Agricultural Sci. J. 42 : 1 (Suppl.) : 283-286 (2011) ว. วิทย. กษ. 42 : 1 (พิเศษ) : 283-286 (2554)

ผลของสารสกัดจากเปลือกลำต้นของพืชสกุล *Aglaia* ต่อการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่แยกจากผลมะละกอ

Effect of Extracts from the Bark of *Aglaia* spp. on the Growth of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. capsici* Isolated from Papaya Fruit

เนตรนภิส เขียวขำ[1] **และ ธัญมน สังข์ศิริ**[1]
Netnapis Khewkhom[1] and Tanyamon Sangsiri[1]

Abstract

Lipophilic crude extracts of plants from five species (stem bark of *Aglaia oligophylla, A. elaeagnoidea, A. eximia, A. leptantha* and *A. spectabilis*) from Kasetsart Research Station at Trad province, were selected for investigation on antifungal activities against *Colletotrichum colletosporioides* and *C. capsici* from papayas CVS. Kaek Dam and Holland. Crude extracts of *A. elaeagnoidea, A. spectabilis* and *A. oligophylla* showed minimum inhibitory concentration (MIC) at 2,500 µg/ml of *C. colletosporioides:* CGK-7 at 24 hr. Fractionation of the bark of *A. elaeagnoidea* by column chromatography on silica gel eluted a fraction VI (solvent mixture of hexane:EtOAc, 1:3) which showed MIC value against 10^3 conidia/ml of *C. colletosporioides* at 24 hr: strains CGH1, CGH9 and CGK7 at 625, 312.5 and 312.5 µg/ml, respectively. A fraction XI (solvent mixture of EtOAc:MeOH, 1:1) showed MIC at 312.5, 312.5 and 625 µg/ml, respectively. *C. gloeosporioides* did not significantly cause disease on papaya fruits with and without wounding in the control. Papaya fruits were inoculated with and without wounding before the application of fraction VI (solvent system of hexane:EtOAc, 1:3) at 10,000 ppm. The infected areas on the fruit skin had diameters of 0.59 and 0.48 cm diameter of wound, respectively. The application of fraction IX (solvent system of EtOAc:MeOH, 9:1)of 10,000 ppm after the fruits were inoculated with *C. capsici* without prior wounding resulted in an infected area with a diameter of 0.23 cm. In addition, all applications resulted in normal fruit skin.

Keywords: *Aglaia*, *Colletotrichum*, *Carica papaya*

บทคัดย่อ

สารสกัดหยาบ lipophilic phase จากพืช *Aglaia species* 5 ชนิด คือ *Aglaia oligophylla, A. elaeagnoidea, A. eximia, A. leptantha* และ *A. spectabilis* จากสถานีวิจัยวนเกษตร จังหวัดตราด ใช้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบและสารประกอบต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum colletosporioides* และ *C. capsici* จากผลมะละกอพันธุ์พันธุ์แขกดำและฮอล์แลนด์ สารสกัดหยาบ *A. elaeagnoidea* ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. colletosporioides* ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) เท่ากับ 2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารประกอบ *A. elaeagnoidea* VI ที่แยกได้จากสารละลาย hexane:EtOAc 1:3 ด้วยวิธี column chromatography ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. colletosporioides* strain CGH1, CGH9 และ CGK7 ความเข้มข้น 10^3 conidia/ml ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่า MIC เท่ากับ 625, 312.5 และ 312.5 µg/ml ตามลำดับ และสารประกอบของ *A. elaeagnoidea* XI ที่แยกได้จากสารละลาย EtOAc:MeOH 1:1 มีค่า MIC เท่ากับ 312.5, 312.5 และ 625 µg/ml ตามลำดับ เมื่อทดสอบการควบคุมโรคบนผลมะละกอพบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* สามารถเข้าทำลายได้ทั้งการปลูกเชื้อแบบทำแผลและไม่ทำแผลไม่แตกต่างกันในชุดควบคุม ผลมะละกอที่ปลูกเชื้อแบบทำแผลและไม่ทำแผลแล้วหยดด้วยสารประกอบ VI (แยกได้จากสารละลาย hexane:EtOAc 1:3) ความเข้มข้น 10,000 ppm มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่เชื้อราเข้าทำลาย 0.59 และ 0.48 เซนติเมตร ตามลำดับ และผลมะละกอที่ปลูกเชื้อ *C. capsici* โดยไม่ทำแผลแล้วหยดสารประกอบของ IX (แยกได้จากสารละลาย EtOAc:MeOH 9:1) ความเข้มข้น 10,000 ppm มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่เชื้อราเข้าทำลาย 0.23 เซนติเมตร แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ผิวผลมะละกอมีลักษณะปกติ

คำสำคัญ: Aglaia, Colletotrichum, Carica papaya

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
[1] Department of Plant Pathology, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

คำนำ

โรคแอนแทรกโนส (anthracnose) เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ลักษณะอาการของโรค จะเกิดแผลกลมฉ่ำน้ำและยุบลงไปในผล ตรงกลางจุดจะมีสปอร์ของเชื้อสีส้มหรือชมพูขึ้นฟูเป็นวงชั้นๆ บริเวณแผลและแผลจะลุกลามขยายตัวไป ทำให้ผลมะละกอเน่าเสียในเวลารวดเร็ว โดยเฉพาะในสภาพร้อนและมีความชื้นสูง เชื้อสาเหตุของโรคจะเข้าทำลายตั้งแต่ระยะที่เป็นผลอ่อนไม่แสดงอาการของโรค แต่จะปรากฏอาการของโรคเมื่อผลมะละกอสุก โดยสปอร์ของเชื้อจะงอกและแทงเข้าสู่ผิวผลได้โดยไม่ต้องมีบาดแผลเกิดขึ้น (Bailey and Jeger, 1992) แต่การควบคุมโรคส่วนใหญ่จะใช้สารเคมี ซึ่งต้องคำนึงถึงความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อมเป็นสำคัญ ในปัจจุบันมีการศึกษาใช้สารจากพืช เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เป็นทางเลือกในการลดการใช้สารเคมี พืชที่น่าสนใจอีกชนิดหนึ่งคือ *Aglaia* อยู่ในวงศ์มะฮอกกานี (Meliaceae) มีสารประเภท aromatic ที่พบเฉพาะในพืชชนิดนี้คือ flavonol-cinnamate-derived cyclopenta[*b*]benzofurans เรียกว่า flavaglines ซึ่งเป็นสารประเภท bioactive สะสมอยู่ที่รากและเปลือกลำต้น (Bacher *et al.,* 1999; Brader *et al*., 1998) สารสกัดหยาบของ *Aglaia edulis* สามารถป้องกันแมลง *Spodoptera littoralis* ได้ นอกจากนี้ยังพบสารกำจัดแมลงที่มีประสิทธิภาพจาก *A. basiphylla* ได้แก่ benzofuran, flavaglines, rocaglamid, desmethylrocaglamide และ aglafoline (Bacher *et al*., 1999) คุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อรามีการศึกษาว่า cyclopenta[*b*]benzofurans จาก *Aglaia odorata A. elaeagnoidea* และ *A. edulis* มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช *Pyricularia grisea*, *Fusarium avenaceum* และ *Alternaria citri* โดยสาร rocaglaol มีประสิทธิภาพสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีกำจัดเชื้อรา (Engelmeier et al., 2000) Khewkhom (2006) ได้ศึกษาผลของสารrocaglaol ซึ่งสกัดได้จากส่วนรากและเปลือกลำต้นของ *A. oligophylla* พบว่ายับยั้งการงอกของสปอร์ *Botrytis cinerea* ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.56 µg/mL ส่วน *C. gloeosporioides* มีค่า EC_{50} 52 µg/mL และ EC_{90} 86 µg/mL การทดลองในครั้งนี้ เพื่อศึกษาสารสกัดหยาบและการแยก lipophilic phase จากพืช *Aglaia species* 5 ชนิด และศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ *Aglaia* species 5 ชนิด ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. colletosporioides* และ *C. capsici* ที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะละกอ เพื่อเป็นแนวทางในการลดการใช้สารเคมีหรือเป็นต้นแบบในการผลิตสารเคมีสังเคราะห์ที่มีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้น และลดปัญหาความรุนแรงของโรคแอนแทรกโนสที่เกิดขึ้นกับผลมะละกอ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อที่ติดมาจากแปลงปลูกของผลมะละกอพันธุ์ฮอล์แลนด์ (ปลักไม้ลาย) จ.สุพรรณบุรี และพันธุ์แขกดำ จ. นครปฐม ทำการทดลองที่ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร ม.เกษตรศาสตร์ ตุลาคม 2552 เก็บผลมะละกอไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10 วัน แล้วจึงแยกเชื้อจากบริเวณที่เกิดโรค ด้วยวิธี tissue transplanting แยกจนได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วเก็บไว้ในหลอดอาหาร PDA slant ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาในการทดลองต่อไป

2. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากพืช ส่วนเปลือกลำต้นของพืช 5 ชนิด ได้แก่ *Aglaia oligophylla, A. elaeagnoidea, A. eximia, A. leptantha* และ *A. spectabilis* สถานที่เก็บตัวอย่าง สถานีวิจัยวนเกษตร ม.เกษตรศาสตร์ ตำบลท่ากุ่ม อำเภอเมือง จังหวัดตราด นำตัวอย่างพืชมาหั่นหยาบ และชั่งน้ำหนักจากนั้นทำการสกัดโดยแช่ตัวอย่างพืชในเมทานอล ในอัตราส่วนตัวอย่างแห้งต่อตัวทำละลายเมทานอล 1:2 เก็บไว้ในขวดแก้วทึบแสงในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ส่วนที่เป็นกากของพืชให้เติมเมทานอลเพื่อสกัดซ้ำอีกครั้ง นำสารละลายที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายเมทานอลออกด้วยเครื่อง rotary evaporator โดยใช้ความดันต่ำที่ -0.8 bar และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำสารสกัดหยาบมาแยกสารตามความสามารถการละลายในกรวยแยก โดยเติมตัวทำละลายอินทรีย์คือ คลอโรฟอร์มและน้ำ เพื่อแยกชั้นของสารที่ละลายในคลอโรฟอร์มซึ่งเป็น lipophilic สกัดหยาบ จากนั้นเติมตัวทำละลายเมทานอลเก็บรักษาในที่มืด อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. แยกสารสกัดหยาบด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) และทดสอบความสามารถการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารสกัดหยาบด้วยวิธี bioautography ของเปลือกลำต้นของพืชทั้ง 5 ชนิด โดยการพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อรา *Cladosporium* sp. ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

4. ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของพืชทั้ง 5 ชนิดต่อเชื้อราสาเหตุโรค *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่แยกได้จากข้อ 1 เพื่อศึกษาการยับยั้งการงอกของสปอร์ ด้วยวิธี microdilution assay เพื่อหา minimum inhibitory concentration (MIC)

5. แยกสารสกัดหยาบ *A. elaeagnoidea* โดยวิธี column chromatography (CC) ด้วยสารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ซึ่งประกอบด้วย เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ในอัตราส่วนต่างๆ และแยกสารสกัดหยาบ *A. oligophylla* โดยวิธี TLC และทดสอบความสามารถการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารประกอบ (fraction) ด้วยวิธี microdilution assay เพื่อหา minimum inhibitory concentration (MIC)

6. ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชในการควบคุมการเกิดโรคบนผลมะละกอ ใช้มะละกอพันธุ์ฮอล์แลนด์ จ. นครปฐม ระยะแก่เต็มที่ (ผิวผลยังเป็นสีเขียว) โดยทำแผลด้วยเข็มเขี่ยฆ่าเชื้อเจาะลงที่ผิวผลความลึก 0.5 cm และไม่ทำแผล บรรจุลงตะกร้าที่บุด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ จากนั้นปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยการใช้ spore suspension ปริมาณ 20 µl ความเข้มข้น 10^3 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นกระดาษกรองฆ่าเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm จากนั้นหยดสารสกัดหยาบ *A. oligophylla* และ *A. elaeagnoidea* สารประกอบ (fraction) จากข้อ 5 ละลายในน้ำความเข้มข้น 10,000 ppm ปริมาณ 100 µl และในชุดควบคุมใช้น้ำ โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ศึกษาการเกิดโรคและความรุนแรงของการเกิดโรค

ผลการทดลอง

ตัวอย่างสารสกัดจากเปลือกลำต้นด้วยเมทานอลโดยใช้ส่วนเปลือกลำต้นของพืช 5 ชนิด ได้แก่ *Aglaia oligophylla, A. elaeagnoidea, A. eximia ,A.leptantha* และ *A. spectabilis* (Table 1) และแยกสารสกัดหยาบด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) และทดสอบความสามารถการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารสกัดหยาบด้วยวิธี bioautography ของพืชทั้ง 5 ชนิด พบบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium* sp. (Figure 1) สารสกัดหยาบ *A. elaeagnoidea* ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. colletosporioides* มีค่า MIC เท่ากับ 2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง (Table 2) จากนั้นแยกสารสกัดหยาบ *A. elaeagnoidea* โดยวิธี CC และแยกสารสกัดหยาบ *A. Oligophylla* โดยวิธี TLC และทดสอบความสามารถการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารประกอบที่แยกได้พบว่า *A. elaeagnoidea* VI (แยกได้จากสารละลาย hexane:EtOAc 1:3) และ IX (แยกได้จากสารละลาย EtOAc:MeOH 9:1) มีค่า MIC ระหว่าง 312.5-625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Table 3) และมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคบนผลมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์ที่ได้รับการปลูกเชื้อ (Table 4)

Table 1 Crude extracts from 5 selected plants

Plant material	Dry weight (g)	Weight of lipophilic ($CHCl_3$) phase (mg)
A. elaeagnoidea	40	219.5
A. eximia	80	5,573.5
A. leptantha	20	356
A. spectabilis	50	1,308.3
A. oligophylla	100	2,701.5

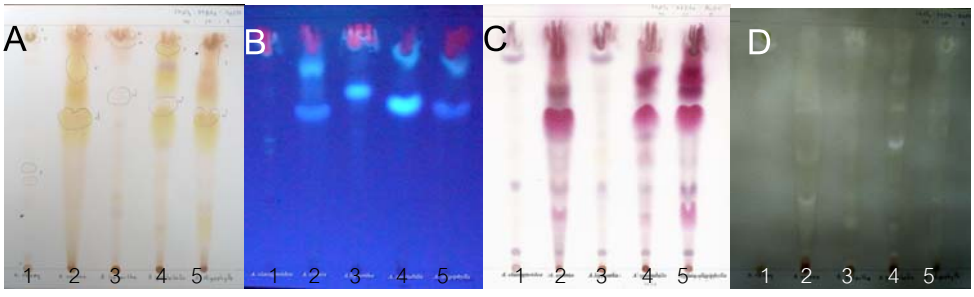

Figure 1 Thin-layer chromatography of fractions from lipophilic crude extracts of *A. elaeagnoidea* (1) *A. eximia* (2) *A. leptantha* (3) *A. spectabilis* (4) and *A. oligophylla* (5) in solvent system: $CHCl_3$:EtOAc:MeOH (70:25:5) (A) observed under UV-lamp at a wavelength of 254 nm (B) and sprayed with anisaldehyde reagent (C). The other plate was used for bioautography sprayed with *Cladosporium* sp. conidia suspension adjusted to a final concentration of 10^5 conidia/ml in 1.7%malt extract broth.

Table 2 Inhibition of *C. gloeosporioides* (CGH-9, CGK-7) and *C. capsici* (CCH-1) 10^3 conidia/ml isolated from papayas cvs. "Holland" and "Kaek Dam" by crude extracts of *Aglaia* 5 species

	Minimum inhibitory concentration (MIC) μg/ml					
	CGH-9		CCH-1		CGK-7	
	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
Control	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500
A. elaeagnoidea	2,500	>2,500	2,500	>2,500	2,500	>2,500
A. eximia	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500
A.leptantha	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500	1,250	>2,500
A. spectabilis	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500	1,250	>2,500
A. oligophylla	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500	2,500	>2,500

Table 3 Inhibition of *C. gloeosporioides* 10^3 conidia/ml on papayas cvs. "Holland" and "Kaek Dam" by active fraction of *A. oligophylla* and *A. elaeagnoidea*

Active fraction	Minimum inhibitory concentration (MIC) μg/ml								
	CGH-1			CGH-9			CGK-7		
	24 hr	48 hr	120 hr	24 hr	48 hr	120 hr	24 hr	48 hr	120 hr
Control	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500
A. oligophylla-1	1,250	>2,500	>2,500	1,250	>2,500	>2,500	2,500	>2,500	>2,500
A. oligophylla-2	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500	>2,500
A. elaeagnoidea VI	625	625	625	312.5	312.5	2,500	312.5	312.5	2,500
A. elaeagnoidea IX	312.5	312.5	>2,500	312.5	312.5	>2,500	625	625	1,250

Table 4 Disease severities in diameter of wound and un-wound inoculated (cm) on papayas cvs. "Holland"

	CCH 1		CGH 1		CGH 9	
	Wound	Un-wound	Wound	Un-wound	Wound	Un-wound
Control (sterilized water)	0.70a	1.08a	1.09ab	1.11a	0.84b	0.83ab
A. oligophylla (crude)	0.88a	0.78bc	1.23a	0.93ab	1.26ab	0.67b
A. elaeagnoidea (crude)	0.78a	0.58bc	0.87ab	0.50b	1.58a	1.00ab
A. elaeagnoidea VI	0.83a	0.91b	0.59b	0.48b	1.14ab	0.57b
A. elaeagnoidea IX	0.63a	0.23c	1.10ab	0.91ab	1.11ab	1.20a

* Mean separation by DMRT, 5% level

วิจารณ์ผล

สารสกัดหยาบ lipophillic phase จากพืช *Aglaia* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum colletosporioides* และ *C. capsici* และมีผลต่อการควบคุมโรคแอนแทรกโนสของผลมะละกอ โดยไม่ทำให้ลักษณะทางคุณภาพผิดปกติ โดยสารที่พบเฉพาะในพืชชนิดนี้คือ flavonol-cinnamate-derived cyclopenta[*b*]benzofurans เรียกว่า flavaglines ซึ่งเป็นสารประเภท bioactive สะสมอยู่ที่รากและเปลือกลำต้น (Bacher *et al.,* 1999; Brader *et al*., 1998) ซึ่งมีรายงานว่าที่เปลือกลำต้นของ *A. elaeagnoidea* มีสาร 1H-cyclopentatetrahydro [b] benzofuran lignans dammarane triterpenoids และสาร limonoid (FuzzA'rI *et al*, 1996)

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย สถานีวิจัยวนเกษตร จังหวัดตราด และรศ.ดร.สรัญญา วัชโรทัย ที่กรุณาแนะนำ และ ตรวจดูชนิดของพืชตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

Bailey, J.A. and M.J. Jeger. 1992. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and control. CAB International, Wallingford. 388 p.

Bacher, M., O. Hofer, G. Brader, S. Vajrodaya and H. Greger. 1999. Thapsakins, possible biogenetic intermediates towards insecticidal cyclopenta[b]benzofurans from *Aglaia edulis*. Phytochemistry 52: 25-263.

Brader, G., S. Vajrodaya, H. Greger, M. Bacher, H. Kalchhauser and O. Hofer. 1998. Bisamides, lignans, triterpenes, and insecticidal cyclopenta[b]benzofurans from *Aglaia* species. Journal of Natural Products 61: 1482-149.

Engelmeier, D., F. Hadacek, T. Pacher, S. Vajrodaya and H. Greger. 2000. Cyclopenta[b]benzofurans from *Aglaia* species with pronounced antifungal activity against rice blast fungus (*Pyricularia grisea*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 1400-1404.

Fuzznti, N., W. Dyatmiko, A. Rahman, F. Achmad and K. Hostettmann. 1996. Triterpenoids, lignans and a benzofuran derivative from the bark of *Aglaia elaeanoidea*. Phytochemistry 42 (5): 1395-1398.

Khewkhom, N. 2006. Bioassay-based phytochemistry of selected tropical plants to discover natural pesticides. Dissertation. University of Vienna, Austria. 118 p.