



วารสารวิชาการ วิศวกรรมศาสตร์ ม.อบ.

UBU Engineering Journal

บทความวิจัย

การยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* โดยใช้สารคาเฟอีนจากเปลือกกาแฟอาราบิก้าInhibition of the fungus *Rhizoctonia solani* by using caffeine from Arabica coffee pulp

ศิริประภา ชัยเนตร* รุ่งนภา เขียววิจิตร

สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50300

Siraprapa Chainetr* Rungnapha Khiewwijit

Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Rajamangala University of Technology Lanna, Muang, Chiang Mai 50300

* Corresponding author.

E-mail: siraprapha42@yahoo.com; Telephone: 0 5392 1444.

วันที่รับบทความ 30 มีนาคม 2563; วันที่แก้ไขบทความ ครั้งที่ 1 5 พฤษภาคม 2563; วันที่แก้ไขบทความ ครั้งที่ 2 21 พฤษภาคม 2563

วันที่ตอบรับบทความ 27 พฤษภาคม 2563

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (*R. solani*) โดยใช้สารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ซึ่งส่วนใหญ่เชื้อรา *R. solani* จะทำให้เกิดอาการเน่าบนเมล็ดและเน่าระดับดิน รวมถึงอาการกาบใบแห้งและใบไหม้ ในการศึกษาครั้งนี้ดำเนินการทดลองโดยการนำเชื้อรา *R. solani* มาเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอที่ผสมสารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่มีความเข้มข้นของคาเฟอีน เท่ากับ 20 40 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ในอุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 10 วัน จากผลการศึกษา พบว่าสารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้ดีกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) โดยที่สารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่มีความเข้มข้น 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* เท่ากับร้อยละ 15.3±4.2 และ 58.8±3.5 ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้น 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* เท่ากับร้อยละ 100.0±0.0 ในทั้งสองความเข้มข้น โดยที่เชื้อรา *R. solani* ไม่สามารถเจริญบนอาหารพีดีเอได้ ทั้งนี้เนื่องจากคาเฟอีนทำหน้าที่เป็นสารอัลลีโลพาตีที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืชได้ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงการพัฒนาวีธีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ที่มุ่งเน้นการใช้สารจากธรรมชาติอย่างคาเฟอีนในเปลือกกาแฟอาราบิก้าซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ

Rhizoctonia solani การยับยั้ง คาเฟอีน เปลือกกาแฟอาราบิก้า

Abstract

The objective of this study was to explore the potential growth inhibition of *Rhizoctonia solani* (*R. solani*) using caffeine from Arabica coffee pulp with respect to different concentrations of caffeine. *R. solani* commonly causes seed rot, damping-off, sheath blight, and leaf blight. In this study, *R. solani* was cultured in the laboratory scale using Potato Dextrose Agar (PDA) plates in the presence of caffeine concentrations of 20, 40, 60, and 80 mg/L for 10 days at room temperature. The results showed that caffeine from Arabica coffee pulp gave significant difference in the growth inhibition rate of *R. solani*, as compared to the control condition ($P < 0.01$). Caffeine from Arabica coffee pulp at the concentrations of 20 and 40 mg/L gave the average growth inhibition rates of *R. solani* of 15.3±4.2% and 58.8±3.5%, respectively. Besides,

the concentrations of 60 and 80 mg/L resulted in the average growth inhibition rate of *R. solani* of $100.0 \pm 0.0\%$ for both conditions, as no growth of *R. solani* could be found on the PDA plates. These results could be explained by the allelopathic potential of caffeine on inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. This study provided a development of efficient method for growth inhibition of *R. solani* in which focused on the use of natural substances, as the caffeine content in Arabica coffee pulp was used. This Arabica coffee pulp was considered as an agricultural waste.

Keywords

Rhizoctonia solani; inhibition; caffeine; arabica coffee pulp

1. บทนำ

Rhizoctonia solani เป็นเชื้อราก่อโรคพืชที่สำคัญ ซึ่งจัดอยู่ในอาณาจักรฟังไจและมีลักษณะที่สำคัญ คือ ไม่สร้างสปอร์ที่ไม่อาศัยเพศ (Asexual spore) แต่จะดำรงชีวิตด้วยการสร้างเส้นใย และเมื่ออายุมากขึ้น เส้นใยที่สร้างขึ้นจะอัดรวมกันเป็นเม็ดสีบัพนัสเคลอโรเทีย (Sclerotia) ที่มีลักษณะเป็นเม็ดกลมสีน้ำตาล ซึ่งสามารถอยู่ได้ในดิน ซากพืชหรือพืชอาศัย และแพร่ระบาดโรคทำความเสียหายในฤดูปลูกต่อไป โดยพบว่าเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (*R. solani*) ทำให้เกิดโรคกับพืชหลายชนิด พืชที่สำคัญ เช่น ข้าว มะเขือเทศ แตงกวา คენห่า พืชตระกูลถั่วและพืชตระกูลกะหล่ำ ซึ่งส่วนใหญ่ทำให้เกิดอาการเน่าบนเมล็ดและเน่าระดับดิน รวมถึงอาการกาบใบแห้งและใบไหม้ เช่น โรคโคนเน่าของกะหล่ำปลี โรคกาบใบแห้งในต้นข้าว และโรคใบไหม้ของต้นถั่วหรั่ง [1-3] สำหรับวิธีการกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* พบว่าเกษตรกรส่วนใหญ่ นิยมใช้สารเคมี เช่น ไตรฟลอกซีสโตรบิน (Trifloxystrobin) โทลโคลฟอสเมทิล (Tolclofos-methyl) ไพราโคลสโตรบิน (Pyraclostrobin) อีพอกซีโคนาโซล (Epoconazole) และทีบูโคนาโซล (Tebuconazole) เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความสะดวกรวดเร็วและให้ผลที่มีประสิทธิภาพ [2] อย่างไรก็ตาม การใช้สารเคมีเพื่อกำจัดโรคและศัตรูพืชอย่างไม่ถูกต้องหรือไม่เหมาะสม อาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศทั้งมนุษย์ สัตว์ พืช และยังก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในพืชผักอีกด้วย โดยเฉพาะกับเกษตรกรซึ่งจัดว่าเป็นกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อการเจ็บป่วยจากการใช้สารเคมีโดยตรง [4, 5] ส่งผลทำให้การทำเกษตรกรรมในปัจจุบันได้รับการส่งเสริมให้นำสารที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ที่มีอันตราย

ด้วยเหตุนี้ คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดและสนใจในการพัฒนาวิธีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* โดยการใช้สาร

คาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้า ซึ่งเป็นวิธีที่ดำเนินการง่าย ไม่ซับซ้อน ใช้เงินลงทุนต่ำ และไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภคผลผลิตทางการเกษตร นอกจากนี้ยังเป็นการนำสารคาเฟอีนที่มีอยู่ในกากของเสียเปลือกกาแฟกลับมาใช้ประโยชน์อีกด้วย สำหรับกระบวนการผลิตและแปรรูปเมล็ดกาแฟอาราบิก้าของมูลนิธิโครงการหลวงมุ่งเน้นให้ใช้วิธีแบบเปียก เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ผลิตภัณฑ์กาแฟที่มีคุณภาพสูง มีกลิ่นและรสชาติของกาแฟที่ดี โดยในแต่ละวันจะมีเปลือกกาแฟอาราบิก้า ซึ่งเป็นของเสียที่ได้จากการแปรรูปเมล็ดกาแฟ คิดเป็น 400 กิโลกรัม จากผลสดกาแฟอาราบิก้า 1 ตันต่อวัน โดยเปลือกกาแฟที่ได้จะมีองค์ประกอบหลัก ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรตและเส้นใยหยาบ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยคาเฟอีน คิดเป็นร้อยละ 1.1-2.2 อีกด้วย [6, 7] ซึ่งหากไม่มีการกำจัดเปลือกกาแฟอย่างถูกวิธี จะมีผลทำให้เกิดการเน่าเสีย ส่งกลิ่นเหม็นและมีผลกระทบต่อระบบนิเวศในน้ำ ดินและอากาศ อีกทั้งยังมีผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่อาศัยอยู่โดยรอบ

จากการทบทวนและศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่าคาเฟอีน (Caffeine) เป็นสารแซนทีนแอลคาลอยด์ (Xanthine alkaloid) และมีชื่อทางเคมีว่า 1,3,7-Trimethylxanthine ซึ่งมีลักษณะเป็นสีขาว ไม่มีกลิ่นและมีรสขม สามารถพบได้ในพืชหลายชนิด เช่น กาแฟ ชาและโกโก้ โดยคาเฟอีนเป็นสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง มีผลทำให้ร่างกายเกิดความตื่นตัวและลดความง่วงได้ จึงทำให้เครื่องดื่มหลายชนิดมีคาเฟอีนเป็นส่วนผสม เช่น ในกาแฟ น้ำชา น้ำอัดลมและเครื่องดื่มชูกำลัง [8] นอกจากนี้ ยังพบว่าสามารถใช้คาเฟอีนเพื่อเป็นยากำจัดศัตรูพืชโดยธรรมชาติได้ โดยคาเฟอีนมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น แบคทีเรีย เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรค ลูกน้ำยุง หอยทากและแมลงศัตรูพืช [9-14] โดยจากตัวอย่างการศึกษาของ Gloria และคณะ [9] และ

Nathanson [13] พบว่าคาเฟอีนสามารถผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้และออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย อีกทั้งคาเฟอีนยังออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในระบบประสาทของแมลง ทำให้แมลงเป็นอัมพาตและตายในที่สุด

ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* โดยใช้สารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่มีความเข้มข้นของคาเฟอีนเท่ากับ 20 40 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของคาเฟอีนที่เกษตรกรและผู้สนใจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริง โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *R. solani* ในระดับห้องปฏิบัติการ ที่ระยะเวลา 10 วัน ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เชื้อรา *R. solani* อยู่ในระยะการผลิตเม็ดสีบัพันธุ์สเคลอโรเทีย (*Sclerotia*) และพร้อมที่จะเข้าสู่วงจรของการแพร่ระบาดโรคในฤดูปลูกต่อไป [15] ทั้งนี้เพื่อนำผลการวิจัยไปใช้พัฒนาวิธีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* อย่างยั่งยืน อีกทั้งยังทำให้เกิดความคุ้มค่าในการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกลับมาใช้ประโยชน์ให้ได้มากที่สุดและสามารถนำผลการวิจัยไปแนะนำให้แก่เกษตรกรและผู้สนใจต่อไป

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 เชื้อราที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อรา *R. solani* ที่ใช้ในการศึกษาได้รับความอนุเคราะห์มาจากสถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา โดยนำเชื้อรามานำเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ (Potato Dextrose Agar; PDA) (Himedia, India) ในจานเพาะเชื้อและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน [1] เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อราในการทดลองขั้นตอนต่อไป

2.2 การเตรียมสารคาเฟอีนจากเปลือกกาแฟอาราบิก้า

เปลือกกาแฟที่ใช้ในการศึกษานี้ได้จากกระบวนการแปรรูปเมล็ดกาแฟอาราบิก้าด้วยวิธีแบบเปียก จากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก จังหวัดเชียงใหม่ โดยนำเปลือกกาแฟอาราบิก้าไปผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปบดให้ละเอียด จากนั้นนำผงเปลือกกาแฟอาราบิก้าไปสกัดสารคาเฟอีนตามวิธีที่ได้มาจากการศึกษาที่ผ่านมาของศิริประภา ชัยเนตร และคณะ [16] ซึ่งพบว่าเป็นวิธีการสกัดสารคาเฟอีนจากเปลือกกาแฟที่มีประสิทธิภาพและให้ความเข้มข้นของคาเฟอีนสูงสุด โดยใช้ผง

เปลือกกาแฟอาราบิก้าปริมาณ 6 กรัม ใส่ลงไปใต้น้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และคนผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มจนเหลือน้ำกลั่นที่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วจึงกรองตะกอนเปลือกกาแฟอาราบิก้าออกจากน้ำคาเฟอีนเข้มข้น หลังจากนั้นนำน้ำคาเฟอีนเข้มข้นที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าไปวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของคาเฟอีน ซึ่งพบว่ามีค่าเข้มข้นของคาเฟอีน เท่ากับ 95 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วจึงทำการเจือจางน้ำคาเฟอีนเข้มข้นที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าให้ได้ความเข้มข้นของคาเฟอีน เท่ากับ 20 40 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเตรียมไว้ทำการทดลองต่อไป

2.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในน้ำคาเฟอีนเข้มข้นที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้า

การหาปริมาณความเข้มข้นของคาเฟอีนในน้ำคาเฟอีนเข้มข้นที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้า ใช้วิธีการวิเคราะห์ที่อ้างอิงตามการศึกษาของปานัสม์ บุรณะกร และธัญวรรณ์ เชื้อเจ็ดตน [17] ซึ่งใช้วิธีอัลตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตเมตรี (Ultraviolet spectrophotometry) ที่ λ_{max} เท่ากับ 274 นาโนเมตร

2.4 ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* โดยใช้สารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

นำสารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน มาทำการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* โดยดำเนินการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ และออกแบบการทดลองทั้งหมดออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ทำการทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *R. solani* ในจานเพาะเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน เท่ากับ 85 มิลลิเมตร ณ สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดเชียงใหม่ สำหรับในชุดการทดลองที่ 1 2 3 และ 4 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *R. solani* โดยใช้สารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่มีความเข้มข้น 20 40 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และชุดการทดลองที่ 5 เป็นชุดควบคุม ในชุดการทดลองที่ 1-4 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอโดยนำพีดีเอมาละลายกับน้ำคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่มีความเข้มข้นของคาเฟอีน เท่ากับ 20 40 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร ที่ปริมาณพีดีเอ 3.9 กรัม ต่อน้ำคาเฟอีน ที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงเทอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ ที่ผสมสารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าลงไปในงานเพาะเชื้อ ในขณะที่ยังอุ่นอยู่ แล้วทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้นใส่หัวเชื้อรา *R. solani* ลงไป สำหรับวิธีการเตรียมหัวเชื้อรา ทำได้โดยใช้อุปกรณ์เจาะจุกคอร์ก (Cork borer) ที่มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง เท่ากับ 6 มิลลิเมตร ตัดชิ้นวุ้นของหัวเชื้อรา *R. solani* อายุ 7 วัน แล้วจึงใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราเจริญอยู่มาวางตรงกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอที่ เตรียมไว้ จากนั้นบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ในอุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เชื้อรา *R. solani* สามารถเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพ [18] เป็นระยะเวลา 10 วัน สำหรับในชุดการทดลองที่ 5 ซึ่งเป็นชุดควบคุม ทำการทดลองเช่นเดียวกับในชุดการทดลองที่ 1-4 แต่ใช้น้ำกลั่นแทนน้ำคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้า

นอกจากนั้น เพื่อยืนยันผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ของสารคาเฟอีน ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* โดยใช้สารละลายมาตรฐานคาเฟอีน (Alfa Aesar, USA) ที่ความเข้มข้น 20 40 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับในชุดการทดลองที่ 1-4 แล้วจึงนำผลของประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* มาเปรียบเทียบกับสารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

2.5 การคำนวณประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rhizoctonia solani*

ในทุกวัน ทำการบันทึกการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. solani* ในชุดการทดลองที่ผสมด้วยสารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าและชุดควบคุม โดยการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา และนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* จากสมการที่ (1) Vincent [19]

$$\eta = \frac{(R_1 - R_2) \times 100}{R_1} \quad (1)$$

โดยที่ η คือประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* (ร้อยละ) R_1 คือขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในชุดควบคุม (มิลลิเมตร) และ R_2 คือขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในชุดการทดลอง (มิลลิเมตร)

2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี Analysis of variance (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

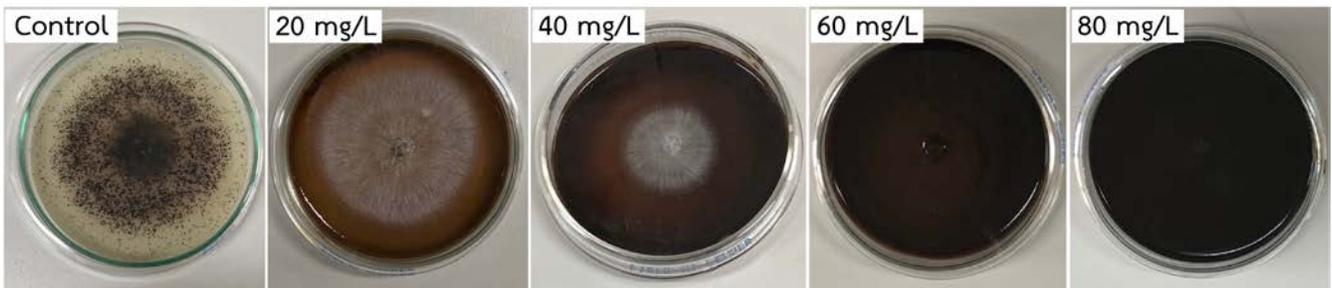
3. ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

3.1 ผลการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่เจริญบนอาหารพีดีเอ โดยใช้สารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 วัน

จากผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. solani* โดยใช้สารยับยั้งจากคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง 10 วัน ดังแสดงในรูปที่ 1 พบว่าในช่วง 2 วันแรกของการเพาะเลี้ยง หัวเชื้อรา *R. solani* ที่เจริญบนอาหารพีดีเอจะเข้าสู่ช่วงการปรับตัวให้เข้ากับอาหารและสิ่งแวดล้อมใหม่ ซึ่งเรียกช่วงนี้ว่า ระยะพัก (Lag phase) [20] ส่งผลให้ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. solani* ในทุกชุดการทดลอง แต่หลังจากวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะในชุดควบคุม พบว่าเชื้อรา *R. solani* สามารถเจริญเติบโตบนอาหารพีดีเอได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งพบว่ามีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา เท่ากับ 0 ± 0 มิลลิเมตร ในวันที่ 2 และเพิ่มขึ้นเป็น 81 ± 3 มิลลิเมตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และหลังจากวันที่ 4 พบว่าเชื้อรา *R. solani* มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจนถึงวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งพบว่าเชื้อรา *R. solani* มีการเจริญเติบโตจนเต็มพื้นที่ของจานเพาะเชื้อ โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา เท่ากับ 85 ± 0 มิลลิเมตร และพบเม็ดสีพินดูลัสเคลอโรเทียเปลี่ยนกลายเป็นสี

น้ำตาลดำอย่างชัดเจน (ดังแสดงในรูปที่ 2) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang และคณะ [21] ที่พบว่าเชื้อรา *R. solani* เริ่มมีการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ หลังจากการเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง และยังพบว่าเชื้อรา *R. solani* จะเข้าสู่ระยะเริ่มต้นของการสร้างเม็ดสีพิกเมนต์คลอโรโรเทีย หลังจากการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง โดยเม็ดสีพิกเมนต์คลอโรโรเทียจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลกลม ตั้งแต่วันที่ 5 จนถึง 14 วัน ของการเพาะเลี้ยง

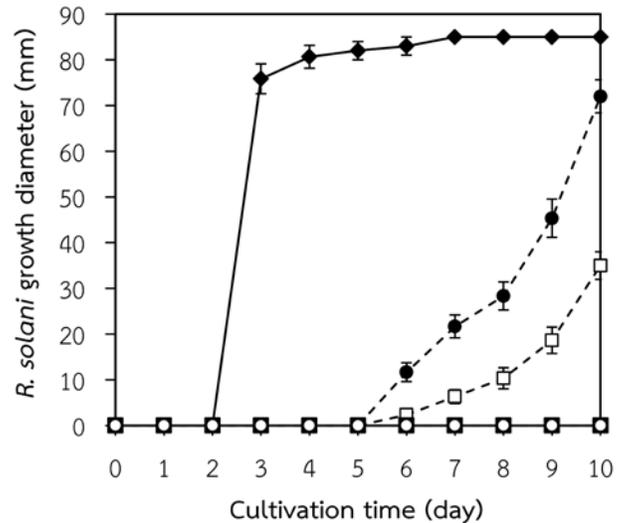
นอกจากนั้น เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. solani* ที่เจริญบนอาหารพีดีเอในชุดที่มีการใช้สารยับยั้งจากคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าและในชุดควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 1 และรูปที่ 2 ซึ่งแสดงผลของการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. solani* ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าสารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่มีความเข้มข้น 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้จนถึงวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และหลังจากวันที่ 5 จนถึงวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง พบได้ว่าเชื้อรา *R. solani* มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 72 ± 4 และ 35 ± 3



รูปที่ 2 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่เจริญบนอาหารพีดีเอผสมสารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่มีความเข้มข้นของคาเฟอีน เท่ากับ 20 40 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ในขณะที่สารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่มีความเข้มข้น 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตั้งแต่วันที่เริ่มต้นจนถึงวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง โดยพบว่าเชื้อรา *R. solani* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ ที่มี

มิลลิเมตร ในชุดการทดลองที่ใช้สารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่มีความเข้มข้น เท่ากับ 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 1 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่เจริญบนอาหารพีดีเอผสมสารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่มีความเข้มข้นของคาเฟอีน เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (●) 40 มิลลิกรัมต่อลิตร (□) 60 มิลลิกรัมต่อลิตร (■) 80 มิลลิกรัมต่อลิตร (○) และในชุดควบคุม (◆) จากวันเริ่มต้นจนถึงวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง

สารคาเฟอีนผสมอยู่ในทั้งสองความเข้มข้นนี้ (ดังแสดงในรูปที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sugiyama และคณะ [14] ที่รายงานว่าปริมาณของคาเฟอีนที่ใช้มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของฟังไจ 8 ชนิด ได้แก่ *Rhizoctonia solani* *Fusarium oxysporum* *Sclerotinia*

sclerotiorum Glomerella cingulata Trichoderma atroviride Trichoderma virens Trichoderma harzianum และ Trichoderma hamatum โดยพบว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญของฟังไจทั้ง 8 ชนิดนี้จะเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของคาเฟอีนที่สูงขึ้น อีกทั้งยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Gloria และคณะ [9] ที่รายงานว่าปริมาณความเข้มข้นของคาเฟอีนที่สูงขึ้น ส่งผลต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เพิ่มมากขึ้น

3.2 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Rhizoctonia solani โดยใช้สารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา R. solani ที่เจริญบนอาหารพีดีเอฟผสมสารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่ความเข้มข้นของคาเฟอีน เท่ากับ 20 40 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานคาเฟอีน มีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Rhizoctonia solani ที่เจริญบนอาหารพีดีเอฟผสมสารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่ความเข้มข้นของคาเฟอีน เท่ากับ 20 40 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานคาเฟอีน

ความเข้มข้น ของคาเฟอีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพ การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา R. solani * (ร้อยละ)	
	คาเฟอีนที่ได้จาก เปลือกกาแฟอาราบิก้า	สารละลาย มาตรฐาน คาเฟอีน
20	15.3±4.2	0.0±0.0
40	58.8±3.5	40.8±2.4
60	100.0±0.0	74.5±4.8
80	100.0±0.0	100.0±0.0

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ยได้จากการตรวจวัดจาก 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้น

จากตารางที่ 1 พบว่าในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับชุดการทดลองที่มีการใช้สารยับยั้งจากคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่ความเข้มข้น 20 40 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญ

ของเชื้อรา R. solani เท่ากับร้อยละ 15.3±4.2 58.8±3.5 100.0±0.0 และ 100.0±0.0 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาการทดสอบค่าทางสถิติ (P-value) ของสารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าในทุกความเข้มข้นโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.01) ทั้งนี้เป็นเพราะคาเฟอีนทำหน้าที่เป็นสารอัลลีโลพาธี (Allelopathy) ซึ่งเป็นสารชีวเคมีที่ถูกปลดปล่อยจากพืชออกสู่สิ่งแวดล้อม ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราและพัฒนาการของเชื้อรา [14, 22, 23] นอกจากนี้ ยังพบว่าสารอัลลีโลพาธีช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย รวมถึงช่วยควบคุมวัชพืช แมลงและสัตว์ศัตรูพืชได้อีกด้วย [24–26]

นอกจากนั้น เมื่อนำผลประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา R. solani ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง โดยใช้สารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานคาเฟอีน พบว่าสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนที่ความเข้มข้น 20 40 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา R. solani เท่ากับร้อยละ 0.0±0.0 40.8±2.4 74.5±4.8 และ 100.0±0.0 ตามลำดับ จากผลการศึกษา ยืนยันได้ว่าสารคาเฟอีนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา R. solani ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตาม จากผลการเปรียบเทียบในตารางที่ 1 พบว่าสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา R. solani น้อยกว่าสารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้า โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของคาเฟอีน เท่ากับ 20 40 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้อาจเป็นเพราะน้ำคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่ใช้ในการศึกษามีองค์ประกอบอื่นๆ ที่มีผลต่อการช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อรา R. solani ร่วมด้วย ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงมีข้อเสนอแนะให้ดำเนินการตรวจสอบลักษณะสมบัติทางเคมีของน้ำคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้า เพื่อหาปริมาณของสารเคมีจากธรรมชาติอื่นที่สามารถพบได้ ดังตัวอย่างจากการศึกษาของ Zhu และคณะ [27] พบว่าสารแทนนิน (Tannin) ซึ่งมีอยู่ในเปลือกกาแฟปริมาณร้อยละ 7.8 [7] มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา Penicillium digitatum ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคเน่าราเขียวของผลส้มที่พบได้ระหว่างการบรรจุภัณฑ์และส่งออก ทั้งนี้เนื่องจากแทนนินสามารถทำลายผนังเซลล์และ

เยื่อพลาสมา (Plasma membrane) ส่งผลทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium digitatum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

4. สรุปผลการศึกษา

จากผลการศึกษา สามารถกล่าวสรุปได้ว่าสารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ซึ่งส่วนใหญ่ทำให้เกิดอาการเน่าบนเมล็ดและเน่าระดับดิน รวมถึงกาบใบแห้งและใบไหม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าที่ความเข้มข้น 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 100 ในทั้งสองความเข้มข้นนี้ ทั้งนี้เนื่องจากคาเฟอีนทำหน้าที่เป็นสารอัลลีโลพาตีที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืชได้ ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* โดยใช้สารคาเฟอีนที่ได้จากเปลือกกาแฟอาราบิก้าให้มีประสิทธิภาพและยั่งยืนต่อไปในอนาคต จึงควรเลือกใช้ความเข้มข้นของคาเฟอีน เท่ากับ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อมุ่งเน้นให้เกิดประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและเกิดความคุ้มค่าในการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกลับมาใช้ประโยชน์ให้ได้มากที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา เชียงใหม่ ในการสนับสนุนทุนวิจัยจากการดำเนินงานของมูลนิธิโครงการหลวง อีกทั้งทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวกัญญารัตน์ อินทวง นางสาวภัทรพร สิงห์ทองทราย และนายพัฒนชัย วงศ์ทา ที่ให้การช่วยเหลือเก็บผลการทดลองในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- [1] นันทวุฒิ นียมวงษ์. การยับยั้งราก่อโรคพืช *Rhizoctonia solani* โดยแอคติโนมัยซีทไอโซเลท EH50-1. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์*. 2561; 5(2): 69–77.
- [2] พิระวรรณ พัฒนวิภาส, ทศนาพร ทศคร, ธารทิพย์ ภาสบุตร, ศิวีไล ลาภบรรจบ, อ้อยทิน จันท์เมือง. การศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืชในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคพืช. ใน:

กลุ่มบริหารโครงการวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (บรรณาธิการ) *รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2554 เล่ม 2*. จังหวัดนนทบุรี: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด; 2555. หน้า 788–795.

- [3] ภรณ์ สว่างศรี. การคัดเลือกและการผลิตมวลชีวภาพเชื้อรา *Trichoderma harzianum* Rifai เพื่อใช้ควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) ที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* Kuhn. *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยาลัยสงขลานครินทร์*. จังหวัดสงขลา; 2546.
- [4] สำนักกระบาดวิทยา. *สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรคประจำปี 2560*. จังหวัดนนทบุรี: กรมควบคุมโรคกระทรวงสาธารณสุข; 2560.
- [5] สมณา ราษฎร์ภักดี, วิเชียร ศรีหนาจ, วัฒนสิทธิ์ ศิริวงศ์. ปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชโพรพีโนฟอสที่ตกค้างในพริกจากตำบลหัวเรือ จังหวัดอุบลราชธานี และความเสี่ยงจากการบริโภค. *วารสารวิชาการ วิศวกรรมศาสตร์ ม.อบ.* 2558; 8(1): 115–122.
- [6] Patra S. Biotransformation of caffeine to value added products. *Ph.D. Dissertation, University of Mysore*. Karnataka, India; 2007.
- [7] Von Enden JC, Calvert KC. Review of coffee waste water characteristics and approaches to treatment. *PPP Project, Improvement of Coffee Quality and Sustainability of Coffee Production in Vietnam. German Technical Cooperation Agency (GTZ)*. 2002: 1–10.
- [8] Nonthakaew A, Matan N, Aewsiri T, Matan N. Caffeine in foods and its antimicrobial activity. *International food research Journal*. 2015; 22(1): 9–14.
- [9] Gloria MBA, Almeida AAP, Engeseth N. Chapter 10: Antimicrobial activity of coffee. In: Farah A. (eds.) *Coffee: Consumption and Health Implications*. UK: The United Kingdom by CPI Group (UK) Ltd; 2019. p. 234–254.
- [10] Hollingsworth RG, Armstrong JW, Campbell E. Caffeine as a repellent for slugs and snails. *Nature*. 2002; 417: 915–916.

- [11] Kim YS, Uefuji H, Ogita S, Sano H. Transgenic tobacco plants producing caffeine: A potential new strategy for insect pest control. *Transgenic research*. 2006; 15: 667–672.
- [12] Laranja AT, Manzatto AJ, de Campos Bicudo, HEM. Effects of caffeine and used coffee grounds on biological features of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) and their possible use in alternative control. *Genetics and molecular biology*. 2003; 26(4): 419–429.
- [13] Nathanson JA. Caffeine and related methylxanthines: Possible naturally occurring pesticides. *Science*. 1984; 226(4671): 184–187.
- [14] Sugiyama A, Sano CM, Yazaki K, Sano H. Caffeine fostering of mycoparasitic fungi against phytopathogens. *Plant signaling & behavior*. 2016; 11(1): e1113362–1–7.
- [15] Kumar S, Kumar A, Chand G, Lal M, Kumar R. Dynamics of mycelial growth and sclerotia production of *Rhizoctonia solani* Kuhn (AG1-IB) of Urdbean. *Ecoscan*. 2014; 8(3&4): 273–277.
- [16] ศิริประภา ชัยเนตร, รุ่งนภา เขียววิจิตร, วรุธ ชัยเนตร, ครรชิต เงินคำคง. การศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดคาเฟอีนในเปลือกกาแฟเป็นสารชีวภัณฑ์. *รายงานฉบับสมบูรณ์ มูลนิธิโครงการหลวง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา*. จังหวัดเชียงใหม่; 2562.
- [17] ปาณัสม์ บุรณะกร, ธัญวรรณ์ เชื้อเจ็ดตน. การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้คาเฟอีนจากกากกาแฟและกากชาเป็นสารชีวภัณฑ์. *ปฏิญญานิพนธ์วิศวกรรมศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา*. จังหวัดเชียงใหม่; 2561.
- [18] Pengnoo A, Kusongwiriawong C, Nilratana L, Kanjanamaneesathian M. Greenhouse and field trials of the bacterial antagonists in pellet formulations to suppress sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *BioControl*. 2000; 45(2): 245–256.
- [19] Vincent JM. Distortion of fungal hyphae in the presence of certain inhibitors. *Nature*. 1947; 159: 850–850.
- [20] Abdel- Ghany TM, El- Sheikh HH. *Mycology*. California, USA: OMICS Group eBooks; 2016.
- [21] Wang C, Pi L, Jiang S, Yang M, Shu C, Zhou E. ROS and trehalose regulate sclerotial development in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. *Fungal biology*. 2018; 122(5): 322–332.
- [22] Anaya AL, Cruz-Ortega R, Waller GR. Metabolism and ecology of purine alkaloids. *Frontiers in bioscience*. 2006; 11: 2354–2370.
- [23] El-Refai IM, Moustafa SMI. Allelopathic effect of some cruciferous seeds on *Rhizoctonia solani* Kuhn and *Gossypium barbadense* L. *Pakistan journal of biological sciences*. 2004; 7(4): 550–558.
- [24] Cheng F, Cheng Z. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. *Frontiers in plant science*. 2015; 6(article 1020): 1–16.
- [25] Singh HP, Batish DR, Kohli RK. Allelopathy in agroecosystems: An overview. *Journal of crop production*. 2001; 4(2): 1–41.
- [26] Tanti AJ, Bhattacharyya PN, Sandilya SP, Dutta P. Allelopathic potential of caffeine as growth and germination inhibitor to popular tea weed, *Borreria hispida* L. *Current life sciences*. 2016; 2(4), 114–117.
- [27] Zhu C, Lei M, Andargie M, Zeng J, Li J. Antifungal activity and mechanism of action of tannic acid against *Penicillium digitatum*. *Physiological and molecular plant pathology*. 2019; 107: 46–50.