



รายงานการวิจัย

การพัฒนานาโนอิทธิจันต์ปัจจัยการผลิต สำหรับการจัดการแบบผสมผสาน
เพื่อแก้ปัญหาโรคโคนเน่าหัวเน่าและสุขภาพมันสำปะหลัง
ในจังหวัดนครราชสีมา

Development of Nano-elicitor on Integrated Management of
Root Rot and Cassava Plant Health in Farmer Field
at Nakhon Ratchasima Province

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การพัฒนา nano-elicitor บังคับจัดการผลิตสารสำหรับการจัดการแบบผสมผสาน
เพื่อแก้ปัญหาโรคโคนเน่าหัวเน่าและสุขภาพมันสำปะหลัง
ในจังหวัดนครราชสีมา

Development of Nano-elicitor on Integrated Management of
Root Rot and Cassava Plant Health in Farmer Field
at Nakhon Ratchasima Province

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ดร. กาญจนา ธรรมนุ

ดร.สุพัชรี ศิริวงศ์

ดร.วรรณพร เทพบัณฑิต

นางสาวกชพร ต้นโพธิ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม 2565

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 และเตรียมเอกสารต่าง ๆ

ณัฐธิญา เป็อนสันเทียะ
หัวหน้าโครงการวิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ และศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง โดยทำการทดสอบเชื้อปฏิปักษ์ที่แยกได้จากดินในอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Trichoderma harzianum* *Trichoderma virens* และ *Bacillus subtilis* เพื่อเป็นตัวริ้วชีวารละลายซิลเวอร์นาโนในเตรตให้เกิดเป็นอนุภาคนาโนเพื่อใช้ในการควบคุมโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง จากการศึกษาพบว่า น้ำเลี้ยงเซลล์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สามารถริ้วชีวให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนได้ดีที่สุดโดยเปลี่ยนสีสารละลายซิลเวอร์นาโนในเตรต 5 มิลลิโมลาร์ จากสีใสเป็นสีเหลืองและสีน้ำตาลเข้มเมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ได้มีรูปร่างค่อนข้างกลม โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 60–90 นาโนเมตร และค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าบนผิวอนุภาค เท่ากับ +39.14 mV โดยใช้เทคนิคการสแกนภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และการวัดขนาดอนุภาคด้วยเทคนิคการกระเจิงแสงแบบพลวัต การใช้ออนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นถึงผลของสารยับยั้งจุลินทรีย์ต่อการลดขนาดของโคนเน่าเชื้อรา *L. theobromae* และ *F. solani* ลดลงได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม นอกจากนี้การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีเส้นใยของเชื้อราด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy พบว่า อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้นั้นมีผลทำให้ปริมาณของกลุ่มไขมันและโปรตีนของเส้นใยเชื้อราเพิ่มขึ้น ในขณะที่กลุ่มของ กรดนิวคลีอิก ฟอสโฟลิปิด และคาร์โบไฮเดรต ลดลง เนื่องจากการรบกวนกระบวนการขนส่งสารเข้าออกเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เชื้อราถูกทำลาย การประเมินความรุนแรงของโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลังที่ฉีดพ่นด้วยอนุภาคซิลเวอร์นาโน สามารถลดความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* ได้ ถึง 65.00% และ *F. solani* ได้ถึง 78.75% เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม นอกจากนี้ผลการทดสอบประสิทธิภาพซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมโรคมันสำปะหลังที่เกิดขึ้นในสภาพธรรมชาติในแปลงทดสอบ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา พบว่าการฉีดพ่นต้นมันสำปะหลังด้วยซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ สามารถควบคุมโรคใบด่างได้ในพันธุ์ซีเอ็มอาร์ 89 ระยะของ 72 และพันธุ์พิรุณ 6 ได้ และยังสามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสและใบไหม้ได้ในพันธุ์ซีเอ็มอาร์ 89 และพันธุ์ระยะของ 72 นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมโรคใบจุดในมันสำปะหลังพันธุ์พิรุณ 6 ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้จำเป็นต้องมีการทดสอบผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในระดับแปลงทดสอบในหลายพื้นที่ที่แตกต่างกันเพื่อนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์การควบคุมโรคมันสำปะหลังต่อไป

Abstract

This research aims to synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using beneficial microorganisms and studies fungal growth inhibition causing root rot disease of cassava. Three antagonistic strains isolated from soil in Pak Chong District, Nakhon Ratchasima Province including *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens* and *Bacillus subtilis* were used as a reducing agent for silver nitrate solutions into nanoparticles for controlling root rot disease of cassava. The results showed that culture filtrate of *T. harzianum* was the best biological synthesis of AgNPs which the color of the silver nitrate solution (5 mM) obviously changed from a clear color to a yellow and dark brown color when incubated for 48 h. AgNPs were nearly spherical, with a diameter between 60–90 nanometers (nm) and the mean zeta potential at +39.14 mV by using scanning electron microscopic image (SEM) and dynamic light scattering zeta (DLS) potential techniques. The use of AgNPs at a concentration of 40 mg L⁻¹ showed the antimicrobial effect on reductions in the size of the fungal colonies of *L. theobromae* and *F. solani* more than 50% which was significantly different when compared with the control. Then, biochemical changes of fungal mycelium by synchrotron FT-IR microspectroscopy technique revealed that the biosynthesized silver nanoparticles resulted in an increase in the lipid and protein content of the fungal mycelium. While the group of nucleic acids, phospholipids, and carbohydrates is reduced due to disruption of the intracellular transport process, the fungal cell membrane is destroyed. An assessment of the severity of root rot disease on cassava sprayed with AgNPs was significantly lower than that of the control which reduced the disease severity cause by *L. theobromae* 65.00% and *F. solani* 78.75% when compared with the control. Furthermore, the effect of silver nanoparticles for controlling natural cassava disease in field trial at Pak Chong District, Nakhon Ratchasima Province was found that spraying AgNPs can control mosaic virus in CMR89, Rayong72, and Pirun 6 varieties and can reduce anthracnose and leaf blast in CMR89 and Rayong72 varieties. In addition, AgNPs can control leaf spot disease in Pirun 6 varieties significantly when compared with the control (p=0.05). However, this research is necessary to evaluate the effect of AgNPs on controlling plant disease in different field areas for application and development as a cassava disease control product.

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 โรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง.....	5
2.4 แนวทางการแก้ปัญหาและควบคุมโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง.....	8
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การตัดแยกเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในมันสำปะหลัง และการเตรียมเชื้อสาเหตุโรค...	16
3.2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไตรโครเดอร์มา และบาซิลลัสจากดิน.....	16
3.3 การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพด้วยไตรโครเดอร์มา และบาซิลลัสจากดิน.....	16
3.4 การศึกษาขนาดรูปร่างพื้นผิวของผลึกอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ	17
3.5 การศึกษาประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการยับยั้ง การเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช.....	18
3.6 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimal inhibitory concentration, MIC)	18
3.7 การทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพต่อการเจริญ เส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	18
3.8 การตรวจสอบสารชีวเคมีเส้นใยเชื้อราด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy	19

3.9 การทดสอบซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง ระดับห้องปฏิบัติการ.....	19
3.10 การทดสอบซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตด้านความสูงต้น และการควบคุมโรคมันสำปะหลังระดับแปลงทดลอง	20
3.11 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	21
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพด้วยไตรโคเรเตอร์มา และบาซิลลัสจากดิน.....	22
4.2 ขนาดรูปร่างและองค์ประกอบของธาตุบนพื้นผิวของผลึกอนุภาคซิลเวอร์นาโน ทางชีวภาพ.....	23
4.3 ประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อรา สาเหตุโรคพืช.....	24
4.4 ผลของของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพต่อการเจริญเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	26
4.5 การเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีเส้นใยของเชื้อราด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy.....	27
4.6 ผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง	30
4.7 ผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุม โรคของมันสำปะหลังระดับแปลงทดลอง	32
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	38
บรรณานุกรม	42
ภาคผนวก	51
ประวัติผู้วิจัย	53

สารบัญญัตราสาร

ตารางที่	หน้า
4.1 ขนาดอนุภาคและศักย์เซต้าของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ทางชีวภาพ.....	23
4.2 การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของอนุภาคนาโนในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค <i>L. theobromae</i> และ <i>F. solani</i> สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่ามันสำปะหลัง.....	26
4.3 ประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการลดความรุนแรงของโรคโคนเน่าหัวเน่าในมันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89 ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรค <i>L. theobromae</i> และ <i>F. solani</i>	30
4.4 แสดงความสูงของต้นมันสำปะหลัง 3 พันธุ์ ที่ฉีดพ่นสารต่างกรรมวิธี	34
4.5 แสดงดัชนีการเกิดโรคใบจุด ใบไหม้ แอนแทรคโนส ใบด่าง และโรครากเน่าโคนเน่ามันสำปะหลังในแต่ละกรรมวิธี ที่อายุ 2 เดือนหลังปลูก	36
4.6 แสดงดัชนีการเกิดโรคใบจุด ใบไหม้ แอนแทรคโนส ใบด่าง และโรครากเน่าโคนเน่ามันสำปะหลังในแต่ละกรรมวิธี ที่อายุ 4 เดือนหลังปลูก.....	37

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.3.1 แสดงลักษณะอาการของโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง (Root rot diseases) เกิดจากเชื้อรา <i>Lasiodiplodia</i> spp. และ <i>Fusarium</i> sp.	5
4.1 การสังเคราะห์ทางชีวภาพของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต 5 มิลลิโมลาร์กับชีวมวลเชื้อราไตรโคเดอร์มา 5 กรัม ที่เวลาปฏิกริยาต่างกัน A) สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต 5 มิลลิโมลาร์, B) การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินที่ 0 ชั่วโมง, C) การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินที่ 24 ชั่วโมง และ D) การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินที่ 48 ชั่วโมง	22
4.2 การสังเคราะห์ทางชีวภาพของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต 5 มิลลิโมลาร์กับน้ำเลี้ยงเซลล์ของเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่เวลาปฏิกริยาต่างกัน A) สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต 5 มิลลิโมลาร์, B) การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินที่ 0 ชั่วโมง, C) การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินที่ 24 ชั่วโมง และ D) การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินที่ 48 ชั่วโมง	23
4.3 การตรวจสอบอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อของ <i>T. harzianum</i> โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)	24
4.4 การยับยั้งเชื้อ <i>Lasiodiplodia theobromae</i> บนจานวุ้นของอนุภาคนาโนที่มีความเข้มข้นต่างกัน, A) 0 mg L ⁻¹ , B) 20 mg L ⁻¹ , C) 30 mg L ⁻¹ , D) 40 mg L ⁻¹ , E) 50 mg L ⁻¹ , F) 100 mg L ⁻¹ , silver nitrate, and G) 4 g L ⁻¹ Carbendazim	25
4.5 การยับยั้งเชื้อ <i>Fusarium solani</i> บนจานวุ้นของอนุภาคนาโนที่มีความเข้มข้นต่างกัน, A) 0 mg L ⁻¹ , B) 20 mg L ⁻¹ , C) 30 mg L ⁻¹ , D) 40 mg L ⁻¹ , E) 50 mg L ⁻¹ , F) 100 mg L ⁻¹ , silver nitrate, and G) 4 g L ⁻¹ carbendazim	25
4.6 เปรอ์เซ็นต์เส้นใยเชื้อราที่เจริญปกติเมื่อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม ซิลเวอร์นาโน, ซิลเวอร์ไนเตรต, และสารเคมีคาเบนดาซิม A) เส้นใยเชื้อราปกติของ <i>Lasiodiplodia theobromae</i> และ B) เส้นใยเชื้อราปกติของ <i>Fusarium solani</i>	27
4.7 A) การวิเคราะห์ Principle component analysis (PCA) of <i>Lasiodiplodia theobromae</i> และ <i>Fusarium solani</i> ของกลุ่มอนุภาคซิลเวอร์นาโน1 (AgNPs1; 40 mg L ⁻¹) และอนุภาคซิลเวอร์นาโน 2 (AgNPs2; 50 mg L ⁻¹) เปรียบเทียบกับซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO ₃ ; 50 mg L ⁻¹) และกลุ่มควบคุม B) Loading แสดงค่าสเปกตรัมที่ใช้แยกความแตกต่างทางชีวเคมีของเส้นใยเชื้อรา	28

- 4.8 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (average 2nd derivative FTIR spectrum) ของสารชีวโมเลกุลในเส้นใยเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* และ *Fusarium solani* ที่ถูกป้อนด้วยอนุภาคซิลเวอร์นาโน 1 (AgNPs1; 40 mg L⁻¹) และอนุภาคซิลเวอร์นาโน 2 (AgNPs2; 50 mg L⁻¹) เปรียบเทียบกับซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO₃; 50 mg L⁻¹) และกลุ่มควบคุม A) ในช่วงความถี่ 3000-2800 cm⁻¹, B) ในช่วงความถี่ 1700-1450 cm⁻¹, และ C) ในช่วงความถี่ 1300-900 cm⁻¹ 29
- 4.9 ประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการลดความรุนแรงของโรคโคนเน่าหัวเน่าในมันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89 ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรค *Lasiodiplodia theobromae* A) กรรมวิธีควบคุม, B) ซิลเวอร์นาโน (AgNPs) 50 mg L⁻¹, C) ซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO₃) 100 mg L⁻¹, and C) คาเบนดาซิม 4 g L⁻¹ 31
- 4.10 ประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการลดความรุนแรงของโรคโคนเน่าหัวเน่าในมันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89 ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรค *Fusarium solani* A) กรรมวิธีควบคุม, B) ซิลเวอร์นาโน 50 mg L⁻¹, C) ซิลเวอร์ไนเตรต 100 mg L⁻¹, and C) คาเบนดาซิม 4 g 32

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 ผลิตภัณท์มันสำปะหลังราคาอยู่ในเกณฑ์ดีมาอย่างต่อเนื่อง 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) จากการวินิจฉัยพบว่า เชื้อสาเหตุสำคัญคือ *Lasiodiplodia*, *Fusarium* และ *Phytophthora* ซึ่งสามารถทำความเสียหายได้มากกว่า 80% และนอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2562 พบโรคใบด่างมันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง จากการวินิจฉัยพบว่า 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 แนวทางการแก้ไขปัญหาโรคดังกล่าวมีด้วยกันหลายวิธี เช่น การใช้พันธุ์ต้านทาน การใช้ท่อนพันธุ์ปลอดโรค การจัดการภายในแปลง และการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดซึ่งเป็นวิธีการจัดการแบบดั้งเดิม ในปัจจุบันความก้าวหน้าทางด้านนาโนเทคโนโลยีเข้ามามีบทบาทสำคัญในทางการเกษตรอย่างมากตั้งแต่ในกระบวนการผลิตในแปลงไปจนถึงการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวและการแปรรูปหรือการเพิ่มมูลค่า เช่น การเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยการนำฟางข้าวมาย่อยสลายให้มีขนาดเล็กลงจนเป็นอนุภาคนาโน การพัฒนาปุ๋ยอินทรีย์เคมีนาโนอัดเม็ดแบบละลายช้า โดยจะค่อย ๆ ปลดปล่อยธาตุอาหารที่พืชต้องการออกมาอย่างช้า ๆ อย่างต่อเนื่อง การปรับปรุงคุณภาพของอาหารเสริมพืชในระดับนาโน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมของพืชให้ได้รับสารอาหารอย่างเต็มที่ สร้างภูมิคุ้มกันให้ปลอดภัยจากโรค พืชสามารถเจริญเติบโตได้ดี และให้ผลผลิตได้อย่างเต็มที่ ดังนั้นการประยุกต์ใช้นาโนเทคโนโลยีจึงเป็นทางเลือกใหม่ในแก้ปัญหาโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ปัจจุบันนาโนเทคโนโลยีของโลหะเป็นที่สนใจเนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับสารชนิดเดียวกันที่มีขนาดใหญ่ ขนาดของอนุภาคนาโนที่นำไปประยุกต์ใช้ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 1–100 นาโนเมตร ซึ่งเป็นระดับขนาดที่มีความน่าสนใจทางนาโนเทคโนโลยีเป็นอย่างมาก 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. เพื่อพัฒนานาโนอิลิซิเตอร์ปัจจัยการผลิตสำหรับการจัดการแบบผสมผสานเพื่อแก้ปัญหาโรคโคนเน่าหัวเน่าและสุขภาพมันสำปะหลังในจังหวัดนครราชสีมา
2. เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ที่สามารถรื้อชีวิตให้เกิดอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ
3. เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

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

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ต้นแบบผลิตภัณฑ์นาโนอิลิซิเตอร์ที่มีผลต่อการป้องกันและควบคุมโรคเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง 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 เนื่องจากมันสำปะหลังเป็นพืชที่ปลูกง่ายมีปัญหาในการผลิตน้อยปรับตัวได้ดีในเกือบทุกสภาพพื้นที่ แม้จะมีปัญหาด้านโรคและแมลง หัวสดมีตลาดรองรับแน่นอน การขุดเก็บเกี่ยวไม่ขึ้นกับฤดูกาลสามารถจะชะลอการเก็บเกี่ยวได้ ทนต่อความแห้งแล้งเมื่อเปรียบเทียบกับพืชไร่ชนิดอื่น หลังจากปลูกไปแล้วประมาณ 1-2 เดือนแม้จะไม่ได้รับความชื้นเลยเป็นเวลา 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) โรคแอนแทรกคโนส (Cassava anthracnose disease, CAD) และโรคโคนเน่าหัวเน่า (Root rot or Tuber rot disease) (รังษิณีเจริญ สถาพร และอมรรักษ์ คัดใจเดียว, 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 ผ่านไปแล้ว โดยจะยึดอายุเก็บเกี่ยวไปได้ถึง 16 เดือน โดยส่วนตาดที่อยู่ด้านข้างท่อนมันจะเจริญเติบโตออกมาเป็นลำต้นต่อไป (दनัย ศุภพร, 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 เจริญจรรย์จจา, 2541) การปลูกมันสำปะหลังมีด้วยกัน 2 วิธี ได้แก่ การปลูกแบบนอนและแบบปัก (สมพงษ์ กาทอง, 2537; โสภณ สินธุประมา, 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; ยุกดี 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 และใจแอนด์ พัฒนาพันธุ์โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ ระยะเวลา 3 พันธุ์โดย กรมวิชาการเกษตร (ศูนย์ส่งเสริมพัฒนาการผลิตมันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2553) มันสำปะหลังสำหรับรับประทานมี 3 พันธุ์คือ มันสำปะหลังพันธุ์ทานาโท พันธุ์พิจิตร 2 และพันธุ์พิจิตร 4 เป็นต้น แต่ในสภาพการปลูกทั่วไป ในช่วง 3-4 ปี ที่ผ่านมามันสำปะหลังมักประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคและแมลงศัตรูพืชเข้าทำลาย

โดยแมลงศัตรูที่เข้าทำลายมันสำปะหลังที่สำคัญได้แก่ เพลี้ยแป้ง และไรแดง เป็นต้น ส่วนโรคที่พบได้แก่ โรคใบไหม้ โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคแอนแทรคโนส โรคลำต้นเน่า และโรคโคนเน่าหัวเน่า เป็นต้น

2.3 โรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง

โรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง มีรายงานว่าเกิดจากเชื้อราใน Family Botryosphaeriaceae โดยมีเชื้อราสกุลสำคัญที่เข้าทำลาย คือ สกุล *Lasiodiplodia* หัวมันสำปะหลังมีอาการหัวเน่าสีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งมีทั้งอาการเน่าแห้ง เน่าและ เนื้อเยื่อบริเวณหัวมันสำปะหลังเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีเหลืองน้ำตาล 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 มีกลุ่มเม็ดพิกนินเดีย (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 โดยมีรายงานที่อ้างอิงถึง teleomorph state ของเชื้อ *L. theobromae* โดยเรียกชื่อว่า *Botryosphaeria rhodina* ในปี 1867 Curtis (Berk and Curtis, 1867) ได้ทดลองแยกเชื้อ type material ของเชื้อรา *Physalospora rhodina* จากต้น *Rosa rubiginosa* และระบุว่า เป็นเชื้อราชื่อ *Sphaeria rhodina* B.&C. พร้อมกับได้บันทึกชื่อเชื้อรานี้ ไว้ในหนังสือ “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* จึงอ้างอิงภายใต้ชื่อของ 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 โดยคาดว่าอาจจะ เป็น *P.gossypina* แต่ก็ยังไม่ได้พิสูจน์ให้แน่ชัด และยังได้แยกเชื้อราในกลุ่มเดียวกับ ascomycete จากต้นไม้ใน Genus *Hicoria*, *Ilex*, *Liquidambar*, *Quercus* และ *Vitis* ในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยเชื้อราที่แยกได้จากพืชทุกชนิดที่กล่าวมาสามารถสร้าง conidia ได้จากหนึ่ง ascospore และได้ถูกพิสูจน์ในภายหลังว่านั่นเป็นเชื้อรา *L. theobromae* โดย Stevens (1926) เพราะฉะนั้น Stevens จึงเชื่อว่า *P.gossypina* แท้ที่จริงก็คือเชื้อราชนิดเดียวกันกับ *P.rhodina* ที่ถูกอ้างอิงโดย Cooke นั้นเอง (Stevens, 1926) อย่างไรก็ตาม ไม่ได้มีรายงานมาสนับสนุนงานวิจัยนี้ เพิ่มเติมแต่อย่างใด ต่อมาในปี เดียวกัน Stevens ได้ศึกษาในระยะ perfect state ของเชื้อราชนิดหนึ่งซึ่งก่อให้เกิดโรค stem end rot คือ เชื้อรา *Diplodia* sp. ก่อให้เกิดโรคในพืชตระกูลส้ม และได้ระบุว่า เป็นเชื้อราใน Genus *Physalospora* และแยกเชื้อราชนิดเดียวกันได้จากพืชอีกสองชนิดคือ *Persea* และ *Rosa* จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่แยกมาได้ Stevens พบว่า ascospore เดียวของเชื้อราดังกล่าว สามารถสร้าง conidia ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับ conidia ของเชื้อรา *L. theobromae* หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งคือ *D. gossypina* ได้ แต่อย่างไรก็ตามมีเพียงรายงานของ Stevens เท่านั้นที่อ้างอิงถึงระยะ teleomorph ของเชื้อรา *L. theobromae* (กาญจนา นิรัย และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552; Stevens, 1926)

Lasiodiplodia spp. พบได้ทุกภูมิภาคของโลกโดยพบได้มากที่สุดในเขตร้อนและกึ่งร้อน เช่น กล้วย ลิ้นจี่ เงาะ มะม่วง น้อยหน่า ทูเรียน พืชตระกูลแตง ลำไย ไม้ดอก ไม้ประดับ และไม้ยืนต้น เป็นต้น ทำให้เปลือกผลไม้มีสีน้ำตาลคล้ำ มีของเหลวไหลออกมาเปื้อนผล มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว มีเส้นใยของเชื้อราขึ้นปกคลุม ในลำไยจะทำให้ชั้วผลเน่าเป็นสีน้ำตาล เนื้อผลมีสีขาวขุ่น นอกจากก่อให้เกิดโรครากและการเก็บเกี่ยวแล้ว ยังเป็นสาเหตุของโรคยอดแห้งตายของสน โรคยางไหลของพืชตระกูลส้ม (กาญจนา นิธิภัย และ เอกชัย ชูเกียรติโรจน์, 2552) โรคหัวเน่าของมันเทศ โรคโคนและรากเน่าของสบู่ดำ (Latha et al., 2009; Machado 2012; Machado et al., 2014) นอกจากนี้เชื้อรา *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 เหงา และรากพืช และเป็นสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ ซึ่งระบาดทำความเสียหายแก่ พืชไร่ พืชหัว พืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ และไม้ผลทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว โรคสำคัญในต่างประเทศที่เกิดจากรา *Fusarium* และทำความเสียหายมากได้แก่ โรคเหี่ยวในกล้วย (Panama wilt) โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ พริก ปอ (flax) ผาย ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ถั่วลันเตา หัวหอม มันฝรั่ง กล้วย ส้ม และ แอปเปิ้ล ในประเทศไทยพบราสกุลนี้หลายชนิดกระจายอยู่ทั้งในดินและพืช มากกว่าชนิดอื่นโดยเป็นสาเหตุของโรคในพืชที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ กล้วยพืชมะพร้าว ผาย ถั่วลิสง หัวหอม กะหล่ำปลีแตงโม มะเขือเทศ พริก ถั่วฝักยาว และ มันฝรั่ง แต่โรคที่พบว่า เชื้อรา *Fusarium* ทำความเสียหายให้กับพืชในประเทศไทยมากที่สุด คือโรคเหี่ยว (*Fusarium* wilt disease) กับพืชล้มลุก และพืชผักหลาย ๆ ชนิด และโรคผลเน่า (*Fusarium* fruit rot) ที่มีการระบาดทำความเสียหายให้กับผลผลิตพืชเพิ่มมากขึ้น 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 โทมรมแต่ไม่ตาย มีลักษณะอาการใบร่วง ต้นแห้ง บริเวณโคนต้นจะแห้ง บางต้นแตกเป็นสีน้ำตาลไหม้ถึงดำ ระบบท่อน้ำท่ออาหารจะเน่ากลายเป็นสีดำโดยจะลุกลามจากแผลรอยตัดของท่อนพันธุ์หรือลำต้นที่เป็นแผล ทำให้

เปลือกบวมเน่าเป็นสีน้ำตาลดำ มีกลุ่มเม็ด pycnidia ของเชื้อราขึ้นบนเปลือกแล้วจะแห้งตายบริเวณโคนต้น ซึ่งเป็นบาดแผลที่ทำให้เชื้อราตัวอื่นสามารถเข้าทำลายได้ (กลุ่มอนุรักษน้ำ และดิน 2545; Duchanee et al., 2015) ในระยะหลังการเก็บเกี่ยวเชื้อราดังกล่าว สามารถทำให้อ่อนแอให้เกิดโรคหัวเน่าโดยจะมีลักษณะหัวเน่าดำ 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 เชื้อราจะเข้าทางแผลและลูกกลมมากขึ้นเมื่อมีความชื้นสูง (กลุ่มอนุรักษน้ำ และดิน 2545; Messiga et al., 2004)

2.4 แนวทางการแก้ปัญหาและควบคุมโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง

โรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia* และ *Fusarium* มีความสามารถในการอยู่รอดได้ดีในดิน และยังเป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยหลายชนิดสามารถควบคุมโรคดังนี้ 1) การเตรียมแปลงปลูกควรจะเป็นดินร่วน มีการระบายน้ำดีไม่ควรเป็นที่เคยมีน้ำท่วมขังหรือใกล้ทางระบายน้ำ หากดินระบายน้ำยาก ควรปลูกโดยวิธีกร่อง ก่อนทำการปลูกควรไถดินและตากแดดไว้ประมาณ 10-15 วัน 2) ทำความสะอาดแปลงก่อนปลูกโดยการทำลายเศษพืชที่เป็นแหล่งเพาะเชื้อโรค 3) คัดเลือกท่อนพันธุ์ที่สมบูรณ์ปราศจากโรคเตรียมท่อนพันธุ์ด้วยความระมัดระวังอย่าให้บอบช้ำ 4) ชุบท่อนพันธุ์ด้วยสารสารเคมี 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) หากพบโรคนี้ระบาดมาก่อน หรือที่ดินเป็นที่เปิดป่าใหม่ควรปลูกพืชหมุนเวียนพวงอัญชุก่อนปลูกมันสำปะหลัง เพื่อลดปริมาณเชื้อโรคนี้ 6) หากพบอาการรากเน่าเกินกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ ควรงดปลูกพืชขนาดอย่างน้อย 6 เดือน 7) ถ้าเป็นพื้นที่ระบาดแล้วให้เก็บเศษหัวมันสำปะหลังไปเผาทิ้งให้หมดเนื่องจากเป็นแหล่งเพาะเชื้อโรคที่สามารถอยู่ค้างได้เป็นปีเพื่อเป็นการตัดวงจรการแพร่กระจายเชื้อไม่ให้ลูกกลมต่อไป 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 หรือกระตุ้นให้พืชมีภูมิต้านทาน (Induced systemic resistance: ISR)

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

2.4.1.1 เชื้อราในกลุ่มไตรโคเดอร์มา

ไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma* spp.) เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช และสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตให้แก่พืชไตรโคเดอร์มาที่สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชมีหลายสายพันธุ์ 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. สาเหตุโรคร่วง ดอกร่วงของลำไย ลิ่นจี โรคดอกร่วงของทุเรียน *Lasiodiplodia* spp. สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของพริก ทุเรียน ส้ม มะนาว พริกไทย แตงโม แตงกวา มะเขือเทศ มันสำปะหลัง *Pythium* spp. สาเหตุโรคเน่าคอดิน กล้าเน่า โคนเน่า ยอดเน่า ของพืชผัก *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคเน่าคอดิน กล้าเน่า โรคใบดก *Fusarium* spp. สาเหตุโรคใบไหม้ใน ไม้ผล พืชไร่ พืชผัก และไม้ดอกไม้ประดับ *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคโคนเน่า โรคกล้าไหม้ ราเม็ดผักกาด โรคเหี่ยวในพืชผัก สตรอเบอร์รี่ และพืชไร่ *Alternaria* spp. สาเหตุโรคใบจุดเน่าใน คื่นช่าย ผักกาดขาว กระหล่ำดอก สตรอเบอร์รี่ มันฝรั่ง พริก *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสในมะม่วง องุ่น มะละกอ พริก หอม กระเทียม มันฝรั่ง *Macrophomina phaseolina* สาเหตุของโรคเมล็ดเน่า และโคนเน่าของพืชตระกูลถั่ว *Mycocentrospora acerina* สาเหตุโรคเน่าของแครอต *Botrytis cinerea* สาเหตุ โรคไหม้ (จระเข้ แง้มสว่าง, 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*, *Armillaria*, *Venturia*, *Endothia*, *Diaporthe*, and *Gaeumannomyces* (Tang et al., 2001)

2.4.1.2 เชื้อแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส

Bacillus สายพันธุ์ต่าง ๆ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมโรคโดยชีววิธี และการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช รวมไปถึงนำมาใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโต และชักนำภูมิคุ้มกันทานพืชเพื่อควบคุมโรคพืช ซึ่งมีความสำคัญในการนำมาประยุกต์ใช้ในทางการเกษตรเพื่อเป็นการลดปัญหาการ ใช้สารเคมีในพืชได้เป็นอย่างดีโดยในปี 1996 Asaka and Shoda ได้ศึกษา *B. subtilis* สายพันธุ์ RB14 ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืช คือสารปฏิชีวนะ iturin A และ surfactin ซึ่งพบว่าสารทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคโคนเน่าคอดิน ที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* ในมะเขือเทศ Berger et al. (1996) รายงานว่า การใช้เชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพืชสกุล *Photinia* และ *Brassica* พบว่า เชื้อดังกล่าวมีความสามารถในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora* sp. และ *Pythium* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ Brian et al. (2002) ได้ทำการศึกษาการฆ่าเหล่าโดยใช้สารเคมีทำให้ได้ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ M04 ซึ่งสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อรา *Botrytis cinerea* (grey mould), เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (bacterial wilt) และ *E. carotovora* pv. *carotovora* (bacterial soft rot) และ พบว่ามีการสร้างสารปฏิชีวนะ เมื่อทดสอบทางเคมี และคุณสมบัติของสารปฏิชีวนะแล้ว พบว่าเป็น สารพวก extracellular ที่ทนความร้อนได้ และสามารถละลายได้ใน methanol สารนี้ดูดยาวคลื่นแสงที่ 212 นาโนเมตร ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับกลุ่ม cyclic antibiotic lipopeptides เช่น iturin Cho et al. (2003) ได้ศึกษาเชื้อที่แยกได้จากฟางข้าว พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ KS03 สามารถผลิตสารทางชีวภาพที่ยับยั้งโรคแอนแทรคโนสจากเชื้อรา *Gloeosporium gloeosporioides* และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ KS03 ไปทำการแยกบริสุทธิ์พบว่าสารที่ให้ผลการยับยั้งคือ สารปฏิชีวนะ iturin A2

2.4.2 การควบคุมโรควิธีเขตกรรม

เป็นการป้องกันกำจัดโรคโดยการจัดระบบนิเวศของสถานที่ปลูกเพื่อไม่ให้พื้นที่เพาะปลูกเอื้ออำนวยต่อการระบาดของโรคโดยลดจำนวนให้น้อยลงด้วยการปฏิบัติทางการเกษตร เช่น การกำหนดระยะปลูกให้เหมาะสมโดยการปลูกมันสำปะหลังระยะ 1 x 1 เมตร มีการเกิดโรคพืชต่ำที่สุดและให้ผลผลิตได้ดีกว่าการปลูกโดยใช้ระยะอื่น คัดเลือกท่อนพันธุ์ที่สมบูรณ์ปราศจากโรค การทำความสะอาดแปลงก่อนปลูกโดยการทำลายเศษพืชที่เป็นแหล่งเพาะเชื้อโรค และจัดการระบบการระบายน้ำตลอดจนกำจัดเศษซากพืชที่เป็นโรคออก นอกจากนี้เมื่อทำการเก็บผลผลิตออกจากแปลงควรเก็บหัวมันสำปะหลังออกทั้งหมดรวมทั้งหัวมันสำปะหลังที่เป็นโรคด้วยเพื่อไม่ให้เป็นแหล่งสะสมของโรคในมันสำปะหลังรุ่นหลัง (อรพรรณ วิเศษสังข์, 2551)

2.4.3 การใช้สารเคมีในการควบคุมโรค

การป้องกันกำจัดโรคโคนเน่าหัวเน่าในปัจจุบัน มีการใช้สารเคมีกำจัดโรคของมันสำปะหลังเป็นจำนวนมากในแต่ละปีสารเคมีที่เกษตรกรนิยมใช้เช่น แชนท์ท่อนพันธุ์ด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อราเมทาแลกซิล 25% WP อัตรา 20-50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หรือฟอสอีทิล-อะลูมิเนียม 80% WP อัตรา 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร เป็นเวลา 10 นาที ในช่วงการเตรียมดินก่อนปลูก แต่การใช้สารเคมีในกลุ่มดังกล่าว มีความเสี่ยงต่อการ

ชักนำให้เกิดความต้านทานสารเคมีของเชื้อรา เนื่องจากสารเคมีในกลุ่มนี้มีกลไกการออกฤทธิ์ไปยับยั้งการสังเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อราจึงทำให้เชื้อราเกิดการเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรม (ชาติชาย ศิริพัฒน์, 2557)

2.4.4 การใช้นาโนเทคโนโลยีในการควบคุมโรค

นาโนเทคโนโลยีเป็นเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับวิทยาการหลากหลายสาขา ตั้งแต่เคมีสังเคราะห์ วัสดุศาสตร์วิศวกรรมไฟฟ้า อิเล็กทรอนิกส์ และวิทยาศาสตร์ชีวภาพ จึงทำให้ยากต่อการระบุคำนิยามที่ครอบคลุมทั้งหมดอย่างไรก็ดีในปัจจุบันองค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน (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) นาโนแมททีเรียลสังเคราะห์ที่ผลิตขึ้น 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 ผลิตภัณฑ์เครื่องมือแพทย์ ผลิตภัณฑ์อาหาร ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร และผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายที่ใช้ในบ้านเรือนหรือทางสาธารณสุข เป็นต้น ขนาดของอนุภาคนาโนที่นำไปประยุกต์ใช้ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 1–100 นาโนเมตร เป็นระดับการทำงานที่มีประสิทธิภาพ ปัจจุบันมีการนำอนุภาคนาโนมาใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตรเป็นจำนวนมากเช่น การปลูกข้าว ซึ่งได้มีการศึกษาผลของอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ปริมาณความเข้มข้นต่างๆ ต่อการงอก จำนวน และความยาวของรากของข้าว (Boonyanitipong et al, 2011) การเจริญเติบโตของข้าวโพด (Taheri et al., 2013) การเติบโตของหอมและขนาดหัวของหัวหอมซึ่งใช้ปริมาณอนุภาคนาโน แตกต่างกัน คือ 0 10 20 30 และ 40 ไมโครกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร พบว่า หัวหอมที่รดด้วยปริมาณอนุภาคนาโน 20 ไมโครกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร มีอัตราการงอก และอัตราการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด (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) และพีชอื่นๆ (Sturikova et al., 2017) และมีบทบาทสำคัญในการเกื้อหนุนการจัดการ

ฟาร์ม เช่น ปุ๋ยนาโนและสารกำจัดศัตรูพืชระดับนาโนเพื่อเพิ่มผลผลิต 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 เมื่ออนุภาคซิลเวอร์นาโนสัมผัสกับผนังเซลล์จะสามารถแพร่ผ่านเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียหรือเชื้อราได้ อนุภาคซิลเวอร์นาโนซึ่งมีสมบัติเป็น soft acid จะเกิดอันตรรกิริยากับโมเลกุลที่เป็น soft base ภายในเซลล์ คือส่วนที่เรียกว่าหมู่ซัลไฟดริล (Sulphydryl group) ของเอนไซม์โปรตีนเอส (Proteinase) ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับเมตาบอลิซึมของเซลล์ โดยหมู่ซัลไฟดริล (-SH) ที่มีอะตอมของซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบจะจับตัวกับอนุภาคของเงินทำให้กระบวนการการทำงานของเอนไซม์หยุดการทำงานจนกระทั่งเซลล์ของแบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตและเสื่อมสภาพไปในที่สุด

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.* โดยใช้นาโนซิลเวอร์ซิงค์ออกไซด์รูปแผ่นที่ความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใย *Alternaria sp.* ได้ดีที่สุดในเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 64.50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum sp.* ได้ 51.67 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับฤทธิ์การยับยั้งกับสารเคมีแมนโคเซบ พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งใกล้เคียงกัน จากนั้นทำการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเส้นใย *Alternaria sp.* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบแสงธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า นาโนซิลเวอร์ซิงค์ออกไซด์รูปแผ่นสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยโดยมีผลต่อกลไกการทำงานภายในเซลล์ทำให้เส้นใยเชื้อราไม่มีรูปร่างผิดปกติและยังมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *Alternaria sp.* (Boxi et al., 2016)

2.4.4.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโน

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนสามารถสังเคราะห์ได้หลายวิธี เช่น วิธีการทางเคมี วิธีการทางกายภาพ และวิธีการทางชีวภาพ ดังนี้ การสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยวิธีการทางเคมี (Chemical approach) เป็นวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากสามารถสังเคราะห์ได้ใน

ปริมาณมาก ควบคุมขนาดและรูปร่างได้ง่ายโดยเริ่มจากการนำเกลือของซิลเวอร์ที่นิยมใช้คือ ซิลเวอร์ไนเตรต (Silver nitrate) มาทำปฏิกิริยากับตัวรีดิวซ์ เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) โซเดียมซิเตรท (Sodium citrate) โซเดียมแอสคอร์เบท (Sodium ascorbate) โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (Sodium borohydride (NaBH₄)) เป็นต้น วิธีการทางกายภาพ (Physical approach) เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากอนุภาคเงินนาโนที่สังเคราะห์ได้มีความบริสุทธิ์สูง สามารถควบคุมขนาด รูปร่าง และปริมาณของอนุภาคเงินนาโนได้ง่าย (Mafune et al., 2002) แต่ข้อเสียคือเครื่องมือที่เขามีราคาแพงทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูง การสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางกายภาพโดยทั่วไปจะใช้วิธีการระเหยและควบแน่น (Evaporation–condensation) โดยใช้เตาเผาแบบหลอดแก้ว (Tube furnace) ที่ความดันบรรยากาศ แต่ข้อเสียของการใช้เตาเผาแบบหลอดแก้วคือต้องใช้เวลาสูงและใช้เวลานานเพื่อทำให้เกิดความเสถียรทางความร้อน ดังนั้นจึงมีการใช้เซรามิกฮีตเตอร์ขนาดเล็ก (Small ceramic heater) เนื่องจากไอที่เกิดขึ้นจากการระเหยจะควบแน่นกลับมาในอัตราเร็วที่เหมาะสมทำให้พื้นผิวของฮีตเตอร์สามารถถ่ายเทความร้อนได้ดี นอกจากนี้อุณหภูมิที่พื้นผิวของฮีตเตอร์ยังค่อนข้างคงที่ตลอดเวลาทำให้อนุภาคเงินนาโนที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเล็กและมีความเข้มข้นสูง อีกหนึ่งวิธีที่นิยมใช้ในสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนคือ วิธีการยิงด้วยเลเซอร์ (Laser ablation) ซึ่งสามารถควบคุมขนาดและรูปร่างได้ง่ายด้วยการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความยาวคลื่นของเลเซอร์ ความเข้มของแสงเลเซอร์ และเวลาในการยิงเลเซอร์ เป็นต้น วิธีการทางชีวภาพ (Biological approach) ปัจจุบันนักวิจัยให้ความสนใจการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนด้วยวิธีทางชีวภาพมากขึ้น เนื่องจากสามารถลดการใช้สารเคมีที่เป็นพิษและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยสามารถใช้แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ และสารสกัดจากพืชในการสังเคราะห์ ซึ่งส่วนประกอบหลักในการสังเคราะห์มี 3 ส่วนคือ 1) สารละลายตัวกลางในการสังเคราะห์ 2) ตัวรีดิวซ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และ 3) สารให้ความคงตัวที่ไม่เป็นพิษ ข้อดีของวิธีการสังเคราะห์ทางชีวภาพคือเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีและทางกายภาพ เนื่องจากสารชีวโมเลกุลที่อยู่ในจุลินทรีย์และสารสกัดจากพืชสามารถเป็นได้ทั้งตัวรีดิวซ์และสารให้ความคงตัว (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 และเซลล์จุลินทรีย์ยังสามารถนำธาตุโลหะเหล่านั้นไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมและการเจริญของเซลล์ช่วยช่วยบำบัดย่อยสลายโลหะที่เป็นพิษในสิ่งแวดล้อม (Sintubin et al., 2009) จุลินทรีย์แตกต่างกันส่งผลต่อกลไกในการเกิดอนุภาคนาโนได้ต่างกัน ซึ่งทั่วไปมีกลไกในการสร้างโดยเริ่มต้นที่ไอออนของโลหะจะยึดจับบริเวณพื้นผิวของเซลล์หรือบริเวณภายในเซลล์ หลังจากนั้นไอออนของโลหะจะถูกรีดิวซ์เป็นอนุภาคนาโนในสภาวะที่มีเอนไซม์เข้ามาช่วยเร่งปฏิกิริยากลายกลายเป็นการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของ gold และ silver NPs, heavy metallic NPs, magnetic NPs และ sulfide NPs

กลไกการสังเคราะห์อนุภาคนาโน กลไกการสังเคราะห์ในปัจจุบันมีนักวิจัยให้ความสนใจเกี่ยวกับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนจากจุลินทรีย์มากขึ้น แม้ว่าจะยังไม่ทราบกลไกการสังเคราะห์ที่แน่นอน แต่ก็มีข้อสันนิษฐานว่า สารประกอบที่เซลล์จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นมา เช่น วิตามิน กรดอินทรีย์ พอลิแซ็กคาไรด์ โพรตีน และ คาร์โบไฮเดรต มีส่วนช่วยในการรีดิวซ์และทำหน้าที่เป็นสารให้ความคงตัว (Ahmad et al., 2010) จากการศึกษาด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปีพบว่า สารเหล่านี้มีหมู่ไฮดรอกซิล คาร์บอนิล และเอมีน ซึ่งหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้มีบทบาทในการรีดิวซ์ซิลเวอร์ไอออน นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นสารให้ความคงตัวซึ่งช่วยให้อนุภาคเงินซิลเวอร์นาโนมีความเสถียรมากขึ้น และช่วยไม่ให้เกิดการรวมตัวของอนุภาคซิลเวอร์นาโนกลายเป็นอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ สารที่มีบทบาทในการเป็นตัวรีดิวซ์ (Sintubin et al., 2009) ซึ่งจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างสารชีวโมเลกุลที่สำคัญต่าง ๆ มากมายจาก กระบวนการ metabolism ได้แก่ โพรตีน เปปไทด์ คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัว reducing agents และเป็นตัว capping agents ที่สำคัญของกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน ดังนี้ $2\text{AgNO}_3 (\text{s}) + \text{cellular fluid} (\text{aq}) \rightarrow 2\text{Ag} (\text{s}) + \text{O}_2 (\text{g}) + 2\text{NO}_2 (\text{g}) + \text{cellular fluid} (\text{aq})$ (Li et al., 2011; Balashanmugam et al., 2016) โดยการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนชีวภาพของเซลล์จุลินทรีย์ได้มีการอธิบายกลไกการสังเคราะห์ เป็น 2 แบบ คือ แบบที่อาศัยเอนไซม์เป็นตัวตัวรีดิวซ์ (Enzymatic reduction) และแบบที่ไม่อาศัยเอนไซม์เป็นตัวตัวรีดิวซ์ (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 ซึ่งจะใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่เร็วกว่าซึ่งจะเกิดขึ้นได้ดีภายใต้สภาวะและปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ เช่น pH อุณหภูมิ และระดับความเข้มข้นของสารละลายเกลือ AgNO_3 (Gurunathan et al., 2009)

ส่วนในจุลินทรีย์บางชนิดที่เกิดอนุภาคนาโนภายในเซลล์ เช่น เซลล์ของเชื้อรา *Verticillium* sp. และสาหร่าย แต่ก็ยังไม่สามารถเข้าใจถึงกลไกได้ ซึ่งตามความเป็นจริงน่าจะอธิบายได้ว่าอนุภาคนาโนจะถูกสร้างบริเวณส่วนพื้นผิวของเซลล์เชื้อราโดยการกระทำของแรงของประจุไฟฟ้า (Electrostatic interaction) ระหว่างไอออนบวกของโลหะและไอออนลบบริเวณผนังเซลล์ซึ่งเป็นประจุของหมู่ carboxy group ในโมเลกุลของเอนไซม์ หลังจากนั้นเอนไซม์จะเป็นตัวรีดิวซ์ให้ประจุของโลหะเกิดการสร้างเป็นอนุภาค gold หรือ silver nuclei แล้วขยายเพิ่มปริมาณมากขึ้น (Zhang et al., 2011) ในเซลล์จุลินทรีย์คาดว่าเอนไซม์ nitrate reductase น่าจะมีส่วนสำคัญและเกี่ยวข้องในปฏิกิริยาโดยเอนไซม์นี้จะถูกชักนำโดยประจุของไนเตรทแล้วไปรีดิวซ์ไอออนของซิลเวอร์เป็น metallic silver ซึ่งจากกลไกนี้น่าจะอธิบายได้ว่าเอนไซม์ NADH-dependent nitrate reductase enzymes เป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของโลหะด้วยเซลล์จุลินทรีย์ผ่าน กระบวนการปฏิกิริยาที่เรียกว่า electron shuttle enzymatic metal reduction อนุภาคของซิลเวอร์นาโนมีพื้นที่ผิวมากทำให้ออกาสการสัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์มีมากเป็นผลให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มสูงขึ้น อนุภาคซิลเวอร์นาโนจะมี

ปฏิกิริยาต่อโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์จุลินทรีย์ ดังนั้นเมื่ออนุภาคซิลเวอร์นาโนสัมผัสกับจุลินทรีย์มันจะไปเกาะที่ผนังเซลล์และแทรกเข้าไปภายในโดยจะไปเกาะกับหมู่ -SH (Sulfphydryl) ของเอนไซม์ ซึ่งจะมีผลต่อระบบเมทาบอลิซึม ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และเกิดการทำลายระบบหายใจ ระบบการขนถ่ายอิเล็กตรอนในกระบวนการเมทาบอลิซึม และระบบขนถ่ายซีสเตรทในเยื่อหุ้มเซลล์ (Zhang et al., 2011; Kalishwaralal et al., 2010)



บทที่ 3

วิธีด าเนินกาฉิจัย

3.1 การคัดแยกเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคน้ำมันส าปะหลัง และการเตรียมเชื้อสาเหตุโรค

นำเชื้อร่าก่อโรคสายพันธุ์ความรุนแรงได้แก่ *L. theobromae* และ *F. solani* ซึ่งเป็นเชื้อร่าสาเหตุโรคโคนเน่าหัวเน่าที่แยกได้จากแปลงปลูกมันสำปะหลังใน อำเภอบางช่อง จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย เพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 7 วันสำหรับ *L. theobromae* และ 10 วันสำหรับ *F. solani* จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงในจานเพาะเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วใช้ช้อนชุดเชื้อที่เจริญบนอาหารที่ใส่หลอดเขย่าด้วยเครื่อง Vortex mixer จากนั้นนำไปตรวจนับโคโคนิตยโดยใช้ฮีโมไซโตมิเตอร์ และปรับความเข้มข้นเป็น 1×10^6 conidia mL⁻¹ สำหรับใช้ในการทดลอง (Oliveira et al., 2015)

3.2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไตรโคเดอร์มา และบาซิลลัสจากดิน

เก็บตัวอย่างดินจากสภาพแวดล้อมในแปลงปลูกมันสำปะหลัง ขนาด 5 ไร่ ที่ระดับความลึก 5-10 เซนติเมตร สุ่มเก็บตัวอย่างดิน 1,000 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกแล้วเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างดินมาอบแห้ง (Air-dried) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงจากนั้นนำตัวอย่างดิน 25 กรัม มากระจายในสารละลาย 0.85% NaCl ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเจือจางสารละลายตัวอย่างดิน แบบลำดับส่วนตั้งแต่ 10⁻¹-10⁻⁶ ปีเปตสารละลายเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร แข็ง water agar (WA) แล้วกระจายตัวอย่างสารละลายดินให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยเทคนิค spread plate โดยใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน คัดโคโลนีของเชื้อที่คาดว่าจะเป็ไตรโคเดอร์มาและบาซิลลัส แล้วเขี่ยโคโลนีไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง Hickey Tresner's agar (HTA) ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บในสารละลาย 25% glycerol ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3 การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพด้วยไตรโคเดอร์มา และบาซิลลัสจากดิน

การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพด้วยไตรโคเดอร์มา โดยนำไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma* spp.) 2 ไอโซเลต ได้แก่ *T. harzianum* และ *T. virens* แต่ละไอโซเลตมาเลี้ยงบนอาหาร แข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นใช้อุปกรณ์เจาะจุกคอร์ก (Cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร เจาะโคโลนีของเชื้อไปเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ในขวดรูปชมพู่ 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง นำส่วนชีวมวล 5 กรัม ผสมกับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต (5 มิลลิโมล) 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการกรองไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที นำสารละลายส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบ

ความสามารถในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน ผสมกับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต (5 มิลลิโมล) ในขวดรูปชมพู่ ด้วยอัตราส่วน 1:1 แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ให้โดนแสง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพด้วยบาซิลลัส โดยนำบาซิลลัส จำนวน 2 ไชโบลิต์ ได้แก่ D604 และ CaSUT007 ที่แยกได้จากห้องปฏิบัติการโรคพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปเขี่ยโคโลนีของเชื้อไปเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ในขวดรูปชมพู่ 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์ออกด้วยการกรองด้วยการปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที นำสารละลายส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์ไปผ่านชุดกรองแบคทีเรียขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโน โดยผสมกับสารละลาย $AgNO_3$ ในขวดรูปชมพู่ ด้วยอัตราส่วน 1:1 แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ให้โดนแสง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาสังเกตการเปลี่ยนสีของสารละลายเป็นสีเหลือง (Yellowish color) ถึงสีเหลืองน้ำตาล (Yellowish-brown color) ซึ่งแสดงว่ามีการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนของน้ำเลี้ยงเซลล์จากนั้นปั่นเหวี่ยงล้างอนุภาคซิลเวอร์นาโนด้วยสารละลาย 0.85% NaCl จำนวน 2 ครั้ง ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้ไปทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze-drying) แล้วเก็บในภาชนะป้องกันแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4 การศึกษาขนาดรูปร่างพื้นผิวของผลึกอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ

3.4.1 ศักย์ไฟฟ้าซีต้าของการกระจายแสงแบบไดนามิก (Dynamic light scat; DLS)

ขนาดและการกระจายของ ซิลเวอร์อนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs) ได้รับการตรวจสอบโดยใช้เครื่อง Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK นำอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้เจือจางด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นหยดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในช่องใส่ตัวอย่างและทิ้งให้อุณหภูมิระหว่างตัวอย่างและช่องใส่ตัวอย่างสมดุล แสงจากแหล่งกำเนิดแสงเลเซอร์จะส่องสว่างผ่านตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ผล (Carvalho et al., 2018)

3.4.2 การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM)

นำตัวอย่างอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่สังเคราะห์ได้มาศึกษารูปร่างและขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) โดยนำผงอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ 1 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตรแล้วทำให้กระจายตัวด้วยเทคนิค sonication เป็นเวลา 30 นาทีโดยไม่ใช้ความร้อนทำแห้งด้วยเครื่อง critical point drying จากนั้นติดลงบน stub แล้วนำไปเคลือบด้วยทองโดยทำการตรวจวัดลักษณะรูปร่างและขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่สังเคราะห์ได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน JEOL JSM-6010LV, Japan (Delvallée et al., 2015)

3.5 การศึกษาประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าหัวเน่าจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lasiodiplodia theobromae* และ *Fusarium solani* โดยนำเชื้อรามาลีบบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน เพื่อเตรียมสำหรับใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค จากนั้นนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราสาเหตุโรคพืช ด้วยเทคนิค 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 วัดขนาดโคโลนีของเชื้อรา เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่หยดน้ำกลั่นหนึ่งข่าเชื้อบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืชจากสมการ

$$\% \text{ การยับยั้ง} = (A - B)/A$$

A = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม

B = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารชุดทดสอบ

3.6 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

ทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดโดยวิธี Broth microdilution method ทำการเตรียมสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน ความเข้มข้นระหว่าง 40-60 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อ *F. solani* และ *L. theobromae* ที่ความเข้มข้น 1×10^6 spore mL⁻¹ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเติมลงในอาหาร PDB ที่ใช้ในการทดสอบซึ่งในแต่ละหลุมจะประกอบด้วยสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน 100 ไมโครลิตร และสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำเพลทไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อ่านผลหาค่า MIC โดย การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรด้วย Epoch micro plate spectrophotometer (Biotek, Germany) ฤทธิ์ต้านเชื้อราแสดงเป็น MIC ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อราหรืออาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีความขุ่น (Makovitzki et al., 2007)

3.7 การทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพต่อการเจริญเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค *L. theobromae* และ *F. solani* ความเข้มข้น 1×10^6 spore mL⁻¹ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร PDA ที่มีความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่างกัน ได้แก่ 0, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ได้แก่ ซิลเวอร์ไนเตรด และสารเคมีเบนดาซิม ที่ความเข้มข้นเดียวกัน จากนั้นทำการเกลี่ยสารทดสอบให้กระจายทั่วผิวหน้า และบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ด้วยแสง 12 ชั่วโมง / ความมืด 12 ชั่วโมง ตรวจสอบการพัฒนาของสปอร์

ภาพได้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกการงอกของสปอร์ระหว่างเส้นใยปกติและไม่ปกติจากนั้นคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์เส้นใยที่เจริญปกติของเชื้อราสาเหตุโรค

3.8 การตรวจสอบสารชีวเคมีเส้นใยเชื้อราด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy

นำเชื้อราสาเหตุโรคพืช *F. solani* และ *L. theobromae* มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค ย้ายลงในอาหาร PDB ที่ผสมกับซิลเวอร์นาโน (40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซิลเวอร์ไนเตรต (50 มิลลิกรัมต่อลิตร) และกรรมวิธีควบคุม บ่มที่ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ และวางตัวอย่างให้เรียบในระนาบเดียวกันบน BaF₂ และทำให้แห้งโดยการนำไปวางใน vacuum desiccator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy ณ BL4.1 IR Spectroscopy and Imaging ที่สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) โดยใช้โปรแกรม OPUS 7.5 (Bruker Optics Ltd, Ettlingen, Germany) ในการควบคุมการวัดตัวอย่าง และวัดที่ช่วง $4000 - 800 \text{ cm}^{-1}$ ที่ขนาดช่องแสง 10×10 ไมโครเมตร และสแกนตัวอย่างโดยกำหนดพารามิเตอร์ที่ 64 สแกน จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างของสารชีวโมเลกุลในแต่ละกลุ่มทดลองโดยการทำ Principle component analysis (PCA) โดยใช้โปรแกรม Unscrambler X 10.5 (CAMO, Norway) (Mihoubi et al., 2017)

3.9 การทดสอบซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลังระดับห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี ได้แก่ 1. น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2. อนุภาคซิลเวอร์นาโน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร 3. ซิลเวอร์ไนเตรต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร 4. สารเคมีคาเบนดาซิม 4 กรัมต่อลิตร โดยนำหัวมันสำปะหลังพันธุ์อ่อนแอ CMR 89 ที่ปลอดเชื้อสาเหตุโรคมานำแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1% เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำไหลผ่าน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้ง แล้วฝังให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะลงบนหัวมันสำปะหลังลึก 4 มิลลิเมตร 4 หลุมต่อ 1 หัว จากนั้นฉีดพ่นสารควบคุมโรคในแต่ละกรรมวิธี ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนหัวมันสำปะหลัง ฝังให้แห้ง เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จึงปลูกเชื้อราสาเหตุโรคพืช *F. solani* และ *L. theobromae* โดยใช้ไมโครปิเปตหยดสารแขวนลอยสปอร์ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะบนมันสำปะหลัง จากนั้นบ่มไว้ในกล่องพลาสติกที่ใส่สำลีชุบน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อรักษาความชื้น ที่อุณหภูมิห้อง 28 ± 2 องศาเซลเซียส ประเมินอาการโรคหลังปลูกเชื้อ 7 วัน โดยประเมินจากลักษณะอาการจุดแผล สัดส่วนความยาวของจุดแผลต่อความยาวของหัวมันสำปะหลัง การพัฒนาของโรคตามเกณฑ์การให้คะแนนระดับความรุนแรงของโรค 1-5 ดังนี้

- 1 = ไม่มีร่องรอยการเข้าทำลายของเชื้อ
- 2 = เชื้อเข้าทำลายเกิดความเสียหายที่หุ้มลำปะหลัง 1-25%,
- 3 = เชื้อเข้าทำลายเกิดความเสียหายที่หุ้มลำปะหลัง 26-50%,
- 4 = เชื้อเข้าทำลายเกิดความเสียหายที่หุ้มลำปะหลัง 51-75%
- 5 = เชื้อเข้าทำลายเกิดความเสียหายที่หุ้มลำปะหลังมากกว่า 75% (Boas et al., 2016)

3.10 การทดสอบซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตด้านความสูงต้นและการควบคุมโรคมันสำปะหลังระดับแปลงทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี ได้แก่ 1) นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 1 2) นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 2 3) นาโนซิงค์ออกไซด์® 4) สารเคมีมีดาคลอฟริต+ฟอสฟอรัสและ 5) กรรมวิธีควบคุม โดยใช้พันธุ์มันสำปะหลังในการทดลองร่วมประเมินทั้งหมด 3 พันธุ์ ได้แก่ ซีอีอาร์ 89 ระยะเวลา 72 และพิรุณ 6 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เหมาะสมต่อพื้นที่และเกษตรกรในพื้นที่นิยมปลูก อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

3.10.1 การเตรียมท่อนพันธุ์

ใช้ท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง 3 พันธุ์ ได้แก่ ซีอีอาร์ 89 ระยะเวลา 72 และพิรุณ 6 อายุท่อนพันธุ์ 11 เดือน ตัดท่อนพันธุ์ความยาว 20 เซนติเมตร และแช่ท่อนพันธุ์ด้วยไตรโคเดอร์มา อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร นาน 5 นาที ก่อนทำการปลูก

3.10.2 การเตรียมแปลง การปลูก ฉีดพ่นสารชีวภัณฑ์ และการกำจัดวัชพืช

เตรียมแปลงปลูกโดยการไถและยกร่องปลูกสูงในทิศทางเดียวกับความลาดเอียงของพื้นที่ ตัดร่องน้ำในบริเวณที่มีน้ำขังเพื่อให้มีการระบายน้ำดี จากนั้นทำการปลูกโดยปักท่อนพันธุ์แบบตรง ระยะห่าง 1.0x0.8 เมตร ทำการฉีดพ่นสารตามกรรมวิธีการทดลอง 3 ครั้ง ที่อายุพืช 1, 2 และ 3 เดือนหลังปลูกและกำจัดวัชพืชโดยใช้แรงงานในการถอน

3.10.3 การเก็บผลการทดลอง

1) ความสูงต้น

บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของมันสำปะหลัง ในลักษณะความสูงต้นที่อายุ 2, 4 และ 8 เดือนหลังปลูก โดยวัดความสูงจากโคนต้นจนถึงยอดของมันสำปะหลัง เก็บผลการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น

2) การประเมินการเกิดโรค

บันทึกข้อมูลการเกิดโรคของมันสำปะหลัง ได้แก่ โรคใบจุด ใบไหม้ แอนแทรคโนส ใบด่าง และรากเน่าโคนเน่า ที่อายุ 2, 4 และ 8 เดือนหลังปลูก โดยเก็บผลการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น โดยให้คะแนนความรุนแรงของโรค (Disease severity) 0-4 คะแนน ดังนี้

0 = ไม่พบการเกิดโรค

1 = พบอาการของโรค 1-25 เปอร์เซ็นต์

2 = พบอาการของโรค 26-50 เปอร์เซ็นต์

3 = พบอาการของโรค 51-75 เปอร์เซ็นต์ และ

4 = พบอาการของโรค >75 เปอร์เซ็นต์ (Harveson et al., 2002)

จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณดัชนีการเกิดโรค (disease index, DI) ตามสมการ ดังนี้

$$\% \text{ การเกิดโรค} = (\text{จำนวนต้นที่เป็นโรค} / \text{จำนวนต้นทั้งหมด}) \times 100$$

$$\% \text{ DI} = \frac{(0 \times N_0) + (1 \times N_1) + (2 \times N_2) + (3 \times N_3) + (4 \times N_4)}{N \times C} \times 100$$

0-4 = คะแนนความรุนแรงของโรค

N_0-N_4 = จำนวนต้นที่เกิดโรคในแต่ละระดับ

N = จำนวนพืชที่ประเมินโรคทั้งหมด

C = ระดับคะแนนความรุนแรงของโรคสูงสุด

3.11 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Random Design (CRD) ในการทดลองระดับห้องปฏิบัติการและโรงเรือน และ วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ในระดับแปลงทดลอง 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 ในการทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพพบว่า น้ำเลี้ยงเซลล์ และ มวลชีวภาพของ ไตรโคเดอร์มาทั้ง 2 ไอโซเลต ได้แก่ *T. harzianum* และ *T. virens* สามารถสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนได้โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตเป็นสีน้ำตาล โดยพบว่า การสังเคราะห์ซิลเวอร์นาโนโดยน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *T. harzianum* มีสีเข้มกว่าน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *T. virens* และเมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนสีของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตระหว่างการใช้ชีวมวลและน้ำเลี้ยงเซลล์ ของ *T. harzianum* พบว่า การใช้ น้ำเลี้ยงเซลล์มีสีที่เข้มกว่าหลังการบ่มที่ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.1 และ ภาพที่ 4.2) ในขณะที่น้ำเลี้ยงเซลล์ของบาซิลลัสทั้งสามไอโซเลต ไม่มีความสามารถรีดิวซ์ให้เกิดอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพได้ โดยสังเกตได้จากไม่พบการเปลี่ยนสีของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต



ภาพที่ 4.1 การสังเคราะห์ทางชีวภาพของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต 5 มิลลิโมลาร์กับชีวมวล เชื้อราไตรโคเดอร์มา 5 กรัม ที่เวลาปฏิกิริยาต่างกัน A) สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต 5 มิลลิโมลาร์, B) การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินที่ 0 ชั่วโมง, C) การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินที่ 24 ชั่วโมง และ D) การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินที่ 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.2 การสังเคราะห์ทางชีวภาพของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต 5 มิลลิโมลาร์กับน้ำเลี้ยงเซลล์ของเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่เวลาปฏิกิริยาต่างกัน A) สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต 5 มิลลิโมลาร์, B) การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินที่ 0 ชั่วโมง, C) การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินที่ 24 ชั่วโมง และ D) การสังเคราะห์อนุภาคนาโนเงินที่ 48 ชั่วโมง

4.2 ขนาดรูปร่างและองค์ประกอบของธาตุพื้นผิวของผลึกอนุภาคนาโนทางชีวภาพ

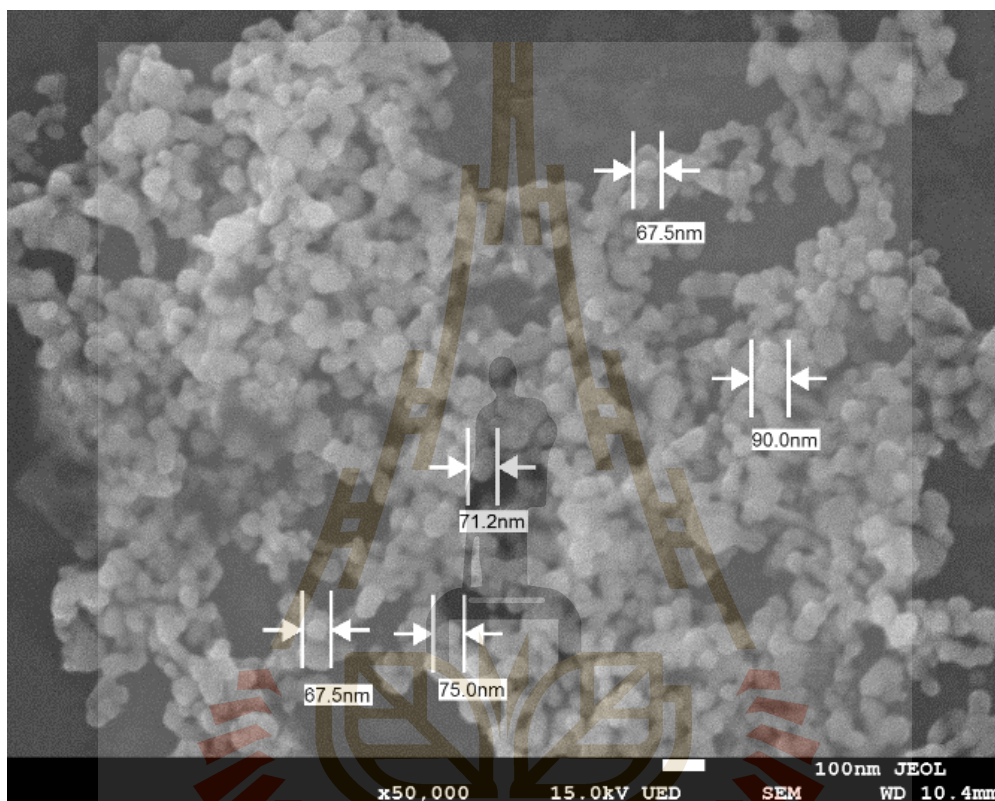
ผลของการวิเคราะห์สัณฐานภาพซีตาแสดงให้เห็นขนาดของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์โดยมวลชีวภาพและน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *T. virens* เท่ากับ 64.92, 41.78 นาโนเมตร และศักย์ภาพซีตาเฉลี่ยที่ -38.9 , $+39.14$ mV ในขณะที่ขนาดของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์โดยมวลชีวภาพ และน้ำเลี้ยงเซลล์ของ *T. harzianum* เท่ากับ 59.2 และ 39.79 นาโนเมตร และศักย์ซีตาเฉลี่ยที่ -23.7 และ -36.5 mV (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ขนาดอนุภาค และ ศักย์ซีตาของอนุภาคนาโนซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ทางชีวภาพ

กรรมวิธี	ขนาดอนุภาค (nm)	ศักย์ซีตา (mV)
ซิลเวอร์นาโนสังเคราะห์โดยมวลชีวภาพของ <i>T. virens</i>	64.92 ± 0.5	-38.9 ± 0.2
ซิลเวอร์นาโนสังเคราะห์โดยมวลชีวภาพของ <i>T. harzianum</i> biomass	59.2 ± 0.7	-23.7 ± 0.1
ซิลเวอร์นาโนสังเคราะห์โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>T. virens</i>	41.78 ± 0.8	$+39.14 \pm 0.3$
ซิลเวอร์นาโนสังเคราะห์โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>T. harzianum</i>	39.79 ± 0.5	-36.5 ± 0.3

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองสี่ซ้ำ

จากผลการศึกษาข้างต้นจึงคัดเลือกอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้ดีที่สุด (อนุภาคนาโนที่สังเคราะห์โดยน้ำเลี้ยงเชื้อของ *T. harzianum*) เพื่อทำการตรวจสอบขนาดและรูปร่างของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่สังเคราะห์ได้ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ SEM พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพมีลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลมอยู่ระหว่าง 60-90 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.3)

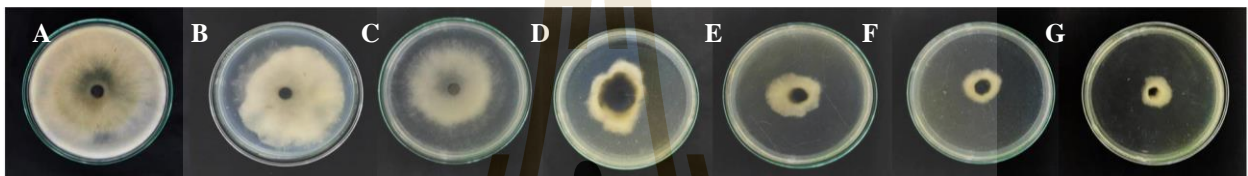


ภาพที่ 4.3 การตรวจสอบอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อของ *T. harzianum* โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

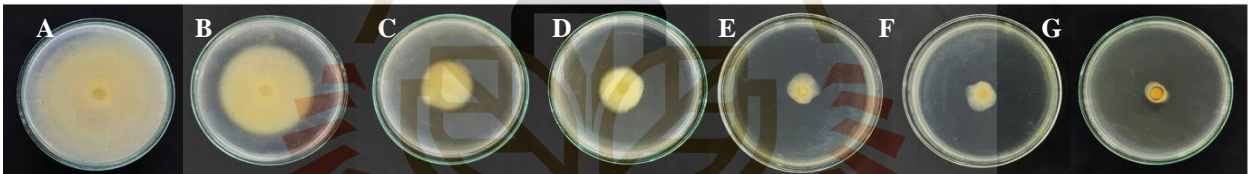
4.3 ประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืช

การทดสอบความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่สังเคราะห์ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อของ *T. harzianum* ตั้งแต่ 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของโคโลนีราสาเหตุโรคพืช 2 ชนิดได้แก่ *L. theobromae* และ *F. solani* พบว่า ระดับความเข้มข้นมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของโคโลนีราได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 4.4 และ ภาพที่ 4.5) โดยระดับความเข้มข้นที่ 20 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อราทั้งสองชนิดได้ *L. theobromae* เท่ากับ 12.80 % ในขณะที่ *F. solani* ยับยั้งได้ 20.22 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อเพิ่มค่าความเข้มข้นมากขึ้นส่งผลทำให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยค่าความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญโคโลนีของเชื้อรา *F. solani* มากกว่า 50% ในขณะที่เชื้อรา

L. theobromae พบว่าถูกยับยั้งการเจริญของโคโลนีได้มากกว่า 50% ที่ระดับความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.2) แสดงให้เห็นว่าเชื้อรามีความอ่อนแอต่ออนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว จากนั้นทำการศึกษาต่อเพื่อทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) โดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 50-60 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีค่า MIC ของเชื้อ *L. theobromae* และ *F. solani* เท่ากับ 58 และ 55 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ ซิลเวอร์ไนเตรต มีค่า MIC ของเชื้อ *L. theobromae* และ *F. solani* เท่ากับ 120 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และคาเบนดาซิม มีค่า MIC ของเชื้อ *L. theobromae* และ *F. solani* เท่ากับ 5 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 4.4 การยับยั้งเชื้อ *L. theobromae* บนจานวุ้นของอนุภาคนาโนที่มีความเข้มข้นต่างกัน, A) 0 mg L⁻¹, B) 20 mg L⁻¹, C) 30 mg L⁻¹, D) 40 mg L⁻¹, E) 50 mg L⁻¹, F) 100 mg L⁻¹, ซิลเวอร์ไนเตรต, และ G) คาเบนดาซิม 4 g L⁻¹



ภาพที่ 4.5 การยับยั้งเชื้อ *F. solani* บนจานวุ้นของอนุภาคนาโนที่มีความเข้มข้นต่างกัน, A) 0 mg L⁻¹, B) 20 mg L⁻¹, C) 30 mg L⁻¹, D) 40 mg L⁻¹, E) 50 mg L⁻¹, F) 100 mg L⁻¹, ซิลเวอร์ไนเตรต, และ G) คาเบนดาซิม 4 g L⁻¹

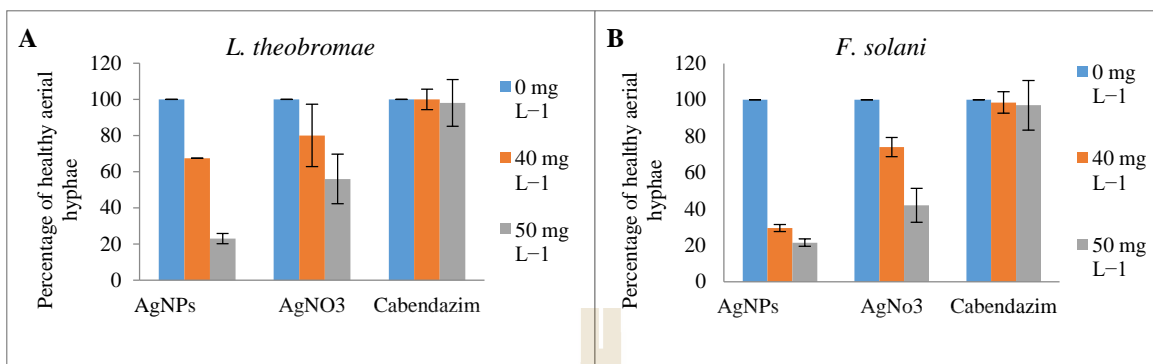
ตารางที่ 4.2 การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของอนุภาคนาโน ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค *L. theobromae* และ *F. solani* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่ามันสำปะหลัง

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>L. theobromae</i>	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของ เชื้อ <i>F. solani</i>
ซิลเวอร์นาโน 0 mg L ⁻¹	0±0 ^f	0±0 ^f
ซิลเวอร์นาโน 20 mg L ⁻¹	12.80±2.87 ^e	20.22±3.77 ^e
ซิลเวอร์นาโน 30 mg L ⁻¹	30.05±4.66 ^d	66.61±1.55 ^d
ซิลเวอร์นาโน 40 mg L ⁻¹	54.66±4.65 ^c	76.22±0.96 ^c
ซิลเวอร์นาโน 50 mg L ⁻¹	79.72±0.58 ^b	83.66±1.12 ^b
ซิลเวอร์ไนเตรต 100 mg L ⁻¹	83.98±0.83 ^{ab}	85.88±1.68 ^{ab}
คาเบนดาซิม 4 g L ⁻¹	87.37±0.76 ^a	89.58±0.53 ^a
F-test	**	**
CV (%)	3.26	5.33

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองซ้ำๆ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (p < 0.05)

4.4 ผลของของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์

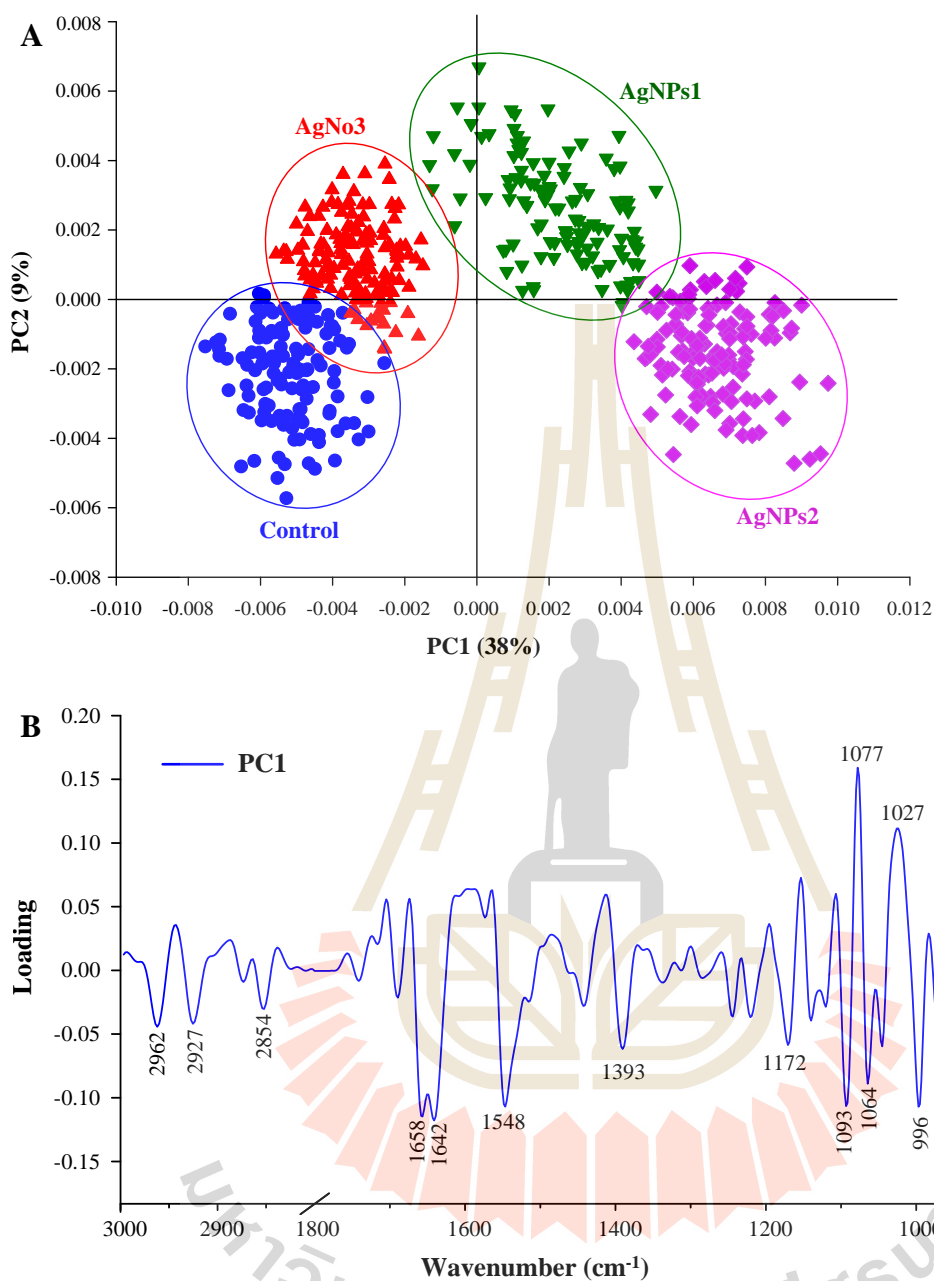
เพื่อตรวจสอบกลไกเพิ่มเติมของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพต่อการเจริญเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค *L. theobromae* และ *F. solani* จึงทำการตรวจสอบความสมบูรณ์ของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพส่งผลทำให้เกิดอาการผิดปกติกับสปอร์เชื้อรา เช่น มีการเจริญของเส้นใยลดลง เส้นใยขนาดใหญ่ขึ้นและเกิดการโป่งพอง มีการแตกแขนง มีขนาดสั้นลงส่งผลต่อความสมบูรณ์ของเชื้อราอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับทุกกรรมวิธี โดยพบเส้นใย *L. theobromae* เจริญปกติเพียง 60% ในกรรมวิธีที่ทดสอบกับอนุภาคซิลเวอร์นาโน (AgNPs) ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และลดลงเหลือ 26% เมื่อทดสอบกับความเข้มข้นที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ พบเส้นใย *F. solani* เจริญปกติเพียง 32.50% และ 20.00% ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่ากรรมวิธีที่ใช้ซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO₃) และสารเคมีคาเบนดาซิม (Cabendazim) (ภาพที่ 4.6)



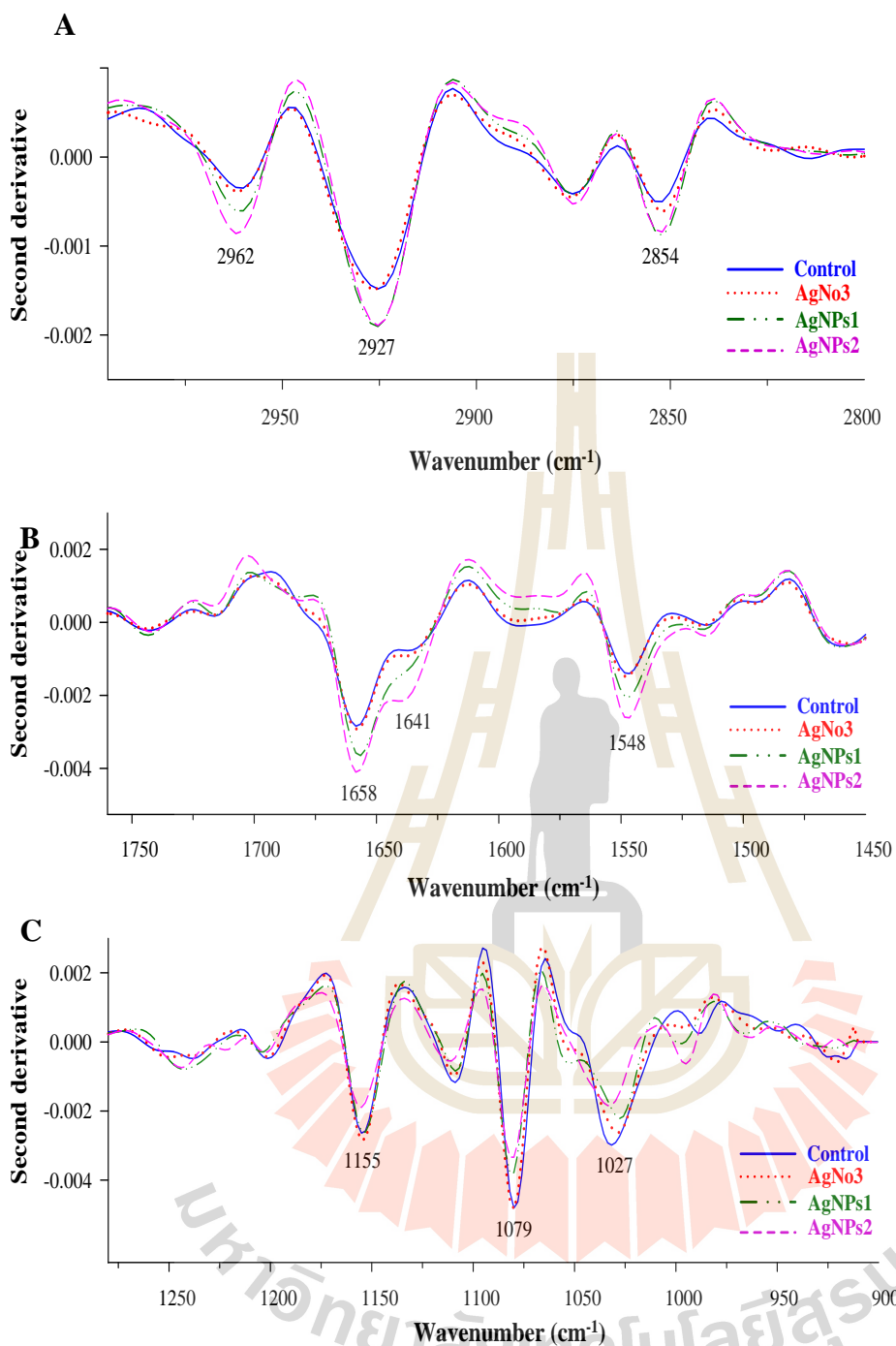
ภาพที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์เส้นใยเชื้อราที่เจริญปกติเมื่อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม ซิลเวอร์นาโน (AgNPs), ซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO₃), และสารเคมีคาเบนดาซิม (Cabendazim) A) เส้นใยเชื้อราปกติของ *L. theobromae* และ B) เส้นใยเชื้อราปกติของ *F. solani*

4.5 การเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีเส้นใยของเชื้อราด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy

จากการศึกษาตัวอย่างเชื้อราที่ได้จากการเลี้ยงร่วมกับสารควบคุมซิลเวอร์นาโนด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy เลือกสเปกตรัมของเส้นใยเชื้อราที่ต้องการ มาวิเคราะห์ Principle component analysis (PCA) พบว่าแกน PC1 สามารถแยกกลุ่มสเปกตรัมของเส้นใยเชื้อรา ระหว่างกลุ่มที่เลี้ยงร่วมกับอนุภาคซิลเวอร์นาโน ซึ่งจัดอยู่ในแกน PC1 ค่าบวกออกจากกลุ่มที่เลี้ยงด้วยซิลเวอร์ไนเตรตและกลุ่มควบคุมที่จัดอยู่ในแกน PC1 ค่าลบได้ด้วยความแตกต่าง 38 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.7A) โดยจำแนกความแตกต่างในตำแหน่ง peak ที่ 1077 and 1027 cm⁻¹ ซึ่งเป็นกลุ่มของโพลีแซ็กคาไรด์สูงกว่าในกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่ตำแหน่ง peak ที่ 2962, 2927, 2854, 1658, 1642 and 1548 cm⁻¹ ซึ่งเป็นกลุ่มของโปรตีนและไขมันสูงกว่าในกรรมวิธีที่ใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโน (ภาพที่ 4.7B) จากนั้นทำการวิเคราะห์สเปกตรัมของหมู่ฟังก์ชันที่เปลี่ยนแปลงไปโดยแยกการวิเคราะห์ออกเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มแรก ได้แก่ กลุ่มไขมันและกรดไขมัน (3000-2800 cm⁻¹) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเส้นใยเชื้อรา แสดงการสั่นของพันธะในหมู่ฟังก์ชัน CH₃, CH₂ ซึ่งพบว่ากรรมวิธีที่ใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนสูงที่สุดในตำแหน่งที่ peak 2962, 2927, and 2854 cm⁻¹ รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ใช้ซิลเวอร์ไนเตรต และกรรมวิธีควบคุมตามลำดับ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ โปรตีน และเปปไทด์ที่เป็นสายโซ่ของกรดอะมิโน เอไมด์ I และ เอไมด์ II (amide I, amide II) พบว่ากรรมวิธีที่ใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนสูงที่สุดในตำแหน่งที่ peak 1658, 1642, and 1548 cm⁻¹ รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ใช้ซิลเวอร์ไนเตรต และกรรมวิธีควบคุมตามลำดับ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ กรดนิวคลีอิก ฟอสโฟลิปิด โพลีแซ็กคาไรด์ และคาร์โบไฮเดรต พบว่ากรรมวิธีควบคุมสูงที่สุดในตำแหน่งที่ peak 1155, 1079 และ 1027 รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ใช้ซิลเวอร์ไนเตรตและอนุภาคซิลเวอร์นาโนตามลำดับ (ภาพที่ 4.8)



ภาพที่ 4.7 A) การวิเคราะห์ Principle component analysis (PCA) ของ *L. theobromae* และ *F. solani* ของกลุ่มอนุภาคซิลเวอร์นาโน 1 (AgNPs1; 40 mg L⁻¹) และอนุภาคซิลเวอร์นาโน 2 (AgNPs2; 50 mg L⁻¹) เปรียบเทียบกับซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO₃; 50 mg L⁻¹) และกรรมวิธีควบคุมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (Control) B) Loading แสดงค่าสเปกตรัมที่ใช้แยกความแตกต่างทางชีวเคมีของเส้นใยเชื้อรา



ภาพที่ 4.8 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (Average 2nd derivative FTIR spectrum) ของสารชีวโมเลกุลในเส้นใยเชื้อรา *L. theobromae* และ *F. solani* ที่ถูกบ่มด้วยอนุภาคซิลเวอร์นาโน 1 (AgNPs1; 40 mg L⁻¹) และอนุภาคซิลเวอร์นาโน 2 (AgNPs2; 50 mg L⁻¹) เปรียบเทียบกับซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO₃; 50 mg L⁻¹) และกรรมวิธีควบคุมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (Control) A) ในช่วงความถี่ 3000-2800 cm⁻¹, B) ในช่วงความถี่ 1700-1450 cm⁻¹, และ C) ในช่วงความถี่ 1300-900 cm⁻¹

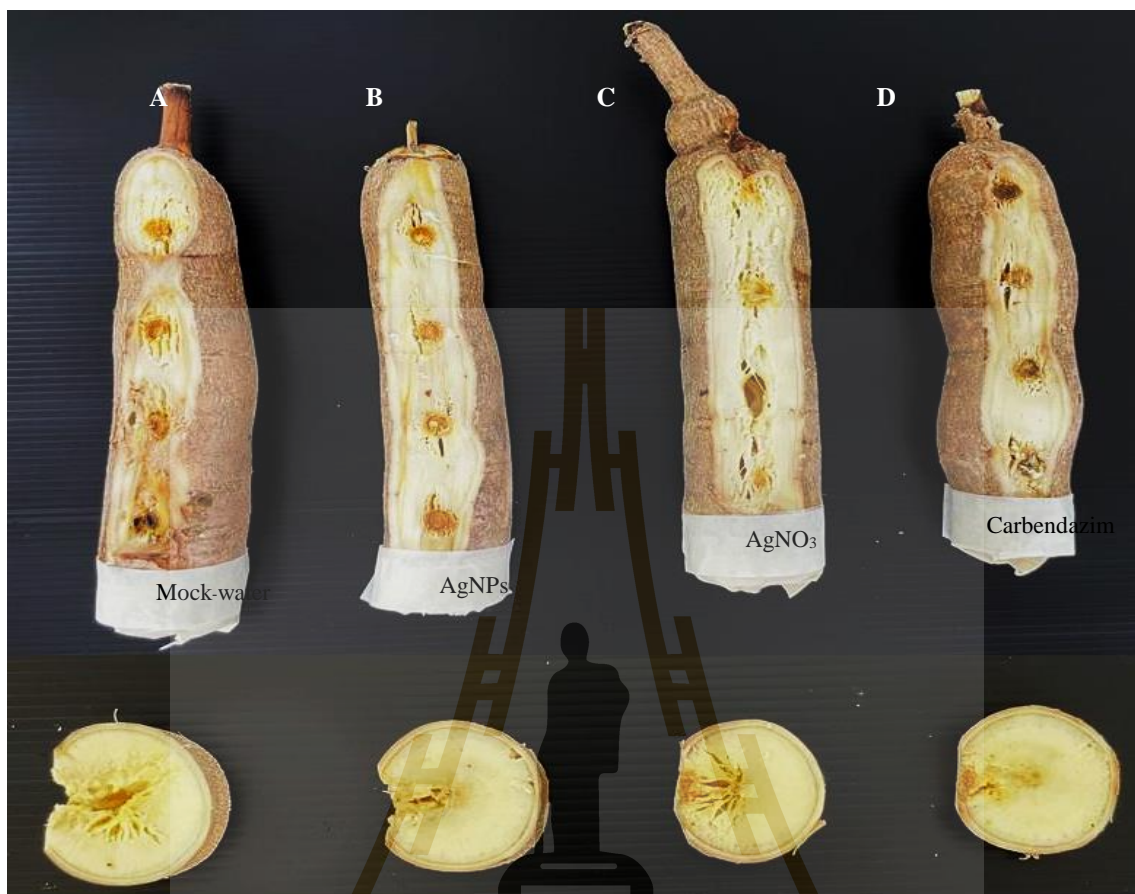
4.6 ผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลังพันธุ์อ่อนแอ CMR 89 ที่เกิดจากเชื้อราสองชนิด ได้แก่ *L. theobromae* และ *F. solani* โดยประเมินความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อ *L. theobromae* หลังการปลูกเชื้อ 7 วัน พบว่า กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยซิลเวอร์นาโน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงความรุนแรงของโรคน้อยที่สุดเท่ากับ 1.75 ± 0.50 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยซิลเวอร์ไนเตรต (2.50 ± 0.57) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ กรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาเบนดาซิม (1.50 ± 0.57) ในส่วนการประเมินความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อ *F. solani* พบว่า กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยซิลเวอร์นาโน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงความรุนแรงของโรคน้อยที่สุดเท่ากับ 1.00 ± 0.00 รองลงมาได้แก่ คาเบนดาซิม ซิลเวอร์ไนเตรต เท่ากับ 1.25 ± 0.50 และ 1.50 ± 0.57 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 4.3, ภาพที่ 4.9 และ 4.10).

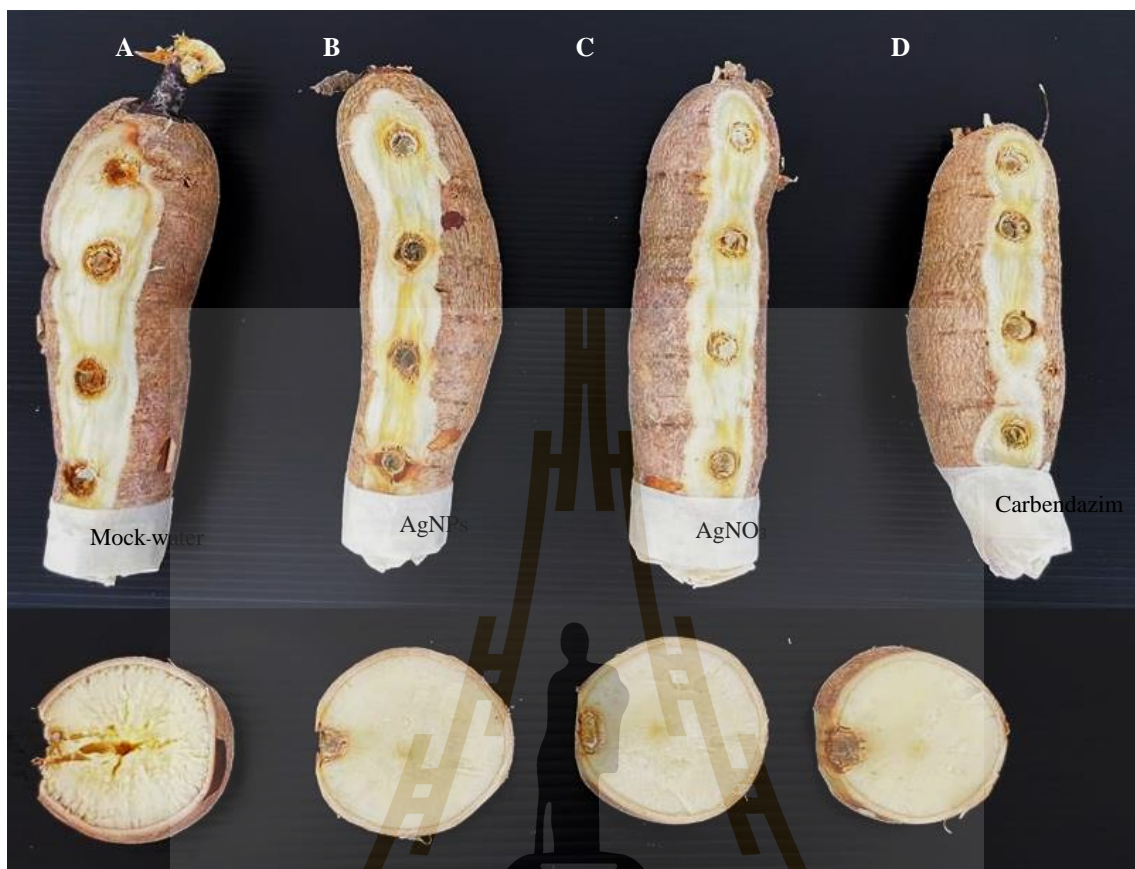
ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการลดความรุนแรงของโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89 ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรค *L. theobromae* และ *F. solani*

กรรมวิธี	ความรุนแรงของโรค (คะแนน)	อัตราการลดโรค (เปอร์เซ็นต์)	ความรุนแรงของโรค (คะแนน)	อัตราการลดโรค (เปอร์เซ็นต์)
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>		<i>Fusarium solani</i>	
น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ	5.00 ± 0.00^a	-	4.75 ± 0.50^a	-
ซิลเวอร์นาโน	1.75 ± 0.50^c	65.00 ± 10.00^a	1.00 ± 0.00^b	78.75 ± 2.50^a
ซิลเวอร์ไนเตรต	2.50 ± 0.57^b	50.00 ± 11.54^b	1.50 ± 0.57^b	68.75 ± 10.31^a
คาเบนดาซิม	1.50 ± 0.57^c	70.00 ± 11.54^a	1.25 ± 0.50^b	73.75 ± 9.46^a
F-test	**	**	**	**
CV (%)	22.50	18.32	22.25	10.33

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองสี่ซ้ำ, ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4.9 ประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการลดความรุนแรงของโรคโคนเน่าหัวเน่าในมันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89 ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรค *Lasiodiplodia theobromae* A) น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (Mock-water), B) ซิลเวอร์นาโน (AgNPs; 50 mg L⁻¹), C) ซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO₃; 100 mg L⁻¹), และ D) คาเบนดาซิม (Carbendazim; 4 g)



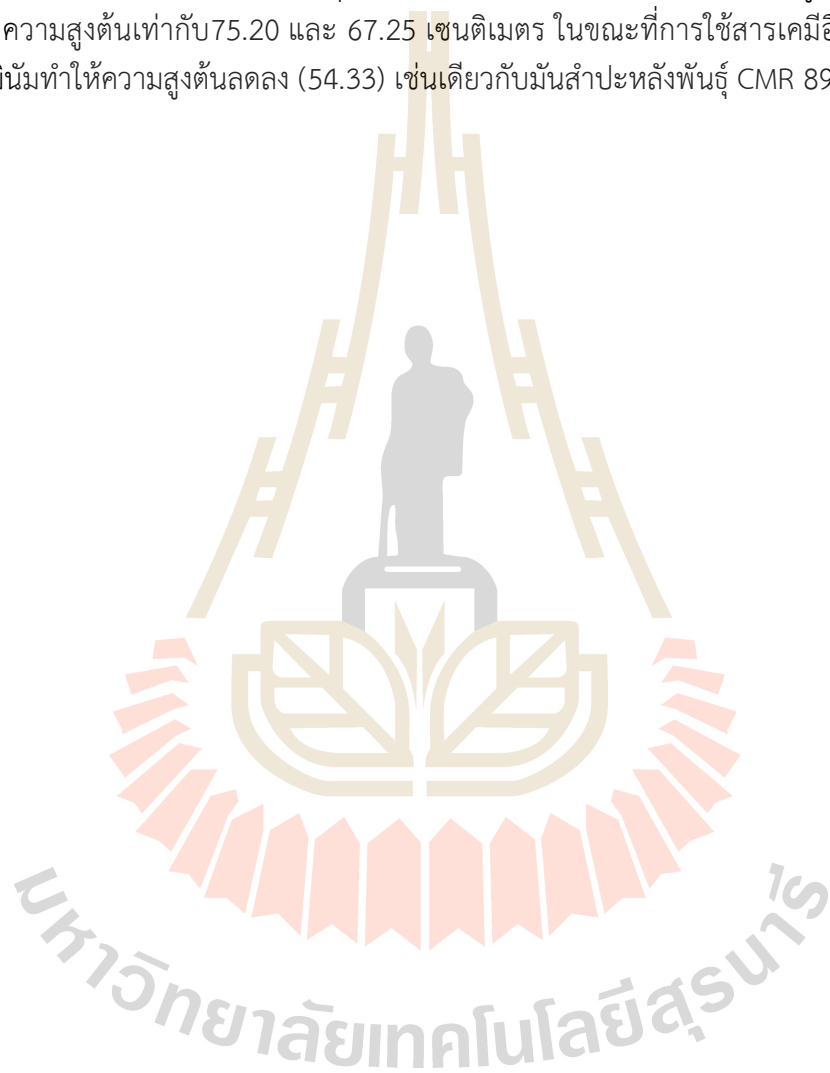
ภาพที่ 4.10 ประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการลดความรุนแรงของโรคโคนเน่าหัวเน่าในมันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89 ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรค *Fusarium solani* A) น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (Mock-water), B) ซิลเวอร์นาโน (AgNPs; 50 mg L⁻¹), C) ซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO₃; 100 mg L⁻¹), และ C) คาเบนดาซิม (Carbendazim; 4 g)

4.7 ผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคของมันสำปะหลังระดับแปลงทดลอง

4.7.1 การส่งเสริมการเจริญเติบโตด้านความสูงของมันสำปะหลัง

จากการศึกษาอิทธิพลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนอิลิซิเตอร์ชีวภาพที่สังเคราะห์ได้ต่อการเจริญเติบโตทางด้านความสูงต้น ในมันสำปะหลัง 3 สายพันธุ์ได้แก่ CMR 89 ระยะเวลา 72 และพิรุณ 6 พบว่า ที่ระยะเวลา 2 เดือน หลังการฉีดพ่นนาโนอิลิซิเตอร์ทั้งสองสูตร สามารถกระตุ้นพืชให้เจริญเติบโตด้านความสูงของมันสำปะหลังทั้งสามสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพบว่า พันธุ์มันสำปะหลัง CMR 89 มีความสูงต้นเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 40.70 เซนติเมตร เมื่อฉีดพ่นด้วยนาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 1 รองลงมาได้แก่ นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 2 และนาโนซิงค์ออกไซด์® มีความสูงต้นเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 37.38 และ 31.40 เซนติเมตร ในขณะที่การใช้กรรมวิธีดั้งเดิมทำให้ความสูงต้นเฉลี่ยลดลงเท่ากับ 27.30 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ความสูงต้นเฉลี่ยเท่ากับ 28.30 เช่นเดียวกับพันธุ์มันสำปะหลัง

ระยอง 72 พบว่า การฉีดพ่นด้วยนาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 1 ส่งผลทำให้ต้นมันสำปะหลังมีความสูงเฉลี่ยเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมเท่ากับ 68.78 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 2 นาโนซิงค์ออกไซด์® เท่ากับ 63.80 และ 59.11 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่การใช้กรรมวิธีดั้งเดิมทำให้ความสูงต้นเฉลี่ยลดลง (38.50 เซนติเมตร) เมื่อพิจารณาพันธุ์มันสำปะหลัง พิรุณ 6 พบว่าการใช้นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 2 ส่งผลทำให้ความสูงต้นเพิ่มขึ้น เท่ากับ 89.30 เซนติเมตรซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับทุกกรรมวิธี รองลงมาได้แก่ นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 1 และนาโนซิงค์ออกไซด์® ความสูงต้นเท่ากับ 75.20 และ 67.25 เซนติเมตร ในขณะที่การใช้สารเคมีอิมิดาโคลพริด+ฟอสฟิทธิลอะลูมิเนียมทำให้ความสูงต้นลดลง (54.33) เช่นเดียวกับมันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89 และระยอง 72 (ตารางที่ 4.4)



ตารางที่ 4.4 แสดงความสูงของต้นมันสำปะหลัง 3 พันธุ์ ที่ฉีดพ่นสารต่างกรรมวิธี

พันธุ์มันสำปะหลัง	กรรมวิธี	ความสูงต้น (เซนติเมตร) ¹		% ความสูงที่เพิ่มขึ้น	
		2 เดือน	4 เดือน	2 เดือน	4 เดือน
ซีเอ็มอาร์ 89	นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 1	40.70 ^a	76.20	43.82	0.26
	นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 2	37.38 ^{ab}	86.50	32.07	13.82
	นาโนซิงค์ออกไซด์ [®]	31.40 ^{bc}	86.50	10.95	13.82
	กรรมวิธีดั้งเดิม ²	27.30 ^c	71.50	-3.53	-5.92
	กรรมวิธีควบคุม	28.30 ^c	76.00	0.00	0.00
f-test		**	ns	-	-
CV (%)		20.34	17.36	-	-
ระยอง 72	นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 1	68.78 ^a	125.50	70.66	11.56
	นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 2	63.80 ^a	116.00	58.31	3.11
	นาโนซิงค์ออกไซด์ [®]	59.11 ^a	116.00	46.68	3.11
	กรรมวิธีดั้งเดิม ²	38.50 ^b	113.00	-4.47	0.44
	กรรมวิธีควบคุม	40.30 ^b	112.50	0.00	0.00
f-test		**	ns	-	-
CV (%)		20.55	18.11	-	-
พิรุณ 6	นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 1	75.20 ^b	118.50	29.88	-2.87
	นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 2	89.30 ^a	129.50	54.23	6.15
	นาโนซิงค์ออกไซด์ [®]	67.25 ^c	125.80	16.15	3.11
	กรรมวิธีดั้งเดิม ²	54.33 ^d	116.50	-6.16	-4.51
	กรรมวิธีควบคุม	57.90 ^d	122.00	0.00	0.00
f-test		**	ns	-	-
CV (%)		18.49	18.38	-	-

¹ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษร (a, b, c) ที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01, ns = ไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

²: กรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกร (อิมิตาคลอปรีด+ฟอสฟอรัส+โพแทสเซียม)

4.7.2 การควบคุมโรคมันสำปะหลังระดับแปลงทดลอง

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมโรคมันสำปะหลัง ที่ระบาดในพื้นที่ปลูกหลังการฉีดพ่น 1 ครั้ง ที่อายุพืช 1 เดือน และเก็บข้อมูลการดัดขึ้นเกิดโรคที่มันสำปะหลัง อายุ 2 เดือน พบว่า มันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89 ในกรรมวิธีที่ใช้นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 2 และกรรมวิธีที่ 1 ใช้นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 1 สามารถลดการระบาดของโรคได้เช่นเดียวกัน สามารถลดการระบาดของโรค ใบต่างได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีค่าดัชนีการเกิดโรค เท่ากับ 6.66 และ 10.00% ตามลำดับ เมื่อ

เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม 36.66% ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้โอลิซิเตอร์ทางการค้า (30.00%) และ สารเคมี (38.33%) ไม่สามารถลดการระบาดของโรคใบด่างได้ นอกจากนั้นผลการทดลองยังชี้ให้เห็นว่า นาโนโอลิซิเตอร์สูตรที่ 2 ยังสามารถควบคุมโรคใบไหม้ และแอนแทรคโนส ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ นาโนโอลิซิเตอร์สูตรที่ 1 ควบคุมได้เพียงโรคแอนแทรคโนส และเมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพหลังพ่นระยะยง 72 พบว่า นาโนโอลิซิเตอร์สูตรที่ 1 และ 2 สามารถควบคุมโรคใบด่างได้ 100% ในขณะที่มันสำปะหลังพันธุ์พิจิตร 6 พบว่า นาโนโอลิซิเตอร์สูตรที่ 1 เพียงสูตรเดียวที่สามารถควบคุมโรคใบด่างได้ในขณะที่นาโนโอลิซิเตอร์สูตรที่ 2 สามารถควบคุมโรคใบไหม้ได้ (8.33%) เช่นเดียวกับนาโนโอลิซิเตอร์สูตรที่ 1 (10.00%) และกรรมวิธีดั้งเดิม (13.33%) ดังแสดงในตารางที่ 4.5

จากนั้นเปรียบเทียบประสิทธิภาพอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมโรคมันสำปะหลัง ที่ระบาดในพื้นที่ปลูกหลังการฉีดพ่น 3 ครั้ง ที่อายุพืช 1 เดือน 2 เดือน และ 3 เดือน และเก็บข้อมูลดัชนีการเกิดโรคมันสำปะหลังที่อายุ 4 เดือน พบว่า มันสำปะหลังพันธุ์ซีเอ็มอาร์ 89 ในกรรมวิธีที่ใช้นาโนซิงค์ออกไซด์ สามารถลดการระบาดของโรคใบด่างได้สูงที่สุด โดยมีดัชนีการเกิดโรคเท่ากับ 6.66% ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้นาโนโอลิซิเตอร์สูตรที่ 2 (18.33%) และกรรมวิธีดั้งเดิม (25.55%) ในขณะที่ การใช้นาโนโอลิซิเตอร์สูตรที่ 1 มีดัชนีการเกิดโรคเท่ากับ 36.66 % ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่มีดัชนีการเกิดโรคเท่ากับ 50% แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองยัง แสดงให้เห็นว่านาโนโอลิซิเตอร์สูตรที่ 1 สามารถควบคุมโรคใบไหม้ในมันสำปะหลังได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีดัชนีการเกิดโรคเท่ากับ 0 เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (18.33%) และเมื่อพิจารณาถึง ประสิทธิภาพหลังพ่นระยะยง 6 ที่มีการระบาดของโรคใบจุดสูงสุดเปรียบเทียบกับมันสำปะหลังพันธุ์อื่น พบว่า กรรมวิธีที่ 1 นาโนโอลิซิเตอร์สูตรที่ 1 มีค่าดัชนีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 26.66% ซึ่งมีประสิทธิภาพ ควบคุมโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (66.66%) รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ใช้ นาโนซิงค์ออกไซด์® และ นาโนโอลิซิเตอร์สูตรที่ 2 เท่ากับ 43.33 และ 55.55% ตามลำดับ ดัง แสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.5 แสดงดัชนีการเกิดโรคใบจุด ใบไหม้ แอนแทรคโนส ใบด่าง และโรครากเน่าโคนเน่ามันสำปะหลัง ในแต่ละกรรมวิธี ที่อายุ 2 เดือนหลังปลูก

พันธุ์มัน ส ำปะหลัง	กรรมวิธี	ดัชนีการเกิดโรค (%) ^{1/}				
		ใบจุด	ใบไหม้	แอนแทรคโนส	ใบด่าง	โคนเน่า หัวเน่า
ซีเอ็มอาร์ 89	นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 1	6.66 ^b	8.33 ^b	1.66 ^a	10.00 ^a	0.00
	นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 2	3.33 ^{ab}	0.00 ^a	0.00 ^a	6.66 ^a	0.00
	นาโนซิงค์ออกไซด์®	0.00 ^a	6.66 ^b	0.00 ^a	30.00 ^b	0.00
	กรรมวิธีดั้งเดิม ^{2/}	3.33 ^{ab}	5.00 ^{ab}	0.00 ^a	38.33 ^b	0.00
	กรรมวิธีควบคุม	3.33 ^{ab}	8.33 ^b	5.00 ^b	36.66 ^e	0.00
	f-test		*	*	*	*
CV (%)		43.12	34.64	34.60	30.78	
ระยอง 72	นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 1	5.00	5.00	5.00	0.00 ^a	0.00
	นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 2	5.00	6.66	0.00	0.00 ^a	0.00
	นาโนซิงค์ออกไซด์®	5.00	13.33	5.00	20.00 ^b	0.00
	กรรมวิธีดั้งเดิม ^{2/}	6.66	6.66	3.33	20.00 ^b	0.00
	กรรมวิธีควบคุม	6.66	10.00	5.00	25.00 ^b	0.00
	f-test		ns	ns	ns	*
CV (%)		17.32	21.65	57.32	17.63	
พิรุณ 6	นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 1	11.66	10.00 ^{ab}	3.33 ^a	0.00 ^a	0.00
	นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 2	5.00	8.33 ^a	3.33 ^a	3.33 ^{ab}	0.00
	นาโนซิงค์ออกไซด์®	8.33	23.33 ^c	11.66 ^b	1.66 ^{ab}	0.00
	กรรมวิธีดั้งเดิม ^{2/}	6.66	13.33 ^b	3.33 ^a	5.00 ^b	0.00
	กรรมวิธีควบคุม	11.66	20.00 ^c	1.66 ^a	5.00 ^b	0.00
	f-test		ns	*	*	*
CV (%)		34.14	13.73	24.74	51.96	

^{1/} ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษร (a, b, c) ที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 ns = ไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

^{2/} กรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกร (อิมิตาคลอฟริด+ฟอสฟอรัส+โพสซีทีลอะลูมิเนียม)

ตารางที่ 4.6 แสดงดัชนีการเกิดโรคใบจุด ใบไหม้ แอนแทรคโนส ใบด่าง และโรครากเน่าโคนเน่ามันสำปะหลัง ในแต่ละกรรมวิธี ที่อายุ 4 เดือนหลังปลูก

พันธุ์มัน สาปะหลัง	กรรมวิธี	ดัชนีการเกิดโรค (%) ¹				
		ใบจุด	ใบไหม้	แอนแทรคโนส	ใบด่าง	โคนเน่า หัวเน่า
ซีเอ็มอาร์ 89	นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 1	18.33	0.00 ^a	6.66 ^a	36.66 ^{bc}	0.00
	นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 2	11.66	0.00 ^a	18.33 ^{ab}	18.33 ^{ab}	0.00
	นาโนซิงค์ออกไซด์®	21.66	0.00 ^a	28.33 ^b	6.66 ^a	0.00
	กรรมวิธีดั้งเดิม ²	23.33	11.66 ^b	16.66 ^{ab}	25.55 ^{ab}	0.00
	กรรมวิธีควบคุม	20.00	18.33 ^c	21.66 ^{ab}	50.00 ^c	0.00
f-test		ns	*	*	*	
CV (%)		31.90	8.10	43.20	49.4	
ระยอง 72	นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 1	21.66 ^{bc}	0.00	11.66	28.33	0.00
	นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 2	13.33 ^a	5.00	10.00	33.33	0.00
	นาโนซิงค์ออกไซด์®	13.33 ^a	8.33	20.00	28.33	0.00
	กรรมวิธีดั้งเดิม ²	28.33 ^c	6.66	13.33	35.00	0.00
	กรรมวิธีควบคุม	20.00 ^{ab}	5.00	16.66	31.66	0.00
f-test		*	ns	ns	ns	
CV (%)		19.73	38.56	43.30	18.17	
พิจิตร 6	นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 1	36.66 ^a	0.00	21.66	3.33	0.00
	นาโนอิลิซิเตอร์สูตรที่ 2	55.55 ^{bc}	1.66	31.66	16.66	0.00
	นาโนซิงค์ออกไซด์®	43.33 ^{ab}	0.00	31.66	3.33	0.00
	กรรมวิธีดั้งเดิม ²	65.00 ^c	0.00	40.00	3.33	0.00
	กรรมวิธีควบคุม	66.66 ^c	1.66	36.66	6.66	0.00
f-test		*	ns	ns	ns	
CV (%)		13.03	39.28	69.28	55.88	

² ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษร (a b) ที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

¹: กรรมวิธีดั้งเดิมของเกษตรกร (อิมิตาคลอฟริด+ฟอสฟอรัส+โพสซีทีลอะลูมิเนียม)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาพบว่าน้ำเลี้ยงเซลล์เชื้อรา *T. harzianum* สามารถเป็นตัวรีดิวซ์ให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพได้ด้วยการทำปฏิกิริยากับสารละลาย $AgNO_3$ ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ โดยพบว่าสารละลายดังกล่าวมีการเปลี่ยนจากสีใสเป็นสีเหลืองอ่อน และกลายเป็นสีน้ำตาลเข้มที่ระยะเวลาการป่ม 48 ชั่วโมง เนื่องจากการกระตุ้นของเซอร์เฟสพลาสมอนเรโซแนนซ์ (Surface plasmon resonance ; SPR) ของซิลเวอร์นาโนเรโซแนนซ์ ให้เกิดการการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นที่ตามองเห็นได้ปกติ จากสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต หรือเอนไซม์ ที่เซลล์สร้างและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ไปรีดิวซ์ไอออนของ Ag^+ ให้เป็นอนุพันธ์ (Ag^0) จึงทำให้เกิดการสังเคราะห์อนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพได้ (Mahmudin et al., 2015) เช่นเดียวกับการรายงานของ Ahluwalia et al., (2014) ที่ใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ของ *T. harzianum* ในรีดิวซ์ซิลเวอร์นาโนเรโซแนนซ์เป็นซิลเวอร์นาโนได้สำเร็จ (Alghuthaymi et al., 2021) การวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพด้วยเทคนิค Dynamic light scattering (DLS) และ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า ศักย์ไฟฟ้าซีตาของอนุภาคและค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของอนุภาคนาโน เท่ากับ + 39.14 mV ศักย์ภาพของซีตาเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญและวัดค่าของความเสถียรของการกระจายตัวของคอลลอยด์ ขนาดของศักย์ซีตาบ่งบอกถึงระดับการผลึกของไฟฟ้าสถิตระหว่างอนุภาคที่มีประจุใกล้เคียงกันในการกระจายตัว สำหรับโมเลกุลและอนุภาคที่มีขนาดเล็กเพียงพอ ศักย์ภาพของซีตาที่มากกว่า + 30 mV or หรือน้อยกว่า - 30 mV จะให้ความเสถียรทางไฟฟ้าซึ่งบ่งชี้ถึงความเสถียรของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ (Clogston and Patri 2011) นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์จากเทคนิค DLS ยังพบว่าขนาดเฉลี่ยของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ขึ้นเท่ากับ 39.79 nm ซึ่งเป็นการยืนยันการสังเคราะห์อนุภาคนาโนที่เกิดขึ้น (<100 nm) แต่เมื่อเปรียบเทียบผลจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีลักษณะเป็นทรงกลม มีขนาดของอนุภาคเฉลี่ย 60-90 นาโนเมตร ซึ่งใหญ่กว่าผลการวิเคราะห์จาก DLS ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผล capping ของน้ำเลี้ยงเซลล์ (*T. harzianum* metabolites) ที่ถูกนำมาคำนวณรวมอยู่ด้วยในเทคนิค DLS (McNamara et al., 2020)

2. เมื่อนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. theobromae* และ *F. solani* พบว่า อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้สามารถลดการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้งสองชนิดได้ โดยพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนชีวภาพมากขึ้นส่งผลให้มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นตามไปด้วยซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim (2012) ที่พบว่าการยับยั้งการเจริญของโคโคนิราสาเหตุ โรคพืช *Fusarium salani* *F. oxysporum* *Pythium* Spp และ *Alternaria alternata* มีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโน ซึ่งประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรค

พืชเป็นผลมาจากคุณสมบัติของอนุภาคซิลเวอร์นาโนในการเข้าไปทำลายเซลล์เชื้อรา โดยเมื่ออนุภาคซิลเวอร์นาโนสัมผัสกับผนังเซลล์ของเชื้อราจะถูกออกซิไดซ์ด้วยออกซิเจนที่อยู่บริเวณผนังเซลล์ของเชื้อรา ทำให้อนุภาคซิลเวอร์นาโนแตกตัวเป็นไอออนบวกเข้าจับกับโปรตีน และเกิดการรบกวนกระบวนการขนส่งสารเข้าออกเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ฉีกขาด เช่นเดียวกับ Shanmugam และคณะ (2016) รายงานว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่แทรกซึมอยู่บริเวณผนังเชื้อราจะถูกออกซิไดซ์ด้วยออกซิเจนเช่นเดียวกัน ทำให้อนุภาคซิลเวอร์นาโนเกิดการสลายตัวและปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนบวกออกมาด้วยความเข้มข้นสูงเกิดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Kim et al., 2012, Shanmugam et al., 2016) ซึ่งจากผลการวิจัยนี้พบว่า อนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์ได้ที่มีความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคทั้งสองได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์และค่าความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *L. theobromae* และ *F. solani* เท่ากับ 58 และ 55 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นประสิทธิภาพในการต่อต้านโรคโคนเน่าหัวเน่า เพื่อความเข้าใจเพิ่มเติมคณะวิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของไมซีเลียมของเชื้อสาเหตุโรคเพิ่มเติมโดยใช้เทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy

3. จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีภายในเซลล์เชื้อราด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy พบว่าไมซีเลียมของเชื้อสาเหตุโรคในกรรมวิธีที่เลี้ยงในอาหารผสมกับอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีปริมาณของไขมัน CH_3 และ CH_2 บริเวณ Peak ที่ 2962, 2927 และ 2854 cm^{-1} สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีที่เลี้ยงในอาหารผสมกับซิลเวอร์นาโนเตรต ซึ่งไขมันเป็นส่วนประกอบหลักของเส้นใยเชื้อราที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่ขนส่งระหว่างเซลล์ โดยการเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์โดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายและมีการสร้างพลังงานจำนวนมากในเชื้อรา (van Aarle and Olsson 2003) นอกจากนี้ กลุ่มไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับเส้นทางการสังเคราะห์ทางชีวภาพของเชื้อซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการปกป้องเซลล์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยการสร้างไบโอฟิล์ม และการปล่อย extracellular vesicles ซึ่งเป็นกลไกพื้นฐานของเซลล์ในการจัดการกับสสารภายในเซลล์ (Rella et al., 2016, Salvatore et al., 2020) สอดคล้องกับ Walley และคณะ (2013) รายงานว่า กรดไขมันของเซลล์เชื้อราทำหน้าที่เป็นโมดูลเตอร์ของเส้นทางการส่งสัญญาณจำนวนมากเมื่อเกิดการกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอก (Walley et al., 2013) นอกจากนี้ผลการศึกษาในครั้งนี้ยังสอดคล้องกับ Shapaval et al (2014) ที่ชี้ให้เห็นว่า เชื้อรา *Mucor plumbeus* ลักษณะของกรดไขมันในเชื้อราแตกต่างกันเมื่อเจริญเติบโตบนแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน โดยส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ FTIR สเปกตรัม บริเวณ 3000-2800 cm^{-1} (Shapaval et al., 2014) เช่นเดียวกับ Walley et al (2013) รายงานว่า ระดับของกรดไขมันอิสระที่เพิ่มขึ้นมีผลมาจากการตอบสนองต่อความเครียดต่าง ในเยื่อหุ้มของเชื้อโรค และทำหน้าที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทานต่อความเครียดจากสิ่งมีชีวิตหรือความเครียดจากสิ่งไม่มีชีวิต นอกจากนี้ กลไกความต่อต้าน หรือซ่อมแซมความเสียหายของเมมเบรนยังมีส่วนช่วยในการเพิ่ม acyl chain ส่งผลให้บริเวณ Peak ที่ 3000-

2800 เพิ่มขึ้นเช่นกัน (Walley et al., 2013) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน Amide I (1600–1690 C=O stretching) and Amide II (1480–1575 CN and NH stretching) สูงสุดในกรรมวิธีที่ใช้อนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยพบ ในตำแหน่งที่ peak 1658, 1642, and 1548 cm^{-1} ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเชื้อรา เนื่องจากมีหน้าที่ในการควบคุมเมแทบอลิซึม เป็นโมเลกุลโครงสร้างและกิจกรรมภายในเซลล์รวมทั้งเป็นเอนไซม์หรือหน่วยย่อยของเอนไซม์ในเซลล์เชื้อรา (Kämper et al., 2006) เช่นเดียวกับ Skoneczny and Skoneczna (2018) รายงานว่ายูคาริโอตรวมทั้งยีสต์และเชื้อราสามารถปรับการตอบสนองการถอดรหัส ซึ่งช่วยให้สามารถปรับให้เข้ากับความเครียดทางเคมีและกายภาพต่างๆ โดยการกระตุ้นวิถีทางไมโทเจนโปรตีนไคเนส (Mitogen-activated protein kinase pathways) (Skoneczny and Skoneczna 2018) ในทางตรงกันข้ามพบว่า กรดนิวคลีอิก ฟอสโฟลิปิด โพลีแซ็กคาไรด์ และคาร์โบไฮเดรต สูงที่สุดในกรรมวิธีควบคุมในตำแหน่ง peak ที่ 1155, 1079 และ 1027 cm^{-1} รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ใช้ซิลเวอร์ไนเตรต และอนุภาคซิลเวอร์นาโนตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า อนุภาคซิลเวอร์นาโนทำให้เกิดการเสียหายต่อไมซีเลียมเนื่องจากสเปกตรัมดังกล่าวเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา โดยได้อธิบายความเสียหายของ DNA ของเชื้อราที่แสดงการลดลงของตำแหน่ง peak ที่ 1048 cm^{-1} และ 1079 cm^{-1} ซึ่งบ่งชี้ถึงการสูญเสียปริมาณกรดนิวคลีอิก (Mihoubi et al., 2017)

4. เมื่อทดสอบประสิทธิภาพอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลังพันธุ์อ่อนแอ CMR 89 โดยประเมินความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อ *L. theobromae* และ *F. solani* หลังการปลูกเชื้อ พบว่า มันสำปะหลังที่ฉีดพ่นด้วยอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ สามารถควบคุมโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยลดความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อ *L. theobromae* ได้ ถึง 65.00% และ *F. solani* ได้ถึง 78.75%

5. การตรวจสอบเพิ่มเติมสำหรับการใช้งานภาคสนามเพื่อแสดงประสิทธิภาพอนุภาคซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพในการควบคุมโรคมันสำปะหลังที่เกิดขึ้นในสภาพธรรมชาติ พบว่า การฉีดพ่นกระตุ้นพืชด้วยซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพสูตรที่ 1 และ 2 จำนวน 1 ครั้ง หลังการปลูกมันสำปะหลังที่ 1 เดือน สามารถควบคุมโรคใบด่างได้ในพันธุ์ซีเอ็มอาร์ 89 และ ระยะเวลา 72 ได้ ในขณะที่พันธุ์พิจิตร 6 สามารถใช้ซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพสูตรที่ 1 เพียงสูตรเดียวในการควบคุมโรคใบด่าง นอกจากนั้นยังพบว่าซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพสูตรที่ 2 สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรกคโนสในพันธุ์ซีเอ็มอาร์ 89 และพันธุ์ระยะเวลา 72 แต่ไม่สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรกคโนสในพันธุ์พิจิตร 6 ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพันธุ์พิจิตร 6 มีระดับดัชนีการเกิดโรคแอนแทรกคโนสที่ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับโรคที่ใบใหม่ที่พบในพันธุ์พิจิตร 6 การแสดงอาการใบไหม้จึงเด่นชัดกว่า และเมื่อเปรียบเทียบการควบคุมโรคจึงพบว่าซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพทั้งสองสูตรสามารถควบคุมโรคใบไหม้ได้เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์มันสำปะหลังอื่น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาการระบาดของโรคหลังการปลูกมันสำปะหลัง 4 เดือน ผ่านการฉีดพ่นกระตุ้นพืชด้วยซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ 3 ครั้ง พบว่า ซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพทั้งสองสูตร สามารถควบคุมโรคใบด่าง และใบไหม้ได้ในมันสำปะหลังพันธุ์ซีเอ็มอาร์ 89 เพียงพันธุ์

เดี่ยว ในขณะที่ซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพสูตรที่ 1 สามารถควบคุมโรคใบจุดในมันสำปะหลังพันธุ์พิจิตร 6 เพียงพันธุ์เดี่ยว

การศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สังเคราะห์โดยวิธีการชีวภาพโดยใช้เชื้อรา *T. harzianum* เป็นตัวรีดิวซ์ซิลเวอร์ในเตรต มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าหัวเน่าได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการทำลายความสมบูรณ์ของเมมเบรนเชื้อราสาเหตุโรค นอกจากนี้การศึกษาในระดับแปลงทดลองเพื่อทดสอบกับพันธุ์มันสำปะหลัง 3 สายพันธุ์ในการควบคุมโรคมันสำปะหลังในสภาพธรรมชาติ ยังพบว่าซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ สามารถควบคุมโรคใบด่างโดยการตรวจสอบดัชนีความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นในพันธุ์มันสำปะหลังทั้งสามสายพันธุ์ได้ในระยะแรก อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการตรวจสอบเพิ่มเติมสำหรับกระบวนการในการกระตุ้นพืชด้านอื่น เช่น การกระตุ้นความต้านทานในพืช เมื่อใช้ซิลเวอร์นาโนทางชีวภาพ อัตราการใช้ในแต่ละพันธุ์พืชทดสอบในการใช้งานภาคสนามเพื่อให้แสดงประสิทธิภาพที่เสถียรในพื้นที่เพาะปลูก และสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันออกไป



บรรณานุกรม

- กาญจนา นิรภัย และ เอกชัย ชูเกียรติโรจน์. 2552. ชีววิทยาของเชื้ออรา *Lasiodiplodia* spp. วารสาร วิทยาศาสตร์ มศว. 25(2): 119-134.
- กลุ่มอนุรักษ์น้ำ และดิน. 2545. มันสำปะหลัง ในเอกสารวิชาการมันสำปะหลัง. สำนักวิจัยและ พัฒนาการ จัดการที่ดิน.กรมพัฒนาที่ดิน.กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 1001: 46.01.
- จิระเดช แจ่มสว่าง วรณวิไล อินทนู และ ถวัลย์ คุ่มช้าง. 2544. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สูตรสำเร็จต่าง ๆ ในการควบคุมโรคโคนเน่าของถั่วฝักยาวที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* การประชุมทางวิชาการประจำปีของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 พืช ศาสตร์ การส่งเสริมการเกษตร และการสื่อสารการเกษตร กรุงเทพฯ ประเทศไทย หน้า 236-242.
- จำลอง เจียมจันรรจา. 2541. มันสำปะหลัง. ในพจนานุกรมพืชเศรษฐกิจ. ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 47-51.
- ชาติชาย ศิริพัฒน์. 2557. รากเน่าหัวเน่าระบาดหนักในไร่มันสำปะหลัง. [ออนไลน์]. ได้จาก <http://www.thairath.co.th/content/442798>.
- จิตติมา วีระศิลป์. 2542. โรคมันสำปะหลัง. ในพืชทองคำได้แผ่นดินมันสำปะหลัง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 41-121.
- दनัย สุภาพร. 2537. พฤษศาสตร์ และพันธุศาสตร์ของมันสำปะหลัง. ในเอกสารวิชาการมันสำปะหลัง. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง.กรมวิชาการเกษตร.กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.14-29.
- ยุกติ สาริกะภูติ. 2526. มันสำปะหลัง. เอกสารวิชาการ เล่มที่7. กรมวิชาการเกษตร. 83 - 87.
- รังษิ เจริญสถาพร และ อมรรักษ์ คัดใจเดียว. 2553. โรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังและแนวทางการ ป้องกันกำจัด. สถาบันวิจัยพืชไร่กรมวิชาการเกษตร. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://soclaimon.wordpress.com>
- ศานิต สวัสดิ์กาญจน์. 2557. มันสำปะหลัง. ในพืชอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ. 1-162.
- ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ. Atomic Force Microscope (Acessed 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 สีนรุประมา. 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 annum 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.
- 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>

- 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
- 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.
- Benítez, T. et al. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
- Berger, F., Hong, Li., White, D., Frazer, R., Lieifert, 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 TiO₂ nanoparticles 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., Hochepped, 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>
- 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., Sreepasad, T.S., Sajanlal, 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 Brono 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>
- Von Arx, J.A. 1970. The genera of fungi sporulating in pure culture. Lehre. J. Cramer. 288.
- Walley, J.W., Kliebenstein, D.J., Bostock, R.M., Dehesh, K., 2013. Fatty acids and early detection of pathogens. Current Opinion in Plant Biology. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.06.011>
- 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.



ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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 คนให้เข้ากันแล้วแบ่งใส่ขวดแก้วใสเพื่อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 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 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวณัฐธิญา เป็อนสันเทียะ เกิดวันที่ 7 กรกฎาคม พ.ศ. 2523 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น และมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนครบุรี อ. ครบุรี จ. นครราชสีมา เริ่มเข้าศึกษาในระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในปีการศึกษา 2542 ขณะที่ศึกษาในระดับปริญญาตรี ได้ศึกษาการตรวจสอบโปรตีน โดยศึกษาและตรวจหาการสะสมโพลีฟีนอลออกซิเดสในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของมะเขือเทศ และจากนั้นจึงมีความสนใจนำเทคนิคทาง เซอร์มิวิทยา และชีวโมเลกุลมาใช้ในการตรวจสอบและวินิจฉัยโรคพืช ภายหลังสำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรีในปีการศึกษา 2/2545 ได้เข้าศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในปีการศึกษา 3/2545 และสำเร็จการศึกษาระดับมหาบัณฑิตศึกษา ในปีการศึกษา 2547 ภายหลังสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิตศึกษา ได้เข้าศึกษาต่อในระดับดุษฎีบัณฑิตในหลักสูตร ปร.ด. (โรคพืช), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2550 และเข้าทำงานในปี พ.ศ. 2553 เป็นอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีจนถึงปัจจุบัน

