

ผลของสารสกัดจากใบพลูควาต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง
Effect of Plookao Leaf Extract on *Colletotrichum gloeosporioides* Causing Anthracnose Disease of Mango

วรัญญา อัจฉันทัก¹ วิชา สอาดสุด²
อุราภรณ์ สอาดสุด³ และ ดำรัส ทรัพย์เย็น⁴
Waranya Atchantug¹, Vicha Sardud²,
Uraporn Sardud³ and Damrat Supyen⁴

Abstract

In searching the active compounds in Plookao (*Houttuynia cordata*) leaf extract against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Cladosporium cladosporioides* by TLC-bioassay, a part of volatile oil was extracted by steam distillation, both nonpolar and polar substances were extracted by maceration in dichloromethane and methanol, respectively. The results revealed that the volatile oil could inhibit both *C. gloeosporioides* and *C. cladosporioides* which were the same band at R_f 0.17-0.30 and at R_f 0.53- 0.70. The chemical structure from the inhibition bands were analyzed by GC-MS. It was found that the chemical structure at R_f 1 was capric acid and at R_f 2 was capryl aldehyde. The part of nonpolar and polar substance could not inhibit both *C. gloeosporioides* and *C. cladosporioides* while the volatile oil could inhibit both vegetative growth on potato dextrose agar and spore germination of *C. gloeosporioides*. In addition, it decreased the growth of *C. gloeosporioides* in potato dextrose broth culture. By observing under transmission electron microscope, the cell organelles deformed by volatile oil were hardly recognized. The minimum inhibitory concentration (MIC) test of volatile oil, capryl aldehyde, capric acid and fungicide (benomyl) on growth of *C. gloeosporioides* were respectively at 0.1000, 0.1000, 0.0250 and 0.0016 mg/ml.

Keywords: capric acid, capryl aldehyde, benomyl, *Colletotrichum gloeosporioides*

บทคัดย่อ

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากใบพลูควา (*Houttuynia cordata*) ต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Cladosporium cladosporioides* โดยวิธี TLC-bioassay โดยส่วนของน้ำมันหอมระเหย สกัดโดยใช้วิธีกลั่นด้วยไอน้ำ ส่วนของสารไม่มีขั้วและสารมีขั้ว สกัดโดยการแช่ในตัวทำละลายไดคลอโรโรมีเทนและเมทานอล ตามลำดับ ผลปรากฏว่า น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อราได้ โดยมีแถบยับยั้งตรงกันคือ ที่ R_f 0.17-0.30 และ R_f 0.53-0.70 และจากการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้ก๊าซโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS) พบว่า สารจากแถบยับยั้ง R_f 1 คือ capric acid และ สารจากแถบยับยั้ง R_f 2 คือ capryl aldehyde ในส่วนของสารสกัดไม่มีขั้วและสารสกัดมีขั้วนั้นไม่สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. cladosporioides* ได้ ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยบนอาหารแข็ง potato dextrose agar และยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ด้วย และเมื่อนำเชื้อรา *C. gloeosporioides* มาเลี้ยงให้เจริญในอาหารเหลว potato dextrose broth ที่มีน้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนประกอบ พบว่า น้ำมันหอมระเหยสามารถชะลอการเจริญของเชื้อได้ จากการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนไมโครสโคปแบบทรานสมิซัน พบว่า น้ำมันหอมระเหยทำให้ออร์แกเนลล์ภายในเซลล์มีลักษณะที่ผิดปกติจนไม่สามารถจำแนกได้ จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของน้ำมันหอมระเหย capryl aldehyde, capric acid และสารฆ่าเชื้อรา benomyl ต่อการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* พบว่า มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.1000 0.0250 และ 0.0016 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: พลูควา, น้ำมันหอมระเหย

คำนำ

มะม่วง (*Mangifera indica*) เป็นผลไม้เมืองร้อนที่เก่าแก่ อยู่ในวงศ์ *Anacardiaceae* เป็นพรรณไม้พื้นเมืองของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีสภาพภูมิอากาศเหมาะสม มีการปลูกมะม่วงมากและกระจายไปทั่วแทบทุกจังหวัด (ประจวบ, 2531) แต่ในการปลูกมะม่วงนั้น ปัญหาที่พบเสมอและทำความเสียหายให้กับมะม่วงตลอดฤดูกาลปลูกมักมี

¹ สถาบันวิชาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ / Postharvest Technology Institute, Chiang Mai University

² ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ / Department of plant pathology Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

³ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ / Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University

⁴ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ / Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University

สาเหตุมาจากโรคแอนแทรกโนส โดยโรคนี้จะทำความเสียหายอย่างรุนแรงให้กับมะม่วงน้ำดอกไม้ อกร่อง หนังกวางวัน ทองคำ และแก้ว ตามลำดับ (อังสุมา, 2530) การใช้สารเคมีสังเคราะห์ควบคุมโรคพืชที่ผ่านมา ถึงแม้จะมีส่วนทำให้ผลผลิตทางการเกษตรเพิ่มขึ้นและสามารถควบคุมการกระจายของโรคได้ก็ตาม แต่ก็ต้องพึ่งพาสารเคมีจากต่างประเทศเนื่องจากสารเคมีดังกล่าว ส่วนใหญ่จะนำเข้าทั้งในลักษณะสำเร็จรูปและสารเคมีต่างๆ ซึ่งเป็นวัสดุส่วนผสมแล้วนำมาผสมตามสูตรภายในประเทศ (อาภา, 2538) การใช้สารเคมีควบคุมโรคพืชในปริมาณมากและใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานนั้น อาจมีผลชักนำให้เชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชสร้างความต้านทานต่อสารเคมีได้ อีกทั้งยังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมโดยมีพิษตกค้างอยู่ในดิน แหล่งน้ำหรืออาจจะตกค้างอยู่ในผลิตผลเกษตร ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ (Farungsang and Farungsang, 1992) วิธีการหนึ่งที่จะเป็นแนวทางในการลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชก็คือ การใช้สารสกัดจากพืชธรรมชาติที่หาได้ตามท้องถิ่นสามารถนำมาสกัดเพื่อใช้ทดแทนสารเคมี ในการทดลองนี้จึงนำใบพลูควาคือเชื้อซึ่งเป็นพืชสมุนไพรพื้นเมืองของภาคเหนือมา สกัดเพื่อใช้ควบคุมโรคแอนแทรกโนส ทำให้มะม่วงมีคุณภาพที่ดีขึ้นเป็นการเพิ่มมูลค่าในการส่งออกและยังสามารถลดปริมาณการใช้สารเคมีอีกด้วย

วิธีการทดลอง

1. การสกัดสารจากใบพลูควาและศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยวิธี TLC-bioassay

ทำการสกัดส่วนน้ำมันหอมระเหยจากใบพลูควาโดยใช้วิธีกลั่นด้วยไอน้ำ จากนั้นนำกากที่ได้มาสกัดสารส่วนที่ไม่มีขั้ว (nonpolar) และส่วนมีขั้วโดยแช่ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเมทานอลตามลำดับ จากนั้นนำส่วนที่สกัดได้มาทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี TLC-bioassay โดยใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Developing solvent) ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล = 95 : 5 และฉีดพ่นด้วยสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. cladosporioides* มาฉีดพ่นลงบนเพลต TLC ก่อนนำมาใส่กล่องปิดมิดชิด เป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบกำหนดจึงตรวจดูแถบต้านเชื้อรา (Inhibition zone) จากนั้นจึงชูดแถบต้านเชื้อรามาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอลในอัตราส่วน 50:50 หลังจากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้เครื่อง GC-MS

2. การหาประสิทธิภาพยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides*

นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้และน้ำกลั่นซึ่งเป็นชุดควบคุม หยดลงบนแผ่นกรอง millipore ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร แผ่นละ 10 ไมโครลิตร รอให้ตัวทำละลายระเหยออกไปจนหมด แล้วหยดสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา 10 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาผ่านไป 4 5 6 7 8 9 และ 12 ชั่วโมง จึงหยดทับด้วย lactophenol cotton blue ก่อนตรวจดูการงอกของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยวิธี paper disc technique ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เตรียมความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ ความเข้มข้น 5,000 4,000 3,000 2,000 1,000 ppm และ ชุดควบคุม (ไดคลอโรมีเทน) หลังจากนั้นเตรียมกระดาษกรองเป็นรูปวงกลมที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร จากนั้นจึงนำน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่างๆ หยดลงบนกระดาษกรองที่เตรียมไว้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วรอให้ตัวทำละลายระเหยออกไปให้หมด หลังจากนั้นจึงนำไปวางบนจานอาหาร PDA ที่ผ่านการ spread plate ด้วยเชื้อรา *C. gloeosporioides* มาก่อนแล้ว บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-4 วัน จึงตรวจดูแถบยับยั้งที่เป็นวงใสรอบกระดาษกรอง

4. การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเชื้อรา (morphology) โดยใช้กล้อง TEM (Transmission Electron Microscope)

เตรียมอาหาร PDB ปริมาตร 9 มิลลิเมตร ใส่ลงในขวดขนาดเล็กแล้วนำไปฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นนำมาเติมน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 5,000 ppm ปริมาตร 1 มิลลิตร หยด tween 20 ลงไปเล็กน้อย ทำให้ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยในขวดอาหาร PDB มีความเข้มข้น 500 ppm หลังจากนั้นจึงใช้ cork bborr ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เลี้ยงไว้ในจานอาหาร PDA แล้วนำมาเลี้ยงต่อในขวดอาหาร PDB ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยซึ่งมีการเขย่าตลอดเวลา บ่มเชื้อไว้จนเชื้อราที่เลี้ยงเจริญเห็นได้ชัดจึงนำมาส่องดูด้วยกล้อง TEM เพื่อตรวจดูการเปลี่ยนแปลง

ส่วนของสารสกัดไม่มีขั้วและมีขั้วนั้นไม่สามารถยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิด

5. การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของสารสกัด

นำน้ำมันหอมระเหยและสารที่ได้จากแถบยับยั้งเชื้อราจากข้อ 3 มาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน แล้วนำมาละลายในไดคลอโรมีเทน และนำสารมาเชื้อรา benomyl มาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ก่อนนำมาละลายในน้ำกลั่นจากนั้นทำการลดความเข้มข้นของสารลงมาร้อยๆ ครั้งละครึ่งหนึ่ง เสร็จแล้วหยดสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมได้ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนเพลต TLC แล้วทำการพ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* บ่มเชื้อไว้ประมาณ 2 วัน จึงตรวจดูแถบยับยั้ง

ผลและวิจารณ์

1. การสกัดสารจากใบพลูควาดและศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยวิธี TLC-bioassay

เมื่อนำน้ำมันหอมระเหย สารไม่มีขั้วและสารมีขั้ว มาทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดโดยวิธี TLC-bioassay พบว่า น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *C. cladosporioides* ได้ โดยพบว่าแถบยับยั้งทั้งสองเขื่อนั้นตรงกันคือที่ R_f 0.17-0.30 และ R_f 0.53-0.70 และจากการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้ก๊าซโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS) พบว่าสารจากแถบยับยั้ง R_{f1} คือ capric acid และ สารจากแถบยับยั้ง R_{f2} คือ capryl aldehyde

2. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการยับยั้งการงอกและการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

จากการทดสอบเบื้องต้นในการหาจำนวนชั่วโมงที่เชื้อรา *C. gloeosporioides* จะเริ่มงอกในสภาวะปกติ พบว่าเชื้อจะเริ่มงอกชั่วโมงที่ 7 โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอก 38.89 เปอร์เซ็นต์ และที่ชั่วโมงที่ 12 จะมีเปอร์เซ็นต์การงอก 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำ น้ำมันหอมระเหยมาทดสอบประสิทธิภาพกับสปอร์เชื้อรา พบว่าน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ 12 ชั่วโมง ไม่พบการงอกของสปอร์ และจากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งเส้นใยเชื้อราโดยวิธี paper disc technique พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อได้ เท่ากับ 2,000 ppm ซึ่งมีค่าตรงกันกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งได้บนแผ่น TLC-plate ขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นที่น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งได้ มีขนาด 0.12 0.11 0.10 และ 0.07 เซนติเมตร ที่ความเข้มข้น 5,000 4,000 3,000 และ 2,000 ppm ตามลำดับ

3. การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเชื้อรา (morphology)

จากการตรวจดูการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เจริญในอาหารเหลวซึ่งมีน้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนประกอบโดยใช้กล้อง TEM พบว่า น้ำมันหอมระเหยมีผลทำให้ลักษณะและองค์ประกอบของเซลล์เชื้อราเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด โดยเซลล์มีลักษณะรูปร่างเบี้ยวผิดปกติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเซลล์มีรูปร่างสมบูรณ์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการปลดปล่อยของเหลวภายในเซลล์ออกมาภายนอกเซลล์ (plasmolysis) ส่วนประกอบอื่นๆ ภายในเซลล์ เช่น ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) แวกิวโอล (vacuole) อินคลูชันบอดี (inclusion body) และนิวคลีโอลัส (nucleolus) เกิดการสลายตัวติดสีที่จับ จนไม่สามารถจำแนกได้ เนื่องจากทุกส่วนประกอบของเซลล์เชื้อรามีความสำคัญต่อการเจริญและพัฒนาของเซลล์ ดังนั้นจึงส่งผลให้เส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* เจริญได้ช้ามาก

4. การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของสารสกัด

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของน้ำมันหอมระเหย, capric acid, capryl aldehyde และ สารฆ่าเชื้อรา benomyl พบว่าน้ำมันหอมระเหยและ capryl aldehyde มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ได้เท่ากันคือ 0.1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสาร capric acid มีค่าความเข้มข้นต่ำสุด 0.0250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสาร benomyl มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดคือ 0.0016 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามแม้ว่าสาร benomyl จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีที่สุด แต่เนื่องจากสาร benomyl เป็นสารเคมีสังเคราะห์ หากใช้ควบคุมโรคพืชในปริมาณที่มากและติดต่อกันเป็นเวลานาน เชื้อรา *C. gloeosporioides* จะมีความต้านทานต่อสารเคมีเพิ่มขึ้น (Farungsang and Farungsang, 1992) ส่วนสาร capric acid ซึ่งเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรองลงมา เป็นกรดไขมัน (fatty acid) ที่มีคาร์บอน 10 อะตอม มีลักษณะเป็นของแข็ง มีจุดหลอมเหลว 31.4 องศาเซลเซียส จุดเดือด 270 องศาเซลเซียส มีกลิ่นเหม็นหืน เมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษกับหนู พบว่ามีค่า LD_{50} 129 ± 5.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในทางอุตสาหกรรมจะใช้ capric acid ในการสังเคราะห์กลิ่นหอมของผลไม้ (Budavari, 1996) ในส่วนของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ในปี 2000 Neyts พบว่า monoglyceride ของ capric acid สามารถต้านเชื้อ HIV, HSV, *Neisseria gonorrhoeae* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคหนองใน และ *Chlamydia trachomatis* ซึ่งเป็นปรสิตทำให้เกิดโรคหลอดปัสสาวะอักเสบและทวารหนักอักเสบ ส่วนสาร capryl aldehyde ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *C. gloeosporioides* รองลงมาจาก capric acid นั้น เป็นสารจำพวกแอลดีไฮด์ มีจำนวนคาร์บอน 8 อะตอม มีลักษณะเป็นของเหลวมีจุดเดือด 163.4 องศาเซลเซียส (Budavari, 1996) โดยทั่วไปแล้วสารจำพวกแอลดีไฮด์จะทำให้ระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อผิวหนังในของร่างกายที่เป็นเมือก เช่น ในจมูก และช่องทางการอาหาร (Fairhall, 1969) อย่างไรก็ตามแม้ว่าสาร capryl aldehyde จะเป็นสารจำพวกแอลดีไฮด์ แต่ในน้ำมันหอมระเหยพลูควาดก็มีสาร capryl aldehyde ปนอยู่น้อยมาก จากการรายงานของวิณาในปี 2543 พบว่าพลูควาดมีพิษต่อร่างกายน้อยมาก ซึ่งผลข้างเคียงที่พบคือ หากรับประทานมากจนเกินไปอาจทำให้อาเจียนอันเนื่องจากพลูควาดมีกลิ่นควาด

สรุป

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย พบว่า น้ำมันหอมระเหยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์และเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เท่ากับ 2000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีผลทำให้ออร์แกนัลภายในเซลล์มีลักษณะที่ผิดปกติจนไม่สามารถจำแนกได้

เอกสารอ้างอิง

- ประจวบ บุตรศาสตร์. 2531. การสำรวจโรคที่เกิดจากเชื้อราหลังการเก็บเกี่ยวผลมะม่วง (*Mangifera indica* L.) และวิธีป้องกันกำจัดโรคที่รุนแรงบางวิธี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. 166 หน้า.
- วีณา เชิดบุญชาติ. 2543. ปลูกผักไทยได้ทั้งอาหารและยา. สำนักพิมพ์บ้านและสวน. กรุงเทพฯ. 269 หน้า.
- อังสุมา ชยสมบัติ. 2530. โรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลมะม่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. และการควบคุม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 105 หน้า.
- Budavari, S. 1996. The Merck Index. 12th ed. Merck Co. USA. 1741 p.
- Fairhall, L.T. 1969. *Industrial Toxicology*. Hafner. New York. 376 p.
- Farungsang, U. and N. Farungsang. 1992. Resistance to benomyl of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of rambutan and mango in Thailand. *Acta. Hort.* 162: 102-108.
- Neyts, J., T. Kristmundsdottir, E. De Clereq and H. Thormar. 2000. Hydrogels containing monolaurin prevent intravaginal and intercutaneous infections with HSV-2 in mice: impact on the search for vaginal microbicides. *J. Med. Vir.* 61: 107-110.