

คำนำ

โครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ การใช้ชีวผลิตภัณฑ์เพื่อผลิตพืชผัก ผลไม้ปลอดสารพิษ เป็นโครงการวิจัย เพื่อพัฒนาอุดมศึกษาและแก้ไขปัญหาเศรษฐกิจของสำนักงานปลัดทบวงมหาวิทยาลัย สำนักนโยบายและแผนอุดมศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2543 จัดอยู่ในแผนงานวิจัยระดับอุดมศึกษา งานวิจัยประยุกต์สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ของคณะเทคโนโลยีการเกษตร หมวดเงินอุดหนุนโครงการวิจัย ในวงเงินงบประมาณอุดหนุน 596,000 บาท ซึ่งจัดเป็นโครงการวิจัยเพื่อนำประเทศไปสู่ความก้าวหน้า โดยมีเป้าหมายเพื่อเพิ่มผลผลิตในเชิงเกษตร พัฒนาคุณภาพชีวิตของประชาชน และประหยัดหรือลดต้นทุนการผลิตได้ ทั้งนี้จะต้องเป็นโครงการที่มีความพร้อมในผลงานวิจัยที่สำเร็จแล้ว พร้อมทั้งจะนำไปขยายผล เพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมได้ทันที

ดังนั้นโครงการนี้ได้มุ่งเน้นฝึกอบรมให้เกษตรกร รู้จักการทำกรเกษตรเพื่อลดการใช้สารเคมีปราบศัตรูพืช และการปลูกพืชผักโดยไม่ใช้สารเคมีปราบศัตรูพืช หรือปลอดสารพิษ โดยให้เกษตรกรมีการปฏิบัติจริง และเมื่อประสบผลสำเร็จแล้วก็จะสามารถผลิตพืชผักปลอดสารพิษบริโภคและจำหน่ายต่อไปได้ โดยสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการใช้สารเคมี



รองศาสตราจารย์ ดร.เกษม สร้อยทอง

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ลาดกระบัง

กรุงเทพ 10520

โทร. 02-3269975

RCH

SB

975

๗๗๘๖๕

เลขหมั.....

เลขทะเบียน..... 41328

วัน, เดือน, ปี..... 16 ส.ค. 2545

b. 11155 & 55
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

คำนำ	-
บทคัดย่อ	1
วิธีดำเนินโครงการ	2
ผลการดำเนินโครงการ	4
เอกสารที่ใช้ในโครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ	30
การผลิตพืชผัก ผลไม้ปลอดสารพิษ	30
การผลิตพืชผัก ไม้ผลปลอดสารพิษเชิงการค้า	48
ปฏิทินการปฏิบัติงานการปลูกพืชผักปลอดสารพิษโดยวิธีไบโอ-ไดฟิเอ็ม	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ การใช้ชีวผลิตภัณฑ์เพื่อผลิตพืชผัก ผลไม้ปลอดสารพิษ

บทคัดย่อ

โครงการนี้สามารถนำชีวผลิตภัณฑ์จากผลงานวิจัยที่มีอยู่แล้วได้แก่ จุลินทรีย์คีโตเมียมควบคุมโรคพืช สารสกัดจากจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช การใช้สะเดาในการกำจัดแมลง การใช้จุลินทรีย์ *Bacillus thuringensis* และ *Actinomyces* ในการป้องกันกำจัดแมลง โดยใช้ร่วมกับการจัดการศัตรูพืชโดยชีววิธีแบบผสมผสาน (Bio-IPM) ซึ่งประสบผลสำเร็จแบบครบวงจร กล่าวคือ เกษตรกรที่ผ่านการอบรม และสำเร็จหลักสูตรการอบรมต่อเนื่องจำนวน 6 รุ่นจำนวน 474 คน เกษตรกรที่ผ่านการอบรมสามารถปลูกพืชผักปลอดสารพิษโดยใช้เทคนิคไบโอไอพีเอ็มแบบไม่กางมุ้ง เทคนิคดังกล่าวสามารถพิสูจน์ได้ว่า นอกจากจะปลอดสารพิษแล้วยังสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ต่ำกว่าวิธีการใช้สารเคมีปราบศัตรูพืช ตัวอย่างความสำเร็จดังกล่าว ทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเกษตรกร สามารถขยายผลให้เกษตรกรที่สำเร็จหลักสูตรการอบรม ปลูกพืชปลอดสารพิษ ส่งไปจำหน่ายยังประเทศอังกฤษได้เป็นต้น กล่าวคือปัจจุบันเกษตรกรสามารถปลูกหน่อไม้ฝรั่งปลอดสารพิษส่งไปจำหน่ายยังต่างประเทศ โดยมีบริษัทส่งออกให้ราคาประกัน และรับซื้อ และในบางพื้นที่ที่อบรม เกษตรกรสามารถปลูกผักปลอดสารพิษแบบไม่กางมุ้ง ลดต้นทุนการผลิต ส่งไปจำหน่ายในตลาดท้องถิ่นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อนำชีวผลิตภัณฑ์ (biological product) จากผลงานวิจัย ที่ได้รับสิทธิบัตร (patent) แล้วไปเผยแพร่สู่เกษตรกรในการผลิตพืชผักปลอดสารพิษ
2. เพื่อหาทางปฏิบัติในการลดการนำเข้าสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช และลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกร
3. เพื่อฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ และลดต้นทุนการผลิต
4. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการใช้ผลิตภัณฑ์จากผลงานวิจัยในภาคสนาม ในการผลิตพืชผักปลอดสารพิษ เช่น ผักกาดขาวปลี ผักบุ้ง คื่นช่าย มะเขือเทศ เป็นต้น

ผลกระทบที่เกิดขึ้น

ผลงานเป็นไปตามความคาดหมาย คือ สามารถหยุดการใช้สารเคมีปราบศัตรูพืชได้สำเร็จ มีผลให้มีสิ่งแวดล้อมภายในประเทศ เพื่อลดการนำเข้าสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช หรือลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์ ในลักษณะเดียวกันในอนาคตอันใกล้นี้ได้ เกษตรกรเกิดการรวมตัวเพื่อผลิตพืชผัก ผลไม้ปลอดสารพิษ ส่งจำหน่ายทั้งในประเทศและต่างประเทศ

ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการ

1. เกษตรกรได้รับความปลอดภัยจากการใช้ชีวผลิตภัณฑ์
2. ผลผลิตทางการเกษตรปลอดจากสารพิษ
3. เกษตรกรมีทางเลือกใหม่ในการทำการเกษตร
4. ผู้บริโภคได้รับความปลอดภัยจากผลผลิตที่ปราศจากพิษตกค้าง

ขอบเขตของการวิจัย

เป็นโครงการที่นำชีวผลิตภัณฑ์ที่มีอยู่แล้ว ได้แก่ คีโตเมียม ควบคุมโรคพืช ไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืช สารสกัดจากจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช ยาเชื้อ *Bacillus thuringensis* สายพันธุ์รัสเซีย และ ยาเชื้อ Actinomycetes สายพันธุ์รัสเซียควบคุมแมลง นำมาใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการในการลดหรือหยุดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช

ระยะเวลาของโครงการ 20 เดือน (1 ตุลาคม 2543 ถึง 30 กรกฎาคม 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

1. เตรียมพื้นที่ปลูกพืชผักปลอดสารพิษ ได้แก่ การปรับปรุงสภาพนิเวศวิทยาของดิน และการปรับปรุงสภาพดินให้พร้อมต่อการปลูกพืชผักปลอดสารพิษ ในพื้นที่ที่ทำการฝึกอบรมมีดังนี้ จันทบุรี ตาก กาญจนบุรี ร้อยเอ็ด และนครราชสีมา

2. การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการในการผลิตพืชผักปลอดสารพิษแบบไม่กางมุ้ง

- (1) รับสมัครคัดเลือกเกษตรกร และผู้สนใจเข้าฝึกอบรมโครงการปลูกพืชผักปลอดสารพิษ จำนวน 6 รุ่น รวม 474 คน โดยใช้ระยะเวลาในการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการอย่างต่อเนื่อง รุ่นละ 4 เดือน
- (2) การปลูกพืชผักปลอดสารพิษ

ผลการดำเนินโครงการ

การฝึกอบรมเกษตรกร

การฝึกอบรมเกษตรกรในการปลูกพืชผักผลไม่ปลอดสารพิษโดยใช้ เทคนิคไปโอโอพีเอ็ม ของสถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เป็นการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติอย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 4 เดือน ในแต่ละรุ่น จำนวน 8 รุ่น ในพื้นที่ที่ดำเนินการ ดังนี้

1. ที่ อ. พบบพระ จ. ตาก จำนวน 2 รุ่น มีผู้เข้าฝึกอบรมรุ่นที่ 1 จำนวน 32 คน และรุ่นที่ 2 จำนวน 67 คน
2. ที่ จ. กาญจนบุรี มีผู้เข้าฝึกอบรมรุ่นที่ 1 จำนวน 55 คน และรุ่นที่ 2 จำนวน 44 คน
3. ที่ อ. แก่งหางแมว จ. จันทบุรี มีผู้เข้าฝึกอบรมรุ่นที่ 1 จำนวน 48 คน และรุ่นที่ 2 จำนวน 228 คน

การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการปลูกพืชผักปลอดสารพิษ

อำเภอ พบบพระ จ. ตาก	จันทบุรี	กาญจนบุรี
รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 1
5-7 พ.ย. 2542	11-12 พ.ย.2542	4-6 ธ.ค. 2542
27-28 พ.ย. 2542	14 ธ.ค. 2542	3-4 ม.ค. 2543
11-12 ธ.ค. 2542	17-18 ม.ค. 2543	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21. สุจิตนา เมฆวิชัย
22. ดำรง สิ้นจ้าง
23. สุรเจษ สุขเนตร
24. ไชยวัฒน์ คงประเสริฐ
25. ตี๋อ แก้วจันเดิน
26. สร้อย อัครเลิศ
27. นิรุช หวังเทียมกลาง
28. นที ถ้ำแก้ว
29. สมพงษ์ คำจุมพล
30. ด.ต. ประยูร รุ่งเรือง
31. เพ็ญญา รุ่งเรือง
32. เสริม ช่อครุฑ

เกษตรกรเข้ารับการฝึกอบรมจำนวน 32 คน โดยมีการปฏิบัติงานอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มการเตรียมพื้นที่ปลูก การปรับสภาพดินโดยใช้ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพในอัตรา 500 กก.ต่อไร่ และจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช (คีโตเมียม) ใส่ลงดินในอัตรา 1 กก.ต่อไร่ ปรับสภาพดินให้มีค่าพีเอช 6.0-6.5 การหว่านเมล็ดผักได้แก่คะน้า กวางตุ้ง ผักบุ้ง การปลูกพืชอื่นได้แก่ข้าวโพด ผักกาดขาว กระหล่ำปลี ต้นหอมเป็นต้น เกษตรกรจัดเป็นกลุ่ม ดูแลรับผิดชอบในการกำจัดวัชพืช การรดน้ำ การใช้วัสดุอินทรีย์คลุมแปลง การฉีดพ่นสารชีวภัณฑ์ ป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นระยะๆ ได้แก่คีโตเมียมควบคุมโรคพืชในอัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร เชื้อบีทีกำจัดแมลงในอัตรา 5 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร สารสกัดสะเดากำจัดแมลงในอัตรา 50 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร อาจมีการใช้กำมะถันผสมละลายน้ำเป็นครั้งคราว มีการใช้กาบเหนียวดักแมลง ใช้แสงไฟล่อแมลงในช่วงหัวค่ำ ปลูกพืชได้แมลงเช่นตะไคร้หอมเป็นต้น

ภาพกิจกรรมการฝึกอบรม



เอกสารที่ส่งมอบให้กับเกษตรกร
ไม่ว่าการอบรมทั้งนี้

ยชน์ด้านการค้า
การนำไปใช้

ภาพกิจกรรมการฝึกอบรม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพกิจกรรมการฝึกอบรม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพกิจกรรมการฝึกอบรม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพกิจกรรมการฝึกอบรม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายชื่อเกษตรกรโครงการ รุ่นที่ 2

การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการใช้สารชีวผลิตภัณฑ์เพื่อผลิตพืชผัก ผลไม้ปลอดภัย

โดย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

ณ 127 ม. 9 ต. ช่างแคบ อ. พงพระ จ. ตาก

ลำดับที่ ชื่อ - นามสกุล

1. บุญเลิศ ร้อยแก้ว
2. จีระ วัฒนอภา
3. สุชาติ มีศิริ
4. ประหยัด มั่นคง
5. ธนู ฉายแก้ว
6. เรืองรอง สุขรุ่งเรือง
7. ประเทือง รุ่งศิริ
8. เสน่ห์ เติตชู
9. ปรีชา อบเชย
10. จุฑามาส บัวแก้ว
11. ประสงค์ มหิทธิมงคล
12. จำลอง บุญเนื่อง
13. ประยุทธ์ สิทธา
14. ประยูร คงเทียนชัย
15. น้อย พงษ์ศรี
16. วสันต์ เหลือหลาย
17. วิมล แก้วทอง
18. สมหมาย จิตรสดศรี
19. ธีรรัตน์ คำศิริ
20. วรสันต์ บุญประเสริฐ
21. วราลักษณ์ ม่านม่วง
22. อังสนา ศรศราสห์
23. อารีรัตน์ ชำนิ
24. อัญชลี ศิริกานนท์
25. วิทน พวงสด
26. เฟิง สมประสงค์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

27. ชุมพล คงแคล้ว
28. สายพิน รุ่งศรี
29. ปลด ย่อมเที่ยงแท้
30. เสริม เต็มง้อ
31. อุดม บุญสม
32. สมพงษ์ แก้วงาม
33. ประยูร หงษ์ศรี
34. จีรพงศ์ มีต้องปิ่น
35. ศุภชัย เวชศาสตร์
36. ชำนาญ รอดศิริ
37. ประภาศรี สัตตะ
38. วลัยารณ์ น่วมธำ
39. เสาวลักษณ์ ศิริพจนาวรรณ
40. สุชานนท์ อัดวงศ์
41. อัญญา ศิริพจนาวรรณ
42. ชาตยุทธ์ อุทัยฉาย
43. ส.อ. นรินทร์ เนตรจำนงค์
44. ส.อ. นุตร สุยะดี
45. จ.ส.อ. สง่า มีสุขแสงจันทร์
46. ไพศาล เขียวขจี
47. ศิริเดช สุวรรณมานนท์
48. ไชยยุทธ์ บุญมี
49. เอกภพ หล่อคงสุข
50. ยุทธ์ ปลื้มถนอม
51. ฉลอม ปลื้มถนอม
52. เชาวน์ พงษ์ไพโร
53. ธนวัฒน์ เทิดศักดิ์รุ่งนภา
54. วันชัย ก้องเจริญพานิชย์
55. สุทธินันท์ แสงเดือนฉาย
56. วีระยุทธ์ ศรีเลอจันทร์
57. ร.ต.ท. บุญส่ง แก่นวงศ์
58. ระพีพัฒน์ บุตรพรม
59. หนู บุตรพรม
60. ทองศรี วรรณพัฒน์
61. บุญช่วย บุตรพรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

62. สุวิทย์ แบนสนิท
63. เพียวร์ ข้าทรัพย์
64. ขาติ อรุณศรีมรกต
65. สัจจวาลย์ อรุณศรีมรกต
66. วิโรจน์ นาคบั้น
67. ปราณี่ นาคบั้น

ภาพกิจกรรมการฝึกอบรม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายชื่อเกษตรกรโครงการ รุ่นที่ 1

การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการใช้สารชีวผลิตภัณฑ์เพื่อผลิตพืชผัก ผลไม้ปลอดภัย

โดย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร วัดไทรทอง ต. จระเข้ อ.
 ตำบลมะขามเตี้ย จ. กาญจนบุรี วันที่ 4 ธันวาคม พ.ศ. 2542

ลำดับที่ ชื่อ - นามสกุล

1. นาง สุณา ภูมิภรณ์
2. นายชุ่นไม้ย พุดเพราะ
3. นายสนิท สีบุผา
4. นางอนงค์ ภูมิภรณ์
5. นางปราณี ภูมิภรณ์
6. นางดวงพร เกษมสุขสถาพร
7. นายทอง แพนนาม
8. นายไธ้ ดอนพุ่มไผ่
9. นายแข็ง จิวะวิสัยการ
10. นายธวัช วงษ์สิน
11. นายอนันต์ โคยุด
12. นายหยิน ไพร์ทอง
13. นายสุขสัน สระทองอ่อน
14. นายวินัย ครองระวะ
15. นายสุพล เจกะบุตร
16. นายสมาน บุญเรือง
17. นายวิฑูรย์ ตั้งสุขสันต์
18. นางเดือน พูนเจริญผล
19. นายหาญ พิมพิสุวรรณ
20. นายมี หลุกกุล
23. นายบุญเสริม จินदानิล
24. นายบุญสร้าง ใส้อากาศ
25. นางสาวราตรี จินदानิล
26. นายพวน ทัพยาง
27. นางสาวราตรี คำมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

28. นางวันทอง ดาวเรือง
29. นายสมศักดิ์ พันธิโชติ
30. สามรถ ธีญลักษณ์เดโช
31. ทับทิม แรมมี
33. ชัชวาล กิจประเสริฐ
34. แซ่ม พวงศิริ
35. วาส เวียงสุข
36. สุรินทร์ นกแก้ว
37. พจนรินทร์ สือดั่ง
38. หยิน ไพร์ทอง
39. สุขสัน สระทองอ่อนทอง
40. วินัย ครองระวะ
41. สุปล เจกะบุตร
42. วันเพ็ญ ตั้งสุขสันต์
43. นายทง กาทหลง
44. แก้ว ประสงค์สุข
45. สังวาล ศิลประเสริฐ
46. สมชัย ม่วงเจริญ
47. เอียด ธาตุทอง
48. ลำรวย จงเจริญ
49. สัมพันธ์ เจกะบุตร
50. สมทรง แซ่ลิ้ม
51. สมพร พรหมภักดี
52. จระพัฒน์ พรหมภักดี
53. สมจิตร แซ่เฮง
54. สมพร ทรงศิริวิทย์
55. วิยะดา ทรงศิริวิทย์

ภาพกิจกรรมการฝึกอบรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายชื่อเกษตรกรโครงการ รุ่นที่ 2

การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการใช้สารชีวผลิตภัณฑ์เพื่อผลิตพืชผัก ผลไม้ปลอดสารพิษ

โดย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

โรงเรียนวัดกระต่ายเต้น ต.ท่าไม้ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี วันที่ 3 มกราคม 2543

ลำดับที่ ชื่อ - สกุล

- 1.นายวิรัช เรืองขจร
2. นายประสาน นาครำพา
- 3.นายพนา จารุวรรณบำรุง
- 4.นางประยูร เรืองแสง
- 5.นางสาวเล็ก นาคลำหา
- 6.นายบุญมา นาคลำหา
- 7.ณรงค์ศักดิ์ กรุดแก้ว
- 8.สิริศักดิ์ วังป่า
- 9.ธนบดี จันทร์ตรี
- 10.อัมพร อรภักดี
- 11.มาลัย สุขต่าย
- 12.ทนอม คุณสุวรรณ
13. วิบูลย์ ฟูประทีปศิริ
- 14.จุม โพธิ์งาม
- 15.สมปอง ทองคง
- 16.ไพริน แสงพันตา
- 17.นายสมศักดิ์ นนทะบุตร
- 18.เรียม เทสินทร์
- 19.อำภา ทวีวรรณะ
- 20.อารีย์ หาดิ
- 21.ระวิง คำเครือ
- 23.สมาน อ่อนเงิน
- 24.จิรพันธ์ ทองร้อยยศ
25. อารีย์ เขียงเตี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

26. สรวที คนตรง
27. วิเชียร ปากน้ำโพ
28. วันดี กล้าเกียรติกุล
29. อำพร สุขสวัสดิ์
30. วันดี ทัดสวน
31. สุณีย์ แจ่มถนอม
32. เล็ก แจ่มถนอม
33. นาย เจ็ด ภูเสวย
34. สัมรอง คุณสรวรงค์
35. สุชาติ บุตรแก้ว
36. ลัดดา เทสิน
37. วันดี จันทร์ธรรม
38. สมชาย อุดมผล
39. พริ้ง ธรรมวงษ์
40. จิรพันธ์ ทองร้อยยศ
41. มะปรางค์ เขียวอ้อม
42. แช แซ่งเฮง
43. บังอร ภูมิสิงห์
44. เตือนใจ เรืองศรี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายชื่อเกษตรกรโครงการ รุ่นที่ 1

การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการใช้สารชีวผลิตภัณฑ์เพื่อผลิตพืช ผลไม้ปลอดภัย

โดยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

ณ โรงเรียนวัดขุนซ่อง อ. แก่งหางแมว จ. จันทบุรี วันที่ 14 ธันวาคม พ.ศ. 2542

ลำดับที่ ชื่อ - นามสกุล

1. สมเดช อรรถจักร์ฐิติกาล
2. บรรเลง ทำนา
3. สายันต์ วงสว่าง
4. มานะ บัวพา
5. รัตนา สมบัติ
6. แป้น ยาดิ
7. ประยงค์ วิสัยหก
8. บุญธรรม วิสัยหก
9. สกุนดา อัครจรรย์
10. เข็ยม โลงจะ
11. สาย คะเชนทร์
12. มานัด อึ้งสุวรรณ
13. ประจิบ จันทศร
14. วิชาญ ชันทอง
15. พรณา มาลัย
16. เดชขจร อ่อนเอน
17. ชลธาร เตือนดี
18. ลัดดา จันถาวร
19. แผง สายใจ
20. สนอง เสือเหมิง
21. เรียง เทพศร
22. วิจิตร สันทสิทธิ์
23. สำเนา คะนอง
24. ช้อย รวดเร็ว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายชื่อเกษตรกรโครงการ รุ่นที่ 2

การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการใช้สารชีวผลิตภัณฑ์เพื่อผลิตพืช ผลไม้ปลอดสารพิษ

โดยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

ณ โรงเรียนวัดขุนซ่ง อ. แก่งหางแมว จ. จันทบุรี วันที่ 3 กรกฎาคม พ.ศ. 2543

ลำดับที่ ชื่อ - นามสกุล

1. สมพงษ์ รอดดี
2. บุญมี เดือนทุก
3. พรทิพย์ แสงสุข
4. ลำลี ศิริกาล
5. รุ่งทิพย์ แสงสุข
6. มะลิ อินทศร
7. ไพศาล รักษาผล
8. ถัน พรมเสนา
9. พันธุ์ แสงอุ่น
10. เอก แก้วละมุล
11. รุจิรา กลางตำบล
12. สมพงษ์ กลางตำบล
13. เสี่ยม พรมเสนา
14. พรทิพย์ แสงสุข
15. ประนอม คงแพทย์
16. รัตนาวัน นิยมรัตนา
17. สมบูรณ์ นามวิชัย
18. ดอน ปกคณะ
19. สิทธิชัย ยั้งยืน
20. นิพนธ์ เอี่ยมลำอางค์
21. สมบัติ พรจันทร์
22. สามารถ แซ่ลิ้ม
23. วันชนะ คะเชนทร์
24. อานนท์ ชันเคลือบ
25. วิจิต พิลาตอน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

26. อนุชิต โนนมี
27. เอกชัย วงศ์ชนะ
28. ชนินทร์ วงศ์วีร์
29. ประจักษ์ แก้วพิลา
30. วิภาพรรณ จันทวรรณ
31. เวโร สารชาติ
32. รัตนาพร พวงบุญชู
33. สุพรรณณี ศรีจันทร์ผ่อง
34. บุปผา ผิวบาง
35. สกาวเดือน รักษาผล
36. ภาวิณี ชัยสิงห์
37. ยุรนนท์ ขุนสิทธิเจริญ
38. สัมพร พรมเสนา
39. ถนอม พันนาม
40. สุรศักดิ์ จินโนรส
41. ยุธนา มาลัย
42. สมเดช อุตสาหดี
43. ยวีระศักดิ์ หงษ์คำ
44. นิภาพร เจริญไพรีทอง
45. หนึ่งฤทัย แก่งไหวหาร
46. พจมาน พรหมดี
47. แสงฤดี ศิริ
48. วราพร สวัสดิ์เป้า
49. กำไล กระแส
50. อาทิม นูรพา
51. สายฝน วงษ์อยู่
52. ทน บุญธรรม
53. ดวงตะวัน คงปัดิ
54. บุญชอบ นรากร
55. เขาวภา บุญทรัพย์
56. รสริน ใจคง
57. สกภาพร พัฒเสมา
58. ดารารัตน์ สีขาว
59. สมหญิง พรมเสมา
60. ชลธิชา มีโก้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

61. จวีวรรณ วงษ์น้อย
62. รุ่งอรุณ บุญเจริญ
63. วรพรรณ พรเพ็ญภักดี
64. ปาริชาติ จินโนรส
65. อรภา ยอดภักดี
66. อนุสรณ์ ทองสงคราม
67. จัตรชัย ศรีหะเนตร
68. ปิยะเดช มีคุณ
69. ครรชิต ทองทา
70. พายุ มาลัย
71. มิตรชัย ทองทา
72. รุ่งอรุณ เตือนดี
73. สมชาย พรหมเสนา
74. ปราณี่ คนขยัน
75. วันดี จันทวรรณ
76. ดวงจิตา ศรีเลิศ
77. จอมขวัญ จันทร์ชมภู
78. สลักจิตรา สมิง
79. จันจิรา พรหมเสนา
80. ดวงทิพย์ พิลาดี
81. ยุพา คมกล้า
82. ฝาคา บุญใหญ่
83. บังอร เรื่องลี
84. ยอดชาย ธงไชย
85. รุ่งโรจน์ อินทศร
86. จำเนียร ทีเป้า
87. เกรียงไกร จิตใจตรง
88. สุภามิตร ละมุด
89. ชำคอง คงแพทย์
90. เอกชัย ผันผาย
91. กรองทอง มีจันทิก
92. เสาวลักษณ์ พวงมาลัย
93. สายฝน โลจะ
94. แหม่ม พัฒเสมา
95. ต้น คนมีเก่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

131. กรรณิการ์ กอบสาริกรณ์
132. ศศิธร ยงยุทธ
133. สาลินี เรืองแดง
134. สาทิต ภู่ทอง
135. นิภา ต้นศรี
136. มานะ เจริญราช
137. เจียวก เอไฮสง
138. น้ำฝน ทำนา
139. ศิรดา วิญญาณ
140. ศศิธร เอมสมบุรณ์
141. แสงสุรีย์ เอี่ยมสะอาด
142. อริสา บุญทรัพย์
143. นันทนา มาสุข
144. จมานันท์ สุรการ
145. นพรัตน์ คะเชนทร์
146. นราทิพย์ ยอดยิ่ง
147. พีรพัฒน์ หอมสุวรรณ
148. เทพวัฒน์ บุญवास
149. อรุษา คำเป้า
150. อชณี วรรณภักดี
151. ธนพร นุชพงษ์
152. พรเทพ ศรีชัย
153. กิตติพงษ์ ศรีชัย
154. เคียงสวรรคค์ รุ่งแสง
155. วันชนะ ขวัญสุข
156. วิชัย เดือนดี
157. ประสิทธิ์ มะปรางอ่อน
158. เจียบ จันทศร
159. สิริภรณ์ ศิริบุญ
160. อุทุมพร วงศ์เสนาะ
161. สมควร จิโนรส
162. สมฤดี อ่อนระเบียบ
163. สุธิมา ศรนรินทร์
164. ธรรมรัตน์ เก่งคำใบ
165. อำนาจ อินทศร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

166. สกุนดา เตือนดี
167. น้ำฟ้า จิตรจํา nangc
168. เอกนรินทร์ มาลัย
169. จักกรี รามสูตร
170. เสาวรส บุตรีดี
171. นมัส พงษ์กําเนิด
172. ธวัชชัย ชะนะลาด
173. เอกชัย บุญธรรม
174. ธนิตา เขียวทองย้อย
175. อุไรวรรณ จันทศร
176. นภา มีโก้
177. สราวุธ ยุธโช
178. มะลิตา พรมเสนา
179. สุนิสรา รักษาผล
180. วิลาวรรณ สิริการ
181. วรณัฐ พฤษชาติพิ
182. ลุกปลา คุณค่า
183. พรพรรณ จันอุตร
184. อรุณศักดิ์ ชาวเขา
185. กฎหมาย บุญโยประการ
186. เอกอาทิตย์ จันทสิทธิ์
187. วรรณวิสา นุชเจริญ
188. ชัชชัย ฉิมมา
189. สมศักดิ์ ยมน้อย
190. สราวุธ สมสวาส
191. ธวัชชัย สัจจลํา
192. หทัยา อินทสอน
193. ประกิต อิมเยี่ยม
194. บุญจริง คงแพทย์
195. ศุภชัย กมุทชาติ
196. อติศร บํารุง
197. เจริญ จันประเสริฐ
198. วัลลภ สนนอก
199. พัชรินทร์ ดิถยมมาต
200. นवलปรางค์ วิลัยหค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

201. พรพิมล ไตรลักษณ์
202. อนนงนุช พรมเสนา
203. เรียม เพิ่มผล
204. ยุพิน สุขุมคลาด
205. อังคณา มั่นเสกวิชัย
206. วารินทร์ ผันผาย
207. ชาลี รักษาจีน
208. อารีวัน สุดสุข
209. พัชรี พิมวงศ์
210. อรรณพ รอดทองตัน
211. ลัดดา เก่งคำใบ
212. ณัฐกุล พรเพียรภักดี
213. ดาวัฒน์ พลบุตร
214. ปราณีย์ ทองทา
215. ศิริพร อ่อนแอน
216. นภาพร พรมเสนา
217. สายสวาท คะเชนทร์
218. สายฝน ดีเทียน
219. วลัยลักษณ์ มะปรางค์อ่อน
220. สุกัญญา บุญธรรม
221. มนต์ อินทศร
222. กัมพล เกิดสุข
223. ชวพันธ์ อัครจรรย์
224. ดำรงค์ พิศภาค
225. วัฒนโชค พรมณา
226. สุวรรณ บุญโญประการ
227. วลัย วรณจินดา
228. เป็นเอก สกุลเชื้อ

ภาพกิจกรรมการฝึกอบรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติ

การผลิตพืชผัก ผลไม้ปลอดสารพิษ

ในอดีตที่ผ่านมา การป้องกันกำจัดศัตรูพืช ได้แก่ โรค แมลงและวัชพืชของเกษตรกรนั้น มีการเพิ่มการใช้สารเคมีที่เป็นพิษหรือสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช (chemical pesticide) ได้แก่ สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช สารเคมีป้องกันกำจัดแมลง และ สารเคมีกำจัดศัตรูพืช อย่างต่อเนื่องและมากขึ้นตามลำดับ สารพิษดังกล่าวไม่เพียงแต่จะอยู่ในต้นพืชเท่านั้นแต่ยังตกค้างในผลผลิตที่นำมาบริโภค และตกค้างในดิน เนื่องจากเชื้อโรคและแมลงเกิดการดื้อยา สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ปกติมีพิษต่อ จุลินทรีย์ สัตว์และมนุษย์ ผลกระทบของการใช้สารเคมีดังกล่าวยังมีผลต่อสุขภาพของมนุษย์ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว ดังนั้นในปัจจุบันจึงมุ่งหาวิธีการจัดการศัตรูพืชวิธีใหม่ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม วิธีการดังกล่าวคือ การจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานโดยชีววิธี (Biological Integrated Pest Management, Bio-IPM) ซึ่งหมายถึงการใช้เทคโนโลยีการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีร่วมกับวิธีการควบคุมอื่นๆ เช่น การเกษตรกรรมเป็นต้น สิ่งที่เกษตรกรต้องการก็คือการลดการสูญเสียของผลผลิต การเพิ่มปริมาณและคุณภาพผลผลิตและการลดต้นทุนการผลิต ในขณะที่เดียวกันก็คือป้องกันสภาพสิ่งแวดล้อมและฟื้นฟูระบบนิเวศในธรรมชาติ ในขณะที่ประชากรโลกของเราเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง มีความต้องการอาหารที่มีความปลอดภัยต่อชีวิต

เราไม่ทราบว่าเป็นโรคและถูกแมลงเข้าทำลายมีความเจ็บปวดหรือไม่สบายมากนักเพียงใด พืชเป็นสิ่งมีชีวิต แต่ไม่สามารถพูดได้หรือเดินได้ ติดต่อบอกตามไม่ได้ว่ารู้สึกอย่างไร เป็นอะไร จึงเป็นการยากที่จะรู้ว่าพืชเริ่มเป็นโรค ส่วนแมลงศัตรูพืชที่เข้าทำลายพืช เรายังมองเห็นด้วยตาเปล่า ส่วนของต้นพืชที่ถูกกัดกินหรือถูกดูดน้ำเลี้ยง แมลงจะทิ้งร่องรอยการเข้าทำลายไว้ให้เห็น พืชที่ปกติจะมีการเจริญเติบโต มีกระบวนการทางสรีรวิทยาอย่างต่อเนื่อง มีการปรุงอาหาร มีการแบ่งเซลล์ การคายน้ำ การหายใจ การดูดน้ำดูดธาตุอาหารลำเลียงผ่านระบบราก มีการผลิดอกออกผลตามปกติ เมื่อกระบวนการต่างๆ ภายในพืชปกติหรือเปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากจุลินทรีย์สาเหตุที่ทำให้เกิดโรคหรือเนื่องจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม หรือแมลงเข้าทำลาย โดยเฉพาะเมื่อจุลินทรีย์สาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืชเริ่มติดเชื้อในเซลล์พืช เรายังมองไม่เห็น จนกระทั่งเชื้อสาเหตุเจริญลุกลามไปในเซลล์และเนื้อเยื่อพืชส่วนต่างๆ จนกระทั่งแสดงอาการผิดปกติให้เห็นด้วยตาเปล่า เราจึงรู้ว่าพืชเป็นโรคแล้ว อย่างไรก็ตามในเรื่องต้น ควรทราบว่าพืชที่จะเป็นโรคจะต้องมีปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคร่วมกัน คือ (1) เชื้อสาเหตุโรครุนแรงต่อการเกิดโรค และมีปริมาณมากพอ (2) พืชที่ปลูกอยู่ในสภาพที่กำลังอ่อนแอ และ (3) สิ่งแวดล้อมอยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค

เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชโดยชีววิธี (BIO-IPM) หมายถึง การนำวิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชหลายวิธีมาใช้ร่วมกับการควบคุมโดยชีววิธี ซึ่งหมายถึงการใช้สิ่งมีชีวิตตั้งแต่หนึ่งชนิดหรือมากกว่าหนึ่งชนิด เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขึ้นไป ได้แก่ จุลินทรีย์ แมลงตัวห้ำ (predator) ตลอดจนสารสกัดจากธรรมชาติ (Natural product) ได้แก่ สารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์หรือจากพืช เป็นต้น ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการลดปริมาณเชื้อก่อโรค (inoculum) ได้ หรือสามารถลดอัตราการเกิดโรคได้ ลดประชากรของแมลงศัตรูพืช และลดอัตราการเข้าทำลายของแมลง รวมถึงการใช้สิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์กำจัดวัชพืช ให้ต่ำกว่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ โดยมีการจัดการพื้นที่ระบบนิเวศสิ่งแวดล้อม และการปฏิบัติทางเกษตรกรรม การใช้วิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชวิธีอื่นๆ มาผสมผสาน รวมถึง การใช้พันธุ์พืชต้านทานโรคและแมลง

อย่างไรก็ตามการพยายามเข้าใจความหมายของการควบคุมโดยชีววิธี นับว่ามีความจำเป็น แต่ที่จำเป็นมากกว่า ก็คือ การพยายามหาวิธีการใหม่มาทดแทนการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อลดปริมาณเชื้อก่อโรคและลดอัตราการเกิดโรค ลดประชากรของแมลงศัตรูพืช ลดการเข้าทำลายของแมลงให้ต่ำกว่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ ซึ่งปกติพืชไม่ควรจะเสียหายจากโรคและแมลงมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์

ความสำเร็จในการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานโดยชีววิธี (BIO-IPM) ควรทำความเข้าใจกับระบบธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตต่างๆ และระบบนิเวศในพื้นที่ปลูกพืช ซึ่งการควบคุมโดยชีววิธี ปกติเกิดขึ้นเองในธรรมชาติอยู่แล้ว หากในพื้นที่นั้นๆ ยังมีความสมดุลในระบบนิเวศ สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโดยชีววิธีจะมีอยู่ในระบบนิเวศ แต่สภาพความเสื่อมโทรมของดินในพื้นที่ทำการเกษตรในปัจจุบัน จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องนำจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโดยชีววิธีเข้าไปใช้ทดแทนสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชร่วมกับวิธีการควบคุมอื่นๆ การใช้ปุ๋ยอินทรีย์และการใช้ปุ๋ยวิทยาศาสตร์ในปริมาณที่พืชต้องการเท่านั้นเพื่อฟื้นฟูสภาพแวดล้อมในพื้นที่ปลูกพืชปลอดสารพิษในเชิงการค้า การจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานโดยชีววิธี ควรทำความเข้าใจเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช (microbial control of plant pests)

การใช้จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดโรคพืชและแมลง ซึ่งมีทั้งในรูปของการใช้สปอร์ที่มีชีวิต หรือชีวผลิตภัณฑ์ (biological product) เนื่องจากพื้นที่ทำการเกษตรส่วนใหญ่ในปัจจุบันขาดความสมดุลในระบบนิเวศของจุลินทรีย์ จึงจำเป็นต้องนำจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพเข้าไปใช้ในพื้นที่ดังกล่าวเพื่อป้องกันกำจัดโรคพืชและแมลง ร่วมกับวิธีการอื่นๆ ทดแทนการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ซึ่งสารเคมีดังกล่าวมีผลกระทบและเป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ และทำให้เกิดมลภาวะ เป็นพิษตกค้างในดิน น้ำ อากาศ เกษตรกรแก้ปัญหาโดยการหาพื้นที่ปลูกใหม่ เพราะรู้ว่าถ้าปลูกซ้ำที่เดิมก็จะพบปัญหาเรื่องโรคอีก พื้นที่ปลูกใหม่ก็เข้าหลักเกณฑ์ที่อธิบายมาแล้วคือ เป็นพื้นที่ที่ไม่มีโรคระบาดมาก่อนและในดินไม่มีเชื้อก่อโรคหรือมีในปริมาณน้อยดังกล่าว สำหรับพืชยืนต้น เช่น ทุเรียน ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโศภน และมะนาว เป็นต้น โรครากเน่าโคนเน่าระบาดทำความเสียหายมานาน ต้นพืชเป็นโรคตายเรื่อยๆ ทุกปี เกษตรกรก็พยายามปลูกเพิ่มทั้งในที่เดิมและหาพื้นที่ใหม่ บางแห่งเชื้อระบาดหนักพืชตายหมดทั้งสวนก็มีหรือไม่มีต้นตายทั้งที่ทันใจ แต่เป็นโรครุนแรงกว่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ ไม่สามารถให้ผลผลิตคุ้มค่าแล้ว การปลูกพืชใหม่ก็ยังยึดหลักการใช้ยาฆ่าเชื้อราตั้งแต่เริ่มปลูก และใช้หลายชนิดอย่างต่อเนื่อง เพราะประสบการณ์ของเกษตรกรสอนว่าหากเกิดโรคระบาดเสียหายแล้วก็ขาดทุน ปัญหาการใช้ยาฆ่าเชื้อราไม่ได้ผลนั้น เป็นที่ทราบกันดีว่าเนื่องมาจากการคือยาของเชื้อ จึงไม่สามารถควบคุมโรคได้ แต่เกษตรกรเข้าใจว่าสิ่งแวดล้อมเหมาะสมกับการเกิดโรคพืช จึงใช้ยาฆ่าเชื้อราไม่ได้ผล ตามทฤษฎีแล้วหากสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม แม้พืชอาศัยจะอ่อนแอและเชื้อโรคจะรุนแรงก็ จะไม่มีการพัฒนาการติดเชื้อ (infection) หรือไม่เกิดโรคกับพืช ข้อสังเกตดังกล่าวนี้ หมายถึงพืชจะเป็นโรคได้ในกรณีเดียวเท่านั้น คือ สิ่งแวดล้อมเหมาะสม (favorable environment) พืชอาศัยอ่อนแอ (susceptible host)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

plant) และ เชื้อโรครุนแรงต่อการเกิดโรค(virulent or aggressive pathogen) ในช่วงเวลาที่เหมาะสม ดังนั้นถ้าพืชเป็นโรคแล้ว จะทำอย่างไรจึงจะสามารถหยุดการแพร่ระบาดของโรคได้ ไม่ว่าจะใช้ยาฆ่าเชื้อราหรือวิธีการอื่นๆ นั้น หมายถึง การรักษาพืชที่เป็นโรค

การนำเทคโนโลยีควบคุมโดยชีววิธีมาใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืช ซึ่งเป็นการส่งเสริมให้มีการใช้ยุทธวิธีควบคุมโรคพืชแบบใหม่ โดยใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช หรือที่เรียกว่า ยาเชื้อป้องกันกำจัดเชื้อรา จึงหลีกเลี่ยงไม่พัวพันกับกรณีที่น่ามาใช้แก้ปัญหาพืชที่กำลังเป็นโรค ซึ่งเกษตรกรส่วนมากยังเข้าใจผิดว่ายาเชื้อควบคุมโรคพืชจะต้องดีกว่ายาฆ่าเชื้อรา และจะต้องควบคุมโรคได้ร้อยละเปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่เกษตรกรจะหันมาทดลองใช้ยาเชื้อควบคุมโรค เป็นเกษตรกรที่ใช้ยาฆ่าเชื้อราไม่ได้ผลแล้ว และพืชกำลังเป็นโรครุนแรงแล้ว ทั้งเกษตรกรที่ปลูกพืชฤดูเดียว หรือปลูกไม้ผล ก็จะไปเอายาควบคุมเชื้อโรคพืชไปใช้ โดยมีความหวังว่าจะสามารถหยุดการระบาดของโรคได้ ในที่สุดก็ล้มเหลวในการควบคุมโรค โดยเข้าใจผิดว่ายาเชื้อควบคุมโรคพืชไม่ได้ และหันกลับไปใช้ยาฆ่าเชื้อราเหมือนเดิม เติญกับปัญหาเดิมต่อไป แต่การใช้วิธีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี จะประสบผลสำเร็จได้ในกรณีดังนี้ พืชที่ปลูกในพื้นที่ที่เคยมีเชื้อโรคระบาดมาก่อน หรือมีเชื้อก่อโรคในดิน (infested field - soil) ซึ่งเกษตรกรใช้ยาฆ่าเชื้อราอย่างต่อเนื่องตามโปรแกรมตั้งแต่เริ่มปลูกก็ใช้ในแง่การป้องกัน (protection) แต่พอพืชเริ่มโตขึ้นจะเป็นระยะการเจริญเติบโตระยะใดระยะหนึ่งก็ตามปรากฏว่าพืชเริ่มติดเชื้อ แสดงอาการโรคพืชเป็นโรคแล้วก็ใช้ยาฆ่าเชื้อราอีกหลายชนิดรักษา (curative) และสามารถลดการเกิดโรคให้ต่ำกว่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจได้ ก็ใช้ยาฆ่าเชื้อราตามโปรแกรมจนถึงพืชให้ผลผลิตและเก็บเกี่ยวผลผลิต หากเกรงว่าผลผลิตจะเน่าเสียหายหลังการเก็บเกี่ยวก็แช่หรือจุ่มยาฆ่าเชื้อราบางชนิด นี่เป็นหลักปฏิบัติทั่วไปของเกษตรกรที่ประสบผลสำเร็จในการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช แต่ถ้าใช้ยาฆ่าเชื้อราควบคุมโรคดังกล่าวไม่ได้แล้ว นั้นหมายถึงเชื้อโรคพืชเกิดการดื้อยา หากเกษตรกรสนใจที่จะนำเทคโนโลยีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีไปใช้ในช่วงนี้ให้ประสบผลสำเร็จในการควบคุมโรคแล้ว มีหลักพิจารณาดังนี้ คือพืช กำลังเป็นโรค อยู่ในช่วงไหน กล่าวคือ ในกรณีที่ 1 พืชเริ่มเป็นโรค (1-5%) กรณีที่ 2 พืชเป็นโรคในระดับกลาง (6-20%) กรณีที่ 3 พืชเริ่มเป็นโรครุนแรง (21-49%) และกรณีที่ 4 พืชเป็นโรครุนแรงแล้ว (มากกว่า 50 %) ถ้าพืชกำลังเป็นโรคในกรณีที่ 1 จะประสบผลสำเร็จ ผลผลิตการเกษตรซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค สารเคมีที่เป็นอันตรายดังกล่าวหมายถึง สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช (fungicides) สารเคมีป้องกันกำจัดแมลง (insecticides) สารเคมีปราบวัชพืช (herbicides) ซึ่งยังมีเกษตรกรบางรายหรืออาจจะเป็นส่วนใหญ่อยังสับสนว่า สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการเกษตรรวมถึงปุ๋ยเคมี ปุ๋ยวิทยาศาสตร์เป็นอันตรายทั้งหมด จึงควรทำความเข้าใจให้ดีและการใช้ปุ๋ยเคมียังเป็นสิ่งจำเป็นในการผลิตพืชทางการค้า เนื่องจากปุ๋ยเคมีไม่ใช่สารพิษ เมื่อพืชดูดเข้าไปก็จะเปลี่ยนรูปและโครงสร้างไปแล้ว ส่วนสารเคมีปราบศัตรูพืชดูดซึมเข้าไปจะตกค้างในเซลล์พืช ฉะนั้นการทำความเข้าใจในเทคโนโลยีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อความสำเร็จและการปฏิบัติในการทำเกษตรยั่งยืน (sustainable agriculture) หรือ เกษตรอินทรีย์ (organic farming) หรือเกษตรชีวภาพ (bioagriculture) หรือการทำเกษตรปลอดสารพิษ หรือเกษตรไร้สารพิษ ตามที่เรียกกัน เป้าหมายหลักของการควบคุมศัตรูพืช ไม่ว่าจะใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช หรือจะใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชและแมลง (microbial antagonists) หรือใช้วิธีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีอื่นๆ นั้น มีเป้าหมายในเชิงปฏิบัติเหมือนกัน คือ การควบคุมโรคพืชให้ต่ำกว่าความเสียหายทางเศรษฐกิจ ฉะนั้นแนวคิดในการปฏิบัติทางการเกษตร บางคนคิดว่าการปลูกพืชแบบธรรมชาติโดยไม่มีการปรับปรุงดิน ไม่มีการใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ ไม่ใช้ปุ๋ยเคมี โดยหวังว่าจะสามารถสร้างธรรมชาติให้สมดุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสามารถควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีให้ประสบผลสำเร็จนั้น จะต้องใช้เวลาหลายปีทีเดียว กว่าที่จะประสบผลสำเร็จในพื้นที่ที่เสียหายแล้ว เช่น จำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้น และเชื้อก่อโรคมีปริมาณมากขึ้น และดื้อยา (สารเคมี) สารเคมีอันตรายดังกล่าว ตกค้างในดินเป็นปริมาณมาก ดินขาดความอุดมสมบูรณ์ มีอินทรีย์วัตถุต่ำ ดินแน่นระบายน้ำไม่ดี และเป็นกรดจัดเป็นต้น ซึ่งอาจจะประสบความล้มเหลวในระยะแรกๆ ได้ ดังนั้นหากไม่คำนึงถึงความเสียหายทางเศรษฐกิจในระยะแรกๆ แล้ว อาจทำได้ เช่น ปลูกพืชปลอดสารพิษไว้รับประทานเอง โดยไม่เน้นการมีรายได้เชิงการค้า หรืออาจกล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ ไม่มีวัตถุประสงค์ในการผลิตพืชเพื่อแบ่งปันไปให้บุคคลที่ประกอบอาชีพอื่นๆ บริเวณ

ความหมายของการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีแบบผสมผสานมีข้อสำคัญ คือ การพยายามป้องกันกำจัดโรคพืช แมลง วัชพืช โดยลดหรือหยุดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช (chemical pesticides) ให้ต่ำกว่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ และบรรลุผลสำเร็จในเชิงปฏิบัติ ให้ผลผลิตพืชที่มีคุณภาพ ปลอดสารพิษ และมีผลต่อการปรับความสมดุลของระบบนิเวศวิทยาในสภาพแวดล้อม ดังนั้นจึงไม่ควรจะให้ความสำคัญของการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีเป็นข้อจำกัดในการนำไปใช้ ฉะนั้นความหมายควรมีขอบเขตที่ครอบคลุมถึง สารพิษหรือสารปฏิชีวนะ จากสิ่งมีชีวิตที่สามารถนำไปใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืช และกำจัดแมลง การพัฒนาพืชให้มีความต้านทานต่อโรค การใช้สารสกัดจากธรรมชาติชักนำให้พืชมีภูมิคุ้มกันโรคและแมลง นอกจากนี้ การควบคุมโรคโดยชีววิธียังรวมถึงการนำสิ่งมีชีวิตมาใช้ร่วมด้วย ได้แก่ การใช้ปุ๋ยอินทรีย์ การอบดินด้วยพลังงานแสงอาทิตย์ เป็นต้น เพื่อมิให้พืชเกิดโรคและลดประชากรแมลงไม่ให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ ดังนั้นการจัดการศัตรูพืชโดยชีววิธีแบบผสมผสาน (Biological Integrated Pest Management, BIO-IPM) จึงเกี่ยวข้องกับการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี การป้องกันกำจัดแมลงโดยชีววิธี การกำจัดวัชพืชโดยชีววิธี การจัดการพืชและการจัดการดินและสิ่งแวดล้อม

การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี เกี่ยวข้องกับการฟื้นฟูสภาพธรรมชาติ โดยเฉพาะระบบนิเวศวิทยาในดิน การจัดการดินให้มีความอุดมสมบูรณ์ การเพิ่มปริมาณอินทรีย์วัตถุหรือธาตุอาหารที่จำเป็นต่อพืชในดิน การปรับสภาพความเป็นกรดเป็นด่างในดินให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช ตลอดจนการหยุดใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในการเพาะปลูกพืชและการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมให้กลับคืนมา ที่บางคนเรียกว่าเกษตรธรรมชาติ หรือเกษตรอินทรีย์ การทำการเกษตรที่ผ่านมานี้ในอดีตนั้น พื้นที่เพาะปลูกพืช มีความอุดมสมบูรณ์ ดินมีอินทรีย์วัตถุสูง ร่วนซุย ระบายน้ำและอากาศดี จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการช่วยย่อยสลายเศษซากพืชและสัตว์ในดินก็มีมาก ระบบนิเวศน์อยู่ในสภาพสมบูรณ์ พืชที่ปลูกเจริญเติบโตดีและแข็งแรง มีภูมิคุ้มกันโรค พืชให้ผลผลิตมากทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพโดยที่ไม่ได้ใช้สารเคมีปราบศัตรูพืช (pesticides) หรือปุ๋ยวิทยาศาสตร์ หรือใช้ก็น้อยมาก พืชที่ปลูกย่อมมีศัตรูพืชเข้าทำลายเป็นธรรมดาและมักจะทำความเสียหายต่อผลผลิตพืช ศัตรูพืชที่สำคัญได้แก่โรคและแมลงแต่การเข้าทำลายของศัตรูพืชนั้นต่ำกว่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจแต่ไม่ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจในขณะนั้น เหตุผลที่ซ่อนเร้นอยู่ก็คือ ในธรรมชาตินั้นจะมีสิ่งมีชีวิตหลากหลายควบคุมซึ่งกันและกันทั้งชนิดและปริมาณของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นให้อยู่ในระดับมีความสมดุลซึ่งกันและกัน สิ่งทีกล่าวนี้ก็คือการควบคุมโดยชีววิธีที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ ซึ่งมีปัจจัยและองค์ประกอบที่สำคัญของการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ได้แก่ สภาพแวดล้อมและระบบนิเวศน์ในดินพืชที่ปลูก เชื้อสาเหตุทำให้เกิดโรคพืช และ จุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อโรคพืช ต่อมาการปฏิบัติการทางเกษตรกรรมในการปลูกพืชที่ผ่านมา ในยุคของการนำสารเคมีทางการเกษตรมาใช้กันมากและมากขึ้นเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน ได้แก่สารเคมีปราบศัตรูพืช (ยาป้องกันกำจัดโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืช ยาฆ่าแมลง ยาปราบวัชพืช) ปุ๋ยเคมีหรือปุ๋ยวิทยาศาสตร์ ฮอริโมนส์ และอื่นๆเป็นต้น ทั้งนี้เพื่อสนองต่อการพยายามเพิ่มปริมาณผลผลิตในมากขึ้นให้เพียงพอต่อจำนวนประชากรที่เพิ่มมากขึ้น โดยสามารถส่งไปจำหน่ายต่างประเทศได้มากขึ้น มีผลงานวิจัยและพัฒนาการนำสารเคมีทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประสิทธิภาพและเกิดประโยชน์สูงสุดเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ ผลกระทบที่ทุกประเทศที่ทำการเกษตรกรรมกำลังเผชิญหน้าอยู่ในขณะนี้ โดยเฉพาะในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงประเทศไทย ก็คือ เกษตรกรเริ่มไม่สามารถที่จะควบคุมปริมาณศัตรูพืชให้ต่ำกว่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจได้โดยเฉพาะโรคพืช หลังจากใช้สารเคมีปราบศัตรูพืชติดต่อกันมาอย่างต่อเนื่อง สารเคมีดังกล่าวยังเป็นปัจจัยที่สำคัญในการทำให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม เป็นพิษตกค้างในดิน น้ำ อากาศและผลผลิตเกษตร ส่งผลให้สิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปและสูญเสียความสมดุลของระบบนิเวศในธรรมชาติ ประเทศที่นำเข้าผลผลิตเริ่มตั้งข้อสังเกตหรือมีกฎเกณฑ์ว่าห้ามมิให้มีสารพิษตกค้างในผลผลิตที่จะส่งไปจำหน่ายในปริมาณต่ำสุดที่กำหนดเป็นต้น ปัญหาดังกล่าวนี้นักประเทศกำลังเริ่มมองหาทางแก้ไขซึ่งประเทศที่พัฒนาแล้วจะให้ความสำคัญมากกว่าประเทศที่กำลังพัฒนา

องค์ประกอบของการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี

ข้อควรพิจารณาคือ

- (1) พืชอาศัย (host plant)
- (2) ศัตรูพืช (plant pests) ได้แก่ เชื้อโรคพืช แมลงและวัชพืช
- (3) สิ่งแวดล้อมกายภาพ (physical environment) โดยเฉพาะการจัดการดิน
- (4) สิ่งมีชีวิตควบคุมโดยชีววิธี (biological agents) เช่น จุลินทรีย์ควบคุมแมลง (ตัวเบียน) จุลินทรีย์ควบคุมโรค สัตว์กินแมลง (ตัวห้ำ)
- (5) การจัดการพืช (crop management)
- (6) การสร้างระบบนิเวศน์ (ecosystem)

พืชอาศัย (host plant)

ปกติพืชที่เป็นโรคหรือถูกแมลงทำลายนั้นจะอยู่ในสภาพที่อ่อนแอ พืชอาจจะถูกทำลายจากแมลงก่อนทำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดบาดแผลจากการถูกกัดกินหรือขบดูดแล้วมีเชื้อสาเหตุเข้าทำลายต่อทางรอยแผลที่มีสาเหตุจากแมลงหรือเข้าทางช่องเปิดธรรมชาติ เช่น ปากใบ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อสาเหตุซึ่งต้องเป็นเชื้อที่รุนแรงต่อการเกิดโรคและอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค ปัจจัยดังกล่าวเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อให้เกิดโรคกับพืช ฉะนั้นในขณะที่พืชกำลังอยู่ในสภาพที่อ่อนแอ เชื้อสาเหตุโรคพืชจะเข้าทำลายและระบาดอย่างรุนแรงต่อการเกิดโรคกับพืช ฉะนั้นในขณะที่พืชกำลังอยู่ในสภาพที่อ่อนแอ เชื้อสาเหตุโรคจะเข้าทำลายและระบาดอย่างรุนแรง ซึ่งในพืชต้นหนึ่งอาจมีเชื้อสาเหตุโรคมากกว่าหนึ่งชนิดเข้าทำลายในเวลาเดียวกัน เช่น เชื้อสาเหตุเข้าทำลายระบบราก และเข้าทำลายส่วนบนของต้น ซึ่งเรียกว่าการเกิดโรคซ้อน (disease complex) และพืชที่อ่อนแอยังง่ายต่อการเข้าทำลายของแมลง แต่ถ้าในสภาพแวดล้อมดังกล่าวมี จุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อโรคพืชและจุลินทรีย์ฆ่าแมลงที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงหรือทำให้เชื้อโรคพืชอ่อนแอลง ก็สามารถลดการเกิดโรคและลดการเข้าทำลายของแมลงได้ หรือหากพืชมีความต้านทานต่อโรค (tolerance) ซึ่ง หมายถึง พืชจะเป็นโรคแต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถให้ผลผลิตได้ตามปกติ นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับสภาวะที่ทำให้พืชอ่อนแอ ได้แก่ การขาดธาตุอาหาร ความแห้งแล้ง น้ำท่วมขัง ดินชั้นและต่อเนื่อง เป็นต้น

ศัตรูพืช (plant pests) ได้แก่ โรคพืช แมลง และ วัชพืช

เชื้อสาเหตุโรคพืช เป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็กมองด้วยตาเปล่าไม่เห็น ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส ไวรอยด์ ไรเคทเซีย ไฟโตพลาสมา(มายโคพลาสมา) ไล้เดือนฝอย สาหร่าย โปรโตซัว กามฝาก ฝอยทอง เป็นต้น ในบรรดาเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืช ดังกล่าว เชื้อราเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคกับพืชต่างๆ มากที่สุด สิ่งจำเป็นก็ต้องทำความเข้าใจ และรู้จักเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืชว่า มีลักษณะอย่างไร มีชีพจักร (วงจรชีวิต) และมีนิสัยในธรรมชาติอย่างไร มีขบวนการเกิดโรค (pathogenesis)อย่างไร เป็นต้น ปกติเชื้อสาเหตุโรคแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะนิสัยการเจริญเติบโต ดังนี้

ก. เป็นเชื้อสาเหตุโรคที่สามารถสร้างสปอร์หรือเอนไซม์ (Necrotrophs) โดยเชื้อสาเหตุโรคสร้างเอนไซม์ เข้าทำลายเซลล์ของพืชโดยตรง หรือมีผลทำให้เซลล์พืชไหม้หรือเน่ายุบตัวตายอย่างรวดเร็วและเชื้อสาเหตุโรคสามารถเจริญเข้าทำลายเนื้อเยื่อของพืชในระหว่างเซลล์พืช (intercellular) เมื่อเกิดโรคระบาดรุนแรง พืชจะตายในที่สุด และในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เชื้อสาเหตุโรคซึ่งปกติจะอาศัยอยู่ในดิน (soil borne) ในรูปโครงสร้างที่พิเศษที่สามารถอยู่ข้ามฤดูได้ ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ในดินเศษซากพืช และสัตว์ อินทรีย์วัตถุ หรือพักตัวอยู่ในเมล็ดพันธุ์พืช (seed borne) และเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมก็จะเจริญเข้าทำลายพืชต่อไป เชื้อสาเหตุโรคพืชกลุ่มนี้ (Facultative parasites) ตลอดชีพจักรจะสามารถเจริญและมีชีวิตอยู่ได้ทั้งในสิ่งมีชีวิต (พืชปลูก) และสิ่งไม่มีชีวิต (เศษซากพืช และสัตว์ อินทรีย์วัตถุ) ซึ่งเชื้อสาเหตุโรคพืชชนิดหนึ่งสามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิด เรียกว่า มีพืชอาศัยกว้าง (wide host range) ได้แก่ โรครากเน่า โคนเน่า โรคเหี่ยว โรคแอนแทรกโนส โรคเน่าระดับดิน เป็นต้น

ข. เป็นเชื้อสาเหตุโรคที่ไม่สามารถสร้างสปอร์หรือเอนไซม์ (Biotrophs) เข้าทำลายเซลล์ของพืชโดยตรงได้หรือมีก็น้อยมาก เชื้อสาเหตุโรคจะสร้างโครงสร้างพิเศษเข้าไปดูต้นเลี้ยงภายในเซลล์พืช (haustoria) โดยส่วนใหญ่โครงสร้างดังกล่าวพืชจะสร้างหลังจากการติดเชื้อ(infectoin)และเจริญเข้าอาศัยอยู่ภายในเซลล์พืช(intracellular) โดยจะไม่ทำลายส่วนเยื่อหุ้มเซลล์(cell membrane)มีผลให้เซลล์พืชตายอย่างช้าๆ เมื่อเกิดโรคระบาดพืชจะไม่ตายทันที มีผลทำให้ผิดปกติภายในเซลล์พืช ทำให้ได้ผลผลิตน้อย ไม่มีคุณภาพ และในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเช่นสิ้นสุดฤดูกาลปลูกพืช(ไม่มีพืชอาศัยหลัก) ภูมิอากาศไม่เหมาะสม เชื้อสาเหตุของโรคดังกล่าวจะมีส่วนขยายพันธุ์ที่สามารถแพร่กระจายโดยลม(air-brone) แมลงพาหะ(insect vectors) ไปอาศัยอยู่ในพืชอื่นๆ(พืชอาศัยรอง)ได้แก่วัชพืชบางชนิด เป็นต้น เชื้อสาเหตุโรคกลุ่มนี้(Obligate parasites) จะไม่อาศัยพักตัวอยู่ในดิน เศษซากพืชและสัตว์ อินทรีย์วัตถุ แต่อาจจะพักตัวอยู่ในเมล็ดพันธุ์พืช(seed-brone) เชื้อสาเหตุโรคพืชดังกล่าวตลอดชีพจักรจะสามารถเจริญและมีชีวิตอยู่ได้ ในสิ่งมีชีวิตเท่านั้นได้แก่ พืชอาศัยหลักและพืชอาศัยรอง ซึ่งเชื้อสาเหตุโรคพืชชนิดหนึ่งสามารถเข้าทำลายพืชแบบเฉพาะเจาะจง อาจจะมีเพียงชนิดหนึ่งหรือสองสามชนิดเท่านั้น เรียกว่ามีพืชอาศัยแคบ (narrow host rang) ได้แก่ ไร้น้ำค้าง ราสนิม ราแป้ง ไวรัสและไวรอยด์สาเหตุโรคเป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขบวนการเกิดโรคพืช (plant pathogenesis) หมายถึง ลำดับเหตุการณ์ของการที่พืชแสดงอาการผิดปกติทางสรีรวิทยาอย่างต่อเนื่อง โดยเริ่มตั้งแต่เชื้อสาเหตุโรคแพร่ระบาดเข้าสู่ผิวพืช แทะทะลุผ่านผิวพืช เกิดการติดเชื้อเจริญลูกกลมในเซลล์พืช ทำลายเซลล์พืช ทำให้เกิดอาการผิดปกติในการปรุงอาหารของพืช การหายใจการดูดธาตุอาหารพืช การคายน้ำ รวมถึงขบวนการอื่นๆ จนกระทั่งพืชแสดงอาการ(symptom) ขบวนการเกิดโรคจึงเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค (disease cycle) ของเชื้อสาเหตุโรคทั้งสองกลุ่ม กล่าวคือวงจรโรคของ facultative parasite และ obligate parasites

โรคพืชที่เกิดจากสิ่งแวดล้อม ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชเช่น อิทธิพลของลม ความชื้นในอากาศและในดิน การขาดออกซิเจน อุณหภูมิ แสง สภาพอากาศเป็นพิษ (air pollution) ฝนกรด (acid rain) อิทธิพลของยาฆ่าหญ้า ยาฆ่าหญ้า นิยมใช้กันทั่วไปในการทำการเกษตรใช้สารเคมีปราบศัตรูพืช มีตัวอย่างจำนวนมากกล่าวถึงการใช้อย่างไม่เหมาะสมทำให้เกิดโรคเพิ่มขึ้น มีผลต่อการเพิ่มหรือลดการอ่อนแอต่อโรคพืช มีผลต่อการเพิ่มหรือลดจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และเชื้อสาเหตุโรคในดินเป็นต้น การขาดหรือมีธาตุอาหารมากเกินไปเป็นต้น รวมถึงอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมดังกล่าวที่มีผลต่อการเพิ่มหรือลดประชากรของแมลงศัตรูพืช

สิ่งแวดล้อมทางกายภาพและการจัดการดิน

สภาพของดินปลูกนับว่าเป็นสิ่งแวดล้อมทางกายภาพที่มีผลทำให้พืชอ่อนแอและง่ายต่อการเกิดโรคและการเข้าทำลายของแมลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดินเสื่อมโทรม หนาดินแข็ง ระบายน้ำและอากาศไม่ดี ดินที่เป็นกรดจัด ดินเค็มหรือดินเปรี้ยว อุณหภูมิหรือความชื้นของดินและธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชในดิน เป็นต้น ฉะนั้นสภาพของดินปลูกจึงนับว่าเป็นปัจจัยหรือองค์ประกอบที่สำคัญต่อความสำเร็จของการควบคุมโดยชีววิธี การปรับปรุงสภาพดินให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืชและต่อพืชจึงเป็นสิ่งจำเป็น ความสัมพันธ์ระหว่างพืช แมลง จุลินทรีย์และระบบนิเวศน์ของดินที่มีผลต่อการควบคุมโดยชีววิธี ค่อนข้างซับซ้อนจำเป็นต้องอาศัยการสังเกตและประสบการณ์จริงในภาคสนาม เนื่องจากจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืชแต่ละชนิด แมลงตัวห้ำ มีลักษณะนิสัยการเจริญเติบโตแตกต่างกันไป นอกจากนี้ในดินยังมีสิ่งมีชีวิตและจุลินทรีย์ทั้งที่มีประโยชน์และโทษอีกมากมาย ภาควิชาของจุลินทรีย์ในดินจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องพิจารณาถึงสาเหตุของความล้มเหลวหรือความสำเร็จในการควบคุมโดยชีววิธี สิ่งมีชีวิตควบคุมโดยชีววิธี (biocontrol agents) เช่น จุลินทรีย์ควบคุมแมลง (ตัวเบียน) จุลินทรีย์ควบคุมโรค สัตว์กินแมลง (ตัวห้ำ)

จุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืชเป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชให้อยู่ในระดับต่ำกว่าความเสียหายทางเศรษฐกิจ สามารถใช้ทดแทนสารเคมีปราบศัตรูพืช จุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืชจะขัดขวางการเจริญเติบโตและความมีชีวิตอยู่รอดของแมลงและเชื้อสาเหตุโรคพืช ทำให้แมลงและเชื้อสาเหตุโรคพืชอ่อนแอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(weak)ไม่สามารถเข้าทำลายเสียหายแก่พืชได้ จุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช ส่วนมากจะเป็นสายพันธุ์ที่มีความเฉพาะเจาะจง(specific strain , specific race ,isolate)ต่อการเข้าทำลายแมลงและเชื้อสาเหตุโรคพืช

จุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช (microbial antagonists) หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคหรือแมลง ได้แก่ เชื้อรา (antagonistic fungi) แบคทีเรีย (antagonistic bacteria) โปรโตซัว (protozoa) และไวรัส(virus) อาจจะแบ่งเป็น 2 กลุ่มด้วยกันดังนี้

ก. จุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืชที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ (resident antagonists)

(1) จุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืชที่อยู่ในดินปลูกพืช ในดินบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) หรือ อาศัยอยู่ตามพื้นผิวของพืช(phyllloplant) หรือ แหล่งที่มีเชื้อสาเหตุทำให้เกิดโรคพืชอาศัยอยู่ ได้แก่ ในเศษซากพืชและอินทรีย์วัตถุในดิน จุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อโรคที่มีอยู่แล้วในพื้นที่นั้นๆ สามารถควบคุมปริมาณเชื้อก่อโรคพืช (inoculum) ไม่ให้เพิ่มปริมาณประชากร จนถึงระดับที่เชื้อสาเหตุโรคพืชจะเข้าทำลายเสียหายแก่โรคพืชได้ ซึ่งจัดว่าเป็นการเกิดการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีในธรรมชาติ(naturally biological control) ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้จะไม่ปรากฏหรืออาจพบน้อยมากในพื้นที่ที่ทำการเกษตรที่ผ่านการใช้สารเคมีมาอย่างต่อเนื่องได้แก่ยาปราบศัตรูพืช เนื่องจากจุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อโรคพืชอาจจะถูกทำลายจากยาป้องกันกำจัดเชื้อราและสภาพแวดล้อมในดินปลูกพืชไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเนื่องจากการสูญเสียความสมดุลของระบบนิเวศน์ในดินนั่นเอง ซึ่งอาจจะส่งผลให้เกิดการสูญเสียพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่างๆไป หรือบางครั้งอาจจะพบแต่ในปริมาณไม่มากนัก อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ต่อต้านที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ มักจะพบในพื้นที่ที่อุดมสมบูรณ์เช่นในป่าไม้เป็นต้น

(2) จุลินทรีย์ฆ่าแมลง เช่นบาซิลลัส ทุริเจนซิส กำจัดหนอนใยผักเป็นต้น

ข. จุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืชที่นำไปใช้ (introduced antagonist)

จุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืชแต่ละสายพันธุ์ที่นำเข้าไปใช้ในพื้นที่ปลูกพืช เป็นจุลินทรีย์ซึ่งนักวิจัยค้นพบโดยแยกได้จากธรรมชาติ นำมาทำการทดสอบและคัดเลือกสายพันธุ์(strain) ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการควบคุมเชื้อโรคพืชหรือแมลงศัตรูพืช ผ่านการเลี้ยงเพิ่มปริมาณภายใต้การควบคุมในสภาพที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการ การทดสอบในเรื่องทดลองและแปลงทดลอง ผ่านการค้นคว้าวิจัยในแง่ต่างๆเช่นกลไกในการควบคุม (control mechanism) ความปลอดภัย(safety test) หรือความเป็นพิษเฉียบพลัน(acute toxicity test) ต่อมนุษย์และสัตว์ ทั้งนี้รวมถึงการนำไปใช้ในลักษณะของการขยายพันธุ์(propagules) หรือเซลล์พืชที่มีชีวิต และในลักษณะเป็นชีวผลิตภัณฑ์(biological products) หรือเกษตรกรรมเรียกว่ายาเชื้อ ซึ่งอาจจะเป็นเม็ด เกล็ดผง หรือในรูปสารละลาย หรือผสมอยู่ในวัสดุอินทรีย์เป็นต้น และสามารถนำไปใช้ในการควบคุมโรคพืชหรือแมลงในแง่ต่างๆได้แก่ หว่านลงดิน คลุกเมล็ดก่อนปลูก ฉีดพ่นบนใบ หรือบนส่วนต่างๆของพืชเป็นต้น

การจัดการพืช (crop management)

การจัดการระบบการปลูกพืช เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิดนับว่าเป็นปัจจัยสำคัญยิ่งต่อความสำเร็จในการควบคุมโรคและแมลงโดยชีววิธี

การสร้างระบบนิเวศน์(ecosystem)

การพยายามให้เกิดความสมดุลในธรรมชาติในพื้นที่ปลูกพืช เป็นการสร้างระบบนิเวศน์ให้กลับคืนมา จะมีผลให้สามารถลดปริมาณศัตรูพืชให้ต่ำกว่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจได้ การฟื้นฟูระบบนิเวศน์ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แปลงปลูกพืชล้มลุกจะทำให้ช้ากว่าในแปลงปลูกไม้ผลหรือไม่ยืนต้น การสร้างระบบนิเวศน์ต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆดังนี้

1. การพยายามลดปริมาณการใช้และหยุดใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชอย่างต่อเนื่อง
2. การใช้จุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืชอย่างต่อเนื่อง การใช้จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช
3. การปรับปรุงสภาพความอุดมสมบูรณ์ของดิน
4. การเลี้ยงสัตว์ที่ไม่อันตรายต่อพืชเช่นการเลี้ยงไก่พื้นเมืองในสวนผลไม้ การเลี้ยงเปิดน่าน การเลี้ยงกบ การเลี้ยงปลาในบ่อ
5. การไม่เผาทำลายเศษซากพืช โดยการใช้จุลินทรีย์เร่งการย่อยสลายในการทำปุ๋ยหมัก

ใช้ในพื้นที่ปลูก

ความสำเร็จหรือความล้มเหลวของการควบคุมโรคโดยชีววิธี ยังขึ้นอยู่กับเวลาและโอกาสที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ ควรคำนึงถึง

- (1) ใช้ในการป้องกัน จะเหมาะสมกว่าในแง่การรักษา ใช้เมื่อพบต้นพืชปกติไม่แสดงอาการโรค ซึ่งจะสามารถใช้จุลินทรีย์ป้องกันกำจัดโรคหรือยาเชื้อในปริมาณน้อย ประหยัดค่าใช้จ่าย
- (2) ใช้ในแง่การรักษา นักโรคพืชส่วนใหญ่ยังมีความเห็นว่าจุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อโรคพืช หรือยาเชื้อไม่สามารถนำไปใช้ในการควบคุมในแง่การรักษาได้ นั่นหมายถึง เมื่อพืชมีอาการติดเชื้อ และเริ่มแสดงอาการโรคนั้นเอง ซึ่งอาจจะอยู่ในระยะที่พืชเริ่มแสดงอาการโรค หรือพืชแสดงอาการโรคปานกลางยังไม่ถึงระดับที่เสียหายทางเศรษฐกิจ หรือพืชเป็นโรคขั้นรุนแรงจนมากกว่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ ไม่สามารถจะแก้ไขได้ไม่ว่าจะใช้วิธีการใดๆ จึงจำเป็นต้องพิจารณาปัจจัยดังกล่าวด้วย มีรายงานไม่น้อยทั้งในและต่างประเทศที่ประสบความสำเร็จในการนำจุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อโรคพืชไปใช้ลดปริมาณเชื้อโรค และลดการเกิดโรคในสภาพพื้นที่ที่มีเชื้อสาเหตุโรคทำให้เกิดโรคพืชในดิน (infested soils) และใช้ในขณะที่พืช แสดงอาการเริ่มต้นหรือการเกิดโรคยังไม่ถึงระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ จึงต้องพิจารณาก่อนนำไปใช้อย่างเหมาะสมและถูกวิธีด้วย ได้แก่ การนำยาเชื้อไปใช้ก่อนปลูกพืชหรือหลังปลูกพืช ใช้ในขณะที่พืชปกติ ใช้ในขณะที่พืชเริ่มเป็นโรค (1-5%) ใช้ในขณะที่พืชเป็นโรคระดับปานกลาง (6-20%) ใช้ในขณะที่พืชเริ่มเป็นโรครุนแรงเกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ (21-50 %) หรือใช้ในขณะที่พืชเป็นโรครุนแรงเกินระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจแล้ว ไม่มีวิธีการใดๆที่จะสามารถควบคุมโรคได้ แม้แต่สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชก็ตาม นอกจากนี้เวลาและโอกาสที่เหมาะสมต่อการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ยังเกี่ยวข้องกับจัดการสภาพแวดล้อม ระบบนิเวศน์ของดินและพืชให้เหมาะสม โดยผ่านการปฏิบัติทางเขตกรรม (cultural practices) และรวมถึงปริมาณเชื้อก่อโรค (inoculum) หรือส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อโรคพืชในดินอยู่ในระยะที่รุนแรงและมีความแข็งแรงต่อการเข้าทำลายพืช (active stage) หรืออยู่ในระยะพักตัว (dormancy stage) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตพืชผัก ไม้ผลปลอดสารพิษเชิงการค้า

หมายถึงการปลูกพืชให้เจริญเติบโตแข็งแรงให้ผลผลิตที่มีปริมาณและคุณภาพสูง โดยการจัดการระบบการปลูกพืชให้เหมาะสมในสภาพดินที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีอินทรีย์วัตถุพอเพียง มีความเป็นกรดเป็นด่างเหมาะสมต่อพืชการใช้ปุ๋ยวิทยาศาสตร์ให้พอดีเท่าที่พืชต้องการ โดยไม่ใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช (chemical pesticides) ได้แก่ ยาฆ่าแมลง ยาป้องกันกำจัดโรคพืช ยาฆ่าหญ้า ซึ่งสามารถเป็นพิษตกค้างในผลผลิต และใช้เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (BIO-IPM) มาใช้ในการควบคุมศัตรูพืชให้อยู่ในระดับที่ต่ำกว่าความเสียหายทางเศรษฐกิจ การปฏิบัติอย่างต่อเนื่องในพื้นที่เดิมจะมีผลให้เกิดระบบนิเวศซึ่งสิ่งมีชีวิตที่มีประโยชน์จะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆในพื้นที่ปลูกพืช มีผลให้สามารถลดต้นทุนการผลิตได้

ความสำเร็จอาจจะไม่เกิดขึ้นทันทีทันใด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ :

- (1) ความพร้อม ความเข้าใจและการยอมรับของเกษตรกร
- (2) สารพิษทางการเกษตรที่ตกค้างอยู่ในพื้นที่ปลูก
- (3) ความรู้ของเกษตรกรในการปรับปรุงบำรุงดินที่เสื่อมโทรม (ดินเสีย)
- (4) การใช้จุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพจริงและใช้อย่างถูกวิธี

การพิจารณาถึงความสำเร็จคือ

- (1) สามารถควบคุมศัตรูพืชได้จนต่ำกว่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ
- (2) มีประสิทธิภาพเท่าเทียมกับการใช้สารเคมีปราบศัตรูพืช
- (3) กรณีเชื้อโรคและแมลงดื้อยาแล้ว สามารถใช้จุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืชได้

ปัญหาที่พบและสาเหตุที่แท้จริงของเกษตรกร

ปัจจุบันเกษตรกรกำลังประสบปัญหาพืชให้ผลผลิตต่ำ ผลผลิตคุณภาพไม่ดี ราคาผลผลิตต่ำ ในขณะที่ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ประสบปัญหาไม่สามารถควบคุมโรคและแมลงได้ โดยเฉพาะบางพื้นที่พืชที่ปลูกเป็นโรคตายเกือบทั้งหมด แม้ว่าจะใช้สารเคมีปราบศัตรูพืชแล้วก็ตามสาเหตุของปัญหาที่แท้จริงคือสภาพดินปลูกพืชเสื่อมโทรม(ดินเสีย) เกษตรกรรู้และเรียกกันไปต่างๆเช่นดินกรด ดินเค็ม ดินเปรี้ยว ดินตาย ดินแข็ง ฯลฯ เป็นต้น และ การใช้สารเคมี (ยา) ฆ่าเชื้อรา, สารเคมี (ยา) แมลง และสารเคมี (ยา) ฆ่าวัชพืช (หญ้า) ฮอริโมน สารเคมี บังคับการออกดอกนอกฤดู รวมถึงการใช้ปุ๋ยวิทยาศาสตร์หรือปุ๋ยเคมี มากเกินไป เป็นต้น

ผลกระทบที่ตามมาในปัจจุบัน คือ :

ก. ดินเสียหรือดินเสื่อมสภาพ หมายถึง หน้าดินแข็งระบายน้ำระบายอากาศไม่ดี อินทรีย์วัตถุ (ปุ๋ยอินทรีย์) ในดินลดน้อยถอยลงหรือแทบจะหมดไป ทำให้โครงสร้างดินเสีย ตลอดจนสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ในดิน ได้แก่ จุลินทรีย์ย่อยสลายเศษซากพืชตายไปเป็นจำนวนมากหรือหมดไป ซึ่งปกติสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ในดินนี้ไม่เป็นอันตราย เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อรากพืช แต่จะช่วยย่อยสลายเศษซากพืชช่วยในการปรับปรุงสภาพดิน และดินเสื่อมสภาพดังกล่าว ส่วนใหญ่จะทำให้ดินเป็นกรดจัด เนื่องจากการใช้ปุ๋ยเคมีมากเกินไป จึงเปลี่ยนเป็น รูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ไม่ได้ และทำให้มีค่าพีเอช (pH) ต่ำ อาจะอยู่ในช่วง 2.0 - 5.0 ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช

ข. จากปัญหาดินเสีย มีผลทำให้ต้นพืชที่ปลูกอ่อนแอ เจริญเติบโตไม่ดี มีระบบรากไม่สมบูรณ์ ปริมาณรากน้อย ดูดอาหารได้น้อยลง และเมื่อพืชอ่อนแอก็จะง่ายต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคและแมลง ผลกระทบดังกล่าว ทำให้เกษตรกรหลงทางกันไปเป็นจำนวนมากกล่าวคือ ยังพยายามยึดติดอยู่กับการใช้สารเคมีปราบศัตรูพืชและใช้ไนโตรเจนมากเกินไป โดยไม่ได้สังเกตว่าต้นทุนสูงขึ้นทุกขณะ แต่พืชที่ปลูกโทรมลงไปเรื่อยๆ และยังคงถูกโรคและแมลงทำลายอย่างต่อเนื่องพืชที่ปลูกอาจเน่าแห้งตายไปเรื่อยๆ ไบโอดีทและเชื้อรา แสดงถึงการขาดธาตุอาหารและความไม่สมดุลของธาตุอาหารในดิน ซึ่งเกษตรกรบางรายเห็นพืชที่ปลูกอาการไม่ดีก็แก้ไขโดย เพิ่มใส่ปุ๋ยเคมีมากขึ้น แต่พืชที่ปลูกก็ไม่ตอบสนองแล้ว ก็เปลี่ยนจากใส่ปุ๋ยเคมีทางดิน หันไปฉีดพ่นปุ๋ยเคมีชนิดน้ำทางใบ พืชก็ไม่ตอบสนองต่อปุ๋ย จะฉีดพ่นหรือใส่ลงดินเท่าไร พืชที่ปลูกก็โทรมลงไปเรื่อยๆ จนไม่สามารถขยายผลผลิตได้อย่างเต็มที่ ประสบภาวะขาดทุน

การแก้ไขปัญหาดินที่ต้นเหตุและระยะยาว

การแก้ปัญหาคาปลูกพืชดังกล่าว ควรจะแก้ไขที่ปัญหาดินต้นเหตุ คือ แก้ไขที่ดินปลูกพืช จากปัญหาดินเสีย ก็ควรแก้ไขให้ดินดีขึ้น โดยการปรับปรุงสภาพดิน ตามขั้นตอนดังนี้

(1) การปรับสภาพพีเอชของดิน หรือความเป็นกรดด่างของดินให้ได้ 6.0-6.5 โดยการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับโดโลไมท์หรือปูนขาว ทำการปรับสภาพดินในลักษณะดังกล่าวทุกกระยะ 4-6 เดือน เกษตรกรบางรายเคยใช้แต่ปูนมาร์ล , ปูนขาว หรือโดโลไมท์อย่างเดียว ในการแก้สภาพ พีเอชของดินทุกปี แต่สภาพดินก็จะเป็นกรดจัดตลอดเวลา ขอแนะนำว่าการปรับสภาพดินที่ถูกต้อง จำเป็นจะต้องใช้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมด้วยเสมอ

นอกจากนี้การใส่ปุ๋ยอินทรีย์จะช่วยทำให้ดินร่วนซุยเร็วขึ้น แก้ปัญหาดินแน่น ทำให้ดินระบายน้ำและอากาศดี น้ำไม่ขังและเกินไป ช่วยปรับสภาพโครงสร้างของดิน ช่วยให้ดินอุดมสมบูรณ์ และเพิ่มอินทรีย์วัตถุให้กับดิน ปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณภาพมาตรฐานควรมีค่า พีเอช อยู่ในช่วงเป็นกลาง (7.0) มีอินทรีย์วัตถุสูงและธาตุอาหารพืชครบความสมบูรณ์

ปกติธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชมี 16 ธาตุ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

1.1 ธาตุอาหารที่พืชต้องการมาก ได้แก่ คาร์บอน (C), ไฮโดรเจน (H), ออกซิเจน (O), ไนโตรเจน (N), ฟอสฟอรัส (P), โพแทสเซียม (K), แคลเซียม (Ca), กำมะถัน (S) และ แมกนีเซียม (Mg)

1.2 ธาตุอาหารที่พืชต้องการน้อยแต่ขาดไม่ได้ ได้แก่ ทองแดง (Cu), โบรอน (B), เหล็ก (Fe), โมลิบดีนัม (Mo), สังกะสี (Zn), คลอรีน (Cl) และแมงกานีส (Mn)

ฉะนั้นการใส่ปุ๋ยอินทรีย์อย่างต่อเนื่อง จะช่วยให้ดินอุดมสมบูรณ์ รักษาสภาพพีเอชของดิน และธาตุอาหารสมบูรณ์ ธาตุอาหารที่พืชต้องการเหล่านี้จะขาดไม่ได้ หรือมีมากเกินไปไม่ได้ หากพืชขาดหรือมีมากเกินไป ก็จะแสดงอาการให้เห็นทางใบ เช่น ใบลาย ใบเหลืองซีด และเล็กลง

(2) การแก้ปัญหาโรค โรคพืชมี 2 ลักษณะคือ

2.1 โรคที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต ได้แก่ โรคที่แสดงอาการผิดปกติเนื่องจาก สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น การขาดธาตุอาหาร หรือได้รับธาตุอาหารมากเกินไป เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สำนักงานส่งเสริมการค้าในต่างประเทศ (สพต.) ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 โรคที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต ได้แก่ เชื้อที่เกิดจากสาเหตุโรค ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส ไวรียต์ ไล้เดือนฝอย เป็นต้น

การใช้ยาเชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรค เช่น ยาเชื้อคิโตเมียม และ ยาเชื้อไตรโคเดอร์มา BIO-1 และ ไตรโคเดอร์มา BIO-2

ขั้นตอนและวิธีใช้

1. ต้องปรับปรุงสภาพดินโดยใช้ปุ๋ยอินทรีย์และสารปรับสภาพดินเช่นปุ๋ยขี้วัวหรือโดโลไมท์ ร่วมกัน
2. หว่านยาเชื้อลงดินตามอัตราที่กำหนด ต้นเป็นโรคใช้มากกว่าปกติ โดยใช้ทุก 4 เดือน และฉีดพ่นยาเชื้อทุก 10-25 วันในการป้องกันโรค
3. ใช้เศษหญ้าหรือวัชพืชคลุมโคนต้น รดน้ำให้ชุ่มชื้นสม่ำเสมอ โดยเฉพาะในหน้าแล้ง
4. จะต้องหยุดใช้ยาฆ่าหญ้า ยาฆ่าเชื้อราและยาฆ่าแมลง

การแก้ปัญหาโรคที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตโดยวิธีการ ไบโอ-ไอพีเอ็ม คือ การใช้จุลินทรีย์ป้องกันกำจัดโรคพืช และวิธีการอื่นๆที่ปราศจากสารเคมีตกค้างร่วมกัน ซึ่งสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ได้วิจัยอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 และได้รับการจดสิทธิบัตร เลขที่ 6266 สป/200-ช มีระยะเวลาคุ้มครองสิทธิบัตร ตั้งแต่ 22 กุมภาพันธ์ 2537 ถึง 21 กุมภาพันธ์ 2557 ชื่อคิโตเมียม ควบคุมโรคพืช นอกจากนี้ยังวิจัยพบ ไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืช (สายพันธุ์ PC01) และได้พัฒนาเป็นชีวผลิตภัณฑ์ หรือยาเชื้อป้องกันกำจัดโรคพืช ประสบผลสำเร็จในการนำไปใช้ในภาคสนามมาแล้วไม่ต่ำกว่า 5 ปี ทั้งในประเทศไทย ประเทศฟิลิปปินส์ ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ประเทศสาธารณรัฐรัสเซีย และประเทศสาธารณรัฐเวียดนาม เป็นต้น

ปัจจุบันนี้จากงานวิจัยเชิงวิทยาศาสตร์ประยุกต์ที่สามารถพิสูจน์ความจริงในเชิงปฏิบัติ ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีได้สำเร็จ สามารถสรุปเป็นทฤษฎีเชิงปฏิบัติเกี่ยวกับการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ได้ดังนี้

ก. การนำไปใช้ในแง่การป้องกัน (protective effects) ลักษณะการนำจุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อโรคพืชไปใช้ในแง่การป้องกัน จะเป็นกรณีที่เกษตรกรมีความเชื่อมั่นแล้วเท่านั้น โดยจะเริ่มนำจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชไปใช้ตั้งแต่เริ่มปลูกพืช ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้เกษตรกรเริ่มเข้าใจมากขึ้นแล้ว การป้องกันกำจัดโดยชีววิธี แบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ นำไปใช้ในพื้นดินที่มีเชื้อก่อโรคในดิน (infested field-soils) และนำไปใช้ในพื้นดินที่ไม่มีเชื้อก่อโรคหรือมีปริมาณน้อย สำหรับการนำไปใช้ในพื้นดินที่มีเชื้อก่อโรคในดินหรือพื้นที่ที่มีเชื้อก่อโรคระบาดมาก่อน เริ่มตั้งแต่การปรับปรุงสภาพดินให้เหมาะสมต่อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช และนำยาเชื้อใส่ลงดินในขณะเตรียมพื้นที่ปลูก หรือใช้ยาเชื้อคลุกเมล็ดก่อนปลูก ซึ่งอัตราการใช้จะสูง เนื่องจากในดินมีเชื้อก่อโรคในปริมาณมาก มีการใช้ยาเชื้ออย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีผลต่อการลดปริมาณเชื้อก่อโรคในดินและลดอัตราการเกิดโรคในที่สุด พืชที่ปลูกอาจจะเป็นโรค เช่น เกิดโรคในระยะเริ่มต้น (1-5%) จนถึงการเกิดโรคระดับปานกลาง (6-20%) แต่ยังไม่เกินกว่าความเสียหายระดับเศรษฐกิจ ถือว่าประสบผลสำเร็จในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีแล้ว ในขณะที่เดียวกันการนำการควบคุมโรคพืชโดยวิธีอื่นๆ มาผสมผสาน เช่น การหมั่นตรวจสุขภาพดิน และปรับสภาพดินโดยใช้ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยขี้วัว การคลุมดินด้วยวัสดุอินทรีย์ การควบคุมความชื้นในดินบริเวณรอบรากพืช การตัดแต่งกิ่ง การถอนกำจัดวัชพืช การนำส่วนของพืชที่เป็นโรคไปเผาทำลาย รวมถึงการเพิ่มปริมาณยาเชื้อลงดินจะสามารถควบคุมโรคพืชให้ต่ำกว่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจดังกล่าวได้ แต่มีข้อจำกัดว่าไม่ควรใช้ยาฆ่าหญ้า ในกรณี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำมาใช้เพื่อประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ปลูกพืชฤดูเดียวหรือพืชล้มลุก เช่น มะเขือเทศ ข้าวโพด แตงโม แคนตาลูป พืชผักต่างๆ หากเกิดโรคลูก ลามไปมากขึ้นจนถึงระดับรุนแรงที่เสียหาย (21-49%) อาจตัดสินใจนำยาป้องกันกำจัดโรคพืชมาใช้และสามารถใช้ในอัตราที่ต่ำลงก็จะสามารถหยุดการระบาดของโรคได้ ส่วนกรณี ไม้ยืนต้นหรือไม้ผล เช่น ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน มะนาว พุเรียน ต้นชา และต้นท้อ เป็นต้น หากปฏิบัติตามวิธีการที่แนะนำแล้วจะสามารถป้องกัน กำจัดโรคได้ระยะยาว

สำหรับการนำจุลินทรีย์ป้องกันกำจัดโรคพืชไปใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชในพื้นที่ที่ไม่มีเชื้อก่อโรค หรือมีปริมาณน้อย ปกติในพื้นที่ดังกล่าว อาจจะมีจุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อโรคพืชในธรรมชาติอยู่แล้ว อย่างไรก็ตาม การใส่ยาเชื้อใส่ลงในดินหรือคลุกเมล็ดก่อนปลูก เป็นการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อโรคพืชจากบริเวณใกล้เคียงหรือจากแหล่งอื่นๆ อัตราการใส่ยาเชื้อจะต่ำ และอาจจะนำมาใช้หลังการปลูกพืชแล้วก็ได้ทั้งพืชยืนต้นและ พืชฤดูเดียว ควรใส่ยาเชื้อตามกำหนดอย่างสม่ำเสมอ และนำวิธีการควบคุมอื่นๆ มาใช้ผสมผสานด้วย พืชจะ เจริญเติบโตปกติหรือมีการเกิดโรคเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และให้ผลผลิตสูงและไม่มีสารพิษตกค้างในผลผลิต การป้องกันโรคดังกล่าวมีลักษณะเช่นเดียวกับการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชหรือยาฆ่าเชื้อราในพื้นที่ที่ไม่มี การเกิดโรคระบาดมาก่อนและดินที่ไม่มีหรือมีปริมาณเชื้อก่อโรคน้อย แต่มีข้อสังเกตว่าผลผลิตที่ได้จะมีสารพิษ ตกค้าง

ข. ใช้ในแง่การกำจัดและการรักษา (curative effects) ในอดีตที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบันเกษตรกรป้องกัน กำจัดโรคพืชโดยใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช (pesticides) เป็นหลัก โดยเฉพาะการใช้สารเคมีป้องกันกำจัด โรคพืชอย่างต่อเนื่อง จนถึงขณะนี้ยังไม่สามารถลดการเกิดโรคที่สำคัญทางที่แพร่ระบาดมานานนับสิบปีได้ เช่น โรครากเน่าโคนเน่า ที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุ *Phytophthora* spp. โรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. และโรคอื่นๆ เป็นต้น ในกรณีที่ปลูกพืชฤดู เดียว เช่น พริก แม้จะใส่ยาฆ่าเชื้อราตั้งแต่เริ่มปลูก แต่ถ้าสิ่งแวดล้อมเหมาะสมต่อการแพร่ระบาดของเชื้อโรค แม้จะเปลี่ยนใส่ยาฆ่าเชื้อราหลายชนิดก็ไม่สามารถควบคุมโรคได้ และพืชที่ปลูกเก็บผลผลิตไม่ได้

ข้อจำกัดในการใช้ยาเชื้อป้องกันกำจัดโรคพืช

ข้อจำกัดเกี่ยวกับการใช้ยาเชื้อป้องกันกำจัดศัตรูพืช (biological pesticides) เช่น ยาเชื้อป้องกันกำจัด โรคพืช (biological fungicides) ยาเชื้อป้องกันกำจัดแมลง (biological insecticides) และ ยาเชื้อป้องกัน กำจัดวัชพืช (biological herbicides) ควรพิจารณาดังนี้

(1) ในเชิงเศรษฐกิจ ความสำเร็จในการส่งเสริมให้ใช้ควบคุมโดยชีววิธี ขึ้นอยู่กับ ต้นทุนการผลิต จุลินทรีย์และราคาจำหน่ายสู่เกษตรกรที่เหมาะสม ซึ่งไม่ควรสูงกว่าหรือเท่ากับการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรค พืช การควบคุมโดยชีววิธี จะไม่ได้รับการยอมรับจากเกษตรกรหากเป็นการลงทุนเพิ่มขึ้น สิ่งนี้นับว่าเป็นข้อ จำกัดที่มีความสำคัญใช้ในการปฏิบัติในการส่งเสริมการใช้ยาเชื้อป้องกันกำจัดศัตรูพืช และต้องอธิบายให้ เกษตรกรรู้ข้อเท็จจริงว่าไม่มีการควบคุมโรควิธีหนึ่งวิธีใด แม้แต่การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชก็ตาม จะสามารถ ประสพผลสำเร็จในการควบคุมโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จำเป็นจะต้องใช้วิธีการควบคุมโรคหลายวิธีมาใช้ร่วมกัน เพื่อควบคุมโรคให้ต่ำกว่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ การประเมินผลความเป็นไปได้ทางเศรษฐกิจต่อ การใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช คือ ราคาของชีวผลิตภัณฑ์ (biological products) และความคุ้มค่าทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เศรษฐกิจของผู้นำไปใช้ นอกจากนี้จึงต้องคำนึงถึงการลงทุนในการควบคุมโรคพืชโดยวิธีอื่นๆ ที่นำมาใช้ร่วมกับการควบคุมโดยชีววิธีด้วย

(2) ความแตกต่างกันในแต่ละเขตภูมิศาสตร์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชที่ประสบผลสำเร็จในการควบคุมโรคพืชพื้นที่หนึ่ง หรือเขตภูมิศาสตร์หนึ่ง อาจจะไม่ประสบผลสำเร็จในอีกพื้นที่หนึ่งหรือเขตภูมิศาสตร์หนึ่งก็ได้ เพื่อที่จะแก้ปัญหาดังกล่าวควรทำการวิจัยเก็บข้อมูลภาคสนามในพื้นที่ต่างๆ เพื่อประเมินความสามารถของจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชในภาคสภาพภูมิอากาศแตกต่างกัน การทดสอบประสิทธิภาพดังกล่าวเป็นข้อมูลที่สามารถนำไปจัดการกับสภาพแวดล้อมต่างๆ ให้เหมาะสมต่อการนำจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชไปใช้

(3) ข้อจำกัดในการนำจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชไปใช้ พบเสมอว่าเกษตรกรมักจะเข้าใจผิดเกี่ยวกับการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ซึ่งเกษตรกรมักจะเข้าใจว่ายาเชื้อป้องกันกำจัดโรคพืชจะดีกว่าสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช ในแง่การป้องกันกำจัดโรคพืช แต่ปรากฏว่า เมื่อนำยาเชื้อป้องกันกำจัดโรคพืชไปใช้ โดยไม่คำนึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องอื่นๆ เลย หรือใช้ผิดวิธีก็พบความล้มเหลวไม่สามารถควบคุมโรคได้ในที่สุด บางนายพืชที่ปลูกมีโรคระบาดมาก ทั้งที่ใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชมาอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มปลูก และก็ใช้มาแล้วหลายชนิดในอัตราที่สูงขึ้นเรื่อยๆ แต่ก็ไม่สามารถควบคุมโรคพืชได้ พืชเป็นโรครุนแรงจนถึงขั้นเสียหายทางเศรษฐกิจแล้วหรือพืชเป็นโรคตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ พืชที่เหลือก็กำลังเป็นโรคในระดับรุนแรงมากขึ้น สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชก็ไม่สามารถควบคุมโรคได้ผลแล้ว เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคคือยา เกษตรกรรายนั้นก็นำยาเชื้อป้องกันกำจัดโรคพืชไปใช้ และก็ประสบความล้มเหลว พืชตายเพิ่มมากขึ้น ก็สรุปแบบง่าย ๆ ว่า การใช้ยาเชื้อป้องกันโรคพืชไม่ได้ผล เป็นต้น ฉะนั้นเพื่อให้เกษตรกรประหยัดค่าใช้จ่ายในการควบคุมโรคพืช จำเป็นต้องทำความเข้าใจกับเกษตรกรในการใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช ข้อปฏิบัติก่อนนำไปใช้และหลังการใช้ เวลาที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ เป็นต้น ในปัจจุบันมีจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชที่ได้รับการจดสิทธิบัตร (Patent) และวิธีผลิตในเชิงการค้าเพียงไม่กี่ชนิด ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากนักวิจัยทางด้านควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีกำลังอยู่ในระหว่างการค้นคว้าวิจัยหาวิธีการที่เหมาะสม ในการนำจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชหรือยาเชื้อไปใช้ร่วมกับการเกษตรกรรม และวิธีการควบคุมโรคอื่นๆ ได้ดีกว่าพืชกำลังเป็นโรคในกรณีนี้ 2 อย่างไว้ก็ตามทั้งสองกรณีดังกล่าวข้างต้น หากปฏิบัติตามคำแนะนำในการควบคุมโดยชีววิธี แล้วสามารถลดการเกิดโรคให้ต่ำกว่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ พืชสามารถให้ผลผลิตได้ ส่วนพืชที่เป็นโรคในกรณีที่สาม นั้นอาจจะประสบผลสำเร็จหรือล้มเหลวต่อการนำจุลินทรีย์หรือยาเชื้อไปใช้ ซึ่งหากต้องการให้ประสบผลสำเร็จมากขึ้น ควรจะต้องดูแลเอาใจใส่อย่างใกล้ชิด และนำวิธีการควบคุมโรคอื่นๆ แบบผสมผสานมาใช้ร่วม จากทั้งสามกรณีดังกล่าวข้างต้น การใช้ยาเชื้อคือโตเมียม สามารถลดการเกิดโรคได้ และประสบผลสำเร็จในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ ต้นชา ต้นท้อ โรคแอนแทรกในสีของมะม่วง พืชผัก ได้แก่ พริก ค่ะน้า แตงโม แคนตาลูป ไม้ดอกไม้ประดับ ได้แก่ คาร์เนชั่น จิบซิฟิลลาร์ และ บีกซาสุวรรณค์ เป็นต้น นอกจากนี้ การใช้ยาเชื้อควบคุมโรคพืชที่ผลิตจาก ไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma harzianum*) สายพันธุ์ PC01 และ (*Trichoderma hamatum*) สายพันธุ์ PC02 ก็สามารถลดการเกิดโรคดังกล่าวได้เช่นเดียวกัน และสำหรับกรณีนี้ 4 ซึ่งพืชเป็นโรครุนแรงถึงระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจแล้ว ไม่คุ้มค่าที่จะนำวิธีการใดๆ เข้าควบคุมโรคแล้วเนื่องจากพืชไม่สามารถให้ผลผลิตหรือให้ผลผลิตน้อยและไม่มีคุณภาพและพืชอาจตายในเวลาต่อมา การนำจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชหรือใช้สาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคมีป้องกันกำจัดโรคพืชก็ตามในช่วงจังหวะเวลาจะไม่ประสบความสำเร็จ อย่างไรก็ตามข้อจำกัดและข้อพิจารณาในแง่อื่นๆ เกี่ยวกับการนำไปใช้ยังมีอีกมาก

(4) ข้อจำกัดอื่นๆ จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี น่าจะเข้าไปแทนที่สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชได้ทั้งหมด การวิจัยพัฒนาเป็นไปช้ามาก เนื่องจากมีข้อจำกัดทางปฏิบัติหลายประการ ข้อจำกัดในด้านการทดสอบความปลอดภัย (safety testing) ของจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ทำได้ในแง่การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity test) ในสัตว์ทดลอง เพื่อให้แน่ใจว่าจะไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ ส่วนผลกระทบที่อาจจะมีต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ และต่อระบบนิเวศน์ต่างๆ ในสิ่งแวดล้อม เป็นระบบที่ค่อนข้างซับซ้อน จะต้องใช้เวลาในการศึกษาวิจัยมาก ยาเชื้อป้องกันกำจัดโรคพืชเป็นสิ่งมีชีวิต ฉะนั้นจะมีข้อจำกัดในเรื่องการเคลื่อนย้าย การเก็บรักษา อายุการใช้งาน การรักษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ การนำไปใช้ในสภาพสิ่งแวดล้อม ซึ่งต้องมีการอธิบายกำกับไว้ ในขณะที่สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชไม่คำนึงถึงสิ่งเหล่านี้ ควรพัฒนายาเชื้อป้องกันกำจัดโรคพืชทั่วไป (broad spectrum mycofungicide) หมายถึง สามารถใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชได้หลายชนิด ซึ่งในปัจจุบันมีน้อยมาก ได้แก่ยาเชื้อคีโตไมยคุมควบคุมโรคพืช เป็นต้น ส่วนมากจะเป็นงานวิจัยพัฒนาจุลินทรีย์เป็นยาเชื้อป้องกันกำจัดเชื้อโรคพืชชนิดเดียว ในขณะที่เกษตรกรต้องการใช้ยาเชื้อป้องกันกำจัดโรคพืชได้หลายโรคเช่นเดียวกับสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช เป็นต้น

แนวทางปฏิบัติในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีในอนาคต

การใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช เป็นองค์ประกอบหนึ่ง ที่สำคัญในการจัดการศัตรูพืชโดยชีววิธีแบบผสมผสาน ซึ่งเป็นยุทธวิธีใหม่ ในการผลิตพืชทางการเกษตรปลอดสารพิษ (free-pesticides agricultural products) เพื่อให้ประสบความสำเร็จในเชิงปฏิบัติจึงจำเป็นต้องนำไปใช้ร่วมกับ การควบคุมศัตรูพืชอื่นๆ แบบผสมผสาน ยุทธวิธีในการควบคุมโรคพืชแบบผสมผสานก็เพื่อลดอัตราการเกิดโรคและลดความเสียหายของผลผลิตให้ต่ำกว่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ ไม้ใช้เป็นการป้องกันพืช (prevention) ฉะนั้นรูปแบบหรือโมเดลในการใช้ป้องกันโรคแบบผสมผสานจะต้องเปลี่ยนไปตามสภาพ และปัจจัยทางนิเวศน์ต่างๆ เป็นหลักเพื่อให้บรรลุผลในการป้องกันกำจัดโรค

การวิจัยควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีบนส่วนของต้นพืชมีน้อยกว่าการควบคุมเชื้อในดิน ทั้งนี้อาจจะด้วยเหตุผลดังนี้ (1) การฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราสะดวกและง่ายกว่า (2) สามารถจัดการสภาพแวดล้อมและปรับสภาพให้จุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อโรคพืชในดินให้เจริญเติบโตได้ดีกว่า (3) การใช้ยาเชื้อจุลินทรีย์จิกพ่นส่วนบนของพืชยังต้องศึกษาถึงสารอาหารที่พืชปลดปล่อยออกมาบนผิวหน้าหรือช่องเปิดธรรมชาติว่ามีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อต้านมากน้อยเพียงใด (hyperparasite) และจุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อโรคพืชนั้นสามารถปลดปล่อยสารปฏิชีวนะออกมาทำลายเชื้อสาเหตุโรคในบริเวณแผลที่เป็นโรคได้มากน้อยเพียงใด สารดังกล่าวสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์พืชได้หรือไม่ หรือซึมผ่านเข้าสู่เซลล์พืชแล้วมีผลต่อการชักนำให้เกิดภูมิคุ้มกันโรค จำเป็นจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมและต่อเนื่องในโรคพืชแต่ละชนิด และ (4) ควรจะมีการค้นหาจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็น hyperparasite มากกว่าเป็น antagonist เพื่อพัฒนาใช้ฉีดพ่นบนส่วนของต้นพืชเพื่อป้องกันโรค เช่น ยีสต์และแบคทีเรีย เป็นต้น

ปฏิทินการปฏิบัติงานการปลูกพืชผักปลอดสารพิษโดยวิธีไบโอ-ไอพีเอ็ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อายุพืช (วัน)	งานที่ปฏิบัติ
	<p><u>การเตรียมแปลงกล้าหรือแปลงปลูก</u></p> <p>หว่านปุ๋ยในอัตรา 100กก./ไร่ ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์ พรอนดินรดน้ำให้ชุ่ม บ่มดินไว้เป็นเวลา 7 วัน ก่อนหว่านเมล็ดพันธุ์</p> <p>แช่เมล็ดพันธุ์ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 15-20 นาที ก่อนหว่านเมล็ดพันธุ์ ใช้ฟางข้าวสับเป็นท่อนคลุมแปลง</p>
7 วัน	<p>สำรวจโรคและแมลงศัตรูพืช เก็บส่วนเป็นโรคทิ้ง ทำการย้ายกล้าและถอน กล้าบริเวณที่ขึ้นหนาแน่นออก ฉีดพ่นบอทอปเอฟ อัตรา 50 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร ฉีดพ่น อินเซก อัตรา 50 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร ฉีดพ่นปุ๋ยอินทรีย์น้ำ อัตรา 50 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร สามารถผสมรวมกันได้ และใช้สารจับใบ</p>
14 วัน 21 วัน 28 วัน	<p>กำจัดวัชพืชโดยการถอนออก สำรวจโรคและแมลง ทำการฉีดพ่นบอทอปเอฟ อัตรา 50 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร ฉีดพ่นอินเซก อัตรา 50 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร ฉีดพ่นปุ๋ย อินทรีย์น้ำ อัตรา 50 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร ใส่ปุ๋ยยูเรียอัตรา 20 กก./ไร่</p>
35 วัน 42 วัน 49 วัน 56 วัน	<p>กำจัดวัชพืชโดยการถอนออก สำรวจโรคและแมลง ทำการฉีดพ่นบอทอปเอฟ อัตรา 50 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร ฉีดพ่นอินเซก อัตรา 50 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร ฉีดพ่นปุ๋ย อินทรีย์น้ำ อัตรา 50 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร</p>
65 วัน	<p>ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิต</p>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Application of *Chaetomium* species (Ketomium®) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control: A review article

K. Soyong*¹, S. Kanokmedhakul², V. Kukongviriyapa³ and M. Isobe⁴

¹Department of Plant Pest Management Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand; *e-mail: kasem_soytong@excite.com

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³Department of Pharmacology, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

⁴Laboratory of Organic Chemistry, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan

Soytong, K., Kanokmedhakul, S., Kukongviriyapa, V. and Isobe, M. (2001). Application of *Chaetomium* species (Ketomium®) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control: A review article. *Fungal Diversity* 7: 1-15.

Research and development of biological control agents for use against plant diseases have been undertaken for several years in both government and private sectors, as natural agents are needed to take the place of chemical fungicides. The problem associated with the use of hazardous chemicals for disease control has received increasing attention worldwide, due to the fact that pathogens become resistant to chemical fungicides and the resulting environmental pollution and ecological imbalances. The implementation of practical integrated biological control technology to control plant diseases has been successfully introduced to growers in China, Philippines, Russia, Thailand and Vietnam by using new broad spectrum biological fungicides from *Chaetomium* (Thailand Patent No. 6266, International Code: AO1N 25/12 and registered as Ketomium® mycofungicide). Since 1989, the biological product has been developed and improved from 22-strains of *Chaetomium cupreum* CC01-CC10 and *Chaetomium globosum* CG01-CG12 in the form of pellet and powder formulation. The formulation has successfully been applied to infested field-soils with integrated with cultural control measures and organic amendments for the long-term protection of Durian (*Durio zibethinus* L.) and Black Pepper (*Piper nigrum* L.) caused by *Phytophthora palmivora*, Tangerine (*Citrus reticulata* Blanco) caused by *Phytophthora parasitica* and Strawberry (*Fragaria* spp.) caused by *Phytophthora cactorum*, Wilt of Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and Basal rot of Corn (*Zea mays* L.) caused by *Sclerotium rolfsii* against *Phytophthora* rot. Bio-control technology of plant diseases has successfully been demonstrated, either completely or partially, when integrated with other control measures for appropriate disease management. Biological products are useful, not only for the protection against plant diseases, but can also be used for curative effects of plant diseases, and also promote plant growth.

Key words: biological control, *Chaetomium*, mycofungicide.

Introduction

Chaetomium species are normally found in soil and organic compost. *Chaetomium* is one of the largest genera of saprobic ascomycetes with more than 300 species worldwide (Arx *et al.*, 1986; Soyong and Quimio, 1989). *Chaetomium* species are potential degraders of cellulosic and other organic material and can be antagonistic against various soil microorganisms. *Chaetomium globosum* and *C. cochlioides* are antagonistic to species of *Fusarium* and *Helminthosporium* (Tveit and Moore, 1954). It has been found that by using specific strains of *C. globosum* it is possible to obtain good control over many plant pathogens. By coating seeds of corn with spores of *Chaetomium globosum* it was possible to prevent seedling blight caused by *Fusarium roseum* f. sp. *cerealis* 'graminearum' (Chang and Kommedahl, 1968; Kommedahl *et al.*, 1981). Such seed coating treatments were also found to reduce disease incidence of apple scab caused by *Venturia inaequalis* (Heye and Andrews, 1983; Cullen and Andrews, 1984; Cullen *et al.*, 1984; Boudreau and Andrews, 1987). It has also been reported that some isolates of *C. globosum* produce antibiotics that can suppress damping-off of sugar beet caused by *Pythium ultimum* (Di-Pietro *et al.*, 1991). A further isolate of *C. globosum* was found to be antagonist against *Rhizoctonia solani* (Walter and Gindrat, 1988) and *Alternaria brassicicola* (Vannacci and Harman, 1987) and also reduced the quantity of sporulation of *Botrytis cinerea* on dead lily leaves exposed in the field (Kohl *et al.*, 1995). One strain of *C. cupreum* has also been reported to be antagonistic against *Phomopsis* and *Colletotrichum* spp which are soybean pathogens (Manandhar *et al.*, 1986).

Screening of *Chaetomium* species and strains isolated from soils for use as potential biological control agents commenced in Thailand in 1989. Reports indicate that strains of *C. cupreum* and *C. globosum* are able to suppress plant pathogens such as *Curvularia lunata*, *Pyricularia oryzae* and *Rhizoctonia oryzae in vitro* (Soyong, 1989, 1992a). Viable spores of *Chaetomium* spp. were able to reduce tomato wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in greenhouse and field trials (Soyong, 1990, 1992b) and also prevent basal stem rot of corn caused by *Sclerotium rolfsii* (Soyong, 1991). Twenty-two strains of *C. cupreum* and *C. globosum* have been found to inhibit isolates of various plant pathogens (Soyong and Soyong, 1997). These effective strains of *Chaetomium* have been formulated into bio-pellets and bio-powders for the biological control of plant diseases and have been patented and registered under the name Ketomium[®]. Their efficacy against tomato wilt (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) and basal rot of corn (*S. rolfsii*) has been successfully evaluated in laboratory and greenhouse tests (Soyong, 1992).

This paper reviews the development of Ketomium[®], its evaluation with field trials, its patenting, biosafety testing and mechanisms of controlling disease and increasing crop production.

Field Evaluations with Ketomium[®]

In order to patent the *Chaetomium* strains (named Ketomium[®]) as a mycofungicide we carried out the following field evaluations on various crops in order to test the activity of the mixed strains prepared as biopellets and biopowders.

Tomato

Heavy reduction in tomato crop yields result from infection with *Fusarium* in Thailand (Soytong, 1992). *Fusarium*-suppression tests and pathogen suppression tests were carried out for tomato. In the *Fusarium*-suppression tests soil that was already infected with *Fusarium* was used for planting. The Ketomium[®] application was however applied to the soil two months before the seedlings were planted in the plot. In the pathogen suppression tests plants were grown in the *Fusarium* infected plots without the addition of Ketomium[®] and when disease symptoms appeared Ketomium[®] was applied. No Ketomium[®] applications were made in the control while a further trail involved the application of the chemical fungicide Pentachloronitrobenzene (PCNB). These trails are described in detail by Soyong and Soyong (1997).

Ketomium[®] in the form of biopellets and biopowders were applied to *Fusarium*-infested soils where tomatoes were growing and it was found that Ketomium[®] suppressed pathogen growth and thus disease symptoms. In *Fusarium*-suppressive soils, it was shown that the tomato plants treated with Ketomium[®] biopowder and the chemical fungicide PCNB completely prevented damage by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. The disease incidence in plants treated with biopellets (22%) was significantly lower than in the non-treated plants (43%). Ketomium[®] in biopellet and biopowder form were as effective in reducing infection rates in the tomato plants as treatment with PCNB (Soyong and Soyong, 1997).

Maize

Basal rot of maize caused by *Sclerotium rolfsii* is a serious disease in lowland fields in Thailand. Ketomium[®] was also effective in the control of pathogens and disease suppression when applied to maize. There was a distinct difference in disease incidence between the treated plants and the non-treated controls. In the pathogen suppression test, disease incidence in the biopellet,

biopowder and PCNB treated plants were 14.5, 15 and 16%, respectively. These were significant improvements, compared with the 23.5% disease incidence in the control. In the disease suppression tests, the same pattern was observed: disease incidence percentages of 16, 15.75 and 15.25 for the biopellet, biopowder and PCNB treated plants, respectively, compared with 25.55% in the control. It was shown that the mycofungicide, in both forms, was equally as effective as the fungicide PCNB in our experiments (Soytong and Soyong, 1997).

Tangerine

Integrated biological control of *Phytophthora* rot of Tangerine using mycofungicide under commercial growing conditions was investigated in Thailand for two years and the experiments were repeated four times. Tangerine (*Citrus reticulata*) is an important economic crop in Thailand. The major problem encountered in the citrus orchard is root and basal rots caused by *Phytophthora parasitica*. The pathogen has invaded citrus planting areas over the previous 30 years and the growers traditionally apply fungicides such as metalaxyl and alleiate. In some cases the infected citrus trees have slowly died over several years. Ketomium[®] has been applied to orchard soils infested with *P. parasitica* and integrated with liming to adjusting soil pH and the addition of organic compost every four months to prevent root and stem rot of Citrus. Ketomium[®] treatments significantly reduced disease incidence by 47.25% when compared to the fungicide (metalaxyl). Incidentally, the inoculum of *P. parasitica* in soil at a depth of 15 and 30 cm was significantly lower with Ketomium[®] treatment than the non-treated soils. The pathogen inoculum at the upper soil profile had a higher population than the lower soil profile. It was also observed that Ketomium[®] treatment produced significantly higher growth parameters in the Citrus plants than with chemical fungicide treatments. *Chaetomium* treatments also gave significantly better fruit yields (52.35 kg/plant) than the fungicide treatments (27.79 kg/plant) as shown in (Fig. 1 and Tables 1, 2).

Table 1. Disease index and disease reduction of *Phytophthora* rot of citrus after applying mycofungicide in the field.

Treatment months	Disease Index ¹				Disease reduction (%)		
	1	3	6	9	3	6	9
<i>Chaetomium</i>	6.71 a ²	3.05 b	2.30 b	1.85 b	16.71	35.41	47.25
Control	6.90 a	3.40 a	3.50 a	3.90 a	-	-	-

¹Disease index : 1 = no disease and 10 = severe disease.

²Average of four repeated experiments. Means with the same common letters in each column are not significantly different.



Fig. 1. Comparative study between before and after application of Ketomium® for plant disease control. (Top = citrus tree before experiment; Bottom = citrus tree after experiment).

Table 2. Percentage colonization by *Phytophthora parasitica* after applying mycofungicide in the citrus orchard

Treatment	Colonization (%) ^{1,2}											
	15 cm						30 cm					
Soil depth	Mar	May	Jul	Sep	Nov	Jan	Mar	May	Jul	Sep	Nov	Jan
<i>Chaetomium</i>	60a	40a	40a	37a	28a	20a	46a	42a	37a	38a	27a	21a
Control	58a	55b	57b	61b	83b	93b	43a	47a	51b	55b	70b	75b

¹Colonization (%) = number of colonized leaf discs with *P. parasitica* / total number of tested leaf discs × 100.

²Average of four repeated experiments. Means with the same common letters in each column are not significantly different.

Black Pepper

The application of Ketomium® in pellet form was conducted in soils infested with *P. palmivora* in Chantaburi Province, Thailand to prevent root and stem rots of Black Pepper (*Piper nigrum*). The experiment was repeated four

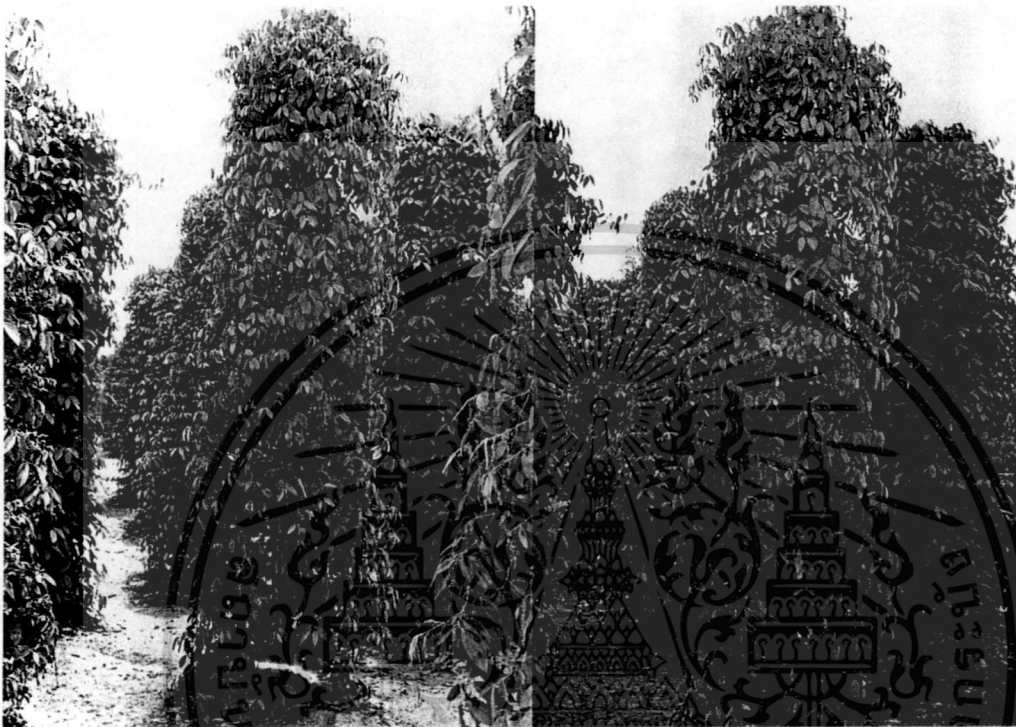


Fig. 2. Comparative study between before and after application of Ketomium® for plant disease control. (left = black pepper before experiment, right = black pepper after experiment).

Table 3. Population dynamics of *Phytophthora* inoculum and antagonistic fungi in rhizosphere soil of Black Pepper.

Treatments	Propagules (cfu/soil g ⁻¹)				Colonization (%) ^{1,2}			
	1	4	8	12	1	4	8	12
<i>Chaetomium</i>	2.7 a ²	2 a	1.7 a	1.7 a	74.50	76.25	18	39
<i>Metalaxl</i>	3.1 a	2.8 b	2.2 b	1.5 a	78	87	66.50	46.75
Control	3.1 a	3.6 c	3.2 c	3.2 b	97.50	93.50	100	79.75

¹Colonization (%) = number of colonized leaf discs with *P. palmivora* / total number of tested leaf discs × 100.

²Average of four repeated experiments. Means with the same common letters in each column are not significantly different.

times. Ketomium® was applied at the rate of 20 g/plant and incorporated with liming and organic compost at intervals of four months for one year. The application of Ketomium® resulted in significant disease suppression with disease incidence at 22.66%. Ketomium® treatment did not significantly reduce disease

incidence when compared to metalaxyl treatment (disease incidence 21.88%. Ketomium® and metalaxyl treated plots however, had significantly lower disease incidence than the non-treated plots which had the highest disease incidence of 71%. Inoculum of *P. palmivora* in rhizosphere soil of Black Pepper was also significantly lower following Ketomium® and metalaxyl treatments than in non-treated soils. Thus, Ketomium® treatment gave significantly higher plants (average of 208 cm), followed by metalaxyl treatment (177 cm) and non-treatment (71 cm) (Fig. 2 and Tables 3, 4).

Table 4. Disease incidence and plant stands of Black Pepper after applying mycofungicide comparison with Metalaxyl to control *Phytophthora* rot in the field.

Treatments	Plant stands (cm)				Disease incidence (%) ^{1,2}			
	1	4	8	12	1	4	8	12
Chaetomium	33.08a ²	75.3b	145.06b	208.12b	1.57a	4.70a	7.82a	10.94a
Metalaxyl	33.61a	75.1b	134.79b	177.82b	5.47b	15.63b	17.97b	21.88b
Control	33.91a	60.4a	71.49a	81.88a	6.25b	14.84b	31.25c	71.63c

¹Disease incidence (%) = number of infected plants/total number of tested plant (healthy and infected) × 100.

²Average of four repeated experiments. Means with the same common letters in each column are not significantly different.

Strawberry

Strawberry Crown Rot invaded the northern part of Thailand in the last few years. Biological control of Strawberry Crown Rot caused by *Phytophthora cactorum* using Ketomium® was evaluated in the infested soils planted with Strawberry at Fang District, Chaingmai Province and Maesai District, Chiangrai Province in Thailand during 1996 to 1997. Ketomium® mycofungicide in pellet form was applied at the rate of 0.04 g/plant added to soil media with 5 g of organic compost in plastic bags with seedlings of Strawberry before transplanting to the field. Chemical fungicide treatments served as a comparison. The percentage of dead plants and strawberry yield were not significantly different with the application of Ketomium® or chemical fungicides. The application of Ketomium® into the field-soil before planting however, resulted in significantly lower percentages of dead plants than Ketomium® treatments in plastic bags.

The population dynamics of antagonistic, plant pathogenic and saprobic fungi in rhizosphere soils of Strawberry were also evaluated for competitive growth in the treated and non-treated soils. It was found that the population of antagonistic fungi, *Chaetomium globosum*, and *C. cupreum* was significantly higher than that of the pathogen, *Phytophthora cactorum*, but this relationship was not shown in all experiments. This indicates that some limiting factors are

involved in biological control of plant diseases in the field, such as the ability of antagonists to grow, soil pH, organic matter content, soil aeration, moisture and chemical residues.

Durian

Durian is a tropical fruit tree originating from Indonesia and Malaysia and is now distributed in Thailand. The major problem encountered in Durian orchards is the low quality of yields due to *Phytophthora* rot. *Phytophthora palmivora* is one of the most economically important stem and root rot of Durian. Our evaluation of Ketomium® have demonstrated that Ketomium® can completely prevent stem and root rot of Durian seedlings grown in inoculated soils in greenhouse tests. The metalaxyl chemical fungicide treated seedlings had the highest disease prevalence while all the seedlings died in non-treated control. The integrated biological control tests were carried out from 1994-1996 in a Durian orchard in an area where the soil is infested with *P. palmivora* and the disease seriously affects Durian trees. Integrated biological control comprised good cultural practices, organic amendment, changes in soil acidity and removal of disease plant parts. This integrated control strategy was highly successful in controlling the disease in the field after application of Ketomium® at four months intervals and all treated disease plants recovered (Pechprom and Soyong, 1997).

Patenting and Registration of Ketomium®

Ketomium® a new broad spectrum mycofungicide (Int. cl. 5 AO 1 N 25/12, Thai Patent No. 6266, 20 years, date of issue - 22 February 1994: date of expiration - 21 February 2014) is a biological product of *Chaetomium globosum* strains Cg1, CG2, Cg3, Cg4, Cg5, Cg6, Cg7, Cg8, Cg9, Cg10, Cg11, Cg12 and *Chaetomium cupreum* strains Cc1, Cc2, Cc3, Cc4, Cc5, Cc6, Cc7, Cc8, CC9 and Cc10. Ketomium® was registered by the Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Co-operatives (No. 458/2539, 2 September 1996) using *C. cupreum* as a mycofungicide for the control of plant diseases, It has been also registered as a biological fertilizer for degrading organic matter and for induction of plant immunity and growth stimulant in Guangxi Province, China and distributed as a biological protection of plant diseases.

Development of Ketomium® Formulations and their Shelf-Life

Formulations of mycofungicides have gradually developed since 1992, and mycofungicides have now been formulated into both pellet and powder preparations (Soyong and Soyong, 1997). The 22 strains of *Chaetomium* spp.

are grown on potato dextrose agar for three weeks at room temperature (27-30 C). A spore suspension is then made and added to alginate mixture and dropped through a pasture pipette into a solution of 0.1 M calcium gluconate. The pellets are dried overnight before packaging. The pellets are ground to make biopowder before packaging (Fig. 3).

Compatibility of the *Chaetomium* strains when mixed together was initially tested and it was found that mixing did not effect activity, but had a synergistic effect. The biopellet and biopowder preparations were formulated and consist of a mixture of 22 effective strains of *C. cupreum* and *C. globosum* (Soytong, 1994). Viable spore populations were determined by dilution plate assays before pellet formation, 24 h after, and every two months for a period of one year. During this period pellets were stored at room temperature (27-30 C) in screw-capped jars. To test viability, pellets were dissolved in water with a mixture of 8×10^2 M KH_2PO_4 for dilution plating assays. Viable spore populations of the biopowder formulation was assessed in the same way. It was found that following storage the viability of propagules decreased in both formulations. There was a better survival rate in the biopellets (77%) compared to that of the biopowder formulation (57%) following three years of storage.

Biosafety tests

Acute toxicity tests of Ketomium[®] were carried out using the suspensions of *Chaetomium* spp. which consisted of equal concentrations of *C. cupreum* and *C. globosum* at the concentration of 9.9×10^7 spores/ml. A suspension was formulated in alginate sodium and talcum in sterilized water. The test animals were the Swiss-albino mice of both sexes weighing between 30-40 g. Mice were allocated into six groups for each sex. Mice were orally administered by gastric gavage with a Ketomium[®] suspension as a single bolus dose. Doses administered were divided into three levels for three mice groups (5, 10, and 20 ml/kg body weight, corresponding to 4.95×10^8 , 9.9×10^8 and 1.98×10^9 spores/kg body weight) and another three groups fed with corresponding amounts of suspension without Ketomium[®], served as control. After mice were fed with Ketomium[®] or the control formulation, the animals were examined for side effects hourly for 6 h in the first day and daily for another 7 d. Drug response profiles were recorded in a standardized worksheet of Nodine and Siegler (1964) where applicable. Observation was made for screening effects on the central nervous system and signs of intoxication. Drug response profiles were grouped as effects on the awareness, mood, CNS excitation, motor



Fig. 3. Formulation of Ketomium® mycofungicide and finished product for plant disease control (left = pellet formation process, right = commercial product).

coordination, muscle tone, reflexes, autonomic signs and death. Special attention was also paid to signs of gastrointestinal disturbance, possibly due to large amount of fungal spores being fed. The number of animals that died in a 7 d period after a single dose was tabulated. In addition to mortality, weight and daily examination for signs of intoxication, lethality and behavioral modification were conducted. Mice were housed with four animals per cage in the animal facility of Faculty of Medicine, Khonkaen University. After the observation period, animals were sacrificed and gross examination of internal organs were made and major organs were weighed.

Acute toxicity tests for Ketomium® were evaluated for bio-safety in experimental animals. It should be noted that this acute toxicity study does not ensure safety resulting from chronic exposure to spore formulations and toxicity with regard to some organ systems such as skin, lung and allergy or mutagenesis and carcinogenesis.

The values of mean lethal dose (LD^{50}) could not be obtained in this study, since there was no death resulting in experimental animals fed with the highest possible dose. It was concluded that Ketomium® shows no apparent signs of acute toxicity in experimental mice for both sexes at doses of up to 1.98×10^9 and 2×10^9 spores/ kg body weight.

How Ketomium® works

Ketomium® contains 22 strains of *C. globosum* and *C. cupreum* in the form of a spore power or pellets. *Chaetomium* species are strictly saprobic fungi belonging to the ascomycetes and are lignocellulose degraders (Arx *et al.*, 1986). Specific strains of *Chaetomium* have been shown to stimulate plant growth and produce better crop yields both in the greenhouse and field, following their application as biological products (Chang and Kommedahl, 1968; Soyong and Quimio, 1989; Soyong, 1989; Soyong, 1992a; Soyong, 1992b; Pechprom and Soyong, 1997).

Control mechanisms

The mechanism of plant disease control involving specific strains of *C. globosum* and *C. cupreum* involves the production of antibiotics, e.g. *C. globosum* produces Chaetoglobosin C (Fig. 4) which suppresses the growth of plant pathogens such as *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. dematium*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora parasitica*, *P. palmivora*, *P. cactorum*,

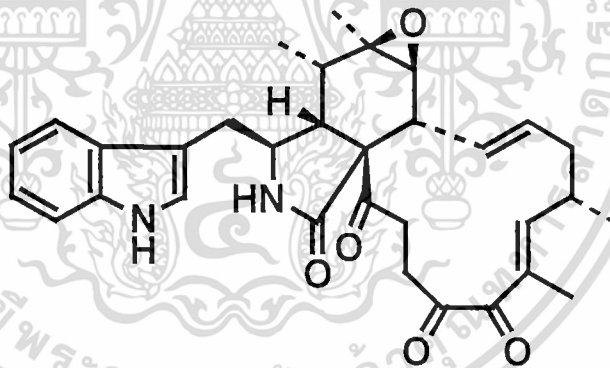


Fig. 4. Structure of Chaetoglobosin C produced from *Chaetomium globosum*.

Pyricularia oryzae, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* (Soyong and Quimio, 1989; Soyong, 1992b, Soyong and Soyong, 1997; Pechprom and Soyong, 1997).

Plant growth stimulant

It has been shown that in greenhouse and field trials, that Tomato, Corn, Rice, Pepper, Citrus, Durian, Bird's of paradise and Carnation plants treated with Ketomium®, have a greater plant growth and higher yields than non-treated plants. This implies that the mechanism of action for stimulating plant growth is probably confined to our specific strain of *Chaetomium*. It has been

found that some strains of *Chaetomium* produce substantial amounts of ergosterol (Fig. 5). This substance can help to improve the humus layer in soils which in turns leads to higher soil fertility.

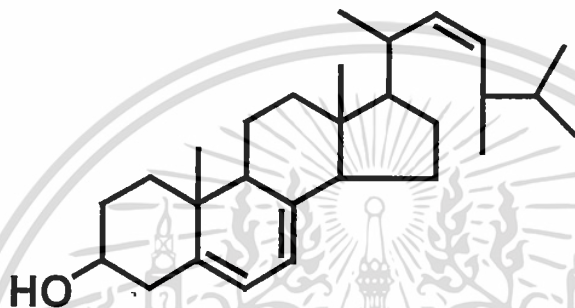


Fig. 5. Structure of ergosterol produced from *Chaetomium globosum*.

Induction of resistance in plants

It has been found that the Chaetoglobosin C produced by our strains of *C. globosum* act as alien substances which induce a localised and sub-systemic oxidative burst (OXB) in tested plants e.g. Carrot, Potato, Sweet potato, Tomato and Tobacco. This possibly acts as an induction of plant immunity for disease resistance. OXB in plants can be characterized by rapid generation of active oxygen species (AOS) immediately after exposure to certain stresses. The active oxygen species play an important role in initiating signals for the response of various plant stresses (Doke, 1997). The OXB has been postulated to be an alarm signal in plant tissues against invasion by aggressive microorganisms and it seems to act as an emergency signal for responses against attack by alien substances, and may be related to resistance or protection against plant pathogens (Doke *et al.*, 1991).

Limitations of Ketomium[®], concluding remarks and future studies

The effectiveness of Ketomium[®] in plant disease control, especially soil-borne pathogens, integrated with other control measures such as cultural practices, e.g. sanitation, improving water drainage, pruning, removal of disease plant parts, adding organic compost and liming was investigated. These integrated control measures completely prevented damage by various pathogens in the infested fields. The curative effects of the Ketomium[®] when

applied to the infected plants, combined with the manipulation of the soil environment has been surprisingly successful. Implementation of integrated biological control of plant pathogens should be used to obtain disease control and reduce economic damage and compared with the use of chemical fungicides. The potential exists to use biological techniques to modify the infested soil environment to disfavor the pathogen and increase the resistance of plants.

Our observations indicate that *Chaetomium globosum* and *C. cupreum* can adapt to harsh microclimate conditions in infested soils when applied as Ketomium® formulations. *Chaetomium* spp. have the ability to survive during dry periods and to colonize the organic substrates rapidly in the soils. Most of data on *Chaetomium* spp. have resulted from laboratory and greenhouse studies. Our studies were conducted in the field for more than four years, with the application of Ketomium® as a broad-spectrum mycofungicide. It has been shown that this biological product can be applied to the field-soils infested with the test pathogens. However, further field trials and observations need to be carried out in order to establish a better integrated approach in using Ketomium®.

This report has shown that Ketomium® is effective and demonstrates the usefulness of an integrated approach in disease control. It discusses some limiting factors involved in biological control of plant diseases in the field such as the ability of the antagonists to grow in the field, and the effects of soil pH, content of organic matter, soil aeration, moisture and chemical residue in the soil. In different soils however, the ecology and climate may possibly result in no or poor biological control. Thus, we need to establish the biological diversity of soil microorganisms, the ecology of microbial antagonists, and the effects of chemical residues in the soil. The above experiments should also be continued in the same infested field-soils to establish whether biological control of plant pathogens can serve as long-term protection.

The expression of antagonistic activity, implying antibiosis, is consistent with the findings of some investigators where antibiotic substances, e.g. chaetomin, sterigmatocystin, chaetomin (Udagawa *et al.*, 1979; Sekita *et al.*, 1981) are released by some isolates of *Chaetomium* spp. such as *C. globosum* (Arx *et al.*, 1986). Screening for antagonism should not be limited to species, but should consider specific strains within species because these can differ in antagonistic activity (Soytong, 1992a). Several strains of *C. globosum* have been shown to produce Chaetoglobosin C which plays a role in antibiosis. These strains produce antibiotic substances which induce local and sub-systemic oxidative bursts (OXB) for signaling induction of disease resistance or immunity in plants such tomato, potato, cucumber, carrot and sweet potato.

Acknowledgements

We would like to thank N. Doke, Plant Pathology Laboratory, Department of Biological Resources and Environmental Sciences, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya, Japan for supporting the oxidative burst test. The research project had been fully supported from the International Foundation for Science (IFS) Sweden from 1989 to 1997 and partly supported by Third World Academy of Science (TWAS), Italy and National Research Council of Thailand. We would like to thank K.D. Hyde for his critical comments on the manuscript.

References

- Arx, J.A. von, Guarro, J. and Figuera, M.J. (1986). The Ascomycete genus *Chaetomium*. Beihefte zur Nova Hedwigia 84: 1-162.
- Boudreau, M.A. and Andrews, J.H. (1987). Factors influencing antagonism of *Chaetomium globosum* to *Venturia inequalis*: a case study in failed biocontrol. *Phytopathology* 77: 1470-1475.
- Chang, I. and Kommedahl, T. (1968). Biological control of seedlings of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. *Phytopathology* 77: 1470.
- Cullen, D., Berbeem, F.M. and Andrews, J.H. (1984). *Chaetomium globosum* antagonizes the apple scab pathogen, *Venturia inequalis*, under field conditions. *Canadian Journal of Botany* 62: 1814-1818.
- Cullen, D., and Andrews, J.H. (1984). Evidence for the role of antibiosis in the antagonism of *Chaetomium globosum* to the apple scab pathogen, *Venturia inequalis*. *Canadian Journal of Botany* 62: 1819-1823.
- Di Pietro, A., Kung, R., Gutrella, M. and Schwinn, F.J. (1991). Parameters influencing the efficacy of *Chaetomium globosum* in controlling *Pythium ultimum* damping-off of sugar-beet. *Journal of Plant Disease and Protection* 98: 565-573.
- Doke, N. (1997). Oxidative burst: Roles in signal transduction and plant stress. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Doke, N., Miura, Y., Chai, H.B. and Kawakita, K. (1991). Involvement of active oxygens induction of plant defense response against infection and injury. In: *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism* (eds E.J. Pell and K.L. Teffen). American Society of Plant Physiology, Rockville, MD: 84-96.
- Heye, C.C. and Andrews, J.H. (1983). Antagonism of *Athelia bombacina* and *Chaetomium globosum* to the apple scab pathogen, *Venturia inequalis*. *Phytopathology* 73: 650-654.
- Kohl, J.W., Molhoek, H.L., van der Plas, C.H. and Fokkema, H.J. (1995). Effect of *Ulocladium atrum* and other antagonists on sporulation of *Botrytis cinerea* on dead lily leaves exposed to field condition. *Phytopathology* 85: 393-400.
- Kommedahl, T., Windels, C.E., Sarbini, G. and Wiley, H.B. (1981). Variability of performance of biological control and fungicidal seed treatments in corn, peas and soybean. *Proceedings in Ecology* 3: 5.
- Manandhar, J.B., Thapliyal, N., Cavanaugh K.J. and Sinclair, J.B. (1986). Interaction between pathogenic and saprobic fungi isolated from soybean roots and seeds. *Mycopathologia* 98: 69-75.

- Nodine, J.H., and Siegler, P.E. (1964). Animal and Clinical Pharmacologic Techniques in Drug Evaluation. Year Book Medical Publication Incorporated, Chicago, USA.
- Pechprom, S. and Soyong, K. (1997). Integrated biological control of Durian stem and root rot caused by *Phytophthora palmivora*. Proceedings of the First International Symposium on Biopesticides: 228-233.
- Sekita, K. Yoshihara, S., Natori, S., Udagawa, S., Muroi, T., Sugiyama, Y., Hurata, H. and Umeda, M. (1981). Mycotoxin production by *Chaetomium* spp. and related fungi. Canadian Journal of Microbiology 27: 716-722.
- Soyong, K. (1989). Antagonism of *Chaetomium cupreum* to *Pyricularia oryzae*: a case study to biocontrol of a rice blast disease. Thai Phytopathology 9: 28-33.
- Soyong, K. (1990). A taxonomic study of *Chaetomium* spp. in Thailand. Abstracts, 4th International Mycological Congress, Regensburg, Germany, August 28 - September 3, 1990.
- Soyong, K. (1991). Species of *Chaetomium* in Thailand and screening for their biocontrol properties against plant pathogens. Abstract. The 12th International Plant Protection Congress, Rio de Janeiro, Brazil.
- Soyong, K. (1992a). Antagonism of *Chaetomium cupreum* to *Pyricularia oryzae*. Journal of Plant Protection in the Tropics 9: 17-24.
- Soyong, K. (1992b). Biological control of tomato wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using *Chaetomium cupreum*. Kasetsart Journal (Natural Science) 26: 310-313.
- Soyong, K. (1994). Development of *Chaetomium cupreum* as a soil mycofungicide for controlling tomato wilt. Abstract, 5th International Mycological Congress. August 14-21. Vancouver, British Columbia, Canada.
- Soyong, K. and Quimio, T.H. (1989). Antagonism of *Chaetomium globosum* to the rice blast pathogen, *Pyricularia oryzae*. Kasetsart Journal (Natural Science) 23: 198-203.
- Soyong, Kasem and Soyong, Kobboon. (1997). *Chaetomium* as a new broad spectrum mycofungicide. Proceedings of the 1st International Symposium on Biopesticides: 124-132.
- Tveit, M. and Moore, M.B. (1954). Isolates of *Chaetomium* that protect oats from *Helminthosporium victoriae*. Phytopathology 44: 686-689.
- Udagawa, S., Muroi, T., Kurata, H., Sekita, S., Yoshihira, K., Natori, S. and Umeda, M. (1979). The production of Chaetoglobosins, sterigmatocystin, O-methylsterigmatocystin and Chaetocin by *Chaetomium* spp. and related fungi. Canadian Journal of Microbiology 25: 170-177.
- Vannacci, G. and Harman, G.E. (1987). Biocontrol of seed-borne *Alternaria raphani* and *A. brassicicola*. Canadian Journal of Microbiology 33: 850-856.
- Wather, D. and Gindrat, D. (1988). Biological control of damping-off of sugarbeet and cotton with *Chaetomium globosum* or a fluorescent *Pseudomonas* sp. Canadian Journal of Microbiology 34: 631-637.

(Received 20 October 2000, accepted 10 April 2001)

Elucidation of high micro-heterogeneity of an acidic–neutral trichotoxin mixture from *Trichoderma harzianum* by electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry

Sathorn Suwan,^{1,2} Minoru Isobe,^{2*} Somdej Kanokmedhakul,³ Nuttaya Lourit,³ Kwanjai Kanokmedhakul,³ Kasem Soyong⁴ and Kazushi Koga²

¹ Scientific and Technological Research Equipment Center, Chulalongkorn University, Chulalongkorn Soi 62, Phaya-Thai Road, Bangkok 10330, Thailand

² Laboratory of Organic Chemistry, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan

³ Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

⁴ Department of Plant Pest Management, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

The high micro-heterogeneity of an acidic–neutral trichotoxin mixture from *T. harzianum*, PC01, was elucidated using a modern tandem mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source, a hybrid quadrupole–orthogonal accelerator and a reflectron time-of-flight analyzer. The trichotoxins appeared predominantly in six possible doubly charged pseudo molecular ions with three different adducts (H, Na and K) as $[M + 2H]^{2+}$, $[M + H + Na]^{2+}$, $[M + H + K]^{2+}$, $[M + 2Na]^{2+}$, $[M + Na + K]^{2+}$ and $[M + 2K]^{2+}$. The singly charged pseudomolecular ions, $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$ and $[M + K]^+$, occurred only in low abundance when the cone voltages were higher than 30 V. Additional singly charged fragments, b_{12} and $y''6$ (complementary *N*- and *C*-terminal fragments), were obtained in high abundance using high cone voltages. The peak patterns of both singly and doubly charged molecular adducts revealed that this trichotoxin mixture contained several components having 6–7 molecular masses with a consecutive 14 u difference among members in the same molecular adduct series. Furthermore, well resolved isotopic peaks of every doubly or singly charged ions and their reproducible peak intensity allowed the identification of the mixing of acidic trichotoxins 1 u molecular mass heavier than the neutral counterparts in the sample. Tandem mass spectrometric (MS/MS) analyses of various singly charged b_{12} and $y''6$ ions supported the sequence deduction of the major and minor components and also the position of Glu in the sequences of these acidic molecules. The setting of either low or high resolution of the quadrupole mass filter unit together with a suitable variation of the collision voltage for any MS/MS precursor were the tools for extracting a number of mixed components and obtaining the major and minor sequences of these precursor peaks. The nature of the MS/MS fragmentation and the data assignment of three major doubly charged ions, $[M + 2H]^{2+}$, $[M + K + H]^{2+}$ and $[M + 2K]^{2+}$, are demonstrated. Eleven new sequences of both acidic and neutral trichotoxins are reported. Copyright © 2000 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: trichotoxins; micro-heterogeneity; *Trichoderma harzianum*; electrospray quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry; peptaibol

INTRODUCTION

Trichotoxins are a group of biologically active peptide analogs of 18 residues first separated from *Trichoderma viride* NRRL5242.^{1–3} Their structures belong to a class of peptide analogs named peptaibols. Trichotoxin

peptaibol has a special structure of 8–10 residues of a non-proteinous amino acid, namely α -aminoisobutyric acid (2-methylalanine, Aib), one or none of the isovaline (2-ethylalanine, Iva), and an *N*-acetylated terminus with a *C*-terminal amino alcohol, valinol (Vol), in the chain. Irmscher *et al.* have classified trichotoxins from *T. viride* NRRL5242 into two groups.⁴ Brückner and co-workers separated them into neutral trichotoxins^{1,3} (or trichotoxin A-50) and acidic trichotoxins² (or trichotoxin A-40). They found that the change of Gln¹⁷ to Glu¹⁷ defined the molecule to be a neutral or acidic trichotoxin. Only three trichotoxin A-40s were isolated and sequenced by field desorption mass spectrometry (FD-MS)³ from its acidic mixture showing nine peaks in high-performance liquid chromatography (HPLC) while 14 molecules were

* Correspondence to: M. Isobe, Laboratory of Organic Chemistry, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-8601, Japan.
E-mail: isobem@agr.nagoya-u.ac.jp

Contract/grant sponsor: Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.

Contract/grant sponsor: JSPS–RFTF. งานวิจัยได้รับการใช้งานเพื่อ

identified by FD- and fast atom bombardment (FAB) MS^{1,3} in the neutral trichotoxin A-50 fraction showing 10 peaks in HPLC. Three more sequences of trichotoxin A-40 determined by LC/electrospray ionization (ESI) MS in positive and negative modes were reported from the same source of sample.⁵ Among the known peptaibols, trichotoxins seem to have the most micro-heterogeneity in their amino acid sequence.

We became interested in mycelial extracts of *T. harzianum* strain PC01 because its peptide extract behaved as a potent biological control agent. The peptides could inhibit mycelial growth and sporangial production of *P. palmivora* with ED₅₀ values of 2.2 and 0.45 mg ml⁻¹ respectively. The same peptide mixture was also effective for promoting plant growth to Chinese cabbage, kale and mungbean. The details of these biological aspects will be reported elsewhere by Soyong and Kanokmedhakul. However, we needed to elucidate the structures of this peptide mixture after establishing its activity. For the agricultural use of peptaibols having high micro-heterogeneity, it is impractical to make the analysis from each purified peptide analog. Furthermore, structural identification needs a new, effective analytical technique that can reduce time- and labor-consuming steps of isolation and purification without the loss of minor constituents. Ionic separation was avoided because some of the trichotoxins would disappear during the separation process owing to the nature of trichotoxins. We report here the use of an ESI quadrupole time-of-flight (QTOF) mass spectrometer in both MS and MS/MS modes as a competent analysis technique for solving such high micro-heterogeneity of an acidic and neutral trichotoxin mixture isolated from *T. harzianum* PC-01. Many of the trichotoxins elucidated in this study are the same as those found previously in *T. viride* NRRL5242 but 11 new sequences of both types are additionally specified from *T. harzianum* PC01.

EXPERIMENTAL

Sample of trichotoxins

The fungus *Trichoderma harzianum* PC01 was cultivated in a potato dextrose broth at 30 °C for 4 weeks. The mycelia were collected by filtration, air-dried (to give 704 g), ground into powder and then extracted successively with hexane, EtOAc and MeOH. From the last extract, methanol was evaporated *in vacuo* to give a residue (81.4 g), which was dissolved in a small amount of methanol and partitioned between water and ethyl acetate. The organic layer was separated, dried (Na₂SO₄), then concentrated to give a white solid that was collected by filtration and crystallized from methanol to obtain white needles (1.87 g). The filtrate was evaporated to dryness, separated on a silica gel column and eluted gradually with a mixture of increasing concentration of MeOH in CH₂Cl₂. The fraction obtained using MeOH-CH₂Cl₂ (8:10) afforded 0.79 g of white needles. The sample obtained was recrystallized from methanol to give white needles (m.p. 229–231 °C) before being used for mass spectrometric and bioactivity studies.

The solid sample was dissolved in methanol to give a stock solution and it was subsequently diluted to

10 ng μl⁻¹ in methanol containing 0.2% formic acid just before being electrosprayed.

Mass spectrometry

All experiments were performed on a QTOF mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) equipped with a conventional ESI source. The QTOF combines a quadrupole unit (Q) with a reflectron time-of-flight (TOF) analyzer in the orthogonal direction. A hexagonal collision chamber and a pusher are located in the connection line between these two units. The reflectron TOF analyzer gave good mass resolution (5000 full width at half-maximum height (FWHM)) covering the maximum mass range used in this study. The sampling rate was 1 s per scan in both MS and MS/MS modes. Data were acquired and processed using MassLynx version 2.9. All experiments in this study were run only in the positive ion mode.

In the MS operation mode, ions were transported from the ESI source via the radiofrequency (r.f.) hexapole to the quadrupole unit operating in the r.f. mode only as a wide-bandpass mass filter. However, in the MS/MS mode the quadrupole was operated in the r.f./d.c. (direct current) mode as a narrow-bandpass filter. Most of the experiments were run at a low resolution setting (resolving quadrupole d.c. at 10.0/10.0, typically allowing isotopic peaks in the 4.5 u range to pass). Some experiments were performed at a high resolution setting (resolving quadrupole d.c. at 15.0/15.0, allowing isotopic peaks in the 1.5 u range to pass).

The sample solution was infused from a syringe pump at a flow-rate of 5 μl min⁻¹. The source temperature was 60 °C. The ESI probe (needle) voltage was 3.3 kV. The sample cone voltage was optimized (20–80 V) according to the analysis purposes and sample peaks. The ESI drying and nebulizing gases were nitrogen and the collision gas for MS/MS measurements was argon. The collision energy was varied between 8 and 70 V depending on the sample peaks or generating precursor ions for the analyses in the MS/MS mode.

External calibration was done in the MS/MS mode using human (Glu¹) fibrinopeptide B (F3261, Sigma) as a standard. Its [M + 2H]²⁺ ion at *m/z* 785.8 was used as the precursor ion and the mass scale was calibrated by the product peaks between *m/z* 72.8 and 1285.54.

NMR spectroscopy

NMR spectra were measured in CDCl₃ or in DMSO-*d*₆ for ¹H NMR, ¹³C NMR ¹H-¹H-COSY, HOHAHA, HMBC and HSQC with a Bruker Model AMX-600 instrument at 315 K.

RESULTS AND DISCUSSION

Molecular mass determination and indicators of a mixed acidic-neutral sample

The peptaibol mixture from the crystalline sample was analyzed using the ESI-QTOF system under various sample cone voltages (20–50 V) in the MS mode to recognize its fragmentation nature. Three ESI mass spectra, at

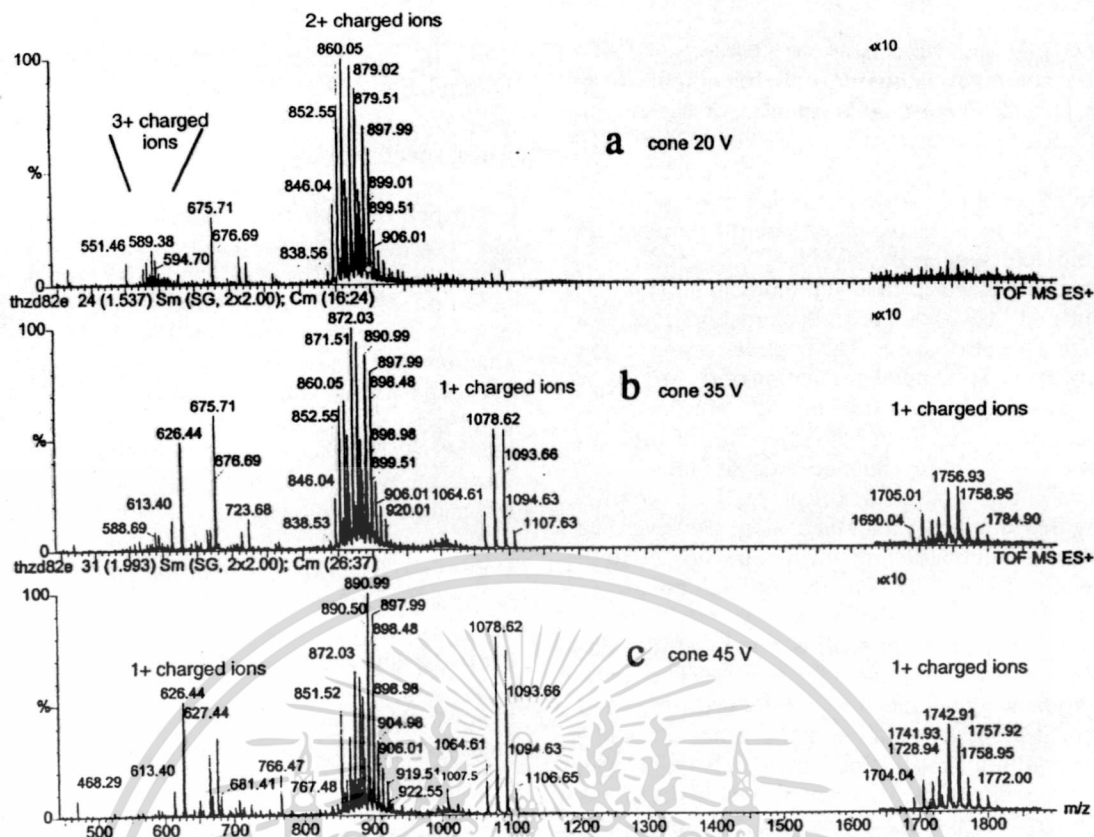


Figure 1. ESI mass spectra of mixed trichotoxins from *T. harzianum* analyzed under different cone voltages. The sample cone voltages were 20, 35 and 45 V in (a), (b) and (c), respectively.

cone voltages 20, 35 and 45 V, are compared in Fig. 1. This sample occurs predominantly as doubly charged ions appearing around m/z 845–925 and at very low abundance as triply charged ions around m/z 576–615 at a low cone voltage [20 V, Fig. 1(a)]. With higher cone voltages (35 and 45 V) many peaks of singly charged ions appear around m/z 1675–1820, 1060–1115, 612 and 626 with increasing abundance, while the abundances of the doubly and triply charged groups were reduced [Fig. 1(b) and (c)]. These in-source fragmentation spectra at cone voltages higher than 30 V suggest that the product peaks (i.e. m/z 613, 626, 1007, 1064, 1078, 1092 and 1106) can confirm the peaks around m/z 1675–1810 to be $[M + X]^+$ of various molecular species. The singly and doubly charged ion clusters around m/z 1675–1810 and 845–925 are expanded in Figs 2 and 3, respectively. The TOF analyzer resolved isotopic peaks ($[A]$, $[A + 1]$, $[A + 2]$, $[A + 3]$ and $[A + 4]$) in each cluster of molecular mass as high as 2500. The patterns of their m/z and isotopic abundance ratios indicated assignments as follows.

(a) Three series of pseudomolecular ions, $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$ and $[M + K]^+$, are expanded in Fig. 2. Each series consists of six or seven groups of peaks as indicated by their monoisotopic masses given in Fig. 2. In addition, each series has consecutive m/z difference of 14 u. The monoisotopic $[A]$ peaks of the $[M + K]^+$ series overlap with the $[A + 2]$ isotopic peaks of the $[M + Na]^+$ ions of the 14 u higher molecular masses. As a consequence, the intensities of those overlapping peaks, e.g. m/z 1728–1729–1730–1731, are much higher than the theoretical height of the $[A + 2]$, $[A + 3]$ and $[A + 4]$ peaks of $[M + Na]^+$ m/z 1726 alone.

The theoretical isotopic distribution of the peaks, $[A]$: $[A + 1]$: $[A + 2]$: $[A + 3]$: $[A + 4]$, of pure compounds with formulae $C_{78}H_{136}N_{20}O_{21}$ – $C_{81}H_{142}N_{20}O_{21}$ are approximately 100:100:53:20:6. In fact, the intensities of the $[A + 1]$ and $[A + 2]$ peaks of the two series, m/z 1691–1705–1719–1733 and m/z 1713–1727–1741–1754–1768–1783, respectively, for $[M + H]^+$ and $[M + Na]^+$ are clearly higher than their theoretical intensities of any pure molecular mass between 1700 and 1800 u. Furthermore, in the first four species of the $[M + H]^+$ series, their $[A + 3]$ and $[A + 4]$ peaks are also clearly higher than the theoretical heights. These data indicate the presence of additional minor components having molecular masses 1 u heavier, as stated earlier. We shall give more details later with the evidence that this is due to a micro-heterogeneity, e.g., Glu in place of Gln.

(b) Six complicated series of doubly charged ions, at m/z 845–925, are illustrated in Fig. 3. It is fairly conceivable from earlier assignments of the three pseudomolecular ion series occurring in Fig. 2. These six series are $[M + 2H]^{2+}$, $[M + H + Na]^{2+}$, $[M + H + K]^{2+}$, $[M + 2Na]^{2+}$, $[M + Na + K]^{2+}$ and $[M + 2K]^{2+}$ as labeled a, b, c, d, e and f, respectively. The theoretical monoisotopic molecular masses of the expected trichotoxins are summarized in Table 1 to confirm the assignments of these peaks in Fig. 3. In each doubly charged series, 7 u differences appear between each consecutive monoisotopic mass. This is still in agreement with the 14 u difference of singly charged molecular species. In addition to the major $[M + 2H]^{2+}$ series (a), two other major series of $[M + H + K]^{2+}$ (c) and $[M + 2K]^{2+}$ (f) also occurred. The $[M + Na + K]^{2+}$ (e), $[M + H + Na]^{2+}$ (b) and $[M +$

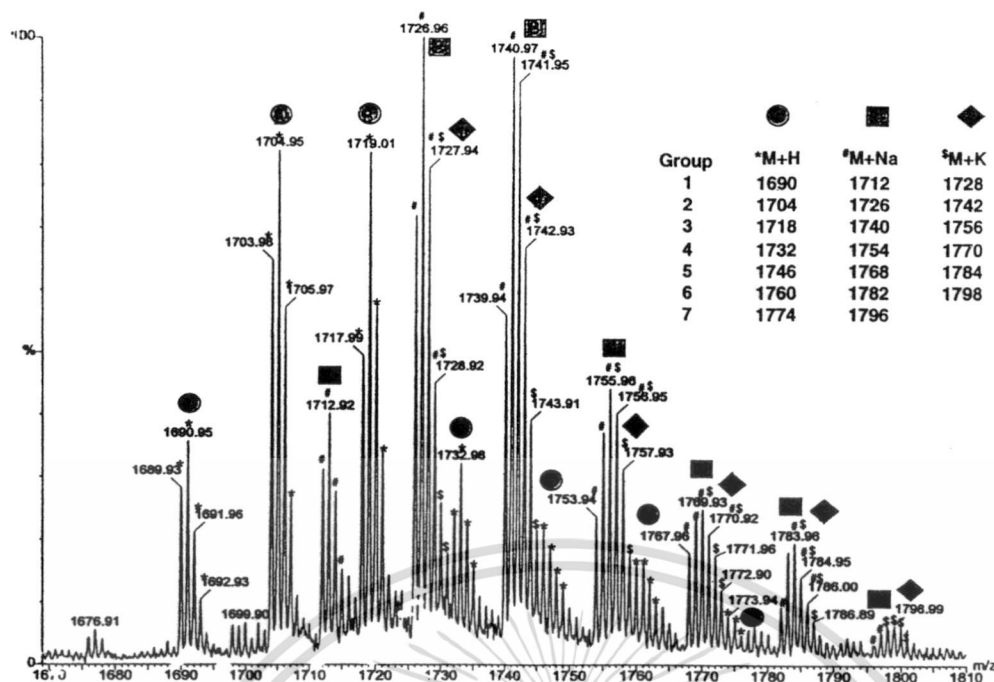


Figure 2. An expansion of the ESI mass spectrum of the trichotoxin mixture showing singly charged quasimolecular adducts of H^+ , Na^+ and K^+ around m/z 1670–1810 under a cone voltage of 48 V. Symbols *, # and \$ represent isotopic peaks in the series of $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$ and $[M + K]^+$, respectively. The same numbers inside circles, squares and diamonds indicate the same original molecular masses without adducts.

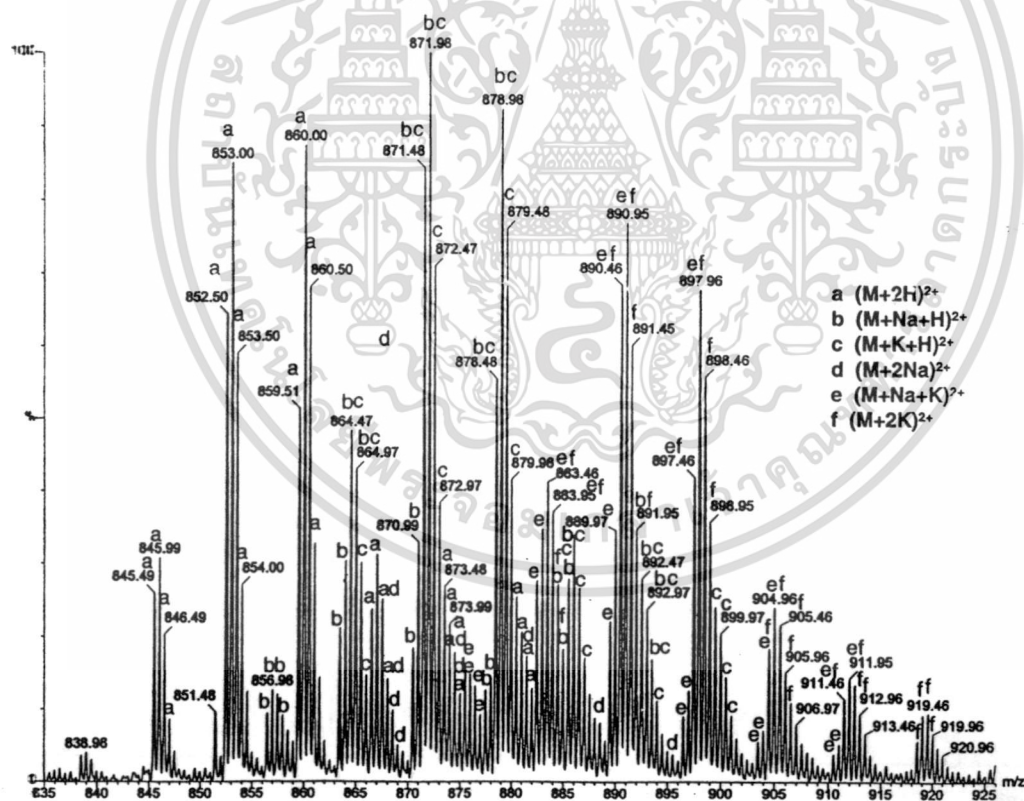


Figure 3. An expansion of the ESI mass spectrum of the trichotoxin mixture showing only the doubly charged ion region analyzed under a cone voltage of 30 V. The labeling on each isotopic peak indicates the forms of ions: a = $[M + 2H]^{2+}$, b = $[M + H + Na]^{2+}$, c = $[M + H + K]^{2+}$, d = $[M + 2Na]^{2+}$, e = $[M + Na + K]^{2+}$ and f = $[M + 2K]^{2+}$. The major series are a, c and f, and b, d and e are the minor series.

$Na]^{2+}$ (d) series occurred as minor constituents. Similar to the cases of singly charged molecular adducts, the intensity ratios of the isotopic peaks in Fig. 3, e.g. in the $[M + 2H]^{2+}$ series, the $[A + 1]$, $[A + 2]$, $[A + 3]$ and $[A + 4]$ peaks are all higher than the theoretical heights

for their corresponding $[A]$ peaks. This pattern was also found with the other five series. Interestingly, both spectra in Figs 2 and 3 show variations in the components contributing to the 1 u higher masses in each species of the same series. Consequently, the isotopic distribution

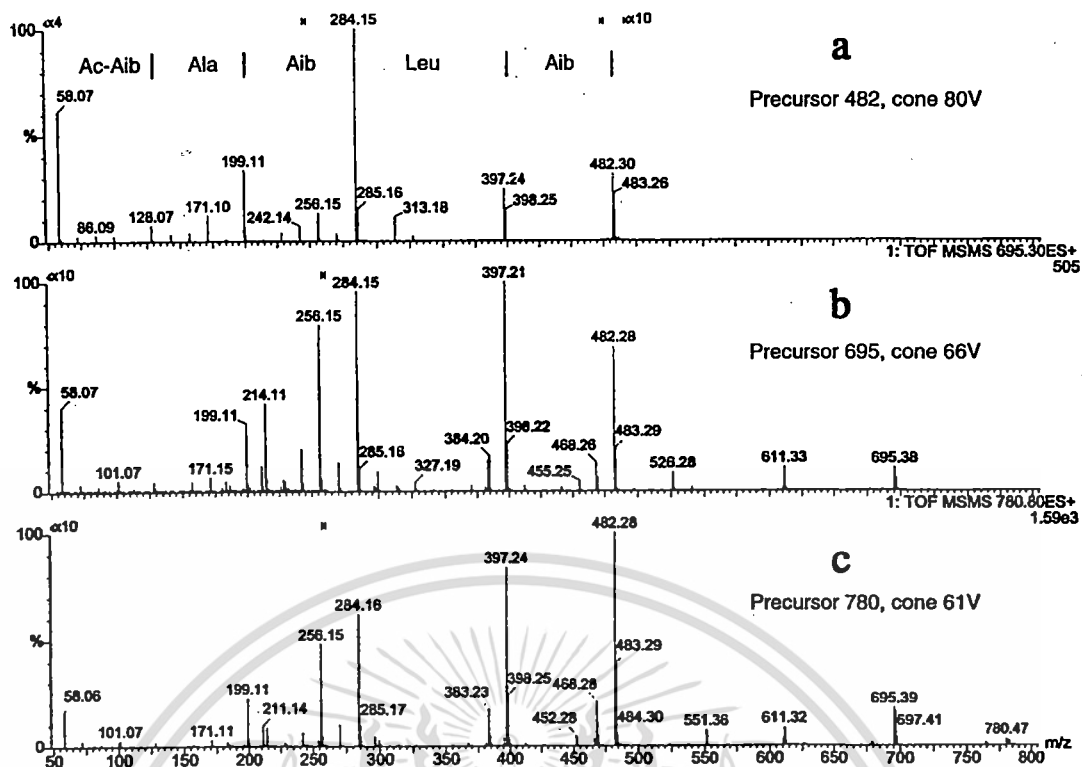


Figure 5. Demonstration of the complete ESI tandem mass spectra of some of the shorter sequence-specific fragments generated to be singly protonated precursor ions by in-source fragmentation at different high cone voltages. (a) Precursor ions 482, (b) precursor ions 695 and (c) precursor ions 780.

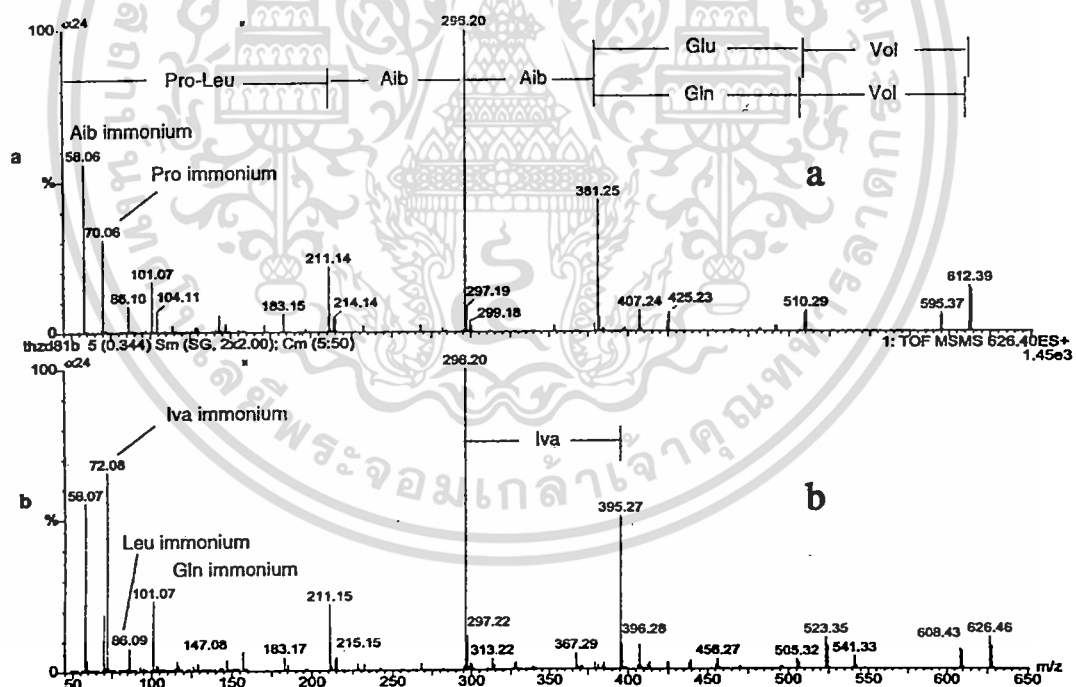


Figure 6. ESI-tandem mass spectra of the four singly protonated y_6' (C-terminal) fragments into a b ion series. (a) The y_6' fragments 612 and 613; (b) the y_6' fragments 626 and 627.

Presence of acidic and neutral trichotoxins

Separation of mixed trichotoxins produced by *T. viride* into acidic and neutral components was previously performed by HPLC on LiChrosorb RP-8⁴ or by counter-current distribution.¹⁻³ Known neutral trichotoxins have two Gln residues, Gln⁶ and Gln,¹⁷ in their chains, while

the acidic trichotoxins have been reported with Gln⁶ (residual mass = 128.06) and Glu¹⁷ (residual mass = 129.04). Our isolation steps used elution from a silica gel column and recrystallization from MeOH, and this process allowed the co-crystallization of the components containing Glu and Gln and also others having minor sequence heterogeneity.

Table 3. Major and minor sequences of neutral and acidic trichotoxins found in *Trichoderma harzianum* PC01

M	Sequence																		Known name ^a
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1675A	Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Ala-Ala-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Aib-Gln-Vol																		(T5D2)
1689A	Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Aib-Gln-Vol																		(T5E)
1689B	Ac-Aib-Ala-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Gly-Ala-Aib-Aib-Pro-Leu-Aib-Aib-Gln-Vol																		(New)
1689C	Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Ala-Ala-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol																		(T5F)
1689D	Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Ala-Gln-Aib-Aib-Ala-Ala-Aib-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol																		New
1690E	Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Aib-Glu-Vol																		Known
1690F	Ac-Aib-Ala-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Gly-Ala-Aib-Aib-Pro-Leu-Aib-Aib-Glu-Vol																		New
1703A	Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol																		(T5G)
1703B	Ac-Aib-Ala-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Gly-Ala-Aib-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol																		New
1703C	Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib-Pro-Leu-Aib-Aib-Gln-Vol																		New
1703D	Ac-Aib-Ala-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Aib-Gln-Vol																		New
1704E	Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Glu-Vol																		New
1704F	Ac-Aib-Ala-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Gly-Ala-Aib-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Glu-Vol																		New
1704G	Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib-Pro-Leu-Aib-Aib-Glu-Vol																		Known
1704H	Ac-Aib-Ala-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Aib-Glu-Vol																		New
1717A	Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol																		(T5I)
1717B	Ac-Aib-Ala-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol																		(T5H)
1717C	Ac-Aib-Ala-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib-Pro-Leu-Aib-Aib-Gln-Vol																		New
1718E	Ac-Aib-Gly-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Glu-Vol																		Known
1718F	Ac-Aib-Ala-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Ala-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Glu-Vol																		New
1718G	Ac-Aib-Ala-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib-Pro-Leu-Aib-Aib-Glu-Vol																		Known
1731A	Ac-Aib-Ala-Aib-Leu-Aib-Gln-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Vol																		(T5J)

^a T5D2–T5J were identified from Ref. 1 and the known ones from Refs 3 and 5.

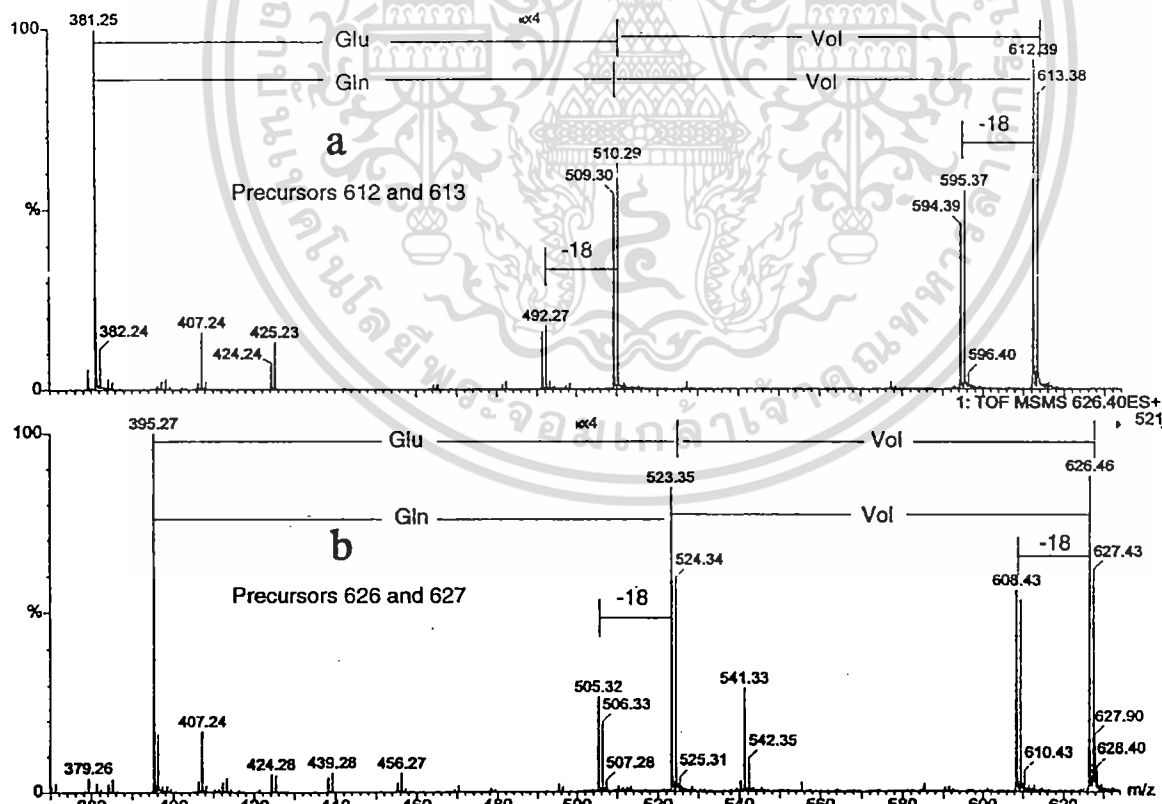


Figure 7. Expansion of fragmentation of the y_6^+ fragments (Fig. 6) to demonstrate the peak intensity indicator of the mixed fragments between (a) the acidic C-terminal fragment 613 with the neutral one fragment 612 and (b) the acidic C-terminal fragment 627 with the neutral fragment 626.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Consequently, the spurious isotopic peak ratios $[A]:[A+1]:[A+2]$ discussed earlier from the data in Figs 2 and 3 well supported the presence of one Glu residue (at either position 6 or 17) in the whole sequence of trichotoxins and in lesser amount than their corresponding neutral molecules. Additional evidence from the tandem mass spectra of the y_6'' fragments in Fig. 6(a) and (b) clearly confirmed the existence of Glu¹⁷ (1690E, 1690F, 1704E, 1704F, 1704G, 1704H, 1718E, 1718F and 1718G in Table 3). The expansion of the spectra in Fig. 6(a) and (b) displayed in Fig. 7 allows the observation of an important feature, the significantly higher than calculated intensity of the isotopic peaks $[A+1]$ over the intensity of its monoisotopic $[A]$ peaks in these pairs of ions: m/z 612–613 (b_6), 594–595 ($b_6 - 18$), 509–510 (b_5) and 491–492 ($b_5 - 18$) in Fig. 7(a) and m/z 626–627 (b_6), 608–609 ($b_6 - 18$), 523–524 (b_5) and 505–506 ($b_5 - 18$) in Fig. 7(b). When the fragments carried only one possible mass (381 or 395), the ratios of the peaks $[A]:[A+1]$ were within the calculated values. These data can be explained as follows: intensity of the m/z 613 peak in this case was actually a result of the contribution from the intensities of both the $[A+1]$ peak of Gln containing an m/z 612 fragment and the $[A]$ peak of the Glu containing an m/z 613 fragment. Hence the sequential assignment of the two acidic C-terminal fragments at m/z 627 and 613 were added to Table 2. However, the specified sequences of the found acidic trichotoxins reported in our work (Table 3) were basically deduced from the data for $[M+2H]^{2+}$ ions presented in the next section plus the knowledge based on the just mentioned data.

It is now possible to deduce that the intensity of the peaks $[A+1]$ and $[A+2]$ of neutral trichotoxins (see Figs 2 and 3) were also contributed by the peaks c $[A]$ and $[A+1]$ of acidic trichotoxins, respectively. The amount of acidic trichotoxins series in the peaks at m/z 1719.0–1719.9 (Fig. 2) of the $[M+H]^+$ was more than the peaks at m/z 1704.95–1705.97, 1690.95–1691.96 and 1732.9–1733.9, respectively. A similar conclusion can be drawn from the $[M+2H]^{2+}$ peaks shown in Fig. 3. (Figure 9(b) presents further evidence that the amount of acidic molecules was rather high and its major acidic molecule $[M+H]^+$ at m/z 1719 was the molecule 1718E.

Analyses of sequences and mixed components of doubly charged pseudomolecular ions

In the case of ESI-MS analysis,^{8,9} the selection of a precursor ion with low abundance of a singly charged molecular ion species results in poor MS/MS, whereas a very high abundance of a doubly or a higher charged molecular ion species give better MS/MS analyses. Figure 8 shows the result of selecting certain isotopic peaks by setting the quadrupole unit at either low or high resolution with clear resolution of the TOF analyzer for doubly charged $[M+2H]^{2+}$ ions. From one doubly charged peak cluster in Fig. 3 resulting in 14 peaks between m/z 863.5 and 870.0 only the two desired peaks at m/z 866.5 and 867.0 [Fig. 8(a)] could be specifically selected from its cluster by using the high resolution setting of the quadrupole unit to transmit only the three isotopic peaks with its spurious isotopic distribution as precursor ions for MS/MS measurement.

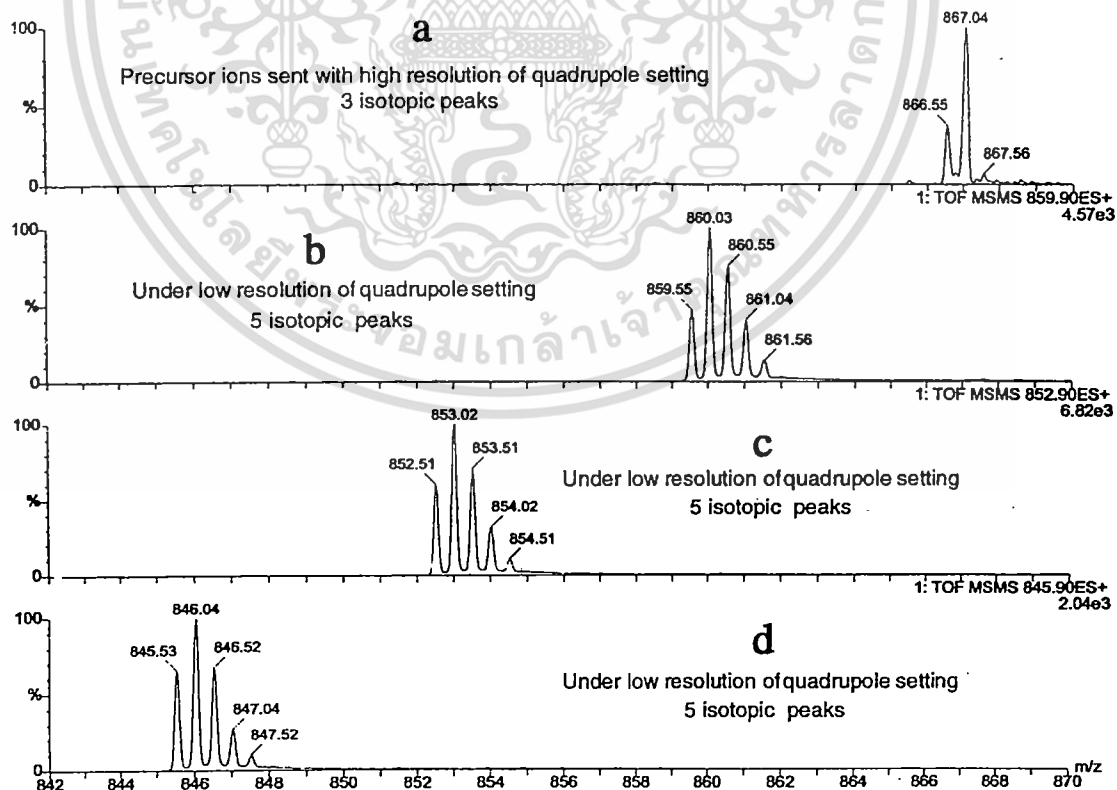


Figure 8. Four ESI tandem mass spectra obtained under the conditions of 4 V collision energy causing no fragmentation and high resolution setting of the quadrupole unit at either low or high resolution for the four doubly charged precursor-peak clusters c $[M+2H]^{2+}$ ions (see mass spectrum in Fig. 3). (a) Spectrum at high resolution setting for the parent peak: m/z 866.5; (b), (c) and (d) spectra analyzed at low resolution for the precursor peaks: m/z 859.5, 852.5 and 845.5, respectively.

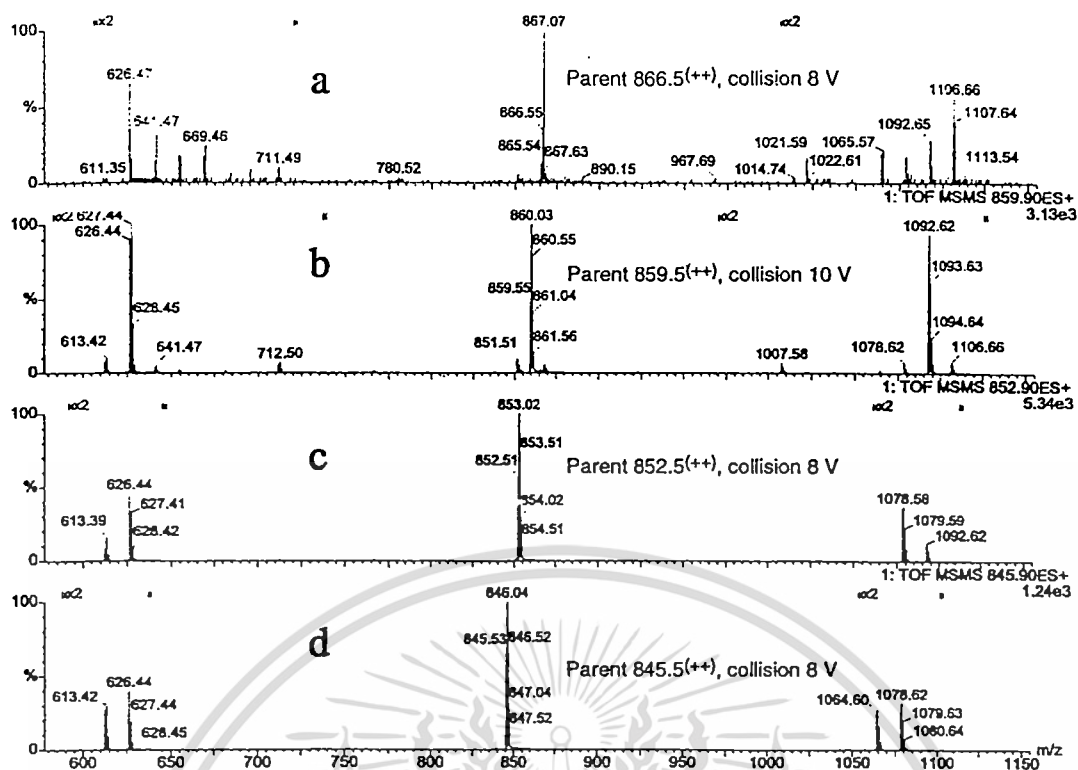


Figure 9. Minimal MS/MS fragmentation of the four corresponding doubly charged precursor peaks displayed in Fig. 8 with the same setting of the quadrupole but increased collision voltage to cause minimal fragmentation into their singly protonated complementary *N*- and *C*-terminal fragments.

Figure 9(a)–(d) show the results of minimal fragmentation of the corresponding four doubly charged parent ions of $[M + 2H]^{2+}$ under the same quadrupole setting as in Fig. 8(a)–(d). A collision voltage of 8 or 10 V is enough to start fragmentation of the labile Aib¹²–Pro¹³ bonds and revealed the resulting components as pairs of complementary fragments. For example, in Fig. 9(b) the precursor peaks, m/z 859.55–860.03–860.55–861.04–861.56, gave a mixture of singly charged complementary fragments of the m/z 1092.62–626.44 fragments as one major plus three minor fragments of m/z 1106.66–612.42, 1078.62–641.47 and 1007.58–712.50. Furthermore, this spectrum also shows a different isotopic peak pattern at the m/z 612–613 and 626–627 peaks. This indicates the co-presence of fragments 1 u mass higher owing to the change from Gln¹⁷ to Glu¹⁷ residues and is useful in specifying exactly the whole sequences of the existing acidic trichotoxins. A number of mixed components vary from one precursor ion to the others. Another example of very high mixing is seen in Fig. 9(a). Although this precursor ion had only two isotopic peaks it displayed five sets of complementary fragments, m/z 1106.66–626.47, 1092.65–640.5, 1078.66–654.46, 1064.57–668.46 and 1021.59–711.49. These data are useful in recognizing several of the mixed components existing in the same precursor ions.

The application of higher collision voltages caused further fragmentation of these $[M + 2H]^{2+}$ precursor ions and their complementary fragments (figure not shown). Although the product ions from more than one fragment were mixed, interpretation was possible as these results are still consistent with the MS/MS data for the singly charged fragments (Table 2). Thus, combining the results of minimal fragmentation of the $[M + 2H]^{2+}$ series, the tandem mass spectra at various collision voltages and

the known sequences of those b_{12} and y_6' fragments (in Table 2) allowed the deduction of the sequences of trichotoxin molecules.

Three examples of major doubly charged $[M + 2H]^{2+}$, $[M + H + K]^{2+}$ and $[M + 2K]^{2+}$ species are presented with detailed discussion.

MS/MS of one peak cluster of the $[M + 2H]^{2+}$ series, the peaks of m/z 852.5 group. Seven isotopic peaks of the peak cluster m/z 852.5–855.5 (Fig. 3) were selected as precursor ions with comparatively very low intensity of the last two peaks [see Figs 3 and 8(c)]. Its expected $[M + H]^+$ ion, m/z 1704, was not detectable at any collision voltage. This doubly charged m/z 852.5 group comprises two pairs of the complementary *N*- and *C*-terminal fragments, m/z 1078–626 and 1092–612 [Fig. 9(c)]. The fragment pair m/z 1078–626 is the major component while the pair m/z 1092–612 is the minor one. Other tandem mass spectra at 16, 25, 28, 40 and 60 V were compared but only the spectra at 28 and 60 V are shown in Fig. 10. From these spectra the following fragmentations are deduced.

(i) Sequence 3 (see Table 2) of the *N*-fragment at m/z 1078: m/z 128–185–270–383–468–596–681–766–851–922–993–1078 was found as the major component.

(ii) Sequence 2 (Table 2) of the minor *N*-fragment at m/z 1092: m/z 128–185–270–383–468–596–681–766–851–922–1007–1092 was detected as a minor component.

(iii) The partial sequence 3.1 of the *N*-fragment at m/z 1078: m/z 128–199–284–(397)–482–(610)–780–837–908–993–1078 was very minor.

(iv) Sequences 5 and 5.1 (Table 2) of the neutral and acidic *C*-fragments at m/z 626 and 627: m/z 211–296–395–523/524–626/627 were found.

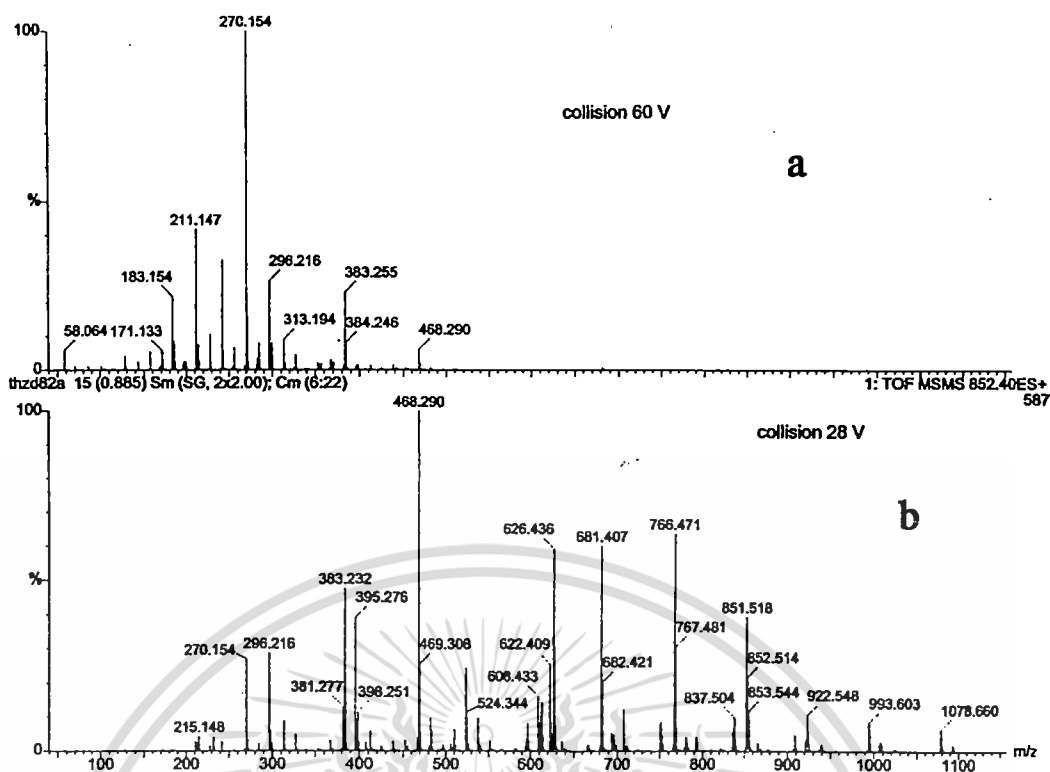


Figure 10. ESI tandem mass spectra of a peak cluster at m/z 852.5–855.5 containing major doubly charged $[M + 2H]^{2+}$ precursor ions. Collision energy: (a) 60 and (b) 28 V.

(v) Sequences 6 and 6.1 (Table 2) of the neutral and acidic *C*-fragments at m/z 612 and 613: m/z 211–296–381–509/510–612/613 were observed.

The total abundance of the fragment of m/z 1078 is about three times that of m/z 1092 [Fig. 9(c)]. These observations clearly allow the deduction of three sequences of trichotoxins with molecular mass (*M*) m/z 1703 in the form of $[1703 + 2H]$, namely 1703A, 1703C, 1703B and another two sequences with the molecular mass of m/z 1704, as 1704E and 1704G.

The use of a collision energy as high as 60 V for this $[M + 2H]^{2+}$ series is high enough to lose the complete sequence information as shown in Fig. 10(a). However, it gives ammonium ions of the amino acid components (Aib = m/z 58, Pro = m/z 70, Iva = m/z 72, Leu = m/z 86, Gln = m/z 101) and only ions containing the first (m/z 128) up to the fifth (m/z 468) residue.

There were also unassignable peaks left in the tandem mass spectra of this m/z 852.5 group such as m/z –537.3–622.4–707.5–792.5 (–Aib–Aib–Aib–) and m/z –509.3–594.4–665.4–750.5–853.5 (–Aib–Ala–Aib–Vol) as a minority.

Consequently, we deduced complete sequences of other trichotoxins found from the other three $[M + 2H]^{2+}$ ions by a similar analysis technique as done with the above example. It is known that the precursor m/z 845.5 group [Fig. 9(d)] is composed of two main molecules, 1689A and 1689C, plus other two neutral and two acidic minors, 1689B, 1689D, 1690E and 1690F, respectively, and a minute unknown $[M + X + Y]^{2+}$ giving peaks between m/z 845.5 and 847.5. Another precursor at m/z 859.5 shows two major components having the sequences 1717A and 1718E with two other pairs of acidic–neutral minors, 1717B–1718F and 1717C–1718G. The last group to be discussed is the precursor m/z 866.5 group. Its

two isotopic peaks are composed of four pairs of complementary fragments: m/z 1106.7–626.5, 1092.6–640.5, 1078.6–654.5 and 1064.6–668.5. Only one sequence of major 1731A could be confirmed. The sequences of other b_{12} fragments and the three new y'_6 fragments, m/z 640.5, 654.5 and 668.5, were impossible to analyze because their amount was extremely small in the whole sample. However, a high intensity of the isotopic precursor m/z 867.07 peak was proved to be due to the contribution of other isotopic acidic peaks of m/z 641.5, 655.5 and 669.5 and not from the acidic peak of m/z 627. More diversity of sequence of the *C*-terminal fragments could be seen from this precursor but their exact sequences could not be specified.

The possible sequences of the three y'_6 fragments heavier than the m/z 626.4 fragment, m/z 640.5, 654.5 and 668.5 (14 u consecutively different), may contain higher homologs than Aib¹⁵ and Iva¹⁶ in the known sequence: Pro¹³–Leu–Aib–Iva–Gln–Vol¹⁸. Higher homologs than Iva without an α -proton such as a higher homolog of Iva (residual mass = m/z 113) and a bis-homolog of Iva (residual mass = m/z 127) have never been reported in all known peptaibols. Another possibility of m/z 113 residual mass with an α -proton and higher than Iva may be Leu/Ile.

MS/MS of one of the $[M + K + H]^{2+}$ series, the peaks of m/z 878.5 group. The pattern of the seven consecutive precursor peaks of m/z 877.5–880.5 for MS/MS measurement is shown in Fig. 3. According to our assignment in Fig. 3 and theoretically in Table 1, the peaks of m/z 877.5–878.0–878.5 belonged to the group of m/z (1731 + Na + H) and the peaks of m/z 878.5–879.0–879.5–880.0 belonged to the group of m/z (1717 + K + H) and the peak of m/z 880.5 belonged to the group of m/z (1759 +

2H). Thus, the group of m/z (1717 + K + H) had a much higher relative abundance than the other two minor groups, m/z (1731 + Na + H) and m/z (1759 + 2H). The $[m/z(M + K + H)]^{2+}$ ions needed a slightly higher collision energy than the $[M + 2H]^{2+}$ series for fragmentation. We compare the two tandem mass spectra at a collision energy of 28 V [Fig. 11(b)] and the summed spectrum at three collision voltages, 40, 50 and 60 V, [e.g. Fig. 11(a)] for assignment. This precursor ion at m/z 878.5 gives the singly charged $[M + H]^+$ at m/z 1717.03 at very low abundance only when high collision voltages are applied [Fig. 11(a)]. The detected product ions at a collision voltage of 28 V are from the major $[M + K + H]^{2+}$ component of this precursor species. The evaluation of these collision experiments provides the following facts.

(i) A major quantity of the b ions of the singly charged b_{12} fragment at m/z 1092 (sequence 2, Table 2): m/z 185–270–383–468–596–681–766–851–922–1007–1092 and another minor series (sequence 2.1): m/z 284–397–482–610–695–780–865–936–1007–1092 were found.

(ii) High intensity of the peaks of m/z 664 and 665 (equal to the C-terminal $[y' + K]^+$ fragments: 625 + K and 626 + K), a series of b ions relating to the fragment of m/z 626 (m/z –211–296–395–) and the $[b + K]^+$ ions of the C-terminal fragment (M) of m/z 625: m/z –334–433–561–664.

Thus, four complete sequences could be concluded: 1717A, 1717B, 1718E and 1718F. In addition, the $[M + K + H]^{2+}$ ions gave another series of product ions as given below.

(iii) High abundance of two $[y' + K]^+$ series of the neutral and acidic sequences: (Ac–Aib–Gly–Aib)–Leu–Aib–Gln–Aib–Aib–Aib–Ala–Aib–Aib–Pro–(Leu–Aib–Iva–Gln/Glu–Vol) (components in parentheses mean undetected). These were concluded from the data:

m/z (39–142)–270–(369–454–567)–664.4–749.5–834.5–905.6–990.6–1075.7–1160.7–1288.8–1373.8–1486.8–(1572–1629–1757) and (39–142)–271–(370–455–568)–665.4–750.5–835.5–906.6–991.6–1076.7–1161.7–1289.8–1374.8–1487.8–(1573–1630–1758).

Although some peaks were not detected, the data were sufficient to prove the major sequences of 1717A and 1718E molecules.

(iv) Moderate intensity of the partial $[b + K]^+$ series of the sequence 1717A: (Ac–Aib–Gly–Aib–Leu–Aib–Gln–Aib–Aib–Aib)–Ala¹⁰–Aib–Aib–(Pro)–Leu–Aib–Iva–(Gln–Vol). This observation was concluded from the detected peaks: m/z –960.5¹⁰–1045.6–1130.6–(1227.7)–1340.7–1425.8–1524.9–(1653–1755). The presence of the acidic molecule 1718E could not be excluded because once the first two residues (Vol and Gln/Glu) fragmented, the rest of their detected $[b + K]^+$ ions must be the same.

(v) Partial fragmentations of the precursor group into some of the doubly charged product ions were found (figure not shown): m/z 878.0, (lost 17 u), 862.3, 763.0, 713.4, (not detected), 565.8, 523.3, 480.8, 445.3 and 402.6. These product peaks related to the unassignably partial sequence ?–?–?–?–?–Aib–Aib–Ala–Aib–.

Thus, the analyses from the $[M + K + H]^{2+}$ precursor ions led to the same conclusion as the analyses from the $[M + 2H]^{2+}$ precursor ions, although the fragmentation patterns other than b series, $[(b + K)$ and $(y' + K)]$, occurred and made some difficulty in the assignment.

MS/MS of one of the $[M + 2K]^{2+}$ series, the peaks of m/z 890.5 group. This precursor group consisting of seven selected peaks at m/z 889.5–892.47 (Fig. 3) was sent into the hexapole collision cell for MS/MS experiments. By calculation (Table 1) these seven peaks should belong to the peaks of four different molecular adduct ions, namely minor m/z (1717 + Na + K) with its four peaks:

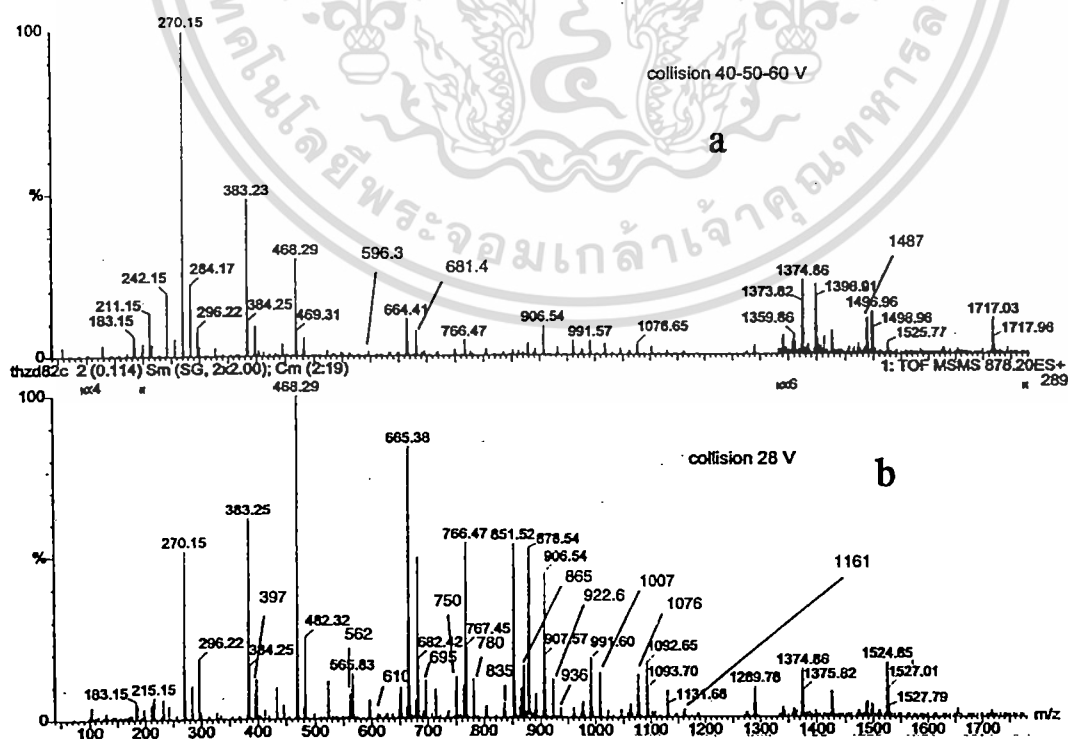


Figure 11. ESI tandem mass spectra of a peak cluster at m/z 877.5–880.5 including major doubly charged $[M + K + H]^{2+}$ precursor ions. (a) The summed spectrum under three collision energies, 40, 50 and 60 V. (b) collision energy 28 V.

m/z 889.5–890.0–890.5–891.0, major m/z (1703 + 2K) with its four peaks: m/z 890.5–891.0–891.5–892.0, very minor m/z (1759 + Na + H) with the three peaks at m/z 891.5–892.0–892.5 and another minor m/z (1745 + K + H) of one peak at m/z 892.5. Among the three doubly charged series, $[M + 2H]^{2+}$, $[M + K + H]^{2+}$ and $[M + 2K]^{2+}$, the $[M + 2K]^{2+}$ ions needed the highest collision energy (i.e. 50 V) to fragment (Fig. 12).

A collision voltage of 40 V gave only one singly charged $[M + X]^+$ at m/z 1741.1–1745.0 with no other fragmented ions. A collision energy of 50 V was enough to induce fragmentation of this group of peaks and can be concluded as follows:

(i) The b ions of the short fragment b_8 at m/z 766: m/z (128–185)–270–383–468–(596)–681–766. This ion series showed the highest abundance. This finding can be extended to the presence of the N-fragment at m/z 1078 of sequence 3 and the N-fragment at m/z 1092 of sequence 2.

(ii) The b ions of the short fragment at m/z 482: m/z (128–199)–284–397–482 with lower abundance than the above series. These data indicated the presence of the N-fragment at m/z 1092 of sequence 2.1 and the N-fragment at m/z 1072 of sequence 3.1.

(iii) High abundance of some b ions of the C-terminal fragment at m/z 626: m/z (98)–211–296–395–(523–626).

(iv) High intensity of the peaks at m/z 664.4 (equal to the neutral C-terminal at m/z 625 + K) and 665.4 (the acidic m/z 626 + K) and the lower intensity of the peaks at m/z 648.4 (the m/z 625 + Na) and 649.4 (the m/z 626 + Na).

Thus, we can deduce four sequences of trichotoxins 1703A as major, 1704E, 1717A and 1718E. There were more data supporting the above assignment.

(v) The $[a - H + K]$ ion series of the molecular mass (M) at m/z 1703: m/z 478.3–606.3–691.4–776.5–861.6–932.6–1003.5–1088.6–(not detected)–1298.8–1383.9–1482.9–1612.0–which corresponds to a partial sequence of 1703A: Gln⁶-Aib-Aib-Aib-Ala-Ala-Aib-(Pro)-Leu-Aib-Iva-Gln¹⁷-.

(vi) Another $[a - H + K]$ ion series of the molecular mass (M) at m/z 1717: m/z 478.3–606.3–691.4–776.5–861.6–932.6–1017.6–1102.6–(not detected)–1312.8–1398.9–1496.9–, corresponding to a partial sequence of 1717A: Gln⁶-Aib-Aib-Aib-Ala-Aib-Aib-(Pro)-Leu-Aib-Iva¹⁶-. This series had lower abundance than the above one.

Furthermore, these last two data sets supported the contention that the group of peaks $[M + X]^+$ from m/z 1740.1 to 1745.0 included the m/z (1703 + K) and the m/z (1717 + Na) as major and minor components, respectively, and their corresponding doubly charged forms were the m/z (1703 + 2K) and m/z (1717 + Na + K) peaks. Other minor and very minor sequences of this precursor group such as m/z (1759 + Na + H) and m/z (1745 + K + H) had such a low abundance that it was too difficult to make confident product ions. To reduce the interference of other components a reduced number of precursor peaks for MS/MS experiments by using a higher resolution of the quadrupole unit would help. The fragmentation patterns of $[M + 2K]^{2+}$ occurred in b and $[a - H + K]^+$ ion series.

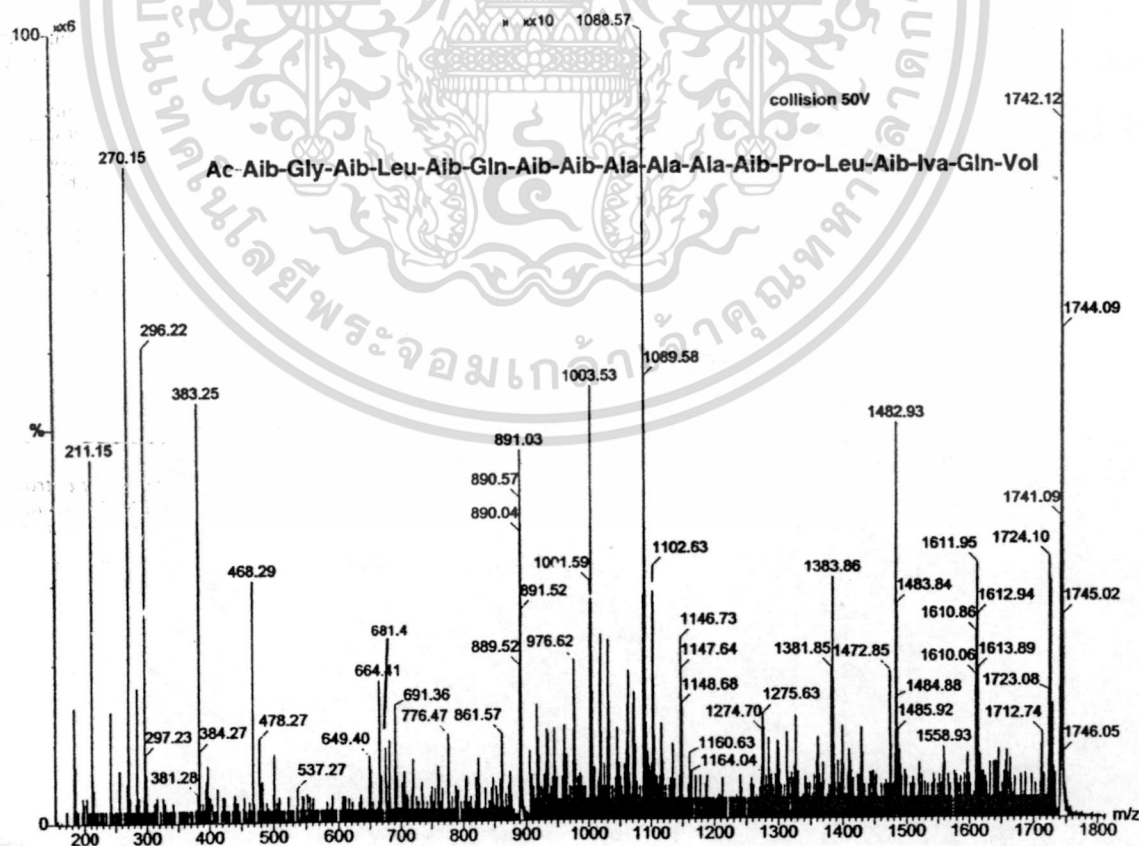


Figure 12. ESI tandem mass spectrum of a peak cluster at m/z 889.5–892.5 containing major doubly charged $[M + 2K]^{2+}$ precursor ions. The fragmentation shown was under a collision energy of 50 V. เทียนน ไมออนูญาดเหน้าไปไซประโยชนด้ำนการค้ำ

Verification of non-proteinogenic amino acids and isobaric amino acids

The ambiguity of MS analysis to specify some kind of amino acids in the proposed sequences had been ruled out by data from NMR measurements. NMR spectra (^1H at 600 MHz and ^{13}C at 125 MHz) including COSY, HOHAHA, HMBC, HSQC) were measured on trichotoxins. These NMR spectra confirmed the structures specific to the peptaibols which are acetylated *N*-termini and reduced *C*-terminal alcohol, Vol ((CH_3)₂CHCH(NH₂)CH₂OH), Iva ((CH_3CH_2)CH(CH₃)C(NH₂)COOH) and Aib ((CH_3)₂C(NH₂)COOH). In addition, the presence of signals of glutamines (not lysine) and leucines (not isoleucine) were also proved. Only seven kinds of amino acids, Gly, Ala, Aib, Pro, Iva, Leu and Gln, and one amino alcohol, Vol (valinol), were detected in this mixture. Each kind of amino acid displays more signals than one residual set. For example, the characteristics of proton peaks and cross peaks indicate many sets of Aib, 7 Ala, 2 Vol, 4 Pro, 4 Leu, 2 Gly, 4 Gln and 2 Iva.

Micro-heterogeneity

As demonstrated above, this trichotoxin sample from *T. harzianum* PC01 has two aspects of micro-heterogeneity in its structures. The first is the molecular mass distribution of the mixed neutral (trichotoxin A-50) and acidic (trichotoxin A-40) components composed of two series of molecular masses (monoisotopic values), one is the series of neutral trichotoxins at m/z 1689–1703–1717–1731–1745–1759–1773 and the other is the series of acidic molecules at m/z 1690–1704–1718–1732–1746–1760. The neutral trichotoxins having masses of m/z 1703 and 1717 were major components while those having masses of m/z 1689, 1731, 1745, 1759 and 1773 were minor constituents. Comparing this study and the previous one¹ in 1984, trichotoxins A-50 from *T. viride* NRRJ.5242 isolated by counter-current distribution and HPLC had a molecular mass distribution of m/z 1675–1639–1704–1730 and the species of m/z 1689 and 1704 were major components.

The other aspect is the alteration in amino acid sequence resulting in the same molecular masses or the relative

difference of 14 u mass intervals. Such a sequential alteration could occur at positions 2, 9, 11 and 16 (Table 3). The changes in position 2 varied as either Gly or Ala while position 9 was either Aib, Gly or Ala. Position 11 was found to be Ala or Aib and position 16 was either Iva or Aib. In this study 13 neutral and nine acidic trichotoxins were identified from their four different molecular masses. There were still some unassigned sequences left in the rest of the minor molecular masses.

Previous peptaibol sequence determination often used FABMS^{1,10} with a selective target hydrolysis or FABMS/MS,¹¹ and prior to these mass analyses, separation of individual components was necessary. Recently, liquid secondary ionization (LSI) with high-energy collision-induced dissociation (CID) MS/MS had been applied to the analysis of mixed peptaibols such as a paracelsin mixture¹² and a trichorzianine-A mixture.⁹ However, these mixtures contained micro-heterogeneity of peptaibol components only in 14 u mass intervals, not a 1 u mass difference as presented here. This work is the first with the application of ESI with sufficient resolution of the mass analyzer for the analysis of mixed neutral and acidic peptaibols possessing both 1 u and 14 u mass differences.

Analysis using the present kind of QTOF tandem mass spectrometer allowed the clear identification of the neutral and acidic molecules without further sample isolation as before. This level of instrument permits the fast examination of component consistency from batch to batch for high-throughput analysis.

Acknowledgments

This research was financially supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (April 1997–March 1999) for International Research Cooperation from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan, and by JSPS-RFTF (April 1996–March 2001). S.S. was a Research Associate of Nagoya University during April 1997–March 1998, and a short-time visitor (October–November 1998 and December 1999–February 2000). We are grateful to Dr Chyagrit Siri-Upathum of Chulalongkorn University for his kind understanding, and also to Dr Tim Williams (JASCO) for illuminating discussions. S.K. and K.S. were short-time visitors (August 1997 and August 1998) at Nagoya University under this International Cooperative Program. The current research was initiated during the program. All of the authors thank Dr Thomas Frantz for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Przybylski M, Dietrich I, Manz I, Brückner H. *Biomed. Mass Spectrom.* 1984; **11**: 569.
2. Brückner H, König WA, Aydin M, Jung G. *Biochim. Biophys. Acta* 1985; **827**: 51.
3. Brückner H, Przybylski M. *J. Chromatogr.* 1984; **296**: 263.
4. Irmischer G, Bovermann G, Boheim G, Jung G. *Biochim. Biophys. Acta* 1978; **507**: 470.
5. Jaworski A, Brückner H. *J. Chromatogr. A* 1999; **862**: 179–189.
6. Roepstorff P, Fohlman J. *Biomed. Mass Spectrom.* 1984; **11**: 601.
7. Biemann K. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1988; **16**: 99.
8. Becker D, Kiess M, Brückner H. *Liebigs Ann./Recl.* 1997; 767.
9. Pócsfalvi G, Scala F, Lorito M, Ritieni A, Randazzo G, Ferranti P, Vékey K, Malorni A. *J. Mass Spectrom.* 1998; **33**: 154.
10. Brückner H, Przybylski M. *Chromatographia* 1984; **19**: 188.
11. Lida A, Okudu M, Vestro S, Takaishi Y, Shingu T, Morita M, Fujita T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1990; 3249.
12. Pócsfalvi G, Ritieni A, Ferranti P, Randazzo G, Vékey K, Malorni A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997; **11**: 922.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้