การยับยั้งเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromea* สาเหตุโรคผลเน่าของมังคุดด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
Inhibition of *Lasiodiplodia theobromae*, A Causal Agent of Fruit Rot in Mangosteen by Hydrogen Peroxide

นฤมล ปิยะเสถียรรัตน์[1] ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์[1,2 *] วาริช ศรีละออง[1,2] อภิรดี อุทัยรัตนกิจ[1, 2] กัลยา ศรีพงษ์[1] และ ธนะชัย พันธ์เกษมสุข[3]
Piyasathianrat, N.[1], Jitareerat, P.[1,2], Srilaong, V.[1,2], Uthairatanakij, U.[1,2], Sripong, K[1] and Pankasemsuk, T.[3]

Abstract

Fruit rot caused by *Lasiodiplodia theobromae* is the major problem of harvested mangosteen fruit. This research aimed to study the effect of hydrogen peroxide (H_2O_2) on the mycelium growth and spore germination of this fungal pathogen. Fungal mycelium and spores were treated with H_2O_2 at 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 % for 5, 10 and 20 min. The results revealed that inhibitory effects of H_2O_2 increased according to its concentration and period time. Treatment with H_2O_2 at 0.5% for 5-20 min showed the completely inhibitory effects on mycelium and spore germination *in vitro*. The Preliminary test showed that H_2O_2 treatment did not affect the appearance of mangosteen fruit. Thus, H_2O_2 may have the potential to apply on mangosteen for controlling fruit rot disease in further study.

Keywords: fruit rot disease, mangosteen, *L. theobromea*, hydrogen peroxide

บทคัดย่อ

โรคผลเน่าจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* เป็นปัญหาสำคัญของมังคุดหลังการเก็บเกี่ยว งานนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ต่อการเจริญเส้นใยและการงอกสปอร์เชื้อรา โดยทำการจุ่มเส้นใยหรือสปอร์เชื้อราใน H_2O_2 เข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 % นาน 5, 10 และ 20 นาที พบว่า ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราของ H_2O_2 เพิ่มขึ้นตามความเข้นข้นและระยะเวลาในการจุ่ม และที่ความเข้นข้น 0.5 % นาน 5-20 นาที สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยและการงอกของสปอร์ได้สมบูรณ์ และจากการทดสอบเบื้องต้นพบว่า H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0.5 % ไม่มีผลเสียต่อลักษณะปรากฏของมังคุด ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ H_2O_2 เพื่อนำไปใช้การควบคุมโรคผลเน่าของมังคุดในการศึกษาต่อไป

คำสำคัญ: โรคผลเน่า มังคุด *Lasiodiplodia theobromae* ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

คำนำ

เชื้อสาเหตุโรคพืช เป็นสาเหตุหนึ่งที่มีผลโดยตรงต่อคุณภาพของมังคุด โดยเฉพาะเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคผลเน่า และเกิดการเปลี่ยนแปลงสารประกอบต่างๆ ในเปลือก ทำให้เกิดอาการผลแข็ง เนื่องจาก pericarp ถูกทำลาย และกลายเป็นปัญหาสำคัญของมังคุดภายหลังการเก็บเกี่ยว (Bunsiri และคณะ, 2003) การใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราทำให้ผู้บริโภคเกิดความกังวลถึงอันตรายจากสารเคมีที่ตกค้าง ดังนั้นการค้นหาวิธีที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อมจึงเป็นเรื่องสำคัญ ปัจจุบันมีการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เพื่อยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งในด้านการแพทย์และอุตสาหกรรมอาหาร (Linley และคณะ, 2013) โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และรา ได้ (ศศิลภัส และคณะ, 2557) H_2O_2 มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์และโมเลกุลโปรตีนภายในเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดความเสียหาย นอกจากนี้ H_2O_2 สามารถสลายตัวได้เป็นออกซิเจนกับน้ำได้อย่างรวดเร็ว จึงไม่เหลือสารเคมีตกค้างในอาหารและสิ่งแวดล้อม (Aguirre และคณะ, 2006) มีรายงานว่าไอของ H_2O_2 สามารถยับยั้งโรคผลเน่าขององุ่น และไม่มีผลต่อสีและปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Forney และคณะ, 1991) ซึ่งจากคุณสมบัติของ H_2O_2 ที่

[1] คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี 49 ซ.เทียนทะเล 25 ถ. บางขุนเทียน-ชายทะเล แขวงท่าข้าม กทม.10150
[1] School of Bioresource and Technology, King Mongkut's University of Technology Thoburi, 49 Thian Thale 25, Bangkhun-thien rd., Thakam, Bangkok, 10150 Thailand
[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม กรุงเทพมหานคร 10400
[2] Postharvest Technology Innovation Center, Ministry of Higher Education, Science, Research and Innovation, Bangkok 10400, Thailand
[3] คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 239 ถนนห้วยแก้ว ต.สุเทพ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200
[3] Faculty of Agriculture, Chiang Mai University 239, Huay Kaew Road, Muang District, Chiang Mai, 50200 Thailand
*corresponding author : pongphen.jit@kmutt.ac.th

กล่าวมา งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาผลของ H_2O_2 ต่อการเจริญเส้นใยและการงอกสปอร์เชื้อรา *L. theobromae* สาเหตุโรคผลเน่าของมังคุด

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดสอบผลของ H_2O_2 ต่อการเจริญเส้นใยเชื้อรา *L. theobromae* ที่แยกได้จากผลมังคุด ทำโดยใช้ cork borer (∅ 0.5 ซม.) ตัดเส้นใยเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) มาแช่ในสารละลาย H_2O_2 เข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 % นาน 5, 10 และ 20 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 100 ml บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นกรองเส้นใยด้วยกระดาษกรองและนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักเส้นใยและรายงานผลเป็น มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร การทดสอบผลของ H_2O_2 ต่อการงอกของสปอร์ ทำโดยเติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราที่ 10^2 ลงในสารละลาย H_2O_2 จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ H_2O_2 เท่ากับ 0 (ชุดควบคุม), 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 % บ่ม นาน 5, 10 และ 20 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการดูดสปอร์แขวนลอยมาเกลี่ยลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน จากนั้นนับจำนวนโคโลนีของเชื้อราบนหน้าอาหาร และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เปรียบเทียบกับสปอร์ในชุดควบคุม การทดสอบ H_2O_2 ต่อลักษณะปรากฏของมังคุด ทำโดยจุ่มมังคุดลงในสารละลาย H_2O_2 เข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) และ 0.5 % นาน 20 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นดูลักษณะปรากฏของมังคุดโดยเปรียบเทียบกับมังคุดชุดควบคุม วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design แต่ละทรีตเมนท์มี 4 ซ้ำ

ผลการทดลอง

1. ผลของ H_2O_2 ต่อการเจริญของเส้นใย *L. theobromae*

H_2O_2 มีผลทำให้การเจริญเส้นใยเชื้อราลดลง โดยพบว่าน้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อราที่แช่ใน H_2O_2 ลดลงตามความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ พบว่าการแช่เส้นใยใน H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0.5 % นาน 5-20 นาที มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย คือ สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยได้อย่างสมบูรณ์ (ยับยั้งได้ 100 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งระยะเวลาในการแช่เส้นใยที่แตกต่างกัน ไม่ส่งผลต่อการลดลงของปริมาณเส้นใยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

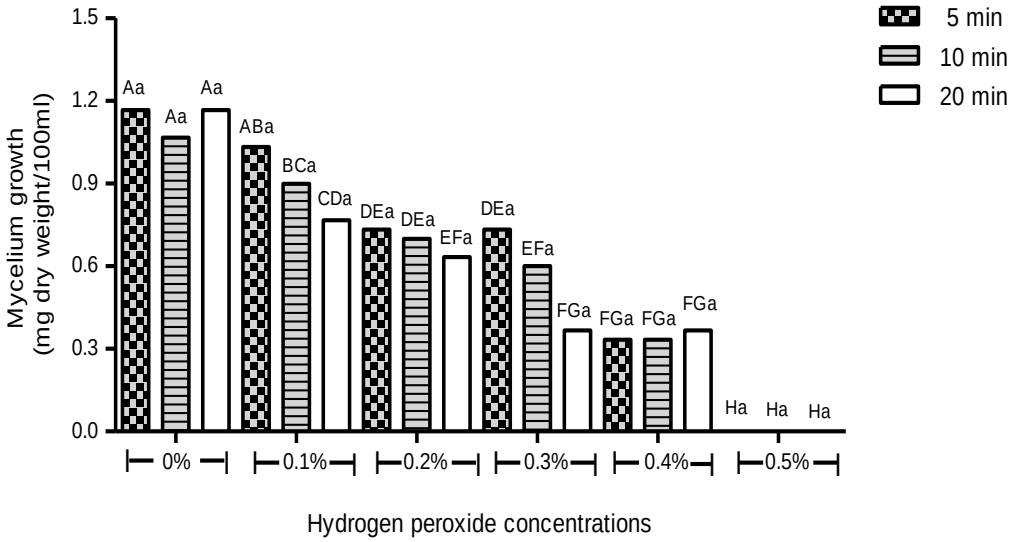

Figure 1 Dry weight of *Lasiodiplodia theobromae* mycelium treated with H_2O_2 at 0 (control), 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5% for 5, 10, and 20 min, then cultured in PDB, and incubated at 30 °C under shaker at 100 rpm for 7 days. Capital letters correspond to comparison between the treatments and small letters correspond to comparison between the treated times .

2. ผลของ H_2O_2 ต่อการงอกของสปอร์ *L. theobromae*

เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อรา พิจารณาจากจำนวนโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนหน้าอาหาร PDA โดยเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของสปอร์ที่ได้รับ H_2O_2 กับจำนวนโคโลนีของเชื้อราที่ไม่ได้รับ H_2O_2 โดยกำหนดให้จำนวนโคโลนีของสปอร์เชื้อราที่ไม่ได้รับ H_2O_2 (ชุดควบคุม) เท่ากับ 100 % พบว่า สปอร์ของเชื้อราที่ได้รับ H_2O_2 เข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, และ 0.4 % มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงตามความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 2) และที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบการงอกของสปอร์ (0 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้ พบว่า ระยะเวลาที่เชื้อราได้รับ H_2O_2 มีผลต่อการงอกของสปอร์ คือ เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงตามระยะเวลาที่สปอร์สัมผัสกับ H_2O_2 นานมากขึ้น ยกเว้น การใช้ H_2O_2 ที่ความเข้มต่ำ (0.1%) และที่ความเข้มข้นสูง (0.4% – 0.5%) พบว่าระยะเวลาที่สปอร์สัมผัสกับ H_2O_2 ไม่ผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์

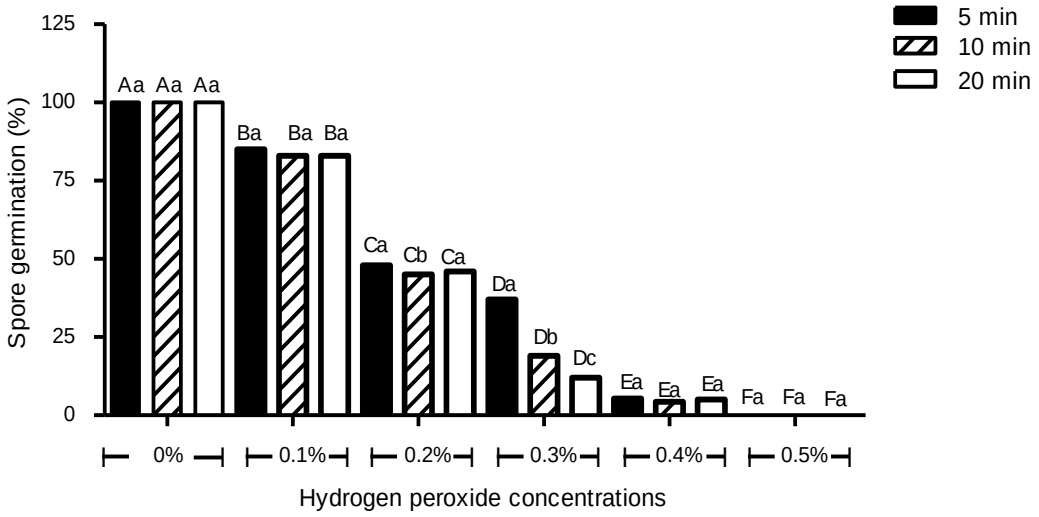

Figure 2 Percentage of spore germination of *Lasiodiplodia theobromae* when it was treated with H_2O_2 at 0 (control), 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5% for 5, 10, and 20 min, then cultured in PDA and incubated at room temperature for 4 days. Capital letters correspond to comparison between the treatments and small letters correspond to comparison between the treated time period.

3. ผลของ H_2O_2 ต่อลักษณะปรากฏของมังคุด

จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่า H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0.5 % ไม่มีผลเสียต่อลักษณะปรากฏของมังคุดเมื่อเปรียบเทียบกับมังคุดชุดควบคุม (ไม่ได้รับ H_2O_2) ทั้งในด้าน สีเปลือก สีกลีบเลี้ยง และสีเนื้อ เมื่อเก็บรักษานาน 7 วัน (Figure 3)

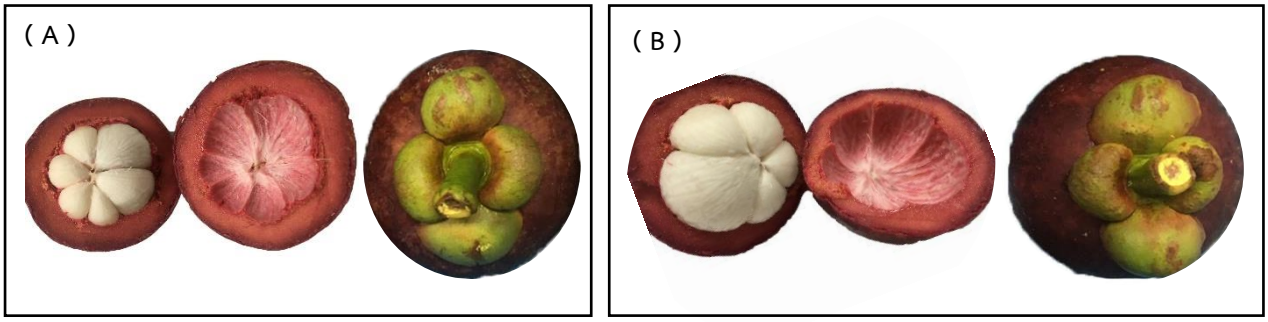

Figure 3 Appearance of mangosteen dipped in H_2O_2 solution at 0 (control) (A) and 0.5% (B) for 20 min and then stored at 13 °C for 7 days.

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองเมื่อจุ่มเส้นใยหรือสปอร์เชื้อราใน H_2O_2 เข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 % นาน 5, 10 และ 20 นาที พบว่า ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราของ H_2O_2 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นและระยะเวลา ซึ่งที่ความเข้มข้น 0.5% นาน 5-20 นาที ให้ผลดีที่สุด เนื่องจากไม่พบการเจริญของเส้นใยและสปอร์เชื้อรา สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sapers และ Simmons (1998) พบว่า การล้างเห็ดด้วย 0.5% H_2O_2 ทำให้จุลินทรีย์ลดลงประมาณ 2 เท่า และมีการเน่าเสียลดลง นอกจากนี้งานวิจัยของ Fallik และคณะ (1994) พบว่าการใช้ 0.5% Sanosil-25 (มีส่วนประกอบของ H_2O_2 เป็นหลัก) สามารถยับยั้งเชื้อรา *Botrytis cinerea* และ *Alternaria alternata* ที่เป็นสาเหตุโรคพืชของมะเขือยาวและพริกแดงหวานในระหว่างการเก็บรักษาได้ ทั้งนี้เนื่องจาก H_2O_2 สามารถแตกตัวได้ ไฮดรอกซิล เรดิคอล (Hydroxyl radical, -OH) ได้โดยไม่ต้องอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) ซึ่ง -OH จัดเป็นสารในกลุ่ม reactive oxygen species (ROS) (อาณัติ, 2562) โดย ROS มีผลทำให้ผนังเซลล์เสียหาย เกิดการรั่วไหลของส่วนประกอบภายในเซลล์ อีกทั้งสามารถออกซิไดซ์โปรตีน เอนไซม์ และกรดนิวคลีอิก มีผลทำให้เซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ตาย (Aguirre และคณะ, 2006) และจากการทดสอบเบื้องต้นพบว่า H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0.5 % นาน 20 นาที ไม่ส่งผลเสียต่อลักษณะปรากฏของมังคุด (สีเปลือก สีกลีบเลี้ยง และสีเนื้อ) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ H_2O_2 เพื่อการควบคุมโรคผลเน่าของมังคุดในการศึกษาต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว และ UGSAS, Gifu University, Japan ที่อนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

อาณัติ ดีพัฒนา, 2562, การพัฒนานวัตกรรมโถปัสสาวะชายปลอดเชื้อโรค ปราศจากกลิ่น ไม่ทำให้เกิดการกระจายคราบปัสสาวะและเกิดภาระในบ่อบำบัดน้ำเสียสำหรับโรงงานอาหาร สถานพยาบาลและสถานพักฟื้นผู้สูงอายุ, รายงานโครงการวิจัยประจาปี 2562, คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา, หน้า 74.

ศศิลภัส เพชรชู เฉลิมชัย ชัยกิตติภรณ์ วิชัย พฤกษ์ธาราธิกุล พิพัฒน์ ลักษมีจรัลกุล วชิระ สิงหะคเชนทร์ และ ธีระ กลลดาเกรียงไกรคเชนทร์, 2557, การศึกษาประสิทธิผลไอไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หลังจากการอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศของห้องผ่าตัด, การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 12, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, หน้า 1399-1470.

Aguirre, J., Hansberg, W. and Navarro, R., 2006, Fungal Responses to Reactive Oxygen Species, Medical Mycology, 44(1): 101–107.

Bunsiri, A., Ketsa, S. and Paull, R.E., 2003, Phenolic Metabolism and Lignin Synthesis in Damaged Pericarp of Mangosteen Fruit After Impact, Postharvest Biology and Technology, 29(1): 61-71.

Fallik, E., Aharoni, Y., Grinberg, S., Copel, A. and Klein, J.D., 1994, Postharvest Hydrogen Peroxide Treatment Inhibits Decay in Eggplant and Sweet Red Pepper, Crop Protection, 13(6): 451–454.

Forney, C.F., Rij, R.E., Denis, R. and Smilaniek, J.L., 1991, Vapor Phase Hydrogen Peroxide Inhibits Postharvest Decay of Table Grapes, HortScience 26: 1512-1514.

Linley, E., Denyer, S.P., McDonnell, G., Simons, C. and Maillard, J.Y., 2012, Use of Hydrogen Peroxide as a Biocide: New Consideration of Its Mechanisms of Biocidal Action, Antimicrobe Chemother, 67: 1589–1596.

Sapers, G.M. and Simmons, G.F., 1998, Hydrogen Peroxide Disinfection of Minimally Processed Fruits and Vegetables, Food Science and Technology, 52(2): 48–52.