


สารจากน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช



นางสาว ชวรินทร์ ธรรมเกษตรศรี

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1262-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTI-PHYTOPATHOGENIC FUNGAL AGENTS FROM ESSENTIAL OIL



Miss Chavarin Thammakasadsri

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program of Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2002


ISBN 974-17-1262-6

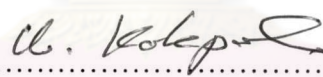
Thesis Title Anti-Phytopathogenic Fungal Agents from Essential Oil
By Miss Chavarin Thammakasadsri
Field of Study Biotechnology
Thesis Advisor Professor Udom Kokpol, Ph.D.
Thesis Co-advisor Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.


Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

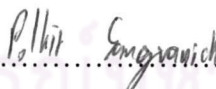

.....Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph. D.)


THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Associate Professor Dr. Sirirat Rengpipat, Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Professor Udom Kokpol, Ph.D.)


..... Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.)


..... Member
(Polkit Sangvanich, Ph.D.)


..... Member
(Pongtharin Lotrakul, Ph.D.)

ชวรินทร์ ธรรมเกษตรศรี : สารจากน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช
(Anti-Phytopathogenic Fungal Agents from Essential Oil)
อ. ที่ปรึกษา : ศ.ดร. อุดม กักผล, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. วรินทร์ ชวศิริ, 83 หน้า
ISBN 974-17-1262-6

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราจากน้ำมันหอมระเหย 25 ชนิดต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Fusarium oxysporum* 43-68, *Alternaria* sp. 43-89 และ *Phytophthora* sp. 572 พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก สะระแหน่ (*Mentha cordifolia* Opiz.), อบเชย (*Cinnamomum bejolghota* Sweet.), ตะไคร้ต้น (*Litsea cubeba* Pers.) และ กานพลู (*Eugenia caryophyllus* Bullock & Harrison.) แสดงฤทธิ์ยับยั้งต่อทุกเชื้อทดสอบ ได้อย่างสมบูรณ์ที่ 1000 ppm น้ำมันกานพลูและน้ำมันอบเชย แสดงฤทธิ์ยับยั้งการงอกของสปอร์ *F. oxysporum* 43-68 ที่ 54 และ 51% ตามลำดับ และสำหรับ *Alternaria* sp. 43-89 ยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ที่ 52 และ 46% ตามลำดับ องค์ประกอบที่แสดงฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยจากสะระแหน่, อบเชย, ตะไคร้ต้น, กานพลูและขิง (*Zingiber officinale* Roseoe.) ได้รับการยืนยันโดยใช้เทคนิคไบโอออโตกราฟฟิก พบว่าน้ำมันหอมระเหยทุกชนิดยกเว้นน้ำมันหอมระเหยจากขิง แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสารกับฤทธิ์ต้านเชื้อรา พบว่าสารประกอบในกลุ่มฟีนอลแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ดีที่สุด รองลงมาคือสารประกอบอัลดีไฮด์ แอลกอฮอล์ กรดคาร์บอกซิลิก และไฮโดรคาร์บอน ตามลำดับ เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและอบเชยมาศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เป็นสารควบคุมโรคพืช หลังการเก็บเกี่ยว ผลการทดลองพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและอบเชยลดการเข้าทำลายโดยเชื้อ *F. oxysporum* ในกล้วยหอม (*Musa* spp.) ได้ 94 และ 87% ตามลำดับ เมื่อแช่ในสารละลายน้ำมันหอมระเหยเข้มข้น 1000 ppm เป็นเวลา 15 นาที เมื่อตรวจสอบผลที่มีต่อพืชทดลองพบว่า สารละลายน้ำมันหอมระเหยก่อให้เกิดความเสียหายเชิงสรีรวิทยา โดยทำให้เปลือกกล้วยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แต่สารเหล่านั้นไม่มีผลต่อการสุกและกลิ่นของกล้วยหอม

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลักสูตร.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....ชวรินทร์ ธรรมเกษตรศรี
สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2545.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4372245723 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: ANTIFUNGAL / ESSENTIAL OIL / BIOAUTOGRAPHIC

CHAVARIN THAMMAKASADSRI : THESIS TITLE. ANTI-PHYTOPATHOGENIC FUNGAL AGENTS FROM ESSENTIAL OIL THESIS ADVISOR : PROFESSOR UDOM KOKPOL, THESIS CO-ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR WARINTHORN CHAVASIRI, 83 pp. ISBN 974-17-1262-6.

The antifungal activity of twenty-five essential oils was evaluated on three phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum* 43-68, *Alternaria* sp. 43-89 and *Phytophthora* sp. 572. Essential oils from kitchen mint (*Mentha cordifolia* Opiz.), cinnamon (*Cinnamomum bejolghota* Sweet.), litsea (*Litsea cubeba* Pers.) and clove (*Eugenia caryophyllus* Bullock & Harrison.) exhibited complete inhibition for all tested microorganisms at 1000 ppm. Crude clove oil and cinnamon oil exhibited conidial germination inhibition for *F. oxysporum* 43-68 at 54 and 51 % and for *Alternaria* sp. 43-89 at 52 and 46 %, respectively. The presence of active compounds in crude essential oils from kitchen mint, cinnamon, litsea, clove and ginger (*Zingiber officinale* Roseoe.) was confirmed by bioautographic assay. All crude essential oils except that from *Z. officinale* showed fungal growth inhibition zone. The relationship between chemical structure and the antifungal activity was also studied. The phenolic compounds showed the highest antifungal activity followed by aldehyde, alcohol, carboxylic acid and hydrocarbon, respectively. The possibility of using clove oil and cinnamon oil as postharvest disease control agent was examined. The results showed that the essential oils from clove and cinnamon reduced *F. oxysporum* infection on inoculated banana (*Musa* spp.) at 94 and 87%, respectively when dipped in 1000 ppm solution for 15 min. The phytotoxicity on inoculated banana was observed. It was found that the heterogeneous solution caused the physiological damage occurred as the browning on peel, but those compounds had no effect on the ripening and the smell of the product.

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Program ofBiotechnology..... Student's signature..... C. Thammakasadsri
Field of study.....Biotechnology..... Advisor's signature..... U. Kokpol
Academic year.....2002..... Co-advisor's signature..... W. Chavasiri

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest appreciation and gratitude to Professor Dr. Udom Kokpol, my advisor and Assistant professor Dr. Warinthorn Chavasiri, co-advisor for their excellent suggestion, guidance, encouragement and supportive throughout the entire period of conducting this thesis.

I would also like to extend my gratitude to Associate Professor Dr. Sirirat Reangpipat, Dr. Polkit Sangvanich and Dr. Pongtharin Lotrakul, as the committees.

I am very grateful to Associate Professor Dr. Somsiri Sangchot, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University for his suggestion on Post-Harvest assignment. Special appreciation is also extended to Division of Plant Disease and Microbiology, Department of Agriculture, Thailand for isolated, identified, and maintained fungal culture use in the thesis.

Many thanks to Miss Jitra Kanchanaprayuth, a staff of Botany Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University for her helpful comments on biological test and for her kind gratitude of finding me the information sources which are unavailable in Thailand.

All the thanks to staff members of Plant Pathology Laboratory, Department of Botany and Natural Product Research Unit, Department of Chemistry for providing laboratory facility throughout the course of my research.

Last but not least, many thanks to all my friends for their assistant and support. Finally, my deepest gratitude is to all my family members for their support, understanding, and encouragement throughout my study.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Contents

	Page
Abstract in Thai.....	iv
Abstract in English.....	v
Acknowledgement.....	vi
List of Figures.....	ix
List of Tables.....	xi
List of Scheme.....	xii
List of Abbreviations.....	xiii
 CHAPTER	
1. INTRODUCTION	
1.1 Plant diseases caused by fungi.....	1
1.2 Literature search on the antifungal constituents from higher plants..	9
1.3 Biological characteristic, distribution and chemical constituents of essential oil	14
1.4 Objective of this research	18
 2. MATERIALS AND METHODS	
2.1 Plant materials	19
2.2 General procedures for hydrodistillation	21
2.3 GC-MS analysis.....	21
2.4 Chemicals.....	22
2.5 Preliminary screening for antifungal activity	22
2.5.1 Fungal cultures	22
2.5.2 Bioassays	22
2.6 Isolation of eugenol from clove oil.....	23
2.7 Evaluation of antifungal activity of potential essential oil	24
2.8 Antifungal tests by bioautographic assay	24
2.8.1 Spore suspension preparation	24
2.8.2 Bioautographic assay.....	25
2.9 Application on post harvest control	25
2.9.1 Fruit preparation	25

Contents (Continued)

	Page
2.9.2 Inoculation	25
2.9.3 Treatment of inoculated fruits	25
3. RESULTS AND DISCUSSION	
3.1 Hydrodistillation results	26
3.2 The preliminary screening for antifungal activity	27
3.3 Further study on antifungal activity of selected essential oil	34
3.4 Evaluation for antifungal activity of essential oil component by bioautographic assay.....	40
3.5 Evaluation of antifungal activity of fractionated clove oil.....	45
3.6 The antifungal activity of eugenol, cinnamaldehyde and their derivatives.....	46
3.7 The effects of exposure time on conidial germination of <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> 43-68.....	50
3.8 Application of essential oils as the postharvest disease control agents.....	52
3.9 Analysis of the components of <i>Limnophila aromatica</i> Merr. essential oil.....	54
4. CONCLUSION	57
Proposal for the future work.....	58
APPENDIX A.....	59
APPENDIX B.....	61
APPENDIX C.....	66
REFERENCES.....	80
VITA.....	83

List of Figures

Figure		Page
1.1	Disease cycle of <i>Fusarium oxysporum</i>	4
1.2	Disease cycle of <i>Alternaria</i> sp.....	6
1.3	Disease cycle of <i>Phytophthora</i> sp.....	8
1.4	Some common monoterpenes found in essential oils.....	15
1.5	Some common sesquiterpenes found in essential oils.....	16
2.1	Dean-stark apparatus.....	21
3.1	The effect of essential oils on spore germination of <i>F. oxysporum</i> 43-68.....	31
3.2	The effect of essential oils on spore germination of <i>Alternaria</i> sp. 43-89.....	32
3.3	Concentration effect of essential oils on mycelial growth of <i>Fusarium oxysporum</i> 43-68.....	35
3.4	Concentration effect of essential oil on mycelial growth inhibition of <i>Alternaria</i> sp. 43-89.....	38
3.5	Bioautographic pattern of <i>Mentha cordifolia</i> Opiz. against <i>F. oxysporum</i> 43-68 (A) and TLC profile (B).....	41
3.6	Bioautographic pattern of <i>Cinnamomum bejolghota</i> Sweet against <i>F. oxysporum</i> 43-68 (A), cinnamon oil profile (B), authentic cinnamaldehyde (C) and bioautographic pattern of authentic cinnamaldehyde (D).....	41
3.7	Bioautographic pattern of <i>Eugenia caryophyllus</i> Bullock & Harrison. against <i>F. oxysporum</i> 43-68 (A), clove oil profile (B), authentic eugenol (C) and bioautographic pattern of authentic eugenol (D).....	42
3.8	Bioautographic pattern of <i>Litsea cubeba</i> against <i>F. oxysporum</i> 43-68 (A) and TLC profile (B).....	42
3.9	Bioautographic pattern of <i>Zingiber officinale</i> Roseoe. against <i>F. oxysporum</i> 43-68 (A) and TLC profile (B).....	43
3.10	Bioautographic pattern of <i>Cinnamomum bejolghota</i> Sweet. against <i>Alternaria</i> sp. 43-89 (A), cinnamon oil profile (B), authentic cinnamaldehyde (C) and bioautographic pattern of authentic cinnamaldehyde (D).....	44

List of Figures (continued)

Figure	Page
3.11 Bioautographic pattern of <i>Eugenia caryophyllus</i> Bullock & Harrison. against <i>Alternaria</i> sp. 43-89 (A), clove oil profile (B), authentic eugenol (C) and bioautographic pattern of authentic eugenol (D).....	44
3.12 The effect of fractionated clove oil on mycelial growth inhibition of <i>F. oxysporum</i> 43-68(A) and <i>Alternaria</i> sp. 43-89 (B).....	46
3.13 Concentration effect of eugenol and eugenol methyl ether on <i>Fusarium oxysporum</i> 43-68 mycelial growth inhibition.....	47
3.14 Concentration effects of cinnamaldehyde and its derivative on <i>Fusarium oxysporum</i> 43-68 mycelial growth inhibition	48
3.15 Conidial germination percentage of <i>Fusarium oxysporum</i> 43-68 after exposing to the crude essential oils at various length of time.....	51
3.16 <i>F. oxysporum</i> infection percentage on banana treated the crude essential oils.....	53
3.17 Percentages of terpenoid groups found in the essential oil from <i>Limnophila aromatica</i> Merr.....	56


 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Tables

Table	Page
1.1 Antifungal constituents in higher plants.....	10
2.1 Sources of essential oils used in this study.....	19
3.1 The results of hydrodistillation of some selected plants.....	27
3.2 The effect of essential oils on mycelial growth inhibition.....	28
3.3 The effect of essential oils on conidial germination.....	30
3.4 Mycelial growth inhibition percentage and IC ₅₀ of selected essential oils against <i>F. oxysporum</i> 43-89.....	34
3.5 Sporulation inhibition percentage of selected essential oils.....	36
3.6 Mycelial growth inhibition percentage and IC ₅₀ of selected essential oils against <i>Alternaria</i> sp. 43-89.....	37
3.7 Sporulation inhibition percentage of selected essential oils.....	39
3.8 Mycelial growth inhibition percentage of the fractionated clove oil against <i>Fusarium oxysporum</i> 43-68.....	45
3.9 Mycelial growth inhibition percentage of eugenol and eugenol methyl ether against <i>F. oxysporum</i> 43-68.....	47
3.10 Mycelial growth inhibition percentage of cinnamaldehyde and its derivatives against <i>F. oxysporum</i> 43-68.....	48
3.11 Mycelial growth inhibition percentage of limonene, γ -terpinene and α -terpinene against <i>F. oxysporum</i> 43-68.....	49
3.12 Conidial germination percentage of <i>Fusarium oxysporum</i> 43-68 after exposing to the crude essential oils at various length of time.....	51
3.13 <i>F. oxysporum</i> infection percentage on banana treated the crude essential oils.....	52
3.14 Possible chemical constituents of essential oil from <i>Limnophila aromatica</i> Merr. as analyzed by GC-MS.....	55

List of scheme

Scheme	Page
2.1 The general procedure for eugenol separation from clove oil.....	24



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Abbreviations

°C	degree centigrade
b.p.	boiling point
CFU	colony forming unit
cm	centimeter
EtOAc	ethyl acetate
g	gram
GC	gas chromatography
Hex	hexane
IC	inhibition concentration
mL	milliliter
MS	mass spectroscopy
PDA	potato dextrose agar
TLC	thin-layer chromatography
v/v	volumn by volumn
w/w	weight by weight
μL	microliter



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย