การควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวบนผลส้มโดยใช้เชื้อยีสต์ปฏิปักษ์และสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร
Control of green mold on citrus fruits with yeasts and medicinal plants

Henik sukorini[1] และสมศิริ แสงโชติ[1]
Henik sukorini[1] and Somsiri Sangchote[1]

Abstract

Green mold caused by *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. is the most devastating pathogen of citrus fruit, being responsible for about 90% of losses during post-harvest handling. Biological control and biofungicide are used an alternative to chemical. Seven yeasts including *Candida utilis* , *Candida tropicalis*, *Pichia membranefaciens, Candida guillermondii*, *Candida sake* , *Aureobasidium pullulans* and *Debaryomyces hansenii* and seven crude extracts of medicinal plants: *Cymbopogon citratus* stem, *Zingiber officinale* rhizome, *Momordica charantia* fruit, *Curcuma longa* rhizome, *Eugenia caryophyllata* dried flower bud, *Cinnamomum cassia* bark, *Tinospora crispa* bark were tested against this disease on citrus. Combination of *Candida utilis* and *Eugenia caryophyllata* dried flower bud crude extract reduced 90.3% of disease incidence and 96.3% for disease severity.

Keywords: *Penicillium digitatum,* green mold of citrus, medicinal plant extract, yeast

บทคัดย่อ

โรคราเขียวที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับผลส้มหลังการเก็บเกี่ยวประมาณ 90% โดยการควบคุมโดยชีววิธี และการใช้สารกำจัดเชื้อราจากชีวภาพถูกใช้เป็นทางเลือกแทนการใช้สารเคมี เชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ 7 ชนิด ได้แก่ *Candida utilis* , *Candida tropicalis*, *Pichia membranefaciens, Candida guillermondii*, *Candida sake* , *Aureobasidium pullulans* and *Debaryomyces hansenii* และสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร 7 ชนิด ได้แก่ ตะไคร้ ขิง มะระ ขมิ้น กานพลู อบเชย และ บอระเพ็ด นำมาใช้ในการป้องกันโรคบนผลส้ม การใช้ *Candida utilis* ร่วมกับสารสกัดหยาบกานพลูสามารถลดการเกิดโรคได้ 90.3% และลดความรุนแรงของโรคได้ 96.3%

คำสำคัญ: *Penicillium digitatum*, โรคผลเน่าราสีเขียวของส้ม, สารสกัดหยาบจากพืช, ยีสต์

บทนำ

โรคราเขียวที่เกิดจากเชื้อรา *Penicilillium digitatum* เชื้อราเจริญบนผลส้มมีลักษณะคล้ายผงแป้งสีเขียวมะกอก เชื้อราชนิดนี้ทำให้เกิดความสูญเสียแก่ผลผลิตถึง 90% โดยพบเชื้อดังกล่าวในช่วงเก็บรักษาผลส้มซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายแก่เศรษฐกิจเป็นอย่างมาก (Canamas *et al.*, 2008) ในปัจจุบันสารเคมีที่ใช้หลากหลายในโรงคัดบรรจุได้แก่ imazalil thiabendazole และ *o*-phenylphenol ซึ่งการใช้สารเคมีในหลายๆชนิดทำให้เชื้อราเกิดการต้านทานต่อสารเคมีได้ จากการคำนึงถึงผลกระทบดังกล่าว จึงได้มีการพัฒนาวิธีการควบคุมด้วยชีววิธีซึ่งมีความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค ผู้ปฏิบัติงานและต่อสิ่งแวดล้อม เชื้อยีสต์เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ประสิทธิภาพ ที่มีความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นเพื่อใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดหลังการเก็บเกี่ยวของผักและผลไม้ได้ (Janisiewicz, 1988) จากการศึกษาการการต่อต้านเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยการใช้สารสกัดจากพืช น้ำมันหอมระเหยจากพืช และการใช้สารประกอบบริสุทธ์ มีผลการควบคุมโรคได้ดี ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์แบบผสมผสานหลากหลายสายพันธุ์กับสารประกอบชนิดต่างๆจึงเป็นงานที่มีความท้าทายต่อผู้วิจัย (Janisiewicz *et al.*,2008).

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน 10900
[1] Plant Pathology department, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Bangkok, 10900

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดหยาบจากพืช จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*), เหง้าขิง (*Zingiber officinale*), ผลมะระขี้นก (*Momordica charantia*), เหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa*), ส่วนของตาดอกกานพลู (*Eugenia caryophyllata*), เปลือกอบเชย (*Cinnamomum cassia*) และบอระเพ็ด (*Tinospora crispa*) โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล และเลี้ยงเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *C. utilis* , *C. tropicalis*, *Pichia membranefaciens*, *Aureobasidium pullulans*, *C.guillermondii*, *C.sake and Debaryomyces hansenii* ในอาหาร yeast malt extract agar (YMA) และเลี้ยงเชื้อราสาเหตุ คือ *Penicillium digitatum* ลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA)

การคัดเลือกสารสกัดหยาบของพืช

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของพืชในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P.digitatum* โดยเตรียมสารสกัดหยาบจากพืชทั้ง 7 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 0 5,000 10,000 15,000 และ 20,000 ppm ทำการปลูกเชื้อรา *P.digitatum* จำนวน $1x10^5$ conidia/ml ปริมาณ 10 µl โดยการทำแผล หลังจากนั้นจึงหยดสารสกัดหยาบจากพืชทั้ง 7 ชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl แล้วจึงบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

การคัดเลือกยีสต์ปฏิปักษ์

ทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P.digitatum* ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร PDA โดยการ streak เชื้อยีสต์และวางเชื้อรา *P.digitatum* ลงบนอาหาร PDA ให้มีระยะห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 30 มม . (Figure 1) แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จึงตรวจวัดการเจริญของเชื้อรา *P.digitatum*

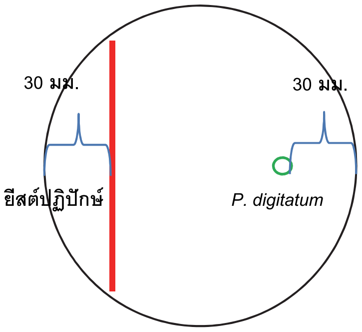

Figure 1 The dual culture method

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบพืชและเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์บนผลส้ม

ปลูกเชื้อรา *P.digitatum* จำนวน $1x10^5$ conidia/ml ปริมาณ 10 µl โดยการทำแผลบนผลส้ม หลังจากนั้นจึงหยดสารสกัดหยาบจากพืช ปริมาณ 10 µl และเชื้อปฏิปักษ์ยีสต์ ปริมาณ 10 µl ที่ได้ทำการคัดเลือกไว้แล้วจากการทดลองที่ผ่านมา แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จึงตรวจวัดการเกิดโรคและความรุนแรงของโรค

ผล

สารสกัดหยาบจากกานพลูที่ระดับความเข้มข้น 5000-20000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* ได้ 100% ในขณะที่สารสกัดหยาบจากอบเชย ขมิ้นชันและตะไคร้ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* ได้ 75% (Table 1) ในส่วนของสารสกัดหยาบจากกานพลูและขมิ้นชัน สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. digitatum* ได้ 100% และ 78.8% ตามลำดับ (Table 2) และเมื่อนำสารสกัดหยาบกานพลูและขมิ้นชันมาทดสอบบนผลส้ม พบว่าสามารถควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มได้ จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ยีสต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* พบว่า ยีสต์ *Candida tropicalis* และ *Candida utilis* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 82.4% และ 29.1% ตามลำดับ จึงได้คัดเลือกสารสกัดหยาบกานพลูและขมิ้นชันร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ คือ *Candida tropicalis* และ *Candida utilis* พบว่า สารสกัดจากกานพลูร่วมกับยีสต์ *Candida utilis* สามารถลดการเกิดโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มได้ 90.3% และลดความรุนแรงของโรคได้ 96.3% (Figure 2)

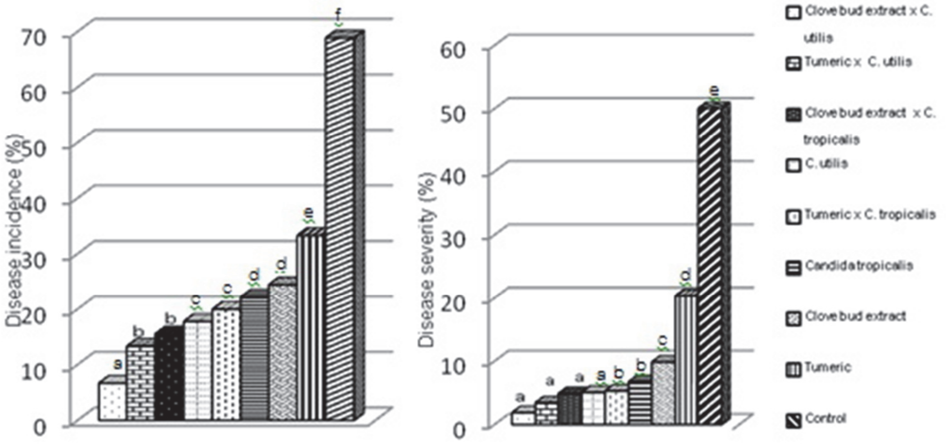

Figure 2 Effect of plant crude extracts, antagonist yeasts and plant extracts combined with yeasts on disease incidence and disease severity of *P. digitatum* on citrus fruits.
The same letter are not significantly different by Duncan 's multiple range test (*P*=5%)

Table1 Effect of plant crude extracts at different concentrations on *P. digitatum* growth

Plant Crude extracts	*P.digitatum* hyphae growth (cm)			
	5000 ppm	10000 ppm	15000 ppm	20000 ppm
Cymbopogon citratus	65.71 kl	67.86 kl	69.12 l	77.00 o
Zingiber officinale	56.93 i	46.30 f	50.00 hi	61.95 j
Momordica charantia	66.67 kl	53.17 hi	75.21 no	77.00 op
Curcoma longa	51.79 gh	78.32 op	79.21 p	73.60 mn
Eugenia caryophyllata	100.00 q	100.00 q	100.00 q	100.00 q
Cinnamomum cassia	33.87 c	57.19 l	56.99 l	77.96 op
Tinospora crispa	54.66 hi	43.07 e	57.47 i	72.76 mn
Ethanol (20%)	37.16 d	13.74 a	24.37 b	39.37 d

Means with the same letter are not significantly different by Duncan 's multiple range test (p=5%)

Table2 Effect of plant crude extracts at different concentrations on *P. digitatum* mycelial growth

Plant Crude extracts	*P.digitatum* hyphae growth (cm)			
	5000 ppm	10000 ppm	15000 ppm	20000 ppm
Cymbopogon citratus	31.35 cd	40.08 e	49.21 g	53.97 hi
Zingiber officinale	53.97 hi	55.95 hi	55.30 hi	69.05 k
Momordica charantia	23.89 b	33.73 d	58.89 i	64.29 j
Curcoma longa	46.67 f	64.68 j	73.41 l	78.97 m
Eugenia caryophyllata	100.00 n	100.00 n	100.00 n	100.00 n
Cinnamomum cassia	0.00 a	0.00 a	50.86 g	75.00 l
Tinospora crispa	42.86 e	55.95 hi	56.75 hi	65.87 j
Ethanol (20%)	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a

Means with the same letter are not significantly different by Duncan 's multiple range test (*P*=5%)

Table 3 Inhibition growth of *Penicillium digitatum* by the combination of yeasts at 7 days after treatment

Yeasts	Inhibition growth of *P. digitatum by* yeast(s) (%)
Candida tropicalis (Ct)	82.418 f
Candida utilis (Cu)	29.121 c
Candida sake (Cs)	26.593 bc
Candida guillermondii (Cg)	17.582 a
CtxCu	76.923 e
CtxCs	75.824 e
CtxCg	79.121 e
CuxCs	25.275 bc
CuxCg	45.055 d
CsxCg	24.725 b

Means within a column with the same letter are not significantly different by Duncan 's multiple range test (p=5%)

วิจารณ์ผล

Cho (2006) รายงานว่า สารสกัดจากขมิ้นชันสามารถควบคุมการโรคใบไหม้ของข้าว ที่เกิดจากเชื้อรา *Magnaporthe grisea* และ โรค late blight ของมะเขือเทศ ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora infestans* ได้ ซึ่งสารสกัดหยาบจากกานพลูและขมิ้นชันสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคได้ โดยมีผลทำให้โคนิเดียและการสร้างเส้นใยผิดปกติ (Suwitchayanon and Kunasakdakul, 2009). ประสิทธิภาพของกานพลูและอบเชย พบว่า มีสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้และยังมีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ของเชื้อราลดลง (Velluti *et al.*, 2003) โดยสารออกฤทธิ์หลักของอบเชย คือ cinnamaldehyde ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มของ aldehyde ซึ่งมีองค์ประกอบที่มีผลในการยับยั้งเชื้อราได้ดี (Wang *et al.*, 2005)

สรุป

สารสกัดหยาบกานพลูและขมิ้นชันมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าราสีเขียวของส้มได้ 100% และ 78.8% ตามลำดับ และเชื้อยีสต์ปฏิปักษ์ *Candida tropicalis* และ *Candida utilis* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. digitatum* ได้ 82.4% และ 29.1% ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดหยาบกานพลูและขมิ้นชันร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ คือ *Candida tropicalis* และ *Candida utilis* พบว่า สารสกัดจากกานพลูร่วมกับยีสต์ *Candida utilis* สามารถลดการเกิดโรคได้ 90.3% และลดความรุนแรงของโรคได้ 96.3%

เอกสารอ้างอิง

Canamas, T.P., I. Vinas, J. Usall, R. Torres, M. Anguera and N. Teixido. 2008. Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest applications of biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2: Part II. Effectiveness of different cell formulations. Postharvest Biology and Technology 49 (1):96–106.

Cho, J.Y. 2006. *In vivo* antifungal activity against various plant pathogenic fungi of curcuminoids isolated from the rhizomes of *Curcuma longa*. Plant Pathology Journal 22(1) : 94-96 (2006).

Janisiewicz, W.J. 1988. Biological control of postharvest diseases of apple with antagonists' mixtures. Phytopathology 78:194–198.

Suwitchayanon, P. and K. Kunasakdakul. 2009. *In vitro* effects of clove and turmeric extracts controlling crucifer pathogens. Journal of Agricultural Technology 5(1): 193-199.

Velluti, A., V. Sanchis, A.J. Ramos and S. Marı. 2003. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. International Journal of Food Microbiology 89: 145–154.