวลา 1 วัน ปรากฏว่าแผลเปลี่ยนเป็นสีดำคล้ำ และเริ่มเห็นเป็นสีดำเข้ม แผลขยายใหญ่ลุกลามไปทั่วใบในวันที่ 2 ส่วนใบที่หยดด้วยสารละลาย Richard's medium ไม่พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณที่หยดสาร

3.2.3 การทดสอบสารสกัดหยาบกับใบลำไย

เมื่อหยดสารสกัดหยาบลงบนใบอ่อนลำไย พบว่าบริเวณที่หยดสารสกัดจะเป็นสีน้ำตาลเข้ม ต่อมาแผลจะขยายใหญ่ขึ้น และมีสีดำ ส่วนบนใบแก่ลำไย แผลที่เกิดขึ้นจะมีขนาด และความเข้มของสีน้อยกว่าแผลที่เกิดขึ้นบนใบอ่อน หลังจากหยดสารละลาย Richard's medium บนใบอ่อนและใบแก่ลำไย ไม่พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณที่หยดสาร (ภาพที่ 32)

ภาพที่ 29 ลักษณะของสารสกัดที่อยู่ในรูปผลึกสีขาว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพที่ 30 ผลของสารสกัดหยาบต่อการงอกของเมล็ดผักกาดขาวบนแผ่น TLC แสดงให้เห็นว่าเมล็ดผักกาดขาวไม่งอกบริเวณที่หยดสารสกัดไว้ (ลูกศรชี้) ซึ่งให้ผลเหมือนกับแถบที่หยดด้วยสารละลาย sodium chlorate (หัวลูกศร)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ก

ข

ภาพที่ 31 ลักษณะแผลบนใบถั่วเขียว หลังจากหยดด้วยสารสกัดหยาบ

ก เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง ทำให้เกิดรอยซีดเหลือง (ลูกศรชี้) รอบ ๆ บริเวณที่หยดสาร

ข เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน ทำให้เกิดรอยสีดำคล้ำ (ลูกศรชี้) บริเวณที่หยดสาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ก

ข

ภาพที่ 32 ลักษณะแผลบนใบลำไย หลังจากหยดด้วยสารสกัดหยาบ

ก เมื่อทดสอบกับใบอ่อนลำไย ทำให้เกิดแผลไหม้สีดำเข้ม (ลูกศรชี้) บริเวณที่หยดสาร

ข เมื่อทดสอบกับใบแก่ลำไย ทำให้เกิดจุดสีดำเข้ม (ลูกศรชี้) บริเวณที่หยดสาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

**การทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ**

1. การทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกับการงอกของเมล็ดผักกาดขาว

ที่ความเข้มข้น 1/1 พบว่าเมล็ดผักกาดไม่งอกบนแถบที่หยดสารละลายไว้ แต่บนแถบที่หยดสารละลายที่ความเข้มข้น 1/10 เมล็ดผักกาดยังสามารถงอกได้ แต่มีการเจริญที่น้อยกว่าแถบที่หยดด้วยสารละลาย Richard's medium ซึ่งเมล็ดผักกาดสามารถงอก และเจริญบนแผ่น TLC ได้ ส่วนแถบที่หยดด้วยสารละลายที่ความเข้มข้นอื่นๆ มีการเจริญเหมือนกับแถบที่หยดด้วยสารละลาย Richard's medium

2. การทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกับใบถั่วเขียว

หลังจากหยดสารละลายที่ความเข้มข้น 1/1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปรากฏว่าเกิดรอยซีดเหลืองบริเวณที่หยดสาร ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีดำคล้ำ และแผลขยายใหญ่ครอบคลุมจนทั่วใบภายในวันที่ 2 หลังจากที่หยดสาร ที่ความเข้มข้น 1/10 และ $1/10^2$ เกิดแผลเป็นรอยสีดำ และมีขนาดของแผลน้อยลงตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นอื่นไม่มีความแตกต่างกับที่หยดด้วยสารละลาย Richard's medium คือไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณที่หยดสาร

3. การทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกับใบลำไย

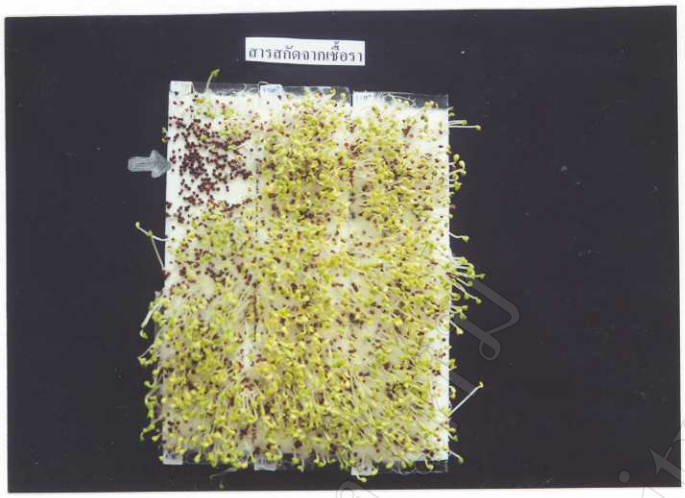
เมื่อหยดสารละลายที่ความเข้มข้น 1/1, 1/10 และ $1/10^2$ ลงบนใบอ่อนลำไยพบว่าเกิดรอยไหม้สีดำ บริเวณที่หยดสาร แต่ขนาดของแผลลดน้อยลงตามความเจือจางลงของสารสกัด ส่วนที่ความเข้มข้นอื่น และที่หยดด้วยสารละลาย Richard's medium ไม่ทำให้เนื้อเยื่อใบเกิดการเปลี่ยนแปลง ในการทดลองกับใบแก่ลำไย พบว่าเกิดรอยไหม้สีน้ำตาลเข้มเฉพาะใบที่หยดด้วยสารละลายที่ความเข้มข้น 1/1 เท่านั้น

**3.3 การทดสอบสารสกัดที่ผ่านการทำให้มีความบริสุทธิ์ขึ้น**

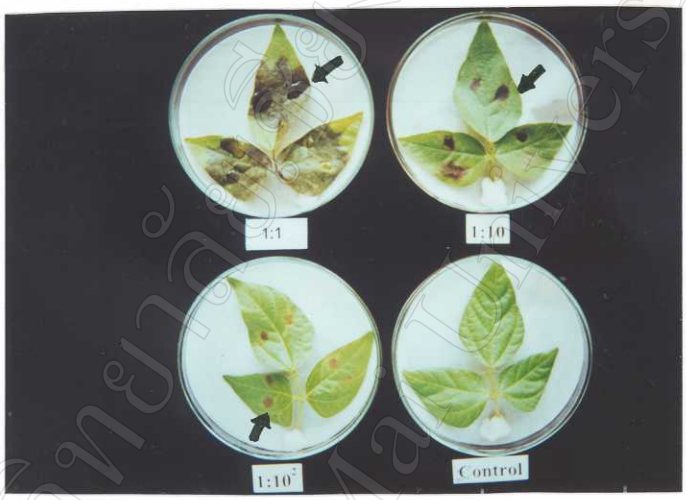
การทำสารสกัดให้มีความบริสุทธิ์ขึ้น

หลังจากที่ละลายผลึกด้วย ethyl acetate โดยใช้ความร้อนอุณหภูมิประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส พบว่าผลึกละลายเป็นสารหนืดสีเหลือง และเมื่อตั้งทิ้งไว้ให้ค่อยๆ เย็นที่อุณหภูมิห้อง ผลปรากฏว่าเกิดการตกผลึกใหม่อีกครั้งหนึ่ง จากนั้นเก็บผลึกที่ได้ไปดูดความชื้น และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –4 องศาเซลเซียส

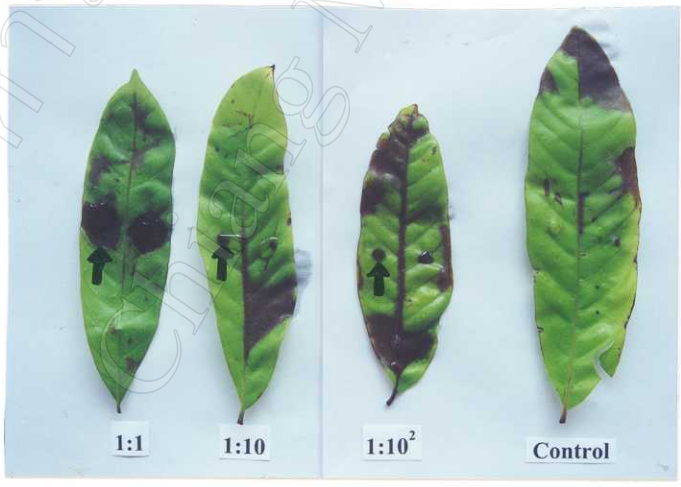
ก




ข




ค




ภาพที่ 33 ผลของการทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดหยาบต่อพืชทดสอบ

ก ยับยั้งการงอกของเมล็ดผักกาดขาว (ลูกศรชี้) ที่ความเข้มข้น 1:1

ข เกิดแผลสีน้ำตาล (ลูกศรชี้) บริเวณหยดสารที่ความเข้มข้น 1:1, 1:10 และ $1:10^2$ บนใบถั่วเขียว

ค เกิดแผลสีดำ (ลูกศรชี้) บริเวณที่หยดสารที่ความเข้มข้น 1:1, 1:10 และ $1:10^2$ บนใบลำไย

**การหาค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration)**

จากการนำผลึกที่ได้มาทดสอบกับการงอกของเมล็ดผักกาดขาว ทดสอบกับใบถั่วเขียว และทดสอบกับใบลำไย ผลปรากฏว่าค่า Minimum Inhibitory Concentration ของสารสกัดต่อพืชทดสอบทั้งสามมีค่า 125, 15.62 และ 31.25 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับ โดยสังเกตจากลักษณะการถูกทำลายของพืชทดสอบที่แตกต่างจาก Control (ภาพที่ 34)

**การทดสอบสารสกัดกับใบลำไยแต่ละพันธุ์**

จากการนำใบอ่อนลำไยพันธุ์ อีดอ เบี้ยเขียว และสีชมพู มาทำการทดลอง พบว่า สารสกัดสามารถทำให้เกิดจุดสีน้ำตาลอ่อนขนาดเล็กได้หมดทุกพันธุ์ที่นำมาทดสอบ ส่วนใบที่หยดด้วยสารละลาย Richard' medium ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

**3.4 การสกัดสารพิษจากแผลของโรคใบจุดดำที่เกิดในสภาพธรรมชาติ**

หลังจากผ่านขั้นตอนต่างๆ ที่ใช้ในการสกัดสารจากแผลของโรคใบจุดดำ พบว่าตะกอนที่เกิดขึ้นในหลอด centrifuge มีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนตะกอนที่เกิดจากการสกัดจากใบปกติจะมีสีขาวขุ่น

**การตรวจหาแถบสารพิษโดยวิธี TLC**

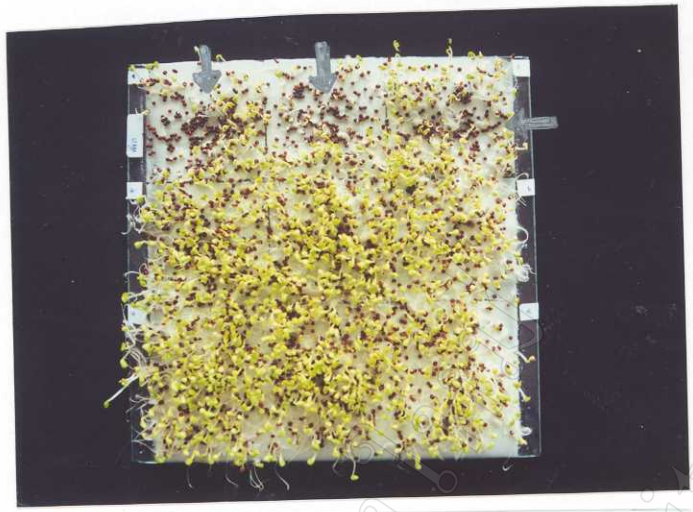
หลังจากที่นำตะกอนที่ได้จากการทดลองที่ 3.4 มาละลายด้วย PBS buffer แล้วจุดลงบนแผ่น TLC และนำไปจุ่มลงในสารละลายตัวพา ต่อจากนั้นนำไปตรวจสอบแถบสารพิษภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบสารเรืองแสง แต่แถบที่เกิดขึ้นไม่แยกออกเป็นแถบที่ชัดเจน สารเป็น polymer ที่มีขนาดต่าง ๆ คล้ายกับที่สกัดได้จากเชื้อราที่เลี้ยงไว้

**การทดสอบสารสกัดกับพืชทดสอบ**

1. การทดสอบกับการงอกของเมล็ดผักกาดขาว

หลังจากที่เพาะเมล็ดผักกาดบนแผ่น TLC ในกล่องพลาสติกที่มีความชื้นสูง พบว่าเมล็ดผักกาดสามารถงอก และให้ผลไม่แตกต่างกันในแต่ละกรรมวิธี

ก



ข

ค

ภาพที่ 34 การทดสอบหาค่า MIC กับพืชทดสอบ

ก ยับยั้งการงอกของเมล็ดผักกาดขาว (ลูกศรชี้)

ข เกิดแผลสีน้ำตาลเข้ม (ลูกศรชี้) บริเวณที่หยดสารบนใบถั่วเขียว

ค เกิดแผลสีดำ (ลูกศรชี้) บนใบลำไย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

2. การทดสอบสารสกัดกับใบถั่วเขียว

เมื่อหยดสารละลายตะกอนของสารสกัดจากแผลกับน้ำจำนวน 50 ไมโครลิตร ลงบนใบถั่วเขียว พบว่าเกิดรอยสีน้ำตาลเข้ม และมีรอยซีดเหลืองรอบๆ บริเวณที่หยดสาร เมื่อเจือจางสารสกัดลงมาโดยผสมสารสกัดจากแผลกับน้ำ 100 ไมโครลิตร และผสมกับ PBS buffer 100 ไมโครลิตร เกิดแผลสีน้ำตาลอ่อนบริเวณที่หยดสาร ส่วนในกรรมวิธีที่หยดสารสกัดจากเนื้อเยื่อปกติ และหยด PBS buffer ไม่ทำให้เนื้อเยื่อใบเกิดการเปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 35)

3. การทดสอบสารสกัดกับใบลำไย

การทดสอบกับใบอ่อนลำไย พบว่ากรรมวิธีที่ละลายตะกอนของสารสกัดจากแผลกับน้ำ 50 ไมโครลิตร เกิดแผลสีน้ำตาลเข้ม และมีรอยซีดเหลืองรอบๆ บริเวณที่หยดสาร แต่เมื่อเจือจางสารสกัดด้วยน้ำ และ PBS buffer ปริมาณ 100 ไมโครลิตร พบว่าเกิดเป็นแผลสีน้ำตาลอ่อน เป็นรอยแผลขนาดเล็กกว่ากรรมวิธีข้างต้น ส่วนกรรมวิธีอื่นไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อใบบริเวณที่หยดสาร ในการทดสอบกับใบแก่ลำไย สารสกัดที่ความเข้มข้นสูงสุดเท่านั้นที่ทำให้เกิดแผลสีน้ำตาลอ่อน แต่มีขนาดเล็กกว่าที่เกิดขึ้นบนใบอ่อนลำไย (ภาพที่ 36)

**4. การตรวจสอบหา Functional group ของสารพิษ**

**การทดสอบน้ำตาล (Anthrone test)**

หลังจากนำหลอดทดลองไปต้มในอ่างน้ำเดือด ปรากฏว่าในหลอดที่เติมสารละลาย glucose และ สารสกัดสีเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเขียวเข้ม ส่วนหลอดที่เติมน้ำกลั่น สีไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

**การทดสอบโปรตีน**

Ninhydrin test

หลอดที่เติมสารละลายไข่ขาว 10 เปอร์เซ็นต์ และ casein 1 เปอร์เซ็นต์ มีการเปลี่ยนสีหลังจากนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นสีฟ้าอ่อน ในหลอดที่เติมสารละลายสารสกัด และน้ำกลั่น ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

Biuret test

เมื่อเติมสารละลาย $CuSO_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ลงไปในหลอดทดลองแต่ละหลอด พบว่าในหลอดที่เติมสารละลายไข่ขาว และสารละลาย casein เกิดการเปลี่ยนเป็นสีม่วงอ่อน ส่วนหลอดที่เติมสารสกัด และน้ำกลั่นสีไม่เปลี่ยนแปลง

ภาพที่ 35 ลักษณะจุดสีน้ำตาลเข้ม (ลูกศรชี้) บนใบถั่วเขียวหลังจากหยดด้วยสารสกัดจากใบจุดดำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ก

ข

ภาพที่ 36 ลักษณะจุดบนใบลำไยหลังจากหยดด้วยสารสกัดจากใบจุดดำ
ก ทดสอบกับใบอ่อน แผลเป็นสีดำ (ลูกศรชี้) เห็นชัดเจน
ข ทดสอบกับใบแก่ แผลมีสีน้ำตาลเข้มขนาดเล็ก (ลูกศรชี้)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

**การตรวจสอบการดูดกลืนแสง**

หลังจากที่นำสารละลายสารสกัดเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้น้ำกลั่นเป็น reference cell ไปตรวจสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร พบว่าสารสกัดดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 200-250 นาโนเมตร

**5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีที่มีแนวโน้มในการป้องกันกำจัดโรคใบจุดดำในสภาพห้องปฏิบัติการ**

จากการทดสอบผสมสารเคมี 6 ชนิด โดยใช้ความเข้มข้นที่บริษัทแนะนำ ลงในอาหาร PDA พบว่า Antracol 70 wp, Benlate OD, Dithane M-45 และ Octave สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum* sp. ซึ่งทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญบนอาหาร PDA รองลงมาคือ Captan 50 WP และ Daconil ตามลำดับ (ภาพที่ 37) เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ ผลปรากฏว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของสารเคมีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. บนอาหาร PDA

| สารเคมี | ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)[1] | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 3 วัน | 5 วัน | 7 วัน | 9 วัน |
| Antracol 70 wp | 0.500 | 0.500 | 0.500 | 0.500 d[2] |
| Benlate OD | 0.500 | 0.500 | 0.500 | 0.500 d |
| Captan 50 WP | 0.785 | 0.920 | 1.210 | 1.755 c |
| Daconil | 1.150 | 1.770 | 2.630 | 3.300 b |
| Dithane M-45 | 0.500 | 0.500 | 0.500 | 0.500 d |
| Octave | 0.500 | 0.500 | 0.500 | 0.500 d |
| Control | 2.365 | 4.905 | 7.260 | 8.520 a |
| LSD(p=0.01) | | | | 0.244 |

หมายเหตุ 1 = ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

2 = ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันถือว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ภาพที่ 37 การเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. บนอาหาร PDA ที่ผสมสารเคมีชนิดต่าง ๆ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University