

นิพนธ์ต้นฉบับ

ฤทธิ์ในการต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากเหง้าว่านน้ำ
ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคบางชนิดในต้นกล้ายูคาลิปตัส

**Antifungal Activity of Essential Oil Extracted of *Acorus calamus* L.
Rhizome in Growth Inhibition of Some Eucalyptus Seedlings Pathogens**

พนิน สินขวาร์ักษ์

สุวิมล อุทัยรัตน์

ธารรัตน์ แก้วกระจ่าง*

Phanin Sintawarak

Suwimon Uthairatsamee

Tharnrat Keawgrajang*

คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Faculty of Forestry, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding Author, E-mail: ffortrk@ku.ac.th

รับต้นฉบับ 19 มีนาคม 2561

รับลงพิมพ์ 23 เมษายน 2561

ABSTRACT

Eucalyptus was an important economic tree of Thailand. Nowadays, the eucalyptus seedlings severely infected by fungal diseases so fungicides have been used for control and management of plant diseases. However, the chemicals have affected on user and environment. This study aimed to investigate the antifungal activity of the essential oil from *Acorus calamus* L. rhizome against some fungal diseases of Eucalyptus, including *Cylindrocladium reteauidii*, *Pestalotiopsis* sp. and *Sclerotium rolfsii*. The extraction of essential oils from rhizomes was carried out by hydrodistillation technique, afterwards the antifungal test was done by poisoned food technique method. Different concentration of essential oil such as 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 and 2,000 ppm were taken to evaluate the effect. The result showed that the essential oil of *A. calamus* rhizome had activity against fungal pathogens, *C. reteauidii*, *Pestalotiopsis* sp. and *S. rolfsii* with IC_{50} (Inhibitory concentration 50%) values of 54.76, 126.47 and 113.68 ppm, respectively. The growth of *C. reteauidii* was completely inhibited at the concentration of 2,000 ppm, while at 500 ppm and 250 ppm concentration of oil also 100% inhibition was found on *Pestalotiopsis* sp. and *S. rolfsii*, respectively. From the results obtained it can be inferred that essential oil from *A. calamus* rhizome might be a good efficiency of antifungal compounds toward using for control fungal disease of Eucalyptus seedlings in nursery.

Keywords: Essential Oil, *Acorus calamus*, Eucalyptus seedling disease, Antifungal activity

บทคัดย่อ

ยูคาลิปตัส เป็นไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย แต่ในปัจจุบันกล้ายูคาลิปตัสเกิดความเสียหายจากโรคที่เกิดจากเชื้อราเข้าทำลายอย่างมาก สารเคมีฆ่าเชื้อราจึงถูกนำมาใช้ในการควบคุมและจัดการโรคพืช อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีมีผลต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคของยูคาลิปตัส ซึ่งเชื้อราสาเหตุโรคที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Cylindrocladium reteaudii*, *Pestalotiopsis* sp. และ *Sclerotium rolfsii* โดยสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำด้วยวิธีการต้มกลั่น (hydrodistillation) แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี poisoned food technique ซึ่งใช้น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ppm ผลการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. reteaudii*, *Pestalotiopsis* sp. และ *S. rolfsii* ได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 54.76, 126.47 และ 113.68 ppm ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ppm สามารถยับยั้งการเติบโตของรา *C. reteaudii* ได้ 100% ในขณะที่ความเข้มข้น 500 ppm และ 250 ppm สามารถยับยั้งรา *Pestalotiopsis* sp. และ *S. rolfsii* ได้ 100% จากผลการศึกษาเห็นได้ว่าน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำมีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคของยูคาลิปตัสในสภาพจานเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำไปประยุกต์ใช้ในสภาพเรือนเพาะชำเพื่อพัฒนาเป็นสารชีวภาพในการยับยั้งโรคบนกล้ายูคาลิปตัสที่เกิดจากเชื้อราดังกล่าวต่อไป

คำสำคัญ: น้ำมันหอมระเหย ว่านน้ำ โรคกล้ายูคาลิปตัส ฤทธิ์การต้านเชื้อรา

คำนำ

ยูคาลิปตัสเป็นไม้เศรษฐกิจที่มีความสำคัญเป็นอันดับต้นๆ ของประเทศไทย โดยมีพื้นที่ปลูกทั่วประเทศมากกว่า 3 ล้านไร่ และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากยูคาลิปตัสสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายและสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมต่างๆ ของประเทศไทย (กรมป่าไม้, 2552) ในปัจจุบันการผลิตกล้ายูคาลิปตัสส่วนใหญ่ใช้วิธีการปักชำ ซึ่งกระบวนการผลิตกล้ายูคาลิปตัสจำเป็นต้องจัดการให้เรือนเพาะชำมีความชื้นสูง แต่สภาพแวดล้อมดังกล่าวส่งผลให้เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืชมีการเติบโตได้ดี อีกทั้งอาจทำให้กล้าไม้อ่อนแอต่อโรคอีกด้วย กฤษณา (2542) ได้ทำการสำรวจโรคกล้าไม้ยูคาลิปตัสในประเทศไทยพบว่า ยูคาลิปตัสประสบปัญหาจากการเข้าทำลายของโรค เช่น โรคโคนเน่าคอดิน ใบจุด ใบไหม้ ยอดไหม้ โรคเน่า โรคตายยอด ซึ่งสาเหตุเกิดจากเชื้อรามากกว่า

25 ชนิด ทำให้เกิดความเสียหายต่อมูลค่าทางเศรษฐกิจอย่างมาก โดยแนวทางในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวในปัจจุบัน คือ การใช้สารเคมีในการควบคุมและกำจัดโรค (Chemical control) แม้การใช้สารเคมีจะสามารถใช้ได้ผลดีแต่สารเคมีบางชนิดส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ใช้และยังอาจตกค้างในธรรมชาติ เป็นผลเสียต่อระบบนิเวศ ดังนั้นการวิจัยในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นหาวิธีการควบคุมและกำจัดโรคโดยชีววิธี (Biological control) เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันและกำจัดโรคพืช ซึ่งการใช้สารสกัดจากพืชในการยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืชเป็นวิธีการหนึ่งที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้แล้วได้ผลดีและยังไม่เป็นพิษต่อผู้ใช้ อีกทั้งสามารถสลายตัวได้เร็วในธรรมชาติ

ว่านน้ำ (*Acorus calamus* L.) จัดอยู่ในวงศ์ Acoraceae เป็นไม้ล้มลุกขนาดเล็ก เติบโตอยู่ในพื้นที่ชื้นแฉะใกล้น้ำ มีเหง้าทอดยาวใต้ดิน มีกลิ่นหอม รสเผ็ดฉุน โดยส่วนเหง้าของว่านน้ำได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์

ในด้านแพทย์แผนไทย เป็นยาขับลม บรรเทาปวด ขับพยาธิ แก้ท้องเสีย หรือโรคบิด ใช้แต่งกลิ่นอาหาร รสเครื่องดื่ม ใช้เป็นเครื่องหอมในพิธีกรรม (พิธีศักดิ์และคณะ, 2546; Preedy, 2016) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการใช้เป็นสารป้องกันแมลง และด้านเชื้อราที่ก่อโรคในคน เช่น เชื้อรา *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypsum*, *Penicillium* spp. (Phongpaichit et al., 2005; Gaidhani et al., 2009; Palani et al., 2010) อีกทั้งยังสามารถยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในพืชได้ เช่น เชื้อรา *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme*, *Trichosporium vesiculosum* (Ghosh, 2006; Devi and Ganjewala, 2009) และจากการศึกษาของ Phongpaichit et al. (2005) และ Devi and Ganjewala (2009) ที่ได้แยกสาร β -asarone จากสารสกัดหยาบของเหง้าว่านนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สารดังกล่าวนี้สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ได้ดี นอกจากนี้ Raina et al. (2003) ยังพบว่า β -asarone เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเหง้าของว่านน้ำและในเหง้ายังมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากกว่าส่วนอื่นๆ อีกด้วย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคของยูคาลิปตัสในสภาพจานเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้หากพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำมีประสิทธิภาพที่ดีจะได้ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำผลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งโรคของยูคาลิปตัสในสภาพเรือนเพาะชำต่อไป

อุปกรณ์ และวิธีการ

การแยกเชื้อราและพิสูจน์การก่อโรค

เชื้อราสาเหตุโรคที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ *Cylindrocladium reteaudii*, *Pestalotiopsis* sp. และ *Sclerotium rolfsii* โดยเชื้อราทั้ง 3 ชนิด มีขั้นตอนการแยกเชื้อและพิสูจน์การก่อโรคดังนี้

เชื้อรา *C. reteaudii* และ *Pestalotiopsis* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุโรคใบจุด ใบไหม้ แยกได้จากใบของกล้ายูคาลิปตัสที่เป็นโรคที่พบในเรือนเพาะชำของบริษัทสยามฟอเรสทรี จำกัด จังหวัดกาญจนบุรี ทำการแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting method เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วจึงนำมาพิสูจน์ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคตามวิธีของ Koch (Koch's Postulation) โดยทำการฉีดพ่นสารละลายแขวนลอยสปอร์เชื้อราความเข้มข้น 5×10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ลงบนกล้ายูคาลิปตัส สายต้น H4 (ลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง *Eucalyptus camaldulensis* และ *E. urophylla*) อายุ 2 เดือน จากนั้นตรวจสอบสัญลักษณ์ (sign) รอยแผล (lesions) และอาการของโรคที่แสดงออกบนกล้ายูคาลิปตัส

สำหรับเชื้อ *S. rolfsii* ซึ่งมีรายงานว่า เป็นสาเหตุของโรครากเน่าคอดิน (damping-off) ของกล้ายูคาลิปตัส ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อที่ใช้ในการทดสอบจากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และทำการพิสูจน์การก่อให้เกิดโรคด้วยวิธี soil infestation method โดยทำการนำสารละลายแขวนลอยสปอร์เชื้อราความเข้มข้น 5×10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ฉีดลงในหลอดปักชำกล้ายูคาลิปตัสที่ใช้ขุยมะพร้าวอบแห้งมาเชื้อเป็นวัสดุปลูก สายต้น H4 อายุ 5 วัน จากนั้นตรวจสอบสัญลักษณ์ รอยแผล และอาการของโรคที่แสดงออกบนกล้ายูคาลิปตัส

การกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำ

นำเหง้าสดของว่านน้ำอายุ 1 ปี ที่ปลูกในพื้นที่อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี มาตากในที่ร่ม ที่มีการระบายอากาศดี จนกระทั่งเหง้าว่านน้ำแห้งสนิท จากนั้นบดให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วชั่งว่านน้ำ 50 กรัม ใส่ในขวดแก้วก้นกลม เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำต่อเข้ากับชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย ให้ความร้อนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำการดูดน้ำมันหอมระเหยออกมา

และเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮไดรส์ (Na_2SO_4) เพื่อกำจัดน้ำที่ปะปนมา และเก็บน้ำมันหอมระเหยได้ชนิดเดียวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดสอบต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำในการยับยั้งเชื้อรา

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำต่อการเจริญของเชื้อราในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธี poisoned food technique ตามวิธีของ Sharma *et al.* (2011)

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ผสมกับน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยนำน้ำมันหอมระเหยมาละลายเจือจางใน 2% Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้น 312.5, 625, 1,250, 2,500, 5,000, 10,000 และ 20,000 ppm จากนั้นนำสารละลายน้ำมันหอมระเหยในแต่ละระดับความเข้มข้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดทดลองในขณะละลายที่มีอุณหภูมิประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส เข้าหลอดทดลองเพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายน้ำมันหอมระเหยผสมกันเป็นเนื้อเดียว ซึ่งจะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันหอมระเหยเจือจางลง 10 เท่า (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ppm) จากนั้นเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ โดยมีชุดทดสอบควบคุม 2 ประเภท คือ (1) ชุดทดสอบที่จานเลี้ยงเชื้อบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ (2) ชุดทดสอบจานเลี้ยงเชื้อบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และ 2% DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2. นำเชื้อราแต่ละชนิดมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งเชื้อเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นเชื้อราแล้วนำไปวางตรงกลาง

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 1 บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยแต่ละชุดการทดสอบมีจำนวน 5 ซ้ำ

3. การวิเคราะห์ข้อมูล เมื่อเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา (fungal colony) ในแต่ละชุดการทดสอบและนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (% Inhibition) จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [(A - B) / A] \times 100$$

เมื่อ A คือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนจานเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม

B คือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารละลายน้ำมันหอมระเหย

นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติด้วยวิธีการ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และทำการสร้างสมการเส้นตรงแสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 50 % หรือค่า Inhibitory Concentration (IC_{50})

ผลและวิจารณ์

การพิสูจน์การก่อให้เกิดโรคในกล้วยาลิปัด

เมื่อพิสูจน์การก่อโรคพบว่าเชื้อรา *C. reteaudii* ก่อให้เกิดโรคใบไหม้ (leaf blight) แก่กล้วยาลิปัดส อการไหม้เริ่มจากขอบใบ และลุกลามเข้าสู่กลางใบ เชื้อราจะสร้างสปอร์บนแผลลักษณะคล้ายช่อดอกไม้ มีก้านชูสปอร์ (conidiophore) สปอร์ (conidia) ทรงกระบอก เป็นแท่งยาว สีขาว เกิดขึ้นอย่างหนาแน่น อการใบไหม้จะลุกลามจนใบร่วงในที่สุด หากมีความรุนแรงมากมักพบอการไหม้ที่ลำต้นร่วมด้วย (Figure 1)



Figure 1 Disease symptoms of Eucalyptus clone H4 (*E. camaldulensis* x *E. urophylla*) caused by *Cylindrocladium reteaudii*; (A-B) leaf blight of an Eucalyptus seedling (C) stem blight of an Eucalyptus seedling (D) conidia on surface of leaves; bar 2 mm (E) conidiophore and conidia on midrib; bar 0.2 mm (F) chlamydospore and conidiophore; bar 50 μ m (G) macroconidia; bar 50 μ m (H) clavate vesicle; bar 50 μ m.

เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ก่อให้เกิดโรคใบไหม้ (leaf blight) แก่กล้าชูลิปดัส เริ่มจากอาการใบเหี่ยวก่อนไหม้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล โดยเริ่มจากบริเวณขอบใบ

มักพบอาการใบแห้งและม้วนงอเชื้อราจะสร้างโครงสร้างบรรจุสปอร์เป็นจุดบนสีน้ำตาลบนใบชูลิปดัสที่ถูกทำลายจากนั้นจะพบอาการใบร่วงอย่างรุนแรง (Figure 2)

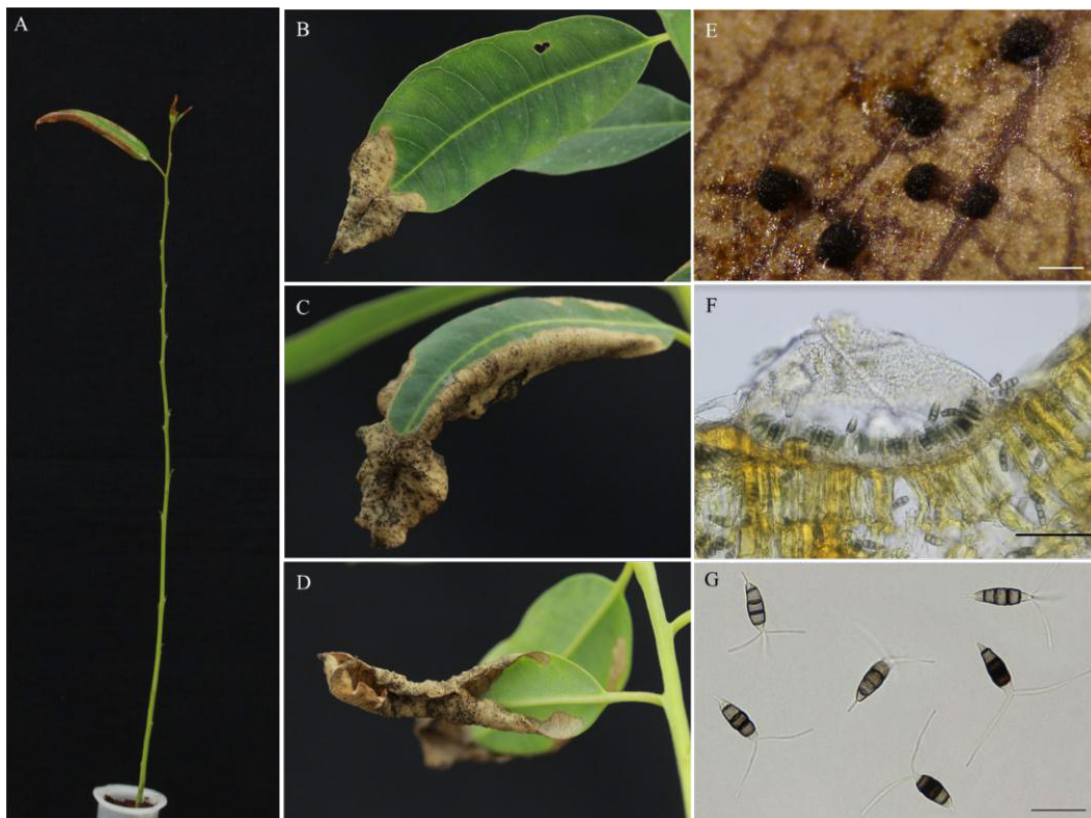


Figure 2 Disease symptoms of Eucalyptus clone H4 (*E. camaldulensis* x *E. urophylla*) caused by *Pestalotiopsis* sp.; (A-D) leaf blight (E) acervulus on surface leaves; bar 0.2 mm (F) cross section of acervulus; bar 50 μ m (G) fusiform five-celled conidia; bar 20 μ m.

เชื้อรา *S. rolfii* ก่อให้เกิดโรคน้ำหรือโคนเน่า คอติ (rot, damping-off) แก่กล้าชุกาลิปดัส ซึ่งอาการของโรคเกิดบริเวณกิ่งขั้วระดับวัสดุปลูก โดยระยะแรก เส้นใยเชื้อราจะเจริญปกคลุมบนวัสดุปลูกและจากนั้นจะแทงเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืช ซึ่งสังเกตได้จากเส้นใยสีขาวที่ปกคลุมบนเนื้อเยื่อกิ่งชำ เนื้อเยื่อส่วนที่ถูกเส้นใย

เชื้อราปกคลุมจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล คล้ำ เริ่มมีอาการน้ำเน่าและหักพับบริเวณระดับวัสดุปลูก เชื้อราแสดงลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวและการสร้างเม็ด sclerotia ลักษณะเป็นเม็ดกลมรี สีน้ำตาล เจริญบนแผ่นเน่า ซึ่งอาการสามารถเกิดกับใบได้ด้วย เห็นได้จากอาการเน่าและมีเส้นใยปกคลุมบนใบของกล้าชุกาลิปดัส (Figure 3)

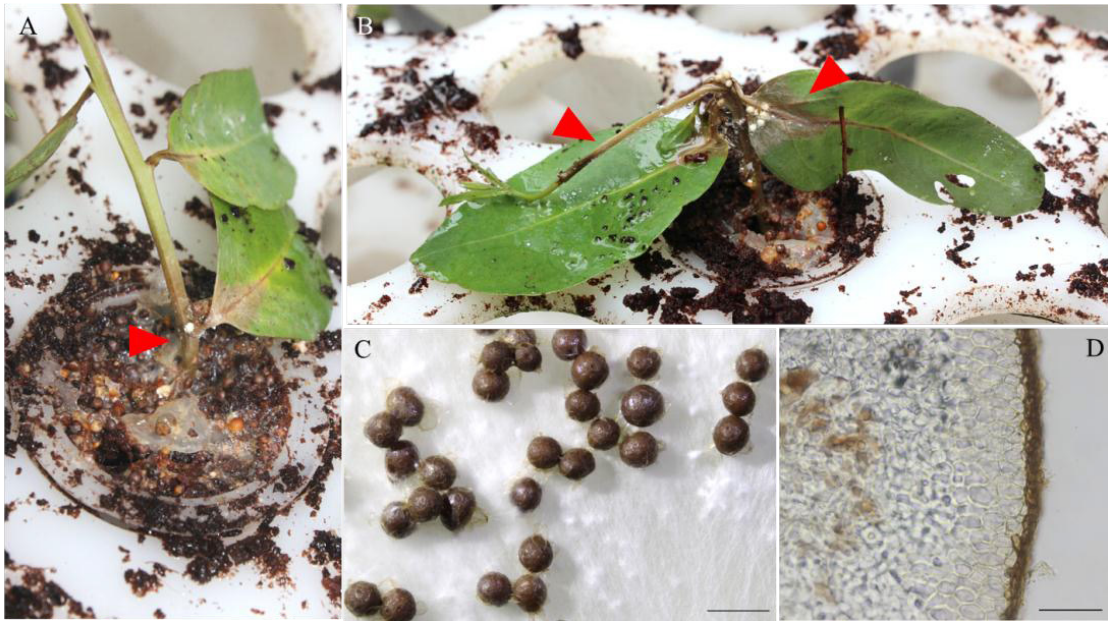


Figure 3 Disease symptoms of Eucalyptus clone H4 (*E. camaldulensis* x *E. urophylla*) caused by *Sclerotium rolfsii*; (A) damping-off (B) stem and leaf rot (C) sclerotia on PDA; bar 2 mm (D) cross section of sclerotia ; bar 50 μ m.

ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่าน น้ำต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

เมื่อสิ้นสุดการทดสอบพบว่าเชื้อรา *C. reteaudii*, *Pestalotiopsis* sp. และ *S. rolfsii* ในชุดทดสอบควบคุม (อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสม 2% DMSO) ใช้เวลาเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ 8, 6 และ 4 วัน ตามลำดับ ลักษณะของโคโลนีเชื้อรา *C. reteaudii* ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมน้ำมันหอมระเหย สังเกตได้ว่าเส้นใยซ้อนทับกันหนาแน่นมากกว่าชุดทดสอบควบคุม และสร้าง chlamydospore ขนาดใหญ่ เป็นชั้น

คล้ายวงปีไม้ แต่ไม่สามารถขยายโคโลนีต่อไปได้และสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อน้อย ส่วนโคโลนีของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมน้ำมันหอมระเหยมีความหนาแน่นและความฟูของเส้นใยน้อยกว่าชุดทดสอบควบคุม ด้านหลังจานเลี้ยงเชื้อมีสีครีมถึงเหลือง และลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *S. rolfsii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมน้ำมันหอมระเหยขยายโคโลนีได้ช้า แตกต่างจากชุดทดสอบควบคุมที่มีการขยายโคโลนีอย่างรวดเร็วและเส้นใยมีการเจริญอัดตัวกันเพื่อสร้างเม็ด Sclerotia แล้ว (Figure 4, 5, 6)

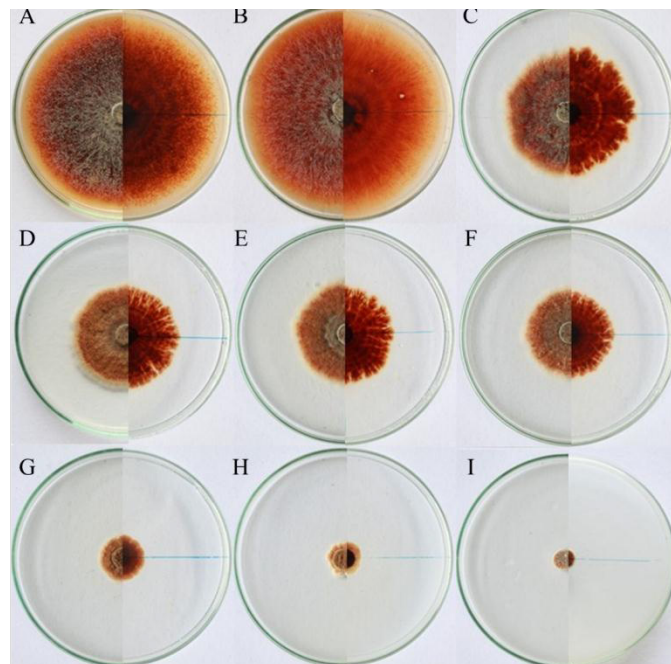


Figure 4 Inhibition of mycelia growth in *Cylindrocladium reteaudii* by essential oil of *Acorus calamus* L. incubated at room temperatures for 8 days (left: front upper, right: lower surface).

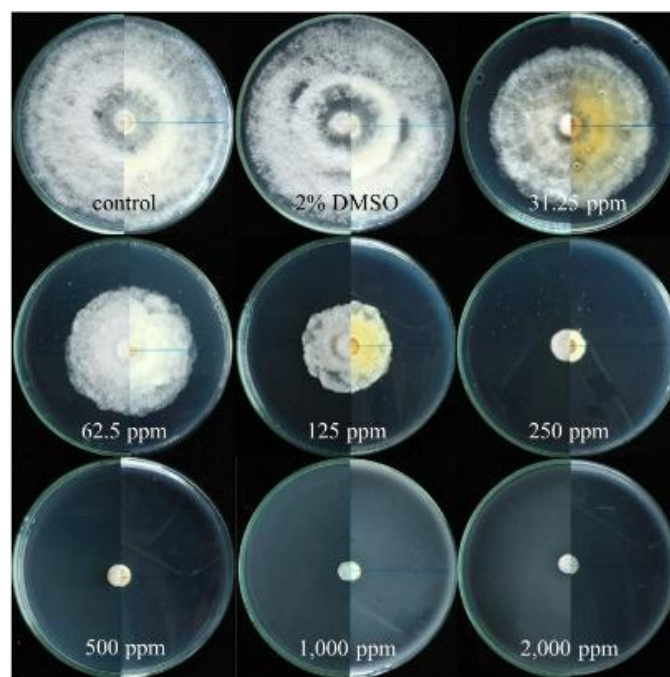


Figure 5 Inhibition of mycelia growth in *Pestalotiopsis* sp. by essential oil of *Acorus calamus* L. incubated at room temperatures for 6 days (left: front upper, right: lower surface).

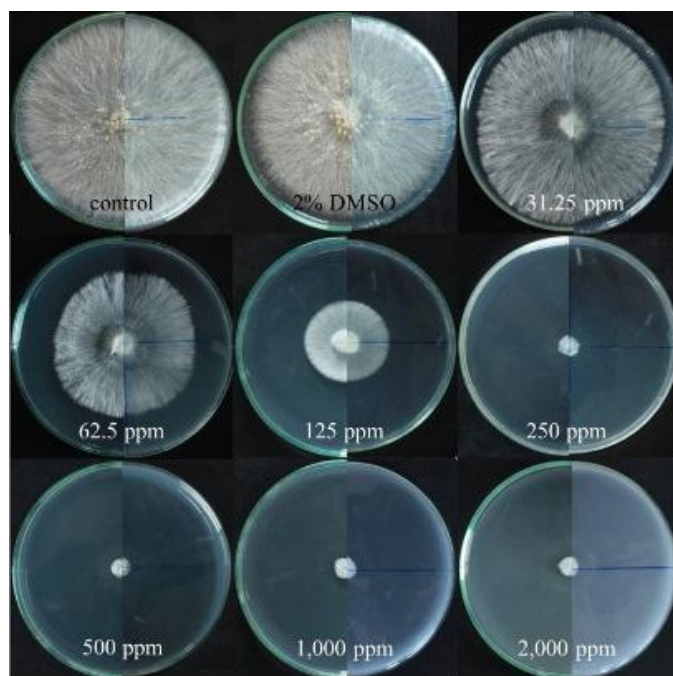


Figure 6 Inhibition of mycelia growth in *Sclerotium rolfsii* by essential oil of *Acorus calamus* L. incubated at room temperatures for 4 days (left: front upper, right: lower surface).

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ได้แตกต่างกัน โดยสามารถยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ดีที่สุด ซึ่งแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 100% (ไม่ปรากฏการเจริญของเส้นใยเชื้อราในงานเลี้ยงเชื้อ) ที่ระดับความเข้มข้น 250 ppm รองลงมาคือ *Pestalotiopsis* sp. และ *C. reteaudii*

แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 100% ที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 2,000 ppm ตามลำดับ (Table 1) แต่เมื่อพิจารณาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 50% (IC_{50}) กลับพบว่า น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อรา *C. reteaudii* ได้ดีกว่า โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 54.76 ppm รองลงมาคือ *S. rolfsii* และ *Pestalotiopsis* sp. มีค่า IC_{50} เท่ากับ 113.68 และ 126.47 ppm ตามลำดับ

Table 1 Mycelial growth inhibition (%) and 50 (%) inhibition concentration (IC₅₀) of *Acorus calamus* L. essential oil against three pathogens.

Concentrations (ppm)	Mycelial growth inhibition (%) ± Standard Deviation *		
	<i>C. reteaudii</i>	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>S. rolfsii</i>
31.25	36.44 ^b ± 2.14	21.33 ^b ± 0.93	15.78 ^b ± 2.88
62.5	50.22 ^c ± 0.50	32.44 ^c ± 4.47	31.56 ^c ± 1.27
125	52.22 ^d ± 0.79	52.89 ^d ± 0.61	58.00 ^d ± 0.63
250	56.00 ^e ± 2.02	83.00 ^e ± 0.50	100.00 ^e ± 0.00
500	76.56 ^f ± 3.25	100.00 ^f ± 0.00	100.00 ^e ± 0.00
1,000	79.22 ^g ± 1.01	100.00 ^f ± 0.00	100.00 ^e ± 0.00
2,000	100.00 ^h ± 0.00	100.00 ^f ± 0.00	100.00 ^e ± 0.00
Control	0.00 ^a ± 0.00	0.00 ^a ± 0.00	0.00 ^a ± 0.00
2% DMSO	0.00 ^a ± 0.00	0.00 ^a ± 0.00	0.00 ^a ± 0.00
IC ₅₀ (ppm)	54.76	126.47	113.68

Remark: * Values are mean ± standard deviation of the mean for bioassay conducted in 5 replications
Means in column with same letter are not significantly different (Duncan's New Multiple Range Test, $P < 0.05$)

จากผลการศึกษาเห็นได้ว่าน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อรา *C. reteaudii* ได้ 50% โดยใช้ความเข้มข้นเพียง 54.76 ppm เท่านั้น แต่การที่จะยับยั้งเชื้อรา 100% นั้นต้องใช้ความเข้มข้นถึง 2,000 ppm ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อรา *C. reteaudii* มีการสร้าง chlamydospore บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Figure 1(F) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทำให้เชื้อราทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี (Old *et al.*, 2003)

ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่ศึกษาการออกฤทธิ์เป็นสารต้านเชื้อราของว่านน้ำซึ่งขุ่ม และคณะ (2549) รายงานว่า การใช้สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ความเข้มข้น 10,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. grisea* สาเหตุโรครูปไหม้ของข้าวได้ 100% และนอกจากนี้ยังใช้ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเน่าผลลิ้นจี่ (*Fusarium solani*, *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Pestalotiopsis* sp. และ *Phoma* sp.) โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm แสดง

การยับยั้งเส้นใยเชื้อราเฉลี่ยสูงที่สุดได้มากกว่า 80% (สุวรรณิ และคณะ, 2557)

แต่อย่างไรก็ตามการนำน้ำมันหอมระเหยจากว่านน้ำมาใช้ในการยับยั้งเชื้อรา *C. reteaudii* และ *Pestalotiopsis* sp. สาเหตุของโรคใบไหม้ของกล้วยคาลิปัสยังไม่พบการรายงานมาก่อนหน้านี้ การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นครั้งแรกที่ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อราทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว และพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราที่ดีในสภาพจานเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมต่อการพิจารณานำมาประยุกต์ใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคของกล้วยคาลิปัสในเรือนเพาะชำต่อไป

สำหรับการใช้น้ำมันหอมระเหยจากว่านน้ำในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* นั้นพบว่า มีการศึกษามาก่อนหน้านี้โดย Sharma *et al.* (2011) ซึ่งได้รายงานว่ามีน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นจากใบของว่านน้ำและละลายใน acetone แสดงการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 163.9 ppm ส่วนในการทดสอบครั้งนี้พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำที่ละลายใน 2%

DMSO มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ดีกว่า เนื่องจากมีค่า IC_{50} ต่ำกว่า (113.68 ppm) สอดคล้องกับการศึกษาของ Devi and Ganjewala (2009) ที่พบว่า สารสกัดจากเหง้าว่านน้ำแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราและยีสต์ได้ดีกว่าสารสกัดที่ได้จากใบ ทั้งนี้เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าและใบของว่านน้ำมีความแตกต่างกันทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ ซึ่งแปรผันตามส่วนต่างๆ ของพืช ลักษณะทางพันธุกรรม ปัจจัยแวดล้อม ระยะเวลาเจริญเติบโต ตลอดจนการเก็บเกี่ยวและวิธีการสกัด (Raina *et al.*, 2003; Ahlawat *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2016; Raal *et al.*, 2016) โดย Phongpaichit *et al.* (2005) และ Devi and Ganjewala (2009) รายงานว่าการออกฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของว่านน้ำนั้นมาจากสาร α , β - asarone ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อราและยีสต์ได้ดีแต่ยับยั้งแบคทีเรียได้ในระดับต่ำ และ Raina *et al.* (2003) ได้รายงานว่าในน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำมีสาร β - asarone เป็นองค์ประกอบมากถึง 83.2% และมีสาร α - asarone 9.7% ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคของกล้ายูคาลิปตัสในการทดสอบครั้งนี้อาจเกิดจากสาร α , β - asarone ด้วยเช่นกัน ดังนั้นการตรวจสอบหาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบควรทำควบคู่กันไปด้วยซึ่งจะทำให้สามารถอธิบายได้ถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งที่อาจสัมพันธ์กับปริมาณสาร α , β - asarone ในน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำ และทั้งนี้ควรแยกสารบริสุทธิ์ชนิดนี้มาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อราจะทำให้สามารถอธิบายผลได้ชัดเจนยิ่งขึ้น น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำยังเป็นที่ถกเถียงกันถึงความปลอดภัยในการใช้งาน โดยคณะกรรมการอาหารยาโรเปียนให้การยอมรับว่าสามารถใช้เป็นวัตถุปรุงแต่งในอาหาร โดยไม่มีความเสี่ยงต่อสุขภาพ (Preedy, 2016) แต่อย่างไรก็ตามยังมีรายงานของสาร β - asarone ในน้ำมันหอมระเหยอาจทำให้เกิดความผิดปกติแก่โครโมโซมในส่วนของรังไข่เนื่องจากมะเร็งและการกลายพันธุ์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Stegmüller *et al.*, in press)

จากการศึกษาค้นคว้าพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำแสดงการยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ที่ก่อให้เกิดโรคในกล้ายูคาลิปตัสได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการยับยั้งเชื้อรา *C. reteauidii* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความรุนแรงในการเข้าทำลายกล้ายูคาลิปตัสในเรือนเพาะชำเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้การผลิตกล้ายูคาลิปตัสไม่ประสบความสำเร็จและจำเป็นต้องใช้สารเคมีในขั้นตอนการผลิตกล้ายูคาลิปตัส การศึกษาในสภาพงานเลี้ยงเชื้อครั้งนี้จึงเป็นการทดสอบเบื้องต้นที่แสดงให้เห็นถึงการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรทำการทดสอบการนำน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำมาใช้ในการยับยั้งการเกิดโรคในกล้ายูคาลิปตัสในสภาพเรือนเพาะชำและควรทำการศึกษาในด้านอื่นๆ ด้วย เช่น การพิจารณาวิธีการใช้งานให้เหมาะสมกับการเข้าทำลายของเชื้อราแต่ละชนิด วิธีการเก็บรักษาและอายุการใช้งานของน้ำมันหอมระเหย ต้นทุนการผลิต ด้านผลกระทบต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นต่อกล้ายูคาลิปตัส หรือความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นต่อผู้ใช้งาน เพื่อให้สามารถใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ จนนำไปสู่การพัฒนา น้ำมันหอมระเหยจากว่านน้ำให้เป็นสารชีวภาพในการใช้แก้ปัญหาโรคที่เกิดจากเชื้อราทดแทนการใช้สารเคมีต่อไป

สรุป

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคของกล้ายูคาลิปตัสของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำ ด้วยวิธีการ poisoned food technique พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *C. reteauidii* ได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 54.76 ppm รองลงมาได้แก่เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *S. rolfsii* โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 126.47 และ 113.68 ppm ตามลำดับ จากผลการศึกษานี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่ดีในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราดังกล่าว จึงเหมาะสมที่จะนำน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งโรคของยูคาลิปตัสที่เกิดจากเชื้อราทั้งสามชนิดนี้ในสภาพเรือนเพาะชำต่อไป

คำนิยม

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัย แผนพัฒนาศักยภาพบัณฑิตวิจัยรุ่นใหม่ จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2561 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ บริษัทสยามฟอเรสทรี จำกัด และภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนเชื้อราทดสอบ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมป่าไม้. 2552. การป่าไม้ในประเทศไทย. กรมป่าไม้ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ.
- กฤษณา พงษ์พานิช. 2542. โรคของไม้ยูคาลิปตัสในประเทศไทยและแนวทางในการลดผลกระทบ. กลุ่มงานกีฏวิทยาและจุลชีววิทยาป่าไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, กรุงเทพฯ.
- ช่อมเปรมีชัย, อภิญา สุราฐ, ปิยนันท์ สังข์ไพฑูรย์, สุจินต์ แก้วคิด, นันทิการ์ แสนแก้วและอารียา จูตคง. 2549. เทคโนโลยีการผลิตและการใช้สารสกัดจากพืชทดแทนสารเคมี. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.
- พีรศักดิ์ วรสุนทรโรสด, สุนทร ตรียะประพันธ์, ทักษิณ อาชาคม, สายันต์ ตันพานิช, ชลธิชา ควณาน, เลิศลักษณ์ พรหมใจมา, มณกานต์ จิตคำและนิลาพร ความดี. 2546. ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ลำดับที่ 12 (1): พืชสมุนไพรและพืชพิษ. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. แปลจาก Padua, L.S. de., N. Bunyapraphatsara and R.H.M. Lemmens. 2546. **Plant Resources of South-East Asia 12: Medicinal and Poisonous Plants.** Veenman printers, Ede., Netherlands.
- สุวรรณี แทนธานี, จารวี สุขประเสริฐ, สายจิต ดาวสุโข และโสธรา รอดประเสริฐ. 2557. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดว่านน้ำในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคผลเน่าที่แยกได้จากผลลิ้นจี่. **Bulletin of Applied Sciences** 3 (3): 88-101.
- Ahlawat, A., M. Katoch, G. Rama and A. Ahuja. 2010. Genetic diversity in *Acorus calamus* L. as revealed by RAPD markers and its relationship with b-asarone content and ploidy level. **Sci Horticulture Amsterdam** 124: 294-297.
- Devi, S.A. and D. Ganjewala. 2009. Antimicrobial activity of *Acorus calamus* (L.) rhizome and leaf extract. **Acta Biologica Szegediensis** 53 (1): 45-49.
- Gaidhani, S.N., G.S. Lavekar, A.S. Juvekar, S. Sen, S. Arjun and K. Suman. 2009. *In-vitro* anticancer activity of standard extracts used in ayurveda. **Phcog Mag.** 5 (20): 425-429.
- Ghosh, M. 2006. Antifungal properties of haem peroxidase from *Acorus calamus*. **Ann. Bot.** 98: 1145-1153.
- Kumar, R., S. Sharma, S. Sharma, A. Kumari, D. Kumar, G. Nadda, Y. Padwad, R.K. Ogra and N. Kumar. 2016. Chemical composition, cytotoxicity and insecticidal activities of *Acorus calamus* accessions from the western Himalayas. **Ind Crops Prod** 94: 520-527.
- Old, K.M., M.J. Wingfield and Z.Q. Yuan. 2003. **A Manual of Diseases of Eucalypts in South-East Asia.** Center for International Forestry Research, Jakarta.
- Palani, S., S. Raja, R.P. Kumar, P. Parameswaran and B.S. kumar. 2010. Therapeutic efficacy of *Acorus calamus* on acetaminophen induced nephrotoxicity and oxidative stress in male albino rats. **Acta Pharm.** 52: 89-100.

- Phongpaichit, S., N. Pujenjob, V. Rukachaisirikul and M. Ongsakul. 2005. Antimicrobial activities of the crude methanol extract of *Acorus calamus* Linn. **Songklanakarin J. Sci. Technol** 27 (2): 517-523.
- Preedy, V.R. 2016. **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. Elsevier Science Inc, London.
- Raal, A., A. Orav and T. Gretchushnikova. 2016. β -asarone content and essential oil composition of *Acorus calamus* L. rhizomes from Estonia. **J. Essent. Oil Res.** 28 (4): 299-304.
- Raina, V.K., S.K. Srivastava and K.V. Syamasunder. 2003. Essential oil composition of *Acorus calamus* L. from the lower region of the Himalayas. **Flavour Fragr. J.** 18: 18-20.
- Sharma, P.K., A.P. Raina and P. Dureja. 2011. Evaluation of the antifungal and phytotoxic effects of various essential oils against *Sclerotium rolfsii* (Sacc) and *Rhizoctonia bataticola* (Taub). **Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz** 42 (1): 65-72.
- Stegmüller, S., D. Schrenk and A.T. Cartus. In press. Formation and fate of DNA adducts of alpha- and beta-asarone in rat hepatocytes. **Food Chem. Toxicol.** doi: 10.1016/j.fct.2018.04.025.
-