ประสิทธิภาพน้ำส้มควันไม้ในการควบคุมเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของพืชวงศ์กะหล่ำในห้องปฏิบัติการ

Efficiency of Wood Vinegar in Controlling *Alternaria brassicicola* Causing Leaf Spot of Brassicas in Laboratory

วิษณุ สุวรรณมงคล[1] และ สรัญยา ณ ลำปาง[1*]
Witsanu Suwanmongkol[1] and Sarunya Nalumpang[1*]

Abstract

A total 32 of *Alternaria brassicicola* isolates causing leaf spot disease in brassicas seedling were collected and isolated during January – April 2557 from 3 locations. The most virulent isolate (Aco_MBo1) was selected from pathogenicity testingand represented as an experimental strain for efficacy testing of 5 types of wood vinegar; longan wood vinegar, eucalyptus wood vinegar, rubber tree wood vinegar, bamboo wood vinegar and coconut wood vinegar. Testing the efficacy on mycelium growth inhibition comparing with acetic acid and commercial vinegar, the mycelium growth inhibition at 100% were shown by bamboo vinegar, rubber vinegar and eucalyptus vinegar at 0.5, 1.5 and 2.0%, respectively, at MIC (minimal inhibitory concentration, MIC) concentrations. The efficacy of wood vinegar on germ tube inhibition of conidia, bamboo vinegar and eucalyptus vinegar at x2 MIC concentration (1.0 and 4.0% respectively) was found at 59.58 and 50.00%, respectively, at 24 hr after inoculation. The wood vinegar has not made irregular shape of conidia. However, toxicity tested at 1 – 5% (v/v) concentration of 5 wood vinegar and chemical control showed no toxicity to the test plants.

Keywords: *Alternaria brassicicola*, leaf spot disease, brassicas, wood vinegar

[1] ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200
Department of Plant pathology.Faculty of Agriculture.Chiang Mai University. Chiang Mai 50200
รับเรื่อง : พฤษภาคม 2559
รับตีพิมพ์ : มิถุนายน 2559
[*] Corresponding author : sarunyav@gmail.com

บทคัดย่อ

จากการเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดวงศ์กะหล่ำจาก 3 แหล่งปลูก ได้แก่ ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ตำบลสันผีเสื้อ อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ และตำบลประตูป่า อำเภอเมือง จังหวัดลำพูนในช่วงเดือนมกราคม – เมษายน 2557 สามารถแยกเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ได้จำนวน 32 ไอโซเลท เมื่อทดสอบความสามารถในการเข้าทำลายพืช พบว่าเชื้อราไอโซเลท Aco_MBo1 สามารถเข้าทำลายผักคะน้าและผักกาดขาวได้รุนแรงที่สุด จึงคัดเลือกเป็นตัวแทนใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ 5 ชนิด ได้แก่ น้ำส้มควันไม้จากไม้ ลำไย ยูคา-ลิปตัส ยางพารา ไม้ไผ่ และมะพร้าว เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราเปรียบเทียบกับกรด acetic acid และน้ำส้มสายชูที่ใช้ทางการค้า ผลการทดสอบทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า น้ำส้มควันไม้ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราได้ 100% ได้แก่ น้ำส้มควันไม้ไผ่ มะพร้าว ยางพารา และ ยูคาลิปตัส ที่ความเข้มข้น MIC (minimal inhibitory concentration, MIC) เท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% ตามลำดับสำหรับน้ำส้มควันไม้ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกgerm tube ของสปอร์เชื้อรา ได้แก่ น้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ และยูคาลิปตัส ที่ความเข้มข้น x2 MIC (1.0 และ 4.0% ตามลำดับ) พบประสิทธิภาพยับยั้งการงอกได้เท่ากับ 59.58 และ 50.00% ภายหลังการทดสอบ 24 ชั่วโมง โดยน้ำส้มควันไม้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ germ tube ของสปอร์เชื้อรา แต่ไม่มีผลทำให้สปอร์เชื้อรามีรูปร่างผิดปกติ และนอกจากนี้เมื่อทดสอบความเป็นพิษที่ระดับความเข้มข้น 1 – 5% (v/v) ของน้ำส้มควันไม้ทั้ง 5 ชนิดและสารทดสอบ พบว่าไม่เป็นพิษต่อพืชทดสอบ

คำสำคัญ : *Alternaria brassicicola* โรคใบจุด พืชวงศ์กะหล่ำ น้ำส้มควันไม้

คำนำ

พืชผักในวงศ์กะหล่ำมีหลายชนิดได้แก่ กะหล่ำปลีกะหล่ำดอกคะน้าผักกาดหัวผักกาดขาว ผักกาดเขียวกวางตุ้ง และแครอทผักในกลุ่มนี้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพาะปลูกง่ายสามารถปลูกได้ตลอดปี(Chanai, 1993) อย่างไรก็ตามพืชกลุ่มนี้มีโรคที่สำคัญหลายชนิด ในพืชตระกูลกะหล่ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคใบจุด เป็นโรคที่ทำลายใบหรือต้นเมื่อโรคนี้ระบาดจะทำให้พืชผักแห้งเหี่ยวส่งผลให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงกับผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์ในภาคเหนือถึง 100% (Orapan and Jumpon, 1990) สำหรับการป้องกันกำจัดโรคเกษตรกรนิยมใช้สารเคมี เนื่องจากวิธีการนี้ให้ผลรวดเร็ว และสะดวก ซึ่งจากการศึกษาพฤติกรรมในการใช้สารเคมีพบเกษตรกรเคยใช้สารเคมีทางการเกษตรถึง 99.3% นอกจากนี้ยังใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืชถึง 52.9% (Sombat *et al*., 2002) แต่การใช้สารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดโรคพืชมักประสบปัญหาการต้านทานต่อสารเคมี โดยเชื้อมีการ

ปรับตัวเองโดยการกลายพันธุ์เมื่อมีการใช้สารเคมีชนิดนั้นติดต่อกันเป็นเวลานานและต่อเนื่อง ซึ่งลักษณะเหล่านี้สามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ ทำให้ไม่สามารถใช้ได้ผลอีกในคราวต่อไป หรือต้องเพิ่มปริมาณการใช้ขึ้นเรื่อยๆ (Thammasak, 2000) นอกจากนี้ยังส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมทำลายธรรมชาติทั้งทางน้ำและดิน จึงทำให้ในปัจจุบันมีการศึกษาวิธีการป้องกันศัตรูพืชในรูปแบบต่างๆ ที่จะช่วยลดหรือเลิกใช้สารเคมีตามระบบเกษตรดีที่เหมาะสมหรือ GAP (good agriculture practice) (Benjarach *et al*., 2005)

การใช้น้ำส้มควันไม้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการควบคุมโรคพืชโดยลดการใช้สารเคมี น้ำส้มควันไม้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเผาถ่านธรรมชาติและควบแน่นควันไฟทำให้เกิดของเหลว จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า มีคุณสมบัติในการควบคุมเชื้อรา *Alternaria mali* สาเหตุโรค Alternaria blotch ของแอปเปิ้ล (Jung, 2007) ดังนั้นในงานวิจัยในนี้จึงมีแนวคิดในการนำน้ำส้มควันไม้หลายชนิดมาทดสอบเพื่อการควบคุมเชื้อรา *A. brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดวงศ์กะหล่ำ ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นทางเลือกในการลดการใช้สารเคมีในการผลิตพืชผัก ปลอดภัยต่อผู้บริโภคเกษตรกรผู้ใช้ และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง แยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดวงศ์กะหล่ำ และทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test)

เก็บตัวอย่างจาก 3 แหล่งปลูก ได้แก่ ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ตำบลสันผีเสื้อ อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ และตำบลประตูป่า อำเภอเมือง จังหวัดลำพูนในช่วงเดือนมกราคม – เมษายน 2557 โดยแยกเชื้อราสาเหตุจากใบพืชที่แสดงอาการโรคใบจุดด้วยวิธี single spore isolation โดยใช้ glass needles เขี่ยสปอร์เดี่ยวของเชื้อราสาเหตุบนใบพืชที่แสดงอาการใบจุดภายใต้กล้อง stereo microscope วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2°C) หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 9 ชั่วโมง นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound micro scope ที่กำลังขยาย 100 เท่าเมื่อพบสปอร์ที่กระจายกันอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้องอก germ tube ใช้เข็มเขี่ยย้ายวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใหม่เพื่อให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์ (pure culture) (Teik, 1999) จากนั้นจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุที่แยกได้ โดยอาศัยหลักเกณฑ์จาก Agrios (1997) และ Kumar *et al*. (2014) เมื่อได้เชื้อราบริสุทธิ์จึงเก็บเชื้อในหลอดอาหารเอียง (PDA slant) เป็น stock culture เพื่อศึกษาขั้นต่อไป

จากนั้นพิสูจน์การเป็นเชื้อราสาเหตุโรค และทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *A. brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดวงศ์กะหล่ำที่แยกได้ตามหลักเกณฑ์ของ Koch (Kochs' postulates) โดยเตรียมเชื้อราในรูปแบบสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspen sion) ความเข้มข้น 10^6 spores/ml แล้วฉีดพ่นบนพืชทดสอบ ได้แก่ ผักคะน้า และผักกาดขาว อายุ 45 วันหลังย้ายปลูก โดยบ่มเชื้อไว้ในโรงเรือน สังเกตอาการ และบันทึกผลการทดสอบหลังจากการปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน

2. ทดสอบประสิทธิภาพน้ำส้มควันไม้ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria brassi cicola* สาเหตุโรคใบจุดพืชวงศ์กะหล่ำ

ทดสอบประสิทธิภาพน้ำส้มควันไม้ 5 ชนิด ได้แก่ น้ำส้มควันไม้จากไม้ลำไยยูคาลิปตัส ไม้ไผ่ ยางพารา และมะพร้าว ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* ไอโซเลท Aco_MBo1 (ไอโซเลทที่มีความสามารถเกิดโรคได้รุนแรง ซึ่งคัดเลือกจากข้อ 1) สาเหตุโรคใบจุดวงศ์กะหล่ำ โดยเปรียบเทียบประสิทธิ ภาพกับกรด acetic acid และน้ำส้มสายชูที่ใช้ทางการค้าด้วยวิธี poison food technique ที่ระดับความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5% (v/v) ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมคือ เชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยทดสอบความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ วางแผนการทดสอบแบบ completely randomized design (CRD) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2°C) จนกว่า เชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผลโดยวัดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา แล้วหาค่าเฉลี่ยเพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (percent inhibition of radial growth, PIRG)

3. ทดสอบประสิทธิภาพน้ำส้มควันไม้ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดพืชวงศ์กะหล่ำ

ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ 5 ชนิด ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. brassicicola* ไอโซเลท Aco_MBo1 (ไอโซเลทที่มีความสามารถเกิดโรคได้รุนแรง ซึ่งคัดเลือกจากข้อ 1) เปรียบเทียบประสิทธิภาพกับกรด acetic acid และน้ำส้มสายชูที่ใช้ทางการค้าเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 ด้วยวิธี slide culture technique โดยเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spores suspension) ของเชื้อราสาเหตุความเข้มข้น 10^6 spores/ml แล้วนำไปผสมกับสารทดสอบแต่ละชนิดในอัตราส่วน 1:1 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 2 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้นที่ค่า MIC และความเข้มข้นสองเท่าของค่า MIC (x2 MIC) เมื่อผสมเข้ากันดีแล้ว หยดสารแขวนลอยปริมาตร 10 µl บนสไลด์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ขนาด 1 x 1 cm ใช้ cover-slip ปิดหน้าชิ้นวุ้นแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นตรวจวัดความงอกสปอร์ วัดความยาว germ tube และศึกษาลักษณะผิดปกติเปรียบเทียบกับชุดควบคุมภายใต้กล้อง compound microscope ที่กำลังขยาย 400 เท่า ณ เวลา 6 9 12 และ 24 ชั่วโมงหลังทดสอบ โดยทดสอบกรรมวิธีละ 3 ซ้ำวางแผนการทดสอบแบบ completely randomized design (CRD) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ผสมน้ำส้มควันไม้

4. ทดสอบความเป็นพิษของน้ำส้มควันไม้ต่อพืช

ทดสอบความเป็นพิษของน้ำส้มควันไม้ 5 ชนิด โดยใช้กรด acetic acid และน้ำส้มสายชูที่ใช้ทางการค้า เป็นชุดควบคุม ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2 3 4 และ 5% (v/v) ตามลำดับ แล้วจึงเติมสารจับใบ (Tween-20) ในอัตราส่วนปริมาตร 20 µl ต่อน้ำ 100 ml ทำการฉีดพ่นบนต้นคะน้า และผักกาดขาวที่มีอายุ 45 วันหลังย้ายปลูก ทดสอบกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น วางแผนการทดสอบแบบ completely randomized design (CRD) บันทึกผลโดยสังเกต

ลักษณะอาการที่เปลี่ยนแปลง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ฉีดพ่นน้ำกลั่นทุกๆ 3 วัน

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่าง และแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดวงศ์กะหล่ำ

จากการเก็บตัวอย่างใบผักวงศ์กะหล่ำที่แสดงอาการใบจุดจาก 3 แหล่ง สามารถแยกเชื้อรา *Alternaria* spp. บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 32 ไอโซเลทโดยเชื้อราทั้งหมดเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 cm บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 °C) เป็นเวลา 14 วัน สามารถแบ่งกลุ่มตามสีของโคโลนีได้ 4 ลักษณะ ได้แก่ สีเขียว สีขาวเป็นวงล้อมรอบ สีดำ และสีขาว เมื่อตรวจสอบลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าเชื้อราทุกกลุ่มมีลักษณะเหมือนกันคือ เส้นใยสีน้ำตาลมีผนังกั้น โคนิเดียรูปกระบองหัวกลับสีน้ำตาลอ่อนมีผนังกั้น 3 – 5 septate โดยพบเฉพาะผนังกั้นตามขวาง เซลล์บริเวณปลายไม่มีจงอย (beak) ขนาดสั้น โดยวัดความยาวโคนิเดียได้เท่ากับ 41 - 60 μm และความกว้างได้เท่ากับ 10 - 17 μm และพบโคนิเดียสร้างต่อกันเป็นสายโซ่ ซึ่งสอดคล้องกับหลักเกณฑ์ที่ Agrios (1997) ได้จัดจำแนกเป็นเชื้อรา *Alternaria brassicicola* คือ เชื้อราสร้างโคนิเดีย (asexual spore) สีเทา สีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ มีทั้งเกิดเดี่ยวๆ หรือต่อกันเป็นลูกโซ่ (catenulate) รูปร่างเป็นรูปไข่ (ovoid) กระบองหัวกลับ (obclavate) รูปทรงกระบอก (cylindrical) มีผนังกันตามยาวและผนังตามยาวกั้นเฉลียง (oblique septa) ก้านชูสปอร์ (conidiophore) นอกจากนี้ Kumar *et al*. (2014) รายงานว่าเส้นใยเชื้อราเป็น necrotrophic โดยมี septate สีเทามะกอกถึงดำ ส่วนก้านชูสปอร์ (conidiophore) เรียวยาว มี septate แตกกิ่งก้าน โดยวัดความยาวโคนิเดียได้เท่ากับ 35 – 45 μm และความกว้างได้เท่ากับ 5 – 8 μm ส่วนโคนิเดียมีสีดำ รูปทรงกระบอกหัวมีขนาดใหญ่ หางมีขนาดเล็ก (muriform) และไม่มีจงอย (beak) วัดความยาวโคนิเดียได้เท่ากับ 44 – 55 μm และความกว้างได้เท่ากับ 11 – 16 μm โดยมี septa แนวขวางที่ 5 – 8 septa และ 0 – 4 septa ในแนวยาว เชื้อราสามารถสร้างโคนิเดียได้ที่อุณหภูมิ 8 – 30 °C โดยงอก germ tube ที่เวลาเฉลี่ย 13 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อรามักจะงอกสปอร์ที่อุณหภูมิสูง และ Kwanuruern (2547) ยังพบว่า เชื้อราจะสร้างโคนิเดียจำนวนมากที่อุณหภูมิ 18 – 30°C โดยเชื้อราจะสร้างโคนิเดียได้ดีที่สุดในที่มีแสงสลับมืด แต่จะไม่สร้าง โคนิเดียหากได้รับแสงอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา

เมื่อพิสูจน์ความเป็นเชื้อสาเหตุโรคทั้ง 32 ไอโซเลท ตามหลักเกณฑ์ของ Koch (Kochs' postulation) พบว่าเชื้อราทั้งหมดสามารถก่อโรคใบจุดได้ ซึ่งแสดงอาการเช่นเดียวกับพืชที่เป็นโรคก่อน นำมาแยกเชื้อโดยเชื้อรา *A. brassicicola* ไอโซเลท Aco_MBo1 สามารถเข้าทำลายพืชทดสอบ 2 ชนิด ได้แก่ คะน้า และผักกาดขาวได้รุนแรงที่สุด (เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่นๆโดยแสดงอาการภายหลังจากการปลูกเชื้อ 4 วัน จึงคัดเลือกเชื้อราไอโซเลทดังกล่าว เพื่อใช้ในการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2. ทดสอบประสิทธิภาพน้ำส้มควันไม้ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria brassi cicola* สาเหตุโรคใบจุดพืชวงศ์กะหล่ำ

จากการทดสอบทดสอบประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ 5 ชนิด ได้แก่ น้ำส้มควันไม้จากไม้ลำไย ยูคาลิปตัส ไม้ไผ่ ยางพารา และมะพร้าว ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. brassicicola* ไอโซเลท Aco_MBo1 สาเหตุโรคใบจุดวงศ์กะหล่ำ โดยเปรียบเทียบประสิทธิ ภาพกับกรด acetic acid และน้ำส้มสายชูที่ใช้ทางการค้าด้วยวิธี poison food technique และทดสอบเพื่อหาค่า MIC เบื้องต้น พบว่าน้ำส้มควันไม้จากลำไยที่ความเข้มข้น 3% (v/v) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราสาเหตุเท่ากับ 68.9% และความเข้มข้นมากกว่า 4% (v/v) ขึ้นไป มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราสาเหตุ 100% น้ำส้มควันไม้จากยูคาลิปตัสที่ความเข้มข้น 1% (v/v) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราสาเหตุที่ 31.1% และความเข้มข้นมากกว่า 2% (v/v) ขึ้นไปมีประสิทธิภาพการยับยั้งเท่ากับ 100% น้ำส้มควันจากไม้ไผ่ที่ความเข้มข้น 1% (v/v) ขึ้นไป มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราสาเหตุเท่ากับ 100% น้ำส้มควันไม้จากยางพาราที่ความเข้มข้น 1% (v/v) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราสาเหตุเท่ากับ 46.7% และความเข้มข้นมากกว่า 2% (v/v) ขึ้นไป มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราสาเหตุเท่ากับ 100% น้ำส้มควันไม้จากมะพร้าวที่ความเข้มข้น 1% (v/v) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราสาเหตุเท่ากับ 63.3% และความเข้มข้นมากกว่า 2% (v/v) ขึ้นไป มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราสาเหตุเท่ากับ 100% กรด acetic acid ตั้งแต่ความเข้มข้น 1% (v/v) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราสาเหตุเท่ากับ 100% และน้ำส้มสายชูที่ใช้ทางการค้าที่ความเข้มข้น 1% (v/v) ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราสาเหตุได้ และที่ความเข้มข้น 2% (v/v) ขึ้นไป มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราสาเหตุเท่ากับ 100% (Table 1)

หลังจากนั้นจึงได้ทำการทดสอบหาค่า MIC โดยละเอียด พบว่าจากน้ำส้มควันไม้ 5 ชนิด น้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ มีประสิทธิภาพสูงสุด เนื่องจากมีค่า MIC ต่ำสุด เท่ากับ 0.5% (v/v) รองลงมาคือน้ำส้มควันไม้จากไม้มะพร้าว ยางพารา ยูคาลิปตัส และลำไย ตามลำดับ มีค่า MIC เท่ากับ 1.0 1.5 2.0 และ 3.7 % (v/v) ตามลำดับ ในขณะที่กรด acetic acid และน้ำส้มสายชูที่ใช้ทางการค้า พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 0.2 และ 1.9% (v/v) ตามลำดับ (Table 2 and Figure 1) โดยน้ำส้มควันไม้สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการงอกของสปอร์เชื้อราได้ เนื่องจากน้ำส้มควันไม้เป็นสารผสมที่มีกรดอินทรีย์อยู่เป็นจำนวนมากกว่า 200 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย acetic acid (กรดน้ำส้ม) เป็นส่วนใหญ่ (Jirapong, 2009)

3. ทดสอบประสิทธิภาพน้ำส้มควันไม้ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดพืชวงศ์กะหล่ำ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ 5 ชนิด ได้แก่ น้ำส้มควันไม้จากไม้ลำไย

ยูคาลิปตัส ไม้ไผ่ยางพารา และมะพร้าว ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. brassicicola* ไอโซเลท Aco_MBo1 สาเหตุโรคใบจุดวงศ์กะหล่ำ โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับกรด acetic acid และน้ำส้มสายชูที่ใช้ทางการค้า ด้วยวิธี slide culture ที่ 2 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้นที่ค่า MIC และความเข้มข้นสองเท่าของค่า MIC (x2MIC) แล้วตรวจวัดผลหลังการทดสอบที่เวลา 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าสารทดสอบทั้งหมดที่ความเข้มข้น x2 MIC มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราดีกว่าความเข้มข้นที่ค่า MIC

โดยพบว่าภายหลังการทดสอบ 24 ชั่วโมง น้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ที่ความเข้มข้น x2 MIC (1.0%) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราเท่ากับ 59.58% รองลงมาได้แก่น้ำส้มควันไม้จากยูคาลิปตัสที่ความเข้มข้น x2 MIC (4.0%) ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้เท่ากับ 50.00% เมื่อเทียบกับกรด acetic acid ที่ความเข้มข้น x2 MIC (0.4%) ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้เท่ากับ 57.33% ในขณะที่น้ำส้มควันไม้ชนิดอื่นๆ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราเท่ากับ 00.00 – 31.33% (Table 3) ส่วนภายหลังการทดสอบที่ 12 ชั่วโมง พบว่า น้ำส้มควันไม้ที่ความเข้มข้น x2 MIC มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราเท่ากับ 100.00% ได้แก่ ยูคาลิปตัส (ความเข้มข้น 4.0%) และยางพารา (ความเข้มข้น 3.0%) เมื่อเทียบกับกรด acetic acid (ความเข้มข้น 0.4%) รองลงมาได้แก่น้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ที่ความเข้มข้น x2 MIC (1.0%) ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้เท่ากับ 59.59% (Table 3)

สำหรับน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัสที่ความเข้มข้น x2 MIC (4.0%) พบว่าภายหลังการทดสอบที่เวลา 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราเท่ากับ 100.00 100.00 100.00 และ 50.00% ตามลำดับ นอกจากนี้น้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ที่ความเข้มข้น x2 MIC (1.0%) พบว่าภายหลังการทดสอบที่เวลา 6 9 12 และ 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราเท่ากับ 100.00 59.89 59.59 และ 59.58% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกรด acetic acid ที่ความเข้มข้น x2 MIC (0.4%) มีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราเท่ากับ 100.00 100.00 100.00 และ 57.33 % ตามลำดับ (Table 3)

Table 1 Efficacy of 5 wood vinegarson growth inhibit of *Alternaria brassicicola* isolate Aco_MBo1, causing leaf spot of brassicas, comparing with acetic acid and commercial vinegar mixed with potato dextrose agar at 1 – 5% (v/v) concentrations after 10 days of inoculation

Sources of vinegar	Mycelium growth inhibition (%) of fungal pathogen[1/]				
	Concentration% (v/v)				
	1	2	3	4	5
bamboo	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
coconut	63.33	100.00	100.00	100.00	100.00
rubber	46.67	100.00	100.00	100.00	100.00
eucalyptus	31.11	100.00	100.00	100.00	100.00
longan	0.00	25.56	68.89	100.00	100.00
acetic acid	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
commercial vinegar	0.00	100.00	100.00	100.00	100.00

[1/]Means of 4 replications from each treatment

Table 2 Efficacy of 5 wood vinegarson growth inhibit of *Alternaria brassicicola* isolate Aco_MBo1, causing leaf spot of brassicas, comparing with acetic acid and commercial vinegar mixed with potato dextrose agar for the minimal inhibitory concentration (MIC) after 10 days of inoculation

Sources of vinegar	pH	Concentration (% v/v)	Percentage of growth inhibition (%)[1/]	MIC[2/]
bamboo	3.07	0.3	30.93	
		0.4	58.89	
		0.5	100.0	✓
coconut	2.44	0.8	26.11	
		0.9	61.85	
		1.0	100.0	✓
rubber	2.04	1.3	82.96	
		1.4	90.00	
		1.5	100.0	✓
eucalyptus	3.42	1.8	0.000	
		1.9	15.00	
		2.0	100.0	✓
longan	3.61	3.5	10.37	
		3.6	36.29	
		3.7	100.0	✓
acetic acid	0.17	0.1	47.59	
		0.2	100.0	✓
		0.3	100.0	
commercial vinegar	2.42	1.7	31.29	
		1.8	52.96	
		1.9	100.0	✓

[1/] Means of 4 replications from each treatment
[2/] ✓ =Minimal inhibitory concentration (MIC)

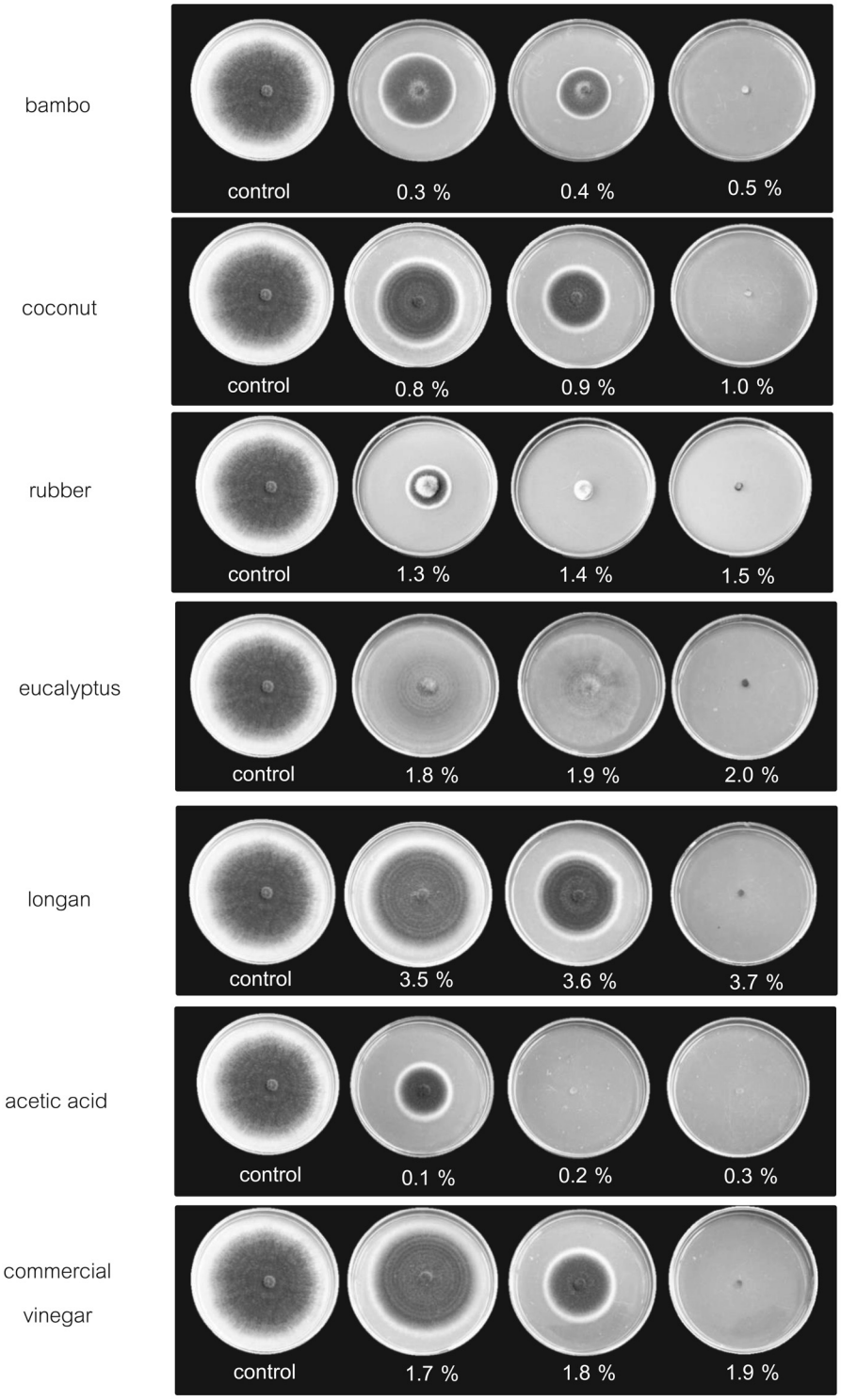

Figure 1 Efficacy of 5 wood vinegarson growth inhibit of *Alternaria brassicicola* isolate Aco_MBo1, causing leaf spot of brassicas, comparing with acetic acid and commercial vinegar mixed with potato dextrose agar for the minimal inhibitory concentration (MIC) after 10 days of inoculation

เมื่อวัดความยาว germ tube ของสปอร์ภายหลังการทดสอบ 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น MIC ของน้ำส้มควันไม้ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ลำไย ยูคาลิปตัส ไม้ไผ่ ยางพารา และมะพร้าว วัดความยาวได้เท่ากับ 27.67 22.10 15.43 14.83 และ 32.07 µm ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่วัดความยาวได้เท่ากับ 44.53 µm ส่วนที่ความเข้มข้น x2 MIC ของน้ำส้มควันไม้ 4 ชนิด ได้แก่ ลำไย ยูคาลิปตัส ไม้ไผ่ และยางพารา ไม่พบการงอก germ tube ของสปอร์ (Table 4) และเมื่อวัดความยาว germ tube ของสปอร์ภายหลังการทดสอบ 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น MIC ของน้ำส้มควันไม้ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ลำไย ยูคาลิปตัส ไม้ไผ่ ยางพารา และมะพร้าว วัดความยาวได้เท่ากับ 74.60 71.67 77.10 72.93 และ 92.30 µm ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่วัดความยาวได้เท่ากับ 184.00 µm ส่วนที่ความเข้มข้น x2 MIC ของน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัส ยางพารา และกรด acetic acid ไม่พบการงอก germ tube ของสปอร์ (Table 4) นอกจากนี้เมื่อวัดความยาว germ tube ของสปอร์ภายหลังการทดสอบ 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น MIC ของน้ำส้มควันไม้ทั้ง 5 ชนิด และในชุดควบคุม พบว่าสปอร์งอก germ tube และพัฒนาเป็นเส้นใยจนไม่สามารถวัดความยาวได้ (∞) ส่วนที่ความเข้มข้น x2 MIC ของน้ำส้มควันไม้ลำไย ไม้ไผ่ และมะพร้าว พบว่าสปอร์งอก germ tube และพัฒนาเป็นเส้นใยจนไม่สามารถวัดความยาวได้ (∞) อย่างไรก็ตามน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัส ยางพารา และกรด acetic acid วัดความยาว germ tube ของสปอร์ได้เท่ากับ 114.10 73.50 และ 146.90 µm ตามลำดับ (Table 4) ซึ่งสอดคล้องกับ Yoshimoto (1994) พบว่า เมื่อนำสปอร์เชื้อรามาจุ่มน้ำส้มควันไม้ที่ความเข้มข้น 1 ต่อน้ำ 10 ลิตร ด้วยวิธีจุ่มสปอร์เชื้อราในน้ำส้มควันไม้ พบว่าไม่สามารถยับยั้งสปอร์เชื้อราได้ในเวลา 4 ชั่วโมงหลังจากการทดสอบ แต่สามารถยับยั้งการงอกโคนิเดียเชื้อราได้หลังจากจุ่มในน้ำส้มควันไม้เป็นเวลา 1 อาทิตย์ ซึ่งมีผลทำให้เชื้อราได้ลดจำนวนการงอกของโคนิเดียลงครึ่งหนึ่ง การเลือกใช้น้ำส้มควันไม้ในเพื่อใช้ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา เนื่องจากน้ำส้มควันไม้เป็นสารผสมที่มีกรดอินทรีย์อยู่เป็นจำนวนมากกว่า 200 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย acetic acid (กรดน้ำส้ม) เป็นส่วนใหญ่ (Jirapong, 2009) ดังนั้นจึงได้คัดเลือกกรด acetic acid และน้ำส้มสายชูที่ใช้ทางการค้าเป็นสารเปรียบเทียบในงานวิจัย โดยพบว่าน้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่มีประสิทธิภาพสูงสุด เนื่องจากความเข้มข้นที่ค่า MIC (0.5%) ต่ำสุด ซึ่งมีประสิทธิภาพต่ำกว่ากรด acetic acid ความเข้มข้นที่ MIC (0.2%) แต่มีประสิทธิภาพสูงกว่าน้ำส้มสายชูที่ใช้ทางการค้าความเข้มข้นที่ค่า MIC (1.9%) เมื่อคำนึงถึงการใช้สารทดสอบควบคุมโรคในสภาพแปลงปลูก กรด acetic acid มีความเป็นกรดสูงมาก (pH 0.17) ซึ่งอาจทำอันตรายให้แก่เกษตรกรผู้ใช้ได้ หากมีความรู้ไม่เพียงพอ หรือขาดความชำนาญ อาจส่งผลกระทบต่อเยื่อโพรงจมูกเมื่อสูดดมเป็นจำนวนมาก โดยกรด acetic acid ไม่สามารถไล่แมลงพาหะเชื้อโรคพืชเข้าสู่แปลงปลูกได้ แต่หากเปรียบเทียบกับการใช้น้ำส้มควันไม้จะมีประสิทธิภาพไล่แมลงพาหะโรคพืชได้และไม่เกิดอันตรายต่อเกษตรกรผู้ใช้ เนื่องจากมีความเป็นกรดน้อยกว่า กรด acetic acid โดยกรด

Table 3 Efficacy of 5 wood vinegars on inhibition of spore germination of *Alternaria brassicicola* isolate Aco_MBo1 causing leaf spot of brassicas at 6, 9, 12 and 24 hrcomparingto acetic acid and commercial vinegar mixed with potato dextrose agar for the minimal inhibitory concentration (MIC) and double concentrations (x2 MIC)

Sources of vinegar	Concentration[3/] (% v/v)	Spores germinate inhibition (%)[1/]			
		6 hr	9 hr	12 hr	24 hr
bamboo	0.5[A]	66.25 [b]	39.53 [d]	0.00 [d]	0.00 [d]
	1.0[B]	100.00 [a]	59.89 [b]	59.59 [b]	59.58 [a]
eucalyptus	2.0[A]	38.00 [c]	0.00 [f]	0.00 [d]	0.00 [d]
	4.0[B]	100.00 [a]	100.00 [a]	100.00 [a]	50.00 [b]
rubber	1.5[A]	36.84 [c]	19.16 [e]	0.00 [d]	0.00 [d]
	3.0[B]	100.00 [a]	100.00 [a]	100.00 [a]	0.00 [d]
longan	3.7[A]	30.67 [d2/]	0.00 [f]	0.00 [d]	0.00 [d]
	7.4[B]	100.00 [a]	47.33 [c]	31.33 [c]	31.33 [c]
coconut	1.0[A]	23.99 [e]	0.00 [f]	0.00 [d]	0.00 [d]
	2.0[B]	36.35 [c]	0.00 [f]	0.00 [d]	0.00 [d]
acetic acid	0.2[A]	0.000 [f]	0.00 [f]	0.00 [d]	0.00 [d]
	0.4[B]	100.00 [a]	100.00 [a]	100.00 [a]	57.33 [a]
commercialvinegar	1.9[A]	0.00 [f]	0.00 [f]	0.00 [d]	0.00 [d]
	3.8[B]	0.00 [f]	0.00 [f]	0.00 [d]	0.00 [d]
F-Test		***	***	***	***
$LSD_{0.05}$		2.90	3.13	2.37	3.61
%CV		3.84	9.88	5.06	15.28

[1/]Means of 4 replications from each treatment

[2/]Means followed by the same letter in each column are not significantly different by LSD (P = 0.05)

[3/]Concentration: A = Minimal inhibitory concentration (MIC) and B = Double minimal inhibitory concentration (x2 MIC)

Table 4 Efficacy of 5 wood vinegars on germ tube length of *Alternaria brassicicola* isolate Aco_MBo1, causing leaf spot of brassicas at 6, 9, 12 and 24 hr comparing to acetic acid and commercial vinegar mixed with potato dextrose agar for the minimal inhibitory concentration (MIC) and double concentrations (x2 MIC)

Sources of vinegar	Concentration[3/] (%v/v)	Germ tube length of pathogen (μm)[1/]			
		6 hr	9 hr	12 hr	24 hr
control	0.0	44.53 i[2/]	91.73 l	184.00 j	∞
bamboo	0.5[A]	15.43 g	18.00 i	77.10 d	∞
	1.0[B]	00.00 h	15.06 j	50.13 g	∞
eucalyptus	2.0[A]	22.10 e	52.90 c	71.67 f	∞
	4.0[B]	00.00 h	00.00 k	00.00 i	114.10 b
rubber	1.5[A]	14.83 g	35.43 h	72.93 ef	∞
	3.0[B]	00.00 h	00.00 k	00.00 i	73.50 c
longan	3.7[A]	27.67 d	47.27 d	74.60 de	∞
	7.4[B]	00.00 h	37.30 g	44.27 h	∞
coconut	1.0[A]	32.07 b	70.27 b	92.30 c	∞
	2.0[B]	15.30 g	44.80 e	73.37 ef	∞
acetic acid	0.2[A]	20.43 f	41.53 f	71.40 f	∞
	0.4[B]	00.00 h	00.00 k	00.00 i	146.90 a
commercial vinegar	1.9[A]	37.20 a	74.13 a	124.30 a	∞
	3.8[B]	29.47 c	72.33 a	101.60 b	∞
F-Test		***	***	***	***
$LSD_{0.05}$		1.45	1.85	2.90	8.23
CV%		5.64	3.05	2.84	3.70

[1/] Means of 4 replications from each treatment

[2/] Means followed by the same letter in each column are not significantly different by LSD (P = 0.05)

[3/] Concentration: A = Minimal inhibitory concentration (MIC) and B = Double minimal inhibitory concentration (x2 MIC)

ส่วนใหญ่ของน้ำส้มควันไม้มักเป็นสารในกลุ่ม phenol และสารอื่นๆ ที่เป็น organic substances (Souza *et al*., 2012) ดังนั้นจากการทดสอบน้ำส้มควันไม้ทั้ง 5 ชนิด ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรค ในงานวิจัยนี้ จากประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา รวมถึงการวัดความยาว germ tube คณะผู้วิจัยแนะนำให้คัดเลือกน้ำส้มควันไม้จากยูคาลิปตัส และยางพารา ไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป โดยอาจจะทดสอบประสิทธิภาพใน

การยับยั้งโรคพืชบนผลผลิตทางการเกษตรโดยตรง หรืออาจจะเป็นการทดสอบในแปลงปลูกเพื่อเป็นแนวทางการควบคุมโรคโดยชีววิธีต่อไป

4. ทดสอบความเป็นพิษของน้ำส้มควันไม้ต่อพืช

ทดสอบความเป็นพิษของน้ำส้มควันไม้ 5 ชนิด โดยใช้น้ำส้มสายชูที่ใช้ทางการค้า และกรด acetic acid เป็นชุดควบคุม ที่ระดับความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5% (v/v) ตามลำดับ โดยทดสอบฉีดพ่นกับคะน้า ผักกาดขาวที่อายุ 45 วันหลังย้ายปลูก พบว่าที่ความเข้มข้น 1 – 5% (v/v) ของน้ำส้มควันไม้ 5 ชนิด กรด acetic acid และน้ำส้มสายชูทางการค้า ไม่เป็นพิษ และไม่ทำให้พืชเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ของผักคะน้า และผักกาดขาว เช่น ใบไหม้ ใบงอ ลำต้นแคระแกรน เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ฉีดพ่นน้ำกลั่น

สรุป

งานวิจัยนี้ได้แสดงถึงประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ ลำไย ยูคาลิปตัส ไม้ไผ่ ยางพารา และมะพร้าว ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย การงอกของสปอร์ และผลต่อความยาว germ tube ของสปอร์เชื้อรา *Alternaria brassicicola* ไอโซเลท Aco_MBo1 สาเหตุโรคใบจุดวงศ์กะหล่ำ ซึ่งเป็นไอโซเลทที่สามารถก่อโรคได้รุนแรงที่สุดจากเชื้อราจำนวน 32 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบกับกรด acetic acid และน้ำส้มสายชูที่ใช้ทางการค้า ผลการทดสอบทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าน้ำส้มควันไม้ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราได้ 100% ได้แก่น้ำส้มควันไม้ไผ่ มะพร้าว ยางพารา และยูคาลิปตัสที่ความเข้มข้น MIC เท่ากับ 0.5 1.0 1.5 และ 2.0% ตามลำดับ สำหรับน้ำส้มควันไม้ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอก germ tube ของสปอร์เชื้อรา ได้แก่ น้ำส้มควันไม้จากไม้ไผ่ และยูคาลิปตัส ที่ความเข้มข้น x2 MIC (1.0 และ 4.0% ตามลำดับ) พบประสิทธิภาพยับยั้งการงอกได้เท่ากับ 59.58 และ 50.00% ภายหลังการทดสอบ 24 ชั่วโมง นอกจากนี้เมื่อทดสอบความเป็นพิษที่ระดับความเข้มข้น 1 – 5% (v/v) ของน้ำส้มควันไม้ทั้ง 5 ชนิดและสารทดสอบพบว่าไม่เป็นพิษต่อพืชทดสอบ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช สาขาโรคพืชที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์การทดลองต่างๆและเรือนปลูกทดลอง (เรือนกระจก) โครงการวิจัย ได้รับทุนสนับสนุนทุนวิจัยจากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

Agrios, G. N. 1997. Plant Pathology, 4th edition. Academic Press. San Diego, CA.

Benjarach Tongyerm, Narongchai Piputthanawong, Nikom Lamsak, Noulprang Yaitakhob, Sawithree Thiwong, Sompon Wongkit, Wirat Prapthuk and Kittisak Jindawong. 2005. Useful Wood Vinegar with Fruit Product Extention in Royal Project area. Royal Project, 31 pp. (in Thai)

Chanai Yodphet. 1993. Cruciferous Crop. Lincorn Printery, Bangkok. 195 pp. (in Thai)

Ervina, M., A. Yandra, N. Erliza and A.A. Noer. 2013. Potential products of coconut shell wood vinegar. RJPBCS. 4(4): 1480 – 1493.

Jirapong, K. 2009. Production of charcoal and wood vinagar. Edition 2. Bangkok, offset creation company. 80 pp. (in Thai)

Jung, K.H. 2007. Growth inhibition effect of pyroligneous acid on pathogenic fungus, *Alternaraimali*, the agent of alternaria blotch of apple. Biotech. and Bioproc. Engineering. 12:318 – 322.

Kumar, D., N. Maurya, K.Y. Bharati, A. Kumar, K. Kumar, K. Srivastava, G. Chand, C. Kushwaha, K.S. Singh, K.R. Mishra and A. Kumar. Alternaria blight of oilseed Brassicas: A comprehansive review. African J. Microbio. Res. 8(30): 2816 - 2829.

Kwanuruern Mala. 2004. Comparable efficacy of herbal extract of galangal, long peper and litseacubeba oil in controlling ring spot and leaf spot diseases of brassica group. Spcial problem Department of Plant Pathology. Faculty of Agriculture. Chiangmai University, Chiang Mai. 38 pp. (in Thai)

Li, X.G., L.H. Han, S.Q. Wu, R.Z. Piao and H.F. Liu. 2014. Inhibitoion effects of wood vinegar on *Alternaria panax* and *Botrytis cinerea*. Zhong Yao Cai. 38(9): 1525 - 1533.

Orapan Wishetsung and Jumpon Saranak. 1990. Documentation Seminar Discussion diseases problem. Limited partnership Chaongprintery, Bangkok. 87 pp. (in Thai)

Sombat Srichuwong, Sawai Buranapanichpan and Chuanpitboon Chitsirikul. 2002. Study behavior using pesticide of northern district farmer and pesticide residues in environment of brassica group. Research report. 46 pp. (in Thai)

Souza, J.B.G., N. Poppi-Re and J.L. Jr. Raposo. 2012. Characterization of Pyroligneous Acid used in agriculture by gas chromatography - mass spectrometry. J. Braz. Chem. Soc. 23(4): 610-617.

Teik, K.G. 1999. Single - spore isolation using a hand - made glass needle. Fungal Diversity 2: 47 - 63.

Thammasaksommart. 2000. Chemical protect plant diseases. Edition 3. Lincorn Printery, Bangkok. 317 pp. (in Thai)

Yanyong, C. and P. Sukhumwat. 2009. Wood vinegar: by - product from rural charcoal kiln and its role in plant protection. As. J. Food Ag-Ind. Special Issue, 189 - 195.

Yoshimoto, T. 1994. Present Status of Wood Vinegar Studies in Japan for Agricultural Usage. Taichung District Agricultural Improvement Station In association with The Society for the Advancement of Breeding Researches in Asia and Oceania. 811 - 820.