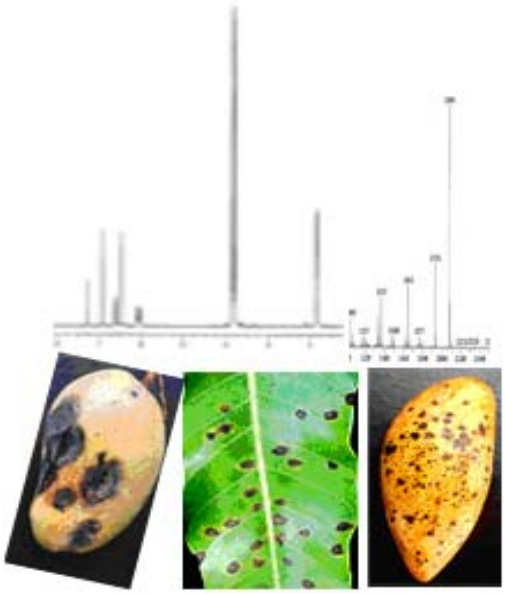
รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

# ฤทธิ์ของสารสำคัญจากพืชสมุนไพรในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง

# Effective of the Active Compounds from Medicinal Plants to Control Anthracnose Disease in Mango



รศ. ดร. วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล

ดร. ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กำแพงแสน นครปฐม

พ.ศ. 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

# ฤทธิ์ของสารสำคัญจากพืชสมุนไพรในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง

# Effective of the Active Compounds from Medicinal Plants to Control Anthracnose Disease in Mango

รศ. ดร. วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล

ดร. ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กำแพงแสน นครปฐม

พ.ศ. 2548

# กิตติกรรมประกาศ


- ผลงานวิจัยนี้สำเร็จได้โดยการสนับสนุนด้านงบวิจัยจาก โครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ภายใต้ความช่วยเหลือของธนาคารพัฒนาแห่งเอเชีย (ADB)
- คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.รุ่งนภา ก่อประดิษฐ์สกุล ที่มีส่วนให้คำแนะนำการเขียนและการวิจารณ์ในรายงานบางส่วน

# สารบัญเรื่อง


| | | หน้า |
|---|---|---|
| คำนำ | | 1 |
| วัตถุประสงค์ | | 2 |
| บทที่ 1 | พืชที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เพื่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในผลมะม่วง | 3 |
| บทที่ 2 | การรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และอาการโรคแอนแทรคโนสในผลมะม่วง | 12 |
| บทที่ 3 | การคัดเลือกวิธีการทดสอบสารสกัดในการควบคุมโรค | 20 |
| บทที่ 4 | การพัฒนาวิธีการสกัดสาร และตรวจสอบชนิดของสารออกฤทธิ์ | 28 |
| บทที่ 5 | องค์ความรู้ และการเผยแพร่ | 48 |
| บทที่ 6 | เอกสารอ้างอิง | 53 |

## คำนำ

ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกมะม่วงประมาณ 1.72 ล้านไร่ (เปรมปรี, 2540) มะม่วงที่ปลูกเป็นมะม่วงที่ใช้รับประทานทั้งผลดิบและผลสุก โดยพันธุ์ที่นิยมใช้รับประทานดิบได้แก่ มะม่วงพันธุ์เขียวเสวย แรด ฟ้าลั่น และหนองแซง สำหรับมะม่วงที่ใช้รับประทานสุกได้แก่ มะม่วงพันธุ์ น้ำดอกไม้ ทองดำ และหนังกลางวัน โดยคุณภาพของมะม่วงที่ดีควรมีความแก่จัด ผลสะอาด รูปร่างดี ปราศจากอาการช้ำ หรืออาการของโรคแอนแทรคโนส

ปัจจุบันประเทศไทยมีการส่งออกผลมะม่วงน้ำดอกไม้ออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศมากขึ้น เพราะมีรูปทรง สีสันที่สวยงาม และรสชาดที่หวาน หอม อร่อย แต่ปัญหาที่สำคัญของการส่งออกคือ ความเสียหายที่เกิดจากโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งทำให้ผลเน่าระหว่างการขนส่ง และจำหน่าย (นิพนธ์ และคณะ, 2539) ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสวิธีที่นิยมมากที่สุดตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน คือการใช้สารเคมี benomyl และ carbendazim การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราติดต่อกันเป็นเวลานานทำให้เชื้อรามีการพัฒนาด้านความต้านทานต่อสารเคมีได้ ทำให้การใช้สารเคมีต่อเนื่องจำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นหรือเปลี่ยนสารเคมีที่ใช้ไปเรื่อยๆ ดังนั้นการควบคุมโรคจึงเกิดความล้มเหลว (Griffee, 1973) สำหรับสารเคมีที่นิยมใช้ชุบผลมะม่วงเพื่อควบคุมโรคเป็นสารในกลุ่ม Thiabendazole ได้แก่ benomyl และ carbendazim นั้นจะพบว่าเป็นปัญหาต่อการส่งออก เนื่องจากผลของสารพิษตกค้างทำให้เชื้อราสามารถสร้างความต้านทานได้ และมีพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม

การหาแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนส โดยหาสารจากธรรมชาติมาใช้ควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงแทนการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช จะเป็นการช่วยลดปัญหาสารเคมีตกค้างในสภาพแวดล้อมดี จากการศึกษาของวัชระ (2535) พบว่าสารสกัดของทองพันชั่งที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ บนอาหาร PDA สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่ระยะเวลา 10 วัน ได้ 66.77 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสารสกัดจากพืชชนิดอื่นๆ ผ่องเพ็ญและคณะ (2542) พบว่าสารสกัดว่านน้ำ โป๊ยกั๊ก ยาสูบ และหมากสง สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ โดยจะแสดงผลในการยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ดีกว่าการเจริญของเส้นใย และจากผลการวิจัยของจรัส (2537) ได้ใช้สมุนไพรผงกานพลู และโป๊ยกั๊ก เพื่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคหลังเก็บเกี่ยวของมะม่วง พบว่ากานพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5,000 ppm ขึ้นไป กรรณิกา (2540) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของ

กระเทียม หอมแดง สาบเสือ มะกรูด และหอมใหญ่ ในการยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์ของเชื้อรา สองชนิด คือ *C. gloeosporioides* และ *Fusarium* sp. โดยใช้น้ำหนักสดของพืชสมุนไพรแต่ละชนิด 1, 5 และ 10 กรัม ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์เชื้อราพบว่าสารสกัดที่แสดงประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราทดสอบได้ดีที่สุดคือกระเทียม รองมาคือหอมใหญ่

ในงานวิจัยครั้งนี้ ทางผู้วิจัยได้รวบรวมสารสกัดจากพืชที่มีรายงานด้านประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค หรือ สามารถควบคุมอาการของโรคแอนแทรคโนสได้ผลดี พืชสมุนไพรในกลุ่มดังกล่าวจะนำมาเปรียบเทียบเพื่อคัดเลือกหาชนิดที่สามารถควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงน้ำดอกไม้ และศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญจากพืชสมุนไพรที่สามารถออกฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides*

## วัตถุประสงค์โครงการ

1. เพื่อรวบรวมพืชที่มีรายงานทางด้านการออกฤทธิ์ต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เช่น ว่านน้ำ ทองพันชั่ง หรือพืชที่มีรายงานฤทธิ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในผลมะม่วง
2. พัฒนาวิธีการสกัดสารและทดสอบสารออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง
3. ตรวจสอบชนิดของสารออกฤทธิ์จากสารสกัดพืชสมุนไพร
4. พัฒนาการใช้สารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพรที่ดีที่สุด เพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว
5. การถ่ายทอดความรู้เรื่องการใช้สารสกัดพืชในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วง

# บทที่ 1
# พืชที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เพื่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในผลมะม่วง

พืชแต่ละสกุลมีความหลากหลายทางรูปร่าง ลักษณะที่แตกต่างกัน และพืชแต่ละชนิดจะมีการผลิตสารที่ต่างชนิดกันในแต่ละชนิดของพืช การรายงานถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชหลายๆชนิดที่มีต่อเชื้อรานั้นได้มีมานาน การศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสได้มีรายงานอย่างต่อเนื่อง เช่น การศึกษาพืชพื้นบ้านทางภาคอิสานในด้านการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* รวมไปถึงการรายงานผลการศึกษาจากสถานศึกษาหรือหน่วยปฏิบัติการโรคพืชต่างๆเกี่ยวกับการปรับใช้และผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดต่างๆในการควบคุมโรคและเชื้อราสาเหตุโรค

การควบคุมโรคแอนแทรคโนสในผลมะม่วงจะมีการใช้ระบบการควบคุมด้วยไอน้ำอุ่น หรือการใช้สารเคมีชุบผลมะม่วง ดังเช่นการใช้ Carbendazim , Benomyl และ Mancozeb ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้กันมานานแล้ว แต่ในปัจจุบันผู้บริโภคได้เล็งเห็นถึงความปลอดภัยของอาหารกันมากขึ้น โดยเฉพาะในยุโรปซึ่งเป็นตลาดที่มีการส่งออกไปมาก ดังนั้นการใช้สารเคมีเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสจึงเป็นข้อจำกัด การตรวจหาพืชที่สามารถสร้างสารเพื่อยับยั้งการเกิดโรคบนผลมะม่วงจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่มีผู้สนใจกันมาก ในประเทศไทยก็ได้มีรายงานเกี่ยวพืชที่สามารถผลิตสารที่สามารถยับยั้งการเกิดโรค หรือยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงได้ เช่น ทองพันชั่ง ข่า พลู ไพล หอม กระเทียม กระทือ เทียนกิ่ง โป๊ยกั๊ก กานพลู มะม่วงหิมพานต์ ประยงค์ ขมิ้น ดีปลี เปลือกมังคุด และยังมีอื่นๆ อีกมากที่ไม่ได้กล่าวถึง

ในการศึกษาพืชสมุนไพรชนิดต่างๆในบทนี้ เป็นการรวบรวมพืชสมุนไพรที่เคยมีรายงานการทดสอบประสิทธิภาพเพื่อควบคุมเชื้อรา และควบคุมโรคของพืช โดยมีเป้าประสงค์ที่จะคัดเลือกชนิดของพืชที่สามารถควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้

## ขั้นตอนในการศึกษา

***1. การคัดเลือกหาสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Colletotrichum gloeosporioides***

จากการสืบค้นเอกสาร ทางผู้วิจัยได้คัดเลือกพืชสมุนไพร 12 ชนิดที่ได้มีรายงานประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชมาบ้างแล้ว ได้แก่ ว่านน้ำ, เร่วหอม, เทียนกิ่ง, กระทือ, พลู, ขมิ้นชัน, กระเทียม, มังคุด, ทองพันชั่ง, ขิง, โป๊ยกั๊ก และ ไพล พืชแต่ละชนิดจะนำมาสกัดหยาบเพื่อเตรียมสารที่สกัดได้ไว้ใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว บนอาหารทดสอบ PDA

***2. การเตรียมสารสกัดหยาบพืชสมุนไพร 12 ชนิด***

สมุนไพรแห้งที่เตรียมไว้จำนวน 500 กรัม จะนำมาแช่ในเอทธิลแอลกอฮอล์ จำนวน 2- 5 ลิตร เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบกำหนดแล้วให้นำไปกรองแยกกากพืชออก นำส่วนของสารละลายที่กรองได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary Evaporator เก็บส่วนของสารสกัดหยาบ (crude extract) เป็นส่วนที่ 1 สำหรับกากพืชที่เหลือจะนำไปแช่ด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์อีกครั้ง จะได้สารสกัดหยาบส่วนที่ 2 นำสารทั้ง 2 ส่วนมารวมกัน และเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อการทดลองต่อไป

***3. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช***

เก็บตัวอย่างมะม่วงที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสจากส่วนต่างๆ เช่น ดอก ใบ และผล มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยนำชิ้นส่วนพืชที่แสดงอาการโรคตัดเป็นชิ้นขนาด 1x1 เซนติเมตร แช่ด้วยสารละลายคลอ - ร๊อก 10 เปอร์เซ็นต์นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหาร water agar (WA) ประมาณ 3 วัน แล้วตัดบริเวณปลายเส้นใยมาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมถ่ายรูปประกอบ และเก็บเชื้อไว้ในหลอดอาหาร PDA เพื่อไว้ใช้ทดลองต่อไป

***4. การวางแผนการทดลองและประสิทธิภาพการยับยั้ง***

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 5 ซ้ำ บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แล้วผสมสารสกัดหยาบ ที่ความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm แล้วใช้ cork borer เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เลี้ยงไว้บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน ย้ายมาวางบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารสกัดดังกล่าว แล้วนำไปบ่มในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน วัดขนาดโคโลนีของเชื้อ

ที่เจริญในอาหารผสมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับ control (ที่ไม่ผสมสารสกัด) และสารเคมีเบนโนมิล (ผ่องเพ็ญ และคณะ, 2542) บันทึกผลการทดลองและหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต

$$\text{เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต} = \left( \frac{A - B}{A} \right) \times 100$$

A = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อใน control

B = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัด

## ผลการศึกษา

จากการคัดเลือกพืชสมุนไพร 12 ชนิด ได้แก่ ว่านน้ำ, เร่วหอม, เทียนกิ่ง, กระทือ, พลู, ขมิ้นชัน, กระเทียม, มังคุด, ทองพันชั่ง, ขิง, โป๊ยกั๊ก และ ไพล (Table 1) เพื่อนำมาสกัดด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์จนได้สารสกัดหยาบ และนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว โดยทดสอบสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) พบว่าที่ความเข้มข้น 1000 ppm สารสกัดหยาบจากว่านน้ำสามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อได้ดีที่สุด โดยโคโลนีของเชื้อสามารถเจริญได้ 2.32 เซนติเมตร และสามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีได้ 74.44 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ ไพล ขิง เทียนกิ่ง และกระทือ มีขนาดโคโลนีเท่ากับ 3.93, 4.15, 4.48 และ 4.48 เซนติเมตร มีการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเท่ากับ 56.33, 53.88, 50.22 และ 50.22 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อเทียบกับเบนโนมิล พบว่าที่ความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 ppm โคโลนีสามารถเจริญได้เท่ากับ 4.90, 2.52, 0.93 เซนติเมตร และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 45.56, 72.00 และ 89.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Table 2 และ Table 3)

Table 1 Local names and scientific names of tested medicinal plants.

| Local name | Scientific name | picture |
|---|---|---|
| ว่านน้ำ (เหง้า) | *Acorus calamus* L. | |
| เร่วหอม (เหง้า) | *Amomum santhioides* Wall. | |
| เทียนกิ่ง (ใบ) | *Lawsonia inermis* | |
| กระทือ (เหง้า) | *Zingiber zerumbet* Smith L. | |
| พลู (ใบ) | *Piper betel* L. | |
| ขมิ้นชัน (เหง้า) | *Curcuma longa* L. | |

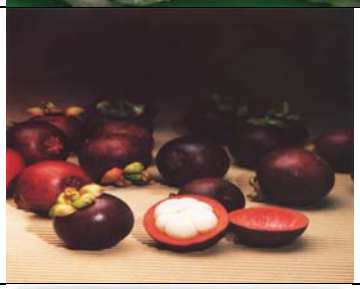
| | | |
|---|---|---|
| กระเทียม (หัว) | *Allium sativum L.* | |
| มังคุด (เปลือก) | *Garcinia mangostana L.* |  |
| ทองพันชั่ง (ใบ) | *Rhinacathus nasutus L.* | |
| ขิง (เหง้า) | *Zingiber offcinale vern.Adrak* | |
| โป๊ยกั๊ก (ดอก) | *Hilcium verum Hook.f.* | |
| ไพล (เหง้า) | *Zingiber montunum Koen.* | ไพล |

Table 2 Effect of crude extracts from 12 medicinal plants on the inhibition mycerial growth of *Colletotrichum gloeosporioides* on potato dextrose agar (PDA).

| Treatment | Diameter of colony (cm) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 ppm[1/] | 10 ppm | 50 ppm | 100 ppm | 500 ppm | 1,000 ppm |
| Waan-nam (MeOH) | 9.00 | 9.00 | 8.95 | 8.07 | 7.23 | 6.12 |
| Waan-nam ($CH_2Cl_2$) | 9.00 | 8.50 | 7.18 | 3.67 | 2.33 | 0.37 |
| Bastard | 9.00 | 9.00 | 8.30 | 7.92 | 7.55 | 6.98 |
| Bastard | 9.00 | 9.00 | 8.33 | 7.92 | 7.53 | 6.98 |
| Henna tree(MeOH) | 9.00 | 9.00 | 8.45 | 7.93 | 7.35 | 6.80 |
| Henna tree($CH_2Cl_2$) | 9.00 | 9.00 | 8.02 | 7.05 | 6.22 | 4.48 |
| Kathue(MeOH) | 9.00 | 9.00 | 8.95 | 8.07 | 7.23 | 6.12 |
| Kathue($CH_2Cl_2$) | 9.00 | 9.00 | 8.31 | 7.45 | 5.73 | 4.48 |
| Betel vine(MeOH) | 9.00 | 8.78 | 8.07 | 7.68 | 6.97 | 6.47 |
| Betel vine($CH_2Cl_2$) | 9.00 | 9.00 | 8.60 | 8.18 | 7.58 | 7.13 |
| Tumeric(MeOH) | 9.00 | 8.72 | 8.13 | 7.10 | 6.10 | 5.55 |
| Tumeric($CH_2Cl_2$) | 9.00 | 9.00 | 8.02 | 7.13 | 6.05 | 5.43 |
| Galic(MeOH) | 9.00 | 8.60 | 8.02 | 7.45 | 7.00 | 6.48 |
| Galic($CH_2Cl_2$) | 9.00 | 9.00 | 8.35 | 8.02 | 7.45 | 7.05 |
| Mangoteen(MeOH) | 9.00 | 8.60 | 8.02 | 7.45 | 7.00 | 6.48 |
| Mangoteen($CH_2Cl_2$) | 9.00 | 9.00 | 7.55 | 7.18 | 7.05 | 6.41 |
| Thongpun | 9.00 | 8.50 | 8.00 | 7.63 | 6.95 | 6.23 |
| Thongpun | 9.00 | 9.00 | 8.03 | 7.55 | 6.98 | 6.11 |
| Ginger(MeOH) | 9.00 | 8.35 | 7.58 | 7.18 | 6.58 | 4.75 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Ginger($CH_2Cl_2$) | 9.00 | 9.00 | 8.05 | 7.08 | 5.97 | 4.15 |
| Chinesestar | 9.00 | 7.87 | 7.40 | 7.42 | 6.87 | 5.97 |
| Chinesestar | 9.00 | 9.00 | 7.90 | 7.45 | 6.95 | 5.88 |
| Cassumunar(MeOH) | 9.00 | 8.60 | 8.32 | 7.53 | 6.02 | 4.88 |
| Cassumunar($CH_2Cl_2$) | 9.00 | 9.00 a | 7.96 | 6.85 | 5.22 | 3.93 |
| Benomyl | 9.00 | 4.90 b | 2.52 | 0.93 | 0.00 | 0.00 |

[1/]Mean value of five repeated experiments. Means in the same row followed by different letters differ significantly aacording to DMRT ($P<0.01$)

Table 3 Percent of mycelialgrowth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* on potato dextrose agar (PDA) supplemented with various concentration of crude extracts from medicinal plants and benomyl fungicide.

| Treatment | % Inhibition of mycelial growth[1/] | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 10 ppm | 50 ppm | 100 ppm | 500 ppm | 1000 ppm |
| Waan-nam (MeOH) | 0.22 | 2 | 5.0 | 27.78 | 42.27 |
| Waan-nam ($CH_2Cl_2$) | 5.55 | 20.22 | 59.22 | 74.11 | 95.89 |
| Bastard cardamon(MeOH) | 0 | 7.78 | 12.00 | 16.77 | 22.44 |
| Bastard cardamom($CH_2Cl_2$) | 0.00 | 7.44 | 12.00 | 16.33 | 22.44 |
| Henna tree(MeOH) | 0 | 6.11 | 17.89 | 18.33 | 24.94 |
| Henna tree($CH_2Cl_2$) | 0.00 | 10.88 | 21.61 | 30.33 | 50.22 |
| Kathue(MeOH) | 0 | 0.55 | 10.13 | 19.47 | 32.00 |
| Kathue($CH_2Cl_2$) | 0.00 | 7.78 | 11.22 | 36.33 | 50.22 |
| Betel vine(MeOH) | 2.44 | 10.33 | 14.67 | 22.56 | 28.11 |
| Betel vine($CH_2Cl_2$) | 0.00 | 4.44 | 9.11 | 15.78 | 20.78 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Tumeric(MeOH) | 3.11 | 9.67 | 21.11 | 32.22 | 38.67 |
| Tumeric($CH_2Cl_2$) | 0.00 | 10.89 | 20.78 | 32.78 | 39.67 |
| Galic(MeOH) | 2.56 | 6.44 | 12.22 | 16.44 | 20.56 |
| Galic($CH_2Cl_2$) | 0.00 | 7.22 | 10.89 | 17.22 | 21.67 |
| Mangoteen(MeOH) | 4.44 | 10.89 | 12.22 | 22.22 | 28.0 |
| Mangoteen($CH_2Cl_2$) | 0.00 | 16.11 | 20.22 | 21.67 | 28.78 |
| Thong pun chang(MeOH) | 5.56 | 11.11 | 15.22 | 22.78 | 30.77 |
| Thong pun chang($CH_2Cl_2$) | 0.00 | 10.78 | 16.11 | 22.44 | 32.11 |
| Ginger(MeOH) | 7.22 | 15.78 | 20.22 | 26.89 | 47.22 |
| Ginger($CH_2Cl_2$) | 0.00 | 11.11 | 21.23 | 33.66 | 53.88 |
| Chinese star anise(MeOH) | 12.56 | 17.56 | 17.60 | 23.67 | 33.67 |
| Chinese star anise($CH_2Cl_2$) | 0.00 | 12.22 | 17.22 | 22.77 | 34.67 |
| Cassumunar(MeOH) | 4.44 | 7.56 | 16.33 | 33.22 | 45.78 |
| Cassumunar($CH_2Cl_2$) | 0.00 | 11.44 | 23.89 | 42.22 | 56.33 |
| Benomyl | 45.56 | 72.00 | 89.67 | 100.00 | 100.00 |

[1/]Percent Growth Inhibition = diameter of colony in control – diameter of colony in PDA mixed with crude extract/diameter of colony in control x 100

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่าสารสกัดทุกชนิดที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งการของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีกว่าการสกัดด้วยเมทธานอล และสารสกัดจากว่านน้ำด้วยไดคลอโรมีเทนนั้นสามารถยับยั้งการเจริญโคโลนีของเชื้อได้ดีที่สุดเท่ากับ 85.89 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้ม 1,000 ppm ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของธารทิพย์) 2540) ที่พบว่าสารสกัดว่านน้ำที่ความเข้มข้น 1000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญ

ของเส้นใยเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้ 82.50 เปอร์เซ็นต์ และจากรายงานของวิชัย และคณะ (2542) พบว่าสารสกัดว่านน้ำที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีกำจัดโรคพืช Benomyl พบว่าที่ความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลดีกว่าว่านน้ำ แต่เนื่องจากว่านน้ำ เป็นสมุนไพรที่มีการใช้ประโยชน์ทางอายุรเวท จึงได้คัดเลือกว่านน้ำเพื่อทำการวิจัยต่อเนื่อง เพื่อตรวจค้นหาสารบริสุทธิ์ว่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดีกว่า สารกำจัดโรคพืช Benomyl หรือไม่

# บทที่ 2
# การรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และอาการโรคแอนแทรคโนสในผลมะม่วง

มะม่วงเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ที่สามารถปลูกได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ดังนั้น มะม่วงในฤดูกาลจึงมีมากเกินความต้องการของผู้บริโภค จึงเป็นสาเหตุให้ผลผลิตราคาตกต่ำ รัฐบาลจึงพยายามผลักดันให้ส่งไปจำหน่ายในต่างประเทศ แต่ปัญหาที่พบคือปัญหาเรื่องโรคแอนแทรคโนสที่ทำให้ผลเน่า ซึ่งเป็นการติดเชื้อแฝงตั้งแต่ผลมะม่วงยังไม่สุก เมื่อเก็บมาบ่มหรือระหว่างการส่งจำหน่าย เชื้อดังกล่าวสามารถทำความเสียหายต่อผลผลิตได้มากโดยเฉพาะพันธุ์น้ำดอกไม้ ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันนิยมการใช้สารเคมี benomyl และ carbendazim ชุบผลก่อนส่งไปจำหน่าย และเมื่อมีการตรวจสอบสารตกค้างในผลผลิต ก็จัดว่าเป็นปัญหาต่อการส่งออกอีกประการหนึ่ง ดังนั้นเราจึงพยายามหาสารจากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการเกิดโรค

ในการทดลองนี้ได้มีการสำรวจ เพื่อคัดเลือกเชื้อโรคแอนแทรคโนส สายพันธุ์ที่จะทำความเสียหายได้รุนแรงกับผลมะม่วง และเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวก็จะนำไปใช้เพื่อเป็นตัวแทนในการศึกษา หรือทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคของสารสกัดจากสมุนไพร

## ขั้นตอนในการศึกษา

### *1. การสำรวจและเก็บตัวอย่าง*

เก็บส่วนต่างๆของมะม่วง คือ ดอก ใบ และผล ที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส จากพื้นที่ 5 จังหวัด คือ จ. นครปฐม จ. ราชบุรี จ.. สระบุรี และ จ. ตราด โดยทำการสำรวจ ในช่วงปี พ.ศ. 2546

### *2. การแยกเชื้อ (isolation) และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)*

ตัดชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรค ให้มีขนาด 1x1 เซนติเมตร แช่ด้วยน้ำยาคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปวางบนอาหาร water agar (WA) 3 วัน ตัดบริเวณปลายเส้นใยเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เพื่อแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ทำการเก็บเชื้อไว้ในอาหาร PDA (slant agar) เพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

***3. การทดสอบการเกิดโรค (pathogenicity test) และความรุนแรงของโรค***

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA 10 วัน ใช้ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร เพื่อตัดบริเวณขอบโคโลนี แล้วนำไปปลูกเชื้อบนผล และใบของมะม่วงน้ำดอกไม้ วางบนแผลที่ใช้เข็มเจาะ แล้วนำไปบ่มในกล่องให้ความชื้นเป็นเวลา 5 วัน วัดขนาดแผลที่เป็นโรค เพื่อคัดเลือก isolate ที่สามารถทำให้เกิดโรคได้รุนแรงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

## ผลการศึกษา

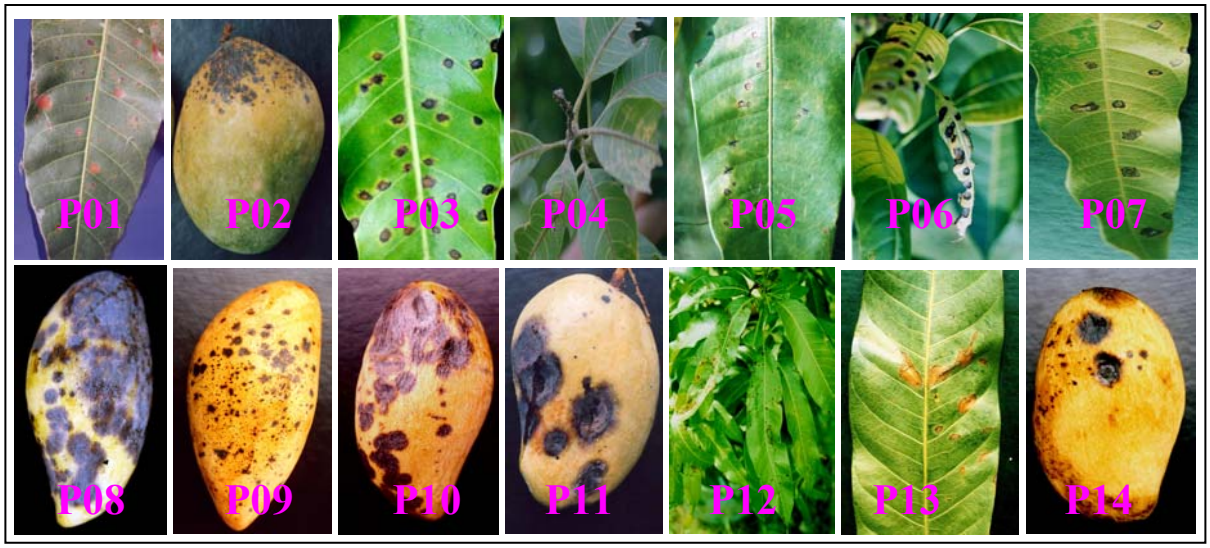
**1. การแยกเชื้อสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสจากมะม่วง**

จากการสำรวจเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากส่วนต่างๆ ของมะม่วงพันธุ์ต่างๆ ในพื้นที่ปลูกมะม่วง 5 แห่ง ได้แก่ จ.นครปฐม จ. นนทบุรี จ. ปทุมธานี จ. สระบุรี และ จ. ตราด พบว่าอาการโรคแอนแทรคโนสนั้นเกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งสามารถจำแนกได้ 14 isolate จาก จ.นครปฐมแยกได้ 3 isolates ได้แก่ isolate P01, P02 และP03 จ.นนทบุรี 2 isolatesได้แก่ isolate P04 และP05 จ.ปทุมธานี 2 isolates ได้แก่ isolate P06 และP07 จ.สระบุรี 4 isolates ได้แก่ isolate P08, P09, P10 และP11 และ จ.ตราด 3 isolates ได้แก่ isolate P12, P13 และP14 (ตารางที่ 1, ภาพที่ 1) โดยแยกจากความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้แก่ ลักษณะสีของโคโลนี เส้นใย รูปร่าง ขนาดของสปอร์ และซึ่งพบว่าเชื้อมีลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA มีสีขาวจนถึงน้ำตาลเทา เส้นใยมีทั้งฟูและเรียบ พบมีการสร้าง conidial masses สีส้มอมชมพูกระจายอยู่บนเส้นใย conidia มีรูปร่าง cylidrical หัวมนท้ายมน ใสไม่มี มีเซลเดียว มีขนาดประมาณ 3.75-5.00 x10.00-15.00 ไมครอน (ภาพที่ 2-3)

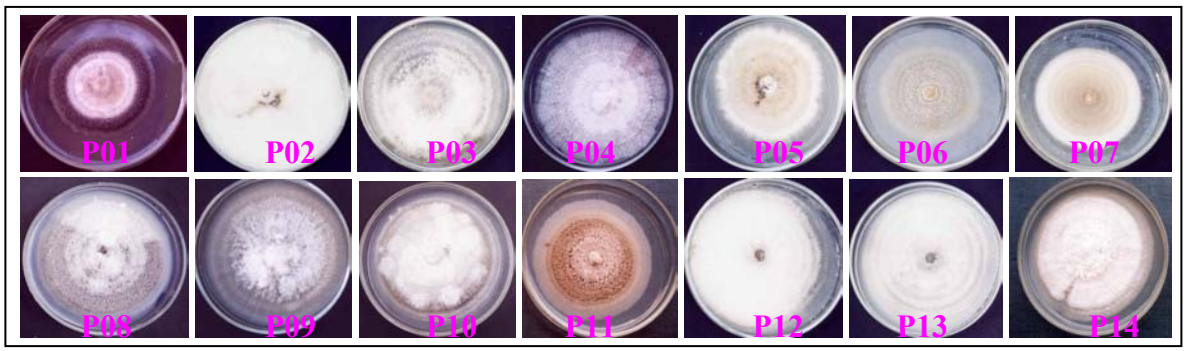
ตารางที่ 1 การแยกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* จากมะม่วงที่แสดงอาการโรคของแอนแทรคโนส

| Isolate | Location | Symptom | Size of colony (cm) | Number of spore spore/ml ($x10^4$) | Color of culture | Size of spore (µm) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| P01 | จ. นครปฐม | ใบจุด | 3.46 h | 19.75 d | สีขาวเทา-ดำ | 2.0x5.5-2.0x6.0 |
| P02 | จ. นครปฐม | ผลเน่า | 5.35 g | 109.50 d | สีเทา-ชมพู | 2.0x5.0-2.0x6.0 |
| P03 | จ. นครปฐม | ผลเน่า | 6.38 ef | 2428.25 a | สีขาว-ส้ม | 2.0x5.0-2.5x6.0 |
| P04 | จ. นนทบุรี | ผลเน่า | 5.85 fg | 981.25 b | สีเทา-ชมพู | 1.5x4.5-2.0x6.5 |
| P05 | จ. นนทบุรี | ใบจุด | 6.07 fg | 900.00 b | สีขาว – เทา | 2.0x6.0-2.0x7.0 |
| P06 | จ. ปทุมธานี | ใบจุด | 7.05 de | 75.25 d | สีขาว – ครีม | 2.0x5.5-2.5x7.0 |
| P07 | จ. ปทุมธานี | ดอกแห้ง | 8.57 ab | 862.50 b | สีขาว – ครีม | 1.5x3.5-2.0x7.5 |
| P08 | จ. สระบุรี | ผลเน่า | 7.47 cd | 1040.75 b | สีขาว – ครีม | 2.0x4.0-2.0x6.5 |
| P09 | จ. สระบุรี | ผลเน่า | 7.85 bcd | 862.00 b | สีขาว – ครีม | 2.0x4.0-2.0x8.0 |
| P10 | จ. สระบุรี | ใบจุด | 8.20 abc | 199.50 d | สีขาว – ชมพู | 2.0x5.0-2.0x5.5 |
| P11 | จ. สระบุรี | ใบจุด | 8.30 abc | 337.25 d | สีขาว – ชมพู | 2.0x4.0-2.5x5.5 |
| P12 | จ. ตราด | ผลเน่า | 8.50 ab | 91.25 d | สีขาว – ครีม | 2.0x5.5-2.5x6.0 |
| P13 | จ. ตราด | ใบจุด | 8.93 a | 381.25 cd | สีขาว – ชมพู | 2.0x4.0-2.0x5.5 |
| P14 | จ. ตราด | ผลเน่า | 9.00 a | 760.50 bc | สีขาว – ชมพู | 2.0x6.5-2.0x8.0 |
| CV (%) | | | 5.70 | 31.80 | | |
| LSD.05 | | | 0.58 | 287.81 | | |
| LSD.01 | | | 0.76 | 380.40 | | |

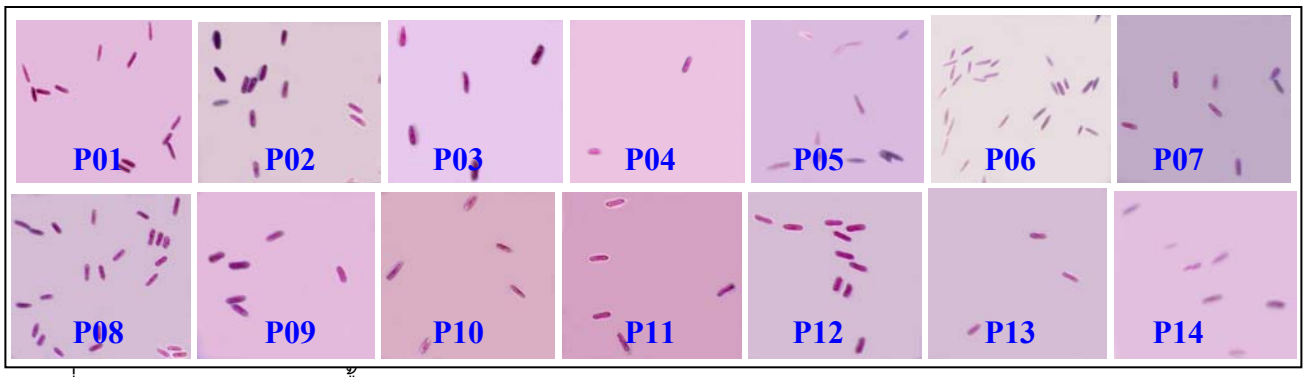
[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ P = 0.01 โดยเปรียบเทียบ treatment mean แบบ Duncan's Multiple Range Test




ภาพที่ 1 อาการของโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงที่แยกได้เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* isolate P01-P14



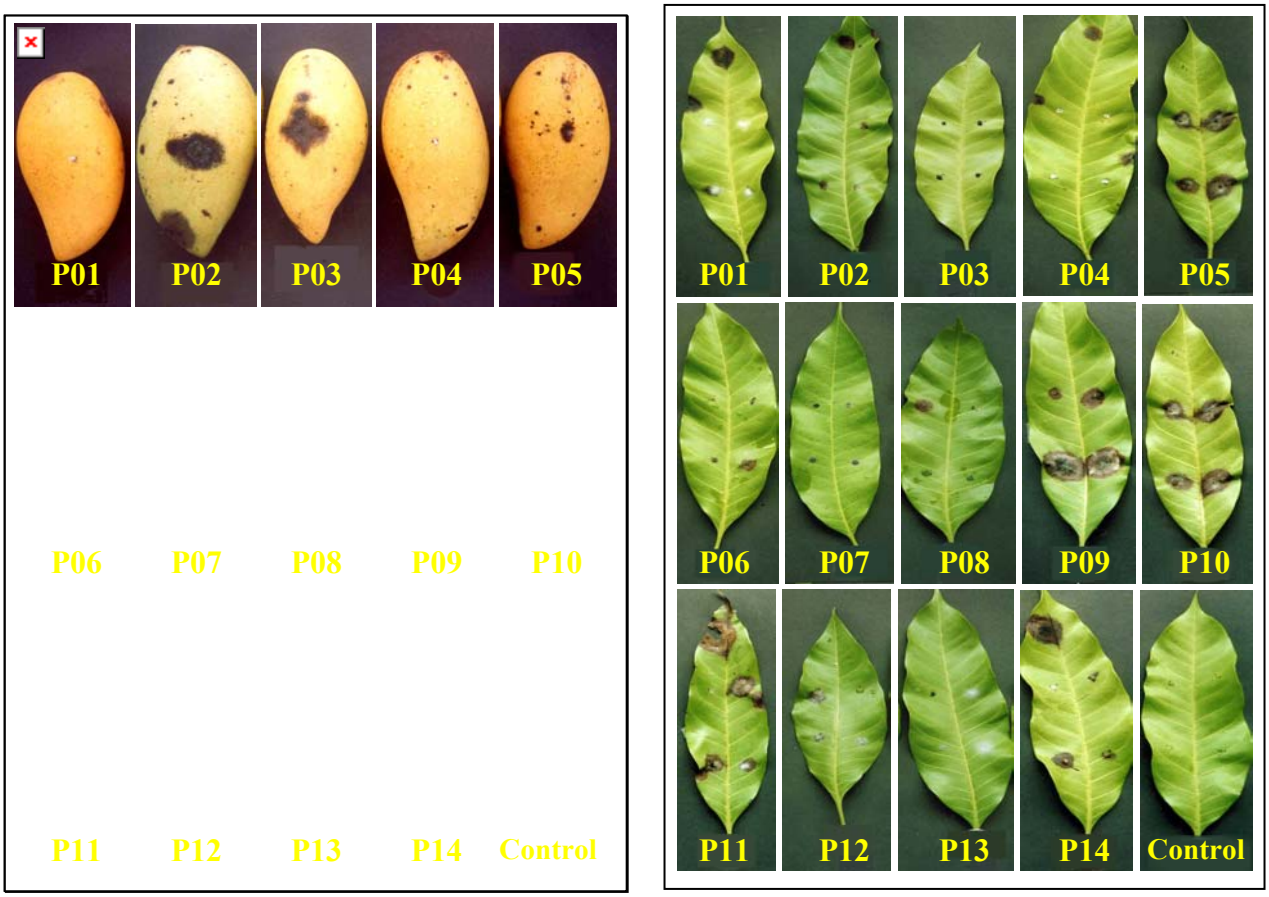

ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* isolate P01-P14




ภาพที่ 3 ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* isolate P01-P14

**2. การทดสอบการเกิดโรค** (pathogenecity test)

เมื่อนำเชื้อรา *C. gleoesporioides* จำนวน 14 isolates มาทดสอบการเกิดโรค เปรียบเทียบกับ control บนผลและใบมะม่วงเป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* isolate P03, P08, P09, P10, P11 และ P14 สามารถทำให้เกิดโรคบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ control พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และพบว่า isolate P08 สามารถทำให้เกิดโรคได้รุนแรงที่สุดโดยพบว่ามีแผลขนาด 3.69 เซนติเมตร และรองลงมาได้แก่ isolate P11, P03, P09, P10, P14, P02, P13, P12, P07 และ P05 ตามลำดับโดยมีขนาดแผลเท่ากับ 3.45, 3.41, 3.33, 3.20, 3.19, 1.88, 1.54, 1.22, 1.10 และ 0.98 เซนติเมตรตามลำดับ ส่วน isolate P01, P04 และP06 นั้นพบว่าไม่ทำให้เกิดโรคบนผลมะม่วงเช่นเดียวกับ control ส่วนการเกิดโรคบนใบนั้นพบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* P09 สามารถทำให้เกิดโรคบนใบมะม่วงน้ำดอกไม้ได้ดีที่สุด สามารถทำให้เกิดมีแผลขนาด 1.74 เซนติเมตร และรองลงมาได้แก่ isolate P05, P11, P10, P01, P12, P13, P14, P02, P06 และ P08 ซึ่งมีขนาดแผล 1.48, 0.99, 0.80, 0.74, 0.70, 0.58, 0.55,0.49, 0.30 และ 0.20 เซนติเมตรตามลำดับ ส่วน isloate P03, P04 และ P07 ไม่สามารถทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนสบนใบได้ (ตารางที่ 2; ภาพที่ 4)




ภาพที่ 4 การทดสอบความสามารถของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่ทำให้เกิดโรคบนผลและใบมะม่วงหลังการปลูกเชื้อ 10 วัน

ตารางที่ 2 การทดสอบความสามารถของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่ทำให้เกิดโรคบนผลและใบมะม่วงหลังการปลูกเชื้อ 10 วัน

| Isolate | Location | Size of Symptom (cm) | |
|---|---|---|---|
| | | Fruit[1/] | Leaf[1/] |
| PO1 | จ. นครปฐม | 0.00 c | 0.74 bcd |
| PO2 | จ. นครปฐม | 1.88 b | 0.49 cd |
| PO3 | จ. นครปฐม | 3.41 a | 0.00 d |
| PO4 | จ. นนทบุรี | 0.00 c | 0.00 d |
| PO5 | จ. นนทบุรี | 0.98 b | 1.48 ab |
| PO6 | จ. ปทุมธานี | 0.00 c | 0.30 cd |
| PO7 | จ. ปทุมธานี | 1.10 b | 0.00 d |
| P08 | จ. สระบุรี | 3.69 a | 0.20 cd |
| P09 | จ. สระบุรี | 3.33 a | 1.74 a |
| P10 | จ. สระบุรี | 3.20 a | 0.80 bcd |
| P11 | จ. สระบุรี | 3.45 a | 0.99 abc |
| P12 | จ. ตราด | 1.22 b | 0.70 bcd |
| P13 | จ. ตราด | 1.54 b | 0.58 cd |
| P14 | จ. ตราด | 3.19 a | 0.55 cd |
| Control | Control | 0.00 c | 0.00 d |
| %CV | %CV | 26.3 | 20.3 |
| LSD0.01 | LSD0.01 | 0.878 | 0.774 |
| LSD0.05 | Lsd0.05 | 0.664 | 0.586 |

[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ P= 0.01 โดยเปรียบเทียบ treatment mean แบบ Duncan's Multiple Range Test

## สรุปและวิจารณ์การทดลอง

จากการเก็บส่วนต่างๆของมะม่วง คือ ดอก ใบและผล ที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส จากพื้นที่ 5 จังหวัดคือ จ. นครปฐม จ. นนทบุรี จ. สระบุรี และ จ. ตราด โดยทำการสำรวจ ในช่วงปี พ.ศ. 2546 สามารถแยกเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 14 isolates และเมื่อนำมาทดสอบการเกิดโรคบนผลและบนใบของมะม่วงน้ำดอกไม้พบว่า isolate P09 สามารถเกิดโรคทั้งบนผลและใบได้รุนแรงที่สุด และในรายงานของประสิทธิ์ และนิพนธ์ (2545) ได้ทดสอบความรุนแรงของโรค พบว่า *C. gloeosporioides* (BK-NK-R1.1-12-5-44) ที่แยกได้จากมะม่วงน้ำดอกไม้ผลสุก ทำให้ผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เกิดโรคแอนแทรกโนสได้รุนแรงกว่าเชื้อ *C. gloeosporioides* (KI-MK-R1.1-12-5-44) ที่แยกได้จากมะม่วงมหาชนกผลดิบ และ *Colletotrichum* sp. (PK-MK-G1.4-7-4-44) ไม่เกิดโรค ซึ่งก็แสดงว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* แต่ละ isolate มีความสามารถในการเกิดโรคได้ไม่เท่ากัน และในการทดลองนี้ก็ได้คัดเลือกเชื้อที่สามารถทำให้เกิดโรคได้รุนแรงที่สุด และสามารถทำให้เกิดโรคได้ทั้งบนผลและใบของมะม่วงน้ำดอกไม้

# บทที่ 3
# การคัดเลือกวิธีการทดสอบสารสกัดในการควบคุมโรค

สารสกัดว่านน้ำได้แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงได้ดีที่สุด (พรชนก และคณะ, 2548) ซึ่งวิธีการทดสอบจะเป็นวิธี Poisonned food โดยใช้อาหาร potato dextrose agar (PDA) ผสมกับสารสกัดจากพืชที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ วิธีดังกล่าวมีการใช้เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของสารมานาน และเป็นที่ยอมรับกันดี

สารสกัดจากพืชสมุนไพรประกอบไปด้วยสารประกอบหลายชนิด สารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพอาจจะมีเพียงบางส่วนในปริมาณน้อย ดังนั้นการศึกษาการใช้ประโยชน์จากสารสกัดจากพืชในด้านการควบคุมโรคพืช จึงจำเป็นต้องมีวิธีการทดสอบประสิทธิภาพ เพื่อจะกำจัดสารที่มีประสิทธิภาพต่ำออกไป จนกระทั่งได้สารที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่อเชื้อโรคพืชที่สูง

การศึกษาในบทนี้เป็นการทดสอบวิธีการต่างๆ ที่จะสามารถตรวจสอบประสิทธิภาพของสารสกัดบางส่วนของพืชสมุนไพร ได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ เทียบได้หรือดีกว่าวิธีทดสอบปกติ โดยมีข้อกำหนดคือจะต้องใช้สารทดสอบในปริมาณที่น้อย ซึ่งวิธีดังกล่าวจะเหมาะสมกับการทดสอบสารที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากสารสกัดจากพืช

## ขั้นตอนในการศึกษา

### 1. *การคัดเลือกวิธีการทดสอบสารสกัดว่านน้ำในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อรา Colletotrichum gloeosporioides*

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดว่านน้ำแบบ Completely Randomized Design (CRD) 5 ซ้ำ ในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ความเข้มข้น 0, 100, 500 และ 1,000 ppm บนอาหารผสมสารสกัดว่านน้ำแล้วย้ายเชื้อ *C. gloeosporioides* มาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง 25-30 องศาเซลเซียส (ผ่องเพ็ญ และคณะ, 2542) และการทดสอบโดยใช้ วิธี paper disc diffusion tectnique บนจานอาหารที่มีสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร จำนวน 0.1 มิลลิลิตร กระจายอยู่บนผิวหน้าอาหาร PDA บ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน (อุดมลักษณ์ และคณะ, 2544) แล้วบันทึกผลการทดลองและหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต

$$\text{เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต} = \left( \frac{A - B}{A} \right) \times 100$$

A = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อใน control

B = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัด

***2. การคัดเลือกวิธีการทดสอบสารสกัดว่านน้ำต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา Colletotrichum gloeosporioides***

ในการทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยสารสกัดว่านน้ำ ใช้การทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 5 ซ้ำ ที่ความเข้มข้น 0, 100, 500 และ 1,000 ppm โดยการทดสอบบนอาหาร water agar (WA), water agar+rose bengal (WA-RB), potato dextrose gar (PDA), potato dextrose agar+rose bengal (PDA-RB), microcentrifuge tube, multiwell plates, concave slide, slide culture และบนใบมะม่วง โดยใช้สปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ความเข้มข้น $1x10^6$ spore/มิลลิลิตร จำนวน 0.1 มิลลิลิตร แล้วทำการตรวจสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์หลังจากทำการปลูกเชื้อแล้ว 16 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Jatisatienr and Jatisatienr., 1999 และ Prusky *et. al.*,1982)

$$\text{เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต} = \left( \frac{A - B}{A} \right) \times 100$$

A = จำนวนสปอร์ของเชื้อราที่งอกใน control

B = จำนวนสปอร์ของเชื้อราที่งอกบนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัด

## ผลการศึกษา

**1. การทดสอบสารสกัดว่านน้ำในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides***

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดว่านน้ำที่ความเข้มข้น 0, 100, 500 และ 1,000 ppm ในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* เชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงบนอาหาร PDA ที่อายุ 9 วัน พบว่าที่ความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *C.gloeosporioides* ได้ที่สุดคือ 77.11 เปอร์เซ็นต์

และรองลงมาคือ 500 และ 100 ppm ตามลำดับ คือ 55.5และ 10.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับ 0 ppm พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) ส่วนการทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion technique ไม่พบ clear zone (Table 2) และไม่สามารถใช้ทดสอบการยับยั้งการเจริญของโคโลนีด้วยเทคนิคนี้ได้

Table 1 Effect of Waan-nam (*Acorus calamus* L.) extract colony diameter (cm) and percent colony inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides,* on potato dextrose agar

| Treatment | Size of Colony (cm)[1/] | inhibition growth (%)[2/] |
|---|---|---|
| 0 ppm | 9.00 a | - |
| 100 ppm | 8.04 b | 10.67 |
| 500 ppm | 3.82 c | 57.56 |
| 1,000 ppm | 2.06 d | 77.11 |
| %CV | 1.76 | - |
| LSD.05 | 0.14 | - |

[1] Mean value of five repeated experiments. Means in the same column followed by different letters differ significantly (P<0.01)

[2/] Percent Growth Inhibition = Size of Colony in Control – Size of Colony in PDA mixed with crude extract / Size of Colony in Control x100

Table 2 Effect of Waan-nam (*Acorus calamus* L.) extract to controll *Colletotrichum gloeosporioides* on paper disc technique.

| Treatment | Size of clear zone (cm) | % inhibition growth (%) |
|---|---|---|
| 0 ppm | 0 | - |
| 100 ppm | 0 | - |
| 500 ppm | 0 | - |
| 1,000 ppm | 0 | - |

## 2. การคัดเลือกวิธีการทดสอบสารสกัดว่านต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดว่านน้ำในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร water agar (WA), water agar+rose bengal (WA-RB), potato dextrose gar (PDA), potato dextrose agar+rose bengal (PDA-RB), microcentrifuge tube, multiwell plates, concave slide, slide culture และ บนใบมะม่วง ที่ความเข้มข้น0, 100, 500 และ 1,000 ppm พบว่าบนอาหาร WA ผสมสารสกัดว่านน้ำสามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุดที่ 1,000 ppm เท่ากับ 94.5 เปอร์เซ็นต์ การตรวจสอบบนอาหาร WA-RB เท่ากับ 93.75 เปอร์เซ็นต์ การตรวจสอบบนอาหาร PDA เท่ากับ 79.75 เปอร์เซ็นต์ การตรวจสอบบนอาหาร PDA-RB เท่ากับ 95.5 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบใน microcentrifuge tube พบว่าสารสกัดว่านน้ำสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* เท่ากับ 62.37 เปอร์เซ็นต์ ใน multiwell plates เท่ากับ 58 เปอร์เซ็นต์ ใน concave slide เท่ากับ 67.81 เปอร์เซ็นต์ บน slide culture เท่ากับ 91.82 เปอร์เซ็นต์ และบนใบอ่อนมะม่วงน้ำดอกไม้ เท่ากับ 69.67 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (Table 3 และTable 4, Figure 1)

Table 3 Effect of Waan-nam extract to control spore germination of *Colletotrichum gloeosporioides,* post-harvest pathogen of mango anthracnose

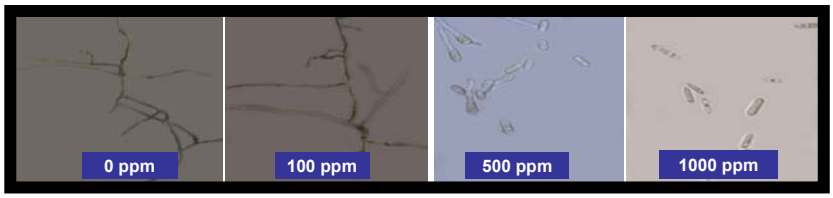
| Treatment | Spore Germination (spore)[1/] | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | WA | WA-RB | PDA | PDA-RB | Micro centrifuge tube | multiwell plates | concave slide | slide culture | mango leaf |
| 0 ppm | 100.00 a | 100.00 a | 100.00a | 100.00 a | 93.00 a | 100.0 a | 94.75 a | 97.75 a | 99.75 a |
| 100 ppm | 94.00 a | 95.00 a | 100.00a | 100.00 a | 93.00 a | 93.0 a | 88.00 a | 89.25 b | 95.25 b |
| 500 ppm | 82.00 b | 81.25 b | 78.25 b | 80.50 b | 48.50 c | 85.0 b | 54.75 b | 53.50 c | 74.50 c |
| 1,000 ppm | 5.50 c | 6.25 c | 20.25c | 4.50 b | 35.0 d | 42.0 c | 30.50 c | 8.00 d | 30.25 d |
| %CV | 5.61 | 5.35 | 6.14 | 4.83 | 13.55 | 6.02 | 6.13 | 7.308 | 5.73 |
| LSD.05 | 6.21 | 5.82 | 6.85 | 5.30 | 13.26 | 7.41 | 6.33 | 7.06 | 6.62 |

[1] Mean value of five repeated experiments. Means in the same column followed by different letters differ significantly (P<0.01)

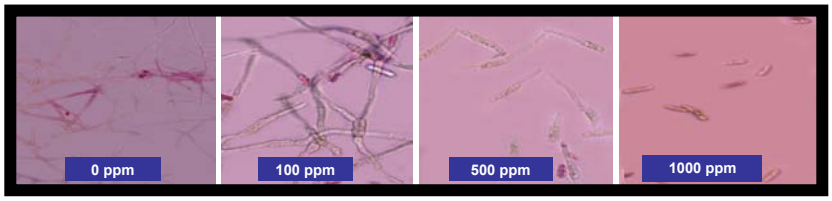
Table 4 Percent inhibition of spore germination of *Colletotrichum gloeosporioides*, post-harvest pathogen of mango anthracnose

| Treatment | inhibition spore germination (%)[1/] | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | WA | WA-RB | PDA | PDA-RB | microcentrifuge tube | multiwell plates | Concave slide | Slide culture | mango leaf |
| 100 ppm | 6.0 | 5.00 | 0.00 | 0.0 | 16.67 | 7 | 7.12 | 8.70 | 4.51 |
| 500 ppm | 18.0 | 18.75 | 21.75 | 19.5 | 47.85 | 15 | 42.22 | 45.27 | 25.31 |
| 1,000 ppm | 94.5 | 93.75 | 79.75 | 95.5 | 62.37 | 58 | 67.81 | 91.82 | 69.67 |

[1/] Percent Growth Inhibition = Size of Colony in Control – Size of Colony in PDA Mixed with Crude Extract / Size of Colony in Control x100




water agar




water agar+rose bengal (WA-RB)

potato dextrose gar (PDA)

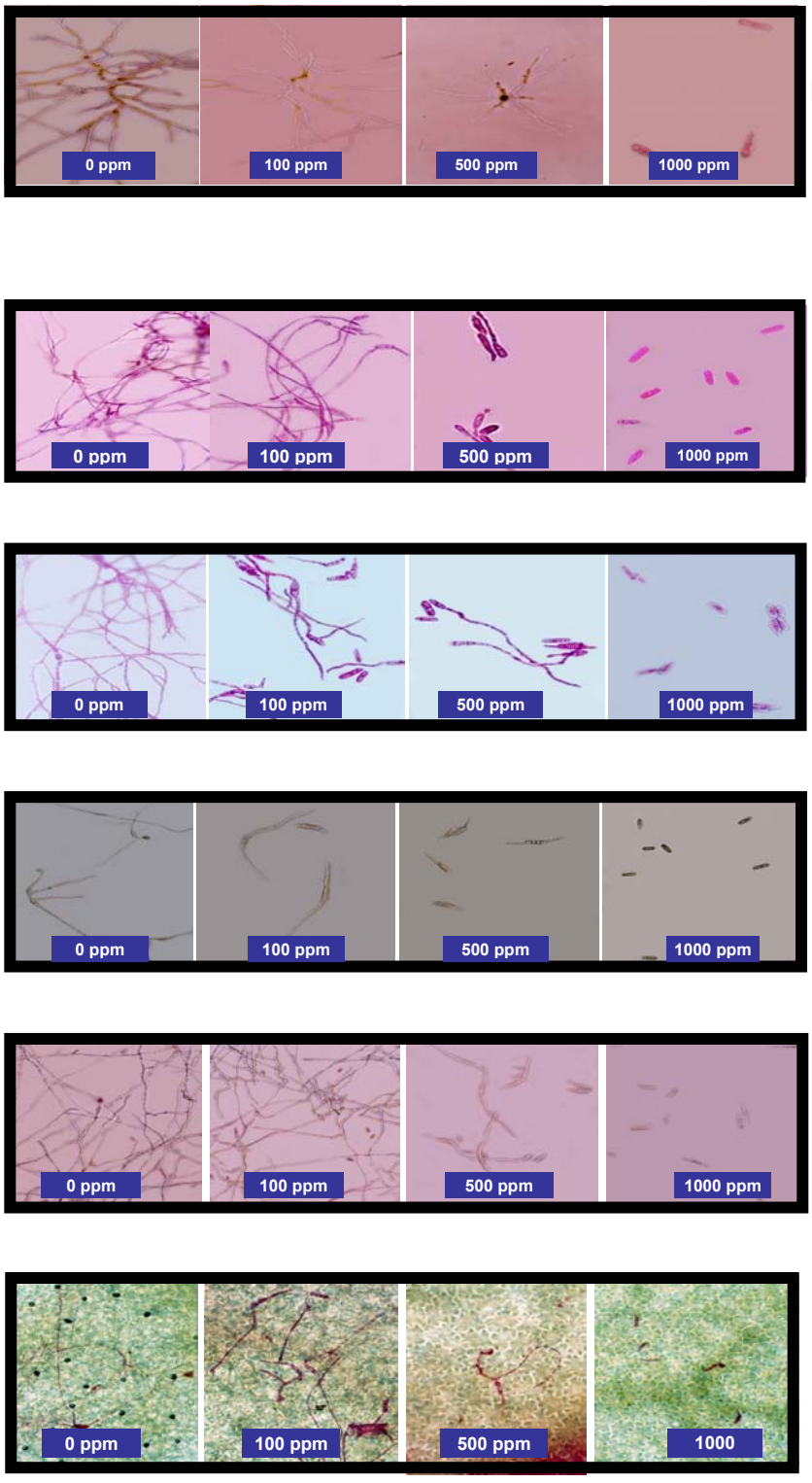



Figure 1 Effect of Waan-nam extract to controlling spore germination of *Colletotrichum gloeosporioides*, post-harvest pathogen of mango anthracnose

## สรุปและวิจารณ์

จากการคัดเลือกหาวิธีการทดสอบสารสกัดว่านน้ำในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงบนอาหาร PDA พบว่าที่ความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุดคือ 77.11 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาคือที่ระดับ 500 และ 100 ppm คือ 55.5 และ 10.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับวิชัย และคณะ (2542) ที่พบว่าสารสกัดว่านน้ำที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่การทดสอบการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อราโดยใช้วิธี diffusion disc technique บนอาหาร PDA ที่มีสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* กระจายอยู่ทั่วผิวหน้าอาหาร แล้วบ่มไว้ในอุณหภูมิห้อง 7 วัน ไม่พบ clear zone ซึ่งแสดงว่าวิธีการนี้ไม่สามารถใช้ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ซึ่งต่างไปจากงานของ Suhaila, *et.al*.(1996) สามารถใช้เทคนิค paper disc diffusion technique ตรวจสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืชสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides, Fusarium pallidoroseum, Botryodiplodia theobromae, Alternaria alternata, Penicillium citrinum, Phomopsis caricae-papayae* และ *Aspergillus niger* ได้ สำหรับอุดมลักษณ์ และคณะ (2544) ได้ใช้ disc diffusion technique ตรวจสอบการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger, Eurotium amstelodami* และ *E. chevalieri* ของสารสกัดหยาบของพลูเพื่อต้านการเจริญของเชื้อรา *E. amstelodami* ที่ความเข้มข้น 100,000 ppm และต้านการเจริญของเชื้อรา *E. chevalieri* ได้ที่ความเข้มข้น 200,000 ppm จากผลการศึกษาของ ชวเลิศ และวิชัย (2545) ได้ตรวจสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* โดยวิธี filter paper disc method พบว่าสารสกัดพลู และกานพลูที่ความเข้มข้น 100,000 ppm สามารถสร้าง clear zone ได้ 78.27 และ 65.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสาร Imazalil ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm

สำหรับวิธีการทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร water agar (WA), water agar+rose bengal (WA-RB), potato dextrose gar (PDA) และ potato dextrose agar+rose bengal (PDA-RB) พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ โดยพบว่าบนอาหาร WA ผสมสารสกัดว่านน้ำ พบว่าสารสกัดว่านน้ำสามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุดที่ 1,000 ppm เท่ากับ 94.5 เปอร์เซ็นต์ บนอาหาร WA-RB เท่ากับ 93.75 เปอร์เซ็นต์ บนอาหาร PDA เท่ากับ 79.75 เปอร์เซ็นต์ และบนอาหาร PDA-RB เท่ากับ 19.5 เปอร์เซ็นต์

จากการตรวจสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ความเข้มข้น 0, 100, 500 และ 1,000 ppm ใน microcentrifuge tube, multiwell plates และ concave slide ใน

microcentrifuge tube สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุดที่ 1,000 ppm เท่ากับ 62.37 เปอร์เซ็นต์ ใน multiwell plate เท่ากับ 58 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งวิธีดังกล่าวหน่วยงาน The National Center for the Delvelopment of Natural Products (NCDNP) ได้หาเทคนิคการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *Botrytis* sp., *Colletotrichum*sp., *Fusarium*sp. และ *Discula* sp. โดยใช้ 96-well microtiter plate bioassay ที่เวลา 0, 24, 48 และ 96 ชั่วโมงได้ (Wedge and Kuhajek, 1998) และใน concave slide เท่ากับ 67.81 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาได้แก่ 500 และ 100 ppm เท่ากับ 42.22 และ 7.12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Chaky, *et.al*.(2001) ได้ตรวจสอบการงอกของสปอร์ในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อบน glass slide และ hanging dropพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 65.5$\pm$13.9 และ 42.3$\pm$9.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

จากการตรวจสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ความเข้มข้น 0, 100, 500 และ 1,000 ppm บน slide culture และ ใบอ่อนมะม่วงน้ำดอกไม้ slide culture พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุดที่ 1,000 ppm เท่ากับ 91.82 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาได้แก่ 500 และ 100 ppm เท่ากับ 45.27 และ 8.7เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Pursky, *et.al.* (1982) พบว่าสารสกัดจากเปลือกผลอ่อนของอโวกาโดสามารถยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยใช้เทคนิค glass slide bioassay ที่ 16 ชั่วโมง พบว่ามีค่า $ED_{50}$ ในการยับยั้งการงอกสปอร์เท่ากับ 450 $\mu g.ml^{-1}$ และบนใบอ่อนมะม่วงน้ำดอกไม้ พบว่ายับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้เท่ากับ 69.67 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาได้แก่ 500 และ 100 ppm เท่ากับ 25.31 และ 4.51 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Chaky *et al*.(2001) รายงานว่าเมื่อสปอร์ของเชื้อรา *C. graminicola* สัมผัสกับผิวพืช สปอร์จะงอกได้เมื่อมีความน้ำ (ความชื้น) ถ้าไม่มีความชื้นสปอร์ก็จะพักตัวอยู่ และเมื่อใดที่มีความชื้นสปอร์จะงอก และสร้าง appressoria เกาะยึดผิวพืช Haugard *et al*.(2003) ได้ตรวจสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อต่อการงอกของสปอร์ และการสร้าง appressorial ของเชื้อรา *Blumeria graminis* บนใบข้าวบาร์เลย์ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำ และพบว่าที่ใช้สารสกัดนั้นเมื่อสปอร์งอกสามารถสร้าง appressorial แต่ไม่สามารถสร้าง haustorium ในเซลพืชได้

# บทที่ 4
# การพัฒนาวิธีการสกัดสาร และตรวจสอบชนิดของสารออกฤทธิ์

ว่านน้ำมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Acorus calamus* Linn. จัดอยู่ในวงศ์ Araceae ส่วนที่ใช้เหง้ามีการรายงานเกี่ยวกับประสิทธิภาพ ของพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ และสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ สารดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นสารแก้แพ้ (antihistaminic substance) หรือสารที่ทำให้แมลงเป็นหมัน (Phonglux, 1987)

กรรมวิธีการแยกน้ำมันหอมระเหยจากพืชมีหลายวิธีตามความเหมาะสมของพืช และต้องคำนึงถึงสถานะของสาร ความเสถียรของสารระเหย ปริมาณความเข้มข้นของสารระเหยในตัวอย่างและวัตถุประสงค์ของการทดลอง ดังนั้นวิธีการแยกน้ำมันหอมระเหยด้วยการกลั่น (distillation) การกลั่นด้วยวิธีต่าง ๆ อาศัยหลักความสามารถในการกลายเป็นไอของสารระเหยจากพืช การกลั่นที่นิยมใช้ คือ การกลั่นด้วยไอน้ำ จะเป็นการแยกสารและทำให้สารบริสุทธิ์ สารที่นำมากลั่นด้วยไอน้ำ จะได้ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ เป็นการกลั่นที่ให้สารและน้ำมันหอมระเหยออกมาด้วยกัน ประโยชน์ของการกลั่นด้วยไอน้ำ คือ แยกสารที่ระเหยง่ายและไม่ละลายน้ำออกมาจากสารผสมที่กลายเป็นไอได้ยาก การกลั่นด้วยไอน้ำได้แก่

-การกลั่นด้วยไอน้ำโดยตรง(direct steam distillation) มักใช้กับพืชสด โดยต้มสารตัวอย่างกับน้ำโดยตรงจนเดือดกลายเป็นไอ ไอน้ำจะพาสารที่ระเหยได้ออกมาแล้วกลั่นเป็นของเหลวที่เครื่องควบแน่นโดยของเหลวจะแยกเป็นสองชั้น เช่น การกลั่นน้ำมันหอมระเหย น้ำมันหอมระเหยซึ่งส่วนใหญ่เบากว่าน้ำจะลอยอยู่ข้างบน

-การกลั่นด้วยไอน้ำโดยอ้อม (Indirect steam distillation) เป็นการกลั่นโดยให้ไอน้ำผ่านตัวอย่างที่ต้องการแยก ใช้ในการกลั่นสารอินทรีย์ที่มีจุดเดือดสูง เป็นวิธีที่นิยมใช้มากในการแยกสารออกจากผลิตผลจากธรรมชาติ การกลั่นไอน้ำโดยอ้อมทำได้โดยใส่สารที่ต้องการกลั่นในขวดกลั่นแล้วผ่านไอน้ำจากหม้อต้มเข้าไปยังขวดกลั่น ไอน้ำจะพาสารระเหยได้ออกมาแล้วกลั่นเป็นของเหลวที่เครื่องควบแน่นเช่นเดียวกับการกลั่นด้วยไอน้ำโดยตรง

วิธีการสกัดสารที่มีฤทธิ์ควบคุมโรคพืชจากพืชหมายถึงสารดังกล่าวนั้นเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นภายในเซลพืชหรือระหว่างเซลพืชหรืออยู่ในเนื้อเยื่อพืชนั่นเอง วิธีการและหลักการมีความยากง่ายแตกต่างกัน ในการปฏิบัติอาจเป็นการสกัดโดยไม่ใช้ความร้อนเช่นการบีบ หรือคั้นในสภาวะที่อุณหภูมิปกติ (Cold Press) เช่นการคั้นน้ำกะทิจากเนื้อมะพร้าว การคั้นน้ำผลไม้ หรือถ้าสกัดด้วยอัลกอฮอล์ หรือตัวทำละลายอื่นๆ ซึ่ง

เป็นวิธีที่ใช้กันโดยภูมิปัญญาหมอพื้นบ้าน เช่นการนำสมุนไพรมาแช่เหล้า เป็นยาดองเหล้าที่มีตำรับหลากหลายกันไป หรือบางวิธีที่สกัดด้วยความร้อน เช่นต้มเพื่อให้สารดังกล่าวละลายออกมาเร็วขึ้น หรือเพื่อให้สารระเหยเป็นไอและกลั่นเก็บในรูปน้ำมัน

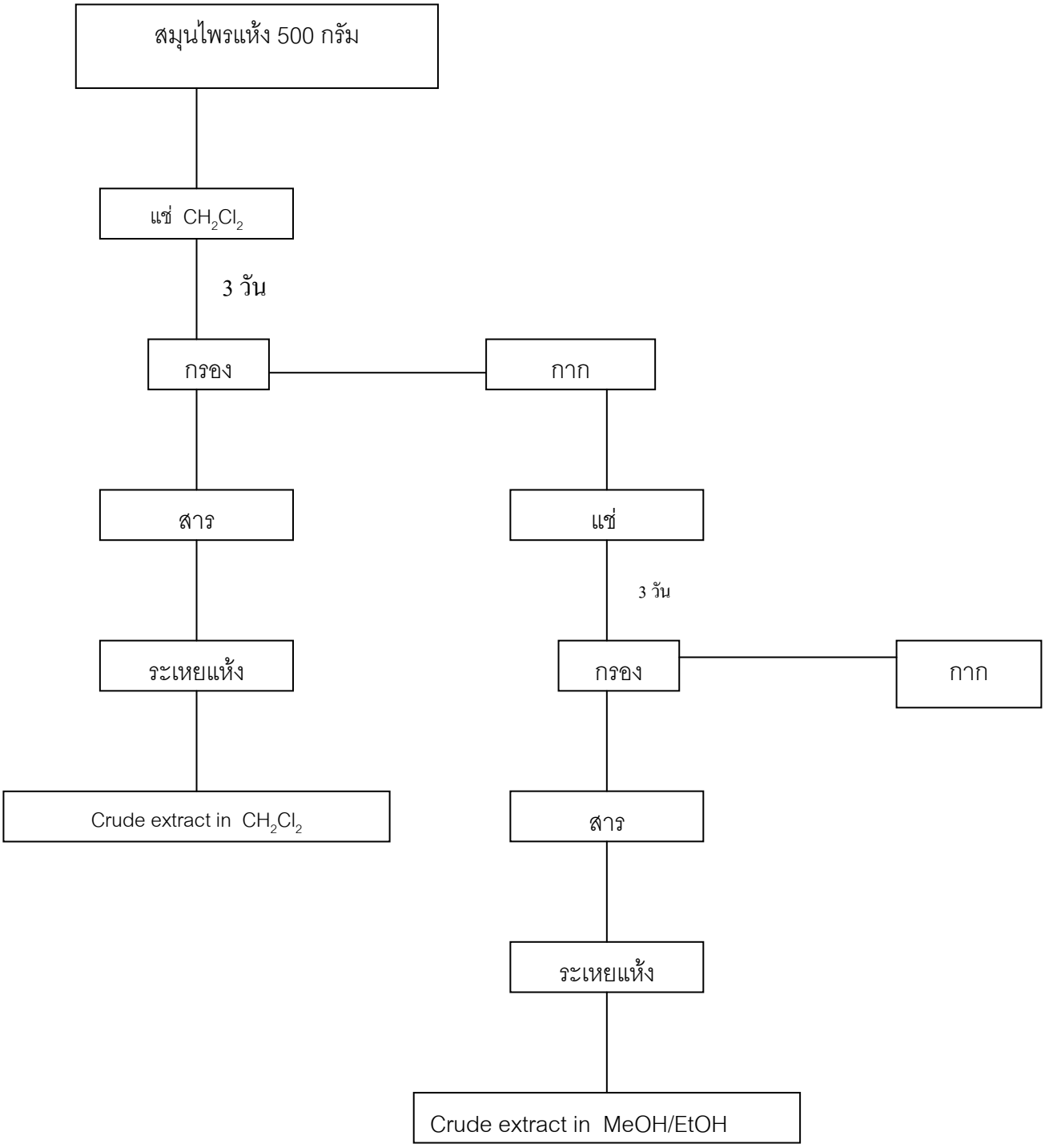
วิธีการสกัดสารเพื่อการทดสอบมักใช้วิธีการกลั่นหาน้ำมันหอมระเหย หรือวิธีการสกัดแบบง่ายด้วยอัลกอฮอล์ การศึกษาในพืชบางชนิดเช่น ต้นพลูคาว พบว่าน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิดในขณะที่สารสกัดโดยตัวทำละลายไม่มีผลยับยั้งเลย ดังนั้นสารจากว่านน้ำเพื่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนส โดยวิธีที่สกัดโดยตัวทำละลายอาจไม่ใช่วิธีที่ดีที่สุด การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดสาร ทดสอบฤทธิ์และเปรียบเทียบประสิทธิภาพ ตลอดจนวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ ด้วยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์

## ขั้นตอนในการศึกษา

### *1. การสกัดสารจากว่านน้ำโดยการกลั่น*

นำตัวอย่างเหง้าของว่านน้ำแบบสดหรือแห้งมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ บรรจุลงในเครื่องสกัดสารอเนกประสงค์ (Thai Extraction Apparatus ) รุ่น TEA – 10 (เครื่องกลั่นสารได้จากกลุ่มวิจัยเครื่องสกัดสารอเนกประสงค์ ต.หนองแหย่ง อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50210) โดยมีหลักการสกัดคือ ไอน้ำร้อนจะเป็นตัวพาให้น้ำมันออกจากตัวอย่างพืช ไอน้ำร้อนจะผ่านบริเวณท่อหล่อเย็น และทำให้ไอน้ำและน้ำมันที่สกัดได้ควบแน่นกลายเป็นของเหลว ตกลงมาในภาชนะบรรจุ โดยจะเห็นตัวอย่างน้ำมันที่แยกเป็นชั้นลอยอยู่เหนือชั้นของน้ำ

2. ***สกัดสารจากว่านน้ำด้วยตัวทำละลาย*** คือไดคลอโรมีเทน เอทธานอล และเมทธานอล ดังภาพที่ 1



***3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดว่านน้ำจากวิธีสกัดต่าง ๆกัน***

นำสารสกัดของว่านน้ำที่กลั่นด้วนน้ำ (น้ำมันหอมระเหย) สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (crude extract) เอทธานอล (crude extract) และเมทธานอล (crude extract) ทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ผสมสารสกัดที่ความเข้มข้น 0, 100, 500 และ 1,000 ppm เป็นเวลา 9 วัน ในสภาพอุณหภูมิห้อง แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ และหาเปอร์เซ็นยับยั้งการเจริญของเชื้อ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต} = \left( \frac{A - B}{A} \right) \times 100$$

A = ขนาดโคโลนีใน control

B = ขนาดโคโลนีในอาหารผสมสารสกัด

***4. ทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา Colletotrichum gloeosporioides***

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบว่านน้ำ, asarone (สารบริสุทธิ์ของว่านน้ำ), *Trichoderma* sp., *T. harzianum* และ *Bacillus* sp. ในการยับยั้งเชื้อรา*C. gloeosporioides* สาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วง โดยทำการทดลองบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ผสมกับสารที่ความเข้มข้น 0, 100, 500 และ 1,000 ppm เป็นเวลา 9 วัน ทำการวัดขนาดโคโลนีของเชื้อ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อรา *C.gloeosporioides*

***5. ทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา Colletotrichum gloeoporioides บนผลมะม่วงน้ำดอกไม้***

นำผลมะม่วงที่สุกแก่เต็มที่มาล้างด้วยน้ำให้สะอาด ตากลมให้แห้ง นำมาแช่ในสารสกัดว่านน้ำ, *Trichoderma* sp. และ *Bacillus* sp. ผสมน้ำอุ่นประมาณ 45 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้น 0, 100, 500 และ 1,000 ppm เป็นเวลา 5 นาที ตากลมให้แห้ง แล้วใช้เข็มทำแผล 3 แผล แล้วใช้ corck borer เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่อายุ 10 วัน แล้วย้ายมาวางบนผลมะม่วง แล้วนำไปบ่มไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ทำการวัดขนาดแผลของการเกิดโรคและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดโรค

***6. การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ของว่านน้ำ***

นำสารสกัดหยาบของว่านน้ำ ระเหยตัวทำละลายออกด้วย vacuum pump เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วละลายด้วย chloroform-d 99.8%DMin ประมาณ 5 มิลลิลิตร ดูดสารใส่หลอดและปิดจุกให้สนิทด้วยความระมัดระวัง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NMR spectrometry (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry) 400 MHz

***7. การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันว่านน้ำด้วยเครื่อง Gas Chromatograph***

ตัวอย่างน้ำมันว่านน้ำที่สกัดได้จากการกลั่นด้วยเครื่องกลั่นอเนกประสงค์ จะนำไปเจือจางด้วยแอลกอฮอล์ชนิดบริสุทธิ์ (Absolute Alcohol) เพื่อที่จะนำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบ ในน้ำมันว่านน้ำด้วยเครื่อง Gas Chromatograph ที่ต่อเข้ากับระบบ Mass Spectrometer โดยมีคุณสมบัติของระบบ Gas Chromatograph ได้แก่ การใช้ท่อแยกชนิด DB-1 ใช้อุณหภูมิในตู้อบจาก 80°ซ (เซลเซียส) ไปจนถึง 250°ซ มีอัตราการเพิ่มของอุณหภูมิเท่ากับ 5°ซ ต่อนาที และคุณสมบัติของระบบ Mass Sperctrometer ได้แก่ การตรวจวัดการแตกตัวของสารด้วยระบบ EI (Electron Ionization)และวัดการแตกตัวของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 35 ถึง 450 m/z

## ผลการศึกษา

น้ำมันหอมระเหยที่ได้จาการกลั่นเหง้าว่านน้ำ มีลักษณะใส สีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ส่วนสารสกัดที่ได้จากไดคลอโรมีเทน มีสีดำ หนืดและข้น ในขณะที่สารสกัดจากเอทธานอล (crude extract) และเมทธานอล(crude extract) มีลักษณะเหลว และความหนืดน้อยกว่า

เมื่อนำสารสกัดว่านน้ำทีได้จากการกลั่น (น้ำมันหอมระเหย) สกัดด้วยเอทธานอล (crude extract) เมทธานอล(crude extract) และไดคลอโรมีเทน(crude extract) มาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วง ที่ความเข้มข้น 0, 100, 500 และ 1,000 ppm บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) พบว่าว่านน้ำที่ความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งได้สูงสุดเท่ากับ 80.78 เปอร์เซ็นต์ รองมาได้แก่ไดคลอโรมีเทน เมทธานอล และเอทธิลแอลกอฮอล์เท่ากับ 75.33, 64.44 และ 60.22 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่เจริญบนอาหารทดสอบที่ผสมด้วยสารสกัดจากว่านน้ำโดยวิธีต่างๆ

| วิธีการ | ขนาดของโคโลนี (ซ.ม.) | | | | %ยับยั้งการเจริญ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 ppm | 100 ppm | 500 ppm | 1000 ppm | 100 ppm | 500 ppm | 1000 ppm |
| กลั่น | 9.00 | 8.18 | 4.95 | 1.73 | 9.11 | 45.00 | 80.78 |
| สกัดด้วย EtOH | 9.00 | 8.40 | 5.44 | 3.58 | 6.67 | 39.56 | 60.22 |
| สกัดด้วย MeOH | 9.00 | 8.35 | 5.45 | 3.20 | 7.22 | 39.44 | 64.44 |
| สกัดด้วย $CH_2Cl_2$ | 9.00 | 8.23 | 5.22 | 2.22 | 8.56 | 42.00 | 75.33 |

เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบว่านน้ำ , asarone (สารบริสุทธิ์ของว่านน้ำ), เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Trichoderma viride, T. harzianum* และ *Bacillus* sp. ในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วง โดยทำการทดลองบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ผสมกับสารที่ความเข้มข้น 0, 100, 500 และ 1,000 ppm เป็นเวลา 9 วัน พบว่า asarone ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ของว่านน้ำที่ความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และรองมาได้แก่สารสกัดหยาบจาก *Bacillus* sp., *Trichoderma* sp., ว่านน้ำ และ*T. harzianum* ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญได้เท่ากับ 83.56, 78.33, 73.33 และ 41.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดว่านน้ำ, *Trichoderma* sp. และ *Bacillus* sp. ผสมน้ำอุ่นประมาณ 45 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้น 0, 100, 500 และ 1,000 ppm เพื่อใช้ในการทดสอบการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 1,000 ppm จากเชื้อ *Bacillus* sp. สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้สูงสุดเท่ากับ 64.91 เปอร์เซ็นต์ และรองมาได้แก่ *Trichoderma* sp. และว่านน้ำ สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้เท่ากับ 46.81 และ 12.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ดังตารางที่ 3, ภาพที่ 1)

ตารางที่ 2 การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการยับยั้งเชื้อรา*Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงที่อายุ 9 วัน

| Crude extract | Diameter of colony (cm) | | | | %Inhibition[1/] | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 100 | 500 | 1,000 | 100 | 500 | 1,000 | ค่าเฉลี่ย[2/] |
| asarone | 9.00 | 6.23 | 2.67 | 0.00 | 30.78 | 70.33 | 100.00 | 67.04 a |
| waan-nam | 9.00 | 7.67 | 4.84 | 2.40 | 14.78 | 46.22 | 73.33 | 44.78 d |
| *Trichoderma isp.* | 9.00 | 7.50 | 3.53 | 1.95 | 16.67 | 60.78 | 78.33 | 51.93 c |
| *T. harzianum* | 9.00 | 8.45 | 7.40 | 5.25 | 6.11 | 17.78 | 41.67 | 21.85 e |
| *Bacillus* sp. | 9.00 | 6.57 | 3.57 | 1.48 | 27.00 | 60.33 | 83.56 | 56.96 b |

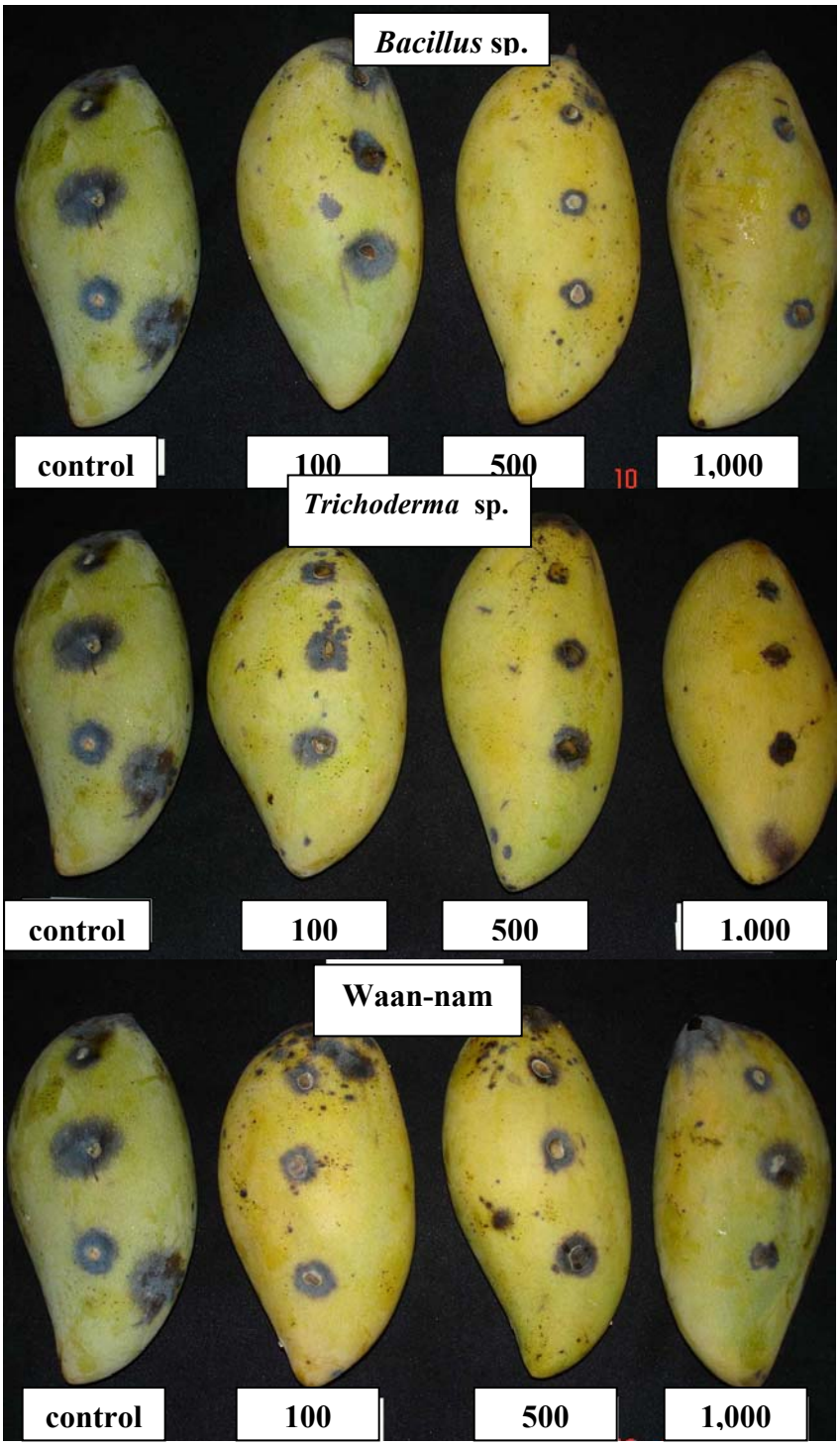
[1/]Percent Growth Inhibition = diameter of colony in control – diameter of colony in PDA mixed with crude extract/diameter of colony in control x 100

[2/]Mean value of five repeated experiments. Means in the same row followed by different letters differ significantly aacording to DMRT (P<0.01)

ตารางที่ 3 การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการยับยั้งเชื้อรา*Colletotrichum gloeosporioides* บนผลมะม่วงที่อายุ 5 วัน

| Crude extract | Diameter of symtom (cm) | | | | %Inhibition | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 100 | 500 | 1,000 | 100 | 500 | 1,000 | ค่าเฉลี่ย[1/] |
| waan-nam | 2.3 | 2.2 | 2.2 | 1.8 | 0.00 | 7.56 | 12.00 | 6.52 c |
| *Trichoderma* sp. | 2.3 | 2.3 | 1.83 | 1.17 | 2.27 | 16.81 | 46.81 | 21.96 b |
| *Bacillus* sp. | 2.28 | 2.12 | 1.4 | 0.8 | 0.70 | 38.59 | 64.91 | 34.73 a |

[1/]Mean value of five repeated experiments. Means in the same row followed by different letters differ significantly aacording to DMRT (P<0.01)




ภาพที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสมะม่วง

**ผลการตรวจวิเคราะห์สารประกอบที่สำคัญในน้ำมันว่านน้ำ**

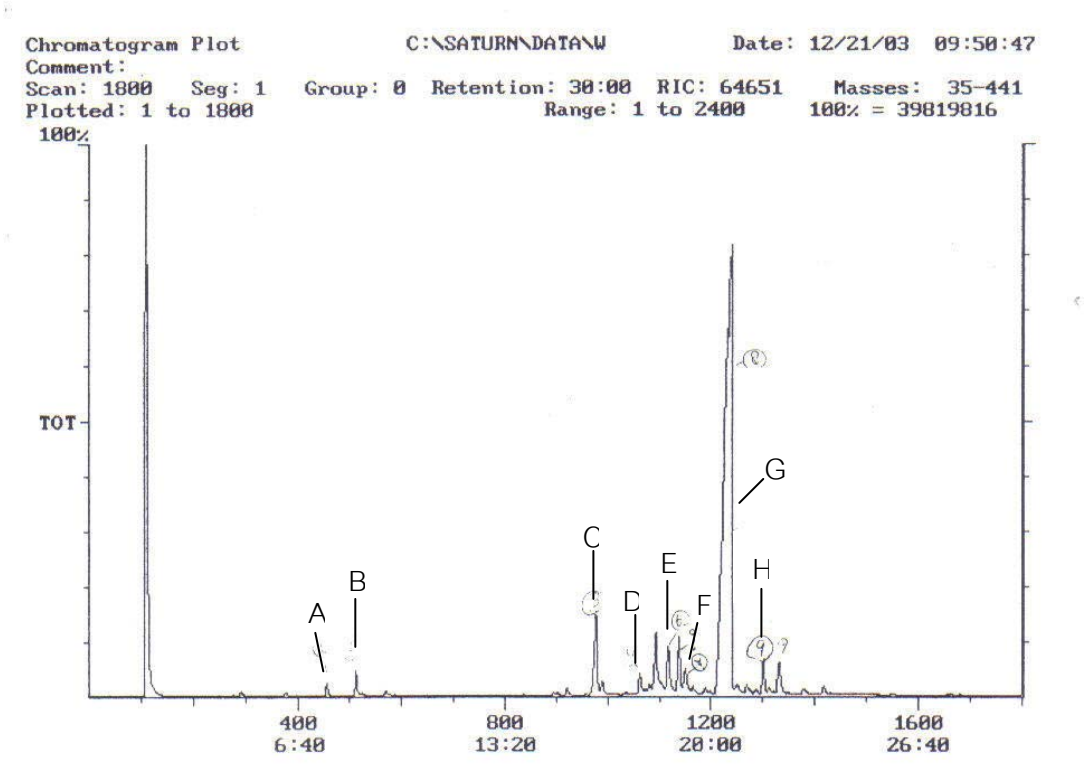
ผลการตรวจหาสารประกอบที่มีอยู่ในน้ำมันกระชายโดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph ที่ต่ออยู่กับเครื่องวิเคราะห์มวลสาร (Mass Spectrometer) โดยตรวจจากลักษณะของ Total ion chromatogram (ภาพที่ 2) พบว่ามีสารที่ประกอบอยู่ในน้ำมันว่านน้ำอย่างน้อย 11 ชนิด โดยสารประกอบที่เป็นองค์ประกอบหลักมีอยู่ 1 ชนิด คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ของสารทั้งหมดเมื่อเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟ

โดยที่มวลสารของสารประกอบแต่ละชนิดจะมีลักษณะการแตกตัวที่แตกต่างกัน และจากการใช้ข้อมูลของลักษณะการแตกตัวของสารที่แยกได้แต่ละชนิดจากน้ำมันว่านน้ำ เพื่อนำไปประมวลผลเปรียบเทียบกับข้อมูลการแตกตัวของสารในแฟ้มข้อมูลหลักของหน่วยประมวลผลการวิเคราะห์ สามารถสรุปลักษณะของสารประกอบที่ทราบชนิดของสารได้ 8 ชนิด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 โดยลักษณะการแตกตัวของสารแต่ละชนิดได้รวบรวมไว้ในภาพที่ 3 ถึง ภาพที่ 10 สารที่น่าจะเป็นไปได้ที่ประกอบในน้ำมันว่านน้ำทั้ง 8 ชนิดได้แก่ สาร A) 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- , สาร B) Bicyclor[2.2.1]heptan-2-one,1,7,7-trimethyl-, สาร C) Benzene, 1,2-dimethoxy-4-(1-propenyl)-, สาร D) Cedrol, สาร E) Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-, สาร F) Benzene, 1,2,3-trimethoxy-5-(2-propenyl)-, สาร G) Asarone และสาร H) Benzene, 1,2,4-trimethoxy-5-(1-propenyl)- โดย สาร G หรือ สาร Asarone จะพบในอัตราส่วนที่สูงที่สุด และได้ดำเนินการนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช

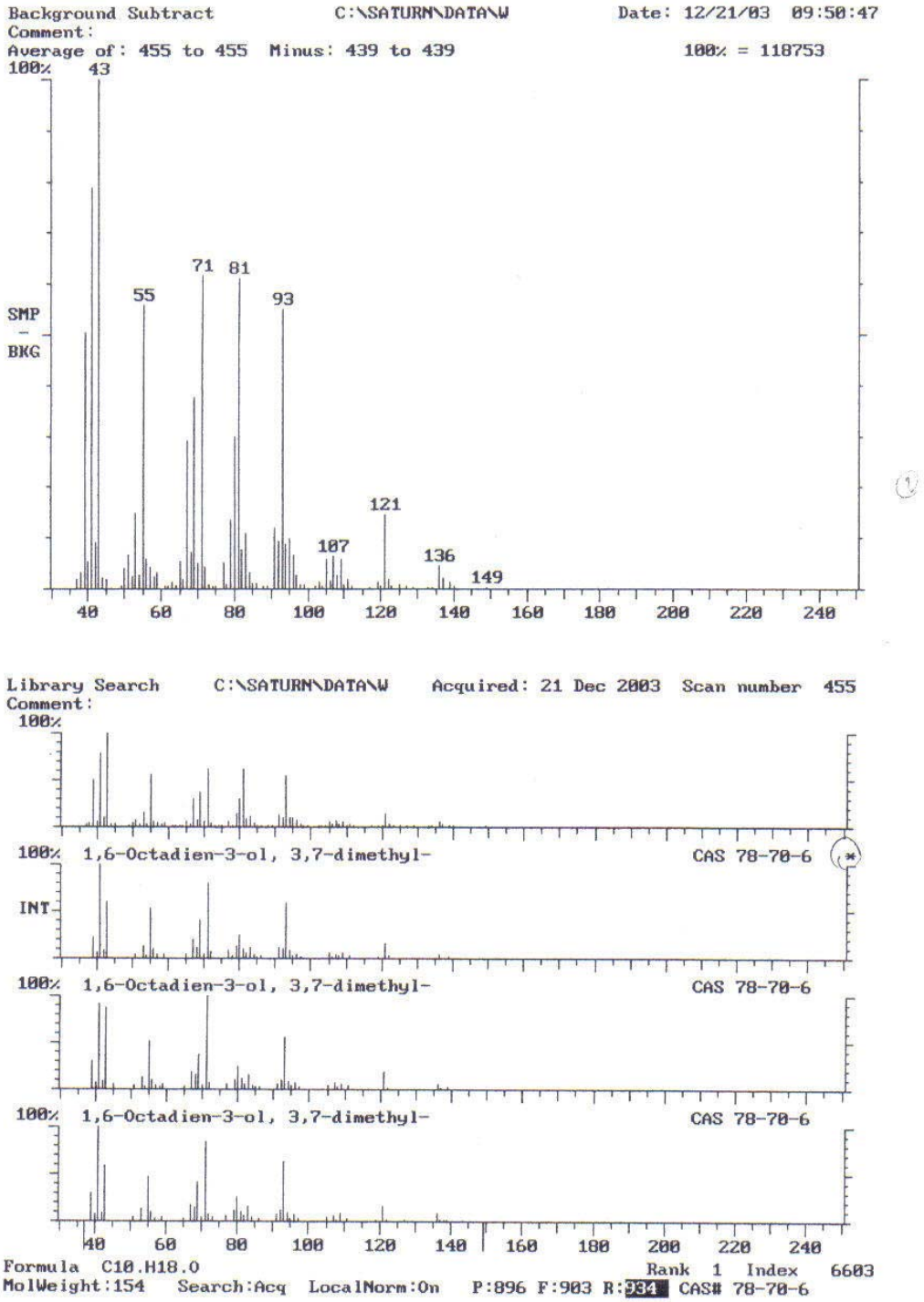
ตารางที่ 4 : แสดงรายชื่อของสารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันว่านน้ำ จากการเปรียบเทียบข้อมูลการแตกตัวของสารกับข้อมูลมาตรฐานประจำเครื่อง (Mass Spectrum Library)

| สารประกอบในน้ำมันว่านน้ำ | น้ำหนักมวลของสาร | รายชื่อของสารประกอบที่เปรียบเทียบได้จากข้อมูลมาตรฐานประจำเครื่อง | | |
|---|---|---|---|---|
| สาร A | 154 | 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- | 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- | 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- |
| สาร B | 152 | Bicyclor[2.2.1]heptan-2-one,1,7,7-trimethyl- | Camphor | Camphor |
| สาร C | 178 | Benzene, 1,2-dimethoxy-4-(1-propenyl)- | Benzene, 1,2-dimethoxy-4-(1-propenyl)- | Benzene, 1,2-dimethoxy-4-(1-propenyl)- |
| สาร D | 222 | Cedrol | Cedrol | Chrysene, octadecahydro |

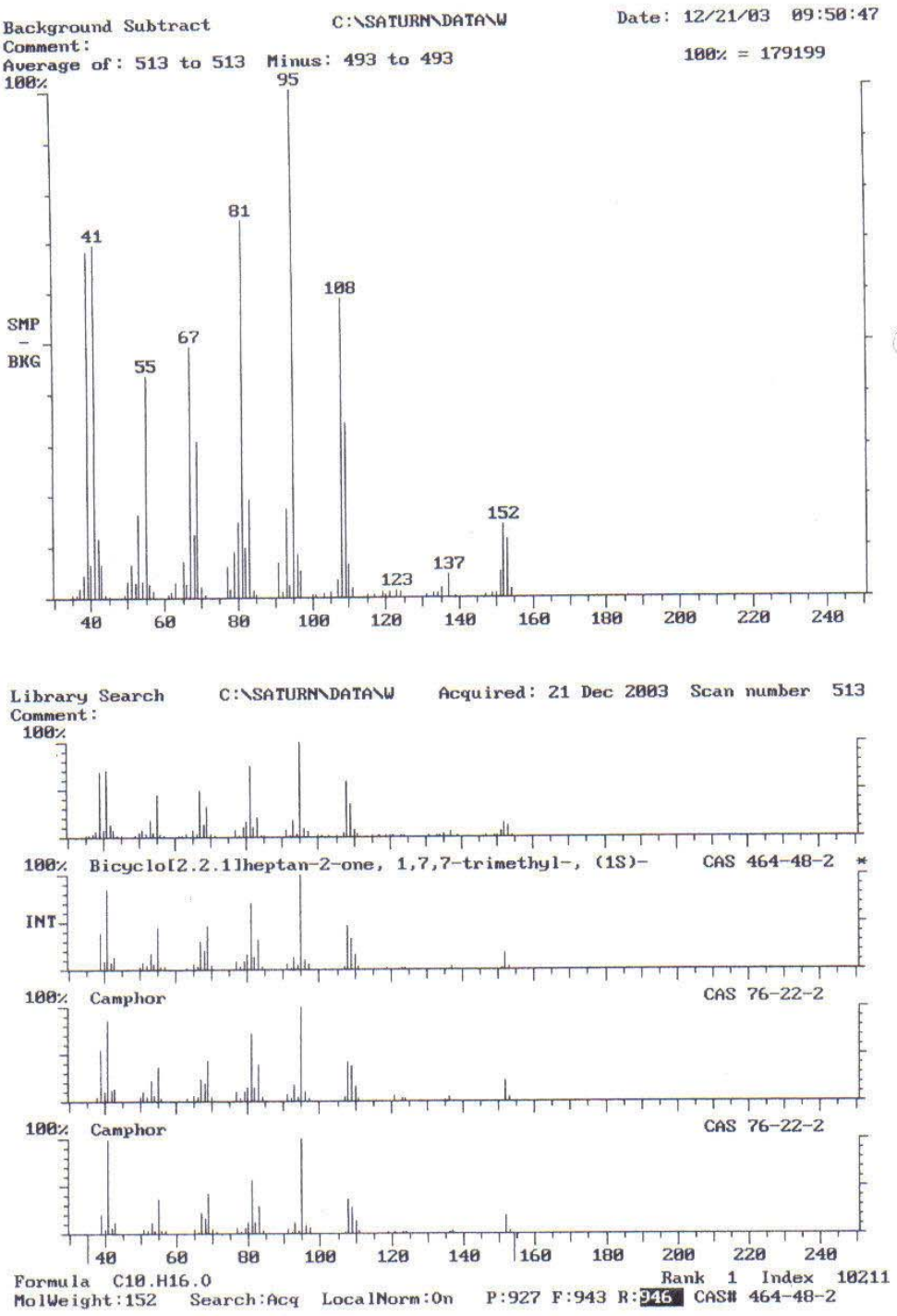
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| สาร E | 204 | Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1- | Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1- | Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-met |
| สาร F | 208 | Benzene, 1,2,3-trimethoxy-5-(2-propenyl)- | Benzene, 1,2,4-trimethoxy-5-(1-propenyl)- | Benzene, 1,2,3-trimethoxy-5-(1-propenyl)- |
| สาร G | 208 | Asarone | Benzene, 1,2,4-trimethoxy-5-(1-propenyl)- | Asarone |
| สาร H | 208 | Benzene, 1,2,4-trimethoxy-5-(1-propenyl)- | Benzene, 1,2,4-trimethoxy-5-(1-propenyl)- | Benzene, 1,2,4-trimethoxy-5-(1-propenyl)- |



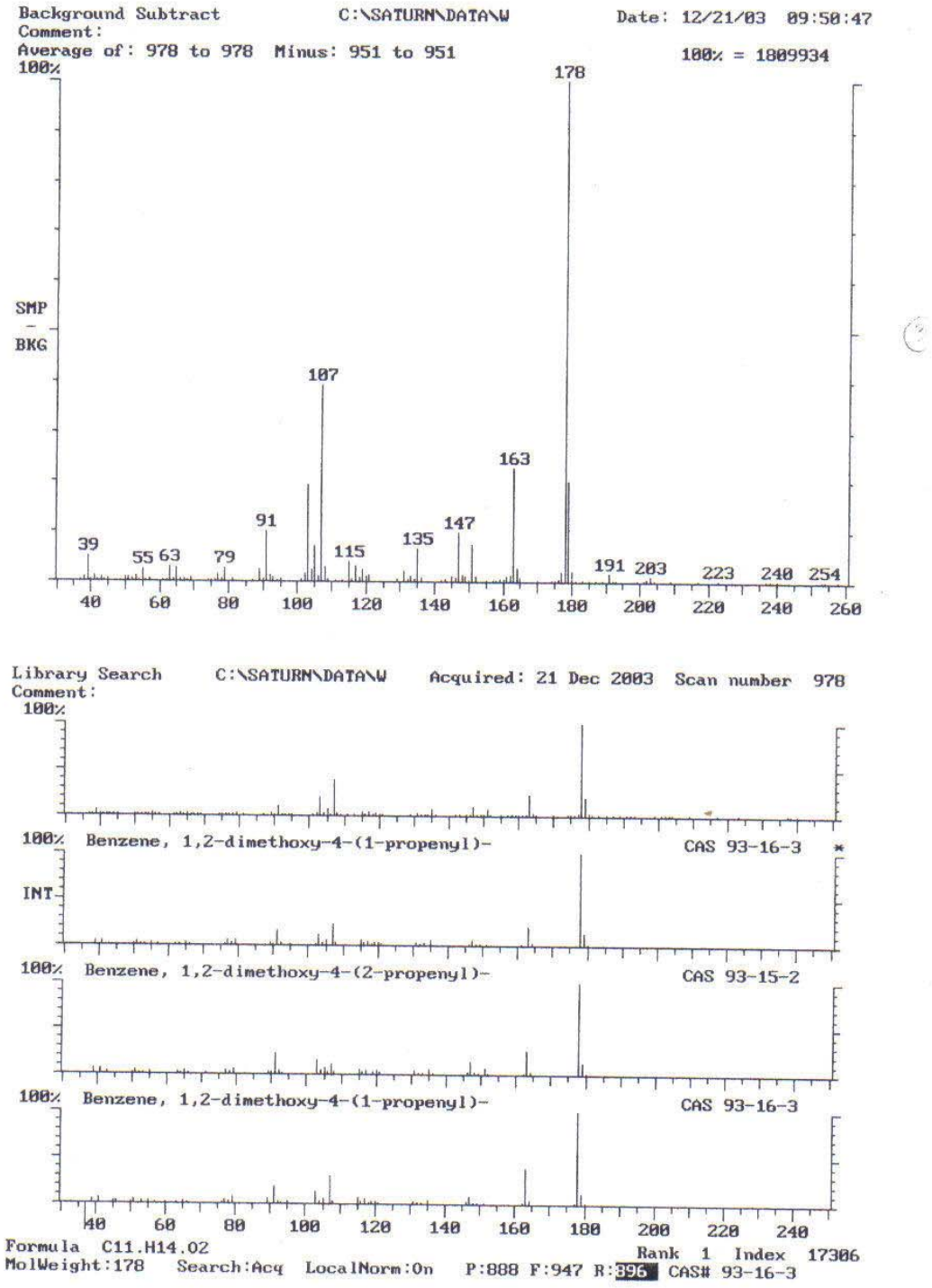

ภาพที่ 2 แสดง Total ion chromatogram ของสารที่แยกได้ด้วย Gas Chromatograph ของ**น้ำมันว่านน้ำ** ซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆประมาณ 11 ชนิด และมีสารที่ทราบถึงโครงสร้างของสารแล้วจำนวน 9 ชนิด



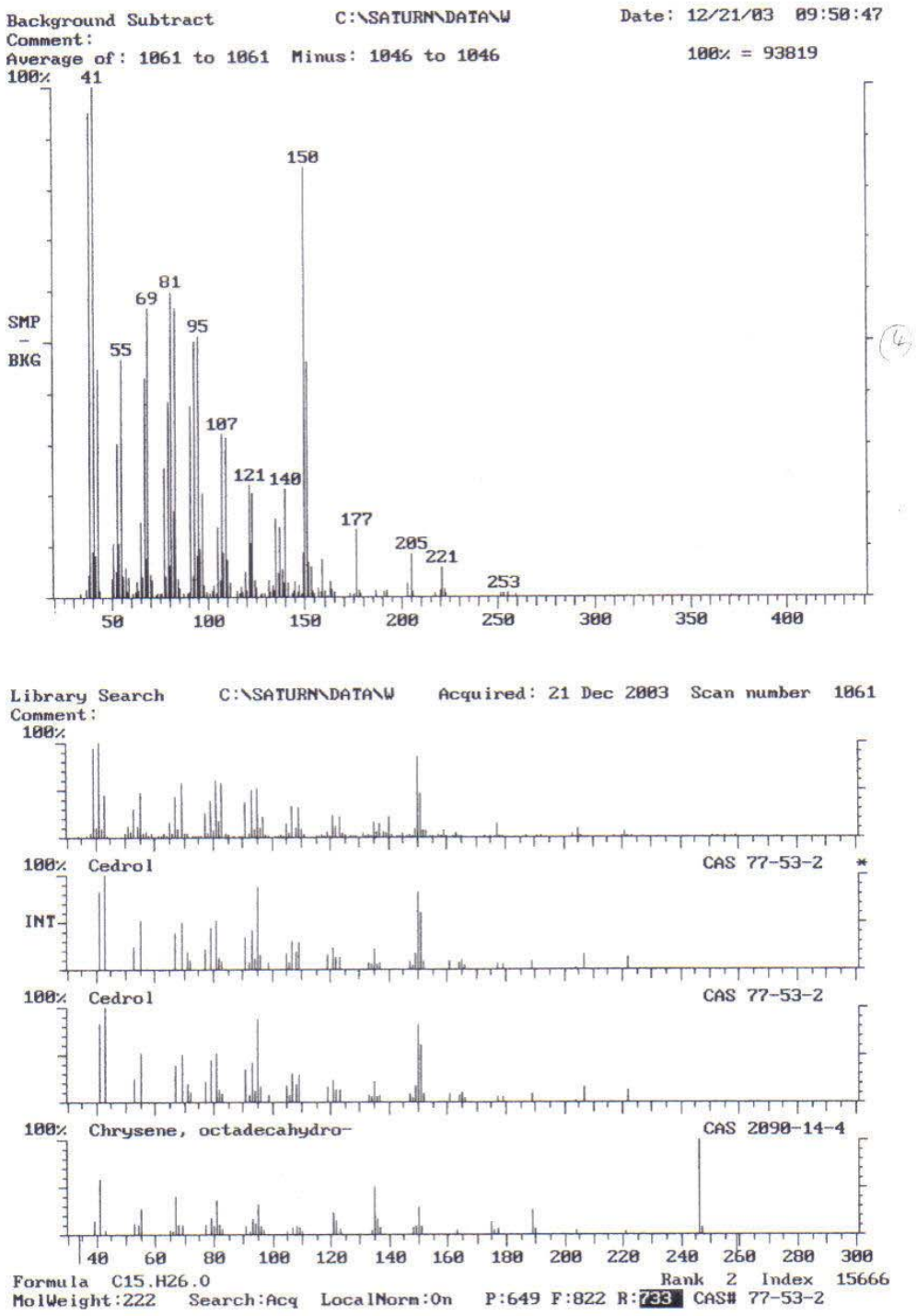

ภาพที่ 3 แสดงการแตกตัวภายใต้ Mass Spectrometer ของ**สารประกอบ** A ที่แยกได้จากน้ำมันว่านน้ำ



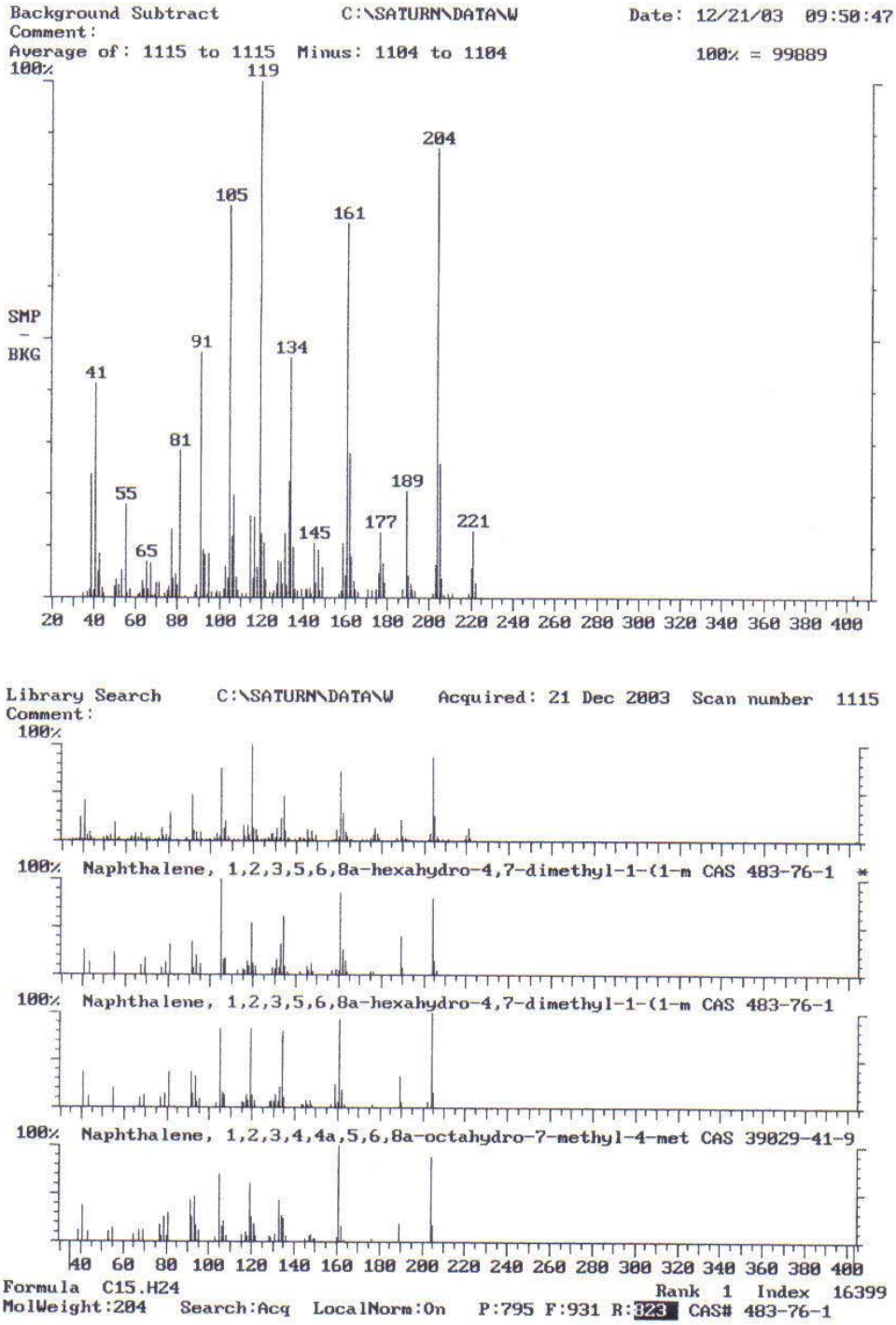

ภาพที่ 4 แสดงการแตกตัวภายใต้ Mass Spectrometer ของ**สารประกอบ** B ที่แยกได้จากน้ำมันว่านน้ำ



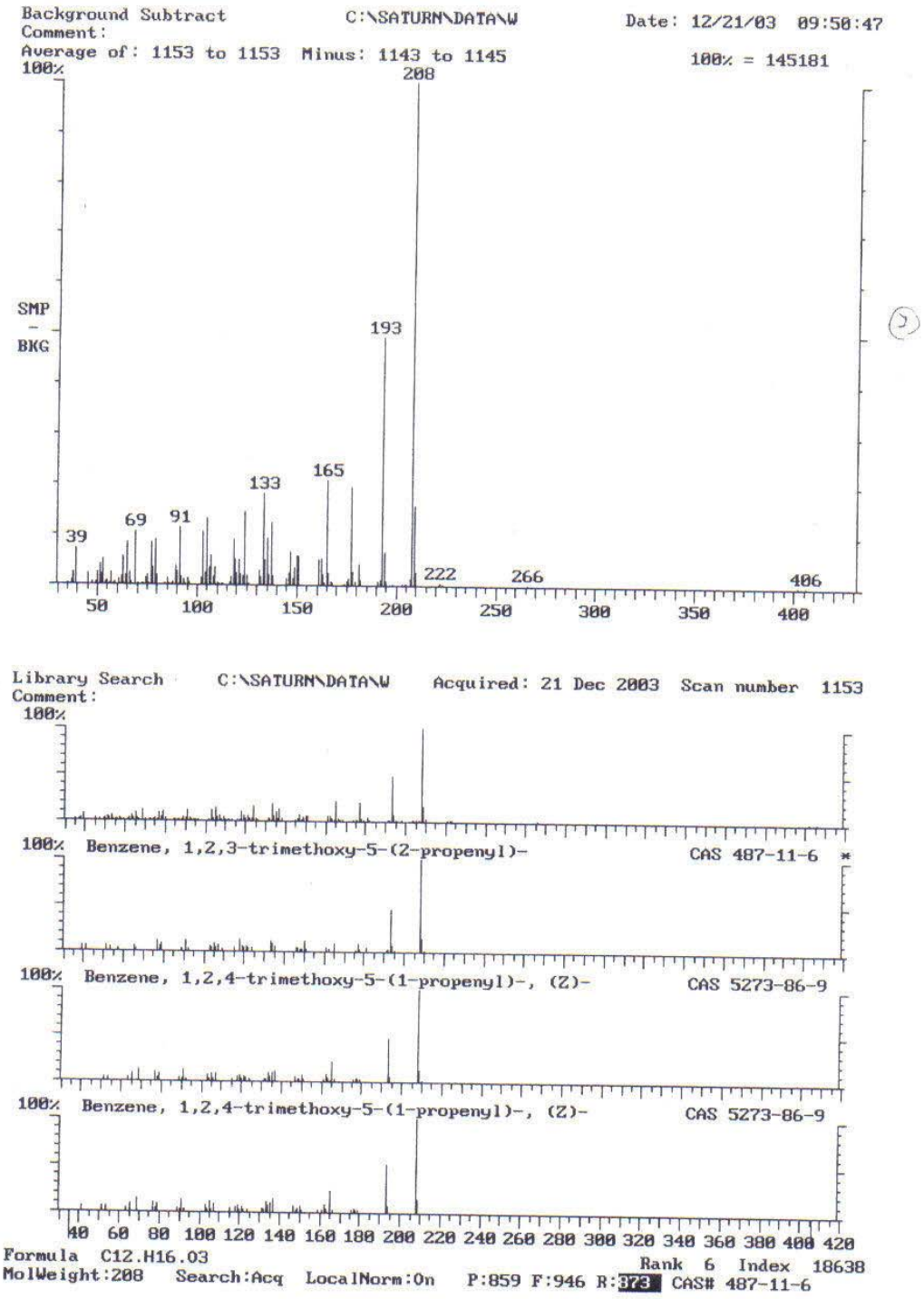

ภาพที่ 5 แสดงการแตกตัวภายใต้ Mass Spectrometer ของ**สารประกอบ** C ที่แยกได้จากน้ำมันว่านน้ำ



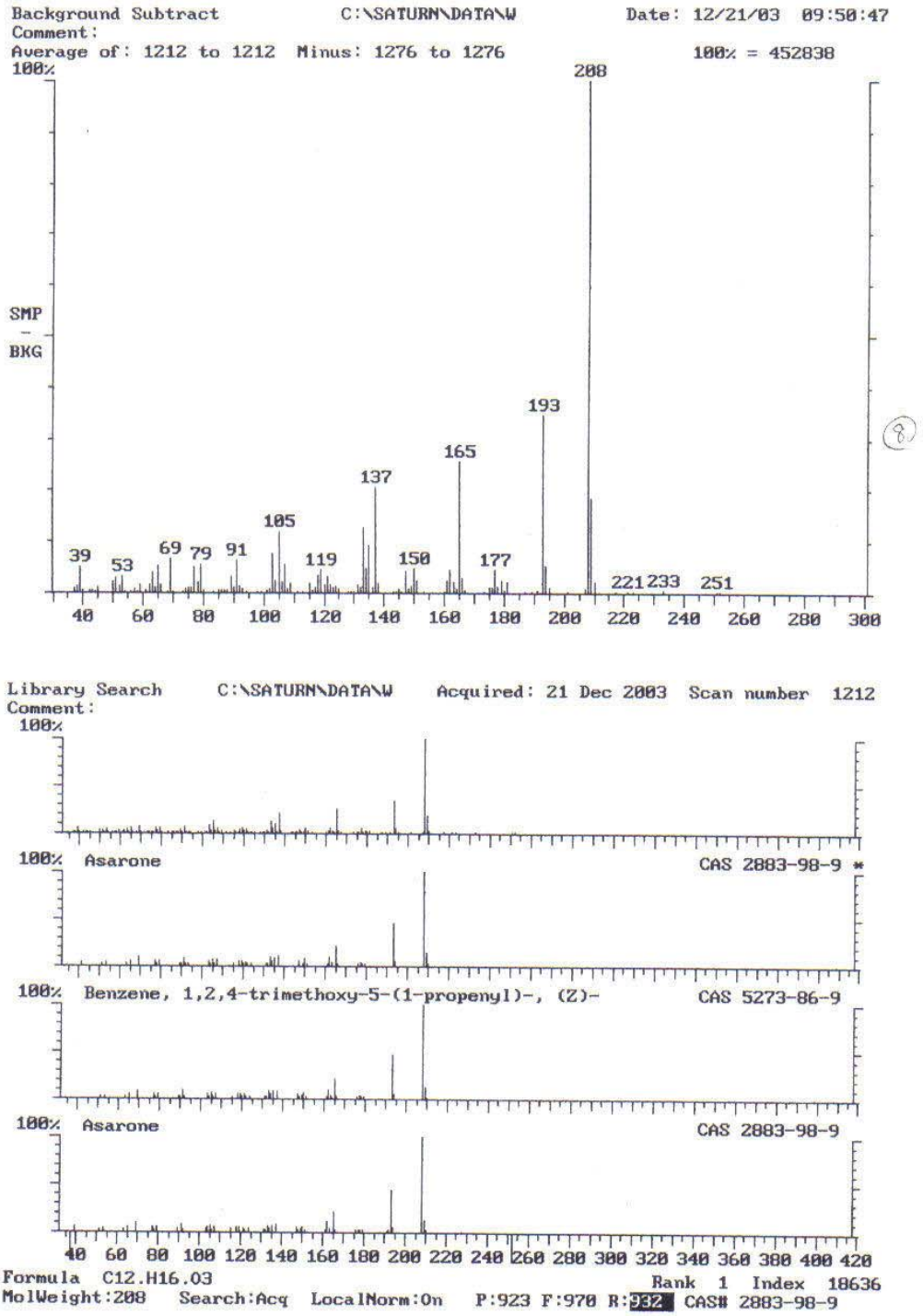

ภาพที่ 6 แสดงการแตกตัวภายใต้ Mass Spectrometer ของ**สารประกอบ** D ที่แยกได้จากน้ำมันว่านน้ำ



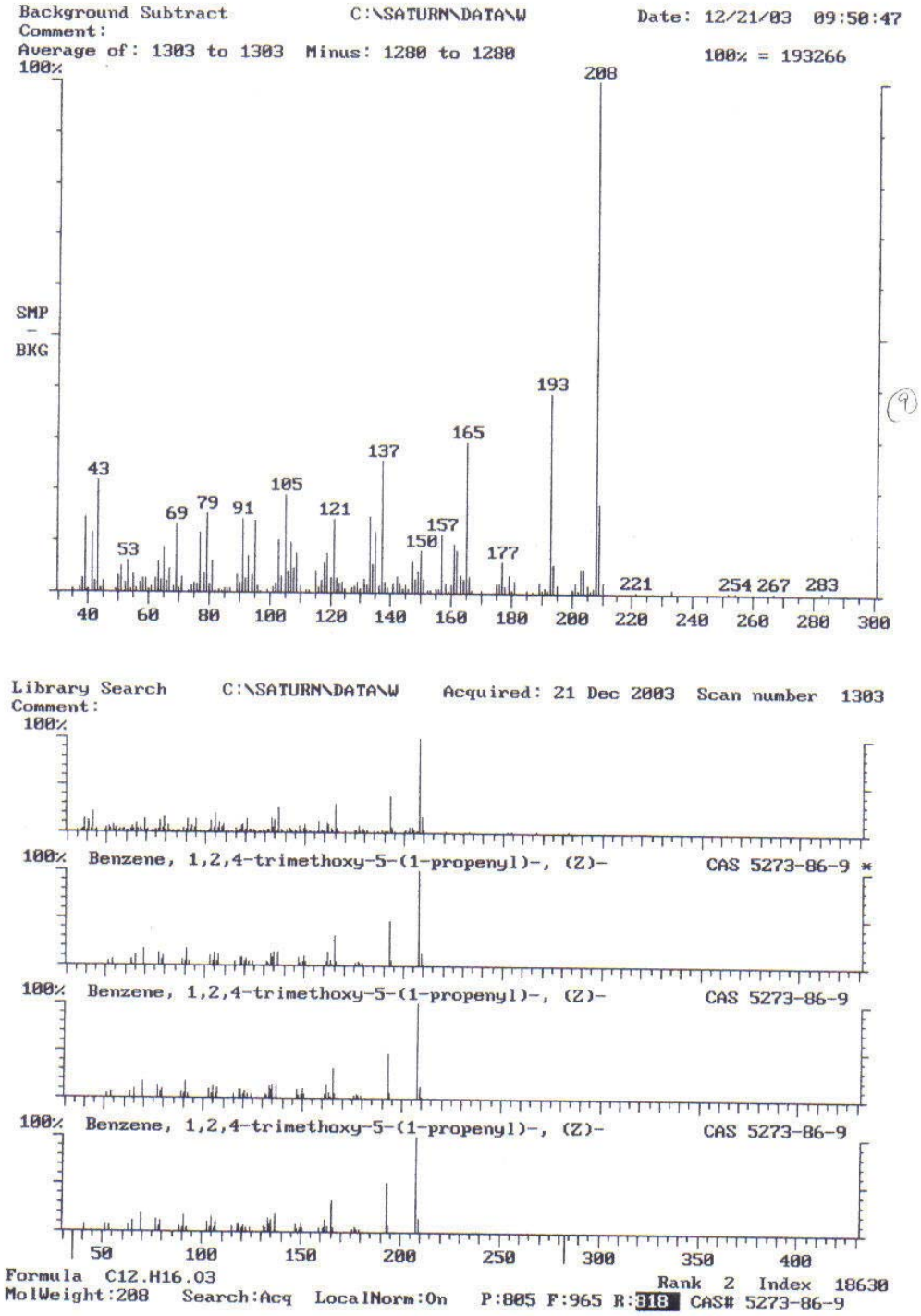

ภาพที่ 7 แสดงการแตกตัวภายใต้ Mass Spectrometer ของ**สารประกอบ** E ที่แยกได้จากน้ำมันว่านน้ำ




ภาพที่ 8 แสดงการแตกตัวภายใต้ Mass Spectrometer ของ**สารประกอบ** F ที่แยกได้จากน้ำมันว่านน้ำ

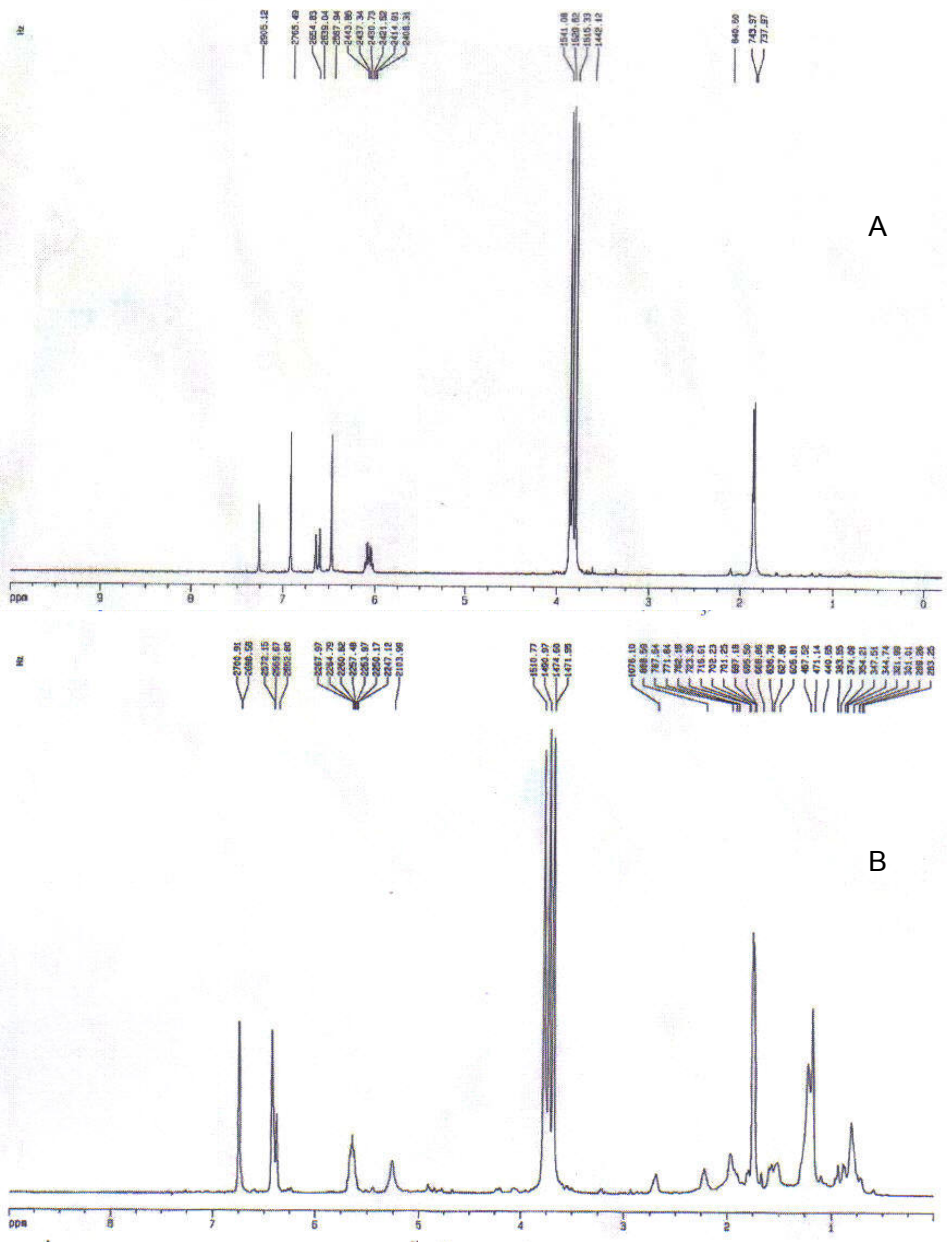



ภาพที่ 9 แสดงการแตกตัวภายใต้ Mass Spectrometer ของ**สารประกอบ** G ที่แยกได้จากน้ำมันว่านน้ำ




ภาพที่ 10 แสดงการแตกตัวภายใต้ Mass Spectrometer ของ**สารประกอบ** H ที่แยกได้จากน้ำมันว่านน้ำ

เมื่อนำสาร asarone และสารสกัดหยาบของว่านน้ำไปวิเคราะห์ตำแหน่งของโมเลกุลของไฮโดรเจนแบบเปรียบเทียบ โดยใช้เครื่อง NMR spectrometry (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry) จะพบลักษณะการเกิด resonance ของไฮโดรเจนโมเลกุลของสาร asarone อยู่ในชุดของสารสกัดหยาบว่านน้ำด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 11 A และ ภาพที่ 11 B)




ภาพที่ 11 แสดง NMR spectrum เปรียบเทียบของสาร **Asarone (A)** และ **สารสกัดหยาบว่านน้ำ (B)** ที่วิเคราะห์ด้วย 400 MHz $^{1}$H NMR ($CDCl_3$)

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นว่านน้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้สูงสุดเท่ากับ 80.78 เปอร์เซ็นต์ รองมาได้แก่การสกัดของว่านน้ำด้วยไดคลอโรมีเทน เมทธานอล และเอทธิลแอลกอฮอล์ ซึ่งแสดงผลเท่ากับ 75.33, 64.44 และ 60.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยประสิทธิภาพของน้ำมันว่านน้ำในการควบคุมเชื้อราทดสอบ ได้แสดงผลการควบคุมในระดับที่ให้ผลดีเทียบเท่ากับสารสกัดของว่านน้ำด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์

ว่านน้ำมีองค์ประกอบของสารอยู่ภายในหลายชนิด จากรายงานของชัยโย (2527) พบว่าสารที่ตรวจพบได้แก่ acoraneae, isocalemendiol, calamonic acid, asarone, acolamone, isoacolamone เป็นต้น จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบกันด้วย NMR spectrometer (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer) ของ asarone และสารสกัดหยาบของว่านน้ำ พบว่ามีลักษณะพีคของสาร asarone อยู่ในพีคของสารสกัดหยาบว่านน้ำ แสดงว่าสารสกัดหยาบของว่านน้ำที่ได้นี้มีสารออกฤทธิ์คือ asarone และจากข้อมูลของการตรวจวิเคราะห์น้ำมันว่านน้ำด้วยเครื่อง Gas Chromatograph ที่ต่อเข้ากับ Mass Spectrometer ก็ยังสามารถยืนยันได้ว่า สารออกฤทธิ์ในว่านน้ำที่สามารถควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* คือ asarone

# บทที่ 5
# องค์ความรู้ และการเผยแพร่

ข้อมูลทางวิชาการเกี่ยวกับการใช้สมุนไพรต่างๆ สามารถตรวจหาได้ทางเครือข่าย Internet ทางผู้วิจัยได้รวบรวมเส้นทางการสืบค้นสำหรับแหล่งข้อมูลที่น่าสนใจดังนี้ :

http://www.ucmp.berkeley.edu/monocots/acorus.html

http://florawww.eeb.uconn.edu/acc_num/199700056.html

http://plants.usda.gov/cgi_bin/topics.cgi?earl=plant_profile.cgi&symbol=ACCA4

http://www.herbs2000.com/herbs/herbs_calamus.htm

http://www.exoticnatural.com/memory-acorus.htm

http://www.exoticnatural.com/antiinflammatory-acorus.htm

แหล่งข้อมูลทางด้านน้ำมันหอมระเหยจากว่านน้ำ

http://res2.agr.ca/stjean/publication/resume9900/belanger4_e.htm

แหล่งข้อมูลด้านสาร Asarone

http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v16je04.htm

http://www.creationherbal.com/yhst-37605164721613/canewiacaeso.html

ทางผู้วิจัยได้นำเสนอผลงานบางส่วนในการประชุมวิชาการ ได้แก่

1) การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 1 แห่ง ในวันที่ 7 – 9 ธันวาคม 2547 ภาคโปสเตอร์ บทคัดย่อตีพิมพ์ใน วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ปีที่ 2 ฉบับพิเศษ ธันวาคม 2547 หน้า 52 - 53

2) การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 43 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในวันที่ 1 – 4 กุมภาพันธ์ 2548 ภาคโปสเตอร์ พร้อมกับการตีพิมพ์เรื่องเต็มในหนังสือ เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 43 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพ

พร้อมกันนี้ทางผู้วิจัยได้รวบรวมตัวอย่างของข้อมูลที่เกี่ยวข้อง :

การประชุมทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 1 2547

# การคัดเลือกสารสกัดพืชที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วง

พรชนก จินดาวงษ์ [1] วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล [1] ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล [2] ประสาท กิตติคุปต์ [3] และจงรักษ์ แก้วประสิทธิ์ [4]

[1]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (กำแพงแสน) จ.นครปฐม 73140
[2]หน่วยวิจัยสภาวะแวดล้อม ศูนย์ปฏิบัติวิจัยและเรือนปลูกทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ.นครปฐม
[3]ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ คลอง1 ต.คลองหลวง จ. ปทุมธานี
[4]สายวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (กำแพงแสน) จ.นครปฐม 73140

จากการคัดเลือกพืชสมุนไพร 12 ชนิด ได้แก่ ว่านน้ำ, เล่วหอม, เทียนกิ่ง, กระทือ, พลู, ขมิ้นชัน, กระเทียม, มังคุด, ทองพันชั่ง, ขิง, โป๊ยกั๊ก และ ไพล ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว พบว่าที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ว่านน้ำสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุดคือ 74.44 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ ไพล ขิง เทียนกิ่ง และกระทือ เท่ากับ 56.33, 53.88, 50.22 และ 50.22 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อเทียบกับเบนโนมิล 98% พบว่าที่ความเข้มข้น 4.9 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 µg/ml สามารถยับยั้งได้ 45.56, 72.00 และ89.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 สาขาพืช 361

# การคัดเลือกวิธีการทดสอบสารสกัดในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วง

## Bio-assay Technique to Screen Crude Extract for Controlling *Colletotrichum gloeosporioides*, Post-harvest Pathogen of Mango Anthracnose

พรชนก จินดาวงษ์ [1] วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล [1] ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล [2] ประสาท กิตติคุปต์ [3] และจงรักษ์ แก้วประสิทธิ์ [4]
Phornchanok Jindawong [1], Vichai Korpraditskul [1], Chainarong Ratanakreetakul [2],
Prasat Kittikup [3] and Jongrak Kaewprasit [4]

## บทคัดย่อ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดว่านน้ำ (*Acorus calamus* L.) ที่ความเข้มข้น 0, 100, 500 และ 1,000 ppm ในการยับยั้งการเจริญของโคโลนี และการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* พบว่าบนอาหาร PDA ผสมสารสกัด ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุดคือ 77.11 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดสอบโดยวิธี paper disc diffusion technique ไม่พบ clear zone การทดสอบการยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร water agar (WA), water agar+rose bengal (WA-RB), potato dextrose gar (PDA), potato dextrose agar+rose bengal (PDA-RB), microcentrifuge tube, multiwell plates, concave slide, slide culture และบนใบมะม่วง พบว่าสารสกัดว่านน้ำความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งการงอกสปอร์ได้ดีที่สุด คือเท่ากับ 94.5, 93.75, 79.75, 95.5, 62.37, 58.00, 67.81, 91.82 และ 69.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ผลการทดสอบพบว่าวิธีการต่างๆสามารถนำมาใช้ในการทดสอบสารสกัดจากพืชในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ ยกเว้น paper disc diffusion technique วิธีการที่ตรวจสอบได้รวดเร็ว และประหยัดคือการทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ใน concave slide

## ABSTRACT

The screening methods for efficacy test of crude extract from Waan-nam (*Acorus calamus* L.) were tested on vegetative growth and spore germination of *Colletotrichum gloeosporioides* at the concentration of 0, 100, 500 and 1,000 ppm. The results revealed that the vegetative growth on potato dextrose agar was inhibited the highest rate at 1,000 ppm as 77.11%, while the inhibition zone on paper disc diffusion technique could not expressed. The inhibition of spore germination on water agar (WA), water agar+rose bengal (WA-RB), potato dextrose agar (PDA), potato dextrose agar+rose bengal (PDA-RB), microcentrifuge tube, multiwell plates, concave slide, slide culture and mango leaf were showed the highest rate at 1,000 ppm as 94.5, 93.75, 79.75, 95.5, 62.37, 58.00, 67.81, 91.82 and 69.67 percent,respectively. Most screening method for efficacy test of plant crude extract were affected to *C. gloeosporioides*, except paper disc diffusion technique. It can be concluded that concave slide technique was the best technique for efficacy test of crude extract on spore germination of the pathogen.

Key Words: anthracnose, mango, *Colletotrichum*, plant extract, inhibition method

P. Jindawong: Rutty7@hunsa.com

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (กำแพงแสน) จ.นครปฐม 73140

[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaengsean, Nakhon Pathom 73140

[2] หน่วยวิจัยสภาวะแวดล้อม ศูนย์ปฏิบัติวิจัยและเรือนปลูกทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ.นครปฐม 73140

[2] Environmental Science Unit, Kasetsart University, Reserch and Development institute, Nakhon Pathom 73140

[3] ศูนย์พันธุวิศวกรรม คลอง1 ต.คลองหลวง จ. ปทุมธานี

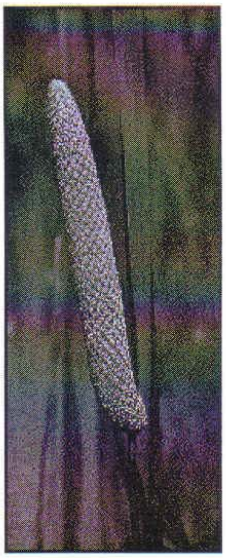
[3] National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 113 Paholyothin Road, Klong1, Pathumtani 12120

[4] ลายวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปะศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (กำแพงแสน) จ.นครปฐม 73140

[4] Department of Scince, Faculty of Liberal Arts and Scince Kasetsart University, Kamphangsean, Nakhon Pathom 73140

# *Acorus*

## Sweet flag



Sweet flag has long been known for its medicinal value, and has been cultivated in Asia for this reason. The species *Acorus calamus* is native to the southeastern United States, growing in wet areas in marshes and ditches. It looks rather grass-like, until closer inspection reveals the arum-like cluster of flowers (the **spadix**), visible in the picture at right.

*Acorus* is a rather remarkable plant in a number of respects. Until recently, it was just another arum among others, in one of the larger and more complicated monocot families. Upon investigation of its morphology and its DNA sequences, it now appears that *Acorus* may represent an early stage in the evolution of the monocots, since it falls out as their sister group.

Because this is such a small group (only one genus), it is not surprising that the fossil record is poorly known. W. L. Crepet has identified some Eocene spadices from Tennessee as belonging to this group. The preservation is good enough to reveal details of the cuticular and floral anatomy, both of which are consistent with modern *Acorus*. The fossils have been named *Acorites heeri*. Despite its sparse fossil record, the group has great importance for paleontologists, in that it gives us one picture of what early monocots may have looked like, and where they may have lived.

---

For more information about *Acorus*, try the DELTA description of the Acoraceae.

http://www.ucmp.berkeley.edu/monocots/acorus.html

Exotic Naturals

Home | Who we are | Enquiry | Contact Us

## Acorus calamus

Botanical Extracts
Other Health Ingredients
Biological Agri-Inputs
Premixes & Formulas

Specifications
Application Search
Consulting & Contract Research

Sweet Flag botanically know as Acorus calamus is a v medicinal plant found almost through out India. Ayur science has always propagated the use of Sweet Flag effective treatment against a wide variety of illnesses calamus is also found to possess anti-inflammatory a which is evident from a number of studies.

Preclinical studies reported that the extract of Acorus calamus at a dose of 400 mg/kg produced 41.2 perce inhibition of carrageenin induced inflammation in rat edema. Extract of Acorus calamus rhizomes also exhi significant anti-inflammatory effect in experimental a like acute and chronic models which was observed to comparable with that of the reference drugs like hydrocortisone, phenylbutazone etc.

In another study for evaluating anti-inflammatory eff revealed that the oral administration the extract of A calamus caused 45 percent inhibition of the carragee induced paw oedema, 13.6 percent inhibition of cotto granuloma formation and 61 percent inhibition of cro granuloma pouch inflammatory response in rats.

For further details email us.

Standardized Extracts | Cosmetic Ingredients | Medicinal Plants | Essential oils | Oleo
Neem Products | Agricultural Products | Nutraceuticals | Herbal Supplements

Best sites

http://www.exoticnatural.com/antiinflammatory-acorus.htm

Horticulture Research and Development Centre
Saint-Jean-sur-Richelieu

Research
Mandate
Pesticide Minor Use
Products/Technologies
Publications
Researchers
Research projects

Staff
Management
Staff

Complementary info
Experimental sites
Governmental programs
Informations on HRDC
Links of agricult. interest
Metric units
Resources
Site index

# Essential Oil from *Acorus Calamus* in Quebec

by André Bélanger, France Boudreau and Nathalie Grondin.

Research Summary - Table of contents.

Sweet flag (*Acorus Calamus* L.) is a perennial plant that grows around swamps and along rivers and ponds, in North America, Europe and Asia. The rhizomes of this plant have long been used as an ingredient in traditional medicines and as a flavouring for beverages. They contain a volatile oil that has a pleasant smell and taste and that can be obtained by steam distillation.

*A. Calamus* plants were harvested several times during 1997 and 1998, and several methods of extraction were tested on the rhizomes, roots and leaves, which were dried separately to various moisture levels. The processes used to extract oil from the rhizomes were steam distillation, extraction with a homogenizer, a Soxhlet and a mortar, along with microwave-assisted extraction. Essential oil was obtained from the roots by steam distillation, mortar extraction and microwave extraction, whereas steam distillation and hydrodiffusion were used on the leaves. Gas

http://res2.agr.ca/stjean/publication/resume9900/belanger4_e.htm

ß-ASARONE

Explanation

ß-asarone and calamus have not previously been eval Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.

ß-asarone (cis-isomer of 2,4,5-trimethoxy-1-propeny constituent of oil of calamus, a flavouring agent derive dried rhizome of Acorus calamus Linn. The ß-asarone cont calamus oils varies with source of the plant. Indian Aco from the Jammu area is tetraploid and yields an oil cont approximately 75% ß-asarone; Acorus calamus from Kashmir and yields an oil containing approximately 5% ß-asarone Handa, 1964). The European variety of the plant is diplo yields an oil with approximately 5% ß-asarone (Larry, 19 only the oil of the diploid variety is used for flavouri alcoholic beverages (Usseglio-Tomasset, cited in Larry, roots and rhizomes of Acorus calamus have been used in t system of medicine for treating a variety of diseases su add hysteria (Madan et al., 1960).

BIOLOGICAL DATA

BIOCHEMICAL ASPECTS

Absorption, distribution and excretion

A small amount of ninhydrin-positive material was e urine of rats following administration of ß-asarone in d 75-300 mg/kg bw i.p. Trans-asarone yielded 10-15 times t found with the cis-isomer in the same doses. The substan identified but were postulated to require the presence o propenyl double bond for formation (Oswald et al., 1969) ninhydrin-positive materials excreted after the administ safrole were later identified as tertiary amino propioph et al., 1971).

http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v16je04.htm

# บทที่ 6
# เอกสารอ้างอิง


จรัส ชื่นราม. 2537. การอารักขาพืชโดยชีววิธี การใช้สารสกัด และการเขตกรรม. **เอกสารประกอบการสัมมนาทางวิชาการเรื่อง "การอารักขาพืชเพื่อความปลอดภัยและเพิ่มรายได้ให้เกษตรกร"** ระหว่างวันที่ 13-15 กรกฎาคม 2537 โรงแรมเพชรงาม จังหวัดเชียงใหม่. 53-57.

ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์ และวิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล. 2545. ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพร และจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเน่าของแง่งขิงระหว่างการเก็บรักษา. ว.วิทย.กษ.33:6 (พิเศษ):16-22.

จิรพรรณ โสภี และสมศิริ แสงโชติ .2546. ผลของความร้อนที่มีต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และโรคแอนแทรคโนสผลมะม่วง. ว.วิทย.กษ.34:4-6 )พิเศษ (:5356.

ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, มยุรี หาญตระกูล, เกรียงศักดิ์ พูนสุข, โสภณ เริงสำราญ, สมใจ เพ็งปรีชา และอมร เพชรสม. 2527. สมุนไพร อันดับที่ 03. **การรวบรวมข้อมูลเบื้องต้นสำหรับงานวิจัยของโครงการศึกษาวิจัยสมุนไพร**. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 159 น.

นิพนธ์ วิสารทานนท์และจงรักษ์ จารุเนตร. 2535. การใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อรา 7 ชนิดระยะก่อนเก็บเกี่ยวเพื่อควบคุมโรคผลเน่า ระยะเก็บเกี่ยวของมะม่วงแรด ใน รายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 30 วันที่ 29 มกราคม –1 กุมภาพันธ์ 2535. สาขาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ร่วมกับกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กระทรวงวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีและการพลังงาน 419-412.

ปริญญา จันทรศรี สาริณี ประสาทเขตต์กรณ์ และวิชชา สอาดสุด .2542. การใช้สารพาราควอทในการตรวจสอบเชื้อราสาเหตุอาการจุดดำบนใบลำไย . รายงานการประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 4 27-29 ตุลาคม 2542. 323-327.

ปริญญา จันทร์ศรี วันเพ็ญ ศรีชาติ และวิชชา สอาดสุด .2544. ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บางชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุของอาการใบจุดดำ .การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5 "อารักขาพืช: ผลิตอาหารเพื่อประชากรโลก" 21-23 พฤศจิกายน 2544 โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แคว อ.เมือง จ.กาญจนบุรี .183-191.

ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์, เฉลิมชัย วงษ์อารี และ ธิติมา วงษ์ชีรี. 2542. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชบางชนิดร่วมกับสารเคลือบผิวที่มีต่อโรคแอนแทรคโนส และขั้วผลเน่าของมะม่วงระหว่างการเก็บรักษา. ว.วิจัยและพัฒนา มจธ. 22(3):77-92.

รวีวรรณ เดื่อมขันมณี. 2542. ผลของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อรา*Sclerotium rolfsii* Sacc. การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 4 " เทคโนโลยีการอารักขาพืชในทศวรรษหน้า" 27-29 ตุลาคม 2542 โรงแรมแอมบาสเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน พัทยา ชลบุรี. 78-81.

วัชระ สวายประโคน. 2535. ผลของสารสกัดจากพืชต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหารสังเคราะห์ PDA. **ปัญหาพิเศษ**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. อุบลราชธานี.

วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล, ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล และรุ่งนภา ก่อประดิษฐ์สกุล. 2533. ผลของสารสกัดจากพืชที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง, ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 28. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 359-370

วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล, ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล และรุ่งนภา ก่อประดิษฐ์สกุล. 2542. การพัฒนาสารออกฤทธิ์จากว่านน้ำเพื่อใช้ควบคุมโรคผลเน่าของมะม่วงเพื่อการส่งออก. **รายงานการวิจัย**. 34 หน้า

สุพจน์ กาเซ็ม และสุดฤดี ประเทืองวงศ์ . 2544. เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคสำคัญของถั่วเหลืองทัดเทียมสารเคมี .การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5 "อารักขาพืช: ผลิตอาหารเพื่อประชากรโลก" 21-23 พฤศจิกายน 2544 โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แคว อ.เมือง จ. กาญจนบุรี .237-248.

อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ, วิชัย หฤทัยธนาสันติ์, งามผ่อง คงคาทิพย์ และอุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์. 2544. การออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราบางชนิดของสารสกัดพลูที่ได้จากตัวทำละลายเอทานอล และเอทานอลผสมกรด. *ใน* รายงานการวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์ การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 197-202.

อุมาพร จันดี อุดมพร นางสุบิน แม้นสรวง วุฒิอุดมเลิศ และสมภพ ประธานธุรารักษ์. 2545. ผลจากตัวทำละลายและเวลาที่ใช้สกัดสมุนไพรต่อฤทธิ์ต้านราของสารสกัด. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40 สาขาวิทยาศาสตร์. 188-191.

Chaky, J., Anderson, K., Moss, M. and Vaillancourt, L. 2001. Surface Hydrophobicity and Surface Rigidity Induce Spore Germination In *Colletotrichum grminicola.* Phytopathology 91: 558-564.

Griffee, P. J. 1973. Resistance to benomyl and related fungicides in *Colletotrichum musae.* **Transactions of the British Mycological Society**. 60:433-439.

Haugard, H., D.B. Collinge and M.F. Lyngkjaer. 2002. Mechanisms ivolved in Control of *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* in barley treated with mycelial extracts from cultured fungi. Plant Pathology 51:612-620.

Jatistienr, C. and Jatisatienr, A. 1999. The Fungicidal Properties of Extracts of Clove (*Eugenia caryophyllus* Spreng.) and Sweet Flag (*Acorus calamus* Linn.) **Acta Hort** : 87-93.

Phonglux, D. 1987. Medical Plants. The first Princess Chulabhorn Science Congress. December 10-13, 1987. Bangkok Thailand.

Pursky, D., Keen, N.T., Sims,J.J. and Midland, S.L. 1982. Possible involvement of antifungal diene in the latecy of *Colletotrichum gloeosporioides* on unripe avocado fruits. Phytopathology 72:1578-1582.

Suhaila, M., S. Suzana, H.E1-S Saleh, M.A. Abdul, and M. Sepiah. 1996. Antimycotic Screening of 58 Malaysian Plant against Plant Pathogens. Pestic.Sci. 47:259-264.

Wedge, D. E. and J.M. Kuhajel. 1998. A Microbioassay for Fungicide Discovery. Biochem&Biotech 11:1-7.