Agricultural Sci. J. 42 : 3 (Suppl.) : 73-76 (2011) ว. วิทย. กษ. 42 : 3 (พิเศษ) : 73-76 (2554)

การทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดเปลือกมังคุดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

Preliminary test of mangosteen pericarp crude extract on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*

รัติยา พงศ์พิสุทธา[1,2] ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1,2] บุชยา โพธิกิจ[1] และ รณภพ บรรเจิดเชิดชู[1,2]

Ratiya Pongpisutta[1,2], Chianarong Rattanakreetakul[1,2], Boochaya Pothikij[1] and Ronnapop Bunjoedchoedchoo[1,2]

Abstract

Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) has a long story of utilize as a medical plant for a great variety of medical conditions, mostly in Southeast Asia. Over the past decades, it was shown that mangosteen contains high amounts of xanthones, a class of polyphenolic compounds. This research was focused on controlling mycelial growth and spore inhibition of *Colletotrichum gloeos porioides* which causes mango anthracnose. Mangosteen pericarp extracted by maceration with 95% ethyl alcohol was evaluated. Five hundred milligrams of the crude extract was diluted with 100 milliliters of 40 and 60% ethyl alcohol. Two milliliters of the dilution was mixed with 18 milliliters of potato dextrose agar (PDA) to assess its activity on mycelial growth of the fungus. Significantly differences in mycelial growth were observed between dilutions after 7 days of inoculation, with inhibition rates of 34.01 and 47.30 %, respectively (LSD = 4.19, P=0.05). Whilst flooding method of conidial agar discs in the crude extract with 40% ethyl alcohol diluted by sterile distilled water at the ratio of 1:4 showed the greatest inhibition of germ tube. The result of this study indicated that an important basis for the use of ethanol alcohol extract from mangosteen pericarp acquiring some compounds could act as defence compounds in *in vitro*. The function may help to prevent disease development on fruits.

Keywords: mangosteen crude extract, anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*

บทคัดย่อ

มังคุด (*Garcinia mangostana* L.) เป็นพืชที่ใช้เป็นยาสมุนไพรมานานแล้วและสามารถใช้เป็นยารักษาโรคได้หลายชนิด ส่วนใหญ่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเมื่อหลายสิบปีที่ผ่านมามีการค้นพบว่ามังคุดนั้นมีสารแซนโทนซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบโพลีฟีนอล ในปริมาณค่อนข้างสูง งานวิจัยนี้เน้นการควบคุมการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราและการยับยั้งการงอกของสปอร์ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง โดยใช้สารสกัดจากเปลือกมังคุดในตัวทำละลายเอทธิลแอลกอฮอล์ 95% ชั่งสารสกัดน้ำหนัก 500 มิลลิกรัม มาละลายในเอทธิลแอลกอฮอล์ 40 และ 60 % นำสารสกัดที่ละลายในแอลกอฮอล์แล้วปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมในอาหาร potato dextrose agar (PDA) ปริมาตร 18 มิลลิลิตร เพื่อประเมินบทบาทของสารสกัดต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา พบว่าหลังการปลูกเชื้อบนอาหาร 7 วัน การเจริญของเส้นใยถูกยับยั้งโดยมีอัตราการยับยั้ง 34.01 และ 47.30% ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (LSD = 4.19, P=0.05) ขณะที่การจุ่มชิ้นวุ้นที่มีสปอร์ในสารสกัดที่ละลายด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 40% ให้ผลในการควบคุมการงอกของสปอร์ได้ดีที่สุดที่อัตราของสารละลายต่อน้ำ 1:4 ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้เอทธิลแอลกอฮอล์สกัดสารจากเปลือกมังคุดทำให้ได้สารประกอบที่ทำหน้าที่เสมือนเป็นสารที่ต่อต้านเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ หากนำไปพัฒนาใช้กับผลไม้อาจช่วยควบคุมการเกิดโรคบนผลได้เช่นกัน

คำสำคัญ: สารสกัดจากเปลือกมังคุด แอนแทรคโนส *Colletotrichum gloeosporioides*

คำนำ

มังคุดเป็นผลไม้ที่ปลูกในเขตภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทยมานานแล้ว ในตำราแพทย์แผนไทยได้นำส่วนเปลือกแห้งที่มีรสฝาดมาใช้แก้ท้องเสีย บิด มูกเลือดสาร ทั้งนี้พบว่ามีสารสำคัญในกลุ่ม xanthones ได้แก่ mangostin จัดเป็น

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1] Dept. of Plant Pathology, Fac. of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University,Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10400

[2] Postharvest Technology Innovation Center, Commission on Higher Education Commission, Bangkok 10400

สารในกลุ่ม polyphenols งานวิจัยของ Dias (2003) พบว่าสาร xanthones ที่ได้จากสมุนไพร *Hypericum androsaemum* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Candida utilis* และ *Saccharomyces cerevisiae* และมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้หลายชนิด สำหรับงานวิจัยในเรื่องการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง มีการศึกษามานานนับสองทศวรรษแล้ว ทั้งที่ใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ การจุ่มผลในน้ำร้อน สุดท้ายกลับมาพึ่งพาการใช้สารเคมีอีกครั้ง สารเคมีบางชนิดที่ใช้ควบคุม เช่น benomyl และ carbendazim เมื่อใช้บ่อยครั้งอาจทำให้เชื้อราเกิดความต้านทานได้ งานวิจัยครั้งนี้ได้นำสารสกัดจากเปลือกมังคุดซึ่งใช้ตัวทำละลายที่หาได้ง่าย มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง การนำสารสกัดที่ได้จากพืชอาจเป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ เป็นวิธีที่ปลอดภัยทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค ช่วยลดปัญหามลภาวะสิ่งแวดล้อมและเพิ่มแนวทางในการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

อุปกรณ์และวิธีการ

การสกัดสารจากเปลือกมังคุด

นำเปลือกมังคุดตากแห้งจำนวน 160 กรัม แช่ด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 95% ปริมาตร 700 มิลลิลิตร นาน 7 วัน แยกสารละลายที่สกัดได้มากรองและระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ให้แอลกอฮอล์ระเหยออกจนหมด จากนั้นนำสารสกัดจำนวน 500 มิลลิกรัม มาละลายในเอทธิลแอลกอฮอล์ 40 และ 60% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

ผสมอาหาร PDA ปริมาตร 18 มิลลิลิตรกับสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่ละลายในเอทธิลแอลกอฮอล์ทั้ง 2 ความเข้มข้น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:9) เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร วาง mycelial disc ของเชื้อรา *C. gloeosporiodes* ที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 5 วัน ตัดปลายเส้นใยด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร ใช้เข็มเขี่ยตักบนชิ้นวุ้นวางบริเวณจุดศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน การทดลองควบคุมใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เอทธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 40 และ 60% วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดสอบจำนวน 5 ซ้ำ/การทดลอง ประเมินผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโดยใช้สูตร = (X-Y) × 100/X

หมายเหตุ X = ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนจานเลี้ยงเชื้อในชุดการทดลองควบคุม

Y = เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนจานเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารละลายต่างๆ

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อการงอกของสปอร์

นำสารสกัดที่ละลายด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 40 และ 60% มาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ความเข้มข้นสุดท้ายได้อัตราของสารสกัดต่อตัวทำให้เจือจางเท่ากับ 1:1 1:4 และ 1:9 และเตรียมสปอร์แขวนลอยของ *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 2 x 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ฉีดพ่นบนอาหาร water agar (WA) ความเข้มข้น 1% ด้วย air brush ปล่อยทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ แบ่งวิธีการทดสอบเป็น 2 วิธี คือ 1). ทดสอบการจุ่มชิ้นวุ้น (Flooding) ลงในสารสกัดที่ละลายด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 40 และ 60% ทั้ง 3 อัตราส่วน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เทลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร 2). ทดสอบการดูดซึมของสารสกัดผ่านชิ้นวุ้น (Absorption) นำสารสกัดที่ละลายด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 60% ทั้ง 3 อัตราส่วน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เทลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร ตัดชิ้นวุ้นขนาด 5x5 มิลลิเมตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 การทดสอบ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง นำชิ้นวุ้นดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 17 ชั่วโมง การทดลองควบคุมใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เอทธิลแอลกอฮอล์ 40 และ 60% ผสมกับน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ในอัตราส่วน 1:1 1:4 และ 1:9 วางแผนการทดลองแบบ CRD ประเมินผลโดยการวัดความยาว germ tube ของสปอร์ จำนวน 50 สปอร์/การทดลอง

ผล

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

สารสกัดจากเปลือกมังคุดที่ละลายในตัวทำละลายเอทธิลแอลกอฮอล์ 60% ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 47.30% รองลงมาคือ เอทธิลแอลกอฮอล์ 60% สารสกัดจากเปลือกมังคุดที่ละลายด้วยตัวทำละลายเอทธิลแอลกอฮอล์ 40% และเอทธิลแอลกอฮอล์ 40% ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใย 43.00 34.01 และ 22.75% ตามลำดับ (Figure 1 และ Table 1) โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (LSD = 4.19, P=0.05)

ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อการงอกของสปอร์

จากวิธีทดสอบจุ่มชิ้นวุ้นที่มีสปอร์ลงในสารสกัดที่ละลายด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 40% ทั้ง 3 อัตราส่วน สามารถควบคุมการงอกของสปอร์ได้ ส่วนในสารสกัดที่ละลายด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 60% พบสปอร์งอกได้น้อยมากเฉลี่ย 49.8 ไมโครเมตร ขณะที่การทดลองควบคุมที่ใช้เอทธิลแอลกอฮอล์ 60% นั้น สปอร์งอก germ tube ยาว 256.4 ไมโครเมตร ส่วนวิธีการดูดซึมของสารผ่านชิ้นวุ้นที่มีสปอร์ที่ผิวหน้า เฉพาะการทดลองที่วางชิ้นวุ้นในสารสกัดที่ละลายด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 60% และในเอทธิลแอลกอฮอล์ 60% ที่อัตราส่วน 1:1 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ (Figure 2 และ Table 2)

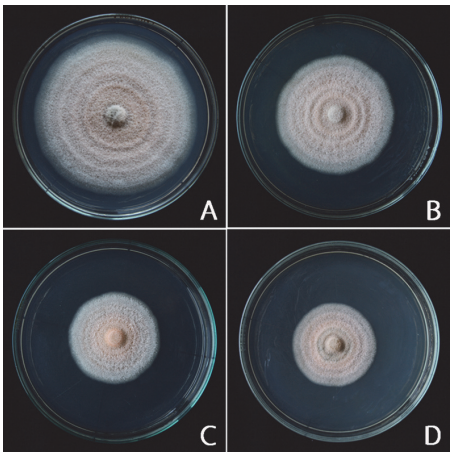

Figure 1 Mycelial inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* onto PDA with (A) 40% ethyl alcohol (B) crude extract diluted with 40% ethyl alcohol (C) 60% ethyl alcohol and (D) crude extract diluted with 60% ethyl alcohol

Table 1 Effect of mangosteen crude extract on mycelial inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* using poisoned food technique after 7d incubation at room temperature.

Treatment	Mycelial inhibition (%)[1/]
40% ethyl alcohol	22.75 d
Mangosteen extract diluted with 40% ethyl alcohol	34.01 c
60% ethyl alcohol	43.00 b
Mangosteen extract diluted with 60% ethyl alcohol	47.30 a

[1/] Column values followed by the same letter are not significantly different with LSD = 4.19 (P = 0.05)

Table 2 Effect of mangosteen crude extract on spore germination of *Colletotrichum gloeosporioides* after 17 hr of incubation.

Treatment	Mixture	Proportion	Germ tube (μm)[1/]
Flooding	40%Ethyl alcohol : Sterile distilled water	1:1	0.0g
		1:4	344.2b
		1:9	393.8a
	Crude extract diluted with 40%ethyl alcohol : Sterile distilled water	1:1	0.0g
		1:4	0.0g
		1:9	0.0g
	60%Ethyl alcohol : Sterile distilled water	1:1	0.0g
		1:4	155.4e
		1:9	256.4d
	Crude extract diluted with 60%ethyl alcohol : Sterile distilled water	1:1	0.0g
		1:4	0.0g
		1:9	49.8f
Absorption	60%Ethyl alcohol : Sterile distilled water	1:1	0.0g
		1:4	237.2d
		1:9	296.2c
	Crude extract diluted with 60%ethyl alcohol : Sterile distilled water	1:1	0.0g
		1:4	169.0e
		1:9	248.2d

[1/] Column values followed by the same letter are not significantly different with LSD = 21.46 (P = 0.05

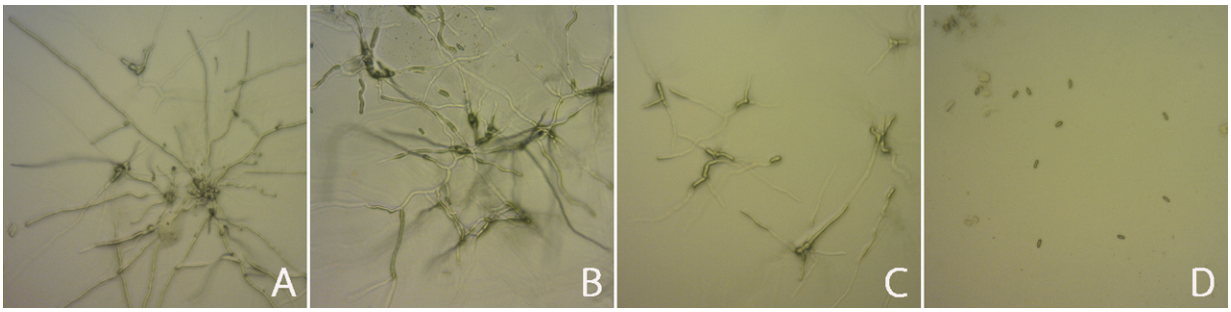

Figure 2 Effect of mangosteen crude extract on spore germination (A) flooding with sterile distilled water (B) flooding 60%alcohol at ratio of 1:4 (C) absorption with crude extract diluted with 60%alcohol at ratio of 1:4 and (D) flooding in crude extract diluted with 60%alcohol at ratio of 1:4

วิจารณ์ผล

งานวิจัยนี้ได้เตรียมสารละลายมีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 0.5% หรือ 5000 พีพีเอ็ม จากการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเส้นใยพบว่าสารสกัดที่ละลายในตัวทำละลายเอทธิลแอลกอฮอล์ 60% ให้ผลได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามหากเปรียบเทียบสารสกัดที่ละลายในตัวทำละลายเอทธิลแอลกอฮอล์ 40% และ 60% กับการทดลองควบคุมที่เป็นเอทธิลแอลกอฮอล์ 40% และ 60% พบว่าสารสกัดที่ละลายในตัวทำละลายเอทธิลแอลกอฮอล์ 40% กับเอทธิลแอลกอฮอล์ 40% ให้ผลการยับยั้งที่ค่อนข้างแตกต่างกันมากคือมีค่า 34.01 และ 22.75% ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดที่ละลายในตัวทำละลายเอทธิลแอลกอฮอล์ 60% กับเอทธิลแอลกอฮอล์ 60% ให้ผลการยับยั้งดีกว่าคือ 47.30 และ 43% ตามลำดับ แต่ประสิทธิภาพในการควบคุมนั้นอาจเป็นผลที่เกิดจากเอทธิลแอลกอฮอล์มากกว่า ส่วนการศึกษาการยับยั้งการงอกของสปอร์พบว่าหากเปรียบเทียบวิธีการพบว่าการจุ่มชิ้นวุ้นให้ผลการยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ดีกว่าการดูดซึมผ่านชิ้นวุ้น ซึ่งการดูดซึมนั้นอาจเกิดจากช่องว่างของชิ้นวุ้นมีขนาดเล็กเกินกว่าที่จะให้อนุภาคของสารสกัดผ่านได้หรือผ่านได้เล็กน้อย หากเปรียบเทียบในอัตรา 1:4 พบว่าสารสกัดที่ละลายในเอทธิลแอลกอฮอล์ 60% กับเอทธิลแอลกอฮอล์ 60% สปอร์งอก germ tube ยาว 169 และ 237.2 ไมโครเมตร ตามลำดับ ซึ่งหมายถึงว่าสารสกัดสามารถเคลื่อนที่ผ่านชิ้นวุ้นได้ ส่วนวิธีการจุ่มชิ้นวุ้นลงไปในสารละลายนั้น เป็นการให้สารสัมผัสกับสปอร์ได้โดยตรง ประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์จึงสูงกว่า และยังพบว่าสปอร์ยังไม่มีการงอกหรือเจริญเป็นโคโลนีแม้เวลาผ่านไป 7 วัน หากเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของตัวทำละลาย เอทธิลแอลกอฮอล์ 40% น่าจะเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมมากกว่าที่จะใช้เอทธิลแอลกอฮอล์ 60% เนื่องจากความเข้มข้นที่สูง เช่น เอทธิลแอลกอฮอล์ 70% นั้นใช้สำหรับการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์อยู่แล้ว สำหรับอัตราส่วนของสารละลายที่มีประสิทธิภาพนั้นควรใช้อัตราส่วน 1:4 ส่วนกลไกการทำงานของสาร xanthones นั้น จะทำให้เนื้อเยื่อของเชื้อราถูกทำลาย โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเชื้อราไม่ทำงานและสูญเสียสภาพ (Stern *et al*., 1996)

สรุป

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่ละลายในเอทธิลแอลกอฮอล์ 40% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ดีกว่า ส่วนวิธีการจุ่มชิ้นวุ้นที่มีสปอร์ในสารสกัดที่ละลายด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 40% และทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ อัตรา 1:4 ให้ผลยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ดีกว่าการจุ่มในสารสกัดที่ละลายด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 60% ที่ความเข้มข้นอัตราเดียวกัน และให้ผลยับยั้งมีประสิทธิภาพมากกว่าการให้สารสกัดที่ละลาย ซึมผ่านชิ้นวุ้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้ในบางส่วน

เอกสารอ้างอิง

Dias, A. C. P. 2003. The potention of *in vitro* cultures of *Hypericum perforatum* and of *Hypericum androsaemum* to produce interesting pharmaceutical compounds. *In*: E. Ernest (ed.). *Hypericum*. Taylor and Francis, London, New York. pp. 137-154.

Stern, J. L., A.E. Hangerman, P.D. Steinberg and P.K. Mason. 1996. Phorotannin-protein interactions. Journal of Chemistry and Ecology 22: 1887-1899.