การคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ควบคุมเชื้อรา *Phytopthora* sp. ที่แยกจากทุเรียนในจังหวัดจันทบุรีและจังหวัดชุมพร

Screening of Effective Herbs for Controlling *Phytopthora* sp. Isolated from Durian in Chanthaburi Province and Chumphon Province

วาสินี ธรรมสถิต[1] สุจิตรา สุคนธมัต[2] และ ดุษณี ธนะบริพัฒน์[1]
Wasinee Thamsatit[1]* Sujitra Sukonthamut[2] and Dusanee Thanaboripat[1]
[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
[2]ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

จากการนำสารสกัดจากสมุนไพร 8 ชนิด ได้แก่ กระชาย ขมิ้นชัน หัวแห้วหมู สบู่เลือด ว่านอัคคีทวาร เปลือกมังคุด เมล็ดมะรุม และไพล มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytopthora* spp. 4 ไอโซเลทที่แยกได้จากทุเรียนจากแปลงทุเรียน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรีและจากแปลงเกษตรทดลอง อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร ด้วยวิธี Poisoned Food Technique บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 5 ระดับ ได้แก่ 5,000, 10,000, 15,000, 20,000 และ 25,000 พีพีเอ็ม วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรทุกชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท โดยสารสกัดจากกระชายสามารถยับยั้งการเจริญของไอโซเลท DF008, PD2-4 และ PD2-16 ได้ดีที่สุด และสารสกัดจากขมิ้นชันสามารถยับยั้งการเจริญของไอโซเลท PD2-2 ได้ดีที่สุด และจากการจัดจำแนกเชื้อราเชื้อรา พบว่าเชื้อราก่อโรคทั้ง 4 ไอโซเลท คือ *Phytopthora palmivora*

คำสำคัญ : เชื้อรา *Phytopthora palmivora*, ทุเรียน, สารสกัดจากสมุนไพร

Abstract

Antifungal activities of 8 herb extracts from Finger root (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.), Turmeric (*Curcuma longa* Linn.), Nut grass (*Cyperus rotundus* Linn.), Bellyache bush (*Jatropha gossypifolia*), Bharangi (*Clerodendrum serratum* Moon var. *wallichii* Clarke), Mangosteen peel (*Garcinia mangostana*), Drumstick seed (*Moringa Oleifera Lam.)* and Cassumunar ginger (*Zingiber cassumunar* Roxb) against 4 isolates of *Phytopthora* sp. from Durian in Amphur Klung, Chanthaburi Province and Agricultural field, Amphur Patiew, Chumphon Province were studied. Five concentrations of herbal extracts at 5,000, 10,000, 15,000, 20,000 and 25,000 ppm were tested by Poisoned Food Technique. The cultures were incubated at 25°C for 7 days. The results indicate that

*ที่อยู่ติดต่อ. E-mail address : ktvasine@kmitl.ac.th

all herb extracts showed inhibitory property against *Phytopthora* spp. Finger root extracts showed the best inhibitory effect on the growth of *Phytopthora* sp. isolate DF008, PD2-4 and PD2-16 whereas turmeric extracts showed the best inhibitory effect on the growth of *Phytopthora* sp. isolate PD2-2. Classification revealed that all isolates were identified as *Phytopthora palmivora*.

Keywords : *Phytopthora palmivora*, Durian, Herb extract

1. บทนำ

ทุเรียนเป็นพืชสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย เป็นผลไม้ส่งออกอันดับหนึ่งต่อเนื่องมาหลายปี แต่การส่งออกนั้นเกษตรกรไทยมักพบปัญหาเรื่องกฎหมายการควบคุมโรคและสารเคมีตกค้างในทุเรียน [1] โดยเชื้อราก่อโรคที่เป็นปัญหาหลักในทุเรียนเช่นกัน คือ เชื้อรา *Phytopthora* spp. ซึ่งก่อให้เกิดโรคโคนเน่าและผลเน่าของทุเรียน เชื้อราชนิดนี้เป็นเชื้อราในดิน อาศัยข้ามฤดูบนเศษซากพืชที่เคยเป็นโรค เศษอินทรีย์วัตถุในดิน หรือบนพืชอาศัยบางชนิด ถ้าอยู่ในดินจะสร้างเส้นใยผนังหนารูปร่างกลม เรียก chlamydospore การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เพศเมียจะสร้าง oogonium เพศผู้สร้าง antheridium เกิดสปอร์ผนังหนาเรียก oospore สปอร์ทั้ง 2 ชนิดมีความคงทนต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะงอกเจริญเป็นเส้นใยสร้าง Sporangium เมื่อมีความชื้นสูงจะปล่อย Zoospore เข้าทำลายรากพืชในฤดูฝนมีความชื้นสูงเชื้อโรคตามผิวดินจะผลิตสปอร์และสามารถแพร่กระจายโดยอาศัยลมและความชื้นไปตกตามยอด ใบและส่วนต่างๆของทุเรียน เกิดการลุกลามของโรค ทำให้ทุเรียนแสดงอาการต้นโทรม อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค ไม่ตอบสนองต่อปุ๋ย ยอดไหม้แห้ง มีอาการลำต้นหรือรากเน่าแฉะฉ่ำน้ำจนเปลือก ร่อน ระบบรากเสีย ไม่มีรากฝอย [2] จากความรุนแรงของโรคทำให้เกษตรกรมีการใช้สารเคมีพวก etridiazole, fosetyl-Al, phosphonic และ metalaxyl ในการป้องกันและกำจัดโรคดังกล่าว [3, 4] ซึ่งการใช้สารเคมีในปริมาณมากและระยะเวลานานจะทำให้เชื้อราดื้อต่อสารเคมีเหล่านี้ ทำให้เกษตรกรต้องเพิ่มปริมาณสารเคมีไปเรื่อยๆ ซึ่งเป็นผลกระทบโดยตรงกับเกษตรกรที่ฉีดพ่นยาและผู้บริโภค ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการแยกเชื้อรา *Phytopthora* sp. จากแปลงทุเรียน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรีและแปลงเกษตรทดลอง อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร ซึ่งเป็นตัวแทนแหล่งส่งออกทุเรียนในเขตภาคตะวันออกและภาคใต้และทำการทดสอบด้วยสารสกัดจากสมุนไพรไทย 8 ชนิดได้แก่ กระชาย ขมิ้นชัน หัวแห้วหมู สบู่เลือด ว่านอัคคีทวาร เปลือกมังคุด เมล็ดมะรุม และไพล สมุนไพรเหล่านี้สามารถหาได้ง่ายในแต่ละท้องถิ่น ส่วนใหญ่มักใช้เป็นยาแผนโบราณรักษาแผลติดเชื้อ ลดอาการผิวหนังอักเสบจากเชื้อรา [5] โดยหวังว่าการใช้สารสกัดจากสมุนไพรจะเป็นทางเลือกให้กับเกษตรกรที่จะลดการใช้สารเคมีเพื่อแก้ปัญหาเรื่องกฎหมายการควบคุมโรคและสารเคมีตกค้างในทุเรียนส่งออก รวมทั้งอันตรายต่อผู้บริโภคอีกด้วย

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเก็บตัวอย่างและคัดแยกเชื้อราก่อโรค

ทำการเก็บตัวอย่างในส่วนของเปลือกลำต้นที่เป็นแผล ใบและผลทุเรียนที่เป็นโรค จากแปลงทุเรียน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรีและจากแปลงเกษตรทดลอง อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร จากนั้นนำส่วนของทุเรียนที่เป็นโรคมาคัดแยกเชื้อราก่อโรค โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Tuite [6] ตัดให้มีขนาด 5 × 5 มิลลิเมตร แช่ในโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6 นาน 4 นาที จากนั้นนำไปล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง ใช้ปากคีบ คีบชิ้นส่วนที่ทำการฟอกฆ่าเชื้อแล้ววางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Water Agar (WA) จากนั้นบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน หลังจากนั้นใช้เข็มเขี่ย (needle) เขี่ยเส้นใยเชื้อรา วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 Selective Medium Agar บ่มที่ 25

องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เพื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในส่วนของการสร้างเส้นใยและการสร้าง sporangium

2.2 การเก็บรักษาเชื้อรา *Phytopthora* spp.

ทำการเก็บรักษาเชื้อราที่แยกได้โดยนำเชื้อราที่แยกได้เลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นตัดชิ้นส่วนเชื้อราในบริเวณขอบนอกของโคโลนีใส่ลงในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส [7]

2.3 การจัดจำแนกเชื้อรา *Phytopthora* spp.โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เพื่อศึกษาการลักษณะการเจริญของเส้นใย ความยาวเส้นใย สี และลักษณะของโคโลนี เลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 Selective Medium Agar บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เพื่อศึกษาการสร้าง ลักษณะและขนาดของ Sporangium โดยเปรียบเทียบกับ Ocular micrometer [8]

2.4 การจัดจำแนกเชื้อรา *Phytopthora* spp.โดยใช้ลักษณะทางอณูวิทยา

2.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เขี่ยเส้นใยเชื้อราลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปเข้าเตาอบไมโครเวฟพร้อมกับบีกเกอร์ใส่น้ำ เปิดด้วยกำลังไฟ 500 วัตต์ นาน 5- 7 นาที จากนั้นเติมTE Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที [9] นำส่วนใสที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction PCR : ITS โดยมีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1× *Taq* buffer (ผสม Mg^{2+}), 0.2 mM dNTP, 0.2 μM Primer (ITS5/ITS4) และ 5 Unit *Taq* DNA polymerase กำหนดอุณหภูมิ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และExtension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เป็นจำนวน 35 รอบ และที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที [10]

2.4.2 Gel electrophoresis และ DNA Sequencing

ตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ Agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 1 ผสมสีย้อม SYBR safe จากนั้นตรวจหาดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลทช่วงความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร และตรวจหาลำดับเบสโดยใช้เครื่อง DNA sequencer และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้ด้วยโปรแกรม Bioedit และเทียบกับในฐานข้อมูลของ GenBank [11]

2.5 การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

นำสมุนไพร 8 ชนิด ได้แก่ กระชาย ขมิ้นชัน หัวแห้วหมู สบู่เลือด ว่านอัคคีทวาร เปลือกมังคุด เมล็ดมะรุม และไพล หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ อบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 6 – 8 ชั่งโมง จากนั้นบดให้ละเอียด นำมาแช่ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ในอัตราส่วนสมุนไพร 1 กรัมต่อเอทานอล 10 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 3 วัน กรองด้วยกระดาษกรอง (whatman No.1) นำส่วนใสที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และชั่งน้ำหนักสารสกัดสมุนไพรที่ได้ [12]

2.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytopthora* sp.

ทำการทดสอบด้วยวิธี Poisoned Food Technique [13] โดยใช้สารสกัดจากสมุนไพร 8 ชนิด ที่เตรียมจากข้อ 2.5 ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 5 ระดับ ได้แก่ 5,000, 10,000, 15,000, 20,000 และ 25,000 พีพีเอ็ม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงอยู่ที่ประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงนำสารสกัดจากสมุนไพรที่ละลายใน

DMSO ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง 0.22 ไมครอน มาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จนได้ระดับความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรตามที่กำหนด จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทิ้งไว้จนอาหารแข็ง นำเชื้อรา *Phytopthora* spp. ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นาน 7 วัน ตัดด้วย Cork Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเลือกตัดบริเวณขอบนอกของโคโลนี และนำชิ้นส่วนเชื้อราที่ได้มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการตรวจผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหาร โดยใช้เวอร์เนียแบบดิจิตอล ซึ่งมีชุดควบคุมเชิงลบเป็นเชื้อรา *Phytopthora* sp. ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ไม่ผสมสารสกัดจากสมุนไพร และมีชุดควบคุมเชิงบวกเป็นเชื้อรา *Phytopthora* sp. ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม Metalaxyl ที่ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร (อัตราแนะนำ) ทำการทดลอง 3 ซ้ำและนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังสมการ

$$P = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

เมื่อ P คือ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

A คือ ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผสมสารสกัดจากสมุนไพร (มิลลิเมตร)

B คือ ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารสกัดจากสมุนไพร (มิลลิเมตร)

2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบแบบ 8 x 5 factorial in CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ข้อมูลโดยหาค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของทูกีย์ (Tukey Pairwise Comparison Test) ที่ระดับนัยสำคัญ 5 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$) [14]

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ผลการจัดจำแนกเชื้อราก่อโรคโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการคัดแยกเชื้อราจากแปลงทุเรียน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี สามารถทำการคัดแยกได้จำนวน 3 ไอโซเลท คือ PD2-2, PD2-4 และ PD2-16 และจากแปลงเกษตรทดลอง อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร 1 ไอโซเลท คือ DF008 (ตารางที่ 3.1) โดยเชื้อราทั้งหมดที่แยกได้พบว่าเป็นเชื้อ *Phytopthora* sp.

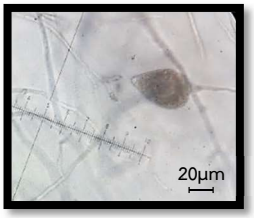
ตารางที่ 3.1.แหล่งที่มาและส่วนที่คัดแยกเชื้อราไอโซเลทต่างๆ

ไอโซเลท	ส่วนที่คัดแยก	แหล่งที่มา
DF008	ผลทุเรียน	อ. ปะทิว จ. ชุมพร
PD2-2	ผลทุเรียน	อ. ขลุง จ. จันทบุรี
PD2-4	ผลทุเรียน	อ. ขลุง จ. จันทบุรี
PD2-16	ลำต้น	อ. ขลุง จ. จันทบุรี

Phytopthora sp. ไอโซเลท DF008 ที่แยกได้จากตัวอย่างผลทุเรียน อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน มีลักษณะโคโลนีกลม เส้นใยสีขาว ไม่มีผนังกั้น ขนาดประมาณ 3.5-5 ไมโครเมตร ผนังเรียบ ดังรูปที่ 3.1 และเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 Selective Medium Agar บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน พบว่ามีการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์คือ sporangium รูปร่าง แบบ elongate

elliptical ขนาดประมาณ 50 x 30 ไมโครเมตร สัดส่วนความ ยาวต่อความกว้างของ sporangium เป็น 1.8: 1 ดังรูปที่ 3.2

รูปที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Phytopthora* sp. ไอโซเลท DF008 (ซ้าย) และลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *Phytopthora* sp. ไอโซเลท DF008 เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า(ขวา)



รูปที่ 3.2 ลักษณะ Sporangium ของเชื้อรา *Phytopthora* sp. ไอโซเลท DF008 เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

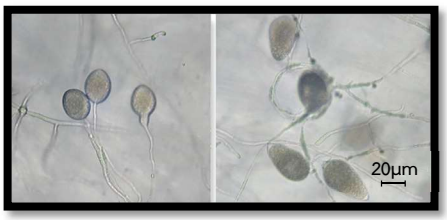
Phytopthora sp. ไอโซเลท PD2-2 ที่แยกได้จากตัวอย่างผลทุเรียน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี พบว่าเมื่อทำการเลี้ยง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน มีลักษณะโคโลนี กลม เส้นใยสีขาว ไม่มีผนังกั้น ขนาดประมาณ 3.5-5 ไมโครเมตร ผนังเรียบ ดังรูปที่ 3.3 และ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 Selective Medium Agar บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน พบว่ามีการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์คือ sporangium และ chlamydospore ซึ่งบริเวณปลายเส้นใยสร้าง chlamydospore รูปร่างกลมขนาด 25 - 42 ไมโครเมตร ผนังเรียบ มี sporangium รูปร่าง แบบ elongate elliptical ขนาดประมาณ 52 x 32 ไมโครเมตร สัดส่วนความ ยาวต่อความกว้างของ sporangium เป็น 1.6 : 1 ส่วนปลายของ sporangium จะแตกออกเมื่อแก่และมี Zoospore หลุดออกมาดังรูปที่ 3.4

รูปที่ 3.3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Phytopthora* sp. ไอโซเลท PD2-2 (ซ้าย) และลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *Phytopthora* sp. ไอโซเลท PD2-2 เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า(ขวา)

รูปที่ 3.4 การสร้าง Chlamydospore ของเชื้อรา *Phytopthora* sp. ไอโซเลท PD2-2 (ซ้าย) และลักษณะ Sporangium ของเชื้อรา *Phytopthora* sp. ไอโซเลท PD2-2 เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า (ขวา)

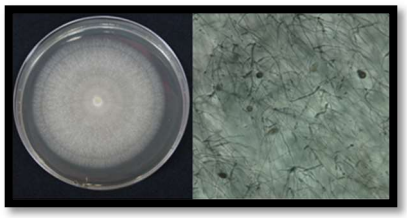
Phytopthora sp. ไอโซเลท PD2-4 ที่แยกได้จากตัวอย่างผลทุเรียน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี พบว่าเมื่อทำการเลี้ยง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน มีลักษณะโคโลนีกลม เส้นใยสีขาว ไม่มีผนังกั้น ขนาดประมาณ 2.5-4 ไมโครเมตร ผนังเรียบ ดังรูปที่ 3.5 และเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 Selective Medium Agar บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน พบว่ามีการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์คือ sporangium และ chlamydospore ซึ่งบริเวณปลายเส้นใยสร้าง chlamydospore รูปร่างกลมขนาด 25 - 42 ไมโครเมตร ผนังเรียบ มี sporangium รูปร่าง แบบ elongate elliptical ขนาดประมาณ 52 x 32 ไมโครเมตร สัดส่วนความ ยาวต่อความกว้างของ sporangium เป็น 1.6 : 1 ดังรูปที่ 3.6

รูปที่ 3.5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Phytopthora* sp. ไอโซเลท PD2-4 (ซ้าย) และลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *Phytopthora* sp. ไอโซเลท PD2-4 เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า(ขวา)

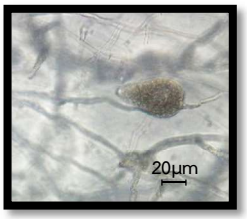


รูปที่ 3.6 การสร้างChlamydospore ของเชื้อรา *Phytopthora* sp. ไอโซเลท PD2-4 (ซ้าย) และลักษณะ Sporangium ของเชื้อรา *Phytopthora* sp. ไอโซเลท PD2-4 เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า (ขวา)

Phytopthora sp. ไอโซเลท PD2-16 ที่แยกได้จากบริเวณลำต้นที่เป็นแผลของต้นทุเรียน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDAบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน มีลักษณะโคโลนีกลม เส้นใยสีขาวไม่มีผนังกั้นขนาดประมาณ 3-5 ไมโครเมตร ผนังเรียบ ดังรูปที่ 3.7 และเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 Selective Medium Agar บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน พบว่ามีการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์คือ sporangium รูปร่าง แบบ elongate elliptical ขนาดประมาณ 35 x 20 ไมโครเมตร สัดส่วนความ ยาวต่อความกว้างของ sporangium เป็น 1.75 : 1 ดังรูปที่ 3.8



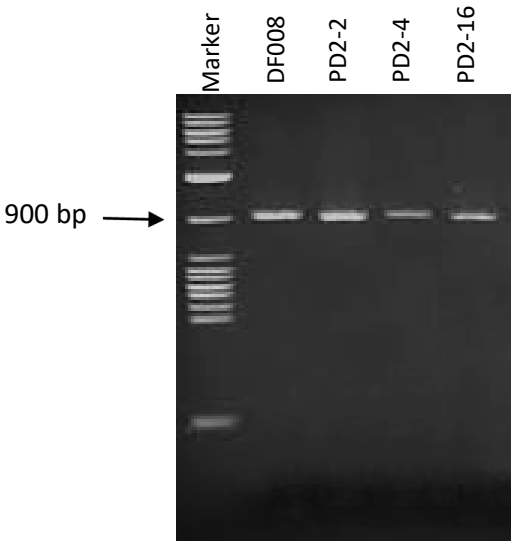
รูปที่ 3.7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Phytopthora* sp. ไอโซเลท PD2-16 (ซ้าย) และลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *Phytopthora* sp. ไอโซเลท PD2-16 เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า (ขวา)



รูปที่ 3.8 ลักษณะ Sporangium ของเชื้อรา *Phytopthora* sp. ไอโซเลท PD2-16 เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

3.2 ผลการจัดจำแนกเชื้อรา *Phytopthora* sp. โดยใช้ลักษณะทางอณูวิทยา

จากการคัดแยกเชื้อรา *Phytopthora* sp.ทั้ง 4 ไอโซเลท ที่แยกได้จากแปลงทุเรียน อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี และแปลงเกษตรทดลอง อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร จากการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS4 และ ITS5 จากนั้นตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ Agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 1 ผสมสีย้อม SYBR safe จากนั้นตรวจหาดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลทช่วงความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร โดยเทียบลำดับช่วงดีเอ็นเอที่ได้กับเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Marker) พบว่าขนาดของ ITS ที่มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส ดังรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.9 แถบดีเอ็นเอที่แยกบนแผ่น Agarose gel ด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis

เมื่อนำมาทำการพิสูจน์ลักษณะทางอณูวิทยาเทียบกับในฐานข้อมูลของ GenBank โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มา BLAST พบว่าเชื้อรา *Phytopthora* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลทมีความคล้ายคลึงกับ *Phytopthora palmivora* มากที่สุด โดย *Phytopthora* sp. ไอโซเลท DF008 มีความคล้ายคลึงกับ *Phytopthora palmivora* มากที่สุดที่ 99.87 เปอร์เซ็นต์และ *Phytopthora* sp. ไอโซเลท PD2-2 ไอโซเลท PD2-4 และไอโซเลท PD2-16 มีความคล้ายคลึงกับ *Phytopthora palmivora* มากที่สุดที่ 100 เปอร์เซ็นต์

3.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytopthora* sp.

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรที่สกัดด้วยเอทานอล 8 ชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของ *Phytopthora* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลท ด้วยวิธี Poisoned Food Technique ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ 5 ระดับ ได้แก่ 5,000, 10,000, 15,000, 20,000 และ 25,000 พีพีเอ็ม พบว่าสารสกัดสมุนไพรทุกชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytopthora* sp. ในแต่ละไอโซเลทได้ โดยแตกต่างกันกันออกไปตามชนิดของสมุนไพรและระดับความเข้มข้นต่างๆ และพบว่ามีปัจจัยร่วมระหว่างชนิดสารสกัดสมุนไพรและระดับความเข้มข้นสารสกัดสมุนไพร (ตารางที่ 3.2 - 3.5)

จากการศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท DF008 พบว่าสารสกัดที่สามารถยับยั้งไอโซเลท DF008 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ สารสกัดจากขมิ้นชัน และสบู่เลือด ตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 15,000 พีพีเอ็ม ขึ้นไป สารสกัดจากกระชายและไพลตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 20,000 พีพีเอ็ม ขึ้นไป แต่พบว่าสารสกัดจากกระชายที่ความเข้มข้น 10,000 พีพีเอ็ม จนถึง 25,000 พีพีเอ็ม มีค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท DF008 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และสารสกัดจากไพลที่ความเข้มข้น 15,000 พีพีเอ็ม จนถึง 25,000 พีพีเอ็ม มีค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท DF008 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เช่นกัน (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2. ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytopthora* sp. ไอโซเลท DF008 โดยสารสกัดจากสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด	**ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytopthora* sp. ไอโซเลท DF008**				
	ระดับความเข้มข้น(พีพีเอ็ม)				
	5,000	**10,000**	**15,000**	**20,000**	**25,000**
1. กระชาย	92.59^{def}	95.29^{abcd}	98.99^{ab}	100.00^{a}	100.00^{a}
2. ขมิ้นชัน	89.23^{fg}	94.35^{bcde}	100.00^{a}	100.00^{a}	100.00^{a}
3.หัวแห้วหมู	27.34^{n}	30.62^{n}	37.36^{m}	56.12^{k}	77.17^{h}
4.สบู่เลือด	48.99^{l}	77.85^{h}	100.00^{a}	100.00^{a}	100.00^{a}
5.ว่านอัคคีทวาร	0.88^{q}	6.74^{p}	19.21^{o}	26.15^{n}	36.84^{m}
6.เปลือกมังคุด	65.59^{ij}	69.59^{i}	84.47^{g}	93.62^{cdef}	99.01^{ab}
7.เมล็ดมะรุม	21.03^{o}	11.04^{p}	39.21^{m}	54.45^{k}	64.15^{j}
8.ไพล	90.38^{ef}	92.09^{def}	98.13^{abc}	100.00^{a}	100.00^{a}
ชุดควบคุมเชิงบวก	100.00				
ชุดควบคุมเชิงลบ	0.00				

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันหมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

ชุดควบคุมเชิงบวก คือ เชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท DF008 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยง PDA ผสม Metalaxyl

ชุดควบคุมเชิงลบ คือ เชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท DF008 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

จากการศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท PD2-2 พบว่าสารสกัดที่สามารถยับยั้งไอโซเลท PD2-2 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ คือ สารสกัดจากขมิ้นชัน และสบู่เลือด ตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุด 15,000 พีพีเอ็มขึ้นไป สารสกัดจากกระชายและไพล ที่ความเข้มข้น 25,000 พีพีเอ็ม โดยพบว่าสารสกัดจากกระชายที่ความเข้มข้น 15,000 พีพีเอ็ม จนถึง 25,000 พีพีเอ็ม มีค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท PD2-2 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และสารสกัดจากขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 5,000 พีพีเอ็ม จนถึง 25,000 พีพีเอ็ม มีค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท PD2-2 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เช่นกัน (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.3. ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytopthora* sp. ไอโซเลท PD2-2 โดยสารสกัดจากสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด	**ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytopthora* sp. ไอโซเลท PD2-2**				
	ระดับความเข้มข้น(พีพีเอ็ม)				
	5,000	**10,000**	**15,000**	**20,000**	**25,000**
1. กระชาย	84.05^{hi}	90.17^{efgh}	95.02^{abcdef}	99.33^{ab}	100.00^{a}
2. ขมิ้นชัน	96.51^{abcde}	96.92^{abcd}	100.00^{a}	100.00^{a}	100.00^{a}
3.หัวแห้วหมู	29.51^{o}	30.49^{o}	46.43^{m}	55.36^{l}	85.93^{gh}
4.สบู่เลือด	75.69^{j}	88.93^{fgh}	100.00^{a}	100.00^{a}	100.00^{a}
5.ว่านอัคคีทวาร	1.47^{q}	18.74^{p}	28.87^{o}	37.99^{n}	44.78^{m}
6.เปลือกมังคุด	62.50^{k}	77.67^{ij}	89.72^{fgh}	97.57^{abc}	98.12^{abc}
7.เมล็ดมะรุม	41.66^{mn}	47.27^{m}	63.54^{k}	77.37^{j}	78.30^{ij}
8.ไพล	90.88^{defg}	91.99^{cdefg}	93.39^{bcdef}	98.43^{bcdef}	100.00^{a}
ชุดควบคุมเชิงบวก	100.00				
ชุดควบคุมเชิงลบ	0.00				

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันหมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

ชุดควบคุมเชิงบวก คือ เชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท PD2-2 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยง PDA ผสมMetalaxyl

ชุดควบคุมเชิงลบ คือ เชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท PD2-2 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

จากการศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท PD2-4 พบว่าสารสกัดที่สามารถยับยั้งไอโซเลท PD2-4 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ คือ สารสกัดจากขมิ้นชันและสบู่เลือดที่ความเข้มข้นต่ำสุด 20,000 พีพีเอ็ม และสารสกัดจากกระชายที่ความเข้มข้น 25,000 พีพีเอ็ม โดยที่สารสกัดจากกระชายที่ความเข้มข้น 5,000 พีพีเอ็ม จนถึง 25,000 พีพีเอ็ม มีค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท PD2-4 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 สารสกัดจากขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 15,000 พีพีเอ็ม จนถึง 25,000 พีพีเอ็ม มีค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท PD2-4 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และสารสกัดจากสบู่เลือดที่ความเข้มข้น 15,000 พีพีเอ็ม จนถึง 25,000 พีพีเอ็ม มีค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท PD2-4 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4. ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ*Phytopthora* sp. ไอโซเลท PD2-4 โดยสารสกัดจากสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด	**ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytopthora* sp. ไอโซเลท PD2-4**				
	ระดับความเข้มข้น(พีพีเอ็ม)				
	5,000	**10,000**	**15,000**	**20,000**	**25,000**
1. กระชาย	94.74^{abcd}	94.44^{abcd}	96.55^{abc}	98.38^{ab}	100.00^{a}
2. ขมิ้นชัน	85.83^{fgh}	87.83^{fg}	95.99^{abc}	100.00^{a}	100.00^{a}
3.หัวแห้วหมู	36.46^{op}	41.92^{no}	51.32^{m}	80.27^{hi}	91.44^{cdef}
4.สบู่เลือด	56.79^{lm}	88.53^{efg}	96.32^{abc}	100.00^{a}	100.00^{a}
5.ว่านอัคคีทวาร	16.26^{q}	21.71^{q}	32.70^{p}	42.41^{n}	51.99^{m}
6.เปลือกมังคุด	75.87^{ij}	76.17^{ij}	84.91^{gh}	93.89^{bcde}	99.24^{ab}
7.เมล็ดมะรุม	33.29^{p}	36.67^{op}	60.56^{l}	69.36^{k}	71.87^{jk}
8.ไพล	81.50^{hi}	89.96^{defg}	95.15^{abcd}	97.29^{ab}	97.96^{ab}
ชุดควบคุมเชิงบวก	100.00				
ชุดควบคุมเชิงลบ	0.00				

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันหมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)
ชุดควบคุมเชิงบวก คือ เชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท PD2-4 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยง PDA ผสมMetalaxyl
ชุดควบคุมเชิงลบ คือ เชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท PD2-4 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

จากการศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท PD2-16 พบว่าสารสกัดที่สามารถยับยั้งไอโซเลท PD2-16 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ คือ สารสกัดจากสบู่เลือดและไพลที่ความเข้มข้นต่ำสุด 20,000 พีพีเอ็ม สารสกัดจากกระชาย ขมิ้นชันและเปลือกมังคุดที่ความเข้มข้น 25,000 พีพีเอ็ม โดยที่สารสกัดจากกระชาย สบู่เลือดและไพลที่ความเข้มข้น 15,000 พีพีเอ็ม จนถึง 25,000 พีพีเอ็ม มีค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท PD2-16 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ส่วนสารสกัดจากขมิ้นชันและเปลือกมังคุดที่ความเข้มข้น 20,000 พีพีเอ็ม จนถึง 25,000 พีพีเอ็ม มีค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท PD2-16 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (**ตารางที่ 3.5**)

ตารางที่ 3.5. ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytopthora* sp. ไอโซเลท PD2-16 โดยสารสกัดจากสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด	**ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytopthora* sp. ไอโซเลท PD2-16**				
	ระดับความเข้มข้น(พีพีเอ็ม)				
	5,000	**10,000**	**15,000**	**20,000**	**25,000**
1. กระชาย	90.02^{defgh}	93.50^{bcde}	96.88^{abc}	99.09^{ab}	100.00^{a}
2. ขมิ้นชัน	85.03^{ghi}	87.41^{fghi}	91.92^{cdef}	95.78^{abcd}	100.00^{a}
3.หัวแห้วหมู	43.03^{o}	51.76^{n}	70.22^{jkl}	89.08^{efghi}	93.40^{bcdef}
4.สบู่เลือด	84.45^{hi}	90.99^{cdefg}	99.15^{ab}	100.00^{a}	100.00^{a}
5.ว่านอัคคีทวาร	13.21^{q}	27.53^{p}	47.37^{no}	66.07^{lm}	73.21^{jk}
6.เปลือกมังคุด	7.78^{jkl}	75.84^{j}	83.96^{i}	95.15^{abcd}	100.00^{a}
7.เมล็ดมะรุม	27.82^{p}	47.88^{no}	60.27^{m}	69.35^{kl}	75.66^{j}
8.ไพล	84.47^{hi}	87.93^{efghi}	96.30^{abc}	100.00^{a}	100.00^{a}
ชุดควบคุมเชิงบวก	100.00				
ชุดควบคุมเชิงลบ	0.00				

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันหมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)
ชุดควบคุมเชิงบวก คือ เชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท PD2-16 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยง PDA ผสมMetalaxyl
ชุดควบคุมเชิงลบ คือ เชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท PD2-16 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

จากผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์เชื้อรา *Phytopthora palmivora* ที่แยกได้จากงานวิจัยนี้เป็นสายพันธุ์เดียวกันกับที่ Drenth และ Guest [15] ได้เคยรายงานไว้ว่าเชื้อรา *Phytopthora* sp. ที่เข้าทำลายในทุเรียนเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ส่วนใหญ่จะพบเป็น *Phytopthora palmivora* มากที่สุด โดยลักษณะของเชื้อรา *P. palmivora* ที่แยกได้จากการทดลองมีลักษณะของโคโลนี sporangium และสัดส่วนของความกว้างและความยาวของ sporangium ในอัตรา 1.6-2.0 ซึ่งเป็นลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *P. palmivora* ซึ่งเป็นไปในลักษณะใกล้เคียงกับที่ Suzui และคณะ [16] ได้เคยรายงานไว้ แต่บางไอโซเลทอาจจะมีขนาดของโคโลนีต่างกันออกไปบ้างใน เนื่องจากเชื้อรา *Phytopthora* sp. มีความผันแปรของลักษณะทางสัณฐานวิทยาค่อนข้างมาก ขึ้นกับแหล่งที่มาและสภาวะต่างๆ ตามที่ Mannon และ Chuanxue [17] ได้รายงานไว้ การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรที่ยับยั้งการเจริญของ *Phytopthora* sp. พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแต่ละไอโซเลทได้แตกต่างกัน เนื่องจากแต่ละไอโซเลทคัดแยกมาจากแหล่งที่มาและชิ้นส่วนที่เกิดโรคต่างกัน รวมทั้งผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ทางอณูวิทยา พบว่า *P. palmivora* คนละสายพันธุ์กัน ทำให้มีความทนต่อสารสกัดสมุนไพรที่แตกต่างกัน

สารสกัดจากไพลสามารถยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* ได้ดีในทุกไอโซเลท ซึ่งสอดคล้องกับที่ วรรณีและคณะ [18] ได้เคยกล่าวไว้ว่า สารสกัดจากไพลประกอบไปด้วยสารออกฤทธิ์สำคัญได้แก่ Sabinene, Terpinen-4-ol, Terpinene และ Pinene มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิด อีกทั้งสารสกัดจากขมิ้นชันและกระชาย ที่ความเข้มข้น 10,000 พีพีเอ็ม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเชื้อรา *P. palmivora* ได้สูงกว่าที่จาณียาและคณะ [19] เคยทำการทดสอบไว้ได้ 58 เปอร์เซ็นต์และ 85 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ คือสามารถยับยั้งได้เฉลี่ย 93 เปอร์เซ็นต์และ 91 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนั้นสารสกัดจากขมิ้นชันที่สกัดได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลท DF008 และ ไอโซเลท PD2-2 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 15,000 พีพีเอ็ม ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่น้อยกว่า วรัญญูและปราณี [20] เคยใช้ที่ความเข้มข้น 20,000 พีพีเอ็มถึงจะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* ด้วยสารสกัดจากเปลือกมังคุดให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับ อุดมลักษณ์ และคณะ [21] เคยทำการสกัดสารจากเปลือกมังคุดด้วยตัวทำละลายเอทานอล มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา พบว่าความเข้มข้นสารต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของของเชื้อราได้ อยู่ที่ 8192 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รวมทั้งสารสกัดจากสบู่เลือด ให้ผลการทดลองไปในทางเดียวกับที่ Makarasen และคณะ [22] เคยทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารอัลคาลอยด์ (Alkaloids) ที่สกัดจากหัวและใบของต้นสบู่เลือด พบว่าสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดและสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีอีกด้วย

4. สรุปผลการทดลอง

จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Phytopthora* spp.ที่ก่อให้เกิดโรคในทุเรียนในประเทศไทยเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันกับ *P. palmivora* และเมื่อทำการคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราดังกล่าวพบว่า สารสกัดจากสมุนไพรทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ได้ โดยเฉพาะสารสกัดจากกระชาย ขมิ้นชัน สบู่เลือด ไพลและเปลือกมังคุด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลในการพัฒนาการใช้สารสกัดจากสมุนไพรเหล่านี้ไปพัฒนาเป็นสารกำจัดเชื้อรา เพื่อเพิ่มทางเลือกให้กับเกษตรกรในการลดปัญหาสารเคมีตกค้างและยังเป็นการลดต้นทุนให้กับเกษตรกร อีกทั้งยังเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรทั้งแปดชนิดนี้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง (References)

[1] จินตน์กานต์ งามสุทธา. 2557. จุดเปลี่ยนทุเรียนไทย. *จดหมายข่าวผลิใบ*. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 67-69. [Jintakarn Ngamsutta. 2014. Turning point of Thai durain. *Jodmaikhaoplibai*. Department of Agriculture Ministry of Agriculture and Cooperatives. 67-69. (in Thai)]

[2] ธรรมศักดิ์ สมมาตย์. 2532. การควบคุมโรคโคนเน่า รากเน่าของทุเรียนด้วยเทคนิคโรคพืช มก. และสาร m-dKP. ในสมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย. เอกสารประกอบการบรรยายเทคนิคและกลยุทธ์ในการต่อสู้โรคทุเรียนและ พริกไทย วันที่ 1 กรกฎาคม 2532. ณ โรงแรมอีสเทิร์น. จังหวัดจันทบุรี. หน้า 42-47. [Thammasak Sommat. 1989. Control of rot disease Root rot of durian with herbicide and m-dKP. Dissertations and Techniques in Fighting Durian and Pepper Diseases. July 1,1989 at Eastern Hotel Chantaburi. 42-47. (in Thai)]

[3] รัตติยา พงศ์พิสุทธา. 2535. โรคผลเน่าของทุเรียนหมอนทองที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butl.)Butl. และการควบคุม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, ภาควิชาโรคพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. [Rattiya Pongpisutta. 1992. Control of *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. causing root rot of durian. M.Sc. Special Project . Pathology program, Kasetsart university. (in Thai)]

[4] Ferrin, D.M. and Kabashima, J.N. 1991. Invitro insensitivity to metalaxyl of isolates, of *Phytophthora citricola* and *P. parasitica* from ornamental host in southern California. *Plant Disease*. 75. 1041-1044.

[5] วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2532. พจนานุกรมสมุนไพรไทย (ฉบับสรรพคุณยาไทย). พิมพ์ครั้งที่ 1, โรงพิมพ์บำรุงสาส์น, กรุงเทพมหานคร. [Witt Theangboontam. 1989. Thai Herbal Dictionary. 1st ed, Bumrungsan Publishing, Bangkok. (in Thai)]

[6] Tuite, J. 1969. Plant Pathological Methods:Fungi and Bacteria. Burgess Publishing Company. University of Minnesota Press.

[7] Carmichael, J.W. 1956. Frozen storage for stock cultures of fungi. *Mycologia*, 48(3), 378-381.

[8] Cory, R.K., Patricia, O.B., Steven, S.G. and Christina, M.H. 2008. Formulation of a defined V8 medium for induction of sexual development of *Cryptococcus neoformans*. *Applied and Environmental Microbiology,* 74(20), 6248–6253.

[9] Koichiro, K., Makiichi, T., Tsutomu, S. and Kozo, N. 2003. Rapid report diagnosis of dehydratase inhibitors in melanin biosynthesis inhibitor (MBI-D) resistance by primer-introduced restriction enzyme analysis in scytalone dehydratase gene of *Magnaporthe grisea. Pest Management Science,* 59, 843-846.

[10] Ishii, H., Fraaije, B.A., Sugiyama, T., Noguchi, K., Nishimura, K., Takeda, T., Amano, T., and Hollomon, D.W. 2001. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology*, 91, 1166-1171.

[11] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5 : molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol.Biol. Evol.*, 28, 2731–2739.

[12] Chien, J.T., Hoff, J.E. and Chien, L.F. 1988. Simultaneous dehydration of 95% ethanol and extraction of rude oil from dried ground corn. *Cereal Chem*, 65(6), 484-486.

[13] Pundir, R.K. and Jain, P. 2010. Antifungal activity of twenty two ethanolic plant extracts against food associated fungi. *J. Pharma. Res*., 3(1), 506-510.

[14] Montgomery, D.C, 2001. Design and Analysis of Experiments. 5 th ed. John Wily & Sons, Inc., New York.

[15] Drenth, A. and Guest, D.I. 2004. Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia. ACIAR Monograph No. 114, Melbourne, Australia.

[16] Suzui, T., Kueprakonr, U. and Kamhangridthirong, T. 1976. *Phytophthora* Disease on some Economic Plants in Thailand. Plant Pathology Div. Dept. of *Agr*. 113.

[17] Mannon, E. G. and Chuanxue, H. 2008. *Phytophthora* : Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints. American Phytopathological Society Publishing.

[18] วรรณี สมัปปิโต, ศุภชัย สมัปปิโตและลือชัย บุตคุป. 2559. ผลของสารสกัดจากเปลือกมังคุด ไพลและน้ำมันไพลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, 36(1), 53-60. [Wannee Samutpito, Supachai Samutpito and Luechai Buttakhup. 2016. Effect of Mangosteen Extract and Plai oil Inhibits the growth of pathogens. *Journal of science and technology Mahasarakham University*, 36(1), 53-60. (in Thai)]

[19] จาณียา ขันชะลี, ศศิประภา คำหงส์, สง่า ผลอ้อ, ศิรประภา การันต์, อนุสรา ถามะพันธ์ และ วรพล สุรพัฒน์. 2555. การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อราในยางพารา. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, ครั้งที่ 50, กรุงเทพมหานคร, 214-221. [Janeeya Kunchalee, Sasiprapa Kumhong, Sanga Pholaor, Siraprapa Karun, Anusara Thamapan and Worrapon Surapat . 2012. Screening for Antifungal Activity of medicinal Plant Extracts in control rubber tree. The 56th Kasetsart University Annual Conference, 36(1), 53-60. (in Thai)]

[20] วรัญญู แก้วดวงตาและปราณี เริ่มกระโทก. 2556. ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยในการควบคุมโรคเน่าดำของกล้วยไม้หวายเอียสกุล. สารวิจัยเพื่อชุมชน, 4(1), 45 -49. [Warunyou Khawdaungtar and Pranee Rermkratoke. 2013. Test the efficacy of Thai herbal extracts to control Black rot disease of orchid . Community Research, 4(1), 45-49. (in Thai)]

[21] อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ, อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, ประภัสสร รักถาวร, สิริพร ศิริวรรณ และ พจมาน พิศเพียงจันทร์. 2552. การสกัดและการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. [Udomluk Sukautta, Auraiwan Dilokkunanun, Prapatsorn Rukthaworn, Siriporn Siriwan and Podjamarn Pitpiangchan. 2009. Extraction and antimicrobial activity of mangosteen peel extract. Kasetsard Agricultural

and Agro Industrial Product Improvenent Institute. (in Thai)]

[22] Makarasen, A., Sirithana, W., Mogkhuntod, S., Khunnawutmanotham, N., Chimnoi, N. and Techasakul S. 2011. Cytotoxic and antimicrobial activities of aporphine alkaloids isolated from *Stephania venosa* (Blume) Spreng. *Planta Med*., 77(13). 1519-1524.