ผลของสารสกัดหยาบเมทานอลจากตะไคร้และมะขามต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* และ *Colletotrichum gloeosporioides* จากมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง

Effect of Methanolic Crude Extracts of Lemongrass and Tamarind on Growth Inhibition of *Lasiodiplodia theobromae* and *Colletotrichum gloeosporioides* of Mango 'Nam Dok Mai Sri Thong'

เนตรนภิส เขียวขำ[1,2] เนตรณพิศ นาคอ่วมค้า[1] บงกช นิลกาญจน์[1] และ สมศิริ แสงโชติ[1,2]
Netnapis Khewkhom[1,2], Netnapit Nakoumkha[1], Bongkot Nillakan[1] and Somsiri Sangchote[1,2]

Abstract

The objective of this research was to study antifungal activity of methanolic crude extracts from lemon grass (*Cymbopogon citratus*) and tamarind (*Tamarindus indica*) against *Lasiodiplodia theobromae* causing stem end rot and *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose disease of mango. The fungi were isolated from mango 'Nam Dok Mai Sri Thong' by using tissue transplanting technique. Mycelium growth inhibition was examined by using poison food technique with the crude extracts at concentrations of 50,000, 10,000 and 1,000 ppm from leaf blade and haulm of lemon grass and leaf blade and ripe tamarind. Crude extract of lemon grass leaf blade at 50,000 ppm showed high mycelium growth inhibition at significant difference of 80.78% and 79.24 % of *L. theobromae* in 3 days of inoculation and *C. gloeosporioides* in 7 days of inoculation, respectively ($P \leq 0.05$). None of crude extract showed spore inhibition of *L. theobromae*. Spore germination of C. *gloeosporioides* at 10^6 conidia/mL was inhibited by crude extract of tamarind blade at minimum inhibitory concentration (MIC) 166.67 µg/ml after 24 hr incubation time.

Keywords: Stem end rot, Anthracnose, Plant crude extract

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเมทานอลจากใบและต้นตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*) มะขามเปียกและใบมะขาม (*Tamarindus indica*) ในการยับยั้งเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* สาเหตุที่ทำให้เกิดโรคขั้วผลเน่าของมะม่วง และเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุที่ทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนส โดยแยกเชื้อราได้จากมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง ด้วยวิธี tissue transplanting ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราด้วยสารสกัดหยาบด้วยเมทานอล โดยใช้ส่วนใบ ลำต้นและกาบใบของตะไคร้ และส่วนใบและเนื้อมะขาม (มะขามเปียก) ทดสอบด้วยวิธี poison food บนอาหาร PDA ความเข้มข้น 50,000 10,000 และ 1,000 ppm หลังจากเลี้ยงเชื้อรา *L. theobromae* เป็นเวลา 3 วัน และเลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสารสกัดหยาบจากใบตะไคร้ที่ความเข้มข้น 50,000 ppm มีประสิทธิภาพสูงสุดในยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราทั้งสองชนิด ได้ร้อยละ 80.78 และ 79.24 ตามลำดับ และไม่มีสารสกัดหยาบชนิดใดที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *L. theobromae* ได้ สารสกัดจากใบตะไคร้แสดงคุณสมบัติยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร มีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ที่ความเข้มข้น 166.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากบ่มไว้ 24 ชั่วโมง

คำสำคัญ: โรคขั้วผลเน่า โรคแอนแทคโนส สารสกัดหยาบจากพืช

คำนำ

มะม่วงเป็นผลไม้ส่งออกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นผลไม้ที่นิยมบริโภคทั้งตลาดภายในและตลาดภายนอกประเทศ ทั้งในลักษณะผลดิบ ผลสุก และผลิตภัณฑ์แปรรูป ในปี พ.ศ. 2556 มีปริมาณการส่งออกมะม่วงทั้งมะม่วงสดและมะม่วงแปรรูป 67,602,051 กิโลกรัม คิดเป็นมูลค่ารวม 2,642,156,601 บาท (สานักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองมีศักยภาพสูงในการส่งออกเนื่องจากมีรูปทรงและสีสวย มีรสชาติเป็นที่นิยมอย่างมาก แต่

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900
[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10400
[2] Postharvest Technology Innovation Center, Commission on Higher Education, Bangkok 10400

เมื่อผลสุกแก่ปัญหาที่มักพบเสมอคืออาการผลเน่า เนื่องจากโรคแอนแทรกโนสจากเชื้อราสาเหตุ *C. gloeosporioides* เป็นส่วนมาก รองลงมาคือโรคขั้วผลเน่าจากเชื้อราสาเหตุ *L. theobromae* (นิพนธ์, 2542; สมศิริ, 2531) ทาให้เกิดการสูญเสียหลังการเก็บเกี่ยว ทั้งในแง่ของต้นทุนการผลิต การขนส่ง และคุณภาพของผลิตผล เพื่อลดปัญหาจากการใช้สารเคมีการใช้สารสกัดจากพืชเป็นทางเลือกที่แนวโน้มในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว (เนตรนภิส และคณะ, 2552) สารสาคัญของพืชสมุนไพรอาทิเช่น น้ามันหอมระเหยจากใบตะไคร้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา (Farhang *et al*., 2013) และมะขามชนิดเปรี้ยวประกอบด้วยกรดอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดทาร์ทาริค กรดซิตริค กรดมาลิค เป็นต้น มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (Donghari *et al*., 2006)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เตรียมเชื้อรา *L. theobromae* และ *C. gloeosporioides* จากผลมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองที่แสดงอาการโรค มาแยกเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี tissue transplanting บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

2. เตรียมสกัดสารสกัดหยาบ นำมะขามเปียก (*Tamarindus indica*) ใบมะขาม ใบตะไคร้ (*Cymbopogon citraus*) และต้นตะไคร้ (กาบใบและลำต้น) อย่างละ 1 กิโลกรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ผึ่งในที่ร่มให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง แช่ด้วยตัวทำละลายเมทานอล 2 ลิตร ในขวดแก้วสีชาที่ปิดสนิทในที่มืด เป็นเวลา 7 วัน กรองแยกสารสกัดด้วยกระดาษกรอง whatman no. 1 แล้วนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator แยกสารสกัดหยาบด้วยกรวยแยกโดยใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและน้ำ โดยจะใช้ส่วนที่ละลายในไดคลอโรมีเทน ซึ่งเป็น lipophillic phase หลังจากระเหยทำละลายคลอโรฟอร์มออกแล้ว เก็บสารสกัดหยาบในเมทานอล ชั่งน้ำหนักแห้งและเก็บสารสกัดหยาบเก็บในขวดสีชา ได้น้ำหนักแห้งของใบมะขาม 1,110 มิลลิกรัม มะขามเปียก 4,882 มิลลิกรัม ต้นตะไคร้ 7,710 มิลลิกรัม และใบตะไคร้ 4,440 มิลลิกรัม จากนั้นนำสารสกัดพืชมาหาค่าความเข้มข้น คำนวณเป็นค่าความเข้มข้นของสารเป็นหน่วย ppm และเตรียมสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้สูตร $N_1 V_1 = N_2 V_2$ เก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชที่มีผลต่อเชื้อรา *L. theobromae* และ *C. gloeosporioides*

3.1ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *L. theobromae* และ *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี poisoned food เตรียมสารสกัดจากมะขามเปียก ใบมะขาม ใบตะไคร้ ต้นตะไคร้ ที่ความเข้มข้น 1,000 10,000 50,000 ppm ในอาหาร PDA ผสมให้เข้ากันแล้วเทใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ในส่วนของชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นผสมแทนสารสกัด ตัดปลายเส้นใยเชื้อราอายุ 7 วัน ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางบนผิวหน้าของอาหารผสมสารสกัดพืช บ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราในส่วนของชุดควบคุมเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ จึงวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีและนำค่าที่ได้มาคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งการเจริญ

โดยใช้สูตร ร้อยละของการยับยั้ง = [(A-B) / A] x 100

เมื่อ A คือ ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อราชุดควบคุม

B คือ ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ผสมสารสกัดจากพืช

3.2 ทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดที่มีผลต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *L. theobromae* และ *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี microdilution bioassay ในอาหารเหลว malt broth เตรียมสารสกัดจากมะขามเปียก ใบมะขาม ใบตะไคร้ ต้นตะไคร้ ความเข้มข้นเริ่มต้น 2,500 ppm เจือจางด้วยวิธี serial dilution ใน micro well plate 96 หลุม และชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เติมสารละลายสปอร์เชื้อราความเข้มข้น 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร สังเกตดูการงอกของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการงอกของสปอร์ (minimum inhibitory concentration, MIC)

ผล

1. **ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *L. theobromae* และ *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี** poisoned food

สารสกัดจากพืชทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราทั้งสองชนิด ร้อยละ 54.24-80.78 สารสกัดหยาบจากใบตะไคร้สามารถการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* และ *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด ร้อยละ 80.78 และ 79.24 ตามลำดับ

2. **ทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดที่มีผลต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *L. theobromae* และ *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี** micro dilution bioassay

สารสกัดหยาบจากมะขามเปียก ใบมะขาม ใบตะไคร้ และต้นตะไคร้ ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* สารสกัดหยาบจากใบตะไคร้มีประสิทธิภาพดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 156 µg/mL เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดหยาบจากมะขามเปียกและใบมะขามสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้เป็นเวลานานกว่า โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1,250 และ 312 µg/mL เมื่อบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แต่สารสกัดหยาบทั้งหมดไม่มีผลต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *L. theobromae*

Table 1 Efficacy of crude extracts of tamarind and lemon grass at three concentrations on mycelial growth inhibition of *Lasiodiplodia theobromae* and *Colletotrichum gloeosporioides*.

Crude extract from plant parts		Percentage of mycelial growth inhibition					
		L. theobromae			*C. gloeosporioides*		
		1,000 ppm	10,000 ppm	50,000 ppm	1,000 ppm	10,000 ppm	50,000 ppm
Tamarindus indica (tamarind)	ripe fruit	77.00a	71.44b	74.56b	57.88b	72.58a	76.21a
	blade	71.33ns	68.56ns	71.78ns	54.24b	64.39a	71.91a
Cymbopogon citratus (lemon grass)	blade	69.67b	79.78a	80.78a	65.30b	69.55b	79.24a
	haulm	72.44ns	68.78ns	76.78ns	65.61ns	68.79ns	68.03ns

Mean values within column followed by the same letter are not significantly different ($p<0.05$) by DMRT (Duncan's New Multiple Range Test)

Table 2 Effect of crude extracts on spore germination inhibition by micro dilution test

Crude extract from plant parts		MIC (µg/mL)					
		L. theobromae			*C. gloeosporioides*		
		24 hr	48 hr	72 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Tamarindus indica	ripe fruit	>2,500	>2,500	>2,500	312.5	312.5	1,250
	blade	>2,500	>2,500	>2,500	312.5	312.5	312.5
Cymbopogon citratus	blade	>2,500	>2,500	>2,500	156	2,500	2,500
	haulm	>2,500	>2,500	>2,500	312.5	>2,500	>2,500

วิจารณ์ผล

จากการทดลองพบว่าสารสกัดจากมะขามเปียก ใบมะขาม ใบตะไคร้ และต้นตะไคร้ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *L. theobromae* และ *C. gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วง มะขามจัดเป็นพืชอาหาร และพืชสมุนไพรเพราะมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด (Doughari, 2006; Escalona-Arranz et al., 2010) ในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะขามมีสาระสำคัญได้แก่ benzyl benzoate และ limonene เป็นต้น (Pino *et al*., 2002) และยังมีสารสำคัญในกลุ่มอื่นอีกเช่น flavonoids ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ มีสาระสำคัญได้แก่ **α**- citral (39.16%), Z- citral (30.95%), limonene (5.83%), caryophyllene (3.44%) และ ceranyl acetate (3.1%) (Farhang *et al*, 2013) มีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* spp. นอกจากนี้มีงานวิจัยพบว่าน้ำมันหอมระเหยของตะไคร้มีคุณสมบัติต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวด้วย (Tzortzakis and Economakis, 2007) เป็นโอกาสดีหากสามารถนำพืชทั้งสองชนิดมาประยุกต์ใช้ควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวได้ เนื่องจากใบมะขามหาได้ง่าย ส่วนมะขามเปียกอาจใช้สิ่งเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม ใบตะไคร้ก็เป็นส่วนที่ตัดแต่งทิ้งเมื่อนำไปวางขาย

สรุป

1. สารสกัดหยาบจากมะขามเปียก ใบมะขาม ใบตะไคร้ และต้นตะไคร้ มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* และ *C. gloeosporioides* ร้อยละ 54.24-80.78 สารสกัดหยาบจากใบตะไคร้สามารถการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *L. theobromae* และ *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด ร้อยละ 80.78 และ 79.24 ตามลำดับ

2. สารสกัดหยาบจากมะขามเปียก ใบมะขาม ใบตะไคร้ และต้นตะไคร้ ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* สารสกัดหยาบจากใบตะไคร้มีประสิทธิภาพดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 156 µg/mL เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดหยาบจากมะขามเปียกและใบมะขามสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้เป็นเวลานานกว่า โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1,250 และ 312 µg/mL เมื่อบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แต่สารสกัดหยาบทั้งหมดไม่มีผลต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *L. theobromae*

เอกสารอ้างอิง

นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2542. โรคไม้ผลเขตร้อนและการป้องกันกาจัด. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 172 หน้า.

เนตรนภิส เขียวขา, สมศิริ แสงโชติ, สรัญญา วัชโรทัย, และวาริช ศรีละออง. 2552. การพัฒนาการใช้สารสกัดจากอบเชยในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงน้ำดอกไม้. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 40(3 พิเศษ): 260-254.

สมศิริ แสงโชติ. 2531. โรคภายหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วง. น.34-43 ในรวมเล่มเอกสารประกอบการอบรมเรื่องเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้เพื่อการส่งออก. ศูนย์ถ่ายทอดเทคโนโลยี สานักงานปลัดกระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการพลังงาน.

สานักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2556. สถิติการส่งออกปี 2556. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php. (20 กุมภาพันธ์ 2557).

Doughari, J.H. 2006. Antimicrobial activity of *Tamarindus indica* Linn. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 5(2): 597-603.

Farhang, V., J.Amini, T. Javadi, J. Nazemi, A. Ebadollahi. 2013. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of Cymbopogon citratus (DC.) Stapf. against three *Phytophthora* species. Greener Journal of Biological Science 3(8): 292-298.

Escalona-Arranz, J.C., R. Péres-Roses, I. Licea-Jiménez. 2010. Antimicrobial activity of extracts from *Tamarindus indica* L. leaves. Pharmacognosy Magazine.

Pino, J.A., J.C. Escalona, I. Licea, R. Pérez, J. Agüero. 2002. Leaf oil of **Tamarindus indica** L. J Essent Oil Res.14:187–188.

Tzortzakis N.G. and C.D. Economakis. 2007. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogen. Innovative Food Science and Emerging Technologies 8:253-258.