Agricultural Sci. J. 43: 3 (Suppl.): 612-615 (2012) ว. วิทย. กษ. 43: 3 (พิเศษ): 612-615 (2555)

การศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria brassicicola* และ *Fusarium oxysporum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ

A Study of Inhibitory Efficacy of Chitosan on *Alternaria brassicicola* and *Fusarium oxysporum* on PDA

นวลจันทร์ ภูคลัง[1] เทอดธวัช โสภณดิลก[1] ชนิตรา โพธิคเวษฐ์[1] และ ทรงศิลป์ พจน์ชนะชัย[1]

Nualjun Phuklung[1], Thurdtawat Sopondilok[1], Chanitra Pothikhawet[1] and Songsin Photchanachai[1]

Abstract

A preliminary study was carried out on the effect chitosan on growth inhibition of two fungal plant pathogens *Alternaria brassicicola* and *Fusarium oxysporum*. The two tested fungi were cultured on PDA (potato dextrose agar) (control 1), on PDA mixed with 0.5% (v/v) acetic acid (control 2) and PDA mixed with 0.2, 0.4, 0.6, and 0.8% (w/v) chitosan at pH 5.6. The results showed that PDA mixed with 0.2% chitosan significantly delayed the mycelial growth of both *A. brassicicola* and *F. oxysporum* compared to the two control treatments. The fungal growth was completely inhibited when chitosan concentration was increased to 0.4% or higher. Besides, it was found that PDA mixed with 0.2% chitosan significantly delayed spore germination. Besides, the test on efficacy of chitosan on spore germination was increased along with increasing chitosan concentrations.

Keywords: plant disease pathogens, chitosan, fungal growth

บทคัดย่อ

การศึกษาเบื้องต้นถึงประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 2 ชนิด คือ *Alternaria brassicicola* และ *Fusarium oxysporum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar) (ชุดควบคุม 1) และอาหาร PDA ผสมกรดแอซิติกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุม 2) และอาหาร PDA ที่มีไคโตซานความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 เปอร์เซ็นต์ (pH 5.6) จากผลการทดลองพบว่า ไคโตซานความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถชะลอการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อราได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมทั้ง 2 ชุด และยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์เมื่อใช้ไคโตซานความเข้มข้นตั้งแต่ 0.4 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป นอกจากนี้ยังพบว่าอาหาร PDA ผสมไคโตซานเข้มข้นตั้งแต่ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ชะลอการงอกของสปอร์เชื้อราทั้ง 2 ชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญ และมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไคโตซาน

คำสำคัญ: เชื้อราสาเหตุโรคพืช ไคโตซาน การเจริญเติบโตของเชื้อรา

คำนำ

ปัจจุบันประเทศไทยผลิตและใช้เมล็ดพันธุ์ เพื่อการเพาะปลูกในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก แต่การผลิตเมล็ดพันธุ์มักประสบกับปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด ซึ่งโรคเมล็ดพันธุ์ส่วนมากมักเกิดจากเชื้อราและเชื้อราเหล่านี้สามารถปนเปื้อนอยู่ในดินและวัสดุปลูก ทำให้เกิดความเสียหายให้กับพืชหลายชนิด เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกับพืชสามารถป้องกันได้ด้วยสารเคมี ซึ่งเป็นวิธีการที่ให้ผลดี และมีประสิทธิภาพสูง แต่การควบคุมโรคด้วยสารเคมีอาจก่อเกิดความเป็นพิษต่อคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม การประยุกต์ใช้สารที่มีความปลอดภัยทดแทนการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายจึงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ไคโตซานเป็นสารชนิดหนึ่งที่มีความปลอดภัย และมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ เช่น *Colletotrichum* sp. (Muñoz *et al.*, 2009 และ Photchanachai *et al.*, 2005), *Rhizopus stolonifer*, *C. gloeosporioides*, *Alternaria alternate* f. sp. *lycopersici* และ *Aspergillus niger* (Bautista-Banos *et al.*, 2003) เป็นต้น แต่พบว่า เชื้อราสาเหตุโรคพืชดังกล่าวข้างต้นตอบสนองต่อความเข้มข้น และวิธีการใช้ไคโตซานต่างกัน *Alternaria brassicicola* เป็นเชื้อราที่สามารถอาศัยอยู่บนเมล็ดพืช (seedborne pathogen) ก่อให้เกิดความเสียหายกับผลิตผลและเมล็ดพันธุ์ เป็นสาเหตุของโรคที่สำคัญของผักในวงศ์กะหล่ำ เช่น ทำให้เกิดโรคใบจุดในผักกาดเขียวปลี ส่วนเชื้อรา *Fusarium oxysporum* เป็นเชื้อโรคอาศัยอยู่ในดิน (soilborne pathogens) ที่สามารถอยู่ข้ามฤดู และมักพบปนเปื้อนในวัสดุปลูกทำให้เกิดโรคน่าคอดิน และโรคเหี่ยวของพืชหลายชนิดรวมทั้งผักกาดเขียวปลี สำหรับการนำไคโตซานมาใช้ในการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 2 ชนิด นี้ยังไม่มีรายงาน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ไคโตซาน เพื่อใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้งสอง ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะนำไปเป็นแนวทางในการควบคุมโรคในผักกาดเขียวปลีที่เกิดจากเชื้อราชนิดดังกล่าวนี้

---

[1] หลักสูตรเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ

[1] Programme of Postharvest Technology, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10140

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

นำเชื้อรา *A. brassicicola* และ *F. oxysporum* ซึ่งซื้อมาจากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato dextrose agar) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป การเตรียมสารละลายไคโตซาน ทำโดยละลายผงไคโตซาน (สินวัฒนาไคโตซานการเกษตร) ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเตรียมเป็น stock solution หลังจากนั้นจึงนำมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ 1. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ชุดควบคุมที่ 1), 2. PDA ที่มีส่วนผสมของกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุมที่ 2), 3., 4., 5. และ 6. คือ อาหาร PDA ที่มีส่วนผสมของไคโตซานที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากนั้นจึงตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราแต่ละชนิดมาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±2°C) เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใย (ซม.) ส่วนการงอกของสปอร์ทำการทดลองโดยนำสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ที่เจือจาง (dilution series) มาทำให้กระจาย (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกันกับการเลี้ยงเส้นใย จากนั้นตรวจนับจำนวนสปอร์ที่งอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ผลและวิจารณ์

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไคโตซานความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *A. brassicicola* และ *F. oxysporum* ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมทั้ง 2 ชุด และยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยได้อย่างสมบูรณ์ในเวลา 16 และ 15 วัน ตามลำดับ เมื่อใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.4 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป (Figure 1) ส่วนกรดอะซิติกไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราทั้ง 2 ชนิด เมื่อเทียบผลกับจินตนา และคณะ (2549) ซึ่งรายงานว่า ไคโตซานสามารถชะลอการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นในระยะเวลาที่แตกต่างกัน แต่กรดอะซิติกมีผลส่งเสริมต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Pythium aphanidermatum, Macrophomena phaseolina* และ *Sclerotium rolfsii* ส่วนผลที่ได้ตรงกัน คือ ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานที่สูงมากขึ้น (0.4 เปอร์เซ็นต์) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยได้อย่างสมบูรณ์สอดคล้องกับ Meng *et al.* (2010) ซึ่งรายงานว่าไคโตซานที่ความเข้มข้น 5 โมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria kikuchiana* และ *Physalospora piricola* Nose ได้อย่างสมบูรณ์

ส่วนผลของไคโตซานต่อการงอกของสปอร์ พบว่า PDA ผสมไคโตซานเข้มข้นตั้งแต่ 0.2 เปอร์เซ็นต์สามารถชะลอการงอกของสปอร์เชื้อราทั้ง 2 ชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนกรดอะซิติกไม่มีผลทั้งส่งเสริม และ/หรือชะลอการงอกของสปอร์ นอกจากนี้ เมื่อใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นประสิทธิภาพในการชะลอการงอกของสปอร์เชื้อราเพิ่มสูงขึ้นด้วย (Figure 2) ผลที่ได้เป็นไปในทางเดียวกันกับ El Ghaouth *et al.* (1992) ซึ่งรายงานว่าการใช้สารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป มีประสิทธิภาพในการชะลอการงอกของสปอร์เชื้อรา *Botrytis cinerea* และ *Rhizopus stolonifer* ได้ ทั้งนี้ประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกของสปอร์ และการเจริญของเชื้อราที่แตกต่างกันนั้น เนื่องจากเชื้อราแต่ละชนิดมีกลไกในการต่อต้านสารละลายไคโตซานได้ไม่เท่ากัน และการที่ไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใย และชะลอการงอกของสปอร์ของเชื้อราได้นั้น เนื่องจากไคโตซานมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยตรง เพราะประจุบวกบน polymer ของไคโตซานสามารถทำปฏิกิริยากับประจุลบที่ผนังเซลล์ของเชื้อรา ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารประกอบจำพวกโปรตีน (proteinaceous) และส่วนประกอบอื่นๆ ภายในเซลล์ (Rabea *et al.*, 2003) อีกทั้งมีรายงานว่าไคโตซานมีหมู่ไฮดรอกซิลซึ่งมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยา โดยเฉพาะการทำปฏิกิริยาบริเวณ active site ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อรา จึงมีผลให้เซลล์เมมเบรนเสียสภาพ และทำให้ลักษณะสัณฐานของทั้งเส้นใย และสปอร์เชื้อราเปลี่ยนแปลงหรือผิดปกติไป อีกทั้งเป็นสาเหตุทำให้เซลล์เมมเบรนสูญเสียความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของสารเข้าออกเซลล์อีกด้วย (Bautista-Banos *et al.*, 2003) นอกจากนี้ มีรายงานว่าไคโตซานเป็นสารพวก chelating agent ที่สามารถเกาะติดกับโลหะในเซลล์ของเชื้อรา ซึ่งนำไปสู่การขัดขวางการเจริญเติบโตของเชื้อรา จึงทำให้ไคโตซานมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการงอกของสปอร์ของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ (อ้างใน สุวลี, 2544)

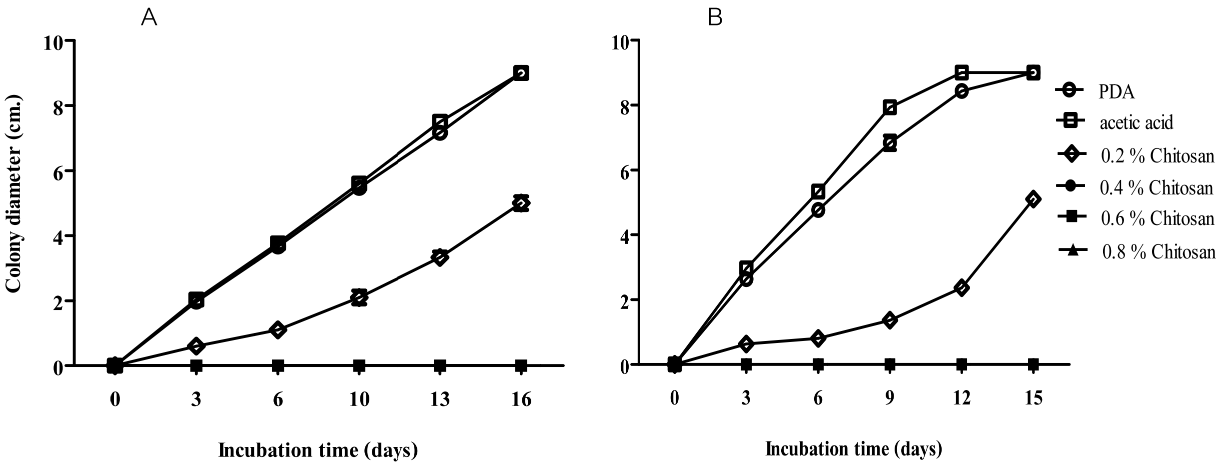

Figure 1 Colony growth of *A. brassicicola* (A) and *F. oxysporum* (B) on PDA, PDA with 0.5% acetic acid and PDA with 0.2-0.8% chitosan

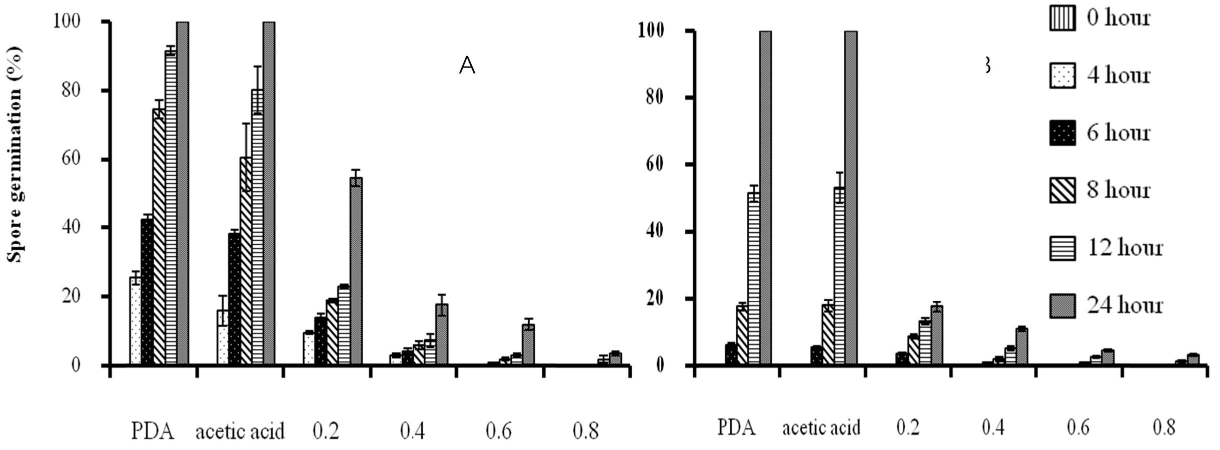

Figure 2 Spore germination of *A. brassicicola* (A) and *F. oxysporum* (B) on PDA, PDA with 0.5% acetic acid and PDA with 0.2-0.8% chitosan

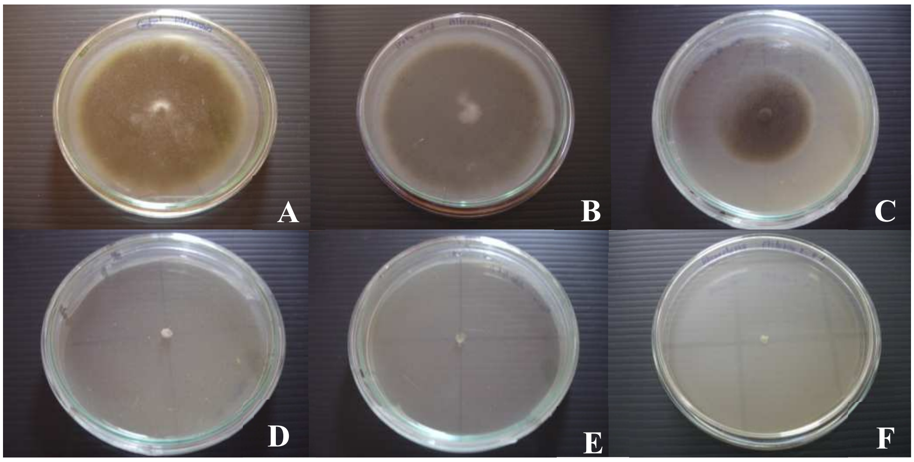

Figure 3 Mycelial growth of *A. brassicicola* on PDA for 16 (A = PDA, B = PDA with 0.5% acetic acid and C-F = PDA with 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8 % chitosan)

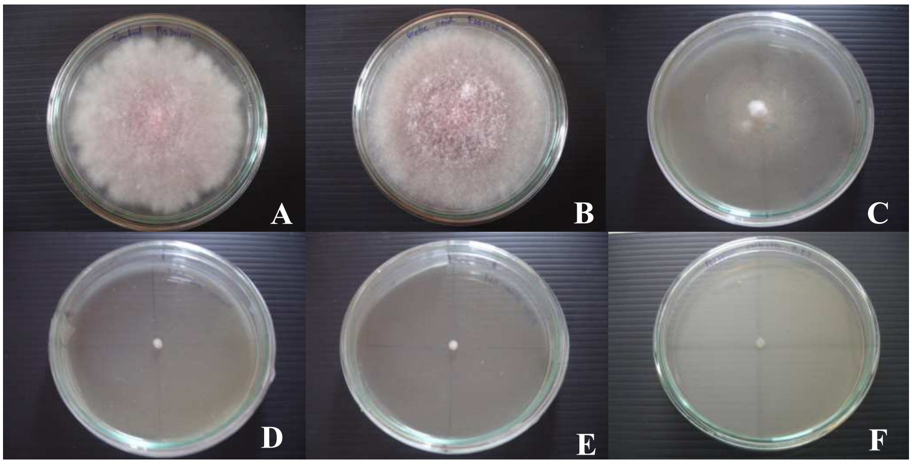

Figure 4 Mycelial growth of *F. oxysporum* on PDA for 15 days (A = PDA, B = PDA with 0.5% acetic acid and C-F = PDA with 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8% chitosan)

สรุป

ไคโตซานความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2 เปอร์เซ็นต์สามารถชะลอการเจริญเติบของเส้นใย และการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. brassicicola* และ *F. oxysporum* และยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยได้อย่างสมบูรณ์นาน 7 วัน และชะลอการงอกของสปอร์ได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น

เอกสารอ้างอิง

จินตนา ทำทอง ทักษอร บุญชู และ ทรงศิลป์ พจน์ชนะชัย 2549. ผลของไคโตซานต่อการงอกของสปอร์และการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 37(2): 116-118.

สุวลี จันทร์กระจ่าง. 2544. การประยุกต์ใช้ไคติน-ไคโตซาน. ใน เอกสารประกอบการบรรยายการประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้. จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย. หน้า 52-58.

Bautista-Banos, S., M. Hernandez-Lopez, E. Bosquez-Molina and C.L. Wilson. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. Crop protection 22(9): 1087–1092.

El Ghaouth, A., J. Arul, J. Grenier and A. Asselin. 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. Phytopathology 82: 398-402.

Meng, X., L. Yang, J.F. Kennedy and S. Tian. 2010. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. Carbohydrate Polymers 81: 70–75.

Muñoz, Z., A. Moret and S. Garcés. 2009. Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum* sp. on tomatoes and grapes. Crop Protection 28(1): 36-40.

Photchanachai, S., J. Singkaew and J. Thamthong. 2005. Effect of chitosan seed treatment on *Colletotrichum* sp. and seedling growth of chili cv. 'JINDA'. Acta Horticulturae 712: 585-590.

Rabea, E.I., M.E. Badawy, C.V. Stevens, G. Smagghe and W. Steurbaut. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromolecules 4: 1457-1465.