

รหัสโครงการ (FF3-303-65-12-99(22))



รายงานการวิจัย

การพัฒนา nano-elicitor เพื่อแก้ปัญหาโรคโคนเน่าหัวเน่าและใบด่าง
(Development of Nano-elicitor to Control Cassava Root Rot and
Mosaic Virus Disease)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การพัฒนา nano-elicitor เพื่อแก้ปัญหาโรคโคนเน่าหัวเน่าและใบต่าง (Development of Nano-elicitor to Control Cassava Root Rot and Mosaic Virus Disease)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กำไร เบือนสันเทียะ

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ดร. กาญจนา ธรรมนุ

ดร.สุพัชรี ศิริวงศ์

ดร.วรรณพร เทพบัณฑิต

นางสาวกชพร ต้นโพธิ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2565

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม 2566

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำและให้ความช่วยเหลือทางด้านวิชาการ และการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี อันได้แก่

ดร. กาญจนา ธรรมนุ ผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่ร่วมวิจัย คอยดูแลและให้คำแนะนำ ตรวจสอบ ติดตามงานอย่างสม่ำเสมอ

ดร.สุพัชรี ศิริวงศ์ ผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่ร่วมวิจัย คอยดูแลและให้คำแนะนำ ตรวจสอบ ติดตามงานอย่างสม่ำเสมอ

ดร.วรรณพร เทพบัณฑิต ผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่ร่วมวิจัย ดูแลและติดตามงาน และช่วยตรวจแก้ไขโครงการวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

นางสาวกชพร ต้นโพธิ์ ผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่ร่วมวิจัย อำนวยความสะดวก ติดต่อประสานงานอย่างเต็มความสามารถ และช่วยให้งานสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป ที่ให้ความช่วยเหลือด้าน การประสานงาน และเตรียมเอกสารต่างๆ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กำไร เป็อนสันเทียะ
หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนานาโนอิลิซิเตอร์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง โดยได้คัดเลือกอนุภาคซิลเวอร์นาโนชีวภาพจากโครงการพัฒนานาโนอิลิซิเตอร์ปัจจัยการผลิตสำหรับการจัดการแบบผสมผสานเพื่อแก้ปัญหาโรคโคนเน่าหัวเน่าและสุขภาพมันสำปะหลังในจังหวัดนครราชสีมา ของปี 2564 เพื่อใช้ในการควบคุมโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง จากการคัดเลือกพบว่า น้ำเลี้ยงเซลล์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สามารถริตวิซให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนได้ดีที่สุดโดยเปลี่ยนสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต จากสีใสเป็นสีเหลืองและสีน้ำตาลเข้มเมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงดัชนีความรุนแรงของโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง น้อยที่สุดเท่ากับ 35.00 % ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ได้ถึง 75.00 % ต่อมาได้ศึกษาประสิทธิภาพของซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการกระตุ้นความต้านทานให้มันสำปะหลังเกิดความต้านทานต่อโรคโคนเน่าหัวเน่าระดับเรือนทดลอง โดยการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน IAA Salicylic acid และ phenolic compound พบว่า กรรมวิธีที่ใช้ซิลเวอร์นาโน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และซีเอ็มอาร์ 89 มีปริมาณ IAA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 20.70 และ 22.80 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Salicylic acid ที่พบว่า ที่ 24 ชั่วโมงหลังการใช้ซิลเวอร์นาโน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และซีเอ็มอาร์ 89 มีปริมาณ Salicylic acid compound ในใบมันสำปะหลัง เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 25.26 และ 42.12% ตามลำดับ และซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพยังส่งผลให้มันสำปะหลังมีปริมาณสาร phenolic compound ที่ 24 ชั่วโมงหลังฉีดพ่นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยในมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 ที่ใช้ซิลเวอร์นาโน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณสาร phenolic compound เพิ่มขึ้น 30.44 % ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรดซาลิไซลิก นอกจากนี้การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีพืชด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy พบว่า อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ที่ได้นั้นมีผลทำให้ปริมาณของกลุ่มไขมัน กรดไขมัน โปรตีน และเปปไทด์ที่เป็นสายโซ่ของกรดอะมิโน เอไมด์ I และ เอไมด์ II (amide I, amide II) ของพืชเพิ่มขึ้น ในขณะที่กลุ่มของ กรดนิวคลีอิก ฟอสโฟลิปิด โพลีแซ็กคาไรด์ และคาร์โบไฮเดรตลดลง เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์พืชมีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นให้พืชเกิดความแข็งแรง อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้จำเป็นต้องมีการทดสอบผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในหลายพื้นที่ที่แตกต่างกันเพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ใช้เพื่อผลผลิตทางการควบคุมโรคมันสำปะหลังต่อไป

Abstract

The objective of this research was to develop a nano-elicitor to inhibit of fungi that cause cassava root rot by selecting biological silver nanoparticles from the project “Development of Nano-elicitor on Integrated Management of Root Rot and Cassava Plant Health in Farmer Field at Nakhon Ratchasima Province in 2021” for the control of cassava root rot disease. From the selection found that the vitreous of *Trichoderma harzianum* was the best reducing agent for the synthesis of silver nanoparticles by discoloring the silver nitrate solution from clear to yellow and dark brown after 48 hours of incubation using silver nanoparticles at a concentration of 20 mg/l. show the severity index of cassava tuber rot disease. The least equal to 35.00%, which is statistically significantly different from the control process up to 75.00%. Later, the efficacy of biological silver nanoparticles in inducing resistance to cassava root rot disease was studied at the greenhouse level. By analyzing the amount of hormone IAA, Salicylic acid and phenolic compound, it was found that the treatment used 20 mg of nano silver per liter. cassava varieties Rayong 72 and CMR 89 significantly increased the IAA content of 20.70 and 22.80 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ of fresh weight, respectively. Similarly, the change in salicylic acid content was found that at 24 hours after taking 20 mg/l of nano silver, the cassava varieties Rayong 72 and CMR 89 contained salicylic acid compound in cassava leaves. Significantly increased by 25.26 and 42.12% respectively, and biological nano silver also resulted in a significant increase in the phenolic compound content of cassava at 24 hours after spraying. In the Rayong 72 cultivar that used 20 mg/l nano silver, the content of phenolic compound increased by 30.44%, which was significantly different from the control treatment. but not statistically different when compared with salicylic acid. In addition, synchrotron FT-IR microspectroscopy analysis of plant biochemical changes showed that the synthesized silver nanoparticles significantly increased the amounts of lipids, fatty acids, proteins and amino acid chain peptides. amide I and amide II (amide I, amide II) of plants increased while the group of nucleic acids, phospholipids, polysaccharides and reduced carbohydrates. Due to changes in biomolecules within plant cells, it affects growth promotion and stimulates plant strength. However, this research is necessary to test the effect of biological silver nanoparticles in controlling the growth of plant pathogenic fungi in different areas in order to be applied as a cassava disease control product in the future.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ความสำคัญของมันสำปะหลัง.....	3
2.2 การปลูกมันสำปะหลัง.....	4
2.3 โรโคโคน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง.....	5
2.4 แนวทางการแก้ปัญหาและควบคุมโรโคโคน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง.....	8
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การคัดเลือกเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรโคโคน่ามันสำปะหลัง และการเตรียมเชื้อสาเหตุโรค... ..	16
3.2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไตรโคโคเดอร์มา และบาซิลลัสจากดิน.....	16
3.3 การคัดเลือก supernatant ของน้ำเลี้ยงเซลล์ของไตรโคโคเดอร์มา และบาซิลลัสจากดิน.....	16
3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพีช.....	16
3.5 การศึกษาขนาดรูปร่างและองค์ประกอบของธาตุบนพื้นผิวของผลึกอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ.....	17
3.6 ทดสอบประสิทธิภาพของนาโนอิลซิเตอร์เพื่อแก้ปัญหาโรโคโคน่าหัวเน่ามันสำปะหลังในสภาพเรือนทดลอง.....	18
3.7 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบชีวเคมีภายในเซลล์พีชด้วยเทคนิค	

Synchrotron FT-IR microspectroscopy	18
3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	18
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพด้วยไตรโคเดอร์มา และบาซิลลัส จากดิน.....	19
4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมโรค มันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรค <i>Fusarium solani</i>	20
4.3 ศึกษากลไกอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการกระตุ้นความต้านทาน มันสำปะหลังระดับเรือนทดลอง.....	21
4.4 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบชีวเคมีภายในเซลล์พืชด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy	24
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	27
บรรณานุกรม	31
ภาคผนวก	40
ประวัติผู้วิจัย	42

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการลดความรุนแรงของโรคโคนเน่าหัวเน่าในมันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 72 และ ซีเอ็มอาร์ 89 ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรค <i>Fusarium solani</i>	21
4.2 ประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณ IAA ในใบมันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 72 และ ซีเอ็มอาร์ 89.....	22
4.3 ประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณ Salicylic acid ในใบมันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 72 และ ซีเอ็มอาร์ 89.....	23
4.4 ประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณ phenolic compound ในใบมันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 72 และ ซีเอ็มอาร์ 89.....	24

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.3.1 แสดงลักษณะอาการของโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง (Root rot diseases) เกิดจากเชื้อรา <i>Lasiodiplodia</i> spp. และ <i>Fusarium</i> sp.	5
4.1 อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i>	19
4.2 การตรวจสอบอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อของ <i>T. harzianum</i> โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)	20
4.3 การวิเคราะห์ Principle component analysis (PCA) ของเนื้อเยื่อใบมันสำปะหลังชั้น mesophyll (A), Loading แสดงค่าสเปกตรัมที่ใช้แยกความแตกต่างทางชีวเคมีของเนื้อเยื่อใบมันสำปะหลังชั้น mesophyll โดยซิลเวอร์นาโนเปรียบเทียบกับกรดซาลิไซลิก และน้ำกลั่น(กรรมวิธีควบคุม) (B) และแสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (Average 2nd derivative FTIR spectrum) ของสารชีวโมเลกุลในเนื้อเยื่อ ใบมันสำปะหลังชั้น mesophyll ในช่วงความถี่ 3000–2800 cm ⁻¹ and 1800–900 cm ⁻¹	25

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตมันสำปะหลังอันดับ 2 ของโลก มีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 8.6 ล้านไร่ จำนวน 523,589 ครัวเรือน ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 30 ล้านตันต่อปี คิดเป็นร้อยละ 9 ของผลผลิตทั่วโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2562) คิดเป็นมูลค่าประมาณแสนล้านบาทต่อปี ในช่วงระหว่างปี 2553 – 2558 ผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังราคาอยู่ในเกณฑ์ดีมาอย่างต่อเนื่อง ราคาหัวมันสดเฉลี่ย 2.19 บาท/กก. มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยเนื่องจากปลูกง่าย ทนทานต่อความแห้งแล้ง ดูแลรักษาง่าย และมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น มันสำปะหลังเป็นพืชที่มีศัตรูพืชรบกวนน้อย แต่ในปี พ.ศ. 2556 พบการระบาดของโรคโคนเน่าหัวเน่าในหลายพื้นที่ โรคนี้มีเชื้อสาเหตุหลายชนิด ได้แก่ เชื้อรา 36 ชนิด และ แบคทีเรีย 4 ชนิด (อรุณี วงษ์กอบรัชฎ์, 2547) จากการวิจัยพบว่า เชื้อสาเหตุสำคัญ คือ *Lasiodiplodia*, *Fusarium* และ *Phytophthora* ซึ่งสามารถทำความเสียหายได้มากกว่า 80% และนอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2562 พบโรคใบด่างมันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง จากการวิจัยพบว่า เชื้อสาเหตุสำคัญ คือ Cassava mosaic virus เป็นโรคที่มีความสำคัญ ก่อให้ผลผลิตเสียหาย 80–100 เปอร์เซ็นต์ เกษตรกรไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ รายงานล่าสุดพบการระบาดใน 15 จังหวัด ได้แก่ อุบลราชธานี, ศรีสะเกษ, สุรินทร์, บุรีรัมย์, นครราชสีมา, ปราจีนบุรี, ฉะเชิงเทรา, ชลบุรี, กาญจนบุรี, สระแก้ว, ระยอง, นครสวรรค์, ลพบุรี, ขอนแก่น และมหาสารคาม คิดเป็นพื้นที่ 55,924 ไร่ ได้ทำลายต้นมันสำปะหลังที่เป็นโรคไปแล้ว 13,111 ไร่ ซึ่งจังหวัดที่พบการระบาดเพิ่มขึ้น มีสาเหตุมาจากการใช้ท่อนพันธุ์ติดโรคที่มาจากแหล่งระบาดของโรค ทำให้เกิดการสูญเสียผลผลิตทางการเกษตรไปอย่างมหาศาล จึงถือเป็นปัญหาใหญ่ของเกษตรกรไทยที่ต้องได้รับการแก้ไขอย่างเร่งด่วน แนวทางการแก้ไขปัญหาโรสดังกล่าวมีด้วยกันหลายวิธี เช่น การใช้พันธุ์ต้านทาน การใช้ท่อนพันธุ์ปลอดโรค การจัดการภายในแปลง และการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดซึ่งเป็นวิธีการจัดการแบบดั้งเดิม ในปัจจุบันความก้าวหน้าทางด้านนาโนเทคโนโลยีเข้ามามีบทบาทสำคัญในทางการเกษตรอย่างมากตั้งแต่ในกระบวนการผลิตในแปลงไปจนถึงการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวและการแปรรูปหรือการเพิ่มมูลค่า เช่น การเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยการนำฟางข้าวมาย่อยสลายให้มีขนาดเล็กลงจนเป็นอนุภาคนาโน การพัฒนาปุ๋ยอินทรีย์เคมีนาโนอัดเม็ดแบบละลายช้า โดยจะค่อย ๆ ปลดปล่อยธาตุอาหารที่พืชต้องการออกมาอย่างช้า ๆ อย่างต่อเนื่อง การปรับปรุงคุณภาพของอาหารเสริมพืชในระดับนาโน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมของพืชให้ได้รับสารอาหารอย่างเต็มที่ สร้างภูมิคุ้มกันให้ปลอดภัยจากโรค พืชสามารถเจริญเติบโตได้ดี และให้ผลผลิตได้อย่างเต็มที่ ดังนั้นการประยุกต์ใช้นาโนเทคโนโลยีจึงเป็นทางเลือกใหม่ในแก้ปัญหาโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ปัจจุบันนาโนเทคโนโลยีของโลกเป็นที่สนใจเนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับสารชนิดเดียวกันที่มีขนาดใหญ่ ขนาดของอนุภาคนาโนที่นำไปประยุกต์ใช้ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 1–100 นาโนเมตร ซึ่งเป็น

ระดับขนาดที่มีความน่าสนใจทางนาโนเทคโนโลยีเป็นอย่างมาก และมีโลหะมากมายที่นำมาสังเคราะห์ให้มีขนาดระดับนาโนเพื่อการนำไปประยุกต์ใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่น โลหะเงิน (Silver, Ag) โลหะทอง (Gold, Au) โลหะทองแดง (Copper, Cu) เป็นต้น หนึ่งในอนุภาคนาโนที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบันคืออนุภาคเงินนาโน เนื่องจากมีสมบัติที่พิเศษคือ สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นจึงถูกนำไปใช้ร่วมกับผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับสินค้า เช่น เสื้อผ้า ระบบกรองน้ำ เครื่องมือทางการแพทย์ เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ภายในครัวเรือน สิ่งแวดล้อม และการเกษตร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรและศึกษาการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคมันสำปะหลังเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์นาโนอิลิซิเตอร์จากอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพสำหรับควบคุมเชื้อสาเหตุโรคโคนเน่าหัวเน่าและสุขภาพมันสำปะหลังในจังหวัดนครราชสีมา

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนานาโนอิลิซิเตอร์ปัจจัยการผลิตสำหรับการจัดการแบบผสมผสานเพื่อแก้ปัญหาโรคโคนเน่าหัวเน่าและสุขภาพมันสำปะหลัง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยและพัฒนานี้เป็นการสรรค์สร้างนวัตกรรมด้านการจัดการโรคมันสำปะหลังที่เหมาะสมสำหรับอุตสาหกรรมมันสำปะหลังเพื่อยกระดับรายได้เกษตรกรชุมชนและผู้ประกอบการนวัตกรรมในท้องถิ่น โดยห้องปฏิบัติการโรคพืชและชีวภัณฑ์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี มีบุคลากรที่มีความรู้ความสามารถในด้านต่าง ๆ อีกทั้งยังมีประสบการณ์ในการทำงานวิจัยทั้งในห้องปฏิบัติการ เรือนทดลอง หรือแปลงทดสอบจริงของเกษตรกร รวมถึงการเผยแพร่องค์ความรู้ด้านเทคโนโลยีการเกษตรให้แก่เกษตรกรผู้มีความสนใจ ทำให้การทำงานในแต่ละโครงการย่อมมีศักยภาพมากขึ้น และอยู่ภายใต้จุดมุ่งหมายของแผนงานเดียวกัน โดยแผนงานนี้จะเป็นการพัฒนางานวิจัยด้านการจัดการโรคมันสำปะหลังที่จะนำไปสู่การถ่ายทอดเทคโนโลยีและนวัตกรรมสู่ผู้ประกอบการ IDE ในท้องถิ่น

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ต้นแบบผลิตภัณฑ์นาโนอิลิซิเตอร์ที่มีผลต่อการป้องกันและควบคุมโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง 1 ต้นแบบ
2. องค์ความรู้และเทคโนโลยีการพัฒนาและผลิตนาโนอิลิซิเตอร์ อย่างน้อย 1 ต้นแบบ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของมันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง *Manihot esculenta* Crantz. เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากมีพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังเป็นอันดับที่ 3 ของโลกรองจากประเทศไนจีเรียและบราซิล นอกจากนั้นประเทศไทยยังเป็นผู้ส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังเป็นอันดับหนึ่งของโลก สร้างรายได้เข้าประเทศมากกว่าปีละ 3 หมื่นล้านบาท เนื่องจากมันสำปะหลังเป็นพืชที่ปลูกง่ายมีปัญหาในการผลิตน้อย ปรับตัวได้ดีในเกือบทุกสภาพพื้นที่ แม้จะมีปัญหาด้านโรคและแมลง หัวสดมีตลาดรองรับแน่นอน การขุดเก็บเกี่ยวไม่ขึ้นกับฤดูกาลสามารถจะชะลอการเก็บเกี่ยวได้ ทนต่อความแห้งแล้งเมื่อเปรียบเทียบกับพืชไร่ชนิดอื่น หลังจากปลูกไปแล้วประมาณ 1-2 เดือนแม้จะไม่ได้ได้รับความชื้นเลยเป็นเวลา 3-4 เดือนมันสำปะหลังยังสามารถเจริญเติบโต และให้ผลผลิตได้เมื่อได้รับความชื้นจากฝนอีกครั้ง จากการสำรวจการปลูกมันสำปะหลังประจำปี 2560 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง 8,918,392 ไร่ ผลผลิตต่อไร่ 3,419 ตัน ผลผลิตรวม 30,495,190 ตัน เปรียบเทียบกับปี 2562 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง 8,823,412 ไร่ ผลผลิตต่อไร่ 3,522 ตัน ผลผลิตรวม 31,079,966 ตัน พื้นที่เก็บเกี่ยวเพิ่มขึ้น 1.41% ผลผลิตต่อไร่เพิ่มขึ้น 2.58 % และผลผลิตรวมเพิ่มขึ้น 4.97% (ศูนย์ส่งเสริมพัฒนาการผลิตมันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2562) ในปี พ.ศ. 2564 ประเทศไทยมีเนื้อที่ปลูกมันสำปะหลัง 10.91 ล้านไร่ และมีผลผลิตประมาณ 35.09 ล้านตัน (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2564) แต่การเพิ่มผลผลิตโดยรวมของประเทศมาจากการขยายพื้นที่ปลูกเพิ่มมากขึ้นมากกว่าเพิ่มผลผลิตต่อไร่ มันสำปะหลังจึงเป็นพืชเศรษฐกิจที่จะต้องมีการพัฒนาและส่งเสริมและถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตสู่เกษตรกรให้สามารถปลูกให้มีผลผลิตหัวสดต่อไร่สูงขึ้นกว่าในปัจจุบันและลดต้นทุนการผลิตให้เกษตรกรมีผลตอบแทนสูงขึ้น เนื่องจากใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่อเนื่องได้หลากหลาย โดยความต้องการใช้ภายในประเทศมีประมาณร้อยละ 20 ที่เหลือร้อยละ 80 เป็นการส่งออก (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2559) ถึงแม้ว่าประเทศไทยจะสามารถผลิตมันสำปะหลังส่งออกได้มากแต่การเพาะปลูกมันสำปะหลังกลับประสบกับปัญหาของแมลง ศัตรูพืช และปัญหาโรคพืช โดยเฉพาะปัญหาที่เกิดจากโรคพืชสร้างความเสียหายต่อผลผลิตของมันสำปะหลังทั้งในแปลงปลูกมันสำปะหลังและผลผลิตมันสำปะหลังหลังการเก็บเกี่ยวเป็นอย่างมาก โดยโรคมันสำปะหลังที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่ โรคใบด่าง (Cassava Mosaic Disease) โรคใบจุดสีน้ำตาล (Brown leaf spot) โรคใบไหม้ (Cassava bacterial blight, CBB) โรคแอนแทรกโนส (Cassava anthracnose disease, CAD) และโรคโคนเน่าหัวเน่า (Root rot or Tuber rot disease) (รังษิเจริญ สถาพร และอมรรักษ์ คิตใจเดียว, 2553; Banito et al., 2010) โรคต่าง ๆ ส่งผลให้ผลผลิตของมันสำปะหลังลดลงมากถึงร้อยละ 80 ของพื้นที่และส่งผลต่อรายได้ของเกษตรกรผู้ปลูกมันสำปะหลังเป็นอย่างมาก นอกจากนั้นยังส่งผลกระทบต่อภาคอุตสาหกรรมต่างๆ ที่ใช้ผลผลิตของมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ หากจะทำให้ผลผลิตต่อไร่สูงขึ้น จึงจำเป็นต้องหาหนทางในการควบคุมโรคมันสำปะหลังอยู่เสมอ

2.2 การปลูกมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นไม้พุ่มยืนต้นมีอายุอยู่ได้หลายปี การปลูกจะใช้ส่วนของลำต้นตัดเป็นท่อนปักไปในดินตรงบริเวณรอยตัดที่ปักอยู่ในดินจะแตกเป็นรากฝอย หลังจากปลูกได้ประมาณ 2 เดือน รากจะค่อย ๆ สะสมแป้ง และมีขนาดโตขึ้นเรียกว่า หัวมันและจะสามารถเก็บเกี่ยวหัวมันได้หลังจาก 6 เดือน ผ่านไปแล้วโดยจะยืดอายุเก็บเกี่ยวไปได้ถึง 16 เดือน โดยส่วนตาที่อยู่ด้านข้างท่อนมันจะเจริญเติบโตออกมาเป็นลำต้นต่อไป (दनัย ศุภภาพร, 2537) โดยแหล่งที่ปลูกมันสำปะหลังมากที่สุดอยู่ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากเป็นพืชที่สามารถปลูกได้ตลอดปี สามารถปลูกได้ในดินแทบทุกชนิด แต่จะเจริญได้ดีในดินร่วนปนทราย ไม่มีน้ำขัง เกษตรกรนิยมปลูกในช่วงต้นฤดูฝนคือ ประมาณเดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม เพิ่มอีก 20 เปอร์เซ็นต์ ปลูกในช่วงฤดูแล้ง ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายนถึงกุมภาพันธ์ ส่วนที่เหลือ 13 เปอร์เซ็นต์ จะปลูกในช่วงเดือนมิถุนายนถึงตุลาคม สำหรับการปลูกในช่วงต้นฤดูฝนนี้ ผลผลิตหัวสดที่ได้จะสูงกว่า การปลูกในช่วงอื่น แต่ในดินที่มีลักษณะเนื้อดินค่อนข้างหยาบ การปลูกในช่วงฤดูแล้งจะให้ผลผลิตสูงที่สุด ดังนั้นในการตัดสินใจเลือกช่วงการปลูกมันสำปะหลังที่เหมาะสม จึงต้องพิจารณาทั้งปริมาณน้ำฝน และลักษณะของดิน (จำลอง เจียมจันรรจา, 2541) การปลูกมันสำปะหลังมีด้วยกัน 2 วิธี ได้แก่ การปลูกแบบนอนและแบบปัก (สมพงษ์ กาทอง, 2537; โสภณ สันธูประมา, 2526; ศานิต สวัสดิ์กาญจน์, 2557) 1) การปลูกแบบนอน เป็นวิธีการที่นิยมปลูกกันมากในอดีต แต่ปัจจุบันนิยมปลูกกันน้อยมากเนื่องจากมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ท่อนพันธุ์มีการเจริญเติบโตช้า วัชพืชงอกเร็วกว่าท่อนพันธุ์ ทำให้กำจัดวัชพืชยาก และจำนวนต้นรอดต้นตาย และจำนวนต้นที่เก็บเกี่ยวค่อนข้างต่ำ แต่การปลูกแบบวางนอนมีข้อดี คือ ไม่ต้องระวังเรื่องการปลูกสลับข้าว โดยมีจำนวนต้นรอดตาย 1,461 ต้น/ไร่ และมีจำนวนต้นเก็บเกี่ยว 1,624 ต้น/ไร่ ในขณะที่การปลูกแบบปัก มีจำนวนต้นรอดต้นตายอยู่ในช่วง 1,919-2,087 ต้น/ไร่ และมีจำนวนต้นเก็บเกี่ยว 2,092-2,235 ต้น/ไร่ (สมพงษ์ กาทอง, 2537; ศานิต สวัสดิ์กาญจน์, 2557) 2) การปลูกแบบปัก เป็นวิธีที่นิยมปลูกในปัจจุบัน วิธีการนี้ทำให้ระยะปลูกมีความถูกต้อง แม่นยำ และใกล้เคียงตามคำแนะนำในการปลูกของกรมวิชาการเกษตร การปลูกแบบปักมีข้อดี ได้แก่ ต้นมันสำปะหลังงอกได้เร็ว สะดวกต่อการกำจัดวัชพืชและการปลูกซ่อม และให้ผลผลิตสูงกว่าการปลูกแบบวางนอนถึง 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การปลูกแบบปักยังมีเปอร์เซ็นต์แป้งและเปอร์เซ็นต์มันแห้งสูงกว่าการปลูกแบบนอนด้วย (สมพงษ์ กาทอง, 2537; ศานิต สวัสดิ์กาญจน์, 2557) โดยใช้ระยะปลูก 1x1 เมตร ปักท่อนพันธุ์ให้ตั้งตรงลึกในดินประมาณ 10 เซนติเมตร ใช้ท่อนพันธุ์มันที่สดอายุ 10-12 เดือน ตัดทิ้งไว้ไม่เกิน 15 วันโดยแต่ละท่อนมีความยาวประมาณ 20 เซนติเมตร (ฐิติมา วีระศิลป์, 2542; ยุกติ สาริกะภูติ, 2526) โดยพันธุ์ที่นิยมปลูกในปัจจุบันได้แก่ พันธุ์มันสำปะหลังของกรมวิชาการเกษตร มีทั้งหมด 9 พันธุ์ คือ ระยะเวลา 1 ระยะเวลา 3 ระยะเวลา 60 ระยะเวลา 90 ระยะเวลา 5 ระยะเวลา 72 ระยะเวลา 7 ระยะเวลา 9 และระยะเวลา 11 พันธุ์มันสำปะหลังของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์มี 3 พันธุ์ คือ เกษตรศาสตร์ 50 หัวยบ 60 และหัวยบ 80 และในปัจจุบันได้มีการพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังสายพันธุ์ใหม่ขึ้นมาหลายสายพันธุ์ เช่น พันธุ์เกล็ดมังกรจัมโบ้ และใจแอนท์ พัฒนาพันธุ์โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ ระยะเวลา 3 ระยะเวลา 5 ระยะเวลา 7 ระยะเวลา 9 และระยะเวลา 11 พันธุ์มันสำปะหลังของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ศูนย์ส่งเสริมพัฒนาการผลิตมันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2553) มันสำปะหลังสำหรับ

รับประทานมี 3 พันธุ์คือ มันสำปะหลังพันธุ์ห่านาที่ พันธุ์พิจิตร2 และพันธุ์พิจิตร4 เป็นต้น แต่ในสภาพการปลูกทั่วไป ในช่วง 3-4 ปี ที่ผ่านมามันสำปะหลังมักประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคและแมลงศัตรูพืชเข้าทำลายโดยแมลงศัตรูที่เข้าทำลายมันสำปะหลังที่สำคัญได้แก่ เพลี้ยแป้ง และไรแดง เป็นต้น ส่วนโรคที่พบได้แก่ โรคใบไหม้ โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคแอนแทรกโนส โรคลำต้นเน่า และโรคโคนเน่าหัวเน่า เป็นต้น

2.3 โรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง

โรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง มีรายงานว่าเกิดจากเชื้อราใน Family Botryosphaeriaceae โดยมีเชื้อราสกุลสำคัญที่เข้าทำลาย คือ สกุล *Lasiodiplodia* หัวมันสำปะหลังมีอาการหัวเน่าสีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งมีทั้งอาการเน่าแห้ง เน่าและ เนื้อเยื่อบริเวณหัวมันสำปะหลังเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีเหลือง น้ำตาล เทา และดำ ถ้าเกิดกับหัวจะทำให้หัวเน่าอย่างรวดเร็ว และมีกลิ่นเหม็น ใบเหี่ยวแล้วร่วง ถ้าเกิดรุนแรงต้นจะตาย บริเวณโคนต้นที่ติดอยู่กับผิวดินพบเม็ด pycnidia สีดำนูนหรือน้ำตาลดำกระจายรอบโคนต้นหรือบริเวณท่อนพันธุ์เดิม

2.3.1 ลักษณะอาการของโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง

โรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง (Root rot disease) เกิดจากเชื้อราหลายชนิด โดยเชื้อราที่สร้างความเสียหายเป็นอย่างมาก คือ เชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. และ *Fusarium* sp. ก่อให้เกิดกับหัวหรือรากมันสำปะหลัง เชื้อราตกค้างในไร่ ระบบท่อลำเลียงเน่ากลายเป็นสีดำโดยจะลุกลามจากแผลรอยตัดของท่อนพันธุ์หรือลำต้นที่เป็นแผล ทำให้เปลือกบวมเน่าเป็นสีน้ำตาลดำ มีกลุ่มเม็ดพิกนิตีเดีย (Pycnidia) ของเชื้อราขึ้นบนเปลือกแล้วจะแห้งตาย (กลุ่มอนุรักษน้ำ และดิน, 2545) และพบในระยะกล้าและระยะลงหัวแล้ว มีอาการหัวเน่าและมีกลิ่นเหม็นต้นเหี่ยว ใบร่วง อาจพบเส้นใยเชื้อราสีขาวคล้ายเส้นด้ายและเห็ดเจริญปกคลุมบริเวณโคนต้น



ภาพที่ 2.3.1 แสดงลักษณะอาการของโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง (Root rot disease) เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. และ *Fusarium* sp.

2.3.2 เชื้อสาเหตุโรคโคนเน่าหัวเน่า เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp.

ข้อมูลทั่วไปของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp.

เชื้อรา *L. theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl (syn. *Botryodiplodia theobromae* Pat.) เป็นเชื้อราที่มีความซับซ้อนในการตั้งชื่อ และมีชื่อเรียกได้หลายชื่อเนื่องจากมีรูปร่างได้หลายแบบ (Pleomorphism) สามารถก่อให้เกิดโรคในพืชได้หลายชนิดกระจายทั่วไปในเขตร้อน ในปัจจุบันการจัดลำดับชั้นทางอนุกรมวิธานของเชื้อราชนิดนี้ยังอ้างอิงตามรูปแบบของ Sutton (1980) และ Barnett and Hunter (1987) เดิมเชื้อรา *L. theobromae* ถูกจัดให้อยู่ใน Subdivision Ascomycotina, Class Ascomycetes, Order Pleosporales, Family Botryosphaeriaceae และ Genus Botryosphaeria โดยมีรายงานที่อ้างถึง teleomorph state ของเชื้อ *L. theobromae* โดยเรียกชื่อว่า *Botryosphaeria rhodina* ในปี 1867 Curtis (Berk and Curtis, 1867) ได้ทดลองแยกเชื้อ type material ของเชื้อรา *Physalospora rhodina* จากต้น *Rosa rubiginosa* และระบุว่าเป็นเชื้อราชื่อ *Sphaeria rhodina* B.&C. พร้อมกับได้บันทึกชื่อเชื้อรานี้ไว้ในหนังสือ “Geographical and natural history survey of North Carolina” แต่ไม่ได้ลงรายละเอียดเพิ่มเติมไว้แต่อย่างใด (Alves et al., 2008) ต่อมาภายหลัง Cooke ได้ให้คำนิยามอย่างเป็นทางการของเชื้อราเดียวกันนี้ ไว้ในชื่อ *P. rhodina* โดยอ้างอิงจากงานของ Berk and Curtis (1867) เนื่องจาก Cooke เป็นบุคคลแรกที่ได้ให้คำนิยามของราชนิดนี้ตั้งนั้นในการอ้างอิงถึงราชนิดนี้ในชื่อ *P. rhodina* จึงอ้างถึงภายใต้ชื่อของ Cooke (Cooke et al, 2006; Berk and Curtis, 1867) แต่เพียงผู้เดียว ต่อมาในปี 1970 von Arx (Von Arx, 1970) ได้จัดให้เชื้อราชนิดนี้ อยู่ใน Genus *Botryosphaeria* ดังนั้นเชื้อรานี้ จึงได้รับการเปลี่ยนชื่อเป็น *B. rhodina* นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของระยะ anamorph กับ teleomorph ของเชื้อรา *L. theobromae* โดยในปี 1925 Stevens ได้แยก ascospore ของเชื้อราชนิดหนึ่งจาก cotton stems ในรัฐฟลอริดา โดยคาดว่าอาจจะเป็น *P.gossypina* แต่ก็ยังไม่ได้พิสูจน์ให้แน่ชัด และยังได้แยกเชื้อราในกลุ่มเดียวกับ ascomycete จากต้นไม้ใน Genus *Hicoria*, *Ilex*, *Liquidambar*, *Quercus* และ *Vitis* ในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยเชื้อราที่แยกได้จากพืชทุกชนิดที่กล่าวมาสามารถสร้าง conidia ได้จากหนึ่ง ascospore และได้ถูกพิสูจน์ในภายหลังว่านั้นเป็นเชื้อรา *L. theobromae* โดย Stevens (1926) เพราะฉะนั้น Stevens จึงเชื่อว่า *P.gossypina* แท้ที่จริงก็คือเชื้อราชนิดเดียวกันกับ *P.rhodina* ที่ถูกอ้างถึงโดย Cooke นั้นเอง (Stevens, 1926) อย่างไรก็ตาม ไม่ได้มีรายงานมาสนับสนุนงานวิจัยนี้ เพิ่มเติมแต่อย่างใด ต่อมาในปี เดียวกัน Stevens ได้ศึกษาในระยะ perfect state ของเชื้อราชนิดหนึ่งซึ่งก่อให้เกิดโรค stem end rot คือ เชื้อรา *Diplodia* sp. ก่อให้เกิดโรคในพืชตระกูลส้ม และได้ระบุว่าเป็นเชื้อราใน Genus *Physalospora* และแยกเชื้อราชนิดเดียวกันได้จากพืชอีกสองชนิดคือ *Persea* และ *Rosa* จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่แยกมาได้ Stevens พบว่า ascospore เดียวของเชื้อราดังกล่าว สามารถสร้าง conidia ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับ conidia ของเชื้อรา *L. theobromae* หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งคือ *D. gossypina* ได้ แต่อย่างไรก็ตามมีเพียงรายงานของ Stevens เท่านั้นที่อ้างถึงระยะ teleomorph ของเชื้อรา *L. theobromae* (กาญจนา นิรภัย และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552; Stevens, 1926)

Lasiodiplodia spp. พบได้ทุกภูมิภาคของโลกโดยพบได้มากที่สุดในเขตร้อนและกึ่งร้อน เช่น กล้วย ลิ้นจี่ เงาะ มะม่วง น้อยหน่า ทุเรียน พืชตระกูลแตง ลำไย ไม้ดอก ไม้ประดับ และไม้ยืนต้น เป็นต้น ทำให้เปลือกผลไม้มีสีน้ำตาลคล้ำ มีของเหลวไหลออกมาเป็นแผล มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว มีเส้นใยของเชื้อราขึ้นปกคลุม ในลำไยจะทำให้ช้ำ ผลเน่าเป็นสีน้ำตาล เนื้อผลมีสีขาวขุ่น นอกจากก่อให้เกิดโรครากเน่าแล้ว ยังเป็นสาเหตุของโรคยอดแห้งตายของสน โรคยางไหลของพืชตระกูลส้ม (กาญจนา นิรัย และ เอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552) โรคหัวเน่าของมันเทศ โรคโคนและรากเน่าของสับดูต้า (Latha et al., 2009; Machado 2012; Machado et al., 2014) นอกจากเชื้อรา *Lasiodiplodia* เป็นเชื้อสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลังแล้ว ยังมีการรายงานว่าเกิดจากเชื้อรา *Scytalidium* sp. ซึ่งเป็นเชื้อราที่อยู่ใน family เดียวกันอีกด้วย (Machado et al., 2014)

2.3.3 เชื้อสาเหตุโรคโคนเน่าหัวเน่า เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* sp.

ข้อมูลทั่วไปของเชื้อรา *Fusarium* sp.

Fusarium เป็นราจัดอยู่ใน subdivision Deuteromycotina, form-class Hyphomycetes, form-order Tuberculariales, form-family Tuberculariaceae *Fusarium* เป็นราอาศัยในดิน พบได้ทั่วไปทุกแห่ง เชื้อรา *Fusarium* สาเหตุโรคพืชเป็นพวกที่เข้าทำลายและทำให้เกิดโรคทางระบบท่อลำเลียงของพืช ทำให้เกิดโรคเน่าในหัว เหง้า และรากพืช และเป็นสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ ซึ่งระบาดทำความเสียหายแก่ พืชไร่ พืชหัว พืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ และไม้ผลทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว โรคสำคัญในต่างประเทศที่เกิดจากรา *Fusarium* และทำความเสียหายมากได้แก่ โรคเหี่ยวในกล้วย (Panama wilt) โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ พริก ปอ (flax) ฝ้าย ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ถั่วลิ้นเต่า หัวหอม มันฝรั่ง กล้วย สม และ แอปเปิล ในประเทศไทยพบราสกุลนี้หลายชนิดกระจายอยู่ทั้งในดินและพืช มากกว่าชนิดอื่นโดยเป็นสาเหตุของโรคในพืชที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ธัญพืชเมืองหนาว ฝ้าย ถั่วลิสง หัวหอม กะหล่ำปลีแตงโม มะเขือเทศ พริก ถั่วฝักยาว และ มันฝรั่ง แต่โรคที่พบบ่อย เชื้อรา *Fusarium* ทำความเสียหายให้กับพืชในประเทศไทยมากที่สุด คือโรคเหี่ยว (Fusarium wilt disease) กับพืชล้มลุกและพืชผักหลาย ๆ ชนิด และโรคผลเน่า (Fusarium fruit rot) ที่ทำการระบาดทำความเสียหายให้กับผลผลิตพืชเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะกับพืชตระกูลแตง ที่มีการขยายพื้นที่ปลูกเพื่อจำหน่ายในประเทศ และส่งออกจำหน่ายยังต่างประเทศในต่างประเทศมีรายงานการเข้าทำลายของเชื้อ *Fusarium* ในพืชตระกูลแตงหลายชนิดด้วยกัน เช่น *F. oxysporum* สาเหตุโรค fusarium wilt นอกจากนั้นยังมีเชื้อ *Fusarium* สาเหตุโรคผลเน่า คือเชื้อรา *F. gramineum corda*, *F. graminearum schwabe*, *F. acuminatum* Ellis & Everh. *Sensu Gordon*, *F. avenaceum* Sacc., *F. culmorum* (W. G. Sm.) Sacc., *F. moniliforme* J. Sheld.

2.3.4 การแพร่ระบาด

การแพร่ระบาดของโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia* และ *Fusarium* มักแพร่ระบาดในระยะ 4 เดือนหลังปลูกจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ต้นมันสำปะหลังจะค่อย ๆ โทมรม แต่ไม่ตาย มีลักษณะ

อาการใบร่วง ต้นแห้ง บริเวณโคนต้นจะแห้ง บางต้นแตกเป็นสีน้ำตาลไหม้ถึงดำ ระบบท่อน้ำท่ออาหารจะเน่า กลายเป็นสีดำโดยจะลุกลามจากแผลรอยตัดของท่อนพันธุ์หรือลำต้นที่เป็นแผล ทำให้เปลือกบวมเน่าเป็นสีน้ำตาลดำ มีกลุ่มเม็ด pycnidia ของเชื้อราขึ้นบนเปลือกแล้วจะแห้งตายบริเวณโคนต้นซึ่งเป็นบาดแผลที่ทำให้เชื้อราตัวอื่นสามารถเข้าทำลายได้ (กลุ่มอนุรักษน้ำ และดิน 2545; Duchanee et al., 2015) ในระยะหลังการเก็บเกี่ยวเชื้อราดังกล่าว สามารถทำให้ก่อให้เกิดโรคหัวเน่าโดยจะมีลักษณะหัวเน่าดำ อีกทั้งเชื้อราดังกล่าวยังเป็น secondary pathogen ที่เข้าทำลายร่วมกับเชื้ออื่นทำให้มีอาการของโรคหัวเน่าในลักษณะต่าง ๆ รุนแรงมากขึ้น (complex disease) (Banito et al., 2010; Bua and Okello, 2011; Buensanteai and Athinuwat, 2012; Machado et al., 2014) แพร่ระบาดโดยเชื้อจะแพร่ไปกับท่อนพันธุ์และเข้าทำลายเมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เชื้อราจะเข้าทางแผลและลุกลามมากขึ้นเมื่อมีความชื้นสูง (กลุ่มอนุรักษน้ำ และดิน 2545; Messiga et al., 2004)

2.4 แนวทางการแก้ปัญหาและควบคุมโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง

โรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia* และ *Fusarium* มีความสามารถในการอยู่รอดได้ดีในดิน และยังเป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยหลายชนิดสามารถควบคุมโรคดังนี้ 1) การเตรียมแปลงปลูกควรจะเป็นดินร่วน มีการระบายน้ำดีไม่ควรเป็นที่เคยมีน้ำท่วมขังหรือใกล้ทางระบายน้ำ หากดินระบายน้ำยาก ควรปลูกโดยวิธียกร่อง ก่อนทำการปลูกควรไถดินและตากแดดไว้ประมาณ 10-15 วัน 2) ทำความสะอาดแปลงก่อนปลูกโดยการทำลายเศษพืชที่เป็นแหล่งเพาะเชื้อโรค 3) คัดเลือกท่อนพันธุ์ที่สมบูรณ์ปราศจากโรคเตรียมท่อนพันธุ์ด้วยความระมัดระวังอย่าให้บอบช้ำ 4) ซุปท่อนพันธุ์ด้วยสารสารเคมี เช่น mancozeb, copper oxychloride (400 ppm) และ captan+carbendazim (2,000 ppm) หรือการแช่ท่อนพันธุ์ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* และ *T.virens* (กลุ่มอนุรักษน้ำ และดิน, 2545) 5) หากพบโรคนี้อะไรมาก่อน หรือที่ดินเป็นที่เปิดป่าใหม่ควรปลูกพืชหมุนเวียนพวกธัญพืชก่อนปลูกมันสำปะหลัง เพื่อลดปริมาณเชื้อโรคนี้อีก 6) หากพบอาการรากเน่าเกินกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ ควรงดปลูกพืชขนาดอย่างน้อย 6 เดือน 7) ถ้าเป็นพื้นที่ระบาดแล้ว ให้เก็บเศษแห้งมันสำปะหลังไปเผาทิ้งให้หมดเนื่องจากเป็นแหล่งเพาะเชื้อโรคที่สามารถอยู่ค้างได้เป็นปีเพื่อเป็นการตัดวงจรการแพร่กระจายเชื้อไม่ให้ลุกลามต่อไป 8) ควรปรับสภาพดินให้มีความเป็นด่างสูงขึ้นโดยใช้ปูนขาว หรือปูนมาร์ล (ชาติชาย ศิริพัฒน์, 2557)

2.4.1 การควบคุมโรคโดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะมีกลไกควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค 4 ลักษณะ

1.การทำลายชีวิต (Antibiosis) เป็นภาวะที่สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งหลังสารเคมีออกมายับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืช

2. การเป็นปรสิต (Parasitism) เป็นภาวะที่สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งแย่งหรือกินอาหารจากสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ยกตัวอย่างเช่น เชื้อรา *Bionectria* sp. และ ไตรโคเดอร์มา ที่สามารถพันรัดเส้นใยของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช และแทงส่วนของเส้นใยเข้าไปภายในและใช้อาหารจากเส้นใยของเชื้อรา ทำให้เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชนั้นไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

3. การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (Induced resistance) โดยจุลินทรีย์มีการสร้างสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น Plant growth promoting rhizobacteria: PGPR หรือกระตุ้นให้พืชมีภูมิคุ้มกันต้านทาน (Induced systemic resistance: ISR)

4. การแข่งขัน (Competition) เป็นภาวะที่สิ่งมีชีวิตสองชนิดอาศัยอยู่ร่วมกันและมีการแข่งขันกันเพื่อใช้ปัจจัยในการดำรงชีวิต สิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการแข่งขันมากกว่าจะเจริญเติบโตได้ดีกว่า ยกตัวอย่างเช่น เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ตอนนี้มีการแนะนำให้ใช้อย่างแพร่หลายในการควบคุมโรคพืช เป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในดิน เนื่องจากสามารถทนทานต่อสารพิษต่างๆ ในดิน เช่น สารกำจัดวัชพืช สารประกอบฟีนอลิก เป็นต้น นอกจากนี้ ไตรโคเดอร์มามีความสามารถเคลื่อนย้ายและดูดซึมธาตุอาหารจากดินได้อย่างดีเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น (Benítez et al., 2004) และยังสามารถทำลายเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้

2.4.1.1 เชื้อรากลุ่มไตรโคเดอร์มา

ไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma* spp.) เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช และสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตให้แก่พืชไตรโคเดอร์มาที่สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายสายพันธุ์ เช่น *Trichoderma harzianum*, *T. viride* และ *T. virens* และสามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria* spp., *Colletotrichum* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Lasiodiplodia* spp. และ *Botrytis cinerea* กลไกการควบคุมโรคของเชื้อราไตรโคเดอร์มามีหลายกลไกที่สำคัญ ๆ เช่น การสร้างสารปฏิชีวนะ การแข่งขัน การเป็นปรสิต และการชักนำให้เกิดความต้านทาน ในปัจจุบันมีการผลิตเชื้อราไตรโคเดอร์มาเพื่อควบคุมโรคพืช และผลิตเพื่อจำหน่ายทางการค้าอย่างกว้างขวาง ไตรโคเดอร์มาเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ (Antagonistic fungus) ที่มีความสามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด โดยเฉพาะเชื้อราที่อยู่ในดิน เช่น *Phytophthora* spp. สาเหตุโรคผลร่วง ดอกร่วงของลำไย ลิ้นจี่ โรคดอกร่วงของทุเรียน *Lasiodiplodia* spp. สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของพริก ทุเรียน ส้ม มะนาว พริกไทย แตงโม แตงกวา มะเขือเทศ มันสำปะหลัง *Pythium* spp. สาเหตุโรคเน่าคอดิน กล้าเน่า โคนเน่า ยอดเน่า ของพืชผัก *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคเน่าคอดิน กล้าเน่า โรคใบด่าง *Fusarium* spp. สาเหตุโรคใบไหม้ใน ไม้ผล พืชไร่ พืชผัก และไม้ดอกไม้ประดับ *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคโคนเน่า โรคกล้าไหม้ ราเม็ดผักกาด โรคเหี่ยวในพืชผัก สตอเบอร์รี่ และพืชไร่ *Alternaria* spp. สาเหตุโรคใบจุดเน่าใน คื่นช่าย ผักกาดขาว กระหล่ำดอก สตอเบอร์รี่ มันฝรั่ง พริก *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง องุ่น มะละกอ พริก หอม กระเทียม มันฝรั่ง

Macrophomina phaseolina สาเหตุของโรคเมล็ดเน่า และโคนเน่าของพืชตระกูลถั่ว *Mycocentrospora acerina* สาเหตุโรคเน่าของแครอต *Botrytis cinerea* สาเหตุ โรคไหม้ (จิระเดช แจ่มสว่าง, 2547; Tang et al., 2001; Harman et al., 2004; Woo and Lorito, 2007) นอกจากนี้ยังมีเชื้อราสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ ที่เชื้อราไตรโคเดอร์มาสามารถควบคุมได้ เช่น *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium* spp., *Bipolaris* spp., *Penicillium* spp., *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Amillaria*, *Venturia*, *Endothia*, *Diaporthe*, and *Gaeumannomyces* (Tang et al., 2001)

2.4.1.2 เชื้อแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส

Bacillus สายพันธุ์ต่าง ๆ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมโรคโดยชีววิธี และการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช รวมไปถึงนำมาใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโต และชักนำภูมิคุ้มกันพืชเพื่อควบคุมโรคพืช ซึ่งมีความสำคัญในการนำมาประยุกต์ใช้ในทางการเกษตรเพื่อเป็นการลดปัญหาการใช้สารเคมีในพืชได้เป็นอย่างดีโดยในปี 1996 Asaka and Shoda ได้ศึกษา *B. subtilis* สายพันธุ์ RB14 ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืช คือสารปฏิชีวนะ iturin A และ surfactin ซึ่งพบว่าสารทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคโคน เน่า คอดิน ที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* ในมะเขือเทศ Berger et al. (1996) รายงานว่า การใช้เชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพืชสกุล *Photinia* และ *Brassica* พบว่าเชื้อดังกล่าวมีความสามารถในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora* sp. และ *Pythium* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ Brian et al. (2002) ได้ทำการศึกษาการฆ่าเหล่าโดยใช้สารเคมีทำให้ได้ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ M04 ซึ่งสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อรา *Botrytis cinerea* (grey mould), เชื้อ แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (bacterial wilt) และ *E. carotovora* pv. *carotovora* (bacterial soft rot) และ พบว่ามีการสร้างสารปฏิชีวนะ เมื่อทดสอบทางเคมี และ คุณสมบัติของสารปฏิชีวนะแล้วพบว่า เป็น สารพวก extracellular ที่ทนความร้อนได้ และสามารถละลายได้ใน methanol สารนี้ดูดความยาวคลื่นแสงที่ 212 นาโนเมตร ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับกลุ่ม cyclic antibiotic lipopeptides เช่น iturin Cho et al. (2003) ได้ศึกษาเชื้อที่แยกได้จากฟางข้าว พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ KS03 สามารถผลิตสารทางชีวภาพที่ยับยั้งโรคแอนแทรกคโนสจากเชื้อรา *Gloeosporium gloeosporioides* และ เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ KS03 ไปทำการแยกบริสุทธิ์พบว่าสารที่ให้ผลการยับยั้งคือ สารปฏิชีวนะ iturin A2

2.4.2 การควบคุมโรควิธีเขตกรรม

เป็นการป้องกันกำจัดโรคโดยการจัดการระบบนิเวศของสถานที่ปลูกเพื่อไม่ให้พื้นที่เพาะปลูก เอื้ออำนวยต่อการระบาดของโรคโดยลดจำนวนให้น้อยลงด้วยการปฏิบัติทางการเกษตร เช่น การกำหนดระยะปลูกที่เหมาะสม โดยการปลูกมันสำปะหลังระยะ 1 x 1 เมตร มีการเกิดโรคพืชต่ำที่สุดและให้ผลผลิตได้ดีกว่าการปลูกโดยใช้ระยะอื่น คัดเลือกท่อนพันธุ์ที่สมบูรณ์ปราศจากโรค การทำความสะอาดแปลงก่อนปลูกโดยการทำลายเศษพืชที่เป็นแหล่งเพาะเชื้อโรค และจัดการระบบการระบายน้ำตลอดจนกำจัดเศษซากพืชที่เป็นโรคออก นอกจากนี้เมื่อทำการเก็บ

ผลผลิตออกจากแปลงควรเก็บหัวมันสำปะหลังออกทั้งหมดรวมทั้งหัวมันสำปะหลังที่เป็นโรคด้วยเพื่อไม่ให้แหล่งสะสมของโรคในมันสำปะหลังรุ่นหลัง (อรพรรณ วิเศษสังข์, 2551)

2.4.3 การใช้สารเคมีในการควบคุมโรค

การป้องกันกำจัดโรคโคนเน่าหัวเน่าในปัจจุบัน มีการใช้สารเคมีกำจัดโรคของมันสำปะหลังเป็นจำนวนมากในแต่ละปีสารเคมีที่เกษตรกรนิยมใช้เช่น แชนท์ออนพันธุ์ด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อราเมทาแลกซิล 25% WP อัตรา 20-50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หรือฟอสอีทิล-อะลูมิเนียม 80% WP อัตรา 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร เป็นเวลา 10 นาทีในช่วงการเตรียมดินก่อนปลูก แต่การใช้สารเคมีในกลุ่มดังกล่าว มีความเสี่ยงต่อการชักนำให้เกิดความต้านทานสารเคมีของเชื้อรา เนื่องจากสารเคมีในกลุ่มนี้มีกลไกการออกฤทธิ์ไปยับยั้งการสังเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อรา จึงทำให้เชื้อราเกิดการเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรม (ชาติชาย ศิริพัฒน์, 2557)

2.4.4 การใช้นาโนเทคโนโลยีในการควบคุมโรค

นาโนเทคโนโลยีเป็นเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับวิทยาการหลากหลายสาขา ตั้งแต่เคมีสังเคราะห์ วัสดุศาสตร์ วิศวกรรมไฟฟ้า อิเล็กทรอนิกส์ และวิทยาศาสตร์ชีวภาพ จึงทำให้ยากต่อการระบุคำนิยามที่ครอบคลุมทั้งหมด อย่างไรก็ตามในปัจจุบันองค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน (The International Organization for Standardization: ISO) ได้ให้คำนิยาม “นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology)” ว่าหมายถึง การประยุกต์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์เพื่อสังเคราะห์และควบคุมสสารในระดับนาโน เพื่อใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติและปรากฏการณ์เชิงโครงสร้างที่เกิดจากอนุภาคขนาดที่เล็กมากทำให้มีความแตกต่างไปจากคุณสมบัติของสสารในระดับอะตอมหรือโมเลกุลหรือวัสดุใหญ่ นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology, NT) ได้ถูกนิยามขึ้นครั้งแรกโดย Professor Norio Taniguchi ในปี ค.ศ. 1974 และได้ถูกนำไปใช้ในการเป็นวัตถุดิบในการผลิตทางอุตสาหกรรมต่างๆมากมายจนถึงปัจจุบัน กระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโน (Nanoparticles, NPs) ซึ่งมีขนาด ≤ 100 นาโนเมตร จะใช้ธาตุโลหะต่างๆ เช่น เงิน (Ag) ทอง (Au) แพลตินัม (Pt) ซีลีเนียม (Se) เป็นต้น (Alghuthaymi et al., 2015) นาโนเมทที่เรียลสังเคราะห์ที่ถูกผลิตขึ้น มีดังนี้ ฟูลเลอร์ีน (Fullerene, C60) ซิงเกิลวอลล์คาร์บอน, นาโนทิวป์ (Single-walled carbon nanotubes: SWCNTs), มัลติวอลล์คาร์บอนนาโนทิวป์ (Multi-walled carbon nanotubes: MWCNTs), อนุภาคนาโนเหล็ก (Iron nanoparticles), ไทเทเนียมไดออกไซด์ (Titanium dioxide: TiO₂), อลูมิเนียมออกไซด์ (Aluminium oxide: Al₂O₃), ซีเรียมออกไซด์ (Cerium oxide: CeO₂) และซิงค์ออกไซด์ (Zinc oxide: ZnO) (ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2556) ซึ่งได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์ยา ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์อาหาร ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร และผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายที่ใช้ในบ้านเรือนหรือทางสาธารณสุข เป็นต้น ขนาดของอนุภาคนาโนที่นำไปประยุกต์ใช้ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 1-100 นาโนเมตร เป็นระดับการทำงานที่มีประสิทธิภาพ ปัจจุบันมีการนำอนุภาคนาโนมาใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตรเป็นจำนวนมากเช่น การปลูกข้าว ซึ่งได้มีการศึกษาผลของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ปริมาณความ

เข้มข้นต่างๆ ต่อการงอก จำนวน และความยาวของรากของข้าว (Boonyanitipong et al., 2011) การเจริญเติบโตของข้าวโพด (Taheri et al., 2013) การเติบโตของหอมและขนาดหัวของหัวหอมซึ่งใช้ปริมาณอนุภาคนาโนแตกต่างกัน คือ 0 10 20 30 และ 40 ไมโครกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร พบว่า หัวหอมที่รดด้วยปริมาณอนุภาคนาโน 20 ไมโครกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร มีอัตราการงอก และอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุด (Laware and Shilpa, 2014) นอกจากนี้ยังพบว่า อนุภาคนาโนมีผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของถั่ว (Prasad et al., 2012) การเจริญเติบโตและน้ำหนักของมันฝรั่ง (Panwar et al., 2012) และแครอท (Elizabeth et al., 2017) ตลอดจนยังมีงานวิจัยที่ศึกษาถึงผลของอนุภาคนาโนที่มีต่อจำนวนและขนาดของใบ ความยาวราก และลำต้นพริก (Afrayeem and Chaurasia, 2017) และพืชอื่นๆ (Sturikova et al., 2017) และมีบทบาทสำคัญในการก่อกวนการจัดการฟาร์ม เช่น ปุ๋ยนาโน และสารกำจัดศัตรูพืชระดับนาโนเพื่อเพิ่มผลผลิต การป้องกันแมลงศัตรูพืช และโรคจุลินทรีย์หลายชนิด

2.4.4.1 ซิลเวอร์นาโน (Silver Nano)

ซิลเวอร์นาโน (Silver Nano) คือ เทคโนโลยีการสังเคราะห์เงินหรือซิลเวอร์ (Silver) ให้มีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร (Nanometer) คือ มีขนาดไม่เกิน 100 นาโนเมตร เทียบเท่ากับดีเอ็นเอในร่างกายของมนุษย์ และเนื่องจากขนาดที่เล็กนี้เอง ทำให้มีปริมาณพื้นที่ผิวสูง ซึ่งสามารถสัมผัสกับเชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้น เมื่ออนุภาคซิลเวอร์นาโนสัมผัสกับผนังเซลล์จะสามารถแพร่ผ่านเข้าไปในเซลล์ ของแบคทีเรียหรือเชื้อราได้ อนุภาคซิลเวอร์นาโนซึ่งมีสมบัติเป็น soft acid จะเกิดอันตรรกิริยากับโมเลกุลที่เป็น soft base ภายในเซลล์ คือส่วนที่เรียกว่าหมู่ซัลไฟดริล (Sulphydryl group) ของเอนไซม์โปรตีนเนส (Proteinase) ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับเมตาบอลิซึมของเซลล์ โดยหมู่ซัลไฟดริล (-SH) ที่มีอะตอมของซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบจะจับตัวกับอนุภาคของเงินทำให้กระบวนการทำงานของเอนไซม์หยุดการทำงานจนกระทั่งเซลล์ของแบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตและเสื่อมสภาพไปในที่สุด

ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้มีการศึกษาใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนเพื่อใช้เป็น biocontrol agent ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช (Phytopathogenic fungi) หลายหลายชนิด อาทิ มีการรายงานการยับยั้ง *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* และ *Pythium aphanidermatum* (Mahdizadeh et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีการรายงานการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชจากอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์จากสารละลายภายนอกเซลล์ (Extracellular) ของเชื้อรา *Trichoderma longibrachiatum* ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช (Phytopathogenic fungi) ได้แก่ *Fusarium verticillioides*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium brevicompactum*, *Helminthosporium oryzae* และ *Pyricularia grisea* ได้ประสิทธิภาพการยับยั้งสูงถึง 90% (Elamawi et al., 2018) มีการศึกษาอนุภาคนาโนของนาโนซิงค์ออกไซด์ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืช 3 ชนิด คือ *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. และ *Colletotrichum* sp. โดยใช้นาโนซิลเวอร์ซิงค์ออกไซด์รูปแผ่นที่มีความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งการ

เจริญเติบโตของเส้นใย *Alternaria* sp. ได้ดีที่สุดในเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 64.50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum* sp. ได้ 51.67 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับฤทธิ์การยับยั้งกับสารเคมีแมนโคเซบ พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งใกล้เคียงกัน จากนั้นทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของเส้นใย *Alternaria* sp. โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบแสงธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า นาโนซิลเวอร์ซิงค์ออกไซด์รูปแผ่นสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยโดยมีผลต่อกลไกการทำงานภายในเซลล์ทำให้เส้นใยเชื้อรามีรูปร่างผิดปกติและยังมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *Alternaria* sp. (Boxi et al., 2016)

2.4.4.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโน

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนสามารถสังเคราะห์ได้หลายวิธี เช่น วิธีการทางเคมี วิธีการทางกายภาพ และวิธีการทางชีวภาพ ดังนี้ การสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยวิธีการทางเคมี (Chemical approach) เป็นวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากสามารถสังเคราะห์ได้ในปริมาณมาก ควบคุมขนาดและรูปร่างได้ง่ายโดยเริ่มจากการนำเกลือของซิลเวอร์ที่นิยมใช้คือ ซิลเวอร์ไนเตรต (Silver nitrate) มาทำปฏิกิริยากับตัวรีดิวซ์ เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) โซเดียมซิเตรท (Sodium citrate) โซเดียมแอสคอร์เบท (Sodium ascorbate) โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (Sodium borohydride (NaBH_4)) เป็นต้น วิธีการทางกายภาพ (Physical approach) เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากอนุภาคเงินนาโนที่สังเคราะห์ได้มีความบริสุทธิ์สูง สามารถควบคุมขนาด รูปร่าง และปริมาณของอนุภาคเงินนาโนได้ง่าย (Mafune et al., 2002) แต่ข้อเสียคือเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพงทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูง การสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางกายภาพโดยทั่วไปจะใช้วิธีการระเหยและควบแน่น (Evaporation-condensation) โดยใช้เตาเผาแบบหลอดแก้ว (Tube furnace) ที่ความดันบรรยากาศ แต่ข้อเสียของการใช้เตาเผาแบบหลอดแก้วคือต้องใช้เวลาสูงและใช้เวลานานเพื่อทำให้ความเกิดความเสถียรทางความร้อน ดังนั้นจึงมีการใช้เซรามิกฮีตเตอร์ขนาดเล็ก (Small ceramic heater) เนื่องจากไอที่เกิดขึ้นจากการระเหยจะควบแน่นกลับมาในอัตราเร็วที่เหมาะสมทำให้พื้นผิวของฮีตเตอร์สามารถถ่ายเทความร้อนได้ดี นอกจากนี้อุณหภูมิที่พื้นผิวของฮีตเตอร์ยังค่อนข้างคงที่ตลอดเวลาทำให้อนุภาคเงินนาโนที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเล็กและมีความเข้มข้นสูง อีกหนึ่งวิธีที่นิยมใช้ในสังเคราะห์อนุภาคนาโนคือ วิธีการยิงด้วยเลเซอร์ (Laser ablation) ซึ่งสามารถควบคุมขนาดและรูปร่างได้ง่ายด้วยการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความยาวคลื่นของเลเซอร์ ความเข้มของแสงเลเซอร์ และเวลาในการยิงเลเซอร์ เป็นต้น วิธีการทางชีวภาพ (Biological approach) ปัจจุบันนักวิจัยให้ความสนใจการสังเคราะห์อนุภาคนาโนด้วยวิธีทางชีวภาพมากขึ้น เนื่องจากสามารถลดการใช้สารเคมีที่เป็นพิษและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยสามารถใช้แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ และสารสกัดจากพืชในการสังเคราะห์ ซึ่งส่วนประกอบหลักในการสังเคราะห์มี 3 ส่วนคือ 1) สารละลายตัวกลางในการสังเคราะห์ 2) ตัวรีดิวซ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และ 3) สารให้ความคงตัวที่ไม่เป็นพิษ ข้อดีของวิธีการสังเคราะห์ทางชีวภาพคือเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีและทางกายภาพ เนื่องจากสารชีวโมเลกุลที่อยู่ในจุลินทรีย์

และสารสกัดจากพืชสามารถแปรรูปได้ทั้งตัวรีดิวซ์และสารให้ความคงตัว (Zhang et al., 2016) ซึ่งถือว่าวิธีทางชีวภาพเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัด รวมทั้งใช้สารเคมีในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับการสังเคราะห์ทางเคมี

2.4.4.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนด้วยจุลินทรีย์

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนด้วยจุลินทรีย์เป็นกลุ่มที่น่าสนใจมากที่สุด เนื่องจากเซลล์ของจุลินทรีย์สามารถสร้างสารเมตาบอไลต์หลากหลายชนิด ได้แก่ proteins, polypeptides, nucleic acids ที่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ไอออน Ag^+ กลายเป็นอนุภาค Ag-NPs และเซลล์จุลินทรีย์ยังสามารถนำธาตุโลหะเหล่านั้นไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมและการเจริญของเซลล์ช่วยช่วยยับยั้งการสลายโลหะที่เป็นพิษในสิ่งแวดล้อม (Sintubin et al., 2009) จุลินทรีย์แตกต่างกันส่งผลต่อกลไกในการเกิดอนุภาคนาโนได้ต่างกัน ซึ่งทั่วไปมีกลไกในการสร้างโดยเริ่มต้นที่ไอออนของโลหะจะยึดจับบริเวณพื้นผิวของเซลล์หรือบริเวณภายในเซลล์ หลังจากนั้นไอออนของโลหะจะถูกรีดิวซ์เป็นอนุภาคนาโนในสถานะที่มีเอนไซม์เข้ามาช่วยเร่งปฏิกิริยา กลไกดังกล่าวจะพบในการสร้างอนุภาคนาโนของ gold และ silver NPs, heavy metallic NPs, magnetic NPs และ sulfide NPs

กลไกการสังเคราะห์อนุภาคนาโน กลไกการสังเคราะห์ในปัจจุบันมีนักวิจัยให้ความสนใจเกี่ยวกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนจากจุลินทรีย์มากขึ้น แม้ว่ายังไม่ทราบกลไกการสังเคราะห์ที่แน่นอน แต่ก็มีข้อสันนิษฐานว่า สารประกอบที่เซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นมา เช่น วิตามิน กรดอินทรีย์ พอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต มีส่วนช่วยในการรีดิวซ์และทำหน้าที่เป็นสารให้ความคงตัว (Ahmad et al., 2010) จากการศึกษาด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปีพบว่า สารเหล่านี้มีหมู่ไฮดรอกซิล คาร์บอนิล และเอมีน ซึ่งหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้มีบทบาทในการรีดิวซ์ซิลเวอร์ไอออน นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นสารให้ความคงตัวซึ่งช่วยให้อนุภาคเงินซิลเวอร์นาโนมีความเสถียรมากขึ้น และช่วยไม่ให้เกิดการรวมตัวของอนุภาคซิลเวอร์นาโนกลายเป็นอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ สารที่มีบทบาทในการเป็นตัวรีดิวซ์ (Sintubin et al., 2009) ซึ่งจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างสารชีวโมเลกุลที่สำคัญต่าง ๆ มากมายจากกระบวนการ metabolism ได้แก่ โปรตีน เปปไทด์ คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัว reducing agents และเป็นตัว capping agents ที่สำคัญของกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน ดังนี้ $2AgNO_3 (s) + cellular\ fluid (aq) \rightarrow 2Ag (s) + O_2 (g) + 2NO_2 (g) + cellular\ fluid (aq)$ (Li et al., 2011; Balashanmugam et al., 2016) โดยการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนชีวภาพของเซลล์จุลินทรีย์ได้มีการอธิบายกลไกการสังเคราะห์ เป็น 2 แบบ คือ แบบที่อาศัยเอนไซม์เป็นตัวรีดิวซ์ (Enzymatic reduction) และแบบที่ไม่อาศัยเอนไซม์เป็นตัวรีดิวซ์ (Non-enzymatic reduction) การสังเคราะห์ที่อาศัยเอนไซม์นั้นเกิดจากเอนไซม์ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate dependent reductase ที่สร้างจากเซลล์ที่สามารถรีดิวซ์ไอออนของโลหะเงิน (Ag^+) เป็นอนุภาคซิลเวอร์นาโนได้ โดยพบว่าปฏิกิริยาที่เกิดการสังเคราะห์จะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ ภายในระยะเวลา 24-120 ชั่วโมง ในขณะที่มีการอธิบายกลไกของการสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยไม่อาศัยเอนไซม์คล้ายกับการสังเคราะห์แบบ chemical reduction แต่สารที่ทำหน้าที่เป็นตัว reducing

agents และ stabilizing agents สร้างและปล่อยออกมาจากจุลินทรีย์ ซึ่งจะใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่เร็วกว่า ซึ่งจะเกิดขึ้นได้ดีภายใต้สภาวะและปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ เช่น pH อุณหภูมิ และระดับความเข้มข้นของสารละลายเกลือ AgNO_3 (Gurunathan et al., 2009)

ส่วนในจุลินทรีย์บางชนิดที่เกิดอนุภาคนาโนภายในเซลล์ เช่น เซลล์ของเชื้อรา *Verticillium* sp. และสาหร่าย แต่ก็ยังไม่สามารถเข้าใจถึงกลไกได้ ซึ่งตามความเป็นจริงน่าจะอธิบายได้ว่าอนุภาคนาโนจะถูกสร้างบริเวณส่วนพื้นผิวของเซลล์เชื้อราโดยการกระทำของแรงของประจุไฟฟ้า (Electrostatic interaction) ระหว่างไอออนบวกของโลหะและไอออนลบบริเวณผนังเซลล์ซึ่งเป็นประจุของหมู่ carboxy group ในโมเลกุลของเอนไซม์ หลังจากนั้นเอนไซม์จะเป็นตัวริติวซ์ให้ประจุของโลหะเกิดการสร้างเป็นอนุภาค gold หรือ silver nuclei แล้วขยายเพิ่มปริมาณมากขึ้น (Zhang et al., 2011) ในเซลล์จุลินทรีย์คาดว่าเอนไซม์ nitrate reductase น่าจะมีส่วนสำคัญและเกี่ยวข้องในปฏิกิริยาโดยเอนไซม์นี้จะถูกชักนำโดยประจุของไนเตรทแล้วไปริติวซ์ไอออนของซิลเวอร์เป็น metallic silver ซึ่งจากกลไกนี้น่าจะอธิบายได้ว่าเอนไซม์ NADH-dependent nitrate reductase enzymes เป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของโลหะด้วยเซลล์จุลินทรีย์ผ่าน กระบวนการปฏิกิริยาที่เรียกว่า electron shuttle enzymatic metal reduction อนุภาคของซิลเวอร์นาโนมีพื้นที่ผิวมากทำให้โอกาสการสัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์มีมากเป็นผลให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มสูงขึ้น อนุภาคซิลเวอร์นาโนจะมีปฏิกิริยาต่อโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์จุลินทรีย์ ดังนั้นเมื่ออนุภาคซิลเวอร์นาโนสัมผัสกับจุลินทรีย์มันจะไปเกาะที่ผนังเซลล์และแทรกเข้าไปภายในโดยจะไปเกาะกับหมู่ $-\text{SH}$ (Sulfphydryl) ของเอนไซม์ ซึ่งจะมีผลต่อระบบเมตาบอลิซึม ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และเกิดการทำลายระบบหายใจ ระบบการขนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการเมตาบอลิซึม และระบบขนย้ายซีสเตรทในเยื่อหุ้มเซลล์ (Zhang et al., 2011; Kalishwaralal et al., 2010)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การตัดแยกเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในมันสำปะหลัง และการเตรียมเชื้อสาเหตุโรค

ใช้เชื้อราที่ใช้ในการวิจัยเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลังเป็นตัวแทน จำนวน 2 สายพันธุ์ ที่ได้จากสต็อกของห้องปฏิบัติการโรคพืชและชีวภัณฑ์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 การแยกเชื้อราไตรโคเดอร์มาและบาซิลลัสจากดิน

การแยกเชื้อราไตรโคเดอร์มาและบาซิลลัสจากดิน เก็บตัวอย่างดินจากสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้แก่ แปลงมันสำปะหลังและดินป่าในบริเวณพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา ที่ระดับความลึก 10 เซนติเมตร ใส่ในถุงพลาสติกแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิธีการแยกแอคติโนแบคทีเรียและบาซิลลัสดัดแปลงวิธีการ Chaudhary et al. (2013) โดยนำตัวอย่างดินมาอบแห้ง (air-dried) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างดิน 25 กรัม มากระจายในสารละลาย 0.85% NaCl ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 225 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเจือจางสารละลายตัวอย่างดิน แบบลำดับส่วนตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-6} แล้วปิเปตสารละลายเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง Starch Casein Agar (SCA) ที่เติม cycloheximide (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ nystatin (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วกระจายตัวอย่างสารละลายดินให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยเทคนิค spread plate โดยใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม (spreader) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน คัดเลือกโคโลนีที่ติดแน่นบนอาหารที่มีลักษณะการเจริญแผ่กระจาย คล้ายผงแป้ง ผิวขรุขระ ไม่มันวาว แล้วเชยโคโลนีไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง Hickey Tresner's agar (HTA) ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์เก็บในสารละลาย 25% glycerol ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3 การคัดเลือก supernatant ของน้ำเลี้ยงเซลล์ของไตรโคเดอร์มา และบาซิลลัสจากดิน

การคัดเลือก supernatant ของน้ำเลี้ยงเซลล์ของไตรโคเดอร์มา และบาซิลลัสจากดิน การคัดเลือก supernatant ของน้ำเลี้ยงเซลล์ของไตรโคเดอร์มา และบาซิลลัสจากดินแต่ละไอโซเลตที่สามารถรื้อชีวิตให้เกิดอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพจากโครงการพัฒนานาโนอิลิซิเตอร์ปัจจัยการผลิตสำหรับการจัดการแบบผสมผสานเพื่อแก้ปัญหาโรคโคนเน่าหัวเน่าและสุขภาพมันสำปะหลังในจังหวัดนครราชสีมา ปี 2564 โดยนำไตรโคเดอร์มาและบาซิลลัสมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง International Streptomyces Project Medium 2 (ISP2 medium) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นใช้อุปกรณ์เจาะจุกคอร์ก (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร เจาะโคโลนีของไตรโคเดอร์มา และบาซิลลัสไปเลี้ยงในอาหารเหลว

ISP2 (pH 6.8) ในขวดรูปชมพู่ 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแยกเซลล์ออกด้วยการกรองด้วย กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) รวบรวม supernatant ของน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการกรองไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสของ supernatant น้ำเลี้ยงเซลล์ไปผ่านชุดกรองแบคทีเรียขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน โดยนำตัวอย่าง supernatant ของน้ำเลี้ยงเซลล์ ผสมกับสารละลาย AgNO₃ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในขวดรูปชมพู่ ด้วยอัตราส่วน 1:1 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไม่ให้โดนแสง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (พสุ และคณะ 2561) เมื่อครบเวลาสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายเป็นสีเหลือง (yellowish color) ถึงสีเหลืองน้ำตาล (yellowish-brown color) ซึ่งแสดงว่ามีการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนของ supernatant ของน้ำเลี้ยงเซลล์จากไตรโคเดอร์มา และบาซิลัส (Krishnakumar & Bai, 2015) จากนั้นปั่นเหวี่ยงล้างอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยสารละลาย 0.85% NaCl จำนวน 2 ครั้ง ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ไปทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying) แล้วเก็บในภาชนะป้องกันแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรค คือ *Fusarium solani* โดยนำเชื้อรามาลีงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน เพื่อเตรียมสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค จากนั้นนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราสาเหตุโรคพืชด้วยเทคนิค spread plate โดยปิเปตสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนจำนวน 200 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร และทำการเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารด้วย sterile spreader รูปตัว L ที่ทำจากแท่งแก้ว จากนั้นเจาะโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคพืชด้วยอุปกรณ์ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร แล้ววางชิ้นวุ้นเชื้อราตรงกลางผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน วัดขนาดโคโลนีของเชื้อราเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่หยดน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืชจากสมการ

$$\% \text{ การยับยั้ง} = (A - B)/A$$

A = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม

B = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารชุดทดสอบ

3.5 การศึกษาขนาดรูปร่างและองค์ประกอบของธาตุบนพื้นผิวของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ

นำตัวอย่างอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพจากโครงการพัฒนานาโนอิลิซิเตอร์ปัจจัยการผลิตสำหรับการจัดการแบบผสมผสานเพื่อแก้ปัญหาโรคโคนเน่าหัวเน่าและสุขภาพมันสำปะหลังในจังหวัดนครราชสีมา ปี 2564 ที่สังเคราะห์ด้วยแอกติโนแบคทีเรียและบาซิลลัสมาศึกษารูปร่าง และขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM) โดย นำผงอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ 1 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วทำให้ กระจายตัวด้วยเทคนิค sonication เป็นเวลา 30 นาทีโดยไม่ใช้ความร้อน ทำแห้งด้วยเครื่อง critical point drying จากนั้นติดลงบน stub แล้วนำไปเคลือบด้วยทอง โดยทำการตรวจวัดลักษณะรูปร่างและขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่สังเคราะห์ได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Tecnai G2 20 S-Twin (ดัดแปลงจาก พสุและคณะ 2561)

3.6 ทดสอบประสิทธิภาพของนาโนอิลิซิเตอร์เพื่อแก้ปัญหาโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลังในสภาพเรือน

ทดลอง

โดยทดสอบในมันสำปะหลัง 2 พันธุ์ ได้แก่ ระยอง 72 และ 89 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เหมาะสมต่อพื้นที่และเกษตรกรในพื้นที่นิยมปลูก อายุก่อนพันธุ์ ประมาณ 11 เดือน ตัดก่อนพันธุ์ความยาว 20 เซนติเมตร และแช่ก่อนพันธุ์ด้วยเมทาแลคซิล อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร นาโนอิลิซิเตอร์ จำนวน 2 สูตร เป็นระยะเวลา 5 นาที นำมาทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมโรคมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรค *Fusarium solani* โดยประเมินความรุนแรงของโรค หลังการปลูกเชื้อ 7 วัน จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพของซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการกระตุ้นความต้านทานให้มันสำปะหลังเกิดความต้านทานต่อโรคโคนเน่าหัวเน่าระดับเรือนทดลอง โดยการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน IAA SA และปริมาณสาร phenolic compound

3.7 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบชีวเคมีภายในเซลล์พืชด้วยเทคนิค Synchrotron FT-IR microspectroscopy

ศึกษาตัวอย่างใบมันสำปะหลังที่กระตุ้นด้วยซิลเวอร์นาโนเปรียบเทียบกับกรดซาลิไซลิก และน้ำกลั่น (กรรมวิธีควบคุม) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบธาตุในเซลล์พืชด้วยเทคนิค Synchrotron FT-IR microspectroscopy

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Random Design (CRD) ในการทดลองระดับห้องปฏิบัติการและโรงเรือน จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS V.16 เพื่อหาความแตกต่างและค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ 95%

บทที่ 4

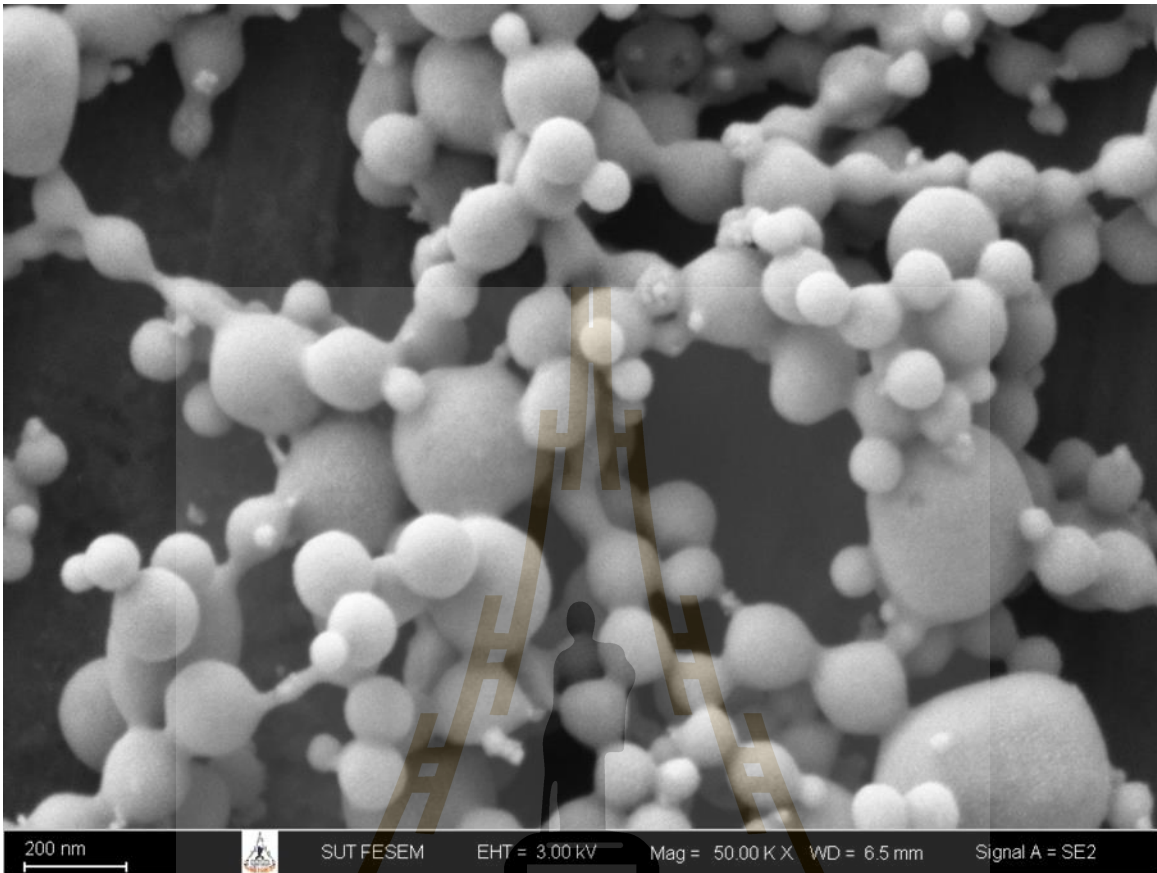
ผลการวิจัย

4.1 การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพด้วยไตรโคเดอร์มา และบาซิลลัสจากดิน

จากการทดสอบความสามารถของไตรโคเดอร์มา 2 ไอโซเลต และ บาซิลลัส 2 ไอโซเลต ในการทำหน้าที่เป็น ตัวรีดิวซ์ให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ จากโครงการพัฒนานาโนอิลิซิเตอร์ปัจจัยการผลิตสำหรับการจัดการแบบผสมผสานเพื่อแก้ปัญหาโรคโคนเน่าหัวเน่าและสุขภาพมันสำปะหลังในจังหวัด นครราชสีมาของปี 2564 พบว่า น้ำเลี้ยงเซลล์ และมวลชีวภาพของไตรโคเดอร์มาทั้ง 2 ไอโซเลต ได้แก่ *T. harzianum* และ *T. virens* สามารถสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนได้โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของสารละลาย ซิลเวอร์ไนเตรตเป็นสีน้ำตาล ดังนั้นโครงการในปี 2565 จึงได้เลือกนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ ของ *T. harzianum* โดยพบว่าการสังเคราะห์ซิลเวอร์นาโนโดยน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *T. harzianum* มีสีเข้มกว่าน้ำเลี้ยงเซลล์ ของ *T. virens* ในขณะที่น้ำเลี้ยงเซลล์ของบาซิลลัสไม่มีความสามารถรีดิวซ์ให้เกิดอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ ได้ (ภาพที่ 4.1) โดยขนาดของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์โดยมวลชีวภาพ และน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *T. harzianum* เท่ากับ 59.2 และ 39.79 นาโนเมตร และศักย์ซีตาเฉลี่ยที่ -23.7 และ -36.5 mV ซึ่งเมื่อตรวจสอบขนาดและรูปร่างของ อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่สังเคราะห์ได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ SEM พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพมี ลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลมอยู่ระหว่าง 60-90 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.1 อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum*



ภาพที่ 4.2 การตรวจสอบอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อของ *T. harzianum* โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมโรคมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรค *Fusarium solani*

จากการทดสอบประสิทธิภาพอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และ CMR 89 ที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* โดยประเมินความรุนแรงของโรค หลังการปลูกเชื้อ 7 วัน ในมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 พบว่า กรรมวิธีที่ใช้ซิลเวอร์นาโน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงดัชนีความรุนแรงของโรคน้อยที่สุดเท่ากับ 35.00 % ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (75.00 %) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ กรรมวิธีที่ใช้กรดซาลิไซลิก 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (40 %) นอกจากนี้การประเมินความรุนแรงของโรคโคนเน่าหัวเน่าในมันสำปะหลังพันธุ์ ซีเอ็มอาร์ 89 พบว่า กรรมวิธีที่ใช้ซิลเวอร์นาโนและกรดซาลิไซลิก แสดงดัชนีความรุนแรงของโรคไม่แตกต่างกัน เท่ากับ 50.00 % แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (90.00 %) (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการลดความรุนแรงของโรคโคนเน่าหัวเน่าในมันสำปะหลังพันธุ์ ระยะเวลา 72 และ ซีเอ็มอาร์ 89 ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรค *Fusarium solani*

กรรมวิธี	ดัชนีความรุนแรงของโรค (%)		การควบคุมการเกิดโรค (%)	
	ระยะเวลา 72	ซีเอ็มอาร์ 89	ระยะเวลา 72	ซีเอ็มอาร์ 89
ซิลเวอร์นาโน 20 mg L ⁻¹	35.00 ^a	50.00 ^a	53.33	47.37
กรดซาลิไซลิก 200 mg L ⁻¹	40.00 ^a	50.00 ^a	46.67	47.37
กรรมวิธีควบคุม	75.00 ^b	95.00 ^b	-	-
F-test	**	**		
CV (%)	5.83	6.01		

/ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามวิธี Duncan's multiple comparison ($p < 0.05$)

4.3 ศึกษากลไกอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการกระตุ้นความต้านทานมันสำปะหลังระดับเรือนทดลอง

จากการศึกษาประสิทธิภาพของซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการกระตุ้นความต้านทานให้มันสำปะหลังเกิดความต้านทานต่อโรคโคนเน่าหัวเน่าระดับเรือนทดลอง โดยการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน IAA ภายในเซลล์ของใบมันสำปะหลัง พบว่า กรรมวิธีที่ใช้ซิลเวอร์นาโน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มันสำปะหลังพันธุ์ระยะเวลา 72 และซีเอ็มอาร์ 89 มีปริมาณ IAA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 20.70 และ 22.80 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรดซาลิไซลิก ที่มีปริมาณ IAA เท่ากับ 21.02 และ 24.37 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณ IAA ในใบมันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 72 และ ซีเอ็มอาร์ 89

กรรมวิธี	IAA ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ of fresh weight)	
	ระยอง 72	ซีเอ็มอาร์ 89
ซิลเวอร์นาโน 20 mg L ⁻¹	20.70 ^a	22.80 ^a
กรดซาลิไซลิก	21.02 ^a	24.37 ^a
กรรมวิธีควบคุม	13.35 ^b	15.24 ^b
F-test	**	**
CV (%)	3.11	2.98

ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามวิธี Duncan's multiple comparison ($p < 0.05$)

เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Salicylic acid ที่พบว่า ที่ 24 ชั่วโมงหลังการใช้ซิลเวอร์นาโน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และซีเอ็มอาร์ 89 มีปริมาณ Salicylic acid compound ในใบมันสำปะหลัง เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 25.26 และ 42.12% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่มีปริมาณ Salicylic acid เพิ่มขึ้นเพียง 16.98 และ 19.43% ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรดซาลิไซลิก ที่มีปริมาณ Salicylic acid เพิ่มขึ้น 31.68 และ 43.20% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณ Salicylic acid ในใบมันสำปะหลังพันธุ์ ระยะเวลา 72 และ ซีเอ็มอาร์ 89

กรรมวิธี	ปริมาณกรดซาลิไซลิก ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ of fresh weight)				% Increased	
	ระยะเวลา 72		ซีเอ็มอาร์ 89		ระยะเวลา 72	ซีเอ็มอาร์ 89
	0 h	24 h	0 h	24 h		
ซิลเวอร์นาโน 20 mg L^{-1}	66.33 ^b	81.97 ^b	59.36 ^b	83.68 ^b	25.26 ^b	42.12 ^b
กรดซาลิไซลิก	70.01 ^b	89.87 ^b	63.82 ^b	91.34 ^b	31.68 ^b	43.20 ^b
กรรมวิธีควบคุม	51.89 ^a	60.56 ^a	46.63 ^a	55.59 ^a	16.98 ^a	19.43 ^a
F-test	**		**			
CV (%)	6.51		6.66			

ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามวิธี Duncan's multiple comparison ($p < 0.05$)

ซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพยังส่งผลให้มันสำปะหลังมีปริมาณสาร phenolic compound ที่ 24 ชั่วโมงหลังฉีดพ่นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดย ในมันสำปะหลังพันธุ์ระยะเวลา 72 ที่ใช้ซิลเวอร์นาโน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณสาร phenolic compound เพิ่มขึ้น 30.44 % ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม ที่มีปริมาณสาร phenolic compound เพิ่มขึ้นเพียง 10.92 % แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้กรดซาลิไซลิก 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณสาร phenolic compound เพิ่มขึ้น 34.67 % และในมันสำปะหลังพันธุ์ ซีเอ็มอาร์ 89 ซิลเวอร์นาโน มีผลทำให้ปริมาณสาร phenolic compound เพิ่มขึ้นมากที่สุด เท่ากับ 25.65 % ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้กรดซาลิไซลิก ซึ่งมีปริมาณสาร phenolic compound เพิ่มขึ้น 22.81 % (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณ phenolic compound ในใบมันสำปะหลังพันธุ์ ระยะเวลา 72 และ ซีเอ็มอาร์ 89

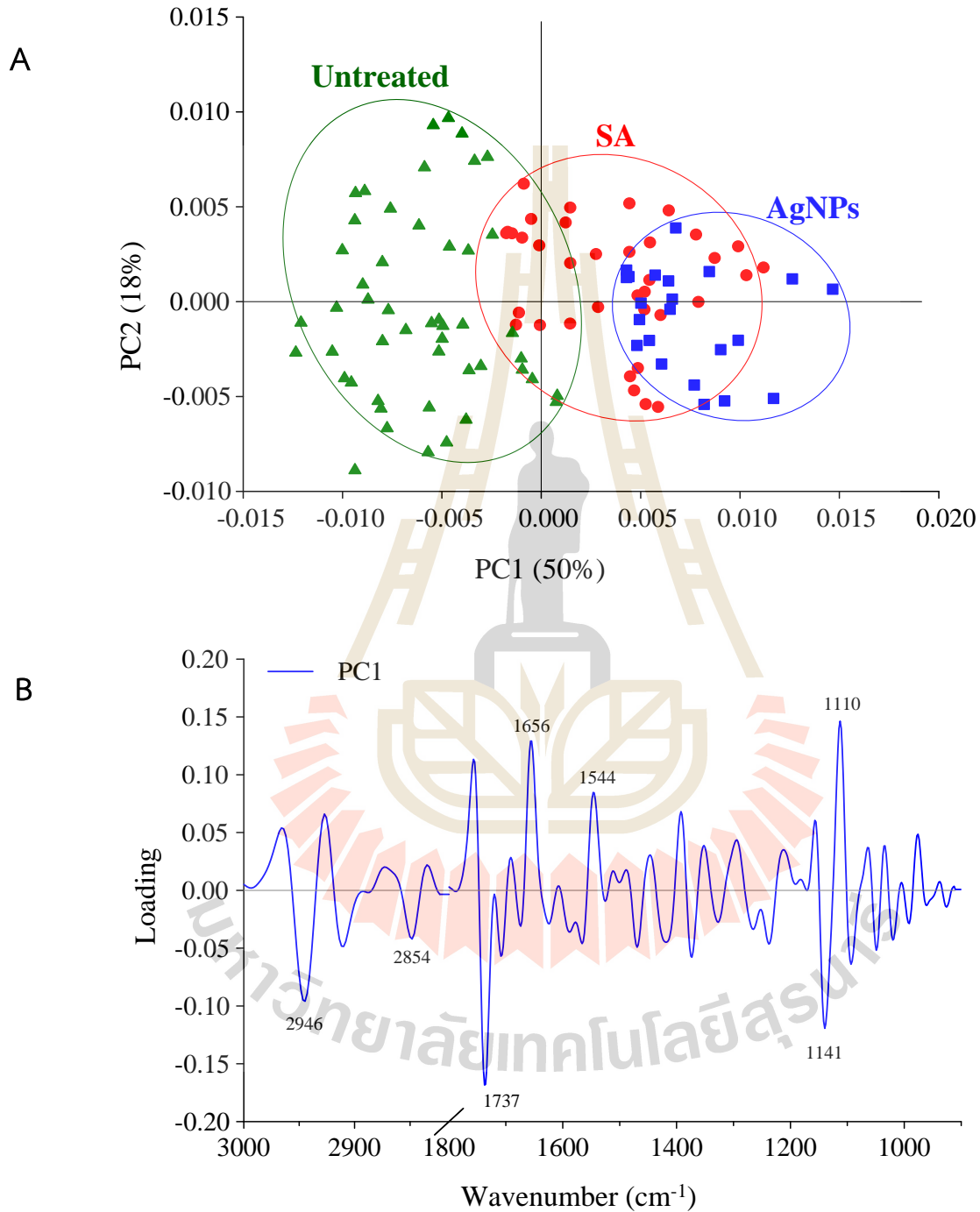
กรรมวิธี	ปริมาณฟีนอลิกรวม ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ of fresh weight)				% Increased	
	ระยะเวลา 72		ซีเอ็มอาร์ 89		ระยะเวลา 72	ซีเอ็มอาร์ 89
	0 h	24 h	0 h	24 h		
ซิลเวอร์นาโน 20 mg L^{-1}	21.07	27.30 ^a	19.90 ^a	25.00 ^a	30.44	25.65
กรดซาลิไซลิก	19.03	25.51 ^a	18.23 ^a	22.31 ^a	34.67	22.81
กรรมวิธีควบคุม	18.76	20.79 ^b	14.76 ^b	15.63 ^b	10.92	5.93
F-test	**		**			
CV (%)	11.69		10.22			

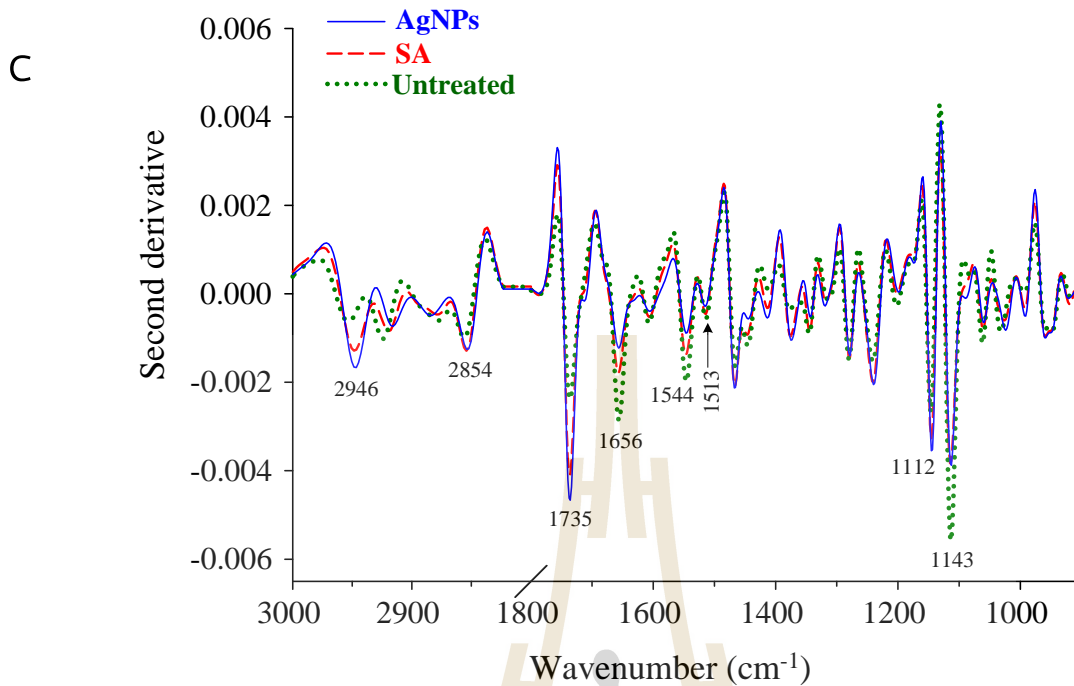
ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามวิธี Duncan's multiple comparison ($p < 0.05$)

4.4 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบชีวเคมีภายในเซลล์พืชด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy

จากการศึกษาตัวอย่างใบมันสำปะหลังที่กระตุ้นด้วยซิลเวอร์นาโนเปรียบเทียบกับกรดซาลิไซลิก และน้ำกลั่น(กรรมวิธีควบคุม) ด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy จากนั้นทำการวิเคราะห์ Principle component analysis (PCA) พบว่าแกน PC1 สามารถแยกกลุ่มสเปกตรัมของต้นมันสำปะหลังที่ถูกกระตุ้นด้วยอนุภาคซิลเวอร์นาโนได้อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยกลุ่มที่ฉีดพ่นด้วยซิลเวอร์นาโนตรงจัดอยู่ในแกนบวก ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่จัดอยู่ในแกน PC1 ค่าลบได้ที่ความแตกต่าง 50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.4A) โดยจำแนกความแตกต่างในตำแหน่ง peak ที่ 1077 and 1027 cm^{-1} ซึ่งเป็นกลุ่มของโพลีแซคคาไรด์สูงกว่าในกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่ตำแหน่ง peak ที่ 2946 , 2854 , 1737 , 1656 , 1544 , 1141 , and 1110 cm^{-1} ซึ่งเป็นกลุ่มของโปรตีนและไขมันสูงกว่าในกรรมวิธีที่ใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโน (ภาพที่ 4.4B) จากนั้นทำการวิเคราะห์สเปกตรัมของหมู่ฟังก์ชันที่เปลี่ยนแปลงไปโดยแยกการวิเคราะห์ออกเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกได้แก่ กลุ่มไขมันและกรดไขมัน ($3000\text{-}2800 \text{ cm}^{-1}$) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์พืช แสดงการสั่นของพันธะในหมู่ฟังก์ชัน CH_3 , CH_2 ซึ่งพบว่ากรรมวิธีที่ใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนสูงที่สุดในตำแหน่งที่ peak 2946 , และ 2854 , รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ใช้กรดซาลิไซลิก และกรรมวิธีควบคุมตามลำดับ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ โปรตีน และเปปไทด์ที่เป็นสายโซ่ของกรดอะมิโน เอไมด์ I และ เอไมด์ II (amide I, amide II) พบว่ากรรมวิธีที่ใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนสูงที่สุดในตำแหน่งที่ peak 1735 รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ใช้กรดซาลิไซลิก และกรรมวิธีควบคุมตามลำดับ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ กรดนิวคลีอิก

ฟอสโฟลิปิด โพลีแซ็กคาไรด์ และคาร์โบไฮเดรต พบว่ากรรมวิธีควบคุมสูงที่สุดในตำแหน่งที่ peak 1143 รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโน และกรดซัลฟิวริกตามลำดับ (ภาพที่ 4.4C)





ภาพที่ 4.3 การวิเคราะห์ Principle component analysis (PCA) ของเนื้อเยื่อไขมันสำปะหลังชั้น mesophyll (A), Loading แสดงค่าสเปกตรัมที่ใช้แยกความแตกต่างทางชีวเคมีของเนื้อเยื่อไขมันสำปะหลังชั้น mesophyll โดยซิลเวอร์นาโนเปรียบเทียบกับกรดซาลีไซลิก และน้ำกลั่น(กรรมวิธีควบคุม) (B) และแสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (Average 2nd derivative FTIR spectrum) ของสารชีวโมเลกุลในเนื้อเยื่อไขมันสำปะหลังชั้น mesophyll ในช่วงความถี่ $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ and $1800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาพบว่าน้ำเลี้ยงเซลล์เชื้อรา *T. harzianum* จากโครงการพัฒนานาโนอิลิซิติเตอร์ปัจจัยการผลิตสำหรับการจัดการแบบผสมผสานเพื่อแก้ปัญหาโรคโคนเน่าหัวเน่าและสุขภาพมันสำปะหลังในจังหวัดนครราชสีมา ปี 2564 สามารถเป็นตัวรีดิวซ์ให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพได้ด้วยการทำปฏิกิริยากับสารละลาย $AgNO_3$ ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ โดยพบว่าสารละลายดังกล่าวมีการเปลี่ยนจากสีใสเป็นสีเหลืองอ่อน และกลายเป็นสีน้ำตาลเข้มที่ระยะเวลาการบ่ม 48 ชั่วโมง เนื่องจากการกระตุ้นของเซอร์เฟสพลาสมอนเรโซแนนซ์ (Surface plasmon resonance ; SPR) ของซิลเวอร์นาโนเรต ให้เกิดการการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นที่ตามองเห็นได้ปกติ จากสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต หรือเอนไซม์ ที่เซลล์สร้างและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ไปรีดิวซ์ไอออนของ Ag^+ ให้เป็นอนุภาค (Ag_0) จึงทำให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพได้ (Mahmudin et al., 2015) เช่นเดียวกับการรายงานของ Ahluwalia et al., (2014) ที่ใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ของ *T. harzianum* ในรีดิวซ์ซิลเวอร์นาโนเรตเป็นซิลเวอร์นาโนได้สำเร็จ (Alghuthaymi et al., 2021)

2. เมื่อนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพจากโครงการพัฒนานาโนอิลิซิติเตอร์ปัจจัยการผลิตสำหรับการจัดการแบบผสมผสานเพื่อแก้ปัญหาโรคโคนเน่าหัวเน่าและสุขภาพมันสำปะหลังในจังหวัดนครราชสีมา ปี 2564 ที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. theobromae* และ *F. solani* พบว่า อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้สามารถลดการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้งสองชนิดได้ โดยพบว่าการเพิ่มระดับความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนชีวภาพมากขึ้นส่งผลให้มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นตามไปด้วยซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim (2012) ที่พบว่าการยับยั้งการเจริญของโคโลนิราสาเหตุ โรคพืช *Fusarium solani* *F. oxysporum* *Pythium* Spp. และ *Alternaria alternata* มีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโน ซึ่งประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืชเป็นผลมาจากคุณสมบัติของอนุภาคซิลเวอร์นาโนในการเข้าไปทำลายเซลล์เชื้อ ซึ่งแสดงให้เห็นประสิทธิภาพในการต่อต้านโรคโคนเน่าหัวเน่า เพื่อความเข้าใจเพิ่มเติมคณะวิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของพืชเพิ่มเติมโดยใช้เทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy

3. จากการทดสอบประสิทธิภาพอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และ CMR 89 ที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* พบว่า มันสำปะหลังที่ฉีดพ่นด้วยซิลเวอร์นาโน

20 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแสดงดัชนีความรุนแรงของโรคน้อยที่สุดเท่ากับ 35.00 % ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ได้ถึง 75.00 %

4. จากการศึกษาประสิทธิภาพของซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการกระตุ้นความต้านทานให้มันสำปะหลัง เกิดความต้านทานต่อโรคโคนเน่าหัวเน่าระดับระดับเรื้อรังทดลอง โดยการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน IAA ภายในเซลล์ของใบมันสำปะหลัง พบว่า กรรมวิธีที่ใช้ซิลเวอร์นาโน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และซีเอ็มอาร์ 89 มีปริมาณ IAA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 20.70 และ 22.80 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shakirova (2007) ได้ทำการศึกษากรดซาลิไซลิกซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชจากภายนอก โดยพบว่าเมื่อนำมาใช้กับข้าวสาลี สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตได้โดยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน IAA และ ABA และป้องกันผลกระทบต่อความเครียดของข้าวสาลีด้วย ต่อมาในปี 2551 วิลาวรรณ เชื้อบุญ ที่รายงานว่าการแขวนลอย (Suspension) เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *P. fluorescens* สายพันธุ์ SP007s และ *B. licheniformis* สายพันธุ์ SP009s มีศักยภาพสูงในการส่งเสริมการออกของเมล็ดและกระตุ้นการเจริญเติบโตในส่วนของความยาวรากและความสูงต้น หลังออก 7 และ 21 วัน นอกจากนี้ Nathan Vinod Kumar et al. (2017) ยังยืนยันผ่านการวิเคราะห์ TLC และ HPLC โดยเปรียบเทียบกับ IAA มาตรฐาน ว่า *T. viride* VKF3 มีประสิทธิภาพในการผลิต IAA สูงถึง $115 \mu\text{g mL}^{-1}$ และสามารถควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* และ *A. niger* โดยแสดงการยับยั้งสูงสุดที่ 82 และ 94% ตามลำดับ

5. จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Salicylic acid ที่พบว่า ที่ 24 ชั่วโมงหลังการใช้ซิลเวอร์นาโน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และซีเอ็มอาร์ 89 มีปริมาณ Salicylic acid compound ในใบมันสำปะหลัง เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 25.26 และ 42.12% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับ อิณชญา ประคองคำ (2554) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้น ชนิดต่าง ๆ ให้ป้องกันความต้านทานต่อโรคสแคบโดยการวัดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสาร salicylic acid หลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น 7 วัน สิ่งกระตุ้นทุกชนิดสามารถกระตุ้นการสร้างสาร salicylic acid เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อที่เป็นชุดควบคุม และ Buensanteai et. al. (2008) พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *B. amyloliquafaciens* สายพันธุ์ KPS46 มีความสามารถในการชักนำให้พืชสร้างสาร salicylic acid ในลำ เหลียงเพิ่มขึ้นในวันแรก และเพิ่มสูงสุดในวันที่ 4 เช่นกัน ดังนั้นจากการทดลองจึงนี้เป็นการยืนยันว่าสาร salicylic acid ที่สร้างขึ้นในมันสำปะหลังมีความเกี่ยวข้องในการตอบสนองต่อการป้องกันตัวเองอย่างรวดเร็วของพืชนำไปสู่การเพิ่มความแข็งแรงของผนังเซลล์พืช (Bradley et al., 1992) และสามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคโคนเน่าหัวเน่าในมันสำปะหลังได้ และซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพยังส่งผลให้มันสำปะหลังมีปริมาณสาร phenolic compound ที่ 24 ชั่วโมงหลังฉีดพ่น

เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยในมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 ที่ใช้ซิลเวอร์นาโน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณสาร phenolic compound เพิ่มขึ้น 30.44 % ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม สอดคล้องกับรายงานของ เป็อนสันเทียะ และคณะ (2550) พบว่า *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ KPS46 สามารถชักนำระบบ phenylpropanoid pathway ให้พืชสร้างเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดการสะสมสารกลุ่มฟีนอลและโปรตีนที่เกี่ยวข้องซึ่งพืชจะใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดนูนที่ลูกกลมเข้าไปภายในต้น ถั่วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งมีแนวโน้มการเป็นตัวกระตุ้นให้ถั่วเหลืองต้านทานโรค นอกจากนี้ Ramamoorthy et al. (2002) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* สายพันธุ์ Pf1 สามารถเหนี่ยวนำให้มะเขือเทศสร้างสาร phenolic compound เพิ่มขึ้นโดยตรวจพบในใบมะเขือเทศที่ผ่านการชักนำให้เกิดความต้านทานมากกว่ามะเขือเทศปกติ ส่งผลให้มะเขือเทศมีความต้านทานต่อเชื้อรา *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici*

6. จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีของพืชด้วยเทคนิค Synchrotron FT-IR microspectroscopy พบว่าแกน PC1 สามารถแยกกลุ่มสเปกตรัมของต้นมันสำปะหลังที่ถูกกระตุ้นด้วยอนุภาคซิลเวอร์นาโนได้อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยกลุ่มที่ผิดพันด้วยด้วยซิลเวอร์ไนเตรตจัดอยู่ในแกนบวก ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่จัดอยู่ในแกน PC1 ค่าลบได้ที่ความแตกต่าง 50 เปอร์เซ็นต์ โดยจำแนกความแตกต่างในตำแหน่ง peak ที่ 1077 and 1027 cm^{-1} ซึ่งเป็นกลุ่มของโพลีแซคคาไรด์สูงกว่าในกรรมวิธีควบคุม จากนั้นทำการวิเคราะห์สเปกตรัมของหมู่ฟังก์ชันที่เปลี่ยนแปลงไป อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้นั้นมีผลทำให้ปริมาณของกลุ่มไขมัน กรดไขมัน โปรตีน และเปปไทด์ที่เป็นสายโซ่ของกรดอะมิโน เอไมด์ I และ เอไมด์ II (amide I, amide II) ของพืชเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของพืช เนื่องจากมีหน้าที่ในการควบคุมเมแทบอลิซึม เป็นโมเลกุลโครงสร้างและกิจกรรมภายในเซลล์รวมทั้งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์หรือหน่วยย่อยของเอนไซม์ในเซลล์พืช ส่วนคาร์โบไฮเดรตมีความสำคัญต่อทั้งการทำงานและโครงสร้างของพืช โดยจะพบคาร์โบไฮเดรตในองค์ประกอบของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ในรูปของเซลลูโลส (cellulose), ไคติน (chitin), ลิกนิน (lignin) และเพกติน (pectin) (ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์, 2545) โดยสารชีวโมเลกุลดังกล่าว สามารถเพิ่มปริมาณสูงขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ อนุภาคซิลเวอร์นาโน และกรดซาลิไซลิก ชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์พืชมีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นให้พืชเกิดความแข็งแรงและสามารถต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าหัวเน่าในมันสำปะหลังเพื่อให้พืชเตรียมความแข็งแรงพร้อมรับมือกับการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรค (priming) สอดคล้องกับผลการทดลองของชานนทร์ แสงจันทร์ (2557) ศึกษาการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตหลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* ไอโซเลต CaSUT007 และกรดซาลิไซลิก พบกลุ่มไขมันชนิด C-H stretching กลุ่มไขมันชนิด C=O ester มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น แต่ในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตชนิด C-H bonding, C-O

stretching และ polysaccharide มีปริมาณลดต่ำลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีเหล่านี้มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโต และกระตุ้นให้พืชเกิดความแข็งแรงและสามารถต้านทานเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคน้ำและในผักกาดเขียวปลีได้ เช่นเดียวกับการทดลองของดาราวดี วงษ์ชาติ (2558) ได้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีของใบพริกที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* ไอโซเลต D604 พบว่าปริมาณของไขมัน ในกลุ่ม C=O ester และกลุ่มคาร์โบไฮเดรตชนิด CH-bonding, hemicellulose และ polysaccharide ในเนื้อเยื่อสูงกว่าใบพริกที่พ่นด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งมีผลทำให้พริกมีการเจริญเติบโตที่ดี เพิ่มผลผลิต และมีความต้านทานต่อโรคแอนแทรกโนส

การศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์โดยวิธีการชีวภาพโดยใช้เชื้อรา *T. harzianum* เป็นตัวรีดิวซ์ซิลเวอร์ไนเตรต มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อราสาเหตุโรคน้ำและในผักกาดเขียวปลีมีประสิทธิภาพ นอกจากนั้นการศึกษาในระดับเรือนทดลองเพื่อทดสอบกับพันธุ์มันสำปะหลัง 2 สายพันธุ์ ในการควบคุมโรคมันสำปะหลัง ยังพบว่าซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ สามารถควบคุมโรคน้ำและในผักกาดเขียวปลีโดยการตรวจสอบดัชนีความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นในพันธุ์มันสำปะหลังทั้งสองสายพันธุ์ และอนุภาคซิลเวอร์นาโนยังสามารถกระตุ้นความต้านทานในพืช ส่งเสริมการเจริญเติบโตของมันสำปะหลังได้โดยการชักนำการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ IAA Phenolic compound และ Salicylic acid ได้อีกด้วย

บรรณานุกรม

- กาญจนา นิรภัย และ เอกชัย ชูเกียรติโรจน์. 2552. ชีววิทยาของเชื้ออรา *Lasiodiplodia* spp. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 25(2): 119-134.
- กลุ่มอนุรักษ์น้ำ และดิน. 2545. มันทำปะหลัง ในเอกสารวิชาการมันทำปะหลัง. สำนักวิจัยและ พัฒนาการจัดการ ที่ดิน.กรมพัฒนาที่ดิน.กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 1001: 46.01.
- จิระเดช แจ่มสว่าง วรณวิไล อินทนู และ ถวัลย์ คุ่มช้าง. 2544. ประสิทธิภาพของเชื้ออรา *Trichoderma harzianum* สูตรสำเร็จต่าง ๆ ในการควบคุมโรคโคนเน่าของถั่วฝักยาวที่เกิดจากเชื้ออรา *Sclerotium rolfsii* การประชุมทางวิชาการประจำปีของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 พืชศาสตร์ การส่งเสริม การเกษตร และการสื่อสารการเกษตร กรุงเทพฯ ประเทศไทย หน้า 236-242.
- จำลอง เจียมจันรรจา. 2541. มันทำปะหลัง. ในพฤษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ. ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตรมหา วิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 47-51.
- ชาติชาย ศิริพัฒน์. 2557. รากเน่าหัวเน่าระบาดหนักในไร่มันทำปะหลัง. [ออนไลน์]. ได้จาก <http://www.thairath.co.th/content/442798>.
- ชานนทร์ แสงจันทร์. การควบคุมโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* PV. *carotovora* ในผักกาด เขียวปลีโดยใช้ความต้านทานจากสิ่งกระตุ้น (Doctoral dissertation, สาขาวิชาเทคโนโลยีการ ผลิตพืชสำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี).
- ฐิติมา วีระศิลป์. 2542. โรคมันทำปะหลัง. ในพืชทองคำใต้แผ่นดินมันทำปะหลัง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 41-121.
- दनัย ศุภาพร. 2537. พฤษศาสตร์ และพันธุศาสตร์ของมันทำปะหลัง. ในเอกสารวิชาการมันทำปะหลัง.ศูนย์วิจัย พืชไร่ระยอง.กรมวิชาการเกษตร.กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.14-29.
- ดาราวดี วงษ์ชาติ, 2558, ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัณฑ์ *Bacillus* สูตร Encapsulate ในการควบคุมโรค แอนแทรกโนสของพริก, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.
- ยุคติ สาริกะภูติ. 2526. มันทำปะหลัง. เอกสารวิชาการ เล่มที่7. กรมวิชาการเกษตร. 83 - 87.

รังษี เจริญสถาพร และ ออมรรักษ์ คัดใจเดียว. 2553. โรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังและแนวทางการป้องกันกำจัด. สถาบันวิจัยพืชไร่กรมวิชาการเกษตร. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://soclaimon.wordpress.com>

ศานิต สวัสดิกาญจน์. 2557. มันสำปะหลัง. ในพืชอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ. 1-162.

ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ. Atomic Force Microscope (Accessed on Mar 21, 2013).
http://www.nanotec.or.th/th/?page_id=545

ศูนย์ส่งเสริมพัฒนาการผลิตมันสำปะหลังแห่งประเทศไทย. 2562. พันธุ์มันสำปะหลัง และการจำแนกชนิดพันธุ์. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.cassava-devlp-center.com/index.php?lay=show&ac=article&Ntype=6>.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2564. มันสำปะหลังโรงงาน: เนื้อที่เพาะปลูก เนื้อที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ปี 2564. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. กรุงเทพฯ. 241 หน้า.

สมพงษ์ กาทอง. 2537. การเขตกรรมมันสำปะหลัง. ในเอกสารวิชาการมันสำปะหลัง. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 71-83.

โสภณ สันธุประมา. 2526. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง. ในเอกสารวิชาการมันสำปะหลัง. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 9-16.

อรุณี วงษ์กอบรัชฎ์. 2547. โรค แมลง และ ศัตรูของมันสำปะหลัง. ใน เอกสารวิชาการมันสำปะหลัง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 210 หน้า.

อรพรรณ วิเศษสังข์. 2551. คำแนะนำในการจัดทำแผนการทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคพืช. กรุงเทพฯ: กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

Afrayeem, S.M. and Chaurasia, A.K. 2017. "Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Seed Germination and Seed Vigour in Chilli (*Capsicum annuum* L.)". *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 6(5), 1654-1566.

Alghuthaymi, M. A., et al. 2015. Myconanoparticles: synthesis and their role in phytopathogens management. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 29 (2): p. 221-236.

- Alghuthaymi, M., Diab, A., Elzahy, A., Mazrou, K., Tayel, A. A. and Moussa, S. H. 2021. Green biosynthesized selenium nanoparticles by cinnamon extract and their antimicrobial activity and application as edible coatings with nano-chitosan. *J Food Qual.* 2021;2021:6670709-6. doi: 10.1155/2021/6670709
- Alves, A., Crous, P.W., Correia, A., Phillips, A.J.L. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Divers.* 28:1–13.
- Ahluwalia, V., Kumar, J., Sisodia, R., Shakil, N.A., Walia, S., 2014. Green synthesis of silver nanoparticles by *trichoderma harzianum* and their bio- efficacy evaluation against staphylococcus aureus and klebsiella pneumonia. *Industrial Crops and Products.* <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.026>
- Ahmad, N., Sharma, S., Alam, M. K., Singh, V. N., Shamsi, S. F., Mehta, B. R. and Fatma, A. 2010. Rapid synthesis of silver nano particles using dried medicinal plant of basil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 81(1): 81-86.
- Asaka, O. and Shoda, M., 1996, Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB 14, *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11): 4081-4085.
- Banito, A., Kpemoua, K. E., Bissang, B., Wydra, K. 2010. Assessment of cassava root and stem rots in ecozones of Togo and evaluation of the pathogen virulence. *Pak. J. Bot.* 42(3): 2059-2068.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi.* 3rd edition, Macmillan Publishing Company, New York. 273.
- Benitez, T. et al. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
- Berger, F., Hong, Li., White, D., Frazer, R., Liefert, C. 1996. Effect of pathogen inoculum, antagonist density, and plant species on biological control of *Phytophthora* and *Pythium* damping-off by *Bacillus subtilis* cot1 in High-humidity fogging glasshouses. *Phytopathology.* 86:428-433.

- Berk, M.J., Curtis, M.A. 1867. Geological and natural history survey of North Carolina. part III: botany. Containing a catalogue of the indigenous and naturalized plants of the State. 148.
- Brian, B. M. G., Deborah, R. F. 2002. Biological control of plant pathogens: research, commercialization and application in the USA. [Online]. Available: <http://www.apsnet.org/online/feature/biocontrol/links.html>.
- Boas, S., Hohenfeld, C., Oliveira, S., Santos, V., Oliveira, E., 2016. Sources of resistance to cassava root rot caused by *fusarium* spp. : A genotypic approach. Euphytica. <https://doi.org/10.1007/s10681-016-1676-4>
- Boonyanitipong, P., Kumar, P., Kositsup, B., Baruah, S. and Dutta, J. 2011. “Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Roots of Rice *Oryza Sativa* L.”, International Conference on Environment and bioscience IPCBEE. 21, IACSIT Press, Singapore, 172-176.
- Boxi, S.S., Mukherjee, K., Paria, S. 2016. Ag doped hollow TiO₂nanoparticles as an effective green fungicide against *Fusarium solani* and *Venturia inaequalis*phytopathogens. Nanotechnology,27(3), 42-51.
- Bua, B., Okello, C. 2011. Isolation and identification of cassava root rot of cassava disease causal pathogens from Lira district, Uganda. African crop science conference proceeding. 10: 183-186.
- Buensanteai, N., Athinuwat, D. 2012. The antagonistic activity of *Trichoderma virens* strain TvSUT10 against cassava stem rot in Thailand Protein Exp. African Journal of Biotechnology. 11(84): 14996-15001.
- Carvalho, P.M., Felício, M.R., Santos, N.C., Gonçalves, S. and Domingues, M.M., 2018. Application of light scattering techniques to nanoparticle characterization and development. Frontiers in Chemistry. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00237>
- Cho, S. J., Lee, S. K., Cha, B. J., Kim, Y. H., Shin, K. S. 2003. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A Form *Bacillus subtilis* strain KS03. FEMS Microbiology Letters. 223: 47-51.

- Clogston, J., Patri, A., 2011. Zeta potential measurement. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6
- Cooke, D.E.L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G. and C.M. Brasier. 2006. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related *Oomycetes*. *Fungal Genet Biol.* 30: 17-32
- Delvallée, A., Feltin, N., Ducourtieux, S., Trabelsi, M., Hochepeid, J.F., 2015. Direct comparison of afm and sem measurements on the same set of nanoparticles. *Measurement Science and Technology*. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/26/8/085601>
- Duchanee, S., Sangpueak, R., Buensanteai, N. 2015. Molecular identification of the causal agent associated with cassava stem and root black rot disease in Thailand. The 2015 International Forum – Agriculture Biology and Life Science (IFABL). 23-25 June 2015. Sapporo. Japan.
- Elamawi, R. M., Al-Harbi, R. E., Hendi, A. A. 2018. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. *Egyptian journal of biological pest control*, 28(28), 1-11.
- Elizabeth, A., Bahadur, V., Misra, P., Prasad, V.M. and Moham, T.T. 2017. “Effect of Different Concentration of Iron Oxide and Zinc Oxide Nanoparticles on Growth and Yield of Carrot (*Daucus carota* L.)”, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 6(4), 1266-1269.
- Gan, P. P., Li, S. F. Y. 2012. Potential of plant as a biological factory to synthesize gold and silver nanoparticles and their applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 11(2): 169-206.
- Ge, L., Li, Q., Wang, M., Ouyang, J., Li, X. & Xing, M.M.Q. 2014. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 2399-2407.
- Gurunathan, S., Kalishwaralal, K., Vaidyanathan, R., Venkataraman, D., Pandian, S. R. K., Muniyandi, J., Eom, S. H. 2009. Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 74(1): 328-335.

- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. 2004. Trichoderma species- opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43-56.
- Harveson, R.M. & Rush, C.M. 2002. The influence of irrigation frequency and cultivar blends on the severity of multiple root diseases in sugar beets. *Plant Disease*, 86, 901-908.
- Kalishwaralal, K., Deepak, V., Ram Kumar Pandian, S., Kottaisamy, M., BarathManiKanth, S., Kartikeyan, B., Gurunathan, S. 2010. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 77(2): 257-262.
- Kämper, J. et al. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature05248>
- Kim, S.W., Jung, J., Lamsal, K., Kim, Y., Min, J., Lee, Y., 2012. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology*. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.1.053>
- Kumar, N. V., Rajam, K. S., & Rani, M. E. (2017). Plant growth promotion efficacy of indole acetic acid (IAA) produced by a mangrove associated fungi-Trichoderma viride VKF3. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(11), 2692-2701.
- Latha, P., Prakasam, V., Kamalakannan, A., Gopalakrishnan, C., Raguchande T., Paramathma M., Samiyappan R. 2009. First report of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl causing root rot and collar rot disease of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in India. *Australasian Plant Disease Notes*. 4: 19-20.
- Laware, S.L. and Shilpa, R. 2014. "Influence of Zinc Oxide Nanoparticles on growth, Flowering and Seed Productivity in Onion", *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*. 3(7), 874-881.
- Li, X., Xu, H., Chen, Z. & Chen, G. 2011. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *Journal of Nanomaterials*, 8, 1-15.

- Machado, A.R., Pinho, D.B., Dutra, D.C., Pereira O.L. 2012. Collar and root rot caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in the biofuel plant *Jatropha curcas*. *Plant Dis.* 96:1697
- Machado, A. R. , Pinho, D. B. , Oliveira, S. A. S. , Pereira, O. L. 2014. New occurrences of *Botryosphaeriaceae* causing black root rot of cassava in Brazil. *Tropical Plant Pathology.* 39(6): 464-470.
- Mafuné, F., Kohno, J.-y., Takeda, Y., Kondow, T. 2002. Full Physical Preparation of Size- Selected Gold Nanoparticles in Solution: Laser Ablation and Laser-Induced Size Control. *The Journal of Physical Chemistry B* 106(31): 7575-7577.
- Mahdizadeh, V., Safaie, N., Khelghatibana, F. 2015. Evaluation of antifungal activity of silver nanoparticles against some phytopathogenic fungi and *Trichoderma harzianum*. *Journal of Crop Production*,4(3), 291-300.
- Mahmudin, L., Suharyadi, E., Utomo, A., Abraha, K., 2015. Optical properties of silver nanoparticles for surface plasmon resonance (spr)-based biosensor applications. *Journal of Modern Physics.* <https://doi.org/10.4236/jmp.2015.68111>
- Makovitzki, A., Viterbo, A., Brotman, Y., Chet, I., Shai, Y., 2007. Inhibition of fungal and bacterial plant pathogens in vitro and in planta with ultrashort cationic lipopeptides. *Applied and environmental microbiology.* <https://doi.org/10.1128/AEM.01334-07>
- McNamara, K., Tofail, S.A.M., Thorat, N.D., Bauer, J., Mulvihill, J.J.E., 2020. Chapter 10 - biomedical applications of nanoalloys. *Nanoalloys (second edition)*. F. Calvo. Oxford, Elsevier: 381-432.
- Mihoubi, W., Sahli, E., Gargouri, A., Amiel, C., 2017. Ftir spectroscopy of whole cells for the monitoring of yeast apoptosis mediated by p53 over-expression and its suppression by nigella sativa extracts. *PLOS ONE.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180680>
- Messiga, A. J. N. A., Mwangi M., Bandyopadhyay, R., Nolte, C. 2004. The status of fungal tuber rots as a constraint to cassava production in the Pouma district of Cameroon. International institute of tropical Agriculture (IITA). Cameroon.

- Oliveira, D.G.P., Pauli, G., Mascarin, G.M., Delalibera, I., 2015. A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *beauveria bassiana* and *metarhizium anisopliae* from commercial products. *Journal of Microbiological Methods*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.09.021>
- Panwar, J., Jain, N., Bhargaya, A., Akhtar, M.S. and Yeung-Song, Y. 2012. "Positive Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Tomato Plants : A Step Towards Developing Nano- Fertilizers" , International conference on Environmental Research and Technology.348–35
- Prasad T.N.V.K.V., Sudhakar, P., Sreennivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Raja Reddy, K., Sreeprasad, T.S., Sajanalal, P.R. and Pradeep, T. 2012. "Effect of Nanoscale Zinc Oxide Particles on Germination, Growth and Yield of Peanut", *Journal of Plant Nutrition*. 35,905-927
- Rella, A., Farnoud, A.M., Del Poeta, M., 2016. Plasma membrane lipids and their role in fungal virulence. *Progress in lipid research*. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.11.003>
- Salvatore, M.M., Alves, A., Andolfi, A., 2020. Secondary metabolites of *lasiodiplodia theobromae*: Distribution, chemical diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Toxins*.
- Shanmugam, C., Sivasubramanian, G., Parthasarathi, B., Baskaran, K., Balachander, R., Parameswaran, V.R., 2016. Antimicrobial, free radical scavenging activities and catalytic oxidation of benzyl alcohol by nano-silver synthesized from the leaf extract of *aristolochia indica* L. : A promenade towards sustainability. *Applied Nanoscience*. <https://doi.org/10.1007/s13204-015-0477-8>
- Shapaval, V., Afseth, N.K., Vogt, G., Kohler, A., 2014. Fourier transform infrared spectroscopy for the prediction of fatty acid profiles in *mucor fungi* grown in media with different carbon sources. *Microbial Cell Factories*. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-86>
- Sintubin, L., De Windt, W., Dick, J., Mast, J., van der Ha, D., Verstraete, W., Boon, N. 2009. Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84(4): 741-749.

- Skoneczny, M., Skoneczna, A., 2018. Response mechanisms to chemical and physical stresses in yeast and filamentous fungi: Theoretical and practical aspects: 35-85.
- Stevens, N.E. 1926. Two species of *Physalospora* on citrus and other hosts. *Mycologia*. 18: 206-217.
- Sturikova, H., Krystofova, O., Hedbravny, J. and Vojtech, A. 2017. "The Comparison of Effect of Zinc Sulfate and Zinc Oxide Nanoparticles on Plants", Mendel Net Conference Brno 2018. November 8-9, Brno, Czech Republic. 932-936.
- Sutton, B. C. 1980. *The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stromata*. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 696 pp.
- Tang, W., Yang, H., Ryder, M. 2001. Research and Application of *Trichoderma* spp. in Biological Control of Plant Pathogens. In: *Bio-Exploitation of Filamentous Fungi* (eds. Pointing, S.B. and Hyde, K.D.), *Fungal Diversity Research Series*, 6, 403-435.
- Taheri, M., Ataie, Q.H., Qarache, A. A. and Yoosefi, M. 2015. "The Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Growth Parameters of Corn (SC704)", *STEM Fellowship Journal*. 1(2), 17-20.
- Van Aarle, I.M., Olsson, P.A., 2003. Fungal lipid accumulation and development of mycelial structures by two arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and environmental microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6762-6767.2003>
- Woo, S.L., Lorito, M. 2007. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plants biocontrol. in: *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, Vurro M. and Gressel J. (eds.), Springer 107-130.
- Zhang, H., Li, Q., Lu, Y., Sun, D., Lin, X., Deng, X., Zheng, S. 2005. Biosorption and bioreduction of diamine silver complex by *Corynebacterium*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 80(3): 285-290.
- Zhang, X., Liu, Z. Shen, W. & Gurunathan, S. 2016. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (9), 1-34.



1. อาหารเลี้ยงเชื้อรา

2.1 Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose หรือ Glucose	20	กรัม
ผงวุ้น (Agar)	18	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

หั่นมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 ลบ.ซม. นำมาต้มกับน้ำ 500 มิลลิลิตร จนสุกนิ่ม กรองเอาเฉพาะน้ำ แล้วเติม dextrose หรือ Glucose ลงไป ต้มผงวุ้นให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วยน้ำส่วนที่เหลือ หลังจากนั้นนำทั้งสองส่วนรวมกัน และปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่ขวดแก้วใส เพื่อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15-20 นาที

2.2 Potato Dextrose Broth (PDB)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose หรือ Glucose	20	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

หั่นมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 ลบ.ซม. นำมาต้มกับน้ำ 500 มิลลิลิตร จนสุกนิ่ม กรองเอาเฉพาะน้ำ แล้วเติม dextrose หรือ Glucose ลงไป ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่ขวดแก้วใสเพื่อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15-20 นาที

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวกัมไร เปือนสันเทียะ เกิดวันที่ 7 กรกฎาคม พ.ศ. 2523 สำเร็จการศึกษาระดับ มัธยมศึกษาตอนต้น และมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนนครบุรี อ. นครบุรี จ. นครราชสีมา เริ่มเข้าศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในปีการศึกษา 2542 ขณะที่ศึกษาในระดับปริญญาตรี ได้ศึกษาการตรวจสอบโปรตีน โดยศึกษาและตรวจหาการสะสมโพลีฟีนอลออกซิเดสในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของมะเขือเทศ และจากนั้นจึงมีความสนใจนำเทคนิคทาง เซอร์มิวติยาและชีวโมเลกุลมาใช้ในการตรวจสอบและวินิจฉัยโรคพืช ภายหลังจากสำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรีในปีการศึกษา 2/2545 ได้เข้าศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 3/2545 และสำเร็จการศึกษาระดับมหาบัณฑิตศึกษา ในปีการศึกษา 2547 ภายหลังจากสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิตศึกษา ได้เข้าศึกษาต่อในระดับดุษฎีบัณฑิตในหลักสูตร ปร.ด. (โรคพืช), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2550 และเข้าทำงานในปี พ.ศ. 2553 เป็นอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีจนถึงปัจจุบัน