

การควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum*

โดยใช้สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากขมิ้น และไคโตแซน

Control of green mold rot of citrus caused by *Penicillium digitatum*,

with partial purified extract of turmeric and chitosan

สมศิริ แสงโชติ^{1,2}, เนตรนภิส เขียวขำ^{1,2} และ ศศิวิมล ลักษณะพิสุทธิ์^{1,2}Somsiri Sangchot^{1,2}, Netnapis Knewhom^{1,2} and Sasivimol Laksanaphisit^{1,2}

Abstract

Crude extracts of turmeric obtained from different extract solvent for instance, hexane, ethanol, methanol and methanol:ethanol:hexane at 1:1:1(v/v). These extracts were separated into 18 fractions using column chromatography. The active compounds from these fractions showed an inhibition zone and brown color of polyacetylene group at $R_f = 0.89$ when tested with *Cladosporium herbarium*, *Penicillium digitatum* and anisaldehyde solution respectively. Further purification and identification using HPLC, ar-Turmerone was found as the main active compound. Crude extracts obtained from methanol extraction at 10000 ppm showed a good result of green mold rot control. This concentration was combined with 2% chitosan (0.5% acetic acid) reduced disease incidence on treated fruits by 70%.

Key word: turmeric, chitosan, green mold rot of citrus

บทคัดย่อ

สารสกัดจากขมิ้นที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และ เมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (v/v) เมื่อแยกสารและวิเคราะห์ตามความสามารถการละลายของสารออกฤทธิ์จากขมิ้น โดยวิธีการ Column Chromatography แยก fraction ได้ 18 fractions เมื่อทดสอบสารออกฤทธิ์จาก fractions ต่างๆแผ่น TLC โดยใช้เชื้อรา *Cladosporium herbarium* และการฉีดพ่นด้วย anisaldehyde พบว่า สารสกัดขมิ้นที่สามารถยับยั้งโดยเกิด clear zone และเกิดสีน้ำตาลของสารในกลุ่ม polyacetylene มีค่า $R_f = 0.89$ เมื่อทำให้บริสุทธิ์และจำแนกพบว่า สารออกฤทธิ์หลักคือ ar-Turmerone และเมื่อทดสอบกับผลส้ม พบว่า สารสกัดจากขมิ้นที่เจือจางด้วยตัวทำละลายเมทานอล 25% ที่ 10000 ppm สามารถควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวได้ดี และเมื่อนำสารสกัดที่ความเข้มข้นนี้รวมกับไคโตแซน 2% (ละลายด้วย 0.5% acetic acid) สามารถลดการเกิดโรคได้ 70%

คำสำคัญ ขมิ้นชัน, ไคโตแซน, โรคผลเน่าราสีเขียวของส้ม

คำนำ

โรคเน่าราสีเขียวของส้ม มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* ซึ่งเป็นโรคหลังการเก็บเกี่ยวของส้มที่สำคัญโรคหนึ่ง (Ortuño et al., 2006) ในปัจจุบันวิธีที่มีประสิทธิภาพเพื่อควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว คือ การใช้สารเคมีสังเคราะห์ อย่างไรก็ตาม มีสารเคมีออกฤทธิ์เพียงไม่กี่ชนิดที่มีใช้อยู่ตามท้องตลาด (Gullino and Kuijpers, 1994; Ragsdale and Sisler, 1994) ประกอบกับปัญหาสารเคมีตกค้างในผลิตภัณฑ์ที่มีผลต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม และความสามารถในการต้านทานของเชื้อราสาเหตุโรคต่อสารเคมีที่ใช้อยู่ประจำเพิ่มขึ้น จึงมีความต้องการอย่างมากในการหาวิธีการต่างๆ เพื่อเป็นทางเลือกที่ปลอดภัยมาใช้ในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว การใช้สารสกัดหรือน้ำมันหอมระเหยจากพืช ซึ่งมีรายงานการใช้สารสกัดและสารบริสุทธิ์ชนิดใหม่จากพืชเพื่อควบคุมเชื้อโรคและศัตรูพืชโดยที่มีความปลอดภัยมากขึ้น (Wisniewski et al., 2001)

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

¹ Department of Plant pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

² ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม 73140

² Postharvest Technology Innovation Center, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

ขมิ้นชัน (*turmeric*) *Curcuma longa* Linn. ในสกุล Zingiberaceae เป็นพืชล้มลุก มีเหง้าใต้ดิน มีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส นอกจากนี้ยังพบว่ามีความสมบัตินี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (Ross, 2003) สารสกัดขมิ้นชันทั้งในรูปแบบสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว เช่น เชื้อรา *Colletotrichum capsici*, *C.gloeosporioides*, *Dothiorella* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis* sp. และ *Pythium aphanidermatum* ด้วยวิธี poisoned food technique (สุภัทรา และคณะ, 2547) ซึ่งมีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชันมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืชได้ดี (Ortuño et al., 2006; Stange et al., 2002.) การนำเอาสารสกัดจากขมิ้นชันมาใช้ร่วมกับไคโตแซน โดยใช้ในลักษณะเคลือบผลส้มก็เป็นสิ่งที่จะช่วยทำให้ผลส้มดูสวยเช่นเดียวกับการใช้ wax ไคโตแซนมีรายงานว่าใช้เคลือบผิวผลไม้ไม่ได้ดี และยังมีคุณสมบัติที่กระตุ้นความต้านทานในพืชหลายชนิด (Bhaskara et al., 2000; Bautista-Baños et al., 2003; Chien et al., 2005) ฉะนั้นจากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นการนำเอาสารสกัดจากขมิ้นชันและไคโตแซนมารวม และพัฒนาเป็นสูตรสำหรับเคลือบผิวส้มเพื่อป้องกันการเน่าเสียจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* จึงเป็นสิ่งที่มีความเป็นไปได้สูง ส่วนสารไคโตแซนนั้นจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารนี้มีลักษณะคล้าย wax เมื่อใช้กับมะม่วงจะกระตุ้นความต้านทานพืชหลังเก็บเกี่ยวได้เล็กน้อย (ธวัช, 2548) ฉะนั้นการนำมาใช้เคลือบผลส้มร่วมกับสารกึ่งบริสุทธิ์จากขมิ้น เพื่อทดแทนการนำเข้า wax และสารเคมีจากต่างประเทศและลดอันตรายแก่ผู้บริโภค และยังช่วยให้อุตสาหกรรมที่มีการใช้ไคโตแซนมีแนวทางเพิ่มขึ้นในการนำมาใช้ทางด้านการเกษตร

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างสกัดจากพืช วิเคราะห์และแยกสารตามความสามารถการละลายของสารสกัด

แช่ขมิ้นชันผง 400 กรัม ลงใน เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และ เมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน อัตราส่วน 1:1:1 (v/v) ปริมาณ 600 มิลลิลิตร เก็บในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ทำการระเหยสารละลายออกด้วยเครื่อง evaporator จะได้ สารสกัดหยาบขมิ้น (crude extract) แล้วเก็บรักษาในที่มืด ที่อุณหภูมิ -20 °C

การวิเคราะห์และแยกสารตามความสามารถการละลายของสารสกัด โดยใช้ column chromatography (CC) จะได้ fraction ต่างๆ ซึ่งแยกตามความสามารถการละลาย โดยจะสารสกัดผ่านคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล โดยใช้สารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในอัตราส่วนต่างๆ ซึ่งประกอบด้วย เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล นำสารสกัดหยาบและ fraction ต่างๆ ที่แยกได้ ทดสอบหาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี Bio-activity assay เมื่อได้สารออกฤทธิ์ที่ดี จึงนำมาแยกสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) โดยเตรียม fraction ที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ นำมาแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) แล้วพิสูจน์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR Spectroscopy)

ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยสารสกัดจากขมิ้น

ทำ Bio-activity assay บนแผ่น TLC โดยศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium herbarium* และ *Penicillium digitatum* เพื่อหาส่วนของสารสกัดที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราได้ดี โดยนำสารสกัดจากขมิ้น แต่ละ fraction มา spot บน TLC plate และนำมา develop ใน tank ที่บรรจุ chloroform:methanol (96:4, v/v) หลังจากนั้นจึงพ่นเชื้อรา *C. herbarium* และ *P. digitatum* แล้วบ่มไว้ในสภาพชื้น เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิด clear zone และบันทึกค่า R_f และทดสอบสารออกฤทธิ์โดยการฉีดพ่นด้วย anisaldehyde เพื่อทดสอบ activity ของแต่ละส่วน โดยนำสารสกัดจากขมิ้น แต่ละ fraction มา spot บน TLC plate หลังจากนั้นจึงพ่นสาร anisaldehyde แล้วนำมาให้ความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 100-110 °C เป็นเวลา 10 นาที จะปรากฏสีตามกลุ่มของสาร ตรวจสอบกลุ่มสีของสาร จึงบันทึกชนิดและค่า R_f

การทดสอบการควบคุมโรคบนผลส้มด้วยสารสกัดจากขมิ้นที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

นำสารสกัดจากขมิ้น ที่ระดับความเข้มข้น 0 10000 20000 และ 30000 ppm ทดสอบการควบคุมโรคผลเน่าราสีเหี่ยวของส้ม โดยการทำให้ผลที่ข้างซั้วผล โดยห่างจากซั้วผล 0.5 เซนติเมตร จำนวน 2 ผล แล้วปลูกเชื้อรา *P. digitatum* โดยใช้ spore suspension 1×10^6 spore/ml ปริมาตร 10 μ l หลังจากนั้นใช้สารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10 μ l บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นระยะเวลา 7 วัน บันทึกความรุนแรงของโรค

การทดสอบการควบคุมโรคบนผลส้มด้วยสารสกัดจากขมิ้นร่วมกับไคโตแซน

นำสารสกัดหยาบจากขมิ้น ที่ระดับความเข้มข้นที่คัดเลือกจากข้อ 3 และไคโตแซน 2% ที่ละลายด้วย 0.5% acetic acid โดยการทำให้ผลที่ข้างซั้วผล ห่างจากซั้วผล 0.5 เซนติเมตร จำนวน 2 ผล แล้วปลูกเชื้อรา *P. digitatum* โดยใช้ spore suspension 1×10^6 spore/ml ปริมาตร 10 μ l หลังจากนั้นใช้สารสกัดที่ระดับความเข้มข้นที่สามารถควบคุมโรคได้ดี นำมาเจือ

จางตัวทำละลายเป็น 0, 25, 50, 75 และ 100% และโคโคแซน 2% ที่ละลายด้วย 0.5% acetic acid หยดในปริมาณ 10 μ l บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นระยะเวลา 7 วัน บันทึกจำนวนผลส้มที่เป็นโรคและความรุนแรงของโรค

ผลและวิจารณ์

การเตรียมตัวอย่างสกัดจากพืช วิเคราะห์และแยกสารตามความสามารถการละลายของสารสกัด

สารสกัดจากขมิ้นที่สกัดด้วย เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และ เมทานอล:เอทานอล:เฮกเซน (1:1:1, v/v) และเมื่อนำมาแยกสารตามความสามารถการละลายของสารสกัด ด้วยวิธีการ column chromatography (CC) สามารถแยกได้ 18 fractions

ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยสารสกัดจากขมิ้น

นำสารสกัดและสารที่แยกได้ 18 fractions ทดสอบด้วยวิธี Bio-activity assay เพื่อหาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* และทดสอบสารออกฤทธิ์โดยการพ่นด้วย anisaldehyde จึงนำมาแยกสารออกฤทธิ์ด้วยวิธีการ TLC นำส่วนที่พบ clear zone ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง HPLC โดยพบว่าสารออกฤทธิ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. herbarium* โดยเกิด clear zone และเกิดสีน้ำตาลของ polyacetylene มีค่า $R_f = 0.89$ และเมื่อนำไปพิสูจน์หาสูตรโครงสร้างทางเคมี ของสารออกฤทธิ์ โดยเครื่อง NMR พบว่าเป็น สาร ar-Turmerone สารนี้เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่มีอยู่ในขมิ้นและมีผลต่อเชื้อ *P. digitatum* ของส้ม

การทดสอบการควบคุมโรคบนผลส้มด้วยสารสกัดจากขมิ้นที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ศึกษาผลในการยับยั้งการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. digitatum* ของสารสกัดจากขมิ้น โดยนำสารสกัดจากขมิ้น ที่ระดับความเข้มข้น 0 10000 20000 30000 ppm ที่เจือจางด้วยตัวทำละลายต่างๆ พบว่า ผลส้มที่ได้รับสารสกัดจากขมิ้นที่เจือจางด้วยตัวทำละลายเมทานอล 10000 30000 ppm และเอทานอล 10000 ppm สามารถควบคุมโรคได้โดยพบความรุนแรงของโรค 7.25%, 7.0% และ 9.5% ตามลำดับ เปรียบเทียบกับผลส้มที่ไม่ได้รับสารสกัดจากขมิ้นพบความรุนแรงของโรค 60.7% (table 1) จึงคัดเลือกสารสกัดจากขมิ้นที่เจือจางด้วยเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 10000 ppm เพื่อการศึกษาต่อไป

Table 1 Disease severity (%) of green mold rot on citrus fruits inoculated by *P. digitatum* and applied crude extract of turmeric at different concentration. These fruits were inoculated at 25 °C for 7 days.

Treatment	Concentration	Disease severity (%)
Control (H ₂ O)		60.75c
crude extract in Methanol	0 ppm	21ab
	10,000 ppm	7.25a
	20,000 ppm	43.25bc
	30,000 ppm	7a
crude extract in Ethanol	0 ppm	24.5ab
	10,000 ppm	9.5a
	20,000 ppm	33abc
	30,000 ppm	24.25ab
crude extract in Hexane	0 ppm	41bc
	10,000 ppm	41bc
	20,000 ppm	34.5abc
	30,000 ppm	33.5abc
crude extract in solvent mixture Methanol: Ethanol: Hexane (1:1:1 by v/v)	0 ppm	35.75abc
	10,000 ppm	26ab
	20,000 ppm	19.25ab
	30,000 ppm	55.5c

Mean with the same are not significantly different based on Duncan's multiple range test ($P=0.05$).

การทดสอบการควบคุมโรคบนผลส้มด้วยสารสกัดจากขมิ้นร่วมกับโคโคแซน

สารสกัดจากขมิ้นที่เจือจางด้วยตัวทำละลายเมทานอล 25% ร่วมกับโคโคแซน 2% ที่ละลายด้วย 0.5% acetic acid สามารถควบคุมโรคได้ดี โดยมีจำนวนผลส้มที่เกิดโรค 20% เมื่อเปรียบเทียบกับผลส้มที่ไม่ได้รับสารสกัดพบจำนวนผลส้มที่เกิดโรค 90% จากการประเมินความรุนแรงของโรค พบว่า ผลส้มที่ได้รับโคโคแซน 2% ที่ละลายด้วย 0.5% acetic acid , ผลส้มที่ได้รับสารสกัดจากขมิ้นที่เจือจางด้วยเมทานอล 25% ร่วมกับโคโคแซน 2% ที่ละลายด้วย 0.5% acetic acid , ผลส้มที่ได้รับสารสกัด

จากขมิ้นที่เจือจางด้วยเมทานอล 75%, ผลส้มที่ได้รับสารสกัดจากขมิ้นร่วมกับไคโตแซน 2%, ผลส้มที่ได้รับสารสกัดจากขมิ้นที่เจือจางด้วยเมทานอล 75% ร่วมกับไคโตแซน และผลส้มที่ได้รับสารสกัดจากขมิ้นที่เจือจางด้วยเมทานอล 50% สามารถควบคุมโรคได้โดยพบความรุนแรงของโรค 1.25%, 7%, 12%, 12.5%, 17.25% และ 23.5% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลส้มที่ไม่ได้รับสารสกัดจากขมิ้นและไคโตแซน 2% ที่ละลายด้วย 0.5% acetic acid พบความรุนแรงของโรค 63.8% (Table 2)

Table 2 Disease severity (%) and disease incidence (%) green mold rot on citrus fruits treated after inoculation with *P. digitatum* and treated different treatments. These treated fruits were incubated at 25 °C for 7 days.

Treatment	Disease severity (%)	Disease incidence (%)
Control (H ₂ O)	63.75d	90de
Chitosan	1.25a	25ab
25%Methanol	53.5d	90de
50%Methanol	63.8d	95de
75%Methanol	48.5cd	100de
100%Methanol	26.5bc	70cd
Crude extract in 25%methanol	46.75cd	90de
Crude extract in 50%methanol	23.5ab	55c
Crude extract in 75%methanol	12ab	45bc
Crude extract in 100%methanol	55.5d	90de
Crude extract in 25% methanol with 2%chitosan	7ab	20a
Crude extract in methanol 50% with 2%chitosan	46.75cd	85de
Crude extract in methanol 75% with 2%chitosan	17.25ab	85de
Crude extract with 2%chitosan	12.5ab	50c

Mean with the same letter are not significantly different based on Duncan's multiple range test ($P=0.05$)

สรุป

การใช้สารสกัดจากขมิ้นเพื่อควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้ม พบว่า สารออกฤทธิ์หลักคือ ar-Turmerone โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่ดีที่สุดคือ เมทานอล เมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอล และเฮกเซน หรือตัวทำละลายผสมของทั้ง 3 ชนิด สารสกัดหยาบจากขมิ้นที่มีความเข้มข้น 10000 ppm ควบคุมโรคได้ดีเมื่อละลายด้วยเมทานอล 25% การใช้สารสกัดจากขมิ้น เมทานอล 25% ร่วมกับไคโตแซน 2% ให้ผลดีในการควบคุมโรค โดยลดการเกิดโรคได้ถึง 70%

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่มีอบทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- ธวัช หะหมาน. 2548. ผลของไคโตแซนต่อการชักนำความต้านทานของผลมะม่วงต่อโรคแอนแทรกโนส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุภัทรา จามกระโทก, ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล, ชลิดา เล็กสมบุญ, นवलวรรณ ฟ่างรุ่งแสง, กวีศรีวานิชกุล และ อุดม ฟ่างรุ่งแสง. 2547. ผลของสารสกัดจากกระชาย ขมิ้นและขิงต่อราสาเหตุโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว <http://kucon.lib.ku.ac.th/FullText/KC4201065.pdf>.
- Gullino, M.L. and L.A.M. Kuijpers. 1994. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. Annu. Rev. Phytopathol. 32: 559-579.