บทคัดย่อ

T164747

การศึกษาวิจัยนี้ ได้ตั้งวัตถุประสงค์หลัก 2 ประการ ได้แก่

1) เพื่อตรวจสอบสารออกฤทธิ์จากข่า (L14 และ L15) ที่มีต่อเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส (*Colletotrichum gloeosporioides,* Penz.) และโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงที่เกิดจากเชื้อราชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Botryodiplodia theobromae* Pat, *Dothiorella dominicana, D. mangiferae, Phomopsis mangiferae* และ *Aspergillus niger*

2) เพื่อพัฒนากระบวนการสกัดสารออกฤทธิ์เชิงการค้า และพัฒนาผลิตภัณฑ์ (formulation) สารออกฤทธิ์จากข่า เพื่อใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส และโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงที่เกิดจากเชื้อรา ในระดับโรงงานบรรจุหีบห่อและแปลงปลูก

โดยเน้นศึกษากับมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เบอร์ 4 และน้ำดอกไม้สีทอง ซึ่งเป็นพันธุ์ส่งออกในปัจจุบัน

การศึกษาตามวัตถุประสงค์ที่ 1) ดำเนินการโดยการสำรวจการแพร่ระบาดของโรค และรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคจากผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่สุก และแสดงอาการของโรคจากแหล่งรับซื้อในภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคเหนือ รวมจำนวน 3 ครั้งใน 2 ปี และทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากบริเวณแผล พบเชื้อราสาเหตุของโรค 5 ชนิด ไม่พบเชื้อรา *Dothiorella mangiferae* ซึ่งเชื่อว่าสภาพสิ่งแวดล้อมในปีที่ศึกษาอาจไม่เหมาะสมต่อการแพร่ระบาด ชนิดเชื้อราที่พบมากที่สุด คือ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส และเชื้อ *Botryodiplodia theobromae* สาเหตุโรคขั้วผลเน่า ซึ่งพบมากในทุกภาค ที่พบรองลงไป คือ *Aspergillus* sp., *Phomopsis* sp. และ *Dothiorella dominicana* ซึ่งเมื่อนำสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ (L14+L15) ที่มีปริมาณสารออกฤทธิ์ 1′-Acetoxychavicol acetate 80 % มาทดสอบฤทธิ์กับเชื้อราเหล่านี้ด้วยวิธี Poison food technique พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 5,000 ส่วนต่อล้านสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides, Botryodiplodia theobromae, Dothiorella dominicana, Phomopsis mangiferae* และ *Aspergillus niger* ได้ 100 %

ในส่วนของการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดข่า ตามวัตถุประสงค์ที่ 2) ได้เริ่มศึกษาโดยตรวจสอบความเป็นพิษของสารออกฤทธิ์ (L14+L15) โดยใช้หนูขาวเป็นสัตว์ทดลอง พบว่า สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ของข่า (L14+L15) มีความเป็นพิษบ้าง (slightly toxic) แต่ยังอยู่ในระดับยอมรับได้ในเชิงเภสัชกรรม โดยมีค่า LD_{50} = 3,013 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวหนู ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ พบว่า สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากข่า (L14+L15) มีลักษณะเป็นน้ำมันไม่ละลายน้ำ จึงต้องพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ โดยใช้ตัวทำละลายร่วมผสม และเติมสารลดแรงตึงผิว ตัวทำละลายร่วมที่ดีได้แก่ ethanol ผสมกับ propylene glycol ส่วนสารลดแรงตึงผิว อาจใช้ Tween 20 และ PEG-RH-40 ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีพิษ นิยมใช้ผสมในอาหาร ยา และเครื่องสำอาง

T164747

ผลิตภัณฑ์สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากข่าที่ได้ เรียก ผลิตภัณฑ์ "EM-1" หากเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส (ในตู้เย็น) มีอายุการใช้งาน 4 ปี แต่ถ้าเก็บที่อุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) มีอายุการใช้งาน 4 เดือน โดยยังคงสารออกฤทธิ์ไว้ได้ 96.01% ของความเข้มข้นเริ่มต้น มีสี และความใสคงเดิม ทำการทดสอบ ประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์หลังจากเก็บผลิตภัณฑ์ไว้นาน 4 เดือน พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ส่วนต่อล้าน สามารถควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *Dothiorella dominicana* และ *Phomopsis mangiferae* ได้ 100 % ในขณะที่ควบคุม *Botryodiplodia theobromae* และ *Aspergillus niger* ได้ 59.26 และ 83.70 % ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ "EM-1" มีปัญหาด้านต้นทุนการผลิต ซึ่งมีราคาต้นทุนผลิตภัณฑ์สูงถึง 9,464 บาท/ลิตร จึงต้องปรับเปลี่ยนแนวทางไปพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดหยาบจนได้ผลิตภัณฑ์ เรียก "CE" ซึ่งมีสูตรผสมประกอบด้วยสารสกัดหยาบ 4.25% ผสมกับ De-EtOH : PG 85.10% และ PEG-RH-40 10.65% ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีราคาถูกกว่ามาก และมีอายุการเก็บรักษาได้ยาวนานกว่า โดยถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีอายุการใช้งาน 30 ปี แต่ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จะเก็บได้นาน 1 ปี ซึ่งเป็นเป้าหมายของการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในงานวิจัยนี้ สำหรับการทดสอบฤทธิ์ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่า 5 ชนิด พบว่า เมื่อผสม CE 500 ส่วนต่อล้าน กับ $CuSO_4$ 500 ส่วนต่อล้าน ในระดับจานอาหารเลี้ยงเชื้อ $CuSO_4$ จะไปเสริมฤทธิ์ของ CE ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดีขึ้น สูตรผสม CE 500 ส่วนต่อล้าน + $CuSO_4$ 500 ส่วนต่อล้าน มีฤทธิ์ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส และโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวในมะม่วงได้ดีที่สุดเทียบเท่ากับสารเคมีเกษตรที่เกษตรกรนิยมใช้ คือ Prochloraz และดีกว่า benomyl

การศึกษา mode of action ของสารสกัดในประเด็น ผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและสรีรวิทยาบางชนิดของเชื้อรา พบว่า ผลิตภัณฑ์สารสกัดหยาบจากข่ามีฤทธิ์ทำให้การเจริญเติบโตน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ของเชื้อราทั้ง 5 ชนิด ลดลงตามสัดส่วนความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักสด : น้ำหนักแห้ง ลดลงด้วย แสดงว่า สายรา (hypha) ตกอยู่ในสภาวะการขาดน้ำแม้จะทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งมีน้ำอยู่มากก็ตาม เซลล์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่เลี้ยงในผลิตภัณฑ์ความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้าน ไม่มีการเจริญเติบโต (ตาย) โดยสารออกฤทธิ์จากข่า ทำความเสียหายให้กับ tonoplast (membrane of the vacuole), cell membrane และ septate

ในกรณีของวัตถุดิบเหง้าข่าเพื่อการแปรรูปเชิงอุตสาหกรรม ได้ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสายพันธุ์ข่าที่เหมาะสม โดยทำการเก็บตัวอย่างข่า จาก 16 จังหวัด ในภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคเหนือ ได้ตัวอย่างพืชรวม 34 ตัวอย่าง ซึ่งเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์ที่มีการสร้างสารออกฤทธิ์มาก ได้สายพันธุ์ข่า 5 สายพันธุ์ที่มีปริมาณสารสกัดหยาบ 7.86 – 9.28% ได้แก่ ข่าตาแดง (ลพบุรี), ข่าหยวก (กำแพงเพชร), ข่าแดง (อุตรดิตถ์), ข่าลิง (กาฬสินธุ์) และข่าป่า (อุตรดิตถ์) จึงเป็นสายพันธุ์ข่าที่คัดเลือกไว้สำหรับเพาะปลูกเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบต่อไป

Abstract

TE164747

The studies were focused on 2 major objectives ; 1) to assess the efficiency of semi-purified active substances from galanga (L14 and L15) in control anthracnose disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) and other fungal diseases causing postharvest mango fruit rot (*Botryodiplodia theobromae* Pat., *Dothiorella dominicana*, *D. mangiferae*, *Phomopsis mangiferae* and *Aspergillus niger*). The second objective was to develop the protocol for galanga extraction, which could be economically used in fungicide formulation for control mango fruit rot diseases in fruit exporting industries. All measurements were carried out on Nam-Dok-Mai # 4 and Nam- Dok-Mai-Srithong, the exported mango cultivars.

The studies for objective 1) were firstly started with survey and collecting of fungal species from rotting Nam-Dok-Mai mango fruits in central, eastern, western and northern parts of Thailand. Fruit collections had been made three times in two years. Through purification technique, five from six above mentioned fungal species were separated and identified. Only *Dothiorella dominicana* was not found, which may be because of unfavourable environmental condition for the growth of this fungus in the studied years. The most common fungi found throughout the surveying areas were *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose fruit rot and *Botryodiplodia theobromae* causing stem end fruit rot. Less frequency of distribution was detected in *Aspergillus* sp., *Phomopsis* sp. and *Dothiorella dominicana*. All these collected and identified fungi were then used as bioassay-indicator to assess the efficiency to control fungi of extract from galanga. Semi-purified substance (L14+L15) containing 80 % 1′-Acetoxychavicol acetate were mixed into Potato Dextrose Agar (PDA) with variation of the L14+L15 concentration before innoced the fungus mycelium. The result revealed that L14+L15 at the concentration of 5,000 ppm could completely (100%) inhibit mycelium growth of all the five species.

To develop the formulation from galanga extract, chronic toxicity test for L14+L15 was firstly carried out using white rat as bioindicator. It was found that L14+L15 had slightly toxic effect but still at the phamaceutical acceptable safe-value. LD50-value was 3.013 g/kg body weight. L14+L15 substance had oily properties, could therefore not dissolve in water. Cosolvent was required, and ethanol + propylene glycol + surfactant (tween 20 or PEG-RH-40) were proved to be the best emulsifier. The achieved formulation was called "EM-1" which could retained 1′-Acetoxychavicol acetate content upto 96.01% of starting point for 4 years when kept at 4°C or

only 4 months when stored at 27 ^{o}C (room temperature). After 4 months storage under room temperature the product could still remain its physical properties of translucent-yellowish-brown colour and could completely control *Colletotrichum gloeosporioides*, *Dothiorella dominicana* and *Phomopsis mangiferae* even at the concentration of 1,000 ppm but control *Botryodiplodia theobromae* and *Aspergillus niger* at only 59.26 and 83.70%, respectively.

The cost studies for "EM-1" produce showed, however, the unperceivable too high price of upto 9,464 baht/litre. New formulation based on a cheaper "crude extract" had to be further developed, called "CE" produce. The "CE" contained 4.25% dichloromethane crude extract, De-EtOH : PG 85.10% and :10.65% PEG-RH-40. The "CE" produce was proved to be much better than "EM-1" in the sense of longer storage life upto 30 years when kept under 4^{o}C condition or upto 1 year under room tempurature (27^{o}C). To achieve the best efficiency to control mango fruit rot diseases, a mixture of 500 ppm $CuSO_4$ with 500 ppm "CE" was however developed. This mixture showed even the similar good result as the conventional agrochemical "Prochloraz" and better than "Benomyl".

Mode of action studies revealed that the galanga formulation at 500 ppm totally inhibited growth of *Colletotrichum gloeosporioides*. The major target hypha parts affected by the active substance from galanga extract were tonoplast, cell membrane and septate. Membrane crack was detected under electron microscope studies.

To study the galanga plant cultivar appropiated to used as raw material in "CE" producing industry, galanga plant specimens were collected from 16 provinces in central, eastern, western and northern Thailand. From total 34 plant samples only 5 cultivars / clones of galanga were selected after one year acclimatized under the same growing condition in Chiang Mai. They were Kha-Ta-Daeng (Lopburi), Kha-Yuak (Kampaengpet), Kha-Daeng (Uttaradit), Kha-Ling (Kalasin) and Kha-Pa (Uttaradit) ; which contained 7.86-9.28%DW of crude extract.