รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2558

ฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคในข้าวของสารแดปโนรีตินที่สกัดจากรากพาหมี

Antifungal Activity of Daphnoretin from the Root extracts of

Linostoma pauciflorum Griff. against Rice Diseases

ทวีสิน นาวารัตน์

อมรรัตน์ ชุมทอง

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

กันยายน 2560

บทคัดย่อ

โรคข้าวที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani, Helminthosporium oryzae*, *Curvularia lunata*, *Fusarium semitectum* และ *Alternaria* sp. นับเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อการปลูกข้าวในวงกว้าง มีรายงานว่าโรคที่เกิดจากเชื้อราเหล่านี้เป็นสาเหตุทำให้สูญเสียผลผลิตข้าว (*Oryza sativa* L.) มากถึง 40% งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมแยกตะกอนและสกัดสารแดปโนรีตินจากรากของต้นพาหมี และนำตะกอนที่แยกได้รวมทั้งสารแดปโนรีตินที่ได้ไปศึกษาฤทธิ์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในข้าวทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *Rhizoctonia solani, Helminthosporium oryzae*, *Curvularia lunata*, *Fusarium semitectum* และ *Alternaria* sp. ด้วยวิธี poisoned food technique โดยผสมตะกอน หรือ สารแดปโนรีตินในอาหาร PDA จากการทดลองพบว่า ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกตะกอนและสารแดปโนรีตินคือเอทานอลโดยทำการสกัดอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 30 นาที ที่ 78-80 °C หรือ ที่จุดเดือดของเอทานอล สามารถ สกัดสารแดปโนรีตินออกมาได้ 2.2 % และสารตะกอนที่ความเข้มข้น 10,000 ppm ให้ผลในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในข้าวทั้ง 5 ชนิด ได้ดีที่สุด (21.8 ± 3.3, 64.0 ± 4.3, 34.8 ± 3.0, 26.5 ± 2.4 และ 46.2 ± 3.6% ตามลำดับ) ในขณะที่สารแดปโนรีตินที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *H. oryzae* ได้ดีที่สุดคือ 83.50 เปอร์เซ็นต์

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

Abstract

Rice diseases, caused by fungus *Rhizoctonia solani, Helminthosporium oryzae*, *Curvularia lunata*, *Fusarium semitectum* and *Alternaria* sp., are an important and serious disease of rice (*Oryza sativa* L.) worldwide. These diseases have been reported to cause yield losses of up to 40%. Studies were conducted to optimize the extraction conditions for precipitation and the extraction of daphnoretin from the roots of *Linostoma pauciflorum* Griff. for controlling of rice diseases as such *R. solani, H. oryzae*, *C. lunata*, *F. semitectum* and *Alternaria* sp. *in-vitro* through poisoned food technique on PDA medium. The optimum conditions that maximize the extraction of daphnoretin were ethanol solvent; extraction time, 30 min; extraction temperature about 78-80 ºC or at boiling point of ethanol. The maximum extraction of daphnoretin obtained experimentally was 2.2%. The precipitate at the concentration of 1,000, 2,500, 5,000 and 10,000 ppm was tested for its abilities to inhibit the mycelium growth of 5 fungus pathogen of rice disease. The results indicate that processed precipitate at 10,000 ppm had the highest (21.8 ± 3.3, 64.0 ± 4.3, 34.8 ± 3.0, 26.5 ± 2.4 and 46.2 ± 3.6%, respectively) inhibitory effect against 5 pathogen of rice diseases. Whereas daphnoretin at concentration 50,000 ppm had highest inhibitory effect against *H. oryzae* at 83.50%.

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบาญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(1)
บทคัดย่อภาษาไทย	(2)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(3)
สารบาญ	(4)
สารบาญภาพ	(5)
สารบาญตาราง	(7)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	10
บทที่ 3 ผลการวิจัย	18
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย	40
บรรณานุกรม	42
ภาคผนวก	45
รายงานการเงิน	46
ประวัตินักวิจัยและคณะ	48
ข้อมูล IR และ NMR ของสารแดปโนรีติน	56
ข้อมูลภาพการทำการวิจัย	61
ข้อมูลการเผยแพร่ผลงาน	65

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบาญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 น้ำหนักสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิห้อง ในเวลา 3, 5 และ 7 วัน	19
3.2 น้ำหนักตะกอนที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิห้อง ในเวลา 3, 5 และ 7 วัน	20
3.3 ปริมาณสารแดปโนรีตินที่สกัดได้จากตัวทำละลายต่าง ๆ	23
3.4 ปริมาณสารแดปโนรีตินที่สกัดด้วยเอทานอลแบบต่อเนื่องด้วยซอล์กเลต ที่เวลา 1, 2, 3, 5 และ 7 ชั่วโมง	24
3.5 ข้อมูล ^{1}H (*J*, Hz) และ ^{13}C NMR ของสารแดปโนรีตินในตัวทำละลาย DMSO-d_6	25
3.6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อราก่อโรคในข้าวของตะกอนที่แยกได้จากสารสกัดหยาบรากพาหมี ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	26
3.7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อราก่อโรคในข้าวของตะกอนที่แยกได้จากสารสกัดหยาบรากพาหมีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	32
3.8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Helminthosporium oryzae* และ *Curvularia lunata* ก่อโรคในข้าวของตะกอนที่แยกได้จากสารสกัดรากพาหมี ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	36
3.9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Helminthosporium oryzae* ก่อโรคในข้าวของสารแดปโนรีตินที่สกัดจากรากพาหมี ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	39

SUAN DUSIT RAJABHAT UNIVERSITY

สารบาญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 ลักษณะอาการกล้าในกระบะเพาะเน่าตาย (ก) และลักษณะอาการกล้าเน่าหลังงอก (ข)	2
1.2 ลักษณะอาการของโรคใบจุดสีน้ำตาล (ก) และโรคเมล็ดด่าง (ข)	3
1.3 ลักษณะอาการของโรคกาบใบแห้ง	4
1.4 ลักษณะอาการของโรคเมล็ดด่าง	5
1.5 ลักษณะ ใบและลำต้น (ก) ใบและดอกของพาหมี (ข)	7
1.6 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากต้นพาหมี	8
2.1 รากพาหมีผึ่งลมแห้งตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และบดหยาบ	12
2.2 การแช่รากพาหมีด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	12
2.3 การสกัดอย่างต่อเนื่องโดยใช้ซอล์กเลต (Soxhlet)	13
2.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา	14
2.5 การเทอาหารใส่จานเพาะเชื้อ	14
2.6 การตัดชิ้น PDA ที่มีเชื้อราก่อโรค วางบนจานเพาะเชื้อที่ไม่มีสารสกัด	14
2.7 การเก็บจานเพาะเชื้อ	14
2.8 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อราเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด	15
2.9 การเทอาหารเลี้ยงเชื้อราใส่ขวด Duran	15
2.10 การชั่งและเทตะกอนที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	16
2.11 การเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีตะกอนที่แยกได้ในจานเพาะเชื้อ	16
2.12 การตัดชิ้น PDA ที่มีเชื้อราก่อโรควางบนจานเพาะเชื้อที่มีตะกอนที่แยกได้ผสมอยู่	16
2.13 การเก็บจานเพาะเชื้อที่ผสมตะกอนที่แยกได้	17
3.1 ตะกอน และ การกรองตะกอนด้วยกรวยบุ๊กเนอร์	19
3.2 ^{1}HNMR สเปกตรัมของตะกอนที่แยกได้	21
3.3 (ก) FT-IR สเปกตราของตะกอนที่แยกได้จากการแช่ด้วยเอทานอล (สีแดง) และ เฮกเซน (สีน้ำเงิน)	21
(ข) FT-IR สเปกตราของ unmodified sugarcane bagasse (spectrum 1) และ maleated sugarcane bagasse (spectrum 2)	
3.4 ของเหลวสีน้ำตาลที่กรองได้	22
3.5 การทำบริสุทธิ์สารแดปโนรีติน โดยวิธี Quick column chromatography	22
3.6 สารแดปโนรีตินที่ได้จากการสกัดที่เวลาต่าง ๆ	24

สารบาญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3.7 ลักษณะของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 1,000 ppm (ข), 2,500 ppm (ค), 5000 ppm (ง) และ 10,000 ppm (จ)	27
3.8 ลักษณะของเชื้อรา *Helminthosporium oryzae* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 1,000 ppm (ข), 2,500 ppm (ค), 5000 ppm (ง) และ 10,000 ppm (จ)	28
3.9 ลักษณะของเชื้อรา *Curvularia lunata* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 1,000 ppm (ข), 2,500 ppm (ค), 5000 ppm (ง) และ 10,000 ppm (จ)	29
3.10 ลักษณะของเชื้อรา *Fusarium semitectum* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 1,000 ppm (ข), 2,500 ppm (ค), 5000 ppm (ง) และ 10,000 ppm (จ)	30
3.11 ลักษณะของเชื้อรา *Alternaria* sp. ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 1,000 ppm (ข), 2,500 ppm (ค), 5000 ppm (ง) และ 10,000 ppm (จ)	31
3.12 ลักษณะของเชื้อรา *Rhizoctonai solani* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 25,000 ppm (ข), 50,000 ppm (ค)	32
3.13 ลักษณะของเชื้อรา *Helminthosporium oryzae* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 25,000 ppm (ข), 50,000 ppm (ค)	33
3.14 ลักษณะของเชื้อรา *Curvularia lunata* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 25,000 ppm (ข), 50,000 ppm (ค)	34
3.15 ลักษณะของเชื้อรา *Fusarium semitectum* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 25,000 ppm (ข), 50,000 ppm (ค)	35
3.16 ลักษณะของเชื้อรา *Alternaria sp.* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 25,000 ppm (ข), 50,000 ppm (ค)	35
3.17 ลักษณะของเชื้อรา *Helminthosporium oryzae* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 1,000 ppm (ข), 5,000 ppm (ค), 10,000 ppm (ง), 50,000 ppm (จ) และ 100,000 ppm (ฉ)	37
3.18 ลักษณะของเชื้อรา *Curvularia lunata* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 1,000 ppm (ข), 5,000 ppm (ค), 10,000 ppm (ง), 50,000 ppm (จ) และ 100,000 ppm (ฉ)	38
3.19 ลักษณะของเชื้อรา *Helminthosporium oryzae* ที่ระดับความเข้มข้นของสาร daphnoretin 0 ppm (ขวา) และ 50,000 ppm (ซ้าย)	38

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ข้าวเป็นพืชอาหารและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งสามารถเพาะปลูกได้ทุกภูมิภาคของประเทศ มีมูลค่าการส่งออกมากกว่าพืชไร่นาชนิดอื่น ๆ รายได้จากข้าว จึงเป็นรายได้หลักของประเทศอย่างหนึ่ง แต่การปลูกข้าวของประเทศไทยยังประสบปัญหาหลายด้าน ที่ทำให้ผลผลิตยังอยู่ในระดับต่ำ ซึ่งโรคที่เกิดจากเชื้อรา (fungus) นับเป็นสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดความเสียหายมากที่สุดต่อการเพาะปลูกข้าว โรคของข้าวมีหลายชนิดและสามารถทำลายให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตตั้งแต่ระดับไม่รุนแรงจนกระทั่งรุนแรงมากเป็นบริเวณกว้าง โรคของข้าวที่เกิดจากเชื้อราที่สำคัญ ได้แก่ โรคไหม้ (rice blast) โรคใบจุดสีน้ำตาล (brown leaf spot) โรคใบขีดสีน้ำตาล (narrow brown leaf spot) โรคถอดฝักดาบหรือโรคข้าวตัวผู้ (bakanae disease) โรคกาบใบแห้ง (sheath blight) โรคกาบใบเน่า (sheath rot) และโรคดอกกระถิน (false smut) (สุวพงษ์, 2542)

โรคข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani, Helminthosporium oryzae*, *Curvularia lunata*, *Fusarium semitectum* และ *Alternaria* sp. มีความสำคัญและระบาดในแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญทั่วโลก ซึ่งโรคเหล่านี้มีรายงานก่อให้เกิดความสูญเสียของผลผลิตข้าวได้ถึง 40% (Ou, 1985) โรคในข้าวที่สำคัญ ๆ มีดังต่อไปนี้

1. โรคกล้าเน่าในกระบะเพาะ

สาเหตุ: เกิดจากเชื้อรา *Curvularia lunata* (Wakk.) Board. และ *Helminthosporium oryzae* Breda de haan

พบมาก: ในกระบะตกกล้าข้าวที่ใช้กับรถปักดำ

ลักษณะอาการ

เริ่มพบอาการได้ในระยะหลังจากการตกกล้าข้าวในกระบะเพาะโดยจะเริ่มพบเมล็ดข้าวบางส่วนที่เพาะไม่งอกและมีเส้นใยของเชื้อราปกคลุม ส่วนเมล็ดที่งอกต้นกล้าจะมีการเจริญเติบโตช้ากว่าต้นกล้าข้าวปกติ และเมื่อถอนต้นกล้าข้าวขึ้นมาดู ก็จะพบส่วนรากและโคน

ต้นกล้ามีแผลสีน้ำตาล และแผลที่เกิดบนโคนต้นจะลุกลามขึ้นไปยังส่วนบนของต้นกล้าทำให้ต้นกล้าเน่าตาย ในขณะเดียวกันเชื้อราสาเหตุของโรคจะขยายจากจุดเริ่มต้นที่เป็นโรคออกไปบริเวณโดยรอบไปยังต้นกล้าข้างเคียง (ภาพที่ 1.1)

ในกรณีที่ตกกล้าหนาแน่น เชื้อราสาเหตุของโรคสามารถแพร่กระจายไปยังส่วนอื่นๆของกระบะเพาะได้อย่างรวดเร็ว ต่อจากนั้นก็จะพบอาการตายของต้นกล้าข้าวเป็นหย่อมๆ กรณีที่เป็นโรคในกระบะกล้ารุนแรงทำให้ไม่สามารถนำต้นกล้าข้าวนั้นไปใช้ปักดำได้ (วันทนา, 2552)

(ก) (ข)

ภาพที่ 1.1 ลักษณะอาการกล้าในกระบะเพาะเน่าตาย (ก) และลักษณะอาการกล้าเน่าหลังงอก (ข)
ที่มา : วันทนา (2552)

การแพร่ระบาด: เนื่องจากเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อราที่ติดเมล็ดพันธุ์มาจากแปลงที่เป็นโรคเมล็ดด่างมาก่อน (วิทูร, 2556)

2. โรคใบจุดสีน้ำตาล

สาเหตุ: เกิดจากเชื้อรา *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan. (*Bipolaris oryzae* (Brada de Haan) Shoemaker)

พบมาก: ทั้งนาน้ำฝนและนาชลประทานในภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคใต้

ลักษณะอาการ

เป็นแผลที่ใบข้าว พบมากในระยะแตกกอ มีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาล รูปกลม หรือรูปไข่ ขอบนอกสุดของแผลมีสีเหลือง มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 - 1 มิลลิเมตร แผลที่มีการพัฒนาเต็มที่จะมีขนาดประมาณ 1-2 x 4-10 มิลลิเมตร บางครั้งพบแผลไม่เป็นวงกลมหรือรูปไข่ แต่จะเป็น

รอยเปื้อน คล้ายสนิมกระจัดกระจายทั่วไปบนใบข้าว แผลยังสามารถเกิดบนเมล็ดข้าวเปลือก (โรคเมล็ดด่าง) บางแผลมีขนาดเล็ก บางแผลอาจใหญ่คลุมเมล็ดข้าวเปลือก ทำให้เมล็ดข้าวเปลือกสกปรก เสื่อมคุณภาพ เมื่อนำไปสี ข้าวสารจะหักง่าย (ภาพที่ 1.2) (วันทนา, 2552)

(ก) **(ข)**

ภาพที่ 1.2 ลักษณะอาการของโรคใบจุดสีน้ำตาล (ก) และโรคเมล็ดด่าง (ข)
ที่มา : วันทนา (2552)

การแพร่ระบาด: เกิดจากสปอร์ของเชื้อราปลิวไปตามลมและติดไปกับเมล็ด (วันทนา, 2552)

3. โรคกาบใบแห้ง

สาเหตุ: เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (*Thanatephorus cucumeris* (Frank Donk)

พบมาก: ในนาชลประทาน ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคใต้ (วันทนา, 2552)

ลักษณะอาการ

เริ่มพบโรคในระยะแตกกอจนถึงระยะใกล้เก็บเกี่ยว ยิ่งต้นข้าวมีการแตกกอมากเท่าใด ต้นข้าวก็จะเบียดเสียดกันมากขึ้น โรคก็จะเป็นรุนแรงขึ้น ลักษณะของแผลจะมีลักษณะเป็นสีเขียวปนเทา ขนาดประมาณ 1-4 x 2-10 มิลลิเมตร ปรากฏตามกาบใบ ตรงบริเวณใกล้ระดับน้ำ แผลจะลุกลามขยายใหญ่ขึ้นจนมีขนาดไม่จำกัดและลุกลามขยายขึ้นถึงใบข้าว (ภาพที่ 1.3)

ถ้าเป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอ แผลสามารถลุกลามถึงใบธงและกาบหุ้มรวงข้าว ทำให้ใบและกาบใบเหี่ยวแห้ง ผลผลิตจะลดลงอย่างมากมาย (วิทูร, 2556)

ภาพที่ 1.3 ลักษณะอาการของโรคกาบใบแห้ง
ที่มา : วันทนา (2552)

การแพร่ระบาด: เชื้อราสามารถสร้างเม็ดขยายพันธุ์อยู่ได้นานในตอซังหรือวัชพืชในนาตามดินนา และมีชีวิตข้ามฤดูหมุนเวียนทำลายข้าวได้ตลอดฤดูการทำนา (วันทนา, 2552)

4. โรคเมล็ดด่าง

เป็นโรคร้ายแรงโรคหนึ่ง โดยเฉพาะกับข้าวต้นเตี้ยที่ใช้ปุ๋ยสูง เป็นระยะข้าวให้รวงใกล้เก็บเกี่ยว พบระบาดแพร่หลายกับข้าวนาปรัง โดยเฉพาะกับพันธุ์ กข 9 เคยพบว่าเป็นโรคนี้ติดต่อกันเป็นเนื้อที่กว่าพันไร่ (นิตยา, 2532)

สาเหตุ: เกิดจากเชื้อรา *Curvularia lunata* (Wakk) Boed., *Cercospora oryzae* I.Miyake, *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan., *Fusarium semitectum* Berk & Rav., *Trichoconis padwickii* Ganguly, *Sarocladium oryzae* Sawada (วันทนา, 2552)

พบมาก: ในนาชลประทาน ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ (วันทนา, 2552)

ลักษณะอาการ

เกิดอาการรวงไหม้ทั้งรวงแต่แตกต่างจากโรคไหม้คอรวง ตรงที่โรคนี้ไม่เกิดแผลที่คอรวงและคอรวงไม่หัก เมล็ดลีบเป็นบางส่วน บนเมล็ดเต็มส่วนใหญ่จะมีแผลเป็นจุดสีน้ำตาล-ดำ บางส่วนก็มีลายสีน้ำตาล และบางพวกมีสีเทาหรือสีปนชมพูทั้งนี้เพราะมีเชื้อราหลายชนิดที่

สามารถเข้าทำลายและทำให้เกิดอาการแตกต่างกันไป การเข้าทำลายของเชื้อรา มักจะเกิดในช่วงที่ดอกข้าวผสมแล้วอยู่ในช่วงเป็นน้ำนมและกำลังจะสุก หลังจากนั้นประมาณเกือบเดือน (ใกล้เกี่ยว) อาการเมล็ดด่างจะปรากฏเด่นชัด (ภาพที่ 1.4) (นิตยา, 2532)

ภาพที่ 1.4 ลักษณะอาการของโรคเมล็ดด่าง
ที่มา : วันทนา (2552)

การแพร่ระบาด: เชื้อราสามารถแพร่กระจายไปกับลม ติดไปกับเมล็ด และสามารถแพร่กระจายในยุ้งฉางได้ (วันทนา, 2552)

ปัจจุบันใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราฉีดพ่นป้องกันและควบคุมโรค ซึ่งมีข้อเสียคือ สารเคมีตกค้างในเมล็ดข้าว ในน้ำและดิน เกิดผลกระทบต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และระบบนิเวศน์ในระยะสั้นและระยะยาว รัฐบาลได้มีนโยบายลดการใช้สารเคมีทางการเกษตร ตั้งแต่แผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 7 (พ.ศ. 2535-2539) เป็นต้นมา โดยสนับสนุนการวิจัยเพื่อหาสิ่งทดแทนเพื่อลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เช่น การใช้สารสกัดจากพืชเป็นวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจและควรได้รับการส่งเสริมอย่างยิ่งเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว (ธวัชชัย, 2541, ชนสิริน และ เสาวนีย์, ม.ป.ป.; Ansari, 1995; Nagendra Raj Thingujam and Chhetry, 2002; Jitendiya Devi and Chhetry, 2013)

ศานิต (2555) ได้ทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากพืช 10 ชนิด คือ มะกรูด (*Citrus hystrix*) ยี่หร่า (*Ocimum gratissimum*) ขี้เหล็ก (*Cassia siamea*) ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaldulensis*) ปีบ (*Millingtonia hortensis*) ผักชีลาว (*Anethium gravelolens*) ผักชีฝรั่ง (*Eryngium foetidium*) เบย์ (*Laurus nobilis*) คลาโมมายด์ (*Anthemis nobilis*) และแห้ม (*Coscimum fenestratum*) ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Curvularia lunata* เชื้อสาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าว ด้วยวิธี poisonous food technique ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1,000, 2,500

5,000, 7,500 และ 10,000 ppm พบว่า สารสกัดจากยี่หร่า ความเข้มข้น 2,500 ppm สารสกัดจากเบย์และคลาโมมายด์ ความเข้มข้น 5,000 ppm สารสกัดจากแห้ม ยูคาลิปตัส และผักชีฝรั่ง ความเข้มข้น 7,500 ppm และสารสกัดจากปีบ ความเข้มข้น 10,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ 100% ส่วนสารสกัดจากมะกรูดและผักชีลาว ความเข้มข้น 10,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ 80 และ 84% ตามลำดับ สำหรับการทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ พบว่า สารสกัดจากพืช 4 ชนิด คือ มะกรูด ยี่หร่า คลาโมมายด์ และแห้ม ความเข้มข้น 2,500 ppm และสารสกัดจากยูคาลิปตัสและผักชีลาว ความเข้มข้น 10,000 ppm สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 100% ส่วนสารสกัดจากขี้เหล็กและเบย์ ความเข้มข้น 10,000 ppm สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 40 และ 55% ตามลำดับ

ศานิต และคณะ (2557) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ที่แยกได้จากแปลงปลูกไผ่จำนวน 3 ไอโซเลท คือ BB1 BB2 และ BB3 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 2 ชนิด คือ *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. สาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าว พบว่า ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* sp. และ *Altranaria* sp. ได้ โดยยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลท BB1 ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Fusarium* sp. ได้สูงสุด 40.80% รองลงมา คือ ยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลท BB2 และ BB3 ที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญเท่ากับ 33.30 และ 25.60% ตามลำดับ ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Altranaria* sp พบว่า ยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลท BB2 ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 56.70% รองลงมา คือ ยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลท BB1 และ BB3 ที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญเท่ากับ 45.40 และ 39.20% ตามลำดับ

พาหมี *Linostoma pauciflorum* Griff. เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Thymelaeaceae พบมากในแถบภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย มีสรรพคุณในการเป็นยาสมุนไพร ใช้เป็นยาแก้พยาธิในไก่ โดยการนำลำต้นมาทุบพอแหลก ใส่ลงในน้ำให้ไก่กิน ใช้เบื่อปลาโดยการนำส่วนราก ลำต้น หรือ ใบ ในที่นี่พบว่ารากดีที่สุด มาทุบพอแหลกใส่ลงในแหล่งน้ำที่จะเบื่อปลา นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อนำย่าน (ลำต้น) พาหมีวางบนคันนาสามารถป้องกันหนอนไม่ให้กินข้าวได้ด้วย และเมื่อนำย่านพาหมีไปตำให้แหลกโปะลงบนบาดแผลของวัวที่กำลังเป็นหนอนจะหายภายในเวลารวดเร็ว (Upho, 2005)

พาหมี มีลักษณะเป็นไม้เถาเนื้อแข็งหรือไม้พุ่ม ใบเดี่ยว ส่วนมากเรียงตรงข้าม ดอกออกเป็นช่อแบบซี่ร่ม ส่วนมากออกตามปลายกิ่ง ใบประดับมี 2-4 ใบ ใบประดับย่อยมีใบเดียว กลีบเลี้ยง 5 กลีบ ติดกันเป็นหลอด กลีบดอก 10 กลีบ รูปกระบองหรือรูปเส้นด้าย เกสรเพศผู้ 10 อัน อับเรณูติดที่จานฐานดอก จานฐานดอกเป็นพูเล็กๆ หรือรูปวงแหวน รังไข่มีขนหนาแน่น ก้านเกสรเพศเมียรูปเส้นด้าย ผลเมล็ดเดียวแข็ง (drupe) มักมีกลีบเลี้ยงหุ้ม พืชในวงศ์นี้มีทั้งสิ้น

500 ถึง 800 ชนิด แต่ในสกุลมหาก่าน (Linostoma) มีสมาชิกทั่วโลกเพียง 4 ชนิด มีเขตการกระจายพันธุ์กว้าง พบตั้งแต่อินเดีย บังคลาเทศ พม่า ถึงภูมิภาคอินโดจีนและภูมิภาคมาเลเซีย ในไทยพบ 3 ชนิด คือ มหาก่าน *Linostoma decandrum* (Roxb.) Wall. ex Meisn. มหาก่าน *Linostoma persimile* Craib และพันไสน (พาหมี) *Linostoma pauciflorum* Griff. (Peterson, B.,1997)

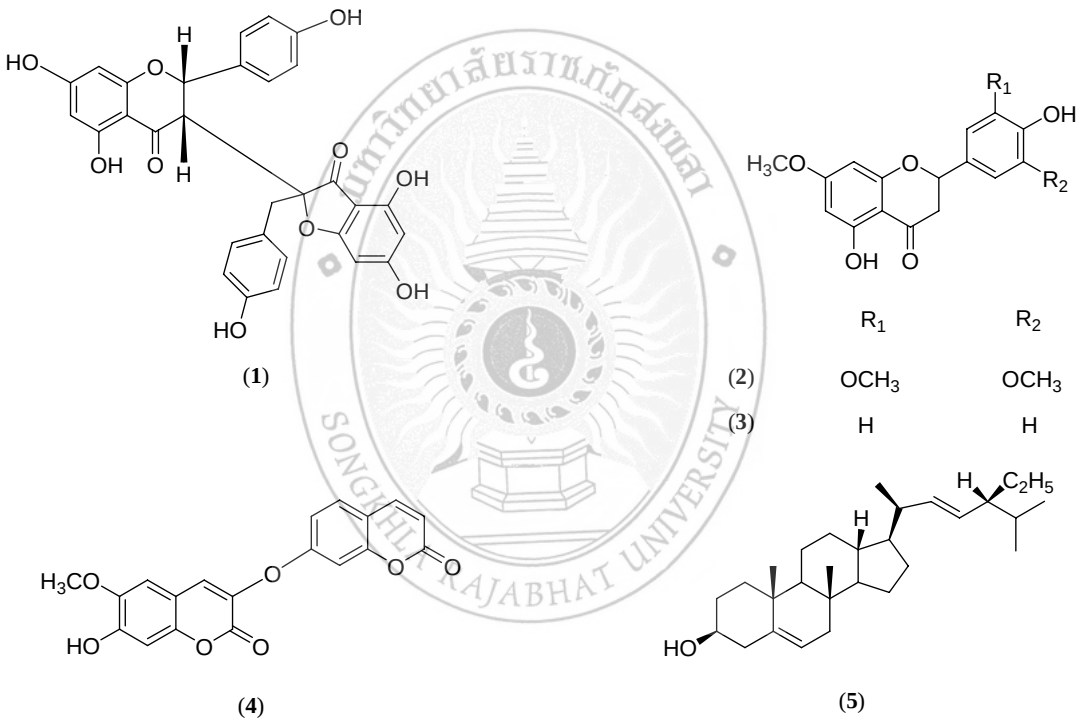
(ก) (ข)

ภาพที่ 1.5 ลักษณะ ใบและลำต้น (ก) ใบและดอกของพาหมี (ข)
ที่มา: ภาพของต้นพาหมีที่เก็บบริเวณ อำเภอควนขนุน จังหวัดพัทลุง

จากรายงานวิจัยของพืชในตระกูล Thymelaeaceae พบว่าพืชหลายชนิดในตระกูลนี้ผลิตสารแดปโนรีติน (daphnoretin) ซึ่งเป็นสารกลุ่ม biscoumarin ether เป็นสารหลัก (Badawi *et al*., 1983; *Zhuang et al.,* 2006; Navarat *et al*., 2011) มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของแดปโนรีตินอย่างกว้างขวางและพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อหลายชนิดได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอในเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง (Liou *et al*. 1982; Mohamed Abou-Karam; 1998) ฤทธิ์ต้านเนื้องอก (Lee *et al*., 1981; Handa *et al*.,1983; Mohamed *et al*., 1998; Hu *et al*., 2000) ฤทธิ์ยับยั้ง Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) ในเลือด ซึ่งเป็นแอนติเจน (ตัวกระตุ้นปฏิกิริยาภูมิต้านทานของร่างกาย) อยู่ที่ผิวของเชื้อไวรัส (Chen *et al*., 1996; Lu *et al*., 2011), ฤทธิ์ต้านไวรัสหลายสายพันธุ์ (Hu *et al*., 2000) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Wang *et al*., 2005) และฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* และ *Fusarium solani* ที่เป็นสาเหตุของโรคพืช (Eman *et al*., 2010) เป็นต้น

เมื่อไม่นานมานี้ได้มีรายงานการวิจัยการสกัดสารออกฤทธิ์ต้านจุลลินทรีย์จากต้นพาหมี พบว่า ส่วนสกัดหยาบในชั้นเอทานอล สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ในระดับความเข้มข้นสูงสุดคือ 2.5 mg/mL เมื่อนำสารสกัดไปแยกสารกลุ่มที่มีขั้วและไม่มีขั้วออก

จากกันพบว่าสารกลุ่มที่มีขั้วสามารถฆ่าทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบเกือบทุกสายพันธุ์ที่ระดับความเข้มข้น 90 mg/mL นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้ง *C. albicans* และ *F. oxysporum* ได้ที่ระดับความเข้มข้น 180 mg/mL แต่ยังไม่สามารถฆ่าทำลายเชื้อราได้ (มณี และคณะ, 2007) ในขณะที่สารในกลุ่มที่ไม่มีขั้วไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ในทุกสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นพาหมี เมื่อปี ค.ศ. 2011 พบสารสำคัญในรากและย่านพาหมี 3 กลุ่มคือ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ กลุ่มคูมาริน และกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ รวม 5 ชนิดได้แก่ linobiflavonoid (1), 5,4′-dihydroxy-7,3′,5′-trimethoxyflavone (2), 5,4′-dihydroxy-7-methoxyflavone (3), daphnoretin (4), stigmasterol (5) ดังแสดงในภาพที่ 1.6 (Navarat *et al*, 2011)



ภาพที่ 1.6 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากต้นพาหมี
ที่มา: Navarat *et al*, 2011

มีการรายงานการสกัดสารแดปโนรีตินจากส่วนต่าง ๆ ของพืชตระกูล Thymelaeaceae โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น เอทิลอะซีเตต (Kabbaj *et al*., 2013) เอทานอล (Pan *et al*., 2010; Lu *et al*., 2011; Pan *et al*., 2014) เมทานอล (Lee *et al*., 1981; Navarat *et al*., 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานการสกัดด้วยตัวทำละลายหลายชนิดโดยเริ่มแช่วัตถุดิบด้วย เฮกเซน จากนั้นตามด้วย เมทิล เอทิล คีโทน เมทานอล และน้ำตามลำดับ

(Li *et al*., 2004) และการสกัดอย่างต่อเนื่องโดยใช้ ปิโตรเลียมอีเทอร์ เบนซีน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และ เอทานอล ตามลำดับ (Mohana and Reveesha, 2007) อย่างไรก็ตามพบว่ายังไม่มีรายงานการเปรียบเทียบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ใช้สกัดสารแดปโนรีตินจากต้นพาหมี และ รายงานวิจัยการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคในข้าวมาก่อน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ หาตัวทำละลายและสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารแดปโนรีตินจากรากพาหมีเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคในข้าว โดยผลการศึกษานอกจากจะเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในข้าว ยังสามารถนำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาเป็นสูตร ตำหรับเพื่อควบคุมโรคในข้าวต่อไปได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อหาตัวทำละลายและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและแยกสารแดปโนรีตินจากรากพาหมี
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคในข้าว

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาความสามารถของตัวทำละลายแต่ละชนิดในการสกัดสารแดปโนรีตินจากรากพาหมี จากนั้นนำสารดังกล่าวไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคในข้าว เพื่อนำไปพัฒนาเป็นสูตรตำรับสำเร็จรูป สำหรับควบคุมโรคข้าวที่เกิดจากเชื้อราในอนาคต

ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สารสำคัญในรากพาหมีมีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคในข้าวได้ดี

บทที่ 2
วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย แบ่งออกเป็นสองส่วน โดยส่วนที่หนึ่งจะเป็นการหาตัวทำละลายและสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารแดปโนรีตินออกจากรากพาหมีให้ได้มากที่สุด และส่วนที่สองนำตะกอนที่แยกได้จากสารสกัดหยาบที่แช่ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา 5 ชนิดที่ก่อโรคสำคัญในข้าวและนำเชื้อราที่ถูกยับยั้งได้ดีที่สุดไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยสารแดปโนรีตินบริสุทธิ์ที่แยกได้เปรียบเทียบกับตะกอนที่แยกได้จากสารสกัดหยาบที่แช่ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

2.1.1 รากพาหมี

รากพาหมีเก็บจากอำเภอควนขนุน จังหวัดพัทลุง ประเทศไทย เดือนเมษายน พ.ศ. 2558 ตรวจสอบและพิสูจน์เอกลักษณ์โดยผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุบลวรรณ อุโพธิ์ ตัวอย่างอ้างอิงในงานวิจัยนี้ (A voucher specimen) ลักษณะตรงกับหมายเลขทะเบียนของหอพรรณไม้ คือ BKF. 125572 ซึ่งเก็บอยู่ที่หอพรรณไม้ กรุงเทพฯ ประเทศไทย

2.1.2 อุปกรณ์

1. คูลเลอร์สำหรับแช่สารสกัด
2. ขวดแก้วพร้อมฝาปิด สำหรับแช่สารสกัด
3. ขวดแก้วขนาด 15 mL สำหรับใส่สารสกัด
4. หลอดทดลองพร้อมที่วางหลอด
5. คอลัมน์แก้วสำหรับแยกสาร
6. TLC Tank
7. ขวดแก้วระเหยสาร (Evaporating flask)
8. ขวบรูปชมพู (Erlenmeyer flask)
9. บีกเกอร์ (Beaker)
10. เครื่องแก้วชุด Soxlet
11. 29/32, Glass Vacuum take-off Adapter
12. คลิปพลาสติกสำหรับ 24/29 ร่วม
13. ชุดอุปกรณ์บดรากพาหมี
14. ผ้าขาวบาง

15. ชุดกลั่นตัวทำละลาย
16. ขวดแก้วพร้อมฝาปิด สำหรับแช่สารสกัด
17. ขวดแก้วขนาด 15 mL สำหรับใส่สารสกัด
18. หลอดทดลองพร้อมที่วางหลอด
19. คอลัมน์แก้วสำหรับแยกสาร
20. TLC Tank
21. ขวดแก้วระเหยสาร (Evaporating flask)
22. ขวบรูปชมพู (Erlenmeyer flask)
23. บีกเกอร์ (Beaker)
24. เครื่องแก้วชุด Soxlet
25. 29/32, Glass Vacuum take-off Adapter
26. คลิปพลาสติกสำหรับ24/29ร่วม
27. ชุดอุปกรณ์บดรากพาหมี
28. ผ้าขาวบาง
29. ชุดกลั่นตัวทำละลาย
30. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

2.1.3 สารเคมี

1. เมทานอล (Methanol)
2. เอทานอล (Ethanol)
3. อะซิโตน (Acetone)
4. คลอโรฟอร์ม (Chloroform)
5. เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate)
6. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)
7. เฮกเซน (Hexane)
8. ซิลิกาเจลสำหรับคอลัมน์
9. Aluminum TLC plate

2.2 การหาตัวทำละลายและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและแยกสาร แดปโนรีตินจากรากพาหมี (Optimization of Extraction conditions for the extraction of Daphnoretin from the Roots of *Linostoma pauciflorum* Griff.)

2.2.1 ผลของตัวทำละลายและระยะเวลาในการสกัดสารแดปโนรีติน

นำรากพาหมีที่ล้างทำความสะอาดเรียบร้อยแล้วมาผึ่งลมให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (34-37ºC) 3 วัน จากนั้นตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปบดด้วยชุดบดให้ละเอียดพอประมาณ ดังแสดงในภาพที่ 2.1

ภาพที่ 2.1 รากพาหมีผึ่งลมแห้งตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และบดหยาบ

จากนั้นชั่งรากพาหมีประมาณ 50 กรัม ใส่ถุงผ้าขาวบางแล้วนำแช่ในตัวทำละลายที่เตรียมไว้ ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเธน อะซีโตน เอทานอล เมทานอล เอทิลอะซิเตต และน้ำ แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ โดยศึกษาผลของระยะเวลาในการสกัดสาร 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง ดังแสดงในภาพที่ 2.2

ภาพที่ 2.2 การแช่รากพาหมีด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

2.2.2 อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารแดปโนรีติน

นำรากพาหมีที่ล้างทำความสะอาดเรียบร้อยแล้วมาผึ่งลมให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (34-37 ºC) 3 วัน จากนั้นตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปบดด้วยชุดบดให้ละเอียดพอประมาณ จากนั้นชั่งรากพาหมีประมาณ 50 กรัม ใส่ถุงผ้าขาวบางแล้วนำแช่ในตัวทำละลายที่เหมาะสมจากข้อที่ 2.2.1 จากนั้นนำมาทำการสกัดอย่างต่อเนื่องโดยใช้ซอล์กเลต (Soxhlet) แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ โดยศึกษาผลอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารแดปโนรีตินดังแสดงในภาพ ที่ 2.3

ภาพที่ 2.3 การสกัดอย่างต่อเนื่องโดยใช้ซอล์กเลต (Soxhlet)

ทำการแยกสารแดปโนรีตินด้วยวิธี Quick column chromatography ใช้ silica gel 60 ประมาณ 10.28 g ชะด้วย $CHCl_3$: MeOH ในอัตราส่วน 49 : 1 (Yang, Z-Y. *et al*., 2013) สารละลายที่ได้จะมีลักษณะสีเขียวอ่อน ชะจนได้สารละลายใสไม่มีสี จากนั้นนำแต่ละ fraction ที่ได้ไปตรวจหาสาร แดปโนรีติน ด้วยเทคนิค TLC, FT-IR และ NMR เทียบกับสาร แดปโนรีตินที่เคยมีการรายงานโครงสร้างมาก่อนแล้ว (Lu,C.-L. *et al*., 2012)

2.3 ฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคในข้าวของสารแดปโนรีตินที่สกัดจากรากพาหมี (Antifungal Activity of Daphnoretin from the Root extracts of *Linostoma pauciflorum* Griff. against Rice Diseases)

2.3.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคในข้าวของตะกอนที่แยกได้จากสารสกัดหยาบที่แช่ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

2.3.1.1 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อรา

1. ชั่งอาหารสำเร็จรูป (PDA) 19.5 กรัม นำมาละลายกับน้ำกลั่นในปริมาตร 500 มิลลิลิตร คนให้อาหารละลาย แล้วนำมาเทใส่ขวด Duran ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

ภาพที่ 2.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา

2. นำอาหารที่เตรียมไว้ไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

3. เมื่ออาหารอุ่น นำไปเทใส่จานเพาะเชื้อ จำนวน 70 จานเพาะเชื้อ (ทำในตู้ปลอดเชื้อ) แล้วรอให้อาหารแข็งตัว

ภาพที่ 2.5 การเทอาหารใส่จานเพาะเชื้อ

4. เมื่ออาหารแข็งตัว ใช้ Cork borer ตัดชิ้น PDA ที่มีเชื้อราก่อโรคทั้ง 5 ชนิด มาวางตรงกลางจาน แต่ละเชื้อทำการเพาะเลี้ยง 10 ซ้ำ

ภาพที่ 2.6 การตัดชิ้น PDA ที่มีเชื้อราก่อโรค วางบนจานเพาะเชื้อที่ไม่มีสารสกัด

5. หลังจากทำเสร็จ นำมาใส่ถุง (ไม่ต้องคว่ำจานเพาะเชื้อ) แล้วมัดด้วยยางเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ภาพที่ 2.7 การเก็บจานเพาะเชื้อ

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

2.31.2 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของตะกอนสารในการยับยั้งเชื้อรา

1. ชั่งอาหารสำเร็จรูป (PDA) 11.7 กรัม ใส่ลงไปในบีกเกอร์ แล้วนำมาละลายกับน้ำกลั่นในปริมาตร 300 มิลลิลิตร

ภาพที่ 2.8 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อราเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด

2. คนให้อาหารละลาย แล้วเทใส่ขวด Duran ขนาด 500 มิลลิลิตร

ภาพที่ 2.9 การเทอาหารเลี้ยงเชื้อราใส่ขวด Duran

3. นำอาหารที่เตรียมไว้ไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

4. หลังจากนั้นรอให้อาหารอุ่น แล้วชั่งตะกอนใส่ลงไปในอาหารให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดดังนี้

ขวดที่ 1 ความเข้มข้น 0 ppm (ไม่ใส่สารสกัด)

ขวดที่ 2 ความเข้มข้น 1,000 ppm (ชั่งสารสกัด 0.3 กรัม)

ขวดที่ 3 ความเข้มข้น 2,500 ppm (ชั่งสารสกัด 0.75 กรัม)

ขวดที่ 4 ความเข้มข้น 5,000 ppm (ชั่งสารสกัด 1.5 กรัม)

ขวดที่ 5 ความเข้มข้น 10,000 ppm (ชั่งสารสกัด 3 กรัม)

ภาพที่ 2.10 การชั่งและเทตะกอนที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. จากนั้นคนอาหารและสารสกัดให้เข้ากัน แล้วนำมาเทใส่จานเพาะเชื้อ โดยเทอาหารทั้งหมด 24 จานเพาะเชื้อ แล้วรอให้อาหารแข็งตัว

ภาพที่ 2.11 การเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีตะกอนที่แยกได้ในจานเพาะเชื้อ

6. ใช้ Cork borer ตัดชิ้น PDA ที่มีเชื้อราก่อโรคข้าวทั้ง 5 ชนิด มาวางตรงกลางจานเพาะเชื้อ โดยแต่ละเชื้อทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น

ภาพที่ 2.12 การตัดชิ้น PDA ที่มีเชื้อราก่อโรควางบนจานเพาะเชื้อที่มีตะกอนที่แยกได้ผสมอยู่

7. หลังจากนั้นก็บรรจุใส่ถุงมัดด้วยยางให้แน่น แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

ภาพที่ 2.13 การเก็บจานเพาะเชื้อที่ผสมตะกอนที่แยกได้

8. วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ดังสูตร

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

กำหนดให้

r = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีรา ใน PDA ผสมตะกอนที่แยกได้ (ชุดทดสอบ)

R = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีรา ใน PDA ผสมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม)

2.3.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคในข้าวของสารแดปโนรีตินบริสุทธิ์

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารแดปโนรีตินบริสุทธิ์ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรคในข้าว ชนิดที่มีเปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้งสูงที่สุดจากตะกอนที่แยกได้ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตะกอนที่แยกได้กับสารแดปโนรีตินบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากพาหมี

บทที่ 3
ผลการวิจัย

ผลการทดลอง แบ่งออกเป็นสองส่วน คือการหาตัวทำละลายและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและแยกสารแดปโนรีตินจากรากพาหมี และส่วนที่สองนำตะกอนที่แยกได้จากสารสกัดหยาบที่แช่ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา 5 ชนิดที่ก่อโรคสำคัญในข้าวจากนั้นนำเชื้อราที่ถูกยับยั้งได้ดีที่สุดไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยสารแดปโนรีตินบริสุทธิ์ที่แยกได้เปรียบเทียบกับตะกอนที่แยกได้จากสารสกัดหยาบที่แช่ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรายละเอียดต่อไปนี้

3.1 การหาตัวทำละลายและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและแยกสารแดปโนรีตินจากรากพาหมี (Optimization of Extraction conditions for the extraction of daphnoretin from the Roots of *Linostoma pauciflorum* Griff.)

จากการทดลองเมื่อนำรากพาหมีแห้งน้ำหนัก 50 กรัม มาแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้ความดัน พบว่า การสกัดรากพาหมีด้วยอะซิโตนให้ปริมาณสารสกัดหยาบสูงสุด คือ 5.4210 กรัม รองลงมาคือการสกัดด้วยเมทานอล และเอทานอล คือ 4.4904 และ 3.6396 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1) ส่วนเวลาในการแช่รากพาหมีในตัวทำละลาย พบว่า การแช่เป็นเวลา 7 วัน ให้ปริมาณสารสกัดหยาบสูงสุด คือ 3.7829 กรัม รองลงมาคือการแช่เป็นเวลา 5 และ 3 วัน คือ 3.2304 และ 2.5969 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 น้ำหนักสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง ในเวลา 3, 5 และ 7 วัน

ตัวทำละลาย (A)	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)			ค่าเฉลี่ย (A)
	3	5	7	
Hexane	0.9640±0.1483	1.4394±0.3207	1.2820±0.2955	1.2285±0.3115 e
Dichloromethane	1.5550±0.3031	1.8225±0.2162	1.4971±0.0668	1.6248±0.2416 e
Acetone	4.1822±0.1867	5.9631±0.5327	6.1177±0.9190	5.4210±1.0764 a
Ethyl acetate	2.4345±0.3821	2.7333±0.3499	4.7109±0.0972	3.2929±1.1033 cd
Ethanol	2.8457±0.4675	3.0837±0.4044	4.9893±0.2808	3.6396±1.0727 bc
Methanol	4.2055±0.7188	5.0661±0.5281	4.1997±0.2951	4.4904±0.6380 b
Water	1.9912±0.9167	2.5048±0.3470	3.6837±0.4319	2.7266±0.9228 d
ค่าเฉลี่ย (B)	2.5969±1.2582 b	3.2304±1.6234 a	3.7829±1.7448a	
F-test	**			
C.V. (%)	21.13			

** ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างระหว่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT ที่ $p \leq 0.01$

หมายเหตุ: A=ตัวทำละลาย B=จำนวนวันที่แช่รากพาหมี (3, 5 และ 7 วัน)

เมื่อทำการละลายสารสกัดหยาบที่ได้ด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน พบว่ามีส่วนที่ไม่ละลาย จึงนำมากรองแบบสุญญากาศด้วยกรวยบุ๊กเนอร์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร และกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ดังภาพที่ 3.1

ภาพที่ 3.1 ตะกอน และ การกรองตะกอนด้วยกรวยบุ๊กเนอร์

นำตะกอนที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 ^{0}C เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็นใน desiccators จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก พบว่าตะกอนที่ได้จากสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากเอทานอล มีน้ำหนักสูงที่สุด คือ 1.2373 กรัม รองลงมาคือการสกัดด้วย อะซิโตน เมทานอล และ เฮกเซน ซึ่งให้น้ำหนักของตะกอน คือ 1.1892, 0.9476 และ 0.9420 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่การสกัดด้วยน้ำให้น้ำหนักของตะกอนต่ำที่สุด คือ 0.7725 กรัม และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3.2)

จากผลการศึกษาจำนวนวันที่แช่รากพาหมีในตัวทำละลาย พบว่า ปริมาณตะกอนที่ได้จากสารสกัดหยาบที่สกัดได้หลังจากแช่ที่เวลาต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่การแช่เป็นเวลา 5 วัน มีแนวโน้มให้ปริมาณตะกอนสูงที่สุด คือ 1.0904 กรัม รองลงมา คือ การแช่เป็นเวลา 7 และ 3 วัน ให้ปริมาณสารสกัดหยาบ เท่ากับ 0.9271 และ 0.8853 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 3.2)

หลังจากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในข้าวต่อไป

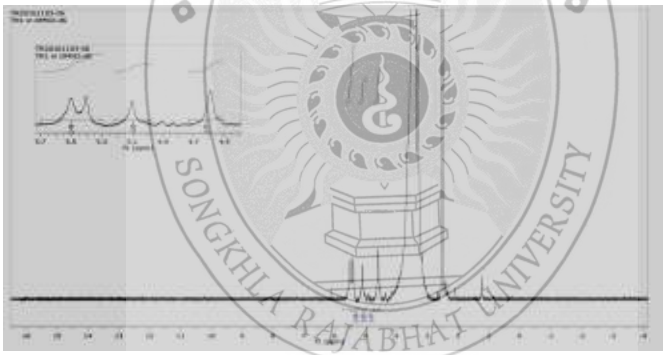
ตารางที่ 3.2 น้ำหนักตะกอนที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง ในเวลา 3, 5 และ 7 วัน

ตัวทำละลาย (A)	**น้ำหนักตะกอน (กรัม)**			**ค่าเฉลี่ย (A)**
	3	**5**	**7**	
Hexane	0.7596±0.1120	0.9776±0.0816	1.0887±0.2621	0.9420±0.2073 abc
Dichloromethane	1.0928±0.2686	1.0989±0.5238	0.2046±0.1236	0.7988±0.5376 bc
Acetone	1.0154±0.1120	1.3856±0.8734	1.1666±0.3930	1.1892±0.5084 ab
Ethyl acetate	0.7720±0.0384	1.1324±0.4345	0.7535±0.1885	0.8860±0.3011 abc
Ethanol	1.2900±0.4123	1.0447±0.3549	1.3773±0.3177	1.2373±0.3486 a
Methanol	0.5272±0.4007	1.1649±0.5668	1.1507±0.2292	0.9476±0.4827 abc
Water	0.7398±0.3408	0.8290±0.1148	0.7486±0.0878	0.7725±0.1899 c
ค่าเฉลี่ย (B)	0.8853±0.2588	1.0904±0.1721	0.9271±0.3916	
F-test	*			
C.V. (%)	39.98			

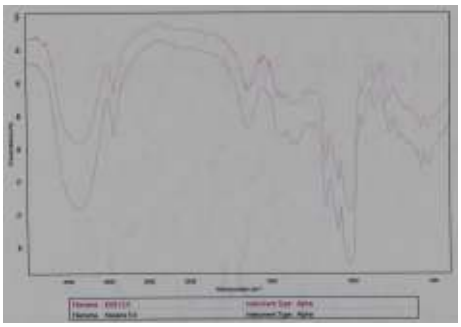
* ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างระหว่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT ที่ $p \leq 0.05$

หมายเหตุ: A=ตัวทำละลาย B=จำนวนวันที่แช่รากพาหมี (3, 5 และ 7 วัน)

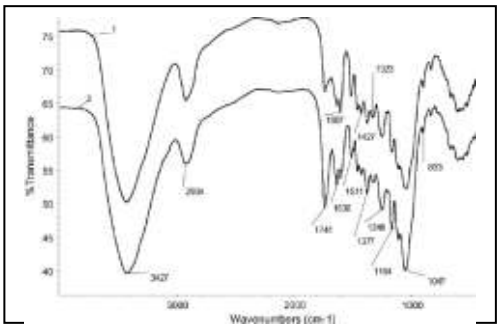
นำตะกอนที่แยกได้ไปตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง จากนั้นทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วย IR และ ^{1}H-NMR พบว่าข้อมูลที่ได้ยังไม่เพียงพอที่จะสรุปโครงสร้างของสารได้ อย่างไรก็ตามข้อมูลจาก IR สเปกตรัมพบว่ามีแถบดูดกลืนที่มีความเข้มสูงและกว้างในย่านความถี่ 3,400 cm^{-1} เกิดจากการสั่นแบบยืดของพันธะ O-H และแถบดูดกลืนที่ ~2,930 cm^{-1} เป็นการสั่นแบบยืดของพันธะ C-H และเมื่อเปรียบเทียบ IR สเปกตรัมของตะกอนที่แยกได้กับ IR สเปกตรัมจากรายงานวิจัยของ Chuan-Fu Lau และคณะที่ได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารในชานอ้อย (สเปกตรัม 1) และชานอ้อยที่มีการปรับสภาพทางเคมีให้เป็น maleated sugarcane bagasse (สเปกตรัม 2) พบว่ารูปแบบสเปกตรัมของตะกอนที่แยกได้มีลักษณะใกล้เคียงกับรูปแบบสเปกตรัมของ สเปกตรัม 1 ดังแสดงในภาพที่ 3.2 และ 3.3 จากรายงานวิจัยสรุปว่าองค์ประกอบทางเคมีของชานอ้อยเป็นเซลลูโลสส่วนใหญ่ ประมาณ 50% เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ประมาณ 25% และลิกนินประมาณ 25% (Liu, *et al*., 2007) ซึ่งจะได้ทำการศึกษาเพื่อหาข้อสรุปต่อไป



ภาพที่ 3.2 ^{1}HNMR สเปกตรัมของตะกอนที่แยกได้



(ก)



(ข)

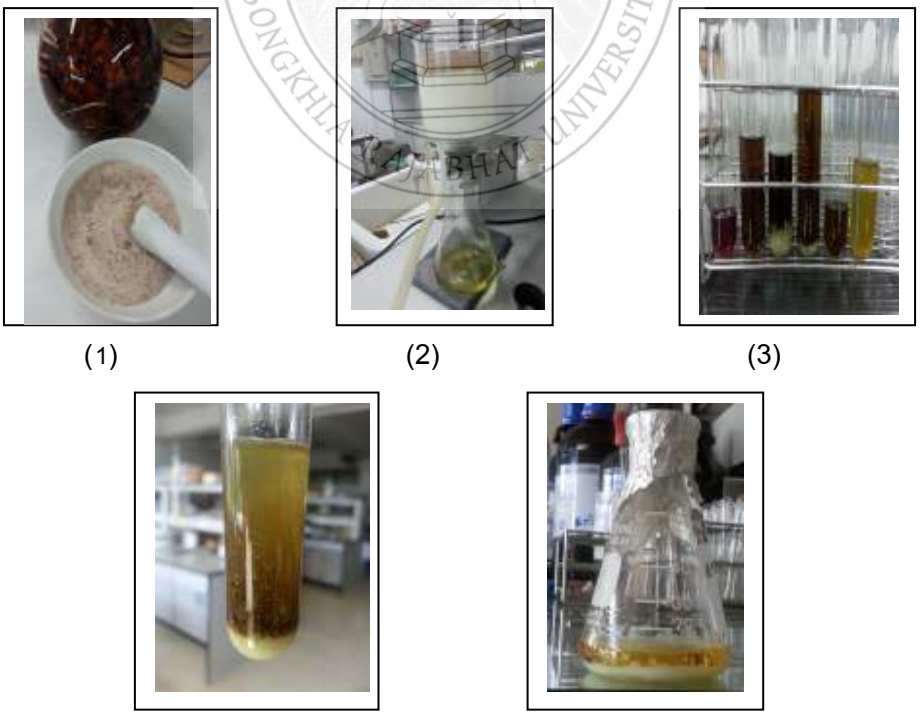
ภาพที่ 3.3 (ก) FT-IR สเปกตราของตะกอนที่แยกได้จากการแช่ด้วยเอทานอล (สีแดง) และเฮกเซน (สีน้ำเงิน)

(ข) FT-IR สเปกตราของ unmodified sugarcane bagasse (spectrum 1) และ maleated sugarcane bagasse (spectrum 2) (Liu *et al*.,2007)

หลังจากนำของเหลว (mother liquor) ที่ได้จากการกรองแบบลดความดัน ลักษณะสีน้ำตาลเข้ม (ดังแสดงในภาพที่ 3.4) ไประเหยแห้งอีกครั้งจะได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะเป็นของหนืดสีน้ำตาลเข้ม จากนั้นนำมาทำการแยกสารแดปโนรีติน โดยใช้เทคนิค Quick column Chromatography (QCC) ใช้ซิลิกาเจล 60 เป็นเฝสคงที่และใช้คลอโรฟอร์ม : เมทานอล (49:1) เป็นตัวทำละลาย (Yang *et al*., 2013)

ภาพที่ 3.4 ของเหลวสีน้ำตาลที่กรองได้

นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นใช้ไดคลอโรมีเทนละลายสารในขวดก้นกลมออกมาใส่หลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้จะเกิดตะกอนสีขาว กรองตะกอน แล้วนำไปตกผลึกใหม่ด้วยไดคลอโรมีเทนอีกครั้ง (ภาพที่ 3.5)



ภาพที่ 3.5 การแยกสารแดปโนรีตินให้บริสุทธิ์โดยวิธี Quick column chromatography

พบว่าการสกัดด้วยเอทานอล ให้ปริมาณสารแดปโนรีติน สูงสุด คือ 58.87 มิลลิกรัม รองลงมาคือการสกัดด้วย เมทานอล เอทิลอะซิเตต อะซิโตน และไดคลอโรมีเทนคือ 58.66, 55.61, 42.58 และ 15.13 มิลลิกรัม ตามลำดับ ในขณะที่การสกัดรากพาหมีด้วยเฮกเซนและน้ำไม่สามารถแยกสารแดปโนรีตินออกมาได้เลย (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.3 ปริมาณสารแดปโนรีตินที่สกัดได้จากตัวทำละลายต่าง ๆ

ตัวทำละลาย (A)	**ปริมาณสาร Dapnoretin (มิลลิกรัม)**			**ค่าเฉลี่ย (A)**
	3	**5**	**7**	
Hexane	0	0	0	0.00±0.00
Dichloromethane	15.2	13.94	16.25	15.13±1.16
Acetone	45.3	40.03	42.42	42.58±2.64
Ethyl acetate	52.8	56.02	58	55.61±2.62
Ethanol	58.5	54.56	63.55	58.87±4.51
Methanol	55.6	63.55	56.83	58.66±4.28
Water	0	0	0	0.00±0.00
ค่าเฉลี่ย (B)	32.49±26.45	32.59±27.44	33.86±27.89	

หมายเหตุ: A=ตัวทำละลาย B=จำนวนวันที่แช่รากพาหมี (3, 5 และ 7 วัน)

3.1.2 อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารแดปโนรีติน

นำรากพาหมีบดหยาบประมาณ 25 กรัม มาทำการสกัดอย่างต่อเนื่องด้วยใช้ซอล์กเลต (Soxhlet) โดยใช้เอทานอล เป็นตัวทำละลาย (ตัวทำละลายที่เหมาะสมจากข้อที่ 3.1.1) แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ และแต่ละซ้ำทำการสกัด 3 ครั้ง แต่ละครั้งใช้เอทานอล 50 มิลลิลิตร โดยศึกษาผลอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารแดปโนรีติน

จากการนำรากพาหมีมาสกัดด้วยเอทานอล แบบต่อเนื่องด้วยซอล์กเลต ที่เวลา 1 2 3 5 และ 7 ชั่วโมง พบว่า การสกัดที่เวลา 3 ชั่วโมง สามารถสกัดสารแดปโนรีตินได้มากที่สุด คือ 55.78 มิลลิกรัม รองลงมาคือการแช่ที่เวลา 7 และ 5 ชั่วโมง โดยมีปริมาณสารแดปโนรีตินที่สกัดได้ เท่ากับ 54.57 และ 52.67 มิลลิกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 3.4)

นำสารแดปโนรีตินที่สกัดได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในข้าวต่อไป

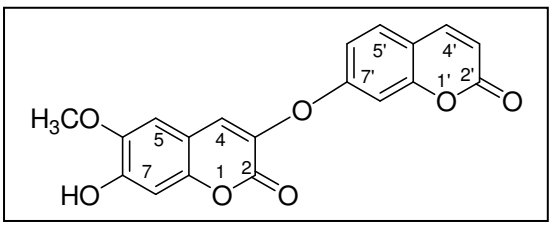
ตารางที่ 3.4 ปริมาณสารแดปโนรีตินที่สกัดด้วยเอทานอลแบบต่อเนื่องด้วยซอล์กเลต ที่เวลา 1, 2, 3, 5 และ 7 ชั่วโมง

เวลาที่ใช้ในการสกัด (ชั่วโมง)	**ปริมาณสาร Daphnoretin (มิลลิกรัม)**
1	42.21±6.53 b
2	48.85±4.07 ab
3	55.78±3.09 a
5	52.67±3.53 ab
7	54.57±0.82 a
F-test	**
C.V. (%)	7.96

** ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างระหว่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT ที่ $p \leq 0.01$

ภาพที่ 3.6 สารแดปโนรีตินที่ได้จากการสกัดที่เวลาต่าง ๆ

ผล ^{1}Hและ^{13}C NMR ของสารแดปโนรีตินเทียบกับข้อมูลจากงานวิจัยที่เคยมีการรายงานโครงสร้างก่อนหน้านี้ (ภาพสเปกตรัมแสดงในภาคผนวก ก)



โครงสร้างของสารแดปโนรีติน

ตารางที่ 3.5 ข้อมูล ^{1}H (*J*, Hz) และ ^{13}C NMR ของสารแดปโนรีตินในตัวทำละลาย DMSO-d_6

position	δ_H (*J* in Hz)	δ_C	δ_C (*)
2		160.1	159.9
3		136.0	136.0
4	7.87 s	131.6	131.1
4[a]		110.6	110.4
5	7.21 s	109.8	109.7
6		146.1	145.9
7		150.8	150.6
8	6.86 s	103.2	103.0
8[a]		147.9	147.7
2′		160.6	160.2
3′	6.37 d (*J* = 9.55)	114.2	114.1
4′	8.02 d (*J* = 9.55)	144.6	144.3
4′a		114.8	114.6
5′	7.70 d (*J* = 8.60)	130.4	130.1
6′	7.10 dd (*J* = 2.22,8.60)	113.8	113.7
7′		157.5	157.2
8′	7.15 d (*J* = 2.22)	104.3	104.3
8′a		155.4	155.2
6-OCH_3	3.80 s	56.5	56.3

* ที่มา: Lu, *et al*. (2012)

FTIR (KBr) ν_{max} IR สเปกตรัมแสดงย่านความถี่ของหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ (free OH) ที่ 3364 cm^{-1} หมู่คาร์บอนิล (-C=O) ที่ 1703 cm^{-1} และการยืดของคาร์บอน-คาร์บอนพันธะคู่ที่ 1060 cm^{-1}

3.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคในข้าวของตะกอนที่แยกได้จากสารสกัดหยาบที่แช่ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และสารแดปโนรีตินบริสุทธิ์ที่สกัดจากรากพาหมี (Antifungal Activity of the precipitate and pure daphnoretin from the Root extracts of *Linostoma pauciflorum* Griff. against Rice Diseases)

3.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของตะกอนที่แยกได้จากสารสกัดหยาบที่แช่ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรคในข้าว 5 ชนิด (*Rhizoctonia solani*, *Helminthosporium oryzae*, *Curvularia lunata*, *Fusarium semitectum*

และ *Alternaria* sp.) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1,000, 2,500 5,000 และ 10,000 ppm พบว่า ตะกอนที่แยกได้ ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. solani* ได้ดีที่สุด คือ 21.8 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง 13.9 เปอร์เซ็นต์ และที่ระดับความเข้มข้น 0, 1,000 และ 2,500 ppm นั้น พบว่า ไม่สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้ (0.0 เปอร์เซ็นต์) และมีความแตกต่างระหว่างกันทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ (ตารางที่ 3.6)

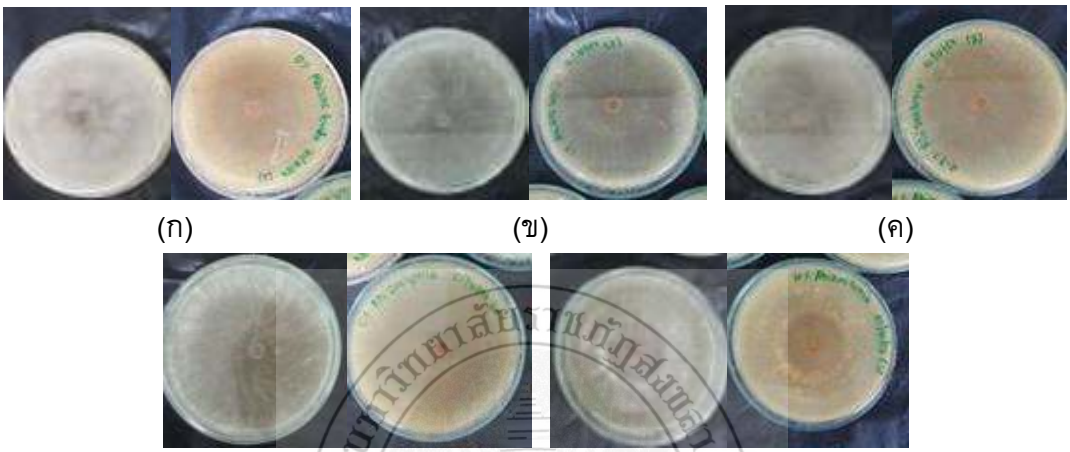
ตารางที่ 3.6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อราก่อโรคในข้าวของตะกอนที่แยกได้จากสารสกัดหยาบจากรากพาหมี ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ระดับความเข้มข้น (ppm)	การยับยั้งเส้นใยเชื้อราก่อโรคในข้าว (เปอร์เซ็นต์)				
	Rhizoctonia solani	*Helminthosporium oryzae*	*Curvularia lunata*	*Fusarium semitectum*	*Alternaria* sp.
0	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 d	0.0 ± 0.0 e	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 c
1,000	0.0 ± 0.0 c	20.4 ± 4.0 c	5.5 ± 0.9 d	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 c
2,500	0.0 ± 0.0 c	38.0 ± 1.6 b	18.4 ± 2.6 c	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 c
5,000	13.9 ± 3.8 b	62.7 ± 4.5 a	24.6 ± 1.2 b	0.0 ± 0.0 b	7.3 ± 0.9 b
10,000	21.8 ± 3.3 a	64.0 ± 4.3 a	34.8 ± 3.0 a	26.5 ± 2.4 a	46.2 ± 3.6 a
F-test	*	*	*	*	*
C.V. (%)	13.4	9.2	11.4	10.3	15.4

* ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างระหว่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT ที่ $p \leq 0.05$

สำหรับลักษณะของเชื้อรา *R. solani* จะมีลักษณะที่แตกต่างจากเชื้อชนิดอื่น โดยที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm เส้นใยมีลักษณะเป็นสีขาว เส้นใยบางซ้อนทับกันแน่น มีลักษณะคล้ายขนนก เดินเต็มจานเพาะเชื้อ และมีคราบสีขาวปนน้ำตาลติดอยู่ (ภาพที่ 3.7 ก) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm เส้นใยมีลักษณะเหมือนกับที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm แต่ภายในจานเพาะเชื้อจะมีก้อนเชื้อสีขาว ๆ เกาะอยู่ เส้นใยเดินน้อยกว่าความเข้มข้น 0 ppm (ภาพที่ 3.7 ข) สำหรับที่ระดับความเข้มข้น 2,500 ppm นั้น พบว่า เส้นใยมีลักษณะเป็นสีขาว เส้นใยบางซ้อนทับกันแน่น มีลักษณะคล้ายขนนกเดินเต็มจานเพาะเชื้อ และภายในจานเพาะเชื้อจะมีลักษณะเป็นก้อนเชื้อสีขาว ๆ เกาะอยู่ เส้นใยเดินได้ใกล้เคียงกับความเข้มข้น 1,000 ppm แต่น้อยกว่าความเข้มข้น 0 ppm (ภาพที่ 3.7 ค) ส่วนที่ความเข้มข้น 5,000 ppm พบว่า เส้นใยมีลักษณะเช่นเดียวกับความเข้มข้น 1,000 และ 2,500 ppm และเส้นใยเจริญเติบโตได้ใกล้เคียงกับความเข้มข้น 1,000 และ 2,500 ppm ดู

บางกว่าเล็กน้อย (ภาพที่ 3.7 ง) และที่ความเข้มข้น 10,000 ppm จะเห็นได้ว่า เส้นใยมีลักษณะเป็นสีขาว เส้นใยบางซ้อนทับกันแน่น มีลักษณะคล้ายขนนกเดินเต็มจานเพาะเชื้อ และภายในจานเพาะเชื้อจะมีลักษณะเป็นก้อนเชื้อสีขาว ๆ เกาะอยู่ เส้นใยเดินได้น้อยและดูบางกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ (ภาพที่ 3.7 จ)

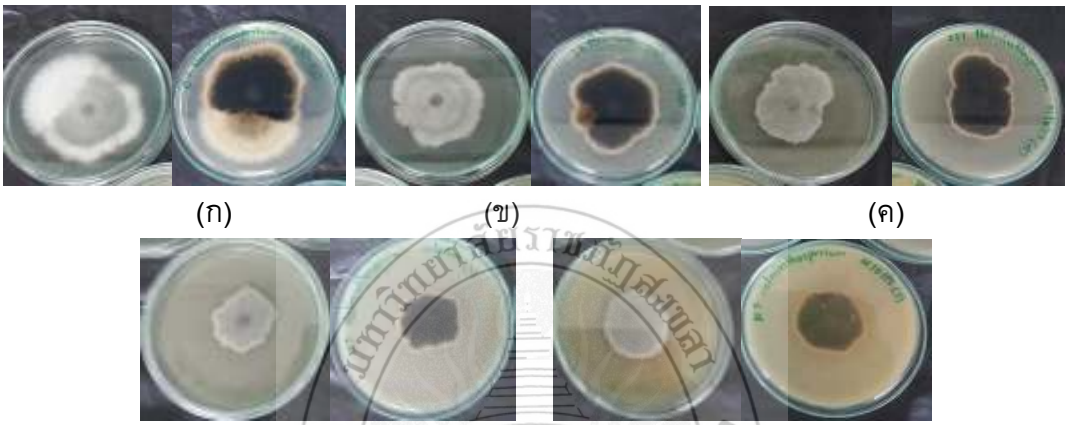


ภาพที่ 3.7 ลักษณะของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 1,000 ppm (ข), 2,500 ppm (ค), 5000 ppm (ง) และ 10,000 ppm (จ)

เมื่อนำตะกอนที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *H. oryzae* พบว่า ตะกอนที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *H. oryzae* ได้ดี คือ 64.0 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับตะกอนที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 62.7 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือสารสกัดจากพาหมีที่ระดับความเข้มข้น 2,500 ppm ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเท่ากับ 38.0 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.5)

สำหรับลักษณะของเชื้อรา *H. oryzae* นั้น พบว่า ที่ความเข้มข้น 0 ppm เชื้อราจะมีลักษณะเป็นสีขาวอมเทา บริเวณขอบมีลักษณะเป็นสีขาวมองเห็นได้ชัดเจน ๆ เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ จะเห็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นสีดำ ส่วนตรงขอบจะมีลักษณะเป็นสีขาวส้มอมครีม (ภาพที่ 3.8 ก) ส่วนที่ความเข้มข้น 1,000 ppm เส้นใยจะมีลักษณะเป็นสีขาวอมเทา บริเวณขอบมีลักษณะเป็นสีขาวน้อยกว่าความเข้มข้น 0 ppm เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ จะเห็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นสีดำ ส่วนตรงขอบจะมีลักษณะเป็นสีขาวส้มอมครีม เส้นใยขยายตัวน้อยกว่าความเข้มข้น 0 ppm (ภาพที่ 3.8 ข) สำหรับที่ระดับความเข้มข้น 2,500 ppm นั้น พบว่าเส้นใยมีลักษณะเช่นเดียวกับความเข้มข้น 1,000 ppm แต่ที่ความเข้มข้น 2,500 ppm เส้นใยจะฟูมากกว่า และขยายตัวน้อยกว่าความเข้มข้นที่ 0 และ 1,000 ppm (ภาพที่ 3.8 ค) ส่วนที่ความเข้มข้น 5,000 ppm พบว่า เส้นใยมีลักษณะเช่นเดียวกับความเข้มข้น 1,000 และ

2,500 ppm แต่ที่ความเข้มข้น 2,500 ppm เส้นใยจะฟูมากกว่า และขยายตัวน้อยกว่าความเข้มข้นที่ 0, 1,000 และ 2,500 ppm (ภาพที่ 3.8 ง) และสำหรับตะกอนที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm นั้น จะเห็นได้ว่า เส้นใยมีลักษณะเป็นสีขาวอมเทา บริเวณขอบมีลักษณะเป็นสีขาว เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ จะเห็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นสีดำ ส่วนตรงขอบจะมีลักษณะเป็นสีขาวส้มอมครีม เส้นใยขยายตัวน้อยกว่าความเข้มข้นอื่นๆ (ภาพที่ 3.8 จ)

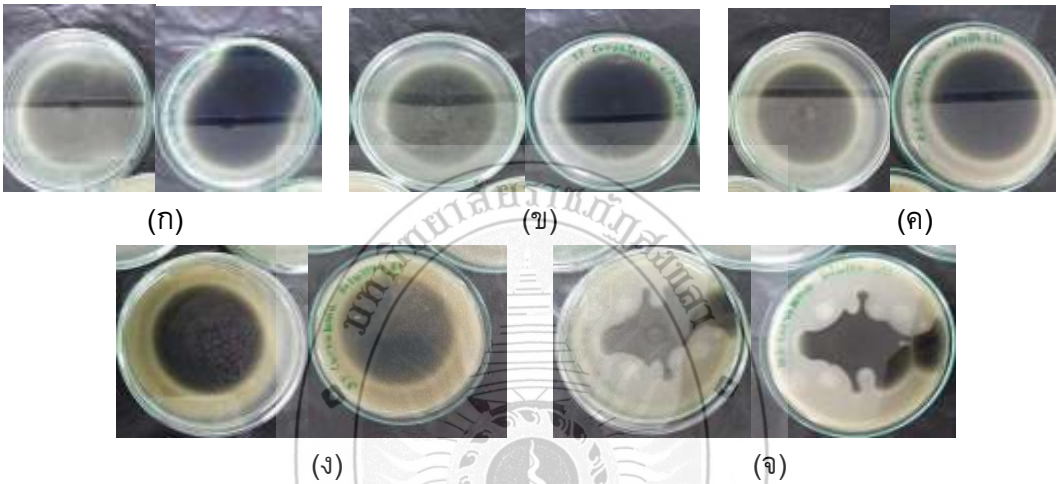


ภาพที่ 3.8 ลักษณะของเชื้อรา *Helminthosporium oryzae* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 1,000 ppm (ข), 2,500 ppm (ค), 5000 ppm (ง) และ 10,000 ppm (จ)

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. lunata* พบว่า ตะกอนที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. lunata* ได้ดีที่สุด คือ 34.8 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง 18.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 1,000 และ 2,500 ppm นั้น จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้น้อย คือ 5.5 และ 18.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3.6)

ส่วนลักษณะของเชื้อรา *C. lunata* พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm เส้นใยจะมีลักษณะเป็นสีดำคล้ำ บริเวณขอบ ๆ จะมีลักษณะเป็นสีขาว เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ จะเห็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นสีดำ ส่วนตรงขอบมีลักษณะเป็นสีขาว เชื้อขยายตัวในลักษณะเกือบจะเป็นทรงกลม (ภาพที่ 3.9 ก) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm เส้นใยมีลักษณะเป็นสีดำคล้ำ บริเวณขอบ ๆ มีลักษณะเป็นสีขาว เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ จะเห็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นสีดำ ส่วนตรงขอบมีลักษณะเป็นสีขาว เชื้อขยายตัวในลักษณะเป็นทรงกลม และขยายตัวได้น้อยกว่าความเข้มข้น 0 ppm (ภาพที่ 3.9 ข) สำหรับที่ระดับความเข้มข้น 2,500 ppm นั้น พบว่า เส้นใยมีลักษณะเช่นเดียวกับความเข้มข้น 1,000 ppm แต่ที่ความเข้มข้น 2,500 ppm เส้นใยจะขยายตัวน้อยกว่าความเข้มข้น 0 และ 1,000 ppm (ภาพที่ 3.9 ค) ส่วนที่ระดับ

ความเข้มข้น 5,000 ppm พบว่า เส้นใยมีลักษณะเช่นเดียวกับความเข้มข้น 1,000 และ 2,500 ppm แต่ที่ความเข้มข้น 5,000 ppm เส้นใยจะขยายตัวน้อยกว่าความเข้มข้น 0, 1,000 และ 2,500 ppm (ภาพที่ 3.9 ง) และที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm จะเห็นได้ว่า เส้นใยมีลักษณะเป็นสีดำคล้ำ บริเวณขอบ ๆ มีลักษณะเป็นสีขาว เชื้อขยายตัวในรูปทรงที่ไม่แน่นอน เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ จะเห็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นสีดำ ส่วนตรงขอบมีลักษณะเป็นสีขาว เชื้อขยายตัวในรูปทรงที่ไม่แน่นอน และมองเห็นเหมือนมีเชื้ออื่นปะปนอยู่ (ภาพที่ 3.9 จ)

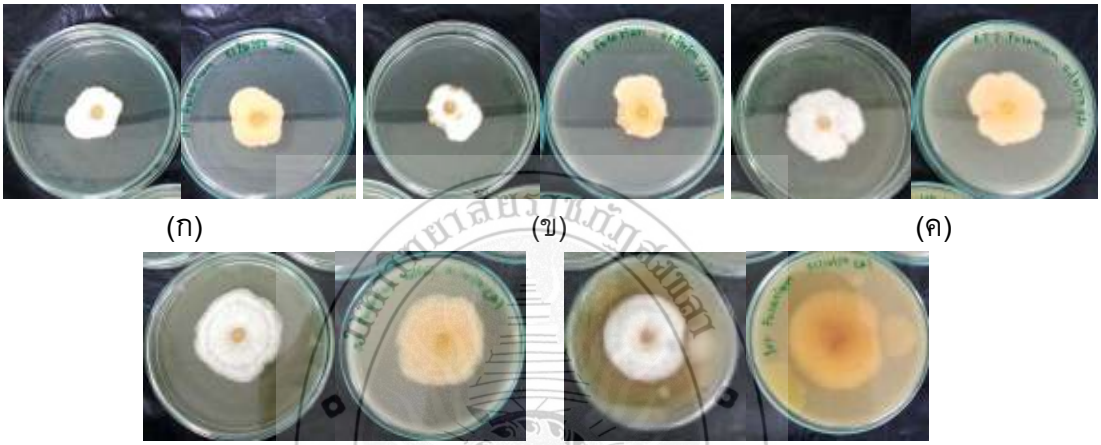


ภาพที่ 3.9 ลักษณะของเชื้อรา *Curvularia lunata* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 1,000 ppm (ข), 2,500 ppm (ค), 5000 ppm (ง) และ 10,000 ppm (จ)

เมื่อนำตะกอนที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *F. semitectum* พบว่า สารสกัดจากพาหมีที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *F. semitectum* ได้ดีที่สุด คือ 26.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 0, 1,000, 2,500 และ 5,000 ppm พบว่า ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้ (0.0 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 3.6)

ส่วนลักษณะของเชื้อรา *F. semitectum* พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm เส้นพบว่า ใยมีลักษณะเป็นสีขาวฟู ๆ คล้ายขนปุย ชิ้น PDA ตรงกลางมีลักษณะเป็นสีส้มอมครีม เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ เชื้อจะมีลักษณะเป็นสีขาวอมครีม ตรงขอบจะมีลักษณะเป็นสีขาว (ภาพที่ 3.10 ก) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm นั้น พบว่า เส้นใยจะมีลักษณะเช่นเดียวกับความเข้มข้น 0 ppm และขยายตัวได้ใกล้เคียงกับความเข้มข้น 0 ppm (ภาพที่ 3.10 ข) สำหรับที่ระดับความเข้มข้น 2,500 ppm นั้น พบว่า เส้นใยมีลักษณะเช่นเดียวกับความเข้มข้น 0 และ 1,000 ppm แต่ที่ความเข้มข้น 2,500 ppm เส้นใยจะฟูมากกว่า และขยายตัวมากกว่าความเข้มข้นที่ 0 และ 1,000 ppm (ภาพที่ 3.10 ค) ส่วนที่ความเข้มข้น 5,000 ppm พบว่า เส้นใยมีลักษณะเป็นสีขาวฟูๆ คล้ายขนปุย มองเห็นเป็นชั้นๆ เมื่อคว่ำ

จานเพาะเชื้อ จะเห็นได้ว่าเชื้อจะมีลักษณะเป็นสีขาวอมครีม มองเห็นเป็นชั้น ๆ ตรงขอบจะมีลักษณะเป็นสีขาว เชื้อขยายตัวได้มากกว่าความเข้มข้นที่ 0, 1,000 และ 2,500 ppm (ภาพที่ 3.10 ง) และสำหรับสารสกัดจากพาหมีที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm จะเห็นได้ว่า เส้นใยมีลักษณะเป็นสีขาวฟู ๆ คล้ายขนปุย เส้นใยดูหนากว่าความเข้มข้นอื่นๆ เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ จะเห็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นสีขาวขุ่นๆ เส้นใยขยายได้มากกว่าความเข้มข้นอื่นๆ (ภาพที่ 3.10 จ)

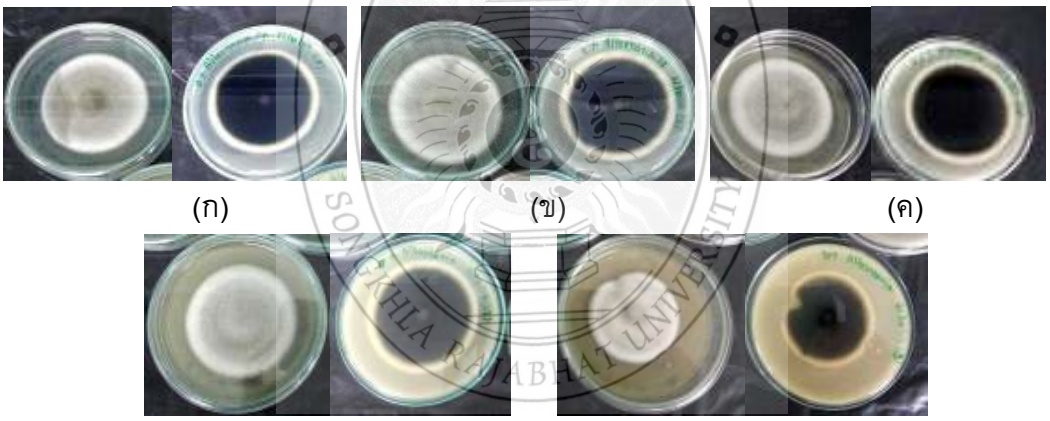


ภาพที่ 3.10 ลักษณะของเชื้อรา *Fusarium semitectum* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 1,000 ppm (ข), 2,500 ppm (ค), 5000 ppm (ง) และ 10,000 ppm (จ)

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Alternaria* sp. พบว่า ตะกอนที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดีที่สุด คือ 46.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ (7.3 เปอร์เซ็นต์) และที่ระดับความเข้มข้น 1,000 และ 2,500 ppm พบว่า ไม่สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้ (0.0 เปอร์เซ็นต์) และมีความแตกต่างระหว่างกันทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ (ตารางที่ 3.6)

อย่างไรก็ตาม จากการทดลองจะเห็นได้ว่า ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ลักษณะของเชื้อแต่ละชนิดก็จะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป โดยเชื้อรา *Alternaria* sp. ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm เส้นใยจะมีลักษณะเป็นสีขาว ซ้อนทับกันเป็นจำนวนมาก ลักษณะคล้ายขนสัตว์สีขาว บริเวณตรงกลางของเชื้อมีลักษณะเป็นสีขาวปนดำอยู่ บริเวณขอบ ๆ ของเชื้อมีลักษณะเป็นสีขาวล้วน เชื้อขยายตัวในลักษณะเป็นทรงกลม เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อจะเห็นได้ว่าส่วนด้านในของเชื้อจะมีลักษณะเป็นสีดำ ส่วนด้านนอกหรือบริเวณขอบจะมีลักษณะเป็นสีขาว ซึ่งมองเห็นได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 3.11 ก) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm พบว่า เส้นใยมีลักษณะเช่นเดียวกับความเข้มข้น 0 ppm แต่เส้นใยจะฟูมากกว่า

และเชื้อราขยายตัวได้มากกว่าที่ความเข้มข้น 0 ppm (ภาพที่ 3.11 ข) สำหรับที่ระดับความเข้มข้น 2,500 ppm นั้น พบว่า เส้นใยมีลักษณะเช่นเดียวกับความเข้มข้น 0 และ 1,000 ppm แต่ที่ความเข้มข้น 2,500 ppm เส้นใยจะฟูมากกว่า และเชื้อราจะขยายตัวได้ใกล้เคียงกับความเข้มข้น 1,000 ppm (ภาพที่ 3.11 ค) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm พบว่า เส้นใยมีลักษณะเช่นเดียวกับความเข้มข้น 0, 1,000 และ 2,500 ppm แต่ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm เส้นใยจะฟูมากกว่า เชื้อราขยายตัวได้น้อยกว่าที่ความเข้มข้น 1,000 ppm และ 2,500 ppm แต่ขยายตัวมากกว่าที่ความเข้มข้น 0 ppm (ภาพที่ 3.11 ง) และสำหรับตะกอนที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm จะเห็นได้ว่า เส้นใยมีลักษณะเป็นสีขาวซ้อนทับกันเป็นจำนวนมาก ลักษณะคล้ายขนสัตว์สีขาว บริเวณตรงกลางของเชื้อจะมีลักษณะเป็นสีขาวปนดำ บริเวณขอบ ๆ ของเชื้อจะมีลักษณะเป็นสีขาวล้วน เส้นใยฟูมากมองเห็นเป็นชั้น ๆ เชื้อขยายตัวในลักษณะเป็นทรงกลมแต่จะเว้าบางส่วน เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อพบว่าส่วนด้านในของเชื้อจะมีลักษณะเป็นสีดำและมีบางส่วนเว้าเข้ามา ด้านนอกหรือบริเวณขอบจะมีลักษณะเป็นสีขาว และสามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าความเข้มข้นอื่นๆ (ภาพที่ 3.11 จ)



ภาพที่ 3.11 ลักษณะของเชื้อรา *Alternaria* sp. ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 1,000 ppm (ข), 2,500 ppm (ค), 5000 ppm (ง) และ 10,000 ppm (จ)

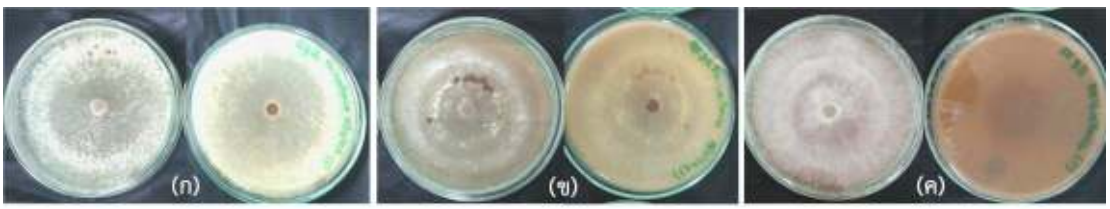
3.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของตะกอนที่แยกได้ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรคในข้าวทั้ง 5 ชนิด โดยเพิ่มระดับความเข้มข้นขึ้นจากการทดลองที่ 2.3.1 ซึ่งทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0, 25,000 และ 50,000 ppm เป็นเวลา 7 วัน (ตารางที่ 3.7) พบว่าตะกอนที่แยกได้จากรากพาหมีที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. solani* ได้ดีที่สุด คือ 13.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 25,000 ppm นั้น พบว่า ไม่สามารถยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้ (0.0 เปอร์เซ็นต์) และมีความแตกต่างระหว่างกันทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ (ตารางที่ 3.7) อย่างไรก็ตามเมื่อสังเกตลักษณะเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ในจานเพาะเชื้อที่

ระดับความเข้มข้นต่างกันพบว่าการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรามีความแตกต่างกันชัดเจน (ภาพที่ 3.8) โดยที่ความเข้มข้น 0 ppm พบว่าเส้นใยมีลักษณะเป็นเส้นบางๆ สีขาว คล้ายขนนก ซ้อนทับกันแน่น มีการสร้างเม็ดสคลอโรเทียมเพื่อสืบพันธุ์ขึ้นมา ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดสีน้ำตาลเข้มและสีน้ำตาลอ่อนกระจายตัวอยู่เต็มจานเพาะเชื้อ ซึ่งเมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อพบว่า เชื้อด้านในมีลักษณะเป็นสีขาวเจริญอยู่อย่างหนาแน่น (ภาพที่ 3.12 ก) ส่วนที่ความเข้มข้น 25,000 ppm พบว่า เส้นใยมีลักษณะเช่นเดียวกับที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm แต่มีความหนาของเส้นใยและจำนวนเม็ดสคลอโรเทียมน้อยกว่าที่ระความเข้มข้น 0 ppm (ภาพที่ 3.12 ข) และที่ความเข้มข้น 50,000 ppm พบว่าเส้นใยเชื้อรามีลักษณะเป็นเส้นบางๆ สีขาว คล้ายขนนก ซ้อนทับกัน แต่ ไม่มีการสร้างเม็ดสคลอโรเทียมในจานเพาะเชื้อ (ภาพที่ 3.12 ค)

ตารางที่ 3.7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อราก่อโรคในข้าวของตะกอนที่แยกได้จากสารสกัดหยาบจากรากพาหมี ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ระดับความเข้มข้น (ppm)	**การยับยั้งเส้นใยเชื้อราก่อโรคในข้าว** (เปอร์เซ็นต์)				
	Rhizoctonia solani	*Helminthosporium oryzae*	*Curvularia lunata*	*Fusarium semitectum*	*Alternaria* sp.
0	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 b	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0 b
25,000	0.0 ± 0.0 b	49.4 ± 2.3 b	55.0 ± 3.1 a	16.1 ± 3.3 b	32.3 ± 1.7 a
50,000	13.2 ± 1.0 a	73.5± 2.6 a	57.0 ± 4.5 a	29.3 ± 4.7 a	36.6 ± 3.5 a
F-test	**	**	**	**	**
C.V. (%)	13.7	7.2	8.4	21.9	9.7

** ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างระหว่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT ที่ $p \leq 0.01$



ภาพที่ 3.12 ลักษณะของเชื้อรา *Rhizoctonai solani* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 25,000 ppm (ข), 50,000 ppm (ค)

เมื่อนำตะกอนที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *H. oryzae* พบว่า ตะกอนผสมสารแดปโนรีตินจากรากพาหมีที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *H. oryzae* ได้ดี คือ 73.5 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างทางสถิติกับสารสกัดจากพาหมีที่ระดับความเข้มข้น 25,000 ppm ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 49.4 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.7) ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm เส้นใยมีลักษณะฟูขึ้นมามีสีเทาปนขาว บริเวณขอบมีลักษณะเป็นสีขาว เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ พบว่า เชื้อด้านในมีลักษณะเป็นสีดำ ส่วนบริเวณขอบของเชื้อจะมีลักษณะเป็นขอบสีขาว มองเห็นชัดเจน (ภาพที่ 3.13 ก) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 25,000 ppm เส้นใยมีลักษณะเช่นเดียวกับที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm เชื้อขยายตัวได้น้อยกว่าที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm และภายในบริเวณจานเพาะเชื้อ พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่ เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ พบว่า เชื้อมีลักษณะเป็นสีดำดูจางในบางส่วน (ภาพที่ 3.13 ข) และที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm พบว่าเส้นใยมีลักษณะเช่นเดียวกับที่ระดับความเข้มข้น 25,000 ppm แต่ที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm มีการปนเปื้อนของราชนิดอื่นซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นใยฟู ๆ สีเทาเกิดขึ้นภายในบริเวณจานเพาะเชื้อ เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ พบว่า เชื้อมีลักษณะเป็นสีดำ มองเห็นไม่ชัดเจน เนื่องจากอาหารค่อนข้างขุ่น (ภาพที่ 3.13 ค)

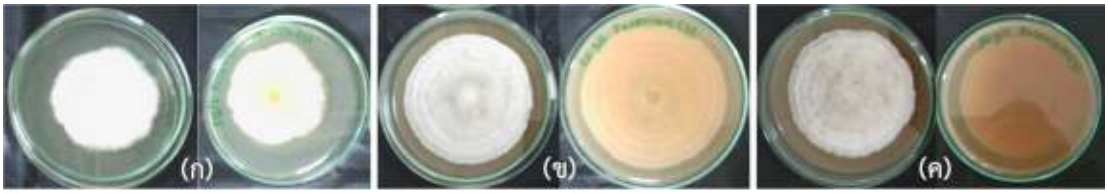
ภาพที่ 3.13 ลักษณะของเชื้อรา *Helminthosporium oryzae* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 25,000 ppm (ข), 50,000 ppm (ค)

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. lunata* พบว่า ตะกอนที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. lunata* ได้ดีที่สุด คือ 57.0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ที่ระดับความเข้มข้น 25,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง 55.0 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.7) ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm พบว่า เส้นใยเชื้อรามีลักษณะเป็นสีดำ บริเวณขอบมีลักษณะเป็นสีขาว เส้นใยขยายเต็มจานเพาะเชื้อ เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ พบว่า เชื้อมีลักษณะเป็นสีดำเข้ม มองเห็นชัดเจน (ภาพที่ 3.14 ก) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 25,000 ppm พบว่าเส้นใยมีลักษณะเป็นสีดำ บริเวณขอบของเชื้อมีลักษณะเป็นสีขาว และตรงกลางของจานเลี้ยงเชื้อนั้น พบว่า มีเส้นใยฟูออกมามากกว่าบริเวณอื่น เชื้อเจริญเติบโตได้น้อยกว่าที่ระดับ

ความเข้มข้น 0 ppm เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ พบว่า เชื้อมีลักษณะเป็นสีดำ มองเห็นไม่ชัดเจน เนื่องจากอาหารค่อนข้างขุ่น (ภาพที่ 3.14 ข) สำหรับที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm พบว่า เส้นใยมีลักษณะเช่นเดียวกับที่ระดับความเข้มข้น 25,000 ppm แต่ที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm มีการปนเปื้อนเชื้อราชนิดอื่นซึ่งมีลักษณะเป็นจุดสีดำเกิดขึ้นภายในบริเวณจานเพาะเชื้อ ขยายตัวได้น้อยกว่าความเข้มข้นอื่น เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ พบว่า เชื้อมีลักษณะเป็นสีดำ มองเห็นไม่ชัดเจน เนื่องจากอาหารค่อนข้างขุ่น (ภาพที่ 3.14 ค)

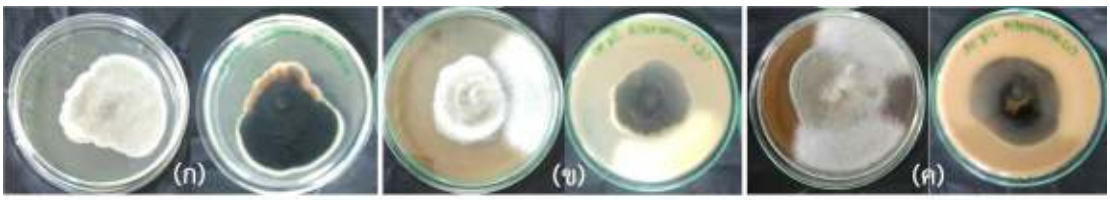
ภาพที่ 3.14 ลักษณะของเชื้อรา *Curvularia lunata* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 25,000 ppm (ข), 50,000 ppm (ค)

เมื่อนำตะกอนที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *F. semitectum* พบว่า ตะกอนที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *F. semitectum* ได้ดีที่สุด คือ 29.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 25,000 ppm พบว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราได้ 16.1 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุมที่ $p \leq 0.05$ (ตารางที่ 3.7) ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm พบว่า เส้นใยเชื้อรามีลักษณะฟูขึ้นมา มีสีส้มอมครีม บริเวณขอบเส้นใยจะฟูขึ้นมามากกว่าบริเวณอื่น มีลักษณะเป็นสีขาว คล้ายขนปุย เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ พบว่า เชื้อด้านในมีลักษณะเป็นสีส้มอมครีม ส่วนบริเวณขอบของเชื้อจะมีลักษณะเป็นสีขาว (ภาพที่ 3.15 ก) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 25,000 ppm พบว่า เส้นใยมีลักษณะเช่นเดียวกับที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm แต่เส้นใยจะฟูน้อยกว่า แต่เส้นใยแผ่ขยายได้กว้างกว่าที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ พบว่า เชื้อมีลักษณะเป็นขาวอมครีม (ภาพที่ 3.15 ข) และที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm พบว่า เส้นใยมีลักษณะเช่นเดียวกับที่ระดับความเข้มข้น 25,000 ppm แต่ที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm เส้นใยจะดูบางกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ พบว่า มองเห็นเชื้อราไม่ชัดเจน เนื่องจากอาหารค่อนข้างขุ่น (ภาพที่ 3.15 ค)



ภาพที่ 3.15 ลักษณะของเชื้อรา *Fusarium semitectum* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 25,000 ppm (ข), 50,000 ppm (ค)

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Alternaria* sp. พบว่า ตะกอนที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดีที่สุด คือ 36.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 25,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเท่ากับ 32.3 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างระหว่างกันทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ (ตารางที่ 3.7) ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm พบว่าเส้นใยมีลักษณะเป็นสีขาวปนเทาฟูขึ้นมา บริเวณขอบ ๆ ของเชื้อมีลักษณะเป็นสีขาว เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ พบว่าเชื้อมีลักษณะสีดำ บริเวณขอบมีลักษณะเป็นสีขาว (ภาพที่ 3.16 ก) สำหรับที่ระดับความเข้มข้น 25,000 ppm พบว่าเส้นใยมีลักษณะเป็นสีขาวปนเทาฟูขึ้นมา ขอบ ๆ มีลักษณะเป็นสีขาว บริเวณกลางจานเพาะเชื้อจะมีเส้นใยฟูขึ้นมามากกว่าบริเวณอื่น มีการปนเปื้อนเชื้อราชนิดอื่นซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวปนเทา เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ พบว่า เชื้อรามีลักษณะสีดำ บริเวณขอบมีลักษณะเป็นสีขาว (ภาพที่ 3.16 ข) และที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm พบว่าเส้นใยมีลักษณะเป็นสีขาวปนเทาฟูขึ้นมา บริเวณขอบ ๆ ของเชื้อมีลักษณะเป็นสีขาว มีการปนเปื้อนเชื้อราชนิดอื่นซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวปนเทาและมีลักษณะเป็นจุดสีดำเกิดขึ้นภายในบริเวณจานเพาะเชื้อ เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ พบว่า เชื้อมีลักษณะสีดำ บริเวณขอบมีลักษณะเป็นสีขาว (ภาพที่ 3.16 ค)



ภาพที่ 3.16 ลักษณะของเชื้อรา *Alternaria sp.* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 25,000 ppm (ข), 50,000 ppm (ค)

3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของตะกอนที่แยกได้จากรากพาหมี ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรคในข้าว 2 ชนิด คือ *H. oryzae* และ *C. lunata* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้งสูงในการทดลองข้อที่ 3.2.1 และ 3.2.2 (ตารางที่ 3.5 และ 3.6) โดยทดสอบที่

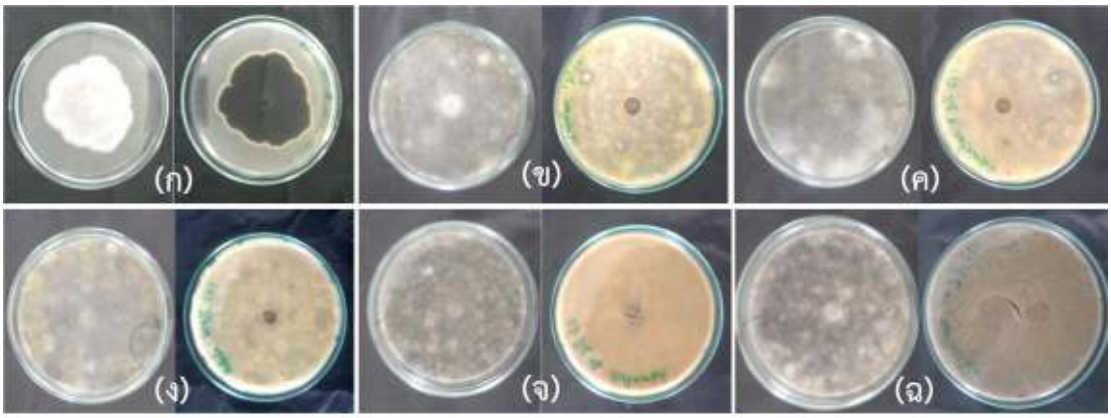
ระดับความเข้มข้น 0-100,000 ppm เป็นเวลา 7 วัน (ตารางที่ 3.8) สำหรับเชื้อรา *H. oryzae* พบว่าระดับความเข้มข้นตะกอนที่แยกได้สูงขึ้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราเพิ่มขึ้นด้วย โดยที่ระดับความเข้มข้น 100,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *H. oryzae* ได้ดีที่สุด คือ 95.76 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm ยับยั้งได้ 81.24 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.8)

ตารางที่ 3.8 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Helminthosporium oryzae* และ *Curvularia lunata* ก่อโรคในข้าวของตะกอนที่แยกได้จากสารสกัดรากพาหมี ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ระดับความเข้มข้น (ppm)	**การยับยั้งเส้นใยเชื้อราก่อโรคในข้าว (เปอร์เซ็นต์)**	
	Helminthosporium oryzae	***Curvularia lunata***
0	0.00±0.00 e	0.00±0.00 e
1,000	67.44±6.09 d	89.42±1.63 a
5,000	72.60±4.84 c	86.03±1.40 b
10,000	76.55±4.09 bc	85.71±1.19 b
50,000	81.24±1.85 b	80.98±2.19 c
100,000	95.76±0.59 a	62.87±3.10 d
F-test	**	**
C.V. (%)	5.60	2.73

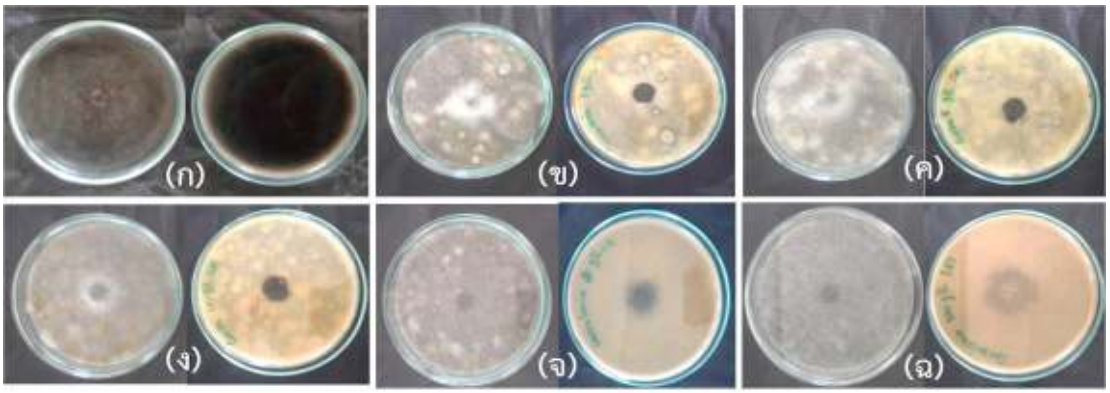
** ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างระหว่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT ที่ $p \leq 0.01$

นอกจากนี้พบว่า เชื้อรา *H. oryzae* ที่ความเข้มข้น 0 ppm เชื้อราจะมีลักษณะเป็นสีขาวอมเทา บริเวณขอบมีลักษณะเป็นสีขาวมองเห็นได้ชัดเจน เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ จะเห็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นสีดำ ส่วนตรงขอบจะมีลักษณะเป็นสีขาวส้มอมครีม (ภาพที่ 3.17 ก) ส่วนที่ความเข้มข้น 1,000-100,000 ppm พบว่า มีการปนเปื้อนของเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใยสีดำอมขาวขึ้นเต็มจานเพาะเชื้อ และมีเชื้อแบคทีเรียและเชื้อที่มีลักษณะคล้ายขนนกสีขาวขึ้นในลักษณะวงกลมขนาดใหญ่ 2-3 จุด เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อจะเห็นว่า เชื้อ *H. oryzae* ขยายตัวได้น้อยมีลักษณะเป็นวงสีดำมองเห็นชัดเจน (ภาพที่ 3.17 ข-ฉ)



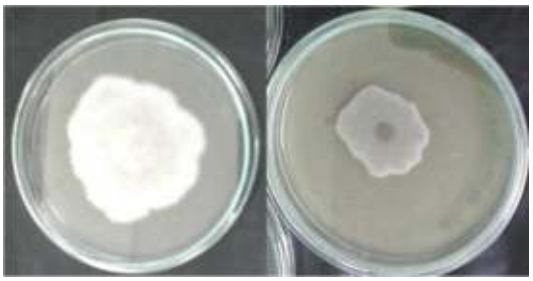
ภาพที่ 3.17 ลักษณะของเชื้อรา *Helminthosporium oryzae* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 1,000 ppm (ข), 5,000 ppm (ค), 10,000 ppm (ง), 50,000 ppm (จ) และ 100,000 ppm (ฉ)

สำหรับเชื้อรา *C. lunata* พบว่าระดับความเข้มข้นของตะกอนที่แยกได้สูงขึ้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราลดลง โดยที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. lunata* ได้ดีที่สุด คือ 89.42 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 และ 10,000 ppm ยับยั้งได้ 86.03 และ 85.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3.8) ส่วนลักษณะของเชื้อรา *C. lunata* พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm เส้นใยมีลักษณะเป็นสีดำคล้ำ และมองเห็นเป็นหยดน้ำเกาะอยู่ บริเวณขอบมีลักษณะเป็นสีขาว เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ จะเห็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นสีดำ ส่วนตรงขอบมีลักษณะเป็นสีขาว เชื้อขยายตัวเป็นวงกลม (ภาพที่ 3.18 ก) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 1,000-100,000 ppm พบว่า มีเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใยสีดำและสีขาวปนเปื้อนเต็มจานเพาะเชื้อ และมีเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนบางส่วน เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อจะเห็นเชื้อ *C. lunata* เชื้อมีลักษณะเป็นสีดำคล้ำ เจริญเติบโตได้มากขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3.18 ข-ฉ)



ภาพที่ 3.18 ลักษณะของเชื้อรา *Curvularia lunata* ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ก), 1,000 ppm (ข), 5,000 ppm (ค), 10,000 ppm (ง), 50,000 ppm (จ) และ 100,000 ppm (ฉ)

3.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารแดปโนรีตินที่สกัดจากรากพาหมี ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรคในข้าว *H. oryzae* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้งสูงสุดจากตะกอนที่แยกได้ในการทดลองข้างต้น (ตารางที่ 3.6, 3.7 และ 3.8) โดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0, 5,000, 25,000 และ 50,000 ppm เป็นเวลา 7 วัน (ตารางที่ 3.9) พบว่าระดับความเข้มข้นสารแดปโนรีตินสูงขึ้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราเพิ่มขึ้นด้วย โดยที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *H. oryzae* ได้ดีที่สุด คือ 83.50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3.19) รองลงมา คือ ที่ระดับความเข้มข้น 25,000 ppm ยับยั้งได้ 50.50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.9) และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้พบว่า ในทุกระดับความเข้มข้น เชื้อรามีลักษณะเป็นสีขาวอมเทา บริเวณขอบมีลักษณะเป็นสีขาวมองเห็นได้ชัดเจน เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ จะเห็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นสีดำ ส่วนตรงขอบจะมีลักษณะเป็นสีขาวส้มอมครีม และไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ



ภาพที่ 3.19 ลักษณะของเชื้อรา *Helminthosporium oryzae* ที่ระดับความเข้มข้นของสาร daphnoretin 0 ppm (ขวา) และ 50,000 ppm (ซ้าย)

ตารางที่ 3.9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Helminthosporium oryzae* ก่อโรคในข้าวของสารแดปโนรีตินที่สกัดจากรากพาหมี ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ระดับความเข้มข้นของสารแดปโนรีติน (ppm)	**การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *H. oryzae* (เปอร์เซ็นต์)**
0	0.00±0.00 d
5,000	29.75±1.71 c
25,000	50.50±2.38 b
50,000	83.50±2.65 a
F-test	*
C.V. (%)	4.82

* ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างระหว่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบโดยวิธี DMRT ที่ $p \leq 0.05$

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 4
สรุปผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัย แบ่งออกเป็น 2 ตอน ดังนี้

4.1 การหาตัวทำละลายและสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและแยกสารแดปโนรีตินจากราก พาหมี (Optimization of Extraction conditions for the extraction of Daphnoretin from the Roots of *Linostoma pauciflorum* Griff.)

4.1.1 การหาตัวทำละลายที่เหมาะสม

จากการทดลองเมื่อนำรากพาหมีแห้งน้ำหนัก 50 กรัมโดยประมาณ มาแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในช่วงเวลาที่กำหนด แล้วนำไปประเหยตัวทำละลายออก พบว่าตัวทำละลายที่แยกตะกอนออกได้มากที่สุดคือ เอทานอล และตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดสารแดปโนรีตินออกมาจากรากพาหมีก็คือ เอทานอล เช่นกัน

นอกจากนี้ยังพบว่าตัวทำละลายที่สามารถแยกสารแดปโนรีตินออกมาได้ดีมี 3 ชนิด ได้แก่ เอทิลอะซีเตต เอทานอล และเมทานอล เมื่อพิจารณาระหว่าง เอทานอล กับเมทานอล พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่จากการงานวิจัยนี้เลือกเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมเนื่องจากมีความเป็นพิษน้อยกว่าเมทานอล

4.1.2 การหาสภาวะที่เหมาะสม

เมื่อนำรากพาหมีมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารแดปโนรีตินโดยเปรียบเทียบระหว่างการสกัดอย่างต่อเนื่องด้วยซอล์กเลต (Soxhlet) แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ กับแช่ที่อุณหภูมิห้องเพื่อศึกษาผลอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารแดปโนรีติน จากการทดลองสรุปว่าเวลาที่ใช้ในการสกัดอย่างต่อเนื่อง 3 ชั่วโมง ได้ปริมาณสารแดปโนรีตินออกมามากที่สุด คิดเป็น 0.22% (55.78 mg/25 g x100%) ขณะที่การแช่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วันได้ปริมาณสารแดปโนรีติน 0.11% (58.87mg/50 g x 100%)

4.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคในข้าวของตะกอนที่แยกได้และสารแดปโนรีตินบริสุทธิ์ที่สกัดจากรากพาหมี (Antifungal Activity of the precipitate and pure daphnoretin from the Root extracts of *Linostoma paucifloruum* Griff. against Rice Diseases)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของตะกอนที่แยกได้ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรคในข้าว 5 ชนิด (*Rhizoctonia solani*, *Helminthosporium oryzae*, *Curvularia lunata*, *Fusarium semitectum*, *Alternaria sp.*) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1,000, 2,500 5,000 และ 10,000 ppm พบว่าตะกอนที่แยกได้ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในข้าวทั้ง 5 ชนิดได้ดีที่สุด และมีความแตกต่างระหว่างกันทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ตะกอนที่แยกได้จากรากพาหมี 0 ppm) นอกจากนี้จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารแดปโนรีตินที่สกัดจากรากพาหมี ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรคในข้าว *H. oryzae* โดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0, 5,000, 25,000 และ 50,000 ppm เป็นเวลา 7 วัน พบว่าระดับความเข้มข้นสารแดปโนรีตินสูงขึ้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราเพิ่มขึ้นด้วย โดยที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *H. oryzae* ได้ดีที่สุด คือ 83.50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ที่ระดับความเข้มข้น 25,000 ppm ยับยั้งได้ 50.50 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และยังพบว่า ในทุกระดับความเข้มข้น เชื้อรามีลักษณะเป็นสีขาวอมเทา บริเวณขอบมีลักษณะเป็นสีขาวมองเห็นได้ชัดเจน เมื่อคว่ำจานเพาะเชื้อ จะเห็นเชื้อที่มีลักษณะเป็นสีดำ ส่วนตรงขอบจะมีลักษณะเป็นสีขาวส้มอมครีม และไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ

สรุปได้ว่าตะกอนที่แยกได้จากรากพาหมีและสารแดปโนรีตินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในข้าวทั้ง 5 ชนิด โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *H. oryzae* ได้ดีที่สุด

บรรณานุกรม

Ansari, M. M., 1995. Control of sheath blight of rice by plant extracts. Indian Phytopath. 48(3), 268-270.

Chen, H. C., Chou, C. K., Kuo, Y. H. and Yeh, S. F., 1996. Identification of a protein kinase C (PKC) activator, daphnoretin, that suppresses hepatitis B virus gene expression in human hepatoma cells. Biochemistry Pharmacology. 52(7), 1025-1032.

Handa, S. S., Kinghorn, A. D., Cordell, G. A. and Farmworth, N. R., 1983. Plant anticancer agents XXXVI Constituents of *Peddiea fischeri*. Journal of Natural Products. 46(2), 248-250.

Hu, K., Kobayashi, H., Dong, A. J., Iwasaki, S. G. and Yao, X. S., 2000. Antifungal, antimitotic and anti-HIV-1 agents from the roots of *Wikstroemia indica*. Planta Media. 66(6), 564-567.

International Rice Research Institute., 2002. Standard evaluation system for rice (SES). International Rice Research Institute, November. 56 pp.

Jitendiya Devi, O. and Chhetry, G. K. N., 2013. Evaluation of antifungal properties of certain plants against *Drechslera Oryzae* causing brown leaf spot of rice in Manipur Valley. International Journal of Scientific and Research Publications. 3(5), 2250-3153.

Kabbaj, F.Z., Lai, D. and Meddah, B., 2013. Chemical constituents from aerial parts of *Thymelaealythroides*. Biochemical Systematics and Ecology. 51, 153-155.

Kamalakannan, A., Shanmugam, V., Surendran, M. and Srinivasan, R., 2001. Antifungal properties of plant extracts against *Pyricularia grisea,* the rice blast pathogen. Indian Phytopath. 54 (4), 490-492.

Lee, K. -H., Tagahara, K., Suzuki, H., Wu, R. -Y., Haruna, M. and Hall, I. H., 1981. Antitumor agents. 49. Tricin, kaempferol-3-O-beta-D-glucopyranoside and (+)-nortrachelogenin, antileukemic principles from *Wikstromia* indica. Journal of Natural Products. 44(5), 530-535.

Li, S. -S., Gao, Z., Feng, X. and Hech, S. M., 2004. Biscoumarin derivatives from *Edgeworthia gardneri* that Inhibit the lyase activity of DNA polymerase. Journal of Natural Products. 67, 1608-1610.

Lu, C. -L., Li, Y. -M., Fu, G .-Q., Jiang, J. -G., Zhu, L., Lin, F. -L., Chen, J., Lin, Q. -S., 2011. Extraction optimization of daphnoretin from root bark of *Wikstroemia indica* (L.) C.A. and its anti-tumour activity tests. Food chemistry. 124, 1500-1506.

Lu, C. -L., Zhu, L., Piao J. -H. and Jiang, J. -G., 2012. Chemical compositions extracted from *Wikstroemia indica* and their multiple activities. Pharmaceutical Biology. 50(2), 225-231.

Mohamed, A.K., Nagwa, E. S. and Thomas, S. W., 1998. Inhibition of oncogene product enzyme activity as an approach to cancer chemoprevention Tyrosine specific protein kinase inhibition by daphnoretin from *Thymelaea hirsuta* root. Phytotherapy Research. 12(4), 282-284.

Mohana, D. C. and Raveesha, K. A., 2007. Anti-fungal evaluation of some plant extracts against some plant pathogenic fields and storage fungi. Journal of Agricultural technology. 4(1), 119-137.

Navarat, T., Pyne, S. G., Prawat, U. and Tuntiwachwuttikul, P., 2011. Isolation of linobiflavonoid, a novel biflavonoid from *Linostoma pauciflorum* Griff. Phytochemistry Letters. 4, 383-385.

Ou, S. H. (Eds.). (1985). Rice Diseases. 2nd edition. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey.

Pan, L., Zhang, X. F., Deng, Y., Zhou, Y., Wang, H. and Ding, L. S., 2010. Chemical constituents investigation of *Daphne tangutica*. Fitoterapia. 81, 38-41.

Pan, T. -L., Wang, P. -W., Aljuffali, I. A., Leu, Y. -L., Hung, Y. -Y. and Fang, J. -Y., 2014.Coumarin derivatives, but not coumarin itself, cause skin irritation via topical delivery. Toxicology Letters. 226, 173-181.

Pan, X., Zhining, X. and Yexin, L., 2012. Chemical constituents from *Edgeworthia gardneri* (Thymelaeaceae). Biochemical Systematics and Ecology. 45, 148-150.

Peterson, B. (1997). Thymelaeaceae. In Flora of Thailand Vol. 6(3): 234-238.

Thingujam, N. R. and Chhetry, G. K. N., 2002. Effect of plant extracts and foliar fungicides on blast and Brown leaf spot disease of upland rice cultivation under Jhumland ecosystem in Manipur Hills. Journal of Basic and Applied Mycology. 1(2), 205-208.

Upho, U. 2005. Ethnobotany of Buddhist and muslim Thasis in some locations in the lower part of Southern Thailand. Ph.D. Thesis, Chiang Mai University, Thailand.

Wang, L. Y., Unehara, N., and Kitanaka, S., 2005. Lignans from the roots of *Wikstroemia indica* and their DPPH radical scavenging and nitric oxide inhibitory activities. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 53(10), 1348-1351.

Yang, Z. –Y., Kan, J.-T., Cheng, Z. –Y., Wang, X. –L., Zhu, Y. –Z. and Guo, W. 2014. Daphnoretin-induced apoptosis in HeLa cells: a possible mitochondria-dependent pathway. Cytotechnology. 66(1); 51-61.

ชนสิริน กลิ่นมณี และเสาวนีย์ ศรีบัว. ม.ป.ป. การใช้สารสกัดจากพืชในการควบคุมโรคไหม้และโรคขอบใบแห้งข้าว. ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง อำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง.

ธวัชชัย ปฏิรูปานุสร. 2541. ผลของสารสกัดจากพืชบางชนิดต่อโรคข้าวที่สำคัญ. หน้า 77-99. *ใน*: รายงานประจำปี 2541. สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

นิตยา สายคุณากร. 2532. การศึกษาโรคราที่ช่อดอกของข้าวฟ่างซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Curvularia lunata*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. 70 หน้า.

รังสี เจริญสถาพร. 2547. วิจัยและพัฒนาสารสกัดพืชเพื่อควบคุมโรคพืช. หน้า 89. *ใน*:รายงานผลงานวิจัยโครงการวิจัยปี 2548 (ต.ค.2547-ก.ย.2548) เล่มที่ 2. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. ม.ป.ป. โรคข้าวที่สำคัญในประเทศไทยและการป้องกันกำจัด. กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (http://www.ricethailand.go.th)

วันทนา ศรีรัตนศักดิ์. 2552. โรคข้าวที่สำคัญในประเทศไทยและการป้องกันกำจัด. (Online Available) http://www.brrd.in.th/library/document/E-book/brrd5203005c1.pdf

วิทูร คลี่บำรุง. 2556. โรคนาข้าว 2. (Online Available) http://yangpara.igetweb.com/index.php?mo=3&art=42073163

ศานิต สวัสดิกาญจน์. 2555. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืช 10 ชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia lunata* สาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าว. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา.

ศานิต สวัสดิกาญจน์ ผกามาศ แก่นวิจิตร และมานะ จอมไกร. 2557. ประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์บางชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. สาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าว. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา.

สุวพงษ์ สวัสดิ์พาณิชย์. 2542. พืชเศรษฐกิจ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ภาคผนวก

ประกอบด้วย

1. รายงานสรุปการเงิน
2. ประวัตินักวิจัยและคณะ
3. ข้อมูล IR และ NMR ของสารแดปโนรีติน
4. ข้อมูลภาพสารตะกอนที่แยกได้จากตัวทำละลายต่าง ๆ
5. ข้อมูลการเผยแพร่ผลงานในสิ่งพิมพ์ต่าง ๆ

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY