

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชวงศ์ชมพู่ในการควบคุมโรคใบจุด
Alternaria และการกระตุ้นเอนไซม์ต้านทานโรคพืชในผักสลัดคอส
และกิจกรรมการฆ่าแมลงศัตรูผัก

ANTIFUNGAL ACTIVITY AND THE INDUCTION OF DEFENSE
ENZYMES OF MYRTACEAE EXTRACTS AGAINST *ALTERNARIA*
LEAF SPOT OF COS LETTUCE AND THEIR INSECTICIDAL ACTIVITY
ON VEGETABLE INSECT PESTS



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรศาสตร์
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2567

KMITL-2024-AG-D-064-048

ANTIFUNGAL ACTIVITY AND THE INDUCTION OF DEFENSE
ENZYMES OF MYRTACEAE EXTRACTS AGAINST *ALTERNARIA*
LEAF SPOT OF COS LETTUCE AND THEIR INSECTICIDAL ACTIVITY
ON VEGETABLE INSECT PESTS



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY IN AGRICULTURE
SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2024

KMITL-2024-AG-D-064-048



COPYRIGHT 2024

SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชวงศ์ชมพู่ในการควบคุมโรคใบจุด <i>Alternaria</i> และการกระตุ้นเอนไซม์ต้านทานโรคพืชในผักสลัดคอส และกิจกรรมการฆ่าแมลงศัตรูผัก
ชื่อนักศึกษา	นายสุริยสิทธิ์ สมนึก
รหัสประจำตัว	60604041
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชา	เกษตรศาสตร์
พ.ศ.	2567
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร.คำรณวิทย์ ทิพย์มณี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ. ดร.ถนิมนันต์ เจนอักษร

บทคัดย่อ

เพื่อหลีกเลี่ยงอันตรายและผลกระทบจากสารเคมีสังเคราะห์ในการป้องกันกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อรา ต่อผู้บริโภค เกษตรกร และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินศักยภาพของพืชท้องถิ่นวงศ์ชมพู่ (*Myrtaceae*) ของไทย สำหรับใช้เป็นทางเลือกที่ปลอดภัยในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดและแมลงศัตรูพืช รวมทั้งการเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดเอนไซม์ต้านทานโรคในผักสลัด โดยการศึกษาได้เริ่มจากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักสลัด และจัดจำแนกโดยวิธีทางสัณฐานวิทยา พบเชื้อราจำนวน 2 ไอโซเลท คือ *Alternaria* sp. (Alt-LL1) และ *Curvularia* sp. (Cur-LL2) ในการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนใบผักสลัด พบว่า เชื้อราทั้ง 2 ชนิด (*Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp.) สามารถก่อให้เกิดโรคใบจุดบนผักสลัดได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงโรค เท่ากับ 85 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการจัดจำแนกเชื้อรา Alt-LL1 ด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา ทำให้ทราบว่าเชื้อราไอโซเลทดังกล่าวเป็นเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สำหรับการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากพืชวงศ์ชมพู่ 4 ชนิด ได้แก่ สารสกัดใบเสมีดขาว (95%EEMC), ใบแปรงล้างขวด (95%EECV), ใบชมพูมะเหมี่ยว (95%EESM), และชมพูน้ำดอกไม้ (95%EESJ) ต่อการงอกเมล็ดและผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์ พบว่า สารสกัดทั้ง 4 ชนิด ไม่เป็นพิษต่อพืชทดสอบ ยิ่งไปกว่านั้น การใช้สารสกัด 95%EECV ส่งเสริมให้ผักสลัดมีการเจริญเติบโตที่มากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดวงศ์ชมพู่ 4 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยเชื้อรา *A. brassicicola* พบว่าสารสกัด 95%EEMC มีประสิทธิภาพสูงสุด (85 - 100 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือสารสกัด 95%EECV (40-63 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้แล้ว สารสกัดทั้ง 2 ชนิด (ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ถึง 50,000 ppm) ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราดังกล่าวได้ อยู่ในช่วง 80-100 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งพบความผิดปกติของสปอร์เชื้อราที่ทดสอบในกรรมวิธีที่ใช้สารสกัดในระดับความเข้มข้นสูง

ส่วนการทดสอบอิทธิพลของสารสกัด 95%EEMC และ 95%EECV ต่อเพื่อย่อยผักและเพื่อย่อยแป้งในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่า การทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 2,000 - 20,000 ppm แสดงเปอร์เซ็นต์ตาย อยู่ในช่วง 5 - 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้แล้ว ยังแสดงเปอร์เซ็นต์การไล่แมลงได้ อยู่ในช่วง 5 - 55

เปอร์เซ็นต์ จากนั้น ทำการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าแมลงของสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 2,500, 5,000, 10,000 และ 20,000 ppm พบว่า สารสกัดทั้ง 2 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยอ่อนและเพลี้ยแป้งได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ ความเข้มข้น 2,500 - 10,000 ppm แสดงเปอร์เซ็นต์การตาย อยู่ในช่วง 38-98 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm สามารถไล่แมลงทดสอบทั้ง 2 ชนิด ได้ 100 เปอร์เซ็นต์

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัด 95%EEMC และ 95%EECV ด้วยเทคนิค GC-MS และ LC-MS พบว่า สารสกัดทั้ง 2 ชนิด มีสารประกอบที่เด่นชัดที่สุด คือ สารกลุ่ม terpenoids ซึ่งจะพบสาร phytol (14%) และ 1,8-cineole (14%) มีปริมาณมากที่สุด

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัด 95%EEMC และ 95%EECV รวมทั้ง 50%EECV ที่ระดับความเข้มข้น 15,000 และ 50,000 ppm ในการควบคุมโรคใบจุด *Alternaria* ในผักสลัด พบว่า สารสกัดทั้งหมดที่ทดสอบ สามารถลดความรุนแรงโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อยู่ในช่วง 50 - 70 เปอร์เซ็นต์ และยังกระตุ้นให้ผักสลัดสร้างเอนไซม์ต้านทานโรคพืช (β -1,3-glucanase, chitinase และ peroxidase) มากกว่าชุดควบคุมและการใช้สารเคมี โดยความเข้มข้นที่สูงจะแสดงประสิทธิภาพที่ดีที่สุด และจากการวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ (correlation) พบความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างความรุนแรงโรคและกิจกรรมเอนไซม์แต่ละชนิด นั้นแสดงให้เห็นว่า สารสกัดทุกตัวที่ทดสอบมีบทบาทในการเป็นตัวกระตุ้นให้พืชสร้างภูมิคุ้มกันตนเองได้

การศึกษาแนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดเสม็ดขาว (95%EEMC) และ แปรงลำซวด (95%EECV) โดยมุ่งเน้นด้วยการผสมสารสกัดและลดขนาดอนุภาคของสารสกัด ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm อีกทั้งยังประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดผสมที่ระดับความเข้มข้น 5,000 และ 10,000 ppm ในการควบคุมโรคใบจุด *Alternaria* ในผักสลัด ซึ่งผลการทดลองในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่า สารสกัดผสมทุกอัตราส่วนที่ทดสอบมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* อยู่ในช่วง 25 - 92 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งการงอกสปอร์ อยู่ในช่วง 75 - 100 เปอร์เซ็นต์ ยิ่งไปกว่านั้น สารสกัดผสมอนุภาคไมโคร ยังแสดงศักยภาพในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราได้เป็นอย่างดี ส่วนการทดสอบในสภาพโรงเรือน พบว่า สารสกัดผสมอนุภาคไมโครทุกอัตราส่วนที่ทดสอบ ในระดับความเข้มข้น 5,000 ppm สามารถยับยั้งโรคใบจุดได้ 63.64 - 65.23 เปอร์เซ็นต์ และที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm ประสิทธิภาพการยับยั้งโรคสูงขึ้นถึง 77.47 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เอนไซม์ต้านทานโรคพืช ยังคงมีการสะสมเพิ่มมากขึ้น

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงโรคใบจุดและเอนไซม์ต้านทานโรคพืช แต่ละชนิด ซึ่งได้จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครทั้งที่ระดับความเข้มข้น 5,000 และ 10,000 ppm นั้น พบว่ายังคงมีความสัมพันธ์ในเชิงลบในทั้ง 2 การทดลอง ซึ่งน่าจะเป็นเพราะสารสกัดจากพืช (ทุกอัตราส่วนผสมของสารสกัด 95%EEMC และ 95%EECV) ยังคงเป็นตัวกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ต้านทานโรคและเป็นตัวยับยั้งโรคใบจุด *Alternaria* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Thesis Title	Antifungal activity and the induction of defense enzymes of Myrtaceae extracts against <i>Alternaria</i> leaf spot of Cos lettuce and their insecticidal activity on vegetable insect pests
Student Name	Mr. Suriyasit Somnuek
Student ID	60604041
Degree	Doctor of Philosophy
Program	Agriculture
Year	2024
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Kamronwit Thipmanee
Thesis Co-advisor	Assoc. Prof. Dr. Tanimnun Jaenaksorn

Abstract

To avoid the risk of harmful effects from synthetic fungicides on human and natural environments. Therefore, this study aimed to evaluate the potential use of the indigenous Thai Myrtaceae plants as a harmless means for controlling fungal pathogens causing leaf spot diseases and insect pests, including induction of plant defense enzymes in lettuce. Phytochemical profiles of the plant extracts were also analyzed using GC/MS and LC/MS. Furthermore, an attempt was made to improve the antifungal potential of plant extracts. Regarding isolation and morphological identification, the result revealed 2 isolates namely *Alternaria* sp. (Alt-LL1) and *Curvularia* sp. (Cur-LL2). The pathogenicity test on detached lettuce leaf revealed that both tested fungi (*Alternaria* sp. and *Curvularia* sp.) were the causal pathogen of the leaf spot disease of lettuce, showing 100% disease incidence (DI) with 85% and 40% disease severity (DS), respectively at 5 DAI. The Alt-LL1 fungus was then classified by molecular biology methods, revealing that the isolate was *Alternaria brassicicola*. For phytotoxicity test, four Myrtaceae extracts namely *Melaleuca cajuputi* (95%EEMC), *Callistemon viminalis* (95%EECV), *Syzygium malaccense* (95%EESM), and *Syzygium jambos* (95%EESJ) showed no phytotoxicity towards lettuce seed and lettuce cultivated in hydroponic conditions, with notable plant-growth-promoting potential observed in lettuce treated with 95%EECV.

Regarding a direct effect, *Melaleuca cajuputi* (95%EEMC) showed the strongest inhibition of mycelial growth of *A. brassicicola* (85-100%), followed by 95% EECV (40-63%), while both extracts significantly inhibited spore germination (80-100%).

In the case of insecticidal activity, the preliminary experiment of 95%EEMC and 95%EECV (2,000, 10,000 and 20,000 ppm) was performed on aphid and mealybug. The result presented that all concentrations of 95%EEMC and 95%EECV significantly

showed the mortality effect on aphid and mealybug about 5-100%. In addition, the 95%EEMC and 95%EECV at 2,000 and 10,000 ppm showed a repellency of about 5-55%. Then, both plant extracts at 2,500, 5,000, 10,000 and 20,000 ppm concentrations were tested to those insects. The 100% mortality of aphid and mealybug was found in the highest concentration of 95%EEMC and 95%EECV while 2,500-10,000 ppm concentrations showed in the range of 38-98%. The 100% repellency capacity was observed at 10,000 ppm concentration.

A GC/MS and LC/MS analysis revealed terpenoids as the predominant compounds at approximately 55% and 37% in 95%EEMC and 95%EECV, respectively, with high concentrations of phytol (14%) and 1,8-cineole (14%) being particularly notable.

For an indirect effect of the plant extracts as an inducer, the results from the experiment with 95%EEMC (15,000 and 50,000 ppm) as well as 50%- and 95%EECV (15,000 and 50,000 ppm) applications was in good agreement, demonstrating significant reductions in disease severity in hydroponically grown lettuce ranging from 50 to 70% together with the induction of defense enzymes (specifically β -1,3-glucanase, chitinase, and peroxidase) compared to those in the inoculated control and fungicide treatment groups. Furthermore, a correlation analysis revealed a negative correlation between disease severity and the three defense enzymes.

Focusing on further improving the efficacy of plant extracts (95%EEMC and 95%EECV), combining the two plant extracts at 5,000 ppm as well as reducing the particle size of extracts was employed and then the extracts were evaluated at 5,000 and 10,000 ppm for their efficacy on controlling *Alternaria* leaf spot in lettuce. Based on the *in vitro* experiment, it showed that all combined extracts could inhibit the mycelial growth of *A. brassicicola* by 25-92% and spore germination by 75-100%. Besides, the combination of micro-extracts improved the antifungal potentiality. With regard to the greenhouse test, the combined micro extracts at all tested ratios with 5,000 ppm presented 63.64-65.23% disease inhibition. Using 10,000 ppm, disease inhibition was up to 77.47% while the accumulation of the three defense-related enzymes in lettuce was stimulated.

Based on the combined micro extract at 5,000 and 10,000 ppm, the negative correlation was still found in both experiments indicating a decrease in disease severity while an increase in plant defense enzymes. This probably implied that plant extracts (all tested formulations of 95%EEMC and 95%EECV) could act as inducers for the induction of plant defense enzymes and be subsequently responsible for the inhibition of *Alternaria* leaf spot.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ต้องขอขอบพระคุณในความกรุณาของอาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดร. คำนวณวิทย์ ทิพย์มณี ในการรับเข้าพิจารณาไว้ในการดูแล และให้คำปรึกษา พร้อมช่วยเหลือสิ่งต่าง ๆ มากมาย

ที่สำคัญที่สุด ต้องขอขอบพระคุณ รศ. ดร. ถนิมนันต์ เจนอักษร เป็นอย่างสูง ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ให้คำชี้แนะ แก้ปัญหา และแรงผลักดันในการทำวิทยานิพนธ์ อีกทั้งยังขัดเกลาอบรม สั่งสอน ด้วยความลำบากยากเย็น เพื่อให้ลูกศิษย์เป็นผู้ที่มีวิชาความรู้ และคนดีอยู่เสมอ มีศีลธรรมจรรยา ตลอดจนคอยเป็นกำลังใจ เป็นที่ปรึกษาทุกปัญหา ในชีวิตตลอดเวลาของข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. พรประพา คงตระกูล ที่คอยช่วยเหลือ แนะนำ แก้ปัญหา และให้คำปรึกษาเพื่อทำวิทยานิพนธ์ที่ดี อีกท่านหนึ่งของข้าพเจ้า

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้กำเนิด ให้ความรัก ความห่วงใยและคอยเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา ช่วยเหลือในยามที่ร้องขอ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ นางสาวแจ้ว สมนึก ที่เปรียบเหมือนดั่งมารดา คอยเลี้ยงดูดูแลเอาใจใส่ ให้ความรัก ความห่วงใย ความเมตตา คอยเป็นกำลังใจ อบรมบ่มนิสัย และให้ทุนทรัพย์สนับสนุนข้าพเจ้าให้ได้เล่าเรียนตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงปัจจุบันนี้

สุริยสิทธิ์ สมนึก

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
1.3 สมมติฐานของการศึกษา.....	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ศัตรูผักสลัด.....	5
2.1.1 เชื้อราสาเหตุโรคทางใบของผักสลัด.....	5
2.1.2 แมลงศัตรูผักสลัด.....	8
2.2 การใช้ประโยชน์จากพืชวงศ์ขมิพู่ (ที่ใช้ในการทดลอง) ในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์และแมลง.....	11
2.2.1 แปรงลำขวิด.....	11
2.2.2 เสม็ดขาว.....	14
2.2.3 ขมิพู่มะเหมี่ยว.....	15
2.2.4 ขมิพู่ไม้ดอกไม้.....	16
2.3 การชักนำความต้านทานโรคของพืชโดยใช้สารสกัดจากพืช.....	17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	19
3.1 การศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคพืชใบจุดผักสลัด.....	19
3.1.1 การแยกและการจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคโดยสัณฐานวิทยา.....	19
3.1.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค.....	19
3.1.3 การจัดจำแนกเชื้อราเชื้อรา <i>Alternaria</i> sp. โดยวิธีอณูชีววิทยา.....	19
3.2 การศึกษาพฤษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเอทานอลจากพืชวงศ์ขมิพู่ 4 ชนิด.....	20
3.3 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเอทานอลจากพืชวงศ์ขมิพู่ 4 ชนิด ต่อการเจริญของพืชปลูก.....	21
3.3.1 อิทธิพลต่อการงอกของเมล็ดผักสลัด.....	21
3.3.2 อิทธิพลต่อการเจริญของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์.....	22

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเอทานอลจากพืชวงศ์ขมิพู่ต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในสภาพห้องปฏิบัติการ.....	22
3.4.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดพืชวงศ์ขมิพู่ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา <i>A. brassicicola</i>	22
3.4.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวดต่อการงอกสปอร์ของเชื้อรา <i>A. brassicicola</i>	23
3.5 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวดต่อแมลงศัตรูพืชผัก.....	23
3.5.1 อิทธิพลต่อการตายของแมลงศัตรูพืชผัก.....	23
3.5.2 อิทธิพลต่อการไล่แมลงศัตรูพืชผัก.....	24
3.6 การวิเคราะห์ฟลักซ์เคมีของสารสกัดใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวด.....	24
3.6.1 เทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS).....	24
3.6.2 เทคนิค Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (LC-MS).....	25
3.7 การศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากพืชวงศ์ขมิพู่ในการควบคุมโรคใบจุด <i>Alternaria</i> และการชักนำเอนไซม์ความต้านทานโรคของผักสลัดในสภาพโรงเรือน.....	25
3.7.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวดในการยับยั้งโรคใบจุด <i>Alternaria</i>	26
3.7.1.1 ผลของสารสกัดใบเสม็ดขาว.....	26
3.7.1.2 ผลของสารสกัดใบแปรงล้าขวด.....	26
3.7.2 ศักยภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวดในการชักนำเอนไซม์ความต้านทานโรคของผักสลัด.....	27
3.7.2.1 ผลของสารสกัดใบเสม็ดขาว.....	27
3.7.2.2 ผลของสารสกัดใบแปรงล้าขวด.....	27
3.7.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความรุนแรงโรคใบจุดและเอนไซม์ความต้านทานโรคพืชที่ได้รับการกระตุ้นของผักสลัด.....	28
3.8 แนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพของใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวดในการควบคุมโรคใบจุด <i>Alternaria</i> ในผักสลัด.....	28
3.8.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดผสมจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในสภาพห้องปฏิบัติการ.....	28

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.8.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครจากใบเสม็ดขาวและ ใบแปรงล้าขวดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในสภาพห้องปฏิบัติการ	29
3.8.3 อิทธิพลของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครจากใบเสม็ดขาวและ ใบแปรงล้าขวดในการควบคุมโรคใบจุดในสภาพโรงเรือน.....	29
3.8.3.1 ผลต่อการลดโรคใบจุด.....	29
3.8.3.2 ผลต่อการเจริญเติบโตของผักสลัด.....	30
3.8.3.3 ผลในการชักนำเอนไซม์ต้านทานโรคพืช.....	30
3.8.4 อิทธิพลของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครที่ระดับความเข้มข้นสูงจากใบ เสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวดในการควบคุมโรคใบจุด <i>Alternaria</i> และ การชักนำเอนไซม์ความต้านทานโรคของผักสลัดในสภาพโรงเรือน.....	30
3.8.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงโรคใบจุดกับกิจกรรม ของเอนไซม์ความต้านทานโรคพืช.....	30
บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล.....	32
4.1 การศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคพืชใบจุดผักสลัด.....	32
4.1.1 การแยกและการจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคโดยสัณฐานวิทยา.....	32
4.1.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค.....	32
4.1.3 การจัดจำแนกเชื้อราเชื้อรา <i>Alternaria</i> sp. โดยวิธีอณูชีววิทยา.....	33
4.2 การศึกษาพหุคูณเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเอทานอลจากพืชวงศ์ชมพู่ 4 ชนิด.....	34
4.3 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเอทานอลจากพืชวงศ์ชมพู่ 4 ชนิด ต่อการเจริญของพืชปลูก.....	35
4.3.1 อิทธิพลต่อการงอกของเมล็ดผักสลัด.....	35
4.3.2 อิทธิพลต่อการเจริญของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์.....	37
4.4 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเอทานอลจากพืชวงศ์ชมพู่ต่อเชื้อราสาเหตุ โรคใบจุดในสภาพห้องปฏิบัติการ.....	40
4.4.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดพืชวงศ์ชมพู่ต่อการเจริญทางเส้นใยของ เชื้อรา <i>A. brassicicola</i>	40
4.4.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวดต่อการ งอกของสปอร์ของเชื้อรา <i>A. brassicicola</i>	42
4.5 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวดต่อ แมลงศัตรูพืชผัก.....	44
4.5.1 อิทธิพลต่อการตายของแมลงศัตรูพืชผัก.....	44
4.5.2 อิทธิพลต่อการไล่แมลงศัตรูพืชผัก.....	48

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6 การวิเคราะห์พิษเคมีของสารสกัดใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวด.....	50
4.6.1 เทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS).....	50
4.6.2 เทคนิค Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (LC-MS).....	50
4.7 การศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากพืชวงศ์ขมิพู่ในการควบคุมโรคใบจุด <i>Alternaria</i> และการชักนำเอ็นไซม์ความต้านทานโรคของผักสลัดในสภาพ โรงเรือน.....	58
4.7.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวดใน การยับยั้งโรคใบจุด <i>Alternaria</i>	58
4.7.1.1 ผลของสารสกัดใบเสม็ดขาว.....	58
4.7.1.2 ผลของสารสกัดใบแปรงล้าขวด.....	60
4.7.2 ศักยภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวดในการชักนำ เอ็นไซม์ความต้านทานโรคของผักสลัดในการยับยั้งโรคใบจุด <i>Alternaria</i>	62
4.7.2.1 ผลของสารสกัดใบเสม็ดขาว.....	62
4.7.2.2 ผลของสารสกัดแปรงล้าขวด.....	64
4.7.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความรุนแรงโรคใบจุดและเอ็นไซม์ ความต้านทานโรคพืชที่ได้รับการกระตุ้นของผักสลัด.....	66
4.8 แนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวด ในการควบคุมโรคใบจุด <i>Alternaria</i> ในผักสลัด.....	69
4.8.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดผสมจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวดใน การยับยั้งการเจริญของเชื้อราในสภาพห้องปฏิบัติการ.....	69
4.8.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครจากใบเสม็ดขาวและ ใบแปรงล้าขวดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในสภาพห้องปฏิบัติการ	71
4.8.3 อิทธิพลของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครจากใบเสม็ดขาวและ ใบแปรงล้าขวดในการควบคุมโรคใบจุดในสภาพโรงเรือน.....	73
4.8.3.1 ผลต่อการลดโรคใบจุด.....	73
4.8.3.2 ผลต่อการเจริญเติบโตของผักสลัด.....	75
4.8.3.3 ผลในการชักนำเอ็นไซม์ความต้านทานโรคพืช.....	78
4.8.4 อิทธิพลของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครที่ระดับความเข้มข้นสูงจาก ใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวดในการควบคุมโรคใบจุด <i>Alternaria</i> และ การชักนำเอ็นไซม์ความต้านทานโรคของผักสลัดในสภาพโรงเรือน.....	82
4.8.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงโรคใบจุดกับกิจกรรม ของเอ็นไซม์ความต้านทานโรคพืช.....	86

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	88
บรรณานุกรม.....	91
ภาคผนวก.....	110
ภาคผนวก ก.....	111
ประวัติผู้เขียน.....	152



สารบัญตาราง

Table	หน้า
3.1 Myrtaceae plants used in the study.....	20
4.1 Pathogenicity test of <i>Alternaria</i> sp. and <i>Curvularia</i> sp. on lettuce leaf.....	33
4.2 Phytochemical compounds of 95% ethanolic crude extracts from leaves of 4 Myrtaceae plants.....	34
4.3 Effect of different concentrations of ethanol extracts from Myrtaceae leaves on seed germination and seedling growth of lettuce.....	36
4.4 Phytotoxicity test of 95% ethanolic crude extracts from 4 Myrtaceae plants on lettuce grown in hydroponics.....	38
4.5 EC ₅₀ of ethanolic extracts of 4 Myrtaceae plants.....	42
4.6 Mortality percentage, LC ₅₀ and LC ₉₀ of aphid and mealybug caused by ethanolic extract of <i>Callistemon viminalis</i> (EECV) and <i>Melaleuca cajuputi</i> (EEMC) using paper contact method.....	47
4.7 Repellency percentage of ethanolic extract of <i>C. viminalis</i> (EECV) and <i>M. cajuputi</i> (EEMC) against aphid and mealybug using paper contact method	48
4.8 Phytochemical compounds from 95% ethanolic extract of Thai <i>M. cajuputi</i> (95% EEMC) analyzed by GC/MS QTOF and LC/MS QTOF.....	53
4.9 Phytochemical compounds from ethanolic extract of Thai <i>C. viminalis</i> (EECV) analyzed by GC/MS QTOF and LC/MS QTOF.....	55
4.10 Activity of defense enzymes against <i>Alternaria</i> in lettuce treated with 95% EEMC.....	63
4.11 Activity of defense enzymes against <i>Alternaria</i> in lettuce treated with 50% and 95% EECV.....	65
4.12 Effect of combined extract from <i>Melaleuca cajuputi</i> (MC) and <i>Callistemon viminalis</i> (CV) on <i>Alternaria</i> leaf spot and plant parameters in lettuce at harvest.....	76
4.13 Activity of β -1,3-glucanase against <i>Alternaria</i> sp. in lettuce treated with <i>Melaleuca cajuputi</i> (MC) and <i>Callistemon viminalis</i> (CV) at 5,000 ppm.....	79
4.14 Activity of chitinase against <i>Alternaria</i> sp. in lettuce treated with <i>Melaleuca cajuputi</i> (MC) and <i>Callistemon viminalis</i> (CV) at 5,000 ppm.....	80
4.15 Activity of peroxidase against <i>Alternaria</i> sp. in lettuce treated with <i>Melaleuca cajuputi</i> (MC) and <i>Callistemon viminalis</i> (CV) at 5,000 ppm.....	81
4.16 Activities of plant defense enzymes against <i>Alternaria</i> sp. in lettuce treated with <i>Melaleuca cajuputi</i> (MC) and <i>Callistemon viminalis</i> (CV) at 10,000 ppm.....	84

สารบัญภาพ

Figure	หน้า
2.1 Frog eye leaf spot caused by <i>Cercospora</i> sp. on lettuce.....	6
2.2 <i>Alternaria</i> leaf spot caused by <i>Alternaria</i> sp. on lettuce and morphological characteristics of <i>A. brassicicola</i>	7
2.3 Leaf spot caused by <i>Curvularia</i> sp. on lettuce and morphology of <i>Curvularia</i> sp.....	8
2.4 Vegetable aphid.....	9
2.5 Common thrips on lettuce.....	10
2.6 Common mealybugs on lettuce	11
3.1 Selected method for repellent effect test	24
4.1 Cultural and morphological characteristics of <i>Alternaria</i> sp. (Alt-LL1) and <i>Curvularia</i> sp. (Cur-LL2).....	32
4.2 A photo (at harvest) showing non-phytotoxicity and plant growth stimulating effect of 95% ethanolic extract of <i>C. viminalis</i> (95% EECV) spraying onto lettuce in hydroponics.....	39
4.3 Mycelial growth inhibition of <i>A. brassicicola</i> by different concentrations of 95% ethanolic extract of 4 Myrtaceae plants (A) and their growth on Petri dish (B).....	41
4.4 Bar graph showing inhibition effect of different concentrations of 95% ethanolic crude extracts from <i>M. cajuputi</i> (95% EEMC) and <i>C. viminalis</i> (95% EECV) on spore germination of <i>A. brassicicola</i>	43
4.5 Mortality and repellency percentage of aphid and mealybug caused by ethanolic extract of <i>C. viminalis</i> and <i>M. cajuputi</i> using paper contact method.....	45
4.6 Effect of 95% ethanolic extract from <i>Melaleuca cajuputi</i> leaves (95% EEMC) on <i>Alternaria</i> leaf spot (at 7 DAI) and growth of lettuce in hydroponics (21 days old).....	59
4.7 Effect of 50% and 95% ethanolic extract from <i>Callistemon viminalis</i> leaves (EECV) on <i>Alternaria</i> leaf spot (at 7 DAI) and growth of lettuce in hydroponics (21 days old).....	61
4.8 Correlation of disease severity with β -1,3-glucanase, chitinase and peroxidase activities in lettuce plants treated with EEMC and EECV as an inducer against <i>A. brassicicola</i> at 3, 5 and 7 DAI.....	67
4.9 Inhibition effect of ethanolic extract from <i>C. viminalis</i> (EECV) and <i>M. cajuputi</i> (EEMC) on <i>Alternaria</i> sp. mycelial growth (at 7 days after incubation) and spore germination test (at 72 h).....	70

สารบัญญภาพ (ต่อ)

Figure	หน้า
4.10 The characteristics of colony (at 7 days after incubation) and abnormal spore (at 72 h) of <i>Alternaria</i> sp. after being treated with plant extract formulation of EECV and EEMC.....	70
4.11 Growth inhibition percentage of extract mixtures from <i>Melaleuca cajuputi</i> (MC) and <i>Callistemon viminalis</i> (CV) on mycelium growth of <i>Alternaria</i> sp.....	72
4.12 Poisoned food plates showing combined effect of <i>Melaleuca cajuputi</i> (MC) and <i>Callistemon viminalis</i> (CV) against <i>Alternaria</i> sp.....	72
4.13 The combination effect of <i>Melaleuca cajuputi</i> (MC) and <i>Callistemon viminalis</i> (CV) extract (at 5,000 ppm) on <i>Alternaria</i> leaf spot disease in lettuce at 7 DAI.....	74
4.14 The image of lettuce leaf showing <i>Alternaria</i> sp. leaf spot (A) and growth of lettuce (B) treated with extract formulation from <i>Melaleuca cajuputi</i> and <i>Callistemon viminalis</i> at the harvest.....	77
4.15 The combination effect of <i>Melaleuca cajuputi</i> (MC) and <i>Callistemon viminalis</i> (CV) extract (at 10,000 ppm) on <i>Alternaria</i> leaf spot disease in lettuce at 7 DAI.....	83
4.16 Correlation of disease severity with β -1,3-glucanase, chitinase, and peroxidase activity in lettuce treated with combined extract from <i>Melaleuca cajuputi</i> (MC) and <i>Callistemon viminalis</i> (CV) against <i>Alternaria</i> sp. at 3-7 DAI.....	87

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันผู้คนทั่วโลกรวมทั้งคนไทยเริ่มหันมาสนใจในสุขภาพมากขึ้น การทานผักเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะส่งเสริมให้สุขภาพดีขึ้น แต่การผลิตผักสดทานใบ เช่น ผักสลัด มักพบปัญหาจากการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก โดยโรคใบจุดในผักสลัดที่พบ จะเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Alternaria* spp., *Curvularia* spp. และ *Cercospora* sp. ซึ่งสร้างความเสียหายแก่พืช ทั้งการปลุกพืชผักแบบทั่วไป หรือแม้กระทั่งกับการปลูกผักปลอดภัยก็ตาม ในการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคดังกล่าว เกษตรกรมักใช้สารเคมีสังเคราะห์เป็นอันดับแรก (Horsfield *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2023) เพราะสะดวกและรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีสังเคราะห์เป็นระยะเวลานาน ย่อมส่งผลเสียต่อผู้บริโภค เกษตรกร และสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังมีรายงานหลายฉบับที่ระบุถึงการเกิดเชื้อราดีดื้อยา หรือการต้านทานสารเคมีสังเคราะห์ (Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2019) นอกจากนี้แล้ว ในปัจจุบันผู้บริโภคได้ตระหนักถึงอันตรายจากการใช้สารเคมีสังเคราะห์ และหลีกเลี่ยงผลผลิตที่ใช้สารเคมีมากขึ้น ทั้งยังมีความต้องการผักที่ผลิตจากกรรมวิธีที่ปลอดภัย จากปัญหาข้างต้น สารสกัดจากพืชจึงสามารถตอบโจทย์ต่อความต้องการเหล่านั้นได้ เนื่องด้วยสารสกัดจากพืชถูกกำจัดได้ง่ายและย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เกษตรกร และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Jantasorn *et al.*, 2016; Dethoup *et al.*, 2018; Dethoup *et al.*, 2019; Sukdee, 2023) โดยทั่วไปแล้ว สารสกัดจากพืชจะมีองค์ประกอบด้วยสารทุติยภูมิหลายชนิด เช่น phenolics, phenolic acids, terpenoids, essential oils, alkaloids, tannins, flavonoids, coumarins, lectins และ polypeptide ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Gurjar *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2018) ยิ่งไปกว่านั้นยังพบรายงานการวิจัยอีกหลายฉบับระบุว่าสารสกัดจากพืชมีศักยภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งสารออกฤทธิ์ของสารสกัดพืชจะมีผลโดยตรงแก่เชื้อสาเหตุโรค สร้างความเป็นพิษ ออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ และขัดขวางการทำงานของเอนไซม์และโปรตีนภายในเซลล์ นอกจากนี้แล้วสารสกัดจากพืชยังสามารถกระตุ้นหรือชักนำให้พืชสร้างภูมิคุ้มกันตนเองได้อีกด้วย (Bonaldo *et al.*, 2004; Celoto *et al.*, 2008; Bulhões *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2018) โดยภูมิคุ้มกันตนเองของพืชนั้นมีหลายกลไกด้วยกัน เช่น กระตุ้นให้พืชสร้างลิกนิน การเกิดปฏิกิริยา Hypersensitive reaction รวมทั้งการกระตุ้นให้พืชสร้างสารประกอบ phenol และการสร้างเอนไซม์ต้านทานโรคของพืช เช่น β -1,3-glucanase, chitinase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase และ polyphenol oxidase (Barros *et al.*, 2010) ซึ่งส่งผลต่อการเข้าทำลายพืชของเชื้อราสาเหตุโรค ในปี 2018 Pinto *et al.* (2018) รายงานว่าสารสกัดจากพืชหลายชนิด (*Anadenanthera macrocarpa*, *Schinopsis brasiliensis*, *Maytenus rigida*, *Caesalpinia pyramidalis*, *C. ferrea*, *Peltophorum dubium*, *Capariscyn ophallophora*, *Ziziphus joazeiro*, *Mimosa hostilis*, *Momordica charantia*, *Erythrina velutina*, *Cleome hassleriana*, *Sideroxylum obtusifolium* *Spondias tuberosa*) สามารถกระตุ้นให้ต้นอ่อนพืชปลูกตอบสนองและการป้องกันตนเองแก่เชื้อรา *Alternaria alternata* f. spp. *citri* อีกทั้งยังพบว่าสารสกัดจากหอมอินเดียนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria solani* ได้เป็นอย่างดี และการใช้สารสกัดดังกล่าวยังสามารถกระตุ้นให้มะเขือเทศสร้างเอนไซม์ peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia-lyase, chitinase และ β -1,3-glucanase ทั้งยังลดการเกิดโรคใบจุด

Alternaria อย่างมีประสิทธิภาพ (Latha *et al.*, 2009) สำหรับประเทศไทย การรายงานที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารสกัดจากพืชในการกระตุ้นให้พืชสามารถสร้างภูมิคุ้มกันตนเองจากโรคใบจุด *Alternaria* ยังคงมีข้อมูลเพียงจำกัด

นอกจากปัญหาการเข้าทำลายของโรคพืชแล้ว แมลงศัตรูพืชหลายชนิด รวมทั้งเพลี้ยอ่อนฝัก และเพลี้ยแป้ง เป็นอีกปัญหาที่สำคัญในกระบวนการปลูกพืชผัก โดยแมลงศัตรูพืชจะเข้าทำลายและสร้างความเสียหายให้แก่ผักทานใบหลายชนิด เช่น คะน้า กวางตุ้ง ผักกาด รวมถึงผักสลัดด้วย ในการป้องกันกำจัดแมลงที่ปลอดภัย มักพบการรายงานที่แพร่หลายเกี่ยวกับสารสกัดจากพืชถึงประสิทธิภาพในการไล่และฆ่าแมลงได้ (Cannon and Bunn, 2017; Palumbo, 2019)

สำหรับประเทศไทย มีพืชสมุนไพรหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์และป้องกันกำจัดแมลงได้ พืชวงศ์ชมพู่ (Myrtaceae plant) อาทิเช่น เสม็ดขาว ชมพู่มะเหมี่ยว ชมพู่หน้าดอกไม้ และแปรงล้างขวด โดยพืชดังกล่าวสามารถพบได้ในประเทศไทยและประเทศใกล้เคียง อย่างเช่น Myanmar, Malaysia, Indonesia รวมทั้ง Australia (Bharat and Praveen, 2016; Salem *et al.*, 2017; Patel *et al.*, 2019; Isah *et al.*, 2023; Salem *et al.*, 2023) ซึ่งพืชในวงศ์ดังกล่าวหลายชนิดถูกนำมาใช้ในการรักษาโรค ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ลดการอักเสบ และยังเป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระ (Imatomi *et al.*, 2013; Al-Abd *et al.*, 2015; Rita *et al.*, 2017; Salem *et al.*, 2017; Puig *et al.*, 2018; Patel *et al.*, 2019; Vasconcelos *et al.*, 2022; Salem *et al.*, 2023) สารสกัดจากแปรงล้างขวดถูกรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (El-Hefny *et al.*, 2017) และเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ (Somnuek *et al.*, 2020; Somnuek *et al.*, 2021) ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาวมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและแมลง (Sharif *et al.*, 2019) และยังมียับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* ที่ต้านทานยาปฏิชีวนะได้เป็นอย่างดี (Keereedach *et al.*, 2020) นอกจากนี้ ยังมีรายงานอีกหลายฉบับระบุถึงประสิทธิภาพที่ดีของสารสกัดจากเสม็ดขาวในการควบคุมแบคทีเรีย ไวรัส โปรโตซัว และเชื้อราหลายชนิด (Isah *et al.*, 2023) ส่วนสารสกัดจากชมพู่หน้าดอกไม้พบรายงานซึ่งระบุว่าสารสกัดจากพืชดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Mohanty and Cock, 2010) ในขณะที่สารสกัดจากชมพู่มะเหมี่ยวสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้เป็นอย่างดี (Bouzada *et al.*, 2009) จากที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าพืชวงศ์ชมพู่เป็นพืชสมุนไพรที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดที่นำสารสกัดจากพืชวงศ์ชมพู่มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด รวมทั้งอิทธิพลต่อแมลงศัตรูผักของผักสลัด ทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและในสภาพโรงเรือน

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

- 1.2.1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเอทานอลจากใบพืชวงศ์ชมพู่ 4 ชนิด ในการควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดผักสลัด ในสภาพห้องปฏิบัติการ
- 1.2.2 เพื่อศึกษาพิษฤทธิของเคมีเบื้องต้นและวิเคราะห์สารสำคัญของสารสกัดจากพืชวงศ์ชมพู่
- 1.2.3 เพื่อศึกษาอิทธิพลเบื้องต้นของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้างขวดในการควบคุมแมลงศัตรูผักในสภาพห้องปฏิบัติการ
- 1.2.4 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้างขวดในการควบคุมโรคใบจุดและผลการกระตุ้นเอนไซม์ต้านทานโรคของผักสลัดในสภาพโรงเรือน
- 1.2.5 เพื่อศึกษาแนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้างขวดในการควบคุมโรคใบจุดในผักสลัดทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและสภาพโรงเรือน

1.3 สมมุติฐานของการศึกษา

ทราบถึงประสิทธิภาพของชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดวงศ์ชมพู และแนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัด รวมทั้งผลต่อการกระตุ้นเอนไซม์ความต้านทานโรค เพื่อใช้ในการควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดในสภาพโรงเรือน และฤทธิ์ในการควบคุมแมลงศัตรูผัก

1.4 ขอบเขตการวิจัย

- 1) แยกและจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดจากผักสลัด พร้อมทั้งทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค และคัดเลือกเชื้อรา 1 ชนิด เพื่อนำมาศึกษาต่อ
- 2) ทำการทดสอบพิษเคมีเบื้องต้น และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด 95% ethanol จากใบของพืชวงศ์ชมพู 4 ชนิด ได้แก่ เสม็ดขาว แปรงลำงวด ชมพู่มะเหมี่ยว และชมพู่น้ำดอกไม้
- 3) ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากพืชวงศ์ชมพู 4 ชนิด ต่อการงอกของเมล็ดและพืชปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์
- 4) ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* และคัดเลือกสารสกัดที่ดีที่สุด 2 ชนิด มาทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา
- 5) ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงลำงวด (ถูกคัดเลือก) ในการฆ่าและไล่แมลงศัตรูผัก 2 ชนิด ในสภาพห้องปฏิบัติการ
- 6) ศึกษาอิทธิพลของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงลำงวดในการควบคุมโรคใบจุด *Alternaria* รวมทั้งผลในการกระตุ้นเอนไซม์ความต้านทานโรคพืชของผักสลัดที่ปลูกด้วยระบบไฮโดรโปนิคส์
- 7) ศึกษาแนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงลำงวด ด้วยวิธีผสมสารสกัด และลดขนาดอนุภาคในการยับยั้งและควบคุมโรคใบจุดจากเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด *Alternaria* ทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและโรงเรือน

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผักสลัด มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lactuca sativa* Linn. จัดอยู่ในวงศ์ Asteraceae มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชียและแถบเมดิเตอร์เรเนียน ทวีปยุโรป ผักสลัดเป็นพืชล้มลุกสามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี โดยพืชดังกล่าวจะเจริญเติบโตได้ดีในอากาศหนาว (Thamburaj and Singh, 2001) และปัจจุบันในประเทศไทยมีการปลูกทั้งในดิน และในระบบไม่ใช้ดิน ในเขตภาคกลาง เช่น นนทบุรี สมุทรสาคร ปทุมธานี เพชรบูรณ์ ภาคอีสาน เช่น นครราชสีมา และภาคเหนือ เช่น เชียงใหม่ และเชียงราย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตพื้นที่โครงการหลวง (อภิชาติ ศรีสอาด, 2558) ผักสลัดเป็นพืชที่เพาะปลูกฤดูกาลเดียว มีลักษณะลำต้นอวบสั้น และช่วงระหว่างข้อถี่ ใบเจริญจากข้อเป็นกลุ่ม มีทั้งลักษณะแบบห่อหัวและไม่ห่อหัว ใบของผักสลัดจะมีรูปร่างแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์ย่อย เช่น กลม รี เรียบ มีหยัก บิด หรืออไบ้มีทั้งแบบใบหนาแข็ง และใบอ่อนนิ่ม มีสีแตกต่างกันตามแต่ละสายพันธุ์ ตั้งแต่สีเขียวอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม บางสายพันธุ์อาจมีสีที่ปนกัน ทั้งสีเขียวและแดง มีระบบรากแบบรากแก้วที่จะเจริญลงสู่ดิน หรือวัสดุปลูกอย่างรวดเร็ว แต่หากเพาะปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ มักจะมองเห็นได้ไม่ชัดเจน จะพบรากแขนงและรากฝอยมาก ดอกมีลักษณะเป็นช่อแบบ panicle สูงประมาณ 120 เซนติเมตร (ซม.) ประกอบด้วยยกลูกดอกที่อยู่กันเป็นแบบกระจุกตรงส่วนยอดแขนง แต่ละยอดจะมีดอกย่อยประมาณ 15-25 ดอก หรือสามารถพบได้มากกว่า ดอกเป็บบแบบสมบูรณ์เพศ กลีบมีสีเหลือง ขาว หรือขาวปนเหลือง ตรงโคนดอกจะเชื่อมติดกัน รังไข่ 1 ห้อง เกสรตัวเมีย 1 ก้าน เป็น 2 แฉก ส่วนเกสรตัวผู้จะมี 5 ก้าน อยู่รวมกันเป็นยอดยาวห่อหุ้มก้านเกสรตัวเมีย ดอกจะบานช่วงเช้าและปิดลงในระยะเวลาสั้น โดยเฉพาะในช่วงที่อุณหภูมิต่ำ การผสมจะค่อนข้างเร็ว แต่หากช่วงอุณหภูมิสูงและช่วงแสงยาว จะกระตุ้นให้มีการแทงช่อดอกเร็วมากขึ้น เมล็ดของผักสลัดจะเป็นเมล็ดเดี่ยวที่เจริญจากรังไข่เดี่ยว มีลักษณะแบนยาว หัวและท้ายแหลมคล้ายหอกหรือสี่เหลี่ยมรูปาว เมล็ดมีเปลือกหุ้มมีสีครีม เทา หรือดำ ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ขนาดเล็ก มีความยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร (มม.) และกว้าง 1 มม. สลัดเป็นพืชที่ชอบอุณหภูมิต่ำถึงอบอุ่น โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 20-27 องศาเซลเซียส (°ซ) แต่ก็ยังสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิที่ต่ำ (7.2 °ซ) และสูง (35 °ซ) และหากปลูกในพื้นที่อุณหภูมิสูง ผักสลัดมักจะเครียด จะพบสารคลอโรฟิลล์จำนวนมาก และมีรสขม (United States Department of Agriculture, 2004; Department of Agriculture, 2017; Thomas *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022; Lal *et al.*, 2024)

ในการเพาะปลูกผักสลัดมักนิยมปลูกหลายสายพันธุ์ ซึ่งสามารถแบ่งตามลักษณะของต้นและใบได้เป็น 6 กลุ่ม (United States Department of Agriculture, 2004; Department of Agriculture, 2017; Lal *et al.*, 2024) ได้แก่

- 1) Leaf lettuce เป็นพันธุ์ที่มีลำต้นสั้น และมีการเจริญของใบเป็นกระจุก มีใบจำนวนมาก และมีหลายสี เช่น Green oak และ Red oak
- 2) Crisp-head เป็นสายพันธุ์ที่มีลำต้นสั้น ใบมีขนาดใหญ่หนาหนักมาก การเจริญของใบแบบห่อหัว คล้ายกระทงปลา สีใบนอกจะมีสีเขียวเข้ม และใบในจะมีสีเขียวปนขาว เช่น ผักกาดหอมห่อ หรือ ผักกาดหอมแก้ว

3) Butterhead เป็นผักสลัดที่มีลักษณะกึ่งห่อ ใบอ่อนและนิ่ม มีสีเขียวอ่อน ห่อเป็นแบบหัวปลีหลวม

4) Cos หรือ Romain เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะไม่ห่อหัว ลำต้นยาวปานกลาง ใบยาวตั้งตรง มีสีเขียวเข้ม เส้นกลางใบนูน ใหญ่ เด่นชัด

5) Stem เป็นสลัดที่มีลักษณะลำต้นยาวชัดเจน ใบยาวเรียวยาว ตั้งตรงคล้าย Cos มีสีเขียว ในบางครั้งจะเรียกว่า Celtuce หรือ Celery-lettuce

ผักสลัดเป็นพืชที่อุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการมาก เช่น วิตามิน A, B1, B2, B3, B6, C และ K ยิ่งไปกว่านั้นผักสลัดจะมีน้ำเป็นองค์ประกอบค่อนข้างสูง ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ให้พลังงานต่ำ (15 กิโลแคลอรี/100 กรัม) จึงทำให้ผู้บริโภคนิยมทานสด แต่อย่างไรก็ตามในการเพาะปลูกผักสลัดมักจะหลีกเลี่ยงศัตรูทางธรรมชาติไม่ได้ ทั้งโรคและแมลง ส่งผลให้เกิดความเสียหายมากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากเกิดที่ใบแล้ว ย่อมทำให้สูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจอย่างมาก (Kim *et al.*, 2016; Lal *et al.*, 2024)

2.1 ศัตรูผักสลัด

2.1.1 เชื้อราสาเหตุโรคทางใบของผักสลัด

2.1.1.1 โรคใบจุดตากบ

ลักษณะอาการเริ่มแรกจะเป็นจุดเล็ก ๆ ฉ่ำน้ำสีน้ำตาล ต่อมาอาการจะขยายมากขึ้น แผลจะมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือสีน้ำตาลแดง กลางแผลจะเป็นจุดสีเทา คล้ายลักษณะของตากบ มักจะพบโรคในส่วนของใบแก่และใบล่าง โดยมักจะพบบริเวณขอบใบ แผลมีหลายขนาด ตั้งแต่ 1 ถึง 10 ซม. สามารถกระจายได้ทั่วต้น หากอาการรุนแรงมากแผลจะลามติดกัน ทำให้เกิดเป็นลักษณะใบไหม้ ลักษณะอาการดังกล่าวมีเชื้อราสาเหตุโรคคือ *Cercospora lactucae-sativa* เป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่ง สามารถพบได้ทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย นอกจากนี้แล้วเชื้อราดังกล่าวยังสามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกระยะปลูกอีกด้วย (Figure 2.1) (Koochakan *et al.*, 2008)

อนุกรมวิธาน

Domain: Eukaryota

Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Class: Hyphomycetes

Order: Hyphomycetales

Family: Dematiaceae

Genus: *Cercospora*

เชื้อรา *Cercospora* เป็นเชื้อราที่มีเส้นใยแบบ septate hypha มีสีใสไปจนถึงสีน้ำตาล สามารถพบได้ทั้งระยะแบบอาศัยเพศ (teleomorph) หรือ perfect stage จะมีชื่อเรียกว่า *Mycosphaella* อยู่ในคลาส Ascomycetes และระยะไม่อาศัยเพศ โดยในระยะนี้เชื้อราจะมีการสร้าง stroma ที่มีลักษณะค่อนข้างกลม มีขนาดประมาณ 25-45 ไมโครเมตร (μm) มีก้านชูโคนิเดีย (conidiophore) เป็นกลุ่มบน stoma มีลักษณะรูปร่างเรียวยาว ส่วน conidia รูปร่างคล้ายเส้นด้าย

(filiform) เกิดบนปลาย conidiophore บริเวณรอย conidial scar สีใสถึงสีน้ำตาลอ่อน มีขนาด $3.5-5 \times 14-18 \mu\text{m}$ มีผนังกั้น (septum) 3-7 ชั้น (Figure 2.1) (Carmello and Cardoso, 2018)



(a) reproductive structures, (b) pathogenicity, (c-e) various kinds of lettuce

Figure 2.1 Frog eye leaf spot caused by *Cercospora* sp. on lettuce.

ที่มา: Koochakan *et al.* (2008)

2.1.1.2 โรคใบจุด *Alternaria*

ลักษณะอาการโรคใบจุด *Alternaria* จะมีอาการเริ่มแรกเป็นจุดเข้มหมุดเล็กสีดำ เมื่อระยะเวลาผ่านไป ขนาดแผลมีการพัฒนามากขึ้นเป็นสีน้ำตาลถึงน้ำตาลดำ เป็นแผลแห้ง มีลักษณะเป็นวงเรียงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ คล้ายเป้ากระสุน (concentric circle) บริเวณขอบแผลมีสีเหลืองล้อมรอบ (yellow halo) ซึ่งอาการโรคสามารถพบได้ทุกระยะพืช และทุกส่วนของต้น โดยเฉพาะใบ มักจะพบใบล่างก่อน จากนั้นจะลามไปสู่ยอด หากโรครุนแรงมากจะส่งผลให้เกิดอาการใบไหม้ และจะตายในที่สุด โรคดังกล่าวเป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่งสามารถพบได้ทั่วโลก มักจะเกิดกับพืชได้หลายชนิด (Michereff *et al.*, 2012; Nowicki *et al.*, 2012; Blagojević *et al.*, 2020) สำหรับประเทศไทยมักพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* หรือ *A. brassicae* ในพืชตระกูลกะหล่ำ อีกทั้งยังแฝงมากับเมล็ดได้อีกด้วย (Pattanamahakul and Strange, 1999; Phuakjaiphaeo and Kunasakdakul, 2015; Häituk *et al.*, 2023) นอกจากนี้แล้วโรสดังกล่าวยังสามารถพบการเข้าทำลายของเชื้อราในผักสลัด อาการโรคจะมีลักษณะค่อนข้างคล้ายกับโรคใบจุดตากบ (Figure 2.2) มักจะเกิดกับใบแก่ (Moses *et al.*, 2017; O'Neill, 2019; Pongpisutta *et al.*, 2023)

อนุกรมวิธาน

Domain: Eukaryota

Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Class: Dothideomycetes

Order: Pleosporales

Genus: *Alternaria*

เชื้อรา *Alternaria* เป็นเชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยแบบ septate hypha สีน้ำตาล ไม่มีการสร้าง Asexual fruiting body มีการสร้าง conidia สีน้ำตาล ลักษณะท่าย่่านปลายเรียว คล้ายลูกแพร์หรือพินโบว์ลิง เกิดบนก้าน conidiophore ขนาดสั้น ไม่มีการแตกกิ่ง ซึ่ง conidia จะเกิดเดี่ยวที่ปลายของ conidiophore และต่อกันเป็นเส้นสาย หรือโซ่ โดย conidia ที่เกิดก่อนจะอยู่ส่วนปลายสุด (Figure 2.2) (Woudenberg *et al.*, 2013; Pongpisutta *et al.*, 2023)



Figure 2.2 *Alternaria* leaf spot caused by *Alternaria* sp. on lettuce and morphological characteristics of *A. brassicicola*; Conidiophore and conidia (E-G), Conidia (H).

ที่มา: Moses *et al.* (2017); Haituk *et al.* (2023)

2.1.1.2 โรคใบจุด *Curvularia*

ลักษณะอาการโรคใบจุด *Curvularia* มีลักษณะเริ่มต้นจะเป็นแผลเล็กสีดำ จากนั้นแผลจะมีขนาดใหญ่มากขึ้น สีน้ำตาลถึงน้ำตาลดำ รูปร่างแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพืชอาศัย หากเกิดกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะมีรูปร่างแผลค่อนข้างกลม หรือรี แต่หากเกิดกับพืชใบเลี้ยงคู่ รูปร่างไม่แน่นอน ขอบแผลเป็นสีน้ำตาล (Wonglom *et al.*, 2018) นอกจากนี้แล้วหากเกิดกับผักสลัดจะมีอาการแผลเป็นจุดขนาดเล็ก (Pornsuriya *et al.*, 2018) (Figure 2.3)

อนุกรมวิธาน

Domain: Eukaryota

Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Class: Euascomycetes

Order: Pleosporales

Family: Pleosporaceae

Genus: *Curvularia*

เชื้อรา *Curvularia* sp. มีลักษณะโคโลนีเริ่มแรกจะเป็นสีขาวครีม เมื่อระยะเวลาผ่านไปจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม สีน้ำตาลเข้ม หรือสีดำ ลักษณะโคโลนีกล้ายกำมะหยี่ เส้นใยมีผนังกันตามแนวขวาง (septate hypha) สีน้ำตาลอ่อน conidia ขนาด $12-13 \times 26-33 \mu\text{m}$ มี 3 septate จำนวน 4 เซลล์ โดยจะมีเซลล์หนึ่งที่มีขนาดกว้างกว่าเซลล์อื่น บางชนิด conidia รูปร่างโค้งคล้าย croissant งอก germ tube ได้ 2 แบบ คือ งอกจากปลาย conidia ข้างใดข้างหนึ่ง หรือ งอกจากปลาย conidia ทั้ง 2 ข้าง โดย conidia จะเกิดบนปลาย conidiophore เป็นแบบข้อ

นอกจากนี้ เชื้อรายังสามารถสร้าง chlamydospore มีลักษณะค่อนข้างกลม เกิดระหว่างกลางของเส้นใย (intercalary chlamydospore) (Pomsuriya *et al.*, 2018; Wonglom *et al.*, 2018)



Figure 2.3 Leaf spot caused by *Curvularia* sp. on lettuce and morphology of *Curvularia* sp.

ที่มา: Pomsuriya *et al.* (2018)

2.1.2 แมลงศัตรูผักสลัด

2.1.2.1 เพลี้ยอ่อนผัก

เพลี้ยอ่อนผักถือเป็นศัตรูชนิดหนึ่งที่สำคัญต่อผัก โดยแมลงดังกล่าวทั้งตัวโตเต็มวัยหรือแม้กระทั่งตัวอ่อน จะดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบพืช (Figure 2.4) โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณยอดอ่อนและดอกของพืช ส่งผลให้พืชมีใบผิดปกติไป เกิดอาการใบหงิกงอ เป็นคลื่น หากมีการระบาดที่หนักมากขึ้น จะทำให้ต้นพืชหยุดชะงัก ทำให้ผลผลิตลดลง และมีคุณภาพที่ต่ำ ยิ่งไปกว่านั้นเพลี้ยอ่อนยังเป็นพาหะนำไวรัสใบต่าง ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญในผักหลายชนิด (Palumbo, 1998; Cannon and Bunn, 2017; Department of Agriculture, 2017; Palumbo, 2019)

อนุกรมวิธาน

Domain: Eukaryota

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Class: Insecta

Order: Hemiptera

Family: Aphidoidea

เพลี้ยอ่อนผัก (Aphid) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Aphis craccivora* อยู่ในอันดับ Hemiptera เป็นแมลงที่มีปากดูดขนาดเล็ก ขนาดความยาวลำตัว ประมาณ 1.30-1.6 มม. รูปร่างคล้ายไข่ สืบพันธุ์ได้โดยไม่อาศัยเพศ ออกลูกเป็นตัว มีการเจริญเติบโตแบบ incomplete metamorphosis ซึ่งตัวอ่อนมีขนาดเล็กมาก สีเหลืองอ่อน เมื่อโตเต็มวัยแมลงดังกล่าวจะมีสีเหลืองถึงเขียว ส่วนปลายท้องมีท่อเล็ก ๆ (cornicles) ยื่นออกมา 2 ท่อ (Palumbo, 1998) โดยปกติแล้วเพลี้ยอ่อนที่เข้าทำลายผักมีหลายชนิด เช่น เพลี้ยอ่อนฝ้าย (*Aphis gossypii* Glover) เพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi* Kaltentbach) และ เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Aphis craccivora* Koch) (เกษตรสุดา สนศิริ และคณะ, 2561)



Figure 2.4 Vegetable aphid

ที่มา: Cannon and Bunn (2017) และ <https://www.growingproduce.com/vegetables/4-keys-effective-aphid-management-leafy-vegetables/>

2.1.2.2 เพลี้ยไฟผัก

เพลี้ยไฟศัตรูผัก เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญในการเพาะปลูกพืชผัก เช่น ผักสลัด มีการระบาดและแพร่กระจายไปทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบอบอุ่น และแถบร้อน มีการแพร่กระจายได้ดีเนื่องจากลำตัวมีขนาดเล็กมาก ทำลายผักได้หลายชนิด โดยเพลี้ยไฟตัวโตเต็มวัย และตัวอ่อน สามารถเข้าทำลายพืชด้วยการดูดน้ำเลี้ยง ในบริเวณอ่อนนุ่ม หรือบริเวณส่วนเจริญมากที่สุด และใบพืช ส่งผลให้ใบซีดลงและเป็นคลื่น หากเข้าทำลายบริเวณท้องใบขณะที่ใบอ่อน ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นเสียหาย เมื่อระยะเวลาผ่านไป ใบพืชนั้นจะมีลักษณะที่โค้งงอลง (Palumbo, 1998; Medhurst and Anderson, 2003; Natwick *et al.*, 2017)

อนุกรมวิธาน

Domain: Eukaryota

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Class: Insecta

Order: Thysanoptera

Family: Thripidae

เพลี้ยไฟ เป็นแมลงศัตรูพืชขนาดเล็ก มีลักษณะลำตัวเพียวบาง มีปีกแคบยาว 2 คู่ ขอบปีกมีขนยาวเป็นฝอย สีของลำตัวสามารถพบได้หลายสี เช่น เหลือง ส้ม สีนํ้าตาลถึงดำ โดยลักษณะของสีจะเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ ท้องที่การระบาด และพืชอาศัย ตัวโตเต็มวัย จะมีลักษณะสีทั้งสว่าง เข้ม และปานกลาง ในขณะที่ตัวอ่อนจะมีสีขาวหรือเหลือง และมีดวงตาสีดำชัดเจน (Palumbo, 1998; Natwick *et al.*, 2017) เพลี้ยไฟที่เข้าทำลายผักสลัด มีหลายชนิด สามารถแบ่งได้ 2 genus คือ *Thrips* และ *Frankliniella* เช่น Onion thrips (*Thrips palmi*) และ Tomato thrips (*Frankliniella schultzei*) ทั้ง 2 genus ค่อนข้างคล้ายกันมาก แบ่งแยกได้ยาก (Palumbo, 1998; Medhurst and Anderson, 2003; Natwick *et al.*, 2017)



Figure 2.5 Common thrips on lettuce: a) Western flower thrips, b) plague thrips, c) onion thrips, d) tomato thrips.

ที่มา: Medhurst and Anderson (2003)

2.1.2.3 เพลี้ยแป้ง

การเข้าทำลายของเพลี้ยแป้ง จะใช้ปากแหลมแทงเข้าไปในเนื้อเยื่อของพืชอาศัยเพื่อดูดน้ำเลี้ยง ทำให้พืชสูญเสียสารอาหารและขาดน้ำ ส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตช้า มีอาการใบเหลือง หรือหากกระบาดหนัก ทำให้พืชหยุดการเจริญเติบโต และตายในที่สุด เพลี้ยแป้งยังสามารถปล่อยสารเหนียว (honeydew) ออกมา ซึ่งเป็นของเสียจากการย่อยน้ำเลี้ยงที่ดูดกินจากพืช โดยสารเหนียวจะเกาะติดอยู่บนใบและกิ่งก้านของพืช ทั้งยังเป็นแหล่งอาหารของเชื้อราดำ (sooty mold) ทำให้เชื้อราเจริญและแพร่กระจายทั่วผิวใบ ทำให้พืชไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้อย่างเต็มที่ การเจริญเติบโตของพืชถูกรบกวน ช้าลง หรือหยุดชะงัก นอกจากนี้แล้ว ยังเป็นพาหะนำโรคไวรัสต่าง ๆ มาสู่พืชได้ (Tanwar *et al.*, 2007; Manners and Duff, 2015)

อนุกรมวิธาน

Domain: Eukaryota

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Class: Insecta

Order: Hemiptera

Suborder: Sternorrhyncha

Family: Pseudococcidae

เพลี้ยแป้ง (Mealybugs) มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือกลมแบน ขนาดเล็กประมาณ 1-4 มม. มีสีขาว สีชมพู หรือสีเทา โดยมีขนแป้งสีขาวปกคลุมทั่วลำตัว เพลี้ยแป้งตัวเมียส่วนใหญ่ไม่มีปีก ขณะที่ตัวผู้มักมีปีกและสามารถบินได้ มีขา 3 คู่ และหนวดบาง ๆ อยู่ที่ส่วนหัว (Figure 3.6) เพลี้ยแป้งมักถูกปกคลุมด้วยสารเหนียวที่พวกมันขับออกมา เพื่อป้องกันตัวจากศัตรูธรรมชาติและสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เพลี้ยแป้งมักเกาะติดอยู่ตามใบ, ก้าน, ลำต้น และรากของพืช โดยเฉพาะในส่วนที่มีการสะสมของสารอาหารมาก (Pintar *et al.*, 2017) ซึ่งเพลี้ยแป้งมีหลายชนิดที่เข้าทำลายผักสลัด เช่น เพลี้ยแป้งส้ม, เพลี้ยแป้งหางยาว, เพลี้ยแป้งมันสำปะหลัง และเพลี้ยแป้งมะละกอ (Figure 2.6)



Figure 2.6 Common mealybugs on lettuce; Jack-beardsley mealybug.
ที่มา: Frank and Baker (2022)

2.2 การใช้ประโยชน์จากพืชวงศ์ชมพู่ (ที่ใช้ในการศึกษา) ในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ และแมลง

พืชในวงศ์ Myrtaceae เป็นกลุ่มพืชที่มีความหลากหลายทั้งในแง่ของลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการใช้ประโยชน์ ทำให้เป็นวงศ์ที่มีความสำคัญทั้งทางเศรษฐกิจและทางนิเวศวิทยา สำหรับประเทศไทยแล้วสามารถพบพืชวงศ์ชมพู่ได้มากมายหลายชนิด และเป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งเป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดี เช่น ชมพู่ ฝรั่ง กานพลู เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีพืชวงศ์ชมพู่อีกหลายชนิด เป็นพืชท้องถิ่นไทย หรือสามารถพบได้ ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เท่านั้น เช่น เสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi*) ชมพู่ น้ำดอกไม้ [*Syzygium jambos* (L.) Alston] และชมพู่ มะเหมี่ยว [*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L.M. Perry] เป็นต้น โดยพืชดังกล่าวยังเป็นพืชใน “โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี” โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เสม็ดขาว เป็นไม้ท้องถิ่น ที่สามารถพบได้ในแถบป่าชายเลน และป่าพรุ ภาคใต้ของประเทศไทย เป็นไม้ที่ได้รับการผลักดันให้เกิดการใช้ประโยชน์ และส่งเสริมให้เป็นไม้ทางเศรษฐกิจ ภายใต้โครงการ “ศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทองอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดนราธิวาส” ตามพระราชดำริของพระบาทสมเด็จพระบรมชนกาธิเบศร มหาภูมิพลอดุลยเดชมหาราช บรมนาถบพิตร

2.2.1 แปรงลำขวด

ชื่อสามัญ:	Bottle brush tree
ชื่อวิทยาศาสตร์:	<i>Callistemon viminalis</i> (Sol.ex Gaertn.) G.Don
วงศ์:	Myrtaceae
ชื่ออื่น:	หลิวดอก

ต้นแปรงลำขวด มีถิ่นกำเนิดในทวีปออสเตรเลีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน วิกตอเรียควีนส์แลนด์ และนิวเซาท์เวลส์ ซึ่งมีมากกว่า 30 ชนิด โดยชื่อสกุล *Callistemon* มาจากภาษากรีก Kallos หมายถึง สวยงาม และ Stemon หรือ stamen คือ เกสรตัวผู้ เมื่อรวมกันจึงหมายความว่า เกสรตัวผู้สวยงาม สำหรับเมืองไทย มีรายงานว่าถูกนำเข้ามาปลูกครั้งแรกในช่วงปี พ.ศ. 2504 โดย หลวงบุเรศร์บำรุงการ เป็นไม้ยืนต้นสูงประมาณ 10-18 เมตร ใบเดี่ยวเรียงเวียนสลับรอบกิ่ง ลักษณะเป็นรูปหอก (pendulous foliage) ปลายใบแหลม โคนใบเรียว ขอบใบเรียบ ขนาดประมาณ 5-10 × 40-50 มม. ยอดอ่อนค่อนข้างอ่อนนุ่ม และมีขนปกคลุม ดอกเป็นช่อสีแดง แบบ spike คล้ายแปรงลำขวด โดยช่อดอกจะออกบริเวณปลายกิ่ง มีความยาวประมาณ 15-25 ซม. ซึ่งแต่ละช่อจะประกอบด้วยดอกย่อยจำนวนมาก กลีบเลี้ยงมีลักษณะเป็นรูปถ้วย กลีบดอกมีสีแดง ออกดอกตลอดทั้งปี ผลเป็นรูปถ้วย

ขนาดเล็กช่วงอ่อนจะมีสีเขียว เมื่อแก่จะมีสีน้ำตาลแห้งและแตกเป็น 3 พู (สำนักพิมพ์บ้านและสวน, 2020)

การใช้ประโยชน์จากแปรงล้างขวดในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

แปรงล้างขวดเป็นพืชที่มีการนำมาใช้ประโยชน์มากมาย และยังมีสรรพคุณในการช่วยป้องกันการแข็งตัวของเลือด บรรเทาการไอ แก้โรคหลอดลมอักเสบ มีสารต้านอนุมูลอิสระ และยังมีรายงานวิจัยอีกหลายฉบับที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช อาทิ Misra *et al.* (1997) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากแปรงล้างขวด (*Callistemon lanceolatus* DC.) ที่ความเข้มข้น 3,000 5,000 8,000 และ 10,000 ppm สามารถควบคุมการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุของข้าว ทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ *Magnaporthe grisea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme*, *Curvularia lunata*, *Aspergillus flavus* และ *A. niger* ได้ โดยที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 8,000 ppm สามารถยับยั้งได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Jazet *et al.* (2009) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากใบแปรงล้างขวด 2 พันธุ์ คือ *C. rigidus* และ *C. citrinus* ในการยับยั้งเชื้อ *Phaeoramularia angolensis* พบว่า น้ำมันหอมระเหยที่ได้จาก *C. rigidus* ที่ความเข้มข้น 6,500 ppm สามารถยับยั้งเชื้อราดังกล่าวได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และ *C. citrinus* ความเข้มข้นที่ 6,000 ppm สามารถยับยั้งเชื้อราดังกล่าวได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า ในพืชสกุลเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ สามารถให้ประสิทธิภาพที่ต่างกัน ในปี 2012 Shukla *et al.* (2012b) ได้รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยจากแปรงล้างขวดที่ระดับความเข้มข้น 0.908 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มก./มล.) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Absidia ramose*, *A. alternata*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *Chaetomium sp.*, *Dreschlera sp.*, *F. nivale*, *F. oxysporum*, *Fusarium sp.*, *Mucor sp.*, *Penicillium citrinum* และ *Trichoderma sp.* ที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเขียว สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ จะสังเกตได้ว่า น้ำมันหอมระเหยจากพืชดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อ *Chaetomium sp.* และ *Trichoderma sp.* ซึ่งเป็นเชื้อปฏิปักษ์ได้ จึงเป็นข้อจำกัดในการใช้น้ำมันหอมระเหยจากแปรงล้างขวดร่วมกับเชื้อทั้งสองชนิด ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช อีกทั้งยังพบว่า สารสกัดจากใบแปรงล้างขวดที่ใช้ petroleum ether, chloroform, ethyl acetate และ methanol เป็นตัวทำละลายสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *X. oryzae* pv. *oryzae*. ได้ โดยสารสกัดที่ใช้ petroleum ether เป็นตัวทำละลายแสดงประสิทธิภาพดีที่สุด โดยมีบริเวณยับยั้งในช่วง 18.66 - 35.33 มม. รองลงมาคือ สารสกัดจาก chloroform เป็นตัวทำละลายมีบริเวณยับยั้งในช่วง 21.33 - 29.33 มม. ส่วนสารสกัดที่ใช้ ethyl acetate และ methanol เป็นตัวทำละลายก็ให้ผลยับยั้งดีเช่นกัน โดยมีบริเวณยับยั้งในช่วง 15.6 - 25.6 มม. ในขณะที่สารสกัดทุกชนิดไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ได้ (Kavitha and Satish, 2013)

นอกจากเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชแล้ว น้ำมันหอมระเหยจากแปรงล้างขวด ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นได้หลายชนิด เช่น เชื้อ *Staphylococcus faecalis*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* (Oyedeji *et al.*, 2009), และ *Escherichia coli* (Gohar *et al.*, 2014) สำหรับสารสกัดแปรงล้างขวดจากตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น สารสกัดน้ำ, methanol และ Hexane สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*,

B. cereus, *St. aureus*, *St. pyogenes* และเชื้อรา *Candida albicans* ได้ โดยมีบริเวณยับยั้ง อยู่ในช่วง 16 - 20 มม. (Delahaye *et al.*, 2009) ส่วนสารสกัดที่ได้จากการใช้น้ำเย็นเป็นตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 80 มก./มล. สามารถยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* จำนวน 4 ไอโซเลท ได้ มีบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 6-17 มม. ในขณะที่การใช้น้ำร้อนเป็นตัวทำละลายไม่แสดงประสิทธิภาพการยับยั้ง (Faris *et al.*, 2011)

ด้าน Oyedeji *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบน้ำมันหอมระเหยจาก แปรงลำขวด 2 สายพันธุ์ในประเทศแอฟริกาใต้ คือ *C. citrinus* และ *C. viminalis* พบว่า มีปริมาณ น้ำมันหอมระเหย 92.0 เปอร์เซ็นต์ และ 98.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยพบสารประกอบทางเคมี ที่สำคัญของน้ำมันหอมระเหยจาก *C. citrinus* และ *C. viminalis* คือ 1,8-cineole (61.2 และ 83.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ), α -pinene (13.4 และ 6.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และยังมีระบุอีกว่า น้ำมันหอมระเหย ที่ความเข้มข้น 0.08 มก./มล. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus faecalis*, *S. aureus* และ *B. cereus* ได้ พบบริเวณยับยั้งในช่วง 23.0 - 26.3 มม.

การใช้ประโยชน์จากแปรงลำขวดในการควบคุมแมลง

แปรงลำขวด นอกจากจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แล้ว ยังมีรายงานอีก ส่วนหนึ่งที่น่าสนใจในการจัดการกับแมลง หลายชนิด เช่น ในประเทศบราซิล การใช้น้ำมันหอมระเหย จากดอกแปรงลำขวด (*C. viminalis*) ความเข้มข้น 0.5% ส่งผลให้จำนวนของเพลี้ยอ่อนเขียว (*Myzus persicae*) และการขยายพันธุ์ลดลง (Sales *et al.*, 2017) ส่วนประเทศอิหร่าน (Iran) Zandi-Sohani *et al.* (2013) กล่าวว่า การใช้น้ำมันหอมระเหยจากใบแปรงลำขวด (*C. citrinus*) ความเข้มข้น 500 μ L/L เป็นพิษต่อดังถั่วพุ่ม (*Callosobruchus maculatus*) ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์ การตายของด้วงตัวผู้ อยู่ในช่วง 50-100 เปอร์เซ็นต์ และยังมีประสิทธิภาพการไล่ได้อีกด้วย ด้านประเทศอินเดีย มีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยจากแปรงลำขวดสายพันธุ์ Curtis (*C. citrinus*) มีผลต่อปริมาณไข่ การฟักตัว การอยู่รอดของตัวอ่อน และการเจริญเป็นตัวเต็มวัยของมอดแป้ง (Ramachandran *et al.*, 2022) ในขณะที่สายพันธุ์ *C. lanceolatus* มีประสิทธิภาพในการไล่แมลง หลายชนิด ได้แก่ ด้วงถั่วพุ่ม ด้วงบุหรี และมอดแป้งได้ (Ankitha *et al.*, 2024) สำหรับประเทศไทย มีรายงานว่า สารสกัดจากใบ *C. lanceolatus* ที่ใช้ hexane เป็นตัวทำละลาย มีผลต่อพฤติกรรมการบิน และยังเป็นพิษต่อหนอนใยผัก (Sannongmueang *et al.*, 2017) และเพลี้ยแป้งสีชมพู (Sannongmueang *et al.*, 2018)

2.2.2 เสม็ดขาว

ชื่อสามัญ: Cajuput tree/ Milk wood/ Paper bark tree

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Melaleuca cajuputi* Powell

ชื่อพ้อง: *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T.Blake
Melaleuca leucadendra var. *albida* Cheel
Metrosideros quinquenervia Cav.

วงศ์: Myrtaceae

ชื่ออื่น: เสม็ด (ภาคกลาง), เม็ด, เหม็ด (ภาคใต้), กือแล (มลายู-ปัตตานี)

เสม็ดขาว สามารถพบได้บริเวณพื้นที่ชุ่มน้ำ แลบชายฝั่งใต้และตะวันออกของประเทศไทย และยังสามารถพบได้ในต่างประเทศ ได้แก่ อินเดีย จีน พม่า เวียดนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย บอร์เนียวติมอร์ เสม็ดขาวเป็นไม้ยืนต้นไม่มีการผลัดใบ มีความสูงประมาณ 5-25 เมตร มีลำต้นบิดงอ เปลือกชั้นนอก มีสีขาวนวล สามารถลอกเป็นแผ่นได้ ชั้นในจะบางมีสีน้ำตาลอ่อน ส่วนใบ เป็นใบเดี่ยว เรียงเวียนสลับกัน ใบมีลักษณะเป็นหอก โคนเล็กน้อย มีขนาดประมาณ 15-40 × 50-100 มม. ปลายและโคนใบแหลม ขอบเรียบ ผิวเกลี้ยง มีเส้นใบ 3-7 เส้น ขนานจากโคนจรดปลายใบ ใบอ่อนจะมีขนสีขาว ดอก มีลักษณะเป็นช่อเชิงลดห้อย ออกดอกที่ปลายกิ่ง สีขาว คล้ายหางกระรอก ขนาดช่อยาวประมาณ 7.5-15 ซม. ดอกย่อยมีขนาดเล็ก ไม่มีก้านดอกที่เด่นชัด ออกดอกตลอดปี ผลเป็นรูปถ้วย เมื่อแก่จะมีสีน้ำตาลอมเทา ขนาดกว้างประมาณ 4 มม. แห้งและแตก การใช้ประโยชน์จากต้นเสม็ดขาว เนื้อไม้จะใช้ในการก่อสร้าง ผนังบ้าน เสาเข็ม และทำฟืน ส่วนเปลือกนิยมนำมาทำยาสูบหรือหมัก (นิจศิริ เรื่องรังษี และรัชชัย มังคละคุปต์, 2547; กรมป่าไม้, 2550)

การใช้ประโยชน์จากเสม็ดขาวในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

ในอดีตชาวบ้านแถบภาคใต้ของไทย จะมีการใช้เสม็ดขาวในรูปแบบของน้ำมัน เรียกว่า น้ำมันเสม็ด หรือน้ำมันเขียว (Cajuput oil) รักษาโรคไขข้ออักเสบ ทำยาแก้ปวดหัว ปวดหู และยังใช้เป็นยารักษาโรคผิวหนัง รักษาสิว และฆ่าเชื้อโรค สำหรับงานวิจัยด้านเชื้อจุลินทรีย์ มีรายงานหลายฉบับที่ระบุว่าสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาวสามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ ในประเทศไทยมีรายงานการใช้น้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ดขาว ช่วงปี 2007-2016 ระบุว่า น้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 1.5-50% สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สูงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Thanaboripat *et al.*, 2007; Thanaboripat, 2011; Thanaboripat *et al.*, 2016) ส่วนในต่างประเทศ ยังพบการรายงานของ Bharat and Praveen (2016) ที่ได้ระบุว่าน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาว *Aspergillus niger* และ *Apergillus* spp. (บริเวณยับยั้ง 2-19.5 มม.) ได้เป็นอย่างดี และ Siddique *et al.* (2018) พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ดความเข้มข้น 8-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/mL}$) สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช *Aspergillus niger*, *A. flavas*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Alternaria alternata* และ *Penicillium digitatum* นอกจากนี้เชื้อราแล้ว Ukit *et al.* (2019) กล่าวว่า สารสกัด methanol จากใบเสม็ดสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus* sp., *B. licheniformis* และ *B. subtilis*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*V.cholerae* และ *S.dysentriae*) ได้

การใช้ประโยชน์จากเสม็ดขาวในการควบคุมแมลง

น้ำมันเสม็ด เป็นภูมิปัญญาชาวบ้านที่นำมาใช้ทาเพื่อไล่ยุง และแมลงต่าง ๆ ทั้งยังมีฤทธิ์ในการฆ่าเหาได้ (นิจศิริและธวัชชัย, 2547; วิจิต และสมชัย, 2542) ยิ่งไปกว่านั้น Ko Ko *et al.* (2009) ได้กล่าวว่า น้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวจากไทย มีฤทธิ์ในการไล่ด้วงวงข้าวโพดและมอดแป้งได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Visheentha *et al.* (2018) พบว่า สารสกัด hexane, dichloromethane และmethanol จากต้นเสม็ดขาว ความเข้มข้น 20% สามารถไล่มด *Camponotus sp.* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเมื่อเร็ว ๆ นี้ Vivekanandhan *et al.* (2024) รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบนี้ยังมีฤทธิ์ในการไล่ยุงก้นปล่อง *Anopheles stephensi* และยังสามารถฆ่าลูกน้ำของยุงได้หลังจากทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ชม.)

2.2.3 ชมพู่มะเหมี่ยว

ชื่อสามัญ:	Malay apple/ Pomerac
ชื่อวิทยาศาสตร์:	<i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & Perry
ชื่อพ้อง:	<i>Eugenia malaccensis</i> Linn.
วงศ์:	Myrtaceae
ชื่ออื่น:	มะเหมี่ยว, ชมพู่สาแหรก, ชมพู่แดง

ชมพู่มะเหมี่ยว เป็นไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในแถบเกาะชวา สุมาตรา คาบสมุทรมลายู รวมทั้งภาคใต้ของประเทศไทย ปัจจุบันพบการกระจายตัวตั้งแต่อินเดียจนถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ชมพู่มะเหมี่ยวเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูงประมาณ 5-15 เมตร ลำต้นสามารถแตกกิ่งก้านได้มาก และมีกิ่งค่อนข้างใหญ่ เปลือกของลำต้นมีสีน้ำตาลอ่อน ผิวขรุขระ สากมือ ใบชมพู่มะเหมี่ยวเป็นใบเดี่ยว เรียงตัวสลับกันเป็นคู่ ใบอ่อนเริ่มแรกมีสีชมพู ใบแก่มีสีเขียว ขนาดใหญ่ ลักษณะใบรี ปลายใบแหลม โคนใบมน มีขนาดประมาณ 8-15 × 15-25 ซม. ขอบใบเรียบ ใบหนา มันเงา ก้านใบอวบสั้น การออกดอก สามารถออกดอกได้ตามกิ่ง และลำต้น ออกดอกเป็นช่อ สีแดงม่วง หรือสีบานเย็น ก้านช่อดอกสั้นมีกลีบเลี้ยง 4 กลีบ มีสีเขียว เกสรตัวผู้ สีเดียวกับกับสีดอก มีจำนวนมาก ผลเป็นรูปประมัย อวบอ้วน ผลอ่อนจะมีสีเขียว และผลแก่จะมีสีแดง เมื่อสุกจะมีสีม่วงอมแดง หรือแดงเข้ม เนื้อหนา นุ่ม ภายในมีสีขาว หรือขาวอมชมพู รสชาติหวาน นิยมปลูกตามบ้าน และรับประทานผลสด มีรสขมคอ (Pazzini *et al.*, 2021)

การใช้ประโยชน์จากชมพู่มะเหมี่ยวในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

ชมพู่มะเหมี่ยว ส่วนมากจะใช้ประโยชน์จากการรับประทานผลสด เนื้อไม้ใช้ทำสิ่งก่อสร้าง บ้านเรือน การใช้งานเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์มีข้อมูลค่อนข้างจำกัด พบการรายงานเพียง Bouzada *et al.* (2009) ซึ่งได้รายงานที่ สารสกัด methanol จากใบชมพู่มะเหมี่ยว มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* และ *Shigella sonnei* ต่อมาในปี 2019 Savi *et al.* (2020) ได้รายงานที่ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Salmonella bongori*, *Candida albicans* และ *Candida tropicalis* มีค่า MIC และ MBC/ MFC อยู่ในช่วง 1-8 และ 5-14 µg/L และที่ผ่านมานี้ พบการรายงานของ Quenon *et al.* (2022) และ Hapida *et al.* (2023) ที่กล่าวว่า สารสกัด methanol จากชมพู่มะเหมี่ยวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้หลายชนิด

2.2.4 ชมพู่ น้ำดอกไม้

ชื่อสามัญ:	Rose apple
ชื่อวิทยาศาสตร์:	<i>Syzygium jambos</i> (L.) Alston
ชื่อพ้อง:	-
วงศ์:	Myrtaceae
ชื่ออื่น:	มะชมพู่ มะน้ำหอม (พายัพ), ชมพู่ น้ำฝรั่งน้ำ (ภาคใต้)

ชมพู่ น้ำดอกไม้ เป็นพืชโบราณ ไม่ค่อยนิยมปลูก เป็นชมพู่พันธุ์ดั้งเดิมของประเทศไทย มีถิ่นกำเนิดในแถบอินโด-มาลายัน รวมทั้งประเทศไทยด้วย ในปัจจุบันพืชชนิดนี้มีการแพร่กระจาย และสามารถพบได้ทั้งในทวีปอเมริกา แอฟริกา และเอเชีย ชมพู่ น้ำดอกไม้เป็นไม้ขนาดกลาง ความสูงของลำต้นประมาณ 10 เมตร ใบของพืชชนิดนี้จะเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงตรงข้ามกันเป็นคู่ ใบมีลักษณะเรียวยาว คล้ายหอก ปลายใบแหลม โคนใบมนรี ขอบใบเรียบ มีขนาดประมาณ 3-4 × 12-17 ซม. ดอกมีลักษณะเป็นสีขาวหรือเหลืองอ่อน ออกดอกเป็นช่อ บริเวณปลายกิ่ง มีดอกย่อย 3-8 ดอก มีเกสรตัวผู้จำนวนมาก ส่วนผล เป็นผลเดี่ยว มีลักษณะกลมมน คล้ายผลจัน สีของผล หากเป็นสายพันธุ์ไทยเมื่อสุกจะมีสีเหลือง ปลายผลมีกลีบสีเขียว 4 กลีบ กลีบคล้ายดอกนมแมว แต่หากเป็นสายพันธุ์มาเลเซียจะมีสีแดง ผลไม้ชนิดนี้นอกจากจะรับประทานสดแล้ว ยังสามารถใช้ผลปรุงเป็นยาหอมบำรุงหัวใจ แก้ลม ส่วนเปลือก ต้นและเมล็ดแก้เบาหวานและท้องเสีย (กัลยา ชุมอินทร์จักร, 2564)

การใช้ประโยชน์จากชมพู่ น้ำดอกไม้ในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

ชมพู่ น้ำดอกไม้เป็นพืชอีกชนิดหนึ่ง ที่นอกจากจะใช้ประโยชน์เป็นผลไม้ทานสดและใช้เป็นยาสมุนไพรแล้ว จะพบข้อมูลในงานวิจัยทางด้านจุลินทรีย์ ทั้งการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียค่อนข้างจำกัด อาทิ ในปี 2000 มีรายงานการใช้สารสกัดของเปลือกชมพู่ น้ำดอกไม้ที่ได้จากน้ำและ acetone เป็นตัวทำละลาย มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *S. hominis*, *S. cohnii* และ *S. warneri* (Djipa et al., 2000) ในขณะที่ Murugan et al. (2011) พบว่า สารสกัดจากใบที่ใช้ตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิดข้างต้น ที่ระดับความเข้มข้น 60-100 µg/mL มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียได้แตกต่างกัน ซึ่งสารสกัดจาก acetone สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. typhi* และ *V. cholera* ส่วนสารสกัดจากน้ำสามารถยับยั้งได้เพียง *S. aureus*, *E. coli* และ *S. typhi* นอกจากนี้แล้ว ยังพบว่า สารสกัด methanol จากใบชมพู่ น้ำดอกไม้ สามารถยับยั้งเชื้อ *A. faecalis*, *A. hydrophilia*, *B. cereus* และ *S. aureus* ได้เป็นอย่างดี ช่วงปี 2015 Begum (2015) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากต้นชมพู่ ๆ ที่ได้จากตัวทำละลาย carbon tetrachloride และ chloroform ซึ่งพบว่า สารสกัดทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus*, *B. megaterium*, *S. aureus* และ *E. coli* ได้

2.3 การชักนำความต้านทานโรคของพืชโดยใช้สารสกัดจากพืช

กลไกการต้านทานโรคของพืช มีด้วยกัน 2 กลไก ได้แก่ 1) constitutive resistance หรือ passive resistance เป็นกระบวนการป้องกันตนเองของพืชที่มีมาตั้งแต่พืชเริ่มเจริญเติบโต เช่น ความหนาของชั้น cuticle ลักษณะทรงพุ่ม ขนที่ใบ รวมทั้งสารประกอบพวก alkaloids, phenol และ glycoside 2) induce resistance หรือ active resistance เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นหลังจากพืชได้รับการกระตุ้นและสร้างขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเชื้อโรค สารเคมี ความเครียด จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และสารสกัดจากพืช (พรทิพย์ วงศ์แก้ว, 2532) เมื่อพืชได้รับสิ่งเร้าเหล่านี้ จะสามารถกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและสรีรวิทยาในพืช เช่น การเสริมความแข็งแรงของผนังเซลล์ผ่านการสร้าง lignins การสะสม suberin และการสะสม callose รวมถึงการผลิตสาร phenolic, phytoalexins และ pathogenesis-related (PR proteins) ซึ่งจะช่วยป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคต่าง ๆ ในกระบวนการเหล่านี้ การผลิตและการสะสมของ PR proteins ในพืชเพื่อตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อโรคถือว่ามีค่าสำคัญมาก พืชจะเพิ่มการตอบสนองการป้องกันโดยการกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ป้องกันที่หลากหลายซึ่งเป็น PR proteins ได้แก่ peroxidase, β -1,3-glucanase, chitinase และ polyphenol oxidase รวมทั้ง phenylalanine ammonia lyase ซึ่งสามารถชะลอการเข้าทำลายของศัตรูพืชและอัตราการแพร่กระจายของโรคได้ (Prasannath, 2017)

การชักนำความต้านทานโรคของพืชสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้สารเคมีสังเคราะห์บางชนิด เช่น Acibenzolar-S-methyl (ASM), Benzothiadiazole (BTH) และ Salicylic Acid ซึ่งสามารถกระตุ้นให้พืชสร้างสารป้องกันตัวเอง การใช้สารชีวภาพหรือชีวภัณฑ์ เช่น การใช้เชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราที่เป็นประโยชน์เพื่อกระตุ้นความต้านทานโรคในพืช รวมทั้งมีการใช้สารสกัดจากพืชกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ป้องกันตนเองมากขึ้น ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ในปี 2003 Bonaldo *et al.* (2004) ได้ศึกษาการใช้สารสกัดน้ำจาก *Eucalyptus citriodora* (Myrtaceae) กับแตงกวา พบว่าสารสกัดดังกล่าวไม่เพียงแต่ลดการงอกของสปอร์และการสร้าง apressoria ของเชื้อรา *Colletotrichum lagenarium* ได้ ยังสามารถกระตุ้นให้พืชสร้างภูมิคุ้มกันตนเองในพืชได้เช่นกัน ต่อมาในปี 2009 Latha *et al.* (2009) พบว่าสารสกัดจากพืช 20 ชนิด รวมทั้ง Zimmu (พืชตระกูลหอมอินเดีย) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria solani* ได้ และการใช้สารสกัดจากพืช Zimmu อย่างเดียว หรือใช้ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (*Pseudomonas fluorescens* และ *B. subtilis*) สามารถลดการเกิดโรค early blight disease ในมะเขือเทศได้ ยิ่งไปกว่านั้นสารสกัด Zimmu ยังกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ต้านทานโรคพืช ได้แก่ peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia-lyase, chitinase และ β -1,3-glucanase ได้มากกว่าการใช้สารเคมีสังเคราะห์และชุดควบคุม ถัดมาในปี 2011 Akila *et al.* (2011) ได้รายงานในทำนองเดียวกันว่า การใช้สารสกัดจากใบลำโพงอินเดียมีประสิทธิผลยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* และ การใช้สารสกัดดังกล่าว ทั้งแบบสารสกัดอย่างเดียวและใช้ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ สามารถลดความรุนแรงโรคเหี่ยวในกล้วย และยังสามารถชักนำให้กล้วยสร้างเอนไซม์ peroxidase และ polyphenol oxidase ได้ ในขณะที่ Farag Hanaa *et al.* (2011) พบว่า การใช้สารสกัดน้ำจากสะเดาและ willow สามารถลดการเกิดโรคเหี่ยวในมะเขือเทศได้ มีความรุนแรงโรคเท่ากับ 25.5 และ 27.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีความรุนแรงโรคเท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังกระตุ้นให้มะเขือเทศสร้างเอนไซม์ peroxidase, catalase และ

superoxidase dismutase และในช่วงปี 2017-2019 พบการรายงานอีกหลายฉบับ ซึ่งได้ระบุว่าการใช้สารสกัดจากพืชหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria solani* (Kumar *et al.*, 2017), *A. alternate* (Pinto *et al.*, 2018), *Botrytis cinerea* (Gholamnezhad, 2019) และ *Puccinia triticina* (Draz *et al.*, 2019) ในสภาพห้องปฏิบัติการแล้ว เมื่อนำไปทดสอบในสภาพโรงเรือน สารสกัดจากพืชยังมีศักยภาพในการกระตุ้นให้พืชอาศัยสร้างเอนไซม์ป้องกันตนเอง (เช่น peroxidase และ polyphenol oxidase, β -1,3-glucanase, chitinase และ phenylalanine ammonia lyase) ได้เป็นอย่างดี



บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคพืชใบจุดผักสลัด

3.1.1 การแยกและการจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคโดยสัณฐานวิทยา

เก็บใบผักสลัดที่มีอาการโรคใบจุด จากฟาร์มปลูกผักไฮโดรโปนิกส์ ในเขตพื้นที่ร่มเกล้า กรุงเทพมหานคร มาแยกเชื้อราสาเหตุโรคโดยวิธี Tissue transplanting technique และ Single spore isolation technique จนได้เชื้อราบริสุทธิ์ และเก็บในหลอดอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

สำหรับการจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดผักสลัด โดยดำเนินการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะและขนาดของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.1.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค

ดำเนินการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้บนใบผักสลัด Cos (เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีความอ่อนแอต่อโรคมากที่สุด) ด้วยการเตรียมใบผักสลัด Cos ล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อด้วย 6% sodium hypochlorite (NaOCl) พร้อมทั้งซับแห้งด้วยกระดาษฆ่าเชื้อ จากนั้นปลูกเชื้อราสาเหตุโรคด้วยชิ้นวุ้นเชื้อ (mycelium agar plug) ขนาด 5 มม. บนใบพืชดังกล่าวที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มเชื้อในกล่องพลาสติกให้ความชื้น ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) จำนวน 5 ซ้ำ (5 ใบ และปลูกเชื้อรา 2 จุดต่อใบ) สำหรับกรรมวิธีควบคุมใช้ชิ้นวุ้น PDA ที่ปราศจากเชื้อแทน บันทึกผลการทดลองด้วยการวัดขนาดแผล เพื่อหาดัชนีความรุนแรงโรค และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงโรค ตามสูตร ดังต่อไปนี้

คะแนนความรุนแรงโรค จัดเป็น 4 ระดับ คือ

- | | | |
|-----------------------|----------------------|----------------------|
| 0 = ไม่มีการติดเชื้อ | 1 = ขนาดแผล 1-5 มม. | 2 = ขนาดแผล 5-10 มม. |
| 3 = ขนาดแผล 10-15 มม. | 4 = ขนาดแผล > 15 มม. | |

เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค = (จำนวนใบที่เกิดโรค / จำนวนใบทั้งหมด) × 100

เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงโรค (Disease severity) = $\frac{\sum(\text{จำนวนใบที่เกิดโรค} \times \text{คะแนนความรุนแรงโรค})}{(\text{จำนวนใบทั้งหมด} \times \text{คะแนนความรุนแรงโรคสูงสุด})} \times 100$

3.1.3 การจัดจำแนกเชื้อรา *Alternaria* sp. โดยวิธีอณูชีววิทยา

ทำการจัดจำแนกชนิด (species) ของเชื้อรา *Alternaria* sp. (Alt-LL1) โดยวิธีทางอณูชีววิทยา ด้วยการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 7 วัน จากนั้นส่งเชื้อราไปดำเนินสกัด DNA พร้อมทั้งจัดจำแนกเชื้อราโดยวิธี DNA identification ตามวิธีของ Mohammadi and Bahramikia (2019) ทำการสกัด DNA ในส่วน genomics ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA

บริเวณ ITS rDNA (ITS1-5.8s-ITS2) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 primer (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') และ ITS4 primer (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC '3) หลังจากนั้น นำ purified PCR products ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยบริษัท Bionics Co., Ltd., ประเทศเกาหลีใต้ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม Basic local alignment search tool (BLAST) ในระบบของ GenBank NCBI database

3.2 การศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเอทานอลจากพืชวงศ์ชมพู่ 4 ชนิด

การเตรียมสารสกัดจากใบพืชวงศ์ชมพู่

ดำเนินการเก็บใบพืชสดของแปรงล้างขวด ชมพู่มะเหมี่ยว และชมพู่ไม้ดอกไม้ ในเขตพื้นที่ต่าง ๆ ของกรุงเทพมหานคร สำหรับใบเสมีดขาว เก็บในพื้นที่จังหวัดชุมพร (ซึ่งแสดงรายละเอียดต่าง ๆ ใน Table 3.1) และนำมาล้างด้วยน้ำสะอาด พร้อมทั้งผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นทำการอบแห้งใบพืชดังกล่าวด้วย ตู้อบลมร้อน (Memmert) ที่อุณหภูมิ 50 °ซ จนแห้งสนิท และเก็บในถุงพลาสติก เพื่อใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ต่อไป

สำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชใช้ 95% ethanol เป็นตัวทำละลาย โดยนำใบพืชวงศ์ชมพู่แต่ละชนิดบดหยาบ และนำมาสกัดโดยวิธี Soxhlet extraction จากนั้นสารละลายที่ได้นำมากรอง แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator, Buchi Rotavapor R300) ที่อุณหภูมิ 50 °ซ จนได้สารเหนียวข้น และเก็บในขวดแก้วที่บดแสงที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

Table 3.1 Myrtaceae plants used in the study

Local name	Common name	Scientific name	Abbreviation
Prang lang khwad	Bottle brush tree	<i>Callistemon viminalis</i>	EECV
Samedkhaw	Cajuput tree	<i>Melaleuca cajuputi</i>	EEMC
Chompoo mameaw	Malay apple	<i>Syzygium malaccense</i>	EESM
Chompoo namdokmai	Rose apple	<i>Syzygium jambos</i>	EESJ

การตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้น

Phenolics และ tannins: ชั่งสารสกัดหยาบ 100 มิลลิกรัม (มก.) และละลายด้วย 50% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (มล.) เขย่าและกรองส่วนที่ไม่ละลายออก จากนั้นนำสารที่ได้เติมด้วยสารละลาย 3% ferric chloride (FeCl_3) ปริมาตร 2 มล. และเขย่า สังเกตผลการทดสอบ หากสารละลายมี phenolics หรือ tannins จะปรากฏเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำ

Flavonoids: ละลายสารสกัดหยาบ 100 มก. ด้วย 50% ethanol ปริมาตร 1 มล. แล้วกรองส่วนที่ไม่ละลายออก ใส่ magnesium ribbon ชิ้นเล็ก ๆ 1 ชิ้น จากนั้นหยดด้วย concentrated hydrochloric acid (conc. HCl) จำนวน 5 หยด นำไปให้ความร้อนด้วยไอน้ำเป็นเวลา 5 นาที สังเกตผลการทดสอบ หากสารละลายมี flavonoids จะปรากฏเป็นสีเหลืองเข้ม หรือสีส้มอมเหลือง

Alkaloids: ชั่งสารสกัดหยาบ 15 มก. ละลายด้วย สาร hydrochloric acid (HCl) ความเข้มข้น 1 % ปริมาตร 6 มล. นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที และกรองด้วยกระดาษกรอง จากนั้นหยดสารละลาย iodine ลงไป (ซึ่งเตรียมโดยผสม potassium iodide ปริมาตร 2 กรัม และ iodine ปริมาตร 1.27 กรัม ในน้ำกลั่น 5 มล. จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น) สังเกตผลการทดสอบ หากสารละลายมี alkaloids จะปรากฏตะกอนสีน้ำตาล

Terpenoids: ชั่งสารสกัดหยาบ 100 มก. และละลายด้วย chloroform (ChCl_3) ปริมาตร 2 มล. แล้วเติมด้วย sulfuric acid (H_2SO_4) 2 มล. สังเกตผลการทดสอบ หากสารละลายมี terpenoids จะปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลช่วงรอยต่อระหว่างชั้นของสารละลาย

3.3 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเอทานอลจากพืชวงศ์ขมิพู่ 4 ชนิด ต่อการเจริญของพืชปลูก

ในการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อป้องกันกำจัดโรคพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับผักทานใบ สารสกัดพืชที่จะนำมาใช้ ต้องมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราแล้ว และต้องไม่เป็นพิษต่อพืชด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบพืชวงศ์ขมิพู่ 4 ชนิด ต่อพืชปลูก ดังนี้

3.3.1 อิทธิพลต่อการงอกของเมล็ดผักสลัด

ผสมสารสกัดพืชแต่ละชนิดด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อผสม dimethyl sulfoxide ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (10% DMSO) ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดพืชเท่ากับ 5,000, 25,000 และ 50,000 ppm นำเมล็ดผักสลัดแช่ในสารสกัดที่เตรียมไว้เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเมล็ดผักสลัดมาวางบนกระดาษเพาะที่ใส่น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 5 มล. ในจานเพาะเชื้อขนาด 9 ซม. จำนวน 4 จาน จานละ 25 เมล็ด และนำจานทั้งหมดไปวางใน growth chamber ที่อุณหภูมิ 25 °ซ ให้แสง 12 ชม. สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำนิ่งฆ่าเชื้อผสม 10% DMSO ไม่ผสมสารสกัดแทน วางแผนการทดลองแบบ 4×4 factorial in Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ โดยกำหนดให้ปัจจัย A คือ ชนิดของสารสกัด 4 ระดับ (EECV, EEMC, EESJ และ EESM) ในขณะที่ปัจจัย B คือ ความเข้มข้นของสารสกัด 4 ระดับ (0, 5,000, 25,000 และ 50,000 ppm) บันทึกผลการทดลองโดยการนับจำนวนเมล็ดงอก วัดขนาดความยาวของต้นและรากของต้นอ่อนผักสลัด

3.3.2 อิทธิพลต่อการเจริญของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ 4×4×2 factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น โดยกำหนดให้ปัจจัย A คือ ชนิดของสารสกัด 4 ระดับ (EECV, EEMC, EESJ และ EESM) ในขณะที่ปัจจัย B คือ ความเข้มข้นของสารสกัด 4 ระดับ (0, 5,000, 25,000 และ 50,000 ppm) และปัจจัย C คือ จำนวนครั้งของการฉีดพ่น 2 ระดับ (แบบฉีดพ่น 1 ครั้ง และแบบฉีดพ่น 2 ครั้ง) ดำเนินการทดสอบด้วยการเตรียมสารสกัดเช่นเดียวกับการทดสอบอิทธิพลต่อการงอกของเมล็ดผักสลัด สำหรับผักสลัด ทำการเตรียมพีชโดยเฉพาะเมล็ดผักลงบนฟองน้ำให้น้ำทุกวันจนงอกเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นให้สารละลายธาตุอาหารพีชความเข้มข้น EC = 1, pH = 5.8-6.2 (ดัดแปลงจาก Benoit and Ceustermans, 1995) เป็นเวลา 11 วัน แล้วจึงย้ายต้นอ่อนผักดังกล่าวไปปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์ (deep water culture : DWC) ให้สารละลายธาตุอาหารพีชความเข้มข้น EC = 1.6-1.8 mS/cm, pH = 5.8-6.2 ในกระบะปลูกพลาสติกขนาด 25 × 34 × 15 ซม. พร้อมเติมอากาศจากนั้นนำสารสกัดพีชที่เตรียมไว้ฉีดพ่นลงบนต้นผักสลัดที่อายุพีช 15 วัน ปริมาตร 2 มล. ต่อต้น ทั้งชุดการทดลองแบบฉีดพ่นครั้งเดียวและฉีดพ่น 2 ครั้ง แต่ชุดการทดสอบแบบฉีดพ่น 2 ครั้ง จะฉีดพ่นซ้ำบนพีชอายุ 30 วัน สำหรับชุดควบคุมจะฉีดพ่นน้ำนิ่งฆ่าเชื้อผสม 10% DMSO แต่ไม่ผสมสารสกัดแทนบันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนใบ วัดขนาดความยาวใบ วัดความเขียวของใบด้วยเครื่อง chlorophyll meter (SPAD-502, Konica Minolta Sensing, Inc., Japan) และชั่งน้ำหนักสดพีช

3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเหานอลจากพีชวงศ์ชมพูต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในสภาพห้องปฏิบัติการ

3.4.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดพีชวงศ์ชมพูต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา

A. brassicicola

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเหานอลจากใบพีชวงศ์ชมพู 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5,000, 15,000 และ 30,000 ppm ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* ด้วยวิธี Poisoned food technique และวางแผนการทดลองแบบ 4×4 factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยกำหนดให้ ปัจจัย A คือ ชนิดของสารสกัดพีช 4 ระดับ (EECV, EEMC, EESJ และ EESM) ปัจจัย B คือ ความเข้มข้นของสารสกัดพีชที่ทดสอบ 4 ระดับ (0, 5,000, 15,000 และ 30,000 ppm) ทำการเตรียมสารสกัดพีชแต่ละชนิด และผสมกับอาหาร PDA ให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการที่ระบุไว้ และเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นย้ายชิ้นวุ้นเชื้อราทดสอบ อายุ 7 วัน ขนาด 5 มม. ไปวางที่กึ่งกลางจานอาหารที่เตรียมไว้ สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำนิ่งฆ่าเชื้อผสม 10% DMSO (ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์) แทนสารสกัด บันทึกผลการทดลอง โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราทดสอบที่เวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน หลังการปลูกเชื้อ แล้วคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Growth inhibition : GI) ตามสูตร

$$GI (\%) = \frac{(\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราชุดควบคุม} - \text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราทดสอบ})}{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราทดสอบ}} \times 100$$

อีกทั้งนำค่าที่ได้ไปคำนวณค่า 50% effective concentration (EC₅₀) ด้วย

3.4.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสมีดขาวและใบแปรงล้าขูดต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola*

ในการทดลองนี้ได้ทำการคัดเลือกสารสกัดพืชที่แสดงผลยับยั้งดีที่สุด 2 ชนิดจากการทดลอง 3.4.1 คือสารสกัดจากใบเสมีดขาวและใบแปรงล้าขูด มาทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* ด้วยวิธี Spore germination test โดยเตรียม spore suspension ของเชื้อราทดสอบความเข้มข้น 10^6 spore/ml จากนั้นดูด spore suspension ดังกล่าว ปริมาตร 1 มล. ผสมสารสกัดพืชแต่ละชนิด ปริมาตร 1 มล. ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 1,000, 5,000, 10,000, 15,000 และ 50,000 ppm สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำนิ่งฆ่าเชื้อผสม 10% DMSO และ สารแมนโคแซบ 500 ppm แทนสารสกัดพืช นำไปป้อนที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 2 °C) บันทึกผลการทดลองโดยการสุ่มนับจำนวนการงอกของสปอร์ของเชื้อรา 100 สปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่เวลาทุก ๆ 12 ชม. จนถึง 72 ชม.

3.5 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสมีดขาวและใบแปรงล้าขูดต่อแมลงศัตรูพืชผัก

นอกจากเชื้อราสาเหตุโรคพืชแล้ว แมลงศัตรูของพืชผักก็เป็นปัญหาที่สำคัญในการเพาะปลูกพืช ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสมีดขาวและใบแปรงล้าขูดในการฆ่าและไล่เพลี้ยศัตรูผัก ซึ่งได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

3.5.1 อิทธิพลต่อการตายของแมลงศัตรูพืชผัก

ในการทดสอบการตายของแมลงศัตรูพืชผักนี้ ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย โดยเริ่มต้นด้วย 1) การทดสอบเบื้องต้น โดยทำการทดสอบสารสกัดจากใบเสมีดขาวและใบแปรงล้าขูดที่ระดับความเข้มข้น 2,000, 10,000 และ 20,000 ppm ต่อเพลี้ยอ่อนผักและเพลี้ยแป้ง วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ตัว โดยเริ่มจากการเตรียมสารสกัดพืชแต่ละชนิดให้ได้ตามความเข้มข้นที่ต้องการและเทราดลงบนกระดาดขนาด 5 ซม. แล้ววางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 5 ซม. จากนั้นย้ายแมลงศัตรูพืชลงในจานที่เตรียมไว้ สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำนิ่งฆ่าเชื้อผสม tween 20 ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ แทนสารสกัดพืช บันทึกผลการทดลองโดยสังเกตพฤติกรรมของแมลง และตรวจนับการตาย ที่ระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชม. จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายตามสูตร

$$\text{Mortality effect (\%)} = \frac{(\text{จำนวนแมลงที่มีชีวิตในชุดควบคุม} - \text{จำนวนแมลงที่มีชีวิตในชุดทดลอง})}{\text{จำนวนแมลงที่มีชีวิตในชุดควบคุม}} \times 100$$

ต่อมา 2) ทำการทดสอบเพื่อหาค่า 50% และ 90% Lethal concentration (LC) ด้วยการฆ่าเพลี้ยอ่อนและเพลี้ยแป้งของสารสกัดจากใบเสมีดขาวและใบแปรงล้าขูด ที่ระดับความเข้มข้น 2,500, 5,000, 10,000 และ 20,000 ppm ด้วยวิธี Paper contact technique โดยขยายการทดสอบและปรับระดับความเข้มข้นของสารสกัดให้มีช่วงที่แคบลง พร้อมทั้งนำค่าเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงไปคำนวณค่า LC_{50} และ LC_{90} โดยวางแผนการทดลองและดำเนินการทดลองเช่นเดียวกันกับการทดสอบเบื้องต้น แต่ใช้จานเพาะเชื้อขนาด 9 ซม. แทน

3.5.2 อิทธิพลต่อการไล่แมลงศัตรูพืชผัก

ทำการทดสอบสารสกัดพืชทั้ง 2 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 1,250, 2,500, 5,000 และ 10,000 ppm ในการไล่แมลงศัตรูพืช 2 ชนิด (เพลี้ยอ่อนผักและเพลี้ยแป้ง) ด้วยวิธีทางเลือก (choice method) เริ่มต้นโดยเตรียมสารสกัดพืชแต่ละชนิดให้ได้ตามความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นตัดกระดาษกรอง (ขนาด 9 ซม.) เป็น 2 ส่วนเท่ากัน (แต่ไม่ให้ขาดจากกัน เพื่อแบ่งขอบเขตการหยดสาร) และวางลงในจาน Petri plate ดูดสารสกัดพืชที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มล. หยดลงบนครึ่งหนึ่งของกระดาษกรอง ในขณะที่อีกครึ่งหนึ่งของกระดาษใช้ tween 80 ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มล. จากนั้นย้ายแมลงทดสอบวางที่กึ่งกลางกระดาษกรองที่เตรียมไว้ วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ตัว บันทึกผลการทดลองโดยสังเกตพฤติกรรมของแมลงทดสอบ และนับจำนวนแมลงในแต่ละส่วนของกระดาษกรอง แล้วนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การไล่ ตามสูตร

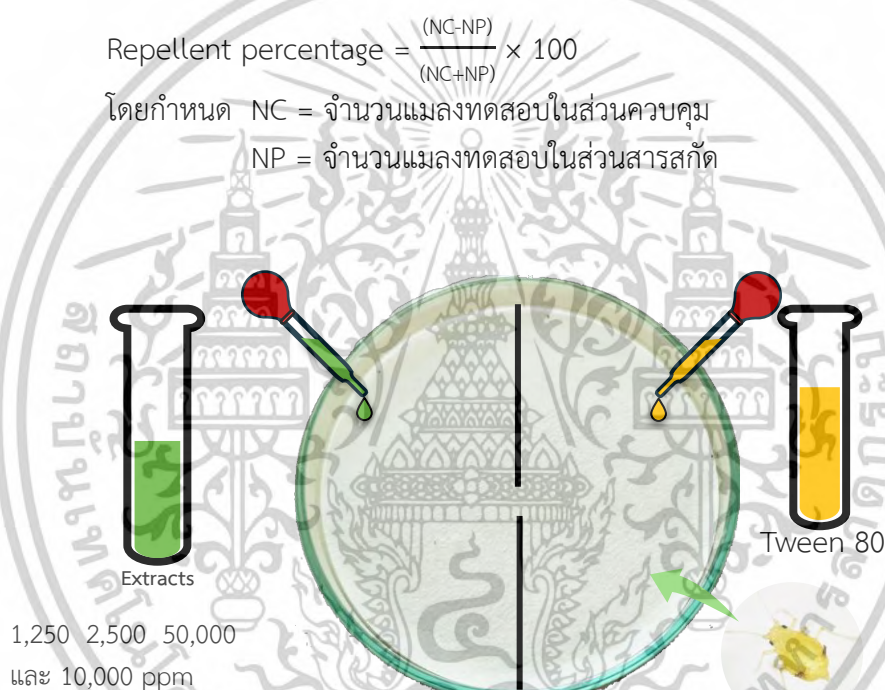


Figure 3.1 Selected method for repellent effect test.

3.6 การวิเคราะห์พฤษเคมีของสารสกัดใบเสมีดขาวและใบแปรงล้างขวด

โดยทั่วไปแล้วพฤษเคมีของพืชจะเป็นสารอินทรีย์ ในรูปแบบสารระเหยและสารไม่ระเหย ดังนั้นในการวิเคราะห์พฤษเคมีจึงนิยมใช้ทั้งเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) และ Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (LC-MS) เพื่อหาและจัดจำแนกสารต่าง ๆ ในพืช ให้ครอบคลุมสารออกฤทธิ์ให้มากที่สุด โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.6.1 เทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

การวิเคราะห์พฤษเคมีของสารสกัดจากใบเสมีดขาว (95%EEMC) และใบแปรงล้างขวด (95%EECV) โดยวิธี GC-MS ดัดแปลงวิธีการจาก Al-Abd et al. (2015) และ Hassan et al. (2022) ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph-Mass Spectrometer, 7890 B GC-5977A MSD (Agilent)

Technologies, Inc., USA) โดยตั้งค่าสภาวะดังนี้ คอลัมน์ HP-5 Ultra Inert column (30 m x 250 μ m x 0.25 μ m, Agilent Technologies) ใช้แก๊ส Helium (He) เป็น carrier gas ตั้งสภาวะการไหลของแก๊สด้วยอัตรา 40 ซม./วินาที อุณหภูมิคอลัมน์จะตั้งโปรแกรมโดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 60 °ซ เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้นในอัตรา 7 °ซ ต่อนาที จนถึงอุณหภูมิสูง 150 °ซ (คงอุณหภูมิ 1 นาที) และปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้นในอัตรา 2 °ซ ต่อนาที จนถึงอุณหภูมิสูง 230 °ซ (คงอุณหภูมิ 1 นาที) จากนั้นปรับเป็นอัตรา 15 °ซ ต่อนาที จนถึงอุณหภูมิสูง 300 °ซ (คงอุณหภูมิ 15 นาที) ฉีดสารตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร (μ L) แบบ split mode 10:1 ส่วนของ MS เป็น single quadrupole acquisition ที่ต่อตรงกับ GC ซึ่งผ่าน transfer line ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 150 °ซ และอุณหภูมิของ Ion source เป็น 230 °ซ ตั้งระบบ scan mode ในช่วง 35 – 600 m/z . จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบและจัดจำแนกกับฐานข้อมูลของ MassHunter Workstation Software Quantitative Analysis Version B.09.00 Unknown Analysis

3.6.2 เทคนิค Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (LC-MS)

การวิเคราะห์พหุขเคมีของสารสกัดจากพืชทั้ง 2 ชนิด ด้วยเทคนิค LC-MS-QTOF ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Al-Abd et al. (2015) ใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer-Quadrupole-Time of Flight [ExonLCTM AD Series (LC) and X500R QTOF System (QTOF),-SCIEX] แบบ dual electrospray ionization (ESI) ใช้คอลัมน์ 2.1 mm (i.d) Narrow-BoreSB-C18 (length 150 mm, particle size 3.5 μ m) ปริมาณการฉีด 1 μ L ตั้งค่าสภาวะต่าง ๆ ดังนี้ อุณหภูมิการฉีดและคอลัมน์เท่ากับ 25 °ซ อัตราการไหล 0.4 มล.ต่อนาที โดยใช้ 0.1% formic acid ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำ เป็นตัวทำละลาย A และ formic acid ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ใน acetonitrile เป็นตัวทำละลาย B ส่วนของ MS จะใช้ ESI capillary voltage of (+) 4000 V แบบ positive ion modes ด้วยกำลัง 125 V และตั้งค่าการฉีดเท่ากับ 45 psi ในอัตรา 10 ลิตรต่อนาที โดยใช้ nitrogen gas ที่อุณหภูมิ 300 °ซ จากนั้นข้อมูลที่ได้นำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล SCIEX OS 2.1.0

3.7 การศึกษาศักยภาพของสารสกัดเอทานอลจากพืชวงศ์ขมิพู่ในการควบคุมโรคใบจุด

Alternaria และการชักนำเอนไซม์ความต้านทานโรคของผักสลัดในสภาพโรงเรือน

จากผลการทดลองในสภาพห้องปฏิบัติการ สารสกัดจากใบเสมีดขาวแสดงประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญทางเส้นใยและการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* ได้อย่างดี ในขณะที่สารสกัดจากใบแปรงล้าขวดนอกจากจะแสดงประสิทธิภาพยับยั้งได้ตรงจากสารสกัดใบเสมีดขาวแล้ว ยังแสดงผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัดได้ดี ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดี ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสมีดขาวและแปรงล้าขวดในการควบคุมโรคใบจุด *Alternaria* รวมทั้งผลในการชักนำเอนไซม์ความต้านทานโรคในผักสลัด

3.7.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้างขวดในการยับยั้งโรคใบจุด *Alternaria*

3.7.1.1 ผลของสารสกัดใบเสม็ดขาว

การเตรียมและวางแผนการทดลอง

ทำการเตรียมกล้าผักสลัดเพื่อใช้ในการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2 จากนั้นเตรียมสารสกัดที่จะทดสอบ ที่ระดับความเข้มข้น 15,000 และ 50,000 ppm และฉีดพ่นลงบนต้นกล้าผักสลัดที่เตรียมไว้ ปริมาณ 1 มล.ต่อต้น เมื่อระยะเวลาผ่านไป 1 วันหลังการฉีดพ่นสารสกัด ทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคที่จะทดสอบลงบนใบผักสลัด จำนวน 3 ใบต่อต้น (2 จุดต่อใบ) และใช้ถุงพลาสติกคลุมพร้อมให้ความชื้น วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ (ซ้ำละ 3 ต้น) โดยมีกรรมวิธีทดสอบดังนี้

T1 = Healthy control
T2 = Inoculated control
T3 = Chemical control (mancozeb 500 ppm)
T4 = 95% EEMC (15,000 ppm)
T5 = 95% EEMC (50,000 ppm)

ผลต่อความรุนแรงของโรคใบจุด

สังเกตการเกิดโรคและวัดขนาดของแผลที่ระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 วันหลังการปลูกเชื้อ จากนั้นนำค่าขนาดแผลที่ได้ไปจัดคะแนนขนาดแผล คือ 0 – 4 ระดับ โดย 0 = ไม่มีการติดเชื้อ; 1 = แผลขนาด 1 – 5 มม.; 2 = แผลขนาด 5 – 10 มม.; 3 = แผลขนาด 10 – 15 มม. และ 4 = ขนาดแผลมากกว่า 15 มม. และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงโรค ตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงโรค} = \frac{\sum (\text{จำนวนใบที่เกิดโรค} \times \text{คะแนนขนาดแผล})}{\text{จำนวนใบทั้งหมด} \times \text{คะแนนขนาดแผลสูงสุด}} \times 100$$

นอกจากนี้ยังประเมินการเจริญเติบโตของผักสลัด ได้แก่ จำนวนใบ ขนาดความยาวใบ ความเขียวของใบ (chlorophyll meter (SPAD-502, Konica Minolta Sensing, Inc., Japan)) และน้ำหนักสด

3.7.1.2 ผลของสารสกัดใบแปรงล้างขวด

ในการทดลองนี้จะเตรียมและดำเนินการทดลอง รวมทั้งประเมินความรุนแรงโรคเช่นเดียวกับการทดลอง 3.7.1.1 โดยมีกรรมวิธีทดสอบดังนี้

T1 = Healthy control
T2 = Inoculated control
T3 = Chemical control (mancozeb 500 ppm)
T4 = 50% EECV (15,000 ppm)
T5 = 50% EECV (50,000 ppm)
T6 = 95% EECV (15,000 ppm)
T7 = 95% EECV (50,000 ppm)

3.7.2 ศักยภาพของสารสกัดจากใบเสมีดขาวและใบแปรงล้างขวดในการชักนำเอนไซม์ ความต้านทานโรคของผักสลัด

3.7.2.1 ผลของสารสกัดใบเสมีดขาว

ในเวลาเดียวกันกับการประเมินโรค ได้ทำการประเมินกิจกรรมเอนไซม์ไปพร้อมกัน ที่ระยะเวลา ก่อนการฉีดพ่นสารสกัด 1 วัน และหลังการปลูกเชื้อ 1, 3, 5 และ 7 วันหลังการปลูกเชื้อ ด้วยการเก็บใบพืชที่ทดสอบมาบดละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) จากนั้นนำตัวอย่างพืชที่บดได้ปริมาณ 1 กรัม ผสมในสารละลาย sodium phosphate buffer (1 M, pH 7) ปริมาตร 2 มล. เขย่าและนำปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 10,000 รอบต่อ นาที หลังจากนั้นนำส่วนใส (supernatant) ไปหากิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase, chitinase และ peroxidase โดยดัดแปลงวิธีจาก Verburg and Huynh (1991), Boller and Mauch (1988), Gupta et al. (2013) และ Selvaraj and Ambalavanan (2013)

กิจกรรม β -1,3-glucanase: ตูด supernatant ปริมาตร 62.5 μ L ผสมกับ laminarin (4% w/v in 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5.0) ปริมาตร 62.5 μ L บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม DNS ปริมาตร 375 μ L แล้วนำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ค่าที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน glucose และรายงานผลของกิจกรรมเป็นหน่วย μ mol glucose/g of fresh leaves

กิจกรรม chitinase: ตูด supernatant ปริมาตร 0.4 มล. ผสมด้วย colloidal chitin (0.1% w/v in 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5.0) อัตราส่วน 1:1 และเติม N-acetyl glucosamine (GlcNAc) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชม. จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร ค่าที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน GlcNAc และรายงานผลของกิจกรรมเป็นหน่วย μ mol GlcNAc/g of fresh leaves

กิจกรรม peroxidase: ตูด supernatant ปริมาตร 100 μ L ใส่ในสารละลาย 0.05 M pyrogallol ปริมาตร 1.5 มล. เริ่มปฏิกิริยาด้วยการเติม H₂O₂ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มล. วัดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรม ด้วยเครื่อง spectrophotometer ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ทุก 30 วินาที จนถึง 3 นาที จากนั้นคำนวณค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปต่อนาทีมาสร้างเป็นสมการเชิงเส้นเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนรวมที่ได้จากการสกัดข้างต้น และรายงานผลของกิจกรรมเป็นหน่วย unit/ g of fresh leaves

3.7.2.2 ผลของสารสกัดใบแปรงล้างขวด

ในการทดลองนี้จะเตรียมและดำเนินการทดลอง รวมทั้งประเมินกิจกรรมเอนไซม์ต้านทานโรคพืช 3 ชนิด เช่นเดียวกับการทดลอง 3.7.2.1

3.7.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความรุนแรงโรคใบจุดและเอนไซม์ความต้านทานโรคพืชที่ได้รับการกระตุ้นของผักสลัด

เพื่อที่จะเข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงโรคกับเอนไซม์ที่ได้รับการกระตุ้นของผักสลัด และเพื่อเป็นการยืนยันถึงบทบาทของเอนไซม์ดังกล่าวในการจัดการโรคใบจุด ดังนั้นจึงทำการคำนวณค่าสหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient: r) ระหว่างความรุนแรงโรคกับกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase, chitinase และ peroxidase นอกจากนี้ยังพัฒนาและวิเคราะห์การถดถอยด้วยสมการถดถอย ($Y = a + bx$) เพื่อนำไปใช้ในการพยากรณ์ค่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอนไซม์สำหรับนำไปใช้ในการควบคุมโรคใบจุด

3.8 แนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าชวดในการควบคุมโรคใบจุด *Alternaria* ในผักสลัด

ผลจากการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบเสม็ดขาวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคใบจุดได้เป็นอย่างดี ในขณะที่สารสกัดจากใบแปรงล้าชวดมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญของผักสลัดที่โดดเด่น และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคอยู่ในระดับหนึ่ง แต่ก็ยังคงต้องใช้ความเข้มข้นที่สูง (50,000 ppm) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงจะเป็นการหาแนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าชวดในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด *Alternaria* ในผักสลัด โดยมุ่งเน้นด้วยการผสมสารสกัดจากพืชทั้งสองชนิดเพื่อควบรวมคุณสมบัติที่เด่นของสารสกัดทั้ง 2 ชนิด และการลดขนาดอนุภาคของสารสกัด เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการแทรกซึมได้ดียิ่งขึ้น โดยรวม เพื่อมุ่งหมายที่จะให้ได้ประสิทธิภาพที่สูงที่สุดของสารสกัด ในขณะที่ลดความเข้มข้นของสารสกัดที่จะนำไปใช้ลง

3.8.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดผสมจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าชวดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในสภาพห้องปฏิบัติการ

การศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดผสมจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าชวดที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* ด้วยวิธี Poisoned food technique และวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ โดยการนำสารสกัดแต่ละชนิดไปละลายด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อผสม 10% DMSO ในอัตราส่วนระหว่างใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าชวด (0:0, 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 และ 0:100) จากนั้นนำสารสกัดดังกล่าวผสมลงใน PDA ให้ได้ความเข้มข้น 5,000 ppm และเทลงในจานเพาะเชื้อขนาด 5 ซม. จากนั้นย้ายชิ้นวุ้นเชื้อราทดสอบขนาด 5 มม. ไปวางกึ่งกลางจานอาหารที่เตรียมไว้ สำหรับชุดควบคุมจะใช้น้ำนิ่งฆ่าเชื้อผสม 10% DMSO (0:0) แทน นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 2 °ซ) บันทึกผลการทดลอง โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราทดสอบที่เวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน หลังการปลูกเชื้อ แล้วคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Growth inhibition : GI) ตามข้อ 3.4.1

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดผสมต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* นั้น จะใช้สารสกัดที่เตรียมไว้ข้างต้นมาทดสอบในการทดลองนี้ ด้วยวิธี Spore germination test และวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ โดยผสมสารสกัดแต่ละอัตราส่วนกับ spore suspension ของเชื้อราทดสอบ (10^6 spore/ml) ลงในหลอด microtube ให้

ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 5,000 ppm นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 2 °C) บันทึกผลการทดลอง โดยการสูบน้ำจำนวนการออกสปอร์เชื้อรา 100 สปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่เวลาทุก ๆ 12 ชม. จนถึง 72 ชม.

3.8.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครจากใบเสมีตขาวและใบแปรงล้าขวด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในสภาพห้องปฏิบัติการ

เมื่อผลการทดสอบสารสกัดผสมจากใบเสมีตขาว (MC) และใบแปรงล้าขวด (CV) ข้างต้น แสดงผลการยับยั้งได้เป็นอย่างดี แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดผสมดังกล่าว 3 อัตราส่วน (75:25 50:50 และ 25:75) ยับยั้งได้เพียงช่วง 41.5-80.5 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ สารสกัดผสมจากพืชทั้ง 2 ชนิด ให้ดียิ่งขึ้น จึงทำการลดขนาดอนุภาคของสารสกัดผสม โดยเตรียม สารสกัดจากพืชแต่ละชนิดให้ได้ความเข้มข้น 100,000 ppm จากนั้นนำสารสกัดดังกล่าวไปลดขนาด อนุภาคด้วยเครื่อง High-Pressure Homogenizer (Microfluidics M-110P) พร้อมทั้งวัดขนาด อนุภาคทั้งก่อนและหลังลดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Micromeritics-Nanoplus อย่างไรก็ตามในการ ลดขนาดอนุภาคของสารสกัด ได้คาดหวังให้ขนาดอนุภาคอยู่ในระดับนาโน แต่ด้วยลักษณะของสาร สกัด และประกอบกับสารออกฤทธิ์ที่ได้มีขนาดใหญ่ จึงทำให้สามารถลดได้เพียงขนาดไมโคร

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* ด้วยวิธี Poisoned food technique โดยมีอัตรา ส่วนผสมและวิธีการดำเนินการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.8.1 (การทดสอบประสิทธิภาพต่อการ เจริญทางเส้นใยของเชื้อรา) แต่วางแผนการทดลองแบบ 6×2 factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดย กำหนดให้ ปัจจัย A คือ อัตราส่วนของการผสม 6 ระดับ (0:0, 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 และ 0:100) ปัจจัย B คือ ขนาดอนุภาค 2 ระดับ (สูตรผสมธรรมดา และสูตรผสมอนุภาคไมโคร)

3.8.3 อิทธิพลของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครจากใบเสมีตขาวและใบแปรงล้าขวด ในการควบคุมโรคใบจุดในสภาพโรงเรือน

สำหรับการทดลองนี้จะเป็นการศึกษาอิทธิพลของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครจากใบเสมีต ขาวและใบแปรงล้าขวดที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm ในการลดโรคใบจุด และผลต่อการ เจริญเติบโต รวมทั้งอิทธิพลในการชักนำเอนไซม์ต้านทานโรคพืชของผักสลัดในสภาพโรงเรือน ซึ่งจะ ดำเนินงานทดลองด้วยระบบไฮโดรโปนิคส์ (DWC) และเตรียมผักสลัดที่ทดสอบเช่นเดียวกันกับข้อ 3.3.2

3.8.3.1 ผลต่อการลดโรคใบจุด

ดำเนินการเตรียมสารสกัดผสมอนุภาคไมโครจากพืชทดสอบตามข้อ 3.8.2 จากนั้นนำไปฉีดพ่นลงบนต้นอ่อนผักสลัด (อายุ 14 วัน) ที่เตรียมไว้ข้างต้น ปริมาตร 1 มล. ต่อต้น จากนั้นทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคด้วยชิ้นวุ้นเชื้อรา *A. brassicicola* ขนาด 5 มม. บนใบพืช 3 ใบ ต่อต้น (2 ชั้น ต่อใบ) หลังฉีดพ่นสารสกัดผสมจากพืช 1 วัน และใช้ถุงพลาสติกคลุมพร้อมให้ความชื้น วางแผนการทดลองแบบ 6×2 factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ (ซ้ำละ 3 ต้น) โดยกำหนดให้ ปัจจัย A คือ อัตราส่วนของการผสม 6 ระดับ (0:0, 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 และ 0:100) ปัจจัย B คือ ขนาดอนุภาค 2 ระดับ (สูตรผสมธรรมดา และสูตรผสมอนุภาคไมโคร) และเพิ่มชุดควบคุมสารเคมี

แมนโคเซบ 500 ppm และชุดควบคุมพืชปกติ บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้น ที่ระยะเวลา 1, 3, 5, 7 และ 14 วันหลังการปลูกเชื้อ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดโรคตามสูตร

$$\text{Disease reduction (\%)} = \frac{(\text{ขนาดแผลในกรรมวิธีควบคุม} - \text{ขนาดแผลในกรรมวิธีทดสอบสารสกัดผสม})}{\text{ขนาดของแผลในกรรมวิธีควบคุม}} \times 100$$

3.8.3.2 ผลต่อการเจริญเติบโตของผักสลัด

บันทึกผลการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ จำนวนใบ ความยาวใบ ความเขียวของใบ และน้ำหนักสด หลังฉีดพ่นสารสกัด เช่นเดียวกับข้อ 3.3.2

3.8.3.3 ผลในการชักนำเอนไซม์ความต้านทานโรคพืช

ในหัวข้อนี้จะดำเนินการและบันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.7.2

3.8.4 อิทธิพลของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครที่ระดับความเข้มข้นสูงจากใบเสม็ดขาว และใบแปรงล้าขาวในการควบคุมโรคใบจุด *Alternaria* และการชักนำเอนไซม์ความต้านทานโรคของผักสลัดในสภาพโรงเรือน

จากผลการทดลองในข้อ 3.8.3 สารสกัดผสมอนุภาคไมโครมีประสิทธิภาพในการลดโรคใบจุดลงได้ และยังส่งเสริมให้การเจริญเติบโตของผักสลัดเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นแนวโน้มที่ดี ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการคัดเลือกสารสกัดผสมอัตราส่วน 75:25, 50:50 และ 25:75 มาเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10,000 ppm โดยคาดหวังว่าประสิทธิภาพการยับยั้งโรคจะสูงขึ้นด้วย วางแผนแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น โดยมีกรรมวิธีทดลองดังนี้

- | | | |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1) Healthy control | 2) Chemical control | 3) Untreated control |
| 4) MC:CV (75:25) × C | 5) MC:CV (75:25) × M | 6) MC:CV (50:50) × C |
| 7) MC:CV (50:50) × M | 8) MC:CV (25:75) × C | 9) MC:CV (25:75) × M |

ผลต่อการลดโรคใบจุด

ดำเนินงานทดสอบและทำการเก็บผลทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.8.3.1

ผลต่อการเจริญเติบโตของผักสลัด

ดำเนินงานทดสอบและทำการเก็บผลทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.8.3.2

ผลในการชักนำเอนไซม์ความต้านทานโรคพืช

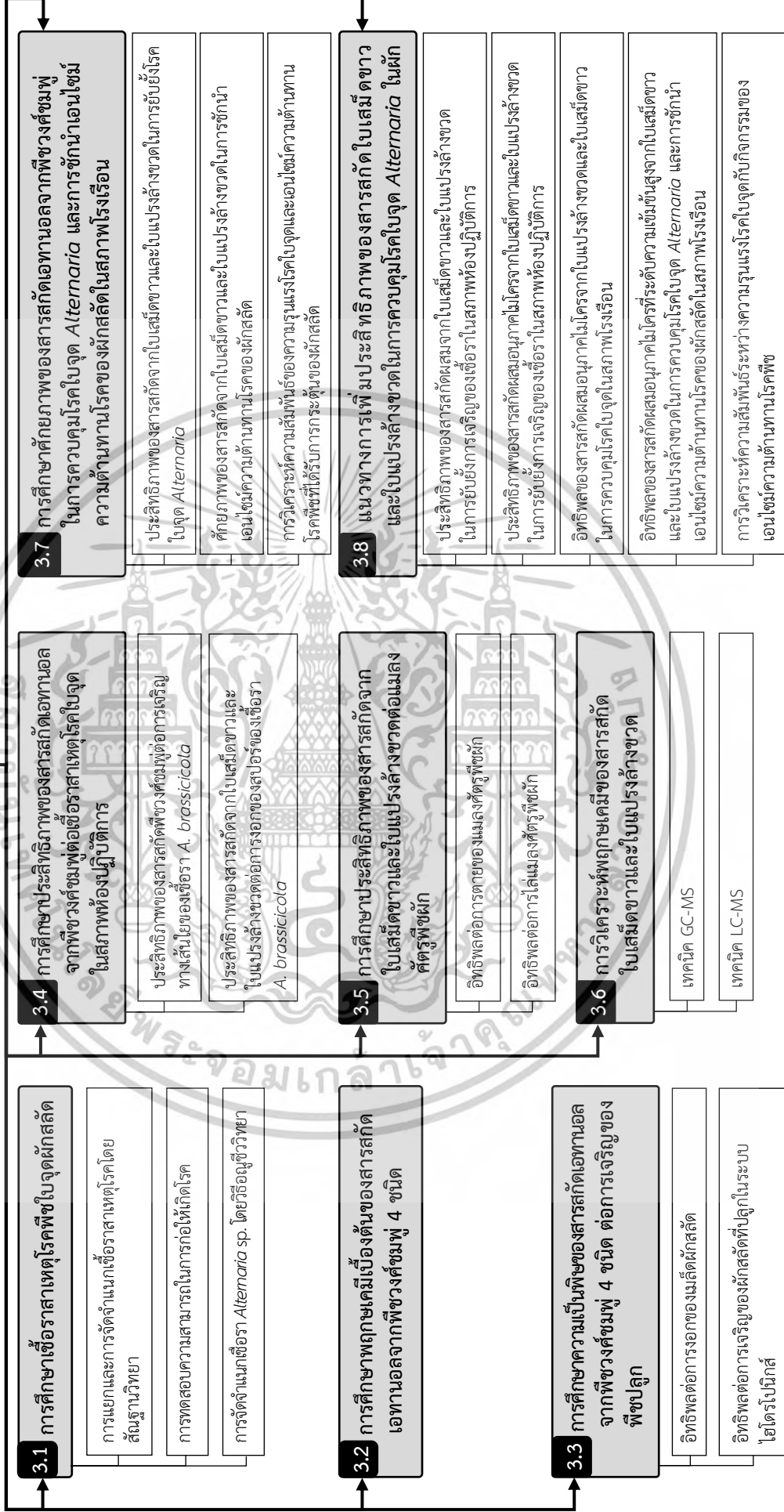
ดำเนินงานทดสอบและทำการเก็บผลทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.8.3.3

3.8.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงโรคใบจุดกับกิจกรรมของเอนไซม์ความต้านทานโรคพืช

ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงโรคกับกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase, chitinase และ peroxidase รวมทั้งสมการถดถอย เช่นเดียวกับข้อ 3.7.3

วิธีการดำเนินงานวิจัยทั้งหมดได้แสดงเป็นผังงานวิทยานิพนธ์ดังต่อไปนี้

ผังงานวิทยานิพนธ์



บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคพืชใบจุดผักสลัด

4.1.1 การแยกและการจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคโดยสัณฐานวิทยา

ผลการแยกเชื้อราจากอาการโรคใบจุดในผักสลัด พบเชื้อรา 2 ไอโซเลท (Alt-LL1 และ Cur-LL2) ส่วนการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า เชื้อรา Alt-LL1 มีอัตราการเจริญทางเส้นใยบนอาหาร PDA 0.6-1 ซม.ต่อวัน โคลนีสีน้ำตาลดำ เส้นใยเป็นแบบ septate hypha สีน้ำตาลดำ conidia มีรูปร่างแบบพิน ขนาด $1.5 - 2 \times 120-150 \mu\text{m}$ เจริญต่อกันแบบเส้นสาย (Figure 4.1) ในขณะที่ เชื้อรา Cur-LL2 มีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA 1.2-1.5 ซม. ต่อวัน โคลนีสีน้ำตาลดำ เส้นใยเป็นแบบ septate hypha สีน้ำตาล ส่วน conidia มีรูปร่างโค้ง คล้าย croissant ขนาด $7.86-17.52 \times 19-30 \mu\text{m}$ เจริญบน conidiophore (Figure 4.1) ซึ่งสอดคล้องกับ Woudenberg *et al.* (2013) และ Wonglom *et al.* (2018) ที่ได้ระบุว่าลักษณะดังกล่าวเป็นเชื้อรา *Alternaria* spp. และ *Curvularia* sp. ตามลำดับ

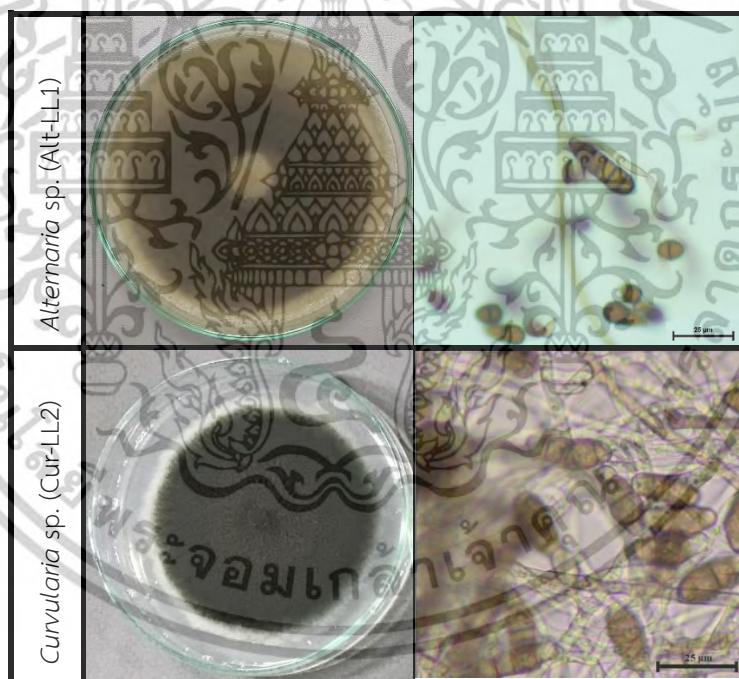





Figure 4.1 Cultural and morphological characteristics of *Alternaria* sp. (Alt-LL1) and *Curvularia* sp. (Cur-LL2).

4.1.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค

การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. ด้วยวิธี Detached leaf test พบว่า เชื้อราทดสอบทั้ง 2 ชนิด สามารถก่อโรคกับใบของผักสลัดได้ โดยแสดงการเกิดโรค เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และความรุนแรงโรคเท่ากับ 85 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 5 วันหลังการปลูกเชื้อ สำหรับการทดสอบกับเชื้อรา *Alternaria* sp.

ใบผักสลัดแสดงอาการแผลตายสีน้ำตาลซ้อนทับเป็นแบบเป่ากระสุน และรอบแผลมีวงสีเหลือง (yellow halo) มีขนาดแผลเท่ากับ 23 มม. ซึ่งใหญ่กว่าขนาดแผลที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia* sp. ที่มีขนาดเพียง 6.6 มม. โดยลักษณะแผลเป็นจุดและมีแผลตายสีน้ำตาล (Table 4.1) ซึ่งผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเชื้อราทั้ง 2 สกุล (genus) เป็นเชื้อสาเหตุโรคในผักสลัด อีกทั้งเชื้อรา *Alternaria* sp. สร้างความเสียหายกับใบพืชทดสอบมากที่สุด และยังสามารถคล้อยกับรายงานหลายฉบับที่ระบุว่า เชื้อราทั้งสองชนิดเป็นสาเหตุโรคทางใบและเมล็ดของผักทานใบ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Alternaria* sp. ที่สามารถพบได้ทั่วไป ในพืชวงศ์กระหล่ำ (Michereff *et al.*, 2012; Nowicki *et al.*, 2012; Pornsuriya *et al.*, 2018; Wonglom *et al.*, 2018)

Table 4.1 Pathogenicity test of *Alternaria* sp. and *Curvularia* sp. on lettuce leaf.

Treatment	Incidence (%)		Severity (%)		Symptom 5 DAI
	3 DAI ²	5 DAI	3 DAI	5 DAI	
Control	0c ¹	0c	0c	0c	
<i>Alternaria</i> sp.	100a	100a	75a	85a	
<i>Curvularia</i> sp.	60b	100b	12b	40b	

¹Values are means of three replicates. Values in each column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test ($P>0.05$).

²DAI= Day after inoculation
Black scale bar = 10 mm.

4.1.3 การจัดจำแนกเชื้อรา *Alternaria* sp. โดยวิธีทางอณูชีววิทยา

การจัดจำแนกเชื้อรา *Alternaria* species (Alt-LL1) ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา (ITS identification) โดยการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ ความยาว 568 คู่เบส และเมื่อนำลำดับคู่เบสไปเปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐาน GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ 551 จาก 554 คู่ มีความคล้ายกับ *A. brassicicola* ไอโซเลท AC70 และ *A. brassicicola* ไอโซเลท PAba1 ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสามารถจัดจำแนกได้ว่า เชื้อราไอโซเลท Alt-LL1 เป็น *A. brassicicola* (OR226735) ซึ่งผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Pongpisutta *et al.* (2023) ที่ได้ทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดจากผักสลัดในฟาร์มปลูกผัก ประเทศไทย และจัดจำแนกโดยวิธีทางอณูชีววิทยา พบเป็นเชื้อรา *A. brassicicola* เช่นเดียวกัน นอกจากนี้แล้ว Haituk *et al.* (2023) และ Phuakjaiphaeo and Kunasakdakul (2015) ได้รายงานว่าการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของพืชตระกูลกระหล่ำ ในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อศึกษาในระดับอณูชีววิทยาเป็นเชื้อรา

4.2 การศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเอทานอลจากพืชวงศ์ชมพู่ 4 ชนิด

การศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัด 95% ethanol จากใบพืชวงศ์ชมพู่ 4 ชนิด ได้แก่ phenols, flavonoids, tannins, alkaloids และ terpenoids (Table 4.2) จากการตรวจสอบ พบสารออกฤทธิ์ phenols, flavonoids และ tannins จากสารสกัดพืชทั้ง 4 ชนิด ยิ่งไปกว่านั้น สารสกัด 95%EEMC จะพบ phenols, flavonoids สูงเป็นพิเศษ (high presence) ขณะที่ terpenoids พบเฉพาะใน 95%EEMC และ 95%EECV เท่านั้น ส่วน alkaloids ไม่พบในสารสกัดทั้งหมด ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยหลายฉบับที่ระบุว่าพืชหลายชนิดในวงศ์ Myrtaceae สามารถตรวจพบสารพฤกษเคมีที่ทดสอบได้หลายกลุ่ม (phenols, flavonoids, tannins, alkaloids และ terpenoids) เช่น สารสกัดจากผลของ *M. cajuputi* (Isnaini *et al.*, 2023) สารสกัดจาก *C. viminalis* (Salem *et al.*, 2017) สารสกัดจากใบและเปลือกของ *S. jambos* (Wamba *et al.*, 2018) สารสกัดจากใบของ *S. malaccense* (Patel *et al.*, 2019) และสารสกัดจากใบ *Psidium cattleianum* (Faleiro *et al.*, 2016) นอกจากนี้ยังตรวจพบสารพฤกษเคมีเหล่านี้ในสารสกัดจากพืชอื่น ๆ ด้วย (Tiwari *et al.*, 2011; Gurjar *et al.*, 2012)

Table 4.2 Phytochemical compounds of 95% ethanolic crude extracts from leaves of 4 Myrtaceae plants.

Phytochemical compound	Plant extract			
	EEMC ¹	EECV	EESJ	EESM
phenols	++ ²	+	+	+
flavonoids	++	+	+	+
tannins	+	+	+	+
alkaloids	-	-	-	-
terpenoids	+	+	-	-

¹EEMC = Ethanolic extract of *M. cajuputi*, EECV = *C. viminalis*, EESJ = *S. jambos*, EESM = *S. malaccense*

²++ = high presence, + = moderate presence, - = absence

4.3 การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเอทานอลจากพืชวงศ์ชมพู 4 ชนิด ต่อการเจริญของพืชปลูก

4.3.1 อิทธิพลต่อการงอกของเมล็ดผักสลัด

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเอทานอลจากพืชวงศ์ชมพู 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 25,000 และ 50,000 ppm ต่อการงอกของเมล็ดผักสลัด พบว่า สารสกัดจากพืชวงศ์ชมพูทั้ง 4 ชนิด ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ ไม่เป็นพิษต่อเมล็ดของผักสลัด และสารสกัดบางชนิดยังกระตุ้นการงอกอีกด้วย นอกจากนี้แล้ว หากพิจารณาด้านการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ พบว่า ทั้งปัจจัยชนิดของสารสกัดพืช ปัจจัยความเข้มข้นของสารสกัด และปัจจัยรวมทั้ง 2 ปัจจัย มีผลต่อการงอก ความยาวลำต้นและรากของผักสลัด (5 วันหลังการทดสอบ) กล่าวคือ การแช่เมล็ดผักสลัดด้วยสารสกัดใบแปรงล้างขวด (95%EECV) ความเข้มข้น 25,000 ppm แสดงผลต่อการงอกของเมล็ดผักสลัดสูงสุด เท่ากับ 98.48 เปอร์เซ็นต์ รองมาคือ สารสกัดใบชมพูมะเหมี่ยว (95%EESM) แสดงการงอกเท่ากับ 91.66 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (74.66 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้สารสกัดอื่น แสดงการงอกอยู่ในช่วง 91.66-72.98 เปอร์เซ็นต์ (Table 4.3) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Carmello and Cardoso (2018) ที่ระบุว่าการใช้สารสกัดน้ำจากดอกกานพลู (Myrtaceae) อบเชยและผักชี ไม่เป็นพิษและยังแสดงการงอกของเมล็ดผักสลัดได้ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม และ Teixeira *et al.* (2018) ก็ได้รายงานในคล้ายกันว่า การใช้สารสกัดน้ำจากฝรั่ง (Myrtaceae) ไม่เป็นพิษต่อการงอกของเมล็ดผักสลัดและคะน้า ซึ่งทำให้การงอกของเมล็ดผักทั้ง 2 ชนิดมีเปอร์เซ็นต์การงอกได้ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แต่อย่างไรก็ตาม การใช้สารสกัดชมพูน้ำดอกไม้ (95%EESJ) ความเข้มข้น 50,000 ppm แสดงการงอกต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 61.66 เปอร์เซ็นต์ (Table 4.3)

นอกจากนี้แล้ว สำหรับความยาวลำต้น การใช้สารสกัดเสม็ดขาว (95%EEMC) ความเข้มข้น 5,000 และ 25,000 ppm จะแสดงความยาวต้นมากที่สุด เท่ากับ 22.52 และ 22.02 มม. ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (18.92 มม.) และการใช้สารสกัดชมพูน้ำดอกไม้ (95%EESJ) ความเข้มข้น 50,000 ppm แสดงความยาวลำต้นน้อยที่สุด เท่ากับ 18.35 มม.

ส่วนด้านความยาวรากนั้น พบว่า การใช้สารสกัดจากใบแปรงล้างขวด (95%EECV) ความเข้มข้น 25,000 ppm ใบชมพูน้ำดอกไม้ (95%EESJ) ความเข้มข้น 5,000 และ 25,000 ppm รวมทั้งสารสกัดจากใบชมพูมะเหมี่ยว (95%EESM) ความเข้มข้น 5,000 ppm แสดงความยาวรากอยู่ในช่วง 16.60 - 17.83 มม. ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่แสดงความยาวรากเท่ากับ 17.40 มม. ยิ่งไปกว่านั้น การใช้สารสกัดในกรรมวิธีอื่น ๆ กลับส่งผลให้มีความยาวรากน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อยู่ในช่วง 13.86 - 15.83 มม. (Table 4.3)

Table 4.3 Effect of different concentrations of ethanolic extracts from Myrtaceae leaves on seed germination and seedling growth of lettuce

Extracts	Concentrations	Seed germination (%)	Hypocotyl length (mm)	Radicle length (mm)
95%EEMC	0 ppm	74.66cd ¹	18.92ef	17.40ab
	5,000 ppm	85.07bc	22.52a	14.20ef
	25,000 ppm	81.66bcd	22.02ab	14.46ef
	50,000 ppm	80.00bcd	20.75bcd	15.53c-f
95%EECV	0 ppm	74.66cd	18.92ef	17.40ab
	5,000 ppm	81.11bcd	19.52c-f	15.83b-e
	25,000 ppm	98.48a	19.09def	17.83a
	50,000 ppm	72.98de	21.07abc	15.43c-f
95%EESJ	0 ppm	74.66cd	18.92ef	17.40ab
	5,000 ppm	81.66bcd	19.85c-f	17.06abc
	25,000 ppm	83.33bcd	20.85abc	17.23abc
	50,000 ppm	61.66e	18.35f	14.80def
95%EESM	0 ppm	74.66cd	18.92ef	17.40ab
	5,000 ppm	91.66ab	20.15cde	16.60a-d
	25,000 ppm	84.82bc	18.92ef	13.86f
	50,000 ppm	85.00bc	18.59ef	14.16ef
	CV (%)	8.80	5.17	7.11
	Extracts	**	**	**
	Concentrations	*	**	**
	Extracts x Concentrations	*	**	**

¹Values are means of 3 replicates. Values in each column followed by the same letter are not significantly different according to LSD ($P>0.05$).

4.3.2 อิทธิพลต่อการเจริญของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์

การศึกษาอิทธิพลของสารสกัดจากใบพืชวงศ์ชมพู่ 4 ชนิด ว่ามีผลด้านลบต่อพืชปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์หรือไม่ โดยทำการศึกษาปัจจัยชนิดของสารสกัด ความเข้มข้นของสารสกัด และจำนวนครั้งในการฉีด ซึ่งผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากพืชวงศ์ชมพู่ทั้ง 4 ชนิด ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ ไม่เป็นพิษต่อผักสลัดเลย กล่าวคือไม่มีอาการผิดปกติ เช่น ใบเหลือง และใบไหม้ (Table 4.4) ส่วนในแง่การเจริญเติบโต พบว่า ทุกปัจจัยที่ศึกษาไม่มีผลต่อความเขียว (SPAD value) ของผักสลัด อีกทั้งผักสลัดที่ถูกฉีดพ่นด้วยสารสกัดจากพืชในทุกระบบวิธีมีค่าความเขียวไม่แตกต่างกัน จากชุดควบคุม อยู่ในช่วง 30.5-33.8 อย่างไรก็ตามในแง่ของผลผลิต (น้ำหนักสด) กลับพบว่าปริมาณน้ำหนักของผักสลัดขึ้นอยู่กับปัจจัยชนิดของสารสกัดและความเข้มข้นของสารที่ฉีดพ่นเท่านั้น แต่จำนวนการฉีดไม่มีผลต่อน้ำหนักสด กล่าวคือ ผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยสารสกัด 95%EECV ทุกความเข้มข้นสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัดได้มากที่สุด ส่งผลให้น้ำหนักสดอยู่ในช่วง 65.5-70.2 กรัมต่อต้น ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (39-43.5 กรัม) (Table 4.4 และ Figure 4.2) นอกจากนี้แล้ว การเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจะส่งผลให้น้ำหนักสดของพืชสูงขึ้นตามด้วย

จากผลการทดสอบผลต่อการงอกเมล็ด ความเป็นพิษ และการเจริญเติบโตของผักสลัด แสดงให้เห็นว่า สารสกัดทั้ง 4 ชนิด ไม่เป็นพิษต่อผักสลัด ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมา (Somnuek *et al.*, 2020) ที่พบว่า การฉีดพ่นสารสกัดจากใบแปรงล้างขวดที่สกัดด้วย ethanol 3 ความเข้มข้น (50%, 70% และ 95%EECV) ความเข้มข้น 5,000-50,000 ppm ไม่เป็นพิษต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของผักสลัด นอกจากนี้แล้ว การใช้สารสกัดน้ำจากพืชดังกล่าวยังไม่เป็นพิษต่อข้าวและยังส่งเสริมการเจริญเติบโตที่มากขึ้นด้วย ไม่เพียงแต่สารสกัดจากแปรงล้างขวดเท่านั้น ยังมีรายงานอีกหลายฉบับซึ่งรายงานว่า โดยทั่วไปแล้ว สารสกัดจากพืชวงศ์ชมพู่ จะไม่เป็นพิษต่อพืชปลูก เช่น *Myrcia tomentosa* (Imatomi *et al.*, 2013), *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh (Rita *et al.*, 2017), *Eucalyptus globulus* (Puig *et al.*, 2018), กานพลู (clove), ทีทรี (tea tree), องุ่นบราซิล (jaboticaba) และ ฝรั่ง (guava) (Carmello and Cardoso, 2018; Teixeira *et al.*, 2018) อีกทั้งยังมีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (ทั้งด้านเปอร์เซ็นต์การงอก อัตราการงอก จำนวนใบ ความยาวราก และผลผลิต) ในผักสลัดด้วย แต่ในทางตรงกันข้ามการใช้สารสกัด *Myrcia vittoriana* (Myrtaceae) กลับเป็นพิษต่อผักสลัด (Vasconcelos *et al.*, 2022)

จากผลการทดสอบข้างต้น แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบพืชวงศ์ชมพู่ 4 ชนิด ไม่เป็นพิษต่อผักสลัด ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของสารสกัดที่จะนำไปใช้งาน ดังนั้นจึงควรนำสารสกัดดังกล่าวไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งต่อการเจริญของเชื้อรา *A. brassicicola* ทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและในสภาพโรงเรือนต่อไป

Table 4.4 Phytotoxicity test of 95% ethanolic crude extracts from 4 Myrtaceae plants on lettuce grown in hydroponics

Plant extract	Concentration	Application time ²	Phytotoxicity ³ (3 DAT)	SPAD ⁴ value	Fresh weight (g/plant)
EECV	0 ppm	One time	-	31.6a ¹	40.9c
		Two times	-	30.2a	42.5c
	5,000 ppm	One time	-	31.4a	65.5b
		Two times	-	31.5a	67.3ab
	25,000 ppm	One time	-	30.8a	68.9ab
		Two times	-	32.4a	67.4ab
	50,000 ppm	One time	-	32.5a	68.3ab
		Two times	-	30.7a	70.2a
EEMC	0 ppm	One time	-	33.4a	40.9c
		Two times	-	32.2a	42.5c
	5,000 ppm	One time	-	33.2a	39.0c
		Two times	-	31.6a	43.5c
	25,000 ppm	One time	-	30.6a	40.1c
		Two times	-	32.2a	41.1c
	50,000 ppm	One time	-	31.3a	40.6c
		Two times	-	31.9a	40.1c
EESJ	0 ppm	One time	-	32.0a	40.9c
		Two times	-	30.6a	42.5c
	5,000 ppm	One time	-	33.8a	40.4c
		Two times	-	33.2a	39.6c
	25,000 ppm	One time	-	32.0a	41.1c
		Two times	-	32.0a	39.4c
	50,000 ppm	One time	-	32.0a	40.2c
		Two times	-	30.8a	41.2c
EESM	0 ppm	One time	-	32.0a	40.9c
		Two times	-	32.8a	42.5c
	5,000 ppm	One time	-	32.0a	39.0c
		Two times	-	30.5a	39.2c
	25,000 ppm	One time	-	32.0a	40.2c
		Two times	-	30.2a	40.0c
	50,000 ppm	One time	-	32.3a	40.6c
		Two times	-	32.5a	40.4c
C.V. (%)			4.56	7.59	
Plant extract			ns	**	
Concentration			ns	**	
Application time			ns	ns	
Plant extract × Concentration			ns	**	
Plant extract × Application time			ns	ns	
Concentration × Application time			ns	ns	
Plant extract × Concentration × Application time			ns	ns	

¹Values are means of 3 replicates. Values in each column followed by the same letter are not significantly different according to LSD ($P>0.05$).

²Application time: For one time group, the spray was made at 15 days. For two times group, sprays were made at 15 and 30 days.

³ - showing non-phytotoxicity, + showing phytotoxicity

⁴SPAD = Soil Plant Analysis Development (SPAD) chlorophyll meter

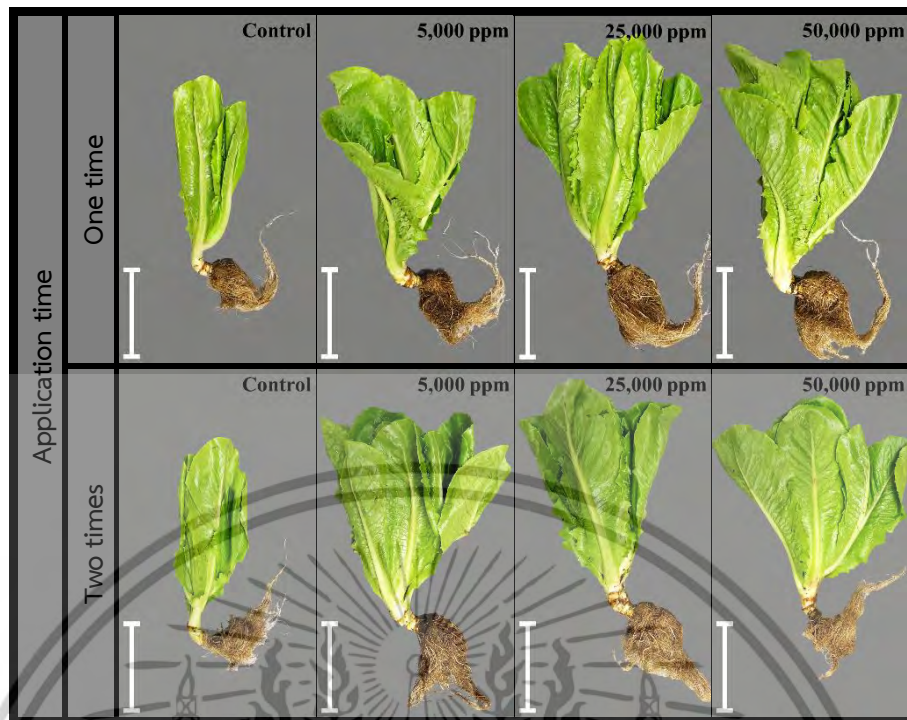


Figure 4.2 A photo (at harvest) showing non-phytotoxicity and plant growth stimulating effect of 95% ethanolic extract of *C. viminalis* (95% EECV) spraying onto lettuce in hydroponics. Bar = 20 cm

4.4 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเอทานอลจากพืชวงศ์ขมฟู่ต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในสภาพห้องปฏิบัติการ

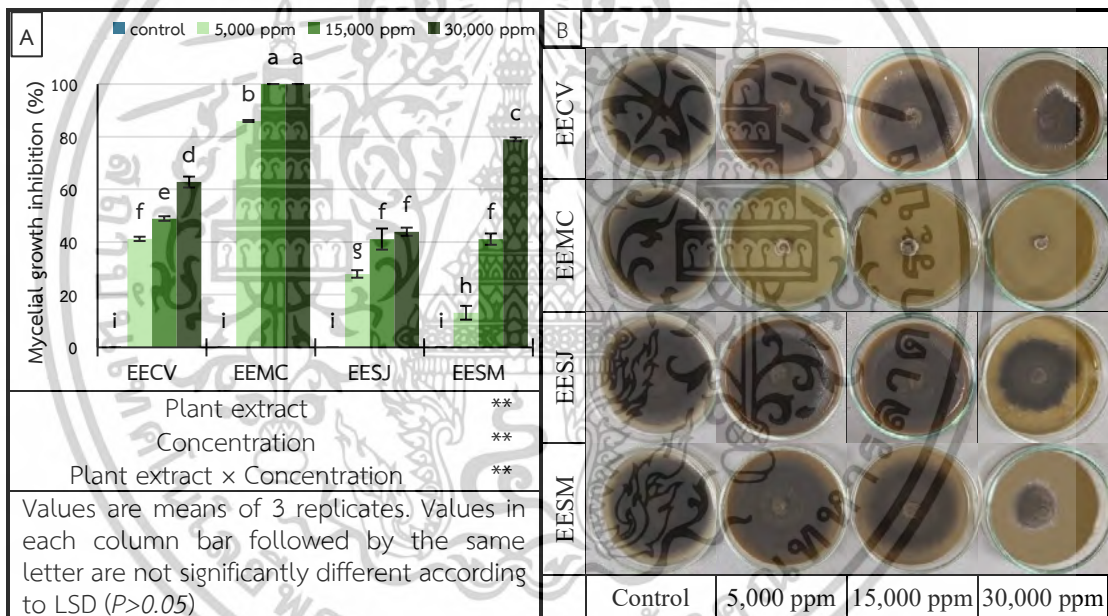
4.4.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดพืชวงศ์ขมฟู่ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา

A. *brassicicola*

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเอทานอลจากพืชวงศ์ขมฟู่ 4 ชนิด (95%EECV, 95%EEMC, 95%EESJ และ 95%EESM) ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 15,000 และ 50,000 ppm ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* ด้วยวิธี Poisoned food technique โดยศึกษาปัจจัยชนิดของสารสกัด และความเข้มข้นของสารสกัด พบว่า สารสกัดทุกชนิดและทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* ได้ ซึ่งประสิทธิภาพการยับยั้งขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบ (Figure 4.3) กล่าวคือ สารสกัด 95%EEMC มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญทางเส้นใยได้ดีที่สุด อยู่ในช่วง 85-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาคือ สารสกัด 95%EECV ยับยั้งได้ อยู่ในช่วง 40-63 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารสกัด 95%EESM และ 95%EESJ สามารถยับยั้งได้ 15-80 และ 30-40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อีกทั้งการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้น จะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพที่มากขึ้นด้วย ซึ่งความเข้มข้น 30,000 ppm มีประสิทธิภาพดีที่สุด ยกเว้น 95%EEMC ที่ความเข้มข้นทั้ง 15,000 และ 30,000 ppm แสดงประสิทธิภาพยับยั้งสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เท่ากัน (Figure 4.3) นอกจากนี้แล้ว จากการคำนวณค่า EC_{50} พบว่า 95%EEMC มีค่า EC_{50} น้อยที่สุดเท่ากับ 4,141.92 ppm ในขณะที่ 95%EECV และ 95%EESM มีค่า EC_{50} ใกล้เคียงกัน เท่ากับ 19,697.06 และ 19,117.62 ppm ส่วน 95%EESJ มีค่า EC_{50} มากที่สุด (Table 4.5) ซึ่งประสิทธิภาพการยับยั้งของสารสกัดจากพืชทั้ง 4 ชนิด ดังกล่าวข้างต้น น่าจะมีผลมาจากฟลาโวนอยด์ที่สามารถตรวจพบได้ในสารสกัด เช่น phenolics, flavonoids, tannins และ terpenoids ซึ่งสารออกฤทธิ์ดังกล่าวนี้ ถูกรายงานว่าเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้เป็นอย่างดี (Al-Abd *et al.*, 2015; Bharat and Praveen, 2016; Salem *et al.*, 2017; Patel *et al.*, 2019) โดยกลไกของสารออกฤทธิ์จะส่งผลไปรบกวนผนังเซลล์ ขัดขวางการทำงานของเอ็นไซม์ ทำให้โปรตีนเสียสภาพ และเป็นพิษ (Tiwari *et al.*, 2011; Gurjar *et al.*, 2012) ยิ่งไปกว่านั้น ผลการทดลองยังสอดคล้องกับการศึกษาฟลาโวนอยด์ของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด (ข้อ 4.2) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 95%EEMC ถูกตรวจพบชนิดของกลุ่มสารมากที่สุด ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Tiwari *et al.*, 2011; Gurjar *et al.*, 2012) อีกทั้งยังเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับรายงานวิจัยอื่น ๆ ที่ระบุว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ดขาว มีประสิทธิภาพอย่างยิ่งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* spp. (Pawar and Thaker, 2007; Siddique *et al.*, 2018), *Aspergillus* spp. (Thanaboripat *et al.*, 2007; Thanaboripat, 2011; Bharat and Praveen, 2016; Thanaboripat *et al.*, 2016; Siddique *et al.*, 2018), *Fusarium* spp. (Pawar and Thaker, 2007; Siddique *et al.*, 2018) และ *Penicillium digitatum* (Siddique *et al.*, 2018) นอกจากฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราแล้ว สารสกัดเมทิลแอลกอฮอล์จากเสม็ดขาวยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้อีกด้วย เช่น *Bacillus* spp., *Enterococcus faecalis* (Ukit *et al.*, 2019), *S. aureus*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, และ *Staphylococcus epidermidis* (Al-Abd *et al.*, 2015; Ukit *et al.*, 2019) ยิ่งไปกว่านั้น สารสกัด 95%EECV ในการทดลองนี้ยังคงยืนยันผลการทดลองที่ผ่านมาของผู้วิจัย ในการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ (Somnuek *et al.*, 2020)

ส่วนสารสกัด 95%EESJ ผลการยับยั้งสอดคล้องกับรายงานของ Sakander *et al.* (2015) ซึ่งระบุถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจากเมล็ดและใบชมพู้น้ำดอกไม้ สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Candida albicans*, *Microsporium canis* และ *M. gypseum* ได้เป็นอย่างดี อีกทั้ง Murugan *et al.* (2011) และ Mohanty and Cock (2010) รายงานว่าสารสกัดจากใบชมพู้น้ำดอกไม้ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ เช่น *Salmonella typhi*, *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* นอกจากนี้แล้ว ผลการยับยั้งเชื้อราจากสารสกัดของใบชมพู่มะเหมี่ยว ยังเหมือนกับการทดสอบของ Bouzada *et al.* (2009) ที่พบว่า สารสกัดจากใบชมพู่มะเหมี่ยวมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* และ *Shigella sonnei*

ผลจากการทดลองนี้ พอที่จะสรุปได้ว่าสารสกัดจากพืชวงศ์ชมพู้ทั้ง 4 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารสกัด 95%EEMC มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด รองลงมาคือ 95%EECV ดังนั้น สารสกัดทั้ง 2 ชนิด จึงถูกเลือกเพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดต่อไป



EECV = *Callistemon viminalis*; EEMC = *Melaleuca cajuputi*, EESJ = *Syzygium jambos*; EESM = *Syzygium malaccense*

Figure 4.3 Mycelial growth inhibition of *A. brassicicola* by different concentrations of 95% ethanolic extract of 4 Myrtaceae plants (A) and their growth on Petri dish (B).

Table 4.5 EC₅₀ of ethanolic extracts of 4 Myrtaceae plants.

Myrtaceae extracts	EC ₅₀ (ppm)
EECV	19,697.06
EEMC	4,141.92
EESJ	28,873.08
EESM	19,117.62

EECV = *Callistemon viminalis*; EEMC = *Melaleuca cajuputi*, EESJ = *Syzygium jambos*; EESM = *Syzygium malaccense*

4.4.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้างขวดต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola*

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้างขวดที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ถึง 50,000 ppm ต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria* sp. พบว่า ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดสอบการเจริญทางเส้นใย โดยสารสกัดที่ทดสอบทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้เป็นอย่างดี ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Figure 4.4) กล่าวคือ สารสกัด 95%EEMC ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 - 50,000 ppm มีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราทดสอบได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งได้ 90.66 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบของสารสกัด 95%EEMC ยังพบสปอร์ที่ผิดปกติ เช่น สปอร์ยวบ ผนังเซลล์แตก และไม่งอก ในขณะที่การทดสอบ 95%EECV สารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ดีเช่นกัน โดยประสิทธิภาพการยับยั้ง 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถพบได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 10,000 ppm ขึ้นไป และจะพบลักษณะความผิดปกติของสปอร์ (สปอร์ยวบ) ในกรรมวิธีที่ความเข้มข้น 50,000 ppm เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Somnuek *et al.* (2020) ซึ่งพบว่า สารสกัดจากใบแปรงล้างขวดที่สกัดด้วย 50%, 70% และ 95% ethanol สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. ได้ ในขณะที่ Bouhlali *et al.* (2021) ซึ่งกล่าวว่า สารสกัดน้ำ (ร้อน) จากยูคาลิปตัส สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Mauginiella scaetiae*

โดยรวมจากผลการทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งต่อการเจริญทางเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria* sp. แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจะมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงขึ้นด้วย

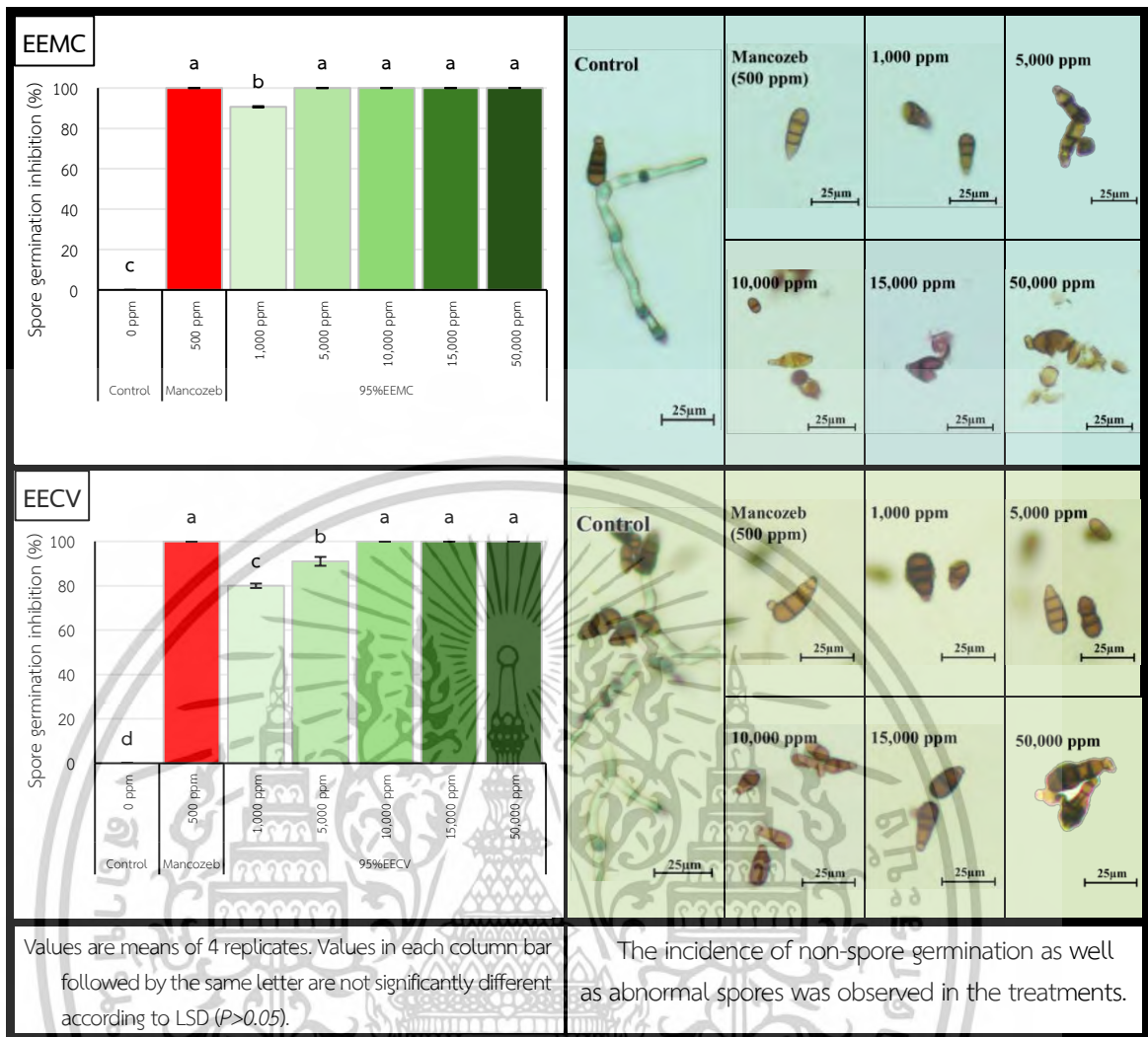


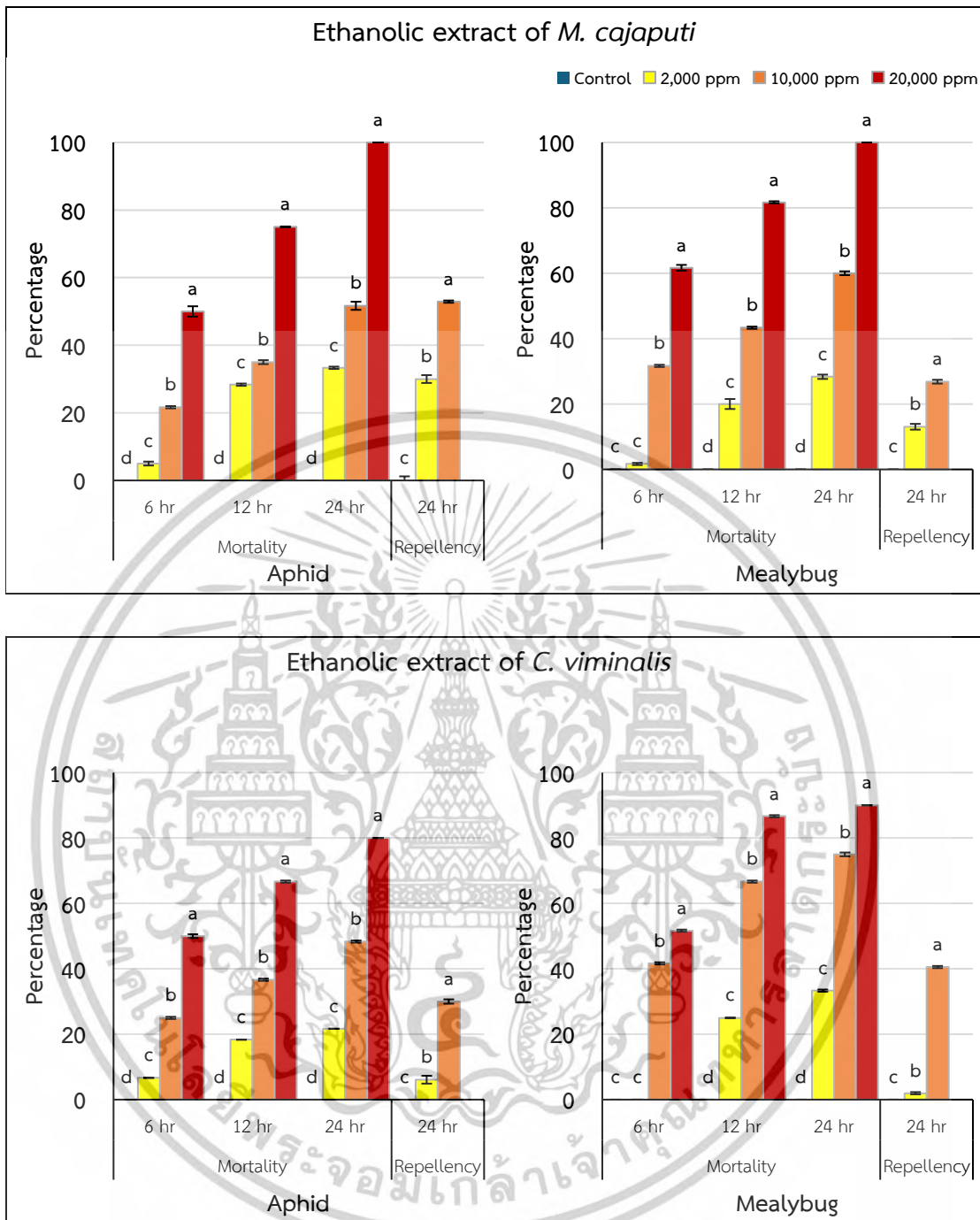
Figure 4.4 Bar graph showing inhibition effect of different concentrations of 95% ethanolic crude extracts from *M. cajuputi* (95% EEMC) and *C. viminalis* (95% EECV) on spore germination of *A. brassicicola*.

4.5 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสมี็ดขาวและใบแปรงล้างขวดต่อแมลงศัตรูพืชผัก

4.5.1 อิทธิพลต่อการตายของแมลงศัตรูพืชผัก

1) การทดสอบอิทธิพลเบื้องต้นของสารสกัดจากใบเสมี็ดขาวและใบแปรงล้างขวด (ที่ระดับความเข้มข้น 2,000, 10,000 และ 20,000 ppm) ต่อแมลงศัตรูพืช 2 ชนิด (เพลี้ยอ่อน และเพลี้ยแป้ง) พบว่า สารสกัดทั้ง 2 ชนิด (95%EEMC และ 95%EECV) มีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงทดสอบทั้ง 2 ชนิดได้ โดยสารสกัดความเข้มข้นสูงสุด (20,000 ppm) มีประสิทธิภาพฆ่าดีที่สุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยิ่งไปกว่านั้นสารสกัด 95%EEMC ความเข้มข้น 20,000 ppm มีประสิทธิภาพฆ่าเพลี้ยอ่อนและเพลี้ยแป้ง สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชม. ในขณะที่สารสกัด 95%EECV (20,000 ppm) สามารถฆ่าแมลงทั้ง 2 ชนิด อยู่ในช่วง 80-90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ความเข้มข้นต่ำ (2,000 ppm) สามารถฆ่าแมลงทดสอบได้เพียง 21-33 เปอร์เซ็นต์ (Figure 4.5)

นอกจากประสิทธิภาพการฆ่าแล้ว ยังสังเกตพฤติกรรมของแมลงที่ทดสอบ พบว่า แมลงที่ทดสอบมีการเดินบนกระดาษกรองที่มีสารสกัดอยู่ช่วงหนึ่ง จากนั้นมีพฤติกรรมการเดินที่เปลี่ยนไป คือ เดินช้าลง และเดินออกจากกระดาษกรองไปบริเวณขอบจานเพาะเชื้อ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารสกัดทดสอบทั้ง 2 ชนิด ในความเข้มข้นปานกลางและต่ำยังมีฤทธิ์ไล่แมลงได้ด้วย โดยสารสกัดความเข้มข้นปานกลาง (10,000 ppm) แสดงการไล่ได้มากกว่าสารสกัดความเข้มข้นต่ำ (2,000 ppm) ซึ่งสารสกัด 95%EEMC (10,000 ppm) มีประสิทธิภาพการไล่เพลี้ยอ่อนและเพลี้ยแป้งได้ 52 และ 26 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารสกัด 95%EECV (10,000 ppm) สามารถไล่แมลงทั้ง 2 ชนิด ได้ 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดความเข้มข้นต่ำทั้ง 2 ชนิด มีประสิทธิภาพการไล่ได้เพียง 2-30 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น (Figure 4.5)



Values are means of three replicates. Values in each hour followed by the same letter are not significantly different according to LSD ($P>0.05$).

Figure 4.5 Mortality and repellency percentage of aphid and mealybug caused by ethanollic extract of *M. cajaputi* and *C. viminalis* using paper contact method.

2) การทดสอบหาค่า LC_{50} และ LC_{90} โดยทำการทดสอบผลของสารสกัดใบเสมีดขาว และใบแปรงล้างขวดที่ระดับความเข้มข้น 2,500 5,000 10,000 และ 20,000 ppm ต่อการฆ่าแมลงศัตรูผัก 2 ชนิด (เพลี้ยอ่อนและเพลี้ยแป้ง) ด้วยวิธี Paper contact technique พบว่า สารสกัด 95%EEMC ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบมีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงศัตรูผักทั้งเพลี้ยอ่อนและเพลี้ยแป้งได้เป็นอย่างดี โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบแสดงประสิทธิภาพการฆ่าดีที่สุด กล่าวคือ ช่วงแรกของการทดสอบ (12 ชม.) สารสกัด 95%EEMC ทุกความเข้มข้นแสดงประสิทธิภาพการฆ่าแมลงศัตรูผักแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสกัดดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้น 20,000 ppm มีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงศัตรูผักที่ทดสอบทั้ง 2 ชนิด ได้ดีที่สุด ต่อมาที่เวลา 24 ชม. หลังการทดสอบ สารสกัดทุกความเข้มข้นที่ทดสอบแสดงประสิทธิภาพการฆ่าเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 20,000 ppm ยังคงแสดงประสิทธิภาพในการฆ่าเพลี้ยอ่อนและเพลี้ยแป้งดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 99 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ (36 ชม. หลังการทดสอบ) สารสกัดใบเสมีดขาวมีประสิทธิภาพมากขึ้น แสดงการตายของแมลงทดสอบทั้งสองชนิด สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ความเข้มข้น 10,000 ppm มีการตายเท่ากับ 83 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Table 4.6)

ส่วนการทดสอบอทธิพลของสารสกัดจากใบแปรงล้างขวด (95%EECV) ผลการทดสอบเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับสารสกัดเสมีดขาว (95%EEMC) กล่าวคือ สารสกัด 95%EECV ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบมีฤทธิ์ในการฆ่าเพลี้ยอ่อนและเพลี้ยแป้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ (20,000 ppm) มีฤทธิ์ฆ่ามากที่สุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งในช่วงแรกของการทดสอบ (12 ชม.) สารสกัด 95%EECV แสดงฤทธิ์การฆ่าเพลี้ยอ่อนและเพลี้ยแป้งอยู่ในช่วง 5-54 และ 6-73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชม. สารสกัดดังกล่าวมีประสิทธิภาพการฆ่าเพิ่มมากขึ้น อยู่ในช่วง 27-75 และ 28-87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง สารสกัดจากใบแปรงล้างขวดที่ระดับความเข้มข้น 20,000 ppm ยังคงมีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงทดสอบทั้ง 2 ชนิด ดีที่สุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Table 4.6)

สำหรับค่า LC_{50} และ LC_{90} พบว่า สารสกัด 95%EEMC มีค่า LC_{50} ของเพลี้ยอ่อนและเพลี้ยแป้งเท่ากับ 2,671 และ 2,981.2 ppm ตามลำดับ ในขณะที่ ค่า LC_{90} เท่ากับ 14,101.1 และ 12,819.2 ppm ตามลำดับ ส่วน 95%EECV มีค่า LC_{50} เท่ากับ 2,541 และ 3,801.6 ppm ตามลำดับ ทั้งยังมีค่า LC_{90} เท่ากับ 13,931.4 และ 12,901.6 ppm (Table 4.6)

Table 4.6 Mortality percentage, LC₅₀ and LC₉₀ of aphid and mealybug caused by ethanolic extract of *Callistemon viminalis* (EECV) and *Melaleuca cajuputi* (EEMC) using paper contact method.

Tested extract	Mortality (%)						LC ₅₀ (ppm)		LC ₉₀ (ppm)	
	Aphid (Ap)			Mealybug (Mb)			Ap	Mb	Ap	Mb
	12 h	24 h	36 h	12 h	24 h	36 h				
Control	0e	0d	0e	0e	0e	0d	2671	2981.2	14101.1	12819.2
95%EEMC	2,500 ppm	7d	35c	49d	8d	33d				
	5,000 ppm	28c	42c	72c	22c	40c				
	10,000 ppm	46b	69b	83b	55b	72b				
	20,000 ppm	86a	99a	100a	81a	95a				
Control	0e ¹	0e	0e	0e	0e	0e	2541	3801.6	13931.4	12901.6
95%EECV	2,500 ppm	5d	27d	43d	6d	28d				
	5,000 ppm	22c	37c	66c	20c	38c				
	10,000 ppm	30b	56b	87b	65b	77b				
	20,000 ppm	54a	75a	100a	73a	87a				

¹Values are means of three replicates. Values in each column within each plant extract followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test ($P>0.05$). EECV = Ethanolic extract of *Callistemon viminalis*; EEMC = Ethanolic extract of *Melaleuca cajuputi*

4.5.2 อิทธิพลต่อการไล่แมลงศัตรูพืชผัก

อิทธิพลของสารสกัดใบเสมีดขาวและใบแปรงล้าขูดที่ระดับความเข้มข้น 1,250 2,500 5,000 และ 10,000 ppm ต่อการไล่เพลี้ยอ่อนและเพลี้ยแป้งศัตรูผัก ด้วยวิธีทางเลือก พบว่า สารสกัด ทั้ง 2 ชนิด ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบสามารถไล่แมลงศัตรูผักที่ทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสารสกัดความเข้มข้นที่สูงขึ้น จะแสดงประสิทธิภาพการไล่เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ซึ่งในช่วง 12 ชม. สารสกัด ทั้ง 95%EEMC และ 95%EECV จะเริ่มแสดงประสิทธิภาพการไล่ได้อย่างชัดเจน เมื่อใช้สารสกัดที่ ระดับความเข้มข้น 2,500 ppm ขึ้นไป สามารถไล่ได้ 10-100 และ 14-100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสิ้นสุด การทดลอง (24 ชม.) สารสกัดทดสอบทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm แสดงประสิทธิภาพ การไล่แมลงศัตรูผักทั้ง 2 ชนิด สูงที่สุด โดยสารสกัด 95%EEMC สามารถไล่แมลงได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วน 95%EECV สามารถไล่เพลี้ยอ่อนและเพลี้ยแป้งได้ 90 และ 86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการทดสอบที่ความเข้มข้น 2,500 -5,000 ppm ของสารสกัด 95%EEMC และ 95%EECV ก็ยังคงประสิทธิภาพการไล่ได้ดี ระดับหนึ่ง อยู่ในช่วง 28-62 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบจะเห็นได้ว่าสารสกัด 95%EEMC มีประสิทธิภาพการไล่มากกว่า 95%EECV (Table 4.7)

Table 4.7 Repellency percentage of ethanolic extract of *C. viminalis* (EECV) and *M. cajuputi* (EEMC) against aphid and mealybug using paper contact method.

Tested extract		Repellency (%)			
		Aphid		Mealybug	
		12 h	24 h	12 h	24 h
95%EEMC	Control	0d	0d	0c	0e
	1,250 ppm	6cd	24c	8c	22d
	2,500 ppm	16c	58b	10c	28c
	5,000 ppm	44b	62b	32b	56b
	10,000 ppm	100a	100a	100a	100a
95%EECV	Control	0d ¹	0d	0d	0d
	1,250 ppm	0d	16c	0d	14c
	2,500 ppm	22c	54b	14c	44b
	5,000 ppm	48b	56b	28b	50b
	10,000 ppm	88a	90a	86a	86a

¹Values are means of three replicates. Values in each column within each plant extract followed by the same letter are not significantly different according to LSD ($P>0.05$).

EECV = Ethanolic extract of *Callistemon viminalis*; EEMC = Ethanolic extract of *Melaleuca cajuputi*

โดยทั่วไปแล้ว สารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากพืชหลายชนิด รวมทั้งพืชในวงศ์ชมพู่จะมีฤทธิ์ในการไล่แมลงได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเสมีดขาว (น้ำมันเสมีด) มักใช้ไล่แมลงศัตรูคนอยู่แล้วในอดีต แถบภาคใต้ของประเทศไทย อีกทั้งผลจากการทดสอบข้างต้น น่าจะพอยืนยันได้ว่าสารสกัดจากใบเสมีดขาวและใบแปรงล้างขวดมีประสิทธิภาพการฆ่าและการไล่แมลงศัตรูผักได้เป็นอย่างดี โดยสามารถฆ่าและไล่เพลี้ยอ่อนและเพลี้ยแป้งได้สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ที่ระดับความเข้มข้นสูง (20,000 และ 10,000 ppm) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าว สอดคล้องกับนักวิจัยหลายท่านที่พบว่าพืชในวงศ์ชมพู่สามารถฆ่าและไล่แมลงได้ (Ndomo *et al.*, 2010; Sannongmueang *et al.*, 2017; Majeed *et al.*, 2018; Sannongmueang *et al.*, 2018) ยิ่งไปกว่านั้น Sannongmueang *et al.* (2018) พบว่า สารสกัดหยาบจาก *Callistemon lanceolatus* ที่ใช้ตัวทำละลาย hexane, acetone และ ethanol ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ สามารถแสดงความเป็นพิษและไล่เพลี้ยแป้งได้ ในขณะที่ Visheentha *et al.* (2018) ได้รายงานว่า สารสกัด hexane, dichloromethane และ methanol จาก ต้นเสมีดขาว (*M. cajuputi* stem) สามารถฆ่ามดไม้ (*Camponotus* sp.) ได้ ส่วน Showler (2017) ระบุว่า น้ำมันหอมระเหยจาก *Syzygium*, *Melaleuca* และ *Eucalyptus* (Myrtaceae) มีผลฆ่าและไล่แมลงวัน horn flies และ stable flies ได้ ซึ่งผลในการฆ่าและไล่แมลงของสารสกัดจากพืชและน้ำมันหอมระเหยน่าจะส่งผลมาจากพฤษเคมีในพืชนั้น ๆ เช่น phenols, flavonoids, alkaloids และ terpenoids โดยสารออกฤทธิ์จะมีกลไกทั้งแบบ broad-spectrum action หรือ multiple modes of action รวมทั้ง antifeedant repellency และ toxicity ต่อแมลงศัตรูพืชและสัตว์ (Cheraghi Niroumand *et al.*, 2016; Hematpoor *et al.*, 2017; Hikal *et al.*, 2017; Salem *et al.*, 2017; Showler, 2017)

4.6 การวิเคราะห์พฤกษเคมีของสารสกัดใบเสมีดขาวและใบแปรงล้างขวด

ผลการวิเคราะห์พฤกษเคมีของสารสกัดจากใบเสมีดขาว (95%EEMC) และใบแปรงล้างขวด (95%EECV) ด้วยเทคนิค GC-MS และ LC-MS-QTOF ได้แสดงไว้ใน Table 4.7 และ 4.8 โดยระบุถึง retention time, molecular formula, m/z, peak area รวมทั้งฤทธิ์ของสารประกอบแต่ละชนิดที่เคยมีรายงานไว้ ดังนี้

4.6.1 เทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

การวิเคราะห์พฤกษเคมีด้วยเทคนิค GC-MS ของสารสกัดใบเสมีดขาว (95%EEMC) พบสารพฤกษเคมีทั้งหมด 41 ชนิด ซึ่งสามารถจัดจำแนกได้เป็น terpenoids 41 %, phenolics 1.95 %, flavonoids 0.32 %, naphthalene และ aromatics 8.85 % รวมทั้งสารประกอบอื่น อีก 41.99 % สำหรับสารกลุ่ม terpenoids ถือเป็นองค์ประกอบหลัก พบสารในกลุ่มนี้ทั้งหมด 28 ชนิด โดยสาร phytol พบมากที่สุดถึง 14 % ของสารพฤกษเคมีทั้งหมด รองลงมา คือ 10,10-dimethyl-2,6-dimethylenebicyclo[7.2.0]undecan-5 β -ol (3.89 %), caryophyllene epoxide (2.53 %), aromadendrene epoxide (2.45 %) และ selin-6-en-4 α -ol (2.12 %) ในขณะที่สารกลุ่ม phenolics พบสาร ethyl α -d-glucopyranoside (1.66 %) และ 2-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde, TMS derivative (0.26 %) สำหรับสารกลุ่ม flavonoids พบสารประกอบ pinostrobin (0.32%) เพียงชนิดเดียวเท่านั้น (Table 4.8 และ 4.9)

สำหรับการวิเคราะห์ของสารสกัดใบแปรงล้างขวด (95%EECV) ซึ่งแสดงไว้ใน Table 4.7 และ 4.8 พบกลุ่มสารเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ 95%EEMC กล่าวคือ สารพฤกษเคมีที่พบทั้งหมด 45 ชนิด โดยสารทั้งหมดส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่ม terpenoids (30.04 %) เป็นองค์ประกอบหลัก และพบสาร 1,8-cineole ปริมาณมากที่สุด เท่ากับ 14 % ของสารพฤกษเคมีทั้งหมด รองลงมาคือ α -phellandrene (2.04 %), γ -sitosterol (1.91 %) และ L- α -terpineol (1.42 %) ถัดมาคือสารกลุ่ม phenolics พบ 3.47 % [2'-hydroxy-5'-methoxyacetophenone, 3-methylbutylether (1.7 %) และ 2,6-di-tert-butyl-4-hydroxy-4-methylcyclohexa-2,5-dien-1-one (1.77 %)] สารกลุ่ม flavonoids พบ 5.27 เปอร์เซ็นต์ [prosogerin E (2.06 %) และ 4',7-di-O-methylnaringenin (1.79 %)] สารกลุ่ม aromatic และ fatty acids รวม 1.49 % รวมทั้งสารกลุ่ม quinones และ steroids รวม 3.81 % นอกจากนี้แล้ว สารในกลุ่มอื่น ๆ พบ 36.65 % (Table 4.8 และ 4.9)

4.6.2 เทคนิค Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (LC-MS)

การวิเคราะห์พฤกษเคมีด้วยเทคนิค LC-MS-QTOF ของสารสกัดทั้ง 2 ชนิด แตกต่างจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS กล่าวคือพบจำนวนชนิดสารที่ค่อนข้างน้อย 18 และ 23 ชนิด เท่านั้น ใน 95%EEMC และ 95%EECV ตามลำดับ ในการวิเคราะห์สารสกัด 95%EEMC ด้วยเทคนิคดังกล่าว พบกลุ่มสาร terpenoids (9.17 %) phenolics (19.49 %) กลุ่ม flavonoids และ naphthalene (5.55 %) กลุ่ม steroids และ benzofurans (7.79 %), กลุ่ม fatty acid และ glucosides (12.91 %) กลุ่ม vitamins (6.63 %) กลุ่ม ethylene glycol (26.25 %) และ กลุ่มสารประกอบอื่น ๆ อีก 9.31 % จะเห็นได้ว่าสารกลุ่ม ethylene glycol เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งพบสาร nonaethylene glycol (10.28 %) และ decaethylene glycol (10.42 %) รองลงมาคือ

สารกลุ่ม phenolics ได้แก่ acetaminophen (9.9 %), 3,5-di-tert-butyl-2-hydroxybenzaldehyde (6.81 %) และ 6-gingerol (2.75 %) ในขณะที่สารกลุ่ม terpenoids และวิตามิน พบสาร ingenol (9.17 %) และ R-lipoic acid (6.63 %) ตามลำดับ เพียงชนิดเดียวในสารแต่ละกลุ่มเท่านั้น (Table 4.8 และ 4.9)

สำหรับการวิเคราะห์สารสกัด 95%EECV พบชนิดของสาร มีความหลากหลายมากกว่า 95%EEMC โดยพบทั้งหมด 23 ชนิด และมีสารกลุ่ม fatty acids เป็นองค์ประกอบหลัก มากถึง 13.32 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ tafluprost (8.59%), 18-carboxy dinor leukotriene B4 (3.53%) และ 16,16-dimethylprostaglandin E2 (1.2%) ส่วนสารกลุ่ม flavonoids พบสาร leiocarposide (2.41%) และ peonidin cation (1.03%) ในขณะที่สารประกอบในกลุ่ม terpenoids, phenolics และ vitamins พบสารเพียงอย่างละชนิด ได้แก่ 11-keto- β -boswellic acid (6.96%) metaproterenol (5.33%) และ 1,25-dihydroxy vitamin D2 (2.07%) ตามลำดับ (Table 4.8 และ 4.9)

จากผลการวิเคราะห์พฤกษเคมีของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวข้างต้น พบกลุ่มสารประกอบ terpenoids มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Al-Abd *et al.* (2015) ซึ่งระบุว่า เสม็ดขาว (*M. cajuputi*) ที่พบในประเทศมาเลเซีย มีองค์ประกอบหลัก ได้แก่ terpenoids, phenolics, flavonoids aromatics และ fatty acids นอกจากนี้แล้ว จากการรวบรวมและสังเคราะห์ข้อมูลของ Isah *et al.* (2023) ในปีที่ผ่านมา ได้รายงานเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งพบว่า องค์ประกอบหรือพฤกษเคมีดังกล่าวสามารถพบได้ทั้งในสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาว ส่วนผลการวิเคราะห์สารสกัดจากใบแปรงล้าขวิด ยังคงสอดคล้องกับการรายงานของนักวิจัยหลายท่าน เช่น Salem *et al.* (2017), Ahmad and Athar (2016) และ de Oliveira *et al.* (2014) ได้กล่าวว่า terpenoids (1,8-cinole), phenolics และ flavonoids ตรวจพบได้และเป็นองค์ประกอบหลักในพืชแปรงล้าขวิด

จากผลที่กล่าวมาข้างต้น พอที่จะสรุปได้ว่า ทั้งสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวิดจะมีสารกลุ่ม terpenoids เป็นองค์ประกอบหลัก รองมาคือ phenolics, flavonoids และ ethylene glycol (Table 4.8 และ 4.9) และจากการรวบรวมข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบแต่ละชนิด ซึ่งแสดงไว้ใน Table 4.8 และ 4.9 ทำให้ทราบว่า สารประกอบส่วนใหญ่ที่พบในสารสกัดทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา แบคทีเรีย และต้านไวรัสได้ ยิ่งไปกว่านั้นฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารกลุ่ม terpenoids (phytol, 1,8-cineole, α -terpinene, terpinene-4-ol และ 11-Keto- β -boswellic acid) มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้หลายชนิด ได้แก่ *Candida albicans* (Tadtong *et al.*, 2016), *Aspergillus* spp. (Morcia *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2018), *Alternaria* spp. (Morcia *et al.*, 2012; Marei and Abdelgaleil, 2018), *Botrytis cinerea* (Yusoff *et al.*, 2020), *Fusarium* spp. (Morcia *et al.*, 2012; Marei and Abdelgaleil, 2018), *Penicillium* sp. (Morcia *et al.*, 2012; Marei and Abdelgaleil, 2018), *Rhizoctonia solani* (Marei and Abdelgaleil, 2018) ซึ่งเป็นการยืนยันให้เห็นว่า ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวิดในการยับยั้งเชื้อรา *A. brassicicola* น่าจะมีผลมาจาก terpenoids ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ยิ่งไปกว่านั้นผลจากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดแปรงล้าขวิด นอกจากไม่เป็นพิษต่อพืชปลูกแล้ว ยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของผัก

สลัดได้อีกด้วย ซึ่งผลดังกล่าวน่าจะมีผลมาจากสาร vitamin E, 1,25-dihydroxy vitamin D2, nigerose และ glu-ile โดยสารประกอบดังกล่าวมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นหรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ (Muñoz and Munné-Bosch, 2019; Qiu *et al.*, 2020; Ichimura *et al.*, 2022)



Table 4.8 Phytochemical compounds from 95% ethanolic extract of Thai *M. cajuputi* (95% EEMC) analyzed by GC/MS QTOF and LC/MS QTOF.

Compound name	RT (min)	Molecular formula	m/z	Peak area (%)	Known bioactivity from literature	
By GC/MS QTOF						
Terpenoids						
1 Copaene	16.74	C ₁₅ H ₂₄	204	0.20	antimicrobial (Scur <i>et al.</i> , 2016)	
2 β-Elemene	17.12	C ₁₅ H ₂₄	204	0.64	anticancer (Xie <i>et al.</i> , 2020)	
3 Caryophyllene	17.87	C ₁₅ H ₂₄	204	0.41	antimicrobial (Selestino Neta <i>et al.</i> , 2017)	
4 α-Muurolene	19.35	C ₁₅ H ₂₄	204	0.33	antimicrobial (Marinas <i>et al.</i> , 2021)	
5 β-Selinene	19.59	C ₁₅ H ₂₄	204	0.95	antifungal (Ding <i>et al.</i> , 2017)	
6 γ-Selinene	19.82	C ₁₅ H ₂₄	204	0.39	antifungal (Foudah <i>et al.</i> , 2021)	
7 Elemol	21.26	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.35	antimicrobial (Noriega <i>et al.</i> , 2020)	
8 Spathulenol	22.22	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.45	antimicrobial (Fu <i>et al.</i> , 2022)	
9 Caryophyllene epoxide	22.44	C ₁₅ H ₂₄ O	220	2.53	antimicrobial (Selestino Neta <i>et al.</i> , 2017)	
10 Muurolo-4,10(14)-dien-1β-ol	23.78	C ₁₅ H ₂₄ O	220	1.54	unknown	
11 Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5α-ol	24.00	C ₁₅ H ₂₄ O	220	1.71	antimicrobial (Selestino Neta <i>et al.</i> , 2017)	
12 10,10-Dimethyl-2,6-dimethylenebicyclo[7.2.0]undecan-5 β -ol	24.12	C ₁₅ H ₂₄ O	220	3.89	unknown	
13 β -Eudesmol	24.39	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.27	antimicrobial (Noriega <i>et al.</i> , 2020)	
14 Selin-6-en-4α-ol	24.61	C ₁₅ H ₂₆ O	222	2.12	antibacterial (Cordeiro <i>et al.</i> , 2020)	
15 Aromadendrene epoxide	24.75	C ₁₅ H ₂₄ O	220	2.45	antimicrobial (Mulyaningih <i>et al.</i> , 2011)	
16 8-Methoxycedrane	25.27	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	264	0.74	unknown	
17 (1R,7S,E)-7-Isopropyl-4,10-dimethylenecyclodec-5-enol	25.44	C ₁₅ H ₂₄ O	220	1.17	unknown	
18 Pluchidiol	26.97	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	208	0.21	antimicrobial (Karimi <i>et al.</i> , 2019)	
19 Proximadiol	29.55	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	222	0.25	unknown	
20 α-Eudesmol	30.29	C ₁₅ H ₂₆ O	222	1.40	antimicrobial (Noriega <i>et al.</i> , 2020)	
21 Squamulosone	30.90	C ₁₅ H ₂₂ O	218	0.78	unknown	
22 6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone	31.46	C ₁₈ H ₃₆ O	268	0.43	antibacterial (Naidoo <i>et al.</i> , 2014)	
23 Corymbolone	31.55	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	236	0.40	antifungal (Hussein <i>et al.</i> , 2016)	
24 4,4,8-Trimethyltricyclo[6.3.1.0(1,5)]dodecane-2,9-diol	31.67	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	238	0.54	unknown	
25 Estra-1,3,5(10)-trien-17 β -ol	32.82	C ₁₈ H ₂₄ O	256	0.91	anticancer (Khan <i>et al.</i> , 2022)	
26 Phytol	38.60	C ₂₀ H ₄₀ O	296	19.14	antimicrobial (Ghaneian <i>et al.</i> , 2015; Saha and Bandyopadhyay, 2020; Yusoff <i>et al.</i> , 2020; Petpheng <i>et al.</i> , 2023)	
27 γ-Sitosterol	41.19	C ₂₉ H ₅₀ O	414	0.54	antibacterial (Subramaniam <i>et al.</i> , 2014)	
28 28-Norolean-17-en-3-ol	42.70	C ₂₉ H ₄₈ O	412	0.57	antiviral (Darshani <i>et al.</i> , 2022)	
				<u>Terpenoids</u>	<u>45.31</u>	
Phenolics						
29 Ethyl α-D-glucopyranoside	23.67	C ₈ H ₁₆ O ₆	208	1.66	antioxidant (Dai <i>et al.</i> , 2022)	
30 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyde,TMS derivative	25.82	C ₁₁ H ₁₆ O ₃ Si	224	0.26	antibacterial (Darshani <i>et al.</i> , 2022)	
				<u>Phenolics</u>	<u>1.92</u>	
Flavonoids						
31 Pinostrobin	32.53	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	206	0.32	antibacterial (Marliyana <i>et al.</i> , 2018)	
				<u>Flavonoids</u>	<u>0.32</u>	
Naphthalenes & Aromatics						
32 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalene-1,2-diol,5,6-dimethoxy-	23.15	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	164	8.45	unknown	
33 9-Butyl-9H-fluoren-9-ol	36.55	C ₁₇ H ₁₈ O	238	0.40	unknown	
				<u>Naphthalenes & Aromatics</u>	<u>8.85</u>	
Other compounds						
34 2,5-Dimethoxythiophenol	15.71	C ₈ H ₁₀ O ₂ S	170	0.26	unknown	
35 Butyric acid, 2,3-epoxy-, ethyl ester	21.47	C ₁₁ H ₁₆ O	164	0.23	unknown	
36 2',3',4' Trimethoxyacetophenone	26.46	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	210	7.16	antibacterial (Freitas <i>et al.</i> , 2020)	
37 2,5,5,8a-Tetramethyl-4-methylene-6,7,8,8a-tetrahydro-4H,5H-chromen-4a-yl hydroperoxide	28.99	C ₁₄ H ₂₂ O ₃	238	1.23	unknown	
38 Octahydro-1-(2-octyldecyl)- pentalene	30.51	C ₂₆ H ₅₀	362	3.63	unknown	
39 10-Methylantracene-9-carboxaldehyde	33.23	C ₁₆ H ₁₂ O	220	11.63	unknown	

Table 4.8 Continued

Compound name	RT (min)	Molecular formula	m/z	Peak area (%)	Known bioactivity from literature
40 2-Isopropyl-10-methylphenanthrene	37.35	C ₁₈ H ₁₈	234	5.32	unknown
41 5-Methyl-6,7,8,9-tetrahydroisothiazolo[5,4-C]isoquinolin-1(2H)-one	37.79	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O _S	220	12.53	unknown
				<u>Other compounds</u>	<u>41.99</u>
				Total	98.39
By LC/MS QTOF					
Terpenoids					
1 Ingenol	15.36	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	348	9.17	antiHIV (Yang <i>et al.</i> , 2019)
				<u>Terpenoids</u>	<u>9.17</u>
Phenolics					
2 Acetaminophen	11.99	C ₈ H ₉ NO ₂	151	9.93	antifungal (Srikanth <i>et al.</i> , 2005)
3 6-Gingerol	12.51	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	294	2.75	antifungal (Xi <i>et al.</i> , 2022)
4 3,5-Di-tert-butyl-2-hydroxybenzaldehyde	27.74	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	234	6.81	antimicrobial (Zhao <i>et al.</i> , 2020)
				<u>Phenolics</u>	<u>19.49</u>
Flavonoids & Naphthalene					
5 Cyanidin-3-O-sophoroside	0.58	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆ ⁺	611	1.34	antibacterial (Tan <i>et al.</i> , 2019)
6 6,2'-Dimethylflavone	15.72	C ₁₇ H ₁₄ O ₄	282	4.21	antifungal (Mangoyi <i>et al.</i> , 2015)
				<u>Flavonoids & Naphthalene</u>	<u>5.55</u>
Steroids & Benzofurans					
7 5β-Androstane-3β,17β-diol	12.54	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292	3.84	unknown
8 Dichlorofluorescein	14.80	C ₂₀ H ₁₀ Cl ₂ O ₅	401	3.95	unknown
				<u>Steroids & Benzofurans</u>	<u>7.79</u>
Ethylene glycol					
9 Nonaethylene glycol	0.58	C ₁₈ H ₃₈ O ₁₀	415	10.28	antimicrobial (Shukla <i>et al.</i> , 2012a)
10 Decaethylene glycol	0.58	C ₂₀ H ₄₂ O ₁₁	459	10.42	antimicrobial (Shukla <i>et al.</i> , 2012a)
11 Pentaethylene glycol	12.51	C ₁₀ H ₂₂ O ₆	238	5.55	antimicrobial (Shukla <i>et al.</i> , 2012a)
				<u>Ethylene glycol</u>	<u>26.25</u>
Vitamins					
12 R-lipoic acid	0.46	C ₈ H ₁₄ O ₂ S ₂	207	6.63	PGPM (Elkelish <i>et al.</i> , 2021)
				<u>Vitamins</u>	<u>6.63</u>
Fatty acid & Glucosides					
13 2,3-Dinor-11β-prostaglandin F ₂ α	12.56	C ₁₉ H ₃₀ O ₅	326	9.45	unknown
14 Harpagide	14.4	C ₁₅ H ₂₄ O ₁₀	364	3.46	unknown
				<u>Fatty acid & Glucosides</u>	<u>12.91</u>
Other compounds					
15 1-(1',3'-Benzodioxol-5'-yl)-2-butanamine	0.42	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	193	1.03	unknown
16 Salicylic acid, valerate	0.82	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222	3.70	ISR (War <i>et al.</i> , 2011; Sangpueak <i>et al.</i> , 2021)
17 2-Acetyl-5-(tetrahydroxybutyl)imidazole	12.47	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₅	230	1.24	unknown
18 Leukotriene B ₃	12.54	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	338	3.34	antibacterial (Serban <i>et al.</i> , 2018)
				<u>Other compounds</u>	<u>9.31</u>
				Total	97.1

PGPM = Plant growth promoting metabolites, ISR = Induced systemic resistance

Table 4.9 Phytochemical compounds from ethanolic extract of Thai *C. viminaris* (EECV) analyzed by GC/MS QTOF and LC/MS QTOF.

Compound name	RT (min)	Molecular formula	m/z	Peak area (%)	Known bioactivity from literature
By GC/MS QTOF					
Terpenoids					
1 α -Phellandrene	8.96	C ₁₀ H ₁₆	136	2.04	antimicrobial (Işcan <i>et al.</i> , 2012)
2 o-Cymene	9.39	C ₁₀ H ₁₄	134	0.84	antimicrobial (Tadtong <i>et al.</i> , 2016)
3 1,8-Cineole	9.52	C ₁₀ H ₁₈ O	154	14.0	antimicrobial (Morcia <i>et al.</i> , 2012; Tadtong <i>et al.</i> , 2016; Kim <i>et al.</i> , 2018)
4 α -Terpinene	10.77	C ₁₀ H ₁₆	136	0.19	antifungal (Marei and Abdelgaleil, 2018)
5 Terpinen-4-ol	12.64	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.36	antifungal (Morcia <i>et al.</i> , 2012; Marei and Abdelgaleil, 2018)
6 L- α -Terpineol	12.89	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1.42	antifungal (Marei and Abdelgaleil, 2018)
7 2-Acetoxy-1,8-cineole	15.24	C ₁₂ H ₂₀ O ₃	212	0.26	antimicrobial (Tadtong <i>et al.</i> , 2016)
8 Caryophyllene	17.86	C ₁₅ H ₂₄	204	0.35	antimicrobial (Selestino Neta <i>et al.</i> , 2017)
9 γ -Selinene	19.81	C ₁₅ H ₂₄	204	0.20	antifungal (Foudah <i>et al.</i> , 2021)
10 Spathulenol	22.21	C ₁₅ H ₂₀ O	220	0.76	antimicrobial (Fu <i>et al.</i> , 2022)
11 Isoleptospermonene	23.65	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	266	1.01	unknown
12 Pluchidiol	29.46	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	208	0.57	antimicrobial (Karimi <i>et al.</i> , 2019)
13 α -Phellandrene, dimer	29.82	C ₂₀ H ₃₂	272	0.76	antimicrobial (Işcan <i>et al.</i> , 2012)
14 Phytol acetate	31.42	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	338	0.49	antifungal (Foudah <i>et al.</i> , 2021)
15 4,4,8-Trimethyltricyclo[6.3.1.0(1,5)]dodecane-2,9-diol	32.82	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	238	0.33	unknown
16 Phytol	42.67	C ₂₀ H ₄₀ O	296	0.53	antimicrobial (Ghaneian <i>et al.</i> , 2015; Saha and Bandyopadhyay, 2020; Yusoff <i>et al.</i> , 2020)
17 Vitamin E	65.48	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430	0.56	PGPM (Munoz and Munné-Bosch, 2019)
18 γ -Sitosterol	68.15	C ₂₉ H ₅₀ O	414	1.91	antibacterial (Subramaniam <i>et al.</i> , 2014)
19 Lanosterol	68.76	C ₃₀ H ₅₀ O	426	0.52	unknown
20 28-Norolean-17-en-3-ol	69.25	C ₂₉ H ₄₈ O	412	1.02	antibacterial (Kim <i>et al.</i> , 2015)
21 α -Amyrin	69.56	C ₃₀ H ₅₀ O	426	0.40	antibacterial (Chung <i>et al.</i> , 2011)
22 γ -Sitostenone	70.52	C ₂₉ H ₄₈ O	412	0.64	antibacterial (Subramaniam <i>et al.</i> , 2014)
23 Betulinaldehyde	73.64	C ₃₀ H ₄₈ O ₂	440	0.88	antibacterial (Chung <i>et al.</i> , 2011)
Terpenoids					30.04
Phenolics					
24 2'-Hydroxy-5'-methoxyacetophenone, 3-methylbutylether	20.33	C ₁₄ H ₂₀ O ₃	236	1.70	unknown
25 2,6-Di-tert-butyl-4-hydroxy-4-methylcyclohexa-2,5-dien-1-one	23.24	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	236	1.77	unknown
Phenolics					3.47
Flavonoids					
26 Hesperetine	58.40	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	0.39	antimicrobial (Carevic <i>et al.</i> , 2022)
27 Prosogerin E	60.00	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	332	2.06	antibacterial (Shamsudin <i>et al.</i> , 2022)
28 Guaiacin	60.63	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	328	0.32	unknown
29 8-hydroxysalvigenin	64.71	C ₁₈ H ₁₆ O ₅	312	0.71	Antimicrobial (Atreshidi <i>et al.</i> , 2020)
30 4',7-Di-O-methylnaringenin	65.01	C ₁₉ H ₁₈ O ₅	326	1.79	antibacterial (Kozłowska <i>et al.</i> , 2017)
Flavonoids					5.27
Aromatic & Fatty acids					
31 Isolongifolene	19.59	C ₁₅ H ₂₄	204	0.48	unknown
32 1,2,3,4,5,6,7,8-Octahydro-2-naphthol, 4-methylene-2,5,5-trimethyl-	24.79	C ₁₄ H ₂₂ O	206	0.25	unknown
33 2,4,6-Octatriene, 3,4-dimethyl-	9.23	C ₁₀ H ₁₆	136	0.26	unknown
34 Hexadecanoic acid, ethyl ester	37.81	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	0.30	unknown
35 Ethyl oleate	44.93	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310	0.20	unknown
Aromatic & Fatty acids					1.49

Table 4.9 Continued

Compound name	RT (min)	Molecular formula	m/z	Peak area (%)	Known bioactivity from literature
Quinones & Steroids					
36 5-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-cyclohexene-1,3-dione	14.26	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	182	1.04	unknown
37 Androst-1-en-3-one, 17-(acetyloxy)-4,5-epoxy-,(4β,5β,17β)-	50.33	C ₂₁ H ₂₈ O ₄	344	2.14	unknown
				Quinones & Steroids	3.18
Other compounds					
38 6-acetyl-2,2,4,4-tetramethylcyclohexane-1,3,5-trione	16.37	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	224	1.59	unknown
39 2-Cyclopropene-1-carboxylic acid, 2(1,1-dimethyl-5-oxohexyl), methyl ester	18.68	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	224	0.31	unknown
40 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyde, TMS derivative	19.16	C ₁₁ H ₁₆ O ₃ Si	224	0.32	unknown
41 2,2,4-Trimethyl-4-trimethylsilylethynylcyclopentane-1,3-dione	21.01	C ₁₃ H ₂₀ O ₂ Si	236	25.0	unknown
42 1-Ethyl-2,2,4a,7,7-pentamethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro[1,8]naphthyridine	22.96	C ₁₅ H ₂₈ N ₂	236	0.72	unknown
43 4a,6a-Dimethyl-2-oxo-1a,2,4a,4b,5,6,6a,7,8,9,9a,9b,10,11-tetradecahydrocyclopenta[7,8]phenanthro[1,10b]oxiren-7-yl acetate pk2	51.49	C ₂₁ H ₂₈ O ₄	344	7.63	unknown
44 2-Amino-3-cyano-4-methyl-4,6-dipyridin-4-ylcyclohexa-1,5-dien-1,3-dicarboxylic acid, diethylester	61.33	C ₂₄ H ₂₄ N ₄ O ₄	432	0.32	unknown
45 2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene,2,6,10,15,19,23-hexamethyl-	62.28	C ₃₀ H ₅₀	410	0.76	unknown
				Other compounds	36.65
				Total	80.1
By LC/MS QTOF					
Terpenoids					
1 11-Keto-β-boswellic acid	16.22	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	471	6.96	antimicrobial (Raja <i>et al.</i> , 2011; Jaroš <i>et al.</i> , 2022)
				Terpenoids	6.96
Phenolics					
2 Metaproterenol	13.34	C ₁₁ H ₁₇ NO ₃	212	5.33	unknown
				Phenolics	5.33
Flavonoids					
3 Leiocarposide	12.63	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₆	653	2.41	antimicrobial (Toiu <i>et al.</i> , 2019)
4 Peonidin cation	15.24	C ₁₆ H ₁₃ O ₆ ⁺	301	1.03	antifungal (Chen <i>et al.</i> , 2023)
				Flavonoids	3.44
Coumarins, Alkaloid & Steroids					
5 7-Methoxycoumarin	0.80	C ₁₀ H ₈ O ₃	177	2.11	antifungal (Chen <i>et al.</i> , 2023)
6 Quinupramine	12.12	C ₂₁ H ₂₄ N ₂	305	1.04	antimicrobial (Caldara and Marmiroli, 2018)
7 5β-Pregnan-3α,17,20β21-tetrol-11-one	12.20	C ₂₁ H ₃₄ O ₅	366	1.39	unknown
8 γ-Muricholic acid	15.28	C ₂₄ H ₃₅ D ₅ O ₅	391	1.70	antibacterial (Watanabe <i>et al.</i> , 2017)
9 5β-Androstane-3α,17β-diol	12.07	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	275	1.33	unknown
				Coumarins, Alkaloid & Steroids	7.57
Ethylene glycol					
10 Nonaethylene glycol	0.81	C ₁₈ H ₃₈ O ₁₀	432	5.00	antimicrobial (Shukla <i>et al.</i> , 2012a)
11 Decaethylene glycol	0.81	C ₂₀ H ₄₂ O ₁₁	459	6.10	antimicrobial (Shukla <i>et al.</i> , 2012a)
				Ethylene glycol	11.1
Vitamins					
12 1,25-Dihydroxy vitamin D2	16.23	C ₂₇ H ₄₄ O ₃	411	2.07	PGPM (Buchala and Pythoud, 1988)
				Vitamins	2.07

Table 4.9 Continued

Compound name	RT (min)	Molecular formula	m/z	Peak area (%)	Known bioactivity from literature
<i>Fatty acid</i>					
13 18-Carboxy dinor leukotriene B4	12.12	C ₁₈ H ₂₆ O ₆	321	3.53	unknown
14 16,16-Dimethylprostaglandin E2	12.23	C ₂₂ H ₃₆ O ₅	363	1.20	unknown
15 Tafluprost (free acid)	12.25	C ₂₂ H ₂₈ F ₂ O ₅	411	8.59	unknown
		<i>Fatty acid</i>		<u>13.32</u>	
<i>Other compounds</i>					
16 Etidocaine	12.05	C ₁₇ H ₂₈ N ₂ O	277	2.05	unknown
17 N-Desethylamodiaquine	12.12	C ₁₈ H ₁₈ ClN ₃ O	328	2.05	unknown
18 Nigeroside	12.19	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	365	5.49	PGPM (Ichimura <i>et al.</i> , 2022)
19 Unoprostone isopropyl ester	12.33	C ₂₅ H ₄₄ O ₅	407	1.23	unknown
20 Glu-Ile	13.49	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₅	261	5.21	PGPM (Qiu <i>et al.</i> , 2020)
21 Cinnamic acid	15.24	C ₉ H ₈ O ₂	149	2.12	antifungal (Guo <i>et al.</i> , 2020)
22 3β-Hydroxy-5-cholenoic acid	15.49	C ₂₄ H ₃₈ O ₃	357	7.98	unknown
23 Octamethylcyclotetrasiloxane	15.54	C ₈ H ₂₀ O ₄ Si ₄	297	1.14	unknown
		<i>Other compounds</i>		<u>27.27</u>	
		Total		77.06	

PGPM = Plant growth promoting metabolites



4.7 การศึกษาศักยภาพของสารสกัดเอทานอลจากพืชวงศ์ขมิพู่ในการควบคุมโรคใบจุด *Alternaria* และการชักนำเอนไซม์ความต้านทานโรคของผักสลัดในสภาพโรงเรือน

4.7.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสมีดขาวและใบแปรงล้างขวดในการยับยั้งโรคใบจุด *Alternaria*

4.7.1.1 ผลของสารสกัดใบเสมีดขาว

การศึกษาศักยภาพของสารสกัดเอทานอลจากใบเสมีดขาว ที่ระดับความเข้มข้น 15,000 และ 50,000 ppm ในการยับยั้งโรคใบจุด *Alternaria* แสดงให้เห็นว่า ในช่วงแรกของการทดสอบ (3 DAI) มีเพียงกรรมวิธีควบคุมและสารสกัด 95%EEMC ความเข้มข้น 15,000 ppm ที่แสดงอาการโรคเท่านั้น (Figure 4.6) และเมื่อผ่านไป 5 DAI พบมีการพัฒนาของโรคเพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามสารสกัด 95%EEMC ทั้ง 2 ความเข้มข้น และสารเคมี ยังคงแสดงความรุนแรงโรคที่ต่ำ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (7 DAI) ทุกกรรมวิธีแสดงความรุนแรงโรคใบจุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นชุดปลูกพืชปกติ โดยชุดควบคุมแสดงความรุนแรงโรคสูงสุด เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารสกัด 95%EEMC ความเข้มข้น 50,000 ppm สามารถลดความรุนแรงโรคได้ดีที่สุด โดยมีความรุนแรงโรคเพียง 25 เปอร์เซ็นต์ รองมาคือ สารสกัดความเข้มข้น 15,000 ppm ซึ่งมีความรุนแรงโรคเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้สารเคมีสามารถลดความรุนแรงโรคได้น้อยสุด กล่าวคือ ยังมีความรุนแรงโรคสูงถึง 66.66 เปอร์เซ็นต์ (Figure 4.6) โดยกรณีนี้ อาจจะมีผลมาจากเชื้อราทดสอบดังกล่าวเกิดการดื้อต่อสารเคมีได้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Yang *et al.* (2019) ที่พบว่า *Alternaria alternata* แบบ Cross-resistance ต่อสารเคมี mancozeb และ difenoconazole อีกทั้ง Iacomi-Vasilescu *et al.* (2004) รายงานว่า *A. brassicicola* เกิดการดื้อต่อสารเคมี flutriafol, difenoconazole และ prochloraz ในระดับที่รุนแรง

ในด้านการเจริญเติบโตของผักสลัด การใช้สารสกัดจากเสมีดขาวและสารเคมี แสดงค่าความเสียหายไม่แตกต่างจากชุดควบคุมพืชปกติซึ่งมีค่า SPAD value อยู่ในช่วง 34.11-35.43 แต่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า SPAD value เท่ากับ 30.12 (Figure 4.6) สำหรับผลผลิตของผักสลัด เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับค่าความเสียหาย กล่าวคือ การใช้สารสกัดพืชและการใช้สารเคมีมีน้ำหนักสด อยู่ในช่วง 19.2-17.5 กรัม (อายุพืช 21 วัน) ไม่แตกต่างจากชุดปลูกพืชปกติ ซึ่งชุดควบคุมมีน้ำหนักสดเพียง 15 กรัม แต่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 4.6)

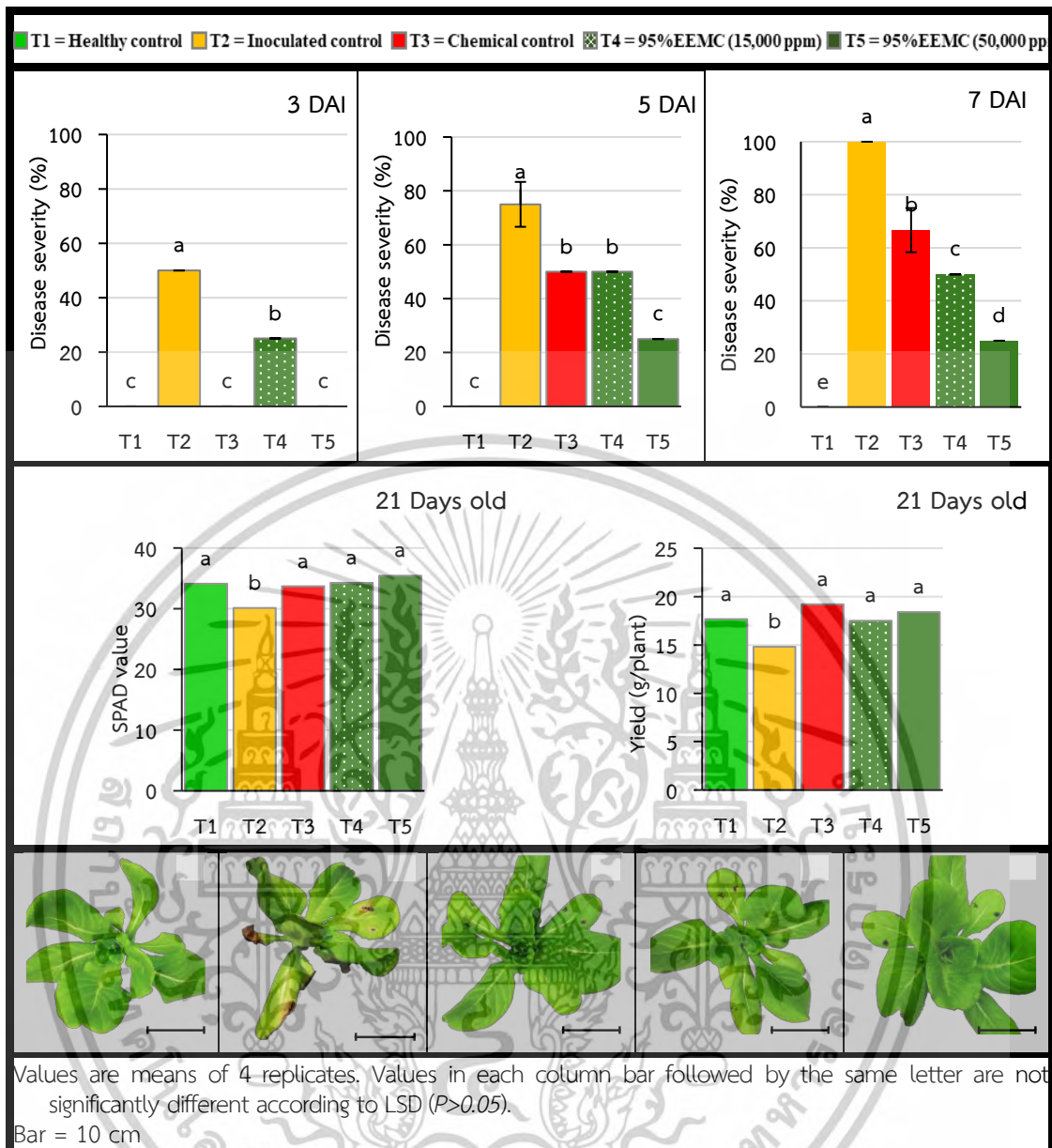


Figure 4.6 Effect of 95% ethanolic extract from *Melaleuca cajuputi* leaves (95% EEMC) on *Alternaria* leaf spot (at 7 DAI) and growth of lettuce in hydroponics (21 days old).

4.7.1.2 ผลของสารสกัดใบแปรงล้างขวด

ประสิทธิภาพของสารสกัดเอทานอลจากใบแปรงล้างขวด 2 ชนิด (50%EECV และ 95%EECV) ที่ระดับความเข้มข้น 15,000 และ 50,000 ppm ในการควบคุมโรคใบจุด *Aternaria* พบว่า ช่วงแรกของการทดสอบ (3 DAI) ทุกกรรมวิธีที่ทดสอบ (ยกเว้น ชุดปลูกพืชปกติ) ความรุนแรงโรคใบจุดไม่แตกต่างกัน คือประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านไป 5 DAI พบการพัฒนาของอาการโรคมมากขึ้น ยกเว้นกรรมวิธีที่ใช้สารสกัด 50%EECV และ 95%EECV ความเข้มข้น 50,000 ppm ยังคงมีความรุนแรงโรคคงที่ เท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (7 DAI) กรรมวิธีที่ใช้สารสกัดจากใบแปรงล้างขวดดังกล่าวทั้ง 2 ชนิดยังคงแสดงประสิทธิภาพลดความรุนแรงโรคได้ดีที่สุด ซึ่งมีความรุนแรงโรคเพียง 25 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น รองลงมาคือ สารสกัด 50%EECV และ 95%EECV ความเข้มข้น 15,000 ppm รวมทั้งสารเคมี สามารถลดความรุนแรงโรคได้ ประมาณ 50-56.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 4.7)

สำหรับการเจริญเติบโตของผักสลัด ทุกกรรมวิธีที่ใช้สารสกัดจากพืชและสารเคมีแสดงค่าความเขียว (SPAD value) ไม่แตกต่างจากชุดปลูกพืชปกติ อยู่ในช่วง 35.44-33.7 แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (SPAD value เท่ากับ 30.25) ในขณะที่ผลผลิตจากกรรมวิธีที่ใช้สารสกัดจากพืชทั้ง 2 ชนิด (50%EECV และ 95%EECV) ที่ระดับความเข้มข้น 15,000 ppm และสารเคมี แสดงผลของน้ำหนักสดไม่แตกต่างกับชุดปลูกพืชปกติ อยู่ในช่วง 17.53-19.36 กรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (16.04 กรัม) และเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง กล่าวคือ การใช้สารสกัดจากพืชดังกล่าวทั้ง 2 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm นอกจากจะไม่เป็นพิษแล้ว ยังพบว่าสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัดได้ และมีน้ำหนักสดสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 23.5 กรัม (Figure 4.7) ซึ่งผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดวงศ์ขมิพู่ทั้ง 4 ชนิด ที่พบว่าการใช้สารสกัดจากแปรงล้างขวดสามารถกระตุ้นการเจริญของผักสลัดมากขึ้น (Table 4.4)

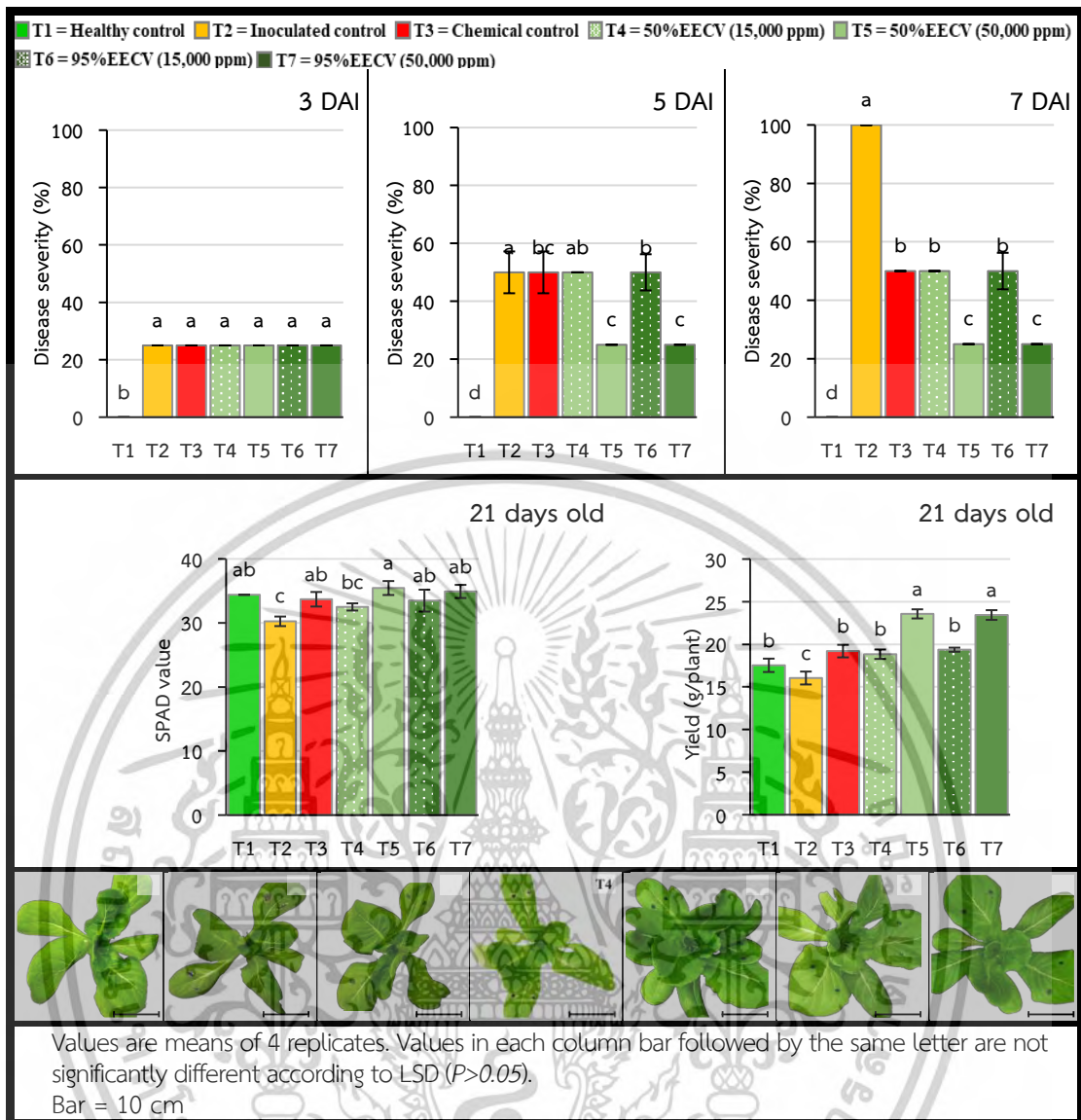


Figure 4.7 Effect of 50% and 95% ethanolic extract from *Callistemon viminalis* leaves (EECV) on *Alternaria* leaf spot (at 7 DAI) and growth of lettuce in hydroponics (21 days old).

4.7.2 ศักยภาพของสารสกัดจากใบเสมีตขาวและใบแปรงล้างขวดในการชักนำเอนไซม์ ความต้านทานโรคของผักสลัด

4.7.2.1 ผลของสารสกัดใบเสมีตขาว

ในช่วงเวลาระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดพืชในการลดความรุนแรงโรค ได้มีการตรวจสอบศักยภาพของสารสกัดจากใบเสมีตขาว (95%EEMC) ในการเป็นตัวกระตุ้น (Inducer) กิจกรรมเอนไซม์ต้านทานโรคพืชของผักสลัด (β -1,3-glucanase, chitinase และ peroxidase) ควบคุมไปด้วย ซึ่งผลการทดสอบในช่วงแรก (1วันหลังการปลูกเชื้อ: DAI) พบว่าทุกกรรมวิธีที่ทดสอบมีกิจกรรมเอนไซม์ β -1,3-glucanase ที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีปลูกพืชปกติ (Healthy control) ยิ่งไปกว่านั้น กรรมวิธีที่ใช้สารสกัดจากใบเสมีตขาว (95%EEMC) ทั้ง 2 ความเข้มข้น (15,000 และ 50,000 ppm) สามารถกระตุ้นให้ผักสลัดสร้างเอนไซม์ β -1,3-glucanase มากที่สุด สูงถึง 2.55 – 2.72 $\mu\text{mol glucose/g}$ of fresh leaves และเมื่อเวลาผ่านไป 3-5 DAI ทุกกรรมวิธีมีกิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (7 DAI) สารสกัด 95%EEMC ทั้ง 2 ความเข้มข้น ยังคงแสดงกิจกรรมเอนไซม์ β -1,3-glucanase มากที่สุด (11.66-11.83 $\mu\text{mol glucose/g}$ of fresh leaves) ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 4.10)

สำหรับการตรวจสอบเอนไซม์ chitinase ผลยังคงเป็นไปในรูปแบบเดียวกันกับการตรวจสอบเอนไซม์ β -1,3-glucanase ซึ่งทุกกรรมวิธีมีกิจกรรมเอนไซม์ที่มากกว่าชุดปลูกพืชปกติ และเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นกิจกรรมเอนไซม์ก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การใช้สารสกัด 95%EEMC ที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm (7 DAI) ยังคงส่งผลให้ผักสลัดมีกิจกรรมเอนไซม์มากที่สุด เท่ากับ 23.12 $\mu\text{mol GlcNAc/g}$ of fresh leaves รองลงมาคือ สารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 15,000 ppm เท่ากับ 20.24 $\mu\text{mol GlcNAc/g}$ of fresh leaves ในขณะที่ชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อราเพียงอย่างเดียว แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 17.30 $\mu\text{mol GlcNAc/g}$ of fresh leaves ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 4.10)

ส่วนเอนไซม์ peroxidase ผลยังคงเป็นไปในรูปแบบเดียวกันกับการตรวจสอบเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase ซึ่งกรรมวิธีที่ใช้สารสกัดจากพืชดังกล่าว (7 DAI) สามารถกระตุ้นให้ผักสลัดสร้างเอนไซม์ peroxidase มากที่สุด อยู่ในช่วง 12.56-13.36 unit/g of fresh leaves ตามลำดับ (Table 4.10) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มมากขึ้นมีความสอดคล้องตามการลดลงของความรุนแรงโรคที่เกิดขึ้นด้วย

Table 4.10 Activity of defense enzymes against *Alternaria* in lettuce treated with 95% EEMC.

Treatment	Activity of defense enzyme											
	β -1,3-Glucanase (μmol glucose /g of fresh leaves)				Chitinase (μmol GlcNAc/g of fresh leaves)				Peroxidase (unit/ g of fresh leaves)			
	1 DAI	3 DAI	5 DAI	7 DAI	1 DAI	3 DAI	5 DAI	7 DAI	1 DAI	3 DAI	5 DAI	7 DAI
Healthy control	1.53d ¹	3.53d	3.60d	3.46d	5.50d	5.07d	5.97d	5.63e	3.38e	4.90e	6.52c	8.44c
Inoculated control	2.17c	5.27b	6.17b	7.36b	9.43b	11.25b	15.95b	17.30c	5.37c	6.89c	8.51b	10.43b
Chemical control + pathogen	2.20b	4.63c	5.20c	6.20c	8.63c	9.17c	11.03c	11.33d	4.70d	6.22d	7.85b	9.76bc
95% EEMC-15,000 ppm + pathogen	2.55a	8.62a	7.87a	11.66a	13.49a	15.29a	19.23a	20.24b	7.50b	9.02b	10.65a	12.56a
95% EEMC-50,000 ppm + pathogen	2.72a	8.72a	7.97a	11.83a	13.49a	14.91a	19.99a	23.12a	8.30a	9.82a	11.45a	13.36a

¹Values are means of 3 replicates. Values in each column within each enzyme followed by the same letter are not significantly different according to LSD ($P>0.05$).

4.7.2.2 ผลของสารสกัดใบแปรงล้างขวด

การทดสอบศักยภาพของสารสกัดเอทานอลจากใบแปรงล้างขวด 2 ชนิด (50%EECV และ 95%EECV) ที่ระดับความเข้มข้น 15,000 และ 50,000 ppm ในการชักนำเอนไซม์ความต้านทานโรคพืชทั้ง 3 ชนิด พบว่า ผลการทดสอบสารสกัดใบแปรงล้างขวดเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดสอบสารสกัดจากใบเสม็ดขาว (95%EEMC) กล่าวคือ กรรมวิธีที่ใช้สารสกัดจากใบแปรงล้างขวดพบกิจกรรมการสะสมเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด (β -1,3-glucanase, chitinase และ peroxidase) มากที่สุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมทั้ง 3 กรรมวิธี (Healthy control, Inoculated control และ Chemical control) และเมื่อระยะเวลาเพิ่มมากขึ้น ปริมาณเอนไซม์จะเพิ่มมากขึ้นตามด้วย กล่าวคือ ผลจากการตรวจเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในช่วง 1 DAI การใช้สารสกัดจากใบแปรงล้างขวดทั้ง 2 ชนิด (50%EECV และ 95%EECV) ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ ยังคงส่งผลให้พืชสร้างเอนไซม์มากที่สุด รองลงมาคือ การใช้สารเคมีแมนโคเซบ (mancozeb) และการปลูกเชื้อราเพียงอย่างเดียว เมื่อระยะเวลาผ่านไป (3 – 5 DAI) การใช้สารสกัดพืชที่ทดสอบทั้งหมดยังคงมีการสะสมปริมาณเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นและสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมอื่น ๆ และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (7 DAI) พบว่า การใช้สารสกัด 95%EECV ทั้ง 2 ความเข้มข้น และ 50%EECV ที่ระดับความเข้มข้น 15,000 ppm มีการสะสมปริมาณเอนไซม์มากที่สุด อยู่ในช่วง 16.2-16.93 $\mu\text{mol glucose/g}$ of fresh leaves รองลงมาคือ 50%EECV-50,000 ppm เท่ากับ 15.73 $\mu\text{mol glucose/g}$ of fresh leaves ในขณะที่กรรมวิธีควบคุม (Inoculated control และ Chemical control) มีปริมาณสะสม อยู่ในช่วง 12.43 – 12.86 $\mu\text{mol glucose/g}$ of fresh leaves (Table 4.11)

สำหรับเอนไซม์ chitinase ผลการตรวจสอบยังคงเป็นไปในรูปแบบเดียวกันกับเอนไซม์ β -1,3-glucanase กล่าวคือ การใช้สารสกัดจากใบแปรงล้างขวดทั้ง 2 ชนิด (50%EECV และ 95%EECV) มีศักยภาพในการกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์มากที่สุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมทั้ง 3 กรรมวิธี ตั้งแต่ช่วงแรกของการทดสอบ (1 DAI) และเอนไซม์มีการสะสมเพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป 3 ถึง 5 วันหลังการปลูกเชื้อ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (7 DAI) การใช้สารสกัดจากแปรงล้างขวดทุกกรรมวิธีที่ทดสอบยังคงแสดงผลการกระตุ้นให้พืชมีการสะสมมากที่สุด อยู่ในช่วง 26.23 – 26.63 $\mu\text{mol GlcNAc/g}$ of fresh leaves ในขณะที่การใช้สารเคมีแมนโคเซบ (Chemical control) และการปลูกเชื้อราเพียงอย่างเดียว (Inoculated control) มีกิจกรรมการสะสมเอนไซม์ อยู่ในช่วง 21.66 – 21.96 $\mu\text{mol GlcNAc/g}$ of fresh leaves (Table 4.11)

ส่วนผลการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase การใช้สารสกัดจากใบแปรงล้างขวดทุกกรรมวิธีที่ทดสอบยังคงเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับกิจกรรมเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase ซึ่งการใช้สารสกัดจากพืชดังกล่าวกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์มากที่สุดและมีการสะสมเพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไปตลอดการทดลอง โดยการใช้สารสกัด 95%EECV ที่ระดับความเข้มข้น 50,000 ppm สามารถกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ peroxidase สูงที่สุด รองลงมาคือ 95%EECV ความเข้มข้น 15,000 ppm และ 50%EECV ทั้ง 2 ความเข้มข้น ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 4.11)

Table 4.11 Activity of defense enzymes against *Alternaria* in lettuce treated with 50% and 95% EECV.

Treatment	Activity of defense enzyme											
	β-1,3-Glucanase (μmol glucose /g of fresh leaves)				Chitinase (μmol GlcNAc/g of fresh leaves)				Peroxidase (unit/ g of fresh leaves)			
	1 DAI	3 DAI	5 DAI	7 DAI	1 DAI	3 DAI	5 DAI	7 DAI	1 DAI	3 DAI	5 DAI	7 DAI
Healthy control	1.53c ¹	3.53d	3.60c	3.46d	5.50c	5.07c	5.97c	5.63c	3.33c	4.98e	5.48e	6.45e
Inoculated control	2.17b	5.27c	9.43b	12.86c	11.00b	14.30b	18.67b	21.96b	6.02b	6.47cd	6.83d	7.45d
Chemical control	2.20b	5.37c	9.50b	12.43c	10.80b	15.07b	18.60b	21.66b	6.79a	6.54bc	7.53c	7.99cd
50% EECV-15,000 ppm + pathogen	3.30a	8.87b	11.20a	16.26ab	16.00a	18.20a	21.63a	26.46a	6.48a	7.12a	7.50c	8.29cd
50% EECV-50,000 ppm + pathogen	3.27a	9.30a	11.60a	15.73b	15.50a	17.63a	22.03a	26.63a	6.52a	6.83ab	7.84b	8.68bc
95% EECV-15,000 ppm + pathogen	3.30a	9.37a	11.67a	16.93a	15.93a	17.73a	21.67a	26.23a	6.37a	6.74bc	6.91d	9.52b
95% EECV-50,000 ppm + pathogen	3.47a	9.47a	11.83a	16.2ab	15.93a	17.27a	21.83a	26.53a	6.22b	6.18d	8.18a	10.97a

¹Values are means of three replicates. Values in each column within each enzyme, followed by the same letter are not significantly different according to LSD ($P>0.05$).

4.7.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความรุนแรงโรคใบจุดและเอนไซม์ความต้านทานโรคพืชที่ได้รับการกระตุ้นของผักสลัด

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงโรคใบจุดและเอนไซม์ความต้านทานโรคพืช 3 ชนิด ที่เกิดจากอิทธิพลของสารสกัดจากใบเสมีตขาวและใบแปรงล้าชวด ที่ระยะเวลา 3, 5 และ 7 วันหลังการปลูกเชื้อ ซึ่งผลการวิเคราะห์พบความสัมพันธ์เชิงลบ (หรือความสัมพันธ์แบบผกผัน) ทั้งหมดระหว่างความรุนแรงโรคและเอนไซม์ความต้านทานโรคแต่ละชนิด กล่าวคือความรุนแรงของโรคลดลง ในขณะที่ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น ยิ่งไปกว่านั้นผลการวิเคราะห์จากอิทธิพลของสารสกัดจากใบเสมีตขาว (7 DAI) พบความสัมพันธ์เชิงลบระดับกลางถึงสูง เท่ากับ -0.766, -0.575 และ -0.807 ในกิจกรรมเอนไซม์ β -1,3-glucanase, chitinase และ peroxidase ตามลำดับ ในขณะที่การวิเคราะห์ความสัมพันธ์จากอิทธิพลของสารสกัดใบแปรงล้าชวด แสดงผลเป็นไปในทิศทางเดียวกับการวิเคราะห์จากอิทธิพลของสารสกัดใบเสมีตขาว กล่าวคือ พบความสัมพันธ์เชิงลบเช่นเดียวกัน เท่ากับ -0.631, -0.722 และ -0.708 ในกิจกรรมเอนไซม์ β -1,3-glucanase chitinase และ peroxidase ตามลำดับ (Figure 4.8) นอกจากนี้ยังพบสมการถดถอยเชิงลบจากทั้งการทดสอบของสารสกัดใบเสมีตขาวและใบแปรงล้าชวด เมื่อความรุนแรงโรคลดลง 1 หน่วย ปริมาณเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น 1 หน่วย ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการพยากรณ์โรคพืชได้



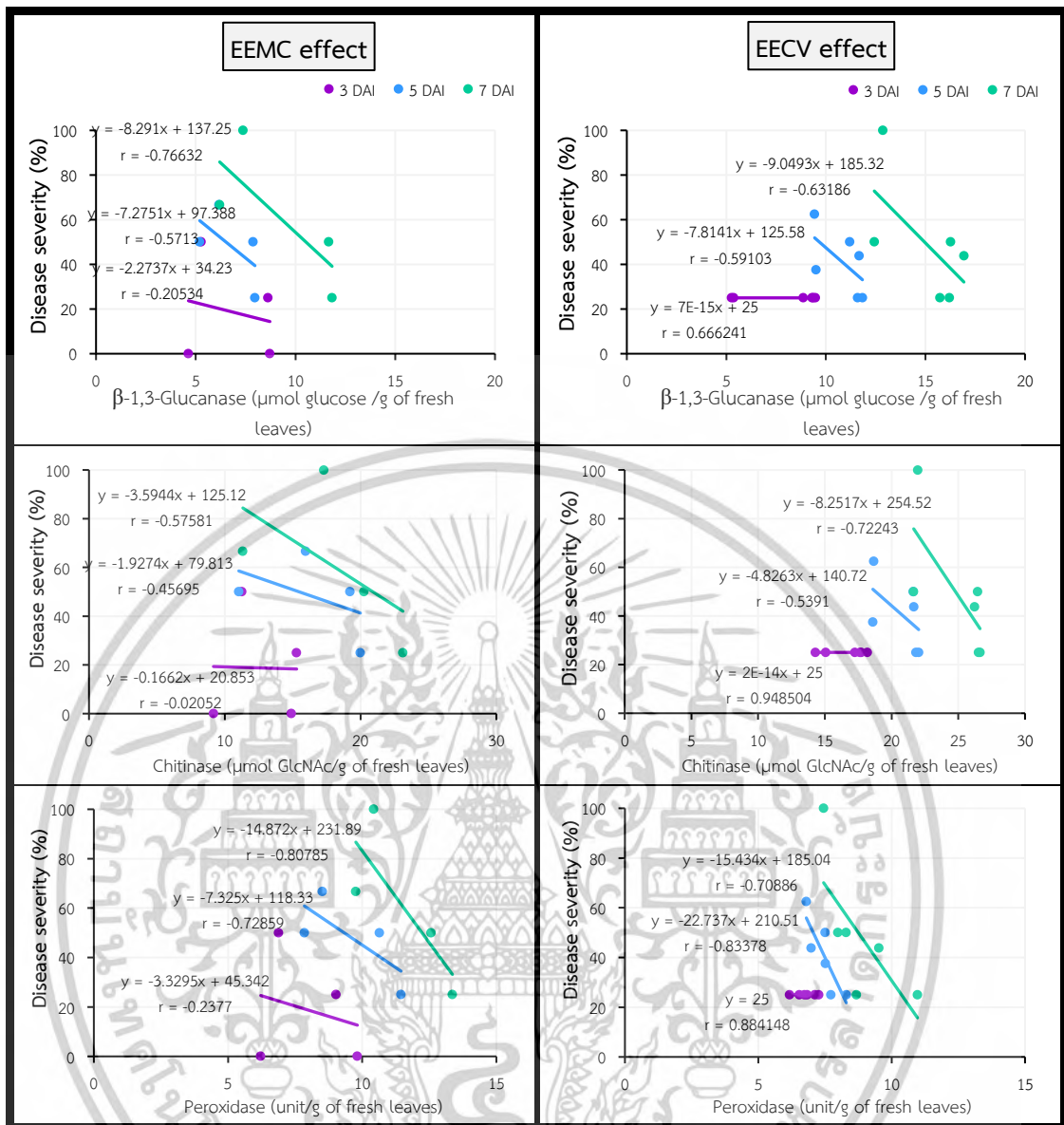


Figure 4.8 Correlation of disease severity with β -1,3-glucanase, chitinase and peroxidase activities in lettuce plants treated with EEMC and EECV as an inducer against *A. brassicicola* at 3, 5 and 7 DAI.

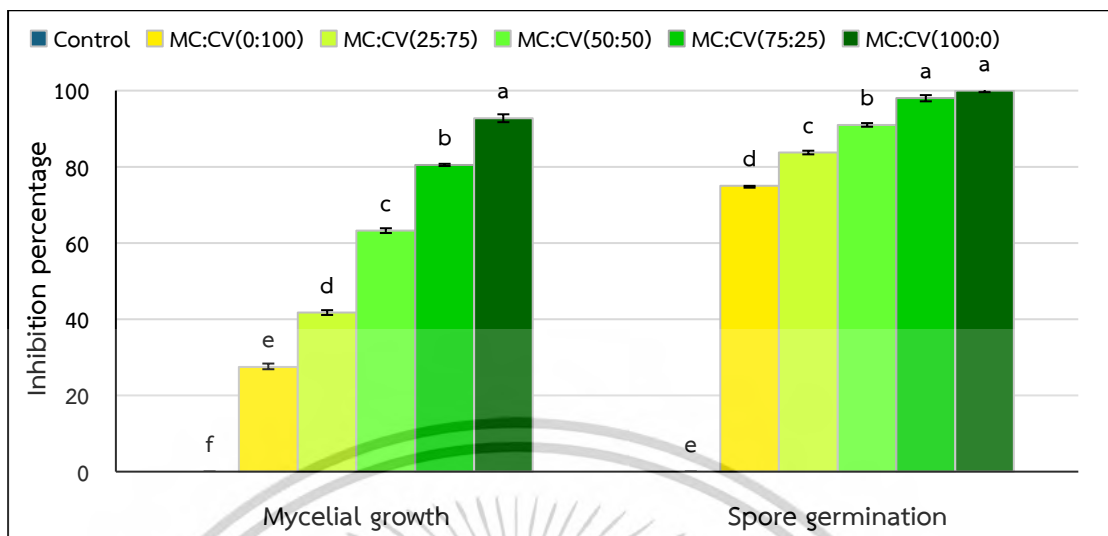
จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขูดข้างต้น แสดงให้เห็นว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิด สามารถลดความรุนแรงโรคใบจุด *Alternaria* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสารสกัดดังกล่าวยังสามารถชักนำให้ผักสลัดสร้างเอนไซม์ β -1,3-glucanase, chitinase และ peroxidase มากกว่าชุดควบคุมอีกด้วย อีกทั้งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงโรคกับกิจกรรมเอนไซม์ ยังแสดงความสัมพันธ์เชิงลบ ซึ่งผลดังกล่าวอาจเป็นเพราะการชักนำเอนไซม์จากสารสกัด (Yamunarani *et al.*, 2004; Latha *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2013; Franzener *et al.*, 2018) ซึ่งเอนไซม์น่าจะมียับยั้งการเกิดโรค หรือยับยั้งการเกิดโรค (Akila *et al.*, 2011; Arzoo *et al.*, 2012; Franzener *et al.*, 2018; Gholamnezhad, 2019) โดยเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase จะมีบทบาทในการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา ซึ่งมี β -1,3-glucans และ chitins เป็นองค์ประกอบ (Yamunarani *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2013; Prasannath, 2017) ในขณะที่ เอนไซม์ peroxidase มีบทบาทในการเกิด hypersensitive reaction การสร้าง lignins รวมทั้งการสังเคราะห์ phenolic glycoproteins และ suberin หรือเรียกว่า phytoalexins ในพืช (Prasannath, 2017) นอกจากนี้แล้ว ผลการทดลองในครั้งนี้ยังสอดคล้องกับรายงานวิจัยจากการใช้สารสกัดวงศ์ขมิ้นชนิดอื่น ซึ่งระบุว่า สารสกัดยูคาลิปตัสสามารถลดโรคเหี่ยวและเพิ่มปริมาณโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ β -1,3-glucanase, chitinase และ peroxidase ในต้นมะเขือเทศ (Arzoo *et al.*, 2012) ด้าน Franzener *et al.* (2018) กล่าวว่า *Corymbia citriodora* (Myrtaceae plant) สามารถลดความรุนแรงโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum lagenarium* และกระตุ้นให้สร้างปริมาณเอนไซม์ peroxidase และ β -1,3-glucanase ในแตงกวาให้มากขึ้น จากผลการทดลองนี้พอที่จะสรุปได้ว่า สารสกัด 95%EEMC และ 95%EECV รวมทั้ง 50%EECV สามารถเป็นตัวกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ต้านทานโรคได้ ซึ่งสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ควรจะพัฒนาหรือหาแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพของสารดังกล่าวในการควบคุมโรคใบจุดให้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ยังนำไปสู่แนวทางปฏิบัติในการพยากรณ์โรค

4.8 แนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดใบเสมีดขาวและใบแปรงล้างขวด ในการควบคุมโรคใบจุด *Alternaria* ในผักสลัด

4.8.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดผสมจากใบเสมีดขาวและใบแปรงล้างขวดในการยับยั้ง การเจริญของเชื้อราในสภาพห้องปฏิบัติการ

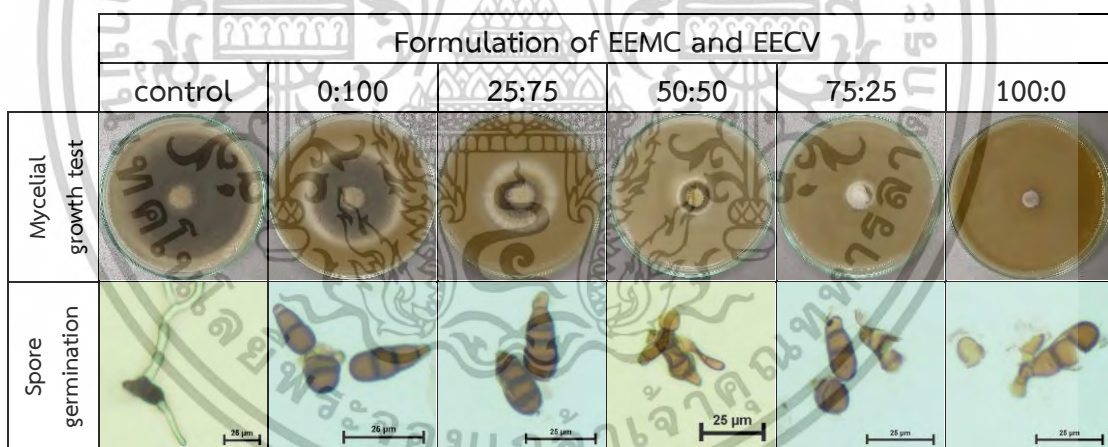
จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดผสมจากใบเสมีดขาว (EEMC) และใบแปรงล้างขวด (EECV) ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm ในอัตราส่วน 0:0, 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 และ 0:100 ผลการทดลองพบว่า เมื่อระยะเวลา 3 DAI สารสกัดผสมทุกอัตราส่วนสามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* ได้ในระดับหนึ่ง และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (7 DAI) สารสกัดผสมทุกอัตราส่วนสามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยเพิ่มมากขึ้น และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม อยู่ในช่วง 28-93 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัดผสมอัตราส่วน 100:0 (สารสกัดจากใบเสมีดขาวเพียงอย่างเดียว) สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราทดสอบได้ดีที่สุด เท่ากับ 93 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ สารสกัดผสม (EEMC:EECV) ในอัตราส่วน 75:25, 50:50 และ 25:75 เท่ากับ 80.5, 63.25 และ 41.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ สารสกัดอัตราส่วน 0:100 (สารสกัดจากใบแปรงล้างขวดเพียงอย่างเดียว) แสดงการยับยั้งได้น้อยที่สุด เท่ากับ 27.5 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จากผลที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราทดสอบขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดจากใบเสมีดขาว ยิ่งอัตราส่วนของสารสกัดใบเสมีดขาวมากขึ้น ประสิทธิภาพการยับยั้งยิ่งเพิ่มมากขึ้นด้วย (Figure 4.9 และ 4.10)

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดผสมต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* พบว่า ผลเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดสอบการเจริญทางเส้นใย กล่าวคือ สารสกัดผสมทุกอัตราส่วน สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อราทดสอบได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม สารสกัดจากใบเสมีดขาวเพียงอย่างเดียว (100:0) และสารสกัดผสม (EEMC:EECV) อัตราส่วน 75:25 แสดงประสิทธิภาพยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ดีที่สุด อยู่ในช่วง 98-100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ สารสกัดผสม (EEMC:EECV) อัตราส่วน 50:50, 25:75 และ 0:100 (สารสกัดแปรงล้างขวดเพียงอย่างเดียว) เท่ากับ 91, 84 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 4.9 และ 4.10) นอกจากนี้แล้วยังพบลักษณะความผิดปกติของสปอร์เชื้อราทดสอบในชุดที่ผสมด้วยสารสกัดผสม (EEMC:EECV) อัตราส่วน 50:50, 75:25 และ 100:0 (สารสกัดจากใบเสมีดขาวเพียงอย่างเดียวด้วย) (Figure 4.10)



Values are means of three replicates. Values in each column bar followed by the same letter are not significantly different according to LSD ($P > 0.05$).

Figure 4.9 Inhibition effect of ethanolic extract from *M. cajuputi* (EEMC) and *C. viminalis* (EECV) on *Alternaria* sp. mycelial growth (at 7 days after incubation) and spore germination test (at 72 h).

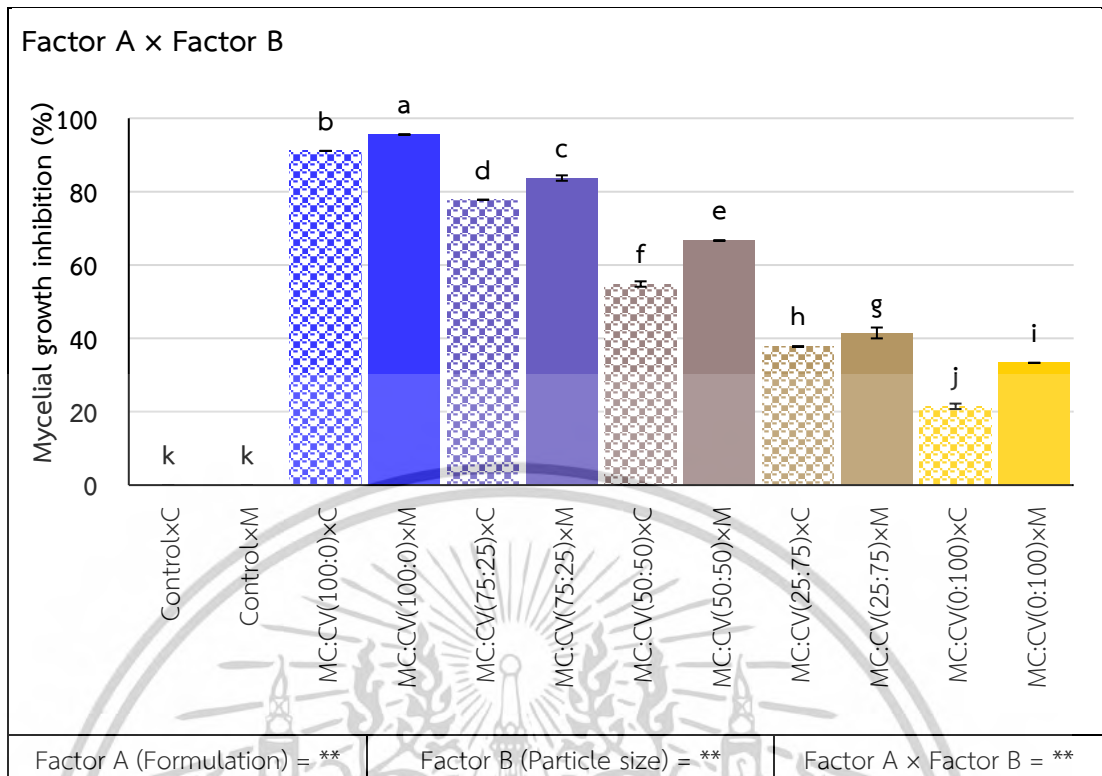


Black bar = 25 μ m

Figure 4.10 The characteristics of colony (at 7 days after incubation) and abnormal spore (at 72 h) of *Alternaria* sp. after being treated with plant extract formulation of EECV and EEMC.

4.8.2 ประสิทธิภาพของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าชวด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในสภาพห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดผสมอนุภาคไมโคร (M) จากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าชวดในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* พบว่า สารสกัดผสมอนุภาคไมโครทุกกรรมวิธีที่ทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ยิ่งไปกว่านั้นประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอัตราส่วนผสม (formulation) และอนุภาคของสารสกัด (particle size) ด้วย ซึ่งในปัจจัยอัตราส่วนผสมยังคงเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดสอบที่ผ่านมา (4.8.1) กล่าวคือ ประสิทธิภาพของการยับยั้งขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของสารสกัดใบเสม็ดขาว โดยการใช้สารสกัดเสม็ดขาวเพียงอย่างเดียวให้ผลการยับยั้งดีที่สุด รองลงมาคือ อัตราส่วน EEMC:EECV 75:25, 50:50 และ 25:75 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปัจจัยอนุภาคของสารสกัด พบว่า สารสกัดอนุภาคไมโคร (M) มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยได้ดีกว่าสารสกัดอนุภาคปกติ (C) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อพิจารณาถึงปัจจัยร่วมระหว่างอัตราส่วนและอนุภาคของสารสกัดแล้ว สารสกัด EEMC:EECV (100:0) × M หรือ สารสกัดใบเสม็ดขาวอนุภาคไมโครเพียงอย่างเดียว แสดงการยับยั้งได้ดีที่สุด เท่ากับ 95.5 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ EEMC:EECV (100:0) × C หรือ สารสกัดเสม็ดขาวอนุภาคปกติ ยับยั้งได้เท่ากับ 91.11 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ EEMC:EECV (0:100) × C หรือ สารสกัดแปรงล้าชวดอนุภาคปกติ แสดงการยับยั้งได้น้อยที่สุด เท่ากับ 21.48 เปอร์เซ็นต์ (Figure 4.11 และ 4.12)



Values are means of three replicates. Values in each column bar followed by the same letter are not significantly different according to LSD ($P < 0.05$).

C = Crude-formulation, M = Micro-formulation.

Figure 4.11 Growth inhibition percentage of extract mixtures from *Melaleuca cajuputi* (MC) and *Callistemon viminalis* (CV) on mycelium growth of *Alternaria* sp.



Figure 4.12 Poisoned food plates showing combined effect of *Melaleuca cajuputi* (MC) and *Callistemon viminalis* (CV) against *Alternaria* sp.

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดผสมจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้างขวด ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm พบว่าสารสกัดผสมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยและการงอกของสปอร์ของเชื้อราทดสอบได้ ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบในข้อ 4.4 โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งขึ้นอยู่กับอัตราส่วนผสมของสารสกัดเสม็ดขาว หากปริมาณของสารสกัดเสม็ดขาวมากขึ้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นด้วย แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบดังกล่าวไม่เป็นที่น่าพอใจเท่าที่ควร อาจเป็นเพราะสารสกัดจากใบแปรงล้างขวดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ไม่เด่นชัดเท่าที่ควร ซึ่งแตกต่างจากการรายงานของ Rueangrit *et al.* (2019) ที่ระบุว่า การใช้สารสกัดผสม 2 ชนิด จากพืช *Acorus calamus* L., *Coscinium fenestratum* (Goetgh.) Colebr., *Piper betle* Linn., *P. nigrum* L. และ *P. retrofractum* Vahl. แสดงการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola*, *C. capsici* และ *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ได้มากกว่าการใช้สารสกัดเดียว

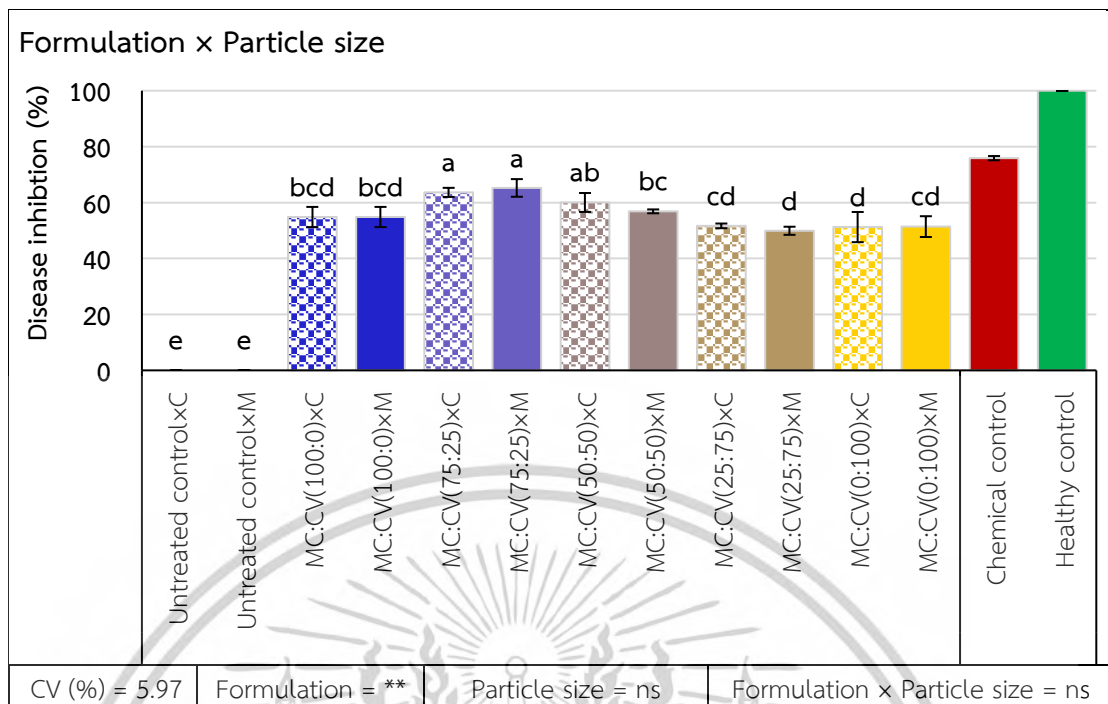
ในขณะที่ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา พบว่า ในภาพรวมการใช้สารสกัดผสมอนุภาคไมโครมีประสิทธิภาพการยับยั้งที่ดีกว่าการใช้สารสกัดผสมอนุภาคปกติ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ Mossa *et al.* (2021) ที่พบว่า การลดขนาดอนุภาคของน้ำมันหอมระเหยจาก clove, black seed, lemon และ orange แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *A. tenuissima*, *F. solani* และ *G. candidum* ได้สูงกว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยอนุภาคปกติ ซึ่งอาจเป็นเพราะอนุภาคของสารสกัดที่มีขนาดเล็กสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของเชื้อราได้มากขึ้น เป็นผลให้สารประกอบออกฤทธิ์ต่าง ๆ ในสารสกัดพืช แสดงประสิทธิภาพได้มากขึ้น (Gevorgyan *et al.*, 2022; Rana *et al.*, 2023)

4.8.3 อธิพลของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้างขวด

ในการควบคุมโรคใบจุดในสภาพโรงเรือน

4.8.3.1 ผลต่อการลดโรคใบจุด

การทดสอบอิทธิพลของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้างขวดในอัตราส่วนผสมที่แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm ในการลดโรคใบจุดในสภาพโรงเรือน พบว่า กรรมวิธีที่ใช้สารสกัดพืชทุกกรรมวิธีสามารถลดการเกิดโรคใบจุดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Untreated control) แต่อย่างไรก็ตาม ผลการยับยั้งโรคใบจุดนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยอัตราส่วนในการผสมสารสกัด (formulation) แต่ขนาดอนุภาคของสารสกัด (particle size) ไม่มีผลต่อการยับยั้งโรค กล่าวคือ สารสกัดผสมทั้ง 2 อนุภาค MC: CV(75:25)×M และ MC:CV(75:25)×C แสดงผลการยับยั้งโรคได้ดีที่สุด อยู่ในช่วง 63.64-65.23 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม รองลงมา คือ MC:CV(100:0)×C และ MC:CV(100:0)×M หรือกรรมวิธีที่ใช้สารสกัดจากใบเสม็ดขาวเพียงอย่างเดียว (54.84 เปอร์เซ็นต์) ส่วนกรรมวิธีอื่น ๆ สามารถยับยั้งได้ อยู่ในช่วง 49-60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีเสริม (chemical control) ยับยั้งโรคใบจุดได้ 75.88 เปอร์เซ็นต์ (Figure 4.13 และ 4.14A) จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การใช้สารสกัดทั้งอนุภาคไมโครและอนุภาคปกติในอัตราส่วน 75:25 มีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งผลการทดลองนี้ไม่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองในสภาพห้องปฏิบัติการ ซึ่งสารสกัดใบเสม็ดขาวเพียงอย่างเดียว (100:0) แสดงประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญทางเส้นใยเชื้อราทดสอบได้ดีที่สุด



Values are means of three replicates. Values in each column bar followed by the same letter are not significantly different according to LSD ($P>0.05$).

C = Crude-formulation, M = Micro-formulation.

Figure 4.13 The combination effect of *Melaleuca cajuputi* (MC) and *Callistemon viminalis* (CV) extract (at 5,000 ppm) on *Alternaria* leaf spot disease in lettuce at 7 DAI.

4.8.3.2 ผลต่อการเจริญเติบโตของผักสลัด

สำหรับผลการทดสอบของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครต่อการเจริญของผักสลัด แสดงให้เห็นว่า อัตราส่วนในการผสมสารสกัด (formulation) มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อ จำนวนใบ ความยาวใบ ค่าความเขียว (SPAD value) และน้ำหนักสด ในขณะที่ขนาดอนุภาคของสารสกัดมีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อความยาวใบและน้ำหนักสดเท่านั้น แต่ไม่มีผลต่อจำนวนใบและค่าความเขียว แต่หากพิจารณาปัจจัยร่วมระหว่างอัตราส่วนในการผสมและขนาดอนุภาคของสารสกัด พบว่าการใช้สารสกัดผสมทุกกรรมวิธีและสารสกัดใบแปรงล้างขวดเพียงอย่างเดียว มีผลต่อจำนวนใบอยู่ในช่วงประมาณ 21-23 ใบ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีควบคุม (untreated control) และสารสกัดเมล็ดข้าวเพียงอย่างเดียว [MC:CV (100:0)] แสดงจำนวนใบอยู่ในช่วงประมาณ 19-20 ใบ ในขณะที่กรรมวิธีเสริม (chemical control และ healthy control) แสดงจำนวนใบเท่ากับ 20 ใบ (Table 4.12)

ส่วนค่าความเขียว (SPAD value) การใช้สารสกัดผสมอนุภาคไมโครทุกกรรมวิธีที่ทดสอบแสดงผลไม่แตกต่างกัน อยู่ในช่วง 37.20-40.27 แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีควบคุม (untreated control) แสดงผลเท่ากับ 28 (Table 4.12)

สำหรับความยาวของใบผักสลัด การใช้สารสกัดผสมอนุภาคไมโครจากพืชทั้ง 2 ชนิด ทุกกรรมวิธี ส่งผลต่อความยาวของใบผักสลัดมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (untreated control) ซึ่งแสดงความยาวใบ 16.63 ซม. ยิ่งไปกว่านั้น การใช้สารสกัดผสม MC:CV (25:75) × C และ MC:CV (25:75) × M แสดงความยาวใบมากที่สุดอยู่ในช่วง 22.57-22.60 ซม. รองลงมาคือ MC:CV(0:100)×M, MC:CV(50:50)×C และ MC:CV(50:50)×M แสดงความยาวใบอยู่ในช่วง 20.87-21.27 ซม. ในขณะที่การใช้สารสกัดผสมกรรมวิธีอื่น ๆ แสดงความยาวอยู่ในช่วง 17.57-19.70 ซม. (Table 4.12)

ส่วนด้านของผลผลิต (yield) การใช้สารสกัดผสมอนุภาคไมโครจากพืชทั้ง 2 ชนิด แสดงผลเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับความยาวใบผักสลัด กล่าวคือ การใช้สารสกัดผสมทุกกรรมวิธีที่ทดสอบ แสดงน้ำหนักของผลผลิตมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (อยู่ในช่วงประมาณ 115-178 กรัม) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (73.67 กรัม) โดยการใช้สารสกัดอนุภาคไมโครจากแปรงล้างขวดเพียงอย่างเดียว [MC:CV(0:100)×M] แสดงน้ำหนักของผลผลิตมากที่สุดเท่ากับ 178.47 กรัม ซึ่งมากกว่ากรรมวิธีควบคุม (untreated control) และ กรรมวิธีเสริม (healthy control) ถึง 142.26 และ 53.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ สารสกัดอนุภาคปกติจากใบแปรงล้างขวดเพียงอย่างเดียว [MC:CV(0:100)×C] แสดงน้ำหนักเท่ากับ 158.03 กรัม ซึ่งมากกว่า untreated control และ healthy control ถึง 114.52 และ 36.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม การใช้สารสกัดผสมก็ยังคงแสดงน้ำหนักของผลผลิตที่ดีเช่นกัน โดยมากกว่า untreated control และ healthy control อยู่ในช่วง 62.17-85.07 และ 2.99-17.53 เปอร์เซ็นต์ (Table 4.12 และ Figure 4.14B) จากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการใช้สารสกัดจากใบเมล็ดข้าวและใบแปรงล้างขวดทุกรูปแบบส่งผลต่อการเจริญเติบโตของผักสลัดมากกว่าชุดควบคุม (untreated control) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การใช้สารสกัดที่มีส่วนผสมจากใบแปรงล้างขวดร่วมด้วย จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัดที่มากขึ้น โดยการกระตุ้นดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับปริมาณสัดส่วนของสารสกัดแปรงล้างขวด ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของสารสกัดดังกล่าว

Table 4.12 Effect of combined extract from *Melaleuca cajuputi* (MC) and *Callistemon viminalis* (CV) on *Alternaria* leaf spot and plant parameters in lettuce at harvest.

Treatment	Leaf number	Leaf length (cm)	SPAD value	Yield (g/plant)	Per cent yield increase over untreated control	Per cent yield increase over healthy control
T1= Untreated controlxC	19.3c ¹	16.63g	28.0b	73.67g	0.00	-36.49
T2= Untreated controlxM	19.3c	16.63g	28.0b	73.67g	0.00	-36.49
T3= MC:CV(100:0)xC	20.3c	17.57f	40.27a	115.47f	56.74	-0.46
T4= MC:CV(100:0)xM	20.3c	17.67f	39.37a	116.77f	58.51	0.66
T5= MC:CV(75:25)xC	22.6ab	18.83e	39.30a	119.47ef	62.17	2.99
T6= MC:CV(75:25)xM	21.6a	19.57d	38.50a	119.63ef	62.40	3.13
T7= MC:CV(50:50)xC	22.0ab	20.33c	37.40a	123.90de	68.19	6.81
T8= MC:CV(50:50)xM	22.3ab	20.87bc	37.83a	126.47d	71.67	9.02
T9= MC:CV(25:75)xC	23.0a	22.57a	37.20a	127.50d	73.08	9.91
T10= MC:CV(25:75)xM	23.0a	22.60a	37.70a	136.33c	85.07	17.53
T11= MC:CV(0:100)xC	23.0a	19.70d	38.23a	158.03b	114.52	36.24
T12= MC:CV(0:100)xM	22.3ab	21.27b	38.50a	178.47a	142.26	53.85
Chemical control	20.0	16.70	39.70	117.9	60.05	1.64
Healthy control	20.3	16.77	35.97	116.0	57.47	0.00
C.V. (%)	2.98	1.70	5.05	2.25		
Formulation	**	**	**	**		
Particle size	ns	**	ns	**		
Formulation x Particle size	ns	**	ns	**		

¹Values are means of three replicates. Values in each column followed by the same letter are not significantly different according to LSD ($P>0.05$).

C: crude extract; M: micro extract.

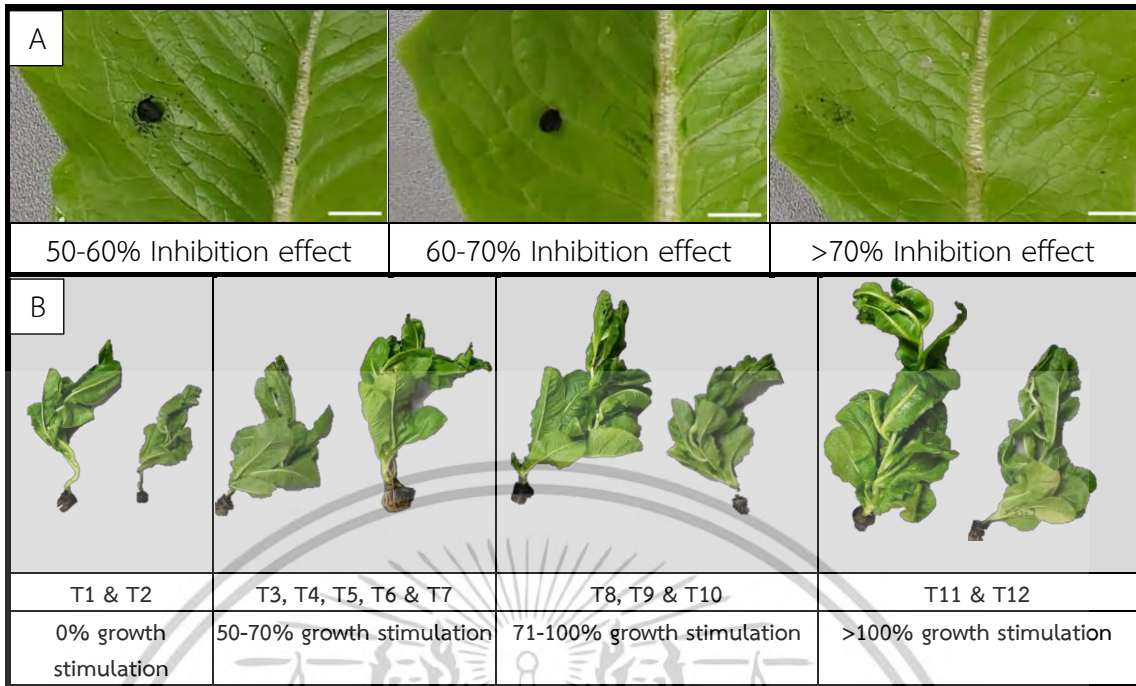


Figure 4.14 The image of lettuce leaf showing *Alternaria* sp. leaf spot (A) and growth of lettuce (B) treated with extract formulation from *Melaleuca cajuputi* and *Callistemon viminalis* at the harvest.

4.8.3.3 ผลในการชักนำเอนไซม์ความต้านทานโรคพืช

การทดสอบศักยภาพของสารสกัดผสมอนุภาคไมโคร (5,000 ppm) ต่อการชักนำเอนไซม์ต้านทานโรคพืชในผักสลัด โดยศึกษาถึงปัจจัยอัตราส่วนผสม (formulation) และขนาดอนุภาค (particle size) ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า ทั้งปัจจัยอัตราส่วนผสม และขนาดของอนุภาคของสารสกัด มีผลต่อการชักนำเอนไซม์ (β -1,3-glucanase, chitinase และ peroxidase) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (1-14 DAI) กล่าวคือ ในช่วงแรกของการทดสอบ (1 DAI) การใช้สารสกัดผสม MC:CV(25:75)×C มีกิจกรรม β -1,3-glucanase สูงสุด รองลงมาคือ MC:CV(25:75)×M, MC:CV(50:50)×M และ MC:CV(0:100)×C ตามลำดับ ในขณะที่ MC:CV(100:0)×C มีกิจกรรมเอนไซม์น้อยที่สุด แต่ยังคงมากกว่ากรรมวิธีควบคุม (untreated control) อย่างมีนัยทางสถิติเมื่อเวลาผ่านไป 3 – 5 DAI กิจกรรมเอนไซม์ในทุกกรรมวิธีเพิ่มมากขึ้น และเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึง 7 DAI กิจกรรม β -1,3-glucanase ในทุกกรรมวิธีเพิ่มสูงที่สุด และผลการทดสอบยังคงเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับช่วงแรก โดยกรรมวิธี MC:CV(25:75)×C มีกิจกรรม β -1,3-glucanase สูงสุดมากกว่า untreated control และ chemical control ถึง 45.2 และ 49.2 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ MC:CV(50:50)×M และ MC:CV(25:75)×M ซึ่งสูงกว่า untreated control ถึง 38.8 และ 35.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 4.13)

สำหรับกิจกรรม chitinase และ peroxidase การใช้สารสกัดจากพืชทุกกรรมวิธี (7 DAI) ยังคงเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ β -1,3-glucanase โดยกรรมวิธี MC:CV(25:75)×C มีกิจกรรม chitinase มากที่สุด และสูงกว่า untreated control และ chemical control ถึง 32.0 และ 39.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่กิจกรรม peroxidase กรรมวิธีดังกล่าวสูงกว่า untreated control และ chemical control ถึง 31.8 และ 38.5 เปอร์เซ็นต์ (Table 4.14 และ 4.15) นอกจากนี้แล้ว เมื่อระยะเวลาผ่านไป 14 DAI เอนไซม์ความต้านทานโรคแต่ละชนิด มีปริมาณการสะสมเอนไซม์ที่ลดลง

จากผลการทดสอบข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ประสิทธิภาพการยับยั้งโรคใบจุด และกิจกรรมเอนไซม์ความต้านทานโรคพืช ไม่มีความสอดคล้องกัน กล่าวคือ ประสิทธิภาพยับยั้งโรคได้สูงที่สุดจะพบจากกรรมวิธีที่ใช้สารสกัดผสมทั้งอนุภาคปกติและอนุภาคไมโครในอัตราส่วน 75:25 แต่ผลการกระตุ้นเอนไซม์ต้านทานโรคพืชที่ดีที่สุด กลับพบในกรรมวิธีที่ใช้สารสกัดผสม MC:CV(25:75)×C

Table 4.13 Activity of β -1,3-glucanase against *Alternaria* sp. in lettuce treated with *Melaleuca cajuputi* (MC) and *Callistemon viminalis* (CV) at 5,000 ppm.

Treatment	Activity of β -1,3-glucanase (μ mol glucose /g of fresh leaves)						Per cent increase over before application of inducers (7 DAI)	Per cent increase over untreated control (7 DAI)	Per cent increase over chemical control (7 DAI)
	Before application of inducers	1 DAI	3 DAI	5 DAI	7 DAI	14 DAI			
Untreated controlxC	1.26a ¹	4.23j	4.77j	5.07i	6.26i	5.77i	79.8	0	7.3
Untreated controlxM	1.26a	4.23j	4.77j	5.07i	6.26i	5.77i	79.8	0	7.3
MC:CV(100:0)xC	1.36a	4.80i	5.37i	6.23h	7.16h	6.20h	81.0	12.5	18.9
MC:CV(100:0)xM	1.30a	6.20f	7.17f	7.87f	8.96e	8.17f	85.4	30.1	35.2
MC:CV(75:25)xC	1.33a	5.57g	6.67g	7.57g	8.33g	7.83g	84.0	24.8	30.3
MC:CV(75:25)xM	1.26a	6.37e	7.47d	8.17e	9.26d	8.47e	86.3	32.3	37.3
MC:CV(50:50)xC	1.36a	6.13f	7.33e	8.43d	9.20d	8.67d	85.2	31.9	36.9
MC:CV(50:50)xM	1.33a	7.23c	8.43b	9.33b	10.23b	9.57b	86.9	38.8	43.3
MC:CV(25:75)xC	1.23a	8.13a	9.17a	10.27a	11.43a	10.23a	89.2	45.2	49.2
MC:CV(25:75)xM	1.40a	7.47b	7.97c	8.57c	9.76c	9.17c	85.6	35.8	40.5
MC:CV(0:100)xC	1.40a	6.73d	7.37e	8.17e	9.16d	8.53e	84.7	31.6	36.6
MC:CV(0:100)xM	1.36a	5.10h	6.33h	7.53g	8.63f	7.83g	84.2	27.4	32.7
Chemical control	1.33	3.13	4.47	5.53	5.80	5.13	77.0	-7.9	0
Healthy control	1.44	2.47	3.53	4.47	5.13	4.23			
C.V. (%)	8.89	0.99	0.72	0.53	0.94	0.71			
Formulation	ns	**	**	**	**	**			
Particle size	ns	**	**	**	**	**			
Formulation x Particle size	ns	**	**	**	**	**			

¹Values are means of three replicates. Values in each column within each enzyme, followed by the same letter are not significantly different according to LSD ($P>0.05$). C: crude extract; M: micro extract.

Table 4.14 Activity of chitinase against *Alternaria* sp. in lettuce treated with *Melaleuca cajuputi* (MC) and *Callistemon viminalis* (CV) at 5,000 ppm.

Treatment	Activity of Chitinase ($\mu\text{mol GlcNAc/g}$ of fresh leaves)						Per cent increase over before application of inducers (7 DAI)	Per cent increase over untreated control (7 DAI)	Per cent increase over chemical control (7 DAI)
	Before application of inducers	1 DAI	3 DAI	5 DAI	7 DAI	14 DAI			
Untreated controlxC	2.43ab ¹	5.87j	6.77k	7.83i	8.26h	7.13i	70.5	0.0	11.2
Untreated controlxM	2.43ab	5.87j	6.77k	7.83i	8.26h	7.13i	70.5	0.0	11.2
MC:CV(100:0)xC	2.40ab	6.07i	7.17j	8.13h	8.36h	7.10i	71.2	1.1	12.3
MC:CV(100:0)xM	2.46a	7.47f	8.33g	8.99f	10.16e	8.77f	75.7	18.7	27.8
MC:CV(75:25)xC	2.26b	6.87g	7.87h	8.69g	9.53g	8.20h	76.2	13.3	23
MC:CV(75:25)xM	2.50a	7.67e	8.67d	9.29e	10.46d	9.17d	76.0	21.0	29.9
MC:CV(50:50)xC	2.36ab	7.43f	8.47f	9.55d	10.40d	9.07de	77.3	20.5	29.5
MC:CV(50:50)xM	2.53a	8.53c	9.67b	10.45b	11.43b	10.13b	77.8	27.7	35.8
MC:CV(25:75)xC	2.40ab	9.43a	10.37a	11.39a	12.16a	10.87a	80.2	32.0	39.7
MC:CV(25:75)xM	2.46a	8.80b	9.17c	9.69c	10.96c	9.67c	77.5	24.6	33.1
MC:CV(0:100)xC	2.50a	6.37h	7.53i	8.65g	9.80f	8.53g	74.4	15.7	25.2
MC:CV(0:100)xM	2.43ab	8.10d	8.57e	9.29e	10.36d	9.00e	76.5	20.2	29.2
Chemical control	2.43	5.13	5.67	6.80	7.33	6.83	66.8	-12.6	0
Healthy control	2.33	3.50	4.67	6.35	6.93	5.63			
C.V. (%)	4.75	1.02	0.68	0.49	0.99	0.87			
Formulation	ns	**	**	**	**	**			
Particle size	*	**	**	**	**	**			
Formulation x Particle size	ns	**	**	**	**	**			

¹Values are means of three replicates. Values in each column within each enzyme, followed by the same letter are not significantly different according to LSD ($P>0.05$). C: crude extract; M: micro extract

Table 4.15 Activity of peroxidase against *Alternaria* sp. in lettuce treated with *Melaleuca cajuputi* (MC) and *Callistemon viminalis* (CV) at 5,000 ppm.

Treatment	Activity of Peroxidase (unit/ g of fresh leaves)						Per cent increase over before application of inducers (7 DAI)	Per cent increase over untreated control (7 DAI)	Per cent increase over chemical control (7 DAI)
	Before application of inducers	1 DAI	3 DAI	5 DAI	7 DAI	14 DAI			
Untreated controlxC	3.83ab ¹	7.46i	7.83j	8.33j	9.20j	10.41d	58.3	0	9.8
Untreated controlxM	3.83ab	7.46i	7.83j	8.33i	9.20j	10.41d	58.3	0	9.8
MC:CV(100:0)xC	3.8ab	7.43i	7.76i	8.69h	9.69i	8.34i	60.7	5.0	14.4
MC:CV(100:0)xM	3.86a	8.70f	9.56f	10.32f	11.49f	10.01f	66.4	19.9	27.8
MC:CV(75:25)xC	3.66b	8.10g	9.09g	10.02g	10.86h	9.44h	66.2	15.2	23.6
MC:CV(75:25)xM	3.90a	8.90e	9.89d	10.62e	11.79e	10.41d	66.9	21.9	29.6
MC:CV(50:50)xC	3.76a	8.66f	9.69ef	10.89d	11.72e	10.31de	67.9	21.5	29.2
MC:CV(50:50)xM	3.93a	9.76c	10.89b	11.79b	12.76b	11.37b	69.2	27.8	35.0
MC:CV(25:75)xC	3.8ab	10.66a	11.59a	12.72a	13.49a	12.11a	71.8	31.8	38.5
MC:CV(25:75)xM	3.86ab	10.03b	10.39c	11.02c	12.29c	10.91c	68.5	25.1	32.5
MC:CV(0:100)xC	3.9a	7.64h	8.76h	10.05g	11.17g	9.77	65.0	17.6	25.7
MC:CV(0:100)xM	3.83ab	9.33d	9.79de	10.62e	11.98d	10.24e	68.0	23.2	30.8
Chemical control	3.83	6.36	6.89	7.53	8.29	9.07	53.7	-10.9	0.0
Healthy control	3.73	5.27	6.93	7.17	7.87	7.07			
C.V. (%)	2.90	0.87	0.95	0.64	0.93	0.81			
Formulation	Ns	**	**	**	**	**			
Particle size	*	**	**	**	**	**			
Formulation x Particle size	Ns	**	**	**	**	**			

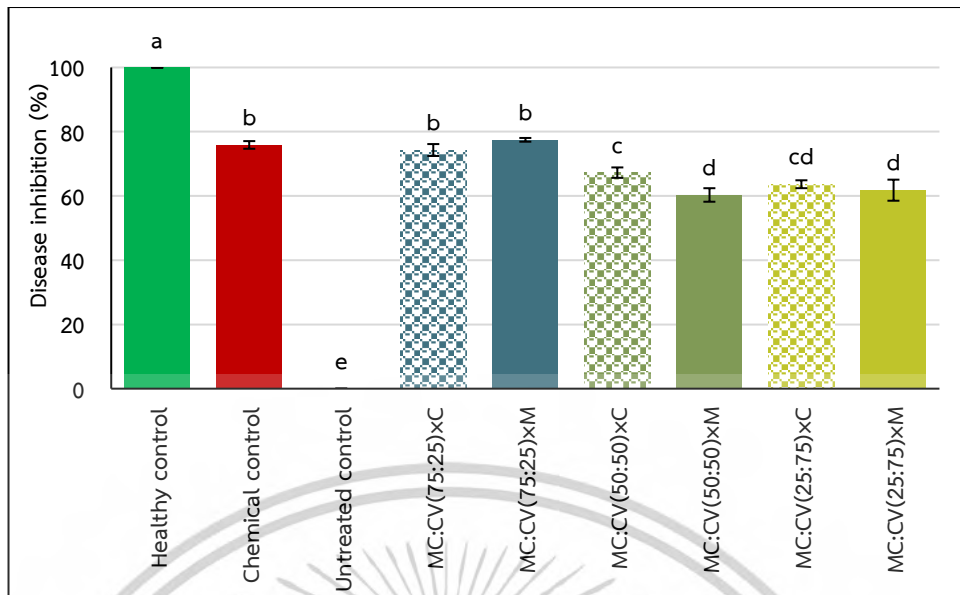
¹Values are means of three replicates. Values in each column within each enzyme, followed by the same letter are not significantly different according to LSD (P>0.05). C: crude extract; M: micro extract.

4.8.4 อิทธิพลของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครที่ระดับความเข้มข้นสูงจากใบเสม็ดขาว และใบแปรงล้าขวดในการควบคุมโรคใบจุด *Alternaria* และการชักนำเอนไซม์ ความต้านทานโรคของผักสลัดในสภาพโรงเรือน

การทดสอบอิทธิพลของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครที่ระดับความเข้มข้นสูง (10,000 ppm) จากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวด ในการควบคุมโรคใบจุด *Alternaria* ในผักสลัด พบว่า การใช้สารสกัดผสมทุกกรรมวิธีสามารถลดโรคใบจุดได้ ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธี untreated control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ กรรมวิธีที่ใช้สารสกัดผสมในอัตราส่วน 75:25 ทั้งอนุภาคปกติและอนุภาคไมโคร [MC:CV (75:25)×C และ MC:CV (75:25)×M] สามารถลดโรคได้สูงสุด อยู่ในช่วง 74.29-77.47 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างจากกรรมวิธี chemical control (75.88 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้สารสกัดผสมอื่น ๆ สามารถลดโรคได้ อยู่ในช่วง 60.30-67.25 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามหากพิจารณาถึงผลการลดโรคใบจุดแล้วจะเห็นได้ว่า การใช้สารสกัดผสมที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้มากขึ้นด้วย ซึ่งการใช้สารสกัดผสมที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm สามารถลดโรคใบจุดได้ อยู่ในช่วง 60.30-77.47 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้สารสกัดผสมดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm แสดงการลดโรคเพียง 49.91-65.23 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น (Figure 4.15)

สำหรับการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ต้านทานโรคพืช (β -1,3 glucanase, chitinase และ peroxidase) ยังคงเป็นไปในรูปแบบเดียวกันกับการใช้สารสกัดผสมที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm กล่าวคือ การใช้สารสกัดผสมทุกกรรมวิธี ส่งผลให้ผักสลัดมีกิจกรรมเอนไซม์ความต้านทานโรค ทั้ง 3 ชนิด มากกว่ากรรมวิธีควบคุมทั้ง 3 กรรมวิธี (Healthy control, Chemical control และ Untreated control) อีกทั้งเมื่อระยะเวลาผ่านไป ทุกกรรมวิธีที่ทดสอบมีกิจกรรมการสะสมเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นด้วย และเมื่อระยะเวลา 7 DAI พบว่า การใช้สารสกัดผสมทุกกรรมวิธีสามารถกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ความต้านทานโรคพืชได้สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยิ่งไปกว่านั้น กรรมวิธีที่ผสมสารสกัดแปรงล้าขวดในอัตราที่สูงขึ้นจะส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้นด้วย โดยกรรมวิธี MC:CV (25:75)×M สามารถชักนำกิจกรรมเอนไซม์ β -1,3 glucanase, chitinase และ peroxidase ได้สูงสุด เท่ากับ 12.10 $\mu\text{mol glucose/g}$ of fresh leaves, 13.46 $\mu\text{mol GlcNAc/g}$ of fresh leaves และ 14.79 unit/g of fresh leaves ตามลำดับ รองลงมาคือ MC:CV (25:75)×C ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Untreated control, Chemical control และ Healthy control) (Table 4.16)

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครในระดับความเข้มข้น 10,000 ppm ยังคงเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดสอบสารสกัดผสมที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm คือ ประสิทธิภาพการยับยั้งโรคใบจุด ไม่สอดคล้องกับกิจกรรมเอนไซม์ต้านทานโรค



Values are means of three replicates. Values in each column bar followed by the same letter are not significantly different according to LSD ($P>0.05$).
C = Crude-formulation, M = Micro-formulation.

Figure 4.15 The combination effect of *Melaleuca cajuputi* (MC) and *Callistemon viminalis* (CV) extract (at 10,000 ppm) on *Alternaria* leaf spot disease in lettuce at 7 DAI.

Table 4.16 Activities of plant defense enzymes against *Alternaria* sp. in lettuce treated with *Melaleuca cajuputi* (MC) and *Callistemon viminalis* (CV) at 10,000 ppm.

Treatment	Activities of plant defense enzymes														
	β -1,3-glucanase (μ mol glucose/g of fresh leaves)					Chitinase (μ mol GlcNAc/g of fresh leaves)					Peroxidase (unit/g of fresh leaves)				
	Before application of inducers	1 DAI	3 DAI	5 DAI	7 DAI	Before application of inducers	1 DAI	3 DAI	5 DAI	7 DAI	Before application of inducers	1 DAI	3 DAI	5 DAI	7 DAI
Healthy control	1.44a	2.47h	3.53i	4.47i	5.13i	2.33a	3.50h	4.67i	6.35i	6.93h	3.73a	5.27h	6.93h	7.17i	7.87h
Chemical control	1.33ab	3.13g	4.47h	5.53g	5.80h	2.43a	5.13g	5.67h	6.80h	7.33g	3.83a	6.36g	6.89h	7.53h	8.29g
Untreated control	1.26b	4.23f	4.77g	5.07h	6.26g	2.43a	5.87f	6.77g	7.83g	8.26f	3.83a	7.46f	7.83g	8.33g	9.20f
MC:CV (75:25) \times C	1.43ab	5.80e	6.27f	7.33f	8.46f	2.40a	7.13e	7.47f	8.45f	9.66e	3.80a	8.36e	8.69f	9.79f	10.99e
MC:CV (75:25) \times M	1.40a	6.53d	7.77d	8.87d	9.86c	2.33a	7.87d	8.97d	9.99d	9.86d	3.73a	9.10d	10.19d	11.32d	11.19d
MC:CV (50:50) \times C	1.36ab	6.53d	6.87e	8.10e	8.96e	2.50a	7.83d	8.07e	9.22e	10.73c	3.90a	9.06d	9.29e	10.55e	12.06c
MC:CV (50:50) \times M	1.33ab	7.53c	8.73c	9.63c	9.63d	2.43a	8.80c	9.93c	10.75c	10.83c	3.83a	10.03c	11.16c	12.09c	12.16c
MC:CV (25:75) \times C	1.33ab	8.50a	9.43a	10.53b	11.46b	2.50a	9.83a	10.27b	11.65b	12.66b	3.90a	10.40b	11.49b	12.99b	13.99b
MC:CV (25:75) \times M	1.26b	7.83b	9.23b	10.93a	12.10a	2.36a	9.17b	10.63a	12.05a	13.46a	3.76a	11.06a	11.86a	13.39a	14.79a
C.V. (%)	6.37	1.32	1.30	1.10	0.97	4.85	0.96	0.93	0.98	0.75	2.9	0.75	1.15	1.27	0.86

Values are means of three replicates. Values in each column within each enzyme, followed by the same letter are not significantly different according to LSD ($P>0.05$). C: crude extract; M: micro extract.

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดผสมทั้งรูปแบบอนุภาคปกติและอนุภาคไมโครในการควบคุมโรคใบจุด *Alternaria* พบว่า สารสกัดผสมทุกอัตราส่วนที่ทดสอบสามารถลดการเกิดโรคได้ โดยการใช้สารสกัดผสม MC:CV(75:25) มีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคได้มากกว่าการใช้สารสกัด MC:CV(100:0) ซึ่งไม่สอดคล้องกับการทดสอบการยับยั้งการเจริญทางเส้นใย ที่พบว่า MC:CV(100:0) มีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งอาจเป็นเพราะคุณสมบัติที่ดีของสารสกัดจากพืชแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน โดยสารสกัดจากใบเสมีต์ขาวจะมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อรา รวมทั้งการลดความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุด โดยพบสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จำนวนมาก ในขณะที่การใช้สารสกัดจากใบแปรงล้างขวดจะส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและยัง กระตุ้นการสร้างเอนไซม์ต้านทานเชื้อราได้เป็นอย่างดี ช่วยเสริมฤทธิ์ในการควบคุมโรคใบจุด ถึงแม้ว่าการลดขนาดอนุภาคของสารสกัดพืช จะไม่มีผลต่อการควบคุมโรคใบจุดก็ตาม นั่นอาจเป็นข้อดีของการใช้สารสกัดจากพืชขนาดอนุภาคไมโครก็เป็นได้ เพราะเนื่องจากมีงานวิจัยหลายฉบับที่ได้รายงานว่าการลดขนาดอนุภาคของสารสกัดพืช หรือการใช้สารสกัดพืชในรูปแบบนาโน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคได้เป็นอย่างดี แต่ในทางกลับกัน สารสกัดในรูปแบบดังกล่าวส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชได้ (Rastogi *et al.*, 2017; Goswami *et al.*, 2019; Selvakesavan *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023) อีกทั้งยังมีผลต่อสิ่งแวดล้อม (Martinez *et al.*, 2020; Tunçsoy, 2023) มากกว่าประโยชน์ที่จะได้รับ



4.8.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงโรคใบจุดกับกิจกรรมของเอนไซม์ความต้านทานโรคพืช

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงโรคใบจุด *Alternaria* กับกิจกรรมของเอนไซม์ต้านทานโรคพืชแต่ละชนิด (β -1,3 glucanase, chitinase และ peroxidase) ในผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วยสารสกัดผสมอนุภาคไมโครจากใบเสมีตขาวและใบแปรงล้าชวด ทั้งระดับความเข้มข้น 5,000 และ 10,000 ppm ในช่วงวันที่ 3, 5 และ 7 วันหลังการปลูกเชื้อ พบว่า ในการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงโรคกับ β -1,3 glucanase, chitinase และ peroxidase (3, 5 และ 7 DAI) พบว่า ความรุนแรงโรคไม่มีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด (Figure 4.16) ซึ่งผลการวิเคราะห์ มีความสอดคล้องกับผลการลดโรคใบจุดและผลการกระตุ้นเอนไซม์ กล่าวคือ การใช้สารสกัดผสมในอัตราส่วน 75:25 ทั้งอนุภาคปกติและอนุภาคไมโครแสดงประสิทธิภาพยับยั้งโรคดีที่สุด ในขณะที่ผลการกระตุ้นเอนไซม์ต้านทานโรคกลับพบในกรรมวิธีที่ใช้สารสกัดผสม MC:CV(25:75)×C ซึ่งไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน กรณีนี้อาจจะเป็นผลมาจากคุณสมบัติที่ดีของสารสกัดแต่ละชนิด โดยสารสกัดจากใบเสมีตขาวมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราและโรคได้เป็นอย่างดี ในขณะที่สารสกัดใบแปรงล้าชวดมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชและกระตุ้นเอนไซม์ต้านทานโรค จึงทำให้สูตรที่มีอัตราส่วนผสมของสารสกัดใบเสมีตขาวสูงกว่าใบแปรงล้าชวดมีคุณสมบัติยับยั้งโรคที่มากและมีคุณสมบัติการกระตุ้นเอนไซม์เล็กน้อย ในทางกลับกัน หากสูตรที่มีอัตราส่วนผสมของสารสกัดใบแปรงล้าชวดมากกว่าสารสกัดเสมีตขาว ก็จะมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชและการสะสมเอนไซม์ความต้านทานโรคที่มากกว่า นอกจากนี้แล้ว การวิเคราะห์ความสัมพันธ์นี้ยังคงเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ Kumar *et al.* (2017) ซึ่งทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงโรคใบไหม้ในมันฝรั่งกับเอนไซม์ความต้านทานโรคพืชที่ได้รับการกระตุ้นจากสารสกัดพืช 11 ชนิด พบว่า ความสัมพันธ์ดังกล่าวมีลักษณะเป็นเชิงลบในระดับต่ำ (ระดับความสัมพันธ์อยู่ในช่วง -0.1 ถึง -0.3 เท่านั้น)

ในขณะที่ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงโรคกับเอนไซม์จากการทดสอบสารสกัดผสมอนุภาคไมโครความเข้มข้น 10,000 ppm พบว่า ในช่วงแรก (1 DAI) ความรุนแรงโรคกับเอนไซม์ความต้านทานโรคทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความสัมพันธ์กัน ส่วน 5 และ 7 DAI พบเป็นความสัมพันธ์เชิงบวก (Figure 4.16) ซึ่งไม่เป็นไปตามสมมุติฐานที่ตั้งไว้ กล่าวคือ กิจกรรมการสะสมเอนไซม์ที่ตรวจพบ ไม่สอดคล้องกับประสิทธิภาพการลดลงของโรคและต่างไปจากทฤษฎี คือ ประสิทธิภาพการยับยั้งโรคสูง แต่กิจกรรมการสะสมเอนไซม์ต่ำ หรือ ประสิทธิภาพการยับยั้งโรคต่ำ แต่กิจกรรมการสะสมเอนไซม์สูง ซึ่งยังคงเป็นที่น่าสงสัย และต้องทำการศึกษาต่อไปเพื่อให้ได้มาข้อสรุป

อย่างไรก็ตาม จากการทดสอบสารสกัดผสมจากใบเสมีตขาวและใบแปรงล้าชวดที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm สารสกัดผสมทุกอัตราส่วนยังสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้เป็นอย่างดี ยิ่งไปกว่านั้น หากเพิ่มความเข้มข้นที่ระดับ 10,000 ppm ประสิทธิภาพการยับยั้งก็ยังคงเพิ่มสูงขึ้นด้วย ถึงแม้กิจกรรมเอนไซม์จะไม่เป็นไปตามที่คาดหวังไว้ และหากพิจารณาในแง่ของผลผลิตแล้ว กรรมวิธีที่ใช้สารสกัดแปรงล้าชวดน่าจะดีที่สุด เนื่องจากสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นผักสลัดได้เป็นอย่างดี และยังพอลดโรคได้ดีในระดับหนึ่ง รองลงมาคือ สูตรผสมสารใบเสมีตขาวและใบแปรงล้าชวดอัตราส่วน 50:50 เนื่องจากสามารถลดโรคได้ดีและยังส่งเสริมการจะเจริญเติบโตของพืชได้ อีกทั้งยังเป็นการลดความเข้มข้น หรือปริมาณการใช้สารสกัดจากพืชลง เพื่อไม่ให้เกิดการต้านทานต่อสารสกัดพืชของเชื้อราสาเหตุโรค ต่อไป

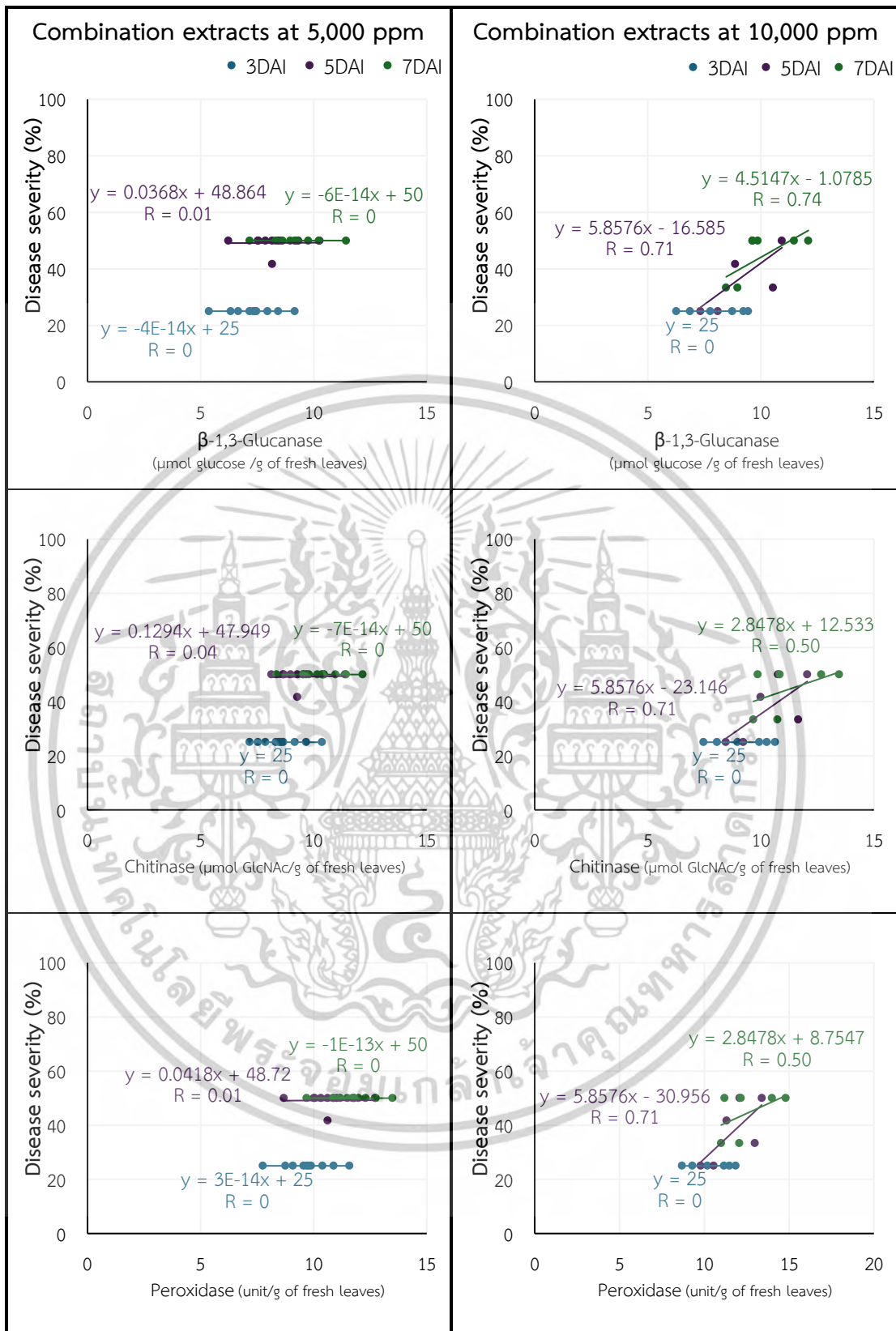


Figure 4.16 Correlation of disease severity with β -1,3-glucanase, chitinase, and peroxidase activity in lettuce treated with combined extract from *Melaleuca cajuputi* (MC) and *Callistemon viminalis* (CV) against *Alternaria* sp. at 3-7 DAI.

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักสลัด พบเชื้อรา 2 ไอโซเลท และศึกษาสัญญาณวิทยา ทำให้ทราบว่าเชื้อราที่แยกได้ คือ *Alternaria* sp. (Alt-LL1) และ *Curvularia* sp. (Cur-LL2) โดยผลจากการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนใบผักสลัด พบว่า เชื้อรา *Alternaria* sp. แสดงความรุนแรงโรคมากที่สุดถึง 85 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปจัดจำแนก species โดยวิธีอนุชีววิทยา ซึ่งสามารถจัดจำแนกได้เป็น *Alternaria brassicicola*

ผลจากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบพืชวงศ์ชมพู่ 4 ชนิด ได้แก่ สารสกัดใบเสมีดขาว (95%EEMC) สารสกัดใบแปรงล้างขวด (95%EECV) สารสกัดใบชมพูมะเหมี่ยว (95%EESM) และสารสกัดชมพูน้ำดอกไม้ม (95%EESJ) ต่อการงอกและพืชปลูก พบว่า สารสกัดทั้ง 4 ชนิด ไม่มีพิษต่อเมล็ดผักสลัดคอสและยังสามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดได้ ส่วนผลต่อพืชปลูก สารสกัดทั้งหมดที่ทดสอบยังคงไม่มีพิษต่อผักสลัดคอสที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์ อีกทั้งสารสกัด 95%EECV ยังสามารถกระตุ้นให้ผักสลัดมีการเจริญเติบโตมากกว่าชุดควบคุม

ผลการประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดพืชวงศ์ชมพู่ 4 ชนิด ต่อการเจริญของเชื้อรา *A. brassicicola* ในสภาพห้องปฏิบัติการพบว่า สารสกัดทั้งหมดที่ทดสอบทุกความเข้มข้น สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราดังกล่าวได้ โดยสารสกัด 95%EEMC มีประสิทธิภาพยับยั้งดีที่สุด อยู่ในช่วง 85-100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ สารสกัด 95%EECV มีฤทธิ์ยับยั้งได้ อยู่ในช่วง 40-63 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งสารสกัดจากใบเสมีดขาวและแปรงล้างขวดทุกความเข้มข้นที่ทดสอบพบว่า สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* ได้ โดยสารสกัดทั้ง 2 ชนิด (ที่ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 5,000 และ 10,000 ppm ตามลำดับ) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสมีดขาวและใบแปรงล้างขวดต่อแมลงศัตรูผัก 2 ชนิด (เพลี้ยอ่อนผักและเพลี้ยแป้ง) ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดทั้ง 2 ชนิด ความเข้มข้น 2,500, 5,000, 10,000 และ 20,000 ppm สามารถฆ่าเพลี้ยอ่อนผักและเพลี้ยแป้งได้ อยู่ในช่วง 49-100 และ 38-100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 2,500, 5,000 และ 10,000 ppm สามารถไล่เพลี้ยอ่อนและเพลี้ยแป้งได้ อยู่ในช่วง 54-100 และ 28-100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อีกทั้งยังสารสกัด 95%EEMC มีค่า LC_{50} ของเพลี้ยอ่อนและเพลี้ยแป้ง เท่ากับ 2,671 และ 2,981.2 ppm ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัด 95%EECV มีค่า LC_{50} ของเพลี้ยอ่อนและเพลี้ยแป้ง เท่ากับ 2,541 และ 3,801.6 ppm ตามลำดับ

สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบเสมีดขาวและใบแปรงล้างขวด ด้วยเทคนิค GC-MS และ LC-MS พบว่า สารสกัดจากใบเสมีดขาวมีองค์ประกอบทางพฤกษเคมีทั้งหมด 41 และ 18 ชนิด ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจากใบแปรงล้างขวดพบองค์ประกอบทั้งหมด 45 และ 23 ชนิด ตามลำดับ โดยสารสกัดทั้ง 2 ชนิด มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารกลุ่ม terpenoids เป็นหลัก สูงถึงประมาณ 50 และ 37 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีสาร phytol ปริมาณ 19.14 เปอร์เซ็นต์ (ในสารสกัดเสมีดขาว) และ 1,8-cineole ปริมาณ 14 เปอร์เซ็นต์ (ในสารสกัดแปรงล้างขวด) เป็นสารหลักในกลุ่ม terpenoids นอกจากนี้แล้วยังพบกลุ่มสาร phenolics และ flavonoids และวิตามินอีกด้วย

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวดในการควบคุมโรคใบจุด *Alternaria* ในผักสลัดคอส พบว่า สารสกัดจากใบเสม็ดขาว (95%EEMC) มีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงโรคใบจุดได้ อยู่ในช่วง 50-75 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถกระตุ้นให้ผักสลัดสร้างเอนไซม์ β -1,3-glucanase, chitinase และ peroxidase มากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่สารสกัดจากใบแปรงล้าขวด (50% และ 95%EECV) ก็สามารถลดการเกิดโรคใบจุดได้ (50-75 เปอร์เซ็นต์) เช่นเดียวกับสารสกัดจากใบเสม็ดขาว และยังคงชักนำให้ผักสลัดสร้างเอนไซม์ความต้านทานโรคพืชทั้ง 3 ชนิดที่ทดสอบได้ และยังมีกิจกรรมเอนไซม์ที่สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้แล้วยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักสลัดทดสอบได้ ยิ่งไปกว่านั้น ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงของโรคและปริมาณกิจกรรมเอนไซม์แต่ละชนิด พบเป็นความสัมพันธ์เชิงลบในทุกความสัมพันธ์ของเอนไซม์ กล่าวคือเมื่อค่าหนึ่งเพิ่ม อีกค่าหนึ่งจะลดตาม ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าเอนไซม์แต่ละชนิดมีบทบาทในการลดความรุนแรงของโรคได้

ผลจากการศึกษาแนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวด โดยวิธีผสมสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ด้วยอัตราส่วน 100:0 75:25 50:50 25:75 และ 0:100 ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* พบว่า ทุกกรรมวิธีที่ทดสอบ (ทุกสูตรผสม) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้ อยู่ 25-92 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งการออกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคได้ อยู่ในช่วง 75-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งระดับการยับยั้งขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของสารสกัดเสม็ดขาว ในขณะที่การทดสอบสารสกัดผสมอนุภาคไมโครในอัตราส่วนเดียวกันต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* พบว่า กรรมวิธีที่ลดขนาดอนุภาคมีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพที่สุดกว่า 33.33-95.55 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารสกัดผสมอนุภาคปกติสามารถยับยั้งได้ 21.48-91.11 เปอร์เซ็นต์

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดผสมอนุภาคไมโคร ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm ในการควบคุมโรคใบจุดของผักสลัด พบว่า สารสกัดผสมจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวด ทั้งอนุภาคไมโครและสารสกัดผสมอนุภาคปกติ อัตราส่วน 75:25 สามารถยับยั้งโรคได้ดีที่สุด อยู่ใน ช่วง 63.64-65.23 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถกระตุ้นในพืชทดสอบมีกิจกรรมเอนไซม์มากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนที่สารสกัดผสมอัตราส่วน 25:75 สามารถกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ความต้านทานโรคได้ดีที่สุด ซึ่งไม่สอดคล้องกัน ในขณะที่การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดผสมอนุภาคไมโครที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น (10,000 ppm) พบว่า การทดสอบยังคงเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ppm กล่าวคือ การใช้สารสกัดผสม 3 อัตราส่วน (75:25, 50:50 และ 25:75) สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้และมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น โดยสารสกัดผสมทั้งอนุภาคไมโครและอนุภาคปกติ อัตราส่วน 75:25 มีประสิทธิภาพยับยั้งโรคใบจุดได้สูงสุด อยู่ใน ช่วง 74.29-77.47 เปอร์เซ็นต์ และการใช้สารสกัดผสมอัตราส่วน 25:75 สามารถกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ความต้านทานโรคได้ดีที่สุด ซึ่งก็ยังคงไม่สอดคล้องกัน แต่อย่างไรก็ตาม ถ้าพิจารณาในแง่ประสิทธิภาพในการยับยั้งโรค ก็ถือว่าผลการทดลองนี้ยังเป็นที่ยอมรับได้ เพราะว่ามีประสิทธิภาพการในการยับยั้งสูงถึง 63.64-77.47เปอร์เซ็นต์ แต่ควรจะนำเอาผลผลิตมาพิจารณาร่วมด้วย หรือใช้เป็นประเด็นหลัก โดยการใช้สารสกัดจากใบเสม็ดขาวเพียงอย่างเดียวสามารถยับยั้งโรคใบจุดได้ แต่กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ดีที่สุด จึงน่าจะเป็นสารสกัดเหมาะสมที่สุด หากจะนำไปใช้หรือพัฒนาต่อยอด รองลงมาคือ สารสกัดผสมอัตราส่วน 50:50 ก็ยังเป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถยับยั้งโรคได้ระดับหนึ่งและยังมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ อีกทั้งยัง

เป็นการลดความเข้มข้นและปริมาณการใช้งานของสารสกัดพืช และยังไม่เสี่ยงต่อการดื้อสารสกัดพืชของเชื้อราในอนาคต นอกจากนี้แล้ว ข้อควรระวังในการที่จะนำสารสกัดมาผสมเพื่อใช้งาน ควรพิจารณาคัดเลือกสารสกัดถึงคุณสมบัติต่าง ๆ การส่งเสริมผลผลิต และค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้นหากมีการผสมสารสกัดจากพืชตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป

ข้อเสนอแนะ

- 1) จากผลการทดลองสารสกัดจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวดในรูปแบบสารผสม มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุด *Alternaria* ได้ แต่อย่างไรก็ตามยังมีเชื้อราสาเหตุอีกหลายชนิดที่สามารถเข้าทำลายผักสลัดได้ ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมกับเชื้อราสาเหตุโรคที่สำคัญชนิดอื่นของผักสลัดให้ครอบคลุมโรคของผักสลัดมากที่สุด
- 2) ควรทำการทดลองสารสกัดผสมจากใบเสม็ดขาวและใบแปรงล้าขวด ในระดับแปลงปลูกให้ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมในการป้องกันกำจัดโรคใบจุดในผักสลัด เพื่อเป็นแนวทางที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากสารสกัดพืช



บรรณานุกรม

- กรมป่าไม้. 2550. **คู่มือ การแปรรูปไม้เสม็ดขาว**. สุโขทัย-ลก: โรงพิมพ์สุโขทัย-ลก. 48 หน้า
- กัลยา ชุ่มอินทรจักร. 2564. **ชมพู่ น้ำดอกไม้ ไม้ผลโบราณของไทยหอม หวาน กรอบ สร้างอาชีพ สร้างรายได้**. มติชนบทเทคโนโลยีชาวบ้าน, 33 (747) ,42-44.
- เกศสุดา สนศิริ, จารุวัตร แต่กุล, ยุวรินทร์ บุญทบ, สุนัดดา เชาวลิต, ชัยพร บัวมาศ, อธิพิล บรรณาการ และจอมสุรางค์ ดวงธิดา. 2561. ชนิดของเพลี้ยอ่อน (Hemiptera: Aphididae) ในพืชผัก (วงศ์แตง กะหล่ำพริก มะเขือ และถั่ว) ของประเทศไทย. หน้า 206-215. ใน **รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2561**. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการ เกษตร.
- นิจศิริ เรืองรังษี และ ธวัชชัย มังคละคุปต์. 2547. **สมุนไพรไทย เล่ม 1**. กรุงเทพฯ: พี เฮลท์ดี. 380 หน้า
- พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2532. การชักนำให้พืชสร้างภูมิคุ้มกันโรค. **วารสารวิชาการเกษตร. กรมวิชาการ เกษตร. ปีที่ 7 ฉบับที่ 1**.
- สำนักพิมพ์บ้านและสวน. 2020. **แปลงล้างขวด**. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์บ้านและสวน.
- อภิชาติ ศรีสอาด. 2558. **ปลูกผักสลัดเชิงการค้า**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: นาคา อินเตอร์มีเดีย. 112 หน้า.
- Ahmad, K., and Athar, F. 2016. Phytochemistry and pharmacology of *Callistemon viminalis* (Myrtaceae): A review. **The Natural Products Journal**, 7: 1-10. <https://doi.org/10.2174/2210315507666161216100323>.
- Akila, R., Rajendran, L., Harish, S., Saveetha, K., Raguchander, T., and Samiyappan, R. 2011. Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) causing *Fusarium* wilt in banana. **Biological Control**, 57(3): 175-183. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.02.010>.
- Al-Abd, N. M., Mohamed Nor, Z., Mansor, M., Azhar, F., Hasan, M. S., and Kassim, M. 2015. Antioxidant, antibacterial activity, and phytochemical characterization of *Melaleuca cajuputi* extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 15: 385. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0914-y>.
- Alreshidi, M., Noumi, E., Bouslama, L., Ceylan, O., Veetil, V. N., Adnan, M., Danciu, C., Elkahoui, S., Badraoui, R., Al-Motair, K. A., Patel, M., De Feo, V., and Snoussi, M. 2020. Phytochemical screening, antibacterial, antifungal, antiviral, cytotoxic, and anti-quorum-sensing properties of *Teucrium polium* L. aerial parts methanolic extract. **Plants**, 9(11). <https://doi.org/10.3390/plants9111418>.
- Ankitha, T. A., Visakh, N. U., Pathrose, B., Mori, N., Baeshen, R. S., and Shower, R. 2024. Phytochemical characterization of *Callistemon lanceolatus* leaf essential oils and their application as sustainable stored grain protectants against major storage insect pests. **Sustainability**, 16(3). <https://doi.org/10.3390/su16031055>.

- Arzoo, K., Biswas, S. K., and Rajik, M. 2012. Biochemical evidences of defence response in tomato against *Fusarium* wilt induced by plant extracts. **Plant pathology journal**, 11(2): 42-50.
- Barros, F. C., Sagata, É., Ferreira, L. C. d. C., and Juliatti, F. C. 2010. Indução de resistência em plantas à fitopatógenos. **Bioscience Journal**, 26(2): 231-239.
- Begum, M. M. 2015. Screening of antioxidant and antimicrobial properties of the *Syzygium jambos* L. **American Journal of BioScience**, 3(2): 23-26. <https://doi.org/10.11648/j.ajbio.s.2015030201.15>.
- Bharat, C. S., and Praveen, D. 2016. Evaluation of in vitro antimicrobial potential and phytochemical analysis of spruce, cajeput and jamrosa essential oil against clinical isolates. **International Journal of Green Pharmacy**, 10.
- Blagojević, J. D., Vukojević, J. B., and Ivanović, Ž. S. 2020. Occurrence and characterization of *Alternaria* species associated with leaf spot disease in rapeseed in Serbia. **Plant Pathology**, 69(5): 883-900. <https://doi.org/10.1111/ppa.13168>.
- Bonaldo, S. M., Schwan-Estrada, K. R. F., Stangarlin, J. R., Tessmann, D. J., and Scapim, C. A. 2004. Fungitoxicity, phytoalexins elicitor activity and protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium*, by *Eucalyptus citriodora* aqueous extract. **Fitopatologia Brasileira**, 29: 128-134.
- Bouhlali, E. D. T., Derouich, M., Meziani, R., and Essarioui, A. 2021. Antifungal potential of phytochemicals against *Mauginiella scaettae*, the plant pathogen causing inflorescence rot of date palm. **Scientifica**, 2021: 1896015. <https://doi.org/10.1155/2021/1896015>.
- Bouzada, M. L. M., Fabri, R. L., Nogueira, M., Konno, T. U. P., Duarte, G. G., and Scio, E. 2009. Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil. **Pharmaceutical Biology**, 47(1): 44-52. <https://doi.org/10.1080/13880200802411771>.
- Buchala, A., and Pythoud, F. 1988. Vitamin D and related compounds as plant growth substances. **Physiologia Plantarum**, 74: 391-396.
- Bulhões, C. C., Bonaldo, S. M., Santos, B. T. d., and Trento, R. A. 2012. Produtos alternativos no controle de antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), cladosporiose (*Cladosporium herbarum*) e bacteriose (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) em maracujazeiro no norte demato grosso. **Rev. Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias**, 7(1): 12-19.
- Caldara, M., and Marmiroli, N. 2018. Tricyclic antidepressants inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 52(4): 500-505. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.06.023>.

- Cannon, C., and Bunn, B. 2017. **Aphid pests on vegetables**. Logan: Utah State University.
https://digitalcommons.usu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2796&context=extension_curall.
- Carevic, T., Kostic, M., Nikolic, B., Stojkovic, D., Sokovic, M., and Ivanov, M. 2022. Hesperetin-Between the ability to diminish mono- and polymicrobial biofilms and toxicity. **Molecules**, 27(20). <https://doi.org/10.3390/molecules27206806>.
- Carmello, C. R., and Cardoso, J. C. 2018. Effects of plant extracts and sodium hypochlorite on lettuce germination and inhibition of *Cercospora longissima* in vitro. **Scientia Horticulturae**, 234: 245-249.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.056>.
- Celoto, M. I. B., Papa, M. d. F. S., Sacramento, L. V. S. d., and Celoto, F. J. 2008. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides* **Acta Scientiarum Agronomy**, 30(1): 1-5.
- Chen, Y. Z., Wang, S. R., Li, T., Zhang, G. C., and Yang, J. 2023. Antifungal activity of 6-methylcoumarin against *Valsa mali* and its possible mechanism of action. **Journal of fungi**, 9(1). <https://doi.org/10.3390/jof9010005>.
- Cheraghi Niroumand, M., Farzaei, M. H., Karimpour Razkenari, E., Amin, G., Khanavi, M., Akbarzadeh, T., and Shams-Ardekani, M. R. 2016. An evidence-based review on medicinal plants used as insecticide and insect repellent in traditional Iranian medicine. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, 18(2): e22361.
<https://doi.org/10.5812/ircmj.22361>.
- Chung, P. Y., Navaratnam, P., and Chung, L. Y. 2011. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 10(1): 25.
<https://doi.org/10.1186/1476-0711-10-25>.
- Cordeiro, L., Figueiredo, P., Souza, H., Sousa, A., Andrade-Júnior, F., Medeiros, D., Nóbrega, J., Silva, D., Martins, E., Barbosa-Filho, J., and Lima, E. 2020. Terpinen-4-ol as an antibacterial and antibiofilm agent against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Molecular Sciences**, 21(12).
<https://doi.org/10.3390/ijms21124531>.
- Dai, J., Hu, Y., Si, Q., Gu, Y., Xiao, Z., Ge, Q., and Sha, R. 2022. Antioxidant and hypoglycemic activity of sequentially extracted fractions from pingguoli pear fermentation broth and identification of bioactive compounds. **Molecules**, 27(18). <https://doi.org/10.3390/molecules27186077>.
- Darshani, P., Sen Sarma, S., Srivastava, A. K., Baishya, R., and Kumar, D. 2022. Anti-viral triterpenes: A review. **Phytochemistry Reviews**, 21(6): 1761-1842.
<https://doi.org/10.1007/s11101-022-09808-1>.

- de Oliveira, C. M., Cardoso, M. d. G., Figueiredo, A. C. d. S., de Carvalho, M. L. M., Miranda, C. A. S. F. d., Marques Albuquerque, L. R., Lee Nelson, D., Souza Gomes, M. d., Silva, L. F., Andrade Santiago, J. d., Teixeira, M. L., and Brandão, R. M. 2014. Chemical composition and allelopathic activity of the essential oil from *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) blossoms on lettuce seedlings. **American Journal of Plant Sciences**, 5(24): 3551-3557. <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.524371>.
- Delahaye, C., Rainford, L., Nicholson, A., Mitchell, S., Lindo, J., and Ahmad, M. 2009. Antibacterial and antifungal analysis of crude extracts from the leaves of *Callistemon viminalis*. **Journal of Medical and Microbiological Sciences**, 3(1): 190.
- Department of Agriculture, P. 2017. **Lettuce: Production guide**. Tuguegarao city, Philippines: Department of Agriculture, Philippines.
- Dethoup, T., Songkumarn, P., Rueangrit, S., Suesa-ard, S., and Kaewkrajay, C. 2018. Fungicidal activity of Thai medicinal plant extracts against *Alternaria brassicicola* causing black spot of Chinese kale. **European Journal of Plant Pathology**, 152(1): 157-167. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1460-5>.
- Dethoup, T., Songkumarn, P., Sirirak, T., and Kijjoa, A. 2019. Fungicidal activity of *Acorus calamus* L. extracts against plant pathogenic fungi. **Agriculture and Natural Resources**, 53(5): 527-532. <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/anres/article/view/226217>.
- Ding, Y., Huffaker, A., Kollner, T. G., Weckwerth, P., Robert, C. A. M., Spencer, J. L., Lipka, A. E., and Schmelz, E. A. 2017. Selinene volatiles are essential precursors for maize defense promoting fungal pathogen resistance. **Plant Physiology**, 175(3): 1455-1468. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00879>.
- Djipa, C. D., Delmée, M., and Quetin-Leclercq, J. 2000. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) alston (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 71(2000): 307-313. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(99\)00186-5](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(99)00186-5).
- Draz, I. S., Elkhwaga, A. A., Elzaawely, A. A., El-Zahaby, H. M., and Ismail, A.-W. A. 2019. Application of plant extracts as inducers to challenge leaf rust of wheat. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, 29(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0109-9>.
- El-Hefny, M., Ashmawy, N. A., Salem, M. Z. M., and Salem, A. Z. M. 2017. Antibacterial activities of the phytochemicals-characterized extracts of *Callistemon viminalis*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Conyza dioscoridis* against the growth of some phytopathogenic bacteria. **Microbial Pathogenesis**, 113: 348-356. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.004>.

- Elkelish, A., El-Mogy, M. M., Niedbala, G., Piekutowska, M., Atia, M. A. M., Hamada, M. M. A., Shahin, M., Mukherjee, S., El-Yazied, A. A., Shebl, M., Jahan, M. S., Osman, A., El-Gawad, H. G. A., Ashour, H., Farag, R., Selim, S., and Ibrahim, M. F. M. 2021. Roles of exogenous alpha-lipoic acid and cysteine in mitigation of drought stress and restoration of grain quality in wheat. **Plants**, 10(11). <https://doi.org/10.3390/plants10112318>.
- Faleiro, J. H., Gonçalves, R. C., dos Santos, M. N. G., da Silva, D. P., Naves, P. L. F., and Malafaia, G. 2016. The chemical featuring, toxicity, and antimicrobial activity of *Psidium cattleianum* (Myrtaceae) leaves. **New Journal of Science**, 2016: 1-8. <https://doi.org/10.1155/2016/7538613>.
- Farag Hanaa, R. M., Abdou, Z. A., Salama, D. A., Ibrahim, M. A. R., and Srour, H. A. M. 2011. Effect of neem and willow aqueous extracts on *Fusarium* wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. **Annals of Agricultural Sciences**, 56(1): 1-7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aoas.2011.05.007>.
- Foudah, A. I., Alqarni, M. H., Alam, A., Salkini, M. A., Alam, P., Alkholifi, F. K., and Yusufoglu, H. S. 2021. Determination of chemical composition, in vitro and in silico evaluation of essential oil from leaves of *Apium graveolens* grown in Saudi Arabia. **Molecules**, 26(23). <https://doi.org/10.3390/molecules26237372>
- Frank, S., and Baker, J. 2022. **Mealybugs Entomology Insect Notes**. <https://content.ces.ncsu.edu/mealybugs>.
- Franzener, G., Schwan-Estrada, K. R. F., Moura, G. S., Kuhn, O. J., and Stangarlin, J. R. 2018. Induction of defense enzymes and control of anthracnose in cucumber by *Corymbia citriodora* aqueous extract. **Summa Phytopathologica**, 44(1): 10-16.
- Freitas, T. S., Xavier, J. D. C., Pereira, R. L. S., Rocha, J. E., Muniz, D. F., da Silva, P. T., da Hora, J. P., Dos Santos, H. S., Bandeira, P. N., Nogueira, C. E. S., Teixeira, A. M. R., and Coutinho, H. D. M. 2020. Direct antibacterial and antibiotic resistance modulatory activity of chalcones synthesized from the natural product 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone. **FEMS Microbiology Letters**, 367(15): 1-5. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa124>.
- Fu, J., Gao, Y., and Xing, X. 2022. Preliminary study on phytochemical constituents and biological activities of essential oil from *Myriactis nepalensis* Less. **Molecules**, 27(14): 4631. <https://doi.org/10.3390/molecules27144631>.
- Gevorgyan, S., Schubert, R., Falke, S., Lorenzen, K., Trchounian, K., and Betzel, C. 2022. Structural characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized using a low-molecular-weight Royal Jelly extract. **Scientific Reports**, 12(1): 14077. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17929-y>.

- Ghaneian, M. T., Ehrampoush, M. H., Jebali, A., Hekmatimoghaddam, S., and Mahmoudi, M. 2015. Antimicrobial activity, toxicity and stability of phytol as a novel surface disinfectant. **Environmental Health Engineering and Management Journal**, 2(1): 13-16.
- Gholamnezhad, J. 2019. Effect of plant extracts on activity of some defense enzymes of apple fruit in interaction with *Botrytis cinerea*. **Journal of Integrative Agriculture**, 18(1): 115-123. [https://doi.org/10.1016/s2095-3119\(18\)62104-5](https://doi.org/10.1016/s2095-3119(18)62104-5).
- Gohar, A. A., Maatooq, G. T., Gadara, S. R., and Aboelmaaty, W. S. 2014. The profile and antimicrobial activity of the essential oil from *Callistemon viminalis* (Sol. Ex Gaertner) G.Don Ex Loudon leaves. **Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research**, 5(1): 7-11.
- Goswami, P., Yadav, S., and Mathur, J. 2019. Positive and negative effects of nanoparticles on plants and their applications in agriculture. **Plant Science Today**, 6(2): 232-242. <https://doi.org/10.14719/pst.2019.6.2.502>.
- Guo, Y., Lv, J., Zhao, Q., Dong, Y., and Dong, K. 2020. Cinnamic acid increased the incidence of *Fusarium* wilt by increasing the pathogenicity of *Fusarium oxysporum* and reducing the physiological and biochemical resistance of faba bean, which was alleviated by intercropping with wheat. **Frontiers in Plant Science**, 11: 608389. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.608389>.
- Gupta, P., Ravi, I., and Sharma, V. 2013. Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. **Journal of Plant Interactions**, 8(2): 155-161. <https://doi.org/10.1080/17429145.2012.679705>.
- Gurjar, M. S., Ali, S., Akhtar, M., and Singh, K. S. 2012. Efficacy of plant extracts in plant disease management. **Agricultural Sciences**, 03(03): 425-433. <https://doi.org/10.4236/as.2012.33050>.
- Haituk, S., Pakdeeniti, P., Withee, P., Karunarathna, A., Literatus, I. C., Kumla, J., Cheewangkoon, R., Suwannamane, J., and Nguanhom, J. 2023. Biological Control of Brassicales Ring Spot Disease Caused by *Alternaria brassicicola* Using Antagonistic Yeasts. **Chiang Mai Journal of Science**, 50(2): 1-17. <https://doi.org/10.12982/cmjs.2023.016>.
- Hapida, Y., Elfita, E., Widjajanti, H., and Salni, S. 2023. The effect of jambu bol (*Syzygium malaccense*) plant extract as an antibacterial *Salmonella typhi* and *Staphylococcus aureus*. In **Sriwijaya International Conference on Basic and Applied Sciences 2021**. Palembang, Indonesia. <https://doi.org/10.1063/5.0171692>.
- Hematpoor, A., Liew, S. Y., Azirun, M. S., and Awang, K. 2017. Insecticidal activity and the mechanism of action of three phenylpropanoids isolated from the roots of

- Piper sarmentosum Roxb. **Scientific Reports**, 7(1): 12576. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12898-z>.
- Hikal, W. M., Baeshen, R. S., and Said-Al Ahl, H. A. H. 2017. Botanical insecticide as simple extractives for pest control. **Cogent Biology**, 3(1): 1404274. <https://doi.org/10.1080/23312025.2017.1404274>.
- Horsfield, A., Wicks, T., Davies, K., Wilson, D., and Paton, S. 2010. Effect of fungicide use strategies on the control of early blight (*Alternaria solani*) and potato yield. **Australasian Plant Pathology**, 39(4): 368-375. <https://doi.org/10.1071/AP09090>.
- Hussein, J. H., Mohammed, Y. H., and Imad, H. H. 2016. Study of chemical composition of *Foeniculum vulgare* using Fourier transform infrared spectrophotometer and gas chromatography - mass spectrometry. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, 8(3): 60-89. <https://doi.org/10.5897/jpp2015.0372>.
- Iacomini-Vasilescu, B., Avenot, H., Bataillé-Simoneau, N., Laurent, E., Guénard, M., and Simoneau, P. 2004. In vitro fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. **Crop Protection**, 23(6): 481-488. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.003>.
- Ichimura, K., Takada, M., and Ogawa, K. 2022. Effects of treatments with nigerosylmaltooligosaccharide, glucose and sucrose on the vase life of cut snapdragon flowers. **Scientia Horticulturae**, 291: 110565. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110565>.
- Imatomi, M., Novaes, P., Matos, A. P., Gualtieri, S. C. J., Molinillo, J. M. G., Lacret, R., Varela, R. M., and Macias, F. A. 2013. Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. **Biochemical Systematics and Ecology**, 46: 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.09.005>.
- Isah, M., Rosdi, R. A., Wan Abdul Wahab, W.-N.-A., Abdulla, H., Sul'ain, M. D., and Ishak, W. R. W. 2023. Phytoconstituents and biological activities of *Melaleuca cajuputi* Powell: A scoping review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. <https://doi.org/10.7324/japs.2023.130102>.
- İşcan, G., Kirimer, N., Demirci, F., Demirci, B., Noma, Y., and Başer, K. H. 2012. Biotransformation of (-)-(R)- α -phellandrene: antimicrobial activity of its major metabolite. **Chemistry and Biodiversity**, 9(8): 1525-1532. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100283>.
- Isnaini, I., Achmadiyah, R. D., Awaeh, G., Khatimah, H., and Yasmina, A. 2023. Antioxidant and antiproliferative activities of methanol extract from *Melaleuca cajuputi* subsp. Cumingiana [Turcz.] fruit. **Jurnal Ilmiah Berkala Sains dan Terapan Kimia**, 17(1): 21-28. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.20527/jstk.v17i1.13055>.

- Jantasorn, A., Moungrsrimuangdee, B., and Dethoup, T. 2016. In vitro antifungal activity evaluation of five plant extracts against five plant pathogenic fungi causing rice and economic crop diseases [Article]. **Journal of Biopesticides**, 9(1): 1-7. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84973863216&partnerID=40&md5=90651b840575a88c61f9a78e7bd4a72c>.
- Jaroš, P., Timkina, E., Michailidu, J., Maršík, D., Kulišová, M., Kolouchová, I., and Demnerová, K. 2022. Boswellic acids as effective antibacterial antibiofilm agents. **Molecules**, 27(12). <https://doi.org/10.3390/molecules27123795>.
- Jazet, P. M., Tatsadjieu, L. N., Ndongson, B. D., Kuate, J., Zollo, P. H. A., and Menut, C. 2009. Correlation between chemical composition and antifungal properties of essential oils of *Callistemon rigidus* and *Callistemon citrinus* of Cameroon against *Phaeoramularia angolensis*. **Journal of Medicinal Plants Research**, 3(1): 9-15.
- Karimi, S., Farzaneh, F., Asnaashari, S., Parina, P., Sarvari, Y., and Hazrati, S. 2019. Phytochemical analysis and anti-microbial activity of some important medicinal plants from north-west of Iran. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, 18(4): 1871-1883. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100817>.
- Kavitha, K. S., and Satish, S. 2013. Antibacterial activity of *Callistemon lanceolatus* DC. against human and phytopathogenic bacteria. **Journal of Pharmacy Research**, 7(3): 235-240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.03.020>.
- Keereedach, P., Hrimpeng, K., and Boonbumrung, K. 2020. Antifungal activity of Thai cajuput oil and its effect on efflux-pump gene expression in fluconazole-resistant *Candida albicans* clinical isolates. **International Journal of Microbiology**, 2020: 5989206. <https://doi.org/10.1155/2020/5989206>.
- Khan, F. A., Khan, N. M., Ahmad, S., Nasruddin, Aziz, R., Ullah, I., Almeahmadi, M., Allahyani, M., Alsaiani, A. A., and Aljuaid, A. 2022. Phytochemical profiling, antioxidant, antimicrobial and cholinesterase inhibitory effects of essential oils isolated from the leaves of *Artemisia scoparia* and *Artemisia absinthium*. **Pharmaceuticals**, 15(10). <https://doi.org/10.3390/ph15101221>.
- Kim, H.-M., Kwon, H., Kim, K., and Lee, S.-E. 2018. Antifungal and antiaflatoxigenic activities of 1,8-cineole and t-cinnamaldehyde on *Aspergillus flavus*. **Applied Sciences**, 8(9). <https://doi.org/10.3390/app8091655>.
- Kim, M. J., Moon, Y., Tou, J. C., Mou, B., and Waterland, N. L. 2016. Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**, 49: 19-34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.03.004>.

- Kim, S., Lee, H., Lee, S., Yoon, Y., and Choi, K. H. 2015. Antimicrobial action of oleanolic acid on *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium*, and *Enterococcus faecalis*. **PLoS One**, 10(3): e0118800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118800>.
- Ko Ko, Juntarajumnong, W., and Chandrapatya, A. 2009. Repellency, fumigant and contact toxicities of *Melaleuca cajuputi* Powell against *Sitophilus zeamais* motschulsky and *Tribolium castaneum* herbst. **Thai Journal of Agricultural Science**, 42(1): 27-33.
- Koohakan, P., Jeanaksorn, T., and Nuntagij, I. 2008. Major diseases of lettuce grown by commercial nutrient film technique in Thailand **KMITL Science and Technology Journal**, 8(2): 56-63.
- Kozłowska, J., Potaniec, B., Żarowska, B., and Anioł, M. 2017. Synthesis and biological activity of novel o-alkyl derivatives of naringenin and their oximes. **Molecules**, 22(9). <https://doi.org/10.3390/molecules22091485>.
- Kumar, V., Biswas, S., Chowdary, V., Lal, K., and Naresh, P. 2017. Induced synthesis of defense enzymes during induced resistance against early blight of potato using plant extracts as inducer. **Journal of Scientific Research and Reports**, 16(1): 1-11. <https://doi.org/10.9734/jsrr/2017/36560>.
- Lal, B., Bhandari, S., Upadhyay, A., Singh, P., and Singh, V. P. 2024. Lettuce: A dive into its nutritional value and economic significance. **Agricultural and Biological Research**, 40(2): 954-956. <https://doi.org/10.35248/0970-1907.24.40.954-956>.
- Latha, P., Anand, T., Ragupathi, N., Prakasam, V., and Samiyappan, R. 2009. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. **Biological Control**, 50(2): 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.03.002>.
- Majeed, M. Z., Nawaz, M. I., Khan, R. R., Farooq, U., and Ma, C.-S. 2018. Insecticidal effects of acetone, ethanol and aqueous extracts of *Azadirachta indica* (A. Juss), *Citrus aurantium* (L.), *Citrus sinensis* (L.) and *Eucalyptus camaldulensis* (Dehnh.) against mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) [Botanical extracts; mealybugs; laboratory evaluation; extraction solvents; *Azadirachta indica*; *Eucalyptus camaldulensis*; *Citrus* spp.]. **2018**, 21(3). <https://doi.org/10.56369/tsaes.2489>.
- Mangoyi, R., Midiwo, J., and Mukanganyama, S. 2015. Isolation and characterization of an antifungal compound 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone from *Combretum zeyheri*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 15: 405. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0934-7>.
- Manners, A., and Duff, J. 2015. **Mealybugs: A pest of a different scale**. Queensland: Department of Agriculture and Fisheries.

- Marei, G. I. K., and Abdelgaleil, S. A. M. 2018. Antifungal potential and biochemical effects of monoterpenes and phenylpropenes on plant. **Plant Protection Science**, 54(1): 9-16. <https://doi.org/10.17221/9/2017-pps>.
- Marinas, I. C., Oprea, E., Buleandra, M., Badea, I. A., Tihauan, B. M., Marutescu, L., Angheloiu, M., Matei, E., and Chifiriuc, M. C. 2021. Chemical composition, antipathogenic and cytotoxic activity of the essential oil extracted from *Amorpha fruticosa* fruits. **Molecules**, 26(11). <https://doi.org/10.3390/molecules26113146>.
- Marliyana, S. D., Mujahidin, D., and Syah, Y. M. 2018. Pinostrobin derivatives from prenylation reaction and their antibacterial activity against clinical bacteria **Materials Science and Engineering**, 349: 012057.
- Martínez, G., Merinero, M., Pérez-Aranda, M., Pérez-Soriano, E. M., Ortiz, T., Begines, B., and Alcudia, A. 2020. Environmental impact of nanoparticles' application as an emerging technology: A review. **Materials**, 14(1). <https://doi.org/10.3390/ma14010166>.
- Medhurst, A., and Anderson, A. 2003. **Thrips and hydroponic lettuce**. <https://ausveg.com.au/app/data/technical-insights/docs/TL128.pdf>.
- Michereff, S. J., Noronha, M. A., Filha, M. S. X., Câmara, M. P., and Reis, A. 2012. Survey and prevalence of species causing *Alternaria* leaf spots on *brassica* species in Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, 30: 345-348.
- Misra, D., Misra, M., and Tewari, S. N. 1997. Toxic effect of volatiles from *Callistemon lanceolatus* on six fungal pathogens of rice. **Indian Phytopathology**, 50(1): 103-105.
- Mohanty, S., and Cock, I. E. 2010. Bioactivity of *Syzygium jambos* methanolic extracts: Antibacterial activity and toxicity. **Pharmacognosy Research**, 2(1): 4-9. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.60577>.
- Morcía, C., Malnati, M., and Terzi, V. 2012. In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, 29(3): 415-422. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.643458>.
- Moses, E., Akrofi, S., and Beseh, P. 2017. *Alternaria* leaf spot on lettuce-Ghana: *Alternaria brassicae* and *A. brassicicola*. In Plantwise (Ed.), **Pest Management Decision Guides**. CABI International. <https://doi.org/https://doi.org/10.1079/pwkb.20177800648>.
- Mossa, A.-T. H., Mohafrash, S. M. M., Ziedan, E.-S. H. E., Abdelsalam, I. S., and Sahab, A. F. 2021. Development of eco-friendly nanoemulsions of some natural oils and evaluating of its efficiency against postharvest fruit rot fungi of cucumber. **Industrial Crops and Products**, 159: 113049. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113049>.
- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Reichling, J., and Wink, M. 2011. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-

- resistant bacterial pathogens. **Pharmaceutical Biology**, 49(9): 893-899. <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.553625>
- Muñoz, P., and Munné-Bosch, S. 2019. Vitamin E in plants: Biosynthesis, transport, and function. **Trends in Plant Science**, 24(11): 1040-1051. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.08.006>.
- Murugan, S., Devi, P., Parameswari, N. K., and Mani, K. R. 2011. Antimicrobial activity of *Syzygium jambos* against selected human pathogens. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 3(2): 44-47.
- Naidoo, Y., Channangihalli Thimmegowda, C. S., Kasim, N., Nicholas, A., and Naidoo, G. 2014. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum obovatum* E. Mey. Ex Benth. (Lamiaceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, 17: 142-147. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.884782>.
- Natwick, E. T., Joseph, S. V., and Dara, S. K. 2017. **Western Flower Thrips**. <https://ipm.ucanr.edu/agriculture/lettuce/western-flower-thrips/#gsc.tab=0>.
- Ndomo, A. F., Tapondjou, L. A., Ngamo, L. T., and Hance, T. 2010. Insecticidal activities of essential oil of *Callistemon viminalis* applied as fumigant and powder against two bruchids. **Journal of Applied Entomology**, 134(4): 333-341. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2009.01475.x>.
- Noriega, P., Ballesteros, J., De la Cruz, A., and Veloz, T. 2020. Chemical composition and preliminary antimicrobial activity of the hydroxylated sesquiterpenes in the essential oil from *Piper barbatum* Kunth Leaves. **Plants**, 9(2). <https://doi.org/10.3390/plants9020211>.
- Nowicki, M., Nowakowska, M., Niezgodna, A., and Kozik, E. 2012. *Alternaria* black spot of crucifers: Symptoms, importance of disease, and perspectives of resistance breeding. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, 76(1): 5-19. <https://doi.org/10.2478/v10032-012-0001-6>.
- O'Neill, T. 2019. **Diseases of lettuce crops**. Warwickshire: AHDB Horticulture.
- Oyedeji, O. O., Lawal, O. A., Shode, F. O., and Oyedeji, A. O. 2009. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Callistemon citrinus* and *Callistemon viminalis* from South Africa. **Molecules**, 14(6): 1990-1998. <https://doi.org/10.3390/molecules14061990>.
- Palumbo, J. 1998. Management of Aphids and Thrips on Leafy Vegetables. **Vegetable: A College of Agriculture Report**: 11-14.
- Palumbo, J. C. 2019. Keys to effective aphid management in leafy vegetables. **Vegetable IPM Updates**, 10(1). https://vegetableipmupdates.arizona.edu/sites/default/files/2021-09/190109_keys_to_aphid_management_in_lettuce_2019_alt.pdf.

- Patel, D., Desai, S., Desai, A., Dave, D., and Meshram, D. 2019. Phytochemical evaluation and in-vitro thrombolytic activity of hydro alcoholic extract of *Syzygium malaccense* leaves. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, 8(3): 3916-3918.
- Pattanamahakul, P., and Strange, R. N. 1999. Identification and toxicity of *Alternaria brassicicola*, the causal agent of dark leaf spot disease of Brassica species grown in Thailand. **Plant Pathology**, 48: 749-755.
- Pawar, V. C., and Thaker, V. S. 2007. Evaluation of the anti-*Fusarium oxysporum* f. sp. cicer and anti-*Alternaria porri* effects of some essential oils. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 23(8): 1099-1106. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9339-6>.
- Pazzini, I. A. E., Melo, A. M. d., and Ribani, R. H. 2021. Bioactive potential, health benefits and application trends of *Syzygium malaccense* (Malay apple): A bibliometric review. **Trends in Food Science & Technology**, 116: 1155-1169. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.09.012>.
- Petpheng, B., Mudtaleb, B., Piboon, W., Paichid, N., and Sangkharak, K. 2023. The extraction of phytol from *Hydrilla verticillata* using ultrasonic-assisted extraction (UAE), the analysis of antibacterial activity, and the utilization of residual extract for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. **Biomass Conversion and Biorefinery**. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-04331-5>.
- Phuakjaiphaeo, C., and Kunasakdakul, K. 2015. Isolation and Screening for Inhibitory Activity on *Alternaria brassicicola* of Endophytic Actinomycetes from *Centella asiatica* (L.) Urban. **Journal of Agricultural Technology**, 11(4): 903-9121.
- Pintar, M., Milek, T. M., Šimala, M., and Markotić, V. 2017. Mealybugs (Hemiptera: Coccoomorpha) as unusual pests on vegetables in Croatia. 325-330. In **Zbornik predavanj in referatov 13. Slovenskega posvetovanje o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo**. Rimske Toplice.
- Pinto, K. M. S. P., de Melo, A. F. R., Mondego, J. M., do Nascimento, L. C., Cortez, M., Izabel Mendes Marques, Aires, A. A. d. C., dos Anjos Neto, A. P., Medeiros, R. L. S. d., Araujo, J. R. G., and Silva, H. F. d. 2018. Plant extracts enhancers of defense response in ponkan mandarin Seedlings against *Alternaria alternate* f. spp. citri infection. **African Journal of Agricultural Research**, 13(13): 650-656. <https://doi.org/10.5897/ajar2018.13025>.
- Pongpisutta, R., Bincader, S., Rattanakreetakul, C., Khienman, S., Tiansawang, T., Promkhlilnil, T., and Kongsorn, A. 2023, 26-27 April 2023. Leaf spot disease of cos lettuce (*Lactuca sativa* var. *longifolia*) and potential of fungicides for residual fungal protection in soilless cultivation. 360-369. In **The 6th**

Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi Conference (RUSCON

6). Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi.

- Pornsuriya, C., Ito, S.-i., and Sunpapao, A. 2018. First report of leaf spot on lettuce caused by *Curvularia aeria*. **Journal of General Plant Pathology**, 84(4): 296-299. <https://doi.org/10.1007/s10327-018-0782-7>.
- Prasannath, K. 2017. Plant defense-related enzymes against pathogens: A review. **AGRIEAST: Journal of Agricultural Sciences**, 11(1). <https://doi.org/10.4038/agrieast.v11i1.33>.
- Puig, C. G., Reigosa, M. J., Valentão, P., Andrade, P. B., and Pedrol, N. 2018. Unravelling the bioherbicide potential of *Eucalyptus globulus* Labill: Biochemistry and effects of its aqueous extract. **PLoS One**, 13(2): e0192872. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192872>.
- Qiu, X. M., Sun, Y. Y., Ye, X. Y., and Li, Z. G. 2020. Signaling role of glutamate in plants. **Front in Plant Science**, 10: 1743. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01743>.
- Quenon, C., Hennebelle, T., Butaud, J. F., Ho, R., Samaillie, J., Neut, C., Lehartel, T., Riviere, C., Siah, A., Bonneau, N., Sahpaz, S., Antherieu, S., Lebegue, N., Raharivelomanana, P., and Roumy, V. 2022. Antimicrobial properties of compounds isolated from *Syzygium malaccense* (L.) Merr. and L.M. Perry and medicinal plants used in French Polynesia. **Life**, 12(5). <https://doi.org/10.3390/life12050733>.
- Raja, A. F., Ali, F., Khan, I. A., Shawl, A. S., and Arora, D. S. 2011. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA); targeting oral cavity pathogens. **BMC Research Notes**, 4: 406. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-406>.
- Ramachandran, M., Baskar, K., and Jayakumar, M. 2022. Essential oil composition of *Callistemon citrinus* (Curtis) and its protective efficacy against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **PLoS One**, 17(8): e0270084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270084>.
- Rana, A., Kumari, A., Chaudhary, A. K., Srivastava, R., Kamil, D., Vashishtha, P., and Sharma, S. N. 2023. An investigation of antimicrobial activity for plant pathogens by green-synthesized silver nanoparticles using *Azadirachta indica* and *Mangifera indica*. **Physchem**, 3(1): 125-146. <https://doi.org/10.3390/physchem3010010>.
- Rastogi, A., Zivcak, M., Sytar, O., Kalaji, H. M., He, X., Mbarki, S., and Brestic, M. 2017. Impact of Metal and Metal Oxide Nanoparticles on Plant: A Critical Review. **Front Chem**, 5: 78. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00078>.
- Rita, d. C. P. d. S., Pedro, V. P. G., Marcelo, R. d. S., Oscar, J. S., Edvan, A. C., and and, C. G. B.-L. 2017. Phytotoxicity of extracts of *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh

- bioprocessed in vegetable crop sensitive to allelochemicals. **African Journal of Plant Science**, 11(6): 244-251. <https://doi.org/10.5897/ajps2016.1491>.
- Rueangrit, S., Eakjamnong, W., and Dethoup, T. 2019. Hidden synergistic effects of the combinations of plant extracts against plant pathogenic fungi. **Journal of Biopesticides**, 12(1): 51-60. http://www.jbiopest.com/users/LW8/efiles/vol_12_1_51-60.pdf.
- Saha, M., and Bandyopadhyay, P. K. 2020. In vivo and in vitro antimicrobial activity of phytol, a diterpene molecule, isolated and characterized from *Adhatoda vasica* Nees. (Acanthaceae), to control severe bacterial disease of ornamental fish, *Carassius auratus*, caused by *Bacillus licheniformis* PKBMS16. **Microbial Pathogenesis**, 141: 103977. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.103977>.
- Sakander, H., Koteswara, A. R., and Akhilesh, B. 2015. Evaluation of antifungal potential of selected medicinal plants against human pathogenic fungi. **International Journal of Green Pharmacy**, 9: 110-117. <https://doi.org/10.4103/0973-8258.155058>.
- Salem, M. Z. M., El-Hefny, M., Nasser, R. A., Ali, H. M., El-Shanhorey, N. A., and Elansary, H. O. 2017. Medicinal and biological values of *Callistemon viminalis* extracts: History, current situation and prospects. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 10(3): 229-237. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.03.015>.
- Salem, S. S., Elsayed, H. E., Shabana, S., Khazaal, M. T., and Moharram, F. A. 2023. Phytochemical profile and antimicrobial activity of essential oils from two *Syzygium* species against selected oral pathogens. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, 23(1): 448. <https://doi.org/10.1186/s12906-023-04277-1>.
- Sales, T. A., Cardoso, M. D. G., Guimarães, L. G. D. L., Camargo, K. C., Rezende, D. A. C. S., Brandão, R. M., Souza, R. V., Ferreira, V. R. F., Marques, A. E., Magalhães, M. L., and Nelson, D. L. 2017. Essential oils from the leaves and flowers of *Callistemon viminalis*: chemical characterization and evaluation of the insecticide and antifungal activities. **American Journal of Plant Sciences**, 08(10): 2516-2529. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.810171>.
- Sangpueak, R., Phansak, P., Thumanu, K., Siriwong, S., Wongkaew, S., and Buensanteai, N. 2021. Effect of salicylic acid formulations on induced plant defense against cassava anthracnose disease. **The Plant Pathology Journal**, 37(4): 356-364. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.02.2021.0015>.
- Sannongmueang, T., Pumnuan, J., and Insung, A. 2017. Effectiveness of bottle brush (*Callistemon lanceolatus* DC.) leaf extracts against diamondback moth (*Plutella*

- xylostella* L.). 109-112. In **Proceeding of The 15th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology (ISBB 2017)**. Hurghada, Egypt.
- Sannongmueang, T., Pumnuan, J., and Insung, A. 2018. Effectiveness of bottle brush (*Callistemon lanceolatus* DC.) leaf extracts to control the nymph of mealybug (*Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero). **International Journal of Agricultural Technology**, 14(1): 53-59.
- Savi, A., Calegari, M. A., Calegari, G. C., Santos, V. A. Q., Wermuth, D., Cunha, M. A. A. d., and Oldoni, T. L. C. 2020. Bioactive compounds from *Syzygium malaccense* leaves: optimization of the extraction process, biological and chemical characterization. **Acta Scientiarum Technology**, 42. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v42i1.46773>.
- Scur, M. C., Pinto, F. G., Pandini, J. A., Costa, W. F., Leite, C. W., and Temponi, L. G. 2016. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. **Brazilian Journal of Biology**, 76(1): 101-108. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.13714>.
- Selestino Neta, M. C., Vittorazzi, C., Guimaraes, A. C., Martins, J. D., Fronza, M., Endringer, D. C., and Scherer, R. 2017. Effects of beta-caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies. **Pharmaceutical Biology**, 55(1): 190-197. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1254251>.
- Selvakesavan, R. K., Kruszka, D., Shakya, P., Mondal, D., and Franklin, G. 2023. Impact of nanomaterials on plant secondary metabolism. In J. M. Al-Khayri, L. M. Alnaddaf, and S. M. Jain (Eds.), **Nanomaterial interactions with plant cellular mechanisms and macromolecules and agricultural implications** (pp. 133-170). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-20878-2_6.
- Serban, G., Stanasel, O., Serban, E., and Bota, S. 2018. 2-Amino-1,3,4-thiadiazole as a potential scaffold for promising antimicrobial agents. **Drug Design, Development and Therapy**, 12: 1545-1566. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S155958>.
- Shamsudin, N. F., Ahmed, Q. U., Mahmood, S., Ali Shah, S. A., Khatib, A., Mukhtar, S., Alsharif, M. A., Parveen, H., and Zakaria, Z. A. 2022. Antibacterial effects of flavonoids and their structure-activity relationship study: A comparative interpretation. **Molecules**, 27(4). <https://doi.org/10.3390/molecules27041149>.
- Sharif, Z. M., Kamal, A. F., and Jalil, N. J. 2019. Chemical composition of *Melaleuca Cajuputi* Powell. **International Journal of Engineering and Advanced Technology**, 9(1): 3479-3483. <https://doi.org/10.35940/ijeat.A2668.109119>.

- Showler, A. T. 2017. Botanically based repellent and insecticidal effects against horn flies and stable flies (Diptera: Muscidae). **Journal of Integrated Pest Management**, 8(1). <https://doi.org/10.1093/jipm/pmx010>.
- Shukla, P., Walia, S., Ahluwalia, V., Parmar, B. S., and Nair, M. G. 2012a. Activity of alkanediol alkanooates against pathogenic plant fungi *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. **Natural Product Communications**, 7(9): 1219-1222.
- Shukla, R., Singh, P., Prakash, B., and Dubey, N. K. 2012b. Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. **Food Control**, 25(1): 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.010>.
- Siddique, S., Mazhar, S., Firdaus-e-Bareen, and Parveen, Z. 2018. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Melaleuca quinquenervia* leaves. **Indian Journal of Experimental Biology**, 56.
- Somnuek, S., Jaenaksorn, T., and Laosinwattana, C. 2020. Effect of crude ethanolic extracts from bottle brush (*Callistemon viminalis*) against leaf spot fungi and their phytotoxicity on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Current Applied Science and Technology journal**, 20(1): 1-14. <https://doi.org/10.14456/cast.1477.1>.
- Somnuek, S., Thipmanee, K., and Jaenaksorn, T. 2021. In vitro effect of *Callistemon viminalis* and *Melaleuca cajuputi* ethanolic extracts as botanical fungicide and insecticide **International Journal of Agricultural Technology**, 17(6): 2363-2374.
- Srikanth, C. V., Chakraborti, A. K., and Bachhawat, A. K. 2005. Acetaminophen toxicity and resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, 151(Pt 1): 99-111. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27374-0>.
- Subramaniam, S., Keerthiraja, M., and Sivasubramanian, A. 2014. Synergistic antibacterial action of β -sitosterol-d-glucopyranoside isolated from *Desmostachya bipinnata* leaves with antibiotics against common human pathogens. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 24(1): 44-50. <https://doi.org/10.1590/0102-695x20142413348>.
- Sukdee, S. 2023. Antifungal activity of plant extracts against *Colletotrichum capsici* causal agent of chili anthracnose. **Rattanakosin Journal of Science and Technology**, 5(1): 1-8. <https://ph02.tci-thaijo.org/index.php/RJST/article/view/247245>.
- Tadtong, S., Puengseangdee, C., Prasertthanawut, S., and Hongratanaworakit, T. 2016. Antimicrobial constituents and effects of blended eucalyptus, rosemary, patchouli, pine, and cajuput essential oils. **Natural Product Communications**, 11(2): 267-270.

- Tan, J., Li, Y., Hou, D. X., and Wu, S. 2019. The effects and mechanisms of cyanidin-3-glucoside and its phenolic metabolites in maintaining intestinal integrity. **Antioxidants**, 8(10). <https://doi.org/10.3390/antiox8100479>.
- Tanwar, R. K., Jeyakumar, P., and Monga, D. 2007. **Mealybugs and their management**. New Delhi: National Centre for Integrated Pest Management LBS Building.
- Teixeira, M. F. F., Pinheiro, D. T., Junior, H. C. S., Alves, E. C., Barros, T. T. V., Freitas, M. A. M. d., and Dias, D. C. F. d. S. 2018. Allelopathic influence of some fruit tree leaf extracts on germination and seedling development of different weeds and vegetable crops. **Australian Journal of Crop Science**, 12(05): 726-730. <https://doi.org/10.21475/ajcs.18.12.05.PNE839>.
- Thamburaj, S., and Singh, N. 2001. **Textbook of Vegetables Tubercrops and Spices**. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research.
- Thanaboripat, D. 2011. Control of aflatoxins in agricultural products using plant extracts. **KMITL Science and Technology Journal**, 11(1): 35-42.
- Thanaboripat, D., Sarutipaisan, C., Puangtong, C., Chatpongsatorn, P., Suvatti, Y., Sukonthamut, S., and Charoensettasilp, S. 2016. Effects of four essential oils on the growth of aflatoxin producing fungi. **KMITL Science and Technology Journal**, 16(2): 104-111.
- Thanaboripat, D., Suvathi, Y., Srilohasin, P., Sripakdee, S., Patthanawanitchai, O., and Charoensettasilp, S. 2007. Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*. **KMITL Science and Technology Journal**, 7(1): 1-7.
- Thomas, T., Biradar, M. S., Chimmad, V. P., and Janagoudar, B. S. 2021. Growth and physiology of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars under different growing systems. **Plant Physiology Reports**, 26(3): 526-534. <https://doi.org/10.1007/s40502-021-00591-3>.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., and Kaur, H. 2011. Phytochemical screening and extraction: A review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, 1(1): 98-106.
- Toiu, A., Vlase, L., Vodnar, D. C., Gheldiu, A. M., and Oniga, I. 2019. *Solidago graminifolia* L. Salisb. (Asteraceae) as a valuable source of bioactive polyphenols: HPLC profile, in vitro antioxidant and antimicrobial potential. **Molecules**, 24(14). <https://doi.org/10.3390/molecules24142666>.
- Tunçsoy, M. 2023. Impacts of metal nanoparticles on fish. In U. Shanker, C. M. Hussain, and M. Rani (Eds.), **Handbook of green and sustainable nanotechnology: Fundamentals, developments and applications** (pp. 2645-2662). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-16101-8_39.
- Ukit, U., Widiana, A., Rahmawati, E., and Hasby, R. M. 2019. Antibacterial activities test of cajuput leaf waste extract (*Melaleuca cajuputi* Powell) on pathogenic

- bacteria. **Journal of Physics: Conference Series**, 1402(3): 033030. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1402/3/033030>.
- United States Department of Agriculture. 2004. **Lettuce: Shipping point and market inspection instructions**. Washington, D.C., United States of America: United States Department of Agriculture.
- Vasconcelos, L. C., Carrijo, T. T., Venancio, A. N., Alves, T. A., Tuler, A. C., Hollunder, R. K., Garbin, M. L., Menini, L., and Praca-Fontes, M. M. 2022. Phytochemical screening and phytocytotoxic effects of the tropical *Myrcia vittoriana* (Myrtaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 94(3): e20210820. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220210820>.
- Visheentha, M., Appalasaamy, S., Nivaarani, A., Boon, J. G., Weeraya, K., and Charoen, P. 2018. The action of gelam (*Melaleuca cajuputi*) stem crude extract as natural insecticide for *Camponotus* sp. **Journal of Biodiversity, Bioprospecting and Development**, 5(2). <https://doi.org/10.4172/2376-0214.1000173>.
- Vivekanandhan, P., Alahmadi, T. A., Ansari, M. J., and Subata, S. P. 2024. Biocontrol efficacy of cajeput oil against *Anopheles stephensi* L. mosquito and its effect on non-target species. **Front Physiol**, 15: 1357411. <https://doi.org/10.3389/fphys.2024.1357411>.
- Wamba, B. E. N., Nayim, P., Mbaveng, A. T., Voukeng, I. K., Dzotam, J. K., Ngalani, O. J. T., and Kuete, V. 2018. *Syzygium jambos* displayed antibacterial and antibiotic-modulating activities against resistant phenotypes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2018: 5124735. <https://doi.org/10.1155/2018/5124735>.
- Wang, H., Huang, Y., Wang, J., Chen, X., Wei, K., Wang, M., and Shang, S. 2016. Activities of azoxystrobin and difenoconazole against *Alternaria alternata* and their control efficacy. **Crop Protection**, 90: 54-58. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.08.022>.
- Wang, X., Xie, H., Wang, P., and Yin, H. 2023. Nanoparticles in plants: Uptake, transport and physiological activity in leaf and root. **Materials**, 16(8). <https://doi.org/10.3390/ma16083097>.
- War, A. R., Paulraj, M. G., War, M. Y., and Ignacimuthu, S. 2011. Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant Signaling and Behavior**, 6(11): 1787-1792. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17685>.
- Watanabe, M., Fukiya, S., and Yokota, A. 2017. Comprehensive evaluation of the bactericidal activities of free bile acids in the large intestine of humans and rodents. **Journal of Lipid Research**, 58(6): 1143-1152. <https://doi.org/10.1194/jlr.M075143>.

- Wonglom, P., Ito, S., and Sunpapao, A. 2018. First report of *Curvularia lunata* causing leaf spot of *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* in Thailand. **New Disease Reports**, 38(1): 15-15. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2018.038.015>.
- Woudenberg, J. H., Groenewald, J. Z., Binder, M., and Crous, P. W. 2013. *Alternaria* redefined. **Studies in Mycology**, 75(1): 171-212. <https://doi.org/10.3114/sim0015>.
- Wu, P. H., Chang, H. X., and Shen, Y. M. 2023. Effects of synthetic and environmentally friendly fungicides on powdery mildew management and the phyllosphere microbiome of cucumber. **PLoS One**, 18(3): e0282809. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282809>.
- Xi, K.-Y., Xiong, S.-J., Li, G., Guo, C.-Q., Zhou, J., Ma, J.-W., Yin, J.-L., Liu, Y.-Q., and Zhu, Y.-X. 2022. Antifungal activity of ginger rhizome extract against *Fusarium solani*. **Horticulturae**, 8(11). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8110983>.
- Xie, Q., Li, F., Fang, L., Liu, W., and Gu, C. 2020. The antitumor efficacy of beta-elemene by changing tumor inflammatory environment and tumor microenvironment. **BioMed Research International**, 2020: 6892961. <https://doi.org/10.1155/2020/6892961>.
- Yamunarani, K., Jaganathan, R., Bhaskaran, R., Govindaraju, P., and Velazhahan, R. 2004. Induction of early blight resistance in tomato by *Quercus infectoria* gall extract in association with accumulation of phenolics and defense-related enzymes. **Acta Physiologiae Plantarum**, 26(3): 281-290. <https://doi.org/10.1007/s11738-004-0018-7>.
- Yang, L.-N., He, M.-H., Ouyang, H.-B., Zhu, W., Pan, Z.-C., Sui, Q.-J., Shang, L.-P., and Zhan, J. 2019. Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* to fungicides with different modes of action. **BMC Microbiology**, 19(1): 205. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1574-8>.
- Yusoff, S. F., Haron, F. F., Tengku Muda Mohamed, M., Asib, N., Sakimin, S. Z., Abu Kassim, F., and Ismail, S. I. 2020. Antifungal activity and phytochemical screening of *Vernonia amygdalina* extract against *Botrytis cinerea* causing gray mold disease on tomato fruits. **Biology**, 9(9). <https://doi.org/10.3390/biology9090286>.
- Zandi-Sohani, N., Hojjati, M., and Carbonell-Barrachina, A. A. 2013. Insecticidal and repellent activities of the essential oil of *Callistemon citrinus* (Myrtaceae) against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Neotropical Entomology**, 42(1): 89-94. <https://doi.org/10.1007/s13744-012-0087-z>.
- Zhao, F., Wang, P., Lucardi, R. D., Su, Z., and Li, S. 2020. Natural sources and bioactivities of 2,4-di-tert-butylphenol and its analogs. **Toxins**, 12(1). <https://doi.org/10.3390/toxins12010035>.
- Zhao, X., Sui, X., Zhao, L., Gao, X., Wang, J., Wen, X., and Li, Y. 2022. Morphological and physiological response mechanism of lettuce (*Lactuca Sativa* L.) to consecutive heat stress. **Scientia Horticulturae**, 301. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111112>.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ผลงานที่ลงตีพิมพ์เผยแพร่

Suriyasit Somnuek, Kamronwit Thipmanee, and Tanimnun Jaenaksorn. 2024. Antifungal activity and phytochemical analysis of myrtaceae leaf extracts including the induction of defense enzymes in lettuce against *Alternaria* leaf spot. Horticultural Science and Technology 42(6). <https://doi.org/10.7235/HORT.20240060>. (WOS Q3)

Somnuek, S., Thipmanee, K. and Jaenaksorn, T. 2021. *In vitro* effect of *Callistemon viminalis* and *Melaleuca cajuputi* ethanolic extracts as botanical fungicide and insecticide. International Journal of Agricultural Technology 17(6): 2363-2374. (SJR Q3)



Antifungal Activity and Phytochemical Analysis of Myrtaceae Leaf Extracts including the Induction of Defense Enzymes in Lettuce against *Alternaria* Leaf Spot

Suriyasit Somnuek^{*}, Kamronwit Thipmanee, and Tanimnun Jaenaksorn

Department of Plant Production Technology, School of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

^{*}Corresponding author: suriyasitson@gmail.com

Abstract

To avoid the risk of harmful effects from synthetic fungicides on human and natural environments, our study aimed to evaluate the potential use of the indigenous Thai Myrtaceae plants as a harmless means for controlling the plant diseases. Four Myrtaceae extracts showed no phytotoxicity towards lettuce cultivated in hydroponic conditions, with notable plant-growth-promoting potential observed in lettuce treated with *Callistemon viminalis* (EECV). With regard to a direct effect, *Melaleuca cajuputi* (95% EEMC) showed the strongest inhibition of mycelial growth of *A. brassicicola* (85–100%), followed by 95% EECV (40–63%), while both extracts significantly inhibited spore germination (80–100%). A GC/MS and LC/MS analysis revealed terpenoids as the predominant compounds at approximately 55% and 37% in EEMC and EECV, respectively, with high concentrations of phytol (14%) and 1,8-cineole (14%) being particularly notable. As an inducer of an indirect effect of the plant extracts, the results from the experiment with 95% EEMC (15,000 and 50,000 ppm) as well as 50 and 95% EECV (15,000 and 50,000 ppm) applications was in good agreement, demonstrating significant reductions in disease severity in hydroponically grown lettuce ranging from 50 to 70% together with the induction of defense enzymes (specifically β -1,3-glucanase, chitinase, and peroxidase) compared to those in the inoculated control and fungicide treatment groups. Furthermore, a correlation analysis revealed a negative correlation between disease severity and the three defense enzymes. Our findings underscore the considerable efficacy of the three botanical fungicides tested here (i.e., 95% EEMC as well as 95% and 50% EECV) for the management of *Alternaria* leaf spot in lettuce.


Additional key words: biofungicide, *Callistemon viminalis*, GC-MS/MS, LC-MS/MS, *Melaleuca cajuputi*, plant extract

Received: 15 April 2024

Revised: 02 May 2024

Accepted: 18 June 2024

Published online: 00 AAA 2024

 OPEN ACCESS



HORTICULTURAL SCIENCE and TECHNOLOGY
42(6) 2024
URL: <http://www.hst-j.org>

pISSN : 1226-8763
eISSN : 2465-8588

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright©2024 Korean Society for Horticultural Science.

The authors are very grateful to the School of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand, for the support provided with this work.

Introduction

For leafy vegetable production, synthetic fungicides have been widely employed to combat foliar diseases, including *Alternaria* leaf spot. However, the use of chemical fungicides is increasingly restricted due to concerns about food safety, particularly within organic farming practices (Horsfield

et al., 2010; Wang et al., 2016; Yang et al., 2019; Wu et al., 2023). Hence, a transfer from synthetic to natural safe fungicide is needed. Plant extracts are of great significance in this regard. Scientific studies have been carried out worldwide on the antifungal activities of plant extracts against the fungal pathogens of plant diseases, which have resulted in the development of promising sources of natural fungicides and botanical fungicides offering a potential solution to agricultural challenges (Jantasorn et al., 2016; Dethoup et al., 2018; Dethoup et al., 2019; Sukdee, 2023). In general, plant extracts have secondary metabolites (e.g., phenolics, phenolic acids, terpenoids, essential oils, alkaloids, tannins, flavonoids, coumarins, lectins and polypeptide) which represent biologically active substances (Gurjar et al., 2012; Pinto et al., 2018). Several researchers have uncovered the potential of medicinal plants to control plant pathogens, both by direct fungal toxic actions and due to the ability to stimulate the accumulation of molecules with elicitor features capable of inducing defense responses (Bonaldo et al., 2004; Celoto et al., 2008; Bulhões et al., 2012; Pinto et al., 2018). These resistance mechanisms may include the accumulation of phenolic compounds, phytoalexins and pathogenesis-related proteins such as β -1,3-glucanase, chitinase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase (Barros et al., 2010). Plant extract enhancers of the defense response in Ponkan mandarin seedlings against *Alternaria alternata* f. spp. citri infection were reported by Pinto et al. (2018). In 2012, Gurjar et al. reviewed the efficacy of plant extracts in plant disease management, finding that thousands of phytochemicals with inhibitory effects on all types of microorganisms in vitro should be subjected to in vivo testing to evaluate how well they control the incidence of disease in crops. The latest studies of natural alternatives for chemical synthetic pesticides, including the application of neem extract to manage postharvest losses due to postharvest diseases (e.g., *Aspergillus flavus*, *A. niger* and *Botrytis cinerea*) of fresh produce in tropical and subtropical fruits, were reviewed by Tzortzakis and Proestos (2024). In Thailand, the popularity of botanical fungicides is also increasing. Quite a number of phytochemical extracts have been evaluated during the search for plant-based antifungal agents for plant disease management, some recently reported studies include those on indigenous plants, such as *Hydnocarpus anthelminticus*, *Crateva magna*, *Caesalpinia sappan* (Jantasorn et al., 2016), *Acorus calamus* (Dethoup et al., 2019) and black pepper (Kunasakdakul and Suwitchayanon, 2012).

Myrtaceae plants, specifically *Callistemon viminalis*, *Melaleuca cajuputi*, *Syzygium jambos*, and *Syzygium malaccense*, are naturally found in Australia, southeast Asian countries, including Thailand, Malaysia and Indonesia (Bharat and Praveen, 2016; Salem et al., 2017; Patel et al., 2019; Isah et al., 2023). Various plant species from the Myrtaceae family have long been widely used for medicinal purposes given their antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant activities (Imatomi et al., 2013; Al-Abd et al., 2015; Rita et al., 2017; Salem et al., 2017; Puig et al., 2018; Patel et al., 2019; Vasconcelos et al., 2022). The phytochemical extract of *C. viminalis* demonstrated strong to moderate antibacterial effects against certain plant bacterial pathogens (El-Hefny et al., 2017) as well as in vitro antifungal effects (Somnuek et al., 2020; Somnuek et al., 2021). Essential oil extracted from *M. cajuputi* has been widely used worldwide for many purposes. Most of the compounds found in this plant possess aromatic, antibacterial and insecticide properties (Sharif et al., 2019). Keereedach et al. (2020) reported that Thai cajuput oil can be used to create new potential combination therapies to combat the antifungal resistance of *Candida albicans*. In addition, several studies have found the excellent antimicrobial effects of *M. cajuputi* extracts against bacteria, viruses, protozoa and fungal species due to the presence of specific phytoconstituents (Isah et al., 2023). *S. jambos* extract showed antimicrobial activity on the growth of both gram-positive and gram-negative bacteria (Mohanty and Cock, 2010), while only gram-negative bacteria were susceptible to the extract of *S. malaccense* (Bouzada et al., 2009). Although multiple studies have analyzed chemical compounds and the

antibacterial activities of extracts from different Myrtaceae family plants (Al-Abd et al., 2015; Salem et al., 2017; Isah et al., 2023), few studies have evaluated the potential of these extracts in in vivo testing to control the incidence of fungal plant diseases.

Therefore, the objective of our research was to investigate the possibility of employing ethanolic extracts from Myrtaceae plants as an alternative approach for managing *Alternaria* leaf spot in lettuce. For this purpose, an experimental series was carried out to determine the following: (1) the phytotoxicity of Myrtaceae plant extracts on the cultivated crop, (2) the direct effects of Myrtaceae extracts on mycelial growth and spore germination of a fungal pathogen of lettuce leaf spot, (3) the phytochemical profile of Myrtaceae plant extracts according to liquid chromatography (LC) / mass spectrometry (MS) and gas chromatography (GC) / MS, (4) the potential of Myrtaceae plant extracts as an inducer for defense-related enzymes for controlling *Alternaria* leaf spot in lettuce grown in hydroponics and (5) the correlation between disease severity and defense enzymes.

Materials and Methods

Myrtaceae extracts preparation

Four Myrtaceae plants were studied here. *Callistemon viminalis* (CV), *Syzygium jambos* (SJ), and *Syzygium malaccense* (SM) were collected from an area in Bangkok province, while *Melaleuca cajuputi* (MC) was collected from Chumphon province in Thailand.

Crude extracts using 95% ethanol

Fresh leaves of the Myrtaceae plants were cleaned with tap water and dried in open air. The leaf samples were then completely dried using a hot air oven (Memmert) at 50°C. The dried leaves were ground and extracted using the Soxhlet extraction technique with 95% ethanol, after which the ethanol solvent was evaporated with a rotary evaporator (Buchi, Rotavapor R300) at 50°C. The sticky extracts were kept at 4°C for further study.

Crude extracts using 50% ethanol

The method used to extract the *Callistemon viminalis* leaves was identical to that used with the 95% ethanolic crude extracts but with 50% ethanol instead as a solvent. This extract as well was kept at 4°C for further study.

Identification of *Alternaria* species by sequence analysis

The *Alternaria* isolate in this experiment obtained from our previous research (Somnuek et al., 2020) was morphologically identified and already proven with regard to its pathogenicity. Here, the identification of *Alternaria* species was confirmed by molecular identification. The genomic DNA of the tested fungus was extracted and the extracted DNA was used as the template for amplification with the ITS1 primer (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') and ITS4 primer (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC '3) of the internal transcribed spacer (ITS) of rDNA regions via polymerase chain reaction (PCR), with the process conducted according to the work of Mohammadi and Bahramikia (2019). The purified PCR products were sequenced by Bionics Co., Ltd. of Korea. Sequence similarity analyses were conducted using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) in the GenBank NCBI database.

Preliminary phytochemical screening of leaf extracts from four Myrtaceae plants

Phytochemical compounds such as phenols, flavonoids, tannins, alkaloids, and terpenoids showed antifungal properties on plant pathogenic fungi, and they acted in a synergistic manner (Tiwari et al., 2011; Gurjar et al., 2012). Therefore, this part of the experiment was undertaken to screen the targeted phytochemical compounds from the ethanolic crude extracts of *Callistemon viminalis* (95% EECV), *Melaleuca cajuputi* (95% EEMC), *Syzygium jambos* (95% EESJ), and *Syzygium malaccense* (95% EESM). Phytochemicals were detected according to a slightly modified version of the methods of Harborne (1998), Iqbal et al. (2015) and Dubale et al. (2023). The qualitative results were assessed by means of colorimetric reactions and were presented here as positive (+) for the presence of and negative (-) for the absence of phytochemicals.

Phytotoxicity of four Myrtaceae extracts on lettuce grown in hydroponics

Plant extracts, an important source of bioactive compounds, have been suggested as a viable, environmentally friendly option for plant disease control. However, plant extracts may also have negative impacts on cultivated crops. Therefore, a preliminary test was conducted here to find the extract with the least negative effect on lettuce grown in a hydroponic system. The experiment utilized a $4 \times 4 \times 2$ factorial in a completely randomized design (CRD) with 3 replications (3 plants per replicate). Factor A was the type of plant extract (EECV, EEMC, EESM, and EEMJ), Factor B was the concentration of the extract used (0, 5,000, 25,000 and 50,000 ppm), and Factor C was the number of applications (one time and two times). The tested lettuce plants were grown in a deep water culture (DWC) system, which was constructed from a plastic box ($25 \times 34 \times 15$ cm) and filled with a nutrient solution (EC = 1.6 – 1.8 mS/cm, pH = 5.8 – 6.2) (Benoit and Ceustermans, 1995). Subsequently, 2 ml of each prepared extract was sprayed on 15-day-old lettuce seedlings, and this step was repeatedly sprayed on 30-day-old lettuce seedling group. Phytotoxicity was evaluated according to the incidence of necrosis and discoloration at 1 to 3 days after the foliar spray. Moreover, the lettuce growth parameter of leaf greenness of the lettuce under test was monitored weekly using a chlorophyll meter (SPAD-502, Konica Minolta Sensing, Inc., Japan) after foliar spraying, whereas the fresh weights of the plants were recorded at the end of the cultivation period.

In vitro antifungal activity of Myrtaceae extracts on the growth of *Alternaria* sp.

Effect of four Myrtaceae extracts on mycelial growth

The effect of the ethanolic extracts from the four Myrtaceae plants on the mycelium growth of *Alternaria brassicicola* was investigated using 4×4 factorials in a completely randomized design (CRD). Factor A indicated the 4 Myrtaceae plants, and Factor B represented the 4 concentrations of the extracts used. The crude extracts were tested with regard to the mycelial growth of *A. brassicicola* by a poisoned food technique. A fungus was cultured on potato dextrose agar (PDA; Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., India) at room temperature ($\sim 25^\circ\text{C}$). Mycelial disks, 0.5 cm in diameter, were cut from the margins of the colonies and inoculated onto PDA mixed with each extract. The sizes of *A. brassicicola* colonies in the control plate and the plate containing the extract were determined at 3, 5, and 7 days after inoculation. Mycelial growth inhibition was calculated using the following formula: Mycelial growth inhibition (%) = $(DC - DT)/DC \times 100$ where DC = diameter of the *Alternaria* colony on the control plate

DT = diameter of the *Alternaria* colony on the plate containing the extract

Effect of potentially selected Myrtaceae extracts on spore germination

Two plant extracts (95% EEMC and 95% EECV) showing high-potential antifungal activity in the mycelium growth test described above were selected and tested further for their effect on *A. brassicicola* spore germination. The experiment was carried out by CRD. One mL of spore suspension (approximately 10^5 spores/mL) was inoculated into 1 mL of PDB in test tubes with 5 extract concentrations (1,000, 5,000, 10,000, 15,000 and 50,000 ppm). Sterilized water and mancozeb (500 ppm) were used as inoculated and chemical controls, respectively. Then, spore germination of the tested fungus was observed under a light microscope at 24, 48, and 72 h.

GC/MS and LC/MC-TOF analyses of the Myrtaceae extracts

GC/MS and LC/MS have often been used to analyze phytochemical compounds in plant extracts. The two methods are more alike than different. The only key difference between the systems is that GC/MS uses a gas mobile phase while LC/MS uses a liquid mobile phase. Therefore, GC/MS appears to be more applicable to more volatile and gas samples.

GC/MS analyses of the 95% EEMC and 95% EECV were carried out according to a slightly modified method based on Al-Abd et al. (2015) and Hassan et al. (2022). A gas chromatograph-mass spectrometer (7890 B GC-5977A MSD, Agilent Technologies, Inc., USA) was employed for these analyses. A HP-5 Ultra Inert column (30 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m, Agilent Technologies) with helium (He, flow rate = 40 cm/s) as the carrier gas was used. The oven was initially programmed to run at a temperature of 60°C (hold time 2 min), a rate of 7°C/min to 150°C (hold time 1 min), a rate of 2°C/min to 230°C (hold time 1 min), and a rate of 15°C/min to 300°C (hold time 15 min). The injection volume of 1 μ L operated in the split mode with a ratio of 10:1. The MS transfer line and ion source temperatures were maintained at 230°C and 150°C, respectively, and the mass spectra detector voltage was set at 70 eV. The scan range was from 35 to 600 *m/z*. Peaks and chemical constituents were identified by a MassHunter Workstation Software Quantitative Analysis Version B.09.00 Unknown Analysis.

The LC/MS analyses of the 95% EEMC and 95% EECV were conducted according to a slightly modified method based on Al-Abd et al. (2015). The system for analyzing the samples consisted of a high-performance liquid chromatograph-mass spectrometer-quadrupole time-of-flight [ExonLCTM AD Series (LC) and X500R QTOF system (QTOF),-SCIEX] with dual electrospray ionization (ESI). The LC separation steps were performed using a 2.1 mm (i.d.) narrow-bore SB-C18 (length 150 mm, particle size 3.5 μ m) analytical column. The LC parameters used were: 25°C for the autosampler temperature, 1 μ L for the injection volume, 25°C for the column temperature, and 0.4 mL/min for the flow rate. A gradient system consisting of 0.1% formic acid in water as solvent A and 0.1% formic acid in acetonitrile as solvent B was used. The mass spectra data were acquired using an ESI capillary voltage of (+) 4000 V in the positive ion mode with the fragmentor set to 125 V. Other conditions were set to 45 psi for the liquid nebulizer, a flow rate of 10 L/min with the drying gas, and vaporizer temperatures maintained at 300°C for the nitrogen drying gas. Moreover, the ionization interface was operated in positive mode. The data were collected and analyzed using SCIEX OS 2.1.0.

Evaluation of EEMC and EECV as an inducer on development of *Alternaria* leaf spot and the induction of defense enzymes in lettuce grown in a hydroponic system

In addition to a direct effect evaluation, we also focused on an indirect effect of the extracts as inducers on *Alternaria*

leaf spot disease severity as well as on the activity of defense enzymes. Two experiments were separately conducted, one to assess the effect of 95% EEMC (15,000 and 50,000 ppm) and the other to test 95% EECV (15,000 and 50,000 ppm). Moreover, 50% EECV, given its potential to stimulate lettuce growth as determined in our previous research (Somnuek et al., 2020), was also included in the 95% EECV experiment for further evaluation as an inducer on defense enzyme activity.

The EEMC effect

Preparation and experimental design

In order to make certain of the indirect effect of EEMC as an inducer, a hydroponic experiment with lettuce was carried out. First, lettuce seeds were germinated in a plastic tray on a moist sponge with nutrient solution (EC = 1, pH = 5.8 – 6.2) for 14 days. The seedlings were then transferred to grow in DWC with nutrient solution (EC = 1.6 – 1.8 mS/cm, pH = 5.8 – 6.2). The 95% EEMC at 15,000 and 50,000 ppm were prepared and foliar sprayed on the above lettuce seedlings (1 mL/plant). The treated seedlings were inoculated with a 100 μ L of tested spore suspension (approximately 10^6 spores/mL) a day after spraying with the plant extract. CRD with 3 replications (3 plants per replicate) was used in this experiment, as follows:

T1 = Healthy control, T2 = Inoculated control, T3 = Chemical control (mancozeb 500 ppm)

T4 = 95% EEMC (15,000 ppm), T5 = 95% EEMC (50,000 ppm)

Determination of disease severity

The treated leaves were observed at 1, 3, 5 and 7 days after inoculation (DAI), and a disease index was scored using a scale of 0 to 4 for the lesion size: 0 = no infection, 1 = 1 to 5 mm, 2 = 5 to 10 mm, 3 = 10 to 15 mm, and 4 \geq 15 mm. Disease severity (DS) of the tested lettuce leaves was analyzed using the following equations:

$$\% DS = [\sum (\text{number of infected leaves} \times \text{disease index}) / \text{number of total leaves} \times \text{the highest disease index}] \times 100.$$

In addition, the plant growth parameters, such as the greenness value (by chlorophyll meter; SPAD-502, Konica Minolta Sensing, Inc., Japan) and fresh weight were checked at 1, 3, 5, 7 days after spraying and at harvest.

Induction of plant defense enzymes due to the effect of the inducer

During pathogenesis, plant defense enzymes were also determined. The aforementioned treated lettuce leaves were collected at 1, 3, 5, and 7 days after foliar spraying. Three treated leaves were sampled from each replication of the treatment and were ground using liquid nitrogen. Then, 1 g of the tested leaf sample in each case was homogenized with 2 mL of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0). The homogenate was centrifuged for 20 min at 10,000 rpm in a cooling centrifuge at 4°C. Subsequently, peroxidase, chitinase, and β -1,3-glucanase were detected according to a modified version of the method introduced by Verburg and Huynh (1991), Boller and Mauch (1988), Gupta et al. (2013) and Selvaraj and Ambalavanan (2013).

β -1,3-glucanase activity

The homogenate of 62.5 μ L was mixed with laminarin (4% w/v in 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5.0) of 62.5 μ L for 10 min at 40°C. The reaction was then stopped by adding 375 μ L of DNS and heating this solution for 5 min in a boiling

water bath. The absorbance was detected by a spectrophotometer at 500 nm. The enzyme activity was expressed as μmol glucose/g of fresh leaves.

Chitinase activity

The homogenate of 0.4 ml was mixed with colloidal chitin (0.1% w/v in 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5.0) at a ratio of 1:1 and incubated at 37°C for 2 hrs with the product of N-acetyl glucosamine (GlcNAc). Then, the chitinase activity was detected with a spectrophotometer at 585 nm. The enzyme activity was expressed as μmol GlcNAc/g of fresh leaves.

Peroxidase (PO) activity

The enzyme supernatant of 100 μl was taken along with 0.05 M pyrogallol. To initiate the enzyme reaction, 1% H_2O_2 in an amount of 0.5 ml was added. The change in the absorbance was recorded by a spectrophotometer at 420 nm at 30 sec intervals for 3 min from zero seconds of incubation at room temperature. The result was expressed as the change in unit/g of fresh leaves.

The EECV effect

In this experiment, the preparation and experimental design, including the determination of disease severity and the plant defense enzyme activity, were carried out in the same manner as in the 95% EEMC experiment. Treatments in the experiment were as follows:

T1 = Healthy control, T2 = Inoculated control, T3 = Chemical control (mancozeb 500 ppm)
 T4 = 50% EECV (15,000 ppm), T5 = 50% EECV (50,000 ppm), T6 = 95% EECV (15,000 ppm),
 T7 = 95% EECV (50,000 ppm)

Correlation of disease severity and plant defense enzymes

In order to understand the relationship between the severity of leaf spot disease and the induced plant defense enzymes, as well as to confirm that these defense enzymes have a role in leaf spot management in lettuce, the correlation coefficients (r) between disease severity and the defense enzymes of β -1,3-glucanase, chitinase and peroxidase were estimated by standard statistical calculations. Simple regression equations ($Y = a + bx$) were also developed for all variables.

Results and Discussion

Identification of *Alternaria* species by sequence analysis

Alternaria species (Sommeek et al., 2020) was confirmed by ITS identification. The nucleotide sequences in the tested isolate were approximately 568 bp in size. The nucleotide sequence of the tested *Alternaria* isolate Alt-LL1 (OR226735) allowed an identification of *Alternaria brassicicola*. Our findings were in agreement with those of many researchers who reported that *A. brassicicola* was the causal agent of leaf spot disease in a number of vegetable crops, including lettuce (Pattanamahakul and Strange, 1999; Dethoup et al., 2018; O'Neill, 2019; Blagojević et al., 2020).

Phytochemical screening of four Myrtaceae leaf extracts

Our study confirmed the presence of qualitative phytochemical compounds, specifically phenol, flavonoids, and tannins, in all tested extracts (Table 1). High levels of phenols and flavonoids were especially detected in the 95% EEMC. Terpenoids were found only in the 95% EEMC and 95% EECV while alkaloids were not found in any of the extracts. Our findings were in accordance with those of many researchers who reported that the targeted phytochemical compounds, i.e., phenol, flavonoids, tannins, alkaloids and terpenoids, were found in several Myrtaceae plants, such as the fruit extract of *M. cajuputi* (Isnaini et al., 2023), *C. viminalis* extract (Salem et al., 2017), an extract from the leaves and bark of *S. jumbos* (Wamba et al., 2018), the leaf extract of *S. malaccense* (Patel et al., 2019) and an extract from *Psidium cattleianum* leaves (Faleiro et al., 2016). These targeted phytochemicals were detected in other plant extracts as well (Tiwari et al., 2011; Gurjar et al., 2012).

Phytotoxicity of four Myrtaceae extracts on lettuce grown in hydroponics

The phytotoxic effect of the four Myrtaceae extracts on lettuce was assessed by the foliar spray technique. Of the 4 Myrtaceae extracts evaluated here, none of the treatments showed phytotoxicity (such as browning and discoloration) on lettuce at 15 and 30 days (Table 2). Regarding the plant growth parameters, the SPAD values did not differ significantly ($p < 0.05$) from control and the other treatments, while the fresh weights were dependent on the plant extracts and corresponding concentrations but not on the application times. The 95% EECV at all concentrations significantly ($p < 0.05$) stimulated the fresh weight of lettuce (65.5–70.2 g/plant) compared to those treated with other plant extracts (39–43.5 g/plant). In addition, an increase in the extract concentration appeared to stimulate lettuce growth more strongly (Table 2 and Fig. 1). This result also agreed with our previous research (Somnuek et al., 2020), which reported that 3 ethanolic extracts from *C. viminalis* (50%, 70% and 95% EECV) at 5,000–50,000 ppm showed no phytotoxic effect and still increased seed germination and the growth of lettuce. More notably, the water extract of this plant showing no phytotoxicity could still promote the growth of rice (Bali et al., 2017). Apart from the 95% EECV, the research on the phytotoxic effect of the other 3 tested plant extracts was rather limited, most likely due to the fact that these plants were Thai native plants. Furthermore, no phytotoxicity of extracts from other plants within Myrtaceae, such as *Myrcia tomentosa* (Imatomi et al., 2013), *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh (Rita et al., 2017), *Eucalyptus globulus* (Puig et al., 2018), clove, tea tree, jaboticaba and guava (Carmello and Cardoso, 2018; Teixeira et al., 2018), was also noted together with the stimulating effects on growth parameters (e.g., germination percentage, germination speed index, leaf number,

Table 1. Phytochemical compounds of 95% ethanolic crude extracts from the leaves of 4 Myrtaceae plants

Phytochemical compound	Plant extract			
	EEMC	EECV	EESI	EESM
Phenols	+++	+	+	+
Flavonoids	++	+	+	
Tannins	+	+	+	+
Alkaloids	–	–	–	–
Terpenoids	+	+	–	–

+++ = high presence, ++ = moderate presence, – = absence.

Table 2. Phytotoxicity test of 95% ethanolic crude extracts from 4 Myrtaceae plants on lettuce grown in a hydroponic system

Factor A (Plant extract)	Factor B (Concentration)	Factor C (Application time) ^z	Phytotoxicity ^y (3 DAT)	SPAD value	Fresh weight (g/plant)	
EECV	0 ppm	One time	–	31.6 a ^x	40.9 c	
		Two times	–	30.2 a	42.5 c	
	5,000 ppm	One time	–	31.4 a	65.5 b	
		Two times	–	31.5 a	67.3 ab	
	25,000 ppm	One time	–	30.8 a	68.9 ab	
		Two times	–	32.4 a	67.4 ab	
	50,000 ppm	One time	–	32.5 a	68.3 ab	
		Two times	–	30.7 a	70.2 a	
	EEMC	0 ppm	One time	–	33.4 a	40.9 c
			Two times	–	32.2 a	42.5 c
5,000 ppm		One time	–	33.2 a	39.0 c	
		Two times	–	31.6 a	43.5 c	
25,000 ppm		One time	–	30.6 a	40.1 c	
		Two times	–	32.2 a	41.1 c	
50,000 ppm		One time	–	31.3 a	40.6 c	
		Two times	–	31.9 a	40.1 c	
EESJ		0 ppm	One time	–	32.0 a	40.9 c
			Two times	–	30.6 a	42.5 c
	5,000 ppm	One time	–	33.8 a	40.4 c	
		Two times	–	33.2 a	39.6 c	
	25,000 ppm	One time	–	32.0 a	41.1 c	
		Two times	–	32.0 a	39.4 c	
	50,000 ppm	One time	–	32.0 a	40.2 c	
		Two times	–	30.8 a	41.2 c	
	EESM	0 ppm	One time	–	32.0 a	40.9 c
			Two times	–	32.8 a	42.5 c
5,000 ppm		One time	–	32.0 a	39.0 c	
		Two times	–	30.5 a	39.2 c	
25,000 ppm		One time	–	32.0 a	40.2 c	
		Two times	–	30.2 a	40.0 c	
50,000 ppm		One time	–	32.3 a	40.6 c	
		Two times	–	32.5 a	40.4 c	
C.V. (%)				4.56	7.59	
A				ns	űű	
B			ns	űű		
C			ns	ns		
A × B			ns	űű		
A × C			ns	ns		
B × C			ns	ns		
A × B × C			ns	ns		

^zApplication time: For one time group, the spray was made at 15 days. For two times group, sprays were made at 15 and 30 days.

^y – showing non-phytotoxicity, + showing phytotoxicity.

^{*}Values are the means of 3 replicates. Values in each column followed by the same letter are not significantly different according to LSD ($p > 0.05$).

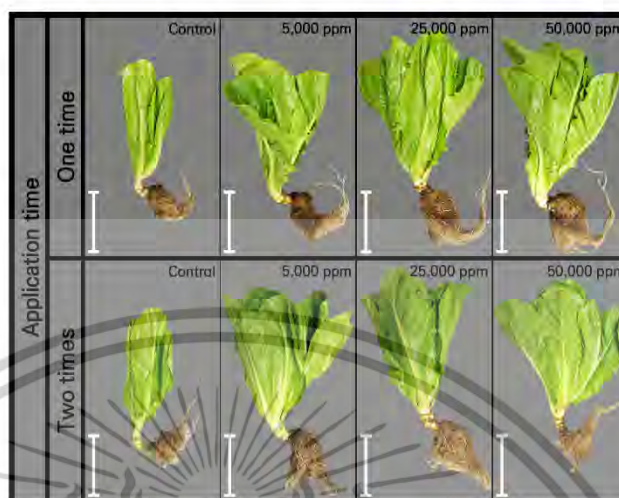


Fig. 1. A photo (at harvest) showing the non-phytotoxicity and plant growth stimulating effect of the 95% ethanolic extract of *C. viminalis* (95% EECV) spraying onto lettuce in a hydroponic system. Bar = 20 cm.

root length, and yield) in lettuce. In contrast, phytotoxic effects of *Myrcia vittoriana* (Myrtaceae) in a plant model (lettuce and onion) have recently been reported by Vasconcelos et al. (2022). Because the 4 Myrtaceae plant extracts have been proven so far from this experiment to have no negative effects on lettuce, their antifungal activities against *Alternaria* sp. in vitro and against leaf spot of lettuce grown in a hydroponic system should be investigated further.

In vitro antifungal activity of Myrtaceae extracts against growth of *Alternaria* sp.

Effect of four Myrtaceae extracts on mycelial growth

The antifungal activities of crude ethanolic extracts from the four Myrtaceae plants, i.e., *Callistemon viminalis* (95% EECV), *Melaleuca cajuputi* (95% EEMC), *Syzygium jambos* (95% EESJ) and *Syzygium malaccense* (95% EESM) at different concentrations were significantly ($p < 0.05$) noted against *A. brassicicola* mycelial growth. Moreover, their effect was dependent on the concentration of the extract and on the Myrtaceae plant species (Fig. 2). The 95% EEMC at all tested concentrations (5,000, 15,000 and 50,000 ppm) statistically ($p < 0.05$) showed the highest inhibitory effect (85–100%), while 95% EECV was the next most effective extract, with activity in the range of 40–63%. The 95% EESM and 95% EESJ presented inhibitory effects in the corresponding ranges of 15–80% and 30–40% (Fig. 2). The antifungal activity found in this experiment is attributable to the presence of phytochemical compounds such as phenolics, flavonoids, tannins and terpenoids. These phytochemicals were reported to have good antifungal effects on plant pathogens (Al-Abd et al., 2015; Bharat and Praveen, 2016; Salem et al., 2017; Patel et al., 2019). The mode of action of the phytochemicals includes membrane disruption, enzyme inactivation, protein binding and toxicity (Tiwari et al., 2011; Gurjar et al., 2012). Moreover, the significant in vitro antifungal activities of 4 extracts were in good agreement with the aforementioned phytochemical screening test, which showed the highest phytochemical substance levels in the 95% EEMC and 95% EECV. This study was in line with those of other researchers who found that *M. cajuputi* (essential oil)

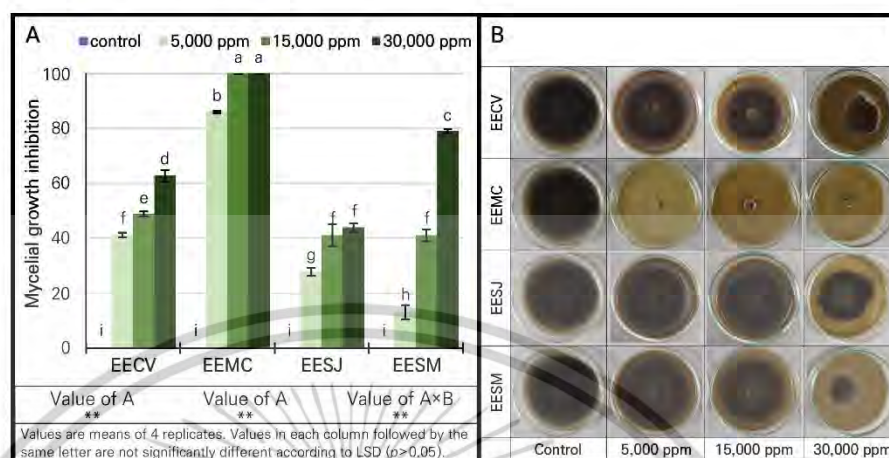


Fig. 2. Mycelial growth inhibition of *A. brassicicola* by different concentrations of 95% ethanolic extract of 4 Myrtaceae plants (EECV = *Callistemon viminalis*; EEMC = *Melaleuca cajuputi*, EESJ = *Syzygium jambos*; EESM = *Syzygium malaccense*) (A) and corresponding growth outcomes on Petri dishes (B).

had strong inhibitory effects on *Alternaria* spp. (Pawar and Thaker, 2007; Siddique et al., 2018), *Aspergillus* spp. (Thanaboripat et al., 2007; Thanaboripat, 2011; Bharat and Praveen, 2016; Thanaboripat et al., 2016; Siddique et al., 2018), *Fusarium* spp. (Pawar and Thaker, 2007; Siddique et al., 2018) and *Penicillium digitatum* (Siddique et al., 2018). Apart from having antifungal activity, the methanolic extract of *M. cajuputi* also exhibited antimicrobial activity against certain bacteria, such as *Bacillus* spp., *Enterococcus faecalis* (Ukit et al., 2019), *S. aureus*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, and *Staphylococcus epidermidis* (Al-Abd et al., 2015; Ukit et al., 2019). Of the 4 extracts tested here, the 95% EECV result confirmed the inhibitory effect, as noted in our previous research (Somnuek et al., 2020), against *Alternaria* sp. For 95% EESJ, our result agreed with other studies testing seed and leaf extracts. The seed extract was effective at controlling certain fungi, e.g., *Candida albicans*, *Microsporum canis*, and *M. gypseum* (Sakander et al., 2015), while the leaf extract inhibited the bacteria, namely *Salmonella typhi* (Murugan et al., 2011), *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* (Mohanty and Cock, 2010). In the 95% EESM case, *S. malaccense* leaf extracts showed inhibition activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, and *Shigella sonnei* (Bouzada et al., 2009).

Effect of potentially selected Myrtaceae extracts on spore germination

Potentially selected Myrtaceae extracts tested here, i.e., 95% EEMC and 95% EECV, at different concentrations (1,000, 5,000, 10,000, 15,000 and 50,000 ppm) were further evaluated for their antifungal activities on spore germination of *A. brassicicola*. Both 95% EEMC and 95% EECV at all tested concentrations indicated a significant ($p < 0.05$) inhibitory effect on spore germination (Fig. 3). Complete inhibition was noted upon the application of 95% EEMC at 5,000 – 50,000 ppm (Fig. 3), while abnormal spores were detected at all tested concentrations. At 72 hrs, abnormalities of *A. brassicicola* spores were detected, taking the forms of collapsed spores, degraded cell walls, and ungerminated spores (Fig. 3). For

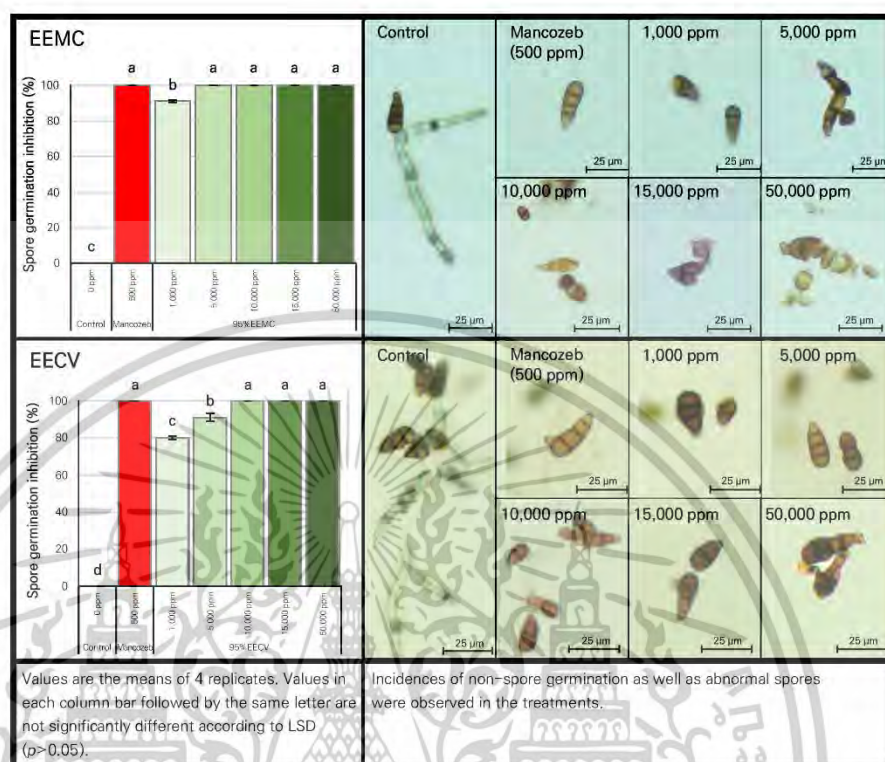


Fig. 3. Bar graph showing the inhibition effects of different concentrations of 95% ethanolic crude extracts from *M. cajuputi* (95% EEMC) and *C. viminalis* (95% EECV) on spore germination of *A. brassicicola*.

95% EECV, complete inhibition of spore germination was initially noted at 10,000 ppm and up. However, abnormal spores were only found at the highest extract concentration (50,000 ppm). Overall, we found that the higher concentration of plant extract induced the more potent inhibition of the growth of the pathogen in terms of mycelial growth and spore germination. Subsequently, the corresponding phytochemical profile responsible for this potent activity was further clarified in the following experiment, as described below.

Phytochemical profile of the Myrtaceae extracts by GC/MS and LC/MC-TOF

The 95% EEMC and 95% EECV were selected from the four Myrtaceae extracts due to their potential plant-growth stimulating effect and antifungal activities from the experiment described above. Subsequently, both 95% EEMC and 95% EECV were analyzed for non-targeted phytochemical compounds by GC/MS QTOF and LC/MS QTOF techniques. An overview of all annotated compounds of 95% EEMC and 95% EECV was given in Tables 3 and 4. These compounds were summarized along with their retention time, molecular formula, m/z, peak area and known bioactivity from the literature.

Table 3. Phytochemical compounds from the 95% ethanolic extract of Thai *M. cajuputi* (95% EEMC) analyzed by GC/MS QTOF and LC/MS QTOF

Compound name	RT (min)	Molecular formula	m/z	Peak area (%)	Known bioactivity from literature	
By GC/MS QTOF						
<i>Terpenoids</i>						
1 Copaene	16.74	C ₁₅ H ₂₄	204	0.20	antimicrobial (Scur et al., 2016)	
2 β-Elementene	17.12	C ₁₅ H ₂₄	204	0.64	anticancer (Xie et al., 2020)	
3 Caryophyllene	17.87	C ₁₅ H ₂₄	204	0.41	antimicrobial (Selestino Neta et al., 2017)	
4 α-Muurolene	19.35	C ₁₅ H ₂₄	204	0.33	antimicrobial (Marinas et al., 2021)	
5 β-Selinene	19.59	C ₁₅ H ₂₄	204	0.95	antifungal (Ding et al., 2017)	
6 γ-Selinene	19.82	C ₁₅ H ₂₄	204	0.39	antifungal (Foudah et al., 2021)	
7 Elemol	21.26	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.35	antimicrobial (Noriega et al., 2020)	
8 Spathulenol	22.22	C ₁₅ H ₂₆ O	220	0.45	antimicrobial (Fu et al., 2022)	
9 Caryophyllene epoxide	22.44	C ₁₅ H ₂₄ O	220	2.53	antimicrobial (Selestino Neta et al., 2017)	
10 Muurola-4,10(14)-dien-1β-ol	23.78	C ₁₅ H ₂₄ O	220	1.54	unknown	
11 Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5α-ol	24.00	C ₁₅ H ₂₄ O	220	1.71	antimicrobial (Selestino Neta et al., 2017)	
12 10,10-Dimethyl-2,6-dimethylenecyclo[7.2.0]undecan-5β-ol	24.12	C ₁₅ H ₂₄ O	220	3.89	unknown	
13 β-Eudesmol	24.39	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.27	antimicrobial (Noriega et al., 2020)	
14 Selin-6-en-4α-ol	24.61	C ₁₅ H ₂₆ O	222	2.12	antibacterial (Cordeiro et al., 2020)	
15 Aromadendrene epoxide	24.75	C ₁₅ H ₂₄ O	220	2.45	antimicrobial (Mulyaningsih et al., 2011)	
16 8-Methoxycedrane	25.27	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	264	0.74	unknown	
17 (1R,7S,E)-7-Isopropyl-4,10-dimethylenecyclodec-5-enol	25.44	C ₁₅ H ₂₄ O	220	1.17	unknown	
18 Pluchidiol	26.97	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	208	0.21	antimicrobial (Karimi et al., 2019)	
19 Proximadiol	29.55	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	222	0.25	unknown	
20 α-Eudesmol	30.29	C ₁₅ H ₂₆ O	222	1.40	antimicrobial (Noriega et al., 2020)	
21 Squamulose	30.90	C ₁₅ H ₂₆ O	218	0.78	unknown	
22 6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone	31.46	C ₁₈ H ₃₆ O	268	0.43	antibacterial (Naidoo et al., 2014)	
23 Corymbolone	31.55	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	236	0.40	antifungal (Hussein et al., 2016)	
24 4,4,8-Trimethyltricyclo[6.3.1.0(1,5)]dodecane-2,9-diol	31.67	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	238	0.54	unknown	
25 Estra-1,3,5(10)-trien-17β-ol	32.82	C ₁₈ H ₂₆ O	256	0.91	anticancer (Khan et al., 2022)	
26 Phytol	38.60	C ₂₀ H ₄₀ O	296	19.14	antimicrobial (Saha and Bandyopadhyay, 2020; Yusoff et al., 2020; Petcheng et al., 2023)	
27 γ-Sitosterol	41.19	C ₂₈ H ₄₈ O	414	0.54	antibacterial (Subramaniam et al., 2014)	
28 28-Norolean-17-en-3-ol	42.70	C ₂₉ H ₄₈ O	412	0.57	antiviral (Darshani et al., 2022)	
				<i>Terpenoids</i>	45.31	
<i>Phenolics</i>						
29 Ethyl α-D-glucopyranoside	23.67	C ₈ H ₁₆ O ₆	208	1.66	antioxidant (Dai et al., 2022)	
30 2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyde, TMS derivative	25.82	C ₁₁ H ₁₆ O ₃ Si	224	0.26	antibacterial (Durgadevi et al., 2019)	
				<i>Phenolics</i>	1.92	
<i>Flavonoids</i>						
31 Pinostrobin	32.53	C ₁₁ H ₁₆ O ₄	206	0.32	antibacterial (Marlyana et al., 2018)	
				<i>Flavonoids</i>	0.32	
<i>Naphthalenes & Aromatics</i>						
32 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalene-1,2-diol,5,6-dimethoxy-	23.15	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	164	8.45	unknown	
33 9-Butyl-9H-fluoren-9-ol	36.55	C ₁₇ H ₁₈ O	238	0.40	unknown	
				<i>Naphthalenes & Aromatics</i>	8.85	
<i>Other compounds</i>						
34 2,5-Dimethoxythiophenol	15.71	C ₈ H ₁₀ O ₂ S	170	0.26	unknown	
35 Butyric acid, 2,3-epoxy-, ethyl ester	21.47	C ₁₁ H ₁₈ O	164	0.23	unknown	
36 2',3',4' Trimethoxyacetophenone	26.46	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	210	7.16	antibacterial (Freitas et al., 2020)	

Table 3. Phytochemical compounds from the 95% ethanolic extract of Thai *M. cajuputi* (95% EEMC) analyzed by GC/MS QTOF and LC/MS QTOF (Continued)

Compound name	RT (min)	Molecular formula	m/z	Peak area (%)	Known bioactivity from literature
37 2,5,5,8a-Tetramethyl-4-methylene-6,7,8,8a-tetrahydro-4H,5H-chrome n-4a-yl hydroperoxide	28.99	C ₁₄ H ₂₂ O ₃	238	1.23	unknown
38 Octahydro-1-(2-octyldecyl)-pentalene	30.51	C ₂₆ H ₄₀	362	3.63	unknown
39 10-Methylantiracene-9-carboxaldehyde	33.23	C ₁₆ H ₁₂ O	220	11.63	unknown
40 2-Isopropyl-10-methylphenanthrene	37.35	C ₁₈ H ₁₈	234	5.32	unknown
41 5-Methyl-6,7,8,9-tetrahydroisothiazolo[5,4-C]isoquinolin-1(2H)-one	37.79	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ OS	220	12.53	unknown
		<i>Other compounds</i>		41.99	
		Total		98.39	
By LC/MS QTOF					
<i>Terpenoids</i>					
1 Ingenol	15.36	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	348	9.17	anti-HIV (Fujiwara et al., 1996)
		<i>Terpenoids</i>		9.17	
<i>Phenolics</i>					
2 Acetaminophen	11.99	C ₉ H ₉ NO ₂	151	9.93	antifungal (Srikanth et al., 2005)
3 6-Gingerol	12.51	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	294	2.75	antifungal (Xi et al., 2022)
4 3,5-Di-tert-butyl-2-hydroxybenzaldehyde	27.74	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	234	6.81	antimicrobial (Zhao et al., 2020)
		<i>Phenolics</i>		19.49	
<i>Flavonoids & Naphthalene</i>					
5 Cyanidin-3-O-sophoroside	0.58	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆ ⁺	611	1.34	antibacterial (Tan et al., 2019)
6 6,2'-Dimethylflavone	15.72	C ₁₇ H ₁₄ O ₄	282	4.21	antifungal (Mangoyi et al., 2015)
		<i>Flavonoids & Naphthalene</i>		5.55	
<i>Steroids & Benzofurans</i>					
7 5β-Androstane-3β,17β-diol	12.54	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292	3.84	unknown
8 Dichlorofluorescein	14.80	C ₂₀ H ₁₀ Cl ₂ O ₅	401	3.95	unknown
		<i>Steroids & Benzofurans</i>		7.79	
<i>Ethylene glycol</i>					
9 Nonaethylene glycol	0.58	C ₁₈ H ₃₈ O ₁₀	415	10.28	antimicrobial (Shukla et al., 2012)
10 Decaethylene glycol	0.58	C ₂₀ H ₄₂ O ₁₁	459	10.42	antimicrobial (Shukla et al., 2012)
11 Pentaethylene glycol	12.51	C ₁₀ H ₂₂ O ₆	238	5.55	antimicrobial (Shukla et al., 2012)
		<i>Ethylene glycol</i>		26.25	
<i>Vitamins</i>					
12 R-lipoic acid	0.46	C ₈ H ₁₄ O ₂ S ₂	207	6.63	PGPM ² (Elkheisi et al., 2021)
		<i>Vitamins</i>		6.63	
<i>Fatty acid & Glucosides</i>					
13 2,3-Dinor-11β-prostaglandin F2α	12.56	C ₁₈ H ₃₀ O ₅	326	9.45	unknown
14 Harpagide	14.4	C ₁₃ H ₂₀ O ₁₀	364	3.46	unknown
		<i>Fatty acid & Glucosides</i>		12.91	
<i>Other compounds</i>					
15 1-(1',3'-Benzodioxol-5'-yl)-2-butanamine	0.42	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	193	1.03	unknown
16 Salicylic acid, valerate	0.82	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222	3.70	ISR ³ (War et al., 2011; Sangueak et al., 2021)
17 2-Acetyl-5-(tetrahydroxybutyl)imidazole	12.47	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₅	230	1.24	unknown
18 Leukotriene B3	12.54	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	338	3.34	antibacterial (Serban et al., 2018)
		<i>Other compounds</i>		9.31	
		Total		97.1	

²PGPM = Plant growth promoting metabolites.³ISR = Induced systemic resistance.

Table 4. Phytochemical compounds from the 95% ethanolic extract of Thai *C. viminalis*(95% EECV) analyzed by GC/MS QTOF and LC/MS QTOF

Compound name	RT (min)	Molecular formula	m/z	Peak area (%)	Known bioactivity from literature	
By GC/MS QTOF						
<i>Terpenoids</i>						
1 α -Phellandrene	8.96	C ₁₀ H ₁₆	136	2.04	antimicrobial (İşcan et al., 2012)	
2 α -Cymene	9.39	C ₁₀ H ₁₄	134	0.84	antimicrobial (Tadong et al., 2016)	
3 1,8-Cineole	9.52	C ₁₀ H ₁₈ O	154	14.0	antimicrobial (Tadong et al., 2016; Şunsek and Dams, 2017; Kim et al., 2018)	
4 α -Terpinene	10.77	C ₁₀ H ₁₆	136	0.19	antifungal (Marei and Abdelgaleil, 2018)	
5 Terpinen-4-ol	12.64	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.36	antifungal (Marei and Abdelgaleil, 2018; Kamiya et al., 2024)	
6 L- α -Terpineol	12.89	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1.42	antifungal (Marei and Abdelgaleil, 2018)	
7 2-Acetoxy-1,8-cineole	15.24	C ₁₂ H ₂₀ O ₃	212	0.26	antimicrobial (Tadong et al., 2016)	
8 Caryophyllene	17.86	C ₁₅ H ₂₄	201	0.35	antimicrobial (Selestino Neta et al., 2017)	
9 γ -Selinene	19.81	C ₁₅ H ₂₄	204	0.20	antifungal (Foudah et al., 2021)	
10 Spathulenol	22.21	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.76	antimicrobial (Fu et al., 2022)	
11 Isopletholone	23.65	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	266	1.01	unknown	
12 Pluchidiol	29.46	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	208	0.57	unknown	
13 α -Phellandrene, dimer	29.82	C ₂₀ H ₃₂	272	0.76	antimicrobial (İşcan et al., 2012)	
14 Phytol acetate	31.42	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	338	0.49	antifungal (Foudah et al., 2021)	
15 4,4,8-Trimethyltricyclo[6.3.1.0(1,5)]dodecane-2,9-diol	32.82	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	238	0.33	unknown	
16 Phytol	42.67	C ₂₀ H ₄₀ O	296	0.53	antimicrobial (Sains and Encyclopaedia, 2020; Yusoff et al., 2020; Petpheng et al., 2023)	
17 Vitamin E	65.48	C ₂₈ H ₅₆ O ₂	450	0.36	PCRMP (Muñoz and Munné-Bosch, 2019)	
18 γ -Sitosterol	68.15	C ₂₈ H ₄₈ O	414	1.91	antibacterial (Subramaniam et al., 2014)	
19 Lanosterol	68.76	C ₃₀ H ₅₄ O	426	0.52	unknown	
20 28-Norolean-17-en-3-ol	69.25	C ₂₈ H ₄₆ O	412	1.02	antibacterial (Kim et al., 2015)	
21 α -Amyrin	69.56	C ₃₀ H ₅₀ O	426	0.40	antibacterial (Chung et al., 2011)	
22 γ -Sitosterolone	70.52	C ₂₈ H ₄₆ O	412	0.64	antibacterial (Subramaniam et al., 2014)	
23 Benzaldehyde	73.64	C ₉ H ₈ O	440	0.88	antibacterial (Chung et al., 2011)	
				<i>Terpenoids</i>	30.04	
<i>Phenolics</i>						
24 2-Hydroxy-5-methoxyacetophenone, 3-methylbutylether	20.33	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	236	1.70	unknown	
25 2,6-Di-tert-butyl-4-hydroxy-4-methylcyclohexa-2,5-diene-1-one	23.24	C ₁₅ H ₂₄ O	236	1.77	unknown	
				<i>Phenolics</i>	3.47	
<i>Flavonoids</i>						
26 Hesperetin	58.40	C ₁₉ H ₁₄ O ₆	330	0.39	antimicrobial (Ćarević et al., 2022)	
27 Prosopetin E	60.00	C ₁₈ H ₁₄ O ₆	332	2.06	antibacterial (Shamsudin et al., 2022)	
28 Gualacitin	60.63	C ₁₉ H ₁₄ O ₆	328	0.32	unknown	
29 8-hydroxyosalvigenin	64.71	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	312	0.71	antimicrobial (Alresaldi et al., 2020)	
30 4',7-Di-O-methylflaringenin	65.01	C ₁₈ H ₁₄ O ₆	326	1.79	antibacterial (Kozłowska et al., 2017)	
				<i>Flavonoids</i>	5.27	
<i>Aromatic & Fatty acids</i>						
31 Isolongifolene	19.59	C ₁₁ H ₁₆	204	0.48	unknown	
32 1,2,3,4,5,6,7,8-Octahydro-2-sulphithol, 4-methylene-2,5-dimethyl-	24.79	C ₁₇ H ₂₈ O	206	0.25	unknown	
33 2,4,6-Octatriene, 3,4-dimethyl-	9.23	C ₁₀ H ₁₆	136	0.26	unknown	
34 Hexadecanoic acid, ethyl ester	37.81	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	0.30	unknown	
35 Ethyl oleate	44.93	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	310	0.20	unknown	
				<i>Aromatic & Fatty acids</i>	1.49	
<i>Quinones & Steroids</i>						
36 5-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-1-cyclohexene-1,3-dione	14.26	C ₁₀ H ₁₆ O ₃	182	1.04	unknown	
37 Androst-1-en-3-one, 17-(acetyloxy)-,1,5-epoxy-, (4 β ,5 β ,17 β)-	50.33	C ₂₇ H ₄₆ O ₃	344	2.14	unknown	
				<i>Quinones & Steroids</i>	3.18	
<i>Other compounds</i>						
38 6-acetyl-2,2,4,4-tetramethylcyclohexane-1,3,5-trione	16.37	C ₁₂ H ₁₈ O ₄	224	1.59	unknown	
39 2-Cyclopropene-1-carboxylic acid, 2-(1,1-dimethyl-5-oxohexyl)-, methyl ester	18.68	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	224	0.31	unknown	

Table 4. Phytochemical compounds from the 95% ethanolic extract of Thai *C. viminalis* (95% EECV) analyzed by GC/MS QTOF and LC/MS QTOF (continued)

	Compound name	RT (min)	Molecular formula	m/z	Peak area (%)	Known bioactivity from literature
40	2-Hydroxy-5-methoxybenzaldehyde, TMS derivative	19.16	C ₁₁ H ₁₄ O ₃ Si	224	0.32	unknown
41	2,2,4-Trimethyl-4-trimethylsilyloxyethylcyclopentane-1,3-dione	21.01	C ₁₉ H ₂₈ O ₃ Si	236	25.0	unknown
42	1-Ethyl-2,2,4a,7,7-pentamethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro[1,8]naphthopyridine	22.96	C ₁₇ H ₂₈ N ₂	236	0.72	unknown
43	4a,6a-Dimethyl-2-oxo-1a,2,4a,4b,5,6,6a,7,8,9,9a,9b,10,11-tetradecahydrocyclopenta[7,8]phenanthro[1,10b]oxirene-7-yl acetate pk2	51.49	C ₂₁ H ₂₈ O ₄	344	7.63	unknown
44	2-Amino-3-cyano-4-methyl-4,6-dipyridin-4-ylcyclohexa-1,5-dien-1,3-dicarboxylic acid, diethyl ester	61.33	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₄	432	0.32	unknown
45	2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene,2,6,10,15,19,23-hexamethyl-	62.28	C ₃₀ H ₅₀	410	0.76	unknown
			<i>Other compounds</i>		36.65	
			Total		80.1	
By LOMS QTOF						
<i>Terpenoids</i>						
1	11-Keto- β -boswellic acid	16.22	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471	6.96	antimicrobial (Jaroš et al., 2022)
			<i>Terpenoids</i>		6.96	
<i>Phenolics</i>						
2	Metaprotogerol	13.34	C ₁₁ H ₁₂ NO ₂	212	5.33	unknown
			<i>Phenolics</i>		5.33	
<i>Flavonoids</i>						
3	Leucoposide	12.63	C ₂₇ H ₃₂ O ₅	653	2.41	antimicrobial (Tou et al., 2019)
4	Peonidin cation	13.24	C ₁₆ H ₁₃ O ⁺	301	1.03	antifungal (Chen et al., 2023)
			<i>Flavonoids</i>		3.44	
<i>Coumarins, Alkaloid & Steroids</i>						
5	7-Methoxycoumarin	0.80	C ₁₀ H ₈ O ₂	177	2.11	antifungal (Chen et al., 2023)
6	Quinazolinine	12.12	C ₁₂ H ₈ N ₂	305	1.04	antimicrobial (Calcara and Mammìrolì, 2018)
7	5 β -Pregnane-3 α ,17,20 β ,21-tetrol-11-one	12.20	C ₃₁ H ₅₄ O ₄	366	1.39	unknown
8	γ -Mirocholic acid	15.28	C ₂₀ H ₃₄ D ₃ O ₂	391	1.70	antibacterial (Wicampbe et al., 2017)
9	5 β -Androstane-3 α ,17 β -diol	12.07	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	275	1.33	unknown
			<i>Coumarins, Alkaloid & Steroids</i>		7.57	
<i>Ethylene glycol</i>						
10	Nonaethylene glycol	0.81	C ₁₈ H ₃₈ O ₁₀	432	5.00	antimicrobial (Shakla et al., 2012)
11	Decaethylene glycol	0.81	C ₂₀ H ₄₂ O ₁₁	459	6.10	antimicrobial (Simida et al., 2012)
			<i>Ethylene glycol</i>		11.1	
<i>Vitamins</i>						
12	1,25-Dihydroxy vitamin D ₂	16.23	C ₂₈ H ₄₄ O ₂	411	2.07	PGPM (Buchala and Pytroid, 1988)
			<i>Vitamins</i>		2.07	
<i>Fatty acid</i>						
13	18-Carboxy dinor leucotriene B ₄	12.12	C ₁₈ H ₃₀ O ₆	321	3.53	unknown
14	16,16-Dimethylprostaglandin E ₂	12.23	C ₂₂ H ₃₈ O ₂	363	1.20	unknown
15	Tafluprost (free acid)	12.25	C ₂₂ H ₃₈ F ₂ O ₂	411	8.59	unknown
			<i>Fatty acid</i>		13.32	
<i>Other compounds</i>						
16	Etioecaine	12.05	C ₁₇ H ₂₆ N ₂ O	277	2.05	unknown
17	N-Desethylamodiaquine	12.12	C ₁₈ H ₁₈ ClN ₂ O	328	2.05	unknown
18	Nigerose	12.19	C ₁₀ H ₂₀ O ₁₁	365	5.49	PGPM (Ichimura et al., 2022)
19	Unoprostone isopropyl ester	12.33	C ₂₅ H ₃₈ O ₃	407	1.23	unknown
20	Glu-Ile	13.49	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₂	261	5.21	PGPM (Qiu et al., 2020)
21	Cinnamic acid	15.24	C ₉ H ₈ O ₂	149	2.12	antifungal (Guo et al., 2020)
22	3 β -Hydroxy-5-cholezoic acid	15.49	C ₂₆ H ₄₆ O ₄	357	7.98	unknown
23	Octamethylcyclotetrasiloxane	15.54	C ₈ H ₂₀ O ₄ Si ₄	297	1.14	unknown
			<i>Other compounds</i>		27.27	
			Total		77.06	

*PGPM = Plant growth promoting metabolites.

As shown in Table 3, the analysis of the 95% EEMC by GC/MS revealed 41 components comprising 98.39% of the total extract composition, represented by 45.31% of terpenoids, 1.95% of phenolics, 0.32% of flavonoids, 8.85% of naphthalene and aromatics as well as 41.99% of other compounds. Of terpenoids containing 28 phytochemicals, phytol (14%) was the predominant component, followed by 10,10-dimethyl-2,6-dimethylenebicyclo[7.2.0]undecan-5 β -ol (3.89%), caryophyllene epoxide (2.53%), aromadendrene epoxide (2.45%) and selin-6-en-4 α -ol (2.12%). For phenolics, the compounds presented a number of components, such as ethyl α -D-glucopyranoside (1.66%) and 2-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde, a TMS derivative (0.26%). In contrast, pinostrobin (0.32%) was the only component of flavonoids. The LC/MS analysis showed the presence of 18 chemicals comprising 97.1% of the total extract composition, represented by 9.17% of terpenoids, 19.49% of phenolics, 5.55% of flavonoids and naphthalene, 7.79% of steroids and benzofurans, 12.91% of fatty acids and glucosides, 6.63% of vitamins, 26.25% of ethylene glycol and 9.31% of other compounds. The main compounds of ethylene glycol were nonaethylene glycol (10.28%) and decaethylene glycol (10.42%). The phenolics namely, acetaminophen (9.99%), 3,5-di-tert-butyl-2-hydroxybenzaldehyde (6.81%) and 6-gingerol (2.75%) were detected. Meanwhile, terpenoids and vitamins each contained only one component namely, ingenol (9.17%) and R-lipoic acid (6.63%), respectively. Based on the 95% EEMC analysis, it was clearly shown that the highest diversity of terpenoids was found among the total identified phytochemical compounds. Our findings were in good agreement with earlier work (Al-Abdi et al., 2015) showing that the major phytochemical groups in *M. cajuputi* were terpenoids, phenolics, flavonoids aromatics and fatty acids. Recently, Isah et al. (2023) compiled and summarized work showing that terpenoids, phenolics, and flavonoids were the major phytochemicals of the solvent extracts and essential oil of *M. cajuputi*.

Regarding 95% EECV, as shown in Table 4, its compositional variability was in line with those of the 95% EEMC case, showing the highest diversity of terpenoids. Based on GC/MS, the 95% EECV contained 45 intricate chemical compositions consisting of 80.1% of the total extract composition, represented by 30.04% of terpenoids [mainly 1,8-cineole (14%), α -phellandrene (2.04%), γ -sitosterol (1.91%) and L- α -terpineol (1.42%)], 3.47% of phenolics [2'-hydroxy-5'-methoxyacetophenone, 3-methylbutylether (1.7%) and 2,6-di-tert-butyl-4-hydroxy-4-methylcyclohexa-2,5-dien-1-one (1.77%)], 5.27% of flavonoids [prosoyerin E (2.06%) and 4',7-di-O-methylnaringenin (1.79%)], 1.49% of aromatic and fatty acids, 3.18% quinones and steroids, including 36.65% of other compounds. Based on the LC/MS, the analysis revealed the presence of 23 phytochemicals comprising 77.06% of the total plant extract composition. A total phytochemical compounds were identified as 6.96% of terpenoids (11-keto- β -boswellic acid), 5.33% of phenolics (metaproteranol), 3.44% of flavonoids (leiocarposide and peonidin cation), 7.57% of the groups of coumarins, alkaloids and steroids, 11.1% of ethylene glycol, 2.07% of vitamins (1,25-dihydroxy vitamin D2), 13.32% of fatty acids (tafluprost, 18-carboxy dinor leukotriene B4, and 16,16-dimethylprostaglandin E2) along with 27.27% of other compounds (nigerose and glu-ile). Based on the 95% EECV analysis, our findings were in good agreement with those of the previous studies by Salem et al. (2017), Almad and Athar (2016) and de Oliveira et al. (2014), demonstrating the detection of terpenoids (1,8-cineole), phenolics and flavonoids in *C. yiminialis*.

As shown in Tables 3 and 4, terpenoids were the main compounds in both the EEMC and EECV followed by phenolics, flavonoids and ethylene glycol. The known biological activities (such as antifungal, antibacterial and antiviral activities) of the phytochemical compounds identified in EECV and EEMC were cited and compiled in Tables 3 and 4. Regarding the antimicrobial activities, terpenoid compounds (mainly phytol, 1,8-cineole, α -terpinene, terpinene-4-ol and 11-Keto- β -boswellic acid) were documented to exert potent antifungal activity against *Candida albicans* (Tadlong et al., 2016),

Aspergillus spp. (Morcia et al., 2012; Kim et al., 2018), *Alternaria* spp. (Morcia et al., 2012; Marei and Abdelgaleil, 2018), *Botrytis cinerea* (Yusoff et al., 2020), *Fusarium* spp. (Morcia et al., 2012; Marei and Abdelgaleil, 2018), *Penicillium* sp. (Morcia et al., 2012; Marei and Abdelgaleil, 2018), and *Rhizoctonia solani* (Marei and Abdelgaleil, 2018). The large amount of terpenoids found in the 95% EEMC (55%) from this analysis tended to support our earlier result regarding the antifungal activity of both plant extracts tested via poisoned food testing, showing the maximum potential inhibition effect of 95% EEMC. Interestingly, our phytochemical analysis also confirmed the presence of vitamin E, 1,25-dihydroxy vitamin D₂, nigerose and glu-ile in 95% EECV, which were cited as plant-growth-promoting metabolites (Muñoz and Munné-Bosch, 2019; Qiu et al., 2020; Ichimura et al., 2022). Hence, this likely supported the positive effect (such as plant-growth-promoting activity) of EECV on the growth of lettuce in our study found during the phytotoxicity assessment.

Evaluation of EEMC and EECV as an inducer on development of *Alternaria* leaf spot and induction of defense enzymes in lettuce grown in a hydroponic system

The EEMC effect

The indirect effect of 95% EEMC at 15,000 and 50,000 ppm against *Alternaria* leaf spot in lettuce using CRD with 3 replications revealed that the use of the highest concentration (50,000 ppm) of the extract and fungicide led to the complete inhibition of leaf spot at 3 DAI (Fig. 4). In addition, disease progress developed further in all treatments. However, the 2 tested concentrations of the extract as well as the fungicide treatment still significantly ($p < 0.05$) showed a strong inhibition effect at 5 DAI. At 7 DAI, a statistically significant difference ($p < 0.05$) in the severity of *Alternaria* leaf spot was noted among the treatments. Disease severity in the extract treatments was significantly reduced ($p < 0.05$) by 50–70% compared to an inoculated control, while only the fungicide treatment resulted in a 40% reduction. Importantly, the high concentration (50,000 ppm) significantly ($p < 0.05$) resulted in the greatest level of disease reduction in this regard. Moreover, the activities of the induced defense enzymes of β -1,3-glucanase, chitinase and peroxidase were monitored along with the disease severity levels at 1, 3, 5 and 7 DAI. When lettuce plants were infected with a pathogen, the enzymatic activities increased with time as the disease developed. On the first day after inoculation, the strongest activity of β -1,3-glucanase at a significant ($p < 0.05$) level was noted in the 95% EEMC treatments (15,000 and 50,000 ppm) compared to an inoculated control. At 7 DAI, the highest activity at a significant level ($p < 0.05$) was shown in the 95% EEMC treatments, followed by the inoculated and fungicide control treatment, while the lowest level of activity was recorded in the healthy control. The activities of the chitinase and peroxidase enzymes showed patterns identical to that of β -1,3-glucanase. At 7 DAI, the 95% EEMC treatments resulted in significantly higher activity ($p < 0.05$) of chitinase compared to the inoculated control and the fungicide treatment, while the highest activity of peroxidase at a significant level ($p < 0.05$) was also noted in the 95% EEMC treatments (Table 5). This result confirmed that the disease severity was related to the activities of the 3 induced defense enzymes. To be precise, the highest level of enzyme activity was noted in lettuce treated with 95% EEMC showing less severity of *Alternaria* leaf spot. This implied that 95% EEMC acted as a resistance inducer.

With regard to plant parameters at harvest (21 days old), the 95% EEMC and fungicide treatments showed the highest values of both parameters (SPAD value and yield), which were statistically different ($p < 0.05$) compared to the inoculated control but not significantly different ($p < 0.05$) from the healthy control.

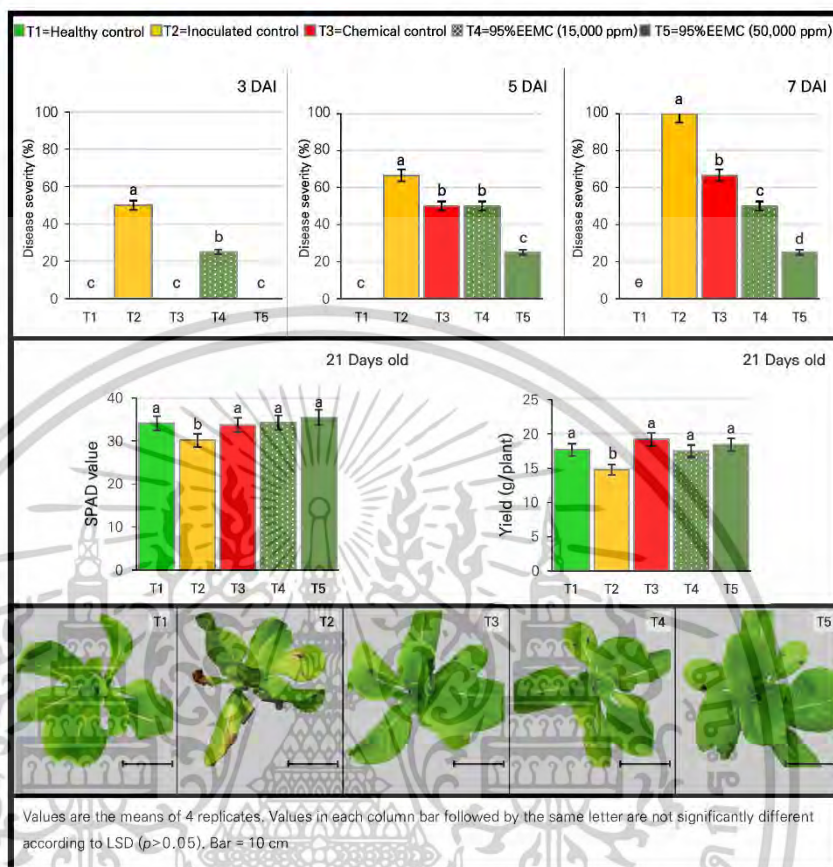


Fig. 4. Effect of 95% ethanolic extract from *Melaleuca cajuputi* leaves (95% EEMC) on *Alternaria* leaf spot (at 7 DAI) and growth of lettuce in a hydroponic system (21 days old).

Table 5. Activity of defense enzymes against *Alternaria* in lettuce treated with 95% EEMC

Treatment	Activity of defense enzyme											
	β -1,3-Glucanase (μmol glucose /g of fresh leaves)				Chitinase (μmol GlcNAc/g of fresh leaves)				Peroxidase (unit/ g of fresh leaves)			
	1 DAI	3 DAI	5 DAI	7 DAI	1 DAI	3 DAI	5 DAI	7 DAI	1 DAI	3 DAI	5 DAI	7 DAI
T1 ²	1.53 d ³	3.53 d	3.60 d	3.46 d	5.50 d	5.07 d	5.97 d	5.63 e	3.38 e	4.90 e	6.52 c	8.44 c
T2	2.17 b	5.27 b	6.17 b	7.36 b	9.43 b	11.25 b	15.95 b	17.30 c	5.37 c	6.89 c	8.51 b	10.43 b
T3	2.20 c	4.63 c	5.20 c	6.20 c	8.63 c	9.17 c	11.03 c	11.33 d	4.70 d	6.22 d	7.85 b	9.76 bc
T4	2.55 a	8.62 a	7.87 a	11.66 a	13.49 a	15.29 a	19.23 a	20.24 b	7.50 b	9.02 b	10.65 a	12.56 a
T5	2.72 a	8.72 a	7.97 a	11.83 a	13.49 a	14.91 a	19.99 a	23.12 a	8.30 a	9.82 a	11.45 a	13.36 a

²T1 = Healthy control, T2 = Inoculated control, T3 = Chemical control + pathogen, T4 = 95% EEMC-15,000 ppm + pathogen, T5 = 95% EEMC-50,000 ppm + pathogen.

³Values are the means of 3 replicates. Values in each column within each enzyme followed by the same letter are not significantly different according to LSD ($p > 0.05$).

The EECV effect

The determination effect of 50% and 95% EECV at 15,000 and 50,000 ppm on disease development and plant defense enzyme induction using CRD with 3 replications revealed that all treatments except for that of the healthy control showed no significant difference with regard to disease severity compared to the inoculated control (at 3 DAI). At 5 DAI, the leaf spot progressed to lesions in all treatment cases, except at the highest concentrations of 50% and 95% EECV, which still showed static lesions. At 7 DAI, the highest concentration (50,000 ppm) of both EECV treatments led to the highest ($p < 0.05$) disease reduction (75%), followed by the lower concentration (15,000 ppm) and the fungicide control treatments in the range of 43.75 – 50%. Regarding the induced defense enzymes (Table 6), all presented a pattern similar to those in the 95% EEMC experiment; that is, the enzymatic activities increased over time, and higher levels of enzyme induction were observed in the lettuce treatments with the plant extracts (including the 50% EECV). At 7 DAI, the highest and significant ($p < 0.05$) enzymes activities of β -1,3-glucanase and chitinase were noted in all 4 EECV treatments compared to the fungicide treatment and the inoculated control. For peroxidase, the highest and significant activity ($p < 0.05$) was only found in the 95% EECV case at 50,000 ppm. Considering these results, there was a reduction in the severity of *Alternaria* leaf spot and an increase in defense-related enzymes in the 50% and 95% EECV-treated lettuce. This result was in line with the EEMC experiment implying that EECV acted as a resistance inducer as well.

For the plant growth parameters, the 50% and 95% EECV as well as the fungicide treatments gave statistically ($p < 0.05$) higher SPAD values, which were significantly different compared to the inoculated control but not significantly different from the healthy control ($P \geq 5$). Interestingly, low concentrations of 50% EECV, 95% EECV and the fungicide treatment gave significantly higher ($p < 0.05$) yields than that of the inoculated control. Besides, the highest concentration (50,000 ppm) of 50% and 95% EECV significantly ($p < 0.05$) led to the highest yields and strongest growth stimulation effects on lettuce (about 23.5 g/plant) compared to the other treatments (in the range of 16.04 – 19.36 g/plant).

Table 6. Activity of defense enzymes against *Alternaria* in lettuce treated with 50% and 95% EECV

Treatment	Activity of defense enzyme											
	β -1,3-Glucanase (μ mol glucose /g of fresh leaves)				Chitinase (μ mol GlcNAc/g of fresh leaves)				Peroxidase (unit/ g of fresh leaves)			
	1 DAI	3 DAI	5 DAI	7 DAI	1 DAI	3 DAI	5 DAI	7 DAI	1 DAI	3 DAI	5 DAI	7 DAI
T1 ^a	1.53 c ^y	3.53 d	3.60 e	3.46 d	5.50 e	5.07 e	5.97 e	5.63 e	3.33 e	4.98 e	5.48 e	6.45 e
T2	2.17 b	5.27 e	9.43 b	12.86 e	11.00 b	14.30 b	18.67 b	21.96 b	6.02 b	6.47 cd	6.83 d	7.45 d
T3	2.20 b	5.37 e	9.50 b	12.43 c	10.80 b	15.07 b	18.60 b	21.66 b	6.79 a	6.54 bc	7.53 c	7.99 cd
T4	3.30 a	8.87 b	11.20 a	16.26 ab	16.00 a	18.20 a	21.63 a	26.46 a	6.48 a	7.12 a	7.50 c	8.29 cd
T5	3.27 a	9.30 a	11.60 a	15.73 b	15.50 a	17.63 a	22.03 a	26.63 a	6.52 a	6.83 ab	7.84 b	8.68 bc
T6	3.30 a	9.37 a	11.67 a	16.93 a	15.93 a	17.73 a	21.67 a	26.23 a	6.37 a	6.74 bc	6.91 d	9.52 b
T7	3.47 a	9.47 a	11.83 a	16.2 ab	15.93 a	17.27 a	21.83 a	26.53 a	6.22 b	6.18 d	8.18 a	10.97 a

^aT1 = Healthy control, T2 = Inoculated control, T3 = Chemical control, T4 = 50% EECV-15,000 ppm + pathogen, T5 = 50% EECV-50,000 ppm + pathogen, T6 = 95% EECV-15,000 ppm + pathogen, T7 = 95% EECV-50,000 ppm + pathogen.

^yValues are the means of three replicates. Values in each column within each enzyme followed by the same letter are not significantly different according to LSD ($p > 0.05$).

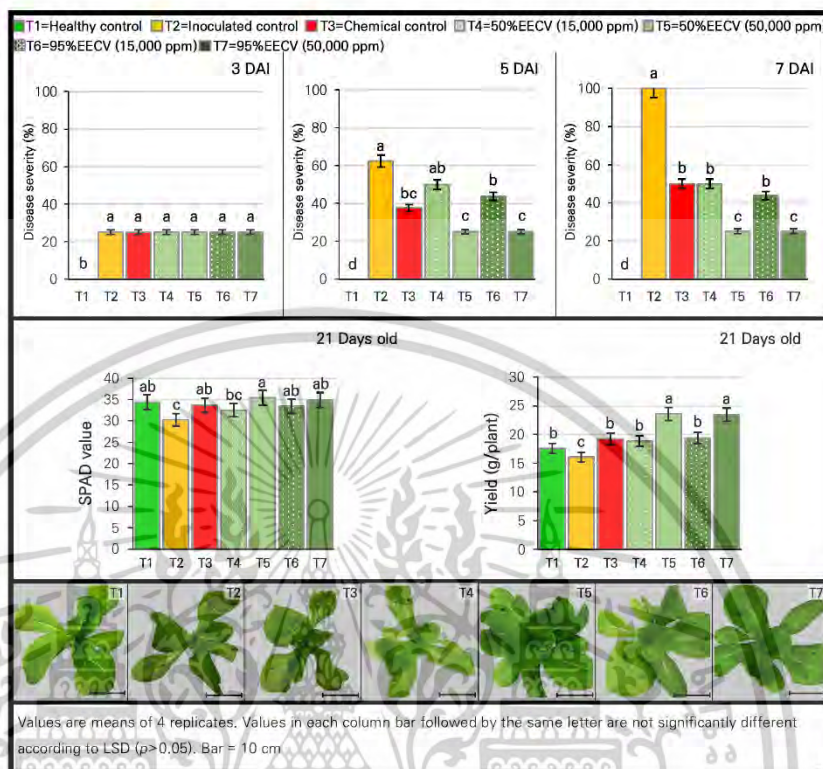


Fig. 5. Effects of 50% and 95% ethanolic extracts from *Callistemon viminalis* leaves (EECV) on *Alternaria* leaf spot (at 7 DAI) and growth of lettuce in a hydroponic system (21 days old).

Correlation of disease severity and plant defense enzymes

The correlation between disease severity and plant defense enzymes in lettuce due to the effects of the inducers (EEMC as well as EECV) was assessed at 3, 5 and 7 DAI, as presented in Fig. 6. Moderate to high correlations (r) of -0.766 , -0.575 and -0.807 were found between defense-related enzymes of β -1,3-glucanase, chitinase and peroxidase with disease severity in lettuce treated with EEMC at 7 DAI. The corresponding simple regression equation also showed that the increased levels of defense-related enzymes played a negative role in reducing the disease severity. A similar observation of a moderate to high negative correlation ($r = -0.631$, -0.722 and -0.708) as well as the corresponding simple regression equation outcomes were also found between defense enzymes and disease severity in the EECV lettuce at 7 DAI.

In the experiments here, EEMC and EECV significantly reduced *Alternaria* leaf spot disease, while significantly higher accumulations of the three enzymes were found in lettuce treated with both extracts. Furthermore, a moderate to high negative correlation was observed between disease severity and plant defense enzymes in lettuce treated with both extracts. These results were likely due to the induction of plant defense enzymes by the plant extracts (Yamunarani et al., 2004; Latha et al., 2009; Gupta et al., 2013; Franzener et al., 2018). These enzymes played a role in suppressing plant

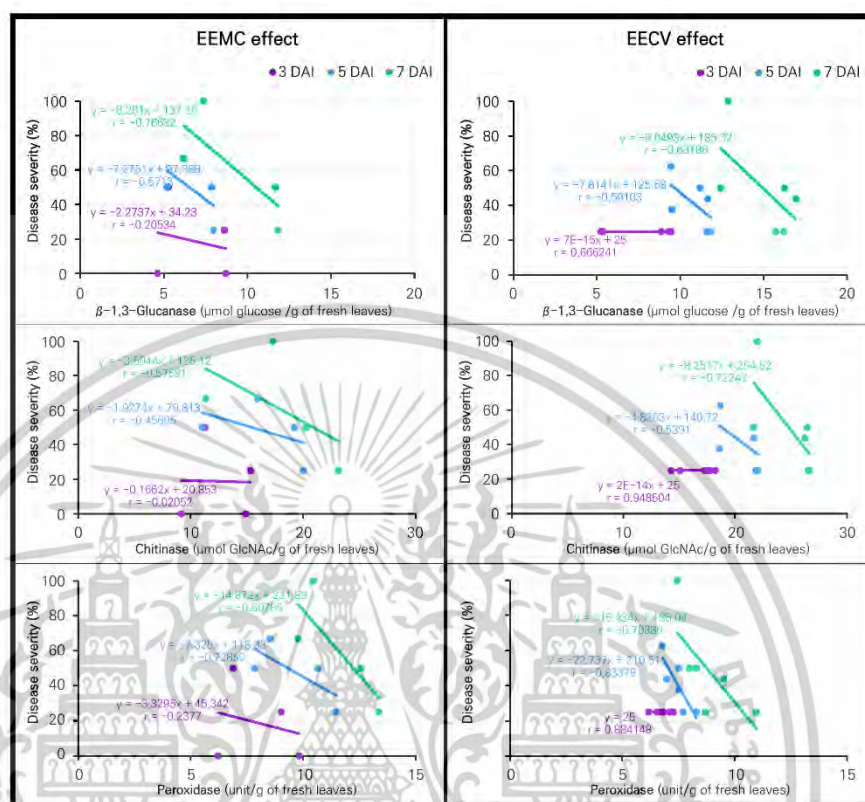


Fig. 6. Correlation of disease severity with β -1,3-glucanase, chitinase and peroxidase activities in lettuce plants treated with EEMC and EECV as an inducer against *A. brassicicola* at 3, 5 and 7 DAI.

diseases, thereby contributing significantly to better overall health and resistance of the plants (Akila et al., 2011; Arzoo et al., 2012; Franzener et al., 2018; Gholamzhad, 2019). β -1,3-glucanase and chitinase sequentially hydrolyzed cell wall components, such as β -1,3-glucans and chitins (Yamunarami et al., 2004; Gupta et al., 2013; Prasannath, 2017). Meanwhile, peroxidase was associated with various defense-related processes, including the hypersensitive reactions; lignin biosynthesis; and the cross-linking of phenolics, glycoproteins, and suberin as well as the production of phytoalexins in plants (Prasannath, 2017). In addition, our results were in good agreement with the reports from other Myrtaceae plant extracts demonstrating that *Corymbia citriodora* aqueous extract reduced *Fusarium* wilt and increased soluble-protein-related β -1,3-glucanase, chitinase and peroxidase levels in tomatoes under greenhouse condition (Arzoo et al., 2012). While Franzener et al. (2018) reported that a water extract of *Corymbia citriodora* (Myrtaceae plant) reduced the disease severity of *Colletotrichum lagenarium* and induced 2 enzymes (peroxidase and β -1,3-glucanase) in cucumber, our findings suggested that 95% EEMC as well as 50% and 95% EECV could act as inducers by increasing plant defense enzymes in the plants. These potential plant extracts could be developed into botanical fungicides for the management of leaf spot disease in the near future.

Conclusion

Thai indigenous Myrtaceae plants were tested here as substitutes for chemical fungicides. The 95% ethanolic extracts derived from 4 Myrtaceae leaves, namely *Callistemon viminalis* (EECV), *Melaleuca cajuputi* (EEMC), *Syzygium jambos* (EESJ), and *Syzygium malaccense* (EESM) exhibited no phytotoxic effects on lettuce. Interestingly, a plant growth stimulation effect on lettuce was detected with the 95% EECV application. Notably, all concentrations (5,000, 15,000, 30,000 ppm) of 95% EEMC significantly demonstrated the highest inhibitory effect, ranging from 85% to 100% on the mycelial growth of *A. brassicicola*, followed by 95% EECV ranging from 40% to 63%. In the spore germination test, complete inhibition was observed with the application of 95% EEMC (5,000 to 50,000 ppm) and 95% EECV (10,000 to 50,000 ppm). Among the identified phytochemical compounds, terpenoids (such as phytol, 1,8-cineole, α -terpinene, terpinene-4-ol and 11-Keto- β -boswellic acid) were the major bioactive components of both extracts (about 37% – 55%) followed by phenolics, flavonoids, ethylene glycols and vitamins. Furthermore, the applications of 95% EEMC, 95% EECV and 50% EECV as inducers reduced the severity of *Alternaria* leaf spot on lettuce by 50% to 75% but increased the levels of plant defense enzymes (β -1,3-glucanase, chitinase, and peroxidase). Our findings provide evidence of the potential use of EEMC and EECV for controlling *Alternaria* leaf spot disease in lettuce, which was likely due to their direct effect with the presence of phytochemicals responsible for antifungal activity and the plant-growth-stimulating effect as well as their indirect effects as inducer for plant defense enzymes. Therefore, these *M. cajuputi* and *C. viminalis* extracts could serve as alternative potential sources for the development of botanical fungicides in agriculture.

Literature Cited

- Ahmad K, Athar F (2016) Phytochemistry and pharmacology of *Callistemon viminalis* (Myrtaceae): A review. J Nat Prod 7:1-10. doi:10.2174/2210315507666161216100323
- Akila R, Rajendran L, Harish S, Saveetha K, Raguchander T, Samiyappan R (2011) Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) causing *Fusarium* wilt in banana. BioControl 57:175-183. doi:10.1016/j.biocontrol.2011.02.010
- Al-Abd NM, Mohamed Nor Z, Mansor M, Azhar F, Hasan MS, Kassim M (2015) Antioxidant, antibacterial activity, and phytochemical characterization of *Melaleuca cajuputi* extract. BMC Complement Altern Med 15:385. doi:10.1186/s12906-015-0914-y
- Alreshidi M, Noumi E, Bouslama L, Ceylan O, Veettil VN, Adnan M, Danciu C, Elkahoui S, Badraoui R, et al. (2020) Phytochemical screening, antibacterial, antifungal, antiviral, cytotoxic, and anti-quorum-sensing properties of *Teucrium polium* L. aerial parts methanolic extract. Plants 9. doi:10.3390/plants9111418
- Arzoo K, Biswas SK, Rajik M (2012) Biochemical evidences of defence response in tomato against *Fusarium* wilt induced by plant extracts. Plant Pathol J 11:42-50. doi:10.3923/ppj.2012.42.50
- Bali AS, Batish DR, Singh HP, Kaur S, Kohli RK (2017) Phytotoxicity and weed management potential of leaf extracts of *Callistemon viminalis* against the weeds of rice. Acta Physiol Plant 39:25. doi:10.1007/s11738-0162313-5
- Barros FC, Sagata É, Ferreira LCdC, Juliatti FC (2010) Indução de resistência em plantas à fitopatógenos. Biosci J 26:231-239
- Benoit F, Ceustermans N (1995) Horticultural aspects of ecological soilless growing methods. In, Ed 396. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium, pp 11-24. doi:10.17660/ActaHortic.1995.396.1
- Bharat CS, Praveen D (2016) Evaluation of in vitro antimicrobial potential and phytochemical analysis of spruce, cajuput and jamrosa essential oil against clinical isolates. Int J Green Pharm 10:27-32
- Blagojević JD, Vukojević JB, Ivanović ŽS (2020) Occurrence and characterization of *Alternaria* species associated with leaf spot disease in rapeseed in Serbia. Plant Pathol 69:883-900. doi:10.1111/ppa.13168
- Boller T, Mauch F (1988) Colorimetric assay for chitinase. In Methods in Enzymology, Vol 161. Academic Press, pp 430-435. doi:10.1016/0076-6879(88)61052-4
- Bonaldo SM, Schwan-Estrada KRF, Stangarlin JR, Tessmann DJ, Scapim CA (2004) Fungitoxicity, phytoalexins elicitor activity and protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium*, by *Eucalyptus citriodora* aqueous extract. Fitopatol Bras 29:128-134. doi:10.1590/S0100-41582004000200002

- Bouzada MLM, Fabri RL, Nogueira M, Konno TUP, Duarte GG, Scio E (2009) Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil. *Pharm Biol* 47:44-52. doi:10.1080/13880200802411771
- Buchala A, Pythoud F (1988) Vitamin D and related compounds as plant growth substances. *Physiol Plant* 74:391-396
- Builhões CC, Bonaldo SM, Santos BTd, Trento RA (2012) Produtos alternativos no controle de antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), cladosporiose (*Cladosporium herbarum*) e bacteriose (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) em maracujazeiro no norte demato grosso. *Rev Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias* 7:12-19
- Caldara M, Mamiroli N (2018) Tricyclic antidepressants inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents* 52:500-505. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.06.023
- Carevic T, Kostic M, Nikolic B, Stojkovic D, Sokovic M, Ivanov M (2022) Hesperetin-Between the ability to diminish mono- and polymicrobial biofilms and toxicity. *Molecules* 27:6806. doi:10.3390/molecules27206806
- Carmello CR, Cardoso JC (2018) Effects of plant extracts and sodium hypochlorite on lettuce germination and inhibition of *Cercospora longissima* in vitro. *Sci Hortic* 234:245-249. doi:10.1016/j.scienta.2018.02.056
- Celoto MIB, Papa MdFS, Sacramento LVSD, Celoto FJ (2008) Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides* *Acta Sci Agron* 30:1-5. doi:10.4025/actasciagr.v30i1.1104
- Chen YZ, Wang SR, Li T, Zhang GC, Yang J (2023) Antifungal activity of 6-methylcoumarin against *Valsa mali* and its possible mechanism of action. *J Fungi (Basel)* 9:5. doi:10.3390/jof9010005
- Chung PY, Navaratnam P, Chung LY (2011) Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 10:25. doi:10.1186/1476-0711-10-25
- Cordeiro L, Figueiredo P, Souza H, Sousa A, Andrade-Júnior F, Medeiros D, Nóbrega J, Silva D, Martins E, et al. (2020) Terpinen-4-ol as an antibacterial and antibiofilm agent against *Staphylococcus aureus*. *Int J Mol Sci* 21:4531. doi:10.3390/ijms21124531
- Dai J, Hu Y, Si Q, Gu Y, Xiao Z, Ge Q, Sha R (2022) Antioxidant and hypoglycemic activity of sequentially extracted fractions from pingguoli pear fermentation broth and identification of bioactive compounds. *Molecules* 27:6077. doi:10.3390/molecules27186077
- Darshani P, Sen Sarma S, Srivastava AK, Baishya R, Kumar D (2022) Anti-viral triterpenes: A review. *Phytochem Rev* 21:1761-1842. doi:10.1007/s11101-022-09808-1
- de Oliveira CM, Cardoso MdG, Figueiredo ACdS, de Carvalho MLM, Miranda CASFd, Marques Albuquerque LR, Lee Nelson D, Souza Gomes Md, Silva LF, et al. (2014) Chemical composition and allelopathic activity of the essential oil from *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) blossoms on lettuce seedlings. *Am J Plant Sci* 5:3551-3557. doi:10.4236/ajps.2014.524371
- Dethoup T, Songkumarn P, Rueangrit S, Suesa-ard S, Kaewkrajay C (2018) Fungicidal activity of Thai medicinal plant extracts against *Alternaria brassicicola* causing black spot of Chinese kale. *Eur J Plant Pathol* 152:157-167. doi:10.1007/s10658-018-1460-5
- Dethoup T, Songkumarn P, Sirirak T, Kijjoa A (2019) Fungicidal activity of *Acorus calamus* L. extracts against plant pathogenic fungi. *Agric Nat Resour* 53:527-532
- Ding Y, Huffaker A, Kollner TG, Weckwerth P, Robert CAM, Spencer JL, Lipka AE, Schmelz EA (2017) Selenene volatiles are essential precursors for maize defense promoting fungal pathogen resistance. *Plant Physiol* 175:1455-1468. doi:10.1104/pp.17.00879
- Dubale S, Kebebe D, Zeynudin A, Abdissa N, Suleman S (2023) Phytochemical screening and antimicrobial activity evaluation of selected medicinal plants in Ethiopia. *J Exp Pharmacol* 15:51-62. doi:10.2147/jep.S379805
- Durgadevi R, Abirami G, Alexpandi R, Nandhini K, Kumar P, Prakash S, Veera Ravi A (2019) Explication of the potential of 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyde in hampering uropathogenic *Proteus mirabilis* crystalline biofilm and virulence. *Front Microbiol* 10:2804. doi:10.3389/fmicb.2019.02804
- El-Hefny M, Ashmawy NA, Salem MZM, Salem AZM (2017) Antibacterial activities of the phytochemicals-characterized extracts of *Callistemon viminalis*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Coryza dioscوريدis* against the growth of some phytopathogenic bacteria. *Mikrob Pathog* 113:348356. doi:10.1016/j.micpath.2017.11.004
- Elkelish A, El-Mogy MM, Niedbala G, Piekutowska M, Atia MAM, Hamada MMA, Shahin M, Mukherjee S, El-Yazied AA, et al. (2021) Roles of exogenous alpha-lipoic acid and cysteine in mitigation of drought stress and restoration of grain quality in wheat. *Plants (Basel)* 10:2318. doi:10.3390/plants10112318
- Faleiro JH, Gonçalves RC, dos Santos MNG, da Silva DP, Naves PLF, Malafaia G (2016) The chemical featuring, toxicity, and antimicrobial activity of *Psidium cattleianum* (Myrtaceae) leaves. *New J Sci* 2016:1-8. doi:10.1155/2016/7538613
- Foudah AI, Alqarni MH, Alam A, Salkini MA, Alam P, Alkholifi FK, Yusufoglu HS (2021) Determination of chemical composition, in vitro and in silico evaluation of essential oil from leaves of *Apium graveolens* grown in Saudi Arabia. *Molecules* 26:7372. doi:10.3390/molecules26237372
- Franzener G, Schwan-Estrada KRF, Moura GS, Kuhn OJ, Stangarlin JR (2018) Induction of defense enzymes and control of anthracnose in cucumber by *Corymbia citriodora* aqueous extract. *Summa Phytopathol* 44:10-16. doi:10.1590/0100-5405/2218
- Freitas TS, Xavier JDC, Pereira RLS, Rocha JE, Muniz DF, da Silva PT, da Hora JP, Dos Santos HS, Bandeira PN, et al. (2020) Direct antibacterial and antibiotic resistance modulatory activity of chalcones synthesized from the natural product 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone. *FEMS Microbiol Lett* 367:1-5. doi:10.1093/femsle/fnaa124
- Fu J, Gao Y, Xing X (2022) Preliminary study on phytochemical constituents and biological activities of essential oil from *Myriactis nepalensis* Less. *Molecules* 27:4631. doi:10.3390/molecules27144631
- Fujiwara M, Ijichi K, Tokuhisa K, Katsuura K, Shigeta S, Konno K, Wang GY, Uemura D, Yokota T, et al. (1996) Mechanism of selective inhibition of human immunodeficiency virus by ingenol triacetate. *Antimicrob Agents Chemother* 40:271-273. doi:10.1128/aac.40.1.271

- Gholamnezhad J (2019) Effect of plant extracts on activity of some defense enzymes of apple fruit in interaction with *Botrytis cinerea*. J Integr Agric 18:115-123. doi:10.1016/s2095-3119(18)62104-5
- Guo Y, Lv J, Zhao Q, Dong Y, Dong K (2020) Cinnamic acid increased the incidence of *Fusarium* wilt by increasing the pathogenicity of *Fusarium oxysporum* and reducing the physiological and biochemical resistance of faba bean, which was alleviated by intercropping with wheat. Front Plant Sci 11:608389. doi:10.3389/fpls.2020.608389
- Gupta P, Ravi I, Sharma V (2013) Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. J Plant Interact 8:155-161. doi:10.1080/17429145.2012.679705
- Gurjar MS, Ali S, Akhtar M, Singh KS (2012) Efficacy of plant extracts in plant disease management. Agric Sci 03:425-433. doi:10.4236/as.2012.33050
- Harborne JB (1998) Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis, Ed 2. Chapman and Hall Publishers, London, UK
- Hassan M, Bala SZ, Bashir M, Waziri PM, Musa Adam R, Umar MA, Kini P (2022) LC-MS and GCMS profiling of different fractions of *Ficus platyphylla* stem bark ethanolic extract. J Anal Methods Chem 2022:6349332. doi:10.1155/2022/6349332
- Horsfield A, Wicks T, Davies K, Wilson D, Paton S (2010) Effect of fungicide use strategies on the control of early blight (*Alternaria solani*) and potato yield. Australas Plant Pathol 39:368-375. doi:10.1071/AP09090
- Hussein JH, Mohammed YH, Imad HH (2016) Study of chemical composition of *Foeniculum vulgare* using Fourier transform infrared spectrophotometer and gas chromatography - mass spectrometry. J Pharmacogn Phytother 8:60-89. doi:10.5897/jpp2015.0372
- Ichimura K, Takada M, Ogawa K (2022) Effects of treatments with nigerosylmaltooligosaccharide, glucose and sucrose on the vase life of cut snapdragon flowers. Sci Hortic 291:110565. doi:10.1016/j.scienta.2021.110565
- Imatomi M, Novaes P, Matos AP, Gualtieri SCJ, Molinillo JMG, Lacret R, Varela RM, Macías FA (2013) Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. Biochem Syst Ecol 46:29-35. doi:10.1016/j.bse.2012.09.005
- Iqbal E, Salim KA, Lim LBL (2015) Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. J King Saud Univ Sci 27:224-232. doi:10.1016/j.jksus.2015.02.003
- Isah M, Rosdi RA, Wan Abdul Wahab WNA, Abdulla H, Sulain MD, Ishak WRW (2023) Phytoconstituents and biological activities of *Melaleuca cajuputi* Powell: A scoping review. J Appl Pharm Sci 13:10-23. doi:10.7324/jaaps.2023.130102
- İşcan G, Kirimer N, Demirci F, Demirci B, Noma Y, Başer KH (2012) Biotransformation of (-)-(R)- α -phellandrene: antimicrobial activity of its major metabolite. Chem Biodivers 9:1525-1532. doi:10.1002/cbdv.201100283
- Isnaini I, Achmadiyah R, Awaeh G, Khatimah H, Yasmina A (2023) Antioxidant and antiproliferative activities of methanol extract from *Melaleuca cajuputi* subsp. Cumingiana [Turcz.] Fruit. Jurnal Berkala Ilmiah Sains dan Terapan Kimia 17:21. doi:10.20527/jstk.v17i1.13055
- Jantasorn A, Moungruangsri B, Dethoup T (2016) In vitro antifungal activity evaluation of five plant extracts against five plant pathogenic fungi causing rice and economic crop diseases. J Biopest 9:1-7. doi:10.57182/jbiopestic.9.1.01-07
- Jaroš P, Timkina E, Michailidu J, Maršik D, Kulišová M, Kolouchová I, Demnerová K (2022) Boswellic acids as effective antibacterial antibiofilm agents. Molecules 27:3795. doi:10.3390/molecules27123795
- Kamiya H, Haraguchi A, Mitarai H, Yuda A, Wada H, Shuxin W, Ziqing R, Weihao S, Wada N (2024) In vitro evaluation of the antimicrobial properties of terpinen-4-ol on apical periodontitis-associated bacteria. J Infect Chemother 30:306-314. doi:10.1016/j.jiac.2023.10.021
- Karimi S, Farzaneh F, Asnaashari S, Parina P, Sarvari Y, Hazrati S (2019) Phytochemical analysis and anti-microbial activity of some important medicinal plants from north-west of Iran. Iran J Pharm Res 18:1871-1883. doi:10.22037/ijpr.2019.1100817
- Keereedach P, Hrimpeng K, Boonbumrung K (2020) Antifungal activity of Thai cajuput oil and its effect on efflux-pump gene expression in fluconazole-resistant *Candida albicans* clinical isolates. Int J Microbiol 2020:5989206. doi:10.1155/2020/5989206
- Khan FA, Khan NM, Ahmad S, Nasruddin, Aziz R, Ullah I, Almhadi M, Allahyani M, Alsaiani AA, et al. (2022) Phytochemical profiling, antioxidant, antimicrobial and cholinesterase inhibitory effects of essential oils isolated from the leaves of *Artemisia scoparia* and *Artemisia absinthium*. Pharmaceuticals (Basel) 15:1221. doi:10.3390/ph15101221
- Kim HM, Kwon H, Kim K, Lee SE (2018) Antifungal and anti-aflatoxigenic activities of 1,8-cineole and *trans*-cinnamaldehyde on *Aspergillus flavus*. Appl Sci 8:1655. doi:10.3390/app8091655
- Kim S, Lee H, Lee S, Yoon Y, Choi KH (2015) Antimicrobial action of oleanolic acid on *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium*, and *Enterococcus faecalis*. PLoS One 10:e0118800. doi:10.1371/journal.pone.0118800
- Kozłowska J, Potaniec B, Żarowska B, Anioł M (2017) Synthesis and biological activity of novel α -alkyl derivatives of naringenin and their oximes. Molecules 22:1485. doi:10.3390/molecules22091485
- Kunasakdakul K, Suwitchayanon P (2012) Antimicrobial activities of chili and black pepper extracts on pathogens of Chinese kale. CMU J Nat Sci 11:135-141
- Latha P, Anand T, Ragupathi N, Prakasam V, Samiyappan R (2009) Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. Biological Control 50:85-93. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.03.002
- Mangoyi R, Midiwo J, Mukanganyama S (2015) Isolation and characterization of an antifungal compound 5-hydroxy-7,4'-dime-thoxyflavone from *Combretum zeyheri*. BMC Complement Altern Med 15:405. doi:10.1186/s12906-015-0934-7
- Marei GIK, Abdelgaleil SAM (2018) Antifungal potential and biochemical effects of monoterpenes and phenylpropenes on plant. Plant

- Protection Science 54:9-16. doi:10.17221/9/2017-pps
- Marinas IC, Oprea E, Buleandra M, Badea IA, Tihauan BM, Marutescu L, Angheloiu M, Matei E, Chifiriuc MC (2021) Chemical composition, antipathogenic and cytotoxic activity of the essential oil extracted from *Amorpha fruticosa* fruits. *Molecules* 26:3146. doi:10.3390/molecules26113146
- Marliyana SD, Mujahidin D, Syah YM (2018) Pinostrobin derivatives from prenylation reaction and their antibacterial activity against clinical bacteria. *Mater Sci Eng* 349:012057. doi:10.1088/1757-899X/349/1/012057
- Mohammadi A, Bahramikia S (2019) Molecular identification and genetic variation of *Alternaria* species isolated from tomatoes using ITS1 sequencing and inter simple sequence repeat methods. *Curr Med Mycol* 5:1-8. doi:10.18502/cmm.5.2.1154
- Mohanty S, Cock IE (2010) Bioactivity of *Syzygium jambos* methanolic extracts: Antibacterial activity and toxicity. *Pharmacognosy Res* 2:4-9. doi:10.4103/0974-8490.60577
- Morcia C, Malnati M, Terzi V (2012) In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 29:415-422. doi:10.1080/19440049.2011.643458
- Mulyaningsih S, Sporer F, Reichling J, Wink M (2011) Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Pharm Biol* 49:893-899. doi:10.3109/13880209.2011.553625
- Muñoz P, Punné-Bosch S (2019) Vitamin E in plants: Biosynthesis, transport, and function. *Trends in Plant Science* 24:1040-1051. doi:10.1016/j.tplants.2019.08.006
- Murugan S, Devi P, Parameswari NK, Mani KR (2011) Antimicrobial activity of *Syzygium jambos* against selected human pathogens. *Int J Pharm Pharm Sci* 3:44-47
- Naidoo Y, Channangihalli Thimmegowda CS, Kasim N, Nicholas A, Naidoo G (2014) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum obovatum* E. Mey. Ex Benth. (Lamiaceae). *J Essential Oil Bearing Plants* 17:142-147. doi:10.1080/0972060X.2014.884782
- Noriega P, Ballesteros J, De la Cruz A, Veloz T (2020) Chemical composition and preliminary antimicrobial activity of the hydroxylated sesquiterpenes in the essential oil from *Piper barbatum* Kunth Leaves. *Plants (Basel)* 9:211. doi:10.3390/plants9020211
- O'Neill T (2019) Diseases of lettuce crops. AHDB Horticulture, Warwickshire, UK
- Patel D, Desai S, Desai A, Dave D, Meshram D (2019) Phytochemical evaluation and in-vitro thrombolytic activity of hydro alcoholic extract of *Syzygium malaccense* leaves. *J Pharmacogn Phytochem* 8:39163918
- Pattanamahakul P, Strange RN (1999) Identification and toxicity of *Alternaria brassicicola*, the causal agent of dark leaf spot disease of Brassica species grown in Thailand. *Plant Pathology* 48:749-755. doi:10.1046/j.1365-3059.1999.00406.x
- Pawar VC, Thaker VS (2007) Evaluation of the anti-*Fusarium oxysporum* f. sp. *cicer* and anti-*Alternaria porri* effects of some essential oils. *World J Microbiol Biotechnol* 23:1099-1106. doi:10.1007/s11274-006-9339-6
- Petpheng B, Mudtaleb B, Piboon W, Paichid N, Sangkharak K (2023) The extraction of phytol from *Hydrilla verticillata* using ultrasonic-assisted extraction (UAE), the analysis of antibacterial activity, and the utilization of residual extract for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Biomass Convers Biorefin* doi:10.1007/s13399-023-04331-5
- Pinto KMSP, de Melo AFR, Mondego JM, do Nascimento LC, Cortez M, Izabel Mendes Marques, Aires AAdC, dos Anjos Neto AP, Medeiros RLSd, Araujo JRG, et al. (2018) Plant extracts enhancers of defense response in ponkan mandarin Seedlings against *Alternaria alternate* f. spp. citri infection. *Afr J Agric Res* 13:650-656. doi:10.5897/ajar2018.13025
- Prasannath K (2017) Plant defense-related enzymes against pathogens: A review. *AGRIEAST J Agric Sci* 11:38. doi:10.4038/agrieast.v11i1.33
- Puig CG, Reigosa MJ, Valentão P, Andrade PB, Pedrol N (2018) Unravelling the bioherbicide potential of *Eucalyptus globulus* Labill: Biochemistry and effects of its aqueous extract. *PLoS One* 13:e0192872. doi:10.1371/journal.pone.0192872
- Qiu XM, Sun YY, Ye XY, Li ZG (2020) Signaling role of glutamate in plants. *Front Plant Sci* 10:1743. doi:10.3389/fpls.2019.01743
- Rita dCPds, Pedro VPG, Marcelo Rds, Oscar JS, Edvan AC, and CGB-L (2017) Phytotoxicity of extracts of *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh bioprocessed in vegetable crop sensitive to allelochemicals. *Afr J Plant Sci* 11:244-251. doi:10.5897/ajps2016.1491
- Saha M, Bandyopadhyay PK (2020) In vivo and in vitro antimicrobial activity of phytol, a diterpene molecule, isolated and characterized from *Adhatoda vasica* Nees. (Acanthaceae), to control severe bacterial disease of ornamental fish, *Carassius auratus*, caused by *Bacillus licheniformis* PKBMS16. *Microb Pathog* 141:103977. doi:10.1016/j.micpath.2020.103977
- Sakander H, Koteswara AR, Akhilesh B (2015) Evaluation of antifungal potential of selected medicinal plants against human pathogenic fungi. *Int J Green Pharmacy* 9:110-117. doi:10.4103/0973-8258.155058
- Salem MZM, El-Hefny M, Nasser RA, Ali HM, El-Shanhorey NA, Elansary HO (2017) Medicinal and biological values of *Callistemon viminalis* extracts: History, current situation and prospects. *Asian Pac J Trop Med* 10:229-237. doi:10.1016/j.apjtm.2017.03.015
- Sangpueak R, Phansak P, Thumanu K, Siriwong S, Wongkaew S, Buensanteai N (2021) Effect of salicylic acid formulations on induced plant defense against cassava anthracnose disease. *Plant Pathol J* 37:356-364. doi:10.5423/PPJ.OA.02.2021.0015
- Scur MC, Pinto FG, Pandini JA, Costa WF, Leite CW, Temponi LG (2016) Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. *Braz J Biol* 76:101-108. doi:10.1590/1519-6984.13714
- Selestino Neta MC, Vittorazzi C, Guimaraes AC, Martins JD, Fronza M, Endringer DC, Scherer R (2017) Effects of beta-caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies. *Pharm Biol* 55:190-197. doi:10.1080/13880209.2016.1254251

- Selvaraj T, Ambalavanan S (2013) Induction of defense-related enzymes in anthurium by application of fungal and bacterial biocontrol agents against *Colletotrichum gloeosporioides*. Int J Curr Microbiol App Sci 2:661-670
- Serban G, Stanasel O, Serban E, Bota S (2018) 2-Amino-1,3,4-thiadiazole as a potential scaffold for promising antimicrobial agents. Drug Des Devel Ther 12:1545-1566. doi:10.2147/DDDT.S155958
- Shamsudin NF, Ahmed QU, Mahmood S, Ali Shah SA, Khatib A, Mukhtar S, Alsharif MA, Parveen H, Zakaria ZA (2022) Antibacterial effects of flavonoids and their structure-activity relationship study: A comparative interpretation. Molecules 27:1149. doi:10.3390/molecules27041149
- Sharif ZM, Kamal AF, Jalil NJ (2019) Chemical composition of *Melaleuca Cajuputi* Powell. Int J Eng Adv Technol 9:3479-3483. doi:10.35940/ijeat.A2668.109119
- Shukla P, Walia S, Ahluwalia V, Parmar BS, Nair MG (2012) Activity of alkanediol alkanooates against pathogenic plant fungi *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. Nat Prod Commun 7:1219-1222
- Siddique S, Mazhar S, Firdaus-e-Bareen, Parveen Z (2018) Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Melaleuca quinquenervia* leaves. Indian J Exp Biol 56:686-693
- Şimşek M, Duman R (2017) Investigation of effect of 1,8-cineole on antimicrobial activity of chlorhexidine gluconate. Pharmacognosy Res 9:234-237. doi:10.4103/0974-8490.210329
- Somnuek S, Jaenaksorn T, Laosinwattana C (2020) Effect of crude ethanolic extracts from bottle brush (*Callistemon viminalis*) against leaf spot fungi and their phytotoxicity on lettuce (*Lactuca sativa* L.). Curr Appl Sci Technol 20:1-14. doi:10.14456/cast.1477.1
- Somnuek S, Thipmanee K, Jaenaksorn T (2021) In vitro effect of *Callistemon viminalis* and *Melaleuca cajuputi* ethanolic extracts as botanical fungicide and insecticide. Int J Agric Technol 17:2363-2374
- Srikanth CV, Chakraborti AK, Bachhawat AK (2005) Acetaminophen toxicity and resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology (Reading) 151:99-111. doi:10.1099/mic.0.27374-0
- Subramaniam S, Keerthiraja M, Sivasubramanian A (2014) Synergistic antibacterial action of β sitosterol-d-glucopyranoside isolated from *Desmostachya bipinnata* leaves with antibiotics against common human pathogens. Rev Bras Farmacogn 24:44-50. doi:10.1590/0102695x20142413348
- Sukdee S (2023) Antifungal activity of plant extracts against *Colletotrichum capsici* causal agent of chili anthracnose. Rattanakosin J Sci Technol 5:1-8
- Tadtong S, Puengseangdee C, Prasertthanawut S, Hongratanaworakit T (2016) Antimicrobial constituents and effects of blended eucalyptus, rosemary, patchouli, pine, and cajuput essential oils. Nat Prod Commun 11:267-270. doi:10.1177/1934578X1601100234
- Tan J, Li Y, Hou DX, Wu S (2019) The effects and mechanisms of cyanidin-3-glucoside and its phenolic metabolites in maintaining intestinal integrity. Antioxidants (Basel) 8:479. doi:10.3390/antiox8100479
- Teixeira MFF, Pinheiro DT, Junior HCS, Alves EC, Barros TTV, Freitas MAMd, Dias DCFds (2018) Allelopathic influence of some fruit tree leaf extracts on germination and seedling development of different weeds and vegetable crops. Aust J Crop Sci 12:726-730. doi:10.21475/ajcs.18.12.05.PNE839
- Thanaboripat D (2011) Control of aflatoxins in agricultural products using plant extracts. KMITL Sci Technol J 11:35-42
- Thanaboripat D, Sarutipaisan C, Puangtong C, Chatpongsatorn P, Suvatti Y, Sukonthamut S, Charoensettasilp S (2016) Effects of four essential oils on the growth of aflatoxin producing fungi. KMITL Sci Technol J 16:104-111
- Thanaboripat D, Suvatti Y, Srilohasin P, Sripakdee S, Patthanawanitchai O, Charoensettasilp S (2007) Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*. KMITL Sci Technol J 7:1-7
- Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H (2011) Phytochemical screening and extraction: A review. Int Pharm Sci 1:98-106
- Toju A, Vlase L, Vodnar DC, Gheldiu AM, Oniga I (2019) *Solidago graminifolia* L. Salisb. (Asteraceae) as a valuable source of bioactive polyphenols: HPLC profile, in vitro antioxidant and antimicrobial potential. Molecules 24:2666. doi:10.3390/molecules24142666
- Tzortzakakis N, Proestos C (2024) Natural products and essential oils biocidal activities and innovative applications. Molecules
- Ukit U, Widiana A, Rahmawati E, Hasby RM (2019) Antibacterial activities test of cajuput leaf waste extract (*Melaleuca cajuputi* Powell) on pathogenic bacteria. J Phys Conf Ser 1402:033030. doi:10.1088/1742-6596/1402/3/033030
- Vasconcelos LC, Carrijo TT, Venancio AN, Alves TA, Tuler AC, Hollunder RK, Garbin ML, Menini L, Praca-Fontes MM (2022) Phytochemical screening and phytocytotoxic effects of the tropical *Myrcia vittoriana* (Myrtaceae). An Acad Bras Cienc 94:e20210820. doi:10.1590/0001376520220210820
- Verburg JG, Huynh QK (1991) Purification and characterization of an antifungal chitinase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol 95:450-455. doi:10.1104/pp.95.2.450
- Wamba BEN, Nayim P, Mbaveng AT, Voukeng IK, Dzotam JK, Ngalani OJT, Kuete V (2018) *Syzygium jambos* displayed antibacterial and antibiotic-modulating activities against resistant phenotypes. Evid Based Complement Alternat Med 2018:5124735. doi:10.1155/2018/5124735
- Wang H, Huang Y, Wang J, Chen X, Wei K, Wang M, Shang S (2016) Activities of azoxystrobin and difenoconazole against *Alternaria alternata* and their control efficacy. Crop Protection 90:54-58. doi:10.1016/j.cropro.2016.08.022
- War AR, Paulraj MG, War MY, Ignacimuthu S (2011) Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Signal Behav 6:1787-1792. doi:10.4161/psb.6.11.17685
- Watanabe M, Fukiya S, Yokota A (2017) Comprehensive evaluation of the bactericidal activities of free bile acids in the large intestine of humans and rodents. J Lipid Res 58:1143-1152. doi:10.1194/jlr.M075143

- Wu PH, Chang HX, Shen YM (2023) Effects of synthetic and environmentally friendly fungicides on powdery mildew management and the phyllosphere microbiome of cucumber. *PLoS One* 18:e0282809. doi:10.1371/journal.pone.0282809
- Xi KY, Xiong SJ, Li G, Guo CQ, Zhou J, Ma JW, Yin JL, Liu YQ, Zhu YX (2022) Antifungal activity of ginger rhizome extract against *Fusarium solani*. *Horticulturae* 8:983. doi:10.3390/horticulturae8110983
- Xie Q, Li F, Fang L, Liu W, Gu C (2020) The antitumor efficacy of beta-elemene by changing tumor inflammatory environment and tumor microenvironment. *Biomed Res Int* 2020:6892961. doi:10.1155/2020/6892961
- Yamunarani K, Jaganathan R, Bhaskaran R, Govindaraju P, Velazhahan R (2004) Induction of early blight resistance in tomato by *Quercus infectoria* gall extract in association with accumulation of phenolics and defense-related enzymes. *Acta Physiol Plant* 26:281-290. doi:10.1007/s11738-004-0018-7
- Yang LN, He MH, Ouyang HB, Zhu W, Pan ZC, Sui QJ, Shang LP, Zhan J (2019) Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* to fungicides with different modes of action. *BMC Microbiology* 19:205. doi:10.1186/s12866-019-1574-8
- Yusoff SF, Haron FF, Tengku Muda Mohamed M, Asib N, Sakimin SZ, Abu Kassim F, Ismail SI (2020) Antifungal activity and phytochemical screening of *Vernonia amygdalina* extract against *Botrytis cinerea* causing gray mold disease on tomato fruits. *Biology (Basel)* 9:286. doi:10.3390/biology9090286
- Zhao F, Wang P, Lucardi RD, Su Z, Li S (2020) Natural sources and bioactivities of 2,4-di-tertbutylphenol and its analogs. *Toxins (Basel)* 12:35. doi:10.3390/toxins12010035



***In vitro* effect of *Callistemon viminalis* and *Melaleuca cajuputi* ethanolic extracts as botanical fungicide and insecticide**

Somnuek, S.^{*}, Thipmanee, K. and Jaenaksorn, T.

Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

Somnuek, S., Thipmanee, K. and Jaenaksorn, T. (2021). *In vitro* effect of *Callistemon viminalis* and *Melaleuca cajuputi* ethanolic extracts as botanical fungicide and insecticide. International Journal of Agricultural Technology 17(6):2363-2374.

Abstract Effect of ethanolic extracts of *Callistemon viminalis* (EECV) and *Melaleuca cajuputi* (EEMC) leaves was evaluated in laboratory against plant pathogenic fungus (*Alternaria* sp.) and plant insect pests (*Aphis craccivora* and *Phenacoccus manihoti*). Regarding the study on botanical fungicide, the combined formulas of EECV and EEMC (5000 ppm) in ratios of 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 and 0:100 were tested on mycelial growth and spore germination of tested fungus. The results revealed that all tested formulas of plant extracts gave significant inhibition on mycelial growth and spore germination in the ranges of 27.5-92.7% and 75-100%, respectively. However, the EEMC itself was unexpectedly found highly effective than the combined formulas. In the case of insecticidal activity, the preliminary experiment of EECV and EEMC (2000, 10000 and 20000 ppm) was performed on aphid and mealybug. The result presented that all concentrations of EECV and EEMC significantly showed the mortality effect on aphid and mealybug about 5-100%. In addition, the EECV and EEMC at 2000 and 10000 ppm showed a repellency of about 5-55%. Then, both plant extracts at 2500, 5000, 10000 and 20000 ppm concentrations were tested to those insects. The 100% mortality of aphid and mealybug was found in the highest concentration of EECV and EEMC while 2500-10000 ppm concentrations showed in the range of 38-98%. The 100% repellency capacity was observed at 10000 ppm concentration. Therefore, two Myrtaceae ethanolic extracts are promising to be used as a natural pesticide in controlling *Alternaria* and insect pests in laboratory.

Keywords: Myrtaceae ethanolic extract, Botanical fungicide, Botanical insecticide, *Callistemon viminalis*, *Melaleuca cajuputi*

Introduction

Vegetables are highly susceptible to insect pests and diseases. Therefore, pests and diseases are considered as a major limiting factor in the commercial vegetable production (Hoffmann *et al.*, 2004). Several insect pests including aphids, mealybugs, beetles and cutworms cause significant damage (up to 60% yield losses) to vegetable crops (Shankar and Raju, 2012). *Alternaria* spp. is one of the most widespread genera in the world that causes pre- and post-

^{*} **Corresponding Author:** Somnuek, S.; **Email:** suriyasitsom@gmail.com

harvest damage to agricultural products including vegetables (Lopez and Cabral 1999). For instance, *Alternaria* infection of broccoli and cauliflower heads can lead to complete deterioration of the heads and results in total loss of marketability (Singh *et al.*, 2015). To combat such a various insect pests and diseases, most growers rely almost exclusively on chemical synthetic insecticides and fungicides but without satisfactory control result. On the other hand, the disadvantages to widespread synthetic pesticide use are significant. Chemical pesticides in agriculture have also imposed a serious negative impact on the environment such as contamination of soils and groundwater and contamination of crop products with harmful chemical residues (Bahar *et al.*, 2007). Therefore, long-term sustainable management can help growers decrease their reliance on chemical insecticides and fungicides. At present, public awareness of pesticides residues on agricultural produces as well as on environmental problems has stimulated research efforts using natural products to reduce the impacts of pests and diseases on agricultural systems. A renewed interest in the use of botanical pesticides for crop protection without other adverse effects on the host (such as reduced yield) has increased markedly in the last 10 years (Wurms, 2020).

Callistemon viminalis (bottle brush tree) and *Melaleuca cajuputi* (cajuput), belong to the family Myrtaceae, were used in traditional and folk medicine (Ko Ko *et al.*, 2009; Ahmad and Athar, 2017; Mohamed *et al.*, 2017). Moreover, the extracts and essential oil from the plants in this family have been reported to have toxic effect on microorganisms and insect pests (Ko Ko *et al.*, 2009; Visheentha *et al.*, 2018; Bakar *et al.*, 2019). However, only a few and limited studies of the extract of *C. viminalis* and *M. cajuputi* as botanical fungicide and insecticide was noted.

Therefore, this research was conducted to determine the effect of ethanolic extracts from *C. viminalis* and *M. cajuputi* as botanical pesticides to control *Alternaria* sp. and insect pests (aphid and mealybug) in a laboratory condition.

Materials and methods

Plant ethanolic extract preparation

Callistemon viminalis (Bottle brush tree) leaves were collected from the area in King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Bangkok province while *Melaleuca cajuputi* (Cajaput tree) leaves were collected in KMITL Prince of Chumphon Campus, Chumphon province, Thailand. Both plant leaves were washed with tap water and dried in the open

air. The leaves were then dried in hot air oven at 50°C. Blender was used to grind the dried samples. The Soxhlet method was used to extract the plant leaves. The ethanolic solvent of obtained crude extracts were removed by rotary evaporator. Then the ethanolic crude extract of *Callistemon viminalis* (EECV) and *Melaleuca cajuputi* (EEMC) were kept in refrigerator at 4 °C for further study.

Sample preparation

Plant pathogen

Alternaria sp. causing leaf spot disease of lettuce was used in this study. The fungus was maintained in potato dextrose agar at 7 days old. Then spore suspension of *Alternaria* sp. was prepared and adjusted to 10⁶ spores/ml for this study.

Insect

The tested insects as aphid and mealybug were collected initially from agricultural farm at Faculty of Agricultural Technology, KMITL, Bangkok. Both aphid and mealybug were reared and multiplied on alternate host in greenhouse further experiment.

Effect of plant ethanolic extracts on *Alternaria* sp.

Mycelial growth test

Effect of antifungal activity of EECV and EEMC on the mycelial growth of *Alternaria* sp. was carried out by poisoned food technique. The EECV and EEMC alone (100:0 and 0:100) including the combination of EECV and EEMC in ratios of 75:25, 50:50 and 25:75 were used in this experiment. The molten PDA was mixed with each formula of the tested plant extracts at a 5000 ppm concentration. Then the PDA with plant extract was poured into Petri dish (5 cm diameter). A mycelial disc of 5 mm diameter was inoculated on the center of the prepared plate. A completely randomized design (CRD) with 5 replications was used in the experiment. Ten percent of dimethyl sulfoxide (DMSO) without plant extract was used as a control treatment. After that, the tested plates were incubated at 25 °C. The diameters of the colony growth in control and plant extract treatment were measured at 1, 3, 5 and 7 day and the antifungal effect was calculated by the following formula:

$$\text{Antifungal activity (\%)} = (\text{Dc}-\text{Dt})/\text{Dc} \times 100$$

where Dc was the diameter of colony growth in control plate.

Dt was the diameter of colony growth in the plate containing tested extract.

Spore germination test

To evaluate the antifungal activity of EECV and EEMC on *Alternaria* sp. by spore germination test, the experiment was carried out in CRD with 5 replications. The experimental treatments were EECV mixed with EEMC in the ratio of 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 and 100:0 at 2500 ppm. One ml of prepared spore suspension (10^6 spores/ml) was added with one ml of the tested plant extract at desired final concentration. Ten percent of DMSO without plant extract was used as control treatment. The spore germination was observed under light microscope at 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h. The inhibitory effect was compared with the control treatment.

Effect of plant ethanolic extracts on insect pests

Preliminary test of plant extracts on insect

To assess the effect of EECV and EEMC on aphids and mealybugs, the lowest, medium and highest concentrations (2000, 10000 and 20000 ppm) of the tested plant extracts were used in this experiment. Each concentration of the plant extract was filled to filter paper of 5 cm in diameter and placed into Petri disc (5 cm in diameter). Then twenty tested insects were transferred on the prepared filter paper. The experiment was designed in CRD with 3 replications. The 10% tween20 without plant extract was used as a control treatment. The mortality effect was observed at 6, 12 and 24 h and calculated followed by mortality effect (%) = $((NC-NT)/NC) \times 100$ where NC was the number of insects in the control treatment while NT was the mortality number of insects in plant extract treatment. In addition, the preliminary repellency of the tested plant extracts was determined at the same time.

Mortality effect of plant extracts on insect pests

The mortality effects of EECV and EEMC at 2500, 5000, 10000 and 20000 ppm concentrations against aphids and mealybugs were carried out by paper contact technique. The experimental method and design were tested in the same way on the preliminary test of the insect. The nine cm in diameter of Petri dishes were used in this experiment. In addition, probit analysis of lethal concentration fifty (LC50) value was evaluated.

Repellent effect of plant extracts on insect pests

The repellent effect of EECV and EEMC on aphids and mealybugs were performed using the different low concentrations (1250, 2500, 5000 and 10000

ppm) as compared with mortality test. Half of the filter paper (9 cm in diameter) was added by one mL of the tested plant extract whereas, the other half filter paper was filled with 10% tween20 (control). Both the treated half and control half of paper filters were placed in a plate of 9 cm in diameter. Then twenty the tested insects were transferred to the center of the prepared filter paper. The CRD with 5 replications was used in the experiment. The repellent activity was observed at 12 and 24 h. The repellent percentage (RP) was calculated using the formula $RP = ((NC-NP)/(NC+NP)) \times 100$ where NC was the number of tested insects on the control half and NP was the number of insects on the plant extract half.

Results

Effect of plant ethanolic extracts on Alternaria sp.

Effects of ethanolic crude extracts from *Callistemon viminalis* (EECV) and *Melaleuca cajuputi* (EEMC) leaf on mycelial growth and spore germination of *Alternaria* sp. were conducted. The tested formulations were the mixture of both EECV and EEMC in the ratios of 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 and 0:100 at 5000 ppm concentration. The result showed that at 3 days after incubation (DAI), colony in control plate was about 50% whereas only slight mycelial growth was detected on the treatment plate. At 7 DAI, control plate reached 100% and inhibitory effects of the extracts revealed significantly about 28-93% (Figure 1 and 2). The stronger inhibitory effect was noted in EEMC alone (EECV+EEMC 0:100) about 93%. In the case of mixture extracts, three ratios (75:25, 50:50 and 25:75) significantly revealed the inhibition effect on the tested fungal mycelial growth in the ranges of 42-82%. The EECV+EEMC (25:75) presented the more significant inhibitory effect than other mixture extracts (EECV+EEMC 75:25 and 50:50). While EECV alone showed a lower inhibition effect of about 28%. Regarding the spore germination test at 24 h after treatment, the spore germination in the control was about 24% while no-spore germination was found in the plant extract treatments. At 72 h, all tested formulas presented strong inhibition effect (about 77-100%) which were higher than in the mycelial growth test (Figure 1). The EEMC alone and EECV+EEMC 25:75 gave the highest inhibition on spore germination of the tested fungus about 98-100% followed by EECV+EEMC 50:50, 75:25 and EECV alone showed the effect about 91, 84 and 91%, respectively. However, the EEMC itself was unexpectedly found highly effective than the combined formulation (Figure 1). Moreover, abnormalities of spores such as swelling and lysis were detected after treating with the tested plant extract (Figure 2).

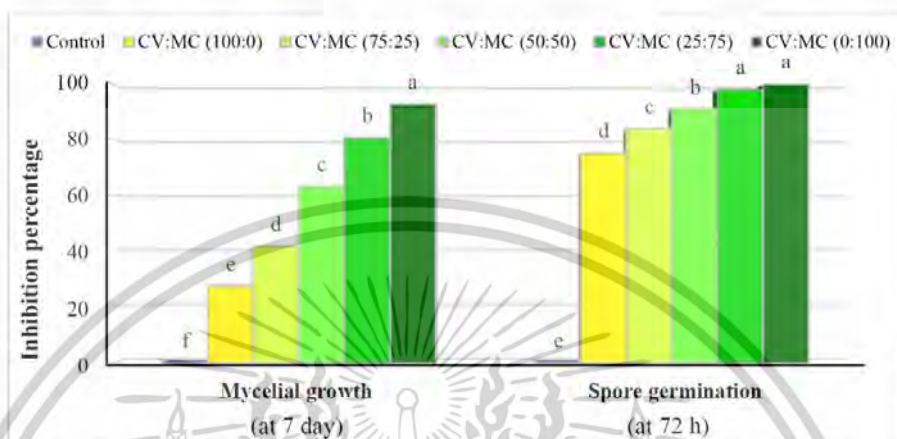


Figure 1. Inhibition effect of ethanolic extract from *C. viminalis* (EECV) and *M. cajuputi* (EEMC) on *Alternaria* sp. mycelial growth (at 7 day after incubation) and spore germination test (at 72 h)

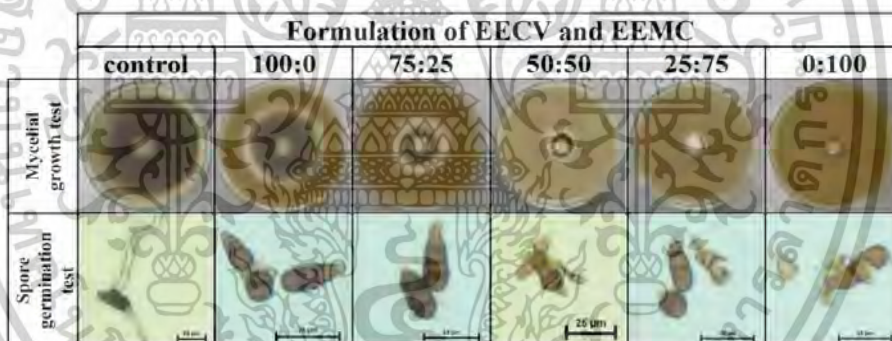


Figure 2. The characteristics of colony (at 7 day after incubation) and abnormal spore (at 72 h) of *Alternaria* sp. after being treated with plant extract formulation of EECV and EEMC : black bar = 25 μm

Effect of plant ethanolic extracts on insect pests

Preliminary test of plant extracts on insect

Effects of ethanolic crude extracts from *C. viminalis* and *M. cajuputi* leaf were determined on aphid and mealybug. The result revealed that all concentrations of both tested plant extracts showed a wide range mortality effect on both tested insects. The highest mortality effect was noted at the highest concentration (20,000 ppm) followed by 10,000 and 2,000 ppm. The

highest concentration (20,000 ppm) of EECV showed mortality effect on both tested insects about 80-90% while EEMC showed the effect about 100% at 24 h. The lowest concentration (2,000 ppm) of both plant extracts showed slightly the effect on the insect about 21-33%. However, EEMC showed effect more than EECV (Figure 3).

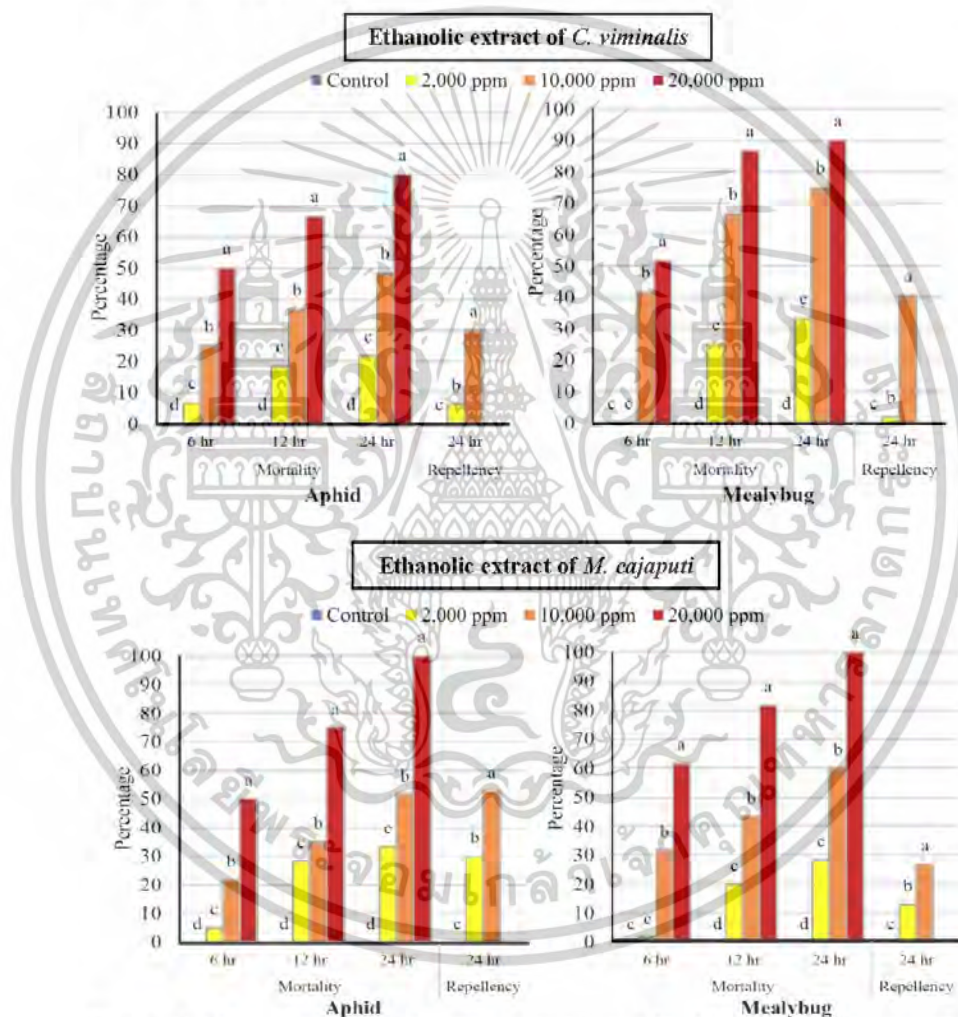


Figure 3. Mortality and repellency percentage of aphid and mealybug caused by ethanollic extract of *C. viminalis* and *M. cajaputi* using paper contact method

In addition, the result obtained from the repellent effect test in the medium and low concentration of both plant extract. The medium concentration (10,000 ppm) showed the repellent effect more than that of the lower concentration (2,000 ppm). The EECV (10,000 ppm) showed the higher repellency about 30 and 40% (aphid and mealybug respectively) while The EEMC showed the effect on aphid (52%) rather than mealybug (26%). The low concentration of both plant extract presented slightly the effect on both tested insects about 2-30%. The repellent effect fast occurred on the medium concentration more than the low concentration (Figure 3).

Table 1. Percentage and LC₅₀ of aphid and mealybug caused by ethanolic extract of *Callistemon viminalis* (EECV) and *Melaleuca cajuputi* (EEMC) using paper contact method

Tested extract		Mortality (%)						LC ₅₀ (ppm)	
		Aphid (Ap)			Mealybug (Mb)			Ap	Mb
		12 h	24 h	36 h	12 h	24 h	36 h		
EECV	Control	0e	0e	0e	0e	0e	0e	2541	3801.6
	2500 ppm	5d	27d	43d	6d	28d	38d		
	5000 ppm	22c	37c	66c	20c	38c	64c		
	10000 ppm	30b	56b	87b	65b	77b	96b		
	20000 ppm	54a	75a	100a	73a	87a	100a		
EEMC	Control	0e	0d	0e	0e	0e	0d	2671	2981.2
	2500 ppm	7d	35c	49d	8d	33d	46c		
	5000 ppm	28c	42c	72c	22c	40c	60b		
	10000 ppm	46b	69b	83b	55b	72b	98a		
	20000 ppm	86a	99a	100a	81a	95a	100a		

Values are means of three replicates. Values in each column within each plant extract followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (P>0.05).

EECV = Ethanolic extract of *Callistemon viminalis*; EEMC = Ethanolic extract of *Melaleuca cajuputi*

Mortality effect of plant extracts on insect pests

Evaluation of the mortality effects of EECV and EEMC at different concentrations (2500, 5000, 10000 and 20000 ppm) on aphid and mealybug nymphs by using paper contact method demonstrated that all tested concentrations of both EECV and EEMC gave the mortality effect on tested insects. Among all tested concentrations, the highest concentration (20000 ppm) significantly presented the highest mortality of both aphid and mealybug nymph. In this regard, 12 and 24 h after treatments, the EECV (20000 ppm) presented the mortality percentage of mealybugs with more than that of aphids by the ranges of 73-87 and 54-75%, respectively. While the EEMC (20000 ppm) gave the higher mortality result on aphids more than mealybug with the ranges of 86-99 and 81-95%, respectively (Table 1). At the end of the test (36 h after the treatment), both EECV and EEMC at the highest concentration presented 100% mortality on two tested insects. Regarding LC₅₀, EECV showed the

concentration value on aphids and mealybugs about 2541 and 3801 ppm, respectively while EEMC showed the value about 2671 and 2981 ppm, respectively. However, when we considered LC50, the tested aphids showed a weaker response to the plant extracts than mealybug (Table 1).

Repellent effect of plant extracts on insect pests

The repellent effects of the different concentrations (1250, 2500, 5000 and 10000 ppm) of EECV and EEMC on aphid and mealybug nymphs were carried out. The results indicated that all tested concentrations of EECV and EEMC repelled the tested aphid and mealybug nymph with a wide range repellency, the lower to medium concentrations (1250-5000 ppm) of both EECV and EEMC gave the moderate repellency of both tested insects in the ranges of 14-62%. Moreover, the highest concentration of tested plant extracts showed the best repellent activity on the insects about 90-100% when compared to other treatments (Table 2). However, EEMC exhibited repellency on the tested insects better than the EECV.

Table 2. Repellency percentage of ethanolic extract of *C. viminalis* (EECV) and *M. cajuputi* (EEMC) against aphid and mealybug using paper contact method

Tested extract		Repellency (%)			
		Aphid		Mealybug	
		12 h	24 h	12 h	24 h
EECV	Control	0d	0d	0d	0d
	1250 ppm	0d	16c	0d	14c
	2500 ppm	22c	54b	14c	44b
	5000 ppm	48b	56b	28b	50b
	10000 ppm	88a	90a	86a	86a
EEMC	Control	0d	0d	0c	0e
	1250 ppm	6cd	24c	8c	22d
	2500 ppm	16c	58b	10c	28c
	5000 ppm	44b	62b	32b	56b
	10000 ppm	100a	100a	100a	100a

Values are means of three replicates. Values in each column within each plant extract followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test ($P > 0.05$).

EECV = Ethanolic extract of *Callistemon viminalis*, EEMC = Ethanolic extract of *Melaleuca cajuputi*

Discussion

Effect of crude ethanolic extracts from *Callistemon viminalis* (EECV) and *Melaleuca cajuputi* (EEMC) as botanical fungicide and insecticide on *Alternaria* sp. and insect pests (aphids and mealybugs) was conducted in the laboratory. Regarding antifungal activity, the results were revealed that all formulations of EECV+EEMC (2500 ppm concentration of extract mixture in

the ratios of 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 and 0:100) gave the inhibition effect on mycelial growth of the tested fungus in the ranges of 27.5-92.75%. Whereas the spore germination test showed the effect in the ranges of 75-100%. However, the best inhibitory effects were noted in EEMC alone treatment while EECV gave the lower inhibition effect. For extract mixtures, the inhibition effect increased with the increasing concentrations of EEMC. Our findings agreed with many previous researches. Both *C. viminalis* and *M. cajuputi*, belong to Myrtaceae family, presented strong inhibition effect on plant pathogenic fungi (Bharat and Praveen, 2016; Pawar and Thaker, 2007; Siddique *et al.*, 2018; Thanaboripat *et al.*, 2007; Thanaboripat *et al.*, 2016; Somnuek *et al.*, 2020). Apparently, our tested extracts were strongly inhibitory to *Alternaria* spore germination. Abnormal fungal spores were found in EEMC alone and the extract mixed with EEMC. The antifungal effects of EECV and EEMC found in our study may be attributed to the presence of their phytochemical compounds. The chemical compounds such as phenolics, flavonoids, tannins and terpenoids were presented in the Myrtaceae plants. These phytochemicals have the ability to suppress plant pathogenic fungi e.g., to inhibit enzymes, bind adhesins and proteins, and degrade cell walls (Tiwari *et al.*, 2011; Gurjar *et al.*, 2012).

Many extracts and essential oils from plants including the Myrtaceae plants have been reported that it gave mortality and repellent effects on insect pests. Our obtained result implied that EECV and EEMC exhibited mortality effects on both aphids and mealybug. The highest mortality effect (100%) was noted in EECV and EEMC treatment at 20000 ppm concentrations. However, EEMC showed an effect more than EECV which gave the LC₅₀ values on both tested insects with the range of 2671-2981 and 2541-3801 ppm. Our finding agreed with previous researchers who reported that Myrtaceae plants could kill and repel various insect pests (Ndomo *et al.*, 2009; Majeed *et al.*, 2018; Sannongmueang *et al.*, 2018). Besides, Sannongmueang *et al.* (2018) found hexane, acetone and ethanolic crude extracts from *Callistemon lanceolatus* at 1-5% (w/v) showed the toxic and repellent activities against mealybug. While Visheentha *et al.* (2018) reported hexane, dichloromethane and methanol extracts from *M. cajuputi* stem gave mortality effect on *Camponotus* sp. Showler (2017) reported that essential oils from *Syzygium*, *Melaleuca* and *Eucalyptus* (Myrtaceae) presented the effect on horn flies and stable flies. In this regard, the effectiveness of plant extracts and essential oils on mortality and repellency of insect pests would be related to the phytochemical components. Such phenols, flavonoids, alkaloids and terpenoids are important compounds containing in the plant extract. Those bioactive compounds showed broad-spectrum action or multiple modes of action, including antifeedant,

repellency and toxicity on insect pests (Showler, 2017; Niroumand *et al.*, 2016; Mohamed *et al.*, 2017; Hematpoor *et al.*, 2017; Hikal *et al.*, 2017).

In conclusion, ethanolic crude extracts from *C. viminalis* (EECV) and *M. cajuputi* (EEMC) alone and extract mixtures of both plants (75:25, 50:50 and 25:75) significantly showed the inhibition effect on mycelial growth and spore germination of *Alternaria* sp. with the ranges of 27.5-92.7% and 75-100%, respectively. Also, the effect in terms of toxic and repellent activities of both plants on aphids and mealybug, all tested concentrations of both plant extracts gave mortality and repellency effect on tested insects in ranges of 38-100% and 14-100%, respectively. Therefore, EECV and EEMC could be used as botanical fungicide and insecticide for controlling *Alternaria* sp. and insects (aphid and mealybug) in laboratory conditions. However, these two plant extracts should be further tested in greenhouse and field conditions in order to obtain the botanical pesticide as an eco-friendly product.

References

- Ahmad, K. and Athar, F. (2017). Phytochemistry and pharmacology of *Callistemon viminalis* (Myrtaceae): A review. *The Natural Products Journal*, 7:1-10.
- Bahar, H., Islam, I., Manna, A. and Uddin, J. (2007). Effectiveness of botanical extracts on bean aphids attacking Yard-Long beans. *Journal of Entomology*, 4:136-142.
- Bakar, A. A., Ahmad, H., Sulaiman, S., Omar, B. and Ali, R. M. (2019). Evaluation of *in vitro* bioactivity of *Melaleuca cajuputi* Powell essential oil against *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse). *Sains Malaysiana*, 48:1919-1926.
- Bharat, C. S. and Praveen, D. (2016). Evaluation of *in vitro* antimicrobial potential and phytochemical analysis of spruce, cajeput and jamrosa essential oil against clinical isolates. *International Journal of Green Pharmacy*, 10:27-32.
- Gurjar, M. S., Ali, G. S., Akhtar, M. and Singh, K. S. (2012). Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences*, 3:425-433.
- Hematpoor, A., Liew, S. Y., Azirun, M. S. and Awang, K., (2017). Insecticidal activity and the mechanism of action of three phenylpropanoids isolated from the roots of *Piper sarmentosum* Roxb. *Scientific Reports* 7:12576. Retrieved from DOI:10.1038/s41598-017-12898-z
- Hikal, W., Rowida, S. B. and Said-Alahl, H. A. H. (2017). Botanical insecticide as simple extractives for pest control. *Cogent Biology* 3(1): 1404274. Retrieved from DOI: 10.1080/23312025.2017.1404274
- Hoffmann, H., Learmonth, S. and Wood, P. (2004). Common insect pests and diseases on vegetables in the home garden. Department of Primary Industries and Regional Development, Western Australia, Perth. Bulletin 4624.
- Ko Ko, Jantarajunnong, W. and Chandrapatya, A. (2009). Repellency, fumigant and contact toxicities of *Melaleuca cajuputi* Powell against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* Herbst. *Thai Journal of Agricultural Science*, 42:27-33.
- Lopez, S. E. and Cabral, D. (1999). *Alternaria*. *Encyclopedia of Food Microbiology* 42-49.
- Majeed, M. Z., Nawaz, M. I., Khan, R. R., Farooq, U. and Ma, C-S. (2018). Insecticidal effects of acetone, ethanol and aqueous extracts of *Azadirachta indica* (A. Juss), *Citrus aurantium* (L.), *Citrus sinensis* (L.) and *Eucalyptus camaldulensis* (Dehnh.) against mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 21:421-430.

- Mohamed, Z. M. S., Mervat, E-H., Ramadan, A. N., Hayssam, M. A., Nader, A. E-S. and Hosam, O. E. (2017). Medicinal and biological values of *Callistemon viminalis* extracts: History, current situation and prospects. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10:229-237.
- Ndomo, A. F., Tapondjou, L. T., Ngamo, L. T. and Hance, T. (2009). Insecticidal activities of essential oil of *Callistemon viminalis* applied as fumigant and powder against two bruchids. *Journal of applied entomology*, 134:333-341.
- Niroumand M. C., Farzaei M. H., Razkenari E. K., Amin G., Khanavi M., Akbarzadeh T. and Shams-Ardekani, M. R. (2016). An evidence-based review on medicinal plants used as insecticide and insect repellent in traditional Iranian medicine. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 18. Retrieved from DOI: e22361. 10.5812/ircmj.22361
- Pawar, V. C. and Thaker, V. S. (2007). Evaluation of the anti-*Fusarium oxysporum* f. sp. *cicer* and anti-*Alternaria porri* effects of some essential oils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23:1099-1106.
- Sannongmueang, T., Pumnuan, J. and Insung, A. (2018). Effectiveness of Bottle Brush (*Callistemon lanceolatus* DC.) Leaf Extracts to Control the Nymph of Mealybug (*Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero). *International Journal of Agricultural Technology*, 14:53-59.
- Shankar, U. and Raju, S. (2012). Integrated pest management in vegetable eco-system. pp. 619-650. In: Abrol, D. P. and Shankar, U. (eds.) *Ecologically based integrated pest management*, New India Publishing Agency, New Delhi.
- Showler, A. T. (2017). Botanically based repellent and insecticidal effects against horn flies and stable flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Integrated Pest Management*, 8:1-11.
- Siddique, S., Sania, M., Bareen, F. E. and Zahida, P. (2018). Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of essential oil from *Melaleuca quinquenervia* leaves. *Indian Journal of Experimental biology*, 56:686-693.
- Singh, V., Shrivastava, A., Jadon, D., Wahi, N., Singh, A. and Sharma, N. (2015). *Alternaria* diseases of vegetable crops and its management control to reduce the low production. *International Journal of Agriculture Science*, 7:834-840.
- Somnuek, S., Jaenaksorn, T. and Laosinwattana, C. 2020. Effect of Crude Ethanolic Extracts from Bottle Brush (*Callistemon viminalis*) against Leaf Spot Fungi and Their Phytotoxicity on Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Current Applied Science and Technology*, 20:1-14.
- Thanaboripat, D., Sarutipaisan, C., Puangtong, C., Chatpongsatorn, P., Chatpongsatorn, P., Suvatti, Y., Sukonthamut, S. and Charoensettasilp, S. (2016). Effects of four essential oils on the growth of aflatoxin producing fungi. *KMITL Science and Technology Journal*, 16:104-111.
- Thanaboripat, D., Suvatti, Y., Srihhasin, P. and Sripakdee, S. (2007). Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*. *KMITL Science and Technology Journal*, 7:1-7.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G. and Kaur, H. 2011. Phytochemical screening and extraction: A review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1:98-106.
- Visheentha, M., Appalasaamy, S., Nivaarani, A., Boon, J. G., Weeraya, K. and Charoen, P. (2018). The action of gelam (*Melaleuca cajuputi*) stem crude extract as natural insecticide for *Camponotus* sp. *Journal of Biodiversity, Bioprospecting and Development*, 5:173.
- Wurms, K. (2020). Natural products for plant pest and disease control. *Plants* (special issue). Retrieved from https://www.mdpi.com/journal/plants/special_issues/natural_products_plant_disease_control

(Received: 16 August 2021, accepted: 30 October 2021)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นายสุริยสิทธิ์ สมนึก
 วันเดือนปีเกิด 30 ธันวาคม 2529
 ภูมิลำเนา 23 ม.3 ต. บ้านแปง อ.บางปะอิน จ.พระนครศรีอยุธยา
 ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2548 สำเร็จการศึกษา มัธยมศึกษาตอนปลาย
 โรงเรียนบางปะอิน “ราชานุเคราะห์ ๑”
 จังหวัดพระนครศรีอยุธยา
 พ.ศ. 2552 สำเร็จการศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต
 สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
 พ.ศ. 2559 สำเร็จการศึกษา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
 สาขาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร
 ลาดกระบัง

